



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Πρωτεωμική προσέγγιση στην ανάλυση ρυθμιστικών
σηματοδοτικών πορειών: ερυθροειδικοί μεταγραφικοί
παράγοντες.**

**ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2013



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Πρωτεωμική προσέγγιση στην ανάλυση ρυθμιστικών
σηματοδοτικών πορειών: ερυθροειδικοί μεταγραφικοί
παράγοντες.**

**ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2013

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Πρωτεύουσα προσέγγιση στη ανάλυση ρυθμιστικών σηματοδοτικών πορειών:
ερυθροειδικοί μεταγραφικοί παράγοντες.

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ

A.M.: 62538

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Καθηγήτρια Αθανασία Σιαφάκα – Καπάδαη – Καθηγήτρια

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

Αθανασία Σιαφάκα – Καπάδαη – Καθηγήτρια

Ιωάννης Στρουμπούλης – Ερευνητής Β'

Μαίρη Μαυρή – Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αθανασία Σιαφάκα – Καπάδαη – Καθηγήτρια

Ιωάννης Στρουμπούλης – Ερευνητής Β'

Μαίρη Μαυρή – Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Γεώργιος Παναγώτου – Ερευνητής Α

Κωνσταντίνος Δημόπουλος – Καθηγητής

Βασιλική Αλεπόρου – Μαρίνου – Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη - Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

20/06/2013

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός νέων πρωτεϊνικών συμπλόκων του ερυθροποιητικού μεταγραφικού παράγοντα GATA-1, μέσω της εφαρμογής της μεθόδου *in vivo* βιοτινυλίωσης σε σύζευξη με φασματομετρία μάζας. Προκειμένου να γίνει ο χαρακτηρισμός των νέων πρωτεϊνικών συμπλόκων, βελτιώσαμε τη μέθοδο της *in vivo* βιοτινυλίωσης η οποία περιλαμβάνει την ομοιοπολική πρόσδεση βιοτίνης σε μια βραχεία αμινοξική αλληλουχία (15-23 αα) συζευγμένη με την υπό μελέτη πρωτεΐνη και την μετέπειτα κατακρήμνιση της βιοτινυλιωμένης πρωτεΐνης από σφαιρίδια στρεπταβιδίνης. Η βελτιωμένη μέθοδος οδήγησε στην ταυτοποίηση νέων αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών με τη GATA-1 όπως και ένα αριθμό πρωτεϊνών που κατακρημνίζονται μη ειδικά εξαιτίας της ύπαρξης νουκλεϊκών οξέων στα πυρηνικά εκχυλίσματα και οι οποίες είναι ικανές να οδηγήσουν στη ταυτοποίηση ψευδών θετικών αλληλεπιδράσεων. Ως ένα τέτοιο παράδειγμα ψευδούς θετικής αλληλεπίδρασης, παρουσιάζεται η αλληλεπίδραση της GATA-1 με τις πρωτεΐνες TAF, ενώ παρουσιάζονται και αποτελέσματα που δείχνουν ότι η χρήση ειδικών νουκλεασών για την διάσπαση των νουκλεϊκών οξέων σε πυρηνικά εκχυλίσματα μειώνει αισθητά τις μη ειδικές πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Επίσης, από τα αποτελέσματα της φασματομετρίας μάζας αναγνωρίστηκε η DNA μεθυλοτρανσφεράση I ως αλληλεπιδρώσα με τη GATA-1 πρωτεΐνη μαζί με τους μεταγραφικούς παράγοντες ZBP-89 και ZNF143. Η ύπαρξη του συγκεκριμένου συμπλόκου επιβεβαιώθηκε από σειρά πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης. Με τη χρήση απαλειπτικών μεταλλάξεων της DNMT-1 βρέθηκε η περιοχή PBD ως υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με το σύμπλοκο GATA-1/ZBP-89/ZNF143. Ο χαρακτηρισμός της περιοχής που είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση επιτρέπει τη διατάραξη του πρωτεϊνικού συμπλόκου με σκοπό τη διασαφήνιση της λειτουργικής σημασίας του πρωτεϊνικού συμπλόκου και του σκοπού που επιτελεί στην ερυθροποίηση.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Ερυθροποίηση

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: *in vivo* βιοτινυλίωση, μεταγραφικοί παράγοντες, πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, φασματομετρία μάζας.

ABSTRACT

GATA-1 is a key hematopoietic transcription factor that is required for erythrocyte differentiation. GATA-1 can positively or negatively regulate erythroid genes through its ability to form multiple protein complexes. In this thesis we sought to discover new GATA-1 protein complexes by using improved *in vivo* biotinylation tagging coupled to mass spectrometry. *In vivo* biotinylation involves the covalent attachment of a biotin group to a small peptide tag (15-23 aa) fused to the protein of interest, by the bacterial biotin ligase BirA and the very high affinity binding of the biotin-tagged protein by streptavidin. We show that including Nonidet P-40 in the nuclear extract preparation reduces background caused by the binding of endogenously biotinylated proteins. We also show that the use of alternative nuclear extract methods, results in more efficient nuclear protein extraction of GATA-1 protein compared to the commonly used high salt extraction method. By using this improved biotinylation tagging method we identify the novel interacting GATA-1 protein DNA methyltransferase I while being able to discard false positive identified interactions. We present an example of the latter by showing how GATA-1 interactions with TAF proteins as identified by mass spec, disappear upon nuclease digestion of nucleic acids from the nuclear extracts. By applying the biotinylation tagging approach for the reverse purification of DNMT1 protein complexes, we confirmed the interaction with GATA-1 and we further identified novel interactions with key hematopoietic transcription factors such as ZBP-89, ZNF143, Gfi-1b, FOG-1 and others. Validation of these interactions further suggested that DNMT1 forms a core complex with ZBP-89 and ZNF143 and subcomplexes with GATA-1, FOG-1 and Gfi-1b. In order to map the DNMT-1 domains necessary for the interaction with transcription factors, DNMT1 deletion mutants of the protein were used to show that the domain responsible for interaction is the PCNA binding domain (PBD). This will be further used in order to unravel the biological significance of the GATA-1 DNMT-1 interaction.

SUBJECT AREA: Erythropoiesis

KEYWORDS: *in vivo* biotinylation tagging, Mass spectrometry, transcription factors, protein-protein interactions.

Στην οικογένεια μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	17
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΕΙΣΑΓΩΓΗ	17
1.1 Αιματοποίηση	17
1.2 Ερυθροποίηση	19
1.3.1 Βασικοί μηχανισμοί μεταγραφής.....	22
1.3.2 Μεταγραφικοί παράγοντες.....	23
1.3.3 Αιματοποιητικοί μεταγραφικοί παράγοντες	24
1.4.1 Μεταγραφικοί παράγοντες GATA.....	25
1.4.2 Έκφραση και λειτουργία του μεταγραφικού παράγοντα GATA-1	26
1.4.3 Δομή της πρωτεΐνης GATA-1.....	28
1.5 Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της GATA-1.....	29
1.5.1 Αλληλεπίδραση της GATA-1 με τον εαυτό της	29
1.5.2 Αλληλεπίδραση της GATA-1 με FOG-1	30
1.5.3 Αλληλεπίδραση της GATA-1 με SCL/TAL-1.....	31
1.5.6 Αλληλεπίδραση της GATA-1 με την EKLF.....	32
1.5.7 Αλληλεπίδραση της GATA-1 με τη Gfi-1b.....	33
1.5.8 Αλληλεπίδραση της GATA-1 με τη ZBP-89.....	33
1.5.9 Αλληλεπίδραση της GATA-1 με τη ZNF143	34
1.6 Πρότυπα για τη μελέτη της ερυθροποίησης	35
1.6.1 <i>In vitro</i> πρότυπα	35
1.6.2 <i>In vivo</i> πρότυπα.....	36
1.7 DNMT-1	37
1.7.1 Λειτουργία της DNMT-1.....	37
1.7.2 Δομή και λειτουργικές περιοχές της DNMT-1	38
1.8. Πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη TBP (TBP associated proteins, TAF)	41
1.9 Φασματομετρία μάζας	42
1.9.1 Πηγές Ιοντισμού.	43
1.9.2 Αναλυτές φασματογράφων μάζας	44
1.9.3 Ταυτοποίηση πρωτεϊνών.....	47
1.10 <i>In vivo</i> βιοτινυλίωση	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	50
ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	52
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	52

3.1. ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ – ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	52
3.1.1 Η κυτταρική σειρά MEL (Murine erythroleukemia)	52
3.1.2 Καλλιέργεια κυττάρων MEL C88	53
3.1.3 Κατάψυξη και απόψυξη κυττάρων MEL C88.	54
3.1.4 Καλλιέργεια, ψύξη και απόψυξη κυττάρων BirA MEL	55
3.1.5 Καλλιέργεια, ψύξη και απόψυξη κυττάρων bioGATA-1 MEL.....	56
3.1.6 Καλλιέργεια, ψύξη και απόψυξη κυττάρων bioDNMT-1 MEL	57
3.1.7 Καλλιέργεια κυττάρων HEK	57
3.1.8 Κατάψυξη και απόψυξη κυττάρων HEK293	59
3.1.9. Μέτρηση κυττάρων με τη χρήση αιματοκυττόμετρου	59
3.1.10 Επαγόμενη διαφοροποίηση της κυτταρικής σειράς MEL	60
3.1.11 Επιμόλυνση κυττάρων HEK293 με τη μέθοδο της συγκατακρήμνισης κατιόντων DNA	61
3.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ	62
3.2.1 Παραγωγή πρωτεϊνικών πυρηνικών εκχυλισμάτων.....	62
3.2.1.1 Απομόνωση πυρήνων με τη χρήση υποτονικού διαλύματος και ομογενοποιητή τύπου Dounce.....	63
3.2.1.2 Απομόνωση πυρήνων με τη χρήση διαλύματος λύσης Nonidet P-40 (NP-40).	65
3.2.2 Εκχύλιση πυρηνικών πρωτεϊνών με τη χρήση διαλύματος υψηλής αλατότητας (high salt nuclear extraction).	66
3.2.3 Εκχύλιση πυρηνικών πρωτεϊνών με τη χρήση διαλύματος NUN.....	67
3.2.4 Εκχύλιση πυρηνικών πρωτεϊνών με τη χρήση διαλύματος RIPA (-SDS).....	67
3.2.5 Επεξεργασία των αδιάλυτων ιζημάτων μετά από απομόνωση των πυρηνικών πρωτεϊνών.	68
3.2.6 Μέτρηση πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με τη μέθοδο Bradford.....	69
3.2.7 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδιου (SDS PAGE electrophoresis).....	70
3.2.8 Χρώση πρωτεϊνών σε πηκτώματα ακρυλαμίδιου με χρωστική Coomassie Blue R-250.	72
3.2.9 Χρώση πρωτεϊνών σε πηκτώματα ακρυλαμίδιου με χρωστική Colloidal Coomassie Blue G-250	73
3.2.10 Χρώση πρωτεϊνών με νιτρικό άργυρο	74
3.2.11 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....	76
3.2.12 Χρώση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με Ponceau S.....	77
3.2.14 Ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	77
3.2.15 Επεξεργασία των πυρηνικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων με Βενζονάση και RNάση .	81
3.2.15 Κατακρήμνιση βιοτινυλιωμένων πρωτεϊνών με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων στρεπταβιδίνης.....	82
3.2.17 Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών	83
3.2.18 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης με τη χρήση πακεταρισμένης στήλης Superose 6	87

3.2.19 Κατακρήμνιση πρωτεϊνών με τη χρήση τριχλωροξικού οξέος.....	89
3.3 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ	90
3.3.1 Πλασμιδιακές κατασκευές και βακτηριακά στελέχη.....	90
3.3.2 Μετασχηματισμός βακτηρίων	91
3.3.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	93
3.3.4 Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	94
3.3.5 Κατεργασία DNA με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση	95
3.3.6 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτώματα αгарόζης.....	96
3.3.7 Αντίδραση λιγάσης	98
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	99
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	99
4.1 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ <i>IN VIVO</i> ΒΙΟΤΙΝΥΛΙΩΣΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ	99
4.1.1 Επιβεβαίωση της έκφρασης του βιοτινυλιωμένου GATA-1 σε bio-GATA-1 MEL κύτταρα.....	99
4.1.2 Μείωση σήματος υποβάθρου (background) με τη χρήση διαλύματος NP-40.....	100
4.1.3 Εμπλουτισμός πυρηνικών εκχυλισμάτων σε GATA-1 με τη χρήση εναλλακτικών μεθόδων απομόνωσης πυρηνικών πρωτεϊνών.	110
4.1.4 Αξιολόγηση των μεθόδων NUN και RIPA στο πλαίσιο της <i>in vivo</i> βιοτινυλίωσης.	117
4.1.5 Μεγάλης κλίμακας κατακρήμνιση στρεπταβιδίνης σε εκχυλίσματα bio-GATA-1 MEL από NUN και RIPA.	118
4.1.6 Παρουσίαση των αποτελεσμάτων της φασματομετρίας μάζας στα εκχυλίσματα bio- GATA-1 MEL από NUN και RIPA.	120
4.1.7 Βελτιστοποίηση συνθηκών για την απομάκρυνση του DNA και RNA από τα πυρηνικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα.....	123
4.2.1 Ανάλυση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ GATA -1 και των πρωτεϊνών TAF (TBP associated Factors).....	126
4.3 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ DNMT-1 ΜΕ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ.....	134
4.3.1 Μεγάλης κλίμακας κατακρήμνιση της DNMT-1	134
4.3.2 Ανάλυση αποτελεσμάτων φασματομετρίας μάζας της κατακρημνισμένης bio-DNMT-1. 135	
4.3.3 Επαλήθευση αποτελεσμάτων φασματομετρίας μάζας με κατακρήμνιση βιοτινυλιωμένης DNMT-1.	137
4.3.4 Επαλήθευση αποτελεσμάτων της φασματομετρίας μάζας με χρήση ανοσοκατακρήμνισης των ενδογενών πρωτεϊνών.	141
4.3.5 Διερεύνηση του πρωτεϊνικού συμπλόκου DNMT-1 / ZBP-89 / ZNF143 / GATA-1 σε MEL κύτταρα.....	147
4.3.6 Επαλήθευση της ύπαρξης του πρωτεϊνικού συμπλόκου DNMT-1/ZBP-89/ZNF143 ...	151
4.3.7 Ανάλυση των πρωτεϊνικών περιοχών αλληλεπίδρασης μεταξύ της GATA-1 και DNMT- 1.	154

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	165
ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	165
5.1 Βελτίωση της <i>in vivo</i> βιοτινυλίωσης.....	165
5.2 Απομάκρυνση νουκλεϊκών οξέων από τα πυρηνικά εκχυλίσματα.	169
5.3 Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις: Παρουσίαση των αλληλεπιδράσεων των TAF με τη GATA-1	171
5.4 Αλληλεπίδραση GATA-1 με DNMT-1	173
5.5 Σύνοψη.....	178
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	186
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	189
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	190

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Μοντέλο διαφοροποίησης αιματοποιητικών βλαστικών κυττάρων του ποντικού.	18
Εικόνα 2. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια προέρχονται από τη διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων	21
Εικόνα 3. Ο μεταγραφικός παράγοντας GATA-1 περιέχει τρεις λειτουργικές περιοχές.	28
Εικόνα 4. Η DNA μεθυλοτρανσφεράση 1 αποτελείται από 6 λειτουργικές περιοχές.	39
Εικόνα 5. Ο φασματογράφος μάζας LTQ Orbitrap XL.	46
Εικόνα 6. Αιματοκυττόμετρο που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση των κυττάρων.	60
Εικόνα 7. Ανίχνευση της έκφρασης βιοτινυλιωμένης GATA-1 στα κύτταρα bioGATA-1 MEL.	100
Εικόνα 8. Μείωση των ενδογενών βιοτινυλιωμένων πρωτεϊνών με χρήση διαλύματος λύσης NP-40 σε πυρηνικά εκχυλίσματα διαφοροποιημένων κυττάρων bioGATA-1 MEL.	101
Εικόνα 9. Μείωση των ενδογενών βιοτινυλιωμένων πρωτεϊνών με χρήση διαλύματος λύσης NP-40 σε πυρηνικά εκχυλίσματα μη διαφοροποιημένων κυττάρων bioGATA-1 MEL.	102
Εικόνα 10. Μείωση της κυτταροπλασματικής μόλυνσης με χρήση διαλύματος λύσης NP-40 σε πυρηνικά εκχυλίσματα διαφοροποιημένων κυττάρων.	103
Εικόνα 11. Μείωση των μη ειδικά προσδεδεμένων πρωτεϊνών με χρήση διαλύματος λύσης NP-40 σε κατακρήμνιση στρεπταβιδίνης πυρηνικών εκχυλισμάτων διαφοροποιημένων κυττάρων BirA MEL.	105
Εικόνα 12. Η χρήση του διαλύματος NP-40 για τη λύση των κυττάρων δεν επηρεάζει τον πυρηνικό φάκελο των κυττάρων MEL.	108
Εικόνα 13. Η χρήση του διαλύματος λύσης δεν επηρεάζει την ικανότητα των πρωτεϊνών GATA-1 και FOG-1 να σχηματίζουν πρωτεϊνικά σύμπλοκα.	109
Εικόνα 14. Η χρήση της μεθόδου υψηλής αλατότητας αφήνει μεγάλη ποσότητα GATA-1 στο αδιάλυτο ίζημα.	111
Εικόνα 15. Η χρήση NUN και RIPA οδηγεί στην εκχύλιση του ίδιου ποσού συνολικής πρωτεΐνης από τον ίδιο αριθμό κυττάρων.	112
Εικόνα 16. Η χρήση των μεθόδων NUN και RIPA οδηγεί στη εκχύλιση μεγαλύτερης ποσότητας GATA-1 από τον ίδιο αριθμό κυττάρων.	114
Εικόνα 17. Η χρήση NUN και RIPA επιτυγχάνει να εκχυλίσει μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεϊνών που βρίσκονται σε σύμπλοκο με τη GATA-1.	115
Εικόνα 18. Η χρήση NUN και RIPA δεν επηρεάζει τη δυνατότητα σχηματισμού συμπλόκων της GATA-1.	116
Εικόνα 19. Οι μέθοδοι NUN και RIPA επιτρέπουν τη απευθείας χρήση των πυρηνικών εκχυλισμάτων χωρίς αραίωση για κατακρήμνιση βιοτινυλιωμένης πρωτεΐνης.	118
Εικόνα 20. Μεγάλης κλίμακας κατακρήμνιση στρεπταβιδίνης σε εκχυλίσματα BirA και bioGATA-1 παρασκευασμένα με χρήση NUN, RIPA.	119
Εικόνα 21. Τα πυρηνικά εκχυλίσματα περιέχουν μεγάλες ποσότητες νουκλεϊκών οξέων. Α	123
Εικόνα 22. Η χρήση DNάσης, RNάσης στα πυρηνικά εκχυλίσματα δεν απομακρύνει πλήρως τα νουκλεϊκά οξέα.	124

Εικόνα 23. Η βενζονάση αποικοδομεί τα νουκλεϊκά οξέα σε όλες τις μεθόδους χωρίς προηγούμενη επεξεργασία των δειγμάτων.....	126
Εικόνα 24. Τα αντισώματα για τις TAF είναι λειτουργικά και τις ανιχνεύουν στα πυρηνικά εκχυλίσματα BirA MEL.....	129
Εικόνα 25. Η GATA-1 αλληλεπιδρά μόνο με την TAF10.....	131
Εικόνα 26. Η TAF10 αλληλεπιδρά με τη GATA-1.....	132
Εικόνα 27. Μεγάλης κλίμακας κατακρήμνιση στρεπταβιδίνης σε πυρηνικά εκχυλίσματα bioDNMT1 παρασκευασμένα με χρήση διαλύματος υψηλής αλατότητας.	135
Εικόνα 28. Η βιοτινυλιωμένη DNMT-1 αλληλεπιδρά με τους μεταγραφικούς παράγοντες που ανιχνεύθηκαν από τη φασματομετρία μάζας.	139
Εικόνα 29. Η βιοτινυλιωμένη DNMT-1 αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες του συμπλόκου NuRD και HDACs που ταυτοποιήθηκαν από τη φασματομετρία μάζας ύστερα από κατακρήμνιση στρεπταβιδίνης.	140
Εικόνα 30. Η πρωτεΐνη GATA-1 αλληλεπιδρά με την DNMT-1 σε κύτταρα MEL.....	142
Εικόνα 31. Η ενδογενής πρωτεΐνη DNMT-1 αλληλεπιδρά με GATA-1 και άλλους αιμοποιητικούς μεταγραφικούς παράγοντες.....	143
Εικόνα 32. Η ανοσοκατακρήμνιση της πρωτεΐνης ZNF143 επαληθεύει την ύπαρξη του συμπλόκου GATA-1/DNMT-1/ZNF143/ZBP-90/FOG-1.	144
Εικόνα 33. Η ανοσοκατακρήμνιση της πρωτεΐνης ZBP-89 επαληθεύει την ύπαρξη του συμπλόκου GATA-1/DNMT-1/ ZNF143/ZBP-89/ FOG-1 σε κύτταρα MEL.	145
Εικόνα 34. Σχηματική απεικόνιση του πειράματος ανοσοεξάντλησης (GATA-1) – ανοσοκατακρήμνισης (DNMT-1) σε κύτταρα MEL.	147
Εικόνα 35. Οι πρωτεΐνες DNMT-1/ZBP-89/ZNF-143 σχηματίζουν πρωτεϊνικό σύμπλοκο το οποίο αλληλεπιδρά με τις GATA-1/FOG-1 και GATA-1/Gfi-1b.	148
Εικόνα 36. Η αλληλεπικάλυση στα προφίλ έκλουσης των DNMT-1/ZNF143/ZBP-89/GATA-1 δικαιολογεί την ύπαρξη του πρωτεϊνικού συμπλόκου.....	150
Εικόνα 37. Η πρωτεΐνη DNMT-1 αλληλεπιδρά με τις ZBP-89 και ZNF143 σε κύτταρα HEK 293.	152
Εικόνα 38. Η GATA-1, αλλά όχι οι FOG-1 και Gfi-1b, αλληλεπιδρά με τις DNMT-1, ZBP-89 και ZNF143 στα κύτταρα HEK.....	153
Εικόνα 39. Σχηματική απεικόνιση των απαλειπτικών μεταλλάξεων της DNMT-1 συζευγμένες με GFP.	155
Εικόνα 40. Έκφραση των απαλειπτικών μεταλλάξεων της DNMT-1 ύστερα απο επιμόλυνση κυττάρων HEK293.	156
Εικόνα 41. Η έλλειψη της περιοχής PBD της DNMT-1 προκαλεί απώλεια της αλληλεπίδρασης μεταξύ των GATA-1 και DNMT-1.....	158
Εικόνα 42. Η GATA-1 αλληλεπιδρά με DNMT-1 που φέρει σημειακές μεταλλάξεις που απεμπολούν την αλληλεπίδραση της DNMT-1 με την PCNA.....	159
Εικόνα 43. Η περιοχή PBD που φέρει τη σημειακή μετάλλαξη Q162E είναι ικανή από μόνη της να αλληλεπιδράσει με τη GATA-1.....	161

Εικόνα 44. Η GATA-1 εξακολουθεί να αλληλεπιδρά με τις ZBP-89 και ZNF143 όταν χάνεται η αλληλεπίδραση με τη GMTΔPBD και την ενδογενή DNMT-1.	162
Εικόνα 45. Η περιοχή PBD της DNMT-1 είναι υπεύθυνη και για την αλληλεπίδραση με τη ZNF143..	163
Εικόνα 46. Η περιοχή PBD της DNMT-1 είναι υπεύθυνη και για την αλληλεπίδραση με τη ZBP-89.	164
Εικόνα 47. Σχηματική παρουσίαση της πορείας της διδακτορικής διατριβής.....	179

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή.	78
Πίνακας 2. Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή	80
Πίνακας 3. Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή	90
Πίνακας 4. Η χρήση του διαλύματος λύσης NP-40 οδηγεί στην ταυτοποίηση λιγότερου βιοτινυλιωμένου υποβάθρου κατά τη φασματομετρία μάζας.	106
Πίνακας 5. Αντιστοίχιση κλασμάτων έκλουσης σε γνωστά μοριακά βάρη πρωτεϊνών.	109
Πίνακας 6. Ταυτοποιημένες πρωτεΐνες σε παλαιότερα πειράματα κατακρήμνισης σε εκχυλίσματα υψηλής αλατότητας.	120
Πίνακας 7. Ταυτοποιημένες πρωτεΐνες ως αλληλεπιδρώσες με τη GATA-1 βιβλιογραφικά.	121
Πίνακας 8. Πιθανώς νέες αλληλεπιδρώσες πρωτεΐνες με τη GATA-1.	122
Πίνακας 9. Η GATA-1 φέρεται να αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες TAF (εκχυλίσματα NUN).	127
Πίνακας 10. Η GATA-1 φέρεται να αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες TAF (εκχυλίσματα RIPA).	128
Πίνακας 11. Η πρωτεΐνη DNMT-1 φέρεται να αλληλεπιδρά με αρκετούς μεταγραφικούς παράγοντες.	136
Πίνακας 12: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων.	180
Πίνακας 13. Ακρωνύμια και ανάπτυξη τους	186

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο του Δρα. Στρουμπούλη στο Τμήμα Μοριακής Ογκολογίας του Ερευνητικού Κέντρου Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμινγκ» ενώ υποστηρίχθηκε οικονομικά από υποτροφία του Ερευνητικού Κέντρου.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον Δρα. Ι. Στρουμπούλη για την ευκαιρία που μου προσέφερε να εκπονήσω τη διδακτορική μου εργασία στο εργαστήριο του, την συνεχή υποστήριξή του η οποία ήταν καθοριστική για την ολοκλήρωση της συγκεκριμένης μελέτης, καθώς και τη σημαντική ερευνητική του καθοδήγηση που διάπλασε το ερευνητικό τρόπο σκέψης μου. Τον ευχαριστώ επίσης για τη δυνατότητα που μου παρείχε να διευρύνω τους ερευνητικούς μου ορίζοντες τόσο μέσα από επιστημονικά συνέδρια και εκπαιδευτικά σεμινάρια όσο και από επισκέψεις σε συνεργαζόμενα εργαστήρια του εξωτερικού.

Ευχαριστώ θερμά την επιβλέπουσα της παρούσας διατριβής Καθηγήτρια Αθανασία Σιαφάκα για την πολύτιμη συμβολή της, την υπομονή της αλλά και την άριστη επικοινωνία από την εποχή που ξεκινούσα ως μεταπτυχιακός φοιτητής στον τομέα Βιοχημείας. Επιπλέον την ευχαριστώ θερμά για το χρόνο που αφιέρωσε ώστε η παρούσα εργασία να δομηθεί σωστά και επιστημονικά. Επίσης ευχαριστώ ιδιαίτερα τη Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μαίρη Μαυρή για τις πολύτιμες και πολύ σημαντικές παρατηρήσεις.

Κατά τη διάρκεια που χρειάστηκε προκειμένου να ολοκληρωθεί η παρούσα εργασία είχα την τύχη αλλά και την τιμή να συνεργαστώ με αρκετούς ανθρώπους τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω. Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στη συνάδελφο μου Έλενα Καρκούλια με την οποία ξεκινήσαμε σχεδόν μαζί στο εργαστήριο για τη πολύτιμη βοήθεια της και την αμέριστη συμπαράσταση της όλα αυτά τα χρόνια. Την ευχαριστώ επίσης για την άψογη συνεργασία και την κατανόηση της στις πιο δύσκολες μέρες (ερευνητικά και προσωπικά). Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στα υπόλοιπα παλιά και νέα μέλη του εργαστηρίου Alexandra Amarral Psarris, Γιώργο Παπαδόπουλο, Δήμητρα Κερδιάνη και Γρηγόρη Τσακνάκη για τη πολύτιμη βοήθεια τους και τις χρήσιμες συμβουλές τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου του Δρα. Γ. Παναγιώτου και ιδιαίτερα τον ίδιο για τη βοήθεια και την παροχή αντιδραστηρίων του πρωτεωμικού μέρους της διατριβής. Ευχαριστώ πολύ την Μαρτίνα Σαμιωτάκη για την ανάλυση αρκετών πρωτεϊνικών μου δειγμάτων και την τεχνογνωσία που μου παρείχε στη μέθοδο της φασματομετρίας μάζας. Σε αυτό το σημείο θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής για το χρόνο που διάθεσαν για την παρούσα διατριβή.

Ολοκληρώνοντας θα ήθελα να πω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στους ανθρώπους που ήταν κοντά μου όλο αυτό διάστημα και ιδιαίτερα στους γονείς μου για τη στήριξη που μου παρείχαν και μου παρέχουν όλα αυτά χρόνια. Χωρίς τη δική τους βοήθεια και αγάπη η παρούσα εργασία δεν θα ήταν εφικτή. Τους ευχαριστώ πολύ από τα βάθη της ψυχής μου και ελπίζω η παρούσα διδακτορική διατριβή να τους κάνει υπερήφανους και να δικαιώσει τις θυσίες τους για εμένα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

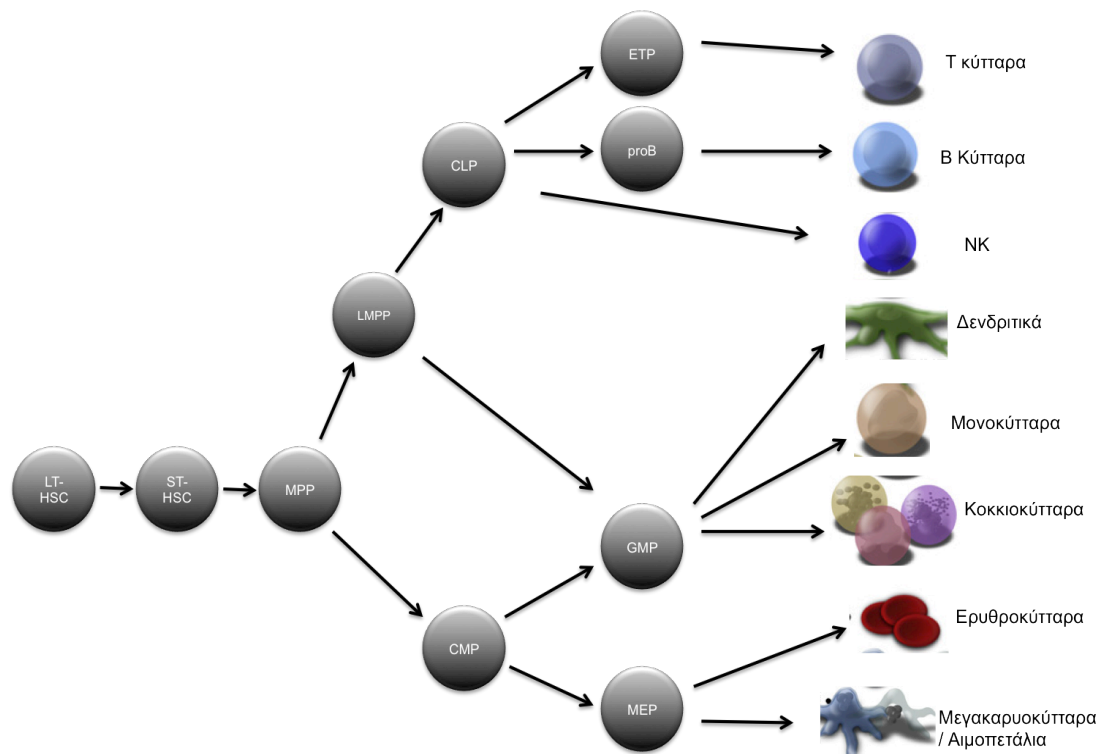
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Αιματοποίηση

Αιματοποίηση είναι η διαδικασία παραγωγής όλων των ώριμων κυττάρων του αίματος από μια μικρή δεξαμενή αρχέγονων αιματοποιητικών βλαστικών κυττάρων (Hematopoietic Stem Cells, HSC). Τα HSC στα ενήλικα θηλαστικά εντοπίζονται στο μυελό των οστών, είναι πολυδύναμα καθώς έχουν την ικανότητα να αυτοαναπληρώνονται αλλά και να διαφοροποιούνται σε δεσμευμένα κύτταρα (1). Τα HSC μπορούν να αποδώσουν όλες τις αιματοποιητικές κυτταρικές σειρές ενώ τα δεσμευμένα κύτταρα μόνο κάποιες από αυτές. Τα προγονικά κύτταρα δημιουργούν πρόδρομα αιματοποιητικά κύτταρα που δεσμεύονται σε διαφορετικές γενεαλογίες με τελικό σκοπό την παραγωγή ώριμων κυττάρων που συμπεριλαμβάνουν ερυθρά, μεγακαρυοκύτταρα, μυελοκύτταρα (μονοκύτταρα, μακροφάγα και ουδετερόφιλα) και λεμφοκύτταρα.

Η διαφοροποίηση των HSC κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής αιματοποίησης γίνεται σταδιακά δημιουργώντας όλο και μεγαλύτερο αριθμό δεσμευμένων αιματοποιητικών κυττάρων. Η κυτταρική διαίρεση των HSC οδηγεί στη δημιουργία δυο θυγατρικών κυττάρων τα οποία μπορούν είτε να διατηρούν τη βλαστική ταυτότητα ή/και να προχωρούν στη διαφοροποίηση τους (2). Οι συγκεκριμένες κυτταρικές συμπεριφορές συνοδεύονται και από αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση που καθορίζονται από μεταγραφικούς παράγοντες, αν και τα πρώτα διαφοροποιημένα κύτταρα από τα HSC προκύπτουν από ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση των παραγόντων που καθορίζουν την κυτταρική συμπεριφορά (3). Στα βλαστικά αυτά κύτταρα πριν από τις αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση εμφανίζονται και επιγενετικές αλλαγές σε γονιδιακές ρυθμιστικές περιοχές που «σημαδεύουν» τα γονίδια ως ενεργά, ανενεργά ή έτοιμα προς ενεργοποίηση .

Τα κύτταρα του αίματος χωρίζονται σε δύο διακλαδώσεις, αυτές της μυελοειδούς και της λεμφοειδούς σειράς (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Μοντέλο διαφοροποίησης αιματοποιητικών βλαστικών κυττάρων του ποντικού. Πληθυσμοί αιματοποιητικών κυττάρων που παρουσιάζονται κατά τη διαδικασία της διαφοροποίησης. LT-HSC (Long Term Hematopoietic Stem Cells): Μακράς διάρκειας αιματοποιητικά βλαστικά κύτταρα, ST-HSC (Short Term Hematopoietic Stem Cells): Μικρής διάρκειας αιματοποιητικά βλαστικά κύτταρα, MPP (Multipotent Progenitor): πολυδύναμο προγονικό κύτταρο, CMP (Common Myeloid Progenitor): Κοινό μυελικό προγονικό κύτταρο, LMPP (Lymphoid Multipotent Progenitor): Λεμφικό πολυδύναμο προγονικό κύτταρο, CLP (Common Lymphoid Progenitor): Κοινό λεμφικό προγονικό κύτταρο, MEP (Megakaryocyte Erythroid Progenitor): Προγονικό κύτταρο της ερυθράς/μεγακαρυωτικής σειράς, GMP (Granulocyte Macrophage Progenitor): Προγονικό κύτταρο κοκκιοκυττάρων /μακροφάγων, ETP (Early T-cell Precursor): Πρόδρομο κύτταρο T-κυττάρων. proB πρόδρομο B κύτταρο, NK (Natural Killer cells): Φυσικοί φονείς.

Τα μακράς διάρκειας αιματοποιητικά βλαστικά κύτταρα (Long Term Hematopoietic Stem Cells, LT-HSC), που ονομάζονται έτσι εξαιτίας της αυξημένης δυνατότητας αυτοανανέωσης τους, βρίσκονται στην κορυφή της ιεραρχίας και είναι αυτά που δεσμεύονται σε μικρής διάρκειας αιματοποιητικά βλαστικά κύτταρα (Short Term Hematopoietic Stem Cells, ST-HSC) με μικρή

δυνατότητα αυτοανανέωσης (Εικόνα 1). Από τα ST-HSC προκύπτουν τα πολυδύναμα προγονικά κύτταρα (Multipotent Progenitor, MPP) τα οποία διακρίνονται από την ικανότητα τους να διαφοροποιούνται είτε προς την μυελική είτε προς της λεμφική σειρά και χαρακτηρίζονται από πολύ μικρή ικανότητα αυτοανανέωσης (4).

Από τα MPP προκύπτουν τα κοινά προγονικά μυελικά κύτταρα (Common Myeloid progenitor, CMP) ή τα λεμφικά πολυδύναμα προγονικά κύτταρα (Lymphoid-biased multipotent progenitors, LMPP). Τα LMPP εμφανίζουν μεγαλύτερη τάση διαφοροποίησης προς λεμφικές σειρές ωστόσο διατηρούν την ικανότητα διαφοροποίησης και προς τις μυελικές σειρές. Ωστόσο σε καμία περίπτωση τα LMPPs δεν έχουν τη δυναμική να διαφοροποιηθούν προς ερυθρές / μεγακαρυωτικές σειρές (5). Τα CLPs αποτελούν τα πρόδρομα κύτταρα από τα οποία προκύπτουν όλα τα λεμφικά κύτταρα T, B και NK (6)

Τα CMP έχουν την ικανότητα να διαφοροποιηθούν σε δύο προγονικές σειρές, στα προγονικά κύτταρα της ερυθράς / μεγακαρυωτικής σειράς (Megakaryocyte / Erythroid progenitor, MEP) και στη προγονική σειρά των κοκκιοκυττάρων / μακροφάγων (Granulocyte macrophage progenitor, GMP) (7). Από τα MEP προκύπτουν τα ερυθροκύτταρα, τα μεγακαρυοκύτταρα και τα αιμοπετάλια ενώ από τα GMP προκύπτουν όλα τα μυελικά κύτταρα. (Δενδριτικά, μονοκύτταρα κοκκιοκύτταρα).

Η αιματοποίηση αποτελεί ένα πολύ καλό μοντέλο μελέτης των μηχανισμών διαφοροποίησης των κυττάρων. Η παραγωγή όλων των ώριμων κυττάρων του αίματος (Εικόνα 1), από ένα κοινό προγονικό κύτταρο είναι μια σταδιακή διαδικασία, κάθε βήμα της οποίας επηρεάζεται από το κυτταρικό περιβάλλον, τα σηματοδοτικά μονοπάτια καθώς και την έκφραση ή αποσιώπηση γονιδίων από τη συνδυαστική δράση συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων.

1.2 Ερυθροποίηση

Η ερυθροποίηση είναι η διαδικασία παραγωγής ερυθροκυττάρων από αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα. Τα ερυθροκύτταρα των θηλαστικών εντοπίζονται στην κυκλοφορία του αίματος και είναι κύτταρα στα οποία λείπει ο πυρήνας (8). Τα κύτταρα αυτά αποτελούν το 45% του όγκου του αίματος και

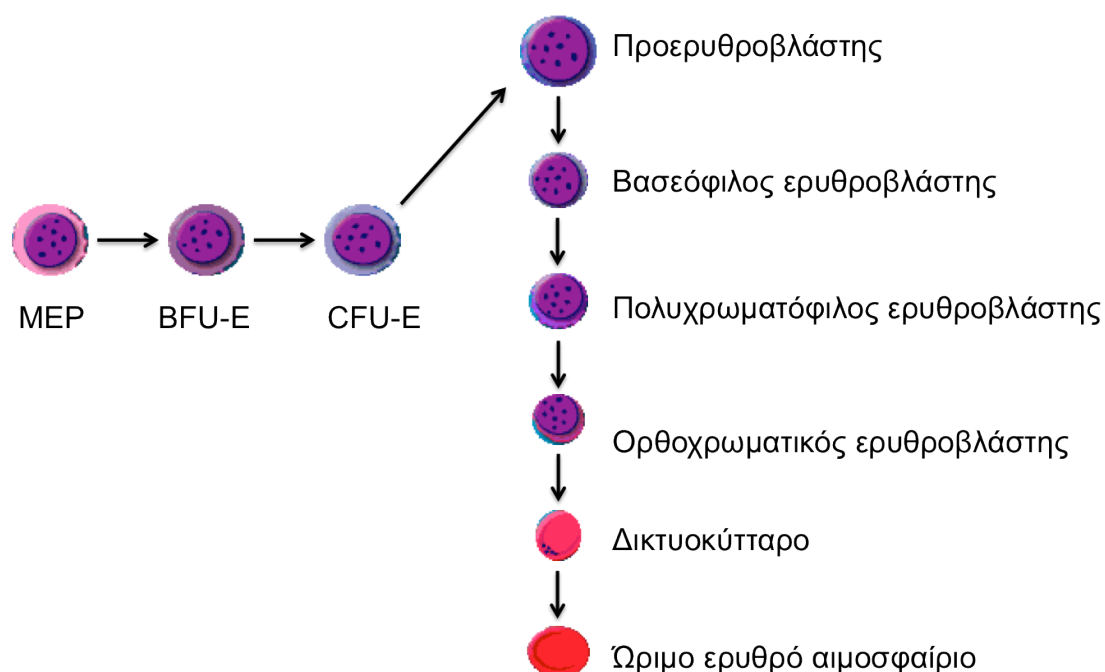
είναι τα πιο συχνά απαντώμενα. Καθημερινά παράγονται δισεκατομμύρια ερυθροκύτταρα στον ανθρώπινο οργανισμό τα οποία έχουν υψηλή συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης για τη δέσμευση και τη μεταφορά οξυγόνου.

Το πρώτο κύμα της ερυθροποίησης κατά την ανάπτυξη λαμβάνει χώρα στο λεκιθικό σάκο (yolk sac) του εμβρύου και ονομάζεται αρχέγονη (primitive). Η κύρια λειτουργία της αρχέγονης ερυθροποίησης είναι η παραγωγή ερυθρών κυττάρων με σκοπό τη διευκόλυνση της οξυγόνωσης του εμβρύου το οποίο αναπτύσσεται ταχύτατα. Το χαρακτηριστικό γνώρισμα των ερυθροκυττάρων της αρχέγονης ερυθροποίησης είναι ότι εκφράζουν εμβρυϊκές σφαιρίνες ενώ απελευθερώνονται στην κυκλοφορία ως εμπύρνηνα κύτταρα, τα οποία όμως είναι ικανά να απορρίψουν τον πυρήνα και να σχηματίσουν δικτυοερυθροκύτταρα (reticulocytes), όντας στην κυκλοφορία του αίματος (9).

Η αρχέγονη ερυθροποίηση είναι ικανή να καλύψει τις αρχικές ανάγκες του εμβρύου, ωστόσο καθώς προχωρά η ανάπτυξη η αρχέγονη ερυθροποίηση αντικαθίσταται από την οριστική ερυθροποίηση (definitive). Στο συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο, το εμβρυϊκό ήπαρ γίνεται το κύριο ερυθροποιητικό όργανο καθώς ο μυελός των οστών δεν έχει ακόμα σχηματιστεί. Η βασική διεργασία ωρίμανσης των ερυθροκυττάρων είναι η σύνθεση αιμοσφαιρίνης και απύρηνων ερυθροκυττάρων. Η διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων σε ερυθροκύτταρα περιλαμβάνει: τη μείωση του μεγέθους του κυττάρου, την παραγωγή αιμοσφαιρίνης, τη σταδιακή εξαφάνιση των κυτταρικών οργανιδίων και τέλος τη συμπύκνωση με επακόλουθη απόρριψη του πυρήνα (8). Στη συνέχεια η ερυθροποίηση μεταναστεύει στο μυελό των οστών, ο οποίος καθίσταται πλέον το κύριο αιματοποιητικό όργανο για το υπόλοιπο της ζωής του θηλαστικού.

Η διαδικασία της ερυθροποίησης ξεκινά από τη διαφοροποίηση των MEP στο πρώτο στάδιο δεσμευμένων, ερυθροειδικών προγονικών κυττάρων, τα οποία ταυτοποιούνται σε κυτταροκαλλιέργειες *in vitro* ως μονάδες “εκρηκτικής αύξησης” ερυθροειδών κυττάρων (Burst Forming Units – E ή BFU-E) (Εικόνα 2). Τα προγονικά αυτά κύτταρα σχηματίζουν με τη σειρά τους *in vitro* μια άλλη προγονική δεσμευμένη κυτταρική σειρά, τις μονάδες σχηματισμού αποικιών ερυθρών κυττάρων, την CFU-E (Colony Forming Units – E, CFU-E) που ανταποκρίνεται στη δράση της αυξητικής ορμόνης ερυθροποιητίνη. Από τα CFU-E προκύπτουν οι προερυθροβλάστες, οι οποίοι

είναι μεγάλα κύτταρα των οποίων ο πυρήνας καταλαμβάνει το 80% του κυττάρου. Οι προερυθροβλάστες υπόκεινται σε περαιτέρω διαφοροποίηση κατά την οποία παράγονται διαδοχικά μορφολογικά διακριτοί κυτταρικοί πληθυσμοί, δηλαδή, οι βασεόφιλοι, οι πολυχρωματόφιλοι και οι ορθοχρωματικοί ερυθροβλάστες (Εικόνα 2). Στα τελικά στάδια της ερυθροποίησης οι ορθοχρωματικοί ερυθροβλάστες αποβάλλουν τον πυρήνα τους ώστε να γίνουν δικτυοκύτταρα, τα οποία αντιστοιχούν στο τελευταίο στάδιο ανώριμων ερυθροκυττάρων που με τη σειρά τους αποβάλλουν και τα τελευταία κυτταρικά οργανίδια ώστε να γίνουν ώριμα ερυθροκύτταρα (10).



Εικόνα 2. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια προέρχονται από τη διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων *MEP*. *BFU-E* (*Burst Forming Units – E*): μονάδες εκρηκτικής αύξησης ερυθροκυττάρων, *CFU-E* (*Colony Forming Units – E*) μονάδες σχηματισμού αποικιών ερυθροκυττάρων.

Η διαδικασία ωρίμανσης των ερυθροκυττάρων από το πρώτο αναγνωρίσιμο μορφολογικά πρόδρομο κύτταρο (προερυθροβλάστη) έως το δικτυοκύτταρο διαρκεί περίπου μια εβδομάδα. Σε αυτή την περίοδο λαμβάνουν χώρα 3 με 5 κυτταρικές διαιρέσεις, όπου τα πρόδρομα κύτταρα πολλαπλασιάζονται μέχρι το ορθοχρωματικό στάδιο. Τα κύτταρα της ερυθράς σειράς σχηματίζονται σε μικρά ερυθροβλαστικά νησίδα στα οποία παρατηρούνται 1 ή 2 μακροφάγα. Τα μακροφάγα φέρνουν μακριές

κυτταροπλασματικές αποφυάδες που περιβάλλουν τα διαιρούμενα κύτταρα της ερυθράς σειράς, τα οποία μεταναστεύουν προς την περιφέρεια των νησιδίων χρησιμοποιώντας ως μονοπάτι τις κυτταροπλασματικές αποφυάδες των μακροφάγων. Όταν τα ερυθροκύτταρα ωριμάσουν, έρχονται σε επαφή με το ενδοθήλιο των κολποειδών τότε διαπερνούν το κυτταρόπλασμα και απελευθερώνονται στην κυκλοφορία (11).

1.3.1 Βασικοί μηχανισμοί μεταγραφής

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα η μεταγραφή διεκπεραιώνεται από τρεις RNA πολυμεράσες. Οι RNA πολυμεράσες I και III είναι υπεύθυνες για τη μεταγραφή του ριβοσωμικού RNA και των μικρών πυρηνικών RNA, αντίστοιχα, ενώ η μεταγραφή των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες γίνεται σχεδόν πάντα από την RNA πολυμεράση II (12). Η μεταγραφή γονιδίων από την RNA πολυμεράση II ξεκινά με τη πρόσδεση ρυθμιστικών παραγόντων στον υποκινητή (promoter) του γονιδίου, ο οποίος βρίσκεται πλησίον της περιοχής έναρξης της μεταγραφής. Οι συγκεκριμένοι ρυθμιστικοί παράγοντες ασκούν τη λειτουργία τους είτε με τη χρήση ενζύμων που έχουν τη δυνατότητα τροποποίησης της χρωματίνης είτε με την άμεση αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες που ευθύνονται για τη μεταγραφή.

Οι δύο αυτοί μηχανισμοί έχουν ως αποτέλεσμα την πρόσδεση του προ-εναρκτήριου πρωτεϊνικού συμπλόκου PIC (Pre-initiation complex) (12) της μεταγραφής στον υποκινητή του γονιδίου. Το σύμπλοκο PIC αποτελείται από το ένζυμο RNA πολυμεράση II και το υποσύμπλοκο TFII το οποίο αποτελείται από τις υπομονάδες TFII-A μέχρι TFII-H, εκτός από τη TFII-E. Το σύμπλοκο PIC κατά το σχηματισμό του παραμένει ανενεργό. Η είσοδος του TFII-E στο σύμπλοκο προκαλεί αλλαγή στη δομή του συμπλόκου, επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο την έναρξη της μεταγραφής. Ύστερα από την παραγωγή μορίου RNA μήκους 30 βάσεων, το καρβόξυ-τελικό άκρο της RNA πολυμεράσης II (CTD) φωσφορυλιώνεται με αποτέλεσμα το σύμπλοκο να απελευθερώνεται από τον υποκινητή ώστε να συνεχίσει και να ολοκληρώσει τη μεταγραφή του γονιδίου.

1.3.2 Μεταγραφικοί παράγοντες

Μεταγραφικοί παράγοντες είναι εκείνες οι πρωτεΐνες οι οποίες αναγνωρίζουν και προσδένονται σε συγκεκριμένες ρυθμιστικές αλληλουχίες του DNA με αποτέλεσμα τη ρύθμιση της έκφρασης ή της αποσιώπησης των γονιδίων. Οι μεταγραφικοί παράγοντες εκφράζονται είτε ιστοειδικά είτε ευρύτερα και εμφανίζουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με συμπαραγόντες με αποτέλεσμα την αλλαγή της δομής της χρωματίνης που, κατά την μεταγραφική ενεργοποίηση, ευνοεί την πρόσδεση του συμπλόκου της μεταγραφής στο γονίδιο. Οι συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις είναι ικανές να οδηγήσουν και στο σχηματισμό συμπλόκων τα οποία μπορούν να αποσιωπήσουν την έκφραση των γονιδίων μέσω της απεμπλοκής του συμπλόκου της μεταγραφής από το γονίδιο.

Οι μεταγραφικοί παράγοντες κατηγοριοποιούνται σε οικογένειες ανάλογα με τις λειτουργικές περιοχές που φέρουν όπως η περιοχή για τη πρόσδεση του DNA (πίνακας παράρτημα) (13). Από τις πρώτες περιοχές ικανές να προσδένουν DNA που ανακαλύφθηκαν ήταν αυτή με μοτίβο έλικας – θηλιάς – έλικας (Helix – Loop – Helix, HLH). Η λειτουργική περιοχή HLH αποτελείται από 2 δομές α-έλικας οι οποίες χωρίζονται από μια μικρή σειρά αμινοξέων που σχηματίζουν θηλιά. Μια άλλη χαρακτηριστική δομή είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες οι οποίοι φέρουν φερμουάρ λευκίνης. Αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες που φέρουν τις δυο παραπάνω περιοχές ανήκουν στην υπέρταξη των βασικών περιοχών.

Μια άλλη υπέρταξη των μεταγραφικών παραγόντων είναι αυτή των παραγόντων που προσδένουν DNA και συντονίζουν ψευδάργυρο. Εδώ ανήκουν οι μεταγραφικοί παράγοντες οι οποίοι φέρουν δάκτυλο ψευδαργύρου. Η κατάταξη των συγκεκριμένων πρωτεϊνών γίνεται ανάλογα με τα αμινοξέα που χρησιμοποιούνται για να προσδένεται ο ψευδάργυρος (πίνακας παραρτήματος). Τα δάκτυλα ψευδαργύρου συνήθως αποτελούνται από 2 β-πτυχωτές δομές και μια α-έλικα. Η πιο γνωστή τάξη των συγκεκριμένων πρωτεϊνών είναι η Cys2His2. Άλλες δυο μεγάλες υπερτάξεις μεταγραφικών παραγόντων είναι αυτή της έλικας – στροφή – έλικας και των παραγόντων με β-ικρίωμα που εφάπτονται με την ελάσσονα αύλακα. Η πρώτη υπέρταξη χαρακτηρίζεται από μεταγραφικούς παράγοντες που

αποτελούνται από δυο α-έλικες ενωμένες μεταξύ τους από μικρό αριθμό αμινοξέων (14). Στη δεύτερη υπέρταξη στην οποία περιέχονται γνωστοί μεταγραφικοί παράγοντες όπως NF-kB1, p53 και δεσμεύουν DNA μέσα από τη χαρακτηριστική δομή β-ικριώματος (15).

1.3.3 Αιματοποιητικοί μεταγραφικοί παράγοντες

Το αιματοποιητικό σύστημα αποτελεί ένα πολύ καλό μοντέλο μελέτης της κυτταρικής διαφοροποίησης αλλά και της γονιδιακής ρύθμισης. Όπως είναι αναμενόμενο, οι μεταγραφικοί παράγοντες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην διαφοροποίηση των HSC σε ώριμα κύτταρα του αίματος, όπως έχει φανεί από πειράματα στοχευμένης απαλοιφής τους (targeted gene knock-out ή conditional knock-out) σε ποντικούς. Οι μεταγραφικοί παράγοντες που είναι απαραίτητοι στην αιματοποίηση προέρχονται από όλες τις τάξεις των μεταγραφικών παραγόντων (16).

Στην αιματοποίηση οι μεταγραφικοί παράγοντες ανάλογα με το ρόλο που παίζουν μπορούν να διαχωριστούν σε 2 κατηγορίες. Σε αυτούς που είναι απαραίτητοι για το σχηματισμό και τη λειτουργία των HSC και σε αυτούς που είναι απαραίτητοι για τη κυτταρική διαφοροποίηση. Για παράδειγμα, ο μεταγραφικός παράγοντας TAL-1 που φέρει δομή έλικας – θηλιάς – έλικας μαζί με την πρωτεΐνη LMO2 με την οποία αλληλεπιδρά άμεσα είναι απαραίτητοι για τη αιματοποίηση καθώς απουσία ενός εκ των δύο έχει ως αποτέλεσμα τη μη παραγωγή αιματοποιητικών κυττάρων τόσο στο στάδιο της αρχέγονης όσο και της οριστικής αιματοποίησης (17). Μεταγραφικοί παράγοντες όπως οι PU.1, C/EBPα, Ikaros, GATA-1, FOG-1 και Gfi-1b έχει δείχθει ότι είναι απαραίτητοι για τη διαφοροποίηση αρκετών αιματοποιητικών σειρών μεταξύ των οποίων η ερυθρά / μεγακαρυωτική, μυελική, εοσινοφιλική κοκ (18).

Οι αιματοποιητικοί μεταγραφικοί παράγοντες έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους αλλά και με μεταγραφικούς συμπαράγοντες και να σχηματίζουν μεγάλα πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Η δράση των συγκεκριμένων συμπλόκων έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ή αποσιώπηση συγκεκριμένων γονιδιακών στόχων (19). Οι μεταγραφικοί συμπαράγοντες μπορούν να τροποποιούν τη δομή του νουκλεοσώματος ή/και να τροποποιούν μετα-μεταφραστικά τις ιστόνες. Οι μετα-μεταφραστικές

τροποποιήσεις που περιλαμβάνουν μεθυλίωση, ακετυλίωση, φωσφορυλίωση, ουβικουϊτίνωση, σουμοϋλίωση και ριβοζυλίωση χαρακτηρίζονται ως επιγενετικές σημάσεις. Η δράση των μεταγραφικών παραγόντων σε συνδυασμό με τις επιγενετικές σημάσεις οδηγούν στην ολοένα μεγαλύτερη δέσμευση των κυττάρων σε μια σειρά της κυτταρικής διαφοροποίησης.

1.4.1 Μεταγραφικοί παράγοντες GATA

Οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA σχηματίζουν μια οικογένεια 6 παραγόντων που είναι εξελικτικά διατηρημένοι και διακρίνονται από δυο χαρακτηριστικά δάκτυλα ψευδαργύρου. Οι παράγοντες GATA προσδένονται στην αλληλουχία (A/T)GATA(A/G) με τη χρήση του δάκτυλου ψευδαργύρου Cys-X₂-Cys-X₁₇-Cys-X₂-Cys, το οποίο εντοπίζεται στο καρβοξυ-τελικό άκρο (CF) της κάθε πρωτεΐνης. Το δεύτερο δάκτυλο ψευδαργύρου βρίσκεται στο αμινο-τελικό άκρο (NF) της πρωτεΐνης.

Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων GATA διαιρείται σε δυο υποομάδες ανάλογα με την έκφραση τους. Η μια ομάδα GATA παραγόντων είναι αυτή που εμπλέκεται στην αιματοποίηση και αποτελείται από τους παράγοντες GATA-1, -2, -3. Κάθε ένας από αυτούς είναι απαραίτητος σε διαφορετικά στάδια της διαφοροποίησης των αιματοποιητικών κυτταρικών σειρών αλλά και για την παραγωγή των κυττάρων του αίματος, καθώς απουσία των συγκεκριμένων παραγόντων οδηγεί σε θάνατο στο εμβρυικό στάδιο σε ποντίκια (16).

Ο μεταγραφικός παράγοντας GATA-2 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα προγονικά αιματοποιητικά κύτταρα όπως επίσης στα μεγακαρυοκύτταρα και στα μαστικά κύτταρα. Σε ποντίκια όπου έχει αδρανοποιηθεί το γονίδιο της GATA-2 υπάρχει σημαντική μείωση της αιματοποίησης στο λεκιθικό σάκο οδηγώντας σε σοβαρή αναιμία και θάνατο κατά το εμβρυικό στάδιο (20). Μελέτες της λειτουργίας του μεταγραφικού παράγοντα GATA-2 έχουν δείξει ότι είναι απαραίτητος για τον πολλαπλασιασμό των MPP σε έμβρυα και ενήλικες (21). Η εξωτερική έκφραση του GATA-2 στα MPP προκαλεί αναστολή της ερυθροποίησης (22). Κατά τη διάρκεια της ερυθροποίησης όπως θα αναφερθεί και παρακάτω η έκφραση της GATA-2 καταστέλλεται ώστε να μπορέσει να εκτελεστεί το πρόγραμμα της διαφοροποίησης.

Ο μεταγραφικός παράγοντας GATA-3 εκφράζεται στα Τ – λεμφοκύτταρα του αιματοποιητικού συστήματος όπως επίσης και σε άλλους ιστούς όπως ο νευρικός, το δέρμα, το ήπαρ και οι νεφροί. Η απώλεια του GATA-3 σε ποντίκια έχει ως αποτέλεσμα τον πρόωρο εμβρυικό θάνατο εξαιτίας εσωτερικής αιμορραγίας και εγκεφαλικών δυσμορφιών. (23)

Η δεύτερη οικογένεια των παραγόντων περιλαμβάνει τους υπόλοιπους παράγοντες GATA που είναι οι GATA-4, -5, -6 και οι οποίοι εκφράζονται σε διαφορετικούς ιστούς και χαρακτηρίζονται και ως καρδιακοί GATA παράγοντες εξαιτίας του σημαντικού ρόλου που διαδραματίζουν στην ανάπτυξη της καρδιάς (24). Συγκεκριμένα η απουσία των μεταγραφικών παραγόντων GATA-4 και GATA-6 έχει ως αποτέλεσμα το θάνατο κατά το εμβρυικό στάδιο εξαιτίας προβλημάτων στο σχηματισμό της καρδιάς και του ενδοδέρματος, αντίστοιχα. Η αποσιώπηση της έκφρασης του GATA-5 δεν οδηγεί σε αναπτυξιακή θνησιμότητα αλλά σε προβλήματα που σχετίζονται με το ουροποιητικό σύστημα. Γενικότερα η απουσία των τριών αυτών παραγόντων δημιουργεί προβλήματα σε ιστούς οι οποίοι προέρχονται από το μεσόδερμα και το ενδόδερμα.

1.4.2 Έκφραση και λειτουργία του μεταγραφικού παράγοντα GATA-1.

Ο μεταγραφικός παράγοντας GATA-1 αποτελεί «ιδρυτικό» μέλος της οικογενείας των παραγόντων GATA και ανήκει στη τάξη Cys4. Είναι επίσης γνωστός ως NF-E1, NF-1, Ery-1 και GF-1 και αρχικά αναγνωρίστηκε ως πρωτεΐνη με ειδικότητα πρόσδεσης στο 3' του ενισχυτή της β-σφαιρίνης (25). Κλωνοποιήθηκε για πρώτη φορά από την ερυθρολευχαιμική κυτταρική σειρά ποντικού MEL (26) και από ερυθρά κύτταρα όρνιθας (27). Η ανθρώπινη ομόλογη πρωτεΐνη εντοπίζεται στο χρωμόσωμα Χ στη θέση Xp21-11 (28), κάτι το οποίο ισχύει και για τη GATA-1 στον ποντικό.

Η GATA-1 εκφράζεται τόσο στα αρχέγονα όσο και στα οριστικά κύτταρα του ερυθροποιητικού συστήματος (29), (30), στα μεγακαρυοκύτταρα (31), (32), εοσινόφιλα (33), μαστικά (31) και στα κύτταρα Sertoli στους όρχεις (34,35).

Ο παράγοντας GATA-1 είναι απαραίτητος για τη φυσιολογική ερυθροποίηση. Εμβρυικά βλαστικά κύτταρα στα οποία δεν εκφράζεται η πρωτεΐνη GATA-1 είναι ικανά να συνεισφέρουν στη δημιουργία όλων των

ιστών σε χειμερινά ποντίκια εκτός των ερυθρών κυττάρων του αίματος (36). *In vitro* διαφοροποίηση των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων στα οποία απουσιάζει ο GATA-1 απέδειξε ότι υπάρχει παύση τόσο της αρχέγονης όσο και της οριστικής ερυθροποίησης στο στάδιο του προερυθροβλάστη (37), το οποίο οφείλεται στο ότι οι προ-ερυθροβλάστες πεθαίνουν λόγω απόπτωσης (38). Ποντίκια στα οποία απουσιάζει ο GATA-1 πεθαίνουν από βαριάς μορφής αναιμία μεταξύ των εμβρυικών ημερών 10,5 και 11,5 (29). Έμβρυα ποντικών στα οποία εκφράζεται 5% της GATA-1 (GATA1.05) εμφανίζουν επίσης παύση στην αρχέγονη ερυθροποίηση και πεθαίνουν μεταξύ των εμβρυικών ημερών 11,5 και 12,5 (39). Έκφραση 20% της GATA-1 έχει ηπιότερο φαινότυπο στα ποντίκια και παρόλο που τα περισσότερα πεθαίνουν μεταξύ των εμβρυικών ημερών 13,5 και 14,5 εξαιτίας αναποτελεσματικής αρχέγονης και οριστικής ερυθροποίησης, μικρό ποσοστό ποντικών, της τάξης του 2%, γεννιούνται (έναντι του αναμενόμενου 25%). Ακόμα μικρότερο ποσοστό αυτών επιβιώνει μέχρι την ενηλικίωση. Τα ποντίκια αυτά είναι αναιμικά κατά τη γέννηση ωστόσο στη συνέχεια ανακάμπτουν και έχουν φυσιολογική διάρκεια ζωής (40). Από τα παραπάνω διαπιστώνεται πως υπάρχει άμεση σύνδεση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης της GATA-1 και της σοβαρότητας του φαινότυπου.

Η ανάλυση της απενεργοποίησης του γονιδίου της GATA-1 ειδικά στα μεγακαρυκύτταρα δείχνει πως η GATA-1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη τους. Συγκεκριμένα η απουσία GATA-1 οδηγεί σε αυξημένο πολλαπλασιασμό και ελαττωματική ωρίμανση των μεγακαρυωτικών προγονικών κυττάρων όπως και σε μειωμένο αριθμό αιμοπεταλίων (41). Τα παραγόμενα αιμοπετάλια δεν είναι πλήρως λειτουργικά και εμφανίζουν μη φυσιολογική μορφολογία. Η GATA-1 έχει επίσης σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των εοσινόφιλων αλλά και στη τελική διαφοροποίηση των μαστικών κυττάρων. Ενδεικτικά αποσιώπηση της GATA-1 ειδικά στα εοσινόφιλα οδηγεί στην απώλεια της σειράς (42). Ανάλυση των μαστικών κυττάρων σε ποντικούς που εκφράζουν 20% GATA-1 δείχνει μεγάλο αριθμό πρόδρομων κυττάρων, φυσιολογικό αριθμό ωρίμων κυττάρων αλλά με μη φυσιολογική μορφολογία (43). Τέλος η αποσιώπηση της GATA-1 στα κύτταρα Sertoli δεν εμφανίζει κάποιο φαινότυπο (44).

1.4.3 Δομή της πρωτεΐνης GATA-1

Η πρωτεΐνη GATA-1 αποτελείται από 413 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 48 kDa. Αποτελείται από τουλάχιστον τρεις λειτουργικές δομικές περιοχές (Εικόνα 3). Έχει δύο δάκτυλα ψευδαργύρου ένα στο αμινο-τελικό (N-F) και ένα στο καρβοξυ-τελικό άκρο (C-F), ενώ στο αμινο-τελικό μέρος περιλαμβάνεται και η περιοχή ενεργοποίησης (AD) που αποτελείται από 80 αμινοξέα.



Εικόνα 3. Ο μεταγραφικός παράγοντας GATA-1 περιέχει τρεις λειτουργικές περιοχές. AD: περιοχή ενεργοποίησης (activation domain), N-F: άμινο-τελικό δάκτυλο ψευδαργύρου (N-finger), C-F (C-finger) καρβοξύ-τελικό δάκτυλο ψευδαργύρου

Η περιοχή AD αρχικά αναγνωρίσθηκε διότι μετά την αφαίρεση της δεν παρατηρήθηκε μεταγραφική ενεργοποίηση ενός γονιδίου μάρτυρα (45). Ωστόσο η απάλειψη των 63 πρώτων αμινοξέων της GATA-1 δεν επηρεάζει τη διαφοροποίηση των ερυθρών και μεγακαρυωτικών κυττάρων (46,47). Όταν η απαλειπτική μετάλλαξη της GATA-1 στην οποία απουσιάζουν τα 83 πρώτα αμινοξέα εκφραστεί στο υπόβαθρο των GATA1.05 ποντικών σε χαμηλά με μέτρια επίπεδα η οριστική ερυθροποίηση είναι προβληματική. Όταν η έκφραση είναι υψηλή υπάρχει διάσωση του φαινότυπου υποδεικνύοντας ότι υπάρχει ρόλος για το AD στην ερυθροποίηση (47).

Από τα δάκτυλα ψευδαργύρου του GATA-1, το καρβοξύ-τελικό C-F είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση και πρόσδεση στις αλληλουχίες GATA (48), που απαντώνται σε όλα τα ερυθροειδικά γονίδια (49). Το δάκτυλο C-F εμπλέκεται και στις αλληλεπιδράσεις με τους μεταγραφικούς παράγοντες (σε συνεργασία και με το N-F) EKLF, Sp1 και PU.1 (50,51). Ο δάκτυλος N-F δεν προσδένει άμεσα DNA αλλά συμμετέχει στη σταθεροποίηση της πρόσδεσης του δακτύλου C-F στο DNA (52). Ο κύριος ρόλος του N-F είναι η συμμετοχή του στο σχηματισμό των πρωτεϊνικών συμπλόκων που σχηματίζει ο GATA-1 με μεγάλο αριθμό μεταγραφικών παραγόντων και συμπαραγόντων όπως FOG-1, EKLF-1, CBP/P300, TAL-1 αλλά και με τον ίδιο του τον εαυτό (49,53).

Μελέτες που έλαβαν χώρα στη προερυθροβλαστική σειρά GATA-1 *-/-* κυττάρων G1E έδειξαν ότι και τα δύο δάκτυλα ψευδαργύρου είναι απαραίτητα για την τελική διαφοροποίηση της σειράς (46). Η G1E είναι μια πρότυπη κυτταρική σειρά ποντικού στην οποία η διαφοροποίηση έχει σταματήσει στο στάδιο του προερυθροβλάστη και η GATA-1 δεν εκφράζεται ύστερα από γονιδιακά στοχευμένη απάλειψη της. Η αποκατάσταση της έκφρασης της GATA-1 οδηγεί στη συνέχιση της τελικής διαφοροποίησης. Περισσότερες αποδείξεις σχετικά με το ρόλο των δακτύλων του GATA-1 προέκυψαν από *in vivo* πειράματα όταν ποντίκια GATA1.05 διασταυρώθηκαν με διαγονιδιακά τα οποία εκφράζουν απαλειπτικές μεταλλάξεις των δακτύλων ψευδαργύρου (47). Από τα συγκεκριμένα πειράματα αποδείχθηκε ότι το C-F είναι απολύτως απαραίτητο τόσο για την πρώιμη όσο και για την τελική ερυθροποίηση, ωστόσο το N-F αποδείχθηκε ότι είναι απαραίτητο μόνο για την τελική ερυθροποίηση.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω διαπιστώνεται πως και οι τρεις λειτουργικές του μεταγραφικού παράγοντα GATA-1 είναι απαραίτητες για τη τελική διαφοροποίηση των ερυθροκυττάρων, ωστόσο για την πρώιμη διαφοροποίηση χρειάζεται μόνο το C-F. Μέσα από τις διαφορικές ανάγκες για GATA-1 ανάλογα με τα αναπτυξιακά στάδια της ερυθροποίησης αποδεικνύεται ο σημαντικός ρόλος που διαδραματίζει στην διαφοροποίηση των ερυθροκυττάρων

1.5 Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της GATA-1

Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι η GATA-1 αλληλεπιδρά με αρκετούς μεταγραφικούς παράγοντες και συμπαράγοντες. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι πολύ σημαντικές για την αιματοποίηση καθώς οδηγούν στην ενεργοποίηση ή αποσιώπηση των γονιδιακών στόχων της GATA-1.

