



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών



IIBEA
ΙΔΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ
ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ

Διπλωματική Εργασία

Μηχανισμοί ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης σε κύτταρα θηλαστικών

Ιωάννα Πολυδούρη

A.M. 41712

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Δημήτριος Στραβοπόδης, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας Κυττάρου & Ανάπτυξης,
ΕΚΠΑ (**Επιβλέπων Καθηγητής**)

Δημήτρης Θάνος, Ακαδημαϊκός, Ερευνητής Α' (IIBEA)

Ισιδώρα Παπασιδέρη, Καθηγήτρια Κυτταρικής & Αναπτυξιακής Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης:

Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Βιολογίας

1. ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	Περιεχόμενα	5
2.	Περίληψη	9
3.	Εισαγωγή.....	11
3.1.	Το ευκαρυωτικό γονιδίωμα- Η χρωματίνη.....	11
3.2.	Η μεταγραφή στα ευκαρυωτικά συστήματα.....	12
3.3.	Η μεταγραφική ρύθμιση	16
3.3.1.	Γενικές αρχές μεταγραφικής ρύθμισης.....	16
3.3.2.	Μεταγραφική ρύθμιση στους ευκαρυώτες	18
3.4.	Επαναπρογραμματισμός διαφοροποιημένων κυττάρων σε πολυδύναμα .	21
3.4.1.	Ανάπτυξη, κυτταρική διαφοροποίηση και επαναπρογραμματισμός.....	21
3.4.2.	Τρόποι επίτευξης επαναπρογραμματισμού διαφοροποιημένων κυττάρων σε πολυδύναμα	24
3.4.3.	Στοχαστικότητα κυτταρικού επαναπρογραμματισμού	25
3.4.4.	Τα στάδια του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού	26
3.4.5.	Η δράση των OSKM παραγόντων.....	29
3.4.6.	Το επαγόμενο δίκτυο των 9 μεταγραφικών παραγόντων	30
3.4.6.1.	Ο μεταγραφικός παράγοντας Ono1.....	32
4.	Σκοπός της εργασίας-Πειραματική προσέγγιση.....	34
5.	Υλικά και μέθοδοι.....	37
5.1.	Συνθήκες καλλιέργειας και αποθήκευσης κυττάρων	37
5.1.1.	Συνθήκες επώασης και θρεπτικό καλλιεργητικό μέσο	37
5.1.2.	Διείρεση καλλιέργειας σε υποκαλλιέργειες	37
5.1.3.	Πάγωμα κυττάρων και αποθήκευση.....	37
5.2.	Πρωτογενείς καλλιέργειες και κυτταρικές σειρές	38
5.2.1.	Εμβρυονικοί ινοβλάστες ποντικού (Mouse Embryonic Fibroblasts, MEFs)	38
5.2.2.	Απομόνωση εμβρυονικών ινοβλαστών ποντικού.....	38
5.2.3.	Δημιουργία υποστηρικτικών κυττάρων (Feeders).....	39
5.2.4.	Εμβρυονικοί ινοβλάστες ποντικού Col1a1-TetO-OSKM ("4F2").....	39
5.2.5.	Επιθηλιακά κύτταρα εμβρυϊκού νεφρού, HEK293T	40
5.3.	Το λεντι-ικό σύστημα μεταφοράς.....	40

5.3.1.	Τα πλασμίδια του συστήματος μεταφοράς	40
5.3.2.	Διαδικασία κατασκευής λεντι-ικών σωματιδίων	43
5.4.	Κλωνοποίηση υποψήφιων ρυθμιστικών περιοχών DNA	44
5.4.1.	Οι περιοχές που μελετήθηκαν	44
5.4.2.	Διαδικασία κλωνοποίησης περιοχών μελέτης.....	45
i.	Σχεδιασμός εκκινητών	45
ii.	Αντίδραση PCR	48
iii.	Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR	48
iv.	Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης	49
v.	Πέψη των προϊόντων PCR και του πλασμιδίου-φορέα	49
vi.	Ηλεκτροφόρηση του φορέα και απομόνωση, καθαρισμός των δειγμάτων	49
vii.	Αποφωσφορυλίωση του φορέα	50
viii.	Αντίδραση συγκόλλησης άκρων (ligation)	50
ix.	Μετασχηματισμός βακτηρίων (transformation)	50
x.	Μεταφορά αποικιών σε υγρή καλλιέργεια	51
xi.	Απομόνωση πλασμιδίου μικρής κλίμακας με αλκαλική λύση βακτηρίων (Mini-prep)	51
xii.	Διαγνωστική πέψη και ηλεκτροφόρηση πλασμιδίων	53
xiii.	Απομόνωση πλασμιδίων σε μεσαία κλίμακα (midi-prep)	53
5.5.	Βασικές μοριακές τεχνικές	53
5.5.1.	Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων	53
5.5.2.	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	54
i.	Συμβατική PCR	54
ii.	PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT PCR)	54
iii.	Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Real-time qPCR)	55
5.5.3.	Καθαρισμός νουκλεϊκών οξέων με διάλυμα φαινόλης-χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη	59
5.5.4.	Απομόνωση DNA από κυτταροκαλλιέργεια (DNA extraction)	60
5.5.5.	Απομόνωση RNA από κυτταροκαλλιέργεια (RNA extraction)	60
5.6.	Επαναπρογραμματισμός εμβρυϊκών ινοβλαστών ποντικού	61
5.7.	Χαρακτηρισμός ενεργότητας υποψήφιων ενισχυτών κατά τον επαναπρογραμματισμό	64
5.7.1.	Ανίχνευση προτύπου ενεργότητας με χρήση γονιδίου αναφοράς (δοκιμασία αναφοράς, reporter assay)	64

5.7.2.	Κυτταρομετρία ροής και διαχωρισμός κυτταρικών πληθυσμών (FACS) ..	65
5.8.	Χρώση με υπόστρωμα αλκαλικής φωσφατάσης (AP staining)	67
5.9.	Πείραμα ανοσοφθορισμού σε κυτταροκαλλιέργεια	69
5.10.	Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (Chromatin ImmunoPrecipitation, ChIP).	71
5.11.	Απομόνωση RNA για RNA-seq.....	78
5.12.	Αλληλούχηση Επόμενης Γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS)- ChIP- seq και RNA-seq	78
5.12.1.	ChIP-seq και RNA-seq	78
5.12.2.	Βιοπληροφορική ανάλυση RNA-seq δεδομένων.....	82
5.12.3.	Βιοπληροφορική ανάλυση ChIP-seq δεδομένων.....	84
6.	Αποτελέσματα	85
6.1.	Αναζήτηση cis ρυθμιστικών στοιχείων της έκφρασης του Ovol1 κατά τον επαναπρογραμματισμό.....	85
6.1.1.	Δοκιμασία αναφοράς (reporter assay) για τις βασικές ελλείψεις της -3kb περιοχής του Ovol1 και σύγκριση της έκφρασης ενδογενούς/εξωγενούς γονιδίου	85
6.1.2.	Cell sorting και replating σε Ovol1 1kb MEFs 4F2 την Ημέρα 6 του επαναπρογραμματισμού	91
6.1.3.	Reporter assay για υποπεριοχές της 1kb περιοχής	93
6.1.4.	Ανοσοφθορισμός σε κύτταρα MEFs 4F2-Ovol1 1kb την Ημέρα 6 του επαναπρογραμματισμού	96
6.2.	Διερεύνηση του ρόλου του Ovol1 ως μεταγραφικού παράγοντα στη διαδικασία του επαναπρογραμματισμού	96
6.2.1.	RNA-seq για τη διερεύνηση του ρόλου του Ovol1 στο μεταγράφημα επαναπρογραμματιζόμενων κυττάρων	97
6.2.2.	ChIP-seq με στόχο τον Ovol1.....	104
7.	Συζήτηση	116
8.	Βιβλιογραφία	123

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, στο εργαστήριο του κ. Δημήτρη Θάνου. Πρώτα και κύρια λοιπόν, ευχαριστώ τον κ. Θάνο που με δέχτηκε στην ομάδα του και μου επέτρεψε να εκπαιδευτώ και να δουλέψω σε ένα σύγχρονο και ανταγωνιστικό εργαστήριο μοριακής βιολογίας.

Ευχαριστώ επίσης θερμά τον κ. Δημήτριο Στραβοπόδη για την επίβλεψη της εργασίας και την προθυμία του να συζητήσει μαζί μου προβληματισμούς και προβλήματα επιστημονικής ή μη φύσεως, ώστε να βρεθούν οι καταλληλότερες λύσεις και απαντήσεις.

Ευχαριστώ εκ βάθρων τον υποψήφιο διδάκτορα και κυρίως ειπείν δάσκαλο και συνεργάτη μου σε αυτή την προσπάθεια, Δημήτρη Βαλάκο, για την υπομονή του να αναλάβει την τεχνική κατάρτισή μου, αλλά και για την εμπιστοσύνη του να μοιραστεί μαζί μου ένα κομμάτι της δικής του εργασίας. Είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων για την καθοδήγηση αλλά και την ελευθερία κινήσεων που μου παρείχε, τις συζητήσεις και τη γενναιοδωρία του να μοιραστεί τις ιδέες του, την υπομονή του να απαντά σε ερωτήσεις αλλά και την ψυχραιμία του στις δυσκολίες και τις αναποδιές που ενσκήπτουν ενίοτε και αναπόφευκτα στην εργαστηριακή πρακτική.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην Κατερίνα Βασσάκη, για την καλή συνεννόηση και τη συνεργασία που είχαμε όλη αυτή τη χρονιά. Ευχαριστώ επίσης τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, και ιδιαίτερα την Ελευθερία Κλάγκου και τον Γιώργο Παναγόπουλο, που ήταν πάντα πρόθυμοι να με βοηθήσουν και να με συμβουλευσουν όποτε τους το ζητούσα. Ευχαριστώ την Ντέπη Παπαδοπούλου, για τις όμορφες συζητήσεις μας, τις πολύτιμες συμβουλές της αλλά κυρίως για τη ζωντάνια που δίνει στην καθημερινή ρουτίνα του εργαστηρίου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον κ. Στρατή Βαλάκο για τη στήριξη και τις συμβουλές του όλα τα χρόνια από τη θητεία μου στον προπτυχιακό κύκλο σπουδών του Βιολογικού μέχρι σήμερα, καθώς και για την προτροπή του να στραφώ στο εργαστήριο του κ. Θάνου για την εκπόνηση αυτής της εργασίας.

2. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Κυτταρικός επαναπρογραμματισμός είναι η στοχαστική διαδικασία μετατροπής σχεδόν οποιουδήποτε κυτταρικού τύπου σε επαγόμενα βλαστικά κύτταρα (induced Pluripotent Stem Cells, iPSCs), μέσω της εξωγενούς υπερέκφρασης 4 μεταγραφικών παραγόντων, των Oct4, Sox2, Klf4 και c-Myc (OSKM παράγοντες). Προηγούμενη έρευνα στο εργαστήριο αποκάλυψε την ενεργοποίηση ενός δικτύου εννιά (9) μεταγραφικών παραγόντων, το οποίο αν συγκροτηθεί μέχρι την ημέρα 6 του επαναπρογραμματισμού αυξάνει σημαντικά την πιθανότητα ανάκτησης της πολυδυναμίας. Στόχος της ανά χείρας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη ενός εκ των μεταγραφικών παραγόντων του δικτύου, του Ovol1, τόσο ως προς τη ρύθμιση της δικής του έκφρασης στα πλαίσια της διαδικασίας, όσο και ως προς το ρόλο του ως ρυθμιστή της γονιδιακής έκφρασης κατά τον επαναπρογραμματισμό. Για τον πρώτο σκοπό, μελετήσαμε τη συμπεριφορά υποψήφιων ρυθμιστικών περιοχών κατά τον επαναπρογραμματισμό με χρήση γονιδίου αναφοράς (GFP). Αποδείξαμε ότι η περιοχή 1kb ανοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου, ενεργοποιείται σε συμφωνία με το πρότυπο έκφρασης του ενδογενούς γονιδίου και μάλιστα ειδικά στα κύτταρα που προορίζονται να επαναπρογραμματιστούν επιτυχώς. Στη συνέχεια, προς επίρρωση αυτού του ευρήματος, με κυτταρομετρία ροής διαχωρίσαμε από τον επαναπρογραμματιζόμενο κυτταρικό πληθυσμό τα κύτταρα εκείνα που είχαν ενεργή την 1kb περιοχή και διαπιστώσαμε πως τα κύτταρα αυτά παρουσίαζαν αυξημένη αποτελεσματικότητα επαναπρογραμματισμού σε σχέση με τα υπόλοιπα. Συμπερασματικά, προσδιορίστηκε η ύπαρξη ενός ενισχυτή στην περιοχή 1kb άνωθεν του σημείου έναρξης της μεταγραφής, ο οποίος ελέγχει την έκφραση του Ovol1 κατά τον επαναπρογραμματισμό και του οποίου η ενεργοποίηση αυξάνει την πιθανότητα για επιτυχή επαναπρογραμματισμό. Για τον δεύτερο σκοπό, πραγματοποιήσαμε πειράματα αλληλούχησης DNA νέας γενιάς μετά από ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (ChIP-seq) έναντι του Ovol1, και αλληλούχηση RNA επόμενης γενιάς (RNA-seq) σε κύτταρα με ενεργή την 1kb περιοχή την Ημέρα 6 του επαναπρογραμματισμού και σε κύτταρα με ανενεργή την περιοχή. Τα αποτελέσματα των RNA-seq πειραμάτων επιβεβαιώνουν την ύπαρξη ενισχυτή στην 1kb περιοχή. Επιπλέον, υποστηρίζουν πως η υπερέκφραση του Ovol1, ως αποτέλεσμα της δράσης του ενισχυτή, αυξάνει την πιθανότητα ανάκτησης της πολυδυναμίας, μέσω της αποτελεσματικότερης ρύθμισης της MET. Τέλος, τα ChIP-seq πειράματα αποκάλυψαν πως η πρόσδεση του Ovol1 στους γονιδιακούς του στόχους την Ημέρα 6 του επαναπρογραμματισμού γίνεται με συνεργατική πρόσδεση με έναν άλλον μεταγραφικό παράγοντα του δικτύου των 9, τον Tead4, ο οποίος είναι προσδεδεμένος στις θέσεις αυτές ήδη πριν από την επαγωγή της διαδικασίας.

ABSTRACT

Cellular reprogramming of somatic cells to induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) is a stochastic process accomplished by the exogenous expression of the transcription factors Oct3/4, Sox2, Klf4 and c-Myc. Prior experimental work in our lab has discovered the assembly of a 9-transcription factor network (9 TR network), which if assembled until the 6th day of reprogramming, helps increase the probability of successful reprogramming. The goal of this study is to investigate the role of one of the transcription factors of the 9-TR network, namely Ovol1, and the ways in which its expression is regulated during the process. At first, we examined the activation of putative regulatory regions of the Ovol1 gene during reprogramming through reporter assays, and we found that the activation profile of the 1kb region upstream of the transcription start site follows the expression profile of the endogenous gene. This 1kb region was being activated in cell subpopulations, which had increased the probability for pluripotency retrieval. In order to confirm this observation, we divided the cell culture at Day 6 of reprogramming into two subpopulations, according to the state of 1kb region- active or inactive. We found that cells with active 1kb region were being more efficiently reprogrammed. Our results show that 1kb region upstream of the transcription start site acts as an enhancer of the Ovol1 gene during reprogramming, and that its activation upregulates the efficiency of the process. Secondly, in order to study the role of Ovol1 at reprogramming, we carried out ChIP-seq and RNA-seq experiments, targeting Ovol1, at days 0 and 6 of the process in cell subpopulations, again for active and inactive 1kb region. Our results from RNA-seq experiments confirm the existence of an enhancer in this 1kb region. They also support that upregulation of Ovol1 has a positive effect on reprogramming efficiency by regulating more efficiently the MET procedure. Finally, ChIP-seq results reveal that Ovol1 binds synergistically with Tead4 on its target genes and that most of the Ovol1 target genes are already occupied by Tead4 at Day 0.

3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

3.1. Το ευκαρυωτικό γονιδίωμα- Η χρωματίνη

Το ευκαρυωτικό γονιδίωμα είναι οργανωμένο σε γραμμικά μόρια DNA, τα **χρωμοσώματα**. Τα χρωμοσώματα δεν αποτελούνται από γυμνό DNA, αλλά από το σύμπλοκο του DNA με τις **ιστόνες** και άλλες μη ιστονικές πρωτεΐνες και RNA, μια δομή που καλείται ως **χρωματίνη**. Οι ιστόνες είναι ειδικές, πυρηνικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην οργάνωση του DNA στον πυρήνα των ευκαρυωτικών κυττάρων· πρόκειται για μια εξαιρετικά συντηρημένη ομάδα πρωτεϊνών, πλούσιες στα θετικά φορτισμένα αμινοξέα λυσίνη και αργινίνη και γι' αυτό ιδανικές για αλληλεπιδράσεις με το αρνητικά φορτισμένο DNA. Υπάρχουν 5 τύποι ιστονών: H1, H2A, H2B, H3, H4, οι 4 εκ των οποίων συνεργάζονται για να σχηματίσουν την βασική δομική μονάδα της χρωματίνης, το **νουκλεόσωμα**. Το νουκλεόσωμα είναι μια σφαιρική δομή που συγκροτείται από δύο αντίγραφα κάθε μιας από τις ιστόνες H2A, H2B, H3, H4 (οκταμερές ιστονών) και λειτουργεί σαν μοριακή κουβαρίστρα, γύρω από την οποία τυλίγεται DNA μήκους 146 ζευγών βάσεων (base pairs, bp). Το DNA μεταξύ δύο συναπτών νουκλεοσωμάτων ονομάζεται συνδετικό και σε αυτό προσδένεται η H1 ιστόνη, η οποία συμβάλλει στη σταθερότητα και τη διατήρηση της εγγύτητας των νουκλεοσωμάτων. Η γραμμική αλυσίδα του νουκλεοσωμικού DNA περιελίσσεται γύρω από έναν νοερό άξονα, σχηματίζοντας τελικά μια σωληνοειδή δομή διαμέτρου 30nm. Αυτή είναι η τυπική δομή του DNA μέσα στον ευκαρυωτικό πυρήνα. Περαιτέρω συμπύκνωση του DNA συμβαίνει μόνο κατά τη μίτωση (και τη μείωση).

Στην πραγματικότητα, τα χρωμοσώματα δεν εμφανίζουν ενιαία μορφολογία σε όλο το μήκος τους. Η χρωματίνη χωρίζεται σε περιοχές πιο συμπυκνωμένης δομής, που ονομάζονται συλλήβδην **ετεροχρωματίνη** (διαμόρφωση του σωληνοειδούς διαμέτρου 30nm), και στις πιο χαλαρές περιοχές της **ευχρωματίνης**. Όπως είναι λογικό, η οργάνωση του DNA σε χρωματίνη καθιστά τη γενετική πληροφορία δυσπρόσιτη. Όσο πιο συμπυκνωμένη γίνεται η χρωματίνη, τόσο μειώνεται η προσβασιμότητα στην πληροφορία. Οι περιοχές ετεροχρωματίνης θεωρούνται ως εκ τούτου μεταγραφικά ανενεργές, ενώ η ευχρωματίνη περιλαμβάνει τις μεταγραφικά ενεργές περιοχές.

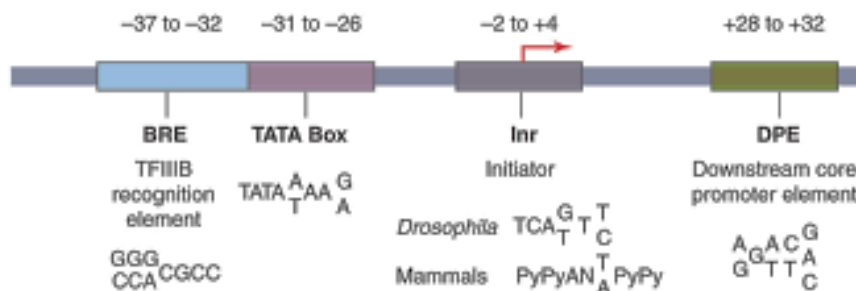
Η χρωματίνη, επίσης, δεν είναι μια στατική δομή. Οι θέσεις των νουκλεοσωμάτων μπορεί αλλάζουν ως απόκριση σε σήματα (εσωτερικά ή/και εξωτερικά). Το κύτταρο διαθέτει **μηχανισμούς αναδόμησης της χρωματίνης**, ώστε να μπορεί να αποκαλύπτει ή να «κλειδώνει» διαφορετικές γενετικές περιοχές ανάλογα με τις ανάγκες του. Σημαντικό ρόλο σε αυτό παίζουν οι ιστόνες των νουκλεοσωμάτων. Τα αμινοτελικά άκρα των ιστονών προεξέχουν από τον πυρήνα των νουκλεοσωμάτων και μπορούν να τροποποιηθούν μετα-

μεταφραστικά αλλάζοντας τη θέση των νουκλεοσωμάτων και το βαθμό συμπύκνωσης της χρωματίνης. Αυτό σημαίνει πως η χρωματίνη δεν είναι μια παθητική δομή, και πως πέραν του δομικού της ρόλου στο πακετάρισμα του DNA μέσα στον πυρήνα, επιτελεί και λειτουργικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης¹.

3.2. Η μεταγραφή στα ευκαρυωτικά συστήματα

Η μεταγραφή στα ευκαρυωτικά κύτταρα πραγματοποιείται από τρία ένζυμα RNA πολυμεράσης, τα I, II, III. Όλα τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II (RNA pol II). Οι ευκαρυωτικές RNA πολυμεράσες έχουν πολύπλοκη δομή· αποτελούνται από 2 μεγάλες υπομονάδες και 12-15 μικρότερες, όμως όλες περιλαμβάνουν υπομονάδες που παρουσιάζουν ομολογία με τον πυρήνα της RNA πολυμεράσης της *Escherichia coli*. Στην πολυμεράση II, και μόνο σ' αυτή, η μία μεγάλη υπομονάδα περιλαμβάνει στο καρβοξυτελικό της άκρο μια σειρά επαναλήψεων 7 αμινοξέων, η οποία προεκβάλει στο οπίσθιο μέρος του συμπλόκου σαν ουρά. Αυτή η δομή ονομάζεται περιοχή του καρβοξυτελικού άκρου (carboxyterminal domain, CTD), ή αλλιώς **ουρά CTD** της RNA pol II και η κατάσταση φωσφορυλίωσής της παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας του ενζύμου¹.

Ο ευκαρυωτικός **βασικός υποκινητής (core promoter)** αναφέρεται στο ελάχιστο σύνολο στοιχείων αλληλουχίας που απαιτείται για την ακριβή εκκίνηση της μεταγραφής από την RNA pol II *in vitro*. Ένας βασικός υποκινητής έχει μήκος 40-60 νουκλεοτιδίων, εκτεινόμενος είτε ανοδικά, είτε καθοδικά της θέσης έναρξης της μεταγραφής. Στην **Εικόνα 1** παρουσιάζονται κάποια από τα στοιχεία που απαντώνται στους βασικούς υποκινητές της RNA pol II.



Εικόνα 1. Μερικά από τα στοιχεία του βασικού υποκινητή. Η θέση έναρξης της μεταγραφής υποδεικνύεται με βέλος. **BRE:** θέση αναγνώρισης από τον παράγοντα TFIIIB, **TATA:** πλαίσιο TATA, **Inr:** στοιχείο έναρξης, **DPE:** στοιχείο υποκινητή μετά τη θέση έναρξης (από Butler & Kadonaga, 2002).

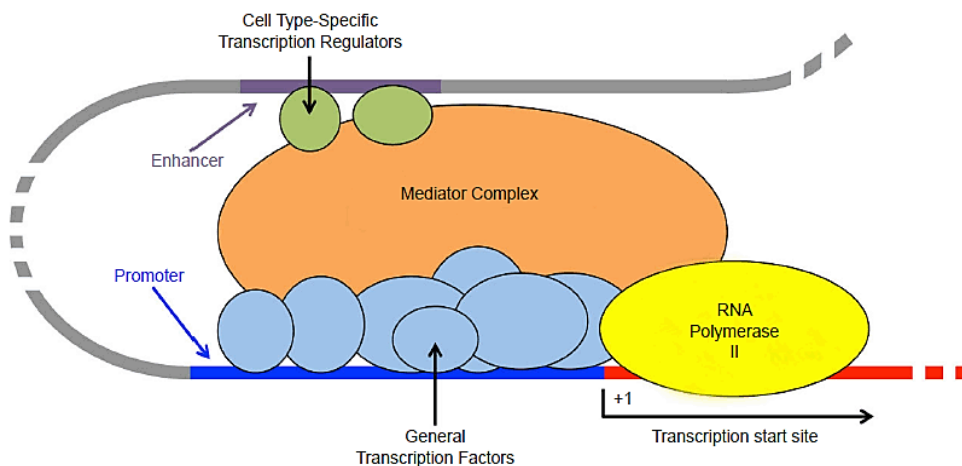
Τυπικά ένας υποκινητής περιλαμβάνει κάποια υποσύνολα αυτών των στοιχείων. Έτσι, για παράδειγμα, οι υποκινητές έχουν είτε ένα στοιχείο TATA είτε ένα στοιχείο DPE, ποτέ και τα δύο. Το στοιχείο Initiator (Inr) είναι το συνηθέστερο και απαντάται σε συνδυασμό είτε με το TATA είτε με το DPE.

Πέραν του βασικού υποκινητή, υπάρχουν κι άλλα στοιχεία αλληλουχίας (εγγύς ρυθμιστικά στοιχεία, **cis στοιχεία**) που απαιτούνται για αποτελεσματική μεταγραφή *in vivo*. Τα στοιχεία αυτά ονομάζονται **ρυθμιστικές αλληλουχίες (regulatory sequences)** και μπορούν να ομαδοποιηθούν σε διάφορες κατηγορίες, αντικατοπτρίζοντας τις εντοπίσεις τους και τη λειτουργία τους. Αυτά τα στοιχεία περιλαμβάνουν κεντρικά στοιχεία του υποκινητή (promoter proximal elements), ανοδικές αλληλουχίες ενεργοποίησης (Upstream Activator Elements, UASs), ενισχυτές και μια σειρά άλλων στοιχείων που καλούνται σιγητές (silencers), οριακά στοιχεία (boundary elements) και μονωτές (insulators) (βλ. επόμενο κεφάλαιο).

Όλα τα cis στοιχεία της μεταγραφής αποτελούν θέσεις αναγνώρισης από πρωτεΐνες που ονομάζονται μεταγραφικοί παράγοντες, χωρίς τους οποίους δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί η μεταγραφή. Οι **γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες** αναγνωρίζουν τα στοιχεία του βασικού υποκινητή, ενώ οι **ειδικοί μεταγραφικοί παράγοντες** αναγνωρίζουν τις ρυθμιστικές αλληλουχίες. Η RNA πολυμεράση μπορεί να μεταγράψει ένα γονίδιο μόνο σε συνεργασία με τους μεταγραφικούς παράγοντες.

Η διαδικασία της μεταγραφής χωρίζεται σε 3 διακριτά στάδια: την έναρξη, την επιμήκυνση και τη λήξη. Καθένα από αυτά τα στάδια περιλαμβάνει το δικό του σύνολο μεταγραφικών παραγόντων, που βοηθούν την RNA pol II τόσο να εκτελέσει τις διεργασίες του κάθε σταδίου, όσο και το να μεταβεί από το ένα στάδιο στο άλλο. Η έναρξη της μεταγραφής πραγματοποιείται από την RNA πολυμεράση σε συνεργασία με τους γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Οι γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες βοηθούν την πολυμεράση να προσδεθεί στον υποκινητή (κλειστό σύμπλοκο) και να τήξει το DNA (ανοιχτό σύμπλοκο). Βοηθούν επίσης την πολυμεράση να διαφύγει από τον υποκινητή και να αρχίσει τη φάση της επιμήκυνσης. Το πλήρες σύνολο των γενικών μεταγραφικών παραγόντων και της πολυμεράσης, προσδεδεμένων μαζί στον υποκινητή και ισορροπώντας για την έναρξη, ονομάζεται **προεναρκτήριο σύμπλοκο (preinitiation complex)**. Η συγκρότηση του προεναρκτήριου συμπλόκου είναι αρκετή για να ξεκινήσει η μεταγραφή από ένα γυμνό DNA *in vitro*. Ωστόσο, τα υψηλά ρυθμιζόμενα επίπεδα μεταγραφής *in vivo*, απαιτούν επιπλέον μεταγραφικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες, το σύμπλοκο του Μεσολαβητή και ένζυμα τροποποίησης νουκλεοσωμάτων.

Η πρόσθετες απαιτήσεις είναι απόρροια της χρωματινικής οργάνωσης του DNA. Αυτή η κατάσταση περιπλέκει την πρόσδεση της πολυμεράσης και των συνοδών παραγόντων της στον υποκινητή. Μεταγραφικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες που καλούνται **ενεργοποιητές** βοηθούν στην προσέλκυση της πολυμεράσης στην υποκινητή, σταθεροποιώντας την πρόσδεσή της σε αυτόν. Οι ενεργοποιητές δεν αλληλεπιδρούν άμεσα με το προεναρκτήριο

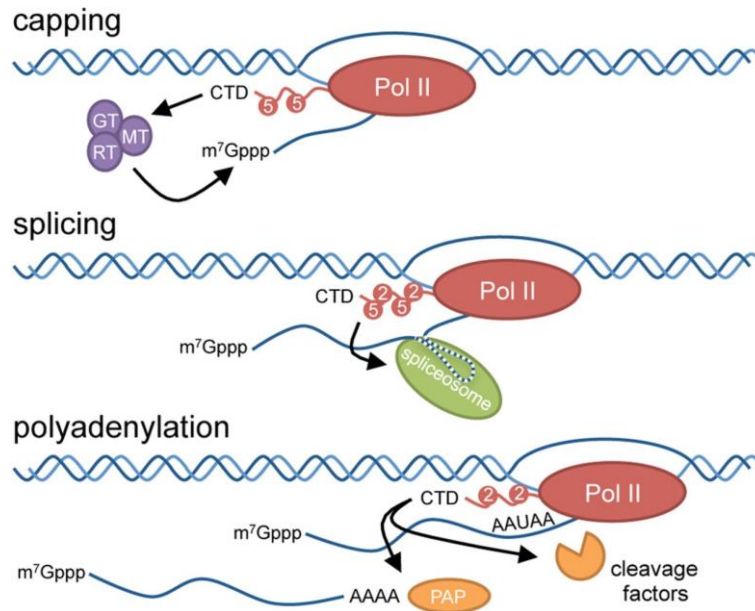


Εικόνα 2. Το σύμπλοκο του μεσολαβητή εξασφαλίζει την έμμεση αλληλεπίδραση των ενεργοποιητών και του προεναρκτηρίου συμπλόκου για την έναρξη της μεταγραφής (από D.Glasco, 2016).

σύμπλοκο, καθώς οι αλληλουχίες στις οποίες προσδένονται, οι **ενισχυτές (enhancers)**, βρίσκονται μερικές φορές ακόμη και χιλιάδες βάσεις μακριά από τον υποκινητή ή ακόμα και σε διαφορετικό χρωμόσωμα. Την αλληλεπίδραση ενεργοποιητών και προεναρκτηρίου συμπλόκου εξασφαλίζει το **σύμπλοκο του Μεσολαβητή (Mediator complex)**, το οποίο με μια επιφάνεια συνδέεται με την CTD ουρά της πολυμεράσης και με άλλες επιφάνειες αλληλεπιδρά με τους ενεργοποιητές (**Εικόνα 2**).

Την πρόσδεση του προεναρκτηρίου συμπλόκου στον υποκινητή και το ξετύλιγμα της αλληλουχίας του υποκινητή ακολουθεί μια περίοδος ατελούς έναρξης, κατά την οποία η πολυμεράση συνθέτει μια σειρά βραχέων μεταγράφων, καθώς δεν μπορεί να αποδεσμευτεί από τον υποκινητή και να συνεχίσει τη μεταγραφή. Η **διαφυγή από τον υποκινητή** επιτυγχάνεται ύστερα από τη φωσφορυλίωση της CTD ουράς της πολυμεράσης, και σηματοδοτεί την ολοκλήρωση της φάσης έναρξης. Η μετάβαση στη φάση επιμήκυνσης περιλαμβάνει την αποβολή του μεγαλύτερου μέρους των παραγόντων έναρξης από την πολυμεράση. Στη θέση τους προσελκύεται ένα άλλο σύνολο παραγόντων, μερικοί εκ των οποίων είναι **παράγοντες επιμήκυνσης (elongation factors)**, ενώ άλλοι είναι παράγοντες απαραίτητοι για την επεξεργασία του RNA. Η επεξεργασία του mRNA (κάλυψη, ωρίμανση και πολυαδενυλίωση) πραγματοποιείται παράλληλα με τη μεταγραφή του. Οι παράγοντες

επεξεργασίας του mRNA προσδένονται στη CTD ουρά της πολυμεράσης σύμφωνα με τη σειρά λειτουργίας τους και ανάλογα με την κατάσταση φωσφορυλίωσης της ουράς, και αντιστοίχως, η κατάσταση φωσφορυλίωσης της ουράς αλλάζει κάθε φορά που αλλάζει η φάση επεξεργασίας του μεταγράφου. Η έξοδος του μεταγράφου από το ένζυμο της πολυμεράσης είναι σε τέτοια θέση που εξασφαλίζει την κατάλληλη εγγύτητα μεταξύ του



Εικόνα 3. Η επεξεργασία του mRNA γίνεται παράλληλα με την μεταγραφή του και εξαρτάται από το πρότυπο φωσφορυλίωσης της CTD ουράς της πολυμεράσης. Φαίνονται οι τρεις φάσεις επεξεργασίας του μεταγράφου, οι διαφορετικές καταστάσεις φωσφορυλίωσης της CTD ουράς σε κάθε φάσης καθώς και η διαφορετική ενζυμολογία κάθε αντίδρασης επεξεργασίας (από Braun & Young, 2014).

μεταγράφου και των ενζύμων επεξεργασίας που είναι προσδεδεμένα στην ουρά (**Εικόνα 3**).

Κατά την επιμήκυνση η πορεία της RNA pol II παρακωλύεται από τα νουκλεοσώματα. Το πρόβλημα αυτό υπερσκελίζεται με τη δράση ενός ετεροδιμερούς, του FACT (FACilitates Chromatin Transcription – διευκολύνει τη μεταγραφή της χρωματίνης), που χαλαρώνει τη περιέλιξη του DNA γύρω από τα χρωμοσώματα. Το FACT προηγείται της πολυμεράσης, αποσυναρμολογεί μερικώς τα νουκλεοσώματα που έπονται και επανασυναρμολογεί τη χρωματίνη στις περιοχές που μόλις μεταγράφηκαν. Τέλος, η λήξη της μεταγραφής περιλαμβάνει την απελευθέρωση του mRNA από την πολυμεράση και την αποσύνδεση του ενζύμου από το DNA. Μετά τη μεταγραφή του σημείου πολυαδενυλίωσης, το mRNA κόβεται αμέσως μετά το σημείο από μια RNάση (Rat1 στον ζυμομύκητα, Xrn2 στον άνθρωπο) και

απελευθερώνεται από τη μηχανή της μεταγραφής και η RNA pol II αποδεσμεύεται από το DNA λίγες βάσεις αργότερα, πιθανότατα λόγω αλλαγής στη στερεοδιάταξή της.

3.3. Η μεταγραφική ρύθμιση

3.3.1. Γενικές αρχές μεταγραφικής ρύθμισης

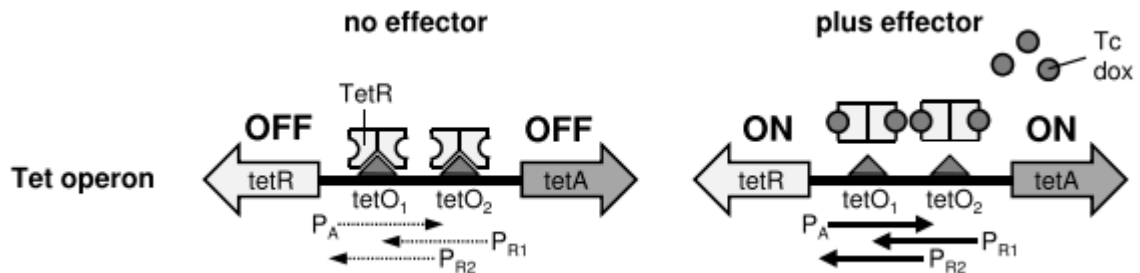
Τα γονίδια ελέγχονται συχνά από εξωκυττάρια (ή/και ενδοκυττάρια) σήματα· η επικοινωνία των σημάτων με τα γονίδια επιτελείται από ρυθμιστικές πρωτεΐνες (ειδικοί μεταγραφικοί παράγοντες) δύο τύπων: τους θετικούς ρυθμιστές ή **ενεργοποιητές (activators)** και τους αρνητικούς ρυθμιστές ή **καταστολείς (repressors)**. Κατά κανόνα οι ρυθμιστές είναι πρωτεΐνες δέσμευσης του DNA, οι οποίες αναγνωρίζουν συγκεκριμένες θέσεις μέσα, κοντά ή μακριά από τους υποκινητές των γονιδίων που ελέγχουν. Οι αλληλουχίες του DNA στις οποίες προσδένονται οι ενεργοποιητές ονομάζονται **ενισχυτές**. Οι ενεργοποιητές αυξάνουν τη μεταγραφή των ρυθμιζόμενων γονιδίων, οι καταστολείς την μειώνουν.

Παρότι η γονιδιακή έκφραση ρυθμίζεται ουσιαστικά σε κάθε στάδιο από το γονίδιο έως τα προϊόντα, το συνηθέστερο στάδιο ρύθμισης είναι η *έναρξη της μεταγραφής*· η δράση της πολυμεράσης ρυθμίζεται ως επί το πλείστον κατά τη φάση πρόσδεσης στον υποκινητή και κατά τη διαφυγή από τον υποκινητή.

Απουσία ρυθμιστικών πρωτεϊνών η RNA πολυμεράση αλληλεπιδρά μόνο ασθενώς με πολλούς υποκινητές (εξαρτάται από τα στοιχεία που συγκροτούν τον υποκινητή), με αποτέλεσμα χαμηλά ποσοστά επιτυχούς πρόσδεσης του ενζύμου. Σε αυτές τις περιπτώσεις επιτυγχάνεται μια χαμηλού επιπέδου **συστατική** έκφραση, που ονομάζεται **βασικό επίπεδο**. Για την ενεργοποίηση της μεταγραφής από έναν τέτοιο υποκινητή αρκεί ένας ενεργοποιητής να βοηθήσει την πολυμεράση να προσδεθεί στον υποκινητή· με τη μία επιφάνεια ο ενεργοποιητής προσδένεται σε μια αλληλουχία δίπλα στον υποκινητή, ενώ με μια άλλη επιφάνεια αλληλεπιδρά με την πολυμεράση φέρνοντάς τη στον υποκινητή. Αυτό το είδος ρύθμισης ονομάζεται **στρατολόγηση** και αποτελεί ένα παράδειγμα **συνεργατικής δέσμευσης** στο DNA· ο ενεργοποιητής προσδένεται στο DNA και προσελκύει την πολυμεράση να προσδεθεί επίσης. Αντίθετα, ένας καταστολέας μπορεί να προσδένεται σε μια αλληλουχία που επικαλύπτει την αλληλουχία του υποκινητή και να δυσχεραίνει περαιτέρω την πρόσδεση της πολυμεράσης σ' αυτόν. Η αλληλουχία του DNA που αναγνωρίζει και προσδένει ο καταστολέας ονομάζεται **χειριστής**. Αυτός ο τρόπος καταστολής συναντάται μόνο στους προκαρυωτικούς οργανισμούς κι ένα καλό παράδειγμα αποτελούν τα βακτήρια που εμφανίζουν ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη.

Κάποια Gram- βακτήρια έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη με το να αποβάλλουν την ενδοκυτταρική τετρακυκλίνη στο περιβάλλον με μια μεμβρανική πρωτεΐνη,

την TetA. Τα επίπεδα της TetA ρυθμίζονται από έναν ελεγχόμενο-από-την-τετρακυκλίνη καταστολέα, τον TetR. Η έκφραση των TetA και TetR γονιδίων ρυθμίζονται από κοινού από δυο στοιχεία χειριστή, τα TetO. Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 4**, τα γονίδια των δύο πρωτεϊνών διευθετούνται σε αντίθετες κατευθύνσεις και ελέγχονται από την κοινή ρυθμιστική περιοχή των TetO. Απουσία τετρακυκλίνης ο TetR προσδένεται στις TetO αλληλουχίες και καταστέλλει την έκφραση. Η τετρακυκλίνη όμως επιφέρει αλλοστερικές αλλαγές στη διαμόρφωση της TetR αποτρέποντας την δέσμευσή της στον χειριστή. Έτσι, αρχίζει η έκφραση των γονιδίων· η τετρακυκλίνη αποβάλλεται σταδιακά από το κύτταρο, τα επίπεδά της μειώνονται ώσπου ο TetR μένει και πάλι ελεύθερος να δεσμευτεί στο TetO και



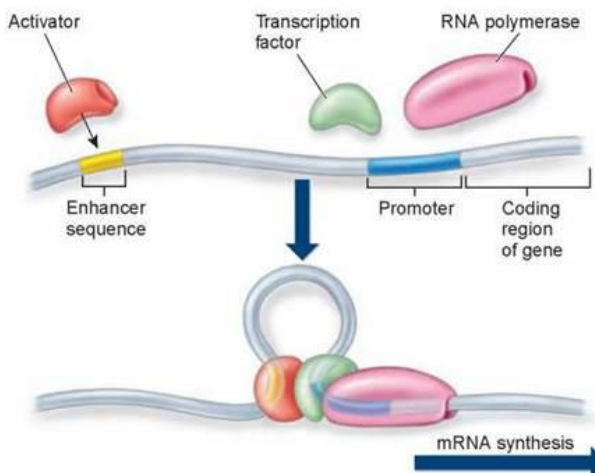
Εικόνα 4. Η ρύθμιση της έκφρασης της TetA πρωτεΐνης στα Gram- βακτήρια με ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη γίνεται μέσω μια πρωτεΐνης καταστολέα, της TetR. Φαίνονται τα TetO στοιχεία του χειριστή, ενώ απεικονίζεται και η αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης της TetR από την πρόσδεση της τετρακυκλίνης σε αυτή (από Atze T. Das et al, 2016).

να καταστείλει τη μεταγραφή.

Ένας άλλος τρόπος ρύθμισης της έναρξης της μεταγραφής είναι ο έλεγχος της ικανότητας της πολυμεράσης να διαφύγει από τον υποκινητή. Υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες παρόλο που η πολυμεράση δεσμεύεται ικανοποιητικά χωρίς εξωτερική βοήθεια στον υποκινητή, δεν μεταβαίνει αυθόρμητα στο ανοιχτό σύμπλοκο ώστε να εκκινήσει τη μεταγραφή. Οι ενεργοποιητές διεγείρουν τέτοιου είδους υποκινητές μέσω **αλλοστερικής** τροποποίησης της πολυμεράσης, δηλαδή μέσω της αλλαγής της στερεοδιαμόρφωσης του ενζύμου ύστερα από αλληλεπίδραση με αυτό.

Η στρατολόγηση και η αλλοστερική ρύθμιση αποτελούν μηχανισμούς δράσης ρυθμιστικών πρωτεϊνών (είτε ενεργοποιητών είτε καταστολέων) που έχουν είτε ως *άμεσο* είτε ως *έμμεσο στόχο* την RNA πολυμεράση. Για παράδειγμα, ένας καταστολέας μπορεί να εμποδίζει την δράση της πολυμεράσης με το να καταστέλλει τη δράση ενός ενεργοποιητή (έμμεση καταστολή). Επίσης, η στρατολόγηση και η αλλοστερική ρύθμιση μπορεί να

συμβαίνουν από ενεργοποιητές (ή καταστολείς) που προσδένονται σε θέσεις DNA κοντά στους υποκινητές των ελεγχόμενων γονιδίων αλλά και σε απομακρυσμένες θέσεις. Η **εξ αποστάσεως ρύθμιση** επιτυγχάνεται ύστερα από αναδίπλωση και σχηματισμό βρόχου στο ενδιάμεσο DNA, ώστε οι δύο θέσεις να έρθουν σε εγγύτητα τέτοια που να επιτρέπει την αλληλεπίδρασή τους (**Εικόνα 5**).



Εικόνα 5. Σχηματισμός βρόχου για την ρύθμιση από απομακρυσμένο ενισχυτή.

Η συνεργατική δέσμευση και η αλλοστερική ρύθμιση διαδραματίζουν κι άλλους ρόλους στη γονιδιακή ρύθμιση. Συχνά, ομάδες ρυθμιστών δεσμεύονται συνεργατικά στο DNA· δύο ή περισσότεροι ρυθμιστές δεσμεύονται μεταξύ τους και με το DNA για να ρυθμίσουν από κοινού κάποιο γονίδιο. Αυτό το είδος ρύθμισης μπορεί να δημιουργήσει ευαίσθητους διακόπτες. Ο αλλοστερισμός με τη σειρά του, δεν είναι μόνο ένας μηχανισμός γονιδιακής ενεργοποίησης, αλλά είναι και ο τρόπος με τον οποίο οι ρυθμιστές ελέγχονται από τα δικά τους σήματα (όπως στην περίπτωση της TetR).

3.3.2. Μεταγραφική ρύθμιση στους ευκαρυώτες

Η μεταγραφική ρύθμιση στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς διέπεται από τις βασικές αρχές που περιγράφηκαν παραπάνω: η έναρξη της μεταγραφής είναι το πιο συχνά ρυθμιζόμενο βήμα, η ρύθμιση επιτυγχάνεται μέσω ενεργοποιητών και καταστολέων, που είναι ειδικοί μεταγραφικοί παράγοντες με μια περιοχή δέσμευσης στο DNA και μια περιοχή ενεργοποίησης, και που ασκούν τη δράση τους μέσω αλλοστερικής τροποποίησης ή μέσω στρατολόγησης. Ωστόσο, η πολυπλοκότητα των ευκαρυωτικών συστημάτων έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη πιο περίπλοκων δικτύων ρύθμισης και στη συμμετοχή επιπλέον ρυθμιστικών παραγόντων. Οι ιδιαιτερότητες στη ρύθμιση της μεταγραφής στους ευκαρυώτες συνοψίζονται σε τρία σημεία¹.

I. Αναδόμηση της χρωματίνης

Το DNA σε ένα ευκαρυωτικό κύτταρο είναι τυλιγμένο γύρω από τις ιστόνες των νουκλεοσωμάτων. με αποτέλεσμα οι ρυθμιστικές αλληλουχίες να είναι πολλές φορές αποκλεισμένες. Ένζυμα που τροποποιούν τα νουκλεοσώματα μπορούν να αλλάξουν τοπικά τη δομή της χρωματίνης και να καταστήσουν προσβάσιμες και ορατές αλληλουχίες που

μέχρι πρότινος ήταν κρυμμένες, ή το αντίστροφο. Οι **τροποποιητές των νουκλεοσωμάτων** είναι δύο τύπων: εκείνοι που αναδιατάσσουν τα νουκλεοσώματα κι εκείνοι που προσθέτουν χημικές ομάδες στις ουρές των ιστονών. Στην αναδιάταξη των νουκλεοσωμάτων χρησιμοποιείται η ενέργεια από την υδρόλυση της ATP για να μετακινηθούν τα νουκλεοσώματα (πχ σύμπλοκο SWI/SNF).

Η χημική τροποποίηση των ιστονών μπορεί να επηρεάσει τη χρωματίνη με δύο τρόπους: πρώτον, μεταβάλλοντας το πόσο στενά συσκευάζονται τα νουκλεοσώματα και δεύτερον, σχηματίζοντας (ή αφαιρώντας) θέσεις πρόσδεσης για άλλες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μεταγραφή του γονιδίου. Οι ιστόνες τροποποιούνται μετα-μεταφραστικά στις αμινοτελικές ουρές των αλυσίδων τους που προεκβάλλουν από τα νουκλεοσώματα, και υφίστανται ακετυλίωση ή μεθυλίωση.

Η **ακετυλίωση** καταλύεται από τις ακετυλάσες των ιστονών (histone acetyltransferases, **HATs**), και στοχεύει κατάλοιπα λυσίνης, κυρίως των ιστονών τύπου H3 και H4. Η ακετυλίωση γενικά έχει συσχετιστεί με το **ξεδίπλωμα και την αυξημένη προσβασιμότητα στη χρωματίνη**. Η αποακετυλίωση των ιστονών καταλύεται από τις αποακετυλάσες των ιστονών (histone deacetylases, **HDACs**), και τα επίπεδα ακετυλίωσης των ιστονών καθορίζονται από την συνδυασμένη δράση αυτών των δύο ανταγωνιστικών ενζυμικών ομάδων ².

Η **μεθυλίωση** των ιστονών καταλύεται από τις μεθυλτρανσφεράσες των ιστονών (histone methyltransferases, **HMTs**), ενώ η απομεθυλίωση από τις απομεθυλάσες των ιστονών (histone demethylases). Η μεθυλίωση μπορεί να συμβεί σε ένα ή σε περισσότερα κατάλοιπα λυσίνης και το πρότυπο της μεθυλίωσης καθορίζει το είδος της ρύθμισης (ενεργοποιητική ή κατασταλτική) ³.

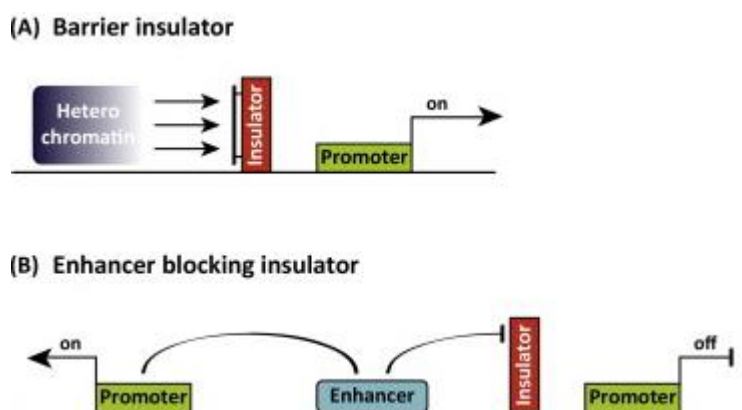
II. Ρόλος ρυθμιστών και εκτεταμένες ρυθμιστικές αλληλουχίες

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα ένα γονίδιο συχνά ελέγχεται από πολλές ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Επίσης, οι αλληλουχίες πρόσδεσης των ρυθμιστικών πρωτεϊνών είναι συνήθως μακριά από την αλληλουχία του γονιδίου. Η αλληλουχία πρόσδεσης της μεταγραφικής μηχανής ονομάζεται **υποκινητής**, οι μεμονωμένες θέσεις δέσμευσης ονομάζονται **θέσεις δέσμευσης ρυθμιστών** και το τμήμα που περιλαμβάνει το σύνολο των θέσεων δέσμευσης ρυθμιστών ενός δεδομένου γονιδίου, **ρυθμιστικές αλληλουχίες**.

Οι θέσεις δέσμευσης ενεργοποιητών ονομάζονται **ενισχυτές**, και μπορεί να απέχουν δεκάδες χιλιάδες βάσεις από τη θέση έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου που ελέγχουν. Η εξ αποστάσεως ρύθμιση πραγματοποιείται, όπως έχει αναφερθεί, με το **σχηματισμό βρόχων** στο ενδιάμεσο DNA, όμως όταν η απόσταση μεγαλώνει τόσο πολύ, μεταξύ της ρυθμιστικής περιοχής και του ρυθμιζόμενου γονιδίου παρεμβάλλονται και άλλα γονίδια που θα μπορούσαν να υποκαταστήσουν τον στόχο ρύθμισης. Η ειδικότητα της δράσης ενός

ενισχυτή εξασφαλίζεται από άλλες ρυθμιστικές αλληλουχίες που ονομάζονται **μονωτές (insulators)**. Όταν ο μονωτής παρεμβάλλεται μεταξύ ενός ενισχυτή κι ενός υποκινητή, καταστέλλει την αλληλεπίδραση αυτών των δύο (**Εικόνα 6**). Ο μονωτής δεσμεύεται από ρυθμιστικές πρωτεΐνες που εμποδίζουν την δράση των ενεργοποιητών του ενισχυτή, χωρίς να την απενεργοποιούν· απλά διακόπτει την επικοινωνία μεταξύ των δύο. Έτσι, ο ενισχυτής παραμένει ικανός να ρυθμίσει άλλα γονίδια.

Οι μονωτές μπορεί επίσης να αναστέλλουν την εξάπλωση των τροποποιήσεων της χρωματίνης. Σε ορισμένες περιπτώσεις, κατασταλτικές τροποποιήσεις των ιστονών διαδίδονται σε μεγάλο μήκος της χρωματίνης, απενεργοποιώντας πολλαπλά γονίδια χωρίς να φέρει το καθένα από αυτά ειδικές θέσεις πρόσδεσης καταστολέων, ένα φαινόμενο που είναι γνωστό ως **κατασίγαση (silencing)**. Η παρουσία των μονωτών εμποδίζει τη διάδοση αυτών των τροποποιήσεων, οριοθετώντας την περιοχή που καταστέλλεται (**Εικόνα 6**).



