



**Εθνικό και Καποδιστριακό  
Πανεπιστήμιο Αθηνών**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»  
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ SH3PXD2A  
ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗΣ ΙΝΩΣΗΣ ΚΑΙ  
ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ**

**ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΝΕΛΛΟΠΟΥΛΟΥ  
ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ  
ΜΑΡΤΙΟΣ 2017**



## ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ SH3PXD2A ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ  
ΤΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗΣ ΙΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

**ΚΑΝΕΛΛΟΠΟΥΛΟΥ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ**

**A.M.:71406**

### ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:

**Αίδινης Βασίλης**, Ερευνητής Α΄ στο Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών επιστημών (ΕΚΕΒΕ) «Αλέξανδρος Φλέμινγκ»

### ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**Αίδινης Βασίλης**, Ερευνητής Α΄, Εργαστήριο Ανοσολογίας, Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών επιστημών (ΕΚΕΒΕ) «Αλέξανδρος Φλέμινγκ»

**Λιανίδου Ευρύκλεια**: Καθηγήτρια Αναλυτικής Χημείας και Κλινικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Σχολή Θετικών Επιστημών, ΕΚΠΑ

**Κουππάρης Μιχάλης**: Καθηγητής Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Σχολή Θετικών Επιστημών, ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 10/3/2017



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (IPF) είναι μια θανατηφόρος μορφή διάμεσης πνευμονίας αγνώστου αιτιολογίας. Η νόσος χαρακτηρίζεται από αυξημένο πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και αυξημένη εναπόθεση κολλαγόνου στον πνεύμονα, που φυσιολογικά παράγεται στην επούλωση πληγών. Για την ανάλυση των χαρακτηριστικών της IPF χρησιμοποιείται το ζωικό μοντέλο της μπλεομυκίνης, το οποίο αναπαριστά τα βασικά χαρακτηριστικά της νόσου σε ζώα. Για την εύρεση νέων πιθανών μορίων στόχων που θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην εξέλιξη της νόσου, πραγματοποιήθηκε μια μελέτη στην οποία αναζητήθηκαν τα γονίδια των οποίων η έκφραση μεταβάλλεται στην IPF. Από τα δεδομένα που προέκυψαν επικεντρωθήκαμε στο γονίδιο SH3PXD2A.

Το γονίδιο SH3PXD2A κωδικοποιεί την πρωτεΐνη προσαρμογέα TKS5, που βασικός της ρόλος είναι η προώθηση της σηματοδότησης, μέσω σύνδεσης με διάφορες άλλες πρωτεΐνες, οι οποίες έτσι μπορούν να αλληλοεπιδράσουν μεταξύ τους. Η πρωτεΐνη αυτή εμπλέκεται, επίσης στην διαμόρφωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, που αποτελεί πρωταρχικό γεγονός στην διαφοροποίηση των ινοβλαστών πνεύμονα σε μυοϊνοβλάστες, καθώς και στην ικανότητα διείσδυσης ορισμένων καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, η TKS5 συμβάλλει στην ομοίωση της εξωκυττάριας μήτρας, μέσω της αλληλεπίδρασης της με τις μεταλλοπρωτεάσες Adams.

Για να επαληθεύσουμε τα παραπάνω δεδομένα, εφαρμόσαμε την τεχνική γονιδιακής στόχευσης της EUCOMM με σκοπό την δημιουργία ενός knockout ποντικού για το γονίδιο Sh3pxd2a. Μετά την δημιουργία του ποντικίου εξετάσαμε ποιοτικά την έκφραση του γονιδίου σε πρωτογενείς ινοβλάστες. Επίσης εξετάστηκαν τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου σε δείγματα ποντικών άγριου τύπου, στα οποία είχε χορηγηθεί μπλεομυκίνη. Επιπλέον, προκαλέσαμε IPF σε ετερόζυγα knockout ποντίκια με ενδοτραχειακή χορήγηση μπλεομυκίνης, ώστε να συμπεράνουμε αν υπάρχει διαφορά στην εμφάνιση της ασθένειας, σε σχέση με τα ποντίκια άγριου τύπου που νοσούν.

Με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα παρατηρείται, ότι τα ετερόζυγα knockout ποντίκια εμφανίζουν αυξημένη θνησιμότητα και τάση για επιδείνωση της νόσου. Και τα ποντίκια άγριου τύπου, όμως εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου Sh3pxd2a. Συμπεραίνουμε ότι το γονίδιο πιθανόν έχει προστατευτικό ρόλο στην ίνωση και η αύξηση που παρατηρείται στα ποντίκια άγριου τύπου οφείλεται στην προσπάθεια που καταβάλλει ο οργανισμός τους για να επιβιώσει από την ασθένεια.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου SH3PXD2A σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα από την οποία παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης στους καρκινικούς ιστούς.

**ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ:** Ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** γονίδιο SH3PXD2A, μοντέλο μπλεομυκίνης, πρωτεΐνη προσαρμογέας TKS5, καρκίνος πνεύμονα, τεχνική EUCOMM

## ABSTRACT

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a fatal form of interstitial pneumonia of unknown etiology. The disease is characterized by increased proliferation of fibroblasts and increased collagen deposition in the lung, which is normally produced in response to wound healing. In order to analyse the characteristics IPF we used the bleomycin induced animal model, which reproduces the main features of the disease in animals. To find new potential target molecules that might contribute to the progression of the disease, a study was conducted that searched genes whose expression is altered in IPF. From the obtained data we focused on SH3PXD2A gene.

The SH3PXD2A gene encodes the adapter protein TKS5, whose main role is to promote signaling through association with other proteins, which thus can interact with each other. This protein is also involved in the modulation of the actin cytoskeleton, which is a primary event in the differentiation of lung fibroblasts into myofibroblasts, and the penetration of certain cancer cells. Furthermore, TKS5 contributes to the homeostasis of the extracellular matrix, through interaction with Adams metalloproteases.

To verify these data, we applied the technique of EUCOMM gene targeting in order to create a knockout mouse for the Sh3pxd2a gene. After creating the knockout mouse, we made a qualitative examination of the gene expression in primary lung fibroblasts. We also examined both qualitatively and quantitatively the gene expression levels in samples of wild-type mice with bleomycin induced IPF. We furthermore, induced IPF in heterozygous knockout mice by intratracheal injection of bleomycin, in order to understand whether there is a difference in the appearance of the disease, compared to wild type mice.

Based on the experimental results, we observed that the heterozygous knockout mice show increased mortality and a tendency towards disease exacerbation. But also wild-type mice, showed increased expression levels of the gene Sh3pxd2a. Therefore, we conclude that the gene has a protective role in fibrosis and the increase observed in wild type mice is due to the effort expended by their organism to survive from the disease.

Finally, a quantification of the gene expression in patients with non-small cell lung cancer was held, by which increased expression levels of the gene were observed.

**SUBJECT AREA:** Idiopathic pulmonary fibrosis

**KEYWORDS:** SH3PXD2A gene, bleomycin protein, adaptor protein TKS5, lung cancer, EUCOMM technique





## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ .....</b>	<b>13</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>14</b>
1.1 Το γονίδιο SH3 and PX domains 2A (SH3PXD2A –TKS5) .....	14
1.1.2 Podosomes και Invadopodia .....	19
1.1.3 Εμπλοκή του γονιδίου Sh3pxd2a στην κυτταρική μετανάστευση και στην εμβρυική ανάπτυξη .....	31
1.1.4 Εμπλοκή του γονιδίου Sh3pxd2a στην παθογένεια του καρκίνου ..	34
1.2 Πνευμονική ίνωση .....	39
1.2.1 Ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση.....	39
1.2.2 Ζωικά πειραματικά μοντέλα της πνευμονικής ίνωσης .....	45
1.3 Δημιουργία διαγονιδιακών και knock-out ποντικών. Το μοντέλο EUCOMM.....	48
1.3.1 Διαγονιδιακή τεχνολογία .....	48
1.3.2 Τεχνολογία κατευθυνόμενης γονιδιακής στόχευσης.....	51
1.3.3 Το μοντέλο EUCOMM .....	62
<b>ΣΚΟΠΟΣ .....</b>	<b>73</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>75</b>
2.1 Εξοπλισμός-Όργανα.....	75
2.2 Υλικά .....	76
2.3 Δείγματα .....	79
2.4 Μέθοδοι.....	81
2.4.1 Απομόνωση DNA.....	81
2.4.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) .....	83
2.4.3 PCR για ενίσχυση μεγάλων τμημάτων DNA (Long- Range PCR) ..	89
2.4.4 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πραγματικού χρόνου (Real Time qPCR) .....	91
2.4.5 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτική αγαρόζη 2% σε TBE. ....	94

2.4.6 Απομόνωση RNA από ιστούς ήπατος και πνευμόνων ποντικού....	97
2.4.7 Κατεργασία καθαρισμού του απομονωμένου ολικού RNA .....	98
2.4.8 Μετατροπή του RNA σε cDNA με χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφή. ....	100
2.4.9 Καταμέτρηση βιώσιμων κυττάρων χρησιμοποιώντας αιματοκυτταρόμετρο .....	102
2.4.10 Προσδιορισμός Πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford .....	104
2.4.11 Μέτρηση διαλυτού κολλαγόνου σε BALF.....	105
2.4.12 Χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης.....	106
2.4.13 Χρώση Lac-Z.....	108
2.4.14 Χρώση ανοσοφθορισμού.....	113
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>119</b>
3.1 Δημιουργία γενετικά τροποποιημένων ποντικών για το γονίδιο SH3PXD2A. ....	119
3.1.1 Δημιουργία ποντικών που φέρουν το «πρώτο knockout» αλληλόμορφο. ....	119
3.1.2 Δημιουργία γενετικά τροποποιημένων ποντικών που φέρουν το αλληλόμορφο με γονίδιο αναφοράς lacZ (tm1b).....	127
3.1.3 Δημιουργία Floxed ποντικών (conditional allele) / Ποντικών που φέρουν κατ'επιλογή αλληλόμορφα (tm1c).....	133
3.1.4 Δημιουργία knockout ποντικών .....	135
3.2 Εξέταση του ρόλου του γονιδίου SH3PXD2A στην παθογένεια της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης.....	139
3.2.1 Χρώση ανοσοφθορισμού σε ιστούς και σε πρωτογενείς ινοβλάστες πνεύμονα. ....	140
3.2.2 Ποσοτικοποίηση έκφρασης του γονιδίου Sh3pxd2a σε δείγματα ποντικών στα οποία έχει εφαρμοστεί το μοντέλο της μπλεομυκίνης .....	143
3.2.3 Εφαρμογή του μοντέλου της μπλεομυκίνης σε ποντίκια με γονότυπο Sh3pxd2a <sup>tm1b</sup> (+/-). ....	145

3.2.4 Εφαρμογή του μοντέλου της μπλεομυκίνης σε $Sh3pxd2a^{tm1d}(+/-)$ ετερόζυγα knockout ποντίκια.....	148
3.3 Ποσοτικοποίηση έκφρασης του γονιδίου SH3PXD2A σε περιπτώσεις καρκίνου του πνεύμονα.....	151
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>154</b>
<b>ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....</b>	<b>158</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>161</b>

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών επιστημών (ΕΚΕΒΕ) «Αλέξανδρος Φλέμινγκ» στα πλαίσια του Γενικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Διπλώματος Ειδίκευσης «Κλινικής Χημείας» του τμήματος Χημείας της σχολής Θετικών Επιστημών του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, κατά τα ακαδημαϊκά έτη 2015-2016, υπό την επίβλεψη του Δρ. Βασίλη Αϊδίνη, Ερευνητή Α΄ στο Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών επιστημών (ΕΚΕΒΕ) «Αλέξανδρος Φλέμινγκ», τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω που μου έδωσε την ευκαιρία να πραγματοποιήσω την διπλωματική μου στο εργαστήριο Ανοσολογίας, σ΄ ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Καθηγήτρια Αναλυτικής και Κλινικής Χημείας του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών, κα Ευρύκλεια Λιανίδου, που μου έδωσε την δυνατότητα να παρακολουθήσω το μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης της Κλινικής Χημείας, αλλά και για όλη της την βοήθεια και υποστήριξη κατά την διάρκεια των δυο αυτών ετών.

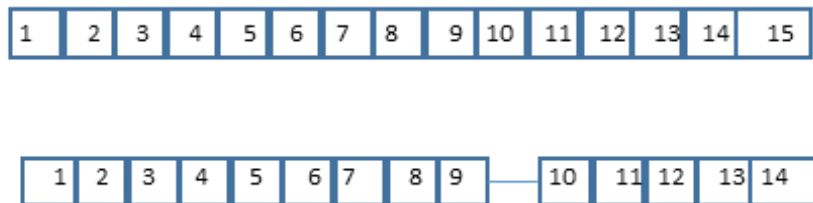
Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου με τα οποία συνεργάστηκα, για την πολύτιμη βοήθεια τους. Πιο συγκεκριμένα, τον Βαγγέλη Διολέτη, μεταδιδακτορικό ερευνητή του εργαστηρίου, για την βοήθεια και καθοδήγηση του σε ότι αφορά το θεωρητικό και πειραματικό μέρος της εργασίας μου. Επιπλέον, τις μεταδιδακτορικές ερευνήτριες Μαρκέλλα Ζαννίκου, Χριστιάννα Μαγκριώτη και τις διδακτορικές φοιτήτριες Ιωάννα Νίνου, Αγγελική Κατσίφα και Ηλιάννα Μπαρμπαγιάννη, που ήταν πάντα πρόθυμες να απαντήσουν σε κάθε μου ερώτηση.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου εντός και εκτός πανεπιστημίου για την αγάπη και την συναισθηματική τους υποστήριξη.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Το γονίδιο SH3 and PX domains 2A (SH3PXD2A –TKS5)

Το γονίδιο **SH3 and PX domains 2A (SH3PXD2A)**, γνωστό και με την ονομασία Tyrosine kinase substrate 5 (Tks5), χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 10 (χρωμοσωμική περιοχή 10q24.33) στους ανθρώπους και έχει μέγεθος 267 kb<sup>(3)</sup>. Το SH3PXD2A γονίδιο παράγει δυο κύρια μετάγραφα διαφορετικού μήκους (long-short transcripts), τα οποία προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα, μεταξύ των εξωνίων 7 και 10. Το πλήρες (long) μετάγραφο έχει μήκος 11468 βάσεις και αποτελείται από 15 εξώνια. Το μικρότερο μετάγραφο (short isoform), συναντάται σε τρεις διαφορετικές μορφές, η κυριότερη από τις οποίες, αποτελείται από 11.245 βάσεις και 14 εξώνια (σχήμα 1.1).<sup>1</sup>



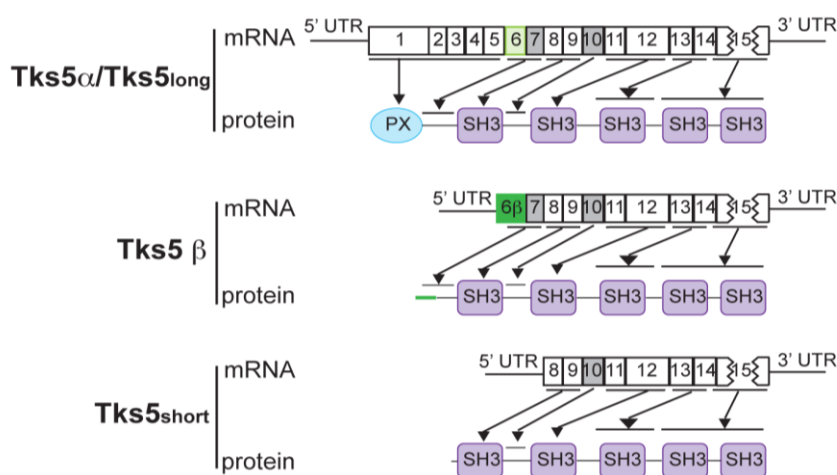
**Σχήμα 1. 1: Σχηματική αναπαράσταση των δυο κυριότερων ισομορφών του γονιδίου SH3PXD2A.**

Όλα τα μετάγραφα (long-short), μεταγράφονται από τον ίδιο υποκινητή ο οποίος βρίσκεται ανοδικά (upstream) του εξωνίου 1. Το πρωτεϊνικό προϊόν του γονιδίου SH3PXD2A που αντιστοιχεί στο πλήρες μετάγραφο, αποτελείται από 1133 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 150 kDa. Η πρωτοταγής δομή της ανθρώπινης Tks5 περιλαμβάνει μια Phox-ομόλογη περιοχή (PX) στο αμινοτελικό άκρο και πέντε Src ομόλογες (SH3) περιοχές στο καρβοξυτελικό άκρο.

Στα ποντίκια, το γονίδιο sh3pxd2a εδράζεται στο χρωμόσωμα 19 (χρωμοσωμική περιοχή 19;19C3). Το πλήρες μετάγραφο (sh3pxd2a/tks5 long), έχει μήκος 10.464 βάσεις και αποτελείται από 15 εξώνια. Το 2013, σε εργασία

για την έκφραση του γονιδίου SH3PXD2A σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, διαπιστώθηκε, ότι υπάρχει ακόμα ένα βραχύ μετάγραφο (tks5 short), το οποίο περιέχει στο 5' άκρο του μια αλληλουχία από το ιντρόνιο 7 του ακολουθούμενη από τα εξώνια 8-15<sup>(2)</sup>. Το 2014, έρευνα βασιζόμενη στην παραπάνω εργασία, ανέδειξε ακόμα μία ισομορφή του γονιδίου (tks5 β) στο ποντίκι, της οποίας η κωδική αλληλουχία ξεκινά στο εξώνιο 6β και αποτελείται από τα εξώνια 8-15 (σχήμα 1.2)<sup>3</sup>.

Στο ποντίκι, υπάρχουν τρεις διαφορετικές ισομορφές της πρωτεΐνης<sup>2-3</sup>. Η tks5α ή tks5 long ισομορφή, κατά ομολογία με την ανθρώπινη, η οποία μεταφράζεται σε πρωτεΐνη 150 kDa, και περιέχει μια PX περιοχή και πέντε SH3 περιοχές. Πέρα από αυτήν όμως υπάρχουν δυο πρωτεϊνικές δομές 140 και 130 kDa, που προκύπτουν από τα μικρότερα μετάγραφα, στις οποίες απουσιάζει η PX περιοχή, αλλά παραμένουν οι πέντε SH3 περιοχές. Συγκεκριμένα η πρωτεΐνη Tks5b, αποτελείται από μια σύντομη μοναδική αμινοτελική αλληλουχία που κωδικοποιείται από το εξώνιο 6β. Το εξώνιο αυτό περιλαμβάνει ένα κωδικόνιο έναρξης που βρίσκεται 29 bp μακριά από το 5'-άκρο του εξονίου 6. Η πρωτεΐνη Tks5 short κωδικοποιείται από τα εξώνια 8- 15 (σχήμα 1.2).



**Σχήμα 1.2: Σχηματική αναπαράσταση των τριών μεταγράφων του γονιδίου sh3pxd2a και των πρωτεϊνών που προκύπτουν<sup>3</sup>.**

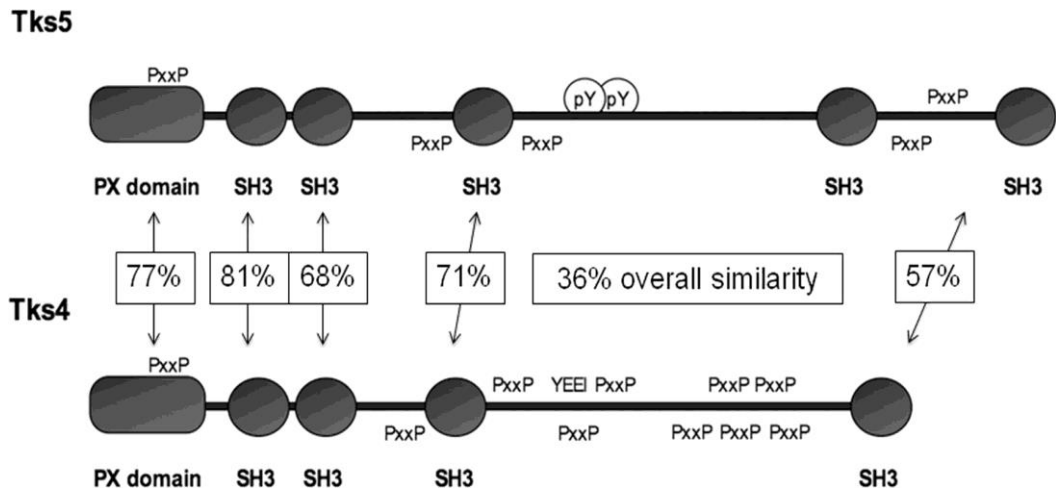
Η περιοχή PX, είναι μια περιοχή δέσμευσης φωσφολιπιδίων, σχηματίζεται από 120 αμινοξέα και εμφανίζεται σε μια ποικιλία ευκαρυωτικών πρωτεϊνών. Η

περιοχή PX αποτελείται στο αμινοτελικό άκρο από μία τριπλή αλυσίδα που σχηματίζει δομή β- πτυχωτού φύλλου η οποία ακολουθείται από μια ελικοειδή δομή που αποτελείται από τέσσερις α- έλικες. Οι περιοχές ομολογίας SH3, είναι μικρές πρωτεϊνικές περιοχές 50 περίπου αμινοξέων, που αρχικά εντοπίστηκαν στο μη καταλυτικό τμήμα αρκετών κινασών τυροσίνης (π.χ. Src). Έκτοτε, έχουν εντοπιστεί σε μια μεγάλη ποικιλία άλλων ενδοκυτταρικών ή μεμβρανικών πρωτεϊνών. Οι SH3 περιοχές συμβάλλουν στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών.<sup>4-5</sup>

Η Tks5, είναι μια πρωτεΐνη προσαρμογέας (adapter), και λειτουργεί ως σκαλωσιά (scaffold), συνδεόμενη με άλλες πρωτεΐνες, διευκολύνοντας το σχηματισμό πολυ-πρωτεϊνικών συμπλοκών. Οι πρωτεΐνες που προσελκύονται από την Tks5 μπορούν να αλληλεπιδράσουν τόσο μεταξύ τους, όσο και με την Tks5. Επομένως, η Tks5 είναι ένα μόριο το οποίο επιτρέπει σε πρωτεΐνες, που υπό άλλες συνθήκες δεν θα αλληλοεπιδρούσαν μεταξύ τους ή τόσο αποτελεσματικά, να έρθουν κοντά και να αλληλεπιδράσουν. Το αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης συνήθως σχετίζεται με την προώθηση της κυτταρικής σηματοδότησης<sup>(5)</sup>. Επίσης, λειτουργεί και ως υπόστρωμα της Src κινάσης, η οποία μπορεί να την φωσφορυλιώνει. Έχει προταθεί ότι η φωσφορυλίωση της Tks5 απελευθερώνει τον τομέα PX από ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις, και της επιτρέπει να δεσμεύεται σε φωσφορικά λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης<sup>(71)</sup>. Φυσιολογικά, η θέση της Tks5 είναι στο κυτταρόπλασμα, αλλά με τα κατάλληλα ερεθίσματα, μπορεί να εντοπιστεί και στα rodosomes, δομές που θα περιγράψουν λεπτομερέστερα στη συνέχεια.

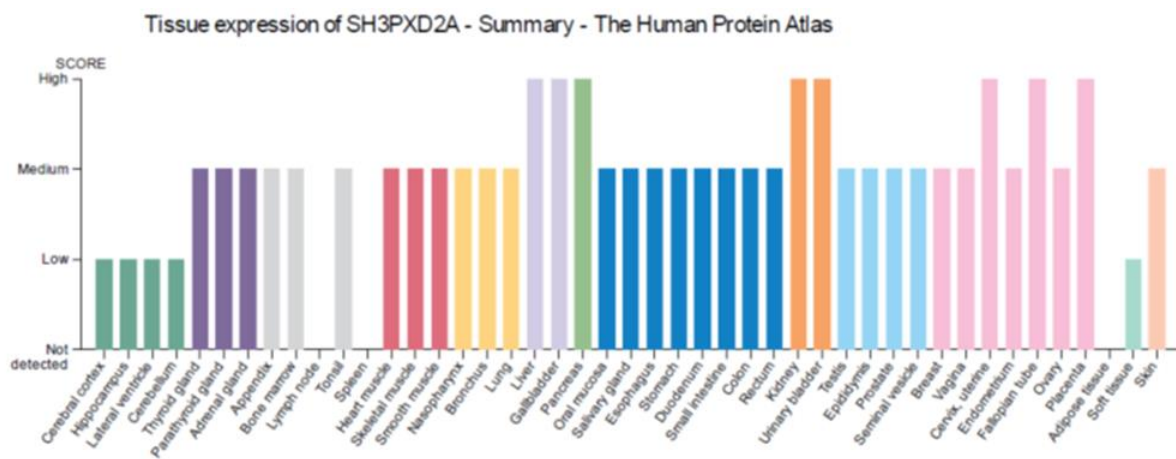
Η πρωτεΐνη Tks5, παρουσιάζει υψηλή ομολογία με μια άλλη πρωτεΐνη προσαρμογέα την Tyrosine kinase substrate 4 (Tks4). Η Tks4 αποτελεί επίσης υπόστρωμα της Src κινάσης και απαρτίζεται από μια PX περιοχή σύνδεσης λιπιδίων και τέσσερις SH3 περιοχές (σχήμα 1.3).<sup>6</sup>





**Σχήμα 1. 3: Σχηματική αναπαράσταση των Tks πρωτεϊνών προσαρμογέων. Απεικονίζεται γραφικά η πρωτοταγής δομή των δύο ομόλογων ανθρώπινων πρωτεϊνών Tks5 και Tks4.<sup>6</sup>**

Η πρωτεΐνη Tks5 εκφράζεται στους περισσότερους ιστούς στον άνθρωπο. Αυξημένη έκφρασή της παρατηρείται στον πλακούντα, στην μήτρα, στις σάλπιγγες, στην χοληδόχο κύστη, στην ουροδόχο κύστη, στο συκώτι, το πάγκρεας και τους νεφρούς. Στους υπόλοιπους ιστούς έχει μέτρια έως χαμηλή έκφραση, ενώ δεν ανιχνεύεται στην σπλήνα, στους λεμφαδένες και στον λιπώδη ιστό (σχήμα 1.4).<sup>7</sup> Ανάμεσα στους κυτταρικούς τύπους που εκφράζουν την Tks5 συγκαταλέγονται, τα μακροφάγα, οι μυοϊνοβλάστες, τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας, οι νευρώνες και οι οστεοκλάστες.



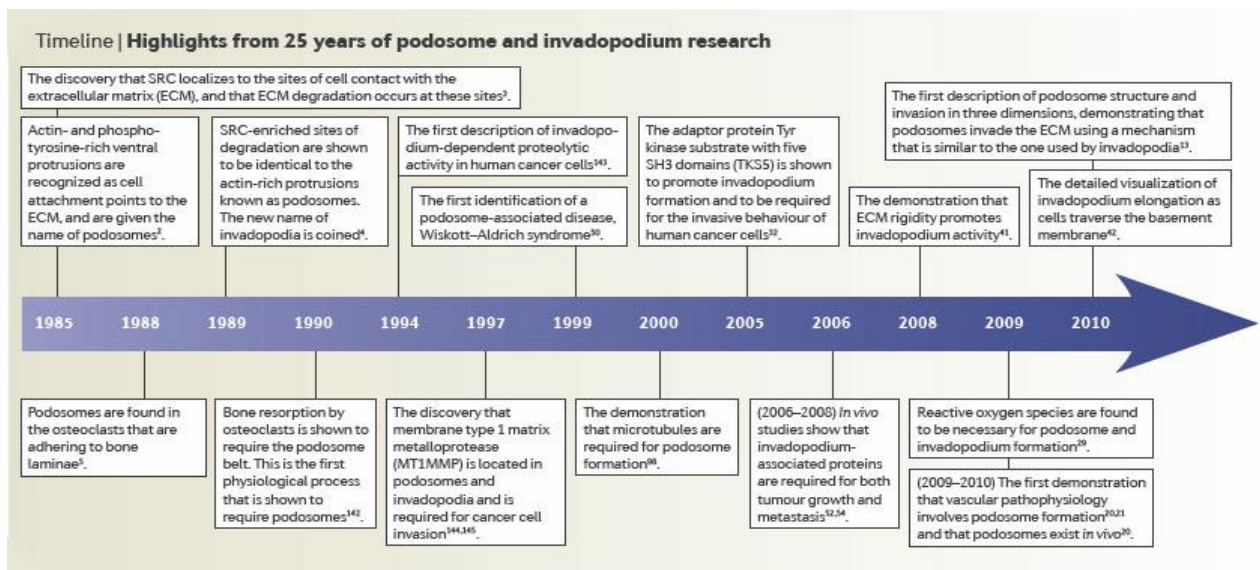
**Σχήμα 1. 4: Διάγραμμα στο οποίο φαίνονται τα φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Tks5 στους διάφορους ανθρώπινους ιστούς.<sup>7</sup>**

Η πρωτεΐνη Tks5, επιτελεί σημαντικό ρόλο στον οργανισμό, τόσο σε συνθήκες υγείας όσο και σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις. Έτσι, έχει αποδειχθεί η εμπλοκή του γονιδίου στην εμβρυική ανάπτυξη *in vivo* και *in vitro*. Το 2010 δημοσιεύθηκε μια μελέτη, η οποία εμπλέκει το γονίδιο στην παθογένεση του Alzheimer<sup>72</sup>. Οι περισσότερες όμως δημοσιεύσεις, συνδέουν την έκφραση του Tks5 με την παθογένεια μορφών καρκίνου. Μάλιστα θεωρείται πολύ πιθανή η εμπλοκή του στους μηχανισμούς της μετάστασης και της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων, ενώ πολλοί θεωρούν την έκφρασή του γονιδίου ως προγνωστικό παράγοντα της πορείας της ασθένειας. Η αιτία της στενής συσχέτισης της νόσου με το γονίδιο, είναι ο σημαντικός ρόλος της πρωτεΐνης στο σχηματισμό των invadosomes.

## 1.1.2 Podosomes και Invadopodia

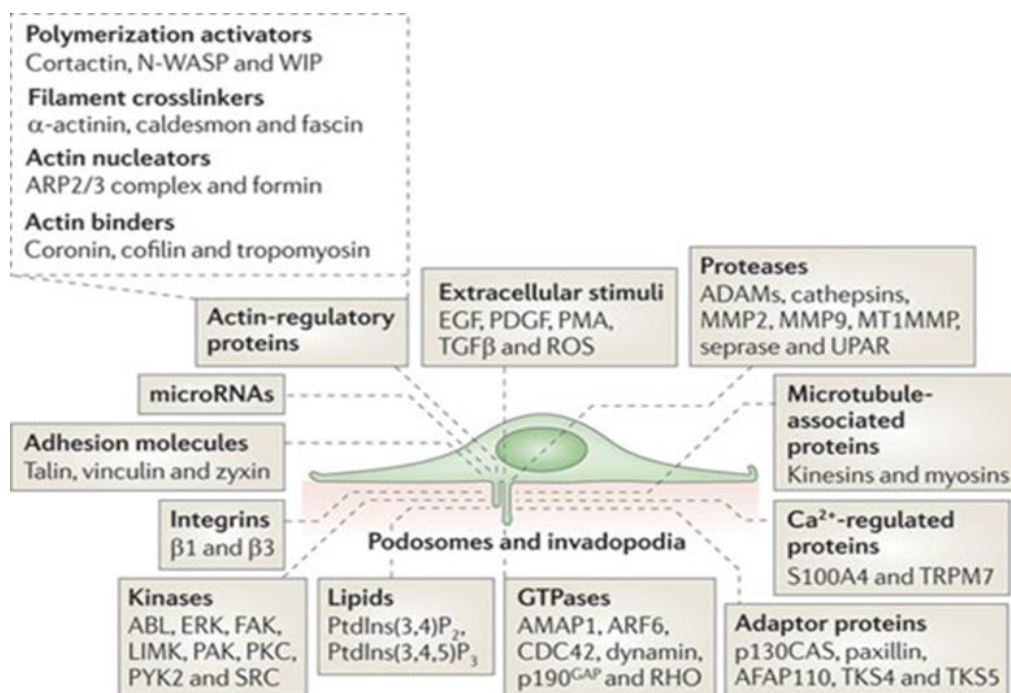
### Γενικά Χαρακτηριστικά των Podosomes και Invadopodia

Οι όροι **podosomes** και **invadopodia** (αμφότεροι δύνανται να περιγραφούν με τον όρο «**invadosomes**»), αναφέρονται σε δυναμικές πλούσιες σε ακτίνη προεξοχές της κοιλιακής μεμβράνης ορισμένων τύπων κυττάρων, οι οποίες προκύπτουν από την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού ακτίνης<sup>6</sup>. Οι δομές αυτές, συμβάλλουν στη στενή επαφή του κυττάρου με την εξωκυττάρια μήτρα (Extracellular Matrix, ECM), ενώ σε αντίθεση με παρόμοιες δομές όπως π.χ. οι εστιακές συμφύσεις, είναι σε θέση να αποδομούν τα συστατικά της ECM. Τα **invadosomes**, ως εκ τούτου, πιστεύεται ότι είναι δομές- κλειδί για την κυτταρική εισβολή. Κατά συνέπεια, μεγάλη προσπάθεια επι του παρόντος επικεντρώνεται στην διακρίβωση του ρόλου τους τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές επεμβατικές διαδικασίες, όπως η φλεγμονή, η αθηροσκλήρωση και η μετάσταση<sup>(8)</sup>. Τα τελευταία 25 χρόνια έχει σημειωθεί μεγάλη επέκταση της έρευνας των **podosomes** και των **invadopodia**, η οποία εστιάζεται στην ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που συνδέονται με αυτές τις δομές, καθώς και των ερεθισμάτων που απαιτούνται για να πραγματοποιηθεί ο σχηματισμός τους (σχήμα 1.5).<sup>9</sup>



Σχήμα 1.5: Οι σημαντικότερες ανακαλύψεις σχετικά με τα Invadosomes έως το 2010.<sup>9</sup>

Τα Podosomes και τα invadopodia μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά, τα οποία είναι ικανά να τα διακρίνουν από άλλες επαφές κυττάρου-μήτρας ή από επιφανειακά παρόμοιες δομές<sup>(8)</sup>. Οι πιο χαρακτηριστικές πρωτεΐνες των invadosomes είναι οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες ακτίνης (π.χ. cortactin), οι νευρικές πρωτεΐνες του συνδρόμου Wiskott-Aldrich (N-WASP), οι πρωτεΐνες προσαρμογείς που δρουν ως υπόστρωμα κινασών, με τέσσερις περιοχές SH3 (TKS4) και με πέντε περιοχές SH3 (TKS5), και οι μεμβρανικές μεταλλοπρωτεάσες μήτρας (MMP) (σχήμα 1.6)<sup>9</sup>. Τόσο τα podosomes όσο και τα invadopodia είναι χαρακτηριστικές δομές που αποτελούνται από ένα πυρήνα πλούσιο σε ακτίνη, ο οποίος περιβάλλεται από πρωτεΐνες προσκόλλησης (adhesion) και πρωτεΐνες που λειτουργούν ως σκαλωσιά (scaffolding). Ένα σύνολο μορίων (π.χ. ρυθμιστές ακτίνης, ενεργοποιητές πολυμερισμού, πρωτεΐνες πρόσδεσης και αλληλεπίδρασης με την ακτίνη, κινάσες, μικρές GTPασες και πρωτεΐνες σκαλωσιάς), ρυθμίζουν την ακτίνη μέσα σε αυτές τις δυναμικές δομές. Επιπλέον, πολλά από τα συστατικά των invadosomes ρυθμίζονται από κινάσες τυροσίνης, γεγονός που οδηγεί σε υψηλό τοπικό εμπλουτισμό σε υπολείμματα φωσφοτυροσίνης (σχήμα 1.6).<sup>9</sup>



Σχήμα 1.6: Τα βασικά στοιχεία που απαιτούνται για τον σχηματισμό και την λειτουργία των invadosomes.<sup>9</sup>

Παρά τις ομοιότητες τους, οι δομές αυτές διαφέρουν μεταξύ τους σε αρκετά σημεία. Τα Podosomes διαθέτουν μια εμφανή δομή δακτυλίου που αποτελείται από πρωτεΐνες προσκόλλησης, όπως η ταλίνη (talin), η παξιλλίνη (paxillin) και η βινκουλίνη (vinculin), ο οποίος περιβάλλει τον πλούσιο σε ακτίνη πυρήνα. Μερικές από αυτές τις πρωτεΐνες, όπως η παξιλλίνη, εντοπίζονται και στα invadopodia, χωρίς όμως να σχηματίζουν δομή δακτυλίου, αλλά συνεντοπίζονται με τον πυρήνα. Τα Podosomes και τα invadopodia διαφέρουν και σε άλλα σημεία. Τα Podosomes συνήθως σχηματίζονται σε μονοκυτταρικά κύτταρα (π.χ. μονοκύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα και οστεοκλάστες), σε ενδοθηλιακά κύτταρα και σε λεία μυϊκά κύτταρα, ενώ τα invadopodia εντοπίζονται κυρίως σε καρκινικά κύτταρα<sup>6</sup>. Η διάκριση των podosomes και των invadopodia είναι επίσης δυνατή μέσω του μεγέθους και της αφθονίας τους. Αν και οι δομές αυτές έχουν παρόμοιο πλάτος τα podosomes έχουν μήκος έως 2μm, ενώ τα invadopodia έχουν μεγαλύτερο μέγεθος (πάνω από 2μm). Τα κύτταρα σχηματίζουν πολυάριθμα podosomes (συχνά πάνω από 100), αλλά, σε πολλές περιπτώσεις, μόνο λίγα invadopodia (μεταξύ 1 και 10). Οι δομές αυτές διαφέρουν σημαντικά και στη διάρκεια ζωής τους. Τα podosomes εμφανίζουν μεγάλο δυναμικό, με διάρκεια ζωής αρκετών λεπτών, ενώ τα invadopodia είναι πιο σταθερά και μπορεί να διαρκέσουν για πάνω από 1 ώρα.<sup>8-9</sup>

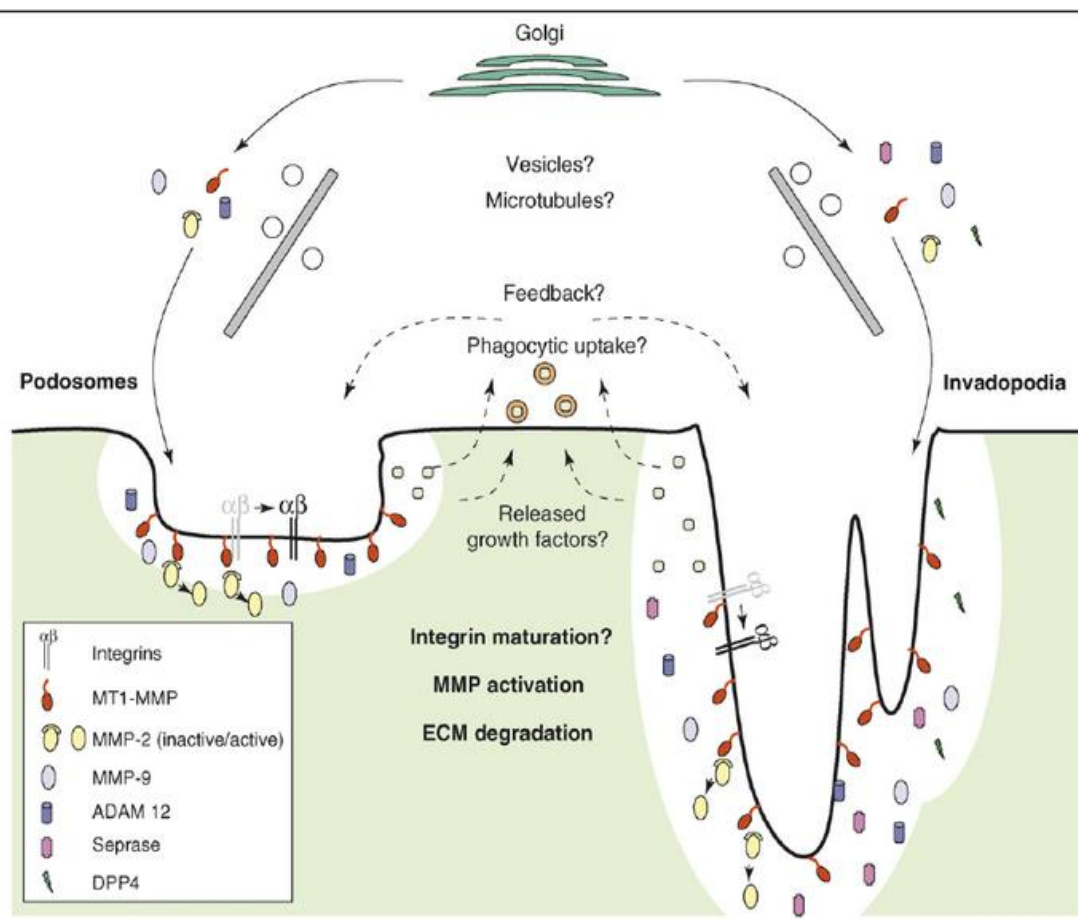
Είναι επίσης σημαντικό να γίνει διάκριση των podosomes και των invadopodia από άλλες κυτταρικές προεξοχές, όπως τα νηματοπόδια (filopodia) και τα ελασματοπόδια (lamellipodia), και από δομές προσκόλλησης, όπως είναι οι εστιακές συμφύσεις (FK-focal adhesions). Καθεμιά από αυτές τις δομές έχει ξεχωριστά μορφολογικά χαρακτηριστικά, ωστόσο υπάρχουν αρκετές κοινές πρωτεΐνες, ιδιαίτερα αυτές που συμμετέχουν στον πολυμερισμό της ακτίνης<sup>(11)</sup>. Ως εκ τούτου, είναι αναγκαίο να εξεταστούν οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια, η μορφολογία και ο εντοπισμός της κάθε δομής προκειμένου να διακριθούν μεταξύ τους (πίνακας 1.1). Ειδικότερα, ο συνεντοπισμός περιοχών ακτίνης σε συνδυασμό με την υποβάθμιση της ECM είναι ένα πολύτιμο μέσο για τη διάκριση των podosomes και των invadopodia από τις άλλες μεμβρανικές δομές.<sup>9</sup>

**Πίνακας 1.1: Μορφολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά των κυτταρικών δομών που έχουν ως βάση την ακτίνη.<sup>9</sup>**

	Lamellipodia	Filopodia	Focal adhesions	Podosomes*	Invadopodia <sup>†</sup>
<b>Description</b>	Surface-attached, sheet-like protrusions	Finger-like projections	Large clusters of transmembrane receptors, integrins and cytosolic proteins that connect the ECM with the actin cytoskeleton	Actin-rich core that is surrounded by a ring of actin-associated and signalling proteins	Actin-rich core that is surrounded by a ring of actin-associated and signalling proteins
<b>Location</b>	Leading edge of the cell	Usually in regions of lamellipodia	Leading edge of the cell <sup>135</sup>	Ventral cell surface, often clustered behind the leading edge of the cell	Ventral cell surface, often situated under the nucleus
<b>Protrusive dimension</b>	Width: 0.1–0.2 $\mu\text{m}$	Width: 0.1–0.3 $\mu\text{m}$ ; length: 3–10 $\mu\text{m}$	Width: 2–6 $\mu\text{m}$	Width: 0.5–2 $\mu\text{m}$ ; length: 0.5–2 $\mu\text{m}$	Width: 0.5–2 $\mu\text{m}$ ; length: >2 $\mu\text{m}$
<b>Actin rearrangement</b>	Branched actin filaments	Parallel actin filament bundles	Predominately parallel actin filament bundles, but with branched actin at the end of the filament <sup>136</sup>	Branched and unbranched actin filaments	Branched actin filaments at the cell surface and unbranched actin filaments through the tip of the protrusion <sup>42</sup>
<b>Lipids involved</b>	PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> (REF. 131)	PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> and PtdIns(3,4,5)P <sub>3</sub>	PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>	PtdIns(3,4,5)P <sub>3</sub> (REF. 140)	PtdIns(3,4)P <sub>2</sub> , PtdIns(3)P and lipid rafts (caveolin 1) <sup>30,30</sup>
<b>Microtubule dependence</b>	They induce lamellipodium extension <sup>132</sup>	Regulates filopodium density in lamellipodium-rich areas <sup>133</sup>	Inhibition of microtubules leads to increased focal adhesions <sup>139</sup>	Required for elongation and/or formation <sup>13,30</sup>	Required for elongation but not formation <sup>42</sup>
<b>Pericellular proteolysis</b>	Minimal <sup>133</sup>	No	Minimal	Yes, through MT1MMP and UPAR <sup>13,141</sup>	Yes, through MMP2, MMP9, MT1MMP, seprase, UPAR, ADAM12, ADAM15 and ADAM19
<b>Duration of structure</b>	Minutes <sup>134</sup>	Minutes	Hours, depends on rate of cell migration	Minutes	Hours

Αν και τα invadosomes είναι δομές κυτταρικής προσκόλλησης, η πιο χαρακτηριστική λειτουργία τους είναι η αποικοδόμηση της ECM. Θεωρείται ότι τα podosomes και τα invadopodia επιτρέπουν σε ένα κύτταρο να συντονίσει την αποικοδόμηση της ECM μέσω κυτταρικής κινητικότητας, προκειμένου να διευκολυνθεί η μετανάστευση των κυττάρων μέσω του μικροπεριβάλλοντος του ιστού. Η μετανάστευση των κυττάρων απαιτείται κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης και, σε ενήλικες, σε απάντηση μετά από έναν τραυματισμό ή μια μόλυνση. Η ανώμαλη κυτταρική μετανάστευση μπορεί να αποτελέσει την βάση της ανάπτυξης, αγγειακών ασθενειών, όπως επίσης και αιτία της μετάστασης νεοπλασιών. Τα podosomes εντοπίζονται κυρίως σε τύπους κυττάρων που εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση των ιστών και στην ανοσολογική επιτήρηση, ενώ η παρουσία των invadopodia συσχετίζεται με την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να εισβάλουν και να δημιουργούν μεταστάσεις<sup>9</sup>. Αν και οι δύο δομές αποικοδομούν τα συστατικά της ECM η αποικοδόμηση μήτρας με τα podosomes τείνει να είναι ρηχή και διαδομένη, ενώ τα invadopodia προκαλούν βαθύτερη και πιο επικεντρωμένη υποβάθμιση (σχήμα 1.7), πιθανώς ως αποτέλεσμα της μικρής διάρκειας ζωής και της υψηλής αφθονίας των podosomes, η οποία έρχεται σε αντίθεση με τη μεγάλη διάρκεια ζωής και

χαμηλή αφθονία των invadosodia ανά κύτταρο. Η ικανότητα αποικοδόμησης της ECM επιτυγχάνεται με πρόσληψη ενζύμων λύσης (lytic enzymes) από τα invadosomes, όπως είναι οι μεταλλοπρωτεϊνάσες ή οι πρωτεϊνάσες σερίνης. Τα γνωστότερα μέλη αυτών των ομάδων είναι οι μεταλλοπρωτεϊνάσες μήτρας (MMPs), με κυριότερες τις MT1-MMP, MMP-2 και MMP-9, οι οποίες φαίνεται να είναι κεντρικά μόρια της αποικοδόμησης μήτρας που οφείλεται στην παρουσία των invadosomes.<sup>8</sup>



**Σχήμα 1.7: Διαφορετική αποικοδόμηση μήτρας με την παρουσία podosomes και invadopodia.<sup>17</sup>**

## Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον σχηματισμό των invadosomes

Ο σχηματισμός των invadosomes είναι μια εξαιρετικά περίπλοκη διαδικασία όπου απαιτείται η εμπλοκή και η αλληλεπίδραση ενός μεγάλου αριθμού δομικών και ρυθμιστικών πρωτεϊνών. Οι σημαντικότερες πρωτεΐνες είναι οι εξής:

- Η **cortical actin binding protein (cortactin)**, η οποία είναι μια κυτταροσκελετική πρωτεΐνη που μπορεί να ενεργοποιηθεί από εξωτερικά ερεθίσματα για την προώθηση του πολυμερισμού και την αναδιάταξη του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Εντοπίζεται σε όλους τους τύπους των κυττάρων, η οποία όταν φωσφορυλιωθεί, από κινάσες τυροσίνης ή κινάσες σερίνης / θρεονίνης, ενεργοποιεί το σύμπλοκο Arp2/3, και προωθεί τον σχηματισμό των invadopodia<sup>10</sup>. Η σύνδεση της cortactin με τα invadopodia περιγράφηκε για πρώτη φορά σε MDA-MB-231 κύτταρα, στα οποία η μικροέγχυση αντι-cortactin αντισώματος, μείωσε την ικανότητα τους να αποικοδομούν την ECM.<sup>12</sup>
- Η πρωτεΐνη **WASP (Wiskott Aldrich Syndrome Protein)**. Αναγνωρίστηκε το 1994 ως το αίτιο του ομώνυμου συνδρόμου, που χαρακτηρίζεται από έκζεμα, αιμορραγίες και υποτροπιάζουσες λοιμώξεις λόγω δυσλειτουργίας των λευκών αιμοσφαιρίων, τα οποία εμφανίζουν ομαλή επιφάνεια<sup>13</sup>. Η WASP εντοπίζεται αποκλειστικά στα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος. Η N-WASP (neural- WASP) είναι ένα άλλο μέλος της οικογένειας, που είναι άφθονη στο νευρικό ιστό, αλλά εντοπίζεται και σε πολλούς άλλους ιστούς του σώματος. Οι WASP πρωτεΐνες αποτελούνται από περίπου 500 αμινοξέα, έχουν παρόμοια πρωτεϊνική δομή και ομόλογα τους εντοπίζονται σε ποικιλία ευκαρυωτών. Εντοπίζονται τόσο στο κυτταρόπλασμα πλησίον της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, όπου αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα με τα φωσφολιπίδια της<sup>14</sup>, όσο και στον πυρήνα. Το έντονο ενδιαφέρον για τη μελέτη τους έγκειται στο γεγονός ότι αποτελούν συνδετικό κρίκο μεταξύ Rho-GTPασών και κυτταροσκελετού ακτίνης. Η πρωτεϊνική δομή του N-WASP εμπεριέχει τις εξής περιοχές<sup>15</sup>:



1. Μια VCA περιοχή, που εντοπίζεται στο C-τελικό άκρο και συνδέεται με ένα μονομερές ακτίνης και με το Agrp2/3 σύμπλεγμα, με αποτέλεσμα το σχηματισμό πυρήνα πολυμερισμού και τη δημιουργία νηματίων ακτίνης. Συνεπώς, το N-WASP έχει την ικανότητα ενεργοποίησης του Agrp2/3 συμπλέγματος οδηγώντας στον ταχύ πολυμερισμό νηματίων ακτίνης<sup>16</sup>.
2. Μια WH1/EVH-1 περιοχή (WASP-homology-1 ή Eνα VASP Homology-1 domain), η οποία εντοπίζεται στο N-τελικό άκρο και αποτελεί θέση πρόσδεσης για την οικογένεια των WIP πρωτεϊνών, οι οποίες σταθεροποιούν την WASP.
3. Μια βασική περιοχή, που αλληλεπιδρά με τα φωσφοϊνοσιτίδια της μεμβράνης
4. Μια πλούσια σε προλίνη περιοχή (Pro-rich domain) που αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που περιέχουν SH3 περιοχές και την προφιλίνη.
5. Μια GBD/CRIB περιοχή (GTPase Binding domain ή Cdc42/Rac interactive binding domain) που αλληλεπιδρά με τις μικρές Rho-GTPάσες και συγκεκριμένα με το Cdc42.

Σε συνθήκες ηρεμίας η πρωτεΐνη N-WASP είναι αναδιπλωμένη μέσω αλληλεπίδρασης της VCA με την CRIB περιοχή και συνεπώς είναι ανενεργή, εφόσον η VCA είναι καλυμμένη και δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με το σύμπλεγμα Agrp-2/3. Η σύνδεση του Cdc42 με την CRIB περιοχή ή/και η σύνδεση φωσφοϊνοσιτιδίων PtdIns(3,4,5)P3 με την βασική περιοχή οδηγούν σε αποκάλυψη της VCA περιοχής και ενεργοποίηση της N-WASP. Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης N-WASP επιτυγχάνεται επίσης τόσο με την σύνδεση πρωτεϊνών με SH3 περιοχές (Src homology-3) με την πλούσια σε προλίνη περιοχή της<sup>15</sup>, όσο και με την φωσφορυλίωση της από την οικογένεια των Src τυροσινικών κινασών. Η φωσφορυλίωση φαίνεται πως ενισχύεται από την ενεργοποίηση του Cdc42, γεγονότα που δρουν συνεργιστικά στην ενεργοποίηση του Agrp-2/3 συμπλέγματος. Μετά την ενεργοποίηση της η πρωτεΐνη N-WASP συμμετέχει σε πληθώρα φυσιολογικών και παθολογικών διεργασιών όπως στην ενδοκυττάρωση και την μεταφορά κυστιδίων, σε κυτταρικές συνδέσεις, σε συνδέσεις με

πρωτεϊνικούς υποδοχείς, αλλά και στον σχηματισμό προσεκβολών κυτταρικής κίνησης (invadosomes).