1.5.1 Αλληλεπίδραση της GATA-1 με τον εαυτό της

Έχει αποδειχθεί ότι η GATA-1 έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με τον εαυτό της *in vitro* (54). Τόσο το N-F όσο και το C-F μπορούν ανεξάρτητα να αλληλεπιδράσουν με τη GATA-1 (53). Ο διμερισμός της GATA-1 είναι πιθανό να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των υποκινητών που

περιέχουν πολλαπλές GATA περιοχές, από τη στιγμή που η μετάλλαξη σε συγκεκριμένα αμινοξέα στη περιοχή των δακτύλων μειώνει τη ικανότητα της GATA-1 να ενεργοποιεί γονιδιακούς μάρτυρες. Επιπλέον έχει δειχθεί ότι ο διμερισμός της GATA-1 είναι σημαντικός για τη θετική ρύθμιση του υποκινητή της GATA-1 στο zebrafish (55). Άλλες πιθανές λειτουργίες του διμερισμού της GATA-1 είναι η δημιουργία επαφών μεταξύ υποκινητών και ενισχυτών όπως και η πρόσληψη των συμπλόκων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης.

1.5.2 Αλληλεπίδραση της GATA-1 με FOG-1

Η FOG-1 είναι μια πρωτεΐνη η οποία περιέχει 9 δάκτυλα ψευδαργύρου τα οποία έχουν ευρεία απόσταση μεταξύ τους και αναγνωρίστηκε πρώτη φορά σε πειράματα διαλογής σε διπλά υβρίδια ζυμομυκήτων (yeast two hybrid) (56). Η FOG-1 αλληλεπιδρά με το N-F της GATA-1 κυρίως μέσα από το 6 δάκτυλο ψευδαργύρου (57) αν και τα δάκτυλα ψευδαργύρου 1, 5, 9 επίσης συμβάλλουν στην αλληλεπίδραση (58). Η FOG-1 συνεκφράζεται και αλληλεπιδρά με τη GATA-1 στις ερυθρές και μεγακαρυωτικές σειρές (56)

Ο φαινότυπος που εμφανίζουν τα ποντίκια στα οποία απουσιάζει η FOG-1 είναι σχεδόν όμοιος με τον φαινότυπο της απουσίας της GATA-1. Τα ποντίκια πεθαίνουν στα μέσα της κύησης από βαριάς μορφής αναιμία που προκαλείται από ελαττωματική αρχέγονη και οριστική ερυθροποίηση αποδεικνύοντας ότι η FOG-1 είναι απαραίτητη για τη σωστή λειτουργία του GATA-1. Η απάλειψη της FOG-1 οδηγεί σε ολοκληρωτική απώλεια της μεγακαρυωτικής σειράς αποκαλύπτοντας ένα ρόλο για τη FOG-1 που εκπληρώνεται ανεξαρτήτως από την αλληλεπίδρασή της με τη GATA-1 (59). Η αναγκαιότητα της αλληλεπίδρασης της GATA-1/FOG-1 κατά τη διάρκεια της οριστικής ερυθροποίησης αποδείχθηκε από την ανάλυση της GATA-1 που φέρει μεταλλάξεις στα αμινοξέα που προσδένεται η FOG-1 (60). Πρόδρομα κύτταρα της ερυθράς σειράς που εκφράζουν μεταλλάξεις της GATA-1 που δεν μπορούν να προσδέσουν FOG-1 δεν μπορούν να διαφοροποιηθούν. Ο συγκεκριμένος φαινότυπος διασώζεται από την έκφραση των μεταλλάξεων της FOG-1 που μπορούν να προσδέσουν τις συγκεκριμένες μεταλλαγμένες GATA-1 πρωτεΐνες.

Η FOG-1 αν και δεν προσδένεται στο DNA έχει την ικανότητα να ρυθμίζει τη δραστηριότητα της GATA-1 στο πλαίσιο του εκκινητή. Συνεργάζεται

με τη GATA-1 τόσο για την ενεργοποίηση όσο και για την αποσιώπηση γονιδίων. Η έκφραση της FOG-1 επάγεται ταχύτατα από τη GATA-1 στα ερυθροκύτταρα μέσω της πρόσδεσης της GATA-1 στον εκκινητή του γονιδίου της FOG-1 ενεργοποιώντας άμεσα την έκφραση της. Αντίθετα αποδείχθηκε ότι η πρωτεϊνοσύνθεση είναι απαραίτητη για τη μεταγραφή της β-σφαιρίνης (61)

Μέσω της FOG-1 η GATA-1 αλληλεπιδρά με κατασταλτικά σύμπλοκα και συμπαράγοντες. Ο χαρακτηρισμός των πρωτεϊνικών συμπλόκων της GATA-1 και της FOG-1 στα κύτταρα MEL έχει δείξει ότι αλληλεπιδρούν με το πρωτεϊνικό σύμπλοκο NuRD (Nucleosome Remodelling Complex) το οποίο περιέχει HDACs (histone deacetylases) το ένζυμο αναδιαμόρφωσης του νουκλεοσώματος Mi2β και MBDs (methyl binding proteins) (62,63). Έχειδειχθεί ότι το σύμπλοκο GATA-1/FOG-1/NuRD, είναι υπεύθυνο για την καταστολή του γονιδίου της GATA-2 που είναι κρίσιμη για τη τελική διαφοροποίηση των ερυθροκυττάρων.

1.5.3 Αλληλεπίδραση της GATA-1 με SCL/TAL-1

Η TAL-1 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ανήκει στην κατηγορία έλικας-θηλειάς-έλικας και προσδένεται στην αλληλουχία του DNA που ονομάζεται E-box (CANNTG). Η έκφραση του TAL-1 μιμείται αυτή του GATA-1 καθώς εκφράζεται στα ερυθρά, στα μεγακαρυοκύτταρα και στα μαστικά κύτταρα (17). Η απαλοιφή του γονιδίου της TAL-1 προκαλεί ολοκληρωτική απώλεια της αιματοποίησης στο λεκιθικό σάκο. Παράλληλα τα βλαστικά κύτταρα στα οποία απουσιάζει η TAL-1 δεν μπορούν να συνεισφέρουν στην αιματοποίηση σε χειμερικά ποντίκια (64). Ειδική απαλοιφή του γονιδίου στο στάδιο της ενηλικιωμένης ερυθροποίησης οδήγησε σε προβληματική ερυθροποίηση. Υποδεικνύοντας το σημαντικό ρόλο της TAL-1 στη διαφοροποίηση των ερυθροκυττάρων (65).

Στα ερυθροκύτταρα η TAL-1 έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχει στο πρωτεϊνικό σύμπλοκο που αποτελείται από τις E2A, LMO2, LDB1 και GATA-1 (10). Το συγκεκριμένο σύμπλοκο έχει την ικανότητα να προσδένει E-box/GATA αλληλουχίες DNA οι οποίες απέχουν μεταξύ τους 9 με 11 βάσεις. Τέτοιες αλληλουχίες είναι παρούσες σε πολλά γονίδια στις ερυθρές κυτταρικές σειρές καθώς και στα ρυθμιστικά στοιχεία των γονιδίων των ίδιων των

μεταγραφικών παραγόντων όπως του GATA-1, TAL-1 και EKLF. Η σπουδαιότητα του συγκεκριμένου συμπλόκου στην ερυθροποίηση αποδεικνύεται όταν η απαλοιφή της LMO2 στα ποντίκια καταλήγει σε πανομοιότυπο φαινότυπο με αυτό της TAL-1 (66). Επίσης ο συγκεκριμένος φαινότυπος συνάδει και με το γεγονός ότι η LMO2 αποτελεί το συνδετικό κρίκο μεταξύ της TAL-1 και της GATA-1 (67). Επιπρόσθετα η εκτοπική έκφραση της TAL-1, LMO-2 και GATA-1 σε έμβρυα *Xenopus* προώθησε την ερυθροποίηση, ενώ στοχευμένη αποσιώπηση της LDB-1 σε zebrafish οδήγησε σε προβληματική οριστική αιματοποίηση (68).

Ο χαρακτηρισμός των συμπλόκων της TAL-1 και LDB-1 από κύτταρα MEL οδήγησε στην ταυτοποίηση νέων αλληλεπιδρώνων πρωτεϊνών όπως της ETO-2 (68,69). Πειράματα αποσιώπησης σε έμβρυα zebrafish απέδειξαν ότι η ETO-2 είναι απαραίτητη για την τελική διαφοροποίηση των ερυθροκυττάρων. Το ποσό της ETO-2 που αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο της TAL-1 μειώνεται κατά τη τελική διαφοροποίηση, γεγονός που συνάδει με το σχηματισμό του συμπλόκου TAL-1/GATA-1 το οποίο ενεργοποιεί σειρά γονιδίων. Ωστόσο ο ακριβής ρόλος της ETO-2 στην αρχή της ερυθροποίησης παραμένει ακόμη άγνωστος.

1.5.6 Αλληλεπίδραση της GATA-1 με την EKLF

Ο ερυθροειδικός παράγοντας τύπου Krüppel EKLF ανήκει στην κατηγορία των μεταγραφικών παραγόντων με δάκτυλο ψευδαργύρου και είναι απαραίτητος για τη ρύθμιση των σφαιρινών αλλά και για την ερυθροποίηση γενικότερα (70). Προσδένεται σε αλληλουχίες τύπου CACC που είναι παρούσες στον υποκινητή της β-σφαιρίνης όπως και στους υποκινητές πολλών ερυθροειδικών γονιδίων. Η αλληλουχία CACC είναι πολύ σημαντική γεγονός το οποίο αποδεικνύεται από τις φυσικά απαντώμενες μεταλλάξεις της συγκεκριμένης αλληλουχίας στη μεσογειακή αναιμία (71). Η απαλοιφή του γονιδίου της EKLF, έχει ως αποτέλεσμα τον εμβρυικό θάνατο στις μέρες E14-15 εξαιτίας σοβαρής αναιμίας (72). Η ανάλυση του φαινότυπου των ποντικών έδειξε ότι υπάρχει αποτυχία ενεργοποίησης του γονιδίου της β-σφαιρίνης όταν η ερυθροποίηση λαμβάνει χώρα στο εμβρυικό ήπαρ. Στον υποκινητή της β-σφαιρίνης παρατηρήθηκε αναδιαμόρφωση της χρωματίνης σε κλειστή μορφή με απώλεια των θέσεων της DNase I στο LCR (locus control region) (73).

Πειράματα ελέγχου της έκφρασης με τη βοήθεια μικροσυστοιχιών σε προγονικά κύτταρα της ερυθράς σειράς στα οποία απουσιάζει ο EKLF απέδειξαν ότι υπάρχει προβληματική έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση της αιμοσφαιρίνης όπως και τη σταθερότητα της μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων (74). Ο παράγοντας EKLF έχει την ικανότητα να ευνοήσει την ερυθροποίηση έναντι της μεγακαρυωποίησης μια λειτουργία η οποία βασίζεται στη σουμοϋλίωση του EKLF (75).

1.5.7 Αλληλεπίδραση της GATA-1 με τη Gfi-1b

Ο μεταγραφικός παράγοντας Gfi-1b αποτελείται από 6 δάκτυλα ψευδαργύρου και μια περιοχή τύπου SNAG στο αμινο-τελικό άκρο που βοηθά τη μεταγραφική καταστολή (76). Υπερέκφραση της Gfi-1b σε προγονικά αιματοποιητικά κύτταρα οδηγεί σε πολλαπλασιασμό των ερυθροβλαστών οι οποίοι δεν μπορούν να διαφοροποιηθούν πλήρως και πεθαίνουν μέσω απόπτωσης (77). Η στοχευμένη απαλειφή του γονιδίου σε ποντίκια έχει ως αποτέλεσμα το θάνατο στο εμβρυικό στάδιο κατά τη μέρα E15 εξαιτίας αποτυχημένης οριστικής ερυθροποίησης αναδεικνύοντας την αναγκαιότητα της Gfi-1b στη διαφοροποίηση (78). Από τα πειράματα υπερέκφρασης και απώλειας λειτουργίας της Gfi-1b προκύπτει ότι η λειτουργία της Gfi-1b στην ερυθροποίηση εξάρταται άμεσα από τη ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης. Υπάρχουν αποδείξεις πως η έκφραση της Gfi-1b αυξάνεται στην αρχή της διαφοροποίησης των ερυθροκυττάρων ενώ στη συνέχεια μειώνεται πιθανώς μέσα από τη καταστολή του υποκινητή της Gfi-1b από την ίδια την πρωτεΐνη (79). Αρκετοί από τους γονιδιακούς στόχους της Gfi-1b που έχουν ταυτοποιηθεί εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και στην καταστολή της σηματοδότησης μέσω κυτοκινών. (80,81)

1.5.8 Αλληλεπίδραση της GATA-1 με τη ZBP-89

Η πρωτεΐνη ZBP-89 ανήκει στην κατηγορία των μεταγραφικών παραγόντων με δάκτυλο ψευδαργύρου τύπου Krüppel (Cys2-His2), αποτελείται από 794 αμινοξέα και προσδένεται σε αλληλουχίες DNA που είναι πλούσιες σε βάσεις GC (82). Στο αμινο-τελικό άκρο εντοπίζονται τα τέσσερα δάκτυλα ψευδαργύρου ενώ στο καρβοξυ-τελικό άκρο υπάρχει μια περιοχή

PEST (proline, glutamic acid, serine, threonine) (83). Ο μεταγραφικός παράγοντας ZBP-89 έχει διπλή λειτουργία αφού μπορεί τόσο να ενεργοποιεί όσο και να καταστέλλει γονίδια και εκφράζεται σε πολλούς ιστούς. Ενδεικτικά έχει βρεθεί ότι η ZBP-89 είναι ικανή να καταστείλει την έκφραση της βιμεντίνης, β_2 ιντεγκρίνης CD11b, γαστρίνης κ.α ενώ μπορεί να ενεργοποιεί την έκφραση των γονιδίων $p21^{waf1}$, τον υποδοχέα α - και β - των T κυττάρων, Ick, IAP κ.α. Ο ακριβής μηχανισμός ωστόσο μέσω του οποίου η ZBP-89 ασκεί τις λειτουργίες αυτές παραμένει ακόμη άγνωστος (83).

Η ZBP-89 αναγνωρίστηκε ως πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τη GATA-1 ύστερα από εφαρμογή της μεθόδου *in vivo* βιοτινυλίωσης (σελ. 48) και απομόνωση συμπλόκων της GATA-1 σε μεγακαρυωβλαστικές και ερυθροβλαστικές κυτταρικές σειρές L8057 και MEL αντίστοιχα (84). Επιπλέον από χρωματογραφία μοριακής διήθησης διαπιστώθηκε πως είναι δυνατό να σχηματιστεί σύμπλοκο μεταξύ των GATA-1, ZBP-89 και FOG-1. Αναλύοντας τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της ZBP-89 διαπιστώθηκε πως είναι ικανή να αλληλεπιδράσει με τη GATA-1 απουσία FOG-1 αλλά και με τη FOG-1 απουσία της GATA-1. Η στοχευμένη απαλοιφή της ZBP-89 σε ποντίκια οδηγεί σε εμβρυικό θάνατο κατά τη μέρα E10.5 εξαιτίας σοβαρής αναιμίας και καθυστερημένης ανάπτυξης υποδεικνύοντας σημαντικό ρόλο στην ερυθροποίηση. Η ZBP-89 προσδένεται σε αρκετά ερυθροειδικά γονίδια στη θέση του υποκινητή (85) και φαίνεται να συμμετέχει ενεργά στην έκφραση των γονιδίων των σφαιρινών.

1.5.9 Αλληλεπίδραση της GATA-1 με τη ZNF143

Η πρωτεΐνη ZNF143 ή αλλιώς STAF (selenocysteine tRNA gene transcription activating factor) είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που προσδένεται σε πλήθος υποκινητών γονιδίων small RNA όπως και πρωτεϊνών (85). Από πειράματα ανοσοκατακρημνίσεων χρωματίνης υπολογίζεται ότι η ανθρώπινη πρωτεΐνη ZNF143 είναι ικανή να προσδεθεί σε 2500 εξελικτικά διατηρημένες θέσεις δέσμησης οι οποίες βρίσκονται σε 2000 γονιδιακούς υποκινητές πολλοί από τους οποίους σχετίζονται με CpG νησίδια (86). Η ικανότητα να ενεργοποιεί τη μεταγραφή των small RNA και των πρωτεϊνών γίνεται μέσω διαφορετικών διακριτών περιοχών της πρωτεΐνης (87) οι οποίες εντοπίζονται και εκτός της περιοχής δέσμησης του DNA.

Παρόλα αυτά, η λειτουργία του ZNF143 δεν είναι πλήρως διευκρινισμένη. Από τα μέχρι στιγμής πειράματα που έχουν γίνει φαίνεται πως εμπλέκεται στη ρύθμιση γονιδίων που έχουν σχέση με τον κυτταρικό κύκλο. (88,89). Επιπλέον η ZNF143 αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της ικανότητας ανανέωσης των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων. (90). Σε μοριακό επίπεδο έχειδειχθεί ότι αλληλεπιδρά με την CHD8 (chromodomain-helicase-DNA binding protein 8) προκειμένου να ενισχυθεί η έκφραση του γονιδίου U6.

Η στοχευμένη αποσιώπηση της ZNF43 σε zebrafish προκαλεί αναπτυξιακά προβλήματα. Ειδικότερα διαπιστώνονται: ανώμαλος σχηματισμός της καρδιάς και του εγκεφάλου, μειωμένος σχηματισμός αίματος, προβλήματα στη κυκλοφορία του αίματος κ.α. (91). Αξίζει να σημειωθεί πως η έκφραση της GATA-1 ήταν αρκετά μειωμένη κατά την αποσιώπηση του γονιδίου της ZNF143 υποδεικνύοντας ότι σχετίζεται άμεσα ή έμμεσα με τη ρύθμιση της έκφρασης της GATA-1. Στο πλαίσιο κατακρήμνισης στρεπταβιδίνης της GATA-1 στη μεγακαρυωβλαστική σειρά L8057 μια από τις πρωτεΐνες που ανιχνεύθηκε και επιβεβαιώθηκε ως αλληλεπιδρώσα με τη GATA-1, ήταν και η ZNF143 (92). Ωστόσο η λειτουργική σημασία της συγκεκριμένης αλληλεπίδρασης παραμένει ακόμα άγνωστη.

1.6 Πρότυπα για τη μελέτη της ερυθροποίησης

1.6.1 *In vitro* πρότυπα

Η ερυθροποίηση είναι δυνατό να μελετηθεί μέσω προτύπων ζωικών μοντέλων (*in vivo*) αλλά και σε πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων (*ex vivo*) ή κυτταροκαλλιέργειες αθανатоποιημένων κυττάρων που προσομοιάζουν τη φυσιολογική κατάσταση (*in vitro*).

Στις κυτταροκαλλιέργειες αθανатоποιημένων κυττάρων, τα κύτταρα είναι ικανά να διαιρούνται επ' άπειρον με τη χρήση θρεπτικού μέσου και με τη χορήγηση συγκεκριμένων αυξητικών παραγόντων ή επαγωγέων μπορούν να διαφοροποιηθούν. Μια τέτοια κυτταροσειρά είναι η ερυθρολευχαιμική σειρά MEL (Murine erythroleukemia cells) (93) στην οποία τα κύτταρα βρίσκονται σταματημένα στο στάδιο του προερυθροβλάστη ύστερα από επιμόλυνση κυττάρων του σπλήνα του ποντικού με τον ιό Friend. Τα MEL έχουν την ικανότητα να διαφοροποιηθούν και να συνθέσουν αιμοσφαιρίνη ύστερα από

την προσθήκη συγκεκριμένων παραγόντων (π.χ. DMSO). Η συγκεκριμένη πρότυπη κυτταρική σειρά επιλέχθηκε στη παρούσα διδακτορική διατριβή για τη μελέτη των συμπλόκων του GATA-1 εξαιτίας της ευκολίας καλλιέργειας της καθώς και της δυνατότητας απομόνωσης πολύ μεγάλης ποσότητας πυρηνικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων.

Μια άλλη πρότυπη κυτταρική σειρά είναι η G1E. Όπως έχει προαναφερθεί η G1E αποτελείται από προερυθλοβλάστες στους οποίους δεν εκφράζεται η GATA-1 ύστερα από στοχευμένη απάλειψη της στο στάδιο των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων (46). Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά πολλαπλασιάζεται όταν καλλιεργείται παρουσία του παράγοντα βλαστικών κυττάρων (stem cell factor, SCF) και χαμηλών επιπέδων ερυθροποιητίνης (Epo). Η διαφοροποίηση των συγκεκριμένων κυττάρων γίνεται ύστερα από εξωγενή αποκατάσταση της έκφρασης της GATA-1 με ταυτόχρονη αύξηση των επιπέδων της ερυθροποιητίνης.

Μια άλλη αρκετά χρησιμοποιούμενη μέθοδος της ερυθροποίησης είναι η διαφοροποίηση των εμβρυικών βλαστικών κυττάρου του ποντικού σε αιμοποιητικές γενεαλογίες (94). Ουσιαστικά δυο πειραματικές διαδικασίες εφαρμόζονται ευρέως. Στην πρώτη τα αιμοποιητικά κύτταρα προκύπτουν από το διαχωρισμό των εμβρυοειδών φορέων (embryoid bodies, EB) και καλλιέργεια των κυττάρων παρουσία συγκεκριμένων κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων (95). Στη δεύτερη μέθοδο τα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα καλλιεργούνται υπό την παρουσία της υποστηρικτικής σειράς OP9 η οποία προάγει την ερυθροποιητική διαφοροποίηση (96).

1.6.2 *In vivo* πρότυπα

Πέρα των κυτταρικών σειρών αρκετά ζωικά πρότυπα χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της ερυθροποίησης. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται ο *xenopus laevis*, zebrafish, όρνιθα και ο ποντικός. Η διαδικασία της ερυθροποίησης στον ποντικό έχει αρκετές ομοιότητες με την ανθρώπινη και διακρίνεται για την ύπαρξη δυο κυμάτων ερυθροποίησης την πρώιμη και την οριστική στα οποία παράγονται οι αντίστοιχες σφαιρίνες, όπως περιγράφεται και παραπάνω. Το zebrafish αποτελεί ένα πολύ καλό πρότυπο οργανισμό διότι προσφέρει πολλές πρακτικές διευκολύνσεις. Συγκεκριμένα η εύκολη εκτροφή τους και ο μεγάλος αριθμός απογόνων που δίνουν σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα

έμβρυα είναι διαφανή, διευκολύνοντας τη χρήση πολλών απεικονιστικών τεχνικών, τα καθιστά ένα αρκετά διαδεδομένο μοντέλο για τη μελέτη της ερυθροποίησης. Ο *xenopus* χρησιμοποιείται ως πρότυπος οργανισμός εξαιτίας της ευκολίας απομόνωσης κυττάρων που χρησιμοποιούνται μετέπειτα για πειράματα μεταμόσχευσης. Τέλος η ερυθροποίηση έχει μελετηθεί εκτεταμένα και στη όρνιθα η οποία προσφέρει πλεονεκτήματα όσον αφορά τη δημιουργία και τη διαφοροποίηση των ερυθρών κυττάρων. Για παράδειγμα μελετώντας την διαδικασία ερυθροποίησης στην όρνιθα διαπιστώθηκε η ένδο-εμβρυική προέλευση της οριστικής ερυθροποίησης (97), η οποία αργότερα αποδείχθηκε και στα θηλαστικά.

1.7 DNMT-1

1.7.1 Λειτουργία της DNMT-1.

Η μεθυλίωση του DNA είναι η βιοχημική διαδικασία προσθήκης μεθυλομάδας με ομοιοπολικό δεσμό στις βάσεις κυτοσίνης ή αδερίνης του DNA και παρατηρήθηκε για πρώτη φορά σε θύμο αδένος βοός (98). Στα θηλαστικά η μεθυλίωση του DNA συμβαίνει στις βάσεις κυτοσίνης στις θέσεις C5 κυρίως στο πλαίσιο δινουκλεοτιδίων CpG και πιο σπάνια σε μη CpG περιοχές. Ωστόσο μόνο συγκεκριμένες περιοχές CpG είναι μεθυλιωμένες, συγκεκριμένα από τις 56 εκατομμύρια CpG περιοχές του ανθρώπινου γονιδιώματος οι 50–60 % είναι μεθυλιωμένες το οποίο αντιστοιχεί σε 4-6% όλων των κυτοσινών (99).

Η μεθυλίωση του DNA γίνεται από μια ομάδα ενζύμων που ονομάζονται DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNA methyl-transferases, DNMTs). Τα συγκεκριμένα ένζυμα καταλύουν τη μεταφορά μεθυλομάδας από την S-αδενοσυλομεθειονίνη (SAM) στη θέση C5 των κυτοσινών. Η προσθήκη της μεθυλομάδας δεν παρεμβαίνει στη δημιουργία ζεύγους βάσεων Watson – Crick επειδή η μεθυλομάδα βρίσκεται στη μεγάλη αύλακα του DNA όπου μπορεί να αναγνωριστεί αποτελεσματικά από πρωτεΐνες που προσδένονται σε μεθυλιωμένο DNA. Στα θηλαστικά υπάρχουν δυο κατηγορίες ενζύμων που είναι υπεύθυνες για τη μεθυλίωση των CpG: η μια είναι οι *de novo* μεθυλοτρανσφεράσες και η άλλη είναι η μεθυλοτρανσφεράση συντήρησης. Στις *de novo* μεθυλοτρανσφεράσες ανήκουν οι DNMT-3a, DNMT-3b και

DNMT3L με την τελευταία όμως να μην εμφανίζει καταλυτική δράση. Στις μεθυλοτρανσφεράσες συντήρησης ανήκει μόνο η DNMT-1.

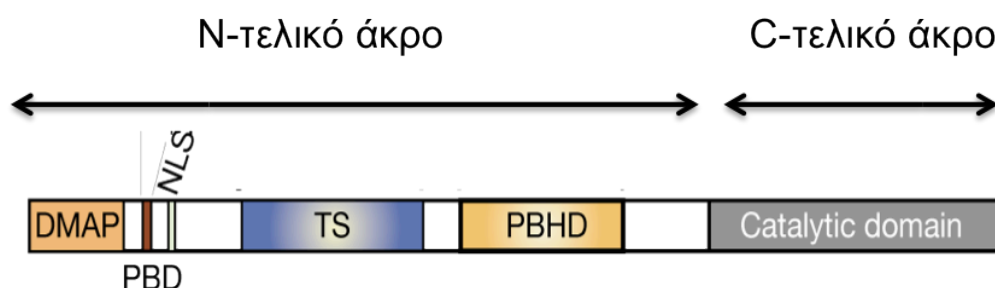
Η DNMT-1 είναι η πρώτη μεθυλοτρανσφεράση που κλωνοποιήθηκε και χαρακτηρίστηκε βιοχημικά (100). Η DNMT-1 έχει μεγαλύτερη συγγένεια για το ημιμεθυλιωμένο DNA έναντι του μη μεθυλιωμένου (101) και εντοπίζεται, σε αντίθεση με τις άλλες μεθυλοτρανσφεράσες, στις εστίες της αντιγραφής του DNA κατά τη διάρκεια της φάσης S (102,103). Ο ρόλος της DNMT-1 είναι ουσιαστικά η διατήρηση της μεθυλίωσης στις νεοσυντιθέμενες αλυσίδες του DNA που προκύπτουν κατά της διάρκεια της αντιγραφής, και για αυτό το λόγο χαρακτηρίζεται και ως μεθυλοτρανσφεράση συντήρησης.

Από γενετικές μελέτες σε ποντίκια έχει δειχθεί ότι η αποσιώπηση του γονιδίου της DNMT-1 οδηγεί σε εκτεταμένη απομεθυλίωση του γονιδιώματος και εμβρυικό θάνατο λίγο μετά το στάδιο της γαστριδίωσης, υποδεικνύοντας της αναγκαιότητα της DNMT-1 στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης (104). Μεταλλάξεις του γονιδίου της DNMT-1 ή μη λειτουργική πρωτεΐνη οδηγούν σε απώλεια της γενομικής αποτύπωσης όπως και σε προβληματική απενεργοποίηση του X χρωμοσώματος (105). Στα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα από τα οποία απουσιάζει η DNMT-1 είναι βιώσιμα και δεν εμφανίζουν αναπτυξιακές ή μορφολογικές ανωμαλίες παρά το αρκετά μειωμένο επίπεδο μεθυλίωσης (60%) (104), ωστόσο όταν γίνει επαγωγή της διαφοροποίησης τα κύτταρα πεθαίνουν. Διατάραξη της έκφρασης του γονιδίου της DNMT-1 σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου οδηγεί σε απώλεια του πολλαπλασιασμού με προβλήματα κατά το στάδιο της μίτωσης με επακόλουθο κυτταρικό θάνατο (106). Όλες οι μελέτες της λειτουργίας της DNMT-1 υποδεικνύουν το ρόλο της στη φυσιολογική ανάπτυξη τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση. Επιπλέον απώλεια της DNMT-1 σε ποντίκια τα καθιστά ευάλωτα στην ανάπτυξη όγκων καθώς δημιουργείται χρωμοσωμική αστάθεια (107).

1.7.2 Δομή και λειτουργικές περιοχές της DNMT-1

Η DNMT-1 είναι ένα μεγάλο ένζυμο το οποίο αποτελείται από 1620 αμινοξέα στον ποντικό και 1616 στον άνθρωπο. Το αμινο-τελικό μέρος της DNMT-1 αποτελείται από αρκετές λειτουργικές περιοχές ενώ στο καρβοξυ-τελικό μέρος εντοπίζεται η καταλυτική περιοχή (Εικόνα 4). Αναλυτικότερα στην

αμινο-τελική περιοχή περιέχεται η περιοχή DMAP η οποία ευθύνεται για την αλληλεπίδραση με τον μεταγραφικό καταστολέα DMAP και εμπλέκεται στη σταθερότητα της DNMT-1 (108,109). Η συγκεκριμένη περιοχή έχειδειχθεί ότι έχει την ικανότητα να προσδένεται και στο DNA σε CpG περιοχές (110). Η περιοχή πρόσδεσης της πρωτεΐνης PCNA (PCNA binding domain, PBD) ευθύνεται για την αλληλεπίδραση της DNMT-1 με την PCNA που έχει σαν αποτέλεσμα την παρουσία της DNMT-1 στις εστίες της αντιγραφής (111).



Εικόνα 4. Η DNA μεθυλοτρανσφεράση 1 αποτελείται από 6 λειτουργικές περιοχές. DMAP: περιοχή αλληλεπίδρασης με τη πρωτεΐνη DMAP, PBD: περιοχή αλληλεπίδρασης με τη PCNA (PCNA binding domain), NLS: σήμα πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization signal), TS: αλληλουχία στόχευσης (targeting sequence), PBHD: polybromo homology domain, Catalytic domain: καταλυτική περιοχή

Το σήμα πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization signal, NLS) εξυπηρετεί τη μεταφορά της DNMT-1 στον πυρήνα. Η αλληλουχία στόχευσης (targeting sequence, TS) εμπλέκεται στη μετάβαση της DNMT-1 στη χρωματίνη και στις εστίες της αντιγραφής (112). Πέρα από αυτό το ρόλο έχει αναφερθεί ότι η περιοχή εξυπηρετεί το διμερισμό της DNMT-1, αν και η λειτουργική σημασία σχηματισμού του διμερούς παραμένει ακόμη άγνωστη (113). Στο άμινο-τελικό άκρο της DNMT-1 περιέχεται ακόμη η polybromo homology domain (PBHD). Η PBHD αποτελείται από τις περιοχές BAH1 και BAH2 (Bromo-adjacent homology 1 and 2) οι οποίες απαντώνται σε πολλές πρωτεΐνες και σχετίζονται με τη μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων. Έχει αναφερθεί ως περιοχή αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών με σκοπό τη μεταγραφική καταστολή ωστόσο ο λειτουργικός της συγκεκριμένης περιοχής στη DNMT-1 είναι ακόμη άγνωστος.

Η καρβοξυ-τελική περιοχή της DNMT-1 ενώνεται με την αμινο-τελική μέσω από μια σειρά πεπτιδίων λυσίνης και γλυκίνης (KG repeats). Τα KG πεπτίδια έχειδειχθεί ότι προσδένονται σε Z-DNA και ενδεχομένως να συνεισφέρουν στη στόχευση της DNMT-1 σε εστίες της αντιγραφής (114). Το καρβοξυ-τελικό άκρο της DNMT-1 αποτελείται αποκλειστικά από την καταλυτική περιοχή και έχειδειχθεί από πειράματα με απαλειπτικές μεταλλάξεις πως η περιοχή από μόνη της δεν είναι ενεργή ούτε *in vitro* ούτε *in vivo* παρά την παρουσία όλων των αμινοξέων που απαιτούνται για τη μεθυλίωση του DNA. (110).

Ο υποπυρηνικός εντοπισμός της DNMT-1 αλλάζει δυναμικά κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Κατά τη διάρκεια της μεσόφασης η DNMT-1 είναι διάχυτα κατανεμημένη στον πυρήνα του κυττάρου. Στην αρχή και μέση της S-φάσης εντοπίζεται στις εστίες της αντιγραφής (112). Οι περιοχές PBD, TS και PBHD έχουν εμπλακεί στη στόχευση της πρωτεΐνης στις εστίες της αντιγραφής. Ωστόσο η απάλειψη των περιοχών TS και PBHD δεν επηρεάζει τη μετάβαση της DNMT-1 στα σημεία της αντιγραφής υποδηλώνοντας ότι η περιοχή PBD διαδραματίζει τον κεντρικό ρόλο για αυτή τη διαδικασία. Επιπλέον ποσότητα της DNMT-1 παραμένει στη κεντρομερή ετεροχρωματίνη στο τέλος της S-φάσης και κατά τη διάρκεια της G2, ακόμη και μετά την αντιγραφή της ετεροχρωματίνης. Η αλληλεπίδραση μεταξύ DNMT-1 και ετεροχρωματίνης γίνεται μέσω της περιοχής TS ανεξάρτητα από την αντιγραφή του DNA. Οι δυναμικές αλλαγές που παρατηρούνται στον υποπυρηνικό εντοπισμό της DNMT-1 κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου υποδηλώνουν την άμεση ρύθμιση της DNMT-1 από τον κυτταρικό κύκλο

Όπως προαναφέρθηκε DNMT-1 έχει μεγαλύτερη συγγένεια για το ημι-μεθυλιωμένο DNA ως υπόστρωμα έναντι του μη μεθυλιωμένου γεγονός το οποίο υποστηρίζει και το ρόλο της ως μεθυλοτρανσφεράση συντήρησης (101). Ουσιαστικά διαβάζει τη μεθυλίωση της μητρικής αλυσίδας την οποία και μεταφέρει στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα DNA. Η DNMT-1 είναι ένζυμο με ικανότητα μεθυλίωσης μεγάλων περιοχών του DNA χωρίς να απομακρύνεται από την εστία της αντιγραφής (115). Η προτίμηση της DNMT-1 για ημι-μεθυλιωμένο DNA οφείλεται στην ειδική αλληλεπίδραση των ημιμεθυλιωμένων CG περιοχών που δημιουργούνται κατά την αντιγραφή του DNA με το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου η οποία οδηγεί σε δομικές αλλαγές

και στην ενεργοποίηση του. Ωστόσο ο ακριβής μηχανισμός αναγνώρισης της μεθυλιωμένης κυτοσίνης στην αλυσίδα του DNA δεν είναι ακόμη γνωστός.

Η DNMT-1 έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με πολλές πρωτεΐνες στις οποίες συμπεριλαμβάνονται: οι HDAC1 (116), HDAC2 (108), DNMT3a και DNMT3b (117), οι μεταγραφικοί παράγοντες Rb και E2F1 (116), οι μεθυλοτρανσφεράσες των ιστονών Suv39H1 (118), Set7/9 (119), G9a (120) και EZH2 (121). Επιπρόσθετα έχει δείχθει ότι αλληλεπιδρά και με τις πρωτεΐνες HP1 (heterochromatin protein 1) (118), MeCP2 (122) και UHRF1 (123). Τέλος όπως αναφέρθηκε προηγουμένως έχει δείχθει ότι η DNMT-1 αλληλεπιδρά με τις PCNA (111) και DMAP1 (108).

Συνοψίζοντας τα παραπάνω τόσο από τις λειτουργικές όσο και από τις βιοχημικές μελέτες γίνεται αντιληπτό ότι DNMT-1 διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της μεθυλίωσης του γονιδιώματος ρόλο τον οποίο τον εκπληρώνει με τη βοήθεια πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με πλήθος πρωτεϊνών.

1.8. Πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη TBP (TBP associated proteins, TAF)

Όπως προαναφέρθηκε στη ενότητα 1.3.1 η έναρξη της μεταγραφής απαιτεί το σχηματισμό του προ-εναρκτήριου συμπλόκου PIC (preinitiation complex) το οποίο θα ενεργοποιήσει την RNA πολυμεράση II. Ανάμεσα στους έξι βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες (TFIIA, B, D, E, F, H) και την RNA πολυμεράση II που απαιτούνται για το σχηματισμό του συμπλόκου PIC, ο TFIID είναι σημαντικός για την αναγνώριση του υποκινητή αλλά και την αλληλεπίδραση με τους συμπαραγόντες.

Ο παράγοντας TFIID είναι ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο που αποτελείται από την πρωτεΐνη πρόσδεσης TATA (TATA binding protein, TBP) και 13 άλλες σχετιζόμενες με την TBP πρωτεΐνες (TBP associated factors, TAFs) (124). Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP) έδειξαν ότι το σύμπλοκο TFIID εντοπίζεται κυρίως σε υποκινητές όπου απουσιάζει η αλληλουχία TATA ενώ το σύμπλοκο SAGA, το οποίο μοιράζεται 5 υπομονάδες με το TFIID, φαίνεται πως είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά του TBP στους υποκινητές που περιέχουν TATA (125). Η αλληλεπίδραση διαφορετικών TAFs με μεταγραφικούς ρυθμιστές και

συμπαράγοντες ορίζει την ειδικότητα του υποκινητή και την ιστοειδικότητα της έκφρασης (126).

Η TAF10 είναι μία από τις πιο μικρές υπομονάδες (30 kDa) του συμπλόκου TFIID και των πρωτεϊνικών συμπλοκών SAGA. Στα πρωτεϊνικά σύμπλοκα SAGA περιλαμβάνονται: στα θηλαστικά το σύμπλοκο των TAF που δεν περιέχει TBP (TBP-free TAF-containing complex, TFTC), το σύμπλοκο με τον παράγοντα p300/CBP (PCAF) και το σύμπλοκο που περιέχει SPT3-TAF9-GCN5 (STAGA complex) ενώ στο ζυμομήκυτα το σύμπλοκο SPT-ADA-GCN5 (SAGA complex) (127).

Η παρουσία του συμπλόκου TFIID αλλά και των μη «κανονικών» συμπλοκών όπως αυτά που δεν περιέχουν την TBP, διευρύνουν αρκετά την ποικιλία των μηχανισμών ενεργοποίησης και ελέγχου της διαδικασίας της μεταγραφής. Ένα τέτοιο παράδειγμα απαντάται στη διαφοροποίηση των μυικών κυττάρων όπου το σύμπλοκο TFIID αντικαθίσταται σταδιακά από ένα σύμπλοκο που περιέχει TBP και TAFs (TAF3-TRF3). Από τα παραπάνω διαπιστώνεται ο σημαντικός ρόλος των TAF πρωτεϊνών στη μεταγραφή.

1.9 Φασματομετρία μάζας

Ο όρος πρωτεωμική χρησιμοποιείται για να περιγράψει τη μεγάλη κλίμακα μελέτη των πρωτεϊνών και ιδιαίτερα τη δομή και τη λειτουργία τους (128). Ως πρωτέωμα ορίζεται η γνώση της δομής και της λειτουργίας όλων των πρωτεϊνών που εκφράζονται μια δεδομένη στιγμή σε ένα κύτταρο (129). Η πρωτεωμική χρησιμοποιεί αρκετές τεχνικές για το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών. Η χρησιμότητα της πρωτεωμικής προέρχεται από τη χρήση του φασματογράφου μάζας για τη ταυτοποίηση των πρωτεϊνών.

Ο φασματογράφος μάζας είναι ένα αναλυτικό όργανο το οποίο μπορεί να μετρήσει το λόγο μάζας προς φορτίου (m/z) ιόντων σε κενό (130). Από τα αποτελέσματα μπορούν να καθοριστούν η μοριακή μάζα με μεγάλη ακρίβεια επιτρέποντας τον μοριακό καθορισμό ενός συγκεκριμένου αναλύτη. Στην περίπτωση της πρωτεωμικής ο αναλύτης είναι μια συλλογή από πεπτίδια που προέρχονται από ένα πρωτεϊνικό δείγμα το οποίο έχει επεξεργαστεί με θρυψίνη ή κάποια άλλη παρόμοια πρωτεάση.

Οι φασματογράφοι μάζας έχουν 3 βασικά μέρη: τη πηγή ιοντισμού, τον αναλυτή μάζας και τον ανιχνευτή ιόντων. Ο ρόλος της πηγής ιοντισμού είναι η μετατροπή του αναλύτη σε ιόντα στην αέρια φάση υπό κενό. Τα ιόντα επιταχύνονται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου προς τον αναλυτή, ο οποίος τα ξεχωρίζει ανάλογα το λόγο m/z κατά τη διαδρομή τους προς τον ανιχνευτή. Ο ρόλος του ανιχνευτή είναι η καταγραφή της πρόσκρουσης των μεμονωμένων ιόντων.

1.9.1 Πηγές Ιοντισμού.

Για τη φασματομετρία μάζας πρωτεϊνών είναι πολύ σημαντική η παραγωγή ανέπαφων ιόντων των πεπτιδίων γεγονός το οποίο καθιστά εφικτή την ταυτοποίηση τους. Για το σκοπό αυτό δύο είναι οι κύριοι τρόποι παραγωγής ιόντων ο ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό (electrospray ionization, ESI) και ο MALDI (matrix assisted laser desorption/ionization). Όταν πηγή ιοντισμού που χρησιμοποιείται είναι MALDI τότε ο αναλύτης αναμιγνύεται με μια αρωματική ένωση (διαλύτης) που χρησιμοποιείται ως μήτρα και μπορεί να απορροφήσει την ενέργεια από το λέιζερ που χρησιμοποιείται. Η χρήση μεταλλικής πλάκας οδηγεί στην εξάτμιση του διαλύτη αφήνοντας κρυστάλλους της μήτρας που εμπεριέχουν τον αναλύτη ο οποίος περνάει σε θάλαμο κενού του φασματομέτρου μάζας όπου του εφαρμόζεται υψηλή τάση. Ταυτόχρονα στους κρυστάλλους εφαρμόζεται μικρής διάρκειας παλμός λέιζερ. Η ενέργεια από το λέιζερ απορροφάται από τους κρυστάλλους και εκπέμπεται ως θερμότητα οδηγώντας σε γρήγορη εξάχνωση που μετατρέπει τον αναλύτη σε ιόντα στην αέρια φάση. Η πηγή ιοντισμού MALDI χρησιμοποιείται για την ανάλυση απλών πεπτιδικών δειγμάτων όπως αυτά που προκύπτουν από ζώνες πήκτωμάτων πολυακρυλαμίδης δύο διαστάσεων (131).

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος για την παραγωγή ιόντων στη φασματομετρία μάζας για την ανάλυση πρωτεϊνών είναι ο ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI). Ο αναλύτης διαλύεται και περνάει από στενή βελόνα στην οποία εφαρμόζεται υψηλή τάση. Το εκνέφωμα που δημιουργείται από φορτισμένα σταγονίδια μεταφέρεται μέσω ενός μικρού στομίου από τη βελόνα στο θάλαμο κενού του φασματογράφου μάζας. Καθώς εισέρχονται στο φασματογράφο μάζας οι σταγόνες στεγνώνουν με τη βοήθεια ρεύματος αδρανούς αερίου το οποίο οδηγεί στη δημιουργία ιόντων στην αέρια φάση τα

οποία επιταχύνονται μέσω του αναλυτή προς τον ανιχνευτή. Το μεγάλο πλεονέκτημα της ESI σε σχέση με τις άλλες μεθόδους παραγωγής ιόντων είναι ότι μπορεί να συζευχθεί άμεσα με τις μεθόδους διαχωρισμού των πεπτιδίων που προηγούνται και χρησιμοποιούν τεχνικές υγρής χρωματογραφίας. Ενώ η MALDI χρησιμοποιείται για την ανάλυση απλών πεπτιδικών δειγμάτων η ESI έχει την δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση πιο πολύπλοκων δειγμάτων (131)

1.9.2 Αναλυτές φασματογράφων μάζας

Υπάρχουν τέσσερις βασικοί τύποι αναλυτών φασματογράφου μάζας που χρησιμοποιούνται στην πρωτεωμική ανάλυση με διαφορετικά χαρακτηριστικά όσον αφορά την ακρίβεια, την ευαισθησία και διακριτική ικανότητα. Στους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους αναλυτές περιλαμβάνονται ο ανιχνευτής τριπλού τετραπόλου (triple quadrupole, TQ) και ο ανιχνευτής χρόνου πτήσης (time of flight, TOF).

Το τετράπολο αποτελείται από ένα ζεύγος τεσσάρων μεταλλικών ράβδων τα οποία είναι ηλεκτρικά ενωμένα ώστε να μπορεί να εφαρμοστεί τάση σε όλο το πλάτος τους. Οι φασματογράφοι μάζας που φέρουν τριπλό τετράπολο ουσιαστικά αποτελούνται από τρία τέτοια τετράπολα συνδεδεμένα σε σειρά. Κάθε τετράπολο μπορεί να λειτουργήσει σε κατάσταση ραδιοσυχνότητας (Radio Frequency, RF-mode) η οποία επιτρέπει τα ιόντα οποιουδήποτε m/z λόγου να διέλθουν μέσα από αυτό και σε κατάσταση σάρωσης (scanning mode) όπου εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού οπότε το τετράπολο λειτουργεί ως φίλτρο μάζας. Στην τελευταία περίπτωση ιόντα συγκεκριμένου λόγου m/z μπορούν να διέλθουν μέσα από τον ανιχνευτή ενώ όλα τα υπόλοιπα εκτρέπονται από τη γραμμική διαδρομή τους και αποκλείονται από την μετέπειτα ανάλυση. Με εναλλαγή της τάσης κατά την πάροδο του χρόνου επιτρέπεται σε ιόντα με διαφορετικό λόγο m/z να διέλθουν στον ανιχνευτή με αποτέλεσμα τα καταγραφεί το φάσμα μάζας του αναλυτή (131).

Οι φασματογράφοι μάζας που χρησιμοποιούν αναλυτή τριπλού τετραπόλου μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση ακέραιων πεπτιδίων ή για την ανάλυση των θρυμματισμένων παραγώγων ιόντων τους. Στην πρώτη περίπτωση χρησιμοποιείται μόνο ένα τετράπολο για τη σάρωση

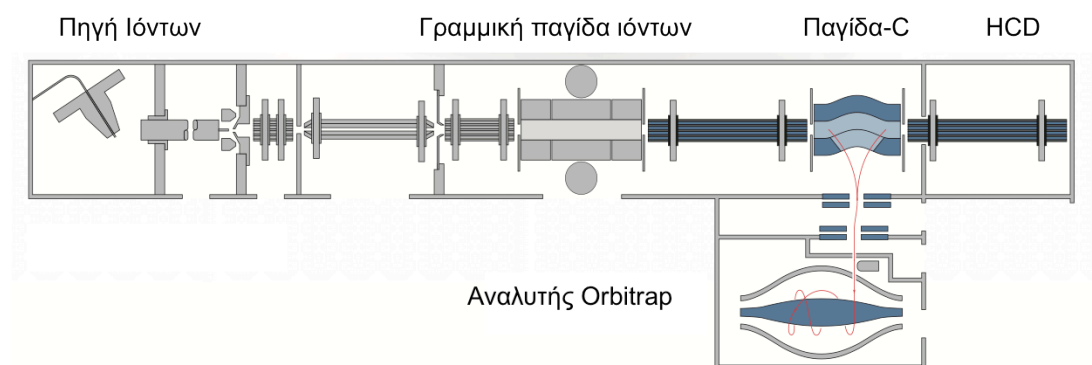
ενώ τα υπόλοιπα δυο τετράπολα λειτουργούν σε κατάσταση RF. Στη δεύτερη περίπτωση το πρώτο τετράπολο σαρώνει τη ροή των ιόντων και κατευθύνει τα ιόντα επιλεγμένου λόγου m/z στο δεύτερο τετράπολο, το οποίο λειτουργεί σε κατάσταση RF και λειτουργεί ως κελί σύγκρουσης. Ο θρυμματισμός των ακέραιων πεπτιδικών ιόντων ενισχύεται από τη σύγκρουση τους με ροή αδρανούς αερίου (πχ. Αργού), η διαδικασία αυτή ονομάζεται επαγωγική διάσπαση (Collision induced dissociation, CID). Στη συνέχεια το τρίτο τετράπολο σαρώνει τη ροή των θρυμματισμένων ιόντων που δημιουργείται από την επαγωγική σύγκρουση και δημιουργεί το φάσμα CID (ουσιαστικά το φάσμα μάζας των θραυσμάτων που προέρχονται από ένα συγκεκριμένο πεπτίδιο. Όταν η διαδικασία της ανάλυσης ολοκληρωθεί τότε το πρώτο τετράπολο επαναδιοχετεύει ένα νέο ακέραιο πεπτιδικό ιόν και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Η χρήση δύο αναλυτών σε σειρά για το διαχωρισμό ακέραιων ιόντων και μετέπειτα των θραυσμάτων που προκύπτουν από αυτούς ονομάζεται δίδυμη φασματομετρία μάζας (tandem Mass Spectrometry, MS/MS) (131).

Σε αντίθεση με τα τετράπολα όργανα οι αναλυτές χρόνου πτήσης δεν χρειάζονται ηλεκτρικό πεδίο για το διαχωρισμό των ιόντων. Οι αναλυτές χρόνου πτήσης (TOF) εκμεταλλεύονται το γεγονός ότι σε οποιοδήποτε δείγμα πεπτιδίων που φέρει το ίδιο φορτίο, τα βαρέα ιόντα θα χρειαστούν περισσότερο χρόνο να διασχίσουν το πεδίο χωρίς ηλεκτρικό ρεύμα από ότι τα ελαφριά ιόντα. Οι αναλυτές TOF συνήθως είναι συζευγμένοι με πηγή ιοντισμού MALDI. Πρόσφατα οι πηγές MALDI έχουν συνδεθεί με φασματογράφους μάζας που περιέχουν στη σειρά αναλυτές TOF κάνοντας με αυτό τον τρόπο εφικτή την απόκτηση φάσματος CID. Οι φασματογράφοι μάζας MALDI-TOF-TOF είναι εξαιρετικά ευαίσθητοι και μπορούν να αναλύσουν μεγάλο αριθμό δειγμάτων ταυτόχρονα.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή τα πειράματα φασματομετρίας μάζας που παρουσιάζονται έχουν γίνει στο εργαστήριο Erasmus Proteomics Center του Ιατρικού Κέντρου του Πανεπιστημίου Erasmus της Ολλανδίας. Ο φασματογράφος μάζας που χρησιμοποιήθηκε είναι LTQ Orbitrap XL (σύστημα τροχιακής παγίδας ιόντων) που χρησιμοποιεί πηγή ιοντισμού ESI και είναι συζευγμένος με σύστημα υγρής χρωματογραφίας για το διαχωρισμό των πεπτιδίων.

Ο αναλυτής τροχιακής παγίδας ιόντων (Orbitrap) ξεκίνησε να χρησιμοποιείται τα τελευταία χρόνια. Η χρήση της συγκεκριμένης τεχνολογίας στη φασματομετρία μάζας περιγράφηκε το 2000 (132) και από τότε χρησιμοποιείται ευρέως στον τομέα της πρωτεωμικής. Ο αναλυτής Orbitrap αποτελείται από ένα εξωτερικό ηλεκτρόδιο σχήματος βαρελιού και εσωτερικό ομοαξονικό ηλεκτρόδιο με σχήμα ατράκτου που δημιουργούν ηλεκτρικό πεδίο λογαριθμικού δυναμικού (Εικόνα 5). Ο φασματογράφος μάζας αποτελείται από την πηγή παραγωγής ιόντων, τη γραμμική παγίδα ιόντων, τη παγίδα-C, τη κυψελίδα HCD και τον αναλυτή Orbitrap. Τα ιόντα που παράγονται από την πηγή ιόντων συλλέγονται από τη γραμμική παγίδα ιόντων τα οποία μεταφέρονται με εκτίναξη στη παγίδα-C. Ο σκοπός της παγίδας-C είναι να φυλάξει και να ψύξει τα ιόντα πριν από την έγχυση τους στον αναλυτή Orbitrap. Τα ιόντα παγιδεύονται στον αναλυτή Orbitrap με τη χρήση αυξανόμενης έντασης ηλεκτρικού πεδίου. Το σήμα από τον ανιχνευτή Orbitrap ενισχύεται και μετατρέπεται σε φάσμα συχνότητας με τη χρήση μετασχηματισμού Fourier το οποίο με τη σειρά του μετατρέπεται τελικώς σε φάσματα μάζας.

LTQ Orbitrap XL



Εικόνα 5. Ο φασματογράφος μάζας LTQ Orbitrap XL. Ο φασματογράφος μάζας αποτελείται: από την πηγή ιόντων, τη γραμμική παγίδα ιόντων (linear ion trap), την παγίδα-C (C-trap), την κυψελίδα υψηλότερης ενέργειας διάσπασης (higher energy collisional dissociation, HCD) και τον αναλυτή Orbitrap

Ο φασματογράφος μάζας τύπου Orbitrap έχει την ικανότητα προσδιορισμού της μάζας με υψηλή ακρίβεια. Στην βιβλιογραφία αναφέρονται

μετρήσεις μάζας κάτω από τα 2 ppm για πολύπλοκα μίγματα πεπτιδίων (133) αλλά και ολόκληρων πρωτεϊνών (134). Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα του ανιχνευτή Orbitrap είναι το δυναμικό εύρος μέσα στο οποίο μπορούν να γίνουν μετρήσεις ακριβείας το οποίο τον καθιστά πολύτιμο στη ταυτοποίηση των πρωτεϊνών. Ο ανιχνευτής μάζας Orbitrap προσφέρει ακριβείς μετρήσεις μάζας μέσα ένα φάσμα για εύρος έντασης της τάξεως του 5000 (135). Το γεγονός αυτό επιτρέπει την ταυτοποίηση πεπτιδίων και κατά συνέπεια πρωτεϊνών που υπάρχουν σε χαμηλή ποσότητα. Επιπλέον η μεγάλη διακριτική ικανότητα σε μικρούς χρόνους καθιστά πολύ γρήγορη την ανάλυση του δείγματος. Τέλος ένα ακόμα πλεονέκτημα του φασματογράφου μάζας Orbitrap είναι ότι η χρήση του τόσο για την ταυτοποίηση πρωτεϊνών σε πολύπλοκα βιολογικά δείγματα όσο και για την ταυτοποίηση μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης.

1.9.3 Ταυτοποίηση πρωτεϊνών

Η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών στη φασματομετρία μάζας γίνεται από την ανάλυση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν σχετικά με τη μάζα των πεπτιδίων η τεχνική αυτή ονομάζεται πεπτιδικό αποτύπωμα μάζας (protein mass fingerprinting, PMF). Η αρχή της συγκεκριμένης τεχνικής είναι ότι κάθε πρωτεΐνη μπορεί να ταυτοποιηθεί από τις μάζες των πεπτιδίων που την απαρτίζουν. Το μοναδικό αυτό αποτύπωμα είναι γνωστό ως πεπτιδικό αποτύπωμα μάζας (peptide mass fingerprint). Αλγόριθμοι οι οποίοι επιτρέπουν τη αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων με κριτήριο τη μάζας του πεπτιδίου αναπτύχθηκαν ταυτόχρονα από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες και έχουν συμπεριληφθεί σε λογισμικά πακέτα πολλά από τα οποία είναι διαθέσιμα και στο διαδίκτυο.

Τα βήματα τα οποία απαιτούνται προκειμένου να ταυτοποιηθεί μια πρωτεΐνη με τη χρήση φασματομετρίας μάζας συμπεριλαμβάνουν τα εξής:

1. Το δείγμα προς ανάλυση θα πρέπει να αποτελείται από μια πρωτεΐνη ή από ένα απλό δείγμα πρωτεϊνών πχ ένα κλάσμα πεπτιδίων που έχει προκύψει ύστερα από διαχωρισμό υγρής χρωματογραφίας.
2. Οι μοριακές μάζες των πεπτιδίων καθορίζονται από το φασματογράφο μάζας.

3. Επιλογή των βάσεων δεδομένων για πρωτεϊνικές αλληλουχίες που θα χρησιμοποιηθούν για το συσχέτισμό των πεπτιδίων με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες πχ. SWISS-PROT
4. Ο αλγόριθμος διεξάγει θεωρητική πρωτεόλυση της κάθε πρωτεΐνης στη βάση δεδομένων χρησιμοποιώντας ως ένζυμο τη θρυψίνη (ή οποιαδήποτε άλλη πρωτεάση έχει χρησιμοποιηθεί πειραματικά) και υπολογίζει τις θεωρητικές μάζες των πεπτιδίων για κάθε πρωτεΐνη.
5. Απόπειρα συσχέτισμού των θεωρητικών μαζών των πεπτιδίων με τις πειραματικά καθορισμένες.
6. Οι πρωτεΐνες στη βάση δεδομένων ταξινομούνται με βάση την καλύτερη συσχέτιση (correlation), ενώ ορίζεται και το κατώτατο όριο (threshold) που ο είναι ο ελάχιστος αριθμός των πεπτιδίων που ταυτίζονται.

Στην περίπτωση μας το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών ήταν το MASCOT, το οποίο λειτουργεί ακριβώς με τη διαδικασία που παρουσιάστηκε παραπάνω.

1.10 *In vivo* βιοτινυλίωση

Η μέθοδος της *in vivo* βιοτινυλίωσης βασίζεται στη σύζευξη ενός πεπτιδίου σήμανσης (tag) είτε 15 είτε 23 αμινοξέων στο αμινο-τελικό άκρο της υπό μελέτη πρωτεΐνης. Η συγκεκριμένη πεπτιδική αλληλουχία έχει την ικανότητα να βιοτινυλιώνεται *in vivo* από τη βακτηριακή λιγάση BirA. Η *in vivo* βιοτινυλίωση εκμεταλλεύεται την πολύ υψηλή συγγένεια της στρεπταβιδίνης για τη βιοτίνη για τη ($K_D=10^{-15}$). Η βακτηριακή λιγάση καταλύει την αντίδραση μεταφοράς της βιοτίνης στη λυσίνη του σημασμένου πεπτιδίου που φέρει η προς μελέτη πρωτεΐνη. Στη συνέχεια με τη χρήση σφαιριδίων στρεπταβιδίνης λαμβάνει χώρα η κατακρήμνιση της βιοτινυλιωμένης πρωτεΐνης μαζί με την οποία συγκατακρημνίζονται και οι πρωτεΐνες οι οποίες αλληλεπιδρούν μαζί της. Το κατακρημνισμένο υλικό διαχωρίζεται σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και ακολουθεί απομόνωση ολόκληρης της διαδρομής των διαχωρισμένων πρωτεϊνών που ταυτοποιούνται με φασματομετρία μάζας. Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει αποδειχθεί πολύτιμη στη μελέτη των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων και έχει εφαρμοστεί επιτυχώς για τη απομόνωση και τη

μελέτη των πρωτεϊνικών συμπλόκων του μεταγραφικού παράγοντα GATA-1 (136,137).

Η σύζευξη της συγκεκριμένης μεθόδου με φασματομετρία μάζας οδηγεί στην ταυτοποίηση μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών. Επίσης στα πλεονεκτήματα της *in vivo* βιοτινυλίωσης συμπεριλαμβάνεται και η ικανότητα χρήσης διαλυμάτων υψηλής αλατότητας για εκπλύσεις χωρίς να υπάρχει ο κίνδυνος έκλουσης της δεσμευμένης πρωτεΐνης. Με τον τρόπο αυτό είναι εφικτή η απομάκρυνση των μη ειδικά προσδεδεμένων πρωτεϊνών (background). Επειδή ο αριθμός των φυσικά απαντώμενων βιοτινυλιωμένων πρωτεϊνών είναι πολύ μικρός (138), το σήμα υποβάθρου που προέρχεται από ειδική πρόσδεση πρωτεϊνών είναι σχετικά μικρό. Οι φυσικά απαντώμενες βιοτινυλιωμένες πρωτεΐνες είναι τέσσερις (τρεις μιτοχονδριακές και μια κυτταροπλασματική) και ανήκουν όλες στην κατηγορία των καρβοξυλασών. Κάθε μέθοδος κατακρήμνισης σημασμένων με επίτοπο πρωτεϊνών οδηγεί και στη μη ειδική πρόσδεση πρωτεϊνών για αυτό το λόγο όπως θα αναφερθεί και στη συνέχεια έγινε προσπάθεια μείωσης του υποβάθρου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή στοχεύει στη διαλεύκανση του μοριακού μηχανισμού λειτουργίας του μεταγραφικού παράγοντα GATA-1 στη διαφοροποίηση των ερυθροκυττάρων

Η ερυθροποίηση είναι η διαδικασία παραγωγής των ώριμων ερυθροκυττάρων του αίματος από τα αιματοποιητικά βλαστικά κύτταρα. Η διαδικασία της ερυθροποίησης είναι απαραίτητη για τη δημιουργία και τη διατήρηση της ζωής καθώς τα ερυθροκύτταρα είναι απαραίτητα για τη μεταφορά του οξυγόνου. Η ερυθροποίηση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία η οποία περιλαμβάνει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση διαφορετικών πληθυσμών κυττάρων. Απόκλιση από τη φυσιολογική διαδικασία της ερυθροποίησης έχει ως συνέπεια την εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων όπως οι αναιμίες.

Η ερυθροποίηση αποτελεί επίσης ένα πολύ καλά μελετημένο μοντέλο όσο αφορά τη διαφοροποίηση των κυττάρων όπως και των μοριακών μηχανισμών που είναι υπεύθυνοι για τη διαφοροποίηση. Συγκεκριμένα, η ερυθροποίηση χρησιμοποιείται για τη μελέτη της λειτουργίας των μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι είναι και οι κύριοι ρυθμιστές της όλης διαδικασίας διαφοροποίησης μέσω της ικανότητας που έχουν να ενεργοποιούν ή να αποσιωπούν γονίδια. Όπως έχει δειχθεί, η ικανότητα αυτή των μεταγραφικών παραγόντων ρυθμίζεται σε μεγάλο βαθμό από το σχηματισμό πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες και συμπαράγοντες.

Με άξονα τα παραπάνω, η μελέτη μας εστιάζεται στον προσδιορισμό νέων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων του κύριου μεταγραφικού παράγοντα της ερυθροποίησης GATA-1 με τη χρήση της μεθόδου της *in vivo* βιοτινυλίωσης. Η συγκεκριμένη στρατηγική περιλαμβάνει τη βελτίωση της μεθόδου με σκοπό τη μείωση του υποβάθρου και τον εμπλουτισμό της πρωτεΐνης GATA-1 και των συμπλόκων της στα πυρηνικά εκχυλίσματα. Ο χαρακτηρισμός και η επιβεβαίωση των νέων πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν

με τη GATA-1 αναμένεται να συμβάλλει στην κατανόηση των μηχανισμών μέσω των οποίων η GATA-1 μπορεί και ρυθμίζει όλα τα ερυθροειδικά γονίδια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Γενικά τα χημικά που αναφέρονται στα υλικά των επιμέρους μεθόδων έχουν αγοραστεί από την Applichem, εκτός αν αναγράφεται διαφορετικά.

3.1. ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ – ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

3.1.1 Η κυτταρική σειρά MEL (Murine erythroleukemia)

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε εκτενώς η κυτταρική σειρά MEL επιμολυσμένη όπως θα αναφερθεί παρακάτω με διάφορους πλασμιδιακούς φορείς. Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά προέρχεται από ερυθροειδή προγονικά κύτταρα του σπλήνα ποντικού που έχουν επιμολυνθεί με τον ιό Friend (93). Τα μετασχηματισμένα από τον ιό κύτταρα έχουν παύσει τη διαφοροποίηση τους στο στάδιο του προερυθροβλάστη και μπορούν να διατηρηθούν σε καλλιέργεια επ' άπειρον. Ένα μικρό ποσοστό των κυττάρων αυτών σε καλλιέργεια (περίπου 1%) μπορεί αυθόρμητα να συνεχίσει την ερυθρή διαφοροποίηση, ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας. Ωστόσο, με τη χρήση διαφόρων χημικών παραγόντων είναι εφικτό να επαχθεί ερυθροειδής διαφοροποίηση σε πολύ μεγαλύτερα ποσοστά (30-100%). Μεταξύ των πιο ικανών επαγωγικών χημικών παραγόντων είναι το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) και άλατα λιπαρών οξέων (πχ. βουτυρικό νάτριο, ρετινοϊκό οξύ κ.α.) (93).

Η τερματική ερυθροειδής διαφοροποίηση των κυττάρων MEL σε καλλιέργεια χαρακτηρίζεται από αλλαγές που είναι ανάλογες με την ωρίμανση των φυσιολογικών ερυθρών κυττάρων (93). Σε αυτές τις αλλαγές περιλαμβάνονται:

1. Μαζική σύνθεση αιμοσφαιρίνης (hemoglobin, Hb)
2. Αύξηση των ενζύμων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της αίμης.
3. Εμφάνιση των ερυθροειδικών μεμβρανικών πρωτεϊνών όπως η α,β –σπεκτρίνη, ζώνης 3 (band 3) και ζώνης 4.
4. Συμπύκνωση χρωματίνης και άλλες μορφολογικές αλλαγές με πιο σημαντικές την παύση της κυτταρικής διαίρεσης και την

εκπυρήνωση που παρατηρείται όμως σε μικρό ποσοστό των διαφοροποιημένων κυττάρων MEL.

Εξαιτίας λοιπόν της μεγάλης ομοιότητας που παρουσιάζουν τα MEL κύτταρα όσον αφορά στη διαδικασία της ερυθροειδικής διαφοροποίησης σε σχέση με τα ερυθροκύτταρα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοντέλο για τη μελέτη ρύθμισης ερυθροειδικών γονιδίων.

3.1.2 Καλλιέργεια κυττάρων MEL C88

Το στέλεχος της κυτταρικής σειράς MEL που χρησιμοποιήθηκε είναι το C88 (139). Η κυτταρική σειρά είναι ημιπροσφυόμενη (semi-adherent) στις επιφάνειες των σκευών καλλιέργειας. Τα κύτταρα C88 διαιρούνται κάθε 12 ώρες και μπορούν να μεγαλώσουν σε πολύ μεγάλη πυκνότητα. Όλοι οι χειρισμοί που αφορούν κύτταρα γίνονται ασηπτικά σε θάλαμο νηματικής ροής αέρα.

Υλικά

- Κυτταρική σειρά MEL στελέχους C88.
- Θρεπτικό υλικό DMEM με L-Γλουταμίνη (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco)
- 10% (v/v) ορός εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco)
- 1% (v/v) πενικιλίνη (100 units/mL, Gibco)
- 1% (v/v) στρεπτομυκίνη (100µg/mL, Gibco)

Όργανα

- Κλίβανος επώασης σταθερής θερμοκρασίας 37 °C, ατμόσφαιρα περιεκτικότητας 5% CO₂ και σχετικής υγρασίας 95% (Thermo Scientific).
- Θάλαμος νηματικής ροής αέρα (Holten).
- Υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 37 °C
- Οπτικό μικροσκόπιο Nikon (TMS) με φακούς 4x, 10x, 20x.

Πορεία μεθόδου

Για την καλλιέργεια τους απαιτείται πλήρες θρεπτικό μέσο που αποτελείται από θρεπτικό υλικό DMEM συμπληρωμένο με 10% (v/v) ορό εμβρύου βοός, 1% (v/v) πενικιλίνη στρεπτομυκίνη όπως και επωαστικός

κλίβανος σταθερής θερμοκρασίας. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε φλάσκες διαφορετικού μεγέθους ανάλογα με το μέγεθος της καλλιέργειας που απαιτείται. Η ανακαλλιέργεια πραγματοποιείται κάθε 2-3 ημέρες όταν τα κύτταρα έχουν καταλάβει το 80 – 90% του της επιφάνειας της φλάσκας μέσα στην οποία βρίσκονται και αραιώνονται σε αναλογία 1:10.

3.1.3 Κατάψυξη και απόψυξη κυττάρων MEL C88.

Υλικά

- Κυτταρική σειρά MEL στελέχους C88.
- Θρεπτικό υλικό DMEM με L-Γλουταμίνη (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco)
- 10% (v/v) ορός εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, Gibco)
- 1% (v/v) πενικιλίνη (100 units/mL, Gibco)
- 1% (v/v) στρεπτομυκίνη (100μg/mL, Gibco)
- 100% ορός εμβρύου βοός
- 10% (v/v) Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)

Όργανα

- Κλίβανος επώασης σταθερής θερμοκρασίας 37 °C, ατμόσφαιρα περιεκτικότητας 5% CO₂ και σχετικής υγρασίας 95% (Thermo Scientific).
- Θάλαμος νηματικής ροής αέρα (Holten).
- Φυγόκεντρος Sorvall RT7 plus με κεφαλή RTH-750.
- Σωλήνες τύπου Falcon 50 mL (Sarstedt)
- Σωλήνες τύπου Falcon 15 mL (Sarstedt)
- Σύστημα κενού
- Ειδικά πλαστικά φιαλίδια χωρητικότητας 2mL (Corning 2mL cryovials)
- Δοχείο πολυαιθυλενίου που περιέχει ισοπροπανόλη (Nalgene, Cryobox)
- Υπερ-καταψύκτης ελάχιστης θερμοκρασίας -80 °C
- Δεξαμενή υγρού αζώτου για τη φύλαξη των κυττάρων
- Υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 37 °C
- Οπτικό μικροσκόπιο Nikon (TMS) με φακούς 4x, 10x, 20x.

