

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΠΜΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΑΝΑΦΟΡΑ ΠΡΟΟΔΟΥ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΤΙΤΛΟΥ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**Δροσάτος Κωνσταντίνος
Μεταπτυχιακός Φοιτητής**

Επίβλεψη
Ζαννής Βασίλειος
Καθηγητής Βιοχημείας
Τμήμα Ιατρικής

2^{ος} εξεταστής
Καρδάσης Δημήτριος
Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας
Τμήμα Ιατρικής

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	2
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
<i>Λιποπρωτεΐνες</i>	4
1. Γενικά.....	4
2. Μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών.....	5
3. Απολιποπρωτεΐνες.....	7
4. Ένζυμα του πλάσματος που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών και μικροσωμική πρωτεΐνη μεταφοράς τριγλυκεριδίων.....	8
5. Υποδοχείς και μεταφορείς λιπιδίων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών...	9
<i>Απολιποπρωτεΐνες</i>	10
1. Απολιποπρωτεΐνη A-I (αποA-I).....	10
2. Απολιποπρωτεΐνη C-III (αποC-III).....	14
<i>Μεταγραφική ρύθμιση- Κυτταρική σηματοδότηση</i>	15
<i>Αδενοϊοί</i>	17
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	20
<i>Υλικά</i>	20
<i>Διαλύματα</i>	20
<i>Μέθοδοι</i>	21
Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων E. coli DH5α.....	21
Απομόνωση DNA από βακτηριακή καλλιέργεια μικρής κλίμακας (mini-prep).....	22
Σχεδιασμός εκκινητών αντιγραφής (primers) για ανίχνευση τμημάτων του cDNA ανθρώπινων γονιδίων απολιποπρωτεϊνών.....	23
Κυτταρικές καλλιέργειες και παροδικές επιμολύνσεις.....	26
Απομόνωση RNA από κυτταροκαλλιέργειες.....	26
Αντίστροφη μεταγραφή.....	27
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	27
Κατασκευή ανασυνδυασμένων αδενοϊών για γονιδιακή μεταφορά σε κυτταροκαλλιέργειες.....	28
Παραγωγή κατάλληλων για κυτταρική επιμόλυνση αδενοϊών.....	33
Πολλαπλασιασμός του παραχθέντος αδενοϊού.....	34
Καθαρισμός απομονωμένου αδενοϊού μετά τον πολλαπλασιασμό του.....	35
Τιτλοδότηση καθαρισμένου αδενοϊού.....	36
Μόλυνση κυτταρικής σειράς με ανασυνδυασμένους αδενοϊούς.....	37
Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (μέθοδος Western Blotting).....	37
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	39
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	44
ΑΝΑΦΟΡΕΣ	49

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε κατά το χρονικό διάστημα Οκτωβρίου 2001-Αυγούστου 2002 στα πλαίσια της πραγματοποίησης του Μεταπτυχιακού Τίτλου Ειδίκευσης της Μοριακής Βιολογίας-Βιοϊατρικής των Τμημάτων Βιολογίας και Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης. Η εργαστηριακή εργασία και η συγγραφή της παρούσας διατριβής ολοκληρώθηκε υπό τη συνεπίβλεψη του Καθηγητή Βιοχημείας κ. Ζαννή Βασίλειου και του Επίκουρου Καθηγητή Βιοχημείας κ. Καρδάση Δημήτριου. Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε, κατά το μεγαλύτερο μέρος, στο εργαστήριο Βιοχημείας του Τομέα Βασικών Επιστημών του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης και ολοκληρώθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας του Whitaker Cardiovascular Institute του Ιατρικού Κέντρου του Πανεπιστημίου της Βοστώνης (Boston University Medical Center).

Ολοκληρώνοντας αυτή τη μελέτη νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω τον Επικ. Καθηγητή Δημήτρη Καρδάση για την ουσιαστική και πολύτιμη βοήθειά του στο σημαντικό διάστημα εργασίας μου στο εργαστήριο Βιοχημείας της ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης. Τον ευχαριστώ για την υπομονή του και τη διάθεσή του να με ακούσει και να με κατευθύνει οποιαδήποτε στιγμή απευθύνθηκα σε αυτόν.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω να πω στον επιβλέποντά μου Καθ. Βασίλειο Ζαννή αφενός για την αποδοχή μου στο εργαστήριό του και αφετέρου για την ουσιαστική και ολοκληρωμένη επίβλεψη και καθοδήγησή μου σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας μελέτης. Επίσης, τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για τη βοήθειά του και τη συμπαράστασή του κατά τη μετάβασή μου και την παραμονή μου στη Βοστώνη και ιδιαίτερα για τη στήριξή του σε θέματα επιστημονικής και μη φύσης.

Ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου τον υποψήφιο Διδάκτορα Γιώργο Κούκο, ο οποίος στάθηκε για μένα πολύτιμος βοηθός και συμπαραστάτης κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας μελέτης αλλά και κατά την εγκατάστασή μου στη Βοστώνη. Ένα μεγάλο, επίσης, ευχαριστώ θέλω να πω στους υποψήφιους Διδάκτορες του Πανεπιστημίου της Βοστώνης Ιορδάνη Καραγιαννίδη και Κυριακή Μπακιρτζή για τη βοήθειά τους στην εκμάθηση της τεχνολογίας των αδενοϊών αλλά και για τη βοήθειά τους στην προσαρμογή μου στη ζωή της Βοστώνης.

Θα ήταν τεράστια παράλειψη να μην απευθύνω ειλικρινείς ευχαριστίες σε όλους τους συνεργάτες μου τόσο στο εργαστήριο της Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης όσο και στο εργαστήριο του Boston University Medical Center. Ευχαριστώ θερμά τους επιστημονικούς συνεργάτες του εργαστηρίου της Βοστώνης Κυριάκο Κυπρέο και Hong-Yuan Kan, τις μετα-διδασκαλικές ερευνήτριες του εργαστηρίου

της Βοστώνης Αγγέλικα Χρόνη και Tong Liu, τους υποψήφιους Διδάκτορες του εργαστηρίου της Κρήτης Βίκυ Προκόβα και Γιώργο Κουτσοδόνη, την τεχνική διευθύντρια του εργαστηρίου της Βοστώνης Gayle Forbes, την τεχνικό του εργαστηρίου της Κρήτης Βέτα Παπακώστα, τις τεχνικούς του εργαστηρίου της Βοστώνης Andella Shkodrani και Heidi Wilson και τη διπλωματική φοιτήτρια του εργαστηρίου της Κρήτης Βαρβάρα Νικολαΐδου. Όλοι υπήρξαν για μένα πολύτιμοι συνεργάτες, συμπαραστάτες και φίλοι που συνέβαλαν τα μέγιστα στη δημιουργία του ιδανικού περιβάλλοντος εργασίας αλλά και ενός πολύ ευχάριστου κλίματος παρέας.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τους υπεύθυνους αλλά και τους εργαζόμενους όλων των εργαστηρίων της Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης και του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας στα οποία χρειάστηκε να απευθυνθώ είτε για τη χρήση πειραματικών συσκευών είτε για την παροχή τεχνικών και επιστημονικών συμβουλών.

Κλείνοντας θέλω να πω ένα τεράστιο ευχαριστώ, το οποίο μάλιστα ίσως δεν είναι αρκετό, στους γονείς μου Γιώργο και Σοφία και την αδερφή μου Αναστασία. Σε όλο το διάστημα της ζωής μου ως τώρα με έμαθαν ότι αξίζει να αγωνίζομαι για αυτό που επιθυμώ να πετύχω ανεξάρτητα από το κόστος. Με στήριξαν ηθικά και οικονομικά στην προσπάθειά μου για την υλοποίηση των ονείρων μου. Τους ευχαριστώ γιατί με βοήθησαν να δω ότι πολλά από αυτά τα όνειρά που φαντάζουν μακρινά είναι δυνατόν να επιτευχθούν όταν έχεις κοντά σου ανθρώπους που σε στηρίζουν και σε αγαπάνε. Οι γονείς μου αποτελούν πραγματικά πρότυπα για μένα και η αδερφή μου ένα ισχυρό στήριγμα και σημείο αναφοράς στη ζωή μου. Ως ελάχιστο δείγμα ευγνωμοσύνης και αγάπης τους αφιερώνω αυτή τη διατριβή.

Κωνσταντίνος Γ. Δροσάτος

Βοστώνη, 16/9/2002

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Λιποπρωτεΐνες

1. Γενικά

Οι λιποπρωτεΐνες αποτελούν μακρομοριακά συμπλέγματα λιπιδίων και πρωτεϊνών. Οι κύριοι ιστοί σύνθεσής τους είναι το ήπαρ και το έντερο. Μετά τη σύνθεσή τους ακολουθεί η έκκρισή τους στο πλάσμα. Η βασική τους λειτουργία έγκειται στη μεταφορά και την αναδιανομή των λιπιδίων στον οργανισμό, τα οποία είναι απαραίτητα για τις ανάγκες του οργανισμού σε μεταβολική ενέργεια αλλά και για τη σύσταση των μεμβρανών, των στεροειδών ορμονών και των χολικών οξέων.

Οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος είναι σφαιρικά σωματίδια τα οποία περιέχουν στο εσωτερικό τους μη πολικά ουδέτερα λιπίδια (εστέρες χοληστερόλης και τριγλυκερίδια) και πολικά συστατικά, τα οποία εδράζονται στην επιφάνειά τους και είναι φωσφολιπίδια, ένα μέρος της ελεύθερης χοληστερόλης, οι απολιποπρωτεΐνες και πρωτεΐνες (1, 2, 3, 4).

Οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος ταξινομούνται σε πέντε κύριες κατηγορίες οι οποίες είναι οι ακόλουθες:

- 1) Χυλομικρά.
- 2) Λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL).
- 3) Λιποπρωτεΐνες ενδιάμεσης πυκνότητας (IDL).
- 4) Λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL).
- 5) Λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (HDL).

Η περιεκτικότητα σε λιπίδια και ελαττώνεται και η περιεκτικότητα σε απολιποπρωτεΐνες αυξάνεται μεταβαίνοντας από τα χυλομικρά στην HDL. Κάθε κατηγορία λιποπρωτεϊνών υποδιαιρείται σε επιμέρους υποκατηγορίες, ανάλογα με το μέγεθος, την πυκνότητα και τη σύστασή της (6, 7).

Οι πρωτεΐνες των λιποπρωτεϊνών ονομάζονται απολιποπρωτεΐνες. Οι απολιποπρωτεΐνες συντελούν στην αύξηση της διαλυτότητας των λιπιδίων και έχουν ονομαστεί: αποΑ-I, αποΑ-II, αποΑ-IV, αποΒ, αποC-I, αποC-II, αποC-III, αποD και αποE (5, 20).

2. Μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών

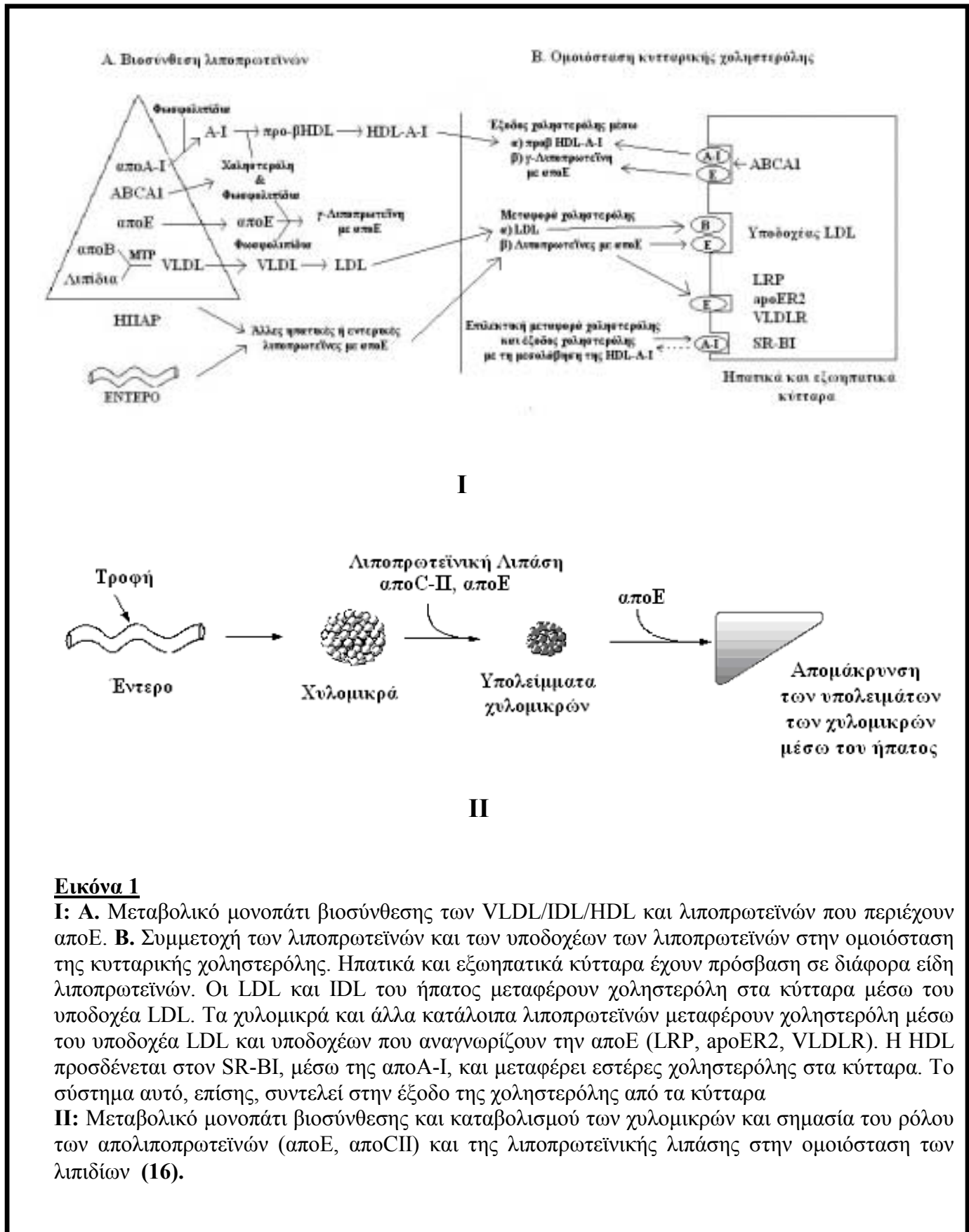
Ο μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών αποτελεί μία πολύπλοκη βιολογική διεργασία η οποία περιλαμβάνει (εικόνα 1):

- 1) Σύνθεση και σε μερικές περιπτώσεις ενδοκύτταρική τροποποίηση των απολιποπρωτεϊνών.
- 2) Ενδοκυττάρια συναρμολόγηση και έκκριση των VLDL/LDL.
- 3) Έκκριση των μικρού μοριακού βάρους απολιποπρωτεϊνών και εξωκυττάρια συναρμολόγησή τους σε λιποπρωτεΐνες.
- 4) Εξωκυττάρια τροποποίηση απολιποπρωτεϊνών και λιποπρωτεϊνών.
- 5) Υδρόλυση τριγλυκεριδίων και φωσφολιπιδίων από τη Λιποπρωτεϊνική Λιπάση (LPL) και την Ηπατική Λιπάση (HL).
- 6) Αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης από τα κύτταρα στις λιποπρωτεΐνες.
- 7) Εστεροποίηση της χοληστερόλης, της HDL και LDL με τη δράση του ενζύμου Ακυλοτρανσφεράση Λεκιθίνης-Χοληστερόλης (LCAT).
- 8) Ενζυμικά καταλυόμενη ανταλλαγή και/ή μεταφορά εστέρων χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων και φωσφολιπιδίων.
- 9) Ανταλλαγή και/ή μεταφορά των απολιποπρωτεϊνών.
- 10) Καταβολισμός των λιποπρωτεϊνών με τη μεσολάβηση ειδικών υποδοχέων.

Οι διαδικασίες σύνθεσης και καταβολισμού των λιποπρωτεϊνών γίνονται σε τρία βασικά μονοπάτια, τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Τα μονοπάτια αυτά είναι (εικόνα 1):

1. Το μονοπάτι μεταβολισμού των χυλομικρών.
2. Το μονοπάτι μεταβολισμού της ομάδας των λιποπρωτεϊνών VLDL/IDL/LDL.
3. Το μονοπάτι μεταβολισμού της HDL.

Στα μονοπάτια αυτά συμμετέχουν διάφορες πρωτεΐνες όπως είναι οι απολιποπρωτεΐνες, τα ένζυμα του πλάσματος, πρωτεΐνες μεταφοράς λιπιδίων και λιποπρωτεϊνικοί υποδοχείς. Η τροποποίηση της δράσης οποιασδήποτε από τις πρωτεΐνες ενός μονοπατιού ή μεταβολή στην έκφρασή τους αναμένεται να επηρεάσει τα επίπεδα των λιπιδίων του πλάσματος και να προκαλέσει αθηρωμάτωση.



Εικόνα 1

I: Α. Μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης των VLDL/IDL/HDL και λιποπρωτεϊνών που περιέχουν apoE. Β. Συμμετοχή των λιποπρωτεϊνών και των υποδοχέων των λιποπρωτεϊνών στην ομοίωση της κυτταρικής χοληστερόλης. Ηπατικά και εξωηπατικά κύτταρα έχουν πρόσβαση σε διάφορα είδη λιποπρωτεϊνών. Οι LDL και IDL του ήπατος μεταφέρουν χοληστερόλη στα κύτταρα μέσω του υποδοχέα LDL. Τα χυλομικρά και άλλα κατάλοιπα λιποπρωτεϊνών μεταφέρουν χοληστερόλη μέσω του υποδοχέα LDL και υποδοχέων που αναγνωρίζουν την apoE (LRP, apoER2, VLDLR). Η HDL προσδένεται στον SR-BI, μέσω της apoA-I, και μεταφέρει εστέρες χοληστερόλης στα κύτταρα. Το σύστημα αυτό, επίσης, συντελεί στην έξοδο της χοληστερόλης από τα κύτταρα

II: Μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης και καταβολισμού των χυλομικρών και σημασία του ρόλου των απολιποπρωτεϊνών (apoE, apoCII) και της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης στην ομοίωση των λιπιδίων (16).

3. Απολιποπρωτεΐνες

Οι απολιποπρωτεΐνες αποτελούν τις πρωτεΐνες των λιποπρωτεϊνών.

Μία θεμελιώδης ιδιότητα των απολιποπρωτεϊνών είναι η ικανότητά τους να διαλυτοποιούν τα λιπίδια. Με αυτό τον τρόπο συμβάλουν στη μεταφορά των λιπιδίων στο πλάσμα και την πρόσληψή τους από διάφορους ιστούς. Παράλληλα, ορισμένες απολιποπρωτεΐνες δρουν ως ενεργοποιητές ή αναστολείς ενζύμων του πλάσματος και αποτελούν συνδέτες διαφόρων υποδοχέων και μεταφορέων λιπιδίων.

Η έκφραση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών είναι συνεχής. Ωστόσο, είναι δυνατόν ορισμένα εξωκυτταρικά σήματα, όπως είναι οι θυρεοειδείς ή στεροειδείς ορμόνες, τα ρετινοειδή, οι συνθήκες έντονης καταπόνησης (stress), οι φλεγμονώδεις (TNF, ιντερλευκίνη-1) και αντιφλεγμονώδεις (TGF-β) κυτοκίνες, να ενεργοποιήσουν ορισμένα σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται άμεσα με τις απολιποπρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, τα μονοπάτια αυτά καταλήγουν στην ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων που επηρεάζουν τη δραστηριότητα των υποκινητών των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών και κατ' επέκταση το βαθμό έκφρασης των γονιδίων αυτών (13-15).

Οι ιδιότητες των διαφόρων απολιποπρωτεϊνών και οι λειτουργίες τους συνοψίζονται στον πίνακα 1.

Απολιποπρωτεΐνες	Λιποπρωτεΐνες στις οποίες περιέχονται	Λειτουργία
ΑποΑ-I	HDL	Έξοδος χοληστερόλης από τα κύτταρα. Προστασία από αθηρωμάτωση
ΑποΑ-II	HDL	Πιθανή συμβολή στην αθηρωμάτωση
ΑποΑ-IV	VLDL και χυλομικρά	Ενεργοποίηση LCAT
ΑποΒ	LDL	Συνδέτης του υποδοχέα LDL
ΑποC-I	VLDL και HDL	Ήπια ενεργοποίηση LCAT
ΑποC-II	VLDL και HDL	Ενεργοποίηση Λιποπρωτεϊνικής Διπάσης
ΑποC-III	VLDL και HDL	Αναστολή καταβολισμού πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών
ΑποΕ	VLDL και HDL	Συνδέτης των υποδοχέων LDL και αποΕ/α ₂ μακροσφαιρίνης

Πίνακας 1: Κατανομή και λειτουργίες των απολιποπρωτεϊνών του ανθρώπου.

