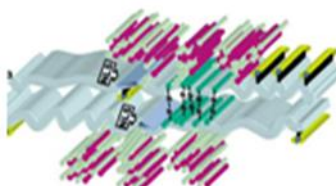
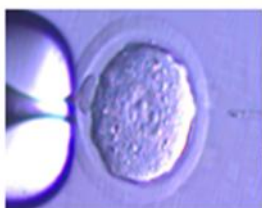




ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΚΑΙ ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΡΟΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ
ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ
ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ J/ CLUSTERIN



Γρίβας Ιωάννης
Α.Μ. 204120
Βιολόγος

ΑΘΗΝΑ 2011

Η διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα Εργαστήρια **Μοριακής Γενετικής-Τμήμα Μικροβιολογίας και Διαγονιδιακής Τεχνολογίας- Τμήμα Ζωικών Προτύπων Βιοϊατρικής Έρευνας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ**, καθώς και στον **Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών**.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Επίκουρος Καθηγητής **Ιωάννης Π. Τρουγκάκος** (επιβλέπων) , Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια **Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη**, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Ομότιμος Καθηγητής **Λουκάς Χ. Μαργαρίτης**, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Η συγκεκριμένη διατριβή υποστηρίχθηκε οικονομικά από το πρόγραμμα «ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΣ» του ΕΚΠΑ, από το πρόγραμμα «Διμερής Ε&Τ Συνεργασία Ελλάδας-Γαλλίας», 2009- ΓΓΕΤ 09FR56 και από το Ευρωπαϊκό Πρόγραμμα COST- CANGENIN (Cancer and Control of Genomic Integrity) στον Επικ. Καθηγ. Ι. Τρουγκάκο, καθώς και από βιομηχανικά προγράμματα του Εργαστηρίου Διαγονιδιακής Τεχνολογίας- Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ στην Ερευνήτρια Β' κ. Σ. Χαραλάμπους.

Στη Σύλβα Χαραλάμπους,
στη Νάντια Καβροχωριανού
και στη Μαρία Ευαγγελίδου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	4-5
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	6-7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8-10
ABSTRACT	11-12

Κεφάλαιο 1- ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	14
1.1.1 Ο ρόλος των Λιποπρωτεϊνών	15
1.2 ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ (Apolipoproteins, Apo)	16-17
Κατηγορίες Απολιποπρωτεϊνών	17-18
1.3 ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ J/ CLUSTERIN (CLU)	18-19
1.3.1 Μεταγραφική Ρύθμιση του Γονιδίου της CLU	20-22
1.3.2 Ισομορφές της CLU	22-24
1.3.3 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΗΣ CLU	
1.3.3.1 Βιολογικός Ρόλος της CLU στη γήρανση	24-27
1.3.3.2 Βιολογικός Ρόλος της CLU στον καρκίνο	27-29
1.3.3.3 Βιολογικός Ρόλος της CLU σε άλλες παθολογίες	30-32
1.3.3.4 Βιολογικός Ρόλος της CLU ως μοριακή συνοδός (Chaperone)	32-34
1.3.3.4 Βιολογικός Ρόλος της CLU στο ανοσοποιητικό σύστημα	35-37
1.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΓΕΝΕΣΗΣ ΣΤΟ Mus musculus	37-39
1.5. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	40

Κεφάλαιο 2- ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ (construct)	
2.1.1 Καλλιέργειες E. Coli	42
2.1.2 Παρασκευή πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες βακτηρίων	
2.1.2.A Μικρής Κλίμακας (mini-prep)	43
2.1.2.B Μεσαίας Κλίμακας	43
2.1.3 Πέψη DNA με περιοριστικά ένζυμα	44

2.1.4	Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	44-45
2.1.5	Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης (Gel extraction)	45
2.1.6	Κλωνοποίηση γονιδιακής κατασκευής σε πλασμιδιακούς φορείς	45-47
2.1.7	Μετασχηματισμός στελεχών E. coli με τη μέθοδο του ηλεκτροπαλμού	47-48
2.1.8	Απομόνωση της διαγονιδιακής κατασκευής που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για μικροένεση	48- 49
2.2	ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ	
2.2.1	Στελέχη Ποντικών	49-50
2.2.2	Δημιουργία Διαγονιδιακών ποντικών με τη μέθοδο μικροένεσης σε προπυρήνα	50- 51
2.2.3	Παραγωγή γονιμοποιημένων ωαρίων	51-52
2.2.4	Μικροένεση του DNA στα γονιμοποιημένα ωάρια	53-54
2.2.5	Μεταφορά των εμβρύων στα οποία έχει ενεθεί DNA στον αγωγό ψευδέγκυων θηλυκών ποντικών	54-55
2.3	ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΘΕΣΗΣ ΤΟΥ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΟΥ	
2.3.1	Απομόνωση DNA από βιοψία ουράς ποντικού	56-57
2.3.2	Φωτομέτρηση DNA (γενωμικού και πλασμιδιακού)	57
2.3.3	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	57-59
Κεφάλαιο 3- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ		
3.1	Δημιουργία πλασμιδιακού φορέα actin CLU IRES Egfp	61-62
3.2	Ταυτοποίηση πλασμιδιακού φορέα	62-64
3.3	Απομόνωση και Καθαρισμός Διαγονιδιακής Κατασκευής	64-65
3.4	Μικροενέσεις διαλύματος DNA σε προπυρήνες ζυγωτών ποντικών	65-66
3.5	Ταυτοποίηση ποντικών που φέρουν το διαγονίδιο	66
3.6	Έλεγχος της διαβίβασης του διαγονιδίου στις επόμενες γενιές	66-67
Κεφάλαιο 4- ΣΥΖΗΤΗΣΗ		68-73
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ		74-78
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ		79

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία είναι το αποτέλεσμα μίας διαρκούς προσπάθειας ενός έτους μετά από αλληλεπίδραση με πολλούς συναδέλφους ερευνητές τόσο στο Τμήμα Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου, όσο και στα εργαστήρια Μοριακής Γενετικής και Διαγονιδιακής Τεχνολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ. Με εφελτήριο, λοιπόν, την ολοκλήρωση του κύκλου αυτού σπουδών καθώς και της παρούσας ερευνητικής πρότασης θα ήθελα να αναφέρω τους ερευνητές με τους οποίους συνεργάστηκα τόσο για τη μεταφορά της τεχνογνωσίας, όσο και για τη επιστημονική τους οξυδέρκεια στην επιστημονική μου καθοδήγηση.

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους τρεις επιβλέποντες ερευνητές που ανέλαβαν να με καθοδηγήσουν στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Ιωάννη Τρουγκάκο που με ενέταξε στην ερευνητική του ομάδα, μου έδειξε εμπιστοσύνη και με βοήθησε να ωριμάσω επιστημονικά. Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Κύρια Ερευνήτρια Σύλβα Χαραλάμπους για την καθοριστική της συμβολή στη δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών καθώς και για τις πολύ εύστοχες παρατηρήσεις, τη συνετή καθοδήγηση και την παιδαγωγική της αγάπη. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ερευνήτρια Δ' Έρα Ταουφίκ και την Διευθύντρια Ερευνών Lesley Probert για τη συμμετοχή τους στη δημιουργία του πλασμιδιακού φορέα, για τη μεταφορά της τεχνογνωσίας και για την εξαιρετική συνεργασία.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμα, τους δύο εξεταστές της τριμελούς μου επιτροπής που δέχθηκαν να συμμετέχουν σε αυτή καθώς και για τις γνώσεις που μου προσέφεραν κατά τη φοίτηση μου στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα, Ομότιμο Καθηγητή Λουκά Μαργαρίτη και Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ισιδώρα Παपाσιδέρη. Αλλά, και την Επίκουρο Καθηγήτρια Ράνια Τσιτσιλώνη για την επιστημονική και συναισθηματική υποστήριξη.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να εκδηλώσω την αγάπη μου και τη μεγάλη εκτίμηση μου προς στην υποψήφια διδάκτορα Νάντια Καβροχωριανού και τη Δρ Μαρία

Ευαγγελίδου όχι μόνο για τη μεταφορά της τεχνογνωσίας όσον αφορά τις τεχνικές διαγένεσης και τις ασηπτικές βακτηριακές τεχνικές αντίστοιχα, αλλά για το επιστημονικό ήθος, την υπομονή τους και την δεκτικότητά τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Μοριακής Γενετικής και Διαγονιδιακής Τεχνολογίας, Μιχάλη Μακρυλλό, Βάσω Κυραργύρη, Μαρία Καραμίτα, Βιβή Τσεβελέκη, Φώτη Μπαντούνα, Ιωάννα Στεργιάτου αλλά και την Δρ. Μαριάννα Χ. Αντωνέλου (Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής) και τα μέλη της Ομάδας Μοριακής- Κυτταρικής Γήρανσης και Καρκινογένεσης του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Ελένη Τσακίρη και Φυλλίτσα Ντουρούπη για τη συμβολή τους και για τις εποικοδομητικές συζητήσεις.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η γήρανση είναι ένα αναπόφευκτο φυσιολογικό φαινόμενο για κάθε ζωντανό οργανισμό. Ως γήρανση ορίζεται το σύνολο των χρονικά αθροιζόμενων βιολογικών μεταβολών οι οποίες καταλήγουν στην φυσική και λειτουργική κατάρρευση του οργανισμού και την προϊούσα αύξηση της θνησιμότητας. Αν και τα βιολογικά αίτια της γήρανσης δεν έχουν μέχρι στιγμής διαλευκανθεί πλήρως είναι γνωστό ότι συμπεριλαμβάνουν ιδιαίτερα περίπλοκες αλληλεπιδράσεις γενετικών παραγόντων και περιβάλλοντος δηλαδή πρόκειται για ένα πολυπαραγοντικό φαινόμενο. Είναι, επίσης, σαφές ότι το γήρας αποτελεί τον κύριο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση μιας σειράς ασθενειών, οι πιο κοινές από τις οποίες είναι ο καρκίνος, οι νευροεκφυλιστικές νόσοι, η στεφανιαία νόσος και ο διαβήτης. Η κατανόηση των κυτταροβιολογικών μηχανισμών που σχετίζονται με την εμφάνιση του φαινοτύπου της γήρανσης και ο συσχετισμός τους με τις μεταβολές που προκαλούν τις ασθένειες του γήρατος, όπως είναι ο καρκίνος, είναι μια σημαντική παράμετρος στην προσπάθεια για τη βελτίωση της ποιότητας ζωής, την πρόληψη των ασθενειών του γήρατος και την ανάπτυξη νέων βιοϊατρικών διαγνωστικών και θεραπευτικών μέσων.

Ο καρκίνος αποτελεί την αιτία για ένα μεγάλο ποσοστό θανάτων ανά τον κόσμο (13% όλων των θανάτων το 2007). Έτσι, η μελέτη θεραπευτικών ουσιών-θεραπευτικών σχημάτων για την αναστολή μορίων που αναστέλλουν τόσο στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων όσο και στην διαφυγή από την επιτήρηση του ανοσοποιητικού βρίσκονται σε εξέλιξη. Η Apolipoprotein J/Clusterin αποτελεί φαρμακευτικό στόχο, αφού μετά τη χρήση αντινοσηματικών νουκλεοτιδίων που ανέστειλαν τη παραγωγή της (κλινικές δοκιμές φάσης II) διαπιστώθηκε η αύξηση της επιβίωσης των ατόμων που έπασχαν από καρκίνο του προστάτη.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι η Clusterin αποτελεί στόχο αντικαρκινικής θεραπείας, καθώς και το γεγονός ότι ο καρκίνος αποτελεί μία ασθένεια κατά την οποία τα καρκινικά κύτταρα εξαρτώνται αρκετά από το περιβάλλον του όγκου (milieu) τόσο για τον πολλαπλασιασμό τους όσο για το αν θα διηθήσουν τη βασική

μεμβράνη και θα ενδοαγγειωθούν στην κυκλοφορία του αίματος, η *in vivo* μελέτη του λειτουργικού ρόλου της συγκεκριμένης πρωτεΐνης υπήρξε ο κύριος στόχος της παρούσας εργασίας. Αξίζει να σημειωθεί ότι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος έχουν δείξει ότι η υπερέκφραση της Clusterin εμποδίζει τον κυτταρικό θάνατο και προωθεί την επιβίωση του καρκινικού κυττάρου.

Η Apolipoprotein J/Clusterin εκτός από την εμπλοκή της στην καρκινογένεση, αποτελεί έναν αξιόπιστο βιοδείκτη της γήρανσης *in vivo* και *in vitro*. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί η αύξηση της εν λόγω πρωτεΐνης κατά τη γήρανση των ατόμων. Πιθανολογείται ότι η αύξηση του οξειδωτικού φορτίου και κατά συνέπεια των οξειδωμένων πρωτεϊνών κατά το γήρας οδηγεί στην υπερέκφραση της Clusterin. Η παρατήρηση αυτή πιθανότατα σχετίζεται με τη δράση της CLU ως μοριακής συνοδού (chaperone), η οποία βοηθά άλλες πρωτεΐνες να επανακτήσουν την σωστή τεταρτοταγή δομή τους, αποτρέπει τη συσσωμάτωσή τους ή οδηγεί τις μη σωστά διπλωμένες πρωτεΐνες για πρωτεόλυση στο πρωτεάσωμα. Η δράση της αυτή πιθανώς εξηγεί την εμπλοκή της CLU σε ασθένειες του γήρατος όπως καρδιαγγειακά νοσήματα και νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως η ασθένεια Alzheimer. Ακόμη, η ρύθμιση της Clusterin μέσω του μονοπατιού GH/IGF-1 μετά από επαγόμενο στρες αποδεικνύει την εμπλοκή του εν λόγω μορίου σε μία ακόμη παθολογία του αναπτυσσόμενου κόσμου, το διαβήτη τύπου II. Η δημιουργία διαγονιδιακών ζώων θα δώσει τη δυνατότητα να μελετηθεί ο λειτουργικός ρόλος της ApoJ/ Clusterin τόσο στη μακροβιότητα των θηλαστικών, όσο και στις προαναφερθείσες νόσους του γήρατος.

Έτσι, για πρώτη φορά διεθνώς, δημιουργήθηκαν διαγονιδιακά ποντίκια με τη μέθοδο μικορένωσης σε προπυρήνα ζυγωτών, που φέρουν το διαγονίδιο που περιέχει το cDNA της Apolipoprotein J/Clusterin υπό το ρυθμιστικό έλεγχο της ανθρώπινης β-ακτίνης. Προέκυψαν δύο διαγονιδιακές σειρές που μεταβιβάζουν το διαγονίδιο στις επόμενες γενιές μετά από γονοτυπική ανάλυση. Το συγκεκριμένο μοντέλο θα δώσει τη δυνατότητα μελέτης του βιολογικού ρόλου της CLU σε ένα

μοντέλο θηλαστικού, τον ποντικό, το οποίο έχει μεγάλη εξελικτική συγγένεια με τον άνθρωπο. Δηλαδή, θα δοθεί η ευκαιρία να μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις της εν λόγω πρωτεΐνης με άλλα μόρια και η εμπλοκή της σε διάφορα μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης. Επιπρόσθετα, η σύγκριση (ιστολογικά, σε επίπεδο DNA, RNA και πρωτεΐνης,) μεταξύ φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων σε φυσιολογικά και διαγονιδιακά ζώα θα δώσει τη δυνατότητα να μελετηθεί ο λειτουργικός ρόλος της ApoJ/ Clusterin κατά την καρκινογένεση.

ABSTRACT

Ageing is an inevitable natural process, which refers to the accumulation of biological changes in an organism over time. These changes lead to physical and functional collapse at the organism level including an increase in mortality rate. Although the biological mechanisms and causes of ageing are not fully defined, it is clear that ageing is a multifactorial phenomenon affected by interactions between genetic factors and the environment. It is evident that ageing is the main risk factor for the emergence of age-related diseases such as cancer, neurodegenerative diseases, diabetes and coronary heart disease. The understanding of the molecular-cellular mechanisms responsible for ageing phenotypes, and of the modifications that age-related diseases may cause, is important for improving the quality of life, preventing diseases and for developing novel biomedical diagnostic and therapeutic strategies.

Malignant neoplasms were the main cause for 13% of the deaths worldwide in 2007. Therefore, the development of novel therapeutic agents and strategies to inhibit the resistance of cancer cells to death and surveillance by the immune system is a significant step for increasing the patients survive. Apolipoprotein J/ clusterin is a novel therapeutic target. Its cytoprotective role became apparent when experiments aimed to block clusterin with antisense nucleotides (ASO) increased the survival rate of patients with prostate cancer (clinical trials phase II).

Considering that clusterin is an anti-sense target for cancer therapy, as well as that cancer is a disease during which cancer cells are milieu-dependent for their proliferation and for basal membrane infiltration, the understanding of the biological role of Clusterin *in vivo* is the main goal of this MSc diploma thesis.

Moreover, apolipoprotein J/ clusterin is an extremely reliable biosensor of ageing *in vivo* and *in vitro*. Particularly, it has been observed that upregulation of this protein during ageing correlates positively with the accumulation of oxidized proteins. This is compatible with the previously described role of clusterin as a molecular chaperone which is implicated in the stabilization of misfolded proteins and targeting of

misfolded proteins to the proteasome for degradation. In fact, clusterin polymorphisms have been associated with multiple phenotypes relating to ageing including cardiovascular diseases, late onset of Alzheimer's disease and type II diabetes. The availability of clusterin transgenic mice will enable us to study in detail and fully understand the functional role of clusterin in the pathogenesis of cancer, neurodegenerative diseases as well as in the regulation of longevity in mammals.

To this end, the development, for the first time, of transgenic mice overexpressing Apolipoprotein J/ clusterin constitutively and ubiquitously under the regulation of the human b-actin promoter will give the opportunity to further investigate and define the biological role of this protein in a mouse model, which is evolutionarily close to humans. So, after pronuclear microinjection of the transgene into mouse zygotes two transgenic lines were obtained, which were checked for transgene transmission. With this model our research group will have the potential to gain detailed knowledge regarding the interactions between clusterin and other molecules as well as regarding its participation in signal transduction pathways relevant for malignancy. Moreover, the effect of clusterin upon tumor progression and metastasis can be studied *in vivo* allowing us to further understand the role of clusterin in neoplasia.

Κεφάλαιο 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.3 ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος, ιστορικά, κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη συμπεριφορά τους παρουσία ηλεκτρικού πεδίου, ενώ η ευρέως αποδεκτή κατηγοριοποίησή τους στηρίζεται στην κατανομή των λιποπρωτεϊνών στα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια ανάλογα με την πυκνότητά τους. Έτσι διακρίνονται πέντε βασικές κατηγορίες λιποπρωτεϊνών (**Πίνακας 1**): τα χυλομικρά (Chylomicrons), η πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (Very Low Density Lipoprotein, VLDL), η χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (Low Density Lipoprotein, LDL), η υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (High Density Lipoprotein, HDL) και η πολύ υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (Very High Density Lipoprotein, VHDL) (1).

Πίνακας 1: Κατηγοριοποίηση Λιποπρωτεϊνών (2)

Λιποπρωτεΐνη	Πυκνότητα	Πρωτεΐνη (% επί του συνολικού βάρους)	Λιπίδια (% επί του συνολικού βάρους)	Υπερισχύον Λιπίδιο (% επί του συνολικού βάρους)
Χυλομικρά	<1.006	2	98	Triacylglycerol (85 %)
VLDL	0.950-1.006	10	90	Triacylglycerol (50%)
LDL	1.019-1.063	25	75	50 % Cholesterol (40 % esterified + 10% free)
HDL	1.063-1.210	55	45	Phospholipids (35 %)

Οι λιποπρωτεΐνες αποτελούν μακρομοριακές δομές που αποτελούνται από πρωτεΐνες και λιπίδια, των οποίων βασικός ρόλος είναι να διευκολύνουν την μεταφορά των λιπιδίων διαμέσου της κυκλοφορίας του αίματος. Όσον αφορά στη δομή τους διακρίνονται ο φάκελος και ο πυρήνας. Ο φάκελος- μεμβράνη σχηματίζεται από μονοστιβάδα φωσφολιπιδίων αλλά και χοληστερόλη, τα οποία προβάλλουν τις υδρόφιλες κεφαλές προς το υδατικό περιβάλλον και τις υδρόφοβες ουρές προς τον πυρήνα του λιποπρωτεϊνικού σωματιδίου που αποτελείται από χοληστερόλη και τριακυλογλυκερίδια.

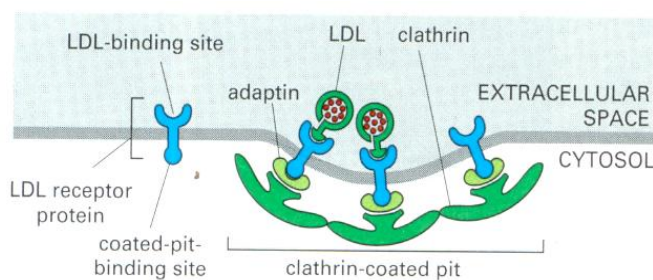
¹ Alaupovic P., 1982. *The Role of Apolipoproteins in Lipid Transport Processes*, La Ricerna Clin. Lab. 12, 3.

² Michael W. King, Ph.D , IU School of Medicine (<http://themedicalbiochemistrypage.org/home.html>)

1.3.1 Ο ρόλος των Λιποπρωτεϊνών

Η χοληστερόλη αποτελεί σημαντικό συστατικό της κυτταρικής μεμβράνης αλλά και πρόδρομο μόριο στεροειδών ορμονών και βιταμινών (D3). Η ομοιόσταση του κυττάρου όσον αφορά τη χοληστερόλη επιτυγχάνεται μέσω της ρύθμισης της χοληστερόλης στο επίπεδο της σύνθεσης, της έκκρισης καθώς και ρύθμιση της ενεργότητας του υποδοχέα των λιποπρωτεϊνών.

Πολλά μετázωα χρησιμοποιούν τον υποδοχέα των λιποπρωτεϊνών για να προσλάβουν τη χοληστερόλη που απαιτείται μέσω ενός μηχανισμού που καλείται ενδοκύττωση με διαμεσολάβηση υποδοχέα (receptor-mediated endocytosis) (Εικόνα 1). Σε περίπτωση, που απορρόφηση χοληστερόλης παρεμποδίζεται, η χοληστερόλη συσσωρεύεται στην κυκλοφορία και συμβάλλει στη δημιουργία αθηρωματικών πλακών στα τοιχώματα των αγγείων.



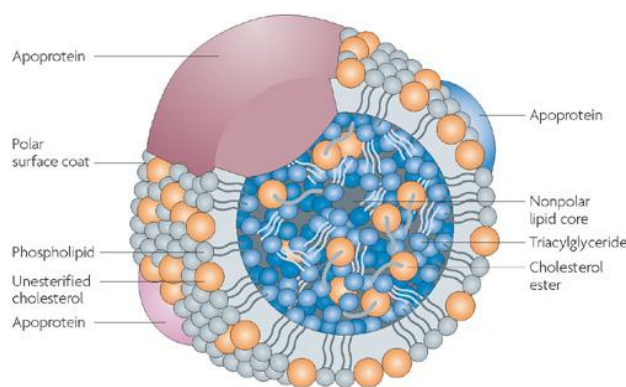
Εικόνα 1: Μηχανισμός ενδοκύττωσης της LDL με διαμεσολάβηση υποδοχέα (Alberts et al., 2002)

Κύριος μεταφορέας της χοληστερόλης από το ήπαρ στους ιστούς είναι η LDL. Όταν ένα κύτταρο, λοιπόν, χρειάζεται χοληστερόλη για τη σύνθεση μεμβράνης, εκφράζει υποδοχείς λιποπρωτεϊνών και συγκεκριμένα LDLR

(Low Density Lipoprotein Receptor) στην κυτταρική μεμβράνη σε περιοχές όπου έχουν σχηματιστεί εσοχές καλυμμένες με κλαθρίνη. Με την πρόσδεση της LDL στον υποδοχέα οι καλυμμένες εσοχές κλείνουν και δημιουργούνται καλυμμένα κυστίδια που περιέχουν την LDL, τα οποία στη συνέχεια ενδοκυττώνονται και συντήκονται με τα ενδοσώματα τα οποία μεταφέρουν τους χοληστερινικούς εστέρες στα λυσοσώματα. Στα λυσοσώματα οι εστέρες υδρολύονται σε χοληστερόλη (3).

1.4 ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ (Apolipoproteins, Apo)

³ Alberts et al., 2002. *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, New York.



Nature Reviews | Drug Discovery

Εικόνα 2: Δομή λιποπρωτεϊνικού σωματιδίου

Ο όρος απολιποπρωτεΐνη χρησιμοποιήθηκε από τον John Oncley το 1963 αναφερόμενος στα πρωτεϊνικά συστατικά των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος. Γενικά, απολιποπρωτεΐνη χαρακτηρίζεται μία λιπιδιο-συνδεόμενη πρωτεΐνη με δυνατότητα να σχηματίζει διαλυτά λιποπρωτεϊνικά σωματίδια. Δηλαδή, η

απολιποπρωτεΐνη που αποτελεί βασικό συστατικό του φακέλου των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων (**Εικόνα 2**). Υπάρχουν τέσσερα βασικά κριτήρια (**4**) για να θεωρηθεί μία πρωτεΐνη ως απολιποπρωτεΐνη:

1. Μοναδικές χημικές, φυσικές και ανοσολογικές ιδιότητες
2. Δυνατότητα σχηματισμού λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων
3. Διακριτές δομικές και λειτουργικές ιδιότητες τόσο στην πρωτεϊνική όσο και στην απολιποπρωτεϊνική μορφή
4. Βασικό συστατικό του συστήματος λιπιδικής μεταφοράς

Λεπτομερής ανοσολογικός χαρακτηρισμός των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων LDL και HDL υποδεικνύει ότι χαρακτηρίζονται από την παρουσία απολιποπρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι οι απολιποπρωτεΐνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ειδικοί δείκτες για τον χαρακτηρισμό των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων. Έτσι, λιποπρωτεϊνικά σωματίδια που φέρουν στον φακέλο τους μία μόνο κατηγορία απολιποπρωτεΐνης ονομάζονται απλές λιποπρωτεΐνες. Από την άλλη, λιποπρωτεϊνικά σωματίδια που περιέχουν δύο ή περισσότερες κατηγορίες απολιποπρωτεϊνών καλούνται σύνθετες απολιποπρωτεΐνες (**5**).

Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης όλων των διαφορετικών κατηγοριών απολιποπρωτεϊνών βασίζεται σε cis και trans ρυθμιστικά στοιχεία όπως

⁴ Alaupovic P., 1982. *The role of Apolipoproteins in lipid transport Processes*, La Ricerca Clin. Lab 12, 3.

⁵ Alaupovic P., 1982. *The role of Apolipoproteins in lipid transport Processes*, La Ricerca Clin. Lab 12, 3

υποκινητές, ενισχυτές και μεταγραφικοί παράγοντες. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις ρυθμίζουν τόσο την ιστοειδική έκφρασή τους όσο και την έκφραση τους κατά τη διαφοροποίηση, καθώς και αλλαγές στην έκφραση ως απόκριση σε ορμονικά και μεταβολικά ερεθίσματα.

Κατηγορίες Απολιποπρωτεϊνών

Πίνακας 2: Κατηγορίες Απολιποπρωτεϊνών (6)

Ονομασία	Χρωμό- σωμα	Ιστός	Αριθμός αμινοξέων της ώριμης Apo	Λειτουργίες
Apo A-I	11	ήπαρ, έντερο	243	Δομικός ενεργοποιητής του LCAT, κύριο πρωτεϊνικό συστατικό της HDL
Apo A-II	1	ήπαρ	77	Ενεργοποιητής της ηπατικής λιπάσης, κύριο πρωτεϊνικό συστατικό της HDL
Apo A-IV	11	ήπαρ, έντερο	377	Ρυθμιστής ενεργότητας της LPL, πρωτεϊνικό συστατικό της HDL και των χυλομικρών
Apo B-100	2	ήπαρ	4536	Δομικό συστατικό της VLDL, προσδέτης της LDL
Apo B-48	2	έντερο	2152	Συστατικό των χυλομικρών
Apo C-I	19	ήπαρ	57	Ενεργοποιητής του LCAT, εμποδίζει την απομάκρυνση των TGRL μέσω LDLR
Apo C-II	19	ήπαρ	79	Ενεργοποιητής της LPL
Apo C-III	11	ήπαρ	79	Εμποδίζει την LPL
Apo D	3	ήπαρ, έντερο, σπλήνας,	169	πρωτεϊνικό συστατικό της HDL, συσχετίζεται με

⁶ Patsch W. and Gotto A., 1996. *Apolipoproteins: Pathophysiology and Clinical Implications*, Methods in Enzymology, vol. 263.

		πάγκρεας, εγκέφαλος, νεφροί		το LCAT
Apo E	19	ήπαρ, μακροφάγα, εγκέφαλος	299	Προσδένεται στον LDLR, ApoE4 σχετίζεται με την πρόωγη εμφάνιση της ασθένειας Alzheimer
Apo F (LTIP)	10	ήπαρ	326	Συστατικό της HDL και της LDL, παρεμποδίζει τη μεταφορά λιπιδίων μεταξύ λιποπρωτεϊνών (7)
Apo H (β_2 glycoprotein I)	17	ήπαρ	345	Συστατικό των χυλομικρών, συμμετοχή στο μεταβολισμό των τριακυλογλυκερολών (8)
Apo J (clusterin)	8	Σε διάφορους κυτταρικούς τύπους και σε όλα τα βιολογικά υγρά	449	Συστατικό της HDL και VLDL, μοριακή συνοδος, εμπλοκή στον καρκίνο και στην γήρανση καθώς και στην ασθένεια Alzheimer
Apo M	6	ήπαρ, νεφροί	188	Κύριο συστατικό της HDL (9)

1.3 ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ J/ CLUSTERIN (CLU)

Η Απολιποπρωτεΐνη J/ Clusterin πρωτοταυτοποιήθηκε ως εκκρινόμενη γλυκοπρωτεΐνη το 1983 σε όρχεις κριαριού και δείχθηκε ότι εκκρίνεται από πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων Sertoli αρουραίου (10). Οφείλει το όνομά της (clusterin) στη δυνατότητα που έχει να αυξάνει τη συσσωμάτωση των κυττάρων Sertoli και των ερυθροκυττάρων *in vitro*, ενώ παρουσιάζει μεγάλο βαθμό

⁷ Lagor W., et al., 2009. *Overexpression of Apolipoprotein F reduces HDL cholesterol levels in vivo*, Arterioscler Thromb Vasc. Biol 29 (1):40-46

⁸ De Groot PG et al., 2011. *$\beta(2)$ -Glycoprotein I: evolution, structure and function*, J Thromb Haemost. [Epub ahead of print]

⁹ Zhou Jun-Wei, et al., 2011. *Apolipoprotein M Gene (APOM) Polymorphism modifies Metabolic and Disease Traits in Type 2 Diabetes*, PLoS ONE 24;6(2)

¹⁰ Blaschuk O., et al., 1983. Purification and Characterization of a Cell- aggregating Factor (Clusterin), the Major Glycoprotein in Rat Rete Testis Fluid, The Journal of Biological Chemistry 258 (12): 7714-7720

συντήρησης στα θηλαστικά, ο οποίος φθάνει το 70%. Στους ανθρώπους πρωτοαπομονώθηκε από τον ορό και κλωνοποιήθηκε το γονίδιό της με τα παρακάτω διαφορετικά ονόματα:

1. καταστολέας της κυτόλυσης από το συμπλήρωμα (Complement Cytolysis inhibitor, CLI) (11)
2. εκκρινόμενη πρωτεΐνη 40 (secreted protein 40,40, SP-40,40) (12)
3. θειομένη γλυκοπρωτεΐνη (sulfated glycoprotein 2, SGP2) (13)
4. προστατικό μετάγραφο που καταστέλλεται από τεστοστερόνη (Testosterone repressed Prostate Message, TRPM2) (14)
5. Τέλος, ως απολιποπρωτεΐνη J, συσχετίστηκε με τις HDL το 1990 και βρέθηκε να είναι ανάλογη της SGP2 στον άνθρωπο (15). Στον ορό, ως απολιποπρωτεΐνη, σχετίζεται με την Apo-AI στα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια HDL και VHDL.

Σχετικά με το ρόλο της CLU, έχει δειχθεί ότι εμπλέκεται σε φυσιολογικές διεργασίες όπως η ωρίμανση του σπέρματος, η καταστολή του συμπληρώματος, η μεταφορά των λιπιδίων, η αναδιαμόρφωση των ιστών, η ανακύκλωση των μεμβρανών, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων, η σταθεροποίηση των πρωτεϊνών που βρίσκονται υπό στρες καθώς και η προώθηση ή η καταστολή της απόπτωσης. Επίσης, εμπλέκεται και σε ποικιλία παθολογικών καταστάσεων όπως νευροεκφυλιστικές ασθένειες, καρκίνος, αθηρωμάτωση καθώς και σε ασθένειες λόγω γήρατος.

¹¹ Jenne D., et al., 1989. *Molecular structure and functional characterization of a human complement cytolysis inhibitor found in blood and seminal plasma: identity to sulfated glycoprotein 2, a constituent of rat testis fluid*, Proc Natl Acad Sci U S A, 86(18):7123-7.

¹² Kirszbaum et al., 1989. *Molecular cloning and characterization of the novel, human complement-associated protein, SP-40,40: a link between the complement and reproductive systems*, EMBO J. 1989 Mar;8(3):711-8.

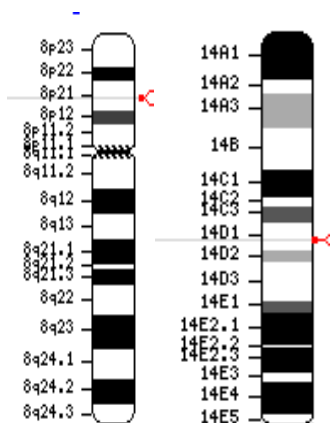
¹³ Collard MW, Griswold MD, 1987. *Biosynthesis and molecular cloning of sulfated glycoprotein 2 secreted by rat Sertoli cells*, Biochemistry 16;26(12):3297-303.

¹⁴ Leger JG et al., 1987. *Characterization and cloning of androgen-repressed mRNAs from rat ventral prostate*, Biochem Biophys Res Commun. 31;147(1):196-203.

¹⁵ De Silva, et al., 1990. *Purification and characterization of apolipoprotein J*, J Biol Chem. 25;265(24):14292-7.

1.3.1 Μεταγραφική Ρύθμιση του Γονιδίου της CLU

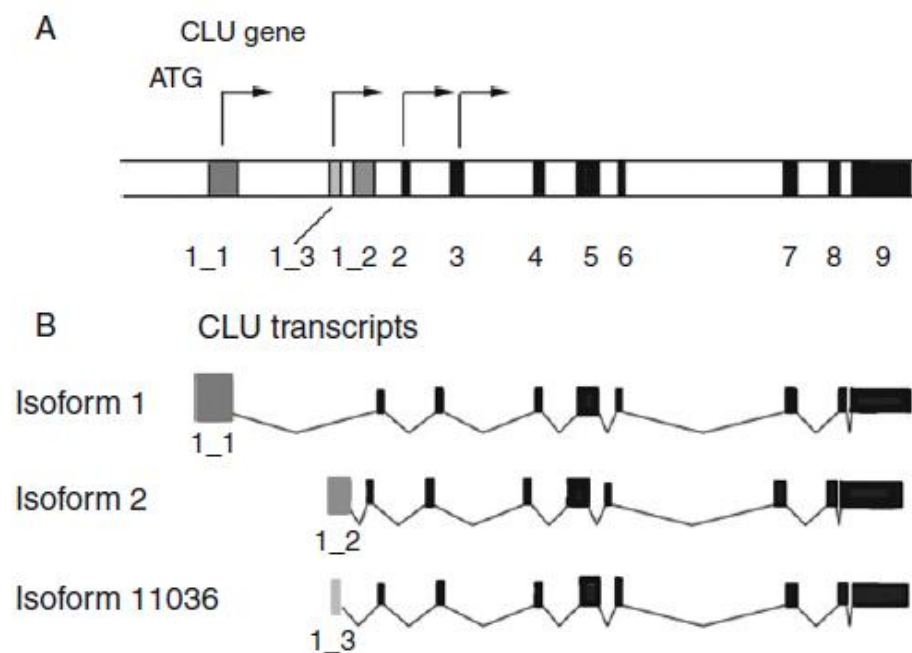
Το γονίδιο της CLU στον άνθρωπο, βρίσκεται σε ένα αντίγραφο στο χρωμόσωμα 8 και συγκεκριμένα στη χρωμοσωμική θέση 8p21-p12. Είναι οργανωμένο σε 9 εξώνια διαφορετικού μήκους βάσεων (**16**) (126-412bp) και καλύπτει μία περιοχή του γονιδιωμάτος μήκους 17.877bp. Η γονιδιακή οργάνωση είναι καλά διατηρημένη τόσο στον ποντικό όσο και στον αρουραίο. Το ομόλογο γονίδιο της CLU στον ποντικό εδράζεται στο χρωμόσωμα 14 και καλύπτει μία γονιδιακή περιοχή 12.923bp, ενώ τα εξώνια 1 και 9 αποτελούν αμετάφραστες περιοχές (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Χρωμοσωμική θέση του γονιδίου της CLU (ξεκινώντας από αριστερά) στον άνθρωπο (Χρωμόσωμα 8) και στον ποντικό (Χρωμόσωμα 14). **Πηγή:** NCBI Map Viewer.

Εικόνα 4 (δεξιά): Γονίδιο της CLU και μετάγραφα. Στην εικόνα Α φαίνεται το γονίδιο της CLU ενώ με μαύρες στικτές γραμμές τα εξώνια. Τα κωδικόνια έναρξης προβάλλονται με βέλη. Υπάρχουν τρία διαφορετικά κωδικόνια έναρξης για κάθε ισομορφή (εικόνα Β) στο εξώνιο 1. **Πηγή:** Alternative Splicing Annotation Project (ASAP).

Στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου της CLU του ανθρώπου υπάρχουν 3 κωδικόνια έναρξης ATG (εξώνιο 1, 2, 3 αντίστοιχα). Σε μεταγραφικό επίπεδο, έχει βρεθεί ότι το γονίδιο της CLU μεταγράφεται σε περισσότερα του ενός μετάγραφα (ισομορφή 1, 2, 11036) λόγω εναλλακτικού ματίσματος (Εικόνα 4). Όλα τα μετάγραφα έχουν ένα μοναδικό εξώνιο 1 και μοιράζονται τα ίδια εξώνια 2-9. Τα



¹⁶ Wong, P., et al., 1994. Molecular characterization of human TRPM-2/clusterin, a gene associated with sperm maturation, apoptosis and neurodegeneration, Eur J Biochem. 1;221(3):917-25.

μετάγραφα αυτά, αποτελούνται από 9 εξώνια, 8 εσώνια και 5' και 3'-αμετάφραστες περιοχές (5' και 3'-UTR).

Η ποικιλία στα επίπεδα έκφρασης της CLU σε διαφορετικούς ιστούς καθώς και σε παθολογίες υποδηλώνει ότι η έκφραση της CLU είναι αυστηρά ρυθμισμένη και μάλιστα ιστοειδικά. Η έκφραση του γονιδίου ρυθμίζεται από αυξητικούς παράγοντες, παράγοντες στρες, κυταροκίνες, αποπτωτικά σήματα καθώς και από επιγενετικούς παράγοντες όπως μεθυλίωση νησίδων CpG (17). Στον υποκινητή της CLU υπάρχουν cis ρυθμιστικά στοιχεία, όπως AP-1, AP-2 (Activator Protein 1, 2), Sp1, NF-1, AR (Androgen Receptor). Επιπρόσθετα, υπάρχει μία μεγάλη επικράτεια του υποκινητή της CLU που είναι συντηρημένη μεταξύ των ειδών και καλείται CLE (Clusterin Element). Η CLE αναγνωρίζεται από τον HSF-1 (Heat Shock Factor- 1), μεταγραφικό παράγοντα, και διαμεσολαβεί την επαγωγή της μεταγραφής σε καταστάσεις θερμικού σοκ ή σε καταστάσεις στρες, όπως παρεμπόδιση του προτεασώματος (18).

Η CLU επάγεται ή καταστέλλεται μεταγραφικά ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, ανάλογα με τα ερεθίσματα (αυξητικοί παράγοντες, ορμόνες) καθώς και ανάλογα με το στάδιο της διαφοροποίησης (Εικόνα 5) (19). Έτσι, για παράδειγμα, η AP-1 αποτελεί θέση πρόσδεσης τόσο για τον TGF-β (Transforming Growth Factor- β) όσο και για τους αυξητικούς παράγοντες NGF (Nerve Growth Factor) και EGF (Epidermal Growth Factor) σε κύτταρα CCL64, PC12 αντίστοιχα με αποτέλεσμα την προώθηση της μεταγραφής του γονιδίου της CLU στους συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους (20). Επιπρόσθετα, η έκθεση σε TNF-α (Tumor Necrosis Factor- α) σε κύτταρα

¹⁷ Lund P., et al., 2006. *Oncogenic HRAS suppresses clusterin expression through promoter hypermethylation*, *Oncogene* 10;25(35):4890-903.

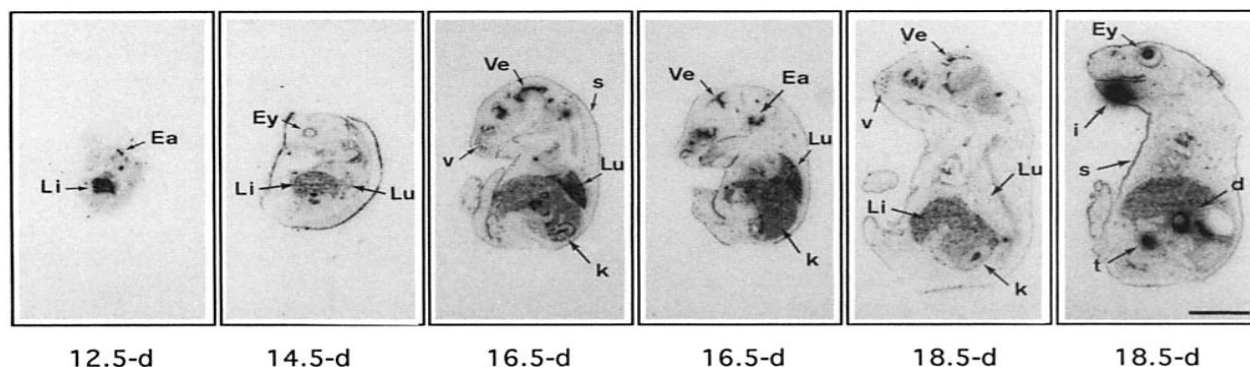
¹⁸ Balantinou E., 2009. *Transcriptional and posttranscriptional regulation of clusterin by the two main cellular proteolytic pathways*, *Free Radic Biol Med.* 1;46(9):1267-74.

¹⁹ French LE, 1993. *Murine clusterin: molecular cloning and mRNA localization of a gene associated with epithelial differentiation processes during embryogenesis*, *J Cell Biol.* 122(5):1119-30.

²⁰ Jin G., 1997. *Regulation of clusterin gene expression by transforming growth factor beta*, *J Biol Chem.* 17;272(42):26620-6.

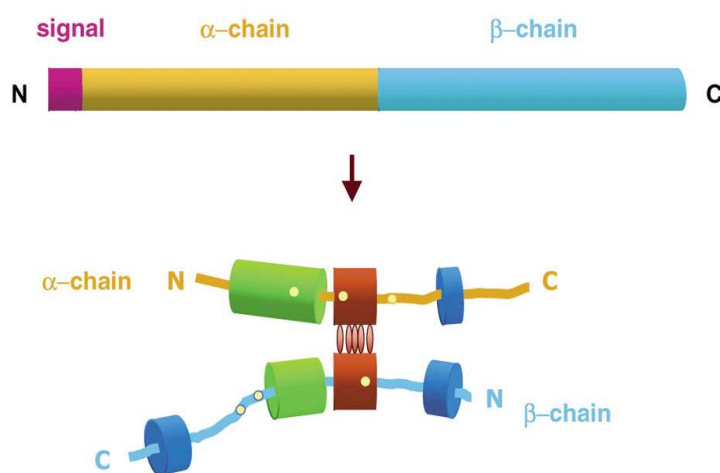
ινοσαρκώματος L929 και σε κύτταρα LNCaP έχειδειχθεί ότι οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της CLU (21).

Από την άλλη, η έκφραση της CLU καταστέλλεται από τον PDGF (Platelet Derived Growth Factor) και τον FGF-β (Fibroblast Growth Factor-β) σε διαφοροποιημένα λεία μυϊκά κύτταρα γουρουνιού (22).



Εικόνα 5: Μακροσκοπικός εντοπισμός του mRNA της CLU με in situ υβριδοποίηση σε τομές εμβρύων ποντικών. Η CLU εμφανίζεται στο ήπαρ (Li), στο αναπτυσσόμενο έσω αυτί (Ea), στις κολπικές κοιλότητες του εγκεφάλου (Ve), στον αναπτυσσόμενο οφθαλμό (Ey), στον νεφρό (k), στο αναπτυσσόμενο δέρμα (s). Παροδικός εντοπισμός της CLU εμφανίζεται στον πνεύμονα (Lu). Στο έμβρυο ηλικίας 18,5 ημερών η CLU εμφανίζεται στον αναπτυσσόμενο οφθαλμό, στους κοπτήρες των δοντιών (i) και στον δωδεκαδάκτυλο (d) (French L.E. et al., 1993)

1.3.2 Ισομορφές της CLU



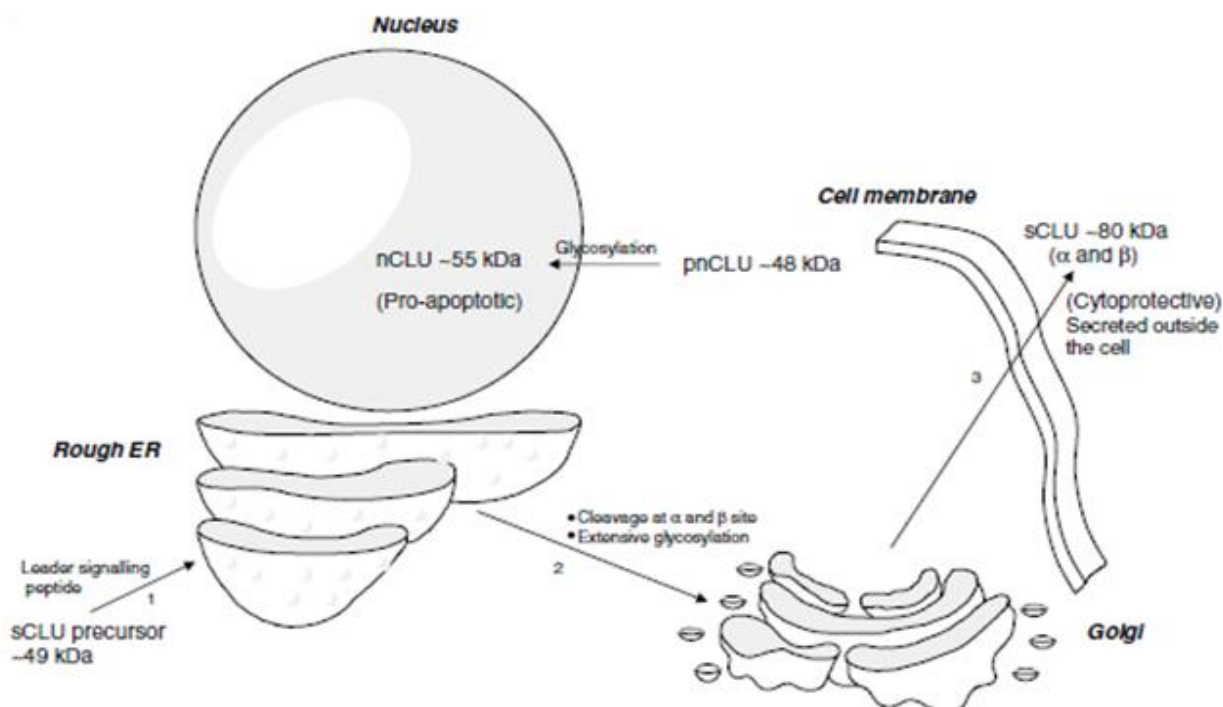
Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της ανθρώπινης CLU. Στο πάνω μέρος της εικόνας εμφανίζεται η πρόδρομη πολυπεπτιδική αλυσίδα. Με κίτρινο η α αλυσίδα και με γαλάζιο η β αλυσίδα. Οι δύο αυτές αλυσίδες στην ώριμη ισομορφή είναι αντιπαράλληλες και αποτελούνται από μία περιοχή 2 υπερελίκων (coiled-coil) (πράσινο), από μια περιοχή 3 αμφιπαθικών α-ελίκων (κυανό) και από μία περιοχή 5 δισουλφιδικών γεφύρων (κόκκινο). Η N-γλυκοζυλίωση που λαμβάνει χώρα στο σύμπλεγμα Golgi παρουσιάζεται με κίτρινες κηλίδες. (Jones S.E., et al., 2002)

Η μετάφραση του πρωτογενούς μετάγραφου της CLU οδηγεί στην παραγωγή ενός πολυπεπτιδίου 449 αμινοξέων, από τα οποία τα 22 πρώτα αμινοξέα αποτελούν το κλασικό υδρόφοβο σινιάλο σηματοδότησης για έκκριση (οδηγό

²¹ Sensibar JA., et al., 1995. Prevention of cell death induced by tumor necrosis factor alpha in LNCaP cells by overexpression of sulfated glycoprotein-2 (clusterin), Cancer Res. 1;55(11):2431-7.

²² Thomas-Salgar et al., 1994. Clusterin expression in differentiating smooth muscle cells, J Biol Chem. 8;269(27):17879-85.

πεπτίδιο). Κατά τη διαμόρφωση της δευτεροταγούς δομής της CLU και την ωρίμανσή της σχηματίζονται 5 συμμετρικά τοποθετημένοι δισουλφιδικοί δεσμοί (5 αντιπαράλληλες δισουλφιδικές γέφυρες), πρωτεολύεται το πεπτίδιο οδηγητής και προστίθενται κατάλοιπα μαννόζης στο ενδοπλασματικό δίκτυο (high-mannose endoplasmic reticulum associated form) με αποτέλεσμα τη δημιουργία (βλ. ενότητα 1.3.1) της κυτταροπλασματικής ισομορφής της CLU 60kDa (c-CLU).



Εικόνα 7: Δημιουργία sCLU και nCLU. Η μετάφραση της πρόδρομης sCLU ξεκινά από το πρώτο κωδικόνιο έναρξης, ενώ η pnCLU παράγεται μετά από εναλλακτικό μάτισμα από το δεύτερο κωδικόνιο έναρξης. Η πρόδρομη sCLU μεταφέρεται στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο μέσω του οδηγού πεπτιδίου και στη συνέχεια πρωτεολύεται και γλυκοζυλιώνεται στο σύμπλεγμα Golgi. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία της ώριμης εκκρινόμενης CLU 75-80kDa. Από την άλλη, η pnCLU υφίσταται πρωτεόλυση αλλά ούτε και εκτεταμένη γλυκοζυλίωση. Βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα κυττάρων χωρίς στρες και ωριμάζει στην n-CLU αφότου μπει στον πυρήνα (Shannan B. *et al.*, 2006).

Περαιτέρω ωρίμανση της c-CLU περιλαμβάνει N- γλυκοζυλίωση και μερική πρωτεολυτική αποκοπή μεταξύ των αμινοξέων R²²⁷-S²²⁸ στο σύμπλεγμα Golgi που οδηγεί στην παραγωγή της ώριμης ετεροδιμερούς πρωτεΐνης (βλ. ενότητα 1.3.1), s-CLU 75-80kDa, με δύο αντιπαράλληλες αλυσίδες α και β (23). Η s-CLU αποτελείται από μία περιοχή 2 υπερελίκων (coiled coil) και από μια περιοχή 3 αμφιπαθικών α ελίκων, οι οποίες είναι απαραίτητες για τη δέσμευση άλλων μορίων όπως

²³ Jones SE, *et al.*, 2002. *Clusterin*, Int J Biochem Cell Biol. 34(5):427-31.

