



ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΕΘΝΙΚΟ &
ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝ/ΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ



Καθ. Βασίλειος Γ. Γοργούλης, MD, PhD
(Επιβλέπων)

Εργαστήριο Ιστολογίας-Εμβρυολογίας
Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Καθ. Ακαδημαϊκός Δημήτριος Θάνος, PhD
(Επιστημονικός Υπεύθυνος)

Πρόεδρος Επιστημονικού Συμβουλίου
Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**<<ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΚΗ
ΜΟΛΥΝΣΗ>>**

Σπύρος Φουταδάκης, M.Sc.

Αθήνα

2020

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	2
SUMMARY	4
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης	6
Η ρύθμιση της μεταγραφής	6
Μεταγραφικοί παράγοντες	6
Ο βιολογικός ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB	7
Ο βιολογικός ρόλος της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων IRF	8
Το ενισχύσωμα της Ιντερφερόνης-B	9
Η αποσαφήνιση του κυτταροειδικού προτύπου έκφρασης της IL-8	10
Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται κατά την απόκριση στις ιικές μολύνσεις.....	11
Ιικές μολύνσεις και ανθρώπινος οργανισμός	12
Ευρείας κλίμακας πρόβλεψη των ενισχυτών μέσω εφαρμογής τεχνικών της γονιδιωματικής	16
Λειτουργική μελέτη της ενεργότητας των ενισχυτών	21
Πρόβλεψη ενισχυτών με βάση την αλληλουχία του DNA.....	26
Η τρισδιάστατη οργάνωση του γονιδιώματος στο πυρήνα	27
Η εύρεση των υπερ-ενισχυτών(super-enhancers)	30
Ο ρόλος του διαχωρισμού φάσης στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης	30
Η εφαρμογή μεθόδων της γονιδιωματικής για τη μελέτη της αποκρίσης των κυττάρων σε ανοσολογικά ερεθίσματα.....	31
Καινοτομία της Διατριβής.....	31
Συνεισφορά της μελέτης στη θεωρητική και εφαρμοσμένη επιστημονική γνώση	32
Δημοσιευμένες μελέτες άλλων εργαστηρίων	32

Ολοκλήρωση του στόχου της Διδακτορικής Διατριβής.....	35
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	37
Καλλιέργεια ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών	37
Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης.....	43
Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο.....	44
Παρασκευή δεκτικών κυττάρων (Competent Cells)	47
Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων	49
Η μέθοδος RNA-seq.....	54
Το πρωτόκολλο FAIRE-seq	62
Το πρωτόκολλο DNaseI-seq.....	66
Το πρωτόκολλο ChIP-seq.....	70
Το πρωτόκολλο ChIP-STARR-seq	101
Πίνακες με τις αλληλουχίες των εκκινητών	123
Ανάλυση των αποτελεσμάτων αλληλούχισης νέας γενιάς με μεθόδους Βιοπληροφορικής	129
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	133
Ανάλυση πειραμάτων RNA-seq.....	133
Πειράματα ChIP-seq	143
Πειράματα IRF3 ChIP-seq σε κύτταρα HeLa	144
Πειράματα IRF3 ChIP-seq σε κύτταρα Namalwa.....	148
Πειράματα IRF3 ChIP-seq σε κύτταρα NIH3T3.....	150
Πειράματα p65 ChIP-seq σε κύτταρα HeLa	153
Πειράματα p65 ChIP-seq σε κύτταρα Namalwa	157
Πειράματα CBP ChIP-seq σε κύτταρα HeLa.....	160
Πειράματα CBP ChIP-seq σε κύτταρα Namalwa.....	163
Πειράματα H3K27ac σε κύτταρα Namalwa.....	165
Πειράματα H3K27ac σε κύτταρα HeLa	171
Πειράματα Med1 ChIP-seq σε κύτταρα HeLa	177
Πειράματα Med1 ChIP-seq σε κύτταρα Namalwa.....	183
Μελέτη της πρόσδεσης της RNA POLI σε πιθανούς ενισχυτές.....	192
Μελέτη της πρόσδεσης του Stat2 σε πιθανούς ενισχυτές	195
Πειράματα Rad21 ChIP-seq	198
Μελέτη της προσβασιμότητας της χρωματίνης με τη μέθοδο DNaseI-seq.....	200

Μελέτη της προσβασιμότητας της χρωματίνης με τη μέθοδο FAIRE-seq	206
Ανάλυση πειραμάτων H3K4me3 ChIP-seq	210
Ανάλυση πειραμάτων H3K4me1 ChIP-seq	212
Συνδυαστική ανάλυση του επιγονιδιωματικού προφίλ γύρω από τους υποκινητές των ιϊκά επαγόμενων γονιδίων στα HeLa.....	214
Συνδυαστική ανάλυση του επιγονιδιωματικού προφίλ γύρω από τους υποκινητές των ιϊκά επαγόμενων γονιδίων στα Namalwa	220
Το κοινό και κυτταροειδικό πρόγραμμα της αντιϊκής απόκρισης.....	224
IRF3-ChIP-STARR-seq	226
P65-ChIP-STARR-seq	245
Πειράματα επιβεβαίωσης της ενεργότητας μεμονωμένων ενισχυτών	254
Οι αλληλουχίες που φέρουν επαναλαμβανόμενα μοτίβα IRF ανιχνεύονται στα γονιδιώματα ειδών από όλα τα στάδια της εξέλιξης	258
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	262
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	273
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	290

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ακαδημαϊκό Καθηγητή κύριο Δημήτρη Θάνο στο εργαστήριο του οποίου πραγματοποιήθηκε η παρούσα Διδακτορική Διατριβή. Οι καίριες παρεμβάσεις του κατά την εξέλιξη της ερευνητικής αυτής προσπάθειας οδήγησαν σε σημαντικά νέα ευρήματα. Χάρης στο κύρος και στη διαρκή του προσπάθεια παρείχε κάθε δυνατή υλική υποστήριξη για τη διεξαγωγή της παρούσας πρωτοποριακής για τα ελληνικά δεδομένα αλλά και συνάμα δαπανηρής ερευνητικής μελέτης. Αλλά και σε ένα ευρύτερο πλαίσιο ο αγώνας του για τον εκσυγχρονισμό και την εισαγωγή νέων τεχνολογιών στο τομέα της μοριακής βιολογίας στη χώρα μας είναι αξιοθαύμαστος.

Ξεχωριστό και καθοριστικό ρόλο στη παρούσα Διατριβή έχει ο Ερευνητής Δρ. Μάριος Αγγελόπουλος. Είναι εκείνος που με στρατολόγησε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και καθημερινά μου μετέδωσε γνώσεις όλα αυτά τα χρόνια. Επίσης παρείχε σημαντική υλική υποστήριξη για την εκτέλεση των πειραμάτων και μέσα από τα ερευνητικά προγράμματα του εργαστηρίου του κάλυψε μέρος των αμοιβών μου όλα αυτά τα χρόνια. Τον ευχαριστώ για όλα και ελπίζω η συνεργασία μας να συνεχίσει αρμονικά και στο μέλλον.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής Βασίλη Γοργούλη που δέχτηκε να είναι επικεφαλής της τριμελούς επιτροπής. Ήταν εκεί για να ακούσει τις προόδους της διατριβής μου και να με συμβουλευτεί κατάλληλα. Τις ευχαριστίες μου και στον Επίκουρο Καθηγητή Αθανάσιο Κοτσίνα μέλος της τριμελούς επιτροπής για τις συμβουλές του.

Ευχαριστώ τους συναδέλφους μου που κοντά ο ένας στον άλλο εργαστήκαμε αρμονικά όλα αυτά τα χρόνια. Με την Ειρήνη Αλεξοπούλου παλέψαμε μαζί όλα αυτά τα χρόνια και περάσαμε καθημερινές δυσκολίες, απογοητεύσεις και επιτυχίες στο εργαστήριο. Ο Αλέξης ήταν εκεί για να με βοηθήσει στα αρχικά στάδια με τις γνώσεις του στις αναλύσεις. Ευχαριστώ το manager του εργαστηρίου Γιώργο Σιανίδα για τη βοήθεια και τις συμβουλές του. Τις ευχαριστίες μου στο Γιώργο, την Ελευθερία, το Δημήτρη και όλα τα μέλη του εργαστηρίου για το αρμονικό κλίμα που επικρατούσε στο εργαστήριο και τη διάθεση τους να βοηθήσουν. Με τα νεότερα μέλη του εργαστηρίου μεταξύ άλλων το Κώστα και τη Μαριάννα είχα την ευκαιρία να δω τη πρόοδό τους και εύχομαι να συνεχίσουν το ίδιο δυναμικά.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τη μητέρα μου και την αδερφή μου που ήταν εκεί για μένα. Τέλος το πατέρα μου που μου παρείχε κάθε δυνατή υποστήριξη.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή είχε ως αντικείμενο μελέτης τους μηχανισμούς γονιδιακής έκφρασης που διέπουν την απόκριση των ανθρώπινων κυττάρων κατά τη διάρκεια Ιικών μολύνσεων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε κατά μόνας ή σε συνδυασμό ο πλέον σύγχρονος και πρωτοποριακός τρόπος εφαρμογής των τεχνικών της *γονιδιωματικής*, μοριακής βιολογίας, βιοχημείας και υπολογιστικής βιολογίας. Κύριοι στόχοι ήταν η μελέτη σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος και του μεταγραφώματος των μοριακών γεγονότων που συμβαίνουν σε ανθρώπινα κύτταρα κατά τη διάρκεια Ιικών μολύνσεων. Πιο συγκεκριμένα [1] η καταγραφή των ανθρώπινων γονιδίων των οποίων η έκφραση μεταβάλλεται, [2] η ταυτοποίηση των ενισχυτών του DNA που ρυθμίζουν την έκφραση αυτών των γονιδίων καθώς και [3] η ενδελεχής μελέτη των μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν το συντονισμό του φαινομένου της αντιϊκής κυτταρικής λειτουργίας. Το βασικό σύστημα μελέτης αποτέλεσαν οι δυο καλά χαρακτηρισμένοι κυτταρικοί τύποι HeLa (επιθηλιακά κύτταρα) και Namalwa (B-λεμφοκύτταρα) και ως περιβαλλοντικό ερέθισμα της Ιϊκής μόλυνσης χορηγήθηκε ιός Sendai στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων.

Αρχικά, μελετήσαμε τις αλλαγές στο μεταγραφικό προφίλ όλων των γονιδίων που μεταβάλουν την έκφρασή τους κατά τη κυτταρική αντιϊκή απόκριση σε Namalwa και HeLa κύτταρα. Εντοπίστηκε ένας πυρήνας περίπου 200 γονιδίων που επάγονται και στους δύο κυτταρικούς τύπους και σχετίζονται με ανοσολογικές λειτουργίες όπως το μονοπάτι των ιντερφερονών και η απόκριση σε κυτοκίνες. Στη συνέχεια με τις τεχνικές FAIRE-seq και DNaseI-seq εντοπίσαμε τις προσβάσιμες περιοχές στο γονιδίωμα και τις μεταβολές στη προσβασιμότητά τους κατά την εξέλιξη της αντιϊκής απόκρισης. Εντοπίστηκαν εκατοντάδες περιοχές με αυξημένη προσβασιμότητα κατά τη διάρκεια της αντιϊκής απόκρισης, οι οποίες είχαν τη τάση να βρίσκονται κοντά σε ιικά επαγόμενα γονίδια σύμφωνα με τα πειράματα RNA-seq και να φέρουν μοτίβα για σημαντικούς ρυθμιστές της αντιϊκής απόκρισης όπως οι παράγοντες IRF. Έπειτα για να μελετήσουμε το πρότυπο πρόσδεσης δύο καίριων μεταγραφικών παραγόντων για την αντιϊκή απόκριση, του IRF3 και του p65 πραγματοποιήσαμε πειράματα ChIP-seq από τα οποία διαπιστώθηκε ο ιικά επαγόμενος συνεντοπισμός των δύο παραγόντων σε εκατοντάδες περιοχές στο γονιδίωμα, γεγονός που υποδηλώνει πιθανή συνέργεια των δύο παραγόντων στη ρύθμιση της αντιϊκής απόκρισης. Η πλειοψηφία των επαγόμενων θέσεων πρόσδεσης για τους παράγοντες IRF3 και p65 εδράζει σε περιοχές χρωματίνης

που ήταν προσβάσιμες ήδη πριν από την ιϊκή μόλυνση και έφεραν επιπλέον χαρακτηριστικά των ενεργών ενισχυτών όπως πρόσδεση των συνενεργοποιητών CBP, Med1 καθώς και παρουσία της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac. Παρόλα αυτά αξίζει να τονιστεί ιδιαίτερα η ύπαρξη περιοχών επαγόμενης πρόσδεσης του IRF3 με ή χωρίς το p65 σε περιοχές της χρωματίνης που είναι μη προσβάσιμες πριν από τη ιϊκή μόλυνση και οι οποίες επιπλέον δεν φέρουν χαρακτηριστικούς δείκτες όπως CBP, Med1 και H3K27ac. Στις περιοχές αυτές όμως παρατηρείται αύξηση της προσβασιμότητας της χρωματίνης και επαγόμενος συνεντοπισμός των παραπάνω δεικτών μετά την ιϊκή μόλυνση. Επιπλέον οι αλληλουχίες αυτές έχουν τη τάση να βρίσκονται κοντά σε ιϊκά επάγομενα γονίδια και να φέρουν μοτίβα για ρυθμιστές της αντιϊκής απόκρισης όπως οι παράγοντες IRF και Jun/Fos, γεγονός που ενισχύει περαιτέρω τη πιθανότητα να ρυθμίζουν κρίσιμα αντιϊκά γονίδια.

Με τις τεχνικές FAIRE-seq, DNaseI-seq και ChIP-seq εντοπίστηκαν πιθανοί επαγόμενοι ενισχυτές με βάση αλλαγές σε δομικά χαρακτηριστικά της χρωματίνης όπως η αύξηση στη προσβασιμότητα της χρωματίνης και η πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων. Παρόλο που οι συγκεκριμένοι δείκτες σύμφωνα και με τη βιβλιογραφία χαρακτηρίζουν τους ενισχυτές, δεν αποδεικνύουν την ενεργότητά τους. Για να καλύψουμε αυτό το κενό και να μπορέσουμε να ελέγξουμε την ενεργότητα των πιθανών ενισχυτών που ανιχνεύσαμε *in vivo*, εφαρμόσαμε και τροποποιήσαμε τη πρωτοποριακή τεχνική ChIP-STARR-seq, μια ευρείας κλίμακας δοκιμασία αναφοράς (reporter assay) με την οποία εξετάσαμε ταυτόχρονα και μαζικά την ιϊκά επαγόμενη ενεργότητα των χιλιάδων περιοχών πρόσδεσης των μεταγραφικών ρυθμιστών της αντιϊκής απόκρισης IRF3 και p65. Το πολύ ενδιαφέρον εύρημα είναι ότι μόνο ένα ποσοστό περίπου 10% από τις περίπου 3000 αλληλουχίες με ισχυρή πρόσδεση του IRF3 λειτουργούν ως ενεργοί επαγόμενοι ενισχυτές.

Από τη μελέτη των αλληλουχιών DNA των επαγόμενων ενισχυτών που προέκυψαν από τη μέθοδο STARR-seq διαπιστώθηκε ότι ένας σημαντικός αριθμός από αυτούς φέρουν στη σειρά επαναλαμβανόμενα μοτίβα πρόσδεσης των παραγόντων IRF. Πραγματοποιώντας σάρωση γονιδιωμάτων από διαφορετικά είδη χρησιμοποιώντας το consensus IRF μοτίβο, που αποτελεί τη δομική μονάδα των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών διαπιστώθηκε ότι οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες εντοπίζονται σε όλους τους οργανισμούς που εξετάστηκαν. Επιπλέον μεμονωμένες αλληλουχίες με επαναλαμβανόμενα μοτίβα IRF εντοπίζονται και στα γονιδιώματα διαφόρων ιών όπως οι ερπητοϊοί.

SUMMARY

The main subject of the present Doctoral Thesis were the regulatory mechanisms that govern gene expression during the antiviral cellular response. In order to achieve this goal an array of modern genomics, molecular biology, biochemistry and computational biology methodologies were implemented. Our main goals were [1] to identify differentially expressed human genes [2] the enhancer elements that regulate those genes and [3] the detailed study of the genomic distribution of master transcription factors that orchestrate the antiviral cellular response. Our experimental system includes two well characterized cell types, HeLa (epithelial-like cells) and Namalwa (B-like cells). As the environmental stimulus of Virus infection we used Sendai Virus that was added to the culture media and experiments were conducted prior and 3 and 6 hours upon infection

Initially, we identified differentially expressed genes at the transcriptome-wide level during the antiviral cellular response in Namalwa and HeLa cells. An antiviral core of approximately 200 genes was induced in both cell types, enriched for immune processes such as the interferon pathway and the response to cytokines. In order to identify the accessible part of the genome and its reconfiguration during the antiviral cellular response, FAIRE-seq and DNaseI-seq methodologies were implemented. This led to the identification of hundreds of regions with Virus inducible chromatin accessibility which are preferentially found in the vicinity of Virus inducible genes according to RNA-seq experiments and bear motifs for master regulators of the immune response such as the IRF family. Next, we studied in detail the genomic redistribution of the immune master regulators IRF3 and p65 ChIP-seq and found an extensive, inducible colocalization of those factors at hundreds of genomic regions, a fact underscoring their potential synergy in regulating the antiviral cellular response. The majority of inducible binding sites were found hosted in chromatin regions that were accessible even prior to infection and carried additional markers characteristic of active enhancers such as CBP and Med1 binding and constitutive H3K27ac levels. Nevertheless, it is important to mention the presence of inducible IRF3 binding sites with or without p65 colocalisation in chromatin regions that were not accessible and did not carry active chromatin marks prior to infection. These regions gain significant accessibility upon infection and inducible binding of the coactivators Med1 and CBP as well as H3K27ac. So, by centering our analyzes around IRF3 we found that inducible

gene expression is accompanied in several cases by an increase in chromatin accessibility, inducible binding of IRF3 with or without p65, inducible coactivator binding and inducible H3K27ac levels. Moreover, these regions are preferentially found in the proximity of virus inducible genes and bear motifs for crucial regulators such as IRF and Jun/Fos, further underscoring their potential role in regulating critical antiviral genes.

By using FAIRE-seq, DNaseI-seq and ChIP-seq methodologies putative inducible enhancers were identified based on structural chromatin characteristics such as increased chromatin accessibility and inducible transcription factor binding. Although these markers are correlated with enhancers based on a plethora of studies, their presence does not prove the enhancer activity of the underlying DNA sequence. In order to fill this gap and test the activity of the identified putative enhancers *in vivo*, we implemented and modified the unique ChIP-STARR-seq methodology, a massive scale reporter assay to simultaneously test the virus inducible enhancer activity of thousands of IRF3 and p65 binding sites. Strikingly, we found that only 10% of the approximately 3000 strongly inducible IRF3 sites are active inducible enhancers.

An interesting finding revealed by scanning the DNA sequences of IRF3-STARR-seq enhancers was that many of them contain serial repetitive IRF motifs. According to our knowledge our finding of Virus inducible enhancers that exclusively carry arrays of IRF binding sites has not been described before. By scanning representative genomes spanning the entire course of evolution using a consensus IRF motif derived from repetitive enhancers we discovered that IRF repetitive sequences are a universal characteristic of genomes as they are found in all examined species. Moreover, individual sequences with repetitive elements are found in Viral genomes such as those of Herpes Viruses.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης

Το γονιδίωμα των κυττάρων φέρει τη κληρονομήσιμη γενετική πληροφορία για τη συγκρότηση και την εύρυθμη λειτουργία οποιουδήποτε οργανισμού. Η ρυθμιζόμενη χρήση μέρους αυτής της πληροφορίας οδηγεί στη δημιουργία διαφορετικών κυτταρικών τύπων και ιστών απαραίτητων για την ανάπτυξη των πολυκύτταρων οργανισμών. Τα ρυθμιζόμενα στάδια της γονιδιακής έκφρασης περιλαμβάνουν το στάδιο της μεταγραφής, της πολυαδενυλίωσης και ματίσματος του RNA, της μεταφοράς στο κυτταρόπλασμα, της μετάφρασης και των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων.

Η ρύθμιση της μεταγραφής

Το στάδιο της μεταγραφής των γονιδίων έχει ύψιστη σημασία καθώς καθορίζει ποια γονίδια θα μεταγραφούν καθώς και το χωροχρονικό και κυτταροειδικό πρότυπο έκφρασης τους. Στη διαδικασία της μεταγραφής συμμετέχουν μια πληθώρα πρωτεϊνών όπως οι μεταγραφικοί παράγοντες, τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης και οι συνενεργοποιητές που στρατολογούν την RNA πολυμεράση που είναι υπεύθυνη για τη μεταγραφή των γονιδίων. Στη διαδικασία της μεταγραφής σημαντικό ρόλο παίζουν και οι αλληλουχίες του DNA και συγκεκριμένα οι υποκινητές και οι ενισχυτές. Οι υποκινητές βρίσκονται κοντά στη θέση έναρξης της μεταγραφής και στις αλληλουχίες τους στρατολογείται η RNA πολυμεράση, ενώ οι ενισχυτές μπορούν να δρουν από απόσταση μέσω δημιουργίας δομών θηλιάς με τους υποκινητές που διαμεσολαβείται από μεταγραφικούς παράγοντες και αρχιτεκτονικές πρωτεΐνες όπως η κοχεσίνη και ο CTCF.

Μεταγραφικοί παράγοντες

Οι μεταγραφικοί παράγοντες αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA με το να προσδένονται στη μικρή αλλά κυρίως στη μεγάλη αύλακα του DNA. Αποτελούνται συνήθως από δύο δομικές επικράτειες, την επικράτεια πρόσδεσης στο DNA και την επικράτεια αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες. Ανάλογα με τα δομικά

χαρακτηριστικά τους οι επικράτειες των μεταγραφικών παραγόντων κατατάσσονται σε κατηγορίες όπως η έλικα-στροφή-έλικα, το μοτίβο δάκτυλος ψευδαργύρου, το φερμουάρ λευκίνης και το μοτίβο έλικα-θηλιά-έλικα. Οι μεταγραφικοί παράγοντες αποκρίνονται σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα και ρυθμίζουν τη μεταγραφική κατάσταση των γονιδίων στόχων τους, δρώντας είτε ως ενεργοποιητές είτε ως αναστολείς ανάλογα με τη θέση πρόσδεσής τους και τους συμπαράγοντές τους (Vaquerizas *et al.*,2009). Οι μεταγραφικοί παράγοντες προσδένονται στο DNA σχηματίζοντας σύμπλοκα και με τη σειρά τους στρατολογούν συνενεργοποιητές, σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης και την RNA πολυμεράση για την έναρξη της μεταγραφής. Η δράση τους χαρακτηρίζεται από συνέργεια και συνεργατικότητα. Η συνέργεια αναφέρεται στην αλληλεπίδραση πολλών μεταγραφικών παραγόντων μεταξύ τους και με τις αλληλουχίες πρόσδεσης τους για να επιτευχθεί ισχυρότερος ρυθμός μεταγραφής απ'ότι αν κάθε παράγοντας λειτουργούσε χωριστά, ενώ με τη συνεργατικότητα δύο ή περισσότερες πρωτεΐνες μπορούν να αυξήσουν τη συγγένεια πρόσδεσης στο DNA που είχε κάθε μία ξεχωριστά.