- Οι πρωτεΐνες προσαρμογείς **Tks**, οι οποίες είναι σημαντικές πολυλειτουργικές πρωτεΐνες, που ρυθμίζονται από διάφορους αλλοστερικούς μηχανισμούς, και εμπλέκονται τόσο στην φωσφορυλίωση τυροσινών όσο και σε άλλες μη καταλυτικές δραστηριότητες. Από την ομάδα πρωτεϊνών προσαρμογέων στον σχηματισμό των invadosomes εμπλέκονται οι πρωτεΐνες Tks4 και Tks5. Οι πρωτεΐνες αυτές, όπως προαναφέρθηκε, περιέχουν περιοχές SH3 και PH για αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών- πρωτεϊνών και πρωτεϊνών – λιπιδίων, και πιστεύεται ότι λειτουργούν ως πρωτεΐνες, που προσλαμβάνουν άλλες πρωτεΐνες και λιπίδια, απαραίτητα για τη συναρμολόγηση των invadopodia. Η Tks5 απαιτείται τόσο για τον σχηματισμό των invadosomes, όσο και για την ικανότητα εισβολής των invadopodia σε μια ποικιλία ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών. Συγκεκριμένα, θεωρείται ότι η Tks5 δεσμεύει την Adam-12, μια μεταλλοπρωτεϊνάση η οποία συνδέεται με τα invadopodia. Επιπλέον, η Tks5 συνδέεται με την ρυθμιστική πρωτεΐνη της ακτίνης N-WASP, και εμπλέκεται στην πρόσληψη της cortactin. Τέλος, η Tks5 συνδέεται με την p22<sup>phox</sup>, ένα μέρος του συμπλόκου της οξειδάσης του NADPH, το οποίο δημιουργεί δραστικά είδη οξυγόνου, που διευκολύνουν τον σχηματισμό και την λειτουργία των invadopodia. Η Tks4, η οποία είναι μέλος της οικογένειας των κινασών τυροσίνης, εντοπίζεται επίσης στα invadopodia σε Src μετασχηματισμένα κύτταρα. Η Tks4 είναι απαραίτητη για την δημιουργία και την λειτουργία των invadosomes, γιατί δεσμεύει την MT1-μεταλλοπρωτεϊνάση μήτρας (MMP), η οποία είναι απαραίτητο συστατικό των δομών αυτών.<sup>10</sup>
- Οι μεταλλοπρωτεάσες (**Matrix Metalloproteases, MMP**), με σημαντικότερη την **MT1-MMP** (membrane type 1 metalloprotease). Η MT1-MMP (επίσης γνωστή ως MMP14), είναι, μια μεμβρανική μεταλλοπρωτεϊνάση, η οποία θεωρείται ένας κεντρικός παράγοντας στην διαμεσολαβούμενη από τα invadopodia υποβάθμιση της ECM. Η MT1-MMP διασπά αρκετά υποστρώματα *in vitro*,

συμπεριλαμβανομένων των συστατικών της ECM όπως η ινωδονεκτίνη (fibronectin) τύπου I, II και III, το κολλαγόνο, η βιτρονεκτίνη (vitronectin) κ.α. Επιπλέον, η MT1-MMP είναι ικανή να ενεργοποιεί άλλα ανενεργά ένζυμα της οικογένειας των MMP, όπως το MMP2. Η MT1-MMP φτάνει στα invadopodia με πολλαπλούς τρόπους. Ένας από αυτούς είναι μέσω της N-WASP πρωτεΐνης, η οποία προωθεί την πυρήνωση της ακτίνης, και προωθεί την μεταφορά της MT1-MMP στα invadosomes. Ένας σημαντικός επαγωγέας των invadopodia, η Src κινάση, έχει επίσηςδειχθεί ότι ρυθμίζει άμεσα την μεταφορά των MT1-MMP στα invadopodia. Η διαμεσολαβούμενη από την Src φωσφορυλίωση της MT1-MMP, επιβραδύνει την ενδοκύτωση της MT1-MMP και αυξάνει την δραστηριότητα της αποικοδόμησης μήτρας.<sup>10</sup>

- Οι πρωτεάσες **Adams**, είναι μια οικογένεια μεταλλοπρωτεϊνών οι οποίες εμπλέκονται σε μία ποικιλία βιολογικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένων της κυτταρικής προσκόλλησης, μετανάστευσης, πρωτεόλυσης, κ.α. Από την οικογένεια αυτών των πρωτεασών, κάριο ρόλο στον σχηματισμό των invadosomes έχει η Adam-12, η οποία αποτελείται από δύο μετάγραφα τα οποία προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα: Το Adam-12-L, το οποίο αποτελείται από διαμεμβρανικές και κυτταροπλασματικές περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη, και το Adam-12-S, στο οποίο δεν εντοπίζονται διαμεμβρανικές και κυτταροπλασματικές περιοχές. Η Adam-12 συμβάλλει στη λειτουργία των invadosomes σε πολλαπλά επίπεδα, συμπεριλαμβανομένου την αποικοδόμηση της ECM, την ρύθμιση της λειτουργίας της ιντεγκρίνης, και την ενεργοποίηση παραγόντων ανάπτυξης.

## Κυτταρικό μονοπάτι σηματοδότησης των invadosomes

Για να ξεκινήσει η δημιουργία των invadosomes, έχει αποδειχθεί ότι συχνά απαιτείται η διέγερση με παράγοντες ανάπτυξης, όπως π.χ. ο παράγοντας που προέρχεται από αιμοπετάλια ανάπτυξης (PDGF), και ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) τόσο σε φυσιολογικά όσο και σε καρκινικά κύτταρα, (σχήμα 1.8α). Αυτά τα ερεθίσματα προκαλούν τη φωσφορυλίωση ή/και την ενεργοποίηση των πρωτεϊνών που σχετίζονται με τα podosomes και τα invadopodia. Πρόσφατα, έχουν έρθει στο φως νέοι μηχανισμοί σχηματισμού οι οποίοι περιλαμβάνουν την σηματοδότηση ιντεγκρίνης, την σηματοδότηση ενεργών ειδών οξυγόνου (ROS), και τον έλεγχο από τα microRNAs.

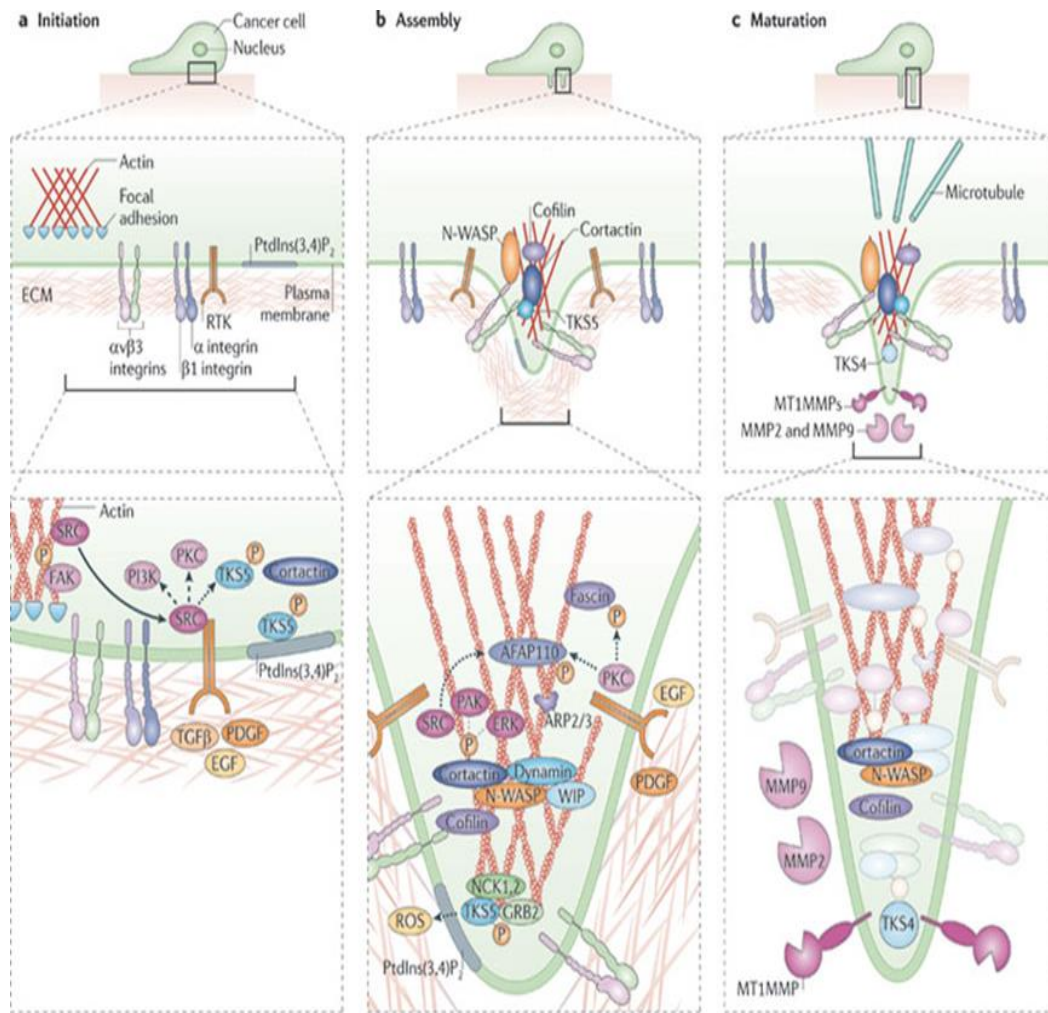
Ο σχηματισμός των invadosomes περιλαμβάνει τρία στάδια, το στάδιο έναρξης, το στάδιο σχηματισμού και το στάδιο ωρίμανσης (σχήμα 1.8).

Κατά την έναρξη του σχηματισμού των invadopodia (σχήμα 1.8α), τα κύτταρα δημιουργούν εστιακές συμφύσεις και έρχονται σε επαφή με την εξωκυττάρια μήτρα (ECM) μέσω της αλληλεπίδρασης των ιντεγκρινών, της SRC και της φωσφορυλιωμένης κινάσης εστιακής προσκόλλησης (focal adhesion kinase, FAK). Σε κύτταρα εισβολής, απελευθερώνεται η SRC κινάση, η οποία δεσμεύεται και φωσφορυλιώνει την κινάση τυροσίνης TKS5, την κινάση της τριφωσφορικής φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης (PI3K) και την πρωτεϊνική κινάση C (PKC). Η απελευθέρωση της Src κινάσης διαμεσολαβείται από παράγοντες ανάπτυξης όπως, ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (PDGF) και ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-β (TGFβ). Η φωσφορυλιωμένη TKS5 στη συνέχεια εντοπίζεται σε περιοχές πλούσιες σε διφωσφορικό φωσφατιδυλ-ινοσιτολικό φωσφολιπίδιο (PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>). Αυτό το λιπίδιο στρατολογεί την TKS5 μέσω σύνδεσης με την PX περιοχή της. Ο συνεντοπισμός της TKS5 με την cortactin στις πρόδρομες ουσίες των invadopodia, προτείνει ότι η TKS5 δρα σαν μόριο σκαλωσιά το οποίο προσλαμβάνει την cortactin η οποία είναι απαραίτητη για τον μετέπειτα σχηματισμό των invadopodia.

Ο σχηματισμός των invadopodia (σχήμα 1.8β) επιτυγχάνεται τόσο με την πρόσληψη και την ενεργοποίηση του συμπλέγματος ARP2/3 και της πρωτεΐνης που αλληλεπιδρά με την WASP (WIP), όσο και με την φωσφορυλίωση των

βασικών συστατικών των invadopodia, όπως π.χ. της cortactin, της TKS5, και της AFAP110. Σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό παίζει επίσης η παραγωγή ενεργών ειδών οξυγόνου (ROS). Η TKS5 δεσμεύει τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες προσαρμογείς NCK1 και NCK2, την πρωτεΐνη δέσμευσης που δρα σαν υποδοχέας του παράγοντα ανάπτυξης (GRB2) και την πρωτεΐνη N-WASP. Η cortactin συνδέεται με την N-WASP και με το σύμπλεγμα ARP2/3 και δημιουργεί επίσης ένα σύμπλεγμα που αποτελείται από τις πρωτεΐνες WIP και dynamin, κατά τη διάρκεια του σχηματισμού invadopodia. Η φωσφορυλίωση τόσο της cortactin (από τις κινάσες SRC, PAK και ERK) όσο και της TKS5 (από την SRC) ρυθμίζει τον σχηματισμό των invadopodia. Επιπλέον, η φωσφορυλίωση της cortactin από τον EGF προκαλεί διαχωρισμό της κοφιλίνης που απαιτείται για την έναρξη του πολυμερισμού της ακτίνης και το σχηματισμό των invadopodia.

Στο στάδιο της ωρίμανσης (σχήμα 1.8γ), τα invadopodia προάγουν την αποικοδόμηση της ECM μέσω της έκκρισης των μεταλλοπρωτεασών μήτρας 2 (MMP2) και 9 (MMP9), και μέσω μεταφοράς (ενδεχομένως μέσω μικροσωληνίσκων) της μεμβρανικής μεταλλοπρωτεάσης τύπου 1 (MT1-MMP) προς το άκρο της προεξέχουσας δομής, μέσω της αλληλεπίδρασης αυτών των πρωτεασών με βασικά συστατικά των invadopodia όπως την cortactin, την TKS4 και την β1 ιντεγκρίνη. Η αποφωσφορυλίωση της cortactin εμποδίζει την ικανότητα αποκοπής της κοφιλίνης και επιτρέπει τη σταθεροποίηση των invadopodia. Οι μηχανισμοί με τους οποίους οι πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν, και ρυθμίζονται χρονικά, είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι και χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Σχήμα 1.8: Τα στάδια σχηματισμού των invadopodia. Στο πάνω μέρος της εικόνας απεικονίζεται η δομή των invadopodia σε σχέση με το κύτταρο, στην μέση αναπαριστούνται οι βασικές πρωτεΐνες των invadopodia σε σχέση με την κυτταρική μεμβράνη και στο κάτω μέρος αναπαρίσταται ο μοριακός σχηματισμός τους.<sup>9</sup>

### 1.1.3 Εμπλοκή του γονιδίου Sh3pxd2a στην κυτταρική μετανάστευση και στην εμβρυική ανάπτυξη

Η κυτταρική μετανάστευση είναι απαραίτητη για διάφορες φυσιολογικές διαδικασίες του οργανισμού, αλλά και για ορισμένα παθολογικά γεγονότα. Η έναρξη της κυτταρικής μετανάστευσης απαιτεί μια αλλαγή στο σχήμα των κυττάρων με σκοπό την προώθηση ενός μεσεγχυματικού φαινότυπου, που προκύπτει με αλλαγή της δυναμικής της ακτίνης, η οποία κατευθύνεται από πρωτεΐνες που σχετίζονται με την ακτίνη, όπως GTPases, κινάσες, και το κυτταροσκελετικό σύστημα ακτίνης-μυοσίνης. Αυτές οι αλλαγές επιτρέπουν στο κύτταρο να δημιουργήσει επαφές και να μεταναστεύσει μέσω, της ECM ως απόκριση σε ερεθίσματα του περιβάλλοντος. Στον ενήλικα οργανισμό, η μετανάστευση των κυττάρων περιορίζεται σε κύτταρα που απαιτούνται για την διάσχιση της εξωκυττάριας μήτρας και συμβαίνει κατά τη διάρκεια διαδικασιών όπως στην επούλωση τραυμάτων, στην αγγειογένεση, στην ανοσολογική επιτήρηση, και στην μετάσταση του καρκίνου. Η μετανάστευση των φυσιολογικών κυττάρων συμβαίνει κυρίως κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, όπου τα κύτταρα κυκλοφορούν για να δημιουργηθούν όργανα και ιστοί στο έμβρυο. Κατά τη διάρκεια της πρώιμης ανάπτυξης, τα μεταναστευτικά κύτταρα υφίστανται την διαδικασία της επιθήλιο-μεσεγχυματικής μετάβασης (**epithelial to mesenchymal transition, EMT**), η οποία οδηγεί στην παραγωγή ενός μεσεγχυματικού φαινότυπου που απαιτείται για την προώθηση της κυτταρικής μετανάστευσης. Αυτή εμφανίζεται στην διαδικασία της γαστριδίωσης κατά τη διάρκεια της σύγκλισης και της επέκτασης και συνεχίζεται κατά τη διάρκεια εμφάνισης της νευρικής ακρολοφίας.

Τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας είναι άκρως μεταναστευτικά, πολυδύναμα κύτταρα που δημιουργούνται στο νευρικό σωλήνα μεταξύ της νευρικής πλάκας και του μη νευρικού εξωδέρματος. Αυτά τα κύτταρα αποικίζουν σχεδόν όλους τους ιστούς του εμβρύου, ενώ από αυτά σχηματίζονται πολλοί διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι, οι σημαντικότεροι από τους οποίους είναι οι νευρώνες και η γλοία του αισθητικού, συμπαθητικού και παρασυμπαθητικού νευρικού συστήματος, ο μυελός των επινεφριδίων, τα μελανοκύτταρα (χρωμοφόρα κύτταρα), και ο σκελετός του κρανίου. Ανάλογα με την περιοχή που

εντοπίζονται, κατά μήκος του πρόσθιου-οπίσθιου άξονα του νευρικού σωλήνα, διακρίνονται στα κρανιακά (cranial), αυχενικά (vagal) και κύτταρα νευρικής ακρολοφίας του κορμού.

Ο παράγοντας TGFβ επάγει τη μετανάστευση των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας με την αύξηση πολλών παραγόντων μεταγραφής, και με την ρύθμιση της σύνδεσης τους με την ECM. Έχει αποδειχθεί ότι τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας σχηματίζουν προεξοχές πλούσιες σε ακτίνη οι οποίες μπορούν και λαμβάνουν σήματα από γειτονικά κύτταρα νευρικής ακρολοφίας ή από την ECM για την προώθηση της κατεύθυνσης της μετανάστευσης.

Η πρωτεΐνη Tks5 έχει εμπλακεί σε πολλούς τύπους καρκίνων, μέσω της συμμετοχής της στον σχηματισμό των *invasorodia*. Ωστόσο ο ρόλος της στην εμβρυϊκή ανάπτυξη μέχρι πρόσφατα δεν είχε διερευνηθεί. Η Murphy D.A. και οι συνεργάτες της, σε μια πρόσφατη μελέτη διερεύνησαν τον ρόλο της Tks5 κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης χρησιμοποιώντας το πειραματικό μοντέλο *zebrafish*, στο οποίο αδρανοποίησαν το εν λόγω γονίδιο με την χρήση ολιγομερών *morpholino*. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν εντυπωσιακές φαινοτυπικές διαφορές στα πειραματόζωα ελέγχου και στα πειραματόζωα στα οποία είχε απενεργοποιηθεί το γονίδιο Tks5, αναδεικνύοντας ένα σημαντικό ρόλο του Tks5 σε πολλαπλές κυτταρικές γραμμές κατά την ανάπτυξη. Η πλειοψηφία των ελαττωμάτων στα ζώα στα οποία είχε απενεργοποιηθεί η έκφραση της πρωτεΐνης Tks5 ήταν σε όργανα και ιστούς που προέρχονταν από τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας, συμπεριλαμβανομένων της καρδιάς, και των κρανιοπροσωπικών δομών (μικρότερο κεφάλι, μικρότερα μάτια), υποδηλώνοντας ότι το γονίδιο Tks5 απαιτείται για την λειτουργία των κυττάρων νευρικής ακρολοφίας κατά την διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Αποδείχθηκε επίσης ότι, το μονοπάτι σηματοδότησης Src-Tks5 απαιτείται για την μετανάστευση των κυττάρων νευρικής ακρολοφίας, αφού η χορήγηση αναστολέων για την Src οικογένεια κινασών μετά το στάδιο της γαστριδίωσης επηρέασε την κατανομή των κυττάρων νευρικής ακρολοφίας στην περιοχή του κορμού. Τέλος, αυτό το μονοπάτι φαίνεται να ρυθμίζει την μετανάστευση του συγκεκριμένου τύπου κυττάρων μέσω του σχηματισμού προμεταναστευτικών πλούσιων σε ακτίνη, προεξοχών *in vivo*, και σε καλλιέργειες *in vitro*, όπου αυτές οι προεξοχές έχουν χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά των *podosomes*.<sup>18</sup>



Το 2014, ο Martin P.C. και οι συνεργάτες του, βασιζόμενοι στην παραπάνω δημοσίευση, διερεύνησαν τη λειτουργία της πρωτεΐνης Tks5 στην ανάπτυξη των θηλαστικών, αναλύοντας ποντικούς που φέρουν μετάλλαξη στο αντίστοιχο γονίδιο. Η διακοπή και των δυο αντίγραφων του γονιδίου Sh3pxd2a (μητρικής και πατρικής προέλευσης), με την τεχνολογία της γονιδιακής παγίδευσης στα ποντίκια, είχε ως αποτέλεσμα το θάνατο των νεογνών και την εμφάνιση του παθολογικού φαινομένου της υπερωισχιστίας.

Η υπερωισχιστία, είναι ένα από τα πιο συχνά κρανιοπροσωπικά ελαττώματα που επηρεάζει 1 στις 700 γεννήσεις, και σε σπάνιες περιπτώσεις θεωρείται θανατηφόρο νόσημα. Η εμφάνιση υπερωισχιστίας μπορεί είτε να σχετίζεται με άλλα ελαττώματα και να αποτελεί μέρος ενός συνδρόμου, γενετικής συνήθως προέλευσης και μεντελιανής κληρονομικότητας, είτε να θεωρηθεί ένα μεμονωμένο γνώρισμα στην δημιουργία του οποίου συμβάλλουν τόσο γενετικοί όσο και περιβαλλοντικοί παράγοντες.

Οι ερευνητές ασχολήθηκαν επίσης με την επίδραση των διαφορετικών ισομορφών της πρωτεΐνης στην ανάπτυξη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το mRNA της πρωτεΐνης Tks5b (σχήμα 1.2), της μικρότερης ισομορφής της πρωτεΐνης Tks5 η οποία εντοπίζεται στα ποντίκια και αποτελεί ανακάλυψη της συγκεκριμένης ομάδας ερευνητών, εκφράζεται σε εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικίων, αλλά και σε όλους τους ιστούς των ποντικίων που αναλύθηκαν, ακόμα και σε αυτούς στους οποίους είχε αδρανοποιηθεί η Tks5long ισομορφή. Η έκφραση βέβαια της συγκεκριμένης ισομορφής βρέθηκε από 8 έως και 490 φορές χαμηλότερη σε σχέση με την έκφραση της Tks5long. Έτσι κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι, για την ομαλή ανάπτυξη των θηλαστικών απαιτείται η ύπαρξη της πλήρους ισομορφής της πρωτεΐνης Tks5.

Τέλος αποκαλύφθηκε επίσης ένα πιθανός γενικότερος ρόλος για τις πρωτεΐνες προσαρμογείς Tks, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των θηλαστικών, επειδή όταν έχουν αδρανοποιηθεί και τα δυο γονίδια που κωδικοποιούν τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες, τα έμβρυα που προκύπτουν δεν γεννιούνται και παραμένουν νεκρά στη μήτρα μετά την εμφύτευση, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με τις μεντελιανές αναλογίες που προκύπτουν κατά τη γέννηση μεταλλαγμένων ποντικίων είτε για την Tks5 είτε για την Tks4 πρωτεΐνη.<sup>3</sup>

#### 1.1.4 Εμπλοκή του γονιδίου Sh3pxd2a στην παθογένεια του καρκίνου

##### Καρκίνος του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί την δεύτερη συχνότερη αιτία θανάτου στις γυναίκες μετά τον καρκίνο του πνεύμονα, ενώ είναι ο πιο συχνός καρκίνος στις γυναίκες στις χώρες του δυτικού κόσμου. Σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας, πάνω από 1,6 εκατομμύρια γυναίκες τον χρόνο νοσούν από καρκίνο του μαστού. Αυτή η ραγδαία αύξηση του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου τα τελευταία χρόνια οδηγεί τους επιστήμονες στην αναζήτηση αιτιών εμφάνισης και θεραπειών για την νόσο.

Σχετικά πρόσφατα εξετάστηκε ο ρόλος της πρωτεΐνης TKS5, τόσο στην ανάπτυξη όσο και στην ικανότητα μετάστασης των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Ένας μηχανισμός μέσω του οποίου τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν μεταναστευτική ικανότητα, είναι μέσω του σχηματισμού των *invadopodia*. Ενώ υπάρχει μια αυξανόμενη πεποίθηση ότι *invadopodia* εμπλέκονται στην μετάσταση του όγκου, λιγότερα είναι γνωστά σχετικά με την εμπλοκή τους στην ανάπτυξη του όγκου, ιδίως *in vivo*.

Διαπιστώθηκε ότι η πρωτεΐνη TKS5 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε πρωτογενείς όγκους καρκίνου του μαστού, σε σύγκριση με φυσιολογικούς ιστούς, ενώ αυξάνεται περαιτέρω στην μετάσταση<sup>19</sup>. Μάλιστα, η υψηλή έκφραση της πλήρους ισομορφής της πρωτεΐνης (TKS5 long), συσχετίστηκε με κακή πρόγνωση, ανεξαρτήτως του υποτύπου του όγκου, ιδιαίτερα στους ασθενείς που παρουσίασαν όψιμη υποτροπή στην φάση I / II της ασθένειας. Επίσης, η αδρανοποίηση της έκφρασης της TKS5 σε καρκινικά κύτταρα του μαστού οδήγησε σε μειωμένη ανάπτυξη του όγκου, τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* πειράματα. Επιπλέον από τα πειράματα προέκυψε ότι η πρωτεΐνη είναι απαραίτητη για την σωστή αγγείωση του όγκου, αφού η απουσία της οδήγησε σε ελαττωμένη αγγειογένεση των όγκων, φαινόμενο που συνοδεύεται από μειωμένο πολλαπλασιασμό και αυξημένη απόπτωση των καρκινικών κυττάρων.<sup>20</sup>

## **Καρκίνος του παχέος εντέρου**

Ο καρκίνος του εντέρου είναι ένας συχνά διαγιγνωσκόμενος τύπος καρκίνου. Αποτελεί τον τρίτο πιο συχνά εμφανιζόμενο τύπο καρκίνου στους άντρες, ενώ εμφανίζεται συχνά και σε γυναίκες. Περισσότεροι από 1 εκατομμύριο άνθρωποι εμφανίζουν καρκίνο του παχέος εντέρου κάθε χρόνο, ενώ υπολογίζεται ότι το 5% των ανθρώπων θα εμφανίσουν καρκίνο του παχέος εντέρου μέχρι την ηλικία των 70 χρόνων<sup>21</sup>. Έχει αποδειχθεί πειραματικά με την μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας σε τομές παραφिनιοποιημένων καρκινικών ιστών, ότι η έκφραση της TKS5 αυξάνεται σημαντικά σε ιστούς ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς ιστούς.<sup>19</sup>

## **Καρκίνος του προστάτη**

Ο καρκίνος του προστάτη είναι ο πρώτος σε συχνότητα εμφάνισης καρκίνου στους άντρες, και αποτελεί την δεύτερη μετά τον καρκίνο του πνεύμονα αιτία θανάτου, από νεοπλασματική νόσο. Σύμφωνα με την Αμερικανική αντικαρκινική εταιρεία, υπολογίζεται ότι ο 1 στους 7 άνδρες θα διαγνωστεί με καρκίνο του προστάτη κατά τη διάρκεια της ζωής του. Η πλειοψηφία των αντρών που προσβάλλονται από την νόσο είναι μεγαλύτεροι από 65 ετών, ενώ ο επιπολασμός αυξάνεται με την αύξηση της ηλικίας περισσότερο από κάθε άλλη μορφή καρκίνου. Η διάγνωση της νόσου συνήθως γίνεται σε προχωρημένο στάδιο με αποτέλεσμα οι ασθενείς να έχουν κακή πρόγνωση. Έτσι ενώ δεν ήταν μια ασθένεια με μεγάλη θνησιμότητα, καθώς ο μέσος όρος ζωής αυξάνεται, αναμένεται να αυξηθούν τόσο οι επιπτώσεις όσο και η θνησιμότητα από την συγκεκριμένη νόσο.

Έχει αποδειχθεί ότι η κινάση Src, υπερεκφράζεται σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του προστάτη, ενώ η αναστολή της δράσης της οδηγεί σε μειωμένο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και μειωμένη ανάπτυξη των όγκων του προστάτη. Είναι γνωστό επίσης ότι η ενεργοποίηση της, προωθεί τον σχηματισμό των podosome και των invadopodia. Ο επιβεβαιωμένος ρόλος τη κινάσης Src στον καρκίνο του προστάτη, σε συνδυασμό με την αλληλεπίδραση της με την πρωτεΐνη TKS5, αποτέλεσε το έναυσμα το 2014, της μελέτης του

ρόλου του Src-TKS5 μονοπατιού σηματοδότησης, στον καρκίνο του προστάτη και στην ανάπτυξη των *invasiveness* στον συγκεκριμένο καρκινικό τύπο.

Αποδείχθηκε ότι το Src-TKS5 μονοπάτι σηματοδότησης διαδραματίζει πράγματι ένα σημαντικό ρόλο στον καρκίνο του προστάτη και στην κυτταρική εισβολή. Η έκφραση της πρωτεΐνης TKS5 βρέθηκε αυξημένη σε καρκινικά δείγματα του προστάτη<sup>(19)</sup>, ενώ συσχετίστηκε με την πρόγνωση των ασθενών. Το γεγονός αυτό έκανε τους ερευνητές να πιστεύουν ότι η TKS5 θα μπορούσε να είναι ένας μελλοντικός βιοδείκτης για την σταδιοποίηση της ασθένειας και για την πρόγνωση της εξέλιξης της νόσου. Πέρα από τον ρόλο της στον όγκο, αποδείχθηκε ότι η έκφραση της TKS5 είναι επαρκής για να οδηγήσει στον σχηματισμό των *invasiveness* σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη, ενώ η φωσφορυλίωση της από την Src κινάση, ρυθμίζει την ικανότητα αναδιαμόρφωσης μήτρας των *invasiveness* καθώς και την ικανότητα εισβολής των κυττάρων.<sup>22</sup>

### **Καρκίνος του πνεύμονα**

Ο καρκίνος του πνεύμονα, είναι η πιο συχνή αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως. Περίπου ένας στους τέσσερις θανάτους από καρκίνο οφείλονται στον καρκίνο του πνεύμονα. Το 2012 είχαν διαγνωστεί περίπου 1,8 εκατομμύρια νέοι ασθενείς παγκοσμίως<sup>(23)</sup>, ενώ η Αμερικάνικη καρκινική εταιρεία εκτιμά ότι το 2016 στις Ηνωμένες Πολιτείες διαγνώστηκαν 224,390 νέες περιπτώσεις καρκίνου και προκλήθηκαν 158,080 θάνατοι από την νόσο.<sup>24</sup>

Οι κύριοι τύποι καρκίνου του πνεύμονα είναι ο μικροκυτταρικός (*small cell lung cancer-SCLC*) και ο μη μικροκυτταρικός (*non small cell lung cancer NSCLC*) καρκίνος του πνεύμονα. Η πιο κοινή αιτία του καρκίνου του πνεύμονα είναι η μακροχρόνια έκθεση στον καπνό, η οποία προκαλεί το 80-90% των καρκίνων του πνεύμονα. Η θεραπεία και η πρόγνωση εξαρτώνται κυρίως από τον ιστολογικό τύπο του καρκίνου, και το στάδιο (βαθμό εξάπλωσης).

Η πρωτεΐνη Tks5, έχει εμπλακεί στην παθογένεια του καρκίνου του πνεύμονα. Έχει βρεθεί ότι η έκφραση της αυξάνεται σε ιστούς ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς ιστούς.<sup>19</sup> Μέχρι πρόσφατα

όμως, δεν είχε μελετηθεί ο ρόλος της στην μετάσταση, καθώς και η δράση των διαφορετικών ισομορφών της πρωτεΐνης.

Το 2013 αποδείχθηκε ότι οι δύο ισομορφές της πρωτεΐνης Tks5, Tks5 long και Tks5 short διαδραματίζουν διαφορετικούς ρόλους στην εξέλιξη της νόσου. Συγκεκριμένα, η πλήρης ισομορφή της πρωτεΐνης (Tks5 long) προωθεί την δραστηριότητα των *invadopodia* και την μετάσταση, αφού πειράματα που έγιναν σε ζωικά μοντέλα ποντικών που αναπαριστούν την ασθένεια, στα οποία η ισομορφή είχε αδρανοποιηθεί, έδειξαν ότι η λειτουργία των *invadopodia* και η ικανότητα μετάστασης μειώνεται, ενώ η αυξημένη έκφραση αυτής της ισομορφής έδειξε τα αντίθετα αποτελέσματα. Αντίθετα, η μικρότερη ισομορφή της πρωτεΐνης (Tks5 short), δρα σαν αρνητικός ρυθμιστής της λειτουργίας των *invadopodia*, καθώς η αυξημένη έκφραση της επηρεάζει αρνητικά την σταθερότητα των *invadopodia* και αναστέλλει την πρωτεόλυση της ζελατίνης. Οι ερευνητές, ως εκ τούτου, θεωρούν ότι για τη μεταστατική εισβολή περισσότερο σημαντική είναι η ισορροπία της έκφρασης των δύο ισομορφών και όχι η συνολική έκφραση της πρωτεΐνης, αφού υψηλό επίπεδο έκφρασης της Tks5long και χαμηλό επίπεδο έκφρασης της Tks5short, συσχετίζεται με την μετάστασή. Επίσης απέδειξαν ότι ο λόγος έκφρασης των δύο ισομορφών (Tks5long/ Tks5short) ρυθμίζει τον σχηματισμό των *invadopodia* *in vitro* και *in vivo*. Τέλος, θεωρούν ότι η σχετική έκφραση των δυο ισομορφών μπορεί να αποτελέσει έναν σημαντικό προγνωστικό παράγοντα για ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, αφού ο υψηλός λόγος TKS5long/ TKS5short σχετίζεται με κακή επιβίωση των ασθενών που νοσούν σε πρώιμο στάδιο.<sup>2</sup>

## **Μελάνωμα**

Οι περισσότεροι καρκίνοι του δέρματος, δε θεωρούνται γενικά πολύ επικίνδυνοι διότι θεραπεύονται εύκολα χειρουργικά ή με διάφορα φάρμακα που εφαρμόζονται τοπικά στο δέρμα. Εξάιρεση αποτελεί ο κακοήθης σπίλος που ονομάζεται μελάνωμα. Το μελάνωμα αποτελεί όχι μόνο τον πλέον κακοήθη δερματικό όγκο αλλά και έναν από τους πλέον κακοήθεις καρκίνους γενικώς. Μπορεί να διασπαρθεί σχεδόν σε κάθε όργανο ή ιστό του σώματος και να

οδηγήσει στο θάνατο μέσα σε ένα χρόνο μετά την υποτροπή του σε απομακρυσμένα σημεία.

Η πρωτεΐνη προσαρμογέας Tks5 ρυθμίζει την ικανότητα εισβολής του μελανώματος *in vitro*, μέσω του σχηματισμού των *invadopodia* σε κύτταρα μελανώματος<sup>(25)</sup>. Σε μελέτη που δημοσιεύτηκε τον Οκτώβριο του 2016, αποδεικνύεται ότι τόσο η πρωτεΐνη Tks5 όσο και η ομόλογη πρωτεΐνη της Tks4 έχουν ουσιαστικό ρόλο εκτός από τον σχηματισμό των *invadopodia* στην ανάπτυξη του όγκου και στην μετάσταση. Συγκεκριμένα, προτείνεται ένα μοντέλο όπου, μέσω των πρωτεϊνών προσαρμογέων Tks, επιτυγχάνεται ο σχηματισμός των *invadopodia* και η πρόσληψη των MT1-MMP, που οδηγούν στην ανάπτυξη του όγκου και στην μετάσταση. Τέλος, αναφέρεται ότι οι πρωτεΐνες προσαρμογείς TKS εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα σε δείγματα ασθενών με μελάνωμα.<sup>26</sup>

## **Γλοιώμα**

Το γλοιώμα είναι όγκος στον εγκέφαλο που αναπτύσσεται από τα νευρογλοιακά κύτταρα, τα οποία στηρίζουν τους νευρώνες του εγκεφάλου και τους παρέχουν μεταξύ άλλων θρεπτικές ουσίες και οξυγόνο. Τα γλοιώματα είναι από τους συχνότερους πρωτογενείς καρκίνους του εγκεφάλου, οι οποίοι παρουσιάζονται με διάφορους βαθμούς κακοήθειας. Μια ομάδα ερευνητών μελέτησε την έκφραση της πρωτεΐνης TKS5, σε ασθενείς με διαφορετικούς βαθμούς κακοήθειας, και παρατήρησαν ότι η TKS5 εκφράζονταν σε όλα τα στάδια του όγκου. Επίσης είδαν ότι η αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης σχετιζόταν με σημαντικά μειωμένη επιβίωση των ασθενών. Αυτά τα αποτελέσματα αναδεικνύουν μια μελλοντική χρήση της πρωτεΐνης TKS5, ως προγνωστικό δείκτη που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ασθενείς με τέτοιες κακοήθειες.<sup>27</sup>

## 1.2 Πνευμονική ίνωση

Η ίνωση είναι μια παθολογική διαδικασία των περισσότερων χρόνιων φλεγμονωδών παθήσεων. Ο πιο επίσημος ορισμός που έχει δοθεί μέχρι στιγμής, είναι ότι ίνωση ορίζεται η αυξημένη παραγωγή και εναπόθεση συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας, που οδηγεί στην καταστροφή της φυσιολογικής αρχιτεκτονικής του ιστού και στην υπονόμηση της λειτουργίας του λόγω του ότι το φυσιολογικό παρέγχυμα αντικαθίσταται από συνδετικό ιστό που συγκροτείται από τα μόρια του στρώματος και λοιπές δομές καθώς και μόρια που βρίσκονται στον εξωκυττάριο χώρο. Το αποτέλεσμα της ίνωσης είναι η δυσλειτουργία οργάνων και θάνατος. Η ίνωση επηρεάζει σχεδόν κάθε ιστό στο σώμα. Η ίνωση που προσβάλλει τον πνεύμονα χαρακτηρίζεται **ως Ιδιοπαθής Πνευμονική Ίνωση (Idiopathic Pulmonary Fibrosis, IPF)**.

### 1.2.1 Ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση

Ως ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (IPF,ΙΠΙ) ορίζεται ένας ιδιαίτερος τύπος χρόνιας μη αναστρέψιμης, προοδευτικά εξελισσόμενης και τελικά θανατηφόρου ινωδοποιού διάμεσης πνευμονίτιδας αγνώστου αιτιολογίας, η οποία εντοπίζεται αποκλειστικά στον πνεύμονα και αντιστοιχεί στο ιστολογικό πρότυπο της συνήθους διάμεσης πνευμονίας (**Usual Interstitial Pneumonia, UIP**). Ο ιστολογικός τύπος προκύπτει από τη χειρουργική βιοψία πνεύμονα, θωρακοσκοπική ή ανοικτή. Η οριστική διάγνωση της ΙΠΙ, όταν συνυπάρχει χειρουργική βιοψία που αντιστοιχεί στο ιστολογικό πρότυπο της UIP απαιτεί και τα ακόλουθα:

- Αποκλεισμό κάθε γνωστής αιτίας διαμέσου πνευμονικής νόσου, όπως φάρμακα, περιβαλλοντολογική έκθεση ή αυτοάνοσο ρευματολογικό νόσημα.
- Συνύπαρξη παθολογικών λειτουργικών δοκιμασιών και συγκεκριμένα παρουσία περιοριστικού συνδρόμου (που χαρακτηρίζεται από μείωση των πνευμονικών στατικών όγκων) και διαταραχή της ανταλλαγής των

αερίων (αύξηση της P(A-a) O<sub>2</sub> ή μείωση της DLCO κατά την ηρεμία ή την άσκηση).

- Τυπικά ευρήματα στην απλή ακτινογραφία θώρακα και την αξονική τομογραφία θώρακα υψηλής ευκρίνειας. Στα αρχικά στάδια της νόσου τόσο οι πνευμονικές λειτουργικές δοκιμασίες όσο και τα απεικονιστικά ευρήματα μπορεί να είναι στα φυσιολογικά όρια ή να έχουν επηρεαστεί ελάχιστα. Επίσης ασθενείς καπνιστές, που πάσχουν συγχρόνως από χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, δεν παρουσιάζουν την τυπική λειτουργική και ακτινολογική εικόνα που αναμένεται ως εκδήλωση της ΙΠΙ. Όταν δεν υπάρχει βιοψία πνεύμονα η διάγνωση της ΙΠΙ είναι αβέβαιη. Όμως σε ασθενείς με ανοσοεπάρκεια, όταν συνυπάρχουν όλα τα παρακάτω μείζονα κριτήρια και τρία από τα ελάσσονα, μπορούμε με σχετική ασφάλεια να θεωρήσουμε τη διάγνωση της νόσου ως σωστή.

#### Μείζονα κριτήρια

- Αποκλεισμό κάθε γνωστής αιτίας διαμέσου πνευμονικής νόσου, όπως φάρμακα, περιβαλλοντολογική έκθεση και αυτοάνοσο ρευματολογικό νόσημα.
- Παθολογικές λειτουργικές δοκιμασίες και συγκεκριμένα παρουσία περιοριστικού συνδρόμου με διαταραχή της ανταλλαγής των αερίων (αύξηση της P (A-a) O<sub>2</sub> ή μείωση της DLCO κατά την ηρεμία ή την άσκηση).
- Δικτυοοζώδες πρότυπο με κατανομή κυρίως στις βάσεις στην αξονική τομογραφία θώρακα υψηλής ευκρίνειας.
- Ευρήματα από την διαβρογχική βιοψία πνεύμονα ή την βρογχοκυψελιδική έκπλυση που δεν είναι συμβατά με άλλη πιθανή διάγνωση.

#### Ελάσσονα κριτήρια

- Ηλικία > 50 ετών.
- Ύπουλη έναρξη δύσπνοιας που δεν μπορεί να αποδοθεί σε άλλη αιτία.
- Διάρκεια νόσου > 3 μηνών.
- Τελοεισπνευστικοί τρίζοντες στις βάσεις (τύπου “Velcro”)



Τα συμπτώματα της IPF είναι μη ειδικά. Οι περισσότεροι ασθενείς αρχικά παρουσιάζουν δύσπνοια στην κόπωση και μη παραγωγικό βήχα. Τα συμπτώματα αυτά είναι κοινά για πολλά πνευμονολογικά και καρδιολογικά νοσήματα. Η δύσπνοια, το κυρίαρχο σύμπτωμα της ΙΠΙ, προοδευτικά επιδεινώνεται. Άλλα συστηματικά συμπτώματα που μπορεί να συνοδεύουν την κλινική εικόνα της IPF είναι απώλεια βάρους, κόπωση, αρθραλγίες/μυαλγίες κ.α. Η μέση διάρκεια των συμπτωμάτων μέχρι τη διάγνωση της νόσου είναι 1-2 έτη.

Η ακριβής επίπτωση και συχνότητα της IPF δεν είναι γνωστή. Στην Ελλάδα, η εκτιμώμενη επίπτωση της νόσου είναι 1-5 νέες περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα, και ο εκτιμώμενος επιπολασμός της νόσου είναι 4-18 περιστατικά ανά 100.000. Οι άντρες προσβάλλονται από IPF συχνότερα από τις γυναίκες. Οι ασθενείς με τη νόσο είναι συνήθως μέσης ηλικίας (40-70 ετών, με μέση ηλικία 66 ετών κατά τη διάγνωση), ενώ τα δύο τρίτα των ασθενών είναι περισσότερο από 60 ετών όταν γίνεται η διάγνωση. Η IPF δεν έχει συγκεκριμένη γεωγραφική κατανομή και προτίμηση ανά εθνικότητα και φυλή. Εντούτοις, η θνητότητα φαίνεται να είναι μεγαλύτερη στη λευκή φυλή, με διαφορετική όμως γεωγραφική κατανομή σε ότι αφορά την ηλικία που εμφανίζεται, γεγονός που πιθανόν να σχετίζεται με τη διαφορετική έκθεση σε επαγγελματικούς ή περιβαλλοντικούς παράγοντες. Οι θάνατοι από ΙΠΙ αυξάνονται σημαντικά με την ηλικία. Μία συνολική εκτίμηση από πρόσφατες μελέτες, αναφέρει ότι ο μέσος όρος επιβίωσης από τη στιγμή της διάγνωσης ποικίλλει από 3,2 έως 5 έτη.<sup>29</sup>

Για την εμφάνιση της νόσου έχει ενοχοποιηθεί το κάπνισμα<sup>30</sup>, η χρήση αντικαταθλιπτικών φαρμάκων, η χρόνια εισρόφηση γαστροϊσοφαγικού περιεχομένου, περιβαλλοντολογικοί (έκθεση σε σκόνης από μέταλλα και ξύλο), καθώς και λοιμώδεις παράγοντες (ιοί, όπως ο HIV, μυκόπλασμα, legionella) χωρίς όμως να έχει διευκρινιστεί κατά πόσο οι παράγοντες αυτοί μπορεί να εμπλέκονται στην παθογένεση της νόσου. Επίσης ο κίνδυνος ανάπτυξης της νόσου μπορεί να σχετίζεται με κληρονομικούς παράγοντες αν και δεν έχουν ταυτοποιηθεί ειδικοί γενετικοί δείκτες που να υποστηρίζουν αυτή την εκδοχή. Όμως η περιγραφή περιπτώσεων ΙΠΙ σε μέλη της ίδιας οικογένειας υποδηλώνει πιθανόν τη συμμετοχή κάποιου γενετικού παράγοντα στην παθογένεση της νόσου και έχει καθιερώσει τον όρο οικογενής IPF που ορίζεται ως η παρουσία

νόσου ιστολογικά αποδεδειγμένης σε τουλάχιστον 2 μέλη της ίδιας βιολογικά οικογενείας (γονείς, παιδιά, αδέρφια). Η οικογενής ΙΠΙ κληρονομείται πιθανόν με αυτοσωματικό κληρονομικό χαρακτήρα με ποικίλη διεισδυτικότητα, ενώ η προσβολή ανδρών και γυναικών παραμένει και δεν φαίνεται να διαφέρει.<sup>31</sup>

## **Μηχανισμός Παθογένεσης της IPF**

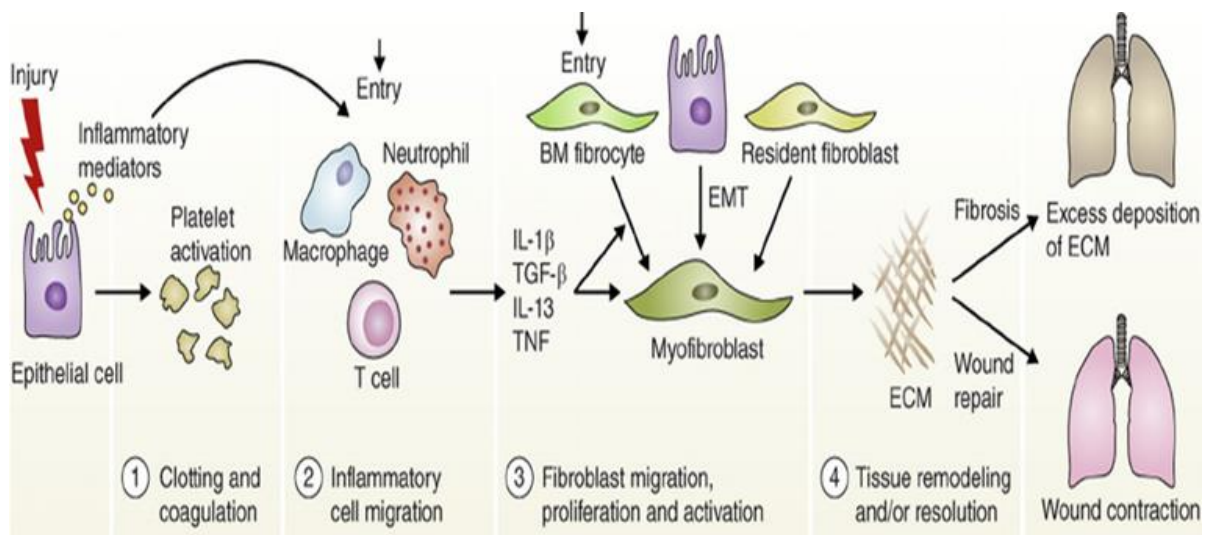
Η ίνωση είναι επίσης ένα σημαντικό παθολογικό χαρακτηριστικό πολλών χρόνιων αυτοάνοσων ασθενειών, συμπεριλαμβάνοντας τη σκληροδερμία, τη ρευματοειδή αρθρίτιδα, τη νόσο του Crohn, την ελκώδη κολίτιδα, τη μυελοΐνωση και το συστηματικό ερυθηματώδη λύκο. Η ίνωση επηρεάζει επίσης την ανάπτυξη όγκου και τη μετάσταση, τη χρόνια απόρριψη μοσχεύματος και την παθογένεση.

Η αποκατάσταση των κατεστραμμένων ιστών, είναι ένας βασικός μηχανισμός του οργανισμού που επιτρέπει την αντικατάσταση των κατεστραμμένων κυττάρων μετά από κάποια βλάβη, μια διαδικασία απαραίτητη για την επιβίωση. Η διαδικασία αποκατάστασης των ιστών μπορεί να εξελιχθεί σταδιακά σε μη αναστρέψιμη ινωτική απόκριση, εάν η απόκριση στην επούλωση πληγής είναι απορυθμισμένη, ή εάν ο τραυματισμός του ιστού είναι σοβαρός ή επαναλαμβανόμενος. Έτσι μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη μιας μόνιμης ινωτικής ουλής, η οποία χαρακτηρίζεται από υπερβολική συσσώρευση εξωκυττάρων συστατικών, μέσα και γύρω από τη φλεγμονή και την βλάβη του ιστού. Συνεπώς η ινωδογένεση ορίζεται ως η εκτός ελέγχου απόκριση στην επούλωση πληγών και στην υπερβολική συσσώρευση ινώδους συνδετικού ιστού. Σημαντικό χαρακτηριστικό του μηχανισμού της ίνωσης αποτελεί επίσης η ενεργοποίηση των εκκρινόμενων από τα εξωκυττάρια συστατικά μυοϊνοβλαστών, οι οποίοι δρουν ως μεσολαβητές για την αναδιαμόρφωση του ινώδους ιστού.

Ο μηχανισμός της επούλωσης του τραύματος αποτελείται από τέσσερις διακριτές φάσεις που περιλαμβάνουν (σχήμα 1.9):

1. Την φάση πήξης
2. Την φλεγμονώδη φάση

3. Τον πολλαπλασιασμό και την μετάβαση των ινοβλαστών
4. Την φάση αναδιαμόρφωσης της αρχιτεκτονικής του ιστού

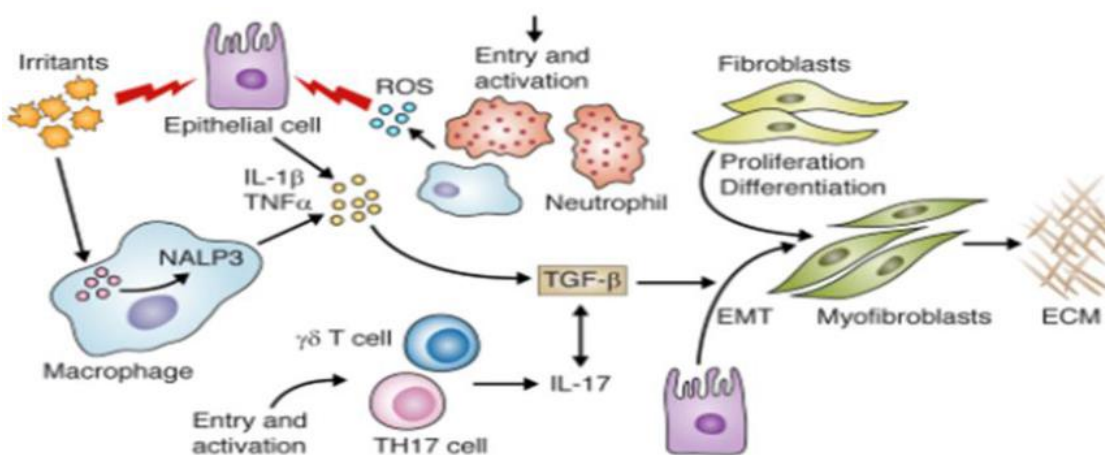


**Σχήμα 1.9: Η φυσιολογική διαδικασία επούλωσης τραύματος και οι διαταραχές που συμβάλλουν στην ανάπτυξη της πνευμονικής ίνωσης.<sup>32</sup>**

Στα πρώιμα στάδια της βλάβης κάποιου ιστού, ενεργοποιείται η πρώτη φάση του μηχανισμού επούλωσης πληγών, δηλαδή η απόκριση πήξης. Στο στάδιο αυτό συμβαίνει η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, μετά την έκθεση τους στο κολλαγόνο και στον παράγοντα von Willenbrand στο υποενδοθηλιακό τμήμα. Ακολουθεί η πρωτεολυτική διάσπαση της προθρομβίνης (παράγοντας πήξης II) σε θρομβίνη, η οποία λειτουργεί ως πρωτεάση σερίνης, μετατρέποντας το διαλυτό τμήμα του ινωδογόνου σε αδιάλυτο τμήμα του ινώδους. Μετά την διάλυση του ινωδογόνου, τα αιμοπετάλια συσσωματώνονται με το ινώδες, δημιουργώντας τον θρόμβο ινώδους που εξασφαλίζει άμεση ομοιόσταση. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απελευθερώνουν παράγοντες ανάπτυξης, όπως π.χ. τον παράγοντα ανάπτυξης των αιμοπεταλίων (PDGF) και τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), ο οποίος διεγείρει την σύνθεση της ECM από τοπικούς ινοβλάστες και επιτρέπουν την αποτελεσματική πρόσληψη των φλεγμονωδών κύτταρων. Κάθε παρατεταμένη διαταραχή στο παραπάνω μονοπάτι πήξης, μπορεί να οδηγήσει σε ίνωση.

Κατά την φλεγμονώδη φάση στην επούλωση πληγών, μεταφέρονται φλεγμονώδη κυτταρα στο σημείο της βλάβης. Τα φλεγμονώδη κύτταρα που μεταφέρονται είναι κυρίως ουδετερόφιλα, μακροφάγα, λεμφοκύτταρα και ηωσινόφιλα. Τα ουδετερόφιλα είναι τα πιο άφθονα φλεγμονώδη κύτταρα σε πρώιμα στάδια της επούλωσης της πληγής, αλλά αντικαθίστανται γρήγορα από τα μακροφάγα μετά την αποκοκκίωση των ουδετερόφιλων. Κατά τη διάρκεια αυτού το αρχικού σταδίου της μετανάστευσης των λευκοκυττάρων, ενεργοποιούνται τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα ώστε να εξαλείψουν τυχόν εισβολή μικροοργανισμών στη πληγείσα περιοχή. Παράγουν επίσης μια ποικιλία κυτοκινών και χημειοκινών που ενισχύουν τη φλεγμονώδη απόκριση και την ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών.