Πορεία μεθόδου

Για την ψύξη κυττάρων MEL C88 που βρίσκονται σε καλλιέργεια ακολουθείται η εξής διαδικασία: 20 mL καλλιέργειας κυττάρων MEL (όπως περιγράφεται στην ενότητα 4.1.1) που έχει φτάσει σε πυκνότητα 80%, αποχύνεται σε σωλήνα τύπου Falcon και φυγοκεντρείται στα 250 x g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια με τη χρήση συστήματος κενού γίνεται αναρρόφηση του υπερκείμενου θρεπτικού μέσου και τα κύτταρα αναδιασπείρονται σε 2mL FBS. Σε αυτά προστίθενται άλλα 2mL FBS τα οποία περιέχουν 20% (v/v) DMSO, ώστε η τελική συγκέντρωση του DMSO να είναι 10% (v/v). Το κυτταρικό εναιώρημα μοιράζεται σε 4 φιαλίδια μέγιστης χωρητικότητας 2mL κατάλληλα για ψύξη και τοποθετούνται σε δοχείο πολυαιθυλενίου που περιέχει ισοπροπανόλη. Το δοχείο μεταφέρεται σε υπερκαταψύκτη θερμοκρασίας -80 °C για τουλάχιστον 16 ώρες, ώστε να επιτευχθεί η σταδιακή κατάψυξη των κυττάρων κατά -1 °C / λεπτό. Τέλος, τα φιαλίδια μεταφέρονται την επόμενη μέρα σε δεξαμενή υγρού αζώτου στην οποία μπορούν να παραμείνουν επ' αόριστον.

Για την απόψυξη των κυττάρων MEL C88 που έχουν αποθηκευθεί σε δεξαμενή υγρού αζώτου ακολουθείται η εξής διαδικασία: Το ειδικό φιαλίδιο που περιέχει το παγωμένο κυτταρικό εναιώρημα που προέκυψε όπως περιγράφεται παραπάνω τοποθετείται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37 °C. Το περιεχόμενο του φιαλιδίου αραιώνεται σε 10 mL πλήρους θρεπτικού μέσου και το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρείται σε ταχύτητα 250 x g για πέντε λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Αμέσως μετά με τη βοήθεια κενού γίνεται αναρρόφηση του υπερκείμενου υγρού ώστε να απομακρυνθεί ο κρυοπροστατευτικός παράγοντας DMSO. Τα κύτταρα αναδιασπείρονται σε 10 mL πλήρους θρεπτικού μέσου και μεταφέρονται στα κατάλληλα τρυβλία για την περαιτέρω καλλιέργεια τους.

3.1.4 Καλλιέργεια, ψύξη και απόψυξη κυττάρων BirA MEL

Υλικά

- Κυτταρική σειρά BirA MEL.
- 5 μg/mL πουρομυκίνη

Πορεία μεθόδου

Η κυτταρική σειρά BirA MEL έχει προκύψει από τη επιμόλυνση με ηλεκτροδιαπύρωση της σειράς C88 με τον πλασμιδιακό φορέα BirA – pEV-neomycin (136). Ο συγκεκριμένος πλασμιδιακός φορέας έχει προκύψει από την κλωνοποίηση του cDNA της βακτηριακής λιγάσης BirA στη θέση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *Bgl*II του πλασμιδίου έκφρασης pEV (136). Ο συγκεκριμένος πλασμιδιακός φορέας περιέχει το γονιδιακό τόπο του ελέγχου της ανθρώπινης β-σφαιρίνης (human β-globin Locus Control Region, miniLCR), τον υποκινητή της β-σφαιρίνης και το δεύτερο ιντρόνιο της β-σφαιρίνης. Το πλασμίδιο αυτό επιπλέον φέρει και γονίδιο αντίστασης για το αντιβιοτικό πουρομυκίνης ώστε να μπορεί να γίνει επιλογή των θετικών κλώνων που εκφράζουν τη λιγάση BirA.

Η κυτταρική σειρά BirA MEL εμφανίζει ακριβώς τις ίδιες ιδιότητες με τη C88 αφού ουσιαστικά έχει προκύψει από αυτή. Ακολουθείται ακριβώς η ίδια διαδικασία για την ανακαλλιέργεια της, κατάψυξη και απόψυξη όπως περιγράφεται στην ενότητα 4.1.1. και 4.1.2. Να σημειωθεί όμως ότι μετά την πρώτη ανακαλλιέργεια των κυττάρων προστίθεται στο πλήρες θρεπτικό μέσο πουρομυκίνη σε τελική συγκέντρωση 5μg/mL ώστε να γίνει επιλογή των κυττάρων που εκφράζουν BirA.

3.1.5 Καλλιέργεια, ψύξη και απόψυξη κυττάρων bioGATA-1 MEL

Υλικά

- Κυτταρική σειρά BirA MEL.
- 5 μg/mL πουρομυκίνη (Santa Cruz)
- 0,8 mg/mL G418 (Gibco)

Πορεία μεθόδου

Η κυτταρική σειρά bioGATA-1 MEL έχει προκύψει από τη επιμόλυνση με ηλεκτροδιαπύρωση της σειράς BirA MEL (ενότητα 4.1.3.) με τον πλασμιδιακό φορέα bioGATA-1-pEV-Neomycin (136). Στο GATA-1 cDNA προστέθηκαν στην θέση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *Nco*I στο αμινοτελικό άκρο τα ολογονουκλεοτίδια εκείνα που κωδικοποιούν το πεπτίδιο σήμανσης (bio) που βιοτινυλιώνεται από τη λιγάση BirA. Το bioGATA-1 cDNA στη συνέχεια κλωνοποιήθηκε στην θέση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *Bgl* II του πλασμιδίου pEV-neomycin (136) Το πλασμίδιο αυτό φέρει το γονίδιο

αντίστασης για το αντιβιοτικό G418 (νεομυκίνη) ώστε να μπορεί να γίνει επιλογή των θετικών κλώνων.

Η κυτταρική σειρά bioGATA-1 MEL εμφανίζει ακριβώς τα ίδια χαρακτηριστικά με τη C88 και BirA MEL και ο χειρισμός της γίνεται με τον τρόπο που περιγράφηκε στην ενότητα 4.1.1. και 4.1.2. Μετά την πρώτη ανακαλλιέργεια στο πλήρες θρεπτικό μέσο γίνεται προσθήκη στο πλήρες θρεπτικό μέσο πουρομυκίνης και G418 σε τελική συγκέντρωση 5μg/mL και 0,8 mg/mL αντίστοιχα για την απομάκρυνση μη θετικών κλώνων τόσο σε BirA όσο και bioGATA-1.

3.1.6 Καλλιέργεια, ψύξη και απόψυξη κυττάρων bioDNMT-1 MEL

Υλικά

- Κυτταρική σειρά BirA MEL.
- 5 μg/mL πουρομυκίνη (Santa Cruz)
- 0,8 mg/mL G418 (Gibco)

Πορεία μεθόδου

Η κυτταρική σειρά bioDNMT-1 έχει προκύψει από επιμόλυνση με ηλεκτροδιαπόρηση της σειράς BirA MEL (ενότητα 4.1.3.) με το πλασμιδιακό φορέα bioDNMT-1-pEV-Neomycin. Η κλωνοποίηση έγινε όπως και για τη σειρά bioGATA-1.

Η κυτταρική σειρά bioGATA-1 MEL εμφανίζει ακριβώς τα ίδια χαρακτηριστικά με τη C88 και BirA MEL και ο χειρισμός της γίνεται με τον τρόπο που περιγράφηκε στην ενότητα 4.1.1. και 4.1.2. Μετά την πρώτη ανακαλλιέργεια στο πλήρες θρεπτικό μέσο γίνεται προσθήκη στο πλήρες θρεπτικό μέσο πουρομυκίνης και G418 σε τελική συγκέντρωση 5μg/mL και 0,8 mg/mL αντίστοιχα για την απομάκρυνση μη θετικών κλώνων τόσο σε BirA όσο και bioDNMT-1.

3.1.7 Καλλιέργεια κυττάρων HEK

Η κυτταρική σειρά HEK 293 προέρχεται από αθανοτοποιημένα κύτταρα νεφρού ανθρωπίνου εμβρύου. Τα κύτταρα αυτά προσκολλώνται στην επιφάνεια των τριβλίων καλλιέργειας και πολλαπλασιάζονται μέχρι να καλύψουν ολόκληρη την επιφάνεια

Υλικά

- Κυτταρική σειρά HEK 293
- Θρεπτικό υλικό DMEM με L-Γλουταμίνη (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco)
- 10% (v/v) ορός εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco)
- 1% (v/v) πενικιλίνη (100 units/mL, Gibco)
- 1% (v/v) στρεπτομυκίνη (100μg/mL, Gibco)
- Διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH=7,4 (PBS): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,8 KH₂PO₄.
- 0,25% (w/v) trypsin-EDTA (1X) (Gibco)

Όργανα

- Κλίβανος επώασης σταθερής θερμοκρασίας 37 °C, ατμόσφαιρα περιεκτικότητας 5% CO₂ και σχετικής υγρασίας 95% (Thermo Scientific).
- Θάλαμος νηματικής ροής αέρα (Holten).
- Υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 37 °C
- Φυγόκεντρος Sorvall RT7 plus με κεφαλή RTH-750.
- Οπτικό μικροσκόπιο Nikon (TMS) με φακούς 4x, 10x, 20x.

Πορεία μεθόδου

Σε κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε καλλιέργεια γίνεται απόρριψη του θρεπτικού μέσου και έκπλυση με διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH = 7,4. Η έκπλυση γίνεται με σκοπό να απομακρυνθεί το FBS, διότι αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα της δράσης της θρυψίνης. Χρησιμοποιείται ο ίδιος όγκος PBS όσο ήταν και ο όγκος του θρεπτικού μέσου που κάλυπτε τη καλλιέργεια. Το διάλυμα PBS απορρίπτεται και προστίθεται διάλυμα θρυψινοποίησης ικανού όγκου ώστε να καλυφθεί η επιφάνεια των κυττάρων και ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 1 λεπτό. Η θρυψίνη είναι μια πρωτεάση σερίνης και χρησιμοποιείται με σκοπό να πρωτεολυθούν οι πρωτεΐνες μέσω των οποίων τα κύτταρα προσκολλούνται στην επιφάνεια των τρυβλίων. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη θρεπτικού μέσου αναδιασπορά των κυττάρων και φυγοκέντρηση ώστε να απομακρυνθεί το διάλυμα θρυψινοποίησης. Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται σε 207 x g απομακρύνεται το υπερκείμενο και τα κύτταρα

επαναδιασπείρονται στον ίδιο με την καλλιέργεια όγκο θρεπτικού μέσου. Ακολουθεί κατάλληλη αραίωση για τη συνέχιση της καλλιέργειας.

3.1.8 Κατάψυξη και απόψυξη κυττάρων HEK293

Για την ψύξη και απόψυξη κυττάρων HEK χρησιμοποιούνται τα υλικά και η πορεία μεθόδου που περιγράφηκαν στην ενότητα 4.1.2.

3.1.9. Μέτρηση κυττάρων με τη χρήση αιματοκυττόμετρου

Υλικά

- Κυτταρική σειρά σε καλλιέργεια
- Διάλυμα PBS

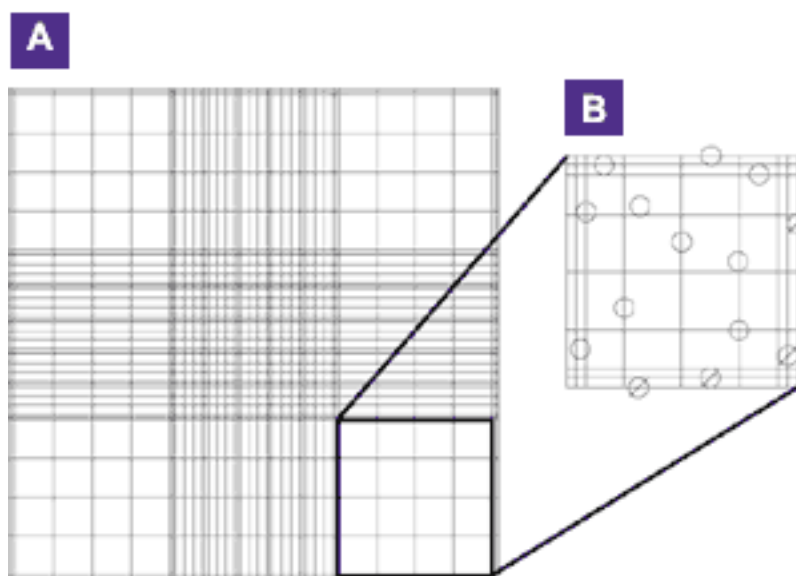
Όργανα

- Αιματοκυττόμετρο
- Φυγόκεντρος Sorvall RT7 plus με κεφαλή RTH-750.
- Οπτικό μικροσκόπιο Nikon (TMS) με φακούς 4x, 10x, 20x.

Πορεία μεθόδου

Κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε καλλιέργεια συλλέγονται (σε περίπτωση κυττάρων HEK ακολουθείται διαδικασία θρυψινοποίησης) με φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 207 x g για 5 λεπτά και εκπλένονται 1 φορά με τη χρήση διαλύματος PBS. Στη συνέχεια αναδιασπείρονται πάλι σε διάλυμα PBS και γίνεται αραίωση ανάλογα με την πυκνότητα τους είτε 1:10 είτε 1:100. Το αιματοκυττόμετρο καλύπτεται με ειδική γυάλινη καλυπτρίδα και από τα αραιωμένα κύτταρα χρησιμοποιούνται 10 μ l για την πλήρωση του αιματοκυττόμετρου. Κάθε αιματοκυττόμετρο αποτελείται από 2 πλέγματα μέτρησης (Εικόνα 6 A) 9 mm², δηλαδή 1 cm² κάθε τετράγωνο (Εικόνα 6 B). Η απόσταση μεταξύ της καλυπτρίδας και του πλέγματος είναι 0,1 mm, οπότε συνολικά ο όγκος του υγρού που καταλαμβάνεται σε ένα τέτοιο τετράγωνο είναι 0,1 mm³ (10⁻⁴ mL). Για την εύρεση του συνολικού αριθμού των κυττάρων γίνεται μέτρηση του αριθμού των κυττάρων και στα 4 τετράγωνα B και εξάγεται ο μέσος όρος. Να σημειωθεί ότι η μεσαία γραμμή από τις τρεις του τετραγώνου είναι το όριο της περιοχής. Μετρούνται τα κύτταρα που ακουμπούν μόνο τις δυο μεσαίες γραμμές στις δυο πλευρές τα άλλα απορρίπτονται (πχ Εικόνα 4 B δεν μετριοούνται τα κύτταρα Ø). Έχουμε λοιπόν α αριθμό κυττάρων σε 4 mm² που σημαίνει α/4 ανά mm² ή (α/4) κύτταρα / 10⁻⁴

mL. Οπότε έχουμε $(\alpha/4 \times 10^4 \text{ κύτταρα} / \text{mL}) \times \text{αραίωση}$. Ο συγκεκριμένος υπολογισμός μας δίνει τον αριθμό των κυττάρων ανά mL. Αν α αριθμός των κυττάρων πολλαπλασιαστεί με το συνολικό όγκο των κυττάρων τότε καταλήγουμε στον συνολικό αριθμό των κυττάρων.



Εικόνα 6. Αιματοκυττόμετρο που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση των κυττάρων.

A) Το πλέγμα του θαλάμου του αιματοκυττομέτρου όπως αυτό απεικονίζεται κάτω από οπτικό μικροσκόπιο. B) Μεγέθυνση του τετραγώνου μέτρησης του αιματοκυττομέτρου.

3.1.10 Επαγόμενη διαφοροποίηση της κυτταρικής σειράς MEL

Υλικά

- DMSO (HPLC grade)
- Θρεπτικό υλικό DMEM με L-Γλουταμίνη (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco)
- 10% (v/v) ορός εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco)
- 1% (v/v) πενικιλίνη (100 units/mL, Gibco)
- 1% (v/v) στρεπτομυκίνη (100μg/mL, Gibco)

Όργανα

- Κλίβανος επώασης σταθερής θερμοκρασίας 37 °C, ατμόσφαιρα περιεκτικότητας 5% CO₂ και σχετικής υγρασίας 95% (Thermo Scientific).
- Θάλαμος νηματικής ροής αέρα (Holten).
- Οπτικό μικροσκόπιο Nikon (TMS) με φακούς 4x, 10x, 20x.

Πορεία μεθόδου

Σε κύτταρα MEL που βρίσκονται σε καλλιέργεια επάγεται ερυθροειδή διαφοροποίηση με την προσθήκη DMSO (93). Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- 1η ημέρα: Σε καλλιέργεια κυττάρων MEL η οποία έχει φτάσει πυκνότητα 80% προστίθεται ίσο όγκος πλήρους θρεπτικού μέσου με αυτό της καλλιέργειας και ο οποίος περιέχει 4% (v/v) DMSO. Η τελική συγκέντρωση του DMSO στη κυτταρική καλλιέργεια είναι 2% (v/v).
- 2η ημέρα: Στην κυτταρική καλλιέργεια προστίθεται ο ίδιος όγκος πλήρους θρεπτικού μέσου με τη 1η ημέρα και περιεκτικότητα 2% (v/v) σε DMSO. Η τελική συγκέντρωση της καλλιέργειας σε DMSO είναι 2% (v/v).
- 3η και 4η ημέρα: Τα κύτταρα αφήνονται χωρίς την προσθήκη θρεπτικού μέσου να διαφοροποιηθούν.
- 5η ημέρα: Γίνεται η περισυλλογή των κυττάρων για την περαιτέρω επεξεργασία τους.

Η συγκεκριμένη μέθοδος διαφοροποίησης των κυττάρων MEL εφαρμόζεται για την επαγόμενη διαφοροποίηση όλων των σειρών: BirA, bioGATA-1, bioDNMT-1.

3.1.11 Επιμόλυνση κυττάρων HEK293 με τη μέθοδο της συγκατακρήμνισης κατιόντων DNA

Υλικά

- Διάλυμα 2x HEBS:
 - 280 mM NaCl
 - 50 mM HEPES
 - 1,5 mM Na₂HPO₄
- Διάλυμα 2,5 M CaCl₂
- Ενέσιμο Ύδωρ

Όργανα

- Σωλήνες 5mL πολυστυρενίου (Becton Dickinson, USA)
- Αυτόματες πιπιλέτες
- Οπτικό μικροσκόπιο Nikon (TMS) με φακούς 4x, 10x, 20x.

Αρχή μεθόδου

Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στο σχηματισμό κατακρημνισμάτων, που δημιουργούνται από την αλληλεπίδραση των θετικά φορτισμένων ιόντων ασβεστίου με τα αρνητικά φορτισμένα φωσφορικά ιόντα και τα μόρια του DNA. Τα σύμπλοκα κατακρημνίζονται στην επιφάνεια των κυττάρων σε pH = 7,10 και εισέρχονται στα κύτταρα με ενδοκύτωση (140). Απαραίτητη προϋπόθεση για την υψηλή απόδοση της επιμόλυνσης είναι η χρήση DNA υψηλής καθαρότητας, ενώ επίσης σημαντικό ρόλο παίζει και η συγκέντρωση του DNA που χρησιμοποιείται.

Πορεία μεθόδου

Την προηγούμενη μέρα της επιμόλυνσης πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια των κυττάρων HEK 293 με σκοπό τη δημιουργία καλλιέργειών που θα βρίσκονται σε αραίωση 1:6 ή 1:7. Την ημέρα της επιμόλυνσης πραγματοποιείται αλλαγή του θρεπτικού υλικού τουλάχιστον 2 ώρες πριν προστεθούν στα κύτταρα τα συγκατακρημνίσματα DNA. Τα κύτταρα τη δεδομένη χρονική στιγμή θα πρέπει να καλύπτουν περίπου το 60% - 70% της επιφάνειας του τριβλίου. Ο όγκος του διαλύματος επιμόλυνσης είναι το 1/10 του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας, κατά συνέπεια για ένα τριβλίο διαμέτρου 15 cm ο όγκος είναι 20 mL. Για το διάλυμα επιμόλυνσης 2 mL αναμίχθηκε σε σωλήνα πολυστυρενίου κατάλληλος όγκος της πλασμιδιακής κατασκευής με νερό ώστε ο τελικός όγκος να είναι 800 μl και σε αυτό προστίθενται 200 μl από 2,5 M CaCl_2 και 1 mL από 2x HEBS. Στη συνέχεια παρασκευάζεται το διάλυμα επιμόλυνσης επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά, ώστε να σχηματιστεί το συγκατακρήνισμα των μορίων του DNA και προστίθεται στάγδην στις καλλιέργειες των κυττάρων. Μετά το πέρας 36 ωρών από τη επιμόλυνση, τα κύτταρα μπορούν να ελεγχθούν για την έκφραση της επιθυμητής πρωτεΐνης.

3.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

3.2.1 Παραγωγή πρωτεϊνικών πυρηνικών εκχυλισμάτων

Η παραγωγή πρωτεϊνικών πυρηνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα που βρίσκονται σε καλλιέργεια αποτελεί κρίσιμο στάδιο, διότι αποτελεί το υλικό πάνω στο οποίο βασίζεται η μελέτη των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που

περιγράφονται στη παρούσα διατριβή. Θα πρέπει από κάθε παρασκευή να διασφαλίζεται η επαναληψιμότητα της ποιότητας των πυρηνικών εκχυλισμάτων, ακόμη και μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών σειρών.

Η παραγωγή πυρηνικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κυτταρικές σειρές ουσιαστικά χωρίζεται σε δυο στάδια: α) Στη συλλογή των κυττάρων που βρίσκονται σε καλλιέργεια και απομόνωση πυρήνων από αυτά και β) την εκχύλιση των πρωτεϊνών από τους απομονωμένους πυρήνες με τη χρήση διαφορετικών διαλυμάτων. Το στάδιο (α) κάνει χρήση ενός υποτονικού ρυθμιστικού διαλύματος που ουσιαστικά διογκώνει τα κύτταρα και στη συνέχεια με την επίδραση είτε μηχανικού στρες (ομογενοποιητή τύπου Dounce) είτε χημικού (απορρυπαντικό Nonidet P – 40) γίνεται ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης και απελευθερώνονται οι πυρήνες. Στο στάδιο (β) χρησιμοποιούνται ρυθμιστικά διαλύματα (υψηλής αλατότητας, NUN και RIPA) ώστε να εκχυλιστούν οι πυρηνικές πρωτεΐνες

3.2.1.1 Απομόνωση πυρήνων με τη χρήση υποτονικού διαλύματος και ομογενοποιητή τύπου Dounce.

Υλικά

- Κυτταρική σειρά MEL σε καλλιέργεια (ή οποιαδήποτε άλλη από τις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα διατριβή).
- Διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH=7,4 (PBS)
- Υποτονικό ρυθμιστικό διάλυμα: 10 mM HEPES, pH 7,9 στους 4 °C, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.2 mM PMSF (ή protease inhibitor cocktail, Roche, προστίθεται πριν από κάθε χρήση), 0,5 mM DTT.
- Χρώση Unna (ή χρώση πράσινου του μεθυλίου – πυρονίνης) 50 mL: 2 mL από 2% (w/v) πράσινο του μεθυλίου, 3 mL από 2 % (w/v) πυρονίνη Υ, 1 mL από 100% (v/v) αιθανόλη, 26,4 mL από 0,1 M οξικό νάτριο και 17,6 mL από 0,1 M οξικό οξύ.

Όργανα

- Φυγόκεντρος Sorvall RT7 plus με κεφαλή RTH-750.
- Δοχεία φυγοκέντρησης χωρητικότητας 750 mL (Beckman).
- Σωλήνες τύπου Falcon 50 mL (Sarstedt)
- Σωλήνες τύπου Falcon 15 mL (Sarstedt)
- Υάλινος ομογενοποιητής τύπου Dounce (γουδοχέρι τύπου B)

- Οπτικό μικροσκόπιο Nikon (TMS) με φακούς 4x, 10x, 20x.

Πορεία μεθόδου

Όλα τα βήματα της διαδικασίας που ακολουθούνται για την απομόνωση των πυρήνων λαμβάνουν χώρα σε θερμοκρασία 0 ως 4 °C. Όλα τα διαλύματα ο εξοπλισμός και οι φυγοκεντρήσεις λαμβάνουν χώρα σε αυτή τη θερμοκρασία. Το πρωτόκολλο που ακολουθείται βασίζεται στη χρήση υποτονικού διαλύματος σε συνδυασμό με ομογενοποιητή Dounce για τη λύση των κυττάρων καθώς οι πυρήνες δεν επηρεάζονται από τη χαμηλή αλατότητα (141). Τα κύτταρα που βρίσκονται σε καλλιέργεια συλλέγονται ανάλογα με τον όγκο της καλλιέργειας είτε σε δοχεία χωρητικότητας 750 mL είτε σε σωλήνες τύπου φάλκον και φυγοκεντρούνται στα 829 x g για 30 min. Μετά το τέλος γίνεται απόρριψη του υπερκείμενου και τα κύτταρα αναδιασπείρονται σε όγκο PBS που είναι ίσος με 5 φορές τον όγκο τους μετά τη φυγοκέντρηση (packed cell volume). Τα κύτταρα εκπλένονται ακόμα δυο φορές και μετά αναδιασπείρονται στο υποτονικό ρυθμιστικό διάλυμα με όγκο 5 φορές τον όγκο pcn και φυγοκεντρούνται αμέσως για 5 λεπτά σε ταχύτητα 829 x g. Το συγκεκριμένο βήμα πρέπει να γίνει πολύ γρήγορα γιατί είναι πιθανό να εκχυλιστούν πρωτεΐνες από τα κύτταρα και να απομακρυνθούν μαζί με το υπερκείμενο. Ο σκοπός της συγκεκριμένης έκπλυσης με το υποτονικό διάλυμα είναι να απομακρυνθεί αποτελεσματικά εντελώς το PBS από τις προηγούμενες πλύσεις και να γίνει αποτελεσματική διόγκωση των κυττάρων στο επόμενο βήμα. Μετά λοιπόν από τη φυγοκέντρηση τα κύτταρα αναδιασπείρονται σε όγκο 3 pcn και αφήνονται για διογκωθούν στον πάγο για 10 λεπτά. Τα κύτταρα μεταφέρονται σε ομογενοποιητή τύπου Dounce στον πάγο όπου και γίνεται η λύση τους 10 κινήσεις του εμβόλου. Η λύση των κυττάρων μπορεί να επιβεβαιωθεί μετά από χρώση Ulna 20 μl από το ομογενοποιημένο υλικό αναμιγνύεται με τη χρωστική Ulna και ύστερα από επώαση 5 λεπτών το μίγμα τοποθετείται σε πλακάκι και παρατηρείται κάτω από το οπτικό μικροσκόπιο. Με τη συγκεκριμένη χρωστική οι πυρήνες βάφονται μπλε και το κυτταροπλασματικό υλικό ροζ. Η λύση των κυττάρων με τη συγκεκριμένη μέθοδο είναι κατ' επανάληψη >90%. Το ομογενοποιημένο υλικό μεταφέρεται σε σωλήνες τύπου falcon και οι πυρήνες συλλέγονται με φυγοκέντρηση στα 207 x g για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και

αποθηκεύεται ως το κυτταροπλασματικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα και οι πυρήνες επεξεργάζονται όπως περιγράφεται στις ενότητες

3.2.1.2 Απομόνωση πυρήνων με τη χρήση διαλύματος λύσης Nonidet P-40 (NP-40).

Υλικά

- Κυτταρική σειρά MEL σε καλλιέργεια (ή οποιαδήποτε άλλη από τις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα διατριβή)
- Διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH=7,4 (PBS)
- Nonidet P-40 ρυθμιστικό διάλυμα λύσης: 10 mM Tris•Cl, pH 7,4, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0,5% (v/v) NP-40 και 1mM PMSF (προσθήκη αμέσως πριν τη χρήση)
- Χρώση Unna (υλικά ενότητας 4.3.1.)

Όργανα

- Τα ίδια όργανα που χρησιμοποιήθηκαν και στην ενότητα 4.3.1.
- Περιστρεφόμενη τροχό επώασης στους 4 °C

Πορεία μεθόδου

Στη συγκεκριμένη μέθοδο χρησιμοποιείται διάλυμα λύσης των κυττάρων το οποίο περιέχει το μη επιφανειοδραστικό απορρυπαντικό Nonidet P – 40 (142). Το συγκεκριμένο απορρυπαντικό λύνει την κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων που βρίσκονται στο υποτονικό διάλυμα, χωρίς να χρειάζεται η χρήση του ομογενοποιητή Dounce ο οποίος μπορεί να επηρεάσει τον πυρηνικό φάκελο.

Τα κύτταρα που βρίσκονται σε καλλιέργεια συλλέγονται ανάλογα με τον όγκο της καλλιέργειας είτε σε δοχεία χωρητικότητας 750 mL είτε σε σωλήνες τύπου φάλκον και φυγοκεντρούνται στα 829 x g για 30 min. Μετά το τέλος γίνεται απόρριψη του υπερκείμενου και τα κύτταρα αναδιασπείρονται σε όγκο PBS που είναι ίσος με 5 φορές το rcv. Τα κύτταρα εκπλένονται ακόμα δυο φορές, μετά αναδιασπείρονται ελαφρώς στο διάλυμα λύσης NP-40 όγκου τριπλάσιου του rcv και μεταφέρονται για επώαση 10 λεπτών σε περιστρεφόμενη τροχό στους 4 °C. Στο σημείο αυτό μπορεί να ελεγχθεί η λύση των κυττάρων με τον ίδιο ακριβώς τρόπο που περιγράφηκε στην ενότητα 4.3.1. Οι πυρήνες μετέπειτα φυγοκεντρούνται σε ταχύτητα 207 x g για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο αποτελεί το κυτταροπλασματικό κλάσμα και μπορεί

να αποθηκευθεί. Οι πυρήνες αναδιασπείρονται ξανά στον ίδιο όγκο που χρησιμοποιήθηκε προηγουμένως διαλύματος λύσης NP-40 και φυγοκεντρώνονται πάλι σε ταχύτητα 207 x g. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και οι απομονωμένοι πυρήνες επεξεργάζονται όπως περιγράφεται στις ενότητες.

3.2.2 Εκχύλιση πυρηνικών πρωτεϊνών με τη χρήση διαλύματος υψηλής αλατότητας (high salt nuclear extraction).

Υλικά

- Απομονωμένοι πυρήνες με τις μεθόδους που περιγράφηκαν στις ενότητες 4.3.1 ή 4.3.2.
- Διάλυμα λύσης υψηλής αλατότητας (Nuclear Lysis Buffer): 10 mM HEPES pH 7.9, 400 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.2 mM , EDTA, 20% Glycerol με αναστολείς πρωτεασών ή 1mM PMSF (προστίθενται πριν από κάθε χρήση).

Όργανα

- Φυγόκεντρος Sorvall RC 26 plus με κεφαλή SA-300.
- Σωλήνες τύπου Falcon 50 mL (Sarstedt)
- Σωλήνες τύπου Falcon 15 mL (Sarstedt)
- Περιστρεφόμενος τροχός επώασης στους 4 °C
- Δοχείο Dewar περιέχει υγρό άζωτο.

Πορεία μεθόδου

Οι πυρήνες που έχουν απομονωθεί όπως περιγράφηκε στις ενότητες 4.3.1 και 4.3.2. αναδιασπείρονται στο διάλυμα λύσης υψηλής αλατότητας (Nuclear Lysis Buffer). Ο όγκος του διαλύματος λύσης που χρησιμοποιείται είναι δυο φορές ο όγκος των πυρήνων μετά τη φυγοκέντρωση. Οι πυρήνες μεταφέρονται στη συνέχεια σε περιστρεφόμενο τροχό. στους 4 °C όπου και επωάζονται για 1 ώρα ώστε να εκχυλιστούν οι πυρηνικές πρωτεΐνες. Μετά την εκχύλιση γίνεται φυγοκέντρωση σε ταχύτητα 18254 x g για 35 λεπτά και το υπερκείμενο ανάλογα με τον όγκο του χωρίζεται σε μικρότερες ποσότητες των 500 μl και ψύχεται άμεσα με τη χρήση υγρού αζώτου. Το πυρηνικό εκχύλισμα φυλάσσεται σε καταψύκτη -80 °C μέχρι να χρησιμοποιηθεί. Το αδιάλυτο ίζημα που προκύπτει επεξεργάζεται όπως περιγράφεται στην ενότητα.

3.2.3 Εκχύλιση πυρηνικών πρωτεϊνών με τη χρήση διαλύματος NUN

Υλικά

- Απομονωμένοι πυρήνες με τις μεθόδους που περιγράφηκαν στις ενότητες 4.3.1 ή 4.3.2.
- Διάλυμα αποθήκευσης πυρήνων (Nuclear Storage Buffer, NSB): 20mM Tris-HCl pH 7.9, 75 mM NaCl, 0.5mM EDTA, 0,85mM DTT, 50% γλυκερόλη και αναστολείς πρωτεασών (Roche, protease inhibitor cocktail) ή 1 mM PMSF.
- Διάλυμα 1,1X NUN: 1.1M Urea, 0.33M NaCl, 1.1%Nonidet P-40, 27.5 mM HEPES pH7.6, 1.1 mM DTT με αναστολείς πρωτεασών ή 1 mM PMSF.

Όργανα

- Τα ίδια όργανα που χρησιμοποιήθηκαν και στην ενότητα 4.3.3.

Πορεία μεθόδου

Οι πυρήνες που έχουν απομονωθεί όπως περιγράφηκε στις ενότητες 4.3.1 και 4.3.2. αναδιασπείρονται στον ελάχιστο δυνατό όγκο στο διάλυμα αποθήκευσης πυρήνων (NSB) (143). Σε αυτό το σημείο οι πυρήνες μπορούν να αποθηκευθούν στους -80°C αφού πρώτα ψυχθούν άμεσα σε υγρό άζωτο. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη διαλύματος 1,1X NUN (143) το οποίο έχει 9 φορές τον όγκο που του NSB που προστέθηκε προηγουμένως (πχ. Για 500 μl διαλύματος NSB προστίθενται 4,5 mL διαλύματος NUN). Οι πυρήνες μεταφέρονται στη συνέχεια σε περιστρεφόμενο τροχό στους 4°C όπου και επωάζονται για 1 ώρα ώστε να εκχυλιστούν οι πυρηνικές πρωτεΐνες. Το μίγμα στη συνέχεια φυγοκεντρείται σε ταχύτητα $18254 \times g$ για 35 λεπτά. και το υπερκείμενο ανάλογα με τον όγκο του χωρίζεται σε μικρότερες ποσότητες των 500 μl και ψύχεται άμεσα με τη χρήση υγρού αζώτου. Το πυρηνικό εκχύλισμα φυλάσσεται σε καταψύκτη -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί. Το αδιάλυτο ίζημα που προκύπτει επεξεργάζεται όπως περιγράφεται στην ενότητα.

3.2.4 Εκχύλιση πυρηνικών πρωτεϊνών με τη χρήση διαλύματος RIPA (-SDS)

Υλικά

- Απομονωμένοι πυρήνες με τις μεθόδους που περιγράφηκαν στις ενότητες 4.3.1 ή 4.3.2.

- Διάλυμα RIPA (-SDS): 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% NP-40, 0.25% Na-Deoxycholate, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 10% γλυκερόλη με αναστολείς πρωτεασών ή 1 mM PMSF.

Όργανα

- Τα ίδια όργανα που χρησιμοποιήθηκαν και στην ενότητα 4.3.3.

Πορεία μεθόδου

Οι πυρήνες που έχουν απομονωθεί όπως περιγράφηκε στις ενότητες 4.3.1 και 4.3.2. αναδιασπείρονται σε διάλυμα RIPA (-SDS). Οι πυρήνες μεταφέρονται στη συνέχεια σε περιστρεφόμενη τροχό στους 4 °C όπου και επωάζονται για 1 ώρα ώστε να εκχυλιστούν οι πυρηνικές πρωτεΐνες. Το μίγμα στη συνέχεια φυγοκεντρείται σε ταχύτητα 18254 x g για 35 λεπτά. και το υπερκείμενο ανάλογα με τον όγκο του χωρίζεται σε μικρότερες ποσότητες των 500 μl και ψύχεται άμεσα με τη χρήση υγρού αζώτου. Το πυρηνικό εκχύλισμα φυλάσσεται σε καταψύκτη -80 °C μέχρι να χρησιμοποιηθεί. Το αδιάλυτο ίζημα που προκύπτει επεξεργάζεται όπως περιγράφεται στην ενότητα.

3.2.5 Επεξεργασία των αδιάλυτων ιζημάτων μετά από απομόνωση των πυρηνικών πρωτεϊνών.

Υλικά

- 6x διάλυμα Laemmli:
 - 10% (w/v) SDS
 - 36% (v/v) Γλυκερόλη
 - 5% (v/v) β-μερκαπτοαιθανόλη
 - 350 mM Tris – HCl, pH 6.8
 - 0,005% (w/v) Μπλε της βρωμοφαινόλης

Όργανα

- Συσκευή υπερήχων (Sonicator Probe, Sonics Vibra Cell)

Πορεία μεθόδου

Το αδιάλυτο ίζημα που προκύπτει μετά τη φυγοκέντρωση κατά τη απομόνωση των πυρηνικών πρωτεϊνών επαναδιαλυτοποιείται όσο καλύτερα γίνεται σε κατάλληλο όγκο διαλύματος Laemmli 2x. Για τη διάσπαση του DNA και την πλήρη επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος γίνεται χρήση συσκευής υπερήχων όπου εφαρμόζονται 5 «χτυπήματα» (bursts) για 30 δευτερόλεπτα

με κενό 30 δευτερολέπτων και στη συνέχεια τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20°C .

3.2.6 Μέτρηση πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με τη μέθοδο Bradford.

Υλικά

- Αντιδραστήριο Bradford 5x (Bio-Rad Protein Assay reagent)
- Πρότυπα διάλυμα αλβουμίνης βοός (BSA) συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Όργανα

- Φωτόμετρο ορατού – υπεριώδους (Eppendorf, bio-Photometer)
- Σωλήνες τύπου Eppendorf 1,5 mL
- Αυτόματες πιπέτες
- Πλαστικές κυψελίδες του 1mL

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών με τη χρωστική Coomassie Blue R-250 σε όξινα υδατικά διαλύματα. Η ανιονική μορφή της χρωστικής δεσμεύεται στις πρωτεΐνες, κυρίως μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, δεσμών Van der Waals, καθώς και μέσω της ανάπτυξης υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των σουλφονικών ομάδων της χρωστικής και των αμινοξέων (κυρίως της αργινίνης, αλλά και ιστιδίνης, λυσίνης, τυροσίνης, τρυπτοφάνης και φαινυλαλανίνης). Η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών με τη χρωστική οδηγεί στη δημιουργία σταθερού εγχρώμου προϊόντος, το οποίο εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης στα 595 nm (144). Το προϊόν είναι σταθερό, απουσία φωτός, για μια περίπου ώρα, ενώ ο σχηματισμός του επηρεάζεται ελάχιστα από άλλες χημικές ενώσεις, που εμπεριέχονται στα κυτταρικά εκχυλίσματα.

Πορεία μεθόδου

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του υπό εξέταση πρωτεϊνικού διαλύματος γίνεται με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης. Από το πρότυπο διάλυμα BSA συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ προστίθενται 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 και 20 μl σε 800, 798, 796, 794, 792, 790, 788, 786, 784, 782, 780 μl νερού αντίστοιχα. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 200 μl αντιδραστηρίου Bradford 5x γίνεται ζωηρή ανάδευση και τα δείγματα επωάζονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της επώασης τα δείγματα φωτομετρούνται στα 595 nm και καταγράφεται η απορρόφηση του κάθε

δείγματος. Το τυφλό είναι το δείγμα που περιέχει 800 μl νερό και 200 μl αντιδραστηρίου Bradford. Η ευθεία που προκύπτει από το σχεδιασμό των τιμών της μάζας του BSA ως συνάρτηση της απορρόφησης είναι η πρότυπη καμπύλη και από τη εξίσωση της ευθείας μπορεί να γίνει ο υπολογισμός της συγκέντρωσης αγνώστου πρωτεϊνικού δείγματος. Όταν είναι γνωστή η εξίσωση της πρότυπης καμπύλης η εύρεση της συγκέντρωσης γίνεται ως εξής: $C = (\mu\text{l δείγματος} / \text{συντελεστής κλίσης ευθείας}) \times \text{αραίωση του δείγματος}$.

3.2.7 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμιδίου (SDS PAGE electrophoresis)

Υλικά

- Πήκτωμα φόρτωσης (Stacking Gel):
 - 4% - 6%(w/v) διάλυμα ακρυλαμιδίου 30% (Bio Rad),
 - 125mM Tris-HCl, pH 6,8
 - 0,1%(w/v) SDS,
 - 0,05%(w/v) APS (υπερθειικό αμμώνιο)
 - 0,1% (v/v) TEMED (N,N,N',N-τετραμεθυλ-αιθυλενοδιαμίνη)
- Πήκτωμα διαχωρισμού (Resolving Gel):
 - 6% – 12% (w/v) διάλυμα ακρυλαμιδίου 30% (Bio Rad)
 - 0,38 M Tris – HCl, pH 8,8
 - 0,1%(w/v) SDS,
 - 0,05%(w/v) APS (υπερθειικό αμμώνιο)
 - 0,06% (v/v) TEMED (N,N,N',N-τετραμεθυλ-αιθυλενοδιαμίνη)
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x:
 - 25 mM Tris base
 - 192 mM γλυκίνη
 - 0,1 % (w/v) SDS
- Διάλυμα Laemmli 6x (ενότητα 4.3.6)
- Benchmark Pre – Stained Protein Ladder (Invitrogen)

Όργανα

- Biorad Mini - PROTEAN electrophoresis system (Bio Rad)
- Biorad PowerPac Basic supply (Biorad, USA)

Αρχή μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια αναλυτική μέθοδος, η οποία στηρίζεται στην ιδιότητα των φορτισμένων σωματιδίων να μετακινούνται υπό την επίδραση ηλεκτρικού φορτίου προς τον αντίθετο από το φορτίο τους πόλο, σε υδατικά διαλύματα. Έτσι η κινητικότητα τους εξαρτάται από τη σταθερά pK και το μοριακό βάρος του φορτισμένου σωματιδίου καθώς επίσης από το pH , την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, τη θερμοκρασία και τη φύση του υλικού στο οποίο πραγματοποιείται η ηλεκτροφόρηση.

Η ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό βάρος τους. Η πολυακρυλαμίδα έχει το πλεονέκτημα να αποτελεί συνθετικό πήκτωμα με εύρος πόρων ρυθμιζόμενο από την αναλογία των συγκεντρώσεων μεταξύ του ακρυλαμιδίου και του συνδετικού παράγοντα bis-ακρυλαμιδίου (145). Στα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης γίνεται επίσης και προσθήκη δωδεκακυλοθειϊκού νατρίου (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) (146). Όταν οι πρωτεΐνες αναδιατάσσονται μέσω βρασμού, παρουσία SDS και άλλων αναγωγικών παραγόντων όπως η β-μερκαπτοαιθανόλη και η διθειοθρεϊτόλη, τα μόρια του απορρυπαντικού αλληλεπιδρούν με τα πρωτεϊνικά δημιουργώντας σύμπλοκα. Το αρνητικό φορτίο του SDS καλύπτει το φορτίο των αποδιατεταγμένων πρωτεϊνών αποδίδοντας σε όλες τις πρωτεΐνες το ίδιο φορτίο ώστε υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου οι πρωτεΐνες να μπορούν να διαχωριστούν ανάλογα με το μέγεθος τους.

Στη συνήθη εργαστηριακή πρακτική χρησιμοποιείται το σύστημα Tris – γλυκίνης το οποίο εισήγαγε ο Laemmli το 1970 (147). Στο σύστημα αυτό η ηλεκτροφόρηση είναι ασυνεχής και αποτελείται από δυο διαδοχικά πηκτώματα: το πήκτωμα φόρτωσης του δείγματος (stacking gel) και το πήκτωμα διαχωρισμού (resolving gel). Στο πήκτωμα φόρτωσης, το οποίο έχει μεγαλύτερους πόρους και pH 6,8 το δείγμα «συμπυκνώνεται» σχηματίζοντας μια λεπτή ζώνη, ώστε όλες οι πρωτεΐνες να εισέλθουν ταυτόχρονα στο πήκτωμα διαχωρισμού.

Πορεία μεθόδου

Σε όλα τα πειράματα που χρειάστηκε ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν οι συσκευές mini PROTEAN cell της Biorad και

η συναρμολόγηση της συσκευής πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ο πολυμερισμός του πηκτώματος διαχωρισμού μεταξύ των γυάλινων πλακών που παρέχονται από τον κατασκευαστή της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Στην επιφάνεια του πηκτώματος διαχωρισμού τοποθετείται μικρή ποσότητα ισοπροπανόλης που συμβάλλει στην ευθυγράμμιση του μετώπου του πηκτώματος διαχωρισμού. Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού αφαιρείται η ισοπροπανόλη και τοποθετείται το προς πολυμερισμό πήκτωμα φόρτωσης μαζί με το ειδικό χτένι που θα σχηματίσει τις θέσεις φόρτωσης του δείγματος. Συναρμολογείται η συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται το διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x.

Τα προς ανάλυση πρωτεϊνικά δείγματα ετοιμάζονται με την προσθήκη διαλύματος Laemmli 6x (τελική συγκέντρωση 1x) και επώαση για 10 λεπτά στους 80 °C. Στη συνέχεια τα δείγματα φορτώνονται στις ειδικά διαμορφωμένες θέσεις του άνω μέρους του πηκτώματος φόρτωσης ενώ παράλληλα γίνεται και φόρτωση των πρωτεϊνικών δεικτών με γνωστά μοριακά βάρη για την ευκολότερη αναγνώριση της υπό μελέτη πρωτεΐνης. Μετά το πέρας της φόρτωσης εφαρμόζεται σταθερή τάση 100V

3.2.8 Χρώση πρωτεϊνών σε πηκτώματα ακρυλαμιδίου με χρωστική Coomassie Blue R-250

Υλικά

- Διάλυμα χρώσης πρωτεϊνών:
 - 40% (v/v) μεθανόλη
 - 10% (v/v) Οξικό οξύ
 - 0,033% (w/v) χρωστική μπλε του Coomassie R-250
- Διάλυμα αποχρωματισμού πρωτεϊνών:
 - 40% (v/v) μεθανόλη
 - 10% (v/v) οξικό οξύ

Όργανα

- Περιστρεφόμενη πλατφόρμα

Αρχή μεθόδου

Η χρωστική Coomassie προσδένεται μη ομοιοπολικά στις αμινικές ομάδες των αμινοξέων συμβάλλοντας τόσο στην ποιοτική όσο και ποσοτική

ανίχνευση των πρωτεϊνών που έχουν αναλυθεί ηλεκτροφορητικά σε αποδιατακτικά πηκτώματα ακρυλαμιδίου. Η χρώση με την Coomassie Blue R-250 πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1963 (148)

Πορεία μεθόδου

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα εμβαπτίζεται στο διάλυμα χρώσης πρωτεϊνών και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 1 ώρα υπό κίνηση στην περιστρεφόμενη πλατφόρμα. Στη συνέχεια απομακρύνεται το διάλυμα χρώσης και γίνονται διαδοχικές πλύσεις με το διάλυμα αποχρωματισμού. Για αποχρωματισμό το πήκτωμα αφήνεται στο διάλυμα αποχρωματισμού ολονύκτια με συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.

3.2.9 Χρώση πρωτεϊνών σε πηκτώματα ακρυλαμιδίου με χρωστική Colloidal Coomassie Blue G-250

Υλικά

- Διάλυμα μονιμοποίησης πρωτεϊνών:
 - 40% (v/v) μεθανόλη
 - 10% (v/v) Οξικό οξύ
- Διάλυμα χρώσης πρωτεϊνών (Συμπυκνωμένο διάλυμα):
 - 10% (w/v) θειικό αμμώνιο
 - 1% (v/v) φωσφορικό οξύ
 - 0,1% (w/v) χρωστική Coomassie Blue G-250
- Διάλυμα χρώσης πρωτεϊνών (Αραιωμένο διάλυμα / Διάλυμα Εργασίας):
 - 8% (w/v) θειικό αμμώνιο
 - 0,8% (v/v) φωσφορικό οξύ
 - 20% (v/v) μεθανόλη
 - 0,08% (w/v) χρωστική Coomassie Blue G-250
- Διάλυμα αποχρωματισμού πρωτεϊνών:
 - Απιονισμένο νερό

Όργανα

- Περιστρεφόμενη πλατφόρμα

Αρχή μεθόδου

Η χρώση με colloidal Coomassie Blue G-250 αποτελεί ουσιαστικά παραλλαγή της χρώσης με Coomassie Blue R-250. Η Coomassie Blue G-250 φέρει επιπλέον δυο μεθυλομάδες στο μόριο της, οι οποίες καθιστούν τη χρώση περισσότερο ευαίσθητη,

Πορεία μεθόδου

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα εμβαπτίζεται στο διάλυμα μονιμοποίησης και επωάζεται στο διάλυμα μονιμοποίησης για 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση. Ύστερα γίνεται απόρριψη του διαλύματος μονιμοποίησης και το πήκτωμα καλύπτεται για ολονύκτια επώαση από το διάλυμα χρώσης των πρωτεϊνών (διάλυμα εργασίας). Την επόμενη μέρα απορρίπτεται (το διάλυμα δύναται να επαναχρησιμοποιηθεί) και ακολουθούν διαδοχικές πλύσεις με απιονισμένο νερό.

3.2.10 Χρώση πρωτεϊνών με νιτρικό άργυρο

Υλικά

- Διάλυμα μονιμοποίησης:
 - 50% (v/v) μεθανόλη
 - 5% (v/v) οξικό οξύ
- Διάλυμα έκπλυσης:
 - 50% (v/v) μεθανόλη
- Διάλυμα ευαισθητοποίησης:
 - 0,02% (w/v) θειοθειικό νάτριο
- Διάλυμα αναγωγής:
 - 5μg/mL DTT
- Διάλυμα χρώσης:
 - 0,1% (w/v) νιτρικός άργυρος
- Διάλυμα εμφάνισης:
 - 2% (w/v) ανθρακικό νάτριο
 - Σε 100 mL διαλύματος προστίθενται 40μl 37% (v/v) φορμαλδεΰδης
- Διάλυμα εξουδετέρωσης:
 - 5% οξικό οξύ
- Διάλυμα αποχρωματισμού (φωτοευαίσθητο):

- 30 mM σιδηροκυανιούχο κάλιο [$K_3(FeCN)_6$]
- 100 mM θειοθειικό νάτριο

Όργανα

- Περιστρεφόμενη πλατφόρμα

Αρχή μεθόδου

Η χρώση με νιτρικό άργυρο αποτελεί την πιο ευαίσθητη χρωμομετρική μέθοδο ανίχνευσης πρωτεϊνών. Η μέθοδος στηρίζεται στο σχηματισμό ιζήματος μεταλλικού αργύρου στην επιφάνεια του πηκτώματος, στα σημεία εκείνα όπου εντοπίζονται οι ζώνες των ηλεκτροφορητικά αναλυμένων πρωτεϊνών. Η χρώση με νιτρικό άργυρο που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή είναι συμβατή με τη φασματομετρία μάζας (149), (150).

Πορεία μεθόδου

Μονιμοποίηση του πηκτώματος με το διάλυμα μονιμοποίησης για 20 λεπτά υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Έκπλυση του πηκτώματος διάρκειας 10 λεπτών, υπό ανάδευση και σε θερμοκρασία δωματίου με το διάλυμα έκπλυσης. Πολλαπλές εκπλύσεις του πηκτώματος με απεσταγμένο νερό υπό ανάδευση και σε θερμοκρασία δωματίου. Οι εκπλύσεις πραγματοποιούνται για συνολικό χρόνο 2 ωρών. Η ευαισθητοποίηση των πρωτεϊνών για χρόνο επώασης λιγότερο του ενός λεπτού υπό ανάδευση με το αντίστοιχο διάλυμα και ακολουθούν δυο διαδοχικές πλύσεις με απιονισμένο νερό διάρκειας 1 λεπτού υπό ανάδευση. Στη συνέχεια η αναγωγή των πρωτεϊνών γίνεται πάλι μέσω του αντίστοιχου διαλύματος με επώαση 30 λεπτών, ύστερα απομακρύνεται το διάλυμα και προστίθεται κρύο διάλυμα χρώσης και το πήκτωμα επωάζεται για 20 λεπτά αναδευόμενο σε θερμοκρασία δωματίου. Γίνονται δυο διαδοχικές εκπλύσεις του πηκτώματος με απιονισμένο νερό για 1 λεπτό και προστίθεται το διάλυμα εμφάνισης υπό ανάδευση μέχρι ότου το επιθυμητό επίπεδο ευαισθησίας της χρώσης. Απομακρύνεται το διάλυμα εμφάνισης και προστίθεται το διάλυμα εξουδετέρωσης με το οποίο πραγματοποιούνται και δυο διαδοχικές εκπλύσεις των 10 λεπτών υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.

Μετά τη χρώση το πήκτωμα φυλάσσεται είτε σε αραιωμένο διάλυμα εξουδετέρωσης (1% v/v οξικό οξύ) είτε σε απιονισμένο νερό στους 4 °C. Σε περίπτωση που η χρώση με νιτρικό άργυρο δεν είναι ικανοποιητική τότε

μπορεί να χρησιμοποιηθεί το διάλυμα αποχρωματισμού, ώστε στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί κάποια άλλη χρώση.

3.2.11 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Υλικά

- Διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών:
 - 25 mM Tris – HCl pH 7.4
 - 192mM Γλυκίνη
 - 20% (v/v) Μεθανόλη
 - 0,05% (w/v) SDS
- Πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου
- Νιτροκυτταρίνη Protran (Whatman)
- Χαρτιά τύπου Whatman

Όργανα

- Trans-Blot Cell (Biorad, USA)
- Biorad PowerPac Basic supply (Biorad)

Αρχή μεθόδου

Σε περιπτώσεις που απαιτείται η ανάλυση των πρωτεϊνών κατά Western πραγματοποιείται ηλεκτροαποτύπωση των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μετά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό τους. Η μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης βασίζεται στην έκλυση των πρωτεϊνών από το πήκτωμα παρουσία ηλεκτρικού δυναμικού. Η πρόσδεση τους στη μεμβράνη γίνεται μέσω υδρόφοβων και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Στη παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο της ηλεκτρομεταφοράς σε υγρή φάση (151).

Πορεία μεθόδου

Μετά το τέλος της ηλεκτροφορητικής διαδικασίας το πήκτωμα ακρυλαμιδίου εξισορροπείται σε διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών, ταυτόχρονα η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης διαβρέχεται με απιονισμένο νερό και εξισορροπείται, επίσης στο διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών. Γίνεται συναρμολόγηση της συσκευής Trans-Blot Cell (Biorad) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και εφαρμόζεται ρεύμα σταθερής έντασης 350 mA για συνολικό χρόνο 60 λεπτών στους 4 °C.

3.2.12 Χρώση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με Ponceau S

Υλικά

- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης
- Διάλυμα χρώσης Ponceau S:
 - 0,1% (w/v) Ponceau S
 - 5% (v/v) οξικό οξύ
- Διάλυμα αποχρωματισμού:
 - PBS – 0,1% Tween 20

Όργανα

- Περιστρεφόμενη πλατφόρμα

Αρχή μεθόδου

Η χρώση Ponceau S σε συνθήκες όξινου pH μπορεί να αλληλεπιδράσει με τις πρωτεΐνες που έχουν ηλεκτροαποτυπωθεί πάνω στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί σε χρώση των πρωτεϊνών η οποία είναι αναστρέψιμη κατά την αύξηση του pH (152). Μετά τον αποχρωματισμό η μεμβράνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανάλυση κατά Western.

Πορεία μεθόδου

Μετά το πέρας της ηλεκτροαποτύπωσης των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης γίνονται 2 εκπλύσεις των 3 λεπτών με απιονισμένο νερό. Η μεμβράνη διαβρέχεται με το διάλυμα χρώσης για 5 λεπτά και στη συνέχεια το διάλυμα απομακρύνεται (το διάλυμα χρώσης μπορεί να φυλαχτεί ώστε να επαναχρησιμοποιηθεί στο μέλλον). Στο σημείο αυτό μπορούν να γίνουν δυο εκπλύσεις με απιονισμένο νερό ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του διαλύματος χρώσης και να εμφανιστούν καλύτερα οι πρωτεΐνες. Για τον πλήρη αποχρωματισμό της μεμβράνης γίνονται 3 εκπλύσεις των 5 λεπτών με το διάλυμα αποχρωματισμού.

3.2.14 Ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση κατά Western

Υλικά

- Διάλυμα έκπλυσης (PBS-T):
 - PBS – 0,1% Tween 20

- Διάλυμα κάλυψης των μη ειδικών θέσεων:
 - 5% (w/v) άπαχο αποξηραμένο γάλα (Regilait)
 - PBS – 0,1% Tween 20
- 10% (w/v) Αζίδιο του Αζώτου (ή Νατραζίδιο)
- Πρωτογενή (Πίνακας 1) και δευτερογενή αντισώματα (Πίνακας 2)
- ECL Plus chemiluminescent (GE Healthcare)

Πίνακας 1. Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

A/A	Αντίσωμα	Εταιρεία - Κωδικός	Οργανισμός προέλευσης του αντισώματος	Αραίωση	Μοριακό βάρος της πρωτεΐνης (kDa)
001	GATA-1 (N6)	Santa Cruz (sc-265)	Αρουραίος	1:5000	49
002	GATA-1 (M20)	Santa Cruz (sc-1234)	Κατσίκα	1:4000	49
003	GATA-1 (11852)	Abcam (Ab11852)	Κουνέλι	1:5000	49
004	FOG-1 (M20)	Santa Cruz (sc-9361)	Κατσίκα	1:3000	120
005	FOG-1 (M216)	Santa Cruz (sc-10754)	Κουνέλι	1:3000	120
006	FOG-1 (A20)	Santa Cruz (sc-93620)	Κατσίκα	1:5000	120
007	Mi-2b (H-242)	Santa Cruz (sc-11378)	Κουνέλι	1:500	220
008	Gfi-1b (D19X)	Santa Cruz (sc-8599X)	Κατσίκα	1:500	37
009	Gfi-1b (B-7)	Santa Cruz (sc-28356)	Ποντίκι	1:500	37
010	DNMT-1 (1-	Bioacademia (70-	Κουνέλι	1:10.000	180

	248)	201)			
011	ZBP-89	Alan Cantor (Harvard)	Κουνέλι	1:1000	90
012	ZBP-89	Abcam (Ab69933)	Κουνέλι	1:1000	90
015	ZBP-89	Rockland (100- 401-685)	Κουνέλι	1:1000	90
016	Nucleophosmin	Baylor College	Ποντίκι	1:10.000	40
017	ZNF143	Gary Kunkel	Κουνέλι	1:5000	80
018	ZNF143 (M01)	Abnova (H00007702 - M01)	Ποντίκι	1:5000	80
019	GFP (3H9)	Chromotek (3H9)	Αρουραίος	1:1000	Επίτοπο
020	GFP (B-2)	Santa Cruz (sc- 9996)	Ποντίκι	1:1000	Επίτοπο
021	HDAC1 (10E2)	Santa Cruz (sc- 81598)	Ποντίκι	1:1000	60
022	HDAC2 (C-8)	Santa Cruz (sc- 9959)	Ποντίκι	1:500	60
023	NF-1A	Active Motif (39397)	Κουνέλι	1:1000	60
024	NF-1X	Active Motif (39348)	Κουνέλι	1:500	60
025	TRRAP (2D5)	Dr. L. Tora	Ποντίκι	1:500	250
026	GCN5 (2C11)	Dr. L. Tora	Ποντίκι	1:500	91
027	SPT20 (2487)	Dr. L. Tora	Κουνέλι	1:500	50
028	TAF10 (2B11)	Dr. L. Tora	Ποντίκι	1:500	30
029	TAF4 (2B9)	Dr. L. Tora	Ποντίκι	1:500	100
030	TAF5 (1C2)	Dr. L. Tora	Ποντίκι	1:500	80
031	TAF6 (2G7)	Dr. L. Tora	Ποντίκι	1:500	49

Πίνακας 2. Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή

A/A	Αντίσωμα	Εταιρεία - Κωδικός	Οργανισμός προέλευσης του αντισώματος	Αραίωση
1	Έναντι κουνελιού - HRP	Dako (P0448)	Κατσίκια	1:30.000
2	Έναντι αρουραίου - HRP	Dako (P0450)	Κουνέλι	1:5000
3	Έναντι κατσίκας- HRP	Santa Cruz (sc-2020)	Όνος	1:5000
4	Έναντι ποντικού – HRP	Santa Cruz (sc-2005)	Κατσίκια	1:5000
5	Streptavidin – HRP	Perkin Elmer (NEL7500)		1:15.000

Όργανα

- Περιστρεφόμενη πλατφόρμα
- Φωτογραφικό Φιλμ (Fuji Medical Xray Film)
- Μηχάνημα εμφάνισης Kodak X-OMAT 1000 Processor (Kodak, USA)

Αρχή μεθόδου

Στις περιπτώσεις όπου απαιτείται η ανίχνευση μιας πρωτεΐνης η οποία εμπεριέχεται σε μικρή ποσότητα, σε ένα πολύπλοκο δείγμα, όπως τα πυρηνικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα, εφαρμόζεται η τεχνική της ανοσο-αποτύπωσης κατά Western. Η τεχνική βασίζεται στην ειδική αναγνώριση του υπό μελέτη πρωτεϊνικού επιτόπου από αντισώματα, που έχουν αναπτυχθεί έναντι της συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Η ανίχνευση της πρωτεΐνης γίνεται με τη βοήθεια δευτερογενούς αντισώματος που αναγνωρίζει Fc τμήματα του πρωτογενούς Το δευτερογενές αντίσωμα είναι συζευγμένο με την υπεροξειδάση της χραΐνας. (Horse Radish Peroxidase, HRP) και παρουσία

του υποστρώματος του αποδίδει φθορίζον σήμα, το οποίο και ανιχνεύεται με τη βοήθεια φωτογραφικού φιλμ (151), (153)

Πορεία μεθόδου

Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μετά την μεταφορά των πρωτεϊνών ξεπλένεται μερικές φορές με απιονισμένο νερό και επωάζεται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση διάλυμα κάλυψης των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του αντισώματος. Ακολουθεί ολονύκτια επώαση υπό ανάδευση στους 4 °C με διάλυμα κάλυψης που περιέχει το πρωτογενές αντίσωμα στην κατάλληλη αραιώση. Ύστερα από την επώαση το πρωτογενές αντίσωμα μπορεί να συλλεχθεί και να φυλαχθεί στους 4 °C αφού προστεθεί νατραζίδιο σε τελική συγκέντρωση 0,02%. Η μεμβράνη εκπλένεται 3 φορές για 5 λεπτά με το διάλυμα PBS-T, και επωάζεται για 1 ώρα με το δευτερογενές αντίσωμα υπό ανάδευση, το οποίο έχει αραιωθεί επίσης στο διάλυμα κάλυψης, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της επώασης πραγματοποιούνται 5 εκπλύσεις διάρκειας 5 λεπτών υπό ανάδευση με τη χρήση διαλύματος PBS-T το ανοσοαποτύπωμα αναπτύσσεται μετά τη επώαση του με το αντιδραστήριο ECL Plus (GE Healthcare) χρήση φωτογραφικού φιλμ το οποίο εμφανίζεται σε αυτόματο μηχάνημα Kodak X-OMAT.

3.2.15 Επεξεργασία των πυρηνικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων με Βενζονάση και RNάση

Υλικά

- Πυρηνικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα
- Βενζονάση 25 U/μl (Millipore, USA)
- RNάση 10 mg/mL
- 1M MgCl₂
- Κοκτέιλ Αναστολέων Πρωτεασών (Roche, Switzerland)

Όργανα

- Παγόλουτρο

Πορεία μεθόδου

Στο πυρηνικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα προστίθεται Βενζονάση 25 U ανά mg συνολικής πρωτεΐνης και RNάση ώστε η τελική της συγκέντρωση να είναι

0,2 mg/mL. Επίσης προστίθεται και $MgCl_2$ ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 2 mM και γίνεται επώαση για τουλάχιστον 2 ώρες σε παγόλουτρο. Για την επιβεβαίωση της πέψης του DNA και RNA από ένα μικρό μέρος του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος γίνεται απομόνωση DNA το οποίο φορτώνεται σε πηκτή αγαρόζης όπως περιγράφεται στην ενότητα.

3.2.15 Κατακρήμνιση βιοτινυλιωμένων πρωτεϊνών με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων στρεπταβιδίνης

Υλικά

- Παραμαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης (Dynabeads M280, Invitrogen, USA)
- Διάλυμα PBS
- Αλβουμίνη από αυγό όρνιθας 20 mg/mL (Chicken egg albumin, CEA)
- Διάλυμα HENG:
 - 10 mM HEPES – KOH pH 7,9
 - 1,5 mM $MgCl_2$
 - 0,25 mM EDTA
 - 20% glycerol
 - 1 mM PMSF ή αναστολείς πρωτεασών. Προστίθεται ακριβώς πριν από τη χρήση.
- 1M $MgCl_2$
- 10 mg/mL EtBr
- Διάλυμα εκπλύσεων HENG (HENG WASH):
 - Διάλυμα HENG
 - 300 mM KCl
 - 0,3% NP-40
- 1x Laemmli Buffer

Όργανα

- Μαγνήτης (Dyna MPC-1)
- Περιστρεφόμενη τροχό.
- Πλάκα ξηρής θερμότητας

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος εκμεταλλεύεται την υψηλή συγγένεια της βιοτίνης για τη στρεπταβιδίνη. Ουσιαστικά η βιοτινυλιωμένη πρωτεΐνη προσκολλάται στα παραμαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης και κατακρημνίζεται μαζί με τις πρωτεΐνες τις οποίες ενδεχομένως να αλληλεπιδρά.

Πορεία μεθόδου

Το πυρηνικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα αφήνεται στον πάγο να λιώσει και στη συνέχεια επεξεργάζεται με βενζονάση και RNάση όπως περιγράφεται στην ενότητα. Για την κατακρήμνιση βιοτινυλιωμένων πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται 40 μl παραμαγνητικών σφαιριδίων στρεπταβιδίνης ανά 1 mg πρωτεΐνης. Για το διαχωρισμό των σφαιριδίων από τα διαλύματα γίνεται χρήση μαγνήτη. Τα παραμαγνητικά σφαιρίδια εκπλένονται 3 φορές με 1 mL PBS και στη συνέχεια επωάζονται σε διάλυμα αλβουμίνης από αυγό όρνιθας συγκέντρωσης 200 μg/mL για 1 ώρα σε περιστρεφόμενο τροχό. Η συγκεκριμένη επώαση εξυπηρετεί στη μείωση της μη ειδικής πρόσδεσης των πρωτεϊνών στα σφαιρίδια (background binding). Ταυτόχρονα το πρωτεϊνικό πυρηνικό εκχύλισμα μετά την επεξεργασία του αραιώνεται 3 φορές με τη χρήση διαλύματος HENG. Στο αραιωμένο διάλυμα προστίθεται $MgCl_2$ ώστε η τελική του συγκέντρωση να παραμείνει 2 mM όπως και EtBr με τελική συγκέντρωση 50 μg/mL. Αφού απορριφθεί το διάλυμα αλβουμίνης προστίθεται το αραιωμένο διάλυμα του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος και το μίγμα τοποθετείται σε περιστρεφόμενη τροχό στους 4 °C για ολονύκτια επώαση.

Την επόμενη μέρα απομακρύνεται το υπερκείμενο διάλυμα και τα σφαιρίδια εκπλένονται 5 φορές (2 άμεσες πλύσεις και 3 πλύσεις των 10 λεπτών) με το διάλυμα εκπλύσεων HENG και 2 φορές με διάλυμα PBS. Μετά το πέρας των εκπλύσεων οι προσδεδεμένες πρωτεΐνες εκκλούνται από τα σφαιρίδια στρεπταβιδίνης με τη χρήση 1x Laemmli και θέρμανση τους στους 80 °C. Η ανάλυση των κατακρημνισμένων πρωτεϊνών γίνεται με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Στο πήκτωμα φορτώνονται το 8% του πυρηνικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, το κατακρημνισμένο υλικό και 8% του υπερκείμενου πυρηνικού εκχυλίσματος μετά την κατακρήμνιση.

3.2.17 Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών

Υλικά

- Παραμαγνητικά σφαιρίδια πρωτεΐνης A ή G (Dynabeads protein A, Dynabeads protein G, Invitrogen, USA)ig
- Πρωτογενή αντισώματα
- Φυσιολογική ανοσοσφαιρίνη IgG:
 - Κουνελιού 200 µg / 0,5 mL (normal rabbit IgG, Santa Cruz, sc-2027)
 - Ποντικού 200 µg / 0,5 mL (normal mouse IgG, Santa Cruz, sc-2025)
 - Αρουραίου 200 µg / 0,5 mL (normal rat IgG, Santa Cruz, sc-2026)
 - Κατσίκας 200 µg / 0,5 mL (normal goat IgG, Santa Cruz, sc-2028)
- Διάλυμα PBS
- Αλβουμίνη από αυγό όρνιθας 20 mg/mL (Chicken egg albumin, CEA)
- 100 mM κιτρικό νάτριο pH 5,0 (Sodium Citrate)
- 200 mM τριαιθανολαμίνη (TEA)
- 20 mM Dimethyl pimelimidate (DMP) διαλυμένα σε 200 mM TEA
- 50 mM Tris – HCl pH 7,5
- PBS – 0,01 % Tween 20
- Διάλυμα HENG:
 - 10 mM HEPES – KOH pH 9
 - 1,5 mM MgCl₂
 - 0,25 mM EDTA
 - 20% glycerol
 - 1 mM PMSF ή Αναστολείς Πρωτεασών Κοκτέιλ. Προστίθενται ακριβώς πριν από τη χρήση.
- 1M MgCl₂
- 10 mg/mL EtBr
- Διάλυμα εκπλύσεων HENG (HENG WASH):
 - Διάλυμα HENG
 - 300 mM KCl
 - 0,3% NP-40
- 1x Laemmli Buffer

Όργανα

- Μαγνήτης: Dynal MPC-1
- Περιστρεφόμενη τροχό.
- Πλάκα ξηρής θερμότητας

Αρχή μεθόδου

Για την ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται παραμαγνητικά σφαιρίδια στα οποία έχει συζευχθεί πρωτεΐνη G ή A. Η πρωτεΐνη G εκφράζεται στα βακτήρια στρεπτόκοκκου και έχει την ικανότητα να προσδένει ανοσοσφαιρίνες συγκεκριμένα στη Fab και Fc περιοχή (154). Αντίστοιχα και η πρωτεΐνη A που εκφράζεται σε βακτήρια στρεπτόκοκκου προσδένει τις ίδιες περιοχές (155). Η πρωτεΐνη A και G έχουν διαφορετικές συγγένειες πρόσδεσης του αντισώματος ανάλογα με τον οργανισμό από τον οποίο έχει προέλθει το αντίσωμα. Ο κατασκευαστής προμηθεύει αναλυτικές οδηγίες σχετικά με την συγγένεια της πρωτεΐνης A ή G ανάλογα με τον οργανισμό. Συνήθως για την περίπτωση μονοκλωνικού αντισώματος χρησιμοποιείται πρωτεΐνη G ενώ για πολυκλωνικό η A. Η ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών γίνεται με τη χρήση πρωτεΐνης A ή G όπου προσδένεται το προς χρήση αντίσωμα και κατακρημνίζεται μαζί με το αντίστοιχο αντιγόνο και κατά συνέπεια οι πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά το αντιγόνο. Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιείται κατάλληλη ανοσοσφαιρίνη IgG (από τον ίδιο οργανισμό με το αντιγόνο) η οποία επίσης προσδένεται.

