



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΙΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ
ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ
ΜΕΣΩ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΜΑΡΙΑΝΝΑ ΚΟΥΤΣΗ
ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΒΙΟΛΟΓΟΣ - ΓΕΝΕΤΙΣΤΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2020



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΙΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ
ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ ΜΕΣΩ
ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΜΑΡΙΑΝΝΑ ΚΟΥΤΣΗ
ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΒΙΟΛΟΓΟΣ - ΓΕΝΕΤΙΣΤΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2020



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΚΑΙ

ΙΔΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ

ΚΕΝΤΡΟ ΒΑΣΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΙΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ
ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ ΜΕΣΣΩ
ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΜΑΡΙΑΝΝΑ ΚΟΥΤΣΗ

ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΒΙΟΛΟΓΟΣ - ΓΕΝΕΤΙΣΤΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΜΕΛΟΣ ΔΕΠ: Ανδρέας Σκορίλας, Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΘΟΔΗΓΗΣΗ: Μάριος Αγγελόπουλος, Ερευνητής Δ', Κέντρο Βασικής Έρευνας, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Ανδρέας Σκορίλας, Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Απόστολος Κλινάκης, Ερευνητής Α', Κέντρο Βασικής Έρευνας, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών
- Μαργαρίτης Αυγέρης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΑΘΗΝΑ 2020

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία με τίτλο «Μελέτη των Επαγόμενων από Ιό Προγραμμάτων Γονιδιακής Έκφρασης σε Κύτταρα Θηλαστικών μέσω Γονιδιωματικής Τεχνολογίας» εκπονήθηκε στο εργαστήριο του Δρ. Μάριου Αγγελόπουλου, στο Κέντρο Βασικής Έρευνας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α).

Πριν την παρουσίαση της διπλωματικής μου εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που γνώρισα, συνεργάστηκα μαζί τους και είχαν πολύ σημαντικό ρόλο στην πραγματοποίησή της.

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή Ανδρέα Σκορίλα, Διευθυντή του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Κλινική Βιοχημεία-Μοριακή Διαγνωστική», του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, ο οποίος μου έδωσε τη δυνατότητα να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα και συντέλεσε ώστε να πραγματοποιήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο του Δρ. Μάριου Αγγελόπουλου. Ακόμη, τον ευχαριστώ καθώς ήταν πάντα διαθέσιμος να παρέχει κάθε βοήθεια που του ζητήθηκε, ενθάρρυνε την προσπάθειά μου και μου έδωσε χρήσιμες συμβουλές για τη βελτιστοποίηση της παρούσας εργασίας.

Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω τον Δρ. Μάριο Αγγελόπουλο, Ερευνητή Δ' του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, ο οποίος μου έδωσε τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω τη διπλωματική εργασία μου ως μέλος της ερευνητικής του ομάδας. Η εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την πρώτη στιγμή που βρέθηκα στο εργαστήριό του, η πολύτιμη καθοδήγησή του και οι παραγωγικές υποδείξεις του κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων, αποτέλεσαν καθοριστικούς παράγοντες για την επιτυχή ολοκλήρωση της εργασίας μου. Τον ευχαριστώ για την επιστημονική, πνευματική και ηθική υποστήριξη που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Είμαι ευγνώμων, καθώς μου έδωσε όλα τα απαραίτητα εφόδια για μια σωστή και συγκροτημένη επιστημονική σκέψη που θα με βοηθήσουν στη μελλοντική επαγγελματική μου πορεία.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Ιωάννη Σεραφειμίδα, Ερευνητή Γ' του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, με τον οποίο συνεργάστηκα σε όλη την πορεία της διπλωματικής εργασίας μου. Οι καλοπροαίρετες παρατήσεις και οι

συμβουλές του αποτέλεσαν πολύτιμα εργαλεία για την οργάνωση και την διεκπεραίωση των πειραμάτων της εργασίας μου.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Απόστολο Κλινάκη, Ερευνητή Α' του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, ο οποίος παρακολούθησε την πορεία μου και με καίριες παρατηρήσεις και υποδείξεις υποστήριξε την προσπάθεια μου. Θα ήθελα ακόμη να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον κύριο Μαργαρίτη Αυγέρη, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Ιατρικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, που δέχτηκε να είναι μέλος της τριμελούς επιτροπής μου καθώς και για τη συνεργασία μας στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος «Κλινική Βιοχημεία-Μοριακή Διαγνωστική».

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο Διδάκτορα Σπύρο Φουταδάκη, για τις γνώσεις και τις συμβουλές που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας μου. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου, τα οποία αποτέλεσαν πολύτιμους συνεργάτες και φίλους, για τη βοήθεια τόσο σε πειραματικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο, κατά το χρονικό διάστημα που βρισκόμουν στο εργαστήριο.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θέλω να απευθύνω στον Ακαδημαϊκό, Αντιπρόεδρο του Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α, και Πρόεδρο του Επιστημονικού Συμβουλίου του Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α, Δημήτριο Θάνο, Διευθυντή του Κέντρου Βασικής Έρευνας, ο οποίος μου έδωσε την δυνατότητα να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία στο Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Απόστολο και Λαμπρινή, καθώς και τη μεγάλη μου αδερφή Σταματίνα, οι οποίοι στέκονται πάντα δίπλα μου και με κάθε τρόπο με στηρίζουν και με εμψυχώνουν, αποτελώντας το αγχολυτικό μου σε όλη την διάρκεια αυτής της προσπάθειας.

Σας ευχαριστώ όλους θερμά,

Μαριάννα

Αθήνα 2020

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή	1
Κεφάλαιο 1. Τρισδιάστατη δομή της χρωματίνης και ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης	3
1.1. Επίπεδα οργάνωσης του ευκαρυωτικού γενετικού υλικού	3
1.2. Η αρχιτεκτονική της χρωματίνης στις ρυθμιστικές περιοχές του γονιδιώματος διαμορφώνει το πρόγραμμα γονιδιακής έκφρασης	6
Κεφάλαιο 2. Μεταγραφή και μηχανισμοί ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης	9
Κεφάλαιο 3. Ίικη μόλυνση και επαγόμενη γονιδιακή έκφραση	15
Κεφάλαιο 4. Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1	23
4.1. Γενετική Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1	24
4.2. Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1 και ιϊκή μόλυνση	26
4.3. Συμπτωματολογία και επιπλοκές Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1	34
4.4. Διάγνωση Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1	35
Κεφάλαιο 5. Η ανάπτυξη της αλληλούχησης ευρείας κλίμακας νέας γενιάς και η εγκαθίδρυση της γονιδιωματικής μελέτης ως βασικό εργαλείο στη βιοϊατρική έρευνα	37
5.1. Αλληλούχηση ευρείας κλίμακας νέας γενιάς (Next Generation Sequencing) ...	37
5.2. Γονιδιωματική τεχνολογία (<i>genomics</i>) και στρατηγικές εφαρμογές στη μελέτη μοριακών μηχανισμών που διέπουν τις ανθρώπινες ασθένειες	38
2. Σκοπός διπλωματικής εργασίας	43
3. Πειραματικό μέρος – Υλικά και μέθοδοι	45
3.1. Κυτταροκαλλιέργεια	45
3.1.1. Κυτταρική σειρά Beta-TC-6	46
3.1.2. Παρασκευή υγρού θρεπτικού μέσου	48
3.1.3. Ξεπάγωμα κυττάρων	49
3.1.4. Πάγωμα κυττάρων	50
3.1.5. Ανακαλλιέργεια κυττάρων – Ανάπτυξη καλλιέργειας σε μεγάλη κλίμακα. ...	52
3.2. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης	52
3.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	55
3.3.1. Συστατικά της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης	57
3.3.2. PCR με Taq DNA πολυμεράση	60
3.3.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR)	61

3.4. Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP) ..	63
3.4.1. Απομόνωση χρωματίνης	65
3.4.2. Κατακερματισμός χρωματίνης με τη χρήση υπερήχων.....	68
3.4.3. Πέψη δείγματος χρωματίνης με πρωτεΐνάση K	71
3.4.4. Καθαρισμός DNA με αντίδραση φαινόλης-χλωροφορμίου και κατακρήμνιση με αιθανόλη	72
3.4.5. Καθαρισμός DNA SPRI μαγνητικά σφαιρίδια	75
3.4.6. Ανοσοκατακρήμνιση	76
3.5. Δημιουργία γενωμικής βιβλιοθήκης για αλληλούχηση (High-Complexity Library).....	83
3.5.1. Απομόνωση DNA από πήκτωμα αгарόζης	90
3.6. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων	92
3.7. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια μικρής έκτασης (Mini-Prep)	94
3.8. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια μεγάλης έκτασης (Midi-Prep)	97
3.9. Απομόνωση RNA	98
3.9.1. Πέψη με DNase I	100
3.9.2. Καθαρισμός RNA με RNeasy Mini Kit	101
3.9.3. Σύνθεση cDNA και RT-PCR.....	102
3.10. Μέθοδος προσδιορισμού χρωματινικών θέσεων υπερευαισθησίας στη DNase I (DNase I Hypersensitive Sites)	103
3.11. Self-Transcribing Active Regulatory Region Sequencing (STARR-seq).....	106
3.11.1. Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με τη χρήση λιποφεκταμίνης	108
3.11.2. Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση (Transfection by electroporation)	109
3.12. Ανάλυση αποτελεσμάτων αλληλούχησης.....	110
3.12.1. Βιοπληροφορική ανάλυση πειραμάτων ChIP-seq και DNaseI-seq	110
3.12.2. Βιοπληροφορική ανάλυση πειραμάτων RNA-seq	111
3.13. Ανάλυση αποτελεσμάτων Real Time PCR	112
3.13.1. Ποσοστό εμπλουτισμού δείγματος σε πειράματα ChIP	112
3.13.2. Fold Enrichment.....	112
4. Αποτελέσματα	114

4.1. Ανάλυση μεταγραφομικής των Beta-TC-6 κυττάρων κατά την εξέλιξη ιϊκής μόλυνσης και μελέτη του προτύπου επαγωγής της γονιδιακής έκφρασης με τη μέθοδο RNA-seq.....	114
4.2. Μελέτη της προσβασιμότητας των χρωματινικών περιοχών του γονιδιώματος των Beta-TC-6 κυττάρων με τη μέθοδο DNase I Hypersensitivity και βαθιά αλληλούχηση (DNaseI-seq)	137
4.3. Μελέτη της παρουσίας της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac στο γονιδίωμα των Beta-TC-6 κυττάρων μέσω πειράματος ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης με αντίσωμα έναντι της H3K27ac και βαθιά αλληλούχηση (H3K27ac-ChIP-seq)	151
4.4. Μελέτη της πρόσδεσης του ενζύμου RNA Polymerase II στο γονιδίωμα των Beta-TC-6 κυττάρων μέσω πειράματος ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης με αντίσωμα έναντι της RNA Polymerase II και βαθιά αλληλούχηση (RNAPolII-ChIP-seq).....	166
4.5. Μελέτη της πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα IRF3 στο γονιδίωμα των Beta-TC-6 κυττάρων μέσω πειράματος ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης με αντίσωμα έναντι του IRF3 και βαθιά αλληλούχηση (IRF3-ChIP-seq).....	179
4.6. Σχεδιασμός συνθετικών αλληλουχιών DNA και πειραματικής μεθοδολογίας για τον λειτουργικό χαρακτηρισμό και τον έλεγχο της ενεργότητάς τους με τη μέθοδο STARR-seq	197
5. Συζήτηση	209
6. Βιβλιογραφία.....	218
Περίληψη.....	231
Abstract	233
Παράρτημα.....	235

1. Εισαγωγή

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 1 [ΣΔΤ1, Type 1 Diabetes Mellitus (T1DM)] έχει χαρακτηριστεί ως μία από τις πλέον επιβλαβείς αυτοάνοσες νόσους του παγκρέατος. Η νόσος αυτή πλήττει εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως, ξεκινώντας νωρίς κατά την παιδική ηλικία και υποβάλλει τους ασθενείς σε εφόρου ζωής λήψη φαρμακευτικών σκευασμάτων ινσουλίνης και ιατρική παρακολούθηση. Ωστόσο, η ακριβής κατανόηση των υποκείμενων μοριακών μηχανισμών παραμένει άγνωστη. Παρόλο που ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1 προσεγγίστηκε/μελετήθηκε κυρίως ως αυτοάνοσο φαινόμενο, το οποίο διέπεται κυρίως από τη γενετική προδιάθεση, δηλαδή τα χαρακτηριστικά του γονιδιώματος των ασθενών, η διαρκής αυξανόμενη συχνότητα εμφάνισης της νόσου σε νεαρή ηλικία, προωθεί την έρευνα στην κατανόηση του ρόλου των περιβαλλοντικών παραγόντων στην έναρξη και τη διατήρηση της νόσου [1]. Συνεπώς, η τρέχουσα τάση στην έρευνα για τον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 βασίζεται στην επιστημονική υπόθεση ότι η γενετική προδιάθεση αλληλεπιδρά με περιβαλλοντικά ερεθίσματα (π.χ. διατροφή, μικροοργανισμοί), οδηγώντας στην αυτοανοσία και την επακόλουθη καταστροφή των β παγκρεατικών κυττάρων. Ένα από τα κύρια περιβαλλοντικά ερεθίσματα, που έχουν εμπλακεί στην εμφάνιση της ασθένειας, είναι η ιϊκή μόλυνση, η οποία σε συνδυασμό με τη γενετική προδιάθεση, οδηγεί στην ανάπτυξη του αυτοάνοσου φαινομένου. Προκειμένου να γίνει κατανοητή η μοριακή βάση της ασθένειας είναι αναγκαία η εις βάθος μελέτη των μοριακών γεγονότων που λαμβάνουν χώρα σε ολόκληρο το γονιδίωμα των β παγκρεατικών κυττάρων (genome-wide studies).

Οι ιϊκές μολύνσεις έχουν ταξινομηθεί στις κορυφαίες θέσεις της κατάταξης μολυσματικών φαινομένων, οι οποίες προκαλούν διαρκές αρνητικό αντίκτυπο στην ανθρώπινη υγεία και σε ορισμένες περιπτώσεις είναι υπεύθυνες για την ανάπτυξη τόσο χρόνιων ανθρώπινων ασθενειών, όσο και παγκόσμιων κυμάτων νοσηρότητας, θνησιμότητας, τα οποία δύναται να οδηγήσουν στην εξάπλωση πανδημιών. Η αδυναμία του οργανισμού του ξενιστή να καταπολεμήσει τον ιό, οδηγεί στην απορρύθμιση των προγραμματών γονιδιακής έκφρασης και σε δυσλειτουργίες, οι οποίες επηρεάζουν την ομοιοστάση του οργανισμού. Είναι γνωστό ότι οι ιοί προάγουν τον μεταγραφικό επαναπρογραμματισμό των μολυσμένων κυττάρων του ξενιστή, ενεργοποιώντας διαφορετικές ρυθμιστικές αλληλουχίες του γονιδιώματος, οι οποίες στη συνέχεια προκαλούν τη δημιουργία νέων προγραμμάτων έκφρασης αντι-ιϊκών γονιδίων. Τα γεγονότα

αυτά οδηγούν στην ανάπτυξη σοβαρών παθογόνων ασθενειών λόγω των ιών, όπως το άσθμα [2], το AIDS, η ηπατίτιδα Β και C [3], η γρίπη [4], ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1 [1] και το πρόσφατο COVID-19 [5]. Το πρόσφατο παράδειγμα της πανδημίας COVID-19, μέσω της εξάπλωσης του ιού SARS-CoV-2 υπογραμμίζει emphatically τις επιβλαβείς επιδράσεις των ιών στην ανθρώπινη υγεία και στην παγκόσμια κοινωνία. Η αδυναμία του οργανισμού του ξενιστή να καταπολεμήσει τον ιό, οδηγεί στην απορρύθμιση των προγραμμάτων γονιδιακής έκφρασης και σε δυσλειτουργίες, οι οποίες επηρεάζουν την ομοιόσταση του οργανισμού. Είναι γνωστό ότι οι ιοί προάγουν τον μεταγραφικό επαναπρογραμματισμό των μολυσμένων κυττάρων του ξενιστή, ενεργοποιώντας διαφορετικές ρυθμιστικές αλληλουχίες του γονιδιώματος, οι οποίες στη συνέχεια προκαλούν τη δημιουργία νέων προγραμμάτων έκφρασης αντι-ϊικών γονιδίων. Τα γεγονότα αυτά οδηγούν στην ανάπτυξη σοβαρών παθογόνων ασθενειών λόγω των ιών, όπως το άσθμα, το AIDS, η ηπατίτιδα, η γρίπη, ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1 και το πρόσφατο COVID-19. Το νέο εύρημα ότι ένα μεγάλο ποσοστό γενετικών πολυμορφισμών, που σχετίζονται με ασθένειες, χαρτογραφείται σε μη κωδικές περιοχές του γονιδιώματος, δηλαδή ρυθμιστικά στοιχεία (π.χ. ενισχυτές), ενισχύει τον κρίσιμο ρόλο του ρυθμιστικού DNA και υπογραμμίζει τους κινδύνους που απορρέουν από δομικές αλλαγές και μεταβολές στην αλληλουχία του [2]. Το γεγονός αυτό έχει οδηγήσει στον όρο «ενισχυοπάθειες» (enhanceropathies) [6, 7], ο οποίος χρησιμοποιείται για να περιγράψει παθολογικούς φαινοτύπους του ανθρώπου, που προκύπτουν λόγω αλλαγών/μεταλλάξεων σε αλληλουχίες ενισχυτών.

Ωστόσο, η αποκρυπτογράφηση των μοριακών μηχανισμών, οι οποίοι διέπουν την εμφάνιση ανθρώπινων νοσημάτων ύστερα από ιικές μολύνσεις, αποτελεί πρόκληση, καθώς είναι δύσκολος ο συσχετισμός των ρυθμιστικών περιοχών και των παραλλαγών/μεταλλάξεων του γονιδιώματος με συγκεκριμένα γονίδια στόχους αυτών.

Κεφάλαιο 1. Τρισδιάστατη δομή της χρωματίνης και ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης

1.1. Επίπεδα οργάνωσης του ευκαρυωτικού γενετικού υλικού

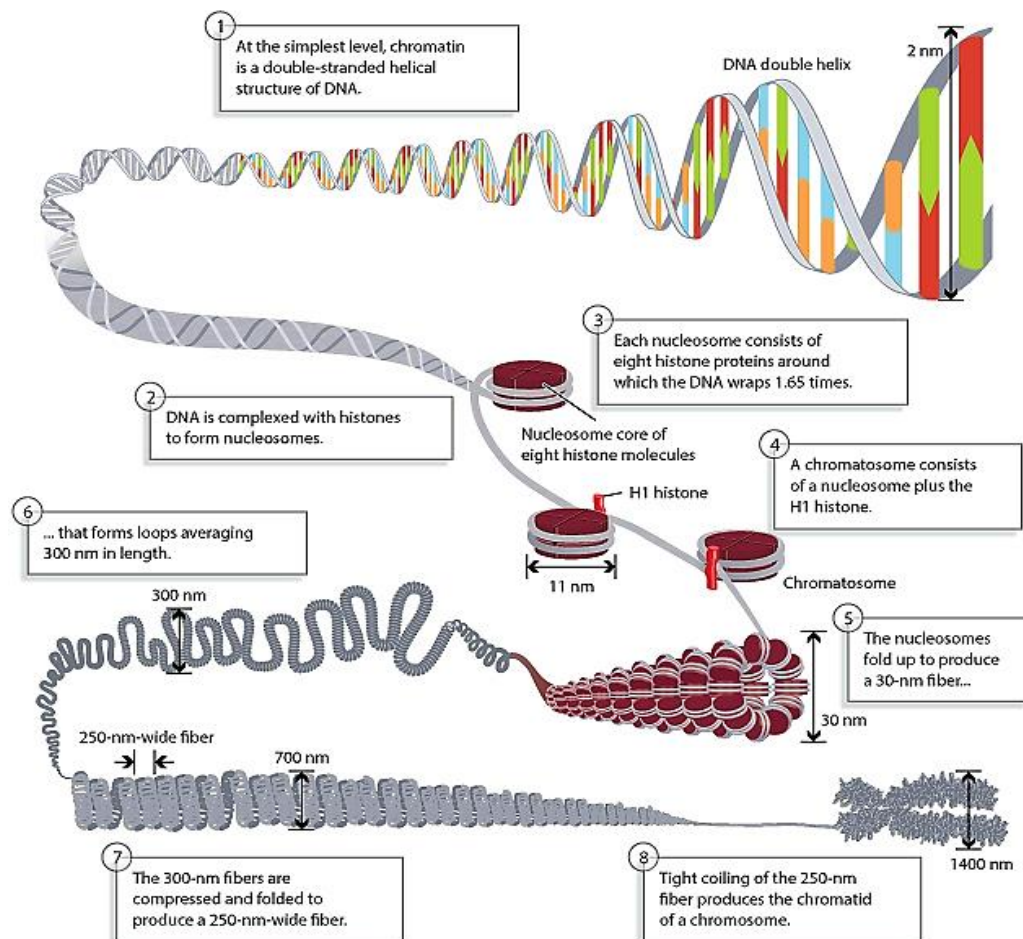
Όλοι οι οργανισμοί, με εξαίρεση τους RNA ιούς, αποθηκεύουν τη γενετική τους πληροφορία σε μόρια DNA, με τη μορφή μιας καθορισμένης σειράς νουκλεοτιδικών βάσεων. Το γενετικό υλικό, δηλαδή το DNA, περιλαμβάνει όλες τις απαραίτητες πληροφορίες για τη δομή και τη λειτουργία των οργανισμών, υπό τη μορφή συγκεκριμένων αλληλουχιών νουκλεοτιδίων, οι οποίες ονομάζονται γονίδια και κωδικοποιούν για ένα γονιδιακό προϊόν, είτε RNA είτε πρωτεΐνη. Αυτή η γενετική πληροφορία χρησιμοποιείται από τους οργανισμούς, ώστε να κατασκευαστούν κατάλληλες δομές και να αναπτυχθούν μηχανισμοί, προκειμένου να επιτευχθούν ζωτικές λειτουργίες αυτών. Η αλληλουχία των βάσεων αποτελεί ιδιαίτερο και εξειδικευμένο χαρακτηριστικό κάθε είδους, επομένως το σύνολο των πληροφοριών που διαθέτει ένας οργανισμός είναι διαφορετικό από το αντίστοιχο ενός άλλου, όταν ανήκουν σε διαφορετικά είδη. Παρόλο που οι πληροφορίες, οι οποίες καθορίζουν τις λειτουργίες διαφέρουν μεταξύ των οργανισμών, ωστόσο οι μηχανισμοί που ελέγχουν την δράση τους είναι συντηρημένοι από τους κατώτερους μονοκύτταρους μέχρι τα ανώτερα θηλαστικά.

Το μεγάλο μήκος του γονιδιώματος καθιστά απαραίτητη την ύπαρξη ενός μηχανισμού συσπείρωσης, ώστε να βρίσκεται συγκεντρωμένο στον πυρήνα, δηλαδή σε ένα ενδοκυτταρικό χώρο, η διάμετρος του οποίου δε ξεπερνά τα 6 μικρόμετρα [8]. Η διαδικασία της χωροταξικής διάταξης του γενετικού υλικού στηρίζεται σε έναν μηχανισμό πακεταρίσματος, σε μια δομή που αποτελεί μείγμα DNA και μιας ομάδας πρωτεϊνών που ονομάζονται ιστόνες, σχηματίζοντας ένα συμπαγές νουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο που καλείται χρωματίνη. Επί σειρά ετών, η χρωματίνη (chromatin) θεωρούνταν ένα δομικό στοιχείο του DNA, με μοναδικό ρόλο το πακετάρισμα του γονιδιώματος στον ευκαρυωτικό πυρήνα. Νεότερα πειραματικά δεδομένα απέδειξαν ότι η χρωματίνη διαθέτει και λειτουργικό ρόλο, καθώς αποτελεί ικρίωμα για αλληλεπιδράσεις, που ελέγχουν βασικές κυτταρικές διαδικασίες, όπως η αντιγραφή, η μεταγραφή, η επιδιόρθωση του DNA, η μίτωση, η μείωση και η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα, η επικρατούσα άποψη είναι ότι η χρωματίνη έχει μείζοντα ρόλο, τόσο στη δομική οργάνωση του DNA στον ευκαρυωτικό πυρήνα, όσο και στη ρύθμιση της λειτουργίας του

γονιδιώματος [8, 9, 10]. Οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον σχηματισμό της χρωματίνης είναι οι ιστόνες (histones), οι οποίες αποτελούν μια υπεροικογένεια πρωτεϊνικών μορίων, σχετικά μικρού μεγέθους, πλούσιες σε βασικά αμινοξέα, με ισχυρό θετικό φορτίο, γύρω από τις οποίες περιελίσσεται το DNA. Οι ιστόνες είναι υπεύθυνες για το πρώτο επίπεδο οργάνωσης του DNA στη χρωματίνη, στο οποίο η συμπύκνωση επιτυγχάνεται μέσω του σχηματισμού δομών που ονομάζονται νουκλεοσώματα. Τα νουκλεοσώματα χαρακτηρίζονται ως οι θεμελιώδεις δομικοί λίθοι της χρωματίνης, οι οποίοι αποτελούνται από οκταμερή ιστονών, οργανωμένα από τέσσερα διμερή πρωτεϊνών (H2A, H2B, H3 και H4), γύρω από τα οποία περιελίσσονται 146 ζεύγη βάσεων DNA [11]. Οι ιστόνες που συμμετέχουν στον σχηματισμό των νουκλεοσωμάτων μπορούν να τροποποιηθούν μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων κυρίως το αμινοτελικό τους άκρο από διάφορα ένζυμα ή να αντικατασταθούν με άλλες παραλλαγές/ποικιλομορφές ιστονών (histone variants). Το αποτέλεσμα της εισαγωγής των ιστονικών ποικιλομορφών στη χρωματίνη, είναι η δημιουργία νουκλεοσωμάτων με εξειδικευμένες δομές και ιδιότητες και κατ' επέκταση τροποποιημένη λειτουργία των χρωματινικών περιοχών [12]. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η macroH2A, η παρουσία της οποίας προσδίδει διαφορετικές ιδιότητες στα νουκλεοσώματα. Πιο συγκεκριμένα, η ύπαρξη της macroH2A στα νουκλεοσώματα του υποκινητή του γονιδίου της ιντερλευκίνης 8 (*IL-8*) σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους, αποτρέπει την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων, με συνέπεια την καταστολή της έκφρασης του γονιδίου στα κύτταρα αυτά [13]. Επίσης έχει αποδειχτεί ότι η αρχιτεκτονική της χρωματίνης στα *cis* ρυθμιστικά στοιχεία (**Cis Regulatory Modules, CRMs**), όπως είναι οι ενισχυτές, διαθέτει σημαντικό ρόλο στο συντονισμό των επαγόμενων προγραμμάτων γονιδιακής έκφρασης μετά από ιϊκή μόλυνση [14].

Μεταξύ γειτονικών νουκλεοσωμάτων υπάρχουν 5-108 ζεύγη βάσεων DNA χωρίς πρωτεΐνες, το οποίο καλείται συνδετικό DNA (linker DNA). Σε αυτό το επίπεδο οργάνωσης, η χρωματίνη έχει τη μορφή «κομπολογιού», με τα νουκλεοσώματα να αντιστοιχούν στις «χάντρες» και το συνδετικό DNA στο «σχοινί». Η συνεχής περιστροφή της διπλής έλικας γύρω από διαδοχικά νουκλεοσώματα καταλήγει στη δημιουργία ινιδίου χρωματίνης. Η δομή αυτή έχει διάμετρο περίπου 30 nm και αποτελεί το επόμενο επίπεδο οργάνωσης του γενετικού υλικού. Στα ινίδια χρωματίνης, τα νουκλεοσώματα περιελίσσονται μεταξύ τους με τη βοήθεια της συνδετικής ιστόνης H1 [10]. Σε επόμενο επίπεδο οργάνωσης, παρατηρείται έντονη συσπείρωση και αναδίπλωση κάθε ινιδίου. Το τελικό στάδιο στη διαδικασία της συσπείρωσης βρίσκει το ευκαρυωτικό DNA κατανεμημένο σε

χρωμοσώματα, δηλαδή σε απόλυτα συμπαγείς δομές, το μέγεθος των οποίων επιτρέπει την αποθήκευση του γενετικού υλικού στον πυρήνα [9]. Τα παραπάνω φαινόμενα συμμετέχουν στη βαθμιαία ελαχιστοποίηση του χώρου που καταλαμβάνει το γενετικό υλικό (Εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1. Δομή και οργάνωση της χρωματίνης. Αρχικά, το ευκαρυωτικό DNA περιελίσσεται γύρω από το οκταμερές των ιστονών, σχηματίζοντας τα νουκλεοσώματα. Τα νουκλεοσώματα συνδέονται μεταξύ τους μέσω συνδετικού DNA. Τα διαδοχικά νουκλεοσώματα αναδιπλώνονται, σχηματίζοντας ένα ινίδιο χρωματίνης, διαμέτρου περίπου 30 nm. Στο τελικό στάδιο οργάνωσης της χρωματίνης, το ινίδιο συσπειρώνεται περαιτέρω σχηματίζοντας ένα χρωμόσωμα, το οποίο αποθηκεύεται στον πυρήνα των κυττάρων [15].

Η ολική δομή της χρωματίνης ελέγχει χωροχρονικά τη γονιδιακή έκφραση και εξαρτάται από το στάδιο του κυτταρικού κύκλου. Η χρωματίνη μπορεί να λάβει είτε χαλαρή είτε συσπειρωμένη μορφή και χαρακτηρίζεται ως ευχρωματίνη ή ετεροχρωματίνη, αντίστοιχα. Κατά κανόνα, η ευχρωματίνη περιλαμβάνει περιοχές προσβάσιμες από μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίες εκφράζονται, ενώ η ετεροχρωματίνη είναι

συζευγμένη με τη γονιδιακή αποσιώπηση. Στο στάδιο της μεσόφασης, το μεγαλύτερο μέρος της χρωματίνης είναι σχετικά αποσυμπυκνωμένο και διάσπαρτο στον πυρήνα, με αποτέλεσμα να πραγματοποιείται η αντιγραφή του μορίου και η μεταγραφή των γονιδίων που περιέχονται στις ευχρωματινικές περιοχές. Αντίθετα, στη μίτωση, τα χρωμοσώματα συμπυκνώνονται έντονα και έτσι δε μπορούν να πραγματοποιηθούν οι διαδικασίες της αντιγραφής και της μεταγραφής. Πολλές περιοχές του γονιδιώματος παραμένουν ετεροχρωματινοποιημένες καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, αποτελώντας την ιδιοστατική ετεροχρωματίνη (constitutive heterochromatin) [9].

1.2. Η αρχιτεκτονική της χρωματίνης στις ρυθμιστικές περιοχές του γονιδιώματος διαμορφώνει το πρόγραμμα γονιδιακής έκφρασης

Ο ευκαρυωτικός πυρήνας έχει τρισδιάστατη δομή και φιλοξενεί τη χρωματίνη. Μέσα στον πυρήνα λαμβάνουν χώρα πολλές αλληλεπιδράσεις ως στοιχεία μηχανισμών, οι οποίες καθίστανται σημαντικές για τη γονιδιακή ρύθμιση [16]. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις που συμβαίνουν στη χρωματίνη μέσω προσθήκης ή αφαίρεσης χημικών ομάδων σε κατάλοιπα αμινοξέων στις ουρές των ιστονών, χωρίς μεταβολή στην αλληλουχία του DNA, επηρεάζουν την ρύθμιση και την έκφραση των γονιδίων. Παραδείγματα επιγενετικών τροποποιήσεων αποτελούν η μεθυλίωση του DNA και οι τροποποιήσεις στις αμινοτελικές ουρές των ιστονών, όπως μεθυλίωση, ακετυλίωση, φωσφορυλίωση και ουβικουιτινυλίωση [17]. Οι ιστονικές τροποποιήσεις των νουκλεοσωμάτων αποτελούν έναν πολύ σημαντικό μηχανισμό ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, καθώς μέσω αυτών η χρωματίνη υπόκειται δομικές και λειτουργικές αλλαγές, οι οποίες επηρεάζουν την ενεργότητα της αντιγραφής και της μεταγραφής.

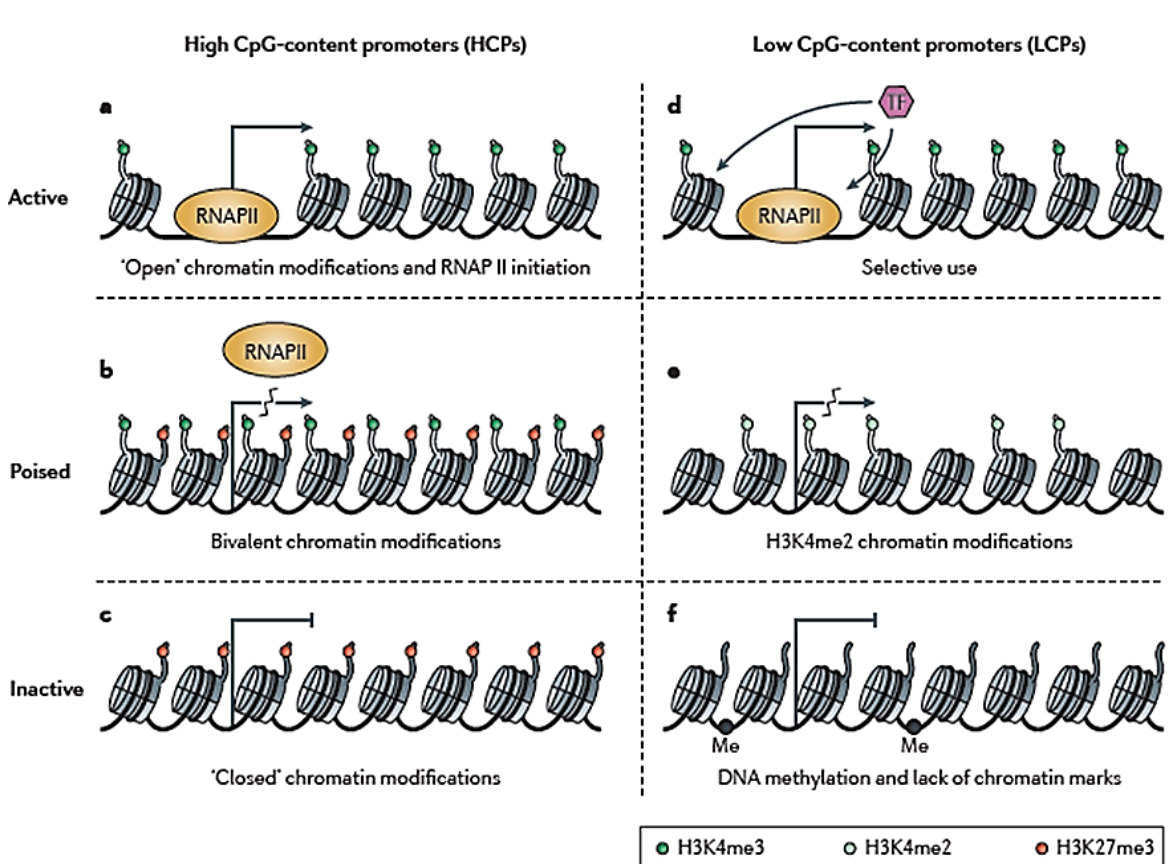
Πιο συγκεκριμένα, η μεθυλίωση του DNA, η οποία πραγματοποιείται σε κατάλοιπα κυτοσίνης, αποτελεί έναν μηχανισμό γονιδιακής αποσιώπησης. Πολλοί υποκινητές γονιδίων στα σπονδυλωτά εντοπίζονται σε περιοχές όπου η συχνότητα εμφάνισης του δινουκλεοτιδίου GC είναι αυξημένη. Οι περιοχές αυτές ονομάζονται νησίδες CpG (CpG islands) και οι υποκινητές των γονιδίων που εντοπίζονται σε αυτές τις περιοχές είναι ανενεργοί. Η μεθυλίωση των κυτοσινών πραγματοποιείται μέσω ομοιοπολικής τροποποίησης, κατά την οποία η μεθυλομάδα τοποθετείται στη θέση του υδρογόνου 5 (H₅) της κυτοσίνης καταλύεται από το ένζυμο DNA μεθυλοτρανσφεράση (DNMT3A,3B) [18]. Η μεθυλίωση αποτελεί δείκτη απενεργοποίησης της γονιδιακής έκφρασης, καθώς

παρεμποδίζει την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων ή την αναδιαμόρφωση της ευχρωματίνης σε ετεροχρωματίνη [19]. Η μεθυλίωση είναι ειδική για κατάλοιπα λυσίνης και αργινίνης και φαίνεται ότι δε μεταβάλλει το ολικό φορτίο των ιστονών, αλλά αλλάζει τις αλληλεπιδράσεις του νουκλεοσώματος με τις πρωτεΐνες, οι οποίες προσδένονται σε ιστόνες. Πιστεύεται ότι η επίδραση πραγματοποιείται μέσω στρατολόγησης πρωτεϊνών-τελεστών, που προσδένονται στη μεθυλιωμένη χρωματίνη [20, 21]. Η μεθυλίωση των λυσινών έχει διττό ρόλο, ανάλογα με το κατάλοιπο στο οποίο πραγματοποιείται και τον αριθμό των μεθυλομάδων που προστίθενται και έχει συνδεθεί με ενεργοποίηση ή καταστολή της μεταγραφής (Εικόνα 1.2). Η μονομεθυλίωση της λυσίνης 4 της ιστόνης 3 (H3K4me1) αποτελεί σημάδι ενεργότητας ενισχυτών, ενώ η τριμεθυλίωση της λυσίνης 4 της ιστόνης 3 (H3K4me3) είναι σημάδι ενεργότητας υποκινητών και επομένως σχετίζονται με μεταγραφική ενεργοποίηση γειτονικών γονιδίων. Αντιθέτως, η τριμεθυλίωση της λυσίνης 9 και της λυσίνης 27 της ιστόνης 3 (H3K9me3, H3K27me3) σχετίζεται με ετεροχρωματινοποίηση και συνεπώς γονιδιακή καταστολή [22].

Οι τέσσερις ιστόνες που συνιστούν τον πυρήνα του νουκλεοσώματος καθώς και η συνδετική ιστόνη H1, αποτελούν τις κύριες πρωτεΐνες που πακετάρουν το DNA και ελέγχουν την έκφρασή του. Κάθε ιστόνη αποτελείται από μια σφαιρική περιοχή, μέσω της οποίας αλληλεπιδρά με τις υπόλοιπες ιστόνες και το DNA, εντός του νουκλεοσώματος και από ευέλικτες αμινοτελικές ουρές, οι οποίες προεκβάλλουν από την πλευρική επιφάνεια του οκταμερούς [9]. Οι ουρές των ιστονών είναι ισχυρά βασικές και αποτελούν υποστρώματα σε πρωτεΐνες-τροποποιητές (modifiers), οι οποίες τροποποιούν ομοιοπολικά συγκεκριμένα κατάλοιπα αμινοξέων.

Η ακετυλίωση λαμβάνει χώρα σε συγκεκριμένα κατάλοιπα λυσίνης όλων των ιστονών και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε μια σειρά λειτουργιών στον ευκαρυωτικό πυρήνα, συμπεριλαμβανομένων της μεταγραφικής επαγωγής, της επιδιόρθωσης του DNA καθώς και της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου. Η ακετυλίωση των ιστονών σε υποκινητές, διευκολύνει την προσέλκυση πρωτεϊνών που επάγουν τη μεταγραφή. Αυξημένα επίπεδα ακετυλίωσης φαίνεται να συνδέονται με την επαγωγή της μεταγραφής, καθώς η προσθήκη της αρνητικά φορτισμένης ακετυλομάδας, προκαλεί εξουδετέρωση του θετικού φορτίου των αμινοξέων λυσίνης και εξασθένηση της πρόσδεσής τους με το αρνητικά φορτισμένο DNA [23]. Έτσι, εξασθενούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ουρών των ιστονών και διευκολύνεται η χαλάρωση της δομής της χρωματίνης, επιτρέποντας την έναρξη της μεταγραφής. Αντίθετα, μεταγραφικά αποσιωπημένες περιοχές δείχνουν να είναι μη

ακετυλιωμένες. Πιο συγκεκριμένα, η ακετυλίωση της λυσίνης 27 της ιστόνης 3 (H3K27ac) συνδέεται με αύξηση της προσβασιμότητας μορίων σε κάποια σημεία της χρωματίνης, που διευκολύνουν την αντιγραφή και τη μεταγραφή [24]. Η παρουσία της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac διαχωρίζει τους ενεργούς ενισχυτές (activated) και αυτούς που είναι σε κατάσταση ετοιμότητας (poised for activation) από τους ανενεργούς (repressed).



Εικόνα 1.2. Χρωματινικά μοτίβα ιστονικών τροποποιήσεων και ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Οι εκκινητές μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με το περιεχόμενο των C και G βάσεων. Οι εκκινητές με υψηλό περιεχόμενο CG (HCPs) και οι εκκινητές με χαμηλό περιεχόμενο CG (LCPs) υπόκεινται σε ξεχωριστά χρωματινικά μοτίβα. α) Οι HCPs έχουν χαρακτηριστικά προσβάσιμης ή ενεργής χρωματίνης από προεπιλογή. Ενεργοί HCPs (εκκινητές γονιδίων κυτταρικής οικονομίας) είναι εμπλουτισμένοι με την ιστονική τροποποίηση H3K4me3 και επιτρέπουν την πρόσδεση της RNAPII. β) Οι HCPs που βρίσκονται σε κατάσταση αναμονής είναι σημασμένοι με τον συνδυασμό των τροποποιήσεων H3K4me3 και H3K27me3. γ) Οι ανενεργοί HCPs φέρουν κατασταλτικές τροποποιήσεις, όπως H3K27me3 και είναι απρόσιτοι στην RNAPII. Αντίθετα με τους HCPs, οι LCPs φαίνεται να ενεργοποιείται εκλεκτικά. δ) Οι ενεργοί LCPs είναι εμπλουτισμένοι με την H3K4me3 και έτσι μεταγράφονται. ε) Οι LCPs που βρίσκονται σε κατάσταση αναμονής περιέχουν H3K4me2 χωρίς H3K4me3. ς) Οι αδρανείς LCPs τυπικά δεν διαθέτουν χρωματινικά μοτίβα αλλά μπορούν να μεθυλιώνονται. [19].

Είναι αποδεκτό ότι ιστονικές τροποποιήσεις μπορούν αφενός να επηρεάσουν τη δομή της χρωματίνης, είτε στο επίπεδο του νουκλεοσώματος, είτε δημιουργώντας θέσεις αλληλεπιδράσεων μεταξύ νουκλεοσωμάτων και αφετέρου να αποτελέσουν θέσεις πρόσδεσης πρωτεϊνών-τελεστών, όπως για παράδειγμα συνενεργοποιητών της μεταγραφής ή αποσιωπητικών παραγόντων [25]. Σύμφωνα με τη θεωρία του ιστονικού κώδικα, ο συνδυασμός των μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων με cis-ρυθμιστικές περιοχές της μεταγραφής, δημιουργεί διακριτά πρότυπα, που λειτουργούν ως κώδικες, οδηγώντας στη στρατολόγηση παραγόντων, που επηρεάζουν τη δομή και τη λειτουργία της χρωματίνης [26]. Συνεπώς, οι επιγενετικές τροποποιήσεις μπορούν να χαρακτηριστούν ως δείκτες ρυθμιστικών στοιχείων, όπως είναι οι υποκινητές (promoters), οι ενισχυτές (enhancers) και οι αποσιωπητές (insulators), οι οποίοι επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων που ρυθμίζουν [16, 27].

Κεφάλαιο 2. Μεταγραφή και μηχανισμοί ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης

Η γενετική πληροφορία, η οποία καθορίζει όλες τις κυτταρικές δραστηριότητες και το αναπτυξιακό πρόγραμμα των οργανισμών, είναι αποθηκευμένη σε λειτουργικές μονάδες που ονομάζονται γονίδια. Ο όρος γονίδιο χαρακτηρίζει κάθε τμήμα DNA, το οποίο έχει καθορισμένη ακολουθία νουκλεοτιδίων και εκφράζεται με τη διαδικασία της μεταγραφής (transcription) και της μετάφρασης (translation) για να δώσει ένα λειτουργικό προϊόν, το οποίο μπορεί να είναι είτε RNA [π.χ. ριβοσωμικό RNA (rRNA), μεταφορικό RNA (mRNA)] είτε πρωτεΐνη. Μεγάλο μέρος του μη κωδικού DNA των ευκαρυωτικών κυττάρων αντιπροσωπεύει αλληλουχίες DNA, οι οποίες παρεμβάλλονται μεταξύ των γονιδίων (non-coding, intergenic regions). Τα τμήματα των κωδικών αλληλουχιών ονομάζονται εξώνια (exons), ενώ οι μη κωδικές περιοχές, οι οποίες βρίσκονται ανάμεσα στα εξώνια, ονομάζονται εσώνια ή ιντρόνια (introns).

Η αρχιτεκτονική ενός γονιδίου περιγράφεται ως εξής: τα γονίδια αποτελούνται από μια κωδική αλληλουχία, ανοδικά της οποίας εδράζεται ο υποκινητής (promoter), ο οποίος αποτελεί αλληλουχία της ρυθμιστικής περιοχής. Από το σημείο αυτό θα ξεκινήσει η μεταγραφή του γονιδίου, αμέσως μετά την πρόσδεση της RNA πολυμεράσης, χωρίς το ίδιο να μεταγράφεται. Τρία ακόμα στοιχεία που αποτελούν μέρος της ρυθμιστικής περιοχής των

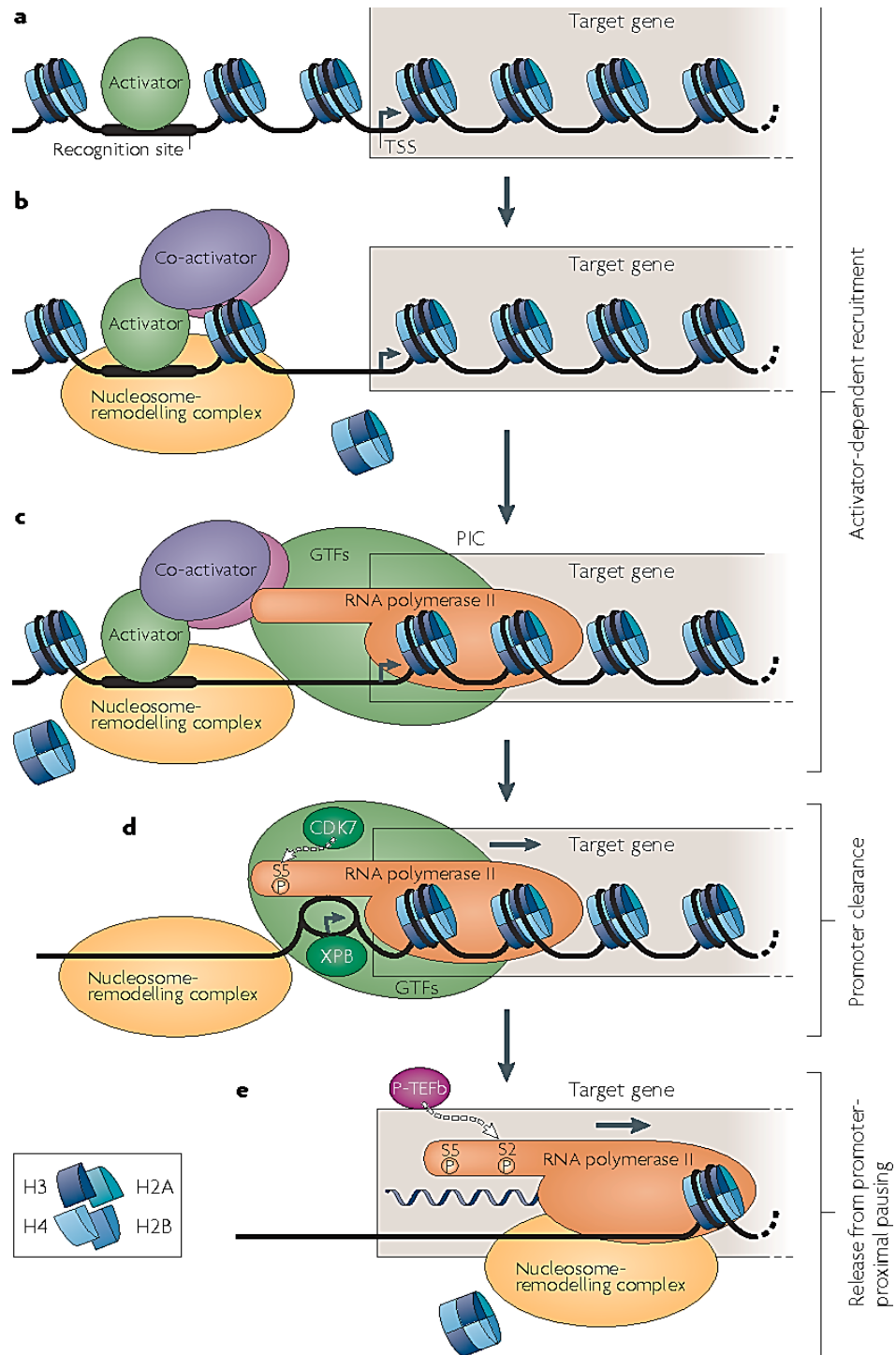
γονιδίων είναι οι ενισχυτές (enhancers), οι αποσιωποητές (insulators) και οι χειριστές (operators). Οι ενισχυτές και οι αποσιωποητές μπορούν να βρίσκονται πλησίον, σε απόσταση ή σε ζεύξη με το γονίδιο το οποίο ρυθμίζουν. Ακόμα μπορούν να βρίσκονται στο ίδιο ή και σε διαφορετικό χρωμόσωμα [28]. Οι ενισχυτές και οι αποσιωποητές είναι αρθρωτές αλληλουχίες με περιορισμένη έκταση, όπου ο ρόλος τους εντοπίζεται στη ρύθμιση της μεταγραφής (ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση) κοντινών ή απομακρυσμένων γονιδίων. Η αρθρωτή μορφή τους αφορά στις πολλαπλές συνεχείς ή επικαλυπτόμενες αλληλουχίες, οι οποίες αναγνωρίζονται από πρωτεΐνες και ονομάζονται θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων (Transcription Factors Binding Sites). Οι μεταγραφικοί παράγοντες (Transcription Factors, TFs) είναι πρωτεΐνες, οι οποίες εντοπίζουν και προσδένονται σε ρυθμιστικές περιοχές του DNA (DNA binding sites), έχοντας ως στόχο τη συναρμολόγηση πρωτεϊνικών συμπλόκων που ελέγχουν τη γονιδιακή έκφραση, καθορίζοντας/επηρεάζοντας το σχηματισμό του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής [8]. Τέλος, οι χειριστές βρίσκονται μέσα σε συστοιχίες γονιδίων, οι οποίες χαρακτηρίζονται ως οπερόνια και ο ρόλος τους είναι να ελέγχουν την ενεργοποίησή τους, μέσω καταστολέων.

Το πρώτο βήμα στην έκφραση των γονιδίων είναι η μεταφορά τους σε ένα κινητό αντίγραφο μέσω της διαδικασίας της μεταγραφής. Η μεταγραφή στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη δομή της χρωματίνης [9]. Το φαινόμενο αυτό πραγματοποιείται με τη συναρμολόγηση ενός μεταγραφικού συμπλόκου στον υποκινητή του γονιδίου, με τελικό στόχο την πρόσδεση της RNA πολυμεράσης II (RNAPolII). Για τη δημιουργία του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής απαιτείται η στρατολόγηση πρωτεϊνών-συνενεργοποιητών, η λειτουργία των οποίων σχετίζεται με την τροποποίηση ιστονών (π.χ. post-translational modifications), αναδιάταξη χρωματίνης (chromatin remodelling) και προσέγγιση απομακρυσμένων μεταξύ τους περιοχών (π.χ. DNA-DNA contacts, looping) (Εικόνα 1.3) [29, 30]. Η μεταγραφική ενεργοποίηση ενός γονιδίου μπορεί να συμβεί μόνο όταν ο απαραίτητος συνδυασμός μεταγραφικών παραγόντων συνυπάρχει στις θέσεις πρόσδεσης που εδράζουν στο χωροχρονικά υπεύθυνο ρυθμιστικό στοιχείο του συγκεκριμένου γονιδίου στόχου.

Το βασικό ένζυμο της μεταγραφής ονομάζεται RNA πολυμεράση II (RNAPolII) και αποτελεί σύμπλοκο πολλών υπομονάδων που καταλύουν συνεργατικά τον πολυμερισμό του mRNA (messenger RNA). Η σύνθεση πραγματοποιείται μέσω της δημιουργίας 3'-5' φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ ριβονουκλεοτιδίων που τοποθετούνται σειριακά απέναντι από τα δεοξυριβονουκλεοτίδια της μιας αλυσίδας του γονιδίου με βάση τον κανόνα

της συμπληρωματικότητας. Η μεταγραφή πραγματοποιείται συνεχώς κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου σε εξειδικευμένες θέσεις του γονιδιώματος και αφορά μόνο μια ομάδα πληροφοριών από το σύνολο που υπάρχει στο γενετικό υλικό. Το γεγονός αυτό δε σημαίνει πως είναι αδύνατη η ταυτόχρονη μεταγραφή πολλών γονιδίων αλλά υπογραμμίζει πως κάθε μεταγραφικό σύμπλοκο δραστηριοποιείται, στοχεύοντας ένα συγκεκριμένο γονίδιο κάθε φορά.

Στη συνέχεια, το προϊόν της μεταγραφής, το οποίο είναι ένα μεγάλο μόριο RNA, υφίσταται μια διαδικασία που καλείται ωρίμανση, κατά την οποία το ετερογενές πυρηνικό RNA (pre-mRNA) μετατρέπεται σε mRNA. Αρχικά, στο 5' άκρο του μορίου προστίθεται μια ομάδα γουανίνης, η οποία αργότερα μεθυλιώνεται, σχηματίζοντας έναν 3'-5' τριφωσφορικό δεσμό, που ονομάζεται κάλυμμα (5' cap). Η δομή αυτή έχει λειτουργικό ρόλο, συμμετέχοντας στην έξοδο του mRNA από τον πυρήνα, στην προστασία του από εξωνουκλεάσες και στην προώθηση της μετάφρασης. Στο 3' άκρο του pre-mRNA προστίθεται μία αλληλουχία πολυαδενυλικού οξέος, η οποία ονομάζεται πολυ(A) ουρά, αποτελούμενη από περίπου 250 κατάλοιπα αδενίνης. Η πολυ(A) ουρά παρέχει προστασία στο mRNA από τη δράση ενζύμων και διευκολύνει την εξαγωγή του από τον πυρήνα. Ακολουθεί η διαδικασία του ματίσματος (splicing), η οποία πραγματοποιείται από ένα σύμπλοκο μικρών πυρηνικών ριβονουκλεοπρωτεϊνών (small nuclear ribonucleoproteins, snRNPs), που απομακρύνει τα ιντρόνια και ενώνει τα εξώνια μεταξύ τους, δημιουργώντας το ώριμο mRNA [31].



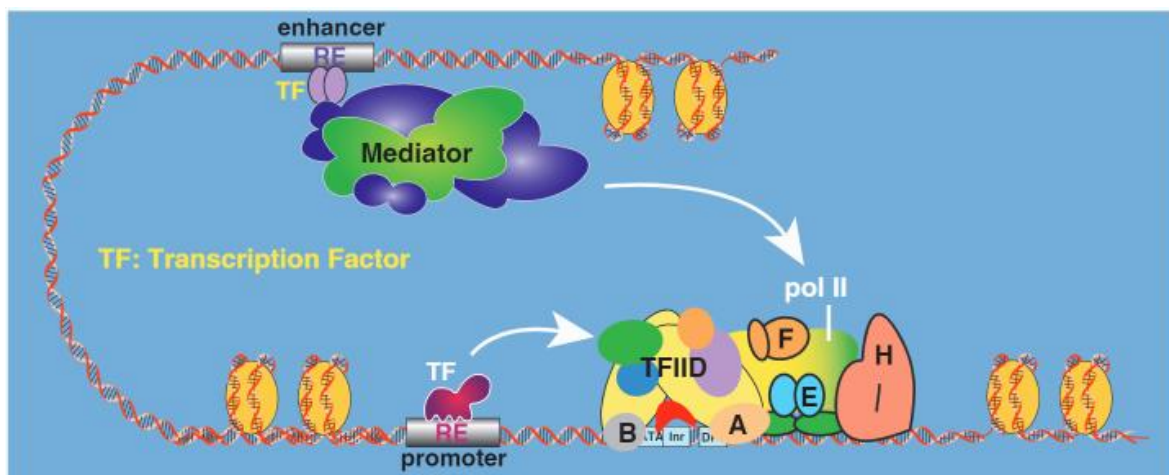
Εικόνα 1.3. Τα πρώτα στάδια του κύκλου μεταγραφής. α) Η επιλογή του υποκινητή καθορίζεται από την αλληλεπίδραση ενός ή περισσότερων μεταγραφικών ενεργοποιητών με ειδικές αλληλουχίες DNA (θέσεις αναγνώρισης) κοντά σε γονίδια στόχους. Οι ενεργοποιητές στη συνέχεια προσλαμβάνουν συστατικά της μεταγραφικής μηχανής σε αυτά τα γονίδια μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. β) Η ενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου επάγεται μέσω της διαδοχικής στρατολόγησης πρωτεϊνικών υπομονάδων και συνενεργοποιητών (τα στοιχεία που εμφανίζονται με ροζ και μοβ χρώμα) μέσω δέσμευσης στους ενεργοποιητές. Ενεργοποιητές στρατολογούν το εξαρτώμενο

από ATP νουκλεοσωμικό σύμπλοκο αναδιαμόρφωσης, το οποίο εκτοπίζει/μετακινεί ιστόνες στον υποκινητή διευκολύνοντας έτσι την ταχεία πρόσληψη και συναρμολόγηση των συνενεργοποιητών και της μεταγραφικής μηχανής. c) Οι συνενεργοποιητές μαζί με το σύμπλοκο αναδιαμόρφωσης διευκολύνουν την ταχεία στρατολόγηση της RNA πολυμεράσης II και άλλων στοιχείων στον υποκινητή. d) Μια υπομονάδα του παράγοντα TFIIF αναδιαμορφώνει 11-15 βάσεις του DNA στη θέση έναρξης της μεταγραφής ώστε να εισαχθεί μονόκλωνο DNA στην ενεργό θέση της πολυμεράσης. e) Η RNA πολυμεράση μεταγράφει 20-40 νουκλεοτίδια στο γονίδιο και σταματά. Για να συνεχίσει, απαιτείται ένα δεύτερο γεγονός φωσφορυλίωσης στην S2 θέση της πολυμεράσης. Ο κύκλος μεταγραφής συνεχίζεται με την επιμήκυνση του μεταγραφώματος από την RNA πολυμεράση [29].

Η πολυπλοκότητα των ευκαρυωτικών γονιδιωμάτων προκύπτει κυρίως από τους πολλούς διαφορετικούς τύπους μη κωδικών αλληλουχιών DNA, που καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος του DNA. Οι αλληλουχίες αυτές συμμετέχουν στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης, μέσω μεταγραφικών ρυθμιστών, που προσδένονται σε συγκεκριμένες ρυθμιστικές περιοχές, στρατολογούν την RNA πολυμεράση II και μεταβάλλουν τη λειτουργία της. Επομένως, η αρχιτεκτονική διαμόρφωση της χρωματίνης συμβάλλει στον καθορισμό των μεταγραφικά ενεργών περιοχών του γονιδιώματος και κατ' επέκταση στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης [13, 16, 32, 33].

Οι ενισχυτές μπορούν να βρίσκονται πλησίον, σε ζεύξη ή σε απόσταση έως και ένα εκατομμύριο ζεύγη βάσεων μακριά από το γονίδιο που ρυθμίζουν και μπορούν να είναι είτε ανοδικά είτε καθοδικά της θέσης έναρξης της μεταγραφής, στο ίδιο ή σε άλλο χρωμόσωμα [34, 35]. Οι ενισχυτές ελέγχουν το χρόνο συγχρονισμού, τη θέση και τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων στόχων τους, με αποτέλεσμα χωρίς τη δράση τους, το γονίδιο να μεταγράφεται σε χαμηλότερα επίπεδα. Οι ενισχυτές παίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταγραφική ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και κατ' επέκταση καθορίζουν το ιστοειδικό πρόγραμμα γονιδιακής έκφρασης. Οι ενισχυτές ενεργοποιούν τη μεταγραφή, στρατολογώντας σημαντικούς παράγοντες στους υποκινητές, έτσι ώστε να ξεκινήσει η συναρμολόγηση του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής [17, 34]. Παραλλαγές νουκλεοτιδίων στους ενισχυτές έχει αποδειχθεί ότι οδηγούν σε πολυάριθμους φαινοτύπους, συμπεριλαμβανομένης της εμφάνισης ασθενειών στον άνθρωπο. Με παρόμοιο τρόπο λειτουργούν και οι αποσιωποποιητές, οι οποίοι χαρακτηρίζονται ως ανταγωνιστές των ενισχυτών, καταστέλλοντας τη μεταγραφική ενεργοποίηση. Πρόκειται για θέσεις πρόσδεσης αρνητικών μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι ονομάζονται καταστολείς.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι ενισχυτές δεν είναι σε θέση από μόνοι τους να αλληλεπιδράσουν με την RNA πολυμεράση, αλλά είναι απαραίτητη η παρουσία άλλων παραγόντων. Για την ενεργοποίηση της μεταγραφής σημαντικό ρόλο έχει το σύμπλοκο του διαμεσολαβητή (Mediator complex). Ο Mediator είναι ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο, το οποίο αποτελείται από πολλές υπομονάδες, λειτουργεί ως μεταγραφικός συνενεργοποιητής σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και στρατολογείται για να ρυθμίσει την έκφραση των περισσότερων γονιδίων που μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II, οργανώνοντας την αρχιτεκτονική της χρωματίνης (Εικόνα 1.4). Η αλληλεπίδραση μεταξύ του Mediator και των μεταγραφικών παραγόντων είναι αναγκαία για την έκφραση γονιδίων, επομένως η απώλεια κάποιας υπομονάδας του μπορεί να οδηγήσει σε αναστολή της έκφρασης των γονιδίων που ρυθμίζονται από το μεταγραφικό παράγοντα που προσδένεται στην υπομονάδα αυτή [35].

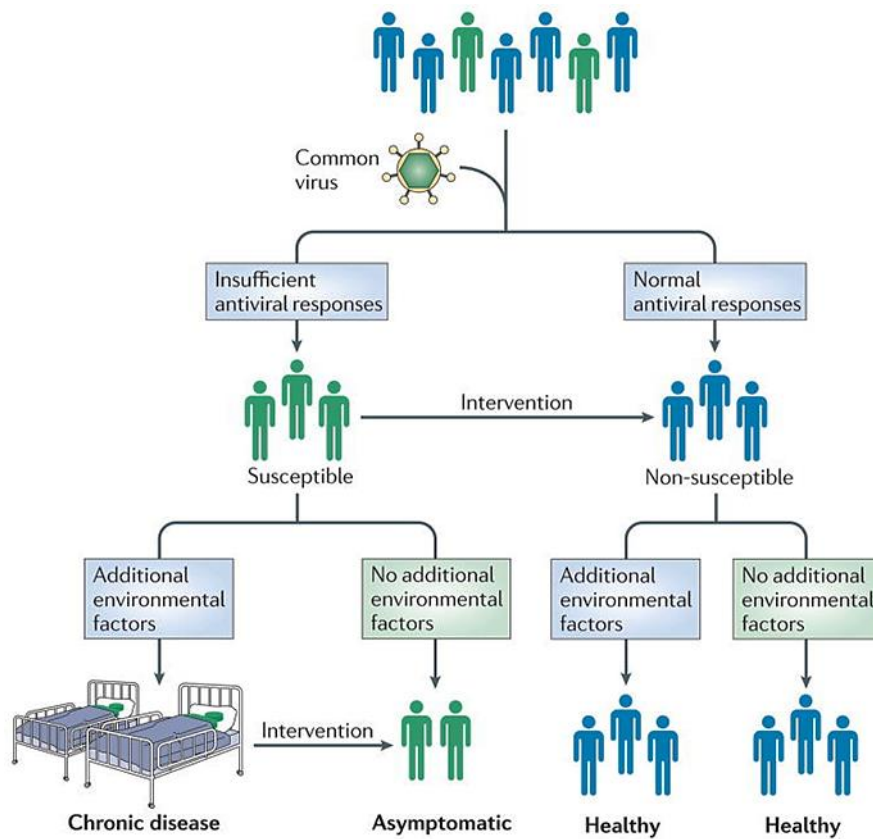


Εικόνα 1.4. Απεικόνιση της αλληλεπίδρασης ενισχυτή-υποκινητή μέσω του παράγοντα Mediator.

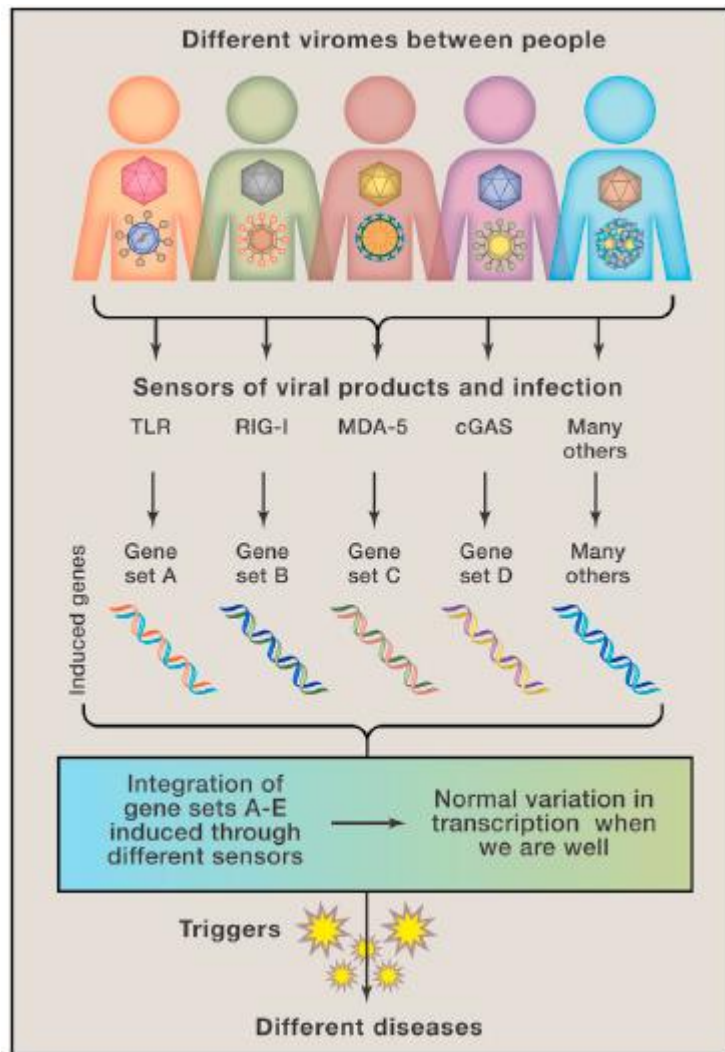
Ο παράγοντας Mediator αλληλεπιδρά ταυτόχρονα με μεταγραφικούς παράγοντες που είναι προσδεσμένοι στον ενισχυτή και με το σύμπλοκο έναρξης της μεταγραφής, συμπεριλαμβανομένης και της RNA πολυμεράσης II. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αναδίπλωση της χρωματίνης, ώστε να ενεργοποιηθεί η μεταγραφή του γονιδίου στόχου από τον ενισχυτή [35].

Κεφάλαιο 3. Ιϊκή μόλυνση και επαγόμενη γονιδιακή έκφραση

Οι ιοί είναι μικροβιακοί παθογόνοι παράγοντες, οι οποίοι εντοπίζονται σε αφθονία στο περιβάλλον, εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία και χαρακτηρίζονται από ταχείς ρυθμούς εξέλιξης. Οι ιοί λειτουργούν ως υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά παράσιτα, τα οποία ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή και συνεπώς αποτελούν σοβαρή απειλή για την ανθρώπινη υγεία. Οι ιϊκές μολύνσεις αποτελούν ένα παγκόσμιο κοινωνικό πρόβλημα, με υψηλά επίπεδα νοσηρότητας και θνησιμότητας, όπου εκτός από τις άμεσες επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία, μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση ασθενειών, αυτοάνοσων ή μη, μέσω της δυσλειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς προκαλούν μεταγραφικό επαναπρογραμματισμό της γονιδιακής έκφρασης. Μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (Genome Wide Association Studies, GWAS) έχουν δείξει ότι ορισμένες ιϊκές μολύνσεις παρέχουν το έναυσμα ή προδιαθέτουν για την εκδήλωση διαφόρων ασθενειών, όπως ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1 (Type 1 Diabetes Mellitus, T1DM), το Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοβιολογικής Ανεπάρκειας (Acquired Immunodeficiency Syndrome, AIDS), η νόσος του Crohn, το άσθμα [1]. Η επιστημονική προσέγγιση αναφέρει πως ένα άτομο το οποίο έχει γενετική προδιάθεση για κάποια ασθένεια, έχει υψηλή πιθανότητα να εμφανίσει την ασθένεια αυτή, εάν μολυνθεί από συγκεκριμένους ιούς (Εικόνα 1.5, Εικόνα 1.6) [1, 2, 4]. Για τον λόγο αυτό, είναι πολύ σημαντική η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που διαθέτουν τα κύτταρα, ώστε να μπορέσουν να αντιμετωπίσουν επιτυχώς μια ιϊκή μόλυνση, αλλά και των μοριακών γεγονότων, που συμβαίνουν στο γονιδίωμα μετά τη ιϊκή μόλυνση.



Εικόνα 1.5. Απεικόνιση μοντέλου που περιγράφει τον ρόλο κοινών μολύνσεων στην ανάπτυξη πολύπλοκων ασθενειών. Σύμφωνα με το μοντέλο, όλοι οι ξενιστές εκτίθενται σε έναν κοινό ιό. Εκείνοι οι οποίοι έχουν φυσιολογική αντι-ιική απόκριση δεν πάσχουν από ασθένεια. Εκείνοι, οι οποίοι εμφανίζουν αλλοιωμένη αντι-ιική απόκριση, έχουν ευαισθησία και τελικά πάσχουν από ασθένεια, μόνο όταν συνυπάρχουν άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες. Άτομα με μειωμένη αντι-ιική απόκριση, τα οποία όμως δεν έχουν εκτεθεί σε περιβαλλοντικό παράγοντα, φαίνεται πως δεν αναπτύσσουν πολύπλοκες ασθένειες [4].



Εικόνα 1.6. Απεικόνιση πιθανού μηχανισμού που περιγράφει την επιρροή των ιών στο φαινότυπο του ξενιστή. Οι διαφορετικοί αισθητήρες που διαθέτει ο άνθρωπος για την ανίχνευση των ιών, μπορούν να προκαλέσουν αλληλεπικαλυπτόμενα αλλά ξεχωριστά μεταγραφικά μονοπάτια, τα οποία αποτελούν τον ανοσοφαινότυπο του ξενιστή. Κάθε ξενιστής ανταποκρίνεται με διαφορετικό τρόπο στις ιϊκές μολύνσεις, που οδηγούν στην ανάπτυξη πολύπλοκων ασθενειών, ανάλογα με τη γενετική σύσταση [2].

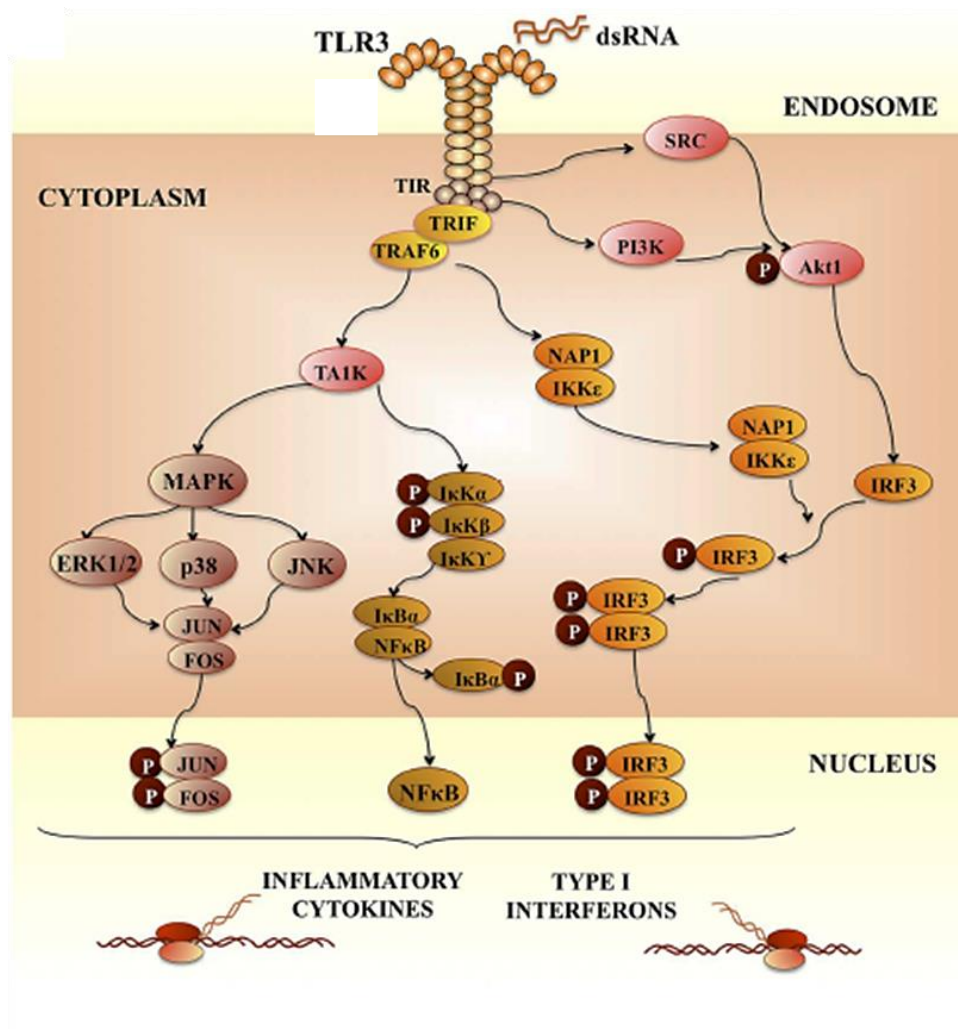
Ο ιός Sendai (SeV), γνωστός και ως ιός γρίπης ποντικού τύπου 1, είναι ένας μονόκλωνος RNA ιός της οικογένειας *Paramyxoviridae*. Ο ιός Sendai ανήκει στο γένος *Respirovirus*, μέλη του οποίου μολύνουν τα θηλαστικά. Ο SeV είναι υπεύθυνος για μια μεταδοτική λοίμωξη του αναπνευστικού συστήματος σε ποντίκια, χάμστερ, ινδικά χοιρίδια και αρουραίους και χρησιμοποιείται παραδοσιακά από το εργαστήριο μας ως εργαλείο προσομοίωσης των γεγονότων που συνοδεύουν την ιϊκή μόλυνση στον άνθρωπο [37, 38]. Τα ιϊκά σωμάτια χαρακτηρίζονται ως πολυμορφικές δομές, οι οποίες αποτελούνται από ένα λιποπρωτεϊνικό περίβλημα που περιβάλλει το γονιδίωμα του ιού, το οποίο αποτελείται από

περίπου 15.000 νουκλεοτίδια. Ο Sendai ιός αντιγράφεται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή, με τη βοήθεια RNA πολυμεράσης του ίδιου του ιού.

Είναι κοινά αποδεκτό πως όλοι οι οργανισμοί είναι ευαίσθητοι στις λοιμώξεις από ιούς και πως όλοι έχουν ένα ειδικό σύστημα για την ανίχνευση και την αντιμετώπιση ξένων νουκλεϊκών οξέων, όπως είναι τα περιοριστικά ένζυμα των προκαρυωτικών κυττάρων εναντίον των βακτηριοφάγων και τα πολύπλοκα δίκτυα αντι-ϊικών αποκρίσεων των ανώτερων οργανισμών [39]. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα διαθέτουν περίπλοκα δίκτυα συστημάτων εξειδικευμένης απόκρισης σε μεγάλο αριθμό εξωκυττάρων ερεθισμάτων. Αυτές οι αποκρίσεις περιλαμβάνουν μονοπάτια μεταγωγής σήματος (signal transduction pathways), τα οποία μεταφέρουν πληροφορίες από την κυτταρική επιφάνεια στον πυρήνα του κυττάρου, προκαλούν συντονισμένες αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση και οδηγούν στην ενεργοποίηση συγκεκριμένων ομάδων γονιδίων για την αντιμετώπιση συγκεκριμένου ερεθίσματος [40].

Η μόλυνση από ιούς οδηγεί στη συντονισμένη ενεργοποίηση τριών διαφορετικών ομάδων μεταγραφικών παραγόντων και αποτελεί το κύριο σήμα παραγωγής ιντερφερονών τύπου I (*IFN α/β*) από όλα σχεδόν τα κύτταρα του σώματος, γεγονός που ανήκει στη γενικότερη άμυνα του οργανισμού (Εικόνα 1.7). Οι μεταγραφικοί παράγοντες IRFs, ο NF- κ B και το ετεροδιμερές ATF-2/c-Jun, οι οποίοι κατόπιν της ενεργοποίησής τους μεταφέρονται στον πυρήνα του κυττάρου, ενεργοποιούν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις ιντερφερόνες τύπου I. Οι ιντερφερόνες τύπου I (*IFNs*) είναι μια οικογένεια κυτταροκινών εξειδικευμένων για το συντονισμό της ανοσολογικής απόκρισης σε ιούς και άλλου τύπου λοιμώξεων. Η βασική λειτουργία των ιντερφερονών τύπου I είναι η αντιμετώπιση της ενδοκυτταρικής λοίμωξης και η διευκόλυνση της επικοινωνίας μεταξύ των αμυντικών κυττάρων του οργανισμού. Αυτό οδηγεί στην παραγωγή και την έκκριση ιντερφερονών που δεσμεύονται με τους αντίστοιχους υποδοχείς τους στην επιφάνεια τόσο μολυσμένων, όσο και μη μολυσμένων κυττάρων, οδηγώντας στην έκφραση μεγάλου αριθμού αντι-ϊικών γονιδίων. Η εκκρινόμενη ιντερφερόνη δρα ως παρακρινής και αυτοκρινής παράγοντας και επάγει ή καταστέλλει την έκφραση γονιδίων επαγόμενων από την ιντερφερόνη (*Interferon Stimulated Genes, ISGs*), τα οποία συνιστούν την αντι-ϊική κατάσταση. Η δυνατότητα της *IFN β* να περιορίζει την αναπαραγωγή του ιού αποδίδεται σε μεγάλο βαθμό στην ενεργοποίηση των *ISGs*. Τα γονίδια αυτά έχουν την ιδιότητα να περιορίζουν τη διαδικασία αντιγραφής του ιού στα ήδη μολυσμένα κύτταρα, επεμβαίνοντας σε διαφορετικά στάδια του

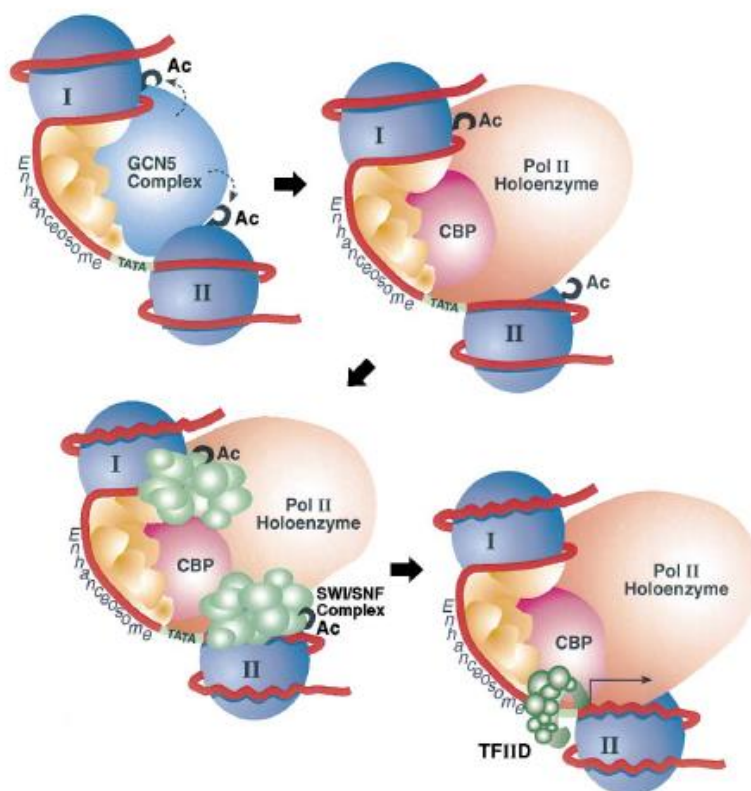
κύκλου αντιγραφής μέσω διαφόρων μηχανισμών [41]. Επίσης, έχουν την ικανότητα έκφρασης είτε ιδιοσυστατικά, σε κύτταρα αποκρινόμενα σε χαμηλά επίπεδα ιντερφερόνης είτε, πιο συχνά, ενεργοποιούνται σε κύτταρα που αποκρίνονται σε υψηλά επίπεδα ιντερφερόνης μετά από μόλυνση. Συνεπώς, οι ιντερφερόνες συμμετέχουν στην προστασία των οργανισμών έναντι των ιών, μέσω της ενεργοποίησης ενός αντι-ϊικού προγράμματος βασισμένου σε ISGs και στην ενίσχυση των ανοσολογικών αποκρίσεων για την αποτελεσματική αντιμετώπισή τους [42].



Εικόνα 1.7. Περιγραφή των τριών κύριων σηματοδοτικών μονοπατιών που ενεργοποιούνται κατά την αντι-ϊική απόκριση. Ύστερα από τη μόλυνση με ιό και την αναγνώρισή του από TLR3 υποδοχείς ενεργοποιούνται μονοπάτια μεταγωγής σήματος που οδηγούν στην ενεργοποίηση και πυρηνική μετανάστευση μεταγραφικών παραγόντων, όπως οι IRFs, ο NF-κB και το ετεροδιμερές ATF-2/c-Jun [43].

Κατά την ιϊκή μόλυνση πραγματοποιείται μια σειρά γεγονότων, που έχουν στόχο την αντιμετώπιση της ενδοκυτταρικής λοίμωξης, με κύριο στάδιο την παραγωγή των ιντερφερονών τύπου I. Η μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου *IFNβ* ρυθμίζεται από έναν ενισχυτή που βρίσκεται ανοδικά του υποκινητή και καταλαμβάνει αλληλουχία 110 ζευγών βάσεων. Ο ενισχυτής αυτός αναγνωρίζεται από τρεις ομάδες μεταγραφικών παραγόντων NF-κB, IRFs, ATF-2/c-Jun, οι οποίοι ενεργοποιούν τα τρία βασικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος, που επάγονται κατά την αντι-ϊκή απόκριση (Εικόνα 1.7) [43, 44]. Η ταυτόχρονη παρουσία των παραγόντων στις επικαλυπτόμενες θέσης πρόσδεσης του ενισχυτή του γονιδίου *IFNβ*, ως απάντηση στην ιϊκή προσβολή, συνοδεύεται από τη διαμόρφωση ενός υψηλής οργάνωσης πολυπαραγοντικού πρωτεϊνικού συμπλέγματος, που ονομάζεται ενισχυόσωμα (enhanceosome) (Εικόνα 1.8) [45]. Το ενισχυόσωμα είναι ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών, το οποίο συναρμολογείται στον ενισχυτή και ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου στόχου του. Η συναρμολόγηση αυτού του πρωτεϊνικού συμπλόκου είναι συνεργατική, λόγω ενεργειακά ευνοούμενων αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης [40]. Το αποτέλεσμα αυτής της στρατολόγησης είναι η τροποποίηση και η αναδιαμόρφωση ενός στρατηγικά τοποθετημένου νουκλεοσώματος, το οποίο μπλοκάρει το πλαίσιο TATA και τη θέση έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου και απενεργοποιεί την έκφρασή του [45]. Το ενισχυόσωμα στρατολογεί μεταγραφικοί παράγοντες, όπως είναι η RNA πολυμεράση II, στην περιοχή του υποκινητή για να ξεκινήσει η μεταγραφή του γονιδίου [46].

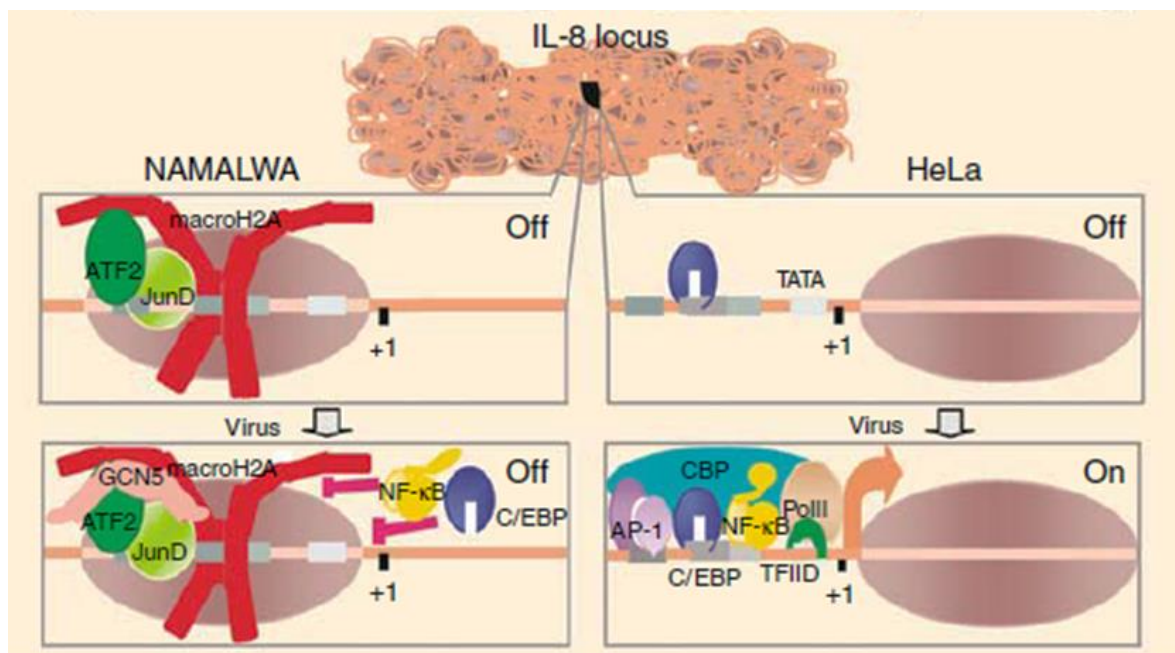
Η συναρμολόγηση του ενισχυοσώματος λαμβάνει χώρα μόνο μετά από ιϊκή μόλυνση και όχι σε απόκριση σε άλλα σήματα που μπορούν να ενεργοποιήσουν ξεχωριστά καθέναν από τους τρεις κύριους μεταγραφικούς παράγοντες. Για τον λόγο αυτό η οργάνωση στην περιοχή ενισχυτή/υποκινητή εξασφαλίζει υψηλό βαθμό εξειδίκευσης. Αρχικά, το ενισχυόσωμα προσελκύει το ένζυμο GCN5, το οποίο καταλύει την ακετυλίωση των αμινοτελικών άκρων των ιστονών, προσφέροντας το κατάλληλο σήμα για τη στρατολόγηση του συμπλόκου αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης SWI/SNF. Ταυτόχρονα με την αναδόμηση, στρατολογείται το σύμπλοκο της RNA πολυμεράσης και του ενζύμου CBP. Το SWI/SNF αλληλεπιδρά με το νουκλεόσωμα, δημιουργώντας τις απαραίτητες προϋποθέσεις για την πρόσδεση των βασικών μεταγραφικών παραγόντων. Αυτές οι διαμορφώσεις επιτρέπουν την στρατολόγηση της υπομονάδας TBP του μεταγραφικού παράγοντα TFIID, η οποία προκαλεί κάμψη του DNA και συνεπώς μετατόπιση του νουκλεοσώματος, 36 ζεύγη βάσεων καθοδικά, ώστε να αποκαλυφθεί η θέση έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου της ανθρώπινης *IFNβ* και να εκφραστεί [45, 46].



Εικόνα 1.8. Μοντέλο στρατολόγησης παραγόντων που αναδιαμορφώνουν τη χρωματίνη και τους βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες στον υποκινητή του γονιδίου της IFN-β. Αμέσως μετά την ιϊκή μόλυνση, πραγματοποιείται η συναρμολόγηση του ενισχυοσώματος στον υποκινητή της IFN-β, ο οποίος στερείται νουκλεοσωμάτων, και ακολουθεί η στρατολόγηση του συμπλόκου GCN5, που ακετυλιώνει νουκλεοσώματα. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο αυτό απομακρύνεται από τον υποκινητή και το ένζυμο της πολυμεράσης στρατολογείται από το ενισχυόσωμα. Κατόπιν, το σύμπλοκο αναδόμησης της χρωματίνης SWI/SNF προσδένεται στον υποκινητή, μέσω αλληλεπίδρασης με το CBP. Το σύμπλοκο αυτό αναδομεί τα νουκλεοσώματα, επιτρέποντας την πρόσδεση του TFIID, την ολοκλήρωση της συναρμολόγησης του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής και την έναρξη της μεταγραφής [45].

Ένα ακόμα σημαντικό παράδειγμα που αποδεικνύει τη σημασία της διαμόρφωσης της χρωματίνης στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, είναι η ιστοειδική έκφραση του ανθρώπινου γονιδίου της ιντερλευκίνης 8 (IL-8). Στην εικόνα 1.9 παρουσιάζεται η διαφορά έκφρασης του γονιδίου IL-8 ανάμεσα σε επιθηλιακά κύτταρα HeLa και τα B-λεμφοκύτταρα Namalwa. Πιο συγκεκριμένα, το IL-8 εκφράζεται μόνο στα κύτταρα HeLa και όχι στα Namalwa κύτταρα μόνο μετά από ιϊκή μόλυνση. Στην κυτταρική σειρά Namalwa, η περιοχή του ενισχυτή/υποκινητή καλύπτεται από ένα νουκλεόσωμα, που φέρει την ιστονική παραλλαγή macroH2A στη θέση της ιστόνης H2A. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την

παρεμπόδιση της πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων/ενεργοποιητών στις αντίστοιχες θέσεις και κατά συνέπεια, το γονίδιο της *IL-8* δεν εκφράζεται. Η διαμόρφωση του ATF2 παράγοντα, η οποία διαφέρει μεταξύ των δύο κυτταρικών τύπων, είναι υπεύθυνη για την στρατολόγηση του νουκλεοσώματος που φέρει αυτή την ιστονική παραλλαγή. Στα Namalwa κύτταρα το σύμπλοκο ATF-2/JunD βρίσκεται σχηματισμένο στον υποκινητή του γονιδίου, ενώ αντίθετα στα HeLa κύτταρα μόνο μετά την ιϊκή μόλυνση το διμερές c-Jun/c-Fos καταλαμβάνει την ίδια θέση. Επομένως, είναι πιθανόν η παρουσία του διμερούς ATF-2/JunD να αποσιωπά τη μεταγραφή του *IL-8* στα Namalwa, προσφέροντας μια επιφάνεια κατάλληλη για την αλληλεπίδραση με το νουκλεόσωμα που φέρει macroH2A [13].



Εικόνα 1.9. Μοντέλο απεικόνισης της κυτταροειδικής έκφρασης του γονιδίου της *IL-8*. Η αρχιτεκτονική δομή της χρωματίνης στην περιοχή του ενισχυτή/υποκινητή του γονιδίου της *IL-8* διαφέρει μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών τύπων. Στα Namalwa κύτταρα είναι αδύνατη η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου αυτού, μετά από ιϊκή μόλυνση, καθώς το νουκλεόσωμα που καλύπτει την περιοχή του ενισχυτή/υποκινητή, περιέχει την ιστονική παραλλαγή macroH2A, αναστέλλοντας έτσι τη σύνδεση των ενεργοποιητών του γονιδίου της *IL-8*. Αυτή η ιστονική παραλλαγή του νουκλεοσώματος στρατολογείται μέσω άμεσων αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης μεταξύ του ετεροδιμερούς ATF-2/JunD και της μακρο-περιοχής της macroH2A. Αντίθετα, στα HeLa κύτταρα, το σύμπλοκο ATF-2/JunD δεν προσδένεται στον ενισχυτή/υποκινητή της *IL-8* και επομένως η παραλλαγή της ιστόνης macroH2A δεν στρατολογείται, επιτρέποντας έτσι τη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου αυτού [13].

Κεφάλαιο 4. Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 1 [ΣΔΤ1, Type 1 Diabetes Mellitus (T1DM)] είναι μια πολυπαραγοντική πάθηση, η οποία επέρχεται ως αποτέλεσμα μακροχρόνιας προοδευτικής αυτοάνοσης καταστροφής των β παγκρεατικών κυττάρων και χαρακτηρίζεται από διήθηση λεμφοκυττάρων (B- και T-) καθώς και μακροφάγων στα νησίδια Langerhans του παγκρέατος, γεγονός το οποίο οδηγεί στη φλεγμονή των νησίδων του παγκρέατος (ινσουλίτιδα) [48, 49]. Ως αποτέλεσμα της καταστροφής των β παγκρεατικών κυττάρων, οι ασθενείς οδηγούνται σε καθολική εξάρτηση από τη χορήγηση ινσουλίνης για τη ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1 αφορά τον σπανιότερο από τους δύο τύπους, με ποσοστό περίπου 10% του συνόλου των περιπτώσεων και συνήθως εμφανίζεται στην παιδική και εφηβική ηλικία. Πρόκειται για ένα νόσημα όπου η παθογένεια και η κλινική έκφραση αποτελούν τη συνισταμένη της γενετικής διαταραχής του συστήματος αυτοανοσίας και της επίδρασης πολλαπλών περιβαλλοντικών παραγόντων. Έρευνες έχουν δείξει ότι σε ποσοστό 90% ευθύνεται το ίδιο το ανοσοποιητικό σύστημα των ασθενών, το οποίο εξαιτίας γενετικού λάθους στρέφεται εναντίων των β παγκρεατικών κυττάρων και τα καταστρέφει. Στο υπόλοιπο 10%, τα αίτια της ασθένειας δεν είναι γνωστά και για τον λόγο αυτό χαρακτηρίζεται ο ιδιοπαθής. Στα ιδιοπαθή αίτια ανήκουν κυρίως περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως διάφοροι λοιμογόνοι παράγοντες, κυρίως ιοί, οι οποίοι ενεργοποιούν λανθασμένα το ανοσοποιητικό σύστημα, ώστε να αρχίσει να επιτίθεται εναντίον των β παγκρεατικών κυττάρων [50].

Τα β παγκρεατικά κύτταρα ρυθμίζουν τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα μέσω της παραγωγής ινσουλίνης. Η ινσουλίνη είναι υπεύθυνη για τον έλεγχο της ποσότητας της γλυκόζης, που μεταφέρεται από το αίμα στα κύτταρα των ιστών, για να μετατραπεί σε ενέργεια. Σε φυσιολογικές συνθήκες η ινσουλίνη εκκρίνεται από το πάγκρεας σε ανάλογη ποσότητα της γλυκόζης του γεύματος που έχει καταναλωθεί. Πιο συγκεκριμένα, η γλυκόζη από τις τροφές οδηγεί στην απελευθέρωση ινσουλίνης και στη μεταφορά της στα κύτταρα. Τα κύτταρα χρησιμοποιούν τη γλυκόζη, καθώς και άλλα θρεπτικά συστατικά, ως πηγή ενέργεια, ώστε να μπορούν να λειτουργούν. Καθώς η γλυκόζη εισέρχεται στα κύτταρα, μειώνεται η ποσότητάς της στο αίμα, γεγονός που οδηγεί στη μείωση της έκκρισης της ινσουλίνης από τα β παγκρεατικά κύτταρα, ώστε να μην προκληθεί υπογλυκαιμία. Με αυτόν τον τρόπο διατηρείται η ομοιόσταση της γλυκόζης. Στην περίπτωση του Σακχαρώδους

Διαβήτη τύπου 1, λόγω της καταστροφής των β παγκρεατικών κυττάρων, η παραπάνω διαδικασία αποδιοργανώνεται. Η αυτοάνοση επίθεση σκοτώνει προοδευτικά το μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού των β κυττάρων, ενώ οι γειτονικοί πληθυσμοί των α και δ κυττάρων διαφυλάσσονται. Η έλλειψη της ινσουλίνης έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία χρήσης της γλυκόζης για ενέργεια των κυττάρων και τη συσσώρευση της γλυκόζης στο αίμα [50].