ηπαρίνης, νουκλεοτιδίων και του Ku70 (24). Εκτός από τις παραπάνω μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις έχουν αναφερθεί και άλλες όπως προσθήκη θείου ή ιωδίου (25) και η φωσφορυλίωση της μαννόζης-6 (M6P), ενώ στο μόριο της CLU υπάρχουν και 3 σήματα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal, NLS) εντοπισμένα και στην α και στη β αλυσίδα.

Η μετάφραση του εναλλακτικά ματισμένου πρωτογενούς μετάγραφου της CLU με απαλοιφή του δεύτερου εξωνίου οδηγεί στη δημιουργία της pn-CLU 49 kDa (putative nuclear pro-death form). Το συγκεκριμένο μετάγραφο στερείται του οδηγού πεπτιδίου, και η πρωτεΐνη που παράγεται απ' αυτό δεν υφίσταται πρωτεόλυση και παραμένει στο κυτταρόπλασμα (26). Μετά από επαγωγή βλαβών στο DNA και τη δημιουργία θραύσης στη διπλή έλικα ή μείωση των ενδοκυτταρικών επιπέδων ασβεστίου (27), η pn-CLU εντοπίζεται στον πυρήνα ως ώριμη n-CLU ισομορφή (nuclear) 55kDa. Η n-CLU συνδέεται με το σύστημα των ελικάσων Ku70/Ku80 και επάγει σήματα κυτταρικού θανάτου (Εικόνα 7). Πρόσφατα βιοχημικά δεδομένα δείχνουν ότι η nCLU στρατολογεί τον παράγοντα Bcl-XL μέσω της καρβοξυτελικής επικράτειας υπερέλικας (coiled coil) οδηγώντας στην απελευθέρωση του Bax και κατά συνέπεια στην απόπτωση (28).

1.3.3 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΗΣ CLU

1.3.3.1 Βιολογικός Ρόλος της CLU στη γήρανση

Η γήρανση αποτελεί μία φυσιολογική και μη αναστρέψιμη διαδικασία που συνοδεύεται από βιοχημικές μεταβολές στους ιστούς, πτώση των φυσιολογικών λειτουργιών καθώς και από συσσώρευση βλαβών σε μακρομόρια και οργανίδια

²⁴ Trougakos IP and Gonos ES, 2002. *Clusterin/apolipoprotein J in human aging and cancer*, Int J Biochem Cell Biol. 34(11):1430-48.

²⁵ Lemansky P., et al., 1999. *Subcellular distribution, secretion, and posttranslational modifications of clusterin in thyrocytes*, Exp Cell Res. 251(1):147-55.

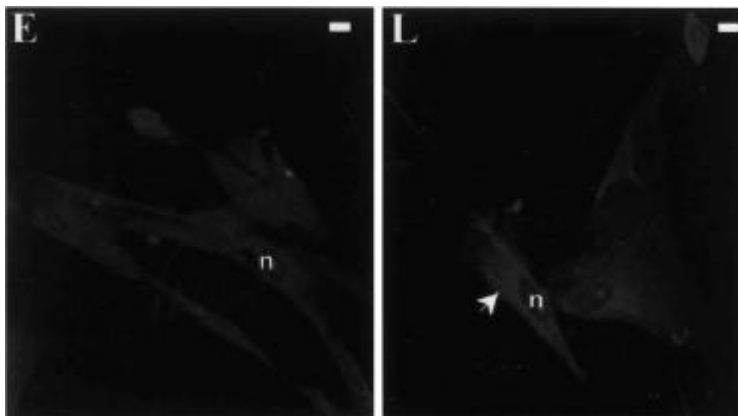
²⁶ Shannan B., et al., 2006. *Challenge and promise: roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer*, Cell Death Differ. 13(1):12-9.

²⁷ Pajak B., 2009. *Regulation of Clusterin Activity by Calcium*, Adv Cancer Res. 104:33-58.

²⁸ Kim N., et al., 2011. *Human nuclear clusterin mediates apoptosis by interacting with Bcl-XL through C-terminal coiled coil domain*, J Cell Physiol. [Epub ahead of print]

που οδηγούν σε πτώση της ομοιοστασίας, αυξημένη ευαισθησία σε ασθένειες και τελικά αύξηση της νοσηρότητας και της θνησιμότητας (29).

Η γήρανση είναι μία εξατομικευμένη και ετερογενής διαδικασία. Η ετερογένεια αυτή οφείλεται τόσο σε γενετικούς παράγοντες και σε μεγαλύτερο ποσοστό σε περιβαλλοντικούς παράγοντες. Οι δύο βασικές θεωρίες που έχουν προταθεί για να εξηγηθεί το φαινόμενο της γήρανσης είναι οι γενετικές- αναπτυξιακές και οι στοχαστικές- εξελικτικές θεωρίες. Οι γενετικές υποστηρίζουν ότι υπάρχει εκτεταμένη γονιδιακή ρύθμιση του φαινομένου (30). Αυτή η θεωρία βασίζεται στις παρατηρήσεις σύμφωνα με τις οποίες ο μέσος χρόνος ζωής είναι ειδικός για κάθε είδος καθώς και στο ότι η συνολική διάρκεια ζωής παρουσιάζει περισσότερες ομοιότητες στα μονοζυγωτικά δίδυμα σε σχέση με τα διζυγωτικά. Τη θεωρία αυτή ενισχύουν έρευνες για την ύπαρξη γονιδίων που σχετίζονται με μακροβιότητα σε οργανισμούς όπως η ζύμη και ο *C.elegans* (31) καθώς και η ύπαρξη συνδρόμων πρόωρης γήρανσης.



Εικόνα 8: Εικόνες από συνεστιακή μικροσκοπία στις οποίες εντοπίζεται μέσω ανοσοφθορισμού η CLU σε WI-38 ινοβλάστες με μικρό αριθμό διπλασιασμών (E) και σε γηρασμένους (L) (Petropoulou C., et al., 2001).

Από την άλλη, οι στοχαστικές θεωρίες περιλαμβάνουν τη θεωρία της συσσώρευσης μεταλλαγών και την ανταγωνιστική πλειοτροπική θεωρία που προτάθηκαν από τον Peter Medawar και τον George Williams αντίστοιχα και αφορούν σε τυχαίες

μεταλλαγές που κληρονομούνται από γενιά σε γενιά. Επιπρόσθετα, η θεωρία του φθαρτού σώματος προτάθηκε από τον Tom Kirkwood και τον Robin Holliday και αναφέρεται στη διχοτόμηση σώματος και γαμετικής σειράς. Δηλαδή, βασίζεται

²⁹ Troen BR., 2003. *The biology of ageing*, Mt Sinai J Med. 70(1):3-22.

³⁰ Finch CE and Tanzi RE., 1997. *Genetics of ageing*, Science 278(5337):407-11.

³¹ Syntichaki P, Tavernarakis N., 2006. *Signaling pathways regulating protein synthesis during ageing*, Exp Gerontol. 41(10):1020-5.

στο γεγονός ότι το σώμα θα πεθάνει ενώ η γαμετική σειρά θα κληρονομηθεί στους απογόνους (32). Τέλος, άλλες θεωρίες που αφορούν την δεύτερη κατηγορία των θεωριών της γήρανσης είναι η θεωρία των πρωτεϊνικών τροποποιήσεων που αφορά σε αλλαγές στη βιοχημική ενεργότητα των πρωτεϊνών και η θεωρία των ελευθέρων ριζών οξυγόνου- οξειδωτικό στρες.

Αρκετοί βιοδείκτες γήρανσης έχουν περιγραφεί, ο πιο αξιοσημείωτος απ' τους οποίους, σε κυτταρικό επίπεδο, είναι η αυξημένη συγκέντρωση λιποφουσκίνης που είναι προϊόν της οξείδωσης των λιπαρών οξέων (33). Η CLU θεωρείται και αυτή αξιόπιστος βιοδείκτης γήρανσης καθώς τα επίπεδά της είναι αυξημένα σε κύτταρα *in vitro*, λόγω αναδιπλασιαστικής γήρανσης (Εικόνα 8) (34). Τα ανθρώπινα φυσιολογικά κύτταρα διαιρούνται *in vitro* 50 -60 φορές και τελικά εμφανίζουν το φαινότυπο της *in vitro* αναδιπλασιαστικής γήρανσης (Replicative Senescence, RS). Η εξάντληση του πολλαπλασιαστικού δυναμικού και η εμφάνιση της RS σχετίζονται με μειωμένο μήκος τελομερών λόγω έλλειψης του ενζύμου τελομεράση.

Επιπρόσθετα, έχει δειχθεί ότι σε *in vivo* μελέτες γήρανσης μεταξύ λεμφοκυττάρων νεαρών, ηλικιωμένων και υπεραιωνόβιων ατόμων, η γονιδιακή έκφραση της CLU αυξάνεται στα ηλικιωμένα άτομα, ενώ στους υπεραιωνόβιους τα επίπεδα της CLU είναι πολύ χαμηλότερα απ' τους ηλικιωμένους. Έτσι, φαίνεται η συσσώρευση της CLU με τη γήρανση δεν σχετίζεται με τη χρονολογική ηλικία των ατόμων, αλλά με τα αυξημένα επίπεδα οργανισμικού στρες (35).

Τα επίπεδα της CLU φαίνονται, επίσης, αυξημένα και σε νεαρά κύτταρα, τα οποία έχουν γηρασμένο φαινότυπο, λόγω της πρώιμης επαγόμενης γήρανσης λόγω στρες (Stress Induced Premature Senescence, SIPS). SIPS επάγεται όταν νεαρά κύτταρα με μακριά τελομερή εκτεθούν σε συνθήκες έντονης καταπόνησης,

³² Troen BR., 2003. *The biology of ageing*, Mt Sinai J Med. 70(1):3-22.

³³ Cui Xu *et al.*, 2004. *D-galactose-caused life shortening in Drosophila melanogaster and Musca domestica is associated with oxidative stress*, Biogerontology 5(5):317-25.

³⁴ Petropoulou C., *et al.*, 2001. *Clusterin/apolipoprotein J is a novel biomarker of cellular senescence that does not affect the proliferative capacity of human diploid fibroblasts*, FEBS Lett. 509(2):287-97.

³⁵ Trougakos IP., *et al.*, 2006. *Reduced expression levels of the senescence biomarker clusterin/apolipoprotein j in lymphocytes from healthy centenarians*, Ann N Y Acad Sci. 1067:294-300.

όπως σε ιονίζουσα ακτινοβολία, ογκογόνα σήματα, βαριά μέταλλα (36), οξειδωτικούς παράγοντες ή σε μερική αναστολή της λειτουργίας του πρωτεασώματος.

1.3.3.2 Βιολογικός Ρόλος της CLU στον καρκίνο

Η CLU εμπλέκεται σε όλα τα στάδια της καρκινογένεσης, από τη δημιουργία του όγκου μέχρι τη μετάσταση και την ανάπτυξη της χημειοανθεκτικότητας. Ο βιολογικός ρόλος της CLU στην καρκινογένεση είναι αμφιλεγόμενος, αφού αφενός η έκφραση της CLU σε άλλες περιπτώσεις νεοπλασιών δείχνει να αυξάνεται και σε άλλες να ελαττώνεται και αφετέρου υπάρχουν ευρήματα που υποστηρίζουν την ογκοκατασταλτική δράση της CLU ενώ άλλες την ογκογόνο.

Υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της CLU εμφανίζονται σε πειραματικά καρκινώματα προστάτη (37), σε *in vivo* καρκινώματα προστάτη και νεφρού (38), σε όγκους στο σπερματικό κυστίδιο (seminal vesicle), την ωοθήκη (39), σε αναπλαστικά μεγαλοκυτταρικά λεμφώματα (40), στον καρκίνο του μαστού (41), στα πλακώδη καρκινώματα του κεφαλιού, του λαιμού, του πνεύμονα, καθώς και στα χονδροσαρκώματα (42). Από την άλλη, υπάρχουν αναφορές σχετικά με μειωμένα επίπεδα της CLU σε περιπτώσεις καρκίνου, όπως μορφές καρκίνου του παγκρέατος (43) ή του προστάτη (44), του οισοφαγικού επιθηλίου (45) και σε ανθρώπινα κερατινοκύτταρα (46).

³⁶ Alexopoulos EC., *et al.*, 2008. *Biological monitoring of hexavalent chromium and serum levels of the senescence biomarker apolipoprotein J/Clusterin in welders*, Bioinorg Chem Appl. 420578.

³⁷ Kadomatsu, K., *et al.*, 1993. *Expression of sulfated glycoprotein 2 is associated with carcinogenesis induced by N-nitroso-N-methylurea in rat prostate and seminal vesicle*, Cancer Res. 53(7):1480-3.

³⁸ Parczyk K, *et al.*, 1994. *Gp80 (clusterin; TRPM-2) mRNA level is enhanced in human renal clear cell carcinomas*, J Cancer Res Clin Oncol. 120(3):186-8.

³⁹ Hough CD, *et al.*, 2001. *Coordinately up-regulated genes in ovarian cancer*, Cancer Res. 61(10):3869-76.

⁴⁰ Wellmann A, *et al.*, 2000. *Detection of differentially expressed genes in lymphomas using cDNA arrays: identification of clusterin as a new diagnostic marker for anaplastic large-cell lymphomas*, Blood. 96(2):398-404.

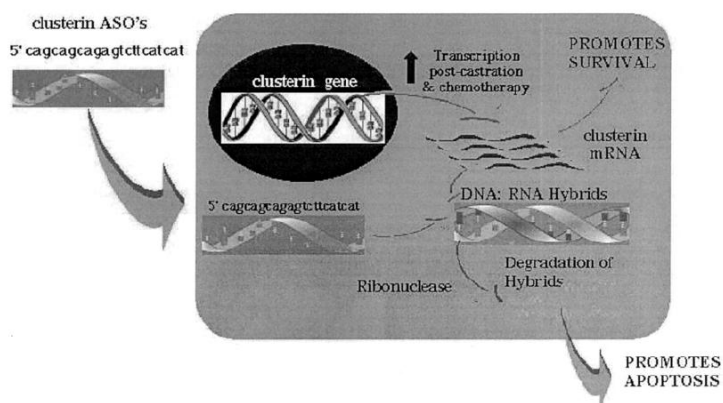
⁴¹ Redondo M, *et al.*, 2000. *Overexpression of clusterin in human breast carcinoma*, Am J Pathol. 157(2):393-9.

⁴² Kumar S, *et al.*, 1993. *Expression of messenger RNAs for complement inhibitors in human tissues and tumors*, Cancer Res. 53(2):348-53.

⁴³ Scaltriti M, *et al.*, 2004. *Clusterin (SGP-2, ApoJ) expression is downregulated in low- and high-grade human prostate cancer*, Int J Cancer. 108(1):23-30.

⁴⁴ Xie MJ, *et al.*, 2002. *Expression of clusterin in human pancreatic cancer*, Pancreas. 25(3):234-8.

Επιπρόσθετα, ερευνητές έχουν παρουσιάσει δεδομένα σχετικά με τον ογκοταστατικό ρόλο της CLU *in vivo* και *in vitro*. Συγκεκριμένα, σε πειράματα αποσιώπησης του mRNA της CLU σε κύτταρα οστεοσαρκώματος, σε καρκινικά κύτταρα προστάτη PC-3, καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστεως και σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα νεφρού CAKI-2 παρουσιάζεται αξιοσημείωτη επιβράδυνση της ανάπτυξης, υψηλότερος ρυθμός απόπτωσης καθώς και ευαισθητοποίηση έναντι αποπτωτικών παραγόντων (47). Αντίθετα, έχει αναφερθεί ότι σε TRAMP ποντίκια που φέρουν το SV40 T αντιγόνο καθωδικά της προμπασίνης παρουσιάζουν επιθετικά κακοήγη νεοπλάσματα μόλις διασταυρωθούν με ελλειμματικά για την CLU (CLU^{-/-}) ποντίκια (48). Η εμφάνιση του καρκίνου ήταν προθύστερη και συνοδευόταν από χαμηλής διαφοροποίησης μεταστάσεις. Συμπερασματικά, λοιπόν, φαίνεται η έλλειψη της CLU να προωθεί την ανάπτυξη του καρκίνου, επιβεβαιώνοντας τον κυτταροπροστατευτικό της ρόλο. Από την άλλη, η CLU παρουσιάζει και ογκογόνο δράση, καθώς αυξάνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και παρεμποδίζει την απόπτωση. Ειδικότερα, έχει



Εικόνα 9: Καταστολή της έκφρασης της CLU μέσω αντισηματικών νουκλεοτιδίων (ASO) (Gleave M., et al., 2002)

δειχθεί ότι αυξημένα επίπεδα της s-CLU προωθούν την ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη μέσω ενεργοποίησης του NF-kB (49), αλλά και αυξάνουν την ικανότητα ανθρώπινων νεφρικών καρκινικών κυττάρων για

⁴⁵ Zhang LY, et al., 2003. Loss of clusterin both in serum and tissue correlates with the tumorigenesis of esophageal squamous cell carcinoma via proteomics approaches, World J Gastroenterol. 9(4):650-4.

⁴⁶ Thomas-Tikhonenko A, et al., 2004. Myc-transformed epithelial cells down-regulate clusterin, which inhibits their growth in vitro and carcinogenesis in vivo, Cancer Res. 64(9):3126-36.

⁴⁷ Trougakos IP, et al., 2009. Advances and challenges in basic and translational research on clusterin, Cancer Res. 2009 69(2):403-6.

⁴⁸ Bettuzzi S., et al., 2009. Genetic inactivation of ApoJ/clusterin: effects on prostate tumorigenesis and metastatic spread, Oncogene.28(49):4344-52.

⁴⁹ Zoubeydi A., et al., 2010. Clusterin facilitates COMMD1 and I-kappaB degradation to enhance NF-kappaB activity in prostate cancer cells, Mol Cancer Res. 2010 8(1):119-30.

μεταστάσεις.

Η υπερέκφραση της s-CLU προσδίδει ανθεκτικότητα τόσο στη χημειοθεραπεία όσο και στην ακτινοθεραπεία (50) καταστέλλοντας την απόπτωση που διαμεσολαβείται από το μιτοχόνδριο (51). Έτσι, η s-CLU καταστέλλει τον παράγοντα p53 και σταθεροποιεί στο κυτοσόλιο το σύμπλοκο Ku70/Bax καθιστώντας ανενεργό τον παράγοντα Bax (52). Καταστολή της έκφρασης της s-CLU με τη χρήση αντινοσηματικών νουκλεοτιδίων ή αποσιώπηση με τη χρήση siRNA's επάγει την αναστολή της αύξησης και τον κυτταρικό θάνατο, ενώ παράλληλα ευαισθητοποιεί τα καρκινικά κύτταρα σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Συγκεκριμένα, αντινοσηματικά νουκλεοτίδια (ASO) έναντι της CLU (custirsen- OGX-011) βρίσκονται σε κλινικές μελέτες φάσης II μειώνοντας την έκφραση της s-CLU σε καρκινικά κύτταρα προστάτη πάνω από 90% (Εικόνα 9) και ευαισθητοποιώντας τα εν λόγω καρκινικά κύτταρα στο docetaxel (53) (54) (55).

Ακόμη, ενεργοποίηση του παράγοντα IGF-1 και της πρωτεϊνικής κινάσης IGF-1R σε κύτταρα μετά από έκθεση σε υπέρυθρη ακτινοβολία οδήγησε σε ενεργοποίηση της CLU, η οποία δρα και ως μοριακή συνοδός, λόγω των βλαβών που προκλήθηκαν στο DNA (DNA damage). Ειδικότερα, βρέθηκε ότι η ενεργοποίηση του IGF-1 οδήγησε με τη σειρά του στην επαγωγή του μονοπατιού Src-Mek-Erk με τελικό στόχο τη μετατόπιση του μεταγραφικού ενεργοποιητή της CLU, Egr-1, στον πυρήνα και την ενεργοποίηση της CLU (Εικόνα 11). Ο μηχανισμός αυτός δράσης της

⁵⁰ Lourda M., et al., 2006. Development of resistance to chemotherapeutic drugs in human osteosarcoma cell lines largely depends on up-regulation of Clusterin/Apolipoprotein J, *Int J Cancer*.120(3):611-22

⁵¹ Zhang H., et al., Clusterin inhibits apoptosis by interacting with activated Bax, *Nat Cell Biol*.7(9):909-15.

⁵² Trougakos IP., et al., 2009. Intracellular clusterin inhibits mitochondrial apoptosis by suppressing p53-activating stress signals and stabilizing the cytosolic Ku70-Bax protein complex, *Clin Cancer Res*.15(1):48-59.

⁵³ Miyake H, et al., 2000. Antisense TRPM-2 oligodeoxynucleotides chemosensitize human androgen-independent PC-3 prostate cancer cells both in vitro and in vivo, *Clin Cancer Res*. 6(5):1655-63.

⁵⁴ Chi NK., et al., 2008. A phase I study of OGX-011, a 2'-methoxyethyl phosphorothioate antisense to clusterin, in combination with docetaxel in patients with advanced cancer, *Clin Cancer Res*.14(3):833-9.

⁵⁵ Zoubeidi A., et al., 2010. Targeting the cytoprotective chaperone, clusterin, for treatment of advanced cancer, *Clin Cancer Res*. 16(4):1088-93.

CLU είναι σημαντικός για την κατανόηση των μηχανισμών ανθεκτικότητας των καρκινικών κυττάρων στην ακτινοθεραπεία (56).

Παρά τον μεγάλο αριθμό των μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί, δεν έχει διευκρινιστεί το γιατί σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές ή σε διαφορετικές μορφές καρκίνου η CLU εμφανίζει διαφορετική δράση (αποπτωτική ή αντιαποπτωτική). Πολλές φορές, η υπερέκφραση της s-CLU οδηγεί και σε υπερέκφραση της n-CLU οδηγώντας τα κύτταρα τελικά σε απόπτωση (57). Φαίνεται να παίζει ιδιαίτερο ρόλο ο λόγος της ποσότητας της s-CLU προς την n-CLU στο κύτταρο αφού η s-CLU έχει ρόλο κυτταροπροστατευτικό, ενώ η n-CLU επάγει κυτταρικό θάνατο.

1.3.3 Βιολογικός Ρόλος της CLU σε άλλες παθολογίες

Με κριτήριο το γεγονός ότι η CLU αποτελεί έναν αξιόπιστο βιολογικό δείκτη στη γήρανση, δεν αποτελεί έκπληξη η εμπλοκή της σε παθολογίες του γήρατος, όπως ο διαβήτης τύπου II, οι νευροεκφυλιστικές νόσοι και ο καρκίνος (βλ. 1.3.32).

Ο συσχετισμός της CLU με τη φλεγμονή και τη λιπιδική μεταφορά (βλ. 1.2, 1.3.) δικαιολογεί και τη συμμετοχή της εν λόγω πρωτεΐνης στις καρδιομεταβολικές ασθένειες. Συγκεκριμένα, μελέτες σε τρωκτικά προτείνουν ότι η CLU παίζει ρόλο στη μετανάστευση και πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων, καθώς και στην προστασία των καρδιομυοκυττάρων από ισχαιμικό θάνατο (58). Επιπρόσθετα, σε ασθένειες που σχετίζονται με βλάβες στο αγγειακό σύστημα βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα της s-CLU τόσο στα αρτηριακά τοιχώματα και στις αορτικές βαλβίδες των ασθενών με αθηρωμάτωση, όσο και στον ορό των

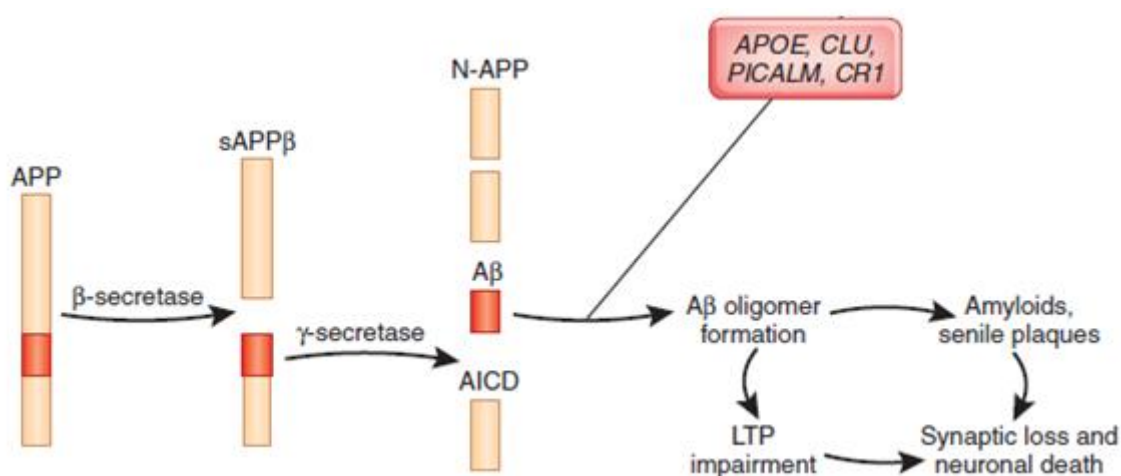
⁵⁶ Criswell T., et al., 2005. *Delayed activation of insulin-like growth factor-1 receptor/Src/MAPK/Egr-1 signaling regulates clusterin expression, a pro-survival factor*, J Biol Chem. 280(14):14212-21.

⁵⁷ Miyake H., et al., *Resistance to cytotoxic chemotherapy-induced apoptosis in human prostate cancer cells is associated with intracellular clusterin expression*, Oncol Rep. 10(2):469-73.

⁵⁸ Aronis KN., et al., 2011. *Clusterin (apolipoprotein J): wither link with diabetes and cardiometabolic risk?*, Metabolism. 60(6):747-8.

ασθενών με διαβήτη τύπου II ή έμφραγμα του μυοκαρδίου (59). Και ειδικότερα, είναι το πεπτίδιο 113-122 της CLU το οποίο προσδίδει αντιφλεγμονώδεις και αντιαθηρωματικές ιδιότητες στην CLU (60).