Ο Βιολογικός ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ

Οι πρωτεΐνες NF-κΒ είναι μεταγραφικοί παράγοντες που αποτελούν βασικούς ρυθμιστές της φλεγμονής και της ανοσολογικής απόκρισης. Ενεργοποιούνται ως απόκριση σε ποικίλα ερεθίσματα όπως η προσβολή από βακτήρια και παράσιτα και το μεταβολικό στρες, εισέρχονται στο πυρήνα του κυττάρου και προσδένονται σε υποκινητές και ενισχυτές των γονιδίων-στόχων τους ρυθμίζοντας τα επίπεδα μεταγραφής τους (Oeckinghaus *et al.*,2009). Η οικογένεια NF-κΒ αριθμεί 5 μέλη στα θηλαστικά που κωδικοποιούνται από τα γονίδια NFKB1, NFKB2, REL,RELA και RELB και δημιουργούν ετεροδιμερή και ομοδιμερή σε διαφορετικούς συνδυασμούς. Τα διμερή του NF-κΒ παραμένουν στο κυτταρόπλασμα πριν την έλευση του κατάλληλου ερεθίσματος προσδεδεμένα με μέλη της οικογένειας του αναστολέα IκΒ. Μετά την έλευση του κατάλληλου ερεθίσματος όπως μέσω των υποδοχέων Toll (TLR) προκαλείται φωσφορυλίωση και αποικοδόμηση του IκΒ με αποτέλεσμα ο NF-κΒ να εισέρχεται στο πυρήνα και να προσδένεται στα γονίδια-στόχους του. Από πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης σε συνδυασμό με κλωνοποίηση διαπιστώθηκε ότι ένα μεγάλο μέρος των θέσεων πρόσδεσης του p65 δεν φέρει το κλασσικό μοτίβο αλλά βρίσκεται σε επαναλαμβανόμενα στοιχεία του DNA τύπου Alu απομακρυσμένα από

γονίδια στόχους (Antonaki *et al.*,2011). Επιπλέον σύμφωνα με άλλη μελέτη όπου πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης σε συνδυασμό με αλληλούχιση νέας γενιάς (ChIP-seq) για τις υπομονάδες του NF-κB σε B λεμφοβλάστες διαπιστώθηκαν πολυάριθμοι συνδυασμοί πρόσδεσης των διαφορετικών υπομονάδων στο DNA ενώ σε ένα ποσοστό περίπου 30% των περιοχών απουσίαζε το μοτίβο πρόσδεσης του παράγοντα (Zhao *et al.*,2014). Μελετώντας την επίδραση της επαγόμενης πρόσδεσης του NF-κB στο γονιδίωμα, με πειράματα ανάλυσης του μεταγραφώματος έχουν βρεθεί εκατοντάδες γονίδια που ρυθμίζονται από τον NF-κB με διαφορετικά ερεθίσματα να προκαλούν επαγωγή τόσο κοινών όσο και ειδικών για κάθε ερέθισμα γονιδίων (Pahl,1999). Η ενεργοποίηση αυτών των προγραμμάτων γονιδιακής έκφρασης είναι απολύτως απαραίτητη για τη λειτουργία του ανοσολογικού συστήματος καθώς και του αιμοποιητικού και του λεμφικού συστήματος (Hayden *et al.*,2006).

Ο Βιολογικός ρόλος της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων IRF

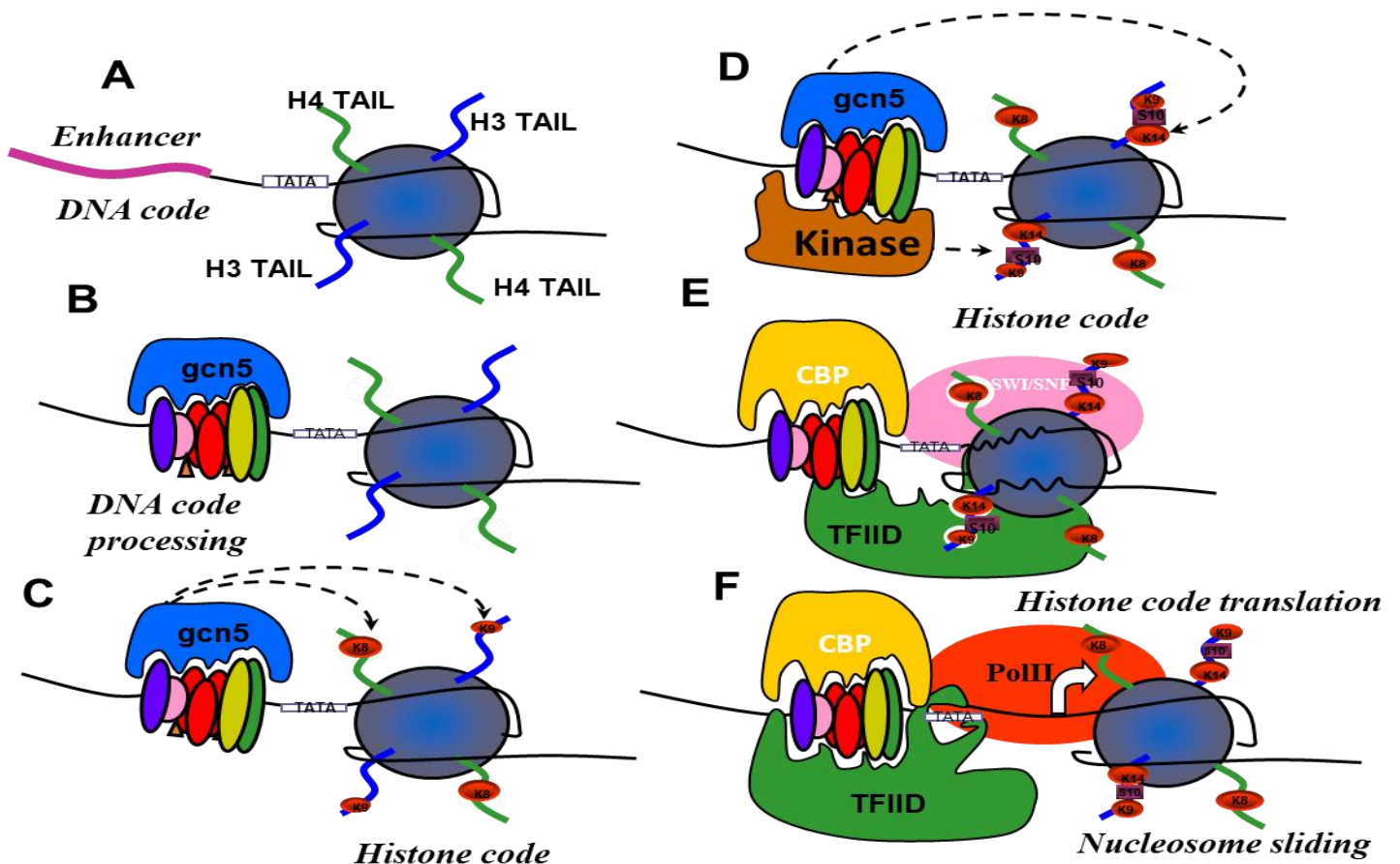
Η οικογένεια των IRF μεταγραφικών παραγόντων στα ανώτερα θηλαστικά αποτελείται συνολικά από εννέα μέλη, τους παράγοντες IRF1-9 (Taniguchi *et al.*,2001). Οι παράγοντες IRF φέρουν μια επικράτεια πρόσδεσης στο DNA στο αμινοτελικό τους άκρο, που σχηματίζει δομή έλικας-στροφής-έλικας και αναγνωρίζει αλληλουχίες του DNA που φέρουν επαναλήψεις του μοτίβου GAAA. Στο καρβοξυτελικό άκρο των παραγόντων IRF υπάρχει επικράτεια που διαμεσολαβεί την αλληλεπίδραση με άλλους παράγοντες της οικογένειας, οδηγώντας στο σχηματισμό ομοδιμερών και ετεροδιμερών. Οι παράγοντες IRF έχουν κοινούς αλλά και διακριτούς ρόλους στη λειτουργία των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και μπορούν να ενεργοποιηθούν από διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Οι παράγοντες IRF3 και IRF7 αποτελούν τους κύριους ρυθμιστές της ενεργοποίησης των γονιδίων που επάγονται από τις ιντερφερόνες τύπου I που παράγονται ως απόκριση σε ιικές μολύνσεις. Ο παράγοντας IRF3 εκφράζεται ιδιοσυστατικά αλλά παραμένει ανενεργός στο κυτταρόπλασμα. Όταν το κύτταρο λάβει το κατάλληλο ερέθισμα όπως η ιϊκή μόλυνση ο IRF3 φωσφορυλιώνεται, σχηματίζει ομοδιμερή ή ετεροδιμερή με άλλους IRF παράγοντες, εισέρχεται στο πυρήνα και προσδένεται στα γονίδια-στόχους του (Lin *et al.*,1998, Fitzgerald *et al.*,2003). Αντίθετα ο παράγοντας IRF7 εκφράζεται σε πολύ

χαμηλά επίπεδα στους περισσότερους κυνταρικούς τύπους και ενεργοποιείται ισχυρά από το μονοπάτι των ιντερφερονών τύπου I (Sato *et al.*,1998).

Το ενισχυόσωμα της Ιντερφερόνης-β

Ένα από τα καλύτερα μελετημένα συστήματα επαγόμενης γονιδιακής έκφρασης στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς αποτελεί το γονίδιο της Ιντερφερόνης-β. Το εργαστήριο μας έχει πρωτοστατήσει τα τελευταία 25 χρόνια στη διαλεύκανση της ακολουθίας των μοριακών γεγονότων που οδηγούν στην συγκρότηση ενός ενισχυοσώματος κοντά στον υποκινητή του γονιδίου που οδηγεί στην ενεργοποίηση του γονιδίου μετά από ιϊκή μόλυνση (εικόνα 1) (Thanos and Maniatis,1995). Ο μήκος περίπου 50 βάσεων ενισχυτής της Ιντερφερόνης-β φέρει θέσεις πρόσδεσης για μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας NF-κB, IRF και Jun/Fos. Η επαγόμενη συνεργατική πρόσδεση των παραγόντων αυτών στον ενισχυτή, οδηγεί στη προσέλκυση συμπλόκων ακετυλίωσης της χρωματίνης που ακετυλιώνουν τα παρακείμενα νουκλεοσώματα σε συγκεκριμένα κατάλοιπα. Οι ακετυλίωσεις αυτές δημιουργούν τις κατάλληλες επιφάνειες για τη πρόσδεση συμπλόκων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης που προκαλούν ολίσθηση του νουκλεοσώματος που καλύπτει το TATA box του υποκινητή επιτρέποντας τη πρόσδεση της RNA polIII και την έναρξη της μεταγραφής του γονιδίου (Lomvardas and Thanos,2001).

Μία πιο πρόσφατη μελέτη του εργαστηρίου μας φανέρωσε την ύπαρξη Alu-like στοιχείων DNA που ονομάστηκαν NRCs (NF-κB reception centers) και λειτουργούν με το να προσδένουν τον NF-κB και να το διαμοιράζουν στον ενισχυτή της Ιντερφερόνης-β μέσω της δημιουργίας στοχαστικών διαχρομοσωμικών αλληλεπιδράσεων κατά τα κρίσιμα αρχικά στάδια της ιϊκής μόλυνσης (Apostolou and Thanos,2008). Σημαντικό ρόλο στη διαδικασία αυτή διαδραματίζει ο παράγοντας ThPOK που προσδένεται τόσο στα NRCs όσο και στον ενισχυτή της Ιντερφερόνης-β και μέσω της ιδιότητας του να ολιγομερίζεται λειτουργεί ως γέφυρα για τις παραπάνω αλληλεπιδράσεις (Nikopoulou *et al.*,2018).



Εικόνα 1: Παρουσιάζεται η ακολουθία των μοριακών γεγονότων που οδηγούν στη συγκρότηση του ενισχυοσώματος και στην ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου της Ιντερφερόνης-β (Agalioti *et al.*,2002).

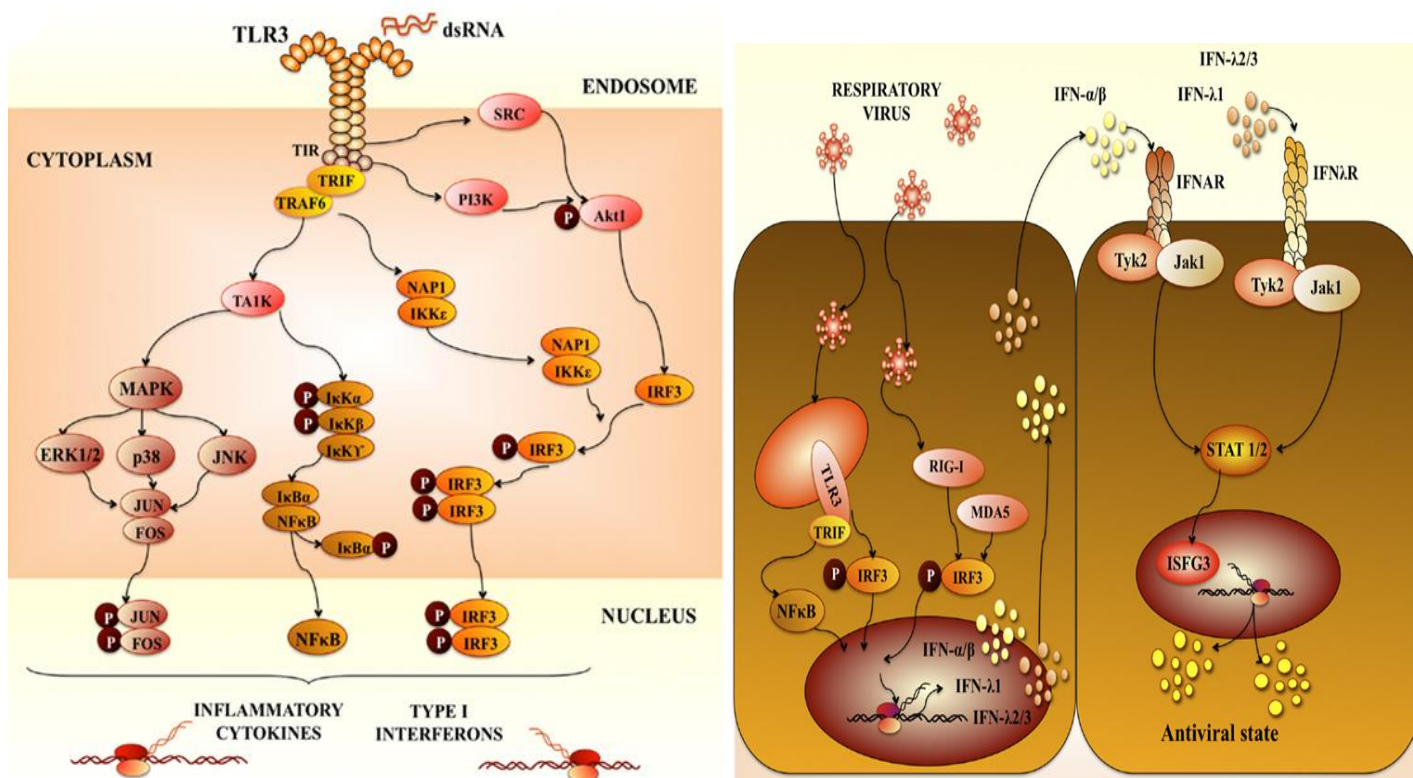
Η αποσαφήνιση του κυτταροειδικού προτύπου έκφρασης της IL-8

Η μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της IL-8 δεν συμβαίνει σε όλους τους κυτταρικούς τύπους παρά το γεγονός ότι οι απαραίτητες ρυθμιστικές πρωτεΐνες απαντώνται ευρύτατα. Μια μελέτη από το εργαστήριο μας αποκάλυψε το κρίσιμο ρόλο της ιστονικής ποικιλομορφής macroH2A στο παραπάνω φαινόμενο (Agelopoulos and Thanos,2006). Συγκεκριμένα στα B κύτταρα όπου δεν εκφράζεται το γονίδιο, η ρυθμιστική περιοχή γύρω από τον υποκινητή καλύπτεται από ένα νουκλεόσωμα που φέρει την ιστονική ποικιλομορφή macroH2A με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων και η επακόλουθη ενεργοποίηση του γονιδίου. Επίσης βρέθηκε ότι ο παράγοντας ATF-2 είναι απαραίτητος για την εναπόθεση της macroH2A μέσω δημιουργίας αλλοστερικών αλληλεπιδράσεων. Η διαλεύκανση του ρόλου της macroH2A στη ρύθμιση της IL-8 αποτέλεσε ένα από τα πρώτα παραδείγματα του ρόλου της macroH2A στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και

άνοιξε το δρόμο για νέες μελέτες της συγκεκριμένης ιστονικής ποικιλόμορφης στο επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος (Lavigne *et al.*,2015, Pliatska *et al.*,2018).

Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται κατά την απόκριση στις ιικές μολύνσεις

Μετά την είσοδο του ιού στο κύτταρο το γενετικό του υλικό αναγνωρίζεται από τους υποδοχείς όπως ο TLR3 και ο RIG-1 με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση τριών βασικών σηματοδοτικών μονοπατιών: του μονοπατιού ενεργοποίησης των IRF, του NF-κB και του Jun/Fos (εικόνα 2) (Kitazawa and Villena,2014). Οι παράγοντες IRF ενεργοποιούνται μέσω φωσφορυλίωσης από τις κινάσες TBK1 και IKK-e και εισέρχονται στο πυρήνα. Παράλληλα μέσω του MAPK σηματοδοτικού μονοπατιού οι παράγοντες Jun/Fos φωσφορυλιώνονται και εισέρχονται στο πυρήνα, ενώ ο NF-κB απελευθερώνεται από τον αναστολέα του και εισέρχεται και αυτός στο πυρήνα. Η συνδυαστική δράση των παραγόντων IRF, NF-κB και Jun/Fos είναι απαραίτητη για τη συγκρότηση ενισχυοσωμάτων και την ενεργοποίηση καίριων αντιικών γονιδίων όπως η ιντερφερόνη-β και οι ιντερφερόνες-α (Thanos and Maniatis,1995). Οι ιντερφερόνες με τη σειρά τους εκκρίνονται από τα κύτταρα και δρουν με αυτοκρινή ή παρακρινή τρόπο οδηγώντας σε ένα δεύτερο κύμα μεταγραφικής ενεργοποίησης των *interferon stimulated genes* που έχουν καίριο αντιϊκό ρόλο. Η συνδυαστική δράση αυτών των δύο κυμάτων μεταγραφικής ενεργοποίησης οδηγεί στην εγκαθίδρυση της κυτταρικής αντιϊκής απόκρισης.



Εικόνα 2: Παρουσιάζονται τα κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται κατά την απόκριση των κυττάρων σε ιικές μολύνσεις (Kitazawa and Villena, 2014).

Ιϊκές Μολύνσεις και Ανθρώπινος Οργανισμός

Οι ιϊκές μολύνσεις έχουν ως χαρακτηριστικό τα υψηλά επίπεδα νοσηρότητας και θνησιμότητας και αποτελούν παγκόσμια απειλή για την ανθρώπινη υγεία, και κατ' επέκταση για την εύρυθμη λειτουργία των σύγχρονων κοινωνιών. Εκτός από τις άμεσες επιπτώσεις τους στην ανθρώπινη υγεία, οι ιϊκές μολύνσεις μπορούν να ενεργοποιήσουν ή να προδιαθέσουν για την εκδήλωση διαφόρων ασθενειών όπως ο διαβήτης τύπου 1 και άλλα αυτοάνοσα νοσήματα (Richardson and Horwitz, 2014). Οι ερευνητικές προσπάθειες σε επαγόμενα από ιούς συστήματα-μοντέλα έχουν οδηγήσει στη διαλεύκανση των βασικών φαινομένων ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, χωρίς όμως να έχει επιτευχθεί η κατανόηση της υποκείμενης ρυθμιστικής λογικής η οποία βρίσκεται αποθηκευμένη στο γονιδίωμα τους με τη μορφή ψηφιακού κώδικα. Οι ενισχυτές σε συνδυασμό με τους μεταγραφικούς παράγοντες και την τοπική αρχιτεκτονική των χρωματινικών επιφανειών συγκροτούν ένα ρυθμιστικό κώδικα ο οποίος καθορίζει το βαθμό επαγωγής παρακείμενων ή απομακρυσμένων γονιδίων και

διέπεται από μηχανιστική λογική η οποία παραμένει δύσκολο να αποκρυπτογραφηθεί (Agelopoulos *et al.*, 2012; Agelopoulos and Thanos, 2006; Agalioti *et al.*, 2000).

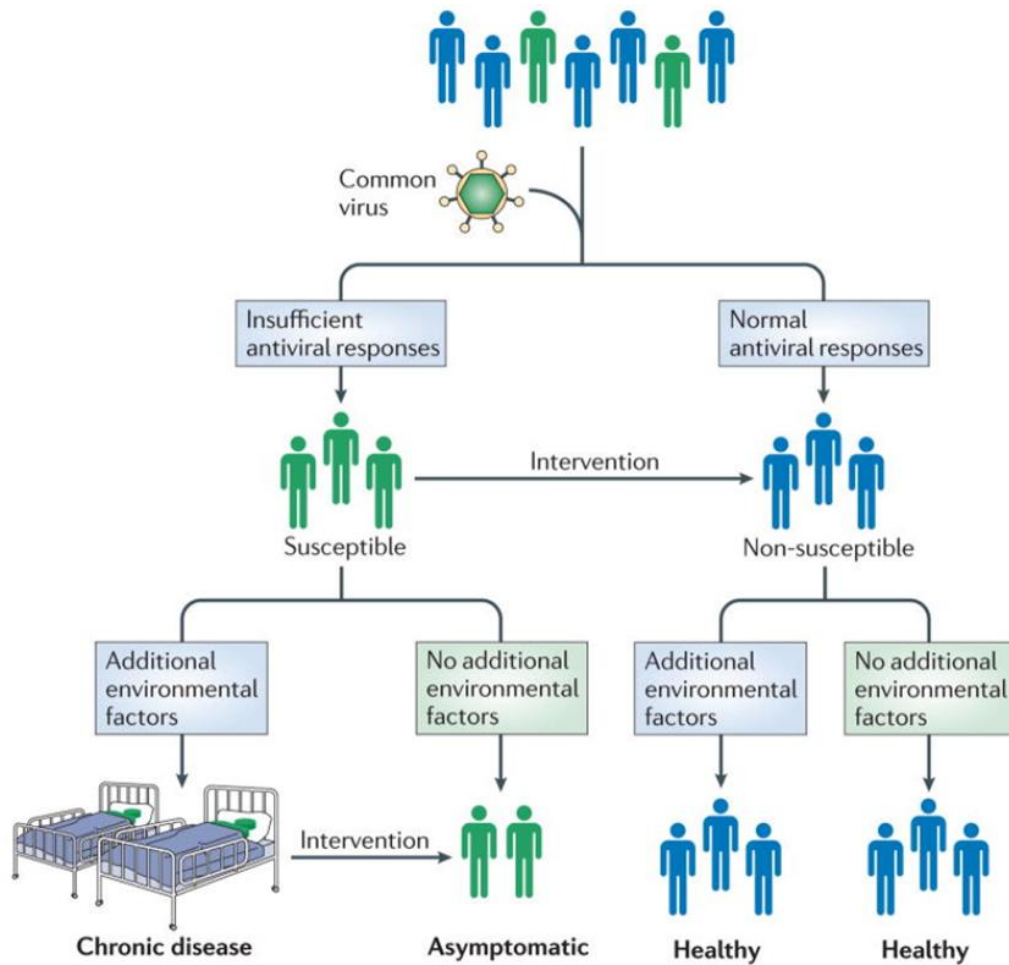
Το εργαστήριο μας ερευνά τους μοριακούς μηχανισμούς ρύθμισης της επαγόμενης γονιδιακής έκφρασης σε ευκαρυωτικά συστήματα-μοντέλα και έχει παράδοση στη μελέτη έκφρασης επαγόμενων από ιό γονιδίων όπως η IFN β και η IL-8 (Agelopoulos and Thanos, 2006; Agalioti *et al.*, 2000, Thanos and Maniatis, 1995) και έχει εφαρμόσει και επεκτείνει την παραπάνω τεχνογνωσία προκειμένου να ταυτοποιηθούν οι μοριακοί διακόπτες οι οποίοι ελέγχουν τη λειτουργία των ενισχυτών κατά την απόκριση ανθρώπινων κυττάρων ενάντια στις ιϊκές μολύνσεις. Στόχος της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι η πραγματοποίηση πειραμάτων τα οποία θα διερευνήσουν τους μηχανισμούς δράσης των παραπάνω στοιχείων/γονιδίων και θα αναδείξουν τη λογική βάσει της οποίας στηρίζεται η συντονισμένη απόκριση των κυττάρων ενάντια στους ιούς μέσω του σχηματισμού δικτύων γονιδιακής έκφρασης.