4.1. Γενετική Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1

Ο κύριος γενετικός παράγοντας κινδύνου για την αυτοάνοση καταστροφή των β παγκρεατικών κυττάρων εντοπίζεται στην περιοχή του γονιδιώματος στο χρωμόσωμα 6p21, όπου χαρτογραφούνται τα γονίδια HLA τάξης II. Το σύστημα αυτών των γονιδίων αντιπροσωπεύει το 30-50% της γενετικής προδιάθεσης του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1 και συνδέεται με ενεργοποίηση του συστήματος αυτοανοσίας [51]. Ένα σύνολο απλότυπων, οι οποίοι σχετίζονται με την ανάπτυξη του Διαβήτη τύπου 1, έχειδειχθεί ότι μεταβιβάζονται μεταξύ των γενεών μιας οικογένειας, αλλά το πρότυπο κληρονομικότητας είναι άγνωστο. Πιο συγκεκριμένα, οι απλότυποι **HLA-DR3-DQ2** και **HLA-DR3/4-DQ8** έχουν χαρακτηριστεί ως υψηλού κινδύνου για την ανάπτυξη της νόσου, ενώ οι απλότυποι **DQA1*0102-DQB1*0602**, **DRB1*1401**, θεωρούνται προστατευτικοί. Μελέτες έχουν δείξει ότι σε παιδιά που φέρουν γονότυπους κινδύνου και υπάρχει οικογενειακό ιστορικό Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1, η πιθανότητα ανάπτυξης αυτοαντισωμάτων έναντι των παγκρεατικών νησιδίων είναι 1/5, ενώ σε παιδιά που φέρουν τους ίδιους γονότυπους κινδύνου αλλά δεν υπάρχει ιστορικό, η πιθανότητα είναι περίπου 1/20 [51]. Άλλοι γενετικοί τύποι που σχετίζονται με την προδιάθεση εμφάνισης της νόσου είναι τα γονίδια **INS**, **PTPN22** και **IFIH1**, οι πρωτεΐνες **CTLA-4** και **CD45** και ο υποδοχέας **IL2RA**.

Τα άτομα που έχουν προδιάθεση για την ανάπτυξη Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1, αντιδρούν παθολογικά σε ορισμένους περιβαλλοντικούς παράγοντες (π.χ. ιώσεις), με αποτέλεσμα την επαγωγή αυτοάνοσης αντίδρασης, η οποία οδηγεί τελικά στην καταστροφή των β παγκρεατικών κυττάρων. Η ανεύρεση αυξημένων επιπέδων τόσο κυκλοφορούντων όσο και εναποτιθέμενων T λεμφοκυττάρων στο πάγκρεας, υπογραμμίζει το ρόλο της διαταραχής της κυτταρικής ανοσίας. Τα διεγερμένα CD8⁺ και CD4⁺ T λεμφοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα B λεμφοκύτταρα διηθούν τα νησίδια του παγκρέατος και συντελούν στην ανάπτυξη φλεγμονής (ινσουλίτιδα). Τα κυτταροτοξικά CD4⁺ και CD8⁺ T λεμφοκύτταρα στρέφονται εναντίον των παγκρεατικών κυτταρικών αντιγόνων και μέσω της ενεργοποίησης

της φυσικής ανοσίας ή του μηχανισμού της απόπτωσης και επαγωγής φλεγμονωδών παραγόντων, καταστρέφουν τα κύτταρα των νησιδίων του παγκρέατος, με αποτέλεσμα την κλινική εκδήλωση της νόσου, η οποία σχετίζεται με την καταστροφή ποσοστού μεγαλύτερου του 80% των β παγκρεατικών κυττάρων [51]. Παράλληλα, η παθογένεια του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1 μέσω του συστήματος ιστοσυμβατότητας HLA, συνδέεται με τη διαταραχή του συστήματος της χυμικής ανοσίας, με ταυτόχρονη παραγωγή αντισωμάτων έναντι κυτταρικών αντιγόνων. Η παραγωγή ενός ή περισσότερων αντισωμάτων ανιχνεύεται έτη ή δεκαετίες πριν την κλινική εκδήλωση και αποτελεί προγνωστικό παράγοντα ανάπτυξης της νόσου. Η αναζήτηση των αντισωμάτων με ευαίσθητες ανοσολογικές μεθόδους έχει προγνωστική αλλά και διαγνωστική αξία. Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω γίνεται σαφές ότι ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1 δεν αποτελεί ενιαία πάθηση, αλλά φαίνεται ότι μεμονωμένοι παράγοντες κινδύνου μπορούν να έχουν ως αποτέλεσμα διαφορετικές παθοφυσιολογικές διεργασίες, που με τη σειρά τους προκαλούν την καταστροφή των β παγκρεατικών κυττάρων.

Μελέτες ευρείας *γονιδιωματικής* συσχέτισης έχουν εντοπίσει περισσότερες από 60 γενετικές περιοχές, οι οποίες χαρακτηρίζονται από πολυμορφισμούς απλού νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs), οι οποίοι προσδίδουν γενετική προδιάθεση στον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1. Οι περισσότερες από αυτές τις παραλλαγές αντιστοιχούν σε μη κωδικές περιοχές του γονιδιώματος, δηλαδή υποκινητές, ενισχυτές, διαγονιδιακές περιοχές και μη κωδικοποιητικά γονίδια και δρουν αλλάζοντας τη γονιδιακή έκφραση, μέσω χωρικών αλληλεπιδράσεων. Παρατηρήθηκε ότι οι παραλλαγές αυτές διασυνδέονται μέσω δικτύων που αποτελούν μέρος των ανοσορρυθμιστικών οδών, συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, της σηματοδότησης κυτοκινών και της επαγωγής του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Αυτά τα δίκτυα, εάν δε ρυθμίζονται ορθά, λόγω της ύπαρξης πολυμορφισμών, προάγουν αυτοάνοσες αντιδράσεις, συμβάλλοντας στην έναρξη φλεγμονής και στην καταστροφή των β παγκρεατικών κυττάρων [52]. Παρά την ισχυρή πρόοδο στη μελέτη του ρόλου αυτών των αλλαγών στην εμφάνιση του μοριακού μηχανισμού ένα μεγάλο τμήμα των μοριακών γεγονότων παραμένει άγνωστο.

4.2. Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1 και ιϊκή μόλυνση

Αν και η γενετική προδιάθεση για την ανάπτυξη Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1 είναι ένας βασικός παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου, δεν μπορεί να εξηγήσει την πρόσφατη και ταχεία αύξηση της συχνότητας εμφάνισης της νόσου, ιδιαίτερα σε ασθενείς κάτω των 5 ετών. Ένα μεγάλο ποσοστό της ανάπτυξης της νόσου αποδίδεται αιτιοπαθογενετικά στην επίδραση εξωγενών περιβαλλοντικών παραγόντων, που δρουν πάνω σε ένα ευάλωτο γενετικό υπόστρωμα και πυροδοτούν ή εκλύουν τους αυτοάνοσους μηχανισμούς καταστροφής των β παγκρεατικών κυττάρων. Επιδημιολογικές, κλινικές και παθολογικές μελέτες σε ανθρώπους με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1, υποστηρίζουν πως η ιογενής λοίμωξη, ιδιαίτερα από εντεροϊούς αποτελεί έναν περιβαλλοντικό παράγοντα για την ανάπτυξη της νόσου [50]. Οι καλύτερα μελετημένοι ιοί, ως προς τη σχέση τους με το Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1, που έχουν ενοχοποιηθεί ότι εμπλέκονται στην παθογένεια, είναι οι εντεροϊοί *Coxsackie A* και *B*, ο ιός της παρωτίτιδας, οι ρετροϊοί και οι *Echo* ιοί.

Οι οξείες λοιμώξεις από εντεροϊούς έχουν συσχετιστεί με την παρουσία αντι-νησιδιακών αυτοαντισώματων, λόγω της πυροδότησης και της εγκατάστασης της αυτοανοσίας [1, 50, 51, 52]. Επιπρόσθετα, οι επανειλημμένες λοιμώξεις από εντεροϊό φαίνεται ότι επιταχύνουν την προοδευτική έκπτωση της λειτουργικότητας των β κυττάρων και προάγουν τη μετάπτωση σε κλινική συμπτωματική νόσο. Οι παράγοντες που καθορίζουν εάν ένας ιός θα επιδράσει στην εκδήλωση της νόσου σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα είναι το είδος του ιού (δομή, τρόπος μετάδοσης, τροπισμός για εκλεκτική προσβολή συγκεκριμένων κυττάρων και ιστών, μηχανισμοί εισόδου στον ανθρώπινο οργανισμό), το ιϊκό φορτίο και η ανοσολογική επάρκεια του ξενιστή. Οι βασικοί παθογενετικοί μηχανισμοί, μέσω των οποίων μπορεί μια ιογενής λοίμωξη να συμβάλει στην εκδήλωση του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1 συνοψίζονται παρακάτω:

1. Ο ιός μπορεί να προσβάλει άμεσα τα β κύτταρα του παγκρέατος, οδηγώντας στη λύση και στην καταστροφή τους, ελαττώνοντας σημαντικά τον αριθμό των κυττάρων του παγκρέατος που παράγουν ινσουλίνη (μη αυτοάνοση μορφή Διαβήτη, λόγω άμεσης καταστροφής των κυττάρων).
2. Τα ιϊκά αντιγόνα μπορούν να εκφραστούν στα β κύτταρα του παγκρέατος, με αποτέλεσμα την επαγωγή της ανοσολογικής αντίδρασης του ξενιστή που στρέφεται εναντίον τροποποιημένων από τον ιό αυτοαντιγόνων.

3. Ο ιός μπορεί να αλληλεπιδράσει με τους φλεγμονώδεις υποδοχείς TLR (Toll Like Receptors) της επιφάνειας των μακροφάγων, επάγοντας την ενεργοποίησή τους και την απελευθέρωση προφλεγμονωδών παραγόντων σε μεγάλες ποσότητες (IL-1, IL-6, IL-8, MCP-1, TNF-α). Στη συνέχεια, οι κυτταροκίνες ενεργοποιούν αυτοδραστικά T λεμφοκυττάρων και προάγουν τον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση αυτών σε σημεία στόχους, όπως τα β κύτταρα του παγκρέατος. Επιπλέον, προκαλούν άμεση βλάβη και δυσλειτουργία των β κυττάρων και ελαττώνουν εκλεκτικά κάποιους προστατευτικούς πληθυσμούς ρυθμιστικών T λεμφοκυττάρων (regulatory T cells).
4. Τα σωματίδια του ιού φαγοκυτταρώνονται από μακροφάγα κύτταρα, με αποτέλεσμα τα ιικά αντιγόνα να παρουσιάζονται στην επιφάνεια των μακροφάγων σε συνδυασμό με συστατικά του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τύπου II (MHC II). Έτσι, αναγνωρίζονται από ειδικά T βοηθητικά λεμφοκύτταρα και τελικά παράγονται πολλά ενεργοποιημένα T και B λεμφοκύτταρα ειδικά για τον συγκεκριμένο ιό. Όταν οι αντιγονικοί επίτοποι του ιού παρουσιάζουν δομικές ομοιότητες με τα συστατικά των β κυττάρων του παγκρέατος (μοριακός μιμητισμός), τα B και T λεμφοκύτταρα που παρήχθησαν από την έκθεση στον ιό, στρέφονται κατά των β κυττάρων και τα καταστρέφουν. Λόγω της περιορισμένης ικανότητάς τους να πολλαπλασιάζονται, τα β κύτταρα αδυνατούν να αντισταθμίσουν την μείωσή τους.
5. Διαδοχικές λοιμώξεις από δύο ανεξάρτητους αλλά δομικά σχετιζόμενους ιούς μπορούν να προάγουν μηχανισμούς αυτοανοσίας, καθώς ένα αντιγόνο κοινό και στους δύο ιούς μπορεί να ενεργοποιήσει τα T λεμφοκύτταρα μνήμης που είχαν σχηματιστεί από την πρώτη λοίμωξη και να εκτρέψουν την ισορροπία μεταξύ αυτοδραστικών και ρυθμιστικών T λεμφοκυττάρων υπέρ των πρώτων.

Μελέτες έχουν αποδείξει πως η πιθανότητα μολύνσεων από εντεροϊούς είναι πολλαπλάσια σε άτομα με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 ή άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, σε σύγκριση με το γενετικό πληθυσμό, αυτό δε σημαίνει πως άτομο που έχει Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 είναι πιο ευάλωτο στις ιικές μολύνσεις αλλά, ότι ένα μεγάλο ποσοστό των ατόμων που πάσχουν από την ασθένεια, έχουν και μολύνσεις [50]. Ο ιός *Coxsackie* ανήκει στο γένος των εντεροϊών, στην οικογένεια *Picornaviridae* και ζει στον ανθρώπινο πεπτικό σωλήνα. Το γενετικό υλικό του ιού είναι μονόκλωνο RNA. Ο ιός μεταδίδεται πολύ εύκολα από άτομο σε άτομο, κυρίως με την κοπρανοστοματική οδό και λιγότερο με την αναπνευστική οδό. Μπορεί να μεταδοθεί ακόμα και μέσω του πλακούντα (από τη μητέρα στο παιδί κατά τη διάρκεια της περιγεννητικής περιόδου). Στις περισσότερες περιπτώσεις,

ο ιός προκαλεί ήπια συμπτώματα που αποχωρούν χωρίς θεραπεία. Αλλά, σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να οδηγήσει σε πιο σοβαρές λοιμώξεις, βλάβες στην καρδιά καθώς και αυτοκαταστροφή των β παγκρεατικών κυττάρων. Μεταξύ των δύο υποτύπων (Α και Β), μόνο ο ιός *Coxsackie B* έχει συσχετιστεί με ανάπτυξη Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1. Ο ιός *Coxsackie B* προσβάλλει άμεσα τα β παγκρεατικά κύτταρα, διαθέτει την πρωτεΐνη P2C, που μοιάζει δομικά με τα ένζυμα αποκαρβοξυλάση του γλουταμινικού οξέος (GAD65) και φωσφατάση της τυροσίνης (IA-2), τα οποία αποτελούν βασικά συστατικά των β παγκρεατικών κυττάρων έναντι των οποίων σχηματίζονται αυτοαντισώματα. Έτσι, ενεργοποιούνται αυτοδραστικά Τ λεμφοκύτταρα, τα οποία προκαλούν την καταστροφή των β παγκρεατικών κυττάρων [53]. Επιπλέον, η ανίχνευση του εντεροϊού στο αίμα ασθενών με πρόσφατα διαγνωσμένο Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1, επιβεβαιώνει τη σχέση του με τη λοίμωξη από εντεροϊούς, ιδιαίτερα με τον ιό *Coxsackie B1*. Έτσι λοιπόν, γίνεται κατανοητό ότι η ιογενής λοίμωξη προηγείται της εμφάνισης της καταστροφής των παγκρεατικών β κυττάρων.

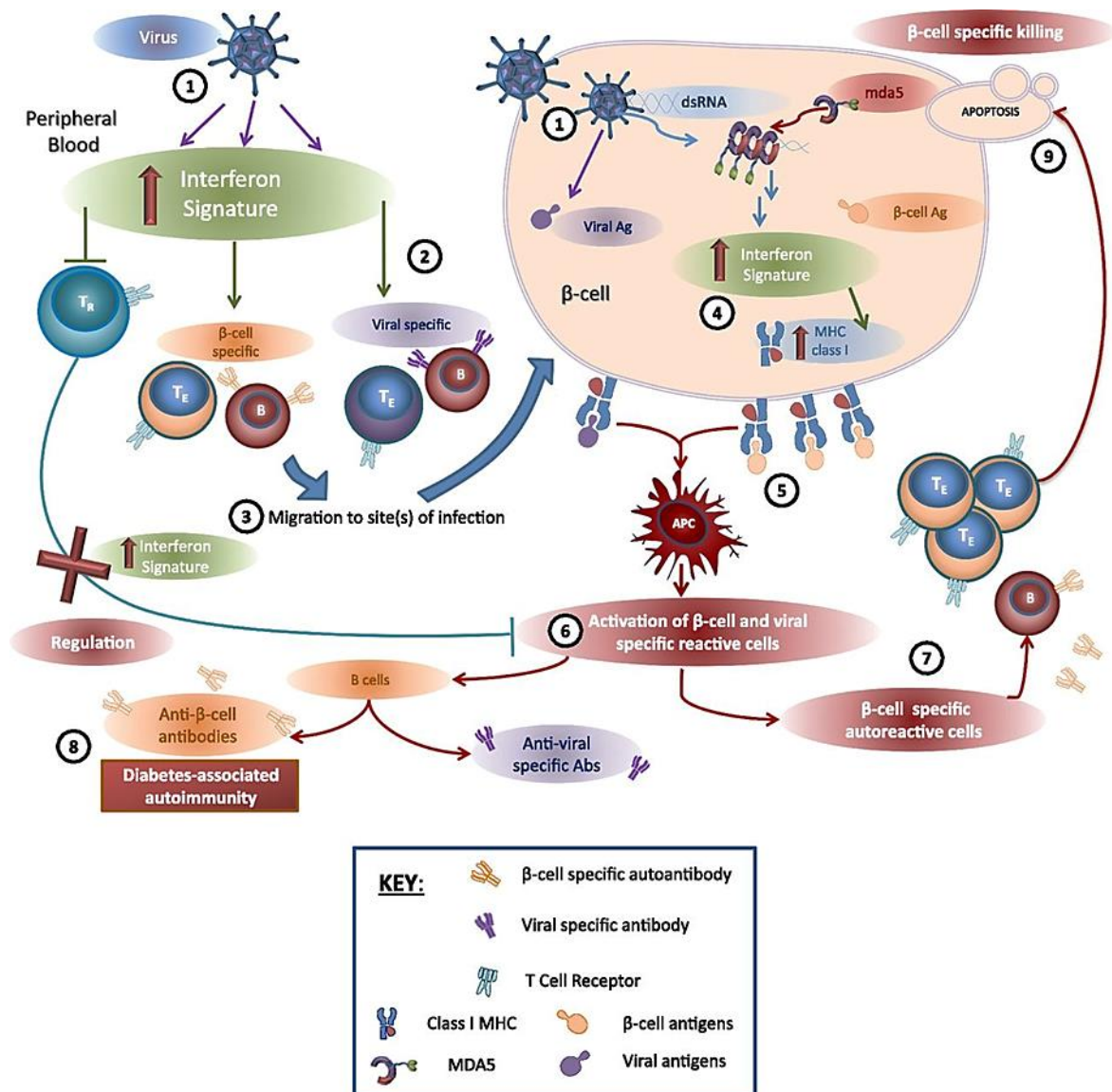
Μετά την ιογενή μόλυνση, το ανθρώπινο σώμα ενεργοποιεί ένα πολύπλοκο ρυθμιστικό σύστημα από έμφυτες και προσαρμοστικές ανοσολογικές αντιδράσεις που έχουν σχεδιαστεί για να καταστρέψουν τον ιό (Εικόνα 1.10). Οι ιντερφερόνες είναι αντι-ϊικές πρωτεΐνες που παράγονται από κύτταρα, τα οποία έχουν μολυνθεί από ιό και επάγουν την παραγωγή αντι-ϊικών πρωτεϊνών σε γειτονικά υγιή κύτταρα. Σε πρώτο στάδιο οι ιντερφερόνες ανιχνεύονται στο κυτταρόπλασμα του μολυσμένου κυττάρου. Σε επόμενο στάδιο, απελευθερώνονται στο μεσοκυττάριο υγρό και από εκεί συνδέονται με υποδοχείς των γειτονικών υγιών κυττάρων. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της παραγωγής άλλων πρωτεϊνών, οι οποίες έχουν την ικανότητα να παρεμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό των ιών. Έτσι τα υγιή κύτταρα προστατεύονται, καθώς ο ιός, ακόμη και αν κατορθώσει να διεισδύσει σ' αυτά, είναι ανίκανος να πολλαπλασιαστεί. Το φυσιολογικό αποτέλεσμα αυτής της απάντησης είναι η ενεργοποίηση ενός ισχυρού πληθυσμού Τ κυττάρων.

Πιο συγκεκριμένα, ο ξενιστής αναγνωρίζει την είσοδο ενός ιού και προκαλεί αντι-ϊική απόκριση με σήμα κατατεθέν την αύξηση της παραγωγής ιντερφερονών τύπου Ι, στο αίμα και στη περιοχή της μόλυνσης (Εικόνα 1.10). Κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος διεγείρονται και μεταναστεύουν στην περιοχή της μόλυνσης, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, ενώ ταυτόχρονα ενεργοποιούνται τα μακροφάγα. Τα κύτταρα αυτά, εκτός από τη δυνατότητα που έχουν να καταστρέφουν τον μικροοργανισμό, έχουν την

ικανότητα να εκθέτουν στην επιφάνειά τους τμήματά του, τα οποία έχουν εγκλωβίσει, λειτουργώντας έτσι ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Το τμήμα του ιού που εκτίθεται συνδέεται με μια πρωτεΐνη της επιφάνειας των μακροφάγων, χαρακτηριστική για κάθε άτομο, η οποία ονομάζεται αντιγόνο ιστοσυμβατότητας. Στη συνέχεια, τα πρώτα κύτταρα που ενεργοποιούνται αμέσως μετά την παρουσίαση του αντιγόνου είναι τα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα. Σ' αυτό το στάδιο τα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα εκκρίνουν ουσίες που ενεργοποιούν τα B λεμφοκύτταρα, προκειμένου αυτά να πολλαπλασιαστούν και τελικά να διαφοροποιηθούν σε πλασματοκύτταρα και B λεμφοκύτταρα μνήμης. Τα πλασματοκύτταρα στη συνέχεια εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες αντισωμάτων ειδικών για το συγκεκριμένο αντιγόνο. Η παραπάνω διαδικασία ονομάζεται χυμική ανοσία, γιατί τα αντισώματα απελευθερώνονται μέσα στο αίμα και στη λέμφο, αντιδρούν με το αντιγόνο και το εξουδετερώνουν. Παράλληλα με την ενεργοποίηση των B λεμφοκυττάρων, τα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα, τα οποία συμμετέχουν στον πολλαπλασιασμό και στην ενεργοποίηση μιας άλλης ειδικής κατηγορίας κυττάρων, των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων, τα οποία θα καταστρέψουν τα κύτταρα-στόχους. Η δράση των βοηθητικών αλλά και των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων αποτελεί την κυτταρική ανοσία.

Το μονοπάτι της ιντερφερόνης στα παγκρεατικά β κύτταρα επάγει την υπερέκφραση των μορίων MHC τάξης I (σύμπλεγμα μείζονος ιστοσυμβατότητας), τα οποία παρουσιάζουν τα β κύτταρα και τα ιϊκά αντιγόνα στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Η υπερέκφραση των μορίων αυτών, η οποία προηγείται της διήθησης των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος στο πάγκρεας, διευκολύνει τα T και B λεμφοκύτταρα να αναγνωρίσουν τα αντιγόνα και τα β κύτταρα και έτσι ενεργοποιούνται τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (Εικόνα 1.10). Στο πάγκρεας ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1, όπου επικρατεί ανισορροπία απόκρισης, τα β παγκρεατικά κύτταρα αναγνωρίζονται ως ξένα κύτταρα, γίνεται επέκταση των T κυττάρων και ωρίμανση B κυττάρων, τα οποία μπορούν να παράγουν αντισώματα ειδικά για τα β κύτταρα και για τον ιό. Αυτά τα αντισώματα, συνήθως ανιχνεύονται μαζί σε άτομα με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1. Καθώς ο ιός εξαλείφεται, υπό φυσιολογικές συνθήκες, η ισορροπία των δραστικών T κυττάρων και των ρυθμιστικών T κυττάρων αναδιαμορφώνεται, ώστε να ελαχιστοποιηθεί οποιαδήποτε υπερβολική αντίδραση. Ωστόσο, σε άτομα με επιρρέπεια στην εμφάνιση Διαβήτη τύπου 1, εμφανίζονται γενετικές παραλλαγές σε βασικά σηματοδοτικά στοιχεία, τα οποία συμμετέχουν στην ανοσολογική απόκριση έναντι του ιού (π.χ. *IFIH1*, *PTPN2*), καθώς και στην ενεργοποίηση και στη ρύθμιση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος

(π.χ. CTLA4, PTPN22, IL-2R). Σε αυτά τα άτομα, η γενετική αστάθεια πιθανόν συμβάλλει στην αλλοίωση της απόκρισης στην ιογενή μόλυνση, με αποτέλεσμα την απώλεια ελέγχου ισορροπίας των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και την αυτοάνοση καταστροφή των β κυττάρων [1].



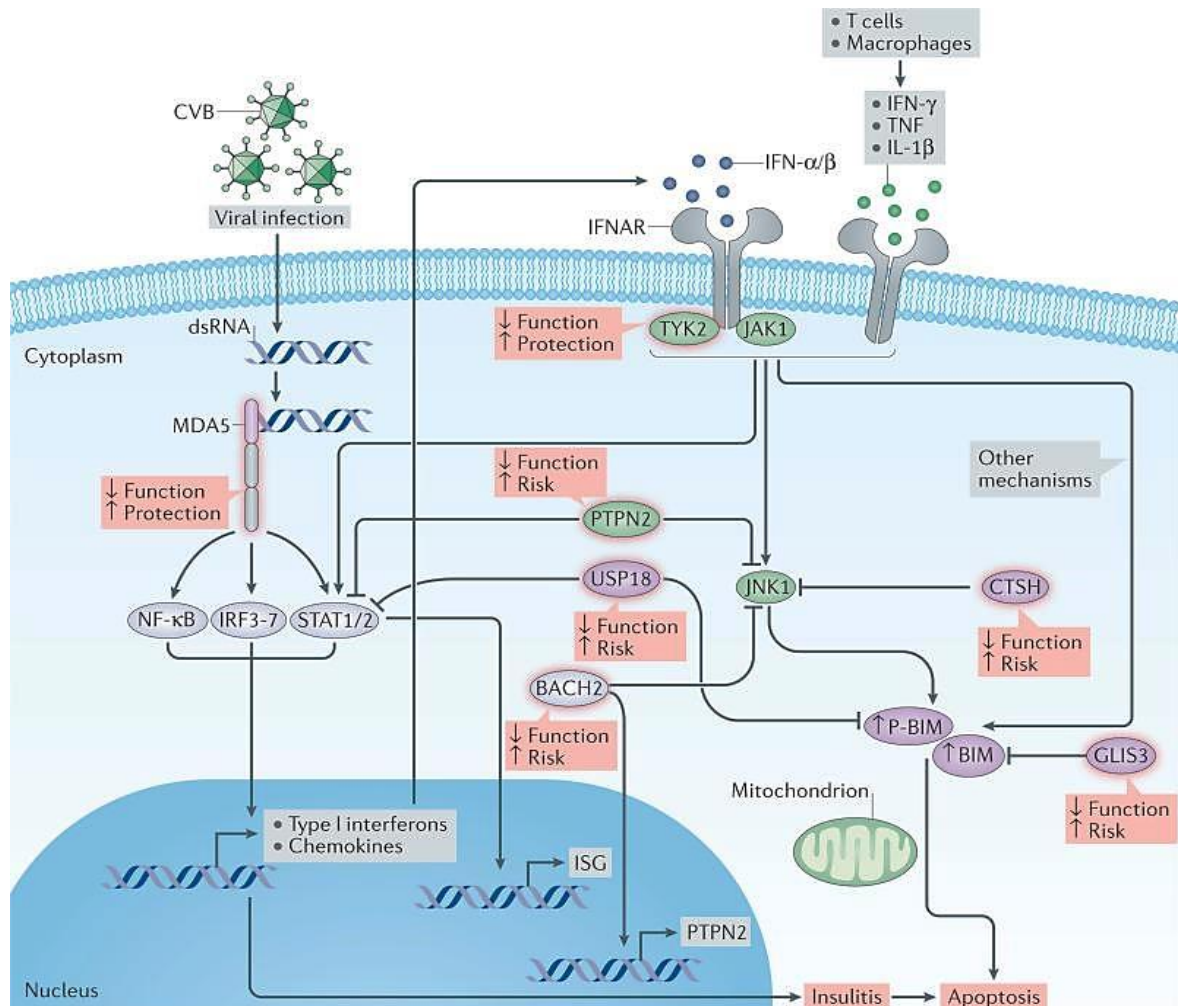
Εικόνα 1.10. Περιγραφή των μονοπατιών, μέσω των οποίων μια ιογενής λοίμωξη μπορεί να προκαλέσει αυτοάνοση επιλεκτική καταστροφή των β παγκρεατικών κυττάρων σε άτομα, τα οποία έχουν συγκεκριμένο γενετικό υπόβαθρο για την ανάπτυξη του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1. (1) Με την είσοδο του ιού στον ξενιστή ενεργοποιείται η αντι-ιϊκή απόκριση μέσω της παραγωγής ιντερφερονών τύπου I. Κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (2) μεταναστεύουν στην περιοχή της μόλυνσης (3). Το μονοπάτι της ιντερφερόνης στα β παγκρεατικά κύτταρα επάγει την υπερέκφραση των μορίων MHC τάξης I (4). Τα μόρια MHC τάξης I παρουσιάζουν τα β κύτταρα και τα ιϊκά αντιγόνα στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (5). Μετά την αναγνώριση των ειδικών

αντιγόνων ενεργοποιούνται κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος σε ένα περιβάλλον το οποίο δεν έχει κανονικό ρυθμιστικό έλεγχο (6). Το γεγονός αυτό οδηγεί στην παραγωγή κυτταροτοξικών *T* λεμφοκυττάρων (7) και στην ωρίμανση *B* λεμφοκυττάρων τα οποία μπορούν να παράγουν αντισώματα ειδικά για τα β παγκρεατικά κύτταρα (8). Στη συνέχεια, τα κύτταρα αυτά μπορούν να στοχεύσουν και να καταστρέψουν τα β κύτταρα (9) [1].

Τα υποψήφια γονίδια, τα οποία σχετίζονται με την εμφάνιση Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1, μπορούν να συμβάλλουν στην ανάπτυξη της ασθένειας, μέσω της απορρύθμισης των αντι-ϊικών αποκρίσεων και της ενεργοποίησης της αυτοάνοσης καταστροφής των β παγκρεατικών κυττάρων. Όπως φαίνεται στην εικόνα 1.11, η ανοσολογική απόκριση στην ιϊκή μόλυνση ξεκινά με την αναγνώριση τμημάτων του ιού, από κατάλληλους υποδοχείς, όπως **TLR3**, **RIG-I**, **MDA5** [50]. Έτσι, πραγματοποιείται τοπική απελευθέρωση ιντερφερονών τύπου I. Οι εκκρινόμενες ιντερφερόνες δεσμεύονται σε υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας (IFNAR) και στη συνέχεια ενεργοποιούν συγκεκριμένες κινάσες (TYK2, JAK). Αυτά τα ένζυμα φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες (STATs) με άμεσο αποτέλεσμα τη διέγερση των μονοπατιών μεταγωγής σημάτων, τα οποία καθορίζουν την αντι-ϊική απόκριση, μέσω ενεργοποίησης άλλων γονιδίων που εξαρτώνται από τις ιντερφερόνες τύπου I. Στην εικόνα 1.11 περιγράφονται τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος των β παγκρεατικών κυττάρων, μετά από μόλυνση με ιούς ή ύστερα από επαγωγή από ιντερφερόνες τύπου I. Γονίδια τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της αντι-ϊικής απόκρισης των β κυττάρων, είναι το *IFIH1*, το οποίο κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη MDA5, το TYK2, και το *PTPN2* [50].

Η άμυνα του ξενιστή έναντι των μικροοργανισμών θεωρείται συνήθως εξειδικευμένο έργο κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, γεγονός που δηλώνει την ανικανότητα των υπόλοιπων κυττάρων του οργανισμού να συμβάλλουν στην αντιμετώπισή τους. Οι μηχανισμοί αντιμετώπισης των αντιγόνων είναι παρόντες σε βασικά επίπεδα αλλά επάγονται περισσότερο μετά από ιϊκή μόλυνση. Ύστερα από συγκριτικές μελέτες μεταξύ των α και β παγκρεατικών κυττάρων διαπιστώθηκε πως τα α κύτταρα είναι πιο αποτελεσματικά στην αντιμετώπιση των ιϊκών μολύνσεων. Αντίθετα, τα β κύτταρα είναι πιο ευαίσθητα στη μόλυνση από τον ιό *Coxsackie*, λόγω έλλειψης κρίσιμων κυτταρικών παραγόντων και αποτελεσματικής αντι-ϊικής απόκρισης [50]. Το γεγονός αυτό οδηγεί στη λειτουργική τους βλάβη. Σημαντικό είναι να τονιστεί ότι οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι τα α κύτταρα προκαλούν μια πιο γρήγορη και αισθητή απόκριση, η οποία οδηγεί σε μείωση της

έκφρασης του ιού σε σύντομο χρονικό διάστημα, σε αντίθεση με τα β κύτταρα, τα οποία φαίνεται ότι δεν μπορούν να ελέγξουν τον πολλαπλασιασμό του ιού. Επίσης, πειράματα έδειξαν ότι οι αδenoϊοί μπορούν να εισέλθουν και στους δύο κυτταρικούς τύπους, ωστόσο προκαλούν έκφραση γονιδίων ειδικών για την αντιμετώπισή τους και αναπαράγονται λιγότερο αποτελεσματικά στα α από ότι στα β κύτταρα, λόγω της αποτελεσματικής παρεμπόδισης της μετάφρασης στα α κύτταρα. Επομένως, φαίνεται ότι ο ιϊκός κύκλος ξεκινάει και στους δύο τύπους κυττάρων αλλά ο έλεγχος του πολλαπλασιασμού του ιού είναι πιο αποτελεσματικός στα α παγκρεατικά κύτταρα, οδηγώντας σε αποτυχημένη μόλυνση. Σύμφωνα με τα παραπάνω είναι φανερό ότι τα α και β παγκρεατικά κύτταρα έχουν διαφορετικές, αυτόνομες, κυτταρικές ιδιότητες. Αυτές οι αποκλίσεις μπορούν να εξηγήσουν την διαφορετική ικανότητα αντιμετώπισης ιϊκών λοιμώξεων και ενδεχομένως ερμηνεύουν το γεγονός ότι χρόνια μολυσμένα β αλλά όχι α παγκρεατικά κύτταρα, στοχεύονται από μια αυτοάνοση απόκριση και καταστρέφονται κατά τη διάρκεια του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1 [50].



Εικόνα 1.11. Ρύθμιση των βασικών αντι-ϊικών αποκρίσεων στα β παγκρεατικά κύτταρα. Μετά τη μόλυνση, ο πολλαπλασιασμός του ιού Coxsackie B (CVB) παράγει ένα μικρό κυτταροπλασματικό δίκλωνο μόριο RNA, μια μη φυσιολογική μορφή mRNA που αναγνωρίζεται από τον κυτταροπλασματικό υποδοχέα MDA5. Η δέσμευση του MDA5 στο δίκλωνο RNA ενεργοποιεί τους μεταγραφικούς παράγοντες NF-κB, IRFs και STATs, προκαλώντας την παραγωγή ιντερφερονών τύπου I και χημειονικών, συμβάλλοντας έτσι στην τοπική φλεγμονή (ινσουλίτιδα). Οι ιντερφερόνες τύπου I (IFNα και IFNβ), οι ιντερφερόνες τύπου II (IFNγ) και οι κυτοκίνες TNF και IL-1β συμβάλλουν στην καταστροφή των β παγκρεατικών κυττάρων γενετικά ευαίσθητων ατόμων. Οι ιντερφερόνες τύπου I δεσμεύονται σε υποδοχείς IFN α/β (IFNAR) μέσω των TYK2 και JAK1 και προκαλούν την ενεργοποίηση των STATs και την έκφραση γονιδίων με αντι-ϊικές ιδιότητες που διεγείρονται από την ιντερφερόνη (ISGs). Οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες προάγουν την ενεργοποίηση του JNK1, το οποίο επάγει την ενδογενή (μιτοχονδριακή) αποπτωτική οδό μέσω της πρωτεΐνης BIM. Το PTPN2 ρυθμίζει τον θάνατο των β κυττάρων που επάγεται από τις ιντερφερόνες, ρυθμίζοντας την ενεργοποίηση του P-BIM μέσω JNK1. Το PTPN2 λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της σηματοδοτικής οδού. Οι ρυθμιστικοί παράγοντες που εμπλέκονται στο Διαβήτη τύπου 1 βρίσκονται σε κόκκινα πλαίσια. Οι κινάσες και οι φωσφατάσες υποδεικνύονται με πράσινο ενώ οι μεταγραφικοί παράγοντες με γκρι χρώμα [50].

4.3. Συμπτωματολογία και επιπλοκές Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1 εκδηλώνεται απότομα με έντονα κλινικά συμπτώματα, όπως υψηλά επίπεδα γλυκόζης (υπεργλυκαιμία) στο αίμα και στα ούρα, πολουρία (συχνή ούρηση), πολυδιψία (υπερβολική δίψα) ως συνέπεια της αφυδάτωσης, πολυφαγία, κόπωση, θολή όραση, απώλεια αίσθησης στα χέρια και στα πόδια, συχνές λοιμώξεις του δέρματος, του ουροποιητικού συστήματος ή των γεννητικών οργάνων και μεγάλη απώλεια βάρους σε σύντομο χρονικό διάστημα. Η αφυδάτωση οφείλεται στην προσπάθεια του ατόμου να απαλλαγεί από την περιττή γλυκόζη. Επομένως, όταν τα νεφρά χάνουν γλυκόζη, απομακρύνουν παράλληλα μεγάλη ποσότητα νερού, οδηγώντας έτσι σε αφυδάτωση. Επιπλέον, η απώλεια βάρους οφείλεται στην απώλεια θερμίδων που βρίσκονται στα ούρα και παρέχουν ενέργεια [54].

Όλα τα παραπάνω συμπτώματα μπορούν να οδηγήσουν τα νεαρά κυρίως άτομα, σε διαβητική κετοξέωση ή αλλιώς διαβητικό κώμα. Η διαβητική κετοξέωση είναι μια οξεία μεταβολική διαταραχή, η οποία δημιουργείται λόγω της ανεπάρκειας της ινσουλίνης και της υπερέκκρισης ανταγωνιστικών ορμονών (γλυκαγόνη, αυξητική ορμόνη, κορτιζόλη). Επιπλέον, τα κύτταρα δεν μπορούν να προσλάβουν γλυκόζη, χωρίς την παρουσία ινσουλίνης. Η έλλειψη γλυκόζης στα κύτταρα, οδηγεί το ήπαρ σε μια προσπάθεια να την αντισταθμίσει, ελευθερώνοντας περισσότερη γλυκόζη στο αίμα. Τα κύτταρα, τα οποία δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν τη γλυκόζη για ενέργεια, αντιδρούν με τη χρησιμοποιώντας ως καύσιμο το λίπος. Η διάσπαση του λίπους για την απόκτηση ενέργειας παράγει κετόνες, οι οποίες συσσωρεύονται σταδιακά στο αίμα σε τοξικά επίπεδα, με αποτέλεσμα αυξημένη οξύτητα. Η τυπική κλινική εικόνα ενός ασθενούς με διαβητική κετοξέωση περιλαμβάνει υπεργλυκαιμία, απώλεια βάρους, πολουρία, δύσπνοια, ταχυκαρδία, ναυτία, ξηροστομία, κοιλιακό άλγος, αφυδάτωση και μεταβολική οξέωση. Έτσι, παρατηρείται αυξημένη ωσμωτικότητα των εγκεφαλικών κυττάρων, οδηγώντας σε αλλαγές στο επίπεδο συνείδησης του ασθενούς με διαβητική κετοξέωση, γεγονός που μπορεί να προκαλέσει εμφάνιση κώματος ακόμα και θάνατο [54].

Η νόσος συνοδεύεται από αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα, λόγω της ανάπτυξης μικροαγγειοπαθειών και μακροαγγειοπαθειών. Οι μακροπρόθεσμες επιπλοκές του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1 σχετίζονται με βλάβες στο νευρικό σύστημα και τα μικροσκοπικά αιμοφόρα αγγεία των νεφρών, των ματιών και της καρδιάς. Τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα μπορούν να επηρεάσουν τη λειτουργία των νεύρων, δημιουργώντας

προβλήματα σε διάφορες λειτουργίες του οργανισμού. Επίσης, μπορούν να φθείρουν τη φυσιολογική λειτουργία των νεφρών να φιλτράρουν προϊόντα του μεταβολισμού, οδηγώντας σε νεφρική ανεπάρκεια. Βλάβες σε λεπτά αιμοφόρα αγγεία των ματιών μπορούν να προκαλέσουν ήπια διαταραχή της όρασης έως και τύφλωση. Τέλος, ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1 προδιαθέτει το άτομο για αθηροσκλήρωση των αρτηριών, κάτι που μπορεί να οδηγήσει σε καρδιοπάθειες, έμφραγμα του μυοκαρδίου ή εγκεφαλικό επεισόδιο.

4.4. Διάγνωση Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1

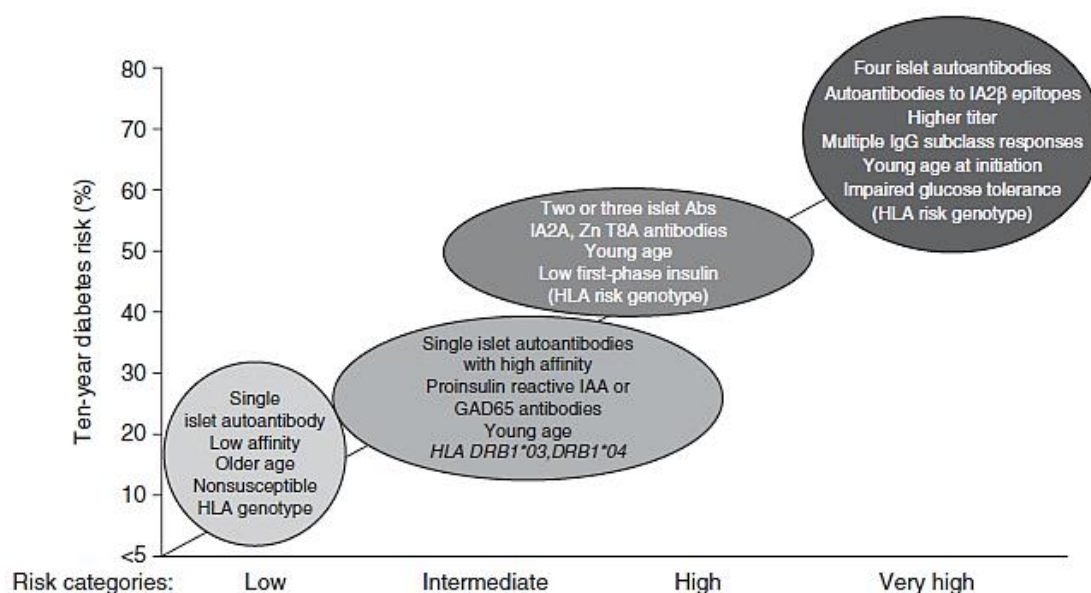
Παρόλο που ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1 μπορεί να διαγνωστεί σε οποιαδήποτε ηλικία, πρωτοεμφανίζεται κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας, σε νεαρά άτομα κάτω των 20 ετών. Η ανάπτυξη της αυτοανοσίας πραγματοποιείται μήνες ή χρόνια πριν την εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων. Παρόλο που οι περισσότερες αυτοάνοσες διαταραχές επηρεάζουν δυσανάλογα τις γυναίκες, ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1 είναι ελαφρώς πιο κοινός στους άνδρες [55].

Η διάγνωση του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1 γίνεται με τον έλεγχο των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα και την ανάλυση γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης καθώς και με τη δοκιμασία ανοχής γλυκόζης. Παράλληλα, ελέγχεται η ύπαρξη γλυκόζης και κετονών στα ούρα. Επίσης, για τη διάγνωση της ασθένειας πραγματοποιείται έλεγχος αυτοαντισωμάτων. Τα κριτήρια για τη διάγνωση του Διαβήτη τύπου 1, με ανάλυση της γλυκόζης στο αίμα, είναι τα εξής:

- Όταν η γλυκόζη του αίματος, σε περίοδο νηστείας 8 ωρών, είναι μεγαλύτερη από 126 mg/dl και επιβεβαιωθεί με δεύτερη μέτρηση άλλη ημέρα. Τα φυσιολογικά επίπεδα σακχάρου στο αίμα είναι 70-100 mg/dl.
- Όταν η γλυκόζη του αίματος, σε τυχαία μέτρηση άσχετα από την ώρα ή την κατάσταση του ατόμου, είναι μεγαλύτερη από 200 mg/dl και υπάρχουν και κλασικά συμπτώματα Διαβήτη.
- Όταν στην κλασική δοκιμασία ανοχής της γλυκόζης, 2 ώρες μετά τη χορήγηση 75 g άνυδρης γλυκόζης, το σάκχαρο είναι μεγαλύτερο από 200 mg/dl, ακόμα και χωρίς συμπτώματα.
- Όταν η γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη είναι μεγαλύτερη από 6,5 %.

Στους περισσότερους ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 παρατηρείται έντονη συμπτωματολογία υπεργλυκαιμίας (πολυδιψία, πολουρία και ανεξήγητη απώλεια βάρους) μαζί με τιμές γλυκόζης μεγαλύτερες από 200 mg/dl [54].

Τέλος, οι κυριότεροι τύποι αυτοαντισωμάτων, οι οποίοι σχετίζονται με την εμφάνιση Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1, είναι τα αντι-νησιδιακά αυτοαντισώματα, τα αυτοαντισώματα έναντι της ινσουλίνης, τα αυτοαντισώματα έναντι της αποκαρβοξυλάσης του γλουταμικού οξέος (GAD65) και τα αυτοαντισώματα έναντι της φωσφατάσης της τυροσίνης (IA-2). Υψηλά επίπεδα 3-4 τύπων αυτοαντισωμάτων συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο κλινικής έκφρασης Διαβήτη τύπου 1, κατά 60-100%, σε 5-10 έτη. Αντίθετα, η παρουσία ενός μόνο τύπου αυτοαντισώματος συσχετίζεται με ήπια, μη εξελισσόμενη διαταραχή [56]. Η καταστροφή των β παγκρεατικών κυττάρων φαίνεται να πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια του 1^{ου} χρόνου μετά την εμφάνιση των πρώτων αυτοαντισωμάτων και αυτό το χρονικό διάστημα θεωρείται κατάλληλο για θεραπευτική παρέμβαση, με στόχο την αναχαίτιση της κλινικής έκφρασης του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1 (Εικόνα 1.12) [54, 56].



Εικόνα 1.12. Διαστρωμάτωση κινδύνου ανάπτυξης Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1 σύμφωνα με την ύπαρξη αυτοαντισωμάτων [56].

Κεφάλαιο 5. Η ανάπτυξη της αλληλούχησης ευρείας κλίμακας νέας γενιάς και η εγκαθίδρυση της γονιδιωματικής μελέτης ως βασικό εργαλείο στη βιοϊατρική έρευνα

5.1. Αλληλούχηση ευρείας κλίμακας νέας γενιάς (Next Generation Sequencing)

Το DNA, ως το γενετικό υλικό, αποτελεί τον κώδικα που καθοδηγεί όλες τις κυτταρικές δραστηριότητες και καθορίζει το αναπτυξιακό πρόγραμμα των πολυκύτταρων οργανισμών. Συνεπώς, η κατανόηση της δομής και της λειτουργίας των γονιδίων είναι σημαντική για την αποκωδικοποίηση των μηχανισμών, που καθορίζουν τη λειτουργία του γονιδιώματος. Η αλληλούχηση ευρείας κλίμακας νέας γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS) είναι ένας όρος που περιγράφει έναν αριθμό νέων τεχνολογιών αλληλούχησης, μέσω των οποίων γίνεται αποκρυπτογράφηση της αλληλουχίας πολλαπλών μορίων DNA, ταυτοχρόνως και με μεγάλη ακρίβεια [57]. Χρησιμοποιώντας τις τεχνολογίες αυτές, καθίσταται δυνατός ο προσδιορισμός ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος σε μία μόνο ημέρα, προσφέροντας τη δυνατότητα κατανόησης των βιολογικών διεργασιών του οργανισμού. Αντιθέτως, με τη χρήση των παλαιότερων τεχνολογιών αλληλούχησης (μέθοδος αλληλούχησης κατά Sanger), η αποκρυπτογράφηση της ίδιας αλληλουχίας αποτελούσε μια χρονοβόρα διαδικασία, η οποία απαιτούσε πάνω από μία δεκαετία για να δώσει το τελικό σχέδιο. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης νέας γενιάς, χρησιμοποιούνται τεχνικές βιοπληροφορικής, όπως η πλατφόρμα Galaxy. Το Galaxy είναι μια πλατφόρμα, η οποία περιέχει διαφορετικά εργαλεία για ανάλυση δεδομένων αλληλούχησης νέας γενιάς, χωρίς ωστόσο να απαιτούνται ειδικές υπολογιστικές γνώσεις [58]. Τα τελευταία χρόνια λόγω της ραγδαίας εξέλιξης της τεχνολογίας της ευρείας αλληλούχησης, έχει αναπτυχθεί ένας νέος τομέας της επιστήμης που ονομάζεται *γονιδιωματική (genomics)*.

Με τη τεχνολογία αλληλούχησης νέας γενιάς κάθε αλληλουχία διαβάζεται αρκετές φορές, ώστε τα αποτελέσματα να είναι υψηλής ποιότητας, παρέχοντας πολύτιμη γνώση και ανεκτίμητες δυνατότητες για την κατανόηση πολλών βιολογικών φαινομένων. Υπάρχουν πολυάριθμες χρήσεις της αλληλούχησης υψηλής απόδοσης τόσο στην βιοϊατρική έρευνα, όσο και στην κλινική πράξη, καθώς καθίσταται δυνατός ο προσδιορισμός νέων μεταλλάξεων σε γονίδια που σχετίζονται με την εμφάνιση διάφορων ασθενειών ή με ογκογόνο δράση. Με

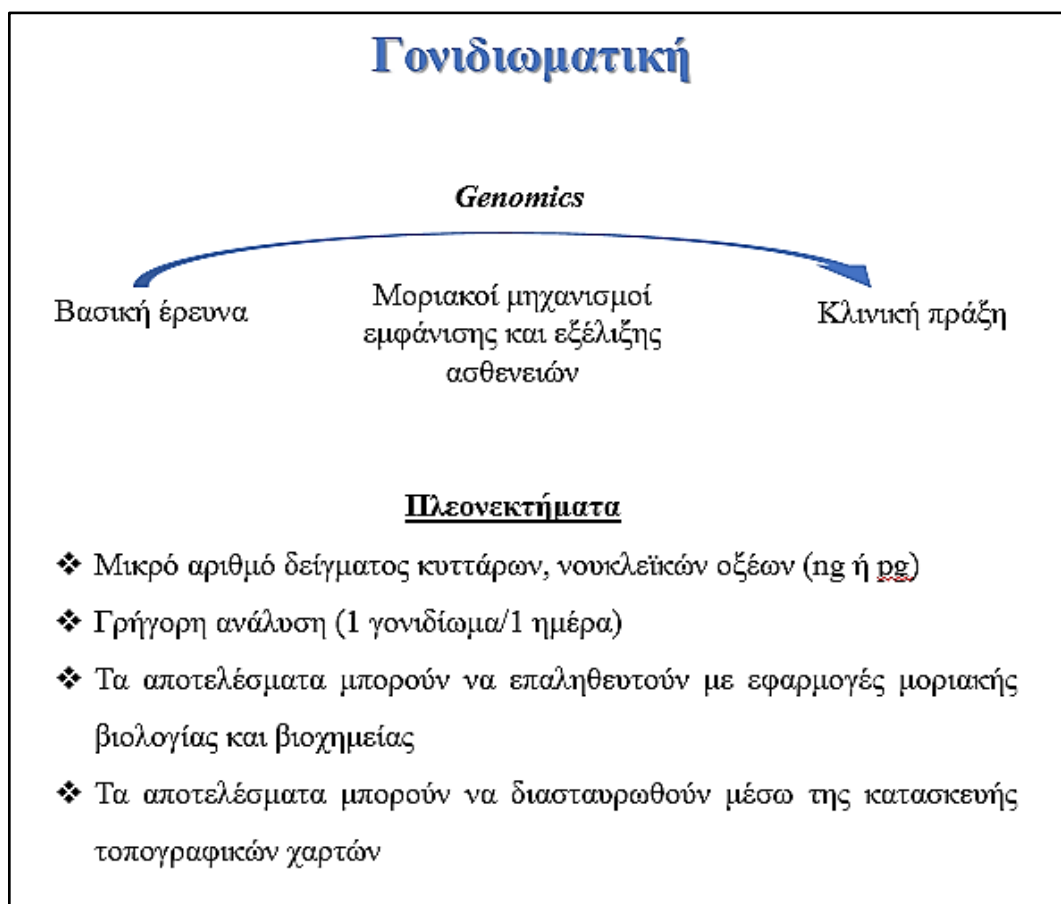
τον τρόπο αυτό μπορεί να επιτευχθεί ακριβέστερη πρόγνωση, διάγνωση και ανάπτυξη εξατομικευμένης διαχείρισης νόσων, γεγονός που βελτιώνει τη φροντίδα των ασθενών.

5.2. Γονιδιωματική τεχνολογία (*genomics*) και στρατηγικές εφαρμογές στη μελέτη μοριακών μηχανισμών που διέπουν τις ανθρώπινες ασθένειες

Η *γονιδιωματική* (*genomics*) είναι η μελέτη των γονιδιωμάτων των οργανισμών, με κύριο στόχο τον προσδιορισμό ολόκληρης της αλληλουχίας του DNA, της δομής, της λειτουργίας και της χαρτογράφησης. Η *γονιδιωματική* μετατόπισε τη μελέτη του γενετικού υλικού, από την ανάλυση μεμονωμένων γονιδίων, στην σφαιρική μελέτη του συνόλου των γονιδίων. Ενσωματώνει στοιχεία της μοριακής βιολογίας και της βιοχημείας, εφαρμόζοντας την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA, μεθόδους αλληλούχησης DNA και βιοπληροφορικής (*bioinformatics*), για την ανάλυση της δομής και της λειτουργίας ολόκληρων των γονιδιωμάτων και άλλων ενδογονιδιακών αλληλεπιδράσεων. Η *γονιδιωματική* διακρίνεται σε υποκατηγορίες ανάλογα με το πεδίο έρευνας, στο οποίο εστιάζει. Η *λειτουργική γονιδιωματική* (*Functional Genomics*) μελετά την έκφραση και τη λειτουργία γονιδίων, πρωτεϊνών και των αλληλεπιδράσεών τους. Η *επιγονιδιωματική* (*epigenomics*) χρησιμοποιείται για την ανάλυση των αναστρεψίμων επιγενετικών τροποποιήσεων του DNA (μεθυλίωση του DNA) ή των ιστονών (μεθυλίωση, ακετυλίωση, φωσφορυλίωση) ενός κυττάρου, οι οποίες αποτελούν το επιγένωμα ή επιγονιδίωμα, και επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων, χωρίς να μεταβάλλουν την αλληλουχία του DNA. Απώτερος στόχος της *γονιδιωματικής* είναι η κατανόηση της σχέσης μεταξύ του γονιδιώματος ενός οργανισμού και του φαινοτύπου [57, 59].

Στο εργαστήριο του Δρ. Μάριου Αγγελόπουλου εφαρμόζεται η προσέγγιση της *γονιδιωματικής* καθώς αποτελεί τη γέφυρα από τη βασική έρευνα στην κλινική πράξη, με ενδιαμέσο και πολύ σημαντικό στάδιο, την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που αποτελούν το θεμέλιο της παθογένεσης και διάφορων ασθενειών. Η *γονιδιωματική* χρησιμοποιείται καθώς απαιτεί μικρό αριθμό δείγματος κυττάρων ή μικρές ποσότητες νουκλεϊκών οξέων (ng ή pg), οι τεχνικές της είναι αρκετά γρήγορες, καθώς μέσα σε μία ημέρα μπορεί να γίνει αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος και επίσης, τα αποτελέσματα που προκύπτουν, μπορούν να επαληθευτούν με εφαρμογές βιοχημείας και μοριακής βιολογίας. Η «ανάγνωση» του γενετικού υλικού, δηλαδή η αναζήτηση συγκεκριμένων ρυθμιστικών στοιχείων, έχει στόχο τη διαπίστωση της παρουσίας γονιδίων

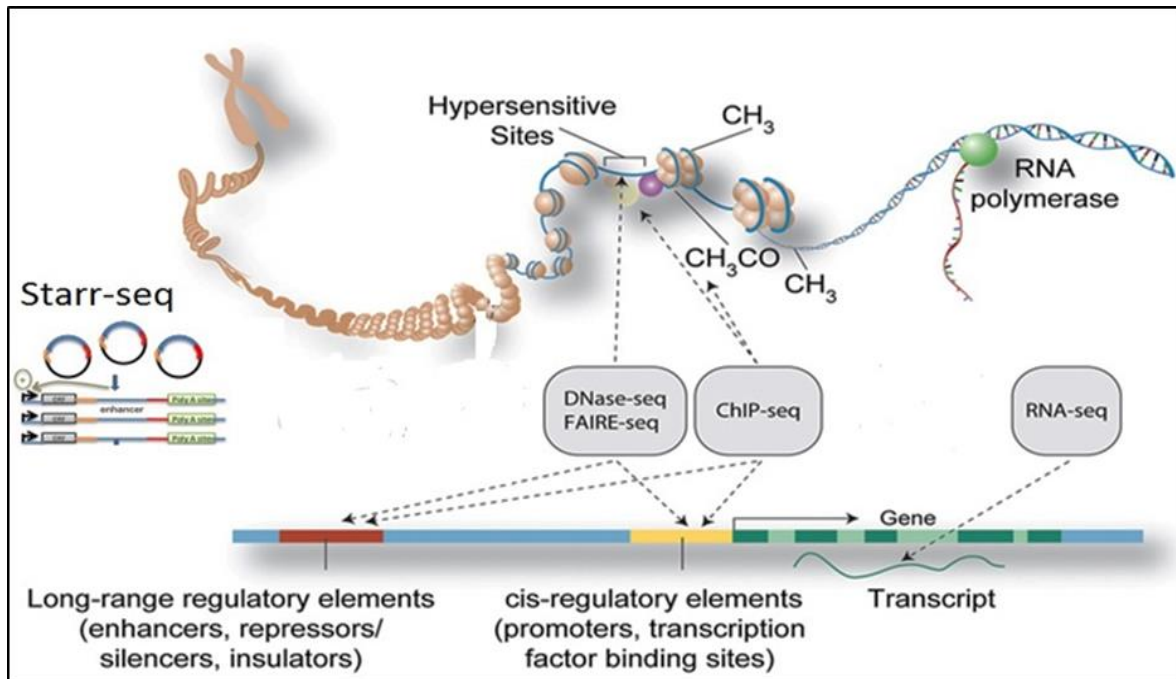
που είτε προκαλούν γενετικά νοσήματα είτε προδιαθέτουν σε συγκεκριμένα νοσήματα, αυξάνοντας την πιθανότητα νόσησης έναντι του γενικού πληθυσμού. Συνεπώς, οι γονιδιωματικές τεχνικές μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με γενετικές δοκιμασίες, για τον προσδιορισμό κινδύνου/πιθανότητας εμφάνισης νόσου αλλά και συγκεκριμένων πολυμορφικών ρυθμιστικών στοιχείων DNA, τα οποία οδηγήσουν σε αλλοίωση των δικτύων των ενισχυτών και τελικά σε μη φυσιολογικές ανοσολογικές αποκρίσεις. Τα αποτελέσματα των μελετών του εργαστηρίου μας στοχεύουν στην ανάπτυξη γενετικών δοκιμασιών, έναντι μιας ομάδας βιοδεικτών DNA, που θα βοηθήσουν στην ανάπτυξη εξατομικευμένων θεραπειών (Εικόνα 1.13).



Εικόνα 1.13. Στόχοι και πλεονεκτήματα της γονιδιωματικής τεχνολογίας (genomics).

Η επιστημονική πρόταση του εργαστηρίου του Δρ. Μάριου Αγγελόπουλου, συνίσταται από μια πρωτοποριακή και ολιστική προσέγγιση, η οποία στηρίζεται στη συνδυαστική χρήση των μεθόδων **FAIRE-seq** (Formaldehyde-assisted Isolation of Regulatory elements sequencing) [60], **DNaseI-seq** (DNase I Hypersensitive sites sequencing) [61], **ChIP-seq** (Chromatin Immunoprecipitation sequencing) [13, 62], **RNA-**

seq (RNA sequencing) [63] και **STARR-seq** (Self-Transcribing Active Regulatory Region sequencing) [64] (Εικόνα 1.14). Αυτές οι *γονιδιωματικές* στρατηγικές σε συνδυασμό με τεχνικές βιοπληροφορικής για την ανάλυση των δεδομένων αλληλούχησης, εφαρμόζονται προκειμένου να ταυτοποιηθούν οι μοριακοί μηχανισμοί ρύθμισης της επαγόμενης γονιδιακής έκφρασης σε ευκαρυωτικά συστήματα-μοντέλα.



Εικόνα 1.14. Απεικόνιση των λειτουργικών γονιδιωματικών στρατηγικών που χρησιμοποιούνται με στόχο τον εντοπισμό διαφορετικών τύπων λειτουργικών στοιχείων σε ολόκληρο το γονιδίωμα [59].

Αρχικά, με τις μεθόδους **FAIRE-seq** και **DNaseI-seq** γίνεται ανίχνευση, σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος, των περιοχών που στερούνται νουκλεοσωμάτων και επομένως έχουν αυξημένη πιθανότητα να φιλοξενούν μεταγραφικούς παράγοντες και να λειτουργούν ως ενισχυτές *in vivo*. Η αποσταθεροποίηση των νουκλεοσωμάτων από τη χρωματίνη είναι χαρακτηριστικό των λειτουργικών ρυθμιστικών στοιχείων του ευκαρυωτικού γονιδιώματος. Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος **DNaseI-seq** αποτελεί μια υψηλής ανάλυσης μοριακή τεχνική που χρησιμοποιεί τη μη ειδική ενδονουκlease DNase I για την χαρτογράφηση της προσβασιμότητας των χρωματινικών περιοχών στο ευκαρυωτικό γονιδίωμα. Οι προσβάσιμες θέσεις της χρωματίνης στη DNase I χαρακτηρίζουν περιοχές, οι οποίες έχουν ρυθμιστική δράση (π.χ. ενισχυτές, υποκινητές, μονωτές) [61]. Στο εργαστήριό

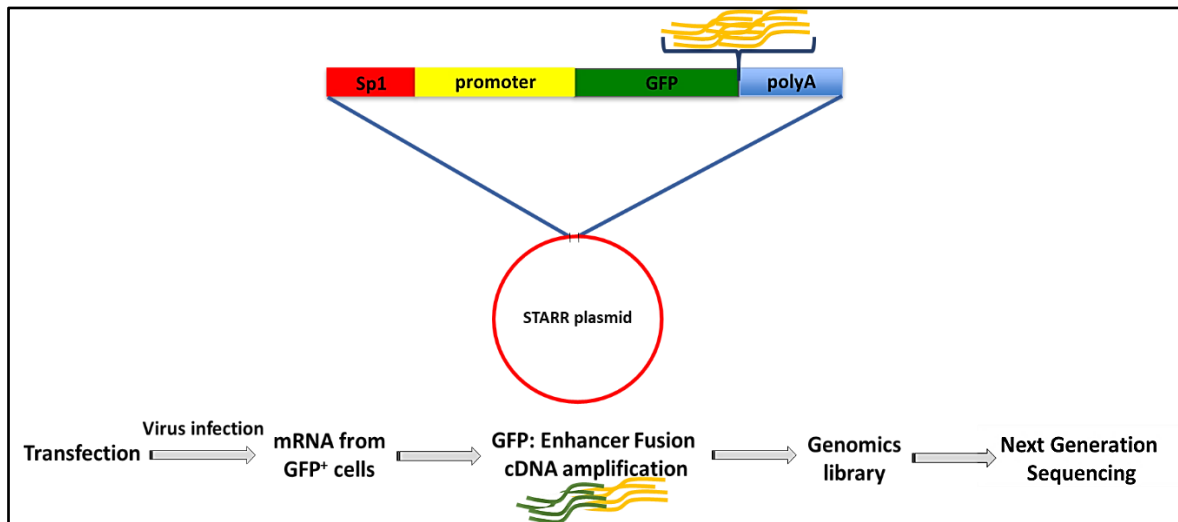
μας εφαρμόζεται με επιτυχία η τεχνική, ακολουθώντας ως πρότυπο το δημοσιευμένο DNaseI-seq πρωτόκολλο [61] και προσαρμόζοντας τις πειραματικές συνθήκες ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο.

Μια σημαντική μελέτη των Ostuni, R., et al. [65] αναφέρει την υπόθεση ότι οι αλλαγές στη συμπεριφορά των κυττάρων που προκαλούνται από ανοσολογική διέγερση, συσχετίζονται με τον επαναπρογραμματισμό των διαθέσιμων *cis*-ρυθμιστικών περιοχών. Για το λόγο αυτό με τη χρήση της μεθόδου **ChIP-seq** γίνεται μελέτη των θέσεων πρόσδεσης κρίσιμων ρυθμιστών π.χ. μεταγραφικών ενεργοποιητών ή συν-ενεργοποιητών, στη χρωματίνη. Η ανοσοκατακρήμνιση σε χρωματίνη αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της μεταγραφικής ρύθμισης, του ανασυνδυασμού του DNA και της δομής της χρωματίνης [62].

Η *ανάλυση του μεταγραφώματος (transcriptomic analysis)* με τη βοήθεια της μεθόδου **RNA-seq** προσφέρει την δυνατότητα ανάλυσης του mRNA καθώς και την ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης, μετά την απομόνωση RNA από υγιή και μολυσμένα κύτταρα. Επιπλέον, τα επίπεδα του RNA αντανακλούν πιο άμεσα τις αλλαγές που συμβαίνουν στην έκφραση των γονιδίων, καθώς ο χρόνος που μεσολαβεί από τη στιγμή που ένα γονίδιο ενεργοποιείται ως την παραγωγή της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί μπορεί να είναι περιοριστικός παράγοντας για την μελέτη ταχείας απόκρισης σε ερεθίσματα. Μια σειρά από μελέτες έχουν δείξει ότι σε σταθερές συνθήκες (steady state), τα επίπεδα του RNA συσχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με τα αντίστοιχα των πρωτεϊνών και παρά το γεγονός ότι ο βαθμός συσχέτισης είναι μειωμένος για τα mRNA που βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση, η ποσοτικοποίηση των mRNA θεωρείται ο πιο διαδεδομένος, άμεσος και συστηματικός τρόπος για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης [63, 66].

Όλες οι παραπάνω τεχνικές προσδιορίζουν γονίδια και υποψήφια ρυθμιστικά στοιχεία του DNA, τα οποία φέρουν δομικά χαρακτηριστικά που αποτελούν κοινά στοιχεία των ενισχυτών, τα οποία στη συνέχεια ελέγχονται ως προς τη δραστικότητά τους *in vivo*. Η οριστική επιβεβαίωση της λειτουργικότητας των ρυθμιστικών στοιχείων προέρχεται από την εφαρμογή μιας τροποποίησης της μεθόδου **STARR-seq**, της μοναδικής τεχνικής, με την οποία μπορούν να ελεγχθούν ταυτόχρονα και μαζικά χιλιάδες υποψήφια τμήματα DNA, για πιθανή δράση ενισχυτή. Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των ενισχυτών να προκαλούν επαγωγή της μεταγραφής ακόμα και εάν βρίσκονται αρκετές χιλιάδες βάσεις κάτωθεν του υποκινητή και συνδέει τη διαφορική γονιδιακή έκφραση με τις διαφορές στην ενεργότητα

του ενισχυτή [64]. Επειδή είναι γνωστό ότι οι ενισχυτές μπορούν να δράσουν ανεξαρτήτως της σχετικής θέσης τους σε σχέση με τα γονίδια που ρυθμίζουν οι υπό εξέταση αλληλουχίες τοποθετούνται καθοδικά ενός ασθενούς υποκινητή και ενός γονιδίου αναφοράς (GFP), έτσι ώστε οι ενεργοί ενισχυτές να μπορούν μεταγράψουν τον ίδιο τους εαυτό [67]. Η ισχύς κάθε ενισχυτή θα είναι ανάλογη της ποσότητας του RNA που έχει προκύψει σαν αποτέλεσμα της μεταγραφής του (Εικόνα 1.15).



Εικόνα 1.15. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού δράσης των ενισχυτών που κλωνοποιούνται στον πλασμιδιακό φορέα STARR και των βημάτων του πειράματος STARR-seq.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία εφαρμόστηκαν σύγχρονες τεχνικές, οι οποίες ανήκουν στο ευρύτερο φάσμα της *γονιδιωματικής*, όπως πειράματα RNA-seq, DNaseI-seq, και ChIP-seq. Όλα τα παραπάνω πειράματα ολοκληρώνονται με την πραγματοποίηση αλληλούχησης ευρείας κλίμακας νέας γενιάς. Η διαδικασία αλληλούχησης των πειραμάτων, πραγματοποιήθηκε στο πλήρως εξοπλισμένο Ελληνικό Κέντρο Γονιδιωματικής (Greek Genome Center, GGC) του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (I.I.B.E.A.A). Η μέθοδος αλληλούχησης που χρησιμοποιείται στα πλαίσια αυτής της εργασίας είναι αυτή της Illumina, η οποία αποτελεί μια από τις τεχνολογίες αλληλούχησης νέας γενιάς.

2. Σκοπός διπλωματικής εργασίας

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας με τίτλο «Μελέτη των Επαγόμενων από Ιό Προγραμμάτων Γονιδιακής Έκφρασης σε Κύτταρα Θηλαστικών μέσω Γονιδιοματικής Τεχνολογίας», η οποία εκπονήθηκε στο εργαστήριο του Δρ. Μάριου Αγγελόπουλου στο Κέντρο Βασικής Έρευνας του Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α, είναι η ανακάλυψη και η κατανόηση/αποκωδικοποίηση των μοριακών μηχανισμών ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, κατά τη διάρκεια της κυτταρικής απόκρισης ύστερα από ιϊκή μόλυνση και η σύνδεση της ανάπτυξης των αντίστοιχων προγραμμάτων γονιδιακής έκφρασης σε β παγκρεατικά κύτταρα. Ως πειραματικό μοντέλο χρησιμοποιήθηκαν β παγκρεατικά κύτταρα ποντικού (Beta-TC-6 cells), μολυσμένα και μη μολυσμένα με τον ιό Sendai, σε πειραματική πλατφόρμα που προσομοιάζει το φαινόμενο έναρξης ανάπτυξης Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1. Πιο συγκεκριμένα, στόχος είναι η ανακάλυψη ρυθμιστικών περιοχών και η κατανόηση της συντονισμένης λειτουργίας τους (coordinated co-operation of regulatory elements), η οποία οδηγεί σε συγχρονισμένη και χωροχρονικά ορθή έκφραση των αντι-ιϊκών γονιδίων, κατά τη διάρκεια της επιτυχημένης κυτταρικής απόκρισης. Μελετάται δηλαδή, ο τρόπος με τον οποίον ενεργοποιούνται και οργανώνονται στοιχεία, όπως cis ρυθμιστικές περιοχές και μεταγραφικοί παράγοντες, με αποτέλεσμα την απόκτηση συγκεκριμένου προτύπου γονιδιακής έκφρασης των β παγκρεατικών κυττάρων πριν και κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη, σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος και του μεταγραφώματος της επίδρασης της ιϊκής μόλυνσης σε β παγκρεατικά κύτταρα και η δημιουργία ενός αξιόπιστου καταλόγου με υποψήφια γονίδια και ρυθμιστικά στοιχεία του DNA, τα οποία συμμετέχουν στην απόκριση των β παγκρεατικών κυττάρων εναντίον των ιών. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να γίνει η αποκωδικοποίηση της ρυθμιστικής λογικής που κρύβεται πίσω από την λειτουργία του γονιδιώματος του ποντικού μετά από ιϊκή μόλυνση, ένα φαινόμενο το οποίο αφορά στην ανάπτυξη του αυτοάνοσου μηχανισμού που οδηγεί στην εμφάνιση του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1.

Για τους παραπάνω λόγους πραγματοποιήθηκαν επιτυχώς οι παρακάτω πειραματικές στρατηγικές: 1) Καλλιέργεια β παγκρεατικών κυττάρων ποντικού (Beta-TC-6 cells) και μόλυνση αυτών με ιό Sendai, 2) Πειράματα απομόνωσης ολικού RNA και αλληλούχηση ευρείας κλίμακας (RNA-seq) σε Beta-TC-6 κύτταρα πριν και μετά την ιϊκή

μόλυνση, 3) Πειράματα προσδιορισμού των χρωματινικών θέσεων υπερευαισθησίας στο ένζυμο DNase I και αλληλούχηση ευρείας κλίμακας (DNaseI-seq) σε Beta-TC-6 κύτταρα πριν και μετά την ιϊκή μόλυνση, 4) Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης σε χρωματίνη και αλληλούχηση ευρείας κλίμακας (ChIP-seq) για τις ιστονικές τροποποιήσεις H3K27ac και H3K4me3, του μεταγραφικού συμπλόκου της RNA πολυμεράσης II και του μεταγραφικού παράγοντα IRF3 σε Beta-TC-6 κύτταρα πριν και μετά την ιϊκή μόλυνση, 5) Δοκιμαστικά πειράματα STARR σε Beta-TC-6 κύτταρα, προκειμένου ελεγχθούν και να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες, 6) Σχεδιασμός 2.500 αλληλουχιών, ώστε να γίνει λειτουργική αξιολόγηση των περιοχών του γονιδιώματος που φέρουν κρίσιμους μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNPs) για δημιουργία του διαβητικού φαινοτύπου, μέσω της μεθόδου synthetic-STARR-seq πριν και μετά την ιϊκή μόλυνση καθώς και πραγματοποίηση πιλοτικών πειραμάτων της διαδικασίας αυτής και 7) Εκτεταμένη βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων που προέκυψαν από την αλληλούχηση ευρείας κλίμακας, με κατάλληλους αλγορίθμους για την ορθή κατασκευή των τοπογραφικών χαρτών των ρυθμιστικών περιοχών που ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης.

Το θέμα της συγκεκριμένης εργασίας αποτελεί μέρος ενός επιστημονικού προγράμματος που πραγματοποιείται στο εργαστήριο του Δρ. Μάριου Αγγελόπουλου, στο Κέντρο Βασικής Έρευνας του Ι.Ι.Β.Ε.Α.Α. Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε με χρηματοδότηση από τον προϋπολογισμό του Ι.Ι.Β.Ε.Α.Α και από το Ίδρυμα «Αντώνιος και Ιωάννης Αγγελικούσης».

3. Πειραματικό μέρος – Υλικά και μέθοδοι

3.1. Κυτταροκαλλιέργεια

Κυτταρική καλλιέργεια είναι η *in vitro* διαδικασία ανάπτυξης κυττάρων υπό ελεγχόμενες συνθήκες στο εργαστήριο, εκτός του φυσικού τους περιβάλλοντος, από το οποίο έχουν απομονωθεί. Για τη διατήρηση των κυττάρων σε καλλιέργεια, απαιτούνται αυστηρές στείρες συνθήκες, κατάλληλα θρεπτικά υλικά, σταθερή θερμοκρασία και παροχή CO₂. Οι εφαρμογές της τεχνολογίας των κυτταροκαλλιεργειών είναι πολύ σημαντικές και αφορούν τόσο στη βασική έρευνα για τη μελέτη των μηχανισμών ρύθμισης της κυτταρικής λειτουργίας, όσο και σε διάφορες βιοτεχνολογικές εφαρμογές, όπως είναι η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων φαρμακευτικών βιομορίων (π.χ. ορμόνες, ένζυμα), εμβολίων και άλλων ουσιών με θεραπευτική δράση [68].

Τα κύτταρα μιας καλλιέργειας αναπαράγονται με διαδοχικές διαιρέσεις. Οι περισσότερες κυτταρικές σειρές που διατηρούνται στο εργαστήριο πολλαπλασιάζονται ομοιόμορφα, δημιουργώντας μια στιβάδα κυττάρων στην επιφάνεια ειδικού πλαστικού πιάτου, στην οποία κάθε κύτταρο είτε είναι προσκολλημένο, με τη βοήθεια ειδικών πρωτεϊνών, όπως κολλαγόνο, είτε είναι αιωρούμενο στο υγρό θρεπτικό μέσο. Όταν η επιφάνεια του τρυβλίου καλυφθεί από κύτταρα σε όλη την έκτασή της, τότε λέγεται ότι εμφανίζει κάλυψη (confluency). Σε αυτό το σημείο, συνήθως σταματά η αύξηση των κυττάρων και είναι απαραίτητη η ανακαλλιέργεια (subculture). Για την ανακαλλιέργεια απαιτείται αρχικά η απομάκρυνση των κυττάρων από το τρυβλίο. Για τους προσκολλητικούς τύπους κυττάρων, αυτό επιτυγχάνεται με την αποκόλλησή τους από την επιφάνεια του τρυβλίου μέσω επίδρασης ενζύμων, όπως της ενδοπεπτιδάσης θρυψίνης (trypsin), τα οποία διασπούν την πρωτεϊνική πρόσφυση στο υπόστρωμα, ενώ για τους αιωρούμενους τύπους κυττάρων στο θρεπτικό μέσο πρέπει να γίνει φυγοκέντρηση, ώστε να συλλεχθούν τα κύτταρα. Στη συνέχεια, γίνεται επαναιώρηση των κυττάρων σε θρεπτικό υλικό και κατανομή ενός ποσοστού του εναιωρήματος σε νέα τρυβλία, ώστε οι νέες καλλιέργειες να έχουν χαμηλότερη κυτταρική πυκνότητα [69]. Έτσι λοιπόν, γίνεται δυνατή η καλλιέργεια μεγάλου αριθμού κυττάρων, ξεκινώντας από σχετικά λίγα κύτταρα.

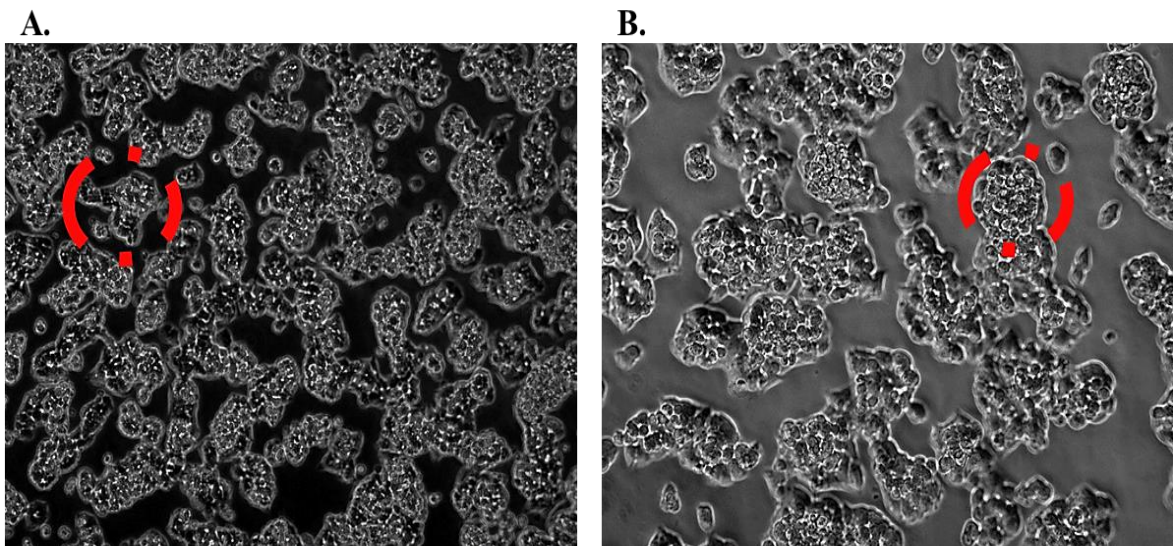
3.1.1. Κυτταρική σειρά Beta-TC-6

Για την παρούσα διπλωματική εργασία έγινε καλλιέργεια, μικρής και μεγάλης κλίμακας, της κυτταρικής σειράς Beta-TC-6 (β-tumor cell line, βTC). Η κυτταρική σειρά Beta-TC-6 είναι καρκινική σειρά, η οποία προήλθε από παγκρεατικό όγκο (ινσουλίνωμα), που προέκυψε σε διαγονιδιακό ποντικό για το γονίδιο του μεγάλου SV40 T-αντιγόνου, σε παγκρεατικά κύτταρα. [70, 71, 72]. Πιο συγκεκριμένα, ο ποντικός φέρει διαγονίδιο που αποτελείται από την πρώιμη περιοχή του γονιδίου SV40 και εκφράζεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου της ινσουλίνης II. Ο SV40 (Simian Virus) είναι συντομογραφία για τον ιό Simian, ή ιός του πιθήκου 40, είναι ένας πολύωμα DNA ιός της οικογένειας Polymaviridae, ο οποίος μολύνει πιθήκους και ανθρώπους.

Το ινσουλίνωμα είναι σπάνιος, συνήθως καλοήθης όγκος του παγκρέατος, ο οποίος προέρχεται από β-κύτταρα των νησίδων Langerhans του παγκρέατος που παράγουν ινσουλίνη. Ο όγκος αυτός, εκκρίνει μεγάλη ποσότητα ινσουλίνης ως απόκριση στη γλυκόζη, με επακόλουθο αποτέλεσμα να οδηγεί σε υπογλυκαιμία. Τα ινσουλινώματα αποτελούν τα 3/4 των ενδοκρινών όγκων του παγκρέατος, τα οποία συνήθως είναι καλοήθη αδενώματα κάτω των 3 εκατοστών [73]. Η κυτταρική σειρά αποτελείται από γενετικά μη κλωνικό πληθυσμό κυττάρων με φαινοτυπική αστάθεια στην έκκριση ινσουλίνης. Με την πάροδο της καλλιέργειας των κυττάρων παρατηρούνται χαμηλότερα επίπεδα γλυκόζης από τα φυσιολογικά και/ή μείωση επιπέδων έκκρισης ινσουλίνης. Η πλειοψηφία των κυττάρων Beta-TC-6 περιέχει άφθονη ποσότητα ινσουλίνης, μόνο ένας μικρότερος αριθμός κυττάρων περιέχει γλυκαγόνη ενώ ακόμα μικρότερος αριθμός κυττάρων περιέχει σωματοστατίνη. Τα κύτταρα τα οποία παράγουν γλυκαγόνη, συνήθως παράγουν και ινσουλίνη, ενώ τα κύτταρα που περιέχουν σωματοστατίνη δεν περιέχουν ινσουλίνη ή γλυκαγόνη. Τα περισσότερα Beta-TC-6 κύτταρα, τα οποία φέρουν γλυκαγόνη, έχουν παρόμοιο μέγεθος με τα κύτταρα που περιέχουν ινσουλίνη. Σπάνια ένα κύτταρο το οποίο είναι θετικό σε γλυκαγόνη είναι μεγαλύτερο από κύτταρο που φέρει ινσουλίνη. Τα κύτταρα που περιέχουν σωματοστατίνη μπορούν να διακριθούν καθώς έχουν ένα μοναδικό χαρακτηριστικό σχήμα 8 κυττάρων οργανωμένα σε νησίδες [71, 72, 73].

Τα Beta-TC-6 είναι προσκολλητικά κύτταρα και έχουν την τάση να δημιουργούν ομάδες/αποικίες, σχηματίζοντας τρισδιάστατες νησίδες, οι οποίες ομοιάζουν στις παγκρεατικές νησίδες (islet-like colonies). Τα κύτταρα αναπτύσσονται αργά, καθώς χρειάζεται λίγες μέρες ώστε να ανακάμψουν ύστερα από την κρυοσυντήρησή τους. Κατά

την έναρξη της καλλιέργειας είναι φυσιολογικό να υπάρχουν πολλά επιπλέοντα κύτταρα, τα οποία ωστόσο είναι βιώσιμα και τελικά θα προσκολληθούν στον πυθμένα της φλάσκας ή των πιάτων, στα οποία πραγματοποιείται η καλλιέργεια, σχηματίζοντας συστάδες. Κάθε ημέρα γίνεται έλεγχος της ανάπτυξης των κυττάρων μέσω παρατήρησης της καλλιέργειας στο μικροσκόπιο. Επίσης, κάθε 48 ώρες γίνεται πλύση των κυττάρων με 1X PBS (Phosphate-Buffered Saline), ώστε να γίνει απομάκρυνση των νεκρών κυττάρων, τα οποία επιπλέον και είναι στρογγυλά, καθώς και παραπροϊόντων του κυτταρικού μεταβολισμού. Η καλλιέργεια των κυττάρων δεν είναι εύκολο να αποκτήσει 100% κάλυψη (confluency) ενώ η μέση συγκέντρωσή τους είναι 10^6 κύτταρα/mL. Η ανακαλλιέργεια, συνήθως πραγματοποιείται όταν παρατηρηθεί 70-80% κάλυψη (confluency). Κατά την ανακαλλιέργεια, ενδείκνυνται αραιώσεις 1/3 ή 1/4, ώστε να μην πραγματοποιηθούν υπερβολικές αραιώσεις των κυττάρων, καθώς αυτό θα επηρεάσει δυσμενώς την ανάπτυξη και την βιωσιμότητά τους.



Εικόνα 3.1. Καλλιέργεια Beta-TC-6 κυττάρων. Μορφολογία της κυτταρικής σειράς Beta-TC-6 από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο με τη χρήση διαφορετικού αντικειμενικού φακού (A, B). Με το διακεκομμένο κόκκινο κύκλο φαίνεται η δημιουργία ομάδων/αποικιών των κυττάρων μέσα στην καλλιέργεια, οι οποίες οδηγούν στο σχηματισμό τρισδιάστατων νησίδων.

3.1.2. Παρασκευή υγρού θρεπτικού μέσου

Το υγρό θρεπτικό υλικό είναι ισότονο διάλυμα ανόργανων αλάτων, το οποίο εξασφαλίζει φυσιολογικό περιβάλλον στα κύτταρα, διατηρώντας τις βασικές μεταβολικές λειτουργίες τους. Περιέχει θρεπτικές ουσίες για την ανάπτυξη των κυττάρων, πηγή άνθρακα όπως είναι η γλυκόζη ή λακτόζη (υδατάνθρακες) και είναι εμπλουτισμένο σε αμινοξέα, βιταμίνες και άλλους αυξητικούς παράγοντες. Επίσης, τα θρεπτικά υλικά περιέχουν αντιβιοτικά έτσι ώστε να αποφευχθεί η ανάπτυξη ανεπιθύμητων μικροοργανισμών.

Για την καλλιέργεια των κυττάρων Beta-TC-6 χρησιμοποιείται θρεπτικό μέσο Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) της Sigma-Aldrich. Στο μέσο αυτό, γίνεται προσθήκη των παρακάτω συστατικών:

- 15% εμβρυϊκός ορός βοοειδών, FBS (Fetal Bovine Serum της gibco)
- 1% αντιβιοτικά, πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (PenStrep της gibco by Life Technologies)
- 1% συμπλήρωμα GlutaMAX (της gibco by Life Technologies)

Μετά την προετοιμασία, το θρεπτικό υλικό φυλάσσεται στους 4°C.

Παρατηρήσεις

- Ο εμβρυϊκός ορός βοοειδών (FBS) είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο συμπλήρωμα ορού για την *in vitro* κυτταροκαλλιέργεια των ευκαρυωτικών κυττάρων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι έχει χαμηλό επίπεδο αντισωμάτων και περιέχει παράγοντες ανάπτυξης, οι οποίοι επιτρέπουν την προσαρμοστικότητα των κυττάρων.
- Το FBS του εμπορίου πριν τη χρήση του πρέπει να απενεργοποιηθεί με επώαση σε υδατόλουτρο στους 56°C για 30 λεπτά. Με αυτόν τον τρόπο αδρανοποιούνται κάποιες πρωτεΐνες του συμπληρώματος, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν λύση των κυττάρων. Στη συνέχεια, διαμοιράζεται σε αποστειρωμένα falcons των 50 mL (της Sarstedt) σε στείρες συνθήκες, αφού πρώτα διηθηθεί από φίλτρο. Φυλάσσεται στους -20°C.
- Η προσθήκη αντιβιοτικών στο υγρό θρεπτικό μέσο αποσκοπεί στο να μειωθούν οι πιθανότητες μόλυνσης της κυτταρικής σειράς.

3.1.3. Ξεπάγωμα κυττάρων

Διαλύματα

10X PBS (Phosphate-Buffered Saline)

Για τελικό όγκο 500 mL

40 g NaCl (AppliChem)

7,2 g Na₂HPO₄ (AppliChem)

1,2 g KH₂PO₄ (Lach-Ner)

1 g KCl (Sigma)

ddH₂O μέχρι τον τελικό όγκο

1X PBS (Phosphate-Buffered Saline)

Για τελικό όγκο 500 mL

50 mL 10X PBS

450 mL ddH₂O

Μετά τη διάλυση των συστατικών είναι απαραίτητη η αποστείρωση στους 120°C.

Πειραματική διαδικασία

1. Το φιαλίδιο (aliquot) των παγωμένων κυττάρων μεταφέρεται από το υγρό άζωτο σε πάγο και ύστερα σε υδατόλουτρο στους 37°C για 1 λεπτό, ώστε να ξεπαγώσουν τα κύτταρα (ταχεία απόψυξη)
2. Σε ένα falcon των 15 mL (της Sarstedt) προστίθενται 4 mL θρεπτικού μέσου και 1 mL από το φιαλίδιο των κυττάρων Beta-TC-6 (όλο το aliquot) σταγόνα-σταγόνα
3. Πραγματοποιείται φυγοκέντρωση των κυττάρων μέσα στο θρεπτικό μέσο σε 1.000 rpm, για 5 λεπτά
4. Αφαίρεση του υπερκειμένου
5. Επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας σε 4 mL θρεπτικού μέσου
6. Τα κύτταρα με το θρεπτικό μέσο μεταφέρονται σε πλαστική φιάσκα των 25 cm² της Sarstedt (συνολικός όγκος 5 mL)
7. Η πλαστική φιάσκα με τα κύτταρα παρατηρείται σε ανάστροφο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

8. Μεταφορά της φλάσκας στον επωαστικό θάλαμο (cell incubator), ρυθμισμένο σε συνθήκες 5% CO₂ και θερμοκρασία 37°C

*Rpm = Rotations per minute = Περιστροφές ανά λεπτό

Παρατηρήσεις

- Ο χειρισμός κυττάρων πραγματοποιείται σε απαγωγό στρωτής ροής ώστε να διατηρούνται στείρες συνθήκες. Πριν εισαχθεί οποιοδήποτε αντικείμενο στον απαγωγό στρωτής ροής, ψεκάζεται καλά όλη η επιφάνεια με 70% αιθανόλη για αποφυγή οποιασδήποτε μόλυνσεως.
- Δίνεται προσοχή κατά το ξεπάγωμα στο υδατόλουτρο να μην έρθει σε επαφή το νερό με τα κύτταρα ή και το καπάκι του αντίστοιχου δοχείου.
- Τα παραπάνω βήματα που ακολουθούνται για το ξεπάγωμα των κυττάρων πρέπει να γίνουν γρήγορα διότι το DMSO, το οποίο χρησιμοποιείται κατά το πάγωμα των κυττάρων, είναι τοξικό για τα κύτταρα και θα πρέπει να αραιωθεί με θρεπτικό μέσο.

3.1.4. Πάγωμα κυττάρων

Πειραματική διαδικασία

1. Τα κύτταρα που προορίζονται για πάγωμα μεταφέρονται εκτός του επωαστικού θαλάμου σε απαγωγό στρωτής ροής
2. Αφαίρεση του θρεπτικού μέσου
3. Πλύση των κυττάρων με 1X PBS για να απομακρυνθούν νεκρά κύτταρα και παραπροϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού
4. Σε ένα falcon (15 mL ή 50 mL της Sarstedt) παρασκευάζεται διάλυμα 1X PBS-10% θρυψίνη (0,5% Trypsin-EDTA [10X] της gibco) και ακολουθεί καλή ανάδευση
5. Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος PBS-θρυψίνης στη φλάσκα των κυττάρων
6. Επώση για 2-4 λεπτά στον επωαστικό θάλαμο ώστε να ξεκολλήσουν τα κύτταρα από το υπόστρωμα (έλεγχος της κατάστασης των κυττάρων στο μικροσκόπιο)
7. Προσθήκη θρεπτικού μέσου για απενεργοποίηση της θρυψίνης και καλή ανάδευση
8. Το περιεχόμενο της φλάσκας μεταφέρεται σε καινούργιο falcon

9. Φυγοκέντρωση σε 1.000 rpm, για 5 λεπτά
9. Αφαίρεση του υπερκειμένου
10. Επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας των κυττάρων σε κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού μέσου
11. Σε ένα falcon γίνεται παρασκευή 2X διαλύματος 80% FBS και 20% DMSO (Dimethyl Sulfoxide for cell culture της PanReac AppliChem)
12. Σε ειδικά φιαλίδια για πάγωμα κυττάρων (vials) του 1 mL προστίθενται ίση ποσότητα αραιωμένων κυττάρων σε θρεπτικό μέσο και διαλύματος FBS-DMSO και γίνεται καλή ανάδευση με τη βοήθεια πιπέτας
13. Φύλαξη των φιαλιδίων στους -80°C

Παρατηρήσεις

- Η θρυψίνη είναι πρωτεολυτικό ένζυμο το οποίο καταλύει την υδρόλυση πεπτιδικών δεσμών, διασπώντας τις πρωτεΐνες σε πεπτίδια. Για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιείται για τη διάσπαση των πρωτεϊνών που συγκρατούν τα κύτταρα προσκολλημένα στο τρυβλίο, ώστε να μπορέσουν να αποδεσμευτούν από τον πυθμένα.
- Το διμέθυλοσουλφοξείδιο (DMSO, Dimethyl Sulfoxide) είναι πολικός διαλύτης που διίσταται, παρέχοντας πρωτόνια. Διαλύει τόσο πολικές όσο και μη πολικές ενώσεις. Το DMSO δρα ως κρυοπροστατευτική ουσία, μειώνοντας τον ρυθμό καταστροφής των κυττάρων κατά την ψύξη τους καθώς μειώνει τη διαφορά της θερμοκρασίας που αναγνωρίζουν τα κύτταρα. Επομένως, τα κύτταρα μέσω του DMSO έχουν πιο ομαλή μετάβαση θερμοκρασίας, με αποτέλεσμα η ψύξη των κυττάρων να γίνεται με αργό ρυθμό. Επίσης, αποφεύγεται η δημιουργία κρυστάλλων η οποία καταστρέφει τα κύτταρα. Το DMSO είναι τοξικό για τα κύτταρα σε θερμοκρασία δωματίου καθώς μπορεί να τα σκοτώσει παρ' όλο που τα προστατεύει από τις εναλλαγές της θερμοκρασίας.
- Σε περίπτωση μόλυνσης της καλλιέργειας, οι φλάσκες απορρίπτονται και ξεκινάει από την αρχή η διαδικασία με νέο ξεπάγωμα κυττάρων.
- Κάθε απόρριμμα που είχε επαφή με κύτταρα τοποθετείται σε ειδική σακούλα απορριμμάτων ώστε να αποφευχθεί οποιαδήποτε μόλυνση.
- Δίνεται προσοχή στις αναδεύσεις με την πιπέτα ώστε να μη δημιουργούνται φυσαλίδες γιατί παγιδεύουν τα κύτταρα.