Στην παρούσα διατριβή σε όλες τις πρωτεϊνικές ανοσοκατακρημνίσεις έγινε διασύζευξη (crosslink) του αντισώματος με το αντιγόνο με τη χρήση DMP. Το DMP (dimethyl pimelimidate) είναι ιμιδοεστέρας που μπορεί να αντιδράσει με πρωτοταγείς αμινομάδες (πχ ε-αμινομάδες της λυσίνης) και ουσιαστικά να ενώσει με ομοιοπολικό δεσμό πρωτεΐνες. Η σύνδεση αυτή γίνεται ώστε να μειωθεί το σήμα υπόβαθρου στην ανάλυση με Western των ανοσοκατακρημνισμένων πρωτεϊνών.

Πορεία μεθόδου

Για την ανοσοκατακρήμνιση χρησιμοποιούνται 100 μl σφαιριδίων πρωτεΐνης A ή G για 25 μl ανοσοσφαιρίνης IgG και 50 μl σφαιριδίων πρωτεΐνης A ή G για 8 μg αντισώματος ανά 500 μg πυρηνικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος. Το πυρηνικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα αφήνεται στον πάγο να

λιώσει και στη συνέχεια επεξεργάζεται με βενζονάση και RNάση όπως περιγράφεται στην ενότητα.

Τα πρωτεϊνικά σφαιρίδια εκπλένονται 3 φορές με PBS και 2 φορές με κιτρικό νάτριο 100 mM pH 5,0. Το κιτρικό νάτριο απομακρύνεται και τα σφαιρίδια αναδιασπείρονται σε διάλυμα HENG όπου προστίθενται η φυσιολογική ανοσοσφαιρίνη IgG και το αντίσωμα (σε ξεχωριστούς σωλήνες) και αφήνονται σε περιστρεφόμενο τροχό σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες (στάδιο πρόσδεσης). Στη συνέχεια απορρίπτεται το διάλυμα και γίνεται έκπλυση 2 φορές με κιτρικό νάτριο και τα σφαιρίδια αναδιασπείρονται σε διάλυμα τριεθανολαμίνης 200 mM pH 8,2. Γίνεται απόρριψη της τριεθανολαμίνης, προστίθεται διάλυμα 20 mM DMP (διαλυμένο σε 200 mM TEA) και λαμβάνει χώρα επώαση σε περιστρεφόμενο τροχό για 45 λεπτά (στάδιο διασύζευξης). Μετά το πέρας των 45 λεπτών το διάλυμα του DMP απορρίπτεται, προστίθεται στα σφαιρίδια 50 mM Tris pH 7,5 το οποίο και αφαιρείται αμέσως και στη συνέχεια γίνεται έκπλυση με 50 mM Tris pH 7,5 για 15 λεπτά (παύση της διασύζευξης). Τα σφαιρίδια εκπλένονται 3 φορές με διάλυμα PBS – 0,01% Tween 20. Σε αυτό το σημείο είναι δυνατό τα σφαιρίδια πρωτεΐνης A ή G με τα διασυζευγμένα αντισώματα να αποθηκευθούν στους 4 °C ως και μια εβδομάδα.

Το PBS – 0,01% Tween 20 των διασυζευγμένων σφαιριδίων με ανοσοσφαιρίνη IgG απορρίπτεται. Τα σφαιρίδια αναδιασπείρονται σε διάλυμα αλβουμίνης τελικής συγκέντρωσης 200 µg / mL και επωάζονται για 1 ώρα σε περιστρεφόμενο τροχό σε θερμοκρασία δωματίου. Τα σφαιρίδια με το διασυζευγμένο αντίσωμα για αυτό το χρονικό διάστημα κρατούνται στους 4 °C. Μετά το πέρας της επώασης το διάλυμα αλβουμίνης απορρίπτεται, στα σφαιρίδια με IgG προστίθεται το επεξεργασμένο πρωτεϊνικό εκχύλισμα το οποίο αραιώνεται 3 φορές με διάλυμα HENG και ακολουθεί επώαση σε περιστρεφόμενο τροχό για 1h . Το αραιωμένο διάλυμα θα πρέπει να περιέχει 2 mM MgCl₂, 50 µg/µl EtBr και αναστολείς πρωτεασών. Ταυτόχρονα στα σφαιρίδια με το αντίσωμα αφαιρείται το PBS – 0,01% Tween 20, προστίθεται διάλυμα αλβουμίνης 200 µg/µl και τα σφαιρίδια επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα σε περιστρεφόμενο τροχό. Μετά το τέλος της επώασης το αραιωμένο πρωτεϊνικό εκχύλισμα αφαιρείται από τα σφαιρίδια IgG και προστίθεται στα σφαιρίδια του αντισώματος, τα οποία και επωάζονται

ολονύκτια σε περιστρεφόμενο τροχό στους 4 °C. Τα σφαιρίδια IgG εκπλένονται 5 φορές για 5 λεπτά με το διάλυμα εκπλύσεων HENG (HENG WASH σε θερμοκρασία δωματίου, στη συνέχεια γίνονται δυο πλύσεις με PBS όπου και γίνεται μεταφορά των σφαιριδίων σε νέο σωλήνα ώστε να μειωθεί η μη ειδική πρόσδεση των πρωτεϊνών στα τοιχώματα του σωλήνα. Οι προσδεσμεμένες πρωτεΐνες εκλούνται από το αντιγόνο με τη χρήση διαλύματος 1x Laemmli και θέρμανση τους στους 80 °C. Το συγκεκριμένο δείγμα αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα του πειράματος. Ταυτόχρονα ετοιμάζεται δείγμα από ένα ποσοστό (8%) του αρχικού πυρηνικού εκχυλίσματος για να φορτωθεί σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (input).

Την επομένη μέρα το υπερκείμενο πυρηνικό εκχύλισμα διαχωρίζεται από τα σφαιρίδια αντισώματος και φυλάσσεται (supernatant) και τα σφαιρίδια εκπλένονται 5 φορές για 5 λεπτά στους 4 °C με διάλυμα HENG. Ακολουθούν δύο πλύσεις με PBS και τα σφαιρίδια μεταφέρονται σε νέο σωλήνα. Οι προσδεσμεμένες πρωτεΐνες εκλούνται από το αντιγόνο με τη χρήση διαλύματος 1x Laemmli και θέρμανση τους στους 80 °C. Ταυτόχρονα ετοιμάζεται ποσοστό (8%) από το υπερκείμενο. Συνολικά στο πηκτωμα πολυακρυλαμίδης, φορτώνεται 8% αρχικού δείγματος (input), δείγμα κατακρήμνισμένου υλικού από το αντιγόνο (pull down), δείγμα κατακρήμνισης IgG (IgG control), 8% υπερκείμενου δείγματος (supernatant).

3.2.18 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης με τη χρήση πακεταρισμένης στήλης Superose 6

Υλικά

- Στήλη χρωματογραφίας μοριακής διήθησης Superose 6 (GE Healthcare, USA)
- Διάλυμα χρωματογραφίας Superose 6 (Φιλτραρισμένο, απαερωμένο):
 - 20 mM HEPES pH 7,9
 - 0.5 mM EGTA
 - 1 mM MgCl₂
 - 200 mM KCl
 - 10% glycerol.

- Πρότυποι δείκτες χρωματογραφίας χρωματογραφίας (Gel Filtration Standard, Biorad, USA)
- Πυρηνικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα
- 1mL, 5mL σύριγγες
- Ενέσιμο ύδωρ
- Διάλυμα αιθανόλης 20% (v/v)

Όργανα

- Akta FPLC Purifier (GE Healthcare)

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στο διαχωρισμό των πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Όσο μικρότερο το μέγεθος της πρωτεΐνης τόσο περισσότερο εισέρχεται στους πόρους του υλικού με αποτέλεσμα να επιβραδύνεται η διήθηση του και να εκλούεται αργότερα σε σχέση με μια πρωτεΐνη μεγαλύτερου μοριακού βάρους. Πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους εκλούνται πολύ γρήγορα διότι δεν εισέρχονται στους πόρους του χρωματογραφικού υλικού διήθησης. Η χρωματογραφική στήλη πληρώνεται με πορώδες υλικό Superose το οποίο είναι διασυζευγμένο με σωματίδια αгарόζης. Το υλικό Superose έχει μεγάλη φυσική και χημική σταθερότητα και εύρος των εκλουόμενων πρωτεϊνών κυμαίνεται από 2 MDa έως 5 kDa.

Πορεία μεθόδου

Η στήλη χρωματογραφίας μοριακής διήθησης Superose 6% διατηρείται σε διάλυμα αιθανόλης 20% (v/v). Η στήλη συνδέεται στο σύστημα χρωματογραφίας Akta purifier από το οποίο με τη χρήση ειδικού λογισμικού ελέγχονται ο όγκος και η ταχύτητα ροής των διαλυμάτων που θα τη διαπεράσουν. Για την αφαίρεση της αιθανόλης η στήλη εκπλένεται με ενέσιμο ύδωρ για 2 όγκους στήλης (48 mL) σε ταχύτητα ροής 0,3 mL / min ή 0,5 mL / min. Στη συνέχεια για την εξισορρόπηση της στήλης σε διάλυμα χρωματογραφίας Superose 6 χρησιμοποιούνται 2 όγκοι στήλης. Για κάθε πρωτεϊνικό δείγμα που διατρέχεται από τη Superose 6 χρησιμοποιείται μέθοδος για τη ρύθμιση όλων των παραμέτρων ή οποία δημιουργείται με τη χρήση του ειδικού λογισμικού που συνοδεύει το Akta Purifier. Οι τιμές των παραμέτρων που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο είναι:

- Ταχύτητα ροής: 0.5 mL / min
- Όγκος εξισορρόπησης στήλης 24 mL
- Εισαγωγή δείγματος στη στήλη με τη χρήση 2.5 mL διαλύματος
- 24 mL ο όγκος του διαλύματος για την έκλυση των πρωτεϊνών
- Συλλογή κλασμάτων ανά 500 μ l για όγκο 24 mL
- Μέγιστη επιτρεπόμενη πίεση συστήματος 1,5 MPa.

Για τη βαθμόνηση της στήλης Superose 6, δηλαδή την αντιστοίχιση πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους σε κλάσμα έκλυσης (ή όγκου έκλυσης) γίνεται χρήση δεικτών πρωτεϊνών μοριακής διήθησης (Gel filtration standards, Biorad). Τα πυρηνικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα διαπερνώνται από τη στήλη με τη χρήση της ίδιας μεθόδου, τα συλλεγόμενα κλάσματα επεξεργάζονται όπως περιγράφεται στην ενότητα και στη συνέχεια αναλύονται με ανοσοαποτύπωση κατά Western.

3.2.19 Κατακρήμνιση πρωτεϊνών με τη χρήση τριχλωροξικού οξέος

Υλικά

- 100% (v/v) τριχλωροξικό οξύ (TCA)
- 100% (v/v) Ακετόνη
- 1x Laemmli

Όργανα

Ψυχόμενη φυγόκεντρος για σωλήνες 1,5mL. (Mikro 22R Hettich, Germany)

Αρχή μεθόδου

Η χρήση του TCA για την κατακρήμνιση πρωτεϊνών ρίχνει σημαντικά το pH του διαλύματος των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να αλλάζει η δομή των πρωτεϊνών και να δημιουργούνται υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις οι οποίες οδηγούν στο σχηματισμό συσσωματωμάτων (156), (157), (158).

Πορεία μεθόδου

Γίνεται προσθήκη TCA ώστε η τελική συγκέντρωση του οξέως στο πρωτεϊνικό διάλυμα να είναι 20% (v/v) και το διάλυμα επωάζεται στους 4 °C για 1 ώρα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 18.890 x g για 20 λεπτά στους 4 °C ώστε να γίνει κατακρήμνιση πρωτεϊνών και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Προστίθεται διάλυμα 1% TCA και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση στην ίδια

ταχύτητα για 15 λεπτά στους 4 °C. Μετά τη φυγοκέντρωση προστίθεται ακετόνη και γίνεται φυγοκέντρωση όπως ακριβώς και προηγουμένως και το ίζημα επαναιωρείται σε κατάλληλο όγκο 1x Laemmli οπότε και μπορεί να αναλυθεί με Western.

3.3 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

3.3.1 Πλασμιδιακές κατασκευές και βακτηριακά στελέχη

Οι πλασμιδιακές κατασκευές και οι φορείς κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή ήταν:

Πίνακας 3. Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή

Πλασμίδιο	Γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά	Χρήση	Προέλευση
GMT1L	Αμπικιλίνη	Φορέας έκφρασης της DNMT1 συζευγμένη με GFP	Δρ. Cardoso, Technische Universität Darmstadt
GMT	Αμπικιλίνη	Φορέας έκφρασης της ελλειπτικής μετάλλαξης GMT της DNMT1 συζευγμένη με GFP	Δρ. Cardoso, Technische Universität Darmstadt
GMTΔPBD	Αμπικιλίνη	Φορέας έκφρασης της ελλειπτικής μετάλλαξης GMTΔPBD της DNMT1 συζευγμένη με GFP	Δρ. Cardoso, Technische Universität Darmstadt
GMTΔTS	Αμπικιλίνη	Φορέας έκφρασης της ελλειπτικής μετάλλαξης GMTΔTS της DNMT1 συζευγμένη με GFP	Δρ. Cardoso, Technische Universität Darmstadt

MTNG.1	Αμπικικιλίνη	Φορέας έκφρασης της ελλειπτικής μετάλλαξης MTNG.1 της DNMT1 συζευγμένη με GFP	Δρ. Cardoso, Technische Universität Darmstadt
GMT1LF169S	Αμπικικιλίνη	Φορέας έκφρασης της εμετάλλαξης MTNG.1 της DNMT1 συζευγμένη με GFP	Δρ. Cardoso, Technische Universität Darmstadt
PBQ162E	Αμπικικιλίνη	Φορέας έκφρασης τμήματος PBD με σημειακή μετάλλαξη Q σε E	Geneart

Το στέλεχος του βακτηρίου *Escherichia coli* που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα διατριβή για την αντιγραφή πλασμιδίων ήταν:

- DH5a δεκτικά βακτηριακά κύτταρα (Subcloning efficiency DH5a competent cells, Invitrogen, USA).

3.3.2 Μετασχηματισμός βακτηρίων

Υλικά

- Δεκτικά κύτταρα DH5a (Subcloning efficiency DH5a competent cells, Invitrogen, USA)
- Πλασμιδιακό DNA
- LB θρεπτικό μέσο:
 - 10 g/l Τρυπτόνη (Tryptone)
 - 10 g/l NaCl
 - 10 g/l (Yeast Extract)
- Τριβλία LB-άγαρ με κατάλληλη συγκέντρωση αντιβιοτικού:
 - 100 µg/mL Αμπικικιλίνη
 - 50 µg/mL Καναμυκίνη
 - 50 µg/mL Ζεοκίνη

Όργανα

- Υδατόλουτρο

- Θερμαινόμενη περιστρεφόμενη πλατφόρμα
- Φυγόκεντρος σωλήνες 1,5 mL τύπου Eppendorf
- Επωαστικός κλίβανος ρυθμισμένος στους 37 °C.

Αρχή μεθόδου

Κατά το μετασχηματισμό (transformation) γίνεται εισαγωγή εξωγενούς γενετικού υλικού (πλασμιδιακού DNA) σε βακτήρια. Η επιλογή των κυττάρων που έχουν μετασχηματιστεί γίνεται με βάση την ανθεκτικότητα τους σε κάποιο αντιβιοτικό, ιδιότητα που προσδίδεται από το πλασμίδιο που έχουν δεχθεί. Η διαδικασία του μετασχηματισμού βασίζεται στην επίδραση θερμικού σοκ, κατά την οποία ανοίγουν οι πόροι στο κυτταρικό τοίχωμα των «δεκτικών» (competent) βακτηρίων και γίνεται είσοδος του εξωγενούς DNA (159)

Πορεία μεθόδου

50 µl δεκτικών βακτηριακών κυττάρων αποψύχονται σταδιακά στον πάγο. Μικρή ποσότητα πλασμιδιακού DNA (50 – 100 ng) αναμιγνύεται με τα βακτηριακά κύτταρα και ακολουθεί επώαση των κυττάρων στον πάγο, για 20 λεπτά. Στη συνέχεια τα κύτταρα υποβάλλονται σε θερμικό σοκ (heat shock), μέσω επώασης τους σε υδατόλουτρο 42 °C, για 20 δευτερόλεπτα ενώ αμέσως μετά μεταφέρονται στον πάγο όπου και παραμένουν για 2 ακόμα λεπτά. Ακολούθως στα κύτταρα προστίθεται 1 mL θρεπτικού μέσου LB το οποίο δεν εμπεριέχει αντιβιοτικό και γίνεται επώαση στους 37 βαθμούς υπό συνεχή ανάδευση για 1 ώρα. Μετά το πέρας της επώασης γίνεται φυγοκέντριση στις 3000 rpm για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου και απόρριψη μέρους του LB. Τα κύτταρα αναδιασπείρονται στο εναπομείναν θρεπτικό μέσο και το κυτταρικό αιώρημα επιστρώνεται σε τριβλία με στερεό θρεπτικό μέσο, που φέρει αντιβιοτικό επιλογής. Τα τριβλία τοποθετούνται ανεστραμμένα σε επωαστικό κλίβανο στους 37 °C για 16 ώρες ώστε να σχηματισθούν αποικίες.

Ο έλεγχος της πρόσληψης του πλασμιδιακού DNA γίνεται με καλλιέργεια μεμονωμένων αποικιών σε θρεπτικό μέσο, απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα, πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες και έλεγχος του προτύπου των προϊόντων των πέψεων.

3.3.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Υλικά

- Διάλυμα I (αποστειρωμένο):
 - 50 mM Γλυκόζη
 - 25 mM Tris – HCl pH 8
 - 10 mM EDTE pH 8
- Διάλυμα II (παρασκευάζεται αμέσως πριν τη χρήση του):
 - 1M NaOH
 - 1% (w/v) SDS
- Διάλυμα III (διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου):
 - 3M οξικό κάλιο
 - 11.5% (v/v) οξικό οξύ
- Φαινόλη / Χλωροφόρμιο / Ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1, v/v)
- Ισοπροπανόλη 100% (v/v)
- Αιθανόλη 70% (v/v)
- Διάλυμα TE:
 - 10 mM Tris – HCl pH 7.5
 - 1mM EDTA pH 8
- RNάση 10mg/mL

Όργανα

- Θερμαινόμενη περιστρεφόμενη πλατφόρμα
- Φυγόκεντρος για σωλήνες 1,5 mL τύπου Eppendorf
- Σωλήνες καλλιέργειας βακτηρίων 13 mL (αποστειρωμένους)

Αρχή μεθόδου

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσεως, η οποία στηρίζεται στην επίδραση του ιοντικού απορρυπαντικού SDS σε αλκαλικό περιβάλλον (160). Οι συνθήκες προκαλούν ρήξη του κυτταρικού τοιχώματος και αποδιάταξη των πρωτεϊνών και του χρωμοσωμικού DNA. Παρόλο που το αλκαλικό περιβάλλον διαταράσσει το ζευγάρωμα των βάσεων, οι αλυσίδες του πλασμιδιακού DNA δεν μπορούν να διαχωριστούν εξαιτίας της υπερελίκωσης του πλασμιδίου και επανέρχονται στη φυσιολογική τους μορφή, όταν το διάλυμα λύσης εξουδετερωθεί.

Πορεία μεθόδου

Υγρή καλλιέργεια βακτηρίων *E.coli* όγκου 3mL, εμβολιάζεται με τυχαία αποικία κυττάρων μετασχηματισμένων με το επιθυμητό πλασμίδιο και αναπτύσσεται για 16 ώρες στους 37 υπό ανάδευση. 1,5 mL από καλλιέργεια μεταφέρεται σε σωλήνα τύπου Eppendorf και φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο απορρίπτεται ενώ το ίζημα διαλυτοποιείται σε 100 μ L του διαλύματος I. Η λύση των κυττάρων πραγματοποιείται με προσθήκη 200 μ L διαλύματος II και ήπια ανάδευση για 1 λεπτό (αποφεύγεται η έντονη ανάδευση διότι μπορεί να προκαλέσει διάσπαση του DNA). Το αλκαλικό διάλυμα λύσης εξουδετερώνεται με προσθήκη 150 μ L διαλύματος III και ανάδευση. Ακολουθεί φυγοκέντριση στις 13.000 rpm, για 5 λεπτά, στους 4 $^{\circ}$ C και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα 1,5 mL. Σε αυτό γίνεται προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης / χλωροφόρμιου το μίγμα αναμιγνύεται και φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα 1,5 mL, προστίθεται ισοπροπανόλη ίσου όγκου και ακολουθεί επώαση του μίγματος διάρκειας 30 λεπτών στους 4 $^{\circ}$ C. Τα νουκλειικά οξέα καθιζάνουν με φυγοκέντριση του μίγματος στις 13.000 rpm, για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημα που προκύπτει από τη φυγοκέντριση ξεπλένεται με 70% (v/v) αιθανόλη και αφήνεται να στεγνώσει στον αέρα. Τα νουκλειικά οξέα αναδιασπείρονται με χρήση διαλύματος TE pH 7,5. Η πέψη του RNA πραγματοποιείται μέσω επώασης του διαλύματος των νουκλειικών οξέων με ένζυμο ριβονουκλεάσης A. (RNάση). Στο διάλυμα προστίθεται RNάση ώστε η τελική της συγκέντρωση να είναι 100 μ g/mL και επωάζεται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το απομονωμένο DNA διατηρείται έως ότου χρησιμοποιηθεί στους – 20 $^{\circ}$ C.

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγαλύτερη κλίμακα βασίστηκε στην ίδια αρχή και πραγματοποιήθηκε με το εμπορικά διαθέσιμο kit Nucleobond Xtra Midi Prep (Macherey Nagel).

3.3.4 Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Υλικά

- DNA
- Περιοριστική ενδονουκλεάση
- Διάλυμα λειτουργίας περιοριστική ενδονουκλεάσης

- Ενέσιμο ύδωρ
- Φαινόλη / χλωροφόρμιο / ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1, v/v)
- 100% (v/v) αιθανόλη
- 70% (v/v) αιθανόλη

Όργανα

- Υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37 °C
- Φυγόκεντρος για σωλήνες 1,5 mL τύπου Eppendorf

Αρχή μεθόδου

Η πέψη DNA έγινε με χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών, δηλαδή ενζύμων που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες και κόβουν τη διπλή έλικα του DNA δημιουργώντας μονόκλωνα προεξέχοντα ή δίκλωνα άκρα.

Πορεία μεθόδου

Για την πέψη 1 μg DNA χρησιμοποιήθηκαν 3 units ενζύμου, το διάλυμα λειτουργίας της περιοριστικής ενδονουκλεάσης και ο όγκος της αντίδρασης ρυθμίζεται κατάλληλα με τη χρήση ενέσιμου νερού. Η πέψη λαμβάνει χώρα σε υδατόλουτρο στους 37 °C για 2 ώρες. Μέρος της αντίδρασης μπορεί να αναλυθεί με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης ώστε να διαπιστωθεί η πέψη του DNA. Στη συνέχεια ακολουθεί καθαρισμός του δείγματος με φαινόλη / χλωροφόρμιο (προσθήκη ίσου όγκου και φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm) απομάκρυνση της υδατικής φάσης και προσθήκη διπλάσιου όγκου 100% (v/v) αιθανόλης. Το μίγμα επωάζεται για 1 ώρα σε θερμοκρασία – 20 °C και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm για 15 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται, το ίζημα εκπλένεται με 70% (v/v) αιθανόλης, φυγοκεντρείται πάλι στις 13.000 rpm και αφήνεται να στεγνώσει. Το DNA επαναιωρείται με χρήση διαλύματος TE pH 7,5 και είναι έτοιμο για τα ακόλουθα βήματα τα οποία ενδεχομένως να περιλαμβάνουν μια ακόμη πέψη ή αποφωσφορυλίωση των άκρων με αλκαλική φωσφατάση.

3.3.5 Κατεργασία DNA με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση.

Υλικά

- DNA
- Εντερική αλκαλική φωσφατάση (Calf intestinal phosphatase, CIAP)
- Διάλυμα λειτουργίας αλκαλικής φωσφατάσης

- Ενέσιμο ύδωρ

Όργανα

- Υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37 °C
- Θερμαινόμενο μπλοκ ρυθμισμένο στους 65 °C

Αρχή μεθόδου

Η αλκαλική φωσφατάση αποφωσφορυλιώνει τα 5' άκρα μορίων DNA, με αποτέλεσμα να εμποδίζει την επανένωση των άκρων που προέκυψαν από πέψη με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση.

Πορεία μεθόδου

Στα πειράματα της παρούσας διατριβής έγινε χρήση εντερικής φωσφατάσης μόσχου (Calf intestinal phosphatase, CIAP) πριν τη πραγματοποίηση αντιδράσεων λιγάσης, όταν τα δύο άκρα του πλασμιδίου ήταν συμβατά μεταξύ τους. Στην περίπτωση αυτή, ανά μg πλασμιδίου προστίθενται κατάλληλος όγκος διαλύματος λειτουργίας αλκαλικής φωσφατάσης, 2 units ενζύμου CIAP και ο όγκος της αντίδρασης ρυθμίζεται στα 50 μl με προσθήκη ενέσιμου ύδατος. Η αντίδραση πραγματοποιείται με επώαση του δείγματος στους 37 °C για 1 ώρα και στη συνέχεια το ένζυμο απενεργοποιείται με θέρμανση στους 65 °C για 20 λεπτά. Το DNA μετά την αντίδραση αναλύεται σε πηκτή αγαρόζης και απομονώνεται από αυτή με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμου πακέτου αντιδραστηρίων (DNA extraction kit, Invitrogen, USA).

3.3.6 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτώματα αγαρόζης

Υλικά

- Διάλυμα TAE (50x), pH 8:
 - 2 M Tris – Οξικό οξύ pH 8
 - 50 mM EDTA pH 8
- Διάλυμα φόρτωσης δείγματος (5x):
 - 25% (v/v) γλυκερόλη
 - 5x διάλυμα TAE
 - 0,25% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης
 - 0,25% (w/v) κυανό της ξυλένης.

Όργανα

- Φούρνος μικροκυμάτων
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Fischer Scientific)
- Biorad PowerPac Basic supply (Biorad)
- Σύστημα απεικόνισης του πηκτώματος με λαμπτήρα υπεριώδους ακτινοβολίας.(UVP Gel Doc-it Imaging System, USA)

Αρχή μεθόδου

Ο διαχωρισμός μορίων DNA διαφορετικού μεγέθους γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η επιλογή της συγκέντρωσης της αγαρόζης εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων DNA που πρέπει να διαχωριστούν, καθώς όσο μικρότερο είναι το μέγεθος των μορίων DNA, τόσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της αγαρόζης. Το πήκτωμα περιέχει επίσης βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο παρεμβάλλεται μεταξύ της διπλής έλικας και επιτρέπει την ανίχνευση των μορίων DNA, με λαμπτήρα υπεριώδους ακτινοβολίας. Τα αρνητικά φορτισμένα μόρια DNA κινούνται προς το θετικό πόλο έπειτα από την εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης στα άκρα του πηκτώματος (161).

Πορεία μεθόδου

Αρχικά παράγεται το πήκτωμα αγαρόζης κατάλληλης συγκέντρωσης ανάλογα με το μέγεθος του DNA. Η αγαρόζη αναμιγνύεται με διάλυμα 1x TAE και θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων έως την πλήρη τήξη της αγαρόζης και προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0.5 $\mu\text{g/mL}$. Το πήκτωμα μεταφέρεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου και τοποθετείται χτένα για τη δημιουργία θέσεων φόρτωσης των δειγμάτων και αφήνεται μέχρι την πλήρη πήξη του. Στη συνέχεια η χτένα αφαιρείται και το πήκτωμα αγαρόζης καλύπτεται πλήρως με διάλυμα 1x TAE. Στα δείγματα του DNA προστίθεται διάλυμα φόρτωσης και τοποθετούνται στις ειδικές θέσεις πηκτώματος. Το διάλυμα φόρτωσης συμβάλλει στην τοποθέτηση των δειγμάτων καθώς και στον έλεγχο της εξέλιξης της ηλεκτροφόρησης. Εφαρμόζεται τάση 100 V και μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα παρατηρείται με τη χρήση της συσκευής απεικόνισης με λαμπτήρα υπεριώδους ακτινοβολίας.

3.3.7 Αντίδραση λιγάσης

Υλικά

- 10x ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης T4.
- T4 DNA λιγάση
- Ενέσιμο ύδωρ

Όργανα

- Υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 16 °C.

Αρχή μεθόδου

Η λιγάση T4 καταλύει το σχηματισμό φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ των 3' και 5' άκρων νουκλεϊκών οξέων. Απαραίτητη προϋπόθεση για να συνδεθεί ο φορέας κλωνοποίησης με το ένθεμα είναι να διαθέτουν κοινά μονόκλωνα προεξέχοντα ή δίκλωνα άκρα, τα οποία προκύπτουν από τη πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. (162).

Πορεία μεθόδου

Η αντίδραση σύνδεσης γίνεται με ανάμιξη 100 ng φορέα με τη αλληλουχία εισδοχής σε ανάλογια 1:3. Στην αντίδραση επίσης προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης, λιγάση και συμπληρώνεται ενέσιμο ύδωρ σε τελικό όγκο 10 μl. Η αντίδραση επωάζεται σε υδατόλουτρο στους 16 °C για 16 ώρες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ *IN VIVO* ΒΙΟΤΙΝΥΛΙΩΣΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ

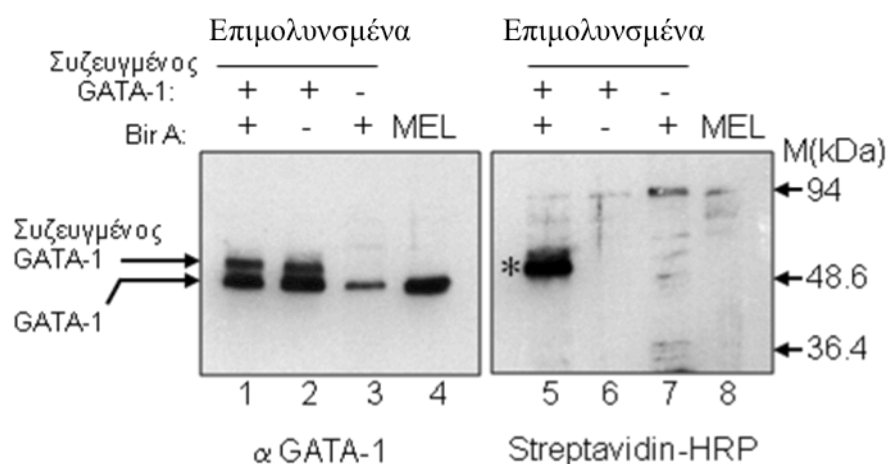
Ο πρώτος εκ των στόχων της παρούσας διατριβής ήταν η βελτιστοποίηση της μεθόδου της *in vivo* βιοτινυλίωσης με σκοπό την εύρεση και ταυτοποίηση νέων αγνώστων πρωτεϊνικών συμπλόκων που σχηματίζει ο μεταγραφικός παράγοντας GATA-1. Η βελτιστοποίηση της μεθόδου όπως θα περιγραφεί στη συνέχεια έγινε σε δυο επίπεδα α) στη μείωση του σήματος υποβάθρου (background) που προέρχεται από τις ενδογενείς βιοτινυλιωμένες πρωτεΐνες (καρβοξυλάσες) με χρήση μη ιονικών απορρυπαντικών και β) στη εφαρμογή διαφορετικών μεθόδων απομόνωσης πυρηνικών εκχυλισμάτων με σκοπό αποδοτικότερη εκχύλιση της GATA-1 πρωτεΐνης και κατά συνέπεια των πρωτεϊνικών συμπλόκων της.

4.1.1 Επιβεβαίωση της έκφρασης του βιοτινυλιωμένου GATA-1 σε bio-GATA-1 MEL κύτταρα.

Κύτταρα C88, BirA, bioGATA-1 MEL καλλιεργήθηκαν όπως περιγράφηκε στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι και στη συνέχεια διαφοροποιήθηκαν με τη χρήση 2% DMSO. Τα διαφοροποιημένα κύτταρα συλλέχθηκαν, από αυτά παράχθηκαν πυρηνικά εκχυλίσματα με τη χρήση υποτονικού διαλύματος για την απομόνωση των πυρήνων και διάλυμα υψηλής αλατότητας, για την εκχύλιση των πυρηνικών πρωτεϊνών (163), (137). Η ποσότητα της πρωτεΐνης των πυρηνικών εκχυλισμάτων ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση της μεθόδου Bradford. Πυρηνικά εκχυλίσματα από κύτταρα bioGATA-1 MEL, bioGATA-1 χωρίς βακτηριακή λιγάση BirA, BirA MEL και C88 MEL αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western για την παρουσία GATA-1 και στρεπταβιδίνης.

Με τη χρήση αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης GATA-1 στα bio-GATA-1MEL (1+5) εκχυλίσματα ανιχνεύεται η ενδογενής και η σημασμένη πρωτεΐνη (Εικόνα 7). Για να επιβεβαιωθεί ότι η σημασμένη πρωτεΐνη GATA-1 είναι και βιοτινυλιωμένη από τη BirA η οποία συνεκφράζεται στα κύτταρα χρησιμοποιήθηκε στρεπταβιδίνη – HRP οπότε και ανιχνεύθηκε η

βιοτινυλιωμένη GATA-1 (Εικόνα 7, ζώνη με αστερίσκο). Τα εκχυλίσματα bioGATA-1 χωρίς BirA , BirA και C88 MEL χρησιμοποιούνται ως εσωτερικοί μάρτυρες ώστε να επαληθευθεί η βιοτινυλίωση της GATA-1. Συνεπώς η κυτταρική σειρά εκφράζει βιοτινυλιωμένη GATA-1.

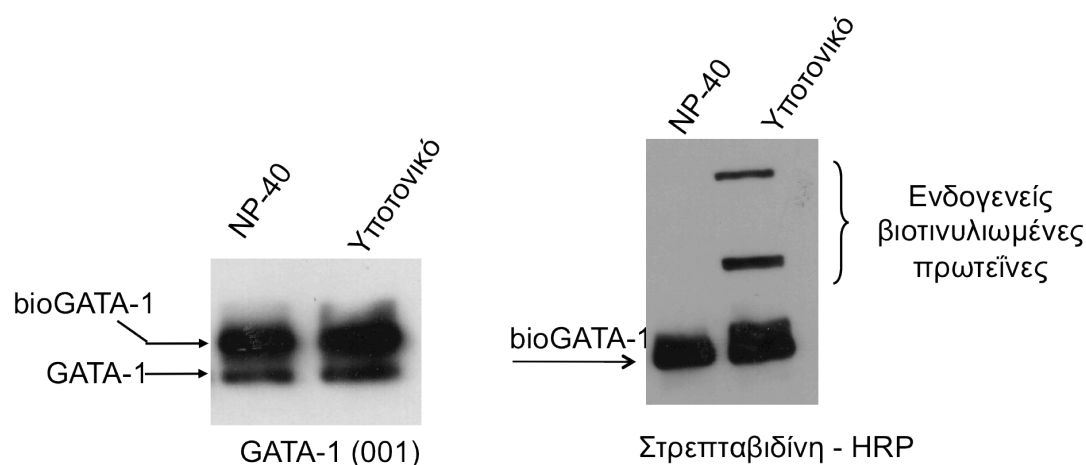


Εικόνα 7. Ανίχνευση της έκφρασης βιοτινυλιωμένης GATA-1 στα κύτταρα bioGATA-1 MEL. Πυρηνικά εκχυλίσματα διαμολυσμένων κυττάρων (1+5) bioGATA-1 MEL, (2+6) bioGATA-1 χωρίς BirA, (3+7) BirA MEL, (4+8) C88 MEL αναλύθηκαν κατά Western και η ανίχνευση των πρωτεϊνών έγινε με αντίσωμα GATA-1 (1, N6) και στρεπταβιδίνη – HRP.

4.1.2 Μείωση σήματος υποβάθρου (background) με τη χρήση διαλύματος NP-40.

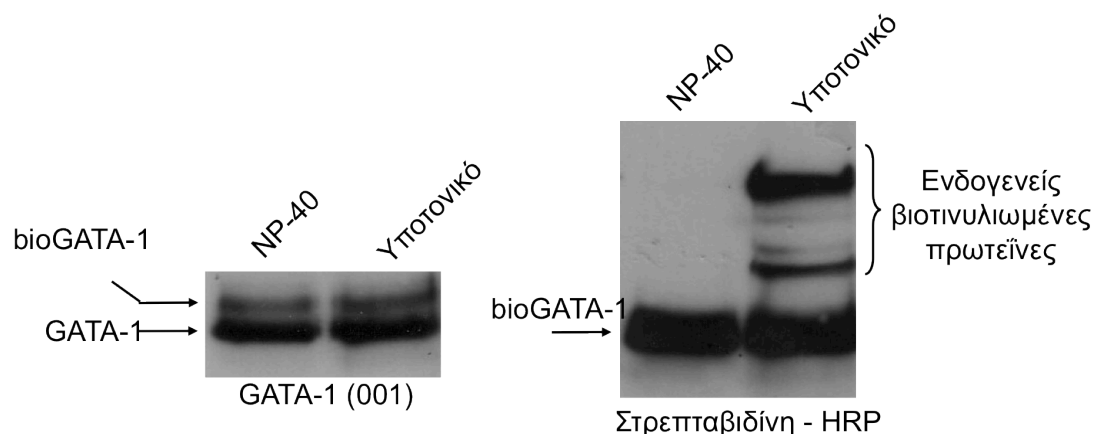
Όπως έχει ήδη προαναφερθεί η *in vivo* βιοτινυλίωση βασίζεται στη δέσμευση της σημασμένης βιοτινυλιωμένης πρωτεΐνης από σφαιρίδια που φέρουν στρεπταβιδίνη και την κατακρήμνισή της. Σε αυτή τη διαδικασία δεσμεύονται και οι ενδογενείς κυτταροπλασματικές βιοτινυλιωμένες πρωτεΐνες (κυρίως καρβοξυλάσες) (164), προφανώς λόγω μόλυνσης των πυρηνικών εκχυλισμάτων με κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες. Ο συνηθέστερος τρόπος απομόνωσης πυρηνικών εκχυλισμάτων προβλέπει τη χρήση υποτονικού διαλύματος για τη διόγκωση των κυττάρων σε συνδυασμό με ομογενοποιητή τύπου Dounce για τη διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης και στη συνέχεια διάλυμα υψηλής αλατότητας για την εκχύλιση των πυρηνικών πρωτεϊνών (high salt nuclear extraction). Υποθέσαμε ότι η μεθοδολογία αυτή δύναται να έχει ως αποτέλεσμα τη μόλυνση των πυρηνικών εκχυλισμάτων με

κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, πιθανώς λόγω προσκόλλησης του ενδοπλασματικού δικτύου και των μιτοχονδρίων στην πυρηνική μεμβράνη κατά την απομόνωση των πυρήνων. Συνεπώς, επιχειρήσαμε να εφαρμόσουμε εναλλακτικές μεθοδολογίες απομόνωσης πυρήνων με στόχο την ελάττωση της κυτταροπλασματικής μόλυνσης και της μείωσης της πρόσδεσης υπόβαθρου ενδογενών βιοτινυλιωμένων πρωτεϊνών στα σφαιρίδια στρεπταβιδίνης.



Εικόνα 8. Μείωση των ενδογενών βιοτινυλιωμένων πρωτεϊνών με χρήση διαλύματος λύσης NP-40 σε πυρηνικά εκχυλίσματα διαφοροποιημένων κυττάρων *bioGATA-1 MEL*. Πυρηνικά εκχυλίσματα διαφοροποιημένων κυττάρων *bio-GATA-1 MEL* που παράχθηκαν είτε με τη χρήση διαλύματος NP-40 / υψηλής αλατότητας είτε με υποτονικό / υψηλής αλατότητας αναλύθηκαν με *Western* χρησιμοποιώντας αντίσωμα για *GATA-1 (001)* και στρεπταβιδίνης – *HRP*.

Αρχικά, απομονώθηκαν πρωτεϊνικά πυρηνικά εκχυλίσματα με τη μέθοδο υψηλής αλατότητας από διαφοροποιημένα κύτταρα *bio-GATA-1 MEL*, και τα οποία αναλύθηκαν με *Western* χρησιμοποιώντας αντίσωμα για την πρωτεΐνη *GATA-1* και στρεπταβιδίνη – *HRP* (Εικόνα 8). Διαπιστώνεται ότι με τη χρήση υποτονικού διαλύματος οι ενδογενείς κυτταροπλασματικές βιοτινυλιωμένες πρωτεΐνες ανιχνεύονται στο πυρηνικό εκχύλισμα (Εικόνα 8, δεξιά).

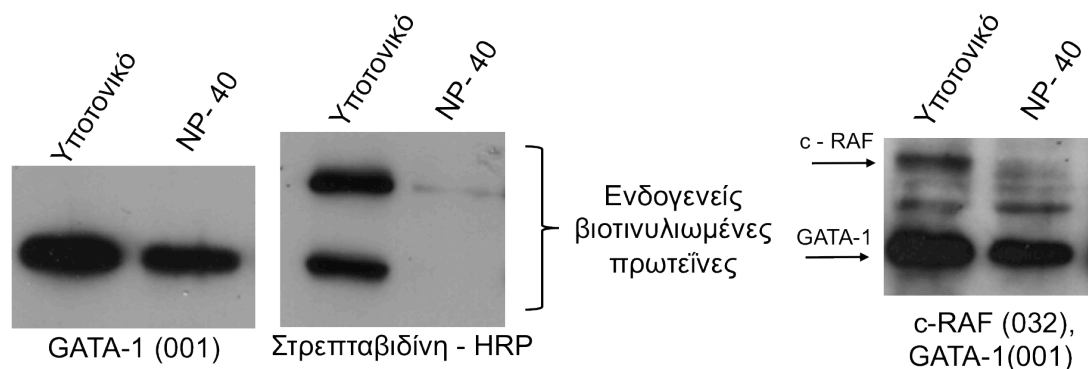


Εικόνα 9. Μείωση των ενδογενών βιοτινυλιωμένων πρωτεϊνών με χρήση διαλύματος λύσης NP-40 σε πυρηνικά εκχυλίσματα μη διαφοροποιημένων κυττάρων bioGATA-1 MEL. Πυρηνικά εκχυλίσματα μη διαφοροποιημένων κυττάρων bio-GATA-1 MEL που παράχθηκαν είτε με τη χρήση διαλύματος NP-40 / υψηλής αλατότητας είτε με υποτονικό / υψηλής αλατότητας αναλύθηκαν με Western χρησιμοποιώντας αντίσωμα για GATA-1 (001) και στρεπταβιδίνη – HRP.

Στην προσπάθεια ελάττωσης του σήματος υποβάθρου και κατά συνέπεια της ποσότητας αυτών των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε διάλυμα λύσης των κυττάρων που περιείχε Nonidet-40 (NP-40). Το NP-40 ανήκει στην κατηγορία των μη ιονικών απορρυπαντικών, τα συγκεκριμένα απορρυπαντικά χαρακτηρίζονται από αφόρτιστες υδρόφιλες οργανικές ομάδες. Το συγκεκριμένο διάλυμα επιτρέπει τη λύση των κυττάρων και την απομόνωση πυρήνων εξαιτίας του απορρυπαντικού που περιέχει χωρίς τη χρήση μηχανικού στρες (ομογενοποιητή Dounce). Η χρήση του NP-40 εξαιτίας του ουδέτερου φορτίου δεν επηρεάζει τη δομή των πρωτεϊνών. Σε πυρηνικά εκχυλίσματα που ετοιμάστηκαν με τη συγκεκριμένη μέθοδο και αναλύθηκαν για την παρουσία βιοτινυλιωμένων πρωτεϊνών παρατηρήθηκε ότι η ανίχνευση τους μειώθηκε σε μεγάλο βαθμό (Εικόνα 8).

Για να επαληθευθεί ότι η συγκεκριμένη μείωση των ενδογενών βιοτινυλιωμένων πρωτεϊνών δεν παρατηρείται μόνο σε διαφοροποιημένα bio-GATA-1 MEL κύτταρα, έγινε παραγωγή πυρηνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα bio-GATA-1 τα οποία δεν έχουν διαφοροποιηθεί με DMSO. Στη συνέχεια με ανίχνευση Western και στρεπταβιδίνης – HRP έγινε ανίχνευση για την παρουσία βιοτινυλιωμένων πρωτεϊνών (Εικόνα 9). Όπως και με τα

διαφοροποιημένα bio-GATA-1 MEL κύτταρα, παρατηρήθηκε ότι η χρήση του διαλύματος NP-40 οδηγεί σε σημαντική μείωση των ενδογενών βιοτινυλιωμένων πρωτεϊνών.



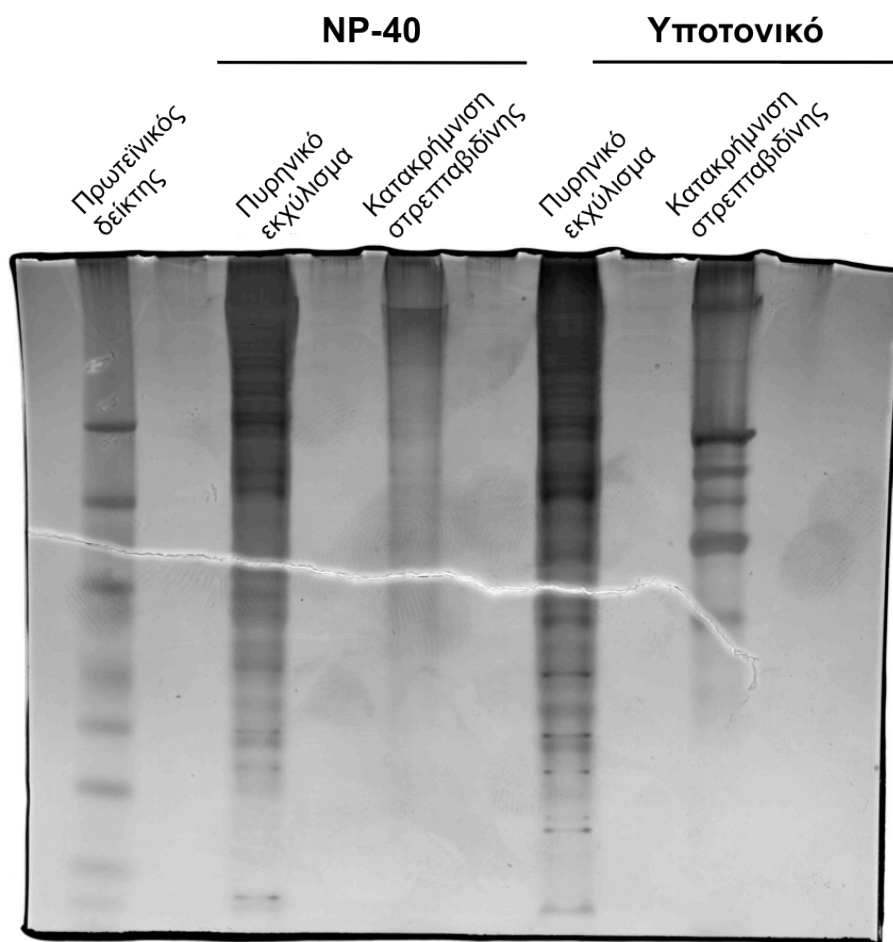
Εικόνα 10. Μείωση της κυτταροπλασματικής μόλυνσης με χρήση διαλύματος λύσης NP-40 σε πυρηνικά εκχυλίσματα διαφοροποιημένων κυττάρων. Πυρηνικά εκχυλίσματα διαφοροποιημένων κυττάρων BirA MEL που παράχθηκαν είτε με τη χρήση διαλύματος NP-40 / υψηλής αλατότητας είτε με υποτονικό / υψηλής αλατότητας αναλύθηκαν με Western χρησιμοποιώντας αντίσωμα για GATA-1 (001), στρεπταβιδίνης – HRP και c-RAF με GATA-1 ταυτόχρονα. BirA MEL.

Το ίδιο ακριβώς πείραμα με τα παραπάνω έγινε και σε πυρηνικά εκχυλίσματα διαφοροποιημένων κυττάρων BirA που εκφράζουν μόνο ενδογενείς βιοτινυλιωμένες πρωτεΐνες και ενδογενή GATA-1 (Εικόνα 10). Ταυτόχρονα στα ίδια πυρηνικά εκχυλίσματα έγινε ανίχνευση για την παρουσία της πρωτεΐνης c-Raf, η οποία αποτελεί μάρτυρα ένδειξης της μόλυνσης των πυρηνικών εκχυλισμάτων από κυτταροπλασματικό υλικό. Και σε αυτή την περίπτωση, παρατηρείται ότι η χρήση διαλύματος λύσης NP – 40 οδηγεί στη μείωση των ενδογενών βιοτινυλιωμένων πρωτεϊνών, κυρίως καρβοξυλασών, που ανιχνεύονται σε σχέση με τη χρήση υποτονικού διαλύματος. Οι εξαρτώμενες από τη βιοτίνη καρβοξυλάσες είναι συνολικά 4 (165), οι τρεις από τις οποίες βρίσκονται στα μιτοχόνδρια και μια στο κυτταρόπλασμα. Η παρουσία τους στα πυρηνικά εκχυλίσματα υποδηλώνει ότι υπάρχει γενικότερη κυτταροπλασματική μόλυνση. Παρατηρούμε όμως ότι με τη χρήση του διαλύματος NP – 40, πέρα από τη μείωση των βιοτινυλιωμένων πρωτεϊνών μειώνεται, και η ποσότητα της πρωτεΐνης c-Raf (Εικόνα 10) κατά

συνέπεια και το συνολικό ποσό κυτταροπλασματικού υλικού που μολύνει τα πυρηνικά εκχυλίσματα.

Προκειμένου να εξακριβωθεί αν η μείωση που παρατηρείται στο επίπεδο του σήματος υποβάθρου με τη χρήση διαλύματος με NP-40 ισχύει και στο επίπεδο της φασματομετρίας μάζας που πραγματοποιείται μετά από κατακρήμνιση στρεπταβιδίνης, τα πυρηνικά εκχυλίσματα (υποτονικό και NP-40) υποβλήθηκαν σε κατακρήμνιση στρεπταβιδίνης και το κατακρημνισμένο υλικό διαχωρίστηκε σε προπαρασκευασμένο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης γραμμικής συγκέντρωσης 4 -12 % (Εικόνα 11). Για τη χρώση του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιήθηκε νιτρικός άργυρος εξαιτίας της ευαισθησίας που προσφέρει. Παρατηρείται ότι η μη ειδική πρωτεϊνική πρόσδεση είναι σημαντικά μειωμένη στα εκχυλίσματα με NP – 40.

Το κατακρημνισμένο υλικό της Εικόνας 11, τόσο με τη μέθοδο NP – 40 όσο και με το υποτονικό διάλυμα, υποβλήθηκε σε φασματομετρία μάζας. Να σημειωθεί ότι σε φασματομετρία μάζας υποβλήθηκαν ολόκληροι οι διάδρομοι με το κατακρημνισμένο υλικό και όχι συγκεκριμένες ζώνες. Από τα αποτελέσματα (Πίνακας 4) διαπιστώνεται ότι στα πυρηνικά εκχυλίσματα που έχει χρησιμοποιηθεί διάλυμα λύσης NP – 40 για την παρασκευή τους ο αριθμός των πεπτιδίων που ταυτοποιούνται (ολικά ή μοναδικά) αλλά και το ποσοστό πρωτεϊνικής κάλυψης είναι σημαντικά μειωμένα σε σχέση με το υποτονικό διάλυμα. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι υπάρχει συνολικά μικρότερο υπόβαθρο (ειδικό ή μη ειδικό) το οποίο δύναται να προσδεθεί στα σφαιρίδια στρεπταβιδίνης κατά την εκτέλεση του πειράματος κατακρήμνισης δημιουργώντας αποτελέσματα φασματομετρίας μάζας υψηλής βεβαιότητας.



Εικόνα 11. Μείωση των μη ειδικά προσδεδεμένων πρωτεϊνών με χρήση διαλύματος λύσης NP-40 σε κατακρήμνιση στρεπταβιδίνης πυρηνικών εκχυλισμάτων διαφοροποιημένων κυττάρων *BirA MEL*. Πυρηνικά εκχυλίσματα διαφοροποιημένων κυττάρων *BirA MEL* που παράχθηκαν είτε με τη χρήση διαλύματος NP-40 / υψηλής αλατότητας είτε με υποτονικό / υψηλής αλατότητας υποβλήθηκαν σε κατακρήμνιση με στρεπταβιδίνη και στη συνέχεια αναλύθηκαν σε προπαρασκευασμένο πήκτωμα ακρυλαμίδης 4-12% . Η χρώση του πηκτώματος έγινε με τη χρήση νιτρικού αργύρου και για την κατακρήμνιση στρεπταβιδίνης χρησιμοποιήθηκαν 15 mg πυρηνικού εκχυλίσματος.

Πίνακας 4. Η χρήση του διαλύματος λύσης NP-40 οδηγεί στην ταυτοποίηση λιγότερου βιοτινυλιωμένου υποβάθρου κατά τη φασματομετρία μάζας. Αριθμός συνολικών, μοναδικών πεπτιδίων αλλά και πρωτεϊνικής κάλυψης των καρβοξυλασών που προέκυψε με φασματομετρία μάζας από κατακρήμνισματα στρεπταβιδίνης 15 mg πυρηνικών εκχυλισμάτων υποτονικού ή NP – 40 / υψηλής αλατότητας (Εικόνα 5),

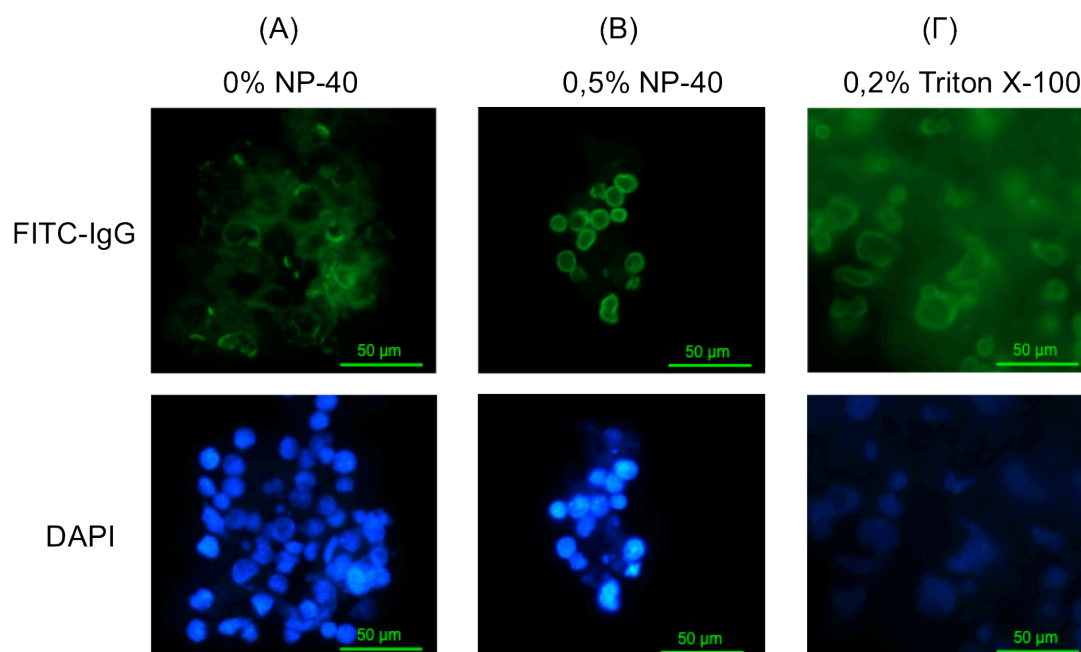
	Αριθμός ολικών πεπτιδίων		Αριθμός μοναδικών πεπτιδίων		Ποσοστό (%) πρωτεϊνικής κάλυψης	
Πρωτεΐνη	Υποτονικό	NP-40	Υποτονικό	NP-40	Υποτονικό	NP-40
Καρβοξυλάση του ακέτυλο συνενζύμου A	89	27	46	17	21,9	7,8
Πυροσταφυλική καρβοξυλάση	659	24	62	11	64	12,1
Καρβοξυλάση του προπιόνυλο συνενζύμου A, α – υπομονάδα	397	22	40	16	56,5	27,2
Καρβοξυλάση του προπιόνυλο συνενζύμου A, β – υπομονάδα	161	3	26	3	64,5	7,2
Καρβοξυλάση του μεθυλ κροτονυλ συνένζυμου A, α – υπομονάδα	292	23	36	11	65,4	20,4
Καρβοξυλάση του μέθυλ κροτονυλ συνένζυμου A β – υπομονάδα	18	Κανένα	11	Κανένα	25,4	Κανένα

Κατά τη εφαρμογή της μεθόδου απομόνωσης πυρήνων με τη χρήση διαλύματος λύσης NP-40 σε συγκέντρωση 0,5% το ίζημα (των πυρήνων) που δημιουργείται μπορεί πολύ εύκολα να επαναιωρηθεί χωρίς να παρατηρείται αύξηση του ιξώδους του δείγματος γεγονός που σημαίνει ότι οι πυρήνες δεν έχουν επηρεαστεί (μορφολογικά τουλάχιστον) από τη χρήση του απορρυπαντικού.

Ωστόσο για να αποκλειστεί το γεγονός ότι η χρήση του NP-40 επηρεάζει τον πυρηνικό φάκελο έλαβε χώρα χρώση με FITC-IgG πυρήνων (από διαφοροποιημένα BirA MEL) που έχουν απομονωθεί με χρήση NP-40 συγκέντρωσης 0,5% ώστε να ελεγχθεί η διαπερατότητα της πυρηνικής μεμβράνης (Εικόνα 12). Υπό κανονικές συνθήκες οτιδήποτε έχει μέγεθος μικρότερο από 40 kDa μεταφέρεται εντός και εκτός πυρήνα μέσω παθητικής διάχυσης ενώ για μέγεθος μεγαλύτερο από 40 απαιτείται ενεργή μεταφορά. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν άθικτα κύτταρα που βάφτηκαν με FITC-IgG ενώ ως θετικός κύτταρα που επωάστηκαν με 0,2 % Triton X-100 και βάφτηκαν επίσης με FITC-IgG. Το Triton X-100 ως πιο ισχυρό απορρυπαντικό κάνει διαπερατό τον πυρηνικό φάκελο. Ταυτόχρονα έγινε χρώση και με DAPI το οποίο μπορεί να εισέλθει στον πυρήνα και να χρώσει το DNA. Σε περίπτωση που ο πυρηνικός φάκελος έχει διαρρηχθεί από τη χρήση του NP-40 τότε το FITC-IgG μπορεί να εισέλθει στον πυρήνα και να τον χρώσει διαφορετικά λόγω υψηλού μοριακού βάρους (~180 kDa) παραμένει εκτός. Διαπιστώνεται (Εικόνα 12) ότι η πυρηνική μεμβράνη δεν επηρεάζεται καθώς το FITC-IgG για συγκέντρωση 0,5% NP-40 παραμένει εκτός πυρήνα (Εικόνα 12 B) σε αντίθεση με το DAPI το οποίο εισέρχεται.

Χρησιμοποιώντας FITC-IgG επιβεβαιώθηκε ότι η διαπερατότητα της πυρηνικής μεμβράνης δεν επηρεάζεται από την χρήση NP-40, ωστόσο εξαιτίας παθητικής διάχυσης είναι δυνατό να διαφύγουν μόρια από τον πυρήνα και να διαταραχθούν τα προς απομόνωση πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Για να αποκλειστεί το ενδεχόμενο της διατάραξης των πρωτεϊνικών συμπλόκων έγινε χρήση χρωματογραφίας μοριακής διήθησης με στήλη Superose 6. Η στήλη βαθμονομήθηκε με τη χρήση προτύπου διαλύματος πρωτεϊνών (Biorad Gel Filtration Standard) γνωστού μοριακού βάρους (Πίνακας 5). Τα πυρηνικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα (NP-40 / υψηλής αλατότητας) από διαφοροποιημένα

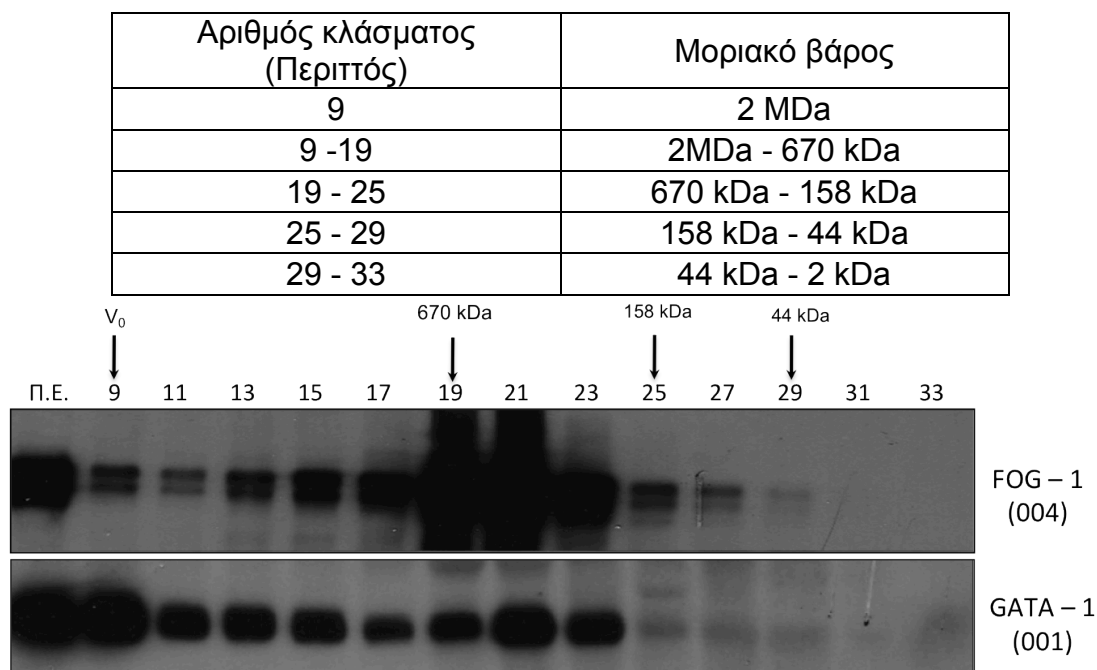
BirA υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία μοριακής διήθησης και τα πρωτεϊνικά κλάσματα συλλέχθηκαν, υποβλήθηκαν σε κατακρήμνιση με χρήση τριχλωροξικού οξέος (TCA).



Εικόνα 12. Η χρήση του διαλύματος NP-40 για τη λύση των κυττάρων δεν επηρεάζει τον πυρηνικό φάκελο των κυττάρων MEL. (Α) Σε διαφοροποιημένα κύτταρα BirA MEL που δεν έχουν έρθει σε επαφή με NP-40 έγινε χρώση με FITC- IgG και DAPI (αρνητικός μάρτυρας), (Β) Από διαφοροποιημένα κύτταρα BirA MEL απομονώθηκαν πυρήνες χρησιμοποιώντας διάλυμα λύσης NP-40 (0,5% v/v NP-40) και έγινε χρώση με FITC- IgG και DAPI., (Γ) Η πυρηνική μεμβράνη διαφοροποιημένων κυττάρων BirA MEL έγινε διαπερατή με τη χρήση 0,2% Triton X-100 και στη συνέχεια έγινε χρώση με FITC-IgG και DAPI (θετικός μάρτυρας).

Τα κατακρημνισμένο υλικό των κλασμάτων με περιττό αριθμό αναλύθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western για την παρουσία των πρωτεϊνών GATA-1 και FOG-1 (Εικόνα 13). Διαπιστώνεται ότι το μεγαλύτερο ποσοστό της GATA-1 εκλούεται στα υψηλά μοριακά βάρη ενώ το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης είναι 49 kDa, γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι η ικανότητα της πρωτεΐνης να σχηματίζει πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Δεν επηρεάζεται. Επιπλέον παρατηρώντας το προφίλ έκλουσης της πρωτεΐνης FOG-1 είναι εμφανές ότι το μεγαλύτερο κομμάτι της πρωτεΐνης εκλούεται σε μοριακό βάρος μεγαλύτερο από το δικό της υποδηλώνοντας ότι τα σύμπλοκα που σχηματίζει δεν επηρεάζονται.

Πίνακας 5. Αντιστοίχιση κλασμάτων έκλυσης σε γνωστά μοριακά βάρη πρωτεϊνών. Διάλυμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους διαχωρίστηκε από τη στήλη Superose 6 και τα εκλουόμενα κλάσματα αντιστοιχήθηκαν με τις πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους.



Εικόνα 13. Η χρήση του διαλύματος λύσης δεν επηρεάζει την ικανότητα των πρωτεϊνών GATA-1 και FOG-1 να σχηματίζουν πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Πυρηνικά εκχυλίσματα από διαφοροποιημένα κύτταρα BirA MEL με τη μέθοδο NP-40 / υψηλή αλατότητα υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία μοριακής διήθησης με τη χρήση στήλης Superose 6. Τα κλάσματα με περιττό αριθμό υποβλήθηκαν σε κατακρήμνιση με χρήση TCA και αναλύθηκαν με Western χρησιμοποιώντας αντισώματα για GATA-1 και FOG-1

Συνοψίζοντας τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι η χρήση υποτονικού διαλύματος που περιέχει NP-40 για τη λύση των κυττάρων και την παραγωγή πυρηνικών εκχυλισμάτων οδηγεί στη μείωση των ενδογενών βιοτινυλιωμένων πρωτεϊνών (καρβοξυλασών) που μπορούν να προσδεθούν στη στρεπταβιδίνη και να αυξήσουν το υπόβαθρο στο πλαίσιο της *in vivo* βιοτινυλίωσης. Η μείωση των καρβοξυλασών αντικατοπτρίζει τη γενικότερη μείωση της κυτταροπλασματικής μόλυνσης χωρίς ωστόσο να διαταράσσονται τα πυρηνικά πρωτεϊνικά σύμπλοκα τα οποία σχηματίζουν οι υπό μελέτη πρωτεΐνες.

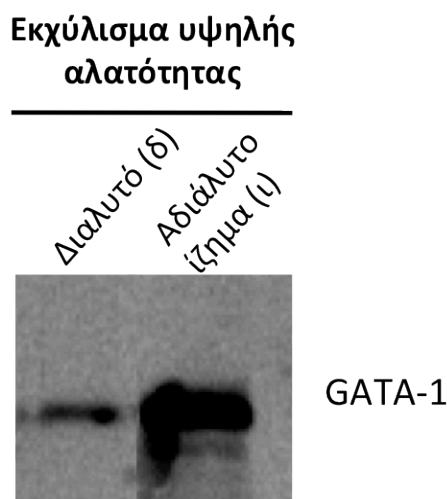
4.1.3 Εμπλουτισμός πυρηνικών εκχυλισμάτων σε GATA-1 με τη χρήση εναλλακτικών μεθόδων απομόνωσης πυρηνικών πρωτεϊνών.

Όπως έχει αναφερθεί ο στόχος της βελτίωσης της *in vivo* βιοτινυλίωσης ήταν σε δύο επίπεδα. Πρώτον να μειωθεί το υπόβαθρο και στη συνέχεια να αυξηθεί η ποσότητα της υπό μελέτης πρωτεΐνης στα πυρηνικά εκχυλίσματα, δηλαδή της GATA-1, ώστε να εμπλουτιστούν τα σύμπλοκα που έχει τη δυνατότητα να σχηματίζει. Η απομόνωση περισσότερης πρωτεΐνης GATA-1 συνεπάγεται τη δυνατότητα χαρακτηρισμού νέων πρωτεϊνικών συμπλόκων μέσω της *in vivo* βιοτινυλίωσης.

Ο λόγος για τον οποίο αναζητήθηκαν νέες μέθοδοι παραγωγής πυρηνικών εκχυλισμάτων, πέραν της υψηλής αλατότητας, ήταν διότι με την τελευταία μέθοδο και μετά τη απομόνωση διαλυτών πυρηνικών εκχυλισμάτων, παραμένει μεγάλη ποσότητα GATA-1 στο αδιάλυτο ίζημα (Εικόνα 14). Διαπιστώνεται ότι όταν συγκριθεί το ποσό της πρωτεΐνης GATA-1 που εκχυλίζεται από τον ίδιο αριθμό διαφοροποιημένων κυττάρων BirA MEL με αυτό που παραμένει στο αδιάλυτο ίζημα μετά την εκχύλιση βλέπουμε ότι το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης εντοπίζεται στο αδιάλυτο ίζημα. Να σημειωθεί όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι, ότι για να απελευθερωθούν οι πρωτεΐνες από το αδιάλυτο ίζημα χρειάστηκε να γίνει αναδιασπορά σε διάλυμα 2x Laemmli και υπερήχηση για τη μείωση του ιξώδους DNA, χειρισμοί που φυσικά αποδιατάσσουν τυχόν πρωτεϊνικά σύμπλοκα που υπάρχουν στο αδιάλυτο ίζημα.