Οι μυοϊνοβλάστες προέρχονται από μια ποικιλία πηγών συμπεριλαμβανομένων των τοπικών μεσεγχυματικών κυττάρων, των προγονικών κυττάρων του μυελού των οστών (που ονομάζονται ινοκύτταρα), και μέσω μιας της διαδικασίας της επιθηλιακής –μεσεγχυματικής μετάβασης (EMT), όπου τα επιθηλιακά κύτταρα διαφοροποιούνται σε ινοβλάστες. Μόλις οι ινοβλάστες ενεργοποιηθούν, μεταμορφώνονται σε μυοϊνοβλάστες λείων μυών που εκφράζουν ακτίνη, εκκρίνοντας συστατικά της ECM (σχήμα 1.10).



**Σχήμα 1.10: Βασικοί μηχανισμοί δημιουργίας μυοϊνοβλαστών στην παθογένεση της Πνευμονικής Ίνωσης.<sup>32</sup>**

Τέλος, στην ωρίμανση της πληγής, μυοϊνοβλάστες προωθούν τη συστολή του τραύματος, μια διαδικασία όπου οι ακμές της πληγής μεταναστεύουν προς το κέντρο και τα επιθηλιακά/ενδοθηλιακά κύτταρα διαιρούνται και μεταναστεύουν για την αναγέννηση του κατεστραμμένου ιστού. Κεντρικό ρόλο στην παθογένεια της πνευμονικής ίνωσης παίζει ο TGF- $\beta$ , συμβάλλοντας στην προώθηση της ενεργοποίησης, του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των επιθηλιακών κυττάρων και του κολλαγόνου που παράγεται από τους μυοϊνοβλάστες.<sup>32,33</sup>

### 1.2.2 Ζωικά πειραματικά μοντέλα της πνευμονικής ίνωσης

Η ανάγκη να ερευνηθούν εις βάθος οι επι μέρους κυτταρικοί και μοριακοί μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την επαγωγή και εξέλιξη της πνευμονικής ίνωσης, οδήγησε στη δημιουργία διαφόρων ζωικών πειραματικών προτύπων που προσομοιάζουν την ανθρώπινη κατάσταση. Ενώ για πολλές περιπτώσεις πνευμονικών ινωτικών νόσων όπου η αιτιολογία είναι γνωστή (π.χ. έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, νόσοι του συνδετικού ιστού), η ύπαρξη του αντίστοιχου ζωικού μοντέλου προσομοιάζει σε μεγάλο βαθμό την περιπλοκότητα των γεγονότων που οδηγούν στην επαγωγή τους καθώς και τα κυριότερα κλινικά χαρακτηριστικά τους, στην περίπτωση της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης δεν έχει βρεθεί ένα πειραματικό πρότυπο που να αναπαράγει όλες τις παραμέτρους της ανθρώπινης κατάστασης. Οι παράγοντες που χρησιμοποιούνται καθώς και οι μεθοδολογίες που ακολουθούνται για την επαγωγή της πνευμονικής ίνωσης σε ποντικούς φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 1.2).

**Πίνακας 1.2: Προσεγγίσεις για την επαγωγή πνευμονικής ίνωσης σε ποντικούς.<sup>34</sup>**

Εξωγενές ερέθισμα	Βλάβη που προκαλείται
Μπλεομυκίνη (Bleomycin)	Ρήγματα στο DNA με αποτέλεσμα την επαγωγή φλεγμονής και παραγωγή κυταροκινών
Ανόργανα μόρια (πυρίτιο, αμίαντος) Ακτινοβολία	Αποκρίσεις υπερευαισθησίας τύπου IV με ή χωρίς σχηματισμό κοκκιωμάτων. Ρήγματα στο DNA μέσω δημιουργίας ελεύθερων ριζών
Έκφραση γονιδίων (TGF- $\beta$ , IL1 $\beta$ , TNF)	Ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών
Fluorescein isothiocyanate (FITC)	Άγνωστος μηχανισμός

## **Ζωικό πειραματικό μοντέλο της Μπλεομυκίνης**

Ένα από τα πρώτα και πιο δημοφιλή ζωικά πρότυπα της πνευμονικής ίνωσης, αποτελεί η επαγωγή της με χορήγηση μπλεομυκίνης. Η συγκεκριμένη προσέγγιση περιλαμβάνει την παρεντερική ή ενδοτραχειακή χορήγηση του παράγοντα η οποία προκαλεί δοσοεξαρτώμενες ινωτικές, παθολογικές αλλαγές στους πνεύμονες των πειραματοζώων.

Η **μπλεομυκίνη** είναι το προϊόν του μύκητα *Streptomyces verticillaris*, ανήκει στη γενική κατηγορία των αντινεοπλαστικών φαρμάκων και χρησιμοποιείται για τη θεραπεία πολλών μορφών καρκίνου του ανθρώπου όπως καρκίνων του αυχένα και του λαιμού, των γεννητικών οργάνων καθώς και μερικών τύπων λεμφωμάτων. Πιστεύεται ότι η μπλεομυκίνη δρα προκαλώντας θραύσματα μονόκλωνων και δίκλωνων τμημάτων του DNA, διακόπτοντας έτσι τον κυτταρικό κύκλο των καρκινικών κυττάρων. Αυτό συμβαίνει με χηλίωση μεταλλικών ιόντων, και αντίδραση του σχηματιζόμενου ενζύμου με το οξυγόνο, το οποίο οδηγεί στην παραγωγή του υπεροξειδίου λόγω διάσπασης του DNA και των ελεύθερων ριζών οξυγόνου. Η κλινική της εφαρμογή περιορίζεται από το γεγονός ότι χορήγηση της σε καρκινοπαθείς είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη πνευμονικής τοξικότητας και την εμφάνιση ίνωσης<sup>35</sup>. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στη χρησιμοποίηση της σε πειραματόζωα για την αναπαραγωγή της νόσου και τη μελέτη των κυτταρικών και μοριακών μηχανισμών που ευθύνονται για την ανάπτυξή της. Η εφαρμογή του πρωτοκόλλου αρχικά περιλάμβανε χορήγηση σε σκύλους αλλά οι Snider και συνεργάτες εδραίωσαν την πιο δημοφιλή ενδοτραχειακή χορήγηση της μπλεομυκίνης σε τρωκτικά<sup>36</sup>. Από τότε το πειραματικό πρότυπο της πνευμονικής ίνωσης-επαγόμενο από μπλεομυκίνη, χρησιμοποιείται εκτεταμένα για το χαρακτηρισμό των φλεγμονωδών και ινωτικών αλλοιώσεων που συνοδεύουν την ανάπτυξη της παθολογίας.

Χορήγηση μιας και μοναδικής δόσης μπλεομυκίνης σε ποντικούς προκαλεί υπο-χρόνιες βλάβες, ενώ πιο χρόνια ίνωση επιτυγχάνεται με επαναλαμβανόμενη δοσολογία<sup>(37)</sup>. Η ενδοτραχειακή χορήγηση της μπλεομυκίνης έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη περιβρογχιακών περιοχών ίνωσης, ενώ ενδοφλέβια ή ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση οδηγεί στην ανάπτυξη

ίνωσης με υποϋπεζωκοτικό εντοπισμό, που προσομοιάζει καλύτερα το ιστολογικό πρότυπο της UIP, κύριο χαρακτηριστικό της ΙΠΙ. Άλλα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά του μοντέλου της μπλεομυκίνης που συναντώνται και στην ΙΠΙ είναι η παρουσία φλεγμονής ποικίλης έκτασης, η καταστροφή των κυψελιδικών κυττάρων, η υπερπλασία των επιθηλιακών κυττάρων, η καταστροφή της βασικής μεμβράνης και τέλος η ανάπτυξη παρεγχυματικής και ενδοκυψελιδικής ίνωσης με την εμφάνιση εστιών ινοβλαστών.<sup>38</sup>

Ενώ η ερευνητική χρήση του πειραματικού προτύπου της μπλεομυκίνης τις προηγούμενες δεκαετίες ευθύνεται εν πολλοίς για τις γνώσεις μας όσον αφορά στους μηχανισμούς που κυβερνούν την ανάπτυξη και εξέλιξη της πνευμονικής ίνωσης, ενστάσεις έχουν διατυπωθεί σχετικά με την αξιοπιστία του ως ακριβές μοντέλου για τη μελέτη της IPF.<sup>39</sup> Η κύρια ένσταση σχετίζεται με δύο χαρακτηριστικά του ζωικού προτύπου που το διαφοροποιεί από την ανθρώπινη κατάσταση: την ταχύτητα ανάπτυξης της παθολογίας και τη διάρκεια των συμπτωμάτων. Ενώ στους ανθρώπους ο χρόνος ανάπτυξης της νόσου μπορεί να αντιστοιχεί σε ορισμένα χρόνια, στο ζωικό πειραματικό πρότυπο της μπλεομυκίνης η ανάπτυξη παθολογίας συμβαίνει σε διάστημα λίγων μόνο ημερών. Επίσης, στα χρόνια στάδια της πνευμονικής ίνωσης-επαγόμενης από μπλεομυκίνη παρατηρούνται κυρίως περιβρογχιακές περιοχές με ίνωση καθώς και εστιακές εμφυσηματικές αλλαγές, παρά το ιστολογικό πρότυπο της UIP που χαρακτηρίζει την ΙΠΙ. Για τους παραπάνω λόγους, η ερμηνεία των δεδομένων που προκύπτουν από τη χρήση του παραπάνω μοντέλου καθώς και η αναγωγή τους στην ανθρώπινη κατάσταση απαιτεί προσοχή.

### **1.3 Δημιουργία διαγονιδιακών και knockout ποντικών. Το μοντέλο EUCOMM**

Με την εκθετική αύξηση του αριθμού των γονιδίων που αποκαλύφθηκαν από το πρόγραμμα αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS-next generation sequencing) διαφόρων οργανισμών, κρίνεται χρήσιμη η ανάπτυξη αποτελεσματικών μεθόδων για την εύρεση της λειτουργίας κάθε γονιδίου. Τα γενετικά τροποποιημένα στελέχη ποντικών αποτελούν ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο, το οποίο αξιοποιείται όλο και περισσότερο κατά την διάρκεια των τελευταίων χρόνων, όπου έγινε δυνατή η δημιουργία σχεδόν κάθε είδους μετάλλαξης στο γονιδίωμα του ποντικού. Η μελέτη των γονιδίων ενδιαφέροντος μπορεί να γίνει με την δημιουργία διαγονιδιακών ή knockout οργανισμών.

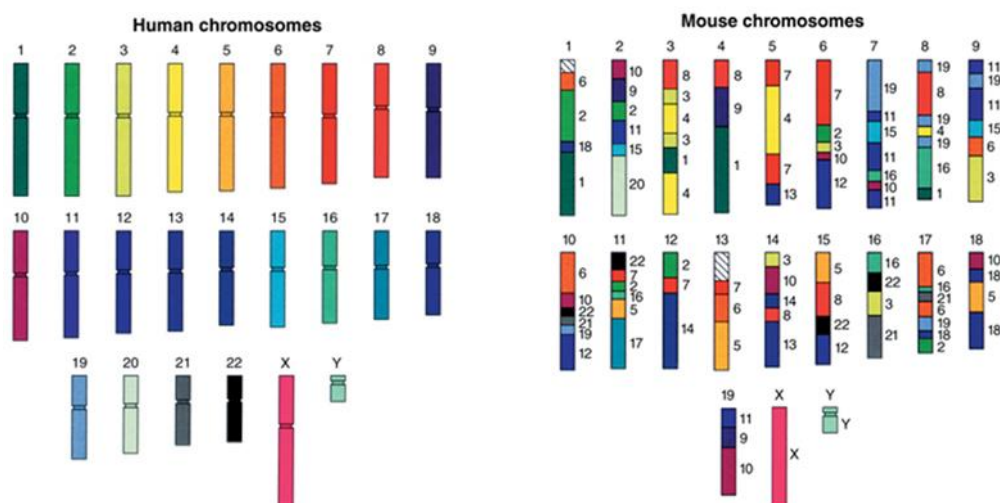
#### **1.3.1 Διαγονιδιακή τεχνολογία**

Με τον όρο «**διαγονιδιακή τεχνολογία**», αναφερόμαστε στην τεχνολογία κατά την οποία ένα τμήμα μη ενδογενούς DNA (το οποίο μπορεί να προέρχεται από το ίδιο είδος, από τελείως διαφορετικό είδος, ή από τεχνητό γενετικό υλικό) εισάγεται μέσω ειδικών φορέων στο γονιδίωμα ενός οργανισμού. Έτσι δημιουργούνται οι διαγονιδιακοί οργανισμοί, οι οποίοι έχουν τροποποιημένο γενετικό υλικό μετά την εισαγωγή του «ξένου» DNA. Το ξένο γενετικό υλικό μεταβιβάζεται στη συνέχεια μέσω των γεννητικών κυττάρων στους απογόνους όπου όλα τα κύτταρα περιέχουν το ίδιο τροποποιημένο γενετικό υλικό.

Η διαγονιδιακή τεχνολογία μπορεί να εφαρμοστεί εν δυνάμει σε όλα τα έμβια συστήματα με διαφορετικές προσεγγίσεις και διαφορετική αποτελεσματικότητα. Στην βιολογική έρευνα, ωστόσο, εφαρμόζεται ως επί το πλείστον σε ζώα και συχνότατα σε ποντίκια. Τα ποντίκια είναι ένα είδος που προτιμάται ευρέως σαν πειραματόζωο, για πολλούς λόγους. Ο κυριότερος λόγος που συμβαίνει αυτό, πέρα από τους πρακτικούς (μικρά θηλαστικά, εύκολη αναπαραγωγή, σύντομος κύκλος ζωής, μικρό κόστος διατήρησης), είναι ότι μεγάλο ποσοστό των γονιδίων τους είναι κοινό με αυτό των ανθρώπων (σχήμα 1.11) Συνεπώς, η



γενετική παρέμβαση στο γονιδίωμα του ποντικού αποτελεί ένα ιδανικό σύστημα για την προτυποποίηση των ανθρώπινων ασθενειών.



**Σχήμα 1.11: Γενετική ομολογία του ανθρώπινου γονιδιώματος με το γονιδίωμα το ΠΟΝΤΙΚΙΟΥ (Human Genome Project-Image gallery gateway).**

Τα πρώτα διαγονιδιακά ποντίκια δημοσιεύθηκαν το 1982, στα οποία είχε γίνει παρέμβαση στα γονίδια-μονοπάτια που καθορίζουν την ανάπτυξη, με αποτέλεσμα την δημιουργία των πρώτων ποντικιών που είχαν μέγεθος μεγαλύτερο από το φυσιολογικό (supermice)<sup>40</sup>. Από τότε μέχρι σήμερα έχουν δημιουργηθεί διαγονιδιακά ζώα για χιλιάδες γονίδια ενδιαφέροντος.

Η τεχνολογία της διαγένεσης πραγματοποιείται με πολλούς τρόπους. Ένα διαγονιδιακό ποντίκι, μπορεί να δημιουργηθεί τροποποιώντας ενδογενή γονίδια του με την εισαγωγή μεταλλάξεων ή ξένου γενετικού υλικού, ή αναστέλλοντας την έκφραση ενδογενών γονιδίων με παρέμβαση σε διαφορετικά επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης (π.χ. διαγραφή ενός γονιδίου). Επίσης η διαγένεση πραγματοποιείται ελέγχοντας την έκφραση γονιδίων σε επιλεγμένους ιστούς, κύτταρα ή σε επιλεγμένα στάδια της ανάπτυξης. Τέλος μπορεί να πραγματοποιηθεί επάγοντας τη γονιδιακή έκφραση σε επιλεγμένες καταστάσεις.

Ο συχνότερος τρόπος δημιουργίας των διαγονιδιακών ποντικιών, είναι μέσω μικροένεσης του «ξένου» DNA σ' έναν από τους δύο προπυρήνες του

γονιμοποιημένου ωαρίου, έναν προερχόμενο από το σπερματοζώαριο και έναν από το ώαριο, που με τη σύντηξή τους θα προκύψει ο πυρήνας του εμβρύου στο στάδιο του ενός κυττάρου. Στην συνέχεια τα ζυγωτά μεταφέρονται στον ωαγωγό μιας θετής μητέρας όπου και αναπτύσσονται φυσιολογικά και οι απόγονοι που θα γεννηθούν ελέγχονται για την παρουσία του διαγονιδίου. Ένα οποιοδήποτε κλωνοποιημένο τμήμα DNA, είτε cDNA είτε γονιδιωματικό, μπορεί να εισαχθεί με μικροένεση στον προπυρήνα αφού απομακρυνθεί πρώτα από αυτό η περιοχή του φορέα κλωνοποίησης. Η ενσωμάτωση γίνεται τυχαία σε μία ή περισσότερες θέσεις του γονιδιώματος του ζυγωτού. Επίσης, μπορεί να ενσωματωθεί ένα ή περισσότερα αντίγραφα που συνήθως είναι διευθετημένα στη σειρά με κοινό προσανατολισμό κεφαλής-ουράς. Η επιλογή ενός ιστοειδικού υποκινητή εξασφαλίζει τη δυνατότητα έκφρασης του διαγονιδίου επιλεκτικά σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους του διαγονιδιακού ζώου.

Οι διαγονιδιακοί οργανισμοί συνήθως υπερεκφράζουν μια πρωτεΐνη οπότε αποτελούν ιδανικά συστήματα μελέτης διαδικασιών και λειτουργιών που πιθανόν απορυθμίζονται και οδηγούν σε ασθένεια. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να μελετηθεί η γονιδιακή έκφραση *in vivo* και να κατανοηθούν οι μοριακοί και κυτταρικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην παθογένεση ασθενειών. Τα διαγονιδιακά μοντέλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για δοκιμές φαρμακευτικών ουσιών σε προκλινικό επίπεδο. Τέλος, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοαντιδραστήρες για την παραγωγή εξαιρετικά χρήσιμων ουσιών και τεχνικών τόσο για την ιατρική (π.χ. εμβόλια, γονιδιακή θεραπεία), όσο και για τη γεωργία ή την κτηνοτροφία.

### 1.3.2 Τεχνολογία κατευθυνόμενης γονιδιακής στόχευσης

Παρόλο που η τεχνολογία της άμεσης μικροένεσης του DNA ενδιαφέροντος στον προπυρήνα ποντικού, είναι μια από τις συχνότερα χρησιμοποιούμενες τεχνικές για τη δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών, υπάρχουν κάποια μειονεκτήματα που οδήγησαν στον περιορισμό χρήσης της μεθόδου<sup>41-45</sup>. Η παραγωγή γενετικά τροποποιημένων ποντικών με μικροένεση του DNA στον προπυρήνα του ποντικού οδηγεί σε τυχαία ενσωμάτωση του εξωγενούς DNA στο γονιδίωμα. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε διαφοροποιημένη έκφραση του διαγονιδίου και σε διάσπαση των γονιδίων στη θέση εντός των οποίων εισάγεται το διαγονίδιο<sup>50</sup>. Μελέτες έχουν αποδείξει ότι, η εισαγωγή των διαγονιδίων με προπυρηνική ένεση μπορεί να δημιουργήσει μεγάλες διαγραφές και πολύπλοκες αναδιατάξεις στο DNA<sup>46</sup>. Τα μειονεκτήματα της μεθόδου, οδήγησαν στην αναζήτηση νέων μεθόδων που θα μπορούσαν να ξεπεράσουν τα εμπόδια.

Ένας πιο ελεγχόμενος τρόπος για τον καθορισμό της λειτουργίας ενός γονιδίου και την μελέτη της επίπτωσης στον φαινότυπο είναι η **κατευθυνόμενη «γονιδιακή στόχευση» (gene targeting)**. Η τεχνολογία της κατευθυνόμενης γονιδιακής στόχευσης, δημιουργήθηκε στα τέλη του 1980, και έχει εφαρμοστεί με μεγάλη επιτυχία τις τελευταίες δύο δεκαετίες στο ποντίκι, επιτρέποντας την ενσωμάτωση εξωγενούς DNA σε συγκεκριμένη γενετική θέση. Αυτό, επιτυγχάνεται με ομόλογο ανασυνδυασμό μεταξύ της γονιδιακής κατασκευής στόχευσης και του ενδογενούς γονιδίου, σε **εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (Embryonic stem cells, ES)**<sup>47</sup>.

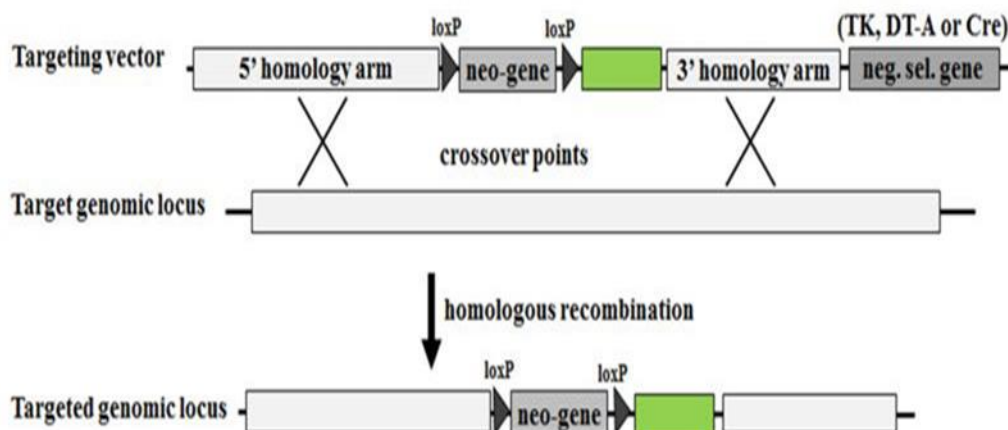
Τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα προέρχονται από μια πολυδύναμη εσωτερική κυτταρική μάζα (ICM) της βλαστοκύστης, μια δομή που σχηματίζεται στο αρχικό στάδιο της εμβρυογένεσης (3.5 ημερών πριν από την εμφύτευση εμβρύου ποντικού). Η βλαστοκύστη αποτελείται από δύο διακριτά μέρη: την εξωτερική επιφάνεια (τροφοεξώδερμα) απ' όπου προέρχονται μεμβράνες που περιβάλλουν το έμβρυο και την εσωτερική κυτταρική μάζα από την οποία προέρχονται τα κύτταρα που συνιστούν το έμβρυο. Τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα μπορούν να καλλιεργηθούν *in vitro* και υπό ειδικές συνθήκες να παραμένουν αδιαφοροποίητα, και διπλοειδικά, έχοντας τη δυνατότητα όταν

εισάγονται σε άλλες βλαστοκύστες να συμβάλουν στη παραγωγή διαφοροποιημένων κυττάρων, ακόμα και κυττάρων της γαμετικής σειράς<sup>(48-49)</sup>. Έχουν δημοσιευτεί αρκετές σειρές βλαστικών κυττάρων οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρέως. Παρόλα αυτά, προτιμάται η χρήση βλαστικών σειρών που προέρχονται από το στέλεχος ποντικών C57Bl/6, το οποίο χρησιμοποιείται ως στέλεχος αναφοράς και η χρήση του μειώνει την ανάγκη πολλών διασταυρώσεων για να καθαριστεί το γενετικό υπόβαθρο των ανασυνδυασμένων ζώων.<sup>50</sup>

Η **γονιδιακή κατασκευή στόχευσης (gene targeting vector)**, η οποία εισάγεται σε συγκεκριμένη γενετική θέση, πρέπει να περιέχει δύο περιοχές με ομόλογες αλληλουχίες ως προς το γονίδιο στόχος, προκειμένου να γίνει ομόλογος ανασυνδυασμός μεταξύ αυτής και του ενδογενούς γονιδίου. Η χρησιμοποίηση δεικτών θετικής και αρνητικής επιλογής είναι απαραίτητη για τον εμπλουτισμό των καλλιιεργειών σε ανασυνδυασμένους ES κλώνους<sup>50</sup> (σχήμα 1.12). Συχνά κρίνεται απαραίτητη και η ενσωμάτωση **γονιδίων αναφοράς (reporter genes)** στον φορέα, ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευση των αλλαγών που έχουν πραγματοποιηθεί εξαιτίας της ενσωμάτωσης του ξένου γενετικού υλικού.

Οι δείκτες επιλογής χρησιμοποιούνται επειδή η ενσωμάτωση (θετική επιλογή) ή απώλεια (αρνητική επιλογή) γενετικού υλικού συμβαίνει συνήθως σε μέρος των κυττάρων. Για τον εντοπισμό των κλώνων (αποικιών) που έχουν ενσωματώσει την γονιδιακή κατασκευή στο γονιδίωμα τους, είτε τυχαία είτε με ομόλογο ανασυνδυασμό, πρέπει κατά τον σχεδιασμό της γονιδιακής κατασκευής να συμπεριληφθεί μεταξύ των δύο ομόλογων περιοχών ένας δείκτης θετικής επιλογής. Παράδειγμα τέτοιου δείκτη, είναι το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην νεομυκίνη (*neo<sup>r</sup>*). Οι κλώνοι που φέρουν στο γονιδίωμα τους το *neo* γονίδιο θα επιβιώσουν παρουσία θετικής επιλογής (π.χ. ανάλογο νεομυκίνης G418). Ο δείκτης αρνητικής επιλογής (π.χ. γονίδιο κινάσης της θυμιδίνης ερπητοϊού, TK) τοποθετείται στα άκρα της γονιδιακής κατασκευής για την εξάλειψη των ES κυττάρων στα οποία έχει γίνει τυχαία ενσωμάτωση. Όταν συμβεί λοιπόν ομόλογος ανασυνδυασμός επιτυχώς, τότε το TK γονίδιο δεν ενσωματώνεται στο γονιδίωμα και έτσι θα επιβιώσουν μόνο τα ορθώς

ανασυνδρασμένα ES κύτταρα παρουσία αρνητικής επιλογής (π.χ. gancyclovir).<sup>50</sup>



**Σχήμα 1.12: Σχηματική αναπαράσταση ενός φορέα γονιδιακής στόχευσης.<sup>50</sup>**

**Διακρίνονται οι ομόλογες αλληλουχίες ως προς το γονίδιο στόχο, που είναι απαραίτητες για να γίνει ο ομόλογος ανασυνδυασμός, καθώς επίσης και οι δείκτες θετικής- αρνητικής επιλογής.**

Για να επιτευχθεί η στόχευση ενός γονιδίου σε όλα τα κύτταρα του ποντικού, η γονιδιακή κατασκευή εισάγεται με ηλεκτροδιάτρηση σε εμβρυικά βλαστικά κύτταρα με σκοπό να ενσωματωθεί στο ενδογενές γονίδιο μέσω του φαινομένου του ομόλογου ανασυνδυασμού. Παρουσία κατάλληλων αντιβιοτικών (G418, gancyclovir), τα περισσότερα κύτταρα πεθαίνουν λόγω της μη πρόσληψης ξένου DNA, ενώ από κάθε ένα κύτταρο που επιβιώνει δημιουργείται μία αποικία που απομονώνεται και καλλιεργείται με σκοπό την παραγωγή αρκετών κυττάρων της ίδιας γενετικής σύστασης για τον έλεγχο του ανασυνδυασμού. Τα επιτυχώς ανασυνδρασμένα ES κύτταρα, δηλαδή τα κύτταρα όπου το ξένο DNA έχει ενσωματωθεί στο ενδογενές γονίδιο- στόχο εισάγονται στην βλαστοκύστη συμβάλλοντας στον σχηματισμό ενός χιμαιρικού οργανισμού. Η μεταφορά των βλαστοκύστεων αυτών σε θετές μητέρες θα οδηγήσει στη δημιουργία χιμαιρικών απογόνων, που θα φέρουν δηλαδή κύτταρα τόσο από την wild type βλαστοκύστη όσο και από τα τροποποιημένα ES κύτταρα. Η μεταβίβαση των τροποποιημένων γονιδίων στους απογόνους εξασφαλίζεται με την παραγωγή γαμετών που προέρχονται από τα ES κύτταρα, ενώ με διασταυρώσεις παράγονται ομόζυγα ζώα για τη μεταλλαγή που εισάχθηκε. Τα ποντίκια στα οποία έχει αδρανοποιηθεί ένα γονίδιο με τη χρήση

της τεχνολογίας της κατευθυνόμενης γονιδιακής στόχευσης ονομάζονται **knockout** και συμβολίζονται ως -/-.

Συνεπώς, ο ομόλογος ανασυνδυασμός σε ES κύτταρα μπορεί να οδηγήσει σε διακοπή της έκφρασης γονιδίων και δημιουργία knockout οργανισμών, όταν ο δείκτης θετικής επιλογής ενσωματώνεται ή αντικαθιστά μια λειτουργική περιοχή ενός γονιδίου. Με την τεχνολογία της γονιδιακής στόχευσης υπάρχει επίσης η δυνατότητα της εισαγωγής μεταλλάξεων σε ένα γονίδιο με μεγάλη ακρίβεια. Για να επιτευχθεί αυτό πρέπει αφενός η μετάλλαξη να εισαχθεί σε μία από τις ομόλογες περιοχές της γονιδιακής κατασκευής και αφετέρου ο δείκτης θετικής επιλογής να μπορεί να απομακρυνθεί μετά τον ομόλογο ανασυνδυασμό για να αποφευχθούν αλλοιώσεις στην έκφραση του γονιδίου. Το τελευταίο στάδιο επιτυγχάνεται με τη δράση ειδικών τοποειδικών ανασυνδυασμών, όπως το ένζυμο **Cre (causes recombination)** του βακτηριοφάγου P1 που έχει την ικανότητα να καταλύει ανασυνδυασμό ανάμεσα σε δύο ειδικές αλληλουχίες που ονομάζονται loxP (locus of crossing over) αφαιρώντας το τμήμα του DNA που εμπεριέχεται μεταξύ αυτών <sup>51</sup>. Επειδή οι loxP αλληλουχίες δεν συναντιούνται στο γονιδίωμα των ευκαρυωτικών οργανισμών αποτελούν το καταλληλότερο σύστημα εφαρμογής τοποειδικού ανασυνδυασμού.

### **Τα συστήματα ανασυνδυασμού Cre/loxP and FLP/FRT στην τεχνολογία της γονιδιακής στόχευσης**

Η δυνατότητα απενεργοποίησης ή τροποποίησης των γονιδίων με μεταλλάξεις και η μελέτη των επιπτώσεων που έχουν αυτές οι αλλαγές σε ολόκληρο τον οργανισμό επιτρέπει την κατανόηση της λειτουργίας των γονιδίων και των προϊόντων τους *in vivo*. Με τη χρήση συγκεκριμένων εργαλείων γενετικής μηχανικής επιτυγχάνεται η τροποποίηση του DNA με αυστηρά προκαθορισμένο τρόπο. Αρκετά ανασυνδυαστικά ένζυμα από προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά συστήματα, έχουν την ικανότητα να κόβουν το DNA σε ειδικές θέσεις-στόχους και να ενώνουν τα κομμένα άκρα του DNA σε μια δεύτερη θέση. Οι πιο γνωστές τοποειδικές ρεκομπινάσες (site-specific recombinases) που έχουν χρησιμοποιηθεί σε κυτταρικά συστήματα, είναι:

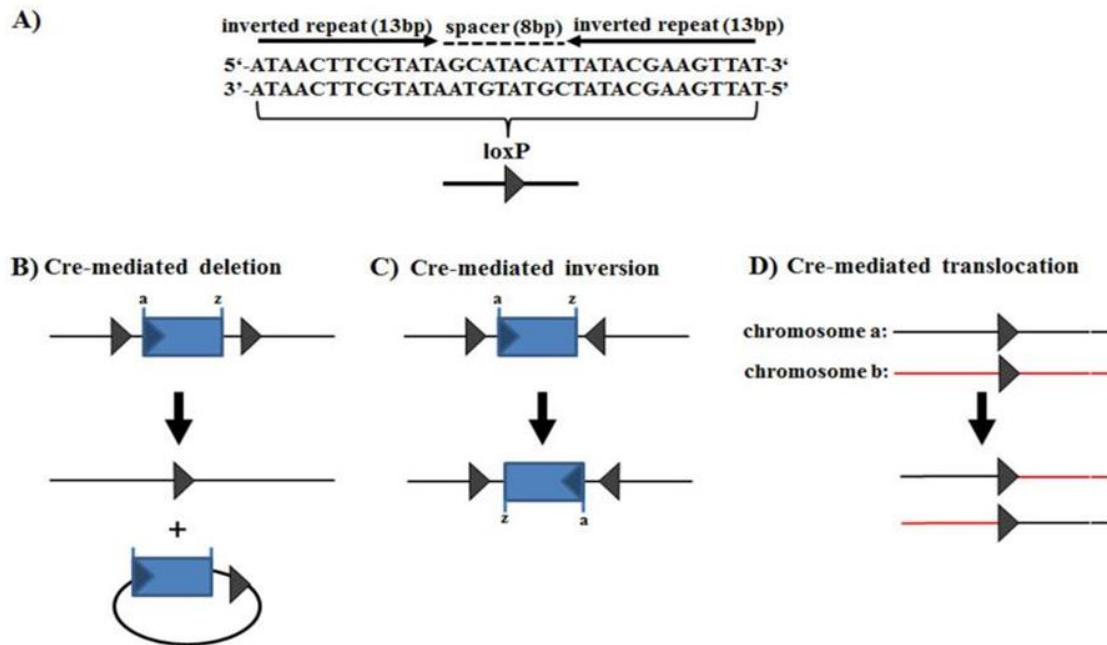
1. η Cre (Causes recombination) του βακτηριοφάγου P1 και
2. η FLP (flippase) που προέρχεται από τη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*.

Αυτές οι ρεκομπινάσες έχουν την ικανότητα να καταλύουν από μόνες τους ανασυνδυασμό ανάμεσα σε δύο ειδικές θέσεις του DNA με μήκος 34bp, την αλληλουχία των οποίων αναγνωρίζουν. Η ρεκομπινάση Cre, όπως προαναφέρθηκε, αναγνωρίζει μια αλληλουχία η οποία ονομάζεται loxP (locus of crossing-over), ενώ η αντίστοιχη αλληλουχία αναγνώρισης της FLP είναι η FRT (FLIP recognition target).

#### Η χρήση του συστήματος ανασυνδυασμού Cre / loxP στη στόχευση γονιδίων

Η Cre ρεκομπινάση είναι μια πρωτεΐνη 38 kDa, ανήκει στην οικογένεια των ιντεργκρασών, παράγεται από το βακτηριοφάγο P1 και μεσολαβεί σε ενδομοριακούς και διαμοριακούς ανασυνδυασμούς ειδικής θέσης μεταξύ δύο θέσεων loxP. Συγκεκριμένα, κόβει το DNA σε συγκεκριμένες θέσεις της αλληλουχίας loxP και συνδέεται ομοιοπολικά με αυτή, μέσω μιας τυροσίνης του καταλυτικού της κέντρου. Σε κάθε loxP αλληλουχία προσδένονται 2 μόρια Cre.

Η αλληλουχία loxP έχει μήκος 34 ζευγών βάσεων (bp) και αποτελείται από δύο ανεστραμμένες επαναλήψεις 13 bp τις οποίες αναγνωρίζει το ένζυμο, και διαχωρίζονται από μια ασύμμετρη αλληλουχία 8 bp στην οποία γίνεται ο ανασυνδυασμός. Η κεντρική αυτή αλληλουχία δεν έχει συμμετρία και προσδίδει τον προσανατολισμό του συνολικού τμήματος loxP. Είναι πολύ σημαντικό να γνωρίζουμε τον προσανατολισμό της κεντρικής περιοχής και κατ' επέκταση τον προσανατολισμό ολόκληρου του loxP, γιατί απ' αυτόν θα εξαρτηθεί το προϊόν του ανασυνδυασμού. Δύο αλληλουχίες loxP με αντίθετο προσανατολισμό οδηγούν στην αναστροφή του παρεμβαλλόμενου DNA μέσω της Cre ρεκομπινάσης, ενώ δύο θέσεις loxP ίδιου προσανατολισμού οδηγούν στην εκτομή του παρεμβαλλόμενου DNA μεταξύ των θέσεων, μετά την οποία παραμένει μόνο μία θέση loxP. Εάν οι θέσεις loxP βρίσκονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα, η Cre ρεκομπινάση μπορεί να οδηγήσει σε μια χρωμοσωμική μετάθεση (σχήμα 1.13).<sup>50-52</sup>



Σχήμα 1.13: A) Η αλληλουχία loxP B) Το αποτέλεσμα της επίδρασης της Cre ρεκομπινάσης ανάλογα με τον προσανατολισμό των αλληλουχιών loxP.<sup>50</sup>

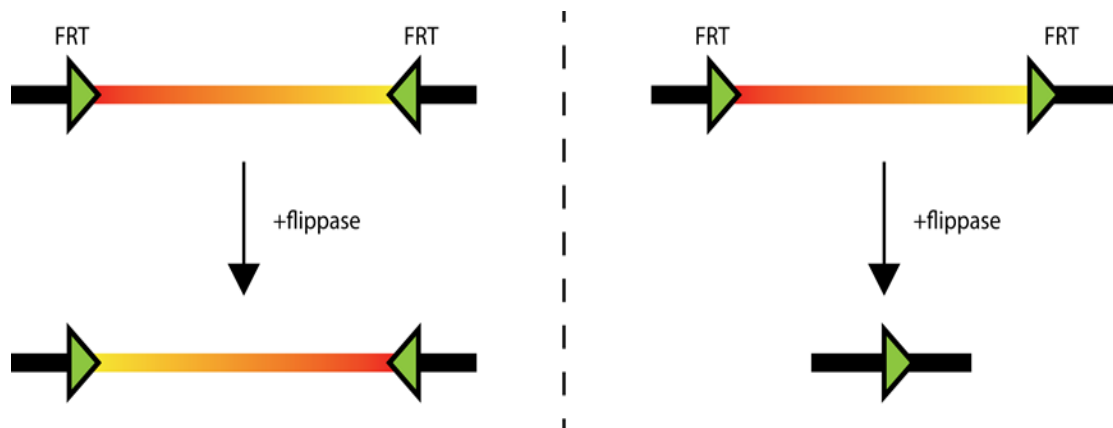
Το σύστημα Cre/ loxP εμφανίζει πολλά πλεονεκτήματα. Το σημαντικότερο, είναι η σχετική του απλότητα. Πρώτον, δεν απαιτούνται συμπαραγόντες για να δράσει η Cre ρεκομπινάση. Αυτό συμβαίνει επειδή το σύμπλοκο Cre / loxP παρέχει την απαραίτητη ενέργεια μέσω του σχηματισμού ενδιάμεσων φωσφοτυροσίνης στο σημείο ανταλλαγής των κλώνων<sup>52-53</sup>. Δεύτερον, οι θέσεις loxP είναι μικρές και συντίθενται εύκολα. Τρίτον, δεν υπάρχουν εμφανείς εξωτερικές ενεργειακές απαιτήσεις. Τέλος, η Cre είναι μια ιδιαίτερα σταθερή πρωτεΐνη. Ως εκ τούτου, το σύστημα αυτό χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο στο χειρισμό ευκαρυωτικών γονιδίων *in vivo*.

#### Χρήση του συστήματος Flp/FRT στην γονιδιακή στόχευση

Το σύστημα ανασυνδυασμού Flp / FRT αποτελεί ουσιαστικά ευκαρυωτικό ομόλογο του συστήματος Cre /loxP. Η Flp ρεκομπινάση, είναι ένα μονομερές πεπτίδιο 423 αμινοξέων, που κωδικοποιείται εντός του πλασμιδίου (2μm) *Saccharomyces cerevisiae*, και εμφανίζει παρόμοια δομή και ίδια πλεονεκτήματα με την Cre ρεκομπινάση. Η αλληλουχία FRT (34 bp) είναι



επίσης παρόμοια με την αλληλουχία loxP, και αποτελείται από τρεις αλληλουχίες επαναλήψεων μήκους 13-bp γύρω από μια ασύμμετρη αλληλουχία μήκους 8-bp. Η ασύμμετρη περιοχή υπαγορεύει αν θα γίνει εκτομή (όταν οι αλληλουχίες FRT είναι προς την ίδια κατεύθυνση) ή αντιστροφή (όταν οι αλληλουχίες FRT έχουν αντίθετο προσανατολισμό) της παρεμβαλλόμενης αλληλουχίας DNA μετά τον ανασυνδυασμό (σχήμα 1.14) .



**Σχήμα 1.14: Η κατεύθυνση των αλληλουχιών FRT καθορίζουν το αποτέλεσμα της επίδρασης της FIp ρεκομπινάσης.<sup>54</sup>**

Παρά το γεγονός ότι δεν χρησιμοποιείται τόσο συχνά όσο το Cre/loxP, το σύστημα FIp/FRT έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί τοπιοειδικό ανασυνδυασμό του DNA σε εμβρυικά βλαστικά κύτταρα και σε διαγονιδιακά ποντίκια. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι παρά τους παρόμοιους μηχανισμούς δράσης και τις παρόμοιες θέσεις αναγνώρισης DNA, τα συστήματα Cre/loxP και FIp/FRT δεν εμφανίζουν σημαντική διασταυρούμενη δραστικότητα. Η μοναδικότητα των δύο αυτών συστημάτων ανασυνδυασμού μπορεί να τους επιτρέπει να χρησιμοποιηθούν από κοινού για να απλοποιηθεί η διαδικασία γονιδιακής στόχευσης.<sup>55</sup>

## Εφαρμογές των δύο συστημάτων ανασυνδυασμού.

### 1. Απομάκρυνση του δείκτη θετικής επιλογής

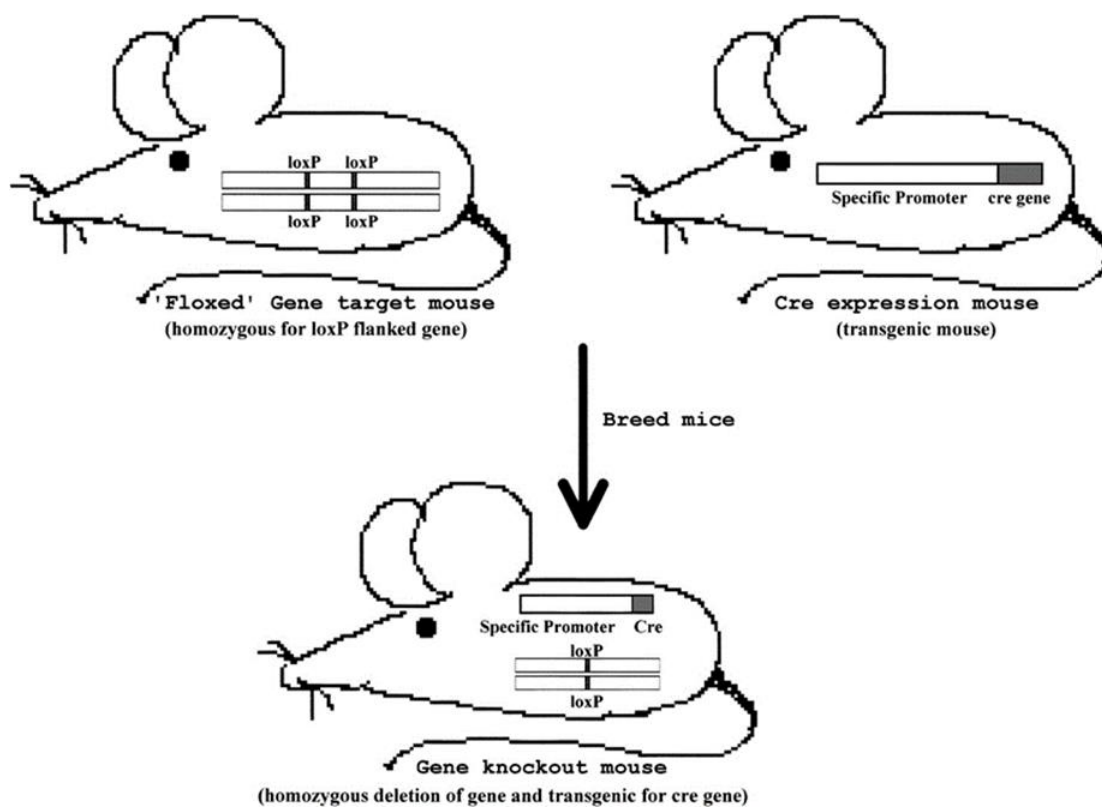
Μια σημαντική εφαρμογή των δύο συστημάτων, είναι η απομάκρυνση του δείκτη θετικής επιλογής, από την γονιδιακή κατασκευή στόχευσης, όταν αυτός δεν είναι πια απαραίτητος, προς αποφυγή μιας πιθανής παρεμπόδισης από αυτόν της σωστής έκφρασης των γειτονικών γονιδίων. Για να μπορέσει να γίνει η απομάκρυνση του δείκτη θετικής επιλογής, θα πρέπει αυτός να εμπεριέχεται ανάμεσα σε δύο loxP (ή FRT) αλληλουχίες με τον ίδιο προσανατολισμό, ώστε να μπορεί να γίνει η εκτομή μετά την επίδραση της Cre (ή της Flp). Ο ανασυνδυασμός από την Cre μπορεί ακόμα να χρησιμοποιηθεί για την αφαίρεση του δείκτη επιλογής μαζί με ένα τμήμα DNA μεγέθους έως και αρκετών kb με τοποθέτηση ενός loxP κοντά στο δείκτη επιλογής και ενός δεύτερου με τον ίδιο προσανατολισμό σε κάποια απόσταση.

### 2. «Κατά επιλογή/ υπό όρους » γονιδιακές τροποποιήσεις

Οι **«κατά επιλογή» γονιδιακές τροποποιήσεις (conditional gene targeting)**, μπορούν να οριστούν ως οι γονιδιακές τροποποιήσεις, οι οποίες συμβαίνουν μόνο σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους (κυτταροειδικές) ή επάγονται σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια ενός οργανισμού (χρονοεπαγόμενες). Η τεχνολογία αυτή είναι ιδιαίτερα χρήσιμη σε περιπτώσεις που α) τα αντίστοιχα full knockout ποντίκια (αδρανοποίηση του γονιδίου σε όλα τα κύτταρα) δεν επιβιώνουν και β) ένα γονίδιο εκφράζεται σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια και/ή σε διάφορους κυτταρικούς τύπους. Η προσέγγιση αυτή συνδυάζει την τεχνολογία της γονιδιακής στόχευσης με το σύστημα τοποειδικού ανασυνδυασμού Cre/loxP και αποσκοπεί συνήθως στην υπό όρους ενεργοποίηση, απενεργοποίηση ή αντικατάσταση ενός γονιδίου.<sup>55</sup>

Για την εφαρμογή του συστήματος Cre/loxP στις «κατά επιλογή» γονιδιακές τροποποιήσεις, προαπαιτείται η δημιουργία δύο σειρών ποντικών: μιας σειράς ποντικών που έχει δημιουργηθεί με γονιδιακή στόχευση, η οποία φέρει δύο loxP αλληλουχίες σε προκαθορισμένες θέσεις ενός γονιδίου, και μιας δεύτερης σειράς ποντικών που συνήθως παράγεται με διαγένεση, στην οποία η Cre εκφράζεται κυτταροειδικά ή σε συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο. Η «κατά

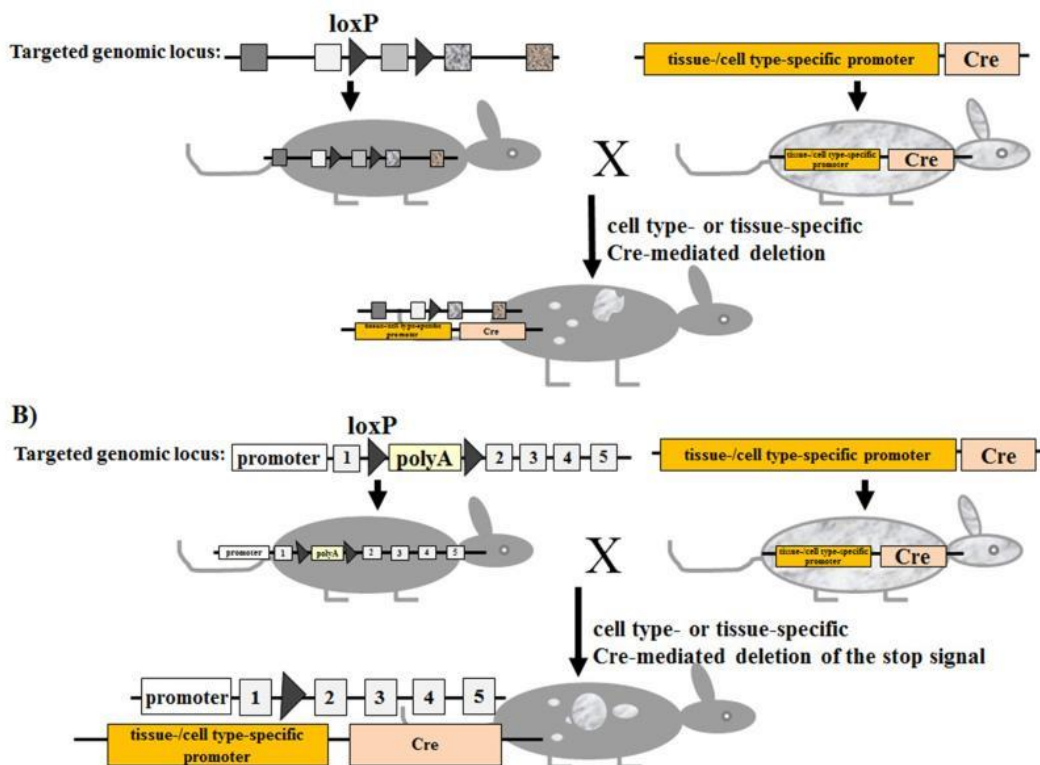
επιλογή» μεταλλαγμένη σειρά ποντικών (conditional) προκύπτει με διασταύρωση των δύο αυτών σειρών ποντικών, έτσι ώστε η τροποποίηση του τμήματος DNA που φέρει τα loxP, να περιορίζεται μόνο στους κυτταρικούς τύπους ή αναπτυξιακά στάδια όπου εκφράζεται η Cre (σχήμα 1.15). Το είδος των «κατά επιλογή» γονιδιακών τροποποιήσεων μπορεί να περιλαμβάνει όλες τις τροποποιήσεις, οι οποίες είναι δυνατό να γίνουν με την εφαρμογή του συστήματος Cre/loxP, συνηθέστερα ωστόσο, αυτές αποσκοπούν στην «υπό όρους» ενεργοποίηση, απενεργοποίηση ή αντικατάσταση ενός γονιδίου.<sup>50-55</sup>



**Σχήμα 1.15: Δημιουργία κατά επιλογή γονιδιακών τροποποιήσεων με κυτταροειδική τροποποίηση ενός γονιδίου.<sup>55</sup>**

Για την κυτταροειδική απενεργοποίηση ενός γονιδίου, αρχικά ένα σημαντικό για τη λειτουργία τμήμα του ή και όλο το γονίδιο, περιβάλλονται από loxP αλληλουχίες με τρόπο ώστε να μην επηρεάζουν την έκφρασή του. Μετά την εισαγωγή των αλληλουχιών loxP, ακολουθεί η διασταύρωση με ποντίκι στο οποίο η Cre ρεκομπινάση εκφράζεται κυτταροειδικά. Από την διασταύρωση

προκύπτει μια κατά επιλογή μεταλλαγμένη σειρά ποντικών, στην οποία η αλληλουχία DNA που περιβάλλεται από τις θέσεις loxP, διαγράφεται από τα κύτταρα ή τους ιστούς, που εκφράζουν την Cre. Για την κυτταροειδική ενεργοποίηση ενός γονιδίου, το γονίδιο αυτό αρχικά απενεργοποιείται με εισαγωγή σε ένα σημαντικό για την έκφρασή του σημείο, ανασταλτικών αλληλουχιών, οι οποίες περιβάλλονται από loxP με τον ίδιο προσανατολισμό, το καθιστούν ανενεργό και εμποδίζουν την σωστή μεταγραφή του. Με τη δράση της Cre, οι ανασταλτικές αλληλουχίες μπορεί να αφαιρεθούν, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της έκφρασης γονιδίου σε ένα συγκεκριμένο τύπο κυττάρου ή ιστού (σχήμα 1.16).<sup>50</sup>



Σχήμα 1.16: Σχηματική αναπαράσταση της υπό όρους A) κυτταρικής απενεργοποίησης B) κυτταρικής ενεργοποίησης.

### Χρονικά επαγόμενες γονιδιακές τροποποιήσεις

Οι επαγόμενες γονιδιακές τροποποιήσεις είναι ιδιαίτερα χρήσιμες στην ανάλυση του ρόλου συγκεκριμένων γονιδίων σε ενήλικα πειραματόζωα, λόγω του ότι προσφέρουν τη δυνατότητα της γονιδιακής τροποποίησης μετά τη φυσιολογική ανάπτυξη των προσαρμοστικών κυτταρικών συστημάτων του οργανισμού, όπως το ανοσοποιητικό και το νευρικό σύστημα. Έτσι, ενώ η συνεχής κυτταροειδική έκφραση της Cre μπορεί να επιτευχθεί με συνδυασμό φυσικών ή κατασκευασμένων υποκινητών, η χρονικά ελεγχόμενη λειτουργία της Cre, επιτυγχάνεται με ρύθμιση τόσο του μεταγραφικού όσο και του μετα-μεταφραστικού επιπέδου της έκφρασής της.

Συνοπτικά, η χρονικά ελεγχόμενη ρύθμιση της μεταγραφής, μπορεί να ελεγχθεί με το σύστημα της τετρακυκλίνης σε ευκαρυωτικά κύτταρα, το οποίο παρέχει τη δυνατότητα ενεργοποίησης ή απενεργοποίησης της μεταγραφής ενός γονιδίου με την παρουσία ή όχι του αντιβιοτικού Dox (παράγωγο της τετρακυκλίνης). Το σύστημα της τετρακυκλίνης επιτρέπει επίσης την αξιολόγηση του ρόλου της επιλεγμένης πρωτεΐνης, η οποία θεωρείται ότι εμπλέκεται στην αιτιολογία ειδικών παθολογιών, μέσω απενεργοποίησης της μετά την εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων, και αξιολόγησης του ρόλου της.<sup>56</sup>

Η ανάπτυξη της διαγονιδιακής τεχνολογίας, και ειδικότερα της τεχνολογίας της γονιδιακής στόχευσης, αποτελεί χρήσιμο εργαλείο στην μελέτη των γονιδίων και την συσχέτιση τους με παθολογικές καταστάσεις. Επιπλέον, η χρήση των συστημάτων ανασυνδυασμού Cre / loxP και Flp / FRT, οδήγησε στην ανάπτυξη της κατά επιλογή στόχευσης, διευκολύνοντας έτσι την μελέτη της συμβολής των γονιδίων που προέρχονται από συγκεκριμένους τύπους κυττάρων σε φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές διεργασίες. Οι παραπάνω τεχνικές, έχουν συμβάλει στην δημιουργία διεθνώς συντονισμένων συλλόγων, με σκοπό την δημιουργία μεγάλης κλίμακας βιβλιοθήκης μεταλλαγμένων βλαστικών κυττάρων ποντικίου, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την δημιουργία πειραματόζωων για ερευνητικούς σκοπούς.