4. Ένζυμα του πλάσματος που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών και μικροσωμική πρωτεΐνη μεταφοράς τριγλυκεριδίων

Οι λιποπρωτεΐνες, μετά την έκκρισή τους, υφίστανται μια σειρά τροποποιήσεων στο πλάσμα από ειδικά ένζυμα. Τα ένζυμα αυτά είναι:

1. Η λιποπρωτεϊνική λιπάση (Lipo-Protein Lipase, LPL), η οποία ενεργοποιείται από την απολιποπρωτεΐνη apoC-II και υδρολύει τα χυλομικρά και τα τριγλυκερίδια των VLDL, με επακόλουθη παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων και μονογλυκεριδίων (17). Αναστολή της δράσης της LPL είτε με χρήση αντισωμάτων είτε λόγω γενετικών ανωμαλιών οδηγεί σε συσσώρευση των λιποπρωτεϊνών VLDL και των χυλομικρών στο πλάσμα (18).
2. Η ηπατική λιπάση (Hepatic Lipase, HL) η οποία έχει λιπολυτική δραστηριότητα (19, 21). Ασθενείς με γενετική ανωμαλία της HL εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων στο πλάσμα, αυξημένα επίπεδα HDL και βVLDL, αυξημένη συγκέντρωση τριγλυκεριδίων και φωσφολιπιδίων στις HDL και LDL και πρόωμη αθηρωμάτωση (21, 22).
3. Η ακυλοτρανσφεράση Λεκιθίνης-Χοληστερόλης (Lecithin:Cholesterol Acyltransferase, LCAT). Το ένζυμο αυτό είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό εστέρων χοληστερόλης στο πλάσμα (23) και καταλύει την εστεροποίηση της χοληστερόλης της HDL και LDL. Η εστεροποίηση αυτή, η οποία συντελεί στη μετατροπή των δισκοειδών πρόδρομων HDL σε ώριμες σφαιρικές HDL, γίνεται με τη συνδρομή της πρωτεΐνης μεταφοράς εστέρα χοληστερόλης (Cholesterol Ester Transfer Protein, CETP). Ασθενείς με γενετική ανωμαλία για την LCAT παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα δισκοειδών σωματιδίων HDL στο πλάσμα. Η LCAT ενεργοποιείται από την απολιποπρωτεΐνη apoA-I και σε μικρότερο βαθμό από τις apoC-I (24), apoA-IV (25) και apoE (26).
4. Η πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης (Cholesterol Ester Transfer Protein, CETP) (27), η οποία έχει τη δυνατότητα σύνδεσης με τις VLDL, LDL, HDL και με τα φωσφολιπίδια. Η πρωτεΐνη αυτή είναι δυνατόν να συνεισφέρει στη μεταφορά εστέρων χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων ή λιπιδίων μεταξύ διαφορετικών λιποπρωτεϊνών (28, 29).
5. Η πρωτεΐνη μεταφοράς φωσφολιπιδίων (Phospholipid Transfer Protein, PLTP), η οποία συντελεί στην ανταλλαγή και τη μεταφορά φωσφολιπιδίων από τις VLDL και LDL στις HDL (30).
6. Η μικροσωμική πρωτεΐνη μεταφοράς τριγλυκεριδίων (MTP), η οποία μεταφέρει τριγλυκερίδια του Ενδοπλασματικού Δικτύου στην apoB και

συμβάλει στη συναρμολόγηση της LDL (80). Έλλειψη της MTP συνδέεται με αβηταλιποπρωτεϊναιμία.

Οι ιδιότητες των παραπάνω ενζύμων συνοψίζονται στον πίνακα 2.

Πρωτεΐνη	Λειτουργία
Λιποπρωτεϊνική Λιπάση (LPL)	Υδρόλυση τριγλυκεριδίων των χυλομικρών και της VLDL
Ηπατική Λιπάση (HL)	Υδρόλυση τριγλυκεριδίων και φωσφολιπιδίων της IDL και της HDL
Ακυλοτρανσφεράση Λεκιθίνης:Χοληστερόλης (LCAT)	Εστεροποίηση της χοληστερόλης της HDL και της LDL
Πρωτεΐνη Μεταφοράς Εστέρα Χοληστερόλης (CETP)	Μεταφορά εστέρων χοληστερόλης από την HDL στη VLDL και την LDL με αμοιβαία μεταφορά τριγλυκεριδίων στην HDL
Μικροσωμική Πρωτεΐνη Μεταφοράς Τριγλυκεριδίων (MTP)	Μεταφορά τριγλυκεριδίων από κυτταρικές μεμβράνες στην αποB

Πίνακας 2: Ιδιότητες ενζύμων του πλάσματος που σχετίζονται με το μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών. Σημαντική συμβολή στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών έχει και η MTP, μολονότι δεν εντάσσεται στην ευρύτερη ομάδα των ενζύμων του πλάσματος.

5. Υποδοχείς και μεταφορείς λιπιδίων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών

Στον καταβολισμό των λιποπρωτεϊνών συμμετέχουν μια σειρά υποδοχέων οι οποίοι διακρίνονται στις εξής κατηγορίες:

1. Μέλη της οικογένειας του υποδοχέα της LDL (LDLR). Ο ρόλος του υποδοχέα της LDL είναι μεγάλης σημασίας για την ομοίωση της χοληστερόλης και την αθηρωμάτωση (31, 32). Η οικογένεια των υποδοχέων της LDL συμπεριλαμβάνει και άλλα μέλη όπως είναι η πρωτεΐνη LRP (LDL receptor-related protein) (33), ο υποδοχέας των VLDL (34) και ο υποδοχέας 2 της apoE (apoER2) (35).

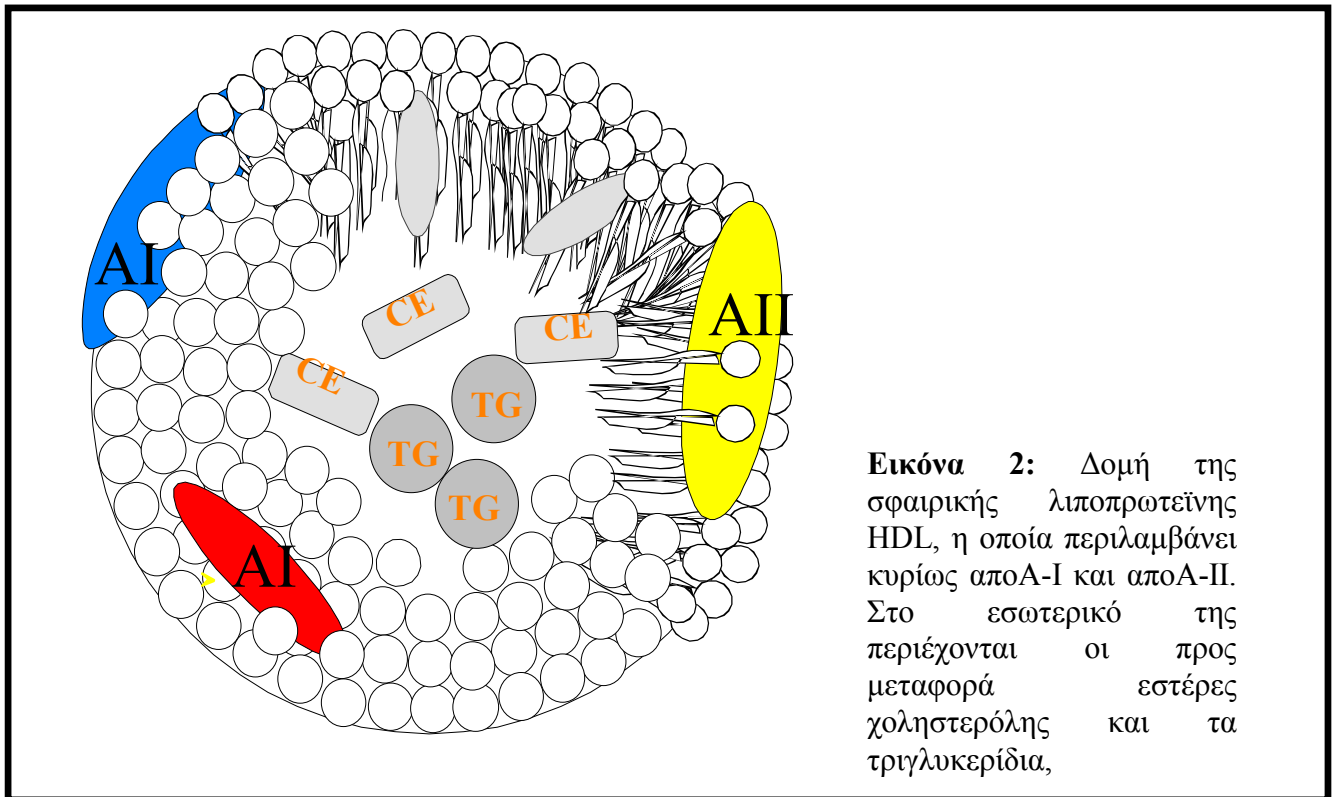
2. Υποδοχείς «καθαριστές» (Scavenger Receptors, SRs), οι οποίοι είναι γλυκοπρωτεΐνες που βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη και έχουν τη δυνατότητα σύνδεσης με τροποποιημένη VLDL (36) καθώς και με μεγάλο αριθμό άλλων συνδετών (ligands). Οι υποδοχείς αυτοί διακρίνονται σε διάφορες τάξεις, εκ των οποίων οι καλύτερα μελετημένες είναι οι τάξεις A και B (SR-A και SR-B). Πρόσφατα στην οικογένεια των υποδοχέων SR-B συμπεριλήφθηκαν υποδοχείς, οι οποίοι συντελούν στην επιλεκτική μεταφορά του εστέρα χοληστερόλης της HDL. Ένας υποδοχέας αυτής της κατηγορίας είναι ο SR-BI (37).

Απολιποπρωτεΐνες

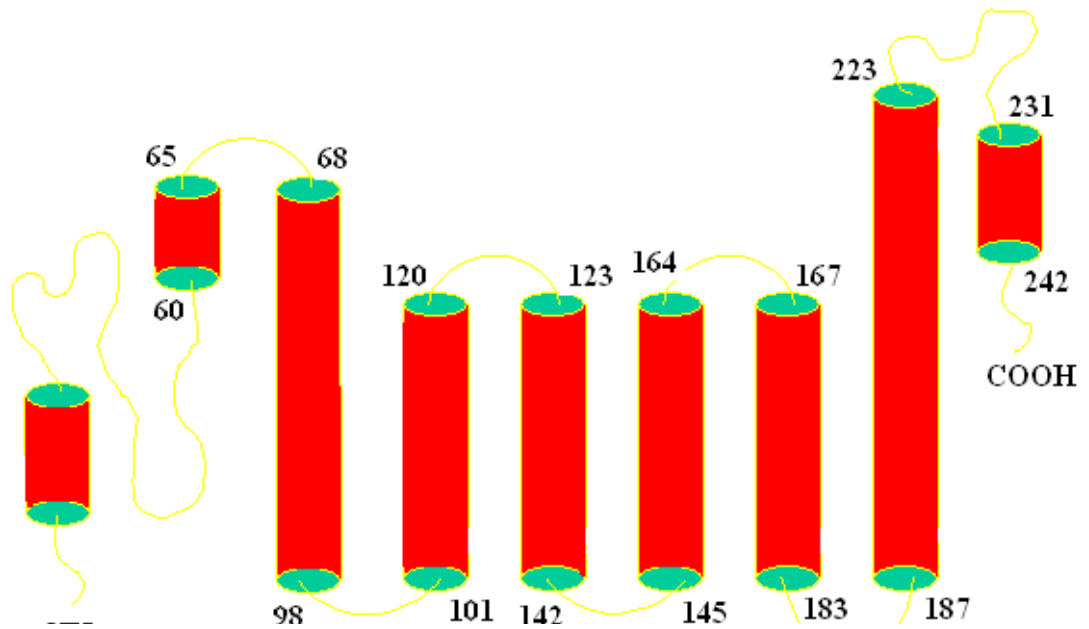
Οι κύριες απολιποπρωτεΐνες που αποτέλεσαν αντικείμενο της παρούσας μελέτης είναι η αποΑ-I και η αποΑ-III.

1. Απολιποπρωτεΐνη Α-I (αποΑ-I)

Η αποΑ-I αποτελεί το κύριο πρωτεϊνικό συστατικό της λιποπρωτεΐνης HDL (εικόνα 2). Αποτελείται από ένα πολυπεπίδιο 243 αμινοξέων (38) το οποίο



Εικόνα 2: Δομή της σφαιρικής λιποπρωτεΐνης HDL, η οποία περιλαμβάνει κυρίως αποΑ-I και αποΑ-II. Στο εσωτερικό της περιέχονται οι προς μεταφορά εστέρες χοληστερόλης και τα τριγλυκερίδια,

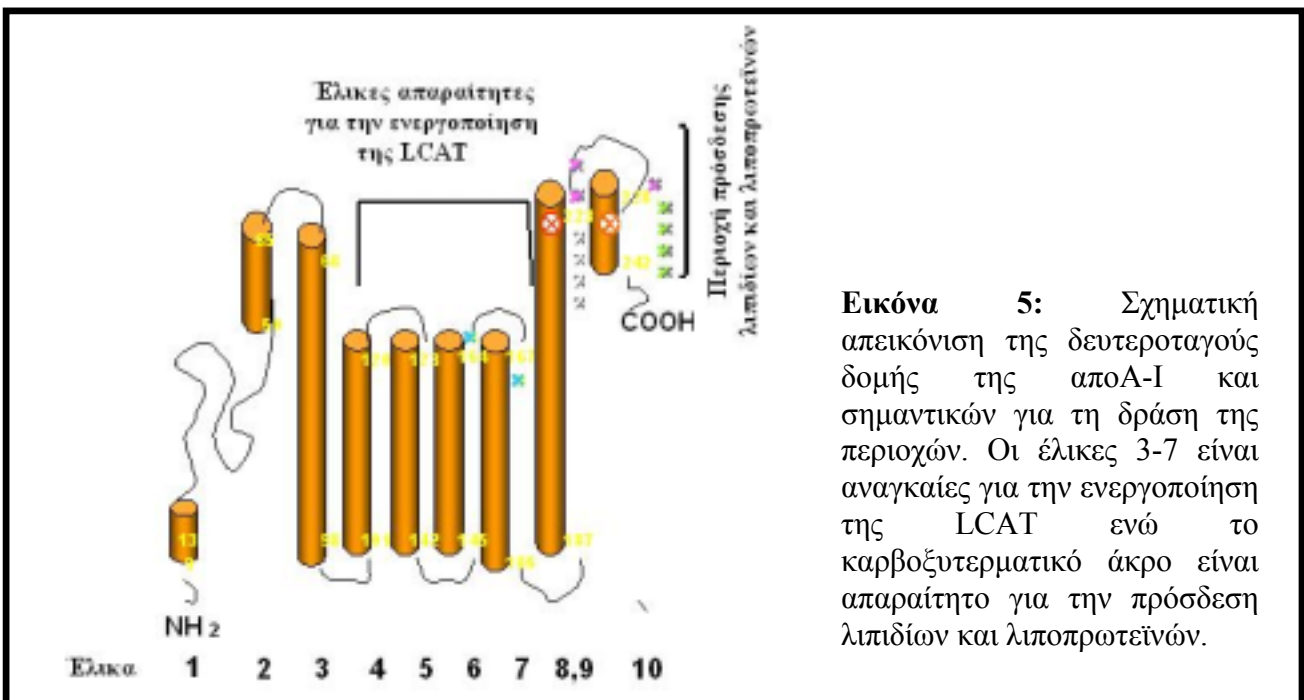
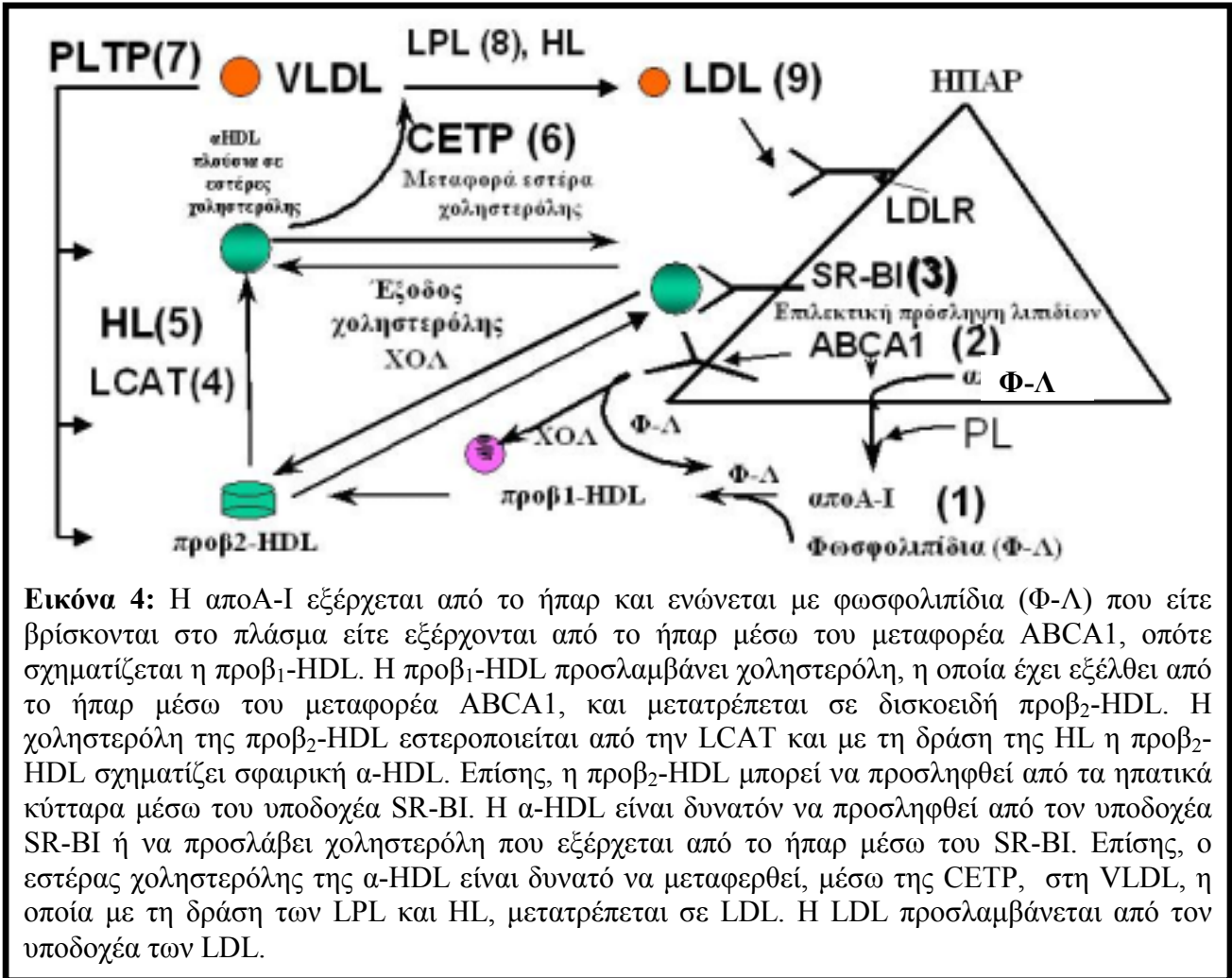