Ύστερα από διερεύνηση στη βιβλιογραφία εντοπίστηκε εναλλακτική μέθοδος παραγωγής πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων η οποία χρησιμοποιεί το διάλυμα NUN για την εκχύλιση πρωτεϊνών από τους πυρήνες (166). Η συγκεκριμένη μέθοδος ευνοεί την καλύτερη εκχύλιση πυρηνικών πρωτεϊνών (εκτός από ιστόνες) καθώς περιέχει υψηλή συγκέντρωση NaCl (0,3 M) και ουρίας (1 M) όπως επίσης και 0,3% (v/v) NP-40, ώστε να αποσταθεροποιηθούν οι γέφυρες άλατος, οι δεσμοί υδρογόνου και οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις, αντίστοιχα. Παράλληλα με το NUN χρησιμοποιήθηκε και το διάλυμα RIPA, χωρίς την προσθήκη SDS. Το συγκεκριμένο διάλυμα χρησιμοποιείται για την παραγωγή ολικών εκχυλισμάτων από κύτταρα εξαιτίας της πολύ καλής ικανότητας στη εκχύλιση

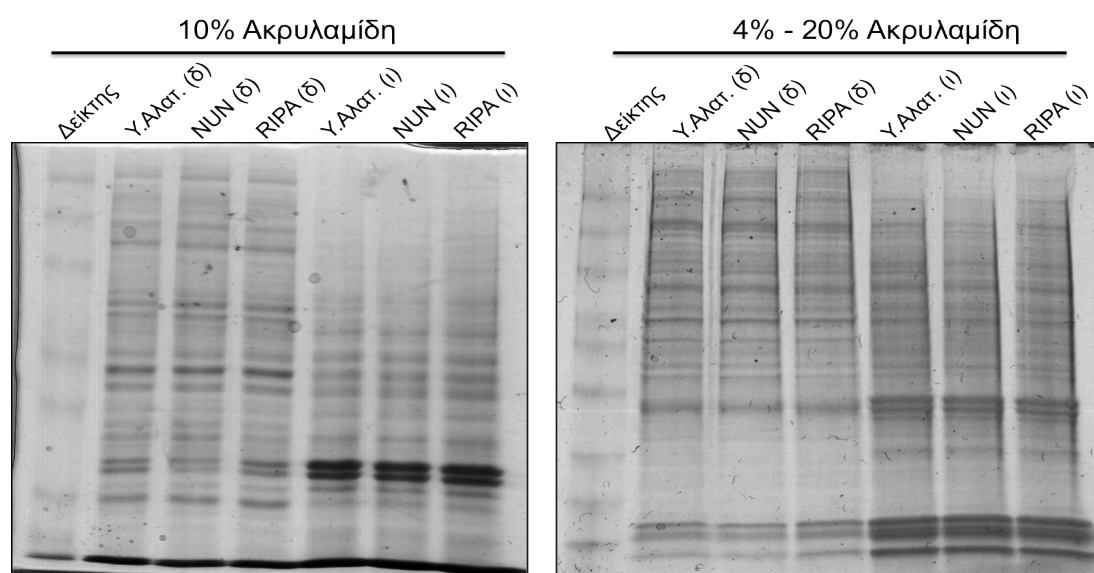
πρωτεϊνών (167). Αφαιρέθηκε το SDS ώστε να μην επηρεάζεται το φορτίο και η δομή των πρωτεϊνών (κατά συνέπεια των συμπλόκων) και χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση των πρωτεϊνών από τους πυρήνες. Η εκχύλιση των πρωτεϊνών βασίζεται στην παρουσία των απορρυπαντικών NP-40 (1% v/v) και δεοξυχολικού νατρίου (0,25 % v/v).



Εικόνα 14. Η χρήση της μεθόδου υψηλής αλατότητας αφήνει μεγάλη ποσότητα *GATA-1* στο αδιάλυτο ίζημα. Πυρηνικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από διαφοροποιημένα κύτταρα *BirA MEL* που προέκυψαν από τη χρήση της μεθόδου υψηλής αλατότητας και τα αδιάλυτα ίζηματα αναλύθηκαν με *Western* για την παρουσία της *GATA-1* (001, N6). Η ποσότητα της πρωτεΐνης σε κάθε ζώνη κανονικοποιήθηκε ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων.

Για να εξεταστεί αν η χρήση των διαλυμάτων NUN και RIPA βελτιώνει την εκχύλιση των πυρηνικών πρωτεϊνών σε σχέση με τη μέθοδο υψηλής αλατότητας προετοιμάστηκαν πυρηνικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από τον ίδιο αριθμό κυττάρων με τη χρήση των τριών διαφορετικών μεθόδων (υψηλής αλατότητας, NUN και RIPA). Για να εξασφαλιστεί ότι για κάθε μέθοδο θα χρησιμοποιηθεί ο ίδιος αριθμός κυττάρων, στο στάδιο των εκπλύσεων με PBS τα κύτταρα συλλέγονται, αναδιασπείρονται όλα μαζί ώστε να μην σχηματίζονται συσσωματώματα και στη συνέχεια χωρίζονται σε 3 ίσα μέρη ώστε να εξασφαλίζεται ότι για κάθε μέθοδο θα έχουμε τον ίδιο αριθμό κυττάρων. Με τη χρήση αιματοκυττομέτρου μετρήθηκε ο αριθμός των κυττάρων ώστε να διασφαλισθεί ότι για κάθε συνθήκη έχουμε τον ίδιο αριθμό. Ο τελικός όγκος που επαναιωρήθηκαν οι πυρήνες για κάθε μέθοδο είναι ο

ίδιος ώστε να αναλογεί ο ίδιος αριθμός κυττάρων στον ίδιο όγκο, οπότε οι μέθοδοι να είναι συγκρίσιμες μεταξύ τους. Τα αδιάλυτα ιζήματα που προκύπτουν για κάθε μέθοδο επαναδιαλυτοποιούνται σε ίδιο όγκο 2x Laemmli ώστε να αντιστοιχούν στον ίδιο αριθμό κυττάρων και να είναι συγκρίσιμα.



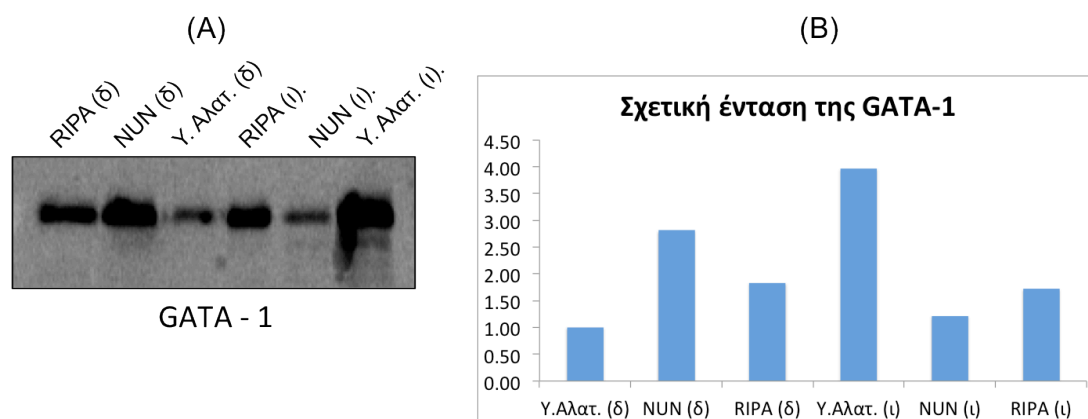
Εικόνα 15. Η χρήση NUN και RIPA οδηγεί στην εκχύλιση του ίδιου ποσού συνολικής πρωτεΐνης από τον ίδιο αριθμό κυττάρων. Πρωτεϊνικά πυρηνικά εκχυλίσματα (δ) αλλά και τα αδιάλυτα ιζήματα (ι) από τον ίδιο αριθμό διαφοροποιημένων κυττάρων BirA MEL για τις μεθόδους υψηλής αλατότητας, NUN και RIPA αναλύθηκαν σε πηκτή ακρυλαμίδης σταθερής συγκέντρωσης 10% (αριστερά) και γραμμικής 4%-20% (δεξιά).

Το διαλυτό μέρος (δ) από τα πυρηνικά εκχυλίσματα που απομονώθηκαν μαζί με τα επεξεργασμένα αδιάλυτα ιζήματα (ι) αναλύθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης συγκέντρωσης 10%. (Εικόνα 15, αριστερά). Παρατηρείται ότι η χρήση εναλλακτικών μεθόδων NUN και RIPA δεν οδηγεί στην εκχύλιση περισσότερης ολικής πρωτεΐνης από τον ίδιο αριθμό κυττάρων. Για να αποκλειστεί το γεγονός ότι ενδεχομένως να εκχυλίζεται περισσότερη συνολική πρωτεΐνη με τις μεθόδους NUN και RIPA αλλά εξαιτίας της σταθερής συγκέντρωσης της πολυακρυλαμίδης η διαφορά να μην είναι εμφανής, το ίδιο ακριβώς πείραμα επαναλήφθηκε χρησιμοποιώντας προπαρασκευασμένα πηκτώματα γραμμικής συγκέντρωσης (4% - 20%) πολυακρυλαμίδης (Εικόνα

15, δεξιά). Η μεταβλητότητα της συγκέντρωσης της πολυακρυλαμίδης επιτρέπει την καλύτερη απεικόνιση των πρωτεϊνών από μεγάλα μοριακά βάρη (~250 kDa) έως αρκετά μικρά (~6 kDa) προσφέροντας τη δυνατότητα καλύτερης σύγκρισης των μεθόδων. Συγκρίνοντας λοιπόν τις μεθόδους ακόμα και σε γραμμική συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης γίνεται αντιληπτό ότι η ποσότητα της συνολικής πρωτεΐνης που εκχυλίζεται δεν εμφανίζει διαφορά.

Από το γεγονός ότι χρήση των μεθόδων NUN και RIPA οδηγεί στην εκχύλιση παραπλήσιων ποσών συνολικής πυρηνικής πρωτεΐνης, προκύπτει το ερώτημα κατά πόσο ισχύει το ίδιο για την εκχύλιση συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Η εφαρμογή των συγκεκριμένων μεθόδων έγινε με σκοπό να εμπλουτιστεί το πυρηνικό εκχύλισμα σε GATA-1 πρωτεΐνη καθώς, όπως δείχθηκε παραπάνω, μεγάλο μέρος αυτής παραμένει στο αδιάλυτο ίζημα. Όπως προηγουμένως, τα πυρηνικά εκχυλίσματα που παρασκευάστηκαν με τις μεθόδους υψηλής αλατότητας, NUN και RIPA μαζί με τα αντίστοιχα αδιάλυτα ιζήματα αναλύθηκαν με Western για την παρουσία της πρωτεΐνης GATA-1 (Εικόνα 16 A).

Διαπιστώνεται ότι με τη χρήση διαλύματος NUN απομονώνεται περισσότερη πρωτεΐνη GATA-1 σε σχέση με το διάλυμα υψηλής αλατότητας. Παρατηρείται επίσης ότι το ποσό της GATA-1 το οποίο παραμένει στο αδιάλυτο ίζημα που προκύπτει από τη μέθοδο NUN είναι αρκετά μικρότερο. Επιπλέον η χρήση του διαλύματος RIPA χωρίς SDS εκχυλίζει περισσότερη πρωτεΐνη GATA-1 σε σχέση με την υψηλή αλατότητα. Ταυτόχρονα χρησιμοποιώντας λογισμικό ποσοτικοποίησης της έντασης του σήματος του Western (Image J) υπολογίστηκε ότι με τη χρήση της μεθόδου NUN απομονώνεται ~2,5 φορές περισσότερη GATA-1 ενώ με τη RIPA ~1,5 φορά περισσότερη πρωτεΐνη σε σχέση με την υψηλή αλατότητα (Εικόνα 16 B). Συνοψίζοντας τα προηγούμενα γίνεται εμφανές ότι παρόλο που η χρήση των εναλλακτικών μεθόδων εκχύλισης δεν οδηγεί σε αύξηση του συνολικού ποσού πυρηνικής πρωτεΐνης ωστόσο καταφέρει να αυξήσει σημαντικά το ποσό της GATA-1 που εκχυλίζεται.

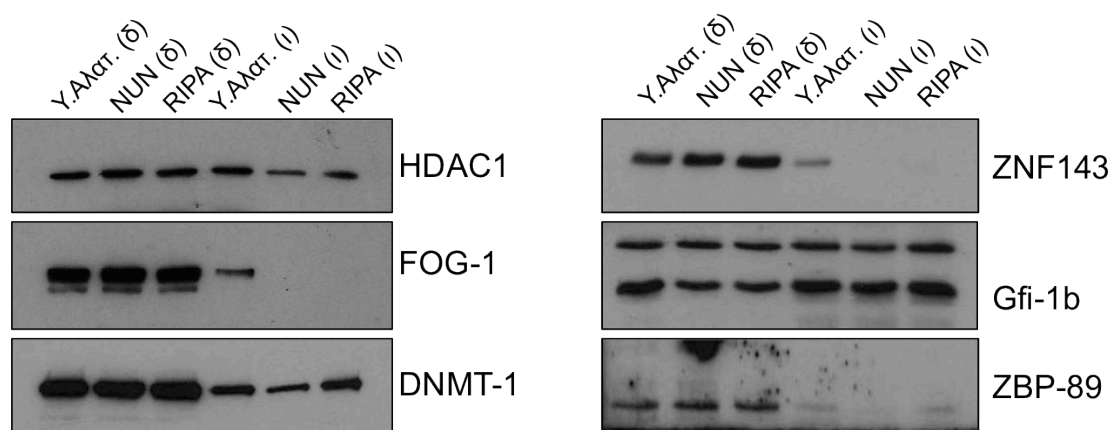


Εικόνα 16. Η χρήση των μεθόδων NUN και RIPA οδηγεί στη εκχύλιση μεγαλύτερης ποσότητας GATA-1 από τον ίδιο αριθμό κυττάρων. (A) Πυρηνικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που παρασκευάστηκαν από τον ίδιο αριθμό κυττάρων με τις μεθόδους υψηλής αλατότητας, NUN, RIPA και τα αντίστοιχα αδιάλυτα ιζήματα τους αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western για την πρωτεΐνη GATA-1 (001, N6) (B) Ποσοτικοποίηση του σήματος του Western με τη χρήση λογισμικού Image J του σήματος της εικόνας (A).

Διαπιστώνοντας ότι τα πυρηνικά εκχυλίσματα εμπλουτίζονται σε GATA-1 διερευνήσαμε τι συμβαίνει με άλλες πυρηνικές πρωτεΐνες και συγκεκριμένα με αυτές με τις οποίες η GATA-1 σχηματίζει σύμπλοκα όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία (168), (169), (92) αλλά και όπως περιγράφεται στην ενότητα της εισαγωγής. Για το λόγο αυτό πυρηνικά εκχυλίσματα των τριών μεθόδων με τα αντίστοιχα αδιάλυτα ιζήματα υποβλήθηκαν σε ανάλυση κατά Western και στη συνέχεια έγινε ανίχνευση για τις πρωτεΐνες HDAC1, FOG-1, DNMT-1, ZNF143, GFI-1b και ZBP-89 (Εικόνα 17).

Το μοτίβο που παρατηρείται για τη βελτίωση της εκχύλισης της GATA-1 δεν ισχύει για όλες τις πρωτεΐνες που ελέγχθηκαν. Αναλυτικότερα παρατηρείται ότι για τις πρωτεΐνες FOG-1, ZNF143 και ZBP-89 δεν διαφαίνονται ιδιαίτερες διαφορές μεταξύ τους, ενώ ελάχιστη πρωτεΐνη παραμένει στο αδιάλυτο ίζημα της μεθόδου υψηλής αλατότητας. Με τη χρήση NUN και RIPA εκχυλίζονται πλήρως και δεν εμφανίζονται στο αδιάλυτο ίζημα. Για τις πρωτεΐνες HDAC1 και DNMT-1 η χρήση των NUN και RIPA επίσης δεν οδηγεί σε σημαντική βελτίωση της εκχύλισης της πρωτεΐνης, παρατηρούμε ωστόσο ότι με τη χρήση του NUN και RIPA παραμένει λιγότερη ποσότητα πρωτεΐνης στο αδιάλυτο ίζημα. Τέλος για την πρωτεΐνη Gfi-1b η χρήση των

εναλλακτικών μεθόδων δεν έχει καμία επίδραση καθώς δεν αυξάνεται το ποσό της εκχύλισης, ενώ αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι και στις τρεις περιπτώσεις παραμένει σημαντική ποσότητα της Gfi-1b πρωτεΐνης στο αδιάλυτο ίζημα.

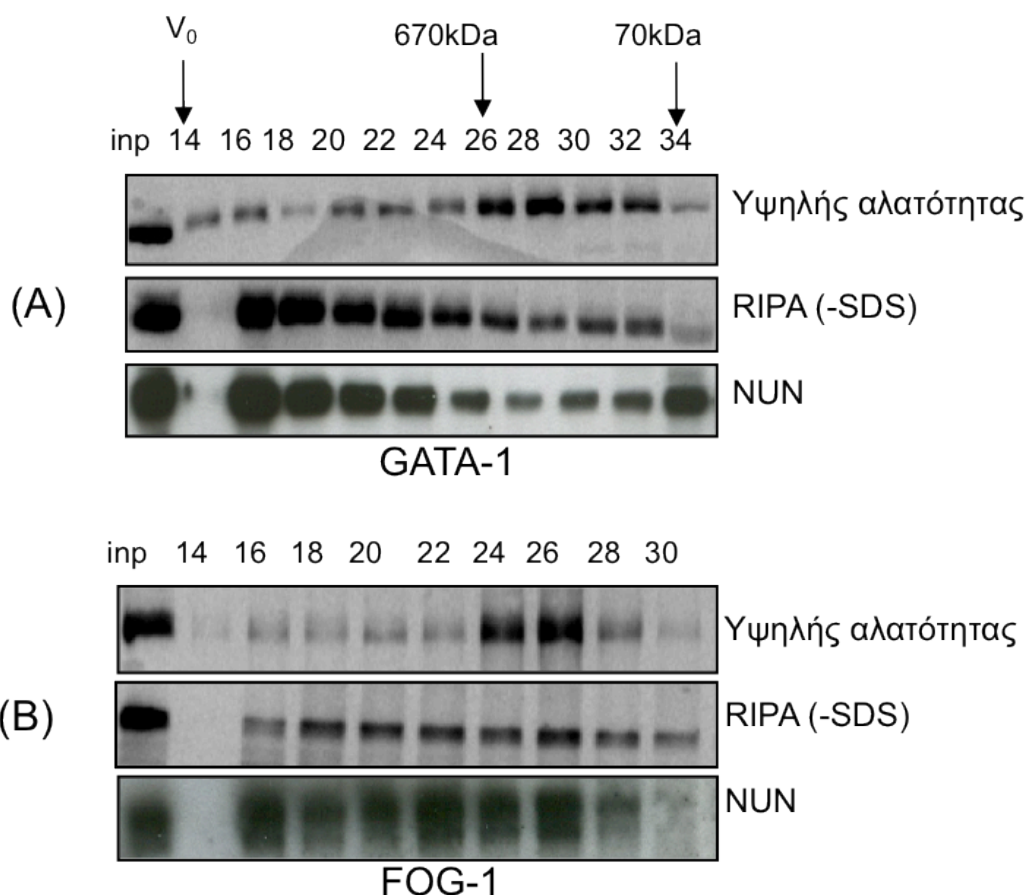


Εικόνα 17. Η χρήση NUN και RIPA επιτυγχάνει να εκχυλίσει μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεϊνών που βρίσκονται σε σύμπλοκο με τη GATA-1. Πυρηνικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που παρασκευάστηκαν από τον ίδιο αριθμό κυττάρων με τις μεθόδους υψηλής αλατότητας, NUN, RIPA και τα αντίστοιχα αδιάλυτα ιζήματα τους αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western για τις πρωτεΐνες HDAC-1 (021, 10E2), FOG-1 (006, A20), DNMT-1 (010), ZNF143 (018, M01), Gfi 1b (009, B-7) και ZBP – 89 (011).

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω μπορούμε να πούμε ότι με τη χρήση των εναλλακτικών μεθόδων παραγωγής εκχυλισμάτων είναι δυνατό να εμπλουτιστούν τα σύμπλοκα που σχηματίζει κυρίως η GATA-1. Η παρατήρηση αυτή εγείρει την πιθανότητα να εκχυλίζονται άγνωστα μέχρι τώρα πρωτεϊνικά σύμπλοκα της GATA-1, κάτι που ενισχύεται από την παρατήρηση ότι η εκχύλιση γνωστών πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την GATA-1, όπως η FOG-1, δεν επηρεάζεται ιδιαίτερα από τη χρήση διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης.

Αφού έγινε εφικτό να εκχυλιστεί περισσότερη πρωτεΐνη GATA-1, το επόμενο βήμα ήταν να διαπιστώσουμε αν η χρήση των NUN και RIPA τυχόν αποδιατάσσει γνωστά πρωτεϊνικά σύμπλοκα της GATA-1. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε στήλη μοριακής διήθησης Superose 6 με τη βοήθεια της

οποίας αναλύθηκαν πυρηνικά εκχυλίσματα που παρασκευάστηκαν και με τις 3 μεθόδους.



Εικόνα 18. Η χρήση NUN και RIPA δεν επηρεάζει τη δυνατότητα σχηματισμού συμπλόκων της GATA-1. Πυρηνικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που παρασκευάστηκαν με τις μεθόδους υψηλής αλατότητας, NUN και RIPA υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία μοριακής διήθησης με τη χρήση στήλης Superose 6. Τα κλάσματα αναλύθηκαν με Western χρησιμοποιώντας αντισώματα για GATA-1 και FOG-1.

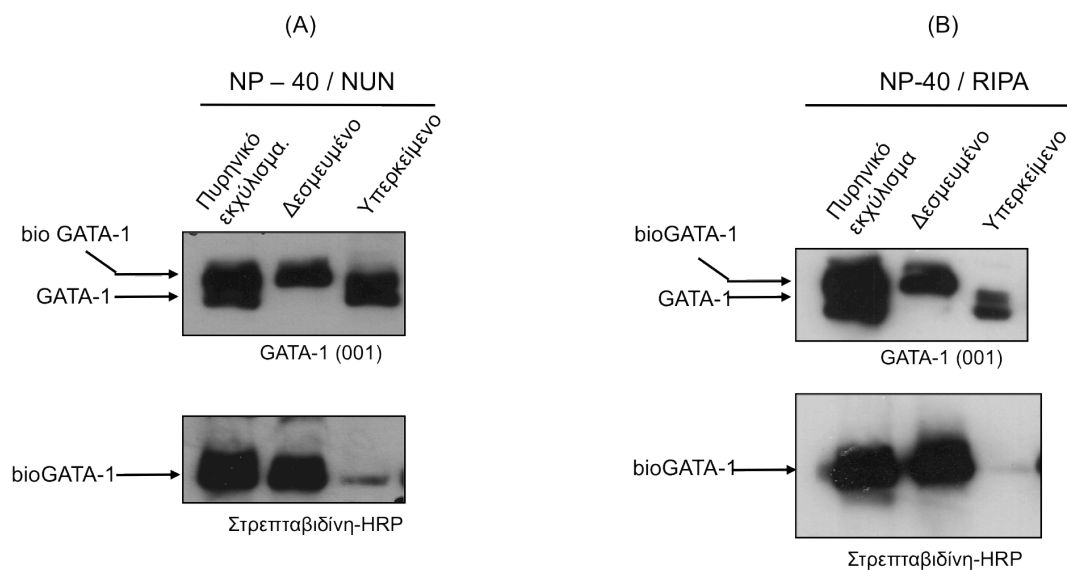
Τα κλάσματα συγκεντρώθηκαν μετά από καθίζηση με τη χρήση τριχλωροοξικού οξέος για την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών και στη συνέχεια με ανοσοαποτύπωση κατά Western έγινε ανίχνευση για τις πρωτεΐνες GATA-1 και FOG-1 (Εικόνα 18 A). Συγκρίνοντας τα προφίλ έκλουσης της GATA-1 μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων διαπιστώνεται ότι τόσο η χρήση του NUN όσο και η χρήση RIPA δεν επηρεάζει το σχηματισμό των συμπλόκων καθώς μεγάλο μέρος της GATA-1 εκλύεται στα υψηλά μοριακά βάρη. Αντίστοιχο με το προφίλ έκλουσης της GATA-1 είναι και αυτό της πρωτεΐνης FOG-1 (Εικόνα 18 B) επιβεβαιώνοντας ότι τα σύμπλοκα δε διαταράσσονται.

4.1.4 Αξιολόγηση των μεθόδων NUN και RIPA στο πλαίσιο της *in vivo* βιοτινυλίωσης.

Το επόμενο στάδιο στην αξιολόγηση των μεθόδων NUN και RIPA ήταν να επιβεβαιώσουμε ότι δεν δημιουργείται πρόβλημα στη κατακρήμνιση της βιοτινυλιωμένης GATA-1 από σφαιρίδια στρεπταβιδίνης ώστε να μπορέσουμε να προχωρήσουμε σε κατακρήμνιση μεγάλης κλίμακας. Για το λόγο αυτό έγινε παραγωγή πυρηνικών εκχυλισμάτων από διαφοροποιημένα κύτταρα bio-GATA-1 MEL με τη μέθοδο NP-40 / NUN και NP-40 / RIPA ώστε να χρησιμοποιηθούν για κατακρήμνιση στρεπταβιδίνης. Ο μέχρι τώρα χρησιμοποιούμενος τρόπος παρασκευής πυρηνικών εκχυλισμάτων bioGATA-1 κάνει χρήση της μεθόδου υψηλής αλατότητας (137). Επειδή η υψηλή συγκέντρωση άλατος στα πυρηνικά εκχυλίσματα καταστέλλει το σχηματισμό δεσμού μεταξύ βιοτίνης και στρεπταβιδίνης, πρέπει πριν από κάθε κατακρήμνιση το πυρηνικό εκχύλισμα να αραιώνεται 3 φορές ώστε η τελική συγκέντρωση KCl να είναι 150 mM.

Προκειμένου να εξετασθεί η συμπεριφορά των NUN και RIPA, έγινε κατακρήμνιση στρεπταβιδίνης για αυτά τα δύο εκχυλίσματα. Η κατακρήμνιση έλαβε χώρα χωρίς αραίωση των δειγμάτων ώστε να διαπιστωθεί κατά πόσο η σύνθεση των NUN (Εικόνα 19 A) και RIPA (Εικόνα 19 B) είναι συμβατές με την πρόσδεση της βιοτίνης στη στρεπταβιδίνη. Η ανάλυση έγινε με Western και χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα GATA-1 (001, N6) και στρεπταβιδίνης – HRP. Κρίνοντας από τη ποσότητα βιοτινυλιωμένης GATA-1 πρωτεΐνης που παραμένει στο υπερκείμενο κλάσμα, παρατηρούμε ότι και για τα δυο διαλύματα το μεγαλύτερο μέρος της GATA-1 προσδένεται στα σφαιρίδια. Επιπλέον να σημειωθεί ότι η ενδογενής πρωτεΐνη GATA -1 δεν προσδένεται στη στρεπταβιδίνη.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω μπορούμε να υποστηρίξουμε ότι η χρήση του NUN και RIPA δεν επηρεάζει το σχηματισμό των πρωτεϊνικών συμπλόκων της GATA -1 και επιπλέον επιτρέπει την άμεση χρήση των εκχυλισμάτων για κατακρήμνιση στρεπταβιδίνης χωρίς προηγούμενη αραίωση με αρκετά μεγάλη αποτελεσματικότητα.



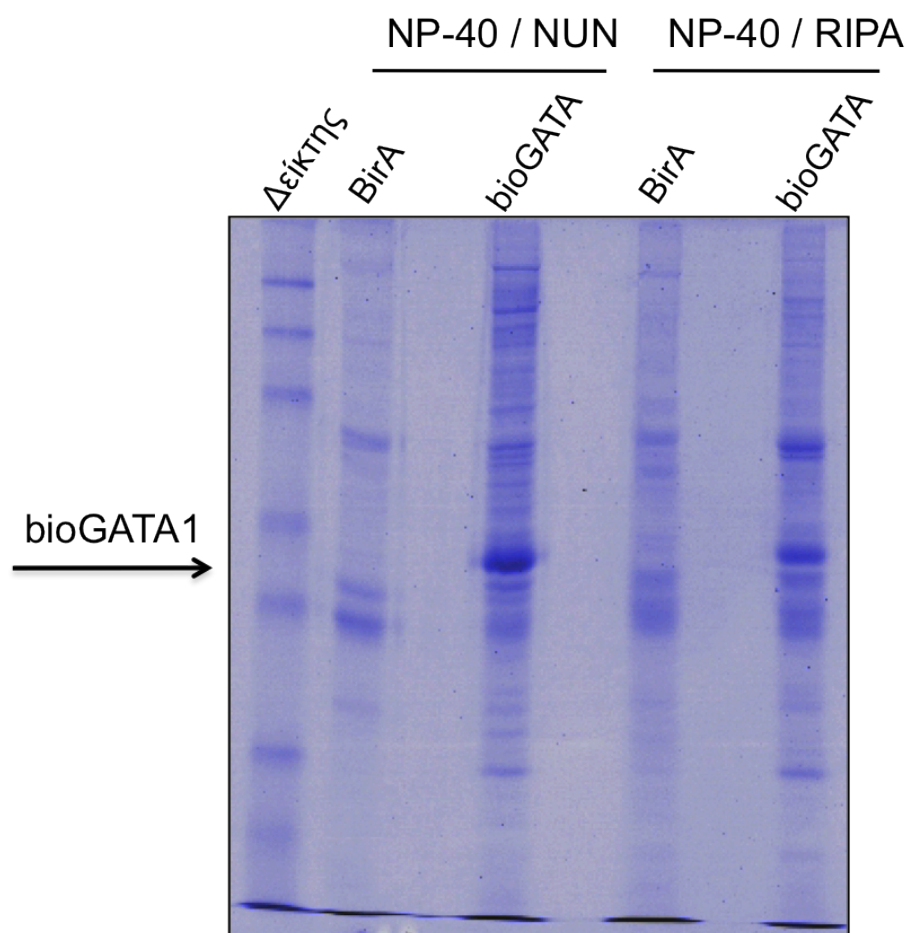
Εικόνα 19. Οι μέθοδοι NUN και RIPA επιτρέπουν τη απευθείας χρήση των πυρηνικών εκχυλισμάτων χωρίς αραίωση για κατακρήμνιση βιοτινυλιωμένης πρωτεΐνης. Πυρηνικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από διαφοροποιημένα κύτταρα bio – GATA-1 MEL παρασκευασμένα με τη χρήση NP-40 / NUN (A) και NP-40 / RIPA υποβλήθηκαν σε κατακρήμνιση στρεπταβιδίνης. Τα τρία κλάσματα της κατακρήμνισης (15% πυρηνικό εκχύλισμα, δεσμευμένο, 15% υπερκεείμενο) αναλύθηκαν με Western χρησιμοποιώντας αντισώματα για GATA-1 (001, N6) και στρεπταβιδίνη – HRP.

4.1.5 Μεγάλης κλίμακας κατακρήμνιση στρεπταβιδίνης σε εκχυλίσματα bio-GATA-1 MEL από NUN και RIPA.

Αφού αποδείξαμε ότι με τη χρήση NUN και RIPA είναι εφικτό να: (α) απομονωθεί περισσότερη GATA-1 από MEL κύτταρα χωρίς τη διατάραξη των πρωτεϊνικών συμπλόκων και (β) η κατακρήμνιση της βιοτινυλιωμένης πρωτεΐνης να πραγματοποιείται με μεγάλη αποτελεσματικότητα, έλαβε χώρα μεγάλη κλίμακας κατακρήμνιση με σκοπό την ταυτοποίηση πιθανών νέων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της GATA-1.

Απομονώθηκαν πυρηνικά εκχυλίσματα χρησιμοποιώντας τις μεθόδους NP-40 / NUN και NP-40 / RIPA από διαφοροποιημένα MEL κύτταρα BirA και bio-GATA – 1. Χρησιμοποιήθηκαν 50 mg πρωτεΐνης για κατακρήμνιση στρεπταβιδίνης για κάθε ένα από τα πυρηνικά εκχυλίσματα. Το κατακρημνισμένο υλικό όπως έχει περιγραφεί εκλούστηκε από τα σφαιρίδια στρεπταβιδίνης με τη χρήση 1x Laemmli και στη συνέχεια αναλύθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης συγκέντρωσης 10% (Εικόνα 20). Η χρώση έγινε

χρησιμοποιώντας Colloidal Coomassie Blue G-250 και οι 4 ζώνες υποβλήθηκαν σε φασματομετρία μάζας για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών. Το κατακρημνισμένο υλικό από τα πυρηνικά εκχυλίσματα BirA χρησιμοποιείται ως αρνητικός μάρτυρας.



Εικόνα 20. Μεγάλης κλίμακας κατακρήμνιση στρεπταβιδίνης σε εκχυλίσματα *BirA* και *bioGATA-1* παρασκευασμένα με χρήση *NUN*, *RIPA*. 50 mg πρωτεϊνικών πυρηνικών εκχυλισμάτων από διαφοροποιημένα κύτταρα *BirA MEL* παρασκευασμένα με τη χρήση *NP-40 / NUN*, *NP-40 / RIPA* και *bio-GATA – 1 MEL* παρασκευασμένα με τη χρήση *NP-40 / NUN*, *NP-40 / RIPA* υποβλήθηκαν σε κατακρήμνιση στρεπταβιδίνης. Το κατακρημνισμένο υλικό αναλύθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 10% με χρώση Colloidal Coomassie Blue G-250 και στη συνέχεια και οι 4 ζώνες υποβλήθηκαν σε φασματομετρία μάζας

4.1.6 Παρουσίαση των αποτελεσμάτων της φασματομετρίας μάζας στα εκχυλίσματα bio-GATA-1 MEL από NUN και RIPA.

Από τα αποτελέσματα της φασματομετρίας μάζας χρησιμοποιώντας τις μεθόδους NUN RIPA ταυτοποιήθηκαν αρκετές νέες πρωτεΐνες οι οποίες χρίζουν περαιτέρω μελέτης και επιβεβαίωσης. Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα από την κατακρήμνιση NUN Στον πίνακα 6 παρουσιάζονται οι πρωτεΐνες που είχαν ταυτοποιηθεί σε προηγούμενα πειράματα κατακρήμνισης που έλαβαν χώρα στο εργαστήριο και περιελάμβαναν τη χρήση της μεθόδου υψηλής αλατότητας.

Πίνακας 6. Ταυτοποιημένες πρωτεΐνες σε παλαιότερα πειράματα κατακρήμνισης σε εκχυλίσματα υψηλής αλατότητας. Πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν από τη φασματομετρία μάζας στην κατακρήμνιση των εκχυλισμάτων NUN και RIPA και είχαν ταυτοποιηθεί και σε παλαιότερα πειράματα κατακρήμνισης εκχυλισμάτων υψηλής αλατότητας.

Ταυτότητα Πρωτεΐνης	Μοναδικά πεπτίδια	Συνολικά πεπτίδια	Βαθμολογία MASCOT	Σχόλια
GATA-1	17	390	1229	Ήδη ταυτοποιημένες σε εκχυλίσματα υψηλής αλατότητας
FOG-1	36	215	2775	
NuRD (Mi2a, RbAp46/48, MTA1, MTA2, p66, Mdb2/3, HDAC1)	13-30	50-100	1100-1400	
TAL-1 complex (Ldb1, LMO2, E2A, ETO-2, Cdk9)	6-10	10-15	305-408	
Gfi-1b	7	30	376	
WSTF/ACF complex (Acf1, Snf2h, WSTF)	18-36	20-72	809-2309	

Στον πίνακα 7 παρουσιάζονται οι πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν από τη φασματομετρία και έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι αλληλεπιδρούν με τη GATA-1 ωστόσο δεν είχαν ταυτοποιηθεί ποτέ σε προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου που έκαναν χρήση της μεθόδου υψηλής αλατότητας.

Πίνακας 7. Ταυτοποιημένες πρωτεΐνες ως αλληλεπιδρώσες με τη GATA-1 βιβλιογραφικά. Πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν από τη φασματομετρία μάζας στην κατακρήμνιση των εκχυλισμάτων NUN και έχουν χαρακτηριστεί ως αλληλεπιδρώσες με τη GATA-1 στη βιβλιογραφία.

Ταυτότητα Πρωτεΐνης	Μοναδικά πεπτίδια	Συνολικά πεπτίδια	Βαθμολογία Mascot	Σχόλια
ZBP-89	13	26	1059	Αλληλεπιδρώσα με GATA-1
CBP/p300	10	15	350	Μεθυλτρανσφεράση ιστονών αλληλεπιδρά με πολλούς μεταγραφικούς παράγοντες
PIASy	8	13	456	SUMO λιγάση αλληλεπιδρά με GATA-1
Fli1	7	13	241	Μεταγραφικός παράγοντας που αλληλεπιδρά με GATA-1 στα μεγακαρυοκύτταρα
Runx1	13	56	870	Απαραίτητος μεταγραφικός παράγοντας που αλληλεπιδρά με GATA-1
Ikaros	5	7	227	Απαραίτητος μεταγραφικός παράγοντας που αλληλεπιδρά με GATA-1
Mediator 19	7	12	801	Αλληλεπιδρά με GATA-1 για την ενεργοποίηση γονιδίων.

Στον πίνακα 8 παρουσιάζονται οι πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν από τη φασματομετρία μάζας στη κατακρήμνιση NUN και αποτελούν νέες πιθανές αλληλεπιδρώσες πρωτεΐνες με τη GATA-1. Να σημειωθεί πως υπάρχει αλληλεπικάλυψη μεταξύ των πρωτεϊνών που ταυτοποιούνται με τη χρήση των

NUN και RIPA ωστόσο υπάρχουν και πρωτεΐνες που ταυτοποιούνται μόνο στη μια ή την άλλη μέθοδο.

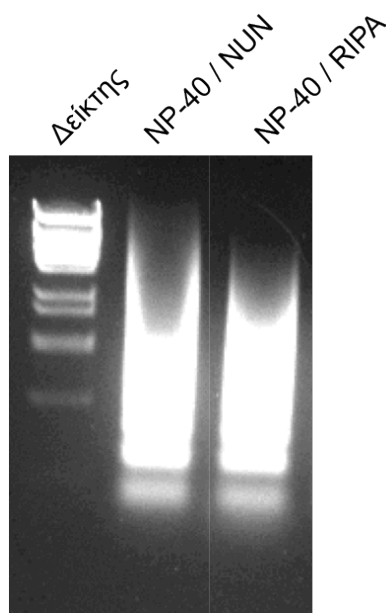
Πίνακας 8. Πιθανώς νέες αλληλεπιδρώσεις πρωτεΐνες με τη GATA-1. Πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν από τη φασματομετρία μάζας στην κατακρήμνιση των εκχυλισμάτων NUN και δεν έχουν αναφερθεί στο παρελθόν ως αλληλεπιδρώσεις με τη GATA-1

Ταυτότητα Πρωτεΐνης	Μοναδικά πεπτίδια	Συνολικά πεπτίδια	Βαθμολογία Mascot	Σχόλια
DNMT1	52	95	3228	Υπεύθυνη για τη διατήρηση της μεθυλίωσης του DNA κατά την αντιγραφή, μεταγραφικός καταστολέας
ZNF143	5	9	242	Γενικός μεταγραφικός παράγοντας, αλληλεπιδρά με GATA-1 στα μεγακαρυοκύτταρα
CTCF	3	3	186	Εμπλέκεται στη αναδίπλωση του DNA στο γονιδιακό τόπο της β-σφαιρίνης.
Cbfb	39	119	2565	Αιμοποιητικός μεταγραφικός παράγοντας που εμπλέκεται στη λευχαιμία
CEBP zeta	8	9	341	Αιμοποιητικός μεταγραφικός παράγοντας που εμπλέκεται στη λευχαιμία
ATRX	14	20	400	Εμπλέκεται στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, ρυθμιστής της α-σφαιρίνης
KLF13	3	3	252	Εμπλέκεται στην ερυθροποίηση καταστολέας του BclXL
MLL2	8	10	224	Μεθυλτρανσφεράση των ιστονών , εμπλέκεται στη ρύθμιση της β-σφαιρίνης
HoxB13	5	7	220	Ογκογονίδιο
MLLT10	6	6	294	Μεταγραφικός παράγοντας που εμπλέκεται στη λευχαιμία

Όπως διαπιστώνεται από τον πίνακα 8 μια από τις πρωτεΐνες που προκύπτει ως πιθανώς αλληλεπιδρώσα με τη GATA-1 και μάλιστα με πολύ υψηλή βαθμολογία Mascot, είναι η DNMT-1 η οποία και μελετάται εκτενώς στη συνέχεια.

4.1.7 Βελτιστοποίηση συνθηκών για την απομάκρυνση του DNA και RNA από τα πυρηνικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα.

Αναλύοντας τα αποτελέσματα από τη φασματομετρία μάζας για τα BirA και bio-GATA-1 διαπιστώθηκε ότι υπάρχει ένας αριθμός πρωτεϊνών ο οποίος φέρεται να κατακρημνίζεται μη ειδικά, δηλαδή όχι εξαιτίας της αλληλεπίδρασης με τη GATA-1, αλλά εξαιτίας της παρουσίας DNA και RNA στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα (background). Για να μειωθούν οι μη ειδικές αλληλεπιδράσεις (ψευδή θετικά αποτελέσματα) μεταξύ των πρωτεϊνών, κρίθηκε απαραίτητη η αφαίρεση του DNA και RNA από τα πυρηνικά εκχυλίσματα. Επιπλέον πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η χρήση μόνο βρωμιούχου αιθιδίου στα πυρηνικά εκχυλίσματα όπου ελέγχονται οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις δεν είναι αρκετή για την εξάλειψη των ψευδών θετικών αλληλεπιδράσεων (170), (171).

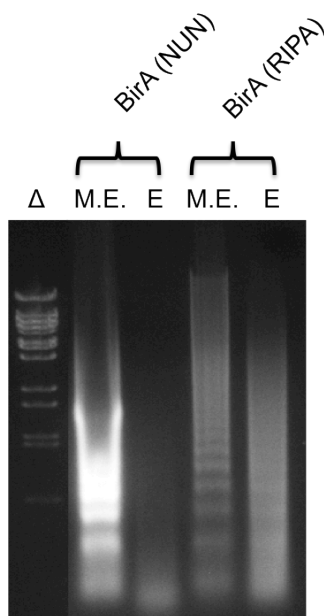


Εικόνα 21. Τα πυρηνικά εκχυλίσματα περιέχουν μεγάλες ποσότητες νουκλεϊκών οξέων. Από πυρηνικά εκχυλίσματα διαφοροποιημένων κυττάρων BirA με NUN και

RIPA απομονώθηκε DNA και RNA το οποίο αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης συγκέντρωσης 1%.

Το πρώτο βήμα ήταν να διαπιστώσουμε την ύπαρξη DNA και RNA στα απομονωμένα πυρηνικά εκχυλίσματα. Για την απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων, πυρηνικά εκχυλίσματα NUN και RIPA διαφοροποιημένων κυττάρων BirA MEL επωάστηκαν με πρωτεϊνάση K για την πέψη των πρωτεϊνών, τα νουκλεϊκά οξέα εκχυλίστηκαν με τη χρήση φαινόλης – χλωροφόρμιου, κατακρημνίστηκαν με αιθανόλη και στη συνέχεια αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης συγκέντρωσης 1%. Η χρώση των νουκλεϊκών οξέων έγινε με βρωμιούχο αιθίδιο (Εικόνα 21). Παρατηρούμε ότι στα πυρηνικά εκχυλίσματα τόσο του NUN και του RIPA ανιχνεύεται μεγάλη ποσότητα DNA και RNA.

Για την πέψη των νουκλεϊκών οξέων, πυρηνικά εκχυλίσματα από διαφοροποιημένα κύτταρα BirA (NUN) και BirA (RIPA) επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου 30 λεπτά παρουσία 100 $\mu\text{g/mL}$ RNάσης και 200 $\mu\text{g/mL}$ DNάσης (τελικές συγκεντρώσεις). Τα νουκλεϊκά οξέα απομονώθηκαν και αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου (Εικόνα 22).



Εικόνα 22. Η χρήση DNάσης, RNάσης στα πυρηνικά εκχυλίσματα δεν απομακρύνει πλήρως τα νουκλεϊκά οξέα. Πυρηνικά εκχυλίσματα διαφοροποιημένων κυττάρων BirA υψηλής αλατότητας, RIPA επεξεργάστηκαν με RNάση (τελικής συγκέντρωσης στο δείγμα 100 $\mu\text{g/mL}$), DNάση (τελικής συγκέντρωσης στο δείγμα 200

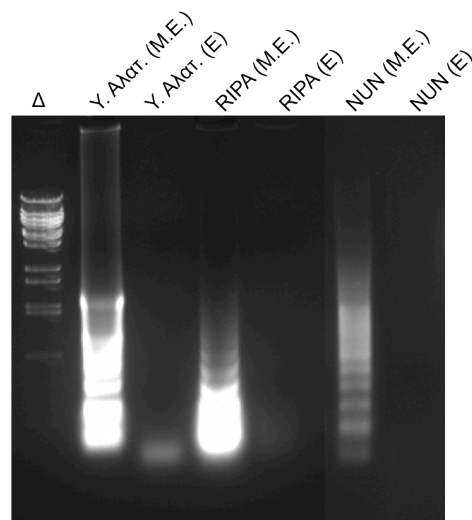
μg/ml) και αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1%. (M.E. : μη επεξεργασμένα, E. : επεξεργασμένα.)

Η ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων δείχνει ότι παρά τη χρήση ικανής συγκέντρωσης DNάσης και RNάσης, η πέψη των νουκλεϊκών οξέων δεν ήταν πλήρης. Το γεγονός αυτό πιθανώς οφείλεται στο ότι τα συγκεκριμένα ένζυμα χρησιμοποιήθηκαν απευθείας στα πυρηνικά εκχυλίσματα. Τα διαλύματα εκχύλισης των πυρηνικών πρωτεϊνών (NUN, RIPA) περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων αλλά και απορρυπαντικών τα οποία μπορεί να περιορίζουν τη δραστηριότητα των ενζύμων.

Το γεγονός ότι δεν απομακρύνονται πλήρως τα νουκλεϊκά οξέα σε συνδυασμό με το γεγονός ότι οι επωάσεις με DNάση και RNάση λαμβάνουν χώρα σε θερμοκρασία δωματίου, μας οδήγησε στην αναζήτηση εναλλακτικών νουκλεασών. Για το λόγο αυτό δοκιμάστηκε η βενζονάση μια γενετικά τροποποιημένη νουκλεάση (172) η οποία μπορεί να αποδομήσει όλες τις μορφές του DNA και του RNA και είναι δραστική σε ευρύ φάσμα λειτουργικών συνθηκών. Μετά το πέρας της πέψης παράγονται 5'-μονοφωσφορικά ολιγονουκλεοτίδια μεγέθους 2 με 5 βάσεων.

Για να ελεγχθεί η ικανότητα της βενζονάσης να αποδομήσει DNA και RNA, πυρηνικά εκχυλίσματα που έχουν παρασκευαστεί και με τις τρεις μεθόδους (υψηλή αλατότητα, NUN και RIPA χωρίς SDS) επωάστηκαν για 2 ώρες στους 4⁰C (Εικόνα 23). Η ποσότητα της βενζονάσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 50 U / mg συνολικής πρωτεΐνης με ταυτόχρονη προσθήκη MgCl₂ τελικής συγκέντρωσης 2mM (η προσθήκη του MgCl₂ είναι καθοριστική καθώς διασφαλίζει τη δραστηριότητα του ενζύμου).

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση με βενζονάση είχε ως αποτέλεσμα την πέψη του DNA και RNA χωρίς πρότερη επεξεργασία του πυρηνικού εκχυλίσματος. Επιπλέον διαπιστώνεται ότι το ένζυμο είναι λειτουργικό ανεξάρτητα από τη σύνθεση του διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση των πυρηνικών πρωτεϊνών. Τέλος η ικανότητα της βενζονάσης να είναι λειτουργική στους 4⁰C αποτρέπει τη διατάραξη των πρωτεϊνικών συμπλόκων. Εφεξής, όλα τα πυρηνικά εκχυλίσματα επεξεργάσθηκαν με βενζονάση με σκοπό την απομάκρυνση των νουκλεϊκών οξέων.



Εικόνα 23. Η βενζονάση αποικοδομεί τα νουκλεϊκά οξέα σε όλες τις μεθόδους χωρίς προηγούμενη επεξεργασία των δειγμάτων. Πυρηνικά εκχυλίσματα διαφοροποιημένων *BirA* που παρασκευάστηκαν και με τις τρεις μεθόδους (υψηλής αλατότητας, NUN, RIPA) επωάστηκαν με βενζονάση (50U / mg πρωτεΐνης) στους 4 °C για 2h. Το DNA απομονώθηκε και αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1% . (M.E. :μη επεξεργασμένο, E : επεξεργασμένο).

Από τα παραπάνω διαπιστώνεται ότι η ύπαρξη νουκλεϊκών οξέων στα πυρηνικά εκχυλίσματα δύναται να αυξήσει τη μη ειδική πρόσδεση πρωτεϊνών οδηγώντας έτσι στη εμφάνιση ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Μια τέτοια περίπτωση είναι αυτή που παρουσιάζεται παρακάτω για τις αλληλεπιδράσεις που ανιχνεύονται μεταξύ της GATA-1 και των πρωτεϊνών TAF.

4.2.1 Ανάλυση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ GATA -1 και των πρωτεϊνών TAF (TBP associated Factors).

Από τα αποτελέσματα της φασματομετρίας μάζας προκύπτει ότι η GATA-1 φέρεται να αλληλεπιδρά με ένα μεγάλο πλήθος πρωτεϊνών TAF (παράγοντες που σχετίζονται με τη πρωτεΐνη TBP: TATA binding protein) (Πίνακας 9, Πίνακας 10).

Πίνακας 9. Η GATA-1 φέρεται να αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες TAF (εκχυλίσματα NUN). Συγκεντρωτικός πίνακας των πρωτεϊνών TAF που ταυτοποιήθηκαν από φασματομετρία μάζας στο κατακρημνισμένο υλικό πυρηνικών εκχυλισμάτων NUN της βιοτινυλιωμένης GATA-1 (Εικόνα 18).

NUN						
	bioGATA-1			BirA		
Πρωτεΐνη	Μοναδικά πεπτίδια	Συνολικά Πεπτίδια	Βαθμολογία Mascot	Μοναδικά πεπτίδια	Συνολικά Πεπτίδια	Βαθμολογία Mascot
GATA-1	15	523	1229	2	6	169
TAF2	3	81	108	2	127	63
TAF1	16	20	687	5	15	101
TBP	3	12	163	0	0	0
TAF9b	5	11	271	0	0	0
TAF4a	7	10	233	2	6	53
TAF6L	8	8	409	0	0	0
TAF5L	7	8	382	0	0	0
TAF5	2	2	45	0	0	0
TAF6	1	1	50	0	0	0
TAF10	1	1	45	0	0	0
GCN5	5	12	366	0	0	0
SPT20	5	5	219	0	0	0
TRRAP	23	35	966	6	10	121

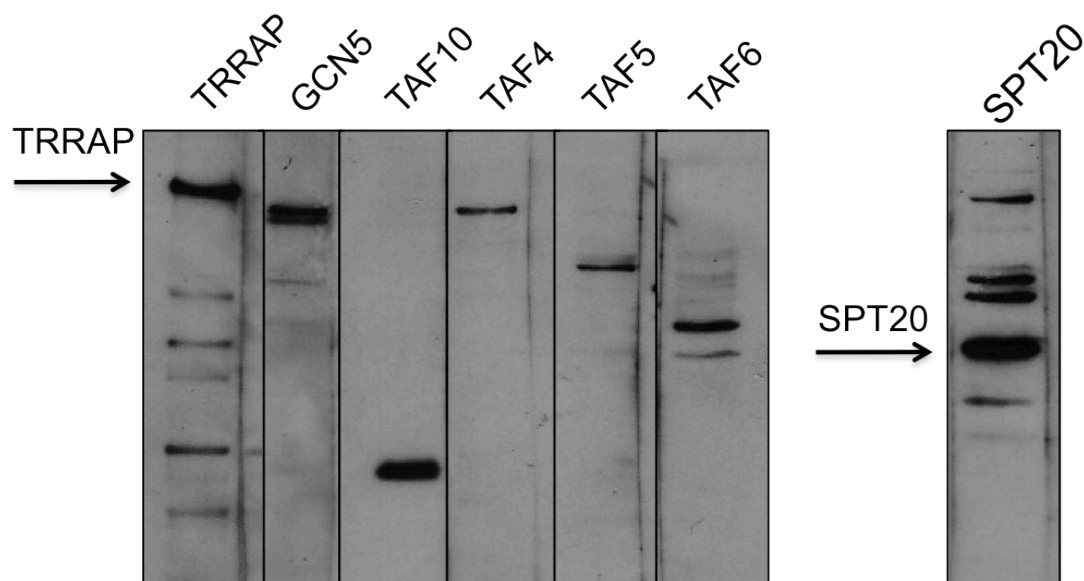
Παρατηρούμε ότι όταν η κατακρήμνιση της βιοτινυλιωμένης GATA – 1 γίνεται σε πυρηνικά εκχυλίσματα που έχουν παρασκευαστεί με τη μέθοδο RIPA ταυτοποιείται μεγαλύτερος αριθμός πρωτεϊνών TAF με υψηλότερη βαθμολογία Mascot (αλλά και αριθμό πεπτιδίων) σε σχέση με τη μέθοδο NUN. Η βαθμολογία Mascot όπως έχει προαναφερθεί ουσιαστικά υποδηλώνει την πιθανότητα η πρωτεΐνη που έχει αναγνωρισθεί να είναι όντως αυτή. Στην παρούσα ανάλυση συμπεριλαμβάνονται πρωτεΐνες οι οποίες εμφανίζουν βαθμολογία Mascot από 40 και άνω.

Πίνακας 10. Η GATA-1 φέρεται να αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες TAF (εκχυλίσματα RIPA). Συγκεντρωτικός πίνακας των πρωτεϊνών TAF που ταυτοποιήθηκαν από φασματομετρία μάζας στο κατακρημνισμένο υλικό πυρηνικών εκχυλισμάτων RIPA της βιοτινυλιωμένης GATA-1 (Εικόνα 18)

RIPA						
bioGATA-1				BirA		
Πρωτεΐνη	Μοναδικά πεπτίδια	Συνολικά Πεπτίδια	Βαθμολογία Mascot	Μοναδικά πεπτίδια	Συνολικά Πεπτίδια	Βαθμολογία Mascot
GATA-1	14	507	1195	2	7	126
TAF2	1	91	43	4	116	112
TAF1	7	11	176	7	12	157
TBP	4	8	173	0	0	0
TAF9b	6	8	346	0	0	0
TAF4a	4	4	217	0	0	0
TAF6L	7	8	333	4	4	148
TAF5L	10	10	537	0	0	0
TAF6	6	6	256	0	0	0
TAF10	1	2	154	0	0	0
TAF9	14	20	745	5	6	108
TAF15	3	9	171	5	17	346
TAF11	2	2	65	0	0	0
TAF3	2	2	43	0	0	0
GCN5	0	0	0	0	0	0
SPT20	0	0	0	0	0	0
TRRAP	77	123	3992	18	30	554

Τα αποτελέσματα της φασματομετρίας μάζας υποδεικνύουν ότι η πρωτεΐνη GATA – 1 πιθανώς αλληλεπιδρά με πλήθος πρωτεϊνών TAF. Παράλληλα όμως η παρουσία κάποιων πρωτεϊνών TAF στην κατακρήμνιση των πυρηνικών εκχυλισμάτων BirA εγείρει την πιθανότητα ότι κάποιες τουλάχιστον από τις αλληλεπιδράσεις να είναι μη ειδικές. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ώστε να επιβεβαιωθεί το κατά πόσο οι συγκεκριμένες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις είναι πραγματικές ήταν: α) έλεγχος της έκφρασης των πρωτεϊνών και β) κατακρήμνιση της ενδογενούς GATA–1 σε κύτταρα MEL. Καταρχήν διερευνήθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών: GCN5, SPT20, TAF10, TAF4, TAF5, TAF6 και TRAPP στα διαφοροποιημένα MEL κύτταρα. Πυρηνικά εκχυλίσματα διαφοροποιημένων κυττάρων BirA MEL τα

οποία έχουν παρασκευαστεί με τη μέθοδο RIPA αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western για την παρουσία των πρωτεϊνών TAF που αναφέρθηκαν παραπάνω (Εικόνα 24). Επιλέχθηκε η μέθοδος RIPA εφόσον μέσω της συγκεκριμένης μεθόδου ανιχνεύθηκαν με υψηλή Mascot βαθμολογία οι πιθανές αλληλεπιδράσεις με τις πρωτεΐνες TAF. Διαπιστώνεται λοιπόν ότι όλα τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των πρωτεϊνών TAF ήταν λειτουργικά και το σήμα που ανιχνεύθηκε κατά την ανοσοαποτύπωση ήταν στο αναμενόμενο μέγεθος.



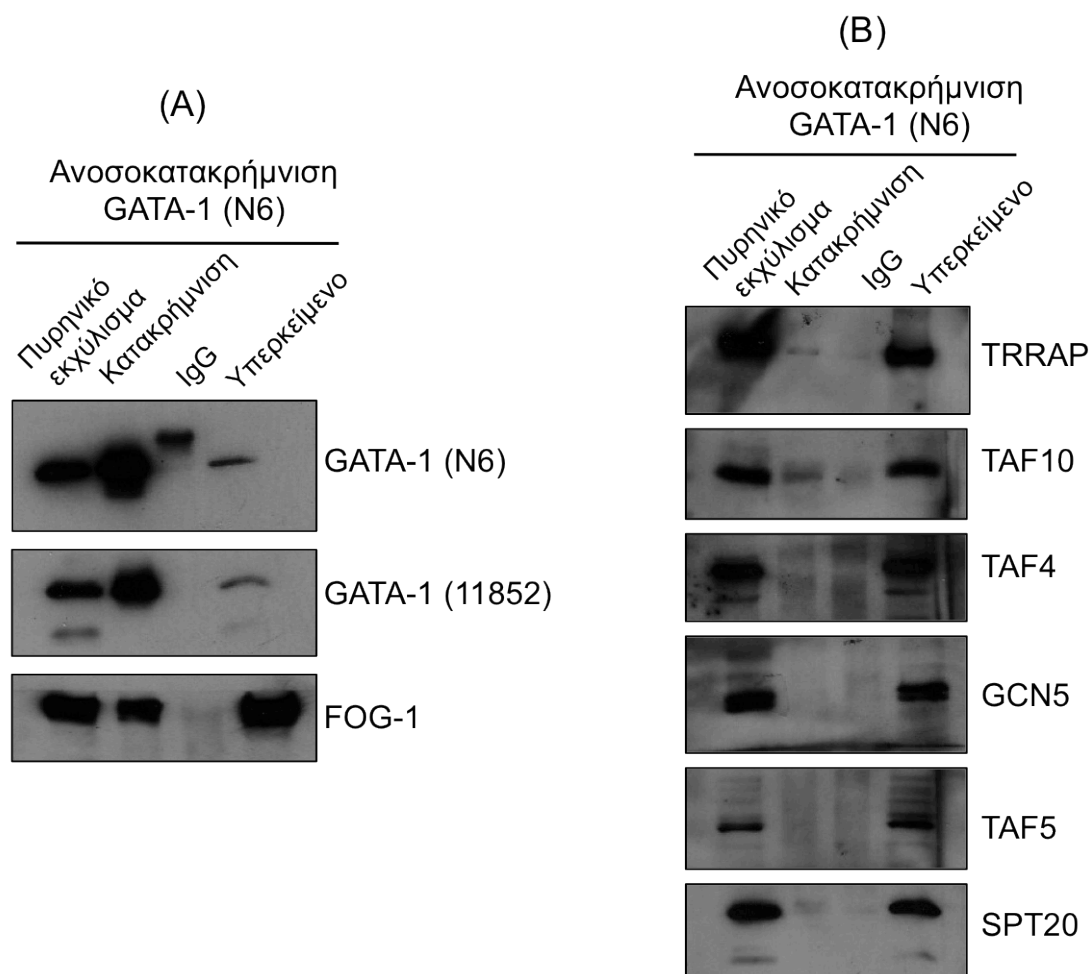
Εικόνα 24. Τα αντισώματα για τις TAF είναι λειτουργικά και τις ανιχνεύουν στα πυρηνικά εκχυλίσματα *BirA MEL*. Πυρηνικά εκχυλίσματα από διαφοροποιημένα κύτταρα *BirA MEL* το οποία παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο RIPA υποβλήθηκαν σε ανοσοαποτύπωση κατά Western για την παρουσία των πρωτεϊνών: TRRAP, GCN5, TAF10, TAF4, TAF5, TAF5, TAF6 και SPT20.

Η λειτουργικότητα των αντισωμάτων επιτρέπει τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της GATA-1 και των TAF όπως αυτές προέκυψαν από τη φασματομετρία μάζας. Για να επιβεβαιωθούν οι συγκεκριμένες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, παρασκευάστηκαν πρωτεϊνικά πυρηνικά εκχυλίσματα RIPA (χωρίς SDS). Συγκρίνοντας τους πίνακες παρατηρούμε ότι υπάρχει διαφορεική ταυτοποίηση των πρωτεϊνών πχ. οι πρωτεΐνες GCN5 και SPT20 δεν ανιχνεύονται καθόλου στο κατακρημνισμένο υλικό από RIPA ενώ ανιχνεύονται στο NUN. Ενώ αντίστροφα οι πρωτεΐνες TRRAP ταυτοποιούνται με μεγαλύτερη βεβαιότητα στις συγκατακρημνισμένες πρωτεΐνες από

εκχύλισμα NUN. Ωστόσο η χρήση της μεθόδου RIPA οδηγεί στην ταυτοποίηση μεγαλύτερου αριθμού πρωτεϊνών TAF, για το λόγο αυτό επιλέχθηκε η πειραματική επιβεβαίωση αλληλεπιδράσεων σε εκχυλίσματα RIPA.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω προετοιμάστηκαν πυρηνικά εκχυλίσματα διαφοροποιημένων κυττάρων BirA MEL χρησιμοποιώντας RIPA (χωρίς SDS). Τα πυρηνικά εκχυλίσματα αφού επεξεργάστηκαν επιπλέον με βενζονάση για την απομάκρυνση του DNA, RNA χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοκατακρήμνιση της ενδογενούς GATA-1 πρωτεΐνης και το κατακρημνισμένο υλικό αναλύθηκε με Western για την συγκατακρήμνιση των πρωτεϊνών: GCN5 (026), SPT20 (027), TAF10 (028), TAF4 (029), TAF5 (030), TAF6 (031) και TRAPP (025) (Εικόνα 23). Παράλληλα έγινε ανίχνευση της FOG-1 πρωτεΐνης ως θετικός μάρτυρας αλληλεπίδρασης με την GATA-1.

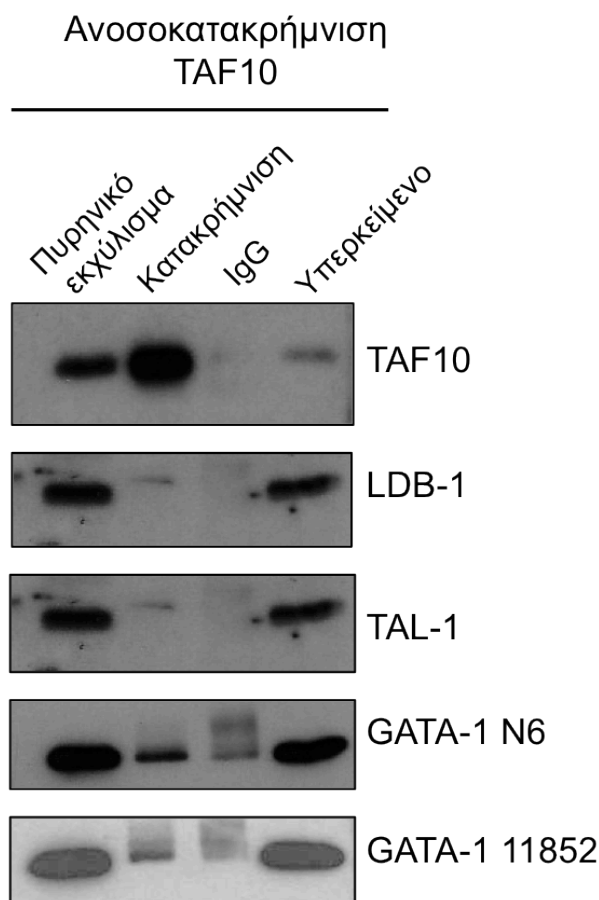
Από την ανάλυση με Western γίνεται αντιληπτό ότι η πρωτεΐνη GATA - 1 κατακρημνίζεται επιτυχώς με τη χρήση του αντισώματος 001. Η κατακρήμνιση είναι αρκετά αποτελεσματική καθώς παραμένει αρκετά λιγότερη ποσότητα πρωτεΐνης GATA - 1 στο υπερκείμενο. Για την ανίχνευση της GATA-1 χρησιμοποιήθηκαν δυο αντισώματα: το 001 (με το οποίο έγινε και η ανοσοκατακρήμνιση) αλλά και με το 003 ώστε να επιβεβαιωθεί ότι δεν υπάρχει μη ειδική κατακρήμνιση της GATA - 1 από την IgG (background). Με την πρωτεΐνη GATA-1 συγκατακρημνίζεται και η FOG-1 γεγονός το οποίο υποδηλώνει την παρουσία αναγνωρισμένων πρωτεϊνικών συμπλόκων της GATA - 1 (Εικόνα 25 A). Χρησιμοποιώντας αντισώματα για τις πρωτεΐνες GCN5, SPT20, TAF10, TAF4, TAF5, TAF6 και TRAPP φαίνεται πως μόνο για την πρωτεΐνη TAF10 ανιχνεύεται αλληλεπίδραση με την GATA-1 η οποία όμως είναι σχετικά ασθενής καθώς δεν συγκατακρημνίζεται μεγάλη ποσότητα αυτής. Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της φασματομετρίας μάζας οι υπόλοιπες πρωτεΐνες που εξετάστηκαν (TRRAP, TAF4, GCN5, TAF5 και SPT20) δεν συγκατακρημνίζονται με την GATA-1 (Εικόνα 25 B).



Εικόνα 25. Η GATA-1 αλληλεπιδρά μόνο με την TAF10. Σε πυρηνικά εκχυλίσματα διαφοροποιημένων κυττάρων BirA MEL με τη μέθοδο RIPA έγινε ανοσοκατακρήμνιση της ενδογενούς GATA-1 με τη χρήση του αντισώματος για τη GATA-1 N6 (001). Το κατακρημνισμένο υλικό παράλληλα με το τυφλό IgG αναλύθηκαν με Western για την παρουσία των πρωτεϊνών: (A) GATA-1 (001 N6 και 003 11852) και FOG-1 (006 A20), (B) GCN5 (026), SPT20 (027), TAF10 (028), TAF4 (029), TAF5 (030), TAF6 (031) και TRAPP (025). Για την κατακρήμνιση χρησιμοποιήθηκαν 500μg πυρηνικού εκχυλίσματος (για κάθε κατακρήμνιση) ενώ για το πυρηνικό εκχύλισμα και το υπερκείμενο φορτώθηκε το 10% το συνολικού εκχυλίσματος.

Για να επιβεβαιωθεί η αλληλεπίδραση που ανιχνεύεται μεταξύ GATA -1 και TAF10, πραγματοποιήθηκε αντίστροφο πείραμα ανοσοκατακρήμνισης της TAF10 σε πυρηνικά εκχυλίσματα διαφοροποιημένων κυττάρων BirA και ανίχνευση της GATA-1 πρωτεΐνης. Όπως και προηγουμένως τα πυρηνικά εκχυλίσματα υπέστησαν πέψη με βενζονάση για την απομάκρυνση των

νουκλεϊκών οξέων. Μετά την ανοσοκατακρήμνιση ακολούθησε ανάλυση με Western όπου έγινε χρήση των αντισωμάτων GATA-1 001, GATA-1 003, LDB-1 και TAL-1 (Εικόνα 26).



Εικόνα 26. Η TAF10 αλληλεπιδρά με τη GATA-1. Σε πυρηνικά εκχυλίσματα διαφοροποιημένων κυττάρων BirA MEL με τη μέθοδο RIPA έγινε ανοσοκατακρήμνιση της ενδογενούς TAF10 με τη χρήση του αντισώματος για τη TAF10 (028). Το κατακρημνισμένο υλικό παράλληλα με το τυφλό IgG αναλύθηκαν με Western για την παρουσία των πρωτεϊνών: GATA-1 (001 N6 και 003 11852), LDB-1, TAL-1 και TAF10 (028). Για την κατακρήμνιση χρησιμοποιήθηκαν 500μg πυρηνικού εκχυλίσματος (για κάθε κατακρήμνιση) ενώ για το πυρηνικό εκχύλισμα και το υπερκείμενο φορτώθηκε το 10% το συνολικού εκχυλίσματος.

Ο λόγος για τον οποίο επιλέξαμε να ελέγξουμε το κατά πόσο η TAF10 αλληλεπιδρά με τους αιμοποιητικούς μεταγραφικούς παράγοντες ήταν α) διότι έχει αναφερθεί και στο παρελθόν αλληλεπίδραση των TAFs με συγκεκριμένους αιμοποιητικούς μεταγραφικούς παράγοντες όπως TAL-1, EKLF1 (173) και β) διότι ύστερα από κατακρήμνιση της TAF10 σε συνδυασμό

με φασματομετρία μάζας ταυτοποιήθηκαν οι πρωτεΐνες TAL-1 και LDB-1 (Πέτρος Παπαδόπουλος, Erasmus Medical Center, προσωπική επικοινωνία, μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Παρατηρείται ότι η κατακρήμνιση της πρωτεΐνης TAF10 συγκατακρημνίζει τη GATA-1 όχι όμως και τις TAL-1 και LDB-1. Όπως και στην περίπτωση της GATA-1, έτσι και η TAF10 φαίνεται να αλληλεπιδρά ασθενώς με την GATA-1. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν την αλληλεπίδραση της GATA-1 με την TAF10 σε κύτταρα MEL, η οποία όμως, κρίνοντας από τις ποσότητες των δύο ανοσοκατακρημνισμένων πρωτεϊνών, φαίνεται να είναι ασθενής.