### 1.3.3 Το μοντέλο EUCOMM

Τα εργαστήρια που χρησιμοποιούν ποντίκια στα πειράματά τους, συμβάλλουν σημαντικά στην επιστημονική έρευνα ήδη από τον 15ο αιώνα, και αποτελούν ένα απαραίτητο εργαλείο για τους ερευνητές που επιθυμούν να μελετήσουν τη βιολογία της ανάπτυξης, της γενετικής, της φυσιολογίας, και της παθολογίας των θηλαστικών *in vivo*.<sup>57</sup> Με την ανάπτυξη της τεχνολογίας της «γονιδιακής στόχευσης», στα τέλη του 20ου αιώνα, οι ερευνητές απέκτησαν την ικανότητα επιλεκτικής μετάλλαξης του γονιδιώματος του ποντικού σε τόπους επιλογής τους.<sup>58</sup> Ωστόσο, η ανάπτυξη και εφαρμογή αυτής της τεχνολογίας εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το επίπεδο τεχνογνωσίας στον σχεδιασμό του φορέα στόχευσης, καθώς επίσης από την απομόνωση, την καλλιέργεια και την εισαγωγή των ES κυττάρων στο έμβρυο. Επιπλέον, αυτή η διαδικασία είναι χρονοβόρα και δαπανηρή. Για τους παραπάνω λόγους, θεωρήθηκε σκόπιμη η δημιουργία μιας βιβλιοθήκης προ-μεταλλαγμένων εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων ποντικού, την οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιήσουν οι ερευνητές οι οποίοι πρόκειται να αρχίσουν μελέτες σε ζώα. Η ανάγκη αυτή ικανοποιείται την τελευταία δεκαετία από την «**Διεθνή κοινοπραξία Knockout ποντικών**» (**International Knockout Mouse Consortium- IKMC**).

Η IKMC ιδρύθηκε το 2007 με στόχο την μετάλλαξη όλων των περιοχών του γονιδιώματος ποντικού που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, αξιοποιώντας τις τεχνικές της γονιδιακής στόχευσης και της γονιδιακής παγίδευσης σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα ποντικού C57BL/6.<sup>59</sup> Η IKMC είναι μια κοινοπραξία που αποτελείται από πολλά προγράμματα συνεργασίας όπως:

- το Knockout Mouse Project (KOMP) (ΗΠΑ)
- το European Conditional Mouse Mutagenesis Program (EUCOMM) (Ευρώπη),
- EUCOMM: Tools for Functional Annotation of the Mouse Genome (EUCOMMTOOLS) (Ευρώπη),
- το North American Conditional Mouse Mutagenesis Project (NorCOMM) (Καναδάς), και το
- Texas A&M Institute for Genomic Medicine (TIGM) (ΗΠΑ)<sup>60</sup>.

Η ιεράρχηση των γονιδίων- στόχων γίνεται με βάση την κοινοτική ζήτηση, τις επιτροπές εμπειρογνομόνων, και την σημασία των μεμονωμένων γονιδίων, με μικρή επικάλυψη μεταξύ των προγραμμάτων<sup>(20)</sup>. Από το 2006 έως το 2010 έχουν δημιουργηθεί (από την KOMP, EUCOMM, NorCOMM) περισσότερα από 40000 ES κύτταρα που φέρουν κάποια μετάλλαξη σε ένα γονίδιο στόχο (πίνακας 1.3).<sup>59</sup>

**Πίνακας 1.3: Οι αριθμοί διαφορετικών μεταλλαγμένων ES κυττάρων και ποντικών που δημιουργήθηκαν από τα 3 προγράμματα του IKMC το διάστημα 2006-2010.**<sup>59</sup>

<b>Table 1. International Mouse Gene Knockout Programs</b>							
Type of Resource	Type of Knockout	2006	2007	2008	2009	2010	Totals
<b>KOMP</b>							
ES Cell	Targeted Deletion	175	500	941	942	942	3500
Mouse	Targeted Deletion	50	50	50	50	50	250
ES Cell	Targeted Conditional	1000	1000	1000	1000	1000	5000
Mouse	Targeted Conditional	50	50	50	50	50	250
<b>EUCOMM</b>							
ES Cell	Trapped Conditional	3000	6000	3000			12,000
ES Cell	Targeted Conditional	1000	3000	4000			8000
Mouse	Mixed	20	100	200			320
<b>NorCOMM</b>							
ES Cell	Trapped Conditional	1000	4000	3000	2000		10,000
ES Cell	Targeted Conditional	100	400	750	750		2000
Mouse	Mixed	25	25	25	25		100
<b>Cumulative for All Programs</b>							
ES Cell	Trapped (Conditional)	4000	14000	20000	22000		22,000 <sup>a</sup>
ES Cell	Targeted (Deletion)	175	675	1616	2558	3500	3500
ES Cell	Targeted (Conditional)	2100	6500	12,250	14,000	15,000	15,000
Mouse	Mixed	125	400	715	830	920	920

Η τεχνολογία της κατά επιλογήν μεταλλαξογένεσης στην Ευρώπη είναι ιδιαίτερα αναπτυγμένη, πράγμα που σε μεγάλο βαθμό οφείλεται στην τοπική ανάπτυξη των τεχνολογιών που απαιτούνται, όπως π.χ. του τοποειδικού ανασυνδυασμού. Έτσι, η Ευρώπη συνέβαλε στις διεθνείς προσπάθειες δημιουργίας βιβλιοθήκης μεταλλαγμένων βλαστικών κυττάρων, δημιουργώντας το πρόγραμμα **EUCOMM**.<sup>61</sup>

Οι στόχοι του προγράμματος EUCOMM είναι οι εξής<sup>61</sup>:

1. Η ανάπτυξη στρατηγικών «κατ' επιλογήν» γονιδιακών τροποποιήσεων.
2. Η δημιουργία μονάδων γονιδιακής στόχευσης και κατά επιλογήν γονιδιακής παγίδευσης.

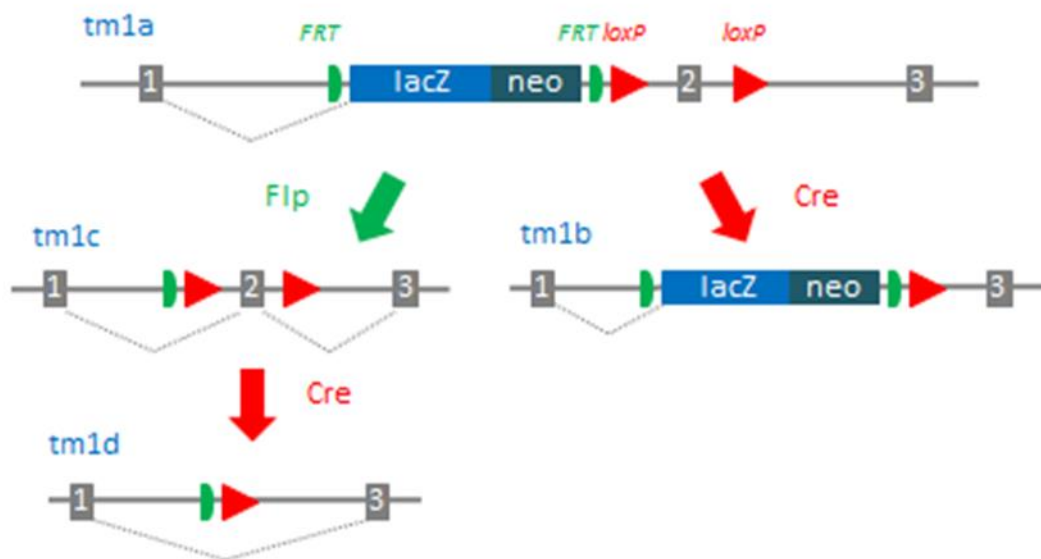
3. Η χρήση της τεχνολογίας της γονιδιακής στόχευσης για την δημιουργία κατά επιλογή αλληλομόρφων, τα οποία θα συμβάλλουν στην δημιουργία του ανενεργού αλληλόμορφου.
4. Η επέκταση των διαγονιδιακών σειρών ποντικών που εκφράζουν την Cre ρεκομπινάση.
5. Η συμβολή στην προσπάθεια δημιουργίας μεταλλαγμένων γονιδίων τα οποία είναι γνωστό ότι εμπλέκονται σε ασθένειες.
6. Η διερεύνηση νέων τεχνολογιών με σκοπό την πρόοδο της λειτουργικής γονιδιωματικής.

### **Η τεχνική γονιδιακής στόχευσης του EUCOMM**

Η κύρια στρατηγική του προγράμματος EUCOMM, περιλαμβάνει τη δημιουργία του «πρώτου knockout» (knockout-first) υπό όρους στοχευμένου αλληλόμορφου, μια ισχυρή προσέγγιση που επιτρέπει τόσο την μελέτη όσο και την υπό όρους μετάλλαξη ενός συγκεκριμένου γονιδίου ενδιαφέροντος. Παρακάτω περιγράφεται πώς αυτή η προσέγγιση εφαρμόζεται σε ένα γονίδιο ενδιαφέροντος, που περιέχει τρία εξώνια, με το εξώνιο 2 να έχει ταυτοποιηθεί ως "κρίσιμο" για τη λειτουργία του γονιδίου.



## Knockout-first allele: Promoterless selection cassette



Σχήμα 1.17: Το μοντέλο γονιδιακής στόχευσης του προγράμματος EUCOMM.<sup>62</sup>

Όπως φαίνεται στο σχήμα 1.17, μια lacZ κασέτα παγίδευσης, τοποθετείται 5' άκρο ενός γενετικού τόπου-φορέα στόχευσης, και συγκεκριμένα εντοπίζεται ανοδικά του εξωνίου 2. Ο φορέας περιέχει επίσης το γονίδιο αντοχής στη νεομυκίνη (**neo κασέτα**- neomycin resistance selection cassette) που ελέγχεται από τον υποκινητή της β-ακτίνης.<sup>66</sup> Η κασέτα αντοχής στη νεομυκίνη, χρησιμοποιείται ως δείκτης θετικής επιλογής, ενώ η lacZ κασέτα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την δημιουργία ζώων που εκφράζουν πρωτεΐνη αναφοράς, π.χ. εκφράζουν lacZ στους ιστούς που εκφράζεται το γονίδιο ενδιαφέροντος. Δυο θέσεις loxP εισάγεται εκατέρωθεν του εξωνίου 2 για να διευκολυνθεί η αφαίρεση του, και ως εκ τούτου η παραγωγή των πειραματικών knockout ζώων τα οποία φέρουν **μηδενικά αλληλόμορφα (null alleles)**. Για να επιτραπεί η ταυτόχρονη αφαίρεση τόσο της lacZ κασέτας όσο και της κασέτας αντοχής στη νεομυκίνη, έχουν εισαχθεί στο αλληλόμορφο δύο FRT αλληλουχίες: μια ανοδικά της κασέτας lacZ και μία μεταξύ της κασέτας αντοχής στη νεομυκίνη και της θέσης loxP αμέσως πριν εξώνιο 2. Το αλληλόμορφο που δημιουργείται αναφέρεται ως αλληλόμορφο που φέρει την «στοχευμένη μετάλλαξη 1<sup>α</sup>» (targeted mutation 1a /tm1a), και χαρακτηρίζεται ως **«πρώτο- knockout»**

αλληλόμορφο, επειδή η εισαγωγή του ξένου γενετικού υλικού (neo- lacZ κασέτα) αναμένεται να διαταράξει το μάτισμα του γονιδίου ενδιαφέροντος.

Ένα βασικό χαρακτηριστικό του προγράμματος EUCOMM είναι ότι ο σχεδιασμός των φορέων είναι ευέλικτος και υψηλής απόδοσης. Επίσης, η EUCOMM χρησιμοποιεί αυτοματοποιημένες διαδικασίες προσδιορισμού των θέσεων των γονιδίων στο γονιδίωμα (gene annotation) και υπολογιστικό σχεδιασμό των φορέων στόχευσης<sup>62</sup>, όπου αφού εντοπίζεται το πιο «κρίσιμο» εξώνιο του γονιδίου, στοχεύεται για να διαγραφεί. Με τον όρο «κρίσιμο εξώνιο», χαρακτηρίζεται ένα εξώνιο το οποίο είναι κοινό σε όλα τα μετάγραφα που προκύπτουν λόγω εναλλακτικού ματίσματος (transcript variants), η διαγραφή του θα οδηγήσει σε μετατόπιση πλαισίου ανάγνωσης, και θα διαταράξει πάνω από το 50% της περιοχής του DNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη του γονιδίου ενδιαφέροντος<sup>60</sup>. Μόλις εντοπιστεί, χρησιμοποιείται ένας αλγόριθμος για να επιλέξει 50-μερή που θεωρούνται κατάλληλα για ανασυνδυασμό και τοποθέτηση των θέσεων loxP σε περιοχές ιντρονίων, όπου είναι απίθανο να διαταράξουν τη μεταγραφή. Ενώ αυτή η προσέγγιση επέτρεψε στην ομάδα EUCOMM να στοχεύσει χιλιάδες γονίδια ενδιαφέροντος, αυτό το σύστημα στόχευσης μπορεί να εφαρμοστεί μόνο στο 40% των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες<sup>62</sup>. Γονίδια με μόνο ένα ή δύο εξώνια, στα οποία στοχεύεται ένα εξώνιο που είναι κοινό σε όλες τις ισομορφές, πρέπει να στοχεύονται με τη χρήση εναλλακτικών μεθόδων (από άλλα προγράμματα της IKMC). Αν και στα ποντίκια που φέρουν το αλληλόμορφο tm1a έχει αδρανοποιηθεί αποτελεσματικά το γονίδιο ενδιαφέροντος τους, απαιτούνται πρόσθετα μέτρα για την δημιουργία των κατάλληλων knock-out πειραματόζωνων η πειραματόζωνων αναφοράς.

## **Δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών που φέρουν το αλληλόμορφο με γονίδιο αναφοράς lacZ (tm1b)**

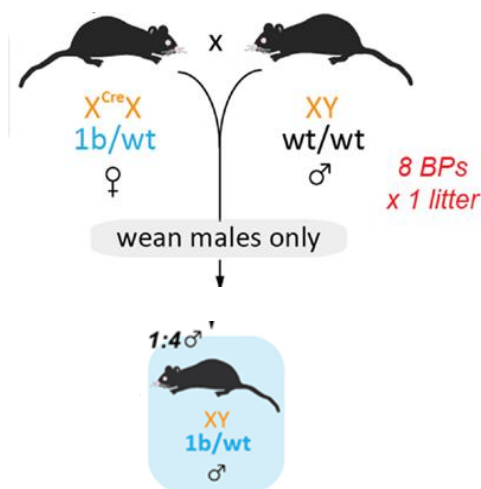
Εκτός από τη στοχευμένη γονιδιακή αποσιώπηση, ο σχεδιασμός αλληλομόρφων με βάση το μοντέλο EUCOMM έχει την ικανότητα να αντικαταστήσει την μετάφραση του γονιδίου ενδιαφέροντος με την έκφραση του ενζύμου της β-γαλακτοσιδάσης (κωδικοποιείται από την lacZ κασέτα), παρέχοντας έτσι ένα τρόπο μελέτης του ιστού στον οποίο το γονίδιο ενδιαφέροντος θα εκφράζονταν φυσιολογικά (επειδή το γονίδιο lacZ ελέγχεται από τον εκκινητή του γονιδίου ενδιαφέροντος).<sup>66</sup>

Το **γονίδιο LacZ** είναι ένα γονίδιο που βρίσκεται στην *E. Coli* και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη β-γαλακτοσιδάση. Το LacZ χρησιμοποιείται συχνά ως γονίδιο αναφοράς, επειδή αν βρεθούν σε ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα που ονομάζεται X-gal, τα αλληλόμορφα που εκφράζουν το LacZ και κατά συνέπεια τη β-γαλακτοσιδάση, διασπών τον κεντρικό δεσμό στο μέσο X-gal και παράγουν γαλακτόζη και μια μπλε χρωστική.

Η έκφραση της β-γαλακτοσιδάσης, μπορεί να αξιολογηθεί μέσω της ανάλυσης των ιστών και των κυτταρικών τύπων, χρησιμοποιώντας είτε ιστοχημική χρώση είτε ανοσοϊστοχημεία. Το πλεονέκτημα της ανοσοϊστοχημικής μεθόδου για την ανίχνευση της πρωτεΐνης β-γαλακτοσιδάσης, αντί του προϊόντος του γονιδίου ενδιαφέροντος, είναι ότι οι ερευνητές μπορούν να χρησιμοποιήσουν καθιερωμένα και ευαίσθητα πρωτόκολλα ανοσοϊστοχημείας για την β-γαλακτοσιδάση, ενώ στην αντίθετη περίπτωση θα πρέπει να σχεδιαστεί ένα πρωτόκολλο διαφορετικό για το κάθε γονίδιο, το οποίο σε πολλές περιπτώσεις μπορεί να μην έχει υποβληθεί σε λεπτομερή αξιολόγηση και πιθανόν να εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη διαθεσιμότητα υψηλής ποιότητας αντισωμάτων. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για την μελέτη υποδοχέων συζευγμένων με πρωτεΐνες, όπου η εξειδίκευση των «ειδικών» αντισωμάτων είναι συχνά κακής ποιότητας, όπως φαίνεται από παρόμοια πρότυπα χρώσης σε ποντίκια knockout και άγριου τύπου.<sup>63</sup>

Με τη διασταύρωση tm1a ποντικών με ποντίκια που υπερεκφράζουν την Cre ρεκομπινάση, ο ανασυνδυασμός που γίνεται στις θέσεις loxP, έχει ως αποτέλεσμα τη διαγραφή τόσο της κασέτας νεομυκίνης όσο και του εξωνίου 2,

οδηγώντας στην παραγωγή των *tm1b*, *lacZ* ποντικών αναφοράς (σχήμα 1.18) τα οποία εκφράζουν την β-γαλακτοσιδάση εντός των ιστών και των κυττάρων στα οποία φυσιολογικά θα εκφράζονταν το γονίδιο αναφοράς (σχήμα 1.17).

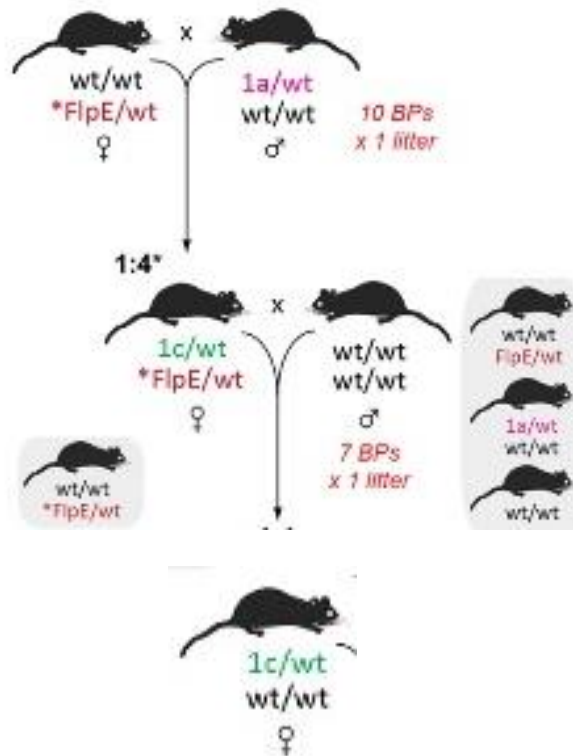


Σχήμα 1.18: Σχηματική αναπαράσταση της δημιουργίας των ποντικών που φέρουν το αλληλόμορφο με γονίδιο αναφοράς *lacZ* (*tm1b*).<sup>66</sup>

### Δημιουργία "Floxed» Ποντικών/ Ποντικών που φέρουν κατ'επιλογή αλληλόμορφα (*tm1c*)

Ως πρώτο βήμα για την δημιουργία του γένους των conditional knockout ποντικών και την αποκατάσταση της έκφρασης του γονιδίου ενδιαφέροντος, τα ετερόζυγα ποντίκια για το *tm1a* αλληλόμορφο, διασταυρώθηκαν με διαγονιδιακά C57BL/6J ποντίκια που υπερεκφράζουν την *Flo* ρεκομπινάση. Όταν οι απόγονοι κληρονομούν τόσο το αλληλόμορφο *tm1a* όσο και το αλληλόμορφο *Flo*, η *FRT*-πλαισιωμένη περιοχή του *tm1a* αποκόπτεται και μετά τον ανασυνδυασμό, αφαιρείται η κασέτα *lacZ*, η κασέτα αντοχής στη νεομυκίνη και αποκαθίσταται η έκφραση του γονιδίου αναφοράς. Οι απόγονοι που προκύπτουν αναφέρονται ως *tm1c* ή "floxed" ποντίκια (σχήμα 1.19) και να χρησιμεύουν τόσο για τη δημιουργία knockout ποντικών αλλά και ως ποντίκια ελέγχου σε πειράματα. Τα ποντίκια *tm1c* θεωρούνται ουσιαστικά «άγριου τύπου» ποντίκια με μόνη διαφορά ότι στο αλληλόμορφο τους έχουν εισαχθεί δύο θέσεις *loxP* που πλευρίζουν το εξώνιο 2. Ωστόσο, θα πρέπει να ελεγχτεί

πειραματικά η απίθανη περίπτωση οι θέσεις loxP να έχουν διαταράξει το μάτισμα του γονιδίου ή ένα σημαντικό ρυθμιστικό ή ενισχυτικό στοιχείο των εσωνίων.



Σχήμα 1.19: Σχηματική αναπαράσταση της δημιουργίας των ποντικών που φέρουν τα κατά επιλογή αλληλόμορφα.<sup>66</sup>

### Δημιουργία Knockout ποντικών (tm1d)

Τέλος, η διασταύρωση tm1c ποντικών είτε με Cre ποντίκια (ίδιου τύπου με αυτά που απαιτούνται για την δημιουργία των tm1b), ή εναλλακτικά με ποντίκια τα οποία υπερεκφράζουν μια ιστοειδική μορφή της Cre ρεκομπινάσης, οδηγεί στην δημιουργία των "tm1d" ποντικών, στα οποία έχει διαγραφεί τόσο ο φορέας στόχευσης όσο και το εξώνιο 2 του γονιδίου ενδιαφέροντος και η μεταγραφή του υπολειπόμενου γονιδίου είναι πιθανό να αποικοδομηθεί ως αποτέλεσμα της διαμεσολαβούμενης διάσπασης του γονιδίου (σχήμα 1.17).

## Πλεονεκτήματα- Μειονεκτήματα χρήσης του μοντέλου EUCOMM <sup>66</sup>

A) Τα ποντίκια που προκύπτουν από το μοντέλο της EUCOMM δεν απαιτούν αναδιασταύρωση (backcross), επειδή χρησιμοποιούνται C57BL/6 εμβρυικά βλαστικά κύτταρα.

Παλαιότερα, οι προσπάθειες στόχευσης γονιδίων πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση εμβρυικών βλαστικών κυττάρων, τα οποία προέρχονταν από διαφορετικά υποστελέχη, επειδή ήταν ευκολότερά στην επεξεργασία και οδήγησαν σε υψηλούς ρυθμούς μετάδοσης της βλαστικής σειράς. Πλέον όμως, λίγες μελέτες εκτελούνται σήμερα χρησιμοποιώντας τα συγκεκριμένα στελέχη, επειδή τα ποντίκια που προκύπτουν δεν αναπαράγονται σε μεγάλο βαθμό και εμφανίζουν διάφορες φαινοτυπικές ανωμαλίες π.χ. αλλαγές στη συμπεριφορά<sup>(64)</sup>. Αντί αυτού, η γονιδιακή στόχευση πραγματοποιείται σε βλαστικά κύτταρα C57BL/6 ποντικών, καθώς είναι καλύτερα αναπαραγωγικά ζώα, τα οποία πλέον αποτελούν το υπόβαθρο για την δημιουργία Cre διαγονιδιακών ποντικών και χρησιμοποιούνται ευρέως σε όλη την ερευνητική κοινότητα, λόγω της καλώς χαρακτηρισμένης απόκρισης τους σε πολλά μοντέλα ασθενειών (π.χ., παχυσαρκία, διαβήτης, αθηροσκλήρωση). Επιπλέον, αν η μεταφορά του στοχευμένου γονιδίου γίνει με τη χρήση των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων από τα στελέχη που χρησιμοποιούνταν παλαιότερα, τα ποντίκια που θα προκύψουν θα πρέπει να διασταυρωθούν περαιτέρω με C57BL/6 ποντίκια για 10 γενιές για να καθαριστεί το γενετικό τους υπόβαθρο. Η IKMC και η EUCOMM, έχουν δημιουργήσει χιλιάδες πρώτα-knockout αλληλόμορφα χρησιμοποιώντας C57BL/6 εμβρυικά βλαστικά κύτταρα<sup>65</sup>. Η χρήση των C57BL/6 εμβρυικών βλαστικών κυττάρων είναι αναμφίβολα ένα από τα σημαντικότερα σημεία υπεροχής του συστήματος EUCOMM, γιατί με την παραγωγή χιμαιρικών σειρών από τέτοια ES κύτταρα, οι ερευνητές μπορούν να μειώσουν τον απαιτούμενο χρόνο και τους πόρους που χρειάζονται οι απαιτητικές διασταυρώσεις και να είναι σίγουροι ότι τα ποντίκια που θα προκύψουν θα έχουν ένα καθαρό γενετικό υπόβαθρο.

B) Δυνατότητα επιλογής ποντικών που υπερεκφράζουν την Cre ρεκομπινάση ανάλογα με τις απαιτήσεις (ιστοειδική- χρονικά επαγόμενη έκφραση)

Μια από τις ισχυρότερες πτυχές του μοντέλου EUCOMM είναι η ικανότητα διαγραφής του γονιδίου σε έναν μόνο ιστό σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή μέσω της διασταύρωσης tm1c ποντικών με εξειδικευμένες σειρές Cre ρεκομπινάσης. Ενώ η συνήθης πρακτική που ακολουθείται για την παραγωγή tm1d ποντικών περιλαμβάνει την διασταύρωση tm1c ζώων με ποντίκια που υπερεκφράζουν την Cre ρεκομπινάση, όπως περιγράφεται παραπάνω, υπάρχουν πολλές περιπτώσεις στις οποίες η καθολική διαγραφή του γονιδίου δεν είναι ιδανική όπως π.χ. σε γονίδια που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη. Σε αυτές τις περιπτώσεις, υπάρχει η δυνατότητα χρήσης επιλεγμένων διαγονιδίων της Cre ρεκομπινάσης τα οποία θα διαγράψουν το γονίδιο ενδιαφέροντος σε συγκεκριμένο ιστό ή αναπτυξιακό στάδιο, πράγμα που μετατρέπει το μοντέλο EUCOMM σε ένα χρήσιμο εργαλείο για την δημιουργία knockout γονιδίων, σημαντικών κατά την εμβρυογένεση ή την ανάπτυξη. Η απίστευτη ευελιξία που παρέχεται από την EUCOMM οφείλεται στην διαθεσιμότητα περισσότερων από 2.000 διαφορετικών στελεχών Cre ποντικών.

Γ) Είναι απαραίτητη η απομάκρυνση του δείκτη θετικής επιλογής και των ενζύμων που προκαλούν τον ανασυνδυασμό

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η χρήση των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων C57BL/6 παρακάμπτει την ανάγκη πολλαπλών διασταυρώσεων ώστε να επιτευχθεί γενετική ομοιογένεια. Παρόλο που τα ποντίκια που προκύπτουν με το μοντέλο EUCOMM έχουν καθαρό γενετικό υπόβαθρο, πρέπει να πραγματοποιηθούν ορισμένες διασταυρώσεις των ποντικών που προκύπτουν με άγριου τύπου ποντίκια για να επιτευχθεί η απομάκρυνση τόσο της κασέτας νεομυκίνης, όσο και των ρεκομπινάσεων (Flp, Cre), πριν από τη διαδικασία φαινοτύπησης των knockout ποντικών. Ο λόγος είναι ότι και οι δύο έχουν συνδεθεί με αλλαγές που προκαλούνται στον φαινότυπο και είναι ανεξάρτητες από εκείνες που οφείλονται στην απενεργοποίηση του γονιδίου ενδιαφέροντος. Για παράδειγμα, η διατήρηση της κασέτας που προσδίδει αντοχή στην

νεομυκίνη, μπορεί να προκαλέσει άμεση διακοπή των στοιχείων γονιδιακής ρύθμισης και απροσδόκητη διακοπή των γονιδίων που βρίσκονται καθοδικά (downstream) σε σχέση με την αρχική μετάλλαξη. Έτσι, κρίνεται απαραίτητη η αναπαραγωγή των ποντικών για πολλές γενιές, ώστε να δημιουργηθούν knockout και floxed ποντίκια που θα είναι απαλλαγμένα από παρεμβολές και από εξωγενείς ακολουθίες.



## ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα εργασία αφορά τη διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου SH3PXD2A στην παθογένεση της πνευμονικής ίνωσης και του καρκίνου. Είναι γνωστό ότι κεντρικό ρόλο στην παρεκκλίνουσα ινωτική απόκριση της IPF διαδραματίζει ο παράγοντας TGF-β, μια ινωτική κυτοκίνη, η οποία συμβάλλει στην διαφοροποίηση του μυοϊνοβλάστη και στην υπερβολική εναπόθεση εξωκυττάριας μήτρας. Ο τόσο σημαντικός του ρόλος στην παθογένεια της νόσου, καθιστά απαραίτητη την κατανόηση του τρόπου με τον οποίο ο TGF-β οδηγεί την ενεργοποίηση / διαφοροποίηση των πνευμονικών ινοβλαστών.

Σε αυτό το πλαίσιο πραγματοποιήθηκε μια διεξοδική ανάλυση όλων των διαθέσιμων πειραματικών δεδομένων (mRNA, miRNAs, βιοδείκτες, κλπ.) που υπάρχουν στη δημοσιευμένη βιβλιογραφία, και σχετίζονται με απορυθμισμένη έκφραση σε ασθενείς με IPF αλλά και σε ζωικά μοντέλα. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν συγκρίθηκαν με στοιχεία γονιδίων τα οποία αποκρίνονται στην χορήγηση TGF σε πνευμονικούς ινοβλάστες. Ο κατάλογος που προέκυψε αντιπροσωπεύει μια πολύτιμη πηγή ενδεχόμενων παθογόνων γονιδίων της IPF και πιθανών θεραπευτικών στόχων. Από τα γονίδια που προέκυψαν από την παραπάνω ανάλυση επιλέχθηκε το γονίδιο SH3PXD2A, η έκφραση του οποίου βρέθηκε αυξημένη στην πνευμονική ίνωση, ως ένα από τα πιο υποσχόμενα μεταξύ των υποψηφίων.

Το γονίδιο SH3PXD2A κωδικοποιεί την πρωτεΐνη προσαρμογέα TKS5, η οποία εμπλέκεται στην διαμόρφωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, που αποτελεί πρωταρχικό γεγονός στην κατευθυνόμενη από TGF / LPA διαφοροποίηση των ινοβλαστών πνεύμονα σε μυοϊνοβλάστες, καθώς και στην ικανότητα διείσδυσης ορισμένων καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, η TKS5 έχει βρεθεί να αλληλεπιδρά *in vitro* και *in vivo* με αρκετά μέλη της οικογένειας μεταλλοπρωτεασών Adams, συμβάλλοντας έτσι στην ομοίωση της εξωκυττάριας μήτρας. Θεωρείται ότι η πρωτεΐνη Tks5 θα μπορούσε να δράσει ως μόριο προσαρμογέας μαζί με την ADAM19, ρυθμίζοντας την TGF-β1 σηματοδότηση μέσω της Src κινάσης, οδηγώντας έτσι στην μετανάστευση των ινοβλαστών και στην εναπόθεση εξωκυττάριας μήτρας με τελικό αποτέλεσμα την πνευμονική ίνωση. Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι η TKS5 δεσμεύει την

οικογένεια ενζύμων NADPH (NOXs) και συμβάλλει στην παραγωγή ενεργών ειδών οξυγόνου (ROS), γεγονότα που συμβάλλουν σε όλες τις φλεγμονώδεις πνευμονικές παθοφυσιολογικές καταστάσεις.

Για να πραγματοποιήσουμε μια πιο διεξοδική μελέτη του γονιδίου, ακολουθήσαμε το μοντέλο της EUCOMM, με σκοπό τόσο την δημιουργία ενός πλήρους knock-out ποντικίου για το γονίδιο Sh3pxd2a όσο και τον πλήρη φαινοτυπικό χαρακτηρισμό του, ώστε να μελετηθούν οι επιπτώσεις της απουσίας του γονιδίου στην εμβρυϊκή ανάπτυξη και στην διαδικασία της ομοίωσης στην ενήλικη ζωή. Το κατά επιλογή knock-out ποντίκι, θα χρησιμοποιηθεί περαιτέρω στην εξέταση του ρόλου του γονιδίου στην παθοφυσιολογία του πνεύμονα, χρησιμοποιώντας ζωικά μοντέλα τα οποία αναπαριστούν την πνευμονική φλεγμονή, την ίνωση αλλά και τον καρκίνο.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Εξοπλισμός-Όργανα

- Ανακινούμενοι επωαστήρες
- Αναλυτικός ζυγός
- Επωαστήρας
- Θερμικοί κυκλοποιητές-Thermal cyclers, (Peqlab: PeqStar 2x και Biorad: #582BR016459 )
- Συσσκευή Real Time PCR (Biorad # CFX96 Optics Module)
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Μετασχηματιστής- Τροφοδοτικό Power supply, (Biorad # 164-5050)
- Πιπέτες
- Κασέτες σκίνωσης
- Ενδοτραχειακοί καθετήρες
- Ράμματα
- Σύριγγες του 1 και των 10ml
- Parafilm
- Συσσκευή ηλεκτροφόρησης (Biorad #283BR15412)
- Συσσκευή απιονισμένου ύδατος
- Σωληνάρια (2- 1.5- 0,5) ml eppendorfs (Greiner bio-one # 616201)
- Σωληνάρια 0.2 ml eppendorfs PCR tubes thick wall (Sarstedt #72.699)
- Φωτόμετρα (Tecan Sunrise #1639400)
- Ψηφιακή Φωτογραφική μηχανή
- pH-μετρο (inolab)
- Πλαστικά ακρορύχια (tips) της εταιρείας Costar.
- Δοκιμαστικοί σωλήνες των 15ml και 50ml της εταιρείας Falcon.
- Αντικειμενοφόρος πλακά (VWR #091814)
- Καλυπτρίδες (Knittel Class #KN00010029628)
- Βάζο χρώσης αντικειμενοφόρων πλακών
- Συσσκευή παροχής ηλεκτρικού ρεύματος
- Συσσκευή με λάμπα UV

- Φούρνος μικροκυμάτων
- Εκμαγείο συσκευής ηλεκτροφόρησης
- Ομογενοποιητής ULTRA TURRAX T25 basic (IKA-Werke)
- Επιτραπέζια ψυχόμενη φυγόκεντρος Heraeus Fresco 17 (Thermo scientific)
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος (Thermo scientific #41775276)
- Συσκευή Vortex
- Σωληνάρια BIJOUX
- Συσκευή Υδατόλουτρου Memert TYP:WB 10
- Φασματοφωτόμετρο Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific)
- Πιάτα Real time PCR (Biorad #64074523)
- Πλάκα 96-φρεατίων (costar #31813037)

Όλα τα υαλικά και πλαστικά είδη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αποστειρωμένα.

## 2.2 Υλικά

- Ξηρός πάγος
- Υγρό άζωτο
- Αγαρόζη, Agarose (Invitrogen # 16500500)
- Διάλυμα λύσης (Tail Buffer) 1L
- Πρωτεϊνάση K, Proteinase K (10 mg/ml) (Roche #3115879 )
- Ρυθμιστικό διάλυμα 10x TBE (Tris/Borate/EDTA)
- Ρυθμιστικό διάλυμα 50x TAE (Tris/Acetate/EDTA)
- Χρωστική Orange G (DNA loading buffer)
- Taq πολυμεράση
- Long Amplification Taq πολυμεράση (New England Biolabs # M0323S)
- Long Amplification Taq Reaction Buffer (New England Biolabs #B0323S)
- Μονοφασικό διάλυμα φαινόλης και ισοθειοκυανικής γουανιδίνης -Trizol Reagent Invitrogen (TR118)
- DEPC-H<sub>2</sub>O (RNAse free)

- Σκόνη Φαινόλης (VWR chemicals #20599.297)
- Χλωροφόρμιο (Fisher Scientific #1173671)
- Διάλυμα άλατος (0.8M C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O και 1,2M NaCl)
- Αιθανόλη 100%, 90%,75%
- Διάλυμα 10x PCR (500 mM χλωριούχο κάλιο, 100mM Tris-υδροχλωρίου με pH 9.0 στους 25 0 C, 1% Triton X-100)
- Χλωριούχο μαγνήσιο (Panreac, CR 161696)
- Εκκινητές με συγκέντρωση 5 pmol/μL, Macrogen
- Ένζυμο αντίστροφης μεταγραφάσης, M-MLV RT (Promega #0000172807)
- M-MLV 5x Buffer (Promega #0000201700)
- Ένζυμο: RQ1 & RNase-free DNase (Promega #0000156360)
- RQ1 DNase 10x Reaction Buffer (Promega #006112322)
- Eva Green supermix (Biorad #172-5204)
- Μίγμα φαινόλης | χλωροφορμίου (1:1) (v/v)
- Διάλυμα γλυκογόνου 10 μg/μL
- Διάλυμα οξικού νατρίου 3M
- Βορικό οξύ, Boric acid ( Fisher Scientific #BP168-1)
- Δεοξυριβονουκλεοτίδια-dNTPs(Invitrogen#18427-088και Fermentas#R0181)
- Trypan Blue solution (Sigma #8154)
- DMF N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο
- DPX (Dibutyl phthalate), (Sigma, #80100)
- EtBr Βρωμιούχο αιθίδιο ethidium bromide (Sigma, #E1510)
- EDTA αιθύλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (Applichm #A2937 1000)
- Γλυκερόλη (Sigma #G8773)
- Ισοπροπανόλη (AppliChem #DS-22,0005)
- Μεθανόλη (Merk #K40357009)
- H<sub>2</sub>O PCR, Gibco distilled water DNase/RNase Free (Invitrogen #05686)
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, ανθρακικό νάτριο (Merck #1.06393.1000)
- NaHCO<sub>3</sub>, όξινο ανθρακικό νάτριο (Sigma #S-7277)
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> μονόξινο φωσφορικό νάτριο (Fisher Bioreagents # 149441)
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> δισόξινο φωσφορικό νάτριο
- K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> σιδηρικού ανιούχο κάλιο (Sigma #20709DB)

- $K_4Fe(CN)_6$  σιδηροκυανουόχο κάλιο (Sigma # 455989)
- Na deoxycolate Δεοξυχολικό νάτριο ( $C_{24}H_{39}O_4$ ) (Fluka Biochemika #30970)
- Nonylphenylpolyethylene glycol NP40 (AppliChem #0J005002)
- Φορμαλδεΰδη (37-40%) (Lab scan #A48C11X)
- Γλουτεραλδεΰδη (25%) (Sigma #G6257)
- Παραφορμαλδεΰδη PFA (4%)
- Οξικό οξύ 0,5 M
- Αιματοξυλίνη
- Υδροχλωρικό οξύ
- Διάλυμα Scott's
- Διάλυμα Ηωσίνης
- Ξυλένιο
- Διάλυμα Bradford (Sigma #SLBL4590V)
- Direct Red 80 (Sigma-Aldrich #365548)
- Κολλαγόνο Type I, από Rat Tail (Sigma-Aldrich)
- PBS pH7.4
- Φυσιολογικός όρος (DEMO ABEE. #1505174)
- OCT ( VWR chemicals #03806271)
- Tween 20 (Sigma #SZBB1080V)
- Triton X (Sigma # T8532)
- Normal Goat Serum (NGS)
- Albumin from Bovine Serum (BSA) (Sigma #A9647)
- Fluoroshield Moviol with DAPI / 4',6'Diamino-2-phenylindole (Sigma #f6057)
- Πολυκλωνικό αντίσωμα Anti-Tks5 (SH3#1) (Millipore #09-403)
- Δευτερογενές αντίσωμα φθορισμού Alexa fluor 555 goat anti rabbit IgG (Invitrogen #1670185)
- Σκόνη X-gal ( $C_{14}H_{15}BrClNO_6$ ) (AppliChem # SF014556)

## 2.3 Δείγματα

### Ζώα

Όλα τα ποντίκια ανατράφηκαν στις εγκαταστάσεις ζώων στο Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών “Αλέξανδρος Φλέμινγκ”, υπό συγκεκριμένες μη παθογόνες συνθήκες. Η θερμοκρασία ήταν σταθερή στους 20-22°C, η υγρασία στο 55±5% και ο κύκλος μέρας-νύχτας ήταν 12 ώρες. Τα ποντίκια διατηρήθηκαν στα αντίστοιχα γενετικά τους υπόβαθρα για περισσότερο από δέκα γενιές. Όλα τα πειράματα είχαν την έγκριση τόσο της Επιτροπής Βιοηθικής του Ε.Κ.Ε.Β.Ε, όσο και της Διεύθυνσης Κτηνιατρικής Υπηρεσίας της Περιφέρειας Αττικής. Όλες οι ενέργειες και οι επεμβάσεις στα ζώα πραγματοποιήθηκαν με τον λιγότερο επώδυνο τρόπο, ενώ η ευθανασία των ζώων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα διεθνή πρωτόκολλα.

### Μπλεομυκίνη και μοντέλο πνευμονικής ίνωσης

Με σκοπό να μελετήσουμε την έκφραση των γονιδίου SH3PXD2A σε knockout ποντίκια κατά τη διάρκεια της πνευμονικής ίνωσης ακολουθήσαμε το μοντέλο της μπλεομυκίνης. Συγκεκριμένα, την ημέρα 0 χορηγείται μπλεομυκίνη (0,08U/ποντίκι) ή φυσιολογικός ορός (saline) με ενδοτραχειακή ένεση, στην πειραματική και στην ομάδα ελέγχου αντίστοιχα. Στη 14η ημέρα έχουμε επαρκή ανάπτυξη ίνωσης που έχει ξεκινήσει από την 7η ημέρα. Την ημέρα 14 γίνεται η λήψη βρογχοκυψελιδικού υγρού (BALF), η λήψη αίματος και η συλλογή του ιστού για περαιτέρω μελέτη.

### Συλλογή αίματος (πλάσματος)

Η συλλογή αίματος από τα ποντίκια πραγματοποιήθηκε μετά την ευθανασία του ζώου, με την χρήση ξηρού πάγου. Το αίμα λαμβάνεται από την κοιλιακή αορτή, και προστίθεται 10% του όγκου 5mM EDTA ως αντιπηκτικό και μετά από φυγοκέντρηση στις 2000g για 20 λεπτά στην ψυχόμενη φυγόκεντρο λαμβάνεται το υπερκείμενο (πλάσμα). Το πλάσμα αποθηκεύεται σε ειδικά σωληνάκια στους -20oC για περαιτέρω μελέτη.

## **Συλλογή BALF**

Η συλλογή BALF πραγματοποιείται με τη χρήση ενδοτραχειακού καθετήρα. Συγκεκριμένα, πραγματοποιούνται 3 εγχύσεις φυσιολογικού ορού (saline) όγκου 1 ml η καθεμία. Σε κάθε ένα από τα στάδια αυτά εγχύεται 1 ml saline ενδοτραχειακά και αναρροφάται (συνήθως λιγότερο από 1ml). Το πρώτο δείγμα συλλογής BALF (BALF 1) φυγοκεντρείται για δέκα λεπτά στις 12000rpm στους 4°C, μεταφέρεται το υπερκείμενο υγρό σε erpendorf σιλικόνης και αποθηκεύεται στους -80°C για να χρησιμοποιηθεί τόσο στη μέθοδο Bradford, όσο και στην μέθοδο Direct Red. Τα BALF 2,3 φυγοκεντρούνται για δέκα λεπτά στις 12000rpm στους 4°C, αφαιρείται το υπερκείμενο υγρό και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 1 ml PBS για να πραγματοποιηθεί η μέτρηση κυττάρων.

## **Συλλογή ιστού**

Γίνεται έγχυση 5-10 ml PBS στην δεξιά πλευρά της καρδιάς για να απομακρυνθεί το αίμα από τους ιστούς. Κόβεται ο αριστερός λοβός του πνεύμονα με ράμματα, μεταφέρεται σε σωληνάριο (tube) και φυλάσσεται σε υγρό άζωτο. Μεταφέρονται τα δείγματα στους -80°C για την επεξεργασία του ιστού για την απομόνωση RNA. Ακολουθεί η διασωλήνωση της τραχείας με καθετήρα και η έγχυση 1 ml φορμαλίνης. Απομακρύνεται ο καθετήρας, κόβεται η τραχεία με ράμματα και μεταφέρονται μαζί με τον υπόλοιπο πνεύμονα σε tube (5ml) με φορμαλίνη (4%) για 24 ώρες. Μετά αντικαθιστάται η φορμαλίνη με PBS και αποθηκεύονται στους 4°C. Για την μελέτη του ήπατος, κόβεται ο μικρότερος λοβός ο οποίος μεταφέρεται σε σωληνάριο και φυλάσσεται σε υγρό άζωτο για απομόνωση RNA, ενώ οι υπόλοιποι λοβοί του τοποθετούνται σε φορμαλίνη (4%) για 24 ώρες. Ακολουθεί, όπως και στον πνεύμονα η αντικατάσταση της φορμαλίνης από PBS και η αποθήκευση στους 4°C. Οι ιστοί τοποθετούνται σε κασέτες, έπειτα σε παραφίνη και χρησιμοποιούνται για ιστολογική μελέτη.



## **2.4 Μέθοδοι**

### **2.4.1 Απομόνωση DNA**

#### **Αρχή της μεθόδου**

Η μέθοδος της φαινόλης βασίζεται στην ισχυρή πρωτεολυτική δράση της πρωτεάσης K σε συνδυασμό με την ικανότητα αποδιάταξης του ιονικού αντιδραστηρίου SDS (δωδεκυλοσουλφονικού νατρίου). Σύμφωνα με το βασικό πρωτόκολλο στο τμήμα του ιστού προστίθεται διάλυμα πρωτεάσης K και SDS κι αφήνεται προς επώαση έως ότου το μεγαλύτερο ποσοστό της κυτταρικής πρωτεΐνης αποσυντεθεί. Κατόπιν το δείγμα υφίσταται αποπρωτεΐνωση με την προσθήκη φαινόλης και ακολουθεί η προσθήκη ισοπροπανόλης για την εξαγωγή και καταβύθιση του DNA.

#### **Παρασκευή διαλυμάτων μεθόδου.**

Διάλυμα λύσης (Tail Buffer) 1L

- Tris pH 8,0 1M 50 ml (50 mM τελική συγκέντρωση)
- EDTA 0,5 M 200 ml (100 mM τελική συγκέντρωση)
- NaCl 5 M 20 ml (100 mM τελική συγκέντρωση)
- ddH<sub>2</sub>O 630 ml
- Φίλτρο 0,22μm, αποστείρωση
- SDS 10% 100 ml (1% τελική συγκέντρωση)

Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

Πρωτεΐνάση K, Proteinase K (10 mg/ml)

- 100 mg Proteinase K
- 10 ml 50mM Tris pH 8.0

Καλή ανάδευση, διαιρείται σε κλάσματα των 500 μL και φυλάσσεται στους -20°C.

## Μέθοδος

- Σημειώνεται- χαρακτηρίζεται το ποντίκι.
- Κόβεται περίπου 0,5-1 εκατοστό ουράς και τοποθετείται σε σωληνάρια (erpendorf) των 1,5ml.
- Προστίθενται 400μl Διάλυμα λύσης με 4μl πρωτεΐνάση K σε κάθε ουρά.
- Επωάζεται όλη την νύχτα στους 55°C σε υδατόλουτρο έως ότου το τρίχωμα της ουράς γίνει ορατό. Αν το δείγμα αποθηκευτεί σε αυτό το στάδιο προστίθεται διάλυμα λύσης χωρίς πρωτεΐνάση K και καταψύχεται στους -20°C.
- Προστίθενται 400 μl φαινόλη σε κάθε σωληνάριο.
- Αναδεύεται πολύ ισχυρά για 5 λεπτά.
- Φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 13.000rpm.
- Με ιδιαίτερη προσοχή μεταφέρονται 300 μl από την πάνω φάση σε καθαρά σωληνάρια των 1,5ml.
- Προστίθεται 270 μl (0.9 του όγκου του DNA) ισοπροπανόλη.
- Τοποθετείται στους -20°C για 10 λεπτά και φυγοκεντρείται στις 16.200rpm για 15 λεπτά στους 4°C.
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το λευκό ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 75% αιθανόλη. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 16.200rpm για 8 λεπτά στους 4°C.
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα αφήνεται σε ξηρό αέρα να στεγνώσει πλήρως.
- Τέλος επαναδιαλύεται το DNA σε σωληνάρια των 1,5 ml που περιέχουν 30 μl (ο όγκος επαναδιάλυσης εξαρτάται από την μάζα του DNA) ddH<sub>2</sub>O.

Τα δείγματα αποθηκεύονται στους 4°C αν πρόκειται να επεξεργαστούν σύντομα ειδάλλως για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα στους -20°C.

## 2.4.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

### Αρχή της μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια μέθοδος για την *in vitro* ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Μέσω της PCR καθίσταται δυνατή η παραγωγή τεράστιου αριθμού πιστών αντιγράφων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA με σχετικά απλό τρόπο. Η αντίδραση PCR σχεδιάστηκε και παρουσιάστηκε από τον Dr K. Mullis το 1983. Η πρώτη δημοσίευση για την PCR εμφανίστηκε το 1985. Από τότε ο αριθμός των δημοσιεύσεων αυξάνεται εκθετικά. Το 1989 το περιοδικό Science επέλεξε την PCR σαν το "μέγιστο επιστημονικό επίτευγμα" και την Taq DNA πολυμεράση σαν το "μόριο της χρονιάς". Το 1993 ο K. Mullis τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ Χημείας. Σήμερα η βασική αντίδραση PCR έχει προσαρμοστεί για ένα τεράστιο εύρος διαφορετικών εξειδικευμένων εφαρμογών, το οποίο εκτείνεται από τον χαρακτηρισμό, κλωνοποίηση και μελέτη έκφρασης γονιδίων, έως την μοριακή διαγνωστική όπου η αντίδραση PCR χρησιμοποιείται για την έγκαιρη ανίχνευση και ταυτοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών, ταυτοποίηση μεταλλάξεων υπεύθυνων για κληρονομικές ασθένειες καθώς και στην Εγκληματολογία, Τοξικολογία και Ιατροδικαστική. Χάρη στην εξαιρετική ευαισθησία, ταχύτητα και την εντυπωσιακή της απλότητα, αποτελεί σήμερα το πλέον βασικό και ουσιαστικό εργαλείο για την βιοιατρική έρευνα.

Η αντίδραση PCR εκμεταλλεύεται ορισμένα χαρακτηριστικά του *in-vivo* μηχανισμού αντιγραφής του DNA με σκοπό την *in vitro* ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο μόριο DNA ως εκμαγείο για την σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου. Τα μονόκλωνα μόρια μπορούν να παραχθούν με απλό τρόπο από δίκλωνα μόρια DNA, όταν αυτά θερμαίνονται σε υψηλές θερμοκρασίες, οπότε αποχωρίζονται. Η DNA πολυμεράση απαιτεί επίσης την παρουσία ενός μικρού τμήματος δίκλωνου DNA για την έναρξη της σύνθεσης. Επομένως το σημείο έναρξης της σύνθεσης του DNA μπορεί να καθοριστεί με τη χρήση ενός ολιγονουκλεοτιδικού εναρκτήριου μορίου (εκκινήτη, primer) που συνδέεται με τη μήτρα σε αυτό ακριβώς το σημείο. Σημαντικό χαρακτηριστικό της αντίδρασης PCR είναι ότι μπορούμε μέσω των κατάλληλων εκκινήτων να κατευθύνουμε την DNA

πολυμεράση να συνθέσει συγκεκριμένη περιοχή του DNA. Και οι δύο κλώνοι του DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εκμαγεία για την σύνθεση DNA, εφ' όσον υπάρχει ένας εκκινητής για κάθε μία αντίδραση. Ακόμη ένα χαρακτηριστικό της αντίδρασης PCR είναι η εκθετική "ενίσχυση" της συγκεκριμένης περιοχής του DNA-στόχου. Το τελικό αποτέλεσμα μιας αντίδρασης PCR μετά από  $n$  κύκλους είναι η παραγωγή, θεωρητικά,  $2^n$  δίκλωνων μορίων DNA, που είναι πιστά αντίγραφα της αλληλουχίας του DNA που περικλείεται μεταξύ των εκκινητών.

Το αρχικό υλικό για μια αντίδραση PCR είναι ένα δείγμα DNA, το οποίο περιέχει την αλληλουχία στόχο. Ένα τυπικό πρωτόκολλο PCR περιλαμβάνει πολλούς κύκλους (συνήθως 25-35), ο καθένας εκ των οποίων περιλαμβάνει επώαση των δειγμάτων σε 3 διαφορετικές θερμοκρασίες με βάση τα ακόλουθα βήματα:

- Αποδιάταξη (denaturation): Το μίγμα θερμαίνεται αρχικά στους  $95^{\circ}\text{C}$  για περίπου 5 λεπτά. Σε αυτή τη θερμοκρασία τα δίκλινα μόρια DNA αποχωρίζονται τελείως και έτσι παράγονται οι μονόκλωνες αλυσίδες που θα χρησιμεύσουν ως εκμαγεία για τους εκκινητές και τη DNA πολυμεράση.
- Υβριδισμό (annealing): Στη συνέχεια η θερμοκρασία μειώνεται ώστε οι εκκινητές να υβριδοποιηθούν με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στα μόρια του μονόκλωνου DNA. Η θερμοκρασία υβριδισμού αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την εξειδίκευση της αντίδρασης PCR. Οι θερμοκρασίες και οι χρόνοι που χρησιμοποιούνται ποικίλουν ανάλογα με τις αλληλουχίες που ενισχύονται.
- Επέκταση (extension): Στο επόμενο βήμα η θερμοκρασία αυξάνεται στους  $72^{\circ}\text{C}$ , περιοχή βέλτιστης θερμοκρασίας για την θερμοσταθερή Taq DNA πολυμεράση, ώστε να εκτελέσει τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσού DNA. Ο χρόνος επώασης στους  $72^{\circ}\text{C}$  ποικίλει ανάλογα με το μήκος του τμήματος στόχου που θέλουμε να ενισχύσουμε.