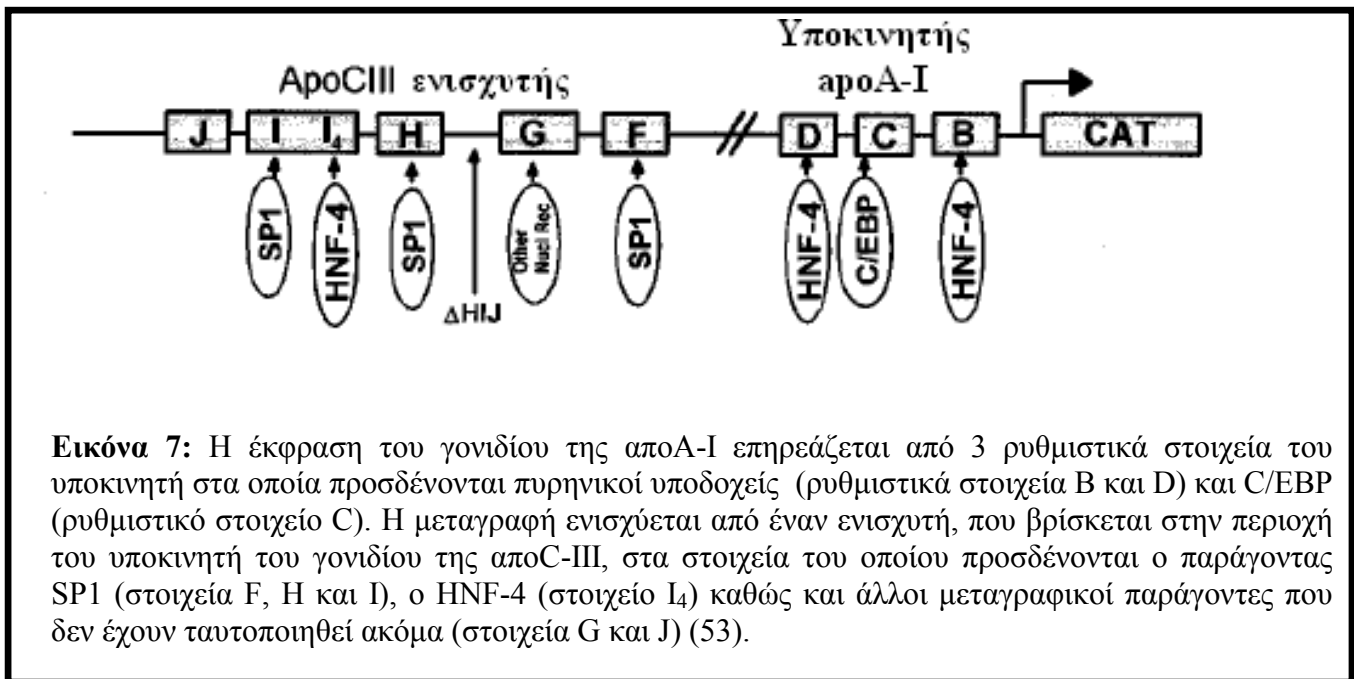
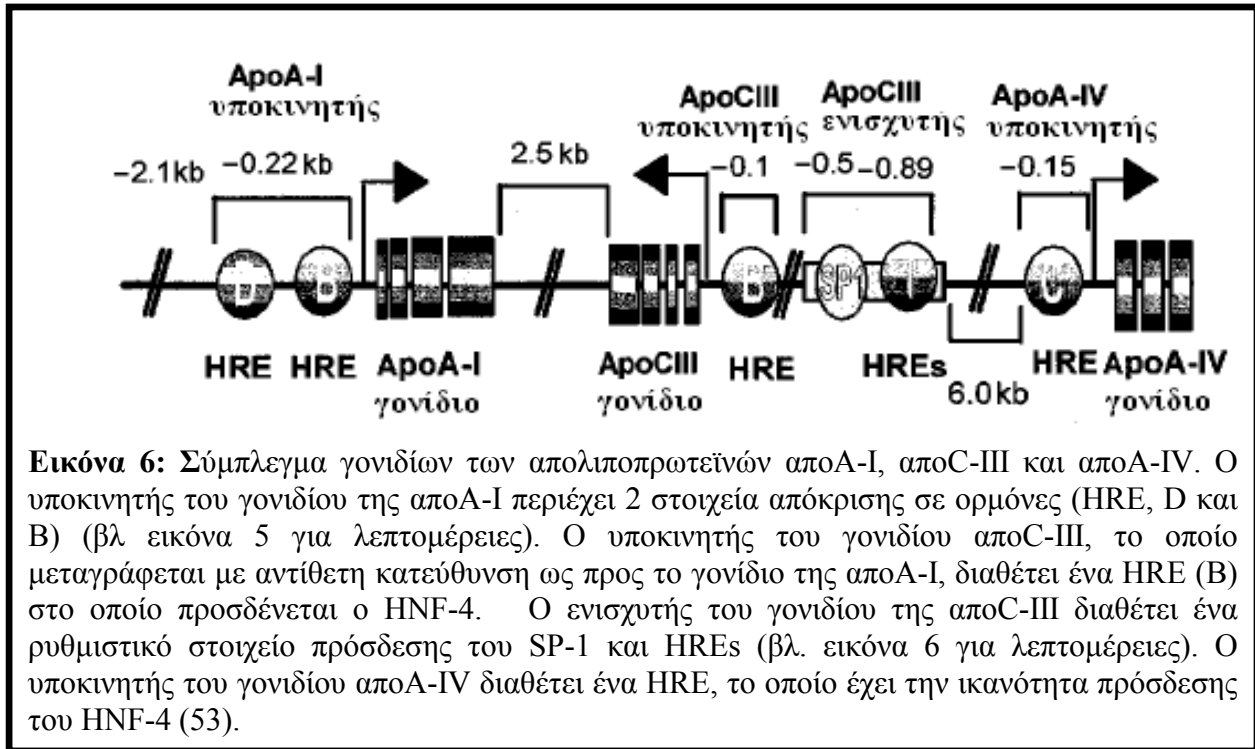
Εικόνα 3: Δευτεροταγής δομή της apoA-I. Η apoA-I αποτελείται από 10 αμφιπαθείς α-έλικες (52).

περιλαμβάνει οκτώ επαναλήψεις 22 αμινοξέων και δύο επαναλήψεις 11 αμινοξέων, οι οποίες είναι οργανωμένες σε 10 αμφιπαθείς έλικες (39, 40, 41) (εικόνα 3).

Η apoA-I συντίθεται κατά κύριο λόγο στο ήπαρ και το έντερο (42, 43). Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της apoA-I στους διάφορους ιστούς επηρεάζονται από ορμονικούς (44) και διατροφικούς παράγοντες (45). Η νεοσυντιθέμενη apoA-I περιέχει ένα πρόσθετο τμήμα 6 αμινοξέων το οποίο απομακρύνεται με πρωτεόλυση (46, 47).

Η απολιποπρωτεΐνη apoA-I, η οποία εντοπίζεται στις λιποπρωτεΐνες HDL, είναι δυνατόν να συνδεθεί με φωσφολιπίδια. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο σχηματισμό δισκοειδών σωματιδίων HDL. Επιπρόσθετα, η apoA-I ενεργοποιεί τη σύνθεση του ενζύμου LCAT (24). Συγκεκριμένα, η HDL αποτελεί τη θέση εστεροποίησης της χοληστερόλης με τη μεσολάβηση του ενζύμου LCAT (54). Οι έλικες της apoA-I που είναι απαραίτητες για τη δράση του ενζύμου LCAT είναι οι έλικες 4-7, ενώ το καρβοξυ-τερματικό άκρο της apoA-I είναι απαραίτητο για την πρόσδεση λιπιδίων και λιποπρωτεϊνών (εικόνα 5) (81). Μία βασική και ιδιαίτερα σημαντική λειτουργία της apoA-I είναι η συνεισφορά στην έξοδο της χοληστερόλης από τα κύτταρα και συνεπώς στην ομοίωση της χοληστερόλης (55). Επίσης, έχει δειχθεί





ότι οι HDL εμπλέκονται στην αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης από τους περιφερειακούς ιστούς προς το ήπαρ και άλλα όργανα (23). Ο μεταβολισμός και οι λειτουργίες της αποΑ-I συνοψίζονται διαγραμματικά στην εικόνα 4.

Το γονίδιο της apoA-I εντοπίζεται στο 11^ο χρωμόσωμα του ανθρώπου (51) και αποτελείται από 1863 ζεύγη βάσεων (bp) (48, 49). Περιλαμβάνει 4 εξόνια και 3 ιντρόνια (50). Το γονίδιο της apoA-I περιλαμβάνεται στο ίδιο γονιδιακό σύμπλεγμα με τα γονίδια που κωδικοποιούν τις απολιποπρωτεΐνες apoC-III και apoA-IV (εικόνα 4) (53).

Η έκφραση του γονιδίου της apoA-I επηρεάζεται από μια σειρά παραγόντων που προσδένονται σε στοιχεία του υποκινητή του και σε ρυθμιστικά στοιχεία του παρακείμενου ενισχυτή του γονιδίου της apoC-III (εικόνα 7). Συγκεκριμένα, έχει διαπιστωθεί ότι ο υποκινητής του γονιδίου της apoA-I προσδένει μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο HNF-4 και άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων (στα στοιχεία B και D) και τον C/EBP (στο στοιχείο C).

2. Απολιποπρωτεΐνη C-III (apoC-III)

Η apoC-III αποτελεί κύριο συστατικό των χυλομικρών και των VLDL, ενώ εντοπίζεται σε μικρότερο βαθμό στις HDL και σε ελάχιστη αναλογία στις IDL. Αποτελείται από 99 αμινοξέα εκ των οποίων τα 20 αποτελούν ένα πεπτίδιο «σύνθημα», το οποίο αποκόπτεται αμέσως μετά τη μετάφραση (12, 56). Η κύρια περιοχή σύνθεσης της apoC-III είναι το ήπαρ ενώ συντίθεται σε χαμηλότερο βαθμό στο έντερο (43).

Ανάλυση της δευτεροταγούς δομής της apoC-III έδειξε ότι αποτελείται από 2 α-έλικες, 2 β-ελάσματα και μία αμφιπαθή α-έλικα (41, 57).

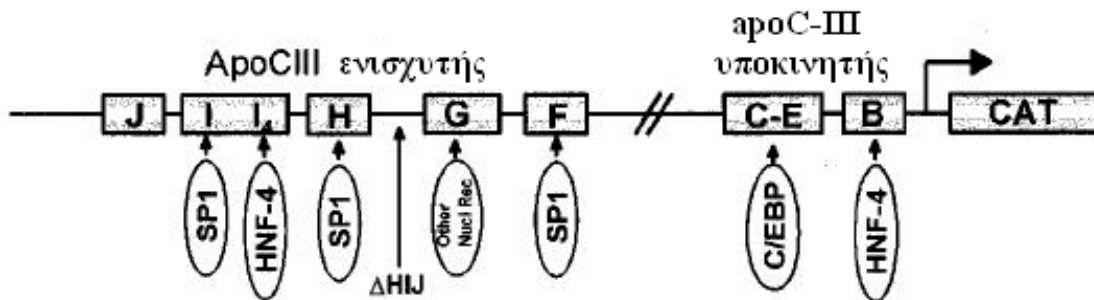
Η apoC-III αναστέλλει *in vitro* τη δράση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης η οποία υδρολύει τα τριγλυκερίδια των χυλομικρών και των λιποπρωτεϊνών VLDL (58). Επίσης, αναστέλλει την πρόσδεση των λιποπρωτεϊνών, που περιέχουν apoE, στον υποδοχέα των LDL (59). Επιπρόσθετα, έχει δειχθεί ότι η πρόσδεση και ο καταβολισμός λιποπρωτεϊνών μέσω υποδοχέων αναστέλλεται από την apoCIII (60). Από τα παραπάνω προκύπτουν ενδείξεις ότι η apoC-III διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον καταβολισμό των τριγλυκεριδίων. Οι λειτουργίες αυτές της apoC-III ενισχύονται από μελέτη που έγινε σε διαγονιδιακά ποντίκια, στα οποία υπερεκφράστηκε η ανθρώπινη apoC-III και τα οποία εμφάνισαν υπερτριγλυκεριδαιμία (61).

Το γονίδιο της apoC-III έχει μέγεθος 3,2 kb και αποτελείται από 4 εξόνια και 3 ιντρόνια (62, 63). Ανήκει στο ίδιο γονιδιακό σύμπλεγμα του 11^{ου} ανθρώπινου χρωμοσώματος με τα γονίδια της apoC-III και της apoA-IV και η κατεύθυνση της μεταγραφής του είναι αντίστροφη από αυτά (εικόνα 4) (53).

Το γονίδιο της apoC-III διαθέτει 4 εγγύς και 6 απώτερα ρυθμιστικά στοιχεία (64). Τα απώτερα ρυθμιστικά στοιχεία απαρτίζουν την περιοχή που λειτουργεί ως

ενισχυτής του γονιδίου apoC-III (εικόνα 6). Ο υποκινητής διαθέτει ένα ρυθμιστικό στοιχείο HRE (θέση B, εικόνα 6), το οποίο έχει τη δυνατότητα πρόσδεσης του HNF-4 και άλλων πυρηνικών υποδοχέων (65, 66, 67). Επίσης, στο ρυθμιστικό στοιχείο D προσδέεται ο C/EBP, ο οποίος φωσφορυλιώνεται από την ιντερλευκίνη-1 και καταστέλλει τη δράση του υποκινητή του γονιδίου apoC-III (68).

Ο ενισχυτής του γονιδίου της apoC-III περιέχει 3 θέσεις στις οποίες προσδέεται ο μεταγραφικός παράγοντας SP-1 (θέσεις F, H και I, εικόνα 6). Επίσης, διαθέτει 2 HRE (θέσεις G και I, εικόνα 6). Στο HRE-I προσδέεται ο μεταγραφικός παράγοντας HNF-4, ο οποίος δεν έχει δυνατότητα πρόσδεσης στο HRE-G, όπου προσδέονται άλλοι πυρηνικοί υποδοχείς (65, 66).



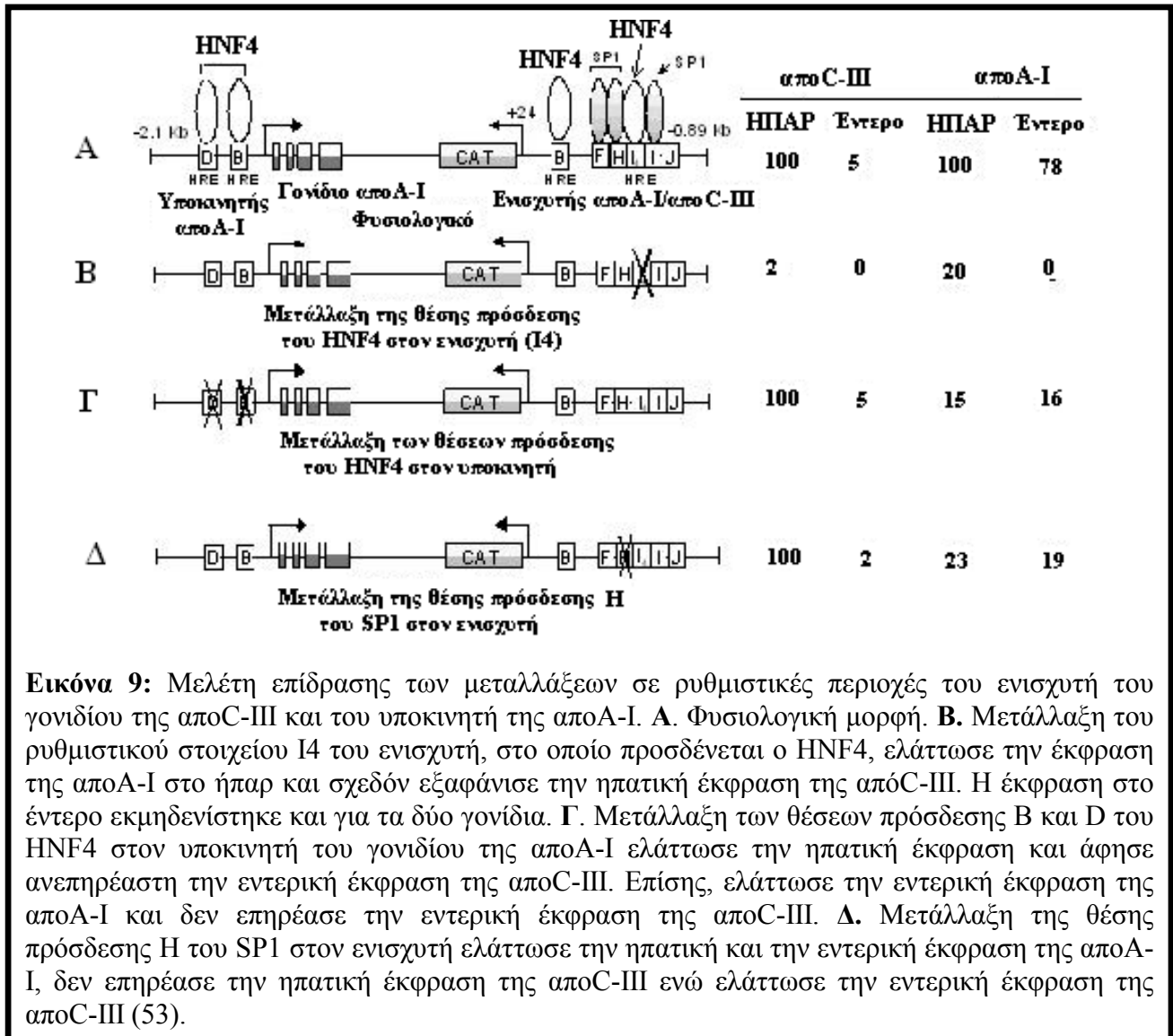
Εικόνα 8: Ρυθμιστικές περιοχές που επηρεάζουν την έκφραση του γονιδίου της apoC-III. Ο υποκινητής του γονιδίου apoC-III διαθέτει 4 ρυθμιστικά στοιχεία (B, C, D, E). Στο ρυθμιστικό στοιχείο B προσδέεται ο HNF-4 και στο D ο C/EBP. Ο ενισχυτής αποτελείται από 6 ρυθμιστικά στοιχεία (F, G, H I₄, I, J) στα 3 εκ των οποίων (F, H και I) προσδέεται ο SP-1. Στο στοιχείο I₄ προσδέεται ο HNF-4 ενώ στο στοιχείο G προσδέονται άλλοι πυρηνικοί υποδοχείς (53).

Μεταγραφική ρύθμιση- Κυτταρική σηματοδότηση

Η μεταγραφή των ευκαρυωτικών γονιδίων αποτελεί μία πολύπλοκη βιολογική διεργασία στην οποία εμπλέκεται μια σειρά πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένης της RNA πολυμεράσης II, των παραγόντων του αρχικού μεταγραφικού συμπλόκου, των μεταγραφικών παραγόντων και ενός σημαντικού αριθμού συνενεργοποιητών, συγκαταστολέων και άλλων επικουρικών παραγόντων. Έχει γίνει σημαντική πρόοδος στο δομικό και λειτουργικό χαρακτηρισμό διαφόρων ηπατοειδικών αλλά και ευρύτερα εκφραζόμενων παραγόντων, οι οποίοι συμμετέχουν στη μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών. Με *in vitro* και *in vivo* μελέτες σε

διαγονιδιακά ποντίκια έχειδειχθεί ότι οι ρυθμιστικές αλληλουχίες των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών αναγνωρίζονται από μια σειρά παραγόντων που προσδένονται στην περιοχή είτε του υποκινητή είτε του ενισχυτή κάθε γονιδίου. Τέτοιες μελέτες έχουν δείξει ότι η μεταγραφή των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών αποΑ-I και αποC-III είναι δυνατόν να τροποποιηθεί μέσω αλλαγής της δράσης ενός συγκεκριμένου μεταγραφικού παράγοντα, όπως είναι ο HNF-4 και άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες. Η δράση τόσο του HNF-4 όσο και των άλλων μεταγραφικών παραγόντων είναι δυνατόν να επηρεαστεί είτε από συνδέτες (ligands) είτε από άλλους μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι επάγονται από μηχανισμούς κυτταρικής σηματοδότησης.

Με *in vitro* μελέτες δείχτηκε ότι για το γονιδιακό σύμπλεγμα αποΑ-I/αποC-III/αποΑ-IV υπάρχει ένας κοινός ενισχυτής. Μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια έδειξαν ότι η πρόσδεση του HNF4 στον κοινό αυτό ενισχυτή εξασφαλίζει την έκφραση τόσο του αποΑ-I όσο και του αποC-III στο έντερο (εικόνα 9) (53). Οι



Εικόνα 9: Μελέτη επίδρασης των μεταλλάξεων σε ρυθμιστικές περιοχές του ενισχυτή του γονιδίου της αποC-III και του υποκινητή της αποΑ-I. **A.** Φυσιολογική μορφή. **B.** Μετάλλαξη του ρυθμιστικού στοιχείου I4 του ενισχυτή, στο οποίο προσδένεται ο HNF4, ελάττωσε την έκφραση της αποΑ-I στο ήπαρ και σχεδόν εξαφάνισε την ηπατική έκφραση της αποC-III. Η έκφραση στο έντερο εκμηδενίστηκε και για τα δύο γονίδια. **Γ.** Μετάλλαξη των θέσεων πρόσδεσης B και D του HNF4 στον υποκινητή του γονιδίου της αποΑ-I ελάττωσε την ηπατική έκφραση και άφησε ανεπηρέαστη την εντερική έκφραση της αποC-III. Επίσης, ελάττωσε την εντερική έκφραση της αποΑ-I και δεν επηρέασε την ηπατική έκφραση της αποC-III. **Δ.** Μετάλλαξη της θέσης πρόσδεσης H του SP1 στον ενισχυτή ελάττωσε την ηπατική και την εντερική έκφραση της αποΑ-I, δεν επηρέασε την ηπατική έκφραση της αποC-III ενώ ελάττωσε την εντερική έκφραση της αποC-III (53).

τρεις περιοχές πρόσδεσης του SP1 στον ενισχυτή απαιτούνται για την έκφραση των αποΑ-I και αποC-III στο έντερο (εικόνα 9) (53).

Στη μελέτη αυτή εξετάστηκε η επίδραση των μεταγραφικών παραγόντων R α R α και Smad7 στην έκφραση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών.

Ο μεταγραφικός παράγοντας R α R α ανήκει στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων. Οι πυρηνικοί υποδοχείς αποτελούν μέλος της ομάδας των μεταγραφικών παραγόντων των οποίων η δράση επάγεται από ligands. Διαδραματίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη μετάδοση μηνυμάτων που προέρχονται από εξωκυτταρικά ή ενδοκυτταρικά ερεθίσματα. Τα κύρια χαρακτηριστικά τους είναι τα εξής:

1. Ανταποκρίνονται άμεσα σε ορμονικά και μεταβολικά μηνύματα.
2. Ρυθμίζουν τη λειτουργία και άλλων βασικών σηματοδοτικών μονοπατιών.
3. Διαθέτουν μία χαρακτηριστική περιοχή πρόσδεσης στο DNA, η οποία περιέχει δύο δακτυλίους ψευδαργύρου, και μία περιοχή πρόσδεσης του ligand (70, 71).