Εικόνα 6. Σχηματική αναπαράσταση της δράσης των μονωτών Α) στη διακοπή της διάδοσης τροποποιήσεων της χρωματίνης, Β) στη διακοπή επικοινωνίας ενισχυτή-υποκινητή (από P.Heger, T.Wiehe, 2014)

Η ρύθμιση ενός μόνο γονιδίου από πολλούς ρυθμιστές γίνεται συνήθως με όρους **συνεργίας και συνεργατικότητας**. Οι ρυθμιστές δεν ασκούν τη δράση τους μεμονωμένα, και το αποτέλεσμα της δράσης τους είναι μεγαλύτερο από το άθροισμα των δράσεων εάν λειτουργούσε ο καθένας μόνος του (**συνεργία**). Επίσης, πολλές φορές οι ρυθμιστές λειτουργούν μόνο εάν συνεργάζονται, πχ πρόσδεση ενός ενεργοποιητή μόνο μετά την πρόσδεση ενός άλλου ή πρόσδεση ενός ενεργοποιητή μόνο ύστερα από την προσέλκυση τροποποιητή που θα αποκαλύψει τη θέση δέσμευσης του πρώτου (**συνεργατικότητα**).

III. Επιγενετική γονιδιακή ρύθμιση

Σε ορισμένες περιπτώσεις η κατάσταση της έκφρασης ενός γονιδίου κληροδοτείται στις επόμενες κυτταρικές γενιές, ένα φαινόμενο γνωστό ως **επιγενετική ρύθμιση**. Η

κληροδότηση αφορά συνήθως τη δομή της χρωματίνης και βασίζεται στην ημισυντηρητική φύση της **μεθυλίωσης** του DNA.

Η μεθυλίωση του DNA είναι η πιο καλά μελετημένη επιγενετική τροποποίηση της χρωματίνης στον άνθρωπο. Περιλαμβάνει την μεταφορά μιας μεθυλομάδας στον 5-C του δακτυλίου της κυτοσίνης, παράγοντας τη 5-μεθυλκυτοσίνη. Η αντίδραση καταλύεται από μια οικογένεια ενζύμων, τις DNA μεθυλτρανσφεράσες (*DNMTs*), μία εκ των οποίων, η DNMT1 ή διατηρητική μεθυλτρανσφεράση, συνδέεται επιλεκτικά σε ημιμεθυλιωμένες διπλές έλικες DNA (μόνο η μία αλυσίδα μεθυλιωμένη) και εξυπηρετεί στη διατήρηση του προτύπου μεθυλίωσης κατά την αντιγραφή του DNA ⁴.

Η μεθυλίωση του DNA επάγει την καταστολή της γονιδιακής έκφρασης (**κατασίγαση γονιδίου, *gene silencing***), είτε μέσω της άμεσης παρεμπόδισης της δέσμευσης ενεργοποιητών, είτε μέσω της προσέλκυσης τροποποιητών της χρωματίνης που καταστέλλουν την έκφραση, όπως αποακετυλάσες (HDACs) και τις μεθυλτρανσφεράσες των ιστονών (HMTs), η δράση των οποίων καταλήγει στο σχηματισμό της αδρανούς μορφής της χρωματίνης, γνωστής ως ετεροχρωματίνη.

3.4.Επαναπρογραμματισμός διαφοροποιημένων κυττάρων σε πολυδύναμα

3.4.1. Ανάπτυξη, κυτταρική διαφοροποίηση και επαναπρογραμματισμός

Η **ανάπτυξη** ενός οργανισμού περιλαμβάνει όλες τις διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα από το στάδιο του ζυγωτού μέχρι τον ολοκληρωμένο σχηματισμό του οργανισμού. Κατά την ανάπτυξη το ζυγωτό δίνει γένεση σε εκατομμύρια κύτταρα. Αυτά οργανώνονται σταδιακά σε ιστούς και όργανα, που επιτελούν τις ζωτικές λειτουργίες του οργανισμού, και διαμορφώνουν την τελική μορφολογία του. Είναι μια συνεχής διαδικασία που χαρακτηρίζεται από τέσσερα φαινόμενα: τοπική εξειδίκευση, κυτταρική διαφοροποίηση, μορφογένεση, αύξηση.⁵

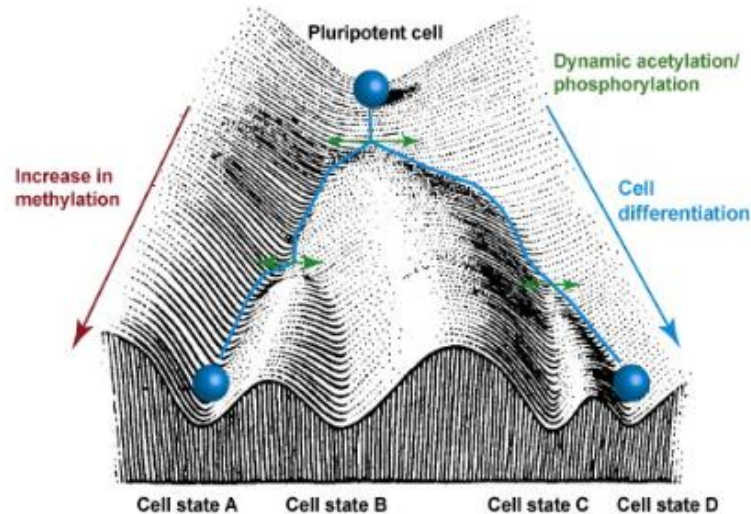
Η **κυτταρική διαφοροποίηση** αφορά στη δημιουργία λειτουργικών υποσυνόλων κυττάρων, από ένα κυτταρικό σύνολο κοινής προέλευσης, δηλαδή πανομοιότυπου γενετικού υποβάθρου. Κύτταρα με το ίδιο γενετικό υλικό αποκτούν διαφορετική μορφολογία και εξειδικευμένη λειτουργία, μέσω της αξιοποίησης διαφορετικού συνδυασμού πληροφοριών του DNA τους. Η διαφορική έκφραση των γονιδίων επιτυγχάνεται με αυστηρή ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, σημαντικό ρόλο στην οποία παίζει η επιγενετική ρύθμιση της χρωματίνης. Έτσι, η κυτταρική διαφοροποίηση παράγει πολλούς **κυτταρικούς τύπους**, καθένας από τους οποίους έχει μοναδικό προφίλ γονιδιακής έκφρασης, χαρακτηριστικό της λειτουργικής του εξειδίκευσης. Η κυτταρική διαφοροποίηση προχωρά σταδιακά από ένα *αδιαφοροποίητο* κύτταρο προς κύτταρα που δεσμεύονται σε

μια ολοένα και πιο εξειδικευμένη λειτουργία, για να δημιουργήσουν τον τελευταίο κρίκο της αλυσίδας, το *τελικώς διαφοροποιημένο κύτταρο*.

Τα κύτταρα πλην των τελικώς διαφοροποιημένων ονομάζονται **βλαστικά**, και έχουν την ικανότητα να διαιρούνται για να διατηρούν τον πληθυσμό τους σταθερό (**αυτοανανέωση**), αλλά και για να δίνουν γένεση, υπό συγκεκριμένες συνθήκες, σε πληθυσμούς περισσότερο διαφοροποιημένων κυττάρων (**διαφοροποίηση**). Τα βλαστικά κύτταρα κατηγοριοποιούνται βάσει της πηγής απομόνωσής τους και βάσει του δυναμικού διαφοροποίησής τους. Ανάλογα με την πηγή απομόνωσής τους, τα βλαστικά κύτταρα χωρίζονται σε **ενήλικα βλαστικά (adult stem cells)**, **εμβρυϊκά βλαστικά (fetal stem cells)**, **εμβρυονικά βλαστικά (embryonic stem cells, ESCs)** και όπως θα δούμε παρακάτω, σε (τεχνητά) **επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (induced pluripotent stem cells, iPSCs)**. Ανάλογα με το δυναμικό διαφοροποίησης τους τα βλαστικά κύτταρα χωρίζονται σε **παντοδύναμα (totipotent)**, **πλειοδύναμα (pluripotent)** και **πολυδύναμα (multipotent)**. Τα *ενήλικα βλαστικά κύτταρα* βρίσκονται στους ιστούς του ενήλικου οργανισμού και είναι *πολυδύναμα*, δηλαδή μπορούν να διαφοροποιηθούν μόνο σε κύτταρα του ιστού από τον οποίο προέρχονται, και εξυπηρετούν στη διατήρηση του ιστού σε περιπτώσεις τραυματισμού, απόπτωσης κλπ. Τα *εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα* είναι πλειοδύναμα ή πολυδύναμα και απομονώνονται από εμβρυϊκούς ιστούς, όπως ο πλακούντας ή η γέλη του Wharton (δομή του ομφάλιου λώρου) είτε από το αμνιωτικό υγρό ή το αίμα του εμβρύου, μετά την 6^η εβδομάδα της κύησης. Έχουν μεγαλύτερο δυναμικό διαφοροποίησης από τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα, αλλά μπορούν να δώσουν γένεση μόνο σε κύτταρα του ιστού από τον οποίο προέρχονται. Τα *εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα* απομονώνονται από εμβρυϊκές κυτταρικές δομές, την E3.5 ή E4.5 της κύησης και είναι *πλειοδύναμα*, δηλαδή δύνανται να παράγουν τα κύτταρα όλων των ιστών ενός οργανισμού, εκτός από τα κύτταρα των εξωεμβρυϊκών δομών. *Παντοδύναμα κύτταρα* είναι το ζυγωτό και τα βλαστομερίδια, τα οποία μπορούν να δώσουν γένεση σε όλο το έμβρυο.

Το 1957 ο Waddington παρομοίασε τη διαδικασία μετάβασης ενός κυττάρου σε ολοένα πιο εξειδικευμένη λειτουργία κατά την ανάπτυξη, με την κίνηση μιας σφαίρας που κατηφορίζει έναν λόφο⁶. Η χρωματίνη των βλαστικών κυττάρων παρουσιάζει υψηλό βαθμό ευελιξίας με στοιχεία όπως το χαμηλό ποσοστό ετεροχρωματίνης⁷, η χαλαρή πρόσδεση αρχιτεκτονικών στοιχείων στη χρωματίνη⁸, η υπομεθυλίωση του DNA, η ισχυρή παρουσία ακετυλιωμένων ιστονών καθώς και της τροποποίησης H3K4me3 (κατασταλτικό τύπος μεθυλίωσης)⁹. Αυτά προσδίδουν την απαραίτητη «ετοιμότητα» στη χρωματίνη ώστε να υποστηρίξει το πρότυπο της γονιδιακής έκφρασης οποιουδήποτε κυτταρικού τύπου, ύστερα από ένα σήμα διαφοροποίησης. Αντίθετα, κατά την κυτταρική διαφοροποίηση η χρωματίνη των κυττάρων συγκεντρώνει πλήθος επιγενετικών τροποποιήσεων που της προσδίδουν μια ετερογενή δομή τόσο με ενεργές ανοιχτές όσο και με ανενεργές κλειστές περιοχές. Το

επιγενετικό τοπίο καθορίζει τη δομή της χρωματίνης, η οποία στα διαφοροποιημένα κύτταρα κρατά σταθερά κατεσταλμένα σε συμπυκνωμένες δομές όλα τα γονίδια που δεν αφορούν τις λειτουργίες του εκάστοτε κυτταρικού τύπου. Το **πεδίο του Waddington** απεικονίζει την τάση των κυττάρων να μεταβαίνουν από καταστάσεις υψηλού δυναμικού διαφοροποίησης στις λιγότερο ευέλικτες χρωματινικές δομές που χαρακτηρίζουν τα διαφοροποιημένα κύτταρα. Άπαξ και τα κύτταρα διαφοροποιηθούν προς έναν κυτταρικό



Εικόνα 7. Το πεδίο του Waddington. Η κατάσταση πολυδυναμίας τοποθετείται στην κορυφή του λόφου, από όπου τα κύτταρα κυλούν με ευκολία στις λιγότερο δυναμικές, διαφοροποιημένες καταστάσεις. Η επάνοδος των κυττάρων σε πρώιμες κυτταρικές μορφές (*reprogramming*) συμβαίνει σπάνια στη φύση, όμως επιτυγχάνεται *in vitro* μέσω ριζικής αναδιοργάνωσης της χρωματίνης (από Srinageshwar et al, 2016).

τύπο, είναι πολύ δύσκολο να σπάσουν τους επιγενετικούς περιορισμούς που έχουν επιβληθεί και να ανελιχθούν σε πιο πρώιμες κυτταρικές μορφές (**Εικόνα 7**).

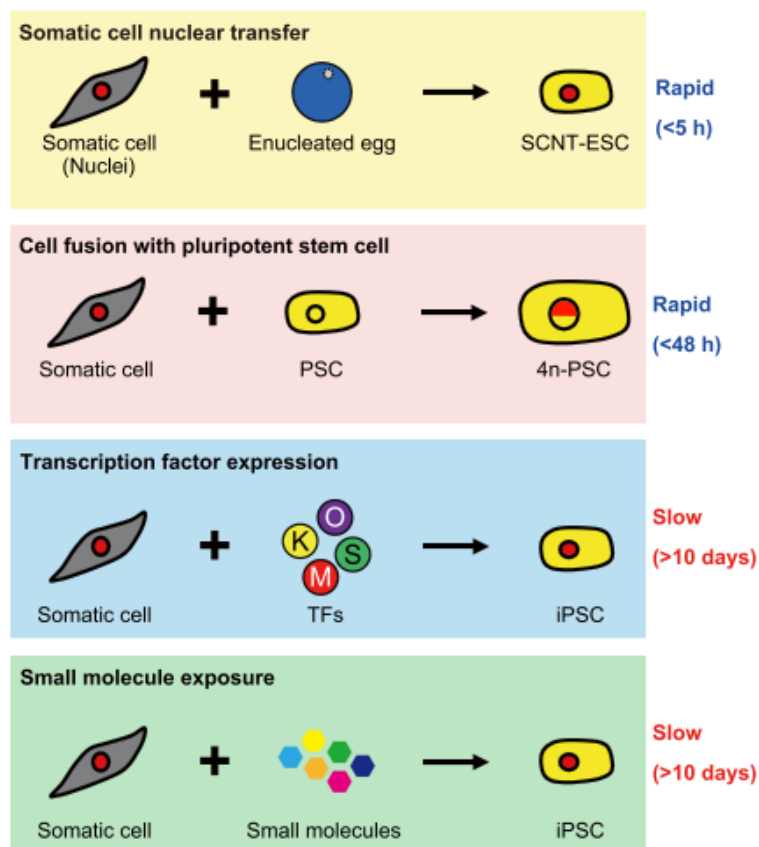
Η αναστροφή της διαφοροποίησης, ή αλλιώς **κυτταρικός επαναπρογραμματισμός**, είναι ένα σπάνιο φαινόμενο που παρατηρείται στη φύση σε εξαιρετικές περιπτώσεις και συνήθως ως μέρος της διαδικασίας ανάπλασης ύστερα από τραυματισμό, όπως στην αναγέννηση της καρδιάς του ψαριού ζέβρα (*Danio rerio*)¹⁰ ή στην αναγέννηση των άκρων των ουρόδηλων αμφιβίων¹¹. Ωστόσο, έχουν βρεθεί τρόποι για την *in vitro* επαγωγή της μετάβασης ενός κυττάρου από τη διαφοροποιημένη κατάσταση στην πολυδυναμία. Ο κυτταρικός επαναπρογραμματισμός υλοποιείται με διαφορετικούς βιολογικούς μηχανισμούς στη φύση και στο εργαστήριο, και στις δύο περιπτώσεις όμως, προϋποθέτει τη ριζική αναδιαμόρφωση της χρωματίνης.

3.4.2. Τρόποι επίτευξης επαναπρογραμματισμού διαφοροποιημένων κυττάρων σε πολυδύναμα

Το πρώτο επιτυχημένο πείραμα επαναπρογραμματισμού έγινε το 1958 από τον Sir John Gurdon, με την τεχνολογία της μεταφοράς πυρήνα¹². Ο Gurdon, αφαίρεσε τον πυρήνα ενός γονιμοποιημένου ωαρίου και μετέφερε στη θέση του τον πυρήνα ενός σωματικού κυττάρου. Τα πειράματα αυτά έγιναν με κύτταρα βατράχου *Xenopus laevis*. Το υβριδικό κύτταρο συμπεριφέρθηκε σαν ζυγωτό, καθώς μετά από εμφύτευσή του στη μήτρα παρένθετης μητέρας έδωσε γένεση σε έναν νέο οργανισμό, πανομοιότυπο με τον οργανισμό από τον οποίο απομονώθηκε το αρχικό σωματικό κύτταρο. Ο τρόπος αυτός επαναπρογραμματισμού ονομάστηκε **μεταφορά πυρήνα σωματικού κυττάρου (Somatic Cell Nuclear Transfer, SCNT)** κι ήταν η πρώτη απόδειξη πως η διαφοροποιημένη κατάσταση των κυττάρων μπορεί να αναστραφεί. Το πείραμα αυτό απέδειξε επίσης πως τα γονιδιακά προϊόντα στο κυτταρόπλασμα του ωοκυττάρου έχουν τη δύναμη να επαναπρογραμματίσουν έναν τελικώς διαφοροποιημένο πυρήνα.

Παρόμοιας λογικής είναι και ο επαναπρογραμματισμός που βασίζεται σε **σύντηξη κυττάρων (cell fusion)**. Σε αυτόν το τύπο επαναπρογραμματισμού διαφοροποιημένα κύτταρα συντήκονται με εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Και πάλι, ο διαφοροποιημένος πυρήνας επαναπρογραμματίζεται σε πυρήνα βλαστικού κυττάρου ως αποτέλεσμα της έκθεσης του στο κυτταρόπλασμα του εμβρυονικού βλαστικού κυττάρου¹³.

Το 2006 και με βάση τα ευρήματα των παραπάνω ερευνών, πραγματοποιήθηκε από τους Takahashi και Yamanaka το πρώτο πείραμα επαναπρογραμματισμού διαφοροποιημένων κυττάρων σε πλειοδύναμα (pluripotent) με **εκτοπική υπρέκφραση μεταγραφικών παραγόντων**¹⁴. Οι ερευνητές έλεγξαν την επίδραση της υπερέκφρασης σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες ποντικού (Mouse Embryonic Fibroblasts, MEFs), μεμονωμένα και σε συνδυασμούς, 24 μεταγραφικών παραγόντων, που ήταν γνωστό ότι παίζουν ρόλο στην εγκαθίδρυση και διατήρηση της πολυδυναμίας¹⁵. Αποδείχθηκε πως ένα σύνολο τεσσάρων μεταγραφικών παραγόντων είναι αρκετό για τον επαναπρογραμματισμό των MEFs σε κύτταρα με χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά των ESCs. Οι τέσσερις μεταγραφικοί παράγοντες είναι οι Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc (OSKM) και είναι γνωστοί ως **OSKM παράγοντες ή παράγοντες Yamanaka**, ενώ τα κύτταρα που προκύπτουν από αυτή τη διαδικασία ονομάζονται **επαγώμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (induced Pluripotent Stem Cells, iPSCs)**. Έκτοτε έχουν πραγματοποιηθεί πλήθος πειραμάτων, στα οποία έχει επιτευχθεί επαναπρογραμματισμός με διαφορετικό συνδυασμό μεταγραφικών παραγόντων^{16,17}, miRNAs¹⁸ καθώς και μέσω επίδρασης με χημικά μόρια^{19,20} (**Εικόνα 8**), ωστόσο ο επαναπρογραμματισμός με εξωγενή υπερέκφραση των OSKM παραγόντων παραμένει ο πλέον διαδεδομένος τρόπος.



Εικόνα 8. Οι διαφορετικοί τρόποι επαναπρογραμματισμού σωματικών κυττάρων σε πολυδύναμα (από Yamanaka, Takahashi, 2015).

3.4.3. Στοχαστικότητα κυτταρικού επαναπρογραμματισμού

Η δημιουργία iPSCs μέσω εξωγενούς υπερέκφρασης των παραγόντων Yamanaka εμφανίζει πολύ μικρό ποσοστό επιτυχίας. Τα πρώτα πειράματα των Takahashi και Yamanaka πέτυχαν μετατροπή σε iPSCs μόλις στο 0,05% της αρχικής καλλιέργειας MEFs²¹. Σήμερα, με πολλές δοκιμές και τροποποιήσεις του αρχικού πρωτοκόλλου η μεγαλύτερη απόδοση επαναπρογραμματισμού που έχει αναφερθεί είναι 3%²². Έχουν προταθεί 2 μοντέλα επαναπρογραμματισμού για την ερμηνεία αυτού του φαινομένου, το ελιτιστικό και το στοχαστικό μοντέλο²¹.

Σύμφωνα με το **ελιτιστικό μοντέλο** μόνο συγκεκριμένα κύτταρα από τον αρχικό κυτταρικό πληθυσμό έχουν τη δυνατότητα να επαναπρογραμματιστούν σε ESCs. Πριν από την επαγωγή της διαδικασίας, είναι προκαθορισμένο το ποια κύτταρα δύνανται να την ολοκληρώσουν, λόγω συγκεκριμένων ενδογενών χαρακτηριστικών που ευνοούν τη μετάβαση στην πολυδυναμία. Ως προνομιούχα κύτταρα θεωρούνται κυρίως τα πλειοδύναμα (multipotent) κύτταρα που υπάρχουν φυσιολογικά στους ιστούς, και που

ενδεχομένως απομονώνονται μαζί με τα τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα. Η ισχύς του μοντέλου αυτού αποδυναμώνεται αφενός από πειράματα βελτιστοποίησης των αρχικών πρωτοκόλλων που αυξάνουν την αρχική αποτελεσματικότητα έως και το 3% (δεδομένου ότι τα πλειοδύναμα κύτταρα συνιστούν λιγότερο από 1% του ιστού από τον οποίο προέρχονται), αφετέρου από πειράματα επιτυχούς επαναπρογραμματισμού τελικώς διαφοροποιημένων T- και B- λεμφοκυττάρων.

Σύμφωνα με το **στοχαστικό μοντέλο** κάθε κύτταρο έχει τη δυνατότητα να μετατραπεί σε iPSC. Η χαμηλή αποτελεσματικότητα, καθώς και η αδυναμία να προβλέψουμε ποια κύτταρα θα επαναπρογραμματιστούν και ποια όχι, οφείλονται σε στοχαστικά γεγονότα που συμβαίνουν κατά τη διαδικασία. Το μεγάλο ζήτημα κατά τον επαναπρογραμματισμό είναι η ριζική αναδιαμόρφωση του επιγενετικού τοπίου. Τα πολυδύναμα κύτταρα έχουν μια πιο ευέλικτη και προσβάσιμη χρωματίνη σε σχέση με τα διαφοροποιημένα, γεγονός που επιβάλλει μια σειρά επιγενετικών αλλαγών, όπως απομεθυλίωση του DNA και ακετυλίωση των ιστονών, για την επιτυχή μετάβαση στην πολυδυναμία. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις είναι συνήθως αποτέλεσμα συνεργασίας πολλών παραγόντων, και είναι ακριβώς οι πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις που αφήνουν το περιθώριο για εκδήλωση στοχαστικότητας στα βιολογικά συστήματα. Το γεγονός πως οι OSKM δεν έχουν εγγενείς ιδιότητες για *άμεσες* δράσεις επιγενετικών τροποποιήσεων, σε συνδυασμό με το ότι η επίδραση με χημικά μόρια που προωθούν επιγενετικές τροποποιήσεις (πχ βαλπροϊκό οξύ ως παράγοντας καταστολής των αποακετυλασών) αυξάνουν την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας, επιβεβαιώνει αυτό το μοντέλο²¹.

3.4.4. Τα στάδια του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού

Οι μηχανισμοί του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού μέσω υπερέκφρασης των παραγόντων Yamanaka έχουν αποτελέσει αντικείμενο εντατικής έρευνας στο τομέα της Μοριακής Βιολογίας. Τα μέχρι σήμερα δεδομένα, υποστηρίζουν την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε δύο κύματα αλλαγών, από τα οποία το πρώτο εξασφαλίζει την αποδόμηση του προφίλ έκφρασης της διαφοροποιημένης κατάστασης, και το δεύτερο εγκαθιδρύει την έκφραση γονιδίων πολυδυναμίας²³. Βλέπουμε λοιπόν, πως το κύτταρο πρώτα χάνει την εξειδίκευσή του, κι έπειτα κατακτά την πολυδυναμία.

Σύμφωνα με το παρόν μοντέλο, η διαδικασία πραγματοποιείται σε 3 φάσεις: μια φάση έναρξης, μια φάση ηρεμίας και μια φάση σταθεροποίησης²⁴ (**Εικόνα 9**).

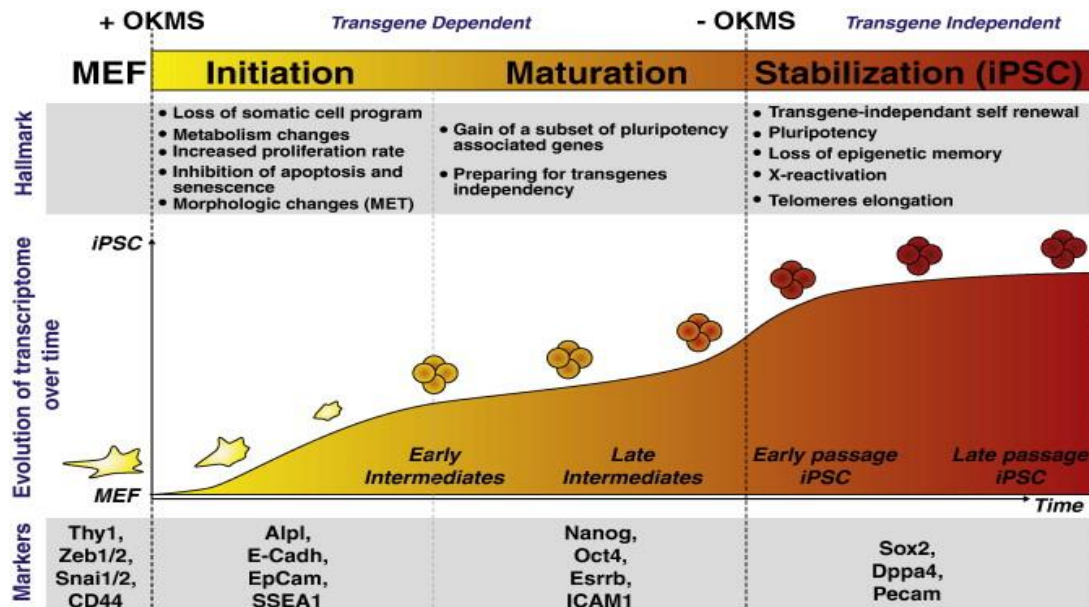
Φάση έναρξης (Initiation phase):

Κατά τη φάση έναρξης τα κύτταρα μεταβαίνουν από τη *μεσεγχυματική στην επιθηλιακή κατάσταση* (mesenchymal to epithelial transition, **MET**), κατά την οποία αλλάζουν σχήμα (ο

επιμηκυσμένος μεσεγχυματικός φαινότυπος αντικαθίσταται από τον σφαιρικό επιθηλιακό), εκφράζουν επιθηλιακές επιφανειακές πρωτεΐνες και σχηματίζουν συστάδες²⁵. Επίσης σε αυτή τη φάση τα κύτταρα αυξάνουν τον ρυθμό πολλαπλασιασμού τους, μειώνουν την έκφραση γονιδίων ανάπτυξης και εμφανίζουν πρώιμους δείκτες πολυδυναμίας²⁶. Η MET συμβαίνει τις πρώτες 4 μέρες του επαναπρογραμματισμού και είναι απόρροια του **πρώτου κύματος αλλαγών στη γονιδιακή έκφραση του επαναπρογραμματισμού (first transcriptional wave of reprogramming)**. Επιπλέον, κατά τη φάση αυτή αλλάζει το πρότυπο ιστονικής μεθυλίωσης σε πολλές θέσεις της χρωματίνης· γονίδια πολυδυναμίας συγκεντρώνουν ενεργοποιητικά πρότυπα μεθυλίωσης στις ιστόνες τους για να ενεργοποιηθούν σε μεταγενέστερο στάδιο, ενώ ιστόνες σε θέσεις σωματικών γονιδίων μεθυλιώνονται κατασταλτικά και αποσιωπούνται. Δείκτες επαναπρογραμματισμού του σταδίου αυτού αποτελούν η απενεργοποίηση του γονιδίου Thy1 (Ημέρες 1-2) και η ενεργοποίηση του εμβρυϊκού αντιγόνου SSEA1 (Ημέρες 3-5) που φαίνεται πως συμπίπτει με τη MET²⁷.

Φάση ωρίμανσης (Maturation phase):

Στη φάση αυτή εκδηλώνεται το **2^ο κύμα μεταβολών στη γονιδιακή έκφραση (2nd transcriptional wave)**, μετά από μια περίοδο ηρεμίας, στην οποία δεν παρατηρούνται ραγδαίες μεταβολές στην έκφραση των γονιδίων. Κατά τη φάση ηρεμίας συμβαίνουν επιγενετικές αλλαγές και αλλαγές στη δομή της χρωματίνης που προετοιμάζουν το έδαφος



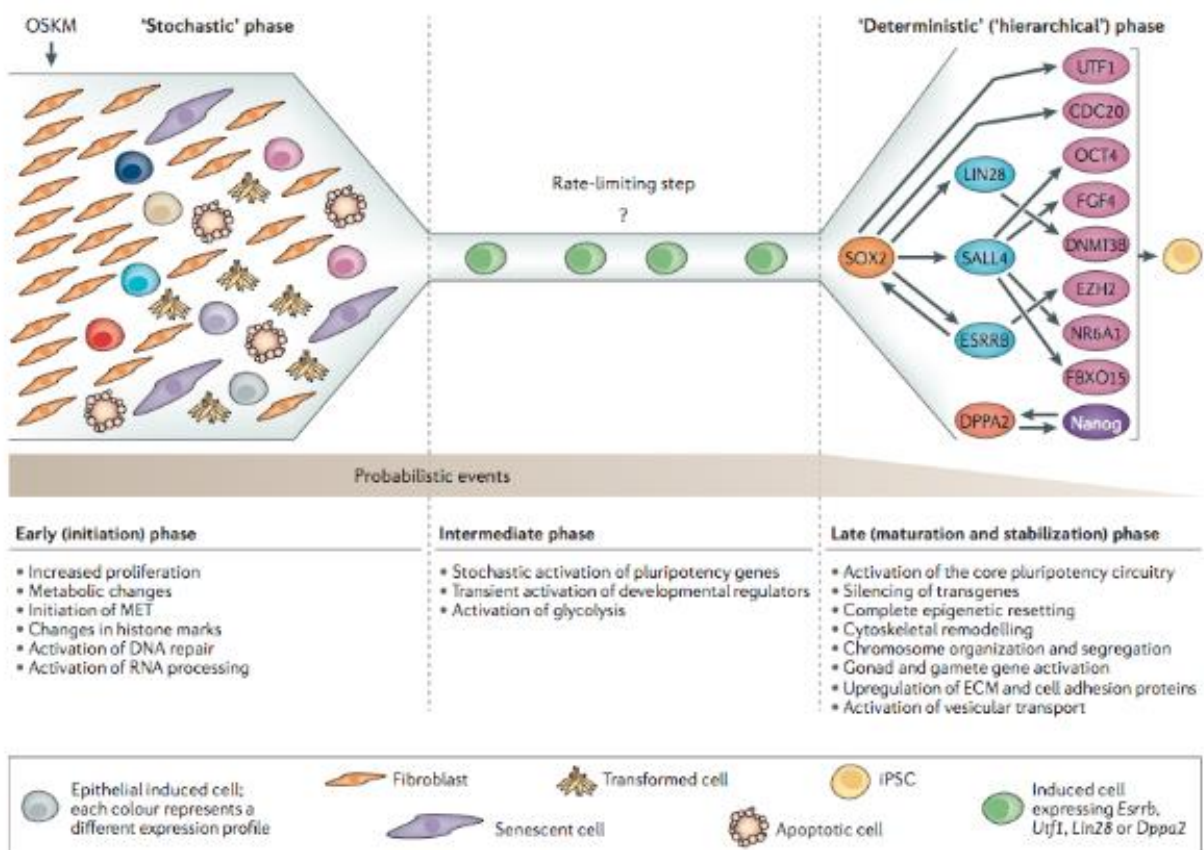
Εικόνα 9. Οι 3 φάσεις του επαναπρογραμματισμού. Σημειώνονται οι αλλαγές στους δείκτες, στη γονιδιακή έκφραση και στην δομή της χρωματίνης κατά την πορεία επαναπρογραμματισμού. Φαίνονται επίσης τα δύο κύματα μεταγραφικών αλλαγών, το ένα στην πρώτη φάση και το δεύτερο στο τέλος της δεύτερης φάσης (από David & Polo, 2014).

για την καθιέρωση της πολυδυναμίας. Το 2^ο κύμα μεταγραφικών αλλαγών συμβαίνει τις ημέρες 9-12 και αφορά στην έκφραση γονιδίων πολυδυναμίας και γονιδίων εμβρυϊκής ανάπτυξης²⁸. Δείκτης αυτού του σταδίου θεωρείται του ενδογενούς Oct4 (γονίδιο *Pou5f1*) (Ημέρα 8) και λίγο αργότερα του Nanog²⁹.

Φάση σταθεροποίησης (Stabilization phase):

Η είσοδος στη φάση σταθεροποίησης σηματοδοτείται από την έκφραση του Sox2 (στα κύτταρα που θα καταφέρουν να επαναπρογραμματιστούν)³⁰. Ο Sox2 μέσω μιας αλυσίδας ενεργοποίησης γονιδίων θα οδηγήσει στην ενεργοποίηση του βασικού γονιδιακού δικτύου της πολυδύναμης κατάστασης. Από κει και πέρα, η πολυδυναμία διατηρείται ανεξάρτητα της εξωγενούς έκφρασης των OSKM^{27,30,31}.

Οι δύο πρώτες φάσεις διέπονται από στοχαστικότητα, ενώ η τελευταία θεωρείται ότι περιλαμβάνει ντετερμινιστικά γεγονότα. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, της **αρχικά**



Εικόνα 10. Ο επαναπρογραμματισμός περιλαμβάνει 2 φάσεις στοχαστικότητας και μια ντετερμινιστική φάση. Κατά τη στοχαστική φάση καθορίζεται με τυχαίο τρόπο ο υποπληθυσμός των κυττάρων που θα ανακτήσουν την πολυδυναμία (από Buganim et al., 2013).

στοχαστικής και τελικά ντετερμινιστικής διαδικασίας (early stochastic and hierarchic late phase)³⁰, η ικανότητα των κυττάρων να ανακτήσουν την πολυδυναμία καθορίζεται από μια σειρά μοριακών γεγονότων που συμβαίνουν (ή όχι) *τυχαιοκρατικά σαν σύνολο* κατά τις 2 πρώτες φάσεις του επαναπρογραμματισμού. Όσα κύτταρα εισέλθουν στην τελευταία φάση έχοντας αποκτήσει τις απαραίτητες ιδιότητες από τις πρώτες 2 φάσεις, θα οδηγηθούν με ντετερμινιστικό τρόπο στην πολυδυναμία (**Εικόνα 10**)³⁰.

3.4.5. Η δράση των OSKM παραγόντων

Ο επαναπρογραμματισμός των κυττάρων μέσω υπερέκφρασης των OSKM παραγόντων προϋποθέτει την μετάβαση της χρωματίνης από μια κλειστή, απρόσιτη δομή σε μια ανοιχτή, προσβάσιμη. Το ερώτημα που ανακύπτει είναι πώς οι OSKM προσεγγίζουν αρχικά τους στόχους τους στην κλειστή χρωματίνη των διαφοροποιημένων κυττάρων. Τα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν τη δράση των **OSK** ως **πρωτοπόρων μεταγραφικών παραγόντων (pioneer factors)**· οι OSKM παράγοντες έχουν τη δυνατότητα να προσδένονται σε περιοχές κλειστής, μη προσβάσιμης χρωματίνης και να την ενεργοποιούν, συνήθως μέσω στρατολόγησης τροποποιητών της χρωματίνης²⁴. Η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης αποτελεί το κρίσιμο βήμα στα πρώτα στάδια της διαδικασίας, καθώς όλα τα γονίδια πολυδυναμίας έχουν συγκεντρώσει κατά την διαφοροποίηση κατασταλτικές επιγενετικές τροποποιήσεις. Οι OSK προσδένονται σε υποκινητές και ρυθμιστικά στοιχεία (ενισχυτές) γονιδίων πολυδυναμίας, όμως η γονιδιακή τους στόχευση δεν περιορίζεται στο σύνολο των γονιδίων που είναι ενεργά στα ESCs. Ο ρόλος του **c-Myc** είναι κυρίως επικουρικός, καθώς ενισχύει γενικά την έκφραση των γονιδίων με ενεργό υποκινητή., αν και σε κάποιες περιπτώσεις φαίνεται πως διευκολύνει την δέσμευση των OSK στο DNA μέσω συνεργατικής πρόσδεσης²⁴. Επίσης ο c-Myc αυξάνει την επιβίωση και τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων στα πρώιμα στάδια της διαδικασίας, καθιστώντας πιο πιθανή την αποτελεσματική ολοκλήρωση του επαναπρογραμματισμού.

Το πρώτο κύμα μεταγραφικών αλλαγών επάγεται κυρίως από το c-Myc και συμβαίνει σε όλα τα κύτταρα του αρχικού πληθυσμού. Αντίθετα, το δεύτερο κύμα περιορίζεται στα κύτταρα που θα ολοκληρώσουν με επιτυχία την διαδικασία και χαρακτηρίζεται από τη σταδιακή αύξηση της έκφρασης των γονιδιακών στόχων των Oct4 και Sox2. Η δράση του Klf4 φαίνεται να υποστηρίζει και τα δύο κύματα· στο πρώτο καταστέλλει την έκφραση σωματικών γονιδίων, ενώ στο δεύτερο συμβάλει στην έκφραση γονιδίων πολυδυναμίας.

Συμπερασματικά, η δράση των OSKM κατά τον επαναπρογραμματισμό έχει δύο αποστολές: πρώτον, την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης σε πιο ευέλικτη και προσβάσιμη δομή, ώστε να επιτρέπεται η ελεύθερη πρόσβαση από ρυθμιστικές πρωτεΐνες σε γονίδια πέραν αυτών που σχετίζονται με τη γονιδιακή υπογραφή του εκάστοτε κυτταρικού τύπου

και μόνο. Δεύτερον, η ρύθμιση της έκφρασης πληθώρας γονιδίων, τόσο για την κατασίγαση των ιστοειδικών γονιδίων, όσο και για την ενεργοποίηση των γονιδίων που καθιερώνουν και διατηρούν την πολυδυναμία.

3.4.6. Το επαγόμενο δίκτυο των 9 μεταγραφικών παραγόντων

Η έρευνα στο εργαστήριο έχει αποκαλύψει πως η υπερέκφραση των OSKM παραγόντων επάγει τη σταδιακή συγκρότηση ενός ρυθμιστικού δικτύου (gene regulatory network) 9 μεταγραφικών παραγόντων, η οποία αν επιτευχθεί μέχρι την ημέρα 6 αυξάνει σημαντικά την πιθανότητα ανάκτησης της πολυδυναμίας³².

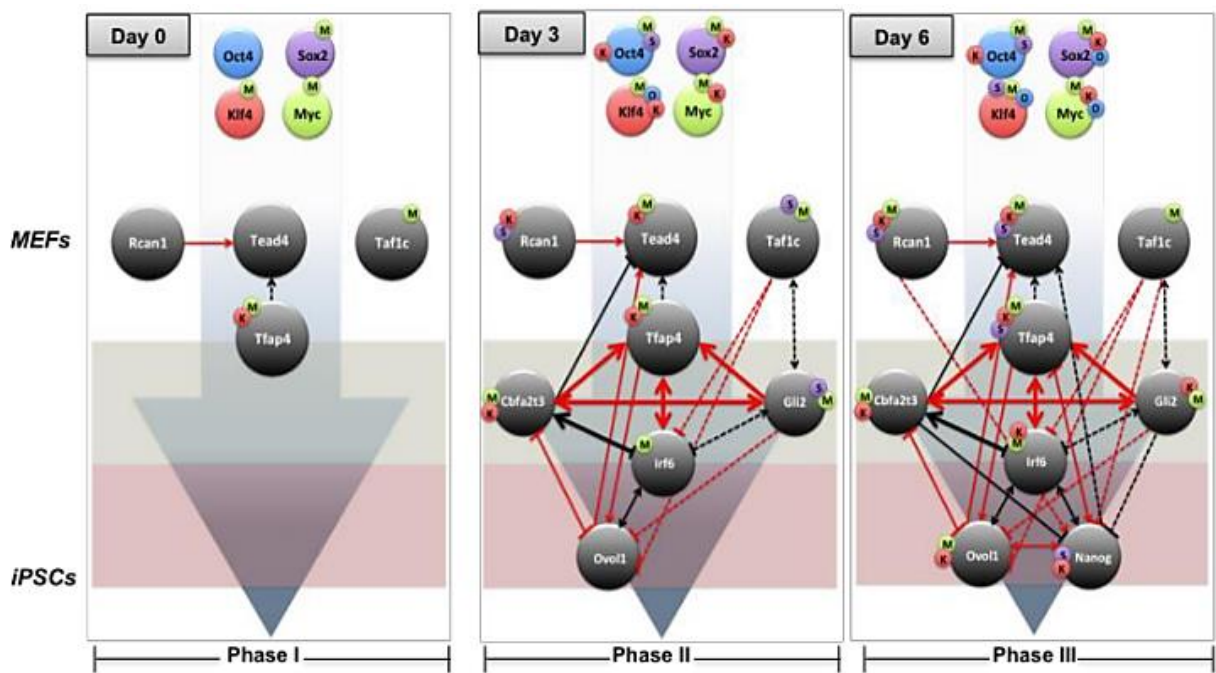
Η αρχική ιδέα περιελάμβανε την επαγωγή επαναπρογραμματισμού σε δύο διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους- ηπατοκύτταρα ποντικού (mouse Hepatocytes, mHEPs) και εμβρυονικούς ινοβλάστες ποντικού (Mouse Embryonic Fibroblasts, MEFs), και τη σύγκριση της γονιδιακής τους έκφρασης σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία στο διάστημα των 6 πρώτων ημερών της διαδικασίας. Η αρχική υπόθεση ήταν πως η έκφραση των γονιδίων με θεμελιώδη ρόλο στην ανάκτηση της πολυδυναμίας θα αυξάνεται σε όλα τα επί επαναπρογραμματισμό κύτταρα, ανεξαρτήτως αρχικού κυτταρικού τύπου. Η 6^η ημέρα του επαναπρογραμματισμού επιλέχθηκε σαν ημέρα ορόσημο, καθώς τότε κάνουν την εμφάνισή τους στην επαναπρογραμματιζόμενη καλλιέργεια σχηματισμοί πρώιμων αποικιών iPSCs. Από τα γονίδια που βρέθηκαν με αυξημένα επίπεδα έκφρασης και στους δύο κυτταρικούς τύπους, τα 30 κωδικοποιούσαν μεταγραφικούς παράγοντες. Ο ρόλος αυτών των 30 μεταγραφικών παραγόντων διερευνήθηκε με πειράματα μείωσης της έκφρασης τους (knockdown) κατά τη διάρκεια του επαναπρογραμματισμού, σε κύτταρα MEFs. Στο τέλος κάθε πειράματος επαναπρογραμματισμού γινόταν εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της διαδικασίας. Με αυτό τον τρόπο βρέθηκε πως οι 30 μεταγραφικοί παράγοντες συγκροτούσαν 3 λειτουργικές ομάδες, εκ των οποίων η πρώτη φάνηκε πως καταστέλλει τον επαναπρογραμματισμό, η δεύτερη πως δεν τον επηρεάζει, ενώ η τρίτη ομάδα βρέθηκε πως ρυθμίζει θετικά τη διαδικασία. Η τρίτη ομάδα αποτελούνταν από **9 μεταγραφικούς παράγοντες**, τους ***Cbfa2t3*, *Gli2*, *Irf6*, *Ovol1*, *Rcan1*, *Taf1c*, *Tead4*, *Tfap4*** και τον ***Nanog***.

Το πρότυπο έκφρασης των 9 αυτών μεταγραφικών παραγόντων εξετάστηκε λεπτομερέστερα με πειράματα RNA in situ υβριδισμού. Από τους 9 παράγοντες, οι 5- ***Nanog*, *Ovol1*, *Irf6*, *Cbfa2t3*, *Gli2***, εμφάνισαν **ειδική έκφραση** στους σχηματισμούς συσσωματωμένων κυττάρων (Ημέρα 3) και **στις pre-iPSC αποικίες (Ημέρα 6)** ενώ οι υπόλοιποι 4 μεταγραφικοί παράγοντες φάνηκε πως εκφράζονται σποραδικά τόσο εντός όσο και εκτός των pre-iPSC σχηματισμών. Ακόμη, **5 από τους παράγοντες, οι *Ovol1*, *Irf6*, *Cbfa2t3*, *Gli2* και *Nanog*** βρέθηκε πως εκφράζονται ως αποτέλεσμα των διαδικασιών του επαναπρογραμματισμού, **η έκφρασή τους δηλαδή είναι επαγόμενη κατά τον**

επαναπρογραμματισμό, σε αντίθεση με τους υπόλοιπους 4 (*Tead4*, *Taf1c*, *Rcan1*, *Tfap4*) οι οποίοι εκφράζονται στα κύτταρα και πριν την επαγωγή της διαδικασίας (Ημέρα 0) (**Εικόνα 11**). Στη συνέχεια, με πειράματα single-cell qPCR υπολογίστηκε το ποσοστό συνέκφρασης των 9 μεταγραφικών παραγόντων σε κύτταρα των pre-iPSC αποικιών, αλλά και το ποσοστό έκφρασης καθενός από αυτούς στις pre-iPSC αποικίες μεμονωμένα. Με δεδομένα αυτά, υπολογίστηκε η πιθανότητα με την οποία οι 9 μεταγραφικοί παράγοντες συνεκφράζονται στις πρώιμες αποικίες αλλά και η πιθανότητα οι 9 μεταγραφικοί παράγοντες να συνεκφράζονται *τυχαία* σε αυτές. Από αυτή την ανάλυση βρέθηκε πως οι 9 μεταγραφικοί παράγοντες **συνεκφράζονται στις πρώιμες αποικίες με μη τυχαίο τρόπο**.

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ChIP-seq για τους 9 παράγοντες (στα χρονικά σημεία 18h, ημέρα 3, ημέρα 5), αποκαλύπτοντας πως καθένας από αυτούς αποτελεί στόχο των OSKM παραγόντων. Επίσης, αποκαλύφθηκε το πρότυπο πρόσδεσης των OSKM στις ρυθμιστικές αλληλουχίες κάθε μεταγραφικού παράγοντα.

Με αυτά τα δεδομένα, κατασκευάστηκε ένα δίκτυο 9 μεταγραφικών παραγόντων, το οποίο συγκροτείται στοχαστικά από την επαγωγή του επαναπρογραμματισμού μέχρι την



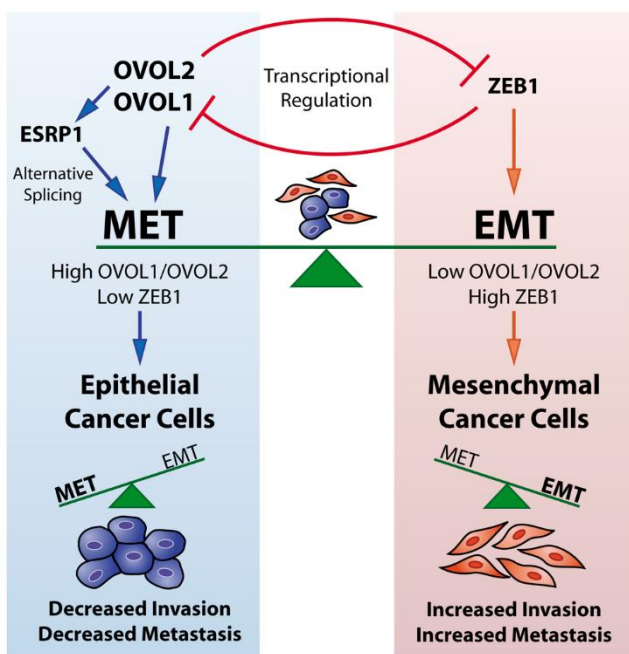
Εικόνα 11. Τα δίκτυο των 9 μεταγραφικών παραγόντων και η σταδιακή συγκρότησή του σε 3 φάσεις, από την Ημέρα 0 έως την Ημέρα 6. Η άρτια συγκρότηση του δικτύου έως την Ημέρα 6 αυξάνει σημαντικά την πιθανότητα επιτυχούς επαναπρογραμματισμού. Φαίνονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των 9 μεταγραφικών παραγόντων, καθώς και ο έλεγχος της έκφρασής τους από τους OSKM παράγοντες. Η συγκρότηση του δικτύου είναι στοχαστική. Ο *Nanog* είναι ο παράγοντας που προστίθεται τελευταίος στο δίκτυο την Ημέρα 6, και θεωρείται πως σφραγίζει την είσοδο της διαδικασίας στη ντετερμινιστική φάση (Parathanasiou et al, in press).

ημέρα 6, ως αποτέλεσμα της δράσης των OSKM παραγόντων και ως δείκτης των κυττάρων εκείνων που με αυξημένη πιθανότητα θα ανακτήσουν την πολυδυναμία (**Εικόνα 11**).

3.4.6.1. Ο μεταγραφικός παράγοντας *Ovol1*

Ο μεταγραφικός παράγοντας **Ovol1 (Ovo-like 1)** λαμβάνει την ονομασία του από τον αντίστοιχο μεταγραφικό παράγοντα **Ovo** της *Drosophila melanogaster* που ταυτοποιήθηκε πρώτος. Πρόκειται για έναν μεταγραφικό παράγοντα που προσδένεται στο DNA με δάχτυλα ψευδαργύρου³³.

Στην Δροσόφιλα ο Ovo λειτουργεί τόσο κατασταλτικά όσο και ενεργοποιητικά της μεταγραφής, και συμμετέχει στην ανάπτυξη της επιδερμίδας (διαφοροποίηση κυττάρων σε επιδερμικά) καθώς και στην επιβίωση και διαφοροποίηση των θηλυκών γαμετικών κυττάρων (αναφορά από FlyBase). Το 1998 ένας μεταγραφικός παράγοντας παρόμοιας δομής και λειτουργίας με τον Ovo ταυτοποιήθηκε στο ποντίκι³⁴. Σήμερα είναι γνωστοί 3 μεταγραφικοί παράγοντες Ovo-like στο ποντίκι και στον άνθρωπο (Ovol1, Ovol2, Ovol3). Ο *Ovol1* έχει 4 δάχτυλα ψευδαργύρου και εμπλέκεται σε πλήθος αναπτυξιακές διαδικασίες και στους δύο οργανισμούς, όπως η ανάπτυξη της επιδερμίδας, η σπερματογένεση, η ανάπτυξη του ήπατος. Αναφέρεται επίσης πώς ο Ovol1 ελέγχει αρνητικά τον πολλαπλασιασμό των βλαστικών κυττάρων³³.

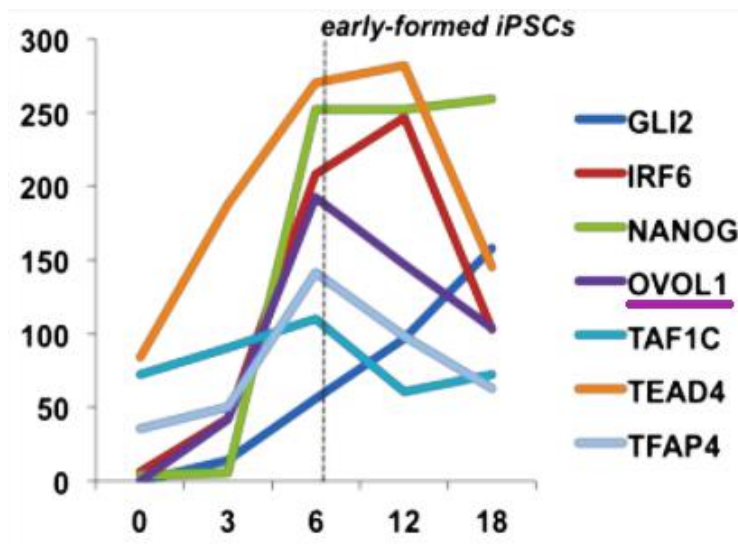


Εικόνα 12. Ο ρόλος των *Ovol1*, *Ovol2* στη μεταστατική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων. Η δράση των *Ovol1*, *Ovol2* μπλοκάρει την EMT και προάγει τη MET, μειώνοντας την κινητικότητα των κυττάρων (από Roca et al, 2013).

Ο Ovol1 έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον των επιστημόνων για το ρόλο που παίζει μαζί με τον Ovol2 στη μεταστατική συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων. Πριν τη μετάσταση, τα καρκινικά κύτταρα υφίστανται μια διαδικασία **μετάβασης από την επιθηλιακή στη μεσεγχυματική κατάσταση** (epithelial to mesenchymal transition, **EMT**), κατά την οποία χάνουν τις διακυτταρικές συνδέσεις, αποκολλώνται από τον αρχικό όγκο και αποκτούν έναν πιο μεσεγχυματικό φαινότυπο που τους προσδίδει την απαραίτητη κινητικότητα για να διηθήσουν τους γύρω ιστούς και να μετακινηθούν σε νέες θέσεις. Σε μελέτες αυτού του φαινομένου, βρέθηκε πως οι Ovol1, Ovol2 αναχαιτίζουν την

ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να μεθίστανται, **μπλοκάροντας την EMT** αλλά και **προάγοντας την MET**, δηλαδή την αντίστροφη της EMT διαδικασία³⁵(**Εικόνα 12**).