Η λειτουργία όλων των οργανισμών στηρίζεται στην αξιόπιστη χωροχρονική και ποσοτική έκφραση των γονιδίων. Στην περίπτωση του ανθρώπου, τα ~20.000 γονίδια ελέγχονται από περίπου 1.000.000 ρυθμιστικά στοιχεία DNA διεσπαρμένα στο ανθρώπινο γονιδίωμα τα οποία δρουν ως ροοστάτες της γονιδιακής έκφρασης με θετικό (ενισχυτές) ή αρνητικό (αποσιωποητές) ρόλο (ENCODE Project Consortium, 2012). Η διαπίστωση ότι άνω του 90% των γενετικών πολυμορφισμών που συνδέονται με ασθένειες χαρτογραφούνται σε μη κωδικές περιοχές ενισχύει περαιτέρω τον κρίσιμο ρόλο των ενισχυτών στη φυσιολογία και παθοφυσιολογία των οργανισμών (Maurano *et al.*, 2012). Η ανάπτυξη των νέων τεχνολογιών της γονιδιωματικής με επίκεντρο την αλληλούχιση DNA νέας γενιάς (Next Generation DNA sequencing, NGS), επιτρέπει πλέον τον ολιστικό χαρακτηρισμό των ενισχυτών και την απάντηση σε σημαντικά ερωτήματα τα οποία παραμένουν νεφελώδη για πολλά χρόνια όπως: α) υπάρχουν κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ ενισχυτών που ελέγχουν γονίδια τα οποία συν-εκφράζονται και συν-ρυθμίζονται; β) έχουν οι κυτταρικές αποκρίσεις σχέση με συγκεκριμένες περιοχές του ρυθμιστικού τμήματος του γονιδιώματος;

Τα ρυθμιστικά στοιχεία χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένες βιοχημικές ενεργότητες και δομικά χαρακτηριστικά που χρησιμοποιούνται για την ευρείας κλίμακας ταυτοποίησή τους στο γονιδίωμα (Calo and Wysocka, 2013). Οι ενισχυτές χαρακτηρίζονται από αυξημένη προσβασιμότητα της χρωματίνης και από μια σειρά τροποποιήσεων της H3 ιστόνης που υποδηλώνουν την ενεργοποίηση ή την αποσιώπησή τους, όπως οι H3K4me1 και H3K27ac (ενεργοποιητικές τροποποιήσεις)

και η H3K9me3 (ανασταλτική τροποποίηση) (ENCODE Project Consortium, 2012). Εκτός όμως από τη γραμμική τους διάσταση τα ευκαρυωτικά γονιδιώματα οργανώνονται στο χώρο σε μια πολύπλοκη συμπαγή και πολυεπίπεδη αρχιτεκτονική (Rao *et al.*, 2014). Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, απομακρυσμένα μεταξύ τους γονίδια στη γραμμική αλληλουχία (*cis*) γειτνιάζουν στο χώρο (*trans*) οδηγώντας σε γενωμικούς/χρωματινικούς σχηματισμούς όπου η πολυάριθμη συνάθροιση ρυθμιστικών μονάδων επιτρέπει τη συντονισμένη έκφρασή τους.

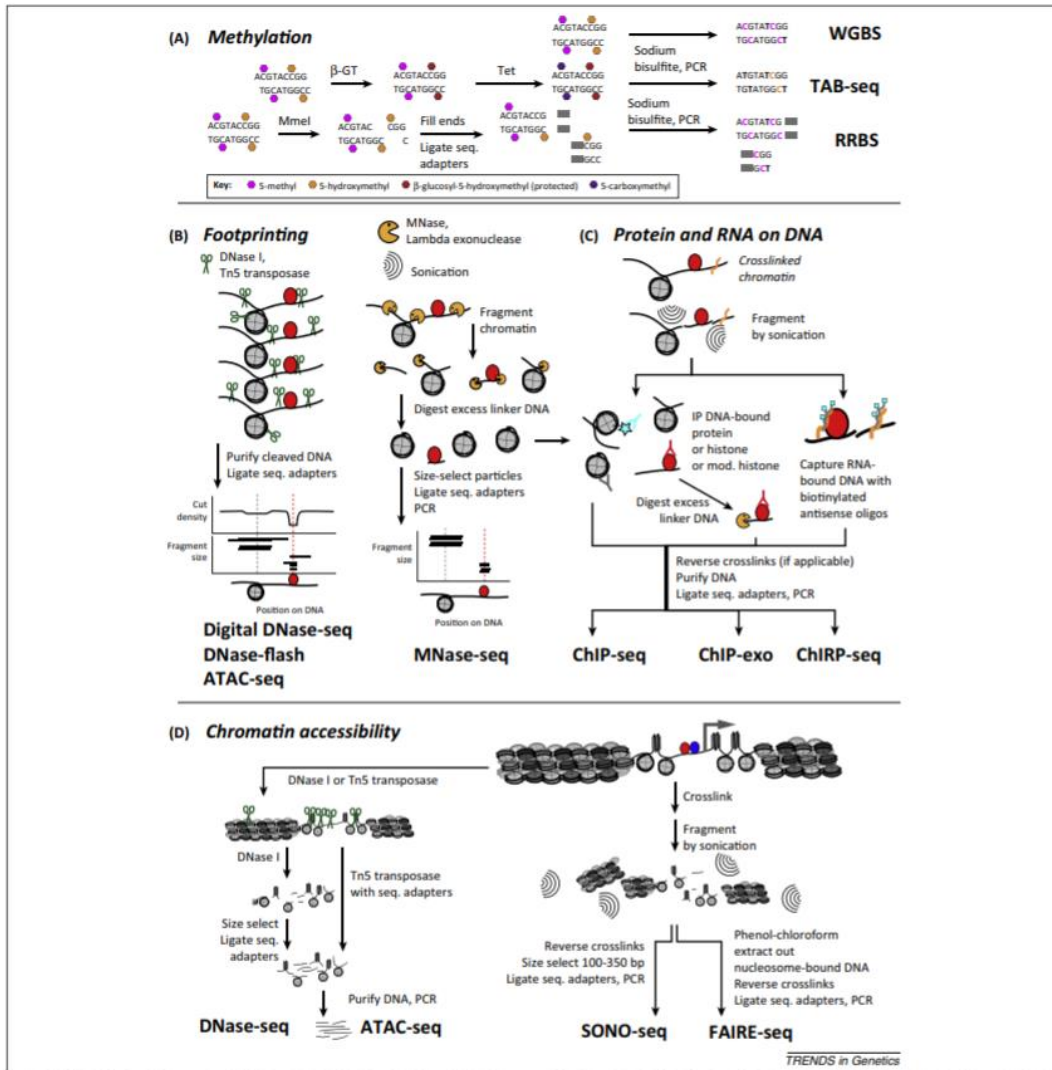
Ο σκοπός της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής είναι η ολοκλήρωση μιας ολιστικής στρατηγικής για την αποσαφήνιση του μηχανισμού μέσω του οποίου τα ανθρώπινα κύτταρα αποκρίνονται στη διάρκεια Ιικών μολύνσεων επιστρατεύοντας συγκεκριμένες αλληλουχίες της μη κωδικής μοίρας του γονιδιώματός τους. Απώτερος στόχος είναι η ανάπτυξη βιοδεικτών στο πλαίσιο της Εξατομικευμένης Ιατρικής για τη πρόβλεψη της προδιάθεσης και των αποκρίσεων στη θεραπεία για ασθενείς που έχουν μολυνθεί από ιούς (εικόνα 3).



Εικόνα 3: Παρουσιάζεται ένα μοντέλο σύμφωνα με το οποίο παραλλαγές στην απόκριση στους ιούς ανάμεσα στον ανθρώπινο πληθυσμό διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη παθογένεση πουάριθμων ασθενειών.(Foxman and Iwasaki,2011). Συγκεκριμένα το σύνολο του πληθυσμού εκτίθεται σε κοινούς ιούς αλλά τα άτομα με φυσιολογική αντιϊκή απόκριση δεν εκδηλώνουν την ασθένεια. Τα άτομα με αλλοιωμένη αντιϊκή απόκριση εκδηλώσουν την ασθένεια με τη προϋπόθεση της συνύπαρξης συγκεκριμένων περιβαλλοντικών παραγόντων. Η αποφυγή αυτών των παραγόντων προσφέρει την ευκαιρία αποτροπής εκδήλωσης της ασθένειας. Παράλληλα η κατανόηση των μηχανισμών που οδηγούν από την αλλοιωμένη αντιϊκή απόκριση στην ασθένεια μπορεί να οδηγήσει στο σχεδιασμό παρεμβάσεων που αλλάζουν την ισορροπία προς τη κατεύθυνση της φυσιολογικής απόκρισης. Τέτοιες παρεμβάσεις μπορεί να περιλαμβάνουν εμβόλια και προσεκτική έκθεση σε ιούς. Επομένως για τη θεραπεία περίπλοκων ασθενειών είναι απαραίτητη η βαθιά κατανόηση της αλληλεπίδρασης ιών και ξενιστών.

Ευρείας κλίμακας πρόβλεψη των ενισχυτών μέσω εφαρμογής τεχνικών της γονιδιωματικής

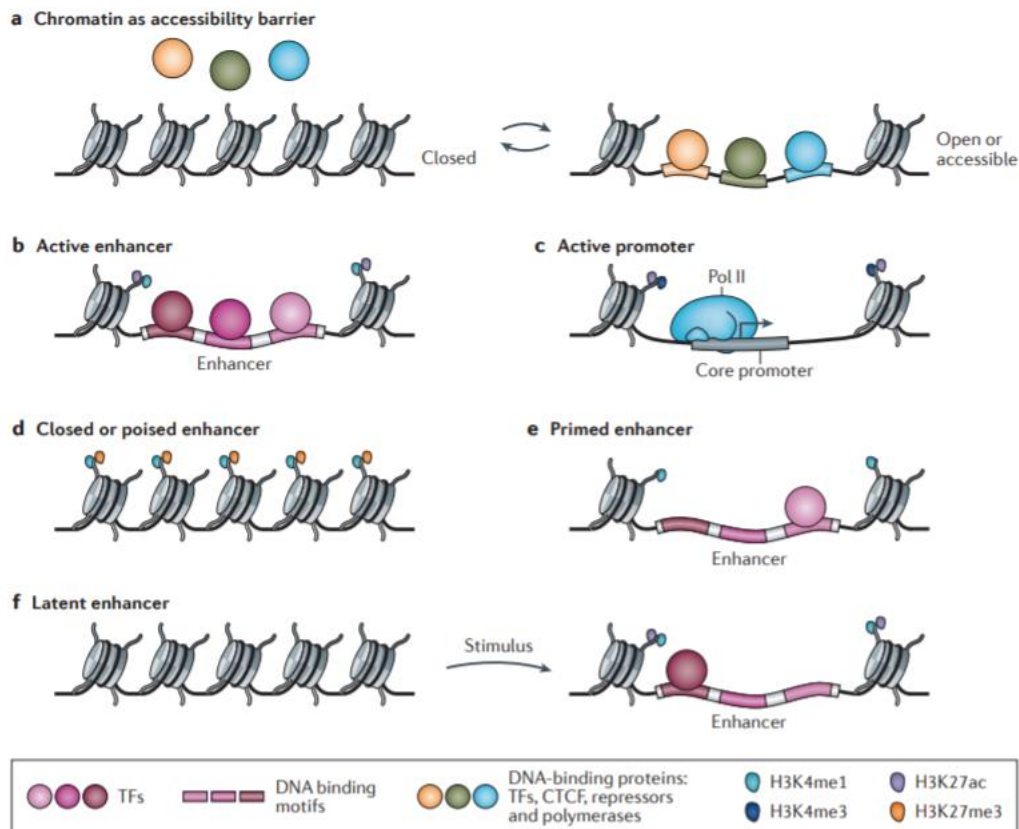
Τη τελευταία δεκαετία η εφαρμογή μεθόδων της γονιδιωματικής όπως οι τεχνικές FAIRE-seq, DNaseI-seq και ChIP-seq επέτρεψε την ευρείας κλίμακας πρόβλεψη των ενισχυτών και την μελέτη των χαρακτηριστικών τους στο επίπεδο ολόκληρων γονιδιωμάτων. Οι τεχνικές αυτές περιλαμβάνουν ως κοινό τελικό στάδιο την ευρείας κλίμακας αλληλούχιση νέας γενιάς και την ανάλυση των αποτελεσμάτων με μεθόδους βιοπληροφορικής (Catarino and Stark,2018). Βασίζονται στη μελέτη κοινών δομικών χαρακτηριστικών των ενισχυτών όπως η προσβασιμότητα της χρωματίνης (μέθοδοι FAIRE-seq, DNaseI-seq και ATAC-seq) και η παρουσία μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων των ιστονών και πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων και συνενεργοποιητών (ChIP-seq) (εικόνα 4). Η εφαρμογή των παραπάνω μεθόδων από την επιστημονική κοινότητα έχει οδηγήσει στη δημιουργία καταλόγων πιθανών ενισχυτών σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, μετά από διαφορετικά περιβαλλοντικά ερεθίσματα, στο επίπεδο κυτταρικών πληθυσμών αλλά τελευταία ακόμα και στο επίπεδο μοναδιαίων κυττάρων (Adli and Bernstein,2011). Η εφαρμογή της μεθόδου ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης σε συνδυασμό με αλληλούχιση ευρείας κλίμακας (ChIP-seq) έναντι ιστονικών τροποποιήσεων χαρακτηριστικών των ενισχυτών όπως η H3K4me1 και η H3K27ac, συνενεργοποιητών όπως ο Mediator και ο CBP και μεταγραφικών παραγόντων χρησιμοποιείται ευρύτατα για την εύρεση ενισχυτών (Robertson et al,2007, Calo and Wysocka,2013). Οι ενεργοί ενισχυτές χαρακτηρίζονται επιπλέον από αυξημένη προσβασιμότητα της χρωματίνης (απουσία νουκλεοσωμάτων) η οποία προσβασιμότητα μπορεί να μελετηθεί με τις μεθόδους FAIRE-seq, DNaseI-seq και ATAC-seq. Στην εικόνα απικονίζονται οι κύριες μέθοδοι προσδιορισμού των δομικών χαρακτηριστικών των ενισχυτών. Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό των ενεργών ενισχυτών είναι η παραγωγή μεταγράφων (eRNAs) τα οποία μπορεί να ανιχνευτούν με τεχνικές όπως η αλληλούχιση ολόκληρου του μεταγραφώματος (RNA-seq), η μέθοδος global run-on sequencing (GRO-seq) και η μέθοδος CAGE (cap analysis of gene expression) (Catarino and Stark,2018). Στην εικόνα 5 παρουσιάζονται τα βασικά δομικά χαρακτηριστικά των ενισχυτών.



Εικόνα 4: Απεικονίζονται οι βασικές μέθοδοι προσδιορισμού των δομικών χαρακτηριστικών των ενισχυτών (Risca *et al.*, 2015).

Όπως προαναφέρθηκε ένα χαρακτηριστικό των ενεργών ενισχυτών είναι η παρουσία ιστονικών τροποποιήσεων όπως η H3K4me1 και η H327ac που καταλύονται από τους μεταγραφικούς συνενεργοποιητές MLL3/4 και CBP/p300 αντίστοιχα. Οι συγκεκριμένες ιστονικές τροποποιήσεις στις ουρές των ιστονών διαβάζονται από ειδικές πρωτεΐνες αλλά η αναγκαιότητά τους για τη λειτουργία του εκάστοτε ενισχυτή δεν έχει αποδειχθεί με ξεκάθαρο τρόπο. Η H3K4me1 βρίσκεται όχι μόνο στους ενεργούς ενισχυτές, αλλά και σε αυτούς που βρίσκονται σε κατάσταση αναμονής (primed) πριν την ενεργοποίησή τους (Creyghton *et al.*, 2010). Η παρουσία της H3K4me1 βρέθηκε πρόσφατα ότι δεν είναι απαραίτητη για την ενεργότητα του ενισχυτή καθώς η μείωση των επιπέδων της μέσω δημιουργίας καταλυτικά ανενεργών

MLL3/MLL4 είχε μικρές επιπτώσεις στο προφίλ γονιδιακής έκφρασης των κυττάρων (Dorigi *et al.*,2017, Rickels *et al.*,2017). Αντίθετα η απαλοιφή των MLL3/MLL4 οδηγεί σε σημαντικές αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση και δεν είναι συμβατή με τη ζωή τόσο σε μύγες όσο και σε ποντίκια (Lee *et al.*,2013).



Εικόνα 5: Παρουσιάζονται τα κύρια δομικά χαρακτηριστικά των ενισχυτών όπως η προσβασιμότητα της χρωματίνης, η πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων και η παρουσία ιστονικών τροποποιήσεων. Ανάλογα με τη συνδυαστική παρουσία των δεικτών αυτών οι ενισχυτές χωρίζονται σε διάφορες λειτουργικές κατηγορίες (Shlyueva *et al.*,2014).

Η H3K27 είναι ένα κατάλοιπο λυσίνης που μπορεί να υποστεί τόσο ακετυλίωση που σχετίζεται με ενεργούς ενισχυτές και καταλύεται από το p300/CBP όσο και τριμεθυλίωση που σχετίζεται με ανενεργούς ενισχυτές και καταλύεται από το σύμπλοκο PRC2. Μέσω μετάλλαξης της λυσίνης K27 σε αργινίνη στη δροσόφιλα παρατηρήθηκε αδυναμία αποσιώπησης των γονιδίων στόχων του συμπλόκου PRC2 (Pengelly *et al.*,2013). Παρόλα αυτά δεν παρατηρήθηκε γενικευμένη μείωση των

επιπέδων μεταγραφής, εύρημα που αμφισβητεί την αναγκαιότητα της H3K27ac για την ενεργότητα των ενισχυτών. Αντίθετα η ενεργότητα ακετυλτρανσφεράσης της CBP/p300 είναι απαραίτητη για την μεταγραφική ενεργοποίηση, γεγονός που υποδηλώνει ότι η CBP/p300 πιθανόν να στοχεύει άλλα ιστονικά κατάλοιπα, μεταγραφικούς παράγοντες και άλλες πρωτεΐνες απαραίτητες για τη μεταγραφή όπως η RNA polIII (Pradeepa *et al.*,2016, Kim *et al.*,2006). Σύμφωνα με τα παραπάνω το γεγονός ότι οι συγκεκριμένες ιστονικές τροποποιήσεις σχετίζονται με τους ενισχυτές δεν σημαίνει ότι είναι απαραίτητες για την ενεργότητά τους. Είναι πιθανό ότι πολλές ιστονικές τροποποιήσεις συμμετέχουν μέσω παράλληλων μηχανισμών στην λειτουργία των ενισχυτών με τρόπο που η απώλεια μίας καλύπτεται από τη παρουσία των άλλων, ενώ δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα να αποτελούν ουδέτερα παραπροϊόντα της εξέλιξης (Catarino and Stark,2018).

Οι ανενεργοί ενισχυτές χαρακτηρίζονται κυρίως από τη παρουσία νουκλεοσωμάτων που παρεμποδίζουν τη πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων (Agelopoulos *et al.*, 2012; Agelopoulos and Thanos, 2006). Η ενεργοποίηση των ενισχυτών φαίνεται να βασίζεται σε πρωτοπόρους (pioneer) μεταγραφικούς παράγοντες που έχουν την ικανότητα να προσδένονται στα νουκλεοσώματα και να προκαλούν τη μετακίνησή τους μέσω της στρατολόγησης συμπλόκων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης (Zaret and Carroll,2011). Αν και η προσβασιμότητα της χρωματίνης είναι ένας από τους καλύτερους δείκτες πρόβλεψης των ενισχυτών και άλλα ρυθμιστικά στοιχεία του DNA όπως οι υποκινητές και οι μονωτές χαρακτηρίζονται από αυξημένη προσβασιμότητα, ενώ και τα επίπεδα προσβασιμότητας δεν αντικατοπτρίζουν με τρόπο ποσοτικό τα επίπεδα ενεργότητας των ενισχυτών (Boyle *et al.*,2008). Επομένως η μελέτη των επιπέδων προσβασιμότητας της χρωματίνης χρησιμοποιείται επικουρικά μαζί με άλλους δείκτες για να αυξηθεί η ειδικότητα πρόβλεψης των ενισχυτών.

Οι ενισχυτές χαρακτηρίζονται επίσης από τη παραγωγή μεταγράφων (eRNAs) με θετική συσχέτιση ανάμεσα στη μεταγραφή των ενισχυτών και στα επίπεδα ενεργότητάς τους (Kim *et al.*,2010). Επομένως η μεταγραφή των ενισχυτών χρησιμοποιείται ως δείκτης πρόβλεψής τους σε διάφορους κυτταρικούς τύπους και σε επαγόμενα συστήματα όπως αυτό της ανοσολογικής απόκρισης. Τα μετάγραφα που προέρχονται από τους ενισχυτές είναι συνήθως διπλής κατεύθυνσης, χωρίς polyA ουρά και ασταθή αφού αποικοδομούνται γρήγορα από το εξώσωμα. Η αστάθεια των eRNAs καθιστά δύσκολη την ανίχνευση τους με τεχνικές RNA-seq που μετρούν τα ολικά

μετάγραφα, για αυτό και χρησιμοποιούνται μέθοδοι ποσοτικοποίησης μόνο των νεοφυών (nascent) μεταγράφων όπως η global run-on sequencing (GRO-seq) (Core *et al.*,2008) και η precision nuclear run-on sequencing (PRO-seq) (Kwak *et al.*,2013). Η διακρίβωση της αναγκαιότητας και του ρόλου των eRNAs για την ενεργότητα των ενισχυτών είναι δύσκολη και δεν είναι σαφές αν η διαδικασία της μεταγραφής είναι απαραίτητη για τη λειτουργία ενός ενισχυτή ή εάν τα ίδια τα μετάγραφα έχουν κάποιο λειτουργικό ρόλο. Πιθανοί ρόλοι για τα eRNAs περιλαμβάνουν τη στρατολόγηση και ενεργοποίηση συνενεργοποιητών και τη διευκόλυνση των επαφών μεταξύ υποκινητών και ενισχυτών μέσω της κοχρσίνης, με τους ρόλους αυτούς να ισχύουν ανά περίπτωση και όχι γενικευμένα (Kaikkonen *et al.*,2013,Li *et al.*,2013).