Ανακεφαλαιώνοντας τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρείται γενικότερα ότι οι πρωτεΐνες που ταυτοποιούνται από τη φασματομετρία μάζας δεν είναι απαραίτητο να σχηματίζουν πραγματικά πρωτεϊνικά σύμπλοκα και απαιτείται επιβεβαίωση μέσω ανοσοκατακρήμνισης της ενδογενούς πρωτεΐνης από πυρηνικά εκχυλίσματα τα οποία έχουν υποστεί πέψη με βενζονάση. Στην περίπτωση των παραγόντων TAF που μελετήθηκε, διαπιστώνεται ότι ενώ από τη φασματομετρία μάζας προκύπτει ότι η GATA - 1 αλληλεπιδρά με αρκετές TAF αλλά και πρωτεΐνες του συμπλόκου SAGA, στις ανοσοκατακρημνίσεις της ενδογενούς GATA-1 δεν παρατηρείται κάτι τέτοιο. Να σημειωθεί ότι τα πυρηνικά εκχυλίσματα BirA και bio-GATA-1 τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη φασματομετρία μάζας δεν είχαν υποβληθεί σε επεξεργασία με βενζονάση, καθώς από τη ανάλυσή τους προέκυψε η αναγκαιότητα επεξεργασίας με νουκλεάσες για τη μείωση της μη ειδικής πρόσδεσης. Όπως έχει αναφερθεί και στο παρελθόν, η παρουσία νουκλεϊκών οξέων και ιδιαίτερα του DNA είναι ικανή να οδηγήσει στην ανίχνευση ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων εξαιτίας εγγύτητας των πρωτεϊνών που προσδένονται στο DNA χωρίς όμως αυτές να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους (170). Ουσιαστικά η απομάκρυνση του DNA στις ανοσοκατακρημνίσεις των ενδογενών πρωτεϊνών έδειξε ότι πολλές από τις αλληλεπιδράσεις της GATA - 1 με τις TAF δεν είναι πραγματικές ακόμα και αν ανιχνεύονται με υψηλή βαθμολογία και μεγάλο αριθμό πεπτιδίων από τη φασματομετρία μάζας. Παρόλα αυτά, επιβεβαιώνεται η αλληλεπίδραση της GATA-1 με την TAF10 παρόλο που στη φασματομετρία μάζας δεν έχει υψηλή βαθμολογία και ανιχνεύεται με χαμηλό αριθμό πεπτιδίων. Συνεπώς καταλήγουμε στο

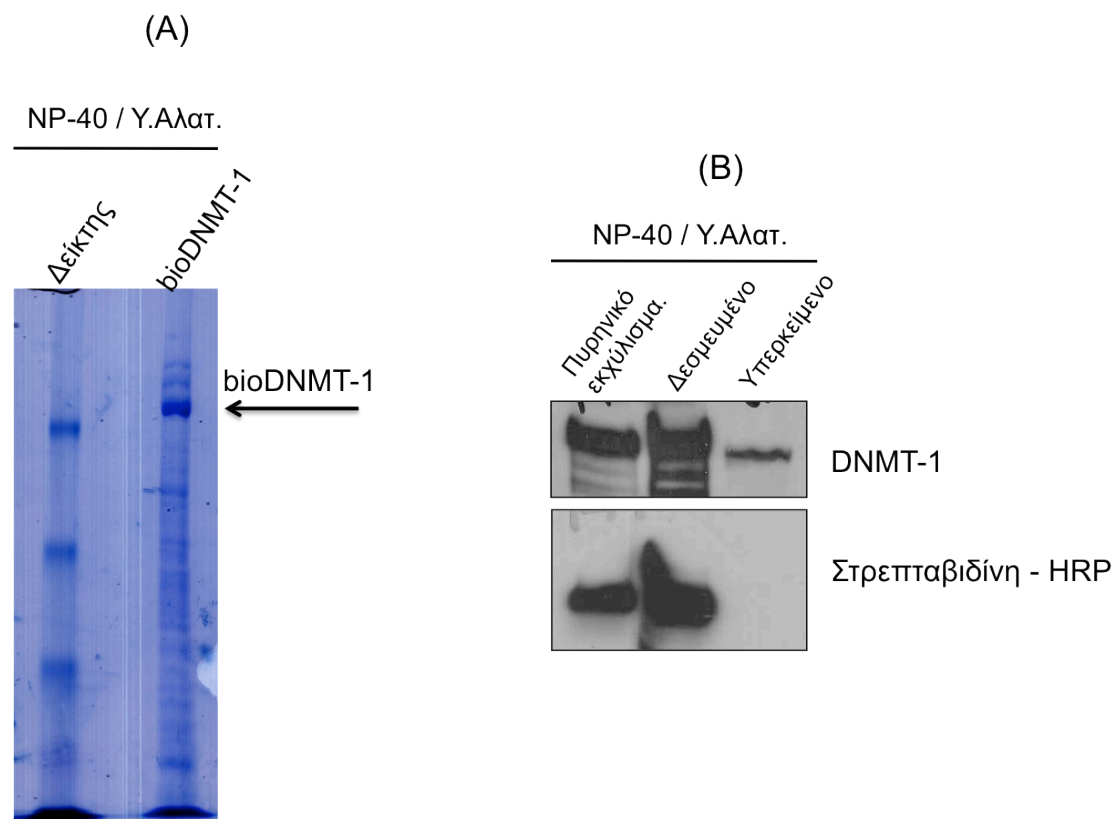
συμπέρασμα ότι τα αποτελέσματα της φασματομετρίας μάζας που αφορούν την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών θα πρέπει να επιβεβαιώνονται με κατακρήμνισεις (τουλάχιστον) ώστε να αποκλειστεί το γεγονός του λάθους.

4.3 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ DNMT-1 ΜΕ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

4.3.1 Μεγάλης κλίμακας κατακρήμνιση της DNMT-1

Όπως προέκυψε από την ανάλυση των αποτελεσμάτων φασματομετρίας μάζας της βιοτινυλιωμένης GATA-1, άλλη μια από τις πρωτεΐνες που ταυτοποιείται ως πιθανώς αλληλεπιδρώσα με την GATA-1 και που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης είναι η DNMT-1 DNA μεθυλτρανσφεράση. Ταυτόχρονα έλαβε χώρα και το αντίστροφο πείραμα, δηλαδή μεγάλης κλίμακας κατακρήμνιση της βιοτινυλιωμένης DNMT-1 σε διαφοροποιημένα κύτταρα MEL και στη συνέχεια φασματομετρία μάζας για την ανάλυση του κατακρημνισμένου υλικού. Το κατακρημνισμένο υλικό αναλύθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης συγκέντρωσης 6% και σε φασματομετρία μάζας υποβλήθηκε ολόκληρη η ζώνη (Εικόνα 27 Α). Παράλληλα με ανοσοαποτύπωση κατά Western έγινε ανάλυση της αποτελεσματικότητας της κατακρήμνισης της βιοτινυλιωμένης πρωτεΐνης (Εικόνα 27 Β).

Να σημειωθεί ότι για την παραγωγή των πυρηνικών εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε NP-40 σε συνδυασμό με διάλυμα υψηλής αλατότητας. Παρατηρούμε ότι μετά την κατακρήμνιση της DNMT-1 δεν ανιχνεύεται καθόλου βιοτινυλιωμένη πρωτεΐνη στο υπερκείμενο κλάσμα. Η μεγάλη κλίμακας κατακρήμνιση της DNMT-1 επαναλήφθηκε άλλες δυο φορές και το υλικό αναλύθηκε με φασματομετρία μάζας. Σε όλα τα παραπάνω πειράματα όπως και αυτά που θα ακολουθήσουν, τα πυρηνικά εκχυλίσματα έτυχαν επεξεργασίας με τις κατάλληλες νουκλεάσες για την απομάκρυνση του DNA και RNA.



Εικόνα 27. Μεγάλης κλίμακας κατακρήμνιση στρεπταβιδίνης σε πυρηνικά εκχυλίσματα bioDNMT1 παρασκευασμένα με χρήση διαλύματος υψηλής αλατότητας. (A) 30 mg πρωτεϊνικού πυρηνικού εκχυλίσματος από διαφοροποιημένα κύτταρα bioDNMT-1 MEL παρασκευασμένα με τη χρήση NP-40 / υψηλής αλατότητας υποβλήθηκαν σε κατακρήμνιση στρεπταβιδίνης. Το κατακρημνισμένο υλικό αναλύθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 6% με χρώση Colloidal Coomassie Blue G-250 και στη συνέχεια ολόκληρη η ζώνη υποβλήθηκε σε φασματομετρία μάζας. (B) Μέρος του κατακρημνισμένου υλικού αναλύθηκε με Western χρησιμοποιώντας αντίσωμα για την πρωτεΐνη DNMT-1 (010) και στρεπταβιδίνη – HRP. Για το πυρηνικό εκχύλισμα και το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε το 2% του συνολικού εκχυλίσματος.

4.3.2 Ανάλυση αποτελεσμάτων φασματομετρίας μάζας της κατακρημνισμένης bio-DNMT-1.

Από τα τρία πειράματα φασματομετρίας μάζας ταυτοποιήθηκε ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών που φέρονται να αλληλεπιδρούν με τη DNMT-1. Στις πρωτεΐνες που αναγνωρίστηκαν υπήρχαν αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες με αιμοποιητικούς αλλά και ευρύτερους ρόλους (Πίνακας 11). Από τα αποτελέσματα της φασματομετρίας μάζας παρατηρείται ότι όχι μόνο

ανιχνεύεται η GATA-1 αλλά επίσης και οι πρωτεΐνες ZBP-89, ZNF143, Gfi-1b και FOG-1 που είναι γνωστό ότι σχηματίζουν σύμπλοκα με τη GATA-1

Ειδικότερα είναι γνωστό ότι η DNMT-1 πέρα από το ρόλο που έχει να διατηρεί τη μεθυλίωση του DNA κατά τη διάρκεια της αντιγραφής εμφανίζεται επίσης να αλληλεπιδρά με αρκετούς μεταγραφικούς παράγοντες (174). Ωστόσο στη συγκεκριμένη δημοσίευση η ανίχνευση των αλληλεπιδράσεων γίνεται από υβριδισμό της DNMT-1 σε συστοιχία από μεταγραφικούς παράγοντες. Τα αποτελέσματα από τη φασματομετρία συνάδουν με τη συγκεκριμένη δημοσίευση όσο αφορά τη GATA-1. Από την βιβλιογραφία γνωρίζουμε επίσης ότι προκειμένου να υπάρξει φυσιολογική ερυθροποίηση είναι απαραίτητος ο ευρεία εκφραζόμενος μεταγραφικός παράγοντας ZBP-89 ο οποίος αλληλεπιδρά με την GATA-1. (169).

Πίνακας 11. Η πρωτεΐνη DNMT-1 φέρεται να αλληλεπιδρά με αρκετούς μεταγραφικούς παράγοντες. Συγκεντρωτικός πίνακας των μεταγραφικών παραγόντων που ταυτοποιήθηκαν από φασματομετρία μάζας στο κατακρημνισμένο υλικό πυρηνικών εκχυλισμάτων υψηλής αλατότητας της βιοτινυλιωμένης DNMT-1 (Εικόνα 25).

	Πείραμα #1			Πείραμα #2			Πείραμα #3		
	Πεπτίδια		% κάλυψη πρωτεΐνης	Πεπτίδια		% κάλυψη πρωτεΐνης	Πεπτίδια		% κάλυψη πρωτεΐνης
Πρωτεΐνη	Μοναδικά	Συνολικά		Μοναδικά	Συνολικά		Μοναδικά	Συνολικά	
DNMT-1	106	2690	67,1	108	2579	69,4	91	3261	58
ZBP-89	15	38	36,3	12	29	24,1	15	49	33
Gfi-1b	6	12	30,6	7	13	34,5	2	2	10,9
GATA-1	2	4	5,1	5	8	23,5	1	1	2,4
ZNF143	2	2	7,3	3	3	11,8	5	11	14,9
RBP-J	5	8	13,6	5	6	11,8	4	6	9,9
NFI-A	5	5	16,1	4	4	10	6	6	24,6
NFI-X	4	5	12,7	7	8	22,4	2	2	5,1
YY1	6	8	26,3	-	-	-	10	25	30
SAFB1	2	3	4,1	6	13	9,2	-		-
FOG-1	-	-	-			-	2	3	3,4

Επίσης είναι γνωστό ότι στα μεγακαρυοκύτταρα υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών GATA-1 / FOG-1 / ZBP-89 και

ZNF143 (92). Άλλος ένας μεταγραφικός παράγοντας που αναγνωρίζεται είναι ο Gfi-1b που και αυτός είναι γνωστό ότι βρίσκεται σε σύμπλοκο με τη GATA-1 (175). Από τα τρία πειράματα φασματομετρίας μάζας της DNMT-1 μόνο σε ένα ταυτοποιείται η πρωτεΐνη FOG-1. Άλλες πρωτεΐνες που αναγνωρίζονται είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες RBP-J, NF-1A, NF-1X, YY1 και SAF-B1. Οι συγκεκριμένοι μεταγραφικοί παράγοντες είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι εμπλέκονται στην αιματοποίηση. Η RBP-J εμπλέκεται στη σηματοδοτική πορεία Notch, όπως και στη διατήρηση των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων (HSC) ενώ στην ερυθροποίηση εμφανίζεται να έχει αντιαποπτοτικές ιδιότητες (176), (177). Η SAFB-1 έχει ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών καθώς εμπλέκεται σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες όπως η κυτταρική ανάπτυξη, η απόπτωση και η απάντηση στο στρες (178). Σε ποντίκια όπου έχει γίνει αποσιώπηση του γονιδίου εμφανίζεται ερυθροποιητικός φαινότυπος. Η YY1 είναι μέλος των πρωτεϊνών Polycomb και ενδεχομένως να συμμετέχει στην ρύθμιση των γονιδίων των σφαιρινών. Η NF-1A προωθεί τη διαφοροποίηση των ερυθρών κυττάρων μέσα από τη ενεργοποίηση των σφαιρινών και τη καταστολή των γονιδίων της μυελοποίησης

4.3.3 Επαλήθευση αποτελεσμάτων φασματομετρίας μάζας με κατακρήμνιση βιοτινυλιωμένης DNMT-1.

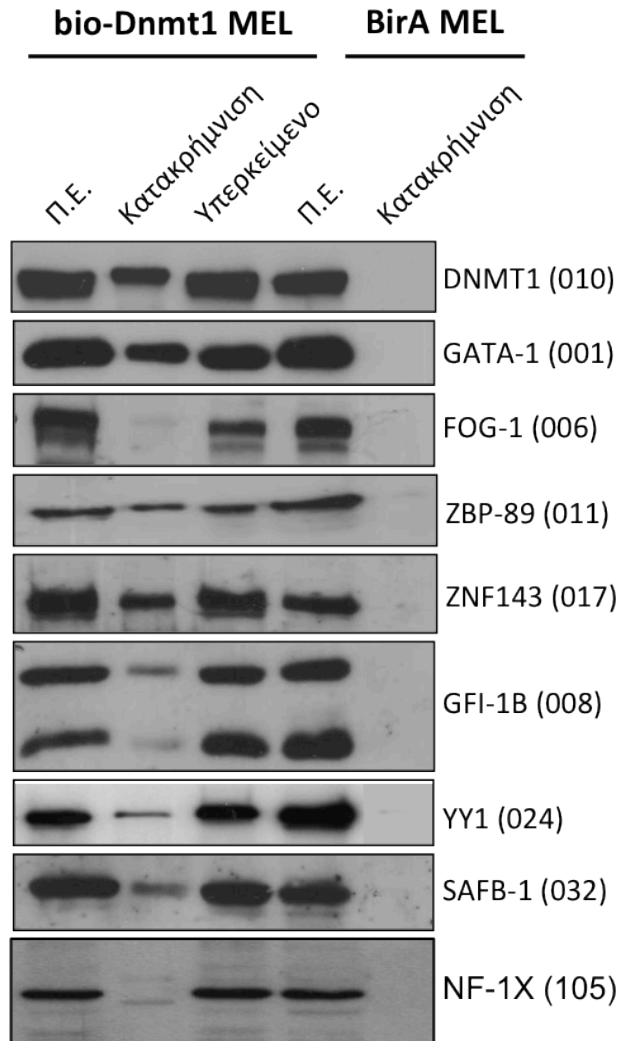
Το πρώτο βήμα για να επαληθεύσουμε κατά πόσο οι πρωτεΐνες που αναγνωρίζονται μέσω φασματομετρίας μάζας όντως αλληλεπιδρούν με τη DNMT-1, προχωρήσαμε σε κατακρήμνιση στρεπταβιδίνης με πυρηνικά εκχυλίσματα από διαφοροποιημένα bio-DNMT-1 MEL κύτταρα και ακολούθησε ανάλυση της κατακρήμνισης για τους μεταγραφικούς παράγοντες που ταυτοποιήθηκαν από τη φασματομετρία μάζας με ανοσοαποτύπωση κατά Western (Εικόνα 28). Παρατηρούμε ότι σχεδόν όλοι οι μεταγραφικοί παράγοντες (εκτός του NF-1X) που ανιχνεύθηκαν με φασματομετρία μάζας κατακρημνίζονται με τη βιοτινυλιωμένη DNMT-1 στα εκχυλίσματα των κυττάρων bio-DNMT-1, χωρίς αυτό να παρατηρείται στα BirA εκχυλίσματα τα οποία αποτελούν αρνητικό μάρτυρα. Η κατακρήμνιση με στρεπταβιδίνη αποτελεί μια πρώτη απόδειξη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της DNMT-1 και των μεταγραφικών παραγόντων.

Από τα αποτελέσματα της φασματομετρίας μάζας εκτός από μεταγραφικούς παράγοντες ταυτοποιήθηκαν και πρωτεΐνες που απαρτίζουν το σύμπλοκο NuRD αλλά και HDACs. Πειραματικά έχειδειχθεί ότι η DNMT-1 αλληλεπιδρά με τις HDAC-1 (179) και HDAC-2 (108) όπως επίσης με τις MBD2 και MBD3 (180). Για αυτό το λόγο όπως και προηγουμένως προχωρήσαμε σε κατακρήμνιση στρεπταβιδίνης σε διαφοροποιημένα bioDNMT-1 MEL κύτταρα χρησιμοποιώντας BirA MEL ως αρνητικό μάρτυρα. Η ανάλυση της κατακρήμνισης έγινε με ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας αντισώματα για τις πρωτεΐνες που απαρτίζουν το σύμπλοκο NuRD και HDACs (Εικόνα 29).

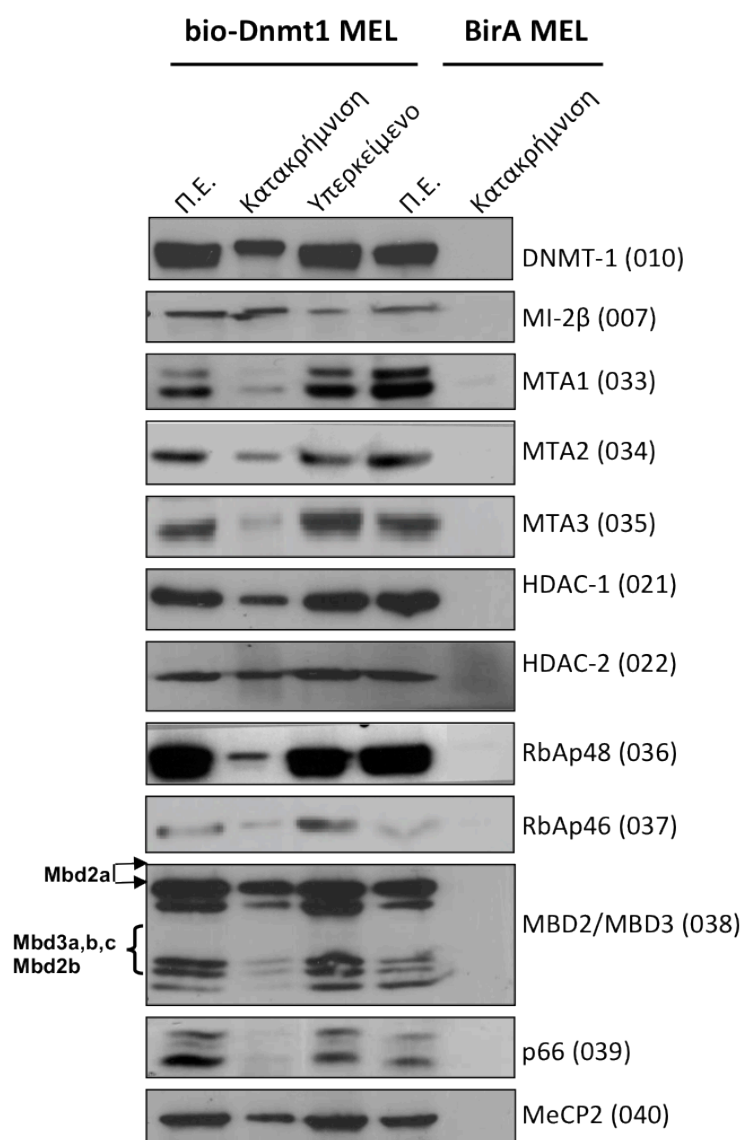
Από την ανοσοκατακρήμνιση στρεπταβιδίνης διαπιστώνουμε ότι η βιοτινυλιωμένη DNMT-1 συγκατακρημνίζεται με τις πρωτεΐνες που απαρτίζουν το σύμπλοκο NuRD. Συγκεκριμένα διαπιστώνεται αλληλεπίδραση με τις HDAC-1, HDAC-2 και RbAp46, RbAp48 τον πυρήνα δηλαδή του αυμπλόκου. Η αλληλεπίδραση της DNMT-1 με τις HDACs είναι σύμφωνη και με την βιβλιογραφία (179),(108).

Επιπρόσθετα διερευνήθηκε αν με την DNMT-1 συγκατακρημνίζεται η πρωτεΐνη p66 που έχει αναφερθεί ως μέλος του NuRD συμπλόκου (181) ωστόσο δεν ανιχνεύθηκε αισθητή αλληλεπίδραση. Επίσης, υπήρχε συγκατακρήμνιση της DNMT-1 με την MeCP2 η οποία ανήκει στην κατηγορία πρωτεϊνών που φέρουν δομή δέσμευσης μεθυλομάδων (methyl binding domain, MBD) και εμπλέκεται στη σίγαση της μεταγραφής (182). Στην ίδια κατηγορία ανήκουν και οι MBD2 και MBD3.

Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω, διαπιστώθηκε ότι οι πρωτεΐνες που ταυτοποιούνται από τη φασματομετρία μάζας ως πιθανώς συμπλεκόμενες με τη βιοτινυλιωμένη DNMT-1 συγκατακρημνίζονται χρησιμοποιώντας σφαιρίδια στρεπταβιδίνης, προσδίδοντας έτσι τη πρώτη απόδειξη ότι η DNMT-1 αλληλεπιδρά με τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Τα παραπάνω αποτελέσματα ενισχύονται περισσότερο από το γεγονός ότι ανιχνεύουμε την αλληλεπίδραση της DNMT-1 με τις πρωτεΐνες HDACs, αλληλεπιδράσεις οι οποίες έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία κατά το παρελθόν.



Εικόνα 28. Η βιοτινυλιωμένη DNMT-1 αλληλεπιδρά με τους μεταγραφικούς παράγοντες που ανιχνεύθηκαν από τη φασματομετρία μάζας. Σε πυρηνικά εκχυλίσματα διαφοροποιημένων κυττάρων bio-DNMT-1 και BirA που παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας NP-40 / διάλυμα υψηλής αλατότητας έγινε κατακρήμνιση με σφαιρίδια στρεπταβιδίνης των βιοτινυλιωμένων πρωτεϊνών. Το κατακρημνισμένο υλικό αναλύθηκε για την παρουσία των πρωτεϊνών: DNMT-1 (010), GATA-1 (001), FOG-1(006), ZBP-89 (011), ZNF143 (017), Gfi-1b (008), YY1 (024), SAFB-1 (032), και NF-1X (105). (Χρησιμοποιήθηκε 5% του συνολικού πυρηνικού εκχυλίσματος της κατακρήμνισης για τα κλάσματα του πυρηνικού εκχυλίσματος και του υπερκείμενου. Τα πυρηνικά εκχυλίσματα επεξεργάστηκαν πριν από την κατακρήμνιση για την αφαίρεση των νουκλεϊκών οξέων.)

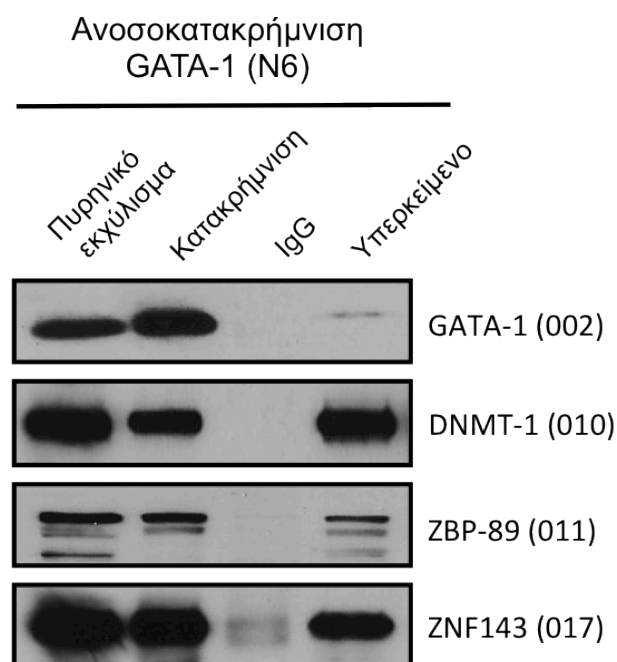


Εικόνα 29. Η βιοτινυλιωμένη *DNMT-1* αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες του συμπλόκου *NuRD* και *HDACs* που ταυτοποιήθηκαν από τη φασματομετρία μάζας ύστερα από κατακρήμνιση στρεπταβιδίνης. Σε πυρηνικά εκχυλίσματα διαφοροποιημένων κυττάρων *bio-DNMT-1* και *BirA* που παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας NP-40 / διάλυμα υψηλής αλατότητας έγινε κατακρήμνιση με σφαιρίδια στρεπταβιδίνης των βιοτινυλιωμένων πρωτεϊνών. Το κατακρημνισμένο υλικό αναλύθηκε για την παρουσία των πρωτεϊνών: *DNMT-1* (010), *Mi-2b* (007), *MTA1*(033), *MTA2* (034), *MTA3* (035), *HDAC-1* (008), *HDAC-2* (022), *RbAp48* (036), *RbAp46* (037), *MBD2/3* (038), *p66*. (Χρησιμοποιήθηκε 5% του συνολικού πυρηνικού εκχυλίσματος της κατακρήμνισης για τα κλάσματα του πυρηνικού εκχυλίσματος και του υπερκείμενου. Τα πυρηνικά εκχυλίσματα έτυχαν επεξεργασίας πριν από την κατακρήμνιση για την αφαίρεση των νουκλεϊκών οξέων).

4.3.4 Επαλήθευση αποτελεσμάτων της φασματομετρίας μάζας με χρήση ανοσοκατακρήμνισης των ενδογενών πρωτεϊνών.

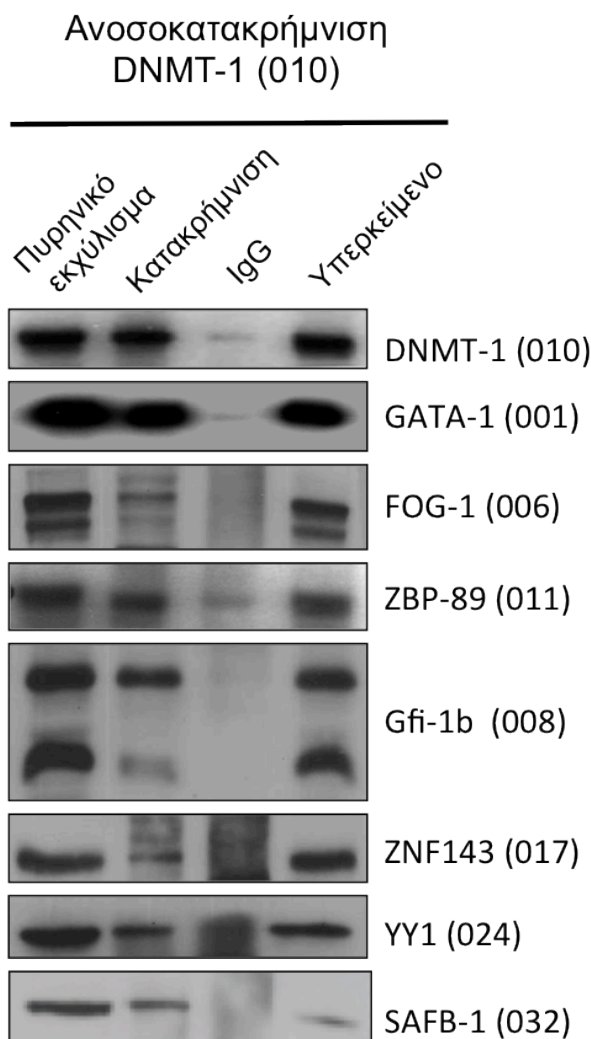
Στα παραπάνω πειράματα που έγιναν για τη διερεύνηση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών DNMT-1 και GATA-1 έγινε κατακρήμνιση των βιοτινυλιωμένων πρωτεϊνών (είτε GATA-1 είτε DNMT-1). Για να αποκλειστεί το ενδεχόμενο ότι οι συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις που περιγράφονται είναι πραγματικές η κατακρήμνιση στρεπταβιδίνης δεν είναι αρκετή διότι στηρίζεται στην κατακρήμνιση σημασμένων πρωτεϊνών σε επιμολυσμένα κύτταρα. Για το λόγο αυτό λοιπόν προχωρήσαμε με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων σε ανοσοκατακρημνίσεις των ενδογενών πρωτεϊνών σε κύτταρα αγρίου τύπου.

Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα C88 MEL στα οποία έγινε επαγωγή της διαφοροποίησης όπως είχε συμβεί και στα προηγούμενα πειράματα με τα bioGATA-1, bioDNMT-1 και BirA. Στα πυρηνικά εκχυλίσματα (NP-40 / Υψηλής αλατότητας) των C88 κυττάρων ανοσοκατακρημνίστηκε η ενδογενής πρωτεΐνη GATA-1 και το κατακρημνισμένο υλικό αναλύθηκε για την παρουσία των πρωτεϊνών DNMT-1, ZBP-89 και ZNF143 (Εικόνα 30). Η ανοσοκατακρήμνιση της ενδογενούς GATA-1 είναι επιτυχής και για την ανίχνευση της πρωτεΐνης GATA-1 χρησιμοποιήθηκε διαφορετικό αντίσωμα από αυτό της κατακρήμνισης ώστε να μην υπάρχει διασταυρούμενη αντίδραση η οποία θα εμφανίζεται στην ανοσοαποτύπωση κατά Western. Διαπιστώνεται ότι η ενδογενής GATA-1 συγκατακρημνίζεται επιτυχώς με τη DNMT-1 ενώ στη ζώνη του αρνητικού μάρτυρα δεν ανιχνεύονται πρωτεΐνες. Ταυτόχρονα με την DNMT-1 ελέγχθηκε και η παρουσία των πρωτεϊνών ZBP-89 και ZNF143 που όπως έχουμε αναφέρει είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία (169), (92) ότι αλληλεπιδρούν. Να σημειωθεί ωστόσο ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ του GATA-1 και του ZNF143 δεν έχει αναφερθεί σε διαφοροποιημένα ερυθροκύτταρα αλλά μόνο σε μεγακαρυοκύτταρα (92).

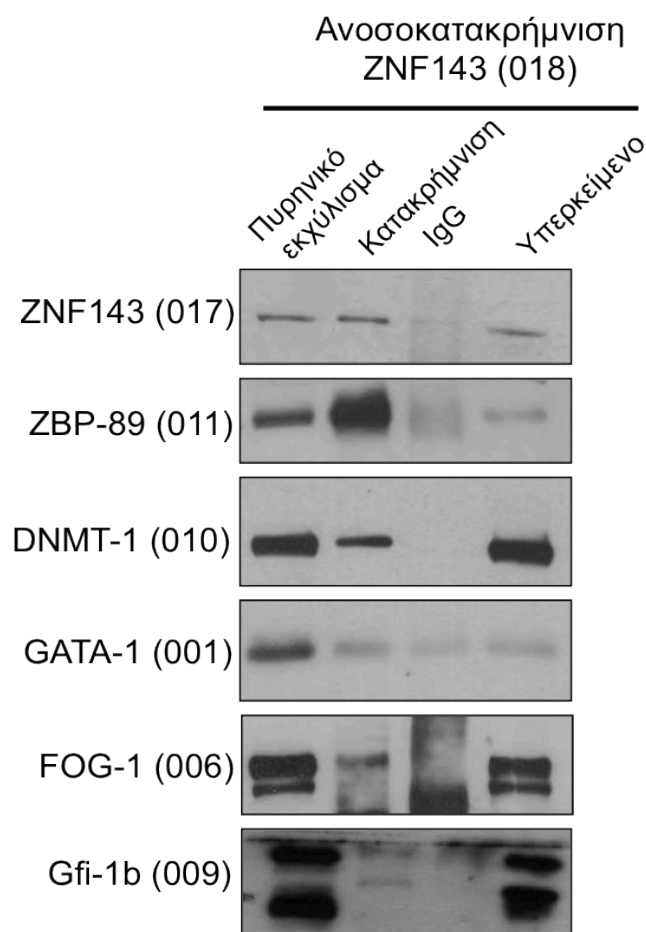


Εικόνα 30. Η πρωτεΐνη GATA-1 αλληλεπιδρά με την DNMT-1 σε κύτταρα MEL. Σε πυρηνικά εκχυλίσματα διαφοροποιημένων κυττάρων C88 MEL με τη μέθοδο NP-40 / Υψηλής αλατότητας έγινε ανοσοκατακρήμνιση της ενδογενούς GATA-1 με τη χρήση του αντισώματος για τη GATA-1 (001). Το κατακρημνισμένο υλικό παράλληλα με το τυφλό IgG αναλύθηκαν με Western για την παρουσία των πρωτεϊνών: GATA-1 (002), DNMT-1 (010), ZBP-89 (011) και ZNF143 (017). Για την κατακρήμνιση χρησιμοποιήθηκαν 500μg πυρηνικού εκχυλίσματος (για κάθε κατακρήμνιση) ενώ για το πυρηνικό εκχύλισμα και το υπερκείμενο φορτώθηκε το 5% το συνολικού εκχυλίσματος.

Αντίστροφα, ελέγχθηκε κατά πόσο η ενδογενής DNMT-1 συγκατακρημνίζεται με τους συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες όπως συμβαίνει παραπάνω με την κατακρήμνιση στρεπταβιδίνης. Για αυτό το λόγο έγινε ανοσοκατακρήμνιση της ενδογενούς DNMT-1 σε πυρηνικά εκχυλίσματα διαφοροποιημένων κυττάρων C88 MEL και το κατακρημνισμένο υλικό αναλύθηκε για την παρουσία των πρωτεϊνών GATA-1, FOG-1, ZBP-89, Gfi-1b και ZNF143 (Εικόνα 31).



Εικόνα 31. Η ενδογενής πρωτεΐνη *DNMT-1* αλληλεπιδρά με *GATA-1* και άλλους αιμοποιητικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Σε πυρηνικά εκχυλίσματα διαφοροποιημένων κυττάρων C88 MEL με τη μέθοδο NP-40 / Υψηλής αλατότητας έγινε ανοσοκατακρήμνιση της ενδογενούς *DNMT-1* με τη χρήση του αντισώματος για τη *DNMT-1* (010). Το κατακρημνισμένο υλικό παράλληλα με το τυφλό IgG αναλύθηκαν με *Western* για την παρουσία των πρωτεϊνών: *GATA-1* (001), *DNMT-1* (010), *ZBP-89* (011), *ZNF143* (017), *FOG-1* και *Gfi-1b*. Για την κατακρήμνιση χρησιμοποιήθηκαν 500μg πυρηνικού εκχυλίσματος (για κάθε κατακρήμνιση) ενώ για το πυρηνικό εκχύλισμα και το υπερκείμενο φορτώθηκε το 5% το συνολικού εκχυλίσματος.

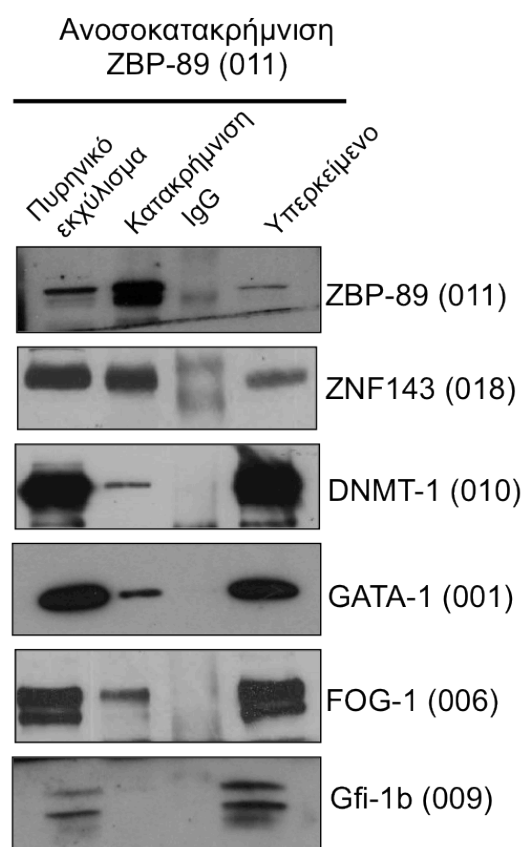


Εικόνα 32. Η ανοσοκατακρήμνιση της πρωτεΐνης ZNF143 επαληθεύει την ύπαρξη του συμπλόκου **GATA-1/DNMT-1/ZNF143/ZBP-90/FOG-1**. Σε πυρηνικά εκχυλίσματα διαφοροποιημένων κυττάρων C88 MEL με τη μέθοδο NP-40 / Υψηλής αλατότητας έγινε ανοσοκατακρήμνιση της ενδογενούς ZNF143 με τη χρήση του αντισώματος για ZNF143 (018). Το κατακρημνισμένο υλικό παράλληλα με το τυφλό IgG αναλύθηκαν με Western για την παρουσία των πρωτεϊνών: GATA-1 (001) DNMT-1 (010), ZBP-89 (011), ZNF143 (017), FOG-1 (006) και Gfi-1b (009). Για την κατακρήμνιση χρησιμοποιήθηκαν 500μg πυρηνικού εκχυλίσματος (για κάθε κατακρήμνιση) ενώ για το πυρηνικό εκχύλισμα και το υπερκείμενο φορτώθηκε το 5% το συνολικού εκχυλίσματος.

Όπως διαπιστώθηκε η κατακρήμνιση της ενδογενούς DNMT-1 συγκατακρημνίζει τις πρωτεΐνες GATA-1, FOG-1, ZBP-89, Gfi-1b και ZNF143. Επιπλέον παρατηρείται ότι με τη κατακρήμνιση της ενδογενούς DNMT-1 ανιχνεύεται και η FOG-1 σε αντίθεση με την περίπτωση της κατακρήμνισης με στρεπταβιδίνη της bio-DNMT-1 όπου δεν συγκατακρημνιζόταν. Τέλος παρατηρείται συγκατακρήμνιση της YY1 και της SAFB-1 όπως συνέβη και στη

κατακρήμνιση στρεπταβιδίνης επιβεβαιώνοντας με αυτό το τρόπο τα αποτελέσματα από τη φασματομετρία μάζας.

Μέχρι στιγμής έχουν επιβεβαιωθεί οι αλληλεπιδράσεις της DNMT-1 και της GATA-1 με ZBP-89, ZNF143, Gfi-1b και FOG-1 μέσω των κατακρημνίσεων των ενδογενών GATA-1 και DNMT-1. Ελέγχθηκε επίσης αν οι αλληλεπιδράσεις αυτές ανιχνεύονται και στην περίπτωση ανοσοκατακρημνίσεων τόσο της ZNF143 όσο και της ZBP-89. Προκειμένου να ελεγχθεί η παραπάνω υπόθεση χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα για την ανοσοκατακρήμνιση των ενδογενών ZBP-89 (011) και ZNF143 (018) σε πυρηνικά εκχυλίσματα διαφοροποιημένων κυττάρων C88 MEL. (NP-40/υψηλής αλατότητας) (Εικόνες 32 και 33). Αναλύοντας τα αποτελέσματα του παραπάνω πειράματος διαπιστώνεται ότι η πρωτεΐνη ZNF143 είναι ικανή να συγκατακρημνίσει τις GATA-1, DNMT-1, ZBP-89 όχι όμως και τη Gfi-1b. Παράλληλα ανοσοκατακρήμνιση της ZBP-89 δίνει το ίδιο ακριβώς αποτέλεσμα (Εικόνα 33),



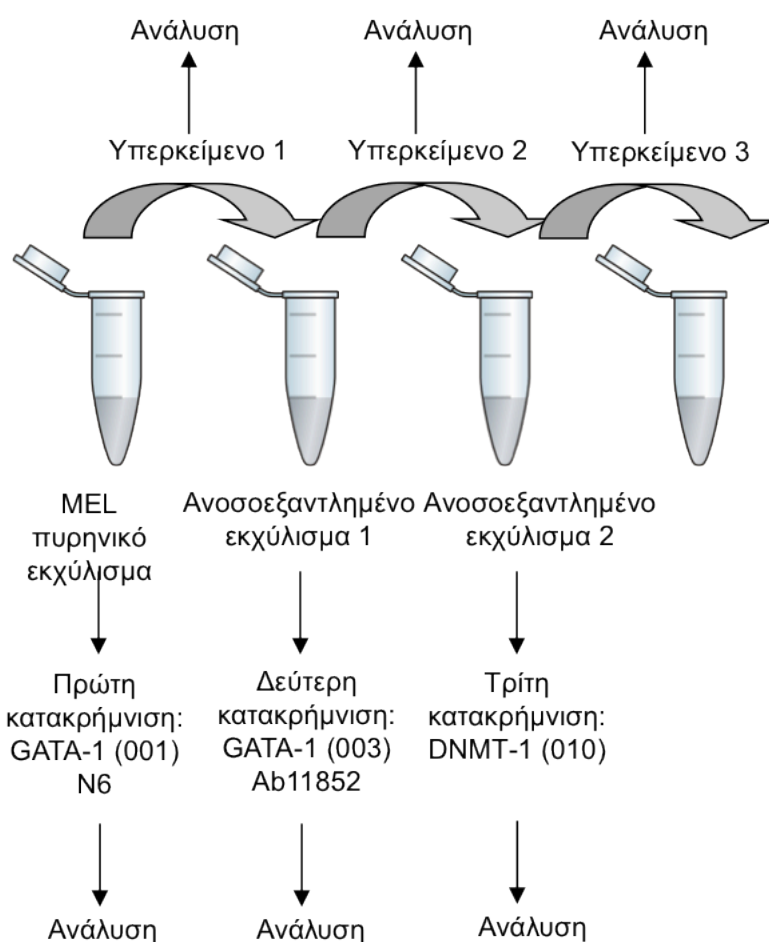
Εικόνα 33. Η ανοσοκατακρήμνιση της πρωτεΐνης ZBP-89 επαληθεύει την ύπαρξη του συμπλόκου GATA-1/DNMT-1/ ZNF143/ZBP-89/ FOG-1 σε κύτταρα MEL. Σε

πυρηνικά εκχυλίσματα διαφοροποιημένων κυττάρων C88 MEL με τη μέθοδο NP-40 / Υψηλής αλατότητας έγινε ανοσοκατακρήμνιση της ενδογενούς ZBP-89 με τη χρήση του αντισώματος για ZBP-89 (011). Το κατακρημνισμένο υλικό παράλληλα με το τυφλό IgG αναλύθηκαν με Western για την παρουσία των πρωτεϊνών: GATA-1 (001) DNMT-1 (010), ZBP-89 (011), ZNF143 (017), FOG-1 (006) και Gfi-1b (009). Για την κατακρήμνιση χρησιμοποιήθηκαν 500μg πυρηνικού εκχυλίσματος (για κάθε κατακρήμνιση) ενώ για το πυρηνικό εκχύλισμα και το υπερκείμενο φορτώθηκε το 5% το συνολικού εκχυλίσματος.

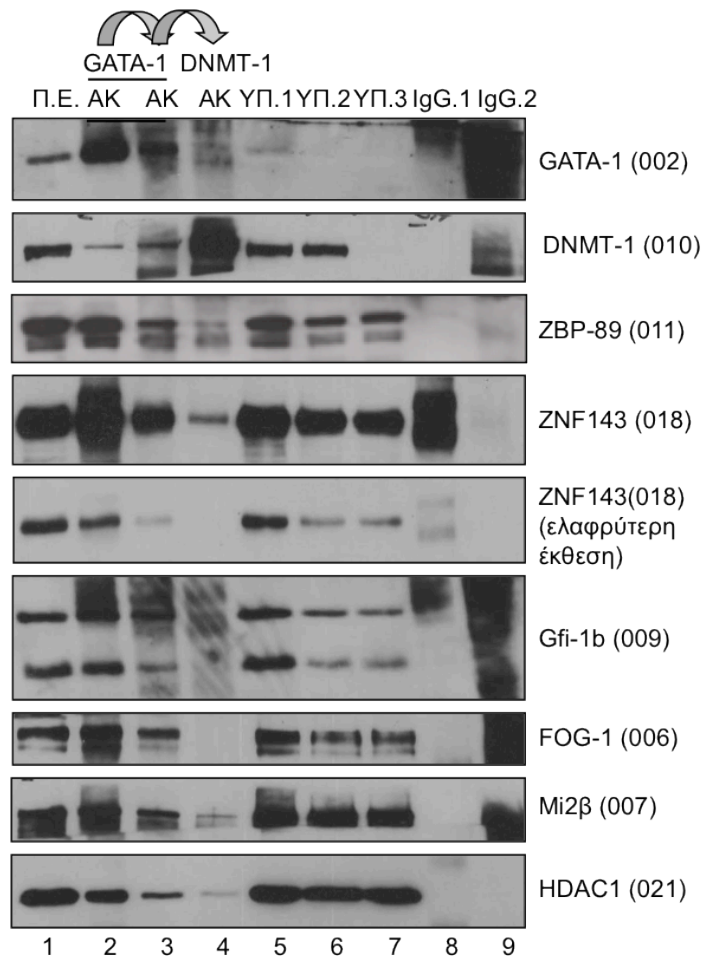
Από όλες τις παραπάνω ανοσοκατακρημνίσεις επιβεβαιώνεται η ύπαρξη του πρωτεϊνικού συμπλόκου GATA-1, ZNF143, ZBP-89 και DNMT-1 το οποίο μπορεί να αλληλεπιδρά με τη FOG-1 και τη Gfi-1b. Οι παραπάνω κατακρημνίσεις έρχονται να επιβεβαιώσουν τα αποτελέσματα της φασματομετρίας μάζας τόσο για τη bio-GATA-1 όσο και για τη bio-DNMT-1. Ωστόσο θα πρέπει να σημειωθεί ότι στις ανοσοκατακρημνίσεις των ZBP-89 και ZNF143 δεν ανιχνεύθηκε η πρωτεΐνη Gfi-1b όπως συνέβη στη περίπτωση της DNMT-1.

4.3.5 Διερεύνηση του πρωτεϊνικού συμπλόκου DNMT-1 / ZBP-89 / ZNF143 / GATA-1 σε MEL κύτταρα.

Εφόσον επιβεβαιώθηκε το σύμπλοκο DNMT-1/ZBP-89/ZNF143/GATA-1 στα MEL κύτταρα, το επόμενο ερώτημα είναι αν όλες αυτές οι πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν ως ένα σύμπλοκο ή σε διακριτά υποσύμπλοκα. Γι αυτό τον σκοπό, ακολουθήθηκε η προσέγγιση της ανοσοεξάντλησης της GATA-1, ώστε να αφαιρεθεί πλήρως η πρωτεΐνη από τα πυρηνικά εκχυλίσματα και της μετέπειτα ανοσοκατακρήμνισης της DNMT-1 από τα πυρηνικά εκχυλίσματα που έχει αφαιρεθεί η GATA-1 (Εικόνα 34).



Εικόνα 34. Σχηματική απεικόνιση του πειράματος ανοσοεξάντλησης (GATA-1) – ανοσοκατακρήμνισης (DNMT-1) σε κύτταρα MEL.



Εικόνα 35. Οι πρωτεΐνες DNMT-1/ZBP-89/ZNF-143 σχηματίζουν πρωτεϊνικό σύμπλοκο το οποίο αλληλεπιδρά με τις GATA-1/FOG-1 και GATA-1/Gfi-1b. Σε πυρηνικά εκχυλίσματα διαφοροποιημένων κυττάρων MEL έγινε ανοσοκατακρήμνιση της ενδογενούς GATA-1 (001) (ζώνη 2), στο υπερκείμενο (ζώνη 5) έγινε δεύτερη διαδοχική κατακρήμνιση με GATA-1 (003) (ζώνη 3), στο υπερκείμενο (ζώνη 6) από τη δεύτερη κατακρήμνιση έγινε τρίτη διαδοχική κατακρήμνιση με DNMT-1 (010) (ζώνη 4) με τη χρήση του αντισώματος για DNMT-1 (010). Το υπερκείμενο της ανοσοκατακρήμνισης DNMT-1 απεικονίζεται στη Ζώνη 7. Το κατακρημνισμένο υλικό για κάθε ανοσοκατακρήμνιση (ζώνες: 2,3,4) μαζί με τα υπερκείμενα εκχυλίσματα (ζώνες:5,6,7) και τα τυφλά IgG (αρουραίου και κουνελιού, ζώνες:8,9) αναλύθηκαν με Western για την παρουσία των πρωτεϊνών: GATA-1 (002), DNMT-1 (010), ZBP-89 (011), ZNF143 (018), Gfi-1b (009), FOG-1 (006), Mi2-β (007) και HDAC-1 (021). Για την κατακρήμνιση χρησιμοποιήθηκαν 300μg πυρηνικού εκχυλίσματος (για κάθε κατακρήμνιση) ενώ για το πυρηνικό εκχύλισμα και κάθε υπερκείμενο φορτώθηκε το 15% το συνολικού εκχυλίσματος. (Π.Ε.: πυρηνικό εκχύλισμα, AK: ανοσοκατακρήμνιση, ΥΠ: υπερκείμενο, IgG:ανοσοσφαρίνη G).

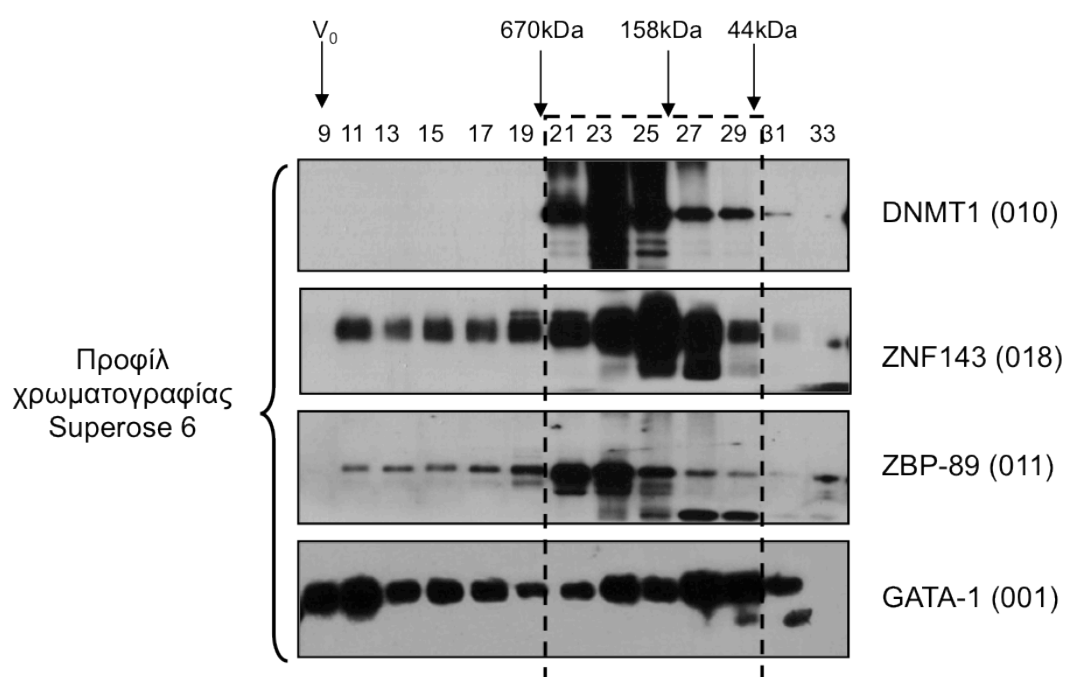
Αρχικά για να επιτευχθεί η πλήρης κατακρήμνιση της GATA-1 έγινε δοκιμή αρκετών αντισωμάτων και συνθηκών κατακρήμνισης προκειμένου να βρεθεί εκείνο το αντίσωμα το οποίο μπορεί να κατακρημνίσει όλη την πρωτεΐνη από τα πυρηνικά εκχυλίσματα. Ωστόσο κάτι τέτοιο δεν ήταν δυνατό καθώς πάντα παρέμενε GATA-1 η οποία ανιχνευόταν στο υπερκείμενο. Για το λόγο αυτό επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε δυο διαδοχικές κατακρημνίσεις με δυο αντισώματα για τη GATA-1, ένα μονοκλωνικό (001) και ένα πολυκλωνικό (003) (Εικόνα 34). Ειδικότερα, μετά το πέρας της πρώτης κατακρήμνισης όπου χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα GATA-1 (001), το υπερκείμενο συλλέγεται και υποβάλλεται σε δεύτερη κατακρήμνιση με το αντίσωμα GATA-1 (003). Μετά και τη δεύτερη κατακρήμνιση το υπερκείμενο συλλέγεται και υποβάλλεται στην τρίτη και τελευταία κατακρήμνιση με το αντίσωμα για τη DNMT-1 (010). Σε κάθε βήμα της διαδικασίας, το κατακρημνισμένο και υπερκείμενο δείγμα αναλύονται με Western.

Η διαδικασία της ανοσοεξάντλησης – ανοσοκατακρήμνισης που περιγράφηκε εφαρμόστηκε σε πυρηνικά εκχυλίσματα διαφοροποιημένων κυττάρων MEL (Εικόνα 35). Από τα αποτελέσματα διαπιστώνεται καταρχάς ότι η χρήση δυο αντισωμάτων για την πλήρη εξάντληση της GATA-1 από τα πυρηνικά εκχυλίσματα είναι επιτυχής καθώς δεν ανιχνεύεται πρωτεΐνη GATA-1 στο τελικό υπερκείμενο (Διαδρομή 6). Παρατηρείται ότι κατά τη πρώτη κατακρήμνιση της GATA-1 (ζώνη 2) συγκατακρημνίζονται, όπως αναμενόταν, οι πρωτεΐνες DNMT-1, ZBP-89, ZNF143, Gfi-1b, Mi2-b και HDAC-1. Επίσης από δεύτερη διαδοχική κατακρήμνιση (ζώνη 3) διαπιστώνεται οι παραπάνω πρωτεΐνες κατακρημνίζονται ξανά αν και σε μικρότερη ποσότητα καθώς και η ποσότητα της κατακρημνισμένης GATA-1 είναι μικρή.

Εφόσον έχει γίνει πλήρης απομάκρυνση της GATA-1 από τα πυρηνικά εκχυλίσματα, λαμβάνει χώρα η τρίτη διαδοχική κατακρήμνιση που είναι αυτή της DNMT-1 (ζώνη 3). Αρχικά η κατακρήμνιση της DNMT-1 παρόλο που είναι αρκετά αποτελεσματική δεν είναι ικανή να συγκατακρημνίσει GATA-1 καθώς η τελευταία έχει πλήρως απομακρυνθεί στα προηγούμενα στάδια της διαδικασίας. Οι πρωτεΐνες ZBP-89, ZNF143 συγκατακρημνίζονται με τη DNMT-1 και απουσία της GATA-1 (ζώνη 3), κάτι όμως το οποίο δεν συμβαίνει στη περίπτωση των πρωτεϊνών FOG-1 και Gfi-1b. Επιπλέον οι πρωτεΐνες

Mi2-β και HDAC-1 κατακρημνίζονται με τη DNMT-1 απουσία της GATA-1 όπως θα ήταν αναμενόμενο όπως έχει δειχθεί βιβλιογραφικά (116).

Συμπεραίνεται από τα παραπάνω πειράματα ότι οι αλληλεπιδράσεις της DNMT-1 με τους συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες λαμβάνουν χώρα σε τρία (τουλάχιστον) υποσύμπλοκα. Το υποσύμπλοκο Α περιλαμβάνει DNMT-1/GATA-1/Gfi-1b, το υποσύμπλοκο Β DNMT-1/ GATA-1/FOG-1/ZBP-89 /ZNF143 και το υποσύμπλοκο Γ DNMT-1/ ZBP-89 /ZNF143.



Εικόνα 36. Η αλληλεπικάλυψη στα προφίλ έκλυσης των DNMT-1/ZNF143/ZBP-89/GATA-1 δικαιολογεί την ύπαρξη του πρωτεϊνικού συμπλόκου. Πυρηνικά εκχυλίσματα από διαφοροποιημένα κύτταρα C88 MEL με τη μέθοδο NP-40 / υψηλής αλατότητας υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία μοριακής διήθησης με τη χρήση στήλης Superose 6. Τα κλάσματα με περιττό αριθμό υποβλήθηκαν σε κατακρήμνιση με χρήση TCA και αναλύθηκαν με Western χρησιμοποιώντας αντισώματα για GATA-1(001) ZNF143 (018) ZBP-89 (011) και DNMT-1 (010).

Πέρα από τις ανοσοκατακρημνίσεις για την επιβεβαίωση των πρωτεϊνικών συμπλόκων χρησιμοποιήθηκε και χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Συγκεκριμένα τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά πυρηνικά εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν για τις συγκατακρημνίσεις διαπεράστηκαν από

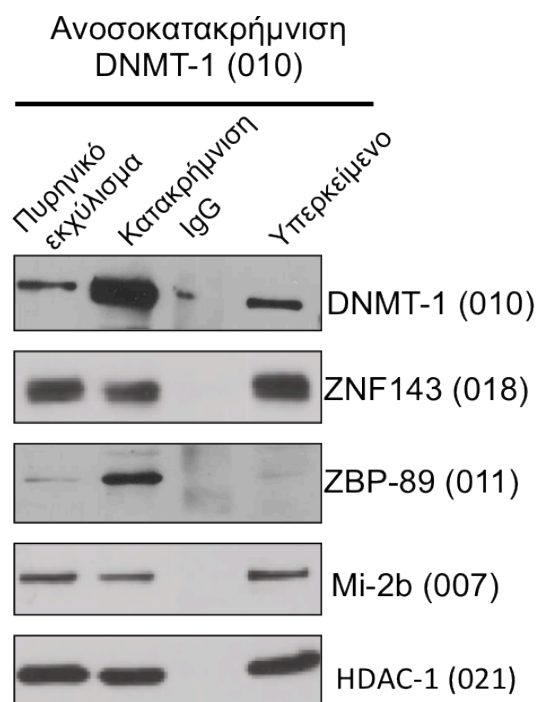
χρωματογραφική στήλη Superose 6. Τα κλάσματα με περιττό αριθμό αναλύθηκαν με Western αφού πρώτα έγινε επεξεργασία τους με τριχλωροξικό οξύ για τη κατακρήμνιση των πρωτεϊνών (Εικόνα 34). Αναλύοντας το χρωματογραφικό προφίλ έκλουσης των πρωτεϊνών διαπιστώνεται ότι υπάρχει αλληλεπικάλυψη στα κλάσματα 21 – 29, αποτέλεσμα το οποίο καταδεικνύει ότι οι πρωτεΐνες DNMT-1/ZBP-89/ZNF143/GATA-1 βρίσκονται στο ίδιο σύμπλοκο, γεγονός το οποίο ενισχύει περαιτέρω τα αποτελέσματα από τα προηγούμενα πειράματα ανοσοκατακρήμνισεων.

4.3.6 Επαλήθευση της ύπαρξης του πρωτεϊνικού συμπλόκου DNMT-1/ZBP-89/ZNF143

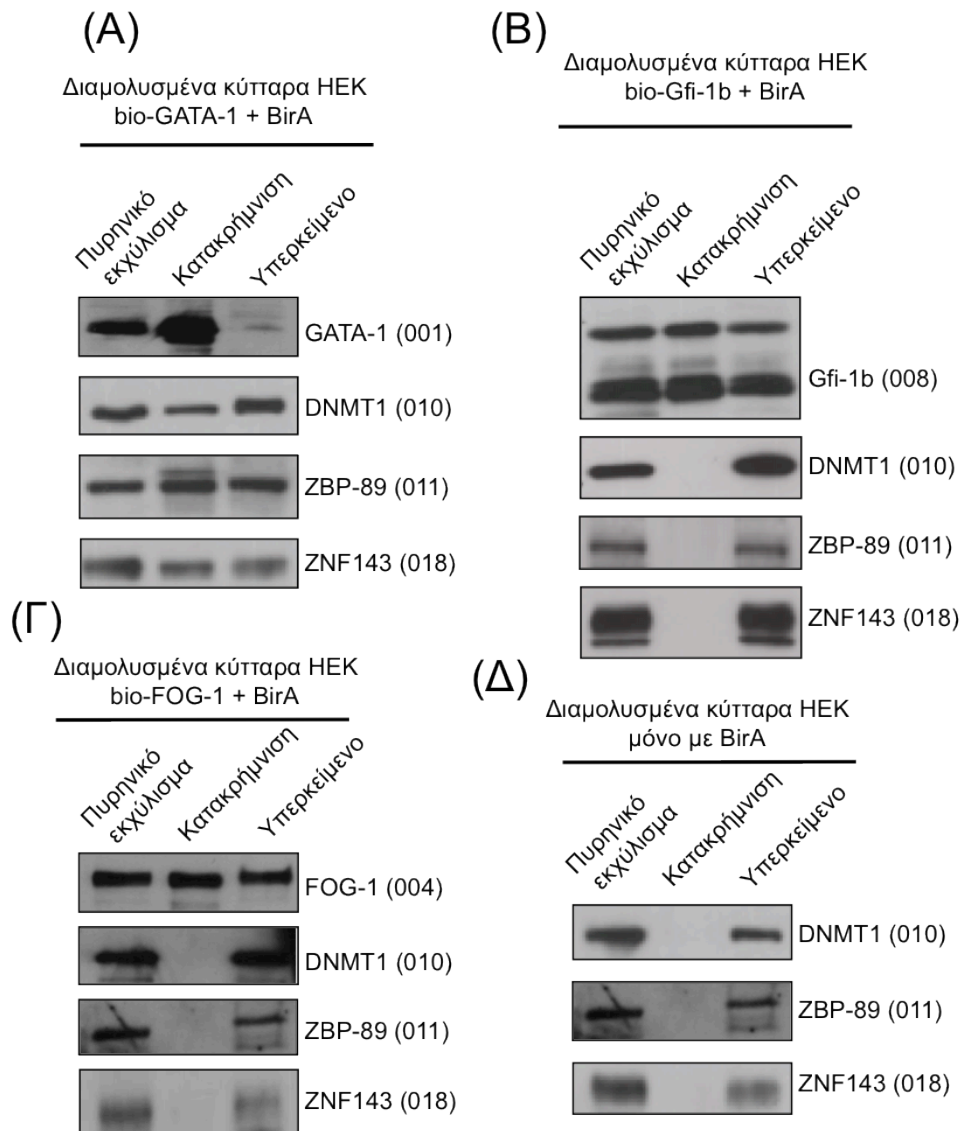
Είναι γνωστό ότι οι πρωτεΐνες DNMT-1 αλλά και οι μεταγραφικοί παράγοντες ZBP-89 και ZNF143 εκφράζονται ευρύτερα σε πολλούς ιστούς. Συνεπώς, θελήσαμε να διερευνήσουμε αν το σύμπλοκο DNMT1/ZBP-89/ZNF143 που ανιχνεύσαμε στα MEL κύτταρα απαντάται και σε κύτταρα από άλλους ιστούς. Για αυτό το σκοπό επιλέχθηκε η κυτταρική σειρά HEK293 η οποία είναι ανθρώπινη εμβρυική νεφρική σειρά, στην οποία εκφράζονται οι πρωτεΐνες DNMT-1, ZBP-89, ZNF143 χωρίς ωστόσο να εκφράζονται οι ερυθροποιητικοί μεταγραφικοί παράγοντες GATA-1 και FOG-1. Σε πυρηνικά εκχυλίσματα κυττάρων HEK έγινε ανοσοκατακρήμνιση της ενδογενούς πρωτεΐνης DNMT-1 και το κατακρήμνισμένο υλικό αναλύθηκε με Western για τις πρωτεΐνες DNMT-1, ZBP-89, ZNF143, Mi-2β και HDAC-1 (Εικόνα 37). Από τη ανοσοκατακρήμνιση παρατηρείται ότι οι πρωτεΐνες DNMT-1, ZNF143 και ZBP-89 αλληλεπιδρούν στα κύτταρα HEK. Οι πρωτεΐνες Mi-2β και HDAC-1 χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες εφόσον είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρούν με τη DNMT-1. Συνεπώς, είναι δυνατή η δημιουργία του συμπλόκου DNMT-1/ZBP-89/ZNF143 και σε μη ερυθροειδικά απουσία GATA-1 και FOG-1.

Ανακεφαλαιώνοντας τα αποτελέσματα από τα παραπάνω πειράματα, διαπιστώνεται ότι η DNMT-1 αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες ZBP-89 και ZNF143 στα κύτταρα HEK293, συνεπώς η αλληλεπίδραση αυτή φαίνεται να μην είναι αποκλειστικά ερυθροειδική. Σε συνδυασμό με τα πειράματα ανοσοεξάντλησης – ανοσοκατακρήμνισης συμπεραίνουμε ότι οι πρωτεΐνες DNMT-1/ZBP-89/ZNF143 σχηματίζουν τον πυρήνα του συμπλόκου το οποίο

έχει την ικανότητα στα ερυθροποιητικά κύτταρα να αλληλεπιδρά με την GATA-1 και τα υποσύνμπλοκα της.



Εικόνα 37. Η πρωτεΐνη DNMT-1 αλληλεπιδρά με τις ZBP-89 και ZNF143 σε κύτταρα HEK 293. Σε πυρηνικά εκχυλίσματα κυττάρων HEK έγινε ανοσοκατακρήμνιση της ενδογενούς DNMT-1 με τη χρήση του αντισώματος για DNMT-1 (010). Το κατακρημνισμένο υλικό παράλληλα με το τυφλό IgG αναλύθηκαν με Western για την παρουσία των πρωτεϊνών: DNMT-1 (010), ZBP-89 (011), ZNF143 (017), FOG-1 (006) και Gfi-1b (009). Για την κατακρήμνιση χρησιμοποιήθηκαν 500μg πυρηνικού εκχυλίσματος (για κάθε κατακρήμνιση) ενώ για το πυρηνικό εκχύλισμα και το υπερκείμενο φορτώθηκε το 5% το συνολικού εκχυλίσματος.



Εικόνα 38. Η GATA-1, αλλά όχι οι FOG-1 και Gfi-1b, αλληλεπιδρά με τις DNMT-1, ZBP-89 και ZNF143 στα κύτταρα HEK. Σε πυρηνικά εκχυλίσματα κυττάρων HEK τα οποία έχουν διαμολυνθεί με πλασμιδιακούς φορείς: (A) bio-GATA-1 και BirA, (B) bio-Gfi-1b και BirA, (Γ) bio-FOG-1 και BirA. (Δ) BirA έγινε κατακρήμνιση στρεπταβιδίνης. Το κατακρημνισμένο υλικό αναλύθηκε με Western για τη παρουσία των πρωτεϊνών GATA-1 (001), Gfi-1b (008), FOG-1 (004), DNMT-1 (010), ZBP-89 (011) και ZNF143 (018). Για την κατακρήμνιση χρησιμοποιήθηκαν 500μg πυρηνικού εκχυλίσματος (για κάθε κατακρήμνιση) ενώ για το πυρηνικό εκχύλισμα και το υπερκείμενο φορτώθηκε το 10% το συνολικού εκχυλίσματος.

Η κυτταρική σειρά HEK 293 εξαιτίας του ότι περιέχει ήδη το σύμπλοκο DNMT-1/ZBP-89/ZNF143 και μπορεί πολύ εύκολα να διαμολυνθεί με πλασμιδιακούς φορείς, είναι ένα πολύ καλό σύστημα για να μελετηθούν λεπτομερέστερα οι αλληλεπιδράσεις με τους ερυθροποιητικούς μεταγραφικούς παράγοντες.