Από την άλλη, πρόσφατες μελέτες αναφέρουν την CLU ως παράγοντα προώθησης της αθηρωμάτωσης, διότι σε πειράματα σε ποντικούς διπλά ελλειμματικούς για την Απολιποπρωτεΐνη E και την CLU, η απώλεια της CLU περιόρισε τις αθηρωματικές βλάβες μέσω μειωμένης ενεργοποίησης του Egr-1 (μεταγραφικός ενεργοποιητής της CLU) και του TNF-α στα λεία μυϊκά κυττάρα των αγγείων και στα μακροφάγα (61).



Εικόνα 10: Η πρόδρομη πρωτεΐνη του β- αμυλοειδούς (APP) διασπάται από τη β- εκκρίταση και στη συνέχεια από τη γ- εκκρίταση, πράγμα που οδηγεί στο σχηματισμό της β- αμυλοειδικής πρωτεΐνης (Αβ). Η έλλειψη ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής της Αβ και της απομάκρυνσης αυτής μέσω των μικρογλοιακών κυττάρων παίζει σημαντικό ρόλο στην προώθηση της νόσου. Οι τρέχουσες έρευνες δείχνουν ότι γενετικοί πολυμορφισμοί στα γονίδια της ApoE, Picalm, Cr1 και Clu μπορεί να εμπλέκονται στον περιορισμό της απομάκρυνσης των πεπτιδίων του β- αμυλοειδούς (Michael A van Es et al., 2009).

Στον εγκέφαλο των ενήλικων θηλαστικών έχουν εντοπιστεί υψηλά επίπεδα της CLU τόσο σε περιπτώσεις τραυματισμού ή χρόνιας φλεγμονής στον εγκέφαλο, όσο και σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Ο συσχετισμός της CLU με την νόσο του

⁵⁹ Trougakos IP., et al., 2002. Serum levels of the senescence biomarker clusterin/apolipoprotein J increase significantly in diabetes type II and during development of coronary heart disease or at myocardial infarction, *Exp Gerontol.* 37(10-11):1175-87.

⁶⁰ Mishra VK., et al., 2011. Structure and lipid interactions of an anti-inflammatory and anti-atherogenic 10-residue class G(*) apolipoprotein J peptide using solution NMR, *Biochim Biophys Acta.* 1808(1):498-507. Epub 2010 Oct 21.

⁶¹ Hamada N., et al., 2010. Loss of clusterin limits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice via reduced expression of Egr-1 and TNF-α, *J Atheroscler Thromb.* 18(3):209-16.

Alzheimer (AD) έγινε από τον Caleb Finch (62), ο οποίος έδειξε ότι η έκφραση της CLU αυξάνεται σε δείγματα ιππόκαμπου από ασθενείς που έπασχαν από AD. Η CLU κατέχει διάφορες ιδιότητες που τη συνδέουν με τη AD, όπως η υψηλής συγγένειας πρόσδεσή της στα πεπτίδια και τα ινίδια β-αμυλοειδούς (Αβ) καθώς και η συμμετοχή της στη διακίνηση των λιπιδίων. Ειδικότερα, η CLU έχει προστατευτικό ρόλο όσον αφορά τον ολιγομερισμό των Αβ και αυξάνει το ρυθμό ενδοκύττωσης τους από κύτταρα της γλοίας και κυρίως από τα μικρογλιακά κύτταρα και τα αστροκύτταρα αποκρινόμενη στο οξειδωτικό στρες. Η CLU απομακρύνει τα β-αμυλοειδή πεπτίδια σε συνεργασία με την Απολιποπρωτεΐνη Ε (ΑpoE), αφού η ανεπάρκεια και των δύο οδηγεί σε συσσώρευση β-αμυλοειδούς τόσο στις νευριτικές πλάκες όσο και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (63). Τέλος, μετά από γενετικές μελέτες σε άτομα που έπασχαν από AD στη Γαλλία, αποδείχθηκε ότι αλληλόμορφα της CLU σχετίζονται με την ύστερη εμφάνιση της AD και συγκεκριμένα η συμμετοχή της CLU στην απομάκρυνση των πεπτιδίων β-αμυλοειδούς (64) (65).

1.3.3.4 Βιολογικός Ρόλος της CLU ως μοριακή συνοδός (Chaperone)

Το οξυγόνο είναι αυτό που υποστηρίζει τον αερόβιο μεταβολισμό των οργανισμών καθώς και τη ζωή αυτών. Τα μόρια αυτά του οξυγόνου υφίστανται μονοσθενείς αναγωγές μέσα σε ένα αναγωγικό κυτταρικό περιβάλλον οδηγώντας στο σχηματισμό δραστικών ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) καθώς και δραστικών υπεροξειδωμένων λιπιδίων. Οι ROS είναι αποτέλεσμα των παραπροϊόντων του αερόβιου μεταβολισμού στο μιτοχόνδριο, αποτελούν δευτερογενή μηνύματα διάφορων σηματοδοτικών μονοπατιών και τέλος

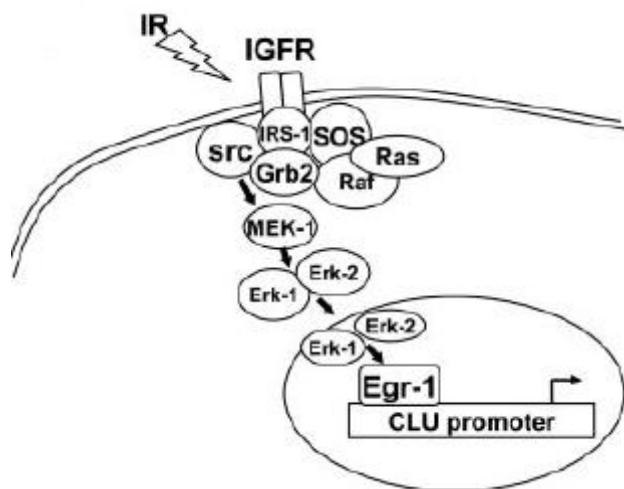
⁶² May PC., et al., 1992. *Sulfated glycoprotein 2: new relationships of this multifunctional protein to neurodegeneration*, Trends Neurosci. 15(10):391-6.

⁶³ Nuutinen T., et al., 2009. *Clusterin: a forgotten player in Alzheimer's disease*, Brain Res Rev. 61(2):89-104.

⁶⁴ Lambert JC., et al., 2009. *Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease*, Nat Genet. 41(10):1094-9.

⁶⁵ Van ES MA, et al., 2009. *Alzheimer's disease beyond APOE*, Nat Genet. 41(10):1047-8.

μπορούν να προκύψουν ως απόκριση σε εξωγενή σήματα, όπως περιβαλλοντικό στρες.



Εικόνα 11: Μοντέλο απεικόνισης της ενεργοποίησης του μονοπατιού σηματοδότησης Src-Mek-Erk που καταλήγει στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού ενεργοποιητή της CLU, Egr-1 και την έκφραση της CLU (Criswell T., et al., 2005)

Η συσσώρευση ROS στο κύτταρο οδηγεί σε οξειδωτικό στρες. Το οξειδωτικό αυτό στρες επηρεάζει σχεδόν όλα τα βιολογικά μακρομόρια, όπως λιπίδια, πρωτεΐνες και DNA. Το παρατεταμένο οξειδωτικό στρες μπορεί να επάγει είτε πρόωμη κυτταρική γήρανση είτε απόπτωση σε φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα.

Το οξειδωτικό στρες ρυθμίζει μία σειρά από σηματοδοτικά μονοπάτια (GH/ IGF-1) με τελικό στόχο την

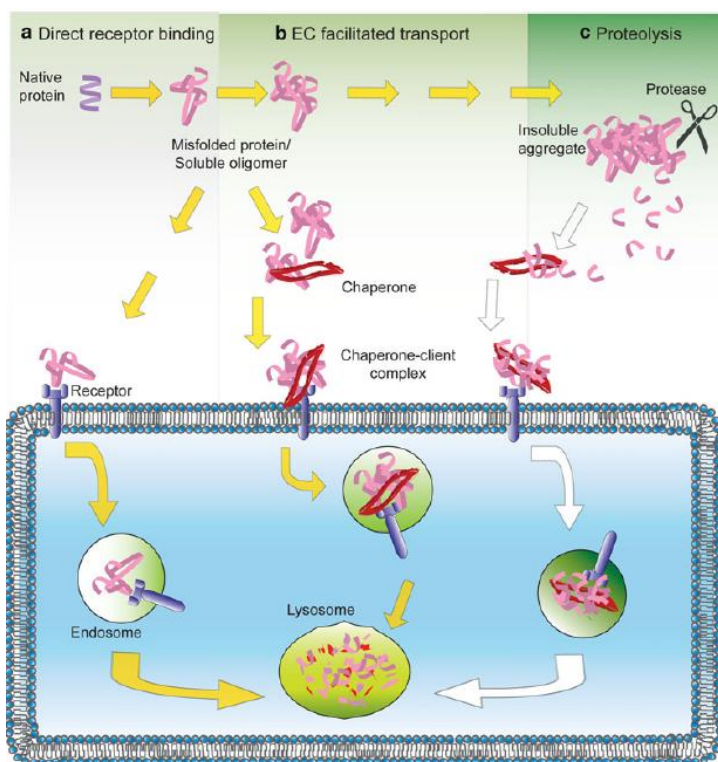
ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο HSF-1, AP-1, NF-Kb καθώς και του p53 (66). Όσον αφορά τον μεταγραφικό παράγοντα HSF-1, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες διατηρείται ανενεργός στο κυτταρόπλασμα αφού είναι προσδεδεμένος σε μοριακές συνοδούς (chaperones) και κυρίως στην Hsp90. Μετά από έκθεση σε στρες, ο HSF-1 μετατοπίζεται στον πυρήνα και ενεργοποιεί διάφορα γονίδια στόχους (67). Λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι το οξειδωτικό στρες ρυθμίζει την ενεργοποίηση του HSF-1 και του AP-1, καθώς και το γεγονός ότι υπάρχουν θέσεις πρόσδεσης αυτών στον υποκινητή της CLU (cis ρυθμιστικά στοιχεία), πιθανολογείται ότι η CLU αποτελεί έναν αρκετά ευαίσθητο βιοαισθητήρα των περιβαλλοντικών αλλαγών και συγκεκριμένα του οξειδωτικού στρες λόγω της δράσης της ως μοριακή συνοδός, με δράση ανάλογη με αυτή των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (heat shock proteins, HSP). Η βασική διαφορά μεταξύ της CLU και των HSP είναι ο διαφορετικός κυτταρικός εντοπισμός. Δηλαδή, οι HSP αποτελούν

⁶⁶ Goetz EM, et al., 2011. ATM-dependent IGF-1 induction regulates secretory clusterin expression after DNA damage and in genetic instability, Oncogene. [Epub ahead of print]

⁶⁷ Trougakos IP and Gonos ES. 2006. Regulation of clusterin/apolipoprotein J, a functional homologue to the small heat shock proteins, by oxidative stress in ageing and age-related diseases, Free Radic Res. 40(12):1324-34.

ενδοκυττάριας μοριακής συνοδούς που εντοπίζονται στο κυτοσόλιο και τον πυρήνα, ενώ η sCLU κυρίως εντοπίζεται στους μεμβρανώδεις σχηματισμούς του κυττάρου καθώς και στο εξωκυττάριο περιβάλλον. Κάποιες αναφορές ωστόσο δεικνύουν ότι μπορεί να εντοπιστεί και στο κυτοσόλιο, στο μιτοχόνδριο και τον πυρήνα. Γενικά ο βιολογικός ρόλος της CLU ως μοριακή συνοδός μπορεί να συνοψιστεί στα παρακάτω:

1. Παρεμπόδιση της επαγόμενης από στρες κατακρήμνισης των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων της CLU.
2. Μη αντιστρεπτή πρόσδεση μέσω ενός ανεξάρτητου από ATP μηχανισμού στις πρωτεΐνες που βρίσκονται υπό στρες οδηγώντας στη δημιουργία διαλυτών υψηλού μοριακού βάρους συμπλόκων.
3. Δεν παρουσιάζει ενεργότητα ΑΤΡάσης (68)
4. Σταθεροποίηση πρωτεϊνών που βρίσκονται υπό στρες σε μία κατάσταση κατά την οποία θα επαδιπλωθούν μέσω των HSP.
5. Συμμετοχή στη διατήρηση της εξωκυττάριας πρωτεόστασης αφού αναγνωρίζει, διατηρεί σε διαλυτή μορφή τις κακώς διπλωμένες πρωτεΐνες (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: Προτεινόμενος μηχανισμός της διατήρησης της εξωκυττάριας πρωτεόστασης. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ειδικοί υποδοχείς αναγνωρίζουν τις κακώς διπλωμένες πρωτεΐνες (α). Οι κυκλοφορούσες μοριακές συνοδοί αναγνωρίζουν και προσδένονται στις εν λόγω πρωτεΐνες διατηρώντας τη διαλυτότητά τους και μεταφέροντας τις στους ειδικούς υποδοχείς της μεμβράνης (β). Όταν η εξωκυττάρια πρωτεόσταση διαταραχθεί, μη διαλυτές πρωτεΐνες σχηματίζουν συσσωματώματα τα οποία με τη σειρά τους ενεργοποιούν πρωτεάσες (π.χ. πλασμίνη). Οι εξωκυττάριας μοριακές συνοδοί αλληλεπιδρούν με τα πεπτιδία και διαμεσολαβούν στη μεταφορά τους στους ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς. Η μεταφορά αυτή καταλήγει στην ενδοκύττωση των πρωτεϊνών και την τελική του μεταφορά στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση (Wyatt A.R., et al., 2011).

⁶⁸ Poon S., et al., 2000. Clusterin is an ATP-independent chaperone with very broad substrate specificity that stabilizes stressed proteins in a folding-competent state, *Biochemistry*. 39(51):15953-60.

1.3.3.4 Βιολογικός Ρόλος της CLU στο ανοσοποιητικό σύστημα

Η CLU σχετίζεται με την φλεγμονή και το ανοσοποιητικό σύστημα ως προς:

1. Τη ρύθμιση της ενεργοποίησης του συμπληρώματος
2. Αρνητική ρύθμιση του NF-Kb
3. Τροποποίηση της κυτταρικής διαφοροποίησης
4. Τη ρύθμιση κυτταροκινών, όπως ο TNF-α και η IL-6.

Το συμπλήρωμα αποτελείται από 30 διαλυτές και μεμβρανικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην άμυνα του ξενιστή αλλά και σε αυτοάνοσες παθολογίες. Ενζυμικοί αναστολείς συμμετέχουν σε όλα τα στάδια του καταρράκτη αντιδράσεων και ρυθμίζουν το σύστημα του συμπληρώματος. Μεταξύ αυτών των καταστολέων κατατάσσεται και η εκκρινόμενη CLU, η οποία έχει δειχθεί ότι συνδέεται με σύμπλοκο C5b5, το οποίο αποτελεί το τελικό στάδιο για τη διάρρηξη της μεμβράνης των παθογόνων ή των κυττάρων στόχων. Η sCLU είναι, πράγματι, μέρος του συμπλόκου MAC (Membrane Complex Attack) με ρόλο την προστασία των κυττάρων και των ιστών από το MAC αφού το καθιστά ανενεργό εμποδίζοντας την λύση του κυττάρου-στόχου (69).

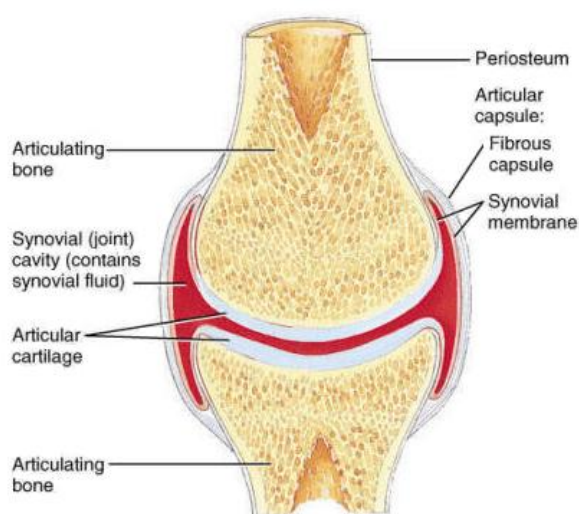
Η sCLU προσδένεται, επίσης, σχεδόν σε όλους τους ισότυπους των ανοσοσφαιρινών (IgG, IgA, IgM) τόσο στην Fc επικράτεια όσο και στην Fab της ανοσοσφαιρίνης (70). Επιπρόσθετα, εμπλέκεται και στα κύτταρα της φυσικής ανοσίας και συγκεκριμένα στα δενδριτικά κύτταρα (Dendritic Cells, DC), τα οποία αποτελούν τα πιο αποτελεσματικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Antigen Presenting Cells, APC). Συγκεκριμένα, τα DC εκφράζουν υψηλά επίπεδα CLU και τα επίπεδα αυτά αυξάνονται ακόμη περισσότερα κατά την ωρίμανση των DC. Από την άλλη, ο Th17 τύπος των T λεμφοκυττάρων, που έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται σε αυτοάνοσα νοσήματα καθώς και στον καρκίνο, εκφράζει σε λιγότερο ποσοστό

⁶⁹ Murphy BF., et al., 1988. *SP-40,40, a newly identified normal human serum protein found in the SC5b-9 complex of complement and in the immune deposits in glomerulonephritis*, J Clin Invest. 81(6):1858-64.

⁷⁰ Wilson MR and Easterbrook-Smith SB, 1992. *Clusterin binds by a multivalent mechanism to the Fc and Fab regions of IgG*, Biochim Biophys Acta. 1159(3):319-26.

την CLU συγκριτικά με τον Th1 τύπο. Τα ανωτέρω ενισχύουν την εμπλοκή της CLU στην χρόνια φλεγμονή, τα αυτοάνοσα νοσήματα και τον καρκίνο (71).

Για παράδειγμα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η συμμετοχή της CLU στη Ρευματοειδή Αρθρίτιδα (Rheumatoid Arthritis, RA). Η RA αποτελεί χρόνια φλεγμονώδη αυτοάνοση ασθένεια η οποία συνοδεύεται από καταστροφή των αρθρικών μερών και κυρίως της μεμβράνης του αρθρικού υμένα (synovial membrane), του χόνδρου (articular cartilage) και του οστού (Εικόνα 13).



Εικόνα 13: Αναπαράσταση της δομής της άρθρωσης (Pfizer)

Καθοριστικό ρόλο στην RA κατέχουν τα κύτταρα του αρθρικού υμένα (macrophage-like και fibroblast-like synovial cells, FLS). Η CLU είναι η πρωτεΐνη που κυρίαρχα εκφράζεται στα κύτταρα του αρθρικού υμένα καθώς και στο υγρό του αρθρικού υμένα (synovial fluid) προωθώντας την απόπτωση των FLS και ενισχύοντας έτσι την πιθανότητα συμβολής της στην ομοιόσταση σε ασθενείς με RA (72). Βέβαια, τα επίπεδα έκφρασης της CLU φαίνεται να είναι μειωμένα σε ιστούς από ασθενείς με RA σε σύγκριση με ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα (OA) και φυσιολογικούς ιστούς. Επιπρόσθετες έρευνες σε ελλειμματικά για την CLU ποντίκια στα οποία έγινε επαγωγή της αρθρίτιδας, έδειξαν ότι η νόσος αναπτύχθηκε ταχύτερα και διήρκησε περισσότερο στα ελλειμματικά ποντίκια, συγκριτικά με τα αγρίου τύπου (73). Τέλος, η ενδοκυττάρια ισομορφή της CLU έχει αναφερθεί ότι παίζει ρόλο στη ρύθμιση του NF-kB αφού

⁷¹ Falgarone G., and Chocchia Gilles, 2009. *Chapter 8: Clusterin: A multifacet protein at the crossroad of inflammation and autoimmunity*, Adv Cancer Res. 104:139-70.

⁷² Devauchelle V., et al., 2006. *Characterization and functional consequences of underexpression of clusterin in rheumatoid arthritis*, J Immunol. 177(9):6471-9.

⁷³ McLaughlin L., et al., 2000. *Apolipoprotein J/clusterin limits the severity of murine autoimmune myocarditis*, J Clin Invest. 106(9):1105-13.

αλληλεπιδρά με τον φωσφορυλιωμένο IκΒα. Η αλληλεπίδραση αυτή σηματοδοτείται από τον TNF-α στα κύτταρα του αρθρικού υμένα (74). Έτσι, ανεπάρκεια της ενδοκυττάριας μορφής της CLU μπορεί να αποτελεί υπεύθυνο μηχανισμό για την περαιτέρω ενεργοποίηση του NF-κΒ σε φλεγμονώδεις καταστάσεις, όπως αυτή στον αρθρικό υμένα κατά την RA.

1.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΓΕΝΕΣΗΣ ΣΤΟ *Mus musculus*

Τα γενετικά τροποποιημένα ποντίκια αποτελούν ένα ανεκτίμητο εργαλείο στη βιοϊατρική έρευνα. Χρησιμοποιούνται διάφορα πρότυπα μελέτης, τα οποία μπορούν να δημιουργηθούν είτε υπερεκφράζοντας το επιθυμητό γονίδιο (διαγονιδιακά ποντίκια), είτε αδρανοποιώντας ή καταστέλλοντας το επιθυμητό γονίδιο (knockout ποντίκια).

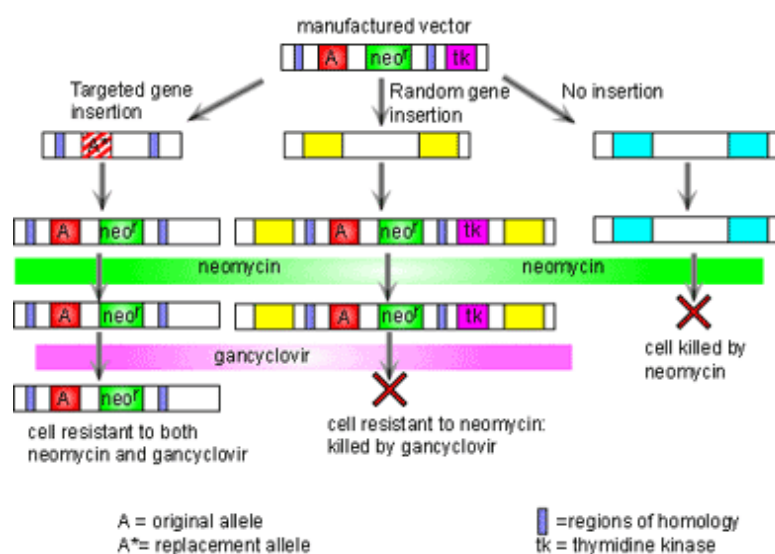
Τα διαγονιδιακά ποντίκια (Tg) περιέχουν επιπλέον γενετικό υλικό («ξένο DNA»), ενσωματωμένο στο γονιδίωμά τους σε κάθε κύτταρο. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε κέρδος μιας λειτουργίας, π.χ. παραγωγή μιας νέας πρωτεΐνης, ή σε απώλεια μιας λειτουργίας, αν το ενσωματωμένο DNA διακόπτει ένα άλλο γονίδιο. Για να βρσκεται το ξένο DNA σε όλα τα κύτταρα, πρέπει να εισαχθεί στα κύτταρα του πολύ πρώιμου εμβρύου. Υπάρχουν δύο κύριες μέθοδοι, για την παραγωγή διαγονιδιακών ποντικών:

1. Μικροένεση προπυρήνα (pronuclear microinjection). Το εξωγενές DNA εισάγεται στο ωάριο αμέσως μετά τη γονιμοποίηση (στάδιο 2 προπυρήνων) στον έναν προπυρήνα, και ενσωματώνεται σε πολλά αντίγραφα σε τυχαία θέση στο γονιδίωμα. Αυτή η μέθοδος ακολουθήθηκε στη συγκεκριμένη εργασία, και αναλύεται εκτενέστερα παρακάτω (Υλικά και μέθοδοι-2.2.2)

2. Εισαγωγή DNA σε εμβρυονικά αρχέγονα κύτταρα. Αυτά προέρχονται από έμβρυα ποντικού πολύ πρώιμου σταδίου, που μπορούν να διαφοροποιηθούν σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, όταν τοποθετηθούν σε άλλο έμβρυο ποντικού. Το εισαγόμενο DNA μπορεί να ενσωματωθεί τυχαία, όπως στην πρώτη μέθοδο, αλλά αν

⁷⁴ Santilli G., et al., 2003. Essential requirement of apolipoprotein J (clusterin) signaling for IκappaB expression and regulation of NF-κappaB activity, J Biol Chem. 278(40):38214-9. Epub 2003 Jul 25.

