



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ

ΚΛΙΝΙΚΗ & ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Καθηγητής Αθανάσιος Γ. Τζιούφας

ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΕΠΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΥ



ΙΔΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ ΤΗΣ ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ (ΙΙΒΕΑΑ)

ΕΙΡΗΝΗ ΑΛΕΞΟΠΟΥΛΟΥ, M.Sc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

AOHNA 2020





ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ

ΚΛΙΝΙΚΗ & ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Καθηγητής Αθανάσιος Γ. Τζιούφας

ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΕΠΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΥ



ΙΔΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ ΤΗΣ ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ (ΙΙΒΕΑΑ)

ΕΙΡΗΝΗ ΑΛΕΞΟΠΟΥΛΟΥ, Μ.Sc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

AOHNA 2020

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής Αθηνών: Καθηγητής Πέτρος Π. Σφηκάκης

Ημερομηνία αιτήσεως του υποψηφίου: 28.09.2012

Ημερομηνία ορισμού 3μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 13.12.2012

Μέλη 3μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Δρ. Βουλγαρέλης Μιχαήλ, Καθηγητής Παθολογικής -Αιματολογίας (Επιβλέπων), Εργαστήριο Παθολογικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Δρ. Βλαχογιαννόπουλος Παναγιώτης, Καθηγητής Παθολογίας-Ανοσολογίας, Εργαστήριο Παθολογικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Δρ. Θάνος Δημήτρης, Ακαδημαϊκός, Πρόεδρος Επιστημονικού Συμβουλίου, Ερευνητής Α', Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών

Μέλη 7μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Δρ. Βουλγαρέλης Μιχαήλ, Καθηγητής Παθολογικής -Αιματολογίας (Επιβλέπων), Εργαστήριο Παθολογικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Δρ. Βλαχογιαννόπουλος Παναγιώτης, Καθηγητής Παθολογίας-Ανοσολογίας, Εργαστήριο Παθολογικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Δρ. Θάνος Δημήτρης, Ακαδημαϊκός, Πρόεδρος Επιστημονικού Συμβουλίου, Ερευνητής Α', Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών

Δρ. Μόσιαλος Γεώργιος, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Γενετικής Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο

Δρ. Κλινάκης Απόστολος, Ερευνητής Α,' Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών

Δρ. Ξάνθου-Τσιγκόγλου Γεωργία, Ερευνήτρια Β΄, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών

Δρ. Καψογεώργου Ευσταθία, Επ. Καθηγήτρια Ανοσολογίας, Εργαστήριο Παθολογικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Ημερομηνία ορισμού του Θέματος: 27.02.2013

Ημερομηνία καταθέσεως της διδακτορικής διατριβής: 23.12.2020

Βαθμός με τον οποίο έγινε αποδεκτή η διατριβή: Άριστα

ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΣ ΟΡΚΟΣ

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ. ΗΓΗΣΕΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΑΥΤΟΥ ΑΔΕΛΦΕΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΙΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥΓΤΡΑΦΗΣ ΠΑΡΑΓΤΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΞΥΓΓΕΓΡΑΜΕΝΟΙΣ ΤΕ ΚΑΙ ΩΡΚΙΣΜΕΝΟΣ ΝΟΜΩ ΙΗΤΡΙΚΟ ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ. ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝΚΑΙ ΔΎΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΗ ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΉΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΗΝ ΤΟΙΝΔΕ ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙΝ ΠΡΗΞΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΙΩ ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ΄ ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΙΑΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΕΙΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΑΡΑΠΕΙΗ Η ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ, ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΚΕΟΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΣ ΟΡΚΟΣ (ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ)

ΟΡΚΙΖΟΜΑΙ ΣΤΟΝ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΤΟΝ ΙΑΤΡΟ ΚΑΙ ΣΤΟΝ ΑΣΚΛΗΠΙΟ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΠΑΝΑΚΕΙΑ ΚΑΙ Σ' ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΘΕΟΥΣ ΚΑΙ ΤΙΣ ΘΕΕΣ, ΠΟΥ ΒΑΖΩ ΜΑΡΤΥΡΕΣ, ΟΤΙ ΘΑ ΕΚΠΛΗΡΩΣΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΜΟΥ ΑΥΤΌ ΚΑΙ ΤΟ ΣΥΜΒΟΛΑΙΟ ΑΥΤΌ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ. ΟΤΙ ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΕΚΕΙΝΟΝ ΠΟΥ ΜΟΥ ΔΙΔΑΞΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΑΥΤΗ ΙΣΟΝ ΜΕ ΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ, ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΝ ΚΑΝΩ ΚΟΙΝΩΝΟ ΤΟΥ ΒΙΟΥ ΜΟΥ, ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΥ ΠΡΟΣΦΕΡΩ ΑΠΟ ΤΑ ΔΙΚΑ ΜΟΥ ΟΤΙ ΧΡΕΙΑΖΕΤΑΙ ΤΟΥΣ ΑΠΟΓΟΝΟΥΣ ΤΟΥ ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΩΣ ΑΔΕΛΦΟΥΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΥΣ ΔΙΔΑΞΩ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΑΥΤΗ, ΑΝ ΕΠΙΘΥΜΟΥΝ ΝΑ ΜΑΘΟΥΝ, ΧΩΡΙΣ ΜΙΣΘΟ ΚΑΙ ΧΩΡΙΣ ΣΥΜΦΩΝΙΑ. ΟΤΙ ΘΑ ΜΕΤΑΔΩΣΩ ΤΟΥΣ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΟΥΣ ΚΑΝΟΝΕΣ, ΤΑ ΘΕΩΡΗΤΙΚΑ ΜΑΘΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΤΙΣ ΥΠΟΛΟΙΠΕΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΣΤΟΥΣ ΓΙΟΥΣ ΜΟΥ, ΣΤΟΥΣ ΓΙΟΥΣ ΤΟΥ ΔΙΔΑΣΚΑΛΟΥ ΜΟΥ, ΚΑΙ ΣΕ ΜΑΘΗΤΕΣ ΠΟΥ ΘΑ ΕΧΟΥΝ ΣΥΝΔΕΘΗ ΜΑΖΙ ΜΟΥ ΜΕ ΟΡΚΟ ΚΑΙ ΣΥΜΒΟΛΑΙΟ, ΚΑΤΑ ΤΗ ΣΥΝΗΘΕΙΑ ΤΩΝ ΙΑΤΡΩΝ, ΚΑΙ ΣΕ ΚΑΝΕΝΑ ΑΛΛΟ. ΘΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΩ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΔΙΑΙΤΑ ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΩΦΕΛΕΙΑ ΤΩΝ ΑΡΡΩΣΤΩΝ, ΟΣΟ ΕΞΑΡΤΑΤΑΙ ΑΠΌ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ, ΚΑΙ (ΥΠΟΣΧΟΜΑΙ ΟΤΙ) ΘΑ ΤΟΥΣ ΠΡΟΦΥΛΑΞΩ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΒΛΑΒΗ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΑ. ΔΕΝ ΘΑ ΧΟΡΗΓΗΣΩ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟ ΦΑΡΜΑΚΟ ΣΕ ΚΑΝΕΝΑ, ΟΣΟ ΚΑΙ ΑΝ ΠΡΟΚΛΗΘΩ, ΟΥΤΕ ΘΑ ΥΠΟΔΕΙΞΩ ΤΕΤΟΙΑ ΣΥΜΒΟΥΛΗ. ΕΠΙΣΗΣ ΔΕΝ ΘΑ ΔΩΣΩ ΣΕ ΓΥΝΑΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΟ ΕΚΤΡΩΤΙΚΟ. ΑΓΝΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΗ ΘΑ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΤΗ ΖΩΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ. ΔΕΝ ΘΑ ΧΕΙΡΟΥΡΓΗΣΩ ΟΠΩΣΔΗΠΟΤΕ ΑΥΤΟΥΣ ΠΟΥ ΠΑΣΧΟΥΝ ΑΠΟ ΠΕΤΡΑ, ΑΛΛΑ ΘΑ ΑΦΗΣΩ ΤΗΝ ΠΡΑΞΗ ΑΥΤΗ ΣΤΟΥΣ ΕΞΑΣΚΗΜΕΝΟΥΣ. ΣΕ ΟΣΑ ΣΠΙΤΙΑ ΠΡΟΣΚΑΛΟΥΜΑΙ, ΘΑ ΜΠΑΙΝΩ ΓΙΑ ΤΟ ΚΑΛΟ ΤΩΝ ΑΡΡΩΣΤΩΝ, ΚΡΑΤΩΝΤΑΣ ΤΟΝ ΕΑΥΤΟ ΜΟΥ ΜΑΚΡΙΑ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΘΕΛΗΜΑΤΙΚΗ ΑΔΙΚΙΑ Η ΑΛΛΗ ΔΙΑΦΘΟΡΑ ΚΑΙ ΠΡΟ ΠΑΝΤΩΣ ΜΑΚΡΙΑ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΑΦΡΟΔΙΣΙΑΚΗ ΠΡΑΞΗ ΣΕ ΣΩΜΑΤΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ Η ΔΟΥΛΩΝ. ΟΣΑ ΔΕ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΘΑ ΔΩ Η ΘΑ ΑΚΟΥΣΩ Η ΚΑΙ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΑΣΧΟΛΙΈΣ ΜΟΥ ΣΤΗΝ ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗ ΖΩΗ, ΟΣΑ ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΠΟΤΕ ΝΑ ΚΟΙΝΟΛΟΓΟΥΝΤΑΙ ΣΤΟΥΣ ΕΞΩ, ΘΑ ΤΑ ΑΠΟΣΙΩΠΩ, ΥΠΟΛΟΓΙΖΟΝΤΑΣ ΟΤΙ ΑΥΤΑ ΕΙΝΑΙ ΙΕΡΑ ΜΥΣΤΙΚΑ. ΟΣΟ ΛΟΙΠΟΝ ΘΑ ΤΗΡΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΜΟΥ, ΚΑΙ ΔΕΝ ΘΑ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΙΑΖΩ, ΕΙΘΕ ΝΑ ΠΕΤΥΧΑΙΝΩ ΣΤΗ ΖΩΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ, ΕΧΟΝΤΑΣ

ΚΑΛΟ ΟΝΟΜΑ ΠΑΝΤΟΤΕ ΑΝΑΜΕΣΑ ΣΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ ΕΑΝ ΟΜΩΣ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΩ ΚΑΙ ΓΙΝΩ ΕΠΙΟΡΚΟΣ, ΝΑ ΠΑΘΩ ΤΑ ΑΝΤΙΘΕΤΑ.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Επώνυμο :	Αλεξοπούλου
Όνομα :	Ειρήνη
Πατρώνυμο:	Νικόλαος
Υπηκοότητα :	Ελληνική
Email Επικοινωνίας:	eirini_alexopoulou@hotmail.co.uk

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

Διδακτορικό Δίπλωμα της Ιατρικής Σχολής Αθηνών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ)

Υποψήφια διδάκτορας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, Τομέας Παθολογικής Φυσιολογίας. Τίτλος Διδακτορικής διατριβής: «Μοριακοί Μηχανισμοί Κυτταρικού Επαναπρογραμματισμού». Η εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής (2012-2020) πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Ακαδημαϊκού Ερευνητή Α', και Πρόεδρο Επιστημονικού Συμβουλίου Δημήτρη Θάνου στο Κέντρο Βασικής Έρευνας ΙΙ, στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ)

Εκπαιδευόμενη Βοηθός Εργαστηρίου

Εργαστήριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού (2011-2012)

Ερευνητικός Υπεύθυνος: Γεώργιος Χρούσος, Καθηγητής Παιδιατρικής και Ενδοκρινολογίας στο Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ), Κέντρο Κλινικής Έρευνας, Ιδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ) Εργαστήριο Κυτταρικής Βιολογίας (2010 – 2011) Ερευνητική Υπεύθυνη: Ερευνήτρια Βίλη Πανουτσακοπούλου, Κέντρο Βασικής Έρευνας Ι, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (IIBEAA)

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα (M.Sc) στη Βιολογία του καρκίνου από το Kingston University, Ηνωμένο Βασίλειο (Σεπτέμβριος 2008 – 2009). Η εκπόνηση της έρευνας πραγματοποιήθηκε στο Queen Mary University, Barts and the London School of Medicine and Dentistry.

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα (M.Sc) Ιατρικής Γενετικής από το London Metropolitan University, Ηνωμένο Βασίλειο (Σεπτέμβριος 2007 – 2008)

Πτυχίο Γενετικής (B.Sc) από το University of Sheffield, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Ηνωμένο Βασίλειο (2002 – 2007)

Απολυτήριο Λυκείου (Λίαν Καλώς) Φιλεκπαιδευτική Εταιρεία - Αρσάκειο Τοσίτσειο Εκάλης (1999 – 2002)

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

Κατά τη διάρκεια των σπουδών μου καθώς και στα πλαίσια της διδακτορικής μου διατριβής απέκτησα εργαστηριακή εμπειρία στις εξής μοριακές και βιοχημικές τεχνικές στο πεδίο της Μοριακής Βιολογίας: ανοσοκατακρήμνιση σε χρωματίνη (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP βιβλιοθηκών ChIP), παρασκευή για αλληλούχηση (ChIP-sequencing), κυτταροκαλλιέργειες, διαμολύνσεις κυτταρικών σειρών, in vitro μεταγραφή γονιδίων σε πυρηνικά εκγυλίσματα HeLa και Namalwa κυττάρων, τεγνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), ανοσοφθορισμός, στίπωμα κατά Western, ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών, κλωνοποίηση γονιδίων σε φορείς επιλογής (χρησιμοποιώντας περιοριστικά ένζυμα), μετασχηματισμός ηλεκτρο-επιδεκτικών κυττάρων E.coli, υπερέκφραση και απομόνωση πρωτεϊνών, παρατήρηση κυττάρων σε confocal μικροσκόπιο, Next Generation Sequencingbased μέθοδοι, όπως RNA-sequencing, DNaseI-sequencing, FAIRE-sequencing, STARRsequencing

ΑΤΟΜΙΚΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΙΚΑΝΟΤΗΤΕΣ

ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Πτυχίο Αγγλικών

- Certificate of Proficiency in English", University of Cambridge
- Certificate of Proficiency in English", The University of Michigan

Πτυχίο Γαλλικών

- Diplôme d'études en langue française (DELF) – 1^{er} Degré

Χρήση Computer

Άριστη γνώση των Windows, Word, Excel και PowerPoint, Access FrontPage και Microsoft Windows

ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ

Παρακολούθηση των σεμιναρίων του τομέα της Παθολογικής Φυσιολογίας, της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

11° Συνέδριο Ιατρικής Χημείας : Σχεδιασμός και Ανάπτυξη Φαρμακευτικών Προϊόντων. Τμήματα Χημείας και Φαρμακευτικής - Πανεπιστήμιο Πατρών, 26 – 28 Απριλίου 2010

12° Συνέδριο Ιατρικής Χημείας : Σχεδιασμός και Ανάπτυξη Φαρμακευτικών Προϊόντων. Πανεπιστήμιο Πατρών - Τμήματα Χημείας και Φαρμακευτικής, 12 – 15 Απριλίου 2011

62° Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας. Ίδρυμα Ευγενίδου, Ελληνική Εταιρεία Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, 9 – 11 Δεκεμβρίου 2011

Επετειακή Ημερίδα - 60 XPONIA DNA. Ίδρυμα Ευγενίδου, Ελληνική Εταιρεία Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, 18 Απριλίου 2013

14° Συνέδριο Ιατρικής Χημείας και 2° FP7 Seedrug Workshop. Τμήμα Χημείας. Συνεδριακό και Πολιτιστικό Κέντρο του Πανεπιστημίου Πατρών, 13 – 14 Μαΐου 2013
64° Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας. Ίδρυμα Ευγενίδου, Ελληνική Εταιρεία Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, 6 – 8 Δεκεμβρίου 2013

15° Συνέδριο Ιατρικής Χημείας : Σχεδιασμός και Ανάπτυξη Φαρμακευτικών Προϊόντων. Τμήμα Χημείας – Συνεδριακό και Πολιτιστικό Κέντρο του Πανεπιστημίου Πατρών, 9 - 11 Απριλίου 2014

66° Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας. Ίδρυμα Ευγενίδου, Ελληνική Εταιρεία Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, 11 – 13 Δεκεμβρίου 2015

5° Πανελλήνιο Forum Νέων Επιστημόνων της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας. Ίδρυμα Ευγενίδου, Ελληνική Εταιρεία Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, 9 Νοεμβρίου 2017

68° Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας. Ίδρυμα Ευγενίδου, Ελληνική Εταιρεία Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, 10 – 12 Νοεμβρίου 2017

70° Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας. Ίδρυμα Ευγενίδου, Ελληνική Εταιρεία Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, 29 – 1 Δεκεμβρίου 2019

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΗ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΗ (poster) με τίτλο: «Decoding the human antiviral gene expression program» 5° Πανελλήνιο Forum Νέων Επιστημόνων της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Ίδρυμα Ευγενίδου, Ελληνική Εταιρεία Βιοχημείας και Μοριακή Βιολογίας, 9 Νοεμβρίου 2017

ΒΡΑΒΕΙΑ – ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

Βραβείο Καλύτερης Αναρτημένης Ανακοίνωσης με τίτλο: «Decoding the human antiviral gene expression program» 5° Πανελλήνιο Forum Νέων Επιστημόνων της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Ίδρυμα Ευγενίδου, Ελληνική Εταιρεία Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, 9 Νοεμβρίου 2017

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ

- Χρηματοδότηση έρευνας για την εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής στο πλαίσιο υλοποίησης της Πράξης του προγράμματος ΘΑΛΗΣ (CancerTFs) με κωδικό: 80799 «ΘΑΛΗΣ-ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ» και συγκεκριμένα του υποέργου «Ο ρόλος πρωτεϊνικού συμπλέγματος ενεργοποίησης ΙΚΚ/NFκΒ στη ρύθμιση γονιδίων-στόχων των μεταγραφικών παραγόντων E2F in vitro και in vivo και στην καρκινογένεση» του ΕΠ Εκπαίδευση και δια Βίου Μάθηση, το οποίο χρηματοδοτείται από το ΕΣΠΑ 2007-2013
- Χρηματοδότηση έρευνας για την εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής από το πρόγραμμα Hellas-CH «The HiPER, ELI and LASERLAB Europe Synergy & IREPION-CH.GR»

KOINΩNIKES ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ

Πρόεδρος του Hellenic Society καθ΄ όλη τη διάρκεια φοίτησής μου στο University of Sheffield (2004-2007), θέση που βοήθησε στην οργανωτικότητα, στο σωστό προγραμματισμό καθώς και στο συντονισμό ομάδων και στη λήψη σημαντικών αποφάσεων

Εθελόντρια για την εκστρατεία του καρκίνου του στήθους (Cancer Research UK)

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων, όπως αυτά περιγράφονται και εξηγούνται στην παρούσα Διδακτορική διατριβή, κατατίθενται προς δημοσίευση στο έγκριτο επιστημονικό περιοδικό "Science magazine", υπό τον τίτλο: «**Decoding the transcriptional code and the evolutionary origins of the human innate anti-viral gene expression program**" Marios Agelopoulos, Spyros Foutadakis, Eirini Alexopoulou, Dimitris Chatzopoulos, Antonis Kokkalis and Dimitris Thanos

Αντί προλόγου

Η διδακτορική μου διατριβή με τίτλο "Μοριακοί μηχανισμοί κυτταρικού επαναπρογραμματισμού" εκπονήθηκε στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (IIBEAA) στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Ακαδημαϊκού Καθηγητή κ. Δημήτρη Θάνου. Την Ακαδημαϊκή επίβλεψη της είχαν οι Καθηγητές Μιχάλης Βουλγαρέλης και Παναγιώτης Βλαχογιαννόπουλος, τους οποίους ευχαριστώ για την τιμή που μου έκαναν να αναλάβουν μέλη της τριμελούς επιτροπής. Ευχαριστώ θερμά για τη διακριτική συμβολή τους για την ασφαλή ολοκλήρωση των προσπαθειών μου. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής για την επιστημονική συμβολή και την ιδιαίτερη τιμή που μου έκαναν να είναι μέλη της επιτροπής μου.

Με την ευκαιρία που έχω θα ήθελα να ευχαριστήσω ειλικρινά τον Ακαδημαϊκό Καθηγητή κ. Δημήτρη Θάνο για την ευκαιρία που μου έδωσε να βουτήξω σε βαθιά επιστημονικά νερά, δοκιμάζοντας τις ικανότητες αλλά και τις αντοχές μου. Κυρίως όμως τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτωντάς μου την παρούσα έρευνα ώστε να πάρω μια γεύση από επιστήμη σε αυτά τα χρόνια που βρίσκομαι στο εργαστήριό του.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στον Ερευνητή Μάριο Αγγελόπουλο για τη συνεχή παρότρυνση και υποστήριξη του κατά την εκπόνηση της διατριβής μου. Η συμβολή του ήταν τεράστια, καθώς με την επιστημονική του καθοδήγηση, με την ουσιαστική, και την καθημερινή του επίβλεψη, με βοήθησε να ξεπεράσω το κάθε εμπόδιο.

Ιδιαίτερη αναφορά και ευχαριστίες οφείλω στον Καθηγητή κ. Βλαχογιαννόπουλο για την αμέριστη υποστήριξη, την ακέραια εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε κάθε πτυχή της συνεργασίας μας και την κατανόηση του απέναντι στις δυσκολίες που συνάντησα, καθώς και για τη διαρκή επιστημονική του καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του. Δε θα διστάσω να πω ότι μέσα σε αυτά τα χρόνια απέκτησα ένα φίλο που εκτιμώ και θαυμάζω για το ιατρικό του μυαλό, τη δίψα του για γνώση και το συνεχές του διάβασμα διότι όπως ξέρουμε το ταξίδι της γνώσης δε σταματά ποτέ ...

Συνοδοιπόρος σε αυτό το ατελείωτο ταξίδι αναζήτησης ήταν ο Σπύρος Φουταδάκης, πάντα πρόθυμος να συνεργαστεί και να με συμβουλεύσει όποτε το χρειαζόμουν.

Σχεδόν οκτώ χρόνια διδακτορικής διατριβής δεν είναι αμελητεό χρονικό διάστημα. Είναι όπως χαρακτηριστικά λέω μια ολόκληρη ζωή. Είναι όμως και αρκετός χρόνος για να βιώσεις έντονες συγκινήσεις και εμπερίες. Έτσι, κι εγώ, ξεκινώντας με σχεδόν παιδικό ενθουσιασμό, συνεχίζοντας με έντονη τάση αμφισβήτησης και απογοήτευσης, στα όρια απομυθοποίησης, ανακάμπτοντας με πείσμα όμως, κατάφερα να ολοκληρώσω αυτό το μεγάλο κεφάλαιο της δικής μου ζωής.

"Αν το διδακτορικό ήταν εύκολη υπόθεση θα το είχαν όλοι", είχα ακούσει κάποτε και ας μου επιτραπεί να το αναφέρω και να συμφωνήσω. Τα πράγματα δεν κύλησαν πάντα απροβλημάτιστα. Νιώθω όμως ευχαριστημένη, γιατί έφτασα στο τέλος. Διαπίστωσα ότι κατά τη διάρκεια όλων αυτών των χρόνων ανακαλύπτεις νέες πτυχές της προσωπικότητάς σου, καλλιεργείς όλα τα αμυντικά και επιθετικά στοιχεία σου και επαναπροσδιορίζεις τις αξίες και τους στόχους σου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ κρατάω για όλα τα μέλη του εργαστηρίου. Μοιραστήκαμε όμορφες στιγμές, εντός και εκτός εργαστηρίου. Μοιραστήκαμε όμως τα προβλήματα της καθημερινότητας και περίσσιες αγωνίες, στενοχώριες και απογοητεύσεις. Γι' αυτό υπήρξα ιδιαίτερα τυχερή ως μέλος αυτού του εργαστηρίου, διότι καθημερινά βίωνα καταστάσεις ανεπανάληπτες και αξέχαστες. Τους ευχαριστώ όλους, έναν προς έναν και τους εύχομαι κάθε επιτυχία και ευτυχία στη ζωή τους.

Ανάμεσά τους θα ήθελα να ξεχωρίσω τον τεχνικό του εργαστηρίου μας, το φίλο μου Γιώργο για τις όμορφες συζητήσεις και την ευγένεια της ψυχής του, τον αγαπημένο μου Αλέξανδρο με την ευχάριστη διάθεσή του, που ήταν πάντα πρόθυμος να με βοηθήσει και μαζί κάναμε την κάθε μας μέρα να κυλάει ξένοιαστα με χαμόγελο, τη Μαρία Καπασά που η φιλία μας παραμένει τόσο δυνατή, τη Χρυσούλα που πρώτη με καλωσόρισε στο εργαστήριο, το Γιώργο που μοιραζόμασταν τους προβληματισμούς μας και συζητούσαμε με τις ώρες για το οτιδήποτε. Το Δημήτρη που περνούσαμε παρέα τόσες ώρες στο εργαστήριο οι οποίες ήταν μόνο ευχάριστες, την Ελευθερία και το χαμόγελό της που μαζί συντονίζαμε όλο το εργαστήριο, τον Γιάννη για την καλοσύνη του και τις ενδιαφέρουσες απόψεις του, το Δημήτρη για την αρμονική συνεργασία μας και τη φιλία μας.

Η εκπόνηση της διατριβής αυτής, όμως, δε θα μπορούσε να ολοκληρωθεί εάν δεν είχα στο πλευρό μου τους φίλους μου, οι οποίοι με στήριζαν στις λιπόψυχες στιγμές μου, με ανέχονταν με τις εμμονές και τις ανασφάλειές μου. Το λιγότερο που μπορώ να κάνω για αυτούς είναι να ευχαριστήσω.

Η συμπαράσταση του Γιώργου υπήρξε πάντοτε ειλικρινής και ουσιαστική, μα και, πάνω από όλα, εντελώς ανεπηρέαστη από τα εκατοντάδες χιλιόμετρα της μεταξύ μας απόστασης.

Τέλος, το πιο μεγάλο ευχαριστώ από όλα, δικαιωματικά, το αφιερώνω στην οικογένειά μου, και πιο συγκεκριμένα στον πατέρα μου, θερμό υποστηρικτή της προσπάθειας μου, συνέπασχε σε κάθε δύσκολή μου στιγμή. Χαιρόταν με κάθε μου επίτευγμα με το δικό του μοναδικό τρόπο δημιουργώντας μέσα μου μεγάλα αποθέματα δύναμης και αντοχής.

Η αγαπημένη μου γιαγιά πάντα στο πλευρό μου, στο ρόλο της μητέρας, έκανε και κάνει ακόμα τα πάντα για να γίνομαι ολοένα και καλύτερη. Τις οφείλω τόσα πολλά και θα την ευχαριστώ για πάντα.

Και οι δύο τους μου ενέπνεαν δύναμη να συνεχίσω τον αγώνα μου ως το τέλος.

Το ότι κατάφερα να πετύχω τους στόχους μου οφείλεται σε όλους σας και σας ευχαριστώ που πιστέψατε σε μένα.

Αφιερώνεται στη μητέρα μου . . .

Ήταν η «δύναμή» μου σε αυτό τον αγώνα.

Στη μνήμη της μητέρας μου

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ПЕРІЛНΨН	1
SUMMARY	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Ι

ΡΥΘΜΙΣΗ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ15
Λειτουργία του κυττάρου15
Γονιδιακή έκφραση17
Μεταγραφικοί παράγοντες18
Επίπεδα ρύθμισης γονιδιακής έκφρασης20
Ο μεταγραφικός έλεγχος επιτυγχάνεται με τη συμβολή πολλών παραγόντων22
Σπουδαιότητα των ενισχυτών και ενισχυοπάθειες
Υπερ-ενισχυτές
Το σύμπλοκο του διαμεσολαβητή29
ΕΠΙΠΕΔΑ ΟΡΓΑΝΩΣΗΣ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΟΥ DNA
Χρωματίνη και χρωμόσωμα30
Ιστόνες και νουκλεόσωμα
ΙΙΚΕΣ ΜΟΛΥΝΣΕΙΣ
ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΕΣ & ΡΥΘΜΙΣΗ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ 36
Ιντερφερόνες
Βιολογική δράση των μεταγραφικών παραγόντων IRFs38
Πρόγραμμα ἑκφρασης του γονιδίου της IFN-β40
Βιολογική δράση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB45
Κυτταρο-ειδικό πρότυπο έκφρασης του γονιδίου της ιντερλευκίνης 8 (IL-8)46
Ο ρόλος της δομής της χρωματίνης στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης

επιγενετικές τροποποιήσεις	50
Επιγενετική	50
Προφίλ τροποποίησης ιστονών	56

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ΙΙ

ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ	58
Ο ρόλος της ανάπτυξης της αλληλούχησης ευρείας κλίμακας νέας γενιάς (NGS)	58
Ελληνικό Κέντρο Γονιδιωματικής (Greek Genome Centre)	59
Γονιδιωματικές τεχνικές NGS για την πρόβλεψη ενισχυτών	61
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	<u>65</u>
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	<u>70</u>
Συνθήκες καλλιέργειας ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών	71
Μόλυνση με ιό Sendai	72
Διαδικασία μέτρησης κυττάρων με αιματοκυτταρόμετρο	73
Nucleospin Gel кат PCR Clean-up	73
Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης	74
PCR με Ταq πολυμεράση	77
PCR με KAPA HiFi πολυμεράση	77
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real time qPCR)	77
Οι φάσεις της Real-time qPCR	78
Αντίδραση DNA δεσμάσης	80
PCR αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR)	81
Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων	83
Μετασχηματισμός με τη χρήση της μεθόδου θερμικής καταπόνησης	84
Παρασκευή δεκτικών κυττάρων	84
Απομόνωση και καθαρισμός πλασμιδιακού DNA από βακτήρια	86
MINI-preps	86
MIDI-prep	88
Μέθοδος RNA-seq	89

Μέθοδος ChIP-seq	99
Μέθοδος FAIRE-seq	118
Μέθοδος DNaseI-seq	124
Μέθοδος STARR-seq	128
Μέθοδος ChIP-STARR -seq	130
STARR-reported assays για μεμονωμένους ενισχυτές	133
Ένθεση βιβλιοθήκης σε πλασμιδιακό φορέα 1xSp1-STARR	134
Διαμόλυνση κυτταρικής σειράς HeLa	135
Κατασκευή βιβλιοθήκης Illumina Tru-seq RNA-seq	138
ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	146
Επεξεργασία δεδομένων RNA-seq	146
Βασικές αρχές ChIP-seq ανάλυσης	147

Ταυτοποίηση	συντηρημένων	αλληλουχιών	пου	περιέχουν	συμπλέγματα	IRF
μοτίβων						.151
Αναλύσεις γο	νιδιακής οντολο	ογίας	• • • • • • • • •			.152
Ανάλυση δεδο	μένων qPCR	•••••				.152

Aνάλυση δεδομένων DNaseI-seq, FAIRE-seq και ChIP-seq149

Ανάλυση δεδομένων ChIP-STARR-seq150

<u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u>.....155

RNA-seq	156
DNaseI-seq	171
DNaseI-seq каı FAIRE-seq	182
ChIP-seq για τροποποιήσεις	185
H3K4me3 ChIP-seq	186
H3K27ac ChIP-seq	192
Τα ιϊκά επαγόμενα και κυτταρο-ειδικά γεγονότα πρόσδεσης IRF3 κα	ı NF-кВ
πυροδοτούν αλλαγές στη χρωματίνη σε ολόκληρο το γονιδίωμα	198
p65 ChIP-seq	

IRF3-ChIP-seq208	8
Μοριακή Ψηφιακή Εγκυκλοπαίδεια - ΑΤΛΑΝΤΑΣ ιϊκών μολύνσεων21	.3
STARR-seq21	.8
IRF3-ChIP-STARR-seq22	2
р65 (NF-кВ)-ChIP-STARR-seq22	28
Ομοτυπικά συμπλέγματα23	51
Ανάλυση Φυλογονιδιωματικού αποτυπώματος23	34
Οι αλληλουχίες με επαναλαμβανόμενα μοτίβα IRF είναι εξελικτικά συντηρημένες ο	30
γονιδιώματα διαφόρων οργανισμών23	5
GFP δοκιμασίες αναφοράς για επιβεβαίωση ενεργότητας ενισχυτών 23	69
<u>ΣΥΖΗΤΗΣΗ244</u>	<u>4</u>
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ259	<u>9</u>
APPENDIX	<u>8</u>
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ	5

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή μελετά τους μηχανισμούς ρύθμισης της επαγόμενης γονιδιακής έκφρασης ευκαρυωτικών κυττάρων σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος και πιο συγκεκριμένα, την ταυτοποίηση των μοριακών διακοπτών, οι οποίοι βάση της συντονισμένης απόκρισης των κυττάρων, ελέγχουν τη λειτουργία των ενισχυτών σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους πριν και μετά από ιϊκή μόλυνση. Ο χαρακτηρισμός των ενισχυτών που αποκρίνονται σε ιϊκές μολύνσεις στο ανθρώπινο γονιδίωμα απαιτείται για την κατανόηση του συντονισμού της ανοσολογικής απόκρισης και των μοριακών χαρακτηριστικών που κυμαίνονται από την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων, συνενεργοποιητών, τροποποιητών και αναδιαμορφωτών της χρωματίνης μέχρι την ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων.

Η έρευνά μας συνίσταται από μια πρωτοποριακή και ολιστική προσέγγιση του φαινομένου των ιϊκών μολύνσεων, η εφαρμογή της οποίας συνδυάζει όλα τα δεδομένα που προέρχονται από μια πληθώρα τεχνικών της γονιδιωματικής. Χρησιμοποιήθηκαν περισσότερες από 150 αναλύσεις των μεθόδων RNA-seq, ChIPseq, DNaseI-seq, FAIRE-seq, STARR-seq και πολυεπίπεδων βιοπληροφορικών αναλύσεων, τα οποία έχουν ως κοινή μέθοδο ανάλυσης την τεχνολογία αλληλούχησης ευρείας κλίμακας νέας γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS). Η σύγκριση των ρυθμιστικών προγραμμάτων γονιδιακής έκφρασης στη διάρκεια της μόλυνσης πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, στα επιθηλιακά κύτταρα HeLa και στα Β-λεμφοκύτταρα Namalwa, τα οποία διαμολύνθηκαν με ιό Sendai, ως περιβαλλοντικό ερέθισμα.

Μελετήσαμε τη μεταβαλλόμενη έκφραση των γονιδίων κατά την ιϊκή μόλυνση και κάναμε διάκριση μεταξύ των κοινών και των κυτταρο-ειδικών προγραμμάτων της γονιδιακής έκφρασης, χρησιμοποιώντας ως πειραματικό εργαλείο την επαγόμενη από ιό ανοσολογική απόκριση. Αρχικά, μέσω πειραμάτων RNA-seq χαρακτηρίσαμε το πρότυπο της έκφρασης των γονιδίων κατά την αντι-ιϊκή απόκριση. Διαπιστώθηκε ότι ο ιός οδηγεί στην επαγωγή και καταστολή διαφορετικών ομάδων γονιδίων στα HeLa και στα Namalwa κύτταρα. Ταυτοποιήσαμε γονίδια που επάγονται με κυτταρο-ειδικό και κοινό πρότυπο. Είναι ενδιαφέρον να ειπωθεί ότι το αντι-ιϊκό πρόγραμμα ενεργοποιείται νωρίτερα στα Namalwa σε σύγκριση με τα κύτταρα HeLa. Εντοπίστηκε μια ομάδα γονιδίων που επάγονται και στους δύο κυτταρικούς τύπους, τα οποία μπορούν να χαρακτηριστούν ως κύρια μέλη του μεταγραφικού δικτύου απόκρισης των κυττάρων στον ιό. Σημαντικό είναι το εύρημα πως και στους δύο διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, σχεδόν, απουσιάζουν κοινά γονίδια των οποίων η έκφραση μειώνεται μετά τη μόλυνση από ιό. Το γεγονός αυτό αποτελεί την πρώτη ένδειξη πως ο συντονισμός της γονιδιακής έκφρασης κατά την αντι-ιϊκή απόκριση αφορά στην επαγωγή και όχι στην αποσιώπηση γονιδίων. Υποδηλώνεται η σύνδεση ενός γενικού προγράμματος αντι-ιϊκής έμφυτης ανοσοαπόκρισης παράλληλα με τις κυτταρο-ειδικές αντι-ιϊκές μεταγραφικές αποκρίσεις, στους διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Οι αποκρίσεις αυτές είναι προσαρμοσμένες στις εξειδικευμένες λειτουργίες διακριτών κυτταρικών τύπων, όπως για παράδειγμα η οικογένεια των IFNAs σε Βλεμφοκύτταρα και αποπτωτικών γονιδίων σε κύτταρα HeLa.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πειράματα DNaseI-seq για την ανάλυση του προφίλ της προσβασιμότητας της χρωματίνης και την εύρεση των περιοχών εκείνων των οποίων η προσβασιμότητα μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ανοσολογικής απόκρισης των κυττάρων. Τα πειράματα αυτά μας δείχνουν όχι μόνο ποιες περιοχές είναι προσβάσιμες αλλά και ποιες από αυτές φιλοξενούν ταυτόχρονα μεταγραφικούς παράγοντες, άρα έχουν μεγάλη πιθανότητα να λειτουργούν ως ενισχυτές in vivo. Μελετώντας τα σήματα από τη μέθοδο αυτή, επικεντρωθήκαμε στη χαρτογράφηση της ιϊκά επαγόμενης προσβασιμότητας της χρωματίνης. Καταφέραμε με αυτό τον τρόπο, τη συστηματική ταξινόμηση των DNaseI-Hypersenstive Sites (DHS) περιοχών των ιϊκά εξαρτώμενων αλλά και κυτταρο-ειδικών DHS μοτίβων ενεργοποίησης. Διαπιστώθηκε καλύτερη συσχέτιση με την ιϊκά επαγόμενη γονιδιακή έκφραση, αυτών που βρίσκονται κοντά στη θέση έναρξης της μεταγραφής. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι η DHS ενεργοποίηση συσχετίζεται με την ύπαρξη μοτίβων πρόσδεσης-DNA κύριων ρυθμιστών της ανοσολογικής απόκρισης, όπως είναι οι IRFs (Interferon Regulatory Factors) ка о NF-кВ (Nuclear Factor kappa B), υπογραμμίζοντας έτσι το ρόλο που διαδραματίζουν στη ρύθμιση της αντι-ιϊκής απόκρισης.

Προσθέτως, πραγματοποιήσαμε συγκριτικά πειράματα για τη μελέτη της προσβασιμότητας της χρωματίνης για τον εντοπισμό των θέσεων υπερευαισθησίας στη DNaseI (DNaseI-seq) και των περιοχών που στερούνται χρωματίνη (FAIRE-seq), στα ίδια χρονικά σημεία με τα RNA-seq πειράματα. Η μέθοδος FAIRE-seq μας προσφέρει τη δυνατότητα αποτελεσματικής προσέγγισης περιοχών του DNA που στερούνται νουκλεοσωμάτων και, συνεπώς, έχουν υψηλή πιθανότητα να φιλοξενούν μεταγραφικούς παράγοντες και να λειτουργούν ως ενισχυτές *in vivo*. Οι κοινές περιοχές που δίνουν σήματα και από τις δύο μεθόδους, έχουν αυξημένες πιθανότητες να είναι αυτές που διαδραματίζουν ζωτικής σημασίας ρόλο στην αντι-ιϊκή απόκριση. Εξαιτίας αυτού παρατηρείται μια δυναμική αναδιοργάνωση στο γονιδίωμα, καθώς και αυξημένη προσβασιμότητα των μη-μολυσμένων κυττάρων και εκτεταμένη αναδιοργάνωση της χρωματίνης που προκαλείται από την ιϊκή μόλυνση.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν ChIP-seq πειράματα τα οποία αποκάλυψαν με ακρίβεια τις μεταβολές της γονιδιακής έκφρασης και της γενωμικής τοπολογίας των ρυθμιστικών αλληλουχιών που χαρακτηρίζονται από το μεγάλο αριθμό δεικτών που χαρακτηρίζουν τους ενισχυτές κατά την ιϊκή μόλυνση σε ανθρώπινα κύτταρα. Χρησιμοποιήσαμε αντισώματα έναντι των μεταγραφικών παραγόντων IRF3 και της ρ65 υπομονάδας του NF-κB, των κύριων ρυθμιστών της ανοσολογικής απόκρισης, σε κύτταρα HeLa και Namalwa. Η παραπάνω ανάλυση έδειξε την ταχύτερη συσχέτιση του παράγοντα IRF3 με το ανθρώπινο γονιδίωμα στα Namalwa κύτταρα συγκριτικά με τα HeLa. Η πρόσδεση του NF-κB παρατηρείται και στους δύο κυτταρικούς τύπους μετά την ιϊκή μόλυνση. Βλέπουμε μια κυτταρο-ειδική κατανομή των γεγονότων πρόσδεσης του p65 σε σχέση με τον IRF3. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι όλες οι κυτταρο-ειδικές περιοχές πρόσδεσης του p65 μοιράζονται ένα βασικό επίπεδο χρωματινικών δεικτών, όπως είναι οι CBP, Med1 και H3K27ac πριν την ιϊκή μόλυνση. Επιπλέον, για να επιβεβαιώσουμε τα παραπάνω δεδομένα ερευνήσαμε με ChIP-seq πειράματα τους IRF7, Med1, CBP, RNA Pol II, H3K4me1, H3K27ac, H3K4me3 καθώς αποτελούν, μέσω της πρόσδεσής τους, χαρακτηριστικά ενεργών ενισχυτών. Ειδικά για τις περιοχές πρόσδεσης του IRF3 υπάρχει συνεντοπισμός, είτε με κοινό είτε με κυτταρο-ειδικό τρόπο, δεικτών των επαγόμενων ενισχυτών. Τα παραπάνω μας οδήγησαν στην υπόθεση της ύπαρξης ενός άγνωστου μηχανισμού συντονισμένης πρόσδεσης ρυθμιστικών πρωτεΐνών κατά μήκος του γονιδιώματος ο οποίος διαθέτει τυπικά δομικά χαρακτηριστικά των ενισχυτών.

Για την περαιτέρω λειτουργική αξιολόγηση των ρυθμιστικών στοιχείων χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο STARR-seq. Η μέθοδος αυτή αποτελεί την πλέον εξελιγμένη και ανταγωνιστική τεχνική ταυτόχρονης αξιολόγησης της ενεργότητας χιλιάδων αλληλουχιών με πιθανό ρόλο ενισχυτή *in vivo*. Η μέθοδος STARR-seq, βασίζεται στην ικανότητα ενός ενισχυτή να επάγει, ανεξαρτήτως της θέσης του και της απόστασής του, τη μεταγραφή μιας αλληλουχίας μέσα στην οποία βρίσκεται και ο ίδιος ο ενισχυτής.

Τα χαρακτηριστικά της χρωματίνης, το προφίλ του επιγονιδιώματος καθώς και η συμμετοχή της μεταγραφικής μηχανής σε γονιδιωματικές συντεταγμένες, όπου εδράζονται οι ενισχυτές και ένας μεγάλος αριθμός καλά χαρακτηρισμένων αντι-ιϊκών γονιδίων, έθεσαν τις βάσεις για την κατασκευή μιας "μοριακής-ψηφιακής εγκυκλοπαίδειας" των γονιδίων και των ενισχυτών. Η εγκυκλοπαίδεια χαρακτηρίζεται με υψηλή εν δυνάμει πιθανότητα να παρουσιάσει "αντι-ιϊκές ιδιότητες" και ονομάζεται ΆΤΛΑΝΤΑΣ των ιϊκών μολύνσεων (Human-ATLAS-of-Virus-Infection). Ο ΑΤΛΑΝΤΑΣ επικυρώθηκε με την εφαρμογή της μεθόδου ChIP-STARR-seq. Η πρωτοποριακή αυτή μέθοδος ευρείας κλίμακας μας επέτρεψε την ταυτόχρονη εξέταση της ιϊκά επαγόμενης ενεργότητας των πολυάριθμων περιοχών πρόσδεσης των μεταγραφικών ρυθμιστών της αντι-ιϊκής απόκρισης IRF3 και p65. Προσδιορίσαμε ένα ευρύ φάσμα λειτουργικών στοιχείων που προσδένονται με τα IRF3 και NF-κB, τα οποία σε πολλές περιπτώσεις συμπίπτουν και ρυθμίζουν την έκφραση εγγύς ή σε απόσταση γονιδίων αντι-ιικής απόκρισης. Με αυτό τον τρόπο καταφέραμε να χαρακτηρίσουμε μέρος των λειτουργικών IRF3-Human-Anti-Viral-Regulome και NF-κB-Human-Anti-Viral-Regulome. Τα παραπάνω μας παρέχουν μια εικόνα των μηχανιστικών αρχών της ανθρώπινης αντι-ιϊκής απόκρισης σύμφωνα με τις οποίες οι παράγοντες IRF3 και p65 του Human-Anti-Viral-Regulome λειτουργούν τόσο ανεξάρτητα όσο και συνεργατικά in vivo, καθοδηγώντας έτσι κοινά ή κυτταροειδικά προγράμματα για την έκφραση των γονιδίων. Στη συνέχεια, μελετήσαμε το μοτίβο κατανομής των θέσεων πρόσδεσης του παράγοντα IRF3 σε IRF-STARR-Active στοιχεία, τα οποία αντανακλούν ένα αυξημένο δυναμικό αυτών των στοιχείων να φιλοξενούν πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης για τον IRF3. Επιπροσθέτως, μετά από εξέταση ολόκληρων των ακολουθιών αλλά και των δομικών χαρακτηριστικών τους, παρατηρήσαμε ότι ένα εκτεταμένο τμήμα των λειτουργικών IRF3-STARR-Active ενισχυτών αποτελείται από μοτίβα διατεταγμένα σε cis με επαναλαμβανόμενο τρόπο που θυμίζει τα ομοτυπικά συμπλέγματα των θέσεων πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων. Τα ομοτυπικά συμπλέγματα βρίσκονται τόσο σε εγγύς-TSS όσο και "σε απόσταση"-TSS στοιχεία σε διαφορετικά εξελικτικά είδη, αποτελώντας έτσι ένα διαδεδομένο χαρακτηριστικό των ευκαρυωτικών γονιδιωμάτων, και χαρακτηρίζονται από ένα εκτεταμένο τμήμα γειτονικών περιοχών πρόσδεσης για τον ίδιο μεταγραφικό παράγοντα ή για μια οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων. Το γεγονός πως αυτά συναντώνται τόσο στους προκαρυωτικούς όσο και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και τα ρυθμιστικά τοπία που φιλοξενούν αλληλουχίες ενισχυτών χαρακτηρίζονται από σημαντική εξελικτική συντήρηση, προχωρήσαμε προς μια στρατηγική βάση της εξελικτικής συντήρησης, Φυλογονιδιωματικό αποτύπωμα ανάλυσης (Phylogenomics Footprinting), ώστε να έχουμε μια καλύτερη κατανόηση για την εξελικτική προέλευση του λειτουργικού τμήματος του Repetitive-IRF3-Human-Anti-Viral Regulome.

Αναλύσεις βασισμένες στη συντήρηση των αλληλουχιών αποκάλυψαν ότι οι λειτουργικοί αντι-ιϊκοί ενισχυτές που περιέχουν συμπλέγματα IRF μοτίβων είναι σε μεγάλο βαθμό σταθεροί σε όλη την εξέλιξη καθώς βρίσκονται στα γονιδιώματα διαφορετικών ειδών που αντιπροσωπεύουν τα σπονδυλωτά, τα ασπόνδυλα, τα φυτά, ακόμη και μικρόβια, συμπεριλαμβανομένων των ιϊκών στελεχών. Αυτές οι απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες αποτελούν τα πρώτα παραδείγματα επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών με αρχέγονη προέλευση ρύθμισης της αντι-ιϊκής απόκρισης. Προκειμένου να μελετηθεί συστηματικά η λειτουργία των συντηρημένων αλληλουχιών από τους παραπάνω διαφορετικούς οργανισμούς σε ανθρώπινα κύτταρα, αλλά και να διαπιστωθεί αν αυτές οι αλληλουχίες παρουσιάζουν και συντηρημένη ενεργότητα ενισχυτών, προβήκαμε σε κλωνοποίηση σε φορείς STARR. Έγινε διαμόλυνση σε κύτταρα HeLa και παρακολουθήσαμε την ικανότητά τους να ενεργοποιούν την έκφραση του γονίδιο αναφοράς *GFP in vivo*. Αυτή είναι μία από τις λίγες φορές που οι ενισχυτές διατηρούνται συντηρημένοι σε διαφορετικά Φύλα και οι αλληλουχίες με την αρχέγονη προέλευση φαίνεται να λειτουργούν ως ρυθμιστές της ανθρώπινης επαγώγιμης γονιδιακής έκφρασης κατά την αντι-ιϊκή κυτταρική απόκριση.

Με βάση όλα τα παραπάνω η ολοκλήρωση της διδακτορικής αυτής διατριβής οδηγεί στη λεπτομερέστερη παρατήρηση του μηχανισμού που χρησιμοποιούν τα ανθρώπινα κύτταρα για να αποκριθούν στη διάρκεια των ιϊκών μολύνσεων. Θέτει επίσης τις βάσεις για περαιτέρω διερεύνηση τους καθώς και στην ανακάλυψη άγνωστων ως σήμερα στοιχείων αυτής της διαδικασίας. Η αποκωδικοποίηση της ρυθμιστικής λογικής πίσω από την αναδιαμόρφωση του γονιδιώματος μετά από ιϊκή μόλυνση θα οδηγήσει σε βαθύτερη κατανόηση των βασικών αρχών οργάνωσης του γονιδιώματος και στη δυνατότητα πρόβλεψης της απόκρισης των ασθενών σε θεραπευτικές και προληπτικές αγωγές με απώτερο σκοπό στο μέλλον να εφαρμόζονται σε εξατομικευμένη βάση.

Η προσέγγιση αυτής της διατριβής θα μπορούσε να αποτελέσει τη βάση και τον οδηγό για τη μελέτη ανοσολογικών αποκρίσεων έναντι συγκεκριμένων ιών που απειλούν τη δημόσια υγεία σε μεγάλη κλίμακα, με πιο πρόσφατο παράδειγμα τον ιό SARS-CoV-2 και την επακόλουθη ανάπτυξη της πανδημίας COVID-19. Οι ιϊκές μολύνσεις χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα νοσηρότητας και θνησιμότητας και μπορούν να παρέχουν το έναυσμα ή να προδιαθέσουν για την εκδήλωση διαφόρων ασθενειών. Οι ασθένειες που προκαλούνται από ιογενείς μολύνσεις αποτελούν σοβαρή απειλή καθώς επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την Παγκόσμια Υγεία και βρίσκονται στις κορυφαίες θέσεις των μολυσματικών φαινομένων. Καταδεικνύεται ολοφάνερα η επιτακτική ανάγκη της καλύτερης κατανόησης της ανοσολογικής απόκρισης και των εμπλεκομένων μηχανισμών, όχι μόνο σε επίπεδο μελέτης συγκεκριμένων γουιδίων και πρωτεϊνών, αλλά σε επίπεδο ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος και της αλληλεπίδρασής του με τον ιό εισβολέα.

SUMMARY

The present doctoral dissertation studies the mechanisms regulating the inducible gene expression of eukaryotic cells at whole genome level and more specifically, the identification of molecular switches, which based on the coordinated cells response, they control the function of enhancers in different cell types before and after virus infection. The characterization of enhancers that respond to viral infections in the human genome is required in order to understand the coordination of the immune response and the molecular characteristics that range from the binding of transcription factors, co-activators, modifiers, and chromatin remodellers to transcription activation.

Our research was based on a pioneering and holistic approach of the phenomenon of virus infection, the application of which combines all the data derived from a variety of genomic techniques. More than 150 analyses of RNA-seq, ChIP-seq, DNaseI-seq, FAIRE-seq, STARR-seq methods and multi-level bioinformatics analyses were performed, which have as a common method of analysis the Next Generation Sequencing (NGS) technology. In order to compare the difference expression regulatory programs during virus infection, our study was performed on different cell types, at HeLa epithelial cells and Namalwa B-lymphocytes, which were transfected with Sendai virus as an environmental stimulus.

We studied the altered gene expression during viral infection and distinguished gene expression between common and cell-type specific programs, using as an experimental tool the virus inducible infection immune response. We initially performed RNA-seq experiments which characterized the pattern of gene expression during anti-viral response. It was shown that the virus leads to the induction or repression of different groups of genes in HeLa and Namalwa cells. We identified genes which are induced by a cell-type specific and independent cell-type manner. It is interesting to mention that the anti-viral program is activated earlier in Namalwa in comparison to HeLa cells.

A group of genes that was induced in both cell types has been identified, which can be identified as "major" members of the transcriptional cell response network of the virus. An important finding is that in both cell types, there are almost no common genes whose expression decreases after virus infection. This is the first indication that the coordination of gene expression during the anti-viral response is related to the induction and not to the silencing of genes. For this reason, we assumed the existence of a general program of innate anti-viral immune response in parallel with cell-type specific anti-viral transcriptional responses to different cell types. These responses are adapted to the specific functions of distinct cell types, such as the IFNAs family in Blymphocytes and apoptotic genes in HeLa cells.

Additionally, DNaseI-seq experiments were performed to analyze chromatin accessibility profile and in order to find the sites whose accessibility is changing during cellular immune response. These experiments revealed, not only which sites are accessible, but also which ones can host transcription factors, so they are more likely to act as enhancers *in vivo*. Studying the signals from this method, we focused on mapping chromatin viral inducible accessibility. In this way, we achieved the systematic classification of DNaseI-Hypersensitive Sites (DHS) of virus-dependent and cell-type specific DHS activation motifs. Those that are close to the transcription start site (TSS) showed a better correlation with virus-induced gene expression. Of particular interest is the fact that DHS activation is associated with the presence of DNA-binding patterns of major regulators of the immune response, such as IRFs (Interferon Regulatory Factors) and NF- κ B (Nuclear Factor kappa B), thus, emphasizing their role in anti-viral response regulation.

In addition, we performed comparative experiments to study chromatin accessibility in order to identify hypersensitivity sites in DNaseI (DNaseI-seq) and chromatin-free sites (FAIRE-seq), at the same time points that were used for the RNA-seq experiments. FAIRE-seq method enables us to effectively approach DNA sites that lack nucleosomes and, therefore, have a high probability of hosting transcription factors and acting as enhancers *in vivo*. The common sites that produce signals, from both these methods, are more likely to be the ones which play a vital role in the antiviral response. This results in a dynamic genome re-organization, as well as to an increased accessibility of uninfected cells and extensive chromatin re-organization caused by viral infection.

Subsequently, ChIP-seq experiments were performed, which accurately revealed the gene expression changes and the genomic topology of the regulatory sequences that are characterized by a large number of markers which mark enhancers during viral infection in human cells. We used antibodies against transcription factors IRF3 and the p65 subunit of NF-kB, the major regulators of the immune response, in HeLa and Namalwa cells. The above analysis showed a fastest correlation of IRF3 transcription factor with the human genome in Namalwa cells compared to HeLa cells. NF-KB binding is observed in both cell types after virus infection. We observed a cell-type specific distribution of p65 binding events relative to IRF3. Interestingly, all p65specific binding sites share a basal level of chromatin markers, such as CBP, Med1, and H3K27ac prior to virus infection. In addition, in order to confirm the above data, we performed additional ChIP-seq experiments for IRF7, Med1, CBP, RNA Pol II, H3K4me1, H3K27ac, H3K4me3, as they are, via their binding, characteristic markers of active enhancers. Specifically for IRF3 binding sites, there is localization of inducible enhancers, either by common or cell-type specific manner. All the above led us to the hypothesis of the existence of an unknown mechanism of coordinated binding of regulatory proteins along the genome which has typical structural features of enhancers.

For further functional evaluation of the regulatory elements we applied the STARRseq method. This method is the most advanced and competitive technique for the simultaneously evaluation of the activity of thousands of sequences of putative enhancers *in vivo*. STARR-seq is based on the ability of an enhancer to induce, regardless its position and orientation, the transcription of a sequence in which an enhancer resides.

Chromatin characteristics, epigenomic profiling, as well as transcription machinery involvement in genomic coordinates, where enhancers are located and a large number of well-characterized anti-viral genes, led us to the construction of a "molecular-digital encyclopedia" of genes and enhancers. The encyclopedia is characterized and can reveal a high potential for anti-viral properties and markers, and is called Human-ATLAS-of-Virus-Infection. The finding of Human-ATLAS were further validated by applying the ChIP-STARR-seq method. This innovative, large-scale method allow us to simultaneously examine the virus inducible activity of the numerous binding sites of IRF3 and p65, the transcriptional regulators of the anti-viral response. We identified a wide range of functional elements that bind to IRF3 and NF-KB, which in many cases overlap and regulate the expression of proximal or distant anti-viral response genes. In this way, we were able to characterize part of the functional IRF3-Human-Anti-Viral-Regulome and NF-KB-Human-Anti-Viral-Regulome. All the above give us an overview of the mechanistic principles of the Human Anti-Viral response according to which, the IRF3 and p65 elements of the Human-Anti-Viral-Regulome function both independently and synergatically *in vivo*, thus, regulating common or cell-type specific programs for gene expression.

Next, we studied the distribution motif of IRF3 binding sites in IRF-STARR-Active components, which reflect an increased potential of these components to host multiple IRF3 binding sites. In addition, after examining the entire sequences and their structural features, we observed that an extensive part of the functional IRF3-STARR-Active enhancers is consisted of patterns that are arranged in a *cis* repetitive manner, reminiscent of the homotypic complexes of transcription factor binding sites.

Homotypic complexes are found in both distal -TSS and proximal -TSS elements in different species across evolution, which is indicative of eukaryotic genomes, and are characterized by an extensive part of adjacent binding sites for the same transcription factor or family of transcription factors. The fact that they are found in both prokaryotic and eukaryotic organisms and also the fact that regulatory landscapes can host enhancers that are characterized by significant evolutionary conservation, led us to move to a strategic basis of evolutionary conservation, called Phylogenomics Footprint. This shed light to the evolutionary origin of the functional part of the Repetitine-IRF3-Human-Anti-Viral Regulome.

Sequence-based analyses have revealed that functional anti-viral enhancers containing IRF motifs are highly conservative throughout evolution, as they are found in the genomes of different species representing vertebrates, invertebrates, plants, and even microbes. These repeat sequences are the first examples of repeating sequences with primary origin for anti-viral response regulation. In order to systematically study the function of the conserved sequences from the above different organisms in human cells, and also in order to determine whether these sequences also show conserved enhancer activity, we cloned them into STARR vectors. HeLa cells were transfected and we monitored their ability to activate the expression of the GFP reported gene *in vivo*. This is one of the few times that enhancers are conserved in different phyla, and primordial sequences appear to function as the regulators of inducible gene expression during the anti-viral cellular response.

Based on the above, the completion of this dissertation leads to a detailed observation of the mechanism used by human cells to respond during viral infections. It also lays the groundwork for further investigation as well as for the discovery of unknown elements that participate in this process. Decoding the regulatory logic behind genome remodeling after viral infection will lead to a deeper understanding of the basic principles of genome organization and the ability to predict patients' response to treatment and prevention with the ultimate goal of being applied on an individual basis. The approach of this dissertation could be the basis and act as a guide for immune response studies to specific viruses that threaten public health on a large scale, with the most recent example that of SARS-CoV-2 virus and the subsequent development of the COVID-19 pandemic. Viral infections are characterized by high levels of morbidity and mortality and can trigger or predispose to the onset of various diseases. Diseases caused by viral infections pose a serious threat as they greatly affect Worldwide Health and they are at the top of the list of infectious phenomena. The urgent need for a better understanding of the immune response and the mechanisms involved is evident, not only at the level of studying specific genes and proteins, but also at the level of the entire human genome and its interaction with the invasive virus.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Ι

ΡΥΘΜΙΣΗ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

Λειτουργία του κυττάρου

Κάθε κύτταρο κατασκευάζει τις δομές του βασιζόμενο σε μια σειρά πληροφοριών, την οποία κληρονομεί από τους προγόνους του. Αυτή η πληροφορία κωδικοποιείται πάνω στο γενετικό του υλικό, βάση της οποίας μπορεί και πραγματοποιεί όλες τις βασικές λειτουργίες του. Από όλα τα βιολογικά μακρομόρια που υπάρχουν σε κάθε δηλαδή τα νουκλεϊκά οξέα (Nucleic δηλαδή οργανισμό, Acids, το Δεοξυριβονουκλεϊκό Οξύ, Deoxy-Ribonucleic Acid (DNA) και το Ριβονουκλεϊκό Οξύ, RiboNucleic Acid (RNA)), τις πρωτεΐνες, τα λιπίδια και τα σάκχαρα, το μόριο που αποθηκεύει τις γενετικές πληροφορίες είναι το DNA. Η λειτουργία του DNA ως γενετικό υλικό είναι δυνατή, γιατί το μόριο αυτό: 1. Μπορεί και παράγει τα ακριβή αντίγραφά του, με αποτέλεσμα η γενετική πληροφορία να μπορεί να μεταβιβάζεται χωρίς αλλαγές από κύτταρο σε κύτταρο και από γενιά σε γενιά και 2. Καθορίζει την παραγωγή των διαφόρων ειδών RNA και μέσω αυτών των πρωτεϊνών.

Για τα βασικά δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των κυττάρων υπεύθυνες είναι οι **πρωτεΐνες.** Η κατεύθυνση με την οποία η γενετική πληροφορία, που είναι καταγραμμένη στο μόριο του DNA, "ρέει" προς τις πρωτεΐνες, ονομάστηκε "Κεντρικό Δόγμα της Βιολογίας" (Crick F., 1958). Αρχικά οι επιστήμονες πίστευαν στην καθολικότητα του δόγματος της Μοριακής Βιολογίας. Το 1970 οι επιστήμονες Χ.Τέμιν και Ντ. Μπάλτιμορ ανακάλυψαν ότι υπάρχουν ιοί, οι οποίοι ως γενετικό υλικό έχουν το RNA και μπορούν να συνθέτουν DNA με αυτό το πρότυπο. Αυτό οδήγησε στην επαναδιατύπωση του κεντρικού δόγματος της Βιολογίας (Crick F., 1970). Έτσι, η αμφίδρομη πορεία της γενετικής πληροφορίας από το RNA στο DNA συμπεριλαμβάνεται στη σύγχρονη διατύπωσή του. Το DNA έχει την ικανότητα να αυτοδιπλασιάζεται, δηλαδή μπορεί να αντιγραφεί σε πολλά πανομοιότυπα μόρια DNA, μια διαδικασία γνωστή ως αντιγραφή του DNA. Επίσης, το DNA μεταγράφεται σε RNA και το RNA μεταφράζεται τελικά σε πρωτεΐνες (Εικόνα 1). Η αντίστροφη πορεία δεν μπορεί να πραγματοπουηθεί, με εξαίρεση κάποιους ιούς που μπορούν να παράγουν DNA από το RNA (αντίστροφη μεταγραφή).



Εικόνα 1. Το "Κεντρικό Δόγμα της Βιολογίας" (Crick F., 1970). Απεικονίζεται η αντιγραφή του DNA, η μεταγραφή του σε RNA και η μετάφραση σε πρωτεΐνη. Συμπεριλαμβάνεται επίσης και η αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε DNA

Η ποσότητα του DNA που διατίθεται στα κύτταρα ενός οργανισμού είναι ΚΑΤΑ ΚΑΝΟΝΑ ανάλογη με το βαθμό της πολυπλοκότητάς του. Η ίδια ποσότητα γενετικού υλικού συναντάται στα σωματικά κύτταρα κάθε είδους ανώτερου οργανισμού, ενώ τα γαμετικά κύτταρα περιέχουν μόλις τη μισή ποσότητα DNA από τα σωματικά κύτταρα των οργανισμών. Κάθε ζωντανός οργανισμός περιέχει διαφορετική γενετική πληροφορία (μοναδικό γενετικό υλικό), οι μηχανισμοί όμως με τους οποίους αξιοποιείται και μεταβιβάζεται αυτή η γενετική πληροφορία παραμένει ίδια σε όλους τους οργανισμούς. Η αντιγραφή του γενετικού υλικού, καθώς και η μεταγραφή και η μετάφραση (γονιδιακή έκφραση) είναι συντηρημένοι μηχανισμοί και έχουν ως απώτερο σκοπό την εύρυθμη λειτουργία των διάφορων οργανισμών καθώς και την επιβίωσή τους εξελικτικά στο βάθος του χρόνου.

Τα γονίδια είναι τμήματα του γενετικού υλικού που έχουν την πληροφορία για μια ιδιότητα οργανισμών και κωδικοποιούν για την έκφραση μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας ή RNA. Στα περισσότερα ευκαρυωτικά γονίδια η περιοχή η οποία κωδικοποιεί την πρωτεΐνη διακόπτεται από μη-κωδικές περιοχές (non-coding regions) που πρέπει να απομακρυνθούν προτού φτιαχτεί η πρωτεΐνη. Οι περιοχές αυτές ονομάζονται εσώνια (introns) και οι κωδικές περιοχές ονομάζονται εξώνια (exons). Το πρώιμο μόριο mRNA περιέχει την πληροφορία για την αρχή και το τέλος των εξωνίων.

Οι **πρωτεΐνες** είναι ιδιαίτερης σημασίας και καθορίζουν ποια γονίδια εκφράζονται σε κάθε κύτταρο. Για την παραγωγή διαφορετικών πρωτεΐνών έχουν εξειδικευτεί διαφορετικοί τύποι κυττάρων επομένως αποκτούν την ικανότητα να μπορούν να επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες. **Αυτό πραγματοποιείται μέσω του γονιδιακού ελέγχου και της γονιδιακής ρύθμισης.** Η γονιδιακή ρύθμιση είναι η διαδικασία, με την οποία αποφασίζεται ποια ακριβώς γονίδια θα εκφραστούν και προσδιορίζει το που αλλά και το πότε θα επιτραπεί αυτή η έκφραση. Η ρύθμιση της έκφρασης των περισσότερων γονιδίων λαμβάνει χώρα στο μεταγραφικό επίπεδο.

Γονιδιακή ρύθμιση = έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης

Η γονιδιακή ρύθμιση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία η οποία προσδιορίζει χωροχρονικά την έκφραση των γονιδίων. Το πρώτο βήμα του παραπάνω μηχανισμού αποτελεί η ρύθμιση της μεταγραφής. Η ενεργοποίηση ή η καταστολή της μεταγραφής βασίζεται στις συντονισμένες δράσεις πολλών πρωτεϊνών που συμπεριλαμβάνουν μεταγραφικούς παράγοντες και τροποποιητές χρωματίνης (Koutroubas *et al.,* 2008). Το εργαστήριό μας έχει παράδοση στην αποκρυπτογράφηση μηχανισμών ρύθμισης της μεταγραφής γονιδίων που ενεργοποιούνται μετά από εξωκυτταρικά ερεθίσματα
(Thanos and Maniatis, 1995; Agalioti *et* al., 2000; Agelopoulos and Thanos, 2006; Apostolou and Thanos, 2008; Lavigne *et* al., 2015).

Γονιδιακή έκφραση

Γονιδιακή ἐκφραση ονομάζεται η διαδικασία που προκαλεί τη μεταφορά των κωδικοποιημένων πληροφοριών του γονιδίου που βρίσκονται στο λειτουργικό προϊόν του γονιδίου (πρωτεΐνη ή RNA). Πραγματοποιείται σε όλους τους οργανισμούς, ευκαρυωτικούς, προκαρυωτικούς και στους ιούς, προκειμένου να παραχθεί ο μακρομοριακός μηχανισμός της ζωής. Η μεταγραφή, το μάτισμα του RNA, η μετάφραση και οι μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών είναι κάποια από τα κύρια βήματα της διαδικασίας της γονιδιακής έκφρασης. Μόνο ο σωστός συγχρονισμός όλων των παραπάνω διαδικασιών μπορεί να οδηγήσει στη μετατροπή της πληροφορίας του γονιδίου σε προϊόν. Επομένως, μέσω της πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων στις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων, μπορεί και επιτυγχάνεται η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

Μεταγραφικοί παράγοντες

Τα ανθρώπινα κύτταρα διαθέτουν μεμβρανικούς υποδοχείς τους οποίους αναγνωρίζουν οι ιοί με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μονοπατιών μεταγωγής σήματος (signal transduction pathways). Τα μονοπάτια αυτά καταλήγουν στην ενεργοποίηση και στην πυρηνική μετανάστευση πρωτεϊνών που ονομάζονται μεταγραφικοί παράγοντες και έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες πρόσδεσης (DNA binding sites) κατά μήκος του ανθρώπινου γονιδιώματος (Agalioti *et al.*, 2000; Agelopoulos and Thanos, 2006; Apostolou and Thanos, 2008; Lavigne *et al.*, 2015). Οι θέσεις πρόσδεσης φιλοξενούνται σε περιοχές που ρυθμίζουν τη μεταγραφή και κατ' επέκταση τη γονιδιακή έκφραση όπως οι ενισχυτές. Η πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων πάνω στις αλληλουχίες DNA των ενισχυτών οδηγεί στη στρατολόγηση της RNA πολυμεράσης ΙΙ και ακολουθείται από την έναρξη της μεταγραφής των γονιδίων. Ως εκ τούτου, η παρουσία των μεταγραφικών παραγόντων σε κάποια αλληλουχία αποτελεί μια ισχυρή ένδειξη για τη δράση της ως ενισχυτή και σε σημαντικό βαθμό "προδίδει" το λειτουργικό/ρυθμιστικό της ρόλο χωρίς να τον αποδεικνύει καθολικά.

Οι μεταγραφικοί παράγοντες επομένως αποτελούν τις απαραίτητες πυρηνικές πρωτεΐνες για την επιτυχημένη μεταγραφή των γονιδίων και η δράση τους πραγματοποιείται σε συνδυασμό με την RNA πολυμεράση. Εκτός από την ιδιότητα τους να προσδένονται στο DNA - ή ακόμα και σε άλλους μεταγραφικούς παράγοντες - διαθέτουν στο σημείο έναρξης της μεταγραφής τη δυνατότητα στρατολόγησης της βασικής μεταγραφικής μηχανής. Αυτή η συνδυαστική τους δράση έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός συμπλόκου. Ανάλογα με τη θέση πρόσδεσης αλλά και ανάλογα με τους συνενεργοποιητές τους, λειτουργούν είτε ως ενεργοποιητές προάγοντας, είτε ως καταστολείς εμποδίζοντας τη συγκρότηση της RNA πολυμεράσης στο συγκεκριμένο γονίδιο (Roeder R.G., 1996; Nikolov D.B. *et al.*, 1997; LeeT.I. and Young R.A. 2000). Μέσω της ειδικής σύνδεσής τους σε μία αλληλουχία DNA, μπορούν να προσδιορίζουν τον τρόπο μεταφοράς της γενετικής πληροφορίας από το DNA σε mRNA (Latchman D.S., 1997; Karin M., 1990).

Πιο συγκεκριμένα, προσδένονται και στη συνέχεια στρατολογούν ποικίλους παράγοντες τροποποίησης των ιστονών αλλά και αναδόμησης των νουκλεοσωμάτων με αποτέλεσμα η δομή της χρωματίνης να γίνεται πιο "ευάλωτη" στην πρόσδεση της βασικής μεταγραφικής μηχανής. Οι κυτταρικοί υποδοχείς λαμβάνουν το περιβαλλοντικό ερέθισμα το οποίο προσδένεται σε αυτούς και ενεργοποιούν διαφορετικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος και μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι προσδένονται στα ρυθμιστικά στοιχεία για να συναντηθούν τελικά με τη μορφή ενεργοποιημένων μορίων σε συγκεκριμένες περιοχές της χρωματίνης (Reményi *et* al., 2004).

Οι μεταγραφικοί παράγοντες με τη σειρά τους, μόνοι τους ή σε συνεργασία με άλλους, και ανάλογα με το ερέθισμα που δέχονται θα ενεργοποιηθούν (συνδυαστικός έλεγχος, combinatorial control of gene expression), θα προσδεθούν στο DNA και θα προβούν στην ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων τους (μεταγραφική ρύθμιση) (Εικόνα 2). Αυτό το πολύπλοκο δίκτυο εκτείνεται από την κυτταρική μεμβράνη ως την πυρηνική μεμβράνη (γενετικό υλικό) και αποτελεί ένα σημαντικό βαθμό οργάνωσης των ανώτερων οργανισμών. Η τοπική δομή της χρωματίνης διαμορφώνει την τελική μορφή του επαγόμενου και ιστο-ειδικού προτύπου έκφρασης.



Εικόνα 2. Απεικονίζονται οι παράγοντες ελέγχου της γονιδιακής ρύθμισης σε έναν ευκαρυωτικό οργανισμό καθώς και η μεταφορά της πληροφορίας για την ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων

Επίπεδα ρύθμισης γονιδιακής έκφρασης

Στον ανθρώπινο οργανισμό υπάρχουν περίπου 20.000 γονίδια (21.306) (Frankish *et* al., 2019) και μέσω της αξιοποίησης ενός περιορισμένου αριθμού ρυθμιστικών πρωτεϊνών μπορεί και επιτυγχάνεται η έκφρασή τους. Οι γνωστές ρυθμιστικές πρωτεΐνες είναι στο σύνολό τους περίπου 2.000 και 3.000 και επομένως, αν το πρότυπο ρύθμισης "ένας παράγοντας-ένα γονίδιο" ίσχυε στα ευκαρυωτικά κύτταρα, θα ήταν αδύνατο να αξιοποιηθεί το σύνολο των γενετικών πληροφοριών. Εξαιτίας του μεγάλου αριθμού των διαφορετικών συνδυασμών που πραγματοποιούνται πάνω στις ρυθμιστικές περιοχές, δημιουργείται από τους μεταγραφικούς παράγοντες ένα

Η ανάπτυξη των μηχανισμών ελέγχου της έκφρασης των γονιδίων των ευκαρυωτικών κυττάρων αποτελεί έναν μηχανισμό συνδυαστικού ελέγχου για τη σωστή απόκρισή τους σε οποιουδήποτε είδους περιβαλλοντική αλλαγή. Ο συνδυαστικός αυτός έλεγχος προϋποθέτει τη συνδυαστική συνεργασία ποικίλων παραγόντων και έχει ως τελικό αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ή την αποσιώπηση της μεταγραφής ενός γονιδίου.

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα η γονιδιακή έκφραση ρυθμίζεται σε τέσσερα επίπεδα: (Εικόνα3)

1. Στο επίπεδο της μεταγραφής: Αυτό είναι το αρχικό και κύριο στάδιο στο οποίο γίνεται ο έλεγχος για το ποια γονίδια θα μεταγραφούν και επίσης πότε και με τι ρυθμό θα πραγματοποιηθεί η μεταγραφή τους. Εδώ καθορίζεται εάν ένα γονίδιο θα παράγει το αντίστοιχο RNA έτσι ώστε να ξεκινήσει η σειρά των βιολογικών αντιδράσεων που θα οδηγήσει στη δημιουργία της αντίστοιχης λειτουργικής πρωτεΐνης. Η σύνθεση όλων των εξωκυτταρικών ερεθισμάτων που είναι καθοριστικά για το πρότυπο της γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιείται σε αυτό το στάδιο.

2. Στο επίπεδο μετά τη μεταγραφή: Περιλαμβάνονται οι μηχανισμοί με τους οποίους γίνεται ο έλεγχος του τρόπου και του ρυθμού επεξεργασίας του παραγόμενου mRNA και καθορίζεται η ταχύτητα με την οποία το ώριμο mRNA εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα. Στη συνέχεια, ακολουθεί έλεγχος του ώριμου mRNA από ειδικά πρωτεϊνικά σύμπλοκα, που θα διευκολύνουν ή όχι την απομάκρυνσή του από τον

πυρήνα και θα το κατευθύνουν σε συγκεκριμένο διαμέρισμα του κυτταροπλάσματος για να μεταφραστεί.

3. Στο επίπεδο της μετάφρασης: Γίνεται επιλογή πόσες φορές και ποιο mRNA θα μεταφραστεί από ένα ή περισσότερα ριβοσώματα. Η ικανότητα πρόσδεσης του mRNA στα ριβοσώματα ποικίλει. Ο χρόνος των μορίων mRNA στο κυτταρόπλασμα δεν είναι ο ίδιος για όλα τα είδη RNA, επειδή μετά από κάποιο χρονικό διάστημα αποικοδομούνται. Συνεπώς ελέγχεται ο χρόνος ζωής του κάθε mRNA αλλά και η διαθεσιμότητά του για μετάφραση. Ελέγχεται επίσης και ο ρυθμός επιμήκυνσης της νεοσυντιθέμενης πρωτεΐνης.

4. Στο επίπεδο μετά τη μετάφραση: Ακόμη και όταν πραγματοποιηθεί η πρωτεϊνοσύνθεση και παραχθεί η κατάλληλη πρωτεΐνη, μπορεί να χρειαστεί να υποστεί τροποποιήσεις για να γίνει βιολογικά ενεργή. Εξετάζονται όλες οι διαδικασίες με σκοπό τη σοστή λειτουργική φρήμανση και τη σφοτή στόγευση της πρωτεΐνη ιρωτεΐνης NUCLEUS στο κατά ομικός ή λειτουργι DN/ Transcription **Transcriptional Control** RNA Splicing mRNA CYTOPLASM **RNA Processing Control** Export mRNA **RNA Transport Control** Translation 000000 a.a. chain **Translational Control** Folding Protein **Protein Activity Control**

Εικόνα 3. Επίπεδα ρύθμισης της γονιδιακής ἑκφρασης (Image Copyright: Alila Medical Media/Shutterstock)

Ο μεταγραφικός έλεγχος επιτυγχάνεται με τη συμβολή πολλών παραγόντων

Η ρύθμιση της γονιδιακής ἐκφρασης, ὁπως αναφέρθηκε, λαμβάνει χώρα σημαντικά στο μεταγραφικό επίπεδο. Πρόκειται για μια πολυσύνθετη, δυναμική διαδικασία στην οποία εμπλέκονται πολλοί διαφορετικοί παράγοντες και πρωτεΐνες (Εικόνα 4). Οι παράγοντες αυτοί έχουν την ικανότητα να λειτουργούν ανεξάρτητα αλλά και σε συνεργασία. Με αυτό τον τρόπο δημιουργούν πολλούς ρυθμιστικούς συνδυασμούς για να επιτευχθεί μια ειδική και αποδοτική μεταγραφική ενεργοποίηση των κατάλληλων γονιδίων.

Από τα σημαντικότερα στοιχεία που εμπλέκονται στη ρύθμιση της μεταγραφής είναι τα *cis* και τα *trans* ρυθμιστικά στοιχεία ενός γονιδίου. Αυτά αποτελούν **τις ρυθμιστικές αλληλουχίες του DNA** (υποκινητής, ενισχυτής) καθώς και τις πρωτεΐνες, όπως οι μεταγραφικοί παράγοντες και οι συνενεργοποιητές, αλλά και καταστολείς και μεσολαβητές, που έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν με ειδικό τρόπο τις αλληλουχίες αυτές και να προσδένονται σε αυτές, αντίστοιχα.

Μονοπάτια μεταγωγής σήματος

Αυξανόμενη εξειδίκευση γονιδιακής έκφρασης

Μεταγραφικοί παράγοντες (ενεργοποιητές, καταστολείς) Ενισχυτές (συνέργεια, συνεργατικότητα) Δομή της χρωματίνης (ευχρωματίνη ετεροχρωματίνη) Πυρηνικά διαμερίσματα (εργοστάσια μεταγραφής) Τροποποίηση της χρωματίνης (ακετυλίωση, μεθυλίωση ιστονών) Τοπική αρχιτεκτονική της χρωματίνης (τοποθέτηση νουκλεοσωμάτων) Ιστονικές ισομορφές (macroH2A) Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση των διαφόρων επιπέδων της μεταγραφικής ρύθμισης των γονιδίων, σε σειρά αυξανόμενης εξειδίκευσης. Οι παράγοντες αυτοί ρυθμίζουν με ακρίβεια τα κυτταρο-ειδικά προγράμματα της γονιδιακής έκφρασης.

Τα γονίδια διακρίνονται σε δύο περιοχές: την κωδική και τη ρυθμιστική περιοχή. Όλες τις πληροφορίες για την κωδικοποίηση ενός συγκεκριμένου χαρακτηριστικού εμπεριέχονται στις ακολουθίες του DNA που βρίσκονται στην κωδική περιοχή, η οποία μπορεί και προσδιορίζει τη σωστή κατεύθυνση σύνθεσης της πρωτεΐνης. Οι **ρυθμιστικές αλληλουχίες του DNA** συναντώνται πριν από κάθε κωδική περιοχή (*in cis* regulatory elements) και εντοπίζονται στη ρυθμιστική περιοχή, η οποία εκτείνεται κατά το 5΄ άκρο του γονιδίου. Η περιοχή αυτή δε μπορεί να μεταγραφεί, αλλά μπορεί να επηρεάζει τη διαδικασία σύνθεσης του mRNA τόσο κατά την έναρξη όσο και κατά την επιμήκυνση.

Ο υποκινητής βρίσκεται ακριβώς πριν την κωδική περιοχή κάθε γονιδίου και αποτελεί μια αλληλουχία της ρυθμιστικής περιοχής η οποία είναι περιορισμένη σε αριθμό νουκλεοτιδίων. Σε αυτό ακριβώς το σημείο του γενετικού υλικού γίνεται η πρόσδεση του βασικό ενζυμικού συμπλόκου της μεταγραφής, της RNA πολυμεράσης. Η συμμετοχή πρωτεϊνών που ονομάζονται βασικοί - γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες (General Transcription Factors) είναι απαραίτητη στα ευκαρυωτικά κύτταρα για να μπορέσει να γίνει η σωστή πρόσδεση της RNA πολυμεράσης. Το σημείο έναρξης της μεταγραφής ονομάζεται Transcription Start Site (TSS) και σηματοδοτεί το όριο μεταξύ της κωδικής και της ρυθμιστικής περιοχής του γονιδίου. Απαραίτητη προϋπόθεση για την έναρξη της μεταγραφής του γονιδίου, αποτελεί η πλήρης πρόσδεση με συντονισμένο τρόπο, των μεταγραφικών παραγόντων και της RNA πολυμεράσης στον υποκινητή ώστε να σχηματιστεί ένα προ-εναρκτήριο μεταγραφικό σύμπλοκο (Svejstrup, 2004; Murakami *et al.*, 2013; Male *et al.*, 2015).

Η περιοχή που μπορούμε να ορίσουμε τον υποκινητή στους προκαρυωτικούς οργανισμούς είναι από -40 έως +20, όπου +1 θεωρείται η θέση έναρξη της μεταγραφής του γονιδίου (Ptashne and Gann, 1990). Αντίστοιχα στα ευκαρυωτικά κύτταρα ως βασικός υποκινητής (core promoter) θεωρείται η περιοχή -40 έως +20 (Butler and

Kadonaga, 2001; Smale, 2001). Άνωθεν του σημείου έναρξης σε απόσταση 20-25 βάσεων βρίσκεται το κουτί ΤΑΤΑ (ΤΑΤΑ-box) το οποίο αποτελείται από μια συντηρημένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων, ένα στοιχείο μεγάλης σημασίας το οποίο συμμετέχει στη διαδικασία της έναρξη της μεταγραφής των γονιδίων (Alberts *et* al., 1994). Η σωστή αναγνώριση των παραπάνω στοιχείων και η κατάλληλη πρόσδεση των απαραίτητων μεταγραφικών παραγόντων οδηγεί στην τελική πρόσδεση της RNA πολυμεράσης. Οι βασικοί υποκινητές λειτουργούν ως τα προσχέδια συγκρότησης λειτουργικών προ-ενακτήριων συμπλόκων τα οποία ελέγχουν την έναρξη της σύνθεσης του mRNA και συμμετέχουν στο μηχανισμό έναρξης της μεταγραφής των γονιδίων.

Ο ενισχυτής μπορεί να βρίσκεται άνωθεν του υποκινητή και σε αυτόν εμπεριέχονται αλληλουχίες που βοηθούν στην εξειδικευμένη αναγνώριση (gene-specific) από ενεργοποιητές (activators) ή καταστολείς (repressors), οπότε ασκείται και η αντίστοιχη δράση (Munshi et al., 1999). Η αλληλουχία του ενισχυτή συμμετέχει στη ρύθμιση της επαγόμενης γονιδιακής έκφρασης. Κάθε ενισχυτής αποτελείται από περιορισμένες σε έκταση αρθρωτές αλληλουχίες, οι οποίες συμμετέχουν στη ρύθμιση της μεταγραφής εγγύς ή ακόμα και απομακρυσμένων γονιδίων. Η αρθρωτή μορφή του ενισχυτή αναφέρεται στις πολλαπλές συνεχείς ή/και επικαλυπτόμενες αλληλουχίες, οποίες ονομάζονται θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών οι ενεργοποιητών/αναστολέων (enhancer binding sites) (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση των κωδικών και ρυθμιστικών στοιχείων ενός τυπικού ευκαρυωτικού γονιδίου

Τα γονίδια μεταγράφονται σε χαμηλά επίπεδα χωρίς τη δράση των ενισχυτών. Με την παρουσία των ενισχυτών η μεταγραφή διεγείρεται. Ο ενισχυτής μπορεί να βρίσκεται σε μεγάλη απόσταση πριν ή και μετά από τον υποκινητή που επηρεάζει και είναι δυνατόν να τον ενεργοποιήσει είτε από ανοδικές ή καθοδικές θέσεις, ακόμα και αν αναστραφεί η θέση του σε σχέση με αυτόν. Ένας ενισχυτής είναι ενεργός, όχι μόνο όταν βρίσκεται ακριβώς ανοδικά σε σχέση με τον υποκινητή, αλλά και όταν βρίσκεται αρκετές κιλοβάσεις, είτε ανοδικά, είτε καθοδικά από τη θέση έναρξης της μεταγραφής. Οι ενισχυτές είναι, επομένως, ενεργοί ανεξάρτητα από τον προσανατολισμό τους σε σχέση με τη θέση έναρξης της μεταγραφής και επίσης, μπορούν να βρίσκονται έως και ένα εκατομμύριο ζεύγη θέσεων μακρυά του γονιδίου (Eichenlaub and Ettwiller, 2011; Birnbaum *et al.*, 2012). Επιπροσθέτως, οι ενισχυτές που εδράζονται σε ένα χρωμόσωμα μπορούν να ρυθμίσουν και να επηρεάσουν την έκφραση γονιδίων τα οποία εδράζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα από αυτό που αρχικά βρίσκονται δια μέσω της δημιουργίας λειτουργικών αλληλεπιδράσεων (διαλληλική επίδραση) (Spilianakis *et al.*, 2005) **(Εικόνα 6)**.



Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση των ιδιοτήτων ενός ενισχυτή. Α. Ενισχυτής με δράση για ενεργοποιήση πολλαπλών γονιδίων και **Β.** Ενισχυτής που ενεργοποιεί γονίδια τα οποία βρίσκονται σε μακρυνή απόσταση το ένα από το άλλο

Να αναφερθεί σε αυτό το σημείο ότι ο ρόλος των ενισχυτών κατά την απόκριση των ανθρώπινων κυττάρων σε ιϊκές μολύνσεις αποτελεί το αντικείμενο μελέτης της διδακτορικής αυτής διατριβής.

Σπουδαιότητα των ενισχυτών και ενισχυοπάθειες

Η σπουδαιότητα του ρόλου των λειτουργικών ενισχυτών μπορεί επίσης να διαπιστωθεί από το γεγονός ότι απλές μεταλλάξεις και χρωμοσωμικές αναδιατάξεις μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες, οι οποίες ονομάζονται **ενισχυσπάθειες** (Smith and Shilatifard, 2014). Ο όρος περιγράφει παθολογικούς φαινοτύπους επιβλαβείς για την ανθρώπινη υγεία, οι οποίοι προκύπτουν ως αποτέλεσμα της μη-φυσιολογικής γονιδιακής έκφρασης μιας σειράς αλλαγών σε αλληλουχίες που βρίσκονται σε μη κωδικά τμήματα του γονιδιώματος. Η θαλασσαιμία, όπου παρατηρείται διαγραφή της περιοχής LCR (Locus Control Region) και η παχυσαρκία, στην οποία η περιοχή πρόσδεσης ενός μεταγραφικού παράγοντα διακόπτεται από μια απλή μοναδική παραλλαγή νουκλεοτιδίου σε έναν ενισχυτή προκαλώντας αλλαγή στο ρυθμό μεταβολισμού των λιποκυττάρων, (Claussnitzer *et al.*, 2015; Smith and Shilatifard 2014; Van der Ploeg *et al.*, 1980) αποτελούν παραδείγματα του όρου αυτού.

Ο χαρακτηρισμός των ενισχυτών που αποκρίνονται σε ιϊκές μολύνσεις στο ανθρώπινο γονιδίωμα απαιτείται για την κατανόηση του συντονισμού της ανοσολογικής απόκρισης που θα οδηγήσει στην κατανόηση των μοριακών χαρακτηριστικών που κυμαίνονται από την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων, τους συνενεργοποιητές, τους τροποποιητές και αναδιαμορφωτές της χρωματίνης μέχρι την ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων. Παρά τη μεγάλη γνώση που έχουμε αποκομίσει από το ENCODE project για τον εντοπισμό και την πρόβλεψη των εκατοντάδων χιλιάδων εν δυνάμει ενισχυτών στο ανθρώπινο γονιδίωμα, παραμένει ακόμα άγνωστο ποιοι ενισχυτές ενεργοποιούνται υπό μια δεδομένη κατάσταση, ποια είναι τα γονίδια εκείνα τα οποία ρυθμίζουν και ποια είναι η σειρά των γεγονότων που μπορεί να οδηγήσει στην ενεργοποίηση των ενισχυτών για το συντονισμό της έκφρασης δεκάδων γονιδίων ως απόκριση σε ένα συγκεκριμένο εξωκυττάριο σήμα. Παρά τη θεμελιώδη συμβολή τους, είναι απολύτως προφανές ότι οι προβλέψεις ενισχυτών που βασίζονται στα δομικά χαρακτηριστικά της χρωματίνης υποφέρουν από περιορισμούς και εμπόδια. Κάποια από αυτά είναι ο χαμηλός λόγος σήματος (θόρυβος), η κυτταρική ετερογένεια, οι ελλιπείς αναλύσεις της βιοπληροφορικής και η έλλειψη στοίχισης του DNA βασισμένη στην εξέλιξη και στη συντήρηση καθώς και

ο ελλιπής καθορισμός της in vivo λειτουργίας των ρυθμιστικών στοιχείων που προσδιορίζονται.

Συνολικά, αυτές οι προσεγγίσεις έχουν δείξει ότι κανένα γονιδιωματικό χαρακτηριστικό από μόνο του δεν είναι ιδιαίτερα προγνωστικό για τον προσδιορισμό ενός ενεργού ενισχυτή. Αυτό υποδηλώνει ότι υπάρχει ανάγκη ενσωμάτωσης πολλαπλών τύπων δεδομένων που κυμαίνονται από transcriptomics έως την ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης ακολουθούμενη από ChIP-seq αλληλούχηση, καθώς και την παράλληλη μαζική λειτουργική ανάλυση των εν δυνάμει ενισχυτών. Σε συμφωνία με αυτό είναι το πρόσφατο εύρημα ότι λιγότερο από το 10% όλων των εν δυνάμει ενισχυτών διαθέτουν πραγματική δραστηριότητα ενισχυτών (Gasperini *et* al., 2019).

Υπερ-ενισχυτές

Οι υπερ-ενισχυτές (Super-enhancers, SEs) ή εναλλακτικά stretch enhancers, είναι συμπλέγματα ενεργών ενισχυτών, > 20 kb κατά μέσο όρο, που συνδέονται με κύριους μεταγραφικούς παράγοντες, παρουσιάζουν εξαιρετικά υψηλή πρόσδεση μεταγραφικών συν-ενεργοποιητών, όπως ο διαμεσολαβητής (Mediator) και έχουν τη δυνατότητα να ενεργοποιούν τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων τους (Hnisz *et* al., 2013; Whyte *et* al., 2013). Οι υπερ-ενισχυτές επηρεάζουν τη μεταγραφική ενεργοποίηση των περισσότερων γονιδίων καθώς παίζουν καθοριστικό ρόλο στην κυτταρική ταυτότητα, συντονίζοντας την κυτταρο-ειδική ρύθμιση των γονιδίων κατά την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση και συμμετέχουν στην ανάπτυξη ασθενειών, όπως στον καρκίνο (Thandapani, 2019; Tang *et* al., 2020).

Η διαφορά τους από τους τυπικούς ενισχυτές αφορά στο μεγαλύτερο μέγεθος τους και στην πυκνότητα των μεταγραφικών παραγόντων, μια τάση που ενεργοποιεί έντονα τη μεταγραφή (Hnisz *et al.*, 2013). Η ταυτοποίηση των υπερ-ενισχυτών βασίζεται

κυρίως σε αναλύσεις ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης (ChIP), χρησιμοποιώντας ένα συνδυασμό δεικτών που χαρακτηρίζει τους ενισχυτές (όπως οι H3K27ac και H3K4me1), συν-ενεργοποιητών και ενός προφίλ μεταγραφικών παραγόντων. Οι ιδιότητες των υπερ-ενισχυτών που παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον είναι η συγκρότησή τους μετά από ένα μοναδιαίο συμβάν πυρηνοποίησης, καθώς και το γεγονός ότι μπορούν και ενεργοποιούν ταυτόχρονα περισσότερα από ένα γονίδια (Cheng *et* al., 2016).

Οι ενεργοί ενισχυτές συχνά χαρακτηρίζονται από την παρουσία σύντομων, ασταθών μεταγράφων που ονομάζονται enhancer RNAs (eRNAs). Τα eRNAs είναι μικρά μηκωδικοποιημένα RNA μόρια που μεταγράφονται από τις περιοχές των ενισχυτών (Hnisz *et al., 2013*). Συμμετέχουν στη ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων και μπορούν να αποτελέσουν θεραπευτικό στόχο για ασθένειες (Thandapani, 2019). Δεκάδες χιλιάδες eRNAs έχουν ταυτοποιηθεί σε ανθρώπινα κύτταρα, πολλά από τα οποία αποδείχθηκε ότι παίζουν σημαντικούς ρόλους στα μεταγραφικά κυκλώματα για τη μεσολάβηση της ενεργοποίησης των γονιδίων-στόχων.

Το σύμπλοκο του διαμεσολαβητή

Η ευκαρυωτική μεταγραφική μηχανή περιέχει την RNA πολυμεράση αλλά και πολλές άλλες πρωτεΐνες, οι οποίες είναι οργανωμένες σε σύμπλοκα που αλληλεπιδρούν με την πολυμεράση. Ορισμένοι ενεργοποιητές οι οποίοι προσδένονται σε ρυθμιστικές αλληλουχίες, όπως οι ενισχυτές, δε μπορούν να στρατολογήσουν την RNA πολυμεράση σε γονίδια-στόχους διότι δε μπορούν από μόνοι τους να έχουν αλληλεπίδραση με αυτήν. Οι ενεργοποιητές αλληλεπιδρούν με ένα ή περισσότερα σύμπλοκα στρατολογώντας τα στη περιοχή του γονιδίου. Ο σημαντικός αυτός ρόλος της γεφύρωσης μπορεί και καταλύεται από το σύμπλοκο του διαμεσολαβητή (Mediator complex, Med) που έχει ως κύριο ρόλο τη μεταφορά σημάτων από τους μεταγραφικούς παράγοντες προς την πολυμεράση. Ο Mediator έρχεται σε επαφή με τα μόρια που συμμετέχουν στο συμπλόκο έναρξης της μεταγραφής (Pre-Initiation Complex, PIC) σε συγκεκριμένες θέσεις, εκεί δηλαδή όπου βρίσκονται οι υποκινητές αυτών των γονιδίων-στόχων, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του σχηματισμό του ολικού συμπλόκου (Εικόνα 7). Με τον τρόπο αυτό, δρα ως "γέφυρα" συμβάλλοντας στη λειτουργική αλληλεπίδραση απομακρυσμένων περιοχών του ιδίου αλλά και διαφορετικών χρωμοσωμάτων (Lewis and Reinberg, 2003).



Εικόνα 7. Το σύμπλοκο του Mediator δρα και διευκολύνει την επικοινωνία ενισχυτή υποκινητή (Poss *et al.*, 2013)

ΕΠΙΠΕΔΑ ΟΡΓΑΝΩΣΗΣ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΟΥ DNA

Χρωματίνη και χρωμόσωμα

Το μέγεθος του γονιδιώματος των ευκαρυωτικών οργανισμών κυμαίνεται σε ένα εύρος από 10^8 ζεύγη βάσεων (base pairs, bp), (C. elegans) μέχρι και 5.4×10^9 ζεύγη βάσεων (Z. mays), ενώ ενός απλοειδούς ανθρώπινου κυττάρου (H. sapiens) αποτελείται από 3x10⁹ ζεύγη βάσεων, μέγεθος που αντιστοιχεί σε μήκος περίπου ενός μέτρου. Το γονιδίωμα μπορεί να πακεταριστεί σε ένα χώρο με διάμετρο μόλις περίπου 10^{-5} μέτρα παρά το τεράστιο μέγεθος που διαθέτει. Στη σωστή χωροταξική οργάνωση του γενετικού υλικού βασίζεται ο μηχανισμός βαθμιαίας συμπύκνωσης με τη συμβολή ενός μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών, οι οποίες διακρίνονται σε ιστόνες και μη ιστόνες. Η νουκλεοπρωτεϊνική αυτή δομή ονομάζεται χρωματίνη και μέσω της έντονης συσπείρωσης της δομής της μπορεί να εξυπηρετηθεί η ανάγκη για πολύπλοκη οργάνωση σε ανώτερα επίπεδα.

Το τελικό στάδιο στη διαδικασία "χρωματινοποίησης" έχει ως αποτέλεσμα να κατανεμηθεί το ευκαρυωτικό DNA σε μια ελικοειδή, δευτεροταγή δομή, από την οποία προκύπτει το **χρωμόσωμα (Εικόνα 8)**. Τα χρωμοσώματα αποτελούν συμπαγείς δομές. Το συμπυκνωμένο μέγεθός τους βοηθάει και ενισχύει την αποθήκευσή τους στον πυρηνικό φάκελο και την κατανομή τους στα θυγατρικά κύτταρα κατά τη διάρκεια της μιτωτικής φάσης του κυτταρικού κύκλου. Η ιδιότητά τους να ελαχιστοποιούν το μέγεθος των μορίων του DNA που συμμετέχουν στη δομή τους, τα καθιστά δομές ύψιστης σπουδαιότητας.



Εικόνα 8. Στάδια αναδίπλωσης και συσπείρωσης της χρωματίνης. Απεικόνιση του ελεύθερου δίκλωνου DNA που περιελίσσεται γύρω από ένα οκταμερές ιστονών, σχηματίζοντας το

νουκλεόσωμα. Αναδίπλωση νουκλεοσωμάτων για το σχηματισμό ινιδίων χρωματίνης και περαιτέρω συσπείρωσή τους σε συμπαγές δομές πακεταρίσματος (Tonna et al., 2010)

Ιστόνες και νουκλεόσωμα

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς το DNA είναι περιτυλιγμένο γύρω από βασικές πρωτεΐνες, που ονομάζονται ιστόνες, οι οποίες συμμετέχουν στην αναδίπλωση της χρωματίνης. Οι ιστόνες και είναι μικρού μοριακού μεγέθους πρωτεΐνες (11 έως 14 kDa) και τα πολλά θετικά φορτισμένα κατάλοιπα λυσίνης και αργινίνης που περιέχονται στο εσωτερικό του μορίου τους αποδίδουν θετικό φορτίο. Αυτό τις βοηθάει στο να αλληλεπιδράσουν με το αρνητικά φορτισμένο DNA (Luger et al., 1997; Oudet et al., 1975). Ο εξαιρετικά συντηρημένος βαθμός τους καθιστά αυτή την υπεροικογένεια πρωτεϊνικών μορίων πολύ σημαντική. Στις ιστόνες συμπεριλαμβάνονται οι κύριες μορφές των ιστονών (core histones) στις οποίες ανήκουν οι H2A, H2B, H3 και H4, οι συνδετικές ιστόνες (linker histones) H1 και H5 (με την τελευταία να βρίσκεται μόνο στα πτηνά) και μια επίσης πληθώρα ποικιλομορφών (variants). Αυτή η διαμόρφωση του DNA, γύρω από τις ιστόνες, αποτελεί το πρωταρχικό στάδιο της οργάνωσης του γενετικού υλικού. Το DNA και οι ιστόνες μαζί αποτελούν τη δομή που ονομάζεται νουκλεόσωμα. Τα νουκλεοσώματα σε αυτό το στάδιο έχουν πάχος περίπου 11 nm σε αυτή τη μορφή η οποία είναι γνωστή και ως "χάντρες σε κομπολόι". Τα νουκλεοσώματα σχηματίζουν ένα ινίδιο των 30 nm, που έχει δηλαδή διάμετρο 30 nm κατά την αναδίπλωσή τους και όταν βρίσκονται κοντά το ένα στο άλλο, βάση δύο μοντέλων, του σωληνοειδούς και του ζιγκ-ζαγκ (Tremethick, 2007) (Εικόνες 9 και 10). Η σε βάθος μελέτη του νουκλεοσώματος βασίστηκε στην αρχική ανακάλυψή του (Kornberg, 1974) και στο χαρακτηρισμό του ως βασικός δομικός λίθος της χρωματίνης (Noll, 1974).



Εικόνα 9. Σχηματική απεικόνιση του νουκλεοσώματος (Kim, 2014)

Επομένως, το νουκλεόσωμα χαρακτηρίζεται ως ένα οκταμερές το οποίο αποτελείται από τέσσερα διαφορετικά είδη ιστονών με διπλή αντιπροσώπευση, δυο αντίγραφα δηλαδή από κάθε μια από τις ιστόνες (H2A, H2B, H3 και H4), γύρω από το οποίο περιελίσσονται 146 ζεύγη βάσεων (1,7 στροφές) δίκλωνου DNA (Oudet *et* al., 1975).



Εικόνα 10. Η θεμελιώδης μονάδα της χρωματίνης, το νουκλεόσωμα. Σχηματική απεικόνιση της κρυσταλλογραφικής ανάλυσης της δομής του (Luger *et al.*, 1997)

ΙΪΚΕΣ ΜΟΛΥΝΣΕΙΣ

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, οι ασθένειες που προκαλούνται από ιογενείς μολύνσεις αποτελούν σοβαρή απειλή για τη δημόσια υγεία. Αρκετές ιογενείς επιδημίες έχουν εμφανιστεί τα τελευταία 20 χρόνια, όπως το σοβαρό οξύ αναπνευστικό σύνδρομο (SARS) το 2003, η γρίπη που προκλήθηκε από τον ιό υποτύπου H1N1 το 2009, το αναπνευστικό σύνδρομο Μέσης Ανατολής (MERS) το 2012, η ασθένεια του ιού Ebola το 2014 και ο πρόσφατος COVID-19 που προκλήθηκε από το SARS-CoV-2 το 2019. Η εμφάνιση μολυσματικών ασθενειών εξαρτάται από δυναμικές πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ ανθρώπων, ζώων, παθογόνων και του περιβάλλοντος. Απαιτείται κατανόηση αυτών των αλληλεπιδράσεων για τον έλεγχο σημερινών και μελλοντικών καταστροφικών ασθενειών. Η έμφυτη των ανοσοαπόκριση (innate immune response), δημιουργεί την πρώτη γραμμή άμυνας καθώς μπορεί και ανιχνεύει και αναστέλλει την αναπαραγωγή και την εξάπλωση του ιού, προτού η επίκτητη ανοσοαπόκριση (adaptive immune response) παρέχει μια πιο αποτελεσματική άμυνα. Οι ιϊκές μολύνσεις ανιχνεύονται από τους κυτταρικούς υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων, όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, οι οποίοι με τη σειρά τους ενεργοποιούν ποικίλα σηματοδοτικά μονοπάτια μέσω συγκεκριμένων διακριτών adaptor πρωτεϊνών, κινασών και ρυθμιστικών πρωτεϊνών που ενεργοποιούν τη σύνθεση αντι-ιϊκών πρωτεϊνών. Αυτά τα μονοπάτια οδηγούν στην ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB και IRF3/7, οι οποίοι μαζί με άλλους κυτταρικούς ενεργοποιούν την έκφραση αντι-ιϊκών effector πρωτεϊνών, παράγοντες συμπεριλαμβανομένων των ιντερφερονών τύπου Ι (IFNs), TNF-a, IL-1β, οι οποίοι είναι κρίσιμοι μεσολαβητές των ενδογενών αντι-ιϊκών ανοσολογικών και φλεγμονωδών αποκρίσεων.

Οι ιϊκές μολύνσεις χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα νοσηρότητας και θνησιμότητας και αποτελούν ένα παγκόσμιο κοινωνικό πρόβλημα. Οι ιϊκές μολύνσεις μπορούν να παρέχουν το έναυσμα ή να προδιαθέσουν επίσης για την εκδήλωση διαφόρων ασθενειών, όπως ο διαβήτης τύπου 1 και άλλων αυτοάνοσων νοσημάτων (Richardson and Horwitz, 2014). Είναι σημαντικό να γίνει αναφορά στο πρόσφατο παράδειγμα της δυναμικής εξάπλωσης του SARS-CoV-2 και της ανάπτυξης της πανδημίας COVID-19. Οι ιογενείς λοιμώξεις βρίσκονται στις κορυφαίες θέσεις των μολυσματικών φαινομένων, οι οποίες επηρεάζουν δραματικά την Παγκόσμια Υγεία.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος οι ρυθμιστικές περιοχές που καθορίζουν τη γονιδιακή έκφραση μετά από ιϊκή μόλυνση ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών (επαγόμενη γονιδιακή έκφραση). Το εργαστήριό μας έχει παράδοση στη μελέτη έκφρασης των επαγόμενων από ιό γονιδίων, όπως είναι χαρακτηριστικά η IFN-β και η IL-8 (Thanos and Maniatis, 1995; Agelopoulos and Thanos, 2006). Η τεχνογνωσία αυτή έχει εφαρμοστεί και έχει ευρέως επεκταθεί για την ταυτοποίηση των μοριακών διακοπτών οι οποίοι μπορούν, βάση της συντονισμένης απόκρισης των κυττάρων, να ελέγχουν τη λειτουργία των ενισχυτών και να διαλευκάνουν τους μοριακούς μηχανισμούς δράσης τους. Στόχος μας είναι να περιγραφεί ο μηχανισμός εκείνος με τον οποίο το κύτταρο επαναπρογραμματίζει τη ρυθμιστική και κωδική μοίρα του γονιδιώματός του προκειμένου να αποκριθεί κατάλληλα στην ιϊκή μόλυνση. Γι' αυτό λοιπόν σε αυτό εδώ το σημείο θα γίνει αναφορά στους ιούς, προτού συνεχιστεί και ολοκληρωθεί το εισαγωγικό μέρος με την επεξήγηση των τεχνικών της γονιδιωματικής που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και την τεκμηρίωση της σπουδαιότητας της παρούσας μελέτης.

Ο ιός Sendai, γνωστός και ως ιός γρίπης ποντικού τύπου 1, είναι ένας μονόκλωνος RNA ιός (single-stranded RNA) της οικογένειας *Paramyxoviridae* και έχει δίκλωνο RNA (dsRNA) ως γενετικό υλικό. Ο ιός Sendai ανήκει στο γένος *Respirovirus*, μέλη του οποίου κυρίως μολύνουν τα θηλαστικά. Ο ιός είναι υπεύθυνος για μια μεταδοτική λοίμωξη του αναπνευστικού συστήματος σε ποντίκια, χάμστερ, ινδικά χοιρίδια και αρουραίους (Flecknell *et al.*, 1983). Στον ανθρώπινο οργανισμό και στις κυτταρικές σειρές δεν προκαλεί κανένα πρόβλημα στη φυσιολογία. Στον άνθρωπο όμως, όπως και στον ποντικό, προκαλεί την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος και φυσικά την ενεργοποίηση του μονοπατιού της *IFN-β*. Τα μόρια του ιού χαρακτηρίζονται ως πολυμορφικές δομές οι οποίες καλύπτονται από ένα

λιποπρωτεϊνικό περίβλημα το οποίο περιβάλλει ένα απλό μη διαχωρισμένο ιϊκό νουκλεοκαψίδιο (Faísca and Desmecht, 2007). Το γονιδίωμά του αποτελείται από περίπου 15.000 νουκλεοτίδια (Faísca and Desmecht, 2007). Η αντιγραφή του πραγματοποιείται μόνο στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή από την RNA πολυμεράση του ιδίου του ιού. Ένας κύκλος αντιγραφής διαρκεί περίπου 12-15 ώρες, καθώς ένα κύτταρο μπορεί να αποδώσει χιλιάδες ιϊκά σωμάτια. Ο ιός αναγνωρίζεται από κυτταρικούς υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (PRRs, Pattern-Recognition Receptors) και μέσω αυτών των μονοπατιών προκαλείται η ενεργοποίηση της έκφρασης του τύπου Ι ιντερφερονών και άλλων κυτταροκινών που συμβάλλουν και ενισχύουν την αντι-ιϊκή απόκριση (Heylbroeck *et* al., 2000).

Στη διαλεύκανση των βασικών φαινομένων ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης έχουν οδηγηθεί αρκετές ερευνητικές προσπάθειες επαγώγιμων ιϊκών συστημάτων-μοντέλων με σκοπό την κατανόηση της ρυθμιστικής λογικής που ακολουθούν τα κύτταρα, κυρίως σε επίπεδο ολόκληρου το γονιδιώματος, χωρίς όμως να έχουν εισχωρήσει σε βάθος. Τα κύτταρα αποκρίνονται στους ιούς μέσω της ενεργοποίησης σηματοδοτικών μονοπατιών που μεταφέρουν την πληροφορία από τους κυτταρικούς υποδοχείς στον πυρήνα, ενεργοποιώντας συντονισμένες μεταβολές στη γονιδιακή έκφραση μέσω κυρίως της αλληλεπίδρασης των μεταγραφικών παραγόντων και άλλων ρυθμιστών της χρωματίνης με τις ρυθμιστικές περιοχές του DNA.

Όπως τονίστηκε προηγουμένως, παρ'όλες τις ανακαλύψεις και την πρόοδο που έχει σημειωθεί τα τελευταία χρόνια στα επίπεδα έκφρασης της γονιδιακής έκφρασης, οι δύσκολοι στόχοι της δημιουργίας *in vivo* μοντέλων ασθενειών καθώς και η εγκαθίδρυση προ-κλινικών εφαρμογών παραμένουν. Χαρακτηριστικό είναι ότι προς το παρόν δεν έχει αποδειχθεί μια αποτελεσματική θεραπεία για τη λοίμωξη από το νέο κορωνοϊό SARS-CoV-2 COVID-19, ούτε υπάρχουν επαρκή κλινικά δεδομένα σχετικά με την προτίμηση ενός έναντι άλλου φαρμάκου σε μέτρια ή σοβαρή νόσηση. Ανάλογα με τα αποτελέσματα των κλινικών δοκιμών που βρίσκονται σε εξέλιξη αλλά και βάση των μελετών βασικής έρευνας ίσως δοθεί μια ανοσολογική απάντηση για τη νόσο και τα επιμέρους στάδιά της. Επομένως κρίνεται επιτακτική η ανάγκη για την αποκωδικοποίηση της ρυθμιστικής λογικής πίσω από την αναδιαμόρφωση του γονιδιώματος μετά από την ιϊκή μόλυνση και των βασικών μοριακών μηχανισμών και τον μονοπατιών που τα κύτταρα χρησιμοποιούν για να μπορέσουν να συντονίσουν το πρόγραμμα της αντι-ιϊκής απόκρισης. Αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα τη βαθύτερη κατανόηση των βασικών αρχών οργάνωσης του γονιδιώματος και τη δυνατότητα της αποτελεσματικής καταπολέμησης από τους ιούς καθώς και μιας ορθής πρόβλεψης της απόκρισης των ασθενών σε εξατομικευμένη βάση.

Στόχος της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι η πραγματοποίηση πειραμάτων τα οποία θα διερευνήσουν τους μηχανισμούς δράσης των παραπάνω στοιχείων/γονιδίων και θα αναδείξουν τη λογική βάση στην οποία στηρίζεται η συντονισμένη απόκριση των κυττάρων ενάντια στους ιούς μέσω του σχηματισμού δικτύων έκφρασης των κατάλληλων γονιδίων.

ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΕΣ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΗ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

Ιντερφερόνες

Οι ιντερφερόνες (IFNs) που αρχικά έγιναν γνωστές για την αντι-ιϊκή τους δράση και ονομάστηκαν έτσι από την λέξη interfere, που σημαίνει παρεμβαίνω, έχουν ως κύριο ρόλο τους την παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού των ιών στα κύτταρα. Έχουν επίσης εξειδικευμένο ρόλο στην οργάνωση της ανοσολογικής απάντησης των κυττάρων έναντι σε ιούς και σε άλλα ερεθίσματα και ρυθμίζουν όλες τις λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος (Katze *et* al., 2002; Fensterl and Sen, 2009). Ένα από τα πιο σημαντικά κομμάτια της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος αφορά τους ιούς και τους τρόπους αντιμετώπισής τους. Παρ' όλη την τεράστια σημασία αντιμετώπισης των ιών από τους οργανισμούς, μέχρι και πριν λίγα χρόνια δεν είχαν ανακαλυφθεί οι υποδοχείς που αναγνωρίζουν τους ιούς προκειμένου να τους αντιμετωπίσουν, ενεργοποιώντας το σύστημα των ιντερφερονών. Αποτελούν μια ομάδα ειδικών κυτοκινών και διακρίνονται σε τρεις τύπους, οι οποίοι συμβολίζονται ως Ι, ΙΙ και ΙΙΙ. Οι **τύπου Ι ιντερφερόνες** περιλαμβάνουν τις ιντερφερόνες- α, -β (Taniguchi *et al.*, 1980) καθώς και τις ιντερφερόνες -ω, -κ, -ε (Pestka *et al.*, 2004). Στον άνθρωπο και στο ποντίκι, τα γονίδια για τις ιντερφερόνες-α είναι 13 και 14, αντίστοιχα, ενώ το γονίδιο της ιντερφερόνης-β (*IFN-β*) είναι μοναδικό. Όλα τα γονίδια των ιντερφερονών τύπου Ι βρίσκονται ομαδοποιημένα σε μια γενωμική περιοχή του ίδιου χρωμοσώματος (chr9 για τον άνθρωπο και chr4 για το ποντίκι). Οι ιντερφερόνες τύπου Ι μπορούν και εκφράζονται ως απόκριση σε μόλυνση με ιό σε ποικίλους κυτταρικούς τύπους και παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο κυρίως στη μηειδική άμυνα.

Οι τύπου ΙΙ ιντερφερόνες αποτελούνται μόνο από ένα μέλος, την ιντερφερόνη-γ (IFN-γ), που επίσης κωδικοποιείται από ένα μόνο γονίδιο. Η IFN-γ εκφράζεται μόνο σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και συγκεκριμένα στο Τ- λεμφοκύτταρα και στα φυσικά φονικά (NK- natular killer) κύτταρα (Farrar and Schreiber, 1993). Πρόσφατα, έχουν ταυτοποιηθεί και κατηγοριοποιηθεί νέα μέλη ιντερφερονών ως ιντερφερόνες τύπου ΙΙΙ (Pestka *et al.,* 2004). Οι τύπου Ι και ΙΙΙ οικογένειες των ιντερφερονών περιέχουν πολλά μέλη με αλληλεπικαλυπτόμενες αλλά διακριτές βιολογικές λειτουργίες.

Οι εκκρινόμενες ιντερφερόνες δρουν σε μη-μολυσμένα κύτταρα μέσω της πρόσδεσής τους σε συγκεκριμένους υποδοχείς κυτταρικής επιφάνειας και προκαλούν ενδοκυτταρικές οδούς σηματοδότησης που ενεργοποιούν την έκφραση γονιδίων που ονομάζονται Interferon-Stimulated Genes (ISGs). Αυτά τα γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες των οποίων η λειτουργία είναι η δέσμευση και η συνεργατικότητα των διαφορετικών τύπων κυττάρων προκειμένου να καταπολεμηθεί η ιϊκή μόλυνση αναστέλλοντας τα διαφορετικά στάδια της ιϊκής αντιγραφής και της εξάπλωσης του ιού (Sen and Sarkar, 2007; Schoggins, 2014; Pervolaraki *et* al., 2018).

Το αντι-ιϊκό πρόγραμμα της γονιδιακής έκφρασης απαιτεί την αυστηρή και εξαιρετικά συντονισμένη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης για την κατάλληλη προειδοποίηση, πρόσληψη και ενεργοποίηση εξειδικευμένων κυττάρων από μια πληθώρα ιστών. Η επιτυχής έναρξη αυτού του αμυντικού προγράμματος απαιτεί μεταγραφικές αλλαγές σε ολόκληρο το γονιδίωμα που περιλαμβάνουν τη συμμετοχή διαφόρων στοιχείων ενισχυτή από διαφορετικούς τύπους κυττάρων, προκειμένου να ενεργοποιηθεί η έκφραση του σωστού συνόλου των γονιδίων-στόχων σε διαφορετικούς ιστούς. Παραδόξως, η βασική πτυχή αυτού του προγράμματος, η επαγωγή τύπου Ι ιντερφερονών, είναι στοχαστική, καθώς μόνο ένα μέρος των μολυσμένων κυττάρων εκφράζουν τις ιντερφερόνες, ακολουθούμενη από την προοδευτική συμμετοχή επιπρόσθετων κυττάρων σε περισσότερους ιστούς μέσω της παρακρινούς δράσης των εκκρινόμενων ιντερφερονών, δρώντας σε μη-μολυσμένα κύτταρα για να προκαλέσουν το ISGF3 σύμπλεγμα της μεταγραφικής ενεργοποίησης (Transcriptional Activating Complex). Έτσι, οι ιντερφερόνες λειτουργούν ως αγωγοί μεταξύ της ιϊκής μόλυνσης και της ενεργοποίησης από τους ISGF3 κρίσιμων αντι-

Βιολογική δράση των μεταγραφικών παραγόντων IRFs

H οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων IRFs (Interferon Regulatory Factors) περιλαμβάνει 9 μέλη: **IRF1, IRF2, IRF3, IRF4** (γνωστή και ως PIP ή ICSAT), **IRF5, IRF6, IRF7, IRF8** (γνωστή και ως ICSBP) και **IRF9** (γνωστή ως ISGF3γ) (Mamane *et al.,* 1999; Taniguchi *et al.,* 2001).

Οι διάφοροι IRF παράγοντες έχουν συγκεκριμένους ρόλους και συμμετέχουν στην ανάπτυξη και στη λειτουργία των ανοσοκυττάρων, όπως έδειξαν ποικίλες γενετικές μελέτες των γονιδίων που τα κωδικοποιούν. Αυτό υποδηλώνεται και από την ενεργοποίησή τους από συγκεκριμένα ερεθίσματα και μονοπάτια (Εικόνα 11). Στη διαφοροποίηση των Τ- λεμφοκυττάρων συναντώνται μέλη της οικογένειας *IRFs*, ενώ τα μέλη τα οποία συσχετίζονται και παίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της *IFN-* β ως ενεργοποιητές είναι οι **IRF1**, **IRF3**, **IRF5** και **IRF7** (Miyamoto *et al.*, 1988). Πιο συγκεκριμένα, ο ρόλος του **IRF1** στη μεταγραφική ενεργοποίηση της IFN-β δεν είναι ξεκάθαρος. Επίσης, ο ρόλος του **IRF5**, δεν είναι απαραίτητος για να προκαλέσει την επαγωγή του γονιδίου της ιντερφερόνης από τον ιό, συμμετέχει όμως στη ρύθμιση της έκφραση άλλων γονιδίων που κωδικοποιούν κυτοκίνες φλεγμονής, όπως για παράδειγμα την IL-12 και τον TNF-a.



Εικόνα 11. Ενεργοποίηση μονοπατιών για διαφορετικά μέλη της οικογένειας των *IRFs* και οι διακριτοί τους βιολογικοί ρόλοι κατά τη διάρκεια της ανοσοποίησης (Honda and Taniguchi, 2006)

Βασικοί ρυθμιστές της έκφρασης των γονιδίων των ιντερφερονών τύπου Ι, επαγόμενοι από μόλυνση με ιό είναι οι IRF3 και IRF7. Οι παράγοντες αυτοί παρουσιάζουν διαφορετικές λειτουργίες στα κύτταρα και παρουσιάζουν διαφορές και στη διαθεσιμότητά τους. Η έκφραση του IRF3 είναι διαρκής στα κύτταρα και παραμένει στο κυτταρόπλασμα όταν δεν είναι ενεργός. Όταν προκληθεί ιϊκή μόλυνση ή επαγωγή με ιντερφερόνες, φωσφορυλιώνεται σε συγκεκριμένα κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης και ακολουθεί σχηματισμός ομο- ή και ετερο-διμερών με τον IRF7, τα οποία εισέρχονται στον πυρήνα. Εκεί, θα γίνει πρόσδεση στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων και θα ακολουθήσει αλληλεπίδραση με τους μοριακούς διαμεσολαβητές - συνενεργοποιητές CBP ή/ και p300, προκειμένου να ενεργοποιήσει τα γονίδια-στόχους αλλάζοντας την τοπική δομή της χρωματίνης (Lin *et* al., 1998, Sato *et* al., 1998).

Να αναφερθεί επίσης ότι αντίθετα με τον IRF3, ο IRF7, ενώ επάγεται ισχυρά από το μονοπάτι μεταγωγής σήματος που ενεργοποιείται από τις τύπου Ι ιντερφερόνες (Sato *et al.*, 1998), η έκφρασή του παρατηρείται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στους περισσότερους τύπους κυττάρων. Ο ανενεργός IRF7 παραμένει στον κυτταρόπλασμα, ενώ μετά την ιϊκή μόλυνση, υφίσταται φωσφορυλίωση σερίνης, διμερισμό (ομο- ή ετερο-) με τελικό αποτέλεσμα να μετατοπιστεί στον πυρήνα και να συνδεθεί στους υποκινητές των γονιδίων της *IFN-β*, όσο και των *IFN-a*. Όπως προαναφέρθηκε, ο IRF7 είναι ο τελευταίος καθοριστικός παράγοντας που συνδέεται στον ενισχυτή του γονιδίου της *IFN-β* για τον σχηματισμό του ενισχυσσώματος έτσι ώστε να μπορέσει να ξεκινήσει η μεταγραφή του γονιδίου της. Επομένως, μέσω του **IRF7** επιτυγχάνεται θετική ανατροφοδότηση, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη μαζική παραγωγή των ιντερφερονών (Sato *et al.*, 1998).

Πρόγραμμα έκφρασης του γονιδίου της IFN-β

Για τη διαλεύκανση των μηχανισμών της γονιδιακής ρύθμισης το γονίδιο της ιντερφερόνης-β (*IFN-β*) του ανθρώπου είναι αυτό που παραδοσιακά μελετάται από το εργαστήριό μας τα τελευταία χρόνια. Αποτελεί ένα από τα καλύτερα μελετημένα γονίδια των θηλαστικών για την κατανόηση των μηχανισμών ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης. Αυτό είναι πολύ σημαντικό γιατί γνωρίζοντας τόσο καλά τους μηχανισμούς ρύθμισης, μπορούμε να θέσουμε νέα βαθύτερα ερωτήματα, αλλά κυρίως, να ερμηνεύσουμε καλύτερα τα αποτελέσματα των πειραματικών μας διεργασιών, διότι γνωρίζουμε με πολύ μεγάλη λεπτομέρεια την ακριβή χρονική σειρά αλλά και τη διασύνδεση των γεγονότων που οδηγούν τόσο στην ενεργοποίηση, όσο και στην απενεργοποίηση του (Munshi *et al.*, 1999; Agalioti *et al.*, 2000; Merika and Thanos, 2001; Lomvardas and Thanos, 2002; Koutroubas *et al.*, 2008).

Έπειτα από την αποκρυπτογράφηση του μηχανισμού ενεργοποίησης της *IFN-β* αποδείχτηκε ότι τα χαρακτηριστικά της λειτουργίας των ενισχυτών οφείλονται στην

ισχύ των βασικών αρχών του συνδυαστικού ελέγχου, της συνεργατικότητας κατά την πρόσδεση, της συνέργειας κατά τη στρατολόγηση και της τοπικής αρχιτεκτονικής της χρωματίνης στη ρυθμιστική περιοχή των γονιδίων (Merika and Thanos, 2001; Thanos, 2006).

Η **ιντερφερόνη-β** (*IFN-β*) είναι μια μικρή κυτοκίνη με αντι-ιϊκή δράση. Ένα από τα χαρακτηριστικά της το οποίο είναι σημαντικό είναι η παρακρινής δράση της, δηλαδή η ικανότητα της για πρόσδεση στα γειτονικά μη προσβεβλημένα από τον ιό κύτταρα και η ενεργοποίησή τους για την αντιμετώπισή του. Μόνο μετά από ιϊκή μόλυνση μπορεί να επαχθεί το γονίδιο της ιντερφερόνης-β στον άνθρωπο. Ο ιός μολύνει τα κύτταρα τα οποία με τη σειρά τους εκφράζουν την ιντερφερόνη-β και στη συνέχεια αποπίπτουν. Η πρόσδεσή της, όμως, σε υποδοχείς γειτονικών κυττάρων είναι αυτή που την καθιστά ανθεκτική στην ιϊκή μόλυνση, η οποία είναι το μοναδικό ερέθισμα που μπορεί να ενεργοποιήσει το γονίδιο της ιντερφερόνης-β στον άνθρωπο (Maniatis and Weintraub, 1992; Thanos, 1996; Ford and Thanos, 2010).

Στην περίπτωση του γονιδίου της ιντερφερόνης-β, μια περιοχή DNA συνολικού μήκους 110 ζευγών βάσεων ανοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής καταλαμβάνεται από τον ενισχυτή και τον κεντρικό υποκινητή της ιντερφερόνης β. Η περιοχή του ενισχυτή αντιστοιχεί στα περισσότερο απομακρυσμένα 55 ζεύγη βάσεων και σε αυτήν συμπεριλαμβάνονται τα ρυθμιστικά στοιχεία PRDIV, PRDIII/I και PRDII (Positive Regulatory Domains) (σε κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$). Κανένα ρυθμιστικό στοιχείο δε μπορεί από μόνο του να επάγει τη μεταγραφή μετά από την ιϊκή μόλυνση. Μόνο η ιϊκή μόλυνση έχει ως αποτέλεσμα τη συντονισμένη ενεργοποίηση τριών ομάδων μεταγραφικών παραγόντων. Στα τρία αυτά θετικά ρυθμιστικά στοιχεία γίνεται η πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB (ετεροδιμερές p50/p65 της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων Rel), μέλη της οικογένειας των παραγόντων IRF, όπως οι IRF3 και IRF7 και του ετεροδιμερούς ATF-2/c-Jun, τα οποία με τη βοήθεια της αρχιτεκτονικής πρωτεΐνης HMG-I/Y συνδέονται στον ελεύθερο από νουκλεοσώματα ενισχυτή/υποκινητή του γονιδίου της ιντερφερόνης-β και σχηματίζουν μια νουκλεοπρωτεΐνη δομή γνωστή ως ενισχυόσωμα (enhanceosome) (Thanos et al., 1993; Thanos and Maniatis 1995; Thanos, 1996; Merika and Thanos,

2001) (Εικόνα 12). Η πρόσδεση των παραγόντων πραγματοποιείται με συνεργατικό τρόπο, δηλαδή η πρόσδεση της κάθε πρωτεΐνης θα ενισχύσει και την πρόσδεση των υπολοίπων. Συγκεκριμένα, η HMG-I/Y αλληλεπιδρά τόσο με το DNA, όσο και με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες.–Ανοδικότερα του PRDIV (5') και καθοδικά του PRDII (3') εντοπίζονται δύο αρνητικά ρυθμιστικά στοιχεία, τα NRDII και NRDI αντιστοίχως (Negative Regulatory Domain), τα οποία συμμετέχουν στην αρνητική ρύθμιση του γονιδίου (Goodbourn *et* al., 1986; Goodbourn and Maniatis 1988; Thanos, 1996; Ren *et* al., 1999; Panne *et* al., 2007).

Επομένως, η ενεργοποίηση του γονιδίου της ιντερφερόνης-β απαιτεί τη συγκρότηση του ενισχυοσώματος. Το μοναδικό ερέθισμα που συμβάλλει σε αυτή την απαίτηση είναι η ιϊκή μόλυνση, διότι μόνο με αυτήν μπορεί να γίνει η ταυτόχρονη ενεργοποίηση όλων των παραγόντων που προσδένονται στην περιοχή του ενισχυτή. Ενεργοποίηση ενός ή ακόμα και δύο από αυτούς τους παράγοντες μπορεί να προκληθεί και από άλλα φυσιολογικά ερεθίσματα, όπως για παράδειγμα ο NF-κB ο οποίος μπορεί να ενεργοποιηθεί και από τον Παράγοντα Νέκρωσης των Όγκων α (Tumor Necrosis Factor alpha, TNF-α) αλλά και από την ιντερφερόνη-γ (Interferon gamma, IFN-γ). Αυτό όμως δεν επαρκεί για την συγκρότηση του ενισχυοσώματος και κατ' επέκταση για την έναρξη της μεταγραφής του γονιδίου της ιντερφερόνης-β.

Σε naïve κύτταρα, ο ανθρώπινος υποκινητής του γονιδίου της ιντερφερόνης-β περιέχει ένα καλά τοποθετημένο νουκλεόσωμα που καλύπτει το TATA box και το σημείο έναρξης της μεταγραφής (TSS). Μόλις συγκροτηθεί το ενισχυόσωμα της ιντερφερόνης-β στρατολογεί με καθορισμένη σειρά την ακετυλάση ιστονών GCN5, τη βασική μεταγραφική μηχανή (CBP και ολοένζυμο PolII) καθώς και το σύμπλοκο αναδόμησης της χρωματίνης SWI/SNF (Yie *et al.*, 1999; Ford and Thanos, 2010) των οποίων η συντονισμένη δράση έχει ως αποτέλεσμα την ολίσθηση του νουκλεοσώματος που καλύπτει το TATA box σε μια νέα θέση 36 bp κάτωθεν, εκθέτοντας έτσι το TATA box και το σημείο έναρξης της μεταγραφής στη γενική μεταγραφική μηχανή. Το γονίδιο εκφράζεται από ένα μόνο αλληλόμορφο, αλλά η έκφραση γίνεται διαλληλική λόγω της δράσης των νεοσυντιθέμενων IRF7 ως αποτέλεσμα της πρώιμης παραγωγής του γονιδίου της ιντερφερόνης-β.



Εικόνα 12. Απεικονίζεται η νουκλεοτιδική αλληλουχία του ενισχυτή, τα μέλη των τριών οικογενειών μεταγραφικών παραγόντων και τα θετικά ρυθμιστικά στοιχεία του γονιδίου της ιντερφερόνης-β (Thanos, 1996)

Η συνδυαστική μετάδοση του σήματος μόλυνσης πρέπει να ερμηνεύεται λειτουργικά από ένα κατάλληλα δομημένο γονιδίωμα με αποτέλεσμα τα κρίσιμα στοιχεία των ενισχυτών να είναι προσβάσιμα για να επιτρέπουν την άμεση μεταγραφική απόκριση των κρίσιμων αντι-ιϊκών γονιδίων. Οι μεταγραφικοί ενισχυτές, όπως είδαμε, είναι αρθρωτές μη-κωδικοποιημένες αλληλουχίες που αποτελούνται από συγκεντρωμένα συμπλέγματα μικρών μοτίβων DNA τα οποία συνδέονται με παράγοντες μεταγραφής. Αυτοί συμβάλλουν συνεργατικά ή αθροιστικά στα συνολικά επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης που διασπείρονται κατά μήκος του γονιδιώματος για τον προσδιορισμό της χωρο-χρονικής και της ποσοτικής έκφρασης των γονιδίων. Η δράση των ενισχυτών έχει αποδειχθεί ότι συσχετίζεται με εξειδικευμένες ιδιότητες χρωματίνης, όπως η χαμηλή πυκνότητα των νουκλεοσωμάτων, ώστε να επιτρέπεται η πρόσβαση των μεταγραφικών παραγόντων στις θέσεις πρόσδεσής τους, και χημικές τροποποιήσεις στις ιστόνες των γειτονικών νουκλεοσωμάτων, όπως η μονομεθυλίωση της λησίνης 4 στην ιστόνη H3 (H3K4me1) και η ακετυλίωση της λυσίνης 27 στην ιστόνη H3 (H3K27ac).

Η εκκρινόμενη IFN-β οδηγεί στην ενεργοποίηση μιας πληθώρας γονιδίων, έπειτα από τη σύνδεσή του σε ειδικούς επιφανειακούς υποδοχείς του ίδιου, αλλά και των γειτονικών κυττάρων, τα προϊόντα των οποίων συμβάλλουν στην αντι-ιϊκή προστασία των κυττάρων (Εικόνα 13). Πιο συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι το

μονοπάτι μεταγωγής του σήματος του γονιδίου της *IFN-β* εμπλέκεται στην πλειοψηφία των σταδίων του κύκλου ζωής των ιών, όπως στην εισβολή, στη μεταγραφή του ιϊκού mRNA, στην αντιγραφή του γενετικού τους υλικού και τέλος στην απελευθέρωση των ιοσωματίων.





Αξίζει να αναφερθεί στο σημείο αυτό η χρονική αλληλουχία των γεγονότων της συστράτευσης των μεταγραφικών παραγόντων η οποία έχει μελετηθεί στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά HeLa στο εργαστήριό μας. Χαρακτηριστικά, η έκφραση του γονιδίου της *IFN-β* αρχίζει στις έξι ώρες μετά από την ιϊκή μόλυνση και

κορυφώνεται στις εννέα ώρες παραμένοντας σχεδόν σταθερή μέχρι τις δεκαοκτώ με δεκαεννέα ώρες, όπου και επέρχεται η σταδιακή πτώση των επιπέδων της μεταγραφής, εφόσον φυσικά δεν υπάρχει νέο ερέθισμα. Μετά τις εικοσιτέσσερις ώρες το mRNA γίνεται σχεδόν μη ανιχνεύσιμο (Agalioti *et* al., 2000). Ο παράγοντας NF-κB ενεργοποιείται δύο ώρες μετά από την ιϊκή μόλυνση και στη συνέχεια προσδένεται στον ενισχυτή του γονιδίου της *IFN-β*, ενώ ο παράγοντας IRF1 εμφανίζεται στις δύο με τρεις ώρες ακολουθούμενος από τον παράγοντα ATF-2/c-Jun.

Βιολογική δράση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB

Το μονοπάτι σηματοδότησης **NF-κB** (Nuclear Factor-κ light chain enhancer Binding protein) αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς κλάδους των μοριακών μηχανισμών εκδήλωσης της φλεγμονής και της ανοσολογικής απόκρισης. Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB αριθμεί 5 μέλη τα οποία αποκωδικοποιούνται από τα γονίδια *NF-κB1, NF-κB2, REL, RELA* και *RELB* και δημιουργούν ετεροδιμερή και ομοδιμερή σε ποικίλους συνδυασμούς.

Η ενεργοποίηση του NF-κB μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω μια πληθώρας διαφορετικών υποδοχέων ως απόκριση σε διαφορετικά ερεθίσματα. Η διέγερση του υπεύθυνου υποδοχέα και των αντίστοιχων πρωτεϊνικών συμπλόκων στο κυτταροπλάσμα, θα οδηγήσει στη φωσφορυλίωση των αναστολέων (IκB), οι οποίοι στη συνέχεια ουβικιτινυλιώνονται και τελικά αποικοδομούνται, επιτρέποντας έτσι στα απελευθερωμένα διμερή να μεταναστεύσουν στον πυρήνα, όπου και δρουν, ρυθμίζοντας την έκφραση των κατάλληλων γονιδίων-στόχων. Το καθοριστικό αυτό σημείο ενεργοποίησης του NF-κB καταλύεται από το σύμπλοκο της IκB κινάσης (IKK), το οποίο αποτελείται από δυο καταλυτικές υπομονάδες, τις ΙΚΚα και ΙΚΚβ και από μια μη καταλυτική υπομονάδα, την ΙΚΚγ/ΝΕΜΟ (Li *et a*l., 2002; Israël, 2010).

Στα περισσότερα κύτταρα ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα με μια ανενεργή μορφή, όπου και βρίσκεται προσδεδεμένος από τις ΙκB πρωτεΐνες που αναστέλλουν τη δράση του. Η μόλυνση των κυττάρων με ιό ή η εισαγωγή δίκλωνου RNA (ds RNA), ενεργοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα NF-κB - η οποία επιτυγχάνεται μέσω των υποδοχέων του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNFR), των υποδοχέων Toll (TLRs) και των κυτταροπλασματικών υποδοχέων RIG-I και MDA-5, με τελικό αποτελέσματα τη μετατόπισή του μέσα στον πυρήνα (Εικόνα 14) (Lenardo *et* al., 1989; Visvanathan and Goodbourn, 1989; Sen and Baltimore 1986).



Εικόνα 14. Σχηματική απεικόνιση της μόλυνσης των κυττάρων με ιό, της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB και της μετατόπισής του μέσα στον πυρήνα

Κυτταρο-ειδικό πρότυπο έκφρασης του γονιδίου της ιντερλευκίνης 8 (IL-8)

Η ιντερλευκίνη-8 είναι μια κυτοκίνη η οποία παίζει κεντρικό ρόλο στην εκδήλωση της φλεγμονής (inflammatory response) (Baggiolini and Clark-Lewis, 1992). Η ιστό-ειδική αποσιώπηση του γονιδίου της κυτοκίνης *IL-8* σε ανθρώπινα Β-λεμφοκύτταρα από τη macroH2A1.2 και η διαλεύκανση του μοριακού της μηχανισμού αποτελεί το πιο καλομελετημένο παράδειγμα μηχανισμού δράσης της ιστονικής αυτής ποικιλομορφής (Agelopoulos and Thanos, 2006) και καταδεικνύει τη σημασία της διαμόρφωσης της χρωματίνης στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Να αναφερθεί

ότι η IL-8 αποτελεί και το μοναδικό μέχρι στιγμής γνωστό γονίδιο-στόχο ρύθμισης από τη macroH2A1.2 σε ανθρώπινα κύτταρα.

Ο μοριακός μηχανισμός δράσης, ή αλλιώς ο μηχανισμός της αποσιώπησης, μας δίνει να καταλάβουμε πολλά σχετικά με την κληρονόμηση των προτύπων της γονιδιακής έκφρασης από τη μία κυτταρική γενιά στην επόμενη και κυρίως για το πως η αρχιτεκτονική δομή της χρωματίνης μπορεί να αποτελέσει καθοριστικό παράγοντα για την ιστό-ειδική έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων. Ενώ σε σειρές επιθηλιακών κυττάρων (HeLa) μετά από μόλυνση των κυττάρων με ιό η *IL-8* εκφράζεται πάντα, δεν παρατηρείται το ίδιο και σε σειρές Β-λεμφοκυττάρων (Namalwa) Η καταστολή της έκφρασης του γονιδίου της *IL-8* στα Β-λεμφοκύτταρα δεν οφείλεται στο γεγονός ότι απουσιάζει κάποιος απαραίτητος μεταγραφικός παράγοντας, καθώς μετά από την ιϊκή μόλυνση, (ATF2/c-Jun, NF-κB και c-EBP) βρίσκονται όλοι προσδεμένοι σε αντίστοιχες θέσεις, σε άλλα γονίδια του ίδιου κυτταρικού τύπου. Ανακαλύφθηκε λοιπόν ότι η ιστό-ειδική αρχιτεκτονική δομή της χρωματίνης στον υποκινητή του γονιδίου είναι υπεύθυνη για το διαφορετικό αυτό πρότυπο της μεταγραφικής επαγωγής του γονιδίου της *IL-8* (Agelopoulos and Thanos, 2006).

Πιο συγκεκριμένα, στα επιθηλιακά κύτταρα ο υποκινητής/ενισχυτής της *IL-8* είναι "γυμνός", ενώ στα Β-λεμφοκύτταρα η ίδια ακριβώς περιοχή βρίσκεται περιτυλιγμένη γύρω από ένα νουκλεόσωμα. Η διαφορά συνεπώς οφείλεται στην παρουσία ενός νουκλεοσώματος το οποίο περιέχει την ιστονική ποικιλομορφή macroH2A1.2 η οποία καλύπτει ολόκληρη τη ρυθμιστική περιοχή στα Namalwa. Η παρουσία της macroH2A1.2 αποτρέπει την πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων. Το νουκλεόσωμα απουσιάζει από την αντίστοιχη περιοχή του γονιδιώματος στα HeLa κύτταρα. Η στρατολόγηση του νουκλεοσώματος απαιτεί την άμεση αλληλεπίδραση της macroH2A1.2 υπομονάδας του νουκλεοσώματος και του παράγοντα ATF2, ο οποίος είναι προσδεδεμένος γειτονικά. Η αλλοστερική τροποποίηση του παράγοντα ATF2 μετά την πρόσδεσή του στις ειδικές θέσεις πρόσδεσης στο DNA ρυθμίζει την αλληλεπίδραση αυτή. Η αλλοστερική τροποποίηση θα εξαρτηθεί από την αλληλουχία του DNA στη θέση πρόσδεσης του ATF2 με αποτέλεσμα η στρατολόγηση του νουκλεοσώματος που περιέχει την ιστονική ποικιλομορφή macroH2A1.2 να πραγματοποιείται μόνο όταν η αλληλουχία της θέσης πρόσδεσης του παράγοντα ATF2 οδηγεί σε συγκεκριμένη αλλοστερική τροποποίηση αυτού του παράγοντα. Με βάση αυτή τη διάταξη/διαμόρφωση, οι βασικοί ενεργοποιητές αδυνατούν να βρουν τη θέση πρόσδεσής τους στον υποκινητή του γονιδίου της *IL-8* (Εικόνα 15).

Επομένως, ένας πολύ καθοριστικός παράγοντας για την ιστο-ειδική έκφραση των γονιδίων είναι **η αρχιτεκτονική της χρωματίνης** η οποία μπορεί και ρυθμίζει επιγενετικά το πότε οι *in cis* ρυθμιστικές αλληλουχίες είναι προσβάσιμες για το μεγάλο αριθμό των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στις διαδικασίες της αντιγραφής, της μεταγραφής, του ανασυνδυασμού και άλλων (Luger, 2003). Με βάση το παραπάνω παράδειγμα της δυναμικής δομής του γονιδίου της *IL-8* είναι προφανές πως η χρωματινική σύσταση κάποιων γονιδίων παρουσιάζει μεγάλες διαφορές στους διάφορους κυτταρικούς τύπους. Οι διαφορές αυτές αντανακλούν το ειδικό πρόγραμμα έκφρασης των γονιδίων σε κάθε κυτταρικό τύπο, καθώς με τη σειρά τους αλλάζουν δραματικά τον τρόπο με τον οποίο μπορεί να ενεργοποιηθεί μετά από ποικίλα περιβαλλοντικά ερεθίσματα.



Εικόνα 15. Μοντέλο που απεικονίζει την τοπική αρχιτεκτονική της χρωματίνης και τις τροποποιήσεις της οι οποίες επηρεάζουν την ιστο-ειδική γονιδιακή έκφραση του γονιδίου IL-8 σε κύτταρα HeLa και Namalwa (Agelopoulos and Thanos, 2006)

Ο ρόλος της δομής της χρωματίνης στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης

Η επιτυχής μεταγραφή των γονιδίων δεν εξαρτάται μόνο από τη λειτουργία του συνολικού μεταγραφικού μηχανισμού και των συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων, αλλά και από πρωτεΐνες, οι οποίες είναι ικανές να αλλάξουν την αρχιτεκτονική δομή της χρωματίνης. Η δομή της χρωματίνης είναι εξαιρετικά δυναμική (Gasser, 2002; Horn and Peterson, 2002; Tremethick, 2007). Είναι πλέον γνωστό, όπως είδαμε και προηγουμένως, ότι η ικανότητα πρόσδεσης στη χρωματίνη διαφέρει στους μεταγραφικούς παράγοντες.

νουκλεοσώματα μπορούν να αναδομούνται καταλλήλως (nucleosome Tα reconstitution), να γλιστράνε και να οδηγούνται σε αλλαγή της θέσης τους και να μεταφέρονται σε νέες θέσεις πάνω στο DNA (nucleosome sliding) (Lomvardas and Thanos, 2001), ή και να αποσταθεροποιούνται και να απομακρύνονται τοπικά (nucleosome loss) και μετά το τέλος της κάθε διαδικασίας να επανασχηματίζονται (Workman, 2006; Li et al., 2007; Berger, 2007). Η χωροταξική οργάνωση του πυρήνα αλλά και της χρωματίνης επηρεάζει και σε ορισμένες περιπτώσεις, καθορίζει τη λειτουργία της έκφρασης των πληροφοριών που εδράζουν στο γενετικό υλικό (Hager et al., 2009). Κομβικό ρόλο σε αυτή τη ρύθμιση έχει το νουκλεόσωμα, το οποίο συντελεί στην απόκτηση μιας ιδιότητας του γονιδιώματος που ονομάζεται "πλαστικότητα". Σε αυτή την "πλαστικότητα" αποδίδεται η σπουδαιότητα του ρόλου τους στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και οφείλεται στην παρουσία φαινομένων αναδόμησης της χρωματίνης από ποικίλα ένζυμα, σε φαινόμενα μετα-μεταφραστικής τροποποίησης των ιστονών και στην παρουσία ιστονικών ποικιλομορφών στις θέσεις που βρίσκονται οι κανονικές ιστόνες (Zhao et al., 2013; Peñalosa-Ruiz et al., 2019). Η συντονισμένη δράση όλων των παραπάνω μηχανισμών καθορίζει την αρχιτεκτονική της χρωματίνης στον πυρήνα των ευκαρυωτικών κυττάρων (Εικόνα 16).



Εικόνα 16. Δυναμική αρχιτεκτονική γονιδιώματος στον πυρηνικό χώρο (3D nuclear architecture). Απεικονίζεται η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε 3 διαστάσεις (Zhao *et al.,* 2013)

ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Επιγενετική

Από τη χρωματινική δομή και όλες εκείνες τις επιμέρους διαδικασίες που την τροποποιούν (επιγενετικά φαινόμενα) δημιουργείται ένας νέος κώδικας, ο επιγενετικός κώδικας, ο οποίος περιγράφει τον τρόπο με τον οποίο η δομή της

χρωματίνης διαμορφώνεται από τα διαφορετικά προγράμματα γονιδιακής έκφρασης. Με τον όρο επιγενετική (epigenetics) αναφερόμαστε συγκεκριμένα στον τομέα της γενετικής που μελετάει το σύνολο των επιγενετικών αλλαγών που συμβαίνουν στο γενετικό υλικό των κυττάρων, δηλαδή μελετάει την επίδραση του περιβάλλοντος στην έκφραση των γονιδίων, χωρίς όμως να προκαλεί αλλαγές στην αλληλουχία του DNA και στον τρόπο με τον οποίο οι εξωτερικοί παράγοντες επηρεάζουν την ανάπτυξη και τη συμπεριφορά του (Luger, 2003). Αυτό μπορεί να εξηγήσει το πως μπορεί ένας άνθρωπος να εκδηλώσει μια παθολογική κατάσταση ενώ έχει κληρονομήσει ένα φυσιολογικό γονίδιο και να εκδηλώσει τελικά μια παθολογική κατάσταση ή να λειτουργεί φυσιολογικά ο οργανισμός του ενώ φέρει μεταλλάξεις.

Η επιγενετική δρα ως ένας διακόπτης των γονιδίων τα οποία είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση ασθενειών και οι μηχανισμοί της μπορούν να μας δώσουν απαντήσεις για το πως το περιβάλλον και η συμπεριφορά μας επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων. Δημιουργεί αλλαγές στη λειτουργία των γονιδίων, όπως αναφέρθηκε, χωρίς όμως να προκαλούνται μόνιμες αλλαγές στο γενετικό κώδικα. Ας δούμε λοιπόν τις αλλαγές αυτές, τις τροποποιήσεις που λαμβάνουν χώρα μέσα στον πυρήνα των ευκαρυωτικών κυττάρων και οι οποίες είναι πολύ σημαντικές για το μηχανισμό της γονιδιακής ρύθμισης (Agelopoulos *et* al., 2012).

Οι χημικές τροποποιήσεις των ιστονών διαμορφώνουν τη γονιδιακή έκφραση, αλλάζοντας τα αμινοτελικά άκρα των ιστονών και επηρεάζουν τη δομή της χρωματίνης. Αυτή η τροποποίηση προκαλεί "χαλάρωση" ή "συσπείρωση" της χρωματίνης. Οι τροποποιήσεις αυτές στρατολογούν και άλλα σύμπλοκα αναδόμησης προκαλώντας περαιτέρω αλλαγές στη δομή της. Οι ιστονικές τροποποιήσεις των νουκλεοσωμάτων αποτελούν έναν πολύ σημαντικό μηχανισμό ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης (Εικόνα 17). Δημιουργούν θέσεις αλληλεπίδρασης μεταξύ των νουκλεοσωμάτων και αποτελούν θέσεις πρόσδεσης πρωτεϊνών-τελεστών, όπως για παράδειγμα συνενεργοποιητών της μεταγραφής ή αποσιωπητικών παραγόντων (Zhou *et a*l., 2011). Οι τροποποιήσεις αυτές μπορούν να επηρεάσουν διαδικασίες στο DNA, όπως η μεταγραφή, η επιδιόρθωση και αντιγραφή του DNA και η οργάνωση των χρωμοσωμάτων. Μπορούν επίσης να είναι είτε ενεργοποιητικές είτε κατασταλτικές για την έκφραση των γονιδίων (Rosenfeld et al., 2009). Οι πιο συνηθισμένες επιγενετικές τροποποιήσεις της χρωματίνης περιλαμβάνουν την προσθήκη ή αφαίρεση χημικών ομάδων σε κατάλοιπα αμινοξέων, στις απολήξεις ("ουρές") των ιστονών και είναι η μεθυλίωση, η ακετυλίωση, η φωσφορυλίωση και η ουβικουιτινυλίωση), οι οποίες μεταφράζονται σε διαφορετική ενεργότητα αντιγραφής και μεταγραφής (Wang *et* al., 2008).



Εικόνα 17. Ποικίλα χαρακτηριστικά του ευκαρυωτικού πυρήνα που συσχετίζονται με τις διαφορετικές ιστονικές τροποποιήσεις (Zhou *et al.,* 2011).

Στην περιοχή του υποκινητή, η **ακετυλίωση των ιστονών** των γονιδίων διευκολύνει την προσέλκυση πρωτεϊνών που μπορούν να επάγουν τη μεταγραφή. Η ακετυλίωση συμμετέχει σε μια σειρά λειτουργιών στον ευκαρυωτικό πυρήνα συμπεριλαμβανομένων της μεταγραφικής επαγωγής, της επιδιόρθωσης του DNA καθώς και της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου (Shahbazian and Grunstein, 2007; Kawasaki *et al.*, 2000). Η ακετυλίωση των ιστονών είναι υπεύθυνη για το συνολικό (θετικό) φορτίο των άκρων, γεγονός που προσδίδει τη "χαλαρή" κατάσταση του DNA
γονιδίων και ενεργοποιώντας την έκφραση των ρυθμίζεται aпò τις ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών (Histone AcetylTransferases, HATs) (Wang et al., 2014; Shen et al., 2015). Η αποκετυλίωση των ιστονών ρυθμίζεται, αντίστοιχα, από τις από-ακετυλάσες των ιστονών, (Histone DeACetylases, HDACs) (Lehrmann et al., 2002; Shen et al., 2015). Οι HATs έχουν την ικανότητα να ακετυλιώνουν τις ιστόνες σε συγκεκριμένες λυσίνες, προσδένονται στις ακετυλιωμένες ιστόνες μέσω του Bromodomain και είναι υπεύθυνες για τη στρατολόγηση μεταγραφικών παραγόντων στους ενισχυτές ή υποκινητές των γονιδίων επάγοντας τη μεταγραφή τους (Shen et al., 2015). Και οι δύο αυτές ομάδες ενζύμων ελέγχουν τη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που καθορίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση. Οι αντιδράσεις των HATs και HDACs βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία προσδίδοντας στις ουρές των ιστονών το σωστό βαθμό ακετυλίωσης.

Η ακετυλίωση των καταλοίπων λυσίνης στα αμινοτελικά άκρα των ιστονών (κυρίως στην ιστόνη H3) είναι μια σημαντική ιστονική τροποποίηση καθώς καθορίζει τη διαμόρφωση της χρωματίνης, αν είναι δηλαδή "κλειστή" ή "ανοιχτή". Οι ακετυλιωμένες λυσίνες παρουσιάζουν ανοιχτή δομή χρωματίνης, η οποία είναι προσβάσιμη από το σύμπλοκο της μεταγραφής προάγοντας τη μεταγραφή. Επομένως, η ακετυλίωση των ιστονικών λυσινών έχει συνδεθεί με αυξημένη μεταγραφή.

Αντιθέτως, η μεθυλίωση των ιστονών μπορεί να σχετίζεται είτε με την ενεργοποίηση της μεταγραφής ή την αποσιώπηση της. Η μεθυλίωση των ιστονών πραγματοποιείται σε κατάλοιπα λυσίνης και αργινίνης στα αμινοτελικά άκρα των ιστονών H3 και H4 (Zhang and Reinberg, 2001; Kouzarides, 2002; Black *et al.*, 2012). Οι αντιδράσεις μεθυλίωσης και απομεθυλίωσης καταλύονται από τα ένζυμα Histone Methyltransferases (HMTs), τα οποία μεθυλιώνουν αμινοξικά κατάλοιπα ιστονών, και από τις Histone Dimethylases, (HDMs), οι οποίες απομεθυλιώνουν αμινοξικά κατάλοιπα ιστονών, αντίστοιχα (Barski *et al.*, 2007)

Η μεθυλίωση μπορεί και αλλάζει τον τρόπο αλληλεπίδρασης του νουκλεοσώματος με τις πρωτεΐνες οι οποίες προσδένονται στις ιστόνες και περιλαμβάνει την προσθήκη μιας μεθυλομάδας στο DNA και λαμβάνει χώρα πάντα στον 5' άνθρακα της κυτοσίνης με αποτέλεσμα τη μείωση της έκφρασης των γονιδίων (Hyun et al., 2017). Η μεθυλίωση δεν αλλάζει όμως το ολικό φορτίο των ιστονών. Ο βαθμός της μεθυλίωσης θα καθορίσει τη δράση και επομένως και την έκφραση του εκάστοτε γονιδίου. Όσο, δηλαδή, μεθυλιώνεται πιο ισχυρά αυτή η βάση τόσο πιο εξασθενημένη είναι η έκφραση του συνόλου των γονιδίων στο οποίο βρίσκεται (Hashimoto et al., 2010; Black et al., 2012). Η μεθυλίωση συγκεκριμένων μορίων λυσίνης στις ιστόνες H3 και H4 θεωρείται υπεύθυνη για την ενίσχυση της σχέσης τους με το DNA, γεγονός που συμφωνεί με τη συσχέτιση μεταξύ της καταστολής γονιδίων και της μεθυλίωσης των ιστονών (Li, Luo et al., 2012; Cheng 2014). Η μεθυλίωση λυσινάν φαίνεται να έχει διττό ρόλο. Ανάλογα με τη θέση του αμινοξέος στο οποίο τοποθετούνται και ανάλογα του αριθμού των μεθυλομάδων που προστίθεται, η τροποποίηση έχει συσχετιστεί με την ενεργοποίηση ή την καταστολή της μεταγραφής (Εικόνα 18). Είναι μια χημική τροποποίηση του DNA που κληρονομείται και μπορεί στη συνέχεια να αφαιρεθεί χωρίς να αλλάξει την αρχική ακολουθία του DNA (Zhou et al., 2011).



Εικόνα 18. Απεικονίζεται ο διαχωρισμός των διαφορετικών λειτουργικών κατηγοριών των υποκινητών. Οι υποκινητές μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σύμφωνα με το περιεχόμενο των C και G βάσεων τους. Οι υποκινητές με υψηλό περιεχόμενο C G (HCPs) και ο υποκινητές με

χαμηλό περιεχόμενο C G (LCPs) κατηγοριοποιούνται σε διακριτά χρωματινικά πρότυπα α. Οι HCPs παρουσιάζουν χαρακτηριστικά προσβάσιμης ή ενεργής χρωματίνης εξ' ορισμού. Οι ενεργοί HCPs (όπως για παράδειγμα οι υποκινητές γονιδίων κυτταρικής οικονομίας) είναι εμπλουτισμένοι με την ιστονική τροποποίηση της τριμεθυλίωσης της ιστόνης H3 στη λυσίνη 4 (H3K4me3) και είναι διαθέσιμοι για την έναρξη της RNA πολυμεράσης ΙΙ (RNAPII). Διατίθενται επίσης και σε επιπρόσθετες ρυθμίσεις **b**. Οι poised HCPs (ή $a\lambda\lambda$ ιώς οι HCPs που βρίσκονται σε κατάσταση αναμονής, όπως για παράδειγμα οι υποκινητές των γονιδίων που συμμετέχουν στη φάση της ανάπτυξης), είναι εμπλουτισμένοι με το συνδυασμό των H3K4me3 και H3K27me3 τροποποιήσεων. Επιτρέπουν την πρόσδεση της RNAPII αλλά τείνουν να μην προωθούν την επιμήκυνση, ούτε την παραγωγή λειτουργικού mRNA c. Οι ανενεργοί HCPs φέρουν κατασταλτικές χρωματινικές τροποποιήσεις όπως είναι η H3K27me3 και δεν είναι προσβάσιμοι στην RNAPII. Αντιθέτως, οι LCPs φαίνεται να ενεργοποιούνται επιλεκτικά (για παράδειγμα, από συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες) **d.** Οι ενεργοί LCPs είναι εμπλουτισμένοι με την H3K4me3 τροποποίηση και μεταγράφονται e. Oι poised LCPs (ή αλλιώς οι LCPs που βρίσκονται σε κατάσταση αναμονής είναι εμπλουτισμένοι με την H3K4me2 τροποποίηση και όχι με την H3K4me3 τροποποίηση f. Οι ανενεργοί LCPs στερούνται χρωματινικούς δείκτες αλλά μπορούν και μεθυλιώνονται (Zhou et al., 2011).

Σε αυτό εδώ το σημείο να κάνουμε μια αναφορά στις διακριτές κατηγορίες των ενισχυτών, οι οποίες είναι: οι ενεργοί (active), λανθάνοντες ή ενισχυτές που βρίσκονται σε κατάσταση αναμονής (poised) και ανενεργοί (repressed or inactive). Αυτή η κατηγοριοποίηση γίνεται με βάση τον τρόπο που ο κάθε ενισχυτής θα ανταποκριθεί τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή στο εκάστοτε ερεθίσμα. Η παρουσία νουκλεοσωμάτων τα οποία παρεμποδίζουν την πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων χαρακτηρίζεται εκείνη η περιοχή του γονιδιώματος η οποία σε διαφοροποιημένα κύτταρα δε θα επιτρέψει την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων. Από αυτήν απουσιάζουν οι χαρακτηριστικές ιστονικές τροποποιήσεις που χαρακτηρίζεται εκείνη, ωστόσο τα χαρακτηριστικά αυτά μπορεί να τα αποκτήσει ως απόκριση στην ιϊκή μόλυνση.

Στις κλειστές περιοχές της χρωματίνης που χαρακτηρίζονται από την παρουσία ιστονικών τροποποιήσεων, όπως η τριμεθυλίωση της λυσίνης K27 στην ιστόνη H3

56

(H3K27me3) βρίσκονται οι ανενεργοί ενισχυτές. Αντιθέτως, οι ενισχυτές που βρίσκονται σε κατάσταση αναμονής (poised) χαρακτηρίζονται από τροποποιήσεις όπως η μονομεθυλίωση της λυσίνης K4 της ιστόνης H3 (H3K4me1) (Engel *et* al., 2016). Η H3K27ac είναι ένας δείκτης που σχετίζεται με ενεργούς ενισχυτές και αποκτάται μόνο εάν προϋπάρχει η τροποποίηση H3K4me1.

Προφίλ τροποποίησης ιστονών

Μετά την επεξήγηση των καλά χαρακτηρισμένων και μελετημένων ιστονικών τροποποιήσεων της μεθυλίωσης και της ακετυλίωσης θα περιγραφούν τα χαρακτηριστικά των ιστονικών τροποποιήσεων που εξετάσαμε στην παρούσα διδακτορική διατριβή. Τα προφίλ τροποποιήσης ιστονών έχουν αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμα για την ταυτοποίηση των ενισχυτών. Οι τροποποιήσεις H3K4me1, H3K4me3, H3K27ac και H3K27me3 χρησιμοποιούνται για τον εντοποιρό αλλά και το διαχωρισμό των ενισχυτών από τους υποκινητές, καθώς και των ενισχυτών που βρίσκονται σε ενεργή κατάσταση (active) ή κατάσταση αναμονής (poised) από τους αντιστοιχους ανενεργούς (repressed or inactive) (Calo and Wysocka 2013).

Συγκεκριμένα, η πρώτη ιστονική τροποποίηση που ο ρόλος της συνδέθηκε με απομακρυσμένες ρυθμιστικές περιοχές είναι η μονομεθυλίωση της λυσίνης 4 της ιστόνης 3 (H3K4me1) (Zaret and Carroll 2011). Η τροποποίηση αυτή καταλύεται από το μεταγραφικό συνενεργοποιητή MLL3/4 και συναντάται όχι μόνο στους ενεργούς ενισχυτές, αλλά και σε αυτούς που βρίσκονται σε κατάσταση αναμονής (poised) πριν την ενεργοποίησή τους και εξακολουθεί να υπάρχει στους ενισχυτές για εκτεταμένο χρονικό διάστημα ακόμα και μετά την απομάκρυνση/αποσύνδεση των μεταγραφικών παραγόντων (Bonn *et al.*, 2012). Να σημειωθεί ότι παρ' όλο που σχετίζεται με την ενεργότητα των ενισχυτών, η H3K4me1 δεν είναι άμεσα συνδεδεμένη με αυτήν αλλά κυρίως σχετίζεται με τη δυνατότητα του ενισχυτή να ενεργοποιηθεί μετά από επιπλέον γεγονότα, όπως είναι η ολίσθηση του νουκλεοσώματος ή/και η πρόσδεση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων (Zaret and Carroll 2011). Αντιθέτως, η τριμεθυλίωση της λυσίνης 4 της ιστόνης 3 (H3K4me3) σχετίζεται με τη μεταγραφική ενεργοποίηση κοντινών γονιδίων, σχετίζεται δηλαδή με τη θέση έναρξης της μεταγραφής πολλών γονιδίων και είναι παρούσα στους ενεργούς υποκινητές (Zhou *et al.,* 2011). Η ιστονική τροποποίηση H3K4me3 αποτελεί τον επικρατέστερο δείκτη ενεργών υποκινητών αλλά ανιχνεύσιμα επίπεδα αυτής της τροποποίησης παρατηρούνται επίσης και σε ενεργούς ενισχυτές στους οποίους προσδένεται η RNA πολυμεράση II (Bonn, Zinzen *et al.,* 2012; Dao *et al.,* 2017).

Οι τροποποιήσεις της τριμεθυλίωσης της λυσίνης 9 και της λυσίνης 27 της ιστόνης 3 (H3K9me3, H3K27me3) σχετίζονται με την εμφάνιση ετεροχρωματίνης επομένως απενεργοποιούν τα κοντινά τους γονίδια. Η H3K27me3 είναι απαραίτητη για τη μεταγραφική αποσιώπηση γονιδίων, ενώ η ακετυλίωση στο ίδιο κατάλοιπο φαίνεται ότι σχετίζεται με πολλά ενεργά γονίδια (Tie *et* al., 2009).

Η παρουσία της ιστονικής τροποποίησης **H3K27ac** διαχωρίζει τους ενεργούς ενισχυτές και αυτούς που είναι έτοιμοι για ενεργοποίηση (poised for activation) από τους ανενεργούς (repressed or inactive). Η τροποποίηση αυτή μπορεί να εισαχθεί τόσο από το ένζυμο p300 (ακετυλοτρανσφεράση), όσο και από το συγγενές του CBP (Creyghton *et al.*, 2010; Bonn *et al.*, 2012). Ο παράγοντας p300 βρίσκεται σε όλους τους ενεργούς ενισχυτές αλλά και στους υποκινητές των γονιδίων και λειτουργεί ως μεταγραφικός συνενεργοποιητής. Να σημειωθεί επίσης ότι και η H3K27ac αποτελεί χαρακτηριστικό δείκτη των ενεργών ρυθμιστικών περιοχών (Visel *et al.*, 2009; Weake and Workman 2010).

Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ουρών των πυρηνικών ιστονών είναι πλέον γνωστό ότι εμφανίζονται σε συγκεκριμένες φάσεις της χρωματίνης. Οι τροποποιήσεις αυτές μπορούν να επηρεάσουν την τάση σύνδεσης μεταξύ ιστονών και του DNA, μειώνοντας ή αυξάνοντας τη μεταξύ τους σχέση. Αποτελούν χαρακτηριστικούς δείκτες ενεργών ρυθμιστικών στοιχείων καθώς μπορούν και επηρεάζουν την έκφρασή τους (Agalioti *et al.,* 2002; Agelopoulos *et al.,* 2012). Μια σειρά ποικίλων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων μπορεί είτε να προστεθεί είτε να

τροποποιητές (modifiers) (Zhang *et al.*, 2003). Η ακετυλίωση και η μεθυλίωση των λυσινών είναι οι δυο πιο καλά χαρακτηρισμένες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που βρίσκονται στα αμινοξέα των ιστονών και παίζουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση της προσβασιμότητας των μορίων σε κάποια σημεία της χρωματίνης, διευκολύνοντας έτσι τις διαδικασίες της αντιγραφής και της μεταγραφής (Calo *et al.*, 2013).

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ΙΙ

ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

Ο ρόλος της ανάπτυξης της αλληλούχησης ευρείας κλίμακας νέας γενιάς, Next Generation Sequencing (NGS)

Η αποκρυπτογράφηση των μηχανισμών που καθορίζουν τη λειτουργία του γονιδιώματος βασίζεται στη γνώση της αλληλουχίας του DNA. Αλληλούχηση είναι η διαδικασία με την οποία μπορεί και προσδιορίζεται η ακριβής σειρά των νουκλεοτιδίων ενός μορίου DNA και επομένως μπορούν να αποκρυπτογραφηθούν αλληλουχίες πολλαπλών μορίων DNA ταυτοχρόνως και με πολύ μεγάλη ακρίβεια.

Η ραγδαία εξέλιξη και ανάπτυξη της αλληλούχησης ευρείας κλίμακας νέας γενιάς που σημειώνεται τα τελευταία χρόνια, οδήγησε με τη σειρά της στην ανάπτυξη ενός νέου τομέα της επιστήμης που ονομάζεται **γονιδιωματική (Genomics**). Με τη γονιδιωματική μπορεί να προσδιοριστεί η αλληλουχία ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος σε μόλις μία μέρα, σε αντίθεση με παράδειγμα την αλληλούχηση κατά Sanger και άλλων μεθόδων αλληλούχησης, στις οποίες η αποκρυπτογράφηση μιας και μόνο αλληλουχίας απαιτούσε ένα πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα (Behjati and Tarpey 2013). Η εξέλιξη και η πρόοδος του τομέα της αλληλούχησης ευρείας κλίμακας νέας γενιάς του γονιδιώματος καθιστά δυνατή την ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος τόσο σε επίπεδο κυτταρικών πληθυσμών όσο και σε μοναδικά κύτταρα (Reuter *et* al., 2015).

Η αλληλούχηση ευρείας κλίμακας νέας γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS), περιγράφει έναν αριθμό νέων τεχνολογιών αλληλούχησης με κύριο στόχο τον

προσδιορισμό του DNA. Οι ιστονικές τροποποιήσεις, οι θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων καθώς και τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων μπορούν να ανιχνευτούν αποτελεσματικά από τις αναλύσεις ευρείας κλίμακας νέας γενιάς. Η γνώση που προσφέρει είναι πολύτιμη και οι χρήσεις της στην κλινική πράξη εξίσου σημαντικές διότι μπορεί να γίνει νέος προσδιορισμός νέων μεταλλάξεων σε γονίδια που συσχετίζονται με την εμφάνιση ποικίλων ασθενειών ή που μπορεί να ακριβέστερων προγνώσεων και διαγνώσεων καθώς και η ανάπτυξη της εξατομικευμένης μελέτης ασθενειών.

Η σπουδαιότητα των NGS τεχνολογιών είναι πλέον αποδεδειγμένη και μπορεί και προσφέρει απαντήσεις σε βασικά βιολογικά ερωτήματα. Η πλατφόρμες αλληλούχησης αλλά και οι αλγόριθμοι της ανάλυσης των δεδομένων βελτιώνονται ολοένα και περισσότερο και προσφέρουν τη δυνατότητα για μία σε βάθος αλληλούχηση και ανίχνευση των θέσεων πρόσδεσης που μέχρι σήμερα δεν ήταν εφικτές. Οι νέοι αλγόριθμοι θα διευκολύνουν περαιτέρω το συνδυασμό δεδομένων από διαφορετικές, νέες τεχνολογίες αλληλούχησης, με τελικό σκοπό το συσχετισμό της γονιδιακής έκφρασης, των ιστονικών τροποποιήσεων, των αλληλεπιδράσεων μεταξύ απομακρυσμένων ρυθμιστικών περιοχών καθώς και τη δημιουργία διαχρωμοσωμικών δικτύων γονιδιακής ρύθμισης. Είναι πλέον λοιπόν αποδεδειγμένη η συνεισφορά των NGS τεχνολογιών στην απάντηση βασικών βιολογικών ερωτημάτων.

Η ανάπτυξη των νέων τεχνολογιών της γονιδιωματικής που επικεντρώνονται στην αλληλούχηση DNA ευρείας κλίμακας νέας γενιάς, επιτρέπει πλέον τον ολιστικό χαρακτηρισμό των ενισχυτών και δίνει απαντήσεις σε σημαντικά ερωτήματα τα οποία παραμένουν ασαφή για πολλά χρόνια όπως: **α**) Πώς είναι δυνατόν οι ενισχυτές που εδράζονται χιλιάδες βάσεις μακρυά από τα γονίδια στόχους να αλληλεπιδρούν με αυτά; **β**) Υπάρχουν κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ ενισχυτών που ελέγχουν τα γονίδια τα οποία συν-εκφράζονται και συν-ρυθμίζονται? **γ**) Έχουν οι κυτταρικές

αποκρίσεις σχέση με συγκεκριμένες περιοχές του ρυθμιστικού τμήματος του γονιδιώματος;

Ελληνικό Κέντρο Γονιδιωματικής

Το Ελληνικό Κέντρο Γονιδιωματικής (Greek Genome Centre) εδράζει τα τελευταία 4 χρόνια στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών. Το κέντρο είναι το πρώτο και μοναδικό μέχρι στιγμής στην Ελλάδα που μας δίνει τη δυνατότητα μελέτης της δομής και της λειτουργίας όλων των γονιδιωμάτων των οργανισμών. Οι υπηρεσίες τόσο σε επίπεδο πληθυσμών όσο και σε επίπεδο single-cell αναλύονται με εκπληκτική ακρίβεια και ποιότητα για τους διάφορους τύπους της γονιδιωματικής. Το υψηλής απόδοσης υπολογιστικό κέντρο με το πανίσχυρο σύμπλεγμα υπολογιστών που διαθέτει (cluster) μπορεί σε λιγότερο από μια ώρα να επεξεργάζεται τα δεδομένα περίπου 1 εκατομμυρίου αλληλουχιών DNA. Το Ελληνικό Κέντρο Γονιδιωματικής και με βαθιά γνώση της βιολογίας, επιστημόνων οι οποίοι μπορούν να επεξεργαστούν και να αναλύσουν τον τεράστιο αυτό όγκο δεδομένων. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή όλες οι διαδικασίες των πειραμάτων αλληλούχησης νέας γενιάς πραγματοποιήθηκαν στο πλήρως εξοπλισμένο Ελληνικό Κέντρο Γονιδιωματικής.

Το Κέντρο είναι εξοπλισμένο με μηχανήματα τελευταίας τεχνολογίας και απαρτίζεται από 3 πλατφόρμες NGS-αλληλούχησης ευρείας κλίμακας νέας γενιάς της Illumina (NovaSeq, NextSeq και MiSeq), σύστημα MiSeq για μικρότερης κλίμακας έργα, NextSeq 500 για μεσαίας έως μεγάλης κλίμακας έργα και ένα NovaSeq 6000 για έργα μεγάλης κλίμακας. Για ερευνητικά πειράματα και αναλύσεις που αφορούν σε επίπεδο κυττάρου χρησιμοποιείται το σύστημα Fluidigm C1. Προκειμένου να υποστηριχθούν οι μελέτες αλληλούχησης, το GGC είναι εξοπλισμένο με ρομποτικά συστήματα υψηλών δυνατοτήτων για εξαγωγή DNA και RNA και προετοιμασία κατασκευής NGS βιβλιοθηκών (QIA Symphony, Primadiag Acsiangs) που επιτρέπουν την αυτοματοποίηση καθαρισμού DNA βιβλιοθηκών (BluePippin), την τυποποίηση και την υψηλή απόδοση από το αρχικό υλικό που εισέρχεται στο εργαστήριο μέχρι τα αποτελέσματα της αλληλούχησης. Ο έλεγχος ποιότητας και ποσότητας του DNA/RNA πραγματοποιείται από τα συστήματα Agilent Bioanalyzer και ποσοτικοποιείται με τις συσκευές Qubit 4.0 και Nanodrop (Εικόνα 19).



Εικόνα 19. Σχηματική απεικόνιση όλων των μηχανημάτων που εξοπλίζουν το Ελληνικό Κέντρο Γονιδιωματικής (Greek Genome Centre)

Γονιδιωματικές τεχνικές ευρείας κλίμακας νέας γενιάς για την πρόβλεψη ενισχυτών

Η ανάγκη της ολιστικής προσέγγισης του φαινομένου των ιϊκών μολύνσεων επιτάσσει το σχεδιασμό πειραματικής στρατηγικής, η οποία στοχεύει στην ταυτόχρονη μελέτη των γεγονότων που συμβαίνουν σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος και του μεταγραφώματος στη διάρκεια της αντι-ιϊκής απόκρισης. Η παρούσα διδακτορική διατριβή μελέτη περιλαμβάνει μεθόδους μοριακής βιολογίας, γονιδιωματικής (genomics), βιοχημείας και υπολογιστικής βιολογίας (bioinformatics) προκειμένου να αποκρυπτογραφηθεί η μοριακή λογική που διέπει την αντι-ιϊκή απόκριση μέσω της μαζικής σύνθεσης και αξιολόγησης της ενεργότητας των πιθανών ρυθμιστικών αλληλουχιών σε πληθυσμούς ανθρώπινων κυττάρων κατά τη διάρκεια των ιϊκών μολύνσεων. Η ερευνητική μας μελέτη στηρίζεται στη συνδυαστική χρήση των μεθόδων RNA-seq (Mortazavi et al., 2008), ChIP-seq (Chromatin Immunoprecipitation sequencing) (Agelopoulos and Thanos 2006; Ford et al., 2014), FAIRE-seq (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements sequencing) (Simon et al., 2012; Simon et al., 2013), DNase I-seq (DNase I Hypersensitive Sites sequencing, DHS) (John et al., 2013) Kat Starr-seq (Self-Transcribing Active **Regulatory Region sequencing**) (Arnold *et al.*, 2013) σε συνδυασμό με αλληλούχηση ευρείας κλίμακας νέας γενιάς (Εικόνα 20). Αυτές οι γονιδιωματικές στρατηγικές σε συνδυασμό με τεχνικές της βιοπληροφορικής για την ανάλυση των δεδομένων αλληλούχησης, εφαρμόζονται για τη μελέτη των χαρακτηριστικών των ενισχυτών σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος και θα μας οδηγήσουν στη δημιουργία ενός καταλόγου πιθανών ενισχυτών διαφόρων κυτταρικών τύπων μετά από ποικίλα περιβαλλοντικά ερεθίσματα.



Εικόνα 20. Σχηματική απεικόνιση ΟΛΩΝ των λειτουργικών τεχνικών της γονιδιωματικής με στόχο τον εντοπισμό διαφορετικών τύπων λειτουργικών στοιχείων σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος (Modified Image from ENCODE Project Consortium)

Ο συνδυασμός όλων των παραπάνω μας οδήγησε στη δημιουργία του ΑΤΛΑΝΤΑ των ιϊκών μολύνσεων (Human-ATLAS-of-Virus-Infection) (Agelopoulos *et* al., 2020, in preparation for submission), ο οποίος μας παρέχει τη δυνατότητα να παρακολουθήσουμε σε μεγάλη ανάλυση τα δυναμικά μοριακά γεγονότα που συμβαίνουν ταυτόχρονα κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος. Επιπλέον, αποκτήσαμε πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με το Human-Anti-Viral-Regulome (Agelopoulos *et* al., 2020, in preparation for submission) και τη συσχέτιση των σύνθετων ενισχυτών του στα συγγενή γονίδιαστόχους του. Επιπροσθέτως, αυτή η μελέτη μας βοηθάει στην καλύτερη κατανόηση και ταυτοποίηση κοινών και κυτταρο-ειδικών προγραμμάτων αντι-ιϊκής γονιδιακής έκφρασης, θεμελιώδους σημασίας για την ακριβή διαμόρφωση της αντι-ιϊκής κυτταρικής απόκρισης. Βασικό χαρακτηριστικό της συγκεκριμένης έρευνας είναι η σύγκριση των ρυθμιστικών προγραμμάτων της γονιδιακής έκφρασης μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών τύπων που επιτυγχάνεται με την ταυτόχρονη μελέτη των επιθηλιακών κυττάρων HeLa και των Β-λεμφοκυττάρων Namalwa. Πραγματοποιήθηκε μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των δύο αυτών κυτταρικών σειρών για να έχουμε μια συγκριτική προσέγγιση της δομής της χρωματίνης προκειμένου να εντοπιστούν οι όποιες ομοιότητες και διαφορές μεταξύ αυτών των κυτταρικών σειρών και να ταυτοποιηθούν τα γονίδια που παρουσιάζουν παρόμοια έκφραση και επομένως είναι πιθανόν να συμμετέχουν σε παρόμοιους λειτουργικούς μηχανισμούς. Η ενεργοποίηση γονιδίων σε μια μόνο εκ των δυο κυτταρικών σειρών θα μας οδηγήσει στο συμπεράσματα ότι τα γονίδια ακολουθούν διαφορετική συμπεριφορά, διαφορετική ενεργοποίηση λειτουργικών μηχανισμών και ως εκ τούτου ξεχωριστό γενετικό προφίλ.

Συνοπτικά, με το συνδυασμό όλων των παραπάνω τεχνικών της γονιδιωματικής, καταφέραμε να δημιουργήσουμε τον ΑΤΛΑΝΤΑ των ιϊκών μολύνσεων (Human-ATLAS-of-Virus-Infection) και των ρυθμιστικών περιοχών του DNA τα οποία είναι υπεύθυνα για την ολοκλήρωση της αντι-ιϊκής απόκρισης και με αυτό τον τρόπο αποκαλύπτεται σταδιακά το σύνολο των ενισχυτών που συντονίζουν την έκφραση των αντι-ϊκών γονιδίων στα ανθρώπινα κύτταρα.

Είμαστε σε θέση να περιγράψουμε για πρώτη φορά το μηχανισμό με βάση τον οποίο το ανθρώπινο γονιδίωμα ανιχνεύει τη μόλυνση από τους ιούς και στρατολογεί/συντονίζει τις απαραίτητες περιοχές του που περιλαμβάνουν ρυθμιστικές και κωδικές αλληλουχίες, οι οποίες συνεργάζονται προκειμένου να επιτευχθεί ένα αποτελεσματικό πρότυπο γονιδιακής επαγωγής που θα εξασφαλίσει άρτια αντι-ιϊκή κυτταρική λειτουργία.

Η προσέγγιση αυτής της διατριβής θα μπορούσε να αποτελέσει τη βάση και τον οδηγό για τη μελέτη ανοσολογικών αποκρίσεων έναντι συγκεκριμένων ιών που απειλούν τη δημόσια υγεία σε μεγάλη κλίμακα. Με πιο πρόσφατο παράδειγμα τον ιό SARS-CoV-2 και την επακόλουθη ανάπτυξη της πανδημίας COVID-19. Καταδεικνύεται

65

ολοφάνερα η επιτακτική ανάγκη της καλύτερης κατανόησης της ανοσολογικής απόκρισης και των εμπλεκομένων μηχανισμών, όχι μόνο σε επίπεδο μελέτης συγκεκριμένων γονιδίων και πρωτεϊνών, αλλά σε επίπεδο ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος και της αλληλεπίδρασής του με τον ιό εισβολέα. Επιπλέον, η γενετική ποικιλομορφία του ανθρώπινου γονιδιώματος αλλά και ο ρυθμός μεταλλαγής των ιών, προσθέτει ένα επιπλέον επίπεδο πολυπλοκότητας και σημαντικότητας στη μελέτη της ιϊκής απόκρισης, η οποία είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με αυτού του είδους την ποικιλομορφία.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η μελέτη των ρυθμιστικών περιοχών που καθορίζουν τη γονιδιακή έκφραση μετά από ιϊκή μόλυνση σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος. Επιδιώκουμε την ολοκλήρωση μιας ολιστικής στρατηγικής για την αποσαφήνιση του μηχανισμού μέσω του οποίου τα ανθρώπινα κύτταρα απαντούν ενάντια στους ιούς προκειμένου να αποτρέψουν τις δυσλειτουργίες που έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση παθολογικών φαινοτύπων. Οι κυτταρικές αποκρίσεις σε ιούς και άλλα ερεθίσματα που προκαλούν ανοσολογικές αποκρίσεις έχουν μελετηθεί στο επίπεδο του γονιδιώματος σε διάφορα συστήματα αλλά με τρόπο αποσπασματικό που δεν αξιοποιεί το σύνολο των διαθέσιμων τεχνολογικών καινοτομιών. Η μελέτη αυτή συνδυάζει μεταγραφικά προφίλ, τη μελέτη της κατανομής των μεταγραφικών παραγόντων σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος, καθώς και την ταυτοποίηση και επιβεβαίωση της ενεργότητας των ενισχυτών σε διάφορους κυτταρικούς τύπους πριν αλλά και μετά την ιϊκή μόλυνση.

Βασικό χαρακτηριστικό της συγκεκριμένης έρευνας αποτελεί η σύγκριση των ρυθμιστικών προγραμμάτων γονιδιακής έκφρασης μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών τύπων που επιτυγχάνεται με την ταυτόχρονη μελέτη δύο διαφορετικών κυτταρικών τύπων: των επιθηλιακών κυττάρων HeLa και των B λεμφοκυττάρων Namalwa. Η παραπάνω συγκριτική μελέτη πραγματοποιείται σε διαφορετικά χρονικά σημεία κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης με ιό Sendai. Συγκεκριμένα τα χρονικά σημεία που επιλέγονται είναι αυτά των 3 ωρών μετά τη μόλυνση των κυττάρων, για τη μελέτη των πρώιμων αλλαγών της κυτταρικής απόκρισης, καθώς και των 6 ωρών μετά την ιϊκή μόλυνση, όπου η ανοσολογική απόκριση βρίσκεται σε πλήρη εξέλιξη.

Για την επίτευξη αυτού του στόχου χρησιμοποιήθηκε ένας πρωτοποριακός συνδυασμός από τις πλέον σύγχρονες μεθόδους της γονιδιωματικής. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων κατά την εξέλιξη της κυτταρικής αντι-ιϊκής απόκρισης με τη μέθοδο **RNA-seq** και οι αλλαγές στα επίπεδα προσβασιμότητας της χρωματίνης με τις συνδυαστικές τεχνικές **DNaseI-seq** (DNase I Hypersensitive Sites, DHS) και **FAIRE-seq** (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory elements). Η μέθοδος ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης, **Chip-seq** (Chromatin Immunoprecipitation) χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση και το χαρακτηρισμό ενισχυτών έναντι ιστονικών τροποποιήσεων οι οποίες είναι μεταγραφικών παραγόντων και συνενεργοποιητών, όπως είναι οι NF-κB, IRF3, IRF7, CBP, RNA Pol II και Med1.

Η τελική επιβεβαίωση όμως της λειτουργικότητας των ρυθμιστικών στοιχείων προήλθε από την εφαρμογή της μεθόδου **Starr-seq** (Self-Transcribing Active Regulatory Region). Πρόκειται για μια μέθοδο η οποία μας επιτρέπει να ελέγξουμε την in vivo δραστηριότητα των αλληλουχιών του γονιδιώματος που φέρουν τα δομικά στοιχεία τα οποία είναι χαρακτηριστικά των ενισχυτών και μπορεί και μας αποδεικνύει τη λειτουργικότητα ενός οποιουδήποτε γνωστού ή άγνωστου ενισχυτή. Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των ενισχυτών να προκαλούν ενεργοποίηση της μεταγραφής ακόμα και όταν βρίσκονται σε απόσταση αρκετών χιλιάδων βάσεων κάτωθεν του υποκινητή και σε πλασμιδιακές βιβλιοθήκες που περιλαμβάνουν εκατομμύρια ανασυνδυασμένους κλώνους στους οποίους τα προς εξέταση ρυθμιστικά στοιχεία βρίσκονται σε σύντηξη με GFP-γονίδιο. Με την τεχνική αυτή ελέγξαμε ταυτόχρονα εκατομμύρια τμήματα DNA για πιθανή δράση ενισχυτή. Το απομονωμένο DNA που προκύπτει από την εφαρμογή των τεχνικών Faire-seq, DNaseI-seq και Chip-seq κλωνοποιήθηκε στο φορέα Starr-seq και με αυτό τον τρόπο με τα Chip-STARR-seq πειράματα πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονος έλεγχος όλων των πιθανών ενισχυτών για τη μεταβολή της ενεργότητάς τους για τις χιλιάδες θέσεις επαγόμενης πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων IRF3 και p65. Οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες έχουν χαρακτηριστεί ως κύριοι ρυθμιστές της αντι-ιϊκών γονιδίων κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης.

Όλες οι παραπάνω τεχνικές της γονιδιωματικής έχουν ως κοινή μέθοδο ανάλυσης την τεχνολογία αλληλούχησης ευρείας κλίμακας νέας γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS) στο Ελληνικό Κέντρο Γονιδιωματικής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (Greek Genome Center). Μέσω της εφαρμογής όλων αυτών των μεθόδων της γονιδιωματικής (genomics) επιδιώκουμε την ταυτοποίηση, την κατηγοριοποίηση καθώς και την επιβεβαίωση της ενεργότητας όλων των ρυθμιστικών στοιχείων του γονιδιώματος αλλά και τη συσχέτιση κάθε

Είμαστε σε θέση να περιγράψουμε για πρώτη φορά το μηχανισμό με βάση τον οποίο το ανθρώπινο γονιδίωμα ανιχνεύει τη μόλυνση από τους ιούς και στρατολογείσυντονίζει τις απαραίτητες περιοχές που περιλαμβάνουν ρυθμιστικές και κωδικές αλληλουχίες, οι οποίες συνεργάζονται προκειμένου να επιτευχθεί ένα αποτελεσματικό πρότυπο γονιδιακής επαγωγής που εξασφαλίζει μια άρτια αντι-ϊική κυτταρική λειτουργία. Ο λεπτομερής χαρακτηρισμός της αντι-ϊικής απόκρισης σε

69

επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος μας δίνει πολύτιμες πληροφορίες για τη ρυθμιστική λογική των ενισχυτών που ρυθμίζουν την ανοσολογική απόκριση, όπως για παράδειγμα για την ταυτότητα των απαραίτητων μοτίβων μεταγραφικών παραγόντων, τη πιθανή μεταξύ τους συνεργατικότητα και την τοπολογία των μοτίβων πάνω στη γραμμική αλληλουχία του DNA. Ο χαρακτηρισμός αυτός μας οδήγησε στον όρο **ΑΤΛΑΝΤΑ των ιϊκών μολύνσεων (Human-ATLAS-of-Virus-Infection)**, ο οποίος μας παρέχει τη δυνατότητα παρακολούθησης υψηλής ανάλυσης της κατάστασης της δυναμικής των μοριακών γενονότων που συμβαίνουν ταυτόχρονα κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος και καθοδηγεί την ανάπτυξη κοινών και κυτταρο-ειδικών προγραμμάτων αντι-ιϊκής γονιδιακής έκφρασης, θεμελιώδους σημασίας για την ακριβή διαμόρφωση της αντι-ιϊκής κυτταρικής απόκρισης. Με αυτό τον τρόπο, στοχεύσαμε στο να υπογραμμίσουμε τα πλεονεκτήματα που παρέχει η "μοριακήψηφιακή εγκυκλοπαίδεια" στην κατανόηση του μηχανισμού της ανθρώπινης αντιιϊκής κυτταρικής απόκρισης.

Τέλος, επικεντρωθήκαμε στο μοτίβο κατανομής των θέσεων πρόσδεσης του παράγοντα IRF3 σε IRF-STARR-Active στοιχεία, τα οποία αντανακλούν ένα αυξημένο δυναμικό αυτών των στοιχείων να φιλοξενούν πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης για τον IRF3 και παρατηρήσαμε ότι ένα ποσοστό του λειτουργικού IRF3 του μηκωδικοποιημένου γονιδιώματος αποτελείται από IRF3 μοτίβα. Προχωρήσαμε προς μια συντηρητική στρατηγική κατάλληλη για να παρέχει μια εις βάθος κατανόηση για την εξελικτική προείλευση του λειτουργικού τμήματος των Repetitive IRF. Αυτή η συνδυαστική προσέγγιση ορίστηκε ως **Φυλογονιδιωματικό αποτύπωμα ανάλυσης** (Phylogenomics footprinting), η οποία ενσωματώνει αποτελέσματα που προέρχονται από την ανάλυση του συνόλων των NGS δεδομένων με το γονιδίωμα διαφορετικών οργανισμών. Ο βαθμός συντήρησης και η ποσότητα των IRF3 επαναλήψεων στο γονιδίωμα διάφορων οργανισμών θα μπορούσε να είναι χαρακτηριστικός της σημαντικότητάς τους, όπως άλλωστε παρατηρείται σε περιοχές του γονιδιώματος που διαδραματίζουν ζωτικής σημασίας λειτουργίες και είναι ιδιαίτερα συντηρημένες σε διάφορα είδη. Με αυτόν τον τρόπο αποκαλύπτεται ο βαθμός αλλά και το πρότυπο της συντήρησης των ιϊκά επαγόμενων ενισχυτών σε ποικίλους οργανισμούς στη πορεία της εξέλιξης, γεγονός που μας προσδίδει σημαντικά στοιχεία για την εξελικτική τους προέλευση υπογραμμίζοντας την αρχαία προέλευσή τους.

Με βάση τα παραπάνω, βρισκόμαστε σε θέση να περιγράψουμε για πρώτη φορά το μηχανισμό με βάση τον οποίο το ανθρώπινο γονιδίωμα αντιλαμβάνεται την ιϊκή μόλυνση και στρατολογεί-συντονίζει τις απαραίτητες περιοχές που περιλαμβάνουν ρυθμιστικές και κωδικές αλληλουχίες που συνεργάζονται προκειμένου να επιτύχουν ένα αποτελεσματικό πρότυπο γονιδιακής επαγωγής που θα εξασφαλίσει άρτια αντιιϊκή κυτταρική λειτουργία.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Συνθήκες καλλιέργειας ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών

Τα HeLa κύτταρα (ATCC, American Type Culture Collection, CCL-2) είναι επιθηλιακά κύτταρα καρκίνου της μήτρας, μετασχηματισμένα από τον ιό HPV18 (Human Papilloma Virus 18). Το θρεπτικό μέσο των HeLa είναι το DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), στο οποίο προστίθεται ορός από νεογνό βοός FBS (Fetal Bovine Serum) σε τελική συγκέντρωση 10% καθώς και μείγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης (Pen/Strep) σε τελική συγκέντρωση 1%. Η επώαση των κυττάρων γίνεται στους 37 °C σε ειδικό επωαστήρα, σε ατμόσφαιρα 95% αέρα και 5% CO2.

Τα **Namalwa** (ATCC, CRL-1432) προέρχονται από ανθρώπινα Β-λεμφοκύτταρα ασθενούς με λέμφωμα Burkitt και είναι κύτταρα μετασχηματισμένα με τον ιό EBV (Epstein Bar Virus). Είναι αιωρούμενα κύτταρα, όπως και όλα τα προερχόμενα από το αίμα, δηλαδή αναπτύσσονται σε εναιώρηση στο θρεπτικό τους μέσο. Το θρεπτικό μέσο των Namalwa είναι το RPMI-1640, στο οποίο προστίθεται ορός από νεογνό βοός FBS σε τελική συγκέντρωση 10%, και μείγμα αντιβιοτικών πενικιλίνηςστρεπτομυκίνης (Pen/Strep) σε τελική συγκέντρωση 1%. Η επώαση τους γίνεται στους 37 °C, σε ατμόσφαιρα 95% αέρα και 5% CO₂, και η ανανέωση τους γίνεται κάθε 3-4 μέρες.

Τα κύτταρα ινοβλαστών NIH/3T3 (CRL-1658) καλλιεργήθηκαν σε μέσο DMEM στο οποίο προστίθεται ορός από νεογνό βοός FBS σε τελική συγκέντρωση 10%, και μείγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης (Pen/Strep) σε τελική συγκέντρωση 1%.

Γίνεται έλεγχος καθημερινά για την ανάπτυξη των κυττάρων μέσω παρατήρησης της καλλιέργειας στο μικροσκόπιο και κάθε 24 - 48 ώρες γίνεται πλύση των κυττάρων με 1X PBS (Phosphate-Buffered Saline) για την απομάκρυνση νεκρών κυττάρων καθώς και των παραπροϊόντων του κυτταρικού μεταβολισμού.

Θρεπτικό μέσο

Στα θρεπτικά μέσα Dulbecco's Modified Eagle's Medium, SIGMA και RPMI-1640, SIGMA προστίθενται τα παρακάτω συστατικά:

- Προσθήκη 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco by Life Technologies). Το
 FBS πριν χρησιμοποιηθεί πρέπει να απενεργοποιηθεί με επώαση σε
 υδατόλουτρο στους 56 °C για 30 λεπτά
- Προσθήκη 1% πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (PenStrep, Gibco by Life Technologies)

Μετά την προετοιμασία, τα θρεπτικά μέσα φυλάσσονται στους 4 °C.

Μόλυνση με ιό Sendai

Η διαμόλυνση των κυττάρων γίνεται με την προσθήκη ιού Sendai (Cantell strain, Charles Rives Laboratories - Murine Parainfluenza Virus Type 1, HPIV1) σε αναλογία 1/10 του όγκου της συνολικής υγρής καλλιέργειας μέσου (2000 HA units/ml) για 3, 6 και 9 ώρες. Η πυκνότητα της καλλιέργειας αγγίζει το 90% (confluency) κατά τη μόλυνση και γίνεται υπό άσηπτες συνθήκες.

Το **ξεπάγωμα των κυττάρων** πραγματοποιείται σε υδατόλουτρο στους 37 °C με τη βοήθεια ανάδευσης και ακολουθεί μεταφορά της καλλιέργειας σε φλάσκα ή πιάτο με τον κατάλληλο όγκο θρεπτικού μέσου. Στη συνέχεια η καλλιέργεια μεταφέρεται στον επωαστικό θάλαμο (cell incubator) σε συνθήκες 5% CO₂ στους 37 °C. Αυτά τα βήματα θα πρέπει να γίνουν γρήγορα επειδή το DMSO είναι τοξικό για τα κύτταρα και θα πρέπει να αραιωθεί άμεσα με το θρεπτικό μέσο.

Για το πάγωμα των κυττάρων γίνεται αρχικά πλύση με 1Χ PBS για να απομακρυνθούν τα νεκρά κύτταρα και τα παραπροϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού αφού πρώτα απορριφτεί το παλιό θρεπτικό μέσο. Παρασκευάζεται διάλυμα 1Χ PBS με 10% τρυψίνη (0.5% Trypsin-EDTA [10X] της Gibco) το οποίο προστίθεται στα κύτταρα τα οποία επωάζονται για 5 λεπτά στον επωαστικό θάλαμο μέχρι να ξεκολλήσουν από το υπόστρωμα. Στη συνέχεια προστίθεται DMEM για την απενεργοποίηση της τρυψίνης και ακολουθεί φυγοκέντρηση 1.200 rpm (Rpm = Revolutions per minute = περιστροφές ανά λεπτό) για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και η πελέτα των κυττάρων επαναδιαλυτοποιείται σε 900 μl Heat Inactivated FBS. Ακολουθεί προσθήκη 10% του τελικού όγκου DMSO (Dimethyl Sulfoxide for cell culture της PanReac AppliChem) στάγδην και μετά από καλή και γρήγορη ανάδευση, διότι το DMSO είναι τοξικό για τα κύτταρα σε θερμοκρασία δωματίου, το διάλυμα μοιράζεται σε ειδικά σωληνάκια του 1 mL τα οποία φυλάσσονται στους -80 °C.

Στα Namalwa παραλείπονται τα βήματα της επώασης με τρυψίνη για να ξεκολλήσουν τα κύτταρα διότι είναι αιωρούμενα κύτταρα συγκριτικά με τα HeLa που είναι προσκολλητικά.

Διαδικασία μέτρησης κυττάρων με αιματοκυτταρόμετρο

- Τοποθέτηση δείγματος από το εναιώρημα των κυττάρων (περίπου 4000-500 μL) προσεκτικά κάτω από την καλυπτρίδα και στα δύο πηγαδάκια του αιματοκυτταρόμετρου
- Ακολουθεί μέτρηση του αριθμού των κυττάρων που εντοπίζονται στα τέσσερα μεγάλα γωνιακά τετράγωνα καθώς και στο κεντρικό τετράγωνο της μίας κοιλότητας. Η μέτρηση πραγματοποιείται με 40x αντικειμενικό φακό ενώ η εστίαση με 10x ή 20x φακό
- Βάση του ακόλουθου υπολογισμού γίνεται η μέτρηση του συνολικού αριθμού των κυττάρων του δείγματος:

Συνολικός αριθμός κυττάρων = (αριθμός κυττάρων) x (αραίωση) x 10^4

Για να υπολογιστεί ο συνολικός αριθμός των κυττάρων της καλλιέργειας, ο παραπάνω αριθμός πολλαπλασιάζεται με το συνολικό όγκο των κυττάρων. Να σημειωθεί ότι ο αριθμός των κυττάρων ανά πηγάδι σε ένα 12-well πιάτο είναι περίπου 1 εκατομμύριο ενώ σε μια φλάσκα των 75 cm² υπάρχουν περίπου 30 εκατομμύρια κύτταρα.

Nucleospin Gel και PCR Clean-up

Τα επιθυμητά τμήματα του DNA απομονώνονται από το πήκτωμα αγαρόζης <u>βάση</u> του πρωτοκόλλου NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Columns for gel extraction and <u>PCR clean up της εταιρείας Macherey-Nagel.</u>

Τα τμήματα του πηκτώματος αγαρόζης τα οποία περιέχουν τις επιθυμητές ζώνες αποκόπτονται και ακολουθεί προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος NT1 σε αναλογία 2:1, ισχυρή ανάδευση για 2-3 λεπτά ώστε το πήκτωμα να διαλυθεί και επώαση στους 55 °C με ενδιάμεση ανάδευση. Τα υγρά πλέον δείγματα τοποθετούνται σε στήλες διαχωρισμού NucleoSpin Extract, ακολουθεί φυγοκέντρηση και στη συνέχεια προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα NT3 στη στήλη, το οποίο περιέχει αιθανόλη για την πραγματοποίηση πλύσης. Τέλος, πραγματοποιείται έκλουση του DNA με νερό σε νέα σωληνάκια, τα οποία αποθηκεύονται στους -20 °C.

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια βιοχημική μέθοδος που περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους ενίσχυσης για συγκεκριμένα τμήματα DNA *in vitro* και αποτελεί ένα από τα βασικά εργαλεία του τομέα της μοριακής βιολογίας με πολυάριθμες εφαρμογές σε διαγνωστικό επίπεδο για την ανάπτυξη της γονιδιακής και της βιολογικής έρευνας. Η επιτυχημένη παραγωγή χιλιάδων ή εκατομμυρίων αντιγράφων DNA πραγματοποιείται σε σύντομο χρονικό διάστημα, γεγονός που προσδίδει ένα μεγάλο πλεονέκτημα στην εφαρμογή της μεθόδου σε συνδυασμό με τον υψηλό βαθμό ευαισθησίας καθώς και την υψηλή εξειδίκευση στην ενίσχυση ακόμα και ενός μόνο μορίου DNA (Schutzbank and Stern, 1993; Billiald and Goyffon, 1995).

Για μια επιτυχημένη αντίδραση PCR απαιτείται ο σχεδιασμός συνθετικών DNA ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητές). Οι εκκινητές είναι απαραίτητοι καθώς οριοθετούν τα άκρα του τμήματος του DNA που θα ενισχυθεί και συνήθως έχουν μήκος 18-28 bp. Οι

εκκινητές παρέχουν το απαραίτητο 3'-OH άκρο που χρειάζεται η DNA πολυμεράση για την πρόσδεσή της στο DNA ώστε να μπορέσει να ξεκινήσει η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας (Billiald and Goyffon, 1995). Η DNA πολυμεράση Taq (του βακτηρίου *Thermus aquaticus*) είναι το πιο συνηθισμένο ένζυμο που χρησιμοποιείται, το όποιο συμβάλλει στην ενίσχυση του DNA. Είναι ανθεκτική στις υψηλές θερμοκρασίες που απαιτούνται στην αποδιάταξη της δίκλωνης αλυσίδας του DNA. Η DNA πολυμεράση μπορεί να αντιγράψει ένα μόριο DNA, το οποίο χρησιμοποιείται ως εκμαγείο (Kolmodin and Williams, 1997). Η βέλτιστη ενεργότητα επιμήκυνσής της είναι 75 °C -80°C αλλά συνήθως επιλέγουμε τους 72 °C διότι σε αυτή τη θερμοκρασία δεν πραγματοποιούνται πολλά λάθη (Stratagene 2007, Valasek and Repa 2005). Το ένζυμο καταλύει την προσθήκη μονονουκλεοτιδίων στο 3'άκρο των εκκινητών και επιμηκύνει και τους δύο εκκινητές προς την κατεύθυνση της αλληλουχίας-στόχου με κατεύθυνση σύνθεσης 5' \rightarrow 3'. Με αυτό τον τρόπο συντίθενται δύο νέες DNA αλυσίδες, συμπληρωματικές προς τις πρότυπες.

Η αντίδραση απαιτεί την παρουσία τεσσάρων 5'-τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (deoxyribonucleotide Triphosphates: dATP, dCTP, dGTP και dTTP) τα οποία είναι απαραίτητα δομικά στοιχεία για τη σύνθεση των νέων αλυσίδων. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση τους, τόσο αυξάνεται και η πιθανότητα εισαγωγής ενός λανθασμένου νουκλεοτιδίου. Απαιτούνται επίσης ιόντα μαγνησίου Mg²⁺ τα οποία μπορούν και σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs, διευκολύνοντας με αυτό τον τρόπο την ενσωμάτωσή τους στην αλυσίδα του DNA και ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο διατηρεί ένα σταθερό pH για τη βέλτιστη δράση της πολυμεράσης (Schutzbank and Stern, 1993; Kolmodin and Williams, 1997).

Κάθε κύκλος αποτελείται από τρία στάδια: **1**. Αποδιάταξη του DNA(**denaturation**). Το μείγμα θερμαίνεται αρχικά στους 95 °C για περίπου 1 λεπτό για να σπάσουν οι δεσμοί υδρογόνου που ενώνουν τις δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες του δίκλωνου DNA. Ως αποτέλεσμα αυτού είναι η δημιουργία δύο μονόκλωνων αλυσίδων που χρησιμεύουν ως μήτρα για τη σύνθεση νέων συμπληρωματικών αλυσίδων. **2**. Υβριδισμός των εκκινητών (**annealing**). Το στάδιο αυτό πραγματοποιείται σε χαμηλότερη θερμοκρασία, όπου εκκινητές υβριδοποιούνται οι με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο μόριο-στόχο τους. 3. Επέκταση (extension). Η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72 °C και η Taq DNA πολυμεράση επιμηκύνει τις αλληλουχίες των υβριδισμένων εκκινητών με κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$ χρησιμοποιώντας ως μήτρα τις μονόκλωνες αρχικές DNA αλυσίδες στις οποίες έχουν προσδεθεί οι εκκινητές. Με αυτό τον τρόπο γίνεται η σύνθεση δύο καινούργιων DNA αλυσίδων. Στη συνέχεια η θερμοκρασία αυξάνεται στους 95 °C για λίγα δευτερόλεπτα έτσι ώστε τα μικρά τμήματα δίκλωνου DNA, που αποτελούνται από την αρχική και τη νεοσυντιθέμενη συμπληρωματική αλυσίδα, να διαχωριστούν και πάλι. Οι μονόκλωνες αλυσίδες αποτελούν τα εκμαγεία του επόμενου γύρου σύνθεσης του DNA (Schutzbank and Stern, 1993; Billiald and Goyffon, 1995) (Εικόνα 21).



Εικόνα 21. Τα στάδια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Encyclopaedia Britannica, Inc.)

Τα παραπάνω στάδια αντιπροσωπεύουν έναν κύκλο PCR ο οποίος επαναλαμβάνεται μέχρι να επιτευχθεί επαρκής συγκέντρωση DNA. Μετά από 25-30 κύκλους, ένα μόριο DNA μπορεί να ενισχυθεί σε πάνω από ένα εκατομμύριο αντίτυπα με αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση του συνολικού αριθμού των αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου. Στο τέλος του κάθε κύκλου η ποσότητα των προϊόντων της PCR θεωρητικά διπλασιάζεται με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή δίκλωνων μορίων DNA, πιστά αντίγραφα της αλληλουχίας του DNA που περικλείεται μεταξύ των εκκινητών (Schutzbank and Stern, 1993; Seidman 2008).

PCR με Taq πολυμεράση

Η παρακάτω πειραματική διαδικασία πραγματοποιείται σύμφωνα με το πρωτόκολλο της NEB (New England Biolabs).

Αρχική προσθήκη 5 μL 10X Taq Buffer. Ακολουθεί προσθήκη 1 μL Taq (1:10 αραίωση) One Taq Hot Start DNA Polymerase καθώς και 3 μL dNTPs, 1 μL Forward εκκινητή (FW) (από stock 1 μg/μL), 1 μL Reverse (RV) εκκινητή (από stock 1 μg/μL), προσθήκη DNA και ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 50 μL. Μετά το τέλος των αντιδράσεων ακολουθεί η ανίχνευση των προϊόντων με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

PCR με KAPA HiFi πολυμεράση

Η παρακάτω πειραματική διαδικασία πραγματοποιείται σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Kapa Biosystems.

- Προσθήκη 25 μL 2X ΚΑΡΑ ΗiFi Pol
- 0.4 μL Forward (FW) εκκινητή (από stock 1 μg/μL)
- 0.4 μL Reverse (RV) εκκινητή (από stock 1 μg/μL)
- Προσθήκη DNA
- ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 50 μL

Αποδιάταξη δίκλωνου DNA στους 98 °C για 3 λεπτά αρχικά και 15 δευτερόλεπτα στην αρχή κάθε κύκλου, υβριδοποίηση εκκινητών στους 63-65 °C για 30 δευτερόλεπτα και επιμήκυνση του προϊόντος στους 72 °C για 30 δευτερόλεπτα μέχρι 1 λεπτό.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο

Η ποσοτική αλυσίδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-time quantitive PCR) είναι η διαδικασία ενίσχυσης μιας αλληλουχίας DNA με τη μέθοδο της αλυσίδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και ταυτόχρονα της ανίχνευσης του προϊόντος που παράγεται σε "πραγματικό χρόνο" και μας δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης της αντίδρασης PCR καθ' όλη τη διάρκεια της εξέλιξής της. Καθώς η ενίσχυση εξελίσσεται, σε κάθε κύκλο υπολογίζεται ο φθορισμός μέσω της χρήσης ειδικών φθορίζουσων χρωστικών που ενσωματώνονται στην αλληλουχία η οποία ενισχύεται (Arya *et al.*, 2005; Houghton and Cockerill, 2006). Με αυτό τον τρόπο, ο ποσοτικός προσδιορισμός στηρίζεται στο ότι όσο πιο μεγάλος είναι ο αριθμός των μορίων DNA ή cDNA στο αρχικό δείγμα, τόσο πιο μικρός είναι ο αριθμός των κύκλων πολλαπλασιασμού που απαιτούνται έτσι ώστε να παραχθεί επαρκής αριθμό που να ξεπεράσει το επίπεδο ανίχνευσης (Higuchi *et al.*, 1993).

Οι φάσεις της Real-time qPCR αντίδρασης

Μια Real-time qPCR αντίδραση χαρακτηρίζεται τυπικά από τρεις φάσεις, την εκθετική (exponential), τη γραμμική (linear) και τη φάση πλατώ (plateau) (Εικόνα 22). Η φάση του "θορύβου" παρατηρείται πριν από την εκθετική φάση στην οποία το σήμα του φθορισμού που ανιχνεύεται είναι αρκετά αδύναμο και αναφέρεται επίσης και ως baseline καθώς ισοδυναμεί με τον ενδογενή φθορισμό των αντιδρώντων μοριών της αντίδρασης (background fluorescent). Το σήμα όμως στη συνέχεια ξεπερνά το σήμα του baseline καθώς το προϊόν της αντίδρασης συσσωρεύεται και αρχίζει να αυξάνεται εκθετικά.

Κατά την εκθετική φάση, η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης πλησιάζει το 100% με αποτέλεσματα να πραγματοποιείται διπλασιασμός του προϊόντος της αντίδρασης καθώς όλα τα συστατικά που απαιτούνται για την PCR βρίσκονται σε περίσσεια (Houghton and Cockerill, 2006; VanGuilder *et al.*, 2008). Η σύνθεση του προϊόντος συνεχίζεται κατά την ονομαζόμενη γραμμική φάση, η ποσότητα του προϊόντος αυξάνεται αλλά η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης μειώνεται αισθητά καθώς τα αντιδραστήρια αρχίζουν να περιορίζονται. Στη φάση πλατώ, την τελική φάση, η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού. Το σημείο αυτό είναι διαφορετικό μεταξύ των δειγμάτων και είναι εξαρτώμενο από την κινητική των αντιδράσεων. Τα αντιδραστήρια έχουν καταναλωθεί σχεδόν πλήρως και οι ποσότητες των προϊόντων έχουν εξαντληθεί γι' αυτό αρχίζουν να αυτο-υβριδοποιούνται παρεμποδίζοντας την περαιτέρω ενίσχυσή τους. Αυτός είναι και ο λόγος που ο υπολογισμός της αρχικής ποσότητας του προϊόντος γίνεται σωστά κατά τη διάρκεια της ενίσχυσης του, σχεδόν στα μισά της εκθετικής φάσης (Wilhelm and Pingoud, 2003; Arya *et* al., 2005; Jozefczuk and Adjaye, 2011).



Εικόνα 22. Διαγραμματική απεικόνιση των τριών βασικών φάσεων της Real-time qPCR (VanGuilder *et al.*, 2008)

Ένα κατώφλι-σήμα φθορίζουσας χρωστικής καθορίζει σε πιο σημείο μπορούν να συγκριθούν όλα τα δείγματα. Το σημείο ανίχνευσης του σήματος φθορισμού πάνω

από το θόρυβο της αντίδρασης ορίζεται ως threshold, και ο αριθμός των κύκλων που αντιστοιχεί σε αυτό το σημείο ονομάζεται κατώφλι κύκλου (cycle threshold, Ct). Οι τιμές Ct εξαρτώνται απόλυτα από την αρχική ποσότητας του δείγματος και είναι η βάση για να μπορέσει να υπολογιστεί ο αριθμός των DNA αντιγράφων (Kubista *et* al., 2006; Jozefczuk and Adjaye, 2011). Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα της αρχικής αλληλουχίας DNA στο κάθε δείγμα τόσο νωρίτερα θα εμφανιστεί η τιμή Ct για κάθε δείγμα, δηλαδή τόσο πιο γρήγορα θα διασχίσει η καμπύλη το όριο threshold. Άρα οι τιμές Ct σχετίζονται με την αρχική συγκέντρωση της αλληλουχίας DNA. Για αυτό το λόγο το threshold ορίζεται σε ένα σημείο όπου όλα τα υπό μελέτη δείγματα έχουν τον ίδιο ρυθμό αύξησης στην ένταση φθορισμού και παράλληλα βρίσκονται στην εκθετική φάση.

Στην αντίδραση PCR σε πραγματικό χρόνο αποκλείεται η ανάγκη για ηλεκτροφόρηση του προϊόντος καθώς η αντίδραση αυτή καταλύεται σε έναν τελευταίας τεχνολογίας θερμοκυκλοποιητή (thermocycler). Ο θερμοκυκλοποιητής επιτρέπει την ταυτόχρονη ενίσχυση και ανίχνευση του προϊόντος,. Μειώνονται με αυτό τον τρόπο τα επιμέρους στάδια επεξεργασίας και κατά συνέπεια και οι πιθανότητες επιμολύνσεων και πειραματικών σφαλμάτων (VanGuilder *et al.,* 2008). Το ευρύ αλλά και δυναμικό φάσμα ανίχνευσης κάνει πιο εύκολη την ανίχνευση και την αποφυγή μίας μη-ειδικής ενίσχυσης (Schmittgen *et al.,* 2000; Jozefczuk and Adjaye, 2011).

Για την αντίδραση PCR σε πραγματικό χρόνο πραγματοποιείται ανάμειξη των παρακάτω συστατικών:

- 10 µL 2X SYBR Green Mix
- 1 μL Forward (FW) εκκινητή
- 1 μL Reverse (RV) εκκινητή
- Προσθήκη επιθυμητής ποσότητας DNA
- Προσθήκη νερού μέχρι τελικό όγκο 20 μL

Οι συνθήκες ενίσχυσης του επιθυμητού τμήματος μέσω αντίδρασης PCR σε πραγματικό χρόνο είναι:

- Αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA: 95 °C για 3 λεπτά
- Αποδιάταξη στην αρχή κάθε κύκλου: 95 °C για 15-30 δευτερόλεπτα
- Υβριδοποίηση εκκινητών: 64 °C (ή σε διαφορετική θερμοκρασία ανάλογα με τον εκκινητή) για 30-45 δευτερόλεπτα
- Επιμήκυνση: 64 °C για 30-45 δευτερόλεπτα

Αντίδραση DNA δεσμάσης

Η μέθοδος του ανασυνδυασμού (Recombination reaction) είναι μια διαδικασία που μας δίνει τη δυνατότητα ένωσης δύο τμημάτων DNA προς την κατασκευή ενός τελικού μέσω του ενζύμου λιγάσης. Η μέθοδος αυτή είναι χρήσιμη κυρίως στην ένθεση ενός επιθυμητού τμήματος δίκλωνου DNA σε ένα πλασμίδιο που έχει υποστεί πέψη με περιοριστικά ένζυμα ειδικότερα κατά τη δημιουργία βιβλιοθηκών πολλαπλών κλώνων.

Πειραματική διαδικασία

Μείγμα για αντίδραση ανασυνδυασμού, $V_{\rm T}$ = 10 μL

- 2 μL ενζύμου T4 DNA Ligase (ή γενικότερα το 1/5 του τελικού όγκου)
- Επιθυμητή ποσότητα πλασμιδίου
- Διπλάσιο αριθμό μορίων τμήματος DNA για ενθέση
- ddH₂O ἑως τελικό όγκο 10 μL
- 1 µL 10X ligase buffer

Σε πολλές δύσκολες εφαρμογές της μεθόδου χρησιμοποιείται επιπρόσθετα ΑΤΡ σε συγκέντρωση 1 mM

Επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου

PCR Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής

Η παρακάτω πειραματική διαδικασία πραγματοποιείται σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της Promega και της Invitrogen.

Η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcriptase PCR, RT-PCR) γίνεται με σκοπό τη σύνθεση μιας συμπληρωματικής (complementary) αλυσίδας DNA (cDNA) έχοντας ως εκμαγείο ένα μόριο RNA. Οι RNA στόχοι πρώτα μετατρέπονται σε cDNA χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το mRNA, μέσω ενός ειδικού ενζύμου, της αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse Transcriptase), και στη συνέχεια ενισχύονται με την κλασική μέθοδο της PCR (Freeman *et al.*, 1999; Bustin *et al.*, 2005). Στην αντίδραση χρησιμοποιούνται poly-T εκκινητές (oligo dT), ικανοί να υβριδοποιήσουν μόνο τις poly-A ουρές στα 3'άκρα των mRNAs. Να αναφερθεί ότι το RNA των RNA-cDNA υβριδίων υδρολύεται χωρίς να επηρεάζεται το ελεύθερο RNA, οπότε στο τέλος της αντίδρασης υπάρχει μόνο μονόκλωνο cDNA.

Για να επιτευχθεί η ενίσχυση απαιτείται η σύσταση της βιβλιοθήκης cDNA από τους RNA στόχους με τη χρήση εκκινητών που περιέχουν θέση δέσμευσης για την RNA πολυμεράση. Επομένως, η βασική αρχή της μεθόδου είναι πως ένας oligo(dT) εκκινητής υβριδοποιείται επιλεκτικά στο mRNA, μέσω συμπληρωματικότητας με τα πολυαδενυλιωμένα 5' άκρα των mRNA μορίων (poly-A oupές) (Grace, 2020) **(Εικόνα** 23).



Εικόνα 23. Σχηματική συγκεντρωτική απεικόνιση των βημάτων αντίστροφης μεταγραφής (Grace, 2020).

Τα νεοσυντιθέμενα cDNA μόρια προέρχονται από το ολικό mRNA. Η διαδικασία απαιτεί περίπου 1µg RNA και η αρχική υβριδοποίηση του µε το oligo(dT) διεξάγεται για 10 λεπτά στους 70 °C (Huggett *et al.,* 2005). Μετά την υβριδοποίηση, ακολουθεί η αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής από το ένζυμο Αντίστροφη Μεταγραφάση (Reverse Transcriptase, RT) ImProm-II™, Promega. Η RNA πολυμεράση αποικοδομεί τον αρχικό RNA κλώνο στα σχηματισμένα RNA-DNA υβρίδια, αφού έχει χρησιμεύσει ως πρότυπο για τον πρώτο εκκινητή. Ο δεύτερος εκκινητής συνδέεται στο νέο cDNA και επεκτείνεται με τελικό αποτέλεσμα το σχηματισμό δίκλωνων μορίων cDNA, οι κλώνοι του οποίου είναι ικανοί να χρησιμεύσουν ως μεταγραφικά πρότυπα για την RNA πολυμεράση (Bustin *et al.,* 2005; Huggett *et al.,* 2005).

Η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής έδωσε νέες δυνατότητες στη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, ενώνοντας την αντίστροφη μεταγραφή με την κλασική ή την ποσοτική PCR. Προσέφερε σημαντική ώθηση στην έρευνα της μοριακής βιολογίας καθώς καθέστησε εφικτή τη μετατροπή των ευαίσθητων μορίων RNA σε σταθερά, συμπληρωματικά μόρια DNA, τα οποία μπορούν να υποστούν χειρισμούς και να μελετηθούν όπως τα υπόλοιπα μόρια DNA (Huggett *et* al., 2005).

Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων

Ο βακτηριακός μετασχηματισμός (Transformation) αποτελεί μια μορφή γενετικού ανασυνδυασμού και είναι η διαδικασία εκείνη κατά την οποία εισάγονται ανασυνδυασμένα πλασμίδια σε βακτηριακά κύτταρα. Στόχος είναι η διάνοιξη πόρων στο εξωτερικό περίβλημα των βακτηρίων προκειμένου να εισέλθει έστω και ένα αντίγραφο του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου. Αυτή η κληρονομήσιμη αλλαγή που θα προκληθεί στις ιδιότητες ενός βακτηριακού στελέχους προκύπτει από την ενσωμάτωση εξωγενούς γενετικού υλικού με άμεση πρόσληψη από το περιβάλλον μέσω της κυτταρικής μεμβράνης. Τα βακτήρια που περιέχουν ανασυνδυασμένα πλασμίδια διαχωρίζονται από τα υπόλοιπα (Zhang et al., 2014). Κριτήριο για αυτό το διαχωρισμό αποτελεί η ανθεκτικότητα των βακτηρίων σε κάποιο αντιβιοτικό, συνηθέστερη η αμπικιλλίνη. Η αντίσταση στην αμπικιλλίνη παρέχεται από ένα ένζυμο που ονομάζεται β-λακταμάση. Εάν στα ευαίσθητα βακτήρια ενσωματωθεί το ξένο DNA, αυτά θα γίνουν ανθεκτικά στην αμπικιλλίνη και επομένως δε θα ανασυνδυασμένα πεθαίνουν. Κάθε βακτήριο пου φέρει πλασμίδια, πολλαπλασιάζεται παράγοντας ένα βακτηριακό κλώνο, μια ομάδα δηλαδή πανομοιότυπων βακτηρίων και επιλέγεται ο βακτηριακός κλώνος που περιέχει το επιθυμητό τμήμα DNA (Zhang et al., 2014; Samuels et al., 2018).

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

Πειραματική διαδικασία

- Μεταφορά των τρυβλίων με το στερεό θρεπτικό υλικό από τους 4 °C, στους 37
 °C ώστε να απομακρυνθεί η υγρασία για 1 ώρα
- 60 μL βακτηριακά δεκτικά κύτταρα ικανά προς το μετασχηματισμό μεταφέρονται στον πάγο
- 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
- Είσοδος του πλασμιδίου στα κύτταρα επιτυγχάνεται με την υποβολή τους σε θερμικό σοκ (heat shock) στους 42 °C για 50-60 δευτερόλεπτα
- 7. Επώαση στον πάγο για 5 λεπτά χωρίς να μετακινηθούν τα δείγματα
- 8. Προσθήκη 300 μL LB στα κύτταρα
- 9. Επώαση στους 37 °C για 1 ώρα σε αναδευτήρα (orbital shaker) στις 220 στροφές ανά λεπτό
- Μεταφορά των κυττάρων σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό υλικό και επίστρωσή τους σε ολόκληρη την επιφάνεια. 5 λεπτά αναμονή στον πάγκο
- 11. Επώαση στους 37 °C για περίπου 18-24 ώρες

Παρασκευή δεκτικών κυττάρων

Το βακτήριο Ε. coli δεν κατέχει το φυσικό μηχανισμό του μετασχηματισμού. Η ικανότητα για την ενσωμάτωση του DNA όμως βρέθηκε ότι μπορούσε να επαχθεί με τεχνητό τρόπο με την έκθεση των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση της ανάπτυξης, σε υποτονικό διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου (CaCl₂) πριν την προσθήκη του DNA. Με αυτόν τον τρόπο τα κύτταρα μπορούν να γίνουν δεκτικά (Competent cells). Τα δεκτικά κύτταρα μπορούν να αποθηκευτούν για μεγάλο χρονικό διάστημα σε θεμοκρασία μικρότερη των -70 °C (Green and Rogers, 2013). Η προσθήκη DNA στο εναιώρημα των δεκτικών κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μεγαλομοριακών συμπλόκων DNA, μέσω σχηματισμού φωσφορικού υδροξυλίου του ασβεστίου, που είναι ανθεκτικά στη δράση των DNAσών. Με μία σύντομη έκθεση του μείγματος σε υψηλή θερμοκρασία (42 °C), τα βακτηριακά κύτταρα ενσωματώνουν τα σύμπλοκα DNA. Μετά από ορισμένες ώρες καλλιέργειας σε πλούσιο θρεπτικό υλικό, τα μετασχηματισμένα βακτήρια επιλέγονται και απομονώνονται με στρώση σε τρυβλία που φέρουν επιλεκτικό θρεπτικό υλικό (αντιβιοτικά) (Lim *et al.,* 2019).

Διαλύματα

<u>0,1 M CaCl₂ (1L)</u>

- 100 mL 1M CaCl₂
- 900 mL ddH₂O

<u>0,1 M CaCl₂ με 15% γλυκερόλη</u>

- 100 mL 1M CaCl₂
- 300 mL 50% γλυκερόλη
- 600 mL ddH₂O

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά γίνεται προσθήκη 3 mL LB σε σωληνάκι συλλογής και γίνεται συλλογή μίας μόνο αποικίας με τη χρήση tip. Ακολουθεί επώαση σε αναδευτήρα (orbital shaker) στους 37 °C στις 220 στροφές ανά λεπτό και ολονύκτια επώαση. Σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη των 250 mL γίνεται προσθήκη 100-200 mL LB. Το LB επιμολύνεται, εκ νέου, με 1-3 mL από την παραπάνω καλλιέργεια των κυττάρων. Ακολουθεί επώαση της κωνικής φιάλης στους 37 °C στις 220 στροφές ανά λεπτό, μέχρι η οπτική πυκνότητα του θρεπτικού υλικού στα 600 nm (OD600) φτάσει την τιμή 0.5 (~2-3 ώρες). Τα κύτταρα μεταφέρονται σε σωλήνες των 50 mL και επωάζονται στον πάγο για 40 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων για 10 λεπτά στις 3.500 rpm στους 4 °C και στη συνέχεια το υπερκείμενο απομακρύνεται. Η πελέτα των κυττάρων επαναδιαλυτοποιείται στις 3.500 rpm στους 4 °C και στη συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο. Η πελέτα των κυττάρων για 10 λεπτά στις 3.500 rpm στους 4 °C και στη συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο. Η πελέτα των κυττάρων επαναδιαλυτοποιείται σε 5 mL 0.1 M CaCl₂ με

15% γλυκερόλη και το εναιώρημα των κυττάρων μοιράζεται ανά 200 μL σε σωληνάκια και αποθηκεύονται στους -80 °C.

Παρατηρήσεις

Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιείται στο cold room.

Η καλλιέργεια η οποία θα χρησιμοποιηθεί, πρέπει να βρίσκεται στην πρώιμη περιοχή της εκθετικής φάσης της καμπύλης ανάπτυξης. Σε αυτό το σημείο τα κύτταρα έχουν επάρκεια θρεπτικών υλικών και οξυγόνου.

Εάν η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας (OD600) ξεπεράσει την τιμή 0.5 τότε η αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού μειώνεται δραστικά.

Απομόνωση και καθαρισμός πλασμιδιακού DNA από βακτήρια

MINI-PREPs

Διαλύματα

Διάλυμα Επαναδιαλυτοποίησης (V=100 mL):

2.5 mg/mL λυσοζύμη & Rvase, 25% w/v σουκρόζη (D-Sucrose Molecular Biology Grade της PanReac AppliChem), 25 mM (0.303 g/100 mL) Tris Base της Fisher Chemical, 10 mM (2.92 g/100 mL) EDTA της AppliChem. Στη συνέχεια προστίθεται υδροχλωρικό οξύ (Hydrochloric acid 1mol/L της Carlo Erba reagents) μέχρι pH8.0. Εναλλακτικά φτιάχνουμε 2X Tris/EDTA και προσθέτουμε φρέσκο διάλυμα 50% σουκρόζης με 10 mg/mL διάλυμα λυσοζύμης πριν τη χρήση.

Διάλυμα λύσης (V=100 mL):

0.8 g NaOH και 10 mL 1% SDS σε νερό μέχρι τελικό όγκο 100 mL
Διάλυμα εξουδετέρωσης (V=100 mL):

29.6 g οξικό νάτριο (Sodium Acetate, CHECOONA της SIGMA-Aldrich) σε νερό. Προστίθεται οξικό οξύ (Acetic Acid) μέχρι να φτάσει pH4.8

Διάλυμα πλύσης (V=100 mL):

25 mM (0.303 g/100 mL ή 1.25 mL), 10 mM (2.92 g/100 mL ή 1 mL) EDTA της AppliChem, 0.3 mM (2.46 g/100 mL ή 5 mL) οξικό νάτριο ή ετοιμάζουμε διάλυμα 3M οξικό νάτριο (24.6 g/100 mL) και προστίθεται νερό μέχρι τελικό όγκο 100 mL

Tris-HC1-EDTA:

25 mM (0.303 g/100 mL) Tris Base της Fisher Chemical, 10 mM (2.92 g/100 mL) EDTA της AppliChem. Προστίθεται διαλύματο HCl (Hydrochloric acid 1 mol/L) μέχρι να φτάσει pH8.5 και προστίθεται νερό μέχρι τελικό όγκο 100 mL

Πειραματική διαδικασία

Η καλλιέργεια μεταφέρεται σε σωληνάκια και (περίπου 1.5 mL) και γίνεται φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 5.000 rpm έτσι ώστε να απομονωθούν τα κύτταρα. Ακολουθεί επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας σε 200 μL διαλύματος επαναδιαλυτοποίησης και έντονη ανάδευση (vortex). Επώαση 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 400 μL διαλύματος λύσης και ήπια ανάδευση με το χέρι. Τα δείγματα θα πρέπει να γίνουν διαυγή καθώς τα κύτταρα λύονται. Επώαση 4-5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθήκη 300 μL διαλύματος εξουδετέρωσης και ήπια ανάδευση με το χέρι. Στο σημείο αυτό παρατηρείται σχηματισμός άσπρου ιζήματος, το οποίο είναι μετουσιωμένες πρωτεΐνες και γενωμικό DNA. Επώαση στον πάγο για 5 λεπτά και φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 13.000 rpm για 8-10 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέα σωληνάκια. Το υπερκείμενο περιέχει το πλασμιδιακό DNA το οποίο δεν έχει αποδιαταχθεί λόγω της υπερελικωμένης διαμόρφωσής του. Ακολουθεί προσθήκη 700 μL παγωμένης ισοπροπανόλης (IPA) και ανάδευση με το χέρι. Επώαση 10 λεπτά στους -80 °C για να γίνει κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 10 λεπτά στους 4 °C και απόρριψη του υπερκείμενου. Τα σωληνάκια μένουν ανοιχτά για 5 λεπτά για να στεγνώσουν. Ακολουθεί προσθήκη 700 μL διάλυμα πλύσης και επώαση για 10 λεπτά για την κατακρήμνιση του DNA. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 13.000 rpm για 5 λεπτά στους 4 °C. Να σημειωθεί ότι εναλλακτικά των βημάτων 10 και 11 γίνεται πλύση με 1 mL 70% αιθανόλη. Το υπερκείμενο στη συνέχεια απορρίπτεται και τα σωληνάκια μένουν ανοιχτά για να στεγνώσουν. Τέλος, η πελέτα επαναδιαλυτοποιείται σε 50 μL νερό με RNase.

MIDI-PREPs

<u>Με βάση το πρωτόκολλο της Macherey-Nagel kit "NucleoBond Xtra plasmid</u> <u>purification</u>"

Πειραματική διαδικασία

Η καλλιέργεια μεταφέρεται σε ειδικά πλαστικά μπουκάλια των 500 mL για φυγοκέντρηση. Τα δείγματα, αφού ισοζυγιστούν με ακρίβεια έως και τρίτου δεκαδικού, φυγοκεντρούνται στις 5.000 rpm για 20 λεπτά στους 4 °C. Μετά το πέρας των 20 λεπτών, το υπερκείμενο απορρίπτεται και η πελέτα επαναδιαλυτοποιείται με 8 mL Resuspension Buffer + RNase (φυλάσσεται στους 4 °C). Ακολουθεί προσθήκη 8 mL Lysis Buffer και ήπια ανάδευση. Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθήκη 12 mL Equilibration Buffer στη στήλη με το φίλτρο (παρέχονται από το kit) με κυκλική κίνηση. Προσθήκη 8 mL Neutralization Buffer και ανάδευση μέχρι να αλλάξει το μπλε χρώμα του Lysis Buffer. Τα δείγματα μεταφέρονται προσεκτικά μέσα στο φίλτρο της κάθε στήλης και περιμένουμε υπομονετικά μέχρι να αδειάσει. Το φίλτρο της κάθε στήλης και περιμένουμε υπομονετικά μέχρι να αδειάσει τελείως. Το φίλτρο απορρίπτεται και η στήλη πλένεται με 8 mL Equilibration Buffer με κυκλική κίνηση και αφήνουμε τη στήλη να αδειάσει τελείως. Το φίλτρο απορρίπτεται και η στήλη πλένεται με 8 mL Wash Buffer μέχρι να

αδειάσει τελείως. Μεταφορά της στήλης σε 50άρι σωλήνα και προσθήκη 5 mL Elution Buffer μέχρι η στήλη να αδειάσει τελείως). Το έκλουσμα που θα περάσει από τη στήλη θα περιέχει το πλασμίδιο. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 5 mL ισοπροπανόλης (2-Propanol της PanReac AppliChem) για την κατακρήμνιση του DNA και έντονη ανάδευση. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 30 λεπτά στους 4 °C και απόρριψη του υπερκείμενου με προσοχή. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 2 mL 70% αιθανόλη στην πελέτα (συνήθως δεν είναι εμφανής) και τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 13.000 rpm για 5 λεπτά. Το υπερκείμενου απορρίπτεται με προσοχή και η πελέτα του κάθε δείγματος επαναδιαλυτοποιείται σε 500 μL dH₂O στα τοιχώματα του γυάλινου σωληνακίου και γίνεται μεταφορά σε νέο σωληνάκι.

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας απομόνωσης των νουκλεϊκών οξέων, το επόμενο κρίσιμο βήμα, πριν προχωρήσουμε στη διεξαγωγή των πειραμάτων μας, είναι να εκτιμήσουμε την ποιότητα και την καθαρότητα του απομονωμένου υλικού και να υπολογίσουμε τη συγκέντρωσή του, ώστε να το χρησιμοποιήσουμε στις κατάλληλες συγκεντρώσεις στις αντιδράσεις που θα ακολουθήσουν. Η μέτρηση της ποσότητας του γενετικού υλικού του κάθε δείγματος μπορεί να υπολογιστεί στο φασματοφωτόμετρο NanoDrop 2000. Το NanoDrop 2000 μας δίνει τη δυνατότητα μέτρησης μικρών όγκων δειγμάτων (1-2 μl) και χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση και την αξιολόγηση της καθαρότητας DNA, RNA και πρωτεϊνών. Η απορρόφηση του δείγματος μετριέται στα 260 nm και στα 280 nm Τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του κάθε δείγματος δίνονται από το λόγο A260nm/A280nm)

Μέθοδος RNA - Sequencing

Η μεθόδος **RNA-seq** (**RNA sequencing**) χρησιμοποιώντας τις δυνατότητες της αλληλούχησης ευρείας κλίμακας νέας γενιάς μπορεί να αποκαλύψει τη στιγμιαία παρουσία του RNA. Μπορεί να προσδιορίσει τα επίπεδα έκφρασης ενός συγκεκριμένου γονιδίου και μας δίνει τη δυνατότητα ανάλυσης του μεταγραφώματος και των εκφραζόμενων γονιδίων μετά την απομόνωση του RNA από υγιή και μολυσμένα κύτταρα (Mortazavi *et al.,* 2008). Η ποσοτικοποίηση της γονιδιακής

έκφρασης αλλά και η ταυτοποίηση των μεταγράφων κατατάσσονται στις κύριες δραστηριότητες του πυρήνα της μοριακής βιολογίας. Ο πληθυσμός του RNA απομονώνεται από τα κύτταρα και στη συνέχεια μετατρέπεται σε βιβλιοθήκη cDNA κομματιών στα οποία προσκολλούνται αντάπτορες (adapters) στο ένα ή και στα δύο άκρα τους. Στη συνέχεια πραγματοποιείται αλληλούχηση ευρείας κλίμακας νέας γενιάς των μορίων για να ληφθούν τα "διαβάσματα" που έχουν αλληλουχηθεί από το ένα άκρο ή και από τα δύο άκρα (single-end sequencing ή paired-end sequencing, αντιστοίχως) (Ozsolak and Milos, 2011).

Πειραματική διαδικασία

<u>Απομόνωση RNA</u>

- Καλλιέργεια των κυττάρων σε πιάτα των 60 mm² έως ότου η καλλιέργεια φθάσει σε 90-100% πυκνότητα
- 2. Μόλυνση των κυττάρων με ιό Sendai για 3 και 6 ώρες
- 3. Απόρριψη θρεπτικού διαλύματος και έκλουση κυττάρων με 10 mL PBS
- 4. Επώαση με 2 mL 0.5% διαλύματος τρυψίνης για 5 λεπτά για την αποκόλληση των προσκολλημένων κυττάρων. Εναλλακτικά τα κύτταρα αποκολλώνται με διάλυμα PBS-2 mM EDTA, επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και πιπετάρισμα για αποκόλληση κυττάρων
- Αναστολή της δράσης της τρυψίνης με προσθήκη διαλύματος 10 mL διαλύματος DMEM εμπλουτισμένο με 10% FBS
- Συλλογή των κυττάρων σε σωληνάκι των 15 mL και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 1.200 rpm
- 7. Απόρριψη του υπερκείμενου και επαναδιάλυση των κυττάρων σε 1 mL παγωμένου διαλύματος PBS. Μεταφορά σε σωληνάκι των 1.5 mL και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 3.000 rpm
- 8. Απόρριψη του υπερκείμενου
- 9. Επανάληψη των βημάτων 7 και 8
- 10. Επαναδιάλυση του ιζήματος (πελέττας) σε 1 mL διαλύματος TRI Reagent (Sigma Aldrich) με έντονο πιπετάρισμα και ανάδευση σε συσκευή vortex για 15 δευτερόλεπτα σε υψηλή ταχύτητα

- 11. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 5 λεπτά
- Προσθήκη 200 μL χλωροφορμίου και ανάδευση στο vortex για 15 δευτερόλεπτα σε υψηλή ταχύτητα
- 13. Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13.000 rpm στους 4 °C
- 14. Μεταφορά του υπερκείμενου που περιέχει το RNA σε νέο σωληνάκι και προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης
- 15. Επώαση στους -80 °C για 10 λεπτά
- 16. Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13.000 rpm στους 4 °C
- 17. Απόρριψη του υπερκείμενου
- 18. Έκπλυση του ιζήματος (πελέττας) με 500 mL διαλύματος αιθανόλης 75%
- 19. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 rpm στους 4 °C
- 20. Απόρριψη του υπερκείμενου. Το ίζημα (πελέττα) αφήνεται να στεγνώσει
- **21.** Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 80 μL RNase-free H₂0 και προσθήκη 1μl RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor, Thermo Fisher Scientific

Κατεργασία με DNase I

22. Προσθήκη 10 μL 10Χ διαλύματος αντίδρασης DNase I και 10 μL (100 Units) DNaseI (Roche) και επώαση στους 37 °C για 1 ώρα

Καθαρισμός RNA

- 23. Προσθήκη 350 μL διαλύματος RLT και καλή ανάμειξη
- 24. Προσθήκη 250 μL 100% αιθανόλης, καλή ανάμειξη με πιπετάρισμα
- 25. Μεταφορά του δείγματος (700 μl) σε RNeasy Mini στήλη που έχει τοποθετηθεί σε σωληνάκι συλλογής των 2 mL. Φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα στις 13.000 rpm. Απόρριψη του διηθήματος (flow-through)
- 26. Προσθήκη 500 μl διαλύματος RPE που περιέχει αιθανόλη στη RNeasy στήλη. Φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα στις 13.000 rpm ώστε να γίνει ξέπλυμα της μεμβράνης της στήλης. Απομάκρυνση του διηθήματος (flow-through)
- 27. Προσθήκη 500 μl διαλύματος RPE που περιέχει αιθανόλη στη RNeasy στήλη. Φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 13.000 rpm ώστε να ξεπλυθεί η στήλη

- 28. Μεταφορά της στήλης RNeasy σε νέο σωληνάκι συλλογής των 2 mL και απόρριψη του παλιού σωληνακίου συλλογής με το διήθημα flow through. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13.000 rpm
- 29. Μεταφορά της στήλης RNeasy column σε νέο σωληνάκι συλλογής των 1.5 mL. Προσθήκη 30 μl RNase-free H₂O πάνω στη μεμβράνη της στήλης. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 2 λεπτά. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13.000 rpm ώστε να έχουμε έκλουση του RNA
- **30.** Απόρριψη της στήλης και προσθήκη 1 μl RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor

<u>Έλεγχος της καθαρότητας και της ακεραιότητας του RNA</u>

- 31. Μέτρηση της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του RNA με το Nanodrop. Ο λόγος A260/A280 πρέπει να είναι μεταξύ 1.8-2 και ο λόγος A260/A230 πάνω από 2 για να θεωρηθεί ότι είναι υψηλής καθαρότητας
- 32. Φορτώνουμε 1 μg RNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1% και το ηλεκτροφορούμε στα 100V προκειμένου να ελέγξουμε την ακεραιότητα του RNA. Η εμφάνιση των δύο ριβοσωμικών υπομονάδων ως 2 ξεκάθαρες ζώνες στο πήκτωμα και η έλλειψη ιχνών αποδόμησης του RNA καταδεικνύουν την ακεραιότητα του RNA

Κατασκευή βιβλιοθήκης

- 33. Ανάμειξη 1000 ng RNA και ddH2O σε τελικό όγκο 16.7 μL
- **34.** Ανάδευση των <u>**RNA Purification Beads</u> και προσθήκη 16.7 μL στο δείγμα RNA**</u>
- 35. Επώαση στο PCR μηχάνημα στους 65 °C 5 λεπτά και 4 °C αναμονή
- **36.** Όταν το PCR μηχάνημα φτάσει στους 4 °C πραγματοποιείται μεταφορά των δειγμάτων στον πάγκο (25 °C)
- 37. Μεταφορά των δειγμάτων σε μαγνητική βάση για 5 λεπτά
- 38. Απομάκρυνση υπερκείμενου
- 39. Αφαίρεση δειγμάτων από το μαγνήτη
- **40.** Προσθήκη 66.7 μL <u>Bead Washing Buffer</u>, ανακάτεμα με χρήση πιπέτας μέχρι το μείγμα να γίνει ομοιογενές
- 41. Μεταφορά των δειγμάτων σε μαγνητική βάση για 5 λεπτά

- 42. Απομάκρυνση και απόρριψη υπερκείμενου
- **43.** Προσθήκη 16.7 μL <u>Elution Buffer</u>, ανακάτεμα με χρήση πιπέτας μέχρι το μείγμα να γίνει ομοιογενές
- 44. Επώαση στο PCR μηχάνημα

80 °C - 2 λεπτά

25 °C - αναμονή

- **45.** Προσθήκη 16.7 μL <u>Bead Binding Buffer</u>, ανακάτεμα με χρήση πιπέτας μέχρι το μείγμα να γίνει ομοιογενές
- 46. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά
- 47. Μεταφορά των δειγμάτων σε μαγνητική βάση για 5 λεπτά
- 48. Απομάκρυνση και απόρριψη του υπερκείμενου
- 49. Αφαίρεση δειγμάτων από το μαγνήτη
- **50.** Προσθήκη 66.7 μL <u>Bead Washing Buffer</u>, ανακάτεμα με χρήση πιπέτας μέχρι το μείγμα να γίνει ομοιογενές
- 51. Μεταφορά των δειγμάτων σε μαγνητική βάση για 5 λεπτά
- 52. Απομάκρυνση και απόρριψη υπερκείμενου
- **53.** Προσθήκη 6.5 μL <u>Elute, Prime, Fragment Mix</u>, ανακάτεμα με χρήση πιπέτας μέχρι το μείγμα να γίνει ομοιογενές
- 54. Επώαση στο PCR μηχάνημα:
 - 80 °C 2 λεπτά
 - 25 °C αναμονή
- 55. Μεταφορά των δειγμάτων σε μαγνητική βάση για 5 λεπτά.
- 56. Μεταφορά 5.7 μL του υπερκείμενου σε νέο 0.2 mL PCR σωληνάκι.

Σύνθεση μονόκλωνου DNA

57. Προσθήκη 2.7 μL First Strand Master Mix/Super Script II Mix στα δείγματα

58. Επώαση στο PCR μηχάνημα

25 °C - 10 λεπτά 42 °C - 50 λεπτά 70 °C - 25 λεπτά 4 °C - αναμονή

Σύνθεση δίκλωνου DNA

- 59. Προσθήκη 8.3 μL Second Strand Master Mix στα δείγματα
- 60. Επώαση στο PCR μηχάνημα στους 16 °C για μια ώρα
- 61. Μεταφορά των δειγμάτων στον πάγκο (25 °C)
- **62.** Προσθήκη 30 μL απο καλά αναμεμειγμένα <u>AMPure XP</u> σφαιρίδια, ανακάτεμα με χρήση πιπέτας μέχρι το μείγμα να γίνει ομοιογενές
- 63. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά
- 64. Μεταφορά των δειγμάτων σε μαγνητική βάση για 5 λεπτά
- 65. Απομάκρυνση και απόρριψη 45 μL από το υπερκείμενο
- 66. Διατήρηση δειγμάτων στο μαγνήτη και προσθήκη 200 μl 80% αιθανόλη
- 67. Επώαση για 30 δευτερόλεπτα. Απομάκρυνση και απόρριψη υπερκείμενου
- 68. Επανάληψη βημάτων 65 και 66
- **69.** Προσθήκη 22 μL <u>Resuspension Buffer</u>, ανακάτεμα με χρήση πιπέτας μέχρι το μείγμα να γίνει ομοιογενές
- 70. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά
- 71. Μεταφορά των δειγμάτων σε μαγνητική βάση για 5 λεπτά
- 72. Μεταφορά 20 μL απο το υπερκείμενο σε νέο 0.2 mL PCR σωληνάκι

Επιδιόρθωση των άκρων του DNA

- 73. Προσθήκη 13.3 μL από End Repair Mix στα δείγματα
- 74. Επώαση στο PCR μηχάνημα στους 30 °C για 30 λεπτά
- **75.** Προσθήκη 53.3 μL απο καλά αναμεμειγμένα <u>AMPure XP</u> σφαιρίδια, ανακάτεμα με χρήση πιπέτας μέχρι το μείγμα να γίνει ομοιογενές
- 76. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά
- 77. Μεταφορά των δειγμάτων σε μαγνητική βάση για 5 λεπτά
- 78. Απομάκρυνση και απόρριψη 81.6 μL από το υπερκείμενο
- 79. Διατήρηση δειγμάτων στο μαγνήτη και προσθήκη 200 μL 80% αιθανόλη
- 80. Επώαση για 30 δευτερόλεπτα. Απομάκρυνση και απόρριψη υπερκείμενου
- 81. Επανάληψη βημάτων 78 και 79
- 82. Προσθήκη 7.8 μL <u>Resuspension Buffer</u>, ανακάτεμα με χρήση πιπέτας μέχρι το μείγμα να γίνει ομοιογενές

- 83. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά
- 84. Μεταφορά των δειγμάτων σε μαγνητική βάση για 5 λεπτά
- 85. Μεταφορά 5.8 μL από το υπερκείμενο σε νέο 0.2 mL PCR σωληνάκι

Προσθήκη Α΄ βάσεων στα 3' άκρα

86. Προσθήκη 4.2 μL <u>A-Tailing Mix</u> στα δείγματα

87. Επώαση στο PCR μηχάνημα στους 37 °C για 30 λεπτά

Πρόσδεση των ανταπτόρων (Adapters) στα DNA τμήματα

88. Προσθήκη

0.8 µL DNA Ligase Mix

 $0.8\ \mu L$ Resuspension buffer

0.8 µL RNA Adapter Mix

- 89. Επώαση στο PCR μηχάνημα στους 30 °C για 10 λεπτά
- **90.** Προσθήκη 1.7 μL <u>Stop Ligase Mix</u>
- **91.** Προσθήκη 14 μL απο καλά αναμεμειγμένα <u>AMPure XP</u> σφαιρίδια, ανακάτεμα με χρήση πιπέτας μέχρι το μείγμα να γίνει ομοιογενές
- 92. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά
- 93. Μεταφορά των δειγμάτων σε μαγνητική βάση για 5 λεπτά
- 94. Απομάκρυνση και απόρριψη 23.2 μL από το υπερκείμενο
- 95. Διατήρηση δειγμάτων στο μαγνήτη και προσθήκη 200 μL 80% αιθανόλη
- 96. Επώαση για 30 δευτερόλεπτα. Απομάκρυνση και απόρριψη υπερκείμενου
- 97. Επανάληψη βημάτων 94 και 95
- **98.** Προσθήκη 18.7 μL <u>Resuspension Buffer</u>, ανακάτεμα με χρήση πιπέτας μέχρι το μείγμα να γίνει ομοιογενές
- 99. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά
- 100. Μεταφορά των δειγμάτων σε μαγνητική βάση για 5 λεπτά
- 101. Μεταφορά 16.7 μL απο το υπερκείμενο σε νέο 0.2 mL PCR σωληνάκι
- 102. Προσθήκη 16.7 μL από καλά αναμεμειγμένα <u>AMPure XP</u> σφαιρίδια ανακάτεμα με χρήση πιπέτας μέχρι το μείγμα να γίνει ομοιογενές
- 103. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά
- 104. Μεταφορά των δειγμάτων σε μαγνητική βάση για 5 λεπτά

- 105. Απομάκρυνση και απόρριψη 28.3 μL από το υπερκείμενο
- 106. Διατήρηση δειγμάτων στο μαγνήτη και προσθήκη 200 μL 80% αιθανόλη
- 107. Επώαση για 30 δευτερόλεπτα. Απομάκρυνση και απόρριψη υπερκείμενου
- 108. Επανάληψη βημάτων 105 και 106
- **109.** Προσθήκη 9.7 μL <u>Resuspension Buffer</u>, ανακάτεμα με χρήση πιπέτας
- 110. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά
- 111. Μεταφορά των δειγμάτων σε μαγνητική βάση για 5 λεπτά
- 112. Μεταφορά 7.7 μL απο το υπερκείμενο σε νέο 0.2 mL PCR σωληνάκι

Υπολογισμός του αριθμού των απαραίτητων κύκλων PCR

Ο αριθμός των κύκλων PCR που είναι απαραίτητος για τον πολλαπλασιασμό της βιβλιοθήκης υπολογίζεται χρησιμοποιώντας αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο.

113. Ανάμειξη:

8 µL H20

1 μL από τη βιβλιοθήκη

1 µL TruSeq PCR Primer Cocktail (25µM)

 $10\,\mu L$ KAPA SYBR FAST 2x PCR Master Mix

114. Ενίσχυση με το ακόλουθο πρωτόκολλο qPCR:

α. 3 λεπτά στους 95 °C

β. 20 κύκλοι:

30 δευτερόλεπτα στους 95 °C

30 δευτερόλεπτα στους 63 °C

30 δευτερόλεπτα στους 72 °C

115. Υπολογισμός του αριθμού των κύκλων που αντιστοιχούν στο 50% της εκθετικής φάσης της αντίδρασης του πολλαπλασιασμού, ο οποίος αντιστοιχεί στον ιδανικό αριθμό κύκλων πολλαπλασιασμού του συνόλου της βιβλιοθήκης

<u>Ενίσχυση βιβλιοθήκης με PCR</u>

116. Ανάμειξη:

6.7 µL Adapter Ligated DNA

1.7 µL PCR Primer Cocktail

 $8.3\,\mu\text{L}$ PCR Master Mix

- 117. Ενίσχυση με το ακόλουθο πρωτόκολλο:
 - a. 98 °C για 30 δευτερόλεπτα
 - β. Αριθμός κύκλων:

98 °C για 10 δευτερόλεπτα

60 °C για 30 δευτερόλεπτα

72 °C για 30 δευτερόλεπτα

γ. 72 °C για 5 λεπτά

δ. Αναμονή 4 °C

- **118**. Προσθήκη 16.7 μL από καλά αναμεμειγμένα <u>AMPure XP</u> σφαιρίδια, ανακάτεμα με χρήση πιπέτας μέχρι το μείγμα να γίνει ομοιογενές
- 119. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά
- 120. Μεταφορά των δειγμάτων σε μαγνητική βάση για 5 λεπτά
- 121. Απομάκρυνση και απόρριψη υπερκείμενου
- 122. Διατήρηση δειγμάτων στο μαγνήτη και προσθήκη 200 μL 80% αιθανόλη.
- **123**. Επώαση για 30 δευτερόλεπτα. Απομάκρυνση και απόρριψη υπερκείμενου
- 124. Επανάληψη βημάτων 121 και 122
- **125**. Προσθήκη 12 μL <u>Resuspension Buffer</u>, ανακάτεμα με χρήση πιπέτας μέχρι το μείγμα να γίνει ομοιογενές
- 128. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά
- 129. Μεταφορά των δειγμάτων σε μαγνητική βάση για 5 λεπτά
- 130. Μεταφορά 10 μL απο το υπερκείμενο σε νέο 0.2 mL PCR σωληνάκι
- 131. Προετοιμασία 1 μL της βιβλιοθήκης σύμφωνα με τις οδηγίες του Agilent DNA 1000 kit και ανάλυση στο μηχάνημα Bioanalyzer 2100

Ποσοτικοποίηση της Βιβλιοθήκης

Η συγκέντρωση της βιβλιοθήκης υπολογίζεται χρησιμοποιώντας αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο και kit που αποτελείται από βιβλιοθήκες γνωστής συγκέντρωσης (Kapa Library Quantification Kit)

132. Αραίωση βιβλιοθήκης 1:1000 και 1:10.000.

133. Προετοιμασία των ακόλουθων αντιδράσεων:

4 μL από βιβλιοθήκες γνωστής συγκέντρωσης (Kapa Library Quantitation Kit) ή 4 μl από τις αραιώσεις της βιβλιοθήκης 1 μL TruSeq PCR primer cocktail (25μM) 5 μL H₂O 10 μL Kapa Sybr Fast 2X Mix

134. Πολλαπλασιασμός:

α. 3 λεπτά στους 95 °C

β. 20 κύκλοι:

30 δευτερόλεπτα στους 95 °C 30 δευτερόλεπτα στους 63 °C 30 δευτερόλεπτα στους 72 °C

135. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των βιβλιοθηκών γίνεται λαμβάνοντας υπόψιν το γνωστό μέγεθος των εμπορικών βιβλιοθηκών (standards) καθώς και του μεγέθους των βιβλιοθηκών όπως προκύπτει από την ανάλυση στο Bioanalyzer 2100

TruSeq PCR Primer Cocktail

136. Επαναδιάλυση του Truseq PCR primer 1 και TruSeq PCR primer 2 σε TE/10 σε τελική συγκέντρωση 100 μ M

137. Σε νέο σωληνάκι αναμειγνύονται:

25 μL TruSeq PCR primer 1 (100μM) 25 μL TruSeq PCR primer 2 (100μM) 50 μL H₂O

<u>Αλληλουχίες εκκινητών</u>

TruSeq PCR 1

AATGATACGGCGACCACCGA*G

TruSeq PCR 2 CAAGCAGAAGACGGCATACGA*G

Μέθοδος Ανοσοκατακρήμνισης Χρωματίνης - Chromatin Immunoprecipitation

Η ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP) είναι μια ισχυρή μέθοδος με την οποία γίνεται δυνατή η συλλογή στόχων DNA για μεταγραφικούς παράγοντες ή για ιστονικές τροποποιήσεις σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος και στη συνέχεια μέσω της αλληλούχησης ευρείας κλίμακας νέας γενιάς ορίζονται οι θέσεις δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων ή η παρουσία ιστονικών τροποποιήσεων, ανακαλύπτοντας έτσι τα ρυθμιστικά δίκτυα των γονιδίων (Εικόνα 24).



Εικόνα 24. Απεικόνιση του μοντέλου παρασκευής και ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης (Orlando *et* al., 1997).

Πραγματοποιείται έναντι ιστονικών τροποποιήσεων, οι οποίες αποτελούν χαρακτηριστικούς δείκτες των ενισχυτών, όπως η H3K27ac και η H3K4me1 αλλά και έναντι μεταγραφικών παραγόντων, όπως είναι ο NF-κB και έναντι σημαντικών συνενεργοποιητών, όπως είναι η μονάδα CBP και το σύμπλοκο του Mediator. Ο συνδυασμός ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης και αλληλούχησης ευρείας κλίμακας νέας γενιάς με μαζική και ταυτόχρονη ανάλυση της αλληλουχίας του DNA οδηγεί στην ταυτοποίηση των θέσεων σύνδεσης μεταγραφικών παραγόντων καθώς και των περιοχών στις οποίες το DNA φέρει ιστονικές τροποποιήσεις οι οποίες μπορεί να αποτελούν *cis* ρυθμιστικά στοιχεία.

Απομόνωση χρωματίνης

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η αρχιτεκτονική της χρωματίνης διαδραματίζει θεμελιώδη ρόλο σε πολλούς μηχανισμούς γονιδιακής ρύθμισης κατά την ανάπτυξη (Agelopoulos, McKay *et* al., 2012). Για την αποκρυπτογράφηση της σχέσης που συνδέει τη δομή της χρωματίνης με τη γονιδιακή ρύθμιση, είναι απαραίτητη η παρασκευή της χρωματίνης. Η παρασκευή χρωματίνης πραγματοποιείται μέσω της απομόνωσης χρωματίνης από κύτταρα τα οποία έχουν μονιμοποιηθεί με φορμαλδεΰδη. Η φορμαλδεΰδη είναι ένα από τα πιο κοινά αντιδραστήρια μονιμοποίησης κυττάρων καθώς το μικρό της μέγεθος και η υψηλή δραστικότητα του μορίου της καθιστά εφικτή στα ζωντανά κύτταρα την ακαριαία δράση της

Η χρωματίνη που προκύπτει μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας αυτής φέρει πάνω της όλες 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. Με τη χρήση της φορμαλδεΰδης γίνεται μονιμοποίηση της χρωματίνης, δηλαδή δημιουργία αναστρέψιμων ομοιοπολικών δεσμών.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Fixing Buffer

- 50 mM Hepes pH7.9 (Cαρχικό= 1 M)
- 0,1 M NaCl (Cαρχικό = 5 M)
- 1 mM EDTA (Cαρχικό = 0,5 M)
- 11 % Formaldehyde (14.8 mL) από 37% stock (Formaldehyde Solution της SIGMA)
- ddH_2O μέχρι ο τελικός όγκος να γίνει 50 mL

Το παραπάνω Fixing Buffer έχει συγκέντρωση 10Χ

Glycine Buffer (Quenching Buffer)

- 0,125 M γλυκίνη από 75.07 g/mol stock (Glycine Molecular Biology grade της AppliChem)
- 50 mL 1X PBS

*Εναλλακτικά γίνεται παρασκευή διαλύματος 2.5 M γλυκίνης (9.38 g σε 50 mL 1X PBS)

Lysis Buffer (Buffer A)

- 10 mM Tris pH8.0 (Cαρχικό = 1 M)
- 10 mM EDTA (Cαρχικό = 0.5 M)
- 0,25% Trixon X-100 της PanReac AppliChem
- ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 50 mL

Nuclei Buffer (Buffer B)

- 10 mM Tris pH8.0 (Cαρχικό= 1 M)
- 200 mM NaCl (Cαρχικό= 5 M)
- 1 mM EDTA (Cαρχικό = 0.5 M)
- ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 50 mL

Sonication Buffer

- 10 mM Tris pH8.0 (Cαρχικό= 1 M)
- 1 mM EDTA (Cαρχικό =0.5 M)
- ddH2O μέχρι τελικό όγκο 50 mL

Πειραματική διαδικασία

Το πρωτόκολλο της ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP) βασίζεται σε ένα δημοσιευμένο πρωτοκόλλο το οποίο έχει υποστεί τροποποιήσεις (Agelopoulos and Thanos, 2006). Αρχικά απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο από τα τρυβλία καλλιέργειας των κυττάρων και προστίθεται Fixing Buffer σε κάθε πιάτο. Τα κύτταρα σε αυτό το βήμα επωάζονται σε διάλυμα 1% φορμαλδεΰδης (F8775, Sigma-Aldrich) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η φορμαλδεΰδη προκαλεί τη διασύνδεση (cross-linking) μέσω ομοιοπολικών δεσμών ανάμεσα σε πρωτεΐνες-πρωτεΐνες και σε πρωτεΐνες-DNA στα μονιμοποιημένα κύτταρα. Στη συνέχεια, η φορμαλδεΰδη απομακρύνεται και για να σταματήσει η σύνδεση πρωτεϊνών και χρωματίνης γίνεται προσθήκη διαλύματος γλυκίνης (Glycine Buffer), η οποία αντιδρά με την εναπομένουσα φορμαλδεΰδη. Ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και απομάκρυνση της γλυκίνης. Στη συνέχεια γίνεται πλύση των κυττάρων με 10 mL 1X PBS . Προστίθενται 10 mL 1X PBS στο κάθε τρυβλίο και με τη βοήθεια scraper γίνεται απόξεση των κυττάρων, τα οποία συλλέγονται σε σωλήνες των 50 mL και φυγοκεντρούνται για 15 λεπτά στις 4.500 rpm στους 4 °C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και η πελέτα επαναδιαλυτοποιείται σε 12.5 mL Lysis Buffer (αποδιάταξη μεμβρανών). Ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά στον πάγο και φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 4.000 rpm στους 4 °C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και η πελέτα επαναδιαλυτοποιείται σε 12.5 mL Nuclei Buffer. Ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά στον πάγο και φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 4.000 rpm στους 4 °C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και γίνεται προσθήκη 3 mL Sonication Buffer και διαλυτοποίηση της πελέτας. Τα δείγματα αποθηκεύονται στους 4 °C μέχρι το επόμενο βήμα της κατεργασίας με υπερήχους.

Κατακερματισμός χρωματίνης με τη χρήση υπερήχων

Η χρωματίνη που απομονώθηκε και μονιμοποιήθηκε κατακρημνίζεται στην αυτόματη συσκευή Covaris S220 με τη χρήση υπερήχων έτσι ώστε να προκύψουν μικρότερα κομμάτια χρωματίνης, τα οποία είναι πιο εύκολο να επεξεργαστούν κατάλληλα και να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης. Η κατακερματισμός της χρωματίνης σε μικρότερα κομμάτια μέσου μήκους περίπου ~200-1000 ζεύγη βάσεων πραγματοποιείται με τη χρήση μιας αυτόματης συσκευής Covaris S220.

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

Μετά τον κατακερματισμό με τη συσκευή Sonicator τα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο αφού μοιραστούν σε ειδικά σωληνάκια Covaris του 1 mL και προετοιμάζεται η συσκευή Covaris. Στο δοχείο της συσκευής προστίθεται ddH₂O μέχρι τη χαρακτηριστική ένδειξη και το πρόγραμμα ρυθμίζεται βάση των ακόλουθων παραμέτρων: Peak Power 140, Duty Factor 5, Cycles/Burst 200, Time 30 λεπτά. Αφού ολοκληρωθούν οι απαιτούμενες διαδικασίες του degas και του cool-down, το κάθε σωληνάκι τοποθετείται ένα ένα στην ειδική υποδοχή της συσκευής. Μετά το πέρας της διαδικασίας του κατακερματισμού όλων των δειγμάτων, τα δείγματα μεταφέρονται και φυλάσσονται στον πάγο. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 15 λεπτά στις 2.000 rpm στους 4 °C. Αυτό γίνεται για να απομακρυνθούν τα θραύσματα και τα υπολείμματα των κυττάρων. Στη συνέχεια , το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέα σωληνάκια. Ακολουθεί μια ακόμα φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 15 λεπτά στις 4.000 rpm στους 4 °C. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέα σωληνάκια και τα δείγματα

Πέψη με πρωτεϊνάση Κ

Ύστερα από τον κατακερματισμό της χρωματίνης, οι πρωτεΐνες των δειγμάτων υφίστανται πέψη από την πρωτεϊνάση Κ. Η πρωτεϊνάση Κ είναι μια εξωκυτταρική ενδοπεπτιδάση η οποία διασπά τους πεπτιδικούς δεσμούς σε συγκεκριμένα σημεία. Με αυτό τον τρόπο αυτό απομακρύνονται οι πρωτεΐνες από το δείγμα DNA και αντιστρέφεται η διασύνδεση (cross-linking). Ο διαχωρισμός των συστατικών μετά την πέψη των πρωτεϊνών από την πρωτεϊνάση Κ πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο φαινόλης- χλωροφόρμιου. Σε αυτό το σημείο δημιουργείται ένα διάλυμα δύο φάσεων 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.

Η αντίδραση πέψης με πρωτεϊνάση Κ (Proteinase K, recombinant, PCR Grade, 3115836001, Sigma-Aldrich) γίνεται συνήθως σε όγκο 100 μL. Το SDS πρέπει να είναι 0.5% και η PK 100 μg ανά αντίδραση.

<u>Καθαρισμός νουκλεϊκών οξέων με φαινόλη-χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με</u> <u>αιθανόλη</u>

Ο καθαρισμός με φαινόλη-χλωροφόρμιο (extraction) είναι μια βασική μέθοδος η οποία μπορεί και απομακρύνει αποτελεσματικά τις πρωτεΐνες που περιέχονται σε ένα δείγμα DNA. Η διαφορά μεταξύ της πυκνότητας και του φορτίου ανάμεσα στο νερό και στη φαινόλη είναι η βασική αρχή αυτής της μεθόδου. Η φαινόλη είναι ένα ισχυρό

αντιδραστήριο, διαλυτό στο νερό, το οποίο απομακρύνει τις περισσότερες πρωτεΐνες από το νουκλεϊκό οξύ με τη βοήθεια του χλωροφορμίου. Οι υπολειπόμενες πρωτεΐνες απομακρύνονται συνήθως με ενζυμική πέψη χρησιμοποιώντας δωδεκύλιο θειϊκό νάτριο (sodium dodecyl sulfate, SDS) και πρωτεϊνάση Κ, ο διαχωρισμός όμως των πρωτεϊνών από το νουκλεϊκό οξύ πραγματοποιείται με φυγοκέντρηση ενός μείγματος που περιέχει φαινόλη-χλωροφόρμιο και νουκλεϊκό οξύ. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας τα οργανικά αυτά αντιδραστήρια δημιουργούν σύμπλοκα/ενώσεις με τις πρωτεΐνες.

Η προσθήκη της φαινόλης σε ένα υδατικό διάλυμα οδηγεί στη δημιουργία δύο φάσεων, στην κατώτερη φάση εντοπίζεται η φαινόλη. Το χλωροφόρμιο έχει μεγαλύτερη πυκνότητα από αυτή του νερού και η πρόσθεσή του θα οδηγήσει τη μεταφορά της φαινόλης από την κατώτερη φάση στην ανώτερη. Με αυτό τον τρόπο, μετά τη φυγοκέντρηση η οποία διαχωρίζει τις δύο φάσεις, είναι πιο εύκολη η απομάκρυνση της οργανικής φάσης που είναι πλέον η ανώτερη (Mukhopadhyay and Roth 1993, Xiong *et al.*, 2014). Στο τέλος της διαδικασίας πραγματοποιείται κατακρήμνιση με αιθανόλη με την προσθήκη άλατος (CH3COONa) και αιθανόλης στην υδατική φάση, η οποία περιέχει το DNA. Το άλας εξουδετερώνει το αρνητικό φορτίο του DNA, με αποτέλεσμα να μη μπορεί να διαλυθεί στο νερό αναγκάζοντας το να κατακρημνιστεί από το διάλυμα.

Πειραματική διαδικασία

Μετά την ολονύχτια επώαση στους 65 °C, γίνεται προσθήκη μισού όγκου δείγματος, δηλαδή προστίθενται 50 μL χλωροφόρμιο (Chloroform biochemica της PanReac AppliChem) στα σωληνάκια με τη χρωματίνη. Στη συνέχεια προστίθεται μισός όγκος δείγματος, δηλαδή 50 μL φαινόλη (Phenol της PanReac AppliChem). Ακολουθεί ανάδευση σε συσκευή vortex για περίπου 10 δευτερόλεπτα. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 15 λεπτά στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Σε νέα σωληνάκια προστίθεται 1/10 του όγκου του δείγματος 3 Μ οξικό νάτριο (CH3COONa) pH5.2. Το οξικό νάτριο χρησιμοποιείται για την εξουδετέρωση των φορτίων του DNA ώστε να κατακρημνιστεί. 1 μL γλυκογόνου προστίθεται στο καπάκι του σωληνακίου ώστε να μην έρθει σε άμεση επαφή με το οξικό νάτριο. Το γλυκογόνο προστίθεται για αποτελεσματικότερη κατακρήμνιση του DNA. Ακολουθεί η μεταφορά της υδατικής φάσης (πάνω φάση) στα σωληνάκια (300 μL) και στη συνέχεια η προσθήκη 3 όγκων (της υδατικής φάσης) 100% αιθανόλη (Ethanol Absolute της BDH Chemicals). Τα δείγματα αναδεύονται και επωάζονται για 30 λεπτά στους -80 °C. Τα σωληνάκια φυγοκεντρούνται για 30 λεπτά στις 13.000 rpm στους 4 °C. Στη συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο με προσοχή (για να μη διαταραχθεί η πελέτα γλυκογόνου που έχει δημιουργηθεί στον πυθμένα των σωληνακίων και περιέχει το DNA). Τα δείγματα μένουν με ανοιχτά καπάκια για να στεγνώσουν και πραγματοποιείται πλύση με 500 μL 70% αιθανόλη (Ethanol Absolute της BDH Chemicals) ώστε να απομακρυνθεί η ποσότητα του οξικού νατρίου και ακολουθεί ήπια ανάδευση. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά στις 13.000 rpm στους 4 °C και απομακρύνεται όσο το δυνατόν περισσότερη ποσότητα υπερκείμενου και τα δείγματα μένουν με ανοιχτά καπάκια για να στεγνώσουν. Τέλος, γίνεται επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας σε 50 μ L 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 παρατηρηθεί το μέγεθος των κομματιών του DNA που έχουν προκύψει μετά τον κατακερματισμό της χρωματίνης με τη χρήση υπερήχων.

109

Πειραματική διαδικασία

Γίνεται προετοιμασία του ρυθμιστικού διαλύματος RIPA Buffer για την πλύση των μαγνητικών σφαιριδίων (μαγνητικά σφαιρίδια πρωτεΐνης G) ώστε να είναι έτοιμα να χρησιμοποιηθούν για το pre-clearing της χρωματίνης. Επίσης, πραγματοποιείται 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 στη χρωματίνη, ώστε να μπορέσουν στη συνέχεια να απομονωθούν μόνο τα σύμπλοκα DNA- αντίσωμα-πρωτεΐνη.

2X RIPA Buffer

- 1 mL Triton X-100
- 1 mL Tris pH8.0 (Cαρχικό= 1 M)
- 2.8 mL NaCl (Cαρχικό= 5 M)
- 0.2 g DOC (Sodium Deoxycholate της PanReac AppliChem)
- ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 50 mL

1X RIPA Buffer

- 25 mL 2X RIPA Buffer
- 25 mL ddH₂O

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προστίθενται 200 μL μαγνητικά σφαιρίδια πρωτεΐνης G σε ένα σωληνάκι. 100 μL θα χρησιμοποιηθούν ανά δείγμα για pre-clearing και 110 μL θα χρησιμοποιηθούν

για coupling. Το σωληνάκι με τα μαγνητικά σφαιρίδια τοποθετείται σε μαγνητική βάση για 2 λεπτά. Ακολουθεί απομάκρυνση του υπερκείμενου και στη συνέχεια προστίθεται 1 mL 1X RIPA Buffer και πραγματοποιείται καλή ανάδευση. Τα μαγνητικά σφαιρίδια επωάζονται σε πάγο για 5 λεπτά. Το σωληνάκι τοποθετείται σε μαγνητική βάση για 2 λεπτά και το υπερκείμενο απομακρύνεται. Να σημειωθεί ότι τα βήματα 4, 5, 6 και 7 για την πλύση των μαγνητικών σφαιριδίων επαναλαμβάνονται άλλες 2 φορές. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου, γίνεται προσθήκη 1.5 mL 1X RIPA Buffer και ακολουθεί καλή ανάδευση. Μοιράζεται η κατάλληλη ποσότητα μαγνητικών σφαιριδίων σε 3 νέα σωληνάκια που αντιστοιχούν σε 100 μL του αρχικού όγκου των σφαιριδίων, ενώ το υπόλοιπο παραμένει στο ρότορα στους 4 °C για ολονύκτια επώαση. Τα υπόλοιπα σωληνάκια τοποθετούνται στη μαγνητική βάση για 1 λεπτό. Στη συνέχεια το υπερκείμενο απομακρύνεται από τα μαγνητικά σφαιρίδια και πάνω σε αυτά προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα χρωματίνης από τα διαφορετικά χρονικά σημεία και πραγματοποιείται ανάδευση (900 μg χρωματίνη). Σε κάθε σωληνάκι που περιέχει τα μαγνητικά σφαιρίδια και τη χρωματίνη προστίθεται 500 μL 2X RIPA Buffer και συμπληρώνονται με ddH_2O μέχρι τελικό όγκο 1 mL. Στη συνέχεια τα σωληνάκια τοποθετούνται σε ρότορα για 30 λεπτά στους 4 °C στο cold room. Τα σωληνάκια με τα μαγνητικά σφαιρίδια και τη χρωματίνη μεταφέρονται από το ρότορα σε μαγνητική βάση για 4 λεπτά. Σε νέα σωληνάκια μοιράζεται η επιθυμητή ποσότητα χρωματίνης (400 μg) από το κάθε δείγμα, ανά χρονικό σημείο, και σε αυτά προστίθενται 300 μL 1X RIPA Buffer καθώς και η κατάλληλη ποσότητα του αντισώματος που προορίζεται για την ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης των δειγμάτων. 4 μg αντισώματος προστίθενται για το IRF3 και 7 μg για το p65 (Abcam) στο κάθε δείγμα. Σε νέα σωληνάκια προστίθενται το 1/20 της ποσότητας της χρωματίνης που υπάρχει σε κάθε αντίδραση ως input control είτε από την αρχική ποσότητα της χρωματίνης, είτε από τη χρωματίνη που έχει γίνει το pre-clearing. Τα σωληνάκια με τη χρωματίνη και το αντίστοιχο αντίσωμα και το σωληνάκι με την υπόλοιπη ποσότητα μαγνητικών σφαιριδίων μεταφέρονται σε ρότορα στους 4 °C για ολονύκτια επώαση και τα σωληνάκια με τα input control μεταφέρονται στους 4 °C.

Παρατηρήσεις

Κατά τη διάρκεια των πλύσεων των μαγνητικών σφαιριδίων, η απομάκρυνση του υπερκείμενου γίνεται με προσοχή ώστε να μην απομακρυνθούν και μαγνητικά σφαιρίδια.

Η διαδικασία του pre-clearing της χρωματίνης γίνεται ώστε να μειωθούν 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 πρωτεΐνεςστόχους που βρίσκονται πάνω στη χρωματίνη.

Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη μαγνητικών σφαιριδίων στα δείγματα χρωματίνηςαντισώματος ώστε να συνδεθούν τα σφαιρίδια με το αντίσωμα. Μετά την ανάδευση στο ρότορα, τα δείγματα τοποθετούνται σε μαγνητική βάση ώστε να γίνει απομάκρυνση του υπερκείμενου. Με αυτόν τον τρόπο παραμένουν στα σωληνάκια μόνο τα μαγνητικά σφαιρίδια τα οποία είναι ενωμένα με το αντίσωμα, δηλαδή την πρωτεΐνη-στόχο που βρίσκεται πάνω στη χρωματίνη. Στη συνέχεια, γίνεται πλύση των μαγνητικών σφαιριδίων και πέψη με πρωτεϊνάση Κ ώστε να απελευθερωθεί το DNA από τις πρωτεΐνες.

2X Wash RIPA Buffer

- 1 mL Triton X-100
- 1 mL Tris pH8.0 (Cαρχικό= 1 M)
- 1 mL 10% SDS
- 5 mL NaCl (Cαρχικό = 5 M)
- 0,14 g DOC (Sodium Deoxycholate της PanReac AppliChem)
- ddH2O μέχρι τελικό όγκο 50 mL

1X Wash RIPA Buffer

- 25 mL 2X Wash RIPA
- 25 mL ddH₂O

Πειραματική διαδικασία

Μεταφορά των σωληνακίων με τη χρωματίνη και τα αντισώματα και τα input control καθώς καθώς και του σωληνακίου με τα μαγνητικά σφαιρίδια σε πάγο. Στα σωληνάκια με τη χρωματίνη και τα αντισώματα γίνεται προσθήκη ίσου όγκου μαγνητικών σφαιριδίων, 100 μL. Στα input δείγματα δεν προστίθενται σφαιρίδια. Τα σωληνάκια τοποθετούνται σε ρότορα στους 4 °C στο cold room για 3 ώρες και στη συνέχεια μεταφέρονται σε πάγο και έπειτα σε μαγνητική βάση για 2 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθεται 1 mL 1X Wash RIPA Buffer. Ακολουθεί επώαση σε πάγο για 3 λεπτά, ώστε να γίνει η ομογενοποίηση, και στη συνέχεια γίνεται και τα βήματα 6, 7, 8 και 9 επαναλαμβάνονται άλλες 4 φορές για την πλύση των μαγνητικών σφαιριδίων. Ακολουθεί πέψη με πρωτεϊνάση K (τόσο για τα δείγματα χρωματίνης όσο και για τα input control) Σε κάθε σωληνάκι προστίθενται 4 μL 25 mg/mL PK, 2.5 μL 10% SDS και συμπληρώνεται ο όγκος με ddH₂O μέχρι τα 50 μL. Τα σωληνάκια επώσοη στους 67 °C.

Παρατηρήσεις

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 του πειράματος, γίνεται πρόσδεση των μαγνητικών σφαιριδίων με το αντίσωμα-χρωματίνη και η απομόνωσή τους από την υπόλοιπη χρωματίνη. Στη συνέχεια, με τη χρήση των σφαιριδίων.γίνεται ο διαχωρισμός της χρωματίνης από τα πρωτεϊνικά κατάλοιπα Τέλος, στην καθαρισμένη χρωματίνη προστίθεται αιθανόλη για την κατακρήμνιση και διαλυτοποίηση της σε νερό.

Πειραματική διαδικασία

Μετά την ολονύκτια επώαση στους 67 °C, γίνεται φυγοκέντρηση στα δείγματα τα οποία τοποθετούνται σε μαγνητική βάση (εκτός από τα input control δείγματα) για 5 λεπτά και στη συνέχεια μεταφέρεται το υπερκείμενο σε νέο σωληνάκι. Ακολουθεί προσθήκη 2 όγκων (100 μL) Nucleomag μαγνητικών σφαιριδίων σε όλα τα δείγματα και επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα τοποθετούνται σε μαγνητική βάση για 5 λεπτά και ακολουθεί πλύση με 80% αιθανόλη ώστε να καλυφθούν τα σφαιρίδια. Απομακρύνεται με προσοχή η αιθανόλη και πραγματοποιείται μια ακόμα πλύση με 80% αιθανόλη. Απομακρύνεται η αιθανόλη και τα δείγματα μένουν με ανοιχτά καπάκια για λίγα λεπτά έως ότου στεγνώσουν. Προστίθενται 52 μL ddH₂O και με πιπετάρισμα γίνεται μια καλή ομογενοποίηση με τα σφαιρίδια. Τα δείγματα επωάζονται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και τοποθετούνται σε μαγνητική βάση για 3 λεπτά. Το υπερκείμενο (50 μL) μεταφέρεται σε καινούργια σωληνάκια.

Τα σωληνάκια 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.

Δημιουργία Γενωμικής Βιβλιοθήκης

Οι γενωμικές βιβλιοθήκες προετοιμάστηκαν χρησιμοποιώντας το δημοσιευμένο πρωτόκολλο (Ford *et al.,* 2014) με τροποποιήσεις. Πιο συγκεκριμένα, το NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (Index Primers Set 1 and 2) (Ε7335S και Ε7500S, Illumina) χρησιμοποιήθηκε για την προσθήκη αλληλουχιών συμβατών άκρων με τα κομμάτια του DNA. Η αλληλούχηση ευρείας κλίμακας νέας γενιάς πραγματοποιήθηκε στο μηχάνημα NextSeq500 και στο NovaSeq6000 χρησιμοποιώντας 75 bp single end και 100 bp paired-end reads, αντίστοιχα, στο Ελληνικό Κέντρο Γονιδιωματικής που βρίσκεται στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.

Για την πραγματοποίηση της γονιδιωματικής ανάλυσης των πειραμάτων πρέπει να γίνει αλληλούχηση ευρείας κλίμακας νέας γενιάς. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιείται κατασκευή γενωμικής βιβλιοθήκης (High Complexity) των δειγμάτων. Πιο αναλυτικά, η διαδικασία δημιουργίας γενωμικής βιβλιοθήκης αποτελείται από 7 βήματα. Αρχικά, γίνεται επιδιόρθωση των άκρων του DNA, καθαρισμός της αντίδρασης με ειδικά σφαιρίδια και ακολουθεί προσθήκη αδενίνης στα 3' άκρα του DNA. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται αντίδραση λιγάσης για την προσθήκη ανταπτόρων (adapter) στα άκρα του DNA και πολλαπλασιασμός της βιβλιοθήκης με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Στο τέλος, κάθε βήματος πραγματοποιείται καθαρισμός των δειγμάτων με ειδικά σφαιρίδια.

Πειραματική διαδικασία

<u>Βήμα 1⁰:</u>

Επιδιόρθωση των άκρων του DNA

Συστατικά για το μείγμα επιδιόρθωσης των άκρων του DNA (Vτελικό= 50 μL)

- 5 µL T4 DNA Ligase Buffer (NEB)
- 1 µL T4 DNA Polymerase (NEB)
- 1 µL Polynucleotide Kinase (NEB)
- 2 µL dNTPs 10 mM
- 1 µL DNA Polymerase I Klenow large fragment (NEB)
- ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 50 μL

Τα δείγματα επωάζονται σε μηχάνημα PCR στους 20 °C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, γίνεται καθαρισμός των δειγμάτων με μαγνητικά σφαιρίδια NucleoMag (NucleoMag NGS Clean-up and Size Select Beads, 744970.50 Macherey Nagel)

- 1. Προσθήκη διπλάσιου όγκου σφαιριδίων (100 μL) στα δείγματα
- 2. Επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 3. Τοποθέτηση των δειγμάτων σε μαγνητική βάση για 5 λεπτά
- 4. Αφαίρεση του υπερκείμενου
- 5. Προσθήκη 200 μL 80% αιθανόλης (1^η πλύση)
- 6. Επώαση στη μαγνητική βάση για 30 δευτερόλεπτα
- 7. Αφαίρεση της αιθανόλης
- 8. Προσθήκη 200 μL 80% αιθανόλης (2^η πλύση)
- 9. Επώαση στη μαγνητική βάση για 30 δευτερόλεπτα
- Αφαίρεση του υπερκείμενου 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 στη μαγνητική και επώαση για 5 λεπτά
- 13. Μεταφορά 34 μL από το υπερκείμενο και μεταφορά σε νέα σωληνάκια

<u>Βήμα 2⁰:</u>

<u>Προσθήκη αδενίνης στα 3' άκρα του DNA</u>

Συστατικά για το μείγμα προσθήκης αδενίνης στα άκρα του DNA (Vτελικό =50 μL)

- 34 μL DNA από το προηγούμενο βήμα
- 5 µL NEB 2 (10X) Buffer
- 10 µL dATPs 1 mM
- 1 µL Klenow Fragment (3' \rightarrow 5' exo-) (NEB)

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

Στη συνέχεια, γίνεται καθαρισμός των δειγμάτων με σφαιρίδια NucleoMag, όπως έχει περιγραφεί στο προηγούμενο βήμα. Η έκλουση γίνεται με προσθήκη 11 μL ddH2O.

<u>Βήμα 3⁰:</u>

Αντίδραση λιγάσης για την προσθήκη ανταπτόρων στα άκρα του DNA

Συστατικά για το μείγμα της αντίδρασης λιγάσης (Vτελικό= 30 μL)

- 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® (Index Primers Set 1 and 2, E7335S and E7500S)]

• 2 µL ddH₂O

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

Μετά το πέρας των 30 λεπτών, ακολουθεί προσθήκη 3 μL USER TM Enzyme Mix. Ακολουθεί επώαση σε μηχάνημα PCR στους 37 °C για 30 λεπτά.

Στη συνέχεια, γίνεται καθαρισμός της αντίδρασης με σφαιρίδια NucleoMag. Σε αυτό το βήμα χρησιμοποιείται 1.6:1 αναλογία του όγκου του διαλύματος των σφαιριδίων προς τον όγκο του δείγματος του DNA. Η έκλουση γίνεται με 20 μL ddH₂O.

<u>Βήμα 4⁰:</u>

Περιορισμένος πολλαπλασιασμός της βιβλιοθήκης με PCR

Η ανίχνευση των ειδικών γενωμικών περιοχών, τα οποία αποτελούν θέσεις πρόσδεσης μιας πρωτεΐνης, στα δείγματα ελέγχου και στα ανοσοκατακρημνισμένα δείγματα αναλύεται ξεχωριστά μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction). Με το βαθμό εμπλουτισμού μιας δεδομένης χρωμοσωμικής ακολουθίας, που φέρει θέσεις πρόσδεσης για την πρωτεΐνη ή ακόμα που δε φέρει καμία θέσεις πρόσδεσης διαπιστώνεται αν μια συγκεκριμένη περιοχή αποτελεί θέση πρόσδεσης του υπό μελέτη μεταγραφικού παράγοντα.

Σε αυτό το βήμα γίνεται περιορισμένος πολλαπλασιασμός της βιβλιοθήκης με PCR για 5 κύκλους για ενίσχυση του DNA πριν την επιλογή κατάλληλου μεγέθους σε πήκτωμα αγαρόζης. Ο πολλαπλασιασμός της βιβλιοθήκης πραγματοποιείται με ειδικούς εκκινητές, οι οποίοι προσδένονται στην αλληλουχία των ανταπτόρων και περιέχουν στα άκρα τους νουκλεοτίδια που είναι συμπληρωματικά με τις θέσεις εισαγωγής της βιβλιοθήκης. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται μετατροπή των άκρων των ανταπτόρων που έχουν σχήμα Y σε δίκλωνο DNA το οποίο θα διαχωριστεί σύμφωνα με το μέγεθός του σε πήκτωμα αγαρόζης.

Συστατικά για το μείγμα της αντίδρασης πολυμερισμού (Vτελικό= 50 μL)

- 19 μL DNA από το προηγούμενο βήμα
- $\bullet~1~\mu L$ Universal Primer / NEBNext adaptor, Universal PCR Primer for Illumina
- 25 μL 2X Kapa Hifi Hotstart Ready Mix Pol (το μείγμα περιέχει το Buffer του ενζύμου, τα νουκλεοτίδια και το ένζυμο)
- 1 µL NebNext index primer
- 4 µL ddH₂O

Η αποδιάταξη του δίκλωνου DNA γίνεται στους 98 °C για 45 δευτερόλεπτα στην αρχή και 15 δευτερόλεπτα στην αρχή κάθε κύκλου. Η υβριδοποίηση πραγματοποιείται στους 63 °C για 30 δευτερόλεπτα και η επιμήκυνση των προϊόντων στους 72 °C για 30 δευτερόλεπτα στους 72 °C (5X κύκλοι). Επώαση στους 4 °C μέχρι την αφαίρεση των αντιδράσεων από το μηχάνημα της PCR.

Στη συνέχεια πραγματοποιείται καθαρισμός της αντίδρασης με σφαιρίδια NucleoMag. Και σε αυτό το βήμα χρησιμοποιείται 1.6:1 αναλογία του όγκου του διαλύματος των σφαιριδίων προς τον όγκο του δείγματος του DNA. Ακολουθεί

επώαση των αντιδράσεων για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το σωληνάκι τοποθετήθηκε σε μαγνήτη για 5 λεπτά. Ακολούθησε αφαίρεση του υπερκείμενου, προσθήκη 500 μL 80% αιθανόλης και επώαση στο μαγνήτη για 30 δευτερόλεπτα. Αφαιρείται το υπερκείμενο και ακολουθεί άλλη μια πλύση με 80% αιθανόλη. Το υπερκείμενο αφαιρείται και το σωληνάκι στεγνώνει για μερικά λεπτά, αφού έχει αφαιρεθεί από το μαγνήτη. Η έκλουση γίνεται με προσθήκη 11.5 μL ddH₂O και έπειτα επωάζονται για λίγα λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μεταφορά σε μαγνήτη και επώαση για 3 λεπτά. Αφαίρεση 10 μL από το υπερκείμενο και μεταφορά σε νέο σωληνάκι.

<u>Βήμα 5⁰:</u>

Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και επιλογή συγκεκριμένου εύρους μεγεθών

- Ηλεκτροφόρηση 10 μL από τις αντιδράσεις που προέκυψαν στο παραπάνω βήμα με προσθήκη 6Χ χρωστικής (περιέχει xylene cyanol και bromophenol blue). Φόρτωση 200 ng από 100 bp μάρτυρα
- 2. Ηλεκτροφόρηση στα 100 V για 45 λεπτά
- Απομόνωση του τμήματος του πηκτώματος που περιέχει υλικό μεταξύ 250 και 500 bp, με τη βοήθεια αποστειρωμένης λεπίδας και μεταφορά σε σωληνάκια
- Ακολουθεί απομόνωση του DNA από το πήκτωμα αγαρόζης με τη χρήση του NUCLEOSPIN Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel kit)

- Μετά τη μεταφορά των στηλών σε νέα σωληνάκια γίνεται προσθήκη 30 μL ddH₂O για την έκλουση και επώαση 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 6. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου
- 7. Μεταφορά του εκλουώμενου υλικού σε νέα σωληνάκια

<u>Βήμα 6⁰:</u>

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, πραγματοποιήθηκε ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο.

Τα συστατικά για την ποσοτική αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο είναι τα εξής:

- 1 μL της ποσότητας DNA που προέκυψε από το προηγούμενο βήμα (1/20)
- 10 µL KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal
- 0,5 µL index primer

 $\bullet~0,5~\mu L$ Universal Primer/NEBNext adaptor, Universal PCR Primer for Illumina

• 8 µL ddH₂O

Ο πολλαπλασιασμός του DNA πραγματοποιήθηκε με το ακόλουθο πρωτόκολλο:

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

Ο αριθμός των κύκλων που είναι απαραίτητοι για τον πολλαπλασιασμό του συνολικού DNA είναι αυτός στον οποίο η αντίδραση βρίσκεται στο μέσο της εκθετικής φάσης. Δε θα πρέπει να ξεπερνά τους 20 κύκλους. Γνωρίζοντας τον αριθμό αυτό στη συνέχεια ακολούθησε ο πολλαπλασιασμός του ολικού υλικού.

<u>Βήμα 7⁰:</u>

Πολλαπλασιασμός της βιβλιοθήκης με PCR

Τα συστατικά για την αντίδραση της PCR είναι τα εξής:

- 18 μL DNA το οποίο απομονώθηκε από το πήκτωμα αγαρόζης
- 25 µL Kapa Hifi Hot Start Ready Mix
- 2.5 µL NEBNext index primer
- $\bullet~2.5~\mu L$ Universal Primer / NEBNext adaptor, Universal PCR Primer for Illumina

Ο πολλαπλασιασμός του DNA έγινε σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο:

Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA για 45 δευτερόλεπτα στους 98 °C και 15 δευτερόλεπτα στην αρχή κάθε κύκλου. Η υβριδοποίηση πραγματοποιείται στους 63 °C για 30 δευτερόλεπτα και η επιμήκυνση των προϊόντων στους 72 °C για 30 δευτερόλεπτα και για 60 δευτερόλεπτα στους 72 °C. Ο συνολικός αριθμός των κύκλων στους οποίους γίνεται πολλαπλασιασμός είναι από 5 έως 13 κύκλοι.

Στη συνέχεια πραγματοποιούνται δύο καθαρισμοί με σφαιρίδια NucleoMag, όπως περιγράφηκε στο βήμα 1. Στο βήμα αυτό χρησιμοποιείται 1.2:1 αναλογία του όγκου του διαλύματος των σφαιριδίων προς τον όγκο του δείγματος του DNA (50 μL). Για την τελική έκλουση γίνεται προσθήκη 42 μL ddH₂O και επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μεταφορά στη μαγνητική βάση και επώαση για 5 λεπτά. Γίνεται αφαίρεση 40 μL από το υπερκείμενο σε νέα σωληνάκια. Τέλος, γίνεται προσθήκη 48 μL σφαιριδίων NucleoMag και επανάληψη του πρωτόκολλου καθαρισμού. Έκλουση σε 11 μL ddH₂O.

Μετά από το πέρας της κατασκευής των βιβλιοθηκών πραγματοποιήθηκε ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο για να διαπιστωθεί αν έχει διατηρηθεί η σχετική αναλογία των θετικών και αρνητικών στόχων και επομένως εάν η ποιότητα της βιβλιοθήκης είναι ικανοποιητική.

Mέθοδος FAIRE - Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements

Η μέθοδος FAIRE (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements) μας δίνει τη δυνατότητα να ανιχνεύσουμε σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος την ύπαρξη περιοχών που στερούνται νουκλεοσωμάτων, και επομένως έχουν αυξημένη πιθανότητα να λειτουργούν ως ενισχυτές, *in vivo*. Είναι ένα σύγχρονο πειραματικό εργαλείο για την ταυτοποίηση περιοχών του γονιδιώματος που ρυθμίζουν τη μεταγραφή και κατ' επέκταση τη γονιδιακή έκφραση (Simon *et al.*, 2012; Simon *et al.*, 2013). Η μέθοδος βασίζεται στη χρήση της φορμαλδεΰδης για να γίνει η εγκάρσια σύνδεση του DNA με τα νουκλεοσώματα και στη διαφορετική ικανότητα μονιμοποίησης μεταξύ του ελεύθερου από πρωτεΐνες DNA και νουκλεοσωμάτων ή μεταξύ DNA και πρωτεΐνών που προσδένονται στο DNA (Nagy et al., 2009; Song *et* al., 2011) (Εικόνα 25). FAIRE Cells crosslinked with formaldehyde

Εικόνα 25. Η βασική αρχή της μεθόδου FAIRE είναι η χρήση φορμαλδεΰδης για την ομοιοπολική δέσμευση πρωτεϊνών και DNA, κατά προτίμηση ιστονών. Μετά τον κατακερματισμό με υπερήχους, η εκχύλιση με φαινόλη-χλωροφόρμιο επιτρέπει την ανάκτηση του "ελεύθερου" DNA στην υδατική φάση, ενώ οι πρωτεΐνες και τα νουκλεοσώματα παραμένουν στην οργανική φάση (Image modified from Giresi *et* al., 2007)

Πειραματική διαδικασία FAIRE - Sequencing

Εφαρμόζουμε το δημοσιευμένο Faire-seq πρωτόκολλο με τροποποιήσεις (Simon *et al.,* 2013) ώστε να ανιχνεύσουμε σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος τις περιοχές που στερούνται νουκλεοσωμάτων και επομένως είναι πολύ πιθανό να λειτουργούν ως ενισχυτές. Η αλληλούχηση ευρείας κλίμακας νέας γενιάς πραγματοποιήθηκε στο μηχάνημα HiSeq 2000 Sequencing System χρησιμοποιώντας 50 bp single end στο <u>EMBL Genomics Core Facility.</u>

Καλλιέργεια κυττάρων, μονιμοποίηση και λύση κυττάρων

Η καλλιέργεια των κυττάρων γίνεται σε 150 mm² πιάτα. Να σημειωθεί ότι σε κάθε πείραμα χρησιμοποιούνται 15 εκατομμύρια κύτταρα, ενώ η πυκνότητά (confluency) τους πρέπει να φθάνει το 85-95 %. Τα κύτταρα μολύνονται με ιό Sendai για 3 και 6 ώρες ενώ σαν δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που δεν έχουν υποστεί μόλυνση. Αρχικά, τα κύτταρα επωάζονται σε διάλυμα 1% φορμαλδεΰδης (F8775, Sigma-Aldrich) και επωάζονται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η φορμαλδεΰδη απενεργοποιείται με τη χρήση γλυκίνης σε τελική συγκέντρωση 125 mM και ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα απορρίπτεται και πραγματοποιείται διπλή πλύση των κυττάρων με PBS. Ακολουθεί λύση των κυττάρων με τη χρήση ειδικού γουδιού σε 7 mL διαλύματος λύσης B και τα κύτταρα μεταφέρονται σε σωληνάκια των 15 mL και προστίθενται 2 mL διαλύματος που περιέχει σουκρόζη. Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται στις 2.100 g για 45 λεπτά στους 4 °C. Γίνεται απόρριψη του υπερκείμενου και επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας σε 2 mL διαλύματος λύσης A.

Κατακερματισμός χρωματίνης και απομόνωση input DNA

Μετά την απομόνωση και τη λύση των πυρήνων, ακολουθεί ο κατακερματισμός της χρωματίνης με υπερήχους μέχρι το μέγεθος των θραυσμάτων της χρωματίνης να είναι κάτω από 1000 ζεύγη βάσεων με τη χρήση της συσκευής Sonics Vibra VCX 500 sonicator. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση μιας ποσότητας 100 μL από το δείγμα σε 13.000 g για 5 λεπτά στους 4 °C για την κατακρήμνιση πιθανών ιζημάτων. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι στο οποίο προστίθενται 24 μg RNaseA και πραγματοποιείται επώαση για 30 λεπτά στους 37 °C. Στη συνέχεια προστίθενται 40 μg πρωτεϊνάση Κ και γίνεται επώαση στους 55 °C για 1 ώρα και ακολουθεί ολονύκτια επώαση στους 65 °C. Στη συνέχεια προστίθενται 200 μL Tris-Hcl pH7.4 και 300 μL φαινόλης/χλωροφορμίου και γίνεται έντονη ανάδευση για δέκα δευτερόλεπτα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.000 g για 12 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφέρεται η άνω φάση σε νέο σωληνάκι. Η άνω φάση που απομονώθηκε είναι εμπλουτισμένη για περιοχές ανοιχτής χρωματίνης. Στη συνέχεια προστίθεται ένας όγκος φαινόλης/χλωροφόρμιου και γίνεται έντονη ανάδευση για 10 δευτερόλεπτα. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 12 λεπτά στις 12.000 g σε θερμοκρασία δωματίου και γίνεται απομόνωση της άνω φάσης σε νέο σωληνάκι. Ακολουθεί προσθήκη ίσου όγκου χλωροφόρμιου και γίνεται έντονη ανάδευση για 10 δευτερόλεπτα. Τα δείγματα

φυγοκεντρούνται στις 12.000 g για 12 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και γίνεται μεταφορά της άνω φάσης σε νέο σωληνάκι. Στη συνέχεια προστίθενται 1/10 του όγκου 3M οξικό νάτριο pH 5.2, 2 όγκοι 100% αιθανόλη και 20 μg γλυκογόνου και ακολουθεί έντονη ανάδευση. Ακολουθεί επώαση στους -80 °C για 60 λεπτά και φυγοκέντρηση στις 12.000 g για 15 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο αφαιρείται και γίνεται πλύση με 500 μL 70% αιθανόλη. Το υπερκείμενο αφαιρείται ξανά και τα δείγματα επαναδιαλυτοποιούνται σε 20 μL H₂O. Ακολουθεί μέτρηση της συγκέντρωσης DNA στο μηχάνημα ανίχνευσης φθορισμού Qubit (Thermo Fischer Scientific). Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση 500 ng των δειγμάτων DNA σε 2% πηκτώματος αγαρόζης για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας του κατακερματισμού της χρωματίνης με υπερήχους.

Απομόνωση του FAIRE DNA

Μια ποσότητα 500 μL από το κάθε δείγμα θα υποστεί φυγοκέντρηση στις 13.000 g για 5 λεπτά στους 4 °C για την κατακρήμνιση πιθανών ιζημάτων. Στη συνέχεια προστίθενται 500 μL φαινόλης/χλωροφόρμιου και γίνεται έντονη ανάδευση για δέκα δευτερόλεπτα. Ακολουθεί άλλη μια φυγοκέντρηση στις 12.000 g για 12 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και γίνεται μεταφορά της άνω φάσης σε νέο σωληνάκι. Ακολουθεί προσθήκη ενός όγκου φαινόλης/χλωροφόρμιου και γίνεται έντονη ανάδευση για 10 δευτερόλεπτα. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται ξανά στις 12.000 g για 12 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και γίνεται ξανά μεταφορά της άνω φάσης σε νέο σωληνάκι. Προστίθεται ίσος όγκος χλωροφόρμιου και γίνεται έντονη ανάδευση για 10 δευτερόλεπτα. Ακολουθεί άλλη μια φυγοκέντρηση στις 12.000 g για 12 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και γίνεται μεταφορά της άνω φάσης σε νέο σωληνάκι. Προστίθενται 1/10 του τελικού όγκου 3Μ οξικό νάτριο pH5.2, 2 όγκοι 100% αιθανόλη και 20 μg γλυκογόνου και γίνεται έντονη ανάδευση. Τα δείγματα επωάζονται στους -80 °C για 60 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.000 g για 15 λεπτά στους 4 ° και γίνεται αφαίρεση του υπερκείμενου και πλύση με 500 μL 70% αιθανόλη. Το υπερκείμενο αφαιρείται και γίνεται επαναδιάλυση σε 20 μL H2O. Σε αυτό το σημείο
γίνεται μέτρηση της συγκέντρωσης DNA στο μηχάνημα ανίχνευσης φθορισμού Qubit (Thermo Fischer Scientific).

Ακολουθεί προσθήκη 24 μg RNaseA και επώαση για 30 λεπτά στους 37 °C. Στη συνέχεια προστίθενται 40 μg πρωτεϊνάση K, γίνεται επώαση στους 55 °C για 1 ώρα και ακολουθεί ολονύκτια επώαση στους 65 °C. Η αντίδραση καθαρίζεται με την προσθήκη 125 μL Agencourt Ampure XP beads (Beckman Coulter) και τα δείγματα επωάζονται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα σωληνάκια μεταφέρονται σε μαγνήτη και επωάζονται για άλλα 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο αφαιρείται και πραγματοποιούνται 2 πλύσεις με 80% αιθανόλη. Η διάρκεια της κάθε πλύσης είναι 30 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, τα σωληνάκια αφαιρούνται από το μαγνήτη και αφού στεγνώσουν από τα ίχνη αιθανόλης, προστίθενται σε αυτά 50 μL H20. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά. Τα σωληνάκια μεταφέρεται και μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι. Ακολουθεί μέτρηση της συγκέντρωσης DNA με το μηχάνημα μέτρησης φθορισμού Qubit (Thermo Fischer Scientific).

Έλεγχοι ποιότητας και αλληλούχηση ευρείας κλίμακας νέας γενιάς

Έλεγχος ποιότητας (A): Πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση 100 ng FAIRE-DNA και input DNA σε 2% πηκτώματος αγαρόζης στα 120V για 1 ώρα. Το μέγεθος των κομματιών FAIRE-DNA πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 70 και 200 ζευγών βάσεων.

Ελεγχος ποιότητας (B): Γίνεται σύγκριση της ποσότητας DNA που απομονώθηκε από το FAIRE πείραμα σε σχέση με αυτή που απομονώθηκε από το input control DNA, λαμβάνοντας υπ' όψιν και τους διαφορετικούς όγκους του αρχικού υλικού που χρησιμοποιήθηκαν. Για ένα επιτυχημένο πείραμα ο λόγος της ποσότητας που απομονώθηκε από το FAIRE πείραμα σε σχέση με την ποσότητα που απομονώθηκε από το input control πείραμα δε θα πρέπει να υπερβαίνει το 5%.

Έλεγχος ποιότητας (Γ): Πραγματοποιείται πολλαπλασιασμός συγκεκριμένων περιοχών του γονιδιώματος που έχουν καταγραφεί σε πολλούς κυτταρικούς τύπους να βρίσκονται ή όχι σε νουκλεοσωμικό περιβάλλον και σύγκριση των αποτελεσμάτων προκειμένου να διαπιστωθεί η αρτιότητα της απομόνωσης FAIRE-DNA. Συνίσταται η πραγματοποίηση qPCR (Simon *et al.,* 2012).

Σε αυτό το σημείο, το DNA είναι έτοιμο να υποβληθεί σε προετοιμασία κατασκευής γενωμικής βιβλιοθήκης (από 25-50 ng) FAIRE DNA σύμφωνα με το TruSeq ChIP Library Preparation Kit Set A and B της Illumina και αλληλούχηση ευρείας κλίμακας νέας γενιάς των δειγμάτων σε μηχάνημα της Illumina (IP-202-1012 και IP- 202-1024 Illumina).

Διαλύματα

Διάλυμα λύσης Α

10 mM Tris-HCl pH8.0 2% Triton X-100 1% SDS 100 mM NaCl 1 mM EDTA **Διάλυμα λύσης Β** 10 mM Tris-HCl pH7.4 15 mM NaCl 60 mM KCl 1 mM EDTA 0.1% NP-40 5% σουκρόζη

Διάλυμα σουκρόζης

10 mM Tris pH7.4 15 mM NaCl 60 mM KCl 10% σουκρόζη

Mέθοδος DNaseI - DNaseI-Hypersensitive Sites (DHS)

Η μέθοδος DNaseI-Hypersensitive Sites (DHS) είναι μια τεχνική που καθίσταται ολοένα και πιο σημαντική την κατανόηση των διαδικασιών αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης. Το μεταγραφικά ανενεργό DNA βρίσκεται σε μορφή συμπυκνωμένης χρωματίνης, γεγονός που το καθιστά μη διαθέσιμο στο σύμπλοκο έναρξης της μεταγραφής. Η ενεργοποίηση των γονιδίων απαιτεί πρώτα την αναδιαμόρφωση της δομής της χρωματίνης, με το DNA να είναι προσβάσιμο σε μεταγραφικούς παράγοντες (John *et al.*, 2011; Thurman *et al.*, 2012). Αυτή η αλλαγή στη δομή της χρωματίνης που σχετίζεται με την ικανότητα της μεταγραφής χαρακτηρίζεται από αυξημένη παρουσία θέσεων υπερ-ευαισθησίας του προσβάσιμου DNA στην πέψη με DNaseI. Αυτή η αυξημένη ευαισθησία αναφέρεται ως υπερ-ευαισθησία στη DNaseI (Elgin, 1981; Song, 2011).

Οι προσβάσιμες περιοχές, που ονομάζονται θέσεις υπερ-ευαισθησίας στη DNaseI (DNaseI Hypersensitive Sites, DHSs), χαρακτηρίζουν περιοχές του γονιδιώματος με ρυθμιστική δράση (ενισχυτές, υποκινητές, μονωτές) (Lu and Richardson, 2004; Song, 2011). Η χαρτογράφηση των θέσεων υπερ-ευαισθησίας στη DNaseI αποτελεί ένα ισχυρό πειραματικό εργαλείο για την ταυτοποίηση των ρυθμιστικών στοιχείων του DNA σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος (Zeng and Mortazavi, 2012) (Εικόνα 26). Η χαρτογράφηση των ρυθμιστικών περιοχών επιτρέπει και συμβάλλει στην κατανόηση θεμελιωδών βιολογικών διεργασιών, όπως η γονιδιακή έκφραση, η αντιγραφή και η οργάνωση του γονιδιώματος καθώς και των επιπτώσεων που έχουν οι όποιες βλάβες των παραπάνω διαδικασιών στην υγεία του ανθρώπου (Stalder *et* al., 1980; Elgin *et* al., 1990; Thurman *et* al., 2012).



Εικόνα 26. Χαρτογράφηση υψηλής ανάλυσης της προσβασιμότητας της χρωματίνης. Απεικόνιση των θέσεων υπερ-ευαισθησίας στη DNaseI εντός της χρωματίνης (Wang et al., 2012).

Ακολούθως, περιγράφεται το σύνολο της μεθόδου για την απομόνωση πυρήνων, την πέψη των πυρήνων με περιορισμένες συγκεντρώσεις DNaseI και την απομόνωση των υπερ-ευαίσθητων θέσεων, η οποία ακολουθείται από τη μέθοδο αλληλούχησης ευρείας κλίμακας νέας γενιάς (Next Generation Sequencing).

Η υψηλής ανάλυσης μοριακή τεχνική εφαρμόστηκε με επιτυχία σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές ακολουθώντας <u>το δημοσιευμένο DNaseI-seq πρωτόκολλο (John et al., 2013) για να ανιχνεύσουμε τις προσβάσιμες περιοχές της χρωματίνης που φιλοξενούν τις θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίες είναι πιθανόν να αντιστοιχούν σε ενισχυτές.</u>

Πειραματική διαδικασία

Για την πειραματική πορεία είναι απαραίτητη η προετοιμασία των παρακάτω ρυθμιστικών διαλυμάτων:

<u>Διάλυμα Α</u>

-15 mM Tris, pH8.0 -15 mM NaCl -60 mM KCl -1 mM EDTA -0.5 mM spermidine

Διάλυμα αναστολής της αντίδρασης

-50 mM Tris, pH8.0 -100 mM NaCl -0,1% SDS -100 mM EDTA Προσθέτουμε 20 μg ανά mL RNaseA πριν τη χρήση

<u>Διάλυμα πέψης</u>

-40 mM Tris, pH8.0 -10 mM NaCl -6 mM MgCl2 -1 mM CaCl2

Καλλιέργεια κυττάρων και απομόνωση πυρήνων

Η καλλιέργεια των κυττάρων γίνεται 10 cm πιάτα για κάθε πειραματική συνθήκη μέχρι η πυκνότητα των κυττάρων (confluency) να φθάσει το 85-95 %. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 2.000 rpm για 5 λεπτά στους 4 °C και απόρριψη του υπερκείμενου. Ακολουθεί πλύση των κυττάρων με PBS δύο φορές και απόρριψη του υπερκείμενου. Η πελέτα επαναδιαλυτοποιείται στο διάλυμα Α σε πυκνότητα 5 εκατομμυρίων κυττάρων ανά mL και μεταφέρεται σε σωληνάκι των 1.5 mL. Προσθήκη του απορρυπαντικού IGEPAL630 ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και στη συνέχεια τα δείγματα επωάζονται στον πάγο για 8 λεπτά. Ακολουθεί έλεγχος της αποτελεσματικότητας της λύσης της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων με χρήση

της χρωστικής Trypan blue και παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 2.000 rpm στους 4 °C.

Αντίδραση πέψης με DNasel

Πραγματοποιείται επαναδιάλυση σε 500 μL διαλύματος πέψης ανά 2.5 εκατομμύρια κύτταρα. Σε κάθε σωληνάκι προστίθενται 80 Units DNaseI (DNaseI recombinant, 04716728001, Roche). Η ποσότητα κάθε φορά μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και τον αριθμό των κυττάρων. Ακολουθεί επώαση της αντίδρασης για 3 λεπτά στους 37 °C ή σε θερμοκρασία δωματίου και προσθήκη του διαλύματος αναστολής της αντίδρασης και επώαση στους 55 °C για 15 λεπτά. Τέλος, προστίθενται 40 μg πρωτεϊνάσης K και τα δείγματα επωάζονται στους 55 °C για τουλάχιστον 18 ώρες.

<u>Καθαρισμός DNA</u>

Μετά την επώαση στους 55 °C, προστίθενται στα δείγματα ίσος όγκος διαλύματος φαινόλης-χλωροφόρμιου και γίνεται ήπια ανάδευση. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 13.000 rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφέρεται η άνω φάση σε νέο σωληνάκι. Στη συνέχεια προστίθεται 1/10 του όγκου 3M οξικό νάτριο pH5.2, 20 μg γλυκογόνου και 3 όγκοι απόλυτης αιθανόλης. Πραγματοποιείται ανάδευση και τα δείγματα επωάζονται στους -80 °C για 30 λεπτά. Φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές για 30 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο αφαιρείται και γίνεται πλύση με 70% αιθανόλη. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 13.000 στροφές για 5 λεπτά στους 4 °C.

Ακολουθεί έλεγχος σε πήκτωμα αγαρόζης και απομόνωση του επιθυμητού τμήματος (100-300 bp) καθώς και έλεγχος με qPCR.

Οι γενωμικές βιβλιοθήκες προετοιμάστηκαν χρησιμοποιώντας το δημοσιευμένο πρωτόκολλο του εργαστηρίου μας (Ford *et al.*, 2014). Η αλληλούχηση ευρείας κλίμακας νέας γενιάς πραγματοποιήθηκε στο μηχάνημα NextSeq500 χρησιμοποιώντας 75 bp single end στο Ελληνικό Κέντρο Γονιδιωματικής που

βρίσκεται στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών ή στο HiSeq 2000 sequencer του EMBl Core Genomics Facility.

Μετά την αλληλούχηση ευρείας κλίμακας νέας γενιάς των δειγμάτων ακολουθεί η στοίχιση των αλληλουχιών στο γονιδίωμα και η εύρεση των κορυφών με τη χρήση κατάλληλων αλγόριθμων (όπως θα συζητηθεί παρακάτω στο κομμάτι της **Βιοπληροφορικής ανάλυσης δεδομένων**).

Mέθοδος STARR - Self-Transcribing Active Regulatory Region

Οι τεχνολογίες γονιδιωματικής ακολουθούμενες από αλληλούχηση, όπως οι DNaseIseq, FAIRE-seq και ChIP-seq, έχουν τη δυνατότητα να μας παρέχουν αρκετές πληροφορίες σχετικά με ρυθμιστικά στοιχεία του γονιδιώματος και να προβλέψουν κατά πόσο μια δεδομένη αλληλουχία μπορεί λειτουργεί ως ενισχυτής, όμως δε μπορούν να αποδώσουν ποσοτικά ή λειτουργικά την ενεργότητα του υπό εξέταση ενισχυτή.

Η μέθοδος STARR (Self-transcribing active regulatory region) μας δίνει τη δυνατότητα να ταυτοποιήσουμε χιλιάδες ενισχυτές ειδικούς για κάθε κυτταρικό τύπο και συνδέει τη διαφορική γονιδιακή έκφραση με τις διαφορές στην ενεργότητα του ενισχυτή (Arnold *et al.*, 2013; Risca and Greenleaf, 2015). Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των ενισχυτών να προκαλούν την επαγωγή της μεταγραφής ακόμα και εάν βρίσκονται αρκετές χιλιάδες βάσεις κάτωθεν (3' κατεύθυνση) του υποκινητή. Η περιοχή ένθεσης των προς εξέταση ρυθμιστικών στοιχείων είναι σχεδιασμένη καθοδικά του υποκινητή, ακριβώς μετά την αλληλουχία λήξης της μεταγραφής (Transcription terminator) και ακριβώς πριν το σινιάλο πολυαδενυλίωσης (poly-A σήμα) του γονιδίου αναφοράς GFP (Green Fluorescent Protein). Ο σχεδιασμός αυτός προσφέρει τη μοναδική ιδιότητα στον προς εξέταση ενισχυτή, αν ενεργοποιηθεί *in vivo*, να προκαλεί τη μεταγραφή του GFP και κατόπιν να μεταγράφει τον εαυτό του. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή χιμαιρικών μορίων RNA GFP:ενισχυτή, τα οποία αναλύονται μέσω βαθιάς αλληλούχησης ευρείας κλίμακας νέας γενιάς (**Εικόνα 27**).



Εικόνα 27. Σχηματική απεικόνιση των βασικών βημάτων του πειράματος STARR-seq. Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των ενισχυτών να δρουν ανεξαρτήτως της θέσης τους σε σχέση με τα γονίδια που ρυθμίζουν και να προκαλούν την ενεργοποίηση της μεταγραφής ακόμα και όταν βρίσκονται σε απόσταση μερικών χιλιάδων βάσεων κάτωθεν του υποκινητή και ανεξάρτητα από την κατεύθυνσή τους σε σχέση με αυτόν. Για το λόγο αυτό οι υπό εξέταση αλληλουχίες, δηλαδή τα στοιχεία του DNA που έχουν δράση ενισχυτή, θα τοποθετηθούν κάτωθεν ενός υποκινητή με αποτέλεσμα οι ενεργοί ενισχυτές να μπορούν να μεταγράφουν τον ίδιο τους τον εαυτό. Η επαγωγή της μεταγραφής από έναν ενισχυτή θα οδηγήσει στη μεταγραφή του ίδιου του ενισχυτή ως σύντηξη στο 3' άκρο του GFP (Green Fluorescent Protein). Οι υπό εξέταση αλληλουχίες θα προκαλέσουν δηλαδή τη μεταγραφή ενός χιμαιρικού μορίου που αποτελείται από το GFP σε σύντηξη με τον υποκινητή (Muerdter *et* al., 2015).

Στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι εφαρμόζουμε μια τροποποιημένη εκδοχή του αρχικού πρωτόκολλου (Arnold *et al.*, 2013; Vockley *et al.*, 2016), όπου έχουμε εισάγει στον υποκινητή του Starr-φορέα θέση πρόσδεσης για το μεταγραφικό παράγοντα Sp1 (Specificity protein 1, πρωτεΐνη εξειδίκευσης 1) που διευκολύνει τις από απόσταση αλληλεπιδράσεις υποκινητή-ενισχυτή (Nolis *et al.*, 2009).

Η επιθυμητή βιβλιοθήκη, η οποία αποτελείται από εκατομμύρια αλληλουχίες υποψήφιες για ενεργότητα ενισχυτή, επεξεργάζεται κατάλληλα ώστε να εισέρθει σε ειδικό πλασμίδιο, αρκετές βάσεις καθοδικά ενός υποκινητή. Ύστερα από

ανασυνδυασμό του πλασμιδιακού φορέα με τη βιβλιοθήκη, ακολουθεί ο μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων, καλλιέργειά τους και απομόνωσηκαθαρισμός των πλασμιδιακών κλώνων. Στη συνέχεια, το απομονωμένο πλασμίδιο εισέρχεται στο εσωτερικό ευκαρυωτικών κυττάρων μέσω διαμόλυνσης και τα αποτελέσματα του πειράματος παρατηρούνται στο μικροσκόπιο φθορισμού. Τέλος, συλλέγεται το ολικό RNA των κυττάρων και πραγματοποιείται επιλογή των τμημάτων με poly-A ουρά, κατασκευάζεται cDNA βιβλιοθήκη, ειδική από τα STARRμετάγραφα και ακολουθεί αλληλούχηση ευρείας κλίμακας νέας γενιάς.

Το απομονωμένο DNA που θα προκύψει από την εφαρμογή των τεχνικών FAIRE-seq, DNaseI-seq και ChIP-seq θα κλωνοποιηθεί στο φορέα Starr-seq και θα πραγματοποιηθεί ταυτόχρονος έλεγχος όλων των πιθανών ενισχυτών για τη μεταβολή της ενεργότητάς τους κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης.

Μέθοδος ChIP-STARR - Sequencing

Ο STARR πλασμιδιακός φορέας είναι μια τροποποιημένη μορφή του πλασμιδίου pGL4.10 (Promega). Στο πλασμίδιο, αντικαταστάθηκε η αλληλουχία μεταξύ SacI και AfeI με αλληλουχία που φέρει έναν ισχυρό συνθετικό υποκινητή, τον Super Core Promoter1 (SCP1), ένα συνθετικό ιντρόνιο (pIRESpuro3, Clontech), αλληλουχία που κωδικοποιεί για GFP (sgGFP,Qbiogene,Inc), το γονίδιο επιλογής ccdB και το SV40 poly-A σήμα. Η αλλαγή που πραγματοποιήσαμε στον παραπάνω φορέα ήταν η εισαγωγή μίας θέσης πρόσδεσης άνωθεν του υποκινητή για το μεταγραφικό παράγοντα Sp1, ο οποίος, όπως αναφέρθηκε, διευκολύνει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ υποκινητή και ενισχυτή (Nolis *et al.,* 2009).

Η κλωνοποίηση στοχευμένων βιβλιοθηκών DNA που προέρχονται από πειράματα ChIP-seq (ChIP-STARR-seq), όπως θα δείτε παρακάτω, αντί τυχαίων τμημάτων DNA επέτρεψε την εξέταση ενεργότητας των ρυθμιστικών αλληλουχιών DNA από κύτταρα θηλαστικών. Στην κατεύθυνση της εξέτασης στοχευμένων βιβλιοθηκών DNA αναπτύχθηκαν επίσης και πρωτόκολλα κλωνοποίησης συνθετικών βιβλιοθηκών DNA (Schöne *et al., 2018*) ή βιβλιοθηκών που έχουν επιλεχθεί μετά από υβριδοποίηση ειδικών "δολωμάτων" (baits) (Vanhille *et al.,* 2015). Μετά από βελτιώσεις στο πρωτόκολλο κλωνοποίησης των προς εξέταση τμημάτων DNA, πλέον είναι εφικτή η δημιουργία βιβλιοθηκών εκατοντάδων εκατομμυρίων διαφορετικών τμημάτων DNA γεγονός που επιτρέπει την εξέταση πολύπλοκων ολόκληρων γονιδιωμάτων. Οι παραπάνω μέθοδοι μαζικού ελέγχου χιλιάδων αλληλουχιών DNA σε συνδυασμό με τη δυνατότητα συνθετικής παραγωγής χιλιάδων αλληλουχιών DNA επιτρέπουν μεταξύ άλλων την εξέταση της επίδρασης πολυμορφισμών στην ενεργότητα ενισχυτών, τον έλεγχο της σημαντικότητας των μοτίβων μεταγραφικών παραγόντων και γενικότερα την αποκρυπτογράφηση της ρυθμιστικής λογικής που διέπει τη λειτουργία των ενισχυτών (Catarino and Stark, 2018).

Πειραματική διαδικασία

Το απομονωμένο υλικό από IRF3 6h και p65 6h HeLa ChIP επεξεργάστηκε κατάλληλα για end-pairs, A-tail, NebNext adaptor και πολλαπλασιάστηκε με PCR με τους εκκινητές ανασυνδυασμού STARR που προσθέτουν 15nt σε κάθε πλευρά συμβατή με τις θέσεις ανασυνδυασμού Agel, Sall του φορέα 1xSp1-STARR-seq. Οι αντιδράσεις PCR καθαρίστηκαν με τα σφαιρίδια NucleoMag NGS Cleanup and Size Select (744970.50, MACHEREY-NAGEL). Οι βιβλιοθήκες καθαρίστηκαν περαιτέρω χρησιμοποιώντας το kit καθαρισμού MinElute PCR (28004, QIAGEN) για να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα του επόμενου σταδίου ανασυνδυασμού. Ο φορέας 1xSp1-STARR-seq υπέστη πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα AgeI και SalI, και η ραχοκοκαλιά διαχωρίστηκε σε 1% πηκτώματος αγαρόζης. Ο φορέας που υπέστη την πέψη καθαρίστηκε με NucleoSpin Gel και PCR clean up (740609.50S, MACHEREY-NAGEL). Ο φορέας που υπέστη την πέψη καθαρίστηκε περαιτέρω χρησιμοποιώντας το kit καθαρισμού MinElute PCR (28004, QIAGEN) για να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα του επόμενου σταδίου ανασυνδυασμού. Οι βιβλιοθήκες ανασυνδυάστηκαν στο φορέα 1xSp1-STARR-seq χρησιμοποιώντας το InFusion HD Cloning Kit (639650, Takara Bio).

Οι αντιδράσεις ανασυνδυασμού μετασχηματίστηκαν σε NEB 10-beta δεκτικά κύτταρα (NEB 10-beta Competent E.coli, C3019H) και αναπτύχθηκαν σε 1 λίτρο LB καλλιεργητικό μέσο. Περίπου 3-5 εκατομμύρια μοναδικοί κλώνοι δημιουργήθηκαν, όπως αρχικά εκτιμήθηκε, μετρώντας αποικίες που αναπτύχθηκαν μετά τη καλλιέργεια μιας μικρής αραίωσης της βιβλιοθήκης σε τρυβλία Petri. Οι βιβλιοθήκες ChIP-STARR απομονώθηκαν από τη βακτηριακή καλλιέργεια χρησιμοποιώντας το kit απομόνωσης Nucleobond Extra Midi Plasmid (740410.50, Macherey Nagel). Η βιβλιοθήκη ChIP-STARR που προέκυψε επιμολύνθηκε σε περίπου 40 εκατομμύρια κύτταρα HeLa χρησιμοποιώντας λιποφεκταμίνη 2000 (11668-027, Thermo Fisher). Η λιποφεκταμίνη είναι κατιονικά λιπίδια τα οποία σχηματίζουν λιποσώματα έχοντας θετικά φορτισμένα επιφάνεια. Τα θετικά φορτισμένα λιποσώματα επιτρέπουν την είσοδο του DNA στο ευκαρυωτικό κύτταρο καθώς αλληλεπιδρούν με τα φωσφορικά του σκελετού του νουκλεϊνικού οξέος και οδηγούν στο σχηματισμό συμπλόκου. Εν συνεχεία, αλληλεπιδρούν με την κυτταροπλασματική μεμβράνη, η οποία είναι αρνητικά φορτισμένη, επιτρέποντας την τήξη της με το σύμπλοκο. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο ενδοκυτταρώνεται και το γενετικό υλικό εισέρχεται στον πυρήνα για να εκφραστεί. Μετά από 24 ώρες μετά την επιμόλυνση, ο μισός πληθυσμός των κυττάρων μολύνθηκε με ιό Sendai για 6 ώρες, ενώ ο υπόλοιπος χρησιμοποιήθηκε ως μη-μολυσμένο control. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με απόξεση και το ολικό RNA απομονώθηκε χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο TRI (T9424, Sigma-Aldrich), ακολουθούμενο από επιλογή poly-A χρησιμοποιώντας Dynabeads Oligo (dT) 25 (61005, Thermo Fisher) DNaseI επεξεργασία (DNaseI ανασυνδυασμένο, 04716728001, Roche). και Ακολούθως, το cDNA παρασκευάστηκε χρησιμοποιώντας SuperScript III Reverse Transcriptase (18080044, Thermo Fisher) και έναν ειδικό για το φορέα εκκινητή για την ενίσχυση μεταγραφών που λαμβάνονται αποκλειστικά από το φορέα STARR.

Στη συνέχεια ακολουθήσε ένα nested PCR πρωτόκολλο, με έναν από τους εξωτερικούς εκκινητές να εκτείνεται σε ένα συνθετικό ιντρόνιο για να αποφευχθεί η μόλυνση από το εναπομείναν πλασμιδιακό DNA. Η βιβλιοθήκη πλασμιδίου STARR απομονώθηκε από περίπου 1 εκατομμύριο επιμολυσμένα κύτταρα HeLa χρησιμοποιώντας QIAprep Spin Miniprep Kit, (27104, Qiagen) και ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας nested

PCR. <u>Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε αλληλούχηση ευρείας κλίμακας νέας γενιάς</u> χρησιμοποιώντας single end High Output V2 kit (75 cycles) (FC-404-2005, illumina) σε Illumina NextSeq 500 στο Ελληνικό Κέντρο Γονιδιώματος που βρίσκεται στο Ιδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών. Τα πειράματα ChIP-STARR-seq από το στάδιο επιμόλυνσης και παρακάτων πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

Πρωτόκολλο STARR reported assays για μεμονωμένους ενισχυτές

Προκειμένου να επικυρωθούν τα αποτελέσματα του ChIP-STARR-seq και να εξεταστεί η ικανότητα των στοιχείων με επαναλαμβανόμενα μοτίβα IRF από διάφορους οργανισμούς να ενεργούν ως ιϊκά επαγώγιμοι ενισχυτές, τα μεμονωμένα DNA στοιχεία κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα 1xSp1-STARR και η ιϊκά επαγώγιμη αύξηση του μεταγραφικού αποτελέσματος ελέγχθηκε σε GFP μικροσκόπιο και ποσοτικοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ποσοτική PCR αντίστροφης μεταγραφής σε πραγματικό χρόνο. Πιο συγκεκριμένα, οι αλληλουχίες DNA των ενισχυτών ενισχύθηκαν ξεχωριστά από τους αντίστοιχους BACs και ενσωματώθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα 1xSp1-STARR χρησιμοποιώντας τις θέσεις περιορισμού AgeI και Sall. Οι BACs χρησιμοποιήθηκαν για να ενισχύσουν τις αλληλουχίες αντί για του ολικού γενωμικού DNA προκειμένου να αποφευχθούν εσφαλμένες μορφές και τα παρα-προϊόντα λόγω της επαναλαμβανόμενης φύσης των ακολουθιών που μελετήθηκαν. Κάθε μεμονωμένο construct που περιέχει έναν εν δυνάμει ενισχυτή επιμολύνθηκε σε κύτταρα HeLa που αναπτύχθηκαν σε 12-well пıа́та χρησιμοποιώντας λιποφεκταμίνη 2000 (Thermo Fisher). 24 ώρες μετά την επιμόλυνση, ο ιός Sendai προστέθηκε στα μισά πηγάδια και επωάστηκε για 6 ώρες, ενώ τα υπόλοιπα χρησίμευαν ως μη μολυσμένος έλεγχος-control. Τα κύτταρα ελέγχθηκαν σε μικροσκόπιο GFP προκειμένου να παρατηρηθούν τυχόν αλλαγές στο σήμα GFP μετά από ιϊκή μόλυνση. Στη συνέχεια, τα κύτταρα συλλέχθηκαν με απόξεση και το RNA απομονώθηκε χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο TRI (Sigma-Aldrich). Το απομονωμένο RNA υπέστη επεξεργασία με DNaseI (DNaseI recombinant, 04716728001, Roche) για 30 λεπτά στους 37 °C. Η αντίδραση καθαρίστηκε με το

RNeasy Mini Kit (74104, Qiagen). Το cDNA παρασκευάστηκε χρησιμοποιώντας τη SuperScript III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher) και oligo (dT). Τα πειράματα επιμόλυνσης πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Πραγματοποιήθηκε ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο χρησιμοποιώντας KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) (Roche) χρησιμοποιώντας ως Forward εκκινητή τον STARR εκκινητή που εκτείνεται στο συνθετικό ιντρόνιο, προκειμένου να αποφευχθεί η ενίσχυση των μολυσματικών αλληλουχιών του πλασμιδιακού DNA και ενός Reverse εκκινητή μέσα στο τμήμα GFP των μεταγραφών. Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν στο μηχάνημα CBX96 της Bio-Rad.

Ένθεση βιβλιοθήκης σε πλασμιδιακό φορέα 1xSp1-STARR μέσω μαζικού ανασυνδυασμού

Αντίδραση πέψης του Starr πλασμιδιακού φορέα

Πραγματοποιείται αντίδραση πέψης του STARR-seq πλασμιδίου με τα περιοριστικά ένζυμα AgeI-HF και Sall-HF ώστε σε επόμενο στάδιο να καταστεί εφικτή η εισαγωγή της βιβλιοθήκης IRF3 6h που φέρει άκρα συμπληρωματικά με αυτά του κομμένου φορέα. Αρχικά πραγματοποιήθηκε πέψη του φορέα με το ένζυμο AgeI-HF και ακολούθησε καθαρισμός των αντιδράσεων με το QIAquick PCR Purification kit, ακολουθώντας το προτεινόμενο πρωτόκολλο. Στη συνέχεια ακολούθησε η αντίδραση πέψης του κομμένου σλάσι για 5 ώρες στους 65 °C ακολούθησε ηλεκτροφόρηση του υλικού της πέψης σε 1% πηκτώματος αγαρόζης και απομόνωση του κομμένου φορέα. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται περαιτέρω καθαρισμός του φορέα.

<u>Αντίδραση ανασυνδυασμού</u>

Η εισαγωγή της IRF3 6h βιβλιοθήκης στον πλασμιδιακό φορέα 1xSp1-STARR πραγματοποιείται με αντίδραση ανασυνδυασμού με τη χρήση του kit Clontech InFusion HD. Η θέση εισαγωγής της βιβλιοθήκης βρίσκεται κάτωθεν της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για το GFP έτσι ώστε να μεταγράφονται και να μεταφράζονται

χιμαιρικά μόρια GFP σε σύντηξη με το εκάστοτε τμήμα DNA με ενεργότητα ενισχυτή. Κάθε αντίδραση περιλαμβάνει τα εξής:

- 50 ng ένθεμα από τη IRF3 6h βιβλιοθήκη
- 100 ng φορέα που έχει υποστεί πέψη με AgeI-HF και Sall-HF
- 2 µL In-Fusion HD Enzyme Premix
- ddH₂O μέχρι τα 10 μL

Στη συνέχεια πραγματοποιείται επώαση της αντίδρασης για 15 λεπτά στους 50 °C και αμέσως μετά επώαση στον πάγο για 5 λεπτά.

<u>Πολλαπλασιασμός του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα 1xSp1-STARR,</u> διαμόλυνση HeLa κυττάρων και απομόνωση του ολικού RNA

Σε αυτό το σημείο, η IRF3 6h βιβλιοθήκη έχει εντεθεί στον πλασμιδιακό φορέα 1xSp1-STARR και χρειάζεται να πολλαπλασιαστεί σε μεγάλο βαθμό.

Χρησιμοποιώντας 3 από τα 10 μL κάθε αντίδρασης ανασυνδυασμού πραγματοποιείται μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με υψηλό βαθμό επιδεκτικότητας (NEB® 10-beta Competent *E. Coli*) με τη μέθοδο του θερμικού σοκ.

Στη συνέχεια, ετοιμάζεται μίξη των διαφορετικών αντιδράσεων μετασχηματισμού, άπλωμα διαφόρων αραιώσεων σε τρυβλία και υπολογισμός του αριθμού των κλώνων που αναπτύχθηκαν. Το υπόλοιπο υλικό μοιράζεται σε 2 φλάσκες των δύο λίτρων που περιέχουν 500 mL LB και επωάζεται ολονύκτια στους 37 °C. Την επόμενη μέρα γίνεται μέτρηση του αριθμού των αποικιών που μεγάλωσαν και γίνεται εκτίμηση του συνολικού αριθμού των μοναδικών αποικιών-κλώνων του πειράματος. Να σημειωθεί ότι για ένα ChIP-STARR-seq πείραμα οι συνολικοί κλώνοι πρέπει να είναι τουλάχιστον 2-3 εκατομμύρια για να αντιπροσωπεύονται επαρκώς στην πλασμιδιακή βιβλιοθήκη οι περιοχές πρόσδεσης του εκάστοτε παράγοντα έναντι του οποίου πραγματοποιήθηκε η ανοσοκατακρήμνιση. Ακολουθεί η απομόνωση της STARR πλασμιδιακής βιβλιοθήκης σύμφωνα με το Macherey Nagel Midiprep kit πρωτόκολλο.

Διαμόλυνση κυτταρικής σειράς HeLa

Ως διαμόλυνση (Transfection) χαρακτηρίζεται η διαδικασία εισαγωγής ξένου DNA σε ένα ευκαρυωτικό κύτταρο. Ο φορέας (vector), ένα μικρό αυτόνομα αντιγραφόμενο κυτταροπλασματικό DNA, μπορεί να μεταφερθεί από οργανισμό σε οργανισμό και να ενσωματωθεί στο DNA του κυττάρου ξενιστή. Να σημειωθεί ότι οι πλειονότητα των φορέων έχει ιογενή προέλευση (Liu *et al.*, 1997). Από τη φύση τους οι ιοί προσβάλλουν τα κύτταρα τα οποία φέρουν τους αντίστοιχους ως προς αυτούς υποδοχείς. Οι φορείς υπόκεινται σε τροποποιήσεις του γενετικού τους υλικού και σε τροποποιήσεις των πρωτεϊνών των κυτταρικών τους περιβλημάτων, έτσι ώστε να αποφευχθεί η έντονη ανοσολογική απόκριση που μπορεί να προκαλέσουν, με αποτέλεσμα την εξειδίκευσή στους στόχους τους (Liu *et al.*, 1997; Maurisse *et al.*, 2010).

Η ηλεκτροδιάτρηση (electroporation) αποτελεί τον πιο συνηθισμένο και αποτελεσματικό τρόπο διαμόλυνσης κυττάρων. Η τεχνική βασίζεται σε σύντομης χρονικής διάρκειας ηλεκτρικών παλμών που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης, δημιουργία πόρων, ώστε να εισέλθουν στο εσωτερικό των κυττάρων τα αρνητικά φορτισμένα νουκλεΐκά οξέα (Liu *et al.*, 1997; Maurisse *et al.*, 2010). Ορισμένες από τις διαθέσιμες τεχνικές διαμόλυνσης είναι η μέθοδος του φωσφορικού ασβεστίου, η διαμόλυνση με τη βοήθεια της λιποφεκταμίνης ή άλλων λιπιδίων, η χρήση DEAE-δεξτράνης, η πυρηνοδιάτριση. Για τα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκε λιποφεκταμίνη για τη διαμόλυνση, ένα πολυκατιονικό συνθετικό λιπίδιο. Η λιποφεκταμίνη συνδυαζόμενη με DNA σχηματίζει λιποσώματα που έρχονται σε σύντηξη με την κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων-στόχων και ελευθερώνουν με αυτό τον τρόπο το DNA στο εσωτερικό του κυττάρου (Dalby *et al.*, 2004).

Σε αυτό το στάδιο, η πλασμιδιακή βιβλιοθήκη IRF3-STARR προστίθεται σε κύτταρα HeLa μέσω διαμόλυνσης με τη βοήθεια λιποσωμάτων (με χρήση **λιποφεκταμίνης 2000**) και η ενεργότητα των ενισχυτών της βιβλιοθήκης παρατηρείται σε μικροσκόπιο φθορισμού. Τα HeLa κύτταρα μολύνονται με ιό Sendai για 3 και 6 ώρες, καθώς η ενεργοποίηση των ενισχυτών της βιβλιοθήκης απαιτεί ιϊκή μόλυνση.

Πραγματοποιείται διαμόλυνση HeLa κυττάρων με τη πλασμιδιακή βιβλιοθήκη με τη χρήση λιποφεκταμίνης 2000.

Πειραματική διαδικασία

Η πορεία για τη διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς HeLa είναι η εξής:

Η κυτταρική σειρά HeLa καλλιεργείται και μεταφέρεται σε πιάτα των 100 mm² μέχρι η πυκνότητά τους να φτάσει το 90% - 100%. Πραγματοποιούνται μίξεις 10 μg πλασμιδιακής βιβλιοθήκης σε 500 μL καλλιεργητικού μέσου DMEM χωρίς την παρουσία ορού (DMEM χωρίς FBS) και αντιβιοτικού (Pen/Strep) και 25 μg λιποφεκταμίνης 2000 σε 500 μL καλλιεργητικού μέσου DMEM επίσης χωρίς την παρουσία ορού και αντιβιοτικού. Ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά. Στη συνέχεια διαλυτοποιείται η λιποφεκταμίνη 2000 σε 250 μL DMEM χωρίς την παρουσία ορού και αντιβιοτικού. Ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά. Έπειτα γίνεται η συνένωση διαλύματος του γενετικού υλικού και του διαλύματος της λιποφεκταμίνης 2000 με καλή ανάδευση με τη βοήθεια της πιπέτας και κομμένου tip. Ακολουθεί επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια αφαιρείται το θρεπτικό μέσο από τα κύτταρα και γίνεται ξέπλυμα με DMEM χωρίς την παρουσία ορού και αντιβιοτικού. Γίνεται προσθήκη 500 μL DMEM χωρίς την παρουσία ορού και αντιβιοτικού και 500 μL γενετικού υλικού-λιποφεκταμίνης 2000 στα κύτταρα. Μεγάλη προσοχή δίνουμε να μην ανακατευτεί με το περιεχόμενο του πιάτου, γεγονός που θα διαταράξει τα σύμπλοκα DNA και λιποφεκταμίνης. Ακολουθεί μια τελευταία επώαση για 4 ώρες στον επωαστικό θάλαμο (cell incubator) στους 37 °C, αφαιρείται το θρεπτικό μέσο και γίνεται προσθήκη 1.5 mL medium με την παρουσία ορού και αντιβιοτικού. Μετά από 24 ώρες, τα κύτταρα μολύνονται με ιό Sendai για 3 και 6 ώρες. Όπως έχει αναφερθεί, προσθέτουμε το 1/10 του όγκου της αρχικής καλλιέργειας, και στη συνέχεια τα κύτταρα παρατηρούνται σε μικροσκόπιο φθορισμού.

Τα κύτταρα στη συνέχεια αφαιρούνται από το θρεπτικό υλικό και γίνεται πλύση με 5 mL 1X PBS ανά κάθε πιάτο καλλιέργειας. 5 mL 1X PBS με 2 mM EDTA προστίθενται έτσι ώστε να ξεκολλήσουν πιο εύκολα τα κύτταρα αφού επωαστούν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση 3.000 rpm για 5 λεπτά και αφαίρεση του υπερκείμενου και μια επιπλέον πλύση μόνο με PBS αυτή τη φορά, 5 mL ανά κάθε πιάτο καλλιέργειας. Ακολουθεί φυγοκέντρηση 3.000 rpm για 5 λεπτά και τα διαλύματα συλλέγονται και φυλάσσονται στους -80 °C.

Παρατηρήσεις

Η αναλογία ποσοτήτων γενετικού υλικού και λιποφεκταμίνης 2000 που απαιτείται είναι περίπου 1 μg DNA/3 μL λιποφεκταμίνη 2000.

Είναι σημαντικό να χρησιμοποιηθεί στα αρχικά στάδια της διαμόλυνσης θρεπτικό μέσο χωρίς την παρουσία ορού και αντιβιοτικού διότι τα αντιβιοτικά είναι σε ένα βαθμό τοξικά για τα κύτταρα και το FBS μπλοκάρει την αντίδραση της διαμόλυνσης.

Κατά τη συνένωση των δύο διαλυμάτων, του γενετικού υλικού και της λιποφεκταμίνης 2000, είναι σημαντικό στην ανάδευση να χρησιμοποιηθεί tip με κομμένο άκρο ώστε να μην καταστραφούν, λόγω μηχανικής κίνησης, τα λιπιδικά κυστίδια.

Απομόνωση ολικού RNA, επιλογή του poly-A RNA και αντίστροφη μεταγραφή

Στο σημείο αυτό, τα κύτταρα έχουν παράξει μετάγραφα της βιβλιοθήκης ChIP-STARR ανάλογα με την ενεργότητα του αντίστοιχου ενισχυτή. Η απομόνωση του mRNA θα οδηγήσει στην αποκρυπτογράφηση της ενεργότητας του κάθε υποψήφιου τμήματος DNA καθώς με αντίστροφη μεταγραφή, πολλαπλασιασμό του cDNA και αλληλούχηση, αποκτώνται όλα τα απαραίτητα δεδομένα για περαιτέρω ανάλυση του πειράματος. Η πορεία για την απομόνωση και την αντίστροφη μεταγραφή έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω ενώ η επιλογή του poly-A RNA πραγματοποιείται με τη βοήθεια του kit Dynabeads oligo (dT).

Κατασκευή βιβλιοθήκης - Illumina Tru-Seq RNA-Seq

Η διαδικασία κατασκευής βιβλιοθηκών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του Tru-Seq RNA Library Preparation kit (Illumina) για την προετοιμασία του υλικού για την αλληλούχηση ευρείας κλίμακας νέας γενιάς. Αρχικά πραγματοποιείται επιλογή του poly-A RNA, κατακρημνίζεται το RNA, το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση φτιάχνει τον cDNA κλώνο, ο οποίος στη συνέχεια μετατρέπεται σε δίκλωνο DNA (Podnar et al., 2014). Ακολουθεί η επιδιόρθωση των άκρων με την προσθήκη μιας βάσης αδενίνης στο 3' άκρο των μορίων του DNA έτσι ώστε, σύμφωνα με την αρχή της συμπληρωματικότητας των βάσεων, να μπορέσουν οι ειδικοί αντάπτορες να συνδεθούν στα άκρα του DNA με την προσθήκη DNA - λιγάσης (END REPAIR, DNA-A-tailing, adaptor-ligation). Οι αντάπτορες περιέχουν ειδικές αλληλουχίες αναγνώρισης (barcode) έτσι ώστε να είναι εφικτή η αλληλούχηση περισσοτέρων από μία βιβλιοθηκών (Podnar et al., 2014) (**Εικόνα 28**).



Εικόνα 28. Συνοπτική απεικόνιση των σταδίων για τη διαδικασία κατασκευής βιβλιοθήκης

σύμφωνα με τις οδηγίες του Tru-Seq Library Preparation Kit (Image from Illumina)

Στη συνέχεια πραγματοποιείται πολλαπλασιασμός των βιβλιοθηκών με PCR και επίσης ο καθαρισμός τους με μαγνητικά σφαιρίδια Ampure XT. Ο αριθμός των απαραίτητων κύκλων πολλαπλασιασμού εξαρτάται από την αρχική ποσότητα του RNA καθώς και από την αποτελεσματικότητα της όλης διαδικασίας.

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 η αντίστροφη μεταγραφή με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (RT-qPCR), η κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης, το στύπωμα κατά Northern, χαρτογράφηση RNA, η ανάλυση του μεταγραφώματος με τη χρήση αλληλούχησης ευρείας κλίμακας νέας γενιάς και μετάφραση *in vitro* (Peirson and Butler 2007). Ο μεγαλύτερος αντίπαλος του RNA κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της απομόνωσης είναι οι RNases (ριβονουκλεάσες). Οι ριβονουκλεάσες είναι ένας τύπος νουκλεάσης που καταλύει τη διαδικασία απεικοδόμησης (υδρόλυση) του RNA σε μικρότερα τμήματα. Γενικά, το RNA είναι πολύ ευαίσθητο. Στο RNA, οι υδροξυλομάδες είναι συνδεδεμένες στη θέση 2' και 3' του σακχάρου της ριβόζης. Το γεγονός αυτό, κάνει το RNA χημικά πιο δραστικό από το DNA. Επομένως, η μόλυνση με ριβονουκλεάσες, μπορεί εύκολα να προκαλέσει ρήξη στο RNA.

Η απομόνωση του RNA με τη χρήση του αντιδραστηρίου TRI (Sigma-Aldrich) είναι μια συνήθη μέθοδος για ολική εξαγωγή από τα κύτταρα. Με το πρωτόκολλο αυτό γίνεται απομόνωση του υλικού από τα υπόλοιπα στοιχεία του κυττάρου 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

Πειραματική διαδικασία

- Σε σωληνάκια στα οποία υπάρχει η πελέτα των κυττάρων γίνεται προσθήκη 1 mL TRI (Sigma-Aldrich) ανά 1-5 εκατομμύρια κύτταρα. Το TRI δρα, διατηρώντας την ακεραιότητα του RNA κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης, διασπά και διαταράσσει τα κύτταρα και τα κυτταρικά συστατικά. Περιέχει περίπου 1/5 φαινόλη και ένα χαοτροπικό αλάτι πολύ δυνατό, το οποίο σπάει τις μεμβράνες και αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες
- Γίνεται καλό ανακάτεμα με την πιπέτα ώστε να διαλυτοποιηθεί η πελέτα των κυττάρων ανάδευση σε vortex
- 3. Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 4. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13.000 rpm στους 4 °C
- 5. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέα σωληνάκια με προσοχή
- Προσθήκη 200 μL χλωροφορμίου (για κάθε 1 mL TRI γίνεται προσθήκη 200 μL χλωροφορμίου)
- 7. Ανάδευση σε vortex
- 8. Επώαση 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 9. Φυγοκέντρηση 15 λεπτά στις 13.000 rpm στους 4 °C
- Μεταφορά της υδατικής φάσης (πάνω φάση) σε νέο σωληνάκι με προσοχή μη διαταραχθεί η μεσόφαση
- 11. Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης (2-Propanol της PanReac AppliChem)
- 12. Καλή ανάδευση
- 13. Επώαση για 30 λεπτά στους -80 °C
- 14. Φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στις 13.000 rpm στους 4 °C
- 15. Απομάκρυνση του υπερκείμενου με προσοχή μη διαταραχθεί η πελέτα
- 16. Τα σωληνάκια παραμένουν ανοιχτά για λίγα λεπτά ώστε να στεγνώσουν καλά
- 17. Προσθήκη 300 μL 70% αιθανόλης
- 18. Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13.000 rpm στους 4 °C
- 19. Απομάκρυνση υπερκείμενου
- 20. Καλό στέγνωμα με ανοιχτά καπάκια για λίγα λεπτά
- Διαλυτοποίηση σε 50 μL ddH₂O στο οποίο έχει γίνει προσθήκη 0.5 μL RNase RNase OUT (RNase inhibitor) της Invitrogen Inhibitor

Συχνά, η ποσότητα των πρωτεϊνών είναι αρκετά μεγάλη και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μεσόφασης, δηλαδή μιας ζώνης μεταξύ των δύο φάσεων. Η μεσόφαση δημιουργείται γιατί τα υδρόφιλα αμινοξέα των πρωτεϊνών προσανατολίζονται (έχουν επαφή) με την υδατική φάση, ενώ τα υδρόφοβα αμινοξέα απομακρύνονται από αυτήν διατηρώντας συνάφεια και επαφή με την οργανική φάση (φαινόλη). Κατά κανόνα, αν με την εφαρμογή αυτής της μεθόδου διαπιστωθεί παρουσία μεσόφασης, παραλαμβάνεται η υδατική φάση (δηλαδή αυτή που περιέχει το DNA ή το RNA) και επαναλαμβάνεται η διαδικασία κλασμάτωσης με φαινόλη.

Παρατηρήσεις

Δίνεται μεγάλη προσοχή κατά τη χρήση του TRI καθώς περιέχει φαινόλη και χλωροφόρμιο τα οποία προκαλούν σοβαρές παθήσεις αν υπάρξει επαφή με το δέρμα. Το TRI περιέχει φαινόλη, χλωροφόρμιο και θειοκυανική γουανιδίνη, τα οποία αποδιατάσσουν μεμβράνες και μετουσιώνουν πρωτεΐνες.

Δίνεται προσοχή να γίνει καλή διαλυτοποίηση της πελέτας των κυττάρων. Αν η πελέτα δε διαλύεται εντελώς, προτείνεται να γίνει προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας TRI.

Πέψη με DNaseI

Μετά την απομόνωση RNA από κύτταρα, απαραίτητο στάδιο είναι η πέψη με DNaseI. Με το βήμα αυτό γίνεται απομάκρυνση του γενωμικού DNA, το οποίο μπορεί να επηρεάσει τις ακόλουθες αναλύσεις των δειγμάτων και καθαρισμός του RNA.

Πειραματική διαδικασία

Στο διαλυτοποιημένο RNA (50 μL) γίνεται προσθήκη

- 1. 10 μL RQ1 DNase 10X Reaction buffer της PROMEGA
- 2. $3 \,\mu L \,RQ1 \,RN$ ase free DN ase ths PROMEGA
- 3. ddH_2O μέχρι τελικό όγκο 100 μL

Επώαση για 30 λεπτά στους 37 °C

Καθαρισμός RNA με RNeasy KIT

Το RNeasy Mini Kit προσφέρει γρήγορη και υψηλής ποιότητας απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα και ιστούς. Ο καθαρισμός του RNA με τη 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. Προσθήκη 350 μL από το RPE Buffer και πραγματοποιείται καλή ανάδευση
- Προσθήκη 250 μL 100% αιθανόλης στο απομονωμένο RNA και καλή ανάδευση με την πιπέτα
- Μεταφορά του δείγματος (700 μL) στις κολώνες οι οποίες εφαρμόζουν σε σωληνάκι συλλογής 2 mL
- 5. Φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στις 13.000 rpm και απόρριψη του υγρού που έχει περάσει μέσα από τη στήλη και έχει συλλεχθεί στο σωληνάκι συλλογής
- 6. Προσθήκη 500 μL RPE Buffer στη στήλη
- Φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στις 13.000 rpm και απόρριψη του υγρού που έχει περάσει μέσα από τη στήλη και έχει συλλεχθεί στο σωληνάκι συλλογής
- Επανάληψη των βημάτων 6 και 7 ακόμα μια φορά για πλύσιμο της μεμβράνης silica της στήλης
- 9. Μεταφορά της στήλης σε νέο σωληνάκι των 1.5 mL
- 10. Προσθήκη 30 μL ddH2O κάθετα πάνω στη μεμβράνη της στήλης
- 11. Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 12. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13.000 rpm για να γίνει η έκλουση του RNA και απόρριψη της στήλης

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 από τη στήλη το εκλουόμενο RNA.

Καθαρισμός RNA με φαινόλη-χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη

Η μέθοδος καθαρισμού με τη χρήση φαινόλης-χλωροφορμίου είναι ένας εύκολος τρόπος για την απομάκρυνση πρωτεϊνών από τα δείγματα νουκλεϊκών οξέων. Τα νουκλεϊκά οξέα παραμένουν στην υδατική φάση ενώ οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται στην οργανική φάση ή βρίσκονται στην ενδιάμεση φάση. Στην εκχύλιση με φαινόληχλωροφόρμιο, οι πρωτεΐνες είναι διαλυτοποιημένες σε φαινόλη ενώ τα λιπίδια διαλυτοποιημένα σε χλωροφόρμιο. Στο τελευταίο στάδιο, το RNA συλλέγεται από την υδατική φάση με ισοπροπανόλη ή αιθανόλη.

Πειραματική διαδικασία

- Μετά τα 30 λεπτά στους 37 °C τα δείγματα αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου
- Απομόνωση με χρήση φαινόλης-χλωροφορμίου (για απομάκρυνση πρωτεϊνών και απομόνωση RNA)
- Προσθήκη μισού όγκου του δείγματος, δηλαδή 50 μL φαινόλη (Phenol της PanReac AppliChem)
- Προσθήκη μισού όγκου δείγματος, δηλαδή 50 μL χλωροφόρμιο (Chloroform biochemica της PanReac AppliChem)
- 5. Καλό ανακάτεμα
- 6. Πραγματοποιείται ανάδευση σε συσκευή vortex για περίπου 10 δευτερόλεπτα
- 7. Φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου
- Στη συνέχεια γίνεται μεταφορά της πάνω φάσης σε νέα σωληνάκια και προσθήκη 100 μL χλωροφόρμιο (ανάδευση)
- 9. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 10. Σε νέα σωληνάκια προστίθεται 1/5 του όγκου του δείγματος 3 M οξικό νάτριο (CH3COONa) pH5.2 γίνεται μεταφορά της υδατικής φάσης και προσθήκη τριπλάσιας ποσότητας όγκου 100% αιθανόλης (Ethanol Absolute της BDH Chemicals) (300 µL)
- 11. Πολύ καλή ανάδευση των δειγμάτων

- 12. Επώαση των δειγμάτων ολονύκτια επώαση στους -80 °C (το βήμα αυτό γίνεται ώστε να υπάρχει καλύτερη απόδοση της κατακρήμνισης του RNA)
- 13. Φυγοκέντρηση των σωληνακίων για 30 λεπτά στις 13.000 rpm στους 4 °C
- 14. Απομάκρυνση του υπερκείμενου με προσοχή μη διαταραχθεί η πελέτα RNA που έχει δημιουργηθεί στον πυθμένα των σωληνακίων
- 15. Πραγματοποιείται στέγνωμα των δειγμάτων με ανοιχτά καπάκια
- Πλύση με 300 μL 70% αιθανόλη ώστε να απομακρυνθεί η ποσότητα του οξικού νατρίου και ήπια ανάδευση
- 17. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13.000 rpm στους 4 °C
- Απομάκρυνση περισσότερης ποσότητας του υπερκείμενου και με στέγνωμα των δειγμάτων με ανοιχτά καπάκια όσο περισσότερο δυνατόν
- 19. Προσθήκη 20 μL ddH₂O και 1 μL inhibitor

Παρατηρήσεις

Η φαινόλη και το χλωροφόρμιο είναι επικίνδυνα χημικά και πρέπει να λαμβάνεται ειδική μέριμνα πριν από τη χρήση τους.

Κανονικά, σε πειράματα isopropanol precipitation γίνεται προσθήκη CHECOONa 3M 1/10 του όγκου του δείγματος.

Σύνθεση cDNA με PCR

Ύστερα από την απομόνωση του ολικού RNA από κύτταρα, παράγεται το υβριδικό μόριο cDNA με τη βοήθεια της 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 μόριο RNA-DNA. 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 μπορέσει να ενσωματωθεί στο γενετικό υλικό των κυττάρων ξενιστών. Η ανακάλυψη του ενζύμου επέτρεψε τη μετατροπή των ευαίσθητων μορίων RNA σε σταθερά,

συμπληρωματικά μόρια DNA, τα οποία μπορούν να υποστούν χειρισμούς και να μελετηθούν όπως τα υπόλοιπα μόρια DNA (PCR, κλωνοποίηση, αλληλούχηση).

Πειραματική διαδικασία

200 ng RNA

Annealing Mix

- 0.5 µL OligodTs
- 1 µL dNTPs
- 9 µLRNA
- 0.5 µL ddH₂O

Ακολουθεί επώαση στους 65 °C για 5 λεπτά ώστε να πραγματοποιηθεί το annealing. Στο βήμα αυτό πραγματοποιείται σπάσιμο της δευτεροταγούς δομής του RNA για να υβριδοποιηθούν οι εκκινητές.

Reverse Transcriptase Mix

- 4 µL 5X Superscript Buffer
- 1 μL DTTs (0.1 M της Invitrogen)
- 1 μL Reverse Transcriptase (Superscript III της Invitrogen)
- 3 µL ddH₂O

Ακολουθεί προσθήκη του Reverse Transcriptase μείγματος στα δείγματα μετά το annealing και 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 τη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα, ενώ η επώαση στους 70 °C έχει ως αποτέλεσμα την απενεργοποίηση του ενζύμου.

ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων, τον εντοπισμό και την ταυτοποίηση των θέσεων πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, των ιστονικών τροποποιήσεων καθώς τη μελέτη των προσβάσιμων περιοχών του γονιδιώματος, χρησιμοποιήθηκε το Galaxy web tool, μέσω του οποίου μπορούν να αναλυθούν δεδομένα αλληλούχησης ευρείας κλίμακας νέας γενιάς ύστερα από πειράματα RNA-sequencing, ChIP-sequencing, RNA-sequencing, DNaseI-sequencing (Landt *et* al., 2012) και STARR-sequencing. To Galaxy παρέχει εργαλεία με τα οποία μπορεί να γίνει σύγκριση, επεξεργασία και σχολιασμός των δειγμάτων αλληλούχησης. Τα εργαλεία είναι εξαιρετικά αποδοτικά και επιτρέπουν στο χρήστη να συγκρίνει μεγάλα σύνολα διαθέσιμων δεδομένων με αυτά που έχουν προκύψει από τα πειράματα μας (Quinlan and Hall, 2010).

Επεξεργασία δεδομένων RNA-seq

Πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις βιοπληροφορικής χρησιμοποιώντας τη διαδικτυακή πλατφόρμα Galaxy (https://usegalaxy.org/) (Afgan et al., 2018). Αρχικά, η ποιότητα των Fastq αρχείων αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα FastQC. Τα reads ("διαβάσματα") χαρτογραφήθηκαν στο ανθρώπινο γονιδίωμα (έκδοση hg19) χρησιμοποιώντας το TopHat2 με τις προεπιλεγμένες ρυθμίσεις (Kim et al., 2013; Maekawa et al., 2014). Στη συνέχεια, reads που εμπίπτουν μέσα στα γονίδια μετρήθηκαν με το htseq-count (Maekawa et al., 2014; Kukurba and Montgomery, 2015; Anders et al., 2015; Koch et al., 2018). Η ανάλυση διαφορικής γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας DESeq (Anders and Huber, 2010). Το πρόγραμμα Enrichr χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των μονοπατιών KEGG και για τις αναλύσεις γονιδιακής οντολογίας (Gene Ontology analysis) (Kuleshov et al., 2016). Οι επαναλαμβανόμενοι όροι της οντολογίας γονιδίων συγχωνεύτηκαν χρησιμοποιώντας το REVIGO (Supek et al., 2011). Για τον προσδιορισμό του σήματος και την ποσοτικοποίηση, τα αρχεία bam μετατράπηκαν σε μορφή bigwig χρησιμοποιώντας την εντολή bamcoverage από το πακέτο deeptools (Ramirez et al., 2014) Για την απεικόνιση γονιδιωματικών σημάτων σε συγκεκριμένους γονιδιωματικούς τόπους, εφαρμόστηκε το πρόγραμμα περιήγησης IGV (Integrative

Genomics Viewer) (Robinson *et* al., 2011). Για τον έλεγχο της αλληλεπικάλυψης μεταξύ των λιστών χρησιμοποιήθηκε το Venny (http://bioinfrogp.cnb.csic.es/tools/venny/).

Βασικές αρχές ChIP-seq ανάλυσης

Το πλεονέκτημά της μεθόδου ChIP-seq έγκειται στο ότι η ανά βάση αλληλούχηση μπορεί και προσφέρει υψηλής ανάλυσης αποτελέσματα, διότι η ταυτοποίηση των θέσεων πρόσδεσης της υπό μελέτης πρωτεΐνης ή ιστόνης καθίστανται επαρκή λόγω των εκατοντάδων εκατομμύριων reads των νουκλεοτιδίων (Park, 2009; Valouev *et al.,* 2008). Η μέθοδος αυτή μας δίνει τη δυνατότητα αποκάλυψης θέσεων πρόσδεσης αλλά και περιοχών με επαναλαμβανόμενα στοιχεία που μπορούν να αλληλουχηθούν και να ταυτοποιηθούν. Επιπλέον, παρέχει τη δυνατότητα εντοπισμού πολυμορφισμών ακόμα και μεταξύ των επαναλαμβανόμενων αυτών αλληλουχιών (Park, 2009). Με τον όρο peaks ("κορυφές") αναφερόμαστε σε γενωμικές περιοχές οι οποίες περιέχουν ενισχυμένα σήματα συγκεκριμένων τμημάτων DNA στο σύνολο των τελικών στοιχισμένων αλληλουχιών (**Εικόνα 31**) (Wilbanks and Facciotti, 2010; Laajala *et al.,* 2009; Furey, 2012).

Ακολουθεί βιοπληροφορική ανάλυση κατά την οποία οι κορυφές αξιολογούνται και καταλήγουμε στην εύρεση μοτίβων (motifs) εντός των κορυφών στην περίπτωση που κάποια ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία παρουσιάζεται με αυξημένη συχνότητα στις θέσεις πρόσδεσης συγκεκριμένων μεταγραφικών ρυθμιστών (Boeva *et al.,* 2010; Kulakovskiy *et al.,* 2010). Με τη μέθοδο αυτή προσδίδεται επίσης και η δυνατότητα ταυτοποίησης ιστονικών τροποποιήσεων, όπως οι μεθυλιώσεις H3K4 και H3K9 ή ακετυλιώσεις, όπως H3K9ac και H3K27ac (Bannister and Kouzarides, 2011). Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων γίνεται με βάση το input, το πείραμα ελέγχου δηλαδή στο οποίο δεν έχει γίνει ανοσοκατακρήμνιση DNA για κάποια πρωτεΐνη ή ιστονική τροποποίηση, και χρησιμοποιείται για να απομακρυνθεί ο "θόρυβος" της αλληλούχησης και για τον προσδιορισμό των πραγματικών σημάτων, τα peaks (Εικόνα 29) (Furey, 2012).



Εικόνα 29. Παράδειγμα ανάλυσης ενός ChIP-seq πειράματος. Απεικόνιση των θέσεων πρόσδεσης (peaks) και του αντίστοιχου πειράματος ελέγχου (input DNA), με σκοπό την κανονικοποίηση των οπτικοποιημένων αυτών κορυφών (Park, 2009)

Τα αποτελέσματα στοιχίζονται στο γονιδίωμα που μελετάται (mapping) και αξιολογούνται. Οι αλληλουχίες που δε μπορούν να στοιχιστούν στο γένωμα ή που στοιχίζονται με πολλές γενωμικές περιοχές, δε συμπεριλαμβάνονται στις μετέπειτα αναλύσεις γιατί παρουσιάζουν χαμηλή ποιότητα. Το Bowtie (Langmead *et al.*, 2009) και το TopHat (Trapnell *et al.*, 2009) αποτελούν τα λογισμικά εργαλεία που χρησιμοποιούνται για να γίνει η στοίχιση. Μια παράμετρος που θα πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψιν είναι το βάθος της αλληλούχησης (sequencing depth). Η τοποθέτηση ορίων (thresholds), που χαρακτηρίζονται από ένα P-value, προσδιορίζει αν μία αλληλούχηση είναι επαρκής. Τα όρια αυτά, τοποθετούνται βάσει των κανονικοποιήσεων που γίνονται με το input πείραμα. Έτσι, μόνο οι αλληλουχίες που έχουν P-value τιμή εντός των ορίων, θα αξιολογηθούν περαιτέρω.

Τέλος, ακολουθεί η εύρεση των κορυφών (peak calling) και η περαιτέρω αξιολόγηση και ανάλυσή τους. Η ταυτοποίηση των κορυφή συνδέεται με το βάθος της αλληλούχησης και τον αριθμό των reads που στοιχίζονται. Για να θεωρήσουμε μια αλληλουχία ως peak, απαιτείται η κανονικοποίηση του σήματος της σε σχέση με αυτό του input, και η αξιολόγηση του enrichment ratio για τη στατιστική σημαντικότητα του, που είναι ανάλογη του αριθμού των reads. Η τιμή που προκύπτει είναι γνωστή

και ως FDR (False Discovery Rate) (Benjamini and Hochberg, 1995; Storey and Tibshirani, 2003), στα πλαίσια του λογισμικού εργαλείου εύρεσης peaks, MACS (Zhang *et al.*, 2008). Η οπτικοποίηση των κορυφών γίνεται μέσω του ειδικού γενωμικού προγράμματος περιήγησης UCSC (https://genome.ucsc.edu).

Ανάλυση δεδομένων DNaseI-seq, FAIRE-seq και ChIP-seq

Η ποιότητα των Fastq αρχείων αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα FASTQC. Τα reads χαρτογραφήθηκαν στο ανθρώπινο γονιδίωμα (έκδοση hg19) χρησιμοποιώντας το Bowtie2 με "very sensitive end to end" παραμέτρους (Landmead and Salzberg, 2012). Στη συνέχεια, τα διπλά reads αφαιρέθηκαν χρησιμοποιώντας την εντολή RmDup από το πακέτο SAMtools (Li et al., 2009). Τα δείγματα κανονικοποιήθηκαν στο ίδιο βάθος αλληλούχησης χρησιμοποιώντας την εντολή Downsample SAM / BAM από το Picard. Οι κορυφές εντοπίστηκαν χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο MACS2 (Feng et al., 2012) με τις εξής παραμέτρους: εύρος ζώνης = 150 bp, lower mfold = 5, upper mfold = 50 και q value = 0.05. Για τη διαφορική εύρεση κορυφών μεταξύ των διαφορετικών χρονικών σημείων τα reads που αντιστοιχούν σε κορυφές μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας την εντολή MultiCovBed από το bedtools (Quinlan and Hall, 2010) και χρησιμοποιήθηκε a 2-fold cutoff μεταξύ αυτών των χρονικών σημείων και ενός ελάχιστου αριθμού των 40 reads. Για τον προσδιορισμό του σήματος και την ποσοτικοποίηση, τα bam αρχεία μετατράπηκαν σε μορφή bigwig χρησιμοποιώντας την εντολή bamcoverage από το deeptools πακέτο (Ramirez et al., 2014). Για την απεικόνιση των γονιδιωματικών σημάτων σε συγκεκριμένους γονιδιωματικούς τόπους εφαρμόστηκε το πρόγραμμα περιήγησης IGV (Integrative Genomics Viewer) (Robinson et al., 2011). Για την κατασκευή των heatmaps εφαρμόστηκαν οι εντολές computeMatrix και plotHeatmap από deeptools (Ramirez et al., 2014). Προκειμένου να εντοπιστούν τα γονίδια που βρίσκονται κοντά στις κορυφές αλλά και οι βιολογικές διεργασίες στις οποίες συμμετέχουν, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα GREAT με ένα μόνο πλησιέστερο γονίδιο εντός 1000 kb για τις σε "απόσταση"-TSS κορυφές καθώς και η επιλογή των 10 kb για τις εγγύς-TSS κορυφές (http: // great. stanford.edu/public/hmtl) (McLean et al., 2010).

Εναλλακτικά, εντοπίστηκαν τα γονίδια που βρίσκονται πιο κοντά στις κορυφές χρησιμοποιώντας την εντολή ClosestBed από bedtools. Η ανάλυση μοτίβων των μεταγραφικών παραγόντων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το MEME-ChIP (http://meme-suite.org/tools/meme-ChIP) (Bailey *et* al., 2009) και το RSAT (http://rsat.sb.roscoff.fr/) (Nguyen *et* al., 2018).

Ανάλυση δεδομένων ChIP-STARR-seq

Η ποιότητα των Fastq αρχείων αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα FASTQC. Τα reads χαρτογραφήθηκαν στο ανθρώπινο γονιδίωμα (έκδοση hg19) χρησιμοποιώντας το Bowtie2 με "very sensitive end to end" παραμέτρους (Landmead and Salzberg, 2012).Τα δείγματα κανονικοποιήθηκαν στο ίδιο βάθος αλληλούχησης χρησιμοποιώντας την εντολή Downsamples SAM / BAM από το Picard. Προκειμένου να αναγνωριστούν οι επαγώγιμοι STARR ενισχυτές, τα sequencing reads που εμπίπτουν εντός των επαγόμενων IRF3 κορυφών μετρήθηκαν για τα δείγματα input-STARR, STARR-0h και STARR-6h. Ως επαγώγιμοι ενισχυτές ονομάστηκαν αυτοί που πληρούσαν τα ακόλουθα κριτήρια: τουλάχιστον 2-fold αύξηση του σήματος στις 6 ώρες σε σύγκριση με το input δείγμα και ταυτόχρονη τουλάχιστον διπλάσια αύξηση του σήματος στις 6 ώρες σε σύγκριση με το μη-μολυσμένο δείγμα. Για τον προσδιορισμό του σήματος και την ποσοτικοποίηση, τα αρχεία bam μετατράπηκαν σε μορφή bigwig χρησιμοποιώντας την εντολή bamcoverage από το deeptools πακέτο (Ramirez et al. 2014). Για την απεικόνιση γονιδιωματικών σημάτων σε συγκεκριμένους γονιδιωματικούς τόπους εφαρμόστηκε το πρόγραμμα περιήγησης IGV (Robinson et al., 2011). Τα δείγματα κανονικοποιήθηκαν στο ίδιο βάθος αλληλούχησης χρησιμοποιώντας την εντολή Downsample SAM / BAM από το Picard. Για την κατασκευή heatmaps εφαρμόστηκαν οι εντολές computerMatrix και plotHeatmaps από deeptools (Ramirez et al., 2014). Προκειμένου να εντοπιστούν τα γονίδια που βρίσκονται κοντά στις κορυφές αλλά και οι βιολογικές διεργασίες στις οποίες συμμετέχουν, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα GREAT με ένα μόνο πλησιέστερο γονίδιο εντός 1000 kb για τις σε "απόσταση"-TSS κορυφές καθώς και η επιλογή των 10 kb για τις εγγύς-TSS κορυφές (http://great.stanford.edu/public/hmtl) (McLean et al., 2010). Εναλλακτικά, εντοπίστηκαν τα γονίδια που βρίσκονται πιο κοντά στις κορυφές χρησιμοποιώντας την εντολή ClosestBed από bedtools. Η ανάλυση μοτίβων μεταγραφικών παραγόντων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το MEME-ChIP (http://meme-suite.org/tools/meme-ChIP) (Bailey *et* al., 2009) και το RSAT (http://rsat.sb.roscoff.fr/) (Nguyen *et* al., 2018).

Ταυτοποίηση συντηρημένων αλληλουχιών που περιέχουν συμπλέγματα IRF μοτίβων

Προκειμένου να εντοπιστούν οι αλληλουχίες με IRF μοτίβα, το μοτίβο που προέκυψε προήλθε από τις 20 πιο επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο MEME-ChIP. Το μοτίβο περιέχει 4 εν δυνάμει IRF θέσεις πρόσδεσης και είναι η δομική μονάδα των IRF επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών. Στη συνέχεια, τα γονιδιώματα των αντιπροσωπευτικών οργανισμών σε όλη την εξέλιξη εξετάστηκαν χρησιμοποιώντας το μοτίβο που καταλήξαμε και το πρόγραμμα PWMScan (Ambrosini *et al.,* 2018). Προκειμένου να εντοπιστούν οι πιο επαναλαμβανόμενες ακολουθίες, τα μοτίβα που ήταν πιο κοντά από 50 bp το ένα από το άλλο συνενώθηκαν χρησιμοποιώντας την εντολή genomic intervals-cluster από το Galaxy και περιοχές με 5 ή περισσότερα παρακείμενα μοτίβα θεωρήθηκαν ως επαναλαμβανόμενα IRF μοτίβα, το BLASTn (Altschul *et al.,* 1990) χρησιμοποιήθηκε επίσης με τις ακόλουθες παραμέτρους: word size 7, without masking and filtering low complexity regions.

Αναλύσεις γονιδιακής οντολογίας (Gene Ontology)

Η συνδυασμένη αξιοποίηση δεδομένων από διαφορετικές τεχνικές έδωσε τη δυνατότητα δημιουργίας βάσης δεδομένων που παρέχουν καταχωρημένες πληροφορίες για τους βιολογικούς ρόλους γονιδίων και τις βιολογικές διαδικασίες στις οποίες συμμετέχουν. Έτσι, οι αλληλουχίες που προκύπτουν από ένα ChIP-seq πείραμα, μπορούν να χαρακτηριστούν βιολογικά μέσω ανάλυσης γονιδιακής οντολογίας (Gene ontology analysis, GO), όπου ελέγχεται η συχνότητα του υπόβαθρου (background) (Ashburner *et* al., 2000). Πιο

συγκεκριμένα, η συχνότητα του δείγματος είναι η αναλογία μεταξύ του αριθμού των γονιδίων σε μια συγκεκριμένη GO ανάλυση και του συνολικού αριθμού γονιδίων στο δείγμα, ενώ η συχνότητα του υπόβαθρου είναι η αναλογία μεταξύ του αριθμού των γονιδίων σε μια συγκεκριμένη GO ανάλυση και του συνολικού αριθμού γονιδίων σε όλη τη βάση δεδομένων. Τα DAVID (Huang *et* al., 2009) και PANTHER (Mi *et* al., 2013) είναι διαδικτυακά εργαλεία που χρησιμοποιούνται για τη διεξαγωγή των αναλύσεων αυτών.

Ανάλυση δεδομένων qPCR

Ποσοστό του INPUT σε ChIP πειράματα

Για να γίνει έλεγχος της επιτυχίας του πειράματος ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης, πρέπει να βρεθεί σε τι ποσοστό του input αντιστοιχούν τα κομμάτια που έχουν απομονωθεί με τη βοήθεια των μαγνητικών σφαιριδίων. Οι τιμές του input που έχουν προκύψει από την PCR θα πρέπει αρχικά να διορθωθούν γιατί έχει γίνει αραίωση στο input για να χρησιμοποιηθεί στη PCR (συνήθως 1:250 φορές αραίωση). Αυτό γίνεται με τον εξής τύπο: Cq του input - log2(αραίωση του input). Στη συνέχεια γίνεται χρήση των διορθωμένων τιμών του input για να γίνει κανονικοποίηση των τιμών των δειγμάτων. Αυτό γίνεται με τον παρακάτω τύπο: 100*2^(διορθωμένο input - Cq δείγματος).

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

LB (Lysogenic Broth) + AΓAP

Το θρεπτικό μέσο LB (Lysogeny Broth) είναι κατάλληλο για την ανάπτυξη βακτηριακών καλλιεργειών.

Η σύσταση του θρεπτικού μέσου είναι η εξής:

- 10 gr/L Tryptone (PanReac AppliChem)
- 5 gr/L Yeast Extract (Melford)
- 10 gr/L NaCl (AppliChem)
- 15 gr/L Agar (PanReac AppliChem)
- ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 1 L

Η απαιτούμενη συγκέντρωση των αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν για επιλογή είναι: Αμπικιλλίνη: 100 mg/mL, Καναμυκίνη: 50 mg/mL

Μετά τη διάλυση των συστατικών είναι απαραίτητη η αποστείρωση. Μόλις βγει το μείγμα από την αποστείρωση στρώνεται απευθείας σε πιάτα υπό φλόγα με προσθήκη και αφήνεται να πήξει.

10X PBS (Phosphate-Buffered Saline)

Η σύσταση του διαλύματος είναι η εξής:

- 40 g NaCl (AppliChem)
- 7.2 g Na2HPO4 (AppliChem)
- 1.2 g KH2PO4 (Lach-Ner)
- 1 g KCl (SIGMA)
- ddH_2O μέχρι τελικό όγκο 500 mL

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

5X TBE (Tris - Borate - EDTA) buffer

Η σύσταση του διαλύματος είναι η εξής:

- 216 g Tris Base (Fisher Chemical)
- 110 g Boric acid (Fisher Chemical)
- 14.9 g EDTA (PanReac AppliChem)
- Προσθήκη ddH2O μέχρι τελικό όγκο 4L

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

RNA - seq Πειράματα

Για να διερευνήσουμε τους μοριακούς μηχανισμούς ρύθμισης της επαγόμενης γονιδιακής έκφρασης που ενορχηστρώνουν την ανθρώπινη αντι-ιϊκή κυτταρική απόκριση και που θα αναδείξουν τη λογική βάση της οποίας στηρίζεται η συντονισμένη απόκριση των κυττάρων ενάντια στους ιούς μέσω του σχηματισμού δικτύων γονιδιακής έκφρασης, πραγματοποιήσαμε, αρχικά, πειράματα RNA-seq (Mortazani *et* al., 2008). Τα πειράματα ανάλυσης της έκφρασης των γονιδίων μετά από ιϊκή μόλυνση με ιό Sendai πραγματοποιήθηκαν στις ανθρώπινες καρκινικές σειρές επιθηλιακών κυττάρων HeLa και Β-λεμφοκυττάρων Namalwa. Για τη σύγκριση των πιθανών διαδοχικών γεγονότων στη γονιδιακή απόκριση και την καλύτερη κατανόηση του φαινομένου της **επαγόμενης γονιδιακής έκφρασης** έγινε μελέτη τόσο στις 3 ώρες που αντιπροσωπεύουν ένα πρώιμο στάδιο κυτταρικής απόκρισης, όσο και στις 6 ώρες μετά από ιϊκή μόλυνση με ιό Sendai, χρονικό σημείο που αποτελεί το πρώτο σημείο της κορύφωσης της γονιδιακής απόκρισης στη μόλυνση, όπου η ανοσολογική απόκριση βρίσκεται σε πλήρη εξέλιξη. Στις 6 ώρες μετά τη μόλυνση ενεργοποιείται πλήρως η μεταγραφή του γονιδίου της *IFN-β* και θεωρούμε ότι αυτό το χρονικό σημείο αποτελεί το πρώτο στάδιο γονιδιακής απόκρισης στη μόλυνση. Τα RNA-seq πειράματα επαναλήφθηκαν δύο φορές (Biological replicates).

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η απομόνωση του ολικού RNA, η τελική ποσότητα του RNA υπολογίστηκε σε NanoDrop και ο έλεγχος για την αρτιότητα της δομής του απομονωμένου RNA πραγματοποιήθηκε μέσω ηλεκτροφόρησης 1μg RNA σε πήκτωμα αγαρόζης (Εικόνα 30). Η ολοκλήρωση της αντίδρασης συνεπάγεται τη δημιουργία μονόκλωνων τεμαχίων cDNA για το σύνολο των μορίων mRNA που υπάρχουν στο κυτταρόπλασμα τη χρονική στιγμή της κατεργασίας των κυττάρων. Το υλικό αυτό χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της έκφρασης συγκεκριμένου γονιδίου ή την κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης που περιέχει το σύνολο των αλληλουχιών που μεταγράφονται τη δεδομένη χρονική στιγμή υπό καθορισμένες συνθήκες.


Εικόνα 30. Quality control 1: RNA integrity

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε κατασκευή βιβλιοθηκών σύμφωνα με τις οδηγίες του Tru-seq RNA library preparation kit v2 της Illumina για την προετοιμασία του υλικού για την αλληλούχηση ευρείας κλίμακας νέας γενιάς. Αρχικά πραγματοποιείται επιλογή του poly-A RNA, κατακρημνίζεται το RNA και το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση δημιουργεί τον cDNA κλώνο, ο οποίος στη συνέχεια μετατρέπεται σε δίκλωνο DNA. Ακολουθεί η επιδιόρθωση των άκρων με την προσθήκη μιας βάσης αδενίνης στο 3' άκρο των μορίων του DNA έτσι ώστε, σύμφωνα με την αρχή της συμπληρωματικότητας των βάσεων, να μπορέσουν οι ειδικοί αντάπτορες να συνδεθούν στα άκρα του DNA με την προσθήκη DNA - λιγάσης (END REPAIR, DNAadaptor-ligation). Οι αντάπτορες περιέχουν ειδικές αλληλουχίες A-tailing, avayvώρισης (barcodes) έτσι ώστε να είναι εφικτή η αλληλούχηση περισσοτέρων από μία βιβλιοθηκών (Εικόνα 31). Στη συνέχεια πραγματοποιείται πολλαπλασιασμός των βιβλιοθηκών με PCR και επίσης ο καθαρισμός τους με μαγνητικά σφαιρίδια Ampure ΧΤ. Ο αριθμός των απαραίτητων κύκλων πολλαπλασιασμού εξαρτάται από την αρχική ποσότητα του RNA καθώς και από την αποτελεσματικότητα της όλης διαδικασίας.



Εικόνα 31. Συνοπτική απεικόνιση των σταδίων για τη διαδικασία κατασκευής βιβλιοθήκης σύμφωνα με τις οδηγίες του Tru-Seq Library Preparation Kit της Illumina (Corney and Basturea, 2016)

Ακολουθεί ένας ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος των βιβλιοθηκών. Η ποσότητα των βιβλιοθηκών διαπιστώνεται έπειτα από μέτρηση στο φωτόμετρο Qubit, χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Qubit dsDNA HS assay kit. Η ποιότητα των βιβλιοθηκών επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση σε μικροτριχοειδή στο μηχάνημα 2100 Bioanalyser με χρήση του DNA 1000 kit (Εικόνα 32). Πρόκειται για μια πολύ ευαίσθητη ανάλυση η οποία μπορεί να ανιχνεύσει πολύ μικρές ποσότητες του DNA.



Εικόνα 32. Προφίλ της ανάλυσης των RNA-seq βιβλιοθηκών στο μηχάνημα Bioanalyzer 2100. Στην πρώτη θέση βλέπουμε κομμάτια γνωστού μοριακού βάρους και ακολουθούν οι βιβλιοθήκες μας όπου διακρίνεται καθαρά το μέγεθός τους, το οποίο κυμαίνεται από 250-500 bp

Όπως φαίνεται χαρακτηριστικά, παρατηρείται το αναμενόμενο μέγεθος των βιβλιοθηκών (250-500 bp) σε κάποια από τα δείγματα, γεγονός που επαληθεύει το επιθυμητό μέγεθός τους καθώς και την απουσία ανεπιθύμητων παραπροϊόντων, κατά κύριο λόγο διμερή εκκινητών, που είναι πολύ πιθανόν να διαβαστούν και να μας οδηγήσουν σε εσφαλμένη ανάλυση. Ο έλεγχος αυτός είναι σημαντικός προκειμένου να εξασφαλισθεί η καλή ποιότητα της βιβλιοθήκης. Η αλληλούχηση των βιβλιοθηκών πραγματοποιήθηκε στο μηχάνημα NextSeq500 της Illumina στο **Ελληνικό Κέντρο Γονιδιωματικής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών** (Greek Genome Center, GGC). Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι σε κάθε δείγμα αντιστοιχούν 16-24 εκατομμύρια αλληλουχίες οι οποίες στοιχίστηκαν στο γονιδίωμα και πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση της έκφραση των γονιδίων.

Στην παρακάτω εικόνα της βιοπληροφορικής ανάλυσης (Εικόνα 33) παρουσιάζεται ο μεγάλος βαθμός συσχέτισης (Pearson συντελεστής συσχέτισης) ανάμεσα στις δύο βιολογικές επαναλήψεις σε κύτταρα HeLa και Namalwa και αποτελεί έναν επιπλέον ποιοτικό έλεγχο. Παρατηρούμε χαρακτηριστικά τη σημαντική συσχέτιση ανάμεσα και στα HeLa κύτταρα αλλά και στα Namalwa. Ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές όμως, η συσχέτιση μειώνεται δραματικά και αυτό διότι πρόκειται για δύο διαφορετικές κυτταρικές σειρές με διαφορετικό πρόγραμμα έκφρασης.

Pearson Correlation Coef.												
			0.0			0.9			1.0			
HeLa Oh	HeLa Oh	HeLa 3h	HeLa 3h	HeLa 6h	HeLa 6h	Namalwa Oh	Namalwa Oh	Namalwa 3h	Namalwa 3h	Namalwa 6h	Namalwa 6h	
1.00	0.98	0.99	0.97	0.96	0.91	0.60	0.65	0.59	0.64	0.58	0.61	HeLa Oh
0.98	1.00	0.98	0.99	0.95	0.93	0.62	0.66	0.61	0.66	0.59	0.63	HeLa Oh
0.99	0.98	1.00	0.98	0.98	0.93	0.59	0.63	0.60	0.64	0.60	0.63	HeLa 3h
0.97	0.99	0.98	1.00	0.98	0.97	0.61	0.65	0.63	0.67	0.63	0.65	HeLa 3h
0.96	0.95	0.98	0.98	1.00	0.98	0.59	0.64	0.64	0.67	0.66	0.68	HeLa 6h
0.91	0.93	0.93	0.97	0.98	1.00	0.58	0.62	0.65	0.67	0.67	0.68	HeLa 6h
0.60	0.62	0.59	0.61	0.59	0.58	1.00	0.97	0.93	0.95	0.88	0.90	Namalwa Oh
0.65	0.66	0.63	0.65	0.64	0.62	0.97	1.00	0.92	0.97	0.88	0.92	Namalwa Oh
0.59	0.61	0.60	0.63	0.64	0.65	0.93	0.92	1.00	0.98	0.98	0.98	Namalwa 3h
0.64	0.66	0.64	0.67	0.67	0.67	0.95	0.97	0.98	1.00	0.95	0.98	Namalwa 3h
0.58	0.59	0.60	0.63	0.66	0.67	0.88	0.88	0.98	0.95	1.00	0.99	Namalwa 6h
0.61	0.63	0.63	0.65	0.68	0.68	0.90	0.92	0.98	0.98	0.99	1.00	Namalwa 6h

Εικόνα 33. Παρουσιάζεται ο υψηλός βαθμός συσχέτισης μεταξύ βιολογικών επαναλήψεων σε κύτταρα HeLa και Namalwa για RNA- seq πειράματα σύμφωνα με τη βιοπληροφορική μέθοδο στατιστικής ανάλυσης Pearson Correlation Coefficient

Θέλοντας να εξετάσουμε το βαθμό επαγωγής της έκφρασης κάποιων σημαντικών αλλά και καλά χαρακτηρισμένων ρυθμιστών γονιδίων-στόχων της ανοσολογικής απόκρισης και σαν έναν επιπλέον ποιοτικό έλεγχο επίσης, μετρήσαμε τα επίπεδα έκφρασής τους με RT-PCR μετά τη μόλυνση με τον ιό. Στην **Εικόνα 34**, διακρίνονται τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της *IFN-β* και φαίνεται χαρακτηριστικά η προοδευτική επαγωγή του γονιδίου κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης και στις δύο κυτταρικές σειρές για δύο διαφορετικές επαναλήψεις του πειράματος. Η έκφραση του γονιδίου της *IFN-β* επάγεται σημαντικά κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης τόσο στα HeLa όσο και στα Namalwa. Στα Namalwa παρατηρείται μέγιστη έκφραση συγκριτικά με τα HeLa. Να σημειωθεί ότι για την κανονικοποίηση του πειράματος χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο GAPDH. Τα επίπεδα έκφρασης κάτω από τη διακεκομμένη γραμμή θεωρούνται ως θόρυβος. Επιπροσθέτως, η έκφραση του γονιδίου της IL-8 παρουσιάζει έναν πολύ υψηλό βαθμό επαγωγής στα HeLa, σε αντίθεση με τα Namalwa, γεγονός που συμβαδίζει απόλυτα με προηγούμενη έρευνα του εργαστηρίου μας (Agelopoulos and Thanos, 2006) και αυτό διότι η παρουσία της macroH2A.1 στα Namalwa εμποδίζει την επαγωγή των γονιδίων.



Εικόνα 34. Απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης χαρακτηριστικών γονιδίων της ανοσολογικής απόκρισης, όπως αυτή προκύπτει από RNA-seq πειράματα.

Στη συνέχεια μελετήσαμε τα δύο αυτά καλά χαρακτηρισμένα γονίδια, της IFN-β και της IL-8, κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης και στις δύο κυτταρικές σειρές. Η κατανομή του σήματος παρουσιάζεται στην παρακάτω Εικόνα 35 (Α-Δ).

Επίπεδα έκφρασης (log2)



A

RNA-seq signal coverage around Namalwa IFN- β





Εικόνα 35. Α-Β) Απεικόνιση της κατανομής του RNA-seq σήματος - μεταγραφή του γονιδίου της *IFN-β* σε Namalwa και HeLa κύτταρα και **Γ-Δ**) Απεικόνιση της κατανομής του RNA-seq σήματος - μεταγραφή του γονιδίου της *IL-8* σε Namalwa και HeLa κύτταρα. Παρατηρούμε την επαγόμενη από ιό έκφραση των γονιδίων, όπως αναμένεται η έκφραση της *IL-8* επάγεται μόνο στα HeLa κύτταρα ενώ του γονιδίου της IFN-β και στους δύο κυτταρικούς τύπους

Στη συνέχεια αναλύσαμε το σύνολο των γονιδίων των οποίων η έκφραση μεταβάλλεται μετά από την ιϊκή μόλυνση. Όσο αφορά τα HeLa, παρατηρούμε ότι 3 ώρες μετά την έναρξη της ιϊκής μόλυνσης 202 γονίδια εμφανίζουν αυξανόμενη έκφραση και 499 6 ώρες μετά τη μόλυνση. Από τα 202 γονίδια τα 170 διατηρούν την υψηλή έκφρασή τους και στις 6 ώρες. Αντιθέτως, μειωμένη είναι η έκφραση 53 γονιδίων 3 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση και 328 γονιδίων 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση και 328 γονιδίων 6 ώρες μετά την ιϊκή την ιϊκή μόλυνση και 328 γονιδίων 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση και 328 γονιδίων 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση και 328 γονιδίων 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση. Αντίστοιχα στα Namalwa παρατηρούμε ότι 3 ώρες μετά την έναρξη της ιϊκής μόλυνση, ενώ τα γονίδια με μειωμένη έκφραση ήταν 119 και 432, αντίστοιχα. Από τα 338 γονίδια τα 287 διατηρούν την υψηλή έκφρασή τους και στις 6 ώρες **(Εικόνα 36)**.



A



Εικόνα 36. Απεικονίζεται ο αριθμός γονιδίων που παρουσιάζουν κοινό και κυτταρο-ειδικό πρότυπο μεταβολής των επιπέδων έκφρασής τους στις 3 ώρες (Α) και στις 6 ώρες (Β), αντίστοιχα, μετά την ιϊκή μόλυνση με ιό Sendai

Αξίζει να παρατηρηθεί ότι ο αριθμός των γονιδίων που η έκφρασή τους μεταβάλλεται είναι μεγαλύτερος στις 6 ώρες σε σύγκριση με τις 3 ώρες, τόσο στα HeLa όσο και στα Namalwa επιβεβαιώνοντας το γεγονός ότι μετά το πέρας 3 ωρών η κυτταρική απόκριση βρίσκεται ακόμα σε πρώιμο στάδιο.

Παρ' όλο που τα επαγόμενα συστήματα μελέτης εστιάζονται κυρίως στην αύξηση της έκφρασης των γονιδίων, η δική μας πλατφόρμα μας έδωσε τη δυνατότητα να εντοπίσουμε γονίδια των οποίων η έκφραση μειώνεται μετά την ιϊκή μόλυνση. Συγκεκριμένα στα HeLa, 53 γονίδια εμφανίζουν μειωμένη έκφραση λόγω της παρουσίας του ιού 3 ώρες μετά τη μόλυνση εκ των οποίων τα 36 συνεχίζουν να βρίσκονται σε καταστολή 6 ώρες μετά τη μόλυνση. Επίσης, στις 6 ώρες 292 επιπλέον γονίδια εμφανίζουν μειωμένη έκφραση λόγω της παρουσίας του ιού 3 σύρες μετά τη μόλυνση. Επίσης, στις 6 ώρες 292 επιπλέον γονίδια εμφανίζουν μειωμένη έκφραση λόγω της παρουσίας του ιού 3 ώρες μετά τη μόλυνση. Επίσης στα Namalwa, 119 γονίδια εμφανίζουν μειωμένη έκφραση λόγω της παρουσίας του ιού 3 ώρες μετά τη μόλυνση. Επίσης στις 6 ώρες μετά τη μόλυνση, εκ των οποίων τα 71 συνεχίζουν να βρίσκονται σε καταστολή 6 ώρες μετά τη μόλυνση. Επίσης στις 6 ώρες μετά τη μόλυνση.

HeLa 3h SeV

170

κατεσταλμένων γονιδίων (Εικόνα 37).



Εικόνα 37. Απεικονίζεται ο αριθμός γονιδίων με μειωμένη έκφραση 3 και 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση με ιό Sendai στα HeLa (A) και στα Namalwa κύτταρα (B)

Παρατηρήσαμε την ενεργοποίηση κοινών γονιδίων μετά από ιϊκή μόλυνση με ιό Sendai και στους δύο κυτταρικούς τύπους. Τα κοινά γονίδια, των οποίων η έκφραση αυξάνεται και στις δύο κυτταρικές σειρές, στις 3 και στις 6 ώρες είναι 82 στο σύνολο, τα οποία και αποτελούν τον **"αντι-ιϊκό πυρήνα"** (anti-viral core) της ανοσολογικής απόκρισης (Εικόνα 38). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι δεν παρατηρείται ο αντίστοιχος πυρήνας γονιδίων σε γονίδια που αποσιωπούνται μετά την ιϊκή μόλυνση. Τα κοινά γονίδια που αποσιωπούνται είναι ελάχιστα.

ΑΝΤΙ-ΙΪΚΟΣ ΠΥΡΗΝΑΣ (82 genes)

APOL1	IFI44	IFNB1	MX1
APOL2	IFI6	IFNL1	MX2
APOL3	IFIH1	IRF1	NFKB2
APOL6	IFIT1	IRF7	NFKBIZ
CCL5	IFIT2	ISG15	OAS1
CXCL10	IFIT3	JUN	OAS2
CXCL11	IFIT5	JUNB	OASL

Εικόνα 38. Ο πίνακας απεικονίζει χαρακτηριστικά γονίδια από το σύνολο των 82 κοινών γονιδίων που εμφανίζουν αυξανόμενη έκφραση στις 3 και στις 6 ώρες μετά την έναρξη της ιϊκής μόλυνσης

Μελετώντας περαιτέρω τα γονίδια, των οποίων η έκφραση επάγεται από κοινού έπειτα από üκή μόλυνση και στις δύο κυτταρικές σειρές, διαπιστώνουμε έπειτα από ανάλυση γονιδιακής οντολογίας (Gene Ontology analysis, GO), όπως ήταν αναμενόμενο, ότι συμμετέχουν σε πολύ μεγάλο βαθμό σε κυτταρικές διαδικασίες όπως η απόκριση σε ιό, σε ανοσολογική απόκριση και στην κυτταρική απόπτωση, γεγονός που υπογραμμίζει την αρτιότητα των αποτελεσμάτων μας. Τα παραπάνω γονίδια συμμετέχουν επίσης σε συγκεκριμένα σηματοδοτικά μονοπάτια όπως για παράδειγμα τα μονοπάτια ρύθμισης της ανοσολογικής απόκρισης των υποδοχέων RIG-I (Retinoic Acid-Inducible Gene 1) και Toll (Toll-like receptors) (Εικόνα 39). Οι υποδοχείς Toll παίζουν κυρίαρχο ρόλο στην ανοσολογική απόκριση του οργανισμού σε περιπτώσεις λοίμωξης ή τραυματισμού (Alexoudi *et al.,* 2015). Ο ρόλος τους είναι να εντοπίζουν πιθανούς παθογόνους παράγοντες και να ενεργοποιούν ενδοκυτταρικές οδούς μεταγωγής μηνυμάτων. Όσον αφορά τους υποδοχείς RIG-I, πρόκειται για ενδοκυττάριους υποδοχείς αναγνώρισης ϊκού RNA (Kato and Fujita, 2015).



Εικόνα 39. Απεικονίζονται τα σηματοδοτικά μονοπάτια (Pathway Enrichment) και οι κυτταρικές διαδικασίες για τα γονίδια των οποίων η έκφραση επάγεται μετά από ιϊκή μόλυνση με ιό Sendai και είναι κοινά μεταξύ των κυτταρικών σειρών HeLa και Namalwa έπειτα από ανάλυση γονιδιακής οντολογίας (Gene Ontology)

Ο παρακάτω πίνακας (Εικόνα 40) περιλαμβάνει κοινά γονίδια, όπως είναι ο NF-κB, IRFs και JUN, γνωστά για τη συμμετοχή τους στα μονοπάτια που ενεργοποιούνται μετά την ιϊκή μόλυνση και επομένως αναμενόμενο να επάγονται και στις δύο κυτταρικές σειρές. Δεξιά, μέλη της οικογένειας των IFN-a, γνωστό ότι επάγονται μόνο στα Β-λεμφοκύτταρα. Αριστερά, καλά χαρακτηρισμένα γονίδια, όπως η IL-6 και η IL-8, γνωστά ότι εκφράζονται μόνο σε επιθηλιακά κύτταρα.

ILIA ITGA2 APOL1 IF144 IFNB1 MX1 IFNA1 IFNA5 ILIB KRT16 APOL2 IF16 IFNL1 MX2 IFNA10 IFNA5

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΙΪΚΑ ΕΠΑΓΟΜΕΝΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

HeLa

BCL10

CXCL2

Κοινά γονίδια

Namalwa

Εικόνα 40. Απεικόνιση χαρακτηριστικών παραδειγμάτων γονιδίων που επάγονται 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση με κοινό πρότυπο έκφρασης επαγωγής

Στην τελευταία εικόνα (Εικόνα 41Α-Γ) αυτού του τμήματος της μελέτης παρουσιάζει μια συγκεντρωτική αναπαράσταση από τη στρατηγική της μεθόδου RNA-seq για την ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων μετά από ιϊκή μόλυνση ανθρώπινων κυτταρικών σειρών HeLa και Namalwa. Μετά από φιλτράρισμα των RNA-seq δεδομένων ορίσαμε την αντ-ιϊκή υπογραφή για υψηλό όριο έκφρασης και επαναληψιμότητας και κάναμε διάκριση μεταξύ των κοινών και των κυτταρο-ειδικών προγραμμάτων της γονιδιακής έκφρασης που ενεργοποιήθηκαν μετά την ιϊκή μόλυνση. Πιο συγκεκριμένα, εντοπίσαμε 768 διαφορικά εκφραζόμενα γονίδια (DEGS: Differentially Expressed Genes) στα HeLa (440 γονίδια με αυξημένη έκφραση και 328 με μειωμένη έκφραση) και 1091 DEGS στα Namalwa (663 γονίδια με αυξημένη έκφραση και 428 με μειωμένη έκφραση) 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση (Εικόνα 41Α). Μεταξύ αυτών, αρκετά καλά-χαρακτηρισμένα αντι-ιϊκά γονίδια εντοπίστηκαν ότι ενεργοποιούνται και στις δύο κυτταρικές σειρές όπως η *IEN-β, OASL, HERC5, ISG15* και άλλα (Εικόνα 41Γ), ή με κυτταρο-ειδικό τρόπο, όπως η *IL-8, IL-6, IL-7R* και μέλη της οικογένειας των ΙFNAs. Είναι ενδιαφέρον ότι το αντι-ιϊκό πρόγραμμα

ενεργοποιείται νωρίτερα στα Namalwa σε σύγκριση με τα κύτταρα HeLa (Εικόνα 41Γ), με διάμεση αναλογία SVI (3h / 6h) 0.81 για τα Namalwa έναντι 0.61 για τα HeLa κύτταρα. Μέσα στα κοινά 228 DEGs, βρέθηκαν 189 γονίδια με αυξημένη έκφραση, ενώ 39 γονίδια είχαν μειωμένη έκφραση (Εικόνα 41Α).

Για να κατανοήσουμε καλύτερα τη σημασία αυτών των ρυθμιστικών γεγονότων, πραγματοποιήσαμε ανάλυση γονιδιακής οντολογίας (Gene Ontology analysis) με τα 189 κοινά γονίδια που παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση. Η ανάλυση αποκάλυψε τη συμμετοχή τους στον αντι-ιϊκό μηχανισμό άμυνας, την ανοσολογική απόκριση καθώς και σε φλεγμονώδεις κυτταρικές λειτουργίες (Εικόνα 41B). Ανοσοποιητικοί ρυθμιστές, όπως οι παράγοντες μεταγραφής (IRF1, IRF2, IRF7, ATF3, STAT1, STAT2, NF-κB, IRF3) μαζί με τα γονίδια-στόχους τους, συμπεριλαμβανομένων των Interferon-Stimulated Genes (ISGs) μπορούν και να κατηγοριοποιηθούν αντίστοιχα (Εικόνα 41A). Αντίθετα, η ανάλυση γονιδιακής οντολογίας των 39 κοινών γονιδίων με μειωμένη έκφραση δεν αποκάλυψε καμία συντονισμένη ρύθμιση μιας κοινής βιολογικής διαδικασίας που συσχετίζεται με αντι-ιϊκούς μηχανισμούς.

Όπως περιγράφεται προηγουμένως, ένα τυπικό στοιχείο της αντι-ιϊκής απόκρισης είναι η ενεργοποίηση κυτταρο-ειδικών προγραμμάτων γονιδιακής έκφρασης. Υπάρχουν 878 DEGs στα Namalwa (474 γονίδια με αυξημένη έκφραση και 389 γονίδια με μειωμένη έκφραση και 540 DEGs στα HeLa (251 γονίδια με αυξημένη έκφραση και 289 γονίδια με μειωμένη έκφραση) (Εικόνα 41Α). Η ανάλυση της γονιδιακής οντολογίας αποκάλυψε ότι ένας αριθμός σχετικά μικρός ενεργοποιημένων γονιδίων και στους δύο κυτταρικούς τύπους σχετίζεται με τη γενική αντι-ιϊκή απόκριση και με ανοσολογικές ή φλεγμονώδεις λειτουργίες, όπως οι οδοί σηματοδότησης των κυτταροκινών. Μεταξύ αυτών, παρατηρούμε την ιϊκά επαγόμενη έκφραση της οικογένειας των IFN-α στα Β-λεμφοκύτταρα καθώς και μελών των ιντερλευκινών (IL-cluster) στα επιθηλιακά κύτταρα HeLa. Όπως και με την ανάλυση των κοινών DEGs, η ανάλυση της γονιδιακής οντολογίας των κυτταρικών-ειδικών γονιδίων που παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση δεν συμμετείχε σε κάποια στατιστικά σημαντική κυτταρική διαδικασία που να συσχετίζεται με αντι-ιϊκές, ανοσολογικές ή φλεγμονώδεις αποκρίσεις.



Εικόνα 41. Συγκεντρωτική απεικόνιση των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων σε κύτταρα HeLa και σε Namalwa **A**. Ven Diagram στο οποίο παρουσιάζεται ο αριθμός των γονιδίων με αυξημένη και μειωμένη έκφραση σε κύτταρα HeLa και Namalwa **6** ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση με ιό Sendai. Παρατηρείται αυξημένη έκφραση σε 440 γονίδια στα HeLa και μειωμένη έκφραση σε 328 γονίδια. Για τα Namalwa παρατηρείται αυξημένη έκφραση σε 663 γονίδια και μειωμένη έκφραση σε 428 γονίδια, αντίστοιχα **B**. Ανάλυση γονιδιακής

οντολογίας (GO) των 189 κοινών γονιδίων που παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση. Τα γονίδια αυτά συμμετέχουν σε βασικούς μηχανισμούς αντι-ιϊκής άμυνας και με μονοπάτια που σχετίζονται με ανοσολογικές κυτταρικές λειτουργίες **Γ.** Κατηγοριοποίηση των ανοσοποιητικών ρυθμιστών σε λίστες μαζί με τα γονίδια-στόχους τους

DNaseI - seq Πειράματα

Χαρακτηριστική είναι η ανακατανομή των προσβάσιμων θέσεων καθ΄ όλη τη διάρκεια της μόλυνσης όπου πολλές περιοχές της χρωματίνης που ήταν προσβάσιμες σε μημολυσμένα κύτταρα ανταλλάσσονται από άλλες που ήταν κλειστές αρχικά αλλά στη συνέχεια, κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης γίνονται προσβάσιμες. Για την ανάλυση του προφίλ της προσβασιμότητας της χρωματίνης και την εύρεση των περιοχών εκείνων των οποίων η προσβασιμότητα μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ανοσολογικής απόκρισης των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν πειράματα **DNaseIseq**, πριν καθώς και 3 και 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση σε κύτταρα HeLa και Namalwa. Τα πειράματα αυτά μπορούν να μας δείξουν όχι μόνο ποιες περιοχές είναι προσβάσιμες αλλά και ποιες από αυτές φιλοξενούν ταυτόχρονα μεταγραφικούς παράγοντες, άρα έχουν μεγάλη πιθανότητα να λειτουργούν ως ενισχυτές.

Μελετώντας τα σήματα από τη μέθοδο της **DNaseI-seq**, επικεντρωθήκαμε στη χαρτογράφηση της ιϊκά επαγόμενης προσβασιμότητας της χρωματίνης. Η ανάλυση έδειξε ένα ισχυρά ιϊκά επαγόμενο άνοιγμα χρωματίνης μόνο σε 479 περιοχές σε HeLa κύτταρα και σε 752 περιοχές σε κύτταρα Namalwa. Από αυτά, 54 και 124 ήταν <2 kb στο εγγύς γονίδιο στα HeLa και στα Namalwa κύτταρα, αντίστοιχα, ενώ τα υπόλοιπα χαρτογραφήθηκαν σε απομακρυσμένες περιοχές. Η σύγκριση με το σύνολο των RNA-seq δεδομένων αποκάλυψε ότι το 50% (27/54) των εγγύς-TSS επαγόμενων DNaseI περιοχών στα HeLa βρίσκονται κοντά σε καλά χαρακτηρισμένα ιϊκά γονίδια, όπως είναι τα CCL5, OASL, IFIT3, IFNL1 και άλλα. Η ανάλυση των 425 "σε απόσταση"-TSS ιϊκά επαγόμενων DNaseI-περιοχών στα HeLa αποκάλυψε ότι είναι γειτονικές σε 371 γονίδια, 59 από τα οποία είναι ιϊκά επαγόμενα (~ 15%), ένα στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα. Τα μισά από αυτά τα γονίδια επάγονται τόσο στα HeLa όσο και στα Namalwa, ενώ τα άλλα μισά επάγονται μόνο σε κύτταρα HeLa. Ομοίως, βρήκαμε ότι

σε κύτταρα Namalwa που έχουν μολυνθεί από τον ιό, 124 εγγύς-TSS επαγόμενα DNaseI σήματα είναι γειτονικά με 122 γονίδια στα Namalwa. Από αυτά, 13 γονίδια είναι κοινά ιϊκά-επαγόμενα γονίδια (~ 15%), ενώ 5 γονίδια επάγονται μόνο στα Namalwa κύτταρα. Τέλος, οι 628 "σε απόσταση"-TSS ιϊκά επαγόμενες-DNaseI περιοχές στα Namalwa γειτνιάζουν με 569 γονίδια, 40 εκ των οποίων είναι ιϊκά επαγόμενα (16 είναι κοινά γονίδια που παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση).

Η ανάλυση μοτίβων των "σε απόσταση"-DNaseI περιοχών αποκάλυψε ότι οι "σε απόσταση" περιοχές των HeLa κυττάρων είναι εμπλουτισμένες για θέσεις πρόσδεσης για την οικογένεια των IRFs, ενώ οι "σε απόσταση"-DNaseI περιοχών των Namalwa κυττάρων αποτελούν θέσεις πρόσδεσης για τον παράγοντα NF-κB. Αυτά τα δεδομένα μας προσδίδουν μια συστηματική ταξινόμηση των DHS χαρτών των ιϊκά εξαρτώμενων αλλά και κυτταρο-ειδικών DHS μοτίβων ενεργοποίησης. Αυτά που βρίσκονται κοντά στη θέση έναρξης της μεταγραφής συσχετίζονται καλύτερα με την ιϊκά επαγόμενη γονιδιακή έκφραση, ενώ οι "σε απόσταση"-DHS περιοχές δείχνουν λιγότερη συσχέτιση με την έκφραση των γειτονικών γονιδίων. Είναι ενδιαφέρον ότι η ενεργοποίηση DHS συσχετίζεται με την ύπαρξη μοτίβων πρόσδεσης-DNA κύριων ρυθμιστών της ανοσολογικής απόκρισης, όπως είναι οι IRFs και ο NF-κB, υπογραμμίζοντας έτσι το ρόλο τους στη ρύθμιση της αντι-ιϊκής απόκρισης.

Για να συσχετίσουμε την DHS ενεργοποίηση με την επαγωγή της μεταγραφής, επικεντρωθήκαμε στα ισχυρά κοινά επαγόμενα γονίδια κατά 2 φορές (by 2-fold) ή ακόμα και περισσότερο (120 κοινά γεγίδια) για να αποφύγουμε το θόρυβο από



-3kb TSS -3kb TSS -3kb TSS

Εικόνα 42. Κατηγοριοποίηση κοινών γονιδίων (n=120) σύμφωνα με το δείκτη επαγωγής σε 3 ομάδες (Group I, II και III) στα HeLa κύτταρα. Η ομάδα Ι αποτελείται από 34 γονίδια με FC > 20, η Ομάδα II με 4 $FC \le 20$ αποτελείται από 48 γονίδια και η ομάδα III με $2 \le FC \le 4$ αποτελείται από 38 γονίδια

Να αναφερθεί ότι ο παράγοντας STAT2 (Signal Transducer and Activator of Transcription 2) διαθέτει την ικανότητα να μεταδίδει σήματα από την κυτταρική

μεμβράνη στον πυρήνα για να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή γονιδίων και στρατολογεί συνενεργοποιητές, (όπως ο CBP και ο p300) αυξάνοντας το ρυθμό μεταγραφής των γονιδίων-στόχων του. Βρήκαμε ότι ο βαθμός του δείκτη επαγωγής της μεταγραφής σχετίζεται με το λόγο ενεργοποίησης DHS και με τη στρατολόγηση της Pol II σε κύτταρα HeLa και Namalwa που έχουν μολυνθεί με ιό.

Επιπλέον, πραγματοποιήσαμε πειράματα DNaseI-seq γύρω από τους υποκινητές των γονιδίων που επάγονται, που αυξάνουν δηλαδή σε σημαντικό βαθμό την έκφρασή τους κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης σε κύτταρα Namalwa **(Εικόνα 43)**. Όπως προαναφέρθηκε, η ικανότητα του ιού να προκαλεί την επαγωγή αντι-ιϊκών γονιδίων μπορεί εύκολα να εξακριβωθεί καθώς υπάρχουν γνωστά γονίδια στόχοι, όπως της *IFN-β*, όπου στις 6 ώρες μετά τη μόλυνση εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα μεταγραφής. Χωρίσαμε τα επαγόμενα γονίδια σε διαφορετικές κατηγορίες ανάλογα με τα επίπεδα αύξησης της μεταγραφής τους και μελετήσαμε τον τρόπο με τον οποία αλλάζει η προσβασιμότητα της χρωματίνης σε απόσταση 500 βάσεων από τη θέση έναρξης της μεταγραφής (TSS) μετά την ιϊκή μόλυνση. Για όλες τις κατηγορίες επαγωγής των γονιδίων παρατηρήθηκε μικρή αύξηση της προσβασιμότητας της χρωματίνης μετά την ιϊκή μόλυνση, με τα επίπεδα αύξησης να μη διαφέρουν ανάμεσα στις διαφορετικές κατηγορίες.



Εικόνα 43. Απεικόνιση των επιπέδων προσβασιμότητας της χρωματίνης σύμφωνα με τα πειράματα DNaseI-seq γύρω από τους υποκινητές των γονιδίων σύμφωνα με τα επίπεδα επαγωγής τους 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση σε κύτταρα Namalwa

Το σημαντικό στοιχείο που ανακαλύφθηκε είναι ότι τα επίπεδα προσβασιμότητας της χρωματίνης πριν από την ιϊκή μόλυνση είναι διαφορετικά και σχετίζονται με τα διαφορετικά επίπεδα επαγωγής. Παρατηρήθηκε αύξηση της προσβασιμότητας της χρωματίνης κατά την ιϊκή μόλυνση, τόσο για τα γονίδια με μικρή όσο και για τα γονίδια με μεγάλη επαγωγή της έκφρασής τους. Συγκεκριμένα, τα γονίδια που παρουσιάζουν λιγότερο προσβάσιμη χρωματίνη στα σημεία των υποκινητών πριν την ιϊκή μόλυνση εμφανίζουν μεγαλύτερα επίπεδα αύξησης της έκφρασής τους, γεγονός αναμενόμενο καθώς πριν την παρουσία του ιού δεν εκφράζονται. Τα γονίδια όμως που παρουσίασαν υψηλά επίπεδα επαγωγής είχαν χαμηλότερα επίπεδα προσβασιμότητας της χρωματίνης πριν από την ιϊκή μόλυνση, σε σχέση με γονίδια που επάγονταν σε μικρότερο βαθμό.

Ακολούθως, μελετήσαμε χαρακτηριστικά παραδείγματα γονιδίων των οποίων οι υποκινητές παρουσιάζουν διαφορετικό πρότυπο προσβασιμότητας κατά τη διάρκεια της αντι-ιϊκής απόκρισης σύμφωνα με τα DNaseI – seq πειράματα Εικόνα 44 (Α-Γ).

Signal coverage around the IRF7 gene

A



Signal coverage around the IFNL1 gene



B



Signal coverage around the LRMP gene

Εικόνα 44. Α. Απεικόνιση της προσβασιμότητας του επαγόμενου από τον ιό γονιδίου IRF7 γύρω από τον υποκινητή διατηρείται σταθερή κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης **B**. Απεικόνιση της προσβασιμότητας του επαγόμενου από τον ιό γονιδίου IFNL1 γύρω από τον υποκινητή αυξάνεται κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης **Γ**. Απεικόνιση της προσβασιμότητας του γονιδίου LRMP γύρω από τον υποκινητή που οποίου η έκφραση μειώνεται κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης

Ερευνήσαμε στη συνέχεια τα επίπεδα προσβασιμότητας σε HeLa κύτταρα και παρατηρήσαμε 425 περιοχές οι οποίες έχουν αυξημένα επίπεδα προσβασιμότητας 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση. Οι περιοχές αυτές βρίσκονται > 2κb από τις θέσεις έναρξης της μεταγραφής. Για τις απομακρυσμένες αυτές περιοχές ακολούθησε ανάλυση μοτίβων μεταγραφικών παραγόντων με πιο στατιστικά μοτίβα αυτά των παραγόντων μελών της οικογένειας των IRFs που όπως γνωρίζουμε παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική απόκριση (Εικόνα 45). Ακολούθησε ανάλυση γονιδιακής οντολογίας των γονιδίων που βρίσκονται κοντά στις απομακρυσμένες από τις θέσεις έναρξης της μεταγραφής περιοχές με επαγόμενη προσβασιμότητα 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση και παρατηρήσαμε τη συμμετοχή τους σε λειτουργίες που σχετίζονται με ανοσολογικές διαδικασίες, όπως είναι η ρύθμιση των ιογενών διεργασιών αλλά και του ανοσοποιητικού συστήματος (Εικόνα 46).

Notif Found	Discovery/Enrichment Program	E-value 2	Known or Scolar Hutch (2)	Distribution 2	Spatts 6.7040 (1)
Baas-SAAA SAAA	1921	436-375	MT. No.001.2 MT. M MT. No.040.0	Not Centrally Enrolled	- Mail Januar Arandar - Mail Januar Strij
Net#found	Oncovery/Exclusional Program	t value -	Known or Souther Hubble ()	Datifiation 2	Realts & FORD (1)
		5.14-001		nut Centrally Enrolled	 Ball Joseph Anglas Ball Joseph 2013
A - Mail front	Discovery/Esciclosest Program	E value I	Knewn ar Similar Hutth (1)	Statebation 2	Spatta & FUND 11
STORE Complement to	Çı	1.1+047		But Carriely Enriched	: Hill Barry Angless
The second second	Discovery/Exclosed Program	E-value -	Knewn ar Similar Multifu 🗹	Distribution 🗮	Spatta & FDHD
	SHEPS	2.84-999	272 54.1 abs: 190 1 272 TRANSLE	But Sectory Devoted	: But inserving
Net# Found	Discovery/Enistement Program	6-value 1	Recent of Soular Hotels (2)	Destribution 2	Sparts & F240-01
	CALINE	1.74-000	NAL MULA ALL/INDAYLA CO. ACTING AMERICAL IN	Not Cartraly Encloyd	: Ref Baser Merca
Multi Found	Discovery/Envisionant Program 🕅	Evalue	Known or Soudar Buttle ()	Distribution 2	Spatte & FIRS
Everse Complement ts	CALIFY	3.5e-004	AND CONTRACT OF CONTRACT.	Not Certrally Striched	: Bull Insura Analog Bull Insura 2013

Εικόνα 45. Απεικόνιση των πιο σημαντικά στατιστικών μοτίβων των μεταγραφικών παραγόντων που βρίσκονται σε περιοχές > 2κb από τη θέση έναρξης της μεταγραφής

GO Biological Process



Εικόνα 46. Παρουσιάζεται η ανάλυση της γονιδιακής οντολογίας και οι διεργασίες στις οποίες συμμετέχουν τα γονίδια που βρίσκονται κοντά στις απομακρυσμένες αυτές περιοχές και παρουσιάζουν επαγόμενη προσβασιμότητα 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση με ιό Sendai σε HeLa κύτταρα

Πριν τη μελέτη της ίδιας μεθόδου σε Namalwa κύτταρα, προβήκαμε σε μια συνδυαστική ανάλυση των πειραμάτων DNaseI-seq και των RNA-seq προκειμένου τα βρούμε τα γονίδια τα οποία επάγονται 6 ώρες μετά την ική μόλυνση και που βρίσκονται κοντά στις απομακρυσμένες περιοχές που παρουσιάζουν επαγόμενα επίπεδα προσβασιμότητας. Παρατηρούμε στην ακόλουθη εικόνα (Εικόνα 47) τα επαγόμενα επίπεδα προσβασιμότητας (DNaseI-seq) για τους χαρακτηριστικούς ενισχυτές των γονιδίων *IFNB1* και *OASL* σε HeLa κύτταρα και ακολουθούν στην επόμενη εικόνα τα χαρακτηριστικά παραδείγματα των ενισχυτών των γονιδίων *OASL* και *ADAP1* (Εικόνα 48).



Εικόνα 47. Παρουσιάζεται ο βαθμός των επιπέδων της προσβασιμότητας γύρω από τον υποκινητή και τον -20κβ ενισχυτή των χαρακτηριστικών γονιδίων IFNB1 και OASL σε HeLa κύτταρα





Εικόνα 48. Παρουσιάζεται ο βαθμός των επιπέδων της προσβασιμότητας γύρω από τον υποκινητή και τον -20κβ ενισχυτή των χαρακτηριστικών γονιδίων OASL και ADAP1 σε Namalwa κύτταρα

Με τον ίδιο τρόπο, μελετήσαμε τα επίπεδα προσβασιμότητας σε Namalwa κύτταρα και παρατηρήσαμε 628 περιοχές οι οποίες έχουν αυξημένα επίπεδα προσβασιμότητας 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση με ιό Sendai. Οι περιοχές αυτές βρίσκονται > 2κb από τις θέσεις έναρξης της μεταγραφής. Για τις απομακρυσμένες αυτές περιοχές

ακολούθησε ανάλυση μοτίβων μεταγραφικών παραγόντων με πιο στατιστικά μοτίβα αυτά του παράγοντα REL που όπως γνωρίζουμε παίζει σημαντικό ρόλο σε λειτουργίες του ανοσολογικού συστήματος (Εικόνα 49). Ακολούθησε ανάλυση γονιδιακής οντολογίας (Gene Ontology analysis) των γονιδίων που βρίσκονται κοντά στις απομακρυσμένες από τις θέσεις έναρξης της μεταγραφής περιοχές με επαγόμενη προσβασιμότητα 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση με ιό Sendai και παρατηρήσαμε και εδώ την συμμετοχή τους σε λειτουργίες που σχετίζονται με ανοσολογικές διαδικασίες όπως είναι οι μηχανισμοί άμυνας έναντι σε ιούς και σε διαδικασίες του ανοσοποιητικού συστήματος (Εικόνα 50).



Εικόνα 49. Απεικόνιση των πιο σημαντικά στατιστικών μοτίβων των μεταγραφικών παραγόντων που βρίσκονται σε περιοχές > 2κb από τη θέση έναρξης της μεταγραφής





Εικόνα 50. Παρουσιάζεται η ανάλυση της γονιδιακής οντολογίας και οι διεργασίες στις οποίες συμμετέχουν τα γονίδια που βρίσκονται κοντά στις απομακρυσμένες αυτές περιοχές και παρουσιάζουν επαγόμενη προσβασιμότητα 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση σε Namalwa κύτταρα

Συνδυαστικά Πειράματα DNasel - seq and FAIRE - seq

Δεδομένου ότι η τοπολογική οργάνωση των νουκλεοσωμάτων σε ολόκληρο το γονιδίωμα δεν είναι ομοιόμορφη καθώς οι ιστόνες λιγοστεύουν σε ενεργούς ρυθμιστικούς τόπους (loci), εξετάσαμε πώς διαφορετικές γονιδιωματικές περιοχές ανοιχτής χρωματίνης σε κύτταρα HeLa και Namalwa θα μπορούσαν να προκαθορίσουν τη δέσμευση στα κυτταρο-ειδικά προγράμματα της αντι-ιϊκής γονιδιακής έκφρασής τους. Πραγματοποιήσαμε συνδυαστικά πειράματα για την προσβασιμότητα της χρωματίνης για τον εντοπισμό των θέσεων υπερευαισθησίας στη DNaseI (DNaseI-seq) και περιοχών που στερούνται χρωματίνη (FAIRE-seq), παράλληλα με πειράματα ChIP-seq για τον προσδιορισμό γνωστών δεικτών των ενισχυτών, όπως είναι η H3K27ac και η RNA πολυμεράση ΙΙ, δείκτες οι οποίοι οριοθετούν ενεργά (active) ή σε κατάσταση αναμονής (poised) cis-ρυθμιστικά στοιχεία. Τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν στο ίδιο χρονικό πρότυπο με τα RNA-seq πειράματα δηλαδή σε κύτταρα πριν και μετά από ιϊκή μόλυνση 3 και 6 ωρών. Χαρτογραφήσαμε ~ 30.000 έως 45.000 μοναδικές, μη-επικαλυπτόμενες ανοιχτές περιοχές χρωματίνης που εντοπίστηκαν και από τις δύο μεθόδους σε κάθε χρονικό σημείο της ιϊκής μόλυνσης, η πλειονότητα των οποίων βρίσκεται "σε απόσταση" από το σημείο έναρξης της μεταγραφής (TSS: Transcription Start Site).

Από αυτά, τα ~ 20.000 και 25.000 είναι κοινές μεταξύ οποιουδήποτε χρονικού σημείου στα HeLa και Namalwa, αντιστοίχως, υποδηλώνοντας ότι η ιϊκή μόλυνση δεν επηρεάζει την αρχιτεκτονική δομή της χρωματίνης (Εικόνα 51), την επηρεάζει μόνο εξειδικευμένα σε συγκεκριμένες περιοχές της χρωματήνης. Επιπλέον, ένας μέσος όρος ~ 14.500 των περιοχών είναι κοινός μεταξύ των κυττάρων HeLa και Namalwa οποιαδήποτε χρονική στιγμή. Ενσωματώσαμε τα δεδομένα της προσβασιμότητας της χρωματίνης με τα αποτελέσματα του RNA-seq και βρήκαμε ότι 164/189 (87%) και 149/189 (79%) των κοινών γονιδίων των οποίων η έκφραση αυξάνεται στα Namalwa και στα HeLa κύτταρα αντίστοιχα, παρουσιάζουν μια ανοιχτή αρχιτεκτονική δομή της χρωματίνης κοντά στον υποκινητή. Παρομοίως, 405/474 (85%) κυτταρο-ειδικά για τα Namalwa (Namalwa-specific) και 93/250 (77%) κυτταρο-ειδικά για τα HeLa (HeLa-specific) των γονιδίων που παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση φέρουν ανοιχτές αλληλουχίες υποκινητή. Έτσι, όπως ήταν αναμενόμενο, η ανοιχτή αρχιτεκτονική δομή της χρωματίνης συσχετίστηκε σύμφωνα με την παρατηρούμενη γονιδιακή έκφραση.

		NAMALA	NA	HeLa			
Hours post Sendai Virus Infection	0	3	6	0	3	6	
FAIRE-seq	79,987	73,981	127,648	45,872	52,557	59,647	
DNAsel-seq	67,490	83,075	121,871	75,096	62,058	82,498	
Common FAIRE-seq/DNaseI-seq	36,704	33,137	45,940	29,145	27,920	34,657	
Common 0h/3h/6h		25,000		20,000			
Common Namalwa/HeLa	14,855	13,281	16,467	14,855	13,281	16,467	

Εικόνα 51. Απεικόνιση κοινών περιοχών ανοιχτής χρωματίνης με το συνδυασμό των μεθόδων FAIRE-seq και DNAseI-seq. Παρατηρείται ότι η αρχιτεκτονική δομή της χρωματίνης για κάποιες περιοχές που ανιχνεύτηκαν και από τις δύο μεθόδους και στις δύο κυτταρικές σειρές για όλες τις χρονικά σημεία (0,3,6 ώρες) (25.000 για Namalwa και 20.000 για HeLa κύτταρα) δεν επηρεάζεται από την ιϊκή μόλυνση

Τα συγκριτικά πειράματα FAIRE-seq και DNAseI-seq στοχεύουν στην ταυτοποίηση των γενωμικών περιοχών DNA που στερούνται νουκλεοσωμάτων και συνεπώς έχουν υψηλή πιθανότητα να φιλοξενούν μεταγραφικούς παράγοντες και να λειτουργούν ως ενισχυτές *in vivo* (Simon *et al.,* 2012). Η συνδυαστική ανάλυση ανέδειξε δυο σημαντικές ιδιότητες της ανθρώπινης χρωματίνης **α**) την αυξημένη προσβασιμότητα των μη-

μολυσμένων κυττάρων και β) την εκτεταμένη αναδιοργάνωση της χρωματίνης που προκαλείται από την ιϊκή μόλυνση.

Για παράδειγμα, παρατηρήσαμε αύξηση στη προσβασιμότητα της χρωματίνης μετά την ιϊκή μόλυνση γύρω από τον υποκινητή της *IFNB1* στα Namalwa, όπως διαπιστώθηκε με τα συνδυαστικά αυτά πειράματα των μεθόδων Faire-seq και DNaseI-seq (Εικόνα 52). Παρατηρείται αύξηση της προσβασιμότητας της χρωματίνης μετά την ιϊκή μόλυνση γύρω από τον υποκινητή του γονιδίου *IFNB1*, ενώ στη περιοχή του ενισχυτή που βρίσκεται 20 kb άνωθεν του η χρωματίνη είναι προσβάσιμη πριν την ιϊκή μόλυνση με ιό Sendai και η ένταση της προσβασιμότητας δε μεταβάλλεται μετά τη ιϊκή μόλυνση.



Εικόνα 52. Συνδυαστική απεικόνιση των αποτελεσμάτων των μεθόδων Faire-seq και DNaseI-seq σε κύτταρα Namalwa για το γονίδιο *IFNB1*

Η ανάλυση των κοινών αυτών περιοχών που προκύπτουν από το συνδυασμό και των δύο τεχνικών είναι περισσότερο πιθανό να αποτελούν τις πλέον κρίσιμες περιοχές οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο κατά την αντι-ιϊκή κυτταρική απόκριση. Το αποτέλεσμα αυτό προσδίδει μια δυναμική αναδιοργάνωσης του γονιδιώματος που καθίσταται σημαντικό να μελετηθεί τόσο με επιπλέον πειράματα όσο και με ποσοτική συγκριτική βιοπληροφορική ανάλυση. Σημαντικό στοιχείο, όπως θα συζητηθεί και παρακάτω, το οποίο αναδεικνύεται από την παραπάνω ανάλυση είναι πως η συντριπτική πλειοψηφία των επαγόμενων από ιϊκή μόλυνση υποψήφιων ενισχυτών βρίσκεται σε περιοχές της χρωματίνης που είναι ήδη προσβάσιμες πριν από την ιϊκή μόλυνση και παραμένουν ανοικτές κατά τη διάρκεια της αντι-ιϊκής απόκρισης. Επίσης κατά την εξέλιξη της αντι-ιϊκής απόκρισης παρατηρείται σημαντική αλληλοεπικάλυψη των θέσεων που στερούνται νουκλεοσωμάτων όπως προκύπτουν από τη μέθοδο FAIRE-seq με περιοχές που είναι ευαίσθητες στη δράση της DNaseI γεγονός пου υπογραμμίζει την πιθανότητα στρατολόγησης/πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων και επομένως σχηματισμού ενισχυοσωμάτων (Thanos and Maniatis, 1995) με επακόλουθη επαγωγή της μεταγραφής κατά τα πρότυπα του ισχύοντα μηχανισμού ενεργοποίησης γονιδίων μέσω στρατολόγησης (Ptashne and Gann, 1998).

ChIP-seq Πειράματα για τροποποιήσεις

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη ενότητα, οι επιγενετικές τροποποιήσεις παίζουν σημαντικό ρόλο στη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης. Οι ιστονικές τροποποιήσεις, όπως η μεθυλίωση και η ακετυλίωση των καταλοίπων της λυσίνης έχουν διαφορετικούς ρόλους ανάλογα με την ιστόνη στην οποία συναντώνται καθώς και επίσης με τη λυσίνη στην οποία προσδένονται ομοιοπολικά. Πιο συγκεκριμένα, για τους ενισχυτές επιλέξαμε την ακετυλίωση της ιστόνης H3 στο κατάλοιπο 27 (H3K27ac) και τη μονομεθυλίωση της ίδιας ιστόνης στο κατάλοιπο 4 (H3K4me1), τροποποιήσεις συνδεδεμένες με την ενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης. Επιπλέον, επιλέξαμε την τριμεθυλίωση της ιστόνης H3 στο κατάλοιπο 4 (H3K4me3), τροποποίηση συνδεδεμένη άμεσα με την παρουσία και την ενεργοποίηση των υποκινητών με απώτερο σκοπό τη διαλεύκανση της ρυθμιστική λογικής που διέπει το αντι-ιϊκό πρόγραμμα της γονιδιακής έκφρασης (Εικόνα 53). Η μελέτη έγινε σε διαφορετικά χρονικά σημεία κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης. Συγκεκριμένα τα χρονικά αυτά σημεία είναι οι 3 ώρες μετά τη μόλυνση των κυττάρων, για τη μελέτη των πρώιμων αλλαγών και οι 6 ώρες μετά τη μόλυνση, σημείο όπου η απόκριση των κυττάρων βρίσκεται σε πλήρη εξέλιξη.



Εικόνα 53. Απεικόνιση περιοχών ενισχυτών με H3K4me1 σε **a**) HeLa κύτταρα και υποκινητών με H3K4me3 σε **β**) Namalwa κύτταρα

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή των παρακάτω βημάτων: **1**. Ποιοτικός έλεγχος των αλληλουχιών με το FastQC πρόγραμμα **2**. Χαρτογράφηση των αλληλουχιών στο ανθρώπινο γονιδίωμα (hg19 version) με τη χρήση του Bowtie2 αλγορίθμου επιλέγοντας τη μέθοδο -very-sensitive **3**. Φιλτράρισμα των όμοιων αλληλουχιών, τα οποία μπορεί να προέρχονται από ενίσχυση των ίδιων περιοχών **4**. Χαρακτηρισμός των περιοχών πλούσιων σε H3K4me1 και H3K4me3 με τη χρήση του MACS14 αλγόριθμου.

H3K4me3 ChIP - seq Πειράματα

Η ανάλυση των ChIP-seq των ιστονικών τροποποιήσεων έδειξε ότι η H3K4me3 τόσο στα HeLa όσο και στα Namalwa δεν εμφάνισε μεγάλες αλλαγές μετά τον επαναπρογραμματισμό του γονιδιώματος από ιϊκή μόλυνση (Εικόνα 54α), καθώς το 94-99% των H3K4me3 παρέμεινε σταθερό. Σε αντίθεση με την τριμεθυλίωση στον υποκινητή η μονομεθυλίωση H3K4me1, που πραγματοποιείται στους ενισχυτές των γονιδίων, εμφάνισε πολύ μεγαλύτερη ανακατανομή στο γονιδίωμα, καθώς μόνο στο 63-76% παρέμεινε σταθερή καθ' n H3K4me1 òλn διάρκεια τn του επαναπρογραμματισμού του γονιδιώματος (Εικόνα 54β).





Στηριζόμενοι στα ευρήματα της ανάλυσης των H3K4me1 και H3K4me3 οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι οι αλλαγές σε επίπεδο μεταγραφής πιθανόν να σχετίζονται σε μεγαλύτερο βαθμό με τον επαναπρογραμματισμό στους ενισχυτές από ότι με τις αλλαγές που πραγματοποιούνται στους υποκινητές των γονιδίων. Η ανάλυση δεδομένων από τις ιστονικές τροποποιήσεις H3K4me1 και H3K4me3, οι οποίες αποτελούν δείκτες ενεργών γονιδίων που εντοπίζονται στον ενισχυτή και υποκινητή των επαγόμενων γονιδίων αντιστοίχως, έδειξε ότι η H3K4me3 αποτελεί μία ιστονική τροποποίηση η οποία δε μεταβάλλεται μετά την ιϊκή απόκριση. Σε αντίθεση με την H3K4me3, η H3K4me1 η οποία εντοπίζεται στους ενισχυτές των γονιδίων εμφάνισε μεγάλη αναδιοργάνωση μετά την ιϊκή μόλυνση. Παράλληλα η ομοιότητα της H3K4me1 στις δύο κυτταρικές σειρές ήταν ιδιαίτερα χαμηλή, υποδηλώνοντας ότι διαφορετικοί ενισχυτές ενεργοποιούνται σε HeLa και Namalwa. Συνεπώς μετά την ιϊκή μόλυνση είναι απόλυτα λογικό να επάγονται διαφορετικές ομάδες γονιδίων στις δύο κυτταρικές σειρές. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε απόλυτη συμφωνία με τα δεδομένα της μεταγραφωμικής ανάλυσης, όπου αποδεικνύεται ότι η επαγωγή των γονιδίων καθορίζεται από την H3K4me1 στους ενισχυτές και όχι τόσο από την H3K4me3 στους υποκινητές των επαγόμενων γονιδίων, η οποία εντοπίζεται σχεδόν στα ίδια επίπεδα πριν και μετά την ιϊκή μόλυνση σε HeLa και Namalwa.

Στη συνέχεια κατηγοριοποιήσαμε τους ενισχυτές με βάση το συνδυασμό των ιστονικών τροποποιήσεων H3K4me1 και H3K27ac που φέρουν και το πως αυτός μεταβάλλεται κατά την ιϊκή μόλυνση (Εικόνα 55). Με τον τρόπο αυτό ανιχνεύσαμε 280 ενισχυτές που αποκτούν τις ενεργοποιητικές τροποποιήσεις H3K4me1 και H3K27ac μόνο μετά την ιϊκή μόλυνση, τους οποίους και ονομάσαμε latent ενισχυτές. Επίσης βρέθηκε μια κατηγορία ενισχυτών την οποία ονομάσαμε poised-activated και περιέχει 1050 μέλη που βρίσκονται σε μία κατάσταση αναμονής πριν την ιϊκή μόλυνση, έχοντας την τροποποίηση H3K4me1 και μετά την ιϊκή μόλυνση ενεργοποιούνται περαιτέρω αποκτώντας την τροποποίηση H3K27ac. Μια άλλη κατηγορία ενισχυτών περιλαμβάνει τους constitutive ενισχυτές με 3169 μέλη που φέρουν και τις δύο ιστονικές τροποποιήσεις πριν και μετά την ιϊκή μόλυνση. Η poised_not_activated κατηγορία περιλαμβάνει 15185 μέλη που φέρουν μόνο τη H3K4me1 τροποποίηση τόσο πριν όσο και μετά την ιϊκή μόλυνση. Τέλος η κατηγορία των ανενεργών (repressed) ενισχυτών που περιλαμβάνει 1293 μέλη χάνει την τροποποίηση H3K27ac κατά την ιϊκή μόλυνση και διατηρεί μόνο τη H3K4me1.

Un-Infected	0-3h post- infection	0-3-6h post- infection	
Constitutive	3169 	2295	
Poised-Activated	1050	382	
Latent	280	122	
Poised-Not Activated	15185	14800	
Repressed	1293	1111	
H3k27ac H3k4	me1		

Εικόνα 55. Παρουσιάζεται η κατηγοριοποίηση των ενισχυτών στα Namalwa ανάλογα με τη μεταβολή των σημάτων H3K4me1 και H3K27ac που φέρουν κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης

Η παραπάνω κατηγοριοποίηση των ενισχυτών βασίστηκε στη συνδυαστική ποιοτική ανάλυση της παρουσίας ή όχι κορυφών-σημάτων για τις διαφορετικές ιστονικές τροποποιήσεις. Για επιβεβαίωση παραπάνω αποτελεσμάτων την των πραγματοποιήθηκε περαιτέρω μελέτη σε ποσοτικό επίπεδο, όπου αναλύθηκε η ένταση του σήματος στις διαφορετικές κατηγορίες ενισχυτών για τις τροποποιήσεις H3K4me1 και H3K27ac. Όπως αναμενόταν οι latent ενισχυτές είχαν χαμηλά επίπεδα H3K4me1 πριν την ιϊκή μόλυνση, τα οποία αυξάνονται μετά την ιϊκή μόλυνση (Εικόνα 56). Επίσης οι υπόλοιπες κατηγορίες ενισχυτών δεν παρουσίασαν αξιόλογες μεταβολές στα επίπεδα της H3K4me1 κατά την ιϊκή μόλυνση. Περνώντας στη H3K27ac επιβεβαιώνεται ότι τα επίπεδά της παρουσιάζονται αυξημένα στους latent και στους poised-activated ενισχυτές 3 ώρες μετά τη μόλυνση, ενώ παρουσιάζεται μειωμένη στους ανενεργούς (repressed) ενισχυτές (Εικόνα 57).



Εικόνα 56. Απεικόνιση της κατανομή της έντασης του σήματος για την τροποποίηση H3K4me1 για τις διαφορετικές κατηγορίες ενισχυτών πριν και μετά την ιϊκή μόλυνση σε Namalwa κύτταρα



Εικόνα 57. Στη παρούσα εικόνα απεικονίζεται η κατανομή της έντασης του σήματος για την τροποποίηση H3K27ac για τις διαφορετικές κατηγορίες ενισχυτών πριν και μετά την ιϊκή μόλυνση σε Namalwa κύτταρα

Ελέγχθηκε στη συνέχεια αν οι διαφορετικές κατηγορίες των ενισχυτών γειτνιάζουν με διαφορικό πρότυπο στα γονίδια των οποίων η έκφραση μεταβάλλεται κατά την απόκριση των κυττάρων στον ιό. Πράγματι διαπιστώθηκε ότι μεγαλύτερο ποσοστό των latent και poised_activated ενισχυτών βρίσκονται πιο κοντά σε γονίδια των οποίων η έκφραση αυξάνεται 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση σε σχέση με το αντίστοιχο ποσοστό των ανενεργών (repressed) ενισχυτών (Εικόνα 58). Συγκεκριμένα 24.5% των latent και 18.1% των poised_activated ενισχυτών βρίσκονται "σε απόσταση" μέχρι 50 kb από υποκινητές γονιδίων που επάγονται κατά την ιϊκή μόλυνση. Το αντίστοιχο ποσοστό των ανενεργών (repressed) ενισχυτών βρίσκονται βρίσκονται σε απόσταση μέχρι 50 και μόλις 7.8%. Η κατάσταση είναι

διαφορετική για τα γονίδια των οποίων η έκφραση μειώνεται κατά την ιϊκή μόλυνση, όπου οι ανενεργοί (repressed) ενισχυτές αποτελούν τη κατηγορία των ενισχυτών με το μεγαλύτερο ποσοστό γειτνίασης, ενώ οι latent ενισχυτές τη κατηγορία με το μικρότερο ποσοστό. Εδώ το ποσοστό των latent ενισχυτών που βρίσκονται "σε απόσταση" 50 kb είναι 6.1%, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό των ανενεργών (repressed) ενισχυτών είναι 9.7%.



Εικόνα 58. Απεικόνιση του ποσοστού των διαφορετικών κατηγοριών ενισχυτών γύρω από γονίδια που επάγονται (πάνω) και γονίδια των οποίων η έκφραση μειώνεται (κάτω) κατά την ιϊκή μόλυνση σε Namalwa κύτταρα
Η3κ27ac ChIP- seq Πειράματα

Με τα πειράματα ChIP-seq έναντι της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac ταυτοποιήθηκαν οι περιοχές του γονιδιώματος με επαγόμενα επίπεδα H3K27ac για το χρονικό σημείο των 6 ωρών μετά την ιϊκή μόλυνση σε κύτταρα Namalwa. Παρατηρήθηκαν 2021 περιοχές απομακρυσμένες από τους υποκινητές, οι οποίες παρουσιάζουν επαγόμενα επίπεδα H3K27ac στις 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση και είναι πολύ πιθανόν να αποτελούν επαγόμενους ενισχυτές (Εικόνα 59). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι στις περιοχές αυτές συναντώνται και επιπλέον δείκτες οι οποίοι χαρακτηρίζουν ενεργούς ενισχυτές και αυτοί είναι οι H3K4me1, Med1, Rad21, Stat2. Οι περιοχές αυτές, σύμφωνα με DNaseI-seq πειράματα, είναι προσβάσιμες και εμφανίζουν επαγόμενα επίπεδα μετά την ιϊκή μόλυνση.

Έπειτα μελετήσαμε αν γύρω από το κέντρο αυτών των 2021 περιοχών με επαγόμενα επίπεδα H3K27ac φέρουν και άλλους επιπλέον δείκτες που χαρακτηρίζουν τους ενισχυτές και αυτό έγινε μέσω αξιολόγησης των σημάτων που προκύπτουν από τα πειράματα Med1 ChIP-seq, H3K4me1 ChIP-seq, Rad21 ChIP-seq, Stat2 ChIP-seq και DNaseI-seq. 381 περιοχές από αυτές εμφάνισαν επαγόμενη στρατολόγηση του συνεργοποιητή Med1. Ένα ποσοστό των περιοχών αυτών χαρακτηρίζεται από την πρόσδεση της υπομονάδας Rad21 αλλά και από την επαγόμενη πρόσδεση των παραγόντων Stat2 και p65. Ο χαρακτηριστικός δείκτης των ενισχυτών H3K4me1 συναντάται στις περιοχές αυτές, οι οποίες είναι επίσης προσβάσιμες, γεγονός που ποροκύπτει από τα DNaseI-seq πειράματα. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι οι δείκτες οι οποίοι χαρακτηρίζουν τους ενισχυτές υπάρχουν στις περιοχές που παρουσιάζουν επαγόμενα επίπεδα H3K27ac με αποτέλεσμα να ενισχύεται ο πιθανός ρυθμιστικός τους ρόλος τους κατά τη διάρκεια της ανοσολογικής απόκρισης.



Εικόνα 59. Απεικόνιση όλων των επιγονιδιωματικών δεικτών γύρω από τις 2021 απομακρυσμένες από τους υποκινητές περιοχές με επαγόμενα H3K27ac επίπεδα σε κύτταρα Namalwa 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση με ιό Sendai

Ακολούθησε ανάλυση γονιδιακής οντολογίας των κοντινότερων γονιδίων αυτών των 2021 περιοχών που παρουσιάζουν επαγόμενα H3K27ac επίπεδα και παρατηρήθηκε η συμμετοχή των γονιδίων σε φλεγμονώδεις αποκρίσεις, στην παραγωγή κυτοκινών και γενικότερα σε διαδικασίες που συσχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση των κυττάρων (Εικόνα 60). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε σύγκριση των γονιδίων που συναντώνται κοντά σε περιοχές με επαγόμενη H3K27ac έκφραση με τα γονίδια που η

έκφρασή τους αυξάνεται 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση βάση των RNA-seq πειραμάτων. Από το συνολικό αριθμό των 722 γονιδίων που παρουσιάζουν επαγόμενα επίπεδα έκφρασης, τα 160 φέρουν πιθανούς ενισχυτές με επίσης επαγόμενα H3K27ac επίπεδα. Η παρουσία των H3K27ac επαγόμενων περιοχών κοντά σε επαγόμενα γονίδια αλλά και η παρουσία χαρακτηριστικών δεικτών για τους ενισχυτές είναι σημαντικά για το ρυθμιστικό ρόλο των παραπάνω αλληλουχιών κατά την απόκριση των κυττάρων κατά τη διάρκεια της ανοσολογικής απόκρισης.



GO Biological Process

Εικόνα 60. Απεικονίζεται η ανάλυση γονιδιακής οντολογίας των γονιδίων που βρίσκονται κοντά σε περιοχές με επαγόμενα H3K27ac επίπεδα και παρουσιάζονται οι διαδικασίες με τις οποίες συσχετίζονται

Στη συνέχεια ακολούθησε η ίδια μελέτη και για την κυτταρική σειρά HeLa. Παρατηρήθηκαν 2978 περιοχές απομακρυσμένες από τους υποκινητές οι οποίες παρουσιάζουν επαγόμενα επίπεδα H3K27ac στις 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση και είναι πολύ πιθανόν να αποτελούν επαγόμενους ενισχυτές. Στην ακόλουθη εικόνα (Εικόνα 61) απεικονίζονται τα επίπεδα H3K27ac γύρω από αυτούς τους 2978 ενισχυτές. Ακολούθως, μελετήσαμε αν γύρω από το κέντρο αυτών των 2978 περιοχών με επαγόμενα επίπεδα H3K27ac υπάρχουν και άλλοι επιπλέον δείκτες που χαρακτηρίζουν τους ενισχυτές. Η διαλεύκανση αυτού του ερωτήματος έγινε μέσω αξιολόγησης των σημάτων που προκύπτουν από τα πειράματα Med1 ChIP-seq, H3K4me1 ChIP-seq, Rad21 ChIP-seq, Stat2 ChIP-seq και DNaseI-seq. 327 περιοχές από αυτές τις περιοχές εμφάνισαν επαγόμενη στρατολόγηση του συνεργοποιητή Med1. Ο χαρακτηριστικός δείκτης των ενισχυτών H3K4me1 συναντάται στις περιοχές αυτές σε αυξημένα επίπεδα, οι οποίες είναι επίσης προσβάσιμες, γεγονός που προκύπτει από τα DNaseI-seq πειράματα. Οδηγούμαστε και εδώ λοιπόν στο συμπέρασμα ότι οι δείκτες οι οποίοι χαρακτηρίζουν τους ενισχυτές υπάρχουν στις περιοχές εκείνες οι οποίες παρουσιάζουν επαγόμενα επίπεδα H3K27ac με αποτέλεσμα να ενισχύεται ο πιθανός ρυθμιστικός τους ρόλος τους στην αντι-ιϊκή απόκριση.



Εικόνα 61. Απεικόνιση όλων των επιγονιδιωματικών δεικτών γύρω από τις 2021 απομακρυσμένες από τους υποκινητές περιοχές με επαγόμενα H3K27ac επίπεδα σε κύτταρα HeLa 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση. Παρατηρείται ότι οι περιοχές αυτές φέρουν επιπλέον

δείκτες των ενεργών ενισχυτών όπως H3K4me1και Med1 και βάση των DNaseI-seq πειράματα οι περιοχές αυτές είναι προσβάσιμες

Ακολούθησε ανάλυση γονιδιακής οντολογίας των κοντινότερων γονιδίων αυτών των 2978 περιοχών με επαγόμενα H3K27ac επίπεδα και παρατηρήθηκε η συμμετοχή των γονιδίων σε φλεγμονώδεις αποκρίσεις, στο μονοπάτι των ιντερφερονών τύπου Ι και γενικότερα σε διαδικασίες που συσχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση των κυττάρων (Εικόνα 62).



GO Biological Process

Εικόνα 62. Απεικονίζεται η ανάλυση γονιδιακής οντολογίας των γονιδίων που βρίσκονται κοντά σε περιοχές με επαγόμενα H3K27ac επίπεδα σε κύτταρα HeLa και παρουσιάζονται οι διαδικασίες με τις οποίες συσχετίζονται

Ακολούθησε σύγκριση των γονιδίων που συναντώνται κοντά σε περιοχές με επαγόμενη H3K27ac έκφραση με τα γονίδια που η έκφρασή τους αυξάνεται 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση βάση των RNA-seq πειραμάτων. Από τον συνολικό αριθμό των 722 γονιδίων που παρουσιάζουν επαγόμενα επίπεδα έκφρασης, τα 160 φέρουν πιθανούς ενισχυτές με επίσης επαγόμενα H3K27ac επίπεδα. Η παρουσία των H3K27ac επαγόμενων περιοχών κοντά σε επαγόμενα γονίδια αλλά και η παρουσία χαρακτηριστικών δεικτών για τους ενισχυτές είναι σημαντικά για το ρυθμιστικό ρόλο των παραπάνω αλληλουχιών κατά την απόκριση των κυττάρων μετά από ιϊκή μόλυνση.

Στη συνέχεια συγκρίναμε τους πιθανούς επαγόμενους ενισχυτές και στις δύο κυτταρικές σειρές για να μπορέσουμε να απαντήσουμε στο ερώτημα αν οι επαγόμενοι ενισχυτές στα HeLa ενεργοποιούνται κατά την ιϊκή μόλυνση και στα Namalwa, και το αντίστροφο. Εντοπίστηκαν 328 πιθανοί ενισχυτές με επαγόμενα H3K27ac επίπεδα και στους δύο κυτταρικούς τύπους (ποσοστό 16.2% των συνολικών επαγόμενων ενισχυτών στα Namalwa). Στην Εικόνα 63 παρουσιάζεται η κατανομή των H3K27ac επιπέδων γύρω από τους 2017 επαγόμενους ενισχυτές στα HeLa καθώς και τα H3K27ac επίπεδα στις ίδιες περιοχές στα κύτταρα Namalwa.



Εικόνα 63. Απεικόνιση της συγκριτικής μελέτης των περιοχών με επαγόμενα H3K27ac επίπεδα οι οποίες είναι απομακρυσμένες από τους υποκινητές και στις δύο κυτταρικές σειρές.

Τα επαγόμενα H3K27ac επίπεδα των συνολικά 2978 περιοχών σε κύτταρα HeLa 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση παρουσιάζονται στα **αριστερά** και στα **δεξιά** παρουσιάζεται ο τρόπος κατανομής των H3K27ac επιπέδων στις 2978 περιοχές σε Namalwa κύτταρα

Όπως και προηγουμένως, σύμφωνα με τα πειράματα RNA-seq έγινε σύγκριση των γονιδίων που βρίσκονται κοντά στις κοινές H3K27ac επαγόμενες περιοχές με τα γονίδια των οποίων η έκφραση τους επάγεται 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση και στα HeLa και στα Namalwa. Από το σύνολο των 210 κοινών επαγόμενων γονίδιων, τα 28 φέρουν ενισχυτές με επαγόμενα H3K27ac επίπεδα (Εικόνα 64). Γονίδια που παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντι-ιϊκή απόκριση την κυττάρων συμπεριλαμβάνεται στη λίστα με πιο χαρακτηριστικά τα γονίδια *IFNB1, IRFI, OASL* και *IFIT2*. Καταλήγουμε επομένως στο συμπέρασμα ότι η ρύθμιση των επαγόμενων γονιδίων φαίνεται να ρυθμίζεται από τους κοινούς επαγόμενους ενισχυτές και ότι ένα πολύ μεγάλο ποσοστό των επαγόμενων ενισχυτών είναι ειδικό ξεχωριστά για τον κάθε τύπο κυττάρων.

IFIT2	OASL	CCL5	IRF1	IFNB1	ADAP1	NEDD9
ZBTB32	CHEK2	NFKBIZ	ANKRD33B	GPBP1	SRPK2	ТТСЗ9В
RBM38	NAV2	PIK3R3	RPS6KC1	OTUD1	SAR1A	GRAMD1B

Εικόνα 64. Λίστα κοινών επαγόμενων γονιδίων και των δύο κυτταρικών σειρών που βρίσκονται κοντά σε περιοχές με επαγόμενα H3K27ac επίπεδα

Τα ιϊκά επαγόμενα και κυτταρο-ειδικά γεγονότα πρόσδεσης IRF3 και NF-κΒ πυροδοτούν αλλαγές στη χρωματίνη σε ολόκληρο το γονιδίωμα

Το ιϊκά επαγόμενο ενισχυόσωμα του γονιδίου της *IFN-β* είναι ένα από τα πιο καλά χαρακτηρισμένα ρυθμιστικά στοιχεία του ανθρώπινου γονιδιώματος. Για την αποσαφήνιση της συνολικής αρχιτεκτονικής και άλλων ιϊκά επαγόμενων ενισχυτών στο ανθρώπινο γονιδίωμα, εξετάσαμε τις αλληλεπιδράσεις των θέσεων πρόσδεσης του DNA των δύο κύριων ιϊκά επαγόμενων μεταγραφικών παραγόντων, δηλαδή τους παράγοντες IRF3 και NF-κB. Και αυτό διότι η συμμετοχή των μεταγραφικών παραγόντων στα ρυθμιστικά στοιχεία ενεργοποιεί τη στρατολόγηση συνενεργοποιητών, αναδιαμορφωτών της χρωματίνης και τροποποιητών για να αλλάξει τη συνολική δομή της χρωματίνης. Με αυτό τον τρόπο προάγει τη συγκρότηση του συμπλόκου προ-έναρξης σε γονίδια-στόχους.

Πραγματοποιήσαμε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης σε χρωματίνη, ChIP-seq, χρησιμοποιώντας χρωματίνη παρασκευασμένη από mock ή μολυσμένα με ιό κύτταρα HeLa και Namalwa ανοσοκατακρημνισμένα με αντισώματα έναντι των μεταγραφικών παραγόντων IRF3 και της ρ65 υπομονάδας του NF-κB, των κύριων ρυθμιστών της ανοσολογικής απόκρισης. Οι μεταγραφικοί παράγοντες IRF3 (Interferon Regulatory Factor 3) και NF-κB (Nuclear Factor kappa B) έχουν χαρακτηριστεί ως κύριοι ρυθμιστές της αντι-ιϊκής λειτουργίας των ανθρώπινων κυττάρων ελέγχοντας την έκφραση σημαντικών αντι-ιϊκών γονιδίων (Thanos and Maniatis, 1995). Η μελέτη μας έχει ξεκινήσει με τη λειτουργική διερεύνηση των περιοχών του γονιδιώματος όπου οι παραπάνω παράγοντες προσδένονται σε μολυσμένα ανθρώπινα κύτταρα. **Τα πειράματα συμπληρώνονται με εφαρμογή της τεχνολογίας αλληλούχησης ευρείας κλίμακας νέας γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS) στο Ελληνικό Κέντρο Γονιδιωματικής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (Greek Genome Center).**

p65 ChIP - seq Πειράματα

Στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε πειράματα ChIP-seq με αντισώματα ενάντι της p65, την υπομονάδα του μεταγραφικού παράγοντα **NF-κB**, πριν την ιϊκή μόλυνση, καθώς και 3 και 6 ώρες μετά τη μόλυνση με ιό Sendai. Για την εύρεση των θέσεων πρόσδεσης του NF-κB έπειτα από την ανάλυση των αποτελεσμάτων, παρατηρήθηκαν 2845 θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα p65 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση. Πραγματοποιήσαμε ανάλυση της κατανομής του σήματος γύρω από αυτές τις 2845 περιοχές για να ελέγξουμε αν φέρουν χαρακτηριστικά των ενεργών ενισχυτών (**Εικόνα 65**). Αυτό που χαρακτηριστικά παρατηρήσαμε είναι η παρουσία τροποποιήσεων που χαρακτηρίζουν τους ενεργούς ενισχυτές, όπως είναι οι τροποποιήσεις H3K27ac και H3K4me1 καθώς και τα υψηλά επίπεδα πρόσδεσης του Med1 στην πλειονότητα των



Εικόνα 65. Συγκριτική απεικόνιση τοπογραφικών θερμικών χαρτών (heatmaps) του τρόπου ανακατανομής των δεικτών που χαρακτηρίζουν τους ενισχυτές γύρω από τις 2845

απομακρυσμένες από ενισχυτές περιοχές στις οποίες προσδένεται ο p65 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση με ιό Sendai σε κύτταρα Namalwa

Στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε ανάλυση γονιδιακής οντολογίας (για τα γονίδια που βρίσκονται "σε απόσταση" μέχρι και 1 εκατομμύριο βάσεις από κάθε θέση πρόσδεσης του p65 (Εικόνα 66). Παρατηρήσαμε ότι 3 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση οι πλέον κρίσιμες βιολογικές διαδικασίες σχετίζονται με την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και έπεται σε σημαντικότητα το σηματοδοτικό μονοπάτι και η απόκριση στις ιντερφερόνες. Μετά από 6 ώρες από την ιϊκή μόλυνση παρατηρούμε ότι οι πλέον σημαντικές διεργασίες σχετίζονται με την απόκριση στις ιντερφερόνες και γενικότερα με σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με την ιϊκή μόλυνση. Παρατηρήσαμε χαρακτηριστικά ότι το μοτίβο του p65 ήταν το πιο στατιστικά σημαντικό (Εικόνα 67). Το γεγονός αυτό προσδίδει μεγάλη αξιοπιστία στο πείραμα μας.

Τα επίπεδα των δεικτών Med1, H3K27ac, H3K4me1 και DNasel που συναντώνται στις περιοχές αυτές, προϋπάρχουν της μόλυνσης, επομένως όπως αναμέναμε, μετά τη μόλυνση ο p65 εισέρχεται στο πυρήνα προσδένεται σε pre-accessible περιοχές της χρωματίνης με αποτέλεσμα τη προοδευτική αύξηση των θέσεων πρόσδεσης του στο γονιδίωμα.

GO Biological Process p65 NM 3h



GO Biological Process p65 NM 6h

				-100	10(Bino	mial	p va	alue))			
0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26
type I interferon-mediated signaling pathway							- 1						26.37
cellular response to type I interferon				12							17		26.35
response to type I interferon													26.04
nuclear-transcribed mRNA catabolic process				21				1	17	.44			
mRNA catabolic process									17	.39			
immune response-activating cell surface receptor signaling pathway				- 2					17.	17			
regulation of type I interferon production								1	6.26	5			
RNA catabolic process								15.	27				
interferon-gamma-mediated signaling pathway								14.4	7				
negative regulation of megakaryocyte differentiation				- 5			13	3.73					
regulation of symbiosis, encompassing mutualism through parasitism							13.	19					
regulation of viral process							12.9	33					
positive regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway						1	1.95						
nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay						11	.54						
positive regulation of mRNA catabolic process			- C.			11.	29						
chromatin assembly or disassembly						11.	21						
regulation of viral genome replication						11.	10						
positive regulation of apoptotic signaling pathway				_		10.8	39						
nucleosome organization						10.5	1						
cellular response to interferon-gamma						10.4	8						

Εικόνα 66. Απεικόνιση της ανάλυσης γονιδιακής οντολογίας των βιολογικών διεργασιών που αντιπροσωπεύονται μεταξύ των θέσεων πρόσδεσης του p65 στις 3 ώρες μετά τη μόλυνση (πάνω) και στις 6 ώρες μετά τη μόλυνση με ιό Sendai (κάτω) σε κύτταρα Namalwa

Hotif Found	Discovery/Enrichment Program 📆	E-value []]	Known or Similar Hotifs 📆
	HENE	7.7e-112	851 (MAQ101.1) 8514 (MAQ107.1) 8552 080
Reverse Complement 🛱 Show 2 More 18			
Hotif Found	Discovery/Enrichment Program 📅	E-value []	Known or Similar Hotifs 🗍
Reverse Complement = Show 2 More 18	MEME	1.1e-106	
Hotif Found	Discovery/Enrichment Program 📅	E-value []]	Known or Similar Hotifs 🔝
Reverse Complement = Show 2 More 10	MEME	2.78-074	287833 (MA0527,1)
Hotif Found	Discovery/Enrichment Program	E-value []]	Known or Similar Hotifs 🛄
	DREME	1.3e-027	TGIPLEX ANI TGIPL DEG TGIPL (MAD797.11
Motif Found	Discovery/Enrichment Program 🖑	E-value []]	Known or Similar Hotifs 🚺
	DREME	1.1e-014	Sfell enmary (UPD0085_1) SPIE (MA0081_1) SPIC_fail
Hotif Found	Discovery/Enrichment Program	E-value []]	Known or Similar Motifs
1 TGAGECA Reverse Complement =	DAEME	4.6e-011	1022 141 1 1022 (MA0325.11 POSI:1000 (MA1141.1)

Εικόνα 67. Απεικόνιση των διαφόρων μοτίβων πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων για τις απομακρυσμένες από υποκινητές περιοχές πρόσδεσης του p65 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση με ιό Sendai σε Namalwa κύτταρα

Συνεχίζοντας τα πειράματά μας βρήκαμε ότι ο συνολικός αριθμός των θέσεων πρόσδεσης αυξάνεται από περίπου 300 θέσεις πρόσδεσης πριν τη μόλυνση σε 900 περιοχές 3 ώρες μετά τη μόλυνση και σε περίπου 5000 περιοχές 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση. Η ανάλυση των υποκείμενων μοτίβων στις θέσεις πρόσδεσης του p65 στις 6 ώρες μετά τη μόλυνση ανέδειξε ως το πλέον στατιστικά σημαντικό μοτίβο αυτό του p65 (RELA) που αποτελεί σημαντική ένδειξη για την υψηλή ποιότητα των πειραμάτων (Εικόνα 68).

factor	DNA binding domain	hits cutoff zscore -10*log(pval)
RELA	Rel Homology Region Family	1601 6.593 -20.884 690.776
	None	1307 6.753 -18.491 690.776
Rela	Rel Homology Region Family	1323 7.156 -17.802 690.776
REL	Rel Homology Region Family	1783 6.466 -15.563 690.776
NFKB2	Rel Homology Region Family	818 6.73 -15.172 690.776
NFKB1	Rel Homology Region Family	251 7.468 -10.035 535.829
CTCF	BetaBetaAlpha-zinc finger Family	639 7.906 -13.784 690.776
Ctcf	BetaBetaAlpha-zinc finger Family	996 6.421 -12.134 690.776
Jun	Leucine Zipper Family	1299 6.972 -10.266 559.511
JUND	Leucine Zipper Family	700 7.915 -9.349 468.689
FOSL1	Leucine Zipper Family	508 7.822 -9.049 440.726
JUNB	Leucine Zipper Family	1093 5.706 -8.859 423.568
JUN	Leucine Zipper Family	435 8.268 -8.183 365.192
FOS	Leucine Zipper Family	346 8.317 -8.13 360.749
Tbx21	Transcription Factor T-Domain	675 7.56 -7.946 345.772
BACH2	Leucine Zipper Family	874 7.079 -7.839 337.221
Jdp2	Leucine Zipper Family	426 7.526 -6.845 262.904
BACH1	Leucine Zipper Family	639 6.701 -6.712 253.719
JDP2	Leucine Zipper Family	236 8.284 -6.652 249.603
NFE2	Leucine Zipper Family	389 7.502 -6.559 243.306

Εικόνα 68. Απεικόνιση των πιο σημαντικών μοτίβων μεταγραφικών παραγόντων για τις θέσεις πρόσδεσης του p65 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση με ιό Sendai σε κύτταρα Namalwa

Μια επιπλέον ένδειξη της ειδικότητας του πειράματος είναι το ποσοστό των επαγόμενων από τον ιό γονιδίων που παρουσιάζουν πρόσδεση του p65 στον υποκινητή τους και φθάνει το 25% σε αντίθεση με τα ποσοστά πρόσδεσης στους υποκινητές των γονιδίων των οποίων η έκφραση μειώνεται κατά την ιϊκή μόλυνση και στο σύνολο των γονιδίων (10% και 9.2% αντίστοιχα) (Εικόνα 69).

p65 0h	p65 3h	p65 6h
0.5%	7%	25%
p65 0h	p65 3h	p65 6h
0.5%	2.3%	10%
p65 0h	p65 3h	p65 6h

Εικόνα 69. Παρουσίαση του ποσοστού αλληλεπικάλυψης των θέσεων πρόσδεσης του p65 πριν και μετά την ιϊκή μόλυνση με τους υποκινητές των **A**. επαγόμενων γονιδίων 6 ώρες μετά τη μόλυνση **B**. των γονιδίων των οποίων η έκφραση μειώνεται 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση και **Γ**. του συνόλου των γονιδίων σε κύτταρα Namalwa

Από την ανάλυση των θέσεων πρόσδεσης του p65 στις 6 ώρες μετά τη μόλυνση παρατηρήσαμε σε αρκετές περιπτώσεις την ύπαρξη συγκέντρωσης 3 ή περισσότερων θέσεων πρόσδεσης του p65 σε κοντινή μεταξύ τους απόσταση (μικρότερη των 12.5 kb), πολλές από τις οποίες βρίσκονται κοντά σε γονίδια που επάγονται κατά την ιϊκή μόλυνση. Στις περιοχές αυτές είναι πιθανόν να εδράζονται super-ενισχυτές που αποτελούνται από διαφορετικούς υποκείμενους ενισχυτές και χαρακτηρίζονται από αυξημένη ένταση του σήματος για ενεργοποιητικές τροποποιήσεις που είναι χαρακτηριστικές των ενεργών ενισχυτών (Whyte *et al.*, 2013). Στην **Εικόνα 70 (Α-Γ)**, παρουσιάζονται χαρακτηριστικά παραδείγματα πιθανών super-ενισχυτών κοντά στα γονίδια *IFIT3, JUNB*, καθώς και στα γονίδια *TNF*. Οι συγκεκριμένες περιοχές φέρουν και άλλες ενεργοποιητικές τροποποιήσεις, όπως είναι η αυξημένη προσβασιμότητα της χρωματίνης και σήματα H3K4me1 και H3K27ac που υποδηλώνουν την ύπαρξη πιθανού super-ενισχυτή στις συγκεκριμένες περιοχές

	אנגעם גנגעם בגנים בגנים בוגים נכווים וכנוים גרוים גרוים גנוים ונכנים נום 14 כבוים	934 9343 9353 9361 9363
	91.00 kb 91.00 kb 1	н,такь I
Seg Genes	*	
and may the		
antipeg 3h		
arei-seg 6h		
wing th		
ereç3h		
10000		
Anet Ch		
4me1 35		
Amet 6h		
27 as 0h		
27ai (h		
Q7 #1 8h		
i4ma3 05		
i4me3 3h		
Head Sh		
sh		
38		

IFIT3

TNF

p132	р1113 р 1113 р 1111 р 11111 р 11111 р 11111 р 11111 р 11111 р 11111 р 111111 р 11111 р 11111	1331 1 1236 ko	11 11 11/11 1	1 q11 q1 24 kb 12 x0 kb 1	12 q1311	q1332 q1	32 q1331	4133	12,515 Ho.	q1343
12836		12395 100	52.60 SD	- 24 kb 12:300 kb	1 1	12,5446 1 1	12.00 kb 1 1	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	12,913 Ho.	9.92
						2000			PROV2	
									1402	=
-	_							_		_
-				i an				_		_
-				-			-	_		
-				-						
-							10			
								22 123		100
	A Second Second									
					_		_			_
			The Milde	1.00		10 - 10 - 10 - 10 - 10 - 10 - 10 - 10 -	_	- viite		
		_			_					-
1.00							10.00			
_										_
				-			-			-
15	100 C	10 <u>4) - 5</u>	1.00		1000000		100			
	-									

A

Γ



Εικόνα 70. Απεικόνιση της συσσώρευσης σε μικρή μεταξύ τους απόσταση των θέσεων πρόσδεσης του p65 μετά την ιϊκή μόλυνση με ιό Sendai γύρω από το γονίδιο **A.** *IFIT3* **B.** *JUNB* και **Γ**. γύρω από τα γονίδια της οικογένειας TNF σε κύτταρα Namalwa

Στη συνέχεια εφαρμόσαμε αυστηρές στατιστικές παραμέτρους (si ^{svi6h/0h} FC≥4) για τον εντοπισμό ισχυρών μοτίβων πρόσδεσης με υψηλή πιθανότητα συμμετοχής στη ρύθμιση της έκφρασης ιϊκά επαγόμενων γονιδίων. Ως μέτρο ποιοτικού ελέγχου για κάθε βιβλιοθήκη ChIP-seq που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη μας, πραγματοποιήσαμε ChIP-qPCR για να επικυρώσουμε γνωστές θέσεις πρόσδεσης πρωτεϊνών ή ιστονικών τροποποιήσεων. Ο ρ65 προσδένεται με υψηλή συγγένεια σε 1121 και 1950 περιοχές στα Namalwa και στα HeLa κύτταρα, αντίστοιχα (Εικόνα 71). Επίσης, ο NF-κB προσδένεται με υψηλότερη προτίμηση σε εγγύς-TSS περιοχές, ειδικά στα Namalwa κύτταρα.

213

Namalwa TSS-Distal

HeLa TSS-Distal



Εικόνα 71. Ενδεικτική απεικόνιση της κατανομής ισχυρών μοτίβων πρόσδεσης του p65 και στους δύο κυτταρικούς τύπους. Τα μοτίβα χαρακτηρίζονται από επαγόμενο συν-εντοπισμό των p65, Med1, CBP και H3K27ac τα οποία βρίσκονται σε μια ανοιχτή χρωματινική δομή πριν από την ιϊκή μόλυνση

Αν και η μόλυνση από τον ιό προκαλεί την πρόσδεση του NF-κB και στους δύο κυτταρικούς τύπους, η κατανομή των γεγονότων πρόσδεσης του p65 φαίνεται να είναι περισσότερο κυτταρο-ειδική σε σύγκριση με τον παράγοντα IRF3, καθώς υπάρχουν μόνο 76 κοινές περιοχές στις οποίες προσδένεται ο NF-κB μεταξύ των κυττάρων HeLa και Namalwa (36 "σε απόσταση"-TSS και 40 εγγύς-TSS), 15 εκ των οποίων είναι κοντά σε κοινά γονίδια στα οποία παρατηρείται αυξημένη έκφραση (όπως IFNB1, CL5, NFKB2, NFKBIZ και IRF1). Πολλές κοινές "σε απόσταση" p65 περιοχές χαρακτηρίζονται από επαγόμενο συν-εντοπισμό των IRF3, Med1, CBP και H3K27ac και βρίσκονται σε μια ανοιχτή χρωματινική δομή πριν από την ιϊκή μόλυνση. Αντίθετα, οι κοινές εγγύς p65 περιοχές στερούνται πρόσδεσης με τον παράγοντα IRF3 και χαρακτηρίζονται από τους CBP, Med1 και H3K27ac και την προσβασιμότητα ακόμη και πριν από την ιϊκή μόλυνση. Είναι ενδιαφέρον ότι όλες οι κυτταρο-ειδικές περιοχές πρόσδεσης του p65 μοιράζονται ένα βασικό επίπεδο (basal level) χρωματινικών δεικτών όπως είναι οι CBP, Med1 και H3K27ac πριν την ιϊκή μόλυνση. Για παράδειγμα, στα 78 κυτταρο-ειδικά γονίδια για τα HeLa περιλαμβάνονται τα IL6, IL7R και KLF4, ενώ στα 80 κυτταρο-ειδικά γονίδια για τα Namalwa τα οποία βρίσκονται κοντά στις θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα p65 συγκαταλέγονται τα γονίδια AIM2, TRAF1 TRAF4 και CD70.

IRF3 - ChIP - seq Πειράματα

Στη συνέχεια, επικεντρώσαμε την ανάλυσή μας σε συγκεκριμένες κυτταρο-ειδικές περιοχές όπου προσδένεται ο IRF3 στα Namalwa και στα HeLa. Στην Εικόνα 72 απεικονίζεται ο συν-εντοπισμός επαγόμενα σημάτων γύρω από τις κυτταρο-ειδικές περιοχές όπου προσδένεται ο IRF3. Αυτό φαίνεται μετά την επικάλυψη και το συνδυαστικό έλεγχο των αποτελεσμάτων του IRF3-ChIP-seq με το σύνολο των δεδομένων της NGS ανάλυσης που περιγράφεται παραπάνω.

HeLa-TSS-Distal



Namalwa-TSS-Distal

Εικόνα 72. Ενδεικτική απεικόνιση της κατανομής ισχυρών μοτίβων πρόσδεσης του IRF3 και στους δύο κυτταρικούς τύπους. Τα μοτίβα χαρακτηρίζονται από επαγόμενο συν-εντοπισμό

των IRF3, Med1, CBP και H3K27ac τα οποία βρίσκονται σε μια ανοιχτή χρωματινική δομή πριν από την ιϊκή μόλυνση

Πρώτον, είναι προφανές ότι είτε τα "σε απόσταση"-TSS είτε τα εγγύς-TSS σήματα ειδικά για τα Namalwa, που αντιστοιχούν στη γονιδιωματική κατανομή του IRF3, απουσιάζουν από τα ChIP-seq πειράματα που πραγματοποιούνται σε HeLa κύτταρα και αντίστροφα. Κατά συνέπεια, αυτές οι 709 περιοχές (647 "σε απόσταση"-TSS και 62 εγγύς-TSS) αποκτούν ένα εκτεταμένο ρεπερτόριο επαγόμενης πρόσδεσης των H3K27ac, CBP και Med1 το οποίο σε ορισμένες περιπτώσεις συνοδεύεται από τον συνεντοπισμό των p65 και H3K4me1. Οι εγγύς-TSS περιοχές σε σύγκριση με τις "σε απόσταση"-TSS περιοχές χαρακτηρίζονται από υψηλή επαγωγή της H3K4me3 και της υψηλής παρουσίας της RNA Pol II. Επιπλέον, η παραπάνω διαδοχική σειρά επιγενωμικών συμβάντων που παρατηρείται σε 709 γονιδιωματικές περιοχές, φιλοξενείται σε συμπαγή δομή χρωματίνης σε naïve Namalwa κύτταρα, η οποία μετά την ιϊκή μόλυνση καθίσταται ισχυρά προσβάσιμη, όπως υποδεικνύεται από το προφίλ

Ακολουθώντας μια ανάλογη στρατηγική καταφέραμε να αναλύσουμε τα επιγενετικά γεγονότα σε κυτταρο-ειδικές για τα HeLa περιοχές στις οποίες προσδένεται ο IRF3. Αρχικά, 498 περιοχές (474 "σε απόσταση"-TSS και 24 εγγύς-TSS) καταγράφηκαν από IRF3 ChIP-seq πειράματα τα οποία αποκτούν επαγόμενη IRF3 πρόσδεση αποκλειστικά σε κύτταρα HeLa 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση. Συμπερασματικά, η ανάλυση του IRF3-ChIP-seq υπογράμμισε την ύπαρξη κοινών και κυτταρο-ειδικών επαγόμενων IRF3 cistromes τα οποία χαρακτηρίζονται από τον επαγόμενο συν-εντοπισμό δεικτών των ενισχυτών με ανάλογο κοινό ή κυτταρο-ειδικό. Επιπλέον, οι κυτταρο-ειδικές περιοχές του IRF3 βρίσκονται κατά προτίμηση σε γειτνίαση με κυτταρο-ειδικά γονίδια με αυξημένη έκφραση. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα

Εντοπίσαμε 927 υψηλής συγγένειας θέσεις πρόσδεσης στα Namalwa και 712 θέσεις πρόσδεσης σε HeLa κύτταρα που καταλαμβάνονται από τον IRF3 μετά την ιϊκή μόλυνση. Οι περισσότερες από τις θέσεις πρόσδεσης του IRF3 εντοπίζονται μέσα στις

"σε απόσταση"-TSS περιοχές. Οι συγκρίσεις μεταξύ των κυττάρων Namalwa και HeLa αποκάλυψαν ότι 219 περιοχές (206 "σε απόσταση"-TSS και 13 εγγύς-TSS) είναι κοινές μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών και γειτνιάζουν με 32 κοινά ιϊκά-επαγόμενα γονίδια με αυξημένη έκφραση (όπως *IFN-β*, *IFIT2*, *IFIT3*, *ISG15*, *IFIH1*, *OASL*, *DDX58*, *DDX60*, *OTUD1*, *NFkBIZ* και άλλα). Τα υπόλοιπα IRF3 φαινόμενα πρόσδεσης είναι κυτταρο-ειδικά και πραγματοποιούνται είτε "σε απόσταση" ή σε εγγύτητα από το σημείο έναρξης της μεταγραφής. Πιο συγκεκριμένα, 709 περιοχές (647 "σε απόσταση"-TSS και 62 εγγύς-TSS) είναι κυτταρο-ειδικές για τα Namalwa και 498 περιοχές (474 "σε απόσταση"-TSS και 24 εγγύς-TSS) καταλαμβάνονται από τον παράγοντα IRF3 μόνο σε HeLa κύτταρα. Στα Namalwa, η πρόσδεση του IRF3 συσχετίζεται με την ενεργοποίηση 111 γονιδίων, 74 εκ των οποίων είναι κυτταρο-ειδικά (όπως *TRAF1*, *IL10RA*, *RIPK1* και *TNFSF10*). Στα HeLa, ο IRF3 ενεργοποιεί την έκφραση 61 γονιδίων, εκ των οποίων τα 42 είναι κυτταρο-ειδικά για τα HeLa (όπως *IL1A*, *SVIL*, *KRT17*, *KLF2* και *KLF4*).

Δεδομένου ότι το μεγαλύτερο μέρος της ιϊκά επαγόμενης πρόσδεσης του DNA των παραγόντων IRF3 και NF-κB είναι κυτταρο-ειδικό, διερευνήσαμε πώς τα μοτίβα πρόσδεσης του DNA μπορούν να επιβάλλουν τοπικά (σε γειτνίαση) συνδυαστικά γεγονότα στην αρχιτεκτονική δομή της χρωματίνης τα οποία είναι απαραίτητα για τη ρύθμιση της έκφρασης των αντι-ιϊκών γονιδίων. Για το χαρακτηρισμό ταυτόχρονων γεγονότων εντοπισμού, χαρακτηρισμένα από την πρόσδεση των IRF3 και NF-κB, πραγματοποιήσαμε πειράματα ChIP-seq για τον Med1 (υπομονάδα του συμπλόκου του Mediator), CBP (CREB-binding protein, ένζυμο τροποποίησης της χρωματίνης, ιστονική ακετυλοτρανσφεράση), RNA Pol II, H3K4me1 (H3K4 μονομεθυλίωση δείκτης ενισχυτών), H3K27ac (δείκτης ενισχυτών), H3K4me3 (τριμεθυλίωση Histone H3K4, δείκτης ενεργότητας των υποκινητών). Δημιουργήσαμε τοπογραφικούς θερμικούς χάρτες (heatmaps) συσχέτισης συγκρίνοντας κοινές με κυτταρο-ειδικές IRF3 and NF-κB DNA θέσεις πρόσδεσης σχετικά με τη στρατολόγηση της Pol II, συνενεργοποιητών και την επαγωγή τοπικών ιστονικών τροποποιήσεων ως απόκριση στη μόλυνση από τον ιό. Η προκύπτουσα ανάλυση έδειξε ότι ο παράγοντας IRF3 συσχετίζεται με το ανθρώπινο γονιδίωμα ταχύτερα στα Namalwa συγκριτικά με τα HeLa κύτταρα, και αυτή η κινητική πρόσδεσης του DNA συσχετίζεται με τα αποτελέσματα από το anti-virus transcriptomics (Συγκεντρωτική Εικόνα 41). Είναι ενδιαφέρον ότι η γρήγορη πρόσδεση του IRF3 δεν οφείλεται στην προτίμησή του στην ανοιχτή χρωματίνη στα Namalwa κύτταρα, αλλά αντιπροσωπεύει μια ταχύτερη επεξεργασία μεταγωγής σήματος σε λεμφοειδή κύτταρα σε σύγκριση με τα HeLa κύτταρα. Όπως φαίνεται, ο IRF3 στοχεύει στη χρωματίνη νωρίς (3 ώρες) μετά τη μόλυνση από ιό (σύμφωνα με τις αναφερόμενες μελέτες, Freaney et al., 2013) και ακολουθεί ένα επιθετικό μοτίβο συσχέτισης κοινών και κυτταρο-ειδικών για Namalwa ή Hela εγγύς-TSS και "σε απόσταση"-TSS περιοχών. 206 κοινές "σε απόσταση"-TSS IRF3 περιοχές μελετήθηκαν στα Namalwa εκ των οποίων 83 (40%) αποκτούν επαγόμενα H3K27ac σήματα, αποτέλεσμα που συμφωνεί με την ταυτόχρονη πρόσδεση του CBP (89/206, 43%). Επιπλέον, ο Med1 προσλαμβάνεται σημαντικά στις παραπάνω περιοχές (125/206, 61%). Αντιθέτως, ο p65 έχει περιορισμένο μοτίβο πρόσδεσης (16/206, 7.8%), τα σήματα της H3K4me1 και της RNA Pol II επάγονται ελάχιστα και τα σήματα της H3K4me3 είναι πολύ αδύναμα, αποτέλεσμα συνεπές με την προτίμηση αυτής της τροποποίησης για εγγύς-TSS στοιχεία και ειδικά για ενεργούς υποκινητές. Επιπροσθέτως, η παραπάνω σειρά επιγενετικών γεγονότων που παρατηρείται σε 206 γονιδιωματικές περιοχές φιλοξενείται κυρίως από συμπαγή δομή χρωματίνης των naïve Namalwa κυττάρων, τα οποία μετά την ιϊκή μόλυνση καθίστανται ισχυρά προσβάσιμα, όπως υποδεικνύεται από το προφίλ των υπερευαίσθητων περιοχών που μας υποδεικνύει η μέθοδος DNaseI.

Ένα παρόμοιο μοτίβο συσχετίσεων παρατηρήθηκε όταν ανάλογα HeLa ChIP-seq NGS δεδομένα συγχωνεύτηκαν και μελετήθηκαν στις γενωμικές περιοχές των 206 κοινών "σε απόσταση"-TSS IRF3 περιοχών. Παρά τον περιορισμένο αριθμό κοινών εγγύς-TSS IRF3 περιοχών που εντοπίστηκε (10-fold λιγότερο σε σχέση με τις "σε απόσταση" περιοχές) χρησιμοποιήσαμε μια ανάλογη ανάλυση. Σύμφωνα με αυτήν η πληρότητα του IRF3 συνοδεύεται από τη στρατολόγηση των H3K27ac, CBP και Med1, τη μικρή αύξηση της τροποποίησης H3K4me1 και την ισχυρή επαγωγή σημάτων της

RNA Pol II και της H3K4me3 σε ένα περιβάλλον χρωματίνης, όπου οι συμπαγείς δομές αντικαθίστανται από χαλαρές διαμορφώσεις τόσο στα Namalwa όσο και στα HeLa κύτταρα μετά από ιϊκή μόλυνση. Αυτό είναι συμβατό με την παρουσία ενεργών υποκινητών στην παραπάνω ομάδα αλληλουχιών. Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι ότι ο p65 συν-εντοπίζεται με τον IRF3 σε κάποιο βαθμό (1/13) 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση στα σημεία των 13 κοινών εγγύς-TSS IRF3 περιοχών στα Namalwa, και σε ένα ευρύτερο ποσοστό στα HeLa (5/13). Το αποτέλεσμα αυτό αποκαλύπτει μια διαφορική σχέση των κύριων ρυθμιστών της αντι-ιϊκής απόκρισης, η οποία πιθανώς καθοδηγείται από τα ειδικά για κάθε περιοχή γονιδιωματικά χαρακτηριστικά.

Μοριακή Ψηφιακή Εγκυκλοπαίδεια - ΑΤΛΑΝΤΑΣ των ιϊκών μολύνσεων

Χρησιμοποιώντας μια πληθώρα τεχνικών της γονιδιωματικής που αποτελούνται από περισσότερες από 150 NGS αναλύσεις των μεθόδων RNA-seq, ChIP-seq, DNaseI-seq, και πολυεπίπεδων βιοπληροφορικών αναλύσεων που ακολουθούνται από την ενσωμάτωση των αντίστοιχων τοπογραφικών χαρτών, κατασκευάστηκε μια "μοριακή-ψηφιακή εγκυκλοπαίδεια". Η εγκυκλοπαίδεια περιλαμβάνει τα αντι-ιϊκά γονίδια και τα ρυθμιστικά στοιχεία των οποίων η έκφραση ή η δραστηριότητα, αντίστοιχα, διαμορφώνεται κατά τις πρώτες φάσεις ή στα πρώιμα στάδια της αντιιϊκής έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης. Πρόκεται για μια ψηφιακή απεικόνιση των αποτελεσμάτων που βασίζεται στην αλληλούχηση δισεκατομμυρίων νουκλεϊκών οξέων που έχουν απομονωθεί από παϊνε κύτταρα ή από κύτταρα τα οποία έχουν μολυνθεί με ιούς. Αυτά τα αποτελέσματα αντιστοιχούν σε μεταγραφώματα, ανοιχτές δομές χρωματίνης και σε γονιδιωματικά τμήματα τα οποία στοχεύονται από κύριους ρυθμιστές της μεταγραφής, συμπλέγματα τροποποίησης της χρωματίνης και μηχανισμούς δράσης της RNA ΙΙ πολυμεράσης ή επικαλύπονται από τροποποιημένα νουκλεοσώματα.

Ο συνδυασμός όλων των παραπάνω μας οδήγησε στον όρο ΑΤΛΑΝΤΑ των ιϊκών μολύνσεων (Human-ATLAS-of-Virus-Infection) (Εικόνα 73), ο οποίος μας παρέχει τη δυνατότητα παρακολούθησης υψηλής ανάλυσης της κατάστασης της δυναμικής

των μοριακών γενονότων που συμβαίνουν ταυτόχρονα κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδώματος, και καθοδηγεί την ανάπτυξη κοινών και κυτταρο-ειδικών προγραμμάτων αντι-ιϊκής γονιδιακής έκφρασης, θεμελιώδους σημασίας για την ακριβή διαμόρφωση της αντι-ιϊκής κυτταρικής απόκρισης. Αρχικά για τη δημιουργία του ΑΤΛΑΝΤΑ διερευνήσαμε αρχικά χαρακτηριστικά της χρωματίνης, το επιγενωμικό προφίλ και τη συμμετοχή της μεταγραφικής μηχανής σε γονιδιωματικές συντεταγμένες όπου βρίσκονται τα καλά χαρακτηρισμένα αντι-ιϊκά γονίδια και οι ενισχυτές. Εντοπίσαμε συμπίπτοντα μοτίβα σημάτων τα οποία οριοθετούν τους προηγουμένως χαρακτηρισμένους ενισχυτές των ιϊκά επαγόμενων γονιδίων (OASL, IFN-β, IFIT, CCL5), όπως περιγράφεται και σε άλλες παρόμοιες γονιδιακές μελέτες (Thanos and Maniatis, 1995) και επιπλέον, ένα πλήθος άγνωστων περιοχών οι οποίες βρίσκονται "σε απόσταση" ή σε εγγύτητα από αντι-ιϊκές θέσεις έναρξης της μεταγραφής, και φέρουν μια σειρά από τα χαρακτηριστικά των υπό εξέταση ενεργών ενισχυτών. Αυτός είναι ένας σημαντικός ποιοτικός έλεγχος που υπογραμμίζει την εγκυρότητα της μελέτης μας. Η συσχέτιση διακριτών NGS δεδομένων που προέρχονται από μια πληθώρα τεχνικών της γονιδιωματικής μπορεί και ανασυγκροτεί με ψηφιακό τρόπο τους ανακαλυφθέντες μηχανισμούς που εντοπίστηκαν σε συγκεκριμένες γονιδιακές μελέτες και παράλληλα αποκαλύπτει νέα στοιχεία του ανθρώπινου μη-κωδικοποιημένου γονιδιώματος όπου εδράζουν νέοι ενισχυτές πιθανώς συσχετιζόμενοι με την αντι-ιϊκή απόκριση.

Για παράδειγμα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 73Α, ο ιϊκά επαγόμενος συν-εντοπισμός δεικτών για ενεργούς ενισχυτές κατά μήκος των γονιδιωματικών συντεταγμένων της περιοχής του OASL σε αλληλουχίες που περιλαμβάνουν το TSS του γονιδίου (Melchjorsen *et al.*, 2009), συνοδεύεται από ένα ανάλογο προφίλ δεικτών που χαρακτηρίζει ενεργούς ενισχυτές ακόμα και 20 kb άνωθεν (Borghini *et al.*, 2018). Τόσο οι εγγύς-TSS όσο και οι "σε απόσταση"-TSS περιοχές αποκτούν επαγόμενη πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων (p65 και IRF3), επαγόμενη προσβασιμότητα χρωματίνης καθώς και τη στρατολόγηση των CBP και Med1. Επιπλέον, εγγύς στοιχεία φέρουν ιστονικούς δείκτες χαρακτηριστικούς για την ενεργότητα των υποκινητών (H3K27ac και H3K4me3), ενώ τα "σε απόσταση" στοιχεία περιλαμβάνουν χαρακτηριστικές ιστονικές τροποποιήσεις, όπως οι H3K4me1 και H3K27ac. Και τα δύο στοιχεία χαρακτηρίζονται από επαγόμενη στρατολόγηση της RNA Pol II και στους δύο κυτταρικούς τύπους κατά τη μόλυνση από τον ιό.

Ως αποτέλεσμα της λειτουργίας των παραπάνω ρυθμιστικών περιοχών, το γονίδιο OASL χαρακτηρίζεται σαν ένα κοινό γονίδιο με αυξανόμενη έκφραση. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι εκτός από τα στοιχεία που είναι σε εγγύτητα με το TSS, ο "σε απόσταση" εν δυνάμει ενισχυτής μπορεί επίσης πιθανώς να οφείλεται στην επαγόμενη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου OASL, ένα σενάριο που ευνοείται από παρόμοιο τρόπο επαγωγιμότητας του Med1 καθώς και άλλων δεικτών μεταξύ των δύο στοιχείων. Κατά συνέπεια, επικαλύπτοντας τα πειράματα γονιδιωματικής στις γονιδιωματικές συντεταγμένες που περιλάμβαναν την OASL περιοχή, αποκτήσαμε πρόσβαση στην αρχιτεκτονική του γονιδιώματος και στα δυναμικά βιοχημικά γεγονότα που ενορχηστρώνουν τη ρύθμιση του γονιδίου κάτω από τις επιβλαβείς συνθήκες της ιϊκής μόλυνσης.

Επιπλέον, **η** Εικόνα 73B απεικονίζει τις γονιδιωματικές συντεταγμένες που φιλοξενούν το σύμπλεγμα γονιδίων IFIT, όπου οι σε εγγύτητα-TSS και οι "σε απόσταση"-TSS ενδογενετικές και διαγονιδιακές αλληλουχίες (επισημαίνονται με κουτιά) εμπεριέχουν τους παραπάνω δείκτες, οι οποίοι χαρακτηρίζουν τους ενισχυτές, κατά την ιϊκή μόλυνση και στους δύο κυτταρικούς τύπους. Αντίθετα, στις περιοχές όπου εντοπίζεται το IFIT1b δεν παρατηρείται με προφανή τρόπο μια περιοχή στην οποία να βρίσκονται μεταγραφικοί παράγοντες, ιστονικές τροποποιήσεις ή η μεταγραφική μηχανή. Επιπλέον, η δομή της χρωματίνης του IFIT1b είναι συμπαγής, όπως φαίνεται από την απουσία των σημάτων προσβασιμότητας στη DNaseI και από το γεγονός ότι το πείραμα RNA-seq απέτυχε να ανιχνεύσει τυχόν μετάγραφα και στους δύο κυτταρικούς τύπους, πριν αλλά και μετά την ιϊκή μόλυνση.

			_	_	_	_	~		_				_		_	_	_				_
Г		p13.32	p13,2	p12.3	p12.1	p11.22	p11.1	a12	a13.11	a13.13	g14,1	a14.3	o21.1 o	21.2 a21.31	a21.33	a23.1	g23.3	a24.12	e24.22	¢24.31	a24.3
	Δ	P	P	,	r		· · · ·	1.2	1	1	1	1	1 1		1	1	1	1	1	1	1
L	~																				
												— 48 kb —									
			121.460	1kb				121.470 kb				121.480 kb			121	490 kb				121.500 kb	
				~																	
ſ	NFkB 0h										-										
T	NEKB 3h																		1		
T	IRF3 0h																				
T	IRF3 3h		-					-			+								-		_
T	IRF3 6h		-	• •															-	• •	_
T	CBP 0h																				
T	CBP 3h		_								-									-	
T	H3K27ac 0h								-										_		
T	H3K27ac 3h				_						AL &	_		-					44	_	
	H3K27ac 6h								h (.										
	H3K4me1 0h H3K4me1 3h										*		-	- *							
Ľ.	H3K4me1 6h									_	-										
9	H3K4me3 0h										÷										
1	H3K4me3 3h																				_
L	DNasel Oh										1			•							
T	DNasel 3h										.										
T	DNasel 6h										-										
I	Med1 0h Med1 3h																				
T	Med1 6h																				
T	RNA pollI 0h		_								1										
T	RNA poll 3h																				
T	RNA polli 6h		÷			-					-										
T	RNA-seq Un RNA-seq 3h		-	_				<u> </u>		1	•										_
L	RNA-seq 6h																				
ž	NFkB 0h																				
I	NFkB 3h													-					+-		_
T	CRP 0h		_								-								1		
T	CBP 3h																				
T	CBP 6h								*		-										
T	H3K27ac 3h									A	-			<u> </u>					-		
T	H3K27ac 6h									_								_	4-10		
T	H3K4me1 0h																		م ک		
T	H3K4me1 3h							•				-									
T	H3K4me1 6h H3K4me3 0h		·								_	-		· · ·					÷		_
1	H3K4me3 3h										-										
~	H3K4me3 6h																				_
PW8	DNasel 0h																				
na	DNasel Sh									-										_	
E C	Stat2 0h					-					-		-								
z	Stat2 3h										Ă.										
	Stat2 6h										-										
L	Rad21 0h	-									-										-
	Rauzi an				_	_			-				_	-	_	_	_		-		

The Human ATLAS of Virus-Infection: OASL locus

The Human ATLAS of Virus-Infection: IFIT locus



Εικόνα 73. Απεικόνιση δύο παραδειγμάτων του ΑΤΛΑΝΤΑ των ιϊκών μολύνσεων (Human-ATLAS-of-Virus-Infection). Α. Παρατηρείται ο ιϊκά επαγόμενος συν-εντοπισμός χαρακτηριστικών δεικτών για ενεργότητα ενισχυτών κατά μήκος των γονιδιωματικών συντεταγμένων του γονιδίου OASL σε αλληλουχίες που περιλαμβάνουν το TSS του γονιδίου. Απεικονίζεται επίσης ένα ανάλογο προφίλ δεικτών ακόμα και 20 kb άνωθεν του γονιδίου. Στις εγγύς-TSS και στις "σε απόσταση"-TSS εντοπίζεται στρατολόγηση των CBP και Med1, καθώς και ιστονικοί δείκτες που χαρακτηρίζουν ενεργούς υποκινητές, όπως είναι οι H3K27ac και H3K4me3. Στα "σε απόσταση" στοιχεία φέρουν ιστονικές τροποποιήσεις, όπως οι H3K4me1 και H3K27ac. Επαγόμενη στρατολόγηση της RNA Pol II παρατηρείται και στα δύο αυτά στοιχεία κατά τη μόλυνση από τον ιό και στους δύο κυτταρικούς τύπους. Β. Παρατηρείται αντίστοιχα ο συν-εντοπισμός δεικτών που χαρακτηρίζουν ενεργούς ενισχυτές κατά μήκος των γονιδιωματικών συντεταγμένων του συμπλέγματος γονιδίων IFIT. Στις εγγύς-TSS και στις "σε απόσταση"-TSS αλληλουχίες εμπεριέχονται οι παραπάνω δείκτες, όπως είναι η στρατολόγηση των Med1, Stat2, Rad1 και RNA PolII, κατά την ιϊκή μόλυνση. Να σημειωθεί ότι στις γονιδιωματικές συντεταγμένες συν-εντοπισμού του IFIT1b δεν εμφανίζονται περιοχές οι οποίες να εμπεριέχουν τους χαρακτηριστικούς αυτούς δείκτες.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η σε εγγύτητα περιοχή του IFIT1b στερείται ένα ISRE μοτίβο, μας παρέχουν μια καλή εξήγηση για την αδυναμία του IFIT1b να ενεργοποιηθεί κατά την ιϊκή μόλυνση και στους δύο κυτταρικούς τύπους. Στοχεύουμε στο να υπογραμμίσουμε τα πλεονεκτήματα που παρέχει η "μοριακή-ψηφιακή εγκυκλοπαίδεια" στην κατανόηση του μηχανισμού της ανθρώπινης αντι-ιϊκής κυτταρικής απόκρισης. Συνολικά, εφαρμόζοντας τις τεχνικές της γονιδιωματικής σε συνδυασμό με τις πολυεπίπεδες αναλύσεις βιοπληροφορικής, επιτύχαμε την κατασκευή του Human-ATLAS-of-Virus-Infection και αποκτήσαμε πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με το Human-Anti-Viral-Regulome και το χαρακτηρισμό σύνθετων ενισχυτών καθώς και των γονιδίων-στόχων τους.

STARR - seq Πειράματα

Σε αρκετές μελέτες που εφαρμόστηκαν σε διαφορετικά συστήματα-μοντέλα, οι μεταγραφικοί παράγοντες χαρτογραφήθηκαν σε χιλιάδες θέσεις πρόσδεσης κατά μήκος της χρωματίνης, αλλά σε έντονη αντίθεση βρίσκεται ο αριθμός των γονιδίων, των οποίων η έκφραση τους τροποποιείται (παρουσιάζουν είτε αυξημένη είτε μειωμένη έκφραση), που είναι συχνά περιορισμένος σε μερικές εκατοντάδες (Vockley et al., 2016; Reddy *et al.*, 2009; Freaney *et al.*, 2013; Barakat *et al.*, 2018). Αυτό το μοτίβο κατανομής μας δείχνει ότι το πραγματικά *in vivo* λειτουργικό αποτέλεσμα των γεγονότων πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων σε μια συγκεκριμένη θέση πρόσδεσης, η οποία φιλοξενείται σε μια ρυθμιστική αλληλουχία, είναι σχεδόν απρόβλεπτη όταν εφαρμόζονται μεμονωμένα οι περιγραφικές τεχνικές της γονιδιωματικής.

Σύμφωνα με την τρέχουσα γνώση, η παρουσία των μεταγραφικών παραγόντων στα ρυθμιστικά στοιχεία μπορεί να εξυπηρετηθεί με άμεση πρόσδεση που χαρακτηρίζεται από διαφορετικό βαθμό συγγένειας (ισχυρό ή μη). Αυτό γίνεται μέσω της συνεργατικής αναγνώρισης σε συνεργασία με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες για την πρόσβαση στην αλληλουχία του DNA, την έμμεση στρατολόγηση από άλλους παράγοντες ή μέσω της δημιουργίας τρισδιάστατης επικοινωνίας μεταξύ των "σε απόσταση" στοιχείων. Ειδικά στις περιπτώσεις των "σε απόσταση" στοιχείων. Ειδικά τοις περιπτώσεις των "σε απόσταση" στοιχείων. Ειδικά τοις περιπτώσεις των "σε απόσταση" στοιχείων. Ειδικά τοις περιπτώσεις των "σε απόσταση" στοιχείων. Ειδικά στις περιπτώσεις των "σε απόσταση" στοιχείων του προσδένονται στους ενισχυτές, η λειτουργική επίδραση που δημιουργείται είναι δύσκολο να προβλεφθεί και να αποδοθεί στα πραγματικά γονίδια-στόχους της. Το παραπάνω εξηγείται από **α**) τα CRMs (cis-regulatory modules) βρίσκονται στο 98% του ανθρώπινου γονιδιώματος **β**) το γεγονός ότι δε μπορεί να προβλεφθεί με ακρίβεια από τα υπολογιστικά εργαλεία λόγω της έλλειψης ενός καθολικού κώδικα ακολουθίας και **γ**) από το ότι η δυναμική λειτουργία τους

εμποδίζει οποιαδήποτε ασφαλή πρόβλεψη σε σχέση με τη χωροχρονική λειτουργία τους (Pennacchio *et al.,* 2013).

Τα παραπάνω σημαντικά εμπόδια εμποδίζουν την πλήρη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών της λειτουργίας των ενισχυτών *in vivo*. Επομένως, είναι λογικό να πούμε πως η απλή ανίχνευση των σημάτων της γονιδιωματικής που αντιστοιχούν στην κατάληψη των θέσεων πρόσδεσης του DNA δεν ισοδυναμεί απαραίτητα με την ταυτοποίηση των λειτουργικών ενισχυτών, *in vivo*. Η τυπική προσέγγιση για τον έλεγχο ενός στοιχείου DNA για δραστικότητα ενισχυτή είναι ο προσδιορισμός βάση του γονιδίου αναφοράς, σύμφωνα με τον οποίο τμήματα του DNA κλωνοποιούνται ξεχωριστά σε φορείς πλασμιδίων που φέρουν το γονίδιο αναφοράς όπως *CAT* ή *GFP*, *Luc*, ακολουθούμενο από διαμόλυνση κυτταρικών καλλιεργειών και μέτρηση της παραγωγής *in vivo* της μεταγραφικής τους ενεργοποίησης (Inoue and Ahituv, 2015). Η εφαρμογή σε ευρεία κλίμακα της παραπάνω προσέγγισης ήταν απολύτως αναγκαία για τη μελέτη των ενισχυτών, η οποία επιτεύχθηκε με την ανάπτυξη μεθόδων ικανών για μαζική-παράλληλη εξέταση χιλιάδων ακολουθιών, *in vivo*, όπως τα assays MPRAs (Massive Parallel Reporter Assays) (Kheradpour *et* al., 2013; Melnikov *et* al., 2012) και η μέθοδος STARR-seq (Arnold *et* al., 2013; Vockley *et* al., 2016).

Οι παραπάνω μέθοδοι έχουν εφαρμοστεί σε διαφορετικά μοντέλα-συστημάτων για τη μελέτη του λειτουργικού τμήματος του γονιδιώματος σε ποικίλα είδη (Arnold et al., 2013; Vockley et al., 2016; Wang et al., 2018; Barakat et al., 2018; Kvon et al., 2014). ME αυτό τον τρόπο έχουμε στη διάθεσή μας θεμελιώδη ευρήματα που εστιάζουν στην αποκρυπτογράφηση του ρυθμιστικού κώδικα των ενισχυτών και στην οργάνωση του regulome σε διαφορετικούς οργανισμούς (Arnold *et al.,* 2013; Kvon *et al.,* 2014). Για να αποκαλύψουμε το άγνωστο λειτουργικό μέρος του Human-Anti-Viral-Regulome περιγράφεται παραπάνω, προχωρήσαμε σε ολιστική пου μια έρευνα χρησιμοποιώντας την προσέγγιση της μεθόδου STARR-seq (Arnold et al., 2013; Vockley et al., 2016; Wang et al., 2018; Barakat et al., 2018). Η μέθοδος αυτή είναι μια μαζικής κλίμακας λειτουργική μελέτη, ιδανική για τη διάκριση μεταξύ γεγονότων πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων. Αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι ακολουθούμενοι από τη λειτουργία των ενισχυτών και κατά συνέπεια της μεταγραφικής ενεργοποίησης και καταστολής των γονιδίων από εκείνα που αποτυγχάνουν να συμμετάσχουν στη δημιουργία λειτουργικών συμπλεγμάτων σε ενισχυτές που έχει σαν αποτέλεσμα τη σημαντική ρύθμιση της μεταγραφής.

Η STARR-seq είναι μια μέθοδος υψηλής απόδοσης ιδανική για μαζική-παράλληλη λειτουργική εξέταση εκατομμυρίων τμημάτων DNA, *in vivo* και βασίζεται στην ικανότητα των ενισχυτών να ενεργοποιούν τη μεταγραφή από απόσταση ακόμα και όταν βρίσκονται κάτωθεν (3' άκρο) ενός minimal υποκινητή και του γονιδίου αναφοράς. Εν συντομία, τμήματα του DNA εισάγονται με ανασυνδυασμό In-fusion σε STARR-vectors, κάτωθεν του GFP κωδικονίου λήξης και άνωθεν των σημάτων τερματισμού της μεταγραφής της polyA. Με αυτό τον τρόπο, ένας ενεργός ενισχυτής μπορεί να προκαλέσει την ίδια του τη μεταγραφή ως 3' επέκταση του GFP mRNA (5'-GFP-enhancer-polyA-3'mRNA chimeras) και στη συνέχεια να ανιχνευθεί ως αυξημένα σήματα με τη μέθοδο RNA-seq (Εικόνα 74). Η αφθονία αυτών των σημάτων αντικατοπτρίζει το πραγματικό λειτουργικό ρυθμιστικό αποτέλεσμα των ενισχυτών *in vivo*, όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα του RNA-seq.



Εικόνα 74. Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα 1xSp1-STARR στον οποίο κλωνοποιούνται μεμονωμένα σλληλουχίες από τα ChIP-seq πειράματα. Εισάγουμε μια θέση πρόσδεσης για το μεταγραφικό παράγοντα Sp1 στον υποκινητή του Starr-φορέα, τροποποιώντας το αρχικό πρωτόκολλο (Arnold *et al.*, 2013; Vockley *et al.*, 2016), η οποία μπορεί και διευκολύνει τις από απόσταση αλληλεπιδράσεις υποκινητή-ενισχυτή. Η περιοχή ένθεσης των υπό εξέταση αλληλουχιών θα τοποθετηθεί κάτωθεν ενός υποκινητή, ακριβώς μετά

την αλληλουχία λήξης της μεταγραφής και ακριβώς πριν το σινιάλο πολυαδενυλίωσης (poly-A σήμα) του γονιδίου αναφοράς GFP. Αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα οι ενεργοί ενισχυτές να μπορούν να μεταγράψουν τον ίδιο τους τον εαυτό. Με αυτόν τον τρόπο, κάθε πιθανή αλληλουχία ενισχυτή που έχει την ικανότητα να επάγει την έκφραση της, προσφέρει σήμα φθορισμού στο κύτταρο στο οποίο βρίσκεται, και μπορεί να παρατηρηθεί μέσω μικροσκοπίου. Επομένως, οδηγούμαστε στην παραγωγή χιμαιρικών μορίων RNA GFP:ενισχυτή, τα οποία στη συνέχεια θα αναλυθούν μέσω βαθιάς αλληλούχησης ευρείας κλίμακας νέας γενιάς

Προκειμένου να παρέχουμε αυξημένη ευαισθησία στα πειράματά μας, τροποποιήσαμε το αρχικό πρωτόκολλο της μεθόδου STARR-seq (Arnold *et al.*, 2013) εισάγοντας μια θέση πρόσδεσης για το μεταγραφικό παράγοντα Sp1 (Specificity Protein 1, πρωτεΐνη εξειδίκευσης 1) άνωθεν (5' άκρο της ακολουθίας του υποκινητή), γνωστός ότι διευκολύνει την επικοινωνία μεταξύ των απομακρυσμένων ενισχυτών και των στοιχείων του υποκινητή (Nolis *et al.*, 2009). Επιπλέον, η στρατηγική μας χρησιμοποίησε τη μεθοδολογία ChIP-STARR-seq (Vockey *et al.*, 2016; Barakat *et al.*, 2018) για να εξετάσει τα στοιχεία του DNA που προέρχονται από τα απομονωμένα πειράματα ChIP-seq που χρησιμοποιήθηκαν προηγουμένως για την κατασκευή του **ΑΤΛΑΝΤΑ των ιϊκών μολύνσεων (Human-ATLAS-of-Virus-Infection)**.

Η πειραματική στρατηγική μας προσανατολίζεται προς τον προσδιορισμό και το λειτουργικό χαρακτηρισμό του Human-Anti-Viral-Regulome, και στοχεύει να διακρίνει, μεταξύ άλλων των διακεκριμένων/ξεχωριστών ή την επικαλυπτόμενη ρυθμιστική μοίρα των παραγόντων IRF3- ή/και NF-κB, οι οποίοι συμμετέχουν στην ανάπτυξη κοινών ή κυτταρικο-ειδικών προγραμμάτων γονιδιακής έκφρασης που προκαλούνται από ιούς, κρίσιμης σημασίας για την έμφυτη αντι-ιϊκή ανοσολογική απόκριση. Εν συντομία, μετά από αναλύσεις NGS και βιοπληροφορικής, τα IRF3-ChIPed DNA τμήματα που προέρχονταν από κύτταρα HeLa (SVI 6h) ανασυνδυάστηκαν μαζικά στον τροποποιημένο φορέα πλασμιδίου 1xSp1-STARR ακολουθούμενο από μετασχηματισμό μεγάλης κλίμακας σε δεκτικά Ε. coli κύτταρα μεγάλης αποδοτικότητας.

IRF3-ChIP-STARR-seq Πειράματα

Η κλωνοποίηση στοχευμένων βιβλιοθηκών DNA που προέρχονται από πειράματα ChIP-seq (ChIP-STARR-seq), αντί τυχαίων τμημάτων DNA επιτρέπει την εξέταση ενεργότητας των ρυθμιστικών αλληλουχιών DNA από κύτταρα θηλαστικών. Μετά από βελτιώσεις στο πρωτόκολλο ανασυνδυασμού των προς εξέταση τμημάτων DNA πλέον είναι εφικτή η δημιουργία βιβλιοθηκών εκατοντάδων εκατομμυρίων διαφορετικών τμημάτων DNA γεγονός που επιτρέπει την εξέταση πολύπλοκων ολόκληρων γονιδιωμάτων όπως του ανθρώπου (Liu *et al.*, 2017).

Αρχικά προετοιμάσαμε τη γενωμική βιβλιοθήκη IRF3-ChIP εφαρμόζοντας το πρωτόκολλο IRF3-ChIP-STARR-seq σε κύτταρα HeLa. Η τροποποίηση που πραγματοποιήσαμε στο STARR-seq πρωτόκολλο με την εισαγωγή μιας θέσης πρόσδεσης για το μεταγραφικό παράγοντα Sp1 ακριβώς άνωθεν του υποκινητή, και βελτίωσε το αρχικά δημοσιευμένο πρωτόκολλο. Ο παράγοντας αυτός μπορεί και διεγείρει τη μεταγραφή μέσω της ειδικής πρόσδεσής του στα πλαίσια GC του υποκινητή του SV40. Αυτή η πρόσδεση υποδεικνύει πως αυτός ο μεταγραφικός παράγοντας προσδένεται με εξειδίκευση σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA. Παλαιότερη έρευνα του δικού μας εργαστηρίου έδειξε ότι η προσθήκη μιας θέσης πρόσδεσης για το μεταγραφικό παράγοντα Sp1 βοηθάει στην επικοινωνία του απομακρυσμένου ενισχυτή και του υποκινητή μέσω της δημιουργίας θηλιάς. Η έρευνα έδειξε ότι εισάγοντας μόνο μια θέση πρόσδεσης για τον Sp1, ανάμεσα στον ενισχυτή του γονιδίου της IFN- β και του υποκινητή στόχου, έχει ως αποτέλεσμα να "παγιδέψει" τον ενισχυτή σε αυτή τη θέση, εμποδίζοντάς τον να φτάσει στον υποκινητή-στόχο. Να σημειωθεί ότι η παρατήρηση αυτή μπορεί να ερμηνεύσει τον τρόπο με τον οποίο οι ενισχυτές δρουν από απόσταση με τη δημιουργία διαδοχικών βρόγχων με γενωμικές περιοχές που έχουν ακολουθίες πρόσδεσης για μεταγραφικούς παράγοντες μέχρι να συναντήσουν κάποιο λειτουργικό ενισχυτή.

Ακολούθησε, μέσω ανασυνδυασμού, ένθεση στον τροποποιημένο πλασμιδιακό φορέα 1xSp1-STARR-seq του απομονωμένου υλικού IRF3-ChIPed (το οποίο είχε προηγουμένως αλληλουχηθεί στα IRF3-ChIP-seq πειράματα) σε κύτταρα HeLa τα οποία είχαν μολυνθεί με ιό για 6 ώρες. Η ένθεση πραγματοποιήθηκε ύστερα από διπλή πέψη, με τα ένζυμα AgeI-HF και SalI-HF, της βιβλιοθήκης και του πλασμιδίου 1xSp1-STARR-seq ώστε να προκύψουν συμπληρωματικά άκρα και να μπορέσει να πραγματοποιηθεί η αντίδραση ανασυνδυασμού. Η πολυπλοκότητα της πλασμιδιακής βιβλιοθήκης εκτιμήθηκε αρχικά με μέτρηση των ανεπτυγμένων βακτηριακών αποικιών και έφτασε έως και τις ~ 5 * 10^6 αποικίες επομένως τόσα ήταν και μοναδικά τμήματα του DNA στην πλασμιδιακή βιβλιοθήκη που δημιουργήθηκε. Ο αριθμός αυτός μπορεί και αντιπροσωπεύει τις πολυάριθμες θέσεις πρόσδεσης του IRF3 στο γονιδίωμα. Ο κάθε κλώνος 1xSp1-STARR περιέχει σε αυτό το στάδιο και μία τυχαία αλληλουχία της IRF3-ChIP-seq βιβλιοθήκης, η οποία εντοπίζεται κάτωθεν της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για την πράσινη πρωτεΐνη φθορισμού GFP μετά το σημείο λήξης της μετάφρασης και πριν το σημείο λήξης της μεταγραφής (όπως είδαμε και στην προηγούμενη Εικόνα 75). Η βιβλιοθήκη στη συνέχεια ελέγχθηκε και επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση ευρείας κλίμακας νέας γενιάς Ως input, χρησιμοποιήθηκε υλικό της ανασυνδυασμένης πλασμιδιακής βιβλιοθήκης IRFE-ChIP-STARR (Input before transfection) και υλικό κυττάρων τα οποία είχαν διαμολυνθεί και στη συνέχεια ακολούθησε μόλυνση με ιό Sendai (Input after transfection 0h και 6h, αντίστοιχα), ώστε να ελέγξουμε το βαθμό της πολυπλοκότητας των STARR πλασμιδιακών βιβλιοθηκών πριν και μετά την εισαγωγή τους στα κύτταρα. Η διαδικασία της αλληλούχησης πραγματοποιείται ύστερα από την επιδιόρθωση των άκρων, την εισαγωγή ανταπτόρων στα άκρα, την επιλογή του κατάλληλου εύρους μεγεθών και τον πολλαπλασιασμό της βιβλιοθήκης με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Οι εκκινητές είχαν ως στόχο περιοχές του πλασμιδιακού φορέα άνωθεν και εκατέρωθεν της εισαγόμενης αλληλουχίας IRF3-ChIP.

Αυτή η εξαιρετικά περίπλοκη πλασμιδιακή βιβλιοθήκη IRF3-ChIP-STARR-seq περιέχει πολλαπλά αντίγραφα ολόκληρου του φάσματος ~ 3.000 θραυσμάτωνκομματιών που προσδένουν IRF3, τα οποία προσδιορίστηκαν με ChIP-seq αναλύσεις. Η IRF3-ChIP-STARR-seq βιβλιοθήκη στη συνέχεια επιμολύνθηκε σε 20*10⁶ κύτταρα HeLa και ακολούθησε ιϊκή μόλυνση (SVI 6h) [ίσος αριθμός επιμολυσμένων μημολυσμένων κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα ελέγχου (SVI 0h)] (Εικόνα 75). Στη συνέχεια, τα IRF3-ChIP-STARR μετάγραφα απομονώθηκαν, πραγματοποιήθηκε αντίστροφη μεταγραφή και στη συνέχεια ενισχύθηκαν χρησιμοποιώντας nested πρωτόκολλα PCR ακολουθούμενα από αλληλούχηση νέας γενιάς στο μηχάνημα της Illumina NextSeq500. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν προηγμένες αναλύσεις βιοπληροφορικής για την ακριβή αναγνώριση των λειτουργικών ενισχυτών αλλά και για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ακριβών επιπέδων ενεργοποίησής τους ακολουθούμενο από περαιτέρω κατηγοριοποίηση. Να αναφερθεί ότι η παραπάνω διαδικασία από το στάδιο της διαμόλυνσης και έπειτα, πραγματοποιήθηκε εις διπλούν για να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων.



Εικόνα 75. Απεικόνιση του πηκτώματος αγαρόζης της βιβλιοθήκης IRF3-ChIP-seq 6h. Η βιβλιοθήκη κλωνοποιήθηκε στο φορέα 1xSp1-STARR. Ύστερα από μόλυνση με ιό Sendai σε κύτταρα HeLa, απομονώνεται το mRNA και κατασκευάζονται STARR βιβλιοθήκες, οι οποίες απεικονίζονται στο επόμενο πήκτωμα αγαρόζης, πριν το τελικό στάδιο της αλληλούχησης τους

Ακολούθως, τα αποτελέσματα της Εικόνας 76 μας παρέχουν μια ευκρινή εικόνα των λειτουργικών ενισχυτών που προσδένουν IRF3, σύμφωνα με το ρυθμό ενεργοποίησής τους κατά την ιϊκή μόλυνση, όπως υποδεικνύεται από τον ακριβή αριθμό των sequencing reads που λαμβάνονται στα αποτελέσματα του RNA-seq. Συνολικά 277 λειτουργικοί IRF3-STARR ενισχυτές (258 "σε απόσταση"-TSS και 19 εγγύς-TSS) εντοπίστηκαν να ενεργοποιούνται και συνεπώς μπορούν να λειτουργήσουν *in vivo*, 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση σε HeLa κύτταρα. Αντιθέτως, ένας υψηλότερος αριθμός (2.803 from which 2.526 "σε απόσταση"-TSS και 277 εγγύς-TSS (σχεδόν 10-fold υψηλότερα) των κομματιών που προσδένουν IRF3 είναι ελάχιστα ενεργοποιημένα ή παραμένουν αδρανή, επομένως, χαρακτηρίζονται ως IRF3-STARR-Silent (σιωπηλοί) ενισχυτές.


Εικόνα 76. Απεικόνιση των λειτουργικών ενισχυτών που προσδένουν IRF3. Παρατηρείται ενεργοποίηση και λειτουργία των ενισχυτών *in vivo*, 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση σε HeLa κύτταρα.

Επιλέξαμε τον όρο σιωπηλοί αντί ανενεργοί (repressed or inactive) προκειμένου να τονίσουμε ότι τα αποτελέσματα που ελήφθησαν περιγράφουν την κατάστασή τους σε εκείνη τη συγκεκριμένη στιγμή της αντι-ιϊκής απόκρισης σε HeLa κύτταρα, και συνεπώς δε μπορούμε να αποκλείσουμε τη δυνατότητα ενεργοποίησης αυτών των στοιχείων σε διαφορετικά χρονικά σημεία ή και σε άλλους κυτταρικούς τύπους. Το συνολικό ποσοστό (εγγύς-TSS και "σε απόσταση"-TSS) των ενεργών ενισχυτών που προσδένουν IRF3 (277/3080, 90%) ταυτίζεται με δημοσιευμένες μελέτες που χρησιμοποιούν τη μαζική-παράλληλη εξέταση και μελετούν το ChIPed DNA του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR: Glucocorticoid Receptor) σε A549 κύτταρα με τη μέθοδο STARR-seq (10%, Vockley *et* al., 2016).

Συνολικά, ένα πρώτο σημείο αποσαφήνισης είναι το γεγονός ότι τα στοιχεία IRF3-STARR-Active είναι ένα λειτουργικό μέρος των συνολικών περιοχών που δεσμεύονται με IRF3 που εξετάστηκαν *in vivo*, γεγονός που εξηγεί εν μέρει μηχανιστικά τη σχέση μεταξύ της ευρείας κατανομής του IRF3 (3080 περιοχές) που συνοδεύεται από την περιορισμένη ενεργοποίηση των ιϊκά επαγόμενων γονιδίωνστόχων του IRF3 (439). Για να αποκτήσουμε περισσότερες πληροφορίες, προχωρήσαμε σε περαιτέρω βιοπληροφορική ανάλυση που επικεντρώθηκε στη χρωμοσωμική κατανομή των περιγραφόμενων στοιχείων. Είναι σημαντικό, ότι το 20% των λειτουργικών "σε απόσταση"-TSS IRF3-STARR-Active ενισχυτών βρίσκεται σε περιοχές του γονιδιώματος που είναι κοντά με 21 κοινά ιϊκά επαγόμενα γονίδια όπως *IFN-β, OASL, OTUD1* καθώς και 29 κυτταρο-ειδικά γονίδια για τα κύτταρα HeLa όπως IL7R, IL1A και 15 κυτταρο-ειδικά γονίδια για τα κύτταρα Namalwa, όπως FNDC3A και DMD.

Επιπλέον, τα 19 εγγός-TSS IRF3-STARR-Active στοιχεία βρίσκονται κοντά σε 16 κοινά γονίδια που παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση (84%) όπως τα *IFIT1, IFIT2, ZC3HAV1, OASL* και *DDX58* και σε 1 HeLa-specific *ZFAS1*. Επομένως, είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι η παραπάνω ομάδα στοιχείων περιλαμβάνει, εκτός από τα νέα λειτουργικά στοιχεία, μια σειρά από προηγουμένως χαρακτηρισμένους ενισχυτές, όπως ο "σε απόσταση" ενισχυτής 20 kb OASL (Borghini et al., 2018), ο "σε απόσταση" ενισχυτής 20 kb eviσχυτής του γονιδίου της *IFNB1* (Banerjee et al., 2014), ο "σε απόσταση" ενισχυτής ZC3HVA1 (Wang et al., 2010) και ο καλά χαρακτηρισμένος σε εγγύτητας ενισχυτής IFIT2 (Kessler et al., 1988). Όπως άλλωστε περιγράφεται σε συγκεκριμένες γονιδιακές μελέτες (Kessler et al., 1988), γεγονός που υπογραμμίζει την εγκυρότητα της μαζικής-παράλληλης εξέτασης και την ακρίβεια των νέων ευρημάτων.

p65 (NF-κB)-ChIP-STARR-seq Πειράματα

Ακολουθώντας ένα ανάλογο πειραματικό σκεπτικό εξετάσαμε το p65 (NF-κB)-ChIPed DNA που προήλθε από τα απομονωμένα και με αλληλούχηση ChIP-seq πειράματα που προηγουμένως χρησιμοποιήθηκαν ως μέρος του **ΑΤΛΑΝΤΑ των ιϊκών μολύνσεων**. Εστιάζοντας στις 1970 θέσεις πρόσδεσης του p65 στις 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση, βρέθηκαν 87 λειτουργικά στοιχεία να λειτουργούν ως ενεργοί ενισχυτές *in vivo* (70 "σε απόσταση"-TSS και 17 εγγύς-TSS) που ονομάζονται p65-STARR-Active (Εικόνα 77) και ένα υποσύνολο αυτών βρίσκεται κοντά σε κρίσιμα αντι-ιϊκά γονίδια συμπεριλαμβανομένων των IFNB1, OASL, CCL5, IFIT2 και DDX58. Αναγνωρίζουμε αυτά τα στοιχεία σαν μέρος του λειτουργικού NF-κB-Human-Anti-Viral-Regulome.



Εικόνα 77. Απεικόνιση της κατανομής του σήματος p65 (NF-κB)-ChIPed DNA των λειτουργικών ενισχυτών που προσδένουν p65

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, με τη χρήση των ChIP-STARR-seq πειραμάτων καταφέραμε να χαρακτηρίσουμε μέρος των λειτουργικών IRF3-Human-Anti-Viral-Regulome και NF-κB-Human-anti-Viral-Regulome. Αυτοί οι λειτουργικοί αντι-ιϊκοί ενισχυτές χαρτογραφήθηκαν στις γονιδιωματικές συντεταγμένες και βρέθηκε ότι ένα μέρος αυτών βρίσκεται σε αλληλουχίες γειτονικών ιϊκά επαγόμενων γονιδίων τα οποία αρχικά ταυτοποιήθηκαν από τις μεταγραφικές μελέτες. Συνδυάζοντας τα "σε απόσταση" ενεργά στοιχεία που προέρχονται από το p65-ChIP-STARR-seq με αυτά που εξήχθησαν από τη μεθοδολογία IRF3-ChIP-STARR-seq, ταυτοποιήθηκαν 25 κοινοί ενισχυτές. Επιπλέον, 11 από τα 24 πλησιέστερα γονίδια σε στοιχεία που είναι ενεργά σύμφωνα με το p65 και το IRF3 ChIP-STARR, είναι ιϊκά επαγόμενα συμπεριλαμβανομένων των *IFNB1, OASL, IL7R* και *IRF1* (Εικόνα 78).

TCN1	OASL	LINC00152	B4GALT5
FGF2	IL7R	PTGER4	IRF1
CCND3	IFNB1	KLF4	

Εικόνα 78. Λίστα ιϊκά επαγόμενων γονιδίων που είναι ενεργά σύμφωνα με τα p65 και IRF3 ChIP-STARR-seq πειράματα

Εστιάζοντας στα 265 σε εγγύτητα επαγόμενα στοιχεία πρόσδεσης στο παράγοντα p65 εντοπίσαμε ότι 17 από αυτά είχαν p65 ChIP-STARR-seq δραστηριότητα. Εντοπίζοντας τα πιο κοντινά γονίδια με τα σε εγγύτητα-p65-STARR-seq επαγόμενα στοιχεία, βρέθηκε ότι 13 από τα 17 ήταν ιϊκά επαγόμενα σύμφωνα με τα RNA-seq πειράματα. Βρήκαμε επίσης ότι 8 από τα 17 p65-STARR-Active στοιχεία ήταν επίσης ενεργά σύμφωνα με τα IRF3-STARR-seq πειράματα. Και τα 8 από αυτά βρίσκονται κοντά στο TSS των παρακάτω ιϊκά επαγόμενων γονιδίων: *IFIT1, IFIT2 IFIT3, GBP5, OAS3 IFIH1, DDX58* και *HERC5*.

Για την καλύτερη διερεύνηση της μηχανιστικής λειτουργίας, διερευνήσαμε περαιτέρω τη γενωμική τοπολογία των δύο Regulomes (IRF3-Human-Anti-Viral-Regulome και NF-κB-Human-anti-Viral-Regulome) εφαρμόζοντας ολοκληρωμένες αναλύσεις βιοπληροφορικής των δεδομένων που προέκυψαν, τα οποία έδειξαν ότι τα παραπάνω λειτουργικά Regulomes IRF3 και p65 αλληλεπικαλύπτονται, καθώς 25 από τις 70 (35%) p65-STARR-Active αλληλουχίες βρίσκονται εντός των IRF3-STARR-Active αλληλουχιών. Αυτό το αποτέλεσμα εναρμονίζεται με τον προαναφερόμενο μηχανισμό λειτουργίας αυτών των θεμελιωδών μεταγραφικών ρυθμιστών, σύμφωνα με τον οποίο εκτελούνται τόσο διακριτές όσο και αλληλεπικαλυπτόμενες λειτουργίες κατά τη ρύθμιση των κρίσιμων γονιδίων της αντι-ιϊκής και ανοσολογικής απόκρισης (Freaney *et al., 2013; Tong et al., 2016),* ενορχηστρώνοντας έτσι τα προγράμματα της έκφρασης αντι-ιϊκών γονιδίων σε ανθρώπινα κύτταρα.

Ένα επιπρόσθετο στοιχείο επαλήθευσης σε σχέση με την *in vivo* λειτουργία προκύπτει από την παραπάνω μελέτη σύμφωνα με την οποία έχει αποδειχθεί ότι ένα πλήθος μηκωδικοποιημένων στοιχείων αυτό-μεταγράφεται (self-transcribed), οδηγώντας στη δημιουργία των λεγόμενων "nvi" RNAs. Συνδυάζοντας το σύνολο των αποτελεσμάτων του ChIP-STARR-seq και NGS με τις γονιδιωματικές συντεταγμένες των παραπάνω nvi RNAs, ανακαλύψαμε ότι αρκετοί (22/258) από τους αναγνωρισμένους λειτουργικούς "σε απόσταση" ενισχυτές IRF3-STARR παράγουν το δικό τους RNA.

Ομοτυπικά Συμπλέγματα

Η προσοχή μας εστιάστηκε στο μοτίβο κατανομής των θέσεων πρόσδεσης του παράγοντα IRF3 σε IRF-STARR-Active στοιχεία, τα οποία αντανακλούν ένα αυξημένο δυναμικό αυτών των στοιχείων να φιλοξενούν πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης για τον IRF3. Υπολογίσαμε την ακριβή αναλογία θέσεων πρόσδεσης ανά kb της ακολουθίας του DNA των ενεργών ενισχυτών που ισούται με 47.8, το οποία είναι ένα εξαιρετικά υψηλό νούμερο, εάν λάβουμε υπ' όψιν ότι κάθε θέση πρόσδεσης του IRF3 δεν ξεπερνά το συνηθισμένος μήκος των 10 bp στην ακολουθία του DNA. Έτσι, βλέπουμε ότι ένα ποσοστό του λειτουργικού IRF3 του μη-κωδικοποιημένου γονιδιώματος αποτελείται από IRF3 μοτίβα. Στη συνέχεια εξετάσαμε το μοτίβο της κατανομής των 7496, εκ των οποίων 277 λειτουργικοί IRF3-STARR-Active ενισχυτές, και τα αποτελέσματα αποκάλυψαν μια μη-ομοιόμορφη κατανομή. Στη συνέχεια, εξετάσαμε ολόκληρες τις ακολουθίες καθώς και τα δομικά χαρακτηριστικά τους και παρατηρήσαμε ότι ένα εκτεταμένο τμήμα των λειτουργικών IRF3-STARR-Active ενισχυτών αποτελείται από παρακείμενα 5'-GAAAG- 3' μοτίβα διατεταγμένα σε cis με επαναλαμβανόμενο τρόπο που θυμίζει τα ομοτυπικά συμπλέγματα των θέσεων πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Επομένως, αυτοί οι λειτουργικοί ενισχυτές του ανθρώπινου γονιδιώματος που περιέχουν πολλαπλές IRF θέσεις πρόσδεσης βρίσκονται ο ένας δίπλα στον άλλον, ο αριθμός των οποίων κυμαίνεται από λίγους έως μέχρι και περισσότερους από εκατό. Επιπλέον, παρακολουθήσαμε την ακριβή σύνταξη των παραπάνω λειτουργικών ενισχυτών και εντοπίσαμε ότι σε αντίθεση με τα προηγούμενα αναφερθέντα συμπλέγματα των NF-κB και GR (Giorgetti et al., 2010; Gotea et al., 2016), αυτά τα νέα IRF3 λειτουργικά στοιχεία ενισχυτών αποτελούνται από συμπλέγματα σε υψηλή συγκέντρωση. Έτσι, εκτελώντας in silico aviχνευση και αναλύσεις στον αριθμό των IRF μοτίβων και τη σύνταξή τους σε IRF3-STARR-Active στοιχεία, αποκαλύψαμε μια προηγουμένως άγνωστη ομάδα σύνθετων ενισχυτών που έχουν θέσεις πρόσδεσης για τον IRF3.

Περαιτέρω ανάλυση γονιδιακής οντολογίας και κατηγοριοποίηση αποκάλυψε ότι αυτοί οι λειτουργικοί ενισχυτές κατά προτίμηση γειτνιάζουν με ιϊκά επαγόμενα γονίδια σε αντίθεση με ανάλογα επαναλαμβανόμενα IRF3-STARR-Silent στοιχεία, τα οποία εμπλέκονται σε μικρότερο βαθμό στα παραπάνω γονίδια. Επίσης, διερευνήσαμε επιπλέον περιοχές του ανθρώπινου γονιδιώματος όπου βρίσκονται πολλαπλά παρακείμενα μοτίβα 5'-GAAAG- 3' τα οποία δε διαθέτουν θέσεις πρόσδεσης για τον IRF3 σύμφωνα με τα IRF3-ChIP seq πειράματά μας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι μη-δεσμευμένες επαναλήψεις δε βρίσκονται κοντά στα αντι-ιϊκά γονίδια. Οι παραπάνω παρατηρήσεις συνδέουν τη λειτουργία των IRF3-STARR ενισχυτών με το μηχανισμό της αντι-ιϊκής απόκρισης.

Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι η υπολογιστική μας ανάλυση πραγματοποιήθηκε κατά τη λειτουργική εξέταση και τον εντοπισμό αυτών των IRF3 ενισχυτών οι οποίοι λειτουργούν in vivo κατά τη διάρκεια της αντι-ιϊκής απόκρισης. Το γεγονός αυτό επικυρώνει και ενισχύει την υπόθεσή μας ότι τα μοναδικά πρωτογενή χαρακτηριστικά της αλληλουχίας είναι πιθανώς συνδεδεμένα με τις λειτουργικές τους ιδιότητες. Προκειμένου να βρούμε το μοριακό εκείνο μηχανισμό που ρυθμίζει την in vivo λειτουργία των Repetitive-IRF3-STARR-Active ενισχυτών, προχωρήσαμε σε περαιτέρω εξέταση μέσω άμεσης σύγκρισης των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τη STARR-seq μέθοδο με εκείνα που περιγράφουν τα χαρακτηριστικά της χρωματίνης του ενδογενούς επιγονιδιώματος χρησιμοποιώντας τα NGS αποτελέσματα του ΑΤΛΑΝΤΑ των ιϊκών μολύνσεων. Στη συνέχεια, εξετάσαμε τις παραπάνω γονιδιωματικές συντεταγμένες των θέσεων πρόσδεσης του IRF3, όπως υποδεικνύεται από τα ChIP-seq πειράματά μας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ισχύς της πρόσδεσης του IRF3 δε συσχετίζεται με τον αριθμό των IRF μοτίβων σε ενισχυτές με διαφορετικά μοτίβα που εμφανίζουν ισχυρή επαγόμενη πρόσδεση IRF3.

Τέλος, η έρευνά μας με τη χρήση της μεθόδου DNaseI-seq αποκάλυψε ότι οι Repetitive-IRF3-STARR-Active ενισχυτές βρίσκονται σε συμπαγείς δομές χρωματίνης, όπως υποδεικνύεται από τα απολύτως αναγκαία σήματα της προσβασιμότητας που εντοπίστηκαν σε naïve κύτταρα ακολουθούμενα από ελαφρώς αυξανόμενα σήματα κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης. Αυτά τα ευρήματα έχουν σημαντική σημασία καθώς επισημαίνουν ότι το μεταγραφικό ρυθμιστικό αποτέλεσμα παράγεται *in vivo* από τους Repetitive-IRF3-STARR-Active ενισχυτές, και ως αποτέλεσμα η συνδρομή τους για τη δημιουργία ακριβής αντι-ιϊκών γονιδιακών προγραμμάτων έκφρασης απαιτείται σε κλειστό χρωματινικό περιβάλλον, τουλάχιστον κατά τη διάρκεια των αρχικών σταδίων της κυτταρικής απόκρισης.

Για να αποκαλύψουμε αυτόν τον παράδοξο τρόπο λειτουργίας, επιστρέψαμε στο μηχανισμό της ενεργοποίησης των ομοτυπικών συμπλεγμάτων, ο οποίος περιγράφει τη συνεργατική και μη-συνεργατική στόχευση από μεταγραφικούς παράγοντες. Σύμφωνα με το πρώτο σενάριο, εάν ένα ομοτυπικό σύμπλεγμα θέσεων πρόσδεσης στοχευθεί από τα μόρια του ιδίου μεταγραφικού παράγοντα με συνεργατικό τρόπο, τότε το τελικό λειτουργικό μεταγραφικό αποτέλεσμα που προκύπτει θα ακολουθήσει έναν τρόπο ενεργοποίησης/απενεργοποίησης (on/off), σύμφωνα με τον οποίο η συγκέντρωση των μεταγραφικών παραγόντων θα αποτελεί την παράμετρο εκείνη που απαιτεί την παραπάνω αλλαγή (on/off). Από την άλλη πλευρά, εάν τα μόρια του μεταγραφικού παράγοντα προσδεθούν ανεξάρτητα το ένα από το άλλο σε μοναδικές θέσεις πρόσδεσης εντός του συμπλέγματος, τότε η βαθμιαία πρόσδεσή τους και η επακόλουθη αύξηση του αριθμού των καταλαμβανομένων θέσεων πρόσδεσης οδηγούν σε ανάλογη δημιουργία αποτελέσματος ενεργοποίησης.

Στην περίπτωση των Repetitive-IRF3-STARR-Active ενισχυτών και οι δύο παραπάνω τρόποι λειτουργίας δεν ακολουθούνται, και το μοτίβο ενεργοποίησης παρουσιάζει μηαναλογική λειτουργία που μεταβαίνει σε αναλογική όταν ο αριθμός των μοτίβων είναι συγκεκριμένος- Έτσι, τα ακριβή αντίγραφα των θέσεων πρόσδεσης απαιτούν το ρυθμό ενεργοποίησης του ενισχυτή σε ημι-αναλογική φάση, πιθανώς λόγω των ανασταλτικών συμπαγών τοπικών δομών της χρωματίνης. Συνοπτικά, η πρόσδεση του IRF3 παρεμποδίζεται έντονα, και μόνο όταν οι πυρήνες κορεστούν από τα μόρια του IRF3, μπορεί και επιτυγχάνεται η ισχυρή πρόσβαση σε Repetitve-IRF3-STARR-Active ενισχυτές.

Ανάλυση Φυλογονιδιωματικού αποτυπώματος

Τα ομοτυπικά συμπλέγματα είναι αρχιτεκτονικά δομικά στοιχεία των γονιδιωμάτων που αποτελούνται από ένα εκτεταμένο τμήμα γειτονικών περιοχών πρόσδεσης για

τον ίδιο μεταγραφικό παράγοντα ή για μια οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων, και βρίσκονται τόσο σε εγγύς-TSS όσο και "σε απόσταση"-TSS στοιχεία σε διαφορετικά εξελικτικά είδη, αποτελώντας έτσι ένα διαδεδομένο χαρακτηριστικό των ευκαρυωτικών γονιδιωμάτων (Giorgetti *et al.,* 2010; Gotea *et al.,* 2010). Τα κύρια χαρακτηριστικά της αλληλουχίας καθώς και η σύνταξη των Repetitive-IRF3 ενισχυτών που αναγνωρίστηκαν προσομοιάζουν εκείνους που χαρακτηρίζουν την πρόσδεση EWS-FLI σε GGAA μικροδορυφόρους στο πλαίσιο του Erwing σαρκώματος (Guillon *et al.,* 2009), καθώς και των επιλογή των επαναλήψεων Tandem (TR) του ανθρώπινου γονιδιώματος από το μεταγραφικό παράγοντα ZEB1 (Balestrieri *et al.,* 2018).

Και στις δύο περιπτώσεις, οι συγκεντρωμένες σε συμπλέγματα θέσεις πρόσδεσης βρίσκονται σε εκτεταμένα μη-κωδικοποιημένα στοιχεία που ρυθμίζουν την εξέλιξη των προγραμμάτων της γονιδιακής έκφρασης. Οι επαναλήψεις καλύπτουν το 46% του ανθρώπινου γονιδιώματος και ταξινομούνται σε δύο κύριες κατηγορίες. Εκείνες που είναι απομεινάρια των τρανσοποζονίων και εκείνες των μεταγραφικών παραγόντων, όπου κάθε επαναλαμβανόμενη μονάδα είναι δίπλα η μία στην άλλη και δημιουργούνται από λάθη στη μεταγραφή του DNA (Gemayel *et* al., 2010; Balestrieri *et* al., 2018).

Δεδομένου ότι τέτοια επαναλαμβανόμενα χαρακτηριστικά των γονιδιωμάτων είναι διαδεδομένα τόσο στους προκαρυωτικούς όσο και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και τα ρυθμιστικά τοπία που φιλοξενούν αλληλουχίες ενισχυτών χαρακτηρίζονται από σημαντική εξελικτική συντήρηση (Bejerano *et al.,* 2004), προχωρήσαμε προς μια συντηρητική στρατηγική κατάλληλη για να παρέχει μια εις βάθος κατανόηση για την εξελικτική προέλευση του λειτουργικού τμήματος του Repetitive-IRF3-Human-Anti-Viral Regulome. Ορίσαμε αυτήν τη συνδυαστική προσέγγιση ως Φυλογονιδιωματικό αποτύπωμα ανάλυσης (Phylogenomics footprinting), η οποία ενσωματώνει αποτελέσματα που προέρχονται από την ανάλυση του συνόλων των NGS δεδομένων με το γονιδίωμα διαφορετικών οργανισμών σύμφωνα με **α**) μια προσέγγιση αναζήτησης βασισμένη σε μοτίβα **β**) μια προσέγγιση ομοιότητας σε επίπεδο αλληλουχίας γ) διάκριση της μελέτης σύμφωνα με σύγκριση με ορθόλογων και μηορθόλογων γονιδιωμάτων δ) άμεση βιοχημική επικύρωση με βάση τα ChIP αποτελέσματα που ελήφθησαν και ε) λειτουργική αξιολόγηση από GFP-reporter assays της *in vivo* λειτουργίας συντηρημένων αλληλουχιών που προέρχονται από διαφορετικούς οργανισμούς σε ανθρώπινα κύτταρα κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης.

Οι αλληλουχίες με επαναλαβανόμενα μοτίβα IRF είναι εξελικτικά συντηρημένες σε γονιδιώματα διαφόρων οργανισμών

Ο βαθμός συντήρησης και η ποσότητα των IRF3 επαναλήψεων στο γονιδίωμα διάφορων οργανισμών θα μπορούσε να είναι χαρακτηριστικός της σημαντικότητάς τους, όπως άλλωστε παρατηρείται σε περιοχές του γονιδιώματος που διαδραματίζουν ζωτικής σημασίας λειτουργίες και είναι ιδιαίτερα συντηρημένες σε διάφορα είδη. Έτσι η πιθανή υψηλή συντήρηση των IRF3 επαναλήψεων, σε περίπτωση που ισχύει, υποθέτουμε πως θα είναι ενδεικτική τις συμμετοχής τους στο συντηρημένο λειτουργικό ρόλο που διαδραματίζουν στην αντι-ιϊκή απόκριση. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να αποκαλυφθεί ο βαθμός συντήρησης ιϊκά επαγόμενων ενισχυτών σε ποικίλους οργανισμούς στη πορεία της εξέλιξης, γεγονός που μας προσδίδει σημαντικά στοιχεία για την εξελικτική τους προέλευση.

Αρχικά, χρησιμοποιήσαμε μια υπολογιστική έρευνα βάση αλγορίθμου για να εκτιμήσουμε το συνολικό αριθμό των IRF3 επαναλήψεων στο γονιδίωμα πολλαπλών σπονδυλωτών και ασπόνδυλων οργανισμών. Δημιουργήσαμε ένα αυστηρό μοτίβο (Εικόνα 79) και σκανάραμε το ανθρώπινο γονιδίωμα, μια στρατηγική που οδήγησε στον προσδιορισμό 8655 IRF3 μοτίβων.



Εικόνα 79. Το μοτίβο πρόσδεσης IRF που προσδιορίστηκε και χρησιμοποιήθηκε για τη σάρωση των γονιδιωμάτων διαφορετικών οργανισμών με σκοπό τη μελέτη συντήρησης και κατά συνέπεια της σπουδαιότητας στο λειτουργικό ρόλο που διαδραματίζουν στην αντι-ιϊκή απόκριση

Στη συνέχεια, αναδείξαμε ένα ακριβές προφίλ για τον εμπλουτισμό του μοτίβου στα γονιδιώματα των Pan troglodytes (8063), Mus musculus (32181), Danio rerio (2122), Drosophila melanogaster (23), Caenorhabditis elegans (4), Zea Mays (581), Arabidopsis thaliana (43) και άλλων πολυκύτταρων οργανισμών (Εικόνα 80).

Organism	# repeats
Homo sapiens	8655
Pan troglodytes	8063
Mus musculus	32181
Danio rerio	2122
Drosophila melanogaster	23
Caenorhabditis elegans	4
Zea mays	581
Arabidopsis thaliana	43

Εικόνα 80. Αριθμός επαναλαμβανόμενων μοτίβων πρόσδεσης IRF αλληλουχιών σε γονιδιώματα διαφορετικών ειδών κατά την εξέλιξη

Επιπλέον, προχωρήσαμε στη "σάρωση" των γονιδιωμάτων των monocytes και εντοπίστηκε ένα ευρύ φάσμα περιοχών με αυξημένη ομοιότητα ακολουθιών. Αξιολογώντας τα παραπάνω αποτελέσματα εφαρμόζοντας "σάρωση" του γονιδιώματος και χρησιμοποιώντας εναλλακτικές εκδοχές από το αρχικό υπολογιστικό μοτίβο - οι οποίες περιλαμβάνουν τροποποιημένη απόσταση (spacing) από τις μονάδες τους και περισσοτέρων ή λιγότερων αντίγραφων της βασικής μονάδας - είδαμε πως το πρότυπο συντήρησης δεν παρουσίασε αλλαγές μεταξύ των διαφορετικών ειδών. Έτσι, έγινε προφανές ότι τα ομοτυπικά συμπλέγματα των θέσεων πρόσδεσης του IRF3 είναι χαρακτηριστικά των γονιδιωμάτων καθ' όλη τη διάρκεια της εξέλιξης, καθώς διατηρούνται σε μεγάλο βαθμό σε ασπόνδυλα, σπονδυλωτά, φυτά, μονοκύτταρους οργανισμούς (μικρόβια, παράσιτα και βακτήρια) και ακόμη και στους ιούς. Η **Εικόνα 81** απεικονίζει χαρακτηριστικά παραδείγματα της ομοιότητας των αλληλουχιών μεταξύ διαφορετικών ειδών.

Homo_sapiens Chimp mouse rat dog zebrafish drosophila elegans zee_mays	1 TGAGAA AGGAA TTGAGATACAAGAAAGGAAAGGAAAGG	63 65 66 66 66 88 63 64 58
Homo_sapiens Chimp mouse rat dog zebrafish drosophila elegans Zee_mays	4 AAAGGAAAAGGAAAAGGAAAAGGAAAAGGAAAAGGAAAAGGAAAA	31 58 57 53 57 51 57 51 54 55 154
Homo_sapiens Chimp mouse rat dog zebrafish drosophila elegans zes_mays	2 GGGAAAGGGA - AAGGGAAAGG GAAAGGGAAA	218 247 238 247 238 244 248 233
Homo_sapiens Chimp mouse rat cat dog zebrafish drosophila elegans sos_mays	9 AGGAAAGGAAAGGAAAGGAAAGGAAAGGAAAGGAA	105 141 138 135 122 354 329 338 321
Homo_sapiens Chimp mouse rat cat dog zebrafish drosophila elegans zes_msys	6 ATGAAATAGAATAAAATA 2 AGGGAAAGGGAAAGGGAAAGGGAAAGGGAAAGGAAA	123 134 128 107 123 112 141 120 131
Homo_sapiens Chimp mouse rat cat dog zebrafish drosophila elegans zes_mays	5 GGAAAGGAAAAGGAAAGGAAAGGAAAGGAAAGGA 9 GGGAAAGGAAA	523 517 509 501 530 512 520
Homo_sapiens Chimp nouse rat cat dog zebrafish	4 AAGGAAAGGAAAGGAAAGGAAAGGAAAGGAAAGGAAA	381 355 335 508 510

Εικόνα 81. Στοίχιση αλληλουχίας ομοτυπικών συμπλεγμάτων που φανερώνει το μεγάλο βαθμό συντήρησης σε διαφορετικά είδη στο βάθος της εξέλιξης

GFP δοκιμασίες αναφοράς (reporter assays) πειράματα για επιβεβαίωση ενεργότητας ενισχυτών

Οι δοκιμασίες αναφοράς χρησιμοποιούνται για τη μελέτη ενεργοποίησης των ενισχυτών in vivo. Το υπό εξέταση ρυθμιστικό στοιχείο κλωνοποιείται ανοδικά του γονιδίου αναφοράς και εισάγεται σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Η μεταγραφή αυτού καθώς και η παραγωγή της αντίστοιχης πρωτεΐνης οδηγεί στην ενεργοποίηση των ρυθμιστικών στοιχείων. Τα ρυθμιστικά στοιχεία αποτελούν τις πιθανές περιοχές που έχουν ρόλο ενισχυτή και το γονίδιο αναφοράς είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί τη φθορίζουσα πρωτεΐνης GFP. Προκειμένου λοιπόν να αξιολογηθεί συστηματικά η λειτουργία των συντηρημένων αλληλουχιών από τους παραπάνω διαφορετικούς οργανισμούς σε ανθρώπινα κύτταρα, σε αυτό το τελευταίο μέρος των αποτελεσμάτων μας, προχωρήσαμε σε κλωνοποίηση σε φορείς STARR και διαμόλυνση σε κύτταρα HeLa ακολουθούμενη από ιϊκή μόλυνση και παρακολουθήσαμε την ικανότητάς τους να ενεργοποιούν την έκφραση του γονίδιο αναφοράς GFP in vivo, με την εφαρμογή μικροσκοπίας φθορισμού. Πιο συγκεκριμένα, θέλοντας να επιβεβαιώσουμε την αξιοπιστία των πειραμάτων ChIP-STARR-seq που πραγματοποιήθηκαν αλλά να έχουμε μια επιπλέον επιβεβαίωση για τη λειτουργία των στοιχείων ως ενισχυτές in vivo, προβήκαμε σε μελέτη ενισχυτών με επαγόμενα επίπεδα μεταγραφής έπειτα από ιϊκή μόλυνση (STARR-ενεργές περιοχές), καθώς και επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών με υψηλά ποσοστά ChIP-STARR-seq consensus motifs drosophila melanogaster, zebrafish kai mus musculus.

Αρχικά, σχεδιάσαμε εκκινητές που στοχεύουν στις επιθυμητές περιοχές των γονιδιωμάτων των υπό μελέτη διαφορετικών ειδών και μέσω αντίδρασης PCR πραγματοποιήθηκε πολλαπλασιασμός της αλληλουχίας τους. Ακολούθησε η κλωνοποίηση τους στον πλασμιδιακό φορέα sp1-STARR-seq στην ίδια ακριβώς θέση που είχαν κλωνοποιηθεί οι βιβλιοθήκες στα πειράματα STARR-seq. Η ενεργοποίηση των ενισχυτών θα έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή χιμαιρικών μεταγράφων GFP που βρίσκονται σε σύντηξη με την αλληλουχία των ενισχυτών. Στη συνέχεια

πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση κυττάρων HeLa, με τα αντίστοιχα constructs των κλωνοποιημένων ενισχυτών. Ακολούθησε οπτικοποίηση του GFP σήματος σε μικροσκόπιο φθορισμού και μετρήσαμε τα μετάγραφα καθενός από τους ενισχυτές πριν αλλά και 7 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση, κάνοντας σύγκριση με το σήμα των κυττάρων που δεν είχε προέλθει από ιϊκή μόλυνση. Με αυτό τον τρόπο πραγματοποιείται έλεγχος της επαγωγής τους μετά την ιϊκή μόλυνση σε κύτταρα HeLa. Οι ενισχυτές με τα επαγόμενα επίπεδα μεταγραφής βρίσκονται κοντά σε ιϊκά επαγόμενα γονίδια , όπως για παράδειγμα *IRF1, OASL 20kb, OTUD1, PMAIP1* και *IL7R.*

Στην Εικόνα 82 παρουσιάζονται τα πειράματα μικροσκοπίας φθορισμού με πλασμίδια που φέρουν το γονίδιο αναφοράς GFP. Σε αυτά έχουν κλωνοποιηθεί οι συγκεκριμένοι μεμονωμένα ενεργοί ενισχυτές οι οποίοι έχουν προηγουμένως αποδειχτεί να είναι ενεργοί μετά από ιϊκή μόλυνση σε πειράματα ChIP-STARR-seq. Εκτός αυτό αυτούς τους ενισχυτές, ελέγξαμε την ενεργότητα χαρακτηριστικών αλληλουχιών από το γονιδίωμα διαφορετικών ειδών από όλα τα στάδια της εξέλιξης, όπως drosophila, zebrafish και mouse. Παρατηρούνται τα επαγόμενα επίπεδα GFP, επομένως και η επαγόμενη ενεργότητα των μεμονωμένων αυτών ενισχυτών που έχουν εισαχθεί σε κύτταρα HeLa. Σε όλα τα παραδείγματα που απεικονίζονται παρουσιάζονται επαγόμενα επίπεδα GFP σήματος 7 ώρες μετά την επαγωγή των κυττάρων με ιό.



Εικόνα 82. Απεικόνιση αντιπροσωπευτικών παραδειγμάτων της ενεργοποίησης του GFP από IRF3 συμπλέγματα συντηρημένων ενισχυτών που προέρχονται από διαφορετικά είδη, σε κύτταρα HeLa κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης σε κύτταρα HeLa. Σε κάθε έναν ενισχυτή βλέπουμε δύο εικόνες (πάνω) οι οποίες απεικονίζουν το GFP σήμα και άλλες δύο εικόνες (κάτω) οι οποίες απεικονίζουν τα κύτταρα σε οπτικό μικροσκόπιο (brightfield). Επίσης, στα αριστερά παρουσιάζονται οι εικόνες απεικονίζουν τα κύτταρα πριν την ιϊκή μόλυνση (0 ώρες), ενώ στα δεξιά παρουσιάζονται τα κύτταρα τα οποία έχουν διαμολυνθεί για 7 ώρες. Τα κύτταρα του πρώτου σετ φέρουν τον ενισχυτή του μεταγραφικού παράγοντα IRF1 και στη συνέχεια ακολουθούν οι: OASL 20kb, OTUD1, PMAIP1 και IL7R καθώς και περιοχές ενισχυτών από τα είδη zebrafish, drosophila and mus musculus

Ακολούθησε πρωτόκολλο απομόνωσης του ολικού RNA από τα κύτταρα για την ακριβή ποσοτικοποίηση των επιπέδων μεταγραφής των επαγόμενων ενισχυτών. Ύστερα από την απομόνωση του RNA και την κατασκευή μορίων cDNA, πραγματοποιήσαμε qPCR, χρησιμοποιώντας εκκινητές έναντι του GAPDH (για control και κανονικοποίηση των δειγμάτων) και του GFP του φορέα sp1STARR (για ποσοτικοποίηση της ενεργότητας και επαγωγής του εκάστοτε ενισχυτή). Στην παρακάτω Εικόνα παρουσιάζονται τα επίπεδα επαγωγής της ενεργότητας των ενισχυτών έπειτα από τη μέτρηση των επιπέδων των μεταγράφων τους. Παρατηρούμε χαρακτηριστικά αυξημένα επίπεδα επαγωγής όλων των ενισχυτών, ενδεικτικά της ενεργότητας της κάθε αλληλουχίας μετά την ιϊκή μόλυνση που μας υποδεικνύει ότι όσο πιο υψηλό είναι το fold change (relative to 0 hours), τόσο περισσότερα τα μετάγραφα GFP:ενισχυτή άρα τόσο μεγαλύτερη η επαγωγή της έκφρασης μέσω της αντίστοιχης αλληλουχίας (Εικόνα 83).



11: HMGA2 mouse intragenic enhancer
12: SUCLG2 mouse intragenic enhancer
50: Imx1ba zebrafish intragenic enhancer
85: Drosophila intergenic enhancer
96FAM19A4 mouse intragenic sauce

Εικόνα 83. Απεικονίζεται η ακριβής ποσοτικοποίηση, qPCR, των επιπέδων επαγωγής των υπό μελέτη ενισχυτών βάση της μέτρησης των GFP μεταγράφων, οι οποίες επιβεβαιώνουν τα παραπάνω αποτελέσματα

Συμπερασματικά, οι παραπάνω αναλύσεις μας αποκάλυψαν σημαντικά επίπεδα συντήρησης μεταξύ των λειτουργικών ανθρώπινων αντι-ιϊκών ενισχυτών και των γονιδιωματικών αλληλουχιών μιας πληθώρας διαφορετικών οργανισμών, οι οποίοι ενεργοποιούνται επίσης κατά τη μόλυνση από ιούς σε ανθρώπινα κύτταρα. Το ευρύ πρότυπο της συντήρησης αυτών των στοιχείων σε ποικίλους οργανισμούς και ιούς υπογραμμίζει τη λειτουργική τους σπουδαιότητα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή μελετά τους μηχανισμούς ρύθμισης της επαγόμενης γονιδιακής έκφρασης ευκαρυωτικών κυττάρων και το φαινόμενο της κυτταρικής απόκρισης κατά τη διάρκεια ιϊκών μολύνσεων. Η έρευνά μας βασίζεται σε μια ολιστική προσέγγιση του φαινομένου των ιϊκών μολύνσεων, η εφαρμογή της οποίας συνδυάζει όλα τα δεδομένα που προέρχονται από μια πληθώρα τεχνικών της γονιδιωματικής, περισσότερες από 150 αναλύσεις των μεθόδων RNA-seq, ChIP-seq, DNaseI-seq, FAIRE-seq, STARR-seq και πολυεπίπεδων βιοπληροφορικών αναλύσεων, τα οποία έχουν ως κοινή μέθοδο ανάλυσης την τεχνολογία αλληλούχησης ευρείας κλίμακας νέας γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS).

Οι σύγχρονες αυτές τεχνικές της γονιδιωματικής σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος καθιστούν εφικτή την ταυτοποίηση των ενισχυτών, την εύρεση των θέσεων πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων και της οργάνωσης της δομής της χρωματίνης στο χώρο καθώς και την αλληλεπίδραση και αλληλεξάρτηση αυτών με τα δίκτυα μεταγραφικών παραγόντων που τελικά ορίζουν την ταυτότητα ενός κυττάρου. Με αυτό τον τρόπο αποκαλύπτεται σταδιακά το σύνολο των ενισχυτών που συντονίζει την έκφραση των αντι-ιϊκών γονιδίων στα ανθρώπινα κύτταρα.

Βασικό χαρακτηριστικό της παρούσας διατριβής είναι η σύγκριση των ρυθμιστικών προγραμμάτων γονιδιακής έκφρασης στη διάρκεια ιϊκής μόλυνσης μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών τύπων, των επιθηλιακών κυττάρων HeLa και των Βλεμφοκυττάρων Namalwa. Χρησιμοποιώντας ως πειραματικό εργαλείο την επαγόμενη από ιό ανοσολογική απόκριση, ερευνήσαμε τις σχέσεις ανάμεσα στη χρωματική δομή στις υποκείμενες αλληλουχίες DNA και στην έκφραση των γονιδίων σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος. Καταγράφηκε η αντ-ιϊκή "υπογραφή" μετά από φιλτράρισμα των RNA-seq δεδομένων για υψηλό όριο έκφρασης και επαναληψιμότητας και κάναμε διάκριση μεταξύ των κοινών και των κυτταρο-ειδικών προγραμμάτων της γονιδιακής έκφρασης που ενεργοποιήθηκαν μετά την ιϊκή μόλυνση. Καταγράψαμε το πρότυπο της έκφρασης των ανθρώπινων γονιδίων μέσω πειραμάτων **RNA-seq**. Τα αποτελέσματα ανέδειξαν δύο κρίσιμα στοιχεία αναφορικά με την αντι-ιϊκή απόκριση. Διαπιστώθηκε ότι ο ιός οδηγεί στην επαγωγή και καταστολή διαφορετικών ομάδων γουιδιών στα HeLa και στα Namalwa κύτταρα. Ταυτοποιήσαμε γονίδια που επάγονται μόνο στα επιθηλιακά ή μόνο στα Βλεμφοκύτταρα, καθώς επίσης και γονίδια που επάγονται και στους δύο κυτταρικούς τύπους. Είναι ενδιαφέρον να ειπωθεί ότι το αντι-ιϊκό πρόγραμμα ενεργοποιείται νωρίτερα στα Namalwa σε σύγκριση με τα κύτταρα HeLa.

Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι 189 γονίδια υπερεκφράζονται 6 ώρες μετά την ϊική μόλυνση και στους δύο κυτταρικούς τύπους τα οποία μπορούν να χαρακτηριστούν ως κύρια μέλη του μεταγραφικού δικτύου απόκρισης των κυττάρων στον ιό. Διαπιστώνεται η ταχύτερη επαγωγή των γονιδίων αυτών στα Namalwa, καθώς ήδη στο χρονικό σημείο των 3 ωρών μετά τη μόλυνση αρκετά γονίδια έχουν επίπεδα που φτάνουν αυτά των 6 ωρών. Παρ' όλες τις διαφορετικές ομάδες γονιδίων που εντοπίστηκαν και στα δύο κυτταρικά συστήματα, ένα μεγάλο ποσοστό από τα γονίδια των οποίων τα επίπεδα αυξήθηκαν μετά την επαγωγή με ιό, σχετίστηκαν με την ενεργοποίηση αμυντικών λειτουργιών. Μελετώντας περαιτέρω τα γονίδια των οποίων η έκφραση επάγεται από κοινού, έπειτα από ιϊκή μόλυνση και στις δύο κυτταρικές σειρές, διαπιστώσαμε, όπως ήταν αναμενόμενο, ότι συμμετέχουν σε πολύ μεγάλο βαθμό σε κυτταρικές διαδικασίες, όπως η απόκριση σε ιό, η ανοσολογική απόκριση και η κυτταρική απόπτωση, γεγονός που υπογραμμίζει την αρτιότητα των αποτελεσμάτων μας. Επίσης, σημαντικό είναι το εύρημα πως και στους δύο διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους σχεδόν απουσιάζουν κοινά γονίδια των οποίων η έκφραση μειώνεται μετά τη μόλυνση από ιό. Το γεγονός αυτό αποτελεί την πρώτη ένδειξη πως ο συντονισμός της γονιδιακής έκφρασης κατά την αντι-ιϊκή απόκριση αφορά στην επαγωγή και όχι στην αποσιώπηση γονιδίων.

Τα αρχικά αυτά αποτελέσματα αποκαλύπτουν κοινά ρυθμιστικά χαρακτηριστικά γνωστών ομάδων γονιδίων που μπορούν να καθιερώσουν γενικές αντι-ιϊκές κυτταρικές αποκρίσεις, οι οποίες θα μπορούσαν να συντονιστούν από κοινούς μεταγραφικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς σε διαφορετικούς ιστούς. Υποδηλώνεται η σύνδεση ενός γενικού προγράμματος αντι-ιϊκής έμφυτης ανοσοαπόκρισης παράλληλα με τις κυτταρο-ειδικές αντι-ιϊκές μεταγραφικές αποκρίσεις, στους διαφορετικούς τύπους κυττάρων, οι οποίες είναι προσαρμοσμένες στις εξειδικευμένες λειτουργίες διακριτών κυτταρικών τύπων, όπως για παράδειγμα η οικογένεια των IFNAs σε Β-λεμφοκύτταρα και αποπτωτικών γονιδίων σε κύτταρα HeLa.

Για την ανάλυση του προφίλ της προσβασιμότητας της χρωματίνης και την εύρεση των περιοχών εκείνων των οποίων η προσβασιμότητα μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ανοσολογικής απόκρισης των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν πειράματα **DNaseI-seq**, πριν καθώς και 3 και 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση με ιό Sendai σε κύτταρα HeLa και Namalwa. Μελετώντας τα σήματα από τη μέθοδο αυτή, επικεντρωθήκαμε στη χαρτογράφηση της ιϊκά επαγόμενης προσβασιμότητας της χρωματίνης. Τα πειράματα αυτά μας δείχνουν όχι μόνο ποιες περιοχές είναι προσβάσιμες αλλά και ποιες από αυτές φιλοξενούν ταυτόχρονα μεταγραφικούς παράγοντες, άρα έχουν μεγάλη πιθανότητα να λειτουργούν ως ενισχυτές *in vivo*.

Στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε ανάλυση για τα μοτίβα των "σε απόσταση"-DNaseI περιοχών. Μέσω αυτής της ανάλυσης παρατηρήσαμε τον εμπλουτισμό για θέσεις πρόσδεσης της οικογένειας των IRFs στις "σε απόσταση" περιοχές των HeLa κυττάρων. Αντίστοιχα, για τις "σε απόσταση"-DNaseI περιοχές των Namalwa κυττάρων παρατηρήσαμε ότι είναι εμπλουτισμένες για θέσεις πρόσδεσης για τον παράγοντα NFκB (Nuclear Factor kappa B). Μέσω αυτής της ανάλυσης και των αποτελεσμάτων της, καταφέραμε τη συστηματική ταξινόμηση των DNaseI-Hypersenstive Sites (DHS) χαρτών των ιϊκά εξαρτώμενων αλλά και κυτταρο-ειδικών DHS μοτίβων ενεργοποίησης. Διαπιστώθηκε καλύτερη συσχέτιση με την ιϊκά επαγόμενη γονιδιακή έκφραση, αυτών που βρίσκονται κοντά στη θέση έναρξης της μεταγραφής. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι η DHS ενεργοποίηση συσχετίζεται με την ύπαρξη μοτίβων πρόσδεσης-DNA κύριων ρυθμιστών της ανσοολογικής απόκρισης, όπως είναι οι IRFs (Interferon Regulatory Factors) και ο NF-κB, υπογραμμίζοντας έτοι το ρόλο τους στη ρύθμιση της αντι-ιϊκής απόκρισης.

Επίσης, με πειράματα DNaseI-seq στους υποκινητές των επαγόμενων γονιδίων σε κύτταρα Namalwa, δείξαμε τη διαφοροποίηση των επιπέδων πρόσβασης της χρωματίνης πριν από την ιϊκή μόλυνση και τη συσχέτισή τους με τα διαφορετικά

επίπεδα επαγωγής. Για όλα τα γονίδια, ανεξαρτήτως του επιπέδου επαγωγής της έκφρασής τους, παρατηρήσαμε αύξηση της προσβασιμότητας της χρωματίνης κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης. Συγκεκριμένα, τα γονίδια που παρουσιάζουν λιγότερο προσβάσιμη χρωματίνη στα σημεία των υποκινητών πριν την ιϊκή μόλυνση εμφανίζουν μεγαλύτερα επίπεδα αύξησης της έκφρασής τους.

Γνωρίζοντας την ανομοιόμορφη κατανομή και οργάνωση των νουκλεοσωμάτων στο γονιδίωμα, εξετάσαμε τη συμμετοχή διαφορετικών γονιδιωματικών περιοχών σε κύτταρα HeLa και Namalwa σχετικά με τη συμμετοχή τους στον προκαθορισμό της δέσμευσης στα κυτταρο-ειδικά προγράμματα της αντι-ιϊκής γονιδιακής έκφρασης και στις ιϊκά επαγόμενες μεταγραφικές μεταβολές. Για αυτό το λόγο πραγματοποιήσαμε συγκριτικά πειράματα για τη μελέτη της προσβασιμότητας της χρωματίνης για τον εντοπισμό των θέσεων υπερευαισθησίας στη DNaseI (DNaseI-seq) και των περιοχών που στερούνται χρωματίνη (FAIRE-seq) στα ίδια χρονικά σημεία με τα RNA-seq και ακολούθησε βιοπληροφορική συγκριτική πειράματα ανάλυση των **FAIRE-seq** μας Η μέθοδος αποτελεσμάτων. προσφέρει τη δυνατότητα αποτελεσματικής προσέγγισης περιοχών του DNA που στερούνται νουκλεοσωμάτων και, συνεπώς, έχουν υψηλή πιθανότητα να φιλοξενούν μεταγραφικούς παράγοντες και να λειτουργούν ως ενισχυτές in vivo (Simon et al., 2012). Οι κοινές περιοχές που δίνουν σήματα και από τις δύο μεθόδους, έχουν αυξημένες πιθανότητες να είναι αυτές που διαδραματίζουν ζωτικής σημασίας ρόλο στην αντι-ιϊκή απόκριση, δίνοντάς μας μια δυναμική αναδιοργάνωση του γονιδιώματος, και πιο συγκεκριμένα την αυξημένη προσβασιμότητα των μη-μολυσμένων κυττάρων καθώς και την εκτεταμένη αναδιοργάνωση της χρωματίνης που προκαλείται από την ιϊκή μόλυνση.

Η πλειοψηφία ανάμεσα σε ~ 30.000 έως 45.000 μοναδικών, μη-επικαλυπτόμενων ανοιχτών περιοχών χρωματίνης βρίσκεται "σε απόσταση" από το σημείο έναρξης της μεταγραφής (TSS: Transcription Start Site), ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ οποιουδήποτε χρονικού σημείου στους διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Επιπλέον, η παραπάνω ανάλυση μας έδειξε πως η μεγάλη πλειοψηφία των επαγόμενων υποψήφιων ενισχυτών από ιϊκή μόλυνση βρίσκεται σε περιοχές της

χρωματίνης που είναι ήδη προσβάσιμες πριν από την ιϊκή μόλυνση. Παρατηρήθηκε επίσης αλληλοεπικάλυψη των θέσεων που στερούνται νουκλεοσωμάτων κατά την εξέλιξη της αντι-ιϊκής απόκρισης, με περιοχές που είναι ευαίσθητες στη δράση της DNaseI, γεγονός που ενισχύει την πιθανότητα στρατολόγησης μεταγραφικών παραγόντων και κατά συνέπεια στη δημιουργία ενισχυοσωμάτων (Thanos and Maniatis, 1995).

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ChIP-seq για την αποσαφήνιση της συνολικής αρχιτεκτονικής και άλλων ιϊκά επαγόμενων ενισχυτών στο ανθρώπινο γονιδίωμα με αντισώματα έναντι των μεταγραφικών παραγόντων IRF3 και της p65 υπομονάδας του NF-κB, των κύριων ρυθμιστών της ανοσολογικής απόκρισης σε κύτταρα HeLa και Namalwa (SVI 0h, 3h, 6h). Είναι ιδιαιτέρως σημαντική η μελέτη των παραπάνω μεταγραφικών παραγόντων διότι συμμετέχουν στα ρυθμιστικά στοιχεία και οδηγούν σε ενεργοποίηση της στρατολόγησης συν-ενεργοποιητών, αναδιαμορφωτών της χρωματίνης και τροποποιητών, οι οποίοι έχουν ως επακόλουθο τη συγκρότηση του συμπλόκου προ-έναρξης σε γονίδια-στόχους.

Η παραπάνω ανάλυση έδειξε την ταχύτερη συσχέτιση του παράγοντα IRF3 με το ανθρώπινο γονιδίωμα στα Namalwa κύτταρα συγκριτικά με τα HeLa, η οποία οφείλεται κατά κύριο λόγο στην ταχύτερη επεξεργασία μεταγωγής σήματος σε Βλεμφοειδή κύτταρα σε σύγκριση με τα HeLa, παρά σε μια κυτταρο-ειδική προτίμησή του στην ανοιχτή χρωματίνη των Namalwa κυττάρων. Η πρόσδεση του NF-κB παρατηρείται και στους δύο κυτταρικούς τύπους μετά την ιϊκή μόλυνση. Παρ' όλα αυτά βλέπουμε μια κυτταρο-ειδική κατανομή των γεγονότων πρόσδεσης του p65 σε σχέση με τον IRF3. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι όλες οι κυτταρο-ειδικές περιοχές πρόσδεσης του p65 μοιράζονται ένα βασικό επίπεδο χρωματινικών δεικτών, όπως είναι οι CBP, Med1 και H3K27ac πριν την ιϊκή μόλυνση.

Διερευνήσαμε επίσης τον τρόπο πρόσδεσης των μοτίβων DNA που μπορούν να επιβάλλουν συνδυαστικά γεγονότα ταυτόχρονου εντοπισμού για πρόσδεση των IRF3 και NF-κB στην αρχιτεκτονική δομή της χρωματίνης, τα οποία είναι απαραίτητα για

τη ρύθμιση της έκφρασης των αντι-ιϊκών γονιδίων. Για το λόγο αυτό ερευνήσαμε με ChIP-seq πειράματα τους IRF7, Med1, CBP, RNA Pol II, H3K4me1, H3K27ac, H3K4me3 καθώς αποτελούν - μέσω της πρόσδεσής τους - χαρακτηριστικά ενεργών ενισχυτών. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων ChIP-seq για H3K4me1, H3K4me3 και H3K27ac, οδήγησαν στον εντοπισμό περιοχών του γονιδιώματος που χαρακτηρίζονται από κλασικές ιδιότητες ρυθμιστικών στοιχείων. Παρατηρήσαμε ότι οι περιοχές που χαρακτηρίζονται από τροποποιήσεις σχετικές με τους ενισχυτές δεν καλύπτονται από νουκλεοσώματα και παρουσιάζουν ευαισθησία σε DNase-I πέψη. Η ανάλυση δεδομένων από τις ιστονικές τροποποιήσεις H3K4me1 και H3K4me3, έδειξε ότι η H3K4me3 δε μεταβάλλεται ιδιαίτερα μετά την ιϊκή απόκριση. Σε αντίθεση, η H3K4me1 φέρεται να εμφανίζει σημαντική ανακατανομή μετά την ιϊκή μόλυνση με σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα HeLa και Namalwa κύτταρα, γεγονός που δείχνει την ύπαρξη και ενεργοποίηση διαφορετικών ενισχυτών. Άρα υπάρχει επαγωγή διαφορετικών ομάδων γονιδίων στις δύο κυτταρικές σειρές. Αυτή η παρατήρηση συμφωνεί με τα αποτελέσματα της μεταγραφικής ανάλυσης, όπου αποδεικνύεται ότι η επαγωγή των γονιδίων καθορίζεται από την H3K4me1 στους ενισχυτές. Σχετικά με την H3K27ac, καθώς και τα επίπεδα πρόσδεσης του Med1 στην πλειονότητα των θέσεων πρόσδεσης του NF-κB, που αποτελούν επιπλέον δείκτες χαρακτηριστικούς για την ενεργότητα των ενισχυτών, παρατηρήσαμε πως προϋπάρχουν της μόλυνσης. Επομένως, όπως ήταν αναμενόμενο, ο p65 μετά τη μόλυνση εισέρχεται στον πυρήνα και προοδευτικά διαμοιράζεται στο γονιδίωμα "στοχεύοντας" ένα σημαντικό μέρος των προσβάσιμων περιοχών της χρωματίνης.

Συμπερασματικά από τα προαναφερθέντα αποτελέσματα παρατηρούμε πως ειδικά για τις περιοχές πρόσδεσης του IRF3 υπάρχει συνεντοπισμός, είτε με κοινό είτε με κυτταρο-ειδικό τρόπο δεικτών των επαγόμενων ενισχυτών. Επιπροσθέτως, λαμβάνοντας υπ' όψιν και τα αποτελέσματα του RNA-seq συμπεραίνουμε πως η ιϊκή μόλυνση οδηγεί στη δημιουργία και ενεργοποίηση κοινών και κυτταρο-ειδικών ενισχυτών που αντίστοιχα εμπλέκονται και ρυθμίζουν κοινά και κυτταρο-ειδικά προγράμματα επαγωγής για την αντι-ιϊκή απόκριση. Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν την ύπαρξη ενός άγνωστου μηχανισμού συντονισμένης πρόσδεσης

258

ρυθμιστικών πρωτεΐνών κατά μήκος του γονιδιώματος διαθέτοντας τυπικά δομικά χαρακτηριστικά των ενισχυτών.

Οι περισσότερες μελέτες σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος, οι οποίες έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση γονιδιωματικών τεχνολογιών, έχουν οδηγήσει στη χαρτογράφηση ενός μεγάλου αριθμού DNA αλληλουχιών διάσπαρτων στο γονιδίωμα, με αποκλειστικό κριτήριο τα δομικά χαρακτηριστικά της χρωματίνης των ρυθμιστικών στοιχείων, και όχι τις λειτουργικές ιδιότητές τους. Για τη λειτουργική αξιολόγηση των ρυθμιστικών στοιχείων χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο STARR-seq (Arnold et al., 2013; Vockley et al., 2016; Wang et al., 2018; Barakat et al., 2018). H μέθοδος αυτή αποτελεί την πλέον εξελιγμένη και ανταγωνιστική τεχνική ταυτόχρονης αξιολόγησης της ενεργότητας χιλιάδων αλληλουχιών με πιθανό ρόλο ενισχυτή in vivo και εφαρμόστηκε με συγκεκριμένες τροποποιήσεις/βελτιώσεις που συμβάλλουν στην πλήρη αποκρυπτογράφηση του μοριακού μηχανισμού που ελέγχει τη λειτουργία των ενισχυτών σαν ρυθμιστές της ανθρώπινης αντι-ιϊκής κυτταρικής απόκρισης. Η μέθοδος STARR-seq, βασίζεται στην ικανότητα ενός ενισχυτή να επάγει, ανεξαρτήτως της θέσης του και της απόστασής του, τη μεταγραφή μιας αλληλουχίας μέσα στην οποία βρίσκεται και ο ίδιος ο ενισχυτής (Arnold et al., 2013). Το προϊόν της μεταγραφής, μεταφράζεται μέσα στο κύτταρο σε χιμαιρική πρωτεΐνη, η οποία περιέχει στο ένα της άκρο την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP). Με αυτόν τον τρόπο, κάθε πιθανή αλληλουχία ενισχυτή που έχει την ικανότητα να επάγει την έκφρασή της, προσφέρει σήμα φθορισμού στο κύτταρο, στο οποίο βρίσκεται, και άρα μπορεί να παρατηρηθεί και να επιλεχθεί μέσω μικροσκοπίου φθορισμού.

Πιο συγκεκριμένα εισαγάγαμε μια θέση πρόσδεσης για το μεταγραφικό παράγοντα Sp1, άνωθεν στο 5' άκρο της ακολουθίας του υποκινητή, και παρείχαμε αυξημένη ευαισθησία στα πειράματά μας. Στη συνέχεια, εφαρμόσαμε τη μέθοδο ChIP-STARR-seq (Vockey et al., 2016; Barakat et al., 2018) για να εξετάσουμε τα στοιχεία του DNA που προέρχονται από τα απομονωμένα πειράματα ChIP-seq που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του ΆΤΛΑΝΤΑ των ιϊκών μολύνσεων. Τα IRF3-ChIPed DNA τμήματα που προέρχονται από κύτταρα HeLa (SVI 6h) ανασυνδυάστηκαν μαζικά

στον τροποποιημένο φορέα πλασμιδίου 1xSp1-STARR ακολουθούμενο από μετασχηματισμό μεγάλης κλίμακας σε δεκτικά Ε. coli κύτταρα μεγάλης αποδοτικότητας. Με αυτή την ευρείας κλίμακας δοκιμασία αναφοράς (reporter assay) ChIP-STARR-seq καταφέραμε να χαρακτηρίσουμε μέρος των λειτουργικών IRF3-Human-Anti-Viral-Regulome και NF-κB-Human-anti-Viral-Regulome. Η πρωτοποριακή αυτή μέθοδος μας επέτρεψε την ταυτόχρονη εξέταση της ιϊκά επαγόμενης ενεργότητας των πολυάριθμων περιοχών πρόσδεσης των μεταγραφικών ρυθμιστών της αντι-ιϊκής απόκρισης IRF3 και p65. Αυτοί οι λειτουργικοί αντι-ιϊκοί ενισχυτές χαρτογραφήθηκαν στις γονιδιωματικές συντεταγμένες και βρέθηκε ότι ένα μέρος αυτών βρίσκεται σε αλληλουχίες γειτονικών ιϊκά επαγόμενων γονιδίων, τα οποία αρχικά ταυτοποιήθηκαν από τις μεταγραφικές μελέτες.

Συνδυάζοντας τα "σε απόσταση" ενεργά στοιχεία που προέρχονται από το p65-ChIP-STARR-seq με αυτά που εξήχθησαν από τη μεθοδολογία IRF3-ChIP-STARR-seq, ταυτοποιήθηκαν 25 κοινοί ενισχυτές. Η πειραματική αυτή στρατηγική στοχεύει να διακρίνει, μεταξύ άλλων των διακεκριμένων/ξεχωριστών ή την επικαλυπτόμενη ρυθμιστική μοίρα των παραγόντων IRF3- ή/και NF-κB, οι οποίοι συμμετέχουν στην ανάπτυξη κοινών ή κυτταρικο-ειδικών προγραμμάτων γονιδιακής έκφρασης που προκαλούνται από ιούς, κρίσιμης σημασίας για την έμφυτη αντι-ιϊκή ανοσολογική απόκριση. Τα αποτελέσματά μας είναι ενδεικτικά της συμμετοχής ενός ειδικού λειτουργικού τμήματος του μη-κωδικού/ρυθμιστικού μέρους του ανθρώπινου γονιδιώματος σε αντι-ιϊκούς μοριακούς μηχανισμούς, μέσω πρόσδεσης του IRF3 με ένα ευρύ φάσμα λειτουργικών ενισχυτών. Αυτοί χαρακτηρίστηκαν ως IRF3-STARR-Active στοιχεία και τα ταξινομούμε ως τα πρώτα χαρακτηρισμένα λειτουργικά τμήματα του IRF3-Human-Anti-Viral-Regulome. Με τη συμμετοχή τους στο IRF3-Human-Anti-Viral-Regulome είναι κατανοητό πως πολύ πιθανόν είναι να είναι ζωτικής σημασίας για τη διαμόρφωση των προγραμμάτων έκφρασης ανθρώπινων αντι-ιϊκών γονιδίων.

Τα παραπάνω πειράματα μας παρέχουν μια εικόνα των μηχανιστικών αρχών της ανθρώπινης αντι-ιϊκής απόκρισης σύμφωνα με τις οποίες οι παράγοντες **IRF3** και **p65**

του Human-Anti-Viral-Regulome λειτουργούν τόσο ανεξάρτητα όσο και συνεργατικά *in vivo*, καθοδηγώντας έτσι κοινά ή κυτταρο-ειδικά προγράμματα για την έκφραση των γονιδίων. Είναι γνωστό ότι οι μεταγραφικοί ενισχυτές εμφανίζουν βασικά χαρακτηριστικά στην αλληλουχία τους τα οποία δε μπορούν να μεταφραστούν απευθείας σε ασφαλείς προβλέψεις σχετικά με τον τρόπο λειτουργίας τους (ενεργοποίηση ή καταστολή). Σε αρκετές περιπτώσεις, οι αλλοστερικές διαμορφώσεις των μεταγραφικών παραγόντων που προκαλούνται από το DNA, η συνεργατική πρόσδεση και η ισορροπία της τοπικής δομής της χρωματίνης είναι μερικοί από τους τρόπους που μπορούν να διαμορφώσουν τη λειτουργία ενός ενισχυτή σχετικά με τη διαθεσιμότητα των μοτίβων πρόσδεσής που πληρούν τις προδιαγραφές για να είναι ενεργοί υπό συγκεκριμένες συνθήκες.

Με τις προαναφερόμενες τεχνικές της γονιδιωματικής και τις πολυεπίπεδες βιοπληροφορικές αναλύσεις, που ακολουθούνται από την ενσωμάτωση των αντίστοιχων τοπογραφικών χαρτών, οδηγηθήκαμε στην κατασκευή μιας "**μοριακήςψηφιακής εγκυκλοπαίδειας**", η οποία μας προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες για την κατανόηση του μηχανισμού της κυτταρικής αντι-ιϊκής απόκρισης. Η εγκυκλοπαίδεια περιλαμβάνει τα αντι-ιϊκά γονίδια και τα ρυθμιστικά στοιχεία των οποίων η έκφραση ή η δραστηριότητα, αντίστοιχα, διαμορφώνεται κατά τις πρώτες φάσεις ή στα πρώιμα στάδια της αντι-ιϊκής έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης. Με άλλα λόγια, δημιουργήσαμε μια απεικόνιση που δίνει σε ψηφιακή μορφή τα αποτελέσματα, βασιζόμενα στην αλληλούχηση δισεκατομμυρίων νουκλεϊκών οξέων που έχουν απομονωθεί από παϊνε κύτταρα ή από κύτταρα τα οποία έχουν μολυνθεί με ιούς. Τα αποτελέσματα αυτά αντιστοιχούν σε μεταγραφώματα, ανοιχτές δομές χρωματίνης και σε γονιδιωματικά τμήματα τα οποία στοχεύονται από κύριους ρυθμιστές της μεταγραφής, συμπλέγματα τροποποίησης της χρωματίνης και μηχανισμούς δράσης της RNA ΙΙ πολυμεράσης ή επικαλύπονται από τροποποιημένα νουκλεοσώματα.

Συνδυάζοντας όλα τα παραπάνω οδηγηθήκαμε στον όρο ΆΤΛΑΝΤΑ των ιϊκών μολύνσεων (Human-ATLAS-of-Virus-Infection) (Agelopoulos *et al., 2020),* ο οποίος μας παρέχει τη δυνατότητα παρακολούθησης μοριακών γενονότων (κοινών αλλά και

κυτταρο-ειδικών, θεμελιώδους σημασίας για την ακριβή διαμόρφωση της αντι-ιϊκής κυτταρικής απόκρισης), που συμβαίνουν ταυτόχρονα κατά τη διάρκεια της ιϊκής μόλυνσης σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος. In . Μας δίνει τη δυνατότητα να εντοπίζουμε μοτίβα σημάτων που συμπίπτουν και οριοθετούν τους ενισχυτές_που έχουν περιγραφεί και από άλλες μελέτες (Thanos and Maniatis, 1995), όπως είναι χαρακτηριστικά οι *IFN-β*, *OASL* και *IFIT*. Με τον ΆΤΛΑΝΤΑ εντοπίζεται επίσης και μια πληθώρα άγνωστων περιοχών που συναντώνται σε "σε απόσταση" ή σε εγγύτητα από αντι-ιϊκές θέσεις έναρξης της μεταγραφής, οι οποίες φέρουν κάποια τυπικά χαρακτηριστικά που διακρίνουν τους ενεργούς ενισχυτές.

Συμπερασματικά, παρουσιάζουμε μια περιγραφή των γονιδίων και των ρυθμιστικών στοιχείων που συσχετίζονται με την ανάπτυξη κοινών και κυτταρο-ειδικών προγραμμάτων έκφρασης ανθρώπινων αντι-ιϊκών γονιδίων. Αυτή είναι η πρώτη φορά που μια τέτοια ακριβής περιγραφή της σχέσης μεταξύ δυναμικών αλλαγών χρωματίνης, μεταγραφικών παραγόντων, ιστονικών και μηχανισμούς γονιδιακής έκφρασης έχει προσδιοριστεί για συγκεκριμένους γονιδιωματικούς τόπους που φαίνεται να έχουν "αντι-ιϊκές ιδιότητες" *in vivo.* Καθώς η σύνταξη του ενισχυτή, η οποία περιλαμβάνει τη σειρά, τον προσανατολισμό και την απόσταση των θέσεων πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, έχει πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας των ενισχυτών ήταν απόλυτη ανάγκη να προχωρήσουμε σε μια εις βάθος μελέτη της ακολουθίας των λειτουργικών στοιχείων, προκειμένου να αποκαλυφθεί η ρυθμιστική λογική τους. Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω γεγονότα, χρησιμοποιήσαμε μια *in-silico* ανίχνευση των πρωτογενών ακολουθιών των STARR-Active και Silent στοιχείων.

Εξετάσαμε το μοτίβο κατανομής των θέσεων πρόσδεσης του παράγοντα IRF3 σε IRF-STARR-Active στοιχεία, τα οποία αντανακλούν ένα αυξημένο δυναμικό αυτών των στοιχείων να φιλοξενούν πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης για τον IRF3. Επιπλέον μετά από εξέταση ολόκληρων των ακολουθιών αλλά και των δομικών χαρακτηριστικών τους παρατηρήσαμε ότι ένα εκτεταμένο τμήμα των λειτουργικών IRF3-STARR-Active ενισχυτών αποτελείται από μοτίβα διατεταγμένα σε *cis* με επαναλαμβανόμενο τρόπο που θυμίζει τα ομοτυπικά συμπλέγματα των θέσεων πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων. Μελετώντας την ακριβή σύνταξη των παραπάνω λειτουργικών ενισχυτών εντοπίσαμε ότι τα νέα IRF3 λειτουργικά στοιχεία των ενισχυτών αποτελούνται από συμπλέγματα σε υψηλή συγκέντρωση. Έτσι, εκτελώντας *in silico* ανίχνευση και αναλύσεις στον αριθμό των IRF μοτίβων και τη σύνταξή τους σε IRF3-STARR-Active στοιχεία, αποκαλύψαμε μια προηγουμένως άγνωστη ομάδα σύνθετων ενισχυτών που έχουν θέσεις πρόσδεσης για τον IRF3. Επιπλέον, εξετάσαμε περιοχές του γονιδιώματος στις οποίες συναντάμε διατεταγμένα μοτίβα τα οποία δε διαθέτουν θέσεις πρόσδεσης για τον IRF3 σύμφωνα με τα IRF3-ChIP seq πειράματά μας.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις συνδέουν τη λειτουργία των IRF3-STARR ενισχυτών με το μηχανισμό της αντι-ιϊκής απόκρισης. Τα ομοτυπικά συμπλέγματα βρίσκονται τόσο σε εγγύς-TSS όσο και "σε απόσταση"-TSS στοιχεία σε διαφορετικά εξελικτικά είδη, αποτελώντας έτσι ένα διαδεδομένο χαρακτηριστικό των ευκαρυωτικών γονιδιωμάτων, και χαρακτηρίζονται από ένα εκτεταμένο τμήμα γειτονικών περιοχών πρόσδεσης για τον ίδιο μεταγραφικό παράγοντα ή για μια οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων (Giorgetti et al., 2010; Gotea et al., 2010). Το γεγονός πως αυτά συναντώνται τόσο στους προκαρυωτικούς όσο και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και τα ρυθμιστικά τοπία που φιλοξενούν αλληλουχίες ενισχυτών χαρακτηρίζονται από σημαντική εξελικτική συντήρηση (Bejerano et al., 2004), προχωρήσαμε προς μια στρατηγική βάση της εξελικτικής συντήρησης, Φυλογονιδιωματικό αποτύπωμα ανάλυσης (Phylogenomics Footprinting), ώστε να έχουμε μια καλύτερη κατανόηση για την εξελικτική προέλευση του λειτουργικού τμήματος του Repetitive-IRF3-Human-Anti-Viral Regulome. Έτσι καταφέραμε να ενσωματώσουμε αποτελέσματα που προέρχονται από την ανάλυση του συνόλων των NGS δεδομένων με το γονιδίωμα διαφορετικών οργανισμών. Η έκταση της εξελικτικής συντήρησης αλλά και η ποσότητα των IRF3 επαναλήψεων στο γονιδίωμα διάφορων οργανισμών θα μπορούσε να είναι ενδεικτικό χαρακτηριστικό της σημαντικότητάς τους, καθώς η συντήρηση αλληλουχιών και μοτίβων στο βάθος της εξελικτικής πορείας σε διάφορα είδη, μπορεί να υποδεικνύει τη σημαντική ρυθμιστική ή ενεργή λειτουργία αυτών των περιοχών. Υποθέσαμε πως η πιθανή υψηλή συντήρηση των IRF3 επαναλήψεων, θα μπορούσε να μεταφράζεται σε ένα σημαντικό και συντηρημένο λειτουργικό ρόλο που διαδραματίζουν στην αντι-ιϊκή απόκριση. Έτσι θα μπορούσε να αποκαλυφθεί ο βαθμός συντήρησης ιϊκά επαγόμενων ενισχυτών στην πορεία της εξέλιξης, γεγονός που μας προσδίδει σημαντικά στοιχεία για την εξελικτική τους προέλευση αλλά και για το βαθμό της λειτουργικότητάς τους.

Επιπλέον, προχωρήσαμε στη "σάρωση" των γονιδιωμάτων και εντοπίστηκε ένα ευρύ φάσμα περιοχών με αυξημένη ομοιότητα ακολουθιών. Παρατηρήσαμε πως το πρότυπο συντήρησης των περιοχών δεν παρουσίασε σημαντικές αλλαγές μεταξύ των διαφορετικών ειδών. Έτσι, συμπεράναμε πως καθ' όλη τη διάρκεια της εξέλιξης τα ομοτυπικά συμπλέγματα των θέσεων πρόσδεσης του IRF3 είναι χαρακτηριστικά των γονιδιωμάτων, καθώς διατηρούνται σε μεγάλο βαθμό σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς (ασπόνδυλα, σπονδυλωτά, φυτά) αλλά και σε προκαρυωτικούς και μονοκύτταρους οργανισμούς (μικρόβια, παράσιτα και βακτήρια), ακόμη και στους ιούς.

Στη συνέχεια, προκειμένου να μελετηθεί συστηματικά η λειτουργία των συντηρημένων αλληλουχιών από τους παραπάνω διαφορετικούς οργανισμούς σε ανθρώπινα κύτταρα αλλά και να διαπιστωθεί αν αυτές οι αλληλουχίες παρουσιάζουν και συντηρημένη ενεργότητα ενισχυτών, προβήκαμε σε κλωνοποίηση σε φορείς STARR. Έγινε διαμόλυνση σε κύτταρα HeLa και παρακολουθήσαμε την ικανότητά τους να ενεργοποιούν την έκφραση του γονίδιο αναφοράς GFP in vivo. Τα αποτελέσματα μας αποκάλυψαν σημαντικά επίπεδα συντήρησης μεταξύ των λειτουργικών αντι-ιϊκών ενισχυτών στον άνθρωπο και των γονιδιωματικών αλληλουχιών πολυάριθμων διαφορετικών οργανισμών. Οι ενισχυτές αυτοί μπορούν να ενεργοποιηθούν μετά την ιϊκή μόλυνση σε ανθρώπινα κύτταρα. Συγκεκριμένα, στο ποντίκι ένας μεγάλος αριθμός συντηρημένων αλληλουχιών λειτουργεί ως ιϊκά επαγόμενοι ενισχυτές σε ανθρώπινα κύτταρα. Επίσης, παρατηρήσαμε ότι στο Zebrafish γονιδίωμα αλλά και στο γονιδίωμα της Drosophila ένας σημαντικός αριθμός συντηρημένων επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών μπορεί και λειτουργεί ως ιϊκά επαγόμενη ενισχυτές σε ανθρώπινα κύτταρα. Το ευρύ αυτό πρότυπο της συντήρησης αυτών των στοιχείων, ακόμη και σε μικροβιακούς οργανισμούς και ιούς,

υπογραμμίζει την πορεία τους στην εξέλιξη καθώς και την αρχαία προέλευσή τους. Αυτή είναι μία από τις λίγες φορές που οι ενισχυτές διατηρούνται συντηρημένοι σε διαφορετικά Φύλα και οι αλληλουχίες με την αρχέγονη προέλευση φαίνεται να λειτουργούν ως ρυθμιστές της ανθρώπινης επαγώγιμης γονιδιακής έκφρασης κατά την αντι-ιϊκή κυτταρική απόκριση.

Τα αποτελέσματα μας συνολικά και η δημιουργία του ΆΤΛΑΝΤΑ των ιϊκών μολύνσεων θα μπορούσαμε να πούμε πως είναι ένα πρώτο πολύ σημαντικό βήμα στη λεπτομερή και καλύτερη κατανόηση των πολύπλοκων μηχανισμών της αντι-ιϊκής απόκρισης. Χρησιμοποιήσαμε δεδομένα από πολυεπίπεδες αναλύσεις διαφορετικών τύπων και τεχνικών σε μια προσπάθεια να προσεγγίσουμε ολιστικά το πολύ σημαντικό ερώτημα της ανοσολογικής και αντι-ιϊκής απόκρισης και τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, γεγονός που αποτελεί ένα πολύ σημαντικό στοιχείο το οποίο ενισχύει τη σημαντικότητα της έρευνας αυτής σε σχέση με υπάρχουσες μελέτες, οι επικεντρώνονταν μελετήσουν ξεχωριστά οποίες στο vα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Η μελέτη αυτή ανοίγει ένα νέο παράθυρο στο πεδίο της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης και της αντι-ϊικής απόκρισης παραθέτοντας ταυτόχρονα διαφορετικών ειδών δεδομένα, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν βάση στην περαιτέρω έρευνα και διαλεύκανση σημαντικών ερωτημάτων. Επίσης γεννούν ταυτόχρονα και ένα πλήθος νέων ερωτημάτων τα οποία θα μπορούσαν να εξεταστούν με την προσθήκη επιπλέον τεχνικών τελευταίας τεχνολογίας. Για παράδειγμα, με τις τελευταίες εξελίξεις και τη διαρκώς βελτιωμένη CRISPR-Cas τεχνική, θα μπορούσαμε να πραγματοποιήσουμε πειράματα ώστε να επέμβουμε σε συγκεκριμένες γονιδιακές περιοχές και να μπορέσουμε να μελετήσουμε την επίδραση των γονιδιακών μετατροπών ώστε να επιβεβαιώσουμε και να ερευνήσουμε καλύτερα την πλήρης λειτουργικότητα των εν λόγω περιοχών και εν δυνάμει ενισχυτών σε διάφορες κυτταρικές σειρές. Επίσης, τεχνικές βασισμένες στη χωροταξική κατανομή της χρωματίνης και στις αλληλεπιδράσεις των περιοχών αυτών (Chromosome Conformation τεχνικές όπως Hi-C και Capture-C), θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για να μελετήσουμε τις αλληλεπιδράσεις των περιοχών αυτών και να εντοπίσουμε επιπλέον σημαντικές περιοχές που με τη σειρά εμπλέκονται στους μηχανισμούς ρύθμισης της έκφρασης στην αντι-ιϊκή απόκριση. Στη μελέτη αυτή τα αποτελέσματά μας είναι βασισμένα σε πληθυσμούς κυττάρων και μας δίνουν τη γενικότερη εικόνα που είναι βασισμένη σε ένα μέσο όρο από εκατομμύρια κύτταρα.

Οι ασθένειες που προκαλούνται από ιογενείς μολύνσεις αποτελούν σοβαρή απειλή για τη δημόσια υγεία και βρίσκονται στις πρώτες θέσεις των μολυσματικών φαινομένων, οι οποίες επηρεάζουν σε τεράστιο βαθμό την Παγκόσμια Υγεία. Χαρακτηριστικό πρόσφατο παράδειγμα αποτελεί η εξάπλωση του SARS-CoV-2 και η επακόλουθη ανάπτυξη της πανδημίας COVID-19, υπογραμμίζοντας τις άκρως επιβλαβείς επιδράσεις που έχουν οι ιοί στην ανθρώπινη υγεία. Οι παράγοντες αυτοί απειλόν την υγεία αποφέροντας δραματικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία και κατ' επέκταση σε ολόκληρη την κοινωνία με απρόβλεπτες συνέπειες στον υγειονομικό αλλά και στον κοινωνικό-οικονομικό τομέα, σε ολόκληρο τον κόσμο. Για το λόγο αυτό κρίνεται άκρως σημαντική η κατανόηση των βασικών μοριακών μηχανισμών που χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια των ιϊκών μολύνσεων σε ανθρώπινα κύτταρα. Υπάρχει επείγουσα ανάγκη για μια εις βάθος εξέταση των μοριακών μηχανισμών που συμβαίνουν σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος, ώστε να κατανοηθεί η μοριακή και γενετική βάση των διάφορων εκφάνσεων των νόσων που προκαλούνται από ιούς.

Με βάση όλα τα παραπάνω η ολοκλήρωση της διδακτορικής αυτής διατριβής οδηγεί στη λεπτομερέστερη παρατήρηση του μηχανισμού που χρησιμοποιούν τα ανθρώπινα κύτταρα για να αποκριθούν στη διάρκεια των ιϊκών μολύνσεων. Θέτει επίσης τις βάσεις για περαιτέρω διερεύνησή τους καθώς και στην ανακάλυψη άγνωστων ως σήμερα στοιχείων αυτής της διαδικασίας. Η αποκωδικοποίηση της ρυθμιστικής λογικής πίσω από την αναδιαμόρφωση του γονιδιώματος μετά από ιϊκή μόλυνση θα οδηγήσει σε βαθύτερη κατανόηση των βασικών αρχών οργάνωσης του γονιδιώματος και στη δυνατότητα πρόβλεψης της απόκρισης των ασθενών σε θεραπευτικές και προληπτικές αγωγές με απώτερο σκοπό στο μέλλον να εφαρμόζονται σε εξατομικευμένη βάση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Afgan E, Baker D, Batut B, van den Beek M, Bouvier D, Cech M, Chilton J, Clements D, Coraor N, Grüning BA, Guerler A, Hillman-Jackson J, Hiltemann S, Jalili V, Rasche H, Soranzo N, Goecks J, Taylor J, Nekrutenko A, Blankenberg D. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. Nucleic Acids Res. 2018 Jul 2;46(W1):W537-W544.

Agalioti T, Chen G, Thanos D. Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. Cell. 2002 Nov 1;111(3):381-92.

Agalioti T, Lomvardas S, Parekh B, Yie J, Maniatis T, Thanos D. Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter. Cell. 2000 Nov 10;103(4):667-78.

Agelopoulos M, McKay DJ, Mann RS. Developmental regulation of chromatin conformation by Hox proteins in Drosophila. Cell Rep. 2012 Apr 19;1(4):350-9.

Agelopoulos M, Thanos D. Epigenetic determination of a cell-specific gene expression program by ATF-2 and the histone variant macroH2A. EMBO J. 2006 Oct 18;25(20):4843-53.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. Molecular biology of the cell. 4th edition. 2002. Published by Garland Science. New York London.

Alexoudi I, Kapsimali V, Vaiopoulos A, Kanakis M, Vaiopoulos G. Toll-like receptors pathways implication in common autoimmune diseases and therapeutic perspectives. G Ital Dermatol Venereol. 2015 Apr;150(2):255-60.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990 Oct 5;215(3):403-10.

Ambrosini G, Groux R, Bucher P. PWMScan: a fast tool for scanning entire genomes with a position-specific weight matrix. Bioinformatics. 2018 Jul 15;34(14):2483-2484.

Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. Genome Biol. 2010;11(10):R106.

Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. Bioinformatics. 2015 Jan 15;31(2):166-9.

Apostolou E, Thanos D. Linking differential chromatin loops to transcriptional decisions. Mol Cell. 2008 Feb 1;29(2):154-6.

Apostolou E, Thanos D. Virus Infection Induces NF-kappaB-dependent interchromosomal associations mediating monoallelic IFN-beta gene expression. Cell. 2008 Jul 11;134(1):85-96.

Arnold CD, Gerlach D, Stelzer C, Boryń ŁM, Rath M, Stark A. Genome-wide quantitative enhancer activity maps identified by STARR-seq. Science. 2013 Mar 1;339(6123):1074-7.

Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. Expert Rev Mol Diagn. 2005 Mar;5(2):209-19.
Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. Nat Genet. 2000 May;25(1):25-9.

Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. FEBS Lett. 1992 Jul 27;307(1):97-101.

Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, Ren J, Li WW, Noble WS. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. Nucleic Acids Res. 2009 Jul;37(Web Server issue):W202-8.

Balestrieri C, Alfarano G, Milan M, Tosi V, Prosperini E, Nicoli P, Palamidessi A, Scita G, Diaferia GR, Natoli G. Co-optation of Tandem DNA Repeats for the Maintenance of Mesenchymal Identity. Cell. 2018 May 17;173(5):1150-1164.e14.

Banerjee AR, Kim YJ, Kim TH. A novel virus-inducible enhancer of the interferon- β gene with tightly linked promoter and enhancer activities. Nucleic Acids Res. 2014 Nov 10;42(20):12537-54.

Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. Cell Res. 2011 Mar;21(3):381-95.

Barakat TS, Halbritter F, Zhang M, Rendeiro AF, Perenthaler E, Bock C, Chambers I. Functional Dissection of the Enhancer Repertoire in Human Embryonic Stem Cells. Cell Stem Cell. 2018 Aug 2;23(2):276-288.e8.

Barski A, Cuddapah S, Cui K, et al. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. Cell. 2007;129:823-837.

Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? Arch Dis Child Educ Pract Ed. 2013 Dec;98(6):236-8.

Bejerano G, Pheasant M, Makunin I, Stephen S, Kent WJ, Mattick JS, Haussler D. Ultraconserved elements in the human genome. Science. 2004 May 28;304(5675):1321-5.

Benjamini, Y., Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. Journal of the Royal Statistical Society. 1995. Series B Methodological, 57(1), 289-300.

Berger SL. The complex language of chromatin regulation during transcription. Nature. 2007 May 24;447(7143):407-12.

Billiald P, Goyffon M. PCR: principe et perspectives en biologie clinique [PCR: principles and prospects in clinical biology]. Ann Pharm Fr. 1995;53(4):155-62.

Birnbaum RY, Clowney EJ, Agamy O, Kim MJ, Zhao J, Yamanaka T, Pappalardo Z, Clarke SL, Wenger AM, Nguyen L, Gurrieri F, Everman DB, Schwartz CE, Birk OS, Bejerano G, Lomvardas S, Ahituv N. Coding exons function as tissue-specific enhancers of nearby genes. Genome Res. 2012 Jun;22(6):1059-68.

Black JC, Van Rechem C, Whetstine JR. Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact. Mol Cell. 2012 Nov 30;48(4):491-507.

Boeva V, Surdez D, Guillon N, Tirode F, Fejes AP, Delattre O, Barillot E. De novo motif identification improves the accuracy of predicting transcription factor binding sites in ChIP-Seq data analysis. Nucleic Acids Res. 2010 Jun;38(11):e126.

Bonn S, Zinzen RP, Girardot C, Gustafson EH, Perez-Gonzalez A, Delhomme N, Ghavi-Helm Y, Wilczyński B, Riddell A, Furlong EE. Tissue-specific analysis of chromatin state identifies temporal signatures of enhancer activity during embryonic development. Nat Genet. 2012 Jan 8;44(2):148-56.

Borghini L, Hibberd M, Davila S. Changes in H3K27ac following lipopolysaccharide stimulation of nasopharyngeal epithelial cells. BMC Genomics. 2018 Dec 27;19(1):969.

Britannica Encyclopaedia, The Editors. Polymerase Chain Reaction. Encyclopaedia Britannica. April 18, 2019. Available from: <u>https://www.britannica.com/science/polymerase-chain-reaction.</u>

Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. J Mol Endocrinol. 2005 Jun;34(3):597-601.

Butler JE, Kadonaga JT. Enhancer-promoter specificity mediated by DPE or TATA core promoter motifs. Genes Dev. 2001 Oct 1;15(19):2515-9.

Calo E, Wysocka J. Modification of enhancer chromatin: what, how, and why? Mol Cell. 2013 Mar 7;49(5):825-37.

Catarino RR, Stark A. Assessing sufficiency and necessity of enhancer activities for gene expression and the mechanisms of transcription activation. Genes Dev. 2018 Feb 1;32(3-4):202-223.

Chen W, Lin H, Chou KC. Pseudo nucleotide composition or PseKNC: an effective formulation for analyzing genomic sequences. Mol Biosyst. 2015 Oct;11(10):2620-34.

Cheng H, Dou X, Han JD. Understanding super-enhancers. Sci China Life Sci. 2016 Mar;59(3):277-80.

Claussnitzer M, Dankel SN, Kim KH, Quon G, Meuleman W, Haugen C, Glunk V, Sousa IS, Beaudry JL, Puviindran V, Abdennur NA, Liu J, Svensson PA, Hsu YH, Drucker DJ, Mellgren G, Hui CC, Hauner H, Kellis M. FTO Obesity Variant Circuitry and Adipocyte Browning in Humans. N Engl J Med. 2015 Sep 3;373(10):895-907. Corney, D., Basturea G. RNA-seq Using Next Generation Sequencing A comprehensive review of RNA-seq methodologies. MATER METHODS 2013 2016.

Creyghton MP, Cheng AW, Welstead GG, Kooistra T, Carey BW, Steine EJ, Hanna J, Lodato MA, Frampton GM, Sharp PA, Boyer LA, Young RA, Jaenisch R. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Dec 14;107(50):21931-6.

Crick FH. On protein synthesis. Symp Soc Exp Biol. 1958;12:138-63.

Crick FH. Central dogma of molecular biology. Nature. 1970 Aug 8;227(5258):561-3.

Dao LTM, Galindo-Albarrán AO, Castro-Mondragon JA, Andrieu-Soler C, Medina-Rivera A, Souaid C, Charbonnier G, Griffon A, Vanhille L, Stephen T, Alomairi J, Martin D, Torres M, Fernandez N, Soler E, van Helden J, Puthier D, Spicuglia S. Genome-wide characterization of mammalian promoters with distal enhancer functions. Nat Genet. 2017 Jul;49(7):1073-1081.

Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ, Ciccarone VC. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. Methods. 2004 Jun;33(2):95-103.

Eichenlaub MP, Ettwiller L. De novo genesis of enhancers in vertebrates. PLoS Biol. 2011 Nov;9(11):e1001188.

Elgin SC. Chromatin structure and gene activity. Curr Opin Cell Biol. 1990 Jun;2(3):437-45.

Elgin SC. DNAase I-hypersensitive sites of chromatin. Cell. 1981 Dec;27(3 Pt 2):413-5.

ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. Nature. 2012 Sep 6;489(7414):57-74.

Engel KL, Mackiewicz M, Hardigan AA, Myers RM, Savic D. Decoding transcriptional enhancers: Evolving from annotation to functional interpretation. Semin Cell Dev Biol. 2016 Sep;57:40-50.

Faísca P, Desmecht D. Sendai virus, the mouse parainfluenza type 1: a longstanding pathogen that remains up-to-date. Res Vet Sci. 2007 Feb;82(1): 115-25.

Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. Annual Rev Immunol. 1993;11:571-611.

Feng J, Liu T, Qin B, Zhang Y, Liu XS. Identifying ChIP-seq enrichment using MACS. Nat Protoc. 2012 Sep;7(9):1728-40.

Fensterl V, Sen GC. Interferons and viral infections. Biofactors. 2009 Jan-Feb;35(1):14-20.

Flecknell PA, Parry R, Needham JR, Ridley RM, Baker HF, Bowes P. Respiratory disease associated with parainfluenza Type I (Sendai) virus in a colony of marmosets (Callithrix jacchus). Lab Anim. 1983 Apr;17(2): 111-3.

Ford E, Thanos D. The transcriptional code of human IFN-beta gene expression. Biochim Biophys Acta. 2010 Mar-Apr;1799(3-4):328-36.

Ford E, Nikopoulou C, Kokkalis A, Thanos D. A method for generating highly multiplexed ChIP-seq libraries. BMC Res Notes. 2014 May 22;7:312.

Frankish A, Diekhans M, Ferreira AM, Johnson R, Jungreis I, Loveland J, Mudge JM, Sisu C, Wright J, Armstrong J, Barnes I, Berry A, Bignell A, Carbonell Sala S, Chrast J,

Cunningham F, Di Domenico T, Donaldson S, Fiddes IT, García Girón C, Gonzalez JM, Grego T, Hardy M, Hourlier T, Hunt T, Izuogu OG, Lagarde J, Martin FJ, Martínez L, Mohanan S, Muir P, Navarro FCP, Parker A, Pei B, Pozo F, Ruffier M, Schmitt BM, Stapleton E, Suner MM, Sycheva I, Uszczynska-Ratajczak B, Xu J, Yates A, Zerbino D, Zhang Y, Aken B, Choudhary JS, Gerstein M, Guigó R, Hubbard TJP, Kellis M, Paten B, Reymond A, Tress ML, Flicek P. GENCODE reference annotation for the human and mouse genomes. Nucleic Acids Res. 2019 Jan 8;47(D1):D766-D773.

Freaney JE, Kim R, Mandhana R, Horvath CM. Extensive cooperation of immune master regulators IRF3 and NFκB in RNA Pol II recruitment and pause release in human innate antiviral transcription. Cell Rep. 2013 Sep 12;4(5):959-73.

Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. Biotechniques. 1999 Jan;26(1):112-22, 124-5.

Fujita PA, Rhead B, Zweig AS, Hinrichs AS, Karolchik D, Cline MS, Goldman M, Barber GP, Clawson H, Coelho A, Diekhans M, Dreszer TR, Giardine BM, Harte RA, Hillman-Jackson J, Hsu F, Kirkup V, Kuhn RM, Learned K, Li CH, Meyer LR, Pohl A, Raney BJ, Rosenbloom KR, Smith KE, Haussler D, Kent WJ. The UCSC Genome Browser database: update 2011. Nucleic Acids Res. 2011 Jan;39(Database issue):D876-82.

Furey TS. ChIP-seq and beyond: new and improved methodologies to detect and characterize protein-DNA interactions. Nat Rev Genet. 2012 Dec;13(12):840-52.

Gasperini M, Hill AJ, McFaline-Figueroa JL, Martin B, Kim S, Zhang MD, Jackson D, Leith A, Schreiber J, Noble WS, Trapnell C, Ahituv N, Shendure J. A Genome-wide Framework for Mapping Gene Regulation via Cellular Genetic Screens. Cell. 2019 Jan 10;176(1-2):377-390.e19.

Gasser SM. Visualizing chromatin dynamics in interphase nuclei. Science. 2002 May 24;296(5572):1412-6.

Gaulton KJ, Nammo T, Pasquali L, Simon JM, Giresi PG, Fogarty MP, Panhuis TM, Mieczkowski P, Secchi A, Bosco D, Berney T, Montanya E, Mohlke KL, Lieb JD, Ferrer J. A map of open chromatin in human pancreatic islets. Nat Genet. 2010 Mar;42(3):255-9.

Gemayel R, Vinces MD, Legendre M, Verstrepen KJ. Variable tandem repeats accelerate evolution of coding and regulatory sequences. Annual Rev Genet. 2010;44:445-77.

Giorgetti L, Siggers T, Tiana G, Caprara G, Notarbartolo S, Corona T, Pasparakis M, Milani P, Bulyk ML, Natoli G. Noncooperative interactions between transcription factors and clustered DNA binding sites enable graded transcriptional responses to environmental inputs. Mol Cell. 2010 Feb 12;37(3):418-28.

Giresi PG, Kim J, McDaniell RM, Iyer VR, Lieb JD. FAIRE (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements) isolates active regulatory elements from human chromatin. Genome Res. 2007 Jun;17(6):877-85.

Giresi PG, Lieb JD. Isolation of active regulatory elements from eukaryotic chromatin using FAIRE (Formaldehyde Assisted Isolation of Regulatory Elements). Methods. 2009 Jul;48(3):233-9.

Goodbourn S, Burstein H, Maniatis T. The human beta-interferon gene enhancer is under negative control. Cell. 1986 May 23;45(4):601-10.

Goodbourn S, Maniatis T. Overlapping positive and negative regulatory domains of the human beta-interferon gene. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Mar;85(5):1447-51.

Gotea V, Visel A, Westlund JM, Nobrega MA, Pennacchio LA, Ovcharenko I. Homotypic clusters of transcription factor binding sites are a key component of human promoters and enhancers. Genome Res. 2010 May;20(5):565-77.

Grace Adams. A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. The Biochemist. (2020). 42.10.

Green R, Rogers EJ. Transformation of chemically competent E. coli. Methods Enzymol. 2013;529:329-36.

Guillon N, Tirode F, Boeva V, Zynovyev A, Barillot E, Delattre O. The oncogenic EWS-FLI1 protein binds in vivo GGAA microsatellite sequences with potential transcriptional activation function. PLoS One. 2009;4(3):e4932.

Hager GL, McNally JG, Misteli T. Transcription dynamics. Mol Cell. 2009 Sep 24;35(6):741-53.

Hashimoto H, Vertino PM, Cheng X. Molecular coupling of DNA methylation and histone methylation. Epigenomics. 2010 Oct;2(5):657-69.

Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M, Herzenberg LA. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. Clin Chem. 2002 Oct;48(10):1819-27.

Heylbroeck C, Balachandran S, Servant MJ, DeLuca C, Barber GN, Lin R, Hiscott J. The IRF-3 transcription factor mediates Sendai virus-induced apoptosis. J Virol. 2000 Apr;74(8): 3781-92.

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology (N Y). 1993 Sep;11(9):1026-30.

Hnisz D, Abraham BJ, Lee TI, Lau A, Saint-André V, Sigova AA, Hoke HA, Young RA. Super-enhancers in the control of cell identity and disease. Cell. 2013 Nov 7;155(4):934-47.

Hogan GJ, Lee CK, Lieb JD. Cell cycle-specified fluctuation of nucleosome occupancy at gene promoters. PLoS Genet. 2006 Sep 22;2(9):e158.

Honda K, Taniguchi T. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. Nat Rev Immunol. 2006 Sep;6(9):644-58.

Horn PJ, Peterson CL. Molecular biology. Chromatin higher order folding--wrapping up transcription. Science. 2002 Sep 13;297(5588):1824-7.

Houghton SG, Cockerill FR 3rd. Real-time PCR: overview and applications. Surgery. 2006 Jan;139(1):1-5.

Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nat Protoc. 2009;4(1):44-57.

Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. Genes Immun. 2005 Jun;6(4):279-84.

Hyun K, Jeon J, Park K, Kim J. Writing, erasing and reading histone lysine methylations. Exp Mol Med. 2017 Apr 28;49(4):e324.

Inoue F, Ahituv N. Decoding enhancers using massively parallel reporter assays. Genomics. 2015 Sep;106(3):159-164.

Israël A. The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010 Mar;2(3):a000158.

John S, Sabo PJ, Canfield TK, Lee K, Vong S, Weaver M, Wang H, Vierstra J, Reynolds AP, Thurman RE, Stamatoyannopoulos JA. Genome-scale mapping of DNase I hypersensitivity. Curr Protoc Mol Biol. 2013 Jul;Chapter 27:Unit 21.27.

John S, Sabo PJ, Thurman RE, Sung MH, Biddie SC, Johnson TA, Hager GL, Stamatoyannopoulos JA. Chromatin accessibility pre-determines glucocorticoid receptor binding patterns. Nat Genet. 2011 Mar;43(3):264-8.

Jozefczuk J, Adjaye J. Quantitative real-time PCR-based analysis of gene expression. Methods Enzymol. 2011;500:99-109.

Karin M. Too many transcription factors: positive and negative interactions. New Biol. 1990 Feb;2(2):126-31.

Kato H, Fujita T. RIG-I-like receptors and autoimmune diseases. Curr Opin Immunol. 2015 Dec;37:40-5.

Katze MG, He Y, Gale M Jr. Viruses and interferon: a fight for supremacy. Nat Rev Immunol. 2002 Sep;2(9):675-87.

Kawasaki H, Schiltz L, Chiu R, Itakura K, Taira K, Nakatani Y, Yokoyama KK. ATF-2 has intrinsic histone acetyltransferase activity which is modulated by phosphorylation. Nature. 2000 May 11;405(6783):195-200.

Kessler DS, Levy DE, Darnell JE Jr. Two interferon-induced nuclear factors bind a single promoter element in interferon-stimulated genes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Nov;85(22):8521-5.

Kharchenko PV, Tolstorukov MY, Park PJ. Design and analysis of ChIP-seq experiments for DNA-binding proteins. Nat Biotechnol. 2008 Dec;26(12):1351-9.

Kheradpour P, Ernst J, Melnikov A, Rogov P, Wang L, Zhang X, Alston J, Mikkelsen TS, Kellis M. Systematic dissection of regulatory motifs in 2000 predicted human enhancers using a massively parallel reporter assay. Genome Res. 2013 May;23(5):800-11.

Kim YZ. Altered histone modifications in gliomas. Brain Tumor Res Treat. 2014 Apr;2(1):7-21.

Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. Genome Biol. 2013 Apr 25;14(4):R36.

Koch CM, Chiu SF, Akbarpour M, Bharat A, Ridge KM, Bartom ET, Winter DR. A Beginner's Guide to Analysis of RNA Sequencing Data. Am J Respir Cell Mol Biol. 2018 Aug;59(2):145-157.

Kolmodin LA, Williams JF. PCR. Basic principles and routine practice. Methods Mol Biol. 1997;67:3-15.

Kornberg RD. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. Science. 1974 May 24;184(4139):868-71.

Koutroubas G, Merika M, Thanos D. Bypassing the requirements for epigenetic modifications in gene transcription by increasing enhancer strength. Mol Cell Biol. 2008 Feb;28(3):926-38.

Kouzarides T. Histone methylation in transcriptional control. Curr Opin Genet Dev. 2002 Apr;12(2):198-209.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med. 2006 Apr-Jun;27(2-3):95-125.

Kukurba KR, Montgomery SB. RNA Sequencing and Analysis. Cold Spring Harb Protoc. 2015 Apr 13;2015(11):951-69.

Kulakovskiy IV, Boeva VA, Favorov AV, Makeev VJ. Deep and wide digging for binding motifs in ChIP-Seq data. Bioinformatics. 2010 Oct 15;26(20):2622-3.

Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, Fernandez NF, Duan Q, Wang Z, Koplev S, Jenkins SL, Jagodnik KM, Lachmann A, McDermott MG, Monteiro CD, Gundersen GW, Ma'ayan A. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. Nucleic Acids Res. 2016 Jul 8;44(W1):W90-7.

Kvon EZ, Kazmar T, Stampfel G, Yáñez-Cuna JO, Pagani M, Schernhuber K, Dickson BJ, Stark A. Genome-scale functional characterization of Drosophila developmental enhancers in vivo. Nature. 2014 Aug 7;512(7512):91-5.

Laajala TD, Raghav S, Tuomela S, Lahesmaa R, Aittokallio T, Elo LL. A practical comparison of methods for detecting transcription factor binding sites in ChIP-seq experiments. BMC Genomics. 2009 Dec 18;10:618.

Landt SG, Marinov GK, Kundaje A, Kheradpour P, Pauli F, Batzoglou S, Bernstein BE, Bickel P, Brown JB, Cayting P, Chen Y, DeSalvo G, Epstein C, Fisher-Aylor KI, Euskirchen G, Gerstein M, Gertz J, Hartemink AJ, Hoffman MM, Iyer VR, Jung YL, Karmakar S, Kellis M, Kharchenko PV, Li Q, Liu T, Liu XS, Ma L, Milosavljevic A, Myers RM, Park PJ, Pazin MJ, Perry MD, Raha D, Reddy TE, Rozowsky J, Shoresh N, Sidow A, Slattery M, Stamatoyannopoulos JA, Tolstorukov MY, White KP, Xi S, Farnham PJ, Lieb JD, Wold BJ, Snyder M. ChIP-seq guidelines and practices of the ENCODE and modENCODE consortia. Genome Res. 2012 Sep;22(9):1813-31. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nat Methods. 2012 Mar 4;9(4):357-9.

Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. Genome Biol. 2009;10(3):R25.

Latchman DS. Transcription factors: an overview. Int J Biochem Cell Biol. 1997 Dec;29(12):1305-12.

Lavigne MD, Vatsellas G, Polyzos A, Mantouvalou E, Sianidis G, Maraziotis I, Agelopoulos M, Thanos D. Composite macroH2A/NRF-1 Nucleosomes Suppress Noise and Generate Robustness in Gene Expression. Cell Rep. 2015 May 19;11(7):1090-101.

Lee TI, Young RA. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. Annual Rev Genet. 2000;34:77-137.

Lehrmann H, Pritchard LL, Harel-Bellan A. Histone acetyl-transferases and deacetylases in the control of cell proliferation and differentiation. Adv Cancer Res. 2002;86:41-65.

Lenardo MJ, Baltimore D. NF-kappa B: a pleiotropic mediator of inducible and tissuespecific gene control. Cell. 1989 Jul 28;58(2):227-9.

Lewis BA, Reinberg D. The mediator coactivator complex: functional and physical roles in transcriptional regulation. J Cell Sci. 2003 Sep 15;116(Pt 18):3667-75.

Li B, Carey M, Workman JL. The role of chromatin during transcription. Cell. 2007 Feb 23;128(4):707-19.

Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. Bioinformatics. 2009 Aug 15;25(16):2078-9.

Li X, Massa PE, Hanidu A, Peet GW, Aro P, Savitt A, Mische S, Li J, Marcu KB. IKKalpha, IKKbeta, and NEMO/IKKgamma are each required for the NF-kappa B-mediated inflammatory response program. J Biol Chem. 2002 Nov 22;277(47):45129-40.

Lim Y, Su CH, Liao YC, Lee SY. Impedimetric analysis on the mass transfer properties of intact and competent E. coli cells. Biochim Biophys Acta Biomembr. 2019 Jan;1861(1):9-16.

Lin R, Heylbroeck C, Pitha PM, Hiscott J. Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. Mol Cell Biol. 1998 May;18(5):2986-96.

Lindgreen S. AdapterRemoval: easy cleaning of next-generation sequencing reads. BMC Res Notes. 2012 Jul 2;5:337.

Liu F, Qi H, Huang L, Liu D. Factors controlling the efficiency of cationic lipidmediated transfection in vivo via intravenous administration. Gene Ther. 1997 Jun;4(6):517-23.

Lomvardas S, Thanos D. Opening chromatin. Mol Cell. 2002 Feb;9(2):209-11.

Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biol. 2014;15(12):550.

Lu Q, Richardson B. DNaseI hypersensitivity analysis of chromatin structure. Methods Mol Biol. 2004;287:77-86. Luger K. Structure and dynamic behavior of nucleosomes. Curr Opin Genet Dev. 2003 Apr;13(2):127-35.

Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. Nature. 1997 Sep 18;389(6648):251-60.

Maekawa S, Suzuki A, Sugano S, Suzuki Y. RNA sequencing: from sample preparation to analysis. Methods Mol Biol. 2014;1164:51-65.

Male G, von Appen A, Glatt S, Taylor NM, Cristovao M, Groetsch H, Beck M, Müller CW. Architecture of TFIIIC and its role in RNA polymerase III pre-initiation complex assembly. Nat Commun. 2015 Jun 10;6:7387.

Mamane Y, Heylbroeck C, Génin P, Algarté M, Servant MJ, LePage C, DeLuca C, Kwon H, Lin R, Hiscott J. Interferon regulatory factors: the next generation. Gene. 1999 Sep 3;237(1):1-14.

Maniatis T, Weintraub H. Gene expression and differentiation. Curr Opin Genet Dev. 1992 Apr;2(2):197-8.

Maurano MT, Humbert R, Rynes E, Thurman RE, Haugen E, Wang H, Reynolds AP, Sandstrom R, Qu H, Brody J, Shafer A, Neri F, Lee K, Kutyavin T, Stehling-Sun S, Johnson AK, Canfield TK, Giste E, Diegel M, Bates D, Hansen RS, Neph S, Sabo PJ, Heimfeld S, Raubitschek A, Ziegler S, Cotsapas C, Sotoodehnia N, Glass I, Sunyaev SR, Kaul R, Stamatoyannopoulos JA. Systematic localization of common diseaseassociated variation in regulatory DNA. Science. 2012 Sep 7;337(6099):1190-5.

Maurisse R, De Semir D, Emamekhoo H, Bedayat B, Abdolmohammadi A, Parsi H, Gruenert DC. Comparative transfection of DNA into primary and transformed mammalian cells from different lineages. BMC Biotechnol. 2010 Feb 8;10:9. McLean CY, Bristor D, Hiller M, Clarke SL, Schaar BT, Lowe CB, Wenger AM, Bejerano G. GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions. Nat Biotechnol. 2010 May;28(5):495-501.

Melchjorsen J, Kristiansen H, Christiansen R, Rintahaka J, Matikainen S, Paludan SR, Hartmann R. Differential regulation of the OASL and OAS1 genes in response to viral infections. J Interferon Cytokine Res. 2009 Apr;29(4):199-207.

Melnikov A, Murugan A, Zhang X, Tesileanu T, Wang L, Rogov P, Feizi S, Gnirke A, Callan CG Jr, Kinney JB, Kellis M, Lander ES, Mikkelsen TS. Systematic dissection and optimization of inducible enhancers in human cells using a massively parallel reporter assay. Nat Biotechnol. 2012 Feb 26;30(3):271-7.

Merika M, Thanos D. Enhanceosomes. Curr Opin Genet Dev. 2001 Apr;11(2):205-8.

Mi H, Muruganujan A, Casagrande JT, Thomas PD. Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. Nat Protoc. 2013 Aug;8(8):1551-66.

Miyamoto M, Fujita T, Kimura Y, Maruyama M, Harada H, Sudo Y, Miyata T, Taniguchi T. Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements. Cell. 1988 Sep 9;54(6):903-13.

Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. Nat Methods. 2008 Jul;5(7):621-8.

Muerdter F, Boryń ŁM, Arnold CD. STARR-seq - principles and applications. Genomics. 2015 Sep;106(3):145-150.

Mukhopadhyay T, Roth JA. Silicone lubricant enhances recovery of nucleic acids after phenol-chloroform extraction. Nucleic Acids Res. 1993 Feb 11;21(3):781-2.

Munshi N, Yie Y, Merika M, Senger K, Lomvardas S, Agalioti T, Thanos D. The IFNbeta enhancer: a paradigm for understanding activation and repression of inducible gene expression. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1999;64:149-59.

Murakami K, Elmlund H, Kalisman N, Bushnell DA, Adams CM, Azubel M, Elmlund D, Levi-Kalisman Y, Liu X, Gibbons BJ, Levitt M, Kornberg RD. Architecture of an RNA polymerase II transcription pre-initiation complex. Science. 2013 Nov 8;342(6159):1238724.

Nagy PL, Price DH. Formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med. 2009 Nov-Dec;1(3):400-406.

Nguyen NTT, Contreras-Moreira B, Castro-Mondragon JA, Santana-Garcia W, Ossio R, Robles-Espinoza CD, Bahin M, Collombet S, Vincens P, Thieffry D, van Helden J, Medina-Rivera A, Thomas-Chollier M. RSAT 2018: regulatory sequence analysis tools 20th anniversary. Nucleic Acids Res. 2018 Jul 2;46(W1):W209-W214.

Nikolov DB, Burley SK. RNA polymerase II transcription initiation: a structural view. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Jan 7;94(1):15-22.

Nolis IK, McKay DJ, Mantouvalou E, Lomvardas S, Merika M, Thanos D. Transcription factors mediate long-range enhancer-promoter interactions. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Dec 1;106(48):20222-7.

Noll M. Subunit structure of chromatin. Nature. 1974 Sep 20;251(5472):249-51. Oudet P, Gross-Bellard M, Chambon P. Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. Cell. 1975 Apr;4(4):281-300.

Orlando V, Strutt H, Paro R. Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking. Methods. 1997 Feb;11(2):205-14.

Ozsolak F, Milos PM. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. Nat Rev Genet. 2011 Feb;12(2):87-98.

Panne D, Maniatis T, Harrison SC. An atomic model of the interferon-beta enhanceosome. Cell. 2007 Jun 15;129(6):1111-23.

Park PJ. ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. Nat Rev Genet. 2009 Oct;10(10):669-80.

Peirson SN, Butler JN. RNA extraction from mammalian tissues. Methods Mol Biol. 2007;362:315-27.

Peñalosa-Ruiz G, Bright AR, Mulder KW, Veenstra GJC. The interplay of chromatin and transcription factors during cell fate transitions in development and reprogramming. Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech. 2019 Sep;1862(9):194407.

Pennacchio LA, Bickmore W, Dean A, Nobrega MA, Bejerano G. Enhancers: five essential questions. Nat Rev Genet. 2013 Apr;14(4):288-95.

Pervolaraki K, Rastgou Talemi S, Albrecht D, Bormann F, Bamford C, Mendoza JL, Garcia KC, McLauchlan J, Höfer T, Stanifer ML, Boulant S. Differential induction of interferon stimulated genes between type I and type III interferons is independent of interferon receptor abundance. PLoS Pathog. 2018 Nov 28;14(11):e1007420.

Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. Immunol Rev. 2004 Dec;202:8-32.

Podnar J, Deiderick H, Huerta G, Hunicke-Smith S. Next-Generation Sequencing RNA-Seq Library Construction. Curr Protoc Mol Biol. 2014 Apr 14;106:4.21.1-19. Poss ZC, Ebmeier CC, Taatjes DJ. The Mediator complex and transcription regulation. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2013 Nov-Dec;48(6):575-608. Ptashne M, Gann AA. Activators and targets. Nature. 1990 Jul 26;346(6282):329-31.

Quinlan AR, Hall IM. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. Bioinformatics. 2010 Mar 15;26(6):841-2.

Ramírez F, Dündar F, Diehl S, Grüning BA, Manke T. deepTools: a flexible platform for exploring deep-sequencing data. Nucleic Acids Res. 2014 Jul;42(Web Server issue):W187-91.

Reddy TE, Pauli F, Sprouse RO, Neff NF, Newberry KM, Garabedian MJ, Myers RM. Genomic determination of the glucocorticoid response reveals unexpected mechanisms of gene regulation. Genome Res. 2009 Dec;19(12):2163-71.

Reményi A, Schöler HR, Wilmanns M. Combinatorial control of gene expression. Nat Struct Mol Biol. 2004 Sep;11(9):812-5.

Ren B, Chee KJ, Kim TH, Maniatis T. PRDI-BF1/Blimp-1 repression is mediated by corepressors of the Groucho family of proteins. Genes Dev. 1999 Jan 1;13(1):125-37.

Reuter JA, Spacek DV, Snyder MP. High-throughput sequencing technologies. Mol Cell. 2015 May 21;58(4):586-97.

Richardson SJ, Horwitz MS. Is type 1 diabetes "going viral"? Diabetes. 2014 Jul;63(7):2203-5.

Risca VI, Greenleaf WJ. Unraveling the 3D genome: genomics tools for multiscale exploration. Trends Genet. 2015 Jul;31(7):357-72.

Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP. Integrative genomics viewer. Nat Biotechnol. 2011 Jan;29(1):24-6.

Roeder RG. The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. Trends Biochem Sci. 1996 Sep;21(9):327-35.

Rosenfeld JA, Wang Z, Schones DE, Zhao K, DeSalle R, Zhang MQ. Determination of enriched histone modifications in non-genic portions of the human genome. BMC. Genomics. 2009;10:143.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 1988 Jan 29;239(4839):487-91.

Samuels DS, Drecktrah D, Hall LS. Genetic Transformation and Complementation. Methods Mol Biol. 2018;1690:183-200.

Sato M, Hata N, Asagiri M, Nakaya T, Taniguchi T, Tanaka N. Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. FEBS Lett. 1998 Dec 11;441(1):106-10.

Schoggins JW. Interferon-stimulated genes: roles in viral pathogenesis. Curr Opin Virol. 2014 Jun;6:40-6.

Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. Anal Biochem. 2000 Oct 15;285(2):194-204.

Schöne S, Bothe M, Einfeldt E, Borschiwer M, Benner P, Vingron M, Thomas-Chollier M, Meijsing SH. Synthetic STARR-seq reveals how DNA shape and sequence modulate transcriptional output and noise. PLoS Genet. 2018 Nov 14;14(11):e1007793.

Schutzbank TE, Stern HJ. Principles and applications of the polymerase chain reaction. J Int Fed Clin Chem. 1993 Jul;5(3):96-105. Seidman L. Basic laboratory calculations for biotechnology. 1st Edition. 2007. Published by Pearson Education, Inc, San Francisco, Calif.; London: Pearson Benjamin.

Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. Cell. 1986 Aug 29;46(5):705-16.

Sen GC, Sarkar SN. The interferon-stimulated genes: targets of direct signaling by interferons, double-stranded RNA, and viruses. Curr Top Microbiol Immunol. 2007;316:233-50.

Shahbazian MD, Grunstein M. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. Annual Rev Biochem. 2007;76:75-100.

Shen Y, Wei W, Zhou DX. Histone Acetylation Enzymes Coordinate Metabolism and Gene Expression. Trends Plant Sci. 2015 Oct;20(10):614-621.

Simon JM, Giresi PG, Davis IJ, Lieb JD. A detailed protocol for formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements (FAIRE). Curr Protoc Mol Biol. 2013;Chapter 21:Unit21.26.

Simon JM, Giresi PG, Davis IJ, Lieb JD. Using formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements (FAIRE) to isolate active regulatory DNA. Nat Protoc. 2012 Jan 19;7(2):256-67.

Smale ST. Core promoters: active contributors to combinatorial gene regulation. Genes Dev. 2001 Oct 1;15(19):2503-8.

Smith E, Shilatifard A. Enhancer biology and enhanceropathies. Nat Struct Mol Biol. 2014 Mar;21(3):210-9.

Song C, Zhang S, Huang H. Choosing a suitable method for the identification of replication origins in microbial genomes. Front Microbiol. 2015 Sep 30;6:1049.

Song L, Crawford GE. DNase-seq: a high-resolution technique for mapping active gene regulatory elements across the genome from mammalian cells. Cold Spring Harb Protoc. 2010 Feb;2010(2):pdb.prot5384.

Song L, Zhang Z, Grasfeder LL, Boyle AP, Giresi PG, Lee BK, Sheffield NC, Gräf S, Huss M, Keefe D, Liu Z, London D, McDaniell RM, Shibata Y, Showers KA, Simon JM, Vales T, Wang T, Winter D, Zhang Z, Clarke ND, Birney E, Iyer VR, Crawford GE, Lieb JD, Furey TS. Open chromatin defined by DNaseI and FAIRE identifies regulatory elements that shape cell-type identity. Genome Res. 2011 Oct;21(10):1757-67.

Spilianakis CG, Lalioti MD, Town T, Lee GR, Flavell RA. Interchromosomal associations between alternatively expressed loci. Nature. 2005 Jun 2;435(7042):637-45.

Stalder J, Larsen A, Engel JD, Dolan M, Groudine M, Weintraub H. Tissue-specific DNA cleavages in the globin chromatin domain introduced by DNAase I. Cell. 1980 Jun;20(2):451-60.

Storey JD, Tibshirani R. Statistical significance for genome-wide studies. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Aug 5;100(16):9440-5.

Stratagene. Introduction to Quantitative PCR: Methods and Applications Guide. 2004. pp 4-7, 9-10, 21-22, 26-27, 29, 35-36.

Supek F, Bošnjak M, Škunca N, Šmuc T. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. PLoS One. 2011;6(7):e21800.

Svejstrup JQ. The RNA polymerase II transcription cycle: cycling through chromatin. Biochim Biophys Acta. 2004 Mar 15;1677(1-3):64-73.

Tang F, Yang Z, Tan Y, Li Y. Super-enhancer function and its application in cancer targeted therapy. NPJ Precis Oncol. 2020 Feb 12;4:2.

Taniguchi T, Mantei N, Schwarzstein M, Nagata S, Muramatsu M, Weissmann C. Human leukocyte and fibroblast interferons are structurally related. Nature. 1980 Jun 19;285(5766):547-9.

Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. Annual Rev Immunol. 2001;19:623-55.

Thandapani P. Super-enhancers in cancer. Pharmacol Ther. 2019 Jul;199:129-138.

Thanos D. Mechanisms of transcriptional synergism of eukaryotic genes. The interferon-beta paradigm. Hypertension. 1996 Apr;27(4):1025-9.

Thanos D, Du W, Maniatis T. The high mobility group protein HMG I(Y) is an essential structural component of a virus-inducible enhancer complex. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1993;58:73-81.

Thanos D, Maniatis T. NF-kappa B: a lesson in family values. Cell. 1995 Feb 24;80(4):529-32.

Thurman RE, Rynes E, Humbert R, Vierstra J, Maurano MT, Haugen E, Sheffield NC, Stergachis AB, Wang H, Vernot B, Garg K, John S, Sandstrom R, Bates D, Boatman L, Canfield TK, Diegel M, Dunn D, Ebersol AK, Frum T, Giste E, Johnson AK, Johnson EM, Kutyavin T, Lajoie B, Lee BK, Lee K, London D, Lotakis D, Neph S, Neri F, Nguyen ED, Qu H, Reynolds AP, Roach V, Safi A, Sanchez ME, Sanyal A, Shafer A, Simon JM, Song L, Vong S, Weaver M, Yan Y, Zhang Z, Zhang Z, Lenhard B, Tewari M, Dorschner MO, Hansen RS, Navas PA, Stamatoyannopoulos G, Iyer VR, Lieb JD, Sunyaev SR, Akey JM, Sabo PJ, Kaul R, Furey TS, Dekker J, Crawford GE, Stamatoyannopoulos JA. The accessible chromatin landscape of the human genome. Nature. 2012 Sep 6;489(7414): 75-82.

Tie F, Banerjee R, Stratton CA, Prasad-Sinha J, Stepanik V, Zlobin A, Diaz MO, Scacheri PC, Harte PJ. CBP-mediated acetylation of histone H3 lysine 27 antagonizes Drosophila Polycomb silencing. Development. 2009 Sep;136(18):3131-41.

Tong AJ, Liu X, Thomas BJ, Lissner MM, Baker MR, Senagolage MD, Allred AL, Barish GD, Smale ST. A Stringent Systems Approach Uncovers Gene-Specific Mechanisms Regulating Inflammation. Cell. 2016 Mar 24;165(1):165-179.

Tonna S, El-Osta A, Cooper ME, Tikellis C. Metabolic memory and diabetic nephropathy: potential role for epigenetic mechanisms. Nat Rev Nephrol. 2010 Jun;6(6):332-41.

Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. Bioinformatics. 2009 May 1;25(9):1105-11.

Tremethick DJ. Higher-order structures of chromatin: the elusive 30 nm fiber. Cell. 2007 Feb 23;128(4):651-4.

Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. Adv Physiol Educ. 2005 Sep;29(3):151-9.

Valouev A, Johnson DS, Sundquist A, Medina C, Anton E, Batzoglou S, Myers RM, Sidow A. Genome-wide analysis of transcription factor binding sites based on ChIP-Seq data. Nat Methods. 2008 Sep;5(9):829-34. Van der Ploeg LH, Konings A, Oort M, Roos D, Bernini L, Flavell RA. gamma-beta-Thalassaemia studies showing that deletion of the gamma- and delta-genes influences beta-globin gene expression in man. Nature. 1980 Feb 14;283(5748):637-42.

VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. Biotechniques. 2008 Apr;44(5):619-26.

Vanhille L, Griffon A, Maqbool MA, Zacarias-Cabeza J, Dao LT, Fernandez N, Ballester B, Andrau JC, Spicuglia S. High-throughput and quantitative assessment of enhancer activity in mammals by CapStarr-seq. Nat Commun. 2015 Apr 15;6:6905.

Virgin HW. The virome in mammalian physiology and disease. Cell. 2014 Mar 27;157(1):142-50.

Visel A, Blow MJ, Li Z, Zhang T, Akiyama JA, Holt A, Plajzer-Frick I, Shoukry M, Wright C, Chen F, Afzal V, Ren B, Rubin EM, Pennacchio LA. ChIP-seq accurately predicts tissue-specific activity of enhancers. Nature. 2009 Feb 12;457(7231):854-8.

Visvanathan KV, Goodbourn S. Double-stranded RNA activates binding of NF-kappa B to an inducible element in the human beta-interferon promoter. EMBO J. 1989 Apr;8(4):1129-38.

Vockley CM, Barrera A, Reddy TE. Decoding the role of regulatory element polymorphisms in complex disease. Curr Opin Genet Dev. 2017 Apr;43:38-45.

Vockley CM, D'Ippolito AM, McDowell IC, Majoros WH, Safi A, Song L, Crawford GE, Reddy TE. Direct GR Binding Sites Potentiate Clusters of TF Binding across the Human Genome. Cell. 2016 Aug 25;166(5):1269-1281.e19.

Wang DY, Ye Q, Li BG, Zhang GL. A new anthraquinone from Gladiolus gandavensis. Nat Prod Res. 2003 Oct;17(5):365-8. Wang N, Dong Q, Li J, Jangra RK, Fan M, Brasier AR, Lemon SM, Pfeffer LM, Li K. Viral induction of the zinc finger antiviral protein is IRF3-dependent but NF-kappaBindependent. J Biol Chem. 2010 Feb 26;285(9):6080-90.

Wang X, He L, Goggin SM, Saadat A, Wang L, Sinnott-Armstrong N, Claussnitzer M, Kellis M. High-resolution genome-wide functional dissection of transcriptional regulatory regions and nucleotides in human. Nat Commun. 2018 Dec 19;9(1):5380.

Wang Y, Miao X, Liu Y, Li F, Liu Q, Sun J, Cai L. Dysregulation of histone acetyltransferases and deacetylases in cardiovascular diseases. Oxid Med Cell Longev. 2014:641979.

Wang YM, Zhou P, Wang LY, Li ZH, Zhang YN, Zhang YX. Correlation between DNase I hypersensitive site distribution and gene expression in HeLa S3 cells. PLoS One. 2012;7(8):e42414.

Wang Z, Zang C, Rosenfeld JA, Schones DE, Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Peng W, Zhang MQ, Zhao K. Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. Nat Genet. 2008 Jul;40(7):897-903.

Weake VM, Workman JL. Inducible gene expression: diverse regulatory mechanisms. Nat Rev Genet. 2010 Jun;11(6):426-37.

Whyte WA, Orlando DA, Hnisz D, Abraham BJ, Lin CY, Kagey MH, Rahl PB, Lee TI, Young RA. Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. Cell. 2013 Apr 11;153(2):307-19.

Wilbanks EG, Facciotti MT. Evaluation of algorithm performance in ChIP-seq peak detection. PLoS One. 2010 Jul 8;5(7):e11471.

Wilhelm J, Pingoud A. Real-time polymerase chain reaction. Chembiochem. 2003 Nov 7;4(11):1120-8.

Workman JL. Nucleosome displacement in transcription. Genes Dev. 2006 Aug 1;20(15):2009-17.

Yie J, Merika M, Munshi N, Chen G, Thanos D. The role of HMG I(Y) in the assembly and function of the IFN-beta enhanceosome. EMBO J. 1999 Jun 1;18(11):3074-89.

Zaret KS, Carroll JS. Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression. Genes Dev. 2011 Nov 1;25(21):2227-41.

Zeng W, Mortazavi A. Technical considerations for functional sequencing assays. Nat Immunol. 2012 Sep;13(9):802-7.

Zhang XZ, You C, Zhang YH. Transformation of Bacillus subtilis. Methods Mol Biol. 2014;1151:95-101.

Zhang Y., T. Liu, C. A. Meyer, J. Eeckhoute, 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.

Zhang Y, Reinberg D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. Genes Dev. 2001 Sep 15;15(18):2343-60.

Zhao YQ, Jordan IK, Lunyak VV. Epigenetics components of aging in the central nervous system. Neurotherapeutics. 2013 Oct;10(4):647-63.

Zhou VW, Goren A, Bernstein BE. Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. Nat Rev Genet. 2011 Jan;12(1):7-18.

APPENDIX

ΠΙΝΑΚΕΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ

Πίνακας 1. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις Real Time qPCR στο ολικό υλικό των πειραμάτων DNaseI-seq

RDSN	F	5' GGACATCCACCAAGACCTACTGAT -3'
	R	5'- ATGTTCTCCCTTCCCATTCATTCC -3'
CNS8966	F	5'- ACCCACCTAAGATCGTCATCTCTC -3'
	R	5'- GGGGACTCAGTCGTCACTGG -3'
CNS28539		5'- GAAGCTGCCGGACTAACACTC -3'
	R	5'- GATATCGCCGATCACAATTAGCA -3'

Πίνακας 2. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις Real Time qPCR στο απομονωμένο από gel υλικό των πειραμάτων DNaseI-seq

RDSN	F	5'- GGACATCCACCAAGACCTACTGAT -3'
	R	5'- GCCTTGGGGAACGTGGGACT -3'
CNS8966	F	5'- ACCCACCTAAGATCGTCATCTCTC -3'
	R	5'- CCTGTTCGGCGGGACTGTGAT -3'
CNS28539		5'- GAAGCTGCCGGACTAACACTC -3'

R	5'- CGGCCTCGGTCTCCATGGAA -3'

Πίνακας 3. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις Real Time qPCR των ChIP-seq πειραμάτων

ACTB core promoter	F	5'-CGGCAAAGGCTAGGCTCTGT-3'
rierb_core_promoter	R	5'-ATTCAGCGTGCGCCGTTCCGAA-3'
АСТВ	F	5'-CCCCAACACCACACTCTACC-3'
	R	5'-CTGGGTTCTGTACGCTCCTG-3'
MYOD1	F	5'-GGACGACTTCTATGACGACCC-3'
	R	5'-TTGGTGGTCTTGCGCTTGC-3'
GAPDH PROMOTER	F	5'-GCCTCTCAGCCTTTGAAAGAAAGA-3'
	R	5'-ACGACTGAGATGGGGAATTGGAGC-3'
IFNB1 PROXIMAL	F	5'-GCTTTCCTTTGCTTTCTCCCAAGT-3'
ENHANCER	R	5'-CCTTTCTCCATGGGTATGGCC-3'
IFNIB1 -20kb	F	5'-TCCCTCTGCTAGAAGCTCCA-3'
	R	5'-AGCTCAGAGAAATGCCTGGT-3'
IFNB long	F	5'-GCTTTCCTTTGCTTTCTCCCAAGTC-3'
n rub_tong	R	5'-CCTTTCTCCATGGGTATGGCC-3'
IFNB coding	F	5'-TCCTGTTGTGCTTCTCCACTAC-3'
n rub_countg	R	5'-GCAGTATTCAAGCCTCCCATTC-3'
CCL5	F	5'-AGAGGATCAAGACAGCACGTGGAC-3'
CCLD		5'-AGCGCAGAGGGCAGTAGCAATGAG-3'
0ASL.	F	5'-CCCGTCACACCTGGTTTCCTCTCT-3'
	R	5'-CATCTCTGTCCCGAGAGTACCGCT-3'
HERC6	F	5'- TCCTCTCGTGCGGAGACAACAGC-3'
	R	5'-CATGTACTGGGGTCCTCACACCCT-3'

USP18	F	5'-GGCTGGAAGTCTGGAGCAGGT3'
	R	5'-CCCAGCTTTCGTTTTCCACTGAA3'
C04	F	5'-GAAGGAGTGCTCTGAGGCTGA-3'
	R	5'-GAACGCCCAAGACCTTTTCC-3'
SCN4A	F	5'-GATTCGAGGGCATGAGGGTGG-3'
	R	5'-GTGGTGCCAAGCTCTCTGCTTC-3'

Πίνακας 4. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σε Real Time qPCR για τον έλεγχο της έκφρασης των γονιδίων

IFNB1	F	5'-TCCTGTTGTGCTTCTCCACTAC-3'
	R	5'-GCAGTATTCAAGCCTCCCATTC-3'
GAPDH	F	5'-AGGGCTGCTTTTAACTCTGGT-3'
	R	5'-CCCCACTTGATTTTGGAGGGA-3'
MX1	F	5'-AAGCCCTGCAGAGAGAGAAGATC-3'
	R	5'-TATGTGTGATGAGCTCGCTGGTAAG-3'
IFIH1	F	5'-ATGACCCCAGAATTCAAGGAACT-3'
	R	5'-CCATCATTGTTCCCCAAGCC-3'
ISG15	F	5'-GAGAGGCAGCGAACTCATCT-3'
	R	5'-CTTCAGCTCTGACACCGACA-3'

Πίνακας 5. Εκκινητές για το πρωτόκολλο ChIP-STARR-seq

NahNavt a damtar		5'-Phos/GAT CGG AAG AGC ACA CGT CTG AAC TCC AGT CdUA CAC
NedNext adaptor		TCT TTC CCT ACA CGA CGC TCT TCC GAT C-s-T-3'
Recombination		
primor	Б	TAGAGCATGCACCGGACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
primer	1	
Recombination		GGCCGAATTCGTCGAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT
primer	R	
Reporter RNA		CAAACTCATCAATGTATCTTATCATG
specific primer		
Reporter-specific		CCCCCACCTCTTCCCCTC*T*C*C*A*C_*phosphrothiosta honda
primer	F	GGGCCAGCIGIIGGGGIGICCCAC phosphrothoate bonds
Reporter-specific		
primer_input	F	GGGCCAGCTGTTGGGGTG*A*G*T*A*C
Reporter-specific		
primer	R	

NEBNext Universal	AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACT CTT TCC CTA CAC
PCR Primer	GAC GCT CTT CCG ATC-s-T-3′
for Illumina 5´-	
NEBNext Index 2	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATACATCGGTGACTG
Primer	GAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3′
NEBNext Index 3	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGCCTAAGTGACTG
Primer	GAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3′
NEBNext Index 4	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTGGTCAGTGACTG
Primer	GAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3′
NEBNext Index 5	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCACTGTGTGACTG
Primer	GAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3′
NEBNext Index 6	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATATTGGCGTGACTG
Primer	GAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3′
NEBNext Index 7	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGATCTGGTGACTG
Primer	GAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3′
NEBNext Index 8	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTCAAGTGTGACTG
Primer	GAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3′
NEBNext Index 9	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCTGATCGTGACTG
Primer	GAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3′
NEBNext Index 10	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAAGCTAGTGACTG
Primer	GAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3′
NEBNext Index 11	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTAGCCGTGACTG
Primer	GAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3′
NEBNext Index 12	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTACAAGGTGACTG
Primer	GAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3′
NEBNext Index 13	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTGTTGACTGTGACT
Primer	GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3′
NEBNext Index 14	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATACGGAACTGTGAC
Primer	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3

NEBNext Index 15	5´-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTCTGACATGTGACT
Primer	GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3′
NEBNext Index 16	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGCGGACGGGTGAC
Primer	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3′
NEBNext Index 18	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTGCGGACGTGAC
Primer	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3
NEBNext Index 19	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGTTTCACGTGACT
Primer	GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3′
NEBNext Index 20	5´-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAAGGCCACGTGAC
Primer	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3′
NEBNext Index 21	5´-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTCCGAAACGTGAC
Primer	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3′
NEBNext Index 22	5´-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTACGTACGGTGACT
Primer	GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3′
NEBNext Index 23	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATATCCACTCGTGACT
Primer	GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3′
NEBNext Index 25	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATATATCAGTGTGACT
Primer	GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3′
NEBNext Index 27	5´-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAAAGGAATGTGACT
Primer	GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3′

Πίνακας 6. Εκκινητές για τον πολλαπλασιασμό των μεμομωμένων ενισχυτών πριν την κλωνοποίηση τους στον πλασμιδιακό φορέα 1xSp1-STARR

OTUD1_human	F	5'-TAAGCAACCGGTGGTCAGAGTAGTTAAAGGTGGCA-3'
OTUD1_human	R	5'-TGCTTAGTCGACGACCAGCCTCTTCTTCAAAGC-3'
IL7R_human	F	5'-TAAGCAACCGGTATCCAGTGCTTTGCAAGTGCTCT-3'
IRF1_human	F	5'-TAAGCAACCGGTAGGTGTGCTCTAGCTGTTCTGATGG-3'
IRF1_human	R	5'-TGCTTAGTCGACTGAGCACAGCCGGTATGAAATGGCC-3'
PMAIP1_human	F	5'-TAAGCAACCGGTGACCCAAGCCTCCTTTAGCCCAAAG-3'
PMAIP1_human	R	5'-TGCTTAGTCGACCAAAAGACCATTCCTAAAATGAGG-3'
OASL_20kb_human	F	5'-TAAGCAACCGGTACGGAAGAATCACTAAGCTTACTT-3'
OASL_20kb_human	R	5'-TGCTTAGTCGACTACGCAACAAAACAAGTAGTAAAGG-3'

96 Mouse	F	5'-TAAGCAACCGGTGACCTGACTCTTAAGTTTTGCTCTAC-3'
	R	5'-TGCTTAGTCGACTGATACTGGGCTGGACAAAGGTC-3'
11_Mouse	F	5'- TAAGCAACCGGTTAGAATGAAGGAGCATTGTCACTG-3'
	R	5'-TGCTTAGTCGACTAGCCGTTCAAAACTGTATAGCTAC -3'
12_Mouse	F	5'TAAGCAACCGGTTGGTGCTTGAAACACATTGTGTTTCATATGC-3'
	R	5'- TGCTTAGTCGACAGGGTGAGGACAGAGGGCACCTCAGCAT-3'
85 Drosophila	F	5'-TAAGCAACCGGTGTTCACTCGTTCACAGAAATAGAAAGAG-3'
oo_Diosopillia	R	5'-TGCTTAGTCGACTAGGTTCTACCTAGGCCACTTGTATG-3'
50_Zebrafish	F	5'-TAAGCAACCGGTTGTGGAAAAGCTAAAAGAAAAGGAAAATG-3'
	R	5'-TGCTTAGTCGACCTTTCCTTCCTTCCTTTCCTTTC-3'