3.1.5. Ανακαλλιέργεια κυττάρων – Ανάπτυξη καλλιέργειας σε μεγάλη κλίμακα

Πειραματική διαδικασία

1. Τα κύτταρα που προορίζονται για ανακαλλιέργεια μεταφέρονται εκτός του επωαστικού θαλάμου σε απαγωγό στρωτής ροής
2. Πραγματοποιείται αφαίρεση του θρεπτικού μέσου
3. Πλύση των κυττάρων με 1X PBS
4. Προσθήκη διαλύματος 1X PBS-10% τρυψίνη (0,5% Trypsin-EDTA [10X] της gibco) (3 mL για πιάτο των 60 mm² και για φλάσκα των 25 cm², 5 mL για 100 mm² πιάτο και για φλάσκα των 75 cm² και 1 mL για 6-well plate)
5. Επώση για 2-4 λεπτά στον επωαστικό θάλαμο ώστε να ξεκολλήσουν τα κύτταρα από το υπόστρωμα
6. Προσθήκη θρεπτικού μέσου για απενεργοποίηση της τρυψίνης
7. Μάζεμα των κυττάρων και μεταφορά σε καινούργιο falcon
8. Φυγοκέντρωση σε 1.000 rpm, για 4 λεπτά
9. Αφαίρεση του υπερκειμένου
10. Επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας των κυττάρων με κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού μέσου
11. Μοίρασμα των κυττάρων σε πιάτα ή φλάσκες (πιάτο για κυτταρική καλλιέργεια 100/150 mm² ή φλάσκα των 75 cm²)
12. Γίνεται συμπλήρωση με τον κατάλληλο όγκο θρεπτικού μέσου (συνολικά τα 100 mm² πιάτα και οι 75 cm² φλάσκες παίρνουν 15 mL ενώ τα 150 mm² πιάτα παίρνουν 20 mL)
13. Παρατήρηση των κυττάρων σε ανάστροφο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο
14. Μεταφορά στον επωαστικό θάλαμο ρυθμισμένο σε συνθήκες 5% CO₂, στους 37°C

3.2. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση με χρήση πηκτώματος αγαρόζης είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική για το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση, την απομόνωση και την ανάλυση νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) και πρωτεϊνών, σύμφωνα με το μέγεθος και το φορτίο τους. Χρησιμοποιείται ευρύτατα στις βιολογικές επιστήμες, σε τομείς όπως η μοριακή βιολογία, η ιατροδικαστική και η έρευνα. Η βασική ιδέα της ηλεκτροφόρησης στηρίζεται στην αρχή

της κίνησης φορτισμένων μορίων κατά μήκος ενός στερεού πορώδους υποστρώματος, κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο τα φορτισμένα σωματίδια κινούνται ανάλογα με το φορτίο τους και αντιστρόφως ανάλογα με το μέγεθός τους. Έτσι, τα περισσότερα φορτισμένα και μικρότερα μόρια απομακρύνονται πιο γρήγορα από το αρχικό σημείο, συγκριτικά με τα μεγαλύτερα και λιγότερο φορτισμένα μόρια. Πιο συγκεκριμένα, τα νουκλεϊκά οξέα μετακινούνται από αρνητικά προς θετικά ηλεκτρόδια, λόγω του φυσικά φερόμενου αρνητικού τους φορτίου που παρατηρείται στις φωσφορικές ομάδες του σκελετού τους.

Η αгарόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης, ο οποίος χρησιμοποιείται για την παρασκευή πηκτωμάτων σε συγκεντρώσεις συνήθως από 0,7% (καλός διαχωρισμός μεγάλων τμημάτων DNA 5–10 kb) έως 2% (καλός διαχωρισμός μικρών τμημάτων DNA 0,2–1 kb). Το ουδέτερο φορτίο καθώς και η χαμηλού βαθμού χημική πολυπλοκότητα της αгарόζης την κάνουν ένα πολύ καλό υλικό που δεν αλληλεπιδρά με τα βιομόρια. Καθώς το πηκτωμα εμποδίζει την τυχαία διάχυσή τους, τα μακρομόρια διαφορετικού μήκους διατάσσονται υπό μορφή ζωνών μέσα στο πηκτωμα. Οι ζώνες αυτές καθίστανται ορατές άμεσα, λόγω της προσθήκης βρωμιούχου αιθιδίου. Εκθέτοντας το πηκτωμα σε υπεριώδη ακτινοβολία (ultraviolet-UV), τα τμήματα του DNA εμφανίζονται σαν μια σειρά από φωτεινές ζώνες, καθεμιά από τις οποίες αντιστοιχεί σε ένα τμήμα συγκεκριμένου μεγέθους. Τα μεγέθη των κομματιών DNA που διαχωρίζονται, μπορούν να προσδιοριστούν μετά από σύγκριση με μόρια DNA γνωστού μεγέθους. Για τον σκοπό αυτό, στο πηκτωμα φορτώνεται και ένας μάρτυρας/κλιμακωτός δείκτης μοριακών βαρών (ladder). Τέλος, για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων απαιτείται η προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης (loading buffer). Τα κυριότερα διαλύματα φόρτωσης που χρησιμοποιούνται στις ηλεκτροφορήσεις αгарόζης είναι το TAE (Tris-Acetate-EDTA) και το TBE (Tris-Borate-EDTA).

Διαλύματα

5X TBE (Tris-Borate-EDTA Buffer)

Για τελικό όγκο 4 L

216 g Tris Base (Fisher Chemical)

110 g Boric acid (Fisher Chemical)

14,9 g EDTA Biochemica (PanReac AppliChem)

ddH₂O μέχρι τον τελικό όγκο

Πειραματική διαδικασία

1. Αρχικά, γίνεται καλή πλύση μιας συσκευής ηλεκτροφόρησης και των χτενακίων με απεσταγμένο νερό
2. Σε έναν ογκομετρικό κύλινδρο (500 mL ή 1.000 mL) προστίθενται 1/5 του όγκου από το 5X TBE Buffer (Tris-Borate-EDTA) και τα υπόλοιπα 4/5 συμπληρώνονται με απεσταγμένο νερό. Έτσι, παρασκευάζεται διάλυμα 1X TBE
3. Σε κωνική φιάλη προστίθενται 50 mL ή 100 mL από το διάλυμα 1X TBE
4. Ζυγίζεται κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης (Certified Low Range Ultra Agarose της Biorad) και προστίθεται στην κωνική φιάλη με το 1X TBE διάλυμα
5. Η κωνική φιάλη τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων και θερμαίνεται μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη και το διάλυμα να γίνει διαυγές. Ανά τακτά χρονικά γίνεται ανάδευση της φιάλης
6. Το διάλυμα αγαρόζης αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι η θερμοκρασία του να είναι περίπου 60°C
7. Προστίθενται περίπου 5 μ L βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr, stock 10 mg/mL) στην κωνική φιάλη και αναδεύεται
8. Το διάλυμα αγαρόζης τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης με τα χτενάκια και αφήνεται να κρυώσει και να στερεοποιηθεί (για την επιτάχυνση της πήξης, το βήμα αυτό πραγματοποιείται στο cold room)
9. Στο διάλυμα 1X TBE προστίθενται περίπου 15-20 μ L βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr). Το διάλυμα αυτό θα χρησιμοποιηθεί στην ηλεκτροφόρηση έτσι ώστε να μπορέσει να γίνει μεταφορά ρεύματος μέσα από το πήκτωμα αγαρόζης και να διατηρηθεί το pH σε μια σχετικά σταθερή τιμή
10. Μετά από την στερεοποίηση του πηκτώματος γίνεται αφαίρεση των χτενακίων προσεκτικά και αλλάζει η διάταξη στη συσκευή ηλεκτροφόρησης
11. Στη συσκευή ηλεκτροφόρησης τοποθετείται το διάλυμα 1X TBE μέχρι η στάθμη να φτάσει την ειδική ένδειξη
12. Συνδέονται τα καλώδια με τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και την πηγή ρεύματος, έτσι ώστε ο θετικός πόλος (κόκκινο καλώδιο) να είναι στο κάτω μέρος της συσκευής (προς το μέρος που «τρέχει» το δείγμα), ενώ το αρνητικό (μαύρο καλώδιο) να είναι στο πάνω μέρος της συσκευής (στο μέρος που βρίσκονται τα πηγαδάκια φόρτωσης των δειγμάτων)

13. Αφού φορτωθούν τα δείγματα στα πηγαδάκια του πηκτώματος αγαρόζης καθώς και ο δείκτης μοριακών βαρών, ανοίγεται η πηγή ρεύματος και ρυθμίζεται η επιθυμητή ισχύς ρεύματος

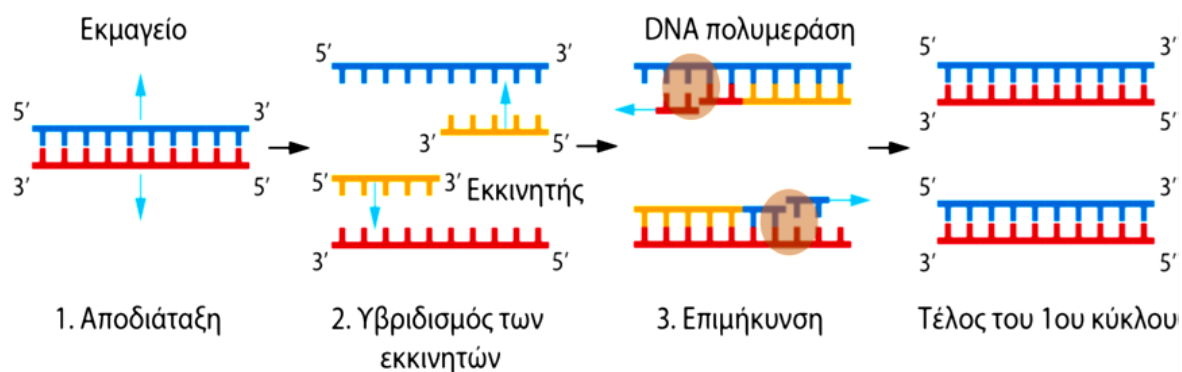
Παρατηρήσεις

- Η χρήση του βρωμιούχου αιθιδίου γίνεται με μεγάλη προσοχή καθώς έχει μεταλλαξιγόνο και τερατογόνο δράση.
- Μετά την διαλυτοποίηση της αγαρόζης το διάλυμα δεν πρέπει να μένει για πολύ ώρα στην κωνική φιάλη ώστε να μην στερεοποιηθεί.
- Κατά την τοποθέτηση του διαλύματος αγαρόζης στο δοχείο ηλεκτροφόρησης προσέχετε να μην υπάρχουν φυσαλίδες διότι παραμορφώνεται το πήκτωμα αγαρόζης και δεν «τρέχουν» ομοιόμορφα τα δείγματα.
- Το φόρτωμα των δειγμάτων γίνεται με προσοχή ώστε να μην τρυπήσει το πήκτωμα αγαρόζης.
- Για να ελεγχθεί εάν δουλεύει η διάταξη, πρέπει να παρατηρηθούν φυσαλίδες που βγαίνουν στα τζάμια, κοντά στα σημεία σύνδεσης των καλωδίων.
- Κατά την παρατήρηση του πηκτώματος λαμβάνονται μέτρα προστασίας. Η υπερϊώδης ακτινοβολία είναι επιβλαβής για τους οφθαλμούς και το δέρμα.

3.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (**P**olymerase **C**hain **R**eaction, PCR) είναι ευρύτατα χρησιμοποιούμενη μέθοδος στη μοριακή βιολογία, με εφαρμογές τόσο σε ερευνητικό όσο και σε διαγνωστικό επίπεδο. Είναι μια ενζυμική μέθοδος ενίσχυσης συγκεκριμένων τμημάτων γενετικού υλικού *in vitro*. Η αντίδραση PCR εκμεταλλεύεται ορισμένα χαρακτηριστικά του *in vivo* μηχανισμού αντιγραφής του DNA με σκοπό τον *in vitro* πολλαπλασιασμό συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR, το επιθυμητό τμήμα του γονιδιώματος πολλαπλασιάζεται μέχρι και δισεκατομμύρια φορές, με την προϋπόθεση ότι είναι γνωστό μέρος της νουκλεοτιδικής του αλληλουχίας που το περιβάλλει. Η αλληλουχία αυτή είναι σημαντική για το σχεδιασμό δύο εκκινητών (primers), δηλαδή συνθετικών, μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων, συμπληρωματικών με τις αλληλουχίες εκατέρωθεν του DNA-στόχου.

Η μέθοδος στηρίζεται στην θερμική ανακύκλωση, η οποία αποτελείται από πολλαπλούς κύκλους θέρμανσης και ψύξης της αντίδρασης, ώστε να επιτευχθεί αποδιάταξη της διπλής έλικας και ενζυμική αντιγραφή του DNA. Η PCR εκτελείται στον θερμικό κυκλοποιητή (thermal cycler), δηλαδή μια προγραμματιζόμενη συσκευή που φέρει θερμαινόμενη πλάκα, η οποία μπορεί να εναλλάσσει θερμοκρασίες με ταχύτητα και ακρίβεια [69]. Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται σε τρία στάδια, τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά. Αρχικά, γίνεται αποδιάταξη των δύο αλυσίδων του DNA (denaturation) με την βοήθεια θέρμανσης στους 95°C για περίπου 30 δευτερόλεπτα έως 1 λεπτό. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται υβριδοποίηση των εκκινητών στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA (annealing) με μείωση της θερμοκρασίας στους 55-65°C για 30 δευτερόλεπτα έως 1 λεπτό. Ακολουθεί η επιμήκυνση των εκκινητών (extension) για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας με επώαση στους 72°C, βέλτιστη θερμοκρασία δράσης μίας θερμοανθεκτικής πολυμεράσης. Η πολυμεράση επιμηκώνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotide triphosphates, dNTPs), χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο. Η ταχύτητα σύνθεσης της νέας αλυσίδας είναι της τάξης των 1.000 bp ανά λεπτό. Τα παραπάνω στάδια επαναλαμβάνονται από 25 έως 35 φορές. Σε κάθε κύκλο η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται. Το τελικό αποτέλεσμα μιας αντίδρασης PCR μετά από n κύκλους είναι η παραγωγή, θεωρητικά, $2n$ δίκλωνων μορίων DNA, τα οποία είναι πιστά αντίγραφα της αλληλουχίας του DNA που περικλείεται μεταξύ των εκκινητών [74, 75, 76].



Εικόνα 3.2. Τα στάδια της αντίδρασης PCR. Αρχικά γίνεται αποδιάταξη των δύο αλυσίδων του DNA (denaturation) με την βοήθεια υψηλής θερμοκρασίας (1), στη συνέχεια πραγματοποιείται υβριδοποίηση των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (annealing) (2), και τέλος γίνεται η επιμήκυνση των εκκινητών (extension) (3). Με αυτόν τον τρόπο στο τέλος του πρώτου κύκλου της αντίδρασης έχει πραγματοποιηθεί διπλασιασμός του δίκλωνου μορίου DNA [75].

3.3.1. Συστατικά της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Τα βασικά συστατικά για τη διενέργεια της αντίδρασης PCR είναι:

1. Taq DNA Polymerase ή HiFi Taq DNA Polymerase
2. Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές
3. Γενετικό υλικό – αλληλουχία στόχος
4. Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης και Mg^{2+}
5. Νουκλεοτίδια (dNTPs)
6. ddH₂O

DNA πολυμεράση

Η DNA πολυμεράση είναι ένζυμο που υπάρχει σε όλους τους οργανισμούς (ευκαρυωτικοί, προκαρυωτικοί και ιοί) και συμμετέχει στην αντιγραφή του DNA. Δε μπορεί να συνθέσει ένα νέο μόριο DNA, μπορεί όμως να αντιγράψει ένα υπάρχον που χρησιμοποιείται ως εκμαγείο. Το ένζυμο που χρησιμοποιείται συνηθέστερα στην PCR είναι η DNA πολυμεράση Taq και έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq), το οποίο έχει ως φυσικό περιβάλλον τις θερμές πηγές. Η Taq πολυμεράση έχει τη βασική ιδιότητα να παραμένει δραστική σε υψηλές θερμοκρασίες. Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της είναι 72°C, ενώ δεν καταστρέφεται από τη θέρμανση ακόμη και στους 95°C για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.

Η θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση μπορεί να συνθέσει μια συμπληρωματική αλυσίδα DNA, χρησιμοποιώντας ένα μονόκλωνο μόριο ως αρχικό εκμαγείο και έναν εκκινητή ως σημείο εκκίνησης. Η DNA πολυμεράση απαιτεί, επίσης, την παρουσία ενός μικρού τμήματος δίκλωνου DNA για την έναρξη της σύνθεσης. Επομένως, το σημείο έναρξης της σύνθεσης του DNA μπορεί να καθοριστεί με τη χρήση ενός ολιγονουκλεοτιδικού εναρκτήριου μορίου (εκκινητής, primer) που συνδέεται με τη μήτρα σε αυτό ακριβώς το σημείο. Και οι δύο κλώνοι του DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εκμαγεία για την σύνθεση DNA, εφόσον υπάρχει ένας εκκινητής για κάθε μία αντίδραση. Η κατεύθυνση της σύνθεσης της νέας αλυσίδας είναι 5'→3'. Με την πάροδο των κύκλων της PCR αντίδρασης, η λειτουργικότητα και η πιστότητα της αντιγραφής φθίνουν και αντίστοιχα αυξάνεται ο αριθμός των λανθασμένων βάσεων που εισάγονται στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα του DNA. Η απλή DNA πολυμεράση κάνει περίπου ένα λάθος στις

100.000 βάσεις. Οι πολυμεράσες υψηλής πιστότητας (Proofreading polymerase), οι οποίες έχουν δραστικότητα 3'→5' εξωνουκλεάσης, μπορούν να διορθώσουν τα λάθη που δημιουργούν κατά τη σύνθεση του μορίου DNA. Έτσι επιτυγχάνουν μικρότερα ποσοστά λαθών, της τάξης του 10^{-6} [77, 78].

Εκκινητές (Primers)

Οι εκκινητές (primers) είναι μονόκλωνα ολιγονουκλεοτίδια με μήκος συνήθως 18-30 ζεύγη βάσεων, συμπληρωματικά με τις αλληλουχίες εκατέρωθεν του DNA-στόχου και οριοθετούν το τμήμα DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Οι εκκινητές αποτελούν απαραίτητο συστατικό της PCR αντίδρασης, καθώς η DNA πολυμεράση ξεκινά από αυτούς τον πολυμερισμό των νουκλεοτιδίων. Αν η συγκέντρωση των εκκινητών είναι υψηλότερη από την απαραίτητη τότε μπορεί να προκαλέσουν τον πολλαπλασιασμό επιπλέον αλληλουχιών πέραν της επιθυμητής αλληλουχίας στόχου, ενώ αν βρίσκονται σε χαμηλότερη συγκέντρωση, μπορεί η απόδοση της αντίδρασης να είναι περιορισμένη. Ο σχεδιασμός των εκκινητών ακολουθεί συγκεκριμένες αρχές, οι οποίες περιγράφονται παρακάτω:

- Μέγεθος των εκκινητών: οι εκκινητές είναι συνήθως ολιγονουκλεοτίδια 18-30 βάσεων. Μικρότεροι εκκινητές οδηγούν σε μη ειδικό υβριδισμό, ενώ μεγαλύτεροι εκκινητές έχουν μεγαλύτερη ειδικότητα, αλλά αυξάνεται η πιθανότητα δημιουργίας δευτερογενών δομών που μειώνουν την αποτελεσματικότητα του υβριδισμού.
- Αλληλουχία των εκκινητών: οι εκκινητές πρέπει να έχουν απόλυτη συμπληρωματικότητα προς την αλληλουχία στόχο, αλλά ελάχιστη έως καθόλου συμπληρωματικότητα μεταξύ τους. Ο υβριδισμός μεταξύ των εκκινητών οδηγεί στο σχηματισμό διμερών εκκινητών (primer dimers) που έχουν μέγεθος 30-50 ζεύγη βάσεων και μειώνουν την αποτελεσματικότητα της PCR. Επίσης, η ύπαρξη περιοχών συμπληρωματικότητας μέσα στον εκκινητή αυξάνει την πιθανότητα δημιουργίας δευτερογενών δομών που μειώνουν την αποτελεσματικότητα του υβριδισμού στην αλληλουχία στόχο.
- Η θερμοκρασία αποδιάταξης των εκκινητών: η θερμοκρασία αποδιάταξης (melting temperature, T_m) είναι η θερμοκρασία στην οποία το 50% των μορίων DNA βρίσκεται σε μονόκλωνα μορφή. Το T_m εξαρτάται από το μέγεθος της αλληλουχίας και τη σύσταση των βάσεων της αλληλουχίας. Υψηλό ποσοστό σε βάσεις C και G αυξάνει το T_m , καθώς οι βάσεις C και G ενώνονται με τις συμπληρωματικές τους στο δίκλωνο DNA με τρεις δεσμούς υδρογόνου, σε αντίθεση με τις βάσεις A και T που ενώνονται με

δύο δεσμούς υδρογόνου. Στην αντίδραση PCR, η θερμοκρασία αποδιάταξης των εκκινητών (T_m) κυμαίνεται τυπικά στους 58-68°C. Οι δύο εκκινητές δεν πρέπει να έχουν πολύ διαφορετικές τιμές T_m μεταξύ τους (διαφορά 3-5°C). Υπάρχουν πολλοί τύποι για τον υπολογισμό του T_m των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών. Ένας από τους ευρύτερα χρησιμοποιούμενους είναι ο ακόλουθος:

$$T_m = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C)$$

Αν και ο παραπάνω τύπος ισχύει με ακρίβεια για ολιγονουκλεοτίδια μέχρι 7 βάσεων, στην πράξη χρησιμοποιείται για τον αδόρο υπολογισμό του T_m εκκινητών μέχρι και 20-22 νουκλεοτιδίων. Το T_m των εκκινητών επηρεάζει άμεσα τη θερμοκρασία υβριδισμού τους στην αλληλουχία στόχο [75].

Γενετικό υλικό (αλληλουχία στόχος)

Ως αρχικό υλικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί DNA ή RNA, το οποίο θα μεταγραφεί στην πιο σταθερή μορφή του, το συμπληρωματικό DNA (complementary DNA, cDNA). Πολύ μικρές ποσότητες DNA (100 ng ανά αντίδραση τελικού όγκου 50 μ L) είναι επαρκείς για τις περισσότερες αντιδράσεις PCR. Μεγάλη ποσότητα DNA μπορεί να αναστείλει την αντίδραση. Για τη βέλτιστη απόδοση της PCR αντίδρασης, το DNA πρέπει να είναι μακρομοριακό και υψηλής καθαρότητας, απαλλαγμένο από υπολείμματα αιθανόλης ή αλάτων που μπορούν να αναστείλουν την αντίδραση.

Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης και συγκέντρωση Mg^{2+}

Ανάλογα με το είδος της πολυμεράσης, από την εταιρεία παραγωγής του ενζύμου, παρέχεται και το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα σε συγκέντρωση δεκαπλάσια (10X) της απαιτούμενης. Το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης διατηρεί το pH και τη συγκέντρωση αλάτων στις βέλτιστες συνθήκες διεξαγωγής της αντίδρασης. Περιέχει επίσης ιόντα Mg^{2+} , που είναι απαραίτητος συμπράγοντας της DNA πολυμεράσης. Τα ιόντα Mg^{2+} σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs, το DNA εκμαγείο και τους εκκινητές. Περίσσεια ιόντων Mg^{2+} οδηγεί σε μη ειδική σύνδεση των εκκινητών με το DNA, αυξάνοντας τα μη ειδικά προϊόντα στην αντίδραση. Επίσης, μειώνει την πιστότητα αντιγραφής της Taq πολυμεράσης. Χαμηλές συγκεντρώσεις Mg^{2+} οδηγούν σε μείωση της ποσότητας του παραγόμενου προϊόντος. Η βέλτιστη συγκέντρωση Mg^{2+} για κάθε αντίδραση PCR πρέπει να προσδιορίζεται εμπειρικά με δοκιμή διαδοχικών συγκεντρώσεων από 1 έως 4 mM [79].

Νουκλεοτίδια

Τα δομικά μόρια που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας είναι τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (deoxynucleotide triphosphates, dNTPs). Τα dNTPs χρησιμοποιούνται ως ισομοριακό μίγμα των τεσσάρων νουκλεοτιδίων (ATP, TTP, CTP και GTP) σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται στα 80-800 μM .

3.3.2. PCR με Taq DNA πολυμεράση

Πίνακας 3.1. Αντίδραση PCR με Taq DNA πολυμεράση.

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
DNA	1 ng - 1 μg
10X Taq Buffer	5 μL (1X)
One Taq Hot Start DNA Polymerase (NEB) (0,5 units/ μL)	1 μL (0,01 units/ μL)
dNTPs (10mM)	3 μL (0,6 mM)
Πρόσθιος εκκινητής (10 μM)	1 μL (0,2 μM)
Ανάστροφος εκκινητής (10 μM)	1 μL (0,2 μM)
ddH ₂ O	
Τελικός όγκος	50 μL

Το πρόγραμμα της PCR πραγματοποιήθηκε στις ακόλουθες συνθήκες:

- 94°C για 5 λεπτά
- για 30 κύκλους:
 - 94°C για 15-30 δευτερόλεπτα
 - 67°C για 15-30 δευτερόλεπτα
 - 72°C για 45 δευτερόλεπτα
- 72°C για 10 λεπτά
- 4°C επώαση μέχρι την αφαίρεση από τη συσκευή

Παρατηρήσεις

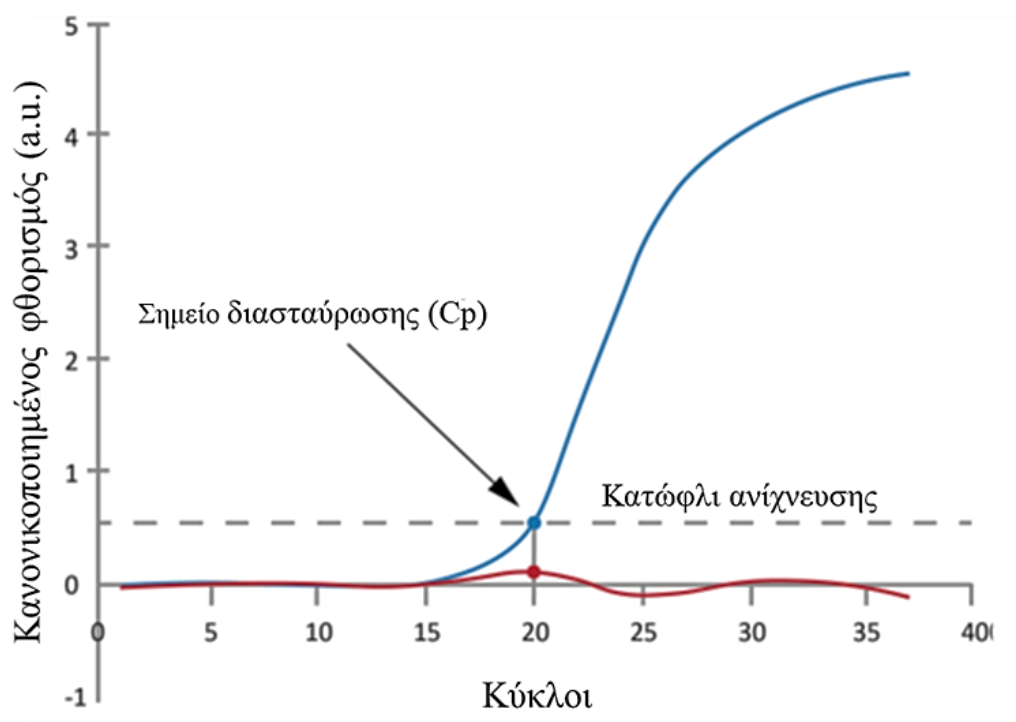
- Είναι σημαντικό κατά την προσθήκη των αντιδραστηρίων, το ένζυμο της πολυμεράσης να μπει στο τέλος έτσι ώστε να μην ξεκινήσει να αντιδρά και παραχθούν παραπροϊόντα.

3.3.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR), επίσης γνωστή και ως ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) αναφέρεται στη ενίσχυση DNA με PCR που ελέγχεται, ενώ συμβαίνει η αντίδραση. Αυτή η μέθοδος είναι μια ακριβής, ευαίσθητη, ποσοτική αντίδραση PCR, κατά την οποία ο πολλαπλασιασμός του DNA στόχου και η ανίχνευση του προϊόντος γίνονται ταυτόχρονα στο ίδιο σωληνάριο, διότι το προϊόν που παράγεται συνδέεται με φθορίζουσα χρωστική που ανιχνεύεται από το οπτικό σύστημα του ειδικού κυκλοποιητή που χρησιμοποιείται στην PCR πραγματικού χρόνου. Με το όργανο αυτό καταγράφεται η κινητική του πολλαπλασιασμού του DNA από την ένταση του σήματος του φθορισμού που αντανακλά το ποσό του νεοσυντιθέμενου DNA σε όλη τη διάρκεια της αντίδρασης [80].

Η βασική αρχή που χρησιμοποιείται στην ανάλυση των δεδομένων της PCR πραγματικού χρόνου, βασίζεται στον αριθμό των κύκλων που είναι αναγκαίοι για να φτάσει η αλληλουχία στόχος μια συγκεκριμένη συγκέντρωση στην αντίδραση, ώστε να αρχίσει να ανιχνεύεται το σήμα φθορισμού πάνω από το «θόρυβο» της αντίδρασης. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να γίνει ακριβής εκτίμηση της αρχικής συγκέντρωσης της αλληλουχίας στόχου [77, 79]. Η καμπύλη ενίσχυσης της αντίδρασης PCR σε πραγματικό χρόνο είναι η συνάρτηση του φθορισμού σε σχέση με τον αριθμό των κύκλων (Εικόνα 3.3) και διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού. Στους αρχικούς κύκλους της Real Time PCR, μεταξύ 3-15 (Εικόνα 3.3), το προϊόν δεν είναι ανιχνεύσιμο, λόγω του ότι βρίσκεται σε πολύ μικρή ποσότητα και αναφέρεται ως επίπεδο αναφοράς (baseline). Το χαμηλό αυτό σήμα φθορισμού ισοδυναμεί με τον ενδογενή φθορισμό (background fluorescent) των αντιδρώντων μορίων ή αλλιώς το «θόρυβο» της αντίδρασης. Καθώς όμως συσσωρεύεται το προϊόν της αντίδρασης, το σήμα ξεπερνά κάποια στιγμή το κατώφλι ανίχνευσης, αρχίζοντας πλέον να αυξάνεται εκθετικά. Αυτό το κατώφλι υπολογίζεται ως συνάρτηση του ποσού του υποβάθρου της φθορίζουσας χρωστικής και τελικά, ο αριθμός των κύκλων, στον οποίον η ένταση του φθορισμού θα ξεπεράσει το βασικό επίπεδο και θα φτάσει ένα συγκεκριμένο κατώφλι ανίχνευσης, χαρακτηρίζεται ως κατώφλι κύκλου (cycle threshold, Ct). Το σημείο αυτό χαρακτηρίζεται και ως σημείο διασταύρωσης, Cp (crossing point). Η τιμή Ct εξαρτάται απόλυτα από το αρχικό ποσό του δείγματος και είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος. Όσο μεγαλύτερη είναι η

αρχική ποσότητα του μορίου-στόχου, τόσο λιγότεροι κύκλοι απαιτούνται για να φτάσει ο φθορισμός στο όριο (κατώφλι) [80]. Οι τιμές Cts μικρότερες των 29 κύκλων είναι ισχυρές θετικές αντιδράσεις που ενδείκνυνται για το άφθονο νουκλεϊκό οξύ στο δείγμα. Στην εκθετική φάση (exponential phase), η απόδοση της αντίδρασης προσεγγίζει το 100%, με αποτέλεσμα σε κάθε κύκλο να διπλασιάζεται το προϊόν της αντίδρασης καθώς όλα τα απαραίτητα συστατικά βρίσκονται σε περίσσεια. Καθώς συνεχίζεται η αντίδραση, επέρχεται η γραμμική φάση, κατά την οποία τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται. Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητά της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεών τους. Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης [82].



Εικόνα 3.3. Υποθετική γραφική παράσταση της καμπύλης της αντίδρασης PCR σε πραγματικό χρόνο. Η οριζόντια γραμμή δείχνει το κατώφλι (threshold) στο οποίο ο φθορισμός των προϊόντων της PCR αρχίζει να ξεχωρίζει από το επίπεδο αναφοράς (baseline). Ο κύκλος, στον οποίο συμβαίνει αυτό αποδίδεται με την τιμή Ct, που αντιστοιχεί στον κύκλο κατά τον οποίο ο φθορισμός ξεπερνά το κατώφλι ανίχνευσης. Το σημείο αυτό είναι αλλιώς γνωστό και ως σημείο διασταύρωσης, Cp (crossing point). Η τιμή Cp είναι απαραίτητη για την ποσοτικοποίηση του δείγματος [79].

Πίνακας 3.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο.

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
DNA	20 ng
2X SYBR Green PCR Master Mix	10 µL (1x)
Πρόσθιος εκκινητής (10 µM)	1 µL (0,5 µM)
Ανάστροφος εκκινητής (10 µM)	1 µL (0,5 µM)
ddH ₂ O	
Τελικός όγκος	20 µL

Το πρόγραμμα της PCR πραγματοποιήθηκε στις ακόλουθες συνθήκες:

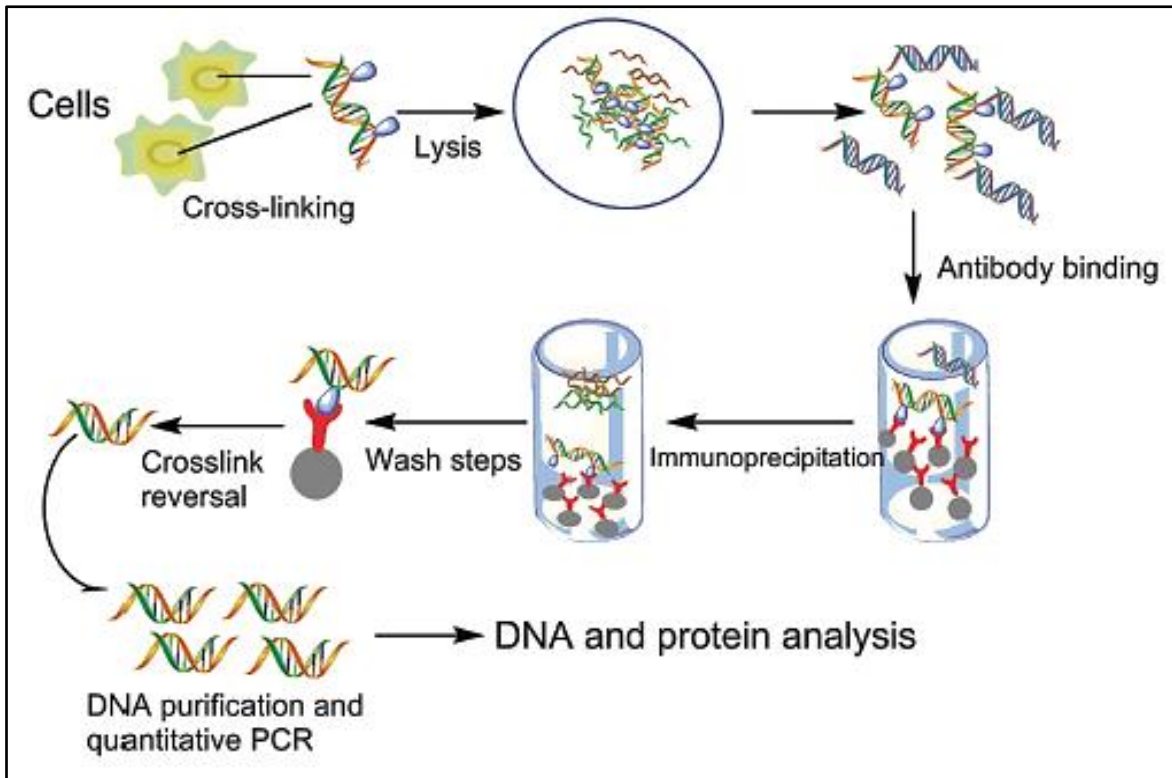
- 95°C για 3 λεπτά
- για 30 κύκλους:
 - 95°C για 30 δευτερόλεπτα
 - 60°C-64°C για 30 δευτερόλεπτα
 - 60°C-64°C για 30 δευτερόλεπτα
- 72°C για 3 λεπτά

3.4. Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP)

Η ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης είναι μια ακριβής μέθοδος ανάλυσης των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με το DNA, χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών αυτών. Τα αντισώματα συνδέονται στη θέση που υπάρχει το αντιγόνο που αναγνωρίζουν, και στη συνέχεια με τη διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης, απομονώνονται τα σύμπλοκα DNA-αντίσωμα-πρωτεΐνη. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη μονιμοποίηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ χρωματίνης και πρωτεϊνών, μέσω εγκάρσιας διασύνδεσης (cross-linking) μεταξύ χρωματίνης και πρωτεϊνών, σε κύτταρα με τη βοήθεια φορμαλδεΐδης, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό αναστρέψιμων, ομοιοπολικών δεσμών. Έτσι, γίνεται δυνατή η λήψη ενός «φωτογραφικού στιγμιότυπου» των αλληλεπιδράσεων στο εσωτερικό των κυττάρων τη χρονική στιγμή της εγκάρσιας διασύνδεσης. Κατόπιν, ακολουθεί κατακερματισμός συμπλόκων χρωματίνης-πρωτεϊνών σε μικρότερα τμήματα (300-1.000 bp) μέσω κατεργασίας με υπέρηχους. Με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων

και μαγνητικών σφαιριδίων γίνεται επιλογή των επιθυμητών συμπλόκων της προς μελέτη πρωτεΐνης και του DNA. Ύστερα, πραγματοποιείται καθαρισμός της χρωματίνης από πρωτεΐνες και ανοσοκατακρήμνιση του DNA (Εικόνα 3.4). Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την ταυτοποίηση των DNA αλληλουχιών που αποτελούν στόχο της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος [83].

Ο συνδυασμός ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP) και της αλληλούχησης ευρείας κλίμακας (Next Generation Sequencing) με μαζική και ταυτόχρονη ανάλυση της αλληλουχίας του DNA οδηγεί στην ταυτοποίηση των θέσεων σύνδεσης μεταγραφικών παραγόντων καθώς και περιοχών, στις οποίες το DNA φέρει ιστονικές τροποποιήσεις, οι οποίες πιθανόν αποτελούν cis ρυθμιστικά στοιχεία. Στην περίπτωση μελέτης ιστονικών τροποποιήσεων χρησιμοποιούνται αντισώματα έναντι των ακετυλο-ομάδων και των μεθυλο-ομάδων και στη συνέχεια γίνεται απομόνωση των θέσεων, στις οποίες υπάρχουν οι τροποποιήσεις. Το DNA που προκύπτει μετά την ανοσοκατακρήμνιση λόγω πρόσδεσης των αντισωμάτων, καθαρίζεται και μετά πολλαπλασιάζεται μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Με τη μέθοδο ChIP-seq (Chromatin Immunoprecipitation sequencing) γίνεται δυνατή η απομόνωση τεμαχίων/στόχων DNA για μεταγραφικούς παράγοντες ή τροποποιήσεις ιστονών σε όλο το γονιδίωμα οποιουδήποτε οργανισμού και στη συνέχεια μέσω της αλληλούχησης ευρείας κλίμακας ορίζονται οι θέσεις δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων ή παρουσίας ιστονικών τροποποιήσεων, ανακαλύπτοντας έτσι τα ρυθμιστικά δίκτυα των γονιδίων.



Εικόνα 3.4. Σχηματική απεικόνιση των βημάτων του πειράματος ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης. Σε πρώτο στάδιο, τα κύτταρα μονιμοποιούνται με φορμαλδεϋδη και απομονώνεται το γενετικό τους υλικό. Το υλικό αυτό κατακερματίζεται με χρήση υπερήχων και στη συνέχεια γίνεται προσθήκη αντισώματος έναντι του παράγοντα που χρειάζεται να μελετηθεί. Το υλικό που έχει συνδεθεί με το αντίσωμα διαχωρίζεται από το υπόλοιπο γενετικό υλικό και ακολουθεί αναστροφή της εγκάρσιας διασύνδεσης και ο καθαρισμός του DNA. Τέλος, οι αλληλουχίες DNA υποβάλλονται σε μια σειρά τεχνικών αναλύσεων, όπως ποσοτική PCR και αναλύσεις σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος, χρησιμοποιώντας βαθιά αλληλούχηση (ChIP-seq) [84].

3.4.1. Απομόνωση χρωματίνης

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η αρχιτεκτονική της χρωματίνης διαδραματίζει θεμελιώδη ρόλο σε πολλούς μηχανισμούς γονιδιακής ρύθμισης κατά την ανάπτυξη [32]. Η παρασκευή χρωματίνης πραγματοποιείται μέσω της απομόνωσης χρωματίνης από κύτταρα, τα οποία έχουν μονιμοποιηθεί με φορμαλδεϋδη [83]. Η χρωματίνη που προκύπτει μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας αυτής, φέρει πάνω της τις πρωτεΐνες και τα σύμπλοκα που ήταν συνδεδεμένα πάνω στο DNA τη στιγμή της μονιμοποίησης. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να γίνει μελέτη των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, DNA-πρωτεΐνης καθώς και RNA-πρωτεΐνης, που υπάρχουν στον πυρήνα των ευκαρυωτικών κυττάρων.

Αρχικά, τα κύτταρα επωάζονται σε διάλυμα φορμαλδεΐδης, ώστε να γίνει μονιμοποίηση της χρωματίνης, δηλαδή δημιουργία αναστρέψιμων ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ πρωτεϊνών και χρωματίνης (εγκάρσια διασύνδεση πρωτεϊνών και χρωματίνης). Η φορμαλδεΐδη είναι ένας ισχυρός και εύκολα αναστρέψιμος παράγοντας, που διατηρεί αποτελεσματικά τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις DNA-πρωτεϊνών, RNA-πρωτεϊνών καθώς και πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Για να σταματήσει η διασύνδεση πρωτεϊνών και χρωματίνης γίνεται προσθήκη διαλύματος γλυκίνης, η οποία αντιδρά με την εναπομένουσα φορμαλδεΐδη. Στη συνέχεια, γίνεται πλύση των κυττάρων και συλλογή. Η λύση των κυττάρων γίνεται μέσω της επαναδιαλυτοποίησης της πελέτας των κυττάρων σε κατάλληλα διαλύματα [83].

Διαλύματα

Fixing Buffer

Για τελικό όγκο 50 mL

1,1 % Formaldehyde (1,48 mL) από 37% stock (Formaldehyde Solution της Sigma)

1X PBS μέχρι τον τελικό όγκο

Glycine Buffer (Quenching Buffer)

Για τελικό όγκο 50 mL

2,5 M γλυκίνη από 75,07 g/mol stock (Glycine Molecular Biology grade της AppliChem)

50 mL ddH₂O

Lysis Buffer (Buffer A)

Για τελικό όγκο 50 mL

10 mM Tris pH 8,0 1 M

10 mM EDTA 0,5 M

0,25% Triton X-100 (PanReac AppliChem)

ddH₂O μέχρι τον τελικό όγκο

Nuclei Buffer (Buffer B)

Για τελικό όγκο 50 mL

10 mM Tris pH 8,0 1 M

200 mM NaCl 5 M

1 mM EDTA 0,5 M

ddH₂O μέχρι τον τελικό όγκο

Shearing Buffer (Sonication Buffer)

Για τελικό όγκο 50 mL

10 mM Tris pH 8,0 1 M

1 mM EDTA 0,5 M

ddH₂O μέχρι τον τελικό όγκο

Σημείωση: Μετά την παρασκευή τους τα διαλύματα τοποθετούνται στον πάγο.

Πειραματική διαδικασία

1. Απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου από τα τρυβλία καλλιέργειας των κυττάρων
2. Προσθήκη Fixing Buffer σε κάθε πιάτο (όσο χρειάζεται για να καλυφθεί όλη η επιφάνεια του πιάτου) και καλή ανάδευση ώστε η φορμαλδεΰδη να πάει σε όλο το τρυβλίο (Με το Fixing Buffer γίνεται μονιμοποίηση των κυττάρων, δηλαδή οι αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν μεταξύ πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων «παγώνουν»)
3. Επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
4. Προσθήκη Glycine Buffer για απενεργοποίηση του Fixing Buffer και καλή ανάδευση ώστε να πάει σε όλο το πιάτο
5. Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
6. Απομάκρυνση φορμαλδεΰδης και γλυκίνης
7. Πλύση των κυττάρων με 10 mL 1X PBS και απομάκρυνση
8. Προσθήκη 10 mL 1X PBS στο κάθε πιάτο
9. Απόξεση κυττάρων με τη βοήθεια scraper
10. Συλλογή κυττάρων σε falcon των 50 mL
11. Φυγοκέντρηση σε 4.500 rpm, για 15 λεπτά, στους 4°C
12. Αφαίρεση υπερκείμενου
13. Επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας των κυττάρων σε 12,5 mL παγωμένου Lysis Buffer (αποδιάταξη μεμβρανών)
14. Επώαση για 10 λεπτά στον πάγο
15. Φυγοκέντρηση σε 4.000 rpm, για 15 λεπτά, στους 4°C
16. Αφαίρεση υπερκείμενου
17. Επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας των κυττάρων σε 12,5 mL παγωμένου Nuclei Buffer

18. Επώαση για 10 λεπτά στον πάγο
19. Φυγοκέντρηση σε 4.000 rpm, για 15 λεπτά, στους 4°C
20. Απόρριψη του υπερκειμένου
21. Προσθήκη 3 mL παγωμένου Sonication Buffer
22. Αποθήκευση των δειγμάτων στους 4°C, έως το επόμενο βήμα της κατεργασίας με υπερήχους

Παρατηρήσεις

- Η φορμαλδεΰδη δεν πρέπει να παραμείνει πολύ λιγότερο ή πολύ περισσότερο χρόνο από ότι χρειάζεται διότι υπάρχει κίνδυνος να επηρεαστούν οι συνδέσεις των μορίων.
- Οι όγκοι που χρησιμοποιούνται και οι χρόνοι επώασης αλλάζουν ανάλογα τον τύπο κυττάρου, τον αριθμό τους και το μέγεθος του τρυβλίου.

3.4.2. Κατακερματισμός χρωματίνης με τη χρήση υπερήχων

Η χρωματίνη που απομονώθηκε στη συνέχεια υφίσταται κατεργασία με τη χρήση υπερήχων για κατακερματισμό έτσι ώστε να προκύψουν μικρότερα κομμάτια χρωματίνης, τα οποία είναι πιο εύκολο να επεξεργαστούν κατάλληλα στη συνέχεια και να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης. Η διάτμηση της χρωματίνης σε μικρότερα κομμάτια από 3.000 ζεύγη βάσεων μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση δύο διαφορετικών μηχανημάτων υπερήχων: μια χειροκίνητη συσκευή Tip Sonicator και μια αυτόματη συσκευή Covaris. Για τον κατακερματισμό της χρωματίνης των Beta-TC-6 κυττάρων γίνεται χρήση και των δύο συσκευών με τους ακόλουθους τρόπους.

Πειραματική διαδικασία κατακερματισμού χρωματίνης στη συσκευή Tip Sonicator

1. Τα δείγματα μεταφέρονται από τους 4°C και τοποθετούνται σε πάγο
2. Ενεργοποίηση της συσκευής Sonicator και ρύθμιση του amplitude της συσκευής στο 40%
3. Η άκρη της συσκευής ξεπλένεται καλά με Sonication Buffer (η συσκευή βρίσκεται σε λειτουργία μέσα στο Sonication Buffer) και καθαρίζεται με Kimtech wipes
4. Τα δείγματα χρωματίνης από Beta-TC-6 κύτταρα τοποθετούνται με τη σειρά στη συσκευή Sonicator για 60 δευτερόλεπτα, 2 φορές το κάθε δείγμα και ύστερα

μεταφέρονται ξανά στον πάγο. Καθώς γίνεται εναλλαγή των δειγμάτων, πρέπει η άκρη της συσκευής να ξεπλένεται. Ανάμεσα στους δύο γύρους κατακερματισμού, τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο ώστε να μην γίνει υπερθέρμανση

5. Μετά το τέλος της κατεργασίας των δειγμάτων, η άκρη του οργάνου ξεπλένεται με ddH₂O και η συσκευή απενεργοποιείται

Παρατηρήσεις

- Για την αποτελεσματική διαδικασία στη συσκευή Sonicator, το δείγμα πρέπει να είναι τοποθετημένο έτσι ώστε η άκρη του οργάνου να είναι ακριβώς στο κέντρο του διαλύματος. Με αυτόν τον τρόπο δεν πρέπει να παρατηρούνται αναταράξεις στο διάλυμα κατά την λειτουργία του μηχανήματος.
- Η άκρη της συσκευής δεν πρέπει να βρίσκεται στην επιφάνεια του δείγματος καθώς δημιουργεί φυσαλίδες οι οποίες μειώνουν την αποτελεσματικότητα τα συσκευής. Επίσης, δεν θα πρέπει να ακουμπάει τα τοιχώματα του falcon καθώς υπάρχει πιθανότητα να το φθείρει.
- Κατά τη διάρκεια του κατακερματισμού με υπερήχους είναι πιθανή η θέρμανση του δείγματος, πράγμα που το καταστρέφει και μειώνει την αποτελεσματικότητα του οργάνου. Για τον λόγο αυτό, το δείγμα συνίσταται να τοποθετείται στον πάγο πριν και μετά τη διαδικασία κατακερματισμού.
- Κατά τη λειτουργία της συσκευής Sonicator, είναι απαραίτητη η χρήση προστατευτικών ακουστικών, λόγω παραγωγής υπερήχων που αποτελούν το ανώτατο όριο της ανθρώπινης ακοής.

Πειραματική πορεία κατακερματισμού της χρωματίνης με τη χρήση αυτόματης συσκευής Covaris S220

1. Τα δείγματα μετά τον κατακερματισμό με τη συσκευή Sonicator τοποθετούνται στον πάγο
2. Ανοίγεται η συσκευή Covaris και το πρόγραμμα του Covaris στον ηλεκτρονικό υπολογιστή
3. Το δοχείο της συσκευής γεμίζεται με ddH₂O μέχρι την ένδειξη που υπάρχει στο τοίχωμα
4. Αναμονή του απαιτούμενου χρονικού διαστήματος, ώστε να ολοκληρωθούν οι διαδικασίες του degas και cooldown
5. Τα δείγματα μοιράζονται σε ειδικά Covaris tubes του 1 mL

6. Μετά την ολοκλήρωση των παραπάνω διαδικασιών της συσκευής, το tube τοποθετείται στην ειδική υποδοχή της συσκευής και κλείνεται το καπάκι
7. Μέσω του προγράμματος στον ηλεκτρονικό υπολογιστή ρυθμίζονται οι παράμετροι για να ξεκινήσει η διαδικασία. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιείται είναι το εξής: Peak Power 140, Duty Factor 5, Cycles/Burst 200, Time 30 minutes
8. Μετά το τέλος της διαδικασίας, γίνεται μεταφορά του δείγματος σε eppendorf tubes των 1,5 mL και φυλάσσεται στον πάγο
9. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση των δειγμάτων σε 13.000 rpm, για 15 λεπτά, στους 4°C. Αυτό γίνεται για να απομακρυνθούν τα θραύσματα και τα υπολείμματα των κυττάρων τα οποία μπορεί να εμποδίζουν τα ακόλουθα πειράματα
10. Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέα eppendorf tubes
11. Φύλαξη των δειγμάτων στους -80°C
12. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας του κατακερματισμού για ολόκληρη την ποσότητα των δειγμάτων, γίνεται απενεργοποίηση της συσκευής, απόρριψη του νερού από το δοχείο και καλό στέγνωμα

Παρατηρήσεις

- Η διαδικασία του degas έχει ως σκοπό να απομονώσει το δοχείο με το νερό από ίχνη αέρα που μπορεί να μειώσουν την αποτελεσματικότητα της συσκευής. Η διαδικασία του cooldown έχει ως σκοπό να μειώσει τη θερμοκρασία του νερού στο δοχείο μέχρι τους 4°C, έτσι ώστε να μπορεί να μένει και η θερμοκρασία του δείγματος χαμηλή.
- Χρησιμοποιείται απεσταγμένο νερό, ώστε να μην σχηματιστούν στερεά άλατα τα οποία θα επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα της συσκευής.
- Τα ειδικά tubes που χρησιμοποιούνται στη συσκευή Covaris, περιέχουν μια μικρή ράβδο η οποία εμποδίζει την δημιουργία φυσαλίδων. Η απομάκρυνση του δείγματος από τα tubes γίνεται με προσοχή ώστε να μην ληφθεί και η ράβδος.
- Δίνεται προσοχή κατά την τοποθέτηση των δειγμάτων στα ειδικά φιαλίδια της συσκευής Covaris να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες. Σε περίπτωση που δημιουργηθούν, είναι σημαντικό να απομακρυνθούν όσες περισσότερες γίνεται ώστε να μην μειωθεί σημαντικά η αποτελεσματικότητα της κατεργασίας με υπέρηχους.

Στη συνέχεια, μπορεί να γίνει έλεγχος της αποτελεσματικότητας του κατακερματισμού της χρωματίνης με τη βοήθεια ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης μετά την πέψη με

πρωτεΐνάση K και καθαρισμό με φαινόλη-χλωροφόρμιο, ώστε να παρατηρηθεί το εύρος των κομματιών DNA της κατακερματισμένης χρωματίνης.

3.4.3. Πέψη δείγματος χρωματίνης με πρωτεΐνάση K

Ύστερα από τον κατακερματισμό της χρωματίνης, οι πρωτεΐνες των δειγμάτων υφίστανται πέψη από την πρωτεΐνάση K, μια εξωκυτταρική ενδοπεπτιδάση, η οποία διασπά τους πεπτιδικούς δεσμούς σε συγκεκριμένα σημεία, χρησιμοποιώντας δωδεκύλιο θειϊκό νάτριο (sodium dodecyl sulfate, SDS). Με αυτόν τον τρόπο καταστρέφονται οι τρισδιάστατες διαμορφώσεις των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την απομάκρυνση των πρωτεϊνών από το δείγμα DNA και την αναστροφή της εγκάρσιας διασύνδεσης (reverse cross-linking). Ο διαχωρισμός των συστατικών μετά την πέψη των πρωτεϊνών από την πρωτεΐνάση K πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο φαινόλη-χλωροφόρμιο. Πιο συγκεκριμένα, δημιουργείται ένα διφασικό διάλυμα, στο οποίο η υδατική φάση (πάνω φάση) περιέχει καθαρή χρωματίνη ενώ η οργανική φάση (κάτω φάση) περιέχει τις πρωτεΐνες που διασπάστηκαν καθώς και ανεπιθύμητα συστατικά που πρέπει να απομακρυνθούν. Με τον παραπάνω τρόπο γίνεται έλεγχος της αποτελεσματικότητας του κατακερματισμού (fragmentation) σε ένα μικρό ποσοστό της συνολικής χρωματίνης.

Πειραματική διαδικασία

Η αντίδραση πέψης με πρωτεΐνάση K γίνεται σε όγκο 100 μL . Το SDS πρέπει να είναι 0,5% και η PK 100 μg ανά αντίδραση.

1. Από τα δείγματα της κατακερματισμένης χρωματίνης μεταφέρεται μικρή ποσότητα 50 μg σε νέα eppendorf tubes
2. Προσθήκη 5 μL 10% SDS και 100 μg Proteinase K (Roche)
3. Συμπλήρωση όγκου με ddH₂O μέχρι τον τελικό όγκο και ήπια ανάδευση με πιπέτα
4. Τα eppendorf tubes τοποθετούνται σε υδατόλουτρο για επώαση στους 55°C για 3 ώρες
5. Ακολουθεί ολονύκτια επώαση στους 65°C

3.4.4. Καθαρισμός DNA με αντίδραση φαινόλης-χλωροφορμίου και κατακρήμνιση με αιθανόλη

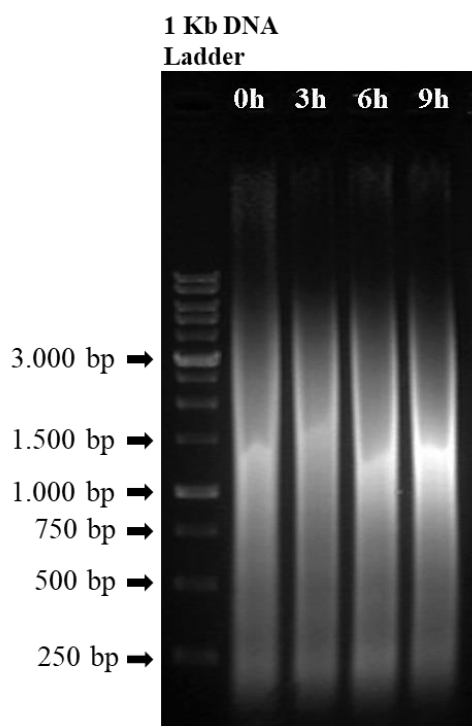
Ο καθαρισμός (extraction) με φαινόλη-χλωροφόρμιο είναι μια βασική μέθοδος καθαρισμού νουκλεϊκών οξέων, η οποία βασίζεται στη διαφορά πυκνότητας και φορτίου ανάμεσα στο νερό και τη φαινόλη. Η φαινόλη και το χλωροφόρμιο είναι ισχυρά αντιδραστήρια, με μεγαλύτερη πυκνότητα από το νερό, με αποτέλεσμα όταν προστεθούν σε υδατικό διάλυμα δεν αναμειγνύονται με αυτό και απομακρύνουν τις πρωτεΐνες από το νουκλεϊκό οξύ. Η προσθήκη φαινόλης-χλωροφορμίου σε υδατικό διάλυμα, στο οποίο περιέχεται DNA, οδηγεί στη δημιουργία συμπλόκων/ενώσεων με τις πρωτεΐνες. Μετά τη φυγοκέντρηση, προκύπτει ένα γαλάκτωμα δύο φάσεων, στην υδατική φάση (πάνω φάση) του οποίου παραμένει το DNA, το οποίο είναι περισσότερο διαλυτό στο νερό, λόγω του αρνητικού φορτίου του. Αντίθετα, στην οργανική φάση (κάτω φάση) εντοπίζεται το πρωτεϊνικό κλάσμα, το οποίο διαχωρίζεται από το DNA. Οι πρωτεΐνες είναι διαλυτοποιημένες στη φαινόλη ενώ τα λιπίδια διαλυτοποιημένα στο χλωροφόρμιο. Κατόπιν, πραγματοποιείται κατακρήμνιση με αιθανόλη, μέσω προσθήκης άλατος (COONa), το οποίο εξουδετερώνει το αρνητικό φορτίο του DNA, αναγκάζοντάς το να κατακρημνιστεί από το διάλυμα. Η αιθανόλη διευκολύνει την αλληλεπίδραση των ιόντων Na^+ με τις αρνητικά φορτισμένες ομάδες του DNA, λόγω της διηλεκτρικής σταθεράς, η οποία είναι πολύ χαμηλότερη από αυτή του νερού [85, 86].

Πειραματική διαδικασία

1. Μετά την ολονύχτια επώαση στους 65°C , γίνεται προσθήκη μισού όγκου χλωροφορμίου, δηλαδή 50 μL (Chloroform biochemica της PanReac AppliChem) στα eppendorf tubes με την χρωματίνη
2. Προσθήκη μισού όγκου φαινόλης, δηλαδή 50 μL (Phenol της PanReac AppliChem)
3. Πραγματοποιείται ανάδευση σε συσκευή vortex για περίπου 10 δευτερόλεπτα
4. Φυγοκέντρηση σε 13.000 rpm, για 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου
5. Σε νέα eppendorf tubes προστίθεται 1/10 του όγκου του αρχικού δείγματος οξικό νάτριο (CH_3COONa) 3 M pH 5,2. Το οξικό νάτριο χρησιμοποιείται για την εξουδετέρωση των φορτίων του DNA, ώστε να κατακρημνιστεί

6. Προσθήκη 1 μL (20 mg) γλυκογόνου στο καπάκι του eppendorf tube, ώστε να μην έρθει σε άμεση επαφή με το οξικό νάτριο. Το γλυκογόνο προστίθεται για αποτελεσματικότερη κατακρήμνιση του DNA
7. Μεταφορά της υδατικής φάσης (πάνω φάση) στα eppendorf tubes
8. Προσθήκη 3 όγκων (της υδατικής φάσης) 100% αιθανόλη (Ethanol Absolute της BDH Chemicals)
9. Πολύ καλή ανάδευση των δειγμάτων
10. Επώαση των δειγμάτων για 30 λεπτά στους -80°C (το βήμα αυτό γίνεται ώστε να υπάρχει καλύτερη απόδοση της κατακρήμνισης του DNA)
11. Φυγοκέντρηση των eppendorf tubes σε 13.000 rpm, για 30 λεπτά, στους 4°C
12. Απομάκρυνση του υπερκειμένου με προσοχή μην διαταραχθεί η πελέτα γλυκογόνου που έχει δημιουργηθεί στον πυθμένα των eppendorf tubes και περιέχει το DNA
13. Πραγματοποιείται στέγνωμα των δειγμάτων με ανοιχτά καπάκια
14. Πλύση με 500 μL 70% αιθανόλη (Ethanol Absolute της BDH Chemicals), ώστε να απομακρυνθεί η ποσότητα του οξικού νατρίου και ήπια ανάδευση
15. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων σε 13.000 rpm, για 5 λεπτά, στους 4°C
16. Απομάκρυνση όσο το δυνατόν περισσότερης ποσότητας του υπερκειμένου και στέγνωμα των δειγμάτων με ανοιχτά καπάκια
17. Επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας σε 50 μL ddH₂O

Μετά την ολοκλήρωση του καθαρισμού του DNA σύμφωνα με την παραπάνω διαδικασία, τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% μαζί με έναν δείκτη μοριακού βάρους (1 Kb), ώστε να ελεγχθεί το μέγεθος των κομματιών DNA που έχουν προκύψει μετά τον κατακερματισμό της χρωματίνης με την χρήση υπερήχων (Εικόνα 3.5). Με αυτόν τον τρόπο πραγματοποιείται έλεγχος της ποιότητας της χρωματίνης. Τα κομμάτια του DNA που προκύπτουν μετά τον κατακερματισμό όπως παρατηρείται στην εικόνα 3.5, κυμαίνονται από 200-1.500 ζεύγη βάσεων.



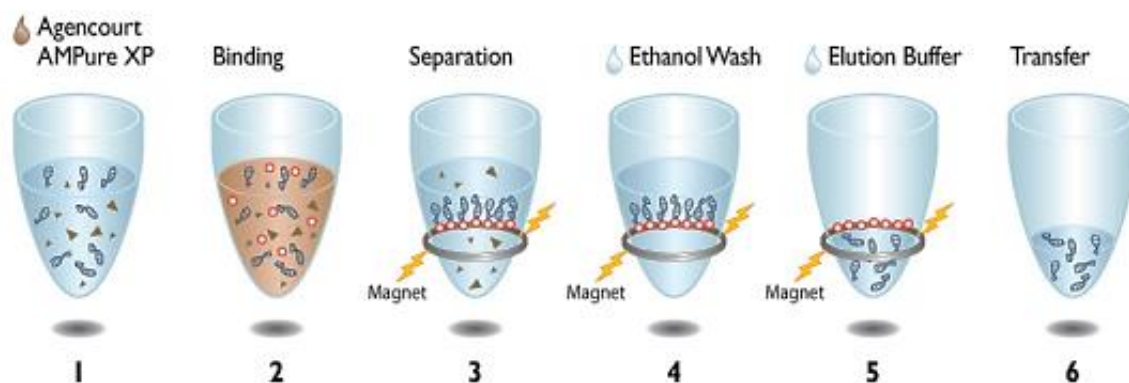
Εικόνα 3.5. Ηλεκτροφόρηση απομονωμένου DNA από χρωματίνη που έχει υποστεί κατακερματισμό με υπερήχους των Beta-TC-6 κυττάρων πριν τη μόλυνση με ιό Sendai (0h) και στα χρονικά σημεία των 3, 6 και 9 ωρών μετά την ιϊκή μόλυνση. Τα κομμάτια DNA που προκύπτουν μετά τον κατακερματισμό κυμαίνονται μεταξύ 200-1.500 ζευγών βάσεων.

Παρατηρήσεις

- Ο καθαρισμός του DNA μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με τη χρήση φαινόλης-χλωροφορμίου, είτε με μαγνητικά σφαιρίδια SPRI, σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία της ενότητας 3.4.5.
- Η μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέα eppendorf tubes γίνεται με μεγάλη προσοχή ώστε να μη μεταφερθεί οργανική φάση (κάτω φάση).
- Κατά τον χρόνο επώασης των δειγμάτων στους -80°C τα μόρια DNA συσσωματώνονται σε αδιάλυτα σύμπλοκα. Η συσσωμάτωση υποβοηθείται από την αφαίρεση του αρνητικού ηλεκτρικού φορτίου του DNA. Η προσθήκη άλατος υποβοηθά την συσσωμάτωση λόγω του φαινομένου της εξαλάτωσης του DNA.
- Και η φαινόλη και το χλωροφόρμιο είναι επικίνδυνα χημικά και απαιτείται ειδική μέριμνα κατά την χρήση τους.
- Τα δείγματα μετά τον καθαρισμό με τη διαδικασία της πρωτεϊνάσης K, φαινόλη-χλωροφόρμιο και την κατακρήμνιση με αιθανόλη αποθηκεύονται στους -20°C .

3.4.5. Καθαρισμός DNA SPRI μαγνητικά σφαιρίδια

Τα σφαιρίδια SPRI (Solid Phase Reversible Immobilization beads) χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό νουκλεϊκών οξέων που μπορεί να βρίσκονται σε διάλυμα με υπολείμματα κυττάρων. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται στον τελικό καθαρισμό κατά την τρίτη ημέρα του πρωτοκόλλου ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης. Τα σφαιρίδια SPRI είναι παραμαγνητικά, δηλαδή εμφανίζουν τη μαγνητική τους ιδιότητα μόνο εάν βρεθούν σε μαγνητικό πεδίο, πράγμα το οποίο καθιστά δυνατή την ομογενοποίηση του διαλύματος και αποτρέπει τη δημιουργία συσσωματωμάτων. Κάθε σφαιρίδιο αποτελείται από έναν πυρήνα πολυστυρενίου (μια συνθετική ρητίνη που είναι ένα πολυμερές στυρενίου), το οποίο περιβάλλεται από ένα στρώμα μαγνητίτη (ένα σκούρο, γκρίζο, μαγνητικό, ορυκτό που αποτελείται από ένα οξείδιο σιδήρου), γύρω από το οποίο υπάρχει ένα στρώμα καρβοξυλικών μορίων. Πάνω σε αυτά τα μόρια, το DNA προσδένεται αντιστρεπτά, παρουσία πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG) και άλατος (NaCl). Η πολυαιθυλενογλυκόλη προκαλεί τη σύνδεση των αρνητικά φορτισμένων μορίων DNA στις καρβοξυλικές ομάδες της επιφάνειας των σφαιριδίων, ενώ το άλας εξουδετερώνει τα αρνητικά φορτία του DNA (Εικόνα 3.6). Λόγω του γεγονότος ότι η δέσμευση του DNA στα σφαιρίδια εξαρτάται από τη συγκέντρωση της πολυαιθυλενογλυκόλης και του άλατος, η ογκομετρική αναλογία των σφαιριδίων προς το DNA πρέπει να ρυθμίζεται αυστηρά. Ένας άλλος λόγος για τον οποίο η αναλογία αυτή είναι σημαντική, είναι το γεγονός ότι το μέγεθος των κομματιών, τα οποία θα προσδεθούν στα σφαιρίδια, εξαρτάται από τη συγκέντρωση των σφαιριδίων. Κατά την επιλογή κομματιών DNA με τη χρήση των σφαιριδίων SPRI, ισχύει ότι στα σφαιρίδια είναι πιο εύκολο να δεσμευτούν μεγάλα κομμάτια λόγω φορτίου και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Δηλαδή, όσο μικρότερη είναι η αναλογία του όγκου των σφαιριδίων προς τον όγκο του διαλύματος του DNA, τόσο μεγαλύτερο θα είναι το μήκος των τμημάτων DNA που θα απομονωθούν [87].



Εικόνα 3.6. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας καθαρισμού δείγματος DNA με SPRI σφαιρίδια. Κατόπιν της προσθήκης των σφαιριδίων στο δείγμα (1), τα μόρια DNA προσδένονται επιλεκτικά (κυρίως με βάση το μέγεθος) στην επιφάνεια των σφαιριδίων (2). Μετά την τοποθέτηση του δείγματος σε μαγνήτη, τα σφαιρίδια, στα οποία είναι προσδεμένα μόρια DNA, δημιουργούν συσσωματώματα καθώς έλκονται από το μαγνητικό πεδίο, με αποτέλεσμα η υγρή φάση, στην οποία περιέχονται ανεπιθύμητα μόρια, να απομακρύνεται (3). Η υγρή φάση αφαιρείται και απορρίπτεται. Ακολουθούν δύο πλύσεις με 80% αιθανόλη, για την πλήρη απομάκρυνση των ανεπιθύμητων ουσιών (4). Το δείγμα απομακρύνεται από τον μαγνήτη, πραγματοποιείται έκλυση του DNA από τα σφαιρίδια, με απεσταγμένο νερό (5) και μεταφορά σε νέο eppendorf tube (6) [87].

3.4.6. Ανοσοκατακρήμνιση

Πειραματική πορεία

1^η ημέρα: Προετοιμασία μαγνητικών σφαιριδίων, καθαρισμός χρωματίνης (preclearing) και ένωση αντισώματος με την πρωτεΐνη στόχο

Την πρώτη ημέρα γίνεται προετοιμασία του ρυθμιστικού διαλύματος RIPA Buffer για την πλύση των μαγνητικών σφαιριδίων, ώστε να είναι έτοιμα να χρησιμοποιηθούν για το καθαρισμό (preclearing) της χρωματίνης. Τα μαγνητικά σφαιρίδια που χρησιμοποιούνται είναι καλυμμένα με G πρωτεΐνες, οι οποίες δημιουργούν σύμπλοκα με τις βαριές αλυσίδες του αντισώματος που προστίθεται και λόγω της ιδιότητάς τους να είναι μαγνητικά, διαχωρίζονται εύκολα από το δείγμα. Επίσης, γίνεται επώαση της κατακερματισμένης χρωματίνης με μαγνητικά σφαιρίδια, έτσι ώστε να αποφευχθούν διάφορες ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους, οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά τα αποτελέσματα της ανοσοκατακρήμνισης σε χρωματίνη. Τέλος, γίνεται προσθήκη του επιθυμητού αντισώματος στη χρωματίνη, το οποίο έχει την ικανότητα να προσδένεται στην

αντίστοιχη πρωτεΐνη-αντιγόνο-στόχο που βρίσκεται πάνω στην χρωματίνη, ώστε να μπορέσουν στη συνέχεια να απομονωθούν μόνο τα σύμπλοκα DNA-αντίσωμα-πρωτεΐνη.

Διαλύματα

2X RIPA Buffer

Για τελικό όγκο 50 mL

1 mL Triton X-100

1 mL Tris pH 8,0 1 M

2,8 mL NaCl 5 M

0,2 g DOC (Sodium Deoxycholate της PanReac AppliChem)

ddH₂O μέχρι τον τελικό όγκο

1X RIPA Buffer

Για τελικό όγκο 50 mL

25 mL 2X RIPA Buffer

25 mL ddH₂O

Πειραματική διαδικασία

1. Σε ένα eppendorf tube προστίθενται 200 μ L μαγνητικών σφαιριδίων (protein G της Invitrogen) (Dynabeads Protein G)
2. Το eppendorf tube με τα μαγνητικά σφαιρίδια τοποθετείται σε μαγνητική βάση για 4 λεπτά
3. Αφαίρεση του υπερκειμένου
4. Προσθήκη 1 mL 1X RIPA Buffer και πραγματοποιείται καλή ανάδευση για ομογενοποίηση
5. Επώαση των μαγνητικών σφαιριδίων στον πάγο για 5 λεπτά
6. Τοποθέτηση του eppendorf tube σε μαγνητική βάση για 4 λεπτά
7. Αφαίρεση του υπερκειμένου
8. Τα βήματα 4, 5, 6 και 7 για την πλύση των μαγνητικών σφαιριδίων επαναλαμβάνονται άλλες 2 φορές
9. Μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου, γίνεται προσθήκη 1,2 mL 1X RIPA Buffer και ακολουθεί καλή ανάδευση για ομογενοποίηση

10. Σε 4 νέα eppendorf tubes μοιράζεται κατάλληλη ποσότητα μαγνητικών σφαιριδίων (για 4 δείγματα θα μοιραστούν 100 μ L σε κάθε eppendorf tube) ενώ το υπόλοιπο αφήνεται για επώαση σε ρότορα στους 4°C ολονυκτίς
11. Τα eppendorf tubes τοποθετούνται στην μαγνητική βάση για 1 λεπτό
12. Αφαίρεση του υπερκειμένου από τα μαγνητικά σφαιρίδια
13. Πάνω στα μαγνητικά σφαιρίδια προστίθενται κατάλληλη ποσότητα χρωματίνης από τα διαφορετικά χρονικά σημεία και πραγματοποιείται ανάδευση (250-500 μ g χρωματίνη)
14. Σε κάθε eppendorf tube, το οποίο περιέχουν μαγνητικά σφαιρίδια και χρωματίνη προστίθεται ίσος όγκος 2X RIPA Buffer, ώστε να αποκατασταθεί η συγκέντρωση του διαλύματος και συμπληρώνεται με ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 1 mL
15. Τα eppendorf tubes τοποθετούνται σε ρότορα για 30-60 λεπτά, σε 5 rpm, στους 4°C στο cold room
16. Μετά την επώαση στο cold room, τα eppendorf tubes με τα μαγνητικά σφαιρίδια και τη χρωματίνη μεταφέρεται από τον ρότορα σε μαγνητική βάση για 4 λεπτά
17. Σε νέα eppendorf tubes μοιράζεται επιθυμητή ποσότητα καθαρισμένης χρωματίνης από το κάθε δείγμα ανά χρονικό σημείο
18. Προστίθεται κατάλληλη ποσότητα αντισώματος που προορίζεται για την ανοσοκατακρήμνιση των δειγμάτων χρωματίνης
19. Σε νέα eppendorf tubes τοποθετείται το 1/10 της ποσότητας της χρωματίνης που έχει καθαριστεί από το κάθε χρονικό σημείο, ως input control (0h input, 3h input, 6h input, 9h input)
20. Τα eppendorf tubes με τη χρωματίνη και το αντίστοιχο αντίσωμα και το eppendorf tube με την υπόλοιπη ποσότητα μαγνητικών σφαιριδίων μεταφέρονται σε ρότορα στους 4°C, για 12 ώρες (ολονυκτίς)
21. Τα eppendorf tubes με τα input controls μεταφέρονται στους 4°C

Πίνακας 3.3. Αντισώματα ιστονικής τροποποίησης, ενζύμου και μεταγραφικού παράγοντα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης (ChIP).

Αντισώματα	Ποσότητα Αντισώματος	Εταιρεία	Κωδικός
H3K27ac	2 μ g	abcam	Ab4729
H3K4me3	2 μ g	abcam	Ab8580
RNApolII	8 μ g	Santa Cruz Biotechnology	SC-9001
IRF3	8 μ g	Cell Signaling Technology	D83B9

Παρατηρήσεις

- Κατά τη διάρκεια των πλύσεων των μαγνητικών σφαιριδίων, η απομάκρυνση του υπερκειμένου γίνεται με προσοχή, ώστε να μην απομακρυνθούν τα μαγνητικά σφαιρίδια.
- Η διαδικασία του preclearing της χρωματίνης γίνεται ώστε να μειθούν όσο το δυνατόν περισσότερο οι ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις μεταξύ μαγνητικών σφαιριδίων και χρωματίνης, οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τα αποτελέσματα της διαδικασίας της ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης.
- Σε αυτό το σημείο, γίνεται πρόσδεση των αντισωμάτων στις αντίστοιχες πρωτεΐνες στόχους που βρίσκονται πάνω στη χρωματίνη.

2^η ημέρα: Συνένωση μαγνητικών σφαιριδίων με το αντίσωμα, απομόνωση συμπλόκων DNA-αντισώματος-πρωτεΐνης και πέψη με πρωτεΐνάση K

Τη δεύτερη ημέρα του πειράματος γίνεται προσθήκη μαγνητικών σφαιριδίων στα δείγματα χρωματίνης-αντισώματος, ώστε να συνδεθούν τα σφαιρίδια με το αντίσωμα. Μετά την ανάδευση στον ρότορα, τα δείγματα τοποθετούνται σε μαγνητική βάση ώστε να γίνει απομάκρυνση του υπερκειμένου. Με αυτόν τον τρόπο παραμένουν στα eppendorf tubes μόνο τα μαγνητικά σφαιρίδια, τα οποία είναι ενωμένα με το αντίσωμα δηλαδή την πρωτεΐνη στόχο που βρίσκεται πάνω στην χρωματίνη. Στη συνέχεια, γίνεται πλύση των μαγνητικών σφαιριδίων και πέψη με πρωτεΐνάση K, ώστε να απελευθερωθεί το DNA από τις πρωτεΐνες.

Διαλύματα

2X Wash RIPA Buffer

Για τελικό όγκο 50 mL

1 mL Triton X-100

1 mL Tris pH 8,0 1 M

1 mL 10% SDS

5 mL NaCl 5 M

0,14 g DOC (Sodium Deoxycholate της PanReac AppliChem)

ddH₂O μέχρι τον τελικό όγκο

1X Wash RIPA Buffer

Για τελικό όγκο 50 mL

25 mL 2X RIPA Buffer

25 mL ddH₂O

Πειραματική διαδικασία

1. Τα eppendorf tubes με τη χρωματίνη και τα αντισώματα καθώς και το eppendorf tube με τα μαγνητικά σφαιρίδια μεταφέρονται σε πάγο
2. Στα eppendorf tubes με τη χρωματίνη και τα αντισώματα γίνεται προσθήκη ίσου όγκου μαγνητικών σφαιριδίων 100 μ L (προσοχή δεν γίνεται προσθήκη σφαιριδίων στα input controls)
3. Τα eppendorf tubes τοποθετούνται σε ρότορα στους 4°C, στο cold room, για 3 ώρες
4. Μετά την επώαση στο cold room, πραγματοποιείται μεταφορά των eppendorf tubes σε πάγο και στη συνέχεια σε μαγνητική βάση για 2 λεπτά
5. Αφαίρεση του υπερκειμένου
6. Προσθήκη 1 mL 1X Wash RIPA Buffer
7. Επώαση στο ρότορα για 3 λεπτά ώστε να γίνει ομογενοποίηση
8. Επώαση σε μαγνητική βάση για 2 λεπτά
9. Αφαίρεση του υπερκειμένου
10. Τα βήματα 6, 7, 8 και 9 επαναλαμβάνονται άλλες 4 φορές για την πλύση των μαγνητικών σφαιριδίων

6. Ακολουθεί πέψη με Proteinase K (της Roche) τόσο για τα δείγματα χρωματίνης με το αντίσωμα όσο και για τα input controls για αναστροφή των εγκάρσιων συνδέσεων, όπως περιγράφηκε στην ενότητα 3.4.3 (5 μ L 10% SDS και 100 μ g Proteinase K)
11. Μεταφορά των eppendorf tubes σε υδατόλουτρο, στους 55°C, για 3 ώρες
12. Ακολουθεί ολονύκτια επώαση στους 65°C

Παρατηρήσεις

- Ο τελικός όγκος των δειγμάτων στην κατεργασία με πρωτεΐνάση K, εξαρτάται από τον τρόπο με τον οποίο θα γίνει ο καθαρισμός της χρωματίνης στη συνέχεια. Αν ο καθαρισμός γίνει με αντίδραση φαινόλης-χλωροφορμίου, τότε ο τελικός όγκος της αντίδρασης θα είναι 100 μ L. Αντίθετα, αν ο καθαρισμός πραγματοποιηθεί με τη χρήση SPRI μαγνητικών σφαιριδίων, τότε ο όγκος της αντίδρασης θα είναι 50 μ L. Αυτή η προσαρμογή γίνεται για λόγους οικονομίας, λόγω του κόστους των σφαιριδίων.
- Όταν παρασκευάζονται τα μείγματα για την πέψη με πρωτεΐνάση K, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η ποσότητα των input controls που έχουν κρατηθεί. Για τον λόγο αυτό φτιάχνεται διαφορετικό μείγμα για τα δείγματα χρωματίνης-αντισώματος και διαφορετικό μείγμα για τα input controls. Τα δείγματα που έχουν τα beads μέσα, δεν έχουν προϋπάρχων όγκο. Δηλαδή, ο όγκος της αντίδρασης για τα δείγματα προέρχεται μόνο από το μείγμα. Κατά τη διάρκεια των πλύσεων των μαγνητικών σφαιριδίων, η απομάκρυνση του υπερκείμενου γίνεται με προσοχή ώστε να μην απομακρυνθούν και μαγνητικά σφαιρίδια.
- Σε αυτό το σημείο, γίνεται πρόσδεση των μαγνητικών σφαιριδίων με το αντίσωμα-χρωματίνη και απομόνωσή τους από την υπόλοιπη χρωματίνη.

3^η ημέρα: Κατακρήμνιση χρωματίνης

Την τρίτη ημέρα του πειράματος γίνεται διαχωρισμός της χρωματίνης από τα πρωτεϊνικά κατάλοιπα με τη χρήση σφαιριδίων. Τέλος, στην καθαρισμένη χρωματίνη προστίθεται αιθανόλη για την κατακρήμνιση και διαλυτοποίηση σε νερό.

Πειραματική διαδικασία

1. Αφαίρεση των δειγμάτων από το υδατόλουτρο
2. Τοποθέτηση των δειγμάτων (εκτός από τα input controls καθώς δεν έχουν μαγνητικά σφαιρίδια) σε μαγνητική βάση για 5 λεπτά
3. Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέα eppendorf tubes
4. Προσθήκη 2 όγκων (100 μ L) SPRI beads clean-up (AMPure XP beads της Beckman Coulter) και στα δείγματα input controls
5. Επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
6. Τοποθέτηση των δειγμάτων σε μαγνητική βάση για 5 λεπτά
7. 2 πλύσεις με 80% αιθανόλη (Ethanol Absolute της BDH Chemicals), προσθέτοντας όση χρειάζεται ώστε να καλυφθούν τα beads
8. Αφαίρεση της αιθανόλης με προσοχή ώστε να μην παρθούν τα σφαιρίδια
9. Καλό στέγνωμα με ανοιχτά καπάκια για λίγα λεπτά
10. Προσθήκη 52 μ L ddH₂O και καλή ομογενοποίηση με τα σφαιρίδια
11. Επώαση για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου
12. Τοποθέτηση των δειγμάτων σε μαγνητική βάση για 4 λεπτά
13. Μεταφορά του υπερκειμένου (50 μ L) σε νέα eppendorf tubes και απόρριψη των σφαιριδίων

Τα eppendorf tubes περιέχουν το κατακρημνισμένο DNA, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να εξαχθούν διάφορες πληροφορίες σχετικά με την έκφραση των γονιδίων που βρίσκονται κοντά στην περιοχή που ήταν δεσμευμένη η πρωτεΐνη, η οποία συνδέθηκε με το αντίστοιχο αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε.

Παρατηρήσεις

- Ο καθαρισμός μπορεί να γίνει και με τη διαδικασία φαινόλης-χλωροφορμίου, η οποία περιγράφεται στην ενότητα 3.4.4.
- Σε αυτό το σημείο, το DNA έχει απελευθερωθεί από τις πρωτεΐνες και απομονώνεται από αυτές μέσω καθαρισμού με μαγνητικά σφαιρίδια.

3.5. Δημιουργία γενωμικής βιβλιοθήκης για αλληλούχηση (High-Complexity Library)

Για την πραγματοποίηση της *γονιδιωματικής* ανάλυσης των πειραμάτων πρέπει να γίνει αλληλούχηση ευρείας κλίμακας. Για τον σκοπό αυτό γίνεται κατασκευή γενωμικής βιβλιοθήκης των δειγμάτων DNA που προέρχονται από πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης, με την τεχνολογία της Illumina. Η διαδικασία αυτή ακολουθείται τόσο για την κατασκευή γενωμικής βιβλιοθήκης για την αλληλούχηση πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP-seq), όσο και για δημιουργία κατάλληλης βιβλιοθήκης, ώστε να πραγματοποιηθούν πειράματα STARR (ChIP-STARR-seq), ύστερα από πειράματα ChIP-seq. Για την κατασκευή βιβλιοθήκης, σημαντικό βήμα αποτελεί η προσθήκη ανταπτόρων στα άκρα του DNA, μέσω των οποίων πραγματοποιείται ο πολλαπλασιασμός της βιβλιοθήκης με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), η πρόσδεση των τμημάτων της βιβλιοθήκης στις αλληλουχίες που βρίσκονται καθηλωμένες στη συσκευή αλληλούχησης, ενώ περιέχουν και συγκεκριμένες αλληλουχίες (barcodes), οι οποίες επιτρέπουν την ταυτοποίηση του δείγματος, από το οποίο προέρχεται κάθε αλληλουχία, μετά την ολοκλήρωση της αλληλούχησης. Το συστατικό που διαφέρει στην κατασκευή των δύο ειδών βιβλιοθηκών, είναι οι αντάπτορες και κατά συνέπεια οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται για τον πολλαπλασιασμό των βιβλιοθηκών.

Πιο αναλυτικά, η διαδικασία δημιουργίας γενωμικής βιβλιοθήκης αποτελείται από 7 βήματα. Αρχικά, γίνεται επιδιόρθωση των άκρων του DNA και προσθήκη αδερίνης στα 3' άκρα, ώστε να είναι συμβατά με τους αντάπτορες, οι οποίοι προστίθενται στη συνέχεια στα άκρα του DNA, μέσω αντίδρασης λιγάσης. Οι αντάπτορες διαθέτουν μια δομή φουρκέτας, η οποία δημιουργείται μέσω της παρουσίας ουρακίλης στην αλληλουχία τους, αποτρέποντας τη δημιουργία διμερών και συμβάλλοντας στην αποτελεσματικότερη σύνδεση των ανταπτόρων στα μόρια DNA. Ύστερα, από την κλωνοποίηση των ανταπτόρων γίνεται κατεργασία με το ένζυμο USER, το οποίο αφαιρεί την ουρακίλη, που είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία της φουρκέτας και έτσι αποδιατάσσεται. Ακολουθεί μικρής έκτασης πολλαπλασιασμός της βιβλιοθήκης με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Από το πήκτωμα αγαρόζης απομονώνονται τα τμήματα που έχει μήκος από 200 bp έως 400 bp, για την κατασκευή βιβλιοθήκης πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP-seq) και από 400 bp έως 700 bp για την κατασκευή βιβλιοθήκης πειραμάτων STARR (STARR-seq). Το υλικό αυτό αφού

καθαριστεί, πολλαπλασιάζεται περαιτέρω με τη βοήθεια του ίδιου ζεύγους εκκινητών. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, μέρος του υλικού ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης, για να πραγματοποιηθεί έλεγχος της ποιότητας της βιβλιοθήκης και ακολουθεί αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR), ώστε να εξεταστούν εάν τα επίπεδα εμπλουτισμού για τις αλληλουχίες στόχους είναι τα ίδια με εκείνα των αρχικών δειγμάτων που προέρχονται από την ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης.

Πειραματική διαδικασία

Βήμα 1^ο: Επιδιόρθωση των άκρων του DNA

Συστατικά για το μείγμα επιδιόρθωσης των άκρων του DNA ($V_{\text{τελικό}} = 50 \mu\text{L}$)

Κατάλληλη ποσότητα DNA, από πείραμα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (50 ng)

5 μL T4 DNA ligase Buffer (10X Buffer for T4) (NEB)

1 μL T4 DNA polymerase (NEB)

1 μL T4 PNK (polynucleotide kinase) (NEB)

2 μL 10 mM dNTPs

1 μL DNA polymerase I Klenow large fragment (NEB)

ddH₂O μέχρι τον τελικό όγκο

Τα δείγματα επωάζονται σε μηχανήμα PCR στους 20°C, για 30 λεπτά.

Καθαρισμός των δειγμάτων με σφαιρίδια AMPure XP

Σε αυτό το βήμα χρησιμοποιείται 2:1 αναλογία του όγκου των σφαιριδίων προς τον όγκο του δείγματος του DNA.

1. Προσθήκη διπλάσιου όγκου σφαιριδίων (100 μL) στα δείγματα
2. Επώση για 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου
3. Τοποθέτηση των δειγμάτων στην μαγνητική βάση
4. Αφαίρεση του υπερκειμένου
5. Προσθήκη 150 μL 80% αιθανόλης (1^η πλύση)
6. Επώση στην μαγνητική βάση για 30 δευτερόλεπτα
7. Αφαίρεση της αιθανόλης
8. Προσθήκη 150 μL 80% αιθανόλης (2^η πλύση)
9. Επώση στην μαγνητική βάση για 30 δευτερόλεπτα

10. Αφαίρεση του υπερκειμένου από τα δείγματα και αφήνονται να στεγνώσουν για μερικά λεπτά
11. Προσθήκη 36 μL ddH₂O και επώαση για 2 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου
12. Μεταφορά στην μαγνητική και επώαση για 5 λεπτά
13. Μεταφορά 34 μL από το υπερκείμενο σε νέα eppendorf tubes

Βήμα 2^ο: Προσθήκη αδερίνης στα 3' άκρα των τμημάτων DNA

Συστατικά για το μείγμα προσθήκης αδερίνης στα άκρα του DNA ($V_{\text{τελικό}} = 50 \mu\text{L}$)

34 μL DNA από το προηγούμενο βήμα

5 μL NEB 2 (10X) Buffer

10 μL 1mM dATPs

1 μL 5 U/ μL Klenow Fragment (3'→5' exo⁻) (NEB)

Τα δείγματα επωάζονται σε μηχανήμα PCR στους 37°C, για 30 λεπτά.

Στη συνέχεια, πραγματοποιείται καθαρισμός των δειγμάτων με σφαιρίδια AMPure Xp. Σε αυτό το βήμα χρησιμοποιείται 2:1 αναλογία του όγκου των σφαιριδίων προς τον όγκο του δείγματος του DNA. Η έκλουση γίνεται με προσθήκη 11 μL ddH₂O και έπειτα μεταφέρονται 10 μL σε νέα eppendorf tubes.

Βήμα 3^ο: Αντίδραση λιγάσης για την προσθήκη ανταπτών στα άκρα του DNA

Συστατικά για το μείγμα της αντίδρασης λιγάσης ($V_{\text{τελικό}} = 30 \mu\text{L}$)

10 μL DNA από το προηγούμενο βήμα

15 μL Quick Ligation Reaction Buffer (NEB)

3 μL Quick T4 DNA ligase (NEB)

1 μL NEBNext adaptor, Universal PCR Primer for Illumina (NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina®)

1 μL ddH₂O

Τα δείγματα επωάζονται σε μηχανήμα PCR στους 20°C, για 30 λεπτά.

Μετά το πέρας των 30 λεπτών, ακολουθεί προσθήκη 3 μL USER™ Enzyme Mix. Το στάδιο αυτό πραγματοποιείται καθώς οι ανάπτορες έχουν φουρκέτες, τις οποίες το

USERTM Enzyme Mix σπάει. Ακολουθεί επώαση σε μηχανήμα PCR στους 37°C, για 30 λεπτά.

Στη συνέχεια, πραγματοποιείται καθαρισμός της αντίδρασης με σφαιρίδια AMPure XP. Σε αυτό το βήμα χρησιμοποιείται 1,6:1 αναλογία του όγκου των σφαιριδίων προς τον όγκο του δείγματος του DNA. Η έκλουση γίνεται με προσθήκη 21 μL ddH₂O και έπειτα μεταφέρονται 20 μL σε νέα eppendorf tubes.

Βήμα 4^ο: Περιορισμένος πολλαπλασιασμός της βιβλιοθήκης με PCR

Σε αυτό το βήμα γίνεται περιορισμένος πολλαπλασιασμός της βιβλιοθήκης με PCR για 5 κύκλους για μέτρια ενίσχυση του DNA, πριν την επιλογή κατάλληλου μεγέθους σε πήκτωμα αγαρόζης. Ο πολλαπλασιασμός της βιβλιοθήκης πραγματοποιείται με ειδικούς εκκινητές, οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί προς τις αλληλουχίες των ανταπτόρων που έχουν προστεθεί στα άκρα των τμημάτων DNA. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται μετατροπή των άκρων των ανταπτόρων που έχουν δομή Y σε δίκλωνο DNA, το οποίο θα διαχωριστεί σύμφωνα με το μέγεθός του σε πήκτωμα αγαρόζης.

❖ Για την κατασκευή βιβλιοθήκης για αλληλούχηση πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP-seq):

Συστατικά για το μείγμα της αντίδρασης πολυμερισμού ($V_{\text{τελικό}} = 50 \mu\text{L}$)

20 μL DNA από το προηγούμενο βήμα

1 μL 10 μM Universal Primer / NEBNext adaptor, Universal PCR Primer for Illumina

25 μL 2X Kapa HiFi Hot start Ready Mix

1 μL 10 μM index primer

3 μL ddH₂O

❖ Για την κατασκευή βιβλιοθήκης πειραμάτων STARR (STARR-seq):

Ο πολλαπλασιασμός της βιβλιοθήκης πραγματοποιείται με ειδικούς εκκινητές που προσδένονται στην αλληλουχία των ανταπτόρων και περιέχουν στα άκρα τους 15 νουκλεοτίδια που είναι συμπληρωματικά με τις θέσεις εισαγωγής της βιβλιοθήκης στο φορέα STARR.

Συστατικά για το μείγμα της αντίδρασης πολυμερισμού ($V_{\text{τελικό}} = 50 \mu\text{L}$)

20 μL DNA από το προηγούμενο βήμα

0,5 μL recombination Starr primer Forward

0,5 μL recombination Starr primer Reverse
25 μL 2X Kapa HiFi Hot start Ready Mix
4 μL ddH₂O

Το πρόγραμμα της PCR πραγματοποιείται στις ακόλουθες συνθήκες:

- 98°C για 45 δευτερόλεπτα
- για 5 κύκλους:
 - 98°C για 15 δευτερόλεπτα
 - 63°C για 30 δευτερόλεπτα
 - 72°C για 30 δευτερόλεπτα
- 72°C για 5 λεπτά
- 4°C επώαση μέχρι την αφαίρεση από τη συσκευή

Στη συνέχεια, πραγματοποιείται καθαρισμός της αντίδρασης με σφαιρίδια AMPure XP. Σε αυτό το βήμα χρησιμοποιείται 1,6:1 αναλογία του όγκου των σφαιριδίων προς τον όγκο του δείγματος του DNA. Η έκλουση γίνεται με προσθήκη 11,5 μL ddH₂O και έπειτα μεταφέρονται 10 μL σε νέα eppendorf tubes.

Βήμα 5^ο: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και επιλογή συγκεκριμένου εύρους μεγεθών

1. Ηλεκτροφόρηση 10 μL από τις αντιδράσεις που προέκυψαν στο παραπάνω βήμα με προσθήκη 5 μL χρωστικής. Φόρτωση 4 μL από 100 bp μάρτυρα
2. Ηλεκτροφόρηση στα 100 V για 45 λεπτά
3. Απομόνωση των τμημάτων του πηκτώματος που περιέχουν υλικό με μήκος από 200 bp έως 400 bp και από 400 bp έως 700 bp, με τη βοήθεια αποστειρωμένης λεπίδας και μεταφορά σε διαφορετικά eppendorf tubes
4. Ακολουθεί απομόνωση του DNA από το πήκτωμα αγαρόζης με την χρήση του NUCLEOSPIN Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) kit. Η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα 3.5.1
5. Μετά την μεταφορά των στηλών σε νέα eppendorf tubes γίνεται προσθήκη 20 μL ddH₂O για την έκλουση και επώαση 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου
6. Φυγοκέντρηση σε 13.000 rpm, για 1 λεπτό, σε θερμοκρασία δωματίου

7. Μεταφορά του εκλουόμενου υλικού σε νέα eppendorf tubes

Βήμα 6^ο: Εύρεση ιδανικού αριθμού κύκλων πολλαπλασιασμού

Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιείται αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο για την εύρεση του ιδανικού αριθμού κύκλων πολλαπλασιασμού. Ο υπερβολικός πολλαπλασιασμός της βιβλιοθήκης μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή ανεπιθύμητων παραπροϊόντων και στην αλλαγή της σχετικής κατανομής των κομματιών DNA. Για την εύρεση του ιδανικού αριθμού κύκλων πολλαπλασιασμού, κατά τον οποίο η αντίδραση βρίσκεται ακόμα στο στάδιο της εκθετικής φάσης, πραγματοποιείται ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο.

❖ Για την κατασκευή βιβλιοθήκης για αλληλούχηση πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP-seq):

Συστατικά για την ποσοτική αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο ($V_{\text{τελικό}} = 20 \mu\text{L}$)

1 μL της ποσότητας DNA που προέκυψε από το προηγούμενο βήμα (1/20), με μέγεθος 200-400 bp

10 μL KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal

0,5 μL index primer

0,5 μL Universal Primer / NEBNext adaptor, Universal PCR Primer for Illumina

8 μL ddH₂O

❖ Για την κατασκευή βιβλιοθήκης πειραμάτων STARR (STARR-seq):

Ο πολλαπλασιασμός της βιβλιοθήκης πραγματοποιείται με ειδικούς εκκινητές που προσδένονται στην αλληλουχία των ανταπτόρων και περιέχουν στα άκρα τους 15 νουκλεοτίδια που είναι συμπληρωματικά με τις θέσεις εισαγωγής της βιβλιοθήκης στο φορέα STARR.

Συστατικά για την ποσοτική αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο ($V_{\text{τελικό}} = 20 \mu\text{L}$)

1 μL της ποσότητας DNA που προέκυψε από το προηγούμενο βήμα (1/20), με μέγεθος 400-700 bp

10 μL KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal

0,5 μL recombination Starr primer Forward

0,5 μL recombination Starr primer Reverse

8 μL ddH₂O

Το πρόγραμμα της Real Time PCR πραγματοποιείται στις ακόλουθες συνθήκες:

- 95°C για 45 δευτερόλεπτα
- για 20 κύκλους:
 - 95°C για 15 δευτερόλεπτα
 - 63°C για 30 δευτερόλεπτα
 - 72°C για 30 δευτερόλεπτα

Ο αριθμός των κύκλων που είναι απαραίτητος για το πολλαπλασιασμό του συνολικού DNA, είναι αυτός στον οποίο η αντίδραση βρίσκεται στο μέσο της εκθετικής φάσης. Θα πρέπει να παραχθεί επαρκής ποσότητα προϊόντος, αλλά δε θα πρέπει να ξεπερνά τους 20 κύκλους. Γνωρίζοντας τον αριθμό αυτό, στη συνέχεια πραγματοποιείται ο πολλαπλασιασμός του ολικού υλικού.

Βήμα 7^ο: Πολλαπλασιασμός της βιβλιοθήκης με PCR

- ❖ Για την κατασκευή βιβλιοθήκης για αλληλούχηση πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP-seq):

Συστατικά για το μείγμα της αντίδρασης πολυμερισμού ($V_{\text{τελικό}} = 50 \mu\text{L}$)

18 μL DNA το οποίο απομονώθηκε από το πύκτωμα αгарόζης

25 μL Kapa HiFi Hot Start Ready Mix

2,5 μL index primer

2,5 μL Universal Primer / NEBNext adaptor, Universal PCR Primer for Illumina

2 μL ddH₂O

- ❖ Για την κατασκευή βιβλιοθήκης πειραμάτων STARR (STARR-seq):

Ο πολλαπλασιασμός της βιβλιοθήκης πραγματοποιείται με ειδικούς εκκινητές που προσδένονται στην αλληλουχία των ανταπτόρων και περιέχουν στα άκρα τους 15 νουκλεοτίδια που είναι συμπληρωματικά με τις θέσεις εισαγωγής της βιβλιοθήκης στο φορέα STARR.

Συστατικά για το μείγμα της αντίδρασης πολυμερισμού ($V_{\text{τελικό}} = 50 \mu\text{L}$)

18 μL DNA το οποίο απομονώθηκε από το πήκτωμα αγαρόζης

25 μL Kapa HiFi Hot Start Ready Mix

1 μL recombination Starr primer Forward

1 μL recombination Starr primer Reverse

5 μL ddH₂O

Το πρόγραμμα της PCR πραγματοποιείται στις ακόλουθες συνθήκες:

- 98°C για 45 δευτερόλεπτα
- για 5-13 κύκλους:
 - 98°C για 15 δευτερόλεπτα
 - 63°C για 30 δευτερόλεπτα
 - 72°C για 30 δευτερόλεπτα
- 72°C για 5 λεπτά

Στη συνέχεια πραγματοποιούνται δύο καθαρισμοί με σφαιρίδια AMPure XP, όπως περιγράφηκε στο βήμα 1. Σε αυτό το βήμα χρησιμοποιείται 1,2:1 αναλογία του όγκου των σφαιριδίων προς τον όγκο του δείγματος του DNA. Η τελική έκλουση γίνεται με προσθήκη 22 μL ddH₂O και έπειτα μεταφέρονται 20 μL από το υπερκείμενο σε νέα eppendorf tubes.

3.5.1. Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Η μέθοδος, η οποία ακολουθείται για την απομόνωση των επιθυμητών τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης, βασίζεται στη χρήση του NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit της εταιρείας Macherey-Nagel. Το πρώτο βήμα περιλαμβάνει την τοποθέτηση του πηκτώματος αγαρόζης σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας, όπου με την βοήθεια ενός νυστεριού αφαιρούνται προσεκτικά τα τμήματα που περιέχουν τις επιθυμητές ζώνες, στην συνέχεια τοποθετούνται σε eppendorf tubes και ογκομετρούνται σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας. Ακολουθεί προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος NT1 σε αναλογία 2:1 (για κάθε 100 mg πηκτώματος γίνεται προσθήκη 200 μL ρυθμιστικού διαλύματος). Στην συνέχεια, πραγματοποιείται ανάδευση και επώαση, ώστε να διαλυθεί πλήρως το πήκτωμα. Τα δείγματα τοποθετούνται σε στήλες διαχωρισμού NucleoSpin Extract II. Έπειτα, προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα NT3, το οποίο περιέχει αιθανόλη για να πραγματοποιηθεί πλύση. Τα

δείγματα μεταφέρονται σε νέα eppendorf tubes, γίνεται προσθήκη νερού για έκλυση του DNA και αποθήκευση στους -20°C.

Πειραματική διαδικασία

1. Κοπή των επιθυμητών ζωνών από το πήκτωμα και μεταφορά σε eppendorf tubes
2. Τα δείγματα ογκομετρούνται σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας
3. Προσθήκη τετραπλάσιου όγκου ρυθμιστικού διαλύματος NT1 [4 × (βάρος του πηκτώματος που κόπηκε σε mg)]. Σε περίπτωση καθαρισμού PCR γίνεται ανάμειξη 1 όγκου δείγματος με 2 όγκους διαλύματος NT1
4. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου και ελαφριά ανακίνηση έως την ολοκληρωτική τήξη του πηκτώματος
5. Μεταφορά του μείγματος στην ειδική στήλη του kit, ανά 700 μ L
6. Φυγοκέντρηση σε 13.000 rpm, 30 δευτερόλεπτα, σε θερμοκρασία δωματίου
7. Απόρριψη του διηθήματος από το σωληνάριο συλλογής
8. Προσθήκη 700 μ L διαλύματος NT3 στη στήλη
9. Φυγοκέντρηση σε 13.000 rpm, 30 δευτερόλεπτα, σε θερμοκρασία δωματίου
10. Απόρριψη του διηθήματος από το σωληνάριο συλλογής
11. Προσθήκη 700 μ L διαλύματος NT3 στη στήλη
12. Φυγοκέντρηση σε 13.000 rpm, 30 δευτερόλεπτα, σε θερμοκρασία δωματίου
13. Απόρριψη διηθήματος από το σωληνάριο συλλογής
14. Φυγοκέντρηση σε 13.000 rpm, 1 λεπτό, σε θερμοκρασία δωματίου, για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα του διαλύματος NT3
15. Μεταφορά της στήλης σε νέο 1,5 mL eppendorf tube
16. Προσθήκη 30 μ L ddH₂O, θερμοκρασίας 55°C, για την έκλυση του DNA από τη στήλη
17. Επώαση 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου
18. Φυγοκέντρηση σε 13.000 rpm, 1 λεπτό, σε θερμοκρασία δωματίου
19. Αφαίρεση της στήλης
20. Μεταφορά του εκλούμενου υλικού σε νέο eppendorf tube
21. Αποθήκευση του DNA στους -20°C

3.6. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων

Μετασχηματισμός (Transformation) καλείται η κληρονομήσιμη αλλαγή στις ιδιότητες ενός βακτηριακού στελέχους, που προέρχεται από την ενσωμάτωση εξωγενούς γενετικού υλικού με άμεση πρόσληψη από το περιβάλλον, μέσω της κυτταρικής μεμβράνης. Για να πραγματοποιηθεί η διαδικασία του μετασχηματισμού, το κύτταρο πρέπει να βρίσκεται σε μια κατάσταση χημικού ανταγωνισμού, ο οποίος μπορεί να είναι είτε επαγόμενος είτε όχι. Χημικός ανταγωνισμός μπορεί να προκληθεί φυσιολογικά σε ένα κύτταρο λόγω πείνας ή μεγάλης πυκνότητας, ή να επαχθεί στο εργαστήριο.

Μετασχηματισμός βακτηρίων με τη χρήση της μεθόδου θερμικής καταπόνησης (Heat shock)

Διαλύματα

Lysogeny Broth (LB)

Για τελικό όγκο 1 L

10 g Tryptone Biochemica (PanReac AppliChem)

5 g εκχύλισμα ζύμης, Yeast Extract granular της (Melford)

10 g NaCl (AppliChem)

ddH₂O μέχρι τον τελικό όγκο

Μετά τη διαλυτοποίηση των συστατικών είναι απαραίτητη η αποστείρωση, στους 120°C, για τουλάχιστον 20 λεπτά.

Πειραματική διαδικασία

1. Μεταφορά των τρυβλίων με το στερεό θρεπτικό υλικό από τους 4°C στους 37°C, ώστε να απομακρυνθεί η υγρασία
2. Σε eppendorf tube μεταφέρονται, μέσα σε πάγο, 60 μ L ικανά προς μετασχηματισμό βακτηριακά κύτταρα NEB® 10-beta Competent *E. Coli* της NEB
3. Προσθήκη ~250 pg πλασμιδιακού DNA, σε όγκο που δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1/10 του όγκου των κυττάρων που χρησιμοποιούνται
4. Πραγματοποιείται ήπια ανάδευση
5. Επώαση του μείγματος στον πάγο, για 30 λεπτά

6. Η είσοδος του πλασμιδίου στα κύτταρα επιτυγχάνεται με θερμικό σοκ (heat shock) στους 42°C, για 50 δευτερόλεπτα
7. Επώαση στον πάγο, για 5 λεπτά, χωρίς μετακίνηση των δειγμάτων
8. Προσθήκη 300 µL LB στα κύτταρα
9. Επώαση στους 37°C, για 1 ώρα, σε αναδευτήρα (orbital shaker), σε 220rpm
10. Μεταφορά των κυττάρων σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό υλικό και επίστρωσή τους σε ολόκληρη την επιφάνεια με τη χρήση cell spreader
11. Επώαση 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου
12. Ακολουθεί επώαση στους 37°C, για περίπου 18 ώρες
13. Σε falcon με LB γίνεται προσθήκη αμπικιλίνης σε αναλογία 1/1000
14. Προσθήκη 3 mL από το LB με αμπικιλίνη σε collection tube
15. Με τη βοήθεια tip, πραγματοποιείται συλλογή αποικιών και το tip απορρίπτεται στο collection tube (τουλάχιστον 5 διαφορετικές αποικίες, καλλιέργεια μικρής κλίμακας)
16. Επώαση σε αναδευτήρα (orbital shaker), στους 37°C, σε 220 rpm, ολονυχτίς και μεταφορά των τρυβλίων με τις αποικίες στους 4°C
17. Σε αποστειρωμένες φλάσκες γίνεται προσθήκη 100-200 mL LB με αμπικιλίνη
18. Επιλογή του οπτικά πυκνότερου collection tube και μεταφορά 1-3 mL στην αντίστοιχη φλάσκα (καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας)
19. Επώαση σε αναδευτήρα (orbital shaker), στους 37°C, σε 220rpm, ολονυχτίς
20. Μεταφορά των ανεπτυγμένων βακτηρίων από τις φλάσκες σε πλαστικά δοχεία και ισοζύγισή με LB με αμπικιλίνη
21. Φυγοκέντρωση σε 3.500 rpm, για 15 λεπτά, στους 4°C
22. Αφαίρεση του LB και στέγνωμα πελέτας, αποθήκευση στους -80°C

Σε αυτό το σημείο ακολουθεί απομόνωση και καθαρισμός του πλασμιδίου, μέσω διαδικασίας Midi prep με το εμπορικό kit NucleoBond Xtra plasmid purification (Ενότητα 3.8).

Παρατηρήσεις

- Κατά τη διάρκεια του πειράματος, όλες οι διαδικασίες πραγματοποιούνται υπό φλόγιστρο, ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος μόλυνσης της καλλιέργειας.

- Η επώαση των βακτηρίων και του πλασμιδίου στους 42°C, για 1 λεπτό πραγματοποιείται ώστε να δημιουργηθούν μικρές ασυνέχειες στις μεμβράνες και τα τοιχώματα και έτσι να περάσει το πλασμίδιο στο εσωτερικό των βακτηρίων. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται Heat Shock.
- Κατά την επίστρωση των βακτηρίων στο τρυβλίο με το στερεό θρεπτικό υλικό, δίνεται προσοχή το cell spreader να ξεπλένεται με αιθανόλη, να περνιέται από φλόγα και να ψύχεται πριν και μετά από κάθε επίστρωση για αποφυγή μόλυνσης.
- Κατά τη στρώση των τρυβλίων, είναι σημαντικό να υπάρχει και ένα αρνητικό control, στο οποίο στρώνονται μόνο κύτταρα χωρίς πλασμίδιο.

3.7. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια μικρής έκτασης (Mini-Prep)

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια μικρή κλίμακας (Mini-Prep), χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό θετικών κλώνων. Με τη μέθοδο αυτή απομονώνεται γρήγορα, μικρή ποσότητα πλασμιδιακού DNA, από αποικίες μετασχηματισμένων βακτηρίων υγρών καλλιεργειών, ώστε να γίνει έλεγχος της ποιότητας ενός πλασμιδίου πριν την ανάπτυξη των βακτηρίων σε μεγάλη έκταση για Midi-Prep. Το πρώτο στάδιο στη διαδικασία αυτή είναι η λύση των βακτηρίων, έπειτα ακολουθεί η έκλυση των νουκλεϊκών οξέων και τέλος πραγματοποιείται ο καθαρισμός του πλασμιδίου.

Διαλύματα

Διάλυμα Επαναδιαλυτοποίησης (Resuspension Buffer)

Για τελικό όγκο 100 mL

2,5 mg/mL λυσοζύμη και RNase

25% w/v σουκρόζη (D-Sucrose Molecular Biolog Grade της PanReac AppliChem)

25 mM (0,303 g/100 mL) Tris Base (Fisher Chemical)

10 mM (2,92 g/100 mL) EDTA (AppliChem)

ddH₂O μέχρι τον τελικό όγκο

Ρύθμιση pH του διαλύματος στο 8,0 με HCl (Hydrochloric acid 1 mol/L της Carlo Erba reagents)

Διάλυμα Λύσης (Lysis Buffer)

Για τελικό όγκο 100 mL

0,8 g NaOH

10 mL 1% SDS

ddH₂O μέχρι τον τελικό όγκο

Διάλυμα Εξουδετέρωσης (Neutralization Buffer)

Για τελικό όγκο 100 mL

29,6 g NaAc (Sodium Acetate της Sigma-Aldrich)

ddH₂O μέχρι τον τελικό όγκο

Ρύθμιση pH του διαλύματος στο 4,8 με CH₃COOH

Διάλυμα Πλύσης

Για τελικό όγκο 100 mL

25 mM (0,303 g/100 mL) Tris Base (Fisher Chemical)

10 mM (2,92 g/100 mL) EDTA (AppliChem)

0,3 M (2,46 g/100 mL) Sodium Acetate

ddH₂O μέχρι τον τελικό όγκο

Διάλυμα Tris-HCl-EDTA για έκλουση

Για τελικό όγκο 100 mL

25 mM (0,303 g/100 mL) Tris Base (Fisher Chemical)

10 mM (2,92 g/100 mL) EDTA (AppliChem)

ddH₂O μέχρι τον τελικό όγκο

Ρύθμιση pH του διαλύματος στο 8,5 με HCl (Hydrochloric acid 1 mol/L της Carlo Erba reagents)

Πειραματική διαδικασία

1. Μεταφορά της μικρής καλλιέργειας βακτηρίων σε eppendorf tubes και φυγοκέντρηση σε 5.000 rpm, για 5 λεπτά, στους 4°C, ώστε να απομονωθούν τα κύτταρα σαν πελέτα
2. Επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας των κυττάρων σε 200 µL διαλύματος επαναδιαλυτοποίησης και έντονη ανάδευση σε συσκευή vortex
3. Επώαση 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου

4. Προσθήκη 400 μL διαλύματος λύσης και ήπια ανάδευση των eppendorf tubes με το χέρι (δεν πραγματοποιείται ανάδευση με vortex ή με πιπέτα διότι το gDNA θα σπάσει και θα προκληθεί μόλυνση του πλασμιδιακού DNA). Τα δείγματα πρέπει να γίνουν διαυγή καθώς τα κύτταρα λύνονται
5. Επώαση 5 λεπτά, στον πάγο
6. Προσθήκη 300 μL διαλύματος εξουδετέρωσης και ήπια ανάδευση με το χέρι. Παρατηρείται δημιουργία άσπρου ιζήματος, το οποίο περιέχει μετουσιωμένες πρωτεΐνες και gDNA
7. Επώαση 5 λεπτά, στον πάγο
8. Φυγοκέντρηση σε 13.000 rpm, για 10 λεπτά, στους 4°C
9. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο eppendorf tubes. Στο υπερκείμενο υπάρχει το πλασμιδιακό DNA, το οποίο δεν έχει αποδιαταχθεί λόγω της υπερελικωμένης διαμόρφωσής του
10. Προσθήκη 700 μL παγωμένης ισοπροπανόλης (IPA) στο υπερκείμενο και ανάδευση με το χέρι
11. Επώαση 10 λεπτά, στους -80°C, ώστε να γίνει κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA
12. Φυγοκέντρηση σε 13.000 rpm, για 10 λεπτά, στους 4°C
13. Αφαίρεση του υπερκείμενου με προσοχή, χωρίς να παρθεί η πελέτα και επώαση με ανοιχτά καπάκια, για 5 λεπτά, ώστε να στεγνώσει
14. Προσθήκη 700 μL διαλύματος πλύσης και επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας με ήπια ανάδευση
15. Προσθήκη 700 μL ισοπροπανόλης και επώαση 10 λεπτά για κατακρήμνιση του DNA
16. Φυγοκέντρηση σε 13.000 rpm, για 5 λεπτά στους 4°C
17. Αφαίρεση υπερκείμενου από τα δείγματα και αφήνονται να στεγνώσουν με ανοιχτά καπάκια, για λίγα λεπτά
18. Επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας σε 50 μL ddH₂O
19. Έλεγχος ποιότητας του πλασμιδίου που απομονώθηκε μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αгарόζης περιεκτικότητας 1%

3.8. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια μεγάλης έκτασης (Midi-Prep)

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας, χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό μεγάλης ποσότητας και υψηλής καθαρότητας πλασμιδιακού DNA, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μεθόδους κλωνοποίησης τμημάτων DNA, σε βακτηριακό μετασχηματισμό, καθώς και σε πειράματα επιμόλυνσης ανώτερων ευκαρυωτικών κυττάρων. Η μέθοδος αυτή πραγματοποιείται με τη βοήθεια του kit NucleoBond® Xtra Plasmid Purification της εταιρείας Macherey-Nagel.

Πειραματική διαδικασία

1. Πλήρης διαλυτοποίηση της πελέτας σε 8 mL Resuspension Buffer + RNase A, με τη χρήση πιπεταδόρου
2. Προσθήκη 8 mL Lysis Buffer και ήπια ανάδευση
3. Επώαση 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου
4. Στήνεται η στήλη μαζί με το φίλτρο που παρέχεται στο kit και προστίθενται 12 mL Equilibration Buffer στη στήλη, με κυκλική κίνηση ώστε όλο το φίλτρο να βραχεί από το Buffer
5. Προσθήκη 8 mL Neutralization Buffer στο εναιώρημα και ακολουθεί ήπια ανάδευση μέχρι να φύγει τελείως το χρώμα του Lysis Buffer
6. Μεταφορά του εναιωρήματος στη στήλη με το φίλτρο και αφήνεται να περάσει όλο το διάλυμα
7. Πλύση του φίλτρου της στήλης με 5 mL Equilibration Buffer, με κυκλική κίνηση και αφήνεται να αδειάσει τελείως
8. Αφαίρεση του φίλτρου
9. Πλύση της στήλης με 8 mL Wash Buffer και αφήνεται να στεγνώσει
10. Μεταφορά της στήλης σε falcon των 50 mL
11. Προσθήκη 5 mL Elution Buffer και συλλογή του διαλύματος που εκλούεται, το οποίο περιέχει το πλασμίδιο
12. Προσθήκη 3,5 mL ισοπροπανόλης (2-Propanol της PanReac AppliChem) για να κατακρημνιστεί στο DNA και έντονη ανάδευση
13. Φυγοκέντρηση σε 13.000 rpm, για 30 λεπτά, στους 4°C και αφαίρεση του υπερκείμενου με προσοχή

14. Προσθήκη 2 mL 70% αιθανόλης στην πελέτα
15. Φυγοκέντρωση σε 13.000 rpm, για 5 λεπτά, στους 4°C και αφαίρεση του υπερκειμένου με προσοχή
16. Επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας σε 500 µL ddH₂O στα τοιχώματα του γυάλινου σωλήνα
17. Μεταφορά σε νέο eppendorf tube
18. Έλεγχος ποιότητας του πλασμιδίου που απομονώθηκε μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 1%

Παρατηρήσεις

- Δίνεται προσοχή κατά τη διαλυτοποίηση της βακτηριακής πελέτας ώστε να μη μείνουν συσσωματώματα, καθώς θα επηρεάσουν την τελική απόδοση.
- Κατά την προσθήκη του Lysis Buffer, εάν το διάλυμα ανακινηθεί έντονα, τότε θα κοπεί και θα απελευθερωθεί χρωμοσωμικό DNA στο εναιώρημα.
- Εάν η πελέτα με το πλασμιδιακό DNA στεγνώσει πολύ, δυσκολεύεται η διαλυτοποίηση της.

3.9. Απομόνωση RNA

Η απομόνωση υψηλής ποιότητας RNA (RNA isolation) αποτελεί το πρώτο και το πιο κρίσιμο βήμα για τη διεξαγωγή πολυάριθμων πειραμάτων μοριακής βιολογίας, όπως αντίστροφη μεταγραφή με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (RT-qPCR), κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης, χαρτογράφηση RNA, ανάλυση μεταγραφώματος με τη χρήση αλληλούχησης νέας γενιάς και μετάφραση *in vitro* [88]. Στο RNA, οι υδροξυλομάδες είναι συνδεδεμένες στις 2' και 3' θέσεις του σακχάρου της ριβόζης. Το γεγονός αυτό, κάνει το RNA χημικά πιο δραστικό από το DNA, αλλά πολύ ευαίσθητο. Ο μεγαλύτερος αντίπαλος του RNA κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της απομόνωσης, είναι οι ριβονουκλεάσες (RNases), οι οποίες απεικοδομούν το RNA σε μικρότερα τμήματα.

Η απομόνωση του RNA με τη χρήση Trizol είναι μια συνήθη μέθοδος για ολική εξαγωγή από τα κύτταρα, με τη χρήση δύο φάσεων, μιας οργανικής και μιας υδατικής φάσης. Στην πάνω φάση, η οποία αποτελεί την υδατική φάση περιέχεται το RNA. Στη μεσόφαση ή αλλιώς ενδιάμεση φάση συνήθως βρίσκεται το DNA, ενώ στην κάτω φάση, η

οποία είναι η οργανική φάση βρίσκονται αποδιαταγμένες μεμβράνες και πρωτεΐνες. Η διαδικασία αυτή παίρνει ελαφρώς περισσότερη ώρα σε σύγκριση με τις μεθόδους που χρησιμοποιούν κολώνες όπως RNeasy, αλλά είναι υψηλότερης δυνατότητας και απόδοσης σε ποσότητα RNA.

Πειραματική διαδικασία

1. Σε eppendorf tubes, στα οποία υπάρχει η πελέτα των κυττάρων γίνεται προσθήκη 1 mL TRI ανά 1-5 εκατομμύρια κύτταρα.
2. Καλή ανάδευση με την πιπέτα και σε συσκευή vortex, ώστε να διαλυτοποιηθεί η πελέτα των κυττάρων
3. Επώαση 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου
4. Προσθήκη 200 μ L χλωροφορμίου (1/5 της ποσότητας του TRI)
5. Ανάδευση σε συσκευή vortex και επώαση 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου
6. Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά, σε 13.000 rpm, στους 4°C
7. Μεταφορά της υδατικής φάσης (πάνω φάση) σε νέα eppendorf tubes με προσοχή μην παρθούν κυτταρικά υπολείμματα που έχουν σχηματίσει πελέτα
8. Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης (2-Propanol της PanReac AppliChem)
9. Καλή ανάδευση
10. Επώαση για 30 λεπτά, στους -80°C
11. Φυγοκέντρηση για 30 λεπτά, σε 13.000 rpm, στους 4°C
12. Αφαίρεση του υπερκειμένου με προσοχή μη διαταραχθεί η πελέτα
13. Τα eppendorf tubes παραμένουν ανοιχτά για λίγα λεπτά ώστε να στεγνώσουν καλά
14. Προσθήκη 300 μ L 70% αιθανόλης και επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας
15. Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά, σε 13.000 rpm, στους 4°C
16. Αφαίρεση υπερκειμένου
17. Καλό στέγνωμα με ανοιχτά καπάκια για λίγα λεπτά
18. Διαλυτοποίηση της πελέτας σε 50 μ L ddH₂O, στο οποίο έχει γίνει προσθήκη 0,5 μ L RNase OUT (RNase inhibitor της Invitrogen Inhibitor)

Παρατηρήσεις

- Για να γίνει σωστά η απομόνωση του RNA πρέπει να ακολουθηθούν μερικά σημαντικά βήματα, ώστε να μεγιστοποιηθούν η απόδοση της διαδικασίας και η ποιότητα του δείγματος. Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι καθαρά και παγωμένα. Ο πάγκος και οι πιπέτες πρέπει να έχουν καθαριστεί με χλωρίνη και αιθανόλη και θα πρέπει να χρησιμοποιείται αναστολέας των ριβονουκλεασών. Επίσης, γίνεται αποκλειστική χρήση filter tips. Ιδανικά, καλό είναι η διαδικασία να πραγματοποιηθεί σε στείρες συνθήκες μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής.
- Δίνεται μεγάλη προσοχή κατά τη χρήση του TRI, καθώς προκαλεί σοβαρές παθήσεις αν υπάρξει επαφή με το δέρμα.
- Το TRI περιέχει φαινόλη, χλωροφόρμιο και θειοκυανική γουανιδίνη, τα οποία αποδιατάσσουν κυτταρικές μεμβράνες και μετουσιώνουν πρωτεΐνες, διατηρώντας την ακεραιότητα του RNA κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης.
- Δίνεται προσοχή να γίνει καλή διαλυτοποίηση της πελέτας των κυττάρων. Αν η πελέτα δεν διαλύεται εντελώς, προτείνεται να γίνει προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας TRI.
- Από το έβδομο βήμα και ύστερα θα πρέπει οι εργασίες να γίνονται σε πάγο.

3.9.1. Πέψη με DNase I

Μετά την απομόνωση RNA από κύτταρα με τη διαδικασία που αναγράφεται στην ενότητα 3.9, απαραίτητο στάδιο είναι η πέψη με DNase I. Με το βήμα αυτό γίνεται απομάκρυνση του γενωμικού DNA, το οποίο μπορεί να επηρεάσει τις ακόλουθες αναλύσεις των δειγμάτων και καθαρισμός του RNA.

Συστατικά για το μείγμα της πέψης με DNase I ($V_{\text{τελικό}} = 100 \mu\text{L}$)

50 μL RNA (από τη διαδικασία απομόνωσης RNA)

10 μL RQ1 DNase 10X Reaction Buffer (Promega)

3 μL RQ1 RNase-free DNase (Promega)

1 μL RNase OUT (RNase inhibitor της Invitrogen Inhibitor)

ddH₂O μέχρι τον τελικό όγκο

Επώαση για 30 λεπτά, στους 37°C

3.9.2. Καθαρισμός RNA με RNeasy Mini Kit

Το RNeasy Mini Kit προσφέρει γρήγορη και υψηλής ποιότητας απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα και ιστούς. Ο καθαρισμός του RNA με την χρήση αυτού του Kit γίνεται με τη βοήθεια στηλών φυγοκέντρησης με μεμβράνη silica με δυνατότητα απομόνωσης 100 µg RNA.

Πειραματική διαδικασία

1. Γίνεται προσθήκη τεσσάρων όγκων 100% αιθανόλης στο διάλυμα RPE
2. Στο eppendorf tube με το απομονωμένο RNA γίνεται προσθήκη 350 µL RPE Buffer και πραγματοποιείται καλή ανάδευση
3. Προσθήκη 250 µL 100% αιθανόλης και καλή ανάδευση με την πιπέτα
4. Μεταφορά του δείγματος (ανά 700µL) στις κολώνες που περιέχονται στο kit, οι οποίες εφαρμόζουν σε σωληνάκι συλλογής 2 mL, το οποίο περιέχεται και αυτό στο kit
5. Φυγοκέντρωση για 30 δευτερόλεπτα, σε 13.000 rpm, σε θερμοκρασία δωματίου και απόρριψη του διηθήματος
6. Προσθήκη 500 µL RPE Buffer στη στήλη
7. Φυγοκέντρωση για 30 δευτερόλεπτα, σε 13.000 rpm, σε θερμοκρασία δωματίου και απόρριψη του διηθήματος
8. Επανάληψη των βημάτων 6 και 7 ακόμα μια φορά για πλύσιμο της μεμβράνης silica της στήλης
9. Μεταφορά της στήλης σε νέο eppendorf tube των 1,5 mL
10. Φυγοκέντρωση για 1 λεπτό, σε 13.000 rpm, σε θερμοκρασία δωματίου και απόρριψη του διηθήματος, ώστε να γίνει πλήρης απομάκρυνση των υπολειμμάτων του διαλύματος RPE από τη στήλη
11. Μεταφορά της στήλης σε νέο eppendorf tube των 1,5 mL
12. Προσθήκη 30 µL ddH₂O κάθετα πάνω στη μεμβράνη της στήλης
13. Επώαση για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου
14. Φυγοκέντρωση για 1 λεπτό, σε 13.000 rpm, σε θερμοκρασία δωματίου για την έκλυση του RNA και απόρριψη της στήλης
15. Προσθήκη 0,5 µL RNase OUT (RNase inhibitor)

Εάν η αναμενόμενη ποσότητα του RNA είναι πάνω από 30 µg επαναλαμβάνουμε το βήμα 9 χρησιμοποιώντας άλλο τόσο νερό. Εάν απαιτείται υψηλή συγκέντρωση RNA, τότε μπορεί να περαστεί πάλι το εκλούόμενο RNA από τη στήλη.

3.9.3. Σύνθεση cDNA και RT-PCR

Ύστερα από την απομόνωση του ολικού RNA από κύτταρα, μπορεί να παραχθεί το υβριδικό μόριο cDNA με τη βοήθεια συσκευής PCR, μια διαδικασία η οποία ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφή (**Reverse Transcription**, RT). Η αντίστροφη μεταγραφή είναι η διαδικασία σύνθεσης μια συμπληρωματικής (complementary) αλυσίδας DNA (cDNA), έχοντας ως εκμαγείο μονόκλωνο μόριο RNA και χρησιμοποιώντας το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση, ώστε να παραχθεί ένα υβριδικό, δίκλωνο μόριο RNA-DNA. Ως εκκινητές σε αυτή τη διαδικασία χρησιμοποιούνται ολιγονουκλεοτίδια θυμίνης, τα οποία προσδένονται συμπληρωματικά στις πολυ(A) ουρές των mRNAs. Το ένζυμο αυτό βρίσκεται στη φύση σε RNA ιούς (ρετροϊούς) και μετατρέπει το γενετικό υλικό του ιού από τη μορφή του μονόκλωνου RNA σε δίκλωνο DNA, έτσι ώστε να μπορεί να ενσωματωθεί στο γενετικό υλικό των κυττάρων ξενιστών. Η ανακάλυψη του ενζύμου έδωσε σημαντική ώθηση στη μοριακή βιολογία και στην έρευνα, καθώς επέτρεψε τη μετατροπή των ευαίσθητων μορίων RNA σε σταθερά, συμπληρωματικά μόρια DNA, τα οποία μπορούν να υποστούν χειρισμούς και να μελετηθούν (PCR, κλωνοποίηση, αλληλούχηση). Επίσης, έδωσε νέες δυνατότητες στη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, ενώνοντας την αντίστροφη μεταγραφή με την κλασική ή την ποσοτική PCR.

Πειραματική διαδικασία

200 ng RNA

Βήμα 1^ο: Αποδιάταξη δευτεροταγών δομών του RNA (Annealing), ($V_{\text{τελικό}} = 10 \mu\text{L}$)

0,5 µL Oligo dTs

1 µL dNTPs

200 ng RNA

ddH₂O μέχρι τον τελικό όγκο

Ακολουθεί επώαση σε συσκευή PCR, στους 65°C, για 5 λεπτά, ώστε να γίνει αποδιάταξη της δευτεροταγούς δομής του RNA για να υβριδοποιηθούν οι εκκινητές.

Βήμα 2^ο: Αντίστροφη μεταγραφάση (Reverse Transcriptase), ($V_{\text{τελικό}} = 20 \mu\text{L}$)

10 μL υλικό από το πρώτο βήμα

4 μL 5X Superscript Buffer

1 μL 0,1 M DTTs (Invitrogen)

1 μL Reverse Transcriptase (Superscript III της Invitrogen)

4 μL ddH₂O

Ακολουθεί επώαση σε συσκευή PCR, στους 50°C, για 1 ώρα και ύστερα στους 70°C, για 10 λεπτά. Η επώαση στους 50°C έχει ως αποτέλεσμα να δράσει η πολυμεράση και να επιμηκύνει την νεοσυντιθέμενη αλυσίδα, ενώ η επώαση στους 70°C έχει ως αποτέλεσμα την απενεργοποίηση του ενζύμου.

Παρατηρήσεις

- Είναι σημαντικό τα βήματα της αντίστροφης μεταγραφής να γίνουν προσεκτικά και γρήγορα, καθώς οποιαδήποτε καθυστέρηση αυξάνει την πιθανότητα σφάλματος κατά την αντίδραση.

3.10. Μέθοδος προσδιορισμού χρωματινικών θέσεων υπερευαισθησίας στη DNase I (DNase I Hypersensitive Sites)

Η μέθοδος DNaseI-seq (DNase I Hypersensitive Sites sequencing) αποτελεί μια υψηλής ανάλυσης μοριακή τεχνική που χρησιμοποιεί τη μη ειδική ενδονουκλεάση DNase I για την χαρτογράφηση της προσβασιμότητας των χρωματινικών περιοχών στο ευκαρυωτικό γονιδίωμα. Αυτές οι προσβάσιμες περιοχές που ονομάζονται θέσεις υπερευαισθησίας στη DNase I (DNase I Hypersensitive Sites, DHSs) χαρακτηρίζουν περιοχές του γονιδιώματος με ρυθμιστική δράση (π.χ. ενισχυτές, υποκινητές, μονωτές) [61]. Στο εργαστήριό μας εφαρμόζεται με επιτυχία η τεχνική, ακολουθώντας ως πρότυπο το δημοσιευμένο DNaseI-seq πρωτόκολλο [61] και προσαρμόζοντας τις πειραματικές συνθήκες ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο.

Η μέθοδος DNaseI-seq αποτελεί πολύτιμο πειραματικό εργαλείο, το οποίο βοηθά στην ταυτοποίηση και κατανόηση των ρυθμιστικών στοιχείων και των χαρακτηριστικών της χρωματίνης. Η χαρτογράφηση των υπερευαίσθητων θέσεων στη DNase I αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για την ταυτοποίηση των ρυθμιστικών στοιχείων του DNA στο επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος και συμμετέχει στην κατανόηση θεμελιωδών βιολογικών διεργασιών (γονιδιακή έκφραση, αντιγραφή, οργάνωση του γονιδιώματος) καθώς και των επιπτώσεων που έχουν οι βλάβες αυτών στην υγεία του ανθρώπου. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει τη λύση των πυρήνων των κυττάρων, την κατεργασία με το ένζυμο DNase I, την απομόνωση και τον καθαρισμό των τμημάτων DNA που έχουν υποστεί πέψη.

Διαλύματα

Διάλυμα Α

Για τελικό όγκο 50 mL

15 mM Tris, pH8,0

15 mM NaCl

60 mM KCl

1 mM EDTA

0,5 mM spermidine

0,5 mM spermine

ddH₂O μέχρι τον τελικό όγκο

Διάλυμα αναστολής της αντίδρασης

Για τελικό όγκο 50 mL

50 mM Tris, pH8,0

100 mM NaCl

0,1% SDS

100 mM EDTA

ddH₂O μέχρι τον τελικό όγκο

Προσθήκη 20 µg ανά mL RNaseA πριν τη χρήση

Διάλυμα πέψης

Για τελικό όγκο 50 mL

40 mM Tris, pH8,0
10 mM NaCl
6 mM MgCl₂
1 mM CaCl₂
ddH₂O μέχρι τον τελικό όγκο

Πειραματική διαδικασία

1. Μετά την καλλιέργεια των κυττάρων Beta-TC-6 σε 6-well plate ή 12-well plate, πραγματοποιείται πλύση των κυττάρων με 1X PBS δύο φορές
2. Απομάκρυνση του 1X PBS
3. Η αποκόλληση των κυττάρων από το υπόστρωμα γίνεται με τη χρήση διαλύματος 2% EDTA σε PBS
4. Συλλογή κυττάρων σε eppendorf tubes
5. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 4.000 rpm για 5 λεπτά στους 4°C
6. Απόρριψη του υπερκείμενου
7. Επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας των κυττάρων σε 500 µL διαλύματος A
8. Προσθήκη του απορρυπαντικού NP40 στη βέλτιστη συγκέντρωση ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο
9. Αναστροφή των eppendorf tubes αρκετές φορές για ομοιόμορφη κατανομή του απορρυπαντικού
10. Επώαση στον πάγο για 10 λεπτά
11. Ακολουθεί έλεγχος της αποτελεσματικότητας της λύσης της κυτταρικής μεμβράνης με χρήση της χρωστικής Trypan Blue και παρατήρηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Η λύση των κυττάρων πρέπει να κυμαίνεται στο 90-100% του πληθυσμού
12. Φυγοκέντρηση στις 2.000 rpm για 5 λεπτά στους 4°C
13. Ακολουθεί αντίδραση πέψης με DNase I
14. Επαναδιαλυτοποίηση σε 500 µL διαλύματος πέψης ανά 2,5 εκατομμύρια κύτταρα. Σε κάθε eppendorf tube προστίθεται διαφορετική ποσότητα DNase I (DNaseI recombinant, της Roche) (0 Units, 60 Units, 120 Units DNase I)
15. Επώαση των αντιδράσεων για 3 λεπτά στους 37°C
16. Μετά το πέρας των 3 λεπτών γίνεται προσθήκη διαλύματος αναστολής της αντίδρασης
17. Καλή ανάδευση των δειγμάτων
18. Επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου

19. Προσθήκη 40 μg πρωτεΐνάσης K σε κάθε δείγμα
20. Επώαση των δειγμάτων στους 55°C , ολονυκτίς
21. Ακολουθεί καθαρισμός του DNA
22. Προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος φαινόλης-χλωρομορμίου και ήπια ανάδευση
23. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
24. Μεταφορά της άνω φάσης σε νέο eppendorf tube
25. Προσθήκη 1/10 του όγκου 3M οξικό νάτριο pH5,2, 20 μg γλυκογόνου και 3 όγκων απόλυτης αιθανόλης
26. Καλή ανάδευση και επώαση στους -80°C για 30 λεπτά
27. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 13.000 στροφές για 15 λεπτά στους 4°C
28. Απομάκρυνση του υπερκείμενου
29. Πλύση με 500 μL 70% αιθανόλη
30. φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές για 5 λεπτά στους 4°C
31. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και στέγνωμα με ανοιχτά καπάκια
32. Επαναδιαλυτοποίηση σε 30 μL ddH₂O

Παρατηρήσεις

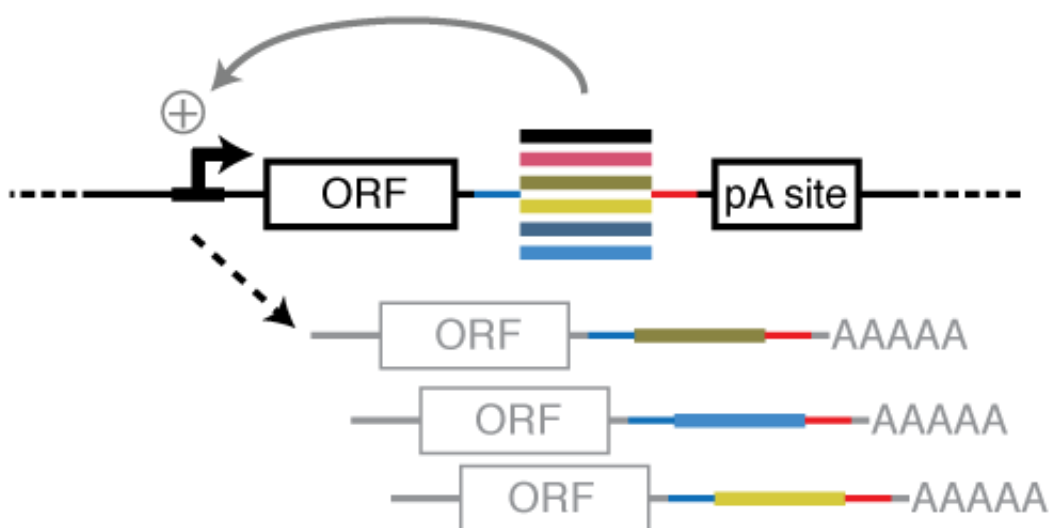
- Τα tips που χρησιμοποιούνται καθ' όλη θα πρέπει να έχουν κομμένες άκρες έτσι ώστε να μη σπάσει το DNA κατά το πιπετάρισμα.

3.11. Self-Transcribing Active Regulatory Region Sequencing (STARR-seq)

Η μέθοδος STARR (Self-Transcribing Active Regulatory Region) χρησιμοποιείται για τον μαζικό και ταυτόχρονο έλεγχο της ενεργότητας χιλιάδων αλληλουχιών με πιθανό ρόλο ενισχυτή *in vivo*, ειδικό για κάθε κυτταρικό τύπο [64]. Η μέθοδος αξιοποιεί ως βασική αρχή, την ικανότητα των ρυθμιστικών στοιχείων να ενεργοποιούν τη μεταγραφή γονιδίων αναφοράς, τα οποία είναι ενσωματωμένα σε πλασμιδιακούς φορείς, ακόμα και αν βρίσκονται σε απόσταση από αυτά και ανεξάρτητα της ανοδικής ή καθοδικής θέσης κλωνοποίησής τους ως προς το σημείο έναρξης της μεταγραφής.

Πιο αναλυτικά, στη μέθοδο STARR-seq, η βιβλιοθήκη μεγάλης πολυπλοκότητας, η οποία περιέχει χιλιάδες κομμάτια, τα οποία διαθέτουν χαρακτηριστικά ενισχυτή,

εισέρχεται σε ειδικό πλασμιδιακό φορέα, καθοδικά ενός υποκινητή και του γονιδίου αναφοράς, GFP (Green Fluorescent Protein). Στη συνέχεια, ακολουθεί ο μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με τους φορείς, καλλιέργεια και απομόνωση των πλασμιδιακών κλώνων. Η απομονωμένη βιβλιοθήκη μεγάλης πολυπλοκότητας εισάγεται σε ευκαρυωτικά κύτταρα και τα αποτελέσματα της διαδικασίας παρατηρούνται στο μικροσκόπιο φθορισμού. Τα κύτταρα, τα οποία διαθέτουν πλασμίδιο, στο οποίο έχει κλωνοποιηθεί μια αλληλουχία κάποιου ενισχυτή, όταν ο ενισχυτής είναι ενεργός, φθορίζουν, λόγω της παραγωγής χημικών μορίων RNA GFP:ενισχυτή (Εικόνα 3.7). Τέλος, τα μόρια αυτά απομονώνονται και αναλύονται μέσω βαθιάς αλληλούχησης νέας γενιάς (RNA-seq) [64].



Εικόνα 3.7. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού δράσης ενισχυτών, που ενθέτονται στο πλασμίδιο STARR. Οι ενισχυτές αλληλεπιδρούν με τον υποκινητή, με αποτέλεσμα να επάγεται η μεταγραφή των ίδιων και του γονιδίου αναφοράς GFP (χημικά μόρια). Οι χρωματιστές γραμμές αντιστοιχούν στους υποψήφιους ενισχυτές και το + σηματοδοτεί τη μεταγραφική ενεργοποίηση [64].

Πειραματική διαδικασία

Βήμα 1^ο: Κατασκευή βιβλιοθήκης για πειράματα STARR (Ενότητα 3.5).

Βήμα 2^ο: Ένθεση της βιβλιοθήκης σε πλασμιδιακό φορέα sp1STARR, ύστερα από διπλή πέψη της βιβλιοθήκης με τα ένζυμα Agel-HF και Sall-HF, μέσω αντίδρασης ανασυνδυασμού με το Clontech In-Fusion HD Kit. Η θέση ένθεσης της βιβλιοθήκης εντοπίζεται καθοδικά του γονιδίου αναφοράς, GFP. Το πλασμίδιο STARR είναι κομμένος με τα περιοριστικά ένζυμα Agel-HF και Sall-HF, ώστε να είναι εφικτή η εισαγωγή της βιβλιοθήκης, η οποία φέρει συμπληρωματικά άκρα με αυτά του κομμένου φορέα.

Βήμα 3^ο: Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με το ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό φορέα STARR, καλλιέργεια και απομόνωση πλασμιδιακών κλώνων (Ενότητα 3.6 και 3.8 αντίστοιχα).

Βήμα 4^ο: Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων και απομόνωση ολικού RNA (Ενότητα 3.11.1 ή 3.11.2).

3.11.1. Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με τη χρήση λιποφεκταμίνης

Η διαδικασία της διαμόλυνσης είναι η εισαγωγή πλασμιδιακού DNA (ή άλλου είδους DNA) σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Η μέθοδος διαμόλυνσης με τη χρήση λιποφεκταμίνης βασίζεται στο γεγονός ότι τα λιπίδια σχηματίζουν λιποσώματα, μέσα στα οποία παγιδεύεται το DNA, δημιουργώντας λιπιδικά κυστίδια και στη συνέχεια συντήκονται και συγχωνεύονται με τη μεμβράνη των ευκαρυωτικών κυττάρων [89]. Για να ελεγχθεί η επιτυχία της διαμόλυνσης, χρησιμοποιείται το πλασμίδιο pmax, το οποίο προωθεί την έκφραση κλωνοποιημένων ενθεμάτων DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα.

Πειραματική διαδικασία

1. Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς Beta-TC-6 σε 6-well plate
2. Σε 250 μ L DMEM χωρίς FBS και αντιβιοτικά προστίθεται 15 μ L λιποφεκταμίνης (Lipofectamine 2000 της Invitrogen)
3. Σε 250 μ L DMEM χωρίς FBS και αντιβιοτικά προστίθεται το 6 μ g πλασμιδίου
4. Επώαση 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου
5. Μεταφορά του διαλύματος που περιέχει τη λιποφεκταμίνη στο διάλυμα που περιέχει το πλασμίδιο με τη χρήση κομμένου tip
6. Επώαση 20 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου
7. Αφαίρεση του θρεπτικού υλικού από τα κύτταρα και πλύση με DMEM χωρίς FBS και αντιβιοτικά
8. Προσθήκη 1,5 mL DMEM χωρίς FBS και αντιβιοτικά σε κάθε well και μεταφορά του διαλύματος πλασμιδίου-λιποφεκταμίνης στα κύτταρα
9. Επώαση 4 ώρες, στους 37°C, 5% CO₂
10. Αφαίρεση DMEM και προσθήκη 2 mL θρεπτικού μέσου με FBS και αντιβιοτικά
11. Μετά από 24 ώρες, πραγματοποιείται μόλυνση με ιό Sendai για 9 ώρες και παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού

Παρατηρήσεις

- Η αναλογία ποσοτήτων πλασμιδίου και λιποφεκταμίνης που απαιτείται είναι περίπου 1 μg πλασμίδιο/2,5 μL λιποφεκταμίνη.
- Το DMEM που χρησιμοποιείται για τη διαμόλυνση δεν περιέχει FBS, καθώς είναι τοξικό και δρα ανασταλτικά για την αντίδραση. Επίσης, δεν περιέχει αντιβιοτικά, διότι μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη και να εισέλθουν στο εσωτερικό των κυττάρων, όπου ένα βρεθούν σε μεγάλη συγκέντρωση είναι τοξικά.
- Κατά τη συνένωση των δύο διαλυμάτων πλασμιδίου και λιποφεκταμίνης χρησιμοποιείται tip με κομμένο άκρο, ώστε να μην καταστραφούν τα κυστίδια.

3.11.2. Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση (Transfection by electroporation)

Ο πιο συνηθισμένος τρόπος διαμόλυνσης ευκαρυωτικών κυττάρων γίνεται μέσω πόρων που ανοίγονται παροδικά στην κυτταρική μεμβράνη, με τη βοήθεια παλμών που παράγονται από ένα έντονο ηλεκτρικό πεδίο, ώστε να εισέλθει το πλασμιδιακό DNA. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται electroporation και στο εργαστήριο μας γίνεται με τη χρήση του kit Amaxa[®] Cell Line Nucleofector[®] της εταιρείας Lonza.

Πειραματική διαδικασία

1. Μετά το μάζεμα κατάλληλης ποσότητας Beta-TC-6 κυττάρων (2×10^6 κύτταρα) και τη φυγοκέντρωσή τους, τα κύτταρα διαλυτοποιούνται σε 100 μL Nucleofector[™] Solution V Buffer
2. Προσθήκη 6 μg πλασμιδίου στα διαλυτοποιημένα κύτταρα και καλή ανάδευση
3. Ρύθμιση της συσκευής στο πρόγραμμα T020
4. Στην ειδική κυψελίδα, που περιέχεται στο kit, προστίθεται το διάλυμα κυττάρων-πλασμιδίου και τοποθετείται στη συσκευή
5. Αμέσως μετά την ολοκλήρωση του προγράμματος προστίθενται 500 μL θρεπτικού υλικού
6. Προσθήκη 1,5 mL θρεπτικού υλικού σε κάθε well ενός 6-well plate και μεταφορά του διαλύματος κυττάρων-πλασμιδίου στα wells
7. Επώαση στους 37°C, 5% CO₂

8. Μετά από 24 ώρες, πραγματοποιείται μόλυνση με ιό Sendai για 9 ώρες και παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού

3.12. Ανάλυση αποτελεσμάτων αλληλούχησης

Για να γίνει μελέτη της έκφρασης των γονιδίων των Beta-TC-6 κυττάρων, εντοπισμός και ταυτοποίηση θέσεων πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, παρουσία ιστονικών τροποποιήσεων, καθώς και μελέτη των προσβάσιμων περιοχών του γονιδιώματος, χρησιμοποιήθηκε το Galaxy web tool, μέσω του οποίου μπορούν να αναλυθούν δεδομένα αλληλούχησης νέας γενιάς ύστερα από πειράματα RNA-seq, ChIP-seq και DNaseI-seq αντίστοιχα [90]. Με τη βοήθεια των εργαλείων που παρέχει το Galaxy μπορεί να γίνει σύγκριση, επεξεργασία και σχολιασμός των δειγμάτων αλληλούχησης. Τα εργαλεία είναι εξαιρετικά αποδοτικά και επιτρέπουν στον χρήστη να συγκρίνει μεγάλα σύνολα διαθέσιμων δεδομένων με αυτά που έχουν προκύψει από πειράματα του εργαστηρίου του [91, 92].

3.12.1. Βιοπληροφορική ανάλυση πειραμάτων ChIP-seq και DNaseI-seq

Τα αρχεία που προκύπτουν από την αλληλούχηση υψηλής απόδοσης περιέχουν τις αλληλουχίες από τα τεμάχια (reads) που έχουν απομονωθεί μετά από ChIP πειράματα. Η αρχική μορφή των αρχείων αυτών δεν είναι αξιοποιήσιμη και θα πρέπει να μετατραπεί σε μορφή fastaQ. Στη συνέχεια, γίνεται έλεγχος της ποιότητας των reads. Το FastQC παρέχει μια γρήγορη επισκόπηση των δεδομένων που περιέχει διαγράμματα και πίνακες, τα οποία μπορούν να προσφέρουν μια γρήγορη αξιολόγηση των reads. Έτσι, μπορεί ο ενδιαφερόμενος να καταλάβει σε ποιες περιοχές μπορεί να υπάρχει πρόβλημα καθώς και τη φύση του προβλήματος (ποιότητα βάσεων διαβάσματος, ύπαρξη πολλών αντιγράφων) πριν προχωρήσει σε περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων.

Μετά τον ποιοτικό έλεγχο, εάν χρειάζεται, γίνεται απομάκρυνση των reads που δεν έχουν καλή ποιότητα, με τη χρήση του εργαλείου Trim Galore [91]. Η χαμηλή ποιότητα μπορεί να σημαίνει μικρό μήκος, χαμηλή ποιότητα βάσεων στην αρχή και στο τέλος κάθε read ή παρουσία ανταπτόρων στα reads. Στη συνέχεια, ακολουθεί η στοίχιση των reads στο ολικό γονιδίωμα (στην περίπτωση μας, στο γονιδίωμα ποντικού, έκδοση mm9), με το εργαλείο Bowtie2 [93], έτσι ώστε να βρεθούν οι θέσεις στις οποίες υπάρχει η ιστονική τροποποίηση ή προσδένεται ο μεταγραφικός παράγοντας που έχει μελετηθεί σε ανάλογα

πειράματα ChIP που έχουν προηγηθεί [94]. Αφού γίνει η στοίχιση θα πρέπει να αφαιρεθούν τα reads, τα οποία έχουν στοιχηθεί σε ίδιες συντεταγμένες στο γονιδίωμα αναφοράς πάνω από μία φορά, δηλαδή τα πολλαπλά αντίγραφα ενός read, αφήνοντας μόνο ένα read σε κάθε θέση (RmDup) [95]. Πριν συνεχιστεί η διαδικασία της ανάλυσης, γίνεται κανονικοποίηση των αρχείων που αντιστοιχούν σε καθένα από τα δείγματα, με βάση το βάθος της αλληλούχησης, ώστε το αποτέλεσμα να είναι αντικειμενικό (εργαλείο NGS:Picard, Downsample BAM/SAM). Ο αλγόριθμος MACS2 αναγνωρίζει εμπλουτισμένες θέσεις σε reads από πειράματα ChIP-seq και δίνει ένα πίνακα με τις συντεταγμένες του γονιδιώματος, στις οποίες υπάρχει αυξημένη ένταση του σήματος [96, 97]. Για να γίνει ποσοτικοποίηση της έντασης του σήματος γίνεται χρήση του εργαλείου bamCoverage [98]. Με τη βοήθεια του UCSC genome browser ή του Integrative Genomics Viewer (IGV) γίνεται προσδιορισμός της θέσης και την έντασης των κορυφών (peaks) πάνω στο γονιδίωμα αναφοράς.

Επιπλέον, για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιείται το εργαλείο ClosestBed, με το οποίο βρίσκεται ποια γονίδια είναι πιο κοντά στις συντεταγμένες των reads. Επίσης, με το εργαλείο PlotHeatMap μπορούν να δημιουργηθούν τοπογραφικοί χάρτες (heat maps), οι οποίοι παρέχουν μια οπτικοποίηση των βαθμολογιών που σχετίζονται με συγκεκριμένες γενωμικές περιοχές. Τέλος, με τη βοήθεια του προγράμματος GREAT, γίνεται ομαδοποίηση των γονιδίων με βάση τις διεργασίες στις οποίες εμπλέκονται και τις λειτουργίες τις οποίες επιτελούν τα προϊόντα τους [99].

3.12.2. Βιοπληροφορική ανάλυση πειραμάτων RNA-seq

Στην ανάλυση δεδομένων RNA-seq τα πρώτα βήματα είναι κοινά με εκείνα της ανάλυσης ενός πειράματος ChIP-seq. Θα πρέπει και εδώ να γίνει έλεγχος ποιότητας των reads και στη συνέχεια Trim, αν χρειαστεί, πριν γίνει η στοίχιση των reads στο γονιδίωμα αναφοράς. Η στοίχιση στην περίπτωση του RNA-seq χρειάζεται ένα εργαλείο, το οποίο να μπορεί να αναγνωρίζει ότι τα reads είναι εξώνια και άρα θα πρέπει να στοιχηθούν πάνω στο γονιδίωμα αναφοράς με τα αντίστοιχα ιντρόνια ανάμεσα τους. Αυτό μπορεί να γίνει μεταξύ άλλων από το HISAT2, το οποίο είναι ένα γρήγορο και ευαίσθητο εργαλείο στοίχισης. Στη RNA-seq ανάλυση δεν πρέπει να αφαιρούνται τα πολλαπλά αντίγραφα των reads όπως γίνεται στην ChIP-seq ανάλυση [100]. Η ποσότητα των αντιγράφων ενός read

αντικατοπτρίζει την ένταση της έκφρασης του αντίστοιχου γονιδίου, στο οποίο έχουν στοιχηθεί τα reads. Στη συνέχεια, πρέπει να βρεθεί πόσα από τα reads έχουν στοιχηθεί. Το εργαλείο htseq-count υπολογίζει πόσα reads έχουν στοιχηθεί στα στοιχεία που υπάρχουν στο γονιδίωμα. Στο RNA-seq τα στοιχεία αναφέρονται συνήθως σε γονίδια, τα οποία αποτελούνται από εξώνια, δηλαδή σε ένα εύρος θέσεων που αντιστοιχούν σε εξώνια και ανάμεσά τους βρίσκονται ιντρόνια. Τέλος, αυτό που πρέπει να γίνει είναι η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων μεταξύ δύο καταστάσεων (στη δική μας περίπτωση μεταξύ των χρονικών στιγμών πριν και μετά από ιϊκή μόλυνση) μέσω του DESeq2 [101].

3.13. Ανάλυση αποτελεσμάτων Real Time PCR

3.13.1. Ποσοστό εμπλουτισμού δείγματος σε πειράματα ChIP

Για να γίνει έλεγχος της επιτυχίας του πειράματος ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης, πρέπει να υπολογιστεί το ποσοστό ανάκτησης του input, δηλαδή σε τι ποσοστό του input αντιστοιχούν τα κομμάτια που έχουν απομονωθεί με τη βοήθεια των μαγνητικών σφαιριδίων. Αρχικά, πρέπει να γίνει διόρθωση των τιμών του input που έχουν προκύψει από την PCR, γιατί το input έχει αραιωθεί για να χρησιμοποιηθεί στην PCR (συνήθης αρραίωση 1:250). Η τιμή αυτή αφαιρείται από την τιμή Ct του input, οδηγώντας στον υπολογισμό των προσαρμοσμένων τιμών, με τον εξής τύπο: Ct του input - $\log_2$ (αραίωση του input). Στη συνέχεια, γίνεται χρήση των διορθωμένων τιμών του input για να γίνει υπολογισμός του ποσοστού του εμπλουτισμού των δειγμάτων μετά την ανοσοκατακρήμνιση, με τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Ποσοστό εμπλουτισμού δείγματος} = 100 \times 2^{(\text{διορθωμένο input} - \text{Ct δείγματος})}$$

3.13.2. Fold Enrichment

Για την εύρεση των επιπέδων επαγωγής (fold of induction) ενός γονιδίου στις 9 ώρες ιϊκής μόλυνσης σε σχέση με τις 0 ώρες έκφρασης γονιδίων, θα πρέπει αρχικά να γίνει διόρθωση με το γονίδιο κυτταρικής οικονομίας (housekeeping gene) που χρησιμοποιήθηκε για την PCR. Αυτό γίνεται βρίσκοντας τις διαφορές των Cq μεταξύ του γονιδίου κυτταρικής

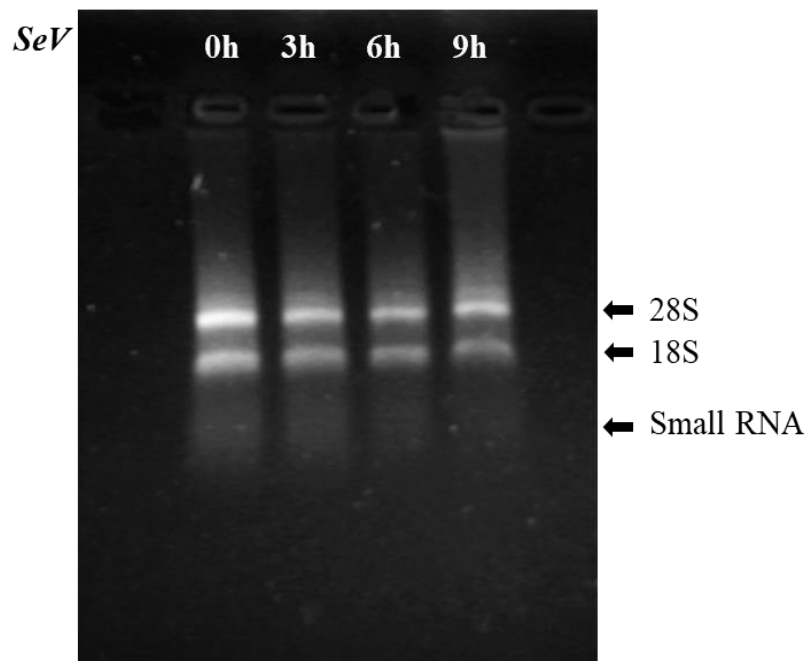
οικονομίας και του γονιδίου που μελετάται, στα αντίστοιχα χρονικά σημεία. Αυτό υπολογίζεται με τον παρακάτω τύπο: Cq housekeeping gene - Cq anti-viral gene (στο ίδιο χρονικό σημείο). Έστερα, υπολογίζεται η διαφορά των υπόλοιπων χρονικών σημείων με στις 0 ώρες, χρησιμοποιώντας τις τιμές που υπολογίστηκαν προηγουμένως. Δηλαδή, πραγματοποιείται αφαίρεση των διαφορών των Cq των χρονικών σημείων μετά την ιϊκή μόλυνση, από τη διαφορά στις 0 ώρες. Στη συνέχεια, ο αρνητικός αριθμός αυτών των τιμών υψώνονται στο 2. Αυτό που προκύπτει είναι τα επίπεδα επαγωγής (fold of induction) του γονιδίου που μελετάται σε σχέση με τις 0 ώρες.

4. Αποτελέσματα

4.1. Ανάλυση μεταγραφομικής των Beta-TC-6 κυττάρων κατά την εξέλιξη ιϊκής μόλυνσης και μελέτη του προτύπου επαγωγής της γονιδιακής έκφρασης με τη μέθοδο RNA-seq

Η μεταγραφομική ανάλυση (*transcriptomic analysis*) αποτελεί βασικό εργαλείο για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, ύστερα από την απομόνωση του RNA των κυττάρων. Για τον σκοπό αυτό, αρχικά, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς Beta-TC-6 σε μικρή κλίμακα, δηλαδή σε 6-well plate και 12-well plate, και ακολούθησε μόλυνση των κυττάρων με ιό Sendai για 3, 6 και 9 ώρες. Έτσι, προέκυψαν οι εξής καλλιέργειες Beta-TC-6 κυττάρων: 1) μη μολυσμένη (0 ώρες από ιϊκή μόλυνση, 0h), 2) μολυσμένη με ιό για 3 ώρες (3h), 3) μολυσμένη με ιό για 6 ώρες (6h) και μολυσμένη με ιό για 9 ώρες (9h). Έπειτα από τη συλλογή των κυττάρων, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του RNA με τη χρήση Trizol και καθαρισμός με τη βοήθεια ειδικών στηλών φυγοκέντρησης με μεμβράνη silica (Ενότητα 3.9). Ο έλεγχος για την αριότητα της δομής του απομονωμένου RNA πραγματοποιήθηκε μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης.

Η εικόνα 4.1 αποτελεί ένα παράδειγμα ηλεκτροφόρησης απομονωμένου RNA από Beta-TC-6 κύτταρα, πριν και μετά την ιϊκή μόλυνση για 3, 6 και 9 ώρες. Το απομονωμένο RNA υφίσταται διαχωρισμό σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, ώστε να ελεγχθεί η ποιότητά του. Παρατηρούνται δύο ξεχωριστές ριβοσωμικές ζώνες που αντιστοιχούν στο 18S και στο 28S RNA καθώς και πολύ αχνά θραύσματα μικρότερου RNA. Η ύπαρξη των δύο διακριτών έντονων ζωνών υποδηλώνει πως το απομονωμένο RNA είναι υψηλής ποιότητας.

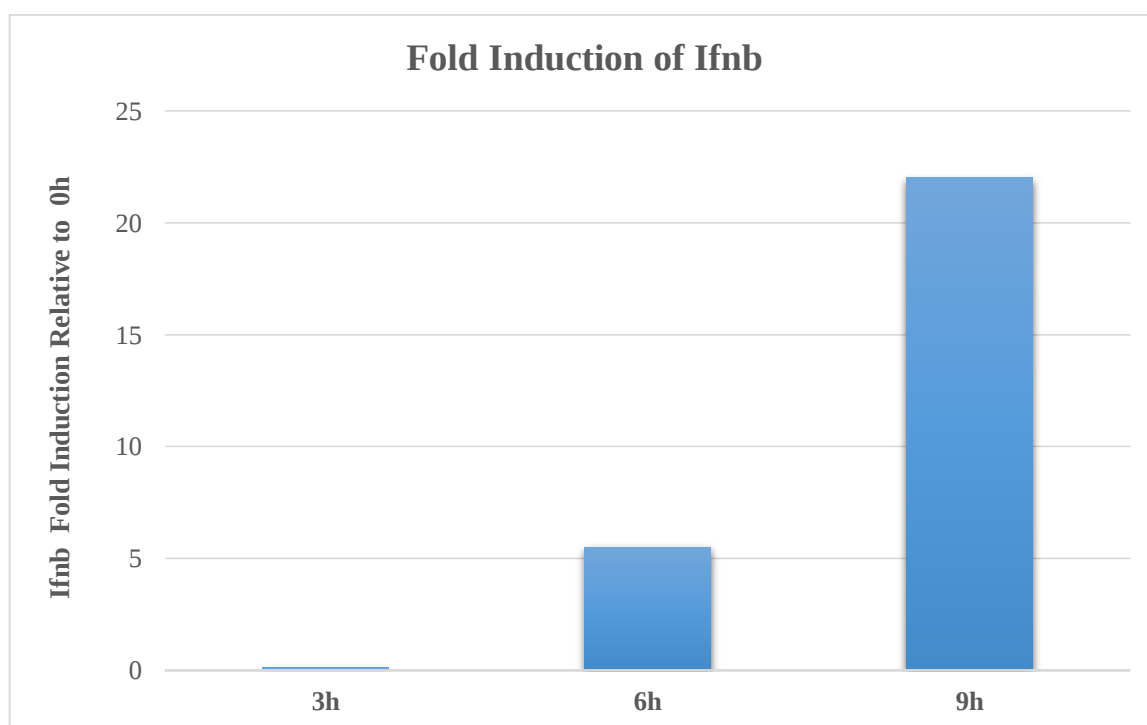


Εικόνα 4.1. Ηλεκτροφόρηση απομονωμένου RNA από κύτταρα Beta-TC-6 πριν (0h) και μετά τη μόλυνση με ιό Sendai σε χρονικά σημεία 3, 6 και 9 ώρες (3h, 6h, 9h). Η ηλεκτροφόρηση του RNA πραγματοποιείται σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Παρατηρούνται 3 ζώνες 28S, 18S και μικρότερου μεγέθους ριβοσωμικού RNA (rRNA).

Στη συνέχεια, το RNA χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα σε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής για τη σύνθεση cDNA. Η αντίδραση πραγματοποιείται με ποσότητα 0,5-1 µg RNA ως αρχικό υπόστρωμα. Το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 1 Unit/1 µg RNA και καταλύει τον σχηματισμό cDNA, χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο RNA (Ενότητα 3.9.3). Η ολοκλήρωση της αντίδρασης συνεπάγεται τη δημιουργία μονόκλωνων τεμαχίων cDNA. Το υλικό αυτό χρησιμοποιείται για ποιοτικό έλεγχο της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων στόχων με τη χρήση ειδικών εκκινητών για αυτά, με την τεχνική της Real-Time PCR. Στο σημείο αυτό πρέπει να υπογραμμιστεί πως η συγκεκριμένη διαδικασία αποτελεί έναν πρωταρχικό έλεγχο, ο οποίος αποκαλύπτει την ποιότητα του RNA και την ορθότητα της μόλυνσης, ώστε να είναι ασφαλής η χρήση του υλικού στις μελέτες μεταγραφομικής.

Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε Real-Time PCR, ώστε να γίνει ποιοτικός έλεγχος των επιπέδων επαγωγής γονιδίων των β παγκρεατικών κυττάρων ποντικού μετά την ιϊκή μόλυνση, με τη χρήση πολλαπλών ζευγαριών εκκινητών για γονίδια στόχους. Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές για τα γονίδια *Ifnb*, *Ptpn2*, *Ifih1*, *Tyk2* και *Gapdh*, τα αποτελέσματα των οποίων εμφάνισαν αναμενόμενα πρότυπα έκφρασης. Παρακάτω

παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα της Real Time PCR με στόχους τα γονίδια της ιντερφερόνης β (*Ifnb*) και του *Gapdh*, το οποίο είναι γονίδιο κυτταρικής οικονομίας και χρησιμοποιείται για την κανονικοποίηση των δειγμάτων. Το γονίδιο *Ifnb* εμπλέκεται στο μηχανισμό της αντι-ϊικής απόκρισης και η έκφρασή του επάγεται από ιϊκές μολύνσεις. Επομένως, αναμένονται αυξημένα επίπεδα της έκφρασης του γονιδίου *Ifnb* μετά την ιϊκή μόλυνση [102]. Το γονίδιο κυτταρικής οικονομίας χρησιμοποιήθηκε για να γίνει ορθός υπολογισμός των επιπέδων επαγωγής. Στο παρακάτω διάγραμμα παρατηρείται αύξηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *Ifnb* 5,5 φορές μετά από 6 ώρες μόλυνσης με τον ιό Sendai, σε σύγκριση με μη μολυσμένα κύτταρα. Επίσης, μετά από 9 ώρες ιϊκής μόλυνσης σημειώνεται η μέγιστη επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου *Ifnb*, 22 φορές σε σχέση με μη μολυσμένα κύτταρα. Ωστόσο, στις 3 ώρες της ιϊκής μόλυνσης παρατηρείται απλή ανίχνευση χαμηλών επιπέδων επαγωγής του γονιδίου *Ifnb* (Εικόνα 4.2).

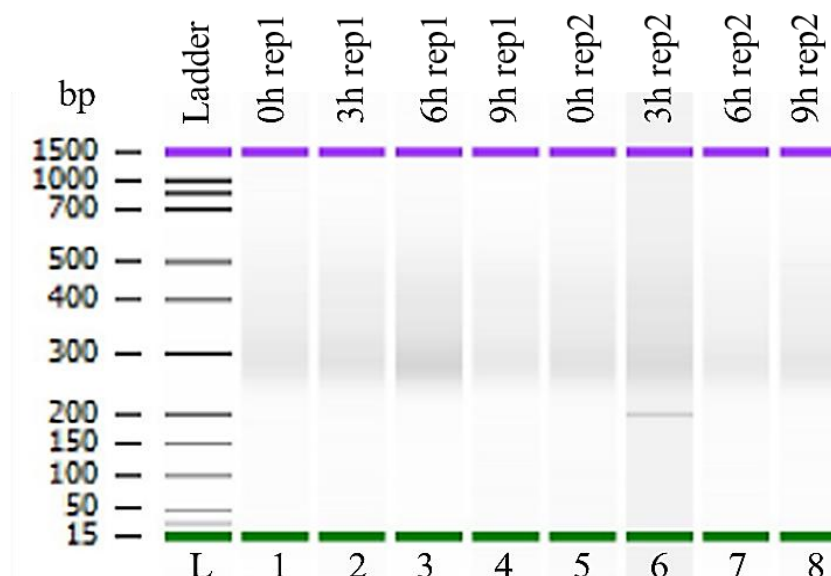


Εικόνα 4.2. Επίπεδα επαγωγής του γονιδίου της ιντερφερόνης β (*Ifnb*) των β παγκρεατικών κυττάρων ποντικού (Beta-TC-6 κύτταρα) ύστερα από μόλυνση με τον ιό Sendai για 3, 6 και 9 ώρες σε σύγκριση με μη μολυσμένα κύτταρα. Στο διάγραμμα παρατηρείται αύξηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *Ifnb* 5,5 φορές και 22 φορές στις 6 και στις 9 ώρες αντίστοιχα μετά την ιϊκή μόλυνση συγκριτικά με τα μη μολυσμένα κύτταρα.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, παρατηρείται ότι γονίδια-βιοδείκτες της αντι-ϊικής απόκρισης, όπως *Ifnb* και *Ifih1*, επάγονται στα β παγκρεατικά κύτταρα, γεγονός που συνάδει

με την εξέλιξη του επαγόμενου προγράμματος γονιδιακής έκφρασης, που σχετίζεται με την άμυνα έναντι ιών του συγκεκριμένου κυτταρικού τύπου. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει τη δυνατότητα αξιοποίησης του συγκεκριμένου κυτταρικού συστήματος (Beta-TC-6, Sendai Virus) ως μοντέλου για την εδραίωση μιας πειραματικής πλατφόρμας, που προσομοιώνει το φαινόμενο της διαβητογένεσης στις παγκρεατικές νησίδες (disease-in-a-dish model of study). Επιπλέον, τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν την υψηλή ποιότητα του απομονωμένου RNA από τα κύτταρα Beta-TC-6 και την ορθή πειραματική διεργασία, επομένως το πείραμα κρίνεται απόλυτα επιτυχημένο και μπορεί να υποστεί αλληλούχηση ευρείας γενιάς, ώστε να μελετηθεί το μεταγράφωμα των κυττάρων πριν και μετά τη μόλυνση με ιό Sendai.

Το απομονωμένο RNA προετοιμάστηκε για μεταγραφομική ανάλυση, μέσω αλληλούχησης νέας γενιάς. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε κατασκευή γενωμικής βιβλιοθήκης από 40 ng απομονωμένου RNA από κάθε χρονικό σημείο, δηλαδή 0, 3, 6 και 9 ώρες, αφού πρώτα έγινε αντίστροφη μεταγραφή για τη σύνθεση cDNA. Το μέγεθος των κλώνων της βιβλιοθήκης είναι σημαντικό να είναι παρόμοιο και επιλέχθηκε να είναι μεταξύ 250-500 ζεύγη βάσεων. Στη συνέχεια, οι βιβλιοθήκες ελέγχθηκαν σε μηχάνημα Agilent Bioanalyzer 2100 για το μέγεθός τους και την παρουσία διμερών εκκινητών (Εικόνα 4.3) και τελικά αλληλουχήθηκαν στο μηχάνημα NextSeq 500 της Illumina του Ελληνικού Κέντρου Γονιδιωματικής του Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α. Η αλληλούχηση ευρείας κλίμακας πραγματοποιήθηκε μόνο από το ένα άκρο των αλληλουχιών, μέσω διαβάσματος 75 ζευγών βάσεων. Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί πως η συγκεκριμένη διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε δύο βιολογικές επαναλήψεις, οι οποίες αποσκοπούν στον ποιοτικό έλεγχο, τον έλεγχο επαναληψιμότητας και ομοιότητας των αποτελεσμάτων, ώστε να είναι εφικτή και ορθή η βιοπληροφορική ανάλυση.



Εικόνα 4.3. Ποιοτική και ποσοτική αξιολόγηση των βιβλιοθηκών των δειγμάτων RNA από Beta-TC-6 κύτταρα σε μηχανήμα Bioanalyzer, πριν την πραγματοποίηση της αλληλούχησης. Στην εικόνα του Bioanalyzer φαίνονται οι ζώνες που αντιστοιχούν στο μέγεθος της βιβλιοθήκης για κάθε δείγμα. Το μέγεθος των βιβλιοθηκών είναι μεταξύ 250 και 500 ζευγών βάσεων.

Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης ευρείας κλίμακας αναλύθηκαν στη διαδικτυακή πλατφόρμα βιοπληροφορικής, Usegalaxy (<https://usegalaxy.org>) [93], όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.12.2. Η βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων, που προέκυψαν από την αλληλούχηση, δίνει τη δυνατότητα στοίχισης των αλληλουχιών (reads) στο ολικό γονιδίωμα του ποντικού και κατ' επέκταση γίνεται δυνατή η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των β παγκρεατικών κυττάρων κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης.

Το πρώτο βήμα για τη βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων, που προέκυψαν από την αλληλούχηση, ήταν ο ποιοτικός έλεγχος των reads (fastQC), ώστε να απομακρυνθούν τα reads χαμηλής ποιότητας. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η διαδικασία αυτή δε χρειάστηκε, καθώς σε όλα τα δείγματα η βαθμολογία της ποιότητας ήταν πάνω από 30, το οποίο θεωρείται το κατώφλι με πιθανότητα λάθους 1 %. Ύστερα από τη στοίχιση των reads στο γονιδίωμα του ποντικού (HISAT2), κατασκευάστηκε ο πίνακας 4.1, όπου παρουσιάζεται ο συνολικός αριθμός των reads ανά δείγμα, ο οποίος είναι 30.000.000 – 45.000.000, ο αριθμός των στοιχισμένων reads στο γονιδίωμα αναφοράς, μαζί με το ποσοστό στοίχισης συγκριτικά με τον συνολικό αριθμό των reads, καθώς και ο αριθμός των στοιχισμένων reads ακριβώς μία φορά και περισσότερες από μία φορές.

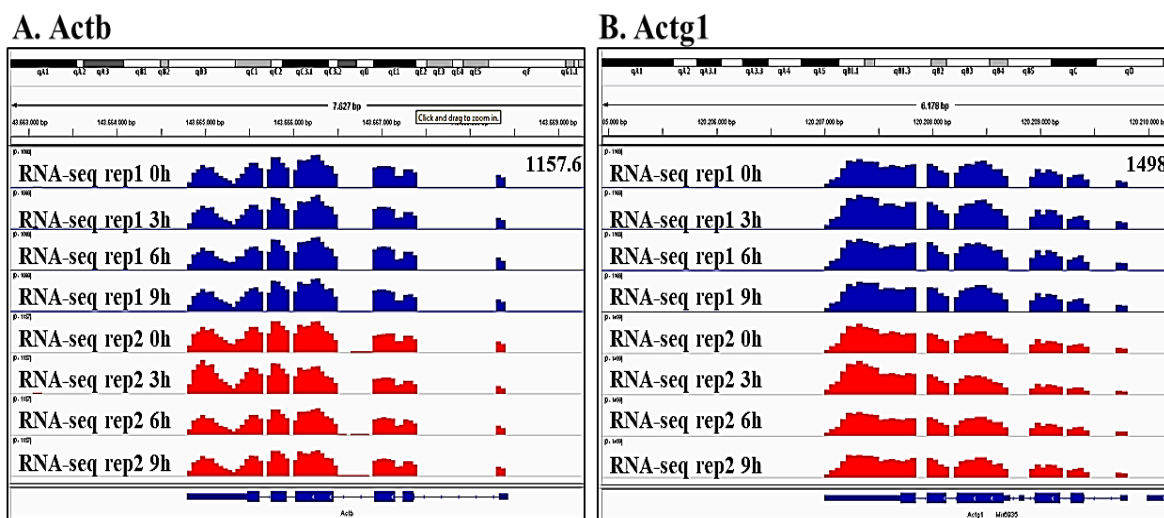
Πίνακας 4.1. Συνολικός αριθμός των reads, που προέκυψαν από τα πειράματα RNA-seq, πριν και μετά τη στοίχιση των αλληλουχιών στο γονιδίωμα αναφοράς.

Datasets	Συνολικός αριθμός reads	Αριθμός στοιχισμένων reads στο γονιδίωμα (mapping)	Αριθμός στοιχισμένων reads ακριβώς 1 φορά	Αριθμός στοιχισμένων reads περισσότερες από 1 φορές
RNA-seq 0h rep 1	40.025.360	37.035.741 (92,53%)	33.364.365 (83,36%)	3.671.376 (9,17%)
RNA-seq 3h rep 1	41.362.656	38.227.386 (92,42%)	34.096.820 (82,43%)	4.130.566 (9,99%)
RNA-seq 6h rep 1	41.813.505	38.719.583 (92,60%)	34.875.744 (83,41%)	3.843.839 (9,19%)
RNA-seq 9h rep 1	36.765.550	33.950.252 (92,34%)	30.719.393 (83,55%)	3.230.859 (8,79%)
RNA-seq 0h rep 2	43.622.552	40.516.322 (92,88%)	35.851.639 (82,19%)	4.664.683 (10,69%)
RNA-seq 3h rep 2	41.539.818	38.662.783 (93,07%)	33.752.441 (81,25%)	4.910.342 (11,82%)
RNA-seq 6h rep 2	36.023.386	33.485.339 (92,95%)	29.874.550 (82,93%)	3.610.789 (10,02%)
RNA-seq 9h rep 2	40.994.273	37.984.191 (92,66%)	34.095.789 (83,17%)	3.888.402 (9,49%)

Μετά τη στοίχιση των reads σε ολόκληρο το γονιδίωμα, μπορεί να γίνει οπτικοποίηση του σήματος, με τον αλγόριθμο bamCoverage [93]. Το σήμα παρουσιάζεται με τη μορφή κορυφών και μπορεί να παρατηρηθεί σε ένα browser, όπως το **Integrative Genomics Viewer (IGV)**. Οι κορυφές αντιστοιχούν στον αριθμό των reads, τα οποία έχουν στοιχηθεί σε μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος και επομένως το ύψος τους είναι ανάλογο του αριθμού των reads.

Για τον έλεγχο της ευαισθησίας και της ειδικότητας των δύο πειραμάτων RNA-seq, αρχικά μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων κυτταρικής οικονομίας (housekeeping genes), πριν και κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης (Εικόνα 4.5). Το γονίδιο *Actb* είναι

συντηρημένο και εμπλέκεται στην κυτταρική κινητικότητα, τη δομή και την ακεραιότητα των κυττάρων. Το γονίδιο *Actg1* παρέχει στο κύτταρο κατάλληλες οδηγίες για τη δημιουργία της ακτίνης γ, μια πρωτεΐνης που συμμετέχει στο δίκτυο ινών για την οργάνωση του κυτταρικού σχήματος και για τον έλεγχο της κυτταρικής κίνησης.

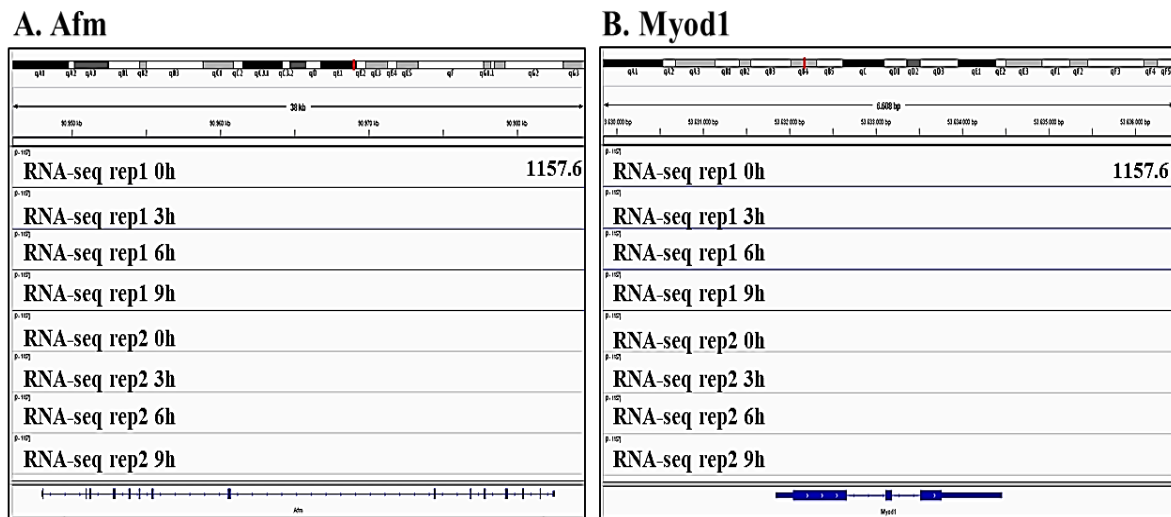


Εικόνα 4.5. Κορυφές του σήματος έκφρασης γονιδίων κυτταρικής οικονομίας (housekeeping genes) στα Beta-TC-6 κύτταρα. Το σήμα παραμένει σταθερό πριν και κατά την εξέλιξη της ιϊκής μόλυνσης. Στην εικόνα φαίνεται το σήμα έκφρασης των γονιδίων *Actb* (A), *Actg1* (B), το οποίο είναι πολύ ισχυρό, υποδεικνύοντας ότι τα γονίδια είναι απαραίτητα για την επιβίωση των β παγκρεατικών κυττάρων. Η κλίμακα μεταξύ των τεσσάρων χρονικών σημείων και των δύο βιολογικών επαναλήψεων σε κάθε περίπτωση είναι ίση, για τη σύγκριση.

Όπως είναι αναμενόμενο, στην εικόνα 4.5 φαίνεται ότι το σήμα στις περιοχές των γονιδίων κυτταρικής οικονομίας εμφανίζεται ισχυρό και σταθερό, τόσο πριν όσο και κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης, καθώς τα γονίδια *Actb* και *Actg1* συμμετέχουν σε βασικές λειτουργίες των β παγκρεατικών κυττάρων. Το γεγονός αυτό είναι σύμφωνο με την άποψη ότι η έκφραση των γονιδίων, που έχουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία των κυττάρων, παραμένει σταθερή, ανεξαρτήτως οποιουδήποτε εξωκυττάριου ερεθίσματος [103]. Επίσης, παρατηρείται ότι οι δύο βιολογικές επαναλήψεις του πειράματος RNA-seq συμβαδίζουν.

Σε αντίθεση με τα γονίδια κυτταρικής οικονομίας, τα γονίδια *Afm* και *Myod1* αποτελούν αρνητικούς στόχους των πειραμάτων, καθώς δεν εκφράζονται στον συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο (Εικόνα 4.6). Το γονίδιο *Afm* κωδικοποιεί για πρωτεΐνη, η οποία παίζει ρόλο στις αντι-αποπτωτικές κυτταρικές διεργασίες [104]. Το γονίδιο *Myod1* κωδικοποιεί για πρωτεΐνη, που παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της διαφοροποίησης των

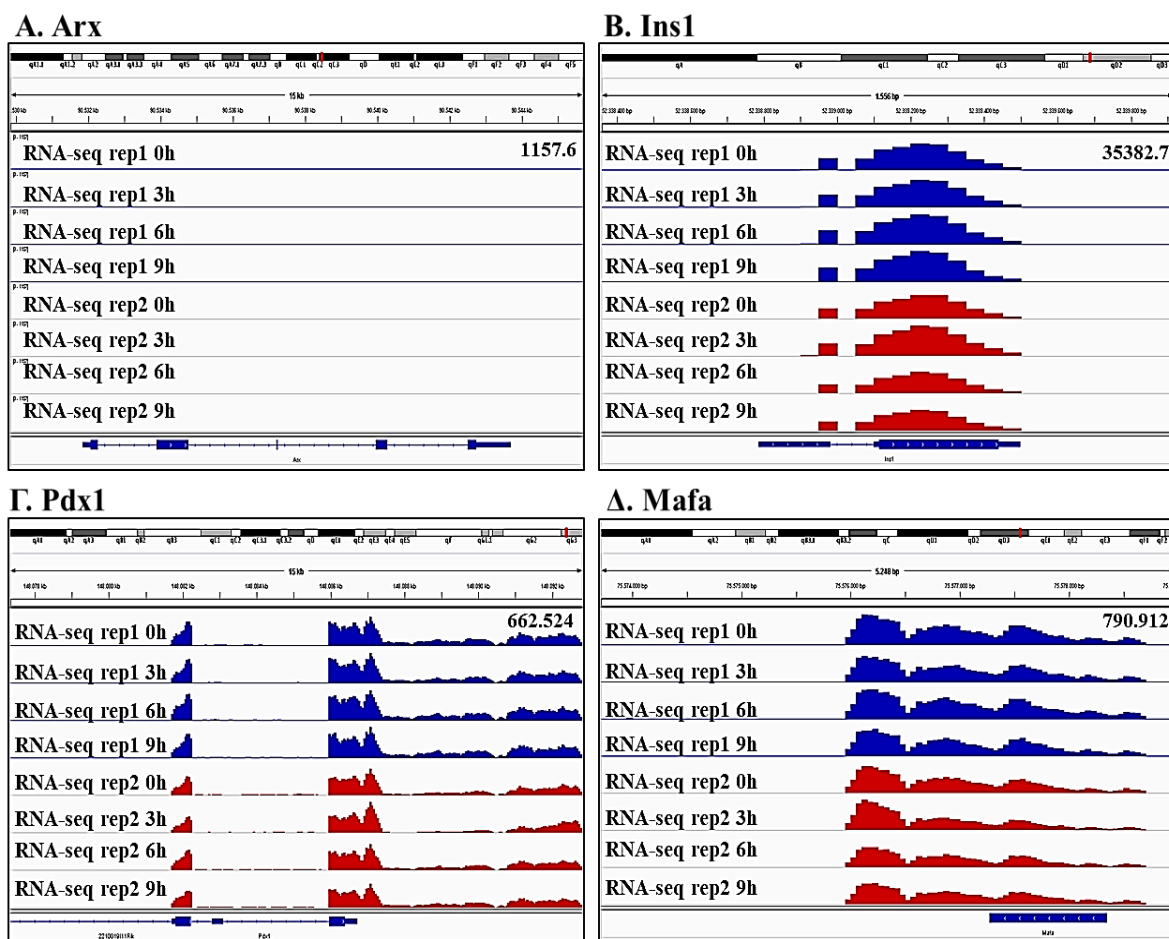
μύων και ανήκει στην οικογένεια των μυογονικών ρυθμιστικών παραγόντων (**Myogenic Regulatory Factors, MRFs**) [105]. Σύμφωνα με τα παραπάνω, στις περιοχές αυτών των γονιδίων αναμένεται πλήρης απουσία σήματος ή σήμα που αγγίζει τα όρια του «θορύβου» (background). Πράγματι, όπως φαίνεται στην εικόνα 4.6 δεν υπάρχουν κορυφές στις περιοχές των γονιδίων *Afm* και *Myod1*, τόσο πριν όσο και κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης.



Εικόνα 4.6. Κορυφές του σήματος έκφρασης των γονιδίων *Afm* (A) και *Myod1* (B), τα οποία δεν εκφράζονται στα *Beta-TC-6* κύτταρα και συνεπώς αποτελούν αρνητικούς στόχους. Στις περιοχές των γονιδίων *Afm* και *Myod1* παρατηρείται πλήρης απουσία σήματος, εφόσον είναι κλειστές και άρα μη προσβάσιμες. Η κλίμακα μεταξύ των τεσσάρων χρονικών σημείων και των δύο βιολογικών επαναλήψεων σε κάθε περίπτωση είναι ίση, για τη σύγκριση.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ευαισθησίας-ειδικότητας του πειράματος, μελετώντας την κατανομή της έκφρασης χαρακτηριστικών γονιδίων των παγκρεατικών κυττάρων, πριν και κατά τη διάρκεια της αντι-ιϊκής απόκρισης (Εικόνα 4.7). Το γονίδιο *Arx* εκφράζεται στα α παγκρεατικά κύτταρα και παρέχει κατάλληλες οδηγίες για την παραγωγή ενός μεταγραφικού παράγοντα, ο οποίος εμπλέκεται στην ανάπτυξη του παγκρέατος [106]. Επομένως, δεν αναμένεται σήμα έκφρασης του γονιδίου *Arx* στα β παγκρεατικά κύτταρα. Αντίθετα, το γονίδιο *Ins1* εκφράζεται ειδικά στα β παγκρεατικά κύτταρα των νησίδων Langerhans για την σύνθεση ινσουλίνης. Το γονίδιο *Pdx1* παράγει έναν απαραίτητο παράγοντα για την ανάπτυξη του παγκρέατος και την ωρίμανση των β παγκρεατικών κυττάρων. Το γονίδιο *Mafa* κωδικοποιεί για μεταγραφικό παράγοντα, ο οποίος λειτουργεί ως ενεργοποιητής των β παγκρεατικών κυττάρων, ελέγχοντας τόσο το

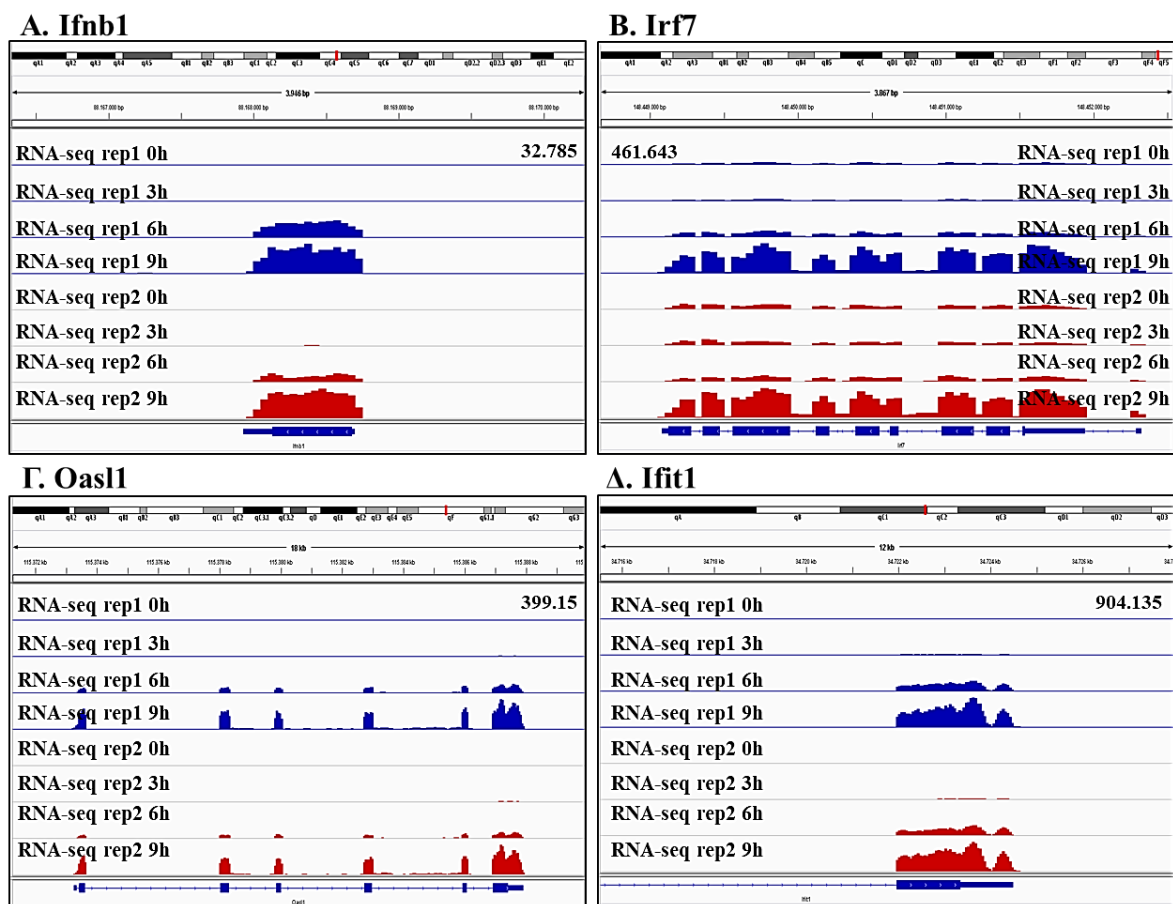
μεταβολισμό τους όσο και την έκκριση ινσουλίνης. Σύμφωνα με την εικόνα 4.7. και όπως αναμένεται, στα γονίδια *Ins1*, *Pdx1* και *Mafa* παρατηρείται ισχυρό και σταθερό σήμα, καθώς η έκφραση των γονιδίων που συμμετέχουν σε βασικές λειτουργίες των β παγκρεατικών κυττάρων, παραμένει κατά κανόνα σταθερή ανεξαρτήτως της ιϊκής μόλυνσης. Αντίθετα, στο γονίδιο *Arx* δεν παρατηρείται σήμα έκφρασης, καθώς δεν εκφράζεται στα β παγκρεατικά κύτταρα (Εικόνα 4.7).



Εικόνα 4.7. Κορυφές του σήματος έκφρασης χαρακτηριστικών γονιδίων για τα παγκρεατικά κύτταρα. Η έκφραση των γονιδίων *Ins1* (B), *Pdx1* (Γ) και *Mafa* (Δ) είναι ισχυρή και παραμένει σταθερή πριν και κατά την εξέλιξη της ιϊκής μόλυνσης, καθώς τα γονίδια αυτά είναι απαραίτητα για την επιβίωση των Beta-TC-6 κυττάρων. Αντίθετα, στο γονίδιο *Arx* (A) παρατηρείται απουσία σήματος εφόσον είναι μη εκφραζόμενη περιοχή στα β παγκρεατικά κύτταρα. Η κλίμακα μεταξύ των τεσσάρων χρονικών σημείων και των δύο βιολογικών επαναλήψεων σε κάθε περίπτωση είναι ίση, για τη σύγκριση.

Στη συνέχεια, μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *Ifnb1*, *Irf7*, *Oasl1* και *Ifit1*, τα οποία έχουν σημαντικό ρόλο στην αντι-ϊκή απόκριση (Εικόνα 4.8). Το γονίδιο

Ifnb1 κωδικοποιεί για μια κυτταροκίνη, η οποία ανήκει στην οικογένεια των ιντερφερονών τύπου I και απελευθερώνεται ως μέρος της έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης έναντι ιογενών λοιμώξεων. Το γονίδιο *Irf7* συμμετέχει στη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων επαγόμενων από ιό, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων των ιντερφερονών τύπου I. Το γονίδιο *Oas1l* είναι μέλος μιας οικογένειας, που επάγεται από ιϊκή μόλυνση και συμμετέχει στο μηχανισμό της αντι-ιϊκής δράσης [107]. Το γονίδιο *Ifit1* ενεργοποιείται από την *Ifnb1* εμποδίζοντας τη μεταγραφή των ιϊκών mRNAs, μπλοκάροντας τις μολύνσεις και επάγει την ανοσολογική απόκριση [108]. Όπως φαίνεται στην εικόνα 4.8 και στις τέσσερις περιπτώσεις παρατηρείται έλλειψη ισχυρού σήματος πριν τη μόλυνση με ιό Sendai, γεγονός το οποίο είναι αναμενόμενο, καθώς η ενεργοποίηση των γονιδίων αυτών πυροδοτείται από ιϊκές μολύνσεις. Κατά τη διάρκεια της αντι-ιϊκής απόκρισης παρατηρείται σήμα 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση, ενώ στις 9 ώρες η ένταση του σήματος αυξάνεται λόγω της μεγαλύτερης έκφρασης των γονιδίων αυτών, με σκοπό την αντιμετώπιση του ιού.



Εικόνα 4.8. Κορυφές του σήματος έκφρασης των γονιδίων *Ifnb1* (A), *Irf7* (B), *Oas1l* (Γ) και *Ifit1* (Δ). Το σήμα έκφρασης του γονιδίου της *Ifnb1* εμφανίζεται μόνο μετά την ιϊκή μόλυνση και συγκεκριμένα από το χρονικό σημείο των 6 ωρών και έπειτα, όπως φαίνεται στο (A). Παρόμοια εικόνα παρατηρείται και στα γονίδια *Irf7* (B), *Oas1l* (Γ) και *Ifit1* (Δ), τα οποία εμπλέκονται στην αντιμετώπιση

της ιϊκής μόλυνσης. Η αύξηση των επιπέδων έκφρασης και των τεσσάρων γονιδίων ξεκινά στο χρονικό σημείο των 6 ωρών (6h), ενώ σε κάθε περίπτωση απουσιάζει οποιοδήποτε σήμα σε μη μολυσμένα κύτταρα (0h). Μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων παρατηρούνται 9 ώρες (9h) μετά την ιϊκή μόλυνση. Η κλίμακα μεταξύ των τεσσάρων χρονικών σημείων και των δύο βιολογικών επαναλήψεων σε κάθε περίπτωση είναι ίση, για τη σύγκριση.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ποσοτική μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, με στόχο την εύρεση των γονιδίων, που εμφανίζουν σημαντικές αλλαγές στην έκφρασή τους, πριν και κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης. Για την επιλογή των γονιδίων, τα οποία παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική αλλαγή στην έκφρασή τους ανάμεσα σε κάθε χρονικό σημείο της ιϊκής μόλυνσης, ορίστηκε το κριτήριο της διαφοράς στα επίπεδα έκφρασης, ίσης ή μεγαλύτερης των 2 fold (διαφορικές κορυφές), δηλαδή $FDR=0,05$ και $\log_2\text{fold change} \geq 0,5$. Με τον τρόπο αυτό εντοπίστηκαν 16 γονίδια, τα οποία εμφανίζουν στατιστικά σημαντική επαγωγή 3 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση σε σύγκριση με τη μη μολυσμένη κατάσταση. Στο χρονικό σημείο των 6 ωρών της ιϊκής μόλυνσης, βρέθηκαν συνολικά 71 γονίδια με αυξημένη έκφραση, ενώ στο σημείο των 9 ωρών προσδιορίστηκαν 272 γονίδια, τα οποία εμφανίζουν σημαντική επαγωγή στην έκφραση (Εικόνα 4.9).

Ιϊκά Επαγόμενα Γονίδια



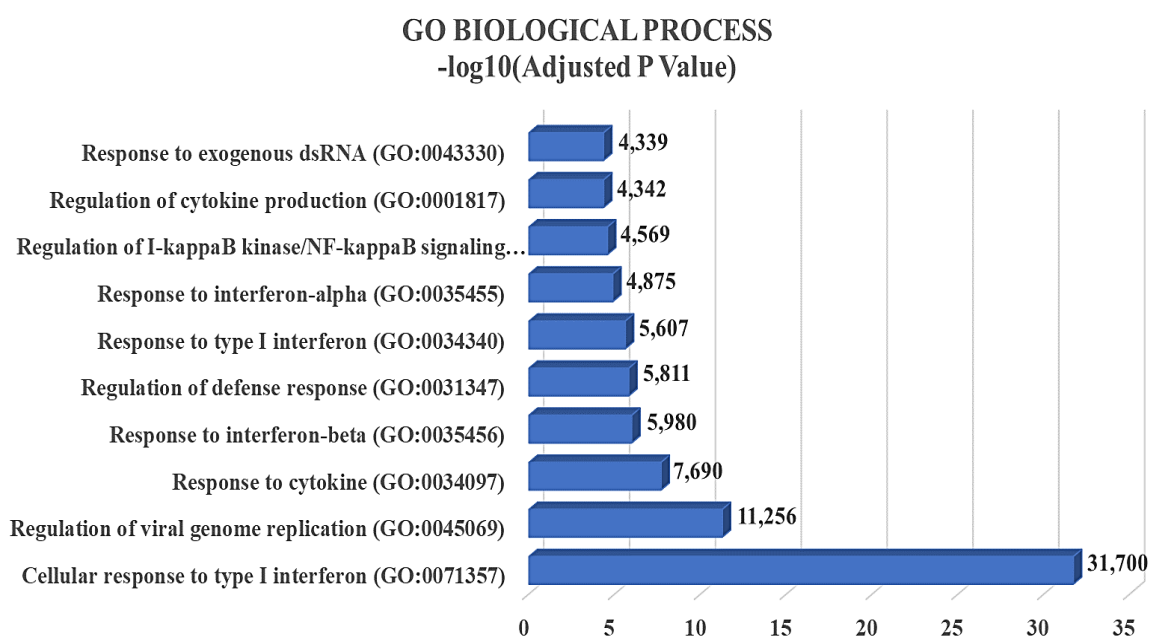
Μεταξύ 3 και 6 ωρών μετά την ιϊκή μόλυνση υπάρχουν 15 κοινά γονίδια.

Μεταξύ 6 και 9 ωρών μετά την ιϊκή μόλυνση υπάρχουν 71 κοινά γονίδια.

Μεταξύ 3 και 9 ωρών μετά την ιϊκή μόλυνση υπάρχουν 15 κοινά γονίδια.

Εικόνα 4.9. Χρονική ανάλυση των επαγόμενων γονιδίων της κυτταρικής σειράς Beta-TC-6, κατά την εξέλιξη της ιϊκής μόλυνσης. Με πράσινο χρώμα απεικονίζεται η λίστα των 16 γονιδίων, των οποίων αυξάνεται η έκφραση, 3 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση. Με μπλε χρώμα απεικονίζεται η λίστα των 71 γονιδίων, των οποίων η έκφραση αυξάνεται, 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση, ενώ με κόκκινο χρώμα παρουσιάζεται η λίστα των 272 γονιδίων, των οποίων η έκφραση αυξάνεται 9 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση.

Για τη μελέτη των βιολογικών διεργασιών, με τις οποίες σχετίζονται τα 272 γονίδια, τα οποία επάγονται στο χρονικό σημείο των 9 ωρών μετά την ιϊκή μόλυνση, πραγματοποιήθηκε ανάλυση γονιδιακής οντολογίας (GO: Gene Ontology analysis), με τη χρήση του διαδικτυακού ιστοτόπου Enrichr [109]. Στην εικόνα 4.10 παρατηρείται ότι τα επαγόμενα γονίδια σχετίζονται με την αντι-ιϊκή απόκριση. Πιο συγκεκριμένα, η ταξινόμηση επισήμανε οικογένειες γονιδίων που σχετίζονται με κυτταρικές λειτουργίες, όπως απόκριση του μονοπατιού των ιντερφερονών τύπου I, συμμετοχή στο μονοπάτι των κυτοκινών, έμφυτη ανοσολογική απόκριση, άμυνα έναντι του ιού και αρνητική ρύθμιση του κύκλου ζωής του. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι οι συνθήκες της κυτταροκαλλιέργειας και της ιϊκής μόλυνσης ήταν άρτιες.



Εικόνα 4.10. Απεικόνιση των βιολογικών διεργασιών στις οποίες συμμετέχουν τα 272 ιϊκά επαγόμενα γονίδια του χρονικού σημείου των 9 ωρών μετά τη μόλυνση. Ο μεγαλύτερος αριθμός των γονιδίων εμπλέκεται σε διεργασίες που σχετίζονται με την αντι-ιϊκή απόκριση.

Η ανάλυση μεταγραφομικής (RNA-seq, *transcriptomics*) απέδειξε πως τα Beta-TC-6 κύτταρα αποκρίνονται αποτελεσματικά στην ιϊκή μόλυνση, μέσω της επαγωγής 272 γονιδίων, στα οποία συμπεριλαμβάνονται κύρια αντι-ιϊκά γονίδια (*Ifnb1*, *Ifit1*, *Ccl5*, *Oasl1*), γονίδια με ανοσολογικές λειτουργίες (*Nf-κB*, *Il33*) καθώς και γονίδια που έχουν εμπλακεί στην ανάπτυξη του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1 (*Ifih1*, *H2-Q6*, *H2-Q4*, *H2-T23*, *H2-Q8*, *H2-T10*) [110]. Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται ότι στο χρονικό σημείο των 3 ωρών μετά την ιϊκή μόλυνση, επάγεται μικρός αριθμός σημαντικών αντι-ιϊκών γονιδίων, δηλαδή 16 γονίδια,

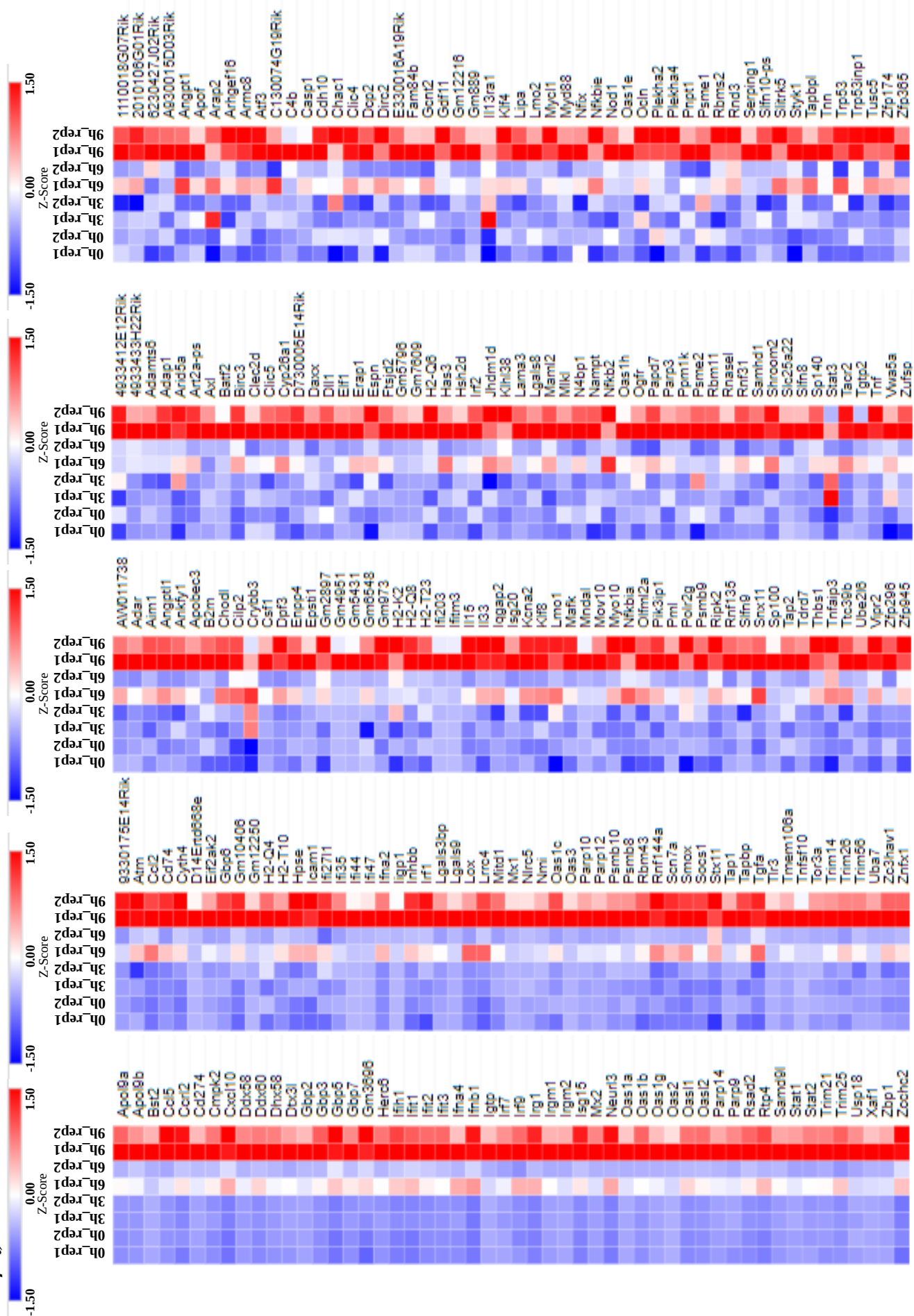
όπως *Ifit1*, *Rsad2*, *Stat3*, *Oasl2*, *Ifih1*, *Isg15*. Τα γονίδια αυτά αποτελούν τον πυρήνα του επαγόμενου προγράμματος γονιδιακής έκφρασης ύστερα από την ιϊκή μόλυνση. Ύστερα από το πέρας 3 ωρών, δηλαδή στο χρονικό σημείο των 6 ωρών παρατηρείται σημαντική αύξηση του αριθμού των επαγόμενων γονιδίων, τα οποία φτάνουν τα 71 γονίδια. Γίνεται κατανοητό ότι στο σημείο αυτό έχει ενεργοποιηθεί μεγάλος αριθμός γονιδίων, τα οποία συμμετέχουν στην ανοσολογική απόκριση έναντι του ιού. Επίσης, παρατηρείται ότι τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων είναι έως και 10 φορές μεγαλύτερα από το χρονικό σημείο των 3 ωρών. Στο χρονικό σημείο των 9 ωρών παρατηρείται ο μέγιστος αριθμός επαγόμενων γονιδίων, δηλαδή 272 γονίδια, στα οποία συμπεριλαμβάνονται αντι-ιϊκά γονίδια, γονίδια της ανοσολογικής απόκρισης, μεταγραφικοί παράγοντες, χαρακτηριστικά γονίδια των β παγκρεατικών κυττάρων καθώς και γονίδια που σχετίζονται με τον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1. Επισημαίνεται ότι η ανάλυση γονιδιακής οντολογίας αποδεικνύει το μεταγραφικό επαναπρογραμματισμό που υφίστανται τα β παγκρεατικά κύτταρα, κατά την απόκριση έναντι του ιού και κατ' επέκταση την απορρύθμιση των αυστηρά κατά τα άλλα κωδικοποιημένων προγραμμάτων γονιδιακής έκφρασης. Συνεπώς, το μεταγράφωνμα των Beta-TC-6 κυττάρων, στη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης, αφενός διατηρεί το χαρακτήρα του, εκφράζοντας χαρακτηριστικά γονίδια των β παγκρεατικών κυττάρων, αφετέρου αποκτά αντι-ιϊκό προφίλ, επιστρατεύοντας αμυντικούς μηχανισμούς, όπως την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν σε μονοπάτια της πρώιμης ανοσολογικής απόκρισης και τέλος εμφανίζει εμπλουτισμένα γονίδια, τα οποία έχουν καταγραφεί να συμμετέχουν στους μηχανισμούς εμφάνισης του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η κινητική της αντι-ιϊκής απόκρισης στα β παγκρεατικά κύτταρα (Beta-TC-6) είναι πιο αργή συγκριτικά με υπάρχοντα δεδομένα του εργαστηρίου μας από Β λεμφοκύτταρα (Namalwa) και επιθηλιακά κύτταρα (HeLa), τα οποία υποδεικνύουν την έξαρση της επαγωγής γονιδίων στο χρονικό σημείο των 6 ωρών μετά την ιϊκή μόλυνση.

Κατά την ποσοτική μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, εντοπίστηκαν 53 γονίδια, τα οποία μειώνουν την έκφρασή τους, κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η ιϊκή μόλυνση λειτουργεί ως επαγωγέας της έκφρασης μεγάλου αριθμού γονιδίων. Αξίζει να σημειωθεί ότι η βιοπληροφορική ανάλυση για τη μελέτη των βιολογικών διεργασιών, μέσω του εργαλείου Enhichr [109], αποκάλυψε ότι τα γονίδια αυτά δεν μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε συγκεκριμένες γονιδιακές οντολογίες (GO: Gene Ontology analysis) ή να ταξινομηθούν σε οικογένειες ανάλογα με την κυτταρική λειτουργία τους. Ύστερα, από τη μελέτη των γονιδίων κατά περίπτωση, βρέθηκαν αντιπροσωπευτικά μέλη,

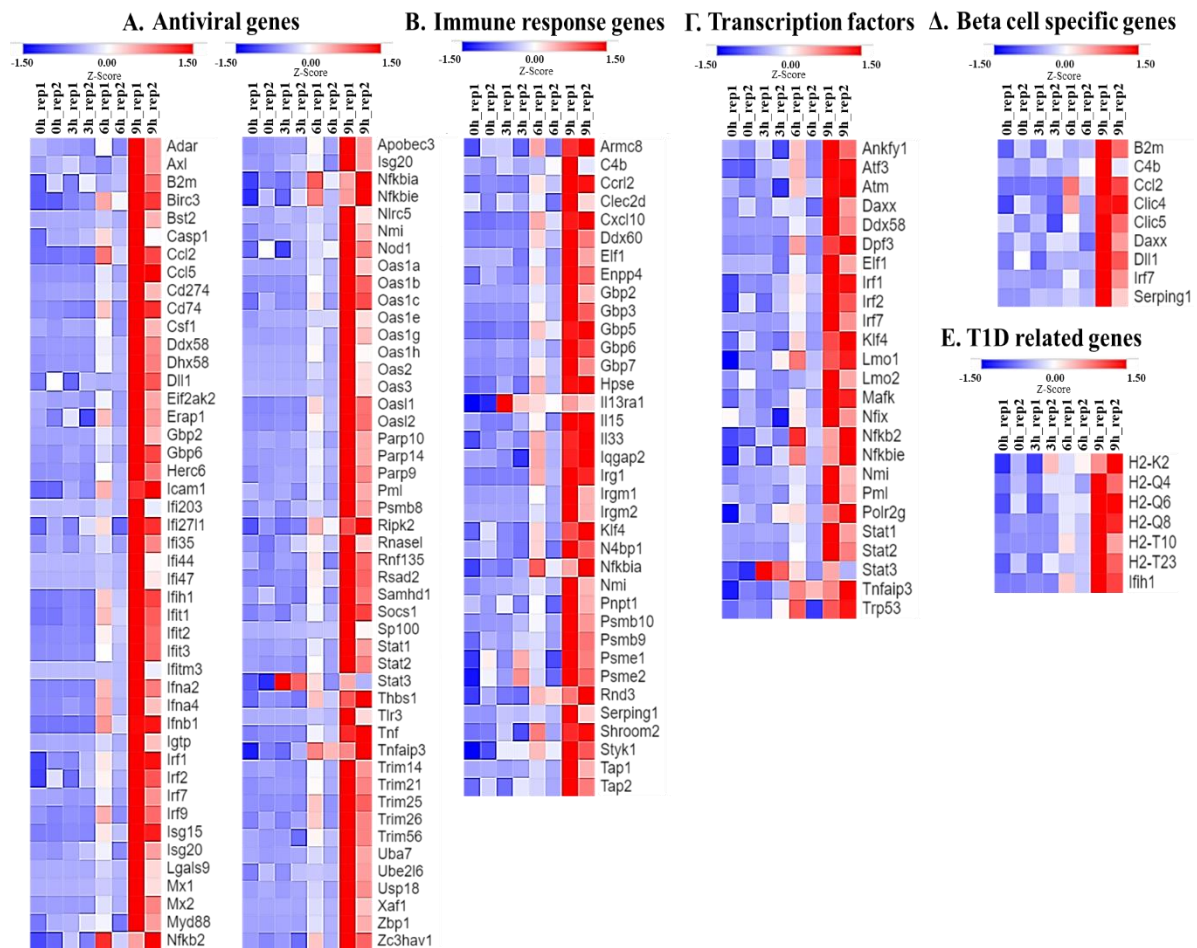
τα οποία έχουν συνδυαστεί με τον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1, όπως τα γονίδια *Nkx2-2* και *Wnt4*. Το γεγονός αυτό υπογραμμίζει την αντίληψή μας ότι ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1 συνοδεύεται από σημαντικές αλλαγές στην έκφραση γονιδίων, τα οποία κατανέμονται σε διαφορετικές οικογένειες γονιδίων καθώς και μεταβολές συγκεκριμένων γονιδίων, τα οποία δρουν ως μοριακοί διακόπτες για την επαγωγή της αυτοανοσίας. Πιο συγκεκριμένα, το γονίδιο *Nkx2-2* κωδικοποιεί για έναν μεταγραφικό παράγοντα, ο οποίος είναι απαραίτητος για την ενεργή διατήρηση της ταυτότητας και τη σωστή λειτουργία των β παγκρεατικών κυττάρων. Η αποσιώπηση του γονιδίου *Nkx2-2* σε β παγκρεατικά κύτταρα προκαλεί ταχεία έναρξη διαβητικού φαινοτύπου, γεγονός που αποδίδεται στην απώλεια ινσουλίνης και στη μείωση της έκφρασης πολλών λειτουργικών γονιδίων των β κυττάρων. Ταυτόχρονα πολλά κύτταρα φαίνεται να επαναπρογραμματίζονται, καθώς αποκτούν μη ειδικά χαρακτηριστικά, που αφορούν την ενδοκρινή μοίρα και τη μορφολογία τους [111]. Επιπλέον, η οδός σηματοδότησης Wnt στα β παγκρεατικά κύτταρα έχει συνδεθεί με την παθογένεση του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2, παρόλο που ο ρόλος της ενδογενούς έκφρασης του γονιδίου *Wnt4* δεν είναι σαφής. Σύμφωνα με μελέτες, το γονίδιο *Wnt4* θεωρείται ότι μπορεί λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής στην ανάπτυξη των β κυττάρων και στην έκκριση ινσουλίνης [112].

Το επόμενο βήμα ήταν η οπτικοποίηση της ποσοτικής ανάλυσης της έκφρασης των 272 επαγόμενων γονιδίων, πριν και κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης προκειμένου να γίνει ευδιάκριτη η κινητική των μοριακών γεγονότων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος βιοπληροφορικής ανάλυσης Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>), ο οποίος δίνει τη δυνατότητα οπτικοποίησης δεδομένων με τη μορφή θερμικών χαρτών (heat maps), εισάγοντας πίνακες με τις κανονικοποιημένες μετρήσεις των πειραμάτων RNA-seq. Το αποτέλεσμα του εργαλείου ήταν η δημιουργία θερμικών χαρτών (heat maps), οι οποίοι αναπαριστούν τις σχετικές τιμές έκφρασης των 272 επαγόμενων γονιδίων, όπως μετρήθηκαν πριν και κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης, σε τέσσερα διαφορετικά χρονικά σημεία (0h, 3h, 6h και 9h) (Εικόνα 4.11). Το γαλάζιο χρώμα αντιστοιχεί σε χαμηλότερη τιμή έκφρασης, ενώ το κόκκινο χρώμα αντικατοπτρίζει υψηλότερη τιμή έκφρασης, σε σύγκριση με την κατάσταση ελέγχου. Σύμφωνα με την εικόνα 4.11 παρατηρείται προοδευτική αύξηση της έκφρασης των γονιδίων κατά την εξέλιξη της μόλυνσης, ενώ είναι εμφανές ότι οι μεγαλύτερες αλλαγές στην έκφραση πραγματοποιούνται 9 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση, καθώς κυριαρχεί το κόκκινο χρώμα.

530'ω



Επιπλέον, αποφασίστηκε να κατασκευαστούν επιμέρους οι θερμικοί χάρτες πέντε βασικών οικογενειών γονιδίων. Η ομαδοποίηση αυτών έγινε σύμφωνα με τη βιολογική διεργασία στην οποία συμμετέχουν, με τη βοήθεια του διαδικτυακού εργαλείου Enrichr [109]. Οι πέντε κατηγορίες των γονιδίων είναι: **α) αντι-ϊικά γονίδια (antiviral genes), β) γονίδια ανοσολογικής απόκρισης (immune response genes), γ) μεταγραφικοί παράγοντες (transcription factors), δ) ειδικά γονίδια των β παγκρεατικών κυττάρων (Beta cell specific genes) και ε) γονίδια που σχετίζονται με τον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 (T1D related genes)** (Εικόνα 4.12).



Εικόνα 4.12. Θερμικοί χάρτες (heat maps) στους οποίους παρουσιάζεται η πρόοδος της έκφρασης πέντε κατηγοριών γονιδίων, κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης (0, 3, 6, 9 ώρες). Οι θερμικοί χάρτες αναπαριστούν τις σχετικές τιμές έκφρασης των (Α) αντι-ϊικών γονιδίων (antiviral genes), (Β) γονιδίων ανοσολογικής απόκρισης (immune response genes), (Γ) μεταγραφικών παραγόντων (transcription factors), (Δ) ειδικών γονιδίων των β παγκρεατικών κυττάρων (Beta cell specific genes) και (Ε) γονιδίων που σχετίζονται με τον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 (T1D related genes). Το γαλάζιο χρώμα υποδεικνύει χαμηλότερη ενώ το κόκκινο χρώμα υψηλότερη τιμή έκφρασης.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε κατηγοριοποίηση των 272 ιϊκά επαγόμενων γονιδίων σε τρεις κατηγορίες, ανάλογα με τα επίπεδα επαγωγής της έκφρασής τους. Στην πρώτη κατηγορία εντάχθηκαν γονίδια με επίπεδο επαγωγής μεγαλύτερο από 16 φορές (fold change > 16) (Πίνακας 4.3), στη δεύτερη κατηγορία συμπεριλήφθηκαν γονίδια με επίπεδο επαγωγής από 4 έως 16 φορές (fold change 4-16) (Πίνακας 4.4), ενώ στην τρίτη κατηγορία τοποθετήθηκαν γονίδια με επίπεδο επαγωγής μικρότερο από 4 φορές (fold change < 4) (Πίνακας 4.5). Επίσης, σε καθεμία κατηγορία βρέθηκαν τα γονίδια, τα οποία εμφανίζουν βασικά επίπεδα έκφρασης σε μη μολυσμένα κύτταρα (0h) και σημειώθηκαν με κόκκινο χρώμα. Με βάση αυτή την πληροφορία υπολογίστηκε το ποσοστό των γονιδίων, τα οποία εμφανίζουν βασικά επίπεδα έκφρασης πριν την ιϊκή μόλυνση, σε καθεμία κατηγορία. Στην κατηγορία των γονιδίων με επίπεδο επαγωγής μεγαλύτερο από 16 φορές (fold change > 16) το ποσοστό των γονιδίων με βασική έκφραση πριν τη μόλυνση είναι 23,68%, στη δεύτερη κατηγορία των γονιδίων με επίπεδο επαγωγής από 4 έως 16 (fold change 4-16) το ποσοστό είναι 50,80%, ενώ στην τρίτη κατηγορία των γονιδίων με επίπεδο επαγωγής μικρότερο από 4 φορές (fold change < 4) το ποσοστό είναι 90,2%. Σύμφωνα με τους παρακάτω πίνακες (Πίνακες 4.3, 4.4, 4.5), παρατηρείται ότι σημαντικοί μεταγραφικοί παράγοντες, όπως NF-κΒ, IRFs, STATs, ανήκουν στη δεύτερη και τρίτη κατηγορία γονιδίων, δηλαδή έχουν επίπεδα επαγωγής μικρότερα από 4 φορές και από 4 έως 16 φορές και εμφανίζουν βασικά επίπεδα έκφρασης πριν την ιϊκή μόλυνση. Αντίθετα, γονίδια της αντι-ιϊκής απόκρισης, όπως *Ifnb1*, *Ifit1*, *Ifih1*, *Ccl5*, *Oasl1* ανήκουν στην πρώτη κατηγορία, δηλαδή έχουν τα μεγαλύτερα επίπεδα επαγωγής και τα περισσότερα από αυτά δεν εκφράζονται σε μη μολυσμένα κύτταρα (0h). Επομένως, γίνεται κατανοητό ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι συμμετέχουν στην ενεργοποίηση βασικών μονοπατιών μεταγωγής σήματος και άλλων γονιδίων που επάγονται κατά την αντι-ιϊκή απόκριση, αυξάνουν την έκφρασή τους λιγότερες φορές, συγκριτικά με τα γονίδια στόχους των μεταγραφικών παραγόντων, τα οποία αυξάνουν της έκφρασής τους περισσότερες φορές. Επιπλέον, μια υπομονάδα των γονιδίων, τα οποία έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1 (*H2-Q6*, *H2-Q4*, *H2-T23*, *H2-Q8*) [113], εμφανίζει βασικά επίπεδα έκφρασης σε μη μολυσμένα κύτταρα (0h), ωστόσο παρατηρείται σημαντική ενίσχυση της έκφρασης 9 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση. Τέλος, φαίνεται ότι το ποσοστό των γονιδίων, τα οποία εμφανίζουν βασικά επίπεδα έκφρασης πριν την ιϊκή μόλυνση, αυξάνεται καθώς μειώνονται τα επίπεδα επαγωγής τους. Αυτό σημαίνει ότι τα περισσότερα γονίδια (76,32%), τα οποία παρουσιάζουν μεγαλύτερη επαγωγή της έκφρασής τους, λόγω της ιϊκής μόλυνσης, δεν εκφράζονται σε μη μολυσμένα κύτταρα (0h)

(Πίνακας 4.3), ενώ τα περισσότερα γονίδια (90,2%), τα οποία έχουν τη μικρότερη επαγωγή, εκφράζονται ήδη σε χαμηλά επίπεδα, πριν την ιική μόλυνση (Πίνακας 4.3).

Πίνακας 4.3. Λίστα των 76 ιικά επαγόμενων γονιδίων, τα οποία παρουσιάζουν επίπεδο επαγωγής μεγαλύτερο από 16 φορές (fold change > 16). Με κόκκινο χρώμα σημαίνονται τα γονίδια, τα οποία έχουν βασικά επίπεδα έκφρασης σε μη μολυσμένα κύτταρα. Το ποσοστό των γονιδίων, τα οποία εμφανίζουν βασικά επίπεδα έκφρασης πριν την ιική μόλυνση είναι 23,68%. Τα γονίδια αναγράφονται με βάση την ονοματολογία τους στο γονιδίωμα του ποντικού.

Γονίδια με επίπεδο επαγωγής μεγαλύτερο από 16 φορές (Fold Change > 16)					
<i>Apol9a</i>	<i>Oasl2</i>	<i>Batf2</i>	<i>Gbp7</i>	<i>Mx1</i>	<i>Xafl</i>
<i>Rsad2</i>	<i>Ifna2</i>	<i>Samd9l</i>	<i>Oas3</i>	<i>Tlr3</i>	<i>Gm12250</i>
<i>Ifi47</i>	<i>Irg1</i>	<i>Oasl1</i>	<i>Bst2</i>	<i>Nlrc5</i>	<i>Ddx60</i>
<i>Ifna4</i>	<i>Ifit3</i>	<i>Oaslg</i>	<i>Rtp4</i>	<i>Oas1b</i>	<i>Gm5431</i>
<i>Ifit1</i>	<i>Ifitm3</i>	<i>Oas2</i>	<i>Tnfsf10</i>	<i>Uba7</i>	<i>Gm4951</i>
<i>Ccl5</i>	<i>Apol9b</i>	<i>Zbp1</i>	<i>Cyth4</i>	<i>Cmpk2</i>	<i>Cd74</i>
<i>Cxcl10</i>	<i>Gbp5</i>	<i>Gbp6</i>	<i>Ddx58</i>	<i>Ifit2</i>	<i>Inhbb</i>
<i>Ifi44</i>	<i>Ifnb1</i>	<i>Oas1h</i>	<i>Irgm2</i>	<i>Hsh2d</i>	<i>Parp14</i>
<i>Sp100</i>	<i>Ccl2</i>	<i>Lgals9</i>	<i>Ifi203</i>	<i>Irgm1</i>	<i>Ifih1</i>
<i>Ifit3b</i>	<i>Isg15</i>	<i>Oas1a</i>	<i>Dhx58</i>	<i>Cd274</i>	<i>Lox</i>
<i>Iigp1</i>	<i>Gbp2</i>	<i>Mx2</i>	<i>Igtp</i>	<i>Trim21</i>	<i>Neurl3</i>
<i>Gbp3</i>	<i>Tgtp2</i>	<i>Mndal</i>	<i>Ccrl2</i>	<i>Gm5796</i>	<i>Gm973</i>
<i>D14Ertd668e</i>	<i>4933433H22Rik</i>	<i>9330175E14Rik</i>	<i>Gm7609</i>		

Πίνακας 4.4. Λίστα των 63 ιικά επαγόμενων γονιδίων, τα οποία παρουσιάζουν επίπεδο επαγωγής από 4 έως 16 φορές (fold change 4-16). Με κόκκινο χρώμα σημαίνονται τα γονίδια, τα οποία έχουν βασικά επίπεδα έκφρασης σε μη μολυσμένα κύτταρα. Το ποσοστό των γονιδίων, τα οποία εμφανίζουν βασικά επίπεδα έκφρασης πριν την ιική μόλυνση είναι 50,8%. Τα γονίδια αναγράφονται με βάση την ονοματολογία τους στο γονιδίωμα του ποντικού.

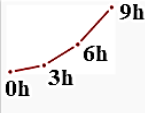
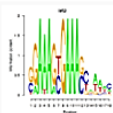
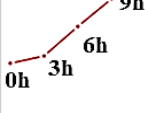
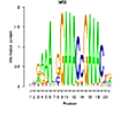
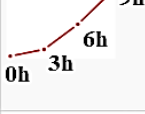
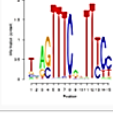
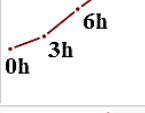
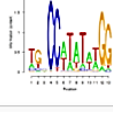
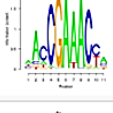
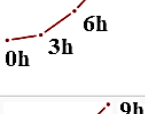
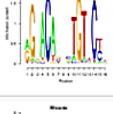
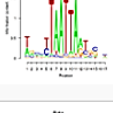
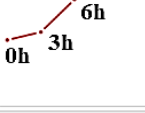
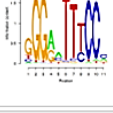
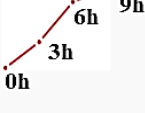
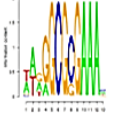
Γονίδια με επίπεδο επαγωγής από 4 έως 16 (Fold Change 4-16)				
<i>Smox</i>	<i>Ifi35</i>	<i>Olfml2a</i>	<i>Usp18</i>	<i>Parp12</i>
<i>Tmem106a</i>	<i>Znfx1</i>	<i>Art2a-ps</i>	<i>Cyp26a1</i>	<i>Tnn</i>
<i>Psmb10</i>	<i>Stat2</i>	<i>Dtx3l</i>	<i>Psmb8</i>	<i>Psmb9</i>
<i>Oas1e</i>	<i>Lama3</i>	<i>H2-T10</i>	<i>Epsti1</i>	<i>Irf9</i>
<i>Socs1</i>	<i>Stx11</i>	<i>Il15</i>	<i>Irf7</i>	<i>Scn7a</i>
<i>Nmi</i>	<i>Trim25</i>	<i>Parp9</i>	<i>Il33</i>	<i>Parp10</i>
<i>Tor3a</i>	<i>Apof</i>	<i>Icam1</i>	<i>Rnasel</i>	<i>D730005E14Rik</i>
<i>Tusc5</i>	<i>Tnf</i>	<i>Helz2</i>	<i>Cped1</i>	<i>Eif2ak2</i>
<i>Trim56</i>	<i>Trim14</i>	<i>Tacr2</i>	<i>Chodl</i>	<i>Herc6</i>
<i>Thbs1</i>	<i>Rbm43</i>	<i>Stat1</i>	<i>Cilp2</i>	<i>Espn</i>
<i>Ocln</i>	<i>Maml2</i>	<i>Axl</i>	<i>Casp1</i>	<i>Lrrc4</i>
<i>Birc3</i>	<i>Slfn8</i>	<i>Tap1</i>	<i>Ube2l6</i>	<i>C4b</i>
<i>Gm10406</i>	<i>Gm3696</i>	<i>Zc3hav1</i>		

Πίνακας 4.5. Λίστα των 133 ιικά επαγόμενων γονιδίων, τα οποία παρουσιάζουν επίπεδο επαγωγής μικρότερο από 4 φορές (fold change < 4). Με κόκκινο χρώμα σημαίνονται τα γονίδια, τα οποία έχουν βασικά επίπεδα έκφρασης σε μη μολυσμένα κύτταρα. Το ποσοστό των γονιδίων, τα οποία εμφανίζουν βασικά επίπεδα έκφρασης πριν την ιική μόλυνση είναι 90,2%. Τα γονίδια αναγράφονται με βάση την ονοματολογία τους στο γονιδίωμα του ποντικού.

Γονίδια με επίπεδο επαγωγής μικρότερο από 4 φορές (Fold Change < 4)							
<i>Zufsp</i>	<i>Shroom2</i>	<i>Kcna2</i>	<i>Gm889</i>	<i>Tdrd7</i>	<i>Vwa5a</i>	<i>Il13ra1</i>	<i>Stat3</i>
<i>Atf3</i>	<i>Rnf31</i>	<i>Irf1</i>	<i>Gm2897</i>	<i>Tapbp</i>	<i>Cdh10</i>	<i>Prr36</i>	<i>Zfp174</i>
<i>Nfkbie</i>	<i>Ftsjd2</i>	<i>H2-T23</i>	<i>B2m</i>	<i>Rnf135</i>	<i>Nod1</i>	<i>Elf1</i>	<i>Arap2</i>
<i>Lgals8</i>	<i>Rbms2</i>	<i>Klhl38</i>	<i>Clec2d</i>	<i>Myo10</i>	<i>Ifi271l</i>	<i>Plekha4</i>	<i>Isg20</i>
<i>Irf2</i>	<i>Gdf11</i>	<i>Adamts6</i>	<i>Fam84b</i>	<i>H2-Q4</i>	<i>Klf8</i>	<i>Slfn9</i>	<i>Dpf3</i>
<i>Ogfr</i>	<i>Plekha2</i>	<i>Angptl1</i>	<i>Pml</i>	<i>Mycl1</i>	<i>Mafk</i>	<i>MLkl</i>	<i>Adar</i>
<i>Rnd3</i>	<i>Jhdm1d</i>	<i>Zfp296</i>	<i>H2-Q6</i>	<i>Slfn10-ps</i>	<i>Lipa</i>	<i>Atm</i>	<i>Rbm11</i>
<i>Samhd1</i>	<i>N4bp1</i>	<i>Pik3ip1</i>	<i>AW011738</i>	<i>H2-K2</i>	<i>Klf4</i>	<i>Tnfaip3</i>	<i>Trp53</i>
<i>Arhgef16</i>	<i>Slitrk5</i>	<i>Sp140</i>	<i>Adap1</i>	<i>Trim26</i>	<i>Psme1</i>	<i>Myd88</i>	<i>Erap1</i>
<i>Pnpt1</i>	<i>Zfp365</i>	<i>Clic5</i>	<i>Csf1</i>	<i>Ripk2</i>	<i>Chac1</i>	<i>Arid5a</i>	<i>Psme2</i>
<i>Gcnt2</i>	<i>Papd7</i>	<i>Tap2</i>	<i>Lmo2</i>	<i>Vipr2</i>	<i>Dirc2</i>	<i>Ppm1k</i>	<i>Oas1c</i>
<i>Nfkb2</i>	<i>Mov10</i>	<i>Serping1</i>	<i>Parp3</i>	<i>Apobec3</i>	<i>Trp53inp1</i>	<i>Lmo1</i>	<i>Hpse</i>
<i>Nfkbia</i>	<i>Zcchc2</i>	<i>Ttc39b</i>	<i>Crybb3</i>	<i>Angpt1</i>	<i>Dcp2</i>	<i>Styk1</i>	<i>Rnf144a</i>
<i>Nampt</i>	<i>Mitd1</i>	<i>Has3</i>	<i>h Q8</i>	<i>Tgfa</i>	<i>Armc8</i>	<i>Aim1</i>	<i>Clic4</i>
<i>Gm12216</i>	<i>Lgals3bp</i>	<i>6230427J02Rik</i>	<i>4933412E12Rik</i>	<i>C130074G19Rik</i>	<i>A930015D03Rik</i>	<i>Gm6548</i>	<i>Polr2g</i>
<i>Tapbpl</i>	<i>Dll1</i>	<i>Slc25a22</i>	<i>Snx11</i>	<i>Daxx</i>	<i>Zfp945</i>	<i>Iqgap2</i>	<i>Enpp4</i>
<i>Nfix</i>	<i>2010106G01Rik</i>	<i>E330016A19Rik</i>	<i>2010106G01Rik</i>	<i>Ankfy1</i>			

Τέλος, για την εύρεση των μοτίβων των μεταγραφικών παραγόντων, τα οποία εντοπίζονται στους υποκινητές των επαγόμενων γονιδίων και ευθύνονται για τις μεταβολές της γονιδιακής έκφρασης, κατά τη διάρκεια της ιικής μόλυνσης, πραγματοποιήθηκε ανάλυση ρυθμιστικών μοτίβων με τη χρήση του διαδικτυακού εργαλείου ISMARA [114]. Το πρόγραμμα αυτό αποτελεί ένα ολοκληρωμένο σύστημα, το οποίο μοντελοποιεί την

έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων ολόκληρου του μεταγραφώματος, με τη χρήση αλγορίθμων που ποσοτικοποιούν την έκφραση αυτών. Με αυτόν τον τρόπο προσδιορίζονται τα μοτίβα και κατ' επέκταση οι μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι οδηγούν στις μεταβολές της έκφρασης μεταξύ των καταστάσεων πριν και μετά την ιϊκή μόλυνση (Εικόνα 4.13).

Motif name	Z-value	Associated genes	Profile	Logo
Irf2_Irf1_Irf8_Irf9_Irf7	23.29	Irf2 Links ▼ Irf1 Links ▼ Irf8 Links ▼ Irf9 Links ▼ Irf7 Links ▼		
Irf3	21.51	Irf3 Links ▼		
Stat2	12.79	Stat2 Links ▼		
Srf	7.89	Srf Links ▼		
Irf5_Irf6	7.76	Irf5 Links ▼ Irf6 Links ▼		
Ar	7.18	Ar Links ▼		
Rhox4e_Rhox6_Vax2	5.72	Rhox4e Links ▼ Rhox6 Links ▼ Vax2 Links ▼		
Rela_Rel_Nfkb1	5.16	Rela Links ▼ Rel Links ▼ Nfkb1 Links ▼		
E2f7	4.17	E2f7 Links ▼		

Εικόνα 4.13. Απεικόνιση των μοτίβων των μεταγραφικών παραγόντων, τα οποία ευθύνονται για τις μεταβολές της γονιδιακής έκφρασης κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης, όπως προέκυψαν από το πρόγραμμα ανάλυση ρυθμιστικών μοτίβων ISMARA [114].

Στην παραπάνω εικόνα παρατηρείται ότι τα μοτίβα, τα οποία έχουν τον υψηλότερο δείκτη Z (Z-score) και ευθύνονται σε μεγάλο βαθμό για τις αλλαγές της γονιδιακής έκφρασης κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης, είναι εκείνα της οικογένειας των IRFs (Interferon Regulatory Factors) παραγόντων. Οι IRFs είναι μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι επάγονται κατά τη διάρκεια της ανοσολογικής αντι-ιϊκής απόκρισης (χρονικά σημεία 3h, 6h και 9h), ρυθμίζουν τη μεταγραφή των ιντερφερονών και συμμετέχουν στο μονοπάτι σηματοδότησης JAK-STAT [43]. Ακολουθεί το μοτίβο του μεταγραφικού παράγοντα STAT2 (Signal Transducer and Activator of Transcription 2), ο οποίος ενεργοποιείται ως αποτέλεσμα της πρόσδεσης των ιντερφερονών τύπου I ($IFN\alpha/\beta$) σε κατάλληλους υποδοχείς της επιφάνειας των κυττάρων και ρυθμίζει την έκφραση των επαγόμενων γονιδίων. Επομένως, γίνεται κατανοητό ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες IRFs και STAT2 επάγονται κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης και έχουν σημαντικό ρόλο στις μεταβολές της γονιδιακής έκφρασης. Επιπλέον, φαίνεται ότι το μοτίβο πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα SRF (Serum Response Factor) συμμετέχει στις μεταβολές της γονιδιακής έκφρασης μετά την ιϊκή μόλυνση. Ο παράγοντας SRF ρυθμίζει την ενεργοποίηση πολλών άμεσα πρώιμων γονιδίων (π.χ. c-Fos) και συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, της απόπτωσης, της ομοιόστασης, της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης των κυττάρων. Επίσης, έχειδειχθεί ότι ρυθμίζει έμμεσα τη σηματοδότηση της ιντερφερονών τύπου I, επηρεάζοντας την έκφραση των ISGs (Interferon-Stimulated Genes) [115]. Συνεπώς είναι πιθανόν να ευθύνεται για την επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης στα Beta-TC-6 κύτταρα κατά τη διάρκεια της αντι-ιϊκής απόκρισης. Στη συνέχεια, εντοπίζεται το μοτίβο του μεταγραφικού παράγοντα RelA (p65), ο οποίος επειδή ρυθμίζει την ανοσολογική απόκριση έναντι της εισβολής παθογόνων [16, 47], επάγεται κατά τη διάρκεια της αντι-ιϊκής απόκρισης και συμμετέχει στη διαμόρφωση της γονιδιακής έκφρασης κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης των κυττάρων. Επιπρόσθετα, σύμφωνα με το πρόγραμμα ανάλυσης ρυθμιστικών μοτίβων, το μοτίβο του μεταγραφικού παράγοντα E2f7 φαίνεται να ευθύνεται για τις μεταβολές της γονιδιακής έκφρασης. Ο μεταγραφικός παράγοντας E2f7 είναι γνωστό ότι λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής βασικών γονιδίων, που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό, στη διαφοροποίηση, στην απόκριση στις βλάβες του DNA και στην απόπτωση των κυττάρων, καταστέλλοντας την μεταγραφή τους [116]. Επομένως, παρόλο που δεν είναι κατανοητός ο τρόπος με τον οποίον ο μεταγραφικός παράγοντας E2f7 διαμορφώνει τη γονιδιακή έκφραση στη συγκεκριμένη περίπτωση, φαίνεται ότι επάγεται μετά την ιϊκή μόλυνση, καθώς το μοτίβο του εντοπίζεται στους υποκινητές των επαγόμενων γονιδίων.

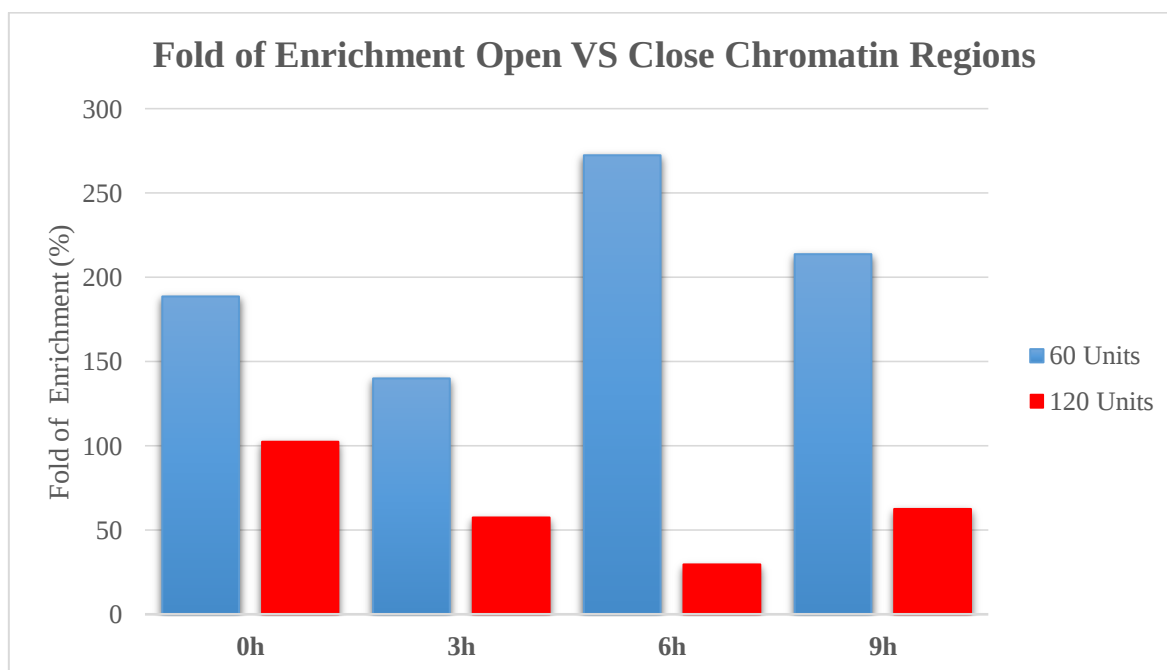
Συμπερασματικά, με τη μεταγραφομική ανάλυση διαλευκάνθηκε το πρότυπο της γονιδιακής έκφρασης και έγινε κατανοητό ότι η πλατφόρμα των β παγκρεατικών κυττάρων ποντικού (Beta-TC-6) αναπτύχθηκε σωστά στο εργαστήριό μας και τα πειράματα αποδεικνύουν πως: 1) μετά την ιϊκή μόλυνση τα κύτταρα διατηρούν το χαρακτήρα τους, εκφράζοντας ειδικά γονίδια δείκτες και όχι γονίδια που εκφράζονται σε άλλους τύπους παγκρεατικών κυττάρων (π.χ. α παγκρεατικά κύτταρα), 2) περίπου 3 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση ξεκινά η αντι-ιϊκή απόκριση, μέσω της ενεργοποίησης και του συντονισμού του προγράμματος γονιδιακής έκφρασης, το οποίο χαρακτηρίζεται από την επαγωγή γονιδίων, όπως *Ifnb*, *Oasl*, *Ccl5*, *Irfs*, *Stats*, *Ifits*, 3) οι μεταγραφικοί παράγοντες, όπως NF-κB, IRFs, STATs, οι οποίοι επάγονται κατά την ανοσολογική αντι-ιϊκή απόκριση, αυξάνουν την έκφρασή τους λιγότερο σε σχέση με τα γονίδια στόχους των μεταγραφικών παραγόντων, τα οποία αυξάνουν της έκφρασής τους περισσότερες φορές, 4) γονίδια, τα οποία είναι γνωστά από τη βιβλιογραφία ότι σχετίζονται με την ανάπτυξη του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1, όπως *H2-Q6*, *H2-Q4*, *H2-T23*, *H2-Q8*, παρουσιάζουν βασικά επίπεδα έκφρασης πριν την ιϊκή μόλυνση, τα οποία αυξάνονται σημαντικά 9 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση. Το γεγονός αυτό είναι πιθανόν να αντικατοπτρίζει την ύπαρξη μιας εκκολαπτόμενης δυνατότητας ανάπτυξης Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1 επιβεβλημένη από ιό, σε περίπτωση όπου συγκεκριμένη γενετική προδιάθεση αλληλεπιδράσει με το περιβαλλοντικό ερέθισμα της ιϊκής μόλυνσης, για παράδειγμα αν βρίσκεται σε κωδική περιοχή κάποιου γονιδίου θα παραχθεί ένα αυξημένο μεταλλαγμένο προϊόν ενώ αν βρίσκεται σε ρυθμιστική περιοχή κάποιου γονιδίου θα παραχθεί σε όχι σωστό επίπεδο. Με βάση τα παραπάνω καθίσταται αναγκαία η επέκταση της μελέτης, μέσω πειραμάτων και ανοσοκατακρήμνισης σε χρωματίνη, για την ανίχνευση ιστονικών τροποποιήσεων, συμπλόκων έναρξης της μεταγραφής και σημαντικών μεταγραφικών παραγόντων κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης, προκειμένου να αποκρυπτογραφηθούν οι πολύπλοκοι μοριακοί μηχανισμοί, που διέπουν την εμφάνιση του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1.

4.2. Μελέτη της προσβασιμότητας των χρωματινικών περιοχών του γονιδιώματος των Beta-TC-6 κυττάρων με τη μέθοδο DNase I Hypersensitivity και βαθιά αλληλούχηση (DNaseI-seq)

Η προσβασιμότητα των χρωματινικών περιοχών του γονιδιώματος (Chromatin accessibility), σε μεταγραφικούς παράγοντες και άλλα μόρια, συμβάλλει στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Είναι γνωστό ότι η ετεροχρωματίνη είναι μεταγραφικά ανενεργή, γεγονός που υπογραμμίζει πως η προσβασιμότητα της χρωματίνης είναι άμεσα συνδεδεμένη με την ενεργότητα της μεταγραφής. Ωστόσο, ένα μεγάλο μέρος της ευχρωματίνης, η οποία περιλαμβάνει περιοχές προσβάσιμες και συνεπώς εκφραζόμενες, καλύπτεται από νουκλεοσώματα, τα οποία συμμετέχουν στη χωροταξική διαμόρφωση της χρωματίνης αλλά και στη γονιδιακή ρύθμιση. Έτσι, τα νουκλεοσώματα καλύπτουν τους υποκινητές γονιδίων, ώστε να παραμείνουν μεταγραφικά ανενεργά, μέχρι να παρουσιαστεί το κατάλληλο ερέθισμα που θα τα ενεργοποιήσει. Επομένως, για την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης είναι απαραίτητη η εύρεση των χρωματινικών περιοχών, οι οποίες στερούνται νουκλεοσωμάτων. Με τη μέθοδο DNaseI-seq (DNase I Hypersensitive Sites sequencing) γίνεται δυνατή η εύρεση των περιοχών της χρωματίνης, οι οποίες είναι ελεύθερες νουκλεοσωμάτων (nucleosome free regions) και συνεπώς έχουν μεγάλη πιθανότητα να αποτελούν ρυθμιστικά στοιχεία [117, 61].

Για τον σκοπό αυτό, αρχικά, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς Beta-TC-6 σε μικρή κλίμακα, δηλαδή σε 6-well plate και ακολούθησε μόλυνση των κυττάρων με ιό Sendai για 0, 3, 6 και 9 ώρες. Έπειτα από τη συλλογή των κυττάρων, πραγματοποιήθηκε λύση με απορρυπαντικό και πέψη του DNA με δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις DNase I (60 Units, 120 Units), σύμφωνα με το πρωτόκολλο της ενότητας 3.10. Ο ποσοτικός έλεγχος της πέψης του DNA έγινε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR), με πολλαπλά ζευγάρια εκκινητών για προσβάσιμες και μη προσβάσιμες περιοχές. Πιο συγκεκριμένα, παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα της Real Time PCR με στόχους το γονίδιο *Afm*, το οποίο λειτουργεί ως αρνητικό control, καθώς αναγνωρίζει μια μη προσβάσιμη περιοχή του γονιδιώματος, και το γονίδιο *Actb*, το οποίο λειτουργεί ως θετικός στόχος. Η κανονικοποίηση των δειγμάτων έγινε με ολικό γενωμικό DNA, το οποίο δεν έχει μολυνθεί με ιό Sendai. Όπως φαίνεται στην εικόνα 4.14, ο εμπλουτισμός των προσβάσιμων περιοχών σε σύγκριση με τις μη

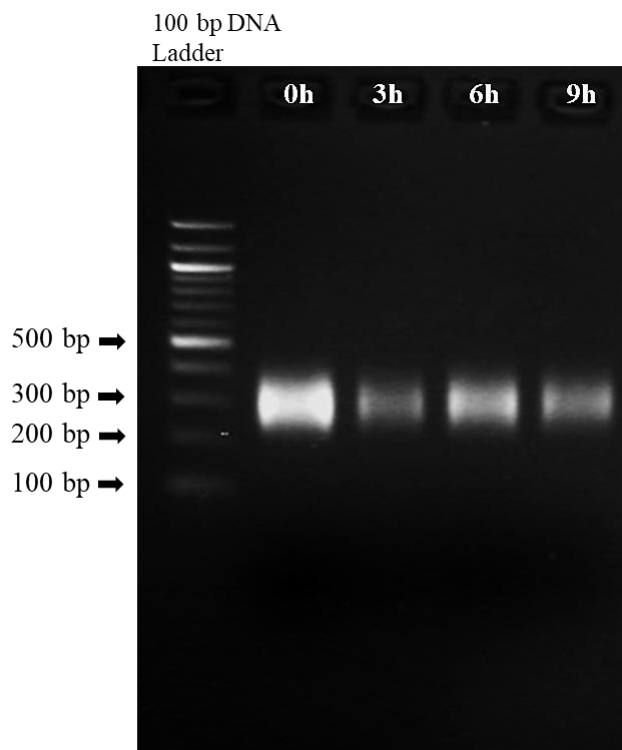
προσβάσιμες περιοχές της χρωματίνης είναι πολύ υψηλός στα 60 Units DNase I, με μέγιστη τιμή εκείνη των 6 ωρών. Αντίθετα, ο εμπλουτισμός στα 120 Units DNase I είναι αρκετά χαμηλός, γεγονός που υποδηλώνει πως έχει χρησιμοποιηθεί μεγάλη συγκέντρωση DNase I, με αποτέλεσμα την εκτεταμένη πέψη του DNA και συνεπώς οι εκκινητές δυσκολεύονται να προσδεθούν στις κατάλληλες θέσεις. Επομένως, η ιδανική συγκέντρωση του ενζύμου DNase I είναι 60 Units.



Εικόνα 4.14. Ποσοτικός έλεγχος ποιότητας (quality control) της πέψης του DNA των Beta-TC-6 κυττάρων με DNase I μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time PCR). Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκε ως θετικός στόχος το γονίδιο της Actb, ενώ ως αρνητικός στόχος για τις μη προσβάσιμες περιοχές, χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο Aftm, το οποίο παρουσιάζει κλειστή χρωματινική διαμόρφωση. Η κανονικοποίηση έγινε με ολικό γενωμικό DNA, το οποίο δεν έχει μολυνθεί με ιό Sendai. Παρατηρείται ότι ο εμπλουτισμός των προσβάσιμων περιοχών σε σύγκριση με τις μη προσβάσιμες περιοχές της χρωματίνης είναι πολύ υψηλός στα 60 Units DNase I. Αντίθετα, ο εμπλουτισμός στα 120 Units DNase I είναι αρκετά χαμηλός, γεγονός που υποδηλώνει πως η καλύτερη συγκέντρωση DNase I είναι εκείνη των 60 Units.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, το πείραμα κρίθηκε επιτυχημένο, ώστε να συνεχιστεί μέσω ανάλυσης με τεχνολογίας βαθιάς αλληλούχησης ευρείας κλίμακας. Έτσι, χρησιμοποιήθηκαν 40 ng απομονωμένου DNA από κάθε χρονικό σημείο (0h, 3h, 6h, 9h), για την κατασκευή γενωμικής βιβλιοθήκης, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της ενότητας 3.5. Το μέγεθος των κλώνων της βιβλιοθήκης θα πρέπει να είναι παρόμοιο. Επομένως, κατά την

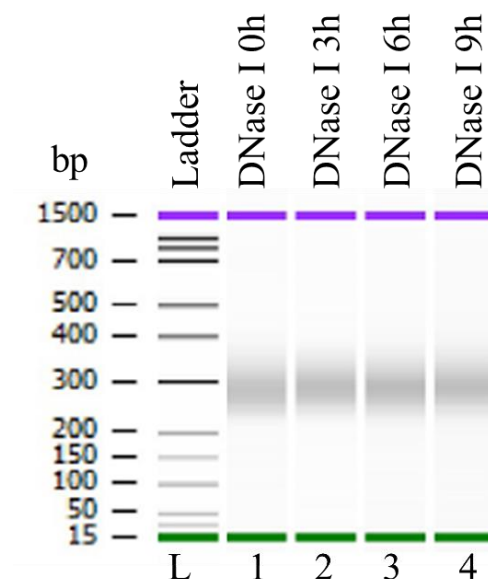
απομόνωση του επιθυμητού μεγέθους από το πήκτωμα αγαρόζης επιλέχθηκαν τα τμήματα με μέγεθος 300-600 ζεύγη βάσεων. Μετά την ολοκλήρωση της κατασκευής των γενωμικών βιβλιοθηκών πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, ώστε να ελεγχθούν τα μεγέθη τους. Όπως φαίνεται στην εικόνα 4.15 οι βιβλιοθήκες έχουν παρόμοιο μέγεθος, το οποίο εντοπίζεται στην περιοχή των 250 bp έως 400 bp.



Εικόνα 4.15. Ηλεκτροφόρηση γενωμικών βιβλιοθηκών απομονωμένου DNA του πειράματος πέψης με το ένζυμο DNase I στην κυτταρική σειρά Beta-TC-6. Παρατηρείται ότι το μέγεθος των βιβλιοθηκών είναι μεταξύ 250 και 400 ζευγών βάσεων.

Στη συνέχεια, οι βιβλιοθήκες αναλύθηκαν ως προς το μοριακό βάρος και την αρτιότητά τους σε μηχάνημα Agilent Bioanalyzer 2100 για το μέγεθός τους (Εικόνα 4.16) και ακολούθησε αλληλούχηση μονού άκρου των 75 ζευγών βάσεων στο μηχάνημα NextSeq 500 του Ελληνικού Κέντρου Γονιδιωμικής του Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α. Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί πως η συγκεκριμένη διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε δύο βιολογικές επαναλήψεις, οι οποίες αποσκοπούν στον ποιοτικό έλεγχο, τον έλεγχο επαναληψιμότητας και ομοιότητας των αποτελεσμάτων, ώστε να είναι εφικτή και ορθή η βιοπληροφορική ανάλυση. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης πραγματοποιήθηκε στη

διαδικτυακή πλατφόρμα βιοπληροφορικής, Usegalaxy (<https://usegalaxy.org>) [90], όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.12.1.



Εικόνα 4.16. Ποιοτική και ποσοτική αξιολόγηση των βιβλιοθηκών της μίας βιολογικής επανάληψης του πειράματος πέψης με το ένζυμο DNase I σε Beta-TC-6 κύτταρα σε μηχανήμα Bioanalyzer, πριν την πραγματοποίηση της αλληλούχησης. Στην εικόνα του Bioanalyzer φαίνονται οι ζώνες που αντιστοιχούν στο μέγεθος της βιβλιοθήκης για κάθε δείγμα.. Το μέγεθος των βιβλιοθηκών είναι μεταξύ 250 και 350 ζευγών βάσεων.

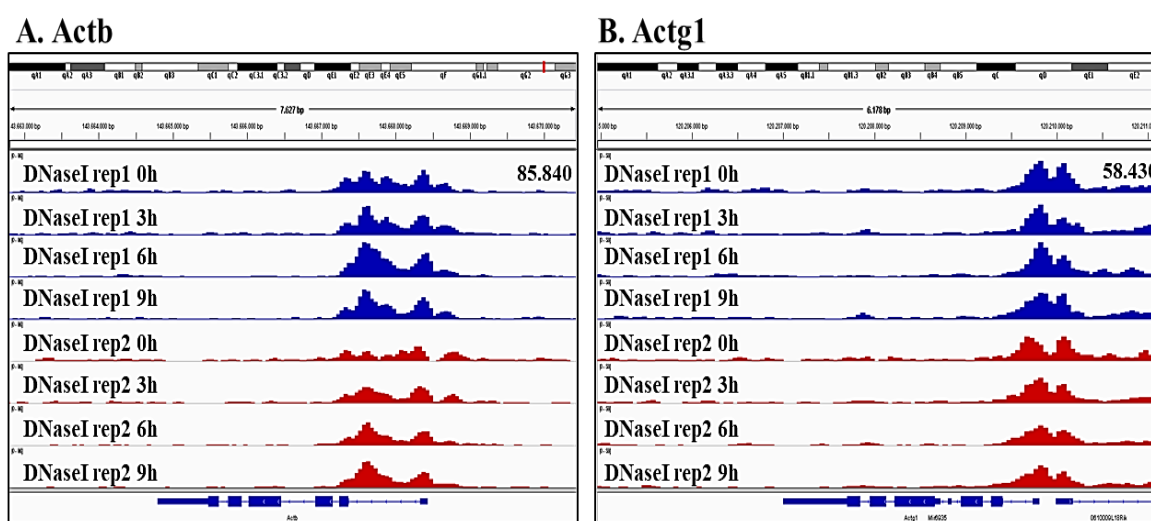
Ύστερα από τον ποιοτικό έλεγχο των reads (fastQC), που προέκυψαν από την αλληλούχηση, ακολούθησε η στοίχιση των εκατομμυρίων reads στο γονιδίωμα του ποντικού (Bowtie2) [84] και η αφαίρεση των πολλαπλών αντιγράφων ενός read (RmDup) [97]. Επίσης, για τον ποιοτικό έλεγχο του πειράματος DNaseI-seq, υπολογίστηκε η βαθμολογία FRiP (Fraction of Reads in Peaks), δηλαδή το κλάσμα των reads που αντιστοιχούν σε peaks και ο μέσος εμπλουτισμός του σήματος κάθε δείγματος σε σύγκριση με την τυχαία κατανομή του σήματος στο γονιδίωμα (Mean Enrichment over Random Distribution) (Πίνακας 4.6).

Πίνακας 4.6. Συνολικός αριθμός των reads, που προέκυψαν από τα πειράματα DNaseI-seq, πριν και μετά τη στοίχιση των αλληλουχιών στο γονιδίωμα αναφοράς, αριθμός των πολλαπλών αντιγράφων (duplicates), κλάσμα των reads που αντιστοιχούν σε peaks (FRiP score) και μέσος εμπλουτισμός του σήματος συγκριτικά με την τυχαία κατανομή (mean enrichment over random distribution).

Datasets	Συνολικός αριθμός reads	Αριθμός στοιχισμένων reads	Αριθμός duplicates	FRiP score	Mean Enrichment over Random Distribution
DNaseI-seq 0h rep 1	23.808.655	23.008.591 (96,64%)	2.506.232 (10,89%)	0,11	16,2908
DNaseI-seq 3h rep 1	24.101.322	23.098.713 (95,84%)	2.880.411 (10,47%)	0,13	17,7799
DNaseI-seq 6h rep 1	26.577.024	24.739.352 (93,09%)	4.346.944 (17,57%)	0,15	20,3356
DNaseI -seq 9h rep 1	24.531.653	23.684.810 (96,55%)	2.849.810 (12,03%)	0,14	19,3372
DNaseI-seq 0h rep 2	28.901.141	28.125.201 (97,32%)	2.026.464 (7,21%)	0,081	15,6867
DNaseI-seq 3h rep 2	21.708.635	20.747.803 (95,57%)	1.796.666 (8,66%)	0,13	21,6078
DNaseI-seq 6h rep 2	28.653.772	27.620.222 (96,39%)	3.105.117 (11,24%)	0,15	18,9734
DNaseI -seq 9h rep 2	25.748.071	24.682.450 (95,86%)	2.855.120 (11,57%)	0,16	22,4443

Ακολούθησε οπτικοποίηση του σήματος που προέρχεται από τις προσβάσιμες χρωματινικές περιοχές (DNaseI-seq) με τον αλγόριθμο bamCoverage [98]. Το σήμα παρουσιάζεται με τη μορφή κορυφών και μπορεί να παρατηρηθεί σε ένα browser, όπως το Integrative Genomics Viewer (IGV). Οι κορυφές αντιστοιχούν στον αριθμό των reads και συνεπώς το ύψος τους είναι ανάλογο του αριθμού των reads.

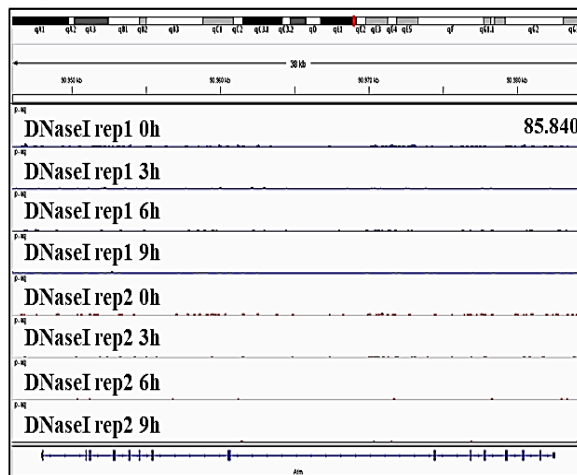
Για τον έλεγχο της ευαισθησίας και της ειδικότητας του πειράματος DNaseI-seq μελετήθηκε η προσβασιμότητα των χρωματινικών περιοχών μεμονωμένων γονιδίων, πριν και κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης. Αρχικά, μελετήθηκαν οι περιοχές των γονιδίων *Actb* και *Actg1*, τα οποία είναι γονίδια κυτταρικής οικονομίας (housekeeping genes) και συνεπώς αναμένεται να είναι προσβάσιμα, ανεξαρτήτως οποιουδήποτε εξωκυττάριου ερεθίσματος [103]. Πράγματι, όπως φαίνεται στην εικόνα 4.17 το σήμα της προσβασιμότητας στους υποκινητές των γονιδίων κυτταρικής οικονομίας εμφανίζεται ισχυρό και σταθερό, τόσο πριν όσο και κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης. Συνεπώς, οι υποκινητές των γονιδίων αυτών στερούνται νουκλεοσωμάτων.



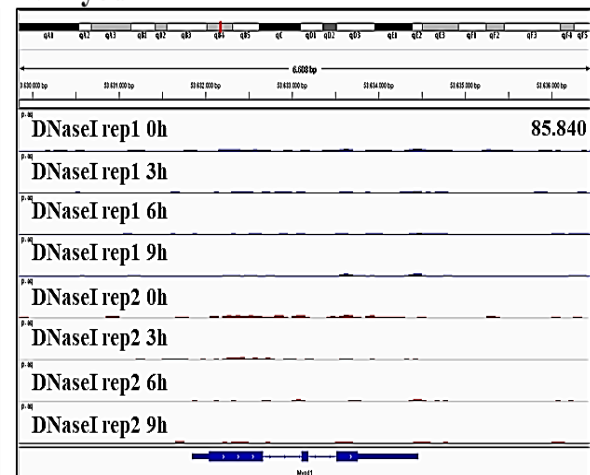
Εικόνα 4.17. Κορυφές του σήματος της προσβασιμότητας των χρωματινικών περιοχών (DNaseI-seq) γονιδίων κυτταρικής οικονομίας (housekeeping genes) στα Beta-TC-6 κύτταρα. Στην εικόνα φαίνεται η προσβασιμότητα της χρωματίνης (DNaseI-seq) γύρω από τους υποκινητές των γονιδίων *Actb* (A) και *Actg1* (B), το οποίο είναι ισχυρό και παραμένει σταθερό πριν και κατά την εξέλιξη της ιϊκής μόλυνσης. Η κλίμακα μεταξύ των τεσσάρων χρονικών σημείων και των δύο βιολογικών επαναλήψεων σε κάθε περίπτωση είναι ίση, για τη σύγκριση.

Αντίθετα, τα γονίδια *Afm* και *Myod1* αποτελούν αρνητικούς στόχους των πειραμάτων, καθώς εντοπίζονται σε περιοχές με κλειστή χρωματινική διαμόρφωση. Συνεπώς, στις περιοχές αυτών των γονιδίων αναμένεται πλήρης απουσία σήματος της προσβασιμότητας. Πράγματι, σύμφωνα με την εικόνα 4.18 δεν υπάρχουν κορυφές στις περιοχές των γονιδίων *Afm* και *Myod1*, τόσο πριν όσο και κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης.

A. Afm

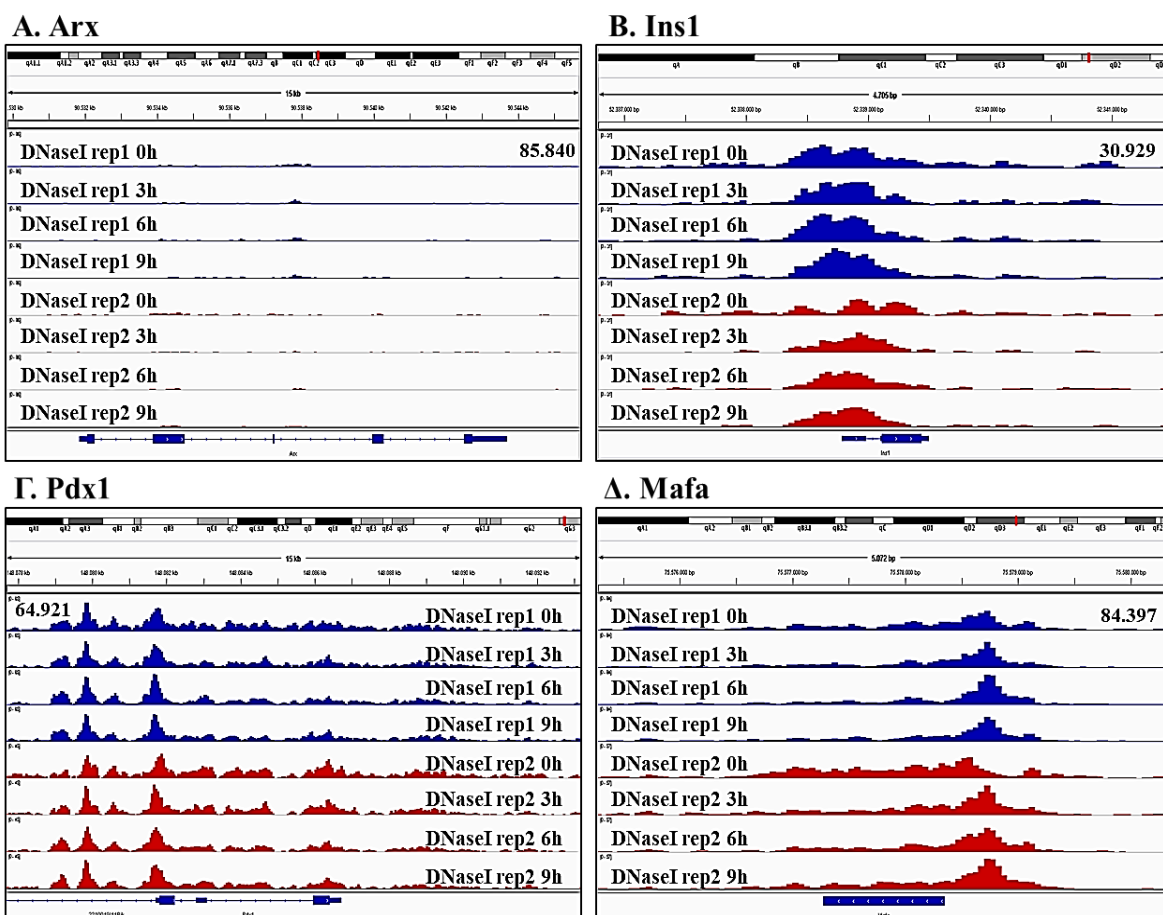


B. Myod1



Εικόνα 4.18. Κορυφές του σήματος της προσβασιμότητας των χρωματινικών περιοχών (DNaseI-seq) των γονιδίων *Afm* (A) και *Myod1* (B) στα *Beta-TC-6* κύτταρα. Στις περιοχές των γονιδίων *Afm* και *Myod1* παρατηρείται πλήρης απουσία σήματος, εφόσον έχουν κλειστή χρωματινική διαμόρφωση. Η κλίμακα μεταξύ των τεσσάρων χρονικών σημείων και των δύο βιολογικών επαναλήψεων σε κάθε περίπτωση είναι ίση, για τη σύγκριση.

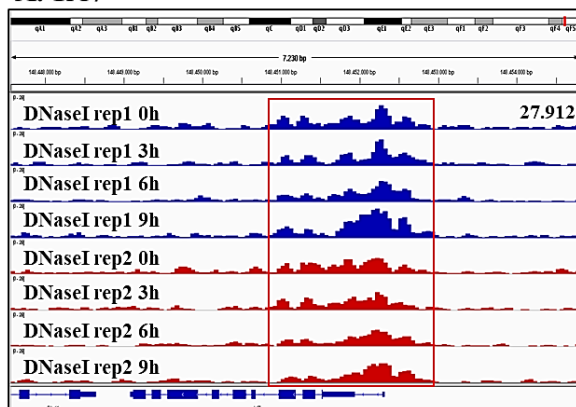
Ακολούθησε η μελέτη της προσβασιμότητας χρωματινικών περιοχών (DNaseI-seq) χαρακτηριστικών γονιδίων των παγκρεατικών κυττάρων, πριν και κατά τη διάρκεια της αντι-ιϊκής απόκρισης. Τα γονίδια που μελετήθηκαν είναι τα: *Arx* (A), *Ins1* (B), *Pdx1* (Γ) και *Maia* (Δ). Όπως αναμένεται οι υποκινητές των γονιδίων *Ins1*, *Pdx1* και *Maia* είναι προσβάσιμοι ανεξαρτήτως της ιϊκής μόλυνσης, καθώς τα γονίδια αυτά είναι απαραίτητα για βασικές λειτουργίες των β παγκρεατικών κυττάρων. Αντίθετα, στον υποκινητή του γονιδίου *Arx* δεν παρατηρείται σήμα, καθώς δεν εκφράζεται στα β παγκρεατικά κύτταρα (Εικόνα 4.19).



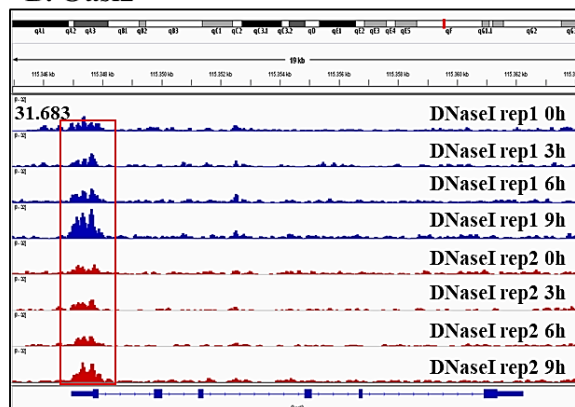
Εικόνα 4.19 . Κορυφές του σήματος της προσβασιμότητας των χρωματινικών περιοχών (DNaseI-seq) χαρακτηριστικών γονιδίων των παγκρεατικών κυττάρων. Το σήμα της προσβασιμότητας της χρωματίνης (DNaseI-seq) στους υποκινητές των γονιδίων *Ins1* (B), *Pdx1* (Γ) και *Mafa* (Δ) είναι ισχυρό και αυξάνεται κατά την εξέλιξη της ιϊκής μόλυνσης, καθώς τα γονίδια είναι απαραίτητα για τα Beta-TC-6 κύτταρα. Αντίθετα, στον υποκινητή του γονιδίου *Arx* (A) παρατηρείται απουσία σήματος εφόσον είναι μη εκφραζόμενο στα β παγκρεατικά κύτταρα. Η κλίμακα μεταξύ των τεσσάρων χρονικών σημείων και των δύο βιολογικών επαναλήψεων σε κάθε περίπτωση είναι ίση, για τη σύγκριση.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η προσβασιμότητα των χρωματινικών περιοχών (DNaseI-seq) στα γονίδια *Irf7*, *Oasl2*, *Ifit1* και *Mx2*, τα οποία είναι κομβικά για την αντι-ϊκή απόκριση. Παρατηρείται ότι και στις τέσσερις περιπτώσεις υπάρχει σήμα στους υποκινητές των γονιδίων πριν την ιϊκή μόλυνση των κυττάρων, το οποίο αυξάνεται κατά τη διάρκεια της μόλυνσης και μεγιστοποιείται στο χρονικό σημείο των 9 ωρών (Εικόνα 4.20). Το γεγονός αυτό είναι σύμφωνο με την αύξηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων αυτών, με στόχο την αντιμετώπιση του ιού.

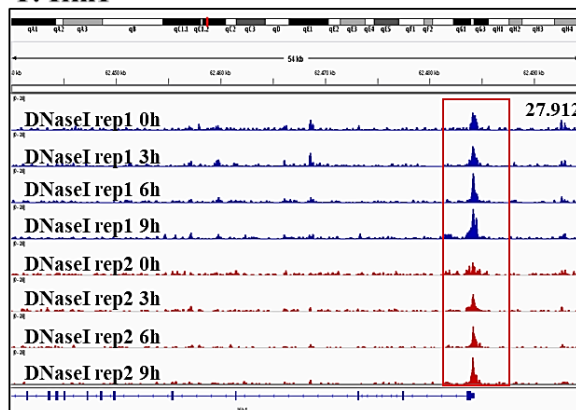
A. Irf7



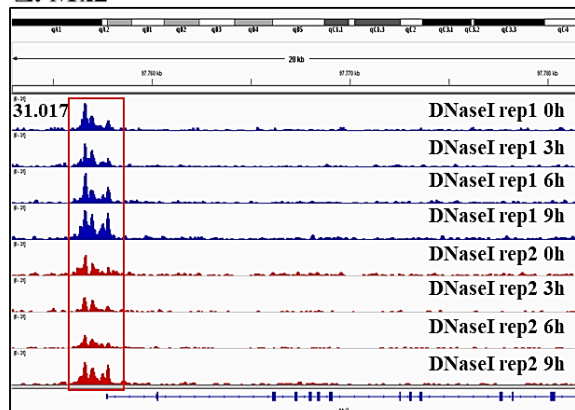
B. Oasl2



Γ. Ifih1



Δ. Mx2

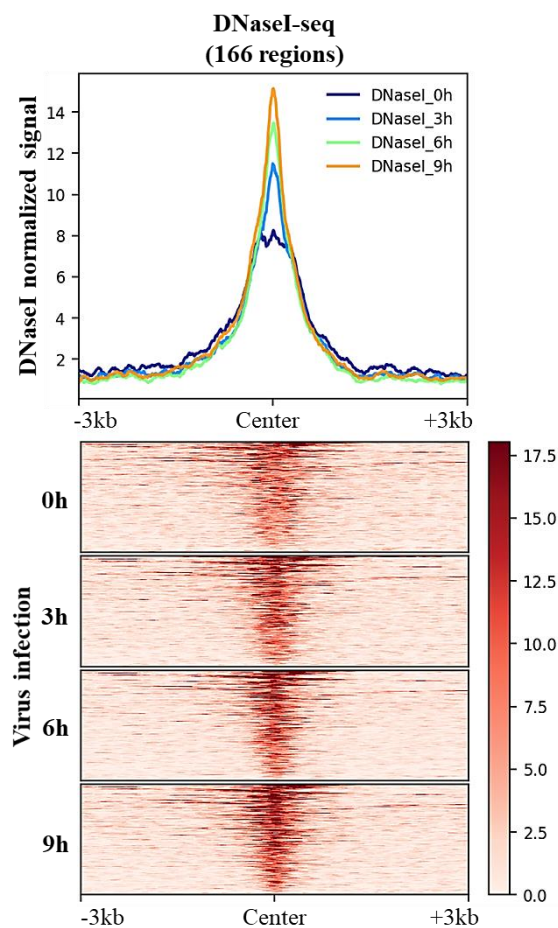


Εικόνα 4.20 . Κορυφές του σήματος της προσβασιμότητας των χρωματινικών περιοχών (DNaseI-seq) των γονιδίων Irf7 (A), Oasl2 (B), Ifih1 (Γ) και Mx2 (Δ). Το σήμα της προσβασιμότητας (DNaseI-seq) στους υποκινητές των γονιδίων είναι χαμηλό πριν την ιϊκή μόλυνση (0h). Στα χρονικά σημεία των 3 (3h) και 6 (6h) ωρών μετά την ιϊκή μόλυνση παρατηρείται αύξηση του σήματος ενώ στο χρονικό σημείο των 9 ωρών (9h) παρατηρούνται μέγιστα επίπεδα προσβασιμότητας. Η κλίμακα μεταξύ των τεσσάρων χρονικών σημείων και των δύο βιολογικών επαναλήψεων σε κάθε περίπτωση είναι ίση, για τη σύγκριση.

Με τη χρήση του αλγορίθμου MACS2 [96, 97], βρέθηκαν οι συντεταγμένες, στις οποίες υπάρχει αυξημένη ένταση σήματος του πειράματος DNaseI-seq. Για την πραγματοποίηση των ποσοτικών αναλύσεων εντοπίστηκαν οι περιοχές, οι οποίες εμφανίζουν διαφορά 2 fold (διαφορικές κορυφές) μεταξύ των χρονικών σημείων των 0 και 9 ωρών, δηλαδή οι επαγόμενες περιοχές με τις μεγαλύτερες ποσοτικές αλλαγές. Σύμφωνα με τα παραπάνω κριτήρια ανακαλύφθηκαν 166 προσβάσιμες περιοχές (DNaseI-seq) 9 ώρες μετά τη μόλυνση. Φαίνεται ότι ο αριθμός των προσβάσιμων περιοχών διατηρείται σταθερός σε μεγάλο ποσοστό, τόσο πριν όσο και μετά τη μόλυνση. Οι περιοχές αυτές κατανέμονται σε ολόκληρο το γονιδίωμα και μπορούν να διαχωριστούν περαιτέρω με βάση την απόστασή

τους από τον υποκινητή του κοντινότερου γονιδίου. Οι περιοχές, οι οποίες απέχουν τουλάχιστον 2 Kb από τους υποκινητές των γονιδίων, χαρακτηρίστηκαν ως TSS-distal DNaseI sites, ενώ οι περιοχές που έχουν απόσταση έως 2 Kb από τον κοντινότερο υποκινητή, ονομάστηκαν TSS-proximal DNaseI sites. Οι 113 περιοχές είναι TSS-distal DNaseI sites. Οι υπόλοιπες 53 περιοχές είναι TSS-proximal DNaseI sites, οι οποίες βρίσκονται σε γονιδιακές συντεταγμένες, που γειτνιάζουν με κομβικά γονίδια της αντι-ϊικής απόκρισης, όπως *Ifit1*, *Ifih1*, *Mx2*, *Irf9* και *Ddx60*.

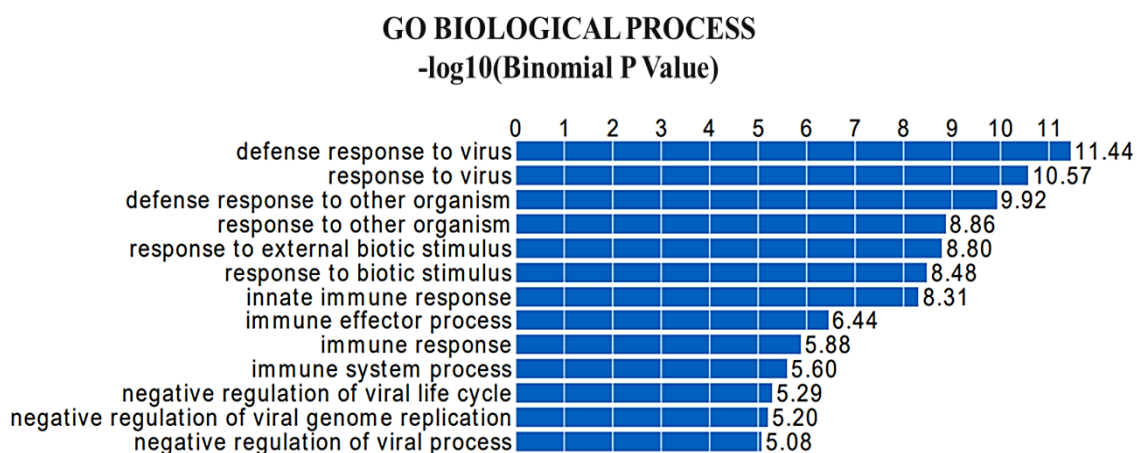
Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανάλυση σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος με μεθόδους βιοπληροφορικής. Για τον σκοπό αυτό έγινε ποσοτική ανάλυση της διασποράς του σήματος (RPKM) των 166 περιοχών επαγόμενης προσβασιμότητας από τον ιό, γύρω από το κέντρο των περιοχών αυτών, δηλαδή γύρω από το κεντρικό σημείο των επαγόμενων κορυφών (peaks) του πειράματος DNaseI-seq, κατά την πρόοδο της ιϊκής μόλυνσης (Εικόνα 4.21). Η μελέτη έγινε ± 3 Kb γύρω από το κεντρικό σημείο των προσβάσιμων χρωματινικών περιοχών (center).



Εικόνα 4.21. Διαγράμματα κατανομής του σήματος (RPKM) που προέρχεται από τις 166 περιοχές επαγόμενης προσβασιμότητας (DNaseI-seq) μετά την ιϊκή μόλυνση, γύρω από το κέντρο των περιοχών αυτών. Στο επάνω μέρος της εικόνας παρατίθεται το aggregation plot, ενώ στο κάτω μέρος το heat map. Η μελέτη έγινε ± 3 Kb σε σχέση με το κεντρικό σημείο των επαγόμενων των επαγόμενων κορυφών του πειράματος DNaseI-seq (center). Παρατηρείται προοδευτική αύξηση της προσβασιμότητας κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης, η οποία μεγιστοποιείται στο χρονικό σημείο των 9 ωρών.

Από τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται ότι ένα μεγάλο ποσοστό των 166 περιοχών είναι προσβάσιμο πριν την ιϊκή μόλυνση, καθώς υπάρχει σήμα στο χρονικό σημείο των 0 ωρών. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της μόλυνσης παρατηρείται προοδευτική αύξηση του σήματος, το οποίο μεγιστοποιείται στο χρονικό σημείο των 9 ωρών (Εικόνα 4.21). Επομένως, οι μεγαλύτερες αλλαγές στην προσβασιμότητα των 166 χρωματινικών περιοχών πραγματοποιούνται στο χρονικό σημείο των 9 ωρών της ιϊκής μόλυνσης. Οι περιοχές χαρακτηρίζονται από αυξημένη προσβασιμότητα κατά την πρόοδο της ιϊκής μόλυνσης.

Με τη χρήση του εργαλείου ClosestBed βρέθηκαν τα κοντινότερα γονίδια των 166 περιοχών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη προσβασιμότητα μετά την ιϊκή μόλυνση. Για την εύρεση των βιολογικών διεργασιών, με τις οποίες σχετίζονται τα 164 γονίδια χρησιμοποιήθηκε ο διαδικτυακός αλγόριθμος GREAT για την πραγματοποίηση ανάλυσης γονιδιακής οντολογίας (GO: Gene Ontology analysis) [99]. Στην εικόνα 4.22 παρατηρείται ότι τα γονίδια, τα οποία γειτνιάζουν με τις χρωματινικές περιοχές, που εμφανίζουν επαγόμενη προσβασιμότητα 9 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση, σχετίζονται με μηχανισμούς άμυνας έναντι της ιϊκής μόλυνσης, με την έμφυτη ανοσολογική απόκριση και με την αρνητική ρύθμιση του κύκλου ζωής του ιού. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την αρτιότητα των συνθηκών πραγματοποίησης των πειραμάτων και την ειδικότητά τους.



Εικόνα 4.22. Απεικόνιση των βιολογικών διεργασιών των 164 γονιδίων τα οποία γειτνιάζουν με τις περιοχές που παρουσιάζουν επαγόμενη προσβασιμότητα (DNaseI-seq) 9 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση. Τα γονίδια εμπλέκονται σε διεργασίες που σχετίζονται με την αντι-ιϊκή απόκριση.

Στη συνέχεια, έγινε σύγκριση της λίστας των 272 ιϊκά επαγόμενων γονιδίων των Beta-TC-6 κυττάρων και της λίστας των 164 γονιδίων, τα οποία γειτνιάζουν με τις περιοχές που εμφανίζουν επαγόμενη προσβασιμότητα (DNaseI-seq), στο χρονικό σημείο των 9 ωρών της ιϊκής μόλυνσης. Το αποτέλεσμα έδειξε την ύπαρξη 28 γονιδίων, τα οποία εμφανίζουν επαγόμενη έκφραση και ταυτόχρονα επαγόμενη προσβασιμότητα στις χρωματινικές περιοχές των υποκινητών τους, 9 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση (Πίνακας 4.7). Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της διαμόρφωσης της γονιδιακής έκφρασης και της προσβασιμότητας των χρωματινικών περιοχών σε μεταγραφικούς παράγοντες και ένζυμα. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι δεν αποκλείεται η ρυθμιστική περιοχή ενός μη

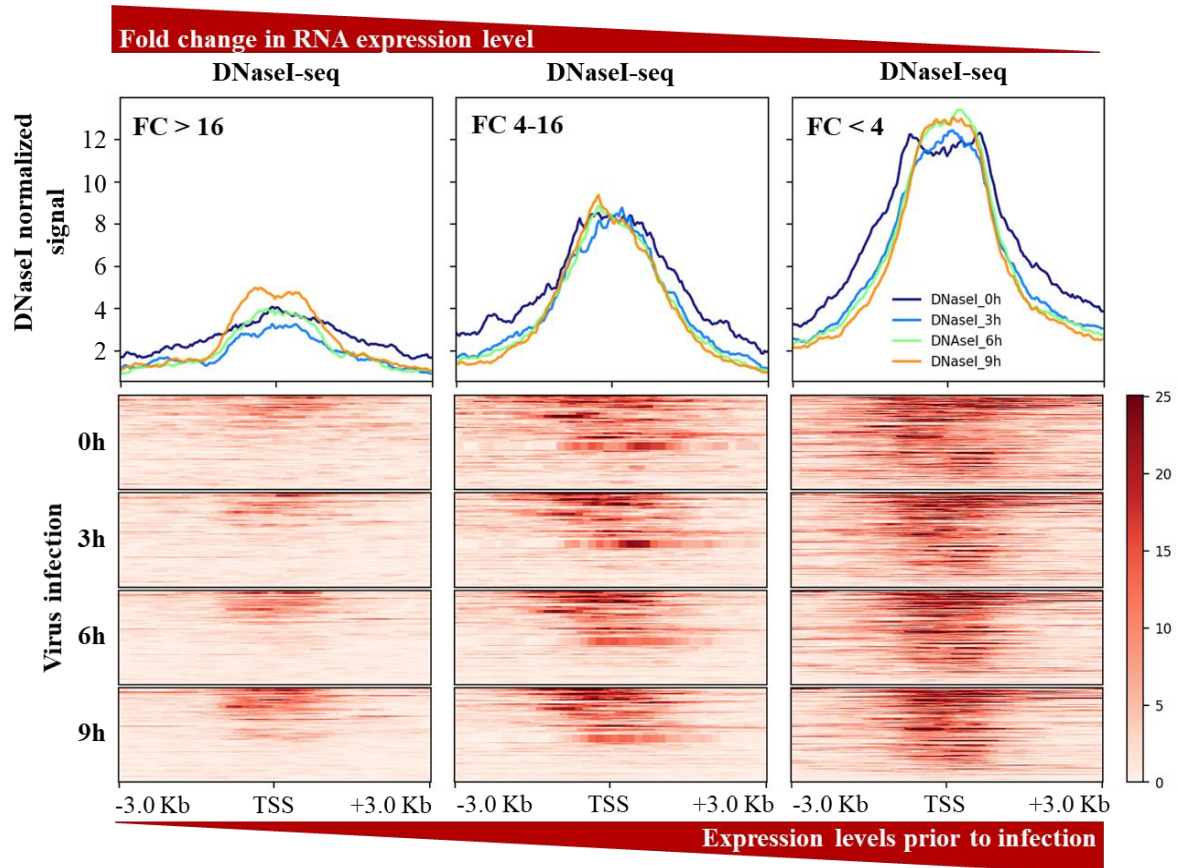
εκφραζόμενου γονιδίου να είναι προσβάσιμη πριν τη μόλυνση και μετά από αυτήν το γονίδιο να ενεργοποιείται, μέσω της στρατολόγησης ενός μεταγραφικού παράγοντα στην περιοχή αυτή. Επιπλέον, θα πρέπει να τονιστεί ότι η προσβασιμότητα είτε προκαθορισμένη είτε επαγόμενη, αυξάνει την πιθανότητα έκφρασης. Όπως παρατηρείται στον πίνακα 4.7., μεταξύ των κοινών γονιδίων που προέκυψαν από τη σύγκριση είναι τα *Ifit1*, *Ddx60*, *Mx2*, *Oasl2*, *Ifih1*, *Irf9* και *Rsad2*, τα οποία έχουν σημαντικό ρόλο κατά την αντι-ϊική απόκριση.

Πίνακας 4.7. Λίστα των 28 ιικά επαγόμενων γονιδίων, τα οποία εμφανίζουν επαγόμενη προσβασιμότητα, ύστερα από ιική μόλυνση. Τα γονίδια αναγράφονται με βάση την ονοματολογία τους στο γονιδίωμα του ποντικού.

Γονίδια με επαγόμενη έκφραση και επαγόμενη προσβασιμότητα μετά την ιική μόλυνση				
<i>Ifit1</i>	<i>Rsad2</i>	<i>Ifih1</i>	<i>Gbp3</i>	<i>Oasl2</i>
<i>Oasl1</i>	<i>Ifit3</i>	<i>Gbp7</i>	<i>Ddx60</i>	<i>Cmpk2</i>
<i>Mx2</i>	<i>Parp14</i>	<i>Dhx58</i>	<i>Irgm2</i>	<i>Zcchc2</i>
<i>Bst2</i>	<i>Irf9</i>	<i>Irf7</i>	<i>Cd274</i>	<i>Lgals9</i>
<i>Parp10</i>	<i>Tor3a</i>	<i>Ifi271l1</i>	<i>Ttc39b</i>	<i>Lmo1</i>
<i>Nfkbia</i>	<i>Slc25a22</i>	<i>Trp53inp1</i>		

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της διασποράς του σήματος (RPKM) των κορυφών (peaks) του πειράματος DNaseI-seq στις τρεις κατηγορίες των ιικά επαγόμενων γονιδίων, όπως διαχωρίστηκαν στην ενότητα 4.1, σύμφωνα με τα επίπεδα επαγωγής της έκφρασής τους (Εικόνα 4.23). Η μελέτη έγινε $\pm$ 3 Kb γύρω από το σημείο έναρξης της μεταγραφής (Transcription Start Site, TSS) των γονιδίων, ύστερα από τη στοίχιση των περιοχών με το υψηλότερο αριθμητικό σήμα κατά φθίνουσα σειρά. Στην πρώτη κατηγορία γονιδίων, τα οποία παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη επαγωγή έκφρασης (fold change > 16), παρατηρούνται χαμηλά επίπεδα προσβασιμότητας γύρω από το σημείο έναρξης της μεταγραφής των ιικά επαγόμενων γονιδίων πριν την ιική μόλυνση, τα οποία αυξάνονται προοδευτικά κατά την εξέλιξη της μόλυνσης ενώ στο χρονικό σημείο των 9 ωρών υπάρχει η μέγιστη συγκέντρωση του σήματος. Στη δεύτερη και τρίτη κατηγορία γονιδίων, στις οποίες συμπεριλήφθηκαν γονίδια με επίπεδο επαγωγής από 4 έως 16 φορές (fold change 4-16) και γονίδια με τη μικρότερη επαγωγή έκφρασης (fold change < 4) αντίστοιχα, φαίνεται ότι υπάρχει έντονη προσβασιμότητα γύρω από τη θέση έναρξης της μεταγραφής των

γονιδίων τόσο πριν όσο και κατά την πρόοδο της ιϊκής μόλυνσης. Επομένως, οι μεγαλύτερες αλλαγές στην προσβασιμότητα των χρωματινικών περιοχών, που περιβάλλουν τα επαγόμενα γονίδια, πραγματοποιούνται στην πρώτη ομάδα γονιδίων, τα οποία εμφανίζουν τη μεγαλύτερη επαγωγή έκφρασης και μόνο το 23,68% αυτών έχει βασικά επίπεδα έκφρασης πριν την ιϊκή μόλυνση.



Εικόνα 4.23. Διαγράμματα κατανομής του σήματος (RPKM) που προέρχεται από το πείραμα DNaseI-seq στις τρεις κατηγορίες των ιϊκά επαγόμενων γονιδίων κατά την πρόοδο της ιϊκής μόλυνσης. Στο επάνω μέρος της εικόνας παρατίθενται τα aggregation plots, ενώ στο κάτω μέρος τα heat maps. Η μελέτη έγινε ± 3 Kb γύρω από το σημείο έναρξης της μεταγραφής των γονιδίων (TSS).

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω αποτελέσματα γίνεται σαφές ότι η προσβασιμότητα των χρωματινικών περιοχών, η οποία έχει βασικό ρόλο στη διαμόρφωση της γονιδιακής έκφρασης των κυττάρων, επάγεται σε μικρό βαθμό κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης. Επιπλέον, φαίνεται ότι οι ρυθμιστικές περιοχές σημαντικών γονιδίων της αντι-ιϊκής απόκρισης στερούνται νουκλεοσωμάτων και συνεπώς είναι προσβάσιμες σε μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι διαμορφώνουν τη γονιδιακή έκφραση. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την ύπαρξη ενός μηχανισμού, ο οποίος στοχεύει συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος.

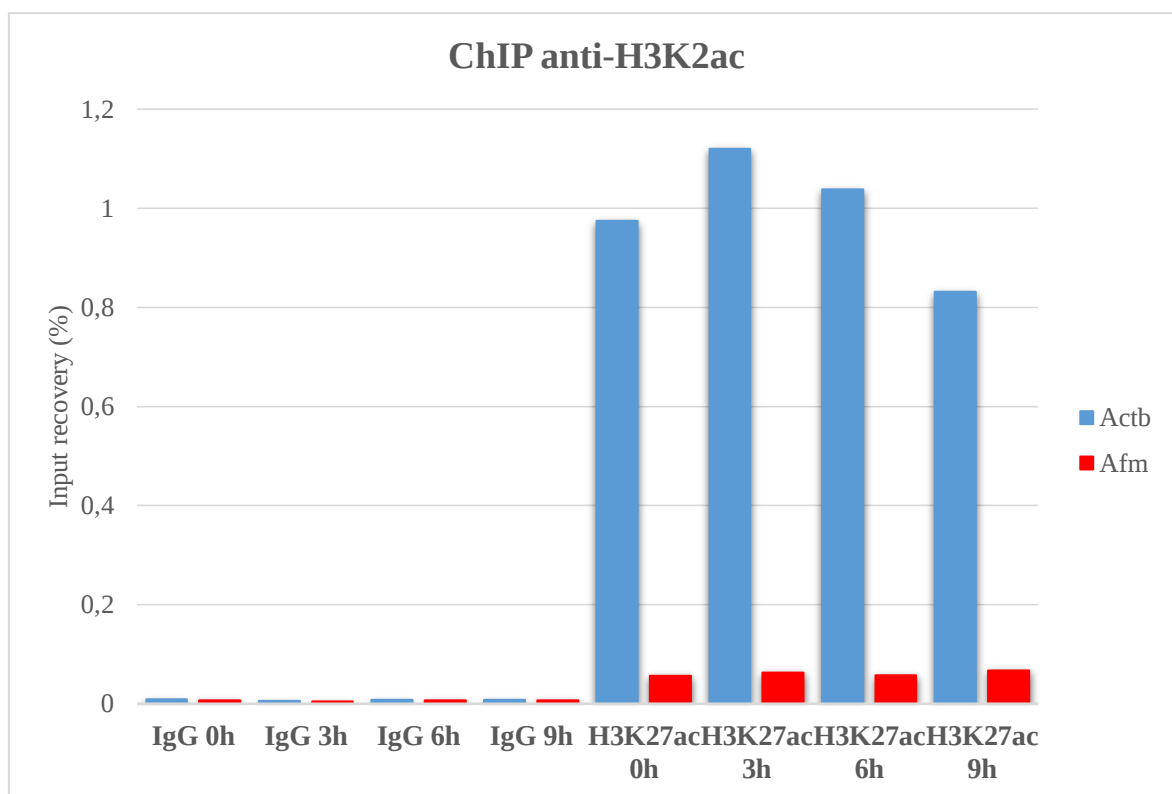
Συμπερασματικά, το πειραματικό μοντέλο των Beta-TC-6 κυττάρων αναπτύχθηκε σωστά στο εργαστήριό μας και σύμφωνα με το πείραμα DNaseI-seq προέκυψαν τα παρακάτω ευρήματα: 1) οι προσβάσιμες χρωματινικές περιοχές του γονιδιώματος των Beta-TC-6 κυττάρων διατηρούνται σε μεγάλο ποσοστό σταθερές μετά την ιϊκή μόλυνση, 2) ταυτοποιήθηκαν 166 περιοχές, οι οποίες εμφανίζουν επαγόμενη προσβασιμότητα μετά τη μόλυνση ενώ πριν την ιϊκή μόλυνση ήταν κλειστές, 3) οι περιοχές αυτές βρίσκονται κοντά σε γονίδια, των οποίων η έκφραση επάγεται μετά τη μόλυνση και σχετίζονται με την αντι-ιϊκή απόκριση, 4) λόγω της απουσίας νουκλεοσωμάτων, οι 166 περιοχές έχουν μεγάλη πιθανότητα να αποτελούν ρυθμιστικά στοιχεία του αντι-ιϊκού προγράμματος γονιδιακής έκφρασης. Επομένως, το πείραμα DNaseI-seq χαρακτηρίζεται από υψηλή ειδικότητα και αρτιότητα.

4.3. Μελέτη της παρουσίας της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac στο γονιδίωμα των Beta-TC-6 κυττάρων μέσω πειράματος ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης με αντίσωμα έναντι της H3K27ac και βαθιά αλληλούχηση (H3K27ac-ChIP-seq)

Οι επιγενετικές τροποποιήσεις συμμετέχουν στη διαμόρφωση της γονιδιακής έκφρασης και για τον λόγο αυτό αποτελούν πεδίο εντατικής ερευνητικής μελέτης. Η ακετυλίωση της λυσίνης 27 της ιστόνης H3 (H3K27ac) σχετίζεται άμεσα με την παρουσία ενεργών ενισχυτών και υποκινητών [18]. Η παρουσία της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac σε νουκλεοσώματα που πλαισιώνουν θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων λειτουργεί ως χαρακτηριστικό για τον διαχωρισμό των ενεργών ενισχυτών από εκείνους που είναι έτοιμοι για ενεργοποίηση (poised for activation). Για τη μελέτη των ενεργών ενισχυτών και υποκινητών των Beta-TC-6 κυττάρων, που φέρουν αυτή την ιστονική τροποποίηση, πραγματοποιήθηκε πείραμα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης με αντίσωμα έναντι της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac, πριν τη μόλυνση με ιό Sendai (0h), καθώς και στα χρονικά σημεία των 3 (3h), 6 (6h) και 9 (9h) ωρών μετά τη μόλυνση. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια σε μεγάλη κλίμακα (150 mm² πιάτα καλλιέργειας κυττάρων) και ακολούθησε μόλυνση των κυττάρων με ιό Sendai (1/10 του όγκου του θρεπτικού υλικού) για 3, 6 και 9 ώρες. Έτσι, προέκυψαν οι εξής καλλιέργειες Beta-TC-6 κυττάρων: 1) μη μολυσμένη (0 ώρες από ιϊκή μόλυνση, 0h), 2) μολυσμένη με ιό για 3 ώρες

(3h), 3) μολυσμένη με ιό για 6 ώρες (6h) και μολυσμένη με ιό για 9 ώρες (9h). Έπειτα, για την πραγματοποίηση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 250 μg χρωματίνης, 2 μg αντισώματος για την ανοσοσφαιρίνη IgG (control) και 2 μg αντισώματος έναντι της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac.

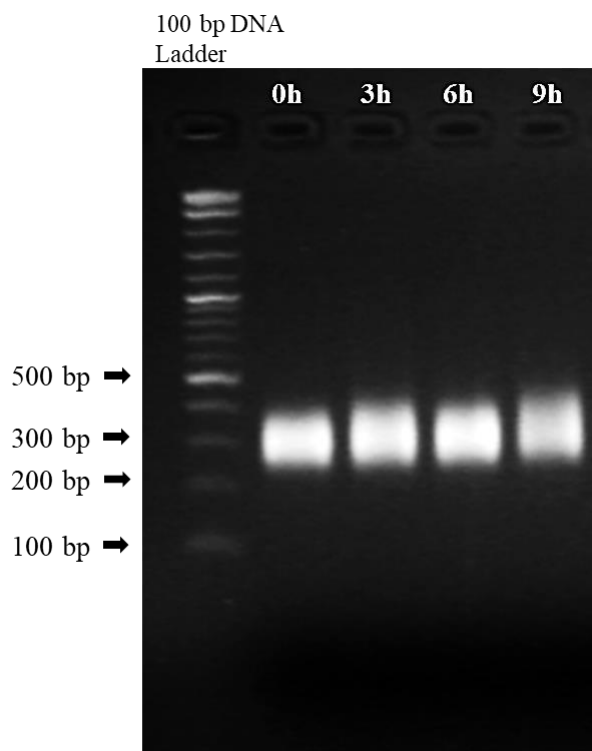
Ύστερα από την ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης και την απομόνωση του DNA, σύμφωνα με την ενότητα 3.4 πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR) για τον έλεγχο της ποιότητας του πειράματος, με πολλαπλά ζευγάρια εκκινητών για κάθε γονίδιο στόχο. Πιο συγκεκριμένα, παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα της Real Time PCR με στόχους το γονίδιο *Afm*, το οποίο λειτουργεί ως αρνητικό control και το γονίδιο *Actb*, το οποίο είναι γονίδιο κυτταρικής οικονομίας (housekeeping gene) και λειτουργεί ως θετικός στόχος. Τα επίπεδα εμπλουτισμού της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac αναμένεται να είναι υψηλά στο γονίδιο *Actb*, καθώς η έκφρασή του παραμένει σταθερή και είναι ανεξάρτητη των εξωκυττάρων ερεθισμάτων και πολύ χαμηλά έως μηδενικά στην κλειστή περιοχή του γονιδίου *Afm*, καθώς δεν έχει μεταγραφική ενεργότητα. Πράγματι, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 4.24 παρατηρηθήκαν υψηλά και σχεδόν σταθερά επίπεδα εμπλουτισμού στο γονίδιο *Actb*, τόσο πριν όσο και μετά τη μόλυνση των κυττάρων. Αντίθετα, το γονίδιο *Afm*, το οποίο βρίσκεται σε περιοχή με κλειστή χρωματινική διαμόρφωση, δε μεταγράφεται στο συγκεκριμένο τύπο κυττάρων και επομένως δεν εμφανίζει σημαντικό εμπλουτισμό. Το αντίσωμα IgG χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της ποιότητας του πειράματος, καθώς το αντίσωμα αυτό δεν έχει ειδικότητα και προσδένεται σε τυχαία μέρη της χρωματίνης. Έτσι, ελέγχεται η ειδικότητα του αντισώματος έναντι της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac. Επομένως, τα χαμηλά επίπεδα εμπλουτισμού στα δείγματα όπου χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα IgG, φανερώνουν την ειδικότητα του πειράματος (Εικόνα 4.24).



Εικόνα 4.24. Διάγραμμα εμπλουτισμού των δειγμάτων από το πείραμα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης σε Beta-TC-6 κύτταρα με αντίσωμα έναντι της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac. Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε ως θετικός στόχος το γονίδιο Actb και ως αρνητικός στόχος το γονίδιο Aftm. Στα αριστερά, παρατηρείται ότι ο εμπλουτισμός των δειγμάτων στις αλληλουχίες που ενισχύουν οι εκκινητές (Actb και Aftm) σε σχέση με τα αντίστοιχα inputs, μετά από ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης με αντίσωμα IgG είναι πολύ χαμηλός -έως μη ανιχνεύσιμος- και δεν εξαρτάται από την ιϊκή μόλυνση. Αντίθετα, στα δεξιά, ο εμπλουτισμός των ίδιων στόχων σε δείγματα, στα οποία έχει χρησιμοποιηθεί αντίσωμα έναντι της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac, είναι πολύ υψηλός για το γονίδιο κυτταρικής οικονομίας Actb (θετικός στόχος) που χρησιμοποιήθηκε ως θετικός στόχος, ενώ στο γονίδιο Aftm (αρνητικός στόχος) παρατηρούνται πολύ χαμηλά επίπεδα εμπλουτισμού.

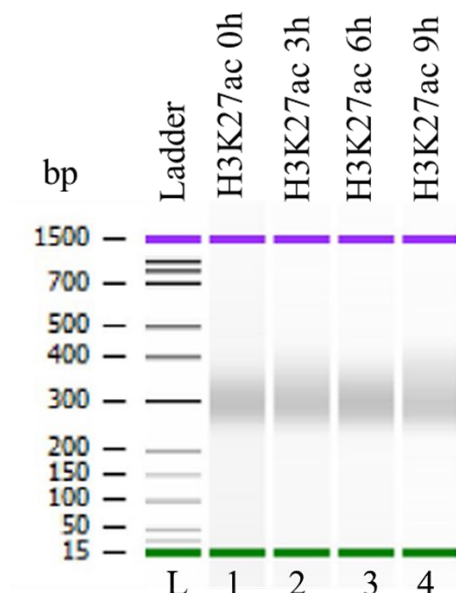
Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, το πείραμα κρίθηκε επιτυχημένο, ώστε να υποστεί αλληλούχηση ευρείας κλίμακας. Έτσι, χρησιμοποιήθηκαν 50 ng απομονωμένου DNA από κάθε χρονικό σημείο (0h, 3h, 6h, 9h), για την κατασκευή γενωμικής βιβλιοθήκης, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της ενότητας 3.5. Το μέγεθος των κλώνων της βιβλιοθήκης θα πρέπει να είναι παρόμοιο. Επομένως, κατά την απομόνωση του επιθυμητού μεγέθους από το πήκτωμα αγαρόζης επιλέχθηκαν τα τμήματα με μέγεθος 300-600 ζεύγη βάσεων. Μετά την ολοκλήρωση της κατασκευής των γενωμικών βιβλιοθηκών πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, ώστε να ελεγχθούν τα μεγέθη

τους. Όπως φαίνεται στην εικόνα 4.25, οι βιβλιοθήκες έχουν παρόμοιο μέγεθος, το οποίο εντοπίζεται στην περιοχή των 250 bp έως 400 bp.



Εικόνα 4.25. Ηλεκτροφόρηση γενωμικών βιβλιοθηκών απομονωμένου DNA του πειράματος ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης με αντίσωμα έναντι της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac στην κυτταρική σειρά Beta-TC-6. Παρατηρείται ότι το μέγεθος των βιβλιοθηκών είναι μεταξύ 250 και 400 ζευγών βάσεων.

Στη συνέχεια, οι βιβλιοθήκες ελέγχθηκαν σε μηχάνημα Agilent Bioanalyzer 2100 για το μέγεθός τους (Εικόνα 4.26) και ακολούθησε αλληλούχηση μονού άκρου των 75 ζευγών βάσεων στο μηχάνημα NextSeq 500 του Ελληνικού Κέντρου Γονιδιωματικής του Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης πραγματοποιήθηκε στη διαδικτυακή πλατφόρμα βιοπληροφορικής, Usegalaxy (<https://usegalaxy.org>) [92], όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.12.1.



Εικόνα 4.26. Ποιοτική και ποσοτική αξιολόγηση των βιβλιοθηκών του πειράματος H3K27ac-ChIP σε Beta-TC-6 κύτταρα σε μηχανήμα Bioanalyzer, πριν την πραγματοποίηση της αλληλούχησης. Στην εικόνα του Bioanalyzer φαίνονται οι ζώνες που αντιστοιχούν στο μέγεθος της βιβλιοθήκης για κάθε δείγμα.. Το μέγεθος των βιβλιοθηκών είναι μεταξύ 250 και 400 ζευγών βάσεων.

Μετά τον ποιοτικό έλεγχο των reads (fastQC), που προέκυψαν από την αλληλούχηση, ακολούθησε η στοίχιση των εκατομμυρίων reads στο γονιδίωμα του ποντικού (Bowtie2) [92] και η αφαίρεση των πολλαπλών αντιγράφων ενός read (RmDup) [95]. Επίσης, για τον ποιοτικό έλεγχο του πειράματος H3K27ac-ChIP-seq, υπολογίστηκε η βαθμολογία FRiP (Fraction of Reads in Peaks), δηλαδή το κλάσμα των reads που αντιστοιχούν σε peaks και ο μέσος εμπλουτισμός του σήματος κάθε δείγματος σε σύγκριση με την τυχαία κατανομή του σήματος στο γονιδίωμα (Mean Enrichment over Random Distribution) (Πίνακας 4.8).

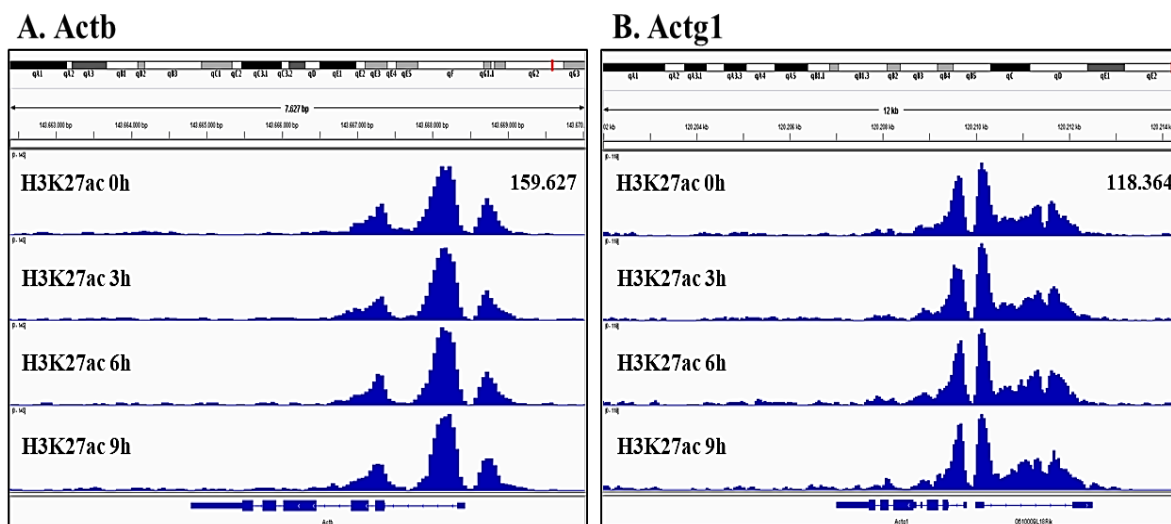
Πίνακας 4.8. Συνολικός αριθμός των reads, που προέκυψαν από το πείραμα H3K27ac-ChIP-seq, πριν και μετά τη στοίχιση των αλληλουχιών στο γονιδίωμα αναφοράς, αριθμός των πολλαπλών αντιγράφων (duplicates), κλάσμα των reads που αντιστοιχούν σε peaks (FRiP score) και μέσος εμπλουτισμός του σήματος συγκριτικά με την τυχαία κατανομή (mean enrichment over random distribution).

Datasets	Συνολικός αριθμός reads	Αριθμός στοιχισμένων reads	Αριθμός duplicates	FRiP score	Mean Enrichment over Random Distribution
H3K27ac-ChIP-seq 0h	28.358.427	27.812.507 (98,07%)	3.616.360 (13,0%)	0,27	25,4509
H3K27ac-ChIP-seq 3h	24.364.531	23.919.430 (98,17%)	2.702.457 (11,30%)	0,25	25,1727
H3K27ac-ChIP-seq 6h	22.167.559	21.735.208 (98,05%)	2.364.731 (10,88%)	0,26	26,6004
H3K27ac-ChIP-seq 9h	20.769.901	20.241.144 (97,45%)	2.019.657 (9,98%)	0,24	25,0168

Ακολούθησε οπτικοποίηση του σήματος που προέρχεται από τις θέσεις, στις οποίες υπάρχει η ιστονική τροποποίηση H3K27ac, με τον αλγόριθμο bamCoverage [98]. Το σήμα παρουσιάζεται με τη μορφή κορυφών και μπορεί να παρατηρηθεί σε ένα browser, όπως το Integrative Genomics Viewer (IGV). Οι κορυφές αντιστοιχούν στον αριθμό των reads και συνεπώς το ύψος τους είναι ανάλογο του αριθμού των reads.

Για τον έλεγχο της ευαισθησίας και της ειδικότητας του πειράματος H3K27ac-ChIP-seq μελετήθηκε το πρότυπο διασποράς της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac, η οποία είναι χαρακτηριστικός δείκτης ενεργών ενισχυτών και υποκινητών, στις χρωματινικές επιφάνειες μεμονωμένων γονιδίων, πριν και κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης. Αρχικά, μελετήθηκαν οι περιοχές των γονιδίων *Actb* και *Actg1*, τα οποία είναι γονίδια κυτταρικής οικονομίας (housekeeping genes) και συνεπώς αναμένεται να εμφανίζουν σταθερό και ισχυρό σήμα, ανεξαρτήτως οποιουδήποτε εξωκυττάριου ερεθίσματος [103]. Πράγματι, όπως φαίνεται στην εικόνα 4.27 το σήμα παρουσίας της ιστονικής τροποποίησης στις

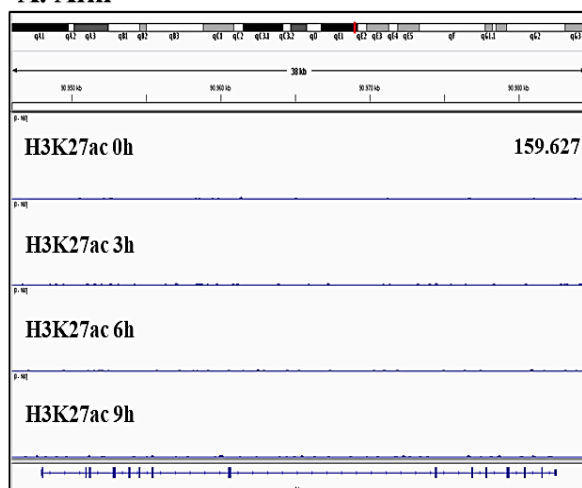
περιοχές γονιδίων κυτταρικής οικονομίας εμφανίζεται ισχυρό και σταθερό, τόσο πριν όσο και κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης.



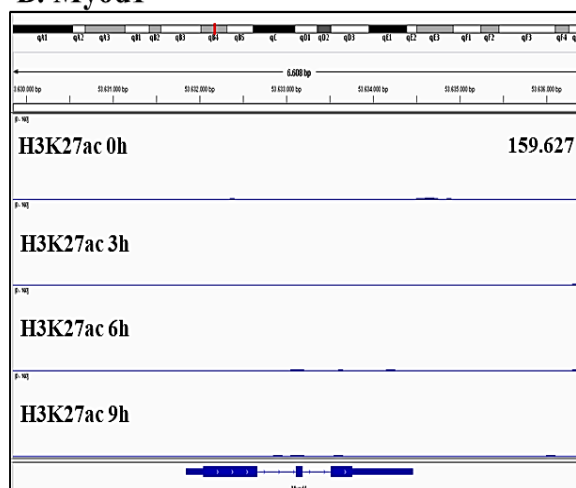
Εικόνα 4.27. Κορυφές του σήματος διασποράς της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac στις περιοχές γονιδίων κυτταρικής οικονομίας (*housekeeping genes*) στα Beta-TC-6 κύτταρα. Στην εικόνα φαίνεται το σήμα της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac γύρω από τους υποκινητές των γονιδίων *Actb* (A) και *Actg1* (B), το οποίο είναι ισχυρό και παραμένει σταθερό πριν και κατά την εξέλιξη της ιϊκής μόλυνσης. Η κλίμακα μεταξύ των τεσσάρων χρονικών σημείων σε κάθε περίπτωση είναι ίση, για τη σύγκριση.

Αντίθετα, τα γονίδια *Afm* και *Myod1* αποτελούν αρνητικούς στόχους των πειραμάτων, καθώς εντοπίζονται σε περιοχές με κλειστή χρωματινική διαμόρφωση και δεν εκφράζονται στο συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο. Συνεπώς, στις περιοχές αυτών των γονιδίων αναμένεται πλήρης απουσία σήματος της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac. Πράγματι, σύμφωνα με την εικόνα 4.28 δεν υπάρχουν κορυφές στις περιοχές των γονιδίων *Afm* και *Myod1*, τόσο πριν όσο και κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης.

A. Afm

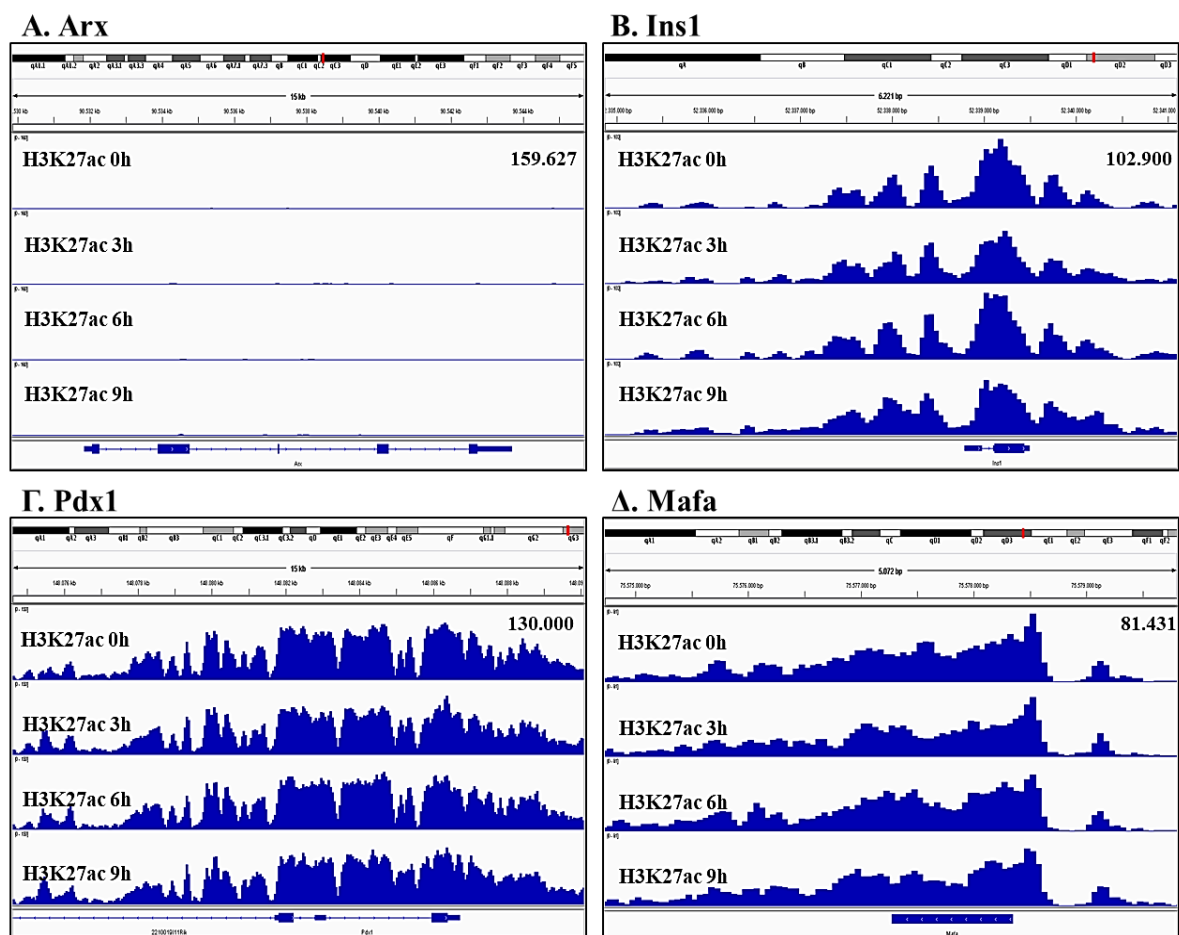


B. Myod1



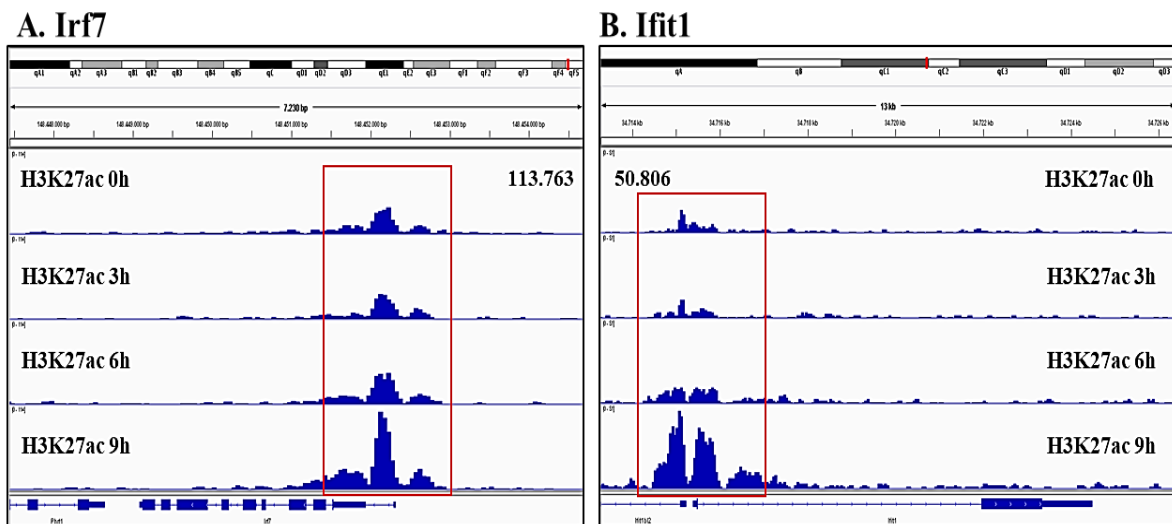
Εικόνα 4.28. Κορυφές του σήματος διασποράς της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac στις περιοχές των γονιδίων *Afm* (A) και *Myod1* (B) στα Beta-TC-6 κύτταρα. Στις περιοχές των γονιδίων *Afm* και *Myod1* παρατηρείται πλήρης απουσία σήματος, εφόσον έχουν κλειστή χρωματινική διαμόρφωση. Η κλίμακα μεταξύ των τεσσάρων χρονικών σημείων σε κάθε περίπτωση είναι ίση, για τη σύγκριση.

Ακολούθησε η μελέτη της κατανομής της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac σε χαρακτηριστικά γονίδια των παγκρεατικών κυττάρων, πριν και κατά τη διάρκεια της αντι-ιϊκής απόκρισης. Τα γονίδια που μελετήθηκαν είναι τα: *Arx* (A), *Ins1* (B), *Pdx1* (Γ) και *Mafa* (Δ). Όπως αναμένεται στα γονίδια *Ins1*, *Pdx1* και *Mafa* εμφανίζεται σταθερό και ισχυρό σήμα της ιστονικής τροποποίησης, ανεξαρτήτως της ιϊκής μόλυνσης, καθώς συμμετέχουν σε βασικές λειτουργίες των β παγκρεατικών κυττάρων. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει πως οι τροποποιήσεις της χρωματίνης έχουν σημαντικό ρόλο στη σωστή έκφραση γονιδίων-δεικτών του συγκεκριμένου κυτταρικού τύπου. Αντίθετα, στο γονίδιο *Arx* δεν παρατηρείται σήμα ύπαρξης της ιστονικής τροποποίησης καθώς δεν εκφράζεται στα β παγκρεατικά κύτταρα (Εικόνα 4.29).



Εικόνα 4.29. Κορυφές του σήματος διασποράς της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac σε χαρακτηριστικά γονίδια των παγκρεατικών κυττάρων. Το σήμα της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac στα γονίδια Ins1 (B), Pdx1 (Γ) και Mafa (Δ) είναι ισχυρό και παραμένει σταθερό πριν και κατά την εξέλιξη της ιϊκής μόλυνσης, καθώς τα γονίδια είναι απαραίτητα για την επιβίωση των Beta-TC-6 κυττάρων. Αντίθετα, στο γονίδιο Arx (A) παρατηρείται απουσία σήματος εφόσον είναι μη εκφραζόμενο στα β παγκρεατικά κύτταρα. Η κλίμακα μεταξύ των τεσσάρων χρονικών σημείων σε κάθε περίπτωση είναι ίση, για τη σύγκριση.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η διασπορά της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac στα γονίδια *Irf7* και *Ifit1*, τα οποία είναι κομβικά για την αντι-ϊκή απόκριση. Παρατηρείται ότι και στις δύο περιπτώσεις υπάρχουν χαμηλά επίπεδα σήματος πριν την ιϊκή μόλυνση των κυττάρων, γεγονός το οποίο είναι αναμενόμενο, καθώς η ενεργοποίηση των γονιδίων αυτών πυροδοτείται από ιϊκές μολύνσεις. Κατά τη διάρκεια της αντι-ϊκής απόκρισης παρατηρείται μικρή αύξηση του σήματος στο χρονικό σημείο των 3 ωρών, ενώ στις 6 ώρες η ένταση του σήματος αυξάνεται περισσότερο. Στο χρονικό σημείο των 9 ωρών της μόλυνσης, παρατηρείται μέγιστο σήμα (Εικόνα 4.30).

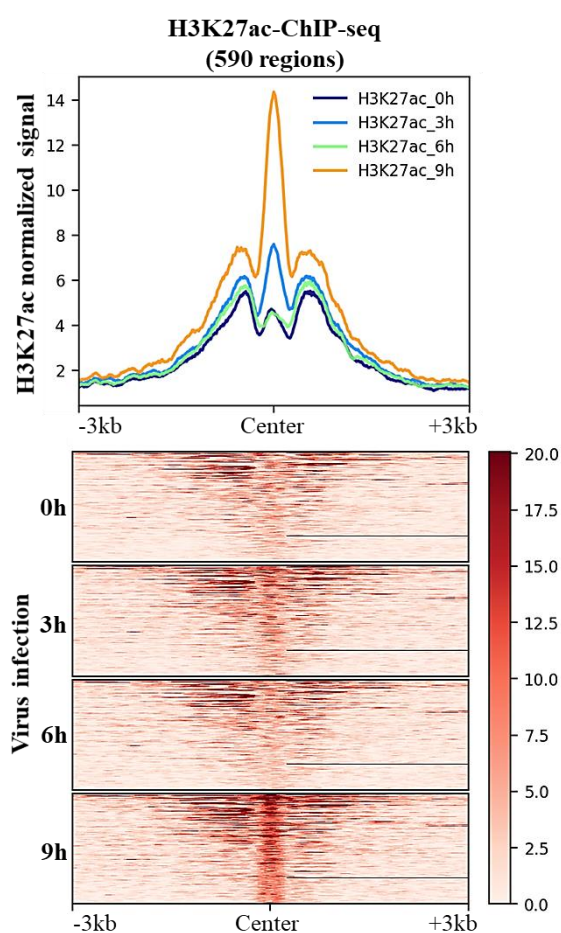


Εικόνα 4.30. Κορυφές του σήματος διασποράς της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac στις περιοχές των γονιδίων *Irf7* (A) και *Ifit1* (B). Το σήμα παρουσίας της ιστονικής τροποποίησης είναι χαμηλό πριν την ιική μόλυνση (0h). Στα χρονικά σημεία των 3 (3h) και 6 (6h) ωρών μετά την ιική μόλυνση παρατηρείται αύξηση του σήματος παρουσίας της H3K27ac στις χρωματινικές επιφάνειες γονιδίων, τα οποία διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην αντιμετώπιση της ιικής μόλυνσης. Στο χρονικό σημείο των 9 ωρών (9h) παρατηρούνται μέγιστα επίπεδα σήματος παρουσίας της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac. Η κλίμακα μεταξύ των τεσσάρων χρονικών σημείων σε κάθε περίπτωση είναι ίση, για τη σύγκριση.

Στη συνέχεια, με τη χρήση του αλγορίθμου MACS2 [96, 97], ο οποίος αναγνώρισε τις εμπλουτισμένες θέσεις του γονιδιώματος σε reads, του πειράματος H3K27ac-ChIP-seq, προέκυψαν οι συντεταγμένες, στις οποίες υπάρχει αυξημένη ένταση του σήματος. Για την πραγματοποίηση των ποσοτικών αναλύσεων εντοπίστηκαν οι περιοχές παρουσίας της ιστονικής τροποποίησης, οι οποίες εμφανίζουν διαφορά 2 fold (διαφορικές κορυφές) μεταξύ των χρονικών σημείων των 0 και 9 ωρών, δηλαδή οι επαγόμενες περιοχές με τις μεγαλύτερες ποσοτικές αλλαγές. Σύμφωνα με τα παραπάνω κριτήρια ανακαλύφθηκαν 590 περιοχές ύπαρξης της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac 9 ώρες μετά τη μόλυνση. Οι περιοχές αυτές κατανέμονται σε ολόκληρο το γονιδίωμα και μπορούν να διαχωριστούν περαιτέρω με βάση την απόστασή τους από τον υποκινητή του κοντινότερου γονιδίου. Οι περιοχές, οι οποίες απέχουν τουλάχιστον 2 Kb από τους υποκινητές των γονιδίων, χαρακτηρίστηκαν ως TSS-distal H3K27ac sites, ενώ οι περιοχές που έχουν απόσταση έως 2 Kb από τον κοντινότερο υποκινητή, ονομάστηκαν TSS-proximal H3K27ac sites. Οι 506 περιοχές είναι TSS-distal H3K27ac sites. Οι υπόλοιπες 84 περιοχές είναι TSS-proximal H3K27ac sites, οι οποίες

βρίσκονται σε γονιδιακές συντεταγμένες, που γειτνιάζουν με κομβικά γονίδια της αντι-ϊικής απόκρισης, όπως *Oasl2*, *Ifit1*, *Ifih1*, *Mx2*, *Irf9* και *Ddx60*.

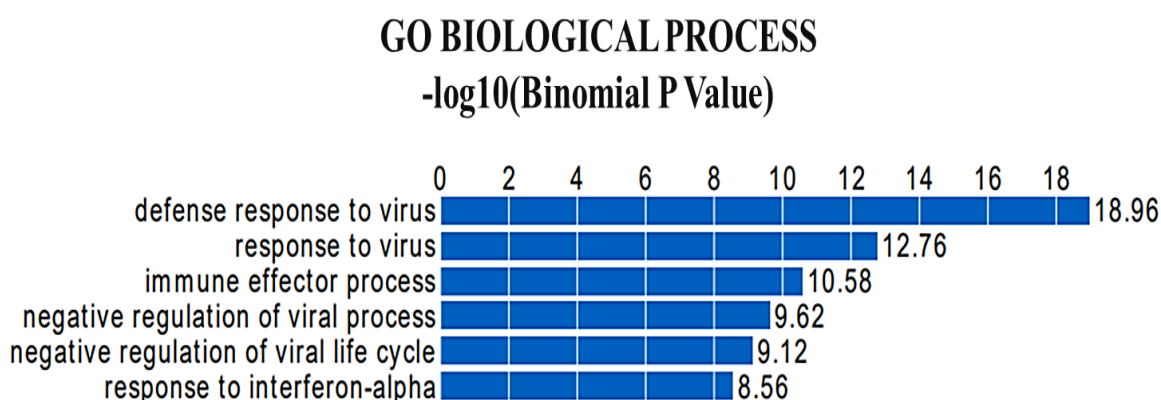
Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανάλυση σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος με μεθόδους βιοπληροφορικής. Για τον σκοπό αυτό έγινε ποσοτική μελέτη της διασποράς του σήματος (RPKM) των 590 περιοχών επαγόμενης από τον ιό παρουσίας της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac, γύρω από το κέντρο των περιοχών αυτών, δηλαδή γύρω από το κεντρικό σημείο των επαγόμενων κορυφών (peaks) του πειράματος H3K27ac-ChIP-seq, κατά την πρόοδο της ιϊκής μόλυνσης (Εικόνα 4.31). Η μελέτη έγινε ± 3 Kb γύρω από το κεντρικό σημείο παρουσίας της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac (center).



Εικόνα 4.31. Διαγράμματα κατανομής του σήματος (RPKM) που προέρχεται από τις 590 περιοχές επαγόμενης παρουσίας της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac μετά την ιϊκή μόλυνση, γύρω από το κέντρο των περιοχών αυτών. Στο επάνω μέρος της εικόνας παρατίθεται το aggregation plot, ενώ στο κάτω μέρος το heat map. Η μελέτη έγινε ± 3 Kb σε σχέση με το κεντρικό σημείο παρουσίας της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac (center). Παρατηρείται μικρή αύξηση της συγκέντρωσης του σήματος στις 3 και 6 ώρες, το οποίο μεγιστοποιείται στις 9 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση.

Από τα παραπάνω διαγράμματα γίνεται κατανοητό ότι πριν την ιϊκή μόλυνση, δηλαδή στο χρονικό σημείο των 0 ωρών, τα επίπεδα του σήματος της παρουσίας της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac στις 590 επαγόμενες περιοχές είναι χαμηλά. Κατά τη διάρκεια της μόλυνσης παρατηρείται μικρή αύξηση του σήματος, το οποίο μεγιστοποιείται 9 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση (Εικόνα 4.31). Επομένως, οι μεγαλύτερες αλλαγές στην παρουσία της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac στις 590 επαγόμενες περιοχές πραγματοποιούνται στο χρονικό σημείο των 9 ωρών της ιϊκής μόλυνσης. Ως επί το πλείστον, το σήμα εντοπίζεται γύρω από το κεντρικό σημείο των επαγόμενων κορυφών (peaks) του πειράματος H3K27ac-ChIP-seq, ενώ μικρότερο ποσοστό κατανέμεται σε απόσταση έως $\pm$ 1 Kb από το κέντρο (center).

Με τη βοήθεια του εργαλείου ClosestBed βρέθηκαν τα κοντινότερα γονίδια των 590 περιοχών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη παρουσία της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac, μετά την ιϊκή μόλυνση. Για την εύρεση των βιολογικών διεργασιών, με τις οποίες σχετίζονται τα 522 γονίδια χρησιμοποιήθηκε ο διαδικτυακός αλγόριθμος GREAT για την πραγματοποίηση ανάλυσης γονιδιακής οντολογίας (GO: Gene Ontology analysis) [99]. Στην εικόνα 4.32 παρατηρείται ότι τα γονίδια, τα οποία γειτνιάζουν στις περιοχές επαγόμενης παρουσίας της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac, σχετίζονται με μηχανισμούς άμυνας έναντι της ιϊκής μόλυνσης, με την αρνητική ρύθμιση του κύκλου ζωής του ιού και με την απόκριση στις ιντερφερόνες α . Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την αρτιότητα των συνθηκών πραγματοποίησης του πειράματος και την ειδικότητά του.



Εικόνα 4.32. Απεικόνιση των βιολογικών διεργασιών των 522 γονιδίων τα οποία γειτνιάζουν με τις περιοχές που παρουσιάζουν επαγόμενη παρουσία της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac 9 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση. Τα γονίδια εμπλέκονται σε διεργασίες που σχετίζονται με την αντι-ιϊκή απόκριση.

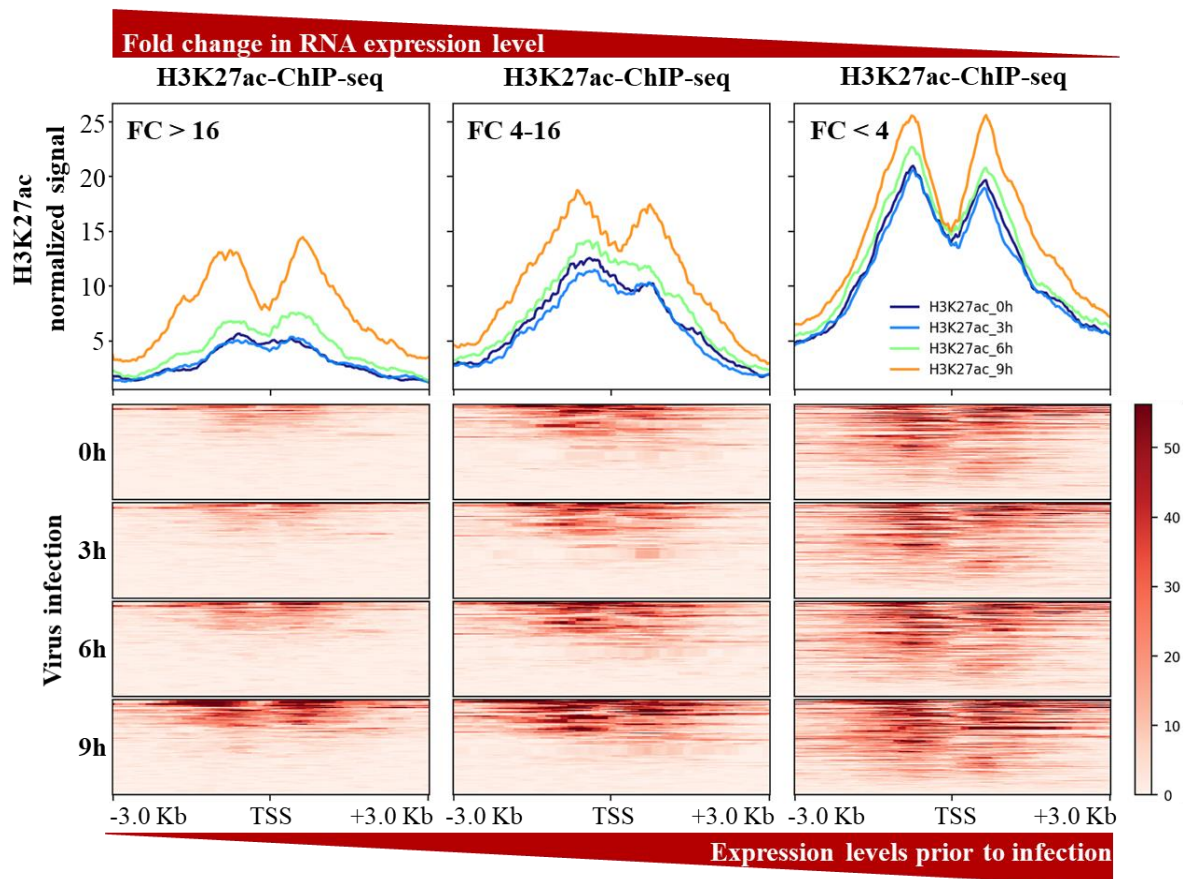
Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε σύγκριση της λίστας των 272 ιικά επαγόμενων γονιδίων των Beta-TC-6 κυττάρων και της λίστας των 522 γονιδίων, τα οποία γειτνιάζουν με τις περιοχές που εμφανίζουν επαγόμενη παρουσία της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac, στο χρονικό σημείο των 9 ωρών της ιικής μόλυνσης. Το αποτέλεσμα έδειξε την ύπαρξη 43 γονιδίων, τα οποία εμφανίζουν επαγόμενη έκφραση και επαγόμενη παρουσία της ιστονικής τροποποίησης H2K27ac, 9 ώρες μετά την ιική μόλυνση (Πίνακας 4.9). Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι η επαγωγή των γονιδίων είναι στενά συνδεδεμένη με επιγενετικές τροποποιήσεις σε χρωματινικές επιφάνειες ρυθμιστικών στοιχείων. Όπως παρατηρείται στον πίνακα 4.9, μεταξύ των κοινών γονιδίων που προέκυψαν από τη σύγκριση είναι τα *Ddx58*, *Mx2*, *Oasl2*, *Ifit1*, *Ifih1*, *Irf9*, *Stat2* και *Rsad2*, τα οποία έχουν σημαντικό ρόλο κατά την αντι-ιική απόκριση.

Πίνακας 4.9. Λίστα των 43 ιικά επαγόμενων γονιδίων, τα οποία εμφανίζουν επαγόμενη παρουσία της ιστονικής τροποποίησης H2K27ac, ύστερα από ιική μόλυνση. Τα γονίδια αναγράφονται με βάση την ονοματολογία τους στο γονιδίωμα του ποντικού.

Γονίδια με επαγόμενη έκφραση και επαγόμενη παρουσία της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac μετά την ιική μόλυνση				
<i>Mitd1</i>	<i>Pik3ip1</i>	<i>Gm5796</i>	<i>Adamts6</i>	<i>Irf9</i>
<i>Sp100</i>	<i>Xaf1</i>	<i>Ifi271l</i>	<i>Rsad2</i>	<i>Myo10</i>
<i>Zcchc2</i>	<i>Rtp4</i>	<i>Parp14</i>	<i>Psmb9</i>	<i>Mx2</i>
<i>Dcp2</i>	<i>Cd274</i>	<i>Ifit3</i>	<i>Ifit1</i>	<i>Ifih1</i>
<i>Eif2ak2</i>	<i>Adar</i>	<i>Gbp7</i>	<i>Gbp3</i>	<i>Ddx58</i>
<i>Psmb8</i>	<i>Oasl2</i>	<i>Klf4</i>	<i>Trim21</i>	<i>Ttc39b</i>
<i>Cxcl10</i>	<i>Oas3</i>	<i>Oas1g</i>	<i>Oas1a</i>	<i>Zc3hav1</i>
<i>Clec2d</i>	<i>Tlr3</i>	<i>Ddx60</i>	<i>Bst2</i>	<i>9330175E14Rik</i>
<i>Il15</i>	<i>Pml</i>	<i>Parp3</i>		

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της διασποράς του σήματος (RPKM) των κορυφών (peaks) του πειράματος H3K27ac-ChIP-seq στις τρεις κατηγορίες των ιικά επαγόμενων γονιδίων, όπως διαχωρίστηκαν στην ενότητα 4.1, σύμφωνα με τα επίπεδα επαγωγής της έκφρασής τους (Εικόνα 4.33). Η μελέτη έγινε $\pm$ 3 Kb γύρω από το σημείο έναρξης της μεταγραφής (Transcription Start Site, TSS) των γονιδίων, ύστερα από τη στοίχιση των περιοχών με το υψηλότερο αριθμητικό σήμα κατά φθίνουσα σειρά. Από την

παρακάτω εικόνα, η οποία παρουσιάζει την κατανομή του δείκτη ενεργών ενισχυτών και υποκινητών, γύρω από τους χρωματινικούς τόπους που περιβάλλουν τα ιϊκά επαγόμενα γονίδια, παρατηρείται ότι και στις τρεις κατηγορίες γονιδίων, παρακείμενα του σημείου έναρξης της μεταγραφής (TSS), υπάρχει αυξημένη παρουσία της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac στο χρονικό σημείο των 9 ωρών μετά την ιϊκή μόλυνση, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα χρονικά σημεία. Αντίθετα, δεν υπάρχει μεγάλη ένταση στο κέντρο, καθώς οι περιοχές αυτές είναι ελεύθερες από νουκλεοσώματα. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη καλής ποιότητας του πειράματος. Πιο συγκεκριμένα, στην πρώτη κατηγορία γονιδίων, τα οποία παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη επαγωγή έκφρασης (fold change > 16), παρατηρείται απουσία σήματος της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac πριν την ιϊκή μόλυνση, ενώ 9 ώρες μετά υπάρχει έντονη συγκέντρωση του σήματος, γύρω από το σημείο έναρξης της μεταγραφής των γονιδίων. Στη δεύτερη κατηγορία γονιδίων, στην οποία συμπεριλήφθηκαν γονίδια με επίπεδο επαγωγής από 4 έως 16 φορές (fold change 4-16), υπάρχει χαμηλό σήμα της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac πριν την ιϊκή μόλυνση, το οποίο μεγιστοποιείται στο χρονικό σημείο των 9 ωρών. Στην τρίτη κατηγορία γονιδίων, τα οποία παρουσιάζουν τη μικρότερη επαγωγή έκφρασης (fold change < 4), φαίνεται πως υπάρχει έντονη συγκέντρωση της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac πριν την ιϊκή μόλυνση, η οποία αυξάνεται με την πάροδο της μόλυνσης (Εικόνα 4.33). Επομένως, οι μεγαλύτερες αλλαγές της κατανομής της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac πραγματοποιούνται στην πρώτη ομάδα γονιδίων, τα οποία εμφανίζουν τη μεγαλύτερη επαγωγή έκφρασης και μόνο το 23,68% αυτών έχει βασικά επίπεδα έκφρασης πριν την ιϊκή μόλυνση. Το γεγονός αυτό συμβαδίζει με την προσβασιμότητα των χρωματινικών περιοχών, που γειτνιάζουν με τα ιϊκά επαγόμενα γονίδια, κατά την εξέλιξη της μόλυνσης.



Εικόνα 4.33. Διαγράμματα κατανομής του σήματος (RPKM) που προέρχεται από το πείραμα H3K27ac-ChIP-seq στις τρεις κατηγορίες των ιικά επαγόμενων γονιδίων κατά την πρόοδο της ιικής μόλυνσης. Στο επάνω μέρος της εικόνας παρατίθενται τα aggregation plots, ενώ στο κάτω μέρος τα heat maps. Η μελέτη έγινε ± 3 Kb γύρω από το σημείο έναρξης της μεταγραφής των γονιδίων (TSS).

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω αποτελέσματα γίνεται σαφές ότι η παρουσία της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac, η οποία αποτελεί βασικό δείκτη ενεργών ενισχυτών και υποκινητών, στο γονιδίωμα των Beta-TC-6 κυττάρων επάγεται κατά τη διάρκεια της ιικής μόλυνσης. Επιπλέον, η ιστονική τροποποίηση H3K27ac εντοπίζεται σε ρυθμιστικές περιοχές γονιδίων, τα οποία συμμετέχουν στην αντι-ϊκή απόκριση. Επομένως, το πείραμα H3K27ac-ChIP-seq χαρακτηρίζεται από υψηλή ειδικότητα και αρτιότητα. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την ύπαρξη ενός μηχανισμού, ο οποίος στοχεύει συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος και περιλαμβάνει την προσθήκη αυτού του επιγενετικού σήματος. Συμπερασματικά, το πειραματικό μοντέλο των Beta-TC-6 κυττάρων αναπτύχθηκε σωστά στο εργαστήριό μας και σύμφωνα με το πείραμα H3K27ac-ChIP-seq προέκυψαν τα παρακάτω ευρήματα: 1) ταυτοποιήθηκαν 590 περιοχές, οι οποίες εμφανίζουν επαγόμενη παρουσία της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac μετά την ιική μόλυνση, 2) οι περιοχές αυτές βρίσκονται κοντά σε γονίδια, των οποίων η έκφραση επάγεται μετά τη μόλυνση και

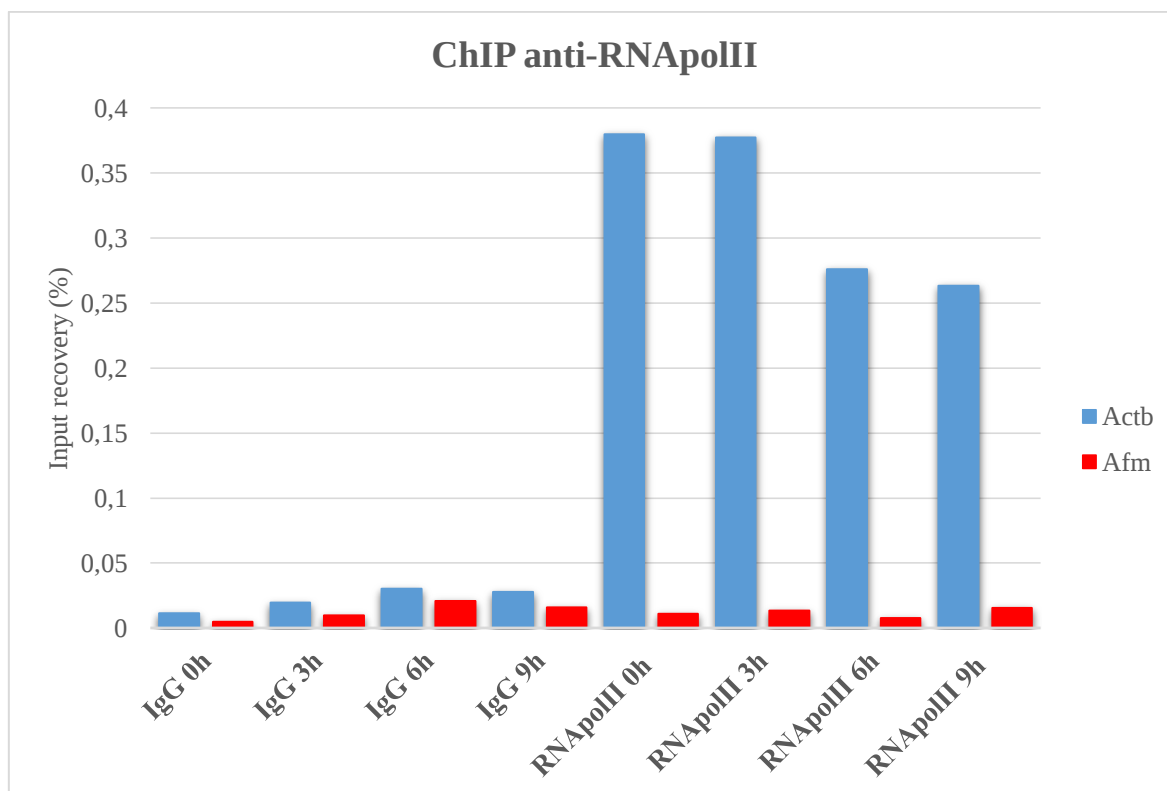
σχετίζονται με την αντι-ϊική απόκριση, 3) λόγω της παρουσίας της επιγενετικής τροποποίησης, οι 590 περιοχές έχουν μεγάλη πιθανότητα να λειτουργούν ως ενισχυτές ή υποκινητές. Επομένως, το πείραμα H3K27ac-ChIP-seq χαρακτηρίζεται από υψηλή ειδικότητα και αρτιότητα.

4.4. Μελέτη της πρόσδεσης του ενζύμου RNA Polymerase II στο γονιδίωμα των Beta-TC-6 κυττάρων μέσω πειράματος ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης με αντίσωμα έναντι της RNA Polymerase II και βαθιά αλληλούχηση (RNAPolII-ChIP-seq)

Είναι γνωστό ότι σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς τα γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II (RNAPolII), η οποία στρατολογείται στους υποκινητές των γονιδίων, με τον βάση το άριστα μελετημένο μηχανισμό της ενεργοποίησης μέσω στρατολόγηση (activation by recruitment) [118]. Η παρουσία της μεταγραφικής μηχανής αποτελεί δείκτη έκφρασης γονιδίων, μέσω της διαδικασίας της μεταγραφής. Για τη μελέτη της στρατολόγησης της RNA πολυμεράσης II στο γονιδίωμα των Beta-TC-6 κυττάρων, πραγματοποιήθηκε πείραμα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης με αντίσωμα έναντι του ενζύμου RNA πολυμεράση II, πριν τη μόλυνση με ιό Sendai (0h) καθώς και στα χρονικά σημεία των 3 (3h), 6 (6h) και 9 (9h) ωρών μετά τη μόλυνση. Ύστερα από την καλλιέργεια των Beta-TC-6 κυττάρων σε μεγάλη κλίμακα (150 mm² πιάτα καλλιέργειας κυττάρων) ακολούθησε μόλυνση με ιό Sendai (1/10 του όγκου του θρεπτικού υλικού) για 3, 6 και 9 ώρες. Έπειτα, για την πραγματοποίηση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 500 μg χρωματίνης, 2 μg αντισώματος για την ανοσοσφαιρίνη IgG (control) και 8 μg αντισώματος έναντι της RNA πολυμεράσης II.

Μετά την ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης και την απομόνωση του DNA, σύμφωνα με την ενότητα 3.4 πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR) για τον έλεγχο της ποιότητας του πειράματος, με πολλαπλά ζευγάρια εκκινήτων για κάθε γονίδιο στόχο. Πιο συγκεκριμένα, παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα της Real Time PCR με στόχους το γονίδιο *Afm*, το οποίο λειτουργεί ως αρνητικό control και το γονίδιο *Actb*, το οποίο είναι γονίδιο κυτταρικής οικονομίας (housekeeping gene) και λειτουργεί ως θετικός στόχος. Τα επίπεδα

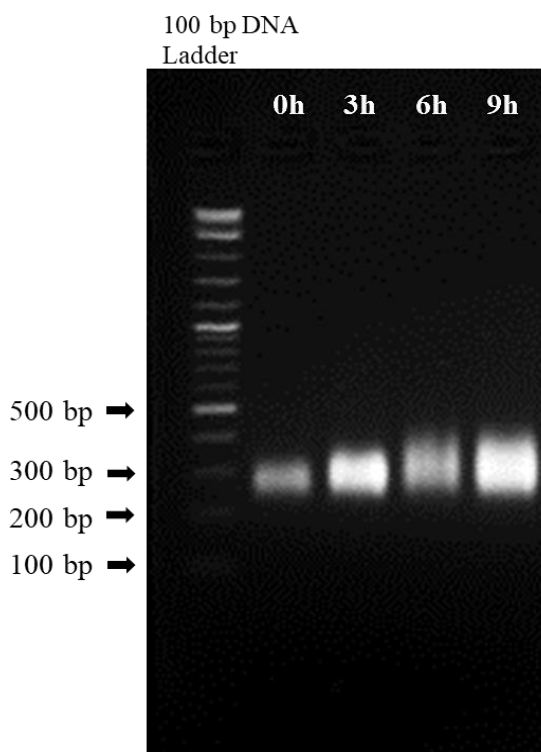
εμπλουτισμού της RNAPolII αναμένεται να είναι υψηλά στο γονίδιο *Actb*, καθώς η έκφρασή του παραμένει σταθερή ανεξαρτήτως εξωκυττάρων ερεθισμάτων και πολύ χαμηλά έως μηδενικά στην κλειστή περιοχή του γονιδίου *Afm*. Πράγματι, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 4.34 παρατηρήθηκαν υψηλά και σχεδόν σταθερά επίπεδα εμπλουτισμού στο γονίδιο *Actb*, τόσο πριν όσο και μετά τη μόλυνση των κυττάρων. Αντίθετα, το γονίδιο *Afm*, το οποίο δε μεταγράφεται στο συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο, δεν εμφανίζει σημαντικό εμπλουτισμό. Το αντίσωμα IgG χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της ποιότητας του πειράματος και της ειδικότητας του αντισώματος έναντι της RNAPolII, καθώς δεν έχει ειδικότητα και προσδένεται σε τυχαία μέρη της χρωματίνης. Επομένως, τα χαμηλά επίπεδα εμπλουτισμού στα δείγματα όπου χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα IgG, σε αντίθεση με τα υψηλά επίπεδα εμπλουτισμού στο γενετικό τόπο της *Actb*, στα δείγματα όπου χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα RNAPolII, φανερώνουν την ειδικότητα του πειράματος (Εικόνα 4.34).



Εικόνα 4.34. Διάγραμμα εμπλουτισμού των δειγμάτων από το πείραμα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης σε Beta-TC-6 κύτταρα με αντίσωμα έναντι του ενζύμου RNAPolII. Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε ως θετικός στόχος το γονίδιο *Actb* και ως αρνητικός στόχος το γονίδιο *Afm*. Στα αριστερά του διαγράμματος, παρατηρείται ότι ο εμπλουτισμός των δειγμάτων στις αλληλουχίες που ενισχύουν οι εκκινητές σε σχέση με τα αντίστοιχα inputs, μετά από ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης με αντίσωμα IgG, είναι πολύ χαμηλός και δεν εξαρτάται από την ιική μόλυνση. Αντίθετα, στα δεξιά του διαγράμματος, ο εμπλουτισμός των ίδιων στόχων σε δείγματα, στα οποία χρησιμοποιήθηκε

αντίσωμα έναντι της RNAPolIII, είναι πιο υψηλός για το γονίδιο Actb (θετικός στόχος), ενώ στο γονίδιο Aftm (αρνητικός στόχος) παρατηρούνται πολύ χαμηλά επίπεδα εμπλουτισμού.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, το πείραμα κρίθηκε επιτυχημένο, ώστε να υποστεί αλληλούχηση ευρείας κλίμακας. Έτσι, χρησιμοποιήθηκαν 50 ng απομονωμένου DNA από κάθε χρονικό σημείο (0h, 3h, 6h, 9h), για την κατασκευή γενωμικής βιβλιοθήκης, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της ενότητας 3.5. Το μέγεθος των κλώνων της βιβλιοθήκης θα πρέπει να είναι παρόμοιο. Επομένως, κατά την απομόνωση του επιθυμητού μεγέθους από το πήκτωμα αγαρόζης επιλέχθηκαν τα τμήματα με μέγεθος 300-600 ζεύγη βάσεων. Μετά την ολοκλήρωση της κατασκευής των γενωμικών βιβλιοθηκών πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, ώστε να ελεγχθούν τα μεγέθη τους. Όπως φαίνεται στην εικόνα 4.35 οι βιβλιοθήκες έχουν παρόμοιο μέγεθος, το οποίο εντοπίζεται στην περιοχή των 250 bp έως 400 bp.



Εικόνα 4.35. Ηλεκτροφόρηση γενωμικών βιβλιοθηκών απομονωμένου DNA του πειράματος ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης με αντίσωμα έναντι της RNAPolIII στην κυτταρική σειρά Beta-TC-6. Παρατηρείται ότι το μέγεθος των βιβλιοθηκών είναι μεταξύ 250 και 400 ζευγών βάσεων.

Στη συνέχεια, οι βιβλιοθήκες ελέγχθηκαν σε μηχάνημα Agilent Bioanalyzer 2100 για το μέγεθός τους και ακολούθησε αλληλούχηση μονού άκρου των 75 ζευγών βάσεων στο

μηχάνημα NextSeq 500 του Ελληνικού Κέντρου Γονιδιοματικής του Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης πραγματοποιήθηκε στη διαδικτυακή πλατφόρμα βιοπληροφορικής, Usegalaxy (<https://usegalaxy.org>) [92], όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.12.1.

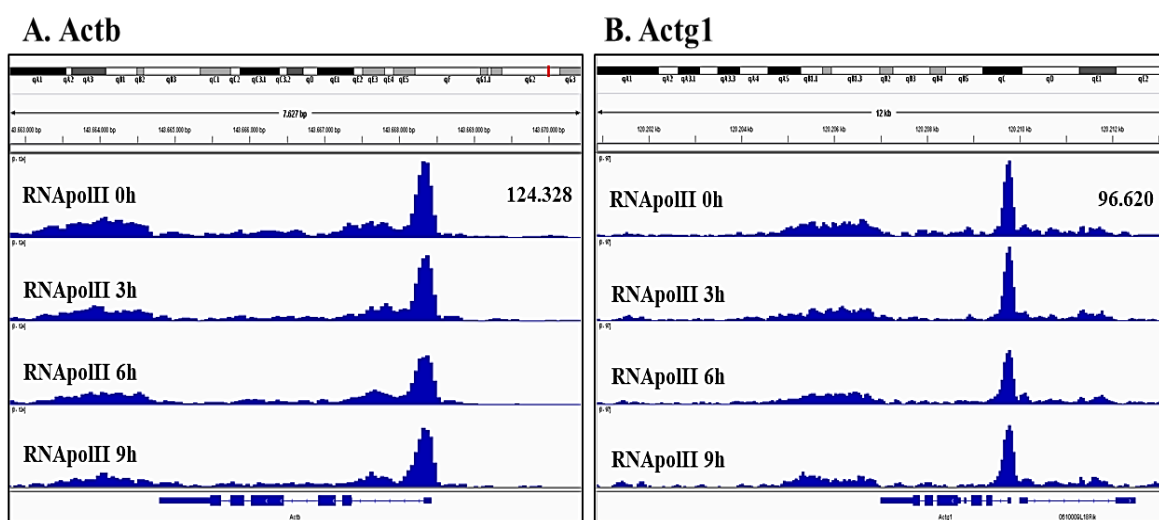
Μετά τον ποιοτικό έλεγχο των reads (fastQC), που προέκυψαν από την αλληλούχηση, ακολούθησε η στοίχιση των εκατομμυρίων reads στο γονιδίωμα του ποντικού (Bowtie2) [94] και η αφαίρεση των πολλαπλών αντιγράφων ενός read (RmDup) [95]. Επίσης, για τον ποιοτικό έλεγχο του πειράματος RNAPolII-ChIP-seq, υπολογίστηκε η βαθμολογία FRiP (Fraction of Reads in Peaks), δηλαδή το κλάσμα των reads που αντιστοιχούν σε peaks και ο μέσος εμπλουτισμός του σήματος κάθε δείγματος σε σύγκριση με την τυχαία κατανομή του σήματος στο γονιδίωμα (Mean Enrichment over Random Distribution) (Πίνακας 4.10).

Πίνακας 4.10. Συνολικός αριθμός των reads, που προέκυψαν από το πείραμα RNAPolII-ChIP-seq, πριν και μετά τη στοίχιση των αλληλουχιών στο γονιδίωμα αναφοράς, αριθμός των πολλαπλών αντιγράφων (duplicates), κλάσμα των reads που αντιστοιχούν σε peaks (FRiP score) και μέσος εμπλουτισμός του σήματος συγκριτικά με την τυχαία κατανομή (mean enrichment over random distribution).

Datasets	Συνολικός αριθμός reads	Αριθμός στοιχισμένων reads	Αριθμός duplicates	FRiP score	Mean Enrichment over Random Distribution
RNAPolII-ChIP-seq 0h	33.432.596	32.412.013 (96,95%)	6.053.364 (18,68%)	0,029	9,57939
RNAPolII-ChIP-seq 3h	30.430.561	29.725.730 (97,68%)	4.884.698 (16,43%)	0,031	14,0788
RNAPolII-ChIP-seq 6h	35.043.850	34.044.984 (97,15%)	5.944.848 (17,46%)	0,039	12,8826
RNAPolII-ChIP-seq 9h	31.671.989	30.776.458 (97,17%)	4.990.814 (16,22%)	0,027	11,8618

Ακολούθησε οπτικοποίηση του σήματος που προέρχεται από τις θέσεις πρόσδεσης του ενζύμου RNAPolIII, με τον αλγόριθμο bamCoverage [98]. Το σήμα παρουσιάζεται με τη μορφή κορυφών και μπορεί να παρατηρηθεί σε ένα browser, όπως το Integrative Genomics Viewer (IGV). Οι κορυφές αντιστοιχούν στον αριθμό των reads και συνεπώς το ύψος τους είναι ανάλογο του αριθμού των reads.

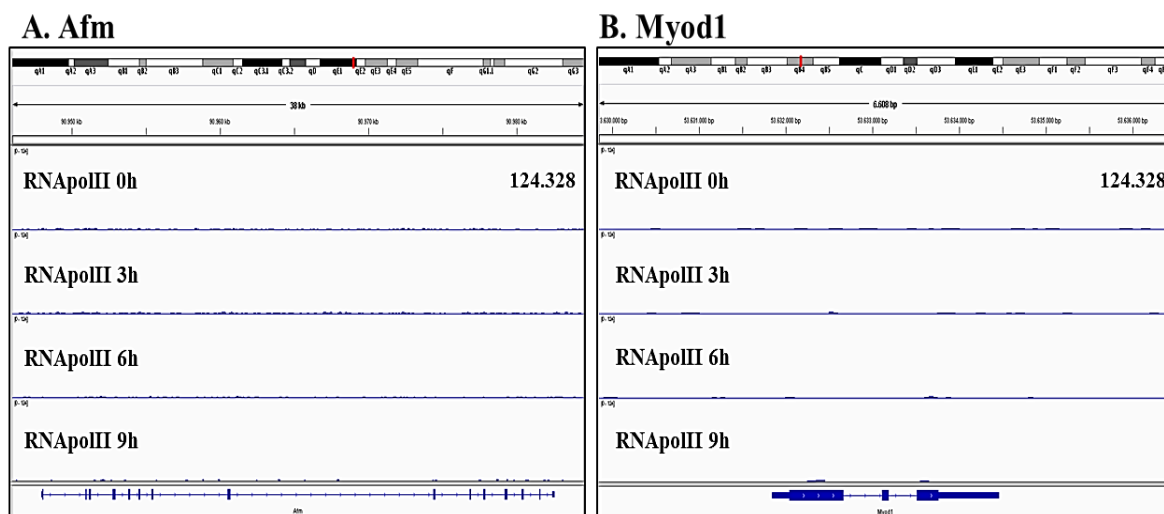
Για τον έλεγχο της ευαισθησίας και της ειδικότητας του πειράματος RNAPolIII-ChIP-seq πραγματοποιήθηκε επιπλέον έλεγχος του σήματος πρόσδεσης της RNAPolIII, κύριου ενζύμου για τη μεταγραφή των γονιδίων, στις χρωματινικές επιφάνειες μεμονωμένων γονιδίων, πριν και κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης. Αρχικά, μελετήθηκαν οι περιοχές των γονιδίων *Actb* και *Actg1*, τα οποία είναι γονίδια κυτταρικής οικονομίας (housekeeping genes) και συνεπώς αναμένεται να εμφανίζουν σταθερό και ισχυρό σήμα, ανεξαρτήτως οποιουδήποτε εξωκυττάριου ερεθίσματος [103]. Πράγματι, όπως φαίνεται στην εικόνα 4.36 το σήμα πρόσδεσης της RNAPolIII στις περιοχές γονιδίων κυτταρικής οικονομίας εμφανίζεται ισχυρό και σταθερό, τόσο πριν όσο και κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης.



Εικόνα 4.36. Κορυφές του σήματος πρόσδεσης του ενζύμου RNAPolIII στις περιοχές γονιδίων κυτταρικής οικονομίας (housekeeping genes) στα Beta-TC-6 κύτταρα. Στην εικόνα φαίνεται το σήμα της RNAPolIII γύρω από τους υποκινητές των γονιδίων *Actb* (A) και *Actg1* (B), το οποίο είναι ισχυρό και παραμένει σταθερό πριν και κατά την εξέλιξη της ιϊκής μόλυνσης. Η κλίμακα μεταξύ των τεσσάρων χρονικών σημείων σε κάθε περίπτωση είναι ίση, για τη σύγκριση.

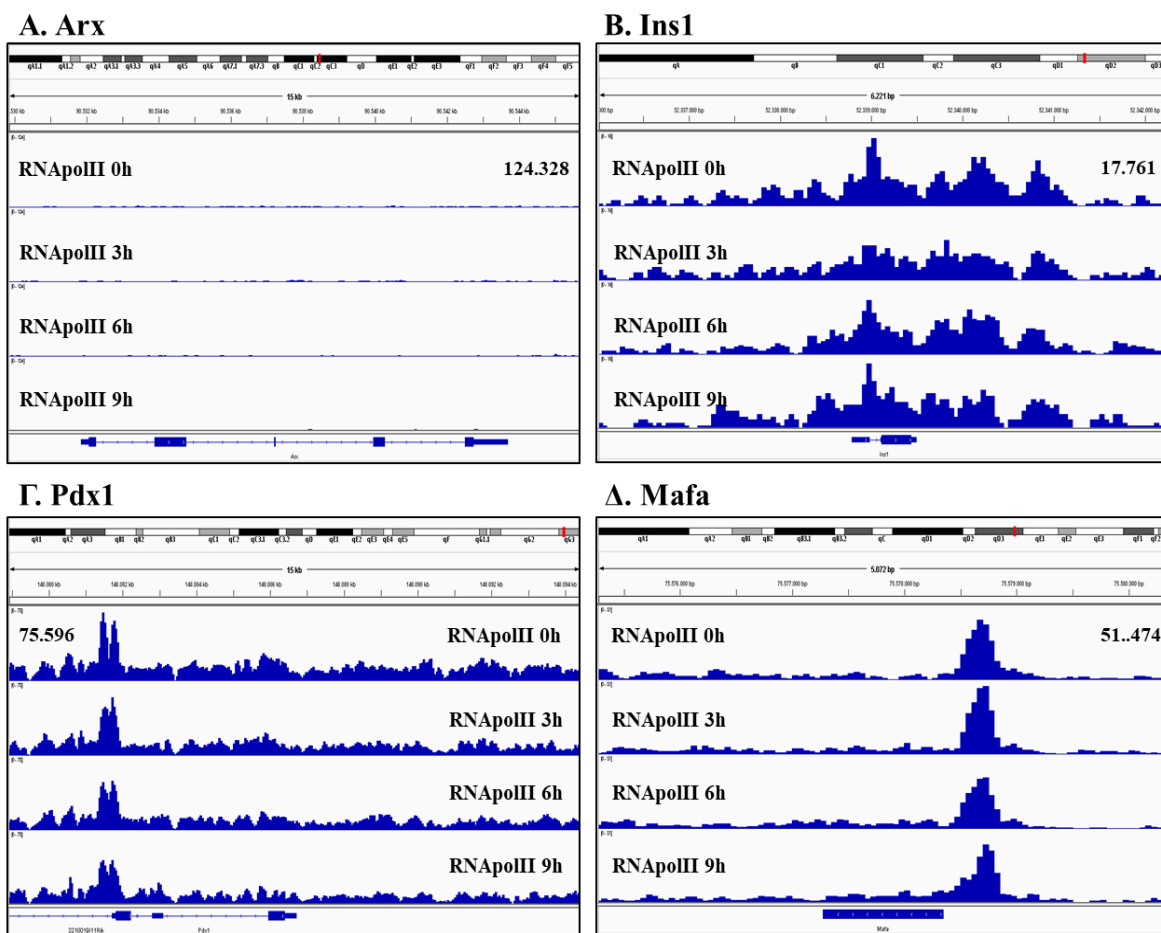
Αντίθετα, τα γονίδια *Afm* και *Myod1* αποτελούν αρνητικούς στόχους των πειραμάτων, καθώς εντοπίζονται σε περιοχές με κλειστή χρωματινική διαμόρφωση και δεν

εκφράζονται στο συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο. Συνεπώς, στις περιοχές αυτών των γονιδίων αναμένεται πλήρης απουσία σήματος πρόσδεσης της RNAPolIII. Πράγματι, όπως φαίνεται στην εικόνα 4.37 δεν υπάρχουν κορυφές στις περιοχές των γονιδίων *Afm* και *Myod1*, τόσο πριν όσο και κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης.



Εικόνα 4.37. Κορυφές του σήματος πρόσδεσης του ενζύμου RNAPolIII στις περιοχές των γονιδίων *Afm* (Α) και *Myod1* (Β) στα Beta-TC-6 κύτταρα. Στις περιοχές των γονιδίων *Afm* και *Myod1* παρατηρείται πλήρης απουσία σήματος, εφόσον έχουν κλειστή χρωματινική διαμόρφωση. Η κλίμακα μεταξύ των τεσσάρων χρονικών σημείων σε κάθε περίπτωση είναι ίση, για τη σύγκριση.

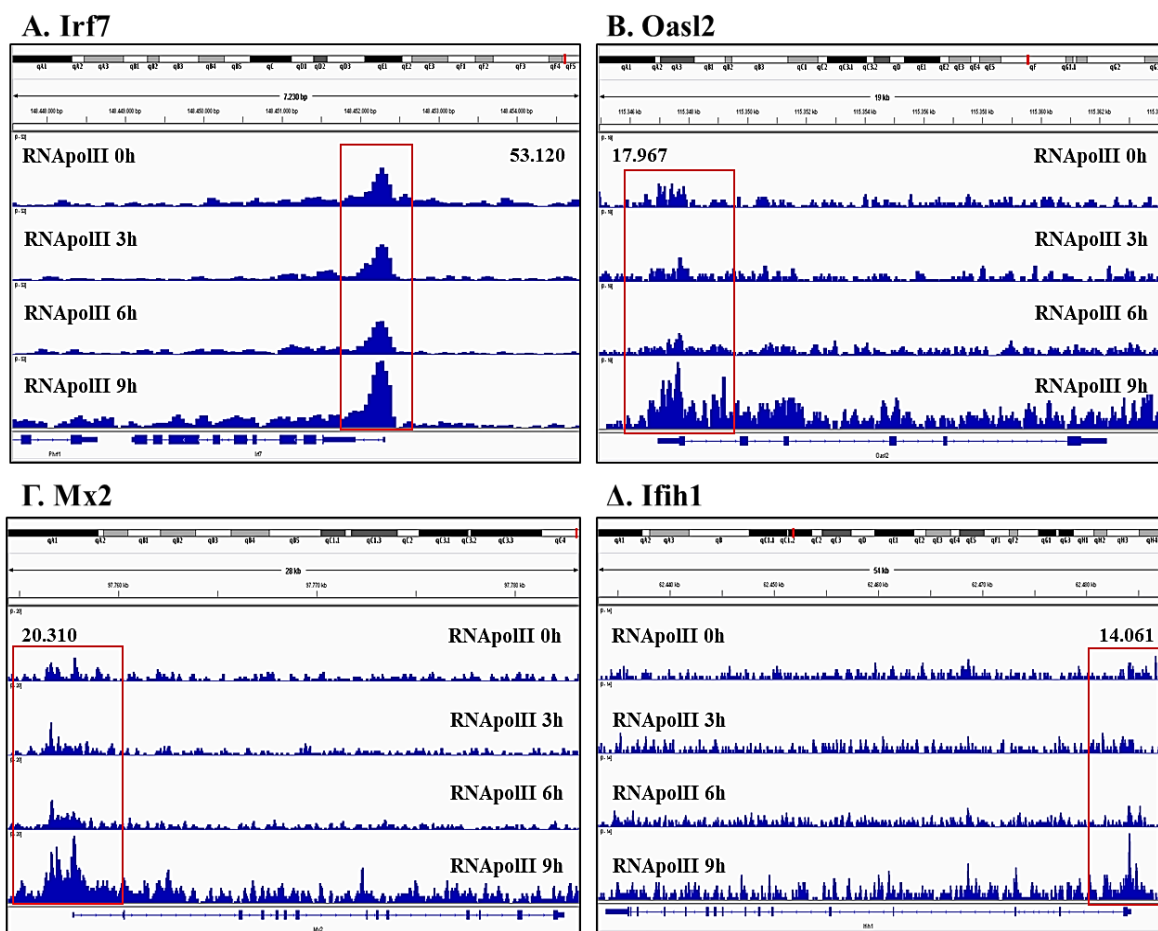
Ακολούθησε η μελέτη της πρόσδεσης του ενζύμου RNAPolIII σε χαρακτηριστικά γονίδια των παγκρεατικών κυττάρων, πριν και κατά τη διάρκεια της αντι-ϊικής απόκρισης. Τα γονίδια που μελετήθηκαν είναι τα: *Arx* (Α), *Ins1* (Β), *Pdx1* (Γ) και *Maia* (Δ). Όπως αναμένεται στα γονίδια *Ins1*, *Pdx1* και *Maia* εμφανίζεται σταθερό και ισχυρό σήμα της RNAPolIII στους υποκινητές των γονιδίων, ανεξαρτήτως της ιϊκής μόλυνσης, καθώς συμμετέχουν σε βασικές λειτουργίες των β παγκρεατικών κυττάρων. Αντίθετα, στο γονίδιο *Arx* δεν παρατηρείται σήμα της RNAPolIII, καθώς δεν εκφράζεται στα β παγκρεατικά κύτταρα (Εικόνα 4.38).



Εικόνα 4.38. Κορυφές του σήματος πρόσδεσης του ενζύμου RNApolII σε χαρακτηριστικά γονίδια των παγκρεατικών κυττάρων. Το σήμα πρόσδεσης της RNApolII στα γονίδια *Ins1* (B), *Pdx1* (Γ) και *Mafa* (Δ) είναι ισχυρό και παραμένει σταθερό πριν και κατά την εξέλιξη της ιικής μόλυνσης, καθώς τα γονίδια είναι απαραίτητα για την επιβίωση των Beta-TC-6 κυττάρων. Αντίθετα, στο γονίδιο *Arx* (A) παρατηρείται απουσία σήματος εφόσον είναι μη εκφραζόμενο στα β παγκρεατικά κύτταρα. Η κλίμακα μεταξύ των τεσσάρων χρονικών σημείων σε κάθε περίπτωση είναι ίση, για τη σύγκριση.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η πρόσδεση της RNApolII στα γονίδια *Irf7*, *Oasl2*, *Mx2* και *Ifih1*, τα οποία είναι κομβικά για την αντι-ϊκή απόκριση και όπως έχουν δείξει τα προηγούμενα ChIP-seq πειράματα διαθέτουν στις ρυθμιστικές περιοχές τους ισχυρή παρουσία DNaseI-seq και H3K27ac-seq. Παρατηρείται ότι και στα τέσσερα γονίδια υπάρχουν χαμηλά επίπεδα σήματος πριν την ιική μόλυνση των κυττάρων, γεγονός το οποίο είναι αναμενόμενο, καθώς η ενεργοποίηση των γονιδίων αυτών πυροδοτείται από ιικές μολύνσεις. Κατά τη διάρκεια της αντι-ϊκής απόκρισης παρατηρείται μικρή αύξηση του σήματος στα χρονικά σημεία των 3 και 6 ωρών. Στο χρονικό σημείο των 9 ωρών της

μόλυνσης, παρατηρείται μέγιστο σήμα της πρόσδεσης της RNAPolIII, προκειμένου να ξεκινήσει η μεταγραφή των γονιδίων της αντι-ϊικής απόκρισης (Εικόνα 4.39).

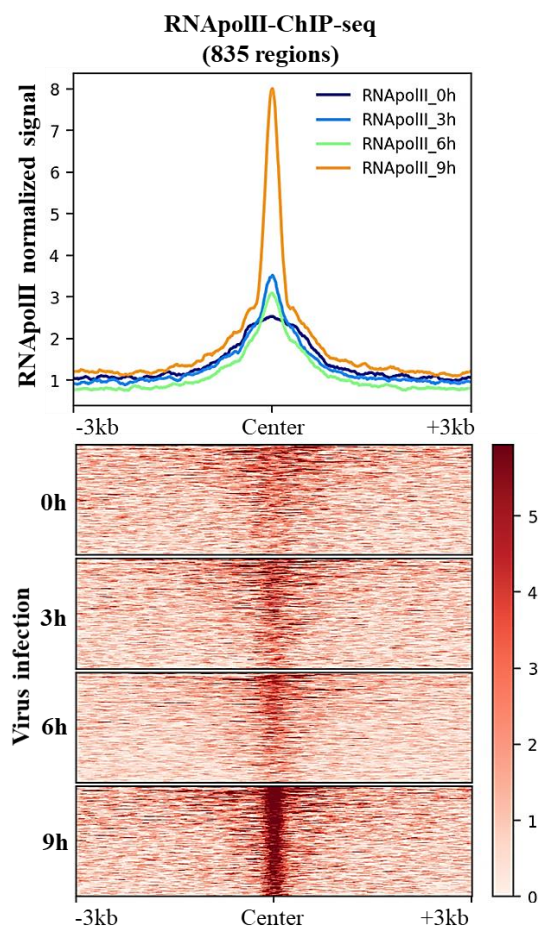


Εικόνα 4.39. Κορυφές του σήματος πρόσδεσης του ενζύμου RNAPolIII στις περιοχές των γονιδίων *Irf7* (Α), *Oasl2* (Β), *Mx2* (Γ) και *Ifih1* (Δ). Το σήμα πρόσδεσης της RNAPolIII είναι χαμηλό πριν την ιϊκή μόλυνση (0h). Στα χρονικά σημεία των 3 (3h) και 6 (6h) ωρών μετά την ιϊκή μόλυνση παρατηρείται μικρή αύξηση του σήματος στις χρωματινικές επιφάνειες γονιδίων, τα οποία διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην αντιμετώπιση της ιϊκής μόλυνσης. Στο χρονικό σημείο των 9 ωρών (9h) παρατηρούνται μέγιστα επίπεδα σήματος πρόσδεσης της RNAPolIII. Η κλίμακα μεταξύ των τεσσάρων χρονικών σημείων σε κάθε περίπτωση είναι ίση, για τη σύγκριση.

Στη συνέχεια, με τη χρήση του αλγορίθμου MACS2 [96, 97] εντοπίστηκαν οι εμπλουτισμένες θέσεις του γονιδιώματος σε reads, του πειράματος RNAPolIII-ChIP-seq και προέκυψαν οι συντεταγμένες, στις οποίες στρατολογείται η RNAPolIII. Για την πραγματοποίηση των ποσοτικών αναλύσεων εντοπίστηκαν οι περιοχές, οι οποίες εμφανίζουν διαφορά 2 fold (διαφορικές κορυφές) μεταξύ των χρονικών σημείων των 0 και 9 ωρών, δηλαδή οι επαγόμενες περιοχές με τις μεγαλύτερες ποσοτικές αλλαγές. Σύμφωνα

με τα παραπάνω κριτήρια ανακαλύφθηκαν 835 περιοχές πρόσδεσης της RNAPolII 9 ώρες μετά τη μόλυνση. Οι περιοχές αυτές κατανέμονται σε ολόκληρο το γονιδίωμα και μπορούν να διαχωριστούν περαιτέρω με βάση την απόστασή τους από τον υποκινητή του κοντινότερου γονιδίου. Οι περιοχές, οι οποίες απέχουν τουλάχιστον 2 Kb από τους υποκινητές των γονιδίων, χαρακτηρίστηκαν ως TSS-distal RNAPolII binding sites, ενώ οι περιοχές που έχουν απόσταση έως 2 Kb από τον κοντινότερο υποκινητή, ονομάστηκαν TSS-proximal RNAPolII binding sites. Οι 637 περιοχές είναι TSS-distal RNAPolII binding sites. Οι υπόλοιπες 198 περιοχές είναι TSS-proximal RNAPolII binding sites, οι οποίες βρίσκονται σε γονιδιακές συντεταγμένες, που γειτνιάζουν με κομβικά γονίδια της αντι-ϊικής απόκρισης, όπως *Oasl2*, *Ifit1*, *Ifih1*, *Mx2*, *Irf9* και *Ddx58*.

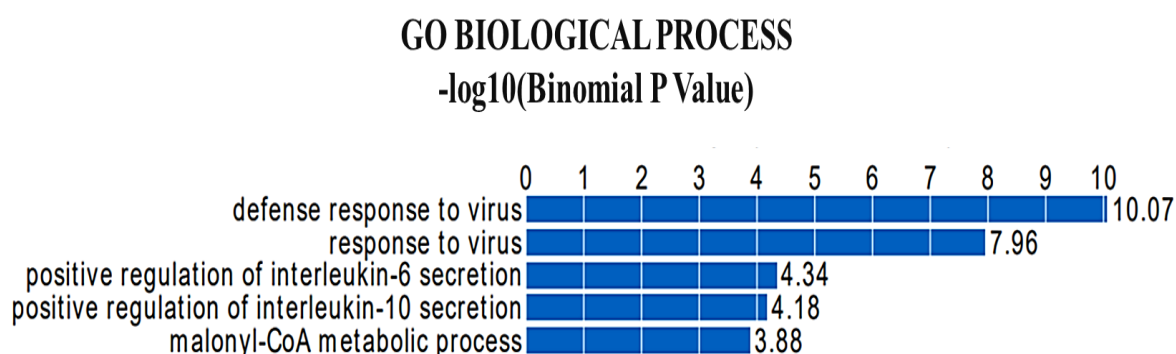
Μετά την επιβεβαίωση του σωστού χωροχρονικά (spatio-temporal) προτύπου πρόσδεσης του ενζύμου RNAPolII σε μεμονωμένα γονίδια, ακολούθησε ανάλυση σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος με μεθόδους βιοπληροφορικής. Έτσι, πραγματοποιήθηκε ποσοτική ανάλυση της κατανομής του σήματος (RPKM), το οποίο προέρχεται από τις 835 περιοχές επαγόμενης πρόσδεσης της RNAPolII, γύρω από το κέντρο των θέσεων αυτών, δηλαδή γύρω από το κεντρικό σημείο των επαγόμενων κορυφών (peaks) του πειράματος RNAPolII-ChIP-seq, κατά την εξέλιξη της ιϊκής μόλυνσης (Εικόνα 4.40). Η μελέτη έγινε ± 3 Kb σε σχέση με το κεντρικό σημείο πρόσδεσης της RNAPolII (center).



Εικόνα 4.40. Διαγράμματα κατανομής του σήματος (RPKM) που προέρχεται από τις 835 περιοχές επαγόμενης πρόσδεσης του ενζύμου RNApolII μετά την ιϊκή μόλυνση, γύρω από το κέντρο των περιοχών αυτών. Στο επάνω μέρος της εικόνας παρατίθεται το aggregation plot, ενώ στο κάτω μέρος το heat map. Η μελέτη έγινε ± 3 Kb σε σχέση με το κεντρικό σημείο πρόσδεσης της RNApolII (center). Παρατηρείται μικρή αύξηση της συγκέντρωσης του σήματος στις 3 και 6 ώρες, το οποίο μεγιστοποιείται στις 9 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση.

Από τα παραπάνω διαγράμματα γίνεται κατανοητό ότι πριν την ιϊκή μόλυνση, δηλαδή στο χρονικό σημείο των 0 ωρών, τα επίπεδα του σήματος της πρόσδεσης της RNApolII στις 835 επαγόμενες περιοχές είναι χαμηλά. Κατά τη διάρκεια της μόλυνσης παρατηρείται μικρή αύξηση του σήματος, το οποίο μεγιστοποιείται 9 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση (Εικόνα 4.40). Επομένως, οι μεγαλύτερες αλλαγές στην πρόσδεση της RNApolII στις 835 επαγόμενες περιοχές πραγματοποιούνται στο χρονικό σημείο των 9 ωρών της ιϊκής μόλυνσης. Επίσης, φαίνεται ότι το σήμα εντοπίζεται κατά κύριο λόγο γύρω από το κεντρικό σημείο των επαγόμενων κορυφών (peaks) του πειράματος RNApolII-ChIP-seq.

Με τη βοήθεια του εργαλείου ClosestBed βρέθηκαν τα κοντινότερα γονίδια των 835 περιοχών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη πρόσδεση της RNAPolII, μετά την ιϊκή μόλυνση. Για την εύρεση των βιολογικών διεργασιών, με τις οποίες σχετίζονται τα 780 γονίδια χρησιμοποιήθηκε ο διαδικτυακός αλγόριθμος GREAT για την πραγματοποίηση ανάλυσης γονιδιακής οντολογίας (GO: gene ontology analysis) [99]. Στην εικόνα 4.41 παρατηρείται ότι η πλειοψηφία των γονιδίων, τα οποία γειτνιάζουν στις περιοχές επαγόμενης πρόσδεσης της RNAPolII, σχετίζονται με μηχανισμούς αντι-ιϊκής απόκρισης και με θετική ρύθμιση της έκκρισης της ιντερλευκίνης-6 (IL-6) και της ιντερλευκίνης-10 (IL-10). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν την αρτιότητα των συνθηκών πραγματοποίησης του πειράματος και την ειδικότητά του.



Εικόνα 4.41. Απεικόνιση των βιολογικών διεργασιών των 780 γονιδίων τα οποία γειτνιάζουν με τις περιοχές που παρουσιάζουν επαγόμενη πρόσδεση του ενζύμου RNAPolII 9 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση. Η πλειοψηφία των γονιδίων εμπλέκεται σε διεργασίες που σχετίζονται με την αντι-ιϊκή απόκριση.

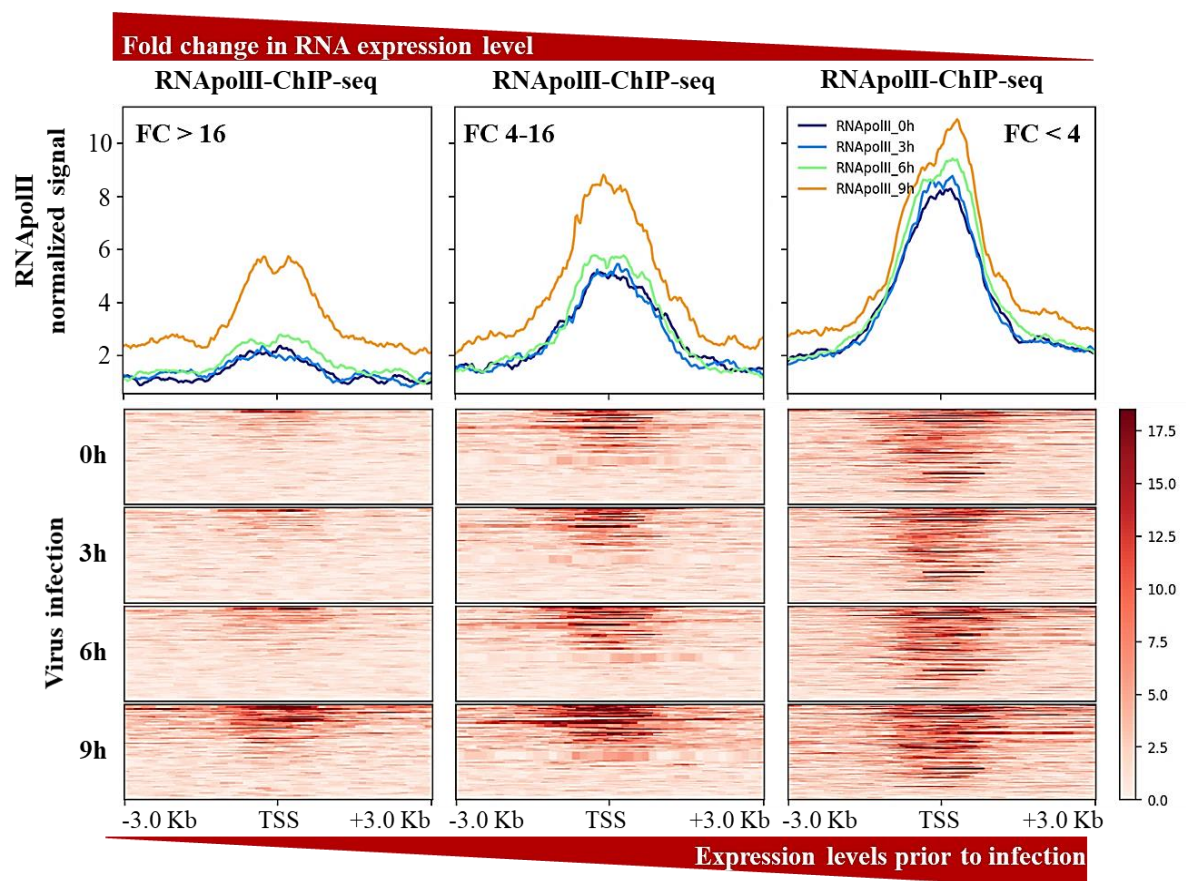
Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε σύγκριση της λίστας των 272 ιϊκά επαγόμενων γονιδίων των Beta-TC-6 κυττάρων της λίστας των 780 γονιδίων, τα οποία γειτνιάζουν με τις περιοχές που εμφανίζουν επαγόμενη πρόσδεση της RNAPolII, στο χρονικό σημείο των 9 ωρών της ιϊκής μόλυνσης. Το αποτέλεσμα έδειξε την ύπαρξη 49 γονιδίων, τα οποία εμφανίζουν επαγόμενη έκφραση και επαγόμενη πρόσδεση της RNAPolII, 9 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση (Πίνακας 4.11). Όπως παρατηρείται στον πίνακα 4.11, μεταξύ των κοινών γονιδίων που προέκυψαν από τη σύγκριση είναι τα *Ddx58*, *Ifit1*, *Ifih1*, *Irf9*, *Mx2*, *Oasl2*, *Stat2*, *Rsad2* και *Herc6*, τα οποία έχουν σημαντικό ρόλο κατά την αντι-ιϊκή απόκριση.

Πίνακας 4.11. Λίστα των 49 ιϊκά επαγόμενων γονιδίων, τα οποία εμφανίζουν επαγόμενη πρόσδεση του ενζύμου RNAPolII, ύστερα από ιϊκή μόλυνση. Τα γονίδια αναγράφονται με βάση την ονοματολογία τους στο γονιδίωμα του ποντικού.

Γονίδια με επαγόμενη έκφραση και επαγόμενη πρόσδεση της RNAPolII μετά την ιϊκή μόλυνση				
<i>Zcchc2</i>	<i>Ddx58</i>	<i>Gbp3</i>	<i>Oasl2</i>	<i>Oasl1</i>
<i>Zfp365</i>	<i>Ifih1</i>	<i>Gbp7</i>	<i>Trp53inp1</i>	<i>Trim56</i>
<i>Irgm1</i>	<i>Ifit1</i>	<i>Gm3696</i>	<i>Rbm11</i>	<i>Lrrc4</i>
<i>Igtp</i>	<i>Ifit3</i>	<i>Gm5796</i>	<i>Dtx3l</i>	<i>Cxcl10</i>
<i>Irgm2</i>	<i>Ifit2</i>	<i>Gm10406</i>	<i>Parp14</i>	<i>Nmi</i>
<i>Xaf1</i>	<i>Mx2</i>	<i>Lgals8</i>	<i>Apobec3</i>	<i>Il33</i>
<i>Lgals9</i>	<i>Irf9</i>	<i>Ocln</i>	<i>Parp10</i>	<i>Cd274</i>
<i>Tusc5</i>	<i>Rsad2</i>	<i>Ifi271l</i>	<i>Epsti1</i>	<i>Tap2</i>
<i>Dhx58</i>	<i>Stat3</i>	<i>Cmpk2</i>	<i>Usp18</i>	<i>Herc6</i>
<i>Irf2</i>	<i>Ddx60</i>	<i>Tlr3</i>	<i>9330175E14Rik</i>	

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της διασποράς του σήματος (RPKM) των κορυφών (peaks) του πειράματος RNAPolII-ChIP-seq στις τρεις κατηγορίες των ιϊκά επαγόμενων γονιδίων, όπως διαχωρίστηκαν στην ενότητα 4.1, σύμφωνα με τα επίπεδα επαγωγής της έκφρασής τους (Εικόνα 4.42). Η μελέτη έγινε ± 3 Kb γύρω από το σημείο έναρξης της μεταγραφής (Transcription Start Site, TSS) των γονιδίων, ύστερα από τη στοίχιση των περιοχών με το υψηλότερο αριθμητικό σήμα κατά φθίνουσα σειρά. Από την παρακάτω εικόνα, η οποία παρουσιάζει την κατανομή του δείκτη έναρξης της μεταγραφής γύρω από τα ιϊκά επαγόμενα γονίδια, παρατηρείται ότι στις τρεις κατηγορίες γονιδίων υπάρχει αυξημένη πρόσδεση της RNAPolII στο χρονικό σημείο των 9 ωρών μετά την ιϊκή μόλυνση συγκριτικά με τα υπόλοιπα χρονικά σημεία. Πιο συγκεκριμένα, στην πρώτη κατηγορία γονιδίων, τα οποία παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη επαγωγή έκφρασης (fold change > 16), παρατηρείται ότι η RNAPolII δεν προσδένεται πριν την ιϊκή μόλυνση, ενώ 9 ώρες μετά υπάρχει έντονη συγκέντρωση γύρω από το σημείο έναρξης της μεταγραφής των γονιδίων. Στη δεύτερη κατηγορία γονιδίων, στην οποία συμπεριλήφθηκαν γονίδια με επίπεδο επαγωγής από 4 έως 16 φορές (fold change 4-16), υπάρχει σήμα πρόσδεσης της RNAPolII, πριν την ιϊκή μόλυνση, το οποίο μεγιστοποιείται στο χρονικό σημείο των 9 ωρών.

Στην τρίτη κατηγορία γονιδίων, τα οποία παρουσιάζουν τη μικρότερη επαγωγή έκφρασης (fold change < 4), φαίνεται πως υπάρχει έντονη πρόσδεση της RNAPII τόσο πριν την ιϊκή μόλυνση όσο και κατά την πρόοδό της (Εικόνα 4.42). Επομένως, οι μεγαλύτερες αλλαγές της πρόσδεσης του ενζύμου RNAPII πραγματοποιούνται στην πρώτη ομάδα γονιδίων, τα οποία εμφανίζουν τη μεγαλύτερη επαγωγή έκφρασης και μόνο το 23,68% αυτών έχει βασικά επίπεδα έκφρασης πριν την ιϊκή μόλυνση. Το γεγονός αυτό συμβαδίζει με την προσβασιμότητα των περιοχών και την κατανομή της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac στα ιϊκά επαγόμενα γονίδια, κατά την εξέλιξη της μόλυνσης.



Εικόνα 4.42. Διαγράμματα κατανομής του σήματος (RPKM) που προέρχεται από το πείραμα RNAPII-ChIP-seq στις τρεις κατηγορίες των ιϊκά επαγόμενων γονιδίων κατά την πρόοδο της ιϊκής μόλυνσης. Στο επάνω μέρος της εικόνας παρατίθενται τα aggregation plots, ενώ στο κάτω μέρος τα heat maps. Η μελέτη έγινε ± 3 Kb γύρω από το σημείο έναρξης της μεταγραφής των γονιδίων (TSS).

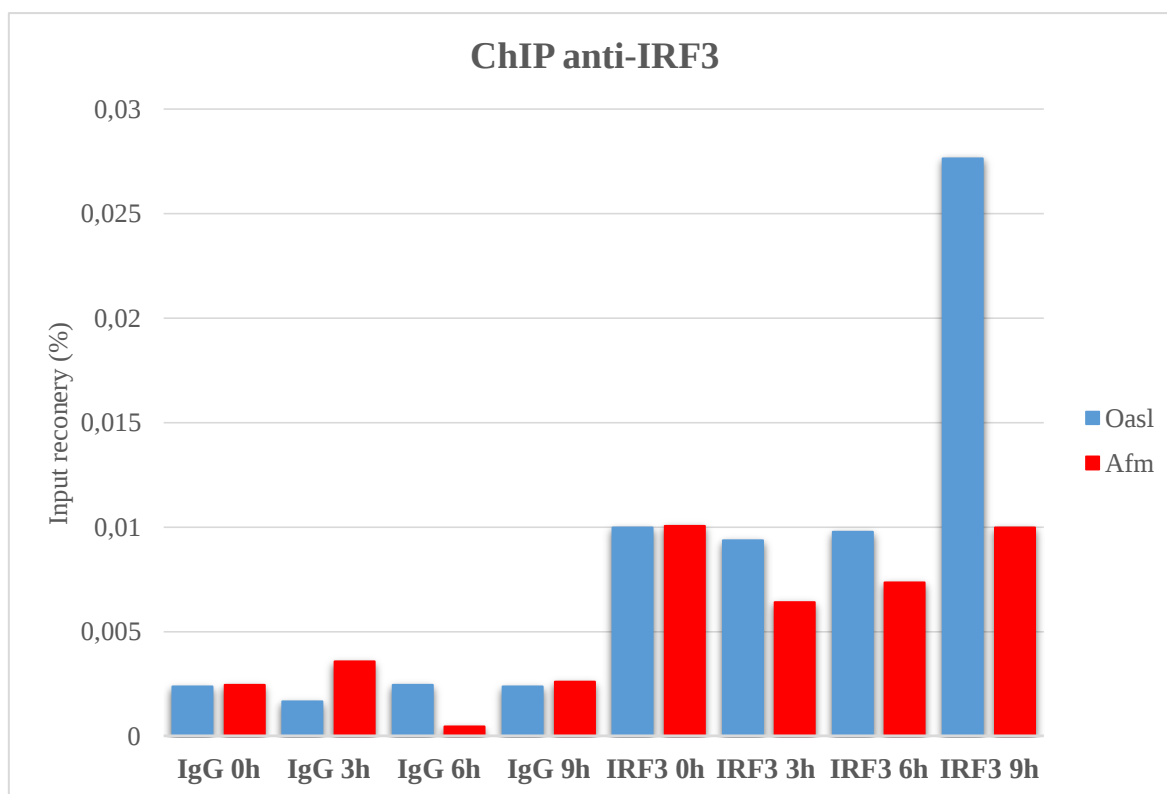
Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω αποτελέσματα γίνεται κατανοητό ότι η πρόσδεση του ενζύμου της RNAPII, η οποία αποτελεί βασικό δείκτη μεταγραφικής ενεργοποίησης, στο γονιδίωμα των Beta-TC-6 κυττάρων, επάγεται κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης ένα

σύνολο γονιδίων με επαγόμενη έκφραση ενώ βρίσκεται προσδεμένη και αυξάνει την παρουσία της σε ένα άλλο σύνολο με βασική έκφραση, η οποία αυξάνεται κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης. Επιπλέον, η πρόσδεσή της πραγματοποιείται σε ρυθμιστικές περιοχές γονιδίων, τα οποία κατέχουν σημαντικό ρόλο στην αντι-ιϊκή απόκριση. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την ύπαρξη ενός μηχανισμού στοχευμένης πρόσδεσης της RNAPII και όχι τυχαίου διασκορπισμού στο γονιδίωμα. Επίσης, τονίζεται ο βασικός ρόλος της RNAPII στην επαγωγή των γονιδίων του αντι-ιϊκού προγράμματος. Συμπερασματικά, το πειραματικό μοντέλο των Beta-TC-6 κυττάρων αναπτύχθηκε σωστά στο εργαστήριό μας και σύμφωνα με το πείραμα RNAPII-ChIP-seq προέκυψαν τα παρακάτω ευρήματα: 1) ταυτοποιήθηκαν 835 περιοχές, οι οποίες χαρακτηρίζονται από επαγόμενη πρόσδεση του ενζύμου RNAPII, μετά την ιϊκή μόλυνση, 2) οι περιοχές αυτές βρίσκονται κοντά σε γονίδια, των οποίων η έκφραση επάγεται μετά τη μόλυνση και σχετίζονται με την αντι-ιϊκή απόκριση, 3) οι 835 περιοχές, επαγόμενης πρόσδεσης της RNAPII έχουν μεγάλη πιθανότητα να αποτελούν ρυθμιστικά στοιχεία του αντι-ιϊκού προγράμματος γονιδιακής έκφρασης. Επομένως, το πείραμα RNAPII-ChIP-seq χαρακτηρίζεται από υψηλή ειδικότητα και αρτιότητα.

4.5. Μελέτη της πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα IRF3 στο γονιδίωμα των Beta-TC-6 κυττάρων μέσω πειράματος ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης με αντίσωμα έναντι του IRF3 και βαθιά αλληλούχηση (IRF3-ChIP-seq)

Η κυτταρική σειρά Beta-TC-6 καλλιεργήθηκε σε μεγάλη κλίμακα (150 mm² πιάτα καλλιέργειας κυττάρων) και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μόλυνση των κυττάρων με ιό Sendai (1/10 του όγκου του θρεπτικού υλικού) για 0, 3, 6 και 9 ώρες. Μετά την μονιμοποίηση των κυττάρων με 1,1% φορμαλδεΰδη και τη συλλογή τους, ακολουθήθηκε κατάλληλο πρωτόκολλο για την απομόνωση και τον κατακερματισμό της χρωματίνης (Ενότητα 3.4). Για την πραγματοποίηση του πειράματος ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης, χρησιμοποιήθηκαν 500 μg χρωματίνης, 8 μg αντισώματος για την ανοσοσφαιρίνη IgG (control) και 8 μg αντισώματος για τον μεταγραφικό παράγοντα IRF3 (Interferon Regulatory Factor 3), ο οποίος είναι κύριος ρυθμιστής της ανοσολογικής απόκρισης.

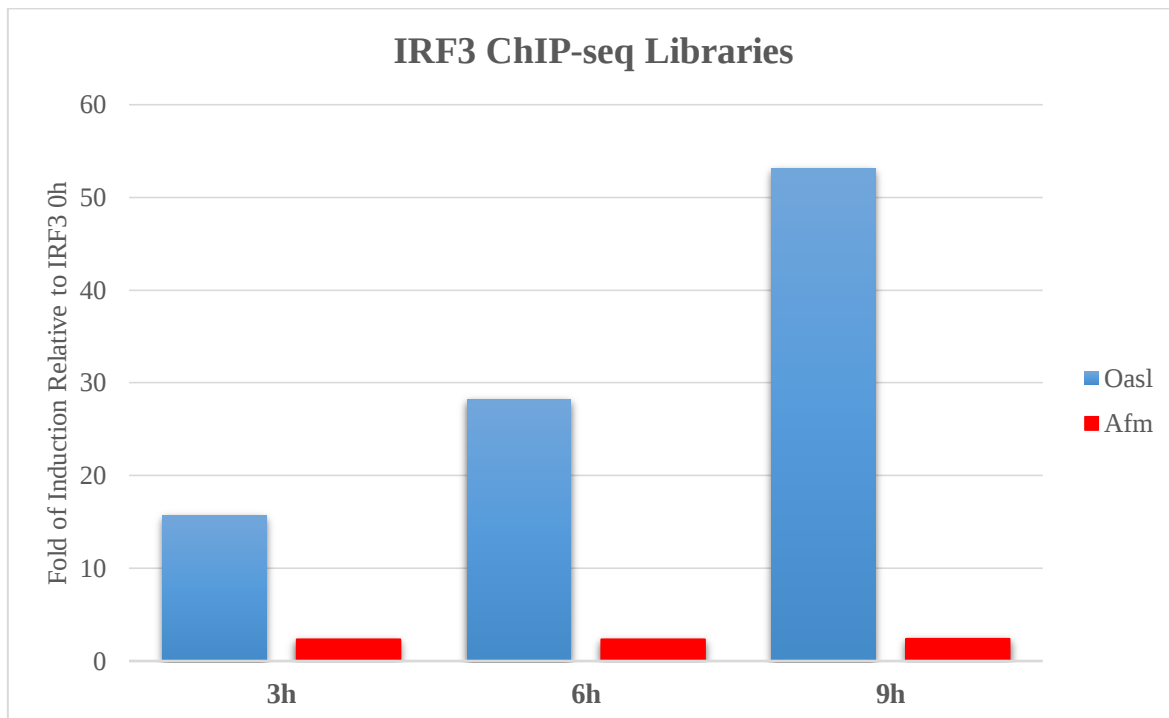
Ύστερα από την ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης με ειδικό αντίσωμα και την απομόνωση του DNA, πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR) για τον έλεγχο της ποιότητας του πειράματος, με πολλαπλά ζευγάρια εκκινήτων για κάθε γονίδιο στόχο. Πιο συγκεκριμένα, παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα της Real Time PCR με στόχους το γονίδιο *Afm*, το οποίο λειτουργεί ως αρνητικό control και το γονίδιο *Oasl*, το οποίο επάγεται κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης και συνεπώς λειτουργεί ως θετικός στόχος. Τα επίπεδα εμπλουτισμού αναμένεται να είναι υψηλά στο γονίδιο *Oasl*, του οποίου η έκφραση επάγεται κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης και πολύ χαμηλά έως μηδενικά στην κλειστή περιοχή του γονιδίου *Afm*, καθώς δεν έχει μεταγραφική ενεργότητα. Πράγματι, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 4.43 παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα εμπλουτισμού στο γονίδιο *Oasl*, ενώ η σταδιακή αύξηση των επιπέδων υποδεικνύει τη βαθμιαία ενεργοποίηση του γονιδίου αυτού, κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης. Αντίθετα, το γονίδιο *Afm*, το οποίο εντοπίζεται σε περιοχή με κλειστή χρωματινική διαμόρφωση, δε μεταγράφεται στο συγκεκριμένο τύπο κυττάρων και επομένως δεν εμφανίζει σημαντικό εμπλουτισμό. Το αντίσωμα IgG χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της ποιότητας του πειράματος, καθώς το αντίσωμα αυτό δεν έχει ειδικότητα και προσδένεται σε τυχαία μέρη της χρωματίνης. Έτσι, με τη χρήση του αντισώματος αυτού ελέγχεται η ειδικότητα του αντισώματος έναντι του παράγοντα IRF3. Επομένως, τα χαμηλά επίπεδα εμπλουτισμού στα δείγματα όπου χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα IgG φανερώνουν την ειδικότητα του πειράματος (Εικόνα 4.43).



Εικόνα 4.43. Διάγραμμα εμπλουτισμού των δειγμάτων από το πείραμα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης σε Beta-TC-6 κύτταρα με αντίσωμα έναντι του μεταγραφικού παράγοντα IRF3. Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε ως θετικός στόχος το γονίδιο Oasl και ως αρνητικός στόχος το γονίδιο Afm. Στα αριστερά του διαγράμματος, παρατηρείται ότι ο εμπλουτισμός των δειγμάτων στις αλληλουχίες που ενισχύουν οι εκκινητές σε σχέση με τα αντίστοιχα inputs, μετά από ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης με αντίσωμα IgG, είναι πολύ χαμηλός και δεν εξαρτάται από την ιϊκή μόλυνση. Αντίθετα, στα δεξιά του διαγράμματος, ο εμπλουτισμός των ίδιων στόχων σε δείγματα, στα οποία χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι του μεταγραφικού παράγοντα IRF3, είναι πιο υψηλός για το γονίδιο Oasl (θετικός στόχος), ενώ στο γονίδιο Afm (αρνητικός στόχος) παρατηρούνται πολύ χαμηλά επίπεδα εμπλουτισμού.

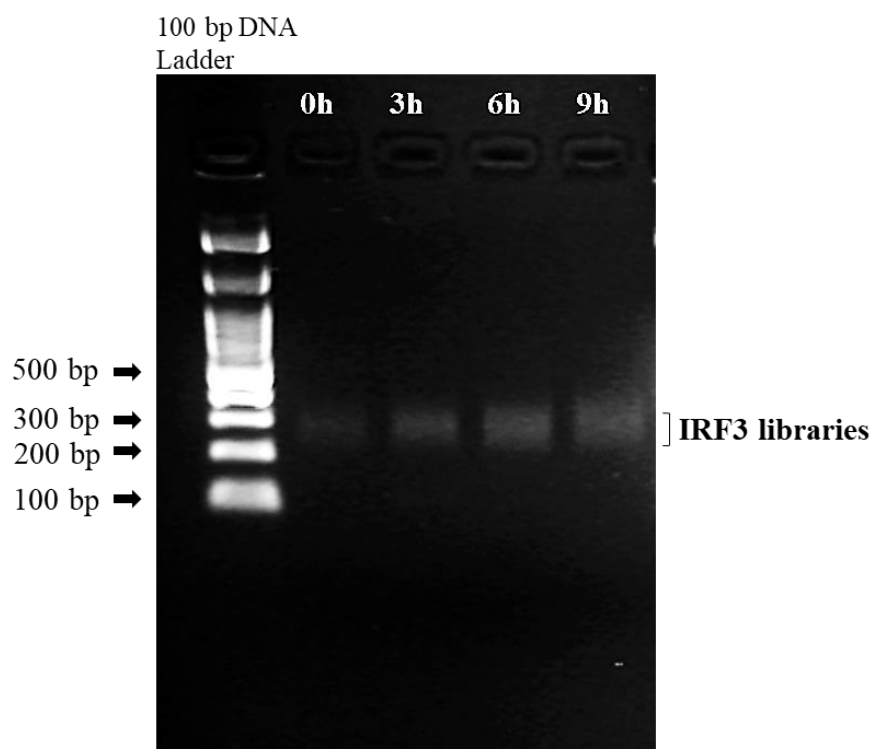
Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, τα οποία υποστηρίζουν την υψηλή ποιότητα της πειραματικής διαδικασίας, το πείραμα κρίθηκε επιτυχημένο, ώστε να υποστεί αλληλούχηση ευρείας κλίμακας. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν 50 ng απομονωμένου DNA από κάθε χρονικό σημείο (0h, 3h, 6h, 9h), για την κατασκευή γενωμικής βιβλιοθήκης από σύμφωνα με το πρωτόκολλο της ενότητας 3.5. Το μέγεθος των κλώνων της βιβλιοθήκης θα πρέπει να είναι παρόμοιο. Επομένως, κατά την απομόνωση του επιθυμητού μεγέθους από το πήκτωμα αγαρόζης επιλέχθηκαν τα τμήματα με μέγεθος 200-500 ζεύγη βάσεων. Μετά την ολοκλήρωση της κατασκευής των γενωμικών βιβλιοθηκών

πραγματοποιήθηκε Real Time PCR, για την επαλήθευση της ποιότητας του πειράματος, με πολλαπλά ζευγάρια εκκινητών για κάθε γονίδιο στόχο. Πιο συγκεκριμένα, παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα της Real Time PCR με στόχους το γονίδιο *Afm*, το οποίο λειτουργεί ως αρνητικό control και το γονίδιο *Oasl*, το οποίο επάγεται κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης και συνεπώς λειτουργεί ως θετικός στόχος (Εικόνα 4.44).



Εικόνα 4.44. Διάγραμμα επιπέδων επαγωγής των δειγμάτων IRF3 3h, IRF3 6h και IRF3 9h σε σύγκριση με το δείγμα IRF3 0h σε υλικό από τις γενωμικές βιβλιοθήκες του πειράματος ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης με αντίσωμα έναντι του μεταγραφικού παράγοντα IRF3. Ως θετικός στόχος χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *Oasl*, το οποίο φαίνεται να είναι επαγόμενο κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης, καθώς παρατηρείται σταδιακή αύξηση των επιπέδων εμπλουτισμού συγκριτικά με τη μη μολυσμένη κατάσταση (IRF3 0h). Ως αρνητικός στόχος χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *Afm*, στο οποίο παρατηρούνται πολύ χαμηλά επίπεδα εμπλουτισμού καθ' όλη τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αгарόζης 2%, ώστε να γίνει έλεγχος του μεγέθους των βιβλιοθηκών. Πράγματι, όλες οι βιβλιοθήκες έχουν παρόμοιο μέγεθος, το οποίο εντοπίζεται στην περιοχή των 250 bp έως 350 bp (Εικόνα 4.45).



Εικόνα 4.45. Ηλεκτροφόρηση γενωμικών βιβλιοθηκών απομονωμένου DNA του πειράματος ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης με αντίσωμα έναντι του μεταγραφικού παράγοντα IRF3 στην κυτταρική σειρά Beta-TC-6. Παρατηρείται ότι το μέγεθος των βιβλιοθηκών είναι μεταξύ 250 και 350 ζευγών βάσεων.

Τα παραπάνω στοιχεία αποδεικνύουν ότι η κατασκευή των βιβλιοθηκών IRF3-ChIP-seq πραγματοποιήθηκε με επιτυχία, καθώς όπως φαίνεται στην εικόνα 4.45 το μέγεθος των γενωμικών βιβλιοθηκών είναι το αναμενόμενο, δηλαδή στην περιοχή μεταξύ 250 bp και 350 bp. Επίσης, σύμφωνα με την εικόνα 4.44 στον θετικό στόχο *Oas1*, η πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα IRF3 είναι επαγόμενη κατά την εξέλιξη της ιϊκής μόλυνσης. Στη συνέχεια, τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχηση μονού άκρου των 75 ζευγών βάσεων στο μηχάνημα NextSeq 500 του Ελληνικού Κέντρου Γονιδιοματικής του Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης ευρείας κλίμακας αναλύθηκαν στη διαδικτυακή πλατφόρμα βιοπληροφορικής, Usegalaxy (<https://usegalaxy.org>) [92], όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.12.1.

Το πρώτο βήμα για τη βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων, που προέκυψαν από την αλληλούχηση, ήταν ο ποιοτικός έλεγχος των reads (fastQC), ώστε να απομακρυνθούν τα reads χαμηλής ποιότητας. Στη συνέχεια, ακολούθησε η στοίχιση των εκατομμυρίων reads στο γονιδίωμα του ποντικού (Bowtie2) [94] και η αφαίρεση των

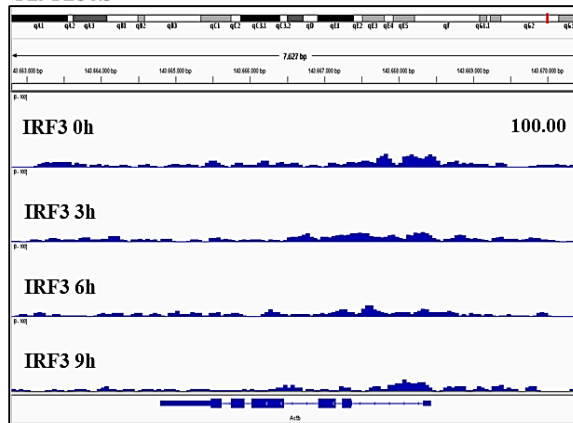
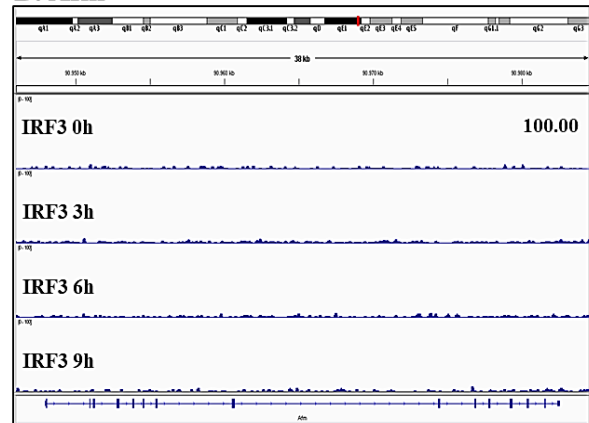
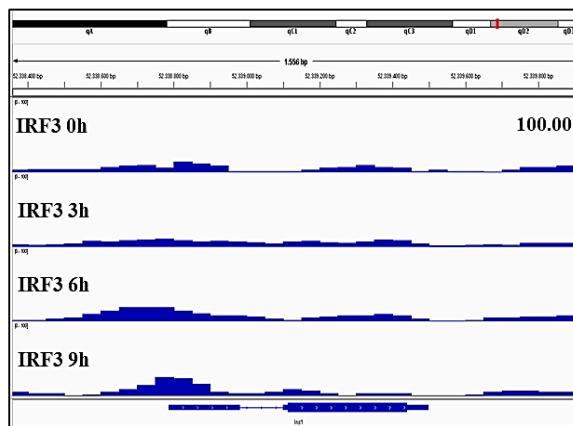
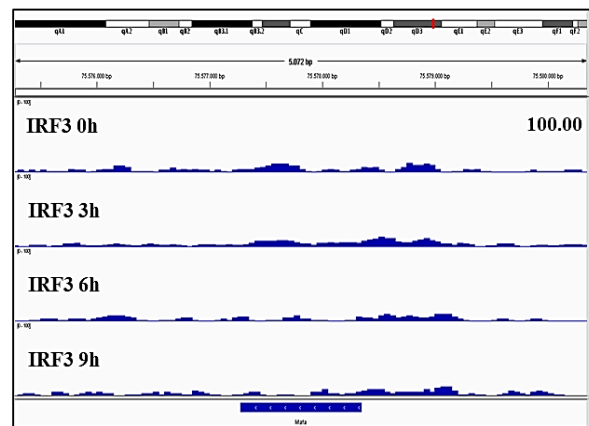
πολλαπλών αντιγράφων ενός read (RmDup) [95]. Επίσης, για τον ποιοτικό έλεγχο του πειράματος IRF3-ChIP-seq, υπολογίστηκε η βαθμολογία FRiP (Fraction of Reads in Peaks), η οποία ορίζεται ως το κλάσμα των reads που αντιστοιχούν σε peaks και ο μέσος εμπλουτισμός του σήματος κάθε δείγματος σε σύγκριση με την τυχαία κατανομή του σήματος στο γονιδίωμα (Mean Enrichment over Random Distribution) (Πίνακας 4.12).

Πίνακας 4.12. Συνολικός αριθμός των reads, που προέκυψαν από το πείραμα IRF3-ChIP-seq, πριν και μετά τη στοίχιση των αλληλουχιών στο γονιδίωμα αναφοράς, αριθμός των πολλαπλών αντιγράφων (duplicates), κλάσμα των reads που αντιστοιχούν σε peaks (FRiP score) και μέσος εμπλουτισμός του σήματος συγκριτικά με την τυχαία κατανομή (mean enrichment over random distribution).

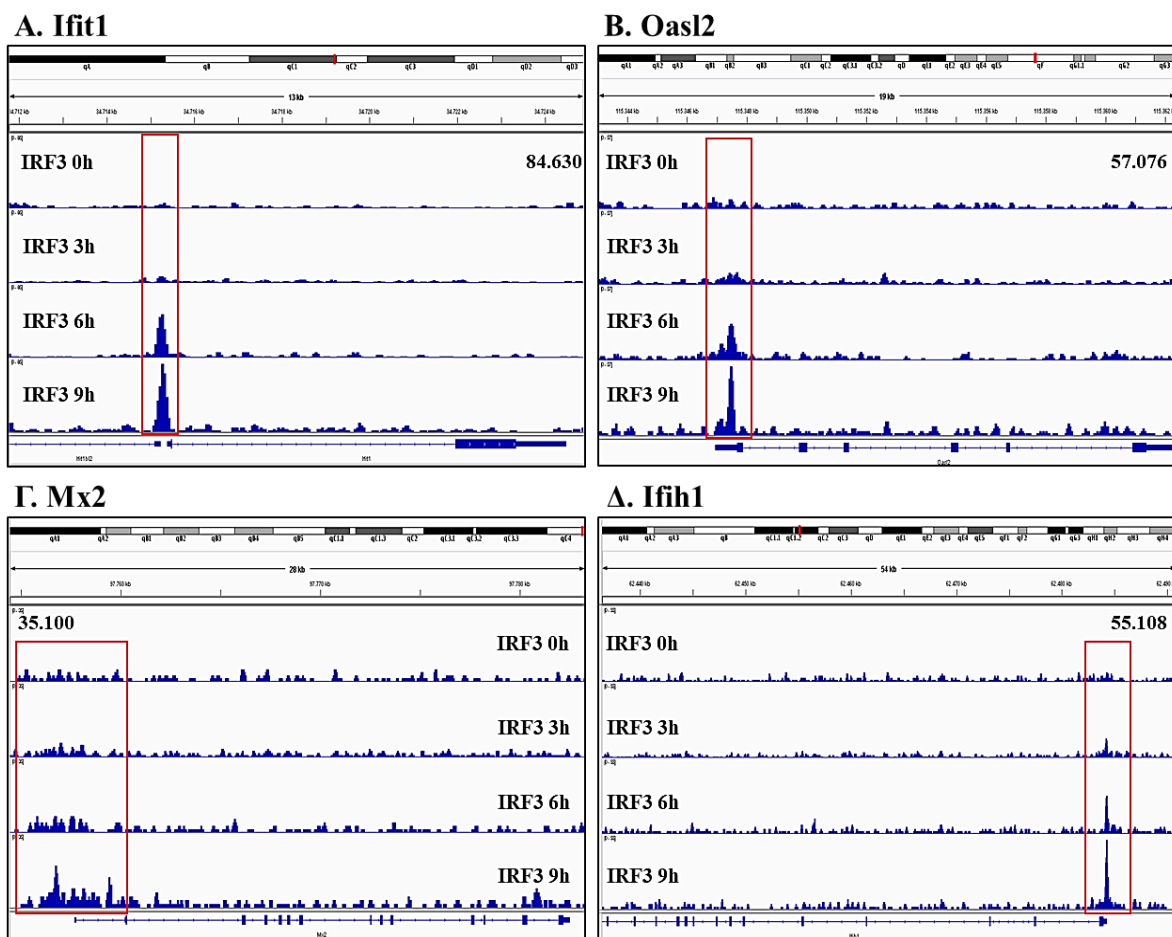
Datasets	Συνολικός αριθμός reads	Αριθμός στοιχισμένων reads	Αριθμός duplicates	FRiP score	Mean Enrichment over Random Distribution
IRF3-ChIP-seq 0h	16.368.593	15.981.299 (97,63%)	2.841.256 (17,78%)	0,0042	22,545
IRF3-ChIP-seq 3h	28.384.547	27.474.644 (96,79%)	7.859.651 (28,61%)	0,0087	11,675
IRF3-ChIP-seq 6h	15.069.652	14.714.746 (97,64%)	2.676.793 (18,19%)	0,0033	22,688
IRF3-ChIP-seq 9h	12.961.464	12.538.499 (96,74%)	2.321.390 (18,51%)	0,0032	28,284

Μετά τη στοίχιση των reads σε ολόκληρο το γονιδίωμα, μπορεί να γίνει οπτικοποίηση του σήματος που προέρχεται από τις θέσεις πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα IRF3, με τον αλγόριθμο bamCoverage [98]. Το σήμα παρουσιάζεται με τη μορφή κορυφών και μπορεί να παρατηρηθεί σε ένα browser, όπως το Integrative Genomics Viewer (IGV). Οι κορυφές αντιστοιχούν στον αριθμό των reads, τα οποία έχουν στοιχηθεί σε μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος και επομένως το ύψος τους είναι ανάλογο του αριθμού των reads.

Για τον έλεγχο της ευαισθησίας και της ειδικότητας του πειράματος IRF3-ChIP-seq μελετήθηκε το σήμα πρόσδεσης του IRF3, κύριου μεταγραφικού παράγοντα που ρυθμίζει την ανοσολογική απόκριση, στις περιοχές των γονιδίων *Actb*, *Afm*, *Ins1*, *Mafa*, *Ifit1*, *Oasl2*, *Mx2* και *Ifih1* πριν και κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης. Τα γονίδια *Actb*, *Afm*, *Ins1* και *Mafa* αποτελούν αρνητικούς στόχους, καθώς δεν σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση και συνεπώς δεν αναμένεται στρατολόγηση του παράγοντα IRF3. Πράγματι, όπως φαίνεται στην εικόνα 4.46 στις περιοχές των γονιδίων *Actb*, *Afm*, *Ins1* και *Mafa* παρατηρούνται πολύ χαμηλά επίπεδα σήματος, τα οποία αγγίζουν τα όρια του «θορύβου» (background), τόσο πριν όσο και κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης. Αντίθετα, τα γονίδια *Ifit1*, *Oasl2*, *Mx2* και *Ifih1* αποτελούν υποψήφιους στόχους καθώς διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αντι-ιϊκή απόκριση και επομένως αναμένεται στρατολόγηση του παράγοντα IRF3 στις συγκεκριμένες περιοχές, σε μεγάλο βαθμό στο σύνολο των κυττάρων που έχουν μολυνθεί από ιό. Όπως αναμένεται και στις τέσσερις περιπτώσεις παρατηρείται έλλειψη σήματος πριν τη μόλυνση με ιό Sendai, καθώς η ενεργοποίηση των γονιδίων αυτών πυροδοτείται από ιϊκές μολύνσεις. Κατά τη διάρκεια της αντι-ιϊκής απόκρισης παρατηρείται σήμα μικρότερης έντασης στις 3 ώρες, ενώ στις 6 ώρες η ένταση του σήματος αυξάνεται περισσότερο. Το μέγιστο σήμα πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα IRF3 παρατηρείται στις 9 ώρες λόγω της μεγαλύτερης έκφρασης των γονιδίων αυτών, με σκοπό την αντιμετώπιση του ιού (Εικόνα 4.47).

A. Actb**B. Afm****Γ. Ins1****Δ. Mafa**

Εικόνα 4.46. Κορυφές του σήματος πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα IRF3 στις περιοχές των γονιδίων *Actb* (Α), *Afm* (Β), *Ins1* (Γ) και *Mafa* (Δ) στα Beta-TC-6 κύτταρα. Οι περιοχές των γονιδίων *Actb*, *Afm*, *Ins1* και *Mafa* δεν περιέχουν υψηλά επίπεδα σήματος, καθώς δεν σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση και συνεπώς αποτελούν αρνητικούς στόχους. Η κλίμακα μεταξύ των τεσσάρων χρονικών σημείων σε κάθε περίπτωση είναι ίση, για τη σύγκριση.



Εικόνα 4.47. Κορυφές του σήματος πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα IRF3 στις περιοχές των γονιδίων Ifit1 (A), Oasl2 (B), Mx2 (Γ) και Ifih1 (Δ) στα Beta-TC-6 κύτταρα. Το σήμα πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα IRF3 γύρω από τους υποκινητές των τεσσάρων γονιδίων, πριν την ιϊκή μόλυνση είναι πολύ χαμηλό. Στα χρονικά σημεία των 3 και 6 ωρών μετά την ιϊκή μόλυνση, παρατηρείται αύξηση του σήματος πρόσδεσης του παράγοντα IRF3 στους υποκινητές των γονιδίων, τα οποία διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην ανοσολογική απόκριση. Στο χρονικό σημείο των 9 ωρών, σημειώνονται τα μέγιστα επίπεδα πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα IRF3 στους υποκινητές των γονιδίων. Η κλίμακα μεταξύ των τεσσάρων χρονικών σημείων σε κάθε περίπτωση είναι ίση, για τη σύγκριση. Οι κορυφές σε κάθε περίπτωση επισημαίνονται με κόκκινο πλαίσιο.

Σύμφωνα με τις παραπάνω εικόνες γίνεται κατανοητό ότι η ιϊκή μόλυνση είναι υπεύθυνη για στρατολόγηση του κύριου μεταγραφικού παράγοντα IRF3, ο οποίος συμμετέχει στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης, σε συγκριμένες περιοχές του γονιδιώματος. Στα γονίδια, τα οποία έχουν σημαντικό ρόλο στην αντι-ιϊκή απόκριση, πριν την ιϊκή μόλυνση (IRF3-ChIP-seq 0h) το σήμα είναι πολύ χαμηλό, στα όρια του «θορύβου» (background), ενώ 3 και 6 ώρες (IRF3-ChIP-seq 3h, IRF3-ChIP-seq 6h) μετά την ιϊκή

μόλυνση παρατηρείται σταδιακή αύξηση, η οποία μεγιστοποιείται στο χρονικό σημείο των 9 ωρών (IRF3-ChIP-seq 9h). Το γεγονός αυτό επισημαίνει το βασικό ρόλο του μεταγραφικού παράγοντα IRF3, στην ενεργοποίηση και στη ρύθμιση του αντι-ϊικού προγράμματος γονιδιακής έκφρασης. Τα σήματα πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα IRF3, τα οποία προέκυψαν από τη βιοπληροφορική ανάλυση του πειράματος IRF3-ChIP-seq, ανέδειξαν νέα πιθανά ρυθμιστικά στοιχεία του γονιδιώματος του ποντικού αλλά δεν είναι σε θέση να χαρακτηρίσουν ποιες από αυτές τις περιοχές είναι ρυθμιστικά ενεργές ή όχι *in vivo*.

Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος MACS2 [96, 97], ο οποίος αναγνώρισε τις εμπλουτισμένες θέσεις του γονιδιώματος σε reads, του πειράματος IRF3-ChIP-seq και έτσι προέκυψαν οι συντεταγμένες, στις οποίες υπάρχει αυξημένη ένταση του σήματος, δηλαδή οι περιοχές των κορυφών (peaks) για κάθε χρονικό σημείο της ιϊκής μόλυνσης. Για την πραγματοποίηση των ποσοτικών αναλύσεων εντοπίστηκαν οι περιοχές πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα IRF3, οι οποίες εμφανίζουν διαφορά 2 fold (διαφορικές κορυφές) μεταξύ των χρονικών σημείων των 0 και 9 ωρών, δηλαδή οι επαγόμενες περιοχές με τις μεγαλύτερες ποσοτικές αλλαγές. Ακολούθησε διερεύνηση της κατανομής του κύριου ρυθμιστή της αντι-ϊικής απόκρισης, IRF3, κατά την εξέλιξη της ιϊκής μόλυνσης, σύμφωνα με τα παραπάνω κριτήρια ανακαλύφθηκαν 235 περιοχές πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα IRF3, 9 ώρες μετά τη μόλυνση. Οι αλλαγές αυτές είναι λίγες αλλά στατιστικά σημαντικές και στοχευμένες σε γονίδια, τα οποία σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση. Οι περιοχές αυτές κατανέμονται σε ολόκληρο το γονιδίωμα και μπορούν να διαχωριστούν περαιτέρω με βάση την απόστασή τους από τον υποκινητή του κοντινότερου γονιδίου. Συγκεκριμένα, οι περιοχές πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα IRF3, οι οποίες απέχουν τουλάχιστον 2 Kb από τους υποκινητές των γονιδίων, χαρακτηρίστηκαν ως TSS-distal IRF3 binding sites, ενώ οι περιοχές που έχουν απόσταση έως 2 Kb από τον κοντινότερο υποκινητή, ονομάστηκαν TSS-proximal IRF3 binding sites. Παρατηρήθηκε ότι η πλειοψηφία των περιοχών πρόσδεσης του IRF3, δηλαδή οι 209 περιοχές είναι TSS-distal IRF3 binding sites, γεγονός αναμενόμενο με την εκτελεστική λειτουργία των ενισχυτών να παρέχουν το ρυθμιστικό τους αποτέλεσμα από απόσταση, μέσω της δημιουργίας τρισδιάστατων δομών [119]. Οι υπόλοιπες 26 περιοχές είναι TSS-proximal IRF3 binding sites, οι οποίες βρίσκονται σε γονιδιακές συντεταγμένες, που γειτνιάζουν με κομβικά γονίδια της αντι-ϊικής απόκρισης, όπως *Stat2*, *Oasl2*, *Ifit1*, *Ifih1* και *Ddx58*.

Για τη μελέτη της κατανομής των αλληλουχιών που προέκυψαν από το πείραμα IRF3-ChIP-seq σε ολόκληρο το γονιδίωμα, χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο βιοπληροφορικής ανάλυσης CEAS [119] της διαδικτυακής πλατφόρμας Cistrome (cistrome.org/ap/) [120]. Το εργαλείο αυτό χαρτογραφεί τις αλληλουχίες που προέκυψαν από το πείραμα και ποσοτικοποιεί τον εμπλουτισμό τους σε σύγκριση με οποιαδήποτε αλληλουχία του γονιδιώματος (Πίνακας 4.13).

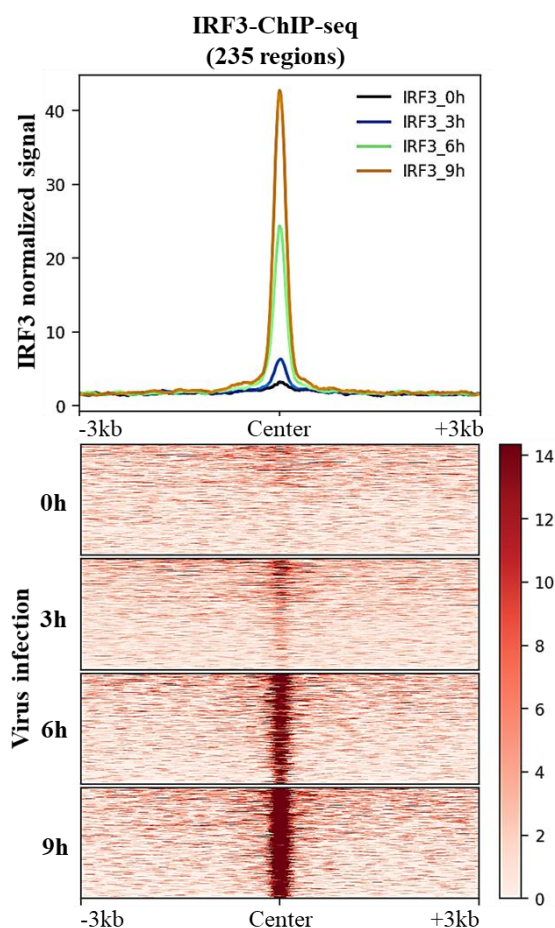
Πίνακας 4.13. Κατηγοριοποίηση της κατανομής του συνόλου των περιοχών του γονιδιώματος σε υποομάδες περιοχών και ποσοτική περιγραφή του εμπλουτισμού των αλληλουχιών του πειράματος IRF3-ChIP-seq στις αντίστοιχες υποομάδες. Στις υποομάδες περιοχών του γονιδιώματος περιλαμβάνονται: περιοχές υποκινητών (promoters), καθοδικές περιοχές (downstream), 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές (5' και 3' Untranslated Region, UTR), κωδικά εξώνια (coding exons), ιντρόνια (introns) και διαγονιδιακές περιοχές (intergenic).

Genomic Regions	Genome	IRF3-ChIP-seq
Promoter (<=1.000 bp)	1,1%	6,0%
Promoter (1.000-2.000 bp)	0,8%	0,9%
Promoter (2.000-3.000 bp)	0,7%	0,9%
Downstream (<=1.000 bp)	1,0%	0,4%
Downstream (1.000-2.000 bp)	0,8%	0,4%
Downstream (2.000-3.000 bp)	0,7%	0,000%
5' UTR	0,3%	3,0%
3' UTR	1,3%	0,4%
Coding exons	2,0%	0,4%
Introns	39,3%	31,9%
Distal intergenic	52,1%	55,7%

Στον πίνακα 4.13 παρατηρείται ότι το υψηλότερο ποσοστό εμπλουτισμού των αλληλουχιών του πειράματος IRF3-ChIP-seq, δηλαδή 55,7% συγκεντρώνεται στις διαγονιδιακές περιοχές (distal intergenic). Επίσης, οι αλληλουχίες, οι οποίες προέκυψαν από το πείραμα, εμφανίζουν μεγάλο ποσοστό εμπλουτισμού στην κατηγορία των υποκινητών, που βρίσκονται έως και 1 Kb μακριά από το TSS (Transcription Start Site) του γονιδίου, ίσο με 6%, σε σχέση με μια τυχαία αλληλουχία του γονιδιώματος. Δηλαδή, μια αλληλουχία από το πείραμα IRF3-ChIP-seq είναι 5,4 φορές ($6\% / 1,1\%$) πιο πιθανή να εντοπίζεται στην

περιοχή των υποκινητών, συγκριτικά με μια τυχαία αλληλουχία του γονιδιώματος. Τέλος, οι αλληλουχίες του πειράματος, οι οποίες κατανέμονται στην 5' αμετάφραστη περιοχή (5' UTR), εμφανίζουν ποσοστό εμπλουτισμό 3% σε σχέση με μια τυχαία αλληλουχία, δηλαδή μια αλληλουχία του πειράματος IRF3-ChIP-seq είναι 10 φορές (3% / 0,3%) πιο πιθανή να χαρτογραφείται σε 5' αμετάφραστη περιοχή.

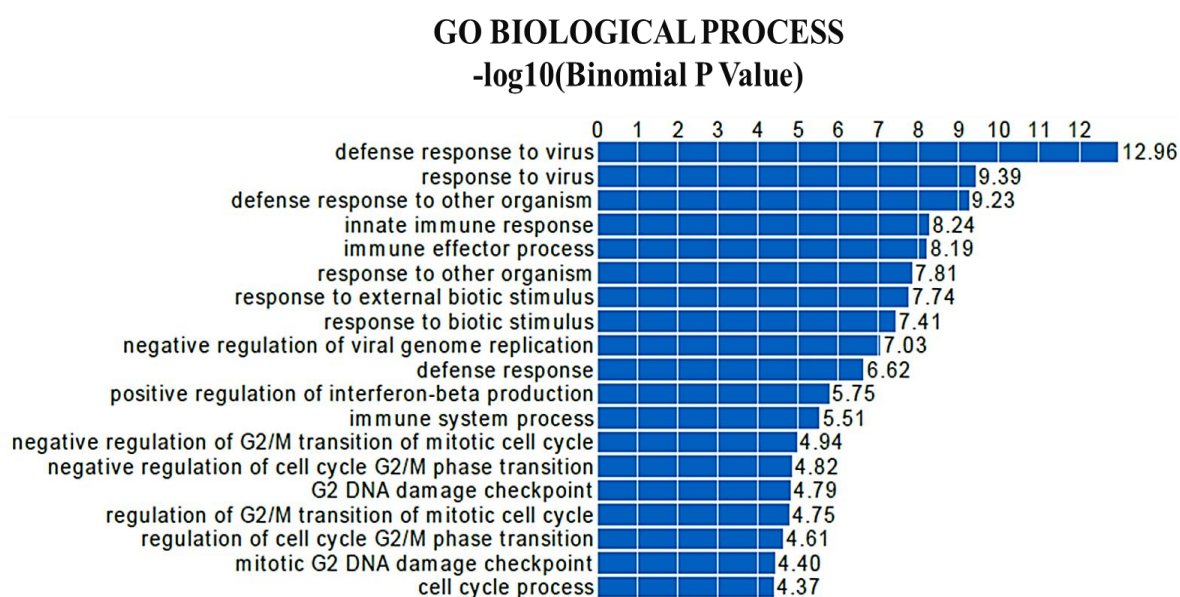
Μετά την επιβεβαίωση του σωστού χωροχρονικά(spatio-temporal) προτύπου πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα IRF3 σε μεμονωμένα γονίδια, ακολούθησε ανάλυση σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος με μεθόδους βιοπληροφορικής. Έτσι, πραγματοποιήθηκε ποσοτική ανάλυση της κατανομής του σήματος (RPKM), το οποίο προέρχεται από τις 235 περιοχές επαγόμενης πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα IRF3, γύρω από το κέντρο των θέσεων αυτών, δηλαδή γύρω από το κεντρικό σημείο των επαγόμενων κορυφών (peaks) του πειράματος IRF3-ChIP-seq, κατά την εξέλιξη της ιϊκής μόλυνσης (Εικόνα 4.48). Η μελέτη έγινε ± 3 Kb σε σχέση με το κεντρικό σημείο πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα IRF3 (center). Το πρότυπο που προκύπτει είναι ισχυρά επαγόμενο, γεγονός που συνάδει με την ενεργοποίηση, την είσοδο στον πυρήνα και την πρόσδεση σε γονίδια-στόχους του συγκεκριμένου μεταγραφικού παράγοντα [33, 121].



Εικόνα 4.48. Διαγράμματα κατανομής του σήματος (RPKM) που προέρχεται από τις 235 περιοχές επαγόμενης πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα IRF3 μετά την ιϊκή μόλυνση, γύρω από το κέντρο των θέσεων αυτών. Στο επάνω μέρος της εικόνας παρατίθεται το aggregation plot, ενώ στο κάτω μέρος το heat map. Η μελέτη έγινε ± 3 Kb σε σχέση με το κεντρικό σημείο πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα IRF3 (center). Παρατηρείται προοδευτική αύξηση της συγκέντρωσης του σήματος πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα IRF3 στις 3, 6 και 9 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση.

Από τα παραπάνω διαγράμματα φαίνεται ότι πριν την ιϊκή μόλυνση, δηλαδή στο χρονικό σημείο των 0 ωρών, ο παράγοντας IRF3 δεν προσδένεται στις 253 περιοχές, ενώ 3 ώρες μετά τη μόλυνση παρατηρούνται χαμηλά επίπεδα πρόσδεσής του. Στο χρονικό σημείο των 6 ωρών παρατηρείται έντονη συγκέντρωση του σήματος πρόσδεσης, γύρω από το κεντρικό σημείο των επαγόμενων κορυφών (peaks) του πειράματος IRF3-ChIP-seq, το οποίο μεγιστοποιείται 9 ώρες ύστερα από την ιϊκή μόλυνση (Εικόνα 4.49). Επομένως, οι μεγαλύτερες αλλαγές στην πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα IRF3 πραγματοποιούνται στο χρονικό σημείο των 9 ωρών της ιϊκής μόλυνσης.

Με τη βοήθεια του εργαλείου ClosestBed βρέθηκαν τα κοντινότερα γονίδια των 235 περιοχών, οι οποίες εμφανίζουν μεγαλύτερη πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα IRF3, μετά την ιϊκή μόλυνση. Για την εύρεση των βιολογικών διεργασιών, με τις οποίες σχετίζονται τα 231 γονίδια χρησιμοποιήθηκε ο διαδικτυακός αλγόριθμος GREAT για την πραγματοποίηση ανάλυσης γονιδιακής οντολογίας (GO: Gene Ontology analysis) [99]. Όπως είναι αναμενόμενο, στην εικόνα 4.49 παρατηρείται ότι η πλειοψηφία των γονιδίων αυτών σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση και συγκεκριμένα με μηχανισμούς άμυνας έναντι της ιϊκής μόλυνσης και με την αρνητική ρύθμιση του κύκλου ζωής του ιού. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την αρτιότητα των συνθηκών πραγματοποίησης του πειράματος και την ειδικότητά του.



Εικόνα 4.49. Απεικόνιση των βιολογικών διεργασιών των 231 γονιδίων τα οποία γειτνιάζουν με τις περιοχές που παρουσιάζουν επαγόμενη πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα IRF3 9 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση. Η πλειοψηφία των γονιδίων εμπλέκεται σε διεργασίες που σχετίζονται με την αντι-ιϊκή απόκριση.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε σύγκριση της λίστας των 272 ιϊκά επαγόμενων γονιδίων των Beta-TC-6 κυττάρων και της λίστας των 231 γονιδίων, τα οποία γειτνιάζουν με τις περιοχές που εμφανίζουν επαγόμενη πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα IRF3, στο χρονικό σημείο των 9 ωρών της ιϊκής μόλυνσης. Το αποτέλεσμα έδειξε πως υπάρχουν 32 κοινά γονίδια, τα οποία εμφανίζουν επαγόμενη έκφραση και επαγόμενη πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα IRF3, 9 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση (Πίνακας 4.14). Όπως παρατηρείται στον πίνακα 4.14, μεταξύ των κοινών γονιδίων που προέκυψαν από σύγκριση

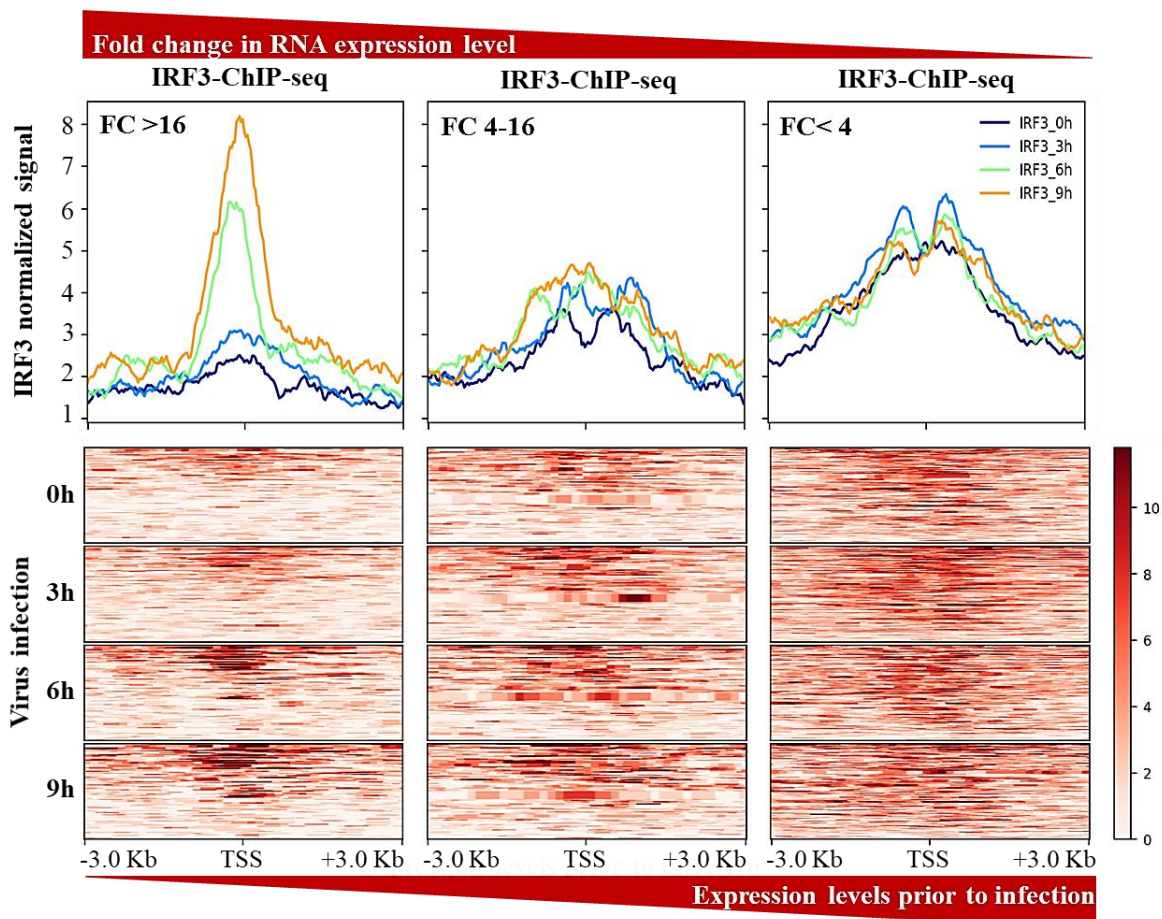
είναι τα *Ddx58*, *Oasl1*, *Oasl2*, *Ifit1*, *Ifit3*, *Ifih1*, *Stat2*, *Rsad2* και *Herc6*, τα οποία έχουν σημαντικό ρόλο κατά την αντι-ϊική απόκριση.

Πίνακας 4.14. Λίστα των 32 ιικά επαγόμενων γονιδίων, τα οποία παρουσιάζουν επαγόμενη πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα IRF3 ύστερα από ιική μόλυνση. Τα γονίδια αναγράφονται με βάση την ονοματολογία τους στο γονιδίωμα του ποντικού.

Γονίδια με επαγόμενη έκφραση και επαγόμενη πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα IRF3 μετά την ιική μόλυνση							
<i>Zcchc2</i>	<i>Inhbb</i>	<i>Gdf11</i>	<i>Cmpk2</i>	<i>Ocln</i>	<i>Dpf3</i>	<i>Ddx60</i>	<i>Zc3hav1</i>
<i>Stat2</i>	<i>Irgm1</i>	<i>Parp14</i>	<i>Trim26</i>	<i>Rtp4</i>	<i>Polr2g</i>	<i>Atm</i>	<i>Lrrc4</i>
<i>Irf1</i>	<i>Rsad2</i>	<i>Il33</i>	<i>Ifit3</i>	<i>Ifit1</i>	<i>Ifih1</i>	<i>Lmo1</i>	<i>Oasl1</i>
<i>Cd274</i>	<i>Gbp7</i>	<i>Ddx58</i>	<i>Ttc39b</i>	<i>Isg15</i>	<i>Hpse</i>	<i>Herc6</i>	<i>Oasl2</i>

Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της διασποράς του σήματος (RPKM) των κορυφών (peaks) του πειράματος IRF3-ChIP-seq στις τρεις κατηγορίες των ιικά επαγόμενων γονιδίων, όπως διαχωρίστηκαν στην ενότητα 4.1, σύμφωνα με τα επίπεδα επαγωγής της έκφρασής τους (Εικόνα 4.50). Η μελέτη έγινε $\pm$ 3 Kb γύρω από το σημείο έναρξης της μεταγραφής (Transcription Start Site, TSS) των γονιδίων, ύστερα από τη στοίχιση των περιοχών με το υψηλότερο αριθμητικά σήμα κατά φθίνουσα σειρά. Στην παρακάτω εικόνα παρατηρείται ότι στην πρώτη κατηγορία γονιδίων, τα οποία παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη επαγωγή έκφρασης (fold change > 16), ο μεταγραφικός παράγοντας IRF3 δεν προσδένεται πριν την ιική μόλυνση, ενώ 9 ώρες μετά υπάρχει έντονη παρουσία γύρω από το σημείο έναρξης της μεταγραφής των γονιδίων. Στη δεύτερη κατηγορία γονιδίων, στην οποία συμπεριλήφθηκαν γονίδια με επίπεδο επαγωγής από 4 έως 16 φορές (fold change 4-16), φαίνεται ότι υπάρχει σήμα πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα IRF3, πριν την ιική μόλυνση, το οποίο μεγιστοποιείται στο χρονικό σημείο των 9 ωρών. Στην τρίτη κατηγορία γονιδίων, τα οποία παρουσιάζουν τη μικρότερη επαγωγή έκφρασης (fold change < 4), υπάρχει έντονη πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα IRF3 γύρω από το σημείο έναρξης της μεταγραφής (Transcription Start Site, TSS) των γονιδίων, η οποία βρίσκεται στα ίδια επίπεδα, τόσο πριν την ιική μόλυνση όσο και κατά την πρόοδό της. Επομένως, οι μεγαλύτερες αλλαγές της πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα IRF3 πραγματοποιούνται στην πρώτη ομάδα γονιδίων, τα οποία εμφανίζουν τη μεγαλύτερη επαγωγή έκφρασης και μόνο το 23,68% αυτών έχει βασικά επίπεδα έκφρασης πριν την ιική

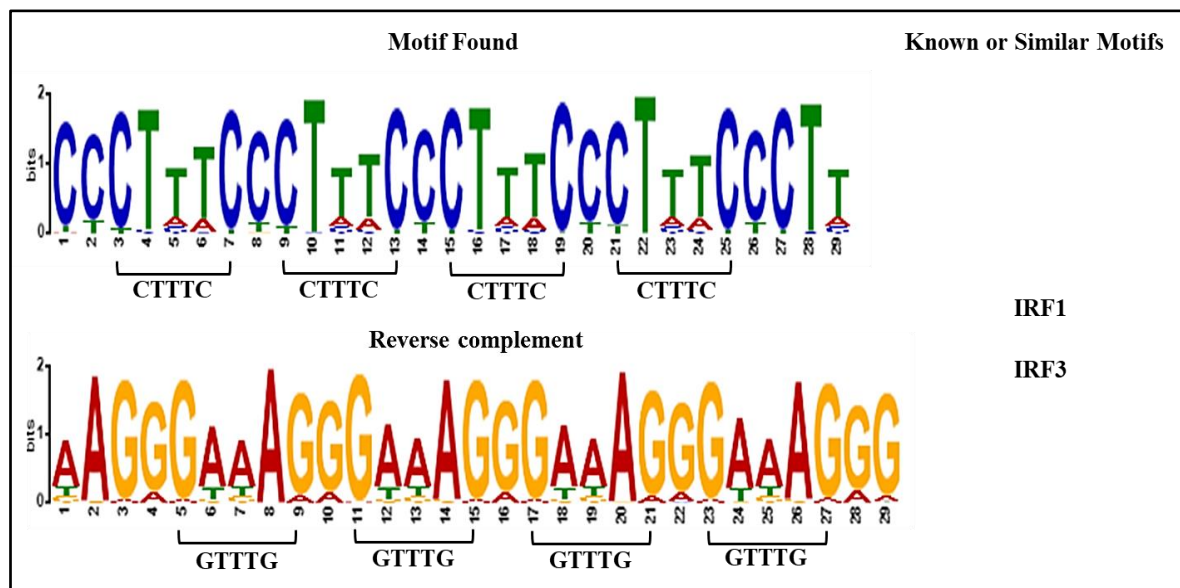
μόλυνση. Το γεγονός αυτό συμβαδίζει με την προσβασιμότητα των χρωματινικών περιοχών, την κατανομή της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac και την πρόσδεση του ενζύμου RNAPolIII στα ιικά επαγόμενα γονίδια, κατά την εξέλιξη της μόλυνσης.



Εικόνα 4.50. Διαγράμματα κατανομής του σήματος (RPKM) που προέρχεται από το πείραμα IRF3-ChIP-seq στις τρεις κατηγορίες των ιικά επαγόμενων γονιδίων κατά την πρόοδο της ιικής μόλυνσης. Στο επάνω μέρος της εικόνας παρατίθενται τα aggregation plots, ενώ στο κάτω μέρος τα heat maps. Η μελέτη έγινε ± 3 Kb γύρω από το σημείο έναρξης της μεταγραφής των γονιδίων (TSS).

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ανάλυση μοτίβων μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι εντοπίζονται στις περιοχές των κορυφών (peaks) που εμφανίζουν αυξημένη ένταση σήματος στο χρονικό σημείο των 9 ωρών μετά την ιική μόλυνση. Με την χρήση του αλγορίθμου MEME-ChIP [122] της διαδικτυακής πλατφόρμας MEME Suite [123], βρέθηκαν τα μοτίβα, τα οποία εμφανίζουν μεγαλύτερο εμπλουτισμό στις αλληλουχίες που μελετήθηκαν. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης του προγράμματος MEME-ChIP, το πιο συχνό και στατιστικά σημαντικό μοτίβο, που υπάρχει στις αλληλουχίες, είναι αυτό στο οποίο σύμφωνα με τη βιβλιογραφία προσδένονται οι μεταγραφικοί παράγοντες

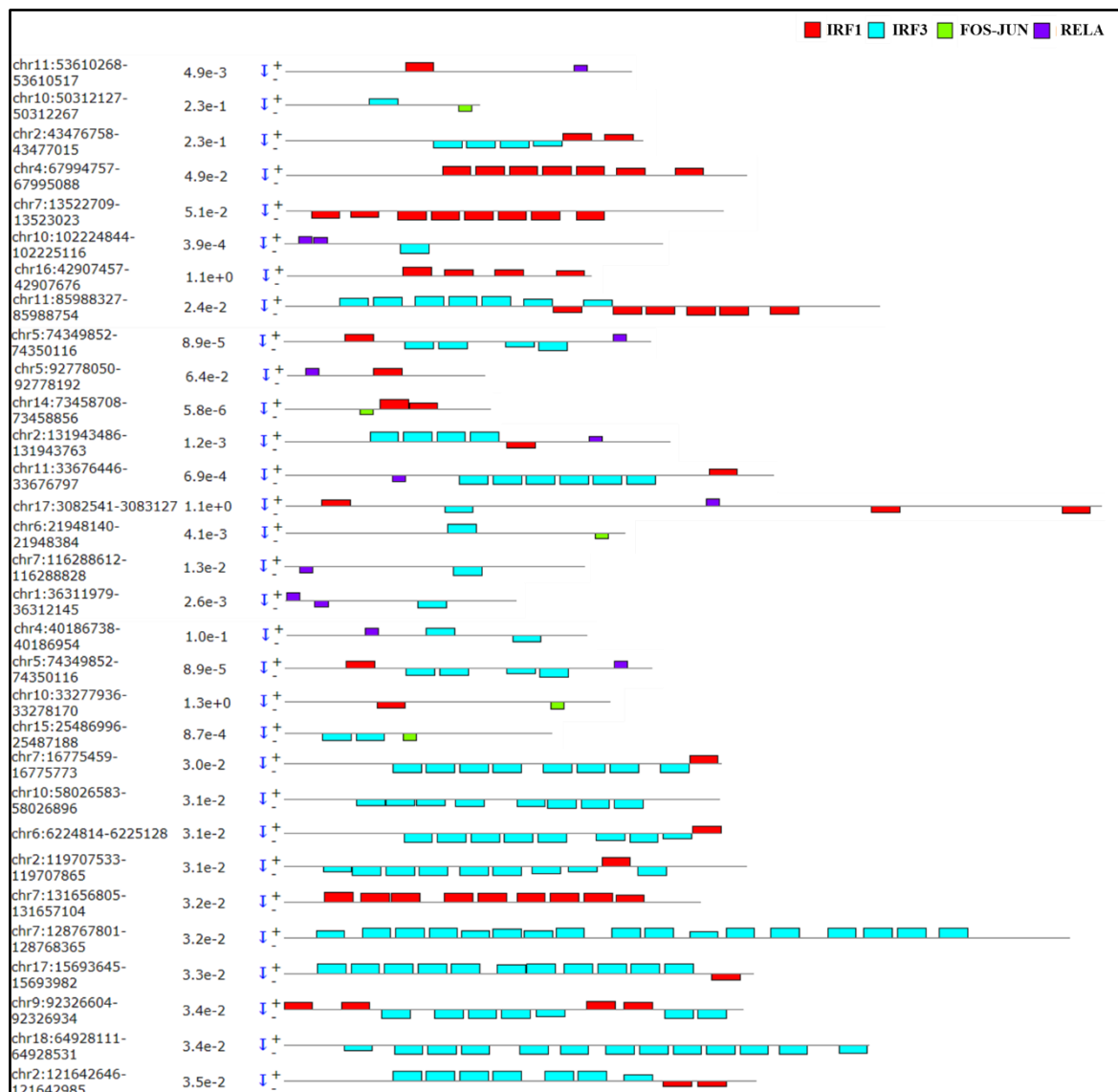
IRF1 και IRF3 (Εικόνα 4.51). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι οι περιοχές, στις οποίες στρατολογείται ο μεταγραφικός παράγοντας IRF3, μπορεί να φιλοξενούν και τον παράγοντα IRF1 και ότι τα μοτίβα πρόσδεσης των δύο μεταγραφικών παραγόντων ομοιάζουν στον μεγαλύτερο αριθμό των δεοξυριβονουκλεοτιδίων.



Εικόνα 4.51. Απεικόνιση του στατιστικά σημαντικότερου μοτίβου που κυριαρχεί στις αλληλουχίες του πειράματος IRF3-ChIP-seq όπως προέκυψε από το πρόγραμμα εύρεσης μοτίβων MEME-ChIP [122].

Με τη χρήση του αλγορίθμου MAST [124] έγινε απεικόνιση των μοτίβων πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων IRF1, IRF3, Fos:Jun και RelA (p65) στις περιοχές των κορυφών (peaks), που εμφανίζουν αυξημένη ένταση σήματος στο χρονικό σημείο των 9 ωρών μετά την ιϊκή μόλυνση. Οι απαραίτητες πληροφορίες για τα μοτίβα πάρθηκαν από τη βάση δεδομένων JASPAR2018_CORE Vertebrate non-redundant [123]. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται οπτικοποίηση της παρουσίας των συγκεκριμένων μοτίβων στις αλληλουχίες του πειράματος IRF3-ChIP-seq. Στην εικόνα 4.52 παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποια από τα αποτελέσματα του εργαλείου MAST. Φαίνεται ότι στην πλειοψηφία των περιοχών εντοπίζονται πολυεπαναλαμβανόμενες μονάδες μοτίβων πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων IRF1 και IRF3. Ο εντοπισμός πολλαπλών μοτίβων πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων IRF1 και IRF3, σε κοντινή απόσταση μεταξύ τους, υποδηλώνει τη μεγάλη σημασία της πρόσδεσης των IRF1 και IRF3 στα αντίστοιχα σημεία κατά τη διάρκεια της αντι-ιϊκής απόκρισης. Επίσης, οι αλληλουχίες περιέχουν περισσότερα του ενός διαφορετικά μοτίβα. Σε έναν μικρό αριθμό περιοχών εντοπίζονται μοτίβα των

βασικών μεταγραφικών παραγόντων Fos:Jun και RelA, οι οποίοι συμμετέχουν στην ανοσολογική απόκριση, συναρμολογώντας το ενισχυόσωμα μετά από ιϊκή μόλυνση [45, 47].



Εικόνα 4.52. Απεικόνιση των μοτίβων πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων IRF1, IRF3, Fos:Jun και RelA στις αλληλουχίες του πειράματος IRF3-ChIP-seq όπως προέκυψε από το πρόγραμμα εύρεσης μοτίβων MAST [123]. Η σήμανση των μοτίβων έγινε με τον εξής τρόπο: κόκκινο χρώμα για τα μοτίβα του μεταγραφικού παράγοντα IRF3, γαλάζιο χρώμα για τα μοτίβα του παράγοντα IRF3, πράσινο χρώμα για τα μοτίβα του παράγοντα Fos:Jun και μοβ χρώμα για τα μοτίβα του παράγοντα RelA. Παρατείνεται ότι η πλειοψηφία των περιοχών χαρακτηρίζεται από επαναλαμβανόμενες μονάδες μοτίβων προσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων IRF1 και IRF3 και σε κάποιες περιοχές εντοπίζονται μοτίβα των μεταγραφικών παραγόντων Fos:Jun και RelA.

Με βάση όλα τα παραπάνω στοιχεία γίνεται κατανοητό ότι η πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα IRF3, ο οποίος είναι κύριος ρυθμιστής της ανοσολογικής απόκρισης, στο γονιδίωμα των Beta-TC-6 κυττάρων, επάγεται κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης. Επίσης, η πρόσδεσή του πραγματοποιείται σε ρυθμιστικές περιοχές γονιδίων, τα οποία κατέχουν σημαντικό ρόλο στην αντι-ϊκή απόκριση. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την ύπαρξη ενός μηχανισμού στοχευμένης πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα IRF3 και όχι τυχαίου διασκορπισμού στο γονιδίωμα. Επιπλέον, τονίζεται ο βασικός ρόλος του παράγοντα IRF3 στην επαγωγή και στη ρύθμιση του αντι-ϊκού προγράμματος γονιδιακής έκφρασης. Συμπερασματικά, η πλατφόρμα των Beta-TC-6 κυττάρων αναπτύχθηκε ορθά στο εργαστήριό μας και βάσει του πειράματος IRF3-ChIP-seq, προέκυψαν τα παρακάτω ευρήματα: 1) ταυτοποιήθηκαν 235 περιοχές, οι οποίες χαρακτηρίζονται από επαγόμενη πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα IRF3, μετά την ιϊκή μόλυνση, 2) οι περιοχές αυτές εντοπίζονται κοντά σε γονίδια, των οποίων η έκφραση επάγεται μετά τη μόλυνση και σχετίζονται με την αντι-ϊκή απόκριση, 3) έχουν ισχυρή πιθανότητα να λειτουργούν ως ενισχυτές και να ρυθμίζουν την επαγόμενη έκφραση των αντι-ϊκών γονιδίων κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης, 4) το μεγαλύτερο ποσοστό των 235 αλληλουχιών αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες μοτίβων πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων IRF1 και IRF3. Επομένως, το πείραμα IRF3-ChIP-seq χαρακτηρίζεται από υψηλή ειδικότητα και αρτιότητα.

4.6. Σχεδιασμός συνθετικών αλληλουχιών DNA και πειραματικής μεθοδολογίας για τον λειτουργικό χαρακτηρισμό και τον έλεγχο της ενεργότητάς τους με τη μέθοδο STARR-seq

Η επιστημονική υπόθεση του εργαστηρίου μας είναι ότι ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1 είναι μια ασθένεια που επέρχεται ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης γενετικών αλλαγών και ιϊκής μόλυνσης, τα οποία οδηγούν στην εγκαθίδρυση ανορθόδοξων προγραμμάτων γονιδιακής έκφρασης στη διάρκεια της αντι-ϊκής απόκρισης, οδηγώντας σε αλλαγές των προγραμμάτων γονιδιακής έκφρασης των β παγκρεατικών κυττάρων. Μελέτες ευρείας γονιδιωματικής συσχέτισης (Genome Wide Association Studies, GWAS) έχουν αναγνωρίσει χιλιάδες γενετικές παραλλαγές και συγκεκριμένα μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs), οι οποίοι εντοπίζονται σε μεγάλο βαθμό σε μη κωδικές περιοχές του γονιδιώματος και σχετίζονται με ανθρώπινες

ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1. Ένας πιθανός μηχανισμός, μέσω του οποίου τα SNPs, που βρίσκονται σε μη κωδικές περιοχές, οδηγούν σε συγκεκριμένους φαινοτύπους, είναι η διακοπή της φυσιολογικής λειτουργίας των ρυθμιστικών αλληλουχιών των γονιδίων [125]. Το γεγονός αυτό περιγράφεται επίσης στο πρόσφατα αναπτυγμένο επιστημονικό πεδίο, το οποίο εισήγαγε τον όρο «ενισχυοπάθειες» [7, 126], ένας όρος που περιγράφει ανθρώπινους παθογόνους φαινοτύπους, οι οποίοι προκύπτουν ως αποτέλεσμα λανθασμένης γονιδιακής έκφρασης, λόγω τροποποιήσεων μη κωδικών τμημάτων του γονιδιώματος. Η αποκρυπτογράφηση αυτών των πολύπλοκων φαινομένων καθώς και της λειτουργίας των γενετικών παραλλαγών είναι κρίσιμη για την κατανόηση του μηχανισμού εμφάνισης και της ετερογένειας των ανθρώπινων κληρονομικών ασθενειών και αποτελεί πρόκληση, εν μέρει επειδή είναι δύσκολο να αποδοθεί η λειτουργική επίδραση των παραλλαγών του γονιδιώματος και επιπλέον έχει αποδειχθεί δύσκολη η σύνδεση των μη κωδικών περιοχών με τα γονίδια στόχους αυτών.

Χάρη στο μεγάλο όγκο διαθέσιμων πληροφοριών από μελέτες ευρείας γονιδιωματικής συσχέτισης (GWAS), που αφορούν μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNPs), οι οποίοι έχουν συσχετιστεί με τον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1, αποφασίσαμε να μελετήσουμε τη λειτουργική δράση των περιοχών του γονιδιώματος που φέρουν κρίσιμες μεταλλάξεις πριν και μετά την ιϊκή μόλυνση και κατά πόσο τα SNPs μπορούν να επηρεάσουν την ενεργότητα των ρυθμιστικών στοιχείων, οδηγώντας τελικά στον διαβητικό φαινότυπο. Η μελέτη αυτή θα πραγματοποιηθεί με την εφαρμογή μιας τροποποιημένης μεθόδου STARR-seq, η οποία ονομάζεται syn-STARR-seq (synthetic-STARR-seq) και περιλαμβάνει τον σχεδιασμό, τη σύνθεση και την ταυτόχρονη λειτουργική *in vivo* εξέταση, χιλιάδων συνθετικών αλληλουχιών DNA. Για τον σκοπό αυτό, σχεδιάστηκε η πειραματική πορεία, ώστε να διερευνηθεί η παραπάνω πρόταση λεπτομερώς. Το πρώτο βήμα ήταν η συλλογή όλων των περιοχών που περιέχουν SNPs [κύρια SNPs και παραλλαγές που βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης ($r^2 > 0,8$) για κάθε ένα από τα κύρια SNPs], τα οποία έχουν συσχετιστεί με τον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1, από το HaploReg,[127], εργαλείο το οποίο περιέχει συγκεντρωτικά δεδομένα από μελέτες ευρείας γονιδιωματικής συσχέτισης. Επιπλέον, με τη βοήθεια των εργαλείων που διαθέτει ο αλγόριθμος Ensembl, βρέθηκαν 25 ομόλογες περιοχές των συντεταγμένων που έχουν κύρια SNPs, στο γονιδίωμα του ποντικού, ώστε να ελεγχθούν και αυτές ως προς τη λειτουργικότητά τους, με τη μέθοδο syn-STARR-seq. Πειράματα IRF3-ChIP-STARR-seq, στο εργαστήριό μας σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα (HeLa) μετά από ιϊκή μόλυνση, έχουν οδηγήσει στην ανακάλυψη ότι

τα πιο συχνά εντοπισμένα μοτίβα στις αλληλουχίες πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα IRF3, είναι αυτά των μεταγραφικών παραγόντων IRF1, IRF3, RelA (p65) και Fos:Jun. Έτσι, είναι πολύ πιθανό οι ρυθμιστικές αλληλουχίες, που έχουν τα παραπάνω μοτίβα, να ρυθμίζονται από την ιϊκή μόλυνση. Επομένως, το επόμενο βήμα ήταν ο έλεγχος όλων των αλληλουχιών που περιέχουν SNPs, τα οποία σχετίζονται με τον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1, για την ύπαρξη των παραπάνω μοτίβων. Με τη χρήση του αλγορίθμου MAST [124] της διαδικτυακής πλατφόρμας βιοπληροφορικών αναλύσεων MEME Suite [123] έγινε χαρτογράφηση και επιλογή των αλληλουχιών που διαθέτουν τα παραπάνω μοτίβα, ώστε να μελετηθούν ως προς την ενεργότητά τους. Τέλος, συμπεριλήφθηκαν αλληλουχίες, οι οποίες προέκυψαν από τα πειράματα *γονιδιωματικής* που αναφέρθηκαν νωρίτερα, χαρακτηρίζονται από ευαισθησία στη DNase I, παρουσία της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac, πρόσδεση της RNA πολυμεράσης II και του μεταγραφικού παράγοντα IRF3 και αποτελούν υποψήφια ρυθμιστικά στοιχεία.

Μετά την ολοκλήρωση της εύρεσης όλων των αλληλουχιών που θέλαμε να μελετήσουμε, προχωρήσαμε στη χειροκίνητη εισαγωγή των SNPs και των μεταλλάξεων. Όσον αφορά τον σχεδιασμό, αποφασίστηκε οι τελικές αλληλουχίες που θα χρησιμοποιηθούν για το πείραμα να έχουν μήκος 163 βάσεων και το SNP να βρίσκεται στο κέντρο της κάθε αλληλουχίας. Για κάθε επιλεγμένη αλληλουχία σχεδιάστηκαν δύο εκδοχές: 1) άγριου τύπου αλληλουχία (wild type), 2) μεταλλαγμένη αλληλουχία (mutated). Τα SNPs εισήχθησαν στις αλληλουχίες, με βάση τα δεδομένα που περιλαμβάνονται στο HarpReg. Έτσι, στη μορφή άγριου τύπου τοποθετήθηκε στην κατάλληλη θέση η βάση αναφοράς, ενώ στη μεταλλαγμένη μορφή τοποθετήθηκε στην αντίστοιχη θέση η παραλλαγή της βάσης (Πίνακας 4.15). Σε ορισμένες περιπτώσεις όπου υπήρξαν περισσότερες από μία παραλλαγές, σχεδιάστηκε αντίστοιχος αριθμός μεταλλαγμένων αλληλουχιών. Επιπλέον, οι μεταλλάξεις αποφασίστηκε να εισαχθούν σε κρίσιμα σημεία των μοτίβων, τα οποία διατηρούνται σταθερά (Πίνακας 4.16). Για τον σχεδιασμό των ομόλογων περιοχών των ανθρώπινων SNPs, που έχουν συσχετιστεί με τον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1, στο γονιδίωμα του ποντικού, τα SNPs εισήχθησαν στις αντίστοιχες συντεταγμένες. Τέλος, στο σύνολο των αλληλουχιών προστέθηκαν περιοχές αρνητικού ελέγχου, χωρίς καταγεγραμμένη σύνδεση με τον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1.

Πίνακας 4.15. Παράδειγμα του τρόπου εισαγωγής των SNPs σε μία θέση που διαθέτει 1 παραλλαγή, η οποία έχουν συσχετιστεί με τον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1. Με πράσινο χρώμα σημαίνεται η βάση αναφοράς της άγριου τύπου αλληλουχίας, ενώ με κόκκινο χρώμα σημαίνεται η παραλλαγή αυτής της βάσης στην μεταλλαγμένη αλληλουχία.

Name	Synthetic sequence
Wild Type	5' -...CAGTCTGTCAGCAAAGCC GC CAGTACACTGAGAAA...- 3'
Mutation #1	5' -...CAGTCTGTCAGCAAAGCC TG CAGTACACTGAGAAA ...- 3'

Πίνακας 4.16. Άγριου τύπου (wild type) αλληλουχίες των μοτίβων **IRF1**, **IRF3**, **RelA** και **Fos:Jun** καθώς και οι αντίστοιχες μεταλλαγμένες (mutated) αλληλουχίες αυτών. Με πράσινο χρώμα σημαίνονται οι βάσεις, οι οποίες δέχονται τη μετάλλαξη, ενώ με κόκκινο χρώμα σημαίνονται οι αλλαγές των βάσεων (μεταλλάξεις) που έχουν πραγματοποιηθεί. Το σύμβολο N αντιστοιχεί σε τυχαίο δεοξυριβονουκλεοτίδιο.

Transcription Factors	Wild Type motif	Mutated motif
IRF1	N TTT CNN TTT C	N CC TCNN CC TC
IRF3	NGA AA NNGA AA N	NGA GG NNGA GG N
RelA	N GG NN TT TCC	NA AN NC CC TCC
Fos:Jun	N TG ANT CA N	N CA ANT TG N

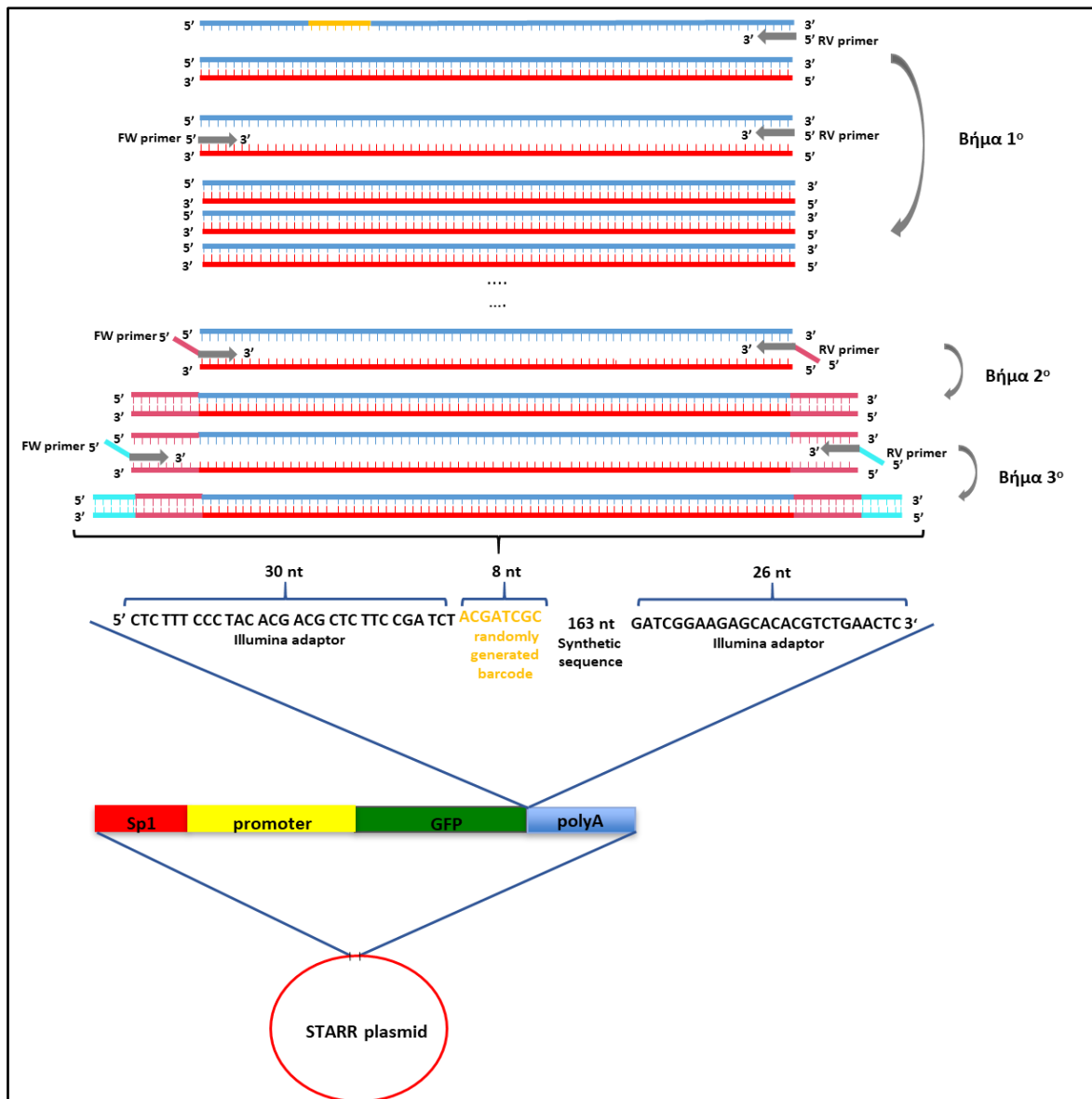
Ύστερα από τον σχεδιασμό 2.500 αλληλουχιών (Εικόνα 4.53), τόσο στο 5' άκρο όσο και στο 3' άκρο όλων προστέθηκαν δύο ειδικές αλληλουχίες μήκους 30 και 26 νουκλεοτιδίων αντίστοιχα, διαφορετικές μεταξύ τους, οι οποίες χαρακτηρίζονται ως αλληλουχίες προσαρμογής (adaptors). Οι adaptors είναι κοινοί για κάθε αλληλουχία και χρησιμοποιούνται για τη διαδικασία της αλληλούχησης νέας γενιάς. Αμέσως μετά τον adaptor του 5' άκρου σε καθεμία αλληλουχία, προστέθηκαν 8 νουκλεοτίδια τυχαίας σειράς και περιεκτικότητας, τα οποία αποτελούν την αλληλουχία σήμανσης (barcode). Τα barcodes χρησιμοποιούνται προκειμένου στο τέλος της αλληλούχησης να είναι δυνατός ο διαχωρισμός και η αναγνώριση των αλληλουχιών μεταξύ τους. Οι επιλεγμένες αλληλουχίες (wild type και mutated) συντέθηκαν μαζί από την Agilent, εταιρεία παραγωγής συνθετικών αλληλουχιών DNA (custom made DNA fragments) και αποστάλθηκαν σε κοινό διάλυμα, σε μορφή μονόκλωνου DNA.

chr7:51027193-51027194	
WT	5'.....TAGAAGTGGGTGCCACAACAAGACATGAGCTAGTCTTGGGATAACCACCTCTGCTGCCAGGCCAAAAAGAAACCTCTGATCCCGGAGG.....3'
Mutation #1	5'.....TAGAAGTGGGTGCCACAACAAGACATGAGCTAGTCTTGGGATAACCACCTCTGCTGCCAGGCCAAAAAGAAACCTCTGATCCCGGAGG.....3'
chr2:12642745-12642746	
WT	5'.....ATGTGTGGACTCAGGAAGTCAGGGGAAGGCACTGCTGCTGAGAAGATGAATGTATACAAATCTATGAACATAAAGAAATCAAGAAATGAGT.....3'
Mutation #1	5'.....ATGTGTGGACTCAGGAAGTCAGGGGAAGGCACTGCTGCTGAGAAGATGAATGTATACAAATCTATGAACATAAAGAAATCAAGAAATGAGT.....3'
chr6:32667909-32667910	
WT	5'.....TGGATGTCTAAATTAATACCCCCACATACAAAAACATACGCATATTACTTTAAAGTCATTGAACTGGGGATAATGACAGTGGAGTAAAGG.....3'
Mutation #1	5'.....TGGATGTCTAAATTAATACCCCCACATACAAAAACATACGCATATTACTTTAAAGTCATTGAACTGGGGATAATGACAGTGGAGTAAAGG.....3'
Mutation #2	5'.....TGGATGTCTAAATTAATACCCCCACATACAAAAACATACGCATATTACTTTAAAGTCATTGAACTGGGGATAATGACAGTGGAGTAAAGG.....3'
Mutation #3	5'.....TGGATGTCTAAATTAATACCCCCACATACAAAAACATACGCATATTACTTTAAAGTCATTGAACTGGGGATAATGACAGTGGAGTAAAGG.....3'
chr7:26885794-26885795	
WT	5'.....ACTTAGCATGTGGCATATTTTGCTATTATACTATTAAACCAACAGTGAACCAATAATATATAGCAAAGATTTTGAAAAAATTCAGA.....3'
Mutation #1	5'.....ACTTAGCATGTGGCATATTTTGCTATTATACTATTAAACCAACGGGTGAGGCCAAATAATATATAGCAAAGATTTTGAAAAAATTCAGA.....3'
chr18:12778624-12778805	
WT	5'.....ATGTAAAGACGCTTTTCCTTGCTCTTGGTACACTGAACCGAAGACGATCTGACTCCCCAACCTGTATGTATGTATGTATGTTTGA.....3'
Mutation #1	5'.....ATGTAAAGACGCTTTTCCTTGCTCTTGGTACACTGAACCGAGGACGAGCTGACTCCCCAACCTGTATGTATGTATGTATGTTTGA.....3'
chr6:126679015-126679196	
WT	5'.....TATTACCATTTTTTTGTGGCTACCATAAATGGGATTGTCTTCTCCATGACCTTCAGTTTGAATGTTATTGATTATAGAATTGCTATTGAATTT.....3'
Mutation #1	5'.....TATTACCATTTTTTTGTGGCTACCATAAATGGGATTGTCTTCTCCATGACCTTCAGCTCAGCTGAATGTTATTGATTATAGAATTGCTATTGAATTT.....3'

Εικόνα 4.53. Παραδείγματα αλληλουχιών της συνθετικής βιβλιοθήκης. Η επάνω αλληλουχία αντιστοιχεί στην άγριου τύπου (Wild Type, WT) μορφή, ενώ η κάτω στη μεταλλαγμένη μορφή (mutation). Με πράσινο χρώμα σημαίνονται οι βάσεις που δέχονται τη μετάλλαξη, ενώ με κόκκινο χρώμα σημαίνονται τα SNPs και οι αλλαγές των βάσεων που έχουν πραγματοποιηθεί.

Ακολούθησε ο σχεδιασμός των απαραίτητων βημάτων για την επεξεργασία, τον εμπλουτισμό της βιβλιοθήκης των συνθετικών αλληλουχιών, η οποία αρχικά συντέθηκε σε πολύ μικρή ποσότητα, και την πραγματοποίηση πιλοτικών πειραμάτων ελέγχου και βελτιστοποίησης των συνθηκών του πειράματος. και η πραγματοποίηση πιλοτικών πειραμάτων ελέγχου και βελτιστοποίησης των συνθηκών. Επειδή η σύνθεση της βιβλιοθήκης πραγματοποιήθηκε σε μονόκλωνη μορφή, πρέπει πρώτα να πραγματοποιηθεί η μετατροπή της σε δίκλωνη. Επομένως, στο πρώτο βήμα της πειραματικής διαδικασίας, πραγματοποιήθηκε η μετατροπή της συνολικής βιβλιοθήκης από μονόκλωνη σε δίκλωνη, με η χρήση ενός συμπληρωματικού εκκινητή, ο οποίος υβριδίζει στο κοινό για όλες τις αλληλουχίες τελικό 3' άκρο με κατεύθυνση 5'→3' και προσφέρει το απαραίτητο 3-OH άκρο, ώστε να ξεκινήσει η πολυμεράση τη σύνθεση των συμπληρωματικών κλώνων. Επίσης, στο ίδιο βήμα πραγματοποιήθηκε ομοιόμορφος πολλαπλασιασμός της βιβλιοθήκης σε εκατομμύρια αντίγραφα, με τη βοήθεια ενός 5'→3' εκκινητή, ο οποίος υβριδίζει στο 3' άκρο των νεοσυντιθέμενων κλώνων. Στη συνέχεια πρέπει να γίνει σταδιακή προσθήκη

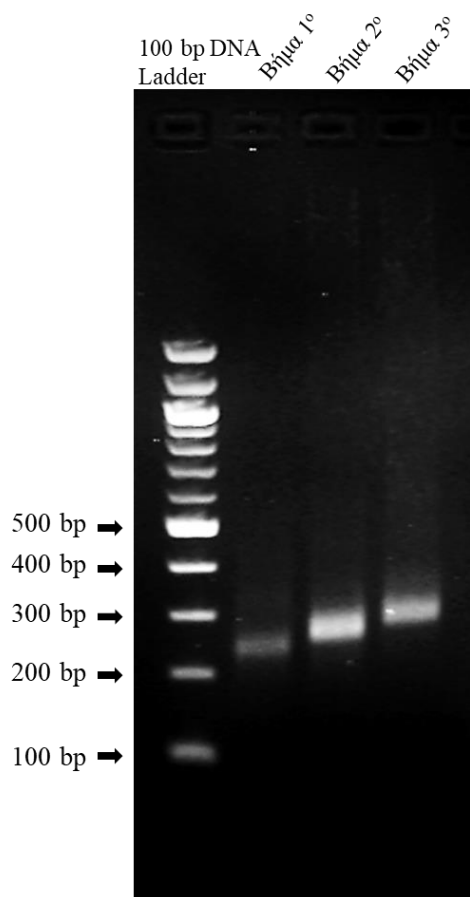
ειδικών θέσεων αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων Agel και Sall, σε κάθε άκρο των αλληλουχιών, ώστε να γίνει εισαγωγή τους, μέσω ανασυνδυασμού στους πλασμιδιακούς φορείς sp1STARR. Επειδή είναι γνωστό ότι κατά τη διαδικασία της συνένωσης τμημάτων DNA, μέσω της αντίδρασης λιγάσης, υπάρχει απώλεια σημαντικού μέρους του αρχικού υλικού της βιβλιοθήκης, το «χτίσιμο» των επιθυμητών αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε μέσω δύο αντιδράσεων PCR. Επομένως, στο δεύτερο βήμα, μέρος των ανώτερων εκκινητών, οι οποίοι έχουν τροποποιηθεί με συγκεκριμένες 5' προεκτάσεις, χρησιμοποιήθηκαν για να προστεθεί ορισμένη έκταση από τις απαραίτητες θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων. Τέλος, στο τρίτο βήμα ολοκληρώθηκε η σύνθεση των άκρων, με τη χρήση εκκινητών που φέρουν 5' προεκτάσεις, οι οποίες συμπεριλαμβάνουν τις απαραίτητες αλληλουχίες για την εισαγωγή της δίκλωνης βιβλιοθήκης στους φορείς sp1STARR (Εικόνα 4.54).



Εικόνα 4.54. Σχηματική απεικόνιση πειραματικής πορείας για την αξιολόγηση των συνθετικών αλληλουχιών με τη μέθοδο syn-STARR-seq.

Ύστερα από την ολοκλήρωση των παραπάνω βημάτων, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση ίσης ποσότητας από τις τρεις αντιδράσεις PCR, σε πήκτωμα αгарόζης 2% μαζί με έναν δείκτη μοριακού βάρους (100 bp) (Εικόνα 4.55). Στην εικόνα 4.55 παρατηρείται ότι τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR κυμαίνονται από 200-300 ζεύγη βάσεων και εμφανίζουν προοδευτική αύξηση του μεγέθους τους ανάμεσα στα στάδια του πειράματος. Πιο συγκεκριμένα, στο πρώτο βήμα, όπου πραγματοποιήθηκε η μετατροπή των αλληλουχιών σε δίκλωνες και ο πολλαπλασιασμός της βιβλιοθήκης, το μέγεθος του προϊόντος της αντίδρασης εντοπίζεται περίπου στα 230 bp. Στο δεύτερο βήμα, όπου πραγματοποιήθηκε προσθήκη συνολικά 24 bp στα άκρα των αλληλουχιών, το μέγεθος του προϊόντος φαίνεται να είναι περίπου 250 bp. Ενώ στο τρίτο βήμα, στο οποίο

πραγματοποιήθηκε προσθήκη συνολικά 16 bp στα άκρα των αλληλουχιών, το μέγεθος του προϊόντος εντοπίζεται στην περιοχή των 270 bp έως 300 bp. Το εύρος μεγέθους των προϊόντων των αντιδράσεων PCR είναι αρκετά ικανοποιητικό, ώστε να πραγματοποιηθεί αντίδραση ανασυνδυασμού για την εισαγωγή της βιβλιοθήκης στον πλασμιδιακό φορέα sp1STARR.



Εικόνα 4.55. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των τριών αντιδράσεων PCR που πραγματοποιήθηκαν για την επεξεργασία της βιβλιοθήκης των συνθετικών αλληλουχιών. Τα προϊόντα που προκύπτουν κυμαίνονται μεταξύ 200-300 ζευγών βάσεων. Βήμα 1^ο: μετατροπή των αλληλουχιών σε δίκλωνες και πολλαπλασιασμός της βιβλιοθήκης. Βήμα 2^ο και 3^ο: σταδιακή προσθήκη ειδικών θέσεων αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων *AgeI* και *Sall*, στα άκρα των αλληλουχιών.

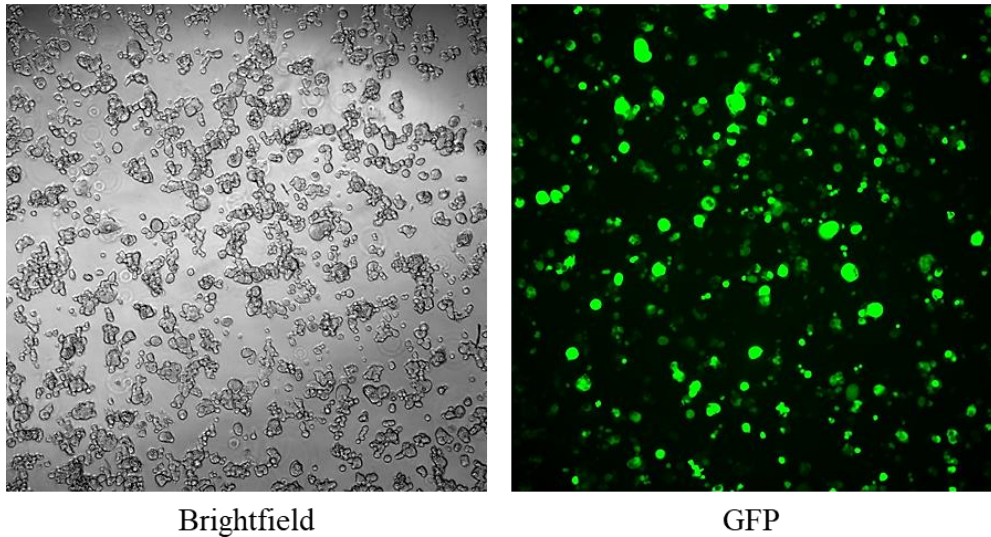
Στη συνέχεια, η αντίδραση ανασυνδυασμού έγινε μέσω του Clontech In-Fusion HD Kit, με αποτέλεσμα κάθε κλώνος sp1STARR να περιέχει μια τυχαία συνθετική αλληλουχία της βιβλιοθήκης. Τα ανασυνδυασμένα μόρια μετασχηματίστηκαν σε βακτηριακά κύτταρα NEB® 10-beta Competent *E. Coli* και καλλιεργήθηκαν με σκοπό οι ανασυνδυασμένοι κλώνοι να πολλαπλασιαστούν. Ακολούθησε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από τα

βακτήρια, μέσω της διαδικασίας Midi prep, ώστε να πραγματοποιηθεί στη συνέχεια διαμόλυνση ανθρώπινων (EndoC-βΗ1 και HeLa) και ποντικίσιας κυττάρων (Beta-TC-6) με τη συνθετική βιβλιοθήκη.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι έχουν πραγματοποιηθεί δοκιμαστικά πειράματα διαμόλυνσης με τη χρήση λιποφεκταμίνης καθώς και με ηλεκτροδιάτρηση (electroporation), στις κυτταρικές σειρές HeLa και Beta-TC-6 με το πλασμίδιο pmax, το οποίο χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της ποιότητας της διαμόλυνσης καθώς και με το απομονωμένο υλικό IRF3-ChIPed, το οποίο έχει προηγουμένως αλληλουχηθεί στο IRF3-ChIP-seq πείραμα. Αρχικά, έγινε προετοιμασία της γενωμικής βιβλιοθήκης IRF3-ChIP και ένθεση αυτής μέσω ανασυνδυασμού στον πλασμιδιακό φορέα sp1STARR. Η ένθεση πραγματοποιήθηκε με αντίδραση ανασυνδυασμού, μέσω της χρήσης του Clontech In-Fusion HD kit, ύστερα από διπλή πέψη της βιβλιοθήκης και του πλασμιδιακού φορέα με τα ένζυμα Age-HF και Sall-HF. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων NEB® 10-beta Competent *E. Coli* με τα ανασυνδυασμένα μόρια και καλλιέργεια, ώστε να πολλαπλασιαστούν οι κλώνοι. Ακολούθησε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA και διαμόλυνση των Beta-TC-6 κυττάρων με τη βιβλιοθήκη IRF3-ChIP-STARR με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης. Ύστερα από μία ημέρα, τα κύτταρα μολύνθηκαν με ιό Sendai για 9 ώρες και μετά το πέρας 24 ωρών ελέγχθηκε η ποιότητα της διαδικασίας με τη χρήση μικροσκοπίου φθορισμού. Στην εικόνα 4.56 παρουσιάζεται ενδεικτικά ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα GFP θετικών κυττάρων, τα οποία εκφράζουν το γονίδιο αναφοράς (GFP) υπό τον μεταγραφικό έλεγχο IRF3 απομονωμένων γονιδιακών στοιχείων (Εικόνα 4.56).

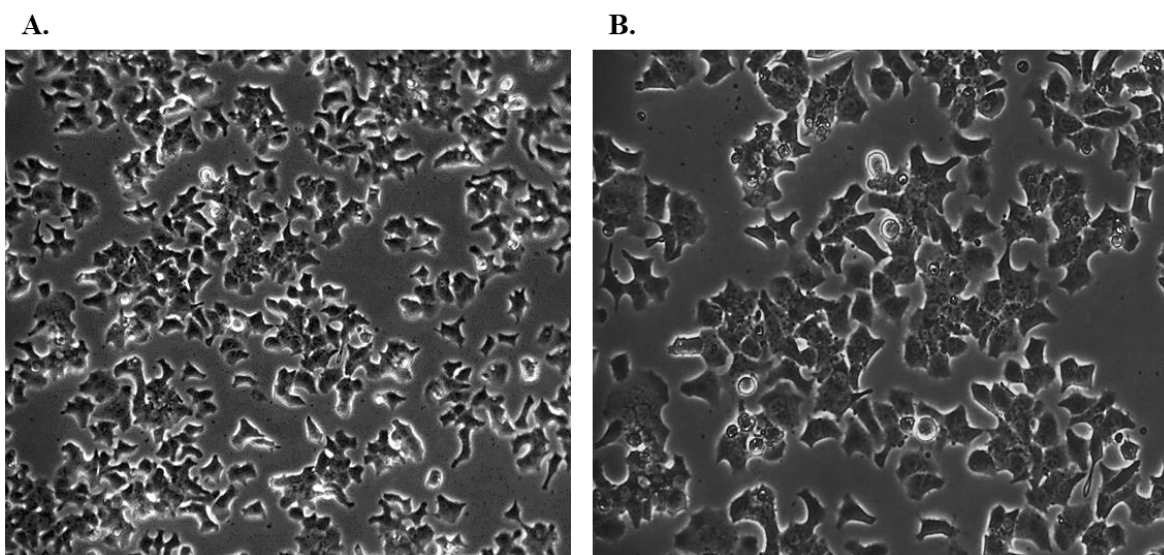
IRF3-ChIP-STARR-seq

9h of viral infection



Εικόνα 4.56. Απεικόνιση του πειράματος διαμόλυνσης των Beta-TC-6 κυττάρων με τη βιβλιοθήκη IRF3-ChIP-STARR και επακόλουθη μόλυνση με ιό Sendai για 9 ώρες. Στην αριστερή εικόνα απεικονίζονται τα κύτταρα στο πεδίο brightfield, ενώ στη δεξιά εικόνα απεικονίζονται τα κύτταρα σε κανάλι GFP, 9 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση. Τα πράσινα κύτταρα είναι αυτά που ανταποκρίνονται στον ιό.

Τέλος, στο εργαστήριό μας έχει πραγματοποιηθεί καλλιέργεια της ανθρώπινης κυτταρικής σειράς β παγκρεατικών κυττάρων EndoC-βH1, η οποία θα χρησιμοποιηθεί σε πειράματα γονιδιωματικής, καθώς και στη μέθοδο synthetic-STARR-seq. Όπως φαίνεται στην εικόνα 4.57, τα EndoC-βH1 κύτταρα σχηματίζουν τρισδιάστατες δομές, οι οποίες ομοιάζουν με αυτές των παγκρεατικών νησίδων.



Εικόνα 4.57: Καλλιέργεια EndoC-βH1 κυττάρων. Μορφολογία της κυτταρικής σειράς EndoC-βH1 από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο με τη χρήση διαφορετικού αντικειμενικού φακού (A, B).

Όλα τα παραπάνω βήματα αποτελούν πιλοτικά πειράματα ελέγχου και κανονικοποίησης των συνθηκών της πειραματικής διαδικασίας. Μετά τη βελτιστοποίηση των συνθηκών όλων των βημάτων που απαιτούνται για την πραγματοποίηση του πειράματος και την επιτυχή εκτέλεσή τους, θα ακολουθήσει διαμόλυνση ανθρώπινων και ποντικίσκων κυττάρων με τη βιβλιοθήκη των συνθετικών αλληλουχιών, μόλυνση με ιό Sendai, απομόνωση του mRNA, κατασκευή cDNA μορίων, κατασκευή βιβλιοθήκης και αλληλούχηση νέας γενιάς στο Ελληνικό Κέντρο Γονιδιοματικής του Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α. Ύστερα από τη βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης, είναι δυνατός ο προσδιορισμός των κορυφών με υψηλό σήμα και η αντιστοίχιση με τις συνθετικές αλληλουχίες, μέσω των αλληλουχιών σήμανσης (barcode). Με την παραπάνω πειραματική διαδικασία θα πραγματοποιηθεί χαρακτηρισμός και λειτουργική διερεύνηση καθεμίας αλληλουχίας που περιέχει είτε SNPs τα οποία έχουν συσχετιστεί με τον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1, είτε μεταλλάξεις μοτίβων, σε σχέση με τις αντίστοιχες αλληλουχίες άγριου τύπου. Επιπλέον, θα γίνει έλεγχος όλων των αλληλουχιών, ως προς τη δυνατότητα ενεργοποίησής τους πριν και κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης. Επομένως, η μέθοδος αυτή μπορεί να αποκρυπτογραφήσει επιπλέον στοιχεία για τη σημασία των SNPs στην ανάπτυξη του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1 και να διαχωρίσει τις λειτουργικές από τις λειτουργικά αδρανείς παραλλαγές, κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης των κυττάρων. Επίσης, είναι σε

θέση να δώσει οριστική απάντηση για τη λειτουργικότητα των υποψήφιων ρυθμιστικών στοιχείων, που προέκυψαν από τα πειράματα γονιδιωματικής.

5. Συζήτηση

Οι ιϊκές μολύνσεις χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα νοσηρότητας και θνησιμότητας, αποτελώντας παγκόσμια απειλή για την ανθρώπινη υγεία. Το γεγονός αυτό επηρεάζει την εύρυθμη λειτουργία των σύγχρονων κοινωνιών και πλήττει την παγκόσμια οικονομία. Επίσης, οι ιϊκές μολύνσεις μπορούν να ενεργοποιήσουν/προδιαθέσουν παθολογικό φαινότυπο, ο οποίος αποτελεί «προάγγελο» της εμφάνισης διαφόρων ασθενειών, όπως το AIDS, το άσθμα, η ηπατίτιδα, η γρίπη, ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1 και άλλα αυτοάνοσα νοσήματα. Το πρόσφατο παράδειγμα της εμφάνισης και εξάπλωσης του ιού SARS-CoV-2, ο οποίο οδήγησε στην πανδημία COVID-19, τονίζει τις αρνητικές επιπτώσεις των ιϊκών μολύνσεων τόσο στην ανθρώπινη υγεία όσο και στην κοινωνία. Ο Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 1 (Type 1 Diabetes Mellitus) αποτελεί χρόνια ασθένεια, η οποία χαρακτηρίζεται από αυτοάνοση καταστροφή των β κυττάρων του παγκρέατος και συνεπώς έλλειψη ινσουλίνης, προκαλώντας επιζήμια αύξηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Τα ακριβή αίτια και οι παράγοντες που πυροδοτούν το ανοσοποιητικό σύστημα να καταστρέψει τα β παγκρεατικά κύτταρα παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστα. Οι ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 οδηγούνται σε καθολική εξάρτηση από τη χορήγηση ινσουλίνης και τακτική παρακολούθηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Ωστόσο, παρόλο που η χορήγηση ινσουλίνης είναι σωτήρια για τους ασθενείς, δεν αποτελεί πραγματική θεραπεία καθώς συχνά οδηγεί σε επικίνδυνες επιπλοκές. Νεότερες κλινικές μελέτες σε ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 έδειξαν ότι η εξάρτηση από ινσουλίνη και οι παρενέργειες μπορούν να περιοριστούν μέσω της αποκατάστασης ενός επαρκούς ποσοστού β παγκρεατικών κυττάρων, ύστερα από μεταμόσχευση νησίδων Langerhans. Σε αντίθεση με την ακριβή φαινοτυπική περιγραφή της νόσου, ο μοριακός μηχανισμός που διέπει την εμφάνιση και την εξέλιξή της παραμένει άγνωστος σε σημαντικό βαθμό. Η διεθνής βιοϊατρική κοινότητα συνεχίζει να αναζητά τη βάση της ασθένειας, δηλαδή τα γονίδια και τις ρυθμιστικές περιοχές του ανθρώπινου γονιδιώματος, οι οποίες όταν υποστούν αλλαγές (μεταλλάξεις) στην αλληλουχία τους μπορούν να οδηγήσουν σε διαβητογένεση. Η αδυναμία πλήρους αποκρυπτογράφησης του μοριακού μηχανισμού που ευθύνεται για την αυτοάνοση καταστροφή των β παγκρεατικών κυττάρων, συνεπάγεται και την αδυναμία σχεδιασμού και ανάπτυξης εύστοχων διαγνωστικών εργαλείων και αποτελεσματικών θεραπευτικών προσεγγίσεων. Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω γίνεται κατανοητή η αναγκαιότητα της μελέτης των μοριακών μηχανισμών ρύθμισης της

γονιδιακής έκφρασης που διέπει την εμφάνιση του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1 στη διάρκεια ιϊκών μολύνσεων, η οποία αποτελεί ερευνητικό στόχο της παρούσας διπλωματικής εργασίας που εκπονήθηκε στο εργαστήριο του Δρ. Μάριου Αγγελόπουλου στο Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α και αποτελεί τμήμα του ερευνητικού προγράμματος που πραγματοποιείται υπό την ευθύνη του.

Η λειτουργία των οργανισμών στηρίζεται στην αξιόπιστη έκφραση των γονιδίων. Το σύνολο των γονιδίων ελέγχεται από ρυθμιστικά στοιχεία DNA, διεσπαρμένα στο γονιδίωμα, τα οποία δρουν ως ροοστάτες/διακόπτες της γονιδιακής έκφρασης [59]. Τα ρυθμιστικά στοιχεία του γονιδιώματος παίζουν κυρίαρχο ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης των κυττάρων και των οργανισμών και επομένως οποιαδήποτε παραλλαγή στην αλληλουχία τους μπορεί να οδηγήσει σε ομοιοστατική διαταραχή και εκδήλωση ασθενειών. Η διαπίστωση ότι άνω του 90% των γενετικών πολυμορφισμών, που σχετίζονται με ασθένειες, χαρτογραφούνται σε μη κωδικές περιοχές του ανθρώπινου DNA ενισχύει περαιτέρω τον κρίσιμο ρόλο των ρυθμιστικών στοιχείων στη φυσιολογία και παθολογία των οργανισμών [128]. Τα κύτταρα αποκρίνονται στις ιϊκές μολύνσεις, διεκπεραιώνοντας αντι-ιϊκά προγράμματα γονιδιακής έκφρασης, τα οποία βρίσκονται αποθηκευμένα στο γονιδίωμα, υπό μορφή ψηφιακού κώδικα. Ως αποτέλεσμα, η είσοδος των ιών στον οργανισμό μπορεί να οδηγήσει στην απορρύθμιση των προγραμμάτων γονιδιακής έκφρασης, γεγονός που διαταράσσει την ομοιόσταση και τους μηχανισμούς προστασίας, με αποτέλεσμα ο οργανισμός ξενιστής να αδυνατεί να καταπολεμήσει την ιϊκή μόλυνση. Η ικανότητα των ιών να τροποποιούν μεγάλο μέρος της γονιδιακής έκφρασης στηρίζεται κατά κύριο λόγο στην ενεργοποίηση μεμβρανικών υποδοχέων, η οποία δημιουργεί έναν καταρράκτη βιοχημικών αντιδράσεων, δηλαδή μονοπατιών μεταγωγής σήματος, τα οποία μεταφέρουν την πληροφορία από το εξωκυττάριο χώρο στον πυρήνα και διαμορφώνουν τη γονιδιακή έκφραση.

Η αντίληψη, η οποία υπάρχει διεθνώς είναι ότι ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1 αναπτύσσεται σε άτομα, τα οποία φέρουν συγκεκριμένο γενετικό υπόβαθρο, δηλαδή εμφανίζουν γενετική προδιάθεση για τη νόσο, και επάγεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως ιϊκές μολύνσεις. Η άποψη αυτή είναι σύμφωνη με πολλές δημοσιευμένες μελέτες, οι οποίες καθιστούν τις ιϊκές μολύνσεις ως κύριο έναυσμα για την ανάπτυξη της ασθένειας [50]. Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι η πιθανότητα παρουσίας εντεροϊών σε άτομα με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1, είναι πολλαπλάσια σε σύγκριση με το αντίστοιχο ποσοστό στο γενικό πληθυσμό [1]. Επίσης, γονίδια, τα οποία ενεργοποιούνται από ιούς (π.χ.

IRF7, IFIH1) έχουν συνδεθεί με την ανάπτυξη της νόσου [129, 130]. Μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (GWAS) έχουν αποδείξει την παρουσία ευαίσθητων αλληλουχιών, κάποιες από τις οποίες έχουν συσχετιστεί με δυσλειτουργίες του ανοσοβιολογικού συστήματος ή εντοπίζονται σε ρυθμιστικές περιοχές σημαντικών γονιδίων [110]. Με βάση τα παραπάνω, η επιστημονική υπόθεση που γεννήθηκε και συνοδεύει την παρούσα διπλωματική εργασία είναι πώς οι μηχανισμοί, οι οποίοι προκύπτουν ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης γενετικών αλλαγών και ιϊκής μόλυνσης, προκαλούν αδυναμία ορθού ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης κατά τη διάρκεια ιϊκών μολύνσεων, οδηγώντας στο διαβητικό φαινότυπο των β παγκρεατικών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, δημιουργήθηκε μία πειραματική πλατφόρμα β παγκρεατικών κυττάρων, στην οποία εφαρμόστηκαν μέθοδοι *γονιδιωματικής* και βιοπληροφορικής ανάλυσης, ώστε να αποκρυπτογραφηθεί ο μοριακός μηχανισμός, ο οποίος διέπει την ανάπτυξη της νόσου. Με βάση αυτήν την πλατφόρμα προέκυψε ένας μεγάλος όγκος νέων πληροφοριών, οι οποίες περιέχουν γονίδια και ρυθμιστικά στοιχεία των β παγκρεατικών κυττάρων, που συμμετέχουν στην αντι-ιϊκή απόκριση και σχετίζονται με την ανάπτυξη αυτοανοσίας του παγκρέατος.

Το πρώτο βήμα ήταν η καλλιέργεια μικρής και μεγάλης κλίμακας, της κυτταρικής σειράς Beta-TC-6, υπό άριστες συνθήκες, σχηματίζοντας τρισδιάστατες νησίδες μέσα σε τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας, οι οποίες ομοιάζουν στις παγκρεατικές νησίδες. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πειράματα μόλυνσης με τον ιό Sendai για 3, 6 και 9 ώρες. Η ομαλή απόκριση των κυττάρων, καθώς και η απουσία εκτεταμένου κυτταρικού θανάτου ή δυσμορφιών, εδραίωσαν την παραπάνω πλατφόρμα ως *in vitro* σύστημα προσομοίωσης της διαβητογένεσης. Ακολούθησε εκτενή μελέτη με μεθόδους *γονιδιωματικής* και βιοπληροφορικής ανάλυση των αποτελεσμάτων. Η συνδυαστική μελέτη περιλάμβανε μεταγραφομική ανάλυση (RNA-seq), ανάλυση προσβασιμότητας των χρωματινικών επιφανειών (DNaseI-seq), μελέτη της παρουσίας της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac (H3K27ac-ChIP-seq), μελέτη της στρατολόγησης του μεταγραφικού συμπλόκου της RNA πολυμεράσης II (RNAPolIII-ChIP-seq) και ανάλυση της πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα IRF3 (IRF3-ChIP-seq), σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος των β παγκρεατικών κυττάρων ποντικού πριν και μετά την ιϊκή μόλυνση. Θα πρέπει να τονιστεί ότι είναι η πρώτη φορά που πραγματοποιείται τόσο λεπτομερής *γονιδιωματική* ανάλυση του γονιδιώματος των Beta-TC-6 κυττάρων. Μετά την ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας υπάρχει κατασκευασμένο ένα μεγάλο μέρος των τοπογραφικών

χαρτών, οι οποίοι συνθέτουν τον Άτλαντα των επαγόμενων από ιό γονιδίων και ρυθμιστικών περιοχών, τα οποία συμμετέχουν στην απόκριση των β παγκρεατικών κυττάρων έναντι των ιών. Ο Άτλας αυτός αποτελεί μια μοριακή-ψηφιακή «εγκυκλοπαίδεια», η οποία αφορά στην αποκρυπτογράφηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν την αντι-ϊική λειτουργία των β παγκρεατικών κυττάρων. Επίσης, εντοπίστηκαν ρυθμιστικές περιοχές, οι οποίες εμφανίζουν αυξημένη πιθανότητα να λειτουργούν ως ροοστάτες της ανάπτυξης του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1.

Αρχικά, η μελέτη μεταγραφομικής αποκάλυψε το πλήρες φάσμα των αλλαγών της γονιδιακής έκφρασης κατά την αντι-ϊική απόκριση και απέδειξε πως η απόκριση των Beta-TC-6 κυττάρων έναντι της ιϊκής μόλυνσης δεν πραγματοποιείται άναρχα, αλλά είναι ένα συντονισμένο φαινόμενο, το οποίο χαρακτηρίζεται από την επαγωγή 272 γονιδίων, στα οποία συμπεριλαμβάνονται κύρια γονίδια της αντι-ϊικής απόκρισης αλλά και χαρακτηριστικά γονίδια των β παγκρεατικών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, ο αριθμός των επαγόμενων γονιδίων αυξάνεται προοδευτικά κατά την εξέλιξη της ιϊκής μόλυνσης, ξεκινώντας από 16 γονίδια στο χρονικό σημείο των 3 ωρών, φτάνει στα 71 γονίδια στο χρονικό σημείο των 6 ωρών και κορυφώνεται στα 272 γονίδια 9 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση. Η ανάλυση γονιδιακής οντολογίας δείχνει ότι τα β παγκρεατικά κύτταρα κατά την απόκρισή τους έναντι του ιού, αφενός διατηρούν το χαρακτήρα τους, εκφράζοντας χαρακτηριστικά γονίδια των β παγκρεατικών κυττάρων (π.χ. *Ccl2*, *Daxx*, *Clic4*, *Clic5*), αφετέρου αποκτούν αντι-ϊικό προφίλ, επιστρατεύοντας αμυντικούς μηχανισμούς, όπως την έκφραση γονιδίων, τα οποία συμμετέχουν στην έμφυτη ανοσολογική απόκριση, στην αρνητική ρύθμιση του κύκλου ζωής του ιού και στα σηματοδοτικά μονοπάτια των ιντερφερονών (π.χ. *Ifnb*, *Il15*, *Il33*, *Ifit1*, *Ifih1*, *Mx2*, *Irf7*, *Oasl2*). Επίσης, μεταξύ των επαγόμενων γονιδίων υπάρχουν γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν για μεταγραφικούς παράγοντες και συμμετέχουν σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος, τα οποία ενεργοποιούνται μετά από την ιϊκή μόλυνση. Γονίδια των οικογενειών των IRFs, STATs και NFκB, τα οποία επάγονται μετά την ιϊκή μόλυνση, συμμετέχουν στη διαμόρφωση της γονιδιακής έκφρασης, μέσω στρατολόγησης του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής σε συγκεκριμένα γονίδια στόχους. Επιπρόσθετα, στα επαγόμενα γονίδια εντοπίζεται μία υποομάδα γονιδίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας του ποντικού (π.χ. *H2-T10*, *H2-Q4*, *H2-T23*, *H2-Q8*), τα οποία συμμετέχουν στην παρουσίαση αντιγονικών πεπτιδίων και έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1. Τα γονίδια αυτά εμφανίζουν υψηλά βασικά επίπεδα έκφρασης στη μη μολυσμένη κατάσταση, τα οποία ενισχύονται σημαντικά

9 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση. Συνεπώς, τα υψηλά επίπεδα έκφρασης γονιδίων που έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1 πριν την ιϊκή μόλυνση καθώς και η επαγωγή τους, αντικατοπτρίζουν την πιθανή ύπαρξη ενός εκκολαπτόμενου μηχανισμού ανάπτυξης της ασθένειας, το οποίο μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία παθολογικού φαινοτύπου σε περιπτώσεις όπου υπάρχει συνδυασμός κάποιας γενετικής προδιάθεσης και συγκεκριμένου περιβαλλοντικού ερεθίσματος. Με περαιτέρω ανάλυση βρέθηκε μικρός αριθμός γονιδίων, των οποίων η έκφραση μειώνεται κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης, ωστόσο δεν μπορεί να γίνει κατηγοριοποίηση αυτών σε οικογένειες ανάλογα με την κυτταρική λειτουργία τους. Για αυτό πραγματοποιήθηκε ανίχνευση γονιδίων ένα προς ένα και παρατηρήθηκαν κάποιες περιπτώσεις που ενδέχεται να έχουν ρόλο στην εμφάνιση του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1 (π.χ. *Nkx2-2*, *Wnt4*). Επομένως, το φαινόμενο της καταστολής της γονιδιακής έκφρασης ύστερα από την ιϊκή μόλυνση είναι αμφιλεγόμενο και υποδεικνύει ότι η ιϊκή μόλυνση λειτουργεί ως επαγωγέας της γονιδιακής έκφρασης.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της προσβασιμότητας των χρωματινικών επιφανειών (DNaseI-seq) των Beta-TC-6 κυττάρων σε τέσσερα χρονικά σημεία πριν και κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης. Η μέθοδος αυτή αποτελεί ένα εργαλείο ταυτοποίησης των χρωματινικών περιοχών, οι οποίες είναι ευαίσθητες στην πέψη από το ένζυμο DNase I, δηλαδή είναι ελεύθερες νουκλεοσωμάτων και συνεπώς έχουν υψηλές πιθανότητες να αποτελούν θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων και να λειτουργούν ως ρυθμιστικά στοιχεία *in vivo*. Οι αναλύσεις αποκάλυψαν την ύπαρξη 40.000 περιοχών, οι οποίες είτε παραμένουν είτε γίνονται προσβάσιμες κατά τη διάρκεια των πρώτων 9 ωρών της ιϊκής μόλυνσης στους πυρήνες των Beta-TC-6 κυττάρων. Το μεγαλύτερο ποσοστό των προσβάσιμων περιοχών διατηρείται πριν και μετά την ιϊκή μόλυνση, ενώ ένα υποσύνολο περίπου 440 αλληλουχιών εντοπίζεται σε απόσταση έως ± 10.000 bp παρακείμενα του σημείου έναρξης της μεταγραφής ιϊκά επαγόμενων γονιδίων (π.χ. *Ifih1*, *Rsad2*, *Oasl2*, *Ifit1*, *Mx2*). Στις αλληλουχίες αυτές ανήκουν 326 υποκινητές γονιδίων και 114 πιθανοί ενισχυτές. Προκειμένου να επιτευχθεί υψηλότερη ανάλυση, πραγματοποιήθηκε συνδυαστική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων RNA-seq και DNaseI-seq, η οποία αποκάλυψε ότι (1) γονίδια που συμμετέχουν στην ανοσολογική απόκριση και έχουν αντι-ιϊκή λειτουργία χαρτογραφούνται κυρίως σε κλειστές χρωματινικές περιοχές μη μολυσμένων κυττάρων, οι οποίες καθίστανται προσβάσιμες κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης, εμφανίζοντας ισχυρά επίπεδα επαγωγής (fold change > 16). (2) Αλληλουχίες, οι

οποίες κωδικοποιούν για μεταγραφικούς παράγοντες, ειδικά γονίδια των β παγκρεατικών κυττάρων και γονίδια τα οποία έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1, εντοπίζονται σε χρωματινικές περιοχές ελεύθερες νουκλεοσωμάτων πριν την ιϊκή μόλυνση, οι οποίες κατά τη διάρκεια της αντι-ιϊκής απόκρισης αυξάνουν την προσβασιμότητά τους. Το γεγονός αυτό είναι ανάλογο με τα υψηλά βασικά επίπεδα έκφρασής τους στη μη μολυσμένη κατάσταση, τα οποία χαρακτηρίζονται από ενδιάμεσα έως χαμηλά επίπεδα επαγωγής (fold change 4-16, fold change < 4) μετά τη μόλυνση. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα απέδειξαν ότι τα β παγκρεατικά κύτταρα τροποποιούν την προσβασιμότητα της χρωματίνης τους σε συγκεκριμένες αλληλουχίες, δημιουργώντας προσβάσιμες περιοχές, οι οποίες πιθανόν να είναι κρίσιμες για την ενεργοποίηση αντι-ιϊκών προγραμμάτων, προκειμένου να αποκριθούν ορθά και αποτελεσματικά στο περιβαλλοντικό ερέθισμα. Επομένως, φαίνεται να υπάρχει ισχυρή συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης και της προσβασιμότητας της χρωματίνης των Beta-TC-6 κυττάρων, γεγονός που υποστηρίζει την ύπαρξη ενός συντονισμένου μοριακού μηχανισμού, ο οποίος είναι κρυπτογραφημένος στον πυρήνα των κυττάρων και εξασφαλίζει την ακριβή απόκριση σε επιβλαβή περιβαλλοντικά ερεθίσματα.

Ακολούθησε η μελέτη της σήμανσης των νουκλεοσωμάτων με τροποποιήσεις, οι οποίες άπτονται σε ρυθμιστικές ενεργές περιοχές. Η πραγματοποίηση της χαρτογράφησης έδειξε εκτεταμένη παρουσία της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac (H3K27ac-ChIP-seq) σε 50.000 περιοχές, οι οποίες δείχνουν να διατηρούνται κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης και έχουν παρόμοια κατανομή με αυτήν που ανιχνεύτηκε στο πείραμα DNaseI-seq. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι οι μηχανισμοί αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης και τροποποίησης των ιστονών συχνά συμπίπτουν, λειτουργώντας ταυτόχρονα/συνεργιστικά στις χρωματινικές περιοχές των β παγκρεατικών κυττάρων. Σημαντική είναι η παρατήρηση ότι σε ορισμένες αλληλουχίες, η ιστονική τροποποίηση H3K27ac είτε απουσιάζει είτε υπάρχει σε χαμηλό επίπεδο πριν την ιϊκή μόλυνση, ενώ κατά την εξέλιξη της αντι-ιϊκής απόκρισης αυξάνεται σημαντικά. Η βιοπληροφορική ανάλυση αποκάλυψε ότι ένα μεγάλο μέρος αυτών των περιοχών γειτνιάζει με γονίδια, τα οποία επάγονται μετά την ιϊκή μόλυνση (π.χ. *Ifih1*, *Ifit1*, *Ifit3*, *Irf9*, *Oasl2*), γεγονός που σημαίνει ότι οι αλληλουχίες αυτές λειτουργούν ως πιθανοί ιϊκά ελεγχόμενοι/επαγόμενοι ενισχυτές. Επίσης, οι αλληλουχίες εντοπίζονται σε κοντινή απόσταση από το σημείο έναρξης της μεταγραφής αντι-ιϊκών γονιδίων, πράγμα το οποίο συμφωνεί με την υπάρχουσα γνώση ότι η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης κατά την αντι-ιϊκή απόκριση πραγματοποιείται σε μεγάλο βαθμό από γειτονικές

ρυθμιστικές περιοχές. Επομένως, φαίνεται ότι τα β παγκρεατικά κύτταρα τροποποιούν τη χρωματίνη τους σε συγκεκριμένα σημεία, προκειμένου να αποκριθούν αποτελεσματικά στο περιβαλλοντικό ερέθισμα.

Η επαγόμενη μεταγραφική ενεργοποίηση απαιτεί τη συναρμολόγηση νουκλεοπρωτεϊνικών δομών, οι οποίες ονομάζονται ενισχυσώματα [13, 40]. Τα ενισχυσώματα αποτελούνται από μεταγραφικούς ενεργοποιητές και συνενεργοποιητές, οι οποίοι όταν προσδεθούν στις αλληλουχίες στόχους συνεργιστικά, στρατολογούν την μεταγραφική μηχανή της RNA πολυμεράσης II σε συγκεκριμένα γονίδια. Το πείραμα RNApolII-ChIP-seq έδειξε ότι η RNA πολυμεράση II αποκτά περιορισμένη πρόσβαση σε 17.000 περιοχές στο γονιδίωμα των Beta-TC-6 κυττάρων, οι οποίες κατανέμονται σε υποκινητές, ενισχυτές, κωδικές αλληλουχίες και διαγονιδιακές περιοχές. Τα σήματα αυτά δεν αντιπροσωπεύουν ξεχωριστά γεγονότα ενεργοποίησης της μεταγραφής, καθώς δεδομένου ότι το ένζυμο κυλάει πάνω στις περιοχές που μεταγράφονται μπορεί να δημιουργούνται πολλαπλά reads κατά την αλληλούχηση, τα οποία προκύπτουν από το ίδιο γονίδιο ή τόπο. Οι 9.000 περιοχές χαρτογραφούνται σε απομακρυσμένες χρωματινικές συντεταγμένες, ενώ οι 8.000 περιοχές εντοπίστηκαν κοντά σε θέσεις έναρξης της μεταγραφής. Από αυτές, ένα υποσύνολο 494 αλληλουχιών εντοπίζεται κοντά σε γονίδια που επάγονται μετά την ιϊκή μόλυνση (π.χ. *Ddx58*, *Ifih1*, *Oasl2*, *Ifit1*, *Mx2*). Σύμφωνα με τη σύγκριση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων DNaseI-seq, H3K27ac-ChIP-seq και RNApolII-ChIP-seq παρατηρείται ότι ένα μεγάλο σύνολο περιοχών εμφανίζουν βαθμιαία αύξηση της προσβασιμότητας, ισχυρή παρουσία της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac και αυξημένα επίπεδα στρατολόγησης της RNA πολυμεράσης II. Οι περιοχές αυτές βρίσκονται σε μη κωδικές περιοχές του γονιδιώματος και φαίνεται ότι έχουν ρυθμιστικό ρόλο. Το γεγονός αυτό, υποδεικνύει ότι τα β παγκρεατικά κύτταρα διαθέτουν έναν πολύπλοκο μηχανισμό, ο οποίος τροποποιεί τη χρωματίνη τους, ώστε να διεκπεραιωθεί το επαγόμενο πρόγραμμα γονιδιακής έκφρασης κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μελέτη της πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα IRF3 (IRF3-ChIP-seq) στο γονιδίωμα των Beta-TC-6 κυττάρων κατά τη διάρκεια της αντι-ιϊκής απόκρισης, η οποία αποκάλυψε την ύπαρξη 1.385 θέσεων πρόσδεσης. Συγκεκριμένα, 51 περιοχές εντοπίζονται κοντά σε θέσεις έναρξης της μεταγραφής γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα έναντι του ιού (π.χ. *Stat2*, *Oasl2*, *Ifit1*, *Ifih1*, *Ddx58*), γεγονός που υποδηλώνει την ενεργοποίηση του αντι-ιϊκού προγράμματος. Οι υπόλοιπες 1.334 θέσεις πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα IRF3 βρίσκονται σε

απομακρυσμένες περιοχές, γεγονός το οποίο είναι σύμφωνο με την ικανότητα των ενισχυτών να δρουν από απόσταση, δημιουργώντας τρισδιάστατες δομές [121]. Σύμφωνα, με τις παραπάνω πληροφορίες κατασκευάστηκε ο τοπογραφικός χάρτης της κατανομής του IRF3 στη διάρκεια των ιϊκών μολύνσεων, αποκαλύπτοντας ένας μεγάλος αριθμός πιθανών ρυθμιστικών στοιχείων, τα οποία ενεργοποιούνται μετά την ιϊκή μόλυνση και φέρουν τον μεταγραφικό παράγοντα IRF3. Επίσης, κομβικής σημασίας είναι το γεγονός ότι ένα μεγάλο μέρος από τις 1.334 περιοχές αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες μοτίβων πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα IRF3. Αυτό ίσως αποτελεί έναν μηχανισμό του γονιδιώματος για την ορθή ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, καθώς με αυτόν τον τρόπο είτε αυξάνεται η πιθανότητα πρόσδεσης του αντίστοιχου μεταγραφικού παράγοντα είτε απαιτείται υψηλός αριθμός μεταγραφικών παραγόντων του ίδιου τύπου. Το πιο σημαντικό είναι ότι μέσω της συνδυαστικής ανάλυσης των πειραμάτων DNaseI-seq και ChIP-seq στο χρονικό σημείο των 9 ωρών της ιϊκής μόλυνσης, ανακαλύφθηκαν 402 περιοχές του γονιδιώματος των β παγκρεατικών κυττάρων, οι οποίες χαρακτηρίζονται από αυξημένη προσβασιμότητα, σήμανση της χρωματίνης με την ιστονική τροποποίηση H3K27ac, φιλοξενούν τη μεταγραφική μηχανή της RNA πολυμεράσης II και τον μεταγραφικό παράγοντα IRF3. Οι περιοχές αυτές γειτνιάζουν με γονίδια, τα οποία συμμετέχουν στην άμυνα έναντι του ιού (π.χ. *Stat4*, *Ifih1*, *Ifit1*, *Ddx58*, *Ddx60*, *Oasl2*, *Herc6*), γεγονός που υποστηρίζει την άποψη ότι η αντι-ιϊκή απόκριση οργανώνεται μέσω αλλαγής της χρωματινικής διαμόρφωσης και συνεργειακής πρόσδεσης ειδικών μεταγραφικών παραγόντων σε ρυθμιστικές περιοχές.

Το επόμενο βήμα αυτής της ερευνητικής εργασίας είναι η μελέτη της λειτουργικής δράσης των περιοχών του γονιδιώματος που φέρουν μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNPs), οι οποίοι έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1, πριν και μετά την ιϊκή μόλυνση, με τη μέθοδο synthetic-STARR-seq. Για τον σκοπό αυτό έχουν συντεθεί μαζικά 2.500 διαφορετικές αλληλουχίες, οι οποίες διακρίνονται σε αγρίου τύπου (wild type) και σε μεταλλαγμένες (mutated) και έχουν πραγματοποιηθεί πιλοτικά πειράματα ελέγχου και βελτιστοποίησης των συνθηκών. Η πραγματοποίηση του παραπάνω πειράματος θα οδηγήσει την ανακάλυψη νέων στοιχείων σχετικά με τη λειτουργική δράση των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών και των μεταλλάξεων και θα εντοπιστούν ιϊκά επαγόμενα λειτουργικά στοιχεία του γονιδιώματος, τα οποία όταν φέρουν συγκεκριμένες αλλαγές στην αλληλουχία τους, έχουν μεγάλη πιθανότητα να συνδέονται με την εμφάνιση διαβητικού φαινοτύπου.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω αποτελέσματα δημιουργείται η υπόθεση ότι οι ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 φέρουν «επικίνδυνο» γενετικό υπόβαθρο, το οποίο στην περίπτωση ιϊκής μόλυνσης, διαταράσσει την ορθή αντι-ιϊκή απόκριση του παγκρέατος, οδηγώντας στην εμφάνιση αυτοανοσίας και στην καταστροφή των β παγκρεατικών κυττάρων. Ωστόσο, δεν είναι ξεκάθαρο ποια μετάλλαξη είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση της νόσου καθώς έχουν καταγραφεί πολυάριθμες αλλαγές στο γονιδίωμα ασθενών. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι ο πυρήνας των γονιδίων της αντι-ιϊκής απόκρισης αλλά και γονίδια, τα οποία έχουν συνδεθεί με την εμφάνιση της νόσου, ενεργοποιούνται από τις πρώτες ώρες της μόλυνσης και ενισχύονται κατά τη διάρκεια αυτής. Επίσης, φαίνεται ότι η αρχιτεκτονική της χρωματίνης αποκτά δυναμικές αλλαγές και διαμορφώσεις που συνοδεύουν τη δημιουργία ενός αντι-ιϊκού μεταγραφώματος. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι το γονιδίωμα των Beta-TC-6 κυττάρων δεν παραμένει στατικό αλλά αναδιαμορφώνεται σύμφωνα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Επιπλέον, η ενεργοποίηση πολλών μεμβρανικών πρωτεϊνών υποδηλώνει πως πραγματοποιούνται αλλαγές στην επιφάνεια των κυττάρων, οι οποίες ίσως τα καταστούν στόχους του ανοσοβιολογικού συστήματος. Η ερμηνεία των παραπάνω γεγονότων θα διαλευκάνει τον τρόπο, με τον οποίο οι γενετικές αλλαγές σε συνδυασμό με τη διαμόρφωση της χρωματίνης και με περιβαλλοντικά ερεθίσματα ευνοούν την καταστροφή των β παγκρεατικών κυττάρων, προκαλώντας την εμφάνιση Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1. Καταλήγοντας, η παρούσα διπλωματική εργασία προσέφερε λεπτομερή περιγραφή των μοριακών γεγονότων που λαμβάνουν χώρα στα β παγκρεατικά κύτταρα κατά την εξέλιξη της ιϊκής μόλυνσης και έθεσε τις βάσεις για περαιτέρω μελέτη, ώστε να αποκρυπτογραφηθεί πλήρως ο μηχανισμός που βρίσκεται κρυμμένος στο γονιδίωμα των κυττάρων και οδηγεί στην εμφάνιση της ασθένειας. Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα οδήγησαν στην ανακάλυψη χιλιάδων πιθανών ρυθμιστικών στοιχείων του γονιδιώματος των β παγκρεατικών κυττάρων. Ωστόσο, το επόμενο βήμα της εργασίας, για την οριστική επιβεβαίωση της ενεργότητάς τους, είναι ο λειτουργικός χαρακτηρισμός των υποψήφιων ρυθμιστικών στοιχείων, μέσω της μεθόδου STARR-seq. Τέλος, είναι αναγκαία η περαιτέρω μελέτη της κατανομής μεταγραφικών παραγόντων που σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση (π.χ. NF-κB, CBP, STAT2), ειδικών ρυθμιστών του παγκρέατος (π.χ. Pdx1, Mafa, Pax) καθώς και η εξιχνίαση των τρισδιάστατων επαφών που πραγματοποιούνται στον πυρήνα των κυττάρων (HiChIP-seq), προκειμένου να αποκτηθεί μια πλήρης εικόνα των υποκείμενων μοριακών μηχανισμών.

6. Βιβλιογραφία

1. Richardson, Sarah J. and Marc S. Horwitz. 2014. “Is Type 1 Diabetes ‘Going Viral’?” *Diabetes* **63** (7):2203–5.
2. Virgin, Herbert W. 2014. “The Virome in Mammalian Physiology and Disease.” *Cell* **157** (1):142–50.
3. Yuen, Man Fung, Ding Shinn Chen, Geoffrey M. Dusheiko, Harry L. A. Janssen, Daryl T. Y. Lau, Stephen A. Locarnini, Marion G. Peters, and Ching Lung Lai. 2018. “Hepatitis B Virus Infection.” *Nature Reviews Disease Primers* 4:1–21.
4. Foxman, Ellen F. and Akiko Iwasaki. 2011. “Genome – Virome Interactions : Examining the Role of Common Viral Infections in Complex Disease.” *Nature Publishing Group* **9** (4).
5. Andreakos, Evangelos and Sotirios Tsiodras. 2020. “COVID -19: Lambda Interferon against Viral Load and Hyperinflammation.” *EMBO Molecular Medicine* **12**(6).
6. Smith, Edwin and Ali Shilatifard. 2014. “Enhancer Biology and Enhanceropathies.” *Nature Structural and Molecular Biology* **21** (3):210–19.
7. Rickels, Ryan and Ali Shilatifard. 2018. “Enhancer Logic and Mechanics in Development and Disease.” *Trends in Cell Biology*.
8. Zaret, Kenneth S, and Jason S Carroll. 2011. “Pioneer Transcription Factors : Establishing Competence for Gene Expression Parameters Affecting Transcription.” *Genes and Development*, 2227–41.
9. Zlatanova J, Leuba SH, Bernardi G. 2004. “Chromatin structure and dynamics: State of the art.” *New comprehensive biochemistry* vol.39.
10. McGinty, Robert K., and Song Tan. 2015. “200. Nucleosome Structure and Function.” *Chemical Reviews*.
11. Kornberg, Roger D. 1977. “Structure of Chromatin.” *Annual Review of Biochemistry* **46** (1): 931–54.
12. Biterge, Burcu and Robert Schneider. 2014. “Histone Variants: Key Players of Chromatin.” *Cell and Tissue Research* **356** (3):457–66.
13. Agelopoulos, Marios and Dimitris Thanos. 2006. “Epigenetic Determination of a Cell-Specific Gene Expression Program by ATF-2 and the Histone Variant MacroH2A.” *The EMBO Journal* **25** (20):4843–53.

14. Lavigne, Matthieu D., Giannis Vatsellas, Alexander Polyzos, Evangelia Mantouvalou, George Sianidis, Ioannis Maraziotis, Marios Agelopoulos, and Dimitris Thanos. 2015. "Composite MacroH2A/NRF-1 Nucleosomes Suppress Noise and Generate Robustness in Gene Expression." *Cell Reports* **11** (7):1090–1101.
15. Nature Education, adapted from Pierce, Benjamin. "Genetics: A conceptual approach", 2nd ed., W. H. Freeman and Company, United Kingdom, 2005.
16. Agelopoulos, Marios, Daniel J. McKay, and Richard S. Mann. 2012. "Developmental Regulation of Chromatin Conformation by Hox Proteins in *Drosophila*." *Cell Reports* **1** (4):350–59.
17. Calo, Eliezer and Joanna Wysocka. 2013. "Modification of Enhancer Chromatin: What, How, and Why?" *Molecular Cell* **49** (5):825–37.
18. Robertson, Keith D., Eva Uzvolgyi, Gangning Liang, Cathy Talmadge, Janos Sumegi, Felicidad A. Gonzales, and Peter A. Jones. 1999. "The Human DNA Methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: Coordinate MRNA Expression in Normal Tissues and Overexpression in Tumors." *Nucleic Acids Research* **27** (11):2291–98.
19. Zhou, Vicky W., Alon Goren, and Bradley E. Bernstein. 2011. "Charting Histone Modifications and the Functional Organization of Mammalian Genomes." *Nature Reviews Genetics* **12** (1):7–18.
20. Li, Keqin Kathy, Cheng Luo, Dongxia Wang, Hualiang Jiang, and Y. George Zheng. 2012. "Chemical and Biochemical Approaches in the Study of Histone Methylation and Demethylation." *Medicinal Research Reviews* **32** (4):815–67.
21. Cheng, Xiaodong. 2014. "Structural and Functional Coordination of DNA and Histone Methylation." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **6** (8):1–23.
22. Patel, Dinshaw J. 2016. "A Structural Perspective on Readout of Epigenetic Posttranslational Modifications." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1–48.
23. Mersfelder, Erica L. and Mark R. Parthun. 2006. "The Tale beyond the Tail: Histone Core Domain Modifications and the Regulation of Chromatin Structure." *Nucleic Acids Research*.
24. Koch, Christoph M., Robert M. Andrews, Paul Flicek, Shane C. Dillon, Ulaş Karaöz, Gayle K. Clelland, Sarah Wilcox, David M. Beare, Joanna C. Fowler, Phillippe Couttet, Keith D. James, Gregory C. Lefebvre, Alexander W. Bruce, Oliver M. Dovey, Peter D. Ellis, Pawandeep Dhami, Cordelia F. Langford, Zhiping Weng, Ewan Birney, Nigel P. Carter, David Vetrie, and Ian Dunham. 2007. "The Landscape of Histone Modifications

- across 1% of the Human Genome in Five Human Cell Lines.” *Genome Research* **17** (6):691–707.
25. Esteller, M. 2009. “Epigenetics in biology and medicine”. CRC press.
 26. Strahl, Brian D., and C. David Allis. 2000. “The Language of Covalent Histone Modifications.” *Nature* **403** (6765): 41–45.
 27. Agalioti, Theodora, Guoying Chen, and Dimitris Thanos. 2002. “Deciphering the Transcriptional Histone Acetylation Code for a Human Gene.” *Cell* **111** (3): 381–92.
 28. Spilianakis, Charalampos G., Maria D. Lalioti, Terrence Town, Gap Ryol Lee, and Richard A. Flavell. 2005. “Interchromosomal Associations between Alternatively Expressed Loci.” *Nature*.
 29. Weake, Vikki M., and Jerry L. Workman. 2010. “Inducible Gene Expression: Diverse Regulatory Mechanisms.” *Nature Reviews Genetics* **11** (6): 426–37.
 30. Soutourina, Julie. 2018. “Transcription regulation by the Mediator complex.” *Nat Rev Mol Cell Biol* **19** (4): 262-274.
 31. Tilgner, Hagen, David G. Knowles, Rory Johnson, Carrie A. Davis, Sudipto Chakraborty, Sarah Djebali, João Curado, Michael Snyder, Thomas R. Gingeras, and Roderic Guigó. 2012. “Deep Sequencing of Subcellular RNA Fractions Shows Splicing to Be Predominantly Co-Transcriptional in the Human Genome but Inefficient for LncRNAs.” *Genome Research* **22** (9):1616–25.
 32. Agelopoulos, M., D. J. McKay and R. S. Mann. 2014. “CgChIP: A Cell Type- and Gene-Specific Method for Chromatin Analysis.” *Methods Mol Biol* **1196**: 291–306.
 33. Freaney, Jonathan. E., Rebecca. Kim, Roli. Mandhana and Curt. M. Horvath 2013. “Extensive cooperation of immune master regulators IRF3 and NFkappaB in RNA Pol II recruitment and pause release in human innate antiviral transcription.” *Cell Rep* **4** (5): 959-973.
 34. Creyghton, M. P., A. W. Cheng, G. G. Welstead, T. Kooistra, B. W. Carey, E. J. Steine, J. Hanna, M. A. Lodato, G. M. Frampton, P. A. Sharp, L. A. Boyer, R. A. Young and R. Jaenisch. 2010. “Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state.” *Proc Natl Acad Sci U S A* **107** (50): 21931-21936.
 35. Poss, Z. C., C. C. Ebmeier and D. J. Taatjes 2013. “The Mediator complex and transcription regulation.” *Crit Rev Biochem Mol Biol* **48** (6): 575-608.
 36. Virgin, Herbert W. 2014. “The Virome in Mammalian Physiology and Disease.” *Cell* **157** (1):142–50.

37. Faísca, P. and D. Desmecht. 2007. "Sendai Virus, the Mouse Parainfluenza Type 1: A Longstanding Pathogen That Remains up-to-Date." *Research in Veterinary Science* (1):115–25.
38. Sakai, Yuko, Katsuhiko Kiyotani, Masayuki Fukumura, Makoto Asakawa, Atsushi Kato, Tatsuo Shioda, Tetsuya Yoshida, Akemi Tanaka, Mamoru Hasegawa, and Yoshiyuki Nagai. 1999. "Accommodation of Foreign Genes into the Sendai Virus Genome: Sizes of Inserted Genes and Viral Replication." *FEBS Letters* **456** (2):221–26.
39. Stetson, Daniel B., and Ruslan Medzhitov. 2006. "Type I Interferons in Host Defense." *Immunity* **25** (3): 373–81.
40. Thanos, Dimitris and Tom Maniatis. 1995. "Virus Induction of Human IFN β Gene Expression Requires the Assembly of an Enhanceosome." *Cell* **83**(7):1091–1100.
41. Yan, N. and Z. J. Chen 2012. "Intrinsic antiviral immunity." *Nat Immunol* **13** (3): 214-222.
42. McNab, F., K. Mayer-Barber, A. Sher, A. Wack and A. O'Garra 2015. "Type I interferons in infectious disease." *Nat Rev Immunol* **15** (2): 87-103.
43. Kitazawa, Haruki and Julio Villena. 2014. "Modulation of Respiratory TLR3-Anti-Viral Response by Probiotic Microorganisms: Lessons Learned from *Lactobacillus Rhamnosus* CRL1505." *Frontiers in Immunology* **5** (5):1–16.
44. Apostolou, Effie and Dimitris Thanos. 2008. "Virus Infection Induces NF-KB-Dependent Interchromosomal Associations Mediating Monoallelic IFN- β Gene Expression." *Cell* **134** (1):85–96.
45. Agalioti, T., S. Lomvardas, B. Parekh, J. Yie, T. Maniatis and D. Thanos 2000. "Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter." *Cell* **103** (4): 667-678.
46. Merika, M. and D. Thanos 2001. "Enhanceosomes." *Curr Opin Genet Dev* **11** (2): 205-208.
47. Lomvardas, Stavros and Dimitris Thanos. 2002. "Modifying Gene Expression Programs by Altering Core Promoter Chromatin Architecture." *Cell* **110** (2):261–71.
48. Eizirik, Décio L., Maikel L. Colli, and Fernanda Ortis. 2009. "The Role of Inflammation in Insulinitis and B-Cell Loss in Type 1 Diabetes." *Nature Reviews Endocrinology* **5** (4): 219–26.
49. Mark A Atkinson, George S Eisenbarth and Aaron w Michels. 2014. "Type 1 Diabetes." *Lancet* **383** (9911): 69–82.

50. Beeck, Anne Op De and Decio L. Eizirik. 2016. "Viral Infections in Type 1 Diabetes Mellitus — Why the β Cells?" Nature Publishing Group **12** (5):263–73.
51. Steck, Andrea K, and Marian J Rewers. 2011. "Genetics of Type 1 Diabetes." Clin Chem **57** (2): 176–85.
52. Nyaga, Denis M., Mark H. Vickers, Craig Jefferies, Jo K. Perry, and Justin M. O'Sullivan. 2018. "The Genetic Architecture of Type 1 Diabetes Mellitus." Molecular and Cellular Endocrinology **477** (7):70–80.
53. Laitinen, O. H., H. Honkanen, O. Pakkanen, S. Oikarinen, M. M. Hankaniemi, H. Huhtala, T. Ruokoranta, V. Lecouturier, P. Andre, R. Harju, S. M. Virtanen, J. Lehtonen, J. W. Almond, T. Simell, O. Simell, J. Ilonen, R. Veijola, M. Knip, and H. Hyoty. 2014. "Coxsackievirus B1 Is Associated With Induction of Beta-Cell Autoimmunity That Portends Type 1 Diabetes." Diabetes **63** (3):446–55.
54. Atkinson, Mark A., George S. Eisenbarth, and Aaron W. Michels. 2014. "Type 1 Diabetes." The Lancet **383** (9911):69–82.
55. Moltchanova EV, Schreier N, Lammi N, Karvonen M. 2009. "Seasonal variation of diagnosis type 1 diabetes mellitus in children worldwide." Diabet Med. **26**: 673-78.
56. Atkinson, Mark A. 2012. "The Pathogenesis and Natural History of Type 1 Diabetes." Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine 2(11):1–18.
57. Behjati, Sam and Patrick S. Tarpey. 2013. "What Is next Generation Sequencing?" Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition **98** (6):236–38.
58. Blankenberg, D., A. Gordon, G. Von Kuster, N. Coraor, J. Taylor, A. Nekrutenko and T. Galaxy 2010. "Manipulation of FASTQ data with Galaxy." Bioinformatics **26** (14): 1783-1785.
59. Harrow, J., A. Frankish, J. M. Gonzalez, E. Tapanari, M. Diekhans, F. Kokocinski, B. L. Aken, D. Barrell, A. Zadissa, S. Searle, I. Barnes, A. Bignell, V. Boychenko, T. Hunt, M. Kay, G. Mukherjee, J. Rajan, G. Despicio-Reyes, G. Saunders, C. Steward, R. Harte, M. Lin, C. Howald, A. Tanzer, T. Derrien, J. Chrast, N. Walters, S. Balasubramanian, B. Pei, M. Tress, J. M. Rodriguez, I. Ezkurdia, J. van Baren, M. Brent, D. Haussler, M. Kellis, A. Valencia, A. Reymond, M. Gerstein, R. Guigo and T. J. Hubbard 2012. "GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project." Genome Res **22** (9): 1760-1774.
60. Simon JM, Giresi PG, Davis IJ, Lieb JD. 2012. "Using FAIRE (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements) to isolation active regulatory DNA". Nat Protoc. 19;7 (2):256-67.

61. John Sam, Sabo J. Peter, Canfield K. Theresa, Lee Kristen, Vong Shinny, Weaver Molly, Wang Hao, Vierstra Jeff, Reynolds P. Alex, Robert E. Thurman, and John A. Stamatoyannopoulos. 2013. "Genome-Scale Mapping of DNaseI Hypersensitivity." *Curr Protoc Mol Biol* **25** (4): 368–79.
62. Ford, Ethan, Chrysa Nikopoulou, Antonis Kokkalis, and Dimitris Thanos. 2014. "A Method for Generating Highly Multiplexed ChIP-Seq Libraries." *BMC Research Notes* **7** (1):1–5.
63. Mortazavi, Ali, Brian A. Williams, Kenneth McCue, Lorian Schaeffer, and Barbara Wold. 2008. "Mapping and Quantifying Mammalian Transcriptomes by RNA-Seq." *Nature Methods* **5** (7):621–28.
64. Arnold, Cosmas D., Daniel Gerlach, Christoph Stelzer, Łukasz M. Boryń, Martina Rath, and Alexander Stark. 2013. "Genome-Wide Quantitative Enhancer Activity Maps Identified by STARR-Seq." *Science* **339** (6123):1074–77.
65. Ostuni, R., V. Piccolo, I. Barozzi, S. Polletti, A. Termanini, S. Bonifacio, A. Curina, E. Prosperini, S. Ghisletti and G. Natoli 2013. "Latent enhancers activated by stimulation in differentiated cells." *Cell* **152** (1-2): 157-171.
66. Vogel C, Marcotte EM. 2012. "Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses." *Nat Rev Genet.* **13**;13 (4):227-32.
67. Risca, Viviana I., and William J. Greenleaf. 2015. "Unraveling the 3D Genome: Genomics Tools for Multiscale Exploration." *Trends in Genetics* **31** (7): 357–72.
68. Yao, Tatsuma, Yuta Asayama. 2017. "Animal-Cell Culture Media : History, Characteristics, and Current Issues," no. January: 99–117.
69. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP 1973 "In vitrocultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors." *J Natl Cancer Inst*, **51** (5):1417-1423.
70. Efrat, S., S. Linde, H. Kofod, D. Spector, M. Delannoy, S. Grant, D. Hanahan, and S. Baekkeskov. 1988. "Beta-Cell Lines Derived from Transgenic Mice Expressing a Hybrid Insulin Gene-Oncogene." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **85** (23): 9037–41.
71. Poitout, Vincent, Laurence E Stout, Michael B Armstrong, Timothy F Walseth, Robert L Sorenson, and R Paul Robertson. 1995. "Morphological and Functional Characterization of β TC-6 Cells—an Insulin-Secreting Cell Line Derived From Transgenic Mice." *Diabetes* **44**: 306–13.

72. D'Ambra, R, M Surana, S Efrat, R G Starr, and N Fleischer. 1990. "Regulation of Insulin Secretion from Beta-Cell Lines Derived from Transgenic Mice Insulinomas Resembles That of Normal Beta-Cells." *Endocrinology* **126** (6): 2815–22.
73. Knaack, David, Deborah M Fiore, Manju Surana, Margarita Leiser, Megan Laurance, David Fusco-demane, Orion D Hegre, Norman Fleischer, and Shimon Efrat. 1994. "Glonal Insulinoma Cell Line That Stably Maintains Correct Glucose Responsiveness" 43.
74. Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich 1988. "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* **239** (4839): 487-491.
75. Lisa A. Seidman. 2008. "Basic laboratory calculations for biotechnology." 1st Edition, ISBN 0132238101. Published by Pearson Education, Inc, San Francisco, Calif.; London: Pearson Benjamin Cummings.
76. Garibyan, Lilit and Nidhi Avashia. 2013. "Polymerase Chain Reaction." *Journal of Investigative Dermatology*.
77. Stratagene, 2007. "Introduction to Quantitative PCR: Methods and Applications Guide." pp 4-7, 9-10, 21-22, 26-27, 29, 35-36.
78. Valasek MA, Repa JJ. 2005. "The power of real-time PCR. Advances in physiology education." **29** (3):151–9.
79. Watson, J. M, Myers, R. M., Candy, A. A., Witkowski, J. A., 2007. "Recombinant DNA: Genes and Genomes- A Short Course." Cold Spring Harbor Laboratory Press.
80. Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger and R. Watson 1993. "Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions." *Biotechnology (N Y)* **11** (9): 1026-1030.
81. Ginzinger, David G. 2002. "Gene Quantification Using Real-Time Quantitative PCR: An Emerging Technology Hits the Mainstream." *Experimental Hematology* **30** (6):503–12.
82. Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., Stahlberg, A., Zoric, N., 2006. "The real-time polymerase chain reaction." *Molecular aspects of medicine* 27, pp 95- 125.
83. Orlando, V., H. Strutt and R. Paro 1997. "Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking." *Methods* **11** (2): 205-214.
84. Song, Chengcheng, Shaocun Zhang, and He Huang. 2015. "Choosing a Suitable Method for the Identification of Replication Origins in Microbial Genomes." *Frontiers in*

Microbiology **6** (7):1–18.

85. Mukhopadhyay, Tapas and Jack A. Roth. 1993. "Silicone Lubricant Enhances Recovery of Nucleic Acids after Phenol-Chloroform Extraction." *Nucleic Acids Research* **21** (3):781–82.
86. Xiong, Erhui, Xiaolin Wu, Le Yang, Fangping Gong, Fujun Tai, and Wei Wang. 2014. "Chloroform-Assisted Phenol Extraction Improving Proteome Profiling of Maize Embryos through Selective Depletion of High-Abundance Storage Proteins." *PLoS ONE* **9** (11):1–8.
87. Fisher, Sheila, Andrew Barry, Justin Abreu, Brian Minie, Jillian Nolan, Toni M. Delorey, Geneva Young, Timothy J. Fennell, Alexander Allen, Lauren Ambrogio, Aaron M. Berlin, Brendan Blumenstiel, Kristian Cibulskis, Dennis Friedrich, Ryan Johnson, Frank Juhn, Brian Reilly, Ramy Shammam, John Stalker, Sean M. Sykes, Jon Thompson, John Walsh, Andrew Zimmer, Zac Zwirko, Stacey Gabriel, Robert Nicol, and Chad Nusbaum. 2011. "A Scalable, Fully Automated Process for Construction of Sequence-Ready Human Exome Targeted Capture Libraries." *Genome Biology* **12** (1):R1.
88. Peirson, S. N. and J. N. Butler 2007. "RNA extraction from mammalian tissues." *Methods Mol Biol* **362**: 315-327.
89. Kim, Tae Kyung and James H. Eberwine. 2010. "Mammalian Cell Transfection: The Present and the Future." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **397** (8):3173–78.
90. Landt, S. G., G. K. Marinov, A. Kundaje, P. Kheradpour, F. Pauli, S. Batzoglou, B. E. Bernstein, P. Bickel, J. B. Brown, P. Cayting, Y. Chen, G. DeSalvo, C. Epstein, K. I. Fisher-Aylor, G. Euskirchen, M. Gerstein, J. Gertz, A. J. Hartemink, M. M. Hoffman, V. R. Iyer, Y. L. Jung, S. Karmakar, M. Kellis, P. V. Kharchenko, Q. Li, T. Liu, X. S. Liu, L. Ma, A. Milosavljevic, R. M. Myers, P. J. Park, M. J. Pazin, M. D. Perry, D. Raha, T. E. Reddy, J. Rozowsky, N. Shores, A. Sidow, M. Slattery, J. A. Stamatoyannopoulos, M. Y. Tolstorukov, K. P. White, S. Xi, P. J. Farnham, J. D. Lieb, B. J. Wold and M. Snyder 2012. "ChIP-seq guidelines and practices of the ENCODE and modENCODE consortia." *Genome Res* **22** (9): 1813-1831.
91. Quinlan, A. R. and I. M. Hall 2010. "BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features." *Bioinformatics* **26** (6): 841-842.
92. Afgan, Enis, Dannon Baker, Bérénice Batut, Marius Van Den Beek, Dave Bouvier, Martin Ech, John Chilton, Dave Clements, Nate Coraor, Björn A. Grüning, Aysam Guerler, Jennifer Hillman-Jackson, Saskia Hiltemann, Vahid Jalili, Helena Rasche, Nicola Soranzo, Jeremy Goecks, James Taylor, Anton Nekrutenko, and Daniel

- Blankenberg. 2018. "The Galaxy Platform for Accessible, Reproducible and Collaborative Biomedical Analyses: 2018 Update." *Nucleic Acids Research* **46** (W1):W537–44.
93. Lindgreen, S. 2012. "AdapterRemoval: easy cleaning of next-generation sequencing reads." *BMC Res Notes* **5**: 337.
 94. Langmead, Ben and Steven L. Salzberg. 2012. "Fast Gapped-Read Alignment with Bowtie 2." *Nature Methods* **9** (4):357–59.
 95. Li, Heng, Bob Handsaker, Alec Wysoker, Tim Fennell, Jue Ruan, Nils Homer, Gabor Marth, Goncalo Abecasis, and Richard Durbin. 2009. "The Sequence Alignment/Map Format and SAMtools." *Bioinformatics* **25** (16):2078–79.
 96. Zhang, Y., T. Liu, C. A. Meyer, J. Eeckhoutte, D. S. Johnson, B. E. Bernstein, C. Nusbaum, R. M. Myers, M. Brown, W. Li and X. S. Liu 2008. "Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS)." *Genome Biol* **9** (9): R137.
 97. Feng, J., T. Liu, B. Qin, Y. Zhang and X. S. Liu 2012. "Identifying ChIP-seq enrichment using MACS." *Nat Protoc* **7** (9): 1728-1740.
 98. Ramírez, Fidel, Devon P. Ryan, Björn Grüning, Vivek Bhardwaj, Fabian Kilpert, Andreas S. Richter, Steffen Heyne, Friederike Dündar, and Thomas Manke. 2016. "DeepTools2: A next Generation Web Server for Deep-Sequencing Data Analysis." *Nucleic Acids Research* **44** (W1):W160–65.
 99. McLean, C. Y., D. Bristor, M. Hiller, S. L. Clarke, B. T. Schaar, C. B. Lowe, A. M. Wenger and G. Bejerano 2010. "GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions." *Nat Biotechnol* **28** (5): 495-501.
 100. Kim, D., B. Langmead and S. L. Salzberg 2015. "HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements." *Nat Methods* **12** (4): 357-360.
 101. Love, M. I., W. Huber and S. Anders 2014. "Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2." *Genome Biol* **15** (12): 550.
 102. Bowie, A. G. and L. Unterholzner. 2008. "Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling." *Nat Rev Immunol* **8** (12): 911-922.
 103. Eisenberg, Eli and Erez Y. Levanon. 2013. "Human Housekeeping Genes, Revisited." *Trends in Genetics* **29** (10):569–74.
 104. Koninger, A., A. Mathan, P. Mach, M. Frank, B. Schmidt, E. Schleussner, R. Kimmig, A. Gellhaus and H. Dieplinger 2018. "Is Afamin a novel biomarker for gestational diabetes mellitus? A pilot study." *Reprod Biol Endocrinol* **16** (1): 30.

105. Davis, R. L., H. Weintraub and A. B. Lassar 1987. "Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts." *Cell* **51** (6): 987-1000.
106. Lawlor, Nathan, Ahrim Youn, Romy Kursawe, Duygu Ucar, and Michael L. Stitzel. 2017. "Alpha TC1 and Beta-TC-6 Genomic Profiling Uncovers Both Shared and Distinct Transcriptional Regulatory Features with Their Primary Islet Counterparts." *Scientific Reports* **7** (1): 1–14.
107. Hovnanian, A., D. Rebouillat, E. R. Levy, M. G. Mattei and A. G. Hovanessian 1999. "The human 2',5'-oligoadenylate synthetase-like gene (OASL) encoding the interferon-induced 56-kDa protein maps to chromosome 12q24.2 in the proximity of the 2',5'-OAS locus." *Genomics* **56** (3): 362-363.
108. Yang, X., X. Jing, Y. Song, C. Zhang and D. Liu 2018. "Molecular identification and transcriptional regulation of porcine IFIT2 gene." *Mol Biol Rep.*
109. Kuleshov, Maxim V., Matthew R. Jones, Andrew D. Rouillard, Nicolas F. Fernandez, Qiaonan Duan, Zichen Wang, Simon Koplev, Sherry L. Jenkins, Kathleen M. Jagodnik, Alexander Lachmann, Michael G. McDermott, Caroline D. Monteiro, Gregory W. Gundersen, and Avi Ma'ayan. 2016. "Enrichr: A Comprehensive Gene Set Enrichment Analysis Web Server 2016 Update." *Nucleic Acids Research* **44** (W1):W90–97.
110. Onengut-Gumuscu, Suna, Wei Min Chen, Oliver Burren, Nick J. Cooper, Aaron R. Quinlan, Josyf C. Mychaleckyj, Emily Farber, Jessica K. Bonnie, Michal Szpak, Ellen Schofield, Premanand Achuthan, Hui Guo, Mary D. Fortune, Helen Stevens, Neil M. Walker, Lucas D. Ward, Anshul Kundaje, Manolis Kellis, Mark J. Daly, Jeffrey C. Barrett, Jason D. Cooper, Panos Deloukas, John A. Todd, Chris Wallace, Patrick Concannon, Stephen S. Rich. 2015. "Fine Mapping of Type 1 Diabetes Susceptibility Loci and Evidence for Colocalization of Causal Variants with Lymphoid Gene Enhancers." *Nature Genetics* **47** (4):381–86.
111. Gutiérrez, Giselle Domínguez, Klaus H. Kaestner, J. Clin Invest, Giselle Domínguez Gutiérrez, Aaron S. Bender, Vincenzo Cirulli, Teresa L. Mastracci, Stephen M. Kelly, Aristotelis Tsirigos, Klaus H. Kaestner, and Lori Sussel. 2017. "Pancreatic b Cell Identity Requires Continual Repression of Non – b Cell Programs Find the Latest Version : Pancreatic β Cell Identity Requires Continual Repression of Non – β Cell Programs." **127** (1):244–59.
112. Yayoi Kurita, Tsuyoshi Ohki, Eri Soejima, Xiaohong Yuan, Satomi Kakino, Nobuhiko Wada, Toshihiko Hashinaga, Hitomi Nakayama, Junichi Tani, Yuji Tajiri,

- Yuji Hiromatsu, Kentaro Yamada, Masatoshi Nomura. 2019. “A High-Fat / High-Sucrose Diet Induces WNT4 Expression in Mouse Pancreatic β -Cells.” 55–62.
113. Noble, Janelle A. and Ana M. Valdes. 2011. “Genetics of the HLA Region in the Prediction of Type 1 Diabetes.” *Current Diabetes Reports* **11** (6):533–42.
 114. Balwierz, Piotr J., Mikhail Pachkov, Phil Arnold, Andreas J. Gruber, Mihaela Zavolan, and Erik Van Nimwegen. 2014. “ISMARA: Automated Modeling of Genomic Signals as a Democracy of Regulatory Motifs.” *Genome Research* **24** (5):869–84.
 115. Xie, Lan, Amy L. Sullivan, Jana G. Collier, and Christopher K. Glass. 2013. “Serum Response Factor Indirectly Regulates Type I Interferon-Signaling in Macrophages.” *Journal of Interferon and Cytokine Research* **33** (10):588–96.
 116. Liu, Beiyu, Igor Shats, Steven P. Angus, Michael L. Gatz, and Joseph R. Nevins. 2013. “Interaction of E2F7 Transcription Factor with E2F1 and C-Terminal-Binding Protein (CtBP) Provides a Mechanism for E2F7-Dependent Transcription Repression.” *Journal of Biological Chemistry* **288** (34):24581–89.
 117. Boyle AP, Davis S, Shulha HP, Meltzer P, Margulies EH, Weng Z, Furey TS, Crawford GE. 2008. “High-resolution mapping and characterization of open chromatin across the genome.” *Cell*. **25**;132 (2):311–22.
 118. Keaveney, Marie and Kevin Struhl. 1998. “Activator-Mediated Recruitment of the RNA Polymerase II Machinery Is the Predominant Mechanism for Transcriptional Activation in Yeast.” *Molecular Cell* **1**(6):917–24.
 119. Shin, Hyunjin, Tao Liu, Arjun K. Manrai, and Shirley X. Liu. 2009. “CEAS: Cis-Regulatory Element Annotation System.” *Bioinformatics* **25** (19):2605–6.
 120. Liu, Tao, Jorge A. Ortiz, Len Taing, Clifford A. Meyer, Bennett Lee, Yong Zhang, Hyunjin Shin, Swee S. Wong, Jian Ma, Ying Lei, Utz J. Pape, Michael Poidinger, Yiwen Chen, Kevin Yeung, Myles Brown, Yaron Turpaz, and X. Shirley Liu. 2011. “Cistrome: An Integrative Platform for Transcriptional Regulation Studies.” *Genome Biology* **12** (8):1–10.
 121. Mumbach, Maxwell R., Adam J. Rubin, Ryan A. Flynn, Chao Dai, Paul A. Khavari, William J. Greenleaf, and Howard Y. Chang. 2016. “HiChIP: Efficient and Sensitive Analysis of Protein-Directed Genome Architecture.” *Nature Methods* **13**(11):919–22.
 122. Machanick, Philip and Timothy L. Bailey. 2011. “MEME-ChIP: Motif Analysis of Large DNA Datasets.” *Bioinformatics* **27** (12):1696–97.

123. Bailey, Timothy L., Mikael Boden, Fabian A. Buske, Martin Frith, Charles E. Grant, Luca Clementi, Jingyuan Ren, Wilfred W. Li, and William S. Noble. 2009. "MEME Suite: Tools for Motif Discovery and Searching." *Nucleic Acids Research* **37** (SUPPL. 2):1–7.
124. Bailey, Timothy L. and Michael Gribskov. 1997. "Score Distributions for Simultaneous Matching to Multiple Motifs." *Journal of Computational Biology* **4** (1):45–59.
125. Kalita, Cynthia A., Christopher D. Brown, Andrew Freiman, Jenna Isherwood, Xiaoquan Wen, Roger Pique-Regi, and Francesca Luca. 2018. "High-Throughput Characterization of Genetic Effects on DNA-Protein Binding and Gene Transcription." *Genome Research* **28** (11):1701–8.
126. Smith, Edwin and Ali Shilatifard. 2014. "Enhancer Biology and Enhanceropathies." *Nature Structural and Molecular Biology* **21** (3):210–19.
127. Ward, Lucas D. and Manolis Kellis. 2016. "HaploReg v4: Systematic Mining of Putative Causal Variants, Cell Types, Regulators and Target Genes for Human Complex Traits and Disease." *Nucleic Acids Research* **44** (D1):D877–81.
128. Maurano, Matthew T., Richard Humbert, Eric Rynes, Robert E. Thurman, Eric Haugen, Hao Wang, Alex P. Reynolds, Richard Sandstrom, Hongzhu Qu, Jennifer Brody, Anthony Shafer, Fidencio Neri, Kristen Lee, Tanya Kutayavin, Sandra Stehling-Sun, Audra K. Johnson, Theresa K. Canfield, Erika Giste, Morgan Diegel, Daniel Bates, R. Scott Hansen, Shane Neph, Peter J. Sabo, Shelly Heimfeld, Antony Raubitschek, Steven Ziegler, Chris Cotsapas, Nona Sotoodehnia, Ian Glass, Shamil R. Sunyaev, Rajinder Kaul, and John A. Stamatoyannopoulos. 2012. "Systematic Localization of Common Disease-Associated Variation in Regulatory DNA." *Science* **337** (6099):1190–95.
129. Heinig, Matthias, Enrico Petretto, Chris Wallace, Leonardo Bottolo, Maxime Rotival, Han Lu, Yoyo Li, Rizwan Sarwar, Sarah R. Langley, Anja Bauerfeind, Oliver Hummel, Young Ae Lee, Svetlana Paskas, Carola Rintisch, Kathrin Saar, Jason Cooper, Rachel Buchan, Elizabeth E. Gray, Jason G. Cyster, Jeanette Erdmann, Christian Hengstenberg, Seraya Maouche, Willem H. Ouwehand, Catherine M. Rice, Nilesh J. Samani, Heribert Schunkert, Alison H. Goodall, Herbert Schulz, Helge G. Roeder, Martin Vingron, Stefan Blankenberg, Thomas Münzel, Tanja Zeller, Silke Szymczak, Andreas Ziegler, Laurence Tiret, Deborah J. Smyth, Michal Pravenec, Timothy J. Aitman, Francois Cambien, David Clayton, John A. Todd, Norbert Hubner, Stuart A.

- Cook. 2010. "A Trans-Acting Locus Regulates an Anti-Viral Expression Network and Type 1 Diabetes Risk." *Nature* **467** (7314):460–64.
130. Oikarinen, Sami, Mika Martiskainen, Sisko Tauriainen, Heini Huhtala, Jorma Ilonen, Riitta Veijola, Olli Simell, Mikael Knip, and Heikki Hyöty. 2011. "Enterovirus RNA in Blood Is Linked to the Development of Type 1 Diabetes." *Diabetes* **60** (1):276–79.

Περίληψη

Οι ιϊκές μολύνσεις έχουν ως χαρακτηριστικό τα υψηλά επίπεδα νοσηρότητας και θνησιμότητας, αποτελώντας παγκόσμια απειλή για την ανθρώπινη υγεία, και κατ' επέκταση για την εύρυθμη λειτουργία των σύγχρονων κοινωνιών. Η εισαγωγή της γενετικής πληροφορίας των ιών στα κύτταρα του ξενιστή προκαλεί επαναπρογραμματισμό του μεταγραφικού προφίλ του γονιδιώματος, γεγονός που οδηγεί συχνά στην εδραίωση παθολογικού φαινοτύπου και συνεπώς στην εμφάνιση ασθενειών, όπως ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1 (Type 1 Diabetes Mellitus), το Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοβιολογικής Ανεπάρκειας (AIDS), η Ιογενής ηπατίτιδα Β και C και άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, κυρίως ως επακόλουθο της αποδιοργάνωσης της ανοσολογικής απόκρισης. Το γεγονός αυτό καθιστά αναγκαία την ολιστική μελέτη του φαινομένου των ιϊκών μολύνσεων στη διάρκεια της αντι-ϊκής απόκρισης. Ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1 έχει θεωρηθεί ως μία ασθένεια, η οποία πυροδοτείται μετά από ιϊκή μόλυνση ανθρώπων που φέρουν συγκεκριμένο γενετικό υπόβαθρο. Ωστόσο, ο μοριακός μηχανισμός που διέπει την εμφάνιση και την εξέλιξη της νόσου παραμένει άγνωστος σε σημαντικό βαθμό.

Η λειτουργία όλων των οργανισμών στηρίζεται στην αξιόπιστη χωροχρονική και ποσοτική έκφραση των γονιδίων. Είναι ευρέως αποδεκτό, ότι τα ρυθμιστικά στοιχεία του DNA σε συνδυασμό με τους μεταγραφικούς παράγοντες και την τοπική αρχιτεκτονική των χρωματινικών επιφανειών συγκροτούν ρυθμιστικούς κώδικες, οι οποίοι καθορίζουν τη γονιδιακή έκφραση καθώς και το βαθμό επαγωγής παρακείμενων ή απομακρυσμένων γονιδίων. Ωστόσο, η μηχανιστική λογική τους δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως και αποτελεί πρόκληση. Η ανάπτυξη των νέων τεχνολογιών με επίκεντρο την αλληλούχηση νέας γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS) επιτρέπει πλέον τον ολιστικό χαρακτηρισμό των ρυθμιστικών στοιχείων και την απάντηση σε σημαντικά ερωτήματα, τα οποία παραμένουν νεφελώδη για πολλά χρόνια, όπως: α) πώς είναι δυνατόν ρυθμιστικά στοιχεία που εδράζουν γειτονικά ή χιλιάδες βάσεις μακριά από τα γονίδια στόχους να αλληλεπιδρούν με αυτά, β) οι κυτταρικές αποκρίσεις σχετίζονται με συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος και γ) υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ της επιγενετικής κατάστασης που ισχύει στον πυρήνα συγκεκριμένων κυτταρικών τύπων και της πιθανότητας εμφάνισης/ανάπτυξης συγκεκριμένης νόσου;

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας με τίτλο «Μελέτη των Επαγόμενων από Ιό Προγραμμάτων Γονιδιακής Έκφρασης σε Κύτταρα Θηλαστικών μέσω Γονιδιωματικής Τεχνολογίας» είναι η αποκωδικοποίηση των μοριακών μηχανισμών που συνδέουν την ιϊκή μόλυνση των β παγκρεατικών κυττάρων με την ανάπτυξη του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1 σε ασθενείς με συγκεκριμένο γενετικό υπόβαθρο, μέσω μελέτης σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος (*genomics*) και του μεταγραφώματος (*transcriptomics*). Μέσω της μελέτης των μηχανισμών ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης κατά τη διάρκεια της αντι-ιϊκής απόκρισης, γίνεται αποκάλυψη του συνόλου των ρυθμιστικών στοιχείων, που διαχειρίζονται/συντονίζουν την κυτταρική απάντηση στην εξέλιξη των ιϊκών μολύνσεων. Για την επίτευξη του στόχου αυτού, χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι μοριακής βιολογίας, βιοχημείας, γονιδιωματικής (RNA-seq, DNaseI-seq, ChIP-seq, STARR-seq) και βιοπληροφορικής, οι οποίες στοχεύουν στην απόκτηση μιας ολοκληρωμένης εικόνας των μοριακών φαινομένων που πραγματοποιούνται κατά την ιϊκή μόλυνση των β παγκρεατικών κυττάρων.

Abstract

Viral infections inflict a lasting negative impact on human health and are often responsible for the generation of waves of worldwide morbidity and mortality. Viruses cause transcriptional reprogramming of the host cells, which often leads to the development and establishment of severe pathogenic phenotypes such as those characterize well-known human diseases such as Type 1 Diabetes Mellitus (T1D), Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS), viral hepatitis B and C and other autoimmune diseases, which are developed mainly as consequences of the disorganization of the immune response. Thus, there is an urgent need for the implementation of holistic studies focused on the molecular mechanisms underlying the phenomenon of anti-viral cellular response. Type 1 diabetes is considered as a virus-provoked disease developed in individuals characterized by specific genetic predisposition. However, the molecular mechanism that governs the onset and progression of the disease remains largely unknown.

The function of all organisms is based on the reliable spatio-temporal and quantitative expression of genes. It is well respected that DNA regulatory elements in combination with transcription factors and the local architecture of chromatic surfaces structure regulatory codes, which determine the gene expression as well as the level of induction of adjacent or distant genes. However, their mechanistic logic has not been fully clarified and is a challenge. The development of new technologies, focusing on the Next Generation Sequencing (NGS), now allows the holistic characterization of regulatory elements and the answer to important questions that remain cloudy for many years like: a) how can regulatory elements, which are located adjacent to or thousands of bases away from the target genes to interact with them, b) the cellular responses are related to specific regions of the genome and c) is there an interaction between the epigenetic status of the nucleus of specific cell types and the likelihood of the emergence / development of a particular disease?

The scientific aim of this diploma thesis entitled “Study of Virus-Induced Gene Expression Programs in Mammalian Cells by Genomics Technology” is to decipher the molecular mechanisms linking viral infection of β pancreatic cells with the development of Type 1 Diabetes through study at the level of the whole genome (*genomics*) and *transcriptomics*. Through the study of the mechanisms of gene expression regulation during the anti-viral response, the totality of the regulatory elements that manage/coordinate the cellular response to the development of viral infections is revealed. To achieve this goal,

methods of molecular biology, biochemistry, genomics (RNA-seq, DNaseI-seq, ChIP-seq, STARR-seq) and advanced bioinformatics were used, which aim to obtain a complete picture of the molecular phenomena that take place during viral infection of β pancreatic cells.

Παράρτημα

Πίνακας 1. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για να ελεγχθεί η έκφραση γονιδίων μέσω Real Time PCR (Εταιρεία: Eurofins Genomics).

Ifnb	Forward	5'-GCAGCTCCAGCTCCAAGAAAGGA-3'
	Reverse	5'-GCATCTCTTGGATGGCAAAGGC-3'
Ifih1	Forward	5'-CCATGAGTCAGACTGAACAA-3'
	Reverse	5'-ATGGCTATCTCGTTCGTGACAA-3'
Ptpn2	Forward	5'-TATACAGAAACGGTGGAAAGA-3'
	Reverse	5'-CACCTTAGAAGGAGGCCCTGTT-3'
Tyk2	Forward	5'-ACAGAATCTAGTCGGCACTTC-3'
	Reverse	5'-ACCTTGCCAAAGTGACCCTCA-3'
Gapdh	Forward	5'-GGGCTCATGACCACAGTCCATG-3'
	Reverse	5'-AGTGAGCTTCCCGTTCAGCTCT-3'

Πίνακας 2. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για να ελεγχθεί η παρουσία ιστονικών τροποποιήσεων και η πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης καθώς και για την επαλήθευση των πειραμάτων DNaseI Hypersensitivity μέσω Real Time PCR (Εταιρεία: Eurofins Genomics).

Actb promoter	Forward	5'-AAGGAGCTGCAAAGAAGCTGT-3'
	Reverse	5'-CGCTGTGGCGTCGTATAAAACC-3'
Actb upstream	Forward	5'-TGAGGAATGGAGGGAGGCTAGGGTA-3'
	Reverse	5'-GTCACCCCATAATGCGCTCTGGTCT-3'
Oasl1	Forward	5'-TCTGGAAGGTCAGACTCAAGCCA-3'
	Reverse	5'-TTGTCATGGTAGGTGTGCCGAGG-3'
Afm	Forward	5'-AGTGAAACACAGCATAATTTTCC-3'
	Reverse	5'-GGTCCTGGTGCAAATTTCTAGGT-3'
Negative	Forward	5'-GGGCTCACTGGTGTATAAGGAAA-3'
	Reverse	5'-GCGTTTTGGTCCATACAAAGCA-3'

Πίνακας 3. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την επεξεργασία της βιβλιοθήκης των συνθετικών αλληλουχιών (Εταιρεία: Eurofins Genomics).

Βήμα 1 ^ο	Forward	5'-CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3'
	Reverse	5'-GAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-3'
Βήμα 2 ^ο	Forward	5'-GCACCGGACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3'
	Reverse	5'-TCGTCGAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-3'
Βήμα 3 ^ο	Forward	5'-TAGAGCATGCACCGGACACTCTTTCCCTACACGACGCTCT-3'
	Reverse	5'-GGCCGAATTCGTCGAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTC-3'