Τέλος, η θερμοκρασία αυξάνεται και πάλι στους  $95^{\circ}\text{C}$ , μόνο για λίγα δευτερόλεπτα, έτσι ώστε τα μικρά τμήματα δίκλωνου DNA (που αποτελούνται από την αρχική και τη νεοσυντιθέμενη συμπληρωματική αλυσίδα) να αποχωριστούν και πάλι. Αυτές οι μονόκλωνες αλυσίδες αποτελούν τα εκμαγεία

για τον επόμενο γύρο σύνθεσης DNA και επαναλαμβάνονται συνήθως 25-35 κύκλοι αποχωρισμού των αλυσίδων, υβριδισμού των εκκινητών και σύνθεσης DNA. Ο χρόνος προέκτασης του τελικού κύκλου είναι συνήθως μεγαλύτερος (~5min) έτσι ώστε να δοθεί χρόνος στην πολυμεράση για την ολοκλήρωση της προέκτασης όλων των προϊόντων.

### **Παρασκευή διαλυμάτων μεθόδου.**

#### ➤ Ταq πολυμεράση

Η ανακάλυψη και η αξιοποίηση θερμοσταθερών DNA πολυμερασών στην αντίδραση PCR, αποτέλεσε μια θεμελιώδη τεχνολογική εξέλιξη, η οποία μετέτρεψε την αντίδραση PCR σε τεχνική ρουτίνας στα ερευνητικά εργαστήρια. Το *Thermus aquaticus*, ένα θερμοφιλό βακτήριο, το οποίο απομονώθηκε στο Yellowstone National Park και περιγράφηκε 20 χρόνια πριν την ανακάλυψη της Ταq πολυμεράσης. Η Ταq πολυμεράση είναι το πιο δημοφιλές ένζυμο για χρήση στην PCR. Η βέλτιστη θερμοκρασία για την ενζυμική δράση της Ταq πολυμεράσης είναι οι 72°C, αλλά είναι αρκετά σταθερή ακόμα και στους 94°C. Προστίθεται μόνο μία φορά στην αρχή της αντίδρασης και παραμένει ενεργή σε όλη την διάρκεια των κύκλων, καθιστώντας δυνατή την αυτοματοποίηση της PCR με την χρήση ειδικών οργάνων, των θερμικών κυκλοποιητών (thermal cyclers).

#### ➤ Εκκινητές, primers:

Ο σχεδιασμός και η επιλογή ενός ικανού και ειδικού εκκινητή αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την επιτυχία της αντίδρασης PCR. Αν και δεν υπάρχουν συγκεκριμένοι κανόνες οι οποίοι να βοηθούν στην επιλογή ενός αποτελεσματικού ζεύγους εκκινητών, υπάρχουν ειδικά λογισμικά προγράμματα που βοηθούν αρκετά στην επιλογή. Είναι φανερό ότι οι εκκινητές είναι αυτοί που θα οδηγήσουν στην επιτυχία ή αποτυχία της αντίδρασης, περισσότερο από κάθε άλλον παράγοντα. Η μοριακή αναλογία των εκκινητών ως προς το DNA στόχο πρέπει να είναι αρκετά μεγάλη. Οι εκκινητές διατηρούνται σε απόθεμα 100pmol/μl. Η συγκέντρωση που χρησιμοποιείται είναι 5pmol/μl.

#### ➤ Συγκέντρωση ιόντων $Mg^{2+}$ σε μορφή $MgCl_2$ :

Η συγκέντρωση των ιόντων  $Mg^{2+}$  έχει μεγάλη επίδραση στην ειδικότητα και στη ποσότητα του προϊόντος της αντίδρασης PCR. Σε κάθε πρωτόκολλο πρέπει να γίνεται βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης ιόντων  $Mg^{2+}$ . Συγκεντρώσεις περίπου 1,5mM είναι συνήθως βέλτιστες, αλλά σε μερικές περιπτώσεις διαφορετικές συγκεντρώσεις  $Mg^{2+}$  μπορεί να αποδειχθούν απαραίτητες. Γενικά, περίσσεια  $Mg^{2+}$  θα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση μη ειδικού προϊόντος, ενώ έλλειψη  $Mg^{2+}$  θα μειώσει την ποσότητα του προϊόντος.

Η τελική συγκέντρωση που χρησιμοποιείται στο εργαστήριο είναι 25mM.

Για 5ml  $MgCl_2$  25mM αναμιγνύουμε :

- $MgCl_2$  0.5M: 0.25ml
- Gibco  $H_2O$ : 4.75ml

➤ Συγκέντρωση τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοζιτών (dNTPs):

Τα dNTPs (δηλ. dATP, dCTP, dGTP και dTTP) αποτελούν τα απαραίτητα συστατικά για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας του DNA στην αντίδραση PCR. Στην αντίδραση PCR οι συγκεντρώσεις των dNTPs κυμαίνονται μεταξύ 50-200 $\mu$ M. Υψηλότερες συγκεντρώσεις μπορεί να προκαλέσουν την παραγωγή παραπροϊόντων από την πολυμεράση και πρέπει ν' αποφευχθούν. Η τελική συγκέντρωση που χρησιμοποιείται είναι 2.5mM.

Για 500 $\mu$ l dNTPs 2.5mM αναμιγνύουμε:

- Gibco  $H_2O$ : 450  $\mu$ l
- dATP: 12.5  $\mu$ l
- dCTP: 12.5  $\mu$ l
- dGTP: 12.5  $\mu$ l
- dTTP: 12.5  $\mu$ l

➤ 10x PCR Buffer:

500mM KCl, 100mM Tris-HCl (pH 9.0 at 25°C), 1% Triton X-100. (Promega catalogue.)

Για δημιουργία 5ml αναμιγνύουμε:

- KCl 1M: 2.5ml
- Tris HCl pH 9.0 1M: 0.5ml

- Gibco H<sub>2</sub>O: 1.95ml
- Filter 0.2μm or autoclave
- Triton X-100: 50μl

## Μέθοδος

- Το αρχικό υλικό για μία αντίδραση PCR είναι δείγμα DNA το οποίο περιέχει την αλληλουχία-στόχο. Δεν είναι απαραίτητο να έχει απομονωθεί μόνο η αλληλουχία DNA που πρόκειται να ενισχυθεί διότι αυτή μπορεί να καθορισθεί από τους εκκινητές που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση. Έτσι πρώτα, προστίθεται 1μl (80ng) του προτύπου DNA στο κατάλληλο σωλήνα.
- Οι εκκινητές αποθηκεύονται στους -20°C σε συγκέντρωση 100 pmol/μL. Από αυτούς ένα μέρος αραιώθηκε σε τελική συγκέντρωση 5 pmol/μL για χρήση στα πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Συγκεκριμένα σε σωληνάρια τύπου Eppendorf 1.5 mL, προστέθηκαν 5 μL του αντίστοιχου εκκινητή και 95 μL H<sub>2</sub>O.
- Στη συνέχεια προστίθενται τα συστατικά με την ακόλουθη σειρά: αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O, 10x Buffer PCR, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, εκκινητές και στη συνέχεια προστίθεται η Taq πολυμεράση. Καλή ανακίνηση καλά και να διανομή 19 μl σε κάθε σωλήνα. Ένα γενικό πρωτόκολλο εργασίας περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 2.1 Ενδεικτική σύσταση μίγματος αντίδρασης PCR.**

Αντιδραστήριο	Όγκος
Εκμαγείο DNA	1 μl
Taq πολυμεράση	0.4μl
10x Buffer	2 μl
dNTPs	1 μl
MgCl <sub>2</sub>	1.2μl
Εκκινητής 1	1 μl
Εκκινητής 2	1 μl
dsH <sub>2</sub> O	12.4 μl
Συνολικός όγκος	20 μl

Στην περίπτωση χρήσης 3 εκκινητών ο όγκος του H<sub>2</sub>O μειώνεται κατά 1μl.

- Τέλος εκτελείται το κατάλληλο πρόγραμμα. Η θερμοκρασία υβριδισμού, εξαρτάται από το μήκος και τη σύσταση των εκκινητών σε βάσεις GC. Όταν το μήκος των εκκινητών δεν είναι μεγαλύτερο των 20 βάσεων, η θερμοκρασία τήξης μπορεί να προσεγγισθεί από τον τύπο:  $T_m = (A+T) \times 2^\circ\text{C} + (G+C) \times 4^\circ\text{C}$ . Η γνώση της  $T_m$  βοηθά κυρίως για τον καθορισμό του πειραματικού σημείου έναρξης της βελτιστοποίησης. Θερμοκρασία  $55^\circ\text{C}$  είναι καλή για αρχή, όσον αφορά ένα τυπικό ολιγονουκλεοτιδικό εκκινητή 20 βάσεων με περίπου 50% σύσταση σε GC. Μεγαλύτερες θερμοκρασίες μπορεί να είναι απαραίτητες προς αύξηση της ειδικότητας του εκκινητή. Ως καλύτερη θερμοκρασία υβριδοποίησης επιλέγεται συνήθως η υψηλότερη θερμοκρασία που δίνει τα καλύτερα προϊόντα. Η πολύ μεγάλη μοριακή περίσσεια των εκκινητών στο μίγμα της αντίδρασης καθιστά δυνατή την υβριδοποίηση σχεδόν στιγμιαία και δεν απαιτείται περαιτέρω επώαση στη θερμοκρασία υβριδισμού.



### 2.4.3 PCR για ενίσχυση μεγάλων τμημάτων DNA (Long- Range PCR)

#### Αρχή της μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), από την πρώτη στιγμή εμφάνισης της, έχει γίνει ένα από τα πιο απαραίτητα εργαλεία στη μοριακή βιολογία για την κλωνοποίηση μικρών τμημάτων DNA. Ωστόσο, οι κλασσικές αντιδράσεις PCR περιορίζονται, εξαιτίας της ικανότητας ενίσχυσης θραυσμάτων μικρού μεγέθους. Το 1992, ο Barnes ανέπτυξε νέες συνθήκες PCR για να καταστεί δυνατή η ενίσχυση θραυσμάτων μέχρι 5 kb<sup>(67)</sup>. Η μέθοδος της Long Range PCR αναφέρεται δηλαδή στην ενίσχυση των μηκών DNA που δεν μπορούν να ενισχυθούν χρησιμοποιώντας συμβατικές μεθόδους PCR. Η ανάπτυξη της συγκεκριμένης «παραλλαγής» της κλασσικής μεθόδου PCR, έχει συμβάλει στην ταχύτητα και στην απλότητα της γενωμικής χαρτογράφησης και της αλληλούχισης, και έχει διευκολύνει τις μελέτες μοριακής γενετικής. Η μέθοδος της Long- Range PCR μπορεί να συνδυαστεί με την αλληλούχιση επόμενης γενιάς (next generation sequencing), αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία της και προσφέροντας ένα ταχύτερο και πιο αποδοτικό εργαλείο για την ανίχνευση γενετικών παραλλαγών.

Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της μεθόδου είναι η χρήση «ειδικών» πολυμερασών. Οι πολυμεράσες που χρησιμοποιούνται ευρύτατα αποτελούν μείγμα δύο πολυμερασών:

- Της θερμοσταθερής Taq πολυμεράσης
- Πολυμερασών με δραστηριότητα 3'→5' εξωνουκλεάσης

Η Taq πολυμεράση είναι το γνωστότερο ένζυμο που χρησιμοποιείται σε αντιδράσεις PCR. Το συγκεκριμένο ένζυμο έχει δράση 5'→3' εξωνουκλεάσης αλλά όχι 3'→5'. Κατά την ενίσχυση μεγάλων τμημάτων DNA, είναι περισσότερο αυξημένη η πιθανότητα εισαγωγής λανθασμένης δράσης κατά την αντίδραση. Έτσι απαιτείται και η παρουσία μιας δεύτερης πολυμεράσης, η οποία θα έχει δραστηριότητα 3'→5' εξωνουκλεάσης ώστε να εντοπίζει και να διορθώνει τυχόν λάθη που θα συμβούν κατά την ενίσχυση. Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζεται η ακρίβεια και η αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Σήμερα πολλαπλές

πολυμεράσες για Long Range PCR είναι εμπορικά διαθέσιμες. Συνήθως για απλά μόρια DNA, οι πολυμεράσες αυτές μπορούν να ενισχύσουν τμήματα έως και 30 kb, ενώ για πιο πολύπλοκα θραύσματα, ενισχύουν περίπου έως 20 kb<sup>(68)</sup>.

## Μέθοδος

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε είναι ίδια με την κλασσική αντίδραση PCR. Αυτό που διαφέρει είναι ότι η αντίδραση γίνεται σε τελικό όγκο 25μl, οι συγκεντρώσεις των δεοξυριβονουκλεοτιδίων και των εκκινητών είναι αυξημένες (10 mM και 10 μM αντίστοιχα) και η χρήση της LongAmp. Taq DNA πολυμεράσης. Η συγκεκριμένη πολυμεράση αποτελεί ένα μοναδικό μείγμα Taq και Deep VentR DNA πολυμερασών. Η δραστηκότητα εξωνουκλεάσης 3'→ 5' της Deep VentR DNA πολυμεράσης, αυξάνει την πιστότητα και την ισχυρή ενίσχυση της Taq πολυμεράσης. Η LongAmp Taq DNA πολυμεράση παρέχει δύο φορές υψηλότερη πιστότητα από αυτήν που θα προσέφερε η χρήση της Taq πολυμεράσης. Με την χρήση της LongAmp Taq DNA πολυμεράσης, μπορεί να δημιουργηθεί ένα ευρύ φάσμα προϊόντων της PCR. Μια διαφορά από την συμβατική αντίδραση PCR είναι επίσης η χρήση μικρής ποσότητας διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) ως αποδιατακτικό. Ένα γενικό πρωτόκολλο εργασίας περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 2.2 Ενδεικτική σύσταση μίγματος αντίδρασης Long-Range PCR.**

Αντιδραστήριο	Όγκος
Εκμαγείο DNA	1μl
LongAmp. Taq πολυμεράση	1μl
5x Buffer (LongAmp. Taq Buffer)	5 μl
dNTPs (10 mM)	0,75 μl
DMSO	0,5 μl
Εκκινητής 1 (10μM)	3,75μl
Εκκινητής 2 (10μM)	3,75 μl
dsH <sub>2</sub> O	9,25 μl
Συνολικός όγκος	25 μl

Το Buffer που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση αγοράστηκε έτοιμο από την εταιρεία New England Biolabs μαζί με την ειδική πολυμεράση (Long Amplification Taq πολυμεράση), σαν συμπληρωματικό αντιδραστήριο.

Περιέχει τα εξής αντιδραστήρια (1X Buffer):

- 60mM Tris-SO<sub>4</sub>
- 20mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 2mM MgSO<sub>4</sub>
- 3% Γλυκερόλη
- 0.06% IGEPAL CA-630
- 0.05% Tween 20

Το pH του είναι ρυθμισμένο στο 9.1 στους 25°C, και φυλάσσεται όπως και η πολυμεράση στους -20°C

#### **2.4.4 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πραγματικού χρόνου (Real Time qPCR)**

##### **Αρχή της Μεθόδου**

Η μέτρηση του επιπέδου έκφρασης ενός συγκεκριμένου μεταγράφου και η σχετική αλλαγή στην έκφραση του μετά από φαρμακολογική ή γονοτυπική διαχείριση, πραγματοποιείται πλέον με την ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πραγματικού χρόνου υψηλής απόδοσης (qPCR). Η μέθοδος της qPCR βασίζεται στην ιχνηθέτηση των προϊόντων της PCR με φθορίζοντα μόρια και στην μέτρηση της εκπομπής του παραγόμενου φθορισμού. Μια αντίδραση PCR μπορεί να θεωρηθεί ότι αποτελείται από τρεις φάσεις: την πρώιμη φάση ή φάση θορύβου, την εκθετική ή λογαριθμική φάση και την φάση κορεσμού. Η φάση υποβάθρου διαρκεί έως το σήμα του προϊόντος της PCR είναι μεγαλύτερο από το σήμα υποβάθρου του συστήματος. Η φάση της εκθετικής ανάπτυξης ξεκινά μόλις συσσωρευτεί επαρκής ποσότητα προϊόντος, ώστε να είναι ανιχνεύσιμο πάνω από τον θόρυβο, και ολοκληρώνεται όταν η απόδοση της αντίδρασης μειωθεί, καθώς η αντίδρασή εισέρχεται στην φάση κορεσμού.

Η παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο της αντίδρασης PCR μπορεί να γίνει με διάφορα συστήματα ιχνηθέτησης φθορισμού που βασίζονται στο φαινόμενο μεταφοράς ενέργειας με φθορισμό (FRET). Η μέθοδος παρακολούθησης φθορισμού που χρησιμοποιήθηκε είναι η SYBR Green. Η SYBR Green είναι μια χρωστική που προσδένεται στην διπλή έλικα του DNA αυξάνοντας τον φθορισμό του μέχρι και 100 φορές. Καθώς ο κύκλος της αντίδρασης προχωρά, καταγράφεται η αύξηση του φθορισμού έναντι του χρόνου. Η SYBR Green απαιτεί ένα συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών εκτός από τα επιπρόσθετα συστατικά της PCR.

Υπάρχουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα σε κάθε μία από τις χημείες χρησιμοποιούνται για qPCR. Ένα βασικό πλεονέκτημα της SYBR Green είναι ότι η αρχική προετοιμασία απαιτεί μόνο λίγες ημέρες για το σχεδιασμό των εκκινητών. Επίσης, η SYBR Green είναι σημαντική ως προς ευαισθησία σε >10 αντίγραφα επειδή η χρωστική αναφοράς προσδένεται σε οποιοδήποτε δίκλωνο DNA που υπάρχει στην αντίδραση, με αποτέλεσμα να ανιχνεύεται το προϊόν PCR σε προηγούμενους κύκλους και αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό στην περίπτωση των μεταγράφων χαμηλής αφθονίας (> 10 αντίγραφα). Ένα μειονέκτημα της χρωστικής αυτής είναι τα μη-ειδικά προϊόντα και mRNAs με υψηλή ταυτότητα αλληλουχίας που μπορεί να ανιχνεύονται λόγω της ιδιότητας δέσμησης στο δίκλωνο DNA.

Ένας από τους πειραματικούς ελέγχους που περιλαμβάνει η δοκιμασία έκφρασης των γονιδίων είναι ο εσωτερικός έλεγχος. Χρησιμοποιείται για την εξομάλυνση της τιμής σήματος του κάθε δείγματος, έτσι ώστε οι διαφορές μεταξύ των δειγμάτων να είναι το αποτέλεσμα μιας πραγματικής βιολογικής διαφοράς και όχι λόγω της ασυνεπής φόρτωσης. Τα housekeeping γονίδια είναι η τυπική επιλογή ελέγχου, εξαιτίας κυρίως της σταθερότητας στα επίπεδα έκφρασης σε όλους τους τύπους κυττάρων. Ωστόσο, εξαιτίας της πολύ υψηλής έκφρασης, η συγκέντρωση του προτύπου εκκίνησης σε μία qPCR πρέπει να είναι χαμηλή, και η ανίχνευση του γονιδίου ενδιαφέροντος μπορεί να χαθεί στη χαμηλότερη ποσότητα του προτύπου. Η επιλογή του ενδογενούς αναφοράς, ως εκ τούτου, θα πρέπει να είναι καθορισθεί εμπειρικά και με βάση το σύστημα που βρίσκεται υπό μελέτη.

Ίσως ο πιο σημαντικός παράγοντας της ανάλυσης qPCR είναι η επιλογή και η επικύρωση των ακολουθιών ολιγονουκλεοτιδίων εκκινητών. Θα πρέπει να είναι πολύ ειδικοί, γεγονός δύσκολο όταν πρόκειται να μελετηθούν ισομορφές ή παραλλαγές ματίσματος. Ένα ζεύγος εκκινητών που έχει χρησιμοποιηθεί σε συμβατική, ανάλυση τελικού σημείου PCR μπορεί να μην επαρκεί για ποσοτικές μετρήσεις. Το ζεύγος των εκκινητών θα πρέπει να περάσει μια σειρά παραμέτρων επικύρωσης. Ένα μειονέκτημα της qPCR πάνω στην ανάλυση είναι ότι δεν μπορεί να ανιχνεύσει την ποιότητα (δηλαδή, το μέγεθος) ενός μηνύματος RNA, ο αριθμός των διαφορετικού μεγέθους μηνυμάτων (π.χ. ματίσματος-παραλλαγές), ή τα επίπεδα έκφρασης τους σε σχέση με το άλλο. Ένα γενικό πρωτόκολλο εργασίας περιγράφεται στον πίνακα 2.3.

**Πίνακας 2.3 Ενδεικτική σύσταση μίγματος αντίδρασης qPCR.**

Αντιδραστήριο	Όγκος
Εκμαγείο cDNA	1 $\mu$ l
Εκκινητής 1	1 $\mu$ l
Εκκινητής 2	1 $\mu$ l
dsH <sub>2</sub> O	2 $\mu$ l
Eva Green 2x	10 $\mu$ l
Συνολικός όγκος	20 $\mu$ l

### Ποσοτικοί Τύποι Ανάλυσης

Υπάρχουν τρεις ποσοτικές μέθοδοι ανάλυσης: η απόλυτη πρότυπη καμπύλη, η σχετική τυπική καμπύλη, και οι συγκριτικοί μέθοδοι χρόνου κύκλου (Ct). Στο παρόν, περιγράφουμε μεθόδους για τη σχετική πρότυπη καμπύλη και τη συγκριτική Ct (ονομάζεται επίσης  $\Delta$ Ct).

Η σχετική τυπική μέθοδος καμπύλης χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της ποσότητας ενός συγκεκριμένου μετάγραφου σε μια ομάδα δειγμάτων. Απαιτείται ότι μια σειρά από αραιώσεις ενός προτύπου cDNA, οι οποίες περιλαμβάνονται για κάθε γονίδιο σε κάθε πιάτο. Για τη σχετική ποσοτικοποίηση, οι τιμές συγκέντρωσης του προτύπου είναι αυθαίρετες. Οι ποσότητες παρεμβολής από την προκύπτουσα πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των σχετικών επιπέδων mRNA σε κάθε άγνωστο δείγμα.

Η συγκριτική μέθοδος Ct (ή  $\Delta$ Ct) χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση σχετικών μεταβολών στα επίπεδα mRNA μεταξύ δύο δειγμάτων, και δεν απαιτείται η

χρήση σειρών αραίωσης προτύπου. Αυτό απαιτεί την ενίσχυση των αποδόσεων των γονιδίων που συγκρίνονται να είναι ίδια. Προκειμένου να παρεμβάλλονται πρότυπες ποσότητες, χρησιμοποιούνται για τους υπολογισμούς οι χρόνοι του κάθε κύκλου.

#### **2.4.5 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης 2% σε TBE**

##### **Αρχή της μεθόδου**

Η κυριότερη μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και την απομόνωση τμημάτων DNA, είναι η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (agarose gel electrophoresis). Η τεχνική αυτή είναι απλή, γρήγορη και ικανή να διαχωρίσει μίγμα τμημάτων DNA, που δεν μπορούν να διαχωριστούν επαρκώς με άλλες μεθόδους. Στηρίζεται στο γεγονός ότι το DNA, σε ουδέτερο pH, είναι αρνητικά φορτισμένο, λόγω των φωσφορικών ομάδων του. Έτσι, τα διάφορα μόρια DNA μετακινούνται, κατά την ηλεκτροφόρηση προς το θετικό ηλεκτρόδιο, με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου του αριθμού των βάσεων τους. Τα μικρότερα μόρια DNA, λοιπόν, μετακινούνται μέσα στην πηκτή πιο γρήγορα από τα μεγαλύτερα κι έτσι επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός μορίων διαφορετικού μήκους. Επειδή η πηκτή εμποδίζει την τυχαία διάχυση των μορίων, τα μόρια διαφορετικού μήκους διαχωρίζονται σε "ζώνες". Οι ζώνες αυτές καθίστανται ορατές κατόπιν σύνδεσης του DNA με ειδικά μόρια, τα οποία είναι κυρίως χημικές ουσίες όπως το βρωμιούχο αιθίδιο (ethidium bromide), η SYBR Green, η SYBR gold κ.α., που έχουν την ικανότητα να παρεμβάλλονται στην διπλή έλικα και να σχηματίζουν φθορίζοντα σύμπλοκα με το DNA. Έτσι, μπορεί να ανιχνευθεί ακόμα και ποσότητα 1 ng DNA με άμεση εξέταση του πηκτώματος κατόπιν διέγερσης με ακτινοβολία U.V. Αν είναι απαραίτητο, οι ζώνες του DNA μπορούν να ανακτηθούν από το πήκτωμα και να χρησιμοποιηθούν για διάφορους σκοπούς.

## Παρασκευή διαλυμάτων μεθόδου

Δείγματα DNA. (τα προϊόντα που προκύπτουν από τις PCR)

Ρυθμιστικό διάλυμα 10x TBE

- Tris base 108 g (0.891M τελική συγκέντρωση)
- Boric acid 55 g (0,889M τελική συγκέντρωση)
- EDTA 9.3 g /0.5 M EDTA (pH 8.0) 40 ml (31,8mM τελική συγκέντρωση)
- H<sub>2</sub>O έως το 1 lt

Το ρυθμιστικό διάλυμα TBE 10x διατηρείται σε RT.

Ρυθμιστικό διάλυμα 50x TAE

- Tris base 242 g
- Acetic acid 57.1 ml
- 0.5 M EDTA (pH 8.0) 100 ml
- H<sub>2</sub>O έως το 1 lt

Το ρυθμιστικό διάλυμα TAE 50x διατηρείται σε RT.

Χρωστική Orange G (DNA loading buffer-15% Ficoll, 0.25% orange)

- Ficoll 400 15g (σε μια φλάσκα των 500ml )
- ddH<sub>2</sub>O 30ml
- θέρμανση στους 55°C για 15-20 λεπτά (αναμιγνύουμε κάθε 5 λεπτά έως ότου διαλυθεί)
- ddH<sub>2</sub>O έως τα 100 ml
- Προσθέτουμε 0.25g Orange G και αναμιγνύουμε καλά
- Μοιράζονται σε σωληνάρια (erpendorfs) και διατηρούνται στους -20°C.

Καθαρή αгарόζη

Βρωμιούχο αιθίδιο (10 mg/ml)

## Μέθοδος

### A. Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 2%

- Ζυγίζονται 5g αγαρόζης και τοποθετούνται σε κωνική φιάλη των 500 mL στην οποία προστίθενται 250ml 1xTBE.
- Τοποθετείται η φιάλη σε θερμαινόμενο μαγνητικό αναδευτήρα ή στα μικροκύματα, καλύπτεται με μεμβράνη στην οποία δημιουργούνται μικρές τρύπες και αφήνεται μέχρι να λειώσει η αγαρόζη και να δημιουργηθεί ένα διαφανές διάλυμα.
- Αφήνεται το διάλυμα να κρυώσει μέχρι τους 60°C και προσθέτουμε 8μL βρωμιούχο αιθίδιο.
- Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι ισχυρό μεταλλαξογόνο και μέτρια τοξικό. Απαραίτητη η χρήση γαντιών όταν χρησιμοποιούνται διαλύματα που περιέχουν αυτή την χρωστική. Το βρωμιούχο αιθίδιο πρέπει να φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου μακριά από το φως.
- Τοποθετούμε την πλαστική χτένα 0.5-1.0mm πάνω από τον πλαστικό δίσκο, ώστε όταν προστεθεί το διάλυμα της αγαρόζης να σχηματιστούν πηγαδάκια.
- Το διάλυμα της αγαρόζης τοποθετείται προσεκτικά μέσα στο δίσκο ώστε να μην δημιουργούνται φουσαλίδες.
- Όταν η πηκτή είναι έτοιμη (χρειάζεται 55-60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου) αφαιρούμε την χτένα και τοποθετούμε τον δίσκο μέσα στη συσκευή της ηλεκτροφόρησης.
- Προσθέτουμε ρυθμιστικό διάλυμα TBE ώστε να βυθιστεί το πήκτωμα κατά 1 mm περίπου.

### B. Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων DNA

- Αναμιγνύουμε τα δείγματα του DNA με το gel-loading buffer 20μl DNA με 4μl χρωστικής η αναλογία είναι 1:5 (Orange G: DNA). Με τη βοήθεια πιπέτας φορτώνουμε σε κάθε εγκοπή της πηκτής αγαρόζης 10 μL κατά σειρά από τα δείγματα. Στο πρώτο πηγαδάκι φορτώνουμε μίγμα της χρωστικής με το DNA του θετικού μαρτύρα.



- Κλείνουμε τη συσκευή και επιλέγουμε τη φορά του πεδίου έτσι ώστε το DNA να μετακινείται προς την άνοδο (+). Η ηλεκτροφόρηση γίνεται υπό σταθερή τάση 120 V για 30 min.
- Κλείνουμε το ρεύμα, βγάζουμε την πηκτή και το εξετάζουμε κάτω από U.V. φως στα 312 nm.
- Βγάζουμε φωτογραφίες. Η φωτογράφιση των προϊόντων της ηλεκτροφόρησης γίνεται με χρήση ψηφιακής κάμερας, η οποία είναι συνδεδεμένη με ηλεκτρονικό υπολογιστή, οπότε είναι δυνατή η επεξεργασία της με χρήση ειδικού λογισμικού προγράμματος.

Τα προϊόντα που προκύπτουν από την Long-Range PCR ηλεκτροφορούνται σε πήκτη αγαρόζης 0,7% με ρυθμιστικό διάλυμα 1x TAE buffer στα 41V για 300 λεπτά.

#### **2.4.6 Απομόνωση RNA από ιστούς ήπατος και πνευμόνων ποντικού**

##### **Μέθοδος**

- Τα δείγματα των ιστών μεταφέρθηκαν από δοχείο υγρού αζώτου όπου βρίσκονταν σε σωληνάρια “BIJOUX”, κατάλληλα για χρήση στον ομογενοποιητή.
- Μετά την μεταφορά ομογενοποιήθηκαν με χρήση της συσκευής ομογενοποίησης σε 1 mL αντιδραστηρίου TRIZOL και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
- Εν συνεχεία τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε αριθμημένα σωληνάρια 1.5 mL Eppendorf και φυγοκεντρήθηκαν σε επιτραπέζια φυγόκεντρο στις 12.000 g για 10 λεπτά στους 4°C. Το μίγμα διαχωρίστηκε σε τρεις φάσεις: μια χαμηλότερη, οργανική φάση που αποτελούνταν από φαινόλη και χλωροφόρμιο και περιείχε τα μόρια DNA, μια μεσόφαση η οποία περιείχε τις πρωτεΐνες, και μια άχρωμη ανώτερη υδατική φάση, η οποία περιείχε τα μόρια RNA.
- Επειδή ιδιαίτερα τα δείγματα του εγκεφάλου ενδέχεται να περιέχουν κομμάτια μεμβρανών, πολυσακχαριτών και μορίων DNA μεγάλου μοριακού βάρους, τα οποία μετά τη φυγοκέντρηση κατακάθονται σαν

ίζημα, το υπερκείμενο το οποίο περιέχει το RNA λήφθηκε με αυτόματη πιπέτα σε νέα αριθμημένα σωληνάρια Eppendorf ενώ το ίζημα απορρίφθηκε.

- Προστέθηκαν σε κάθε σωληνάριο 200  $\mu\text{L}$  χλωροφόρμιο στον απαγωγό. Τα σωληνάρια με τα δείγματα πωματίστηκαν και ακολούθησε βίαιη ανάδευση με συσκευή Vortex για 15 δευτερόλεπτα.
- Ακολούθησε εκ νέου φυγοκέντρηση σε 12.000 g για 15 λεπτά στους 4°C και μετά λήφθηκαν 500  $\mu\text{L}$  της υδατικής φάσης κάθε δείγματος, τα οποία μεταφέρθηκαν σε νέα σωληνάρια Eppendorf.
- Προστέθηκαν 0.25 mL ισοπροπανόλης και 0.25 mL διαλύματος αλάτων (κιτρικό νάτριο 0.8M και χλωριούχο νάτριο 1.2M) και μετά τα δείγματα αφέθηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκεντρήθηκαν στις 12.000g για 8 λεπτά στους 4°C με αποτέλεσμα το RNA να κατακάτσει ως λευκό/ημιδιαφανές ίζημα ενώ το υπερκείμενο απορρίφθηκε προσεκτικά με χρήση πλαστικού ακρορυγχίου, προσαρμοσμένου σε σωλήνα κενού αέρος.
- Για πλύση του ιζήματος σε κάθε δείγμα προστέθηκε 1 mL αιθανόλη 75% και ακολούθησε βίαιη ανάδευση με Vortex.
- Τα παραπάνω στάδια φυγοκέντρησης και πλύσης επαναλήφθηκαν άλλη μια φορά.
- Τα δείγματα RNA αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

#### **2.4.7 Κατεργασία καθαρισμού του απομονωμένου ολικού RNA**

Σκοπός ήταν ο καθαρισμός του RNA από επιμολύνσεις DNA ώστε εν συνεχεία να απομονωθεί με υψηλή καθαρότητα.

##### **Μέθοδος**

- Τα δείγματα απομονωμένου RNA φυγοκεντρήθηκαν στις 6.000 g για 5 λεπτά στους 4°C για καταβύθιση του RNA ενώ η αιθανόλη 75% που αποτελούσε το διαλύτη, απορρίφθηκε προσεκτικά με χρήση πλαστικού ακρορυγχίου, προσαρμοσμένου σε σωλήνα κενού αέρος.

- Εν συνεχεία στα δείγματα όπου το ίζημα ήταν μη ορατό (αραιό) προστέθηκαν 20  $\mu\text{L}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  ενώ στα υπόλοιπα 100  $\mu\text{L}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  και επωάστηκαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 60°C για 10 λεπτά. Όπου το ίζημα δεν είχε διαλυτοποιηθεί έγινε χρήση πλαστικού ακρορυγχίου με ρυθμιζόμενη παλίνδρομη εισροή/εκροή μέσω της πιπέτας έως ότου να διαλυτοποιηθούν τα ιζήματα σε όλα τα δείγματα.
- Προσδιορίστηκε η συγκέντρωση και μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στο φασματοφωτόμετρο Nanodrop ND-1000 πριν προχωρήσουμε παραπέρα στην ενζυμική κατεργασία με την RQ1 DNase RNase free DNase, ώστε να αποκτήθει μια πρώτη εικόνα σχετικά με το πόση συγκέντρωση RNA έχει εκχυλίσει από τους ιστούς και ποια είναι η υφιστάμενη μόλυνση των δειγμάτων από DNA.
- Μετά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων του φασματοφωτομέτρου κατασκευάστηκε πίνακας ποσοτήτων για τα υπόλοιπα αντιδραστήρια που θα προστίθεντο στη συνέχεια. Οι υπολογισμοί βασίστηκαν σε δύο προϋποθέσεις. Η πρώτη ήταν ο τελικός όγκος των δειγμάτων να μην ξεπερνά τα 20  $\mu\text{L}$  ενώ παράλληλα οι ποσότητες του ενζύμου και του RQ1 DNase 10X Reaction Buffer ήταν σταθερές στα 2  $\mu\text{L}$ . Η δεύτερη ήταν η ύπαρξη ίδιας ποσότητας RNA (10- 5 $\mu\text{g}$ ) στα δείγματα. Επομένως στους υπολογισμούς αυξομειώθηκαν οι ποσότητες του RNA και του DEPC- $\text{H}_2\text{O}$ . Τα περισσότερα δείγματα ικανοποιούσαν και τις δύο συνθήκες, ενώ σε κάποιες μεμονωμένες εξαιρέσεις χρησιμοποιήθηκε αναγκαστικά λιγότερη αρχική ποσότητα RNA.
- Ακολούθησε η προσθήκη των υπολογισμένων όγκων DEPC- $\text{H}_2\text{O}$ , RNA σε νέα αντιστοίχως αριθμημένα σωληνάρια τύπου Eppendorf 1.5 mL και μετά η προσθήκη 2  $\mu\text{L}$  RQ1 DNase 10X Reaction Buffer και 2  $\mu\text{L}$  του ενζύμου. Όλη η εργασία πραγματοποιήθηκε με νέα σωληνάρια τύπου Eppendorf 1.5 mL στον πάγο ενώ τα παλιά σωληνάρια με το ακαθάριστο απομονωμένο RNA φυλάχθηκαν για μελλοντική χρήση στους -20°C.
- Τα δείγματα επωάστηκαν στους 37°C για μία ώρα στο υδατόλουτρο. Με το πέρας του χρόνου ακολούθησε προσθήκη 200  $\mu\text{L}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  και 200  $\mu\text{L}$  μίγματος αποτελούμενο από φαινόλη και χλωροφόρμιο σε αναλογία

όγκων 1:1, ακολουθούμενη από στιγμιαία έντονη ανάδευση σε συσκευή Vortex για 30 δευτερόλεπτα.

- Μετά τοποθετήθηκαν σε επιτραπέζια φυγόκεντρο για φυγοκέντρωση στις 12.000 g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Οι οργανικές κάτω φάσεις απορρίφθηκαν ενώ οι υδατικές άνω φάσεις των δειγμάτων που περιείχαν το RNA συλλέχθηκαν σε νέα σωληνάρια τύπου Eppendorf των 0.5 mL
- Προστέθηκαν 200  $\mu$ L χλωροφόρμιο στο καθένα. Εν συνεχεία ακολούθησε έντονη ανάδευση με συσκευή Vortex για δέκα δευτερόλεπτα και φυγοκέντρωση σε επιτραπέζια φυγόκεντρο στις 12.000 g για δέκα λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Συλλέχθηκαν οι υδατικές φάσεις ( $V'$ ) έως ορίου  $V'_{max}=180$   $\mu$ L σε νέα σωληνάρια τύπου Eppendorf των 0.5 mL και προστέθηκε στο καθένα από αυτά 2  $\mu$ L γλυκογόνο ως συμπαράγοντας κατακρήμνισης (10  $\mu$ g/ $\mu$ L). Αν  $V'$  ο αντίστοιχος ληφθείς όγκος RNA, προστέθηκαν στο δείγμα αντίστοιχα  $1/10xV'$  διάλυμα οξικό νάτριο συγκέντρωσης 3M και  $2.5xV'$  παγωμένη αιθανόλη 100%, συνοδευόμενα από καλή ανάμειξη των δειγμάτων με χρήση της συσκευής Vortex κάθε φορά.
- Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Εναλλακτικώς αν απαιτούνταν άμεση χρήση στην επόμενη μία ώρα μπορούν να αποθηκευτούν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για είκοσι λεπτά.

#### **2.4.8 Μετατροπή του RNA σε cDNA με χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση.**

##### **Μέθοδος**

- Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 12.000g για 10 λεπτά στους  $4^{\circ}\text{C}$  ώστε το RNA να κατακρημνιστεί σαν ίζημα και να απομακρυνθεί εν συνεχεία μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης το υπερκείμενο με χρήση πλαστικού ακρορυγχίου, προσαρμοσμένου σε σωλήνα κενού αέρος.

- Σε κάθε δείγμα έγινε προσθήκη 500  $\mu\text{L}$  αιθανόλης 75% για πλύση του ιζήματος.
- Τα δείγματα τοποθετήθηκαν προσεκτικά σε επιτραπέζια συσκευή φυγοκέντρησης, ώστε να φυγοκεντρηθούν ξανά στα 12.000 g για 10 λεπτά στους 4°C. Ακολούθησε εκ νέου απομάκρυνση της αιθανόλης και τα δείγματα ξηράθηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Έγινε αναδιάλυση των ιζημάτων σε 20  $\mu\text{L}$  DEPC-H<sub>2</sub>O και ακολούθησε μέτρηση απορρόφησης των δειγμάτων στο φασματοφωτόμετρο Nanodrop ND-1000 ώστε να προσδιοριστεί η τελική συγκέντρωση ολικού RNA σε αυτά.
- Δημιουργήθηκαν δείγματα RNA συγκέντρωσης 2000 ng/ $\mu\text{L}$  RNA σε νέα αριθμημένα σωληνάρια τύπου Eppendorf στον πάγο.
- Προστέθηκε 1  $\mu\text{L}$  oligo(dT)-18 προς υβριδοποίηση όλων των μεταγραφημάτων με poly-A ουρά και οι όγκοι συμπληρώθηκαν με DEPC-H<sub>2</sub>O, έως τελικού όγκου 12  $\mu\text{L}$ .
- Τα δείγματα θερμάνθηκαν για πέντε λεπτά στους 70°C, ώστε να διασπαστούν τυχόν σχηματισμένες δευτεροταγείς δομές και τοποθετήθηκαν στο πάγο για άμεση ψύξη ώστε να αποφευχθεί ο τυχόν αυθόρμητος ανασχηματισμός τους.
- Ακολούθησε ένα στιγμιαίο spin σε επιτραπέζια φυγόκεντρο ώστε να συλλεχθεί ο όγκος κάθε δείγματος στο κάτω μέρος των σωληναρίων.
- Προστέθηκαν κατά σειρά 4 $\mu\text{L}$  M-MLV 5x buffer, 2 $\mu\text{L}$  δεοξυνουκλεοτίδια συγκέντρωσης 10mM και τέλος 2  $\mu\text{L}$  του ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης M-MLV RT του ρετροϊού Moloney Leukemia Virus. Ο συνολικός όγκος όλων των δειγμάτων με βάση και τις οδηγίες του πρωτοκόλλου αντίστροφης μεταγραφής της Promega ήταν 20  $\mu\text{L}$ .
- Τα δείγματα επώαστηκαν για μία ώρα σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 42°C.
- Ακολούθησε θέρμανση των δειγμάτων στους 70°C ώστε να τερματιστεί η αντίδραση (καταστροφή ενζύμου/ αλυσίδας RNA).
- Μετά το πέρας της θέρμανσης τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον πάγο για δέκα λεπτά και αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

Η κατεργασία της αντιστροφής μεταγραφής σε συνδυασμό με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αποτελούν την πιο ευαίσθητη και αξιοποιήσιμη τεχνική ώστε να ανιχνευτεί το mRNA ενός γονιδίου. Το απομονωμένο και καθαρισμένο ολικό RNA χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για να συντεθεί το συμπληρωματικό DNA (cDNA) με χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση.

#### **2.4.9 Καταμέτρηση βιώσιμων κυττάρων χρησιμοποιώντας αιματοκυτταρόμετρο**

##### **Μέθοδος**

- Προετοιμασία αιμοκυτταρομέτρου

Αρχικά καθαρίζεται με αλκοόλη τόσο το αιμοκυτταρόμετρο όσο και η καλυπτρίδα, πριν από τη χρήση. Η καλυπτρίδα τοποθετείται στο αιμοκυτταρόμετρο.

- Προετοιμασία αιωρήματος κυττάρων

Ανακινείται απαλά το erpendorf που βρίσκονται τα κύτταρα για να εξασφαλιστεί η ομοιόμορφη κατανομή τους.

Πριν τα κύτταρα κατακαθίσουν, αφαιρούνται 100  $\mu$ L κυττάρων και μεταφέρονται σε ένα νέο σωλήνα erpendorf, προστίθεται 400  $\mu$ L 0,4% Trypan Blue (τελική συγκέντρωση 0,08%). Ανακατεύονται απαλά.

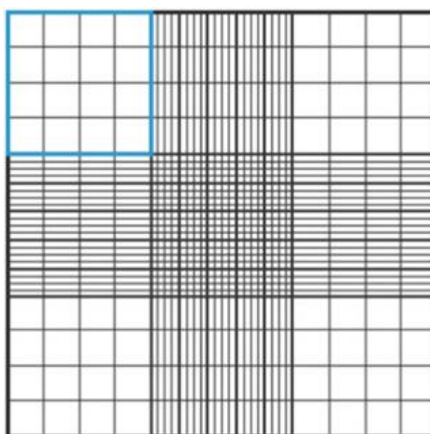
- Καταμέτρηση

Χρησιμοποιώντας 10  $\mu$ L του επεξεργασμένου κυτταρικό εναιωρήματος με Trypan Blue εφαρμόζονται στο αιμοκυτταρόμετρο (Newbauer chamber). Σε γυάλινο αιμοκυτταρόμετρο, συμπληρώνονται και στους δύο θαλάμους κάτω από την καλυπτρίδα, επιτρέποντας το κυτταρικό εναιώρημα να συναχθεί από τριχοειδή φαινόμενα.

Χρησιμοποιώντας ένα μικροσκόπιο, επικεντρώνονται στις γραμμές του πλέγματος του αιμοκυτταρομέτρου με αντικειμενικό φακό 10X.

Χρησιμοποιώντας ένα μετρητή ψηλά το χέρι, μετράνε τα ζωντανά, μη χρωματισμένα κύτταρα (ζωντανά κύτταρα δεν βάφονται με Trypan Blue) σε ένα σύνολο 16 τετράγωνων (Σχήμα 2.1). Κατά την καταμέτρηση, χρησιμοποιείται ένα σύστημα με το οποίο τα κύτταρα υπολογίζονται μόνο όταν είναι μέσα σε ένα τετράγωνο ή στο δεξί χέρι ή στο κάτω όριο της γραμμής. Ακολουθώντας τις ίδιες κατευθυντήριες γραμμές, τα νεκρά κύτταρα χρωματίζονται με Trypan Blue, μπορεί επίσης να μετρηθεί για μια εκτίμηση της βιωσιμότητας, εάν απαιτείται.

Μετακινείται το αιματοκυτταρόμετρο στο επόμενο σύνολο των 16 τετραγώνων και συνεχίζεται η καταμέτρηση μέχρι να συνυπολογιστούν όλα τα 4 σετ των 16 τετραγώνων.



Σχήμα 2. 6 Σχηματική αναπαράσταση αιματοκυτταρόμετρου.

- Βιωσιμότητα

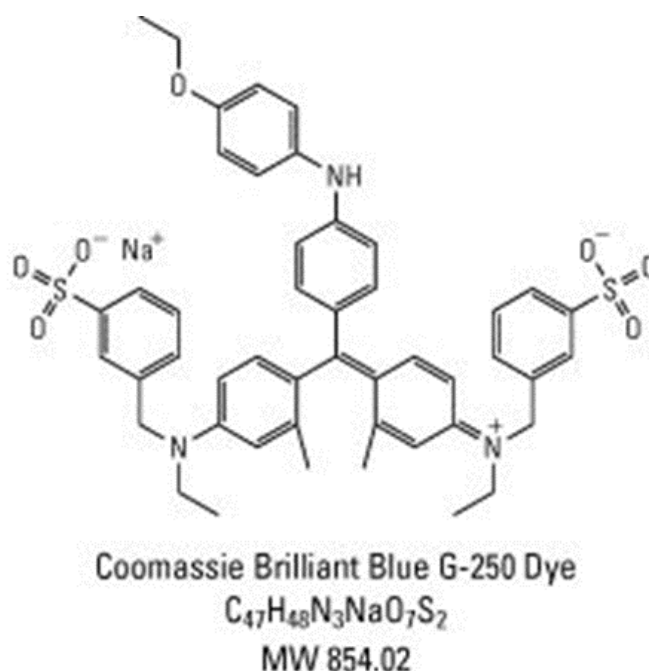
Για τον υπολογισμό του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων /ml:

- Λαμβάνεται ο μέσος όρος αριθμός των κυττάρων από κάθε ένα από τα σύνολα των 16 τετραγώνων.
- Πολλαπλασιάζεται με 10.000 ( $10^4$ ).
- Πολλαπλασιάζεται με 5 για την αραιώση 1: 5 από την προσθήκη Trypan Blue.
- Η τελική τιμή είναι ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων/mL στο αρχικό εναιώρημα κυττάρων.

## 2.4.10 Προσδιορισμός Πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

### Αρχή της μεθόδου

Ο ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών σε ένα διάλυμα συνήθως πραγματοποιείται φωτομετρικά. Οι πρωτεΐνες αντιδρούν με ορισμένα αντιδραστήρια παρέχοντας έγχρωμα προϊόντα. Στην ιδιότητα τους αυτή στηρίζεται και ο ποσοτικός προσδιορισμός με την μέθοδο Bradford. Η χρωστική που χρησιμοποιείται στην μέθοδο είναι η Coomassie Brilliant Blue G-250 (σχήμα 2.2). Η χρωστική αυτή αρχικά είχε αναπτυχθεί για χρήση στην υφαντουργία, αλλά σήμερα χρησιμοποιείται ευρύτατα για χρώση πρωτεϊνών στην αναλυτική βιοχημεία. Η μέθοδος Bradford βασίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική η οποία χρησιμοποιείται στην μέθοδο, αλλάζει χρώμα όταν συνδέεται με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα και δίνουν ένα κυανό χρώμα. Το χρώμα αυτό σχηματίζεται σχεδόν αμέσως, είναι σταθερό για περίπου 1 ώρα και επηρεάζεται ελάχιστα η καθόλου που συνυπάρχουν σε πρωτεϊνικά διαλύματα. Το σύμπλοκο της χρωστικής-πρωτεΐνης που δημιουργείται, απορροφά στα 595nm. Ο προσδιορισμός γίνεται με αναφορά σε πρότυπη καμπύλη απορρόφησης συναρτήσει της συγκέντρωσης πρότυπου διαλύματος BSA (0-25μg πρωτεΐνης).



Σχήμα 2. 7: Μοριακή δομή της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250

(<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/20279>)



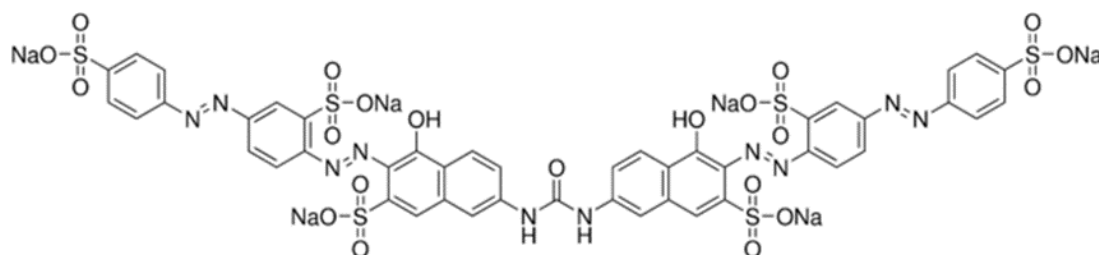
## Μέθοδος

- Σε μικρο πλάκα δημιουργείται η πρότυπη καμπύλη απορρόφησης με εύρος αναφοράς 15,625-2000μg/ml. Το εύρος αυτό προκύπτει από το διάλυμα παρακαταθήκης μέσω διαδοχικών αραιώσεων πρότυπου διαλύματος BSA.
- Δείγμα ελέγχου: προστίθεται ένα σημείο ακόμη χωρίς την παρουσία πρωτεΐνης που θα χρησιμοποιηθεί ως τυφλό.
- Δείγματα: προστίθεται σε κάθε φρεάτιο 5μl δείγμα και 245μl αντιδραστήριο Bradford (έτοιμο προς χρήση).
- Φωτομετρείται στα 595nm.

### 2.4.11 Μέτρηση διαλυτού κολλαγόνου σε BALF

#### Αρχή της μεθόδου

Η συγκεκριμένη μέθοδος, μετρά το διαλυτό κολλαγόνο σε δείγματα BALF. Είναι χρωματομετρική μέθοδος, πραγματοποιείται σε πλάκα 96-φρεατίων και βασίζεται στην καθίζηση του κολλαγόνου μετά την προσθήκη του αντιδραστήριου Direct-Red 80, το οποίο είναι μια ανιονική χρωστική με ομάδες σουλφονικού οξέος (σχήμα 2.3) που χρησιμοποιείται ευρύτατα σε μετρήσεις κολλαγόνου. Αυτή η χρωστική μπορεί να δεσμεύσει ομάδες πλευρικής αλυσίδας βασικών υπολειμμάτων αμινοξέων. Η χρωστική ουσία απελευθερώνεται από τα καταβυθισμένα σύμπλοκα σε υψηλό pH που ακολουθείται από χρωματομετρική ανίχνευση. Η δοκιμασία είναι βελτιστοποιημένη έτσι ώστε άλλες πρωτεΐνες (όπως π.χ. η αλβουμίνη) να μην παρεμβαίνουν.



Σχήμα 2.8 Μοριακή δομή της χρωστικής Direct-Red 80

(<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/365548?lang=en&region=CA&gclid=CK-7vsvD5NACFQ2ZGwodhviGWw>)

### **Παρασκευή διαλυμάτων μεθόδου**

- Διαλύεται το κολλαγόνο από Rat Tail σε 0,5 M οξικό οξύ με τελική συγκέντρωση 1 mg/ml. Ανακινείται σε θερμοκρασία δωματίου για 1-3 ώρες.
- Διαλύεται η Direct Red 80 σε 0,5 M οξικό οξύ με τελική συγκέντρωση 120 µg/ml.

### **Μέθοδος**

- Προστίθεται 25-50 µl δείγματα BALF σε 1 mL 0.5 M οξικού οξέος. Χρησιμοποιούνται 2 ml erpendorf.
- Κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς με κολλαγόνο από Rat Tail. Το εύρος αραιώσεων είναι: κολλαγόνο 0-500 µg/ ml σε 1 ml 0.5 M οξικού οξέος. Χρησιμοποιούνται 2 ml erpendorf.
- Στα δείγματα και στην πρότυπη προστίθεται 1 ml Direct Red 80 (120µg/ml). Ανακατεύονται καλά.
- Επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.
- Αναδεύονται στο Vortex για 3-4 λεπτά.
- Φυγοκεντρώνονται σε 10.000rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 200 mL υπερκειμένου από τα δείγματα και τα πρότυπα μεταφέρονται σε πλάκα 96-φρεατίων.
- Η απορρόφηση στην οποία μετριοούνται οι διάφορες συγκεντρώσεις κολλαγόνου τύπου I, είναι 540 nm.