Όπως είδαμε παραπάνω, ο *Ovol1* είναι μέρος του δικτύου των 9 μεταγραφικών παραγόντων που ενεργοποιείται από τους OSKM μέχρι την ημέρα 6 του επαναπρογραμματισμού. Ο *Ovol1* είναι ένας από τους 5 μεταγραφικούς παράγοντες που φάνηκε πως εκφράζεται επαγόμενα και ειδικά εντός των πρώιμων αποικιών iPSCs. Η έκφραση του *Ovol1* αυξάνεται σταδιακά από την ημέρα της επαγωγής της διαδικασίας και προστίθεται λειτουργικά στο δίκτυο την ημέρα 3, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 11**. Στην **Εικόνα 13** φαίνεται λεπτομερέστερα το πρότυπο έκφρασης του κατά την πορεία του επαναπρογραμματισμού. Η έκφρασή του ξεκινά μετά την Ημέρα 0 κατόπιν ενεργοποίησης των OSKM, όμως την Ημέρα 3 ο ρυθμός έκφρασης αυξάνεται ραγδαία για να κορυφωθεί την 6^η Ημέρα. Ο *Ovol1* προστίθεται προτελευταίος στο ρυθμιστικό δίκτυο. Μετά την προσθήκη του *Nanog* και την ολοκλήρωση του δικτύου την Ημέρα 6, η έκφραση του *Ovol1* αρχίζει να μειώνεται³².



Εικόνα 13. Το πρότυπο έκφρασης των 9 μεταγραφικών παραγόντων του δικτύου. Με μωβ ο *Ovol1*. Την 3^η Ημέρα αυξάνεται ο ρυθμός έκφρασης του για να κορυφωθεί την Ημέρα 6 (από Parathanasiou et al, in press).

Πειράματα υπερέκφρασης του *Ovol1* καθόλη τη διάρκεια του επαναπρογραμματισμού αποκάλυψαν πως η συνεχής δράση του μεταγραφικού παράγοντα μειώνει την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας. Επίσης, η καταστολή του *Ovol1* είχε ως αποτέλεσμα τη δραματική μείωση του ποσοστού ανάκτησης της πολυδυναμίας. Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν ότι η δράση του *Ovol1* είναι απαραίτητη μόνο συγκεκριμένες ημέρες για τον κυτταρικό επαναπρογραμματισμό, ενώ η επιτυχής ολοκλήρωση της διαδικασίας προϋποθέτει την καταστολή του.

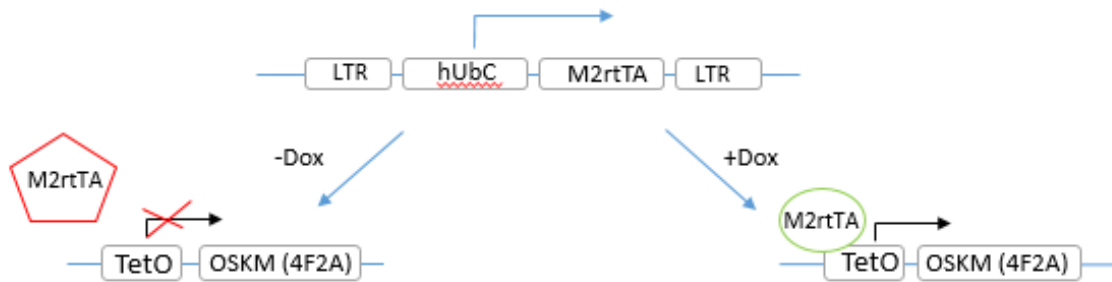
4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ-ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

Ο κυτταρικός επαναπρογραμματισμός είναι η διαδικασία μετάβασης των κυττάρων από τη διαφοροποιημένη κατάσταση στην πολυδύναμη κατάσταση των βλαστοκυττάρων. Επιτυγχάνεται με την εξωγενή υπερέκφραση των OSKM παραγόντων, οι οποίοι επιφέρουν δραματικές αλλαγές στη δομή της χρωματίνης των κυττάρων και ως εκ τούτου μεταβάλλουν άρδην το προφίλ της γονιδιακής έκφρασης. Η μικρή αποτελεσματικότητα της διαδικασίας, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι δεν υπάρχουν στοιχεία που να υποδεικνύουν ποια κύτταρα θα καταφέρουν να επαναπρογραμματιστούν και ποια όχι, οδηγεί στο συμπέρασμα πως ο επαναπρογραμματισμός διέπεται από στοχαστικές συνιστώσες. Προηγούμενη έρευνα του εργαστηρίου ανακάλυψε την σταδιακή ενεργοποίηση ενός δικτύου εννιά (9) μεταγραφικών παραγόντων, η συγκρότηση του οποίου αν επιτευχθεί με αρτιότητα μέχρι την ημέρα 6 του επαναπρογραμματισμού, αυξάνει σημαντικά την πιθανότητα του επιτυχούς επαναπρογραμματισμού.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ανακάλυψη *cis* ρυθμιστικών στοιχείων του γονιδίου ενός εκ των εννιά μεταγραφικών παραγόντων του δικτύου, του *Ono1*, καθώς και η διερεύνηση του ρόλου του *Ono1* στη διαδικασία του επαναπρογραμματισμού. Συγκεκριμένα, ο ρόλος του *Ono1* στον επαναπρογραμματισμό, βασίστηκε αφενός στην αναζήτηση των γονιδίων-στόχων του μεταγραφικού παράγοντα στο γονιδίωμα των επί επαναπρογραμματισμό κυττάρων, αφετέρου στην σύγκριση της γονιδιακής έκφρασης μεταξύ κυττάρων που εκφράζουν και που δεν εκφράζουν τον *Ono1* την ημέρα 6 του επαναπρογραμματισμού.

Βάση της ερευνητικής προσέγγισης είναι μια πειραματική πλατφόρμα που επιτρέπει την επαναλήψιμη επαγωγή επαναπρογραμματισμού σε κυτταροκαλλιέργειες. Αυτή περιλαμβάνει ένα διαγονιδιακό στέλεχος ποντικού, το οποίο επιτρέπει τον άμεσο επαναπρογραμματισμό κυττάρων ποντικού μέσω της *επαγόμενης* και *ταυτόχρονης* έκφρασης των OSKM παραγόντων με την ίδια στοιχειομετρία. Πιο συγκεκριμένα, το διαγονιδιακό ποντίκι έχει στην 3' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου του κολλαγόνου τύπου 1 (*Col1a1*) μια κασσέτα έκφρασης που ονομάζεται 4F2A· η 4F2A κασσέτα είναι ένα πολυσιστρονικό διαγονίδιο των OSKM παραγόντων, οι οποίοι διαχωρίζονται από αυτό-καταλύσιμα 2A πεπτιδία³⁶. Η έκφραση της κασσέτας ρυθμίζεται από ένα Tet-On σύστημα, στο οποίο η κασσέτα εκφράζεται παρουσία δοξυκυκλίνης (Dox), ενώ απουσία της όχι³⁷. Συστατικά στοιχεία του συστήματος είναι η πρωτεΐνη M2rtTA και ο χειριστής TetO. Η M2rtTA (Mutation 2 reverse tetracycline Transcription Activator) είναι μια χιμαιρική πρωτεΐνη η οποία προσδένεται στον TetO μόνο όταν έχει προσδέσει δοξυκυκλίνη. Όταν η M2rtTA προσδεθεί στον υποκινητή επάγει την έναρξη της μεταγραφής. Έτσι, η δοξυκυκλίνη

λειτουργεί σαν διακόπτης “on-off” για την έκφραση των OSKM παραγόντων, δηλαδή για την έναρξη του επαναπρογραμματισμού (**Εικόνα 14**). Η έκφραση των OSKM από ένα κοινό γονίδιο εξασφαλίζει την συγχρονισμένη και ισόποση μεταγραφή τους, προσδίδοντας στο σύστημα ομοιογένεια και επαναληψιμότητα.

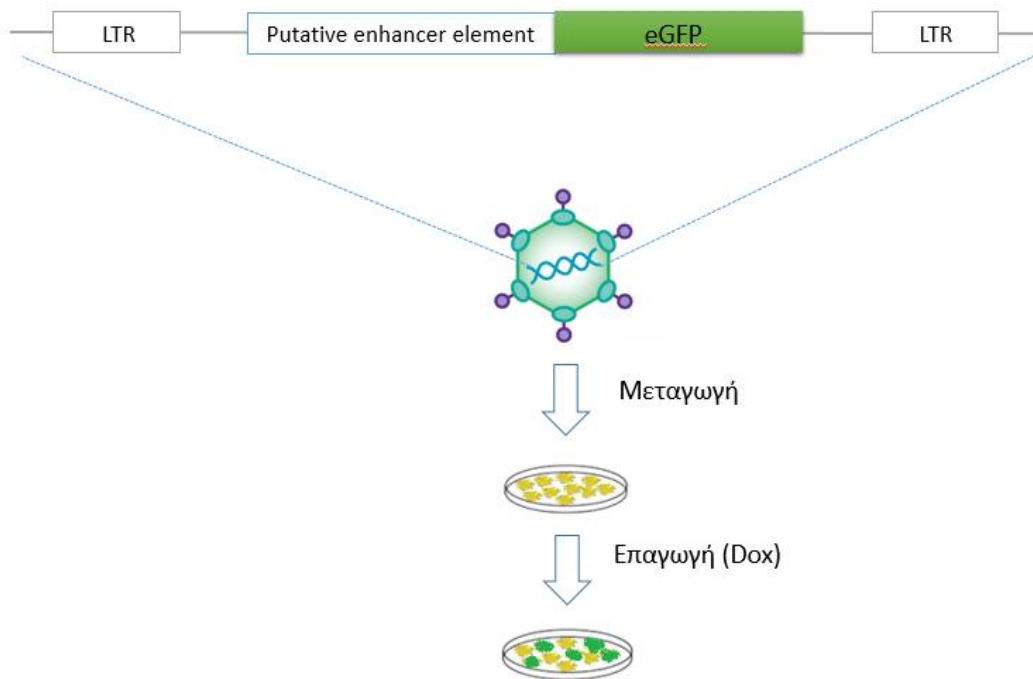


Εικόνα 14. Σχηματική απεικόνιση του Tet-On συστήματος επαναπρογραμματισμού. Οι LTRs (Long terminal repeats) είναι οι αλληλουχίες στο γονιδίωμα των λεντι-ιών που οριοθετούν την περιοχή ενσωμάτωσης στο γονιδίωμα του ξενιστή. Φαίνεται η συνεχής έκφραση της M2rtTA υπό τη ρύθμιση του hUbC υποκινητή. Παρουσία Dox η M2rtTA προσδένεται στον υποκινητή και επάγει την έκφραση της κασσέτας.

Η M2rtTA πρωτεΐνη δεν είναι εγγενές στοιχείο του συστήματος· ως εκ τούτου χορηγείται εξωγενώς στα κύτταρα. Όπως είναι λογικό, η έκφρασή της μέσα στα κύτταρα που πρόκειται να επαναπρογραμματιστούν πρέπει να είναι συνεχής, ώστε να μπορεί να ανταποκρίνεται ανά πάσα στιγμή στην παρουσία Dox. Η M2rtTA χορηγείται στα κύτταρα με μεταγωγή με λεντι-ιούς. Οι λεντι-ιοί έχουν την ιδιότητα να ενσωματώνουν το γενετικό τους υλικό στο γονιδίωμα των κυττάρων τα οποία μολύνουν. Έτσι, κατασκευάσαμε λεντι-ϊικά σωματίδια που είχαν ως γενετικό υλικό ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, το οποίο έφερε το γονίδιο της M2rtTA ρυθμιζόμενο από έναν υποκινητή διαρκούς έκφρασης. Με αυτό τον τρόπο, το γονίδιο της M2rtTA ενσωματώνεται τυχαία στο γονιδίωμα των κυττάρων και εκφράζεται συνεχώς (Εικόνα 1).

Η διαδικασία μεταγωγής με λεντι-ιούς ακολουθήθηκε για οποιαδήποτε υποψήφια ρυθμιστική περιοχή μελετήθηκε. Οι περιοχές ενδιαφέροντος κλωνοποιήθηκαν άνωθεν ενός γονιδίου GFP. Το γονίδιο GFP χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο-ανταποκριτής (reporter gene), καθώς η ρύθμιση της έκφρασής του παρακολουθείται εύκολα από την παραγωγή φθορίζοντος χρώματος, με χρήση μικροσκοπίου φθορισμού. Έτσι, η υποψήφια περιοχή, ως ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου GFP πλέον, συγκροτήθηκε σε λεντι-ϊικά σωματίδια, και

ύστερα από μεταγωγή των κυττάρων ενσωματωνόταν στο γονιδίωμα τους. Με την προσθήκη Dox στην κυτταροκαλλιέργεια ξεκινούσε ο επαναπρογραμματισμός, και η συμπεριφορά της περιοχής ενδιαφέροντος παρακολουθούταν έμμεσα, μέσω της έκφρασης της GFP πρωτεΐνης (reporter assay) (**Εικόνα 15**).



Εικόνα 15. Σύστημα εργασίας για παρακολούθηση της ενεργότητας υποψήφιας ρυθμιστικής περιοχής κατά τον επαναπρογραμματισμό. Οι LTRs (Long terminal repeats) είναι οι αλληλουχίες στο γονιδίωμα των λεντιών που οριοθετούν την περιοχή ενσωμάτωσης στο γονιδίωμα του ξενιστή. Μετά τη διαμόλυνση γίνεται επαγωγή του επαναπρογραμματισμού με επίδραση με Dox και παρακολουθείται η ενεργότητα της ρυθμιστικής περιοχής μέσω της ανίχνευσης του πράσινου φθοριοχρώματος της GFP.

5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1. Συνθήκες καλλιέργειας και αποθήκευσης κυττάρων

5.1.1. Συνθήκες επώασης και θρεπτικό καλλιεργητικό μέσο

Η καλλιέργεια των κυττάρων γίνεται στους 37°C, σε ατμόσφαιρα 95% αέρα και 5% CO₂. Βάση των καλλιεργητικών θρεπτικών μέσων είναι το Dulbecco's Modified Eagles Media (DMEM), στο οποίο προστίθεται 1x διαλύματος αντιβιοτικών πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης (pen-strep), 1x glutaMAX (υποκατάστατο της L-γλουταμίνης που δεν αποδιατάσσεται μέσα στην κυτταροκαλλιέργεια), 1x MEM non-essential amino acids (διάλυμα μη απαραίτητων αμινοξέων που βελτιώνει τις συνθήκες καλλιέργειας) και εμβρυϊκός ορός βοδιού (Fetal Bovine Serum, FBS) σε συγκέντρωση διαφορετική για κάθε τύπο κυττάρων (αναφέρεται στην σχετική για κάθε κυτταρικό τύπο παράγραφο).

5.1.2. Διάρθρωση καλλιέργειας σε υποκαλλιέργειες

Η πυκνότητα των κυττάρων στα πιάτα καλλιέργειας ελέγχεται καθημερινά. Σε περίπτωση πυκνότητας 100% (confluency) τα κύτταρα αποκολλώνται από την επιφάνεια του πιάτου καλλιέργειας (εφόσον είναι προσκολλητικά) και διαχωρίζονται κατόπιν επίδρασης με θρυψίνη, ώστε να διαιρεθούν σε νέες καλλιέργειες (πέρασμα-passaging). Η θρυψίνη είναι μια ενδοπεπτιδάση που διασπά τον πεπτιδικό δεσμό στην αμινοξική αλυσίδα στις θέσεις μετά τα αμινοξέα αργινίνη και λυσίνη³⁸, διακόπτοντας τις διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις που μεσολαβούνται από πρωτεΐνες και τις αλληλεπιδράσεις με την επιφάνεια του πιάτου κυτταροκαλλιέργειας. Για το σκοπό αυτό, αφαιρείται το θρεπτικό μέσο από το πιάτο καλλιέργειας, τα κύτταρα ξεπλένονται με διάλυμα PBS 1x και επώάζονται με διάλυμα θρυψίνης 1x για 5-10min, στους 37°C. Η θρυψίνη απενεργοποιείται με υπερδιπλάσιο όγκο θρεπτικού μέσου, το εναιώρημα μεταφέρεται σε φιαλίδιο τύπου falcon και φυγοκεντρείται στις 1.200rpm για 5min ώστε τα κύτταρα να σχηματίσουν ίζημα (πελέτα, pellet). Τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε θρεπτικό μέσο και μοιράζονται στα πιάτα καλλιέργειας στην επιθυμητή πυκνότητα.

5.1.3. Πάγωμα κυττάρων και αποθήκευση

Η αποθήκευση των κυττάρων για μελλοντική τους χρήση γίνεται στους -80°C σε διάλυμα παγώματος με σύσταση 90% FBS και 10% DMSO (dimethylsulfoxide). Συνήθως παγώνονται κύτταρα που έχουν φτάσει 100% πυκνότητα σε 10cm plate. Θρυψινοποιούνται όπως περιγράφηκε στο 5.1.2. και επαναδιαλύονται σε 3ml διάλυμα παγώματος, για να

μοιραστούν ανά 1ml σε βιδωτό φιαλίδιο χωρητικότητας 1,5ml. Αποθηκεύονται στους -80°C. Το DMSO είναι κρυοπροστατευτικός παράγοντας καθώς αποτρέπει τον σχηματισμό παγοκρυστάλλων μέσα στα κύτταρα³⁹. Σε θερμοκρασία δωματίου όμως είναι ιδιαίτερα τοξικός για τα κύτταρα· ως εκ τούτου οι χειρισμοί από την επαναδιάλυση σε διάλυμα παγώματος μέχρι τη μεταφορά των κυττάρων στους -80°C πρέπει να είναι ταχείς.

Κατά το ξεπάγωμα των κυττάρων, τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C και λίγο πριν λιώσει κι ο τελευταίος κρύσταλλος πάγου (για να μην επιδράσει τοξικά το DMSO) επαναδιαλύονται σε θρεπτικό μέσο (10% σε FBS). Για κάθε πρώτο φιαλίδιο παγωμένων κυττάρων η επαναδιάλυση γίνεται σε 5ml μέσου, και για κάθε επόμενο προστίθεται 1ml θρεπτικού μέσου επιπλέον. Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται σε 1200rpm για 5min, η πελέτα επαναδιαλύεται στο κατάλληλο θρεπτικό μέσο και μοιράζεται στο πιάτο κυτταροκαλλιέργειας.

5.2. Πρωτογενείς καλλιέργειες και κυτταρικές σειρές

5.2.1. Εμβρυονικοί ινοβλάστες ποντικού (Mouse Embryonic Fibroblasts, MEFs)

Οι εμβρυονικοί ινοβλάστες ποντικού (Mouse Embryonic Fibroblasts, MEFs) που χρησιμοποιούμε στην πειραματική διαδικασία απομονώνονται από έμβρυο ποντικού στελέχους C57BL/6. Έχουν σχήμα επίμηκες και διακλαδισμένο και προσκολλώνται στην επιφάνεια του τρυβλίου κυτταροκαλλιέργειας. Τα MEFs, ύστερα από επεξεργασία, χρησιμοποιούνται ως υποστηρικτικά κύτταρα (feeders) για την καλλιέργεια βλαστικών κυττάρων, καθώς δημιουργούν κατάλληλο υπόστρωμα για τον σχηματισμό πολυδύναμων αποικιών. Τα MEFs καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο DMEM με 15%FBS.

5.2.2. Απομόνωση εμβρυονικών ινοβλαστών ποντικού

Οι εμβρυονικοί ινοβλάστες ποντικού απομονώνονται από έμβρυο ποντικού 14 ημερών. Το έμβρυο απομακρύνεται από την έγκυο μητέρα και αφαιρείται προσεκτικά ο αμνιακός σάκος. Στη συνέχεια, απομακρύνεται το κεφάλι (εξώδερμα) και τα σπλαχνικά όργανα (μεσόδερμα) ώστε να παραμείνουν οι μεσοδερμικής προέλευσης ιστοί. Αυτοί τεμαχίζονται με ξυράφι και επωάζονται για 30min σε 0.5ml διαλύματος θρυψίνης 1x, στους 37°C. Η θρυψίνη απενεργοποιείται με την προσθήκη 5ml θρεπτικού μέσου και το εναίωρημα επεξεργάζεται αρχικά με μια σύριγγα διαμέτρου 18G και στη συνέχεια 21G προκειμένου να σπάσουν τα συσσωματώματα. Συμπληρώνεται θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C μέχρι να φτάσουν 100% πυκνότητα. Συνήθως προχωράμε σε πάγωμα των κυττάρων και αποθήκευσή τους στους -80°C για μελλοντική χρήση.

5.2.3. Δημιουργία υποστηρικτικών κυττάρων (Feeders)

Τα κύτταρα feeders είναι MEFs αγρίου τύπου που έχουν χάσει την ικανότητά τους να διαιρούνται ύστερα από επεξεργασία με μιτομυκίνη C. Η μιτομυκίνη εμποδίζει την αντιγραφή του DNA σχηματίζοντας σύμπλοκο με αυτό. Οι feeders χρησιμοποιούνται ως καλλιεργητικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη βλαστικών κυττάρων. Για τη δημιουργία feeders επιδρούμε, σε καλλιέργεια MEFs 100% πυκνότητας (confluency), με θρεπτικό καλλιεργητικό μέσο που περιέχει 10% v/v μιτομυκίνη C συγκέντρωσης 100μg/ml (4,5ml θρεπτικό+0,5ml μιτομυκίνη σε 10cm plate) και επωάζουμε για 3h στους 37°C. Στη συνέχεια ξεπλένουμε δις με διάλυμα PBS 1x και προχωρούμε σε πάγωμα των κυττάρων και αποθήκευση στους -80°C μέχρι την χρήση τους (βλ. 5.1.3.).

5.2.4. Εμβρυονικοί ινοβλάστες ποντικού Col1a1-TetO-OSKM ("4F2")

Πρόκειται για εμβρυονικούς ινοβλάστες του knock in στελέχους ποντικού Col1a1-TetO-OSKM ("4F2"). Χρησιμοποιούνται για τα πειράματα επαναπρογραμματισμού, διότι προσφέρουν τη δυνατότητα της έκφρασης των OSKM παραγόντων με *ελεγχόμενο τρόπο* και με *ίδια στοιχειομετρία*. Το knock in στέλεχος διαθέτει στην 3' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου του κολλαγόνου τύπου 1 μια κασσέτα έκφρασης των 4 παραγόντων Yamanaka. Πιο συγκεκριμένα η κασσέτα περιλαμβάνει τα γονίδια των OSKM παραγόντων, διαχωριζόμενα από τρία 2A αυτό-καταλυόμενα πεπτίδια (2A self-cleaving peptides), υπό τον έλεγχο ενός βασικού υποκινητή (minimal enhancer-less promoter) του κυτταρομεγαλοϊού (Cytomegalovirus, CMV) και ενός χειριστή 2 TetO στοιχείων. Οι TetO αλληλουχίες είναι αλληλουχίες χειριστή, και στη φύση βρίσκονται στο γονιδίωμα βακτηρίων που εμφανίζουν ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη. Στο δικό μας σύστημα οι TetO αλληλουχίες είναι μέρος ενός Tet-ON[®] συστήματος έκφρασης, στο οποίο η μεταγραφή της κασσέτας επάγεται από την παρουσία της δοξυκυκλίνης (Dox, παράγωγο της τετρακυκλίνης). Το Tet-ON σύστημα έκφρασης, βασίζεται σε μια πρωτεΐνη -ενεργοποιητή της μεταγραφής, η οποία ελέγχεται κατ' αντίστροφο (από το φυσικό) τρόπο από την τετρακυκλίνη (rtTA, reverse tetracycline-controlled transcriptional activator). Η rtTA είναι μια χιμαιρική πρωτεΐνη που αποτελείται από το κομμάτι του TetR καταστολέα, μεταλλαγμένο σε 4 βάσεις ώστε να προσδένει τον TetO χειριστή *παρουσία* Dox, και από την επικράτεια (domain) επαγωγής της μεταγραφής του ιού VP16, η οποία στρατολογεί την πολυμεράση II στον υποκινητή για την έναρξη της μεταγραφής. Στα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκε συγκεκριμένα η M2rtTA πρωτεΐνη, που φέρει επιπλέον μεταλλάξεις ώστε να προσδένει με ικανοποιητική ευαισθησία την Dox. Έτσι, όταν η rtTA προσδένει Dox, προσδένεται στον TetO χειριστή και επάγει την μεταγραφή των OSKM παραγόντων σε ένα πολυσιστρονικό μετάγραφο, που κατά τη μετάφραση θα

διαχωριστεί στις επιμέρους λειτουργικές πρωτεΐνες. Η rtTA πρωτεΐνη δεν είναι ενδογενές στοιχείο του συστήματος, και χορηγείται εξωγενώς στα κύτταρα.

5.2.5. Επιθηλιακά κύτταρα εμβρυϊκού νεφρού, HEK293T

Τα επιθηλιακά κύτταρα εμβρυϊκού νεφρού (HEK293T) είναι κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται ευρέως για την κατασκευή ανασυνδυασμένων ιικών σωματιδίων. Προέρχονται από τα HEK293 ύστερα από ενσωμάτωση μιας μεταλλαγμένης μορφής του γονιδίου του T αντιγόνου (T large antigen, TAg), του ιού SV40. Τα HEK293T, όπως και τα HEK293 από τα οποία προέρχονται, είναι ιδιαίτερα δεκτικά σε διαμόλυνση (transfection), δηλαδή στην πρόσληψη ξένου DNA· η παρουσία του TAg όμως καθιστά τα HEK293T πολύ πιο αποτελεσματικά στην παραγωγή υψηλού τίτλου ιών⁴⁰. Τα κύτταρα έχουν στρογγυλή μορφολογία και προσκολλώνται στην επιφάνεια του πιάτου κυτταροκαλλιέργειας. Επώάζονται σε θρεπτικό μέσο DMEM με 10% FBS.

5.3. Το λεντι-ϊικό σύστημα μεταφοράς

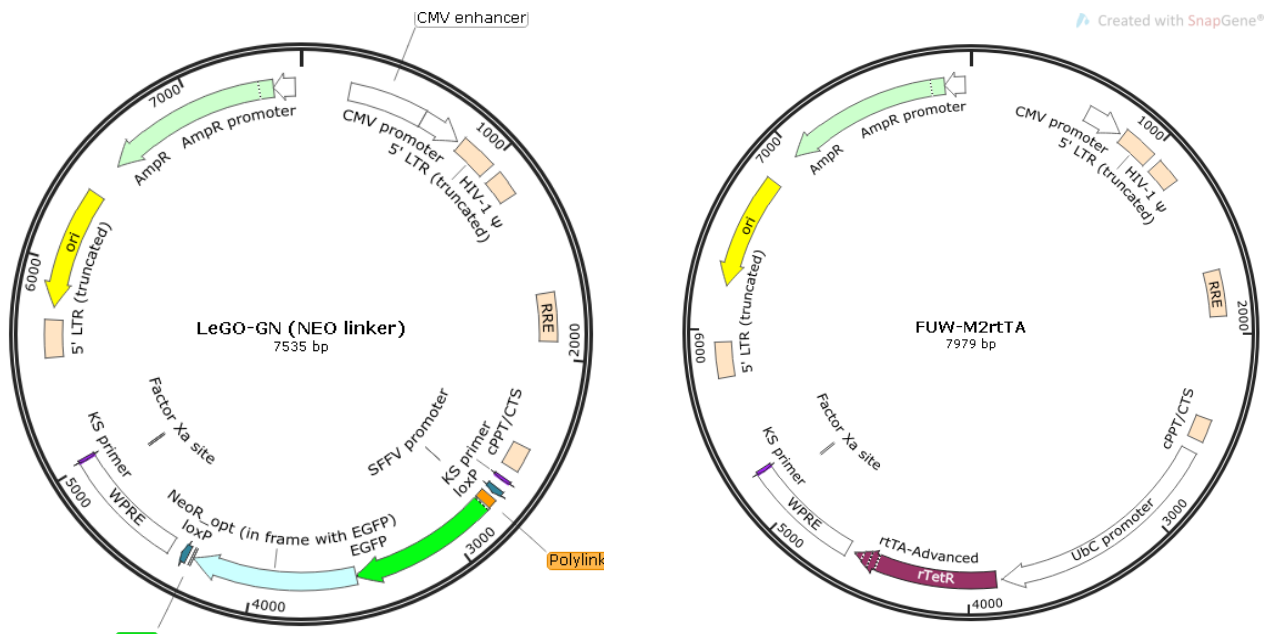
Οι λεντι-ιοί είναι RNA ιοί που μολύνουν διαιρούμενα και μη κύτταρα ενσωματώνοντας το γενετικό τους υλικό στο γονιδίωμα του ξενιστή. Οι λεντι-ιοί χρησιμοποιούνται ευρέως ως μεταφορείς γενετικού υλικού σε κύτταρα, καθώς παρουσιάζουν κάποια πλεονεκτήματα σε σχέση με τους ρετροϊούς: ενσωματώνονται σταθερά στο γονιδίωμα του ξενιστή, μολύνουν εξίσου διαιρούμενα και μη διαιρούμενα κύτταρα, δεν επάγουν την έκφραση ανοσολογικής απάντησης και μπορούν να μεταφέρουν σχετικά μεγάλα κομμάτια DNA (έως και 9kb).

5.3.1. Τα πλασμίδια του συστήματος μεταφοράς

Οι απαραίτητες πληροφορίες για τη συγκρότηση του ιού βρίσκονται φυσιολογικά στο γενετικό υλικό του ιού. Στην εργαστηριακή πρακτική, οι πληροφορίες αυτές έχουν κερματιστεί σε τρία πλασμίδια, από τα οποία τα δύο έχουν μόνο ρόλο στη συγκρότηση των ιικών σωματιδίων (πλασμίδια συγκρότησης, packaging plasmids), ενώ από το τρίτο θα προκύψει το γενετικό υλικό του ιού (πλασμίδιο-φορέας)(πλασμιδιακό σύστημα μεταφοράς της Addgene⁴¹).

Στις Εικόνες 3 και 4 φαίνονται οι χάρτες των πλασμιδίων. Τα psPAX2 και pMD2.G είναι τα πλασμίδια συγκρότησης, ενώ το LEGO-GN είναι το πλασμίδιο που χρησιμοποιείται στο εργαστήριο μας ως φορέας της περιοχής μελέτης (αποτελεί τροποποιημένη μορφή του LEGO-G2⁴²). Τα πλασμίδια συγκρότησης είναι εμπορικά διαθέσιμα και έχουν πάντα τη συγκεκριμένη αλληλουχία. Το πλασμίδιο-φορέας διαφέρει ανάλογα με τον σκοπό της πειραματικής διαδικασίας, αλλά έχει πάντα τα εξής δύο χαρακτηριστικά: 2 περιοχές LTR

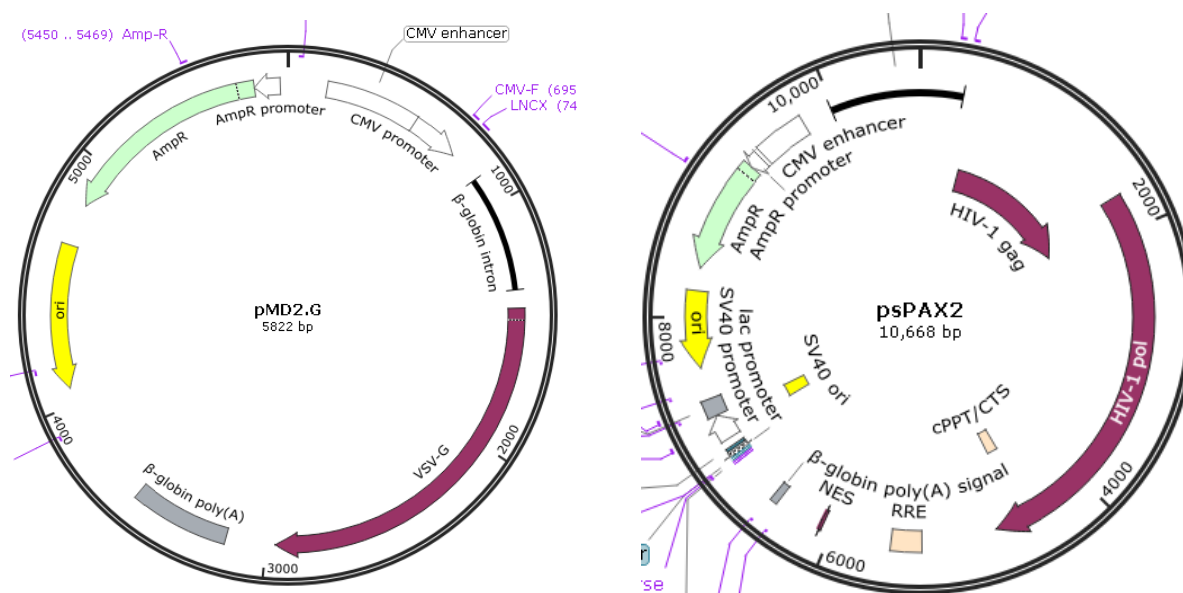
(long terminal repeats) και μια ψ αλληλουχία (Psi-sequence, ψ), όπως φαίνονται στο χάρτη του LEGO-GN. Αυτά τα δύο χαρακτηριστικά είναι που καθιστούν το πλασμίδιο φορέα της αλληλουχίας που προορίζεται να γίνει το γενετικό υλικό του ιού. Η αλληλουχία ψ είναι μια αλληλουχία-σινιάλο στο mRNA που επάγει την αυτοσυγκρότηση του ιού γύρω από αυτό. Οι LTRs είναι οι περιοχές που αναγνωρίζει η ιντεγκράση στο DNA που παράγεται από την αντίστροφη μεταγραφή, για να το ενσωματώσει στο ξένο γονιδίωμα. Ως εκ τούτου, στο ξένο γονιδίωμα ενσωματώνεται τελικά η ενδιάμεση των LTRs περιοχή. Συνήθως σε αυτή την περιοχή το πλασμίδιο φορέας φέρει και μια αλληλουχία με πολλές θέσεις αναγνώρισης από περιοριστικά ένζυμα (πολυσύνδεσμος), που δίνει τη δυνατότητα ποικιλίας ανασυνδυασμών. Στον LEGO-GN ο πολυσύνδεσμος ακολουθείται από το γονίδιο του eGFP, που είναι και το γονίδιο αναφοράς (reporter gene) στα πειράματά μας, καθώς το προϊόν του είναι ανιχνεύσιμο, και ελέγχεται από την περιοχή που έχει ενσωματωθεί στον πολυσύνδεσμο. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3, ο LEGO-GN φέρει στην εκτός των LTRs περιοχή, μια αλληλουχία έναρξης της αντιγραφής (ori) και το γονίδιο της ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (AmpR), οι οποίες επιτρέπουν την κλωνοποίηση του πλασμιδίου σε βακτηριακές καλλιέργειες. Επίσης, στον LEGO-GN έχει προστεθεί ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη, υβριδικό με το γονίδιο της eGFP. Εκτός από το LEGO-GN, χρησιμοποιήθηκε και το πλασμίδιο FUW-M2rtTA (**Εικόνα 16**) ως πλασμίδιο-γενετικό υλικό λεντι-ιών, που φέρει το γονίδιο της M2rtTA πρωτεΐνης. Επιπλέον, στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε ένα ακόμη



Εικόνα 16. Το πλασμίδιο-φορέας LEGO-GN. Φαίνονται οι LTRs περιοχές, η αλληλουχία ψ , ο πολυσύνδεσμος καθώς και το γονίδιο eGFP. Στο πλασμίδιο της M2rtTA φαίνεται και ο υποκινητής της UbC, που εξασφαλίζει διαρκή έκφραση του γονιδίου στα κύτταρα-ξενιστές.

πλασμίδιο, το LEGO-G2, που αποτελούσε τον θετικό μάρτυρα της διαδικασίας. Στο LEGO-G2 το γονίδιο της eGFP ελέγχεται από τον ισχυρό υποκινητή του SSFV, που εξασφαλίζει διαρκή έκφραση.

Τα πακεταριστικά πλασμίδια εκφράζουν ένζυμα και δομικές πρωτεΐνες του ιού. Το psPAX2 φιλοξενεί 2 ομάδες μεταγραφής, την *rol*, που εκφράζει τα ένζυμα της αντίστροφης μεταγραφάσης και της ιντεγκράσης καθώς και μια πρωτεάση, και τη *gag* η οποία εκφράζει σε ένα πολυσιστρονικό μετάγραφο τις δομικές πρωτεΐνες του ιού. Μετά τη μετάφραση του μεταγράφου η πρωτεάση της *rol* διαχωρίζει τις πρωτεϊνικές αλυσίδες. Τα υπόλοιπα δύο ένζυμα της *rol* δεν δρουν κατά το πακετάρισμα του ιικού σωματιδίου, αλλά συσκευάζονται σε αυτό και λειτουργούν μετά τη μόλυνση το κυττάρου ξενιστή· η αντίστροφη μεταγραφάση παράγει το δίκλωνο DNA από το RNA γενετικό υλικό του ιού, το οποίο θα ενσωματώσει η ιντεγκράση στο γονιδίωμα του ξενιστή. Το pMD2.G πλασμίδιο φιλοξενεί το γονίδιο της γλυκοπρωτεΐνης VSV-G, η οποία αντικαθιστά τη φυσιολογική SU επιφανειακή γλυκοπρωτεΐνη του ιού, προσδίδοντας στον ιό ευρύτερο φάσμα μολυσματικότητας.



Εικόνα 17. Ο χάρτης των πακεταριστικών πλασμιδίων psPAX2 και pMD2.G. Επισημαίνονται με κόκκινο τα γονίδια που βοηθούν στη συγκρότηση του ιικού σωματιδίου. Το SV40 ori στο psPAX2 αναγνωρίζεται από αντιγόνο Τα (TAg) που εκφράζουν τα HEK293T κύτταρα (στα οποία γίνεται το πακετάρισμα), με αποτέλεσμα την αντιγραφή του πλασμιδίου μέσα στα κύτταρα. Αυτό αυξάνει την αποδοτικότητα της παραγωγής ιικών σωματιδίων.

Για λόγους ασφάλειας, αλλά και επιτυχίας του πειράματος, οι LTRs φέρουν κάποιες μεταλλαγές ώστε ο προϊός να καθίσταται ανενεργός μετά την πρώτη ενσωμάτωση, δηλαδή να μην μπορεί παράγει νέα ιικά σωματίδια στα κύτταρα ξενιστές. Γι' αυτό το σκοπό έχουν αφαιρεθεί οι υποκινητές στις 5' και 3' περιοχές, με αποτέλεσμα ο ιός εφόσον ενσωματωθεί

στο DNA του ξενιστή, να μην μπορεί να μεταγραφεί (κάτι που θα δημιουργούσε mRNA με ψ αλληλουχία).

5.3.2. Διαδικασία κατασκευής λεντι-ικών σωματιδίων

Η συγκρότηση των λεντι-ικών σωματιδίων γίνεται σε κύτταρα HEK293T ύστερα από συγχορήγηση των τριών πλασμιδίων του συστήματος μεταφοράς. Η μεταφορά γυμνού DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα ονομάζεται διαμόλυνση (transfection) και πραγματοποιείται με τη συγκατακρήμνιση DNA-κρυστάλλων φωσφορικού ασβεστίου στην επιφάνεια των κυττάρων. Θεωρείται πως μετά την αγκυροβόληση του DNA στην κυτταρική επιφάνεια πραγματοποιείται ενδοκύττωση, χωρίς όμως να έχει διασαφηνιστεί ο μηχανισμός. Χρησιμοποιείται διάλυμα HBS 2x (HEPES Based Saline) που περιέχει φωσφορικά ιόντα, και αναδεύεται έντονα μαζί με το ασβέστιο (Ca^{2+}) και τη σειρά των πλασμιδίων ώστε να σχηματιστούν οι κρύσταλλοι. Η διαδικασία διαρκεί 4 ημέρες, πραγματοποιείται σε θάλαμο νηματικής ροής σε ειδικό δωμάτιο κυτταροκαλλιέργειών και περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

Ημέρα -2

- Δημιουργία πιάτων HEK293T πυκνότητας 10-20%

Ημέρα -1

- Αφαιρώ το θρεπτικό μέσο από τα πιάτα καλλιέργειας και προσθέτω 9ml νέου (DMEM, 10% FBS)
- Σε ειδικά γυάλινα φιαλίδια προστίθενται τα αντιδραστήρια : 9,3μg psPAX2, 9,3μg pMD2.G, 18,6μg πλασμιδίου-φορέα, 62μl CaCl_2 2M, 500μl HBS 2x, dH_2O μέχρι το 1ml Το HBS προστίθεται στο τέλος ανά 70μl με ταυτόχρονη έντονη ανάδευση
- Επώαση 30min σε θερμοκρασία δωματίου (room temperature, RT)
- Χορήγηση κάθε αντίδρασης στο αντίστοιχο πιάτο κυτταροκαλλιέργειας.
- Επώαση των κυττάρων με τα πλασμίδια για 16-18h στους 37°C

Ημέρα 0

- Αφαίρεση θρεπτικού μέσου και προσθήκη 11ml νέου

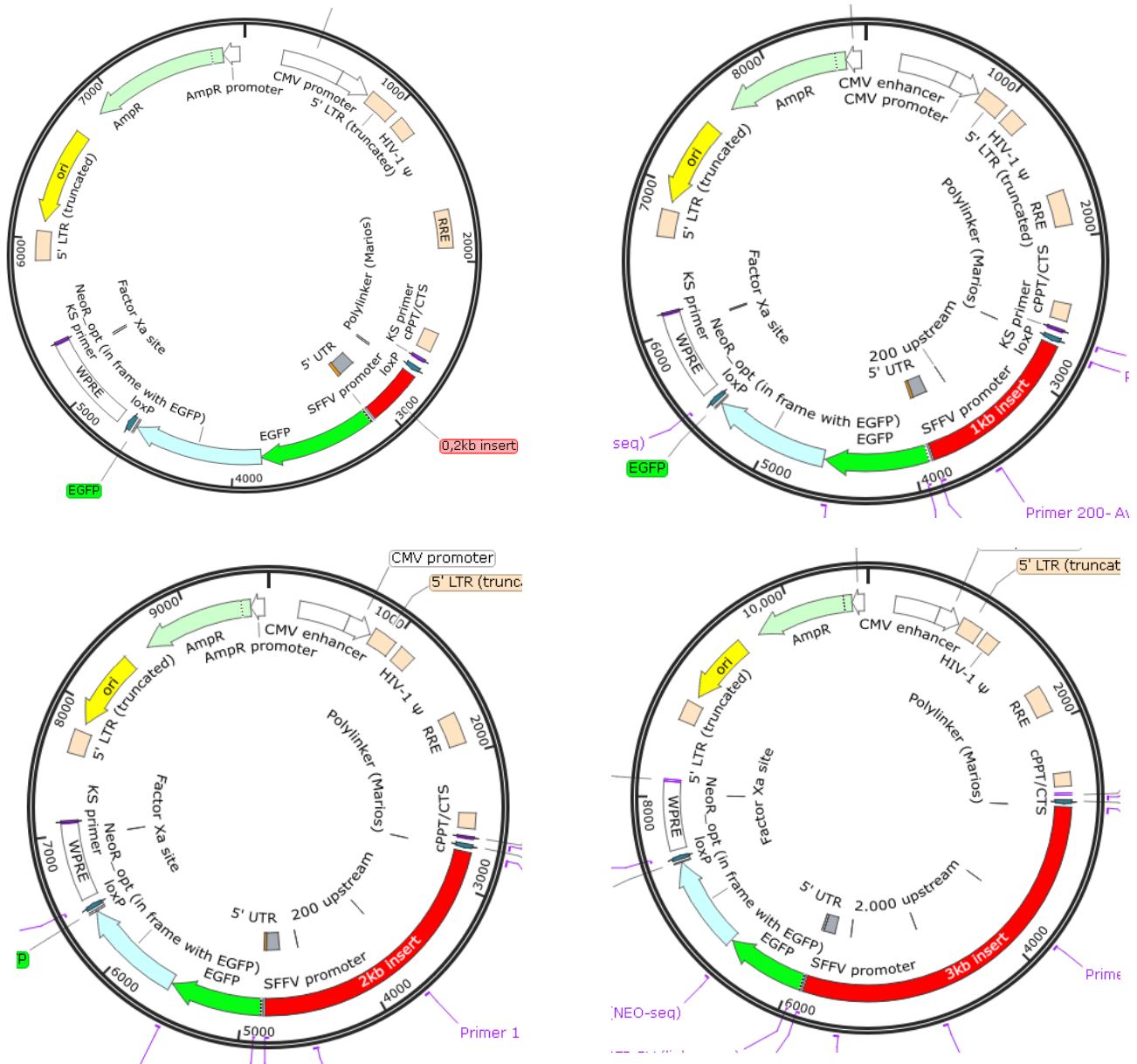
Ημέρα 3

- Συλλογή ιών σε ένα φιαλίδιο τύπου falcon. Συλλέγεται το θρεπτικό μέσο κάθε πιάτου και φιλτράρεται με φίλτρο 0.45μm ώστε να διαχωριστούν τα ιικά σωματίδια από τα κυτταρικά υπολείμματα
- Αποθήκευση ιών στους -80°C

5.4.Κλωνοποίηση υποψήφιων ρυθμιστικών περιοχών DNA

5.4.1. Οι περιοχές που μελετήθηκαν

Αναζητώντας cis ρυθμιστικές περιοχές του ονο1 κατά τον επαναπρογραμματισμό, κλωνοποιήσαμε την περιοχή 3kb άνωθεν της 3' αμετάφραστης περιοχής του γονιδίου. Η

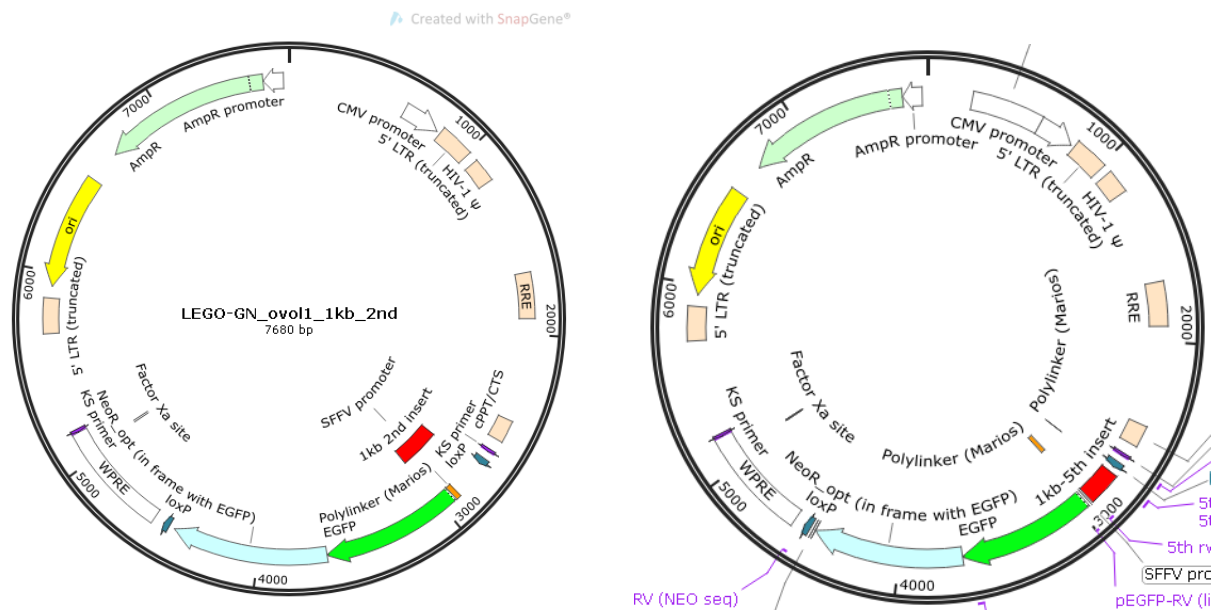


Εικόνα 18. Οι χάρτες των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων LEGO-GN. Η περιοχή μελέτης επισημαίνεται με κόκκινο.

περιοχή μελετήθηκε σε κομμάτια των 0,2kb, 1kb, 2kb και 3kb. Ως φορέας κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε ο LEGO-GN. Στη συνέχεια, θέλοντας να μελετήσουμε περαιτέρω την περιοχή 1kb προχωρήσαμε σε κερματισμό της σε 5 κομμάτια μήκους 150bps. Τα κομμάτια

αυτά ενσωματώθηκαν στον φορέα μαζί με την 0.2kb περιοχή και άνωθεν αυτής, καθώς στην 0.2kb εδράζεται ο φυσικός υποκινητής του γονιδίου.

Στην Εικόνα 5 παρατίθενται τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια των βασικών ελλείψεων της 3kb περιοχής, ενώ στην Εικόνα 6 παρατίθενται ενδεικτικά οι χάρτες 2 εκ των 5 πλασμιδίων των μικρότερων ελλείψεων της 1kb περιοχής που κατασκευάστηκαν.



Εικόνα 19. Οι χάρτες των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων για τις περαιτέρω ελλείψεις της 1kb περιοχής. Παρατίθενται ενδεικτικά τα πλασμίδια του 2^{ου} και του 5^{ου} κομματιού των 150bps.

5.4.2. Διαδικασία κλωνοποίησης περιοχών μελέτης

Περιγράφεται η διαδικασία που ακολουθήσαμε για την κατασκευή και απομόνωση των, 9 συνολικά, ανασυνδυασμένων πλασμιδίων.

i. Σχεδιασμός εκκινητών

Από τη βάση δεδομένων *Ensembl* προμηθευτήκαμε την αλληλουχία του γονιδίου *Ovol1* του ποντικού (*Mus musculus*), καθώς και πληροφορίες για τα στοιχεία του γονιδίου (3',5' αμετάφραστες περιοχές, εσώνια, εξώνια). Σχεδιάστηκαν εκκινητές (primers) ειδικοί για τα άκρα της αλληλουχίας ενδιαφέροντος. Ο σχεδιασμός έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος SnapGene, ενώ οι ιδιότητες των ζευγών εκκινητών ελέγχθηκαν και με διαδικτυακά διαθέσιμα εργαλεία (OligoAnalyzer Tool, Primer Blast). Στο 5' άκρο κάθε εκκινητή σχεδιάστηκε επιπλέον μια «ουρά» βάσεων, η οποία περιλάμβανε μια αλληλουχία

αναγνώρισης από κάποιο ένζυμο περιορισμού. Τα ένζυμα περιορισμού για κάθε ζεύγος εκκινητών επιλέγονταν με βάση τρία κριτήρια: να μην έχουν θέση αναγνώρισης μέσα στην περιοχή ενδιαφέροντος, να τέμνουν τον φορέα μόνο μέσα στον πολυσύνδεσμο, να επιτρέπουν ενσωμάτωση της περιοχής στον φορέα με τη σωστή φορά. Στον **Πίνακα 1** παρατίθενται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 1. Παρατίθενται τα στοιχεία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση των περιοχών μελέτης. Με μικρά γράμματα φαίνονται οι ουρές των εκκινητών που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για το ένζυμο περιορισμού που γράφεται στην παρένθεση. Το 0.2kb new ζεύγος,, που παρουσιάζεται στην τελευταία γραμμή, έχει την ίδια αλληλουχία υβριδισμού με τον 0.2kb αλλά διαφέρει στην αλληλουχία της ουράς για να πραγματοποιηθεί με τον επιθυμητό τρόπο η ενσωμάτωση στο φορέα κλωνοποίησης.

Περιοχή στόχος	Πρόσθιος εκκινητής (5'-3')	Ανάστροφος εκκινητής (5'-3')
0,2kb	gatacctaggTAACAAATAGGTGGGTTGTCACCG (AvrII)	accggatcCCACGTTCTTAGGACAGAGTGTAC (XhoI)
1kb	acgacctaggCCTGCTGAAGAGTACAGCAG (AvrII)	
2kb	atctacctaggCCGAGCAAGGTCCAAATCAGAGTGAA (AvrII)	
3kb	ctacctaggCGATCATTGCTCAGCCAGTGTA (AvrII)	
1st	acgacctaggCCTGCTGAAGAGTACAGCAG (AvrII)	tacactcg AGATTCTGAAAACCTGGAAGAGGCTC (XhoI)
2nd	caacctaggAAATCCGGCTGTTTATGACCAGGAG (AvrII)	actactcgagGATGCGCCTGTGAATCCAAAG (XhoI)
3rd	caacctaggATTCACAGGCGCATCCGAG (AvrII)	caactcgagCGATGACATAAACTGGCCCAAC (XhoI)
4th	caacctaggAACCAAGAATTGCTCACCTGG (AvrII)	aatcctcgagTTTCGGAGGGAGCG (XhoI)
5th	caacctaggTCCGAAACTCTAGTTTGCAAACGTG (AvrII)	caactcgagAACCGGTTTCCATTCCGCTG (XhoI)
0.2kb (new)	CaactcgagAGGTAACAAATAGGTGGGTTGTCACCG(XhoI)	accggaatccCACGTTCTTAGGACAGAGTGTAC (BamHI)

ii. Αντίδραση PCR

Με το γενωμικό DNA του ποντικού ως υπόστρωμα, χρησιμοποιούμε τους εκκινητές που σχεδιάσαμε για να πολλαπλασιάσουμε ειδικά την περιοχή ενδιαφέροντος με μια αντίδραση PCR. Οι συνθήκες την αντίδρασης εξαρτώνται από το μήκος της περιοχής που στοχεύεται και από την θερμοκρασία στην οποία οι εκκινητές υβριδίζονται με τις συμπληρωματικές περιοχές. Χρησιμοποιείται πολυμεράση υψηλής πιστότητας (HiFi Polymerase, της Kara), η οποία έχει πολύ μικρό ποσοστό λάθους κατά την αντιγραφή. Η πολυμεράση HiFi προμηθεύεται μαζί με τα απαραίτητα για τη δράση της αντιδραστήρια (dNTPs, Mg^{2+} κλπ) σε ένα κοινό διάλυμα (Kmix). Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 20μl. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων και οι συνθήκες της αντίδρασης φαίνονται στον **Πίνακα 2**.