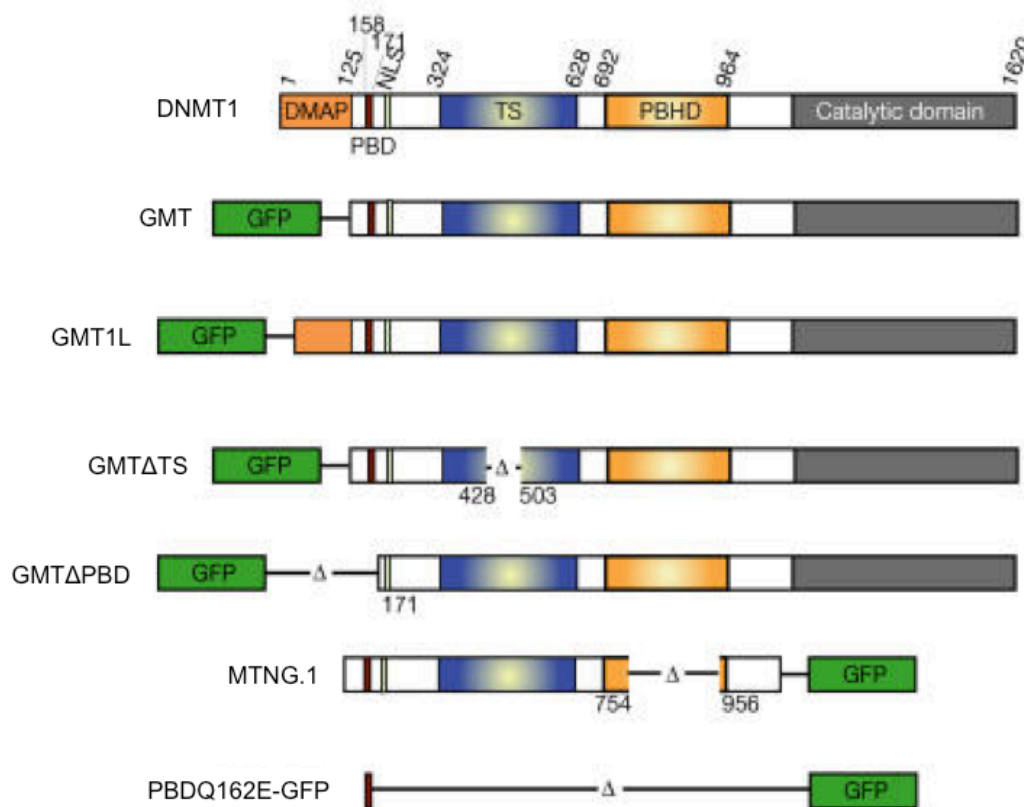
Όπως αναφέρθηκε η κατακρήμνιση της ενδογενούς DNMT-1 στα κύτταρα HEK 293 συγκατακρημνίζει και τις πρωτεΐνες ZNF143 και ZBP-89. Στα κύτταρα αυτά έγινε επιμόλυνση με κάθε ένα από τους πλασμιδιακούς φορείς οι οποίοι εκφράζουν τις σημασμένες πρωτεΐνες bio-GATA-1, bio-Gfi-1b, και bio-FOG-1 σε συνδυασμό με πλασμιδιακό φορέα που εκφράζει τη βακτηριακή λιγάση BirA ώστε να μπορέσουν οι σημασμένες πρωτεΐνες να βιοτινυλιωθούν. Μετά τη επιμόλυνση των κυττάρων HEK παράχθηκαν πυρηνικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα στα οποία έγινε κατακρήμνιση της βιοτινυλιωμένης πρωτεΐνης (Εικόνα 38).

Αναλύοντας τα αποτελέσματα της κατακρήμνισης παρατηρείται ότι στα κύτταρα HEK η πρωτεΐνη GATA-1 είναι ικανή να αλληλεπιδράσει με τις DNMT-1, ZBP-89 και ZNF143 (Εικόνα 38 Α). Η αλληλεπίδραση της GATA-1 με το σύμπλοκο DNMT-1/ZNF143/ZBP89 στα HEK υποδεικνύει ότι δεν χρειάζεται το ερυθροποιητικό υπόβαθρο προκειμένου να λάβει χώρα η αλληλεπίδραση. Επιπλέον διαπιστώνεται ότι οι πρωτεΐνες Gfi-1b (Εικόνα 38 Β) και FOG-1 (Εικόνα 38 Γ) δεν συγκατακρημνίζονται μαζί με τις DNMT-1, ZBP-89 και ZNF143. Το γεγονός ότι τόσο η Gfi-1b όσο και η FOG-1 δεν μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το σύμπλοκο DNMT-1/ZBP-89/ZNF143 υποδηλώνει πως ίσως να χρειάζεται η παρουσία του GATA-1 για να σχηματιστεί η αλληλεπίδραση ή γενικότερα πως η παρουσία ερυθροποιητικού υποβάθρου είναι απαραίτητη (μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και ερυθροειδικοί παράγοντες).

4.3.7 Ανάλυση των πρωτεϊνικών περιοχών αλληλεπίδρασης μεταξύ της GATA-1 και DNMT-1.

Από όλα τα παραπάνω πειράματα αποδεικνύεται η ύπαρξη του πρωτεϊνικού συμπλόκου DNMT-1/ZBP-89/ZNF143 το οποίο δύναται να αλληλεπιδρά και με την πρωτεΐνη GATA-1. Για να αποκαλυφθούν οι

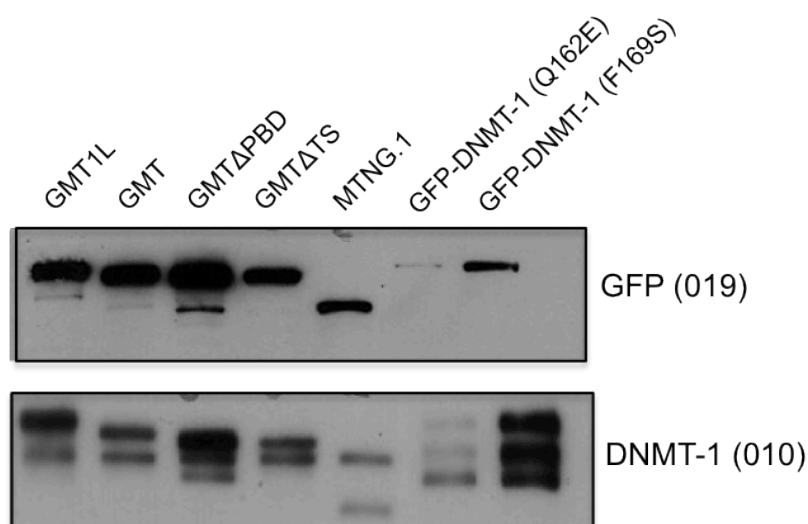
λειτουργικές περιοχές της DNMT-1 που μεσολαβούν για την αλληλεπίδραση της με τους παραπάνω μεταγραφικούς παράγοντες, χρησιμοποιήθηκαν πλασμιδιακοί φορείς που φέρουν απαλειπτικές μεταλλάξεις της DNMT-1 συζευγμένες με τη GFP (Εικόνα 39).



Εικόνα 39. Σχηματική απεικόνιση των απαλειπτικών μεταλλάξεων της DNMT-1 συζευγμένες με GFP. GMT: απαλειπτική μετάλλαξη στη οποία απουσιάζει η περιοχή DMAP. GMT1L: η πρωτεΐνη DNMT-1. GMTΔTS: απαλειπτική μετάλλαξη στη οποία απουσιάζει η περιοχή TS (targeting sequence). GMTΔPBD: απαλειπτική μετάλλαξη στην οποία λείπει η περιοχή PBD (PCNA binding domain). MTNG.1: απαλειπτική μετάλλαξη στη οποία λείπει η καταλυτική περιοχή και η PBHD (polybromo homology domain). PBDQ162E: η περιοχή PBD της DNMT-1 η οποία φέρει σημειακή μετάλλαξη Q σε E.

Σε κάθε μια από τις μεταλλάξεις αυτές απουσιάζει μια λειτουργική περιοχή της DNMT-1. Συγκεκριμένα στη μετάλλαξη GMT απουσιάζει η περιοχή DMAP1 που είναι υπεύθυνη για τη αλληλεπίδραση με το μεταγραφικό καταστολέα DMAP-1. Στη GMTΔTS λείπει η περιοχή TS (targeting sequence) που είναι υπεύθυνη για το διμερισμό της πρωτεΐνης, τη

στόχευση της πρωτεΐνης στα κεντρομερίδια και στις εστίες της αντιγραφής. Στην ελλειπτική μετάλλαξη GMTΔPBD απουσιάζει η περιοχή PBD (PCNA binding domain) που είναι η περιοχή πρόσδεσης της PCNA πρωτεΐνη που επίσης μεσολαβεί στη στόχευση της DNMT-1 στις εστίες της αντιγραφής. Στην ελλειπτική μετάλλαξη MTNG.1 απουσιάζουν και η καταλυτική περιοχή και η PBHD (polybromo homology domain). Η περιοχή PBHD είναι υπεύθυνη για τις ιδιότητες μεταγραφικής ρύθμισης που εμφανίζει η DNMT-1 ενώ μέσω της καταλυτικής περιοχής γίνεται η μεθυλίωση του DNA. Οι μεταλλάξεις αυτές καλύπτουν συνολικά ολόκληρη την DNMT-1.



Εικόνα 40. Έκφραση των απαλειπτικών μεταλλάξεων της DNMT-1 ύστερα από επιμόλυνση κυττάρων HEK293. Κύτταρα HEK 293 επιμολύνθηκαν με 30 μg από κάθε πλασμίδιο απαλειπτικής μετάλλαξης της DNMT-1. Στις 36 ώρες έγινε συλλογή των κυττάρων και απομόνωση πυρηνικών εκχυλισμάτων. Τα πυρηνικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με Western για την ύπαρξη των διαμολυσμένων πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας αντισώματα για GFP (019) και DNMT-1 (010). Οι απαλειπτικές μεταλλάξεις της DNMT-1 επεξηγούνται στην εικόνα 37, Η GFP-DNMT-1 Q162E είναι η πλήρης πρωτεΐνη DNMT-1 που φέρει τη σημειακή μετάλλαξη Q162E, και η GFP-DNMT-1 F169S είναι η πλήρης πρωτεΐνη DNMT-1 που φέρει τη σημειακή μετάλλαξη F169S.

Το πρώτο βήμα ήταν η επιμόλυνση των παραπάνω απαλειπτικών μεταλλάξεων της DNMT-1 σε κύτταρα HEK293 ώστε να επαληθευθεί η

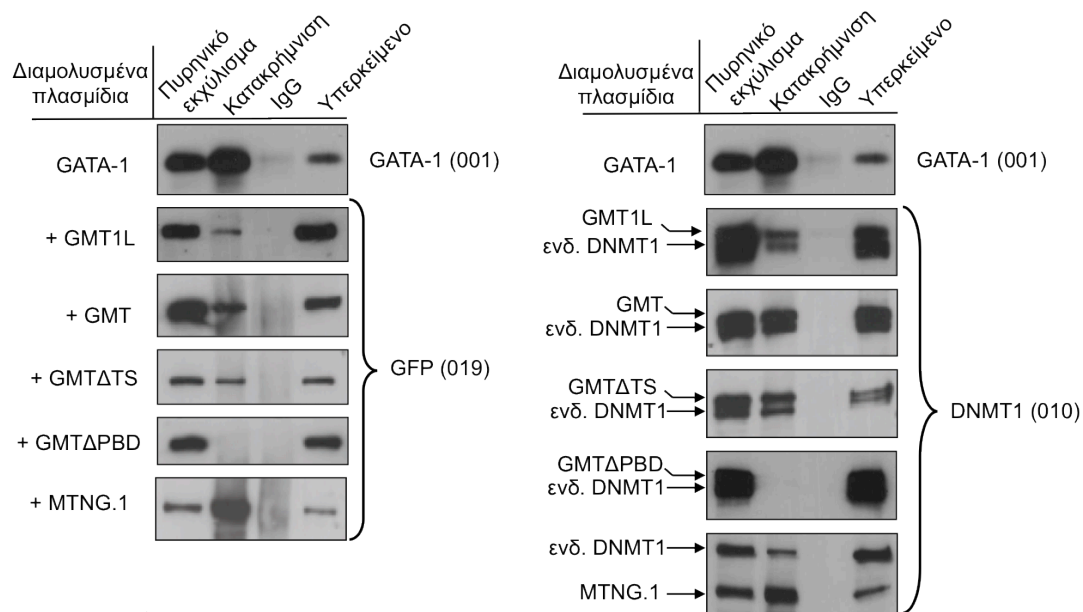
επιτυχής έκφραση τους. Ύστερα από τη επιμόλυνση απομονώθηκαν πυρηνικά εκχυλίσματα, τα οποία αναλύθηκαν με Western χρησιμοποιώντας αντισώματα για DNMT-1 (010) και GFP (019) (Εικόνα 40). Παρατηρείται ότι υπάρχει επιτυχής έκφραση όλων των μεταλλάξεων που επιτρέπει τη χρήση των πλασμιδίων σε επακόλουθα πειράματα κατακρημνίσεων.

Προκειμένου να διερευνηθεί η πρωτεϊνική περιοχή που οφείλεται για την αλληλεπίδραση μεταξύ της DNMT-1 και της GATA-1 έγινε συνεπιμόλυνση των κυττάρων HEK 293 με κάθε ένα από τα πλασμίδια που φέρουν τις απαλειπτικές μεταλλάξεις της DNMT-1 μαζί με πλασμίδιο που εκφράζει τη GATA-1 και απομόνωση πυρηνικών εκχυλισμάτων από όλες τις διαμολύνσεις.

Στα παραπάνω πυρηνικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα έγινε ανοσοκατακρήμνιση της GATA-1 και ελέγχθηκε μέσω Western ποιες από τις απαλειπτικές μεταλλάξεις της DNMT-1 συγκατακρημνίζονται (Εικόνα 41). Από το αποτέλεσμα των ανοσοκατακρημνίσεων παρατηρείται πως η πρωτεΐνη GATA-1 δύναται να αλληλεπιδράσει με όλες τις ελλειπτικές μεταλλάξεις της DNMT-1, εκτός της GMTΔPBD. Αναλυτικότερα βλέπουμε πως η GATA-1 συγκατακρημνίζει την πλήρη πρωτεΐνη GMT1L αλλά και τις ελλειπτικές μεταλλάξεις GMT, GMTΔTS και MTNG.1. Η συγκατακρήμνιση αυτών των μεταλλάξεων ανιχνεύεται τόσο με τη χρήση GFP αντισώματος όσο και αντισώματος για τη DNMT-1. Με τη χρήση DNMT-1 αντισώματος ανιχνεύονται η ενδογενής και η διαμολυσμένες πρωτεΐνες. Να σημειωθεί πως το χρησιμοποιούμενο αντίσωμα για τη DNMT-1 είναι ικανό να ανιχνεύσει όλες τις μεταλλάξεις της DNMT-1 (Εικόνα 40, Εικόνα 41). Τέλος το γεγονός ότι GATA-1 είναι ικανή να κατακρημνίσει την πλήρη DNMT-1 συζευγμένη με GFP (GMT1L) αποδεικνύει ότι η GFP δεν αλλοιώνει τη δομή της DNMT-1.

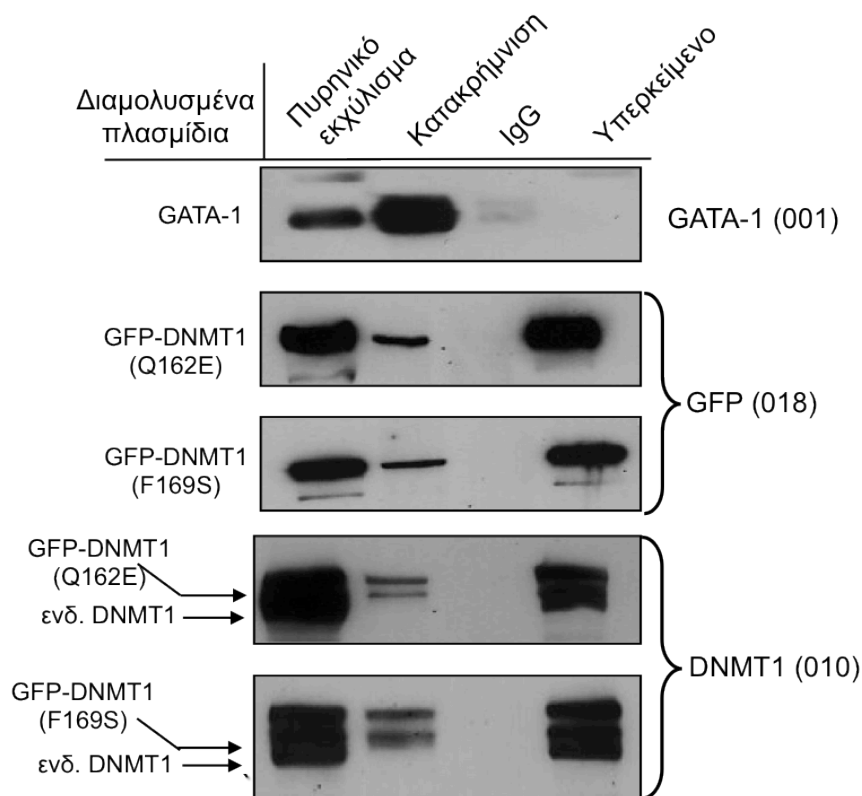
Από όλες τις μεταλλάξεις που δοκιμάστηκαν, εκείνη που δεν μπορεί να συγκατακρημνιστεί με τη GATA-1 είναι η GMTΔPBD, δηλαδή εκείνη στην οποία απουσιάζει η περιοχή PBD (Εικόνα 39). Η έλλειψη της εν λόγω περιοχής ουσιαστικά καταργεί την αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη GATA-1. Είναι αξιοσημείωτο ότι στην ανοσοκατακρήμνιση των πυρηνικών εκχυλισμάτων όπου εκφράζονται η GATA-1 και η GMTΔPBD δεν ανιχνεύεται

ούτε αλληλεπίδραση μεταξύ της GATA-1 και της ενδογενούς πρωτεΐνης DNMT-1.



Εικόνα 41. Η έλλειψη της περιοχής PBD της DNMT-1 προκαλεί απώλεια της αλληλεπίδρασης μεταξύ των GATA-1 και DNMT-1. Κύτταρα HEK συν-επιμολύνθηκαν με πλασμίδιο που εκφράζει GATA-1 και κάθε μία από τις απαλειπτικές μεταλλάξεις της DNMT-1 (Εικόνα 37,38). Από τα διαμολυσμένα κύτταρα απομονώθηκαν πυρηνικά εκχυλίσματα στα οποία έγινε ανοσοκατακρήμνιση της GATA-1 (001) και το κατακρημνισμένο υλικό αναλύθηκε για την παρουσία των GATA-1 (001) GFP (019) και DNMT-1 (010). Για κάθε κατακρήμνιση χρησιμοποιήθηκαν 500μg πυρηνικού εκχυλίσματος) ενώ για το πυρηνικό εκχύλισμα και το υπερκείμενο φορτώθηκε το 8% του συνολικού εκχυλίσματος.

Όπως έχει αναφερθεί η περιοχή PBD είναι μια μικρή περιοχή που απαρτίζεται από 19 αμινοξέα και είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση μεταξύ της DNMT-1 με τη PCNA ώστε να μεταφερθεί η πρώτη στις εστίες της αντιγραφής. Προκειμένου να αποκλειστεί το ενδεχόμενο ότι η αλληλεπίδραση της GATA-1 και DNMT-1 δεν είναι εξαιτίας της ύπαρξης κάποιου συμπλόκου DNMT-1/GATA-1/PCNA που να σχετίζεται με την αντιγραφή του DNA, έγινε συν-επιμόλυνση των κυττάρων HEK με GATA-1 και τη πλήρη πρωτεΐνη DNMT-1 η οποία φέρει τις σημειακές μεταλλάξεις Q162E είτε F169S.



Εικόνα 42. Η GATA-1 αλληλεπιδρά με DNMT-1 που φέρει σημειακές μεταλλάξεις που απεμπολούν την αλληλεπίδραση της DNMT-1 με την PCNA. Κύτταρα HEK συν-επιμολύνθηκαν με πλάσμιδιο που εκφράζει GATA-1 και κάθε μία από τις σημειακές μεταλλάξεις της DNMT-1 Q162E και F169S (Εικόνα 38). Από τα διαμολυσμένα κύτταρα απομονώθηκαν πυρηνικά εκχυλίσματα στα οποία έγινε ανοσοκατακρήμνιση της GATA-1 (001) και το κατακρημνισμένο υλικό αναλύθηκε για την παρουσία των GATA-1 (001) GFP (019) και DNMT-1 (010). Για κάθε κατακρήμνιση χρησιμοποιήθηκαν 500μg πυρηνικού εκχυλίσματος) ενώ για το πυρηνικό εκχύλισμα και το υπερκείμενο φορτώθηκε το 8% του συνολικού εκχυλίσματος.

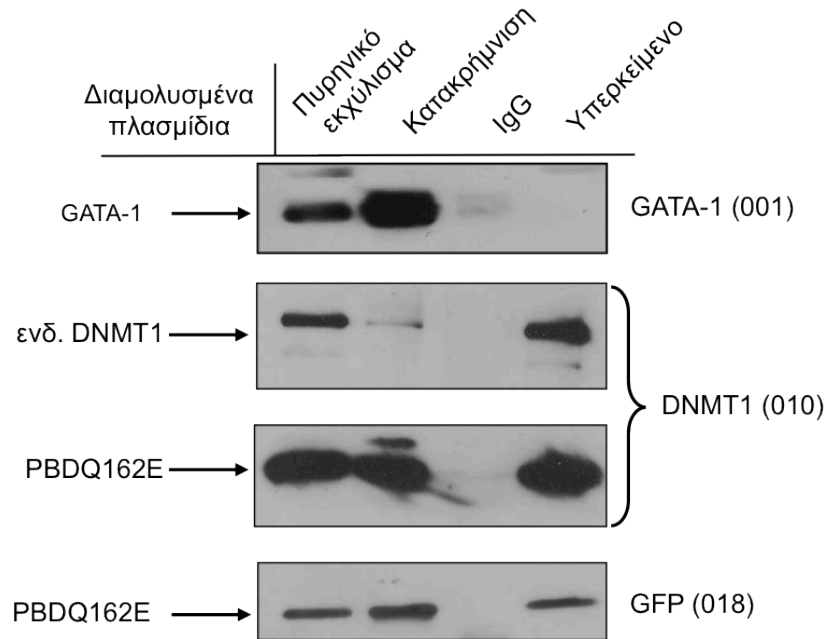
Οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις επιλέχθηκαν επειδή έχει αποδειχθεί βιβλιογραφικά (183) ότι είναι ικανές να απεμπολήσουν την αλληλεπίδραση μεταξύ της DNMT-1 και της PCNA. Ακολουθώντας την ίδια πειραματική πορεία απομονώθηκαν πυρηνικά εκχυλίσματα από τα κύτταρα HEK293 που είχαν συν-διαμολυνθεί με τις GATA-1 και τις δυο σημειακές μεταλλάξεις της DNMT-1 Q162E και F169S με επακόλουθη κατακρήμνιση της GATA-1. Το κατακρημνισμένο υλικό αναλύθηκε για τη παρουσία των GATA-1, και GFP, DNMT-1 (Εικόνα 42). Διαπιστώνεται ότι μετάλλαξη των αμινοξέων που απαιτούνται ώστε να αλληλεπιδράσει η DNMT-1 με την PCNA, δηλαδή η

γλουταμίνη 162 και η φαινυλαλανίνη 169, δεν επηρεάζουν την αλληλεπίδραση της DNMT-1 με τη GATA-1. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι οι δυο σημειακές μεταλλάξεις της DNMT-1 είναι ικανές να συγκατακρημνιστούν μαζί με τη GATA-1. Συνεπώς, η αλληλεπίδραση της GATA-1 με την DNMT-1 δεν γίνεται στα πλαίσια της παρουσίας της τελευταίας στις εστίες διπλασιασμού του DNA.

Προκειμένου να αποδειχθεί πέρα από κάθε αμφιβολία ότι η περιοχή PBD ευθύνεται για την αλληλεπίδραση με τη GATA-1 δημιουργήθηκε πλασμιδιακός φορέας ο οποίος περιέχει τη περιοχή αυτή που φέρει τη σημειακή μετάλλαξη Q162E συζευγμένη με GFP (Εικόνα 39) ώστε να μην υπάρχει αλληλεπίδραση με τη PCNA. Ακολουθώντας την ίδια στρατηγική με τα προηγούμενα πειράματα ο συγκεκριμένος φορέας συν-διαμολύνθηκε σε κύτταρα HEK293 μαζί με GATA-1 με επακόλουθη παραγωγή πυρηνικών εκχυλισμάτων και ανοσοκατακρήμνιση της GATA-1 (Εικόνα 43).

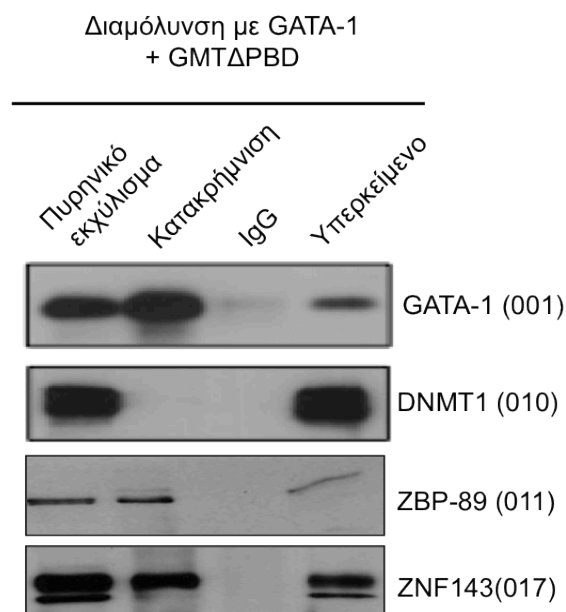
Από τα αποτελέσματα της κατακρήμνισης παρατηρείται ότι η περιοχή PBDQ162E, παρόλο που απαρτίζεται μόνο από 19 αμινοξέα, επαρκεί για να αλληλεπιδράσει με τη GATA-1. Το αντίσωμα έναντι της DNMT-1, όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις, ανιχνεύει τόσο την ενδογενή DNMT-1 αλλά και τη PBDQ162E. Αξίζει να σημειωθεί πως η υπερέκφραση της PBDQ162E είναι ικανή να διαταράξει την αλληλεπίδραση της GATA-1 με τη ενδογενή DNMT-1 καθώς ανιχνεύεται πολύ μικρότερη ποσότητα της τελευταίας να αλληλεπιδρά με τη GATA-1. Αυτό πιθανώς συμβαίνει διότι ποσότητα της πρωτεΐνης GATA-1 αποσπάται από το σύμπλοκο GATA-1/DNMT-1 προκειμένου να αλληλεπιδράσει με τη PBDQ162E.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω αποτελέσματα, αναγνωρίσαμε την περιοχή PBD ως την ελάχιστη ικανή περιοχή της DNMT-1 που είναι απαραίτητη ώστε να μπορεί να αλληλεπιδρά με τη GATA-1. Επιπλέον στην αλληλεπίδραση αυτή δεν εμπλέκονται η γλουταμίνη 162 και φαινυλαλανίνη 169 που οφείλονται για την αλληλεπίδραση της DNMT-1 με τη PCNA.



Εικόνα 43. Η περιοχή PBD που φέρει τη σημειακή μετάλλαξη Q162E είναι ικανή από μόνη της να αλληλεπιδράσει με τη GATA-1. Κύτταρα HEK συν-επιμολύνθηκαν με πλασμίδιο που εκφράζει GATA-1 και το πεπτίδιο PBDQ162E (Εικόνα 37). Από τα διαμολυσμένα κύτταρα απομονώθηκαν πυρηνικά εκχυλίσματα στα οποία έγινε ανοσοκατακρήμνιση της GATA-1 (001) και το κατακρημνισμένο υλικό αναλύθηκε για την παρουσία των GATA-1 (001) GFP (019) και DNMT-1 (010). Για κάθε κατακρήμνιση χρησιμοποιήθηκαν 500μg πυρηνικού εκχυλίσματος) ενώ για το πυρηνικό εκχύλισμα και το υπερκείμενο φορτώθηκε το 8% του συνολικού εκχυλίσματος.

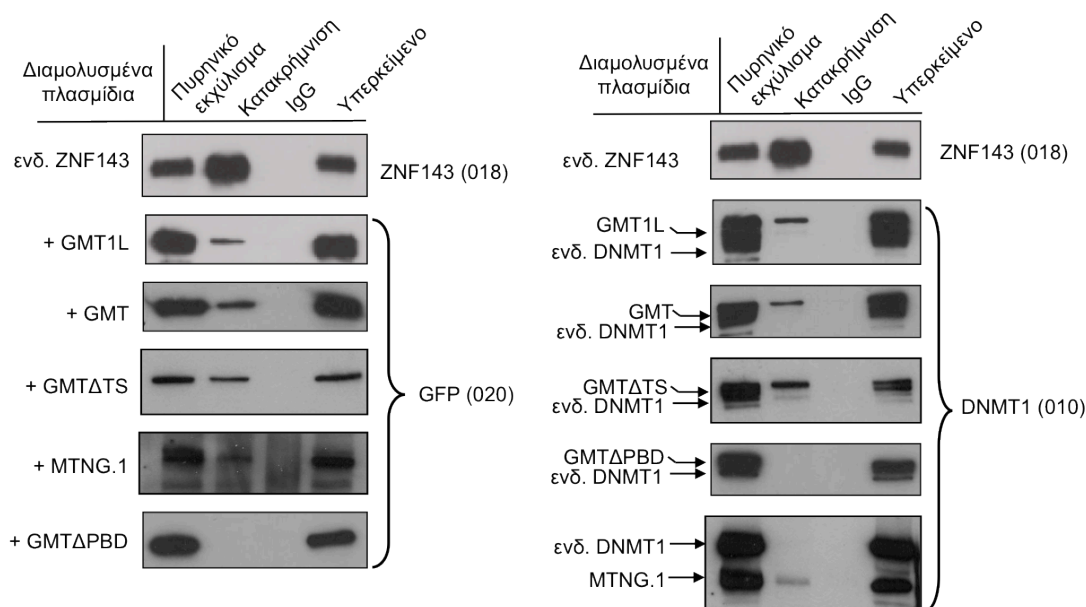
Όπως παρουσιάστηκε παραπάνω σε κύτταρα HEK τα οποία είναι διαμολυσμένα με GATA-1 και GMTΔPBD, η GATA-1 δεν αλληλεπιδρά ούτε με τη απαλειπτική μετάλλαξη GMTΔPBD ούτε όμως και με την ενδογενή DNMT-1. Στα πυρηνικά εκχυλίσματα αυτά ελέγχθηκε αν με τη κατακρήμνιση της GATA-1 ανιχνεύονται οι πρωτεΐνες ZNF143 και ZBP-89 (Εικόνα 44). Πράγματι οι ZBP-89 και ZNF143 συγκατακρημνίζονται με τη GATA-1 παρόλο που η τελευταία δεν αλληλεπιδρά ούτε με τη GMTΔPBD ούτε με την ενδογενή DNMT-1. Συμπεραίνεται ότι η αλληλεπίδραση της GATA-1 με τις ZBP-89 και ZNF143 λαμβάνει χώρα ανεξαρτήτως της DNMT-1



Εικόνα 44. Η *GATA-1* εξακολουθεί να αλληλεπιδρά με τις *ZBP-89* και *ZNF143* όταν χάνεται η αλληλεπίδραση με τη *GMTΔPBD* και την ενδογενή *DNMT-1*. Κύτταρα HEK συν-επιμολύνθηκαν με πλασμίδιο που εκφράζει *GATA-1* και τη *GMTΔPBD* (Εικόνα 37,38). Από τα διαμολυσμένα κύτταρα απομονώθηκαν πυρηνικά εκχυλίσματα στα οποία έγινε ανοσοκατακρήμνιση της *GATA-1* (001) και το κατακρημνισμένο υλικό αναλύθηκε για την παρουσία των *GATA-1* (001) GFP (019) και *DNMT-1* (010). Για κάθε κατακρήμνιση χρησιμοποιήθηκαν 500μg πυρηνικού εκχυλίσματος) ενώ για το πυρηνικό εκχύλισμα και το υπερκείμενο φορτώθηκε το 8% του συνολικού εκχυλίσματος.

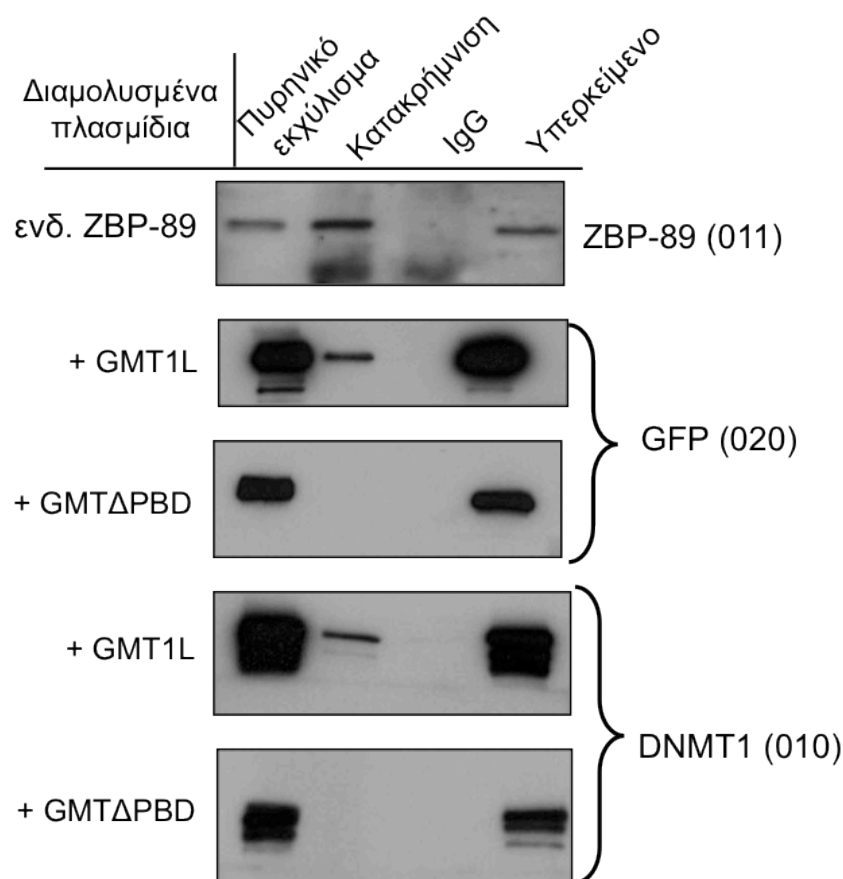
Όπως αποδείξαμε η πρωτεΐνη ZNF143 στα κύτταρα HEK βρίσκεται σε σύμπλοκο, με τις DNMT-1 και ZBP-89. Για να μελετήσουμε ποια περιοχή της DNMT-1 είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση της με τη ZNF143 χρησιμοποιήθηκαν όπως και προηγουμένως οι απαλειπτικές μεταλλάξεις της DNMT-1 (Εικόνα 39,40). Σε αντίθεση όμως με τη *GATA-1* η ZNF143 εκφράζεται ενδογενώς στα κύτταρα οπότε δεν χρειάζεται να γίνει συν-επιμόλυνση. Σε κύτταρα HEK λοιπόν έγινε επιμόλυνση με τις ελλειπτικές μεταλλάξεις της DNMT-1 και επακόλουθη απομόνωση πυρηνικών εκχυλισμάτων. Στα πυρηνικά εκχυλίσματα έγινε ανοσοκατακρήμνιση της ενδογενούς ZNF143 και το κατακρημνισμένο υλικό ελέγχθηκε για τις πρωτεΐνες ZNF143, GFP, DNMT-1 (Εικόνα 45). Από τα αποτελέσματα διαπιστώνεται πως η αλληλεπίδραση μεταξύ της DNMT-1 και της ZNF143

χάνεται όταν χρησιμοποιείται η GMTΔPBD υποδεικνύοντας ότι η περιοχή PBD είναι απαραίτητη και γι αυτή την αλληλεπίδραση. Παρατηρείται λοιπόν πως και στη περίπτωση της ZNF143, όπως και στη GATA-1, η περιοχή PBD της DNMT-1 είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία του συμπλόκου.



Εικόνα 45. Η περιοχή PBD της DNMT-1 είναι υπεύθυνη και για την αλληλεπίδραση με τη ZNF143. Κύτταρα HEK επιμολύνθηκαν με πλασμίδιο που εκφράζει κάθε μία από τις απαλειπτικές μεταλλάξεις της DNMT-1 (Εικόνα 37,38). Από τα διαμολυσμένα κύτταρα απομονώθηκαν πυρηνικά εκχυλίσματα στα οποία έγινε ανοσοκατακρήμνιση της ZNF143 (018) και το κατακρημνισμένο υλικό αναλύθηκε για την παρουσία των ZNF143 (018) GFP (019) και DNMT-1 (010). Για κάθε κατακρήμνιση χρησιμοποιήθηκαν 500μg πυρηνικού εκχυλίσματος) ενώ για το πυρηνικό εκχύλισμα και το υπερκείμενο φορτώθηκε το 8% του συνολικού εκχυλίσματος.

Θελήσαμε επίσης να ελέγξουμε κατά πόσο ισχύει το ίδιο και για την πρωτεΐνη ZBP-89. Για το λόγο αυτό επιμολύνθηκαν κύτταρα HEK293 με τα πλασμίδια GMT1L και GMTΔPBD (Εικόνα 37). Η πρωτεΐνη ZBP-89 εκφράζεται ενδογενώς. Από τα κύτταρα αυτά απομονώθηκαν πυρηνικά εκχυλίσματα στα οποία έγινε ανοσοκατακρήμνιση της ZBP-89 και στη συνέχεια το κατακρημνισμένο υλικό αναλύθηκε με τη χρήση αντισωμάτων για ZBP-89, GFP και DNMT-1 (Εικόνα 46).



Εικόνα 46. Η περιοχή PBD της DNMT-1 είναι υπεύθυνη και για την αλληλεπίδραση με τη ZBP-89. Κύτταρα HEK επιμολύνθηκαν με πλασμίδιο που εκφράζει τις GMT1L και GMTΔPBD (Εικόνα 37,38). Από τα διαμολυσμένα κύτταρα απομονώθηκαν πυρηνικά εκχυλίσματα στα οποία έγινε ανοσοκατακρήμνιση της ZBP-89 (011) και το κατακρημνισμένο υλικό αναλύθηκε για την παρουσία των ZBP-89 (001) GFP (019) και DNMT-1 (010). Για κάθε κατακρήμνιση χρησιμοποιήθηκαν 500μg πυρηνικού εκχυλίσματος) ενώ για το πυρηνικό εκχύλισμα και το υπερκείμενο φορτώθηκε το 8% του συνολικού εκχυλίσματος.

Παρατηρούμε πως η ελλειπτική μετάλλαξη της DNMT-1 GMTΔPBD δεν είναι ικανή να αλληλεπιδράσει με την ενδογενή ZBP-89. Επιπλέον όπως και στην περίπτωση των GATA-1 και ZNF143 όπου εκφράζεται και η GMTPBD καταργείται η αλληλεπίδραση και με την ενδογενή πρωτεΐνη DNMT-1.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

5.1 Βελτίωση της *in vivo* βιοτινυλίωσης

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής ο σκοπός ήταν ο χαρακτηρισμός και η μελέτη νέων πρωτεϊνικών συμπλόκων του μεταγραφικού παράγοντα GATA-1. Ο GATA-1 που είναι ο κύριος ρυθμιστής της ερυθροποίησης, εκπληρώνει τον ρόλο του μέσω του σχηματισμού πρωτεϊνικών συμπλόκων. (10). Με τη χρήση της μεθόδου της *in vivo* βιοτινυλίωσης στο παρελθόν χαρακτηρίστηκαν επιτυχώς νέες αλληλεπιδρώσεις πρωτεΐνες (168) αποδεικνύοντας τη δύναμη της συγκεκριμένης μεθόδου αλλά και το σημαντικό ρόλο της GATA-1 στη ερυθροποίηση.

Πρωταρχικός στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η βελτίωση της μεθόδου της *in vivo* βιοτινυλίωσης. Προς αυτή τη κατεύθυνση η βελτίωση εστιάστηκε σε δύο τομείς: α) Στη μείωση του υποβάθρου (background) που προσδένεται στα σφαιρίδια στρεπταβιδίνης και β) στον εμπλουτισμό των πυρηνικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων. Η *in vivo* βιοτινυλίωση σε σύζευξη με φασματομετρία μάζας αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο για την απομόνωση και χαρακτηρισμό των πρωτεϊνικών συμπλόκων. (184). Παρόλο που η συγκεκριμένη μέθοδος εξαιτίας της ειδικότητάς της υπερτερεί των πρωτεϊνικών ανοσοκατακρημνίσεων (είτε ενδογενών είτε με επίτοπο), ωστόσο κατά το στάδιο της φασματομετρίας μάζας ανιχνεύονται πρωτεΐνες οι οποίες προσδένονται τόσο μη ειδικά όσο και ειδικά. Γίνεται λοιπόν αντιληπτό ότι η μείωση του σήματος υποβάθρου θα ενδυναμώσει ακόμη περισσότερο τη συγκεκριμένη μέθοδο.

Όπως παρουσιάστηκε για τη μείωση του υποβάθρου που προσδένεται στα σφαιρίδια στρεπταβιδίνης εφαρμόστηκε διαφορετική μέθοδος απομόνωσης των πυρήνων. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε υποτονικό διάλυμα λύσης το οποίο περιέχει το μη ιονικό απορρυπαντικό NP-40. Η επιλογή του συγκεκριμένου διαλύματος έγινε προκειμένου να αποφευχθεί το μηχανικό στρες από τον ομογενοποιητή Dounce που μπορεί να αλλοιώσει τη

δομή του πυρηνικού φακέλου και να οδηγήσει σε διαρροή των πυρηνικών πρωτεϊνών. Όπως αποδείξαμε πειραματικά τα πρωτεϊνικά πυρηνικά εκχυλίσματα τα οποία παρασκευάζονται με τη χρήση του διαλύματος έχουν πολύ σημαντική μείωση στο ποσό των ενδογενών βιοτινυλιωμένων πρωτεϊνών. Χρησιμοποιώντας την πρωτεΐνη c-RAF διαπιστώθηκε ότι η παρατηρούμενη μείωση οφείλεται στη γενικότερη μείωση της μόλυνσης από τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες.

Μια ακόμη απόδειξη ότι η χρήση του NP-40 οδηγεί στη μείωση του υποβάθρου προέρχεται από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που παρασκευάστηκαν με τη χρήση υποτονικού διαλύματος και NP-40 και υποβλήθηκαν σε κατακρήμνιση στρεπταβιδίνης και φασματομετρία μάζας για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών. Από τη κατακρήμνιση στρεπταβιδίνης διαπιστώνεται ότι η χρήση του NP-40 προκαλεί δραματική μείωση των ενδογενών κυτταροπλασματικών βιοτινυλιωμένων πρωτεϊνών που προσδένονται στα σφαιρίδια. Η συγκεκριμένη μείωση αποτυπώνεται και στα αποτελέσματα της φασματομετρίας μάζας καθώς ανιχνεύεται πολύ μικρότερος αριθμός πεπτιδίων που αντιστοιχούν σε καρβοξυλάσες (φυσικά βιοτινυλιωμένες πρωτεΐνες).

Στο συγκεκριμένο σημείο θα πρέπει να τονιστεί ότι η χρήση του διαλύματος NP-40 δεν επηρεάζει την ποιότητα των πυρήνων ή των πυρηνικών εκχυλισμάτων που απομονώνονται. Η διαπίστωση αυτή προκύπτει από τη χρώση των απομονωμένων πυρήνων με FITC-IgG. Στο ενδεχόμενο που οι πυρήνες είχαν επηρεαστεί από το απορρυπαντικό τότε το FITC-IgG θα ήταν σε θέση να διαπεράσει την πυρηνική μεμβράνη και να την χρώσει, γεγονός το οποίο δεν ισχύει στην προκειμένη περίπτωση καθώς παραμένει εκτός πυρήνα. Επιπλέον ο σχηματισμός μεγαλομοριακών συμπλόκων από τις GATA-1 και FOG-1 όπως αυτά από χρωματογραφία διήθησης Superose 6 δείχνει ότι δεν υπάρχει διατάραξη των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων εξαιτίας της διαφυγής πυρηνικών πρωτεϊνών προς το κυτταρόπλασμα.

Το σημαντικότερο πλεονέκτημα της μείωσης της κυτταροπλασματικής μόλυνσης στα πυρηνικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα εξαιτίας του NP-40 είναι η αύξηση της ποιότητας των αποτελεσμάτων στα αποτελέσματα της φασματομετρίας μάζας από την *in vivo* βιοτινυλίωση. Μικρότερο υπόβαθρο

πρόσδεσης σημαίνει ευκολότερη ταυτοποίηση αλληλεπιδρώσων πρωτεϊνών. Η χρήση NP-40 επιτρέπει τον ευκολότερο χειρισμό σε περίπτωση πολλών δειγμάτων σε ένα πρωτόκολλο απομόνωσης πυρηνικών εκχυλισμάτων από ότι αν αυτό περιελάμβανε ομογενοποιητή Dounce.

Η ικανότητα που εμφανίζει το διάλυμα NP-40 είναι πολύ πιθανό να οφείλεται στην απομάκρυνση των κυτταροπλασματικών υπολειμμάτων που δημιουργούνται ύστερα από τη λύση των κυττάρων. Η χρήση ενός επιπλέον βήματος έκπλυσης των πυρήνων με NP-40 στο πρωτόκολλο απομόνωσης πιθανώς απομακρύνει το κυτταροπλασματικό υλικό που προσκολλάται στην εξωτερική μεριά της πυρηνικής μεμβράνης.

Ο δεύτερος στόχος για τη βελτίωση της μεθόδου της *in vivo* βιοτινυλίωσης ήταν στο επίπεδο της απομόνωσης των πυρηνικών εκχυλισμάτων. Αναλυτικότερα όπως προαναφέρθηκε η μέθοδος που χρησιμοποιούνταν μέχρι στιγμής για τη παραγωγή πυρηνικών εκχυλισμάτων από τα κύτταρα MEL έκανε χρήση διαλύματος υψηλής αλατότητας για την απομόνωση των πυρηνικών πρωτεϊνών(137). Όπως αποδείχθηκε, η συγκεκριμένη μέθοδος έχει το μειονέκτημα ότι δεν εκχυλίζει μεγάλη ποσότητα πρωτεΐνης GATA-1 η οποία και παραμένει στο αδιάλυτο ίζημα. Για το λόγο αυτό έγινε χρήση δυο εναλλακτικών μεθόδων εκχύλισης των πυρηνικών πρωτεϊνών με σκοπό να επιτευχθεί μεγαλύτερη εκχύλιση. Οι δύο αυτές μέθοδοι περιλαμβάνουν τη χρήση των διαλυμάτων NUN και RIPA από το οποίο όμως απουσιάζει το SDS (166).

Συγκρίνοντας το ποσό της συνολικής πρωτεΐνης που εκχυλίζεται από τον ίδιο αριθμό κυττάρων χρησιμοποιώντας τα διαλύματα υψηλής αλατότητας, NUN και RIPA διαπιστώθηκε ότι και τα 3 διαλύματα εμφανίζουν την ικανότητα να εκχυλίζουν το ίδιο ποσό συνολικής πρωτεΐνης από τους πυρήνες. Η σύγκριση του ποσού της πρωτεΐνης που εκχυλίζεται από τον ίδιο αριθμό κυττάρων έλαβε χώρα σε πηκτή πολυακρυλαμίδης τόσο σταθερής όσο και γραμμικής συγκέντρωσης. Η χρήση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης γραμμικής συγκέντρωσης 4-20% εξασφαλίζει την ικανότητα σύγκρισης του ποσού των πρωτεϊνών υψηλού μοριακού αλλά και χαμηλού μοριακού βάρους ταυτόχρονα.

Εφόσον διαπιστώθηκε πως το συνολικό ποσό της πρωτεΐνης που εκχυλίζεται από τον ίδιο αριθμό κυττάρων φαίνεται το ίδιο και για τις 3

μεθόδους στη συνέχεια διερευνήθηκε κατά πόσο υπάρχουν διαφορές στο ποσό εκχύλισης συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Ειδικότερα έγινε σύγκριση του ποσού της πρωτεΐνης GATA-1 που απομονώνεται στο διαλυτό εκχύλισμα και του ποσού που παραμένει στο αδιάλυτο ίζημα από τον ίδιο αριθμό κυττάρων. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της παραπάνω σύγκρισης έδειξε πως τόσο η χρήση του διαλύματος NUN όσο και RIPA (-SDS) έχουν την ικανότητα να εκχυλίζουν μεγαλύτερο ποσό πρωτεΐνης GATA-1 σε σχέση με τη χρήση διαλύματος υψηλής αλατότητας. Επίσης, τα διαλύματα NUN και RIPA (-SDS) είναι σε θέση να εκχυλίζουν σε μεγαλύτερο βαθμό μερικές από τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τη GATA-1 όπως τις FOG-1 και ZNF143 καθώς με τη χρήση τους δεν ανιχνεύεται πρωτεΐνη στο αδιάλυτο ίζημα. Ωστόσο για άλλες αλληλεπιδρώσες με τη GATA-1 πρωτεΐνες, όπως τις Gfi-1b και DNMT-1, η χρήση των NUN και RIPA (-SDS) δεν οδηγεί σε μεγαλύτερα ποσά εκχύλισης από ότι η χρήση του διαλύματος υψηλής αλατότητας.

Συνεπώς, με τη χρήση των παραπάνω διαλυμάτων έγινε εφικτή η εκχύλιση μεγαλύτερου ποσού GATA-1 πρωτεΐνης στο διαλυτό κλάσμα. Ωστόσο η χρήση των συγκεκριμένων μεθόδων εκχύλισης δεν θα είχε καμία πρακτική αξία εάν στα απομονωμένα πυρηνικά εκχυλίσματα δεν σχηματίζονται πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Προκειμένου να διαπιστωθεί ότι η σύσταση των διαλυμάτων αυτών δεν επιδρά στην ικανότητα της GATA-1 να σχηματίσει πρωτεϊνικά σύμπλοκα τα πυρηνικά εκχυλίσματα υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία μοριακής διήθησης με τη χρήση στήλης Superose 6. Από τα αποτελέσματα της χρωματογραφίας είναι εμφανές πως η χρήση των μεθόδων NUN και RIPA (-SDS) επιτρέπει το σχηματισμό μεγαλομοριακών πρωτεϊνικών συμπλόκων της GATA-1 όπως προκύπτει από το προφίλ της έκλουσης. Το ίδιο ισχύει και για τη FOG-1 καθώς και αυτή όπως αποδεικνύεται είναι σε θέση να σχηματίσει πρωτεϊνικά σύμπλοκα.

Συγκεντρωτικά αποδεικνύεται πως παρόλο που οι μέθοδοι εκχύλισης NUN και RIPA (-SDS) δεν αλλάζουν το ποσό εκχύλισης της συνολικής πρωτεΐνης ωστόσο έχουν την ικανότητα να εκχυλίζουν μεγαλύτερο ποσό GATA-1 χωρίς η σύσταση τους να επηρεάζει τη δομή των πυρηνικών πρωτεϊνών καθώς η δημιουργία των πρωτεϊνικών συμπλόκων δεν επηρεάζεται. Η ικανότητα που εμφανίζουν οι συγκεκριμένες μέθοδοι σε σχέση με τη μέθοδο υψηλής αλατότητας να απομονώνουν μεγαλύτερο ποσό

GATA-1 (και όχι μόνο) από τον ίδιο αριθμό κυττάρων οφείλεται πιθανότατα στη σύσταση τους η οποία πέρα από αλάτι περιέχει και ικανή συγκέντρωση απορρυπαντικών που μπορεί να διαταράξει τις υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις, τους δεσμούς υδρογόνου και τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (143)

Έχοντας πετύχει το στόχο βελτίωσης της *in vivo* βιοτινυλίωσης αφενός με τη μείωση του υποβάθρου πρόσδεσης και αφετέρου με τον εμπλουτισμό των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων σε GATA-1 έγινε μεγάλης κλίμακας κατακρήμνιση στρεπταβιδίνης της GATA-1 πυρηνικών εκχυλισμάτων παρασκευασμένα από τις συγκεκριμένες μεθόδους προκειμένου να αναγνωριστούν νέες αλληλεπιδρώσες πρωτεΐνες. Από την αρχική ανάλυση των αποτελεσμάτων διαπιστώσαμε μια αλληλεπικάλυψη πρωτεϊνών μεταξύ των μεθόδων NUN και RIP. Στα αποτελέσματα της φασματομετρίας μάζας ταυτοποιήσαμε πρωτεΐνες που στο παρελθόν είχαν χαρακτηριστεί ως αλληλεπιδρώσες με τη GATA-1 σε πυρηνικά εκχυλίσματα παρασκευασμένα με τη μέθοδο υψηλής αλατότητας (168). Επιπλέον από τα αποτελέσματα ταυτοποιήθηκαν και πρωτεΐνες που είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι αλληλεπιδρούν με τη GATA-1 χωρίς ωστόσο να έχουν ανιχνευθεί στο παρελθόν με τη μέθοδο παραγωγής πυρηνικών εκχυλισμάτων υψηλής αλατότητας, ενδυναμώνοντας με αυτό τον τρόπο την πειραματική μας διαδικασία. Παράλληλα αναγνωρίστηκαν και πρωτεΐνες που δεν έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικά μέχρι στιγμής ότι αλληλεπιδρούν με τη GATA-1 και χρήζουν περισσότερης ανάλυσης προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι αλληλεπιδρούν με τη GATA-1 όπως και ο λειτουργικός ρόλος της συγκεκριμένης αλληλεπίδρασης. Ανάμεσα σε αυτή την κατηγορία πρωτεϊνών εντοπίστηκε και η πρωτεΐνη DNMT-1 και την οποία επιλέξαμε να επικεντρωθούμε και θα συζητηθεί παρακάτω.

5.2 Απομάκρυνση νουκλεϊκών οξέων από τα πυρηνικά εκχυλίσματα.

Ύστερα από σύγκριση των πρωτεϊνών που ανιχνεύονται στην κατακρήμνιση των πυρηνικών εκχυλισμάτων bioGATA-1 και BirA (και για τις δυο μεθόδους) διαπιστώνεται ότι υπάρχουν αρκετές πρωτεΐνες οι οποίες προσδένονται και κατακρημνίζονται μη ειδικά όπως πχ τοποϊσομεράσες και πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην επεξεργασία του DNA και του RNA.

Αρχικώς, προκειμένου να διαπιστωθεί η παραπάνω υπόθεση, έγινε απομόνωση νουκλεϊκών οξέων από τα πυρηνικά εκχυλίσματα NUN και RIPA όπου και επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη DNA και RNA. Για την πέψη των νουκλεϊκών οξέων έγινε χρήση DNάσης και RNάσης στα πυρηνικά εκχυλίσματα, οι οποίες όμως απέτυχαν να απομακρύνουν πλήρως τα νουκλεϊκά οξέα. Η αποτυχία αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι στις συνθήκες που επικρατούν στα διαλύματα NUN και RIPA τα συγκεκριμένα ένζυμα δεν είναι δραστικά παρόλο που η επώαση λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

Για το λόγο αυτό έγινε δοκιμή της πέψης των νουκλεϊκών οξέων με χρήση βενζονάσης (172). Με τη χρήση βενζονάσης επιτύχαμε την πλήρη πέψη του DNA και του RNA και βρήκαμε τις βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας της. Η βενζονάση έχει την ικανότητα να είναι πλήρως λειτουργική σε θερμοκρασία 4 °C χωρίς να απαιτείται προεργασία για την αλλαγή των συστατικών ή των συγκεντρώσεων των διαλυμάτων εκχύλισης. Με αυτόν τον τρόπο δεν υπάρχουν απώλειες στις ποσότητες των πρωτεϊνών και τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα δεν διαταράσσονται.

Η απομάκρυνση των νουκλεϊκών οξέων από το προς κατακρημνισμένο υλικό είναι ικανή όπως θα συζητηθεί και παρακάτω να απομακρύνει αρκετές από τις πρωτεΐνες που ανιχνεύονται στη φασματομετρία. Ο πρώτος λόγος για τον οποίο συμβαίνει το συγκεκριμένο οφείλεται στο γεγονός ότι πολλές από τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις που ανιχνεύονται ενδεχομένως να οφείλονται στην εγγύτητα των πρωτεϊνών εξαιτίας της ικανότητας τους πρόσδεσης σε γειτονικές αλληλουχίες του DNA και όχι επειδή μπορούν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους. Ο δεύτερος λόγος είναι ότι πολλές από τις πρωτεΐνες που ανιχνεύονται και έχουν σχέση με την επεξεργασία του DNA και του RNA και δε θα ανιχνεύονταν στο κατακρημνισμένο υλικό εφόσον δεν υπήρχαν σε αυτό νουκλεϊκά οξέα.

Από τα αποτελέσματα της φασματομετρίας μάζας που παρουσιάστηκαν αλλά και όπως συζητείται αναλυτικά στη συνέχεια αποφασίσαμε να αναλύσουμε περαιτέρω τις ανιχνευόμενες αλληλεπιδράσεις της GATA-1 με τις πρωτεΐνες TAF αλλά και με την DNMT-1. Η χρήση βενζονάσης απέδειξε ότι οι περισσότερες αλληλεπιδράσεις με τις πρωτεΐνες TAF δεν ήταν πραγματικές. Ωστόσο κάτι τέτοιο δεν ισχύει για την

αλληλεπίδραση της GATA-1 με την DNMT-1 αλλά και της DNMT-1 με τους μεταγραφικούς παράγοντες.

5.3 Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις: Παρουσίαση των αλληλεπιδράσεων των TAF με τη GATA-1

Όπως προαναφέρθηκε χρησιμοποιώντας τις εναλλακτικές μεθόδους απομόνωσης πυρηνικών εκχυλισμάτων ταυτοποιήθηκε ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών ως αλληλεπιδρώσες με τη GATA-1. Ανάμεσα σε αυτές που ταυτοποιούνται είναι και αρκετές πρωτεΐνες TAF.

Η μελέτη των πρωτεϊνών TAF παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον εξαιτίας της ικανότητας που έχουν να αλληλεπιδρούν με τη πρωτεΐνη TBP σχηματίζοντας το σύμπλοκο TFIID (185). Η ιδιότητα της TBP να προσδένεται στην αλληλουχία TATA προσδίδει στο σύμπλοκο TFIID την ικανότητα αναγνώρισης του υποκινητή και μεταγραφή του συγκεκριμένου γονιδίου μέσω της αλληλεπίδρασης με το σύμπλοκο PIC. Επίσης η ιδιότητα των πρωτεϊνών TAF να αλληλεπιδρούν με βασικά στοιχεία του υποκινητή όπως : Inr, DPE και DCE προσδίδει την ικανότητα της τοποθέτησης του PIC σε υποκινητές χωρίς αλληλουχία TATA (186). Επιπλέον οι TAF έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδράσουν με τις περιοχές ενεργοποίησης των μεταγραφικών παραγόντων (187). Το γεγονός αυτό εγείρει την πιθανότητα ιστοειδικής ρύθμισης της μεταγραφής από τις TAF είτε μέσω της δημιουργίας διαφορετικών συμπλόκων είτε μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων.

Για τους παραπάνω λόγους αποφασίσαμε να διερευνήσουμε τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών της GATA-1 και των TAF. Αρχικά παρατηρώντας τα αποτελέσματα της φασματομετρίας μάζας διαπιστώθηκε πως για τη κατακρήμνιση στα εκχυλίσματα NUN και RIPA των κυττάρων bioGATA-1 ανιχνεύεται μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών TAF. Ωστόσο μέρος αυτών των πρωτεϊνών ανιχνεύεται και στην κατακρήμνιση των αντίστοιχων εκχυλισμάτων των κυττάρων BirA, υποδεικνύεται το ενδεχόμενο οι παρατηρούμενες αλληλεπιδράσεις να μην είναι αληθινές. Να σημειωθεί πως η χρήση της μεθόδου RIPA για την παραγωγή των προς κατακρήμνιση πυρηνικών εκχυλισμάτων οδηγεί στην ταυτοποίηση περισσότερων πρωτεϊνών TAF. Το γεγονός αυτό οφείλεται στη σύσταση του διαλύματος RIPA που επιτρέπει καλύτερη εκχύλιση για τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες.

Ένας ακόμη παράγοντας ο οποίος πρέπει να ληφθεί υπόψη είναι το γεγονός ότι τα πυρηνικά εκχυλίσματα NUN και RIPA στα οποία έγινε κατακρήμνιση της βιοτινυλιωμένης GATA-1 και στη συνέχεια ταυτοποίηση των κατακρημνισμένων πρωτεϊνών με φασματομετρία μάζας δεν έχουν υποβληθεί σε επεξεργασία με βενζονάση. Εγείρεται λοιπόν η πιθανότητα ότι κάποιες από τις ανιχνευόμενες αλληλεπιδράσεις να μην είναι πραγματικές. Ως ένα τέτοιο παράδειγμα ψευδών θετικών αλληλεπιδράσεων παρουσιάζουμε τις πρωτεΐνες TAF. Αναλυτικότερα ύστερα από την επιτυχή εύρεση λειτουργικών αντισωμάτων έναντι των TAF, κατέστη εφικτή η δυνατότητα πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης με σκοπό τη διαλεύκανση των αλληλεπιδράσεων.

Η κατακρήμνιση της ενδογενούς GATA-1 σε πυρηνικά εκχυλίσματα κυττάρων RIPA τα οποία έχουν υποστεί επεξεργασία με βενζονάση, έδειξε πως αρκετές από τις ανιχνευόμενες με φασματομετρία μάζας αλληλεπιδράσεις δεν είναι πραγματικές. Συγκεκριμένα, η GATA-1 αλληλεπιδρά ασθενώς με τη TAF10 ενώ δεν εμφανίζεται να αλληλεπιδρά με τις άλλες πρωτεΐνες που ταυτοποιούνται στη φασματομετρία μάζας. Ωστόσο η αλληλεπίδραση της GATA-1 με τη πρωτεΐνη TAF10 είναι πραγματική καθώς το αντίστροφο πείραμα δηλαδή κατακρήμνιση της ενδογενούς TAF10 κατακρημνίζει επιτυχώς την ενδογενή GATA-1. Να συμπληρωθεί ότι η TAF10 δεν αλληλεπιδρά με τους μεταγραφικούς παράγοντες TAL-1 και LDB-1 με τους οποίους έχει αναφερθεί στον παρελθόν ότι αλληλεπιδρά (Πέτρος Παπαδόπουλος, Erasmus Medical Center, μη δημοσιευμένα αποτελέσματα).

Η ανίχνευση της αλληλεπίδρασης της GATA-1 με τις πρωτεΐνες TAF αποτελεί ένα πολύ καλό παράδειγμα ψευδούς θετικής αλληλεπίδρασης που υποδεικνύει ότι κατά τη μελέτη πρωτεϊνών με ικανότητα πρόσδεσης στο DNA θα πρέπει να γίνεται πέψη των νουκλεϊκών οξέων. Η παρατήρηση αυτή συνάδει και με πρόσφατη αναφορά (171) ενός παραδείγματος ανίχνευσης ψευδούς θετικής αλληλεπίδρασης μεταξύ της GATA-1 και του μεταγραφικού παράγοντα KLF3. Στη συγκεκριμένη δημοσίευση χρησιμοποιήθηκε κατακρήμνιση GST προκειμένου να διερευνηθεί η αλληλεπίδραση των δυο αυτών πρωτεϊνών *in vitro* και διαπιστώθηκε πως η ανιχνευόμενη αλληλεπίδραση τους οφείλεται στην παρουσία νουκλεϊκών οξέων. Στο άρθρο αυτό διαπιστώνεται η αδυναμία της μεθόδου σήμανσης με GST για τη μελέτη πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων.

Η αλληλεπίδραση της GATA-1 μόνο με τη TAF10 ενδεχομένως να εξασφαλίζει την ιστοειδική πρόσληψη του συμπλόκου TFIID σε γονίδια που ρυθμίζονται μέσω της GATA-1 και ίσως προσφέρει ένα ακόμη στάδιο ελέγχου ρύθμισης των γονιδίων αυτών. Παρόλα αυτά χρειάζονται περαιτέρω πειράματα που θα περιλαμβάνουν ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης ώστε να προσδιοριστούν κοινοί γονιδιακοί στόχοι μεταξύ της GATA-1 και της TAF10 για να αποσαφηνιστεί ο λειτουργικός ρόλος της συγκεκριμένης αλληλεπίδρασης.

5.4 Αλληλεπίδραση GATA-1 με DNMT-1

Στα αποτελέσματα της φασματομετρίας μάζας για τη GATA-1 μια από τις πρωτεΐνες που αναγνωρίζεται με υψηλή βαθμολογία να αλληλεπιδρά με τη GATA-1 είναι η DNMT-1. Σε μελέτες που είχαν λάβει χώρα στο παρελθόν σχετικά με τη ρύθμιση της έκφρασης της γ-σφαιρίνης χαρακτηρίστηκε το πρωτεϊνικό σύμπλοκο DRED (direct repeat erythroid definitive) το οποίο έχει την ικανότητα να προσδένεται στην περιοχή DR1 που εντοπίζεται στον υποκινητή της γ-σφαιρίνης (188). Η ανάλυση του συμπλόκου DRED έδειξε ότι κύρια συστατικά του είναι οι πυρηνικοί υποδοχείς TR2/TR4 (Testicular receptor 2 / Testicular receptor 4). Σε συνέχεια της συγκεκριμένης μελέτης έγινε εφαρμογή της μεθόδου της *in vivo* βιοτινυλίωσης στους υποδοχείς TR2 και TR4 σε κύτταρα MEL (189). Από τη φασματομετρία μάζας στους σημασμένους με βιοτίνη υποδοχείς TR2/TR4 υποδοχείς που ακολούθησε ταυτοποιήθηκαν αρκετές πρωτεΐνες ανάμεσα στις οποίες ήταν οι DNMT-1, τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα NuRD και CoREST, όπως και οι HDAC3, TIF1β. Η επιβεβαιωμένη παρουσία της DNMT-1 στο συγκεκριμένο σύμπλοκο όπως και η παρουσία της στα δικά μας αποτελέσματα σε συνδυασμό με την ικανότητα που εμφανίζει να λειτουργεί και ως καταστολέας της μεταγραφής (116) μας οδήγησε στην περαιτέρω μελέτη για τη λειτουργία της στην ερυθροποίηση.

Προκειμένου να διευκρινιστεί ο ρόλος ο οποίος διαδραματίζει η DNMT-1 στην ερυθροποίηση είναι απαραίτητο να διευκρινιστούν τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα στα οποία αυτή συμμετέχει. Για το σκοπό αυτό αποφασίσαμε να εφαρμόσουμε τη μέθοδο της *in vivo* βιοτινυλίωσης. Συγκεκριμένα σε κύτταρα MEL στα οποία εκφράζεται βιοτινυλιωμένη DNMT-1 έγινε κατακρήμνιση στρεπταβιδίνης και οι πρωτεΐνες του κατακρημνισμένου υλικού

ταυτοποιήθηκαν με φασματομετρία μάζας. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί όπως συζητήθηκε και παραπάνω τα πυρηνικά εκχυλίσματα επεξεργάστηκαν με βενζονάση προκειμένου να απομακρυνθεί το υπόβαθρο και οι μη ειδικές αλληλεπιδράσεις.

Στα αποτελέσματα της φασματομετρίας μάζας για την DNMT-1 ανιχνεύθηκαν αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες. Είναι πολύ ενδιαφέρον το γεγονός ότι μια πρωτεΐνη όπως η DNMT-1 που έχει ως σκοπό τη μεθυλίωση του DNA εμφανίζεται να αλληλεπιδρά με τόσους μεταγραφικούς παράγοντες. Αναλύοντας τα αποτελέσματα από τη φασματομετρία παρατηρείται η ανίχνευση των μεταγραφικών παραγόντων ZBP-89, Gfi-1b, ZNF143 και GATA-1 που έχουν σημαντικό ρόλο στην ερυθροποίηση. Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι οι πρωτεΐνες ZBP-89, Gfi-1b και ZNF143 αλληλεπιδρούν με τη GATA-1 (92,168,169), με την αλληλεπίδραση GATA-1/ZNF143 να είναι χαρακτηρισμένη μόνο στα μεγακαρυοκύτταρα. Η πρωτεΐνη FOG-1 ανιχνεύεται μόνο σε ένα πείραμα φασματομετρίας γεγονός το οποίο σημαίνει ότι υπάρχει η πιθανότητα να μην αλληλεπιδρά με την DNMT-1. Διαπιστώνουμε λοιπόν ότι η DNMT-1 μπορεί να αλληλεπιδράσει με ερυθροποιητικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Πέρα από τους ερυθροποιητικούς μεταγραφικούς παράγοντες που ανιχνεύθηκαν να αλληλεπιδρούν με τη DNMT-1 ταυτοποιούνται και οι μεταγραφικοί παράγοντες RBP-J NFI-A, NFI-X, YY1, που είναι γνωστό βιβλιογραφικά ότι έχουν ενεργό ρόλο στην αιματοποίηση (ενότητα 4.3.2 Ανάλυση αποτελεσμάτων φασματομετρίας μάζας της κατακρημνισμένης bio-DNMT-1).

Όπως έγινε σαφές από τη μελέτη των ανιχνευόμενων αλληλεπιδράσεων της GATA-1 η ταυτοποίηση νέων πρωτεϊνών από τη φασματομετρία δε συνεπάγεται απαραίτητα ότι συγκεκριμένες πρωτεΐνες βρίσκονται στο ίδιο σύμπλοκο. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητο να γίνει επιβεβαίωση των ανιχνευόμενων αλληλεπιδράσεων. Στο πρώτο στάδιο εφαρμόσαμε κατακρήμνιση στρεπταβιδίνης της βιοτινυλιωμένης DNMT-1 και μέσω ανοσοαποτύπωσης διαπιστώσαμε συγκατακρήμνιση όλων των παραγόντων που ανιχνεύονται στη φασματομετρία μάζας πλην της FOG-1. Ταυτόχρονα με κατακρήμνιση στρεπταβιδίνης συγκατακρημνίστηκαν επιτυχώς οι πρωτεΐνες MI-2β, MTA2, MTA3, HDAC-1, HDAC-2, RbAp46, RbAp48, MBD2 και MBD3, που αποτελούν κύρια συστατικά του συμπλόκου

αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης NuRD (190). Πολλές από τις πρωτεΐνες που απαρτίζουν το σύμπλοκο NuRD ανιχνεύθηκαν στη φασματομετρία μάζας για την DNMT-1. Οι συγκεκριμένες κατακρημνίσεις αποδεικνύουν ότι ανιχνευόμενες αλληλεπιδράσεις είναι πραγματικές.