### **2.4.12 Χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης**

#### **Αρχή της Μεθόδου**

Η χρώση αιματοξυλίνης- εωσίνης αποτελεί μια από τις βασικότερες μεθόδους της ιστολογίας. Στην μέθοδο αυτή οι πυρήνες των κυττάρων βάφονται από την αιματοξυλίνη, ενώ το κυτταρόπλασμα χρωματίζεται από την εωσίνη. Η

αιματοξυλίνη αποτελεί το άχρωμο υπόστρωμα που οξειδώνεται και δίνει το χρωμοφόρο παράγοντα και η ηωσίνη αποτελεί μια όξινη χρωστική. Οι δομές που περιέχουν νουκλεϊκά οξέα (κυρίως οι πυρίνες αλλά και τα ριβοσώματα) βάφονται σκούρο μωβ ή μπλέ (από την αιματοξυλίνη), ενώ οι υπόλοιπες δομές του κυτταροπλάσματος βάφονται κόκκινες (από την εωσίνη).

Τα δείγματα που μελετώνται είναι τομές παραφινोποιημένων ιστών που κόβονται στον μικροτόμο. Πρώτα οι ιστοί τριμμαρονται για να απομακρυνθούν οι πρώτες στρώσεις παραφίνης, τοποθετούνται σε ψυχρό μέρος και κόβονται τομές πάχους 5μm, οι οποίες τοποθετούνται σε ειδικό υδρόλουτρο θερμοκρασίας 42°C, ώστε να «ανοίξει» καλά η τομή. Στην συνέχεια τοποθετούνται σε ειδικά πλακάκια τα οποία αφήνονται να στεγνώσουν στους 42°C για πολλές ώρες ώστε να εξασφαλιστεί ότι η τομή θα κολλήσει σωστά στο πλακάκι και δεν θα υπάρχει εγκλωβισμένος αέρας ή νερό, γεγονός που θα δυσκολέψει την οπτική στο μικροσκόπιο.

## **Μέθοδος**

Η διαδικασία της χρώσης που ακολουθείται είναι η εξής:

- Τομές των 5μm από μονιμοποιημένους ιστούς εμβαπίζονται για 5 λεπτά σε τρία διαδοχικά διαλύματα ξυλενίου.
- Εν συνεχεία σε διαδοχικά διαλύματα 100% αιθανόλης, 96% αιθανόλης (δισ), 75% αιθανόλης και 50% αιθανόλης σε καθένα από τα οποία παραμένει για 2-3 λεπτά.
- Έπειτα σε απεσταγμένο νερό για 5 λεπτά.
- Στη συνέχεια τα πλακάκια με τις τομές παραμένουν σε διάλυμα αιματοξυλίνης για 2 λεπτά και ξεπλένονται με απεσταγμένο νερό μέχρι την απομάκρυνση της χρωστικής.
- Ακολουθεί εμβάπτιση σε διάλυμα 70% αιθανόλης με 37% HCl (acid alcohol) και ξέπλυμα με απεσταγμένο νερό.
- Επόμενο βήμα είναι η παραμονή σε διάλυμα Scott's για 3-5 λεπτά και το ξέπλυμα με απεσταγμένο νερό.

- Μετά τα πλακάκια υφίστανται τη χρώση με ηωσίνη για 2-3 λεπτά, ανάλογα με την παλαιότητα της χρωστικής. Ξεπλένεται με απεσταγμένο νερό.
- Στην συνέχεια έχουμε αφυδάτωση του ιστού όπου οι τομές εμβαπτίζονται για 8-10 φορές στα διαλύματα των αλκοολών με αντίστροφη σειρά 50% αιθανόλη, 70% αιθανόλη, 96% αιθανόλη και 100% αιθανόλη και τέλος ξυλενίου.
- Τέλος ακολουθεί η κάλυψη των τομών με διάλυμα DPX (Dibutyl phthalate, BDH) που περιέχει ξυλένιο και παρατήρησή τους στο μικροσκόπιο.

### 2.4.13 Χρώση Lac-Z

#### Αρχή της Μεθόδου

Το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης (*lacZ*) προέρχεται από την *Escherichia coli*, και χρησιμοποιείται ευρύτατα σε διαγονιδιακές τεχνολογίες, ως γονίδιο αναφοράς. Η έκφραση του *lacZ* μπορεί να ανιχνευθεί με ενζυμική ιστοχημική χρώση, χρησιμοποιώντας χρωμογόνα υποστρώματα όπως το X-gal (5-βρώμο-4-χλώρο-3-ινδόδυλο-β-d-γαλακτοσιδάση). Το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης, όταν εκφράζεται, έχει την ικανότητα να διασπά τον κεντρικό δεσμό στο μέσο του υποστρώματος X-gal, παράγοντας γαλακτόζη και μια μπλε χρωστική. Στους ιστούς δηλαδή, που εκφράζεται το γονίδιο σχηματίζονται σκούρες μπλε κηλίδες, οι οποίες μπορούν να ανιχνευθούν στο επίπεδο του ενός κυττάρου, παρέχοντας μια ισχυρή οπτική ένδειξη της γονιδιακής έκφρασης στον εκάστοτε ιστό. Επειδή η ενζυμική δράση του *lacZ* είναι ευαίσθητη σε υψηλές θερμοκρασίες, το πρωτόκολλο είναι δύσκολο να πραγματοποιηθεί σε παραφρηνοποιημένους ιστούς, και πραγματοποιείται συνήθως σε κρυοτομές, οι οποίες κόβονται σε ειδικό μηχάνημα θερμοκρασίας 4°C, τον κρυοτόμο.

## Παρασκευή διαλυμάτων μεθόδου

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου 1M pH 7.3

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  103.6 g
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  37.25 g
- d.  $\text{H}_2\text{O}$  800 ml
- Ρύθμιση pH στο 7.3
- Προσθήκη  $\text{H}_2\text{O}$  μέχρι το 1L

Το διάλυμα αποστειρώνεται πριν από την χρήση.

1x PBS/ 2mM  $\text{MgCl}_2$

- 100 ml 10x PBS
- 1 ml 2M  $\text{MgCl}_2$
- Προσθήκη  $\text{H}_2\text{O}$  μέχρι το 1L

Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C για έως 6 μήνες

Ρυθμιστικό διάλυμα σταθεροποίησης (Fixative Buffer)

- Διαλύονται 50mg Na deoxycolate σε 50ml 10x PBS
- Προστίθενται 100μl NP40 (στον απαγωγό- ιδιαίτερα τοξικό)
- Προσθήκη  $\text{H}_2\text{O}$  μέχρι το 1L

Το διάλυμα αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για έως 6 μήνες

Σταθεροποιητικό διάλυμα (Fixative Solution)

- 5,25 ml 38% φορμαλδεΐδης
- 0,8 ml 25% γλουτεραλδεΐδης
- Προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος σταθεροποίησης μέχρι τα 100ml

Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C για 1 ημέρα

Διάλυμα χρώσης X-gal

Για 100 ml διαλύματος αναμιγνύουμε

- 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου 1M pH 7.3
- 10 mg Na deoxycolate
- 164 mg  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$

- 210 mg  $K_4Fe(CN)_6$
- 100  $\mu$ l  $MgCl_2$  2M
- 20  $\mu$ l NP40
- 90 ml d.  $H_2O$

Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C προστατευμένο από το φως για τουλάχιστον 12 μήνες

250 mg από την έτοιμη σκόνη X-gal διαλύεται σε 5ml DMSO για να υπάρχει stock διάλυμα συγκέντρωσης 50mg/ml. Το διάλυμα αυτό αποθηκεύεται στους -20 °C προστατευμένο από το φως.

### Μέθοδος

- Διασωληνώνεται η τραχεία του ζώου με καθετήρα και εγχύεται 1 ml διαλύματος PBS-OCT σε αναλογία 1-1. Απομακρύνεται ο καθετήρας, κόβεται η τραχεία με τα ράμματα και μεταφέρονται μαζί με τον υπόλοιπο πνεύμονα σε ειδικά διαμορφωμένες θήκες από αλουμινόχαρτό, που έχουν δημιουργηθεί πριν την έναρξη της διαδικασίας, οι οποίες περιέχουν OCT, και αφήνονται να παγώσουν σιγά-σιγά σε ατμούς υγρού αζώτου.
- Κόβεται ιστός πάχους 6-10 $\mu$ m στον κρουτόμο και τοποθετείται σε πλακίδια επικαλυμμένα με ζελατίνη.
- Αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.
- Τα πλακίδια στην συνέχεια τοποθετούνται σε ειδικά διάφανα δοχεία στα οποία προστίθεται κρύο σταθεροποιητικό διάλυμα και αφήνονται για 10-15 λεπτά στους 4 ° C.
- Στο διάστημα αυτό θερμαίνεται στους 37 °C ο επιθυμητός όγκος του διαλύματος χρώσης X-gal. Απαιτείται περίπου 100  $\mu$ l για κάθε τομή.
- Τα πλακίδια στην συνέχεια ξεπλένονται με κρύο διάλυμα 1xPBS / 2mM  $MgCl_2$  δύο φορές για 10 λεπτά.
- Προετοιμάζεται η χρώση lac-Z. Προστίθεται ο επιθυμητός όγκος του διαλύματος X-gal συγκέντρωσης 50mg/ml στο διάλυμα χρώσης X-gal (θερμοκρασίας 37°C), ώστε η τελική συγκέντρωση του διαλύματος να είναι 2 mg / ml.

- Προστίθενται περίπου 100ml από το διάλυμα που δημιουργήθηκε σε κάθε τομή. Τα πλακάκια τοποθετούνται σε ένα δοχείο, προστατευμένα από το φως και αφήνονται στους 37°C όλη την νύχτα. ( Το χρώμα γίνεται εμφανές σε διάστημα 2 έως 24 ωρών). Προστίθεται parafilm πάνω στις τομές ώστε να μην εξατμιστεί η χρώση κατά την διάρκεια που βρίσκεται στους 37°C.
- Την επόμενη μέρα αφαιρείται προσεκτικά το parafilm από τα πλακάκια, και πλένονται δύο φορές σε διάλυμα 1xPBS/2 mM MgCl<sub>2</sub> σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- Ξεπλένονται με dH<sub>2</sub>O.
- Μετά τα πλακάκια υφίστανται τη χρώση με εωσίνη για 30 δευτερόλεπτα.
- Ξεπλένονται σε απεσταγμένο νερό.
- Τέλος ακολουθεί η κάλυψη των τομών με διάλυμα DPX που περιέχει ξυλένιο και παρατήρησή τους στο μικροσκόπιο.

Επειδή ο πνεύμονας είναι ένας ιδιαίτερα ευαίσθητος ιστός με τον παραπάνω τρόπο χρώσης, καταστρέφονταν η αρχιτεκτονική του. Έτσι χρησιμοποιήθηκε μια παραλλαγή του παραπάνω τρόπου χρώσης, η οποία όμως ήταν κατάλληλη για χρήση σε παραφηνωποιημένους ιστούς.

### **Παρασκευή διαλυμάτων μεθόδου**

Διάλυμα σταθεροποίησης

Για 500 ml διαλύματος αναμιγνύουμε

- 100 ml φορμαλίνης
- 200 ml γλουτεραλδεΐδης
- 100 ml NP 40
- 400 ml PBS

## Διάλυμα χρώσης X-gal

Για 500 ml διαλύματος αναμιγνύουμε

- 1.050g  $K_3Fe(CN)_6$
- 0.825 g  $K_4Fe(CN)_6$
- 0.05 g Na deoxycolate
- 0.2 g  $MgCl_2$  2M
- 500  $\mu$ l NP40
- 0.5 g σκόνη X-gal διαλυμένη σε 5 ml N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF)
- 495 ml PBS

Διάλυμα σταθεροποίησης μετά την προσθήκη του X-gal (post X-gal fixative solution)

Για 100 ml διαλύματος αναμιγνύουμε

- 1.16 g  $NaH_2PO_4$
- 0.27 g NaOH
- 88 ml  $H_2O$
- 10 ml φορμαλδεΐδη
- 2 ml γλουτεραλδεΐδη

Ρύθμιση του pH στο 7.2

## Μέθοδος

- Διασωληνώνεται η τραχεία του ζώου με καθετήρα και εγχύεται 1 ml διαλύματος σταθεροποίησης. Απομακρύνεται ο καθετήρας, κόβεται η τραχεία με τα ράμματα και μεταφέρονται μαζί με τον υπόλοιπο πνεύμονα σε σωληνάριο των 10ml που περιέχει διάλυμα σταθεροποίησης και αφήνεται για 2 ώρες στους 4°C.
- Μετά το πέρας των 2 ωρών ο ιστός εμβαπτίζεται για 5 λεπτά σε PBS.
- Ο ιστός τοποθετείται στην συνέχεια σε κασέτες σκίνωσης.



- Οι κασέτες σκίνωσης τοποθετούνται σε ένα δοχείο το οποίο περιέχει 10ml διαλύματος χρώσης X-gal.
- Ακολουθεί επώαση για 3 ώρες στους 37°C και στην συνέχεια για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Εναλλακτικά η επώαση μπορεί να γίνει για 24-48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απομακρύνεται το διάλυμα χρώσης X-gal, ξεπλένονται οι κασέτες που περιέχουν τους ιστούς 2 φορές με αφιονισμένο νερό και τοποθετούνται στο διάλυμα σταθεροποίησης μετά την προσθήκη του X-gal (post X-gal fixative solution) για αρκετές ώρες.
- Στην συνέχεια ακολουθείται η κλασική διαδικασία παραφινποίησης των ιστών, κόβονται τομές των 5 μm και τοποθετούνται σε πλακάκια.
- Μετά τα πλακάκια υφίστανται τη χρώση με εωσίνη για 30 δευτερόλεπτα.
- Ξεπλένονται σε απεσταγμένο νερό.
- Τέλος ακολουθεί η κάλυψη των τομών με διάλυμα DPX που περιέχει ξυλένιο και παρατήρησή τους στο μικροσκόπιο.

#### **2.4.14 Χρώση ανοσοφθορισμού**

##### **Αρχή της μεθόδου**

Ο ανοσοφθορισμός είναι η μέθοδος κατά την οποία χρησιμοποιούνται φθορίζοντα αντισώματα για την ανίχνευση και εντόπιση αντιγόνου ή αντισώματος σε ιστούς ή κύτταρα. Αποτελεί μια εργαστηριακή τεχνική η οποία συνδυάζει την ιστοπαθολογία με την ανοσολογία και τη χημεία. Ένα αντίσωμα κατευθύνεται προς ένα ειδικό αντιγόνο-στόχο και μια χημική αντίδραση λαμβάνει χώρα για να καταστήσει ορατό το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος, εφόσον σχηματίζεται. Οι τεχνικές αυτές βασίζονται στην ικανότητα των ειδικών αντισωμάτων να εντοπίζουν και να συνδέονται με το αντίστοιχο αντιγόνο. Η σήμανση του αντισώματος με την κατάλληλη ουσία (2<sup>ο</sup>ταγές αντίσωμα φθορισμού) καθιστά το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος ορατό. Ανάλογα με τη φύση της τεχνικής και το είδος της χρησιμοποιούμενης

ουσίας, η αντίδραση μεταξύ αντιγόνου-αντισώματος ελέγχεται με κοινό, φθορίζον ή ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Ο ανοσοφθορισμός αποτελεί εξέλιξη της ανοσοϊστοχημείας, μέθοδος που αναπτύχθηκε από τον Coon οπού πρώτος είχε τη ιδέα να σημάνει με φθορίζοντα ιχνηθέτη ένα αντίσωμα που ανέπτυξε σε πειραματόζωο και κατόπιν να αναζητήσει σε τομή το αντιγόνο εναντίον του οποίου είχε αναπτυχθεί το αντίσωμα εξετάζοντας τον ιστό (μετά την επώαση) με φθορίζον μικροσκόπιο. Μετά την εισαγωγή των σεσημασμένων με ένζυμα αντισωμάτων η ανοσοϊστοχημεία έγινε γενικότερα αποδεκτή σαν ένα απλό, έξυπνο και πρακτικό εργαλείο στη διαγνωστική ιστοπαθολογία. Το αμέσως επόμενο βήμα, ήταν η εισαγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων στην ανοσοϊστοχημεία, που πρόσφερε στο παθολογοανατομικό εργαστήριο μια ανεξάντλητη πηγή ειδικών αντιδραστηρίων μεγάλης εξειδίκευσης για την ανίχνευση διαφόρων αντιγόνων σε ιστούς και κυτταρα. Το σύμπλεγμα αντισώματος-ενζύμου διατηρεί τόσο τις ανοσολογικές όσο και τις ενζυμικές του ιδιότητες και έτσι είναι σε θέση να δεσμεύει τόσο το αντιγόνο που αναζητούμε στον ιστό, όσο και να μεταβάλλει το χρώμα του κατάλληλου χρωμογόνου καθιστώντας το ορατό στο μικροσκόπιο.

Πραγματοποιήθηκαν χρώσεις ανοσοφθορισμού τόσο σε ιστούς όσο και σε ινοβλάστες.

A. Χρώση ανοσοφθορισμού σε ιστούς

### **Παρασκευή διαλυμάτων**

Διάλυμα πλύσης 1x PBST

- 995 ml 1x PBS
- 0.50 ml TWEEN 20

Διάλυμα αποκάλυψης επιτόπων (antigen retrieval)

- EDTA 10 mM pH 8.0

Διάλυμα δέσμευσης μη ειδικών θέσεων στους επιτόπους (serum blocking)

- 2% v/v NGS
- 1% w/v BSA
- 1x PBST

## Διαλύτης αντισωμάτων

- 1% w/v BSA
- 1x PBST

## Μέθοδος

- Κόβονται τομές των 5 μm στον μικροτόμο, τοποθετούνται σε πλακάκια και αφήνονται στους 42°C να στεγνώσουν.
- Τα πλακάκια τοποθετούνται σε φούρνο στους 60°C για δύο ώρες για να αποπαραφινωποιηθούν.
- Έπειτα οι τομές εμβαπτίζονται για 10 λεπτά σε τρία διαδοχικά διαλύματα ξυλενίου.
- Εν συνεχεία σε διαδοχικά διαλύματα 100% αιθανόλης (δισ), 96% αιθανόλης (δισ), 75% αιθανόλης και 50% αιθανόλης σε καθένα από τα οποία παραμένει για 2-3 λεπτά.
- Έπειτα σε απεσταγμένο νερό για 5 λεπτά.
- Τοποθετούνται σε ποτήρι ζέσεως στο οποίο έχει προστεθεί το διάλυμα αποκάλυψης επιτόπων (antigen retrieval) και θερμαίνονται σε φούρνο μικροκυμάτων για 20 λεπτά στην μέγιστη θερμοκρασία.
- Μετά την θέρμανση αφήνονται να ψυχθούν σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολουθούν πλύσεις:
  - 2 φορές από 5 λεπτά με d. H<sub>2</sub>O.
  - 2 φορές από 5 λεπτά με PBST
- Ακολουθεί η διαδικασία δέσμευσης των μη ειδικών θέσεων (blocking). Προστίθενται περίπου 150 μl από το serum blocking σε κάθε τομή. Τα πλακάκια τοποθετούνται σε δοχείο προστατευμένο από το φως και αφήνονται για 45 λεπτά.
- Τοποθετείται το πρώτο αντίσωμα. Το πρώτο αντίσωμα προστέθηκε σε δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις (2,4 μg/ml) οπότε πραγματοποιήθηκαν δυο αραιώσεις (το αντίσωμα έχει αρχική συγκέντρωση 1mg/ml)
  - 2 μg/ml: Δημιουργήθηκαν 600μl στα οποία προστέθηκε 1.2 μl αντισώματος και 598.8 μl διαλύτη (1% w/v BSA σε 1x PBST).

- 4 µg/ml: Δημιουργήθηκαν 600µl στα οποία προστέθηκε 2.4 µl αντισώματος και 597.6 µl διαλύτη (1% w/v BSA σε 1x PBST).

Προστίθενται περίπου 150 µl από το πρώτο αντίσωμα σε κάθε τομή. Τα πλακάκια τοποθετούνται σε δοχείο προστατευμένο από το φως και αφήνονται στους 4°C για όλη την νύχτα.

- Την επόμενη μέρα πραγματοποιούνται δύο πλύσεις των 5 λεπτών η καθεμία με PBST.
- Προστίθεται το δεύτερο αντίσωμα (η αρχική του συγκέντρωση είναι 2 mg/ml), αφού πρώτα αραιωθεί 500 φορές με τον διαλύτη.

Προστίθενται περίπου 150 µl από το αντίσωμα σε κάθε τομή. Τα πλακάκια τοποθετούνται σε δοχείο προστατευμένο από το φως και αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για μια ώρα.

- Ακολουθούν πλύσεις:
  - 1 φορά 5 λεπτά με PBST
  - 2 φορές από 5 λεπτά με PBS
  - 1 φορά 5 λεπτά με d. H<sub>2</sub>O.
- Έπειτα, ακολουθεί η κάλυψη των τομών με διάλυμα μονιόλ που περιέχει την πυρηνική χρώση DAPI (φθορίζουσα χρωστική που συνδέεται με τις βάσεις A-T του DNA).
- Τέλος, ακολουθεί η απεικόνιση των δειγμάτων σε φθορίζον μικροσκόπιο σε 2 φάσματα (μπλέ-DAPI, κόκκινο Tks5).

Ως αρνητικοί μάρτυρες, χρησιμοποιήθηκαν ιστοί στους οποίους προστέθηκε στην πρώτη φάση 100µl από τον διαλύτη, χωρίς να προστεθεί πρώτο αντίσωμα.

## B. Χρώση ανοσοφθορισμού σε ινοβλάστες

Χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενείς ινοβλάστες ποντικών C57Bl/6 σε 24αρα πλάκα.

### Μέθοδος

- Τα κύτταρα επιστρώνονται σε συγκεκριμένη πυκνότητα. Έτσι, σε κάθε φρεάτιο με καλυπτρίδα διαμέτρου 13 mm στρώθηκαν  $6 \times 10^4$  κύτταρα.
- Μετά την προσκόλληση των κυττάρων, το starvation και την προσθήκη των παραγόντων ανάπτυξης απομακρύνεται το υπάρχον θρεπτικό υλικό.
- Ακολουθεί άδειασμα του κάθε φρεατίου με ειδική αντλία και στη συνέχεια πραγματοποιούνται 3 πλύσεις με 500  $\mu$ L φιλτραρισμένο PBS.
- Εν συνεχεία πραγματοποιείται μονιμοποίηση με διάλυμα PFA 4% για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε κάθε φρεάτιο. Ακολουθούν 2 πλύσεις με 500  $\mu$ L PBS σε κάθε φρεάτιο.
- Προστίθενται 300  $\mu$ L 0,2% Triton-X για 15 λεπτά σε κάθε φρεάτιο. Στη συνέχεια προστίθεται 0,1% Triton-X και 0,2% BSA για 1 ώρα για να πραγματοποιηθεί η δέσμευση των μη ειδικών θέσεων (blocking).
- Έπειτα προστίθεται το πρωτογενές αντίσωμα anti -Tks5 (σε αραιώση 1/250) σε φιλτραρισμένο PBS-0,1% BSA. Τα πλακάκια τοποθετούνται σε δοχείο προστατευμένο από το φως και αφήνονται στους 4°C για όλη την νύχτα.
- Την επόμενη μέρα, πραγματοποιούνται 3 πλύσεις με 500  $\mu$ L φιλτραρισμένο PBS σε κάθε φρεάτιο.
- Προστίθενται 300  $\mu$ L από το δευτερογενές αντίσωμα (anti rabbit συζευγμένου με Alexa-555), αφού πρώτα αραιωθεί 1000 φορές σε φιλτραρισμένο PBS-0,1% BSA, για 1 ώρα στους 25°C στο σκοτάδι.

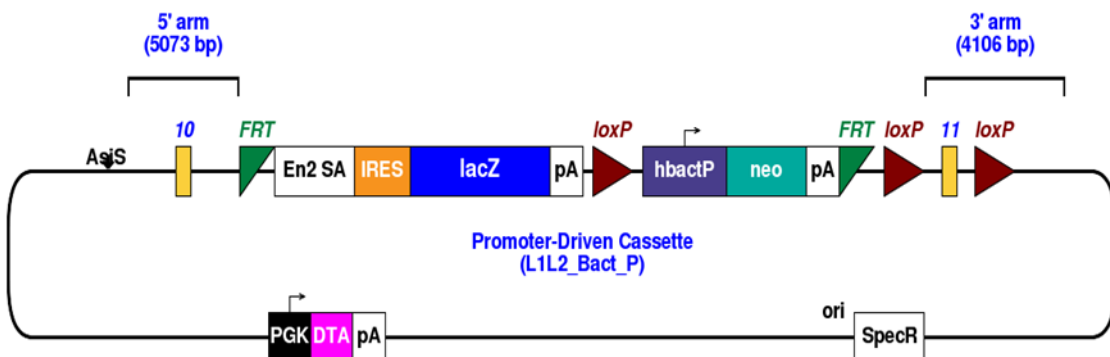
- Ακολουθεί η τοποθέτηση καλυπτρίδων πάνω σε πάραφιλμ, και πλύσιμο της κάθε καλυπτρίδας διαδοχικά με 100  $\mu$ L φιλτραρισμένο PBS-0,1% BSA, PBS και dH<sub>2</sub>O.
- Την ίδια μέρα η καλυπτρίδα σταθεροποιείται στην αντικειμενοφόρο πλάκα με στερεωτικό που περιέχει την πυρηνική χρώση DAPI και αφού στεγνώσει, η πάνω πλευρά της καθαρίζεται με λίγο οινόπνευμα.
- Ακολουθεί η απεικόνιση των καλυπτρίδων σε φθορίζον μικροσκόπιο σε 2 φάσματα (μπλέ-DAPI, κόκκινο Tks5).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1 Δημιουργία γενετικά τροποποιημένων ποντικών για το γονίδιο Sh3pxd2a.

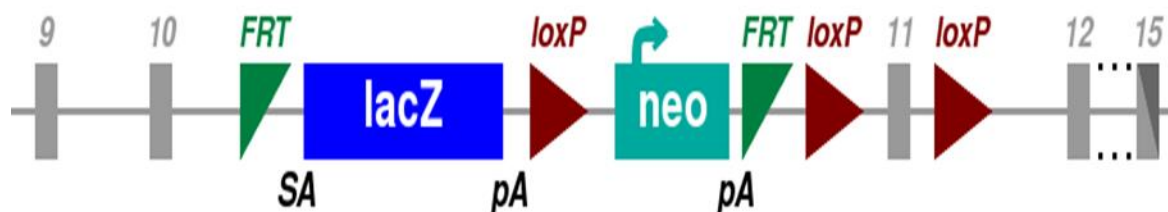
#### 3.1.1 Δημιουργία ποντικών που φέρουν το «πρώτο knockout» αλληλόμορφο.

Για την δημιουργία ποντικών που φέρουν το πρώτο knockout αλληλόμορφο (tm1a) ακολουθήσαμε το μοντέλο της EUCOMM. Η στόχευση έγινε στο γονίδιο ενδιαφέροντος που ήταν το Sh3pxd2a. Από την αναζήτηση στην σελίδα της Διεθνούς κοινοπραξίας Knockout ποντικών (IKMC) είδαμε ότι είναι διαθέσιμο το SH3PXD2A<sup>tm1a</sup> αλληλόμορφο τόσο σε εμβρυικά βλαστικά κύτταρα όσο και σε ποντίκι. Στην ίδια σελίδα υπάρχει και ο φορέας στόχευσης του γονιδίου (σχήμα 3.1), από τον οποίο είδαμε ότι το κρίσιμο εξώνιο θεωρείται το εξώνιο 11. Ένας τυπικός φορέας στόχευσης του προγράμματος EUCOMM περιέχει μια κασέτα στόχευσης με ένα γονίδιο αντίστασης στην νεομυκίνη (neo), που οδηγείται από τον υποκινητή β-ακτίνης. Αυτό επιτρέπει τη στόχευση όλων των γονιδίων, ανεξάρτητα από το προφίλ έκφρασής τους σε ES κύτταρα ποντικού. Στον φορέα στόχευσης υπάρχει επίσης ο γονιδιακός τόπος που περιέχει το γονίδιο Lac-z.



Σχήμα 3.1: Φορέας στόχευσης του γονιδίου Sh3pxd2a  
[https://www.i-dcc.org/imits/targ\\_rep/alleles/26004/vector-image](https://www.i-dcc.org/imits/targ_rep/alleles/26004/vector-image)

Μετά από προσεκτική μελέτη του εργαστηρίου, προμηθευτήκαμε κατεψυγμένο σπέρμα αρσενικών ποντικών ετερόζυγων για το *tm1a* αλληλόμορφο. Η δομή του *Sh3pxd2a<sup>tm1a</sup>* αλληλόμορφου φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (σχήμα 3.2).



Σχήμα 3.2: Δομή του *Sh3pxd2a<sup>tm1a</sup>* αλληλόμορφου

(<http://www.mousephenotype.org/data/search/allele2?kw=%22Sh3pxd2a%22#order2>)

Όπως φαίνεται και από το σχήμα 3.2, το «κρίσιμο» εξώνιο 11, περιβάλλεται από δύο θέσεις *loxP*, για να είναι εφικτή μετέπειτα η εκτομή του. Μετά το εξώνιο 10 έχουν εισαχθεί το γονίδιο αναφοράς (*lacZ*) και ο δείκτης θετικής επιλογής (*neo* κασέτα) τα οποία περιβάλλονται από τις αλληλουχίες *FRT*, ώστε να μπορούν να απομακρυνθούν κατά την δημιουργία του *tm1c* αλληλομόρφου. Ανάμεσα από το γονίδιο αναφοράς και τον δείκτη θετικής επιλογής έχει ενσωματωθεί η τρίτη θέση *loxP*.

Το σπέρμα που προμηθευτήκαμε από την EUCOMM, εισήχθει σε ποντίκια στο εργαστήριο της διαγένεσης του ερευνητικού κέντρου «Αλέξανδρος Φλέμινγκ» με την μέθοδο της εξωσωματικής γονιμοποίησης (**in vitro fertilization, IVF**).

Η μέθοδος της IVF αποτελεί ένα ιδιαίτερα ευέλικτο εργαλείο που προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα σε εργαστήρια με εγκαταστάσεις ποντικιών, συμβάλλοντας τόσο στην εξέλιξη της έρευνας όσο και στην αποτελεσματική χρήση του χώρου και των πόρων. Για παράδειγμα, με την μέθοδο της IVF είναι δυνατή η κατάψυξη σπέρματος στελεχών, τα οποία δεν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν σε εργαστηριακές πρακτικές άμεσα, δίνοντας όμως την δυνατότητα ανάκτησης σε μεταγενέστερη ημερομηνία. Επίσης, δίνει την δυνατότητα επέκτασης μικρών αποικιών, για να καλυφθούν πιθανές ανάγκες. Τέλος, η εξωσωματική γονιμοποίηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάσωση στελεχών που αποτυγχάνουν να αναπαραχθούν ή στελεχών όπου ο αρσενικός ιδρυτής είναι άρρωστος ή πεθαίνει ξαφνικά.



Το εργαστήριο της διαγένεσης του ερευνητικού κέντρου ακολουθεί την μέθοδο εξωσωματικής γονιμοποίησης που προτείνεται από την EMMA. Αρχικά τα δείγματα σπέρματος αποψύχονται και επωάζονται σε θρεπτικό υλικό ΤΥΗ (Tyrosine Hydroxylase) με προσθήκη 0.75mM MBCD που συμβάλλει στην διατήρησή τους, για μισή ώρα στους 37°C. Ακολουθεί η συλλογή ωαρίων, από θηλυκά ποντίκια με ωορρηξία, η επώαση τους σε θρεπτικό υλικό με λάδι και η εξωσωματική γονιμοποίηση τους με το σπέρμα που έχει προ-αποψυχθεί. Τα τρυβλία που περιέχουν τα γονιμοποιημένα ωοκύτταρα επωάζονται στους 37°C, σε 5% CO<sub>2</sub> σε αέρα για περίπου 3-4 ώρες για να συμβεί γονιμοποίηση. Τα ωοκύτταρα στην συνέχεια εκπλένονται με HTF (Human tubal fluid) για να απομακρυνθούν τα εκφυλισμένα-μη γονιμοποιημένα ωοκύτταρα και τα υπολείμματα σπέρματος και τοποθετούνται σε μέσο που περιέχει HTF και λάδι όλη την νύχτα. Τέλος, μεταφέρονται στους αγωγούς θετών ψευδοέγκυων θηλυκών ποντικιών, για να προκύψουν οι επιθυμητοί απόγονοι.

Από την πρώτη γέννα μετά την IVF, προέκυψαν 3 απόγονοι από τους οποίους απομονώθηκε γενωμικό DNA, και έγινε γονοτύπηση ως προς τον γενότυπο tm1a. Το πρωτόκολλο γονοτύπησης των tm1a, αναπτύχθηκε από τη EUCOMM και ελέγχει τρία διαφορετικά γενωμικά τμήματα με τη διενέργεια τριών ανεξάρτητων αντιδράσεων PCR.

Η πρώτη αντίδραση PCR, ανιχνεύει την παρουσία του γονιδίου LacZ, το οποίο έχει βακτηριακή προέλευση και αναμένεται να είναι παρών αποκλειστικά στα ανασυνδρασμένα ποντίκια. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται προσδένονται πάνω στο γονίδιο LacZ και δίνουν προϊόν 715bp.

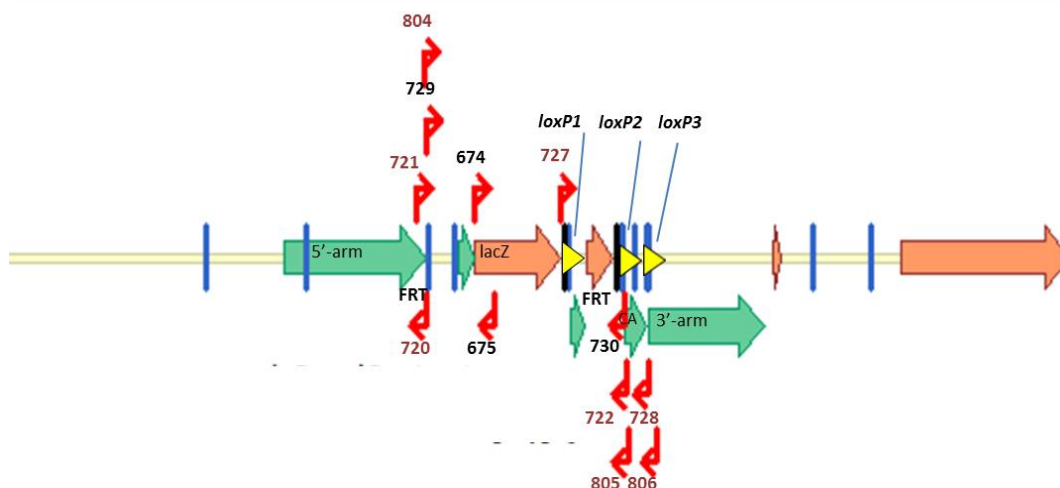
Η δεύτερη αντίδραση PCR στοχεύει τμήμα της αλληλουχίας του άγριου τύπου του γονιδίου SH3PXD2A και έχει διπλό σκοπό. Αφενός αποτελεί ένα θετικό μάρτυρα, που αποδεικνύει την ύπαρξη γενωμικού DNA αποδεκτής ποιότητας το οποίο χρησιμοποιείται και για τις τρεις αντιδράσεις που διενεργούνται, αφετέρου επιβεβαιώνει ότι το υπο εξέταση ζώο είναι ετερόζυγο. Τόσο ο πρόσθιος όσο και ο ανάστροφος εκκινητής προσδένονται πάνω στο 5' βραχίονα ομολογίας και συγκεκριμένα στο ιντρόνιο 9-10. Στο tm1a αλληλόμορφο οι εκκινητές αυτοί δίνουν προϊόν 7543bp, το οποίο δεν παράγεται κάτω από τις συγκεκριμένες χρονικές συνθήκες του πρωτοκόλλου, αλλά στο αλληλόμορφο φυσικού τύπου δίνουν προϊόν 474bp, το οποίο και ανιχνεύεται.

Η τρίτη αντίδραση PCR δίνει προϊόν 338bp και είναι επιτυχής μόνο σε γενωμικό υλικό που προέρχεται από ζώο στο οποίο έχει γίνει ανασυνδυασμός, αφού ο ένας εκκινητής (721) προσδένεται σε περιοχή που υπάρχει και στο αλληλόμορφο φυσικού τύπου, όπως προαναφέρθηκε, ενώ ο άλλος (720) προσδένεται σε εξωγενή/συνθετική περιοχή που απαντάται μόνο στο ανασυνδυασμένο αλληλίο ( αλληλουχία FRT).

**Πίνακας 3 .1: Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην ταυτοποίηση του Sh3pxd2a<sup>tm1a</sup> αλληλόμορφου.**

Περιοχή στόχευσης	Εκκινητής	Αλληλουχία (5'-3')	Αναμενόμενο μέγεθος(bp) της PCR
Lac-Z κασέτα	674	GATCCCGTCGTTTTACAACGTCGT	715 bp
	675	GAAC TTCAGCCTCCAGTACAGCGC	
Wt ποντίκια	721(F)	CTGCCACCAAGTTCTTTCC	474 bp
	722(R)	AAAGCAGATCCCCCAGACAG	
Tm1a ποντίκια	720 (R)	TCGTGGTATCGTTATGCGCC	340 bp
	721(F)	CTGCCACCAAGTTCTTTCC	

Οι παραπάνω εκκινητές, σχεδιάστηκαν από την EUCOMM επαληθεύτηκαν στο εργαστήριο πριν την χρήση τους με το πρόγραμμα Primer Blast. Επίσης με το λογισμικό Vector NTI 9.1.0 (Invitrogen), ελέγχθηκε η περιοχή πρόσδεσης όλων των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην γονοτύπηση των ποντικών που δημιουργήθηκαν, καθώς επίσης και των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην Long-Range PCR. Στο σχήμα 3.3 φαίνεται η περιοχή πρόσδεσης όλων των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην γονοτύπηση.



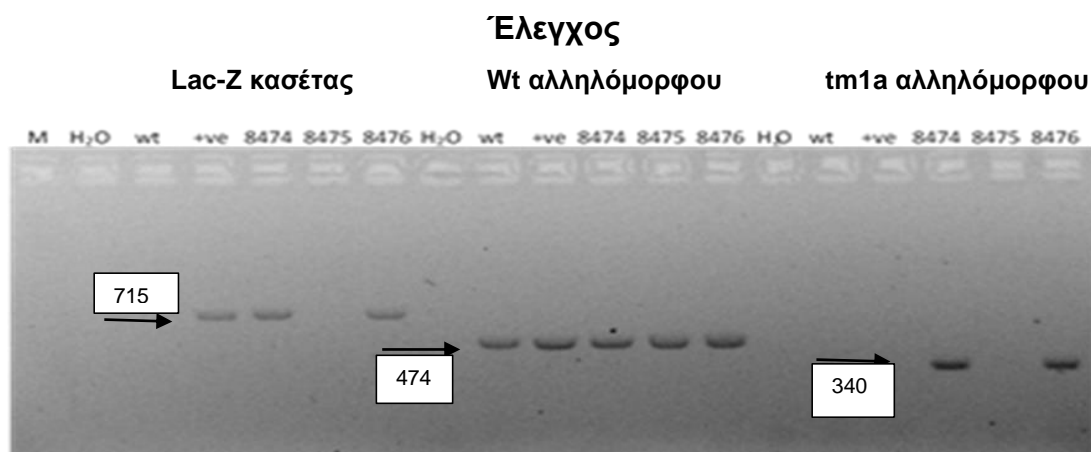
**Σχήμα 3.3:** Θέση πρόσδεσης εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην γονοτύπηση των γενετικά τροποποιημένων για το γονίδιο *Sh3rxd2a* ποντικών (Το σχήμα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα Vector NTI).

Το πρόγραμμα που εκτελέστηκε η PCR ήταν το εξής:

**Πίνακας 3.2:** Συνθήκες αντίδρασης PCR που πραγματοποιήθηκε για την ταυτοποίηση του *Sh3rxd2a<sup>tm1a</sup>* αλληλόμορφου.

Στάδια PCR	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος
1. Θέρμανση κεφαλής	110	
2. Αρχική αποδιάταξη	94	5 min
<b>35 κύκλοι</b> (επανάληψη βημάτων 3-5)		
3. Αποδιάταξη	95.0	30sec
4. Υβριδισμός	60.5	30sec
5. Επέκταση	72.0	1min
6. Τελική επέκταση	72.0	5min

Μετά την γονοτύπηση των τριών πρώτων απογόνων και για τις τρεις διαφορετικές συνθήκες, ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR (σχήμα 3.4).



**Σχήμα 3.4: Εικόνα ηλεκτροφόρησης των Sh3rxd2a tm1a απογόνων της πρώτης γενιάς.**

Από τους 3 απόγονους που πήραμε οι δύο (8474,8476) φαίνεται να έχουν κληρονομήσει το Sh3rxd2a<sup>tm1a</sup> αλληλόμορφο.

Μετά την δημιουργία των πρώτων tm1a ποντικών, και αφότου τα ζώα αυτά έφτασαν σε αναπαραγωγική ηλικία (περίπου 8 εβδομάδων), τα διασταυρώσαμε με ποντίκια C57Bl/6, για να διαπιστώσουμε αν το γενετικά τροποποιημένο αλληλόμορφο κληρονομείται και στην δεύτερη γενιά μετά την IVF, αλλά και για να αυξηθεί ο αριθμός των ποντικών που φέρουν το τροποποιημένο αλληλόμορφο, ώστε να πραγματοποιηθούν περαιτέρω διασταυρώσεις.

Μετά από 21 μέρες περίπου από την διασταύρωση προέκυψαν απόγονοι, οι οποίοι γονοτυπήθηκαν για να βρεθεί ποιοι από αυτούς φέρουν το επιθυμητό γονίδιο και αν οι αναλογίες ακολουθούν τον νόμο του Mendel. Από την στιγμή που εξασφαλίστηκε ότι και οι F2 απόγονοι φέρουν την Lac-Z κασέτα, δεν ξαναέγινε γονοτύπηση και στους επόμενους απογόνους. Το κλασσικό πρωτόκολλο γονοτύπησης ξεχωρίζει τα ζώα άγριου τύπου από τα ανασυνδυασμένα ζώα με τους εκκινήτες 720-721-722. Από την ανάλυση αποδείχθηκε ότι δεν υπήρξε κανένα πρόβλημα τόσο στην απόκτηση απογόνων που φέρουν το tm1a αλληλόμορφο όσο και στις αναλογίες που προέκυψαν.

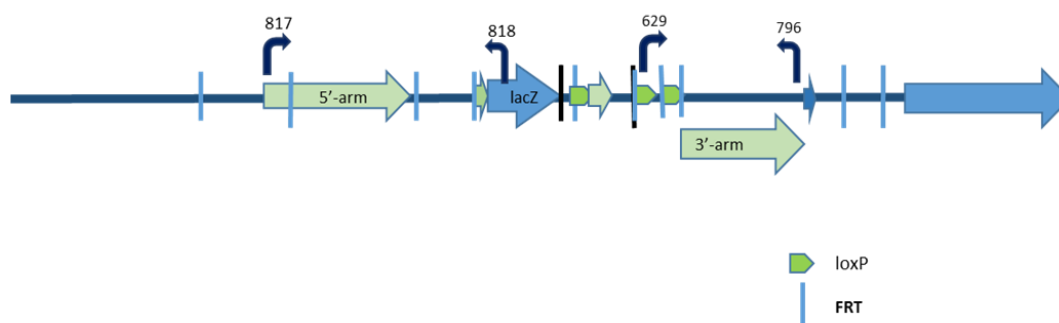
Πριν προχωρήσουμε σε οποιοδήποτε άλλη διασταύρωση για να εκτελέσαμε την μέθοδο της Long-Range PCR για να επαληθεύσουμε τον επιτυχή ανασυνδυασμό του γονιδίου.

Με την μέθοδο της Long-Range PCR ελέγχθηκε τόσο ο 5' όσο και ο 3' βραχίονας ομολογίας για να επαληθευτεί ότι έχει εισαχθεί σωστά το διαγονίδιο. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 3.3).

**Πίνακας 3.3: Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση της Long Range PCR.**

Περιοχή στόχευσης	Εκκινητής	Αλληλουχία (5'-3')	Αναμενόμενο μέγεθος (bp) της PCR
5' βραχίονας ομολογίας	817 (F)	TTGTCGTGGCCTCTCTGAAGCAT	6703 bp
	818 (R)	TCACCTTCTACCCCAGACCTTGG	
3' βραχίονας ομολογίας	629 (F)	AAGTATAGGAACTTCGTTCGAGATAACTTCG	5610 bp
	796 (R)	GCGTTGCAGAGGATCGGTAAGCTG	

Οι παραπάνω εκκινητές, σχεδιάστηκαν από την EUCOMM και επαληθεύτηκε η ειδικότητά τους με το πρόγραμμα Primer Blast. Ο εκκινητής 817 (F) προσδένεται σε περιοχή φυσικού τύπου πιο ανοδικά από τον 5' βραχίονα ομολογίας του φορέα στόχευσης. Ο εκκινητής 818 (R), προσδένεται σε τεχνητή αλληλουχία, η οποία αποτελεί τμήμα της κασέτας ανασυνδυασμού και έτσι δίνει προϊόν μόνο στο ανασυνδυασμένο DNA και όχι στο DNA που προέρχεται από ποντίκια άγριου τύπου. Ο εκκινητής 629 (F), προσδένεται σε τεχνητή περιοχή της κασέτας ανασυνδυασμού και έτσι δίνει προϊόν μόνο στο ανασυνδυασμένο DNA. Ο εκκινητής 796 (R) προσδένεται σε περιοχή φυσικού τύπου πιο καθοδικά από τον 3' βραχίονα ομολογίας του φορέα στόχευσης (σχήμα 3.5).



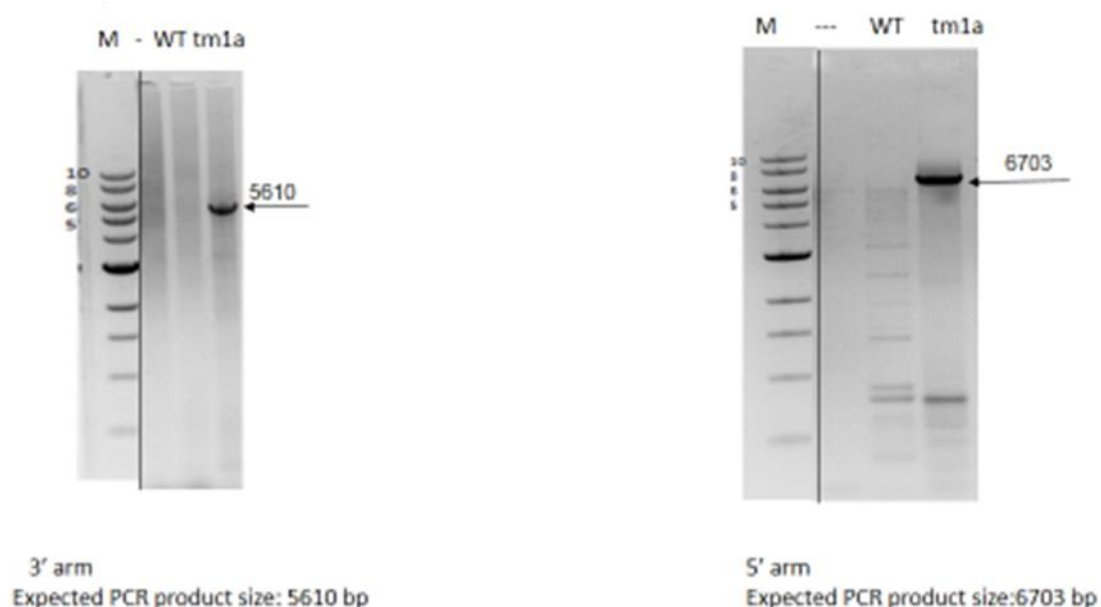
**Σχήμα 3.5: Θέση πρόσδεσης εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση της Long-Range PCR.**

Το πρόγραμμα που εκτελέστηκε η PCR ήταν το εξής:

**Πίνακας 3.4: Συνθήκες αντίδρασης Long Range PCR.**

Στάδια PCR	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος
1. Θέρμανση κεφαλής	110	
2. Αρχική αποδιάταξη	93	3 min
<b>8 κύκλοι (επανάληψη βημάτων 3-5)</b>		
3. Αποδιάταξη	92.0	15sec
4. Υβριδισμός	65.0 (σε κάθε κύκλο πέφτει η θερμοκρασία κατά 1°C)	30sec
5. Επέκταση	65.0	8min
<b>30 κύκλοι (επανάληψη βημάτων 6-8)</b>		
6. Αποδιάταξη	92.0	15sec
7. Υβριδισμός	55.0	30sec
8. Επέκταση	65.0	8min (σε κάθε κύκλο αυξάνεται ο χρόνος κατά 20sec)
9. Τελική επέκταση	65.0	9min

Χρησιμοποιήθηκε ένα δείγμα tm1a σαν θετικός μάρτυρας και ένα δείγμα άγριου τύπου σαν αρνητικός μάρτυρας του ανασυνδυασμού. Το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος της Long-range PCR υπολογίστηκε με το πρόγραμμα Vector NTI. Η εικόνα της ηλεκτροφόρησης επιβεβαίωσε τον σωστό ανασυνδυασμό του γονιδίου (σχήμα 3.6).



**Σχήμα 3.6: Εικόνα ηλεκτροφόρησης της αντίδρασης Long Range PCR για τον 5' και 3' βραχίονα ομολογίας.**

### 3.1.2 Δημιουργία γενετικά τροποποιημένων ποντικών που φέρουν το αλληλόμορφο με γονίδιο αναφοράς lacZ (tm1b)

Για την δημιουργία ποντικών που φέρουν το tm1b αλληλόμορφο, απαιτείται μια στρατηγική αναπαραγωγής δύο σταδίων. Αρχικά διασταυρώθηκαν tm1a ζώα, αρσενικά και θηλυκά, με C57Bl/6 ποντίκια που υπερεκφράζουν την Cre ρεκομπινάση, με σκοπό το ένζυμο να αναγνωρίσει τις loxP αλληλουχίες που έχουν ενσωματωθεί στο γονιδίωμα, και μέσω ανασυνδυασμού να προκύψουν tm1b απόγονοι. Το διάστημα που χρειάστηκε για να πάρουμε απογόνους και οι αναλογίες που προέκυψαν από αυτήν την διασταύρωση, ήταν λίγο διαφορετικά από τα αναμενόμενα. Οι αιτίες αυτού του φαινομένου μπορεί να είναι πολλές (π.χ. τα Cre διαγονιδιακά ζώα που χρησιμοποιήθηκαν πιθανόν να μην μπορούσαν να οδηγήσουν σε ανασυνδυασμό). Παρόλα αυτά υπήρχαν απόγονοι που μετά την γονοτύπηση αποδείχθηκε ότι σε αυτούς είχε συμβεί ανασυνδυασμός. Μετά τον προσδιορισμό του γονότυπου και επαλήθευση της μετατροπής των tm1a αλληλομόρφων σε tm1b, τα ζώα αυτά διασταυρώθηκαν με άγριου τύπου C57BL/6 ποντίκια, για να επαληθεύσουμε ότι το γενετικά τροποποιημένο αλληλόμορφο κληρονομείται και στην επόμενη (F2) γενιά, αλλά και για να απομακρυνθεί η Cre ρεκομπινάση από το γονιδίωμα τους. Από την στιγμή που δημιουργηθεί έστω και ένα ποντίκι με γονότυπο Sh3pxd2a<sup>tm1b</sup>+/-/Cre+/-, αυτό διασταυρώνεται με C57Bl/6 ποντίκι με σκοπό τον καθαρισμό του γενετικού υποβάθρου (από την Cre ρεκομπινάση) και την επέκταση της συγκεκριμένης γενετικής σειράς.

Από την πρώτη διασταύρωση, πέρα από Sh3pxd2a<sup>tm1b</sup> +/-/Cre+/- ετερόζυγα ζώα, προέκυψαν επίσης Sh3pxd2a<sup>tm1a</sup>+/-/Cre+/- ετερόζυγα ζώα (σε αναλογία περίπου 25%) καθώς και C57Bl/6/Cre+/- ζώα, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν μελλοντικά για επέκταση της φυλής, ή στην περίπτωση των ζώων που είναι ετερόζυγα για το Cre για άλλους ανασυνδυασμούς.

Η αντίδραση PCR, που πραγματοποιείται στα ζώα που προκύπτουν από την πρώτη διασταύρωση, δίνει προϊόν 380bp και είναι επιτυχής μόνο σε γενωμικό υλικό που προέρχεται από ζώο στο οποίο έχει γίνει ανασυνδυασμός, αφού ο πρόσθιος εκκινήτης (727) προσδένεται σε περιοχή που βρίσκεται αμέσως μετά την κασέτα Lac-Z, ενώ ο ανάστροφος (728) προσδένεται στον 3' βραχίονα

ομολογίας. Στο tm1a αλληλόμορφο οι εκκινητές αυτοί δίνουν προϊόν 3205 bp, το οποίο δεν παράγεται κάτω από τις συγκεκριμένες χρονικές συνθήκες του πρωτοκόλλου. Οι παραπάνω εκκινητές, σχεδιάστηκαν και ελέγχθηκαν με το πρόγραμμα Primer Blast πριν την χρήση τους. Η περιοχή πρόσδεσης τους φαίνεται στο σχήμα 3.3. Στο δεύτερο στάδιο (καθαρισμού του γενετικού υποβάθρου), πέρα από την ύπαρξη του tm1b αλληλόμορφου, ελέγχεται και κατά πόσο έχει απομακρυνθεί το ένζυμο της Cre ρεκομπινάσης από τα ποντίκια στα οποία έχει συμβεί ο ανασυνδυασμός.