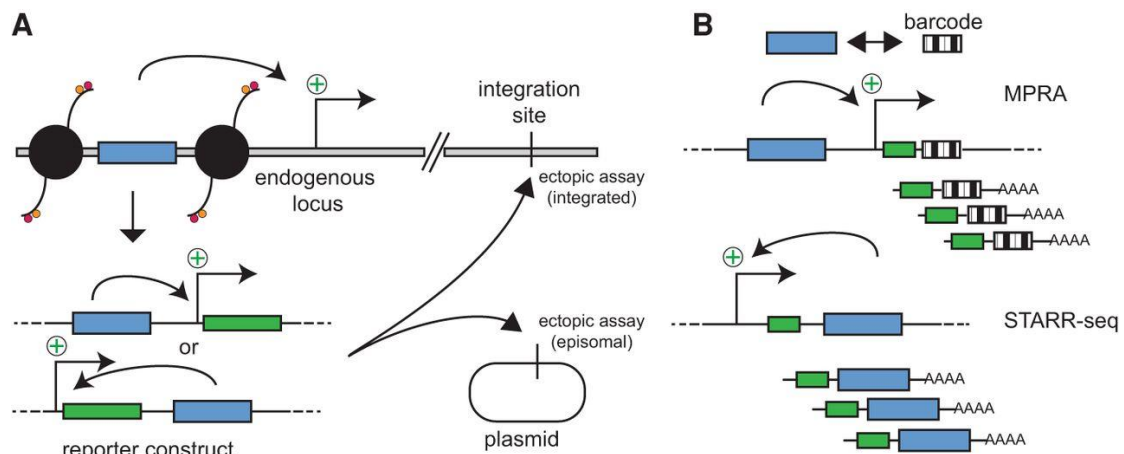
Η μεθυλίωση του DNA στη 5-μεθυλοκυτοσίνη (5mC) σχετίζεται με αποσιώπηση του γονιδιώματος και παρεμπόδιση της πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων κατά τη διάρκεια ποικίλων βιολογικών διεργασιών (Smith and Meissner,2013). Η παραδοχή αυτή συμβαδίζει με την αντίστροφη συσχέτιση που παρατηρείται ανάμεσα στη παρουσία ιστονικών δεικτών χαρακτηριστικών των ενεργών ενισχυτών και πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων από τη μία και των επίπεδων DNA μεθυλίωσης από την άλλη. Παρόλα αυτά δεν είναι ξεκάθαρο αν η μεθυλίωση του DNA έχει ενεργό ρόλο στη διαμόρφωση του καταλόγου των ενεργών ενισχυτών σε ένα γονιδίωμα μέσω εκδίωξης των μεταγραφικών παραγόντων από τις θέσεις πρόσδεσής τους ή η μεθυλίωση έχει ένα παθητικό ρόλο καταλαμβάνοντας τις θέσεις από τις οποίες έχουν αποχωρήσει οι μεταγραφικοί παράγοντες. Προς υποστήριξη του δεύτερου σεναρίου η πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων και συγκεκριμένα του CTCF και του REST φαίνεται να επαρκεί για τη δημιουργία υπομεθυλιωμένων περιοχών ακόμα και αν στις περιοχές αυτές προϋπήρχε μεθυλίωση του DNA (Feldmann *et al.*,2013). Είναι γνωστό ότι η 5mC υφίσταται οξείδωση από τις πρωτεΐνες Tet με ενδιάμεσο βήμα τη παραγωγή 5 hydroxymethyl-cytosine (5hmc). Τόσο η πρόσδεση των πρωτεϊνών Tet όσο και η παρουσία της 5hmc σχετίζονται θετικά με δείκτες χαρακτηριστικούς των ενεργών ενισχυτών όπως η H3K4me1 και η H3K27ac (Ficz *et al.*,2011). Επομένως είναι πιθανό η προετοιμασία για την ενεργοποίηση των ενισχυτών να περιλαμβάνει ενεργή απομεθυλίωση τους μέσω του ενδιάμεσου 5hmc. Για παράδειγμα κατά τη συντηρημένη φυλοτυπική περίοδο της εμβρυογένεσης σε zebrafish, *Xenopus tropicalis* και ποντικό παρατηρείται γενικευμένη απομεθυλίωση των ενισχυτών με πρόσδεση των Tet πρωτεϊνών και παρουσία της 5hmc στις θέσεις αυτές (Bogdanović *et al.*,2016). Οι συγκεκριμένοι ενισχυτές σχετίζονται με

αναπτυξιακά γονίδια τα οποία υφίστανται συντονισμένες αλλαγές στο χρωματινικό τους προφίλ και στα επίπεδα μεταγραφής τους κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης. Ο ρόλος των Tet πρωτεϊνών στη παραπάνω διαδικασία φαίνεται να είναι απαραίτητος καθώς η απαλοιφή τους μείωσε τα επίπεδα προσβασιμότητας της χρωματίνης και αύξησε τα επίπεδα μεθυλίωσης μόνο στους παραπάνω ενισχυτές, υποδηλώνοντας ότι η μεθυλίωση του DNA δρα ανοροϊκά στη ρύθμιση των συγκεκριμένων ενισχυτών.

Λειτουργική μελέτη της ενεργότητας των ενισχυτών

Οι παραπάνω τεχνικές εύρεσης ενισχυτών (πχ. FAIRE-seq, DNaseI-seq, ChIP-seq) βασίζονται σε δομικά χαρακτηριστικά των ενισχυτών και δεν αποδεικνύουν ότι πράγματι οι περιοχές DNA που ανιχνεύονται διαθέτουν ενεργότητα ενισχυτή. Για την διαπίστωση της ενεργότητας των ενισχυτών είναι απαραίτητες λειτουργικές δοκιμασίες που είτε εξετάζουν κάθε ενισχυτή εκτός του χρωματινικού του περιβάλλοντος (πχ. δοκιμασίες λυσιφεράσης) είτε στη ενδογενή του θέση (πχ. απαλοιφή, αποσιώπηση ή ενεργοποίηση με τη τεχνολογία CRISPR/CAS) (Catarino and Stark,2018).

Οι δοκιμασίες αναφοράς (reporter assays) εξετάζουν κάθε πιθανό ενισχυτή εκτός του χρωματινικού του περιβάλλοντος, καθώς αυτός βρίσκεται σε πλασμίδιο άνωθεν του υποκινητή και ενός γονιδίου αναφοράς (πχ GFP ή λουσιφεράση). Το μειονέκτημα των κλασσικών δοκιμασιών αναφοράς είναι ότι δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το μαζικό έλεγχο χιλιάδων αλληλουχιών, καθώς κάθε αλληλουχία πρέπει να κλωνοποιηθεί και να εξεταστεί μεμονωμένα. Το μειονέκτημα αυτό αποτέλεσε το έναυσμα για την ανάπτυξη μεθόδων για το ταυτόχρονο και μαζικό έλεγχο χιλιάδων πιθανών ενισχυτών οι οποίες βασίζονται στην αλληλούχιση ευρείας κλίμακας νέας γενιάς (εικόνα 6). Η μέθοδος MPRA (massively parallel reporter assay) χρησιμοποιεί μικρές αλληλουχίες DNA ως barcodes μοναδικά για κάθε ενισχυτή αντί των κλασσικών γονιδίων αναφοράς επιτρέποντας τον ταυτόχρονο χιλιάδων αλληλουχιών DNA για ενεργότητα ενισχυτή (Kwasniewski et al.,2012). Συγκεκριμένα οι ενισχυτές προκαλούν μεταγραφή των barcodes τους με τα επίπεδα κάθε barcode να αντικατοπτρίζει την ενεργότητα του σχετιζόμενου ενισχυτή. Στην εικόνα παρουσιάζονται σχηματικά οι δοκιμασίες γονιδίων αναφοράς για τον έλεγχο της ενεργότητας των ενισχυτών σε μεμονωμένη ή μαζική κλίμακα.



Εικόνα 6: Παρουσιάζονται οι δοκιμασίες γονιδίων αναφοράς για τον έλεγχο της ενεργότητας των ενισχυτών τόσο σε μεμονωμένη (A) όσο και σε μαζική κλίμακα (B) (Catarino and Stark,2018).

Η μέθοδος STARR-seq (Self-transcribing active regulatory region sequencing) επιτρέπει το ταυτόχρονο έλεγχο εκατομμυρίων αλληλουχιών DNA για ενεργότητα ενισχυτή (Arnold *et al.*,2013). Οι προς εξέταση αλληλουχίες κλωνοποιούνται κάτωθεν ενός συνθετικού υποκινητή στο 3' UTR του γονιδίου αναφοράς GFP. Επομένως οι αλληλουχίες που έχουν ενεργότητα ενισχυτή θα προκαλέσουν τη μεταγραφή του εαυτού τους και θα ανιχνευτούν με τη μέθοδο RNA-seq. Αρχικά η μέθοδος εφαρμόστηκε για την εξέταση της ενεργότητας ολόκληρου του γονιδιώματος της *Drosophila*. Η κλωνοποίηση στοχευμένων βιβλιοθηκών DNA που προέρχονται από πειράματα ChIP-seq (ChIP-STARR-seq) (Vockley *et al.*,2016) ή ATAC-seq (Wang *et al.*,2018) αντί τυχαίων τμημάτων DNA επέτρεψε τη εξέταση ενεργότητας των ρυθμιστικών αλληλουχιών DNA από κύτταρα θηλαστικών. Στη κατεύθυνση της εξέτασης στοχευμένων βιβλιοθηκών DNA αναπτύχθηκαν επίσης και πρωτόκολλα κλωνοποίησης συνθετικών βιβλιοθηκών DNA (Schöne *et al.*,2018) ή βιβλιοθηκών που έχουν επιλεγεί μετά από υβριδοποίηση ειδικών 'δολωμάτων' (baits) (Vanhille *et al.*,2015). Μετά από βελτιώσεις στο πρωτόκολλο κλωνοποίησης των προς εξέταση τμημάτων DNA πλέον είναι εφικτή η δημιουργία βιβλιοθηκών εκατοντάδων εκατομμυρίων διαφορετικών τμημάτων DNA γεγονός που επιτρέπει την εξέταση πολύπλοκων ολόκληρων γονιδιωμάτων όπως του ανθρώπου (Liu *et al.*,2017).

Οι παραπάνω μέθοδοι μαζικού ελέγχου χιλιάδων αλληλουχιών DNA σε συνδυασμό με τη δυνατότητα συνθετικής παραγωγής χιλιάδων αλληλουχιών DNA επιτρέπουν μεταξύ άλλων την εξέταση της επίδρασης πολυμορφισμών στην ενεργότητα ενισχυτών, τον έλεγχο της σημαντικότητας των μοτίβων μεταγραφικών παραγόντων και γενικότερα την αποκρυπτογράφηση της ρυθμιστικής λογικής που διέπει τη λειτουργία των ενισχυτών (Catarino and Stark,2018).

Το βασικό χαρακτηριστικό της μεθόδου STARR-seq που πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων είναι ότι εξετάζει τα ρυθμιστικά στοιχεία εκτός του ενδογενούς τους χρωματινικού περιβάλλοντος. Το γεγονός αυτό από την μία είναι πλεονέκτημα καθώς εξετάζεται αποκλειστικά και μόνο η επάρκεια μιας αλληλουχίας DNA να δρα ως ενισχυτής, απαλλαγμένη από τη ρύθμιση που μπορεί να επιβάλλει το ενδογενές χρωματινικό περιβάλλον. Το μειονέκτημα είναι ότι δεν μπορεί να αποδειχθεί με τη μέθοδο αυτή αν μια αλληλουχία λειτουργεί ως ενισχυτής στο ενδογενές της περιβάλλον. Πράγματι ένα σημαντικό ποσοστό των ενισχυτών που ανιχνεύονται με τη μέθοδο STARR-seq (μέχρι και το 60%) βρίσκονται σε κλειστό χρωματινικό περιβάλλον και φέρουν τις ιστονικές τροποποιήσεις H3K27me3 και H3K9me3, γεγονός που υποδηλώνει ότι πιθανόν να αποσιωπώνται στο επίπεδο της χρωματίνης (Muerdter *et al.*,2018). Η ενσωμάτωση επομένως των προς εξέταση αλληλουχιών στο γονιδίωμα θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι προσδίδει ένα περιβάλλον που προσομοιάζει περισσότερο στον ενδογενή τόπο της αλληλουχίας αν και η χρήση ρετροϊών ή λεντιών δεν οδηγεί σε τυχαία ενσωμάτωση των αλληλουχιών στο γονιδίωμα αλλά προδιαθέτει για ενσωμάτωση σε ανοικτές-ενεργές περιοχές. Παρόλα αυτά η συγκριτική ανάλυση της ενεργότητας ενισχυτών με τη χρήση λεντικών που ενσωματώνονται ή όχι στο γονιδίωμα δεν αποκάλυψε σημαντικές διαφορές στην ενεργότητα μεταξύ των δύο μεθόδων (Inoue *et al.*,2017). Η παρούσα Διδακτορική διατριβή περιλαμβάνει εφαρμογή και βελτιστοποίηση της παραπάνω μεθόδου και εξαγωγή κρίσιμων αποτελεσμάτων και συμπερασμάτων.

Τα τελευταία χρόνια η δυνατότητα στοχευμένης τροποποίησης του γονιδιώματος μέσω της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 επιτρέπει την εξέταση της επίπτωσης κάθε ενισχυτή στην έκφραση των γειτονικών γονιδίων (Cong *et al.*,2013). Η μέθοδος CRISPR/Cas9 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απαλοιφή ενός ενισχυτή μέσω στόχευσης της νουκλεάσης Cas9 με τη χρήση δύο ειδικών για τα άκρα του ενισχυτή guide RNAs. Για παράδειγμα η απαλοιφή των επιμέρους ενισχυτών μιας συστοιχίας ενισχυτών (super-enhancer) κατέδειξε ότι η ενεργότητα ενισχυτή βασίζεται

σε ορισμένους μόνο επιμέρους ενισχυτές που λειτουργούν κυρίως με τρόπο προσθετικό (Zhou et al.,2014). Με τη μέθοδο CRISPR—Cas9 και την επιδιόρθωση μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού μπορεί να επιτευχθούν στοχευμένες αλλαγές ή και ανταλλαγή ολόκληρης της αλληλουχίας ενός ενισχυτή. Για παράδειγμα για τη μελέτη της ρύθμισης του ενισχυτή του Shh κατά τη διάρκεια της εξέλιξης στα σπονδυλωτά, ο ενισχυτής του Shh στο ποντικό αντικαταστάθηκε από αυτό του φιδιού από τον οποίο λείπουν 17 βάσεις που περιέχουν θέσεις πρόσδεσης για το ETS1 και οδήγησε στη δημιουργία ποντικών χωρίς άκρα (Kvon *et al.*,2016). Επιπλέον εφαρμογές της μεθόδου περιλαμβάνουν τη μελέτη της επίδρασης πολυμορφισμών σε ρυθμιστικές αλληλουχίες που σχετίζονται με ασθένειες στα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης (Smemo *et al.*,2014).

Με τη μέθοδο CRISPR-Cas9 μπορούν να στοχευτούν και να εξεταστούν ταυτόχρονα και πολυάριθμες αλληλουχίες DNA μέσω εισαγωγής στα κύτταρα μιας βιβλιοθήκης από guide RNAs, επιλογής των κυττάρων με βάση κάποιο φαινοτυπικό χαρακτηριστικό και εύρεσης των sgRNAs που υπερ-αντιπροσωπεύονται ή υπο-αντιπροσωπεύονται σε κάθε πληθυσμό. Με το τρόπο αυτό έχουν ελεγχθεί για παράδειγμα ποιες από τις αλληλουχίες πρόσδεσης του p53 και του ERα λειτουργούν ως ενισχυτές (Korkmaz *et al.*,2016. Επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη λεπτομερή σάρωση μεμονωμένων περιοχών DNA για την εύρεση λειτουργικών μοτίβων μέσω κορεσμού των αλληλουχιών με μεταλλάξεις που προέρχονται από την επιδιόρθωση των κοπών στο DNA που προκαλεί η Cas9 (Canver *et al.*,2015).

Το σύστημα CRISPR-Cas9 μπορεί να χρησιμοποιηθεί εκτός από την απαλοιφή περιοχών του DNA και για την αποσιώπηση και ενεργοποίηση ρυθμιστικών στοιχείων του DNA. Η μέθοδος βασίζεται στη καταλυτικά ανενεργή μορφή της Cas9 που διατηρεί την ικανότητα στόχευσης στο γονιδίωμα σε σύντηξη με μία επικράτεια καταστολής της μεταγραφής όπως η KRAB (Thakore *et al.*,2015) ή ενεργοποίησης όπως η VP16 (Gilbert *et al.*,2013).

Τα αποτελέσματα από τα πειράματα επεξεργασίας των ενισχυτών στον ενδογενές τους περιβάλλον μπορούν να αποδείξουν την αναγκαιότητα μιας αλληλουχίας για την έκφραση ενός γονιδίου αλλά πρέπει να αξιολογούνται με προσοχή καθώς δεν αποδεικνύουν ότι οι αλληλουχίες είναι ενισχυτές μιας και θα μπορούσαν να επηρεάζουν τη μεταγραφή με άλλους τρόπους πχ. λειτουργώντας ως μονωτές ή υποκινητές. Επίσης μια αλληλουχία που δεν φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση κάποιου γονιδίου δεν αποκλείεται να δρα ως ενισχυτής και η απουσία του να καλύπτεται από άλλους ενισχυτές που συν-ρυθμίζουν το ίδιο γονίδιο. Από τα

παραπάνω καθίσταται σαφές ότι οι δοκιμασίες ελέγχου ενισχυτών στον ενδογενή τους τόπο και εκτοπικά παρέχουν συμπληρωματικές πληροφορίες για το ρόλο τους στη γονιδιακή έκφραση (Catarino and Stark,2018).

Μία επιπλέον έννοια στη ρυθμιστική λογική της μεταγραφής είναι αυτή της βιοχημικής συμβατότητας των ενισχυτών με τους υποκινητές με τους οποίους επικοινωνούν. Για παράδειγμα οι ενισχυτές που ρυθμίζουν γονίδια κυτταρικής οικονομίας έχουν ειδικότητα για τους υποκινητές των γονιδίων κυτταρικής οικονομίας, ενώ οι ενισχυτές γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη έχουν ειδικότητα για τους υποκινητές γονιδίων της ανάπτυξης (Zabidi *et al.*,2015). Η ειδικότητα αυτή πιθανότατα βασίζεται στα διαφορετικά μοτίβα προσδεσης μεταγραφικών παραγόντων που φέρουν οι ενισχυτές με αποτέλεσμα να βασίζονται σε διαφορετικούς μεταγραφικούς παράγοντες και συνενεργοποιητές για την ενεργοποίησή τους. Πράγματι η στρατολόγηση συνενεργοποιητών σε core υποκινητές με τη τεχνολογία yeast one hybrid κατέδειξε τη προτίμηση τους για υποκινητές είτε γονιδίων κυτταρικής οικονομίας είτε αναπτυξιακών γονιδίων (Stampfel *et al.*,2015).

Στην εξίσωση της γονιδιακής ρύθμισης πρέπει να ληφθεί υπ'όψιν ότι η μεταγραφή δεν είναι μια συνεχής διαδικασία αλλά συμβαίνει κατά κύματα, γεγονός που υποδηλώνει ότι μπορεί να ρυθμιστεί τόσο η συχνότητα όσο και το μέγεθος του κύματος (burst frequency and burst size) (Raj *et al.*,2006). Για παράδειγμα η μικροσκοπήση με διακριτικότητα ενός μορίου των γονιδίων των β και γ σφαιρινών σε κύτταρα ποντικού και ανθρώπου, έδειξε ότι οι ενισχυτές ενεργοποιούν τη μεταγραφή κυρίως μέσω αύξησης στη συχνότητα και όχι στο μέγεθος του κύματος (Bartman *et al.*,2016). Επιπλέον η συχνότητα και το μέγεθος του κύματος φαίνεται να καθορίζεται από την κεντρική αλληλουχία του υποκινητή με τις αλληλουχίες TATA box να σχετίζονται με μεγάλο μέγεθος κύματος (Tantale *et al.*,2016).

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή έχει εκπονηθεί βασισμένη στις μεθόδους της γονιδιωματικής πολλές από τις οποίες έχουν τροποποιηθεί προκειμένου να εφαρμόζονται με μεγαλύτερη επιτυχία στο σύστημα των Ιικών μολύνσεων των ανθρώπινων κυττάρων. Κρίνεται σκόπιμο να αναφερθούν συνοπτικά σε αυτό το σημείο ως μέρος της συνολικής τεχνογνωσίας που αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε (αναλυτική περιγραφή υπάρχει στο τμήμα της Μεθοδολογίας).

FAIRE-seq (Formaldehyde-assisted Isolation of Regulatory elements sequencing):

Εφαρμόζουμε το δημοσιευμένο FAIRE-seq πρωτόκολλο για να ανιχνεύσουμε στο επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος τις περιοχές που στερούνται νουκλεοσωμάτων και πιθανόν λειτουργούν ως ενισχυτές.

DNaseI-seq (DNaseI hypersensitive sites sequencing): Εφαρμόζουμε το δημοσιευμένο DNaseI-seq πρωτόκολλο για να ανιχνεύσουμε τις προσβάσιμες περιοχές της χρωματίνης που φιλοξενούν θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων και πιθανούς ενισχυτές.

STARR-seq (Self-transcribing active regulatory region sequencing): Οι προς μελέτη αλληλουχίες κλωνοποιούνται στο 3' άκρο της κωδικής αλληλουχίας του GFP, κάτωθεν από ισχυρό υποκινητή και άνωθεν της αλληλουχίας poly-A. Η επαγωγή της μεταγραφής από ένα ενισχυτή θα οδηγήσει στη μεταγραφή του ίδιου του ενισχυτή ως σύντηξη στο 3' άκρο του GFP. Επομένως, μετά τη διαμόλυνση των κυττάρων με τη βιβλιοθήκη των πιθανών ενισχυτών και τη μόλυνση με ιό θα μετρηθεί η ενεργότητά τους μέσω της επιλεκτικής απομόνωσης των μεταγράφων τους

ChIP-seq (Chromatin Immunoprecipitation-sequencing): Εφαρμόζονται τα πρωτόκολλα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης που έχουν βελτιστοποιηθεί στο εργαστήριό μας. Μετά την ανοσοκατακρήμνιση και τον καθαρισμό του απομονωμένου DNA, ακολουθεί κατασκευή γενωμικής βιβλιοθήκης και αλληλούχιση.