Πίνακας 2. Ενδεικτικό Πρωτόκολλο αντίδρασης PCR για ενίσχυση περιοχών από γονιδιωματικό ή πλασμιδιακό DNA

Ποσότητες αντιδραστηρίων	Συνθήκες αντίδρασης PCR
DNA γενωμικό: 100-300ng (DNA πλασμιδιακό: 10ng) primers: 22,5pmol (ή 1,5μl από 10μM) Kmix: 10μl (1/2 του όγκου αντίδρασης) H ₂ O: μέχρι τα 20μl	95°C, 3min 98°C, 20sec (αποδιάταξη) (T _m pr-2)°C, 10-20sec (υβριδισμός) 72°C: 20-40sec(επιμήκυνση) 72°C, 5min 4°C (τερματισμός, αποθήκευση)

Στην περίπτωση των ελλείψεων του 1kb, χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το πλασμίδιο LEGO-GN- 1kb.

Όσο μεγαλύτερο μήκος έχει η περιοχή-στόχος, τόσο περισσότερος χρόνος δίδεται στο βήμα της επιμήκυνσης. Η διάρκεια του βήματος υβριδισμού καθορίζει την αυστηρότητα των συνθηκών της αντίδρασης: όσο αυξάνεται, τόσο διευκολύνεται η μη ειδική πρόσδεση των εκκινητών στο υπόστρωμα. Η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών στο στόχο ρυθμίζεται 1-2°C χαμηλότερα από την θερμοκρασία τήξης των εκκινητών (στον πίνακα 2: T_mpr).

iii. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR

Ηλεκτροφορούμε τις αντιδράσεις PCR ώστε να ελέγξουμε αν το προϊόν της αντίδρασης είναι το επιθυμητό. Οι αντιδράσεις για τα κομμάτια των 3kb και 2kb ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα 1%, της 1kb περιοχής σε 1,5% ενώ οι υπόλοιπες περιοχές σε 2%. Στα πηκτώματα 1-1,5% εφαρμόζεται τάση 80—100V, ενώ στα 2% εφαρμόζεται τάση

120V. Οι αντιδράσεις PCR που κατά την ηλεκτροφόρησή τους θα δώσουν μια ζώνη στο επιθυμητό ύψος (δηλαδή στο κατάλληλο μέγεθος) θεωρούνται επιτυχείς.

iv. Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Απομονώνουμε τις σωστές ζώνες από το πήκτωμα με ένα καθαρό νυστέρι και τοποθετούμε τα κομμάτια σε σωληνάκια τύπου erppendorf. Η απομόνωση των DNA μορίων από το πήκτωμα γίνεται με χρήση kit της Macherey-Nagel, *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up*. Τα δείγματα τελικά επαναδιαλύονται σε 20λ H₂O. Μετράμε τη συγκέντρωση του DNA με φωτομέτρηση σε μηχανήμα Nanodrop™ 2000/2000C, της Thermo Fisher Scientific.

v. Πέψη των προϊόντων PCR και του πλασμιδίου-φορέα

Προχωρούμε σε αντίδραση πέψης των προϊόντων της PCR (insert) και του πλασμιδίου LEGO-GN, που χρησιμοποιείται ως φορέας για την κλωνοποίηση τους (vector). Οι πέψεις γίνονται με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες για τις οποίες έχουν σχεδιαστεί οι ουρές των εκκινητών, όπως περιγράφηκε στο (i). Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων παρατίθενται στον **Πίνακα 3**.

Πίνακας 3. Ποσότητες αντιδραστηρίων για τις αντιδράσεις πέψης

insert	vector
1μl από κάθε ένζυμο	1μl από κάθε ένζυμο
3μl buffer	3μl buffer
20μl δείγμα	3μg πλασμιδίου
H ₂ O μέχρι τα 30μl	H ₂ O μέχρι τα 30μl

Οι αντιδράσεις επωάζονται για 3h στους 37°C και στη συνέχεια μπορούν να αποθηκευτούν στους -20°C.

vi. Ηλεκτροφόρηση του φορέα και απομόνωση, καθαρισμός των δειγμάτων

Ηλεκτροφορούμε τον φορέα μετά την πέψη του για να επιβεβαιώσουμε ότι είναι άρτιος. Στην ηλεκτροφόρηση δεν διακρίνεται κομμένος από τον άκοπο φορέα, καθώς η πέψη γίνεται στο κομμάτι του πολυσύνδεσμου και καταλήγει σε απομάκρυνση πολύ λίγων βάσεων. Μετά την ηλεκτροφόρηση κόβουμε τη ζώνη του φορέα από το πήκτωμα με καθαρό νυστέρι και συνεχίζουμε σε απομόνωσή του από την πηκτή. Παράλληλα καθαρίζουμε τα δείγματα των insert ώστε να απομακρύνουμε τα ένζυμα. Η απομόνωση από την πηκτή όσο και ο καθαρισμός των δειγμάτων γίνεται με χρήση kit της Macherey-Nagel, *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up*.

vii. Αποφωσφορυλίωση του φορέα

Ο κομμένος φορέας αποφωσφορυλιώνεται στα 5' άκρα του με χρήση αλκαλικής φωσφατάσης, προκειμένου να αποτραπεί η επανακυκλοποίησή του. Γενικά, το βήμα αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό στις περιπτώσεις που ο φορέας επωάζεται με ένα μόνο ένζυμο περιορισμού, καθώς αποκτά έτσι συμπληρωματικά μονόκλωνα άκρα. Όμως ακόμη και στις περιπτώσεις πέψης με δύο ένζυμα που δημιουργούν μη συμπληρωματικά άκρα, όπως οι δικές μας, η αποφωσφορυλίωση του πλασμιδίου αποτρέπει την επανακυκλοποίηση των μορίων εκείνων που κόπηκαν μόνο από το ένα εκ των δύο ενζύμων της αντίδρασης. Η αντίδραση αποφωσφορυλίωσης έγινε με χρήση της rAPid Alkaline Phosphatase της Roche, ακολουθώντας το πρωτόκολλο της εταιρίας.

viii. Αντίδραση συγκόλλησης άκρων (ligation)

Ο φορέας και τα ενθέματα (insert) έχουν κοπεί με τα ίδια ένζυμα κι έχουν επομένως συμπληρωματικά μονόκλωνα άκρα. Η αντίδραση ενσωμάτωσης του κάθε ενθέματος στο φορέα γίνεται παρουσία του ενζύμου λιγάση, η οποία θα «κλειδώσει» την ενσωμάτωση και την κυκλοποίηση του πλασμιδίου με τη δημιουργία φωσφοδιεστερικών δεσμών στα σημεία κοπής των δύο αλυσίδων. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 10μl. Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιούνται 40-50μg φορέα, ενώ η ποσότητα του insert υπολογίζεται με τον παρακάτω τύπο ώστε τα μόρια του ενθέματος να είναι 3-5 φορές περισσότερα από τα μόρια του φορέα.

$$ng\ insert = (3 - 5) \times \frac{ng\ vector \times kb\ insert}{kb\ vector}$$

Προστίθεται 1μl ενζύμου και συμπληρώνεται H₂O μέχρι τα 10μl. Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 16°C για 16-18h.

ix. Μετασχηματισμός βακτηρίων (transformation)

Τα ανασυνδυασμένα πλέον πλασμίδια θα κλωνοποιηθούν σε βακτηριακές καλλιέργειες. Τα πλασμίδια εισάγονται σε DH5α στελέχη E.coli (transformation) ύστερα από μια διαδικασία θερμικού σοκ (heatshock). Τα DH5α είναι στελέχη E.coli με μετάλλαξη στο γονίδιο της recA, ώστε να μην πραγματοποιείται ομόλογος ανασυνδυασμός και με έλλειψη σε κάποιες ενδονουκλεάσες. Έτσι, διασφαλίζεται η σταθερότητα του πλασμιδίου τόσο κατά τον πολλαπλασιασμό του στις βακτηριακές καλλιέργειες, όσο και κατά την απομόνωσή του από αυτές.

Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 5.3.1 ο φορέας LEGO-GN φέρει ένα σημείο έναρξης της αντιγραφής (ori) και ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (Amp^R). Οι

βακτηριακές καλλιέργειες πραγματοποιούνται σε θρεπτικό μέσο Lysogeny Broth (LB) που περιέχει αμπικιλίνη (amp) σε συγκέντρωση 100μg/mL, και η επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων να γίνεται βάση της ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη που προσφέρει στα κύτταρα το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Οι καλλιέργειες μεταχειρίζονται πάντα υπό φλόγα ώστε να αποτραπούν οι μολύνσεις.

Αντίδραση μετασχηματισμού:

- 2λ από αντίδραση ligation
 - 50λ DH5a
 - 30min στον πάγο
 - 50sec στους 42°C
 - 5min στους 4°C
 - προσθήκη 1ml LB
 - 37°C, 45min, υπό ανάδευση
 - φυγοκέντρηση 3.000, 5min
 - αφαίρεση 900λ από το υπερκείμενο
 - επαναδιάλυση κυττάρων στα 100λ που απομένουν
 - επίστρωση πιάτου LB άγαρ-amp
 - 37°C, 16-18h
- } φάση heatshock
- φάση ανάκαμψης

χ. Μεταφορά αποικιών σε υγρή καλλιέργεια

Οι αποικίες που σχηματίστηκαν μεταφέρονται σε υγρή καλλιέργεια 2ml LB-amp, με τη βοήθεια tip. Επώζονται 16-18h στους 37°C και σε 220rpm.

χι. Απομόνωση πλασμιδίου μικρής κλίμακας με αλκαλική λύση βακτηρίων (Mini-prep)

Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιείται απομόνωση του πλασμιδίου από την μισή καλλιέργεια, ώστε να ελεγχθεί αν η αποικία που επιλέχθηκε έφερε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο ή σκέτο φορέα (που ενδεχομένως επανακυκλοποιήθηκε ή δεν κόπηκε εξ αρχής).

Η απομόνωση πλασμιδίων με αλκαλική λύση αποτελεί ένα πρωτόκολλο απομόνωσης DNA από κύτταρα, με τη διαφορά ότι οι συνθήκες λύσης των κυττάρων καθιστούν το γενωμικό DNA μη υδατοδιαλυτό. Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα λύνονται με ένα διάλυμα υψηλά αλκαλικού pH, στο οποίο η διπλή έλικα του DNA αποδιατάσσεται. Ενώ το πλασμιδιακό έχει την δυνατότητα να επαναδιαταχθεί κατά την επαναφορά του pH, λόγω του μικρού το μεγέθους και λόγω υπερελίκωσης, το DNA αποτυγχάνει να επαναδιαταχθεί αφήνοντας εκτεθειμένες τις υδρόφοβες βάσεις. Ως εκ τούτου, το πλασμιδιακό DNA

παραμένει υδατοδιαλυτό, ενώ το γενωμικό DNA παρασύρεται από τα οργανικά διαλύματα. Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται παρατίθεται στον **Πίνακα 4**.

Πρωτόκολλο mini-prep:

- 1ml καλλιέργειας σε erpendorf
- φυγοκέντρηση 13.000rpm, 3min
- αφαίρεση υπερκείμενου
- επαναδιάλυση σε 200μl διαλύματος επαναδιάλυσης (P1)
- 5min σε θερμοκρασία δωματίου (Room Temperature, RT)
- προσθήκη 200μl διάλυμα λύσης (P2), έντονη ανάδευση
- 5min στον πάγο
- προσθήκη 200μl διαλύματος εξουδετέρωσης (P3), έντονη ανάδευση
- 200μl χλωροφόρμιο
- 5min στον πάγο
- φυγοκέντρηση 13.000rpm, 20min, 4°C (τοποθέτηση αιθανόλης 100% στους -80°C)
- μεταφορά 600μl από το υπερκείμενο σε νέο erpendorf
- 1,2ml παγωμένης αιθανόλης 100%
- φυγοκέντρηση 13.000rpm, 15min, 4°C
- απομάκρυνση υγρής φάσης
- 400μl αιθανόλης 75%
- φυγοκέντρηση 11.000rpm, 5min
- απομάκρυνση υγρής φάσης
- επαναδιάλυση σε 25μl H₂O

Πίνακας 4. Σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται κατά το mini-prep.

P1 (resuspension)	P2 (lysis)	P3(neutralization)
50mM Tris pH 8.0	200mM NaOH	3M CH ₃ COOK
10mM EDTA	1% SDS	pH 5,5 (με προσθήκη glacial
10μM RNase		acetic acid)

xii. Διαγνωστική πέψη και ηλεκτροφόρηση πλασμιδίων

Σχεδιάζεται μια διαγνωστική πέψη των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με ένζυμα που κόβουν σε τέτοιες θέσεις το πλασμίδιο ώστε να δημιουργούν χαρακτηριστικό και ευδιάκριτο πρότυπο ζωνώσεων κατά την ηλεκτροφόρηση. Εναλλακτικά, η διαγνωστική πέψη μπορεί να γίνει με τα ίδια ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του πλασμιδίου· στην περίπτωση αυτή στην πηκτή αγαρόζης αναμένουμε να δούμε τη ζώνη του φορέα και τη ζώνη του insert. Οι καλλιέργειες οι οποίες τελικά θα δώσουν πλασμίδια με σωστό πρότυπο ζώνωσης, θα μεταγγισθούν (το υπόλοιπο 1ml) σε καλλιέργειες 200ml (με αμπικιλίνη), ώστε να γίνει παραγωγή των πλασμιδίων σε μεγαλύτερη κλίμακα. Οι 200ml καλλιέργειες επάζονται για 16-18h, στους 37°C και στις 220rpm.

xiii. Απομόνωση πλασμιδίων σε μεσαία κλίμακα (midi-prep)

Η 200ml καλλιέργεια φυγοκεντρείται για 20min, σε 5200 rcf, στους 4°C. Η απομόνωση πλασμιδίων μεσαίας κλίμακας γίνεται με kit της Macherey- Nagel, *NucleoBond® Xtra Midi*. Τα πλασμίδια επαναδιαλύονται σε 400λ H₂O και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πείραμα επιμόλυνσης για κατασκευή ιών.

5.5.Βασικές μοριακές τεχνικές

5.5.1. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τον διαχωρισμό και την ανάλυση νουκλεϊκών οξέων. Βασίζεται στην ιδιότητα των νουκλεϊκών οξέων να κινούνται προσανατολισμένα σε ηλεκτρικό πεδίο, λόγω του αρνητικού φορτίου του φωσφορικού σκελετού τους. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε πήκτωμα αγαρόζης. Η αγαρόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης που πολυμερίζεται στους 100°C και πήζει σε θερμοκρασία μικρότερη των 45°C, σχηματίζοντας πόρους στο εσωτερικό του. Όπως είναι λογικό, το δίκτυο των πόρων αναχαιτίζει την ελεύθερη διέλευση των μορίων DNA μέσα στην πηκτή, και το μέγεθος των μορίων DNA είναι αντιστρόφως ανάλογο με την ταχύτητα με την οποία τρέχουν στο πήκτωμα. Όσο πιο μεγάλη είναι η συγκέντρωση της αγαρόζης σε ένα πήκτωμα, τόσο πιο πυκνό θα είναι το δίκτυο των πόρων. Έτσι, σε δεδομένο χρόνο ηλεκτροφόρησης, κάθε μόριο DNA αποκτά συγκεκριμένη θέση στο πήκτωμα, που είναι χαρακτηριστική του μεγέθους του. Στο ίδιο πήκτωμα φορτώνεται και ένας μάρτυρας μεγεθών DNA μορίων (ladder), ώστε να αποκαλύπτει το μέγεθος των προϊόντων που θα ανιχνευθούν. Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης αποτελείται από δις απιονισμένο H₂O και 0.5x TBE (Tris Borate acid EDTA solution) και εξασφαλίζει τη διατήρηση του pH (ώστε το DNA να διατηρεί το αρνητικό του φορτίο) και την αγωγιμότητα του μέσου. Η οπτικοποίηση του DNA κατά την ηλεκτροφόρηση γίνεται με

προσθήκη στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης, αλλά και στο πήκτωμα κατά την παρασκευή του, βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr). Το EtBr παρεμβάλλεται στη διπλή έλικα του DNA και γίνεται ορατό σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV), λόγω φθορισμού.

5.5.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

i. Συμβατική PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια ενζυμική μέθοδος ενίσχυσης συγκεκριμένων τμημάτων DNA *in vitro*. Βασίζεται στην ιδιότητα της Taq πολυμεράσης να διατηρεί την ενεργότητά της σε υψηλές θερμοκρασίες (βέλτιστη 72°C) και να μην αποδιατάσσεται σε θερμοκρασίες ακόμη και μέχρι τους 95°C (για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα). Τα δείγματα DNA υποβάλλονται σε κύκλους εναλλαγής θερμοκρασιών, κατά τους οποίους συμβαίνει αποδιάταξη της δίκλωνης αλυσίδας (95°C), υβριδοποίηση των εκκινητών (55-70°C), και αντιγραφή του DNA (72°C). Με αυτή τη διαδικασία, συγκεκριμένο τμήμα του DNA πολλαπλασιάζεται μέχρι και ένα τρισεκατομμύριο φορές.

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε ειδικά μηχανήματα, τους θερμικούς κυκλοποιητές, οι οποίοι αλλάζουν αυτόματα θερμοκρασίες σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία και για συγκεκριμένη διάρκεια, βάσει του πρωτοκόλλου που σχεδιάζεται κάθε φορά.

Για την κλωνοποίηση των περιοχών μελέτης χρησιμοποιήθηκε το KAPA HiFi PCR kit, της KAPABIOSYSTEMS. Η Kapa HiFi πολυμεράση είναι μια υψηλής πιστότητας πολυμεράση με πολύ χαμηλό ποσοστό λαθών κατά την αντιγραφή (1 λάθος στα $3,6 \times 10^6$ νουκλεοτίδια που ενσωματώνονται). Παρέχεται σε ένα διάλυμα μαζί με όλα τα απαραίτητα για τη δράση της αντιδραστήρια και προστίθεται στην αντίδραση PCR σε όγκο ίσο με το μισό του τελικού όγκου της αντίδρασης. Οι λεπτομέρειες του πρωτοκόλλου αναφέρονται στο σχετικό κεφάλαιο (ν, στο 5.4.2.).

ii. PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT PCR)

Η PCR αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription PCR, RT PCR) εφαρμόζεται στη μελέτη της έκφρασης γονιδίων. Η τεχνική επιτρέπει την έμμεση παρακολούθηση των επιπέδων των mRNAs, μέσω στόχευσης σε DNA που έχει παραχθεί με αντίστροφη μεταγραφή από αυτά. Από το σύνολο των RNAs που απομονώνονται από έναν κυτταρικό πληθυσμό, μεταγράφονται σε cDNA μόνο τα mRNAs, καθώς στην αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιούνται poly-T εκκινητές, ικανοί να υβριδοποιούν μόνο τις poly-A ουρές στα 3' άκρα των mRNAs. Η αντίδραση πραγματοποιείται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση.

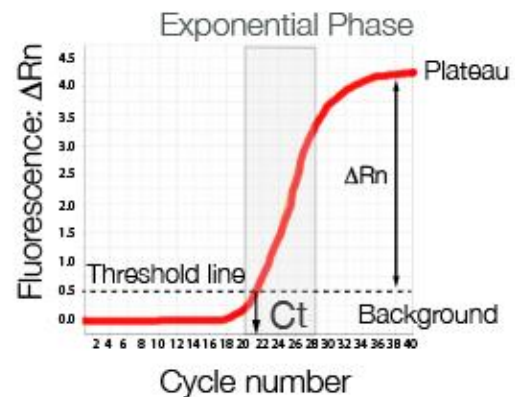
Στην πειραματική μας διαδικασία, εφαρμόσαμε RT-PCR για να συγκρίνουμε, σε διάφορα σημεία του επαναπρογραμματισμού, τα επίπεδα έκφρασης του ενδογενούς γονιδίου *oncl1*, με τα επίπεδα έκφρασης του διαγονιδίου της GFP, η οποία ελέγχεται από την εκάστοτε υποψήφια ρυθμιστική περιοχή που μελετάμε. Για το σκοπό αυτό, απομονώσαμε το RNA του κυτταρικού πληθυσμού, το μετατρέψαμε σε δίκλωνο cDNA και προχωρήσαμε σε ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου με στόχο τις αλληλουχίες των *oncl1* και GFP cDNA. Η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής έγινε με το PrimeScript™ RT Reagent Kit (Perfect Real Time) της Takara. Το πρωτόκολλο καθώς και οι συνθήκες της αντίδρασης φαίνονται στον **Πίνακα 5**.

Πίνακας 5. Ποσότητες αντιδραστηρίων και συνθήκες αντίδρασης RT-PCR

Ποσότητες αντιδραστηρίων	Συνθήκες αντίδρασης
300ng RNA	37°C 15 min
1 λ PrimeScript Buffer	85°C 5 sec (heat inactivation)
0,25 λ Oligo dT Primer	4°C (λήξη, αποθήκευση)
0,25 λ Random 6mers	
0,25 λ PrimeScript RT Enzyme mix I	
H ₂ O μέχρι τα 5λ	

iii. Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Real-time qPCR)

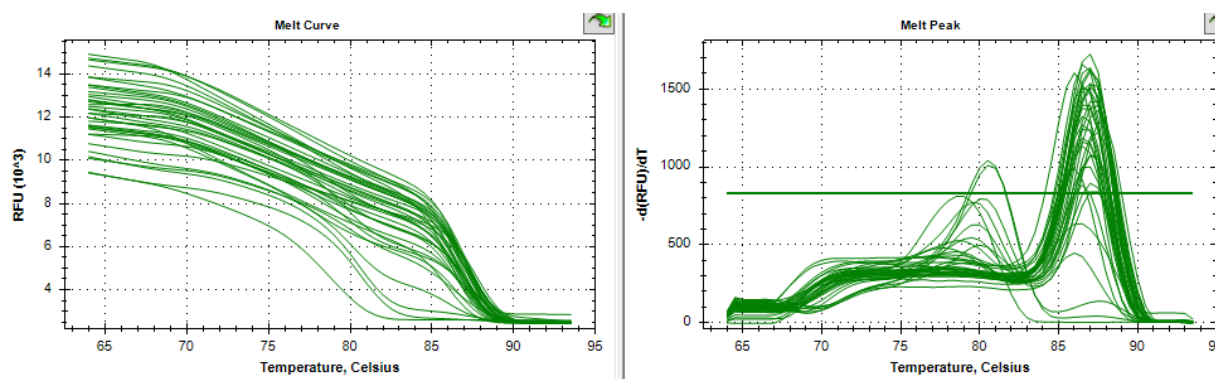
Ενώ η συμβατική PCR παρέχει μόνο ποιοτικά αποτελέσματα (ύπαρξη ή μη ενός τμήματος DNA σε ένα δείγμα), η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου δίνει πληροφορίες σχετικά με την αρχική ποσότητα του DNA στο δείγμα. Η ποσοτική PCR αποτελεί μια εφαρμογή της απλής PCR, όπου με τη χρήση εξειδικευμένων χρωστικών και ειδικών θερμοκυκλοποιητών που ανιχνεύουν τα σήματα των χρωστικών, πραγματοποιείται καταγραφή της ποσότητας του DNA στο τέλος κάθε κύκλου αντιγραφής. Για κάθε αντίδραση καταγράφεται τελικά μια καμπύλη, που αναπαριστά την αύξηση του προϊόντος με την πάροδο των κύκλων. Η ποσοτικοποίηση του αρχικού δείγματος στηρίζεται στο C_q (quantification cycle), το σημείο όπου το σήμα του δείγματος θα



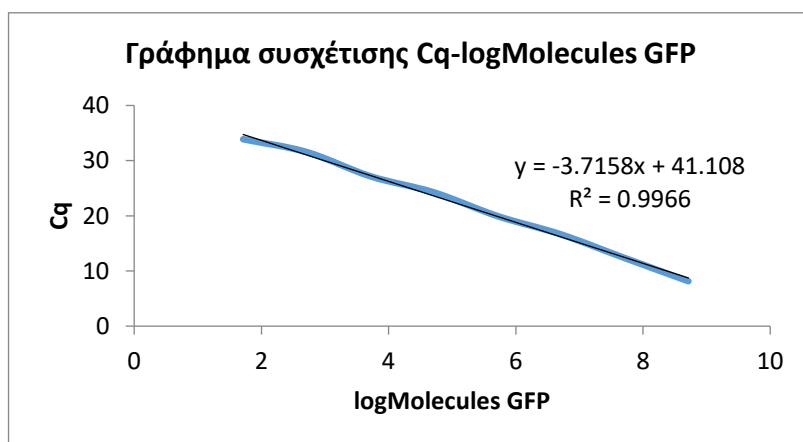
Εικόνα 20. Η καμπύλη αποτελέσματος σε μια qPCR. Φαίνεται το κατώφλι βασικού επιπέδου (threshold line) και το σημείο διασταύρωσης του σήματος με το κατώφλι (Ct ή Cq) που σηματοδοτεί την έναρξη της εκθετικής φάσης. Όσο πιο μεγάλη η ποσότητα του αρχικού δείγματος, τόσο πιο μικρό είναι το Ct (Cq).

διασταυρωθεί με το κατώφλι φθορισμού βασικού επιπέδου (threshold line, **Εικόνα 20**). Το κατώφλι φθορισμού ορίζεται αυτόματα από το μηχάνημα, βάσει των διακυμάνσεων φθορισμού στους αρχικούς κύκλους της αντίδρασης (όπου το σήμα θεωρείται μη ειδικό), και συμπίπτει με το σημείο όπου η αντίδραση μπαίνει στην εκθετική της φάση. Όπως είναι λογικό, όσο πιο μεγάλος είναι ο αρχικός αριθμός των στόχων της PCR στο αρχικό δείγμα, τόσο πιο μικρό είναι το Cq. Στο εργαστήριο χρησιμοποιείται η χρωστική SYBR Green, η οποία προσδένεται στη διπλή έλικα του DNA και εκπέμπει φθορισμό μόνο από αυτή τη θέση, εξασφαλίζοντας έτσι την ειδικότητα του σήματος. Οι αντιδράσεις της qPCR γίνονται σε μηχάνημα CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

Το πρωτόκολλο της qPCR διαφοροποιείται από το αντίστοιχο της απλής PCR σε δύο σημεία: πρώτον, ο κύκλος της αντιγραφής περιλαμβάνει 2 στάδια (αντί για 3) καθώς η



Εικόνα2 21.: Οι καμπύλες που σχηματίζονται για τα προϊόντα στο τελευταίο θήμα της qPCR. Αριστερά: όσο αυξάνεται η θερμοκρασία, όλο και περισσότερο αυξάνεται ο ρυθμός αποδιάταξης του DNA. Δεξιά: Η κορυφή της κάθε καμπύλη αντιστοιχεί στο Tm του αντίστοιχου προϊόντος. Οι λιγότερες και μικρότερες κορυφές στα αριστερά αντιστοιχούν στον υβριδισμό των εκκινήτων.



Εικόνα 21. Η πρότυπη καμπύλη που κατασκευάστηκε για την ποσοτικοποίηση του αριθμού των ενδεμάτων στο γονιδίωμα των κυττάρων που επαναπρογραμματίστηκαν.

αντιγραφή της περιοχής-στόχου και η υβριδοποίηση των εκκινητών γίνεται σε ένα βήμα, δηλαδή σε κοινή θερμοκρασία (λόγω πιο αποδοτικής πολυμεράσης)· δεύτερον, μετά την ολοκλήρωση των κύκλων αντιγραφής ακολουθεί ένα βήμα σταδιακής αύξησης της θερμοκρασίας, κατά το οποίο υπολογίζεται η θερμοκρασία τήξης των προϊόντων (melt Temperature, T_m). Στο τέλος της αντίδρασης σχηματίζεται για το κάθε προϊόν μια καμπύλη τήξης, η οποία είναι ενδεικτική του μεγέθους και της περιεκτικότητας του προϊόντος σε GC, παρέχοντας πληροφορίες για ενδεχόμενες μολύνσεις (**Εικόνα 21**).

Η ποσοτικοποίηση του αρχικού δείγματος μπορεί να γίνει είτε με απόλυτο τρόπο είτε σχετικά με κάποιο γονίδιο αναφοράς· η κάθε μέθοδος ποσοτικοποίησης εξυπηρετεί διαφορετικούς πειραματικούς σκοπούς. Στην δική μας πειραματική διαδικασία, χρησιμοποιήσαμε την απόλυτη ποσοτικοποίηση για να εκτιμήσουμε πόσες φορές οι περιοχές ενδιαφέροντος είχαν ενσωματωθεί στο γονιδίωμα των κυττάρων που επαναπρογραμματίστηκαν. Για το σκοπό αυτό, κατασκευάσαμε μια πρότυπη καμπύλη τιμών Cq-αριθμού γονιδίων GFP, από δείγματα γνωστών συγκεντρώσεων σε γονίδια GFP (**Εικόνα 22**), και στη συνέχεια αντιστοιχίσαμε τις τιμές Cq που πήραμε από qPCR σε γενωμικό DNA των κυττάρων (με στόχο το GFP γονίδιο) με τον αριθμό των γονιδίων. Παρατίθεται το πρωτόκολλο της qPCR με τους GFP εκκινητές (**Πίνακας 6**).

Πίνακας 6. Πρωτόκολλο αντίδρασης PCR με στόχο το γονίδιο GFP

Ποσότητες αντιδραστηρίων	Συνθήκες αντίδρασης
40ng DNA	95°C, 3min
0,8λ primer mix GFP	95°C, 15sec
7,5λ SYBR 2x	66°C, 30sec
H ₂ O μέχρι τα 15λ	Melt curve:
	64°C to 93.5°C, increment 0.5°C +plate read

Χρησιμοποιήσαμε την σχετική ποσοτικοποίηση στην περίπτωση της RT-PCR για να συγκρίνουμε επίπεδα έκφρασης γονιδίων, όπως αναφέρθηκε στο ii (5.5.2). Η ποσοτικοποίηση σε αυτή την περίπτωση γίνεται με ένα γονίδιο αναφοράς· το γονίδιο αναφοράς πρέπει να έχει σταθερή έκφραση στις δεδομένες πειραματικές συνθήκες και χρησιμοποιείται για να εξομαλύνει τις διαφορές που υπάρχουν ανάμεσα στα δείγματα, είτε λόγω αποκλίσεων στην απόδοση της σύνθεσης του cDNA, είτε λόγω μικροδιαφορών στο πιπετάρισμα κατά την προσθήκη γενετικού υλικού στην αντίδραση. Ως γονίδιο αναφοράς επιλέχθηκε το GAPDH που έχει σταθερή έκφραση στα κύτταρα (housekeeping gene). Η

σχετική ποσοτικοποίηση (Relative Expression, RE) της έκφρασης κάθε γονιδίου υπολογίστηκε από τον παρακάτω τύπο:

$$RE = 2^{-\Delta Cq}$$

όπου $\Delta Cq = Cq \text{ γονιδίου μελέτης} - Cq \text{ GAPDH}$

Παρατίθενται τα πρωτόκολλα της αντίδρασης RT-PCR για τα cDNA των *Ovol1* και *GAPDH* (Πίνακες 7 και 8 αντίστοιχα). Στον Πίνακα 9 παρατίθενται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 7. Πρωτόκολλο αντίδρασης RT-PCR με στόχο τα cDNAs του *Ovol1*.

Ποσότητες αντιδραστηρίων	Συνθήκες αντίδρασης
40ng DNA	95°C, 3min
0,8λ primer mix <i>Ovol1</i>	95°C, 15sec
7,5λ SYBR 2x	62°C, 30sec
H ₂ O μέχρι τα 15λ	Melt curve: 64°C to 93.5°C, increment 0.5°C +plate read
	x39, +plate read

Πίνακας 8. Πρωτόκολλο αντίδρασης RT-PCR με στόχο τα cDNAs του *GAPDH*

Ποσότητες αντιδραστηρίων	Συνθήκες αντίδρασης
40ng DNA	95°C, 3min
0,8λ primer mix <i>GAPDH</i>	95°C, 15sec
7,5λ SYBR 2x	61°C, 30sec
H ₂ O μέχρι τα 15λ	Melt curve: 64°C to 93.5°C, increment 0.5°C +plate read
	x39, +plate read

Πίνακας 9. Στοιχεία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για qPCR.

Στόχος εκκινητή	Πρόσθιος εκκινητής (5'-3')	Οπίσθιος εκκινητής (3'-5')
<i>Ovol1</i> (cDNA)	AAGTGCAGTCTGTGTGATAAGG	GACTCTCGGATGTGCAACCG
<i>eGFP</i> (cDNA)	TACGTCCAGGAGCGCACCATCT	TGATCGCGTCTCTCGTTGGGG
<i>GAPDH</i> (cDNA)	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

5.5.3. Καθαρισμός νουκλεϊκών οξέων με διάλυμα φαινόλης-χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη

Μετά την απομόνωσή του από τα κύτταρα, τα DNA/RNA καθαρίζονται από τα κυτταρικά κατάλοιπα, τις πρωτεΐνες, καθώς και τα ένζυμα και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωσή τους. Ο καθαρισμός γίνεται με χρήση διαλύματος φαινόλης-χλωροφόρμιο-ισοαμυλικής αλκοόλης (αναλογία 25:24:1) και κατακρήμνιση του DNA/RNA με αιθανόλη και οξικό νάτριο. Παρακάτω θα αναφερόμαστε στο διάλυμα αυτό ως διάλυμα φαινόλης-χλωροφόρμιο για χάριν ευκολίας.

Στο διάλυμα φαινόλης –χλωροφόρμιο τα υδρόφοβα αμινοξέα, που στο υδατικό περιβάλλον του κυττάρου βρίσκονται στον πυρήνα της αναδιπλωμένης δομής της πρωτεΐνης, αναδύονται και σχηματίζουν υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με το οργανικό περιβάλλον. Αυτό οδηγεί στην καταστροφή της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών και στην κατακρήμνισή τους στην υδρόφοβη φάση του διαλύματος. Τα νουκλεϊκά οξέα λόγω του ιοντισμένου φωσφορικού σκελετού τους, παραμένουν υδατοδιαλυτά. Η οργανική φάση της φαινόλης-χλωροφόρμιο είναι πιο πυκνή από την υδατική, καθιστώντας εύκολο τον διαχωρισμό τους.

Η κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων επιτυγχάνεται με τη βοήθεια αιθανόλης 100% και ιόντων Na^+ . Τα ιόντα Na^+ τείνουν φυσικά να σχηματίσουν ιοντικούς δεσμούς με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες των DNA/RNA. Ωστόσο, σε υδατικό περιβάλλον κάτι τέτοιο δεν είναι εφικτό, λόγω της μεγάλης διηλεκτρικής σταθεράς του νερού ($\epsilon_{\text{rH}_2\text{O}}=80$, αντιστρόφως ανάλογη της δύναμης Coulomb). Παρουσία αιθανόλης όμως ($\epsilon_{\text{rEtH}}=24$) το περιβάλλον γίνεται πολύ ευνοϊκότερο για ιοντικές αλληλεπιδράσεις· τα Na^+ αλληλεπιδρούν με τις φωσφορικές ομάδες, το DNA/RNA χάνει το ιοντικό του φορτίο, ως εκ τούτου χάνει την υδατοδιαλυτότητά του και κατακρημνίζεται.

Πρωτόκολλο καθαρισμού DNA με διάλυμα φαινόλης-χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη:

- προσθήκη δ/τος φαινόλης-χλωροφόρμιο όγκου ίσου με τον όγκο του δείγματος, έντονη ανάδευση
 - φυγοκέντρηση 11.000rpm, 20min
 - μεταφορά υπερκλειμένου (υδατική φάση) σε νέο eppendorf
 - (προσωρινή τοποθέτηση αιθανόλης 100% στους -80°C)
 - προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου, ανακίνηση
 - φυγοκέντρηση 11.000rpm, 5min
 - μεταφορά υπερκλειμένου σε νέο eppendorf
- } x2

- προσθήκη υπερδιπλάσιου όγκου παγωμένης αιθανόλης 100%
- προσθήκη 1/10 του όγκου CH₃COONa, ανάδευση
- φυγοκέντρηση 11.000rpm, 20min
- αφαίρεση υπερκλειμένου
- προσθήκη 300λ 75% αιθανόλη (καθαρισμός από άλατα)
- φυγοκέντρηση 11.000rpm, 5min
- αφαίρεση υπερκλειμένου
- επαναδιάλυση πελέτας DNA σε H₂O

5.5.4. Απομόνωση DNA από κυτταροκαλλιέργεια (DNA extraction)

Αρχικά θρυψινοποιούμε τα κύτταρα και τα φυγοκεντρούμε προς σχηματισμό πελέτας, όπως περιγράφηκε στο 5.1.2. Επαναδιαλύουμε τα κύτταρα σε 0,5ml διαλύματος Tris-EDTA (TE) και προσθέτουμε 0,5ml διαλύματος λύσης 2x (lysis buffer 2x). Προσθέτουμε 10λ RNase (τελικής συγκέντρωσης) και επωάζουμε για 10min στους 37°C. Προσθέτουμε 10λ πρωτεΐνάση K (τελικής συγκέντρωσης 10μg/mL) και αφήνουμε να επωαστούν 16-18h στους 52°C. Την επόμενη μέρα προχωρούμε σε καθαρισμό του DNA με διάλυμα φαινόλης-χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη, όπως περιγράφηκε στο 5.5.3.

Πίνακας 10. Σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται κατά το DNA extraction.

Διάλυμα	Σύσταση
Διάλυμα λύσης 2x (lysis buffer 2x)	10% SDS, Tris pH 7.5 1M, EDTA pH 8 0.5M, NaCl 5M, H ₂ O

5.5.5. Απομόνωση RNA από κυτταροκαλλιέργεια (RNA extraction)

Η απομόνωση του RNA γίνεται με χρήση του διαλύματος NucleoZOL, της Macherey Nagel. Το NucleoZOL είναι διάλυμα όξινης φαινόλης που περιέχει επιπλέον τον χαστροπικό παράγοντα guanidium thiocyanate. Η φαινόλη, όπως έχει περιγραφεί στο 5.6, διαχωρίζει τα νουκλεϊκά οξέα από τις πρωτεΐνες· σε όξινο pH ωστόσο, το DNA μόνο, και όχι το RNA, χάνει την υδατοδιαλυτότητά του και παρασύρεται στην οργανική φάση. Αμφότερα τα νουκλεϊκά οξέα σε όξινες συνθήκες χάνουν το ιοντικό τους φορτίο λόγω αλληλεπίδρασης των υδρογονοκατιόντων με τον φωσφορικό τους σκελετό, όμως το μονόκλωνο RNA εξακολουθεί να είναι διαλυτό στο νερό, καθώς οι εκτεθειμένες βάσεις του σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με αυτό. Ο χαστροπικός παράγοντας guanidium thiocyanate προκαλεί αποδιάταξη των πρωτεϊνών και προστίθεται για προστασία του RNA από τις ιδιαίτερα

ανθεκτικές RNάσες (δεδομένου ότι και από μόνη της η φαινόλη αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες). Η τεχνική εφαρμόζεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας. Μετά την πρώτη απομόνωση με το NucleoZOL, προχωρούμε σε καθαρισμό του RNA με διάλυμα φαινόλης-χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη, όπως περιγράφηκε στο 5.6.

5.6.Επαναπρογραμματισμός εμβρυϊκών ινοβλαστών ποντικού

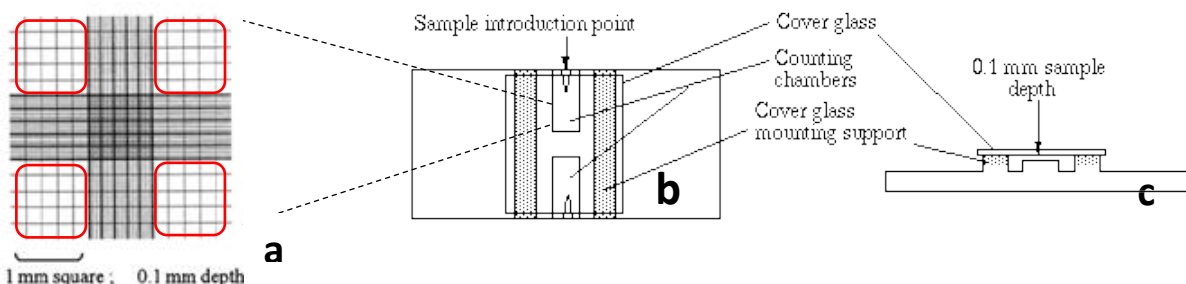
Ο επαναπρογραμματισμός γίνεται σε κύτταρα MEFs 4F2 (5.2.4.). Ξεκινάει με την προσθήκη δοξκυκλίνης (Dox, τελικής συγκέντρωσης 2μg/mL) στο καλλιεργητικό μέσο (Ημέρα 0) και ολοκληρώνεται μετά από 18 ημέρες, όπου τα κύτταρα έχουν μετατραπεί σε iPSCs και έχουν αποκτήσει την ικανότητα να διατηρούν την πολυδυναμία ανεξάρτητα από την εξωγενή υπερέκφραση των OSKM παραγόντων (Ημέρα 18).

Ημέρα -4: μέτρηση κυττάρων σε αιματοκυτταρόμετρο και στρώσιμο κυττάρων

Πρώτο βήμα της διαδικασίας, είναι η δημιουργία υποκαλλιεργειών, από μια καλλιέργεια MEFs 4F2 πυκνότητας 100%, με συγκεκριμένο αριθμό κυττάρων ανά επιφάνεια. Για επαναπρογραμματισμό σε 10cm plates διαμοιράσαμε 400.000 κύτταρα, σε 6cm plates 200.000 και σε 6-well plates 100.000 κύτταρα. Επιδίωξή μας είναι να επιτύχουμε τέτοια πυκνότητα την Ημέρα 0, στην οποία τα κύτταρα θα είναι αρκετά αραιά ώστε να έχουν χώρο για διπλασιασμό, παράλληλα όμως να είναι αρκετά πυκνά ώστε να επιτυγχάνονται διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις, χωρίς τις οποίες δύσκολα διαιρούνται τα MEFs. Για το σκοπό αυτό, μετράμε τον αριθμό των κυττάρων της αρχικής καλλιέργειας σε αιματοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer) και υπολογίζουμε το ποσοστό της αρχικής καλλιέργειας που θα στρωθεί στα νέα πιάτα.

Τα αιματοκυτταρόμετρα έχουν ένα ή δύο πλέγματα μέτρησης κυττάρων (Εικόνα 9, a). Κάθε πλέγμα αποτελείται από 9 μεγάλα τετράγωνα, μήκους 1mm (a). Το επίπεδο κάθε πλέγματος είναι 0,1mm χαμηλότερα από το επίπεδο στήριξης της καλυπτρίδας (c). Επομένως μεταξύ πλέγματος και καλυπτρίδας σχηματίζεται ένας χώρος ύψους 0,1mm, όπου μπορεί να τοποθετηθεί το εναιώρημα των κυττάρων.

Μετά τη θρυψινοποίηση της αρχικής καλλιέργειας, μεταφέρονται 10μl καλλιέργειας στην πλάκα Neubauer, στο χώρο ανάμεσα στην καλυπτρίδα και στην πλάκα (b, sample introduction point). Σε ανάστροφο φωτονικό μικροσκόπιο μετράμε τα κύτταρα που υπάρχουν σε κάθε ένα από 4 μεγάλα γωνιακά (κόκκινα) τετράγωνα (a, εικόνα 9).



Εικόνα 22. Απεικόνιση στοιχείων τυπικού αιματοκυτταρόμετρου: b. αιματοκυτταρόμετρο ή πλάκα Neubauer, a. πλέγμα μέτρησης κυττάρων, c. σχετική θέση καλυπτρίδας με πλέγμα μέτρησης κυττάρων.

Υπολογίζουμε το μέσο όρο των κυττάρων ενός τετραγώνου. Ο όγκος ενός κόκκινου τετραγώνου ισούται με $1 \times 1 \times 0.1 \text{ mm}$, δηλαδή με 0.1 mm^3 ή αλλιώς 10^{-4} ml ($1 \text{ mm} = 10^{-3} \text{ ml}$). Η συγκέντρωση των κυττάρων σε ένα κόκκινο τετράγωνο ισούται με τον μέσο όρο των κυττάρων ανά τετράγωνο (M), δια του όγκου του τετραγώνου, δηλαδή

$$c = M / 10^{-4} \text{ ml}$$

ή αλλιώς

$$c = M \times 10^4 / \text{ml}$$

Επομένως, ο αριθμός των κυττάρων σε 1ml καλλιέργειας ισούται με τον μέσο όρο των κυττάρων σε ένα γωνιακό τετράγωνο επί 10.000. Ο συνολικός αριθμός κυττάρων της αρχικής καλλιέργειας ισούται με το γινόμενο του αριθμού αυτού επί του όγκου της καλλιέργειας από όπου πήραμε τα 10λ.

Μετά την μέτρηση των κυττάρων, φυγοκεντρούμε προς σχηματισμό πελέτας στις 1200rpm για 5min, επαναδιαλύουμε σε θρεπτικό μέσο 15% σε FBS. Υπολογίζουμε τον όγκο της καλλιέργειας που περιέχει τον επιθυμητό αριθμό κυττάρων και μοιράζουμε στα πιάτα.

Ημέρα -3: Μεταγωγή (transduction)

Την επόμενη μέρα επιμολύνουμε τα κύτταρα με ιό rtTA. Στα 6-well plates επιδρούμε με 0,5ml ανά πηγάδι, στα 6cm plates με 1ml και στα 10cm plates με 1,5ml. Επίσης, μαζί με

τους ιούς χορηγούμε στις καλλιέργειες polybrene (θετικά φορτισμένο λιπίδιο που διευκολύνει τη την πρόσληψη του ιού από τα κύτταρα), σε τελική συγκέντρωση 6-8μg/ml.

Ημέρα -2: Ανανέωση θρεπτικού μέσου

Την επόμενη μέρα ανανεώνουμε το καλλιεργητικό μέσο. Αφήνουμε τα κύτταρα σε ηρεμία μια ημέρα, ώστε να επιτευχθεί η ενσωμάτωση του ιού στο γονιδίωμα τους.

Ημέρα 0: Επαγωγή επαναπρογραμματισμού με επίδραση με Dox

Την ημέρα 0 πυροδοτούμε την έναρξη του επαναπρογραμματισμού με προσθήκη Dox. Ανανεώνουμε το θρεπτικό μέσο, αυτή τη φορά με θρεπτικό που περιέχει επιπλέον Dox σε συγκέντρωση 2μg/ml. Από εδώ και πέρα ανανεώνουμε το θρεπτικό μέσο (με Dox) κάθε 2^η μέρα.

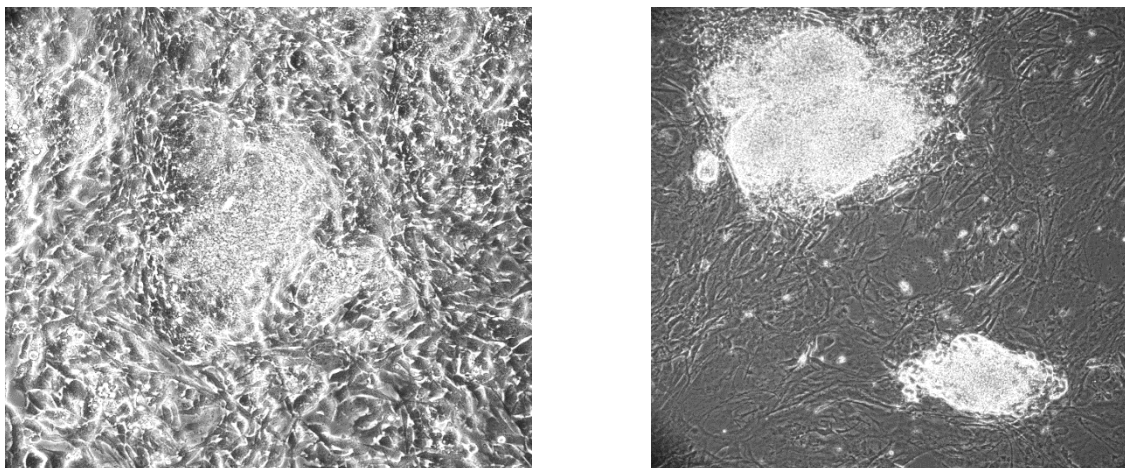
Ημέρα 6 : Καλλιεργητικό μέσο για βλαστικά κύτταρα

Την 6^η μέρα αλλάζουμε τη σύσταση του καλλιεργητικού μέσου. Τα κύτταρα εφεξής επωάζονται σε θρεπτικό μέσο ειδικό για βλαστικά κύτταρα (ESC medium). Η 6^η ημέρα είναι μέρα ορόσημο, καθώς σ' αυτή ολοκληρώνεται το δίκτυο των εννιά μεταγραφικών παραγόντων που ενεργοποιείται από τους OSKM. Στις καλλιέργειες παρατηρούνται πρώιμοι σχηματισμοί εν είδει αποικιών βλαστικών κυττάρων, που ονομάζονται pre-iPSC colonies. Στο ESC medium προστίθεται Dox σε τελική συγκέντρωση 2μg/ml, και mLIF (mouse Lif) σε τελική συγκέντρωση 10μg/ml. Το mLIF είναι μια κυτταροκίνη που απομονώνεται από ποντίκι, η οποία εμποδίζει την διαφοροποίηση των κυττάρων. Το θρεπτικό μέσο ανανεώνεται κάθε 2 ημέρες.

ESC medium: 15% Hyclone serum (φιλτραρισμένο με 0.2μm φίλτρο), , 1x Penstrep, 1x Glutamax, 1x MEM-NEAA σε Knockout DMEM (Gibco).

Ημέρα 18: Ολοκλήρωση του επαναπρογραμματισμού

Την 18^η μέρα της διαδικασίας ο επαναπρογραμματισμός λαμβάνει τέλος. Όσα κύτταρα κατάφεραν να επαναπρογραμματιστούν (iPSCs) λειτουργούν πλέον σαν βλαστικά κύτταρα και δεν εξαρτώνται από την εξωγενή υπερέκφραση των OSKM παραγόντων. Στην καλλιέργεια φαίνονται καλοσχηματισμένες αποικίες iPS κυττάρων πάνω σε ένα «χαλί» από MEFs (Εικόνα 24).



Εικόνα 23. (Αριστερά): Απεικόνιση pre-iPSC colony την ημέρα 6 του επαναπρογραμματισμού. (Δεξιά) Δύο καλοσχηματισμένες αποικίες iPS κυττάρων την ημέρα 18 του επαναπρογραμματισμού.

5.7. Χαρακτηρισμός ενεργότητας υποψήφιων ενισχυτών κατά τον επαναπρογραμματισμό

5.7.1. Ανίχνευση προτύπου ενεργότητας με χρήση γονιδίου αναφοράς (δοκιμασία αναφοράς, reporter assay)

Για τη διερεύνηση της ενεργότητας των υποψήφιων ενισχυτών, κλωνοποιήσαμε τις αλληλουχίες τους άνωθεν του γονιδίου eGFP, όπως περιγράφηκε στο 5.4. Στη συνέχεια, συγκροτήσαμε λεντι-ιούς (βλ. 5.3.), με τους οποίους ενσωματώσαμε τις πλασμιδιακές κατασκευές στο γονιδίωμα των κυττάρων που θα επαναπρογραμματίζονταν (MEFs 4F2). Γι' αυτό το σκοπό, στην ημέρα -3 του πειράματος επαναπρογραμματισμού (5.6.) επιμολύναμε τις κυτταροκαλλιέργειες με τους ιούς των πλασμιδιακών κατασκευών των υποψήφιων ενισχυτών, παράλληλα με την επιμόλυνση με τον M2rtTA ιό. Στη διάρκεια του επαναπρογραμματισμού τέθηκαν 5 χρονικά σημεία (timepoints): **ημέρες 1, 3, 6, 9, 12** στα οποία αφενός ελεγχόταν η ενεργότητα της περιοχής ενδιαφέροντος μέσω ανίχνευσης σήματος σε μικροσκόπιο φθορισμού (βλ. 4), αφετέρου συλλεγόταν το RNA των κυττάρων (βλ. 5.5.5.) για πείραμα RT-PCR (βλ. 5.5.2., ii). Οι στόχοι της RT-PCR ήταν η GFP, ο Ono1 (η ρύθμιση του οποίου διερευνάται) και το GAPDH (γονίδιο αναφοράς στην PCR σχετικής

ποσοτικοποίησης)· υποθέσαμε πως η υποψήφια περιοχή ρυθμίζει στην πραγματικότητα την έκφραση του *Ono1* κατά τον επαναπρογραμματισμό, μόνο αν τα πρότυπα έκφρασης των GFP και *Ono1* ταυτίζονταν (5.5.2, ii).

5.7.2. Κυτταρομετρία ροής και διαχωρισμός κυτταρικών πληθυσμών (FACS)

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια τεχνική που επιτρέπει τη μελέτη των κυτταρικών πληθυσμών μέσω της ανάλυσης της σκέδασης του φωτός από τα κύτταρα και της εκπομπής φθορισμού από αυτά. Πραγματοποιείται από ειδικό μηχάνημα, το κυτταρόμετρο, στο οποίο γίνεται καταγραφή του σκεδασμένου φωτός και του φθορισμού όσο τα κύτταρα περνάνε ένα-ένα από μια δέσμη laser. Το κυτταρόμετρο έχει επίσης τη δυνατότητα να διαχωρίζει κυτταρικούς υποπληθυσμούς, με βάση ένα ορισμένο χαρακτηριστικό, για παράδειγμα το μέγεθος ή το χρώμα φθορισμού (fluorescence-activated cell sorting, FACS).