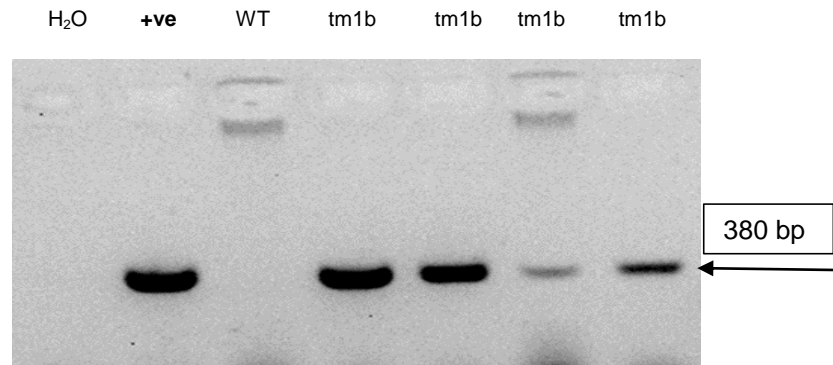
**Πίνακας 3.5: Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην ταυτοποίηση του Sh3pxd2a<sup>tm1b</sup> αλληλόμορφου.**

Περιοχή ελέγχου	Εκκινητής	Αλληλουχία (5'-3')	Αναμενόμενο μέγεθος( bp) της PCR
Cre ρεκομπινάση	725 (F)	CATTTGGGCCAGCTAAACAT	233bp
	726 (R)	TAAGCAATCCCCAGAAATGC	
Tm1b αλληλόμορφο	727(F)	CGGTCGCTACCATTACCAGT	380 bp
	728(R)	ACTGATGGCGAGCTCAGACC	

**Πίνακας 3.6: Συνθήκες αντίδρασης PCR που πραγματοποιήθηκε για την ταυτοποίηση του Sh3pxd2a<sup>tm1b</sup> αλληλόμορφου.**

Στάδια PCR	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος
1. Θέρμανση κεφαλής	110	
2. Αρχική αποδιάταξη	94	5 min
<b>35 κύκλοι (επανάληψη βημάτων 3-5)</b>		
3. Αποδιάταξη	95.0	30sec
4. Υβριδισμός	58.5	30sec
5. Επέκταση	72.0	1min
6. Τελική επέκταση	72.0	5min

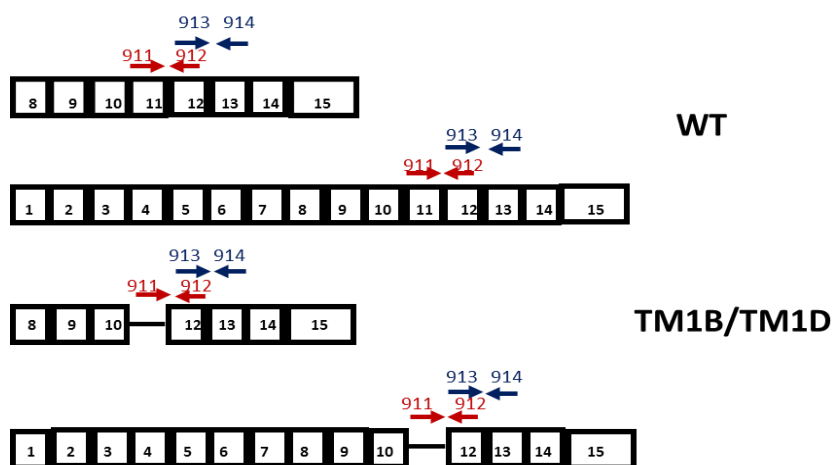




**Σχήμα 3.7: Εικόνα ηλεκτροφόρησης των Sh3rxd2a tm1b ανασυνδυασμένων ποντικών.**

Μετά την επαλήθευσή μέσω γονοτύπησης των tm1b ποντικών στα οποία έχει διαγραφεί το εξώνιο 11, απομονώθηκε RNA και πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου σε ιστούς πνεύμονα και ήπατος. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με βάση την συγκριτική μέθοδο Ct (ή ΔCt).

Χρησιμοποιήθηκαν δυο διαφορετικά ζεύγη εκκινήτων. Το ένα ζεύγος προσδένεται στα εξώνια 11-12 και χρησιμοποιείται για να επαληθευτεί η απουσία του «κρίσιμου» εξωνίου 11, και το άλλο ζεύγος προσδένεται στα εξώνια 12-13 και ελέγχει κατά πόσον η μεταγραφή μπορεί να ολοκληρωθεί αν απουσιάζει το εξώνιο 11 (σχήμα 3.8). Η κανονικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου έγινε χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς το B2M (B2 microglobulin). Επειδή, το εξώνιο 11 υπάρχει και σε όλες τις ισομορφές του γονιδίου, αναμένεται μείωση της έκφρασης σε όλες τις ισομορφές.



**Σχήμα 3.8:** Σχηματική αναπαράσταση της θέσης πρόσδεσης των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου σε *tm1b-tm1d* knockout ποντίκια.

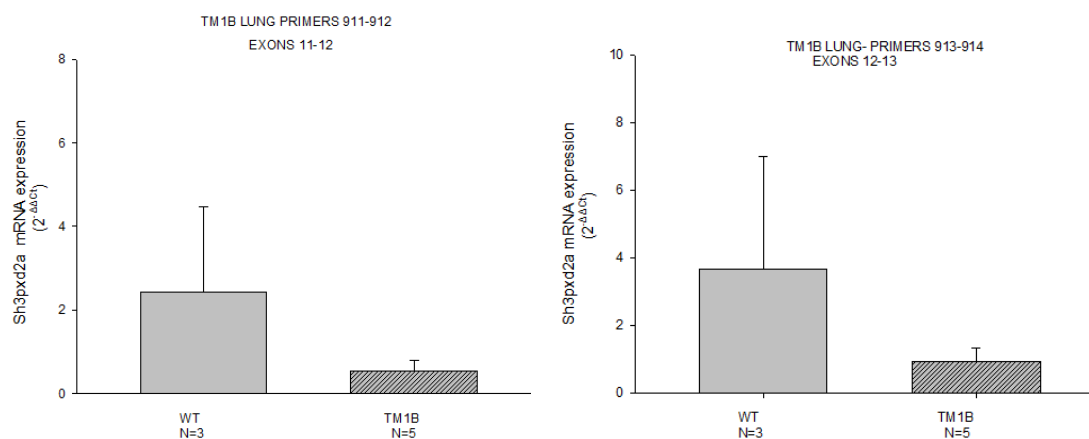
Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για το γονίδιο *SH3PXD2A* σχεδιαστήκαν και επαληθεύτηκαν με το πρόγραμμα Primer Blast. Οι αλληλουχίες όλων των εκκινητών φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (3.7).

**Πίνακας 3.7:** Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην ποσοτικοποίηση έκφρασης του γονιδίου *Sh3pxd2a* σε δείγματα knockout ποντικίων.

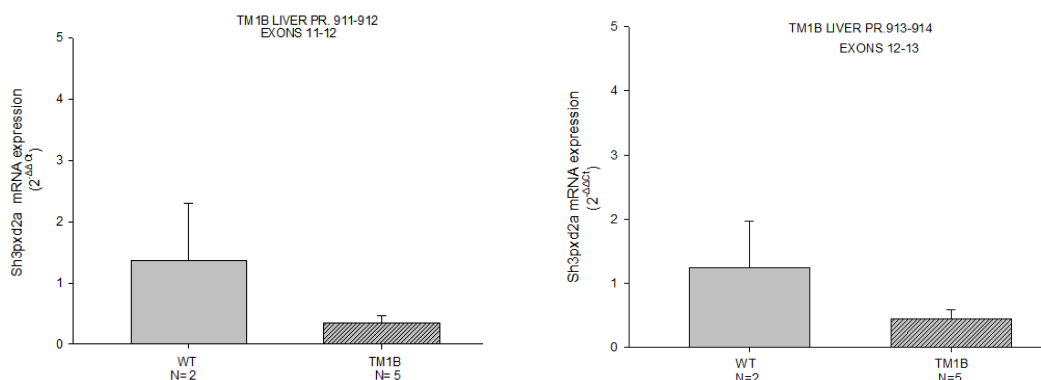
Περιοχή πρόσδεσης	Εκκινητής	Αλληλουχία (5'-3')
Εξώνιο 11-12	911(F)	AAGACGAGATCGGCTTCGAG
	912(R)	TCCCTATGATCTCCACCGGA
Εξώνιο 12-13	913(F)	CGAGAGGACCACATCCAAGC
	914(R)	GATTCTCTGCGCGGGGG
Γονίδιο <i>B<sub>2</sub>M</i>	111(F)	TTCTGGTGCTTGTCTCACTGA
	112(R)	CAGTATGTTCCGGCTTCCCATTC

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε 3 ποντίκια άγριου τύπου και 5 ποντίκια με γονότυπο *Sh3pxd2a<sup>tm1b</sup> +/-*, και εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου στους πνεύμονες και στο ήπαρ. Από όλα τα ποντίκια απομονώθηκε ιστός για να πραγματοποιηθεί και μελέτη ιστολογίας, ώστε να ολοκληρωθεί η φαινοτυπική τους ανάλυση.

A/.



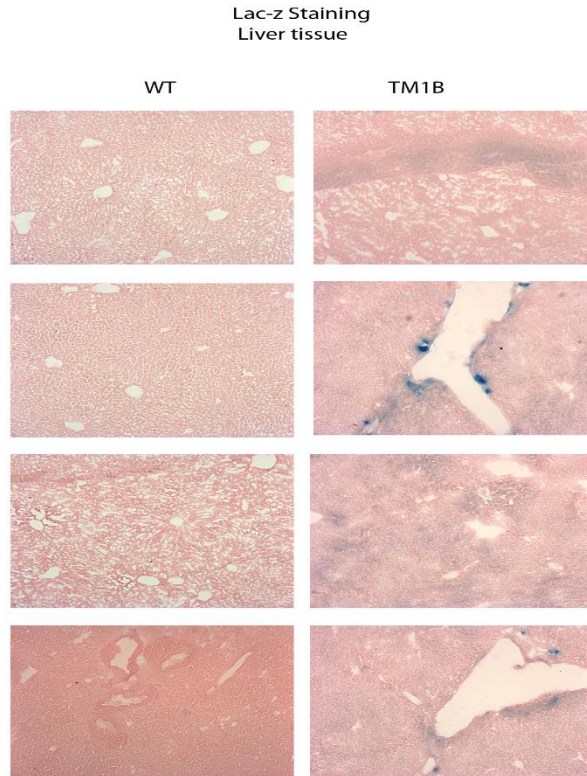
B/.



**Σχήμα 3.9: Ποσοτικοποίηση έκφρασης του γονιδίου Sh3pxd2a σε tm1b ποντίκια A) σε ιστό πνεύμονα, B) σε ιστό ήπατος.**

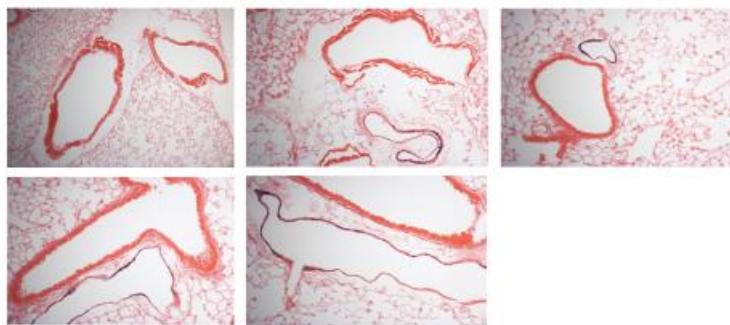
Όπως φαίνεται και από το σχήμα 3.9, η έκφραση του γονιδίου Sh3pxd2a είναι μειωμένη στα ετερόζυγα ποντίκια στα οποία έχει διαγραφεί το κρίσιμο εξόνιο (tm1b) σε σχέση με τα ποντίκια άγριου τύπου (WT).

Στους ιστούς ήπατος των tm1b ποντικών και των ποντικών άγριου τύπου πραγματοποιήθηκε χρώση Lac-z (σχήμα 3.10). Όπως αναμένονταν, η ενεργοποίηση του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης από τον υποκινητή του γονιδίου Sh3pxd2a, έχει ως αποτέλεσμα την διάσπαση του κεντρικού δεσμού του υποστρώματος X-gal, και την δημιουργία μπλε περιοχών στον ηπατικό ιστό των tm1b ποντικών.



**Σχήμα 3.10: Φωτογραφίες από τομές ήπατος μετά από χρώση Lac-Z σε ποντίκια tm1b και άγριου τύπου (10x μεγέθυνση).**

Εξαιτίας της «δυσκολίας» εφαρμογής του πρωτοκόλλου σε ιστούς πνεύμονα, πραγματοποιήθηκε χρώση Lac-z σε παραφρηνοποιημένους ιστούς SH3PXD2A<sup>tm1a</sup> ποντικών, στα οποία επίσης δεν εκφράζεται το γονίδιο εξαιτίας της εισαγωγής του ξένου γενετικού υλικού, για να εντοπιστεί σε ποιες περιοχές του πνεύμονα εκφράζεται περισσότερο το γονίδιο. Προέκυψε ότι αυξημένη έκφραση του γονιδίου παρατηρείται κυρίως στα επιθηλιακά λεία μυϊκά κύτταρα, αλλά και στο ενδοθήλιο (σχήμα 3.11).



**Σχήμα 3.11: Φωτογραφίες από τομές πνεύμονα μετά από χρώση Lac-Z σε ιστούς tm1a ποντικών (10x μεγέθυνση).**

### 3.1.3 Δημιουργία Floxed ποντικών (conditional allele) / Ποντικών που φέρουν κατ'επιλογή αλληλόμορφο (tm1c)

Τα tm1c ποντίκια δημιουργήθηκαν με διασταύρωση των ποντικίων που είναι ετερόζυγα για το tm1a αλληλόμορφο, με C57BL/6 διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν την Flp ρεκομπινάση. Οι απόγονοι προέκυψαν σε φυσιολογικό χρονικό διάστημα, και από την γονοτύπηση, αποδείχθηκε ότι οι αναλογίες των απογόνων ακολουθούν τον νόμο του Mendel (περίπου 25% των απογόνων φέρουν το tm1c αλληλόμορφο). Για να διαπιστωθεί ότι το γενετικά τροποποιημένο αλληλόμορφο κληρονομείται στην επόμενη γενιά αλλά και για να απομακρυνθεί η Flp ρεκομπινάση και να καθαριστεί το γενετικό υπόβαθρο των ποντικών, ένα υποσύνολο των απογόνων που φέρει το αλληλόμορφο tm1c διασταυρώθηκε με C57BL/6 ποντίκια. Αξίζει να σημειωθεί, ότι το εργαστήριο αυτήν την στιγμή έχει αποκτήσει Sh3pxd2a<sup>tm1c</sup>+/-/Flp-/-, ποντίκια δηλαδή τα οποία είναι ετερόζυγα για το κατά επιλογή αλληλόμορφο αλλά έχουν καθαρό γενετικό υπόβαθρο. Πρόσφατα μάλιστα με την βοήθεια της διαγένεσης, παγώθηκε σπέρμα από τρία αρσενικά ζώα με τον συγκεκριμένο γονότυπο, τα οποία κατατέθηκαν στην EMMA (European Mouse Mutant Archive), με σκοπό να συμπεριληφθεί μετέπειτα ο συγκεκριμένος φαινότυπος στα δεδομένα του IKMC.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα Primer Blast και ανιχνεύουν τόσο το Sh3pxd2a<sup>tm1c</sup> αλληλόμορφο, όσο και το αλληλόμορφο άγριου τύπου. Τα προϊόντα που προκύπτουν από την ηλεκτροφόρηση έχουν διαφορετικό μέγεθος, επειδή στο tm1c αλληλόμορφο υπάρχουν ενσωματωμένες οι θέσεις loxP και FRT. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων της αντίδρασης PCR, φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 3.8). Η περιοχή πρόσδεσης των εκκινητών απεικονίζεται στο σχήμα 3.3.

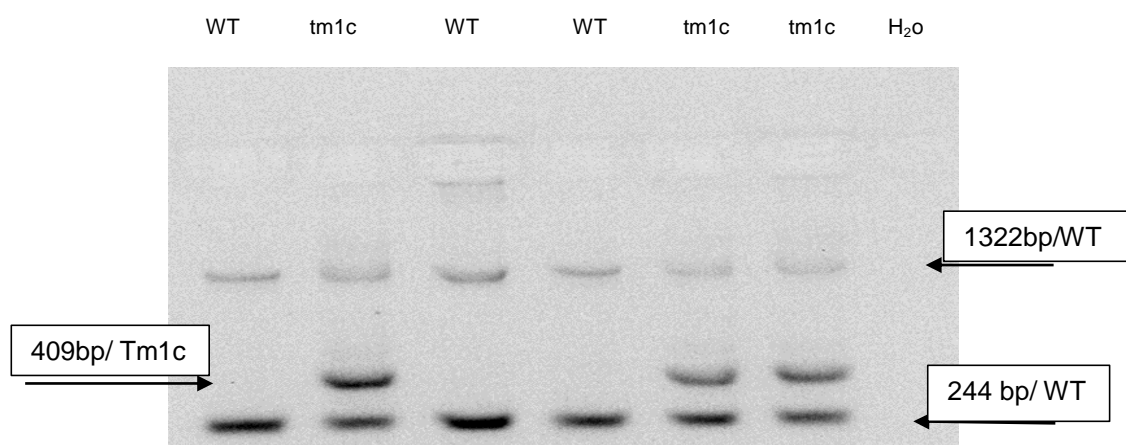
**Πίνακας 3.8: Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην ταυτοποίηση του Sh3pxd2a<sup>tm1c-tm1d</sup> αλληλόμορφου.**

Εκκινητής	Αλληλουχία (5'-3')	Αναμενόμενο μέγεθος(bp) της PCR	
804(F)	TATCCCTGGAAGCCTTCATCTGG	<b>WT</b> 244, 1322 bp	<b>Tm1c</b> 409 bp
805(R1)	GCAGCGTGAAAGCAGATCCC		
806(R2)	GCTGTGCTTTTAGCCACTGCTGC		
710 (Flper F)	GAGAACGGCATAGTGCG	600 bp	
711(Flper R)	GACAAGCGTTAGTAGGCACAT		

Οι συνθήκες του προγράμματος PCR που πραγματοποιήθηκε φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 3.9: Συνθήκες αντίδρασης PCR που πραγματοποιήθηκε για την ταυτοποίηση του Sh3pxd2a<sup>tm1c</sup> αλληλόμορφου.**

Στάδια PCR	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος
1. Θέρμανση κεφαλής	110	
2. Αρχική αποδιάταξη	94	5 min
<b>35 κύκλοι (επανάληψη βημάτων 3-5)</b>		
3. Αποδιάταξη	95.0	30sec
4. Υβριδισμός	63.9	30sec
5. Επέκταση	72.0	1.30min
6. Τελική επέκταση	72.0	5min



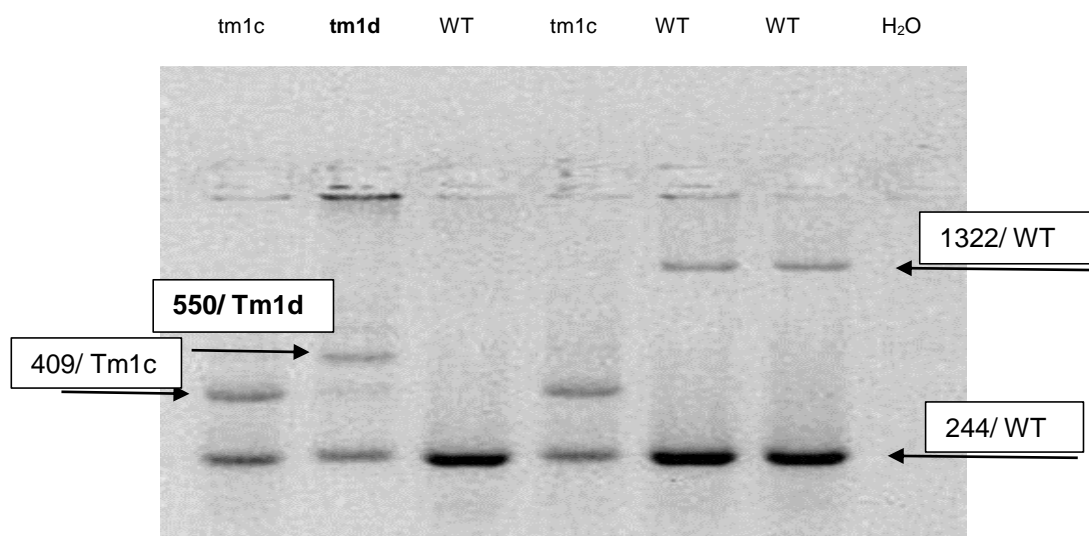
**Σχήμα 3.12: Εικόνα ηλεκτροφόρησης των *Sh3pxd2a* tm1c ανασυνδυασμένων ποντικών.**

### 3.1.4 Δημιουργία knockout ποντικών

Για την δημιουργία ετερόζυγων knockout ποντικών tm1d, απαιτείται η ίδια στρατηγική αναπαραγωγής με αυτήν που περιγράφηκε παραπάνω για τα tm1b ποντίκια. Η μόνη διαφορά βρίσκεται στην πρώτη διασταύρωση στην οποία χρησιμοποιούνται tm1c ζώα. Όπως και για τα tm1b, το διάστημα που χρειάστηκε για να πάρουμε απογόνους και οι αναλογίες που προέκυψαν από αυτήν την διασταύρωση, ήταν διαφορετικές από τα αναμενόμενες. Παρόλα αυτά υπήρχαν απόγονοι που μετά την γονοτύπηση αποδείχθηκε ότι σε αυτούς έχει διαγραφεί το γονίδιο, οι οποίοι διασταυρώθηκαν στην συνέχεια με C57Bl/6 ποντίκια για να καθαριστεί το γενετικό τους υπόβαθρο και να ελεγχθεί η ικανότητα κληρονομής του γενετικά τροποποιημένου αλληλόμορφου.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και η αντίδραση PCR που εκτελέστηκε είναι οι ίδιοι με αυτούς που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση του tm1c αλληλόμορφου. Βέβαια είναι διαφορετικό το προϊόν της αντίδρασης. Συγκεκριμένα στα ζώα στα οποία έχει γίνει ο ανασυνδυασμός και έχει διαγραφεί τόσο το κρίσιμο εξώνιο όσο και η εξωγενής περιοχή που είχε εισαχθεί στο γονίδιο, το ζεύγος εκκινητών 804-805 δεν αναμένεται να δώσει προϊόν μετά την PCR, γιατί ο ανάστροφος εκκινητής (805), προσδένεται σε συνθετική περιοχή, η οποία στο tm1d αλληλόμορφο απουσιάζει. Το ζεύγος εκκινητών 804-806,

προσδένονται στον 5' και 3' βραχίονα ομολογίας αντίστοιχα, και δίνουν μετά την ηλεκτροφόρηση προϊόν 550 ζευγών βάσεων (πίνακας 3.8 και σχήμα 3.3).



**Σχήμα 3.13: Εικόνα ηλεκτροφόρησης των SH3PXD2A tm1d ανασυνδυασμένων ποντικών.**

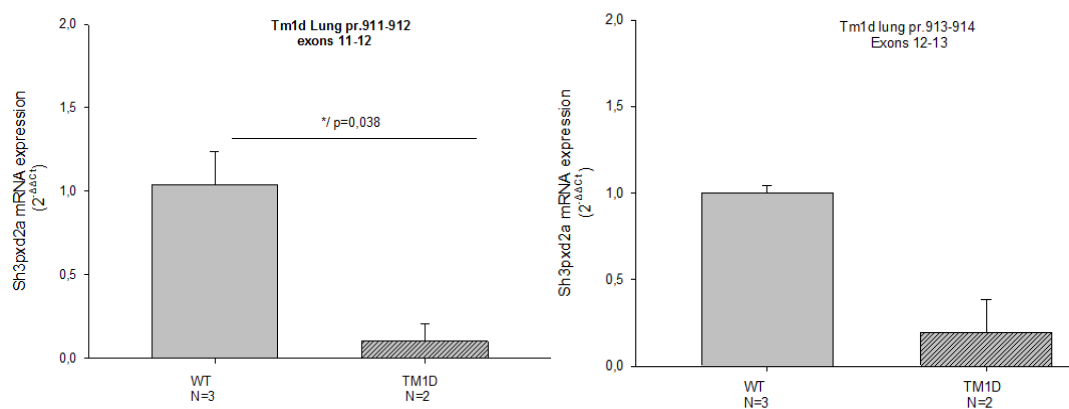
Μετά την επαλήθευσή μέσω γονοτύπησης των tm1d ποντικών στα οποία έχει διαγραφεί το εξώνιο 11 αλλά και το γονίδιο LacZ (πλήρη knockout), απομονώθηκε RNA και πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου σε ιστούς πνεύμονα και ήπατος, όπως συνέβη και στα ποντίκια που φέρουν το tm1b αλληλόμορφο. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με βάση την συγκριτική μέθοδο Ct (ή ΔCt).

Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν και στην ποσοτικοποίηση έκφρασης των ποντικών που φέρουν το tm1b αλληλόμορφο (σχήμα 3.8-πίνακας 3.7). Η κανονικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου έγινε χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς το B2M.

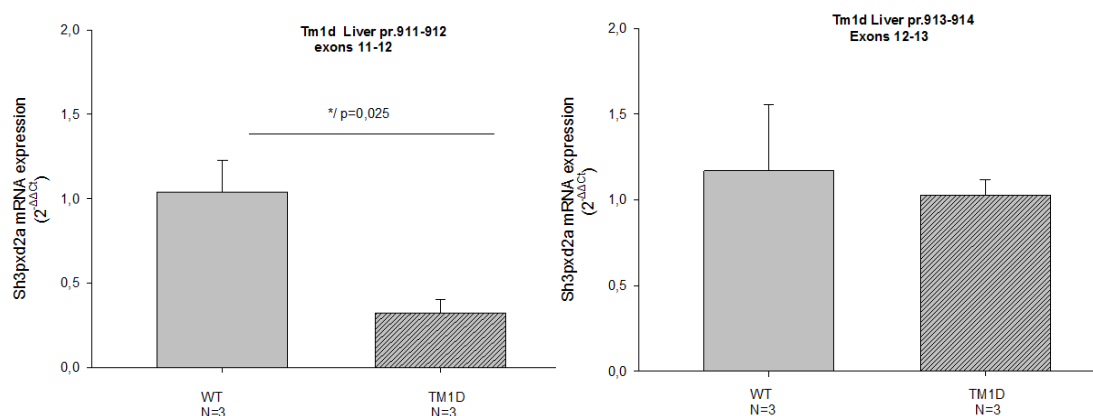
Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε 3 ποντίκια άγριου τύπου και 3 ποντίκια με γονότυπο *Sh3pxd2a*<sup>tm1d+/-</sup>, σε ιστούς πνεύμονα και ήπατος. Από όλα τα ποντίκια απομονώθηκαν ιστοί και για μελέτη ιστολογίας, ώστε να ολοκληρωθεί η φαινοτυπική τους ανάλυση.



A/.



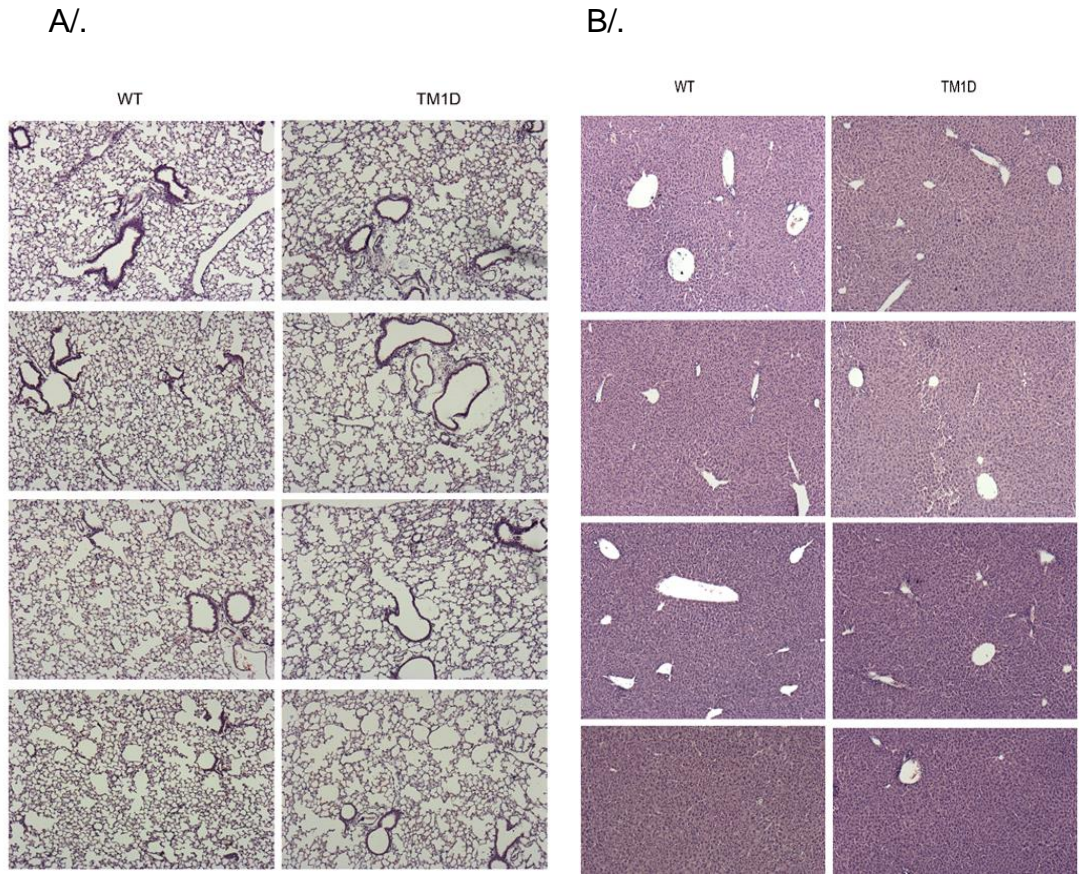
B/.



**Σχήμα 3.14: Ποσοτικοποίηση έκφρασης του γονιδίου SHh3pxd2a σε tm1d ποντίκια A) σε ιστό πνεύμονα, B) σε ιστό ήπατος.**

Όπως φαίνεται και από το σχήμα 3.14, η έκφραση του γονιδίου SH3PXD2A είναι μειωμένη στα ετερόζυγα tm1d knockout ποντίκια σε σχέση με τα ποντίκια άγριου τύπου (WT).

Στους ιστούς που απομονώθηκαν για ιστολογική μελέτη, πραγματοποιήθηκε χρώση αιματοξυλίνης- ηωσίνης. (σχήμα 3.15). Από τις φωτογραφίες που τραβήχτηκαν δεν εντοπίζονται σημαντικές διαφορές στους ιστούς που προέρχονται από ετερόζυγα knockout ποντίκια σε σχέση με τους ιστούς των ποντικίων άγριου τύπου.

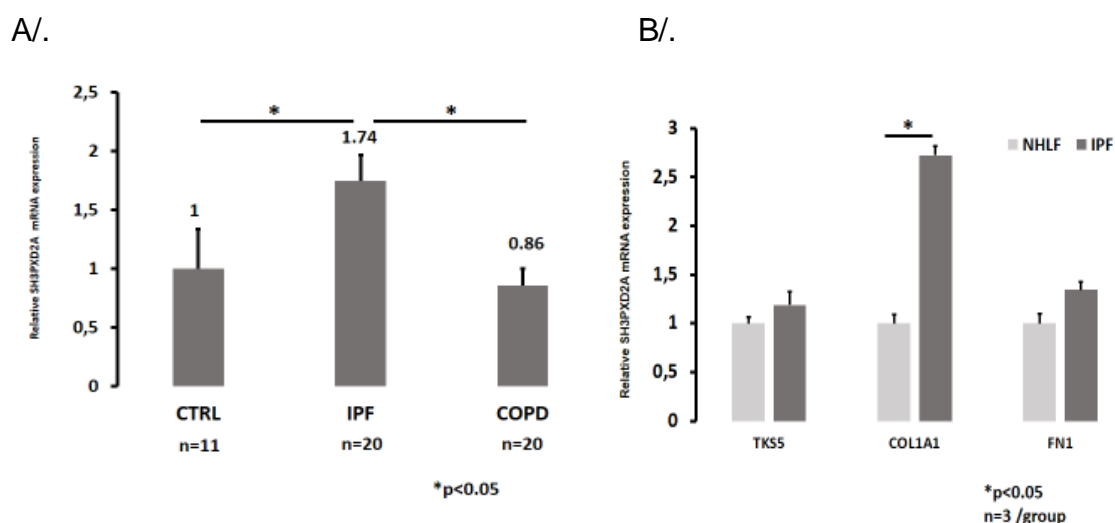


**Σχήμα 3.15: Φωτογραφίες από τομές Α)πνεύμονα Β) ήπατος μετά από χρώση αιματοξυλίνης -ηωσίνης σε ιστούς ποντικών tm1d και άγριου τύπου (20x μεγέθυνση).**

### 3.2 Εξέταση του ρόλου του γονιδίου SH3PXD2A στην παθογένεια της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης.

Από την διεξοδική ανάλυση όλων των διαθέσιμων πειραματικών δεδομένων που υπάρχουν στη δημοσιευμένη βιβλιογραφία και σχετίζονται με απορυθμισμένη έκφραση σε ασθενείς με IPF αλλά και σε ζωικά μοντέλα, προέκυψαν πολλά γονίδια των οποίων η έκφραση αυξάνεται στην ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση. Ένα από τα γονίδια αυτά είναι και το γονίδιο SH3PXD2A.

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου SH3PXD2A σε ασθενείς που πάσχουν από ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση και από χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (COPD-chronic obstructive pulmonary disease). Επίσης μελετήθηκε η έκφραση του γονιδίου σε ινοβλάστες ασθενών με IPF και συγκρίθηκε με την έκφραση ανθρώπινων πνευμονικών ινοβλαστών ελέγχου (σχήμα 3.16).

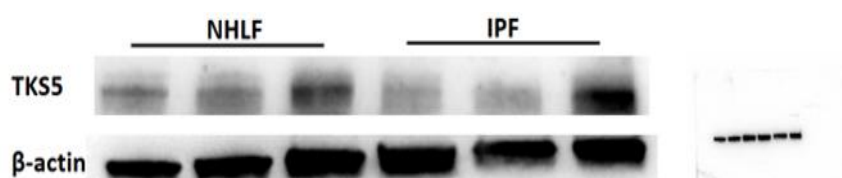


**Σχήμα 3.16 :** Ποσοτικοποίηση έκφρασης του γονιδίου SH3PXD2A σε A) σε ασθενείς με IPF και COPD, B) σε πνευμονικούς ινοβλάστες ασθενών με IPF.

Από το σχήμα 3.16 A/. φαίνεται ότι η έκφραση του γονιδίου SH3PXD2A αυξάνεται σημαντικά σε ασθενείς με ίνωση, συγκριτικά με ασθενείς που πάσχουν από COPD και με φυσιολογικούς ασθενείς. Δεν ισχύει το ίδιο και για τους πνευμονικούς ινοβλάστες, όπου δεν παρατηρείται ιδιαίτερη διαφορά στην έκφραση του γονιδίου μεταξύ ασθενών και υγείων ατόμων (3.16 B/.) Στο σχήμα

φαίνονται επίσης τα επίπεδα έκφρασης του κολλαγόνου 1 και της φιβρονεκτίνης 1, γονίδια που αποτελούν δείκτες της ίνωσης.

Στην συνέχεια μελετήθηκε η έκφραση σε επίπεδο πρωτεΐνης, μέσω ανάλυσης Western σε ινοβλάστες ασθενών με IPF και σε φυσιολογικούς ανθρώπινους πνευμονικούς ινοβλάστες. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι δεν υπάρχει διαφορά στο επίπεδο έκφρασης της πρωτεΐνης (σχήμα 3.17).



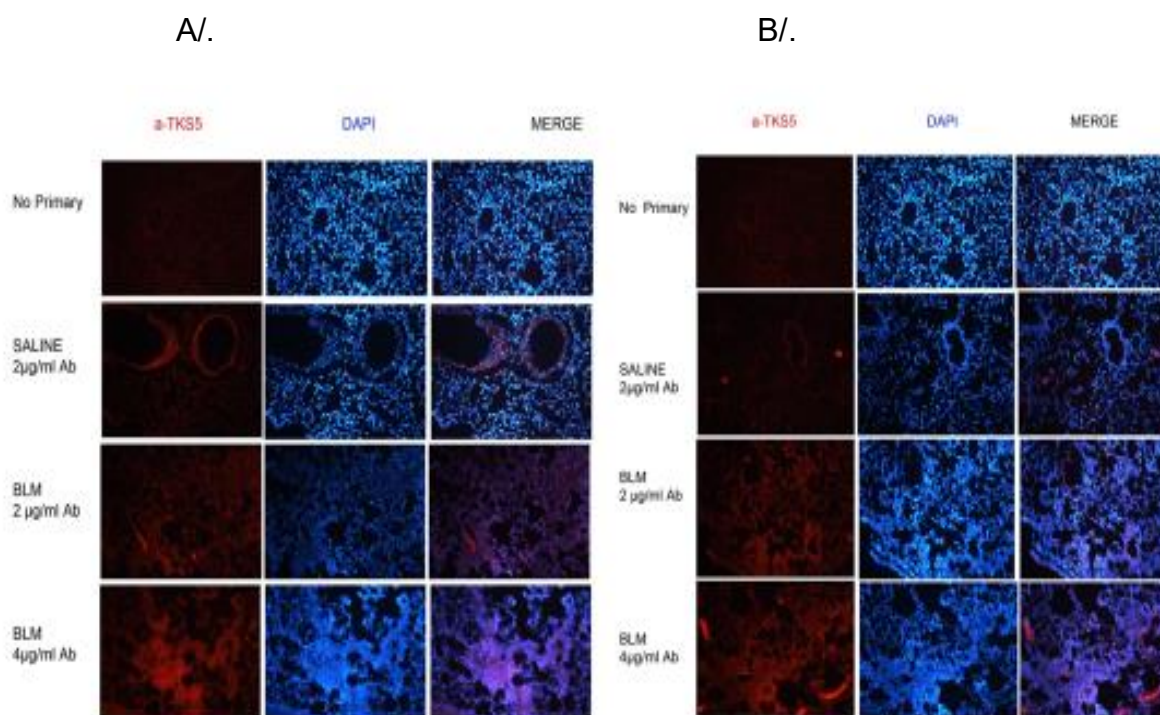
**Σχήμα 3.17:** Ανάλυση επιπέδου έκφρασης της πρωτεΐνης TKS5 σε πνευμονικούς ινοβλάστες ασθενών με IPF σε σύγκριση με ινοβλάστες που προέρχονται από υγιή άτομα.

Τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν μέρος της εργασίας του μεταδιδακτορικού ερευνητή του εργαστηρίου κύριου Αργύρη Τζουβελέκη, η οποία εκπονήθηκε στο πανεπιστήμιο Yale των Ηνωμένων Πολιτειών. Βασιζόμενοι στα στοιχεία της βιβλιογραφίας και στα παραπάνω αποτελέσματα, ασχοληθήκαμε πιο διεξοδικά με την εξέταση του ρόλου του γονιδίου στην πνευμονική ίνωση.

### **3.2.1 Χρώση ανοσοφθορισμού σε ιστούς και σε πρωτογενείς ινοβλάστες πνεύμονα.**

Η μέθοδος του ανοσοφθορισμού επιτρέπει την ανίχνευση ενός αντιγόνου ή ενός αντισώματος και τον εντοπισμό της θέσης του σε κυτταρικό και υποκυτταρικό επίπεδο αλλά και σε επίπεδο ιστών. Στηρίζεται στη χρήση ιχνηθετημένων με φθορίζουσες ουσίες δευτερογενών αντισωμάτων τα οποία αναγνωρίζουν και προσδένονται στη σταθερή περιοχή των πρωτογενών αντισωμάτων που χρησιμοποιούνται για τη δέσμευση του επιθυμητού αντιγόνου.

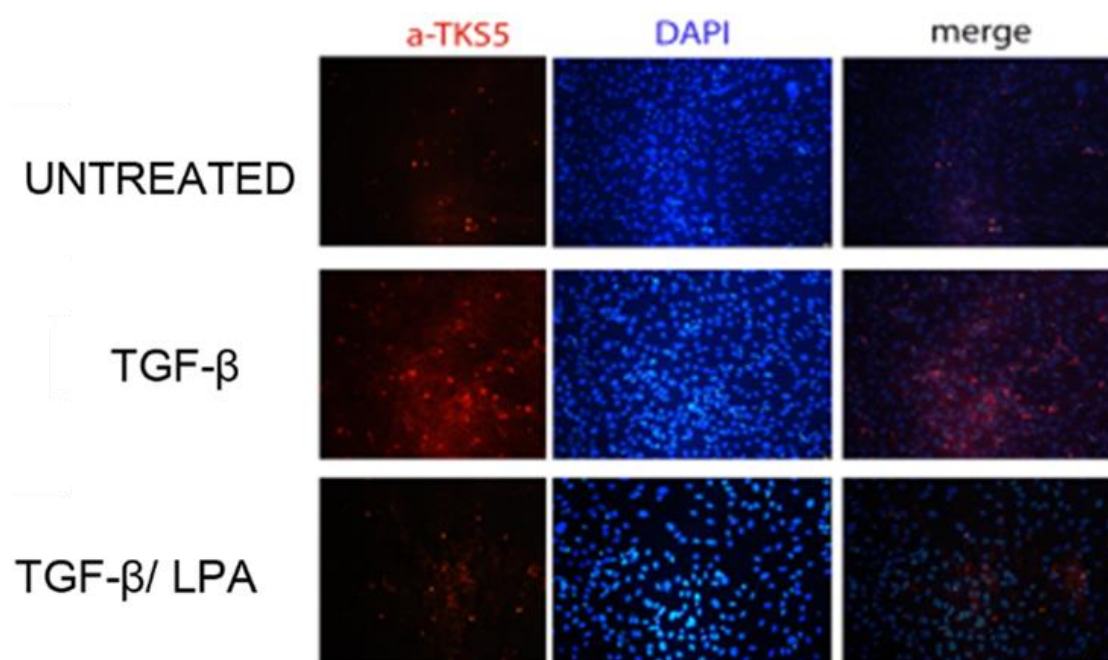
Αρχικά, πραγματοποιήθηκε χρώση ανοσοφθορισμού σε τομές πνευμόνων, που προέρχονται από C57Bl/6 ποντίκια στα οποία έχει εφαρμοστεί το μοντέλο της μπλεομυκίνης, ώστε να πραγματοποιηθεί ποιοτική μελέτη έκφρασης του γονιδίου *Sh3pxd2a*. Σαν αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ιστός στον οποίο δεν είχε προστεθεί πρώτο αντίσωμα έναντι του γονιδίου, ενώ σαν δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε ιστός από πνεύμονα ποντικού, στον οποίο χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός. Το αντίσωμα στα δείγματα τις ίνωσης, χρησιμοποιήθηκε σε δύο συγκεντρώσεις, 2 και 4  $\mu\text{g/ml}$ . Το πείραμα πραγματοποιήθηκε δυο φορές. Στο σχήμα 3.18 αναπαριστούνται ενδεικτικές φωτογραφίες.



**Σχήμα 3.18: Ποιοτικός προσδιορισμός έκφρασης του γονιδίου *Sh3pxd2a* σε τομές πνεύμονα με την χρήση ανοσοφθορισμού( 20x μεγέθυνση).**

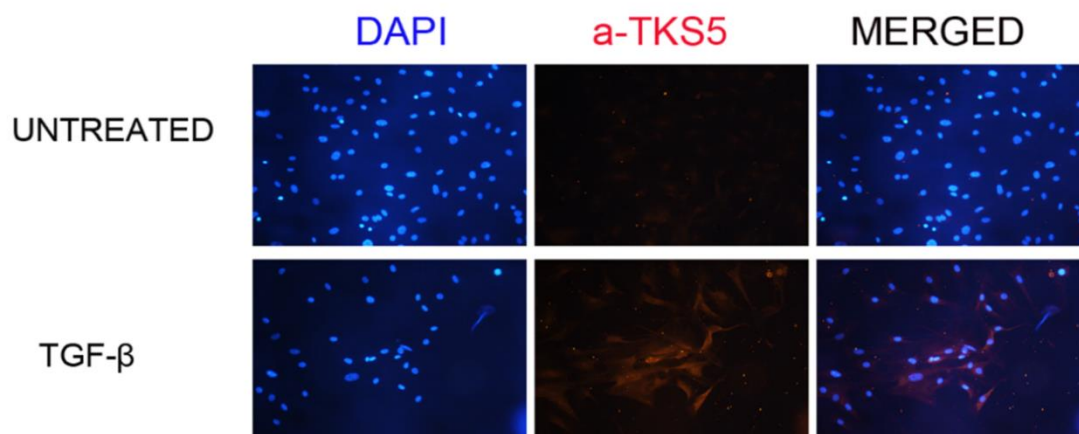
Όπως φαίνεται και από το σχήμα 3.18, η έκφραση του γονιδίου *Sh3pxd2a* είναι ιδιαίτερα αυξημένη στους ιστούς οι οποίοι προέρχονται από ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε μπλεομυκίνη σε σχέση με τους ιστούς των ποντικών ελέγχου (τα οποία έλαβαν φυσιολογικό όρο). Μάλιστα αυξημένη έκφραση παρατηρείται κυρίως στις ινωτικές περιοχές που σχηματίζονται στους πνεύμονες των ποντικών που αναπαριστούν την ασθένεια.

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε χρώση ανοσοφθορισμού σε πρωτογενείς ινοβλάστες ποντικών C57Bl/6, οι οποίοι επώαστηκαν για 24 ώρες στον προϊνώτικο παράγοντα TGF- $\beta$  (1ng/ml) παρουσία ή απουσία του παράγοντα LPA (10 $\mu$ M), για να διαπιστώσουμε αν οι συγκεκριμένοι πρωϊνωτικοί παράγοντες επάγουν την έκφραση του γονιδίου SH3PXD2A. Σαν δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ινοβλάστες στους οποίους δεν προστέθηκε κάποιος παράγοντας ανάπτυξης (untreated). Στο σχήμα 3.19 φαίνονται ενδεικτικές φωτογραφίες.



**Σχήμα 3.19: Ποιοτικός προσδιορισμός έκφρασης του γονιδίου Sh3pxd2a σε πρωτογενείς ινοβλάστες στους οποίους έχει προστεθεί ο πρωϊνωτικός παράγοντας TGF- $\beta$ , παρουσία και απουσία του προϊνώτικού παράγοντα LPA, με την χρήση ανοσοφθορισμού( 20x μεγέθυνση).**

Από το σχήμα 3.19 φαίνεται ότι ο παράγοντας TGF- $\beta$  επάγει την έκφραση του γονιδίου Sh3pxd2a σε πρωτογενείς πνευμονικούς ινοβλάστες. Η επώαση των ινοβλαστών και με τους δύο παράγοντες (TGF- $\beta$ / LPA) δεν φαίνεται να αυξάνει περισσότερο την έκφραση του γονιδίου, οπότε συμπεραίνουμε ότι δεν υπάρχει συνέργεια των δυο παραγόντων. Με βάση αυτό το δεδομένο το πείραμα πραγματοποιήθηκε δεύτερη φορά, με προσθήκη μόνο TGF- $\beta$  και επαληθεύτηκε το παραπάνω αποτέλεσμα (σχήμα 3.20).



**Σχήμα 3.20:** Ποιοτικός προσδιορισμός έκφρασης του γονιδίου *Sh3rxd2a* σε πρωτογενείς ινοβλάστες στους οποίους έχει προστεθεί ο παράγοντας TGF- $\beta$ , με την χρήση ανοσοφθορισμού( 20x μεγέθυνση).

### 3.2.2 Ποσοτικοποίηση έκφρασης του γονιδίου *Sh3rxd2a* σε δείγματα ποντικών στα οποία έχει εφαρμοστεί το μοντέλο της μπλεομυκίνης.

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης του γονιδίου *Sh3rxd2a* σε δείγματα ποντικών C57Bl/6 στα οποία έχει εφαρμοστεί το μοντέλο της μπλεομυκίνης. Τα δείγματα αυτά, υπάρχουν στο εργαστήριο σαν δείγματα ελέγχου και χρησιμοποιούνται για ποσοτικοποίηση της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στην παθογένεια της πνευμονικής ίνωσης.

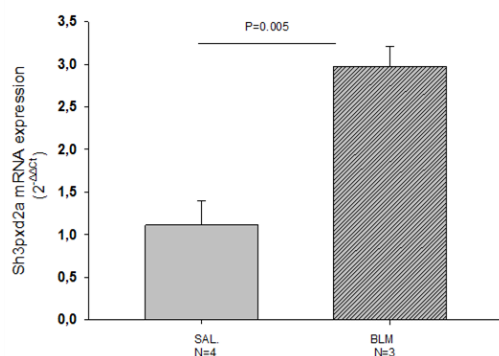
Αρχικά μελετήθηκαν δείγματα τα οποία προέρχονται από ζώα που θυσιάστηκαν την 14η ημέρα, ενώ στην συνέχεια μελετήθηκαν δείγματα ζώων που θυσιάστηκαν σε διαφορετικές χρονικές φάσεις της ίνωσης. Οι χρονικές στιγμές που πραγματοποιήθηκε ή ευθανασία των ζώων, αν μέρα 0 θεωρηθεί η μέρα χορήγησης της μπλεομυκίνης, ήταν την 3<sup>η</sup> ημέρα στην οποία αρχίζει να δημιουργείται η φλεγμονή, την 7<sup>η</sup> ημέρα κατά την οποία ξεκινά η ίνωση και την 14<sup>η</sup> ημέρα στην οποία το ποντίκι αναπαριστά πλήρως την πνευμονική ίνωση. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, σχεδιάστηκαν και επαληθεύτηκαν με το

πρόγραμμα Primer Blast, και από το πρόγραμμα Vector NTI, διαπιστώθηκε ότι ανιχνεύουν την πλήρη ισομορφή του γονιδίου. Συγκεκριμένα ο πρόσθιος εκκινητής προσδένεται στο εξώνιο 1 και ο ανάστροφος στο εξώνιο 3, που υπάρχουν μόνο στην πλήρη ισομορφή. Σαν γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το B2M. Οι αλληλουχίες των δυο εκκινητών φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 3.10).

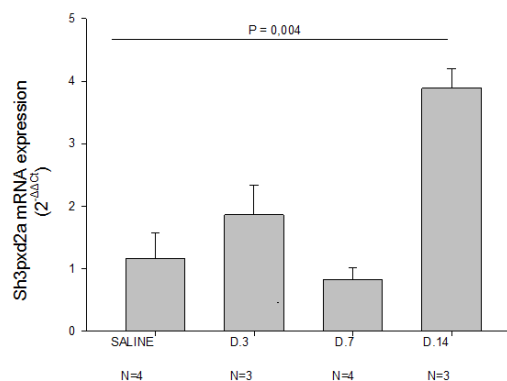
**Πίνακας 3.10: Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην ποσοτικοποίηση έκφρασης του γονιδίου SH3PXD2A σε δείγματα C57Bl/6 ποντικών στα οποία έχει εφαρμοστεί το μοντέλο της μπλεομυκίνης.**

Περιοχή πρόσδεσης	Εκκινητής	Αλληλουχία (5'-3')
Εξώνιο 3-4	733 (F)	GGAGCCCCTCTAAACACTATGT
	734(R)	GGCCACCTTCAATAGGAAACTT

A/.



B/.



**Σχήμα 3.21: Ποσοτικοποίηση έκφρασης του γονιδίου Sh3pxd2a σε C57Bl/6 ποντίκια στα οποία έχει εφαρμοστεί το μοντέλο της μπλεομυκίνης A) την 14<sup>η</sup> μέρα από την χορήγηση, B) σε 3 διαφορετικές χρονικές φάσεις κατά την διάρκεια εξέλιξης της νόσου.**

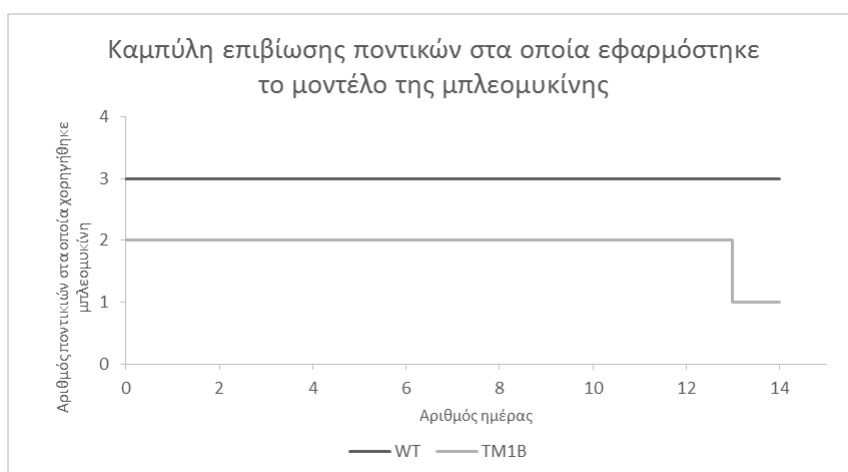
Τόσο στο σχήμα 3.21 A/ όσο και στο σχήμα 3.21 B/., η έκφραση του γονιδίου sh3pxd2a φαίνεται να αυξάνεται σημαντικά κατά την 14<sup>η</sup> ημέρα, ενώ στο σχήμα B/ φαίνεται ότι αυξάνεται η έκφραση του γονιδίου και κατά την 3<sup>η</sup> ημέρα. Το αποτέλεσμα αυτό επαληθεύεται με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, στην οποία αναφέρεται ότι η έκφραση του γονιδίου είναι αυξημένη σε περιπτώσεις ίνωσης.



### 3.2.3 Εφαρμογή του μοντέλου της μπλεομυκίνης σε ποντίκια με γονότυπο $Sh3rxd2a^{tm1b}(+/-)$ .

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε τρία ποντίκια άγριου τύπου (C57Bl/6) και σε δυο ποντίκια  $Sh3rxd2a^{tm1b}$  (+/-), τα οποία είναι ετερόζυγα knockout για το γονίδιο  $Sh3rxd2a$ . Τα ζώα που θυσιάστηκαν, ήταν ηλικίας 12 εβδομάδων περίπου και δεν χορηγήθηκε σε κάποιο φυσιολογικός ορός (saline), γιατί σκοπός του πειράματος ήταν η μελέτη της εξέλιξης της ασθένειας σε ποντίκια τα οποία έχουν αδρανοποιημένο το ένα από τα δύο αλληλόμορφα του γονιδίου, σε σχέση με ποντίκια άγριου τύπου. Η μπλεομυκίνη δόθηκε με ενιαίο ενδοτραχειακό τρόπο. Ορίστηκε ως μέρα 0 η ημέρα εισαγωγής της και τελικό σημείο η ημέρα 14, στην οποία θυσιάζονται τα ζώα.