RNA-seq (RNA sequencing): Μετά την απομόνωση του RNA, πραγματοποιείται κατασκευή γενωμικής βιβλιοθήκης σύμφωνα με το πρωτόκολλο illumina Truseq-RNA-seq και αλληλούχιση.

Πρόβλεψη ενισχυτών με βάση την αλληλουχία του DNA

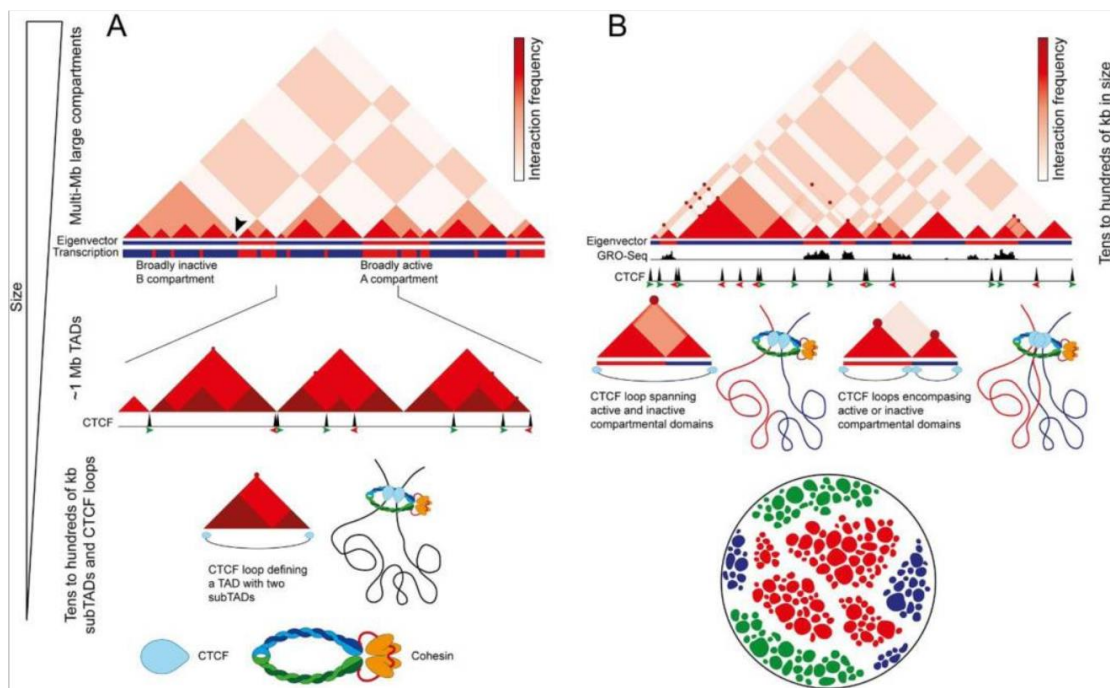
Οι διαθέσιμες μέθοδοι για τη πρόβλεψη ενισχυτών με βάση μόνο την αλληλουχία του DNA ανιχνεύουν τις περιοχές του DNA που είναι εμπλουτισμένες για μοτίβα κάποιου μεμονωμένου μεταγραφικού παράγοντα και μπορεί να χρησιμοποιήσουν και τη συντήρηση των αλληλουχιών μεταξύ διαφορετικών ειδών ως επιπλέον κριτήριο (Shlyueva *et al.*,2014). Παρόλα αυτά η σχέση ανάμεσα στη παρουσία ενός μοτίβου, στη πρόσδεση του παράγοντα που αναγνωρίζει το μοτίβο και στη πιθανή ενεργότητα ενισχυτή της αλληλουχίας είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη. Για

παράδειγμα μόνο ένα μικρό ποσοστό των μοτίβων ενός παράγοντα προσδένεται από το παράγοντα μιας και η πρόσδεση μπορεί να εξαρτάται από τη παρουσία άλλων πρωτεϊνών και μπορεί να είναι ειδική για κάθε κυτταρικό τύπο (Yáñez-Cuna *et al.*,2012). Αλλά και οι μέθοδοι που βασίζονται στη συντήρηση των αλληλουχιών αστοχούν στο να βρουν όλους τους ενισχυτές λόγω της γέννησης νέων ενισχυτών κατά την εξέλιξη των ειδών και της αντισταθμιστικής αλλαγής μοτίβων σε συντηρημένους ενισχυτές (Meireles *et al.*,2009). Οι πιο σύγχρονες υπολογιστικές μέθοδοι χρησιμοποιούν machine-learning τεχνικές για να βρουν διακριτικά χαρακτηριστικά των αλληλουχιών του DNA που έχουν επιβεβαιωθεί πειραματικά ότι παρουσιάζουν ενεργότητα ενισχυτή και χρησιμοποιούν αυτά τα χαρακτηριστικά για να προβλέψουν νέους ενισχυτές. Οι μέθοδοι αυτές μπορούν να δώσουν πολύ καλά αποτελέσματα όταν συνδυάζονται με δεδομένα συντήρησης αλληλουχιών ή έκφρασης γειτονικών γονιδίων (Hardison *et al.*,2012). Στο τελευταίο τμήμα των αποτελεσμάτων καθώς και το τμήμα της συζήτησης περιγράφονται αναλυτικά τα ευρήματα και η σημασία των συντηρημένων αλληλουχιών που ανακαλύφθηκαν με βάση μεθόδους της γονιδιωματικής σε συνδυασμό με μελέτη συντήρησης των αλληλουχιών στη διάρκεια της εξέλιξης.

Η τρισδιάστατη οργάνωση του γονιδιώματος στο πυρήνα

Το γονιδίωμα των κυττάρων οργανώνεται στο τρισδιάστατο χώρο του πυρήνα σχηματίζοντας δομές σε διαφορετικές κλίμακες μεγέθους (εικόνα 7). Τεχνικές που βασίζονται στη συνένωση τμημάτων DNA που βρίσκονται κοντά στο χώρο όπως η Hi-C αποκάλυψαν αρχικά το διαχωρισμό του γονιδιώματος των θηλαστικών σε δύο τύπους διαμερισμάτων (compartments) A και B (Zheng and Xie,2019). Αλληλουχίες που βρίσκονται στο διαμέρισμα A σχετίζονται γενικά με γονίδια που μεταγράφονται και φέρουν ενεργές ιστονικές τροποποιήσεις, ενώ τα διαμερίσματα τύπου B σχετίζονται με ανενεργά γονίδια και ιστονικές τροποποιήσεις χαρακτηριστικές των κατεσταλμένων γονιδίων. Το επόμενο επίπεδο οργάνωσης είναι οι επικράτειες (topologically associating domains, TADs), δομές με μέγεθος μεταξύ 0,2-10 Mb. Οι αλληλουχίες μέσα σε ένα TAD έχουν την ιδιότητα να αλληλεπιδρούν πιο συχνά μεταξύ σε σχέση με άλλες περιοχές του γονιδιώματος. Η πιο βαθιά αλληλούχιση των δειγμάτων που έγινε εφικτή τα τελευταία χρόνια οδήγησε στην αποκάλυψη μικρότερων δομών των θηλιών που συνήθως προκύπτουν από τις αλληλεπιδράσεις δύο

αλληλουχιών που είναι προσδεδεμένες από το παράγοντα CTCF (Rao *et al.*,2014). Οι θηλιές μπορούν να έχουν αρχιτεκτονικό ή και λειτουργικό ρόλο φέρνοντας κοντά στο χώρο ενισχυτές με άλλους ενισχυτές ή με τους υποκινητές που ρυθμίζουν. Η παρατήρηση ότι στις δύο άγκυρες των θηλιών στις οποίες συμμετέχει ο CTCF τα μοτίβα του έχουν ισχυρή προτίμηση να βρίσκονται σε convergent διάταξη είναι συμβατή με το μοντέλο που προτείνει ότι η κοχεσίνη οργανώνει τις θηλιές μέσω εξώθησης (loop extrusion model) (Goloborodko *et al.*,2016).



Εικόνα 7: Παρουσιάζονται τα επίπεδα της τρισδιάστατης οργάνωσης των γονιδιωμάτων στο χώρο του πυρήνα (Rowley and Corces,2018).

Συγκεκριμένα προτείνεται ότι η κοχεσίνη εξωθεί τη χρωματίνη μέχρι να μπλοκαριστεί από το CTCF που βρίσκεται προσδεδεμένος σε περιοχή με τη κατάλληλη διάταξη μοτίβων. Στη διαδικασία μπορεί να εμπλέκεται το motor activity της κοχεσίνης που της επιτρέπει να κινείται με υψηλές ταχύτητες στο DNA ή εναλλακτικά άλλες πρωτεΐνες με ικανότητα μετακίνησης στο DNA όπως η RNA polIII μπορεί να βοηθούν τη κοχεσίνη. Η πειραματική μείωση των επιπέδων του CTCF οδήγησε στην απώλεια των

θηλιών χωρίς σημαντικές αλλαγές στις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις επικράτειες πιθανόν επειδή η κοχεσίνη συνεχίζει να εξωθεί τυχαία τη χρωματίνη (Nora *et al.*,2017). Η μείωση των επιπέδων της κοχεσίνης προκάλεσε απώλεια των CTCF θηλιών και ισχυρότερες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των επικρατειών (Schwarzer *et al.*,2017). Αντίθετα αποτελέσματα όπως ήταν αναμενόμενο είχε η μείωση των επιπέδων του WAPL, της πρωτεΐνης που απομακρύνει τη κοχεσίνη από τη χρωματίνη, που οδήγησε σε μεγαλύτερες θηλιές και μείωση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των επικρατειών (Haarhuis *et al.*,2017). Περιέργως η ταχεία μείωση των επιπέδων του CTCF ή της κοχεσίνης σε κύτταρα καλλιέργειας είχε πολύ μικρές επιπτώσεις στα επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων (Nora *et al.*,2017), ενώ αντίθετα η πλήρης έλλειψη του CTCF δεν είναι συμβατή με τη ζωή (Moore *et al.*,2012). Η συσχέτιση ανάμεσα στη μεταγραφική κατάσταση και στη τρισδιάστατη οργάνωση του γονιδιώματος αποτελεί θέμα έντονης μελέτης. Αυτό που δεν έχει καταστεί σαφές ακόμα είναι εάν η ίδια η διαδικασία της μεταγραφής ή οι πρωτεΐνες που σχετίζονται με αυτή συμμετέχουν στη τρισδιάστατη οργάνωση (Rowley and Corces.,2018). Για παράδειγμα η καταστολή της μεταγραφής με τη χρήση τριπτολίδης δεν οδήγησε σε πλήρη εξουδετέρωση των επικρατειών (Rowley *et al.*,2017). Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στο γεγονός ότι ο συγκεκριμένος αναστολέας δεν οδηγεί σε πλήρη απομάκρυνση της RNA polII από τους υποκινητές. Εκτός από τη κοχεσίνη και άλλες πρωτεΐνες φαίνεται να συμμετέχουν στη τρισδιάστατη οργάνωση των θηλιών όπως η YY1 (Weintraub *et al.*,2017). Η χρήση νέων τεχνολογιών αλληλούχισης όπου καθίσταται δυνατό το διάβασμα αλληλουχιών μήκους αρκετών χιλιάδων βάσεων έχει αρχίσει να αποκαλύπτει την ύπαρξη δομών με πολλές θηλιές στις οποίες έρχονται κοντά πολυάριθμα μόρια DNA (Allahyar *et al.*,2018). Η μελέτη των τρισδιάστατων αλληλεπιδράσεων με τη μέθοδο Hi-C σε μεμονωμένα κύτταρα έχει αποκαλύψει το σημαντικό βαθμό ετερογένειας στην οργάνωση της χρωματίνης σε κάθε κύτταρο, αν και η κάλυψη του γονιδιώματος και επομένως η διακριτική ικανότητα για μεμονωμένα κύτταρα είναι περιοριστικός παράγοντας (Stevens *et al.*,2017). Στο σημείο αυτό τη λύση έρχονται να δώσουν οι σύγχρονες μέθοδοι μικροσκοπίας όπως η μέθοδος STORM σε συνδυασμό με ιχνηθέτες Oligopaint που καθιστούν δυνατή την απεικόνιση επικρατειών σε μεμονωμένα κύτταρα (Beliveau *et al.*,2015). Επομένως ο συνδυασμός μεθόδων της γονιδιωματικής και της μικροσκοπίας αναμένεται να αποκαλύψει τις αρχές της οργάνωσης της χρωματίνης στο επίπεδο του ενός κυττάρου.

Η εύρεση των υπερ-ενισχυτών (super-enhancers)

Η ύπαρξη μεμονωμένων περιοχών στο γονιδίωμα που φέρουν συστοιχίες ενισχυτών που αποτελούνται από δύο ή περισσότερους ενισχυτές σε κοντινή απόσταση μεταξύ τους όπως είναι για παράδειγμα τα LCRs (Locus Control Regions) των αιμοσφαιρινών είναι γνωστή εδώ και πολλά χρόνια (Grosveld *et al.*,1987). Με την εφαρμογή μεθόδων της γονιδιωματικής τα τελευταία χρόνια κατέστη δυνατός ο εντοπισμός εκατοντάδων αντίστοιχων περιοχών σε πληθώρα κυτταρικών τύπων που ονομάστηκαν υπερ-ενισχυτές (super-enhancers) (Whyte *et al.*,2013) ή εναλλακτικά stretch enhancers (Parker *et al.*,2013). Οι super-enhancers χαρακτηρίζονται από υψηλότερα επίπεδα πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, συνενεργοποιητών και ιστονικών τροποποιήσεων σε σχέση με τους κλασσικούς ενισχυτές ενώ και το μέγεθος τους είναι κατά μέσο όρο μία τάξη μεγέθους μεγαλύτερο. Οι super-enhancers φαίνεται να ρυθμίζουν σημαντικά γονίδια για τη κυτταρική ταυτότητα των κυττάρων καθώς και ογκογονίδια, είναι εμπλουτισμένοι για πολυμορφισμούς που σχετίζονται με ασθένειες ενώ η ευαισθησία τους σε φαρμακευτικούς αναστολείς των bromodomains όπως το JQ1 είναι ελπιδοφόρα για τη θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνων (Shin,2018). Ο ρόλος των υποκείμενων ενισχυτών που απαρτίζουν κάθε υπερενισχυτή δεν είναι ξεκάθαρος με τα πειράματα συνδυαστικής απαλοιφής επιμέρους ενισχυτών με τη τεχνική CRISPR-Cas να φανερώνουν τόσο ιεραρχική δομή μεταξύ των ενισχυτών (Shin *et al.*,2016) όσο και ανεξάρτητες λειτουργίες (Hay *et al.*,2016).

Ο ρόλος του διαχωρισμού φάσης στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης

Πρόσφατα βρέθηκε ότι οι μεταγραφικοί συνενεργοποιητές BRD4 και MED1 δημιουργούν πηκνώματα (condensates) στο πυρήνα των κυττάρων στα οποία εντοπίζονται super-enhancers (Sabari *et al.*,2018). Τα condensates αυτά έχουν χαρακτηριστικά υγρού τύπου πηκνωμάτων και είναι ευαίσθητα στη δράση παραγόντων που καταστρέφουν τις υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις. Συγκεκριμένα η χρήση του παράγοντα 1,6 hexanediol οδήγησε τόσο στη μείωση των πηκνωμάτων αλλά και ελάττωση των επιπέδων πρόσδεσης των BRD4, MED1 και RNA polIII κατά προτίμηση σε super-enhancers και οδήγησε σε μείωση των επιπέδων έκφρασης των γειτονικών τους γονιδίων. Οι πρωτεΐνες BRD4 και MED1 έχουν περιοχές εγγενώς

αποδιοργανωμένες πλούσιες σε γλουταμίνη, σερίνη και προλίνη οι οποίες περιοχές έχουν την ιδιότητα να σχηματίζουν σταγονίδια διαχωρισμένης φάσης (phase separated droplets) τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* και έχουν την ιδιότητα να ενσωματώνουν άλλες πρωτεΐνες σχηματίζοντας διαμερίσματα διαχωρισμένης φάσης. Δύο άλλες μελέτες αποκάλυψαν ότι και η RNA polIII σχηματίζει σταγονίδια διαχωρισμένης φάσης, τα οποία μάλιστα εξαρτώνται από τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της καρβοξυ-τελικής επικράτειας υποδηλώνοντας ότι η μεταγραφική ενεργοποίηση μπορεί να προκαλεί το διαχωρισμό φάσης της ενεργής χρωματίνης (Boehning *et al.*,2018, Lu *et al.*,2018).

Η εφαρμογή μεθόδων της γονιδιωματικής για τη μελέτη της απόκρισης των κυττάρων σε ανοσολογικά ερεθίσματα

Καινοτομία της Διατριβής

Η παρούσα ερευνητική μελέτη χαρακτηρίζεται από τεχνικές και εννοιολογικές καινοτομίες. Δεν περιορίζεται σε απλή εφαρμογή των πλέον σύγχρονων μεθοδολογιών γονιδιωματικής αλλά σε συνδυαστική και βελτιστοποιημένη επιστημονική προσέγγιση, η οποία περιλαμβάνει σύγχρονες μεθόδους της γονιδιωματικής που συνδυάζονται με αλληλούχιση DNA νέας γενιάς (Next Generation DNA sequencing, NGS) και καινοτόμους αγωγούς ανάλυσης δεδομένων (pipeline of data analysis) οι οποίες εφαρμόζονται για πρώτη φορά στην Ελλάδα. Στο ΙΙΒΕΑΑ έχει δημιουργηθεί το πρώτο και μοναδικό μέχρι στιγμής στην Ελλάδα Κέντρο Γονιδιωματικής (ΕΚΓ, Greek Genome Center, GGC) το οποίο προσφέρει την δυνατότητα μελέτης της δομής και λειτουργίας των γονιδιωμάτων όλων των οργανισμών από απλούς όπως βακτήρια και ιούς έως τον άνθρωπο με άριστη ποιότητα και εκπληκτική ακρίβεια.

Το εργαστήριό μας έχει συμβάλει σημαντικά στην ανάπτυξη και εφαρμογή των μεθοδολογιών αλληλούχισης DNA και ανάλυσης των δεδομένων κάνοντας διαθέσιμα στον Ελληνικό ερευνητικό ιστό πολύτιμα εργαλεία μελέτης και ανάλυσης γονιδιωμάτων τα οποία αναμένεται σύντομα να χρησιμοποιηθούν και στην πρόγνωση και διάγνωση ασθενειών. Η παρούσα μελέτη εμπεριέχει εννοιολογική καινοτομία η οποία έγκειται στο γεγονός πως για πρώτη φορά στην έρευνα σχετικά με τις ιϊκές μολύνσεις συνδυάζονται τριών ειδών προσεγγίσεις (δομικές, λειτουργικές και υπολογιστικές μοντελοποιήσεις) με στόχο την απόκτηση μίας ολοκληρωμένης εικόνας των μοριακών συστημάτων που λειτουργούν συντονισμένα για την επιβίωση των οργανισμών μετά από ιϊκή μόλυνση. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι το γονιδίωμα του

ανθρώπου περιέχει σε ποσοστό που υπερβαίνει το 25% αλληλουχίες DNA οι οποίες έχουν χαρακτηριστεί ως ιικά υπολείμματα της εξέλιξης του ανθρώπινου είδους. Πιστεύουμε ότι η συνεξέλιξη του ανθρώπινου είδους παράλληλα με εκείνη των ιών έχει οδηγήσει στην επιλογή κυτταρικών αντιϊκών μοριακών λειτουργιών οι οποίες διασφαλίζουν ότι κάθε φορά που ένας νέος ιός εμφανίζεται το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου εξελίσσεται ταυτόχρονα προσαρμοζόμενο στις νέες απαιτήσεις. Η κατανόηση όμως αυτών των πολύπλοκων διεργασιών απαιτεί ολιστικές καινοτόμες προσεγγίσεις όπως αυτές που περιγράφονται στην παρούσα ερευνητική πρόταση.

Συνεισφορά της μελέτης στη θεωρητική και εφαρμοσμένη επιστημονική γνώση

Η κατανόηση των μηχανισμών που ευθύνονται για τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης από τα ~1 εκατομμύριο ρυθμιστικά στοιχεία DNA τα οποία βρίσκονται διάσπαρτα στο γονιδίωμα των ανθρώπινων κυττάρων είναι εξέχουσας σημασίας για τη σύγχρονη μοριακή ιατρική, επειδή σήμερα γνωρίζουμε ότι η πλειονότητα των γενετικών πολυμορφισμών που συνδέονται με ασθένειες όπως ο καρκίνος, τα νευροεκφυλιστικά νοσήματα, οι καρδιοπάθειες και ο διαβήτης βρίσκονται εντός απομακρυσμένων ρυθμιστικών στοιχείων DNA και έχουν ως αποτέλεσμα τη μεταβολή της γονιδιακής έκφρασης σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων (Maurano *et al.*, 2012). Συνεπώς, η μεγάλη πρόκληση στη μελέτη της φυσιολογίας και παθοφυσιολογίας του ανθρώπου αφορά στην ανάπτυξη και εφαρμογή μεθόδων υψηλής απόδοσης οι οποίες θα επιτρέψουν την άμεση σύνδεση των διάσπαρτων ρυθμιστικών στοιχείων του DNA με συγκεκριμένα γονίδια και τη διαλεύκανση του τρόπου με τον οποίον τα ρυθμιστικά στοιχεία και η συνδεσιμότητά τους επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση κατά την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και την ενήλικη ζωή.

Σε αυτό το σημείο κρίνεται σκόπιμο να αναφερθούμε σε δημοσιευμένες μελέτες σχετικές με την ερευνητική στρατηγική της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής.

Δημοσιευμένες μελέτες άλλων εργαστηρίων

Μία πρόσφατη μελέτη σε κύτταρα Namalwa που είχαν μολυνθεί με ιό Sendai αποκάλυψε τον εκτεταμένο συνεντοπισμό των μεταγραφικών παραγόντων IRF3 και p65 που αποτελούν δύο από τους κύριους ρυθμιστές της ανοσολογικής απόκρισης σε εκατοντάδες περιοχές πρόσδεσης στο γονιδίωμα (Freeney *et al.*, 2013). Σε ένα μεγάλο

ποσοστό των περιοχών αυτών παρατηρήθηκε επίσης πρόσδεση των παραγόντων Med1 και της RNA polii γεγονός που υπογραμμίζει ότι πιθανόν οι περιοχές αυτές να λειτουργούν ως ενισχυτές που ρυθμίζουν την αντίκλιση απόκριση.

Σε μία ερευνητική προσπάθεια όπου πραγματοποιήθηκε συστηματική ανάλυση της επίδρασης διαφορετικών ανοσολογικών ερεθισμάτων όπως το Ips στο προφίλ των ενισχυτών σε μακροφάγα κύτταρα ποντικού διαπιστώθηκε μεταξύ άλλων η ύπαρξη κρυπτικών (latent) ενισχυτών (Ostuni *et al.*,2013). Οι ενισχυτές αυτοί δεν παρουσίασαν πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων ούτε ενεργές ιστονικές τροποποιήσεις πριν την έλευση του ερεθίσματος, αλλά στρατολόγησαν με επαγόμενο τρόπο το κύριο μεταγραφικό ρυθμιστή των μακροφάγων Pu.1, τους παράγοντες Stat1 και Stat6, και τις χαρακτηριστικές των ενεργών ενισχυτών ιστονικές τροποποιήσεις H3K4me1 και H3K27ac. Κάθε ανοσολογικό ερέθισμα οδήγησε στην ενεργοποίηση κοινών όσο και ειδικών για κάθε ερέθισμα ομάδων ενισχυτών. Οι latent αυτοί ενισχυτές διατήρησαν κάποια επίπεδα H3K4me1 και μετά την απομάκρυνση του ερεθίσματος σαν ένα είδος επιγενετικής μνήμης που επέτρεψε την γρηγορότερη και ισχυρότερη απόκρισή τους μετά από επαναμόλυνση με το ίδιο ερέθισμα.