Ο R α R α αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα που ενεργοποιείται από την επίδραση ρετινοειδών (72) όπως είναι το 9-cis-ρετινοϊκό οξύ το οποίο αποτελεί το συνδέτη του. Ο R α R α σχηματίζει ομοδιμερή ή ετεροδιμερή με τον RAR (Retinoic Acid Receptor), τον PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) και τη θυρεοειδή ορμόνη β (T $_3$ R β) (13).

Η πρωτεΐνη Smad7 αποτελεί μέλος της ευρύτερης οικογένειας των πρωτεϊνών Smad, οι οποίες συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF- β . Το μονοπάτι αυτό ενεργοποιείται μέσω συνδετών οι οποίοι επάγουν το σχηματισμό συμπλόκου μεταξύ των υποδοχέων κινάσης σερίνης/θρεονίνης τύπου I (T β RI) και II (T β RII) (73). Μετά την ενεργοποίηση του υποδοχέα το σήμα μεταδίδεται μέσω των πρωτεϊνών Smad (74). Συγκεκριμένα ο υποδοχέας ενεργοποιεί τις Smad2 και Smad3 (R-Smads), οι οποίες είναι δυνατόν να σχηματίσουν σύμπλοκο με τη Smad4 (co-Smad) και να εισέλθουν στον πυρήνα όπου θα επηρεάσουν τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων (75). Οι Smad6 και Smad7 έχουν ανασταλτική δραστηριότητα (76). Έχει αναφερθεί πρόσφατα ότι οι Smad6 και Smad7 αλληλεπιδρούν με τον ενεργοποιημένο υποδοχέα T β RI παρεμποδίζοντας την πρόσδεση και ενεργοποίηση των R-Smads (77, 78).

Αδενοϊοί

Οι αδενοϊοί απομονώθηκαν αρχικά ως παράγοντες αδενοειδούς φλεγμονής σε παιδιά, και η μόλυνση του αναπνευστικού συστήματος από αδενοϊούς εκδηλώνεται με συμπτώματα κοινού κρυολογήματος. Έχουν περιγραφεί περίπου 50 διαφορετικοί τύποι αδενοϊών εκ των οποίων ο τύπος 5 είναι ο περισσότερο κοινώς χρησιμοποιούμενος αδενοϊός για κατασκευή ιικών φορέων.

Οι αδενοϊοί είναι ιοί δίκλωνου γραμμικού DNA μεγέθους 36kb και σχηματίζουν κανονικά εικοσάεδρα διαμέτρου 65-80 nm αποτελούμενα από 252 καψομερίδια. Είκοσι ίνες εκτείνονται από το κέντρο του ιού και αποτελούνται από το στέλεχος και ένα τελικό τμήμα. Στο τελικό τμήμα υπάρχει η περιοχή που αναγνωρίζεται από τον Αδενοϊκό Υποδοχέα Coxsack (CAR).

Το γραμμικό DNA του αδενοϊού φέρει στα άκρα του δύο ανεστραμμένες τελικές επαναλήψεις (inverted terminal repeats, ITRs). Το αριστερό ITR αλληλεπικαλύπτεται με την αλληλουχία που είναι αναγκαία για το πακετάρισμα του DNA στο ιοσωμάτιο (virion). Κατά την μόλυνση ενός κυττάρου ξενιστή από τον αδενοϊό, το DNA ξεπακετάρεται και αρχίζει η πρόωμη (early) μεταγραφή. Τα πρώτα και σημαντικά μετάγραφα προέρχονται από την περιοχή E1A (~1ώρα μετά την μόλυνση). Οι πρωτεΐνες της E1A ελέγχουν την μεταγραφή των υπόλοιπων πρόωμων γονιδίων E1B, E2, E3 και E4. Η μεταγραφή των όψιμων (late) γονιδίων, πολλά από τα οποία κωδικοποιούν για δομικά συστατικά του ιού, είναι υπό τον έλεγχο αυτών των πρόωμων γονιδίων. Επίσης αυτά ελέγχουν την αντιγραφή του ιϊκού DNA. Είναι ενδιαφέρον ότι οι E1A πρωτεΐνες έχουν ικανότητα μετασχηματισμού και πολλές ανθρώπινες κυτταρικές σειρές έχουν δημιουργηθεί από μετασχηματισμό με E1A., εκ των οποίων η κυτταρική σειρά HEK293 χρησιμοποιείται περισσότερο.

Η πρώτη γενιά αδενοϊκών φορέων βασίστηκε στην παρατήρηση ότι οι αδενοϊοί που στερούνται της E1A περιοχής, στερούνται δυνατότητας αντιγραφής. Πολλαπλασιάζοντας, λοιπόν, τέτοιους ιούς σε κυτταρικές σειρές που εκφράζουν E1A πρωτεΐνες, όπως τα HEK293, αυτοί συμπληρώνονται και πολλαπλασιάζονται.

Ανασυνδυασμένοι αδενοϊοί χρησιμοποιούνται με ποικίλους στόχους όπως ο *in vivo* εμβολιασμός, η γονιδιακή θεραπεία και η μεταφορά γονιδίων *in vitro* (που αποτελεί και τον άμεσο σκοπό της παρούσας μελέτης). Οι βασικοί λόγοι που καθιστούν τους ιούς αυτούς κατάλληλους για τέτοιου είδους προσεγγίσεις είναι:

1. Μεταφέρουν γονίδια σε ένα μεγάλο φάσμα κυττάρων.
2. Δεν εξαρτώνται από κυτταρικό πολλαπλασιασμό.
3. Αναπτύσσονται σε υψηλό τίτλο.
4. Δίνουν υψηλά επίπεδα έκφρασης του διαγονιδίου.

Η μέθοδος του ομόλογου ανασυνδυασμού αδενοϊκών φορέων, η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, αναπτύχθηκε από τον He *et al.* στο εργαστήριο του Vogelstein και αναφέρεται ως το σύστημα Ad-Easy (79). Με βάση αυτό το σύστημα, το προς μεταφορά γονίδιο εισαγάγεται αρχικά σε ένα δορυφορικό πλασμίδιο-φορέα.

Δεδομένου του μεγάλου μεγέθους του DNA των αδενοϊκών φορέων (36kb), είναι πρακτικά δύσκολο να υποκλωνοποιηθούν κατασκευές από πλασμιδιακούς φορείς κατ'ευθείαν στο ιϊκό DNA. Για το λόγο αυτό το γονίδιο κλωνοποιείται σε ένα σχετικά μικρό δορυφορικό φορέα (shuttle vector) που περιέχει την τελική περιοχή του αδενοϊκού DNA. Ο δορυφορικός φορέας με το γονίδιο-ένθεμα (insert)

εισάγεται με συν-διαμόλυνση (cotransfection) με ένα μεγαλύτερο πλασμίδιο που περιέχει το υπόλοιπο ιϊκό DNA, κύτταρα HEK293 ή σε βακτήρια. Μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού μεταξύ των αλληλεπικαλυπτόμενων περιοχών των δύο πλασμιδίων, παράγεται ολόκληρο (full length) το αδενοϊκό DNA (εικόνα 10).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την ολοκλήρωση των πειραμάτων της παρούσας αναφοράς αγοράστηκαν από τις ακόλουθες εταιρείες:

- Ένζυμα περιορισμού και ένζυμα μετατροπής του DNA (T4 DNA λγίαση, VENT DNA πολυμεράση) από τη MINOTECH Co. και τη NEW ENGLAND BIOLABS Inc.
- Μίγμα τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs) από την INVITROGEN LIFE TECHNOLOGIES.
- Διάλυμα TRIZOL για την απομόνωση του RNA από την INVITROGEN LIFE TECHNOLOGIES.
- Διάλυμα PBS 10x από τη GIBCO.
- Τυχαία εξαμερή και ανάστροφη μεταγραφάση από την PROMEGA.
- Διάλυμα βρωμιούχου εθιδίου από την INVITROGEN LIFE TECHNOLOGIES.
- Δείκτης μεγέθους DNA 1kb από τη NEW ENGLAND BIOLABS Inc.
- Θρεπτικό μέσο βακτηρίων SOC από την INVITROGEN LIFE TECHNOLOGIES.
- Εκκινητές αντιγραφής DNA (primers) από τη MINOTECH Co. και INVITROGEN LIFE TECHNOLOGIES.
- Θρεπτικά μέσα κυτταροκαλλιιεργειών (DMEM, Leibovitz's, ορός εμβρύου μόσχου FCS, πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη) από τη GIBCO.
- Χλωροφόρμιο, αιθανόλη και ισοαμυλική αλκοόλη από τη SIGMA-ALDRICH LTD.
- Βακτοτρυπτόνη (bactotryptone) και εκχύλισμα μυκήτων-βακτηρίων (bacto-yeast extract) από την VWR (Pittsburgh, PA).

Διαλύματα

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

1xHBS (2ml Hepes 1M, pH 7.4, 3ml NaCl 5M, 95ml ddH₂O).

Διαλύματα CsCl για υπερφυγοκέντρωση

A. Διάλυμα-1: 610g/l CsCl σε TE, pH 8.0

B. Διάλυμα-2: 277g/l CsCl σε TE, pH 8.0

Γ. Διάλυμα-3: 450g/l CsCl σε TE, pH 8.0

Ρυθμιστικό διάλυμα διαπίδυσης (10mM Tris pH 8,0 , 2mM MgCl₂, 5% Σουκρόζη).

2X Διάλυμα Άγαρ (17g Άγαρ, 40ml HEPES 1M, pH 7.2).

50x TAE (121g Tris, 28,55ml Υγρό Οξικό Οξύ, 18,6g Na₂EDTA, διάλυση σε 500ml H₂O).

10x TBE (108g Tris, 55g Βορικό οξύ, 40ml EDTA 0,5M, pH 8,0, διάλυση σε 1000ml H₂O).

10x TBS (24,2 g Tris, 175g NaCl, διάλυση σε 1000 ml H₂O).

Θρεπτικό μέσο βακτηρίων LB (10g NaCl, 10g βακτοτρουπτόνης, 5g εκχυλίσματος μυκήτων-βακτηρίων, επαναδιάλυση σε 1000ml H₂O).

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Για στερεό θρεπτικό μέσο χρησιμοποιούνται 15g άγαρ/1000ml υγρού θρεπτικού μέσου.

Μέθοδοι

Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων E. coli DH5α

- 200 μl ειδικών δεκτικών (competent) κυττάρων E. coli DH5α που διατηρούνται σε θερμοκρασία Θ= -80° C αποψύχονται ήπια στον πάγο.
- Το προς μετασηματισμό πλασμιδιακό DNA προστίθεται στα κύτταρα.
- Επώαση στον πάγο για 30 λεπτά.
- Θερμικό πλήγμα των κυττάρων με επώασή τους σε θερμοκρασία Θ=42° C για 45 δευτερόλεπτα.
- Επώαση στον πάγο για 2 λεπτά.
- Προσθήκη 1 ml θρεπτικού μέσου SOC.
- Επώαση σε θερμοκρασία Θ=37° C για 1 ώρα.
- Άπλωμα σε τριβλία με θρεπτικό υλικό LB που περιέχει το αντιβιοτικό για το οποίο το πλασμίδιο φέρει το γονίδιο ανθεκτικότητας.

Απομόνωση DNA από βακτηριακή καλλιέργεια μικρής κλίμακας (miniprep)

Η μέθοδος που ακολουθείται για την απομόνωση DNA από minipreps ονομάζεται μέθοδος βρασμού και έχει ως εξής:

- Επιλογή αποικιών από τριβλίο βακτηριακής καλλιέργειας.
- Εμβάπτιση κάθε αποικίας σε 2 ml θρεπτικού μέσου LB που περιέχει το αντιβιοτικό στο οποίο είναι ανθεκτικές οι αναπτυσσόμενες αποικίες.
- Επώαση σε κινούμενο επωαστήρα θερμοκρασίας $\Theta=37^{\circ}$ C για 16 ώρες.
- Μεταφορά 1,5 ml της καλλιέργειας σε δοκιμαστικό σωλήνα erpendorf.
- Φυγοκέντρηση (13000 στροφές/λεπτό, 1 λεπτό).
- Απομάκρυνση υπερκειμένου.
- Επαναιώρηση ιζήματος σε 600 μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (Lysis Buffer: 8% σουκρόζη, 5% Triton X-100, 50 mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH 7,6-8,0).
- Έντονη ανάδευση.
- Προσθήκη 20 μl λυσοζύμης 10mg/ml.
- Έντονη ανάδευση.
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
- Επώαση σε θερμοκρασία $\Theta=100^{\circ}$ C για 1,5 λεπτό.
- Επώαση στον πάγο για 10 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση (13000 στροφές/λεπτό, 15 λεπτά).
- Απομάκρυνση ιζήματος με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα.
- Προσθήκη 600 μl ψυχρής ισοπροπανόλης.
- Ανάδευση.
- Επώαση σε θερμοκρασία $\Theta=-20^{\circ}$ C για 30 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση (13000 στροφές/λεπτό, 15 λεπτά).
- Αφαίρεση υπερκειμένου.
- Προσθήκη 1 ml 75% αιθανόλης.
- Φυγοκέντρηση (13000 στροφές/λεπτό, 5 λεπτά).
- Αφαίρεση υπερκειμένου.
- Στέγνωμα ιζήματος.
- Επαναδιάλυση σε 20 μl ddH₂O που περιέχει 0,5 μl Rnάσης 1μg/μl.

Σχεδιασμός εκκινητών αντιγραφής (primers) για ανίχνευση τμημάτων του cDNA ανθρώπινων γονιδίων απολιπορωτεϊνών.

Οι primers που σχεδιάστηκαν αφορούσαν στην ανίχνευση της έκφρασης των ακόλουθων γονιδίων απολιπορωτεϊνών του ανθρώπου:

1. ΑποΑ-I.
2. ΑποΑ-IV.
3. ΑποΒ.
4. ΑποC-II.
5. ΑποC-III.
6. ΑποΕ.

Ο σχεδιασμός έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε το υπό ανίχνευση τμήμα να περιλαμβάνει τμήματα δύο διαδοχικών εξονίων των γονιδίων των απολιπορωτεϊνών.

Επιπρόσθετα χρησιμοποιήθηκαν primers για τον εντοπισμό της όξινης ριβοσωμικής φωσφο-πρωτεΐνης ARPPO ως θετικό δείγμα ελέγχου, προκειμένου να εξασφαλιστεί η ισοδυναμία των δειγμάτων ως προς την περιεχόμενη ποσότητα cDNA.

Οι αλληλουχίες των παραπάνω γονιδίων εντοπίστηκαν στη δικτυακή βάση Entrez-Nucleotide του NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>).

Ο σχεδιασμός των primers έγινε με επιλογή της επιθυμητής προς πολλαπλασιασμό αλληλουχίας του γονιδίου και εισαγωγή της στο πρόγραμμα «Primer Design» της ομάδας προγραμμάτων ‘The Genome Web’ που εντοπίζεται στη δικτυακή βάση του Human Genome Mapping Project Resource Centre (<http://www.hgmp.mrc.ac.uk>). Το εν λόγω πρόγραμμα σχεδιάζει αυτόματα όλα τα πιθανά ζεύγη primers, που μπορούν να αντιγράψουν την υποβληθείσα γονιδιακή περιοχή. Από την ομάδα αυτή το πρόγραμμα επιλέγει αυτόματα το ιδανικό ζευγάρι των primers το οποίο δίνει τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα.

Οι συνθήκες πολλαπλασιασμού του DNA με χρήση των επιλεγμένων primers προσδιορίστηκαν πειραματικά. Ιδανικές συνθήκες θεωρούνται εκείνες οι οποίες συντελούν στην εμφάνιση της αναμενόμενης, σύμφωνα με το σχεδιασμό των primers, ζώνης DNA με ταυτόχρονη απουσία μη ειδικών προϊόντων.

Οι αλληλουχίες των primers που σχεδιάστηκαν για κάθε γονίδιο είναι οι εξής:

1. ΑποΑ-I primers

5' primer: AGTTTGAAGGCTCCGCCTTGGGAAA.

3' primer: CACTTCTTCTGGAAGTCGTCCAGGTA.

Οι συνθήκες πολλαπλασιασμού είναι οι εξής:

Στάδιο αποδιάταξης: 94° C για 30 δευτερόλεπτα (sec).

Στάδιο πρόσδεσης των primers: 65° C για 60 sec.

Στάδιο επιμήκυνσης: 72° C για 40 sec.

Ανιχνεύουν ένα τμήμα 229 ζευγών βάσεων (bp) cDNA ή 818 bp γενομικού DNA μετά από 25 κύκλους και ανάλυση σε πηκτική αγαρόζη 1,5% ή μετά από 16 κύκλους όταν το αναπτυσσόμενο τμήμα DNA σημαίνεται με ραδιενεργό α -³²P-dCTP (10 mCi/ml) και η ανάλυση γίνεται σε μη αποδιατακτική πηκτική ακρυλαμίδης-δισακρυλαμίδης (σε αναλογία 29:1) συγκέντρωσης 5%, η οποία περιέχει και διάλυμα TBE (non denaturing acrylamide gel).

2. ΑποΑ-IV primers

5' primer: ATGTTTCCTGAAGGCCGTGGTCCT.

3' primer: GGGTGAGTTCAGATTTCTGGAGATGTT.

Οι συνθήκες πολλαπλασιασμού είναι οι εξής:

Στάδιο αποδιάταξης: 94° C για 30 δευτερόλεπτα (sec).

Στάδιο πρόσδεσης των primers: 57° C για 60 sec.

Στάδιο επιμήκυνσης: 72° C για 40 sec.

Οι primers αυτοί συντελούν στην ανίχνευση ενός τμήματος 166 bp cDNA ή 523 bp γενομικού DNA μετά από 25 κύκλους ή μετά από 20 κύκλους όταν το αναπτυσσόμενο τμήμα DNA σημαίνεται με ραδιενεργό α -³²P-dCTP (10 mCi/ml).

3. ΑποΒ primers

5' primer: ATGAGCTCAAGCTGGCCATTCAGGA.

3' primer: CTTTGATGAGAGCAAGTGGGCTGATG.

Οι συνθήκες πολλαπλασιασμού είναι οι εξής:

Στάδιο αποδιάταξης: 94° C για 30 δευτερόλεπτα (sec).

Στάδιο πρόσδεσης των primers: 68° C για 45 sec.

Στάδιο επιμήκυνσης: 72° C για 40 sec.

Αυτό το ζευγάρι των primers επιτυγχάνει την ανίχνευση ενός τμήματος 303 bp cDNA ή 980 bp γενομικού DNA μετά από 25 κύκλους ή μετά από 15 κύκλους όταν το αναπτυσσόμενο τμήμα DNA σημαίνεται με ραδιενεργό α -³²P-dCTP (10 mCi/ml).

4. ΑποC-II primers

5' primer: ATGAGCTCAAGCTGGCCATTCCAGA.

3' primer: CTTTGATGAGAGCAAGTGGGCTGATG.

Οι συνθήκες πολλαπλασιασμού είναι οι εξής:

Στάδιο αποδιάταξης: 94° C για 30 δευτερόλεπτα (sec).

Στάδιο πρόσδεσης των primers: 65° C για 60 sec.

Στάδιο επιμήκυνσης: 72° C για 40 sec.

Αυτό το ζευγάρι των primers επιτυγχάνει την ανίχνευση ενός τμήματος 303 bp cDNA ή 980 bp γενομικού DNA μετά από 25 κύκλους ή μετά από 18 κύκλους όταν το αναπτυσσόμενο τμήμα DNA σημαίνεται με ραδιενεργό α -³²P-dCTP (10 mCi/ml).

5. ΑποC-III primers

5' primer: AGGAGTCCCAGGTGGCCCAGCAG.

3' primer: CACGGCTGAAGTTGGTCTGACCTCA.

Οι συνθήκες πολλαπλασιασμού είναι οι εξής:

Στάδιο αποδιάταξης: 94° C για 30 δευτερόλεπτα (sec).

Στάδιο πρόσδεσης των primers: 65° C για 60 sec.

Στάδιο επιμήκυνσης: 72° C για 40 sec.

Αυτό το ζευγάρι των primers συνδράμει στην ανίχνευση ενός τμήματος 148 bp cDNA ή 1977 bp γενομικού DNA μετά από 25 κύκλους ή μετά από 20 κύκλους όταν το αναπτυσσόμενο τμήμα DNA σημαίνεται με ραδιενεργό α -³²P-dCTP (10 mCi/ml).

6. ΑποE primers

5' primer: CCAGCGGAGGTGAAGGAC.

3' primer: CGCTTCTGCAGGTCATCG.

Οι συνθήκες πολλαπλασιασμού είναι οι εξής:

Στάδιο αποδιάταξης: 94° C για 30 δευτερόλεπτα (sec).

Στάδιο πρόσδεσης των primers: 58° C για 30 sec.

Στάδιο επιμήκυνσης: 68° C για 2 λεπτά.

Αυτό το ζευγάρι των primers επιτυγχάνει την ανίχνευση ενός τμήματος 585 bp cDNA μετά από 25 κύκλους πολλαπλασιασμού και ανάλυση σε πηκτική αγαρόζη 1,5%. Οι primers αυτοί έχουν χρησιμοποιηθεί σε παλαιότερη μελέτη (69).