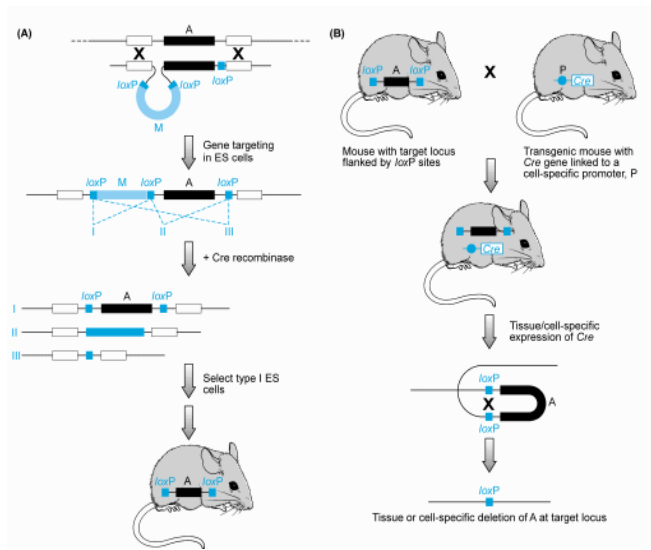
η αλληλουχία του είναι παρόμοια με μέρος του γονιδιώματος του ποντικού, ίσως υποβληθεί σε ομόλογο ανασυνδυασμό και ενσωματωθεί σαν μονό αντίγραφο σε συγκεκριμένη θέση (Knockout ποντίκια). Αυτά τα ES κύτταρα χρειάζονται ένα έμβryo-ξενιστή, το οποίο απομονώνεται από ποντίκι διαφορετικού χρώματος. Τα κύτταρα θα αποικίσουν το έμβryo, και θα προκύψει ένα χιμαιρικό ποντίκι. Κάποια από αυτά τα κύτταρα θα οδηγήσουν στην παραγωγή γεννητικών κυττάρων, που θα περιέχουν το επιπλέον DNA. Όταν το διαγονιδιακό σπέρμα γονιμοποιήσει ένα φυσιολογικό ωάριο, θα παραχθεί ένα διαγονιδιακό ποντίκι, με το ίδιο εξωγενές DNA σε όλα τα κύτταρα. Ο φορέας αποτελείται από δύο περιοχές ομολογίας σε κάθε άκρο (συμπληρωματικές για συγκεκριμένες θέσεις του γονιδιώματος), το διακεκομμένο (disrupted) γονίδιο που μας ενδιαφέρει μαζί με τα γονίδια-δείκτες θετικής και αρνητικής επιλογής (το γονίδιο αντίστασης στη νεομυκίνη (neo^r), μεταξύ των δύο περιοχών ομολογίας, καθώς και το γονίδιο κινάσης της θυμιδίνης (tk), εκτός της ομόλογης περιοχής). Αυτό το σύστημα εκμεταλλεύεται τη διαδικασία του ανασυνδυασμού, για να ανταλλάξει το «διακεκομμένο» γονίδιο με το κανονικό. Απ' τη στιγμή που ο φορέας θα εισαχθεί στο κύτταρο, μπορεί είτε να ενσωματωθεί στο γονιδίωμα έπειτα από ομόλογο ανασυνδυασμό (επιθυμητό αποτέλεσμα), είτε να υποστεί πλήρη εισαγωγή σε μη επιθυμητό σημείο του γονιδιώματος, είτε να μην έχει εισαχθεί στο κύτταρο (Εικόνα 14). Η νεομυκίνη χρησιμοποιείται για την επιλογή των



Εικόνα 14: Κατασκευή ενός φορέα. (Ανατύπωση από Walinski, 2004)

κυττάρων, όπου ο φορέας έχει ενσωματωθεί, και η gancyclovir χρησιμοποιείται για την επιλογή κυττάρων, στα οποία έχει συμβεί ανασυνδυασμός (αν ο φορέας έχει ενσωματωθεί χωρίς ανασυνδυασμό, τότε το tk γονίδιο θα βρίσκεται στο γονιδίωμα, και το κύτταρο θα

είναι ευαίσθητο στη grancyclovir).

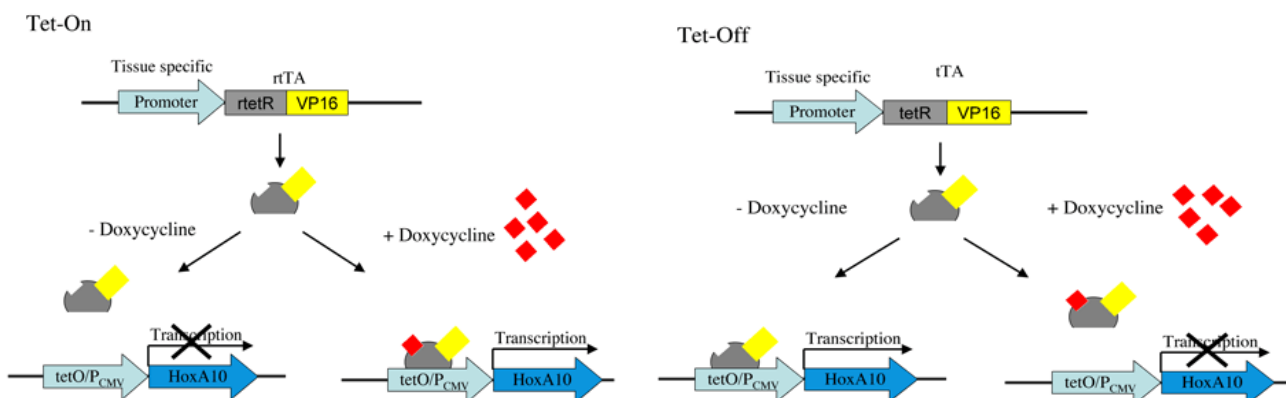


Εικόνα 15: Στόχευση Cre- LoxP (Strachan and Read, 1999)

Τα knockout ποντίκια (ΚΟ) αποτέλεσαν την απάντηση στην ερώτηση των ερευνητών, που ασχολούνταν με την παραγωγή διαγονιδιακών ποντικών με μικροένεση προπυρήνα: “σε ποιο σημείο στο γονιδίωμα μπορεί να εισαχθεί το ξένο γενετικό υλικό;” Με την παραγωγή τους αποδείχθηκε ότι είναι δυνατή η στόχευση του εισαγόμενου γονιδίου σε

συγκεκριμένη θέση στο γονιδίωμα. Τα ΚΟ δημιουργούνται με επιλεκτική αδρανοποίηση ενός γονιδίου-στόχου στα ES κύτταρα με μία από τις παρακάτω μεθόδους γονιδιακής στόχευσης: Τόσο η υπερέκφραση, όσο και η αδρανοποίηση ή καταστολή ενός επιθυμητού γονιδίου, μπορούν να γίνουν ιστοειδικά και χρονοειδικά, με χρήση του συστήματος ανασυνδυασμού Cre-loxP (Εικόνα 15) και Tet on/Tet off (Εικόνα 16).

Η διαφορά των δύο συστημάτων έγκειται στο ότι ενώ στο πρώτο σύστημα είναι δυνατή η απενεργοποίηση του γονιδίου όποια χρονική στιγμή αυτό είναι επιθυμητό, χωρίς να υπάρχει αναστροφή του φαινομένου, στο δεύτερο σύστημα είναι δυνατή η ενεργοποίηση και απενεργοποίηση του γονιδίου με προσθήκη ή αφαίρεση ενός παράγοντα, οπότε η διαδικασία είναι αναστρέψιμη.



Εικόνα 16 : Σύστημα Tet on/ Tet off Ανατύπωση από http://www.molmed.lu.se/hematopoiesis_po4.htm

1.5. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η εμπλοκή της CLU σε μία σειρά από παθολογίες, όπως ασθένειες του γήρατος καθώς και σε φυσιολογικές διαδικασίες, όπως η γήρανση *per se* καθιστά απαραίτητη τη δημιουργία ενός μοντέλου θηλαστικού, το οποίο είναι εξελικτικά συγγενές με τον άνθρωπο με σκοπό τη μελέτη του βιολογικού ρόλου του *en* λόγω μορίου *in vivo*. Δεδομένου του βιοϊατρικού ενδιαφέροντος που υπάρχει και του αποδεδειγμένου ρόλου της CLU ως αξιόπιστο βιοδείκτη γήρανσης, το συγκεκριμένο ζωικό πειραματικό πρότυπο μέσω διασταυρώσεων με άλλα ζωικά μοντέλα ασθενειών θα επιτρέψει την κατανόηση του βιολογικού ρόλου της CLU στις νόσους αυτές καθώς και στη γήρανση.

Κεφάλαιο 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ (construct)

2.3.1 Καλλιέργειες E. Coli

Τα βακτηριακά στελέχη, που μετασχηματίστηκαν με σκοπό τον πολλαπλασιασμό του πλασμιδιακού DNA, είναι τα TOP10 επιδεκτικά *E.coli* (InVitrogen). Τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν αποτελούν θρεπτικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και διαχωρίζονται σε στερεά και υγρά. Τα στερεά θρεπτικά μέσα παρασκευάζονται σε ημιστερεή κατάσταση και ακινητοποιούν τα βακτηριακά κύτταρα στην επιφάνειά τους ώστε να μπορούν να σχηματιστούν αποικίες. Τα στερεά μέσα παρασκευάζονται με τον ίδιο τρόπο με τα υγρά μόνο που προστίθεται άγαρ ως πηκτικός παράγοντας. Ειδικότερα, η υγρή καλλιέργεια των εν λόγω βακτηρίων πραγματοποιήθηκε σε Luria-Bertani Broth-LB (Bacto Yeast Extract 0,5%, Bacto Tryptone 1%, NaCl 1% διαλύονται σε 1L ενέσιμο ύδωρ), ενώ η στερεή καλλιέργεια γίνεται σε τριβλία Petri με προσθήκη Άγαρ (5,6gr Nutrient Agar διαλύονται σε 200mL ενέσιμο ύδωρ) με τη χρήση ασηπτικών τεχνικών.

Στα θρεπτικά διαλύματα των καλλιεργειών αυτών προστίθεται ποσότητα του αντιβιοτικού Αμπικιλίνη και Καναμυκίνη/ Νεομυκίνη (Sigma) (διαλύεται σε νερό σε συγκέντρωση 100 mg/mL και χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 100 µg/mL) κατάλληλη για την επιλεκτική ανάπτυξη (selection) μόνο των βακτηρίων που είναι ανθεκτικά στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό (antibiotic resistance genes). Τα βακτήρια αναπτύσσονται σε κλιβάνους σταθερής θερμοκρασίας στους 37 °C, ενώ στην υγρή καλλιέργεια βρίσκονται επιπλέον σε συνεχή ανάδευση. Η μακράς διάρκειας αποθήκευση των βακτηρίων επιτυγχάνεται στους -70 °C σε διάλυμα 1 x Hogness (36mM $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 13mM KH_2PO_4 , 20mM $Na_3 Citrate \cdot 2H_2O$, 10mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 44% Γλυκερόλη διαλύονται σε 100mL ddH₂O) σε πλαστικούς κρυοσωλήνες 1,5 mL.

2.3.2 Παρασκευή πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες βακτηρίων

2.1.2.A Μικρής Κλίμακας (mini-prep)

Η μέθοδος αυτή απομόνωσης πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των αποικιών μετασχηματισμένων βακτηρίων που έχουν αναπτυχθεί σε στερεή καλλιέργεια.

Για την απομόνωση μικρής ποσότητας DNA (Maniatis *et al.*, 1989) τοποθετείται 1,5 mL υγρής καλλιέργειας βακτηρίων σε δοκιμαστικούς σωλήνες και φυγοκεντρείται σε 12.000rpm για 2min στους 4°C. Ακολουθεί λύση των βακτηρίων με άλκαλι μέσω επαναδιαλυτοποίησης του βακτηριακού ίζηματος σε 100μL διαλύματος S1 (50mM glucose, 25mM Tris·Cl (pH=8), 10mM EDTA (pH=8)) και ισχυρή ανάδευση σε Vortex. Στη συνέχεια, προστίθενται διαδοχικά 200μL διαλύματος S2 (0,2N NaOH, 1%SDS) και 150μL διαλύματος S3, (60mL 5M potassium acetate, 11,5mL glacial acetic acid, 28,5mL H₂O), ακολουθεί ήπια ανάδευση και επώαση στους 4°C για 5min. Έπειτα, ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων σε 12.000rpm για 10min στους 4°C και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα. Η διαδικασία αφυδάτωσης και κατακρήμνισης του πλασμιδιακού DNA γίνεται με 2 όγκους αιθανόλης 100% και ισχυρή ανάδευση. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρούνται σε 12.000rpm για 2min στους 4°C, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα του πλασμιδιακού DNA ξεπλένεται με 1mL αιθανόλη 70% και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και φυγοκέντρηση σε 12.000rpm για 2min στους 4°C. Τέλος, γίνεται και πάλι απόρριψη του υπερκείμενου και τα ιζήματα αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να εξατμιστεί η περίσσεια αιθανόλης. Τα δείγματα αυτά αφήνονται να ενυδατωθούν σε ddH₂O στους 4°C καθόλη τη διάρκεια της νύχτας (O/N). Την επόμενη ημέρα θα προστίθεται RNAase (Sigma, 20μg/mL).

2.1.2.B Μεσαίας Κλίμακας

Για την απομόνωση μεγαλύτερης ποσότητας πλασμιδιακού DNA (midi-prep) χρησιμοποιούνται οι στήλες απομόνωσης Nucleobond AX PC 100 (Macherey- Nagel 740573) σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών. Με την μέθοδο αυτή απομονώνονται 150-300μg DNA μεγάλης καθαρότητας.

2.3.3 Πέψη DNA με περιοριστικά ένζυμα

Για τον χαρακτηρισμό καθώς και τον μοριακό έλεγχο (μοριακή υπογραφή) των πλασμιδίων πραγματοποιήθηκαν επιλεκτικές πέψεις με περιοριστικά ένζυμα. Για την πέψη πλασμιδιακού DNA με περιοριστικά ένζυμα χρησιμοποιήθηκαν περιοριστικά ένζυμα (New England Biolabs, Fermentas) και οι αντιδράσεις έγιναν σύμφωνα με τις οδηγίες των συνοδευτικών φυλλαδίων των ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν.

2.3.4 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Το πήκτωμα που χρησιμοποιείται για την ηλεκτροφόρηση μορίων με καθαρό φορτίο, χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR) (βλ. 2.3.3) για το γονίδιο της Clusterin όσο και το eGFP περιέχει 1% αγαρόζη. Ως ρυθμιστικό διάλυμα για την πραγματοποίησή της χρησιμοποιείται 1x TBE (10x stock solution: 215,6g Tris base, 110g βορικό οξύ, 18,6g EDTA, dH₂O σε τελικό όγκο 2L).

Τα στάδια παρασκευής πηκτώματος αγαρόζης και ηλεκτροφόρησης είναι τα εξής:

- Προετοιμασία κατάλληλης φόρμας (rack) και τοποθέτηση διαχωριστικών και χτενιών, έτσι ώστε να σχηματιστούν τα πηγάδια για την τοποθέτηση των δειγμάτων
- Προσθήκη σε φιάλη 3 g αγαρόζης και 300mL (1% αγαρόζη) για την παρασκευή του πηκτώματος
- Προσθήκη 9μL βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) στο διάλυμα αγαρόζης και 30μL EtBr στο διάλυμα 1X TBE. Το EtBr έχει την ιδιότητα να προδένεται στο δίκλωνο DNA και να φθορίζει κατά την ακτινοβολήση με υπεριώδες φως
- Το πήκτωμα τοποθετείται σε κατάλληλη πλατφόρμα και βυθίζεται σε 1x TBE
- Προσθήκη 5μL Orange G σε όλα τα δείγματα εκτός από τον marker (δείγματα και controls). Η χρωστική αφενός βοηθάει στην καθίζηση των δειγμάτων στα πηγάδια φορτώματος και αφετέρου στην παρατήρηση της διαδικασίας

- Τοποθέτηση στο πήκτωμα 10μL από τα δείγματα και τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες. Εκτός από τα δείγματα τοποθετούνται στο πήκτωμα και 10μL φάγου λ που έχει υποστεί πέψη από τα ένζυμα HindIII/EcoRI, ο οποίος αποτελεί μάρτυρα γνωστού προτύπου ζώνωσης μοριακών βαρών που θα βοηθήσει στην ταυτοποίηση των τμημάτων DNA
- Στη συνέχεια, εφαρμόζεται ηλεκτρικό δυναμικό στο πήκτωμα, τάσης 120 Volt, 150mA. Όταν οι ζώνες του μάρτυρα είναι διακριτές, το πήκτωμα εκτίθεται σε υπεριώδες φως έτσι ώστε να γίνει η ταυτοποίηση των δειγμάτων βάσει των θετικών μαρτύρων.

2.3.5 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης (Gel extraction)

Με τη βοήθεια της τεχνικής αυτής δίδεται η δυνατότητα καθαρισμού της διαγονιδιακής κατασκευής από την αγαρόζη. Με τη μέθοδο αυτή απομονώθηκαν τόσο το γονίδιο της Apolipoprotein J/Clusterin όσο και ο υποκινητής του γονιδίου της ανθρώπινης β- ακτίνης. Η συγκεκριμένη μεθοδολογία εκτελέστηκε με τη χρήση του QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen- 28706).

Το DNA που απομονώνεται με την μέθοδο αυτή είναι κατάλληλο για πέψη με περιοριστικά ένζυμα (βλ. 2.1.3) και για υποκλωνοποίηση με T4 λιγάση (New England Biolabs). Το DNA ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% σε διάλυμα 1x TAE (βλ. 2.1.4). Κάτω από πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας κόβεται η ζώνη του DNA που περιέχει το τμήμα προς απομόνωση και ακολουθείται το πρωτόκολλο με βάση τις οδηγίες τις εταιρείας. Τέλος, λαμβάνεται το υπερκείμενο στο οποίο βρίσκεται διαλυμένο το τμήμα DNA που αρχικά είχε επιλεχθεί από το πήκτωμα της αγαρόζης.

2.3.6 Κλωνοποίηση γονιδιακής κατασκευής σε πλασμιδιακούς φορείς

Το προς κλωνοποίηση μόριο DNA και το πλασμίδιο κόβονται με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα (βλ. 2.1.3) Η σύνδεσή τους έγινε είτε με συγκόλληση άκρων που παρουσιάζουν συμπληρωματικές αλληλουχίες και θα λειτουργήσουν ως

κολλώδη άκρα (sticky ends) ή αν τα άκρα τους είναι διαφορετικά ώστε να είναι αναγκαία η συγκόλληση μη συμπληρωματικών άκρων (blunt end ligation). Στην πρώτη περίπτωση είναι αναγκαία η αποφωσφορυλίωση του 5' άκρου του πλασμιδίου μέσα στο οποίο πρόκειται να εισαχθεί το μόριο του DNA, με τη χρήση του ενζύμου αλκαλική φωσφατάση (calf intestinal alkaline phosphatase) (Fermentas). Στη δεύτερη περίπτωση, όπου τα άκρα των αλληλουχιών δεν είναι συμπληρωματικά, είναι απαραίτητη η ενζυμική μετατροπή τους σε άκρα χωρίς την μικρή περιοχή μονής αλυσίδας του DNA, που χαρακτηριστικά αφήνουν μετά την πέψη τα περισσότερα περιοριστικά ένζυμα.

Γενικά, η διαδικασία της κλωνοποίησης περιλαμβάνει την πέψη του DNA με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού (βλ. 2.1.3). Η μετατροπή των κολλωδών άκρων σε τυφλά γίνεται με την προσθήκη στην αντίδραση 2,5 U Klenow DNA πολυμεράσης (Fermentas) και 2 μl dNTPs 25 mM (Fermentas) και επώαση στους 37 °C για 20min. Στο πλασμίδιο φορέα γίνεται αποφωσφορυλίωση του 5' άκρου με την προσθήκη 1 μl αλκαλικής φωσφατάσης και επώαση στους 37 °C για 20min. Στη συνέχεια, τα τμήματα του DNA προς κλωνοποίηση απομονώνονται από πήκτωμα αγαρόζης με βάση το QIAquick Gel Extraction Kit (βλ. 2.1.5)

Η σύνδεση του πλασμιδίου φορέα και του προς κλωνοποίηση μορίου DNA γίνεται με τη χρήση T4 DNA λιγάσης (New England Biolabs). Συγκεκριμένα, αναμιγνύονται το γραμμικό πλασμιδιακό DNA (linearized vector) με την αλληλουχία DNA που πρόκειται να εισαχθεί στο πλασμίδιο σε αναλογία 1 προς 3. Η αντίδραση διεξάγεται σε τελικό όγκο 20 μL, παρουσία 1 x διαλύματος λιγάσης με 1U T4 DNA λιγάσης. Η αντίδραση επωάζεται για 8 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μέρος της αντίδρασης χρησιμοποιείται για το μετασχηματισμό βακτηρίων.

Στην παρούσα διπλωματική, η στατηγική κλωνοποίησης για το σχηματισμό της διαγονιδιακής κατασκευής που φέρει το γονίδιο της Apolipoprotein J/Clusterin, ανωδικά αυτού τον υποκινητή του γονιδίου της ανθρώπινης β-ακτίνης και καθωδικά το IRES (Internal Ribosome Entry Site) και το γονίδιο της φυσικής φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP, έγινε σε δύο βήματα.

Αρχικά, μέσω πέψης με περιοριστική ενδονουκλεάση (EcoRI) στο πλασμίδιο MIGR1 –CLU (προσφορά της Serena Davoli και S. Bettuzzi, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Biochimica, Biochimica Clinica e Biochimica dell'Esercizio Fisico, Università di Parma, Parma, Italy) απομονώθηκε το cDNA Apolipoprotein J/Clusterin. Εν συνεχεία, κλωνοποιήθηκε η Clusterin σε μοναδική θέση κοπής EcoRI του τροποποιημένου πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης pIRES2-EGFP (Clonetech Laboratories, προσφορά του εργαστηρίου Μοριακής Γενετικής, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ) που βρίσκεται ανωδικά του IRES-EGFP, που πλέον θα ονομάζεται CLU-IRES-EGFP.

Στο δεύτερο στάδιο της κλωνοποίησης, απομονώθηκε (EcoRI, SalI) ο υποκινητής της ανθρώπινης β- ακτίνης από πλασμιδιακό φορέα BS (προσφορά του εργαστηρίου Μοριακής Γενετικής, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ) και δημιουργήθηκαν τυφλά άκρα με τη χρήση της Klenow DNA πολυμεράσης (Fermentas). Τέλος, ο υποκινητής αυτός υποκλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα CLU-IRES-EGFP σε μοναδική θέση κοπής XhoI ανωδικά του γονιδιού της CLU για να δημιουργηθεί το πλασμίδιο που θα ονομάζεται actin CLU-IRES-EGFP, το οποίο και περιλαμβάνει τη διαγονιδιακή κατασκευή.

2.3.7 Μετασχηματισμός στελεχών E. coli με τη μέθοδο του ηλεκτροπαλμού

Αρχικά, γίνεται η προετοιμασία των βακτηρίων ώστε να μπορούν να μετασχηματιστούν με πλασμιδιακό DNA. Για το σκοπό αυτό δημιουργείται μια υγρή καλλιέργεια βακτηρίων όγκου 1L στην οποία τα βακτήρια βρίσκονται στην αυξητική φάση ανάπτυξης (η οπτική απορρόφηση στα 600 nm είναι 0.5-0.7). Αφού η καλλιέργεια παγώσει για 1 ώρα και 45min τουλάχιστον πάγο και με υπό ισχυρή ανάδευση, τα βακτήρια φυγοκεντρούνται στα 3.400 rpm για 10-15min και στους 4°C. Τέλος, τα βακτήρια ξεπλένονται με Water for Injections 2 φορές και με διάλυμα 10 % γλυκερόλης μια φορά. Τα βακτήρια επαναιωρούνται σε 2-3 mL 10% γλυκερόλης έτσι ώστε η συγκέντρωσή τους να είναι $1-3 \times 10^6$ κύτταρα/mL. Τα βακτήρια μοιράζονται σε σωλήνες eppendorf, παγώνονται σε υγρό άζωτο ενώ είναι οι

σωλήνες είναι ήδη τοποθετημένοι σε ξηρό πάγο (snap freeze) και φυλάσσονται στους -70 °C.

Τα βακτήρια αυτά είναι κατάλληλα για μετασχηματισμό με ηλεκτροδιάτρηση (electroporation). Από αυτά χρησιμοποιούνται 40 μ L στα οποία προστίθεται 1-2 μ L διαλύματος DNA από την αντίδραση συγκόλλησης με λιγάση (βλ. 2.1.6). Το μείγμα DNA-βακτηρίων εισάγεται σε ειδικές κυψελίδες (cuvettes), οι οποίες τοποθετούνται στο θάλαμο ηλεκτροδιάτρησης της συσκευής Micro Pulser της Biorad. Στη συνέχεια, εφαρμόζεται τάση 1,8 KV με αντίσταση 200 Ω (capacitance 25 μ F). Μετά τον ηλεκτροπαλμό, στην κυψελίδα με τα βακτήρια προστίθεται 1 mL διαλύματος SOC (Bacto-tryptone 2%, Yeast extract 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, Glucose 20 mM, ddH₂O 1L) που έχει προθερμανθεί στους 37 °C. Το διάλυμα της κυψελίδας μεταφέρεται σε σωλήνες eppendorf και επωάζεται για 1 ώρα στους 37 °C, μετά το πέρας της οποίας επιστρώνεται σε τριβλίο Petri που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό με σκοπό την ανάπτυξη βακτηριακών αποικιών τα οποία φέρουν το επιθυμητό πλασμιδιακό DNA.

2.3.8 Απομόνωση της διαγονιδιακής κατασκευής που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για μικροένεση

Ύστερα από την πέψη του DNA με περιοριστικά ένζυμα (εν προκειμένω στο actin CLU-IRES-EGFP έγινε πέψη με BssHII), απομακρύνονται από το τμήμα που προορίζεται για μικροένεση οι πλασμιδιακές αλληλουχίες, με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης και τη χρήση παρασκευαστικού πηκτώματος αγαρόζης με χαμηλό σημείο τήξης περιεκτικότητας 1%. Η ζώνη του DNA που περιέχει την επιθυμητή αλληλουχία κόβεται από το πήκτωμα και τοποθετείται σε 10X ρυθμιστικό διάλυμα β-αγαράσης στους 65 για 10 λεπτά. Ακολουθεί επώαση με 2 U β-αγαράσης (New England Biolabs) ανά 100 μ L πηκτώματος σε ρυθμιστικό διάλυμα β-αγαράσης στους 40 °C για 1 ώρα. Στο διάλυμα αυτό προστίθεται 1/10 του όγκου 5 M NaCl και τα άπεπτα τμήματα του πηκτώματος απομακρύνονται με

φυγοκέντρωση στις 13,000rpm στους 25°C για 15min. Από το διάλυμα αυτό το DNA απομονώνεται και καθαρίζεται τελικά με κατακρήμνιση με αιθανόλη.



Εικόνα 17: Elutip-d

Στη συνέχεια, η απαλλαγμένη από προσμίξεις διαγονιδιακή κατασκευή καθαρίζεται περαιτέρω με τη χρήση ειδικών μικροκολώνων καθαρισμού Elutip-d (Whatman, Schleicher & Schuell) για την απομάκρυνση μη ενσωματωμένων νουκλεοτιδίων (Εικόνα 17). Οι συγκεκριμένες κολώνες δεσμεύουν νουκλεϊκά οξέα σε συνθήκες χαμηλής αλατότητας, ενώ η διαγονιδιακή κατασκευή εκλύεται σε συνθήκες υψηλής αλατότητας και διαλυτοποιείται σε MJV ρυθμιστικό διάλυμα (10 mM Tris, 1×10^{-4} M EDTA, pH=7.4).