Η μελέτη των τρισδιάστατων αλληλεπιδράσεων μεταξύ ρυθμιστικών περιοχών DNA με τη μέθοδο HI-C στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά IMR90 μετά από επίδραση με TNF-α αποκάλυψε μόνο μικρές αλλαγές στις τρισδιάστατες θηλιές που σχηματίζουν οι ενισχυτές που αποκρίνονται στον TNF-α (Jin *et al.*,2013). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η πλειοψηφία των αλληλεπιδράσεων μεταξύ υποκινητών και ενισχυτών προϋπάρχει του ερεθίσματος και δεν μεταβάλλονται αξιολογικά με τη παροδική ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση των ενισχυτών. Αντίθετα κατά τη διαφοροποίηση μονοκύτταρων ανθρώπου σε μακροφάγα παρατηρήθηκαν ότι οι αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση συνοδεύτηκαν σε αρκετές περιπτώσεις από αλλαγές στις θηλιές DNA μέσω των οποίων αλληλεπιδρούν μεταξύ τους απομακρυσμένες περιοχές του DNA που ρυθμίζουν καίρια γονίδια για την λειτουργία των μακροφάγων (Phanstiel *et al.*,2017). Οι νέες θηλιές που δημιουργήθηκαν καθώς και εκείνες που διατηρήθηκαν και περιελάμβαναν ενισχυτές που ενεργοποιήθηκαν δημιουργούσαν ομάδες από θηλιές που έρχονταν κοντά στο τρισδιάστατο χώρο του πυρήνα και συνέδεαν ένα υποκινητή με πολλαπλούς απομακρυσμένους ενισχυτές. Οι ενισχυτές αυτοί χαρακτηρίζονταν από ισχυρή παρουσία μοτίβων για παράγοντες της οικογένειας AP-1.

Σε μία άλλη μελέτη πραγματοποιήθηκε λεπτομερή ανάλυση του μεταγραφώματος διαφόρων κυτταρικών τύπων του ανοσοποιητικού συστήματος τα οποία είχαν καλλιεργηθεί παρουσία IFN α για διάφορα χρονικά διαστήματα (Mostafavi *et al.*, 2016). Η ανάλυση αποκάλυψε τη παρουσία ενός πάνελ 166 γονιδίων που επάγονται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους καθώς και ομάδων γονιδίων που επάγονταν μόνο σε συγγενείς κυτταρικούς τύπους ή επάγονταν μόνο σε συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο. Στη συνέχεια μελέτησαν με ChIP-seq την ανακατανομή των θέσεων πρόσδεσης του Stat2 και της RNA polIII στο γονιδίωμα και με ATAC-seq αλλαγές στη προσβασιμότητα της χρωματίνης. Διαπιστώθηκε ταχεία στρατολόγηση των παραγόντων αυτών στο γονιδίωμα με προτίμηση για περιοχές που βρίσκονται κοντά σε επαγόμενα γονίδια, ενώ παράλληλα παρατηρήθηκε αύξηση της προσβασιμότητας της χρωματίνης σε πολλές από αυτές τις περιοχές. Επίσης βρέθηκε ότι υπήρχε θετική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα πρόσδεσης των Stat2 και της RNA polIII και στα επίπεδα επαγωγής των κοντινότερων γονιδίων. Όπως ήταν αναμενόμενο οι θέσεις πρόσδεσης είχαν αυξημένη συχνότητα μοτίβων πρόσδεσης των IRF (ISRE motif), γεγονός που ενισχύει το πιθανό ρυθμιστικό τους ρόλο. Τέλος η κατασκευή ενός ρυθμιστικού δικτύου διαχώρησε τα γονίδια που αποκρίνονται στην IFN α σε 5 ομάδες με λειτουργικές διαφοροποιήσεις μεταξύ τους που επιβεβαιώθηκαν πειραματικά.

Σε μία μελέτη όπου συγκρίθηκαν τα μεταγραφικά προγράμματα, το επιγενετικό προφίλ και η συντήρηση των αλληλουχιών των ενισχυτών μεταξύ μακροφάγων ποντικού και ανθρώπου κατά τη διάρκεια της απόκρισης σε Ips διαπιστώθηκε καταρχάς η μεγάλη συντήρηση των μεταγραφικών προγραμμάτων ανάμεσα στα δύο είδη για τα γονίδια που επάγονται ισχυρά (Donnard *et al.*, 2018). Επιπλέον βρέθηκε ότι οι ενισχυτές των γονιδίων που επάγονται στα πρώτα στάδια της απόκρισης είναι περισσότερο συντηρημένοι στο επίπεδο της αλληλουχίας ανάμεσα στα δύο είδη σε σχέση με τους υπόλοιπους ενισχυτές. Επιπλέον πιθανοί ενισχυτές με συντηρημένο επαγόμενο πρότυπο προσβασιμότητας ανάμεσα στα δύο είδη ρύθμιζαν κατά προτίμηση γονίδια που επάγονταν ισχυρά τόσο στον άνθρωπο όσο και στο ποντίκι.

Σε μια ερευνητική εργασία στην οποία μελετήθηκε το προφίλ των ενισχυτών κατά τη διάρκεια μόλυνσης κυττάρων HuH7 με το κορονοϊό HCoV-229E εντοπίστηκαν περίπου 1000 πιθανοί ενισχυτές με επαγόμενα επίπεδα H3K27ac (Poppe *et al.*, 2017). Τέλος από την ποσοτική ανάλυση πειραμάτων RNA-seq, ChIP-seq και μοτίβων μεταγραφικών παραγόντων σε μακροφάγα ποντικού μετά από χρήση lipid A βρέθηκε ότι μόνο ένας μικρός αριθμός 5 υποκινητών γονιδίων που επάγονται έντονα φέρει

ταυτόχρονα ισχυρά μοτίβα IRF3, RELA καθώς και ισχυρή πρόσδεση των συγκεκριμένων παραγόντων (Tong *et al.*,2016). Επομένως οι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι οι χιλιάδες των ασθενών θέσεων πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων πιθανόν έχουν μικρή έως καθόλου επίδραση στην έκφραση των γονιδίων.

Από τις παραπάνω μελέτες προκύπτει ότι περιβαλλοντικά ερεθίσματα όπως οι ιικές μολύνσεις προκαλούν την ενεργοποίηση ρυθμιστικών στοιχείων του DNA που ήταν ανενεργά πριν την έλευση του ερεθίσματος τα οποία μαζί με τα ρυθμιστικά στοιχεία που ήταν ήδη ενεργά οργανώνουν συντονισμένες αλλαγές στο μεταγραφικό προφίλ των κυττάρων.

Ολοκλήρωση του στόχου της Διδακτορικής Διατριβής

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ταυτοποίηση των ρυθμιστικών στοιχείων του DNA που είναι υπεύθυνα για την απόκριση των κυττάρων σε ιϊκή μόλυνση και η μελέτη της ρυθμιστικής λογικής που διέπει το παραπάνω φαινόμενο μέσω εύρεσης των παραγόντων που ρυθμίζουν τα παραπάνω στοιχεία τα οποία οδηγούν στην ενεργοποίηση των γονιδίων που εγκαθιδρύουν τη κατάσταση απόκρισης των κυττάρων στους ιούς. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ένας πρωτοποριακός συνδυασμός από τις πλέον σύγχρονες μεθόδους της γονιδιωματικής και βιοπληροφορικής ανάλυσης. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων κατά την εξέλιξη της κυτταρικής αντιϊκής απόκρισης με τη μέθοδο RNA-seq, οι αλλαγές στα επίπεδα προσβασιμότητας της χρωματίνης με τις τεχνικές DNaseI-seq και FAIRE-seq, και η ανακατανομή της πρόσδεσης στο γονιδίωμα καίριων μεταγραφικών παραγόντων, συνενεργοποιητών, της μεταγραφικής μηχανής καθώς και ιστονικών τροποποιήσεων που χαρακτηρίζουν τους ενεργούς ενισχυτές. Για την επιβεβαίωση της λειτουργικότητας των ενισχυτών χρησιμοποιήθηκε η τεχνική CHIP-STARR-seq μια μέθοδος που παρείχε τη μοναδική δυνατότητα για το ταυτόχρονο έλεγχο της ενεργότητας ενισχυτή για τις χιλιάδες περιοχές επαγόμενης πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων IRF3 και p65 που συγκαταλέγονται μεταξύ των καίριων ρυθμιστών της αντιϊκής απόκρισης. Η συνδυαστική ανάλυση των παραπάνω δεδομένων με μεθόδους βιοπληροφορικής οδήγησε στη κατάρτιση του άτλαντα των ενισχυτών που ρυθμίζουν την αντιϊκή απόκριση, καίριων παραγόντων που προσδένονται σε αυτούς τους ενισχυτές και των γονιδίων των οποίων μεταβάλλεται η

έκφραση. Τέλος αποδείχτηκε η εξελικτικά συντηρημένη προέλευση κρίσιμων λειτουργικών περιοχών. Με βάση τα παραπάνω η αποκωδικοποίηση της ρυθμιστικής λογικής που κρύβεται πίσω από την αναδιαμόρφωση του γονιδιώματος του ανθρώπου μετά από ιϊκή μόλυνση αποτέλεσε βασικό αντικείμενο μελέτης. Η γνώση που προέκυψε θα οδηγήσει στη βαθύτερη κατανόηση των βασικών αρχών οργάνωσης του γονιδιώματος και στη δυνατότητα πρόβλεψης της απόκρισης των ασθενών σε θεραπευτικές αγωγές έναντι ιϊκών μολύνσεων σε εξατομικευμένη βάση. Τα αποτελέσματα των μελετών μας στοχεύουν στην ανάπτυξη γενετικών δοκιμασιών έναντι μιας ομάδας βιοδεικτών DNA που θα βοηθήσει στην ανάπτυξη εξατομικευμένων θεραπειών.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Καλλιέργεια ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές HeLa και Namalwa, από την ATCC(American Type Culture Collection). Για την καλλιέργεια των κυττάρων HeLa χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό μέσο το DMEM με προσθήκη 10% του τελικού όγκου ορού από νεογνό βοός (FBS) και 1% μίγματος των αντιβιοτικών πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη. Για τα κύτταρα Namalwa χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο RPMI-1640 με προσθήκη 10% FBS και 1% διαλύματος πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης. Η επώαση των κυττάρων έγινε σε ειδικό επωαστήριο στους 37°C και σε συνθήκες 5% CO₂. Τέλος για την κατάψυξη των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 90% FBS-10%DMSO και η φύλαξη των κυττάρων έγινε σε υγρό άζωτο. Πιο αναλυτικά τα πρωτόκολλα καλλιέργειας κυττάρων είναι τα εξής:

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΥΓΡΟΥ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΜΕΣΟΥ

- Προσθήκη 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco by Life Technologies)

*Όταν χρησιμοποιείται για πρώτη φορά το FBS θα πρέπει να επωαστεί στους 56°C για 30 λεπτά για να απενεργοποιηθούν πρωτεΐνες του συμπληρώματος που μπορεί να προκαλέσουν λύση των κυττάρων.

- Προσθήκη 1% πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (PenStrep, Gibco by Life Technologies)

Το FBS και τα αντιβιοτικά προστίθενται στα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιούμε για την καλλιέργεια κυττάρων HeLa (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, SIGMA) και Namalwa (RPMI-1640, SIGMA)

1.1.1. ΠΑΓΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

1. Απόρριψη παλιού θρεπτικού μέσου
2. Πλύση με PBS
3. Προσθήκη PBS με 10% τρυψίνη (0,5% Trypsin-EDTA [10X], Gibco)
4. Επώαση μέχρι να ξεκολλήσουν τα κύτταρα από το υπόστρωμα (χτυπάμε ελαφρά το δοχείο για να βοηθήσουμε τη διαδικασία)

Εάν δουλεύουμε με Namalwa τα βήματα αυτά παραλείπονται

5. Απενεργοποίηση της τρυψίνης με προσθήκη DMEM και καλή ανάδευση
6. Μεταφορά σε καινούριο falcon (50ml ή 15ml, SARSTEDT)
7. Φυγοκέντρηση 1200 rpm για 5 λεπτά
8. Απόρριψη υπερκείμενου
9. Επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας σε 900 μl FBS Heat Inactivated (90%) για μέχρι 5 εκατομμύρια κύτταρα
10. Προσθήκη 10% του τελικού όγκου DMSO (Dimethyl Sulfoxide for cell culture της PanReac AppliChem) στάγδην και με καλή ανάδευση
*Για να μην κάνουν κρυστάλλους τα κύτταρα και καταστραφούν, δρα ως κρυοπροστατευτικό
11. Μοίρασμα του παραπάνω διαλύματος σε vials του 1 ml (γρήγορα γιατί το DMSO είναι τοξικό για τα κύτταρα σε θερμοκρασία δωματίου)
12. Φύλαξη στους -80°C

1.1.2. ΞΕΠΙΑΓΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

1. Τοποθέτηση του vial των παγωμένων κυττάρων σε υδατόλουτρο στους 37°C μέχρι να υγροποιηθεί πάλι η καλλιέργεια
2. Προσθήκη 1 ml καλλιέργειας (όλο το aliquot) σε φλάσκα ή πιάτο με τον κατάλληλο όγκο θρεπτικού μέσου
3. Ήπια ανάδευση
4. Επώαση στους 37°C

Αυτά τα βήματα θα πρέπει να γίνουν γρήγορα γιατί το DMSO είναι τοξικό για τα κύτταρα και θα πρέπει να αραιωθεί άμεσα με θρεπτικό μέσο.

1.1.3. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΣΕ ΜΕΓΑΛΗ ΚΛΙΜΑΚΑ

1. Απόρριψη παλιού θρεπτικού υλικού
2. Πλύση με 1X PBS
3. Προσθήκη 10% τρυψίνη (0,5% Trypsin-EDTA [10X] της gibco) σε 1X PBS (3-5ml για 10αρι πιάτο και φλάσκα, 1ml για 6-well plate)

4. Επώαση 5 λεπτά για να ξεκολλήσουν τα κύτταρα (χτυπάμε ελαφρώς τα πιάτα για να βοηθήσουμε τα κύτταρα να σηκωθούν και ελέγχουμε αν έχει ολοκληρωθεί η διαδικασία στο μικροσκόπιο)
5. Προσθήκη θρεπτικού μέσου DMEM για απενεργοποίηση της τρυψίνης (όσο χρειάζεται για να μπορέσουμε να μοιράσουμε μετά τα κύτταρα στο επιθυμητό αριθμό πιάτων)
6. Μοίρασμα των κυττάρων σε πιάτα ή φλάσκες (πιάτο για κυτταρική καλλιέργεια 100/150 mm² ή φλάσκα της SARSTEDT)
7. Συμπληρώνουμε με τον κατάλληλο όγκο θρεπτικού μέσου (συνολικά τα 10άρια πιάτα και οι φλάσκες παίρνουν 15 ml ενώ τα 15άρια πιάτα παίρνουν 20 ml)
8. Τοποθέτηση στον επωαστήρα

Μόλυνση των κυττάρων με ιό

Για τη μόλυνση των κυττάρων χρησιμοποιείται ο ιός Sendai (Cantell strain, Charles River Laboratories) σε όγκο ίσο με το 1/10 του όγκου του καλλιεργητικού μέσου και επώασεται με τα κύτταρα για επιλεγμένα χρονικά διαστήματα.

ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ (FACS)

Η διαλογή κυττάρων με βάση το φθορισμό (FACS) είναι ένας εξειδικευμένος τύπος κυτταρομετρίας ροής. Παρέχει τη δυνατότητα συλλογής κυττάρων από ένα ετερογενές βιολογικό δείγμα, σε δύο ή περισσότερα δοχεία, με βάση τα χαρακτηριστικά φθορισμού κάθε κυττάρου (Herzenberg, Parks et al. 2002).

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΓΙΑ ΤΟ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

1. Απόρριψη του παλιού θρεπτικού μέσου
2. Πλύση με PBS
3. Αποκόλληση των κυττάρων από το υπόστρωμα με διάλυμα 2mM EDTA σε PBS
4. Μεταφορά των κυττάρων σε καινούριο falcon (50 ml ή 15 ml της SARSTEDT)
5. Φυγοκέντρηση 5 λεπτά 1.200 rpm σε θερμοκρασία δωματίου
6. Απόρριψη υπερκείμενου
7. Επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας σε PBS

8. Προσθήκη χρωστικής DAPI (από 1000X stock) έτσι ώστε να ξεχωρίσουμε τα νεκρά από τα ζωντανά κύτταρα. Μόνο τα νεκρά κύτταρα βάφονται γιατί η χρωστική περνάει από τη κυτταρική μεμβράνη τους
9. Επώαση 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
10. Φυγοκέντρηση 5 λεπτά 1.200 rpm σε θερμοκρασία δωματίου
11. Απόρριψη υπερκείμενου
12. Πλύση με 1 ml FACS Buffer*
13. Φυγοκέντρηση 5 λεπτά 1.200 rpm (3000 rpm στη μικρή φυγόκεντρο) σε θερμοκρασία δωματίου
14. Απόρριψη υπερκείμενου
15. Επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας σε 800-1.200 μl FACS Buffer
16. Φιλτράρισμα του διαλύματος σε φίλτρο με πόρους διαμέτρου 50 μm (της Biogenetics Steriline)
17. Διαχωρισμός κυττάρων

*FACS Buffer: 2% FBS (για να διατηρούνται τα κύτταρα σε καλή κατάσταση), 1 mM EDTA (για να μην κολλάνε τα κύτταρα μεταξύ τους και να μην δημιουργούνται συσσωματώματα) σε 50 ml 1X PBS.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

Διαλύματα

Διάλυμα Λύσης $V_{\text{τελ}}=50$ ml

- 100 mM NaCl
- 10 mM Tris-HCl pH 8.0
- 25 mM EDTA pH 8.0
- 0.5% Sodium dodecyl sulfate (SDS), PanReac AppliChem
- 100 μg Πρωτεϊνάση K ανά δείγμα
- 24 μg/δείγμα RNase A

Την PK και την RNase A τις βάζουμε στη ποσότητα του διαλύματος λύσης που θα χρησιμοποιήσουμε και όχι στα συνολικά 50 ml.

Διαδικασία

1. Συλλογή κυττάρων σε διάλυμα PBS-2 mM EDTA από καλλιέργεια με περίπου 80%–90% πληρότητα και μεταφορά των κυττάρων σε eppendorfs.

- Φυγοκέντρηση στις 1200 rpm (3000 rpm αν δε θέλουμε να κρατήσουμε τα κύτταρα) για 5 λεπτά στους 4°C και απόρριψη του υπερκείμενου
2. Επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας σε 5 ml PBS. Φυγοκέντρηση στις 1200 rpm για 5 λεπτά στους 4°C και απόρριψη του υπερκείμενου (καθαρισμός κυττάρων από τρυψίνη, ορό κτλ)
 3. Επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας σε 300 µl διαλύματος λύσης
 4. Ολονύκτια επώαση των δειγμάτων στους 55°C
 5. Προσθήκη 150 µl φαινόλη και 150 µl χλωροφόρμιο και ήπια ανάδευση για 10 λεπτά στον αναδευτήρα (shaker)(τα erpendorfs να είναι κλεισμένα καλά για να μη χυθούν η φαινόλη και το χλωροφόρμιο)
 6. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφορά της πάνω υδατικής φάσης σε καινούριο erpendorf
 7. Προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου και ήπια ανάδευση για 10 λεπτά στον αναδευτήρα
 8. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφορά της πάνω υδατικής φάσης σε καινούριο erpendorf
 9. Προσθήκη 1/10 του όγκου (30 µl) sodium acetate (COONa) 3M pH 5.2 και 1 µl (20µg) γλυκογόνο σε κάθε δείγμα
 10. Προσθήκη 3 όγκων 100% αιθανόλης (θα πρέπει το DNA να εμφανιστεί ως ίζημα)
 11. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm στους 4°C για 15 λεπτά και απόρριψη του υπερκείμενου
 12. Πλύση της πελέτας με 1 ml 70% αιθανόλη, φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm στους 4°C για 5 λεπτά και απόρριψη του υπερκείμενου
 13. Αφήνουμε ανοιχτά τα erpendorfs για να στεγνώσουν καλά
 14. Επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας σε 50 µl dH₂O και ολονύκτια φύλαξη στους 4°C έτσι ώστε να διαλυθεί καλά το DNA

Εάν το DNA που έχουμε απομονώσει είναι υψηλού μοριακού βάρους τότε θα πρέπει να αποφεύγουμε κάθε είδους στρες, όπως vortex και βίαιη ανάδευση. Επίσης θα πρέπει να κόβουμε τις άκρες από τα tips έτσι ώστε να μη σπάει το DNA καθώς το πιπετάρουμε.

ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η ηλεκτροφόρηση με χρήση πήκτωματος αγαρόζης είναι μια διαδικασία με την οποία μπορεί να διαχωριστεί ένα δείγμα DNA με βάση το μέγεθός του. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για οπτικοποίηση και καθαρισμό του DNA. Κατά την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται ηλεκτρικό πεδίο για να μετακινήσει το αρνητικά φορτισμένο DNA διαμέσου ενός πήκτωματος αγαρόζης προς ένα θετικό ηλεκτρόδιο. Τα μικρότερα κομμάτια του DNA μεταναστεύουν πιο γρήγορα από τα μεγαλύτερα. Για να μπορεί να προσδιοριστεί το μέγεθος ενός κομματιού DNA που διαχωρίζεται σε ένα πήκτωμα φορτώνεται παράλληλα με αυτό και ένας ladder/κλιμακωτός δείκτης μοριακών βαρών (μια συλλογή τμημάτων DNA γνωστών μηκών).