7. ARPPO primers

5' primer: GGAAGGCTGTGGTGCTGATGG

3' primer: AAGGAGAAGGGGGAGATGTTG

Οι συνθήκες πολλαπλασιασμού είναι οι εξής:

Στάδιο αποδιάταξης: 94° C για 30 δευτερόλεπτα (sec).

Στάδιο πρόσδεσης των primers: 65° C για 60 sec.

Στάδιο επιμήκυνσης: 72° C για 40 sec.

Αυτό το ζευγάρι των primers συνδράμει στην ανίχνευση ενός τμήματος 480bp cDNA μετά από 25 κύκλους ή μετά από 18 κύκλους όταν το αναπτυσσόμενο τμήμα DNA σημαίνεται με ραδιενεργό α-³²P-dCTP (10 mCi/ml).

Κυτταρικές καλλιέργειες και παροδικές επιμολύνσεις

Κυτταρικές σειρές καρκινικών ηπατικών κυττάρων του ανθρώπου HepG2 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM με συμπλήρωμα 10% εμβρυικού ορού βοός, L-γλουταμίνης και των αντιβιοτικών πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (100 μονάδες/ml) σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂. Παροδικές επιμολύνσεις έγιναν με την μέθοδο της συγκατακρήμνισης με Ca₃(PO₄)₂ ή μέσω της χρήσης αντιδραστηρίου Dospers® (Boeringer-Mannheim).

Απομόνωση RNA από κυτταροκαλλιέργειες

Τα στάδια που ακολουθούνται για την απομόνωση του RNA από κυτταροκαλλιέργειες είναι τα εξής:

- Συλλογή κυττάρων και θρεπτικού μέσου από το καλλιεργητικό δοχείο.
- Φυγοκέντρηση (3000 στροφές/λεπτό, 5 λεπτά).
- Απομάκρυνση υπερκείμενου εκτός μικρής ποσότητας στην οποία επαναδιαλύεται το ίζημα.
- Μεταφορά εναιωρήματος κυττάρων σε δοκιμαστικό σωλήνα erpendorf.
- Φυγοκέντρηση (5000 στροφές/λεπτό, 5 λεπτά).
- Απομάκρυνση υπερκείμενου.
- Προσθήκη PBS 1x.

- Φυγοκέντρωση (5000 στροφές/λεπτό, 5 λεπτά).
- Απομάκρυνση υπεκρειμένου.
- Προσθήκη διαλύματος TRIZOL και απομόνωση RNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρείας.
- Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA γίνεται με φωτομέτρηση υπό υπεριώδη ακτινοβολία μήκους κύματος 260 nm.

Αντίστροφη μεταγραφή

- Προσθήκη σε δοκιμαστικό σωλήνα eppendorf:
 - 1 µg RNA.
 - H₂O μέχρι όγκου 30,5 µl.
 - 10 µl 5x ρυθμιστικού διαλύματος αντίστροφης μεταγραφής (RT-Buffer).
 - 3 µl τυχαίων εξαμερών primers 100 ng/µl.
 - 5 µl μίγματος dNTP 2mM.
- Επώαση σε θερμοκρασία Θ=65° C για 5 λεπτά.
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
- Προσθήκη 1 µl M-MLV αντίστροφης μεταγραφάσης 200 u/µl.
- Προσθήκη 0,5 µl αναστολέα RNασών.
- Επώαση σε θερμοκρασία Θ=37° C για 90 λεπτά..

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Το δείγμα cDNA που συντίθεται με τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό της έκφρασης επιλεγμένων ανθρώπινων γονιδίων απολιποπρωτεϊνών. Ο έλεγχος επιβεβαίωσης της χρήσης ίσης ποσότητας cDNA για δείγματα που υπόκεινται σε σύγκριση γίνεται μέσω του προσδιορισμού του επιπέδου έκφρασης του γονιδίου της όξινης ριβοσωμικής φωσφο-πρωτεΐνης (ARPP0), η οποία εκφράζεται συνεχώς και σταθερά, μεταξύ των προς σύγκριση δειγμάτων.

Τα δείγματα που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για PCR περιέχουν τα εξής:

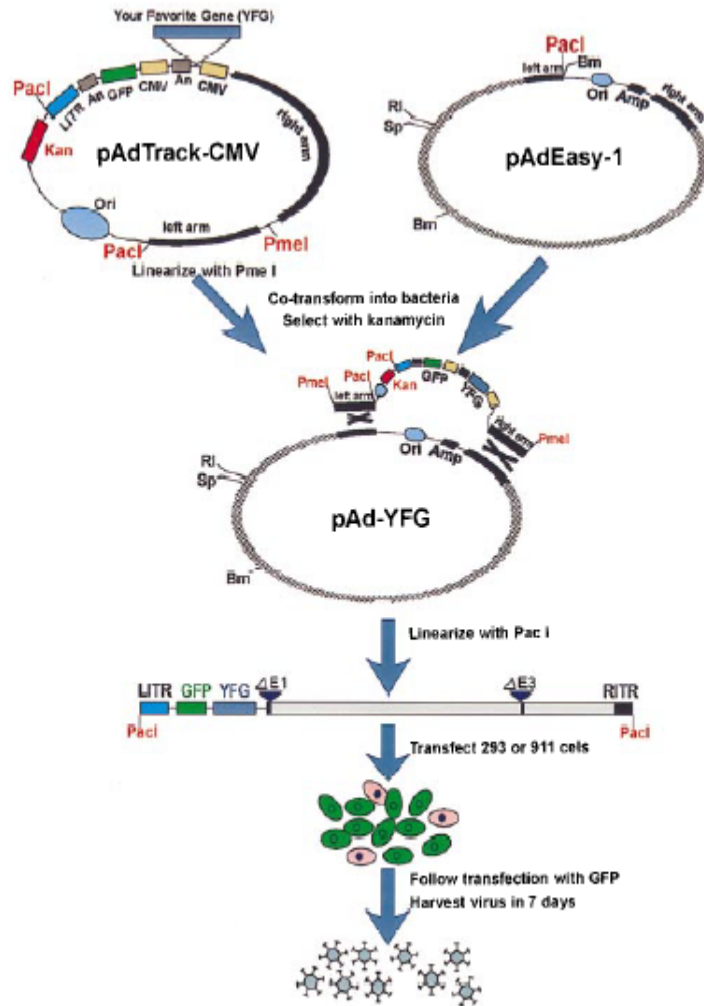
H ₂ O	: 13,95 µl
10x ρυθμιστικό διάλυμα DNA πολυμεράσης	: 2,5 µl
Μίγμα dNTPs 2mM	: 1,25 µl
5' primer 10µM	: 2,5 µl
3' primer 10µM	: 2,5 µl
DNA πολυμεράση	: 0,3 µl

Τα δείγματα υπόκεινται σε διαδικασία πολλαπλασιασμού μιας περιοχής του cDNA ώστε να διαπιστωθεί αφενός αν υπάρχει έκφραση της συγκεκριμένης γονιδιακής περιοχής, δεδομένου ότι το cDNA προέρχεται από την αντίστροφη μεταγραφή του RNA, και αφετέρου ο βαθμός και οι μεταβολές στην έκφραση μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων. Οι συνθήκες για τον πολλαπλασιασμό κάθε γονιδιακής περιοχής εξαρτώνται από τις συνθήκες λειτουργίας των primers (βλ. παραπάνω).

Κατασκευή ανασυνδυασμένων αδενοϊών για γονιδιακή μεταφορά σε κυτταροκαλλιέργειες

Η κατασκευή των ανασυνδυασμένων αδενοϊών που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για γονιδιακή μεταφορά πραγματοποιήθηκε με το σύστημα AdEasy που περιγράφηκε από τους He T-C. και συν. (79) και το οποίο αποδίδεται σχηματικά στην εικόνα 10.

Στη διάρκεια της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε η κατασκευή του πλασμιδιακού φορέα pAdTrack-CMV-dnRxR. Πιο συγκεκριμένα η επικρατούσα ανασταλτική μορφή του μεταγραφικού παράγοντα RxR (dominant negative RxR, dnRxR) εντέθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pAdTrack-CMV (εικόνα 11). Ο φορέας αυτός θα χρησιμοποιηθεί στο άμεσο μέλλον για την κατασκευή αδενοϊού, ο οποίος θα χρησιμοποιηθεί για τη μεταφορά του dnRxR σε κυτταροκαλλιέργειες. Η μεταλλαγμένη μορφή του RxR είναι δώρο από τον Dr Michael Saunders και αποτελεί μία ακρωτηριασμένη μορφή του RxR που στερείται την περιοχή της πρωτεΐνης που βρίσκεται μετά το αμινοξύ 454. Έχει διαπιστωθεί ότι το RxR(1-454) λειτουργεί ως dominant negative μεταλλαγή. Η μεταλλαγμένη μορφή του RxR κλωνοποιήθηκε με την εξής διαδικασία:

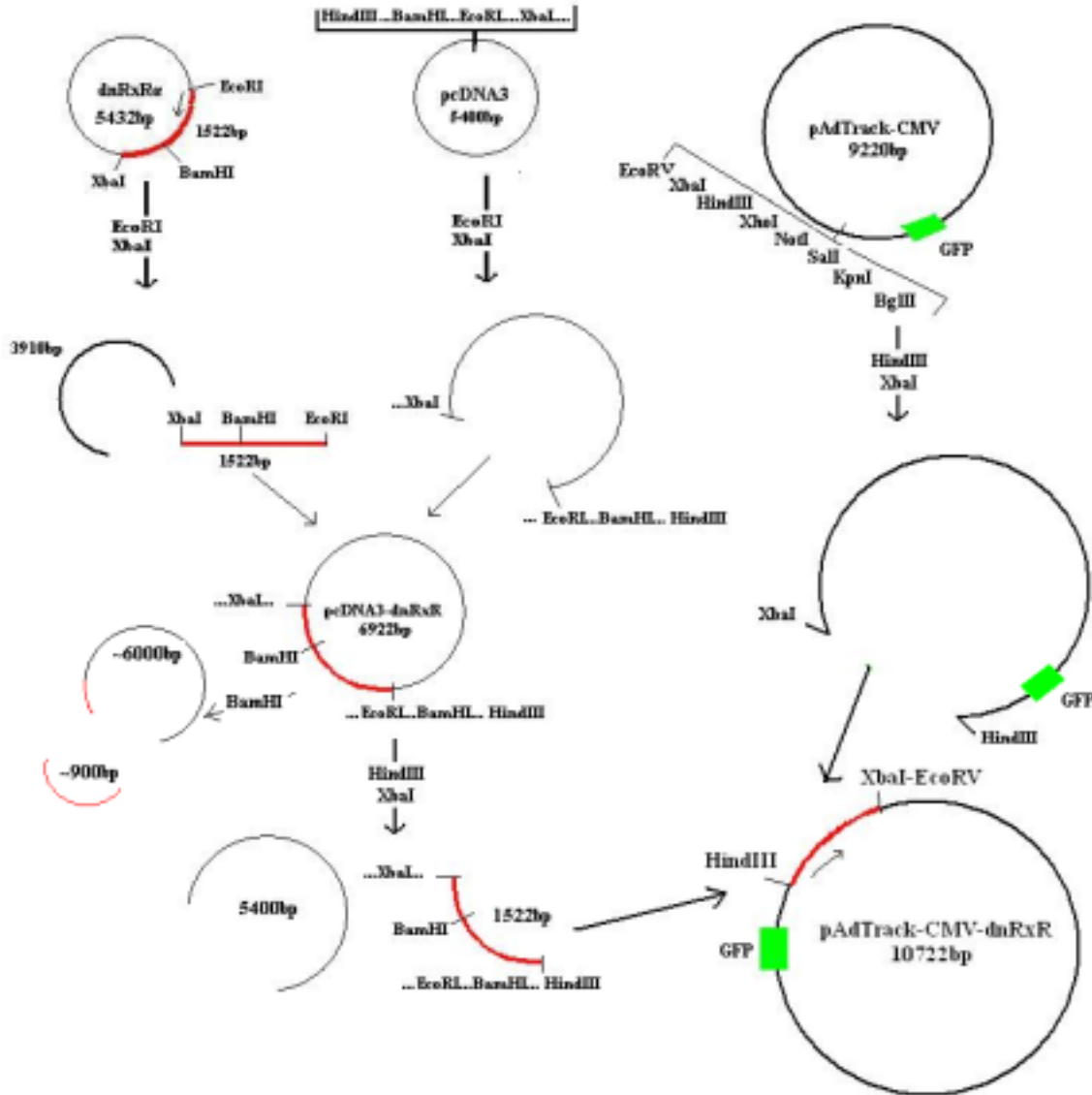


Εικόνα 10: Σχηματική περιγραφή του συστήματος AdEasy για την κατασκευή ανασυνδυασμένων αδενοϊών που χρησιμοποιούνται για τη γονιδιακή μεταφορά σε κυτταροκαλλιέργειες. Το επιθυμητό γονίδιο εντίθεται στο φορέα pAdTrack-CMV, ο οποίος σε ευθυγραμμισμένη μορφή, μετά από πέψη με PmeI, συμμαετασηματίζει με το πλασμίδιο pAdEasy βακτηριακά κύτταρα *E.coli* BJ5183. Αποτέλεσμα της συνεπιμόλυνσης είναι ο ομόλογος ανασυνδυασμών των δύο πλασμιδίων και η δημιουργία ενός μεγάλου πλασμιδιακού φορέα. Ο φορέας αυτός ευθυγραμμίζεται με PacI και χρησιμοποιείται για την επιμόλυνση σε κύτταρα 911 ή 293, τα οποία αποτελούν τους ξενιστές πακεταρίσματος των νεοσηματιζόμενων ιών, οι οποίοι φέρουν το επιθυμητό γονίδιο στο γενετικό τους υλικό (από He και συν.)

Εισαγωγή του dnRxR στο pAdTrack-CMV πλασμίδιο

- Πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI και XbaI του πλασμιδίου που περιέχει το dnRxR.
- Απομόνωση του ενθέματος από πηκτή αγαρόζης 1% σύμφωνα με τις οδηγίες του συστήματος Concert® (Life Technologies).
- Πέψη του πλασμιδιακού φορέα pcDNAIII με τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI και XbaI και απομόνωση της ευθυγραμμισμένης μορφής από πηκτή αγαρόζης 1% σύμφωνα με τις οδηγίες του συστήματος Concert® (Life Technologies).
- Σύνδεση (ligation) του dnRxR ενθέματος με το pcDNAIII πλασμίδιο στις θέσεις EcoRI και XbaI.
- Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων *E. Coli* DH5a.
- Τυχαία επιλογή αποικιών από θρεπτικό μέσο που περιέχει αμικιλίνη και ανάπτυξή τους σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας.

- Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τις καλλιέργειες μικρής κλίμακας (mini-preps) με τη μέθοδο του βρασμού.
- Έλεγχος αποικιών για την ανίχνευση της κατάλληλης αποικίας που περιέχει το πλασμίδιο pcDNAIII-dnRxR με πέψη με το περιοριστικό ένζυμο BamHI. Επιλέχθηκαν οι κλώνοι, οι οποίοι μετά την πέψη έδιναν μία ζώνη 6 kb, η οποία αντιστοιχεί στον ευθυγραμμισμένο φορέα και ένα μέρος του ενθέματος, και μία ζώνη 900 bp η οποία αντιστοιχεί στο υπόλοιπο μέρος του ενθέματος.
- Ανάπτυξη του επιλεγμένου κλώνου σε μεγάλη κλίμακα και απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σύμφωνα με τις οδηγίες του συστήματος Maxi-prep (Life Technologies).
- Απομόνωση του dnRxR ενθέματος από το φορέα pcDNAIII-dnRxR μετά από πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα HindIII και XbaI και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%.
- Πέψη του πλασμιδιακού φορέα pAdTrack-CMV με τα περιοριστικά ένζυμα HindIII και XbaI και απομόνωση της ευθυγραμμισμένης μορφής από πηκτή αγαρόζης 1%.
- Σύνδεση (ligation) του dnRxR ενθέματος με το pAdTrack-CMV πλασμίδιο στις θέσεις HindIII και XbaI.
- Τυχαία επιλογή αποικιών και ανάπτυξή τους σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας.
- Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τις καλλιέργειες μικρής κλίμακας (mini-preps) με τη μέθοδο του βρασμού.
- Έλεγχος αποικιών για την ανίχνευση της κατάλληλης αποικίας που περιέχει το πλασμίδιο pAdTrack-CMV-dnRxR με πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα HindIII και XbaI. Επιλέχθηκε ο κλώνος από την πέψη του οποίου προέκυψε το ένθεμα μεγέθους 1500 bp και ο πλασμιδιακός φορέας pAdTrack-CMV σε ευθυγραμμισμένη μορφή μεγέθους 9200 bp.
- Ανάπτυξη του επιλεγμένου κλώνου σε μεγάλη κλίμακα και απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σύμφωνα με τις οδηγίες του συστήματος Maxi-prep (Life Technologies).



Εικόνα 11: Στρατηγική κατασκευής του πλασμιδίου pAdTrack-CMV-dnRxR, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή του αδενοϊού που θα εκφράζει το γονίδιο dnRxR (βλ. κείμενο για λεπτομέρειες).

Συμμετασηματισμός βακτηρίων με τα πλασμίδια pAdTrack-CMV-dnRxR και pAdEasy-1 για ομόλογο ανασυνδυασμό

- Ευθυγράμμιση του πλασμιδίου pAdTrack-CMV-dnRxR με το περιοριστικό ένζυμο PmeI.
- Απομόνωση του ευθυγραμμισμένου πλασμιδίου από πηκτή αγαρόζης 1% σύμφωνα με τις οδηγίες του συστήματος Concert® (Life Technologies).

- Ανάμιξη 1μg γραμμικού pAdTrack-CMV-dnRxR με περίπου 100ng αδενοϊκού πλασμιδίου pAdEasy-1, σε συνολικό όγκο 5-10μl.
- Προσθήκη 20 μl ηλεκτρο-ικανών για μετασχηματισμό βακτηρίων BJ5183 στο μίγμα των πλασμιδίων.
- Μετασχηματισμός με ηλεκτροδιαπίδωση (electroporation) σε κυψελίδες 2.0mm και συνθήκες 2.5kV, 200W και 25mF. Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Gene Pulser (BioRad).
- Άμεση προσθήκη 1ml θρεπτικού μέσου S.O.C.
- Επώαση σε θερμοκρασία $\Theta=37^{\circ}$ C για 2 ώρες.
- Μεταφορά και άπλωμα του εναιωρήματος των κυττάρων σε βακτηριακά πιάτα με στερεό θρεπτικό μέσο που φέρει το αντιβιοτικό καναμυκίνη.
- Επώαση σε θερμοκρασία $\Theta=37^{\circ}$ C για 16-20 ώρες.
- Επιλογή των μικρότερων, ως προς το μέγεθος, αποικιών και ανάπτυξή τους σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας (mini-preps).
- Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τις καλλιέργειες μικρής κλίμακας (mini-preps) με τη μέθοδο του βρασμού.
- Έλεγχος των κλώνων για επιλογή του κατάλληλου κλώνου που διαθέτει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pAd-dnRxR, το οποίο φέρει το επιθυμητό γονίδιο και όλες τις αναγκαίες αλληλουχίες για την ανάπτυξη του μη μολυσματικού ιού που θα χρησιμοποιηθεί σαν φορέας του εν λόγω γονιδίου. Ο έλεγχος γίνεται με πέψη με το περιοριστικό ένζυμο PacI. Το πρότυπο ηλεκτροφόρησης των θετικών κλώνων είναι χαρακτηριστικό και αποτελείται από ένα τμήμα 3 kb κι ένα τμήμα 41 kb περίπου.
- Το DNA του θετικού κλώνου, που έχει απομονωθεί από τις καλλιέργειες μικρής κλίμακας, χρησιμοποιείται για το μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων E. coli DH5a.
- Τα μετασχηματισμένα βακτήρια απλώνονται σε βακτηριακό πιάτο, το οποίο περιέχει αντιβιοτικό καναμυκίνη.
- Επιλέγονται 3 αποικίες και αναπτύσσονται σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας.
- Έλεγχος για επιβεβαίωση θετικού κλώνου με πέψη με PacI.
- Ο θετικός κλώνος αναπτύσσεται σε καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας και το πλασμιδιακό DNA απομονώνεται και καθαρίζεται σύμφωνα με τις οδηγίες του συστήματος Maxiprep (Life Technologies).

Το απομονωμένο πλασμίδιο θα ευθυγραμμιστεί με PacI και θα χρησιμοποιηθεί για την επιμόλυνση κυττάρων πακεταρίσματος, στα οποία θα σχηματιστούν αδενοϊοί που θα έχουν την ικανότητα επιμόλυνσης κυττάρων και μεταφοράς σε αυτά της κωδικοποιούσας αλληλουχίας για dnRxR.