Στην πειραματική μας διαδικασία υλοποιήσαμε πείραμα FACS προκειμένου να διαχωρίσουμε την ημέρα 6 του επαναπρογραμματισμού τα κύτταρα που εξέπεμπαν σήμα (GFP) από εκείνα που δεν εξέπεμπαν. Οι δύο κυτταρικοί υποπληθυσμοί επανακαλλιεργήθηκαν ξεχωριστά (replating) μέχρι την ημέρα 18 του επαναπρογραμματισμού, όπου βιάφτηκαν με υπόστρωμα αλκαλικής φωσφατάσης (βλ. επόμενη ενότητα, 5.7.3.). Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθεται στον **Πίνακα 11**.

Πρωτόκολλο cell sorting για επανεπίστρωση (replating) την Ημέρα 6:

Προετοιμασία πιάτων:

Ημέρα -1:

- 2ml μίγματος gelatin 0,1% σε 10cm plates (όσα θα χρησιμοποιήσω για replating). Το gelatin είναι ένα μίγμα υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών μεγάλου μοριακού βάρους που προέρχονται από το κολλαγόνο. Χρησιμοποιείται για κάλυψη της επιφάνειας των πιάτων κυτταροκαλλιέργειας, προς ενίσχυσης της προσκόλλησης των κυττάρων.
- επώαση 37°C, 30min
- ξεπάγωμα κυττάρων feeders στα πιάτα αυτά (περίπου 2-3 10^6 σε κάθε πιάτο)

Ημέρα 0:

- κυτταροκαλλιέργεια MEFs (4F2) στην ημέρα 6 του επαναπρογραμματισμού (10cm plate)
- 3ml θρυψίνης 1x
- επώαση 37°C, 30min

στο μεταξύ προσθέτω σε όσα *erpendorfs* χρειαστούν από 1ml FBS. Σε αυτά θα συλλεχθούν τα κύτταρα κατά το *sorting*· η επώαση με FBS αποσκοπεί στην κάλυψη των τοιχωμάτων του *tube* ώστε να μην προσκολληθούν κύτταρα σε αυτά (*coating*)

- απενεργοποίηση θρυψίνης με 7ml θρεπτικό μέσο 10% σε FBS
- μεταφορά σε 15ml falcon
- φυγοκέντρηση 1200rpm, 5min
- χρώση με DAPI: επαναδιάλυση πελέτας κυττάρων σε 1ml PBS 1x με DAPI σε αραιώση 1/1000, δηλαδή 1λ
σχόλιο: αυτό το βήμα γίνεται για τον διαχωρισμό των νεκρών κυττάρων από τα ζωντανά, Η DAPI είναι μια χρωστική (μπλε χρώματος) που εισέρχεται στους πυρήνες των νεκρών κυττάρων και προσδένεται στο DNA
- επώαση 10min σε RT
- φυγοκέντρηση 1200rpm, 5min
- ξέπλυμα από DAPI: επαναδιάλυση πελέτας σε 1ml PBS 1x
- φυγοκέντρηση 1200rpm, 5min

στο μεταξύ αφαιρώ το FBS από τα *erpendorfs* και προσθέτω από περίπου 0,5ml θρεπτικό μέσο για ESCs. Σε αυτά θα γίνει η συλλογή των κυττάρων. Τοποθέτηση σε πάγο

- επαναδιάλυση πελέτας κυττάρων σε 1ml FACS buffer
- μεταφορά εναιωρήματος στο γυάλινο φιαλίδιο του *sorting* μετά από φιλτράρισμα (φίλτρο για *sorting*)

Sorting:

- ορισμός συνθηκών διαχωρισμού κυττάρων βάσει των σημάτων του αρνητικού δείγματος
- ως αρνητικό δείγμα χρησιμοποιήθηκε κυτταροκαλλιέργεια MEFs 4F2 επιμολυσμένη με LEGO-GN. Ο φθορισμός από GFP που ανιχνεύεται σε αυτό το δείγμα ορίζεται βασικό επίπεδο σήματος

Replating:

- φυγοκέντρηση διαχωρισμένων κυττάρων, 2.000rpm, 5min

σχόλιο: τα κύτταρα διαχωρίστηκαν σε GFP(-) και GFP(+). Επιπλέον, τα κύτταρα καθώς διαχωρίζονται καταμετρούνται: πάνω σε κάθε erppendorf αναγράφεται ο αριθμός των κυττάρων που περιέχει

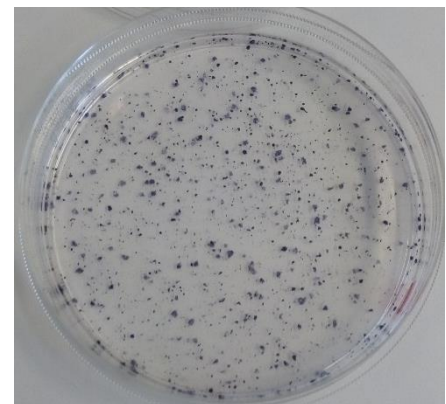
- επαναδιάλυση κυττάρων σε 1ml θρεπτικό μέσο για ESCs.
- στρώσιμο κυττάρων στα 10cm plates με τους feeders, με θρεπτικό μέσο για ESCs, ως εξής:
από κάθε δυάδα αρνητικών-θετικών (για GFP) κυττάρων στρώνω δύο πιάτα που αποτελούν επίσης δυάδα: ένα αρνητικών και ένα θετικών κυττάρων. Τα πιάτα κάθε δυάδας πρέπει να στρωθούν με ακριβώς τον ίδιο αριθμό κυττάρων. Υπολογίζω τον όγκο του εναιωρήματος που θα προσθέσω σε κάθε πιάτο για να το επιτύχω
- επώαση στους 37°C, 2h
- προσθήκη Dox στο καλλιεργητικό μέσο (τελική συγκέντρωση 2μg/ml) και mLif (τελική συγκέντρωση 10μg/ml)

Πίνακας 11. Σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται κατά το cell sorting.

Διάλυμα	Σύσταση
PBS 1X	4gr NaCl, 0,72gr Na ₂ HPO ₄ , 0,4gr KH ₂ PO ₄ , 0,1gr KCL
Gelatin 0,1%	αραίωση σε PBS 1x εμπορικού gelatin 2%
FACS buffer	EDTA 1mM, FBS 10%, PBS (διαλύτης)

5.8.Χρώση με υπόστρωμα αλκαλικής φωσφατάσης (AP staining)

Η χρώση πιάτου κυτταροκαλλιέργειας με υπόστρωμα αλκαλικής φωσφατάσης (Alkaline Phosphatase staining, AP staining) γίνεται με σκοπό την οπτικοποίηση των πολυδύναμων αποικιών. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται αντιδρά παράγοντας ένα σκουρόχρωμο προϊόν ύστερα από κατεργασία από το ένζυμο της αλκαλικής φωσφατάσης. Η αλκαλική φωσφατάση εκφράζεται στην επιφάνεια των βλαστικών κυττάρων και αποτελεί δείκτη της πολυδυναμίας. Ως εκ τούτου οι πολυδύναμες αποικίες βάφονται επιτρέποντας την καταμέτρησή τους (Εικόνα 11). Στην πειραματική μας διαδικασία, προχωρήσαμε σε AP staining την ημέρα 18 του επαναπρογραμματισμού σε



Εικόνα 24. AP staining την ημέρα 18 του επαναπρογραμματισμού

κυτταροκαλλιέργειες που είχαν προκύψει από πείραμα FACS, όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη στο 5.7.2..Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται στον **Πίνακα 12**.

Πρωτόκολλο AP staining:

- αφαίρεση θρεπτικού μέσου από τα πιάτα
 - πλύση με PBS 1x
 - **μονιμοποίηση κυττάρων:** επίδραση με διάλυμα μονιμοποίησης (fixing buffer), 4ml σε 10cm plate
 - επώαση στους 4°C για 10min
 - αφαίρεση διαλύματος μονιμοποίησης
 - ξέπλυμα με PBS 1x

 - προσθήκη 3ml MTNT διαλύματος
 - επώαση για 3min
 - αφαίρεση διαλύματος
 - προσθήκη MBT/BCIP διαλύματος (υπόστρωμα), σε τελική συγκέντρωση 1:100 σε διαλύτη MTNT (4ml σε 10cm plate)
 - επώαση 10min σε θερμοκρασία δωματίου
- } **x3**
- Προστατεύω τα πιάτα γιατί το υπόστρωμα είναι φωτοευαίσθητο*
- αφαίρεση διαλύματος
 - πλύση με PBS
 - προσθήκη 4ml PBS
 - φωτογράφιση αποτελέσματος
 - αποθήκευση στους 4°C, τυλιγμένα με αλουμινόχαρτο

Πίνακας 12. Σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται κατά το AP staining..

Διαλύματα	Σύσταση
<i>PBS 1x</i>	4gr NaCl, 0,72gr Na ₂ HPO ₄ , 0,4gr KH ₂ PO ₄ , 0,1gr KCl
<i>Fixing buffer</i>	4% φορμαλδεΐδη σε PBS 1x
<i>MTNT</i>	100mM NaCl 100mM Tris-HCl pH 9.5 0,1% Tween 50mM MgCl

5.9.Πείραμα ανοσοφθορισμού σε κυτταροκαλλιέργεια

Ο ανοσοφθορισμός σε κυτταροκαλλιέργεια επιτρέπει τον εντοπισμό ή/και τον συνεντοπισμό πρωτεϊνών-στόχων μέσα στα κύτταρα. Εφαρμόσαμε σύστημα δύο αντισωμάτων (antibodies, Ab), ένα πρωτογενές ειδικό για την πρωτεΐνη-στόχο και ένα δευτερογενές ειδικό για τη σταθερή περιοχή του πρωτογενούς (Fc περιοχή αντισώματος, σχετική με το είδος του ζώου που παράγει το αντίσωμα). Χρησιμοποιήσαμε πρωτογενές αντίσωμα anti-Ovol1 (το αντιγόνο κατασκευάστηκε στο εργαστήριο για την ανοσοποίηση κουνελιού) και εμπορικό anti-GFP αντίσωμα. Τα δευτερογενή αντισώματα ήταν αντίστοιχα anti-rabbit και anti- mouse. Τα δευτερογενή αντισώματα ήταν συζευγμένα με χρωμοφόρο μόριο, που φθορίζει σε συγκεκριμένο μήκος κύματος. Η ανίχνευση του σήματος έγινε σε συνεστιακή μικροσκοπία (confocal microscopy). Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθεται στον **Πίνακα 13**. Τα στοιχεία των αντισωμάτων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 14**.

Πρωτόκολλο ανοσοφθορισμού:

Προετοιμασία κυττάρων

η διαδικασία ξεκινάει την ημέρα που η καλλιέργεια των κυττάρων που θα υποβληθούν σε ανοσοφθορισμό έχει φτάσει πυκνότητα 100%

- τοποθέτηση μιας καλυπτρίδας σε κάθε πηγάδι πιάτου 24 πηγαδιών (24-well plate)
- έκθεση του πιάτου με ανοιχτό τα καπάκι σε UV για 10min (για εξασφάλιση στείρων συνθηκών)
- προσθήκη 200μl gelatin 0,1% στο κέντρο κάθε καλυπτρίδας (σαν σταγόνα)
- επώαση 37°C, 30min
- αφαίρεση gelatin
- διαμοίρασμα 200.000 κυττάρων σε κάθε πηγάδι (τα 200.000 κύτταρα να εμπεριέχονται σε 150μl θρεπτικού μέσου)
- επώαση κυττάρων στους 37°C μέχρι την επόμενη μέρα (προσκόλληση κυττάρων στην καλυπτρίδα)

IF staining:

Ημέρα 1:

- αφαίρεση θρεπτικού μέσου

- πλύση με PBS 1x
- πλύση με κρύο PBS 1x (4°C, πάγος)
- μονιμοποίηση κυττάρων με 4% διαλύματος φορμαλδεΐδης (διαλύτης: PBS 1x)
- επώαση 20min σε θερμοκρασία δωματίου
- πλύση με κρύο PBS 1x } **x3**
σε αυτό το βήμα το πιάτο μπορεί να αποθηκευτεί στους 4°C για 10 ημέρες
- προσθήκη διαλύματος blocking)
σε αυτό το βήμα καλύπτονται οι μη ειδικές θέσεις (blocking step)
- επώαση 1h σε θερμοκρασία δωματίου

από εδώ και πέρα δουλεύω σε 15cm plate εξωτερικά καλυμμένο με αλουμινόχαρτο κι εσωτερικά με parafilm. Τοποθέτηση 50μl διαλύματος πρωτογενούς αντισώματος σε μια θέση για κάθε καλυπτρίδα

- μεταφορά κάθε καλυπτρίδας από το πηγάδι του πιάτου στη σταγόνα του πρωτογενούς αντισώματος
- επώαση 16-18h, 4°C

Ημέρα 2:

- σε ένα 2° 15cm πιάτο τοποθέτηση 50l διαλύματος δευτερογενούς Ab σαν σταγόνα στη θέση όπου θα τοποθετηθεί κάθε καλυπτρίδα
- ξέπλυμα κάθε καλυπτρίδας με PBS 1x } **x3**
διαδοχική εμβάπτιση της καλυπτρίδας σε 3 εν σειρά bicker με PBS 1x
- τοποθέτηση έκαστης καλυπτρίδας πάνω στη σταγόνα του δευτερογενούς Ab
- επώαση 1-2h σε θερμοκρασία δωματίου (προστασία πιάτου λόγω φωτοευαισθησίας αντισώματος)
- σε αντικειμενοφόρους πλάκες: τοποθέτηση σταγόνας 3l DAPI για κάθε καλυπτρίδα
- πλύση κάθε καλυπτρίδας με PBS 1x } **x3**
- τοποθέτηση κάθε καλυπτρίδας στη σταγόνα DAPI (φωτοευαίσθητη)
- επώαση 16-18h, 4°C
- σταθεροποίηση καλυπτρίδας στην αντικειμενοφόρο πλάκα με εφαρμογή μανό περιμετρικά

Πίνακας 13. Σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται στον ανοσοφθορισμό.

Διάλυμα	Σύσταση
Διάλυμα <i>blocking</i>	10% FBS 0.3% Triton X-100 in PBS 1%
Διάλυμα αντισώματος (ίδιο για όλα)	1% FBS 0.1% Triton X-100 in PBS 1%

Πίνακας 14. Στοιχεία αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στον ανοσοφθορισμό.

Αντίσωμα	Εταιρεία	Κωδικός	Χρώμα εκπομπής	Αραίωση
Anti-mouse GFP,	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>	<i>SC9996</i>		<i>1:300</i>
Anti-ovol1, rabbit	Παραγωγή στο εργαστήριο			<i>1:300</i>
Anti-mouse	<i>Molecular Probes</i>	<i>Alexa-488</i>	<i>πράσινο</i>	<i>1:500</i>
Anti-rabbit	<i>Molecular Probes</i>	<i>Alexa-568</i>	<i>κόκκινο</i>	<i>1:500</i>

5.10. Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP)

Η ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης στοχεύει στην ταυτοποίηση των αλληλουχιών DNA στις οποίες προσδένονται πρωτεΐνες. Η χρωματίνη μονιμοποιείται με χημικό τρόπο (δημιουργία σταυροσυνδέσεων μεταξύ πρωτεϊνών ώστε να μην μετακινηθούν/απομακρυνθούν από τις θέσεις που είχαν τη στιγμή της απομόνωσης), κερματίζεται με τη βοήθεια υπερήχων σε κομμάτια των 200-500bps, και στη συνέχεια κατακρημνίζονται οι υπό μελέτη πρωτεΐνες με χρήση αντισωμάτων ειδικών γι' αυτές. Οι πρωτεΐνες που κατακρημνίζονται είναι προσδεδεμένες πάνω στην αλληλουχία DNA που αναγνωρίζουν, η οποία συν-κατακρημνίζεται με αυτές. Τέλος, πραγματοποιείται αντιστροφή των σταυροσυνδέσεων και ταυτοποίηση των αλληλουχιών. Η ταυτοποίηση των αλληλουχιών μπορεί να γίνει με qPCR, εάν διερευνάται η πρόσδεση σε μια συγκεκριμένη (γνωστή) αλληλουχία. Εναλλακτικά, ο προσδιορισμός άγνωστων αλληλουχιών γίνεται με αλληλούχηση νέας γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS). Τα αποτελέσματα αξιολογούνται βάσει ενός δείγματος αναφοράς (input), το οποίο δεν έχει υποστεί επεξεργασία με αντισώματα.

Πρωτόκολλο CHIP

I. Σταυροσύνδεση πρωτεϊνών στη χρωματίνη (fixation)

- καλλιέργειες κυττάρων που θέλουμε να μελετήσουμε σε πιάτα 10cm
- αφαίρεση θρεπτικού μέσου από τα πιάτα και ξέπλυμα με PBS 1x (x2)
- 5ml διαλύματος fixing, ήπια ανάδευση
- επώαση 10min σε RT, με ήπια ανάδευση
- απενεργοποίηση διαλύματος fixing με προσθήκη 250λ γλυκίνης 2,5M
- 7min επώαση σε RT, με ήπια ανάδευση
- απομάκρυνση διαλυμάτων με απόχυση και ξέπλυμα με PBS 1x
- προσθήκη 5ml PBS 1x
- συλλογή τα κύτταρα σε φιαλίδιο τύπου falcon
- φυγοκέντρηση 4°C, 3.000rpm, 8min
- απόχυση υπερκειμένου
- (μπορεί να γίνει αποθήκευση των κυττάρων στους -80°C)

II. Κερματισμός χρωματίνης με υπερήχους (chromatin sonication)

- επαναδιάλυση πελέτας σε 7ml PBS 1x
 - φυγοκέντρηση 3.000rpm, 4°C, 7min
 - απόχυση και aspiration
 - επαναδιάλυση πελέτας σε διάλυμα λύσης (lysis buffer), με όγκο 2ml/15εκ. κύτταρα, και προσθήκη αναστολέων πρωτεασών:
 - αναστολείς πρωτεασών (protease inhibitors) 50x του τελικού όγκου
 - PMSF 100x του τελικού όγκου
 - επώαση 15min, 4°C
 - φυγοκέντρηση 4.000rpm, 4°C, 7min
 - αφαίρεση υπερκειμένου με απόχυση και aspiration
 - επαναδιάλυση πελέτας με 5ml διαλύματος πλύσης (Wash buffer)
 - φυγοκέντρηση 4.000rpm, 4°C, 7min
 - απομάκρυνση υπερκειμένου
- } x2

- πλύση των τοιχωμάτων του falcon με 0,5ml διαλύματος κερματισμού (shearing buffer)
- επαναδιάλυση πελέτας σε shearing buffer, όγκου 1ml/15εκ. κύτταρα, και προσθήκη αναστολέων πρωτεασών:
 - proteinase inhibitors 50x του τελικού όγκου
 - PMSF 100x του τελικού όγκου
- επώαση 30min, στους 4°C
- κερματισμός χρωματίνης ανά 1ml στο μηχάνημα covaris (“Covaris S220”, τοποθέτηση δείγματος σε ειδικά TC12X12mm tubes με AFA Fiber) στις κατάλληλες συνθήκες (παρατίθενται)
- μεταφορά διαλύματος κερματισμένης χρωματίνης σε erpendorf χωρητικότητας 2ml
- φυγοκέντρηση 4.000rpm, 4°C, 13.000rpm
- μεταφορά υπερκειμένου σε φιαλίδιο 15ml τύπου falcon
- μεταφορά 50λ από κάθε δείγμα χρωματίνης σε erpendorf (για το επόμενο βήμα)
- αποθήκευση κερματισμένης χρωματίνης στους -80°C

Πίνακας 15. Συνθήκες κερματισμού χρωματίνης στο μηχάνημα covaris

Peak Power	Duty Factor	Cycles per Burst	Duration
75.0	15.0	200	900 sec

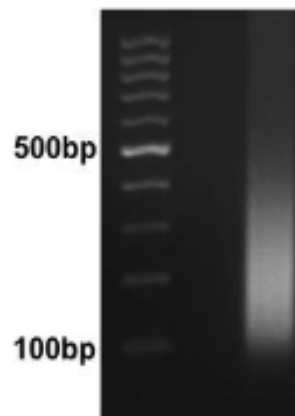
III. Αναστροφή σταυροσύνδεσης για έλεγχο ποιότητας χρωματίνης (Input preparation)

Ημέρα 1^η – αναστροφή σταυροσύνδεσης (reverse crosslink)

- στο δείγμα των 50λ προσθήκη 0,5ml RNase (30ng/ml)
- επώαση 30min, 37°C
- προσθήκη 2λ proteinase K (20mg/ml) και 1λ SDS 20%
- επώαση 15min, 50°C
- προσθήκη 9λ NaCl 5M
- επώαση στους 65°C, 16-18h

Ημέρα 2^η –ολοκλήρωση αναστροφής σταυροσύνδεσης και απομόνωση DNA

- προσθήκη 1,5λ proteinase K (20mg/ml)
- επώαση στους 50°C, 1h
- απομόνωση και καθαρισμός χρωματίνης με διάλυμα φαινόλης-χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη
- ηλεκτροφόρηση του DNA σε 2% gel αγαρόζης, 100V, η σωστά κερματισμένη χρωματίνη δίνει την παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 25: Η επιθυμητή εικόνα της κερματισμένης χρωματίνης ύστερα από ηλεκτροφόρηση

IV. Ανοσοκατακρήμνιση (ImmunoPrecipitation, IP)

α. Απομάκρυνση μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης (Preclear process)

Η ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης γίνεται με χρήση μαγνητικών σφαιριδίων (**magnetic beads**) που είναι συζευγμένα με πρωτεΐνη G (PureProteome™ Protein G Magnetic Bead System, της Millipore), η οποία δεσμεύει τις Fc περιοχές των IgG αντισωμάτων. Αρχικά προχωρούμε σε μια διαδικασία καθαρισμού της κερματισμένης χρωματίνης από τα κομμάτια εκείνα που δεσμεύονται μη ειδικά στα beads (**preclear process**).

- προσθήκη στα δείγματα της κερματισμένης χρωματίνης Triton 20% όγκου 1/10 του τελικού και NaCl 5M όγκου 1/33 του τελικού
αυτό το βήμα αποσκοπεί στην εξισορρόπηση του διαλύματος της χρωματίνης (μετατροπή από διάλυμα *shearing* σε διάλυμα ανοσοκατακρήμνισης (IP buffer))
- φιλτράρισμα χρωματίνης με 0,2μm φίλτρο

εξισορρόπηση των beads

- σε σωληνάκι errendorf διάλυμα των bead, μεταφέρουμε τον μισό όγκο beads από αυτόν που θα χρησιμοποιηθεί συνολικά στην διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης
- προσθήκη IP buffer σε υπερδιπλάσιο όγκο από τον όγκο των beads
- spin down μέχρι 3.000rpm
- τοποθέτηση των tubes στο μαγνητικό rack
- αφαίρεση IP buffer

} x3

απομάκρυνση “θορύβου” χρωματίνης

- επαναδιάλυση των beads σε IP buffer τόσου όγκου όσοου θα χρειαστεί για τον διαμοιρασμό των beads στα δείγματα της χρωματίνης
σε αυτό το βήμα το πλήθος των beads κάθε αντίδρασης αντιστοιχεί στο μισό του πλήθους των beads που θα χρησιμοποιηθούν για την κατακρήμνιση. Το πλήθος των beads αντιστοιχεί σε συγκεκριμένο όγκο Ab. Κάθε πρωτεΐνη δεσμεύεται σε συγκεκριμένες συνθήκες συγκέντρωσης Ab.
- διαμοιρασμός κατάλληλου όγκου διαλύματος IP buffer-beads σε σωληνάκι errendorf- ένα errendorf για κάθε δείγμα
- spin down μέχρι 3.000rpm
- τοποθέτηση errendorfs σε μαγνητικό rack, απομάκρυνση υπερκειμένου
- προσθήκη 1ml χρωματίνης για κάθε συνθήκη και κάθε πρωτεΐνη που εξετάζεται, αφαίρεση μαγνήτη
μεταφέρονται 100μl χρωματίνης από κάθε συνθήκη σε ξεχωριστό errendorf- θα χρησιμοποιηθεί ως Input. Επίσης, σχεδιάζονται 2 επιπλέον αντιδράσεις για κάθε συνθήκη, τα δείγματα των οποίων προορίζονται για μάρτυρες (σε αυτά θα γίνει επώαση με αντίσωμα 1) anti-H3 (ιστόνη 3)- θετικός μάρτυρας, 2) anti-IgG- αρνητικός μάρτυρας)
- επώαση στους 4°C, 1h
- errendorfs σε μαγνήτη, μεταφορά υπερκειμένου (αδέσμευτη χρωματίνη) σε νέο errendorf

β. Επώαση χρωματίνης με Ab και κατακρήμνιση με μαγνητικά beads

Ημέρα 1^η: επώαση με Ab

- προσθήκη κατάλληλης ποσότητας Ab σε κάθε αντίδραση
anti-onc1 Ab: 10μg
anti-H3 Ab: 2μg (ιστόνη 3, θετικός μάρτυρας)
anti-IgG Ab: 10μg (αντίσωμα IgG μη ειδικό για πρωτεΐνη, αρνητικός μάρτυρας)

- επώαση στους 4°C, 16-18h, με ήπια ανάδευση

Ημέρα 2^η: ανοσοκατακρήμνιση

εξισορρόπηση των beads

- υπολογίζω τον όγκο των beads που θα χρειαστεί κάθε αντίδραση
από εταιρεία: 1μl beads δεσμεύει 200ng Ab, επομένως:
δείγμα ονο1: 50μl beads
δείγμα H3: 50μl beads
δείγμα IgG: 10μl beads
- εξισορρόπηση του συνολικού πλήθους των beads που θα χρησιμοποιηθεί, όπως παραπάνω

επώαση δείγματος χρωματίνης-Abs με beads

- επαναδιάλυση εξισορροπημένων beads σε IP buffer
- διαμοιρασμός beads σε κάθε αντίδραση
- επώασης 4°C, 3h, με ήπια ανάδευση

πλύσιμο των συμπλόκων χρωματίνη-Ab-beads

το βήμα αυτό αποσκοπεί στην απομάκρυνση των κομματιών χρωματίνης που έχουν προσδεθεί μη ειδικά από τα αντισώματα ή/και τα beads

- ακολουθείται η διαδικασία πλύσης 4 βημάτων (4 step wash):

χρησιμοποιούνται **με σειρά** τα εξής διαλύματα πλύσης (κατά τη διαδικασία είναι τοποθετημένα στον πάγο)

1. Low salt buffer (2x)
2. Medium salt buffer (1x)
3. High salt buffer
4. LiCl buffer (1x)
5. TE (1x)

ως εξής:

Το πλύσιμο με κάθε διάλυμα διαρκεί 4min το πολύ. Κάθε φορά τοποθετούνται τα δείγματα σε μαγνητικό rack, αφαιρείται το διάλυμα, αφαιρείται ο μαγνήτης, προστίθεται το επόμενο διάλυμα, ξεκινάει η χρονομέτρηση, ανάδευση up and down. Η προσθήκη του TE (1x) γίνεται αμέσως μετά την προσθήκη του LiCl buffer (1x), δηλαδή χωρίς να παρεμβληθεί επώαση.

αντιστροφή σταυροσυνδέσεων και αποδιάταξη πρωτεϊνών:

- αφαίρεση διαλύματος πλύσης (σε μαγνήτη)
- επαναδιάλυση σε 50μl PK buffer (αφαίρεση μαγνήτη)
- επώαση 65°C, 30min, με ανάδευση σε vortex κάθε 5min
- προσθήκη 3μl RNase (10mg/ml)
- επώαση 30min, 50°C
- προσθήκη 2μl proteinase K (20mg/ml)
- προσθήκη 3μl NaCl 5M
- επώαση 65°C, 16-18h

Ημέρα 3^η: απομόνωση DNA (DNA purification)

μετά την επώαση με πρωτεϊνάση K οι αλληλουχίες του DNA αποδεσμεύτηκαν από τις πρωτεΐνες της χρωματίνης κι ως εκ τούτου και από τα μαγνητικά beads. Η απομόνωση καθαρών αλληλουχιών γίνεται με χρήση nucleomag beads της Macherey –Nagel (NucleoMag® NGS Clean-up and Size Select).

- προσθήκη 2x τον όγκο του δείγματος nucleomag beads σε κάθε δείγμα
- επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, 15min
- 5min σε θερμοκρασία δωματίου σε μαγνητικό rack
- αφαίρεση υπερκειμένου
- (με μαγνήτη) προσθήκη 900μl 80% αιθανόλη
- επώαση 30sec
- αφαίρεση αιθανόλης
- αφαίρεση μαγνήτη
- επαναδιάλυση σε 52μl H₂O, ανάδευση up and down
- επώαση 2min σε θερμοκρασία δωματίου
- τοποθέτηση μαγνήτη, 5min σε θερμοκρασία δωματίου
- μεταφορά 50μl σε νέο eppendorf
- αποθήκευση στους -20°C

x2

Πίνακας 16. Σύσταση διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν κατά το ChIP

Διάλυμα	Σύσταση
<i>IP buffer</i>	0.1% SDS, 1mM EDTA, 10mM Tris, pH 8.1, 1% Triton X-100, 150mM NaCl, H ₂ O
<i>Low salt buffer (2x)</i>	0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Hepes-KOH, pH 7.9, 150mM NaCl, H ₂ O
<i>Medium salt buffer (1x)</i>	0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Hepes-KOH, pH 7.9, 275mM NaCl, H ₂ O
<i>High salt buffer</i>	0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Hepes-KOH, pH 7.9, 400mM NaCl, H ₂ O
<i>LiCl buffer (1x)</i>	100mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.250mM LiCl, 1% NP-40, 1% Sodium Deoxycholate, H ₂ O
<i>TE (1x)</i>	10mM Tris-HCl, pH 8.01mM EDTA, H ₂ O
<i>Proteinase A Digestion buffer</i>	20mM HEPES, pH 7.9, 1mM EDTA, 0.5% SDS, H ₂ O

5.11. Απομόνωση RNA για RNA-seq

Η απομόνωση RNA από κυτταροκαλλιέργεια που προορίζεται για αλληλούχιση (RNA-seq) έγινε με χρήση του NucleoSpin® RNA kit, της Macherey-Nagel. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν σε πελέτα με επίδραση θρυψίνης και φυγοκέντρωση και στη συνέχεια εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο της εταιρείας.

5.12. Αλληλούχιση Επόμενης Γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS)- ChIP-seq και RNA-seq

5.12.1. ChIP-seq και RNA-seq

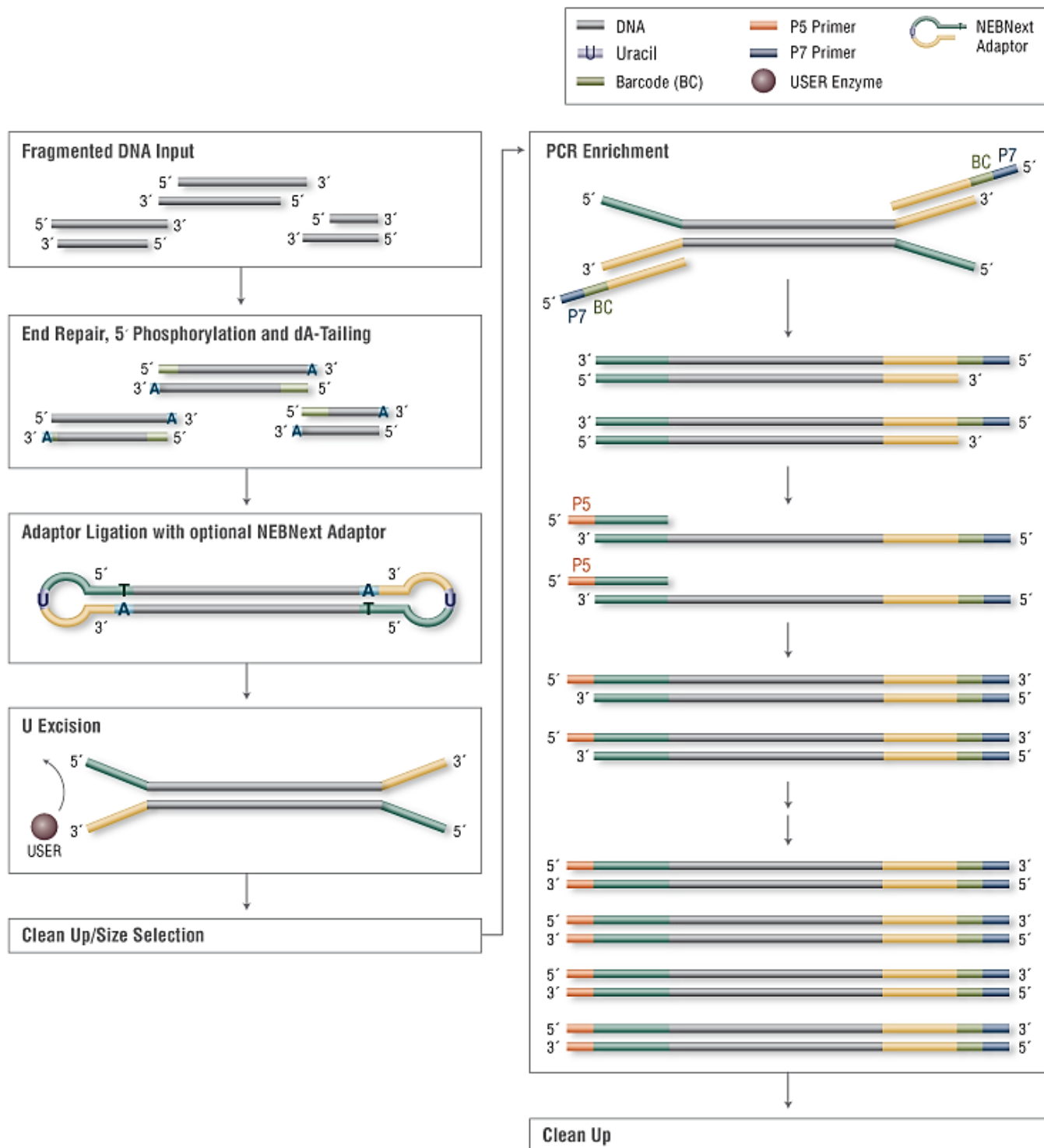
Πραγματοποιήθηκαν πειράματα αλληλούχισης επόμενης γενιάς στα δείγματα DNA που συλλέχθηκαν από το ChIP (**ChIP-seq**) και στα RNA που συλλέχθηκαν με χρήση kit (**RNA-seq**). Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε στο *Ελληνικό Κέντρο Γονιδιοματικής Έρευνας (Greek Genome Center, (GGC))* στο ΙΙΒΕΑΑ από το εξειδικευμένο προσωπικό, όπως και η

προετοιμασία των δειγμάτων. Τα πειράματα έγιναν με την τεχνολογία της Illumina στο μηχάνημα *NextSeq500*. Περιγράφονται συνοπτικά τα βήματα της διαδικασίας.

Σε όλες της περιπτώσεις αλληλούχησης νέας γενιάς τα δείγματα μετατρέπονται σε βιβλιοθήκες αλληλουχιών, που διαθέτουν τις απαραίτητες ιδιότητες για να διαβαστούν από το μηχάνημα αλληλούχησης (sequencer). Η κατασκευή βιβλιοθηκών και ο έλεγχος της ποιότητάς τους είναι ίδια για το ChIP-seq και το RNA-seq, με εξαίρεση τα αρχικά βήματα επεξεργασίας του mRNA για να μετατραπεί σε cDNA κατάλληλου μήκους. Χρησιμοποιήθηκαν αντάπτορες Truseq. Περιγράφεται αρχικά η διαδικασία κατασκευής DNA βιβλιοθήκης και ο έλεγχος της ποιότητας και της ποσότητάς της και στη συνέχεια αναλύονται τα ιδιαίτερα βήματα για την κατασκευή RNA βιβλιοθήκης.

- *Κατασκευή DNA βιβλιοθήκης*

Πρώτο βήμα κατασκευής της DNA βιβλιοθήκης είναι η **δημιουργία τυφλών άκρων (end repair)** στα τμήματα DNA που απομονώθηκαν μέσω ChIP. Κατά τον κερματισμό της χρωματίνης με υπερήχους το DNA έσπασε σε τυχαία σημεία δημιουργώντας κομμάτια με μονόκλωνα άκρα. Τα μονόκλωνα άκρα συμπληρώνονται με τη δράση πολυμεράσης και λιγάσης. Στη συνέχεια προστίθεται μια **αδενίνη στα 3' άκρα** των τμημάτων DNA, ώστε να διευκολύνει την πρόσδεση των αλληλουχιών-ανταπτόρων, που φέρουν μια αδέσμευτη θυμίνη στο 5' άκρα. Οι **αντάπτορες** είναι προκατασκευασμένες γνωστές αλληλουχίες DNA στις οποίες θα υβριδοποιηθούν οι εκκινητές για την αντίδραση PCR του επόμενου βήματος. Τα κομμάτια του DNA υφίστανται PCR για την επέκταση των άκρων τους ειδικές αλληλουχίες. Χρησιμοποιούνται δύο ζεύγη εκκινητών (Εικόνα 20): το ένα ζεύγος υβριδοποιείται με τον αντάπτορα του 5' άκρου, ενώ το άλλο με αυτόν του 3' άκρου. Οι εκκινητές φέρουν στα 5' άκρα τους αλληλουχίες με διαφορετικές και ειδικές λειτουργίες η καθεμία, οι οποίες στο τέλος της αντίδρασης θα έχουν ενσωματωθεί στα άκρα των DNA μορίων όπως φαίνεται στην Εικόνα 20. Οι P5 και P3 αλληλουχίες είναι συμπληρωματικές με τα αντίστοιχα τμήματα DNA που βρίσκονται προσκολλημένα στην επιφάνεια του chip όπου θα γίνει η αλληλούχηση. Η αλληλουχία barcode είναι μια γνωστή αλληλουχία που χρησιμεύει ως κωδικός του δείγματος που αλληλουχείται, δεδομένου ότι η αλληλούχηση γίνεται σε πολλαπλά δείγματα ταυτόχρονα (multiplex sequencing).



Εικόνα 26. Βήματα κατασκευής DNA βιβλιοθηκών με την Truseq τεχνολογία. Αρχικά η δημιουργία τυφλών άκρων, έπειτα η αδενυλίωση των 3' άκρων, η συγκόλληση των ανταπτόρων και η PCR με τους ειδικούς εκκινητές που διαμορφώνει την τελική μορφή και τις ιδιότητες των DNA τμημάτων που θα αλληλουχηθούν. Φαίνονται οι επιπλέον αλληλουχίες που φέρουν οι ουρές των εκκινητών και οι λειτουργίες τους. Οι P6, P7 περιοχές είναι συμπληρωματικές στο μονόκλωνο DNA που είναι προσκολλημένο στο chip της αντίδρασης.

Απομόνωση της ChIP βιβλιοθήκης από πήκτωμα αγαρόζης

Η αντίδραση PCR μετά την προσθήκη ανταπτόρων παράγει εκτός από την επιθυμητή βιβλιοθήκη και διμερή ανταπτόρων. Τα προϊόντα της PCR διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης: το DNA της βιβλιοθήκης έχει μέγεθος 200-500 βάσεις, ενώ τα διμερή 100 βάσεις. Τα μόρια της βιβλιοθήκης επιλέγονται βάσει μεγέθους και απομονώνονται από την πηκτή.

Ποσοτικοποίηση της βιβλιοθήκης και τελική ενίσχυση

Η βιβλιοθήκη ποσοτικοποιείται με qPCR. Ανάλογα με τα αποτελέσματα, η βιβλιοθήκη υφίσταται μια τελική ενίσχυση με PCR και στο τέλος της αντίδρασης καθαρίζεται από τα αντιδραστήρια με ειδικό kit.

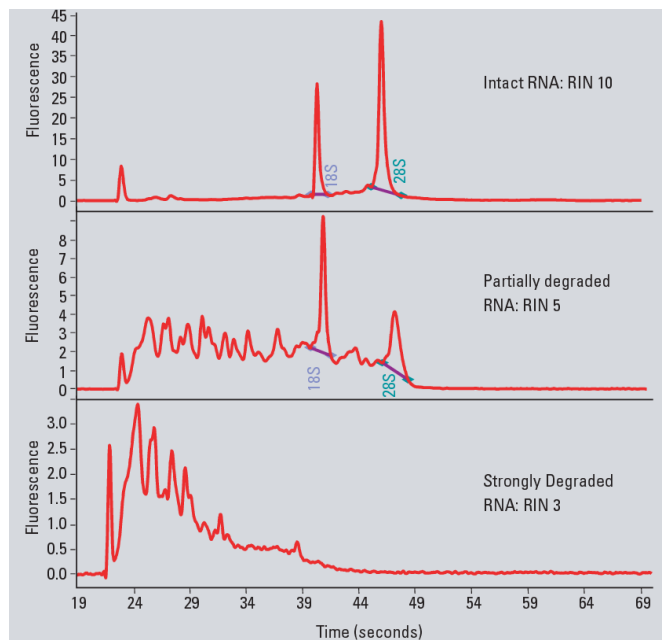
Έλεγχος ποιότητας της βιβλιοθήκης

Η βιβλιοθήκη ποσοτικοποιείται εκ νέου με qPCR και η ποιότητά της ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση μικρής ποσότητάς της σε συσκευή Bioanalyzer (Agilent 2100 Bioanalyzer, της Agilent Technologies) με χρήση ειδικών chips. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης απεικονίζονται σε ηλεκτροφερόγραμμα, όπου αξιολογείται η καθαρότητα του DNA.

- *Κατασκευή RNA βιβλιοθήκης*

Για την κατασκευή RNA βιβλιοθήκης από συνολικό mRNA προηγείται ένα στάδιο αντίστροφης μεταγραφής των μορίων RNA cDNA. Στη συνέχεια τα cDNAs κερματίζονται και η διαδικασία συνεχίζεται με τον σχηματισμό τυφλών άκρων και των υπόλοιπων σταδίων όπως περιγράφηκαν για τις DNA βιβλιοθήκες. Επίσης, περιλαμβάνεται ένα στάδιο ελέγχου

της ποιότητας του ολικού RNA αμέσως μετά την απομόνωσή του από τα κύτταρα. Ο έλεγχος ποιότητας γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε Bioanalyzer σε ειδικό chip, και ελέγχονται οι κορυφές των 18S και 28S: ένα ποιοτικό δείγμα εμφανίζει τριπλάσια ποσότητα 28S από 18S RNA (Εικόνα 28).



Εικόνα 27. Ηλεκτροφερόγραμμα ελέγχου ποιότητας ολικού mRNA. Φαίνονται οι κορυφές των 18S και 28S rRNAs. Ένα ποιοτικό δείγμα φέρει περίπου τριπλάσια ποσότητα 28S από 18S rRNA.

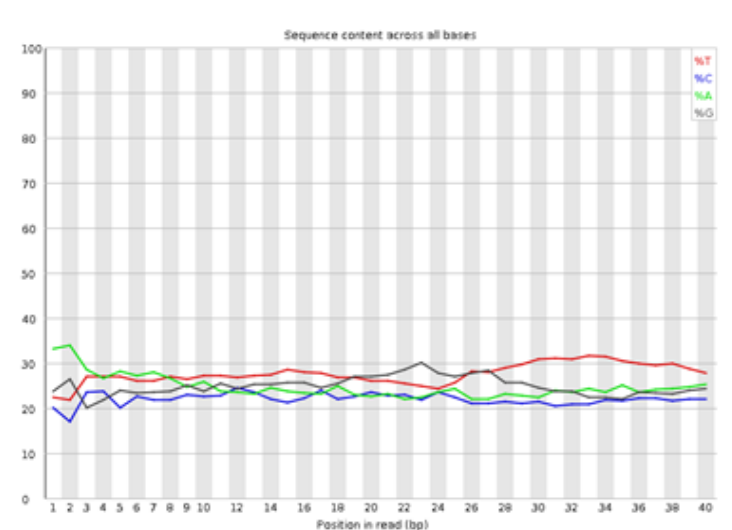
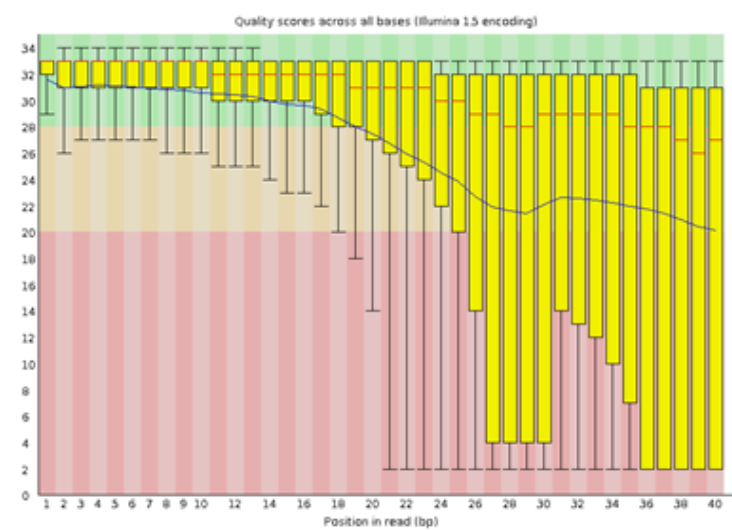
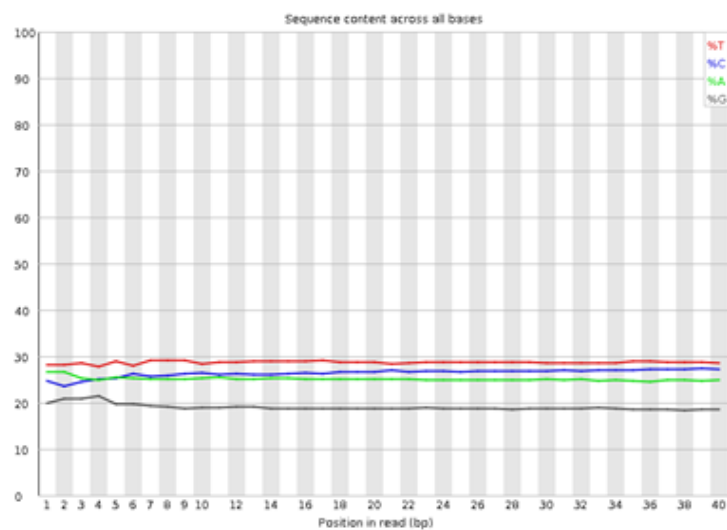
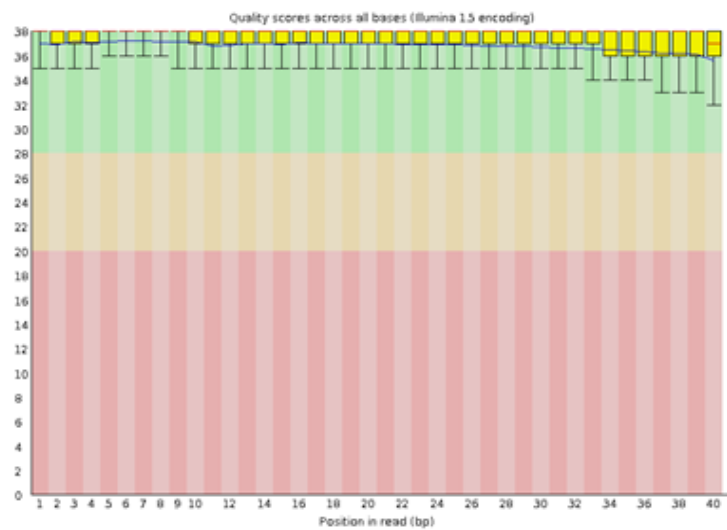
5.12.2. Βιοπληροφορική ανάλυση RNA-seq δεδομένων

Από την αλληλούχηση των δειγμάτων προκύπτουν οι αλληλουχίες των cDNA μήκους περίπου 75 βάσεις. Η πρωτογενής μορφή των αποτελεσμάτων είναι σε αρχεία *.bcl· αυτά προκύπτουν από τις φωτογραφίες που λαμβάνονται από το μηχάνημα σε κάθε κύκλο σύνθεσης. Τα αρχεία *.bcl μετατρέπονται σε *.fastq αρχεία. Αυτά περιέχουν την αλληλουχία κάθε τμήματος κι ένα σκορ της αξιοπιστίας της σε κώδικα ASCII (κώδικας αντιστοίχισης γραμμάτων σε αριθμούς), βάση του κριτηρίου Q₃₀.

Οι αλληλουχίες των *.fastq αρχείων ελέγχονται ποιοτικά με το πρόγραμμα FASTQC. Επικεντρωνόμαστε στην αξιολόγηση της ποιότητας κάθε βάσης σε σχέση με τη θέση της κατά μήκος της αλληλουχίας (per base sequence quality) και στην αξιολόγηση της ορθής αντιπροσώπευσης των 4 βάσεων στην αλληλουχία (per base sequence content). Η πρώτη παράμετρος εκτιμά την ορθότητα της ανάγνωσης κατά μήκος της αλληλουχίας, δεδομένου ότι το μηχάνημα εισάγει με μεγαλύτερη πιθανότητα λανθασμένες βάσεις στην αρχή και στο τέλος της αλληλουχίας. Η δεύτερη παράμετρος εκτιμά τη ενδεχόμενη εύνοια στην προσθήκη συγκεκριμένης/ων βάσης/εων έναντι άλλων (**Εικόνα 29**).

Με το εργαλείο *fastx-trimmer* αφαιρέθηκαν από τις αλληλουχίες οι 5 πρώτες και οι 3 τελευταίες βάσεις, η αλληλούχηση των οποίων δεν ήταν αξιόπιστη βάσει των αποτελεσμάτων από το FASTQC. Στη συνέχεια έγινε στοίχιση των αλληλουχιών από το FASTQC στο γονιδίωμα του ποντικού (mm10) με χρήση του εργαλείου *TopHat2*. Τα αποτελέσματα λαμβάνονται σε αρχείο .bam.

Τα αποτελέσματα αξιολογούνται στατιστικά βάσει του αριθμού των reads που αντιστοιχίζονται σε κάθε δείγμα. Η στατιστική αξιολόγηση αφορά στα μετάγραφα εκείνα που ρυθμίζονται θετικά (upregulated) ή αρνητικά (downregulated) σε μια συνθήκη σε σύγκριση με μια άλλη. Έτσι, συγκρίνεται στατιστικά ο αριθμός των reads κάθε μεταγράφου μεταξύ δύο δειγμάτων, ώστε να βρεθούν τα γονίδια εκείνα που εκφράζονται με διαφορετικό τρόπο στις δύο συνθήκες (**differentially expressed genes, DEGs**). Η στατιστική αξιολόγηση γίνεται με το εργαλείο DESEQ2 σε περιβάλλον R. Όριο στατιστικής σημαντικότητας ορίζεται το 0,05 (p-value=0,05)· μετάγραφα των οποίων η έκφραση σε δύο συνθήκες διαφέρει με πιθανότητα κάτω του 5% λόγω τύχης, θεωρείται ότι διαφέρουν στατιστικά σημαντικά. Για τα μετάγραφα εκείνα που ισχύει p-value<0.05 η στατιστική αξιολόγηση ολοκληρώνεται με εφαρμογή του κριτηρίου Log₂-fold change: όσα μετάγραφα των οποίων η έκφραση διαφέρει κατά 1,5 φορές το log₂ μεταξύ δύο συνθηκών, θεωρείται πως ρυθμίζονται θετικά (upregulated), ενώ τα μετάγραφα με έκφραση -1,5 φορές το log₂ μεταξύ δύο συνθηκών, θεωρείται ότι ρυθμίζονται αρνητικά (downregulated).



Εικόνα 28. Γραφήματα αξιολόγησης αποτελεσμάτων από τη χρήση του FASTQC. **Αριστερά:** τα γραφήματα per base sequence quality (πάνω) και per base sequence content (κάτω) από μια ποιοτική αλληλούχηση. **Δεξιά:** τα αντίστοιχα γραφήματα από μια αλληλούχηση χαμηλής ποιότητας

Μετά τη εύρεση των DEGs με αυτή τη διαδικασία, προχωρούμε στη λειτουργική διερεύνησή του με τη χρήση διαδικτυακών εργαλείων οντολογίας, όπως το Enrichr και το David.ncif. Επίσης, συγκρίνουμε τα DEGs διαφόρων συνθηκών μεταξύ τους στο διαδικτυακό εργαλείο Venny 2.1, ώστε να βρούμε υποσύνολα κοινών ή μη DEGs, και να συνεχίσουμε με λειτουργικό χαρακτηρισμό των υποσυνόλων με τα εργαλεία που αναφέρθηκαν.

5.12.3. Βιοπληροφορική ανάλυση ChIP-seq δεδομένων

Όπως και στο RNA-seq, τα ChIP-seq πρωτογενή δεδομένα είναι σε μορφή *.bcl. Προχωράμε όπως και στην ανάλυση των RNA-seq δεδομένων, σε μετατροπή των αρχείων σε *.fastq μορφή και αξιολόγηση της ποιότητάς τους με το πρόγραμμα FASTQC. Από τις αλληλουχίες των ChIP-seq αφαιρέθηκαν οι 2 πρώτες και οι 3 τελευταίες βάσεις κάθε τμήματος που αλληλουχήθηκε. Στη συνέχεια στοιχίζουμε τις αλληλουχίες με το γονιδίωμα αναφοράς του ποντικού mm10 με χρήση αλγορίθμου bowtie2.0. Οι περιοχές που αλληλουχήθηκαν και χαρτογραφήθηκαν στο γονιδίωμα του ποντικού, υφίστανται μια διαδικασία προ-επεξεργασίας (preprocessing) κατά την οποία «φιλτράρονται» με χρήση εργαλείων BEDTOOLS και SAMTOOLS ώστε να αφαιρεθούν από αυτές αλληλουχίες χαμηλής ποιότητας ανάγνωσης, οι αλληλουχίες του μιτοχονδριακού DNA (chromosome M) και οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που δεν είναι σωστά χαρτογραφημένες (blacklist sequences).