2.4 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ

2.2.1 Στελέχη Ποντικών

Τα στελέχη των ποντικών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ανήκουν στο είδος *Mus musculus* και είναι τα εξής :

- Θηλυκά ποντίκια για την παραγωγή γονιμοποιημένων ωαρίων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια F1 (από τη διασταύρωση CBA x C57BL/6/H) ηλικίας 3 – 4 εβδομάδων γιατί έχει δειχθεί ότι παράγουν μεγάλο αριθμό καλής ποιότητας εμβρύων (75).
- Γόνιμα αρσενικά ποντίκια για αναπαραγωγή και γονιμοποίηση των ωαρίων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται ποντίκια F1, ηλικίας τουλάχιστον 8 εβδομάδων.
- Στείρα αρσενικά ποντίκια NMRI (Charles River) στα οποία έχει αποκοπεί ο σπερματογωγός με μικροχειρουργική επέμβαση χρησιμοποιούνται για να την απόκτηση ψευδοέγκυων θηλυκών.

⁷⁵ Nagy A., et al., 2003. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Θηλυκά ποντίκια F1 που χρησιμεύουν ως ψευδοέγκυα (pseudopregnants), δεδομένου ότι η χρήση αυτών έναντι καθαρών σειρών προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα όσον αφορά την αποδοχή των εμφυτευμένων ωαρίων, αλλά και τη φροντίδα που δείχνουν οι θετές μητέρες στα νεογνήνητα (76).

2.2.2 Δημιουργία Διαγονιδιακών ποντικών με τη μέθοδο μικροένεσης σε προπυρήνα

Η δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών περιλαμβάνει αδρομερώς τα παρακάτω στάδια:

1. Σχεδιασμός, παρασκευή και κλωνοποίηση γονιδιακών κατασκευών (βλ. 2.1)
2. Έλεγχος των παρασκευασθέντων γονιδιακών κατασκευών με επιλεκτικές πέψεις (βλ. 2.1.3) ή αλληλούχιση
3. Παρασκευή και καθαρισμός της προς μικροένεση γονιδιακής κατασκευής (βλ. 2.1.8)
4. Προσδιορισμός κατάλληλης συγκέντρωσης της γονιδιακής κατασκευής για μικροενέσεις
5. Μέθοδος μικροένεσης του DNA σε προπυρήνες ζυγωτών F2 (CBAXC57Bl/6) και τυχαία ενσωμάτωση στο γονιδίωμά τους κατά την οποία πραγματοποιούνται μικροενέσεις με διάφορες συγκεντρώσεις της γονιδιακής κατασκευής
6. Εμβρυομεταφορά των μετά την μικροένεση ωαρίων που επιβίωσαν σε ψευδοέγκυες F1 (CBAXC57Bl/6)
7. Παρακολούθηση των εγκυμονούντων ποντικών μετά από 10 ημέρες και καταγραφή του βάρους τους (έλεγχος πιθανών αποβολών)
8. Γέννηση ποντικών μετά από 19-21 ημέρες
9. Έλεγχος της διαβίβασης του διαγονιδίου στους απογόνους (διασταύρωση των ποντικών που φέρουν το διαγονίδιο με φυσιολογικά ποντίκια του ίδιου γενετικού υπόβαθρου)

⁷⁶ Nagy A., et al., 2003. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

10. Μεταφορά των διαγονιδιακών ποντικών που δημιουργήθηκαν σε γενετικό υπόβαθρο C57Bl/6. (Ανάδρομες διασταυρώσεις των διαγονιδιακών ποντικών C57Bl/6 για 10 γενιές). Επειδή αυτή η διαδικασία είναι εξαιρετικά χρονοβόρα, ο έλεγχος του διαγονιδιακού που επιλέχθηκε για τα πειράματα της παρούσης εργασίας ήταν ήδη στην 4η γενιά. Ο λόγος για τον οποίο τα διαγονιδιακά ποντίκια-υπερεκφραστές της Clusterin δεν παρήχθησαν απ' ευθείας σε C57Bl/6 γενετικό υπόβαθρο, είναι ότι τα ζυγωτά του C57Bl/6 στελέχους είναι περιορισμένα σε αριθμό, μικρής ανθεκτικότητας όταν εκτίθενται σε εργαστηριακές συνθήκες, ενώ εμφανίζουν δυσκολίες κατά τη διάρκεια της μικροένεσης (όχι καλά διακριτοί πυρήνες) σε αντίθεση με τα F1 ζυγωτά τα οποία συνιστώνται σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία (77).
11. Διατήρηση των διαγονιδιακών σειρών που διαβιβάζουν. Κατάλληλες διασταυρώσεις των ιδρυτών ποντικών καταρχάς και των απογόνων τους στη συνέχεια.

2.2.3 Παραγωγή γονιμοποιημένων ωαρίων

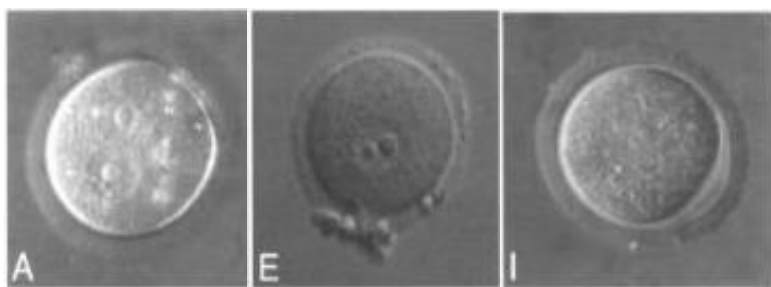
Χρησιμοποιήθηκαν F1 θηλυκά ποντίκια ηλικίας 3-4 εβδομάδων, στα οποία έχει επαχθεί ωορρηξία περισσότερων ωαρίων από όσα θα παράγονταν φυσιολογικά, με χρήση γοναδοτροπινών (superovulation). Μέσω των ορμονών αυτών περιορίζεται ο αριθμός των χρησιμοποιούμενων ζώων εργαστηρίου, που έρχεται σε πλήρη συμφωνία με τον κανόνα των 4 R (Αντικατάσταση, Βελτίωση, Μείωση και Σεβασμός) (78) Χρησιμοποιείται γοναδοτροπίνη ορού εγκύου φοράδας (PMSG), η οποία μιμείται την ενδογενή FSH – θυλακιοτρόπο ορμόνη, καθώς και ανθρώπινη χοριονική γοναδοτροπίνη (hCG), η οποία μιμείται την LH – ωχρινοτρόπο ορμόνη. Η PMSG και η hCG προμηθεύονται με τη μορφή λυοφιλιωμένης σκόνης, με την εμπορική ονομασία Folligon και Chorulon αντίστοιχα (Intervet).

⁷⁷ Nagy *et al.*, 2003. *Manipulating the mouse embryo: A laboratory Manual*, third edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

⁷⁸ Russell W.M.S. and Burch R.L., 1992. *Principles of Human Experimental Technique*, Universities Federation for Animal Welfare.

Τέσσερις ώρες πριν την έναρξη της σκοτεινής περιόδου του ημερήσιου κύκλου (δηλ. περίπου στις 2 μ.μ.) γίνεται ενδοπεριτοναϊκή ένεση (ip, intraperitoneal) με 100μL που περιέχουν 10 IU Folligon στα θηλυκά F1 ποντίκια. Μετά από 46–48 ώρες γίνεται ενδοπεριτοναϊκή ένεση με 10 IU Chorulon στα ίδια ποντίκια τα οποία τοποθετούνται για διασταύρωση με F1 αρσενικά ποντίκια.

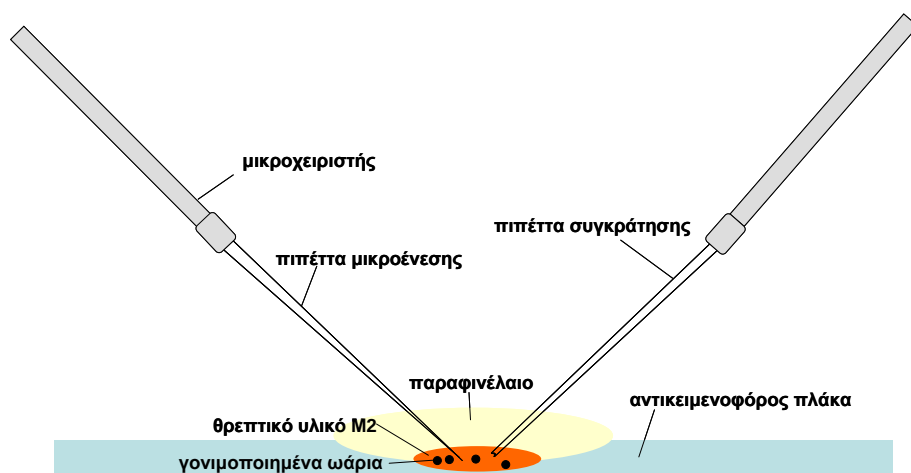
Την επόμενη μέρα τα θηλυκά ποντίκια θανατώνονται και οι ωαγωγοί (oviducts) αφαιρούνται και τοποθετούνται σε μικρά τρυβλία Petri με 1,5mL υλικό καλλιέργειας M2 (Sigma), όπου έχει προστεθεί υαλουρονιδάση σε συγκέντρωση 10 mg/mL. Με τη χρήση κατάλληλου στρεοσκοπίου και με ειδικές λαβίδες (FST) δημιουργείται εκτομή στο διογκωμένο σημείο του ωαγωγού (ampulla), σημείο συγκέντρωσης των γονιμοποιημένων ωαρίων, από την οποία απελευθερώνονται στο υλικό καλλιέργειας.



Εικόνα 18: Μορφολογία των ζυγωτών των ποντικών. Α. φυσιολογική μορφολογία, εμφανείς οι δύο προπυρήνες Ε. θυλακοκύτταρα είναι ακόμη προσκολλημένα στη διαφανή ζώνη, γεγονός που δυσκολεύει τη μικροένεση Ι. μη γονιμοποιημένο ζυγωτό, δε φαίνονται οι προπυρήνες (Ανατύπωση από Nagy *et al.*, 2003)

Με τη δράση της υαλουρονιδάσης, που περιέχεται στο υλικό καλλιέργειας, αποκολλώνται από τα γονιμοποιημένα ωάρια τα ωοθυλακικά κύτταρα (κοκκώδη και θυλακιακά, cumulus cells), που είναι προσκολλημένα πάνω σε αυτά (Εικόνα 18). Η παραμονή των ζυγωτών σε αυτό το υλικό πρέπει να είναι σύντομη. Τα καθαρά πλέον ωάρια μεταφέρονται σε νέο τρυβλίο με M2, ώστε να εκπλυθούν και να απομακρυνθούν και τα τελευταία ίχνη υαλουρονιδάσης. Στη συνέχεια μεταφέρονται σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό M16 (Sigma) και τέλος σε τρυβλίο στο οποίο έχουν τοποθετηθεί 4 σταγόνες M16 (για να εξασφαλίζει τη συγκέντρωση των ζυγωτών σε μικρή και ελεγχόμενη επιφάνεια του τρυβλίου) καλυμμένες με παραφινέλαιο (για να μην εξατμιστεί η μικρή ποσότητα του M16 που χρησιμοποιείται). Το τρυβλίο τοποθετείται σε κλίβανο επώασης 37° C και 5% CO₂ (το pH του M16 ρυθμίζεται στο 7,5, έχοντας τοποθετηθεί τουλάχιστον μία ώρα πριν τη χρήση του στον κλίβανο).

2.2.4 Μικροένεση του DNA στα γονιμοποιημένα ωάρια



Εικόνα 19: Αντικειμενοφόρος πλάκα στην οποία βυθίζονται η πιπέττα μικροένεσης και η πιπέττα συγκράτησης των γονιμοποιημένων ωαρίων. Οι άκρες των πιπετών καλύπτονται με θρεπτικό μέσο M2 και παραφινέλαιο. Οι πιπέττες προσαρμόζονται στους μικροχειριστές του μικροσκοπίου. (Βιβή Τσεβελέκη)

Για τις μικροενέσεις DNA (**microinjections**) στα γονιμοποιημένα ωάρια απαιτείται ένα ανάστροφο μικροσκόπιο με μικροχειριστές (Erpendorf). Μέχρι και 30 ζυγωτά (εξαρτάται κυρίως από την εμπειρία του χειριστή) μεταφέρονται σε M2 όπου ξεπλένονται έτσι ώστε να μην υπάρχουν υπολείμματα από M16. Σε μια ειδική αντικειμενοφόρο πλάκα, που φέρει μια κοιλότητα στο κέντρο, τοποθετείται μια σταγόνα περίπου 15μL M2 και καλύπτεται με παραφινέλαιο. Στη σταγόνα αυτή γίνεται προσθήκη των ωαρίων που πρόκειται να μικροενεθούν με το επιθυμητό DNA (Εικόνα 19).

Έχει στο μεταξύ προηγηθεί η τοποθέτηση μιας πιπέττας συγκράτησης του ωαρίου (**holding pipette**) στους μικροχειριστές του μικροσκοπίου καθώς και η κατασκευή και τοποθέτηση μιας πιπέττας μικροένεσης (**injection pipette**), χρησιμοποιώντας τον κατάλληλο εξοπλισμό (KOPF pipette puller, Model 750)

Τα στάδια που ακολουθούν είναι τα εξής:

- Φυγοκέντρηση του DNA για 15-20 min στις 13.000 rpm, 25 °C
- Λήψη 5μL DNA από το επάνω μέρος και μεταφορά σε μικρό σωλήνα erpendorf
- Βύθιση της πιπέττας μικροένεσης με το πίσω μέρος στο erpendorf με το DNA, ώστε λόγω τριχοειδούς φαινομένου να γεμίσει, τοποθέτηση στο μικροχειριστή και βύθισή της στη σταγόνα M2 της αντικειμενοφόρου πλάκας
- Ρύθμιση της πιπέττας μικροένεσης, ώστε να βρίσκεται στη νοητή ευθεία (ίδιο επίπεδο εστίασης) με την πιπέττα συγκράτησης

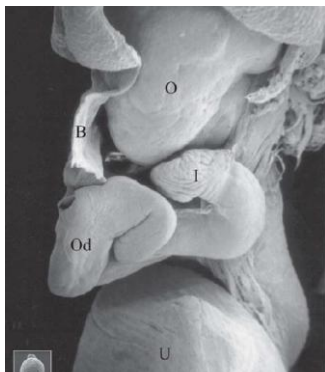
- Σπάσιμο της άκρης της πιπέττας μικροένεσης χρησιμοποιώντας μεγαλύτερη μεγέθυνση. Έλεγχος του κατάλληλου ανοίγματος της πιπέττας: Τοποθέτηση της πιπέττας μικροένεσης ακριβώς δίπλα σε ένα ελεύθερο ωάριο και απελευθέρωση DNA. Αν το ωάριο κάνει μια πλήρη περιστροφή και σταματήσει, τότε η πιπέττα έχει σπάσει στο κατάλληλο σημείο. Σε κάθε άλλη περίπτωση κατασκευάζεται νέα πιπέττα.



Εικόνα 20: Μικροένεση DNA στον προπυρήνα ωαρίου. Παρατηρείται ελαφρά διόγκωση του προπυρήνα ύστερα από την εισαγωγή του DNA. (Λήψη από ανάστροφο μικροσκόπιο 200X του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, Ιωάννης Γρίβας)

- Κρατώντας σταθερό το ωάριο με την πιπέττα συγκράτησης, γίνεται εστίαση στη μεμβράνη ενός από τους δύο προπυρήνες (κατά προτίμηση στον πυρήνα του αρσενικού επειδή είναι μεγαλύτερος) και μετακινώντας την πιπέττα μικροένεσης, δημιουργείται μια οπή στη διάφανη ζώνη (zona pellucida), την πλασματική μεμβράνη και τη μεμβράνη του προπυρήνα, ακολουθεί απελευθέρωση τόσης ποσότητας διαλύματος DNA ώστε να είναι ορατή και ελεγχόμενη η μεταβολή του όγκου του πυρήνα (Εικόνα 20).
- Επανάληψη της μικροένεσης και στα υπόλοιπα ωάρια και επιστροφή σε τρυβλίο με M16 και τοποθέτηση στον κλίβανο.

2.2.5 Μεταφορά των εμβρύων, στα οποία έχει ενεθεί DNA, στον αγωγό ψευδοέγκυων θηλυκών ποντικών



Εικόνα 21: Ηλεκτρονιοφωτογραφία Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης στο οποίο προβάλλονται η είσοδος του αγωγού (infundibulum) (I), ο αγωγός (Od), η ωοθήκη (O), και η μήτρα (U) και η μεμβράνη Bursa (B). Μεγέθυνση 48X. Guang Y. Wen and Jing Chen, 2004. *Scanning Electron Microscopy of the Infundibulum, Ampulla and Eggs of Mice*, Comparative Medicine Vol 54, No. 5, pp. 543-548

Αφού ολοκληρωθούν οι μικροενέσεις στα γονιμοποιημένα ωάρια, ακολουθεί η μεταφορά τους (**transfer**) στους αγωγούς ψευδέγκυων θηλυκών (Εικόνα 21).

- Τα έμβρυα ξεπλένονται πολύ καλά σε M2 και μεταφέρονται σε μια ειδικά κατασκευασμένη πιπέττα μεταφοράς (**transfer pipette**) με τον εξής τρόπο: λίγο M2, μια φυσαλίδα αέρα, λίγο M2, μια φυσαλίδα αέρα, λίγο M2, μια φυσαλίδα αέρα, M2 μαζί με 30-40 έμβρυα (αν είναι ακόμη στο στάδιο του ενός κυττάρου, ειδικά μεταφέρονται 10-15 έμβρυα), μια φυσαλίδα αέρα και λίγο M2.
- Σε κάθε θηλυκό ποντίκι χορηγείται ενδοπεριτοναϊκά μια ποσότητα μίγματος αναισθητικού και μυοχαλαρωτικού σε αναλογία 0,8ml:1ml αντίστοιχα (Rompun, Imalgene) σε 7,2ml 0,9% NaCl, σε όγκο (μL) που αντιστοιχεί στο βάρος του ποντικού.
- Καθαρισμός της ράχης του ποντικού με αιθανόλη και ραχιαία τομή στο δέρμα, στο ύψος του επάνω μέρους του ποδιού. Μετακίνηση της τομής ώστε να φανεί η ωοθήκη (κόκκινη) και το λίπος (άσπρο) κάτω από το περιτόναιο. Ακολουθεί τομή στο περιτόναιο και με λαβίδα με στρογγυλά άκρα τραβιέται το λίπος της ωοθήκης προς τα έξω, παρασύροντας τον αγωγό.
- Μεταφορά του ποντικού κάτω από το στερεοσκόπιο, όπου εφαρμόζεται εξωτερική πηγή φωτισμού. Διάνοιξη της μεμβράνης που καλύπτει την ωοθήκη και τον αγωγό με λεπτές λαβίδες, ώστε να εντοπισθεί η άκρη του αγωγού (**infundibulum**), όπου και θα εισαχθεί η πιπέττα μεταφοράς.
- Τοποθέτηση της άκρης της πιπέττας στην είσοδο του αγωγού και εισαγωγή των εμβρύων. (Η παρατήρηση φυσαλίδων μέσα στον αγωγό πιστοποιεί την επιτυχή εμφύτευση των γονιμοποιημένων ωαρίων στις ψευδοέγκυες μητέρες)
- Κλείσιμο της τομής του δέρματος με ειδικό εξάρτημα και κάλυψη του ποντικού με χαρτί, για τη διατήρηση της θερμοκρασίας του σώματός του
- Οι απόγονοι θα γεννηθούν σε 19-21 ημέρες , και όταν φθάσουν στην ηλικία των 10 ημερών, θα ταυτοποιηθούν, με ανάλυση DNA από βιοψία ουράς (βλ. Υλικά και μέθοδοι), τα ποντίκια που φέρουν το διαγονίδιο.

2.5 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΘΕΣΗΣ ΤΟΥ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΟΥ

2.3.1 Απομόνωση DNA από βιοψία ουράς ποντικού

Για την ανίχνευση της ενσωμάτωσης του διαγονιδίου στο γονιδίωμα του ποντικού, έγινε δειγματοληψία ιστού ουράς (tail biopsy) από τα προς εξέταση ζώα, ηλικίας 10,5 dpc. Η βασική αρχή της διαδικασίας αυτής στηρίζεται στη σταδιακή απομάκρυνση προσμείξεων (ακαθαρσίες, RNA και πρωτεΐνες) με τη μέθοδο της φαινόλης. Πρακτικά, τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι:

- Βιοψία ουράς (1 cm από την άκρη της) και τοποθέτηση σε eppendorf
- Προσθήκη 400μL Tail Buffer (Tris-HCl 1M pH=8, EDTA 0,5M pH=8, NaCl 5M, SDS 10%, ddH₂O)
- Προσθήκη 7μL πρωτεϊνάση K (10mg/mL) και ανάδευση σε συσκευή ανάδευσης τύπου Vortex
- Επώαση στους 55°C σε υδατόλουτρο κατά τη διάρκεια της νύχτας (Overnight- O/N) προκειμένου να γίνει πέψη των πρωτεϊνών της ουράς
- Ανάδευση σε συσκευή Vortex ώστε να διαλυθεί ο σκελετός της ουράς
- Προσθήκη 400μL διαλύματος φαινόλης/ χλωροφορμίου/ ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1 v/v) για τον καθαρισμό από τις πρωτεΐνες
- Ισχυρή ανάδευση σε Vortex ή shaker για 10 min, 25 °C και κατόπιν, φυγοκέντρωση για στα 11.800 rpm για 10min στους 25 °C.
- Μεταφορά της υδατικής φάσης από κάθε δείγμα, με ευρύστομα ακρορύγχια, σε νέα σωληνάκια eppendorf
- Προσθήκη 400μL διαλύματος ισοπροπανόλης (ο όγκος πρέπει να είναι περίπου το 80% αυτού του διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης) και ανάδευση, κουνώντας δυνατά το σωλήνα 3-4 φορές για δέσμευση του νερού και κατακρήμνιση του DNA
- Γίνεται ορατό το DNA μέσω της χαρακτηριστικής νεφελώδους μορφής, και συλλέγεται (ψαρεύεται) με γυάλινη πιπέττα Pasteur με κεκαμένο κυρτό άκρο
- Σταδιακή αφυδάτωση του DNA σε 70% αιθανόλη και 100% αιθανόλη

- Αναστροφή του σιφωνίου για 15-30 min προκειμένου να εξατμιστεί η αιθανόλη
- Εμβάπτιση του σιφωνίου με το DNA σε erpendorf με 200μL ddH₂O και επώαση στους 25 °C καθόλη τη διάρκεια της νύχτας (O/N)
- Ανάδευση της πιπέττας Pasteur ώστε να απομακρυνθεί το DNA και να μείνει στο σύνολό του στο νερό
- Αποθήκευση των erpendorfs με το DNA διαλυμένο σε ddH₂O στους -20 °C.

2.3.2 Φωτομέτρηση DNA (γενωμικού και πλασμιδιακού)

Η εύρεση της συγκέντρωσης του DNA (γενωμικού ή πλασμιδιακού) που έχει απομονωθεί πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) και τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι:

- Τοποθέτηση 2μL μη αραιωμένου δείγματος DNA στη βάση μέτρησης του Nanodrop 2000
- Με επαναφορά του ειδικού βραχίονα και χρήση ειδικού λειτουργικού συστήματος γίνεται μέτρηση οπτικής απορρόφησης σε μήκη κύματος 260, 280nm. Η συγκέντρωση του δείγματος υπολογίζεται αυτόματα με βάση τη σχέση $C = OD_{260} \times 50 \times \text{αραίωση}/1000 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{L}$, καθώς και η καθαρότητα του δείγματος.

2.3.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επιτρέπει τη γρήγορη ανίχνευση διαγονιδίου σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων. Η βασική αρχή της PCR συνοψίζεται στην in vitro ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA, με τη χρήση διαδοχικών μεταβολών θερμοκρασίας

Τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται ποικίλουν ανάλογα με τις απαιτήσεις του ενζύμου, τη δομή και το μέγεθος του DNA, που χρησιμοποιείται σαν εκμαγείο, καθώς και τις βέλτιστες συνθήκες πρόσδεσης των εκκινητών. Ένα γενικό όμως πρωτόκολλο εργασίας της συμβατικής τεχνικής PCR (regular PCR) περιλαμβάνει: αποδιάταξη αρχικού δείγματος (denaturation), υβριδισμό (annealing),

πολυμερισμό (extension), αποδιάταξη προϊόντων και επαναλήψεις του κύκλου για συγκεκριμένο αριθμό, ανάλογα με την περίπτωση (Πίνακες 3, 4). Σκοπός της αντίδρασης είναι να διαπιστωθεί ο γονότυπος των ποντικών των οποίων το DNA έχουμε απομονώσει, ως προς το γονίδιο της Apolipoprotein J/ Clusterin καθώς και ως προς το γονίδιο επιλογής της eGFP.

Αρχικά, παρασκευάζεται σε ένα eppendorf το Master Mix το οποίο στη συνέχεια θα μοιραστεί εξίσου (19μL) σε όλα τα σωληνάκια με τα δείγματα. Σε κάθε αντίδραση, εκτός από τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν και οι απαραίτητοι μάρτυρες (controls). Ο αρνητικός μάρτυρας είναι το νερό, που προστίθεται αντί του δείγματος προκειμένου να γίνει έλεγχος για πιθανές μολύνσεις, ενώ ο θετικός μάρτυρας είναι το πλασμιδιακό DNA στο οποίο κλωνοποιήθηκε η διαγονιδιακή κατασκευή ακτίνη- Clusterin, αφού με βάση την αλληλουχία του εν λόγω πλασμιδίου σχεδιάστηκαν οι ειδικοί εκκινητές (Genebank) (Πίνακας 5). Στη συνέχεια, μοιράζονται 19μL του Master Mix σε δοκιμαστικούς σωλήνες για PCR και προστίθεται 1μL γενωμικού DNA σε καθένα από αυτά.