Διαδικασία

1. Πλένουμε καλά μια συσκευή ηλεκτροφόρησης και τα χτενάκια της με απεσταγμένο νερό
2. Σε έναν ογκομετρικό κύλινδρο (500 ή 1000 ml) βάζουμε 1/5 του όγκου από το 5X TBE buffer και τα υπόλοιπα 4/5 τα συμπληρώνουμε με απεσταγμένο νερό
3. Από αυτό μεταφέρουμε 50 ή 100 ml σε μια κωνική φιάλη για να κάνουμε το πήκτωμα αγαρόζης
4. Ζυγίζουμε την κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης (Certified Low Range Ultra Agarose, BIORAD) και τα προσθέτουμε στην κωνική φιάλη με το TBE διάλυμα
5. Βάζουμε την κωνική φιάλη σε φούρνο μικροκυμάτων και θερμαίνουμε μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα αφαιρούμε τη φιάλη και το αναδεύουμε. Αφήνουμε τη φιάλη σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι η θερμοκρασία της να είναι περίπου 60°C
6. Προσθέτουμε 5 ml βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) ανά 100 ml TBE στην κωνική φιάλη και αναδεύουμε
7. Ρίχνουμε το υγρό πήκτωμα μέσα στη συσκευή με τα χτενάκια και το αφήνουμε να πήξει σε θερμοκρασία δωματίου (για επιτάχυνση της πήξης, το βήμα αυτό γίνεται στο cold room)
8. Προσθήκη 20 ml EtBr σε 1Lt TBE διαλύματος το οποίο θα χρησιμοποιηθεί στην ηλεκτροφόρηση έτσι ώστε να μπορέσει να περάσει το ρεύμα μέσα από το πήκτωμα αγαρόζης

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια μέθοδος με την οποία γίνεται ο πολλαπλασιασμός της επιθυμητής αλληλουχίας DNA. Με την PCR μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος μπορεί να πολλαπλασιαστεί μέχρι και δισεκατομμύρια φορές, με την προϋπόθεση ότι είναι γνωστό μέρος της νουκλεοτιδικής της αλληλουχίας. Η αλληλουχία του γονιδίου (ή «τμήματος DNA») είναι απαραίτητη για το σχεδιασμό των συνθετικών DNA ολιγονουκλεοτιδίων, το καθένα συμπληρωματικό με μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA. Τα ολιγονουκλεοτίδια που θα χρησιμοποιηθούν ως εκκινητές πρέπει να δεσμεύονται σε θέσεις αντίθετες από την αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί, με άλλα λόγια καθορίζουν τα άκρα του θραύσματος DNA που πρόκειται να ενισχυθεί. Ένας πλήρης κύκλος μιας PCR αντίδρασης περιλαμβάνει τρία στάδια: την αποδιάταξη του DNA (denaturation), την υβριδοποίηση των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (annealing) και την επιμήκυνση των εκκινητών (extension). Σε μια τυπική αντίδραση, το δίκλωνο DNA αποδιάσσεται με θέρμανση στους 95°C. Στη συνέχεια οι εκκινητές υβριδοποιούνται στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA εκμαγείου με ψύξη του δείγματος στους 50 – 60°C. Ακολουθεί επώαση στους 72°C για την επιμήκυνση των εκκινητών από μία θερμοανθεκτική πολυμεράση, παρουσία των τεσσάρων νουκλεοτιδίων. Καθώς η διαδικασία επαναλαμβάνεται, οι νεοσύστατοι κλώνοι με τη σειρά τους χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για την *in vitro* σύνθεση του DNA. Μετά από μερικούς κύκλους το επικρατές προϊόν είναι ένα τμήμα DNA, το μέγεθος του οποίου αντιστοιχεί στην μεταξύ των δύο αρχικών εκκινητήρων απόσταση. Σε κάθε κύκλο που διαρκεί συνήθως από ένα μέχρι πέντε λεπτά η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται (Saiki, Gelfand *et al.* 1988).

PCR με KAPA HiFi πολυμεράση

- Προσθήκη 25 µl 2X KAPA HiFi Pol (το μείγμα αυτό περιέχει το buffer του ενζύμου, τα νουκλεοτίδια και το ένζυμο)
- 0,4 µl πρόσθιου εκκινητή (από stock 1 µg/µl)
- 0,4 µl ανάστροφου εκκινητή (από stock 1 µg/µl)
- Προσθήκη DNA

- dH₂O μέχρι τελικό όγκο 50 μl

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

PCR με Taq πολυμεράση

- Προσθήκη 5 μl 10X Taq Buffer
- 1 μl Taq (1:10 αραιωμένη) One Taq Hot Start DNA Polymerase της NEB
- 3 μl dNTPs
- 1 μl πρόσθιου εκκινητή (από stock 1μg/μl)
- 1 μl ανάστροφου εκκινητή (από stock 1μg/μl)
- Προσθήκη DNA
- dH₂O μέχρι τελικό όγκο 50 μl

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΧΡΟΝΟ

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real -Time PCR), επίσης γνωστή και ως ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) αναφέρεται στη ενίσχυση DNA με PCR που ελέγχεται, ενώ συμβαίνει η αντίδραση. Στη συμβατική PCR τα δεδομένα συλλέγονται αφού η αντίδραση ενίσχυσης έχει ολοκληρωθεί (endpoint determination), συνήθως μετά από 30-40 κύκλους και η τελική ποσότητα φθορισμού χρησιμοποιείται για να υπολογιστεί η ποσότητα του αρχικού DNA στόχου, χρησιμοποιώντας πηκτωμα αγαρόζης. Αυτή η μέθοδος ποσοτικοποίησης είναι χρονοβόρα, αφού χρειάζεται επεξεργασία των δεδομένων και μετά το πέρας της αντίδρασης. Επιπλέον μπορεί να δώσει αντιφατικά αποτελέσματα μιας και η αποδοτικότητα της αντίδρασης της PCR μειώνεται κατά τη διάρκεια πολλαπλασιασμού, επειδή τα αντιδραστήρια καταναλώνονται και έτσι η αλληλουχία στόχος δεν 7 της PCR σε πραγματικό χρόνο είναι ότι καθορίζει με ακρίβεια το ποσό

του αρχικού DNA στο δείγμα πριν την ενίσχυση. Πρόκειται δηλαδή για μια ποσοτική αντίδραση PCR κατά την οποία ο πολλαπλασιασμός του DNA-στόχου και η ανίχνευση του προϊόντος γίνονται ταυτόχρονα στο ίδιο σωληνάριο, διότι το προϊόν που παράγεται συνδέεται με φθορίζουσα χρωστική που ανιχνεύεται από το οπτικό σύστημα του ειδικού κυκλοποιητή που χρησιμοποιείται στην PCR πραγματικού χρόνου. Με το όργανο αυτό καταγράφεται η κινητική του πολλαπλασιασμού του DNA από την ένταση του σήματος του φθορισμού που αντανακλά το ποσό του νεοσυντιθέμενου DNA σε όλη τη διάρκεια της αντίδρασης. Ο φθορισμός που εκπέμπεται από ιχνηθέτες που υβριδίζονται με το παραγόμενο προϊόν της αντίδρασης, αυξάνεται όσο προχωράει η αντίδραση. Εάν η αλληλουχία στόχος είναι άφθονη στο αρχικό δείγμα, θα παρατηρηθεί αύξηση στην ένταση του φθορισμού σε χαμηλότερο κύκλο από ότι εάν η αλληλουχία στόχος είναι ελλειμματική, οπότε και θα ανιχνευθεί σε μεταγενέστερο κύκλο. Ο φθορισμός που παράγεται σε κάθε κύκλο είναι ανάλογος του πληθυσμού των παραγόμενων αλληλουχιών σε κάθε θερμοδυναμικό κύκλο. Έτσι μπορεί να προσδιοριστεί επακριβώς το ποσό του DNA σε πραγματικό χρόνο. (Stratagene, 2007).

Η καμπύλη ενίσχυσης της αντίδρασης PCR σε πραγματικό χρόνο διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού. Πριν την εκθετική φάση της αντίδρασης παρατηρείται η φάση “υπόβαθρου” ή φάση “θορύβου” κατά την οποία το σήμα φθορισμού είναι ασθενές και δεν μπορεί να διακριθεί από το σήμα υποβάθρου του συστήματος. Καθώς όμως συσσωρεύεται το προϊόν της αντίδρασης, το σήμα ξεπερνά κάποια στιγμή το σήμα του υποβάθρου, αρχίζοντας πλέον να αυξάνεται εκθετικά. Στην εκθετική φάση (exponential phase), η απόδοση της αντίδρασης προσεγγίζει το 100%, με αποτέλεσμα σε κάθε κύκλο να διπλασιάζεται το προϊόν της αντίδρασης καθώς όλα τα απαραίτητα για την PCR συστατικά (π.χ. dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση) βρίσκονται σε περίσσεια. Καθώς συνεχίζεται η αντίδραση, επέρχεται η γραμμική φάση κατά την οποία κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται, σταδιακά, αναστολείς. Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητά της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Ο κορεσμός είναι αποτέλεσμα της μείωσης κάποιου εκ των συστατικών της αντίδρασης, όπως των εκκινητών, της χρωστικής, των dNTPs ή των μορίων της DNA πολυμεράσης. Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεών τους. Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης.

Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR σε πραγματικό χρόνο, ένα κατώφλι-σήμα φθορίζουσας χρωστικής καθορίζει σε πιο σημείο όλα τα δείγματα μπορούν να συγκριθούν. Αυτό το κατώφλι υπολογίζεται ως συνάρτηση του ποσού του υπόβαθρου της φθορίζουσας χρωστικής και τελικά ο κλασματικός αριθμός των κύκλων PCR που απαιτούνται για να παράγουν αρκετό σήμα φθορίζουσας χρωστικής που θα φθάσει σε αυτό το κατώφλι χαρακτηρίζεται ως κατώφλι κύκλου (cycle threshold, Ct). Οι τιμές Ct εξαρτώνται απόλυτα από το αρχικό ποσό του δείγματος και είναι η βάση για τον υπολογισμό των DNA αντιγράφων. Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος. Όσο μεγαλύτερη είναι η αρχική ποσότητα του μορίου-στόχου, τόσο λιγότεροι κύκλοι απαιτούνται για να φτάσει ο φθορισμός στο όριο (κατώφλι), δηλαδή η ποσότητα του προϊόντος σε ανιχνεύσιμα επίπεδα. (Bustin et al., 2005; Kubista et al., 2006).

Για την PCR σε πραγματικό χρόνο πραγματοποιείται ανάμιξη των παρακάτω συστατικών:

- 10 μ L 2X SYBR Green Mix
- 1 μ L πρόσθιου εκκινητή (1:20 αραιωμένος)
- 1 μ L ανάστροφου εκκινητή (1:20 αραιωμένος)
- Προσθήκη επιθυμητής ποσότητας DNA
- Προσθήκη νερού μέχρι τελικό όγκο 20 μ L

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

- Αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA: 95°C για 3 λεπτά
- Αποδιάταξη στην αρχή κάθε κύκλου: 95°C για 15-30 δευτερόλεπτα
- Υβριδοποίηση εκκινητών και επιμήκυνση: 64°C για 30-45 δευτερόλεπτα

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ qPCR

ΠΟΣΟΣΤΟ ΤΟΥ INPUT

Για να γίνει έλεγχος της επιτυχίας του πειράματος ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης, πρέπει να βρεθεί σε τι ποσοστό του input αντιστοιχούν τα κομμάτια DNA που χρησιμοποιούμε ως θετικούς και αρνητικούς στόχους.

Αρχικά, πρέπει να γίνει διόρθωση των τιμών του input που έχουν προκύψει από την PCR γιατί το input έχει αραιωθεί για να μπει στην PCR (συνήθως 1:250 φορές αραιώση). Αυτό γίνεται με τον εξής τύπο: C_q του input - $\log_2(\text{αραιώση του input})$. Στη συνέχεια γίνεται χρήση των διορθωμένων τιμών του input για να γίνει κανονικοποίηση των τιμών των δειγμάτων. Αυτό γίνεται με τον παρακάτω τύπο: $100 \cdot 2^{(\text{διορθωμένο input} - C_q \text{ δείγματος})}$.

FOLD ENRICHMENT

Για την εύρεση των επιπέδων επαγωγής (fold of induction) ενός γονιδίου στις 8 ώρες ιϊκής μόλυνσης σε σχέση με τις 0 ώρες έκφρασης γονιδίων θα πρέπει αρχικά να γίνει διόρθωση με το γονίδιο κυτταρικής οικονομίας που χρησιμοποιήθηκε για την PCR. Αυτό γίνεται βρίσκοντας τις διαφορές των C_q μεταξύ των χρονικών στιγμών (και των καταστάσεων σε αυτές τις χρονικές στιγμές, π.χ. αφαίρεση του C_q των GFP θετικών κυττάρων μετά από 8 ώρες ιϊκής μόλυνσης από το C_q των 0 ωρών) της μόλυνσης για κάθε διαφορετικό στόχο που χρησιμοποιήθηκε. Στη συνέχεια θα πρέπει να γίνει κανονικοποίηση με το γονίδιο κυτταρικής οικονομίας. Αυτό γίνεται με την αφαίρεση του C_q του γονιδίου που μας ενδιαφέρει από το C_q του γονιδίου κυτταρικής οικονομίας. Ύστερα βρίσκουμε τη διαφορά αυτή των C_q (housekeeping gene-antiviral gene) και την υψώνουμε στο τετράγωνο. Αυτό που προκύπτει είναι τα επίπεδα επαγωγής (fold of induction) του γονιδίου που μας ενδιαφέρει σε σχέση με τις 0 ώρες.

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (COMPETENT CELLS)

Για να γίνουν τα κύτταρα δεκτικά στο DNA ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία. Κύτταρα *E. coli* καλλιεργούνται σε πλούσιο υγρό θρεπτικό υλικό LB, συλλέγονται με φυγοκέντρηση ενόσω βρίσκονται στην εκθετική φάση και επαναδιαλυτοποιούνται εκ νέου σε διάλυμα CaCl_2 . Η επώαση σε αυτό το ιονικό περιβάλλον σε θερμοκρασία 4°C καθιστά τα κύτταρα δεκτικά στο DNA. Τα βακτήρια υποβάλλονται σε θερμικό σοκ που πιθανόν επιτρέπει την αναδιάταξη της βακτηριακής μεμβράνης και την αποτελεσματική είσοδο του DNA μέσα στο κύτταρο. Τα κύτταρα γίνονται δεκτικότερα όταν βρίσκονται στην λογαριθμική ή εκθετική φάση ανάπτυξης.

Διαλύματα

0,1 M CaCl₂ (1L)

- 100 mL 1M CaCl₂
- 900 mL ddH₂O

0,1 M CaCl₂ με 15% γλυκερόλη

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

Η κατεργασία βακτηριακών κυττάρων DH5a ώστε να γίνουν δεκτικά για μετασχηματισμό είναι η εξής:

1. Σε collection tube γίνεται προσθήκη 3 mL LB
2. Με τη χρήση tip, πραγματοποιείται συλλογή μιας μόνο αποικίας DH5a και το tip με την αποικία, ενοφθαλμίζεται στο collection tube
3. Επώαση σε αναδευτήρα (orbital shaker) στους 37 °C στις 220 στροφές ανά λεπτό ολονυχτίς
4. Σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη των 250 mL, γίνεται προσθήκη 100-200 mL LB
5. Το LB επιμολύνεται, εκ νέου, με 1-3 mL από την παραπάνω κορεσμένη καλλιέργεια DH5a
6. Επώαση της κωνικής φιάλης στους 37 °C στις 220 στροφές ανά λεπτό, έως ότου η οπτική πυκνότητα του θρεπτικού υλικού στα 600 nm (OD600) φτάσει την τιμή 0,5 (~2-3 ώρες)
7. Μεταφορά των κυττάρων σε falcons των 50 mL και επώαση στον πάγο για 40 λεπτά
8. Φυγοκέντρηση των κυττάρων για 10 λεπτά στις 3.500 rpm στους 4 °C
9. Απομάκρυνση του υπερκείμενου με προσοχή να μη διαταραχθεί η πελέτα των κυττάρων
10. Επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας των κυττάρων σε 30 mL διαλύματος 0,1 M CaCl₂ με ήπια ανάδευση
11. Επώαση των κυττάρων στον πάγο για 20 λεπτά
12. Φυγοκέντρηση των κυττάρων για 10 λεπτά στις 3.500 rpm στους 4 °C

13. Απομάκρυνση του υπερκείμενου με προσοχή να μη διαταραχθεί η πελέτα των κυττάρων
14. Επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας των κυττάρων σε 5 mL 0,1 M CaCl₂ με 15% γλυκερόλη
15. Το εναιώρημα των κυττάρων μοιράζεται ανά 200 μL σε erpendorf tubes και γίνεται αποθήκευση στους -80 °C

Παρατηρήσεις

- Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιείται σε cold room.
- Η χρήση σχετικά μεγάλης κωνικής φιάλης εξασφαλίζει τον αποτελεσματικότερο αερισμό των κυττάρων κατά την ανάδευση.
- Η καλλιέργεια η οποία θα χρησιμοποιηθεί, πρέπει να βρίσκεται στην πρόιμη περιοχή της εκθετικής φάσης της καμπύλης ανάπτυξης. Σε αυτό το σημείο τα κύτταρα έχουν επάρκεια θρεπτικών υλικών και οξυγόνου.
- Εάν η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας (OD600) ξεπεράσει την τιμή 0,5 τότε η αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού μειώνεται δραστικά.
- Τα διαλύματα 0,1 M CaCl₂ και 0,1 M CaCl₂ με 15% γλυκερόλη πρέπει να τοποθετούνται στον πάγο αμέσως μετά την παρασκευή τους.
- Η κατεργασία με Ca⁺⁺ καθιστά το κυτταρικό περίβλημα σχετικά διαπερατό στο DNA.

ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

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

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

Πειραματική διαδικασία

1. Μεταφορά των τρυβλίων με το στερεό θρεπτικό υλικό από τους 4 °C, στους 37 °C ώστε να απομακρυνθεί η υγρασία
2. Σε erppendorf tube μεταφέρονται, μέσα σε πάγο, 60 μL ικανά προς μετασχηματισμό κύτταρα DH5a
3. Προσθήκη ~250 pg πλασμιδιακού DNA σε όγκο που δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1/10 του όγκου των κυττάρων που χρησιμοποιούνται
4. Πραγματοποιείται ήπια ανάδευση
5. Επώαση του μείγματος στον πάγο για 30 λεπτά
6. Η είσοδος του πλασμιδίου στα κύτταρα επιτυγχάνεται με την υποβολή τους σε θερμικό σοκ (heat shock) στους 42 °C για 45 δευτερόλεπτα
7. Επώαση στον πάγο για 5 λεπτά χωρίς μετακίνηση των δειγμάτων
8. Προσθήκη 300 μL LB στα κύτταρα
9. Επώαση στους 37 °C για 1 ώρα σε αναδευτήρα (orbital shaker) στις 220 στροφές ανά λεπτό
10. Μεταφορά των κυττάρων σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό υλικό και επίστρωσή τους σε ολόκληρη την επιφάνεια με τη χρήση cell spreader
11. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C για περίπου 18 ώρες

Παρατηρήσεις

- Κατά τη διάρκεια του πειράματος απαιτείται φλόγιστρο ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος μόλυνσης της καλλιέργειας.
- Η επώαση των βακτηρίων και του πλασμιδίου στους 42 °C για 45 δευτερόλεπτα πραγματοποιείται ώστε να δημιουργηθούν μικρές ασυνέχειες στις μεμβράνες και τα τοιχώματα και έτσι να περάσει το πλασμίδιο στο εσωτερικό των βακτηρίων. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται Heat Shock.
- Κατά την εξάπλωση των βακτηρίων στο τρυβλίο με το στερεό θρεπτικό υλικό, δίνεται προσοχή το cell spreader να ξεπλένεται με αιθανόλη, να περνιέται από φλόγα και να ψύχεται πριν και μετά από κάθε εξάπλωση για αποφυγή μόλυνσης.
- Κατά τη στρώση των τρυβλίων, είναι σημαντικό να υπάρχει και ένα αρνητικό control στο οποίο στρώνονται μόνο κύτταρα χωρίς πλασμίδιο και να χειρίζεται πρώτο ώστε να μειωθεί η πιθανότητα μόλυνσης.

MIDI-PREP

Με βάση το πρωτόκολλο του kit της Macherey-Nagel “NucleoBond Xtra plasmid purification”

Διαδικασία

1. Μεταφορά της καλλιέργειας βακτηρίων σε ειδικά πλαστικά μπουκάλια των 500ml για φυγοκέντρηση
2. Φυγοκέντρηση στις 3.500 rpm για 15 λεπτά στους 4°C
3. Απόρριψη υπερκείμενου
4. Επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας με 8ml Resuspension Buffer + RNase χρησιμοποιώντας πιπεταδόρο
5. Προσθήκη 8 ml Lysis Buffer και ήπια ανάδευση. Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
6. Προσθήκη 12 ml Equilibration Buffer στη στήλη με το φίλτρο (παρέχονται από το kit) με κυκλική κίνηση έτσι ώστε όλο το φίλτρο να βραχεί από το Buffer
7. Προσθήκη 8 ml Neutralization Buffer και ανάδευση μέχρι να φύγει τελείως το μπλε χρώμα του Lysis Buffer
8. Μεταφορά του μείγματος μέσα στο φίλτρο της στήλης
9. Αφήνουμε τη στήλη να αδειάσει
10. Πλύση του φίλτρου της στήλης με 5 ml Equilibration Buffer (πάλι με κυκλική κίνηση και αφήνουμε τη στήλη να αδειάσει τελείως)
11. Απόρριψη του φίλτρου
12. Πλύση της στήλης με 8 ml Wash Buffer (αφήνουμε τη στήλη να αδειάσει τελείως)
13. Μεταφορά της στήλης σε 50άρι falcon
14. Προσθήκη 5 ml Elution Buffer (αφήνουμε τη στήλη να αδειάσει τελείως). Το έκλουσμα που θα περάσει από τη στήλη θα περιέχει το πλασμίδιο.
15. Προσθήκη 3,5 ml ισοπροπανόλης (2-Propanol της PanReac AppliChem) για κατακρήμνιση του DNA και έντονη ανάδευση
16. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 30 λεπτά στους 4°C και απόρριψη του υπερκείμενου με προσοχή
17. Προσθήκη 2 ml 70% αιθανόλη στην πελέτα (δε φαίνεται συνήθως)

18. Φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm για 5 λεπτά και απόρριψη του υπερκείμενου με προσοχή
19. Επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας σε 500 µl dH₂O στα τοιχώματα του γυάλινου σωλήνα
20. Μεταφορά σε Eppendorf

MINI-PREP

Διαλύματα

Διάλυμα Επαναδιαλυτοποίησης (V=100 ml):

- 2.5 mg/ml λυσοζύμη & RNase
- 25% w/v σουκρόζη (D-Sucrose Molecular Biology Grade της PanReac AppliChem)
- 25 mM (0.303 g/100 ml) Tris Base της Fisher Chemical
- 10 mM (2.92 g/100 ml) EDTA της AppliChem
- Προσθήκη υδροχλωρικού οξέος (Hydrochloric acid 1 mol/L της Carlo Erba reagents) μέχρι pH 8.0

Διάλυμα λύσης (V=100 ml):

- 0.8 g NaOH
- 10 ml 10% SDS
- νερό μέχρι τελικό όγκο 100 ml

Διάλυμα εξουδετέρωσης (V=100 ml):

- 29.6 g οξικό νάτριο (Sodium Acetate της SIGMA-Aldrich) σε νερό και
- προσθήκη acetic acid στάγδην μέχρι pH 4.8

Διάλυμα πλύσης (V=100 ml):

- 25 mM (0.303g/100ml) Tris Base της Fisher Scientific
- 10 mM (2.92g/100ml) EDTA της AppliChem,
- 0.3 M (10 ml από stock 3M) οξικό νάτριο
- Προσθήκη νερού μέχρι τελικό όγκο 100 ml

Tris-HCl-EDTA: Το TE buffer προστατεύει το DNA από νουκλεάσες.