Τα αποτελέσματα του ChIP-seq αναλύονται σε σχέση με ένα δείγμα αναφοράς (input), το οποίο αποτελεί κερματισμένη χρωματίνη που δεν κατακρημνίστηκε με κάποιο αντίσωμα και το οποίο αλληλουχείται επίσης. Έτσι, μετά το φιλτράρισμα των αλληλουχιών γίνεται σύγκριση της ποσότητας μιας αλληλουχίας σε ένα δείγμα με αυτή στο input. Αναμένεται οι αλληλουχίες που κατακρημνίστηκαν να εμφανίζονται **εμπλουτισμένες** στα δείγματα σε σχέση με το input. Η διαδικασία σύγκρισης ονομάζεται **αναζήτηση κορυφών (peak calling)** και πραγματοποιείται με αλγόριθμο MACS2 (Model-based Analysis for ChIP-SEQ). Προκύπτουν αρχεία *.bed με τις αλληλουχίες που εμπλουτίστηκαν.

Οι αλληλουχίες των κορυφών αναλύονται ως προς το λειτουργικό τους ρόλο. Για το σκοπό αυτό αρχικά αναλύονται οι αλληλουχίες *ως προς τα μοτίβα πρόσδεσης (Motif analysis)* που μπορεί να φέρουν. Η διερεύνηση ύπαρξης συγκεκριμένων μοτίβων γίνεται με χρήση του διαδικτυακού εργαλείου FIMO, ενώ η αναζήτηση οποιουδήποτε πιθανού μοτίβου πρόσδεσης γίνεται με το MEME εργαλείο. Στη συνέχεια, με χρήση του εργαλείου GREAT αναζητούνται τα γονίδια που μπορεί να εδράζονται στο γονιδίωμα δίπλα στις περιοχές των κορυφών (**gene annotation**) και πραγματοποιείται ανάλυση οντολογίας (gene ontology).

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

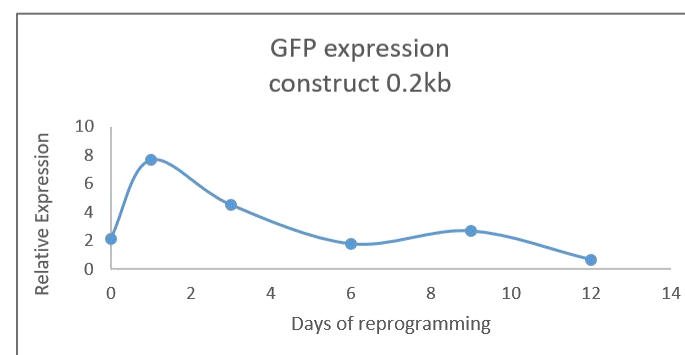
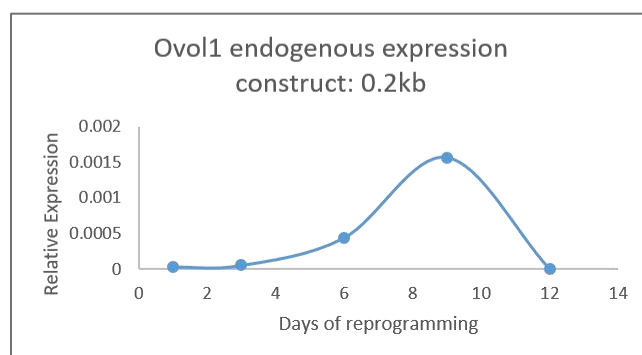
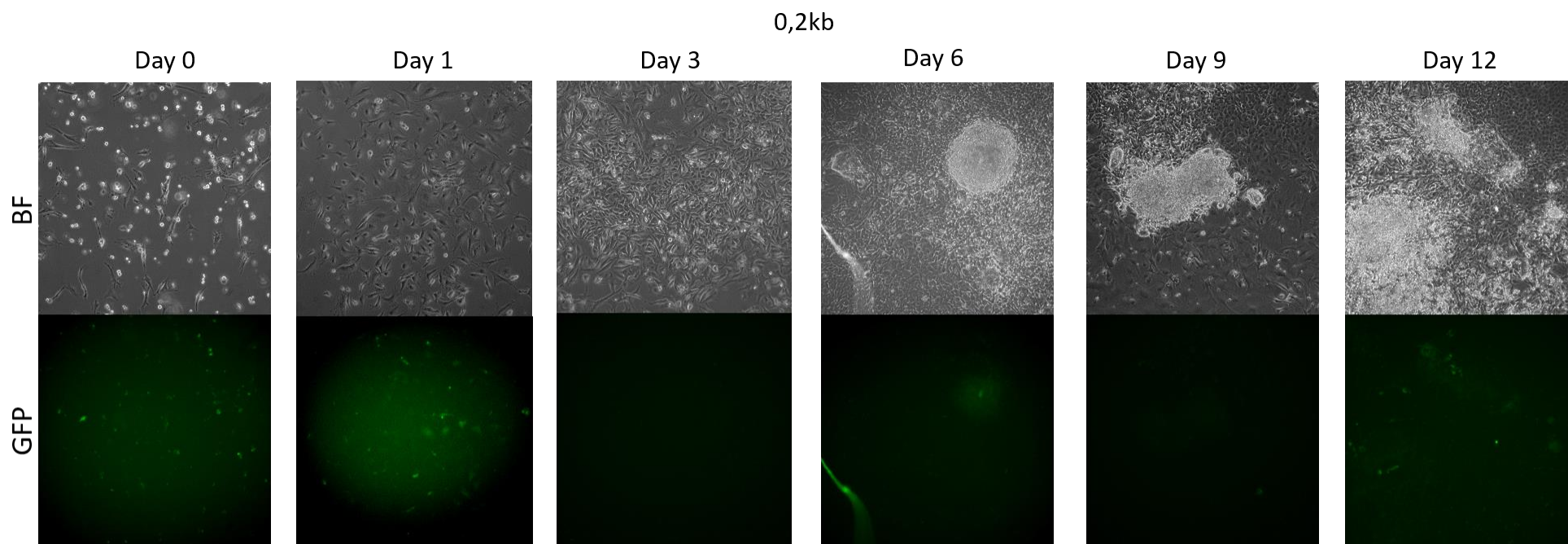
6.1. Αναζήτηση cis ρυθμιστικών στοιχείων της έκφρασης του *Ono1* κατά τον επαναπρογραμματισμό

Πρώτος στόχος της διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση της ρύθμισης της έκφρασης του *Ono1* κατά τον επαναπρογραμματισμό. Υποθέσαμε πως η περιοχή 3kb ανοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου φιλοξενεί αλληλουχίες ενισχυτή. Για να ελέγξουμε την υπόθεσή μας κλωνοποιήσαμε την **3kb περιοχή** ακέραια, αλλά και τις υποπεριοχές **2kb, 1kb, 0.2kb** αυτής, που ονομάστηκαν **βασικές ελλείψεις της 3kb** περιοχής (basic deletions), σε πλασμιδιακό φορέα LEGO-GN άνωθεν ενός γονιδίου-ανταποκριτή GFP. Επισημαίνεται πως η 3kb περιοχή και οι υποπεριοχές της, συμπεριλαμβάνουν την περιοχή 200kb καθοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου, ώστε να συμπεριληφθούν όλα τα στοιχεία του υποκινητή. Με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια συγκροτήσαμε λεντι-ικά σωμάτια, με τα οποία επιμολύνουμε κύτταρα MEFs 4F2. Με αυτό τον τρόπο οι κατασκευές ρυθμιστική περιοχή-GFP (**constructs**) ενσωματώθηκαν στο γονιδίωμα των κυττάρων που θα επαναπρογραμματίζονταν. Κατά τη διάρκεια του επαναπρογραμματισμού οι καλλιέργειες παρατηρούνταν σε μικροσκόπιο φθορισμού τις ημέρες 1, 3, 6, 9 και 12. Έτσι, παρακολουθήσαμε το πρότυπο έκφρασης της GFP, και κατ'επέκταση το πρότυπο ενεργοποίησης της εκάστοτε ρυθμιστικής περιοχής (δοκιμασία αναφοράς, **reporter assay**). Για να διασταυρώσουμε πως η υποψήφια ρυθμιστική περιοχή ελέγχει πράγματι το γονίδιο του *Ono1* και συντονίζει την έκφρασή του, συμπληρώσαμε το πείραμα με σύγκριση των επιπέδων έκφρασης της GFP και του ενδογενούς γονιδίου *Ono1* κατά τον επαναπρογραμματισμό. Στην περίπτωση που το πρότυπο έκφρασης του ενδογενούς με το εξωγενές γονίδιο (GFP) ταυτίζονταν, σημαίνει πως τα δύο γονίδια βρίσκονται από τον έλεγχο των ίδιων ρυθμιστικών στοιχείων, δηλαδή πως η υπό μελέτη περιοχή ελέγχει πράγματι τον *Ono1*. Για το σκοπό αυτό, στις ίδιες χρονικές στιγμές του επαναπρογραμματισμού, απομονώσαμε τα RNAs των κυττάρων, ώστε να συγκρίνουμε την έκφραση των γονιδίων με real-time qPCR. Οι λεπτομέρειες του πειράματος αναγράφονται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι.

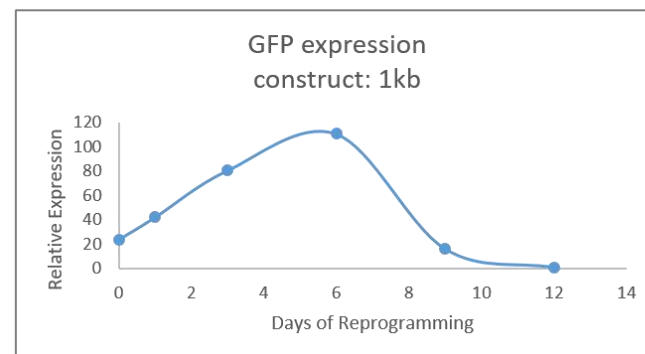
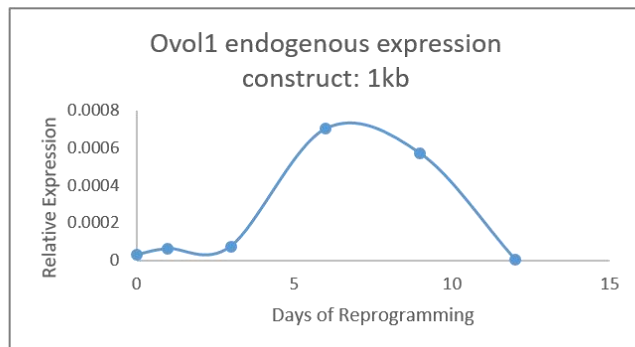
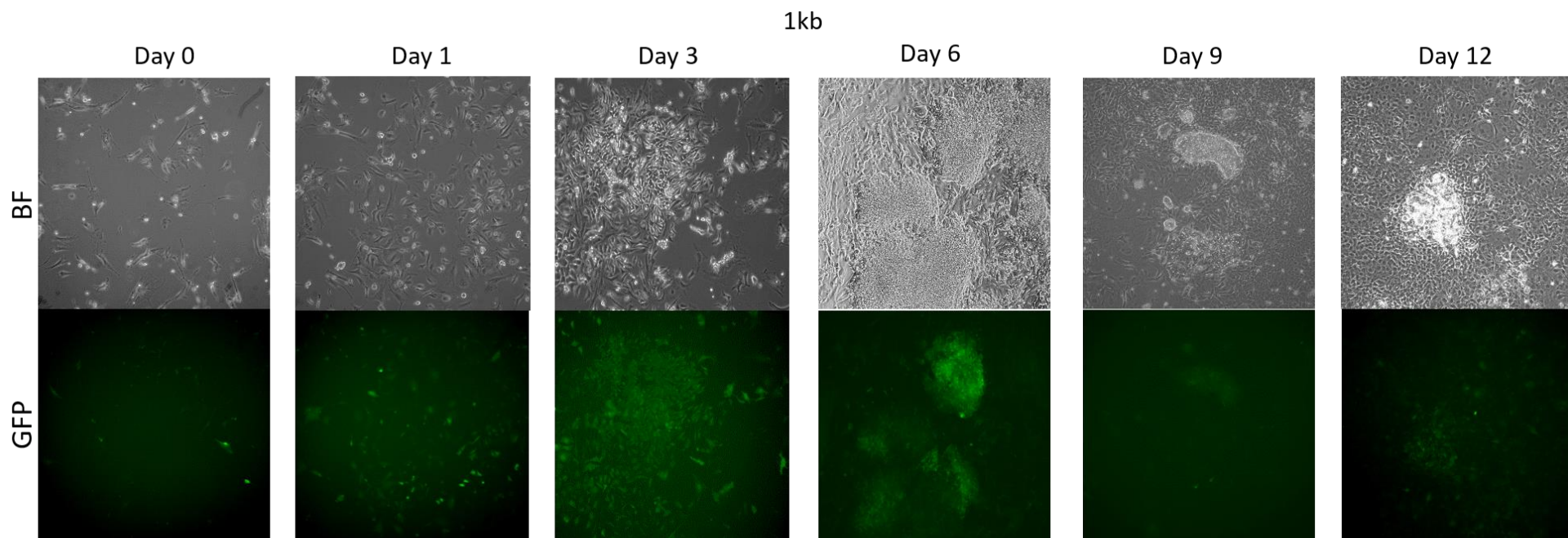
6.1.1. Δοκιμασία αναφοράς (reporter assay) για τις βασικές ελλείψεις της -3kb περιοχής του *Ono1* και σύγκριση της έκφρασης ενδογενούς/εξωγενούς γονιδίου

Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας αναφοράς μαζί με τη σύγκριση της έκφρασης ενδογενούς/εξωγενούς γονιδίου για κάθε construct φαίνονται παρακάτω. Οι τιμές της

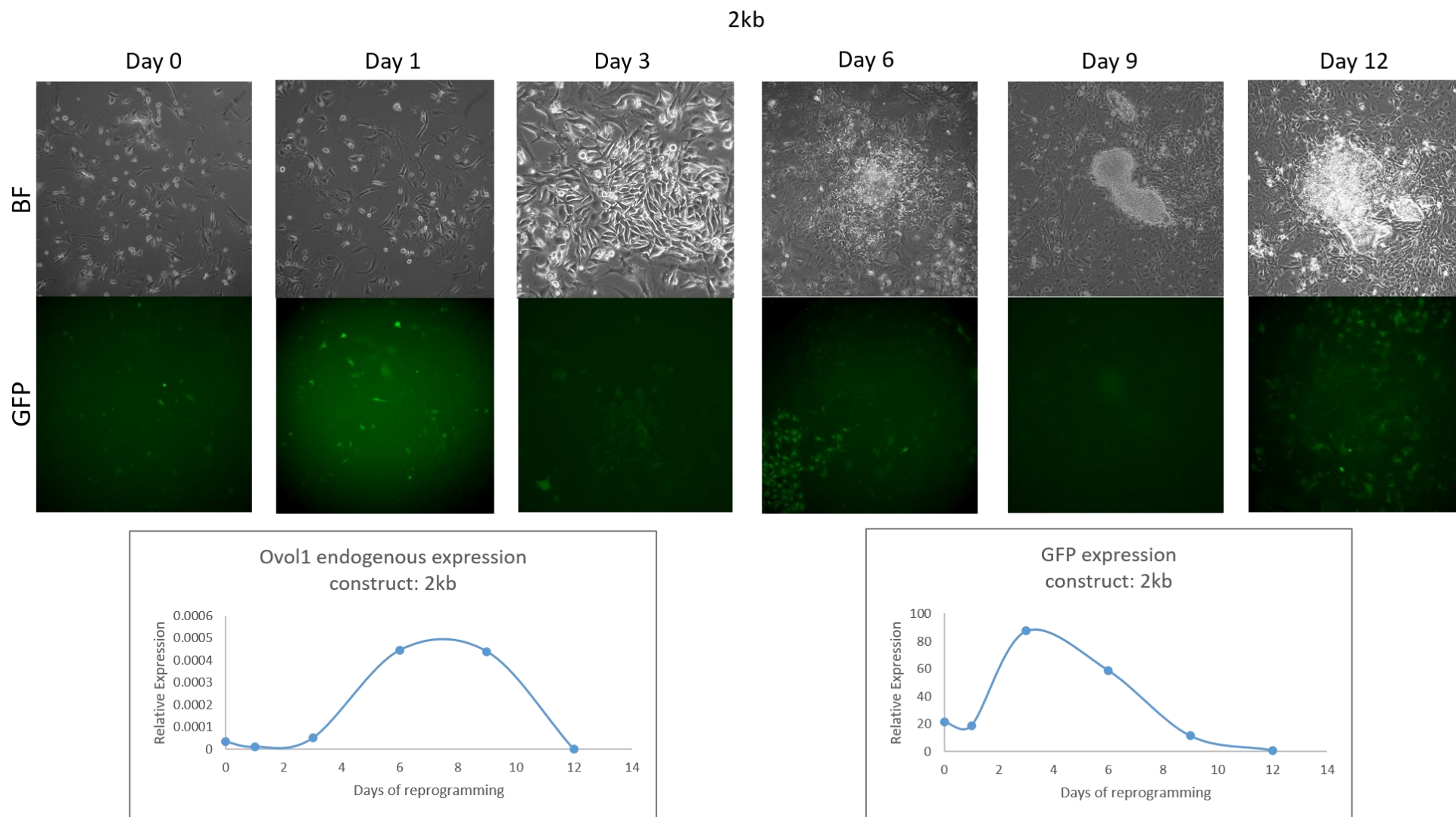
έκφρασης της GFP για κάθε construct κανονικοποιήθηκαν με τις τιμές της έκφρασής της σε κύτταρα μολυσμένα με τον αρνητικό μάρτυρα LEGO-GN



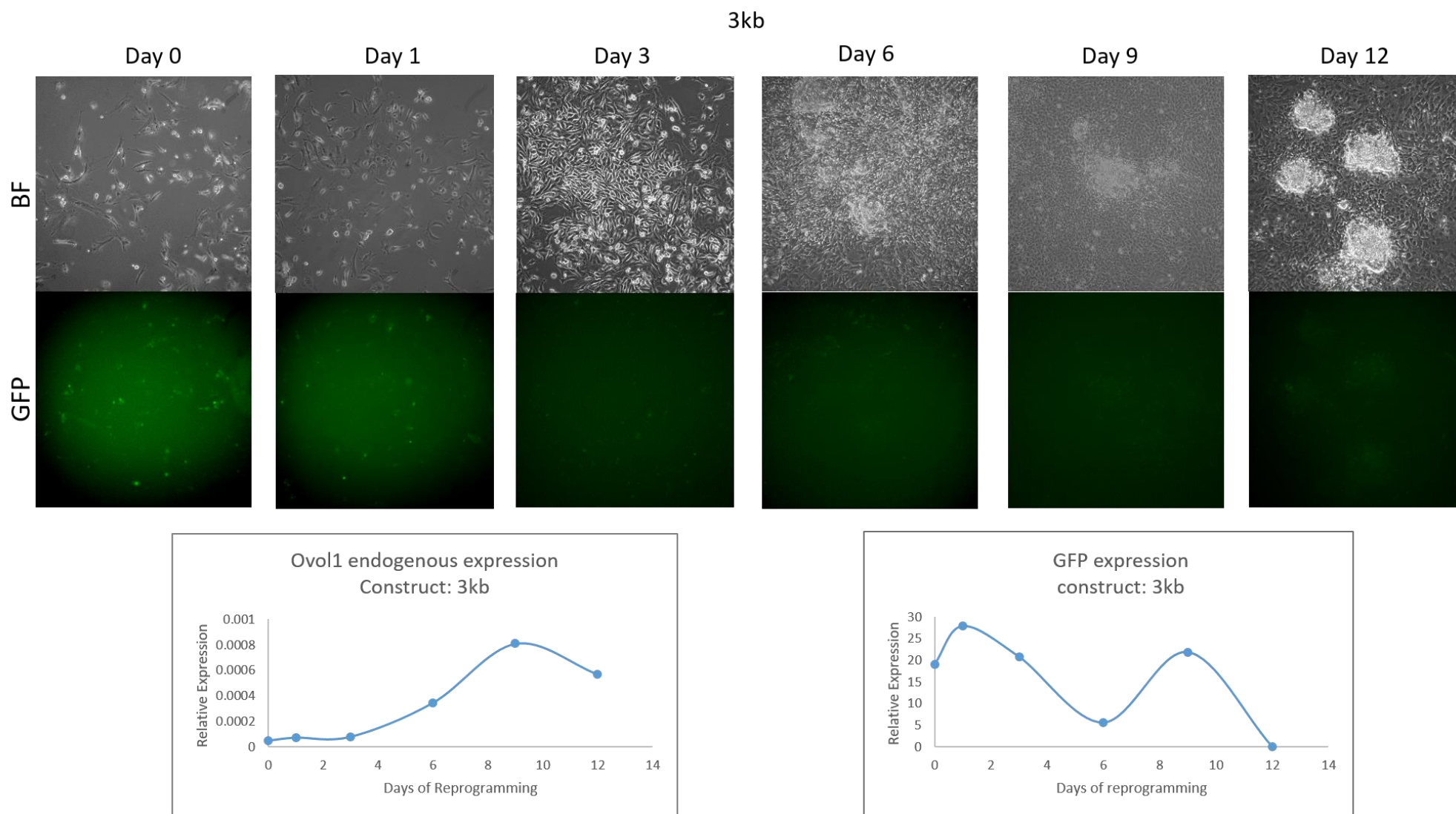
Εικόνα 29. (Επάνω) Reporter assay κατά τις 12 πρώτες ημέρες του επαναπρογραμματισμού για το construct 0,2kb (upstream) του *ovol1* και **(Κάτω)** τα γραφήματα της έκφρασης του ενδογενούς γονιδίου *ovol1* και της GFP. Η 0,2kb περιοχή δεν φαίνεται να παρουσιάζει ενεργότητα κατά τον επαναπρογραμματισμό. Επιπλέον, το πρότυπο της έκφρασης της GFP δεν μιμείται αντίστοιχο του ενδογενούς γονιδίου.



Εικόνα 30. (Επάνω) Reporter assay κατά τις 12 πρώτες ημέρες του επαναπρογραμματισμού για το construct 1kb (upstream) του *ovof1* και **(Κάτω)** τα γραφήματα της έκφρασης του ενδογενούς γονιδίου *ovof1* και της *GFP*. Η 1kb περιοχή παρουσιάζει ενεργότητα από την 3^η ημέρα του επαναπρογραμματισμού σε περιοχές κυττάρων υπό διαδικασία *MET* και το σήμα φαίνεται να κορυφώνεται την 6^η ημέρα, ειδικότερα στις *pre-iPSCs* αποικίες. Μετά την 6^η ημέρα το σήμα εξασθενεί. Το πρότυπο έκφρασης του ενδογενούς γονιδίου φαίνεται να ταυτίζεται με αυτό της *GFP*.



Εικόνα 31. (Επάνω) Reporter assay κατά τις 12 πρώτες ημέρες του επαναπρογραμματισμού για το construct, 2kb (upstream) του οvol1 και **(Κάτω)** τα γραφήματα της έκφρασης του ενδογενούς γονιδίου οvol1 και της GFP. Η 2kb περιοχή ενεργοποιείται την 3^η ημέρα σε περιοχές υπό MET, ωστόσο τις επόμενες ημέρες δεν εντοπίζεται ικανοποιητικό σήμα. Το πρότυπο έκφρασης του ενδογενούς γονιδίου αποκλίνει από αυτό της GFP.



Εικόνα 32. (Επάνω) Reporter assay κατά τις 12 πρώτες ημέρες του επαναπρογραμματισμού για το construct 0,2kb (upstream) του ovol1 και **(Κάτω)** τα γραφήματα της έκφρασης του ενδογενούς γονιδίου ovol1 και της GFP. Η περιοχή 3kb δεν παρουσιάζει αξιοσημείωτη ενεργότητα. Τα πρότυπα έκφρασης ενδογενούς-εξωγενούς γονιδίου διαφέρουν.

Από τα αποτελέσματα του πειράματος φαίνεται πως οι 0,2kb και 3kb περιοχές δεν παρουσιάζουν αξιοσημείωτη ενεργότητα κατά τον επαναπρογραμματισμό (Εικόνες 30 και 33 αντίστοιχα), η 2kb περιοχή ενεργοποιείται τις πρώτες ημέρες και κυρίως την Ημέρα 3, τόσο σε περιοχές MET όσο και διάχυτα στα υπόλοιπα κύτταρα, αλλά στη συνέχεια απενεργοποιείται (Εικόνα 32), ενώ η 1kb περιοχή ενεργοποιείται σταδιακά από τις πρώτες ημέρες με κορύφωση την Ημέρα 6 και μάλιστα ειδικά στα κύτταρα των πρώιμων iPSCs αποικιών. Επίσης, φαίνεται πως το πρότυπο της έκφρασης του ενδογενούς γονιδίου *onol1* διαφέρει από το αντίστοιχο της GFP για τα construct 0,2kb, 2kb και 3kb, αλλά στην περίπτωση του 1kb construct παρατηρείται ταύτιση.

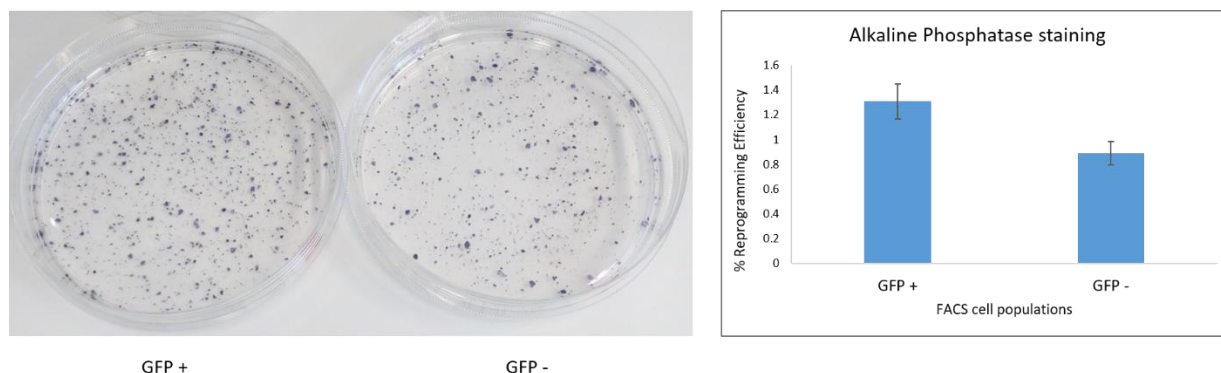
Η περιοχή του 0,2kb περιλαμβάνει τον υποκινητή του γονιδίου· συμπεραίνουμε πως ο υποκινητής δεν είναι ικανός να επάγει από μόνος του την έναρξη της μεταγραφής. Από τα αποτελέσματα συμπεραίνεται επίσης πως οι περιοχές των 2kb και 3kb δεν λειτουργούν ως ενισχυτές του γονιδίου κατά τον επαναπρογραμματισμό, καθώς αφενός δεν παράγουν αξιοσημείωτο σήμα GFP κατά τη διαδικασία, αφετέρου ελέγχουν την έκφραση της GFP με τρόπο διαφορετικό από αυτόν του ενδογενούς γονιδίου.

Τα αποτελέσματα είναι διαφορετικά για την 1kb περιοχή (Εικόνα 31). Η 1kb περιοχή επάγει την έκφραση της GFP από τις πρώτες ημέρες· συγκεκριμένα από την Ημέρα 3 εντοπίζεται σήμα διάχυτα στον κυτταρικό πληθυσμό, με μια τάση για εξειδίκευση στις περιοχές των κυττάρων που υφίστανται MET. Μέχρι την Ημέρα 6 το σήμα αυξάνεται και γίνεται πιο ειδικό, ενώ την Ημέρα 6 παρουσιάζει την υψηλότερη ένταση και ειδικότητά του, με την GFP να εντοπίζεται στις πρώιμες αποικίες iPS κυττάρων. Μετά την 6^η ημέρα η έκφραση της GFP μειώνεται. Το πρότυπο έκφρασης της GFP ταυτίζεται με το πρότυπο έκφρασης του ενδογενούς *Onol1* γονιδίου, τα οποία ταυτίζονται επίσης με το πρότυπο έκφρασης του *Onol1* που βρέθηκε με RNA ISH στα πειράματα ανακάλυψης του δικτύου των 9 μεταγραφικών παραγόντων (Εικόνα 13). Αυτά τα ευρήματα επιβεβαιώνουν πως η περιοχή 1kb *ρυθμίζει πράγματι το γονίδιο του onol1* κατά τον επαναπρογραμματισμό και έχει ρόλο *ενισχυτή*, ο οποίος μάλιστα επάγει την έκφραση του γονιδίου *ειδικά* στα κύτταρα εκείνα που προορίζονται να ολοκληρώσουν επιτυχώς τη διαδικασία ανάκτησης της πολυδυναμίας (αφού οι pre-iPSC αποικίες της ημέρας 6 καταλήγουν σε ώριμες iPSC αποικίες).

6.1.2. Cell sorting και replating σε *Onol1* 1kb MEFs 4F2 την Ημέρα 6 του επαναπρογραμματισμού

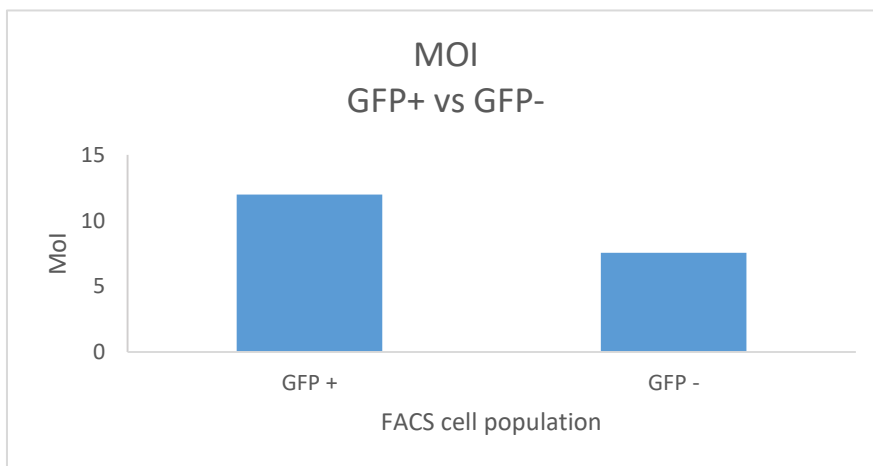
Για να ελέγξουμε αν η 1kb περιοχή είναι πράγματι ενεργή σε κύτταρα που προορίζονται να γίνουν iPSCs, πραγματοποιήσαμε πείραμα FACS την Ημέρα 6 του επαναπρογραμματισμού σε κύτταρα MEFs 4F2 επιμολυσμένα με ιούς του 1kb construct και διαχωρίσαμε τα κύτταρα σε δύο υποπληθυσμούς, ανάλογα με το αν εξέφραζαν (GFP +) ή όχι

(GFP -) την GFP πρωτεΐνη. Μετά τον διαχωρισμό κάθε υποπληθυσμός στρώθηκε ξανά σε πιάτα κυτταροκαλλιέργειας, ώστε να συνεχιστεί η διαδικασία του επαναπρογραμματισμού μέχρι την Ημέρα 18 (ολοκλήρωση επαναπρογραμματισμού). Από κάθε υποπληθυσμό στρώθηκαν 100.000 κύτταρα, και στο τέλος της διαδικασίας μετρήθηκε η αποτελεσματικότητα του επαναπρογραμματισμού, μέσω καταμέτρησης των αποικιών iPSCs ύστερα από χρώση με υπόστρωμα αλκαλικής φωσφατάσης (AP staining)(**Εικόνα 34**).



Εικόνα 33. Αποτελέσματα πειράματος cell sorting και replating GFP+ και GFP- πληθυσμών MEFs 4F2 ονο1 1kb την Ημέρα 6 του επαναπρογραμματισμού. (**Αριστερά**) Εικόνα κυτταροκαλλιέργειών GFP+ και GFP- κυττάρων την Ημέρα 18, ύστερα από AP staining. Οι αποικίες βλαστικών κυττάρων είναι περισσότερες στο GFP+ πιάτο. (**Δεξιά**) Ύστερα από καταμέτρηση των αποικιών, το ποσοστό επιτυχίας του επαναπρογραμματισμού βρέθηκε 1,3% για το GFP+ πληθυσμό, και 0,9% για τον GFP-, δηλαδή η διαδικασία ήταν κατά 40% πιο αποτελεσματική για τα GFP+ κύτταρα.

Επίσης, απομονώθηκε DNA από κάθε υποπληθυσμό ώστε να υπολογιστεί το ποσοστό ενσωμάτωσης των construct στο γονιδίωμα των κυττάρων (Multiplicity Of Infection,



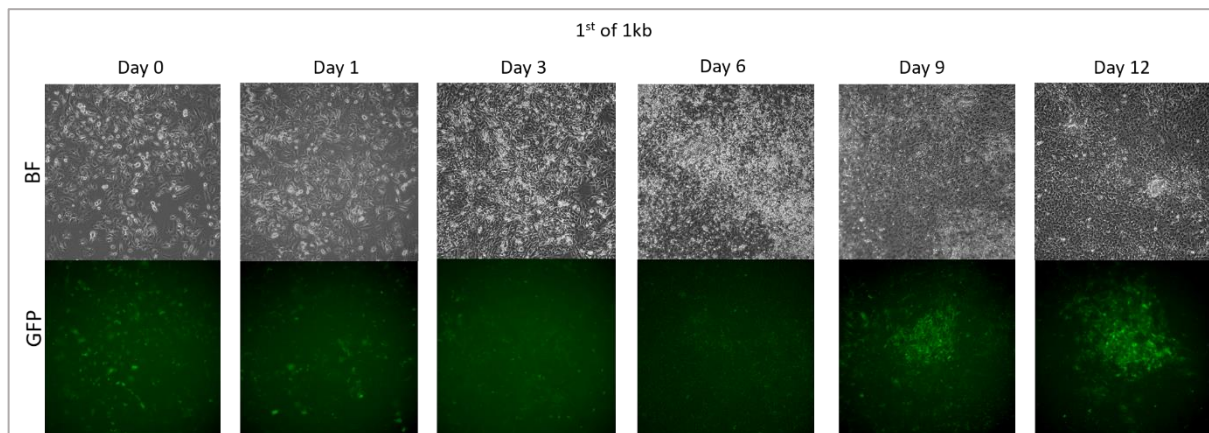
Εικόνα 34. Αριθμός ενσωματωμένων construct ανά γονιδίωμα κυττάρου. Στα GFP+ κύτταρα η ενσωμάτωση είναι κατά μέσο όρο 12 φορές ανά γονιδίωμα, ενώ στα GFP- 7,5 φορές ανά γονιδίωμα.

MOI). Ο υπολογισμός έγινε με qPCR με στόχο το γονίδιο της GFP, όπως έχει περιγραφεί στα Υλικά και Μέθοδοι.

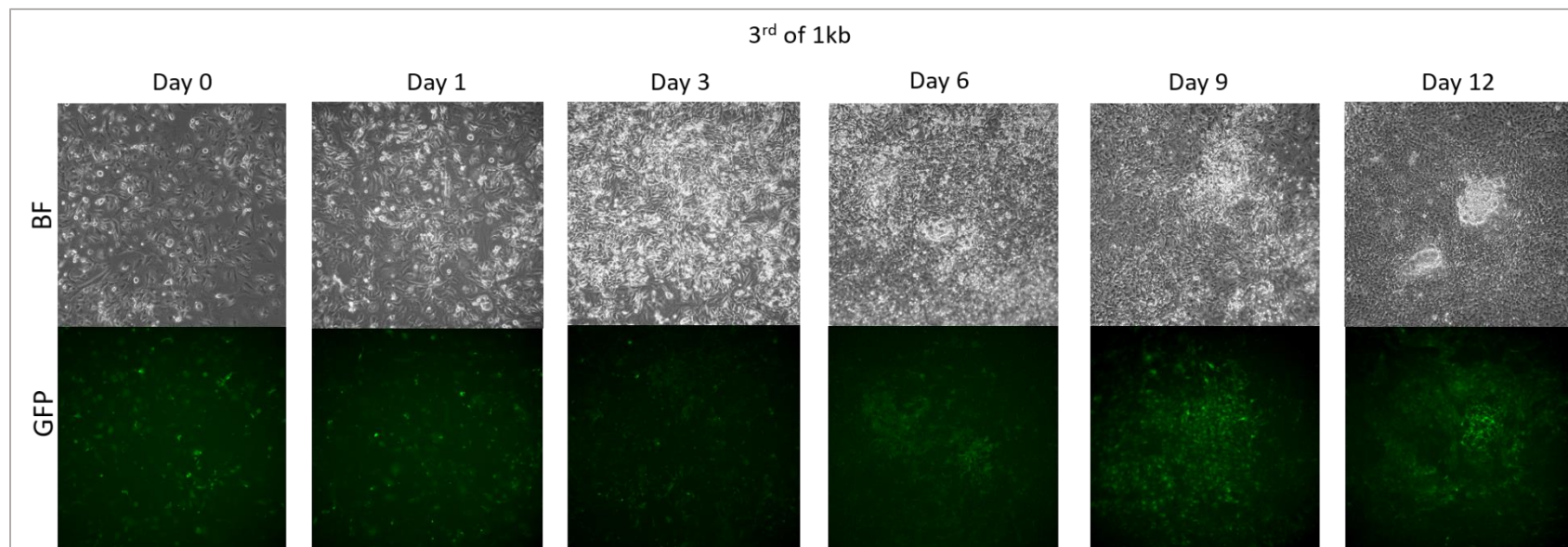
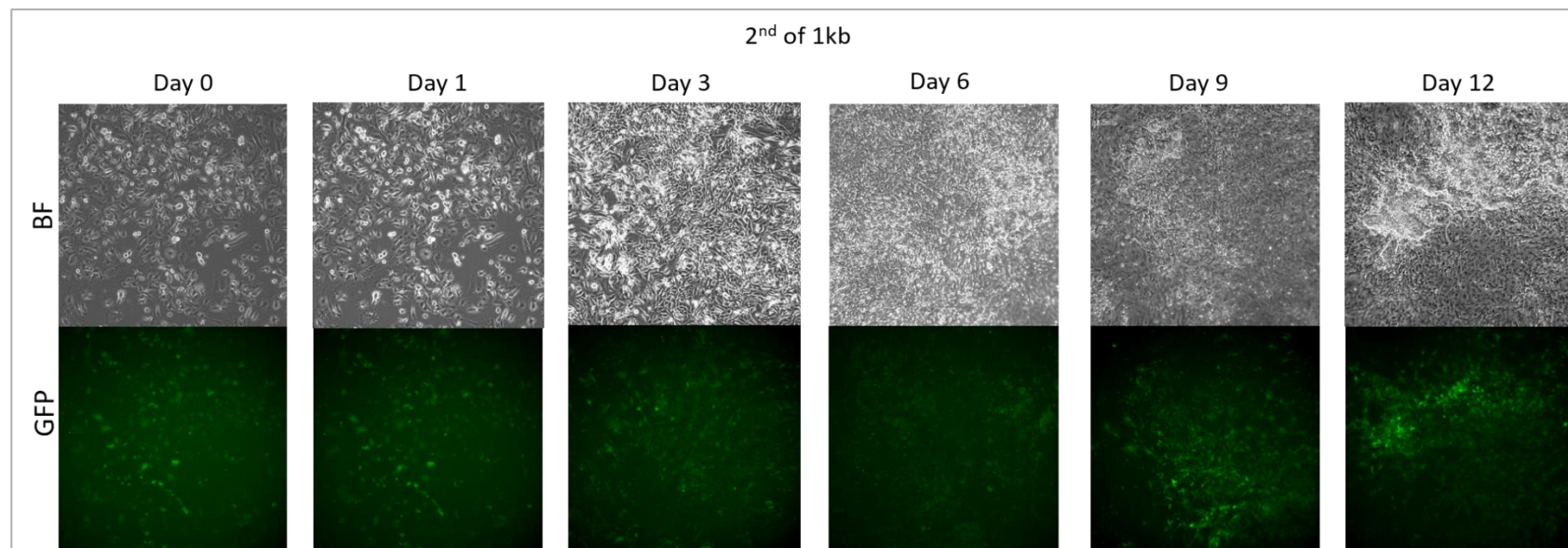
Τα αποτελέσματα του πειράματος επιβεβαιώνουν την αρχική παρατήρηση από τη δοκιμασία αναφοράς, ότι ο ενισχυτής στην 1kb περιοχή ενεργοποιείται με ειδικότητα σε κύτταρα που έχουν αυξημένη πιθανότητα να γίνουν iPSCs. Συγκεκριμένα, ο GFP+ πληθυσμός εμφάνισε 1,3% αποτελεσματικότητα επαναπρογραμματισμού, ενώ ο GFP- 0,9%, τουτέστιν 40% μεγαλύτερη αποδοτικότητα επαναπρογραμματισμού για τα GFP+ κύτταρα. Επιπλέον, η ανάλυση MOI ενισχύει αυτό το αποτέλεσμα: στα GFP- κύτταρα η ενσωμάτωση του construct ήταν 7,5 φορές ανά γονιδίωμα, ενώ στα GFP+ 12. Αυτό σημαίνει πως τα GFP- κύτταρα έχουν λάβει το construct της 1kb περιοχής 40% λιγότερο από τα GFP+ κατά μέσο όρο· ως εκ τούτου, ενδέχεται κάποια GFP- κύτταρα να είχαν ενεργή στην πραγματικότητα την 1kb περιοχή, αλλά να απέτυχαν να συμπεριληφθούν κατά το sorting με τα GFP+ λόγω χαμηλού σήματος. Συμπερασματικά, τα κύτταρα που εμφανίζουν ενεργή την 1kb περιοχή την ημέρα 6 του επαναπρογραμματισμού, σημειώνουν **τουλάχιστον** 40% μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα ανάκτησης της πολυδυναμίας.

6.1.3. Reporter assay για υποπεριοχές της 1kb περιοχής

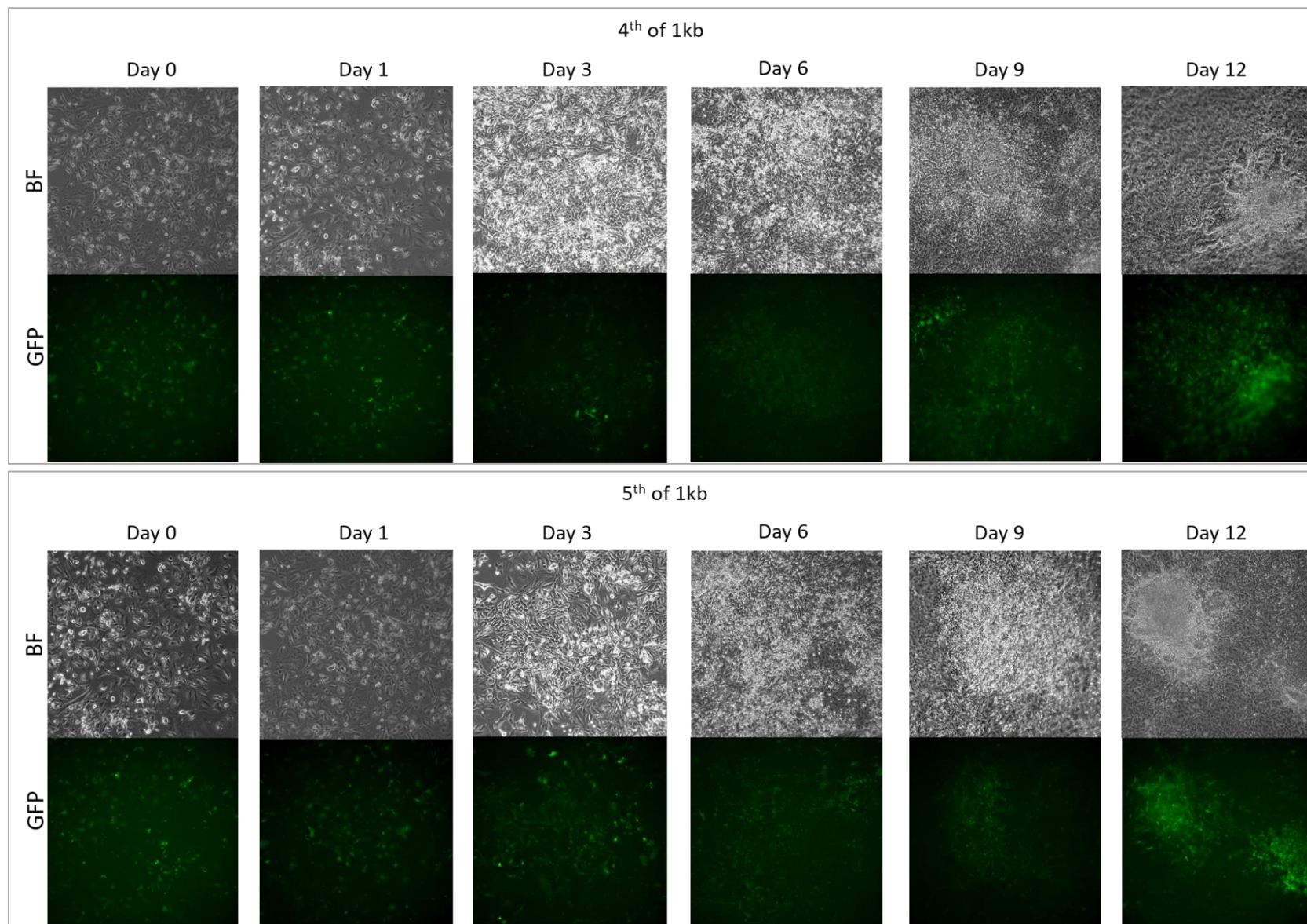
Κερματίσαμε την 1kb περιοχή σε 5 υποπεριοχές μήκους περίπου 150bp, για να διερευνήσουμε αν η αλληλουχία του ενισχυτή εκτείνεται σε όλο το μήκος της περιοχής ή αν περιορίζεται σε ένα μέρος της. Διευκρινίζεται πως τα constructs των 5 υποπεριοχών συμπεριελάμβαναν το 0,2kb κομμάτι, όπου εδράζεται ο ενδογενής υποκινητής του γονιδίου, κι επομένως και σε αυτά τα constructs όπως και στα προηγούμενα, η ρύθμιση της έκφρασης της GFP από τους υποψήφιους ενισχυτές πραγματοποιείται μέσω της ρύθμισης του ενδογενούς υποκινητή του γονιδίου.



Εικόνα 35. Reporter assay για 1^ο κομμάτι μήκους 150bp της περιοχής 1kb. Το σήμα της GFP είναι διάχυτο και για τα 2 construct καθόλη τη διάρκεια του επαναπρογραμματισμού αλλά και πριν την επαγωγή της (Day 0)



Εικόνα 36. Reporter assay για (πάνω) το 2^ο κομμάτι μήκους 150bp της περιοχής 1kb και για (κάτω) το 3^ο κομμάτι. Το σήμα της GFP είναι διάχυτο και για τα 2 construct καθόλη τη διάρκεια του επαναπρογραμματισμού αλλά και πριν την επαγωγή της (Day 0).

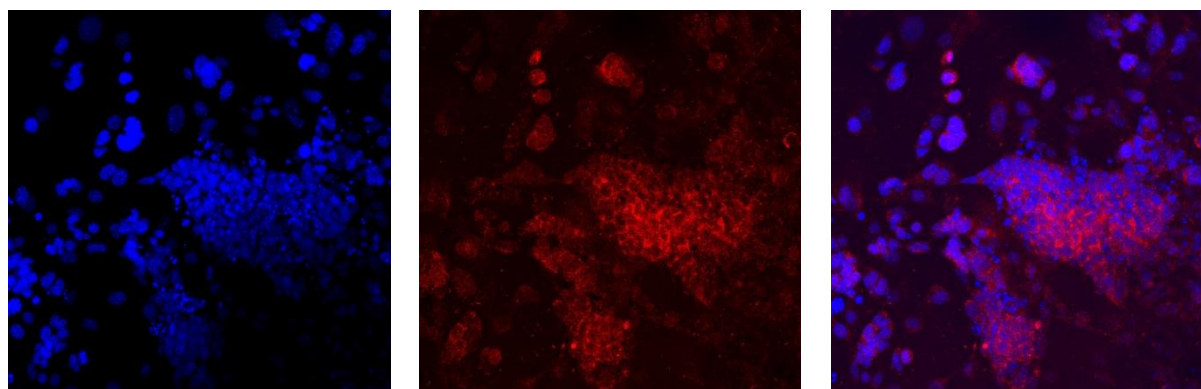


Εικόνα 37. Reporter assay για (πάνω) το 4^ο κομμάτι μήκους 150bp της περιοχής 1kb και για (κάτω) το 5^ο κομμάτι. Το σήμα της GFP είναι διάχυτο και για τα 2 construct καθόλη τη διάρκεια του επαναπρογραμματισμού αλλά και πριν την επαγωγή της (Day 0).

Σε όλα τα constructs παρατηρούμε έντονη έκφραση της GFP καθόλη τη διάρκεια του επαναπρογραμματισμού καθώς και πριν την επαγωγή της διαδικασίας. Επίσης, το σήμα εκπέμπεται από όλα τα κύτταρα της καλλιέργειας, τόσο εντός αποικιών όσο και εκτός (Εικόνες 36, 37, 38). Συμπεραίνουμε πως ο ενισχυτής στην 1kb περιοχή εκτείνεται σε όλο το μήκος της αλληλουχίας, καθώς ο κερματισμός της οδηγεί στην απώλεια των ιδιοτήτων του (επαγόμενη και ειδική έκφραση).

6.1.4. Ανοσοφθορισμός σε κύτταρα MEFs 4F2-Ono1 1kb την Ημέρα 6 του επαναπρογραμματισμού

Πραγματοποιήσαμε πείραμα ανοσοφθορισμού σε κύτταρα επιμολυσμένα με το construct της 1kb περιοχής την Ημέρα 6 του επαναπρογραμματισμού, στοχεύοντας την ενδογενή Ono1 πρωτεΐνη. Με αυτό τον τρόπο οπτικοποιήσαμε την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα. Ο Ono1 εκφράζεται πράγματι την Ημέρα 6 στα επαναπρογραμματιζόμενα κύτταρα και έχει πυρηνική εντόπιση, κάτι που προσδίδει εγκυρότητα στις παρατηρήσεις και τα συμπεράσματα από τις δοκιμασίες αναφοράς.



Εικόνα 38. (Αριστερά) Πυρήνες των κυττάρων την Ημέρα 6 του επαναπρογραμματισμού βαμμένοι μπλε (DAPI) (Κέντρο) Εντοπισμός του Ono1 στα ίδια κύτταρα (κόκκινο) (Δεξιά) Συνδυασμός των δύο εικόνων. Ο Ono1 εκφράζεται και έχει πυρηνική εντόπιση.

6.2.Διερεύνηση του ρόλου του Ono1 ως μεταγραφικού παράγοντα στη διαδικασία του επαναπρογραμματισμού

Δεύτερος στόχος της διπλωματικής εργασίας ήταν η αναζήτηση του ρόλου του μεταγραφικού παράγοντα Ono1 κατά τον επαναπρογραμματισμό. Γι' αυτό το σκοπό, πραγματοποιήσαμε πειράματα RNA-seq, ώστε να συγκρίνουμε το μεταγράψωμα κυττάρων που εκφράζουν τον Ono1 την Ημέρα 6 του επαναπρογραμματισμού με αυτό κυττάρων που δεν τον εκφράζουν αλλά και με το μεταγράψωμα ES και iPS κυττάρων. Επιπλέον,

πραγματοποιήσαμε πειράματα ChIP-seq την Ημέρα 0 και την Ημέρα 6 του επαναπρογραμματισμού, αναζητώντας τους στόχους πρόσδεσης του Ono1 στο DNA.

6.2.1. RNA-seq για τη διερεύνηση του ρόλου του Ono1 στο μεταγράφημα επαναπρογραμματιζόμενων κυττάρων

Πραγματοποιήθηκε πείραμα RNA-seq στα εξής κύτταρα/συνθήκες:

- MEFs 4F2 επιμολυσμένα με το construct της 1kb περιοχής του ono1 (**MEFs**)
- MEFs 4F2 επιμολυσμένα με το construct της 1kb περιοχής του Ono1, διαχωρισμένα με FACS την Ημέρα 6 του επαναπρογραμματισμού σε δύο υποπληθυσμούς:
 - α. έναν που εξέφραζε την πρωτεΐνη GFP (**D6-GFP+**), δηλαδή είχε ενεργή την 1kb περιοχή
 - β. έναν που δεν εξέφραζε την πρωτεΐνη GFP (**D6-GFP-**), δηλαδή με ανενεργή την 1kb περιοχή
 - γ. σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού (**ESCs**)
 - δ. σε επαγόμενα βλαστικά κύτταρα ποντικού (**iPSCs**)

Βρέθηκαν τα DEGs όλων των πιθανών ζευγών των κυττάρων αυτών. Τα DEGs είναι δύο κατηγοριών: η πρώτη κατηγορία αφορά στα γονίδια εκείνα που εμφανίζουν στατιστικά σημαντική *αύξηση* της έκφρασής τους (στη μία συνθήκη σε σχέση με την άλλη)(**upregulated DEGs**), ενώ η δεύτερη περιλαμβάνει τα γονίδια που εμφανίζουν στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης τους (**downregulated DEGs**). Στο εξής τα DEGs από τη σύγκριση κυττάρων συνθηκών α και β θα συμβολίζονται με τον ακόλουθο τρόπο: **κύτταρα α /κύτταρα β upregulated (ή downregulated) DEGs**, που θα σημαίνει **τα DEGs που είναι upregulated (ή downregulated) στα κύτταρα β σε σχέση με τα κύτταρα α** . Τα DEGs αξιολογήθηκαν με χρήση των διαδικτυακών εργαλείων Venny 1.2, Enrichr και DAVID. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων μπορούν να συνοψισθούν σε 4 σημεία.