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ CLUSTERIN

Πίνακας 3: Διάλυμα Αντίδρασης PCR		Πίνακας: Κατανομή Κύκλων PCR		
ddH ₂ O	6,4	ΚΥΚΛΟΙ	°C	Χρόνος
Taq buffer 5X (Promega)	4	Προεπώαση	94 °C	1:30 min
MgCl ₂ 25mM (Promega)	2	Αποδιάταξη	94 °C	1:00 min
dNTP's 5Mm (Invitrogen)	3,2	Υβριδισμός	57 °C	1:00 min
Primer sense MO_CLUF1_SPL 10pmol/μL	1,6	Πολυμερισμός	72 °C	2:00 min
Primer antisense MO_CLUR2_SPL 10pmol/μL	1,6	Αρ. Κύκλων	30	
Taq DNA pol 5u/μL (Promega)	0,2	Τελικός πολύ/σμός	72 °C	10:00 min
DNA	150ng/μL	Θερ/σία Αναμονής	4 °C	
Σύνολο	20 μL	Μέγεθος προϊόντος	392bp	

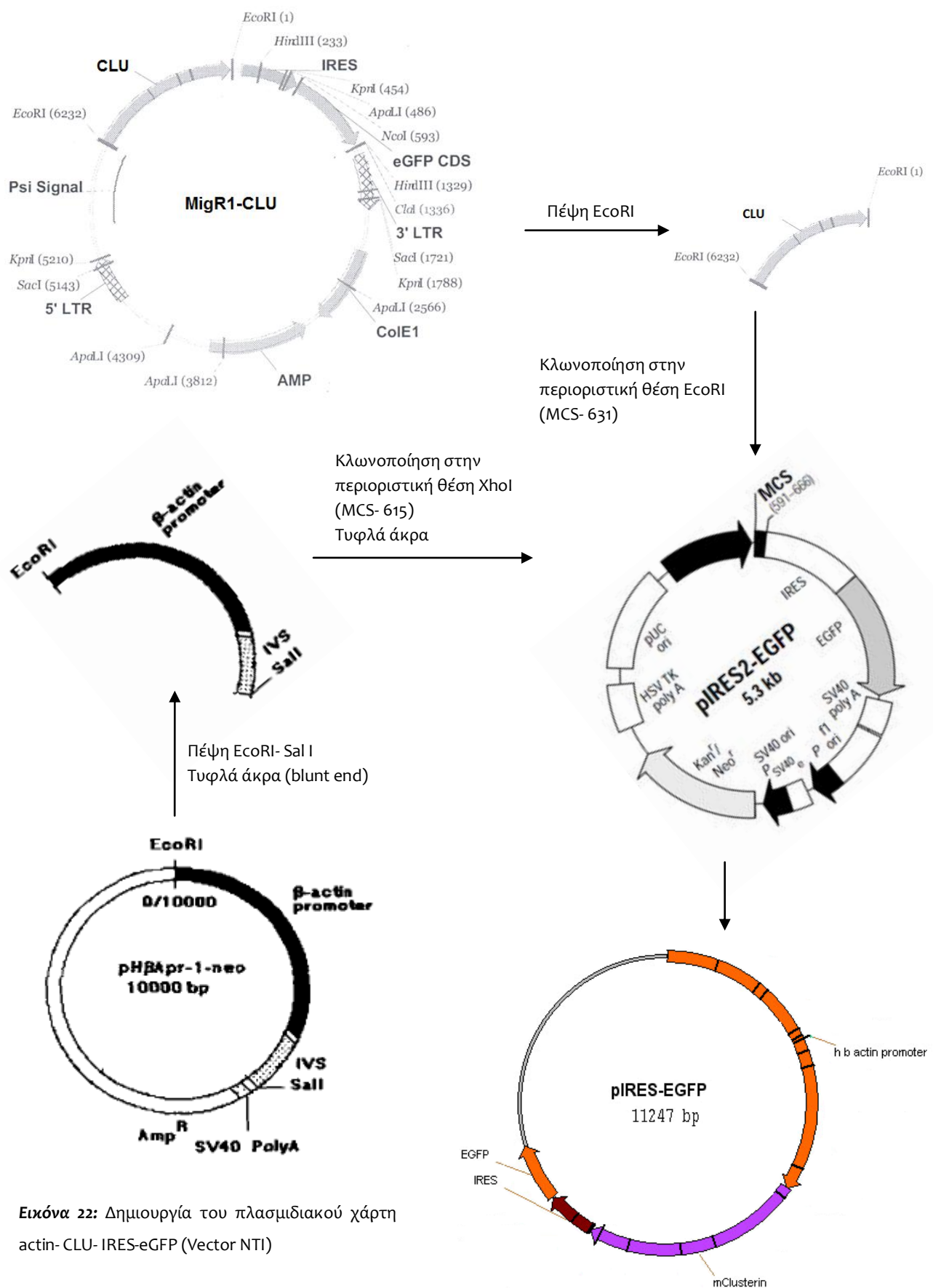
ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ eGFP

Πίνακας 4: Διάλυμα Αντίδρασης PCR		Πίνακας: Κατανομή Κύκλων PCR		
ddH ₂ O	8,1	ΚΥΚΛΟΙ	°C	Χρόνος
Taq buffer 5X (Promega)	4	Προεπώαση	94 °C	5:00 min
MgCl ₂ 25mM (Promega)	1,2	Αποδιάταξη	94 °C	1:00 min
dNTP's 2,5Mm (Fermentas)	1,5	Υβριδισμός	65 °C	1:00 min
Primer sense #449 1pmol/μL	2	Πολυμερισμός	72 °C	1:30 min
Primer antisense #450 1pmol/μL	2	Αρ. Κύκλων	30	
Taq DNA pol 5u/μL (Promega)	0,2	Τελικός πολύ/σμός	72 °C	10:00 min
DNA	150ng/μL	Θερ/σία Αναμονής	6 °C	
Σύνολο	20 μL	Μέγεθος προϊόντος	300bp	

Κεφάλαιο 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Δημιουργία πλασμιδιακού φορέα actin CLU IRES eGFP

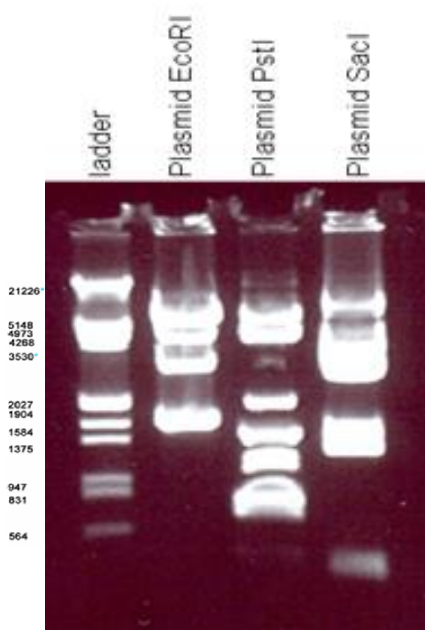


Εικόνα 22: Δημιουργία του πλασμιδιακού χάρτη actin-CLU-IRES-eGFP (Vector NTI)

Όπως περιγράφηκε στα Υλικά και Μέθοδοι (βλ. 2.1.6), ο πλασμιδιακός φορέας προέκυψε ύστερα από κλωνοποίηση δύο σταδίων σε συνεργασία με την Ερευνήτρια Δ' Δρ Έρα Ταουφίκ (Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ). Αρχικά από τον πλασμιδιακό φορέα MigR1- sCLU (ευγενική προσφορά του Bettuzzi S., University of Parma, Italy) εξήχθη το cDNA της s-CLU του ποντικού (ιώδης περιοχή) μετά από πέψη με EcoRI και ακολούθησε επανακλωνοποίηση στον φορέα pIRES2- EGFP (Clontech) στη μοναδική περιοριστική θέση EcoRI, η οποία βρίσκεται στο MCS (Multiple Cloning Site). Εν συνεχεία, ο υποκινητής της ανθρώπινης β- ακτίνης (πορτοκαλί περιοχή) απομακρύνθηκε με χρήση ενζύμων περιορισμού EcoRI/ Sal I από τον πλασμιδιακό φορέα pHbApr-1-neo (ευγενική προσφορά του Εργαστηρίου Μοριακής Γενετικής, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ) και αφού δημιουργήθηκαν τυφλά άκρα επανακλωνοποιήθηκε ανωδικά του cDNA της s-CLU στη θέση περιορισμού XhoI.

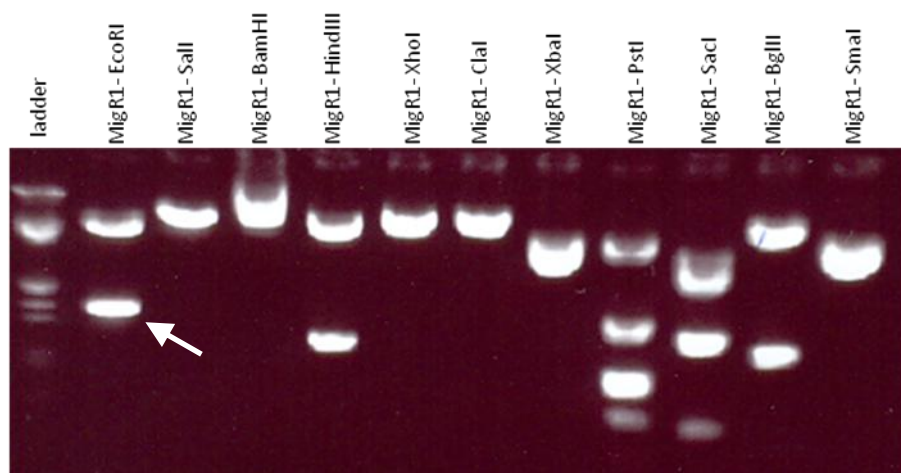
Η αλληλουχίες που αφορούν στο IRES (καφέ περιοχή) και την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (μικρή πορτοκαλί περιοχή) υπήρχαν ήδη στον πλασμιδιακό φορέα (Εικόνα 22). Η διαγονιδιακή κατασκευή που θα χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια για μικροενέσεις εξάγεται με τη χρήση του περιοριστικού ενζύμου BssHII.

3.2 Ταυτοποίηση πλασμιδιακού φορέα



Αρχικά, πραγματοποιήθηκε έλεγχος ταυτοποίησης του πλασμιδιακού φορέα MigR1- CLU, που περιλάμβανε το cDNA της CLU του ποντικού. Όπως παρατηρείται στην Εικόνα 24, η πέψη με το ένζυμο περιορισμού EcoRI οδηγεί στην απομάκρυνση της s-CLU, η οποία και εντοπίζεται σε τέτοια θέση που υποδηλώνει το μήκος της αλληλουχίας, δηλαδή 1684bp.

Εικόνα 23: Επιλεκτικές πέψεις του πλασμιδιακού φορέα



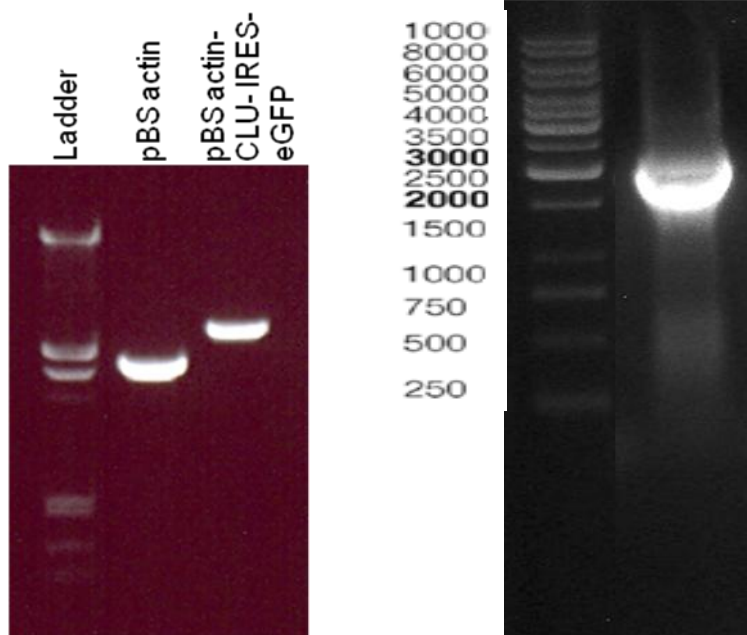
Εικόνα 24: Επιλεκτικές πέψεις του πλασμιδιακού φορέα MigR1-CLU με σκοπό την απομάκρυνση του cDNA της s-CLU (βέλος) για υποκλωνοποίηση στον πλασμιδιακό φορέα pIRES2-eGFP.

Ο πλασμιδιακός φορέας actin- CLU- IRES- eGFP πριν καθαριστεί από τις πλασμιδιακές αλληλουχίες ταυτοποιήθηκε με επιλεκτικές πέψεις με ένζυμα περιορισμού (Εικόνα 23) καθώς και με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Εικόνα 26, 27) με ειδικούς εκκινητές που σχεδιάστηκαν (Πίνακας 5), με σκοπό τον έλεγχο του προσανατολισμού καθώς και την ορθότητα της κλωνοποίησης. Από τις ζώνες που φαίνονται στο πήκτωμα ηλεκτροφόρησης διαπιστώθηκε η ορθότητα της διαγονιδιακής κατασκευής αφού προέκυψαν ζώνες αναμενόμενου μοριακού βάρους.

Πίνακας 5: Αλληλουχίες εκκινητών

MO_CLUF1_SPL	5'-GATCTTGTCTGTGGACTGTTCA-3'
MO_CLUR2_SPL	5'-CTATCTCATTCCGCACGGCTT-3'
#449	5'-TGAACCGCATCGAGCTGAAGCC-3'
#450	5'-TCCAGCAGGACCATGTGATCGC-3'





Εικόνα 25 (αριστερά): Επιλεκτικές πέψεις του πλασμιδιακού φορέα pHbApr-1-neo που φέρει τον υποκινητή της ανθρώπινης β- ακτίνης καθώς και του πλασμιδιακού φορέα

Εικόνα 26 (δεξιά): Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης με χρήση ειδικών εκκινητών CLU F1/ eGFP στον πλασμιδιακό φορέα actin- CLU- IRES- eGFP, απ' όπου και προκύπτει αναμενόμενη ζώνη 1900bp στο πήκτωμα αγαρόζης υποδηλώνοντας την επιτυχία της κλωνοποίησης της s- CLU στον πλασμιδιακό φορέα pIRES2-eGFP.



Εικόνα 27: Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης με χρήση ειδικών εκκινητών για το eGFP στον πλασμιδιακό φορέα actin- CLU- IRES- eGFP, απ' όπου και προκύπτει αναμενόμενη ζώνη 300 bp στο πήκτωμα αγαρόζης

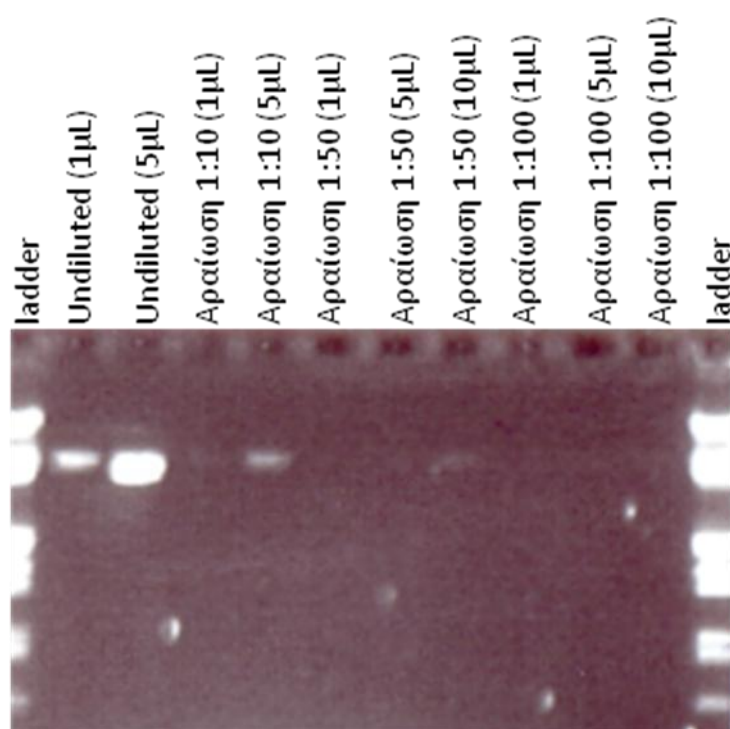
Τέλος, η διαγονιδιακή κατασκευή καθαρίστηκε από τις πλασμιδιακές αλληλουχίες του φορέα με πέψη με ένζυμο περιορισμού BssHII και έγινε σύγκριση με το πλασμίδιο απ' το

οποίο απομονώθηκε ο υποκινητής της ανθρώπινης β- ακτίνης. Αυτό που παρατηρείται στην Εικόνα 25 είναι ότι, όπως αναμενόταν το πλασμίδιο actin- CLU- IRES- eGFP διαθέτει μεγαλύτερο μοριακό βάρος και η ζώνη του εμφανίζεται ψηλότερα στο πήκτωμα αγαρόζης απ' ότι ο πλασμιδιακός φορέας του υποκινητή της β- ακτίνης. Επιπρόσθετα, διαπιστώνεται και η καθαρότητα της διαγονιδιακής κατασκευής από τυχόν προσμίξεις ή μολύνσεις.

3.3 Απομόνωση και Καθαρισμός Διαγονιδιακής Κατασκευής

Η διαγονιδιακή κατασκευή που θα χρησιμοποιηθεί για τις μικροενέσεις σε προπυρήνες ζυγωτών F2 προέκυψε ύστερα από πέψη με ένζυμο περιορισμού BssHII (Εικόνα 29). Αφού διαπιστώθηκε η καθαρότητά της ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ακολούθησε ο περαιτέρω καθαρισμός της με χρήση κολώνων καθαρισμού Elutip-d. Η διαγονιδιακή κατασκευή απαλλαγμένη

από προσμίξεις και άλατα των ρυθμιστικών διαλυμάτων αραιώνεται με σκοπό να βρεθεί η κατάλληλη συγκέντρωση για τις μικροενέσεις. Αυτό συμβαίνει, γιατί μικρής συγκέντρωσης διαγονιδιακή κατασκευή δεν θα βοηθήσει στην ενσωμάτωση στο γονιδίωμα. Από την άλλη, η διαγονιδιακή κατασκευή υψηλής συγκέντρωσης διαταράσσει την ανάπτυξη οδηγώντας στην παύση της. Οπότε ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αгарόζης διάφορες αραιώσεις της διαγονιδιακής κατασκευής (Εικόνα 28), οι οποίες και φασματοφωτομετρήθηκαν με τη χρήση Nanodrop- 2000 (βλ. 2.3.2).



Εικόνα 28: Ηλεκτροφόρηση διαφορετικών συγκεντρώσεων της διαγονιδιακής κατασκευής με σκοπό τον προσδιορισμό της κατάλληλης συγκέντρωσης για τις μικροενέσεις.



Εικόνα 29: Ηλεκτροφόρηση της πέψης BssHII του πλασμιδιακού φορέα actin-CLU- IRES- eGFP με σκοπό την απομάκρυνση των πλασμιδιακών αλληλουχιών και την προετοιμασία της διαγονιδιακής κατασκευής για μικροένεση.

Πίνακας 6: Συγκεντρώσεις διαγονιδιακής κατασκευής

Πλασμίδιο actin- CLU-IRES- eGFP 1:1		Πλασμίδιο actin- CLU-IRES- eGFP 1:10	
1 ^η μέτρηση	2 ^η μέτρηση	1 ^η μέτρηση	2 ^η μέτρηση
18,3 ng/µL	19,2 ng/µL	1,1 ng/µL	1,2 ng/µL

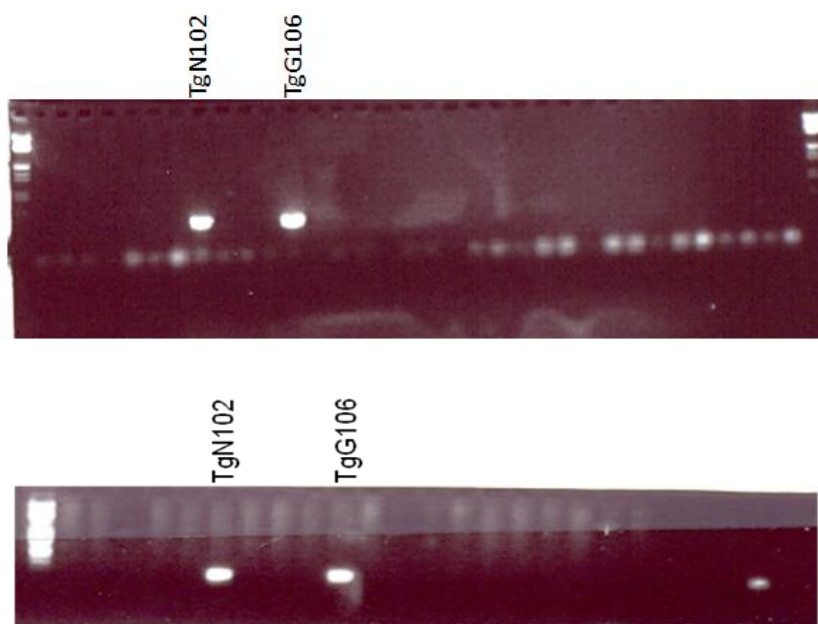
3.4 Μικροενέσεις διαλύματος DNA σε προπυρήνες ζυγωτών ποντικών

Μικροενέσεις (σε συνεργασία με τη Νάντια Καβροχωριανού και τη Σ. Χαραλάμπους, Εργαστήριο Διαγονιδιακής Τεχνολογίας, Τμήμα Ζωικών Προτύπων Βιοϊατρικής Έρευνας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ) της γονιδιακής κατασκευής πραγματοποιήθηκαν σε γονιμοποιημένα wάρια F1 ποντικών με μικτό γενετικό υπόβαθρο CBA/C57Bl/6. Σε ψευδοέγκυα F1 θηλυκά ποντίκια μεταφέρθηκαν συνολικά 193 γονιμοποιημένα wάρια, που είχαν ενεθεί με τη γονιδιακή κατασκευή actin- CLU-IRES- eGFP. Από τα wάρια που μεταφέρθηκαν, γεννήθηκαν 33 απόγονοι (Πίνακας 7).

Πίνακας 7: Αποτελέσματα μικροενέσεων σε προπυρήνες ζυγωτων	
Γονιδιακή κατασκευή	actin- CLU-IRES- eGFP
Γονιμοποιημένα wάρια που μεταφέρθηκαν σε ψευδοέγκυα θηλυκά	193
Απόγονοι που γεννήθηκαν	33
Διαγονιδιακές σειρές	TgN102, TgG106

3.5 Ταυτοποίηση ποντικών που φέρουν το διαγονίδιο

Από τα ποντίκια που γεννήθηκαν, απομονώθηκε γενωμικό DNA από βιοψία ουράς και πραγματοποιήθηκε ανάλυση PCR (Εικόνα 30). Προέκυψαν, λοιπόν, δύο ιδρυτές (founders) οι TgN102 και TgG106 που χρησιμοποιήθηκαν περαιτέρω με σκοπό τον έλεγχο της διαβίβασης του διαγονιδίου στις επόμενες γενιές.



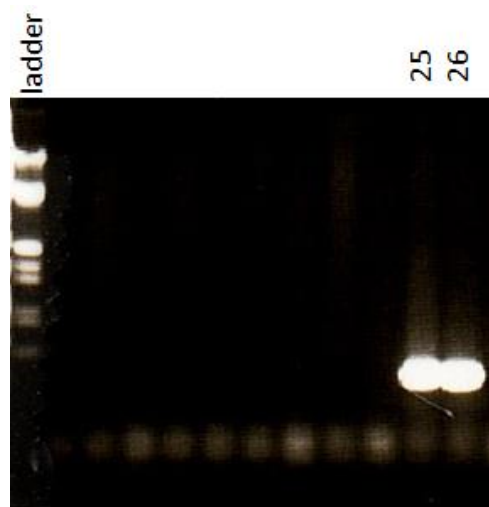
Εικόνα 30: Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης τόσο με εκκινητές CLU F1/ CLU R2 (πάνω), όσο και με εκκινητές eGFP (κάτω) που ταυτοποιούν τη δημιουργία των δύο διαφορετικών υπερεκφραστών TgN102, TgG106, που προέκυψαν ύστερα από μικροενέσεις σε προπυρήνες ζυγωτών. Στη πρώτη περίπτωση, εμφανίζεται ζώνη 392 bp και στη δεύτερη 300 bp, όπως αναμενόταν.

3.6 Έλεγχος της διαβίβασης του διαγονιδίου στις επόμενες γενιές

Ανιχνεύτηκαν δύο διαγονιδιακά ποντίκια (TgN102, TgG106). Κάθε ένα από αυτά αποτελεί τον λεγόμενο ιδρυτή (founder) της κάθε διαγονιδιακής σειράς. Όλοι οι ιδρυτές διασταυρώθηκαν με αγρίου τύπου (WT) ποντικούς, ώστε να διαπιστωθεί, εάν το γονίδιο διαβιβάζεται στους απογόνους με μενδελιανή κληρονομικότητα. Στα δείγματα από ουρές των απογόνων της πρώτης γενιάς έγινε ανάλυση PCR και φάνηκε ότι και οι δύο διαγονιδιακές σειρές που προέκυψαν με την τεχνική της διαγένεσης κληροδοτούσαν το γονίδιο στους απογόνους τους με μενδιαλιανό τρόπο (Εικόνα 31), δηλ. περίπου 50% των απογόνων τους έφεραν το διαγονίδιο (Πίνακας 8).

Πίνακας 8: Ποσοστό διαγονιδιακών ποντικών που προέκυψαν στην N1 γενιά

TgN102	TgG106
5/10	2/5
50%	40%



Εικόνα 31: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος Αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, σύμφωνα με την οποία και οι δύο διαγονιδιακές σειρές μεταβιβάζουν το διαγονίδιο στην N1 γενιά και κατά 50%. Συγκεκριμένα, στην εικόνα στα αριστερά παρουσιάζονται οι απόγονοι της σειράς TgN102, ενώ στα αριστερά οι απόγονοι της σειράς TgG106.