- 25 mM (0.303g/100ml) Tris Base της Fisher Chemical
- 10 mM (2.92g/100ml) EDTA της AppliChem
- Προσθήκη υδροχλωρικού οξέος (Hydrochloric acid 1 mol/L της Carlo Erba reagents) μέχρι pH 8.5
- Προσθήκη νερού μέχρι τελικό όγκο 100 ml

Διαδικασία

1. Μεταφορά της καλλιέργειας σε eppendorfs (1.5 ml) και φυγοκέντρωση έτσι ώστε να απομονωθούν τα κύτταρα σαν πελέτα
2. Επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας σε 200 μl διαλύματος επαναδιαλυτοποίησης και έντονη ανάδευση (vortex). Επώαση 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
3. Προσθήκη 400 μl διαλύματος λύσης, κλείσιμο των eppendorfs και ήπια ανάδευση με το χέρι (δεν αναδεύω με vortex, πιπέτα ή με άλλο βίαιο τρόπο γιατί το γενωμικό DNA θα σπάσει και θα προκληθεί μόλυνση του πλασμιδιακού DNA). Τα δείγματα θα πρέπει να γίνουν διαυγή καθώς τα κύτταρα λύνονται. Επώαση 4-5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
4. Προσθήκη 300 μl διαλύματος εξουδετέρωσης και ήπια ανάδευση με το χέρι. Παρατηρείται δημιουργία ενός άσπρου ιζήματος, το οποίο αποτελείται από μετουσιωμένες πρωτεΐνες και γενωμικό DNA
5. Επώαση στον πάγο για 5 λεπτά
6. Φυγοκέντρωση των δειγμάτων στις 13.000 rpm για 8-10 λεπτά στους 4°C. Θα σχηματιστεί πελέτα από τα μετουσιωμένα συστατικά του κυττάρου
7. Μεταφορά του υπερκεείμενου σε νέα eppendorfs. Αυτό περιέχει το πλασμιδιακό DNA το οποίο δεν έχει αποδιαταχθεί λόγω της υπερελικωμένης διαμόρφωσής του
8. Προσθήκη 700μl παγωμένης ισοπροπανόλης (IPA) στο υπερκεείμενο και ανάδευση με το χέρι. Επώαση 10 λεπτά στους -80°C για να γίνει κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA
9. Φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C.
10. Απόρριψη του υπερκεείμενου με προσοχή χωρίς να πειράζουμε την πελέτα και αφήνουμε ανοιχτά τα eppendorfs για 5 λεπτά για να στεγνώσουν.
11. Προσθήκη 700μl διάλυμα πλύσης και επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας με ήπια ανάδευση
12. Προσθήκη 700μL IPA και επώαση για 10 λεπτά για κατακρήμνιση του DNA

13. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 5 λεπτά στους 4°C
*Εναλλακτικά αντί των βημάτων 10 και 11 γίνεται πλύση με 1ml 70% αιθανόλη
14. Απόρριψη του υπερκείμενου και αφήνουμε ανοιχτά τα eppendorfs να στεγνώσουν
15. Επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας σε 50 µl νερό με RNaseA

Η μέθοδος RNA-seq

Απομόνωση RNA

1. Καλλιέργεια των κυττάρων σε πιάτα των 60mm έως ότου η καλλιέργεια φθάσει σε πυκνότητα 90-100%.
2. Μόλυνση των κυττάρων με ιό Sendai για 3 και 6 ώρες
3. Απόρριψη θρεπτικού διαλύματος και έκπλυση των κυττάρων με 10 ml PBS.
4. Επώαση με 2 ml 0.5% διαλύματος θρυψίνης για 5 λεπτά για την αποκόλληση των προσκολλημένων κυττάρων. Εναλλακτικά τα κύτταρα αποκολλώνται με διάλυμα PBS-2mM EDTA, επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και πιπετάρισμα για αποκόλληση των κυττάρων
5. Αναστολή της δράσης της θρυψίνης με προσθήκη 10 ml διαλύματος DMEM εμπλουτισμένο με 10% FBS.
6. Συλλογή των κυττάρων σε σωλήνες falcon των 15 ml και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 1200rpm.
7. Απόρριψη του υπερκείμενου και επαναδιάλυση των κυττάρων σε 1 ml παγωμένου διαλύματος PBS. Μεταφορά σε σωλήνες eppendorf 1.5 ml και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 3000rpm.
8. Απόρριψη του υπερκείμενου.
9. Επανάληψη των βημάτων 7 και 8.
10. Επαναδιάλυση του ιζήματος (πελέτας) σε 1 ml διαλύματος TRI reagent (Sigma Aldrich) με έντονο πιπετάρισμα και ανάδευση σε συσκευή vortex για 15 δευτερόλεπτα σε υψηλή ταχύτητα.
11. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 5 λεπτά.
12. Προσθήκη 200 µl χλωροφορμίου και ανάδευση στο vortex για 15 δευτερόλεπτα σε υψηλή ταχύτητα.
13. Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13.000rpm στους 4°C.
14. Μεταφορά του υπερκείμενου που περιέχει το RNA σε νέο σωληνάκι eppendorf και προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης.

15. Επώαση στους -80°C για 10 λεπτά.
16. Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13.000rpm στους 4°C .
17. Απόρριψη του υπερκείμενου.
18. Έκπλυση του ιζήματος (πελέττας) με 500 ml διαλύματος αιθανόλης 75%.
19. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000rpm στους 4°C .
20. Απόρριψη του υπερκείμενου. Το ίζημα (πελέττα) αφήνεται να στεγνώσει.
21. Επαναδιάλυση του ιζήματος (πελέττας) σε 80 μl RNase-free H_2O και προσθήκη 1 μl RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor, Thermo Fisher Scientific.

Κατεργασία με DNase I

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

Καθαρισμός RNA

Καθαρισμός του RNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο RNeasy Mini kit (Qiagen).

23. Προσθήκη 350 μl διαλύματος RLT και καλή ανάμειξη με χρήση πιπέττας.
24. Προσθήκη 250 μl 100% αιθανόλης και καλή ανάμειξη με χρήση πιπέττας.
25. Μεταφορά του δείγματος (700 μl) σε RNeasy Mini στήλη που έχει τοποθετηθεί σε σωληνάκι συλλογής των 2 ml. Φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα στις 13000rpm. Απόρριψη του διηθήματος (flow-through).
26. Προσθήκη 500 μl διαλύματος RPE που περιέχει αιθανόλη στη RNeasy στήλη. Φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα στις 13.000rpm ώστε να γίνει ξέπλυμα της μεμβράνης της στήλης. Απομάκρυνση του διηθήματος (flow-through).
27. Προσθήκη 500 μl διαλύματος RPE που περιέχει αιθανόλη στην RNeasy στήλη. Φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 13000rpm ώστε να ξεπλυθεί η μεμβράνη της στήλης.
28. Μεταφορά της στήλης RNeasy σε νέο σωληνάκι συλλογής των 2 ml και απόρριψη του παλιού σωλήνα συλλογής με το διήθημα (flow-through). Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13.000rpm.
29. Μεταφορά της στήλης RNeasy σε νέο σωληνάκι συλλογής των 1.5 ml. Προσθήκη 30 μl RNase-free H_2O πάνω στη μεμβράνη της στήλης. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 2 λεπτά.
30. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13.000rpm, ώστε να έχουμε έκλυση του RNA.
30. Απόρριψη της στήλης και προσθήκη 1 μl RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor, Thermo Fisher Scientific

Έλεγχος της καθαρότητας και της ακεραιότητας του RNA

31. Μέτρηση της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του RNA με το μηχάνημα

Nanodrop. Για να θεωρηθεί ότι το RNA είναι υψηλής καθαρότητας πρέπει ο λόγος A260/A280 να είναι μεταξύ 1.8-2 και ο λόγος A260/A230 πάνω από 2.

32. Φορτώνουμε 1 µg RNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1% και το ηλεκτροφορούμε στα 100V προκειμένου να ελέγξουμε την ακεραιότητα του RNA. Η εμφάνιση των δύο ριβοσωμικών υπομονάδων ως 2 ξεκάθαρες ζώνες στο πήκτωμα και η έλλειψη ιχνών αποδόμησης του RNA καταδεικνύουν την ακεραιότητα του απομονωμένου RNA.

Κατασκευή βιβλιοθήκης

Η κατασκευή της βιβλιοθήκης πραγματοποιείται σύμφωνα με τροποποιήσεις του πρωτόκολλου του Illumina TruSeq RNA kit.

Επιλογή poly-A mRNA

33. Ανάμειξη **1000 ng** RNA και υψηλής καθαρότητας H₂O σε τελικό όγκο **16.7 µl**.

34. Ανάδευση των **RNA Purification Beads** και προσθήκη **16.7 µl** στο δείγμα RNA.

35. Επώαση στο PCR μηχάνημα:

65° C - 5 λεπτά

4° C - αναμονή

36. Όταν το PCR μηχάνημα φτάσει στους 4° C πραγματοποιείται μεταφορά των δειγμάτων στον πάγκο (25° C).

37. Μεταφορά των δειγμάτων σε μαγνητικό rack για 5 λεπτά.

38. Απομάκρυνση του υπερκείμενου.

39. Αφαίρεση δειγμάτων από το μαγνήτη.

40. Προσθήκη **66.7µl Bead Washing Buffer** και ανακάτεμα με χρήση πιπέττας μέχρι το μείγμα να γίνει ομοιογενές.

41. Μεταφορά των δειγμάτων σε μαγνητικό rack για 5 λεπτά.

42. Απομάκρυνση και απόρριψη του υπερκείμενου.

43. Προσθήκη **16.7µl Elution Buffer** και ανακάτεμα με χρήση πιπέττας μέχρι το μείγμα να γίνει ομοιογενές.

44. Επώαση στο PCR μηχάνημα

- 80° C - 2 λεπτά
- 25° C - αναμονή
45. Όταν το PCR μηχάνημα φτάσει στους 4° C πραγματοποιείται μεταφορά των δειγμάτων στον πάγκο (25° C).
46. Προσθήκη **16.7μl Bead Binding Buffer** και πιπετάρισμα μέχρι το μείγμα να γίνει ομοιογενές.
47. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
48. Μεταφορά των δειγμάτων σε μαγνητικό rack για 5 λεπτά.
49. Απομάκρυνση και απόρριψη του υπερκείμενου.
50. Αφαίρεση δειγμάτων από το μαγνήτη.
51. Προσθήκη **66.7μl Bead Washing Buffer** και ανακάτεμα με χρήση πιπέττας μέχρι το μείγμα να γίνει ομοιογενές.
52. Μεταφορά των δειγμάτων σε μαγνητικό rack για 5 λεπτά.
53. Απομάκρυνση και απόρριψη του υπερκείμενου.
54. Προσθήκη **6.5μl Elute, Prime, Fragment Mix** και ανακάτεμα με χρήση πιπέττας μέχρι το μείγμα να γίνει ομοιογενές.
55. Επώαση στο PCR μηχάνημα:
- 94° C - 8 λεπτά
 - 4° C - αναμονή
56. Μεταφορά των δειγμάτων σε μαγνητικό rack για 5 λεπτά.
57. Μεταφορά **5.7μl** του υπερκείμενου σε νέο 0.2ml PCR tube.

Σύνθεση Μονόκλωνου DNA

58. Προσθήκη **2.7μl First Strand Master Mix/Super Script II mix** στα δείγματα.
59. Επώαση στο PCR μηχάνημα:
- 25° C - 10 λεπτά
 - 42° C - 50 λεπτά
 - 70° C - 15 λεπτά
 - 4° C - αναμονή

Σύνθεση Δίκλωνου DNA

60. Προσθήκη **8.3μl Second Strand Master Mix** στα δείγματα.

61. Επώαση στο PCR μηχάνημα στους 16° C για μια ώρα.
62. Μεταφορά των δειγμάτων στον πάγκο (25° C).
63. Προσθήκη **30μl** από καλά αναμεμειγμένα **AMPure XP** σφαιρίδια και ανακάτεμα με χρήση πιπέττας μέχρι το μείγμα να γίνει ομοιογενές.
64. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.
65. Μεταφορά των δειγμάτων σε μαγνητικό rack για 5 λεπτά.
66. Απομάκρυνση και απόρριψη **45 μl** από το υπερκείμενο.
67. Διατήρηση δειγμάτων στο μαγνήτη και προσθήκη **200μl** 80% αιθανόλη.
68. Επώαση για 30 δευτερόλεπτα. Απομάκρυνση και απόρριψη του υπερκείμενου.
69. Επανάληψη βημάτων 66 και 67.
70. Προσθήκη **22 μl Resuspension Buffer** και ανακάτεμα με χρήση πιπέττας μέχρι το μείγμα να γίνει ομοιογενές.
71. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
72. Μεταφορά των δειγμάτων σε μαγνητικό rack για 5 λεπτά.
73. Μεταφορά **20 μl** από το υπερκείμενο σε νέο 0.2ml PCR tube.

Επιδιόρθωση των Άκρων του DNA

74. Προσθήκη **13.3 μl** από **End Repair mix** στα δείγματα.
75. Επώαση στο PCR μηχάνημα στους 30° C για 30 λεπτά.
76. Προσθήκη **53.3 μl** από καλά αναμεμειγμένα **AMPure XP** σφαιρίδια και ανακάτεμα με χρήση πιπέττας μέχρι το μείγμα να γίνει ομοιογενές.
77. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.
78. Μεταφορά των δειγμάτων σε μαγνητικό rack για 5 λεπτά.
79. Απομάκρυνση και απόρριψη **81.6 μl** από το υπερκείμενο.
80. Διατήρηση δειγμάτων στο μαγνήτη και προσθήκη **200μl** 80% αιθανόλη.
81. Επώαση για 30 δευτερόλεπτα. Απομάκρυνση και απόρριψη του υπερκείμενου.
82. Επανάληψη βημάτων 79 και 80.
83. Προσθήκη **7.8 μl Resuspension Buffer** και ανακάτεμα με χρήση πιπέττας μέχρι το μείγμα να γίνει ομοιογενές.
84. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
85. Μεταφορά των δειγμάτων σε μαγνητικό rack για 5 λεπτά.
86. Μεταφορά **5.8 μl** από το υπερκείμενο σε νέο 0.2ml PCR tube.

Προσθήκη 'Α' Βάσεων στα 3' Άκρα

87. Προσθήκη **4.2 μl A-Tailing mix** στα δείγματα.
88. Επώαση στο PCR μηχάνημα στους 37° C για 30 λεπτά.

Πρόσδεση των adapters στα DNA τμήματα

89. Προσθήκη **0.8 μl DNA Ligase mix**
0.8 μl Resuspension Buffer
0.8 μl RNA Adapter mix
90. Επώαση στο PCR μηχάνημα στους 30° C για 10 λεπτά.
91. Προσθήκη **1.7 μl Stop Ligase mix.**
92. Προσθήκη **14 μl** από καλά αναμεμειγμένα **AMPure XP** σφαιρίδια και ανακάτεμα με χρήση πιπέττας μέχρι το μείγμα να γίνει ομοιογενές.
93. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.
94. Μεταφορά των δειγμάτων σε μαγνητικό rack για 5 λεπτά.
95. Απομάκρυνση και απόρριψη **23.2 μl** από το υπερκείμενο.
96. Διατήρηση δειγμάτων στο μαγνήτη και προσθήκη **200μl** 80% αιθανόλη.
97. Επώαση για 30 δευτερόλεπτα. Απομάκρυνση και απόρριψη του υπερκείμενου.
98. Επανάληψη βημάτων 95 και 96.
99. Προσθήκη **18.7 μl Resuspension Buffer** και ανακάτεμα με χρήση πιπέττας μέχρι το μείγμα να γίνει ομοιογενές.
100. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
101. Μεταφορά των δειγμάτων σε μαγνητικό rack για 5 λεπτά.
102. Μεταφορά **16.7 μl** από το υπερκείμενο σε νέο 0.2ml PCR tube.
103. Προσθήκη **16.7 μl** από καλά αναμεμειγμένα **AMPure XP** σφαιρίδια και ανακάτεμα με χρήση πιπέττας μέχρι το μείγμα να γίνει ομοιογενές.
104. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.
105. Μεταφορά των δειγμάτων σε μαγνητικό rack για 5 λεπτά.
106. Απομάκρυνση και απόρριψη **28.3 μl** από το υπερκείμενο.
107. Διατήρηση δειγμάτων στο μαγνήτη και προσθήκη **200μl** 80% αιθανόλη.
108. Επώαση για 30 δευτερόλεπτα. Απομάκρυνση και απόρριψη του

υπερκείμενου.

109. Επανάληψη βημάτων 106 και 107.

110. Προσθήκη **9.7 µl Resuspension Buffer** και ανακάτεμα με χρήση πιπέττας μέχρι το μείγμα να γίνει ομοιογενές.

111. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.

112. Μεταφορά των δειγμάτων σε μαγνητικό rack για 5 λεπτά.

113. Μεταφορά **7.7 µl** από το υπερκείμενο σε νέο 0.2ml PCR tube.

Υπολογισμός του αριθμού των απαραίτητων κύκλων PCR

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

114. Ανάμειξη:

8 µl H₂O

1 µl από τη βιβλιοθήκη

1 µl TruSeq PCR primer cocktail (25µM)

10 µl KAPA SYBR FAST 2x PCR master mix

115. Ενίσχυση με το ακόλουθο πρωτόκολλο qPCR:

α. 3 λεπτά στους 95° C

β. 20 κύκλοι:

30 δευτερόλεπτα στους 95 ° C

30 δευτερόλεπτα στους 63 ° C

30 δευτερόλεπτα στους 72 ° C

plate read

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

Ενίσχυση βιβλιοθήκης με PCR

117. Ανάμειξη:

6.7 µl Adapter ligated DNA από το βήμα 112

1.7 µl PCR Primer Cocktail

8.3 µl PCR Master Mix

118. Ενίσχυση με το ακόλουθο πρωτόκολλο:

α. 98° C για 30 δευτερόλεπτα

β. Αριθμός κύκλων σύμφωνα με το βήμα 115:

98° C για 10 δευτερόλεπτα

60° C για 30 δευτερόλεπτα

72° C για 30 δευτερόλεπτα

γ. 72° C για 5 λεπτά

δ. Αναμονή 4° C

119. Προσθήκη **16.7 µl** από καλά αναμεμειγμένα **AMPure XP** σφαιρίδια και ανακάτεμα με χρήση πιπέττας μέχρι το μείγμα να γίνει ομοιογενές.

120. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.

121. Μεταφορά των δειγμάτων σε μαγνητικό rack για 5 λεπτά.

122. Απομάκρυνση και απόρριψη υπερκείμενου.

123. Διατήρηση δειγμάτων στο μαγνήτη και προσθήκη **200µl** 80% αιθανόλη.

124. Επώαση για 30 δευτερόλεπτα. Απομάκρυνση και απόρριψη του υπερκείμενου.

125. Επανάληψη βημάτων 122 και 123.

126. Προσθήκη **12 µl Resuspension Buffer** και ανακάτεμα με χρήση πιπέττας μέχρι το μείγμα να γίνει ομοιογενές.

127. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.

128. Μεταφορά των δειγμάτων σε μαγνητικό rack για 5 λεπτά.

129. Μεταφορά **10 µl** από το υπερκείμενο σε νέο 0.2ml PCR tube.

Ανάλυση του μεγέθους της βιβλιοθήκης στο μηχάνημα Bioanalyzer 2100

130. Προετοιμασία 1µl της βιβλιοθήκης σύμφωνα με τις οδηγίες του

Agilent DNA 1000 kit και ανάλυση στο μηχάνημα Bioanalyzer 2100.

Ποσοτικοποίηση της Βιβλιοθήκης

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

131. Προετοιμασία αραιώσεων της βιβλιοθήκης 1:1000 και 1:10.000.

132. Προετοιμασία των ακόλουθων αντιδράσεων:

4 µl από βιβλιοθήκες γνωστής συγκέντρωσης (Kapa Library

Quantitation Kit) ή 4 µl από τις αραιώσεις της βιβλιοθήκης

1 µl TruSeq PCR primer cocktail (25µM)

5 µl H₂O

10 µl KAPA SYBR FAST 2x PCR master mix

133. Πολλαπλασιασμός:

α. 3 λεπτά στους 95° C

β. 20 κύκλοι:

30 δευτερόλεπτα στους 95° C

30 δευτερόλεπτα στους 63° C

30 δευτερόλεπτα στους 72° C

plate read

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

TruSeq PCR Primer Cocktail

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

Σε νέο σωληνάκι αναμειγνύονται:

25 µl TruSeq PCR primer 1 (100µM)

25 µl TruSeq PCR primer 2 (100µM)

50 µl H₂O

Αλληλουχίες εκκινητών

TruSeq PCR 1

AATGATACGGCGACCACCGA*G

TruSeq PCR 2

CAAGCAGAAGACGGCATACGA*G

Το πρωτόκολλο FAIRE-seq

Καλλιέργεια κυττάρων, μονιμοποίηση και λύση κυττάρων

1. Καλλιέργεια κυττάρων σε 150mm² πιάτα. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιούνται 15 εκατομμύρια κύτταρα, ενώ η πυκνότητά τους πρέπει να φθάνει το 90-100%.
2. Μόλυνση των κυττάρων με ιό Sendai για 3 και 6 ώρες ενώ ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που δεν είχαν υποστεί μόλυνση.
3. Μονιμοποίηση των κυττάρων με 1% τελική συγκέντρωση φορμαλδεΰδης και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Απενεργοποίηση της φορμαλδεΰδης με χρήση γλυκίνης σε τελική συγκέντρωση 125mM. Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Απόρριψη του υγρού και διπλή πλύση των κυττάρων με PBS.
6. Λύση των κυττάρων με τη χρήση ειδικού γουδιού σε 7 ml διαλύματος λύσης B.
7. Μεταφορά σε σωληνάκια των 15ml και προσθήκη 2ml διαλύματος που περιέχει σουκρόζη στο πυθμένα του σωλήνα.
8. Φυγοκέντρωση στις 2100g για 45 λεπτά στους 4 °C. Αναρρόφηση και απόρριψη του υπερκείμενου.
9. Επαναδιάλυση της πελλέτας σε 2ml διαλύματος λύσης A .

Κατακερματισμός χρωματίνης και απομόνωση input DNA

10. Θραύση της χρωματίνης με υπέρηχους μέχρι το μέγεθος των κομματιών DNA να είναι μεταξύ 200 και 500 ζευγών βάσεων.
11. Πραγματοποιείται φυγοκέντρωση μιας ποσότητας 100 μl από το δείγμα στις 13,000g για 5 λεπτά στους 4 °C για την κατακρήμνιση πιθανών ίζημάτων.
12. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι eppendorf στο οποίο προστίθεται 24 μg RNaseA και πραγματοποιείται επώαση για 30 λεπτά στους 37 °C.
13. Στη συνέχεια προστίθενται 40 μg proteinase K και γίνεται επώαση στους 55 °C για 1 ώρα και στη συνέχεια ολονύκτια επώαση στους 65 °C.
14. Προσθήκη 200 μl Tris-Hcl pH 7,4 και 300 μl φαινόλης/χλωροφόρμιου και έντονη ανάδευση για 10 δευτερόλεπτα.
15. Φυγοκέντρωση στις 12,000g για 12 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφορά της άνω φάσης σε νέο σωληνάκι eppendorf.
16. Προσθήκη ενός όγκου φαινόλης/χλωροφόρμιου και έντονη ανάδευση για 10 δευτερόλεπτα. Φυγοκέντρωση στις 12,000g για 12 λεπτά σε

θερμοκρασία δωματίου και μεταφορά της άνω φάσης σε νέο σωληνάκι erpendorf.

17. Προσθήκη ίσου όγκου χλωροφόρμιου και