I. Στα επαναπρογραμματιζόμενα κύτταρα, την Ημέρα 6 της διαδικασίας, υπερεκφράζονται γονίδια που εμπλέκονται στη MET, τα οποία καταστέλλονται στην πορεία προς την πολυδυναμία

Η πρώτη ομάδα αναλύσεων φανερώνει πως την Ημέρα 6 του επαναπρογραμματισμού τα κύτταρα εκφράζουν, σε στατιστικά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα, γονίδια που σχετίζονται με τη MET, σε σχέση με τα MEFs κύτταρα. Αυτό ισχύει τόσο για GFP+ όσο και για τα GFP- κύτταρα και αποκαλύπτεται από τις εξής αναλύσεις:

- α. Τα MEFs/D6 **GFP-** upregulated DEGs εμφανίζουν πολλά κοινά γονίδια με τα MEFs/D6 **GFP+** upregulated DEGs. Το σύνολο των κοινών γονιδίων εμπλέκεται, βάσει οντολογικών αναλύσεων (Enrichr), στην διαδικασία MET (**Εικόνα 39**).
- β. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το ότι μέρος αυτών των κοινών γονιδίων (46,2%) καταστέλλεται κατά την πορεία προς την πολυδυναμία. Αυτό φαίνεται από το ότι το 46,2% των γονιδίων αυτών είναι κοινό με τα downregulated DEGs των iPSCs όταν αυτά συγκριθούν με τα GFP- είτε με τα GFP+ κύτταρα (**Εικόνα 40**). Φαίνεται επομένως, πως τα γονίδια που ρυθμίζουν τη MET πρέπει να σιγηθούν για να επιτευχθεί ανάκτηση της πολυδυναμίας.

II. Τα D6-GFP+ κύτταρα υπερεκφράζουν τον Ovol1 σε σχέση με τα D6-GFP- κύτταρα

Ο Ovol1 είναι ένα από τα γονίδια που υπερεκφράζονται στα D6-GFP+ σε σχέση με τα D6-GFP- (**Εικόνα 41**). Αυτό επιβεβαιώνει ότι η 1kb περιοχή έχει ενεργότητα ενισχυτή για το γονίδιο του Ovol1 κατά τον επαναπρογραμματισμό, καθώς λειτούργησε ως δείκτης για τον διαχωρισμό των κυττάρων εκείνων που υπερεκφράζουν τον μεταγραφικό παράγοντα την Ημέρα 6 της διαδικασίας, από εκείνα που δεν τον υπερεκφράζουν. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως στα D6-GFP- κύτταρα ο Ovol1 εμφανίζει αυξημένη έκφραση σε σχέση με τα MEFs. Αυτό σημαίνει πως η έκφραση του γονιδίου επάγεται κατά τον επαναπρογραμματισμό και χωρίς την λειτουργία του ενισχυτή. Η έκφραση του Ovol1 στα GFP- κύτταρα ενδεχομένως αντιπροσωπεύει το *βασικό επίπεδο έκφρασης του γονιδίου*, το οποίο υπερακοντίζεται από τη λειτουργία του ενισχυτή της 1kb περιοχής.

III. Στα κύτταρα που την Ημέρα 6 υπερεκφράζουν τον Ovol1 παρατηρείται υπερέκφραση γονιδίων σχετικών με τη MET και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, σε σχέση με τα κύτταρα που δεν υπερεκφράζουν τον Ovol1 την ημέρα αυτή.

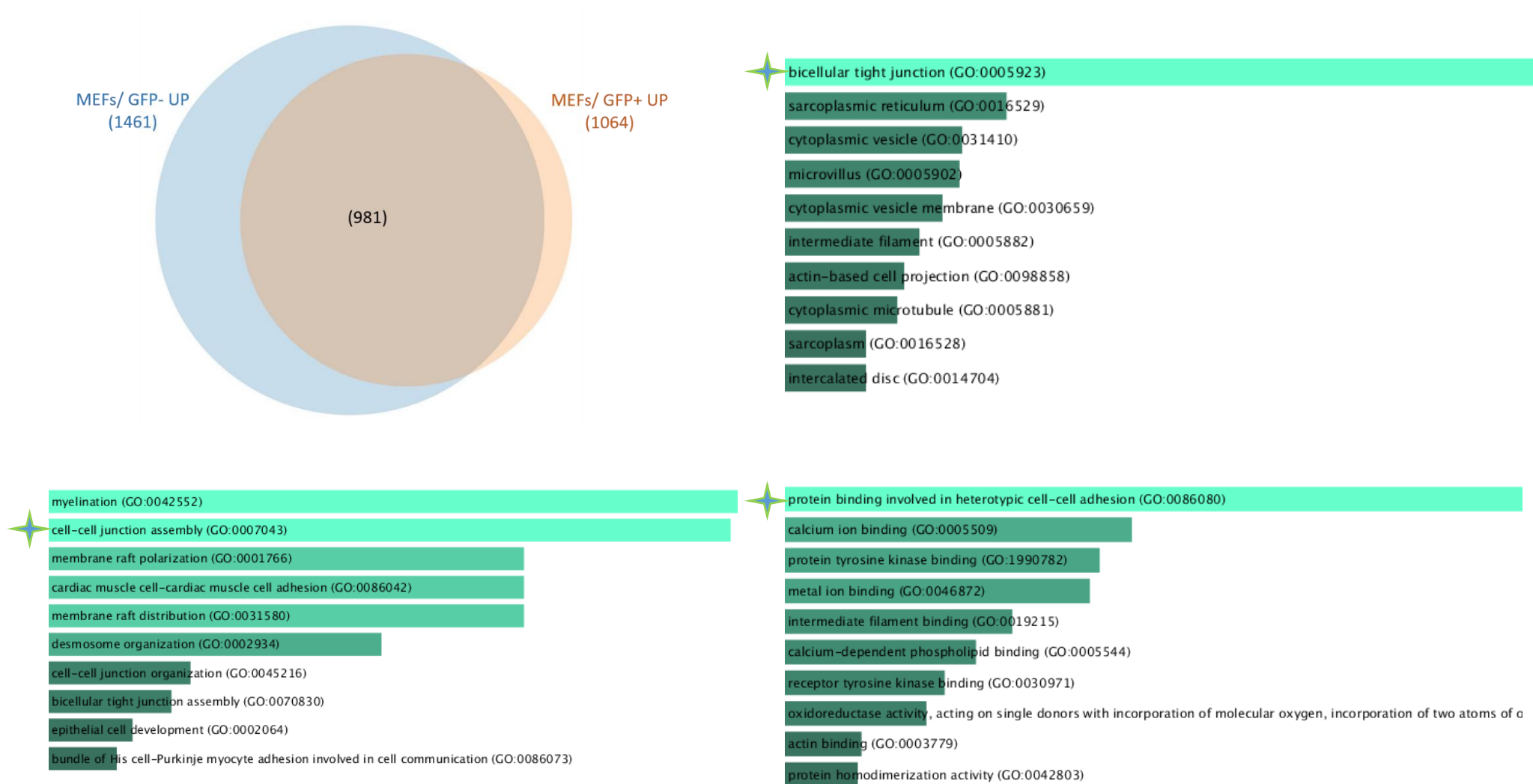
Η δεύτερη ομάδα αναλύσεων αποκαλύπτει πως στα D6-GFP+ συμβαίνει πιο έντονη έκφραση γονιδίων σχετικών με τη MET σε σχέση με τα D6-GFP-, παρότι αμφότερες οι ομάδες υπερεκφράζουν γονίδια που εμπλέκονται στη MET, όπως φάνηκε από την πρώτη ομάδα αναλύσεων. Αυτό προκύπτει από τις εξής αναλύσεις:

- α. Τα D6-GFP-/D6-GFP+ upregulated DEGs συσχετίζονται ύστερα από οντολογική ανάλυση με τη διαδικασία της MET (**Εικόνα 41**). Μεταξύ τους ο Ovol1. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι δεύτερη σε σειρά στατιστικής σημαντικότητας εμφανίζεται η λειτουργία των γονιδίων αυτών στην *ενίσχυση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού*.

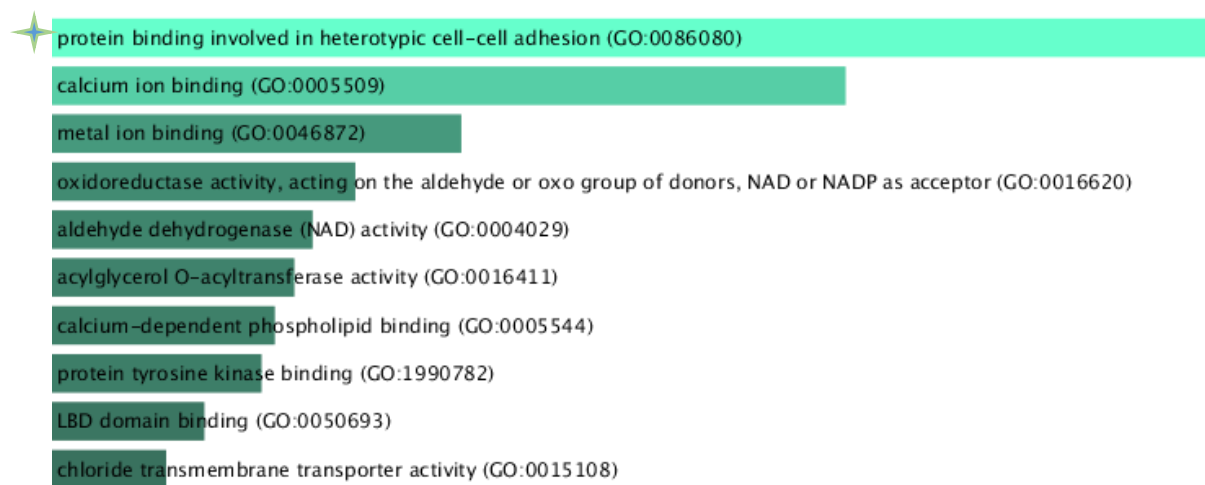
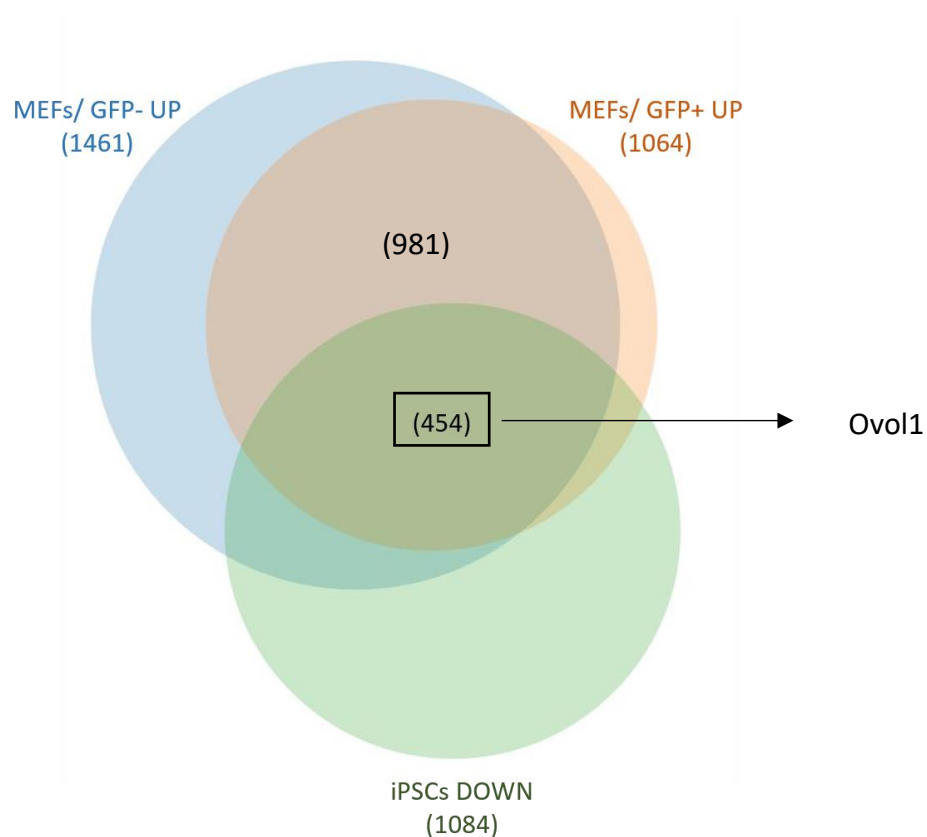
- β. Μεταξύ των D6-GFP+ και ESCs υπάρχουν κοινά upregulated DEGs (όταν συγκριθούν με τα D6-GFP-), που σχετίζονται με την ενίσχυση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Μάλιστα, τα κοινά αυτά γονίδια μεταξύ GFP+ και ESCs, αποτελούν το 40,7% του συνόλου των upregulated DEGs των GFP+ κυττάρων (**Εικόνα 42**). Αυτό το αποτέλεσμα υποστηρίζει πως το προφίλ της γονιδιακής έκφρασης των D6-GFP+ κυττάρων εμφανίζει μεγαλύτερη ομοιότητα από ό,τι αυτή των D6-GFP-, με το προφίλ της γονιδιακής έκφρασης των ESCs.

IV. Η υπερέκφραση του Ono1 την Ημέρα 6 του επαναπρογραμματισμού αυξάνει την πιθανότητα επιτυχούς ανάκτησης της πολυδυναμίας, αλλά για την επίτευξή της πρέπει στην πορεία να κατασταλεί.

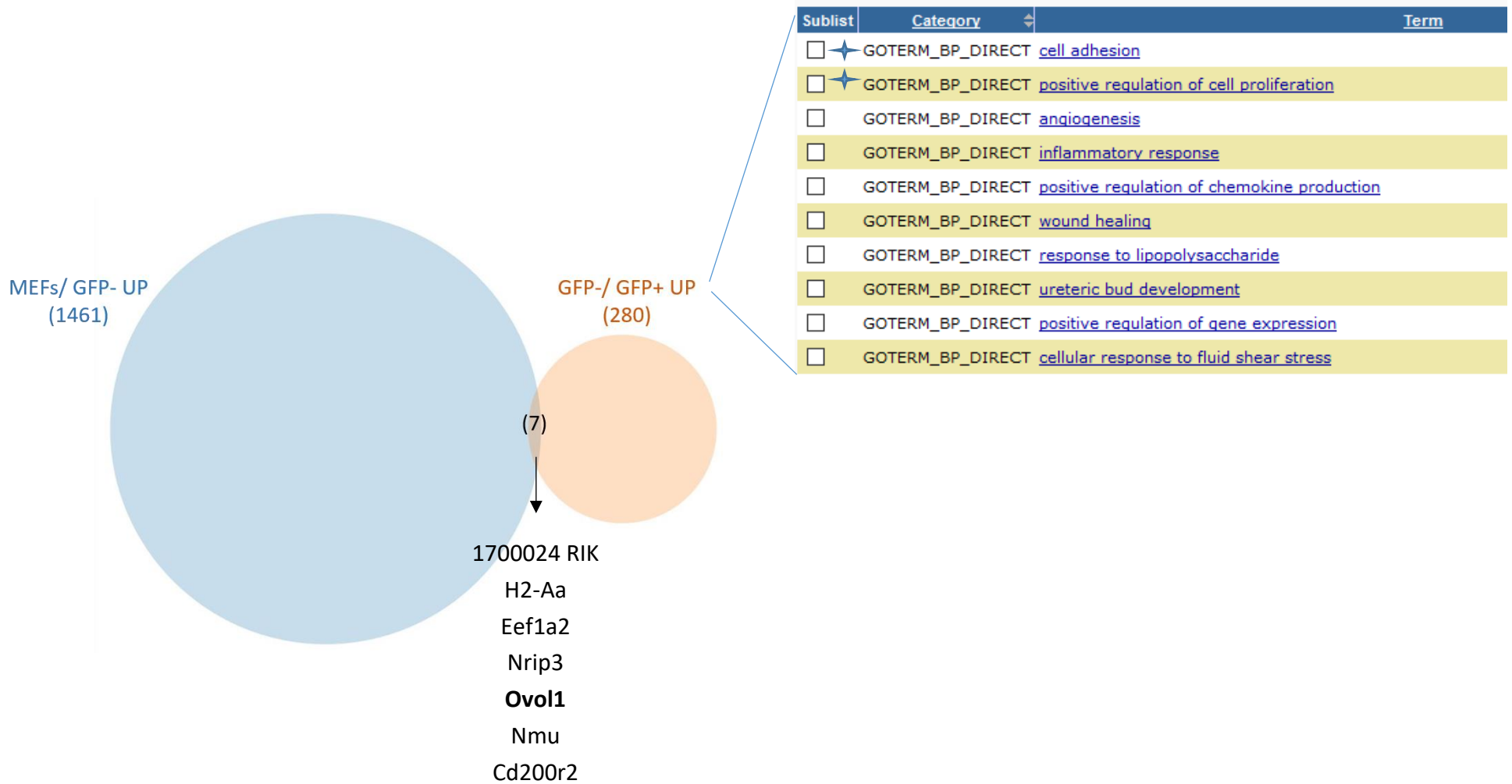
Ο Ono1 ανήκει στο σύνολο των γονιδίων που καταστέλλονται στην πορεία προς την πολυδυναμία (**Εικόνα 40**). Το εύρημα αυτό επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα πειραμάτων υπερέκφρασης του Ono1 που έγιναν κατά την ανακάλυψη του δικτύου των 9 μεταγραφικών παραγόντων, σύμφωνα με τα οποία η υπερέκφραση του Ono1 καθόλη τη διάρκεια του επαναπρογραμματισμού μειώνει την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας.



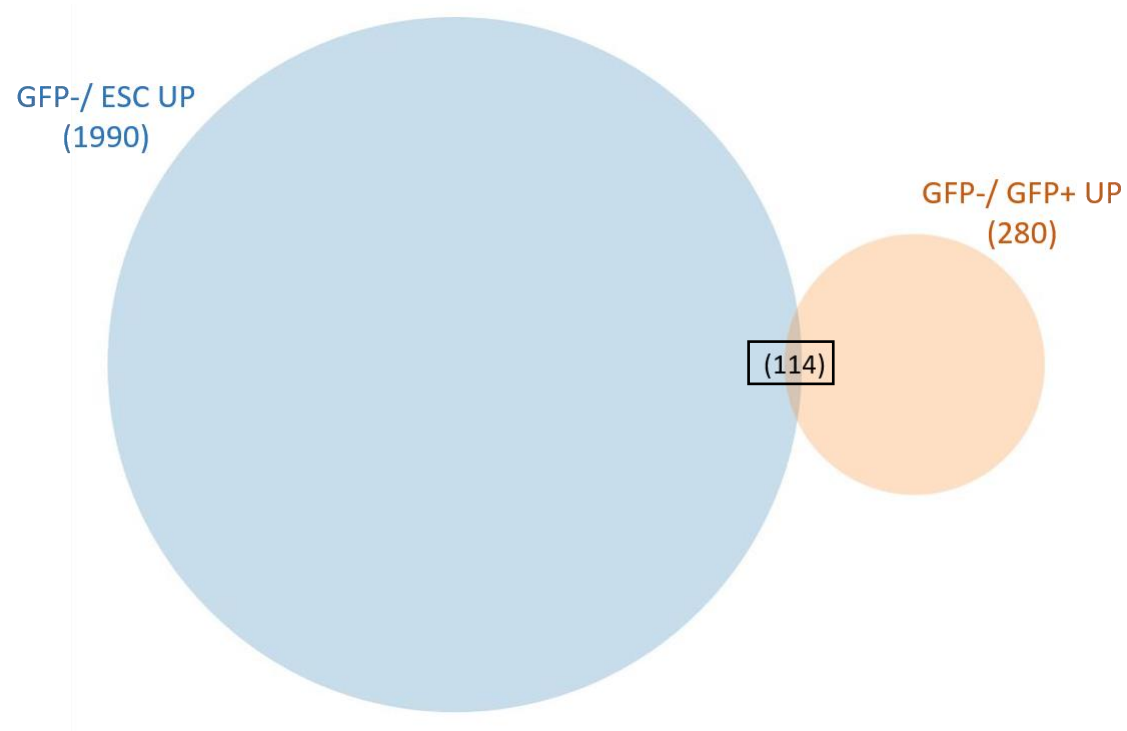
Εικόνα 39. Σύγκριση των upregulated DEGs των MEFs/D6 GFP- & MEFs/D6 GFP+. (Πάνω αριστερά) Το 63,5% των συνολικών DEGs είναι κοινά στις 2 ομάδες κυττάρων. (Υπόλοιπα) Αποτελέσματα ανάλυσης οντολογίας των γονιδίων ως προς το είδος των κυτταρικών συστατικών που εκφράζουν (πάνω δεξιά), τη βιολογική (κάτω αριστερά) και τη μοριακή (κάτω δεξιά) λειτουργία των προϊόντων τους. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης οντολογίας παρουσιάζονται ιεραρχικά από το στατιστικά σημαντικότερο προς το λιγότερο στατιστικά σημαντικό (πάνω προς κάτω). Τα αποτελέσματα και των τριών προσεγγίσεων (bicellular tight junction, cell-cell junction assembly, protein binding involved in heterotypic cell-cell adhesion αντίστοιχα) αφορούν στην ανάπτυξη διακυτταρικών συνδέσεων, δηλαδή στη MET.



Εικόνα 40. (Πάνω) Το 46,2% (454 από τα 981) των κοινών upregulated DEGs των D6-GFP- και D6-GFP+ (σε σχέση με τα MEFs) πρέπει να σιγηθούν προκειμένου τα κύτταρα να γίνουν iPSCs. Μεταξύ τους κι ο Ovol1. **(Κάτω)** Τα DEGs αυτά εμπλέκονται στη διαδικασία της MET (protein binding involved in heterotypic cell-cell adhesion). Η MET συμβαίνει σε όλα τα κύτταρα που επαναπρογραμματίζονται, αλλά τα γονίδια που την ελέγχουν πρέπει να σιγηθούν για την επιτυχή ανάκτηση της πολυδυναμίας.



Εικόνα 41. (Αριστερά) 7 γονίδια υπερεκφράζονται **περαιτέρω** στα D6-GFP+ κύτταρα σε σχέση με τα GFP-. Μεταξύ τους ο *Ovol1*. (Δεξιά) Η ανάλυση οντολογίας για τα D6 GFP-/D6 GFP+ upregulated DEGs. Οι δύο πρώτες κατηγορίες αφορούν την κυτταρική προσκόλληση και την ενίσχυση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (*cell adhesion, positive regulation of cell proliferation*). Η ιεράρχηση των κατηγοριών βασίζεται στο *P-value* (από το χαμηλότερο στο μεγαλύτερο).



Sublist	Category	Term
☐ ★	GOTERM_BP_DIRECT	positive regulation of cell proliferation
☐	GOTERM_BP_DIRECT	cellular response to fluid shear stress
☐	GOTERM_BP_DIRECT	ureteric bud development
☐	GOTERM_BP_DIRECT	wound healing
☐	GOTERM_BP_DIRECT	positive regulation of gene expression
☐	GOTERM_BP_DIRECT	positive regulation of cell migration involved in sprouting angiogenesis
☐	GOTERM_BP_DIRECT	negative regulation of collagen biosynthetic process
☐	GOTERM_BP_DIRECT	cell adhesion
☐	GOTERM_BP_DIRECT	angiogenesis

Εικόνα 42. (Πάνω) Μεταξύ των D6-GFP+ και των ESCs υπάρχουν κοινά upregulated (σε σχέση με τα MEFs-D6 GFP-) DEGs, τα οποία δεν περιλαμβάνονται στα upregulated DEGs των D6-GFP- (σε σχέση με τα MEFs). **(Κάτω)** Τα DEGs αυτά σχετίζονται με τη θετική ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμό (positive regulation of cell proliferation, πρώτο στη λίστα άρα το στατιστικά σημαντικότερο).

6.2.2. ChIP-seq με στόχο τον Ono1

Πραγματοποιήσαμε πειράματα ChIP-seq με στόχο τον Ono1 σε χρωματίνη κυττάρων MEFs, D6-GFP- και D6-GFP+ για να ταυτοποιήσουμε τους γονιδιακούς στόχους του μεταγραφικού παράγοντα. Στοχεύσαμε επίσης και άλλους παράγοντες του μεταγραφικού δικτύου για να ελέγξουμε τυχόν συνεργατικότητα αυτών με τον Ono1. Στη συνέχεια συγκρίναμε το σύνολο των γονιδιακών στόχων του Ono1 με DEGs συνθηκών από το RNA-seq πείραμα, για να βρούμε γονίδια, η έκφραση των οποίων αλλάζει κατά τον επαναπρογραμματισμό υπό την άμεση ρύθμιση του Ono1. Τέλος, προχωρήσαμε σε οντολογική ανάλυση αυτών των γονιδίων.

Η αξιοπιστία του πειράματος ελέγχθηκε από την ανάλυση των DNA μοτίβων στα οποία προσδένεται ο Ono1. Ο Ono1 βρέθηκε πως προσδένεται σε περιοχές που αναγνωρίζονται από πρωτεΐνες με δάκτυλα ψευδαργύρου (**Εικόνα 43**). Ο Ono1 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας με 4 δάκτυλα ψευδαργύρου, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, και αυτό επιβεβαιώνει την ορθότητα του πειράματος. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το ότι εκτός από τα μοτίβα πρόσδεσης πρωτεϊνών με δάκτυλα ψευδαργύρου, ο Ono1 φάνηκε πως προσδένεται επίσης στο μοτίβο πρόσδεσης των πρωτεϊνών Tead (**Εικόνα 43**): 3 από τις 4 πρωτεΐνες Tead, οι Tead1, Tead2 και Tead 4 αναγνωρίζουν το ίδιο μοτίβο DNA⁴³. Η Tead4 πρωτεΐνη είναι επίσης μέλος του δικτύου των 9 μεταγραφικών παραγόντων μαζί με τον Ono1. Το εύρημα αυτό υποδεικνύει *ενδεχόμενη συνεργατική δέσμευση του Ono1 με τον Tead4*.



Εικόνα 43. Τα μοτίβα του DNA στα οποία προσδένεται ο Ono1. (**Πάνω**) Ως μεταγραφικός παράγοντας με δάκτυλα ψευδαργύρου ο ίδιος, αναγνωρίζει μοτίβα πρόσδεσης πρωτεϊνών με αυτές τις δομές (ZNF- zinc finger). (**Κάτω**) Η στόχευση του Ono1 κατακρημνίζει και περιοχές χρωματίνης με μοτίβα πρόσδεσης των πρωτεϊνών Tead.

Από τις συγκρίσεις και αναλύσεις μεταξύ των γονιδίων που βρέθηκαν ότι στοχεύονται από τον Ono1 και των DEGs διαφόρων συνθηκών από το πείραμα RNA-seq προκύπτουν 3 σημαντικά συμπεράσματα.

I. Ο Ono1 ρυθμίζει άμεσα γονίδια που εμπλέκονται στη MET

Αυτό το συμπέρασμα προκύπτει από τις εξής αναλύσεις

- οι γονιδιακοί στόχοι του Ono1 εμφανίζουν κοινά γονίδια με τα MEFs/D6 GFP+ upregulated DEGs. Το κοινό σύνολο γονιδίων, ύστερα από οντολογική ανάλυση, φαίνεται πως εμπλέκεται στη διαδικασία της MET (**Εικόνα 44**).
- οι γονιδιακοί στόχοι του Ono1 εμφανίζουν κοινά γονίδια με τα MEFs/D6 GFP- upregulated DEGs. Το κοινό σύνολο των γονιδίων εμπλέκεται στη διαδικασία της MET, όπως και στην προηγούμενη περίπτωση (**Εικόνα 44**),
- όμως, τα δύο σύνολα γονιδίων ρυθμίζουν τη MET με διαφορετική στατιστική σημαντικότητα: τα GFP+ κύτταρα εμφανίζουν ισχυρότερη στατιστική σημαντικότητα από τα GFP- κύτταρα (**Εικόνα 45**).

Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τα συμπεράσματα που προέκυψαν από τα RNA-seq πειράματα. Ο Ono1 ρυθμίζει με θετικό τρόπο γονίδια που εμπλέκονται στη διαδικασία της MET, ενώ η υπερέκφραση του Ono1 συμβάλλει στην αποτελεσματικότερη διεξαγωγή της MET.

II. Ο Ono1 καταστέλλει γονίδια σχετικά με την κυτταρική διαφοροποίηση

Από τις συγκρίσεις των γονιδιακών στόχων του Ono1 την Ημέρα 6 με τα γονίδια που καταστέλλονται την ημέρα αυτή στα GFP- και GFP+ κύτταρα (σε σχέση με τα MEFs) βρέθηκε πως ο Ono1 καταστέλλει σύνολα γονιδίων που ρυθμίζουν την κυτταρική διαφοροποίηση. Συγκεκριμένα:

- α. Τα MEFs/GFP+ downregulated DEGs εμφανίζουν κοινά γονίδια με τους στόχους του Ono1 την Ημέρα 6 του επαναπρογραμματισμού. Τα γονίδια αυτά σχετίζονται, σύμφωνα με οντολογική ανάλυση, με τη ρύθμιση της κυτταρικής διαφοροποίησης (**Εικόνα 46**)
- β. Το ίδιο ισχύει και για τα downregulated DEGs των MEFs/GFP- κυττάρων. Ωστόσο, το σύνολο των κοινών γονιδίων σε αυτή την περίπτωση συνδέεται με χαμηλότερη στατιστική σημαντικότητα με τον έλεγχο της κυτταρικής διαφοροποίησης (**Εικόνα 46**).

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η υπερέκφραση του Ono1 συμβάλλει στην αποτελεσματικότερη καταστολή της κυτταρικής διαφοροποίησης.

III. Ο Ovol1 προσδένεται συνεργατικά με τον Tead4 στους περισσότερους γονιδιακούς στόχους του την Ημέρα 6 του επαναπρογραμματισμού

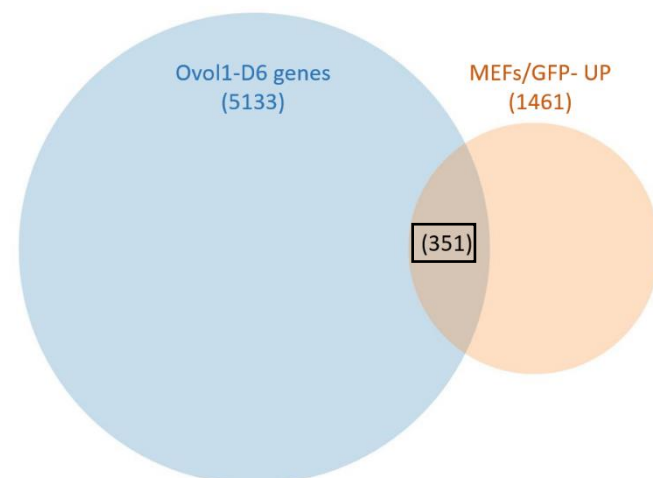
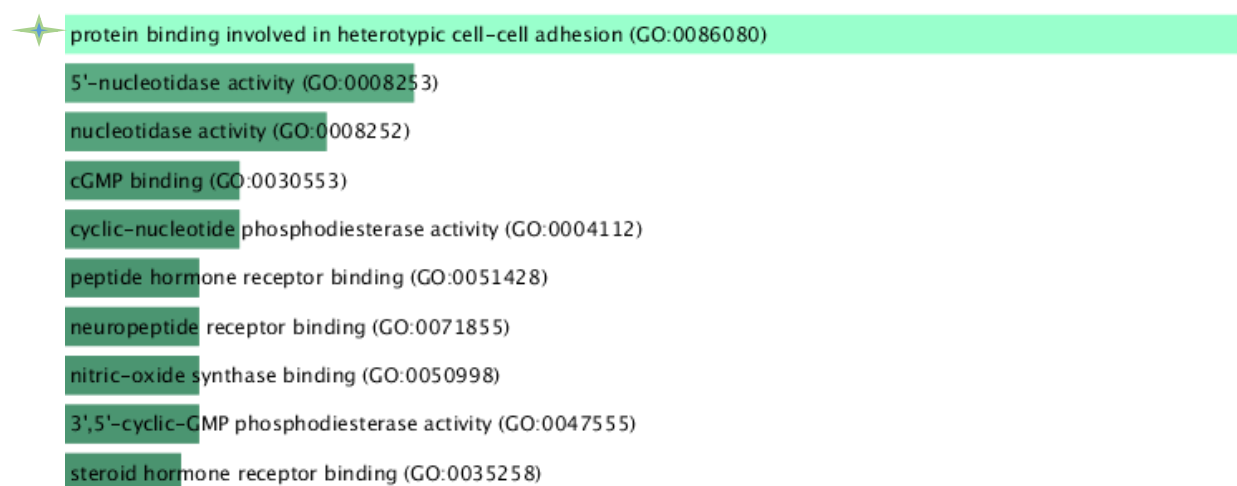
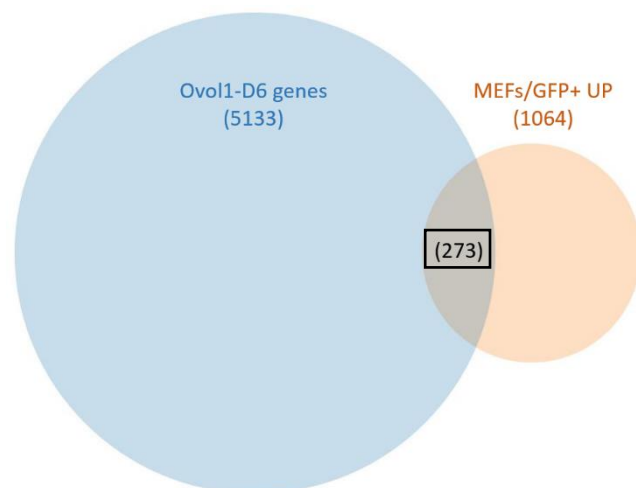
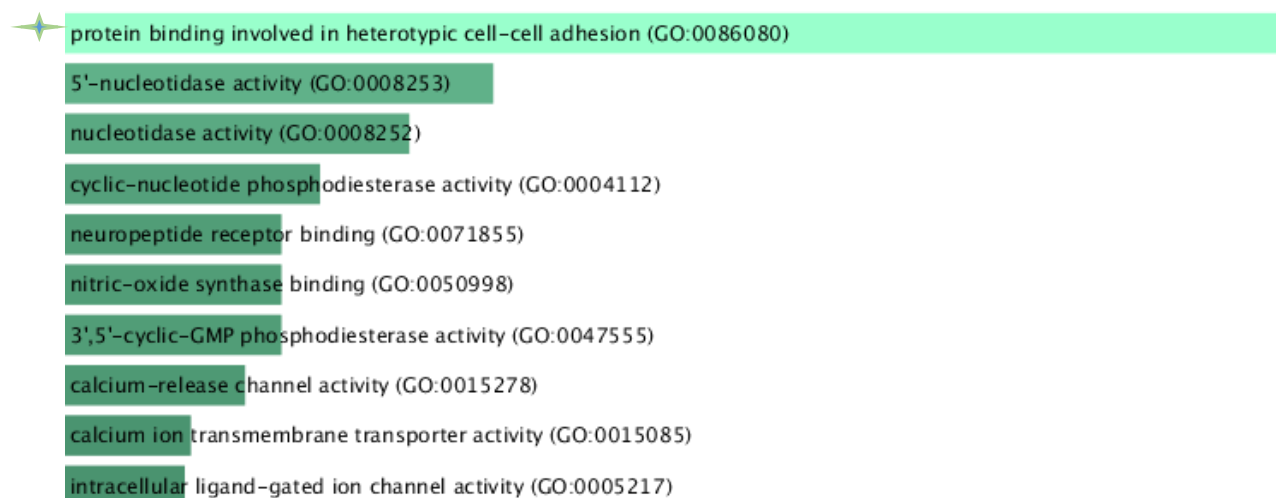
Υποψιασμένοι από το ότι ο Ovol1 προσδένεται στο μοτίβο πρόσδεσης του Tead4 μεταγραφικού παράγοντα, αναζητήσαμε κοινούς γονιδιακούς στόχους των δύο μεταγραφικών παραγόντων την ημέρα 6 του επαναπρογραμματισμού. Πράγματι, το 57,2% των συνολικών γονιδιακών στόχων των Tead4 και Ovol1 είναι κοινό για τους δύο μεταγραφικούς παράγοντες (**Εικόνα 47**). Πιο συγκεκριμένα όμως, οι στόχοι του Ovol1 ανήκουν κατά 82,5% στους στόχους του Tead4, ποσοστό που για τον Tead4 αντιστοιχεί στο 65%. Το δεδομένο αυτό ενισχύει το συμπέρασμα της συνεργατικής πρόσδεσης στο DNA του Ovol1 με τον Tead4. Η επικάλυψη των θέσεων πρόσδεσης των δύο μεταγραφικών παραγόντων την Ημέρα 6 της διαδικασίας αναπαρίσταται με μεγαλύτερη ευκρίνεια στον θερμικό χάρτη (heatmap) της **Εικόνας 48**, ενώ στις **Εικόνες 50 και 51** παρουσιάζονται ως παραδείγματα οι περιπτώσεις κοινής πρόσδεσης των παραγόντων σε 4 γονίδια., τα Nanog, Sox2, Gli2 και Rcan1.

Το γονιδιακό σύνολο των κοινών στόχων των Ovol1-Tead4 φαίνεται, ύστερα από οντολογική ανάλυση, πως εμπλέκεται στην ανάπτυξη διακυτταρικών συνδέσεων (ρύθμιση έκφρασης κατενινών (catenin complex) και διακυτταρικές συνδέσεις μέσω καδερίνης (cell-cell adhesion mediated by cadherin) (**Εικόνα 49**), διαδικασία που αποτελεί μέρος της MET.

IV. Ο Tead4 είναι προσδεδεμένος στις κοινές θέσεις πρόσδεσης πριν την έναρξη του επαναπρογραμματισμού

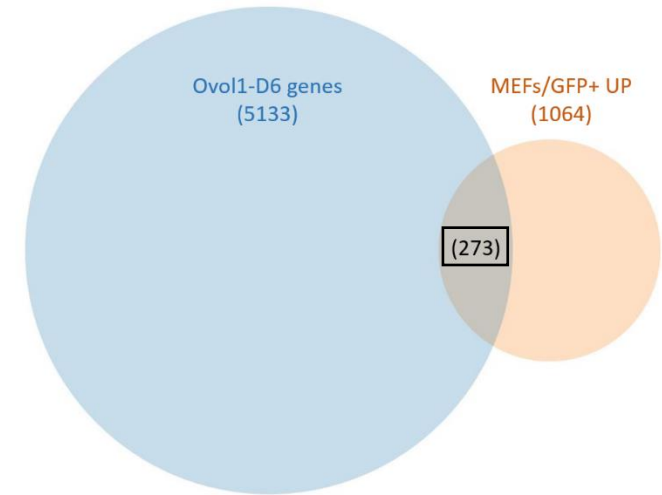
Διερευνώντας περαιτέρω το τελευταίο εύρημα, συγκρίναμε τους στόχους του Tead4 την Ημέρα 6 με τους στόχους του την Ημέρα 0 και διαπιστώσαμε πως εμφανίζουν ομοιότητα 53,9% (**Εικόνα 47**). Αν εξετάσουμε πιο λεπτομερώς τους αριθμούς, βρίσκουμε πως το 60,4% των στόχων του Tead4 την Ημέρα 6 του επαναπρογραμματισμού, είναι ήδη κατειλημμένο από αυτόν την Ημέρα 0, δηλαδή πριν την επαγωγή του φαινομένου. Ακόμη πιο ενδιαφέρον είναι το γεγονός πως το μεγαλύτερο μέρος των κοινών γονιδιακών στόχων των Ovol1-Tead4 εμπεριέχεται στο σύνολο των προ-κατειλημμένων αυτών θέσεων πρόσδεσης του Tead4 (**Εικόνα 47**). Συγκεκριμένα, το 74,3% των κοινών γονιδίων-στόχων των δύο μεταγραφικών παραγόντων, αποτελούν ήδη στόχοι του Tead4 πριν από την έναρξη της διαδικασίας (Ημέρα 0) Αυτό σημαίνει πως ο Ovol1 προσδένεται στο DNA κατά τις πρώτες ημέρες του επαναπρογραμματισμού σε θέσεις προδιαγεγραμμένες και κατειλημμένες από τον Tead4 πριν από την έναρξη του φαινομένου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το πρότυπο πρόσδεσης των παραγόντων στα γονίδια Nanog, Gli2, Sox2 και Rcan1 όπως φαίνεται στις **Εικόνες 50 και 51**, εκ των οποίων τα 3 αποτελούν μέρος του δικτύου των 9 μεταγραφικών παραγόντων ενώ ο Sox2 είναι ένας από τους Yamanaka παράγοντες. Αυτό σημαίνει πως οι

Ovol1 και Tead4 δεν ελέγχουν μόνο τη ρύθμιση άλλων γονιδίων σημαντικών για τον επαναπρογραμματισμό, αλλά ρυθμίζουν επίσης την συγκρότηση ή/και τη διατήρηση του ίδιου του ρυθμιστικού δικτύου.

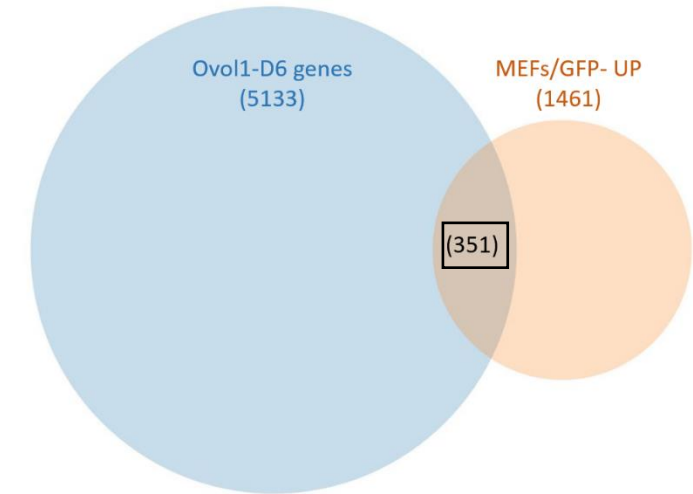


Εικόνα 44. Τόσο τα MEFs/D6 GFP+(Πάνω) όσο και τα MEFs/D6 GFP- (Κάτω) upregulated DEGs εμφανίζουν κοινά γονίδια με τους γονιδιακούς στόχους του Ovov1 την Ημέρα 6. Αυτά τα κοινά γονίδια εμπλέκονται στη διαδικασία της MET (η ιεράρχηση των λειτουργιών έχει γίνει βάσει στατιστικής σημαντικότητας).

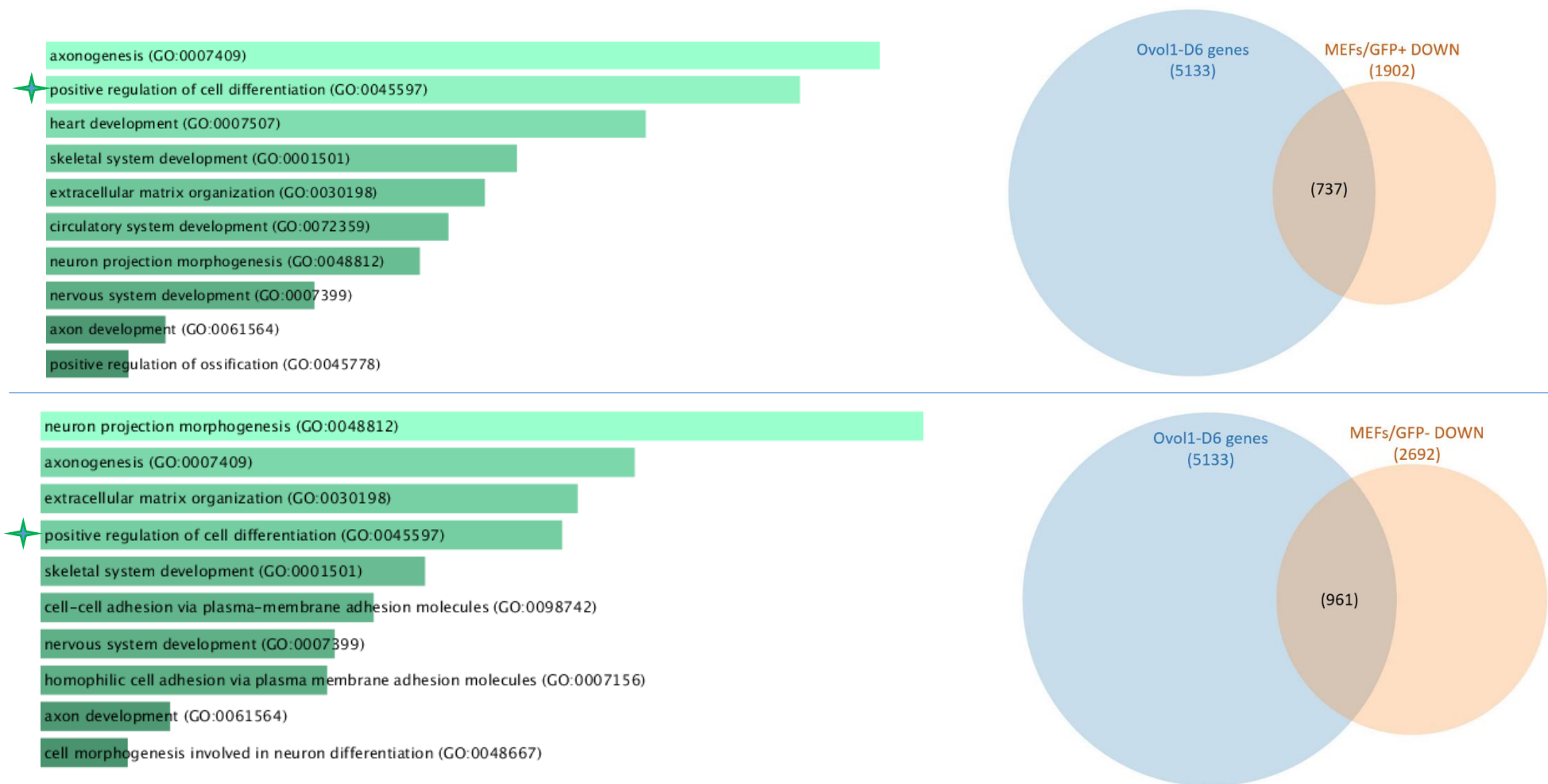
Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Odds Ratio	Combined score
1	protein binding involved in heterotypic cell-cell adhesion (GO:0086080)	0.00008454	0.09731	31.40	294.45
2	5'-nucleotidase activity (GO:0008253)	0.0008190	0.2357	15.70	111.58
3	nucleotidase activity (GO:0008252)	0.001235	0.2843	13.74	91.99
4	cyclic-nucleotide phosphodiesterase activity (GO:0004112)	0.007771	0.7454	14.65	71.17
5	neuropeptide receptor binding (GO:0071855)	0.009413	0.8334	13.32	62.15
6	nitric-oxide synthase binding (GO:0050998)	0.009413	0.7739	13.32	62.15
7	3',5'-cyclic-GMP phosphodiesterase activity (GO:0047555)	0.009413	0.7223	13.32	62.15
8	calcium-release channel activity (GO:0015278)	0.003639	0.5236	9.56	53.66
9	calcium ion transmembrane transporter activity (GO:0015085)	0.0006910	0.2651	5.64	41.01
10	intracellular ligand-gated ion channel activity (GO:0005217)	0.01734	1.000	9.77	39.61



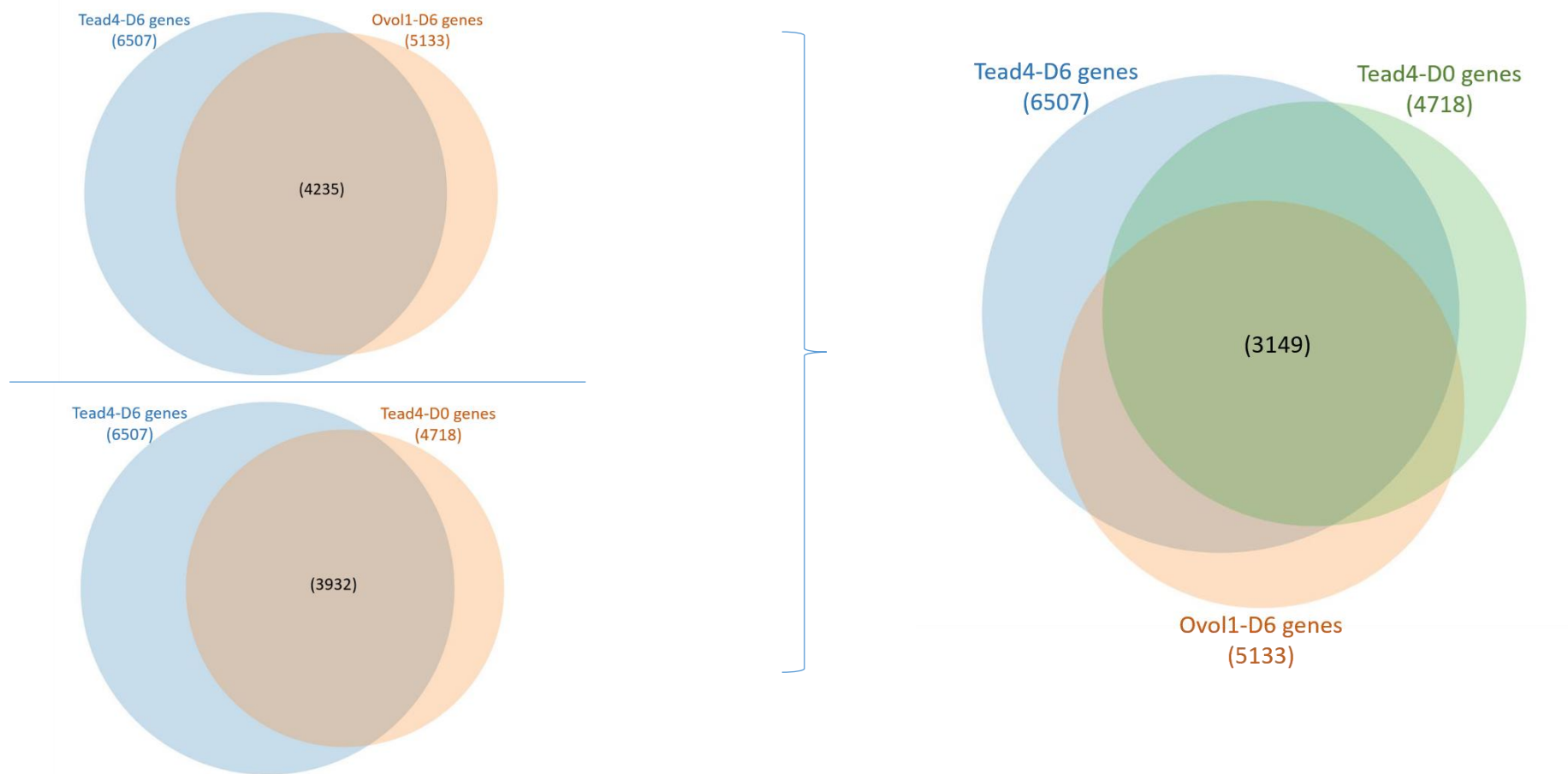
Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Odds Ratio	Combined score
1	protein binding involved in heterotypic cell-cell adhesion (GO:0086080)	0.0001780	0.2049	24.42	210.84
2	5'-nucleotidase activity (GO:0008253)	0.001690	0.4862	12.21	77.94
3	nucleotidase activity (GO:0008252)	0.002533	0.4164	10.68	63.87
4	cGMP binding (GO:0030553)	0.01259	1.000	11.40	49.85
5	cyclic-nucleotide phosphodiesterase activity (GO:0004112)	0.01259	0.9662	11.40	49.85
6	peptide hormone receptor binding (GO:0051428)	0.01521	1.000	10.36	43.36
7	neuropeptide receptor binding (GO:0071855)	0.01521	1.000	10.36	43.36
8	nitric-oxide synthase binding (GO:0050998)	0.01521	0.9728	10.36	43.36
9	3',5'-cyclic-GMP phosphodiesterase activity (GO:0047555)	0.01521	0.9216	10.36	43.36
10	steroid hormone receptor binding (GO:0035258)	0.0004051	0.2331	5.18	40.46



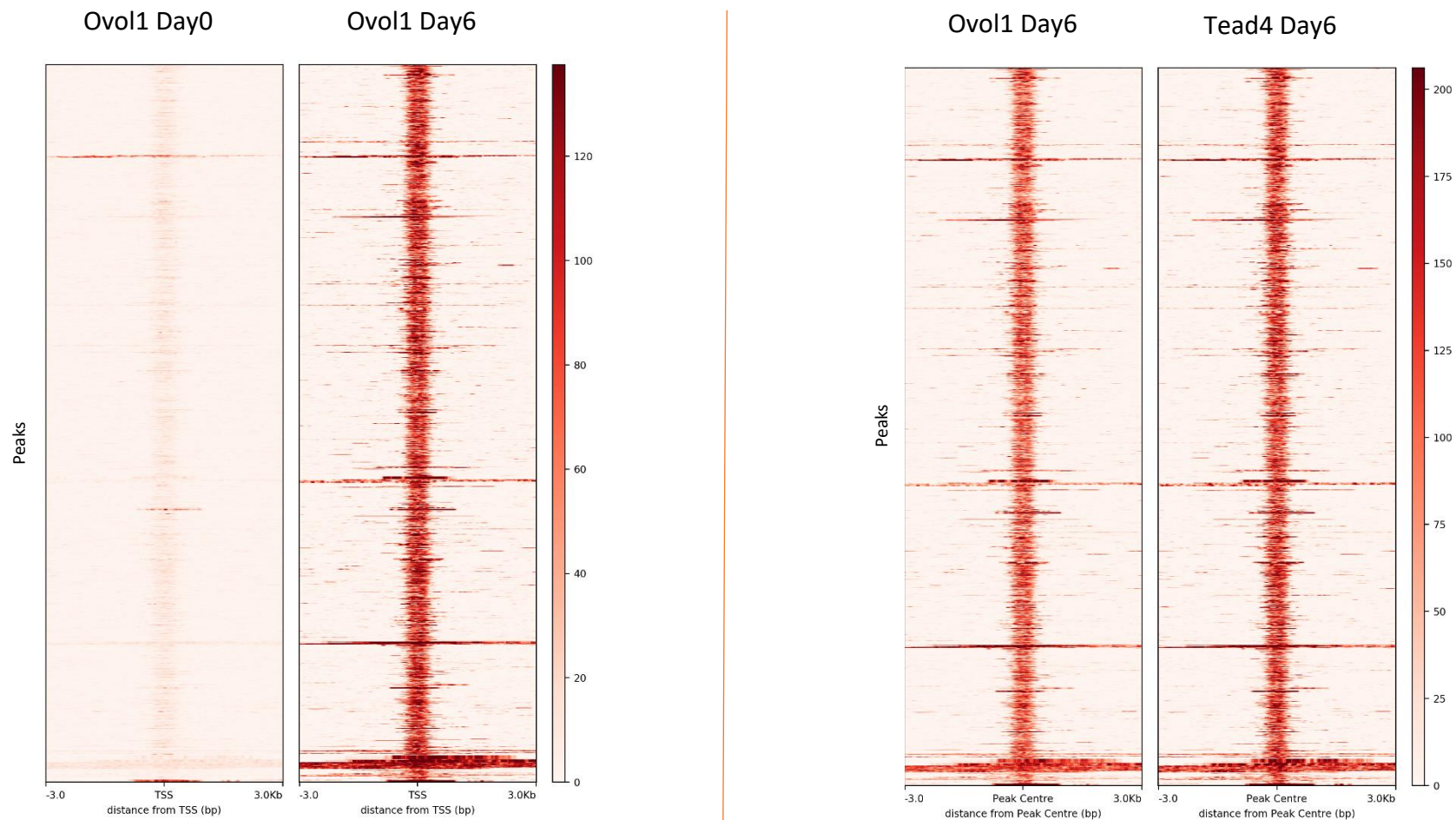
Εικόνα 45. Όπως και πριν, τόσο τα MEFs/D6- GFP+(Πάνω) όσο και τα MEFs/D6-GFP- (Κάτω) upregulated DEGs εμφανίζουν κοινά γονίδια με τα peaks του Ovot1, τα οποία εμπλέκονται στη διαδικασία της MET. Ωστόσο, τα γονίδια του πρώτου συνόλου (GFP+, πάνω· p-value= 0,00008454) ρυθμίζουν τη διαδικασία με πολύ μεγαλύτερη στατιστική σημαντικότητα από ότι τα γονίδια του δεύτερου συνόλου (GFP-, κάτω· p-value= 0,0001780).