Λόγω του ότι οι ιδρυτές έχουν γενετικό υπόβαθρο F2 (CBA x C57BL/6) θα πρέπει μέσω ανάδρομων διασταυρώσεων (10 γενιές) να γίνει μεταφορά σε γενετικό υπόβαθρο C57BL/6.

Κεφάλαιο 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αύξηση του προσδόκιμου ζωής τα τελευταία χρόνια, έχει οδηγήσει στην εμφάνιση ασθενειών του γήρατος σε μεγαλύτερα ποσοστά συγκριτικά με το παρελθόν. Συγκεκριμένα, ασθένειες όπως καρκίνος, νευροεκφυλιστικές ασθένειες, διαβήτης τύπου II, καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν στόχο της ερευνητικής δραστηριότητας. Μέσα από την μελέτη αυτών των ασθενειών και των μηχανισμών που εμπλέκονται σε κάθε έναν από αυτούς θα μελετηθούν επιπλέον η φυσιολογική διαδικασία της γήρανσης αλλά και η μακροβιότητα ή η προγηρία στα θηλαστικά, σε περιπτώσεις συνδρόμων προγηρίας.

Η Απολιποπρωτεΐνη J/ Clusterin αποτελεί ένα μόριο με πολυπαραγοντική δράση. Χαρακτηριστικά, η CLU έχει δειχθεί ότι υπερεκφράζεται κατά τη γήρανση, χωρίς να φαίνεται ότι η υπερέκφραση αυτή σχετίζεται απόλυτα με την ηλικία, αλλά κυρίως με το οξειδωτικό φορτίο (79). Πιθανολογείται ότι, κατά τη γήρανση των ατόμων το σύνολο των οξειδωμένων πρωτεϊνών και λιπιδίων αυξάνεται, με αποτέλεσμα αυτό με τη σειρά του να ρυθμίζει θετικά την έκφραση της CLU, αφού αποτελεί ένα αξιόπιστο βιοδείκτη για την γήρανση. Αυτή η ικανότητά της οφείλεται στο ότι δρα ως μοριακή συνοδός συμμετέχοντας στη διατήρηση της πρωτεόστασης του οργανισμού (80).

Επιπρόσθετα, η CLU φαίνεται να αυξάνεται σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις των ασθενειών του γήρατος (81), υποδηλώνοντας έτσι τον κυτταροπροστατευτικό της ρόλο. Συγκεκριμένα, σε πολλά είδη κακοηθών νεοπλασιών, η CLU υπερεκφράζεται με αποτέλεσμα να μην επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα να αποπίψουν ή να ευαισθητοποιηθούν σε χημειοθεραπείες και ακτινοθεραπείες. Προς επίρρωση των ανωτέρω, μελέτες σιώπησης του μετάγραφου της s-CLU με χρήση αντινοσηματικών

⁷⁹ Trougakos IP., et al., 2006. *Reduced expression levels of the senescence biomarker clusterin/apolipoprotein j in lymphocytes from healthy centenarians*, Ann N Y Acad Sci. 1067:294-300.

⁸⁰ Trougakos IP., et al., 2009. *Chapter 9: Oxidative stress in malignant progression: The role of Clusterin, a sensitive cellular biosensor of free radicals*, Adv Cancer Res. 104:171-210.

⁸¹ Trougakos IP and Gonos ES, 2002. *Clusterin/apolipoprotein J in human aging and cancer*, Int J Biochem Cell Biol. 34(11):1430-48.

νουκλεοτιδίων (ASO) έχουν γίνει κλινικά σε καρκινικά κύτταρα προστάση σε συνδυασμό με το docetaxel και βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές φάσης II (82).

Ο ρόλος της CLU βέβαια, παρουσιάζει μία αντίφαση. Από τη μία παρουσιάζει κυτταροπροστατευτικό ρόλο, ενώ κατά άλλους έχει και προαποπτωτικό ρόλο. Ακόμη, υπάρχουν ερευνητές που δραστηριοποιούνται στο συγκεκριμένο πεδίο που υποστηρίζουν ότι η CLU αποτελεί ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο, ενώ άλλοι ερευνητές υποστηρίζουν την ογκογόνο δράση της (83). Γενικά, οι αντιδιαμετρικά αντίθετες αυτές δράσεις του μορίου ίσως να οφείλονται σε διαφορετικές ισομορφές του μορίου ή ακόμα να εξαρτώνται από τον κυτταρικό τύπο που μελετάται. Επίσης, έχει δειχθεί ότι η εκκρινόμενη CLU (sCLU) παρουσιάζει κυτταροπροστατευτικό ρόλο, ενώ η πυρηνική CLU έχει προαποπτωτική δράση. Αυτό, εντέλει, που φάνηκε να έχει σημασία είναι ο λόγος μεταξύ αυτών των δύο ισομορφών. Η παρούσα μελέτη, βέβαια, επικεντρώνεται στη μελέτη του ρόλου της τυπικής εκκρινόμενης sCLU ισομορφής.

Η δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών που εκφράζουν συστατικά το μόριο s-CLU του ποντικού θα δώσει τη δυνατότητα μελέτης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης *in vivo* σε ένα μοντέλο θηλαστικού με μεγάλη εξελικτική ομοιότητα με τον άνθρωπο. Επελέγη, η CLU του ποντικού και όχι του ανθρώπου, προς αποφυγή προβλημάτων αναγνώρισης του μορίου από τους αντίστοιχους υποδοχείς *in vivo*, αν και το μόριο παρουσιάζει μεγάλη ομοιολογία μεταξύ των οργανισμών. Μέσω του πρότυπου αυτού, θα υπάρξει, επίσης, η δυνατότητα μελέτης των αλληλεπιδράσεων του εν λόγω μορίου με άλλα καθώς και η συμμετοχή του σε σηματοδοτικά μονοπάτια. Κεφαλαιώδους σημασίας είναι και η μελέτη του ρόλου της CLU σε περιπτώσεις καρκίνων, της αλληλεπίδρασης των καρκινικών κυττάρων με τα κύτταρα του στρώματος καθώς και η μελέτη των μεταστάσεων μέσω νέων απεικονιστικών τεχνικών (2 photon microscopy).

⁸² Chi NK., et al., 2008. A phase I study of OGX-011, a 2'-methoxyethyl phosphorothioate antisense to clusterin, in combination with docetaxel in patients with advanced cancer, Clin Cancer Res.14(3):833-9.

⁸³ Sala A., et al., 2009. Regulation of CLU gene expression by oncogenes and epigenetic factors implications for tumorigenesis, Adv Cancer Res. 105:115-32.

Το προνόμιο του συγκεκριμένου πρότυπου, είναι η δυνατότητα που προσφέρει για μελέτη δύο ή και περισσότερων παραγόντων ταυτόχρονα. Αφού μπορεί κανείς να χρησιμοποιήσει άλλα ζωικά μοντέλα πρότυπα ασθενειών τα οποία και θα διασταυρωθούν με το ήδη υπάρχον πρότυπο. Για παράδειγμα, τα διαγονιδιακά ζώα, μπορούν να διασταυρωθούν τόσο με μοντέλα καρκίνου (π.χ. ηπατοκαρκίνωμα), όσο και με μοντέλα νευροεκφυλιστικών ασθενειών, όπως Alzheimer's ή μοντέλα αυτοάνοσων φλεγμονωδών νοσημάτων π.χ. ρευματοειδής αρθρίτιδα, Συστημικός Ερυθηματώδης Λύκος. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να διαλευκανθεί ο ρόλος της CLU σε κάθε πρότυπο ασθένειας.

Στην συγκεκριμένη εργασία, έχουμε προκατακτικά ευρήματα που αφορούν σε δύο διαφορετικές διαγονιδιακές σειρές (TgN102, TgG106) clusterin. Οι δύο αυτές σειρές δίδουν τη δυνατότητα διαλεύκανσης του αν ο φαινότυπος που παρουσιάζουν τα ποντίκια οφείλεται στην clusterin και όχι σε ασυνέχεια κάποιου ενδογενούς γονιδίου λόγω *in situ* ενσωμάτωσης της διαγονιδιακής κατασκευής. Αναλυτικότερα, το διαγονίδιο που σχεδιάστηκε και εξετάστηκε για τη λειτουργικότητά του και αφού υποβλήθηκε σε τεχνικές που εξασφαλίζουν υψηλή καθαρότητα, εισήχθη με μικροένεση σε προπυρήνες ζυγωτών F1 ποντικών. Προκειμένου να ταυτοποιηθούν οι απόγονοι που φέρουν το διαγονίδιο, γενωμικό DNA απομονώθηκε από βιοψία ουράς και εξετάστηκε με PCR. Από τους 10 απογόνους στους οποίους ανιχνεύθηκε το διαγονίδιο, οι 5 το διαβίβαζαν στους απογόνους τους με μενδελιανό τρόπο. Αυτοί αποτέλεσαν και τους ιδρυτές των διαγονιδιακών σειρών. Ο φαινότυπος των υπερεκφραστών φαίνεται μέχρι τώρα να είναι φυσιολογικός σε συμφωνία με άλλες μελέτες, σύμφωνα με τις οποίες δημιουργήθηκαν διαγονιδιακά ποντίκια που υπερέκφραζαν την CLU στα κύτταρα των φωτοϋποδοχέων του ματιού με σκοπό την μελέτη της απόπτωσης στους νευρώνες. Αυτό που αποδείχθηκε είναι ο κυτταροπροστατευτικός ρόλος της CLU, αφού η CLU δεν εμπλέκεται στους αποπτωτικούς μηχανισμούς των

φωτοϋποδοχέων του ματιού (84). Επιπρόσθετα, η δημιουργία ελλειμματικών για την CLU ποντικών (CLU-/-) δεν έδειξε την ύπαρξη κάποιου φαινοτύπου, αφού μετά από ιστολογικές μελέτες τα ελλειμματικά ποντίκια ήταν φυσιολογικά (85). Τα actin-CLU ποντίκια που δημιουργήθηκαν και θα χρησιμοποιηθούν ως πρότυπα μελέτης θα πρέπει να βρίσκονται σε αμιγές C57Bl6 γενετικό υπόβαθρο μέσω ανάδρομων διασταυρώσεων των διαγονιδιακών ποντικών που έχουν μικτό γενετικό υπόβαθρο (CBA/C57BL6), με ποντίκια που είναι αμιγώς C57Bl6.

Μελλοντικοί στόχοι της παρούσας διατριβής, αποτελούν η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός των διαγονιδιακών σειρών τόσο σε μεταγραφικό επίπεδο, όσο και σε μεταφραστικό καθώς και η δημιουργία ιστοειδικών διαγονιδιακών ζώων (π.χ. ήπαρ και πάγκρεας) για τη μελέτη παθολογιών που αφορούν στα συγκεκριμένα όργανα. Τέλος, η διασταύρωση του εν λόγω προτύπου με άλλα πρότυπα ασθενειών αποτελεί έναν από τους άμεσους στόχους μας.

⁸⁴ Jomary C., et al., 1999. *Effect of targeted expression of clusterin in photoreceptor cells on retinal development and differentiation*, J Cell Sci. 112 (Pt 10):1455-64.

⁸⁵ McLaughlin L., et al., 2000. *Apolipoprotein J/clusterin limits the severity of murine autoimmune myocarditis*, J Clin Invest. 2000 106(9):1105-13.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alaupovic P., 1982. *The role of Apolipoproteins in lipid transport Processes*, La Ricerca Clin. Lab 12, 3.
- Alberts et al., 2002. *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, New York.
- Alexopoulos EC., et al., 2008. *Biological monitoring of hexavalent chromium and serum levels of the senescence biomarker apolipoprotein J/Clusterin in welders*, Bioinorg Chem Appl. 420578.
- Aronis KN., et al., 2011. *Clusterin (apolipoprotein J): wither link with diabetes and cardiometabolic risk?*, Metabolism. 60(6):747-8.
- Balantinou E., 2009. *Transcriptional and posttranscriptional regulation of clusterin by the two main cellular proteolytic pathways*, Free Radic Biol Med. 1;46(9):1267-74.
- Bettuzzi S., et al., 2009. *Genetic inactivation of ApoJ/clusterin: effects on prostate tumourigenesis and metastatic spread*, Oncogene.28(49):4344-52.
- Blaschuk O., et al., 1983. *Purification and Charecterization of a Cell- aggregating Factor (Clusterin), the Major Glycoprotein in Ram Rete Testis Fluid*, The Journal of Biological Chemistry 258 (12): 7714-7720
- Chi NK., et al., 2008. *A phase I study of OGX-011, a 2'-methoxyethyl phosphorothioate antisense to clusterin, in combination with docetaxel in patients with advanced cancer*, Clin Cancer Res.14(3):833-9.
- Collard MW, Griswold MD, 1987. *Biosynthesis and molecular cloning of sulfated glycoprotein 2 secreted by rat Sertoli cells*, Biochemistry 16;26(12):3297-303.
- Criswell T., et al., 2005. *Delayed activation of insulin-like growth factor-1 receptor/Src/MAPK/Egr-1 signaling regulates clusterin expression, a pro-survival factor*, J Biol Chem. 280(14):14212-21.
- Cui Xu et al., 2004. *D-galactose-caused life shortening in Drosophila melanogaster and Musca domestica is associated with oxidative stress*, Biogerontology 5(5):317-25.
- De Groot PG et al., 2011. *β(2) -Glycoprotein I: evolution, structure and function*, J Thromb Haemost. [Epub ahead of print]
- De Silva, et al., 1990. *Purification and characterization of apolipoprotein J*, J Biol Chem. 25;265(24):14292-7.
- Devauchelle V., et al., 2006. *Characterization and functional consequences of underexpression of clusterin in rheumatoid arthritis*, J Immunol. 177(9):6471-9.
- Falgarone G., and Chocchia Gilles, 2009. *Chapter 8: Clusterin: A multifacet protein at the crossroad of inflammation and autoimmunity*, Adv Cancer Res. 104:139-70.
- Finch CE and Tanzi RE., 1997. *Genetics of ageing*, Science 278(5337):407-11.

- French LE, 1993. Murine clusterin: molecular cloning and mRNA localization of a gene associated with epithelial differentiation processes during embryogenesis, *J Cell Biol.* 122(5):1119-30.
- Goetz EM, et al., 2011. ATM-dependent IGF-1 induction regulates secretory clusterin expression after DNA damage and in genetic instability, *Oncogene*. [Epub ahead of print]
- Guang Y. Wen and Jing Chen, 2004. Scanning Electron Microscopy of the Infundibulum, Ampulla and Eggs of Mice, *Comparative Medicine* Vol 54, No. 5, pp. 543-548.
- Hamada N., et al., 2010. Loss of clusterin limits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice via reduced expression of Egr-1 and TNF- α , *J Atheroscler Thromb.* 18(3):209-16.
- Hough CD, et al., 2001. Coordinately up-regulated genes in ovarian cancer, *Cancer Res.* 61(10):3869-76.
- Jenne D., et al., 1989. Molecular structure and functional characterization of a human complement cytotoxic inhibitor found in blood and seminal plasma: identity to sulfated glycoprotein 2, a constituent of rat testis fluid, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(18):7123-7.
- Jin G., 1997. Regulation of clusterin gene expression by transforming growth factor beta, *J Biol Chem.* 17;272(42):26620-6.
- Jomary C., et al., 1999. Effect of targeted expression of clusterin in photoreceptor cells on retinal development and differentiation, *J Cell Sci.* 112 (Pt 10):1455-64.
- Jones SE, et al., 2002. Clusterin, *Int J Biochem Cell Biol.* 34(5):427-31.
- Kadomatsu, K., et al., 1993. Expression of sulfated glycoprotein 2 is associated with carcinogenesis induced by N-nitroso-N-methylurea in rat prostate and seminal vesicle, *Cancer Res.* 53(7):1480-3.
- Kim N., et al., 2011. Human nuclear clusterin mediates apoptosis by interacting with Bcl-XL through C-terminal coiled coil domain, *J Cell Physiol.* [Epub ahead of print]
- Kirschbaum et al., 1989. Molecular cloning and characterization of the novel, human complement-associated protein, SP-40,40: a link between the complement and reproductive systems, *EMBO J.* 1989 Mar;8(3):711-8.
- Kumar S, et al., 1993. Expression of messenger RNAs for complement inhibitors in human tissues and tumors, *Cancer Res.* 53(2):348-53.
- Lagor W., et al., 2009. Overexpression of Apolipoprotein F reduces HDL cholesterol levels in vivo, *Arterioscler Thromb Vasc. Biol* 29 (1):40-46

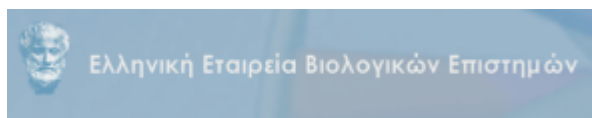
- Lambert JC., et al., 2009. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease, *Nat Genet.* 41(10):1094-9.
- Leger JG et al., 1987. Characterization and cloning of androgen-repressed mRNAs from rat ventral prostate, *Biochem Biophys Res Commun.* 31;147(1):196-203.
- Lemansky P., et al., 1999. Subcellular distribution, secretion, and posttranslational modifications of clusterin in thyrocytes, *Exp Cell Res.* 251(1):147-55.
- Lourda M., et al., 2006. Development of resistance to chemotherapeutic drugs in human osteosarcoma cell lines largely depends on up-regulation of Clusterin/Apolipoprotein J, *Int J Cancer.*120(3):611-22
- Lund P., et al., 2006. Oncogenic HRAS suppresses clusterin expression through promoter hypermethylation, *Oncogene* 10;25(35):4890-903.
- May PC., et al., 1992. Sulfated glycoprotein 2: new relationships of this multifunctional protein to neurodegeneration, *Trends Neurosci.* 15(10):391-6.
- McLaughlin L., et al., 2000. Apolipoprotein J/clusterin limits the severity of murine autoimmune myocarditis, *J Clin Invest.* 2000 106(9):1105-13.
- Michael W. King, Ph.D , IU School of Medicine (<http://themedicalbiochemistrypage.org/home.html>)
- Mishra VK., et al., 2011. Structure and lipid interactions of an anti-inflammatory and anti-atherogenic 10-residue class G(*) apolipoprotein J peptide using solution NMR, *Biochim Biophys Acta.* 1808(1):498-507. Epub 2010 Oct 21.
- Miyake H, et al., 2000. Antisense TRPM-2 oligodeoxynucleotides chemosensitize human androgen-independent PC-3 prostate cancer cells both in vitro and in vivo, *Clin Cancer Res.* 6(5):1655-63.
- Miyake H., et al., Resistance to cytotoxic chemotherapy-induced apoptosis in human prostate cancer cells is associated with intracellular clusterin expression, *Oncol Rep.* 10(2):469-73.
- Murphy BF., et al., 1988. SP-40,40, a newly identified normal human serum protein found in the SC5b-9 complex of complement and in the immune deposits in glomerulonephritis, *J Clin Invest.* 81(6):1858-64.
- Nagy A., et al., 2003. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Nuutinen T., et al., 2009. Clusterin: a forgotten player in Alzheimer's disease, *Brain Res Rev.* 61(2):89-104.
- Pajak B., 2009. Regulation of Clusterin Activity by Calcium, *Adv Cancer Res.* 104:33-58.
- Parczyk K, et al., 1994. Gp80 (clusterin; TRPM-2) mRNA level is enhanced in human renal clear cell carcinomas, *J Cancer Res Clin Oncol.* 120(3):186-8.
- Patsch W. and Gotto A., 1996. Apolipoproteins: Pathophysiology and Clinical Implications, *Methods in Enzymology*, vol. 263.

- Petropoulou C., et al., 2001. Clusterin/apolipoprotein J is a novel biomarker of cellular senescence that does not affect the proliferative capacity of human diploid fibroblasts, *FEBS Lett.* 509(2):287-97.
- Poon S., et al., 2000. Clusterin is an ATP-independent chaperone with very broad substrate specificity that stabilizes stressed proteins in a folding-competent state, *Biochemistry.* 39(51):15953-60.
- Redondo M, et al., 2000. Overexpression of clusterin in human breast carcinoma, *Am J Pathol.* 157(2):393-9.
- Russell W.M.S. and Burch R.L., 1992. *Principles of Human Experimental Technique*, Universities Federation for Animal Welfare.
- Sala A., et al., 2009. Regulation of CLU gene expression by oncogenes and epigenetic factors implications for tumorigenesis, *Adv Cancer Res.* 105:115-32.
- Santilli G., et al., 2003. Essential requirement of apolipoprotein J (clusterin) signaling for I κ B expression and regulation of NF- κ B activity, *J Biol Chem.* 278(40):38214-9. Epub 2003 Jul 25.
- Scaltriti M, et al., 2004. Clusterin (SGP-2, ApoJ) expression is downregulated in low- and high-grade human prostate cancer, *Int J Cancer.* 108(1):23-30.
- Sensibar JA., et al., 1995. Prevention of cell death induced by tumor necrosis factor alpha in LNCaP cells by overexpression of sulfated glycoprotein-2 (clusterin), *Cancer Res.* 1;55(11):2431-7.
- Shannan B., et al., 2006. Challenge and promise: roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer, *Cell Death Differ.* 13(1):12-9.
- Syntichaki P, Tavernarakis N., 2006. Signaling pathways regulating protein synthesis during ageing, *Exp Gerontol.* 41(10):1020-5.
- Thomas-Salgar et al., 1994. Clusterin expression in differentiating smooth muscle cells, *J Biol Chem.* 8;269(27):17879-85.
- Thomas-Tikhonenko A, et al., 2004. Myc-transformed epithelial cells down-regulate clusterin, which inhibits their growth in vitro and carcinogenesis in vivo, *Cancer Res.* 64(9):3126-36.
- Troen BR., 2003. The biology of ageing, *Mt Sinai J Med.* 70(1):3-22.
- Trougakos IP and Gonos ES, 2002. Clusterin/apolipoprotein J in human aging and cancer, *Int J Biochem Cell Biol.* 34(11):1430-48.
- Trougakos IP and Gonos ES. 2006. Regulation of clusterin/apolipoprotein J, a functional homologue to the small heat shock proteins, by oxidative stress in ageing and age-related diseases, *Free Radic Res.* 40(12):1324-34.
- Trougakos IP, et al., 2009. Advances and challenges in basic and translational research on clusterin, *Cancer Res.* 69(2):403-6.
- Trougakos IP., et al., 2002. Serum levels of the senescence biomarker clusterin/apolipoprotein J increase significantly in diabetes type II and during development of coronary heart disease or at myocardial infarction, *Exp Gerontol.* 37(10-11):1175-87.

- Trougakos IP., et al., 2006. Reduced expression levels of the senescence biomarker clusterin/apolipoprotein j in lymphocytes from healthy centenarians, *Ann N Y Acad Sci.* 1067:294-300.
- Trougakos IP., et al., 2009. Chapter 9: Oxidative stress in malignant progression: The role of Clusterin, a sensitive cellular biosensor of free radicals, *Adv Cancer Res.* 104:171-210.
- Trougakos IP., et al., 2009. Intracellular clusterin inhibits mitochondrial apoptosis by suppressing p53-activating stress signals and stabilizing the cytosolic Ku70-Bax protein complex, *Clin Cancer Res.* 15(1):48-59.
- Van ES MA, et al., 2009. Alzheimer's disease beyond APOE, *Nat Genet.* 41(10):1047-8.
- Wellmann A, et al., 2000. Detection of differentially expressed genes in lymphomas using cDNA arrays: identification of clusterin as a new diagnostic marker for anaplastic large-cell lymphomas, *Blood.* 96(2):398-404.
- Wilson MR and Easterbrook-Smith SB, 1992. Clusterin binds by a multivalent mechanism to the Fc and Fab regions of IgG, *Biochim Biophys Acta.* 1159(3):319-26.
- Wong, P., et al., 1994. Molecular characterization of human TRPM-2/clusterin, a gene associated with sperm maturation, apoptosis and neurodegeneration, *Eur J Biochem.* 1;221(3):917-25.
- Xie MJ, et al., 2002. Expression of clusterin in human pancreatic cancer, *Pancreas.* 25(3):234-8.
- Zhang H., et al., Clusterin inhibits apoptosis by interacting with activated Bax, *Nat Cell Biol.* 7(9):909-15.
- Zhang LY, et al., 2003. Loss of clusterin both in serum and tissue correlates with the tumorigenesis of esophageal squamous cell carcinoma via proteomics approaches, *World J Gastroenterol.* 9(4):650-4.
- Zhou Jun-Wei, et al., 2011. Apolipoprotein M Gene (APOM) Polymorphism modifies Metabolic and Disease Traits in Type 2 Diabetes, *PLoS ONE* 24;6(2)
- Zoubeydi A., et al., 2010. Clusterin facilitates COMMD1 and I-kappaB degradation to enhance NF-kappaB activity in prostate cancer cells, *Mol Cancer Res.* 2010 8(1):119-30.
- Zoubeydi A., et al., 2010. Targeting the cytoprotective chaperone, clusterin, for treatment of advanced cancer, *Clin Cancer Res.* 16(4):1088-93.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ



1. **Ιωάννης Ν. Γρίβας**, Νάντια Καβροχωριανού, Ερα Ταουφίκ, Σύλβα Χαραλάμπους και Ιωάννης Π. Τρουγκάκος, ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ J/CLUSTERIN, 32^ο ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ, ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ, ΚΑΡΠΕΝΗΣΙ ΕΥΡΥΤΑΝΙΑΣ, ΕΛΛΑΔΑ, 2010.



ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

1. **Ioannis N. Grivas**, Nadia Kavrochorianou, Era Taoufik, Sylva Haralambous and Ioannis P. Trougakovs, Clusterin/Apolipoprotein J in ageing and cancer: towards the establishment of CLU transgenic mice, Training School "High-throughput screens in genome integrity and cancer", University of Oxford, UK, 2010.



2. **Ioannis N. Grivas**, Nadia Kavrochorianou, Era Taoufik, Vassilis Gorgoulis, Sylva Haralambous and Ioannis P. Trougakovs, Establishment of transgenic mice for the molecular chaperone Clusterin/Apolipoprotein J, a biomarker of ageing and carcinogenesis, 3rd Genomic Instability Workshop, European Institute of Oncology (IEO), Milan, Italy, 2011.