Ανεξάρτητα από την κατακρημνιση της βιοτινυλιωμένης DNMT-1 έγινε και κατακρημνιση της ενδογενούς DNMT-1 όπου καταφέραμε επίσης επιτυχώς να συγκατακρημνίσουμε όλους του μεταγραφικούς παράγοντες που ανεφέρθηκαν παραπάνω. Να σημειωθεί ότι με την κατακρημνιση της ενδογενούς πρωτεΐνης ανιχνεύσαμε και την FOG-1 που δεν είχε ανιχνευθεί από τις κατακρημνίσεις στρεπταβιδίνης. Εξαιτίας του ρόλου που έχει η GATA-1 στην ερυθροποίηση αλλά και από τα αποτελέσματα φασματομετρίας μάζας τόσο για τη GATA-1 όσο και για τη DNMT-1 σε συνδυασμό με τις κατακρημνίσεις επιλέξαμε να μελετήσουμε ειδικότερα την αλληλεπίδραση DNMT-1/ GATA-1. Επιβεβαιώσαμε την ικανότητα της ενδογενούς GATA-1 σε κύτταρα MEL να συγκατακρημνίζει την DNMT-1 όπως και τις ZBP-89 και ZNF143. Από τα συγκεκριμένα πειράματα μπορούμε να υποστηρίξουμε την ύπαρξη του συμπλόκου GATA-1/DNMT-1/ZNF-143/ZBP-89. Η ύπαρξη του συμπλόκου αυτού επιβεβαιώνεται επίσης και όταν κατακρημνίζοντας τις ZNF143 και ZBP-89 συγκατακρημνίζονται οι GATA-1/DNMT-1 αλλά και από τα προφίλ έκλουσης σε στήλη χρωματογραφίας Superose 6. Επιπρόσθετα κατακρημνίζοντας ξεχωριστά τις ενδογενείς DNMT-1, ZNF143 και ZBP-89 ανιχνεύουμε τη FOG-1 ενώ η Gfi-1b συγκατακρημνίζεται μόνο με τη DNMT-1 και όχι με τις ZBP-89 και ZNF143.

Από τις κατακρημνίσεις αυτές είναι πολύ δύσκολο να απαντηθεί το ερώτημα αν οι πρωτεΐνες DNMT-1/ZBP-89/ZNF143/GATA-1 στα κύτταρα MEL αλληλεπιδρούν ως ένα σύμπλοκο ή σε διακριτά υποσύνπλοκα. Για το σκοπό αυτό αφαιρέσαμε πλήρως την GATA-1 από τα πυρηνικά εκχυλίσματα και διαπιστώσαμε πως η DNMT-1 είναι ικανή να αλληλεπιδρά με τις ZBP-89 και ZNF143 απουσία της. Ωστόσο απουσία της GATA-1 η DNMT-1 δεν αλληλεπιδρά με τις FOG-1 και Gfi-1b. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η DNMT-1 σχηματίζει τουλάχιστον τρία υποσύνπλοκα: το υποσύνπλοκο Α DNMT-1/GATA-1/Gfi-1b, το υποσύνπλοκο Β DNMT-1/GATA-1/FOG-1/ZBP-89/ZNF143 και το υποσύνπλοκο Γ DNMT-1/ZNF143/ZBP-89.

Η ευρεία έκφραση των DNMT-1, ZNF143 και ZBP-89 μας επέτρεψε να διαπιστώσουμε πως οι πρωτεΐνες αυτές αλληλεπιδρούν και σε μη ερυθροποιητικά κύτταρα όπως τα HEK. Επιπλέον το γεγονός ότι στα HEK δεν εκφράζονται και ερυθροποιητικοί παράγοντες μας επέτρεψε τη χρήση τους για πειράματα επιμολύνσεων. Μέσα από αυτά τα πειράματα αποδείξαμε ότι σε μη ερυθροποιητικό υπόβαθρο μόνο η GATA-1 μπορεί και αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο DNMT-1/ZNF143/ZBP-89 και όχι οι FOG-1 και Gfi-1b. Το γεγονός αυτό είναι πολύ πιθανό να οφείλεται σε δύο λόγους: α) στο ότι οι FOG-1 και Gfi-1b αλληλεπιδρούν με το σύμπλοκο DNMT-1/ZNF143/ZBP-89 μέσω της GATA-1 και β) η έλλειψη ερυθροποιητικού υποβάθρου οδηγεί σε απώλεια μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων απαραίτητων για το σχηματισμό των αλληλεπιδράσεων.

Για να ανακαλυφθεί η περιοχή της DNMT-1 που είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση της DNMT-1 με τη GATA-1 χρησιμοποιήσαμε απαλειπτικές μεταλλάξεις της DNMT-1 με τις οποίες επιμολύναμε κύτταρα HEK. Να σημειωθεί πως επειδή η χρήση αντισώματος GFP για την κατακρήμνιση των απαλειπτικών μεταλλάξεων της DNMT-1 οδηγούσε στη συγκατακρήμνιση και της ενδογενούς πρωτεΐνης DNMT-1 χρειάστηκε να ακολουθήσουμε την αντίστροφη στρατηγική. Για το λόγο αυτό προχωρήσαμε σε κατακρήμνιση της GATA-1 ελέγχοντας ποια από τις μεταλλάξεις δεν κατακρημνίζεται. Η μετάλλαξη της DNMT-1 που δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με τη GATA-1 είναι εκείνη στην οποία απουσιάζει η PBD περιοχή.

Η χρήση των σημειακών μεταλλάξεων της DNMT-1 Q162E και F169S που δεν μπορούν να αλληλεπιδράσουν (183) με την PCNA αλληλεπιδρούν με GATA-1 αποδεικνύει ότι η αλληλεπίδραση δεν γίνεται μέσω της PCNA ή των αμινοξέων που χρειάζονται για την αλληλεπίδραση με τη PCNA. Εκφράζοντας την πεπτιδική αλληλουχία PBDQ162E σημασμένη με GFP σε κύτταρα HEK μαζί με GATA-1 δείξαμε πως μόνο αυτό το μικρό κομμάτι της DNMT-1 είναι ικανό να αλληλεπιδρά με τη GATA-1 χωρίς να χρειάζονται οι υπόλοιπες λειτουργικές περιοχές. Ακολουθώντας την ίδια στρατηγική για τις ZBP-89 και ZNF143 διαπιστώσαμε πως η περιοχή PBD απαιτείται και για την αλληλεπίδραση των δυο αυτών πρωτεϊνών με τη DNMT-1.

Στο σημείο αυτό πρέπει να τονισθούν δυο αποτελέσματα. Πρώτον εκφράζοντας την απαλειπτική μετάλλαξη GMTΔPBD παρατηρούμε την απώλεια αλληλεπίδρασης της GATA-1 με τη συγκεκριμένη μετάλλαξη όπως και απώλεια της αλληλεπίδρασης της GATA-1 με την ενδογενή DNMT-1 πρωτεΐνη. Δεύτερον η έκφραση της PBDQ162E-GFP αποσπά τη μεγαλύτερη ποσότητα της GATA-1 με αποτέλεσμα να διαταράσσεται η αλληλεπίδραση της GATA-1 με την ενδογενή DNMT-1. Η χρήση των δυο αυτών συμπληρωματικών μεταλλάξεων μας επιτρέπει με βεβαιότητα να υποστηρίξουμε ότι η περιοχή PBD ευθύνεται αποκλειστικά για την αλληλεπίδραση των δυο πρωτεϊνών

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι μετά το χαρακτηρισμό της περιοχής της DNMT-1 που απαιτείται για την αλληλεπίδραση της με τη GATA-1 μπορούμε να προχωρήσουμε σε πειράματα προκειμένου να εξακριβώσουμε τη λειτουργική σημασία της συγκεκριμένης αλληλεπίδρασης. Η αποσιώπηση της έκφρασης της DNMT-1 στα MEL (πχ με τη χρήση shRNA) αποτελεί μια πολύ καλή στρατηγική για τη μελέτη της γενικότερης λειτουργίας της εν λόγω πρωτεΐνης ωστόσο δεν μπορεί να προσφέρει πληροφορίες για το ρόλο της αλληλεπίδρασης GATA-1/DNMT-1. Ο μοναδικός τρόπος για να διαπιστωθεί η λειτουργία της GATA-1 είναι η διατάραξη της αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών. Σε πειράματα που βρίσκονται σε εξέλιξη έγινε έκφραση της πρωτεΐνης PBDQ163E-GFP από το υποκινητή του γονιδίου της GATA-1 σε ποντικούς. Σκοπός του πειράματος είναι η PBDQ162E να αλληλεπιδράσει με την GATA-1 ώστε να διαταράξει την αλληλεπίδραση DNMT1 - GATA-1 και εφόσον η αλληλεπίδραση αυτή έχει κάποιο ρόλο στη φυσιολογία του ζώου θα οδηγήσει στη δημιουργία κάποιου φαινότυπου. Η ανάλυση του φαινοτύπου θα οδηγήσει στην κατανόηση της σημασίας της αλληλεπίδρασης. Παρόμοια στρατηγική έχει ακολουθηθεί και από άλλες ερευνητικές ομάδες για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων της GATA-1 με πρωτεΐνες που έχουν διαχειριστικό ρόλο στο κύτταρο (housekeeping gene) (191).

Ο ολοένα αυξανόμενος αριθμός μελετών για το ρόλο της DNMT-1 στην αιματοποίηση και γενικότερα στην κυτταρική διαφοροποίηση αποδεικνύει τη γενικότερη προσπάθεια αποσαφήνισης της λειτουργίας της ως πιθανού ρυθμιστή της μεταγραφής. Όσον αφορά την αιματοποίηση οι μέχρι στιγμής

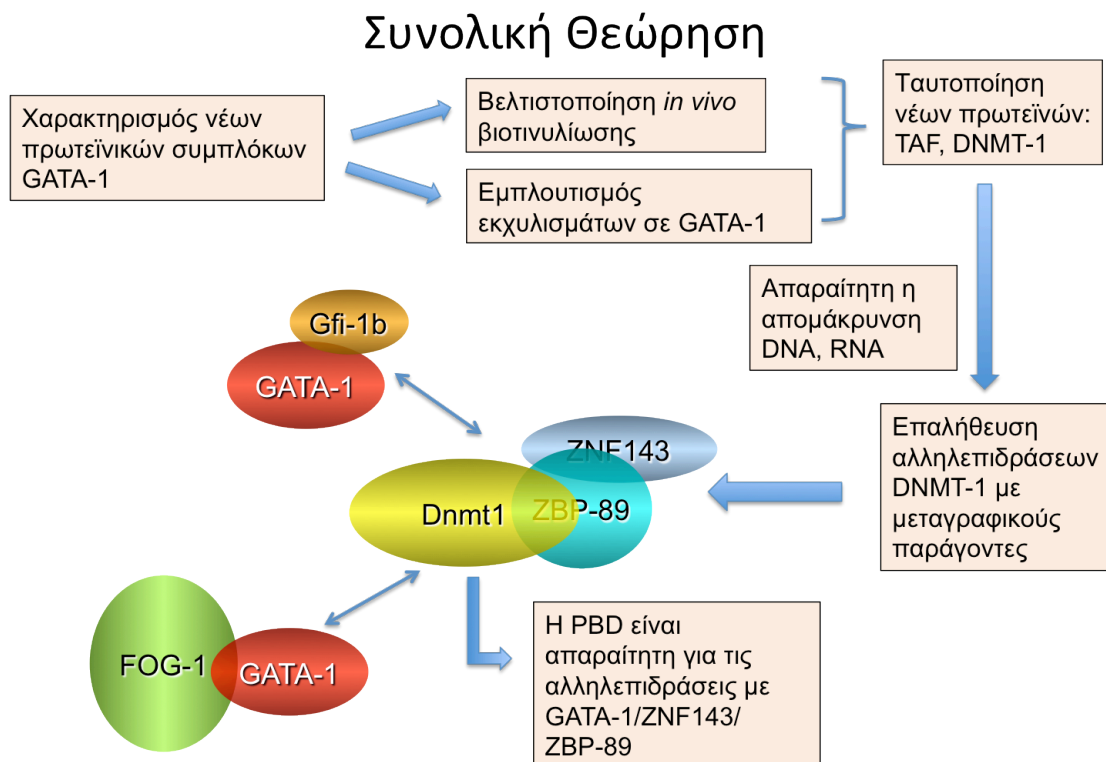
μελέτες δίνουν αντιφατικά αποτελέσματα (192,193), καθώς μειωμένη έκφραση της DNMT-1 σε HSC στην μια περίπτωση δημιουργεί προβλήματα διαφοροποίησης της λεμφικής σειράς χωρίς να επηρεάζεται η λεμφική ενώ στην άλλη περίπτωση παρατηρείται το ακριβώς αντίθετο. Η απουσία της DNMT-1 σε προγονικά κύτταρα του παγκρέατος έχει ως αποτέλεσμα την ανικανότητα ανάπτυξης του ιστού (194). Επίσης σε μια ακόμα μελέτη διαπιστώνεται η ανάγκη της DNMT-1 για τη διαμόρφωση του κερατοειδούς του οφθαλμού (195). Γίνεται λοιπόν αντιληπτό ότι η DNMT-1 πέρα από το ρόλο που εμφανίζεται να έχει στη διαφοροποίηση των κυττάρων του αιματοποιητικού συστήματος εμπλέκεται και στη διαφοροποίηση των κυττάρων και άλλων ιστών.

Όσον αφορά τον μοριακό μηχανισμό των χαρακτηρισμένων αλληλεπιδράσεων μέχρι στιγμής δεν είναι δυνατό να ειπωθεί κάτι συγκεκριμένο. Ευελπιστούμε πως η διατάραξη της αλληλεπίδρασης στα ποντίκια θα οδηγήσει στη δημιουργία κάποιου φαινοτύπου η μελέτη του οποίου θα εξηγήσει το μοριακό μηχανισμό. Είναι πολύ πιθανό ο μηχανισμός δράσης της DNMT-1 να είναι ανεξάρτητος από το ρόλο της ως μεθυλοτρανσφεράση.. Η συγκεκριμένη υπόθεση βασίζεται σε πρόσφατες αναφορές (194) που δείχνουν πως σε προγονικά κύτταρα του παγκρέατος στα οποία απουσιάζει η DNMT-1 υπάρχει σημαντική συσσώρευση της p53. Μέρος της εν λόγω συσσώρευσης οφείλεται στην ανικανότητα καταστολής του γονιδίου της p53 εξαιτίας της απουσίας της DNMT-1 από τον υποκινητή. Ωστόσο η μη ύπαρξη μεθυλιωμένων CpG νουκλεοτιδίων γύρω από τον υποκινητή υποδηλώνει πως η DNMT-1 λειτουργεί ως καταστολέας της έκφρασης ανεξάρτητα από τη μεθυλίωση. Λαμβάνοντας τα παραπάνω υπόψη υποθέτουμε πως η αλληλεπίδραση της DNMT-1 με μεταγραφικούς παράγοντες προσφέρει ένα επιπλέον επίπεδο ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης πέρα από τη μεθυλίωση. Οι διάφορες αλληλεπιδράσεις της DNMT-1 με μεταγραφικούς παράγοντες ενδεχομένως να προσδίδουν εξειδίκευση στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδιακών στόχων.

5.5 Σύνοψη

Συνοπτικά λοιπόν στην παρούσα διδακτορική διατριβή:

1. Έλαβε χώρα η βελτίωση της μεθόδου της *in vivo* βιοτινυλίωσης με μείωση του υποβάθρου που προκύπτει από την ειδική πρόσδεση των ενδογενώς βιοτινυλιωμένων πρωτεϊνών μέσω χρήσης του μη ιονικού επιφανειοδραστικού παράγοντα NP-40 για τη λύση των κυττάρων.
2. Έγινε εμπλουτισμός των πυρηνικών εκχυλισμάτων κυττάρων MEL σε πρωτεΐνη GATA-1 με τη χρήση εναλλακτικών μεθόδων απομόνωσης πυρηνικών εκχυλισμάτων NUN και RIPA
3. Απομακρύνθηκαν επιτυχώς τα νουκλεϊκά οξέα από τα πυρηνικά εκχυλίσματα τα οποία οδηγούν στην ανίχνευση ψευδώς θετικών πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων.
4. Με την εφαρμογή της βελτιωμένης *in vivo* βιοτινυλίωσης ταυτοποιήθηκε η DNMT-1 ως νέα αλληλεπιδρούσα GATA-1 πρωτεΐνη.
5. Χαρακτηρίστηκε επιτυχώς η περιοχή της DNMT-1 που είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση με την GATA-1 επιτρέποντας μελλοντικά πειράματα διατάραξης της αλληλεπίδρασης ώστε να αποκαλυφθεί ο λειτουργικός της ρόλος.



Εικόνα 47: Σχηματική παρουσίαση της πορείας της διδακτορικής διατριβής.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας 12: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
Activation domain	Περιοχή ενεργοποίησης
Ammonium persulfate	Υπερθειικό αμμώνιο
Background	Υπόβαθρο
Burst Forming Units – E	Μονάδες εκρηκτικής αύξησης ερυθροειδών κυττάρων
Calf intestinal phosphatase	Εντερική αλκαλική φωσφατάση
Catalytic domain	Καταλυτική περιοχή
Chicken Egg Albumin	Αλβουμίνη από αυγό όρνιθας
Chromatin Immunoprecipitation	Ανοσκατακρήμνιση χρωματίνης
Collision Induced Dissociation	Επαγωγική διάσπαση
Colony Forming Units – E	Μονάδες σχηματισμού αποικιών ερυθροειδών κυττάρων
Common Lymphoid Progenitor	Κοινό λεμφικό προγονικό κύτταρο
Common myeloid Progenitor	Κοινό μυελικό προγονικό κύτταρο
Competent cells	Δεκτικά κύτταρα
Conditional knock out	Μερική απαλοιφή γονιδίου
Definitive Erythropoiesis	Οριστική Ερυθροποίηση
Dimethylsulfoxide	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
Direcet Repeat Erythroid Definitive	Πρωτεϊνικό σύμπλοκο που προσδένεται σε αλληλουχίες DR1
DNA methyl-transferases	DNA μεθυλτρανσφεράσες
Dounce homogenizer	Ομογενιοποιητής Dounce
Early T-cell Precursor	Πρόδρομο κύτταρο T-κυττάρων

Electrospray ionization	Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό
Elution profile	Προφίλ έκλουσης
Embryoid bodies	Εμβρυοειδείς φορείς
Enhacer	Ενισχυτής
Erythropoietin	Ερυθροποιητίνη
Ethidium bromide	Βρωμιούχο αιθίδιο
Fast protein liquid chromatography	Υγρή χρωματογραφία γρήγορου διαχωρισμού πρωτεϊνών
Fetal Bovine Serum	Ορός εμβρύου βοός
Gel filtration chromatography	Χρωματογραφία μοριακής διήθησης
Gel filtration standard	Πρότυπο διάλυμα για τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης
Gene target	Γονιαδιακός στόχος
Granulocyte Macrophage Progenitor	Προγονικό κύτταρο κοκκιοκυττάρων / μακροφάγων
Green fluorescent protein	Πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη
Heat shock	Θερμικό σοκ
Helix – Loop – Helix	Μοτίβο έλικας – θηλιάς – έλικας
Hematopoietic Stem Cell	Αιματοποιητικό βλαστικό κύτταρο
Hemocytometer	Αιματοκυττόμετρο
Hemoglobin	Αιμοσφαιρίνη
High performance liquid chromatography	Υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία
Hight salt nuclear extraction	Εκχύλιση πυρηνικών πρωτεϊνών με τη χρήση διαλύματος υψηλής αλατότητας
Horseradish peroxidase	Υπεροξειδάση χραΐνας
Housekeeping gene	Διαχειριστικό γονίδιο
Immunoprecipitation	Ανοσοκατακρήμνιση

Immunodepletion	Ανοσοεξάντληση
Inducer	Επαγωγέας
Input	Αρχικό δείγμα που χρησιμοποιείται για κατακρήμνιση
KG repeats	Σειρά πεπτιδίων λυσίνης, γλυκίνης
Knock out gene	Καθολική απαλοιφή γονιδίου
Laminar air flow	Διαστρωματική αέρα
Leucine zipper	Δομή φερμουάρ λευκίνης
Locus Control Region	Γονιδιακή περιοχή ρύθμισης των σφαιρινών
Long Term Hematopoietic Stem Cell	Μακράς διάρκειας αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα
Lymphoid Multipotent Progenitor	Λεμφικό πολυδύναμο προγονικό κύτταρο
Mass Spectrometry	Φασματομετρία Μάζας
Megakaryocyte Erythroid Progenitor	Προγονικό κύτταρο της ερυθράς / μεγακαρυωτικής σειράς
Methyl binding domain	Δομή δέσμευσης μεθυλομάδων
Microarrays	Μικροσυστοιχίες
Mouse erythroleukemic cells	Ερυθρολευχαιμική κυτταρική σειρά ποντικού
Multipotent Progenitor	Πολυδύναμο προγονικό κύτταρο
Natural Killer Cells	Φυσικοί φονείς
Negative control	Αρνητικός μάρτυρας
Nuclear extracts	Πυρηνικά εκχυλίσματα
Nuclear localization signal	Σήμα πυρηνικού εντοπισμού
Nuclear Lysis Buffer	Διάλυμα υψηλής αλατότητας για τη λύση των πυρήνων
Nuclear Storage Buffer	Διάλυμα αποθήκευσης πυρήνων
Nucleosome Remodelling Complex	Σύμπλοκο αναδιαμόρφωσης χρωματίνης

Orbitrap	Τροχιακή παγίδια ιόντων
PCNA binding domain	Περιοχή πρόσδεσης PCNA
Peptide mass fingerprinting	Πεπτιδικό αποτύπωμα μάζας
Phosphate buffer saline	Διάλυμα φωσφορικών αλάτων
Plasmid	Πλασμιδιακός φορέας ή πλασμίδιο
Polyacrylamide gel	Πήκτωμα πολυακρυλαμίδης
Positive control	Θετικός μάρτυρας
Preinitiation complex	Προ-εναρκτήριο σύμπλοκο
Primitive Erythropoiesis	Αρχέγονη Ερυθροποίηση
Pro B	Πρόδρομο κύτταρο Β-κυττάρων
Promoter	Υποκινητής
Protease inhibitor cocktail	Κοκτέιλ αναστολέων πρωτεασών
Protein A beads	Σφαιρίδια πρωτεΐνης Α
Protein complexes	Πρωτεϊνικά σύμπλοκα
Protein G beads	Σφαιρίδια πρωτεΐνης G
Protein marker	Πρωτεϊνικός δείκτης
Protein pull down	Κατακρήμνιση πρωτεϊνών
Proteomics	Πρωτεωμική
Resolving gel	Πήκτωμα διαχωρισμού
Restriction enzyme	Περιοριστική ενδονουκλεάση
Reticulocyte	Δικτυοερυθροκύτταρα
Semi-adherent cell line	Ημιπροσφύμενη κυτταρική σειρά

Short Term Hematopoietic Stem Cell	Μικρής διάρκειας αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα.
Size exclusion chromatography	Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού
Stacking gel	Πήκτωμα φόρτωσης του δείγματος
Stem cell factor	Παράγοντας βλαστικών κυττάρων
Streptavidin beads	Σφαιρίδια στρεπταβιδίνης
Supernatant	Υπερκείμενο
Tagged protein	Σημασμένη πρωτεΐνη
Tandem mass spectrometry	Δίδυμη φασματομερία μάζας
Targeting sequence	Αλληλουχία στόχευσης
Targeting sequence	Αλληλουχία στόχευσης
TATA binding protein	Πρωτεΐνη που προσδένεται στην περιοχή TATA
TBP associated proteins	Πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τη TBP
Tetramethylethylenediamine	Τετραμεθυλ-αιθυλενοδιαμίνη
Time of flight	Ανιχνευτής χρόνου πτήσης.
Transfection	Επιμόλυνση
Transformation	Μετασχηματισμός
Trichloroacetic acid	Τριχλωροξικό οξύ
Triple Quadrupole	Ανιχνευτής τριπλού τετράπολου
Water for injection	Ενέσιμο ύδωρ
Western blot	Ανοσοαποτύπωση κατά Western
Yeast two hybrid	Διπλά υβρίδια ζυμομύκητων
Yolk sac	Λεκιθικός σάκος
Zebrafish	Ψάρι ζέβρα

Zinc finger	Δάκτυλο ψευδαργύρου
-------------	---------------------

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Πίνακας 13. Ακρωνύμια και ανάπτυξη τους

AD	Activation Domain
APS	Ammonium persulfate
BFU-E	Burst Forming Units – E
CEA	Chicken Egg Albumin
CFU – E	Colony Forming Units – E
CHD8	Chromodomain-helicase-DNA binding protein
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation
CIAP	Calf Intestinal Phosphatase
CID	Collision Induced Dissociation
CLP	Common Lymphoid Progenitor
CMP	Common Myeloid Progenitor
CTD	Carboxy-terminal Domain
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMP	Dimethyl pimelimidate
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNMT	DNA methyl – transferases
DRED	Direct Repeat Erythroid Definitive
DTT	Dithiothreitol
EB	Embryoid Bodies
ES	Embryonic stem cells
ESI	Electrospray ionization
EtBr	Ethidium Bromide
ETP	Early T-Cell Precursor
FBS	Fetal Bovine Serum
FOG	Friend of GATA
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GMP	Granulocyte Macrophage Progenitor
Hb	Hemoglobin
HDAC	Histone Deacetylase
HEK	Human Embryonic Kidney

HLH	Helix – Loop - Helix
HRP	Horseradish Peroxidase
HSC	Hematopoietic Stem Cell
IgG	Immunoglobulin G
LCR	Locus Control Region
LMPP	Lymphoid Multipotent Progenitor
LT-HSC	Long Term Hematopoietic Stem Cell
MALDI	matrix-assisted laser desorption/ionization
MBD	Methyl Binding Domain
MEL	Murine Erythroleukemia cells
MEP	Megakaryocyte Erythroid Progenitor
MPP	Multipotent Progenitor
MS	Mass Spectrometry
MS/MS	Tandem mass spectrometry
NK	Natural Killer cells
NLS	Nuclear Localization Signal
NP-40	Nonidet P – 40 (detergent)
NSB	Nuclear Storage Buffer
NUN	Solution containing NaCl, Urea and NP-40
NuRD	Nucleosome Remodeling Complex
PAGE	Poly Acrylamide Gel Electrophoresis
PBD	PCNA Binding Domain
PBHD	Polybromo Homology Domain
PBS	Phosphate Buffer Saline
PBS-T	Phosphate Buffer Saline – Tween 20
PCAF	p300/CBP associated factor
PCNA	Proliferation Cell Nuclear Antigen
PEST	Proline, glutamic acid, Serine, Threonine
PIC	Pre-initiation Complex
PMF	Peptide mass fingerprinting
PMSF	Phenyl methyl sulfonyl fluoride
RIPA	Radio immunoprecipitation solution
SAGA	SPT-ADA-GCN5 acetylase complex

SAM	S-adenosyl methionine
SCF	Stem Cell Factor
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
ST-HSC	Short Term Hematopoietic Stem Cell
STAF	Selenocysteine tRNA gene transcription activating factor
STAGA	SPT3-TAF9-GCN5 containing complex
TAE	Tris, Acetic Acid, EDTA solution
TAF	TBP Associated Factors
TBP	TATA Binding Protein
TCA	Trichloroacetic Acid
TE	Tris EDTA solution
TEA	Triethanolamine
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TFII	Transcription Factor II
TFTC	TBP-free containing complex
TOF	Time of flight
TQ	Triple quadrupole
TR2	Testicular Receptor 2
TR4	Testicular Receptor 4
TS	Targeting Sequence
UV	Ultra violet
E.	Επεξεργασμένα
M.E.	Μη επεξεργασμένα

Κατάταξη μεταγραφικών παραγόντων με βάση τη λειτουργική περιοχή

Υπέρταξη									
Βασικές Περιοχές					Παράγοντες που προσδέχουν DNA και συντονίζουν ψευδάργυρο				
Τάξη					Τάξη				
Παράγοντες με μοτίβο έλκας-θηλειάς (bHLH)	Παράγοντες με μοτίβο έλκας-θηλειάς-έλικας/φερμουάρ λευκίνης (bHLH-ZIP)	NF-1	RF-X	bHLH	Πυρηνικοί υποδοχείς με δάκτυλο Zn τύπου Cys4	Διάφοροι παράγοντες με δάκτυλο ψευδάργυρου Cys4	Περιοχή με δάκτυλο ψευδάργυρου Cys2His2	Συνάθροιση κυστεϊνών-ψευδάργυρου Cys6	Δάκτυλοι ψευδάργυρου εναλλασσόμενης σύστασης
AP-1, CREB, C/EBP, bZIP/PAR κ.α.	E2A, MyoD, Scute, TAL, Twist/Atan, arHen κ.α.	TFE3,USF κ.α.	RF-X1, RF-X2 κ.α.	AP-2 κ.α.	Υποδοχείς στεροειδών ορμονών κ.α.	Παράγοντες GATA, Tlx κ.α.	TFIIIA, SP3, YY1, Ktuppel κ.α.	ARG RII, CAT8, GAL4 κ.α.	BAF-1, Byr3

Υπέρταξη									
Έλικας-στροφη-έλικα					Παράγοντες με β-κρίωμα που εφάπτονται με την ελάσσονα αύλακα				
Τάξη					Τάξη				
Ομοιοτική περιοχή	Ζευγαρωμένο κουτί	forkhead/ φτερωτή έλικα	Παράγοντες θερμικού shock	Συναθροίσματα τρυπτοφάνης	Περιοχή TEA	RHR (περιοχή ομολογίας Rel)	p53	Κουτί MADS	μεταγραφικοί παράγοντες με β-βαρέλια-έλικα
AbdB, Antp, Cad HNF, κ.α.	Pax-1, -2, -3, 4 κ.α.	Flh, Slp1, Slp2, 31, HNF-3α, ILF κ.α.	HSF1, HSF2 κ.α.	Myb, Ets, IRF	TEF-1, Scl, TEC1	NF-κB1, IκBα, NF-AT	p53	MEF-2, MCM1, SRF, RLM	E2, EBNA-1
									SOX, TCF-1, UBF, MATA κ.α.
									CP2, LBP-1A
									CP1A/HAP3
									grainyhead
									παράγοντες με περιοχή ψυχρού shock
									runt
									PEBP2αA, Runt κ.α.

Υπέρταξη				
Άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες				
Τάξη				
Πρωτεΐνες με "γροθιά" χαλαρού	HMG1	STAT	Περιοχή θύλακος	Παράγοντες τύπου E1A
ACE1/CUP2, AMT1	HMG(Y)	STAT1	Rb	E1A

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Orkin, S.H. (2000) Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet*, **1**, 57-64.
2. Till, J.E., McCulloch, E.A. and Siminovitch, L. (1964) A Stochastic Model of Stem Cell Proliferation, Based on the Growth of Spleen Colony-Forming Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **51**, 29-36.
3. Neumuller, R.A. and Knoblich, J.A. (2009) Dividing cellular asymmetry: asymmetric cell division and its implications for stem cells and cancer. *Genes & Development*, **23**, 2675-2699.
4. McDevitt, M.A., Fujiwara, Y., Shivdasani, R.A. and Orkin, S.H. (1997) An upstream, DNase I hypersensitive region of the hematopoietic-expressed transcription factor GATA-1 gene confers developmental specificity in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 7976-7981.
5. Adolfsson, J., Mansson, R., Buza-Vidas, N., Hultquist, A., Liuba, K., Jensen, C.T., Bryder, D., Yang, L., Borge, O.J., Thoren, L.A. *et al.* (2005) Identification of Flt3⁺ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell*, **121**, 295-306.
6. Kondo, M., Weissman, I.L. and Akashi, K. (1997) Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*, **91**, 661-672.
7. Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T. and Weissman, I.L. (2000) A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, **404**, 193-197.
8. Palis, J. (2008) Ontogeny of erythropoiesis. *Curr Opin Hematol*, **15**, 155-161.
9. Gregory, G.D., Miccio, A., Bersenev, A., Wang, Y., Hong, W., Zhang, Z., Poncz, M., Tong, W. and Blobel, G.A. (2010) FOG1 requires NuRD to promote hematopoiesis and maintain lineage fidelity within the megakaryocytic-erythroid compartment. *Blood*, **115**, 2156-2166.
10. Tsiftoglou, A., Vizirianakis, I. and Strouboulis, J. (2009) Erythropoiesis: Model systems, molecular regulators, and developmental programs. *IUBMB life*, **61**, 800-830.
11. Manwani, D. and Bieker, J.J. (2008) The erythroblastic island. *Current topics in developmental biology*, **82**, 23-53.
12. Kornberg, R.D. (1999) Eukaryotic transcriptional control. *Trends in cell biology*, **9**, M46-49.
13. Stegmaier, P., Kel, A.E. and Wingender, E. (2004) Systematic DNA-binding domain classification of transcription factors. *Genome informatics. International Conference on Genome Informatics*, **15**, 276-286.
14. Brennan, R.G. and Matthews, B.W. (1989) The helix-turn-helix DNA binding motif. *The Journal of biological chemistry*, **264**, 1903-1906.

15. Ghosh, G., Wang, V.Y., Huang, D.B. and Fusco, A. (2012) NF-kappaB regulation: lessons from structures. *Immunological reviews*, **246**, 36-58.
16. Orkin, S.H. and Zon, L.I. (2008) Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*, **132**, 631-644.
17. Kim, S. and Bresnick, E. (2007) Transcriptional control of erythropoiesis: emerging mechanisms and principles. *Oncogene*, **26**, 6777-6794.
18. Liang, S.Y., Moghimi, B., Crusselle-Davis, V.J., Lin, I.J., Rosenberg, M.H., Li, X., Strouboulis, J., Huang, S. and Bungert, J. (2009) Defective erythropoiesis in transgenic mice expressing dominant-negative upstream stimulatory factor. *Molecular and Cellular Biology*, **29**, 5900-5910.
19. Miccio, A., Wang, Y., Hong, W., Gregory, G.D., Wang, H., Yu, X., Choi, J.K., Shelat, S., Tong, W., Poncz, M. *et al.* (2010) NuRD mediates activating and repressive functions of GATA-1 and FOG-1 during blood development. *The EMBO Journal*, **29**, 442-456.
20. Tsai, F.Y., Keller, G., Kuo, F.C., Weiss, M., Chen, J., Rosenblatt, M., Alt, F.W. and Orkin, S.H. (1994) An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature*, **371**, 221-226.
21. Tsai, F.Y. and Orkin, S.H. (1997) Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood*, **89**, 3636-3643.
22. Heyworth, C., Gale, K., Dexter, M., May, G. and Enver, T. (1999) A GATA-2/estrogen receptor chimera functions as a ligand-dependent negative regulator of self-renewal. *Genes Dev*, **13**, 1847-1860.
23. Pandolfi, P.P., Roth, M.E., Karis, A., Leonard, M.W., Dzierzak, E., Grosveld, F.G., Engel, J.D. and Lindenbaum, M.H. (1995) Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis. *Nature Genetics*, **11**, 40-44.
24. Molkenstein, J.D. (2000) The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *The Journal of biological chemistry*, **275**, 38949-38952.
25. Wall, L., deBoer, E. and Grosveld, F. (1988) The human beta-globin gene 3' enhancer contains multiple binding sites for an erythroid-specific protein. *Genes & Development*, **2**, 1089-1100.
26. Tsai, S.F., Martin, D.I., Zon, L.I., D'Andrea, A.D., Wong, G.G. and Orkin, S.H. (1989) Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells. *Nature*, **339**, 446-451.
27. Evans, T. and Felsenfeld, G. (1989) The erythroid-specific transcription factor Eryf1: a new finger protein. *Cell*, **58**, 877-885.
28. Zon, L.I., Tsai, S.F., Burgess, S., Matsudaira, P., Bruns, G.A. and Orkin, S.H. (1990) The major human erythroid DNA-binding protein (GF-1): primary sequence and localization of the gene to the X

- chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **87**, 668-672.
29. Fujiwara, Y., Browne, C.P., Cunliffe, K., Goff, S.C. and Orkin, S.H. (1996) Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 12355-12358.
 30. Leonard, M., Brice, M., Engel, J.D. and Papayannopoulou, T. (1993) Dynamics of GATA transcription factor expression during erythroid differentiation. *Blood*, **82**, 1071-1079.
 31. Martin, D.I., Zon, L.I., Mutter, G. and Orkin, S.H. (1990) Expression of an erythroid transcription factor in megakaryocytic and mast cell lineages. *Nature*, **344**, 444-447.
 32. Romeo, P.H., Prandini, M.H., Joulin, V., Mignotte, V., Prenant, M., Vainchenker, W., Marguerie, G. and Uzan, G. (1990) Megakaryocytic and erythrocytic lineages share specific transcription factors. *Nature*, **344**, 447-449.
 33. Zon, L.I., Yamaguchi, Y., Yee, K., Albee, E.A., Kimura, A., Bennett, J.C., Orkin, S.H. and Ackerman, S.J. (1993) Expression of mRNA for the GATA-binding proteins in human eosinophils and basophils: potential role in gene transcription. *Blood*, **81**, 3234-3241.
 34. Ito, E., Toki, T., Ishihara, H., Ohtani, H., Gu, L., Yokoyama, M., Engel, J.D. and Yamamoto, M. (1993) Erythroid transcription factor GATA-1 is abundantly transcribed in mouse testis. *Nature*, **362**, 466-468.
 35. Yomogida, K., Ohtani, H., Harigae, H., Ito, E., Nishimune, Y., Engel, J.D. and Yamamoto, M. (1994) Developmental stage- and spermatogenic cycle-specific expression of transcription factor GATA-1 in mouse Sertoli cells. *Development*, **120**, 1759-1766.
 36. Pevny, L., Simon, M.C., Robertson, E., Klein, W.H., Tsai, S.F., D'Agati, V., Orkin, S.H. and Costantini, F. (1991) Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature*, **349**, 257-260.
 37. Weiss, M.J., Keller, G. and Orkin, S.H. (1994) Novel insights into erythroid development revealed through in vitro differentiation of GATA-1 embryonic stem cells. *Genes Dev*, **8**, 1184-1197.
 38. Weiss, M.J. and Orkin, S.H. (1995) Transcription factor GATA-1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 9623-9627.
 39. Takahashi, S., Onodera, K., Motohashi, H., Suwabe, N., Hayashi, N., Yanai, N., Nabesima, Y. and Yamamoto, M. (1997) Arrest in primitive erythroid cell development caused by promoter-specific disruption of the GATA-1 gene. *J Biol Chem*, **272**, 12611-12615.
 40. McDevitt, M.A., Shivdasani, R.A., Fujiwara, Y., Yang, H. and Orkin, S.H. (1997) A "knockdown" mutation created by cis-element gene targeting reveals the dependence of erythroid cell maturation on the level of transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 6781-6785.
 41. Shivdasani, R.A., Fujiwara, Y., McDevitt, M.A. and Orkin, S.H. (1997) A lineage-selective knockout establishes the critical role of

- transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *EMBO J*, **16**, 3965-3973.
42. Yu, C., Cantor, A.B., Yang, H., Browne, C., Wells, R.A., Fujiwara, Y. and Orkin, S.H. (2002) Targeted deletion of a high-affinity GATA-binding site in the GATA-1 promoter leads to selective loss of the eosinophil lineage in vivo. *J Exp Med*, **195**, 1387-1395.
 43. Migliaccio, A.R., Rana, R.A., Sanchez, M., Lorenzini, R., Centurione, L., Bianchi, L., Vannucchi, A.M., Migliaccio, G. and Orkin, S.H. (2003) GATA-1 as a regulator of mast cell differentiation revealed by the phenotype of the GATA-1^{low} mouse mutant. *J Exp Med*, **197**, 281-296.
 44. Lindeboom, F. (2003) A tissue-specific knockout reveals that Gata1 is not essential for Sertoli cell function in the mouse. *Nucleic Acids Research*, **31**, 5405-5412.
 45. Martin, D.I. and Orkin, S.H. (1990) Transcriptional activation and DNA binding by the erythroid factor GF-1/NF-E1/Eryf 1. *Genes Dev*, **4**, 1886-1898.
 46. Weiss, M.J., Yu, C. and Orkin, S.H. (1997) Erythroid-cell-specific properties of transcription factor GATA-1 revealed by phenotypic rescue of a gene-targeted cell line. *Molecular and Cellular Biology*, **17**, 1642-1651.
 47. Shimizu, R., Takahashi, S., Ohneda, K., Engel, J.D. and Yamamoto, M. (2001) In vivo requirements for GATA-1 functional domains during primitive and definitive erythropoiesis. *EMBO J*, **20**, 5250-5260.
 48. Yang, H.Y. and Evans, T. (1992) Distinct roles for the two cGATA-1 finger domains. *Molecular and Cellular Biology*, **12**, 4562-4570.
 49. Cantor, A.B. and Orkin, S.H. (2002) Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene*, **21**, 3368-3376.
 50. Merika, M. and Orkin, S.H. (1995) Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Krüppel family proteins Sp1 and EKLF. *Molecular and Cellular Biology*, **15**, 2437-2447.
 51. Rekhtman, N., Radparvar, F., Evans, T. and Skoultschi, A.I. (1999) Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. *Genes & Development*, **13**, 1398-1411.
 52. Trainor, C.D. (2000) GATA Zinc Finger Interactions Modulate DNA Binding and Transactivation. *Journal of Biological Chemistry*.
 53. MacKay, J.P., Kowalski, K., Fox, A.H., Czolij, R., King, G.F. and Crossley, M. (1998) Involvement of the N-finger in the self-association of GATA-1. *J Biol Chem*, **273**, 30560-30567.
 54. Crossley, M., Merika, M. and Orkin, S.H. (1995) Self-association of the erythroid transcription factor GATA-1 mediated by its zinc finger domains. *Molecular and Cellular Biology*, **15**, 2448-2456.
 55. Nishikawa, K., Kobayashi, M., Masumi, A., Lyons, S.E., Weinstein, B.M., Liu, P.P. and Yamamoto, M. (2003) Self-association of Gata1 enhances transcriptional activity in vivo in zebra fish embryos. *Molecular and Cellular Biology*, **23**, 8295-8305.

56. Tsang, A.P., Visvader, J.E., Turner, C.A., Fujiwara, Y., Yu, C., Weiss, M.J., Crossley, M. and Orkin, S.H. (1997) FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell*, **90**, 109-119.
57. Fox, A.H., Kowalski, K., King, G.F., MacKay, J.P. and Crossley, M. (1998) Key residues characteristic of GATA N-fingers are recognized by FOG. *J Biol Chem*, **273**, 33595-33603.
58. Fox, A.H., Liew, C., Holmes, M., Kowalski, K., Mackay, J. and Crossley, M. (1999) Transcriptional cofactors of the FOG family interact with GATA proteins by means of multiple zinc fingers. *EMBO J*, **18**, 2812-2822.
59. Tsang, A.P., Fujiwara, Y., Hom, D.B. and Orkin, S.H. (1998) Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG. *Genes Dev*, **12**, 1176-1188.
60. Crispino, J.D., Lodish, M.B., MacKay, J.P. and Orkin, S.H. (1999) Use of altered specificity mutants to probe a specific protein-protein interaction in differentiation: the GATA-1:FOG complex. *Molecular Cell*, **3**, 219-228.
61. Welch, J.J., Watts, J.A., Vakoc, C.R., Yao, Y., Wang, H., Hardison, R.C., Blobel, G.A., Chodosh, L.A. and Weiss, M.J. (2004) Global regulation of erythroid gene expression by transcription factor GATA-1. *Blood*, **104**, 3136-3147.
62. Rodriguez, P., Bonte, E., Krijgsveld, J., Kolodziej, K.E., Guyot, B., Heck, A.J., Vyas, P., de Boer, E., Grosveld, F. and Strouboulis, J. (2005) GATA-1 forms distinct activating and repressive complexes in erythroid cells. *The EMBO Journal*, **24**, 2354-2366.
63. Hong, W., Nakazawa, M., Chen, Y., Kori, R., Vakoc, C., Rakowski, C. and Blobel, G. (2005) FOG-1 recruits the NuRD repressor complex to mediate transcriptional repression by GATA-1. *The EMBO Journal*, **24**, 2367.
64. Shivdasani, R.A., Mayer, E.L. and Orkin, S.H. (1995) Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature*, **373**, 432-434.
65. Mikkola, H.K.A., Klintman, J., Yang, H., Hock, H., Schlaeger, T.M., Fujiwara, Y. and Orkin, S.H. (2003) Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/tal-1 gene. *Nature*, **421**, 547-551.
66. Warren, A.J., Colledge, W.H., Carlton, M.B., Evans, M.J., Smith, A.J. and Rabbitts, T.H. (1994) The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein rbtn2 is essential for erythroid development. *Cell*, **78**, 45-57.
67. Wadman, I.A., Osada, H., Grutz, G.G., Agulnick, A.D., Westphal, H., Forster, A. and Rabbitts, T.H. (1997) The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *The EMBO Journal*, **16**, 3145-3157.
68. Meier, N., Krpic, S., Rodriguez, P., Strouboulis, J., Monti, M., Krijgsveld, J., Gering, M., Patient, R., Hostert, A. and Grosveld, F.

- (2006) Novel binding partners of Ldb1 are required for haematopoietic development. *Development*, **133**, 4913-4923.
69. Schuh, A.H., Tipping, A.J., Clark, A.J., Hamlett, I., Guyot, B., Iborra, F.J., Rodriguez, P., Strouboulis, J., Enver, T., Vyas, P. *et al.* (2005) ETO-2 associates with SCL in erythroid cells and megakaryocytes and provides repressor functions in erythropoiesis. *Molecular and Cellular Biology*, **25**, 10235-10250.
 70. Bieker, J.J. (2005) Probing the onset and regulation of erythroid cell-specific gene expression. *The Mount Sinai journal of medicine, New York*, **72**, 333-338.
 71. Feng, W.C., Southwood, C.M. and Bieker, J.J. (1994) Analyses of beta-thalassemia mutant DNA interactions with erythroid Kruppel-like factor (EKLF), an erythroid cell-specific transcription factor. *The Journal of biological chemistry*, **269**, 1493-1500.
 72. Nuez, B., Michalovich, D., Bygrave, A., Ploemacher, R. and Grosveld, F. (1995) Defective haematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the EKLF gene. *Nature*, **375**, 316-318.
 73. Wijgerde, M., Gribnau, J., Trimborn, T., Nuez, B., Philipsen, S., Grosveld, F. and Fraser, P. (1996) The role of EKLF in human beta-globin gene competition. *Genes & Development*, **10**, 2894-2902.
 74. Hodge, D., Coghill, E., Keys, J., Maguire, T., Hartmann, B., McDowall, A., Weiss, M., Grimmond, S. and Perkins, A. (2006) A global role for EKLF in definitive and primitive erythropoiesis. *Blood*, **107**, 3359-3370.
 75. Siatecka, M., Xue, L. and Bieker, J.J. (2007) Sumoylation of EKLF Promotes Transcriptional Repression and Is Involved in Inhibition of Megakaryopoiesis. *Molecular and Cellular Biology*, **27**, 8547-8560.
 76. Gilks, C.B., Bear, S.E., Grimes, H.L. and Tsichlis, P.N. (1993) Progression of interleukin-2 (IL-2)-dependent rat T cell lymphoma lines to IL-2-independent growth following activation of a gene (Gfi-1) encoding a novel zinc finger protein. *Molecular and Cellular Biology*, **13**, 1759-1768.
 77. Osawa, M., Yamaguchi, T., Nakamura, Y., Kaneko, S., Onodera, M., Sawada, K., Jegalian, A., Wu, H., Nakauchi, H. and Iwama, A. (2002) Erythroid expansion mediated by the Gfi-1B zinc finger protein: role in normal hematopoiesis. *Blood*, **100**, 2769-2777.
 78. Saleque, S., Cameron, S. and Orkin, S.H. (2002) The zinc-finger proto-oncogene Gfi-1b is essential for development of the erythroid and megakaryocytic lineages. *Genes Dev*, **16**, 301-306.
 79. Huang, D.Y., Kuo, Y.Y. and Chang, Z.F. (2005) GATA-1 mediates auto-regulation of Gfi-1B transcription in K562 cells. *Nucleic Acids Research*, **33**, 5331-5342.
 80. Jegalian, A.G. and Wu, H. (2002) Regulation of Socs gene expression by the proto-oncoprotein GFI-1B: two routes for STAT5 target gene induction by erythropoietin. *The Journal of biological chemistry*, **277**, 2345-2352.
 81. Tong, B., Grimes, H.L., Yang, T.Y., Bear, S.E., Qin, Z., Du, K., El-Deiry, W.S. and Tsichlis, P.N. (1998) The Gfi-1B proto-oncoprotein represses p21WAF1 and inhibits myeloid cell differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, **18**, 2462-2473.

82. Bai, L. and Merchant, J.L. (2003) Transcription factor ZBP-89 is required for STAT1 constitutive expression. *Nucleic Acids Res*, **31**, 7264-7270.
83. Zhang, C.Z., Chen, G.G. and Lai, P.B. (2010) Transcription factor ZBP-89 in cancer growth and apoptosis. *Biochimica et biophysica acta*, **1806**, 36-41.
84. Woo, A.J., Moran, T.B., Schindler, Y.L., Choe, S.K., Langer, N.B., Sullivan, M.R., Fujiwara, Y., Paw, B.H. and Cantor, A.B. (2008) Identification of ZBP-89 as a novel GATA-1-associated transcription factor involved in megakaryocytic and erythroid development. *Molecular and Cellular Biology*, **28**, 2675-2689.
85. Woo, A.J., Kim, J., Xu, J., Huang, H. and Cantor, A.B. (2011) Role of ZBP-89 in human globin gene regulation and erythroid differentiation. *Blood*, **118**, 3684-3693.
86. Myslinski, E., Gerard, M.A., Krol, A. and Carbon, P. (2006) A genome scale location analysis of human Staf/ZNF143-binding sites suggests a widespread role for human Staf/ZNF143 in mammalian promoters. *The Journal of biological chemistry*, **281**, 39953-39962.
87. Schuster, C., Krol, A. and Carbon, P. (1998) Two distinct domains in Staf to selectively activate small nuclear RNA-type and mRNA promoters. *Molecular and Cellular Biology*, **18**, 2650-2658.
88. Myslinski, E., Gerard, M.A., Krol, A. and Carbon, P. (2007) Transcription of the human cell cycle regulated BUB1B gene requires hStaf/ZNF143. *Nucleic Acids Research*, **35**, 3453-3464.
89. Izumi, H., Wakasugi, T., Shimajiri, S., Tanimoto, A., Sasaguri, Y., Kashiwagi, E., Yasuniwa, Y., Akiyama, M., Han, B., Wu, Y. *et al.* (2010) Role of ZNF143 in tumor growth through transcriptional regulation of DNA replication and cell-cycle-associated genes. *Cancer Science*, **101**, 2538-2545.
90. Chia, N.Y., Chan, Y.S., Feng, B., Lu, X., Orlov, Y.L., Moreau, D., Kumar, P., Yang, L., Jiang, J., Lau, M.S. *et al.* (2010) A genome-wide RNAi screen reveals determinants of human embryonic stem cell identity. *Nature*, **468**, 316-320.
91. Halbig, K.M., Lekven, A.C. and Kunkel, G.R. (2012) The transcriptional activator ZNF143 is essential for normal development in zebrafish. *BMC Molecular Biology*, **13**, 3.
92. Hamlett, I., Draper, J., Strouboulis, J., Iborra, F., Porcher, C. and Vyas, P. (2008) Characterization of megakaryocyte GATA1-interacting proteins: the corepressor ETO2 and GATA1 interact to regulate terminal megakaryocyte maturation. *Blood*, **112**, 2738-2749.
93. Antoniou, M. (1991) Induction of Erythroid-Specific Expression in Murine Erythroleukemia (MEL) Cell Lines. *Methods in molecular biology*, **7**, 421-434.
94. Olsen, A.L., Stachura, D.L. and Weiss, M.J. (2006) Designer blood: creating hematopoietic lineages from embryonic stem cells. *Blood*, **107**, 1265-1275.
95. Wiles, M.V. and Keller, G. (1991) Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. *Development*, **111**, 259-267.

96. Nakano, T., Kodama, H. and Honjo, T. (1996) In vitro development of primitive and definitive erythrocytes from different precursors. *Science*, **272**, 722-724.
97. Caprioli, A., Jaffredo, T., Gautier, R., Dubourg, C. and Dieterlen-Lievre, F. (1998) Blood-borne seeding by hematopoietic and endothelial precursors from the allantois. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 1641-1646.
98. Hotchkiss, R.D. (1948) The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *The Journal of biological chemistry*, **175**, 315-332.
99. Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R., Hawkins, R., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J., Lee, L., Ye, Z. and Ngo, Q. (2009) Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*.
100. Bestor, T., Laudano, A., Mattaliano, R. and Ingram, V. (1988) Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. *Journal of molecular biology*, **203**, 971-983.
101. Goyal, R., Reinhardt, R. and Jeltsch, A. (2006) Accuracy of DNA methylation pattern preservation by the Dnmt1 methyltransferase. *Nucleic Acids Research*, **34**, 1182-1188.
102. Leonhardt, H., Page, A., Weier, H. and Bestor, T. (1992) A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell*, **71**, 865-873.
103. Margot, J.B., Cardoso, M.C. and Leonhardt, H. (2001) Mammalian DNA methyltransferases show different subnuclear distributions. *Journal of cellular biochemistry*, **83**, 373-379.
104. Li, E., Bestor, T.H. and Jaenisch, R. (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, **69**, 915-926.
105. Sado, T., Fenner, M.H., Tan, S.S., Tam, P., Shioda, T. and Li, E. (2000) X inactivation in the mouse embryo deficient for Dnmt1: distinct effect of hypomethylation on imprinted and random X inactivation. *Developmental biology*, **225**, 294-303.
106. Chen, T., Hevi, S., Gay, F., Tsujimoto, N., He, T., Zhang, B., Ueda, Y. and Li, E. (2007) Complete inactivation of DNMT1 leads to mitotic catastrophe in human cancer cells. *Nature Genetics*, **39**, 391-396.
107. Eden, A., Gaudet, F., Waghmare, A. and Jaenisch, R. (2003) Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science*, **300**, 455.
108. Rountree, M.R., Bachman, K.E. and Baylin, S.B. (2000) DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet*, **25**, 269-277.
109. Ding, F. and Chaillet, J.R. (2002) In vivo stabilization of the Dnmt1 (cytosine-5)-methyltransferase protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 14861-14866.

110. Fatemi, M., Hermann, A., Pradhan, S. and Jeltsch, A. (2001) The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA. *Journal of molecular biology*, **309**, 1189-1199.
111. Chuang, L.S., Ian, H.I., Koh, T.W., Ng, H.H., Xu, G. and Li, B.F. (1997) Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science*, **277**, 1996-2000.
112. Easwaran, H.P., Schermelleh, L., Leonhardt, H. and Cardoso, M.C. (2004) Replication-independent chromatin loading of Dnmt1 during G2 and M phases. *EMBO Rep*, **5**, 1181-1186.
113. Fellingner, K., Rothbauer, U., Felle, M., Längst, G. and Leonhardt, H. (2009) Dimerization of DNA methyltransferase 1 is mediated by its regulatory domain. *J Cell Biochem*, **106**, 521-528.
114. Lau, N.C., Seto, A.G., Kim, J., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Bartel, D.P. and Kingston, R.E. (2006) Characterization of the piRNA complex from rat testes. *Science*, **313**, 363-367.
115. Hermann, A., Goyal, R. and Jeltsch, A. (2004) The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *The Journal of biological chemistry*, **279**, 48350-48359.
116. Robertson, K.D., Ait-Si-Ali, S., Yokochi, T., Wade, P.A., Jones, P.L. and Wolffe, A.P. (2000) DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet*, **25**, 338-342.
117. Kim, G.-D., Ni, J., Kelesoglu, N., Roberts, R.J. and Pradhan, S. (2002) Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases. *The EMBO Journal*, **21**, 4183-4195.
118. Fuks, F., Hurd, P.J., Deplus, R. and Kouzarides, T. (2003) The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Research*, **31**, 2305-2312.
119. Pradhan, S., Chin, H.G., Estève, P.-O. and Jacobsen, S.E. (2009) SET7/9 mediated methylation of non-histone proteins in mammalian cells. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society*, **4**, 383-387.
120. Esteve, P.O., Chin, H.G., Smallwood, A., Feehery, G.R., Gangisetty, O., Karpf, A.R., Carey, M.F. and Pradhan, S. (2006) Direct interaction between DNMT1 and G9a coordinates DNA and histone methylation during replication. *Genes & Development*, **20**, 3089-3103.
121. Vire, E., Brenner, C., Deplus, R., Blanchon, L., Fraga, M., Didelot, C., Morey, L., Van Eynde, A., Bernard, D., Vanderwinden, J.M. *et al.* (2006) The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature*, **439**, 871-874.
122. Zheng, J., Kitajima, K., Sakai, E., Kimura, T., Minegishi, N., Yamamoto, M. and Nakano, T. (2006) Differential effects of GATA-1 on proliferation and differentiation of erythroid lineage cells. *Blood*, **107**, 520-527.

123. Bostick, M., Kim, J.K., Esteve, P.O., Clark, A., Pradhan, S. and Jacobsen, S.E. (2007) UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science*, **317**, 1760-1764.
124. Dynlacht, B.D., Hoey, T. and Tjian, R. (1991) Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell*, **66**, 563-576.
125. Basehoar, A.D., Zanton, S.J. and Pugh, B.F. (2004) Identification and distinct regulation of yeast TATA box-containing genes. *Cell*, **116**, 699-709.
126. Hochheimer, A. and Tjian, R. (2003) Diversified transcription initiation complexes expand promoter selectivity and tissue-specific gene expression. *Genes & Development*, **17**, 1309-1320.
127. Nagy, Z. and Tora, L. (2007) Distinct GCN5/PCAF-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation. *Oncogene*, **26**, 5341-5357.
128. Anderson, N.L. and Anderson, N.G. (1998) Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*, **19**, 1853-1861.
129. Wilkins, M.R., Pasquali, C., Appel, R.D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J.C., Yan, J.X., Gooley, A.A., Hughes, G., Humphery-Smith, I. *et al.* (1996) From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Bio/technology*, **14**, 61-65.
130. Sparkman, O.D. (2000) *Mass spectrometry desk reference*. 1st ed. Global View Pub., Pittsburgh, Pa.
131. Twyman, R.M. (2004) *Principles of proteomics*. BIOS Scientific Publishers, New York.
132. Makarov, A. (2000) Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Analytical chemistry*, **72**, 1156-1162.
133. Yates, J.R., Cociorva, D., Liao, L. and Zabrouskov, V. (2006) Performance of a linear ion trap-Orbitrap hybrid for peptide analysis. *Analytical chemistry*, **78**, 493-500.
134. Macek, B., Waanders, L.F., Olsen, J.V. and Mann, M. (2006) Top-down protein sequencing and MS3 on a hybrid linear quadrupole ion trap-orbitrap mass spectrometer. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, **5**, 949-958.
135. Makarov, A., Denisov, E., Lange, O. and Horning, S. (2006) Dynamic range of mass accuracy in LTQ Orbitrap hybrid mass spectrometer. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **17**, 977-982.
136. de Boer, E., Rodriguez, P., Bonte, E., Krijgsveld, J., Katsantoni, E., Heck, A., Grosveld, F. and Strouboulis, J. (2003) Efficient biotinylation and single-step purification of tagged transcription factors in mammalian cells and transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 7480-7485.
137. Rodriguez, P., Braun, H., Kolodziej, K.E., de Boer, E., Campbell, J., Bonte, E., Grosveld, F., Philipsen, S. and Strouboulis, J. (2006)

- Isolation of transcription factor complexes by in vivo biotinylation tagging and direct binding to streptavidin beads. *Methods Mol Biol*, **338**, 305-323.
138. Chapman-Smith, A. and Cronan, J.E., Jr. (1999) In vivo enzymatic protein biotinylation. *Biomolecular engineering*, **16**, 119-125.
 139. Deisseroth, A. and Hendrick, D. (1978) Human [alpha]-globin gene expression following chromosomal dependent gene transfer into mouse erythroleukemia cells. *Cell*, **15**, 55-63.
 140. Chen, C. and Okayama, H. (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Molecular and Cellular Biology*, **7**, 2745-2752.
 141. Abmayr, S.M., Yao, T., Parmely, T. and Workman, J.L. (2006) Preparation of nuclear and cytoplasmic extracts from mammalian cells. *Curr Protoc Mol Biol*, **Chapter 12**, Unit 12 11.
 142. Greenberg, M.E. and Bender, T.P. (2007) Identification of newly transcribed RNA. *Curr Protoc Mol Biol*, **Chapter 4**, Unit 4 10.
 143. Lavery, D. and Schibler, U. (1993) Circadian transcription of the cholesterol 7 alpha hydroxylase gene may involve the liver-enriched bZIP protein DBP. *Genes & development*, **7**, 1871.
 144. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
 145. Davis, B.J. (1964) Disc Electrophoresis. II. Method and Application to Human Serum Proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **121**, 404-427.
 146. Shapiro, A.L., Vinuela, E. and Maizel, J.V., Jr. (1967) Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochemical and biophysical research communications*, **28**, 815-820.
 147. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
 148. Meyer, T.S. and Lamberts, B.L. (1965) Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochimica et biophysica acta*, **107**, 144-145.
 149. Lindner, L.E. (1993) Improvements in the silver-staining technique for nucleolar organizer regions (AgNOR). *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, **41**, 439-445.
 150. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. and Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical chemistry*, **68**, 850-858.
 151. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **76**, 4350-4354.
 152. Salinovich, O. and Montelaro, R.C. (1986) Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after

- separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, **156**, 341-347.
153. Renart, J., Reiser, J. and Stark, G.R. (1979) Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **76**, 3116-3120.
 154. Sjobring, U., Bjorck, L. and Kastern, W. (1991) Streptococcal protein G. Gene structure and protein binding properties. *The Journal of biological chemistry*, **266**, 399-405.
 155. Graille, M., Stura, E., Corper, A., Sutton, B., Taussig, M., Charbonnier, J. and Silverman, G. (2000) Crystal structure of a *Staphylococcus aureus* protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 5399-5404.
 156. Debro, J. and Korner, A. (1956) Solubility of albumin in alcohol after precipitation by trichloroacetic acid: a simplified procedure for separation of albumin. *Nature*, **178**, 1067.
 157. Xu, Z., Xie, Q. and Zhou, H.-M. (2003) Trichloroacetic acid-induced molten globule state of aminoacylase from pig kidney. *Journal of protein chemistry*, **22**, 669-675.
 158. Rajalingam, D., Loftis, C., Xu, J. and Kumar, T. (2009) Trichloroacetic acid-induced protein precipitation involves the reversible association of a stable partially structured intermediate. *Protein science : a publication of the Protein Society*, **18**, 980-993.
 159. Cohen, S., Chang, A. and Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **69**, 2110-2114.
 160. Birnboim, H. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, **7**, 1513-1523.
 161. McDonell, M., Simon, M. and Studier, F. (1977) Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *Journal of molecular biology*, **110**, 119-146.
 162. Weiss, B., Thompson, A. and Richardson, C. (1968) Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VII. Properties of the enzyme-adenylate intermediate in the polynucleotide ligase reaction. *The Journal of biological chemistry*, **243**, 4556-4563.
 163. Dignam, J.D., Lebovitz, R.M. and Roeder, R.G. (1983) Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res*, **11**, 1475-1489.
 164. Jitrapakdee, S. and Wallace, J. (2003) The biotin enzyme family: conserved structural motifs and domain rearrangements. *Current protein & peptide science*, **4**, 217-229.

165. Gravel, R. and Narang, M. (2005) Molecular genetics of biotin metabolism: old vitamin, new science. *The Journal of nutritional biochemistry*, **16**, 428-431.
166. Lavery, D.J. and Schibler, U. (1993) Circadian transcription of the cholesterol 7 alpha hydroxylase gene may involve the liver-enriched bZIP protein DBP. *Genes & Development*, **7**, 1871-1884.
167. Ngoka, L.C. (2008) Sample prep for proteomics of breast cancer: proteomics and gene ontology reveal dramatic differences in protein solubilization preferences of radioimmunoprecipitation assay and urea lysis buffers. *Proteome science*, **6**, 30.
168. Rodriguez, P., Bonte, E., Krijgsveld, J., Kolodziej, K.E., Guyot, B., Heck, A.J.R., Vyas, P., de Boer, E., Grosveld, F. and Strouboulis, J. (2005) GATA-1 forms distinct activating and repressive complexes in erythroid cells. *EMBO J*, **24**, 2354-2366.
169. Woo, A.J., Moran, T.B., Schindler, Y.L., Choe, S.-K., Langer, N.B., Sullivan, M.R., Fujiwara, Y., Paw, B.H. and Cantor, A.B. (2008) Identification of ZBP-89 as a novel GATA-1-associated transcription factor involved in megakaryocytic and erythroid development. *Molecular and Cellular Biology*, **28**, 2675-2689.
170. Lai, J. and Herr, W. (1992) Ethidium bromide provides a simple tool for identifying genuine DNA-independent protein associations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 6958-6962.
171. Wissmueller, S., Font, J., Liew, C.W., Cram, E., Schroeder, T., Turner, J., Crossley, M., Mackay, J.P. and Matthews, J.M. (2011) Protein-protein interactions: analysis of a false positive GST pulldown result. *Proteins*, **79**, 2365-2371.
172. Nestle, M. and Roberts, W. (1969) An extracellular nuclease from *Serratia marcescens*. II. Specificity of the enzyme. *The Journal of biological chemistry*, **244**, 5219-5225.
173. Sengupta, T., Cohet, N., Morl[√]©, F.o. and Bieker, J. (2009) Distinct modes of gene regulation by a cell-specific transcriptional activator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 4213-4218.
174. Hervouet, E., Vallette, F.M. and Cartron, P.F. (2010) Dnmt1/Transcription factor interactions: an alternative mechanism of DNA methylation inheritance. *Genes & cancer*, **1**, 434-443.
175. Grosveld, F., Rodriguez, P., Meier, N., Krpic, S., Pourfarzad, F., Papadopoulos, P., Kolodziej, K., Patrinos, G.P., Hostert, A. and Strouboulis, J. (2005) Isolation and characterization of hematopoietic transcription factor complexes by in vivo biotinylation tagging and mass spectrometry. *Ann N Y Acad Sci*, **1054**, 55-67.
176. van Werven, F.J. and Timmers, H.T. (2006) The use of biotin tagging in *Saccharomyces cerevisiae* improves the sensitivity of chromatin immunoprecipitation. *Nucleic Acids Research*, **34**, e33.
177. Borggrefe, T. and Liefke, R. (2012) Fine-tuning of the intracellular canonical Notch signaling pathway. *Cell Cycle*, **11**, 264-276.
178. Garee, J.P. and Oesterreich, S. (2010) SAFB1's multiple functions in biological control-lots still to be done! *J Cell Biochem*, **109**, 312-319.

179. Fuks, F., Burgers, W.A., Brehm, A., Hughes-Davies, L. and Kouzarides, T. (2000) DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nature Genetics*, **24**, 88-91.
180. Tatematsu, K.I., Yamazaki, T. and Ishikawa, F. (2000) MBD2-MBD3 complex binds to hemi-methylated DNA and forms a complex containing DNMT1 at the replication foci in late S phase. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, **5**, 677-688.
181. Brackertz, M., Gong, Z., Leers, J. and Renkawitz, R. (2006) p66alpha and p66beta of the Mi-2/NuRD complex mediate MBD2 and histone interaction. *Nucleic Acids Research*, **34**, 397-406.
182. Nan, X., Campoy, F.J. and Bird, A. (1997) MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell*, **88**, 471-481.
183. Schermelleh, L., Haemmer, A., Spada, F., Rosing, N., Meilinger, D., Rothbauer, U., Cardoso, M.C. and Leonhardt, H. (2007) Dynamics of Dnmt1 interaction with the replication machinery and its role in postreplicative maintenance of DNA methylation. *Nucleic Acids Research*, **35**, 4301-4312.
184. de Boer, E. (2003) Efficient biotinylation and single-step purification of tagged transcription factors in mammalian cells and transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**, 7480-7485.
185. Papai, G., Weil, P.A. and Schultz, P. (2011) New insights into the function of transcription factor TFIID from recent structural studies. *Current opinion in genetics & development*, **21**, 219-224.
186. Albright, S.R. and Tjian, R. (2000) TAFs revisited: more data reveal new twists and confirm old ideas. *Gene*, **242**, 1-13.
187. Verrijzer, C.P. and Tjian, R. (1996) TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity. *Trends in Biochemical Sciences*, **21**, 338-342.
188. Tanabe, O., Katsuoka, F., Campbell, A.D., Song, W., Yamamoto, M., Tanimoto, K. and Engel, J.D. (2002) An embryonic/fetal beta-type globin gene repressor contains a nuclear receptor TR2/TR4 heterodimer. *The EMBO Journal*, **21**, 3434-3442.
189. Cui, S., Kolodziej, K.E., Obara, N., Amaral-Psarris, A., Demmers, J., Shi, L., Engel, J.D., Grosveld, F., Strouboulis, J. and Tanabe, O. (2011) Nuclear receptors TR2 and TR4 recruit multiple epigenetic transcriptional corepressors that associate specifically with the embryonic beta-type globin promoters in differentiated adult erythroid cells. *Molecular and Cellular Biology*, **31**, 3298-3311.
190. Allen, H.F., Wade, P.A. and Kutateladze, T.G. (2013) The NuRD architecture. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*.
191. Lamonica, J.M., Deng, W., Kadauke, S., Campbell, A.E., Gamsjaeger, R., Wang, H., Cheng, Y., Billin, A.N., Hardison, R.C., Mackay, J.P. *et al.* (2011) Bromodomain protein Brd3 associates with acetylated GATA1 to promote its chromatin occupancy at erythroid target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, E159-168.
192. Bröske, A.-M., Vockentanz, L., Kharazi, S., Huska, M.R., Mancini, E., Scheller, M., Kuhl, C., Enns, A., Prinz, M., Jaenisch, R. *et al.*

- (2009) DNA methylation protects hematopoietic stem cell multipotency from myeloerythroid restriction. *Nature Genetics*, **41**, 1207-1215.
193. Trowbridge, J.J., Snow, J.W., Kim, J. and Orkin, S.H. (2009) DNA methyltransferase 1 is essential for and uniquely regulates hematopoietic stem and progenitor cells. *Cell Stem Cell*, **5**, 442-449.
194. Georgia, S., Kanji, M. and Bhushan, A. (2013) DNMT1 represses p53 to maintain progenitor cell survival during pancreatic organogenesis. *Genes & Development*, **27**, 372-377.
195. Nasonkin, I.O., Merbs, S.L., Lazo, K., Oliver, V.F., Brooks, M., Patel, K., Enke, R.A., Nellisery, J., Jamrich, M., Le, Y.Z. *et al.* (2013) Conditional knockdown of DNA methyltransferase 1 reveals a key role of retinal pigment epithelium integrity in photoreceptor outer segment morphogenesis. *Development*, **140**, 1330-1341.