Εικόνα 46. (Δεξιά) Τόσο στα GFP- όσο και στα GFP+ κύτταρα καταστέλλονται γονίδια (σε σχέση με τα MEFs) τα οποία αποτελούν στόχους του Ovol1 την Ημέρα 6 του επαναπρογραμματισμού. **(Αριστερά)** Τα γονίδια αυτά σχετίζονται με τη θετική ρύθμιση της κυτταρικής διαφοροποίησης (η ιεράρχηση των λειτουργιών έχει γίνει βάσει p-value, από το χαμηλότερο στο υψηλότερο). Στα GFP+ κύτταρα η σύνδεση των κοινών γονιδίων με την ρύθμιση της κυτταρικής διαφοροποίησης γίνεται με μεγαλύτερη στατιστική σημαντικότητα.



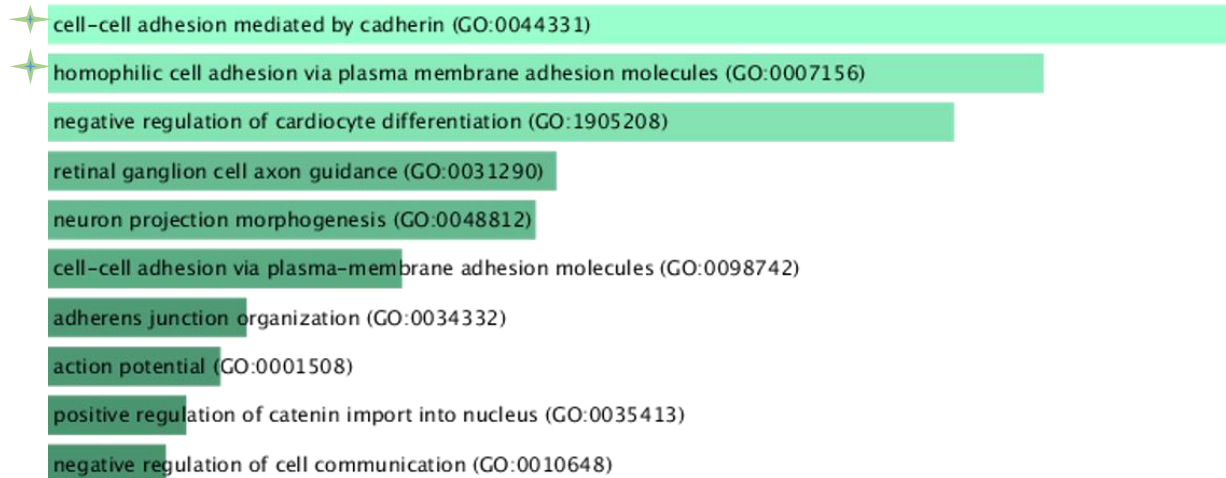
Εικόνα 46. (Πάνω αριστερά) Το 57,2% των συνολικών γονιδιακών στόχων των *Tead4* και *Ovnl1* είναι κοινό για τους δύο μεταγραφικούς παράγοντες. Συγκεκριμένα, από τους 5.133 στόχους του *Ovnl1* (4.235+898) οι 4.235, δηλαδή το 82,5%, είναι κοινοί με τους γονιδιακούς στόχους του *Tead4*. **(Κάτω αριστερά)** Το 53,9% των συνολικών στόχων του *Tead4* τις Ημέρες 0 και 6 είναι κοινό. Συγκεκριμένα, από τους 6.507 (3.932+2.575) στόχους του *Tead4* την Ημέρα 6, τα 3.932, δηλαδή το 60,4%, εμπεριέχονται στους στόχους της Ημέρας 0. **(Δεξιά)** Οι περισσότεροι κοινοί στόχοι των *Ovnl1* και *Tead4* την Ημέρα 6 του επαναπρογραμματισμού, είναι ήδη κατελημμένοι από τον *Tead4* πριν από την έναρξη της διαδικασίας (Ημέρα 0). Συγκεκριμένα, από τα 4.235 κοινά γονίδια-στόχους, τα 3.149, δηλαδή το 74,3% είναι στόχοι του *Tead4* ήδη από την Ημέρα 0.



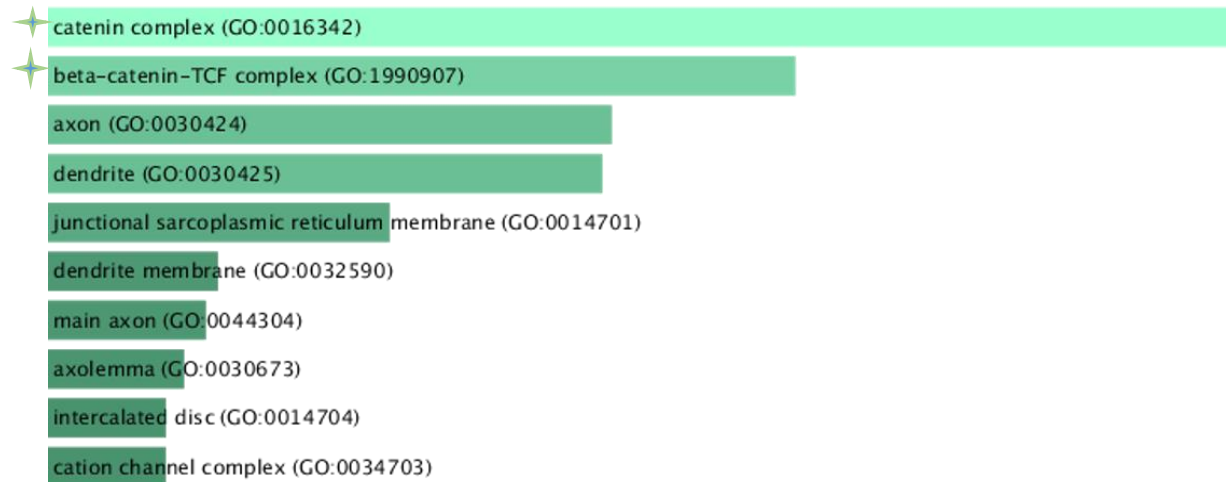
Εικόνα 47. (Αριστερά) Θερμικοί χάρτες των θέσεων πρόσδεσης (peaks) του Ovol1 τις Ημέρες 0 και 6 του επαναπρογραμματισμού. Η έκφραση του Ovol1 επάγεται τις πρώτες ημέρες του επαναπρογραμματισμού, γι' αυτό τα peaks του την Ημέρα 0 είναι μηδαμινά. **(Δεξιά)** Θερμικοί χάρτες των θέσεων πρόσδεσης των Ovol1 και Tead4 την Ημέρα 6 του επαναπρογραμματισμού. Η ομοιότητα των χαρτών αντικατοπτρίζει την επικάλυψη των θέσεων πρόσδεσης των δύο μεταγραφικών παραγόντων την Ημέρα 6.

GO common gene targets of Ovol1-Tead4, Day 6 of reprogramming

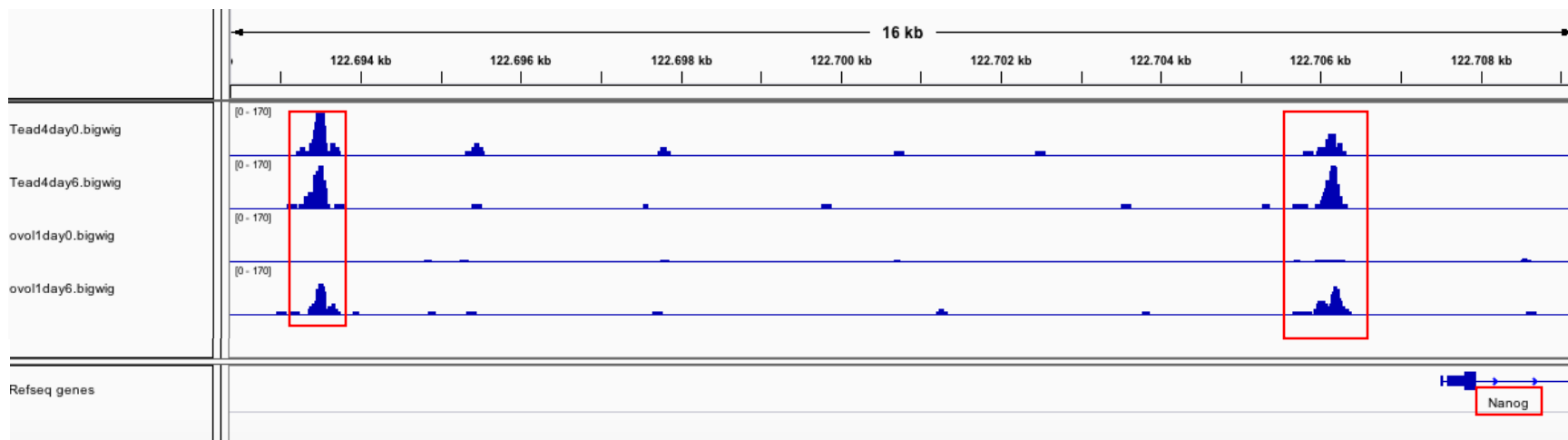
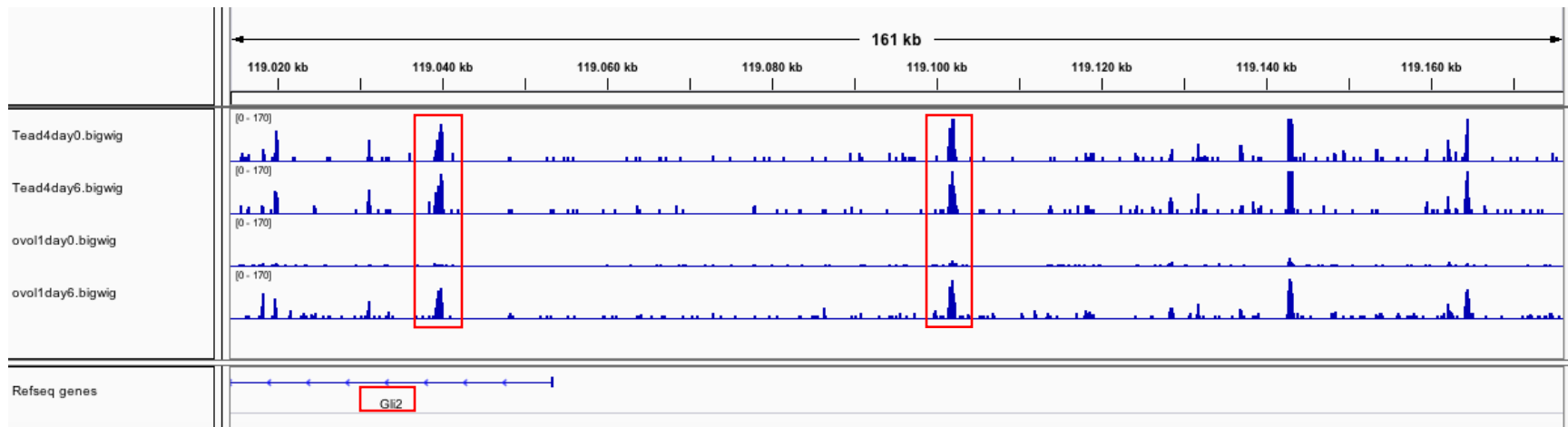
GO Biological Process



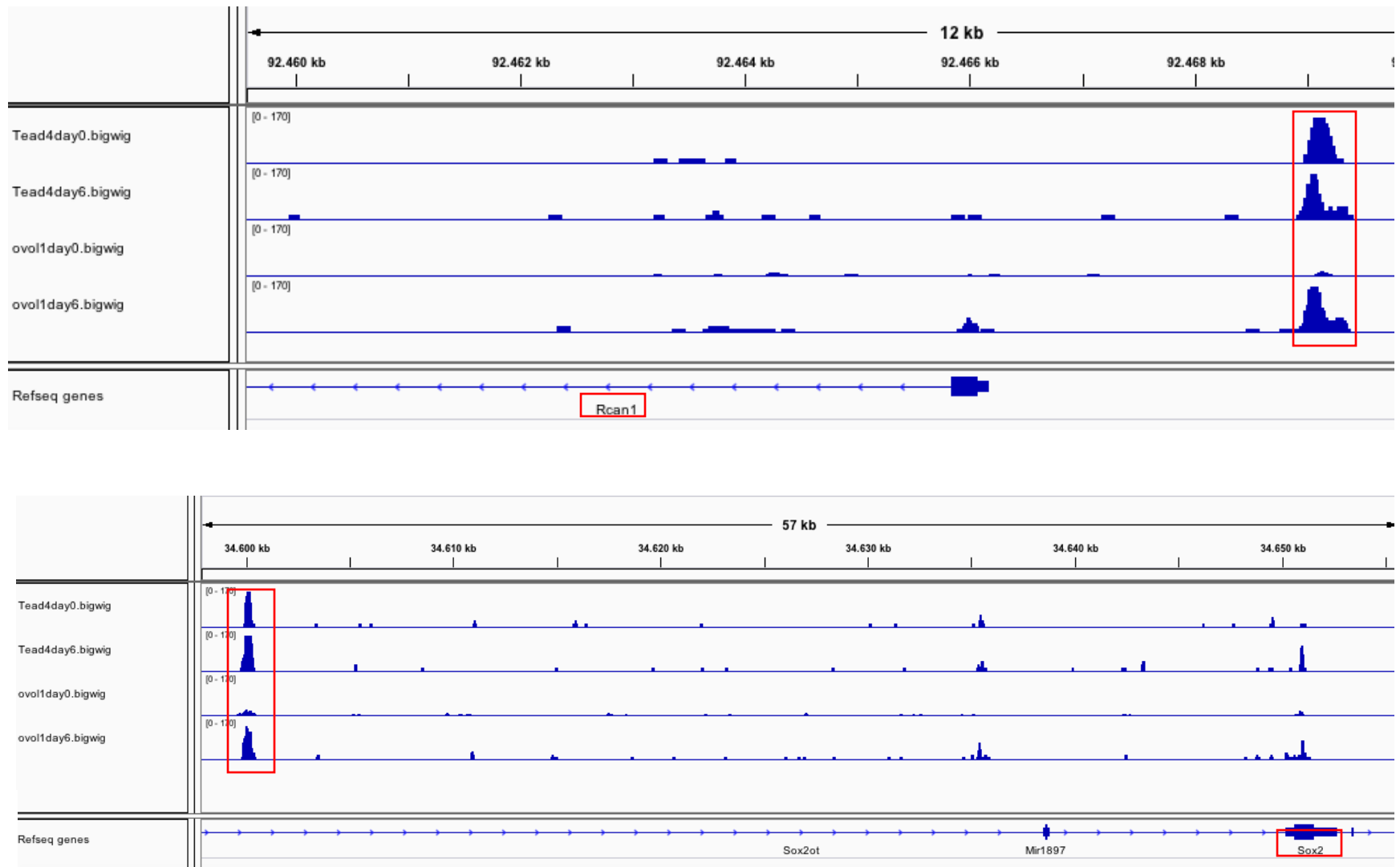
GO Cellular Component



Εικόνα 48. Οι κοινοί γονιδιακοί στόχοι των Ovol1-Tead4 την Ημέρα 6 του επαναπρογραμματισμού ρυθμίζουν διαδικασίες (πάνω, cell-cell adhesion mediated by cadherin) και την έκφραση μορίων (κάτω, catenin complex) που εμπλέκονται στην ανάπτυξη διακυτταρικών συνδέσεων.



Εικόνα 49. Παραδείγματα γονιδίων στα οποία προσδένονται από κοινού οι *Ovol1* και *Tead4*. **(Πάνω)** Το *Gli2* εμφανίζει θέσεις πρόσδεσης για τους δύο μεταγραφικούς παράγοντες τόσο εντός του γονιδίου όσο και στην εγγύς περιοχή. **(Κάτω)** Εμφανίζονται επίσης δύο *peaks* των *Ovol1* και *Tead4* δίπλα στο γονίδιο του *Nanog*. Και στα δύο γονίδια η πρόσδεση του *Ovol1* πραγματοποιείται την Ημέρα 6, ενώ ο *Tead4* είναι προσδεμένος σε αυτά ήδη από την Ημέρα 0.



Εικόνα 50. Παραδείγματα γονιδίων στα οποία προσδένονται από κοινού οι Ono1 και Tead4. **(Πάνω)** Ισχυρό *peak* των δύο μεταγραφικών παραγόντων πολύ κοντά στο γονίδιο του Rcan1. **(Κάτω)** Πρόσδεση και των δύο μεταγραφικών παραγόντων κοντά στο γονίδιο Sox2. Και στις δύο περιπτώσεις, ο Ono1 προσδένεται την Ημέρα 6 σε περιοχές που έχει ήδη προσδέσει ο Tead4 από την Ημέρα 0.

7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η εξωγενής υπερέκφραση των OSKM παραγόντων επάγει την ενεργοποίηση ενδογενών μεταγραφικών παραγόντων που αλλάζουν το πρότυπο της γονιδιακής έκφρασης της διαφοροποιημένης κατάστασης και οδηγούν τα κύτταρα στην πολυδυναμία. Παλαιότερη έρευνα στο εργαστήριο αποκάλυψε την ενεργοποίηση ενός δικτύου 9 μεταγραφικών παραγόντων από τους OSKM παράγοντες μέχρι την Ημέρα 6 της διαδικασίας. Το γεγονός πως η συγκρότηση του δικτύου αυτού την Ημέρα 6 του επαναπρογραμματισμού αυξάνει την πιθανότητα επιτυχούς ανάκτησης της πολυδυναμίας, καθιστά τη δράση του δικτύου ενδεχόμενη *προϋπόθεση* για την ολοκλήρωση της διαδικασίας. Η συγκρότηση του δικτύου αποτελεί στοχαστικό φαινόμενο, όπως και ο ίδιος ο κυτταρικός επαναπρογραμματισμός· έτσι, η διερεύνηση της ρύθμισης της ενεργοποίησής του δικτύου ενδέχεται να προσφέρει απαντήσεις σχετικά με την στοχαστικότητα της ίδιας της διαδικασίας.

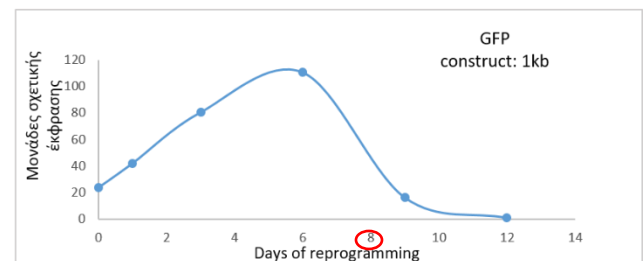
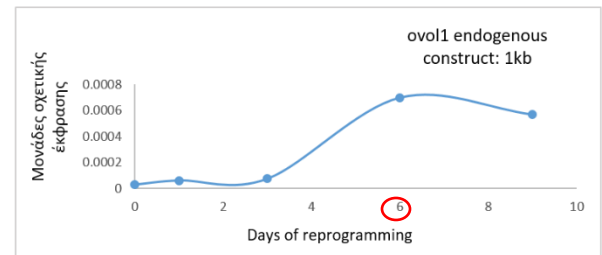
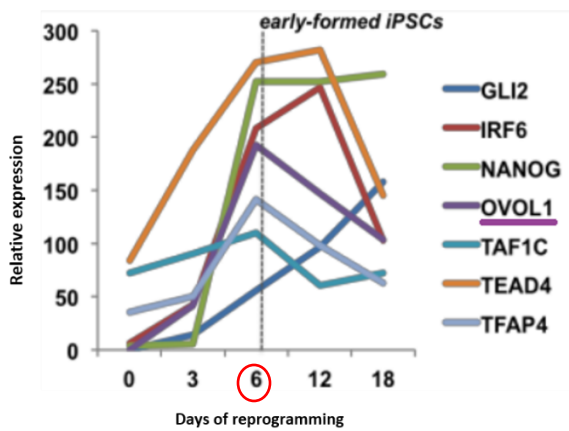
Από τους εννιά μεταγραφικούς παράγοντες, *Cbfa2t3*, *Gli2*, *Irf6*, *Ovol1*, *Rcan1*, *Taf1c*, *Tead4*, *Tfap4* και *Nanog*, στόχος της διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση της ρύθμισης του *Ovol1* καθώς και ο προσδιορισμός του ρόλου του ως μεταγραφικού παράγοντα στην πορεία του επαναπρογραμματισμού. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων συνοψίζονται σε τέσσερα βασικά συμπεράσματα.

- 1. Η έκφραση του *Ovol1* κατά τον επαναπρογραμματισμό ρυθμίζεται από έναν ενισχυτή που εδράζεται στην 1kb περιοχή ανοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου, ο οποίος ενεργοποιείται κατά τον επαναπρογραμματισμό ειδικά στα κύτταρα των pre-iPSC αποικιών***

Οι δοκιμασίες αναφοράς φανέρωσαν την ύπαρξη ενός ενισχυτή στην περιοχή 1kb ανοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής του *Ovol1*. Το σήμα ενεργότητας της περιοχής εντοπίστηκε από την 3^η Ημέρα του επαναπρογραμματισμού με μικρή ένταση κυρίως στα κύτταρα της καλλιέργειας που υφίσταντο MET. Μέχρι την 6^η Ημέρα η ένταση του σήματος είχε αυξηθεί και ο εντοπισμός είχε περιοριστεί ειδικά στα κύτταρα εκείνα που συμμετείχαν στις πρώιμες αποικίες iPSCs (**Εικόνα 30**). Το γεγονός πως πριν την επαγωγή του φαινομένου ο ενισχυτής δεν παρουσιάζει σήμα, υποδηλώνει πως η δράση του ενισχυτή είναι επαγόμενη από τα γεγονότα που λαμβάνουν χώρα τις πρώτες ώρες του επαναπρογραμματισμού. Μετά την 6^η Ημέρα το σήμα σταδιακά εξασθενεί. Επομένως, **ο ενισχυτής της 1kb περιοχής δρα επαγόμενα κατά τον επαναπρογραμματισμό, με αυξανόμενη ένταση από την Ημέρα 3**

μέχρι την Ημέρα 6 και ειδικά στα κύτταρα εκείνα που με μεγαλύτερη πιθανότητα θα ανακτήσουν την πολυδυναμία (pre-iPSC αποικίες).

Τα αποτελέσματα από τη σύγκριση της έκφρασης ενδογενούς και εξωγενούς γονιδίου προσδίδουν την απαραίτητη εγκυρότητα στις παρατηρήσεις της δοκιμασίας αναφοράς. Το πρότυπο της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς GFP ταυτίζεται με το αντίστοιχο του ενδογενούς *Ovol1* γονιδίου (**Εικόνα 30**), αποδεικνύοντας πως η έκφραση των δύο γονιδίων ρυθμίζεται από το ίδιο ρυθμιστικό στοιχείο, δηλαδή πως ο ενισχυτής της 1kb περιοχής ρυθμίζει όντως τον *Ovol1*. Μια σημαντική επιβεβαίωση της εγκυρότητας των αποτελεσμάτων μας αποτελεί επίσης το γεγονός πως το πρότυπο έκφρασης της GFP (και του *Ovol1*) ταυτίζεται και με το πρότυπο έκφρασης που βρέθηκε για τον *Ovol1* κατά τα πειράματα ανακάλυψης του δικτύου των 9 μεταγραφικών παραγόντων με χρήση μικροσυστοιχιών (**Εικόνα 52**).



Εικόνα 51. (Αριστερά) Τα πρότυπα έκφρασης των 9 μεταγραφικών παραγόντων κατά τον επαναπρογραμματισμό. Με μωβ η περίπτωση του *Ovol1* (από Parathanasiou et al, in press). **(Δεξιά)** Τα πρότυπα έκφρασης του ενδογενούς *Ovol1* γονιδίου και του γονιδίου αναφοράς GFP, από τις δοκιμασίες αναφοράς. Και τα τρία πρότυπα έκφρασης ταυτίζονται.

Ακόμη, ενδιαφέρον παρουσιάζει το ότι ενώ η 2kb περιοχή έχει κάποια ενεργότητα κατά τον επαναπρογραμματισμό (**Εικόνα 31**), η 3kb περιοχή εμφανίζεται εντελώς ανενεργή (**Εικόνα 32**). Αυτό ίσως αποτελεί ένδειξη για την ύπαρξη μιας *αλληλουχίας σιγητή* στην περιοχή μεταξύ των 2kb και 3kb κομματιών, κάτι που μένει να διερευνηθεί με περαιτέρω πειράματα.

Ο ενισχυτής της 1kb περιοχής φαίνεται πως αποτελείται από στοιχεία που εκτείνονται σε όλο το μήκος της περιοχής, καθώς ο κερματισμός της περιοχής καταλήγει στην απώλεια των ιδιοτήτων του ενισχυτή: οι υποπεριοχές της 1kb περιοχής δεν είναι

επαγώνιμες, καθώς παράγουν σήμα ήδη πριν από την επαγωγή του φαινομένου (Ημέρα 0), εμφανίζουν αμείωτη ενεργότητα καθόλη τη διάρκεια της διαδικασίας και δεν δρουν ειδικά στα κύτταρα που πρόκειται να ανακτήσουν την πολυδυναμία (**Εικόνες 35,36,37**). Παρατηρείται λοιπόν πλήρης *αποσυντονισμός της δράσης του ενισχυτή* μετά τον κερματισμό του σε μικρότερα κομμάτια.

Η ειδικότητα της δράσης του ενισχυτή σε κύτταρα με αυξημένη πιθανότητα να επαναπρογραμματιστούν επιτυχώς επαληθεύεται από τα αποτελέσματα του πειράματος FACS. Ο πληθυσμός των κυττάρων με ενεργή την 1kb περιοχή την Ημέρα 6 της διαδικασίας (GFP+) εμφάνισε 1,3% ποσοστό επαναπρογραμματισμού, ενώ ο πληθυσμός με ανενεργή την περιοχή 1kb την ημέρα αυτή (GFP-) εμφάνισε μόλις 0,9% (**Εικόνα 33**), δηλαδή η ενεργότητα του ενισχυτή την Ημέρα 6 αποτελεί δείκτη της αυξημένης κατά 40% πιθανότητας του κυττάρου να ανακτήσει την πολυδυναμία.

Το ποσοστό αυτό ενδέχεται στην πραγματικότητα να είναι ακόμη μεγαλύτερο, όπως υποδεικνύει η ανάλυση MOI των δύο πληθυσμών. Ο GFP- πληθυσμός έχει κατά μέσο όρο 7,5 φορές ενσωμάτωση του construct στο γονιδίωμα του, ενώ ο GFP+ πληθυσμός 12 (**Εικόνα 34**). Στην πράξη η παρουσία του construct ανιχνεύει την ενεργότητα του ενισχυτή και την καθιστά ορατή μέσω της έκφρασης της GFP. Η μειωμένη παρουσία του construct στα GFP- κύτταρα μειώνει την ευαισθησία της μεθόδου για ανίχνευση των κυττάρων με ενεργό ενισχυτή, με αποτέλεσμα στον GFP- πληθυσμό να συμπεριλήφθηκαν ενδεχομένως και κύτταρα με ενεργό ενισχυτή. Αυτό σημαίνει πως *η δράση του ενισχυτή την Ημέρα 6 αυξάνει τουλάχιστον κατά 40% την πιθανότητα το κύτταρο να ανακτήσει την πολυδυναμία*.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως το ποσοστό του επαναπρογραμματισμού παραμένει σχετικά χαμηλό στο τέλος αυτής της πειραματικής διαδικασίας, ενδεχομένως διότι εν μέσω της απαιτητικής διαδικασίας του επαναπρογραμματισμού τα κύτταρα διέρχονται από στρεσογόνες διαδικασίες, τόσο κατά την προετοιμασία όσο και κατά την ίδια τη διεξαγωγή του FACS. Αυτό μπορεί να μειώνει την ικανότητά τους να ανταποκριθούν σε ειδικές καλλιεργητικές συνθήκες.

Αποτελέσματα από τα ChIP-seq και RNA-seq πειράματα επιβεβαιώνουν τη λειτουργία της 1kb περιοχής ως ενισχυτή καθώς και την επαγόμενη κατά τον επαναπρογραμματισμό δράση του.

Μια αρχική σημαντική παρατήρηση των RNA-seq αποτελεσμάτων είναι πως ο *Ovo1* υπερεκφράζεται τόσο στα D6-GFP+, όσο και στα D6-GFP-, σε σχέση με τα MEFs (**Εικόνα 41**). Αυτό υποδεικνύει πως *ο Ovo1 εκφράζεται ως αποτέλεσμα των διαδικασιών του επαναπρογραμματισμού*, κάτι που έρχεται σε συμφωνία με τα αρχικά πειράματα ανακάλυψης του δικτύου, στα οποία ο *Ovo1* είναι ένας από τους πέντε *επαγόμενους* μεταγραφικούς παράγοντες³². Αυτή η βásiμη υπόθεση επιβεβαιώνεται από το ότι τα peaks του *Ovo1* στο ChIP-seq πείραμα την Ημέρα 0 είναι μηδαμικά (**Εικόνα 48**), επομένως η

παρατηρούμενη υπερέκφρασή του στα GFP+/- κύτταρα πρόκειται επί της ουσίας για έκφραση εκ του μηδενός.

Το γεγονός πως ο *Ono1* υπερεκφράζεται στα D6-GFP+ σε σχέση με τα D6-GFP- υποστηρίζει πως **η δράση του ενισχυτή της 1kb περιοχής** (βάσει της οποίας έγινε ο διαχωρισμός των δύο πληθυσμών) **εξασφαλίζει την αυξημένη έκφραση του γονιδίου**, δηλαδή πως έχει λειτουργία ενισχυτή, ενώ μια βασική έκφραση επιτυγχάνεται και στα κύτταρα με ανενεργό τον ενισχυτή (GFP-), εφόσον και σε αυτά τα κύτταρα υπερεκφράζεται σε σχέση με τα MEFs (**Εικόνα 41**). Η δράση του ενισχυτή με επαγόμενο τρόπο κατά τον επαναπρογραμματισμό συνάδει με την επαγόμενη έκφραση του *Ono1* κατά την διαδικασία, επιβεβαιώνοντας τη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου από την περιοχή αυτή.

II. Τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του Ono1 αυξάνουν την αποτελεσματικότητα του επαναπρογραμματισμού μέσω της αύξησης της αποτελεσματικότητας της MET, της αύξησης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της καταστολής της κυτταρικής διαφοροποίησης

Από τα αποτελέσματα του FACS πειράματος διαπιστώσαμε πως ο ενισχυτής της 1kb μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης των κυττάρων που έχουν αυξημένη πιθανότητα να επαναπρογραμματιστούν. Τα αποτελέσματα των RNA-seq πειραμάτων επιβεβαίωσαν πως η δράση του ενισχυτή προκαλεί την υπερέκφραση του *Ono1* (**Εικόνα 41**)· επομένως τα αυξημένα επίπεδα του *Ono1* αυξάνουν την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας.

Περαιτέρω αναλύσεις των RNA-seq αποτελεσμάτων συνδέουν τη δράση του *Ono1* με την θετική ρύθμιση της MET (κυρίως) και του ρυθμού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (δευτερευόντως) (**Εικόνα 41**). Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με το ότι μέρος των υπερεκφραζόμενων γονιδίων που ελέγχουν τη MET αποτελούν άμεσους στόχους του *Ono1* (**Εικόνα 44**), υποστηρίζει ότι **ο *Ono1* είναι άμεσος ρυθμιστής της MET και ότι η έκφρασή του σε αυξημένα επίπεδα (GFP+ κύτταρα) αυξάνει την αποτελεσματικότητα της διεξαγωγής της**. Αυτό υποστηρίζεται επίσης από το ότι στα GFP+ κύτταρα οι διαδικασίες που σχετίζονται με τη MET γίνονται με στατιστικά σημαντικότερο τρόπο από ότι στα GFP- κύτταρα (**Εικόνα 45**). Αντίθετα, από τα ChIP-seq πειράματα, οι γονιδιακοί στόχοι του *Ono1* δεν συσχετίστηκαν με την ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Παρόλαυτα, το 40,7% των γονιδίων που υπερρυθμίζονται στα GFP+ κύτταρα είναι κοινά με υπερρυθμιζόμενα στην πολυδύναμη κατάσταση (ESCs) γονίδια και σχετίζονται με την αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (**Εικόνα 42**). Από αυτά τα αποτελέσματα, συμπεραίνουμε πως **ο *Ono1* ευνοεί την έκφραση γονιδίων που αυξάνουν τον ρυθμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού χωρίς να ασκεί άμεσο έλεγχο σε αυτά** και συμβάλλει στη διαμόρφωση μια γονιδιακής υπογραφής (την Ημέρα 6) εγγύτερης με αυτή των ESCs.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο συσχετισμός του *Ovol1* με την καταστολή γονιδίων που ασκούν θετική ρύθμιση στην κυτταρική διαφοροποίηση. Τα κύτταρα και των δύο κυτταρικών πληθυσμών εμφανίζουν μια ομάδα downregulated DEGs που αποτελούν εν μέρει στόχους του *Ovol1* την Ημέρα 6. Αυτά τα κοινά γονίδια σχετίζονται με θετική ρύθμιση της κυτταρικής διαφοροποίησης. Η απώλεση της ιστοειδικής γονιδιακής υπογραφής των κυττάρων είναι το πρώτο βήμα για τον επαναπρογραμματισμό και συμβαίνει τις πρώτες μέρες της διαδικασίας, δηλαδή παράλληλα με τη δράση του *Ovol1*. Επιπλέον, η υπερέκφραση του *Ovol1* φαίνεται πως αυξάνει την αποτελεσματικότητα της καταστολής της κυτταρικής διαφοροποίησης (**Εικόνα 46**). Τα αποτελέσματα αυτά αποκαλύπτουν πως **ο *Ovol1* καταστέλλει άμεσα γονίδια που προωθούν την κυτταρική διαφοροποίηση**.

III. Η ανάκτηση της πολυδυναμίας προϋποθέτει την σίγηση του *Ovol1* γονιδίου

Αποτελέσματα από τα RNA-seq πειράματα υποστηρίζουν ότι η έκφραση του *Ovol1* γονιδίου πρέπει να κατασταλεί προκειμένου να ανακτηθεί η πολυδυναμία Παρατηρούμε πως όλα τα επαναπρογραμματιζόμενα κύτταρα υπερεκφράζουν τον *Ovol1* τις πρώτες ημέρες της διαδικασίας, ενώ κατά την επιτυχή ολοκλήρωση της διαδικασίας η έκφρασή του είναι κατεσταλμένη (**Εικόνα 40**). Το γεγονός αυτό συνάδει με το ότι ένα σύνολο υπερεκφραζόμενων γονιδίων στα GFP+ και GFP- κύτταρα (σε σχέση με τα MEFs), το οποίο εμπλέκεται στη θετική ρύθμιση της MET, καταστέλλεται κατά την πορεία των κυττάρων προς την iPS λειτουργία (**Εικόνα 40**). Φαίνεται επομένως πως ο *Ovol1* είναι απαραίτητος μόνο κατά τις πρώτες ημέρες του επαναπρογραμματισμού για την διεξαγωγή της MET (και της καταστολής της ιστοειδικής γονιδιακής έκφρασης όπως φάνηκε από το **II**), ενώ για την ανάκτηση της πολυδυναμίας απαιτείται η μετέπειτα καταστολή της έκφρασής του.

IV. Ο *Ovol1* προσδένεται στο DNA ως επί το πλείστον μέσω συνεργατικής πρόσδεσης με τον Tead4

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το εύρημα της συνεργατικής πρόσδεσης του *Ovol1* με τον Tead4. Από τις ChIP-seq αναλύσεις προκύπτει πως το 82,5% των γονιδιακών στόχων του *Ovol1* την 6^η Ημέρα του επαναπρογραμματισμού είναι κοινό με τους στόχους του Tead4 της ίδιας μέρας. Ακόμη πιο σημαντικό, είναι το ότι το 73,2% των κοινών στόχων *Ovol1*-Tead4 την Ημέρα 6, είναι ήδη κατειλημμένα από τον Tead4 πριν την επαγωγή της διαδικασίας (Ημέρα 0) (**Εικόνες 47, 48**). Από αυτό το αποτέλεσμα προκύπτουν δύο συμπεράσματα: πρώτον, ότι **ο *Ovol1* προσδένεται στην πλειονότητα των γονιδιακών του στόχων με συνεργατική πρόσδεση με τον Tead4**, και δεύτερον, πως **η πλειονότητα των στόχων του *Ovol1* κατά τον επαναπρογραμματισμό είναι ήδη κατειλημμένη από τον Tead4 πριν την επαγωγή του επαναπρογραμματισμού**. Ο Tead4 ανήκει στο δίκτυο των 9

μεταγραφικών παραγόντων που συγκροτείται από τους OSKM, όμως είναι *μη-επαγόμενος*, δηλαδή εκφράζεται και προσδένεται στο DNA των MEFs και εκτός επαναπρογραμματισμού, σε αντίθεση με τον Ovol1, η έκφραση του οποίου επάγεται από τη δράση των OSKM. Φυσιολογικά, ο Tead4 έχει βρεθεί πως παίζει ρόλο στη διαφοροποίηση του εκτοδέρματος κατά τον σχηματισμό της βλαστοκύστης²⁸. Επίσης, είναι θετικός ρυθμιστής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, και της μετάβασης από την επιθηλιακή στην μεσεγχυματική κατάσταση (EMT), μέσω συνεργασίας με την Yap πρωτεΐνη-ενεργοποιητή⁴⁴. Η οντολογική ανάλυση των κοινών γονιδιακών στόχων Tead4-Ovol1 παρόλαυτα, παρουσιάζει το σύνολο γονιδίων ως εμπλεκόμενο στην ανάπτυξη διακυτταρικών συνδέσεων, διαδικασία που αποτελεί συστατικό στοιχείο της MET, κάτι που συμφωνεί με την κεντρική λειτουργία που φαίνεται να έχει ο Ovol1 κατά τον επαναπρογραμματισμό από τα υπόλοιπα αποτελέσματα. Το καινοφανές στοιχείο αυτού του ευρήματος, είναι ότι οι θέσεις πρόσδεσης του Ovol1 είναι εν πολλοίς προκαθορισμένες και δεν εξαρτώνται από την τυχαία δράση των OSKM παραγόντων. Θα ήταν ενδιαφέρον να διερευνηθεί αν οι θέσεις στις όποιες είναι προσδεδεμένος ο Tead4 ανήκουν σε περιοχές προσβάσιμης χρωματίνης ή αν χρειάζεται η δράση των OSKM για να καταστούν μεταγραφικές ενεργές. Μια υπόθεση είναι ο Tead4 να αναγνωρίζεται από τους OSK στις θέσεις πρόσδεσής του, επάγοντας αναδιαμόρφωση της χρωματίνης σε πιο προσβάσιμη μορφή ώστε να μπορέσει να προσδεθεί και να δράσει ο Ovol1. Η συνεργατικότητα Tead4-Ovol1 καθώς και η αλληλεπίδρασή τους με τους OSKM τις πρώτες ημέρες του επαναπρογραμματισμού χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.

Συμπερασματικά, η παρούσα διπλωματική εργασία διασαφηνίζει πτυχές της ρύθμισης της έκφρασης και της δράσης του Ovol1 κατά τον επαναπρογραμματισμό, καθώς και τον ρόλο του ως μεταγραφικό παράγοντα στη διαδικασία.

Τα αποτελέσματα υποστηρίζουν την ύπαρξη ενός ενισχυτή του Ovol1 στην 1kb περιοχή ανοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου. Ο ενισχυτής της 1kb περιοχής ενεργοποιείται ασθενώς από την έναρξη του επαναπρογραμματισμού και σταδιακά η ενεργότητά του αυξάνεται για να κορυφωθεί την Ημέρα 6. Η δράση του είναι εντοπισμένη στα κύτταρα εκείνα που έχουν αυξημένη πιθανότητα να ολοκληρώσουν επιτυχώς τη διαδικασία- την 6^η Ημέρα ενεργοποιείται ειδικά στα κύτταρα των pre-iPSC αποικιών. Η δράση του ενισχυτή έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση του Ovol1. Ο Ovol1 είναι βασικός ρυθμιστής της μετάβασης από την μεσεγχυματική στην επιθηλιακή κατάσταση (MET) και η υπερέκφρασή του οδηγεί σε αποτελεσματικότερη διεξαγωγή της διαδικασίας αυτής στα επί επαναπρογραμματισμό κύτταρα. Η δράση ευνοεί επίσης την αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων, ενώ παράλληλα καταστέλλει την έκφραση γονιδίων που ρυθμίζουν θετικά την κυτταρική διαφοροποίηση. Η MET είναι απαραίτητο στάδιο στην πορεία των επαναπρογραμματιζόμενων κυττάρων προς την

πολυδυναμία, όπως και η καταστολή της ιστοειδικής γονιδιακής έκφρασης, και η αποτελεσματικότητά της κρίνει την πιθανότητα του επιτυχούς επαναπρογραμματισμού. Αυτό εξηγεί γιατί η δράση του ενισχυτή της 1kb περιοχής εντοπίζεται στα κύτταρα που έχουν αυξημένη πιθανότητα να επαναπρογραμματιστούν (κύτταρα των pre-iPSC αποικιών)-δηλαδή η δράση του ενισχυτή αυξάνει την πιθανότητα των κυττάρων να επαναπρογραμματιστούν. Αυτό καθιστά τον ενισχυτή δείκτη των κυττάρων εκείνων που έχουν αυξημένη πιθανότητα να ανακτήσουν την πολυδυναμία. Ο Ovol1 ασκεί τη δράση του τις πρώτες 6 ημέρες του επαναπρογραμματισμού. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων, οι γονιδιακοί στόχοι του είναι ήδη «μαρκαρισμένοι» από την πρόσδεση του Tead4 σε αυτούς πριν από την επαγωγή της διαδικασίας και πιθανολογούμε πως ο Ovol1 προσδένεται σε αυτούς μέσω συνεργατικής πρόσδεσης με τον Tead4. Η έκφραση του Ovol1 μειώνεται μετά την 6^η Ημέρα της διαδικασίας, κάτι που φαίνεται πως αποτελεί προϋπόθεση για την επιτυχή ανάκτηση της πολυδυναμίας.

Προτεινόμενα Πειράματα:

Η παρούσα εργασία πυροδοτεί νέες απορίες και μια σειρά νέων πειραμάτων για την επιβεβαίωση ή/και την εμβάθυνση των αποτελεσμάτων της. Αρχικά, θα πρέπει να πραγματοποιηθεί ένα πείραμα νέας γενιάς αλληλούχησης μετά από ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (ChIP-seq) έναντι του Ovol1, σε κύτταρα την Ημέρα 6 του επαναπρογραμματισμού, τα οποία θα έχουν υποστεί καταστολή της έκφρασης του Tead4 (knockdown) ήδη από την Ημέρα 0. Αναμένεται τα peaks του Ovol1 να είναι πολύ λιγότερα από αυτά που βρέθηκαν στη παρούσα εργασία (χωρίς knockdown του Tead4), λόγω συνεργατικής πρόσδεσης των δύο παραγόντων στο DNA.

Επίσης, θα ήταν σημαντικό να πραγματοποιηθεί ένα ακόμη ChIP-seq πείραμα σε χρονικές στιγμές μετά την Ημέρα 6 του επαναπρογραμματισμού, σε κύτταρα που θα υφίστανται εξωγενή υπερέκφραση του Ovol1, ώστε να διερευνηθεί η κατασταλτική δράση που φαίνεται να έχει ο Ovol1 στη διαδικασία μετά την Ημέρα 6.

Ακόμη, ενδιαφέρον θα είχε η διερεύνηση της επίδρασης των ποσοτικών αλλαγών στην έκφραση του Ovol1 τις πρώτες ημέρες του επαναπρογραμματισμού μέχρι την Ημέρα 6, καθώς φαίνεται πως η υπερέκφραση του Ovol1 την Ημέρα 6 αυξάνει την πιθανότητα για ανάκτηση της πολυδυναμίας. Ένα εύστοχο πείραμα, θα ήταν η εκτίμηση της αποτελεσματικότητας του επαναπρογραμματισμού σε κύτταρα που υπερεκφράζουν σε διαφορετικό βαθμό τον Ovol1 τις πρώτες ημέρες της διαδικασίας.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Watson, J. *et al.* *Μοριακή Βιολογία του Γονιδίου (Molecular Biology of the Gene)*. (Utopia, 2011).
2. Verdone, L., Caserta, M. & Di Mauro, E. Role of histone acetylation in the control of gene expression. *Biochem Cell Biol* **83**, 344–353 (2005).
3. C, M. & Y., Z. The diverse functions of histone lysine methylation. *Trends Cell Biol* **6**, 838–849. (2005).
4. Magklara, A. & Lomvardas, S. Epigenetics and Human Disease BT - Gene Regulatory Sequences and Human Disease. in (ed. Ahituv, N.) 253–279 (Springer New York, 2012). doi:10.1007/978-1-4614-1683-8_12
5. Slack, J. M. W. *Βασικές αρχές ανάπτυξης (Essential developmental biology)*. (Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε., 2007).
6. Takahashi, K. & Yamanaka, S. A developmental framework for induced pluripotency. *Dev.* **142**, 3274–3285 (2015).
7. Park, S.-H. *et al.* Ultrastructure of Human Embryonic Stem Cells and Spontaneous and Retinoic Acid-Induced Differentiating Cells. *Ultrastruct. Pathol.* **28**, 229–238 (2004).
8. Meshorer, E. *et al.* Hyperdynamic Plasticity of Chromatin Proteins in Pluripotent Embryonic Stem Cells. *Dev. Cell* **10**, 105–116 (2006).
9. Azuara, V. *et al.* Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat. Cell Biol.* **8**, 532–538 (2006).
10. Zhang, R. *et al.* In vivo cardiac reprogramming contributes to zebrafish heart regeneration. *Nature* **498**, 497 (2013).
11. Brockes, J. P. & Kumar, A. Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 566–574 (2002).
12. Gurdon, J. B. © 1958 Nature Publishing Group. *Sep. Isol. fractions Rabbit gamma-globulin Contain. Antib. Antigen. Comb. sites* **182**, 670–671 (1958).
13. Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N. & Tada, T. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr. Biol.* **11**, 1553–1558 (2001).
14. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
15. Tokuzawa, Y. *et al.* Fbx15 Is a Novel Target of Oct3/4 but Is Dispensable for Embryonic Stem Cell Self-Renewal and Mouse Development. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 2699 LP – 2708 (2003).
16. Yu, J. *et al.* Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science (80-.)*. **318**, 1917 LP – 1920 (2007).
17. Buganim, Y. *et al.* The developmental potential of iPSCs is greatly influenced by reprogramming factor selection. *Cell Stem Cell* **15**, 295–309 (2014).
18. Anokye-Danso, F. *et al.* Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* **8**, 376–388 (2011).
19. Hou, P. *et al.* Pluripotent Stem Cells Induced from Mouse Somatic Cells by Small-Molecule Compounds. *Science (80-.)*. **341**, 651 LP – 654 (2013).
20. Zanto, T. P., Hennigan, K., Östberg, M., Clapp, W. C. & Gazzaley, A. NIH Public Access.

- 46**, 564–574 (2011).
21. Yamanaka, S. Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation. *Nature* **460**, 49–52 (2009).
 22. Huangfu, D. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1269–1275 (2008).
 23. Hansson, J. *et al.* Highly Coordinated Proteome Dynamics during Reprogramming of Somatic Cells to Pluripotency. *Cell Rep.* **2**, 1579–1592 (2012).
 24. Yosef Buganim, Dina A. Faddah, R. J. Mechanisms and models of somatic cell reprogramming. *Nat Rev Genet* **14**, 427–439 (2013).
 25. Li, R. *et al.* A mesenchymal-to-Epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* **7**, 51–63 (2010).
 26. Samavarchi-Tehrani, P. *et al.* Functional genomics reveals a BMP-Driven mesenchymal-to-Epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell* **7**, 64–77 (2010).
 27. Stadtfeld, M., Maherali, N., Breault, D. T. & Hochedlinger, K. Defining Molecular Cornerstones during Fibroblast to iPS Cell Reprogramming in Mouse. *Cell Stem Cell* **2**, 230–240 (2008).
 28. Yagi, R. *et al.* Transcription factor TEAD4 specifies the trophectoderm lineage at the beginning of mammalian development. *Development* **134**, 3827–3836 (2007).
 29. Brambrink, T. *et al.* Sequential Expression of Pluripotency Markers during Direct Reprogramming of Mouse Somatic Cells. *Cell Stem Cell* **2**, 151–159 (2008).
 30. Buganim, Y. *et al.* Single-cell expression analyses during cellular reprogramming reveal an early stochastic and a late hierarchic phase. *Cell* **150**, 1209–1222 (2012).
 31. Hussein, S. M. I. *et al.* Genome-wide characterization of the routes to pluripotency. *Nature* **516**, 198 (2014).
 32. Papathanasiou, M. *et al.* Stochastic assembly of a transcriptional regulatory network is required for cellular reprogramming. In press
 33. No Title. Available at: <https://www.uniprot.org/uniprot/?query=Ovol1&sort=score>.
 34. Dai, X. *et al.* The ovo gene required for cuticle formation and oogenesis in flies is involved in hair formation and spermatogenesis in mice. *Genes Dev.* **12**, 3452–3463 (1998).
 35. Roca, H. *et al.* Transcription Factors OVOL1 and OVOL2 Induce the Mesenchymal to Epithelial Transition in Human Cancer. *PLoS One* **8**, e76773 (2013).
 36. Carey, B. W., Markoulaki, S., Beard, C. & Hanna, J. NIH Public Access. **7**, 56–59 (2011).
 37. T. Das, A., Tenenbaum, L. & Berkhout, B. Tet-On Systems For Doxycycline-inducible Gene Expression. *Curr. Gene Ther.* **16**, 156–167 (2016).
 38. No Title. Available at: <http://www.worthington-biochem.com/TRY/>.
 39. Pegg, D. E. *Principles of Cryopreservation. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Methods in Molecular Biology™* (Humana Press, 2007). doi:https://doi.org/10.1007/978-1-59745-362-2_3
 40. No Title. Available at: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-3216.aspx?geo_country=gr#characteristics.
 41. No Title. Available at: <https://www.addgene.org/viral-vectors/lentivirus/lenti-guide/>.
 42. Robinson, D. A. *et al.* A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary

mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat. Genet.* **33**, 401–406 (2003).

43. No Title. Available at:
<https://www.uniprot.org/uniprot/?query=tead+mouse&sort=score>.
44. Chen, L. *et al.* Structural basis of YAP recognition by TEAD4 in the Hippo pathway. *Genes Dev.* **24**, 290–300 (2010).