Παραγωγή κατάλληλων για κυτταρική επιμόλυνση αδενοϊών

Παράλληλα με την προετοιμασία του πλασμιδίου που θα χρησιμοποιηθεί για παραγωγή αδενοϊού, με τη χρήση του οποίου θα πραγματοποιηθεί ευρεία μεταφορά του dnRxR σε κυτταρικές σειρές, ολοκληρώθηκε η παραγωγή υψηλών τίτλων αδενοϊών που εκφράζουν τα γονίδια RxRα, GFP και Smad7 (Ad-RxR, Ad-GFP και Ad-Smad7 αντίστοιχα). Οι ανασυνδυασμένοι αδενοϊοί Ad-RxR και Ad-GFP κατασκευάστηκαν από τον Dr H. Kan και τον υποψήφιο Διδάκτορα Γιώργο Κούκο. Ο αδενοϊός Ad-Smad7 είναι δώρο του Δρ Άρη Μουστάκα του Ludwig Institute της Upsala. Η παραγωγή αδενοϊών έγινε ως εξής:

- Σε καλλιιεργητικά δοχεία T-25 με θρεπτικό μέσο DMEM που περιέχει 5% ορό FBS και 1% μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης αναπτύσσονται κύτταρα 911. Η ανάπτυξη των κυττάρων γίνεται σε μονοστιβάδες και μέχρι ποσοστού 70-80% της μέγιστης πυκνότητας (~ 3×10^6 κύτταρα).
- Τα κύτταρα επιμολύνθηκαν με 3 μg από τον κάθε πλασμιδιακό φορέα που φέρει την επιθυμητή κωδικοποιούσα αλληλουχία (pAd-RxR, pAd-GFP και pAd-Smad7 αντίστοιχα) και ο οποίος έχει ευθυγραμμιστεί με χρήση του περιοριστικού ενζύμου PacI. Πιο συγκεκριμένα η ακολουθούμενη διαδικασία έχει ως εξής:
 1. Σε δοκιμαστικό σωλήνα 15 ml προστίθενται 3 μg ευθυγραμμισμένου πλασμιδίου που φέρει την επιθυμητή κωδικοποιούσα αλληλουχία (pAd-RxR, pAd-GFP και pAd-Smad7) και διάλυμα 1x HBS μέχρι τελικού όγκου 150 μl (**Διάλυμα A**).
 2. Σε δοκιμαστικό σωλήνα 15 ml προστίθενται 18 μl διαλύματος Dospreg, το οποίο περιέχει λιποσώματα και 132 μl διαλύματος 1x HBS (**Διάλυμα B**).
 3. Προσθήκη του διαλύματος A στο διάλυμα B στάγδην και υπό ήπια ανάδευση στο vortex.
 4. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.
 5. Πριν την πάροδο του διαστήματος 15 λεπτών το θρεπτικό υλικό στο οποίο αναπτύχθηκαν τα κύτταρα αντικαθίσταται με θρεπτικό μέσο DMEM που δεν περιέχει ορό και αντιβιοτικά.
 6. Κατά την ολοκλήρωση του διαστήματος των 15 λεπτών προστίθεται το μίγμα των διαλυμάτων A και B στάγδην και σε όλη την έκταση της κυτταροκαλλιέργειας.
- Επώαση σε κλίβανο θερμοκρασίας $\Theta=37^\circ\text{C}$ και υπό χορήγηση αερίου μίγματος 5% CO_2 για 16 ώρες.

- Απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου.
- Προσθήκη θρεπτικού υλικού DMEM που περιέχει 5% ορό FBS και 1% μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης.
- Στο μεσοδιάστημα από την αρχική μόλυνση ως τη συλλογή των κυττάρων τα κύτταρα παρατηρούνται για έκφραση της πρωτεΐνης GFP στο μικροσκόπιο φθορισμού.
- Συλλογή κυττάρων και θρεπτικού μέσου μετά από 8-12 ημέρες, οπότε και τα περισσότερα κύτταρα έχουν υποστεί λύση.
- Το συλλεχθέν υικό διάλυμα χρησιμοποιείται για επιμόλυνση νέων κυττάρων 911 που αναπτύσσονται σε καλλιεργητικά δοχεία T-75.
- Τα εκ νέου μολυσμένα κύτταρα παρατηρούνται αφενός στο μικροσκόπιο φθορισμού για το βαθμό έκφρασης της GFP και αφετέρου για εμφάνιση μολυσματικών χαρακτηριστικών (διόγκωση κυτταρικών σωμάτων, αποκόλληση από το υπόστρωμα και λύση).
- Συλλογή του θρεπτικού μέσου που περιέχει τον αδενοϊό μετά την πάροδο 7 ημερών και χρήση για μόλυνση κυττάρων HEK-293, που αναπτύσσονται σε τριβλία 3 διαστάσεων, όπως περιγράφεται παρακάτω.

Πολλαπλασιασμός του παραθέντος αδενοϊού

- Κύτταρα HEK-293 αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο Leibovitz που περιέχει 10% FCS και 1% μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης. Η ανάπτυξη έγινε σε καλλιεργητικά τριβλία T-175 έως ότου τα κύτταρα αποκτήσουν πυκνότητα 70%.
- Μετά την πάροδο της 1 εβδομάδας απομακρύνθηκε το θρεπτικό μέσο από τα καλλιεργητικά τριβλία και τα κύτταρα αποκολλήθηκαν με τη χρήση τρυψίνης και έντονης ανακίνησης.
- Ακολούθησε μεταφορά των κυττάρων σε 500 ml φρέσκου θρεπτικού μέσου Leibovitz στο οποίο έχει προστεθεί ορός FCS (10%) και μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης (1%).
- 100 ml του εναιωρήματος κυττάρων μεταφέρθηκε σε καλλιεργητικό δοχείο «3 διαστάσεων» (triple flask).
- Τα κύτταρα επώαστηκαν σε κλίβανο θερμοκρασίας $\Theta=37^{\circ}$ C και 5% CO₂ για 5 ημέρες.
- Ακολούθησε απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού.
- Έγινε συλλογή του θρεπτικού μέσου που περιέχει τον αδενοϊό από τις καλλιέργειες που αναπτύσσονταν για 7 ημέρες σε καλλιεργητικά τριβλία T-75 μετά τη μόλυνση με τους αδενοϊούς (βλ. περιγραφή παραγωγής κατάλληλων για κυτταρική επιμόλυνση αδενοϊών).

- Μόλυνση με 7 ml θρεπτικού μέσου το οποίο συλλέχθηκε από τις καλλιέργειες των κυττάρων 911 που αναπτύχθηκαν για 7 ημέρες σε καλλιεργητικά τριβλία T-75
- Επώαση σε κλίβανο θερμοκρασίας $\Theta=37^{\circ}$ C και 5% CO_2 για 15-20 λεπτά.
- Σε κάθε triple flask προστέθηκαν 100 ml θρεπτικού μέσου DMEM.
- Έγινε επώαση σε κλίβανο θερμοκρασίας $\Theta=37^{\circ}$ C και 5% CO_2 για 2-3 ημέρες, έως ότου 50% των κυττάρων ήταν έτοιμα να λυθούν.
- Πραγματοποιήθηκε συλλογή των κυττάρων από τις triple flasks με έντονη ανάδευση, μεταφορά σε δοκιμαστικό σωλήνα 50 ml και φυγοκέντρηση (1000 στροφές/λεπτό, 5 λεπτά).
- Αποθήκευση του ιζήματος σε θερμοκρασία $\Theta=-80^{\circ}$ C έως ότου πραγματοποιηθεί το στάδιο καθαρισμού του απομονωμένου αδενοϊού.

Καθαρισμός απομονωμένου αδενοϊού μετά τον πολλαπλασιασμό του

- Τα κύτταρα υπεβλήθησαν 3 φορές σε ψύξη σε ξηρό πάγο και επαναθέρμανση σε θερμοκρασία 37° C (freeze-thaw), που οδήγησε στη λύση τους.
- Φυγοκέντρηση (4000 στροφές/λεπτό, 10 λεπτά).
- Έγινε διαχωρισμός διαβάθμισης CsCl με προσεκτική επιστίβαξη 4 ml διαλύματος CsCl συγκέντρωσης 0,277 g/ml πάνω σε 2 ml διαλύματος CsCl συγκέντρωσης 0,619 g/ml σε πλαστικό σωλήνα υπερφυγοκέντρησης (Beckmann, #344059). Η επιστίβαξη θεωρείται επιτυχημένη όταν είναι εμφανής ένας σκουρόχρωμος δακτύλιος μεταξύ των δύο πυκνοτήτων.
- Επιστίβαξη του υπερκειμένου της φυγοκέντρησης πάνω στη στιβάδα του CsCl συγκέντρωσης 0,277 g/ml.
- Φυγοκέντρηση σε υπερφυγόκεντρο (30.000 στροφές/λεπτό, 90 λεπτά, 4° C, SW41-Beckmann).
- Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης ακολούθησε απομάκρυνση με σύριγγα της λευκής ζώνης, που εντοπίζεται στη μεσόφαση των δύο πυκνοτήτων και μεταφορά του διαλύματος σε σωλήνα υπερφυγοκέντρησης (Beckmann #342413).
- Προσθήκη CsCl συγκέντρωσης 0,45 g/ml έως ότου γέμισε πλήρως ο σωλήνας υπερφυγοκέντρησης.
- Σφράγισμα του σωλήνα υπερφυγοκέντρησης με μεταλλική κεφαλή.
- Φυγοκέντρηση σε υπερφυγόκεντρο (48000 στροφές/λεπτό, τουλάχιστον 16 ώρες, 4° C, Ti-70 κεφαλή).
- Συλλογή της ζώνης, που εμφανίζεται μετά τη φυγοκέντρηση. Η ζώνη αυτή μεταφέρθηκε σε κασέτα διαπίδυσης (PIERCE #66425).

- Εμβάπτιση της κασέτας διαπίδυσης σε 500 ml ρυθμιστικού διαλύματος διαπίδυσης (10mM Tris pH 8,0 , 2mM MgCl₂, 5% σουκρόζη).
- Διαπίδυση για 3 ώρες με ανανέωση του ρυθμιστικού διαλύματος διαπίδυσης ανά 1 ώρα.
- Συλλογή ιού από την κασέτα διαπίδυσης.
- Μοίρασμα σε μικρές ποσότητες. Συγκεκριμένα, ετοιμάστηκαν 3 δείγματα 20 μl που χρησιμοποιήθηκαν για τιτλοδότηση και η υπόλοιπη ποσότητα μοιράστηκε σε δείγματα 200 μl.
- Άμεση αποθήκευση σε θερμοκρασία Θ= -80° C.

Τιτλοδότηση καθαρισμένου αδενοϊού

- Προετοιμάστηκε καλλιέργεια κυττάρων 911 σε θρεπτικό μέσο DMEM με 10% FBS και 1% μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης σε καλλιεργητικά πιάτα 6 κελιών, έως ότου η πυκνότητα των κυττάρων προσέγγισε το 100%.
- Έγιναν διαδοχικές αραιώσεις του αδενοϊού σε 2% HTHS/PBS (Ca⁺⁺). Χρησιμοποιήθηκαν αραιώσεις του ιού της τάξης του 10⁻⁸, 10⁻⁹ και 10⁻¹⁰ σε συνολικό όγκο 1 ml.
- Το θρεπτικό μέσο απομακρύνθηκε από τις καλλιέργειες κυττάρων και προστέθηκαν 500μl από κάθε αραιώση αδενοϊού στις κυτταροκαλλιέργειες.
- Έγινε επώαση των κυττάρων 911 για 10 λεπτά σε θερμοκρασία Θ=37°C και 5% CO₂.
- Ακολούθησε ανάμιξη προθερμασμένου σε θερμοκρασία Θ=37° C 2% HTHS και προθερμασμένου σε θερμοκρασία Θ=42° C 2x άγαρ σε αναλογία 1:1 αμέσως μετά την ολοκλήρωση της επώασης.
- Αφαιρέθηκε το διάλυμα του ιού και έγινε άμεση προσθήκη μίγματος άγαρ-HTHS.
- Στερεοποίηση μίγματος με επώαση σε θερμοκρασία δωματίου.
- Επώαση σε θερμοκρασία Θ=37° C και 5% CO₂ για 10 ως 14 ημέρες.
- Μετά την πάροδο 10-14 ημερών παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο και μετρήθηκαν οι πλάκες μόλυνσης.
- Έγινε προσδιορισμός του τίτλου του αδενοϊού με βάση τον τύπο:

$$\text{Τίτλος ιού (pfu/ml)} = \frac{\text{Αριθμός μετρούμενων πλακών στη μέγιστη αραιώση}}{\text{10}^{\text{παράγοντας αραιώσης}}} \times$$

pfu = Plaque Forming Unit (μονάδα σχηματισμού πλάκας)

Μόλυνση κυτταρικής σειράς με ανασυνδυασμένους αδενοϊούς

- Προετοιμάστηκαν 2×10^6 κύτταρα HepG2 σε καλλιεργητικό δοχείο T-25, που περιείχε θρεπτικό μέσο DMEM με 5% ορό FBS και 1% μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης.
- Το θρεπτικό μέσο απομακρύνθηκε.
- Προστέθηκαν 3 ml θρεπτικού μέσου DMEM με 2% ορό HTS και 1% μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης.
- Έγινε προσθήκη 10 μολυσματικών μονάδων ιού ανά κύτταρο (multiplicity of infection, m.o.i.) στο θρεπτικό μέσο του καλλιεργητικού τριβλίου και ανάδευση. Οι ιοί που χρησιμοποιήθηκαν για επιμόλυνση ήταν οι εξής:
 - Ad-GFP.
 - Ad-RxR.
 - Ad-Ribozyme RxRa.
 - Ad-Smad7.
- Ακολούθησε επώαση σε κλίβανο θερμοκρασίας $\Theta=37^\circ \text{C}$ και 5% CO_2 για 8 ως 16 ώρες.
- Έγινε απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου και προσθήκη 3 ml DMEM με 10% ορό FBS και 1% μίγμα πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης. Στο στάδιο αυτό, επίσης, γίνεται προσθήκη οποιασδήποτε ουσίας της οποίας η επίδραση μελετάται. Συγκεκριμένα, στην παρούσα μελέτη προστέθηκε 9-cis-ρετινοϊκό οξύ, το οποίο αποτελεί το συνδέτη (ligand) του RxR, σε τελική συγκέντρωση 10^{-4} M , σε κύτταρα που είχαν επιμολυνθεί με αδενοϊό που κωδικοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα RxR.
- Έγινε επώαση σε κλίβανο θερμοκρασίας 37°C και 5% CO_2 για 48 ώρες.
- Συλλέχθηκαν κύτταρα για απομόνωση RNA.

Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (μέθοδος Western Blotting)

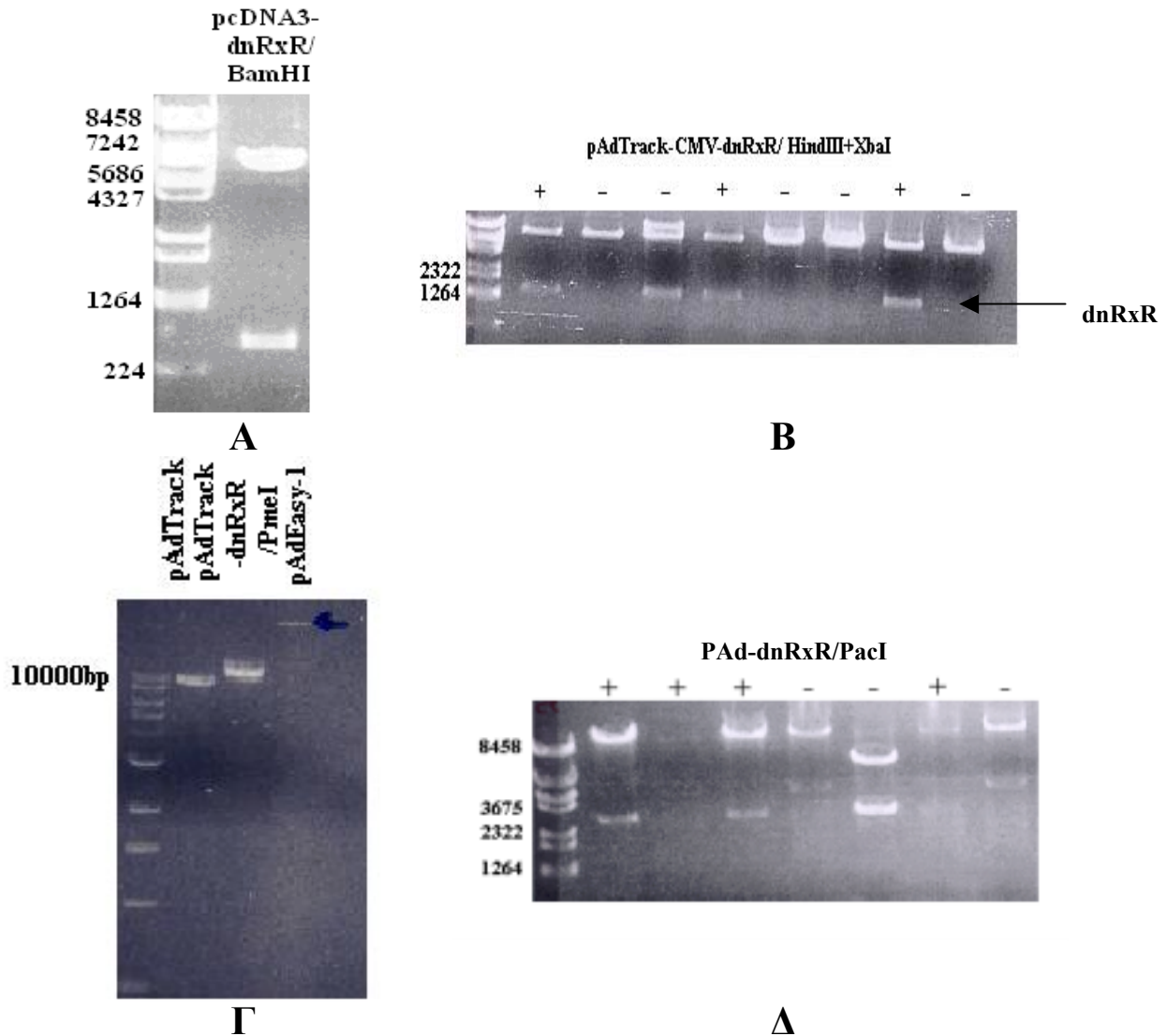
Το πλασμίδιο pAdTrack-CMV-dnRxRa χρησιμοποιήθηκε για επιμόλυνση κυττάρων 911 με σκοπό να διαπιστωθεί αν το ανασυνδυασμένο αυτό πλασμίδιο εκφράζεται σε ικανοποιητικό βαθμό. Επιπρόσθετα, τα κύτταρα επιμολύνθηκαν με το ικό πλασμίδιο pAd-RxRa και το πλασμίδιο pMT2-RxRa.

- Μετά την επιμόλυνση και τη συλλογή των κυττάρων έγινε απομόνωση κυτταρικού λύματος.
- Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση SDS σε πηκτική ακρυλαμίδης (SDS-PAGE).
- Οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν με ηλεκτρομεταφορά διάρκειας 3 ωρών και σε τάση $U=80V$ από την πηκτική ακρυλαμίδης σε μεμβράνη PVDF.
- Έγινε επώαση της μεμβράνης σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με διάλυμα κορεσμού (Blocking Buffer: TBS, 0,1% Tween-20, 5% γάλα, 0,5% BSA).
- Ακολούθησε επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με το 1^ο αντίσωμα (anti-RxRa sc-553, πολυκλωνικό αντίσωμα ειδικό για την πρωτεΐνη RxRa του ανθρώπου, που έχει συντεθεί σε κουνέλι) σε αραιώση 1:2500.
- Έγιναν τρεις εκπλύσεις διάρκειας 10 λεπτών με TBS+0,1% Tween-20.
- Ακολούθησε επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με το 2^ο αντίσωμα (anti-rabbit IgG-HRP, sc-2004) σε αραιώση 1:4000.
- Έγιναν τρεις εκπλύσεις διάρκειας 10 λεπτών με TBS+0,1% Tween-20.
- Επακολούθησε μία έκπλυση διάρκειας 10 λεπτών με TBS.
- Απομακρύνθηκε το υγρό από τη μεμβράνη PVDF.
- Έγινε εμφάνιση των πρωτεϊνών σε φιλμ αυτόραδιογραφίας με χρήση του αντιδραστηρίου ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL, RPN2109, Amersham Biosciences).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κατασκευή αδενοϊικού πλασμιδίου pAd-dnRxR που φέρει το γονίδιο για τη dominant negative μεταλλαγή του RxRa

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την επικρατούσα ανασταλτική μορφή (dominant negative) του RxRa [RxR(1-454)] απομονώθηκε μετά από πέψη του dnRxRa πλασμιδίου με περιοριστικά ένζυμα που αναγνωρίζουν τις θέσεις EcoRI και XbaI στα άκρα του γονιδίου. Το γονίδιο αυτό υποκλωνοποιήθηκε στις θέσεις EcoRI και XbaI του πολυσυνδέσμου (polylinker) του πλασμιδιακού φορέα pcDNA-III (εικόνα 11). Ο έλεγχος της ορθής ένθεσης του γονιδίου στο pcDNA-III έγινε με πέψη με το ένζυμο BamHI. Οι θετικοί κλώνοι μετά την πέψη έδωσαν μία ζώνη 6 kb, η οποία αντιστοιχεί στον ευθυγραμμισμένο φορέα και ένα μέρος του ενθέματος, και μία ζώνη 900 bp η οποία αντιστοιχεί στο υπόλοιπο μέρος του ενθέματος (εικόνα 12Α). Το γονίδιο dnRxR απομονώθηκε εκ νέου με πέψη του pcDNA-III με περιοριστικά ένζυμα που αναγνωρίζουν τις θέσεις HindIII και XbaI (εικόνα 11). Τα ένζυμα HindIII και XbaI χρησιμοποιήθηκαν, επίσης, για τη γραμμοποίηση του πλασμιδιακού φορέα pAdTrack-CMV(εικόνα 11). Το dnRxR γονίδιο ενετέθη στις θέσεις HindIII και XbaI του pAdTrack-CMV(εικόνα 11). Τα ένζυμα HindIII και XbaI χρησιμοποιήθηκαν για την αντίχνευση θετικών κλώνων που έφεραν το ένθεμα. Οι θετικοί κλώνοι έδωσαν ένα τμήμα 1500bp, που αντιστοιχεί στο ένθεμα, και ένα τμήμα περίπου 9200 bp που αντιστοιχεί στο γραμμικό pAdTrack-CMV (εικόνα 12B). Στη συνέχεια έγινε ομόλογος ανασυνδυασμός του πλασμιδίου pAdEasy-1 με το pAdTrack-CMV-dnRxR πλασμίδιο, το οποίο υπέστη πέψη με PmeI, προκειμένου να γραμμοποιηθεί(εικόνα11, εικόνα 12Γ). Ο ομόλογος ανασυνδυασμός έγινε σε κύτταρα E. coli BJ 5183, τα οποία υπεβλήθησαν σε συμματασηματισμό με ηλεκτρομεταφορά (electroporation). Ο έλεγχος ύπαρξης ανασυνδυασμένων φορέων pAd-dnRxR έγινε με πέψη με το περιοριστικό ένζυμο PacI. Το πρότυπο ηλεκτροφόρησης των θετικών κλώνων είναι χαρακτηριστικό. Οι θετικοί κλώνοι, μετά από πέψη με PacI, δίνουν ένα τμήμα 3 kb κι ένα τμήμα περίπου 41 kb (εικόνα 12Δ). Ο πλασμιδιακός φορέας απομονώθηκε και θα χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή υψηλού τίτλου αδενοϊών, οι οποίοι θα χρησιμοποιηθούν για μόλυνση κυττάρων ή πειραματοζώων (εικόνα 10).



Εικόνα 12: Α. Έλεγχος επιβεβαίωσης της ένθεσης του dnRxRα στον πλασμιδιακό φορέα pcDNA-III με πέψη με BamHI. Β. Έλεγχος ένθεσης του dnRxRα στο πλασμίδιο pAdTrack-CMV μετά από διπλή πέψη με HindIII και XbaI. Οι θετικοί κλώνοι δίνουν ένα τμήμα 1,5 kb (ένθεμα) και ένα τμήμα περίπου 9,2 kb (pAdTrack-CMV). Γ. Έλεγχος επιβεβαίωσης της ύπαρξης του ενθέματος dnRxRα στο πλασμίδιο pAdTrack-CMV και ταυτόχρονη σύγκριση με το ίδιο πλασμίδιο, που δεν περιέχει το ένθεμα και το πλασμίδιο pAdEasy-1 με το οποίο θα γίνει ομόλογος ανασυνδυασμός. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pAdTrack-CMV-dnRxR(3^η στήλη) έχει μεγαλύτερο μέγεθος και μειωμένη ηλεκτροφορητική κινητικότητα, σε σχέση με το αρχικό πλασμίδιο pAdTrack-CMV(2^η στήλη) και πολύ μικρότερο μέγεθος σε σύγκριση με το πλασμίδιο pAdEasy-1(4^η στήλη) Δ. Έλεγχος επιβεβαίωσης του ομόλογου ανασυνδυασμού που οδηγεί στην κατασκευή του πλασμιδίου pAd-dnRxRα, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για παραγωγή υψηλού τίτλου αδενοϊού. Οι θετικοί κλώνοι εμφανίζουν μια χαρακτηριστική ζώνη 3 kb (2^η, 3^η, 4^η και 7^η στήλη).

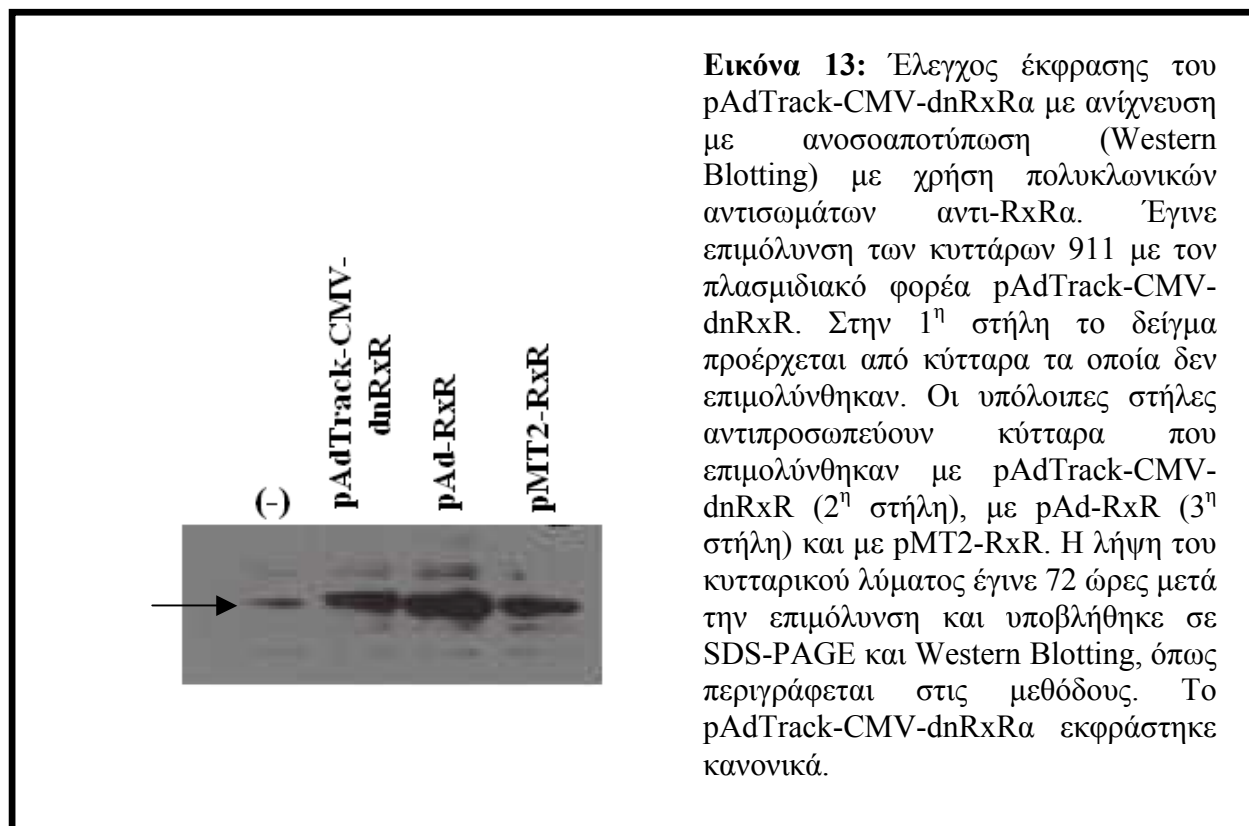
Έλεγχος της έκφρασης του γονιδίου dnRxRa σε κύτταρα 911

Κύτταρα 911 επιμολύνθηκαν με τα εξής πλασμίδια:

1. pAdTrack-CMV-dnRxR.
2. pAd-RxR.
3. pMT2-RxR
4. (-).

Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν μετά την πάροδο 72 ωρών σε μικροσκόπιο φθορισμού, ώστε να διαπιστωθεί η ποιότητα της επιμόλυνσης. Η εκτίμηση της ποιότητας επιμόλυνσης έγινε μέσω του προσδιορισμού του ποσοστού των κυττάρων που εξέφραζαν την πρωτεΐνη GFP, η οποία κωδικοποιείται από τα πλασμίδια pAdTrack-CMV-dnRxR και pAd-RxR. Διαπιστώθηκε ότι η ποιότητα της επιμόλυνσης ήταν πολύ καλή. Τα κύτταρα συλλέχτηκαν άμεσα και απομονώθηκε το κυτταρικό λύμα. Μετά από την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης 12% και την ηλεκτρομεταφορά σε μεμβράνη PVDF έγινε ανίχνευση των πρωτεϊνών RxR και dnRxR με χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων αντι-RxR (εικόνα 13).

Διαπιστώθηκε ότι το dnRxR εκφράζεται στα κύτταρα 911. Συνεπώς, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για παραγωγή λειτουργικών αδενοϊών, οι οποίοι θα χρησιμοποιηθούν για τη μεταφορά του εν λόγω γονιδίου σε κυτταρικές σειρές.



Εικόνα 13: Έλεγχος έκφρασης του pAdTrack-CMV-dnRxRa με ανίχνευση με ανοσοαποτύπωση (Western Blotting) με χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων αντι-RxRa. Έγινε επιμόλυνση των κυττάρων 911 με τον πλασμιδιακό φορέα pAdTrack-CMV-dnRxR. Στην 1^η στήλη το δείγμα προέρχεται από κύτταρα τα οποία δεν επιμολύνθηκαν. Οι υπόλοιπες στήλες αντιπροσωπεύουν κύτταρα που επιμολύνθηκαν με pAdTrack-CMV-dnRxR (2^η στήλη), με pAd-RxR (3^η στήλη) και με pMT2-RxR. Η λήψη του κυτταρικού λύματος έγινε 72 ώρες μετά την επιμόλυνση και υποβλήθηκε σε SDS-PAGE και Western Blotting, όπως περιγράφεται στις μεθόδους. Το pAdTrack-CMV-dnRxRa εκφράστηκε κανονικά.

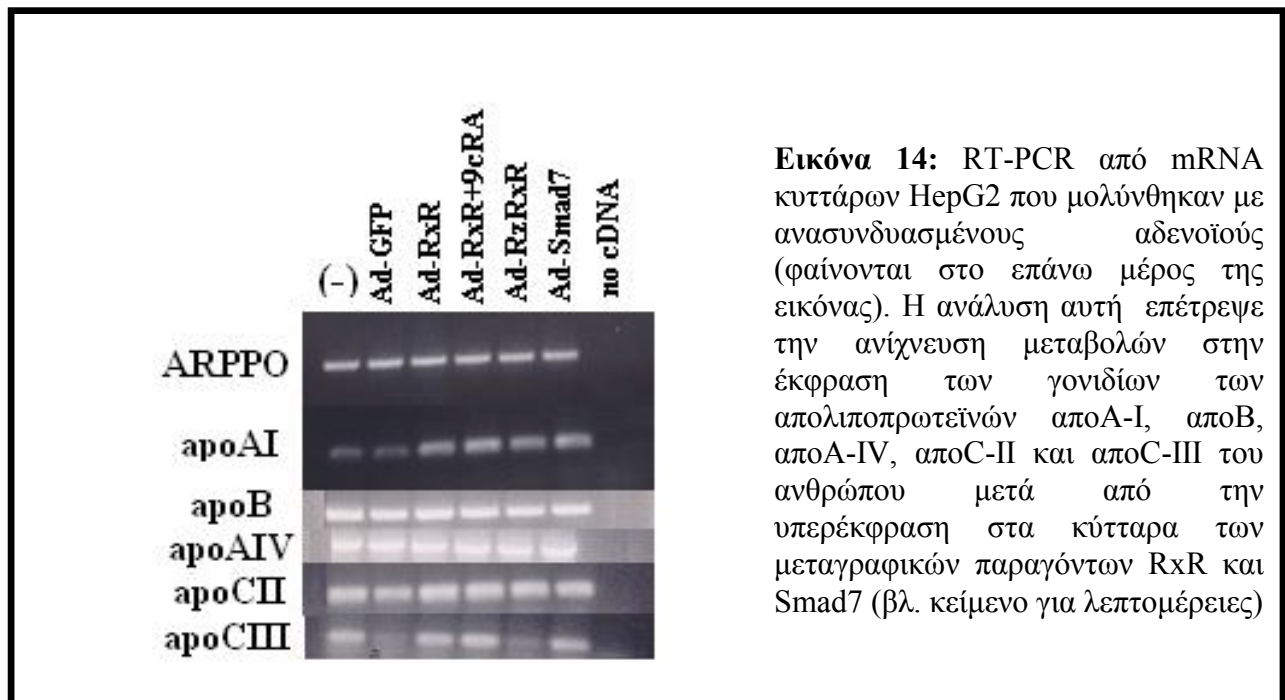
Έλεγχος της επίδρασης των πυρηνικών υποδοχέων και της Smad7 στην έκφραση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών του ανθρώπου

Κυτταρικές σειρές HepG2 μολύνθηκαν με ανασυνδυασμένους αδενοϊούς. Συγκεκριμένα, έγινε προσθήκη 10 μολυσματικών μονάδων ιού ανά κύτταρο (multiplicity of infection, m.o.i.). Οι αδενοϊοί που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

1. (-).
2. Ad-GFP.
3. Ad-RxR.
4. Ad-RxR+9-cis-ρετινοϊκό οξύ.
5. Ad-RzRxR (ριβοζυμικό RxR).
6. Ad-Smad7.

Τα κύτταρα συλλέχθηκαν μετά από πάροδο 48 ωρών και χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του RNA, όπως εξηγείται στις μεθόδους. Το απομονωμένο RNA χρησιμοποιήθηκε για αντίστροφη μεταγραφή. Το παραγόμενο cDNA αποτέλεσε υπόστρωμα για την αντίδραση PCR στην οποία ελέγχθηκε το επίπεδο έκφρασης των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών αποA-I, αποA-IV, αποB, αποC-II, και αποC-III. Για την εξομάλυνση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν primers που συντελούν στην ανίχνευση της έκφρασης του γονιδίου της όξινης ριβοσωμικής φωσφοπρωτεΐνης ARPPPO. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 14.

Διαπιστώθηκε ότι μετά τη μόλυνση με τον αδενοϊό που φέρει το γονίδιο για τον πυρηνικό υποδοχέα RxR παρατηρείται εμφανής αύξηση της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις απολιποπρωτεΐνες αποA-I και αποC-III, συγκριτικά με το αντίστοιχο επίπεδο έκφρασης των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών των κυττάρων που μολύνθηκαν με Ad-GFP.



Εικόνα 14: RT-PCR από mRNA κυττάρων HepG2 που μολύνθηκαν με ανασυνδυασμένους αδενοϊούς (φαίνονται στο επάνω μέρος της εικόνας). Η ανάλυση αυτή επέτρεψε την ανίχνευση μεταβολών στην έκφραση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών αποA-I, αποB, αποA-IV, αποC-II και αποC-III του ανθρώπου μετά από την υπερέκφραση στα κύτταρα των μεταγραφικών παραγόντων RxR και Smad7 (βλ. κείμενο για λεπτομέρειες)

Επίσης, παρατηρείται μικρή αύξηση στην έκφραση του γονιδίου της απολιποπρωτεΐνης αποC-II. Ο RxR δεν φαίνεται να μεταβάλλει τα επίπεδα των απολιποπρωτεϊνών αποB και αποA-IV.

Η χρήση του 9-cis-ρετινοϊκού οξέος, το οποίο είναι ο συνδέτης του RxRa, 16 ώρες μετά τη μόλυνση με τον αδενοϊό που εκφράζει τον RxRa, φαίνεται να ενεργοποιεί το RxRa και να αυξάνει την έκφραση της αποA-I και σε μικρότερο βαθμό της αποC-III. Αντίθετα, η έκφραση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών αποB, αποA-IV και αποC-II δεν φαίνεται να επηρεάζεται από το συνδυασμό του RxRa και του 9-cis-ρετινοϊκού οξέος.

Η μόλυνση με αδενοϊό Ad-RzRxR φαίνεται να προκαλεί αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της αποA-I, σε σύγκριση με το επίπεδο έκφρασης στο δείγμα ελέγχου (Ad-GFP). Η αύξηση αυτή ωστόσο είναι μικρότερη σε σύγκριση με την αντίστοιχη αύξηση που παρατηρείται στα δείγματα στα οποία έγινε μόλυνση με Ad-RxR και Ad-RxR+9-cis-ρετινοϊκό οξύ. Το RzRxR φαίνεται να μη μεταβάλλει καθόλου την έκφραση του γονιδίου της απολιποπρωτεΐνης αποC-III, σε σχέση με το δείγμα ελέγχου Ad-GFP. Ωστόσο, η έκφραση του γονιδίου της αποC-III του δείγματος ελέγχου φαίνεται αισθητά μειωμένη σε σχέση με το δείγμα (-) στο οποίο δεν έχει γίνει μόλυνση.

Η μόλυνση με αδενοϊό που εκφράζει τη Smad7 ποικίλει. Πιο συγκεκριμένα, η Smad7 φαίνεται να αυξάνει την έκφραση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών αποA-I και αποC-III, ενώ δεν φαίνεται να προκαλεί καμμία μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών αποA-IV, αποB και αποC-II.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κύριοι στόχοι της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση των μηχανισμών που ενεργοποιούν ή αναστέλλουν επιλεκτικά την έκφραση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών καθώς και άλλων γονιδίων, των οποίων η έκφραση έχει σχέση με την ομοιόσταση των λιπιδίων.

Για το σκοπό αυτό έγινε γονιδιακή μεταφορά μέσω αδενοϊών σε κύτταρα HepG2. Συγκεκριμένα έγινε μεταφορά γονιδίων μεταγραφικών παραγόντων στα κύτταρα HepG2 ώστε να μελετηθεί η μεταβολή που προκαλείται στο επίπεδο του mRNA των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών, που αποτελούν τα γονίδια στόχους των εν λόγω παραγόντων. Η μεταφορά των γονιδίων έγινε με ανασυνδυασμένους αδενοϊούς που εκφράζουν μεταγραφικούς παράγοντες. Είναι γνωστό από προηγούμενες μελέτες ότι οι παράγοντες αυτοί επηρεάζουν τη μεταγραφή ορισμένων από τα γονίδια στόχους. Εκτός, όμως, από τους κανονικούς μεταγραφικούς παράγοντες χρησιμοποιήθηκαν και τροποποιημένες μορφές των μεταγραφικών παραγόντων. Μία τροποποιημένη μορφή που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν το αντικωδικό ριβοενζυμικό RxRa (RzRxRa). Η τροποποιημένη αυτή μορφή έχει σχεδιαστεί με τέτοιο τρόπο ώστε να προσδέεται στο φυσιολογικό mRNA, δηλαδή το mRNA που κωδικοποιεί τη φυσιολογική μορφή του μεταγραφικού παράγοντα RxRa και να καταλύει τη διάσπασή του ελαττώνοντας, μ' αυτό τον τρόπο, τη συγκέντρωσή του στα κύτταρα (82).

Αν ο υπό μελέτη ενδογενής παράγοντας, που στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι ο RxRa, αυξάνει την έκφραση των γονιδίων στόχων στα κύτταρα HepG2 τότε η προσθήκη μέσω γονιδιακής μεταφοράς μιας ανασταλτικής μορφής του εν λόγω μεταγραφικού παράγοντα θα προκαλέσει ελάττωση του mRNA και της πρωτεΐνης. Η αναστολή της δράσης ενός συγκεκριμένου μεταγραφικού παράγοντα και η μελέτη της επίδρασης που έχει αυτή η αναστολή στην έκφραση των μελετώμενων γονιδίων αποτελεί καλύτερη πειραματική προσέγγιση από την επιμόλυνση κυττάρων με τη φυσιολογική μορφή αυτού του μεταγραφικού παράγοντα. Ο λόγος για τον οποίο συμβαίνει αυτό είναι ότι όταν ένας μεταγραφικός παράγοντας, υπό φυσιολογικές συνθήκες, υπάρχει σε υψηλή συγκέντρωση στο κύτταρο η υπερέκφρασή του δεν θα προκαλέσει σημαντική διαφορά στο βαθμό ενεργοποίησης του υποκινητή και κατ' επέκταση στη μεταγραφή του γονιδίου στόχου. Αντίθετα, η χρήση μιας επικρατούσας ανασταλτικής μορφής (dominant negative) ενός μεταγραφικού παράγοντα αναμένεται να προκαλεί σημαντική μείωση της μεταγραφής του γονιδίου στόχου.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ανασυνδυασμένοι αδενοϊοί για τη μεταφορά φυσιολογικών και ανασταλτικών μορφών των μεταγραφικών παραγόντων που μελετήθηκαν. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν οι μεταγραφικοί

παράγοντες RxRa, ριβοενζυμικό RxRa και Smad7. Οι ανασυνδυασμένοι αδενοϊοί κατασκευάστηκαν με χρήση του συστήματος AdEasy-1 (79). Στο σύστημα αυτό ο ανασυνδυασμένος ιός παρήχθη με μετασχηματισμό βακτηρίων BJ5183 με το πλασμίδιο pAdTrack-CMV που περιέχει το υπό μεταφορά γονίδιο και το πλασμίδιο pAdEasy-1, που περιέχει τις συμπληρωματικές αλληλουχίες, που απαιτούνται για την ανάπτυξη του αδενοϊού (εικόνα 10)(79). Οι πλασμιδιακές κατασκευές των ανασυνδυασμένων αδενοϊών περιέχουν και το γονίδιο της φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP, ώστε να είναι δυνατή η παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού της έκφρασης του ανασυνδυασμένου αδενοϊού.

Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HepG2 τα οποία μολύνθηκαν με ανασυνδυασμένους αδενοϊούς που περιείχαν το γονίδιο RxRa (Ad-RxRa), το γονίδιο Rz-RxRa (αντικωδικό ριβοενζυμικό RxRa) (Ad-RzRxRa) και το γονίδιο Smad7 (Ad-Smad7). Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τα οποία μολύνθηκαν με αδενοϊό που έφερε μόνο το γονίδιο της GFP (Ad-GFP). Ταυτόχρονα, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τα οποία μολύνθηκαν με Ad-RxRa και στα οποία χορηγήθηκε 9-cis-ρετινοϊκό οξύ (9cRA), το οποίο είναι ο συνδέτης του RxRa, μία ημέρα μετά την αρχική μόλυνση. Η πολλαπλότητα μόλυνσης (multiplicity of infection, m.o.i) που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις ήταν 10 (10 ιοί ανά κύτταρο HepG2). Η εξέλιξη της μόλυνσης των κυττάρων παρατηρήθηκε με μικροσκόπιο φθορισμού και ήταν 100% των καλλιεργούμενων κυττάρων. Τα μολυσμένα κύτταρα συλλέχθηκαν μετά από 48 ώρες και απομονώθηκε το RNA τους.

Το RNA, που απομονώθηκε από τα κύτταρα που μολύνθηκαν με ανασυνδυασμένους αδενοϊούς, χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για τη σύνθεση cDNA με αντίστροφη μεταγραφή. Το cDNA που συντέθηκε εξετάστηκε με PCR για την έκφραση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών αποA-I, αποA-IV, αποB, αποC-II και αποC-III (εικόνα 14).

Διαπιστώθηκε ότι ο RxRa αυξάνει σημαντικά την έκφραση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών αποA-I και αποC-III, ενώ η έκφραση του γονιδίου της αποC-II αυξάνει λιγότερο. Αντίθετα, η έκφραση των γονιδίων αποB και αποA-IV δεν φαίνεται να επηρεάζεται από το μεταγραφικό παράγοντα RxRa. Η προσθήκη του 9cRA σε κύτταρα που είχαν μολυνθεί με Ad-RxRa φαίνεται να επάγει ελαφρά την έκφραση των γονιδίων αποA-I και αποC-III, ενώ δεν φαίνεται να προκαλεί αντίστοιχη αύξηση στην έκφραση των γονιδίων αποA-IV, αποB και αποC-II. Το RzRxRa φαίνεται να προκαλεί χαμηλή αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της αποA-I, σε σύγκριση με το επίπεδο έκφρασης στο δείγμα ελέγχου (Ad-GFP). Τα πειράματα με το RzRxR είναι δύσκολο να ερμηνευθούν και χρειάζεται να επαναληφθούν με διάφορες συγκεντρώσεις ανασυνδυασμένου αδενοϊού. Επίσης, η έκφραση του γονιδίου της αποC-III του δείγματος ελέγχου φαίνεται αισθητά μειωμένη σε σχέση με το δείγμα (-) στο οποίο δεν έχει γίνει μόλυνση. Γι' αυτό το

λόγο και αυτό το πείραμα χρειάζεται να επαναληφθεί. Τέλος, η επίδραση της Smad7 διαφοροποιείται ανάλογα με την περίπτωση. Η Smad7 φαίνεται να αυξάνει την έκφραση των γονιδίων των αποΑ-I και αποC-III, ενώ δεν φαίνεται να μεταβάλει την έκφραση των αποΑ-IV, αποB και αποC-II. Όπως αναφέρθηκε πολλά από τα παραπάνω αποτελέσματα χρειάζεται να επιβεβαιωθούν με πρόσθετα *in vitro* και *in vivo* πειράματα, προτού εξαχθούν τα οριστικά συμπεράσματα. Η αύξηση της έκφρασης των γονιδίων της αποΑ-I και της αποC-III μέσω του R α Rα και του συνδέτη του παρουσιάζει ενδιαφέρον. Η αρχική αύξηση λόγω του συνδέτη του R α Rα (9cRA) πιθανόν να οφείλεται σε ενεργοποίηση του ενδογενούς R α Rα. Το γεγονός ότι η μόλυνση με αδενοϊό που εκφράζει το R α Rα δεν έχει σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τα κύτταρα τα οποία έχουν μολυνθεί με R α Rα και έχει προστεθεί και 9cRA είναι πιθανό, υπό τις συνθήκες του πειράματος, να οφείλεται στο ότι η συγκέντρωση του ενδογενούς 9cRA να επαρκεί για την ενεργοποίηση της αποΑ-I και αποC-III.

Η παρατηρηθείσα αύξηση στη μεταγραφή των γονιδίων αποΑ-I και αποC-III μέσω του R α Rα, παρουσία του 9cRA, είναι συμβατή με προηγούμενες *in vitro* και *in vivo* μελέτες (15, 83, 84). Επιπρόσθετες ενδείξεις για την εξαγωγή βέβαιων συμπερασμάτων, σχετικά με την επίδραση του R α Rα στη γονιδιακή ρύθμιση της αποΑ-I και της αποC-III, θα είναι δυνατό να ληφθούν με πειράματα στα οποία θα γίνει μόλυνση κυττάρων με αδενοϊούς που εκφράζουν την επικρατούσα ανασταλτική μορφή (dominant negative) του R α Rα. Η πλασμιδιακή κατασκευή για την παραγωγή αυτών των αδενοϊών ολοκληρώθηκε στη διάρκεια της παρούσας μελέτης (εικόνα 11, εικόνα 12).

Παλαιότερες μελέτες που αφορούν στον υποκινητή του γονιδίου της αποC-III έχουν επιβεβαιώσει την ύπαρξη ενός HRE στο ρυθμιστικό στοιχείο B (εικόνα 8). Σε αυτό το HRE είναι δυνατό να προσδεθούν ισχυρά τόσο ο HNF-4 όσο και άλλοι ορφανοί και εξαρτώμενοι από συνδέτες πυρηνικοί υποδοχείς (εικόνα 8) (83, 85, 86). Επιπρόσθετα, ο ενισχυτής της αποC-III περιέχει ένα HRE (I₄) (εικόνα 8) τα οποία μπορούν να προσδέσουν τον HNF-4 και άλλους ορφανούς ή εξαρτώμενους από συνδέτες πυρηνικούς υποδοχείς, όπως είναι τα ομοδιμερή του R α Rα και τα ετεροδιμερή του R α Rα με ένα μόριο εκ των RAR α , T₃R β και PPAR α (83, 85). Στις ίδιες μελέτες διαπιστώθηκε ότι η δραστηριότητα του υποκινητή και τα επίπεδα του mRNA του γονιδίου της αποC-III σε κύτταρα HepG2 είναι αυξημένα παρουσία του συνδέτη του R α Rα.

Παρόμοια συμπεράσματα έχουν εξαχθεί από αντίστοιχες μελέτες που έγιναν στον υποκινητή του γονιδίου της αποΑ-I, ο οποίος περιέχει δύο ρυθμιστικά στοιχεία HREs (B και D) (εικόνα 7) που προσδένουν τον HNF-4 και άλλα μέλη της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων (87, 88). Παρεμπόδιση της πρόσδεσης των πυρηνικών υποδοχέων σε αυτά τα HREs μειώνει τη δραστηριότητα του υποκινητή περίπου κατά 95% (88) σε κύτταρα HepG2. Η δραστηριότητα του υποκινητή του

γονιδίου της αποΑ-I αυξάνεται δραματικά παρουσία του ενισχυτή απόC-III, ο οποίος είναι κοινός για όλο το γονιδιακό σύμπλεγμα αποΑ-I/αποC-III/αποΑ-IV. Η δράση του ενισχυτή μειώνεται σημαντικά όταν μεταλλαχθούν τα HREs του B και D υποκινητή της αποΑ-I.

Παράλληλα, μελέτες που έγιναν σε διαγονιδιακά ποντίκια έδειξαν ότι η περιοχή πρόσδεσης του HNF-4 στον ενισχυτή του γονιδίου αποC-III που αποτελεί και περιοχή πρόσδεσης των ετεροδιμερών του RxRa με άλλους πυρηνικούς υποδοχείς απαιτούνται για την έκφραση των γονιδίων αποΑ-I και αποC-III στο έντερο. Επιπρόσθετα, η πρόσδεση του HNF-4 στον ενισχυτή του γονιδίου αποC-III πολλαπλασιάζει την έκφραση των γονιδίων της αποΑ-I και αποC-III στο ήπαρ. Παράλληλα, σε ποντίκια που έχει καταστραφεί το γονίδιο του HNF-4 (HNF-4^{-/-}) με ομόλογο ανασυνδυασμό έχει δείχθει ότι χάνεται η έκφραση των γονιδίων του συμπλέγματος αποΑ-I/αποC-III/αποΑ-IV (89).

Οι παραπάνω παρατηρήσεις δείχνουν τη μεγάλη σημασία των πυρηνικών υποδοχέων, όπως ο HNF-4 και ο RxRa, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, στην αύξηση της έκφρασης των γονιδίων των αποΑ-I και αποC-III. Διαπιστώθηκε ότι ο RxRa αυξάνει την έκφραση των γονιδίων αποΑ-I και αποC-III.

Επιπρόσθετα, *in vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως είναι ο TNFα και η ιντερλευκίνη-1 καταστέλλουν τη δράση του υποκινητή του γονιδίου αποC-III. Αντίθετα, ο TGFβ αυξάνει τη δράση του υποκινητή. Επίσης, οι μεταγραφικοί παράγοντες ATF-2 και Jun καταστέλλουν τη δράση του υποκινητή αποC-III. Βρέθηκε ότι τα μόρια που λειτουργούν κατασταλτικά αλληλεπιδρούν με τον HNF-4 και παρεμποδίζουν τη δράση του. Ο TGFβ, αντίθετα, ενεργοποιεί τις Smad3/Smad4, οι οποίες αλληλεπιδρούν με μόρια HNF-4 που είναι συνδεδεμένα στον υποκινητή και ενισχύουν τη δράση του, αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο την έκφραση του γονιδίου της αποC-III (53).

Έχει δείχθει ότι η πρωτεΐνη Smad6 και η Smad7, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, αλληλεπιδρούν με τον ενεργοποιημένο υποδοχέα του TGFβ (T_βRI). Με αυτό τον τρόπο παρεμποδίζουν την πρόσδεση και την ενεργοποίηση των Smad3/Smad4 και αναστέλλεται η μετάδοση του σήματος του TGFβ (53). Στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε ότι η Smad7 συνετέλεσε σε αύξηση της έκφρασης των γονιδίων της αποΑ-I, ενώ, παράλληλα, δεν προκάλεσε μεταβολή στα επίπεδα της έκφρασης των αποΑ-IV, αποB και αποC-II. Η έκφραση της αποC-III με επίδραση της Smad7 φαίνεται να είναι χαμηλότερη από την αντίστοιχη έκφραση της αποC-III των κυττάρων που δεν μολύνθηκαν με κανένα ιό. Εντούτοις, το δείγμα ελέγχου (κύτταρα που μολύνθηκαν με ιούς που εκφράζουν GFP) παρουσιάζει μειωμένη έκφραση του αποC-III σε σχέση με αυτή των κυττάρων που δεν μολύνθηκαν. Αυτό δεν ισχύει για τα γονίδια αποΑ-I, αποΑ-IV, αποB και αποC-II. Αναμφίβολα είναι αναγκαία η επιβεβαίωση των πειραμάτων για την εξαγωγή των συμπερασμάτων.

Η γνώση που θα προκύψει από μελλοντικές επιστημονικές μελέτες αναμένεται να βοηθήσει στην κατασκευή νέων φαρμάκων που επηρεάζουν την έκφραση της apoA-I και άλλων γονιδίων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση και τον καταβολισμό της HDL. Τέτοιου είδους φάρμακα μπορεί να είναι αγωνιστές ή ανταγωνιστές πυρηνικών υποδοχέων, που σύμφωνα με τις παρατηρήσεις μας και προηγούμενες μελέτες, παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των γονιδίων που ελέγχουν τη βιοσύνθεση και τον καταβολισμό των λιποπρωτεϊνών.

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. **Zannis V.I. et al** (1985) *Advances in Human Genetics*, Vol. 14 (H. Harris and K. Hirschhorn, eds) Plenum Press, New York, pp. 125-215, 383-386.
2. **Smith L.C. et al** (1978) *Annu. Rev Biochem.*, 47:751-778.
3. **Breslow J.L.** (1988) *Physiol. Rev.* 68:85-132.
4. **Havel R.J. et al** (1982) *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (J.B. Stanbury, J.B. Wyngaarden, D.S. Fredrickson, J.L. Goldstein, and M.D. Brown, eds), McGraw-Hill, New York, pp. 1129-1138.
5. **Alaupovic P.** (1971) *Protides of Biological Fluids* (H. Peeters, ed), Pergamon Press, Oxford, pp. 9-20.
6. **Herbert P.N. et al** (1982) *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (J.B. Stanbury, J.B. Wyngaarden, D.S. Fredrickson, J.L. Goldstein, and M.D. Brown, eds), McGraw-Hill, New York, pp. 589-651.
7. **Cheung M.C. et al** (1984) *J. Biol. Chem.*, 259: 12201-12209.
8. **Hoeg J.M. et al** (1986) *J. Biol. Chem.*, 261: 3911-3914.
9. **Zannis et al** (1986) *J. Biol. Chem.*, 261: 13415-13421.
10. **Hoeg J.M. et al** (1988) *J. Lipid. Res.*, 29: 1215-1220.
11. **Beg Z.H. et al** (1989) *J. Biol. Chem.*, 264:6913-6921.
12. **Hussain M.M et al** (1990) *Biochemistry*, 29: 209-217.
13. **Chawla A. et al** (2001) *Science*, 294: 1866-1870.
14. **Strobl W. et al** (1992) *Atherosclerosis*, 97(2-3): 161-170.
15. **Vu-Dac N. et al** (1998) *J. Clin. Invest.*, 102: 625-632
16. **Zannis V. et al** (2001) *Vascular Endothelium-Source and Target of Inflammatory Mediators*, (J.D. Catravas et al, eds) IOS Press, pp: 42-86.
17. **Nilsson-Ehle P. et al** (1980) *Annu. Rev. Biochem.*, 49: 667-693.
18. **Stalenhoef A.F. et al** (1981) *Metabolism: Clinical and Experimental*, 30: 919-926.
19. **Ostlund-Lindqvist A.M.** (1979) *Biochem. J.*, 179: 555-559.
20. **Zannis V.I. et al** (1985) *Advances in Human Genetics*, Vol. 21 (H. Harris and K. Hirschhorn, eds) Plenum Press, New York, pp. 145-319.
21. **Breckenridge W.C. et al** (1982) *Atherosclerosis*, 45: 161-179.
22. **Connely F.W. et al** (1990) *Arteriosclerosis*, 10: 40-48.
23. **Glomset J.A.** (1968) *J. Lipid Res.*, 9:155-167.
24. **Fielding C.J. et al** (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 46: 1943-1949.
25. **Steinmetz A. et al** (1985) *J. Biol. Chem.*, 260: 2258-2264.
26. **Chen C.H. et al** (1985) *Biochim. Biophys. Acta*, 836: 279-285.
27. **Albers J.J. et al** (1984) *Arteriosclerosis*, 4: 49-58.

28. **Pattnaik N.M. et al** (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, 530: 428-438.
29. **Barter P.J. et al** (1980), *J. Lipid Res.*, 21: 238-249.
30. **Dag J.R. et al** (1994), *J. Biol. Chem.*, 269: 9388-9391.
31. **Goldstein J.L. et al** (1977), *Annu. Rev. Biochem.*, 46: 897-930.
32. **Orsi L. et al** (1978) *Exp. Cell Res*, 113: 1-13.
33. **Beisiegel U. et al** (1989) *Nature*, 341: 162-164.
34. **Niemeier A. et al** (1996) *J. Lipid. Res.*, 37:1733-1742.
35. **Kim D.H. et al** (1996) *J. Biol. Chem.*, 271: 8373-8380.
36. **Krieger M et al** (1994) *Annu. Rev. Biochem.*, 63: 601-637.
37. **Greaves D.R. et al** (1998) *Curr. Opin. Lipidol.*, 9: 425-432.
38. **Brewer Jr. H.B. et al** (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 80: 623-630.
39. **Li W.H. et al** (1988) *J. Lipid. Res.*, 29: 245-271.
40. **Fukushima D. et al** (1979) *J. Am. Chem. Soc.*, 101: 3703-3704.
41. **Segrest J.P. et al** (1974) *FEBS Lett.* 38: 247-253.
42. **Zannis V.I. et al** (1985) *Biochemistry*, 24: 4450-4455.
43. **Lenich C. et al** (1988) *J. Lipid. Res.*, 29:755-764.
44. **Lin R.C.** (1988) *Metabolism: Clinical and Experimental*, 37: 745-751.
45. **Sorci-Thomas M. et al** (1989) *J. Lipid Res.*, 30: 1397-1403.
46. **Edelstein C. et al** (1983) *J. Biol. Chem.*, 258: 11430-1433.
47. **Kilsdonk E.P.C. et al** (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, 1045: 205-212.
48. **Makrides S.C. et al** (1988) *Eur. J. Biochem.*, 173: 465-471.
49. **Karathanassis S.K. et al** (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 6147-6151.
50. **Shoulders C.C. et al** (1983) *Nucleic. Acids. Res.*, 11:2827-2837.
51. **Cheung P. et al** (1984) *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 508-511.
52. **Liu T.** (2002), Dissertation, Department of Chemistry, Graduate School of Arts and Science, Whitaker Cardiovascular Institute, School of Medicine, Boston University.
53. **Zannis V.I. et al** (2001) *Current Opinion in Lipidology*, 12:181-207.
54. **Fielding C.J. et al** (1990) *Advances in Cholesterol Research* (M. Esfahani and J.B.Swaney, eds.), Telford Press, New Jersey, pp. 271-314.
55. **Fielding C.J. et al** (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:3911-3914.
56. **Shulman R.S. et al** (1974) *J. Biol. Chem.*, 249: 4969-4974.
57. **Sparrow J.T. et al** (1982) *Crit. Rev. Biochem.*, 13
58. **Brown W.V. et al** (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 46: 375-382.
59. **Kowal R.C. et al** (1990) *J. Biol. Chem.*, 265: 10771-10779.
60. **Quartford S.H. et al** (1982) *J. Biol. Chem.*, 257: 14642-14647.
61. **Ito Y. et al** (1990) *Science*, 249: 790-793.
62. **Karathanasis S.K. et al** (1983) *Nature*, 304: 371-373.
63. **Karathanasis S.K. et al** (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 6374-6378.

64. **Ogami K. et al** (1990) *J. Biol. Chem.*, 265: 9808-9815.
65. **Talianidis I. et al** (1995) *Biochemistry*, 34: 10298-10309.
66. **Lavrentiadou S.N. et al** (1998) *Biochemistry*, 38: 964-975.
67. **Ladias J.A.A. et al** (1992) *J. Biol. Chem.*, 267: 15849-15860.
68. **Lacorte J.M et al** (1997) *J. Biol. Chem.*, 272: 23578-23584.
69. **Ferreira S. et al** (2000) *Experimental Neurology*, 166: 415-421.
70. **Bourguet W. et al** (2000) *TiPS*, 21: 381-388.
71. **McKenna et al** (2002) *Cell*, 108: 465-474.
72. **Mangelsdorf D.J. et al** (1995) *Cell*, 83:841-850.
73. **Wrana J.L. et al** (1994) *Nature*, 370: 341-347.
74. **Kretzschmar M. et al** (1998) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 8: 103-111.
75. **Labbe E. et al** (1998) *Mol. Cell*, 2: 109-120.
76. **Massague J.** (1998) *Annu. Rev. Biochem.*, 67: 753-791.
77. **Nakao A. et al** (1997) *Nature*, 389: 631-635.
78. **Hayashi H. et al** (1997) *Cell*, 89: 1165-1173.
79. **He et al** (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 2509-2514.
80. **Wetterau J.R. et al** (1992) *Science*, 258: 999-1001.
81. **Laccotripe M et al** (1997) *J. Biol. Chem.*, 272: 17511-17522.
82. **Foster A.C. et al** (1987) *Cell*, 24:211-220.
83. **Lavrentiadou S.N. et al** (1999) *Biochemistry*, 38: 964-975.
84. **Kan H.Y. et al** (2000) *J. Biol. Chem.*, 275: 30423-30431.
85. **Talianidis I et al** (1995) *Biochemistry*, 34: 10298-10309.
86. **Ktistaki E. et al** (1994) *Nucl. Acids Res.*, 22: 4689-4696.
87. **Papazafiri P. et al** (1991) *J. Biol. Chem.*, 266: 5790-5797.
88. **Tzamelis I. et al** (1996) *J. Biol. Chem.*, 271: 8402-8415.
89. **Li J. et al** (2000) *Genes Dev.*, 14: 464-474.