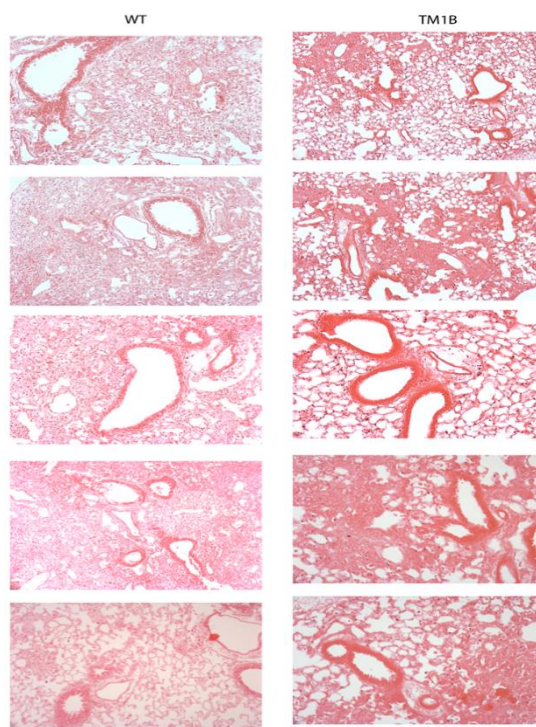
Για την αξιολόγηση της ίνωσης χρησιμοποιούνται αρκετές κοινές μέθοδοι. Οι πιο σημαντικές είναι: η ιστολογική ανάλυση, ο ποσοτικός προσδιορισμός του κολλαγόνου και των πρωτεϊνών από το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BALF) και ο συνολικός αριθμός κυττάρων στο BALF. Πρόσφατοι παράμετροι όπως το βάρος και ο χρόνος επιβίωσης αξιολογούνται επίσης.



**Σχήμα 3.22: Καμπύλη επιβίωσης των ποντικών στα οποία εφαρμόστηκε το μοντέλο της μπλεομυκίνης.**

Όπως φαίνεται και στο σχήμα 3.22, το ένα από τα δύο ποντίκια με γονότυπο  $Sh3rxd2a^{tm1b}$  (+/-), βρέθηκε νεκρό την 13<sup>η</sup> ημέρα πριν την πραγματοποίηση του πειράματος, πιθανόν λόγω της χορήγησης της μπλεομυκίνης.

Στα ζώα στα οποία μελετήθηκαν, πραγματοποιήθηκε ιστολογική παρατήρηση των πνευμονικών ιστών μετά από χρώση ηωσίνης, όπως παρουσιάζεται παρακάτω (σχήμα 3.23).

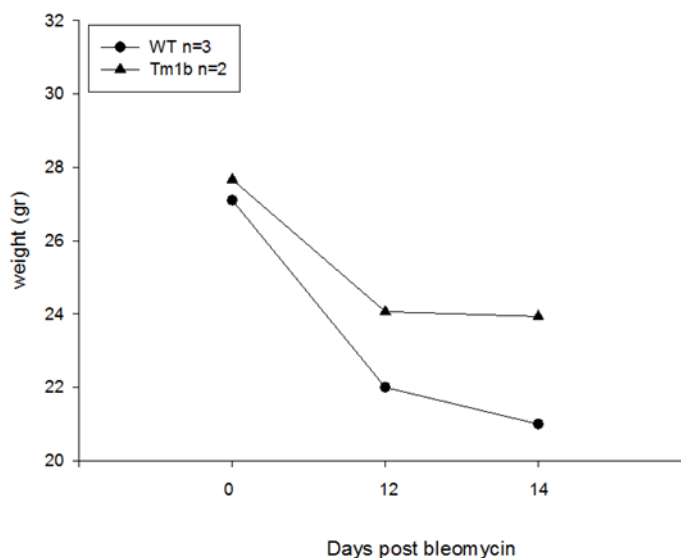


**Σχήμα 3.23: Φωτογραφίες από τομές πνεύμονα ποντικών στα οποία έχει χορηγηθεί μπλεομυκίνη, μετά από χρώση Ηωσίνης (10x μεγέθυνση).**

Στην φωτογραφία ενός φυσιολογικού πνευμονικού ιστού, απεικονίζονται οι βρόγχοι, το κυψελιδικό επιθήλιο και τα κυψελιδικά διαφράγματα, σε αντίθεση με έναν μη φυσιολογικό ινωτικό ιστό στον οποίο η αρχιτεκτονική του πνεύμονα είναι αλλοιωμένη. Χαρακτηριστικά ευρήματα των ινωτικών ιστών είναι η εναπόθεση κολλαγόνου στον ενδιάμεσο κυψελιδικό χώρο, η πάχυνση των κυψελιδικών διαφραγμάτων και η πλήρης απόφραξη τους από ινωτικές μάζες. Στο σχήμα 3.23 παρατηρούνται φωτογραφίες ινωτικών ιστών, οι οποίοι παρουσιάζουν τα παραπάνω ευρήματα. Στα ετερόζυγα *Sh3pxd2a tm1b* ποντίκια όμως παρατηρείται μεγαλύτερη πάχυνση των κυψελιδικών διαφραγμάτων και περισσότερες περιοχές με ινωτικές μάζες, ευρήματα που αποδεικνύουν ότι έχουν νοσήσει περισσότερο εξαιτίας της χορήγησης μπλεομυκίνης.

Η απώλεια βάρους είναι αποτέλεσμα της χορήγησης της μπλεομυκίνης και το αρχικό χαρακτηριστικό εξέλιξης της νόσου. Στο σχήμα 3.24 παρουσιάζεται το

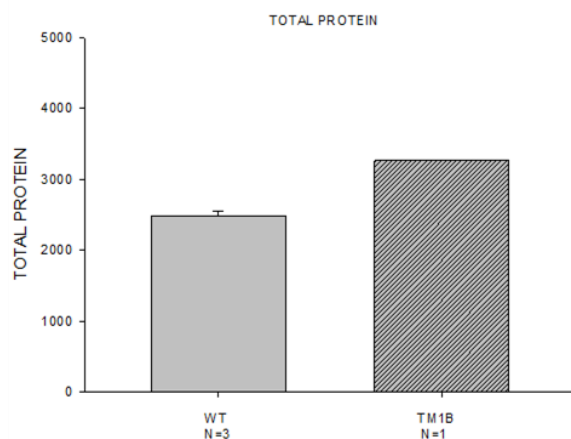
διάγραμμα απώλειας βάρους των ζώων στα οποία χορηγήθηκε μπλεομυκίνη. Το βάρος των ζώων μετρήθηκε την ημέρα χορήγησης, την 12η ημέρα, και την 14η ημέρα που τα ζώα θυσιάστηκαν. Και στις δυο ομάδες παρατηρείται απώλεια βάρους 10% περίπου ήδη από την 12η ημέρα.



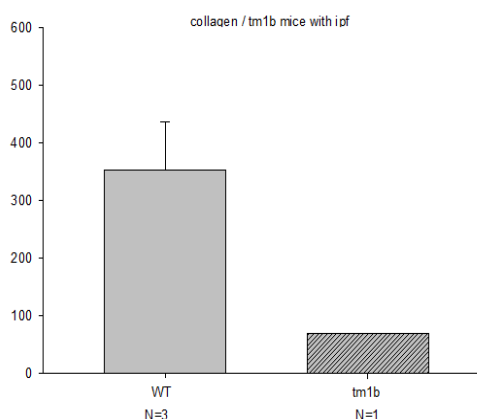
**Σχήμα 3.24: Διάγραμμα απώλειας βάρους μετά την 12<sup>η</sup> και την 14<sup>η</sup> ημέρα μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης.**

Στην συγκεκριμένη πειραματική ομάδα πραγματοποιήθηκε επίσης ποσοτικοποίηση της συνολικής πρωτεΐνης και του διαλυτού κολλαγόνου στο βρογχοκυψελιδικό υγρό πλύσης (BALF). Με την ποσοτικοποίηση της συνολικής πρωτεΐνης στο BALF, προσδιορίζεται το οίδημα που έχει δημιουργηθεί εξαιτίας της καταστροφής του πνευμονικού ιστού και της διαπερατότητας του πνευμονικού επιθηλίου. Η εναπόθεση διαλυτού κολλαγόνου από τους μυοϊνοβλάστες αποτελεί επίσης βασικό χαρακτηριστικό της πνευμονικής ίνωσης.

A/.



B/.

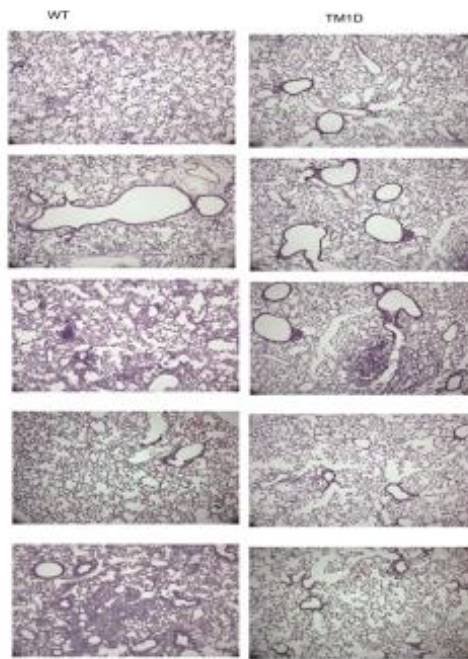


**Σχήμα 3.25: Ποσοτικός προσδιορισμός A) συνολικής πρωτεΐνης B) διαλυτού κολλαγόνου, στο βρογχοκυψελιδικό υγρό πλύσης (BALF).**

Όπως απεικονίζεται στο σχήμα 3.25 A/., η ποσότητα της συνολικής πρωτεΐνης φαίνεται να είναι περισσότερο αυξημένη στα ζώα τα οποία είναι ετερόζυγα knock-out σε σχέση με τα ζώα άγριου τύπου. Αντίθετά στο σχήμα 3.25 B/., φαίνεται πως στην ομάδα των ζώων άγριου τύπου υπάρχει μεγαλύτερη ποσότητα διαλυτού κολλαγόνου στο βρογχοκυψελιδικό υγρό.

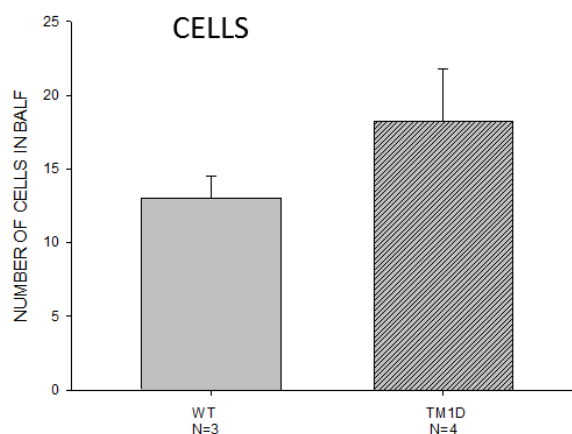
### **3.2.4 Εφαρμογή του μοντέλου της μπλεομυκίνης σε $Sh3rxd2a^{tm1d}(+/-)$ ετερόζυγα knock-out ποντίκια.**

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε συνολικά σε 4 ποντίκια με γονότυπο  $Sh3rxd2a^{tm1d}(+/-)$  και 3 ποντίκια άγριου τύπου, ηλικίας 10-12 εβδομάδων στα οποία χορηγήθηκε μπλεομυκίνη και θυσιάστηκαν την 14<sup>η</sup> ημέρα. Πραγματοποιήθηκε ιστολογική παρατήρηση των πνευμονικών ιστών, μετά από χρώση αιματοξυλίνης- ηωσίνης, όπως παρουσιάζεται παρακάτω (σχήμα 3.26).



**Σχήμα 3.26:** Φωτογραφίες από τομές πνεύμονα ποντικών στα οποία έχει χορηγηθεί μπλεομυκίνη, μετά από χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης (10x μεγέθυνση).

Στις παραπάνω φωτογραφίες φαίνονται μικρές ινωτικές περιοχές και στις δυο πειραματικές ομάδες ενώ στα ποντίκια  $Sh3rxd2a^{tm1d}$  (+/-), εμφανίζεται ελαφρώς μεγαλύτερη πάχυνση των κυψελιδικών διαφραγμάτων.

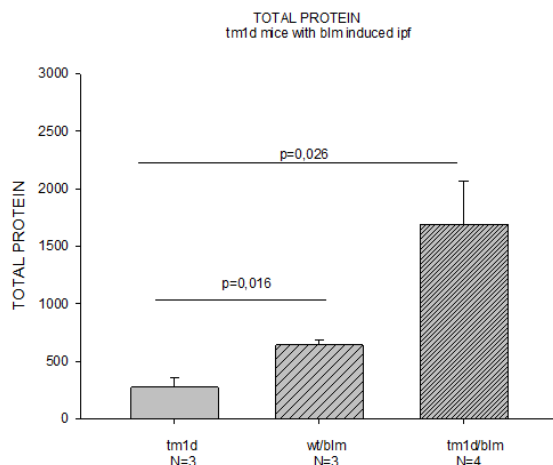


**Σχήμα 3.27:** Μέτρηση κυττάρων στο βρογχοκυψελιδικό υγρό πλύσης (BALF).

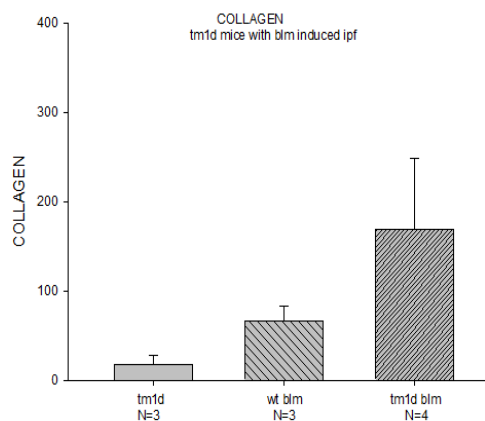
Στο σχήμα 3.27 παρουσιάζεται η μέτρηση των συνολικών κυττάρων στο συνολικό βρογχοκυψελιδικό υγρό πλύσης και των δυο ομάδων. Η ποσότητα των κυττάρων είναι μια αρχική ένδειξη της παθογένειας της πνευμονικής ίνωσης γιατί, σύμφωνα με τον μηχανισμό της ασθένειας, στα πρώτα στάδια της

ινωτικής απόκρισης γίνεται η πρόσληψη των φλεγμονωδών κυττάρων (π.χ. ουδετερόφιλων, μακροφάγων, λεμφοκυττάρων ηωσινόφιλων). Τα ετερόζυγα κnockout ποντίκια εμφανίζουν αυξημένο αριθμό κυττάρων στο BALF.

A/.



B/.



**Σχήμα 3.28: Ποσοτικός προσδιορισμός Α) συνολικής πρωτεΐνης Β) διαλυτού κολλαγόνου, στο βρογχοκυψελιδικό υγρό πλύσης (BALF).**

Στον ποσοτικό προσδιορισμό της συνολικής πρωτεΐνης και του διαλυτού κολλαγόνου, χρησιμοποιήθηκαν σαν ομάδα ελέγχου τρία ποντίκια  $Sh3rxd2a^{tm1d}$  (+/-), στα οποία δεν είχε χορηγηθεί μπλεομυκίνη. Όπως φαίνεται στο σχήμα 3.28, τόσο η ποσότητα της συνολικής πρωτεΐνης όσο και η ποσότητα του διαλυτού κολλαγόνου στις ομάδες των ζώων που έχει χορηγηθεί μπλεομυκίνη είναι αρκετά μεγαλύτερη από τις ομάδες ελέγχου. Από το σχήμα προκύπτει επίσης ότι, τα ετερόζυγα tm1d κnockout ζώα στα οποία χορηγήθηκε μπλεομυκίνη έχουν πιο αυξημένη ποσότητα πρωτεΐνης και κολλαγόνου από τα ζώα φυσικού τύπου τα οποία επίσης έχουν λάβει μπλεομυκίνη.

### **3.3 Ποσοτικοποίηση έκφρασης του γονιδίου SH3PXD2A σε περιπτώσεις καρκίνου του πνεύμονα.**

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι μια ασθένεια που χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτη ανάπτυξη των κυττάρων στους ιστούς του πνεύμονα. Εάν δε θεραπευθεί, ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός μπορεί να εξαπλωθεί και πέραν του πνεύμονα, οδηγώντας σε μετάσταση σε κάποιο κοντινό ιστό και, τελικά, σε άλλα μέρη του σώματος. Οι περισσότεροι καρκίνοι που ξεκινούν στον πνεύμονα, γνωστοί ως πρωτογενείς καρκίνοι του πνεύμονα, είναι καρκινώματα που προέρχονται από επιθηλιακά κύτταρα. Οι κύριοι τύποι καρκίνου του πνεύμονα είναι το καρκίνωμα των μικρών κυττάρων του πνεύμονα (SCLC), και ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (NSCLC). Ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα, περιγράφει μια κατηγορία περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα στην οποία τα κύτταρα δεν χαρακτηρίζονται ως «μικρά» κατά τη μικροσκοπική εξέταση, σε αντίθεση με τον μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα. Οι 3 κύριοι ιστολογικοί τύποι του NSCLC είναι το πλακώδες καρκίνωμα, το αδενοκαρκίνωμα και το καρκίνωμα του πνεύμονα από μεγάλα κύτταρα.

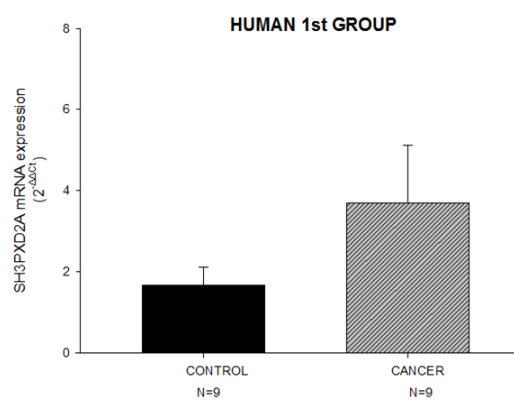
Πολλά άρθρα αναφέρουν πως το γονίδιο SH3PXD2A εμπλέκεται στην παθογένεια του καρκίνου. Η αυξημένη έκφραση του σχετίζεται τόσο με την μετάσταση όσο και με την κακή πρόγνωση των ασθενών. Με αφορμή τα ευρήματα της βιβλιογραφίας, μελετήσαμε την έκφραση του γονιδίου σε δείγματα ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.

Εξετάστηκαν δυο διαφορετικές ομάδες ασθενών. Μελετήθηκε ιστός που αποτελούσε τμήμα του όγκου και σαν δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε τμήμα που προέρχονταν από υγιή ιστό του πνεύμονα γειτονικό του όγκου. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σχεδιάστηκαν και επαληθεύτηκαν με το πρόγραμμα Primer Blast. Ο πρόσθιος εκκινητής προσδένεται στο εξώνιο 2 του γονιδίου SH3PXD2A και ο ανάστροφός στο εξώνιο 3. Σαν γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο ESD (esterase D). Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 3.11).

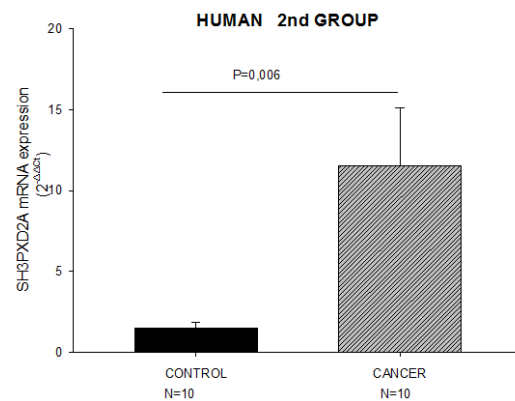
**Πίνακας 3.11: Αλληλουχίες εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν στην ποσοτικοποίηση έκφρασης του γονιδίου SH3PXD2A σε δείγματα ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα.**

Περιοχή πρόσδεσης	Εκκινήτης	Αλληλουχία (5'-3')
Εξώνιο 2-3 (γονίδιο h.SH3PXD2A)	807 (F)	TCTACCGGAGGTACAGCAAGTTCT
	808(R)	CTGCGGAAGAGGATCTTGCC
Γονίδιο ESD	821(F)	TGATCAAGGGAAAGATGACCA
	822(R)	AACCCTCTTGCAATCGAAAA

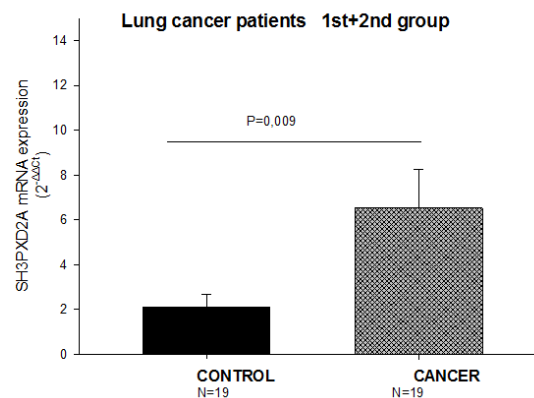
A/.



B/.



Γ)



**Σχήμα 3.29: Ποσοτικοποίηση έκφρασης του γονιδίου SH3PXD2A σε δείγματα ασθενών με καρκίνο πνεύμονα**



Όπως φαίνεται στο σχήμα 3.29 Α),Β) και οι δυο ομάδες ασθενών έχουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου SH3PXD2A. Στο σχήμα 3.29 Γ) απεικονίζεται το συνολικό διάγραμμα έκφρασης του γονιδίου SH3PXD2A, από το οποίο φαίνεται ότι τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αυξάνονται σημαντικά σε περιπτώσεις μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το γονίδιο SH3PXD2A κωδικοποιεί την πρωτεΐνη TKS5, η οποία είναι μια πρωτεΐνη προσαρμογέας, που λειτουργεί ως σκαλωσιά, δηλαδή συνδέεται και αλληλεπιδρά με διάφορες άλλες πρωτεΐνες, οι οποίες έτσι μπορούν να αλληλοεπιδράσουν μεταξύ τους. Το αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης συνήθως σχετίζεται με την προώθηση της κυτταρικής σηματοδότησης<sup>(5)</sup>. Επίσης, λειτουργεί και σαν υπόστρωμα Src κινάσης, η οποία μπορεί και να την φωσφορυλιώνει. Η πρωτεΐνη TKS5 εκφράζεται σε πολλούς τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων, των μυοϊνοβλαστών, των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας, των νευρώνων και των οστεοκλαστών. Η έκφραση της εντοπίζεται και σε πολλούς ιστούς συμπεριλαμβανομένου του πνεύμονα και του ήπατος<sup>(7)</sup>.

Ένας από τα σημαντικότερα μονοπάτια που έχει εμπλακεί η Tks5 είναι στο μονοπάτι σχηματισμού των podosomes και των invadopodia. Οι δομές αυτές είναι πλούσιες σε ακτίνη και συμβάλλουν στην στενή επαφή του κυττάρου με την εξωκυττάρια μήτρα, ενώ είναι σε θέση να αποδομούν τα συστατικά της ECM<sup>(6)</sup>. Τα podosomes εντοπίζονται κυρίως σε τύπους κυττάρων που εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση των ιστών και στην ανοσολογική επιτήρηση, ενώ η παρουσία των invadopodia συσχετίζεται με την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να εισβάλουν και να δημιουργούν μεταστάσεις<sup>(9)</sup>. Η πρωτεΐνη TKS5 εμπλέκεται στα δυο πρώτα στάδια σχηματισμού των invadosomes, δηλαδή στην έναρξη και στον σχηματισμό. Κατά την έναρξη του σχηματισμού, η αλληλεπίδραση της SRC κινάσης με παράγοντες ανάπτυξης όπως, ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (PDGF) και ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-β (TGFβ), οδηγεί στην απελευθέρωση της από δομές εστιακής προσκόλλησης. Η SRC κινάση στην συνέχεια δεσμεύεται και φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη TKS5, η οποία δρα σαν μόριο σκαλωσιά και προσλαμβάνει την cortactin, η οποία είναι απαραίτητη στον σχηματισμό των invadopodia. Στο στάδιο σχηματισμού, η TKS5 δεσμεύει τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες προσαρμογείς NCK1 και NCK2 και την πρωτεΐνη N-WASP. Επομένως, η

φωσφορυλίωση της TKS5, είναι ένα απαραίτητο βήμα για τον σχηματισμό των *invadopodia*<sup>(9)</sup>.

Η υποβοηθούμενη από τα *invadopodia* αποικοδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας, συμβάλει στην μετανάστευση των κυττάρων σε περιφερικούς ιστούς. Η εισβολή των κυττάρων μέσω των στρωμάτων ECM είναι ένα βασικό βήμα, για την ανάπτυξη φλεγμονής. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της φλεγμονής είναι ότι μπορεί να οδηγήσει σε ίνωση, όπως συμβαίνει και στην πνευμονική ίνωση.

Η πνευμονική ίνωση έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση φυσιολογικών κυττάρων με ινοβλάστες και τελικά την αντικατάσταση του φυσιολογικού από ουλώδη ιστό. Κεντρικό ρόλο στην παρεκκλίνουσα ινωτική απόκριση της πνευμονικής ίνωσης διαδραματίζει ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-β (TGFβ), μια ινωτική κυτοκίνη, η οποία συμβάλλει στην διαφοροποίηση του μυοϊνοβλάστη και στην υπερβολική εναπόθεση εξωκυττάριας μήτρας. Συγκεκριμένα επάγει την ενεργοποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων και του κολλαγόνου που παράγεται από τους μυοϊνοβλάστες<sup>(32,33)</sup>.

Η πρωτεΐνη TKS5 εμπλέκεται στην διαμόρφωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, που αποτελεί πρωταρχικό γεγονός στην κατευθυνόμενη από TGF / LPA διαφοροποίηση των ινοβλαστών πνεύμονα σε μυοϊνοβλάστες. Επιπλέον, αλληλεπιδρά *in vitro* και *in vivo* με αρκετά μέλη της οικογένειας μεταλλοπρωτεασών Adams, συμβάλλοντας έτσι στην ομοίωση της εξωκυττάριας μήτρας. Θεωρείται ότι η πρωτεΐνη TKS5 συμβάλλει στην ρύθμιση της TGF-β1 σηματοδότησης μέσω της Src κινάσης, οδηγώντας έτσι στην μετανάστευση των ινοβλαστών και στην εναπόθεση εξωκυττάριας μήτρας με τελικό αποτέλεσμα την πνευμονική ίνωση. Τέλος, η συμμετοχή της TKS5 τόσο στον σχηματισμό των *invadopodia* όσο και στην παραγωγή ενεργών ειδών οξυγόνου (ROS), αποδεικνύει πιθανή συμβολή της σε όλες τις φλεγμονώδεις πνευμονικές παθοφυσιολογικές καταστάσεις<sup>(9)</sup>.

Για να εξεταστεί διεξοδικότερα το γονίδιο ακολουθήσαμε το μοντέλο της EUCOMM<sup>(62)</sup>, και δημιουργήσαμε μέσω της μεθόδου της εξωσωματικής γονιμοποίησης ένα ποντίκι το οποίο φέρει το γενετικά τροποποιημένο «πρώτο

knockout» (tm1a) αλληλόμορφο για το γονίδιο SH3PXD2A. Με κατάλληλες διασταυρώσεις από το παραπάνω ποντίκι προέκυψαν ποντίκια που φέρουν αλληλόμορφα με το γονίδιο αναφοράς LacZ (tm1b), ποντίκια που φέρουν τα κατ'επιλογή αλληλόμορφα (tm1c) και ετερόζυγα knockout ποντίκια για το γονίδιο Sh3pxd2a (tm1d). Αφού επαληθεύτηκε ο σωστός ανασυνδυασμός και στα τέσσερα διαφορετικά γένη που προέκυψαν, πραγματοποιήθηκε πλήρης φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των ετερόζυγων knockout ποντικών (tm1b-tm1d). Επαληθεύτηκε μέσω της αντίδρασης της real time PCR ότι τόσο τα tm1b όσο και τα tm1d ποντίκια έχουν, όπως αναμένονταν, είχαν χαμηλότερη έκφραση του γονιδίου Sh3pxd2a. Στόχος του εργαστηρίου για αυτά τα ζώα, είναι η επέκταση της γενετικής σειράς και η κατάθεση τους στην EMMA, μετά τον πλήρη καθαρισμό του γενετικού υποβάθρου. Μελλοντικά, πρόκειται επίσης να διασταυρωθούν τα ετερόζυγα tm1d ποντίκια μεταξύ τους, ώστε να μελετηθεί αν και σε ποια αναλογία γεννιούνται ομόζυγα knockout ποντίκια για το γονίδιο Sh3pxd2a, με σκοπό να διερευνηθεί πιθανή εμπλοκή του γονιδίου στην εμβρυική ανάπτυξη.

Το δεύτερο σκέλος της εργασίας αφορούσε την μελέτη της εμπλοκής του γονιδίου στην παθογένεια της πνευμονικής ίνωσης. Αρχικά πραγματοποιήθηκε ποιοτικός προσδιορισμός της έκφρασης του γονιδίου τόσο σε ιστούς πνευμόνων ποντικών στα οποία είχε χορηγηθεί μπλεομυκίνη, όσο και σε κύτταρα ινοβλαστών τα οποία επώαστηκαν με TGF-β. Τα αποτελέσματα έδειξαν αυξημένη έκφραση του γονιδίου τόσο στους ινωτικούς ιστούς, όσο και στους ινοβλάστες που επώαστηκαν με TGF-β. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου σε δείγματα που προέρχονταν από WT ποντίκια στα οποία είχε χορηγηθεί μπλεομυκίνη, και παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του γονιδίου την 14<sup>η</sup> ημέρα μετά την χορήγηση της μπλεομυκίνης, όπου τα ποντίκια αναπαριστούν πλήρως την ανθρώπινη νόσο. Τα πειραματικά αποτελέσματα που προέκυψαν είναι σύμφωνα με υπολογιστικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο, και έδειχναν ότι η έκφραση του γονιδίου είναι αυξημένη σε ασθενείς με ίνωση. Τέλος πραγματοποιήθηκαν ορισμένα αρχικά πειράματα χορήγησης μπλεομυκίνης τόσο σε tm1b και σε tm1d ετερόζυγα knockout ποντίκια για το γονίδιο Sh3pxd2a, όσο και σε WT ποντίκια.

Οι περισσότερες μέθοδοι αξιολόγησης της ίνωσης (ιστολογία, βάρος, κύτταρα, ποσότητα συνολικής πρωτεΐνης, ποσότητα διαλυτού κολλαγόνου), έδειξαν ότι τα ποντίκια που ήταν ετερόζυγα knockout για το γονίδιο Sh3pxd2a, εμφάνισαν αυξημένη θνησιμότητα και τάση για επιδείνωση της νόσου σε σχέση με τα ποντίκια άγριου τύπου. Το γεγονός ότι τα ετερόζυγα knockout ποντίκια, εμφανίζουν χειρότερη παθογένεια, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το γονίδιο έχει πιθανόν προστατευτικό ρόλο στην ίνωση. Στα ποντίκια άγριου τύπου κατά την χορήγηση μπλεομυκίνης πιθανόν ενεργοποιούνται διάφοροι μηχανισμοί και ενώ αναμένονταν να έχουν χαμηλότερη έκφραση του γονιδίου σε σχέση με τα ποντίκια στα οποία δεν χορηγείται μπλεομυκίνη, στην προσπάθειά τους να επιβιώσουν αυξάνουν την έκφραση του γονιδίου χωρίς όμως να βελτιώνεται η ασθένεια. Σε κάθε περίπτωση τα πειράματα χορήγησης μπλεομυκίνης πρέπει να επαναληφθούν μελλοντικά και να πραγματοποιηθούν σε μεγαλύτερο αριθμό tm1d ποντικών, στα οποία να χορηγηθεί και φυσιολογικός ορός πέρα από μπλεομυκίνη, ώστε να μπορεί να εξαχθεί ένα πιο ασφαλές συμπέρασμα. Ενδιαφέρον θα ήταν επίσης, να μελετηθεί η έκφραση σε επίπεδο πρωτεΐνης, πραγματοποιώντας αναλύσεις Western Blot, τόσο σε δείγματα ασθενών όσο και σε δείγματα ποντικών στα οποία έχει χορηγηθεί μπλεομυκίνη.

Τέλος, με αφορμή την πρόσφατη δημοσίευση, στην οποία προτείνεται ότι η πρωτεΐνη TKS5 εμπλέκεται στην παθογένεια του καρκίνου του πνεύμονα<sup>(2)</sup>, πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου σε δείγματα ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Από τα αποτελέσματα επαληθεύτηκε η βιβλιογραφία, αφού παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του γονιδίου στα δείγματα που προέρχονταν από τον καρκινικό ιστό.

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

### Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

ADAM	A Disintegrin and Metalloproteinase	Δισιντεγκρίνη και μεταλλοπρωτεϊνάση
ADAM-12	A Disintegrin and Metalloproteinase 12	Δισιντεγκρίνη και μεταλλοπρωτεϊνάση-12
ADAM-19	A Disintegrin and Metalloproteinase 19	Δισιντεγκρίνη και μεταλλοπρωτεϊνάση-19
AFAP110	Actin filament-associated protein of 110 kDa	Πρωτεΐνη που σχετίζεται με τα ινίδια ακτίνης μεγέθους 110 kDa
ARP2/3 complex	Actin-Related Protein-2/3 complex	Σύμπλοκο πρωτεϊνών που σχετίζεται με την ακτίνη
BALF	Bronchoalveolar lavage Fluid	Βρογχοκυψελιδικό Υγρό πλύσης
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease	Χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια
Cortactin	Cortical Actin Binding Protein	Δεσμευτική πρωτεΐνη ακτίνης του φλοιού
Cre enzyme	Enzyme Causes recombination	Ένζυμο που προκαλεί ανασυνδυασμό
ECM	Extracellular Matrix	Εξωκυττάρια μήτρα
EGF	Epidermal Growth Factor	Επιδερμικός παράγοντας ανάπτυξης
EMMA	European Mouse Mutant Archive	Ευρωπαϊκός Σύλλογος κατάθεσης μεταλλαγμένων στελεχών ποντικών
ERK	Extracellular Signal-Regulated kinase	Κινάση ρύθμισης της εξωκυττάριας σηματοδότησης
ES cells	Embryonic stem cells	Εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα
EUCOMM	European Conditional Mouse Mutagenesis Program	Ευρωπαϊκό πρόγραμμα δημιουργίας κατά επιλογήν μεταλλαγμένων ποντικών
EMT	Epithelial to Mesenchymal transition	Επιθήλιο-μεσεγχυματική μετάβαση
FK	Focal Adhesions	Εστιακές Συμφύσεις
FRT	FLP Recognition Target	Θέση αναγνώρισης του ενζύμου FLP
FAK	Focal Adhesion Kinase	Κινάσης εστιακής προσκόλλησης
GBD domain	GTPase Binding domain	Περιοχή πρόσδεσης GTPασών
GRB2	Growth Factor receptor-Bound protein 2	Πρωτεΐνη δέσμευσης του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα-2
ICM	Inner cell mass	Εσωτερική κυτταρική μάζα
IKMC	International Knockout Mouse Consortium	Διεθνής κοινοπραξία Knockout ποντικών
IPF- ΙΠΙ	Idiopathic Pulmonary Fibrosis	Ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση
IVF	In vitro fertilization	Εξωσωματική γονιμοποίηση
KOMP	Knockout Mouse Project	Πρόγραμμα δημιουργίας Knockout ποντικών
LacZ gene	Bacterial beta-galactosidase gene	Γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη β-γαλακτοσιδάση

loxP	Locus of crossing over	Θέσεις διασταύρωσης- ανασυνδυασμού
LPA	Lysophosphatidic Acid	Λυσοφωσφατιδικό οξύ
MMP2	Matrix Metalloproteinase 2	Μεταλλοπρωτεϊνάση μήτρας 2
MMP9	Matrix Metalloproteinase 9	Μεταλλοπρωτεϊνάση μήτρας 9
MMPs	Matrix Metalloproteinases	Μεταλλοπρωτεϊνάσες μήτρας
MT1-MMP	Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase	Μεμβρανική μεταλλοπρωτεϊνάση μήτρας τύπου 1
MMP14	Matrix Metalloproteinase 14	Μεταλλοπρωτεϊνάση μήτρας 14
N- WASP	Neural Wiskott–Aldrich Syndrome protein	Πρωτεΐνη του συνδρόμου Wiskott–Aldrichπου εντοπίζεται στον νευρικό ιστό
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate – oxidase	Νικοτιναμιδο-αδενινο- δινουκλεοτίδιο φωσφορική οξειδάση
NCK1	Non-Catalytic region of Tyrosine Kinase adaptor protein 1	Πρωτεΐνη με μη καταλυτική περιοχή για τον προσαρμογέα κινάσης τυροσίνης-1
NCK2	Non-Catalytic region of Tyrosine Kinase adaptor protein 2	Πρωτεΐνη με μη καταλυτική περιοχή για τον προσαρμογέα κινάσης τυροσίνης-2
Neo <sub>r</sub> cassette	Neomycin resistance selection cassette	Κασέτα επιλογής κλώνων με ανθεκτικότητα στην νεομυκίνη
Neo <sub>r</sub> gene	Neomycin resistance gene	Γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην νεομυκίνη
NGS	Next Generation Sequencing	πρόγραμμα αλληλούχισης επόμενης γενιάς
NorCOMM	North American Conditional Mouse Mutagenesis Project	Πρόγραμμα δημιουργίας κατά επιλογήν μεταλλαγμένων ποντικών της Βόρειας Αμερικής
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer	Μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα
PAK	Serine/Threonine P21- Activating kinase	P21 ενεργοποιημένη κινάση
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor	Παράγοντας ανάπτυξης που προέρχεται από αιμοπετάλια
PI(3,4,5)P3	Phosphatidylinositol (3,4,5)- Trisphosphate	Τριφωσφορικό φωσφατιδυλ- ινοσιτολικό φωσφολιπίδιο
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase	Κινάση της τριφωσφορικής φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης
PKC	Protein kinase C	Πρωτεϊνική κινάση C
PtdIns(3,4)P2	Phosphatidylinositol (3,4)- Bisphosphate	Διφωσφορικό φωσφατιδυλ- ινοσιτολικό φωσφολιπίδιο
ROS	Reactive Oxygen species	Ενεργά είδη οξυγόνου
SCLC	Small Cell Lung Cancer	Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα
SH3 domain	Src Homology 3 domain	3 <sup>η</sup> Περιοχή ομολογίας Src

TGF	Transforming Growth Factor	Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού
TGFβ	Transforming Growth Factor β	Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού βήτα
TIGM	Texas A&M Institute for Genomic Medicine	Ινστιτούτο γονιδιωματικής ιατρικής του Τέξας
TK gene	Thymidine kinase gene	Γονίδιο που κωδικοποιεί την κινάση της θυμιδίνης
TKS4	Tyrosine Kinase Substrate With 4 SH3 Domains	Υπόστρωμα κινάσης τυροσίνης με 4 SH3 περιοχές
TKS5	Tyrosine Kinase Substrate With 5 SH3 Domains	Υπόστρωμα κινάσης τυροσίνης με 5 SH3 περιοχές
Tm1a allele	Targeted mutation 1aallele	Αλληλόμορφο που φέρει την στοχευμένη μετάλλαξη 1a
Tm1b allele	Targeted mutation 1ballele	Αλληλόμορφο που φέρει την στοχευμένη μετάλλαξη 1b
Tm1c allele	Targeted mutation 1callele	Αλληλόμορφο που φέρει την στοχευμένη μετάλλαξη 1c
Tm1d allele	Targeted mutation 1dallele	Αλληλόμορφο που φέρει την στοχευμένη μετάλλαξη 1d
UIP	Usual Interstitial Pneumonia	Συνήθης διάμεση πνευμονία
WASP	Wiskott–Aldrich Syndrome protein	Πρωτεΐνη του συνδρόμου Wiskott–Aldrich
WH1 domain	WASP-Homology-1 domain	1 <sup>η</sup> Περιοχή ομολογίας WASP
WIP	WASP-Interacting protein	Πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με την WASP



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ensembl.org, 2017. Ensembl genome browser 87. Available at:[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000107957;r=10:103594027103855543;t=ENST00000355946](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000107957;r=10:103594027103855543;t=ENST00000355946). [Τελευταία επίσκεψη: 13.2.2017].
2. Li, C., Chen, G., Dayton, T., Kim-Kiselak, C., Beer, D., Winslow, M. and Jacks T. Abstract C22: Differential Tks5 isoform expression contributes to metastatic invasion of lung adenocarcinoma. Cancer Research 2013, 73(19 Supplement), pp1557-167.
3. Cejudo-Martin, P., Yuen, A., Vlahovich, N., Lock, P., Courtneidge, S. and Diaz, B. Genetic Disruption of the Sh3pxd2a Gene Reveals an Essential Role in Mouse Development and the Existence of a Novel Isoform of Tks5. PLoS ONE 2014, 9(9),p1-13.
4. EMBL-EBI, I. (2017). InterPro protein sequence analysis & classification InterPro EMBL-EBI. Ebi.ac.uk. Available at: <http://www.ebi.ac.uk/interpro/> [Τελευταία επίσκεψη: 13.2. 2017].
5. Moodley, S., Hui Bai, X., Kapus, A., Yang, B. and Liu, M. XB130/Tks5 scaffold protein interaction regulates Src-mediated cell proliferation and survival. Molecular Biology of the Cell 2015 , 26(24), p.4492-4502,.
6. Courtneidge, S. Cell migration and invasion in human disease: the Tks adaptor proteins. Biochemical Society Transactions 2012, 40(1), pp.129-132.
7. Proteinatlas.org. 2017. The Human Protein Atlas. Available at: <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000107957SH3PXD2A/tissue#gene-information>, 2017 [Τελευταία επίσκεψη 9.2.2017].
8. Linder, S. Invadosomes at a glance. Journal of Cell Science 2009, 122(17), pp.3009-3013.
9. Murphy, D. and Courtneidge, S. The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. Nature Reviews Molecular Cell Biology 2011, 12(7), p.413-426.

10. Paz, H., Pathak, N. and Yang, J. Invading one step at a time: the role of invadopodia in tumor metastasis. *Oncogene* 2013 , 33(33), p.4193-4202.
11. Block, M. R. et al. Podosome-type adhesions and focal adhesions, so alike yet so different. *European Journal Cell Biology* 2008, 87, 491–506.
12. Bowden ET, Barth M, Thomas D, Glazer RI, Mueller SC. An invasion-related complex of cortactin, paxillin and PKC $\mu$  associates with invadopodia at sites of extracellular matrix degradation. *Oncogene* 1999, 18: 4440–4449.
13. Derry JM, Ochs HD, Francke U. Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell* 1994, 78(4): p635-44.
14. Kurisu S, Takenawa T. The WASP and WAVE family proteins. *Genome Biology* 2009, 10(6):226.
15. Takenawa T, Miki H. WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *Journal Cell Science* 2001,114 (Pt. 10):1801-1809.
16. Rohatgi R, Ma L, Miki H, Lopez M, Kirchhausen T, Takenawa T, Kirschner MW. The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* 1999, 97(2):221-231.
17. Linder, S. The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends in Cell Biology* 2007, 17(3), p.107-117.
18. Murphy, D., Diaz, B., Bromann, P., Tsai, J., Kawakami, Y., Maurer, J., Stewart, R., Izpisua-Belmonte, J. and Courtneidge, S. A Src-Tks5 Pathway Is Required for Neural Crest Cell Migration during Embryonic Development. *PLoS ONE* 2011, 6(7), p.e22499.
19. Stylli, S., Luwor, R., Kaye, A., I, S., Hovens, C. and Lock, P. Expression of the adaptor protein Tks5 in human cancer: Prognostic potential. *Oncology Reports* 2014, vol32, p989-1002.
20. Blouw, B., Patel, M., Iizuka, S., Abdullah, C., You, W., Huang, X., Li, J., Diaz, B., Stallcup, W. and Courtneidge, S. The Invadopodia Scaffold Protein Tks5 Is Required for the Growth of Human Breast Cancer Cells In Vitro and In Vivo. *Plos one* 2015, 10(3), p.e0121003.

21. Kinzler, K. and Vogelstein, B. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 1997, 386(6627), p.761-763.
22. Burger, K., Learman, B., Boucherle, A., Sirintrapun, S., Isom, S., Díaz, B., Courtneidge, S. and Seals, D. Src-dependent Tks5 phosphorylation regulates invadopodia-associated invasion in prostate cancer cells. *The Prostate* 2013, 74(2), p.134-148.
23. Wcrf.org. 2017. Lung cancer statistics | World Cancer Research Fund International. [online] Available at: <http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/data-specific-cancers/lung-cancer-statistics> [Τελευταία επίσκεψη: 13. 2.2017].
24. Cancer.org.2017. American Cancer Society | Information and Resources about for Cancer: Breast, Colon, Lung, Prostate, Skin. [online] Available at: <https://www.cancer.org/> [Τελευταία επίσκεψη: 13.2. 2017].
25. Seals DF, Azucena EF, Jr., Pass I, Tesfay L, Gordon R, Woodrow M, Resau JH and Courtneidge SA. The adaptor protein Tks5/Fish is required for podosome formation and function, and for the protease-driven invasion of cancer cells. *Cancer Cell* 2005; 7: p155-165.
26. Iizuka, S., Abdullah, C., Buschman, M., Diaz, B. and Courtneidge, S. The role of Tks adaptor proteins in invadopodia formation, growth and metastasis of melanoma. *Oncotarget* 2016, p1-14.
27. Stylli, S., I, S., Kaye, A. and Lock, P. Prognostic significance of Tks5 expression in gliomas. *Journal of Clinical Neuroscience* 2012, 19(3), p.436-442.
28. Mutsaers, S., Bishop, J., McGrouther, G. and Laurent, G. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 1997, 29(1), pp.5-17.
29. American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS), *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2000, 161(2), pp.646-664.
30. Liu JY, Brass DM, Hoyle GW, and Brody AR, TNF-alpha receptor knockout mice are protected from the fibroproliferative effects of inhaled

- asbestos fibers. *American Journal of Pathology* 1998, 153(6): p.1839-47.
31. Liu, J., Sime, P., Wu, T., Warshamana, G., Pociask, D., Tsai, S. and Brody, A. Transforming Growth Factor-  $\beta$  1 Overexpression in Tumor Necrosis Factor-  $\alpha$  Receptor Knockout Mice Induces Fibroproliferative Lung Disease. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2001, 25(1), pp.3-7.
  32. Wynn, T. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *The Journal of Experimental Medicine* 2011, 208(7), p.1339-1350.
  33. Wynn, T. and Ramalingam, T. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nature Medicine* 2012, 18(7), pp.1028-1040.
  34. Mouratis, M. and Aidinis, V. Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 2011, 17(5), pp.355-361.
  35. Fujita M, Shannon JM, Morikawa O, Gauldie J, Hara N, and Mason RJ, Overexpression of tumor necrosis factor-alpha diminishes pulmonary fibrosis induced by bleomycin or transforming growth factor-beta. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2003, 29(6): p. 669-76.
  36. Kuroki M, Noguchi Y, Shimono M, Tomono K, Tashiro T, Obata Y, Nakayama E, and Kohno S, Repression of bleomycin-induced pneumopathy by TNF. *The Journal of Immunology*, 2003 170(1): p. 567-574.
  37. Lundblad, L., Thompson-Figueroa, J., Leclair, T., Sullivan, M., Poynter, M., Irvin, C. and Bates, J. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Overexpression in Lung Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2005, 171(12), p.1363-1370.
  38. Miyazaki, Y., Araki, K., Vesin, C., Garcia, I., Kapanci, Y., Whitsett, J., Piguet, P. and Vassalli, P. Expression of a tumor necrosis factor-alpha transgene in murine lung causes lymphocytic and fibrosing alveolitis. A mouse model of progressive pulmonary fibrosis. *Journal of Clinical Investigation* 1995, 96(1), p.250-259.
  39. Sime PJ, Marr RA, Gauldie D, Xing Z, Hewlett BR, Graham FL, and Gauldie J, Transfer of tumor necrosis factor-alpha to rat lung induces

- severe pulmonary inflammation and patchy interstitial fibrogenesis with induction of transforming growth factor-beta 1 and myofibroblasts. *American Journal of Pathology* 1998, 153(3): p. 825-32.
40. Brinster R.L., Chen H. Y., Warren R., Sarthy A, Palmiter R.D., Regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion plasmids injected into mouse eggs *Nature* 1982, vol. 296 , p.39-42
  41. Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1980, 77:7380–7384.
  42. Costantini F, Lacy E. Introduction of a rabbit beta-globin gene into the mouse germ line. *Nature* 1981, 294:92–94.
  43. Brinster RL, Chen HY, Trumbauer M, Senear AW, Warren R, Palmiter RD. Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell* 199981. 27:223–231.
  44. Wagner, E., Stewart, T. and Mintz, B. The human beta-globin gene and a functional viral thymidine kinase gene in developing mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1981, 78(8), p.5016-5020.
  45. Harbers K, Jahner D, Jaenisch R. Microinjection of cloned retroviral genomes into mouse zygotes: integration and expression in the animal. *Nature*1981, 293: p540–542.
  46. Conlon, RA. *Animal Models of Dementia: Transgenic and Gene Targeted Models of Dementia*. Vol. 48. Springer Science and Business Media 2011; p. 77-90.
  47. Torres, R.M., et al., *In Laboratory protocols for conditional gene targeting*. Oxford University Press, New York 1997, p. 32-48.
  48. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981, 292:154–156.
  49. Martin G. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1981, 78:7634–7638.

50. Bouabe H., Okkenhaug K.. Gene Targeting in Mice: a Review. *Methods of Molecular Biology* 2013, 1064: p315–336. Doi: 10.1007/978-1-62703-601-6\_23.
51. Nagy, A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring *Genesis* 200, vol. 26, p99-109.
52. Abremski, K., and R. Hoess. Bacteriophage P1 site-specific recombination. *Journal of Biol. Chem.* 1984, 259: p1509–1514.
53. Guo, F., D. Gopaul, and G. Van Dyne. Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. *Nature* 1997 389: 40–46.
54. The Node - the community site for and by developmental biologists. (2017). [online] the Node. Available at: <http://thenode.biologists.com/flippase-recognition-target-orientation-matters-so-why-care/discussion/> [Τελευταία επίσκεψη: 5.2.2017].
55. Stricklett P.K., Nelson R.D. Kohan D.E. The Cre/loxP system and gene targeting in the kidney. *Am. J. Physiol.* 276 (Renal Physiol. 45) 1999: p. 651–657.
56. Sun Y., Chen, X. and Xiao D. Tetracycline-inducible Expression Systems: New Strategies and Practices in the Transgenic Mouse Modeling. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2007, 39(4), p.235-246.
57. Suckow MA, Danneman P, Brayton C. First Ed. In: Suckow MA, editor. *The Laboratory Mouse*. CRC Press. 2001, p. 1–5.
58. Capecchi MR. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nature Reviews Genetics* 2005, 6(6):507–12. Doi: 10.1038/nrg1619.
59. International Mouse Knockout Consortium, Collins FS, Rossant J, Wurst W. A mouse for all reasons. *Cell* 2007, 128(1):9–13. doi:10.1016/j.cell.2006.12.018.
60. Bradley A, Anastassiadis K, Ayadi A, Battey JF, Bell C, Birling MC, et al. The mammalian gene function resource: the international knockout mouse consortium. *Mamm Genome* 2012, 23(9–10):580–6. doi: 10.1007/s00335-012-9422.
61. Corrigendum: The European dimension for the mouse genome mutagenesis program. *Nature Genetics* 2004, 36(11), p.1238-1248.

62. Skarnes WC, Rosen B, West AP, Koutsourakis M, Bushell W, Iyer V, et al. A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature* 2011, 474(7351):337–42. doi:10.1038/nature10163.
63. Seymour PA, Sander M. Immunohistochemical detection of beta-galactosidase or green fluorescent protein on tissue sections. *Methods of Molecular Biology* 2007, 411: p13–23.
64. Crawley JN, Belknap JK, Collins A, Crabbe JC, Frankel W, Henderson N, et al. Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology* 1997, 132(2):107–24. doi:10.1007/s002130050327.
65. Pettitt SJ, Liang Q, Rairdan XY, Moran JL, Prosser HM, Beier DR, et al. Agouti C57BL/6N embryonic stem cells for mouse genetic resources. *Nature Methods* 2009, 6(7):493–5. doi:10.1038/nmeth.1342.
66. Coleman, J., Brennan, K., Ngo, T., Balaji, P., Graham, R. and Smith, N. Rapid Knockout and Reporter Mouse Line Generation and Breeding Colony Establishment Using EUCOMM Conditional-Ready Embryonic Stem Cells: A Case Study. *Frontiers in Endocrinology* 2015, 6, p 1-13.
67. Barnes, W. The fidelity of Taq polymerase catalyzing PCR is improved by an N-terminal deletion. *Gene* 1992, 112, p 29–35.
68. Jia, H., Guo, Y., Zhao, W. and Wang, K. Long-range PCR in next-generation sequencing: comparison of six enzymes and evaluation on the MiSeq sequencer. *Scientific Reports* 2014, 4 p.1-8.
69. Terblanche, J. and Hickman, R. Animal models of fulminant hepatic failure. *Digestive Diseases and Sciences* 1991, 36(6), pp.770-774.
70. Icen, A. and Huovinen, J. The effect of acute carbon tetrachloride poisoning on the sulfhydryl content of rat liver, kidney and blood. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica* 2009, 47(3), p.297-303.
71. Oikawa, T., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Uehara, S., Udagawa, N., Saya, H. and Matsuo, K. Tks5-dependent formation of circumferential podosomes/invadopodia mediates cell–cell fusion. *The Journal of Cell Biology* 2012, 197(4), pp.553-568.

72. Laumet, G., Petitprez, V., Sillaire, A., Ayrat, A., Hansmannel, F., Chapuis, J., Hannequin, D., Pasquier, F., Scarpini, E., Galimberti, D., Lendon, C., Campion, D., Amouyel, P. and Lambert, J. A study of the association between the ADAM12 and SH3PXD2A (SH3MD1) genes and Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters* 2010, 468(1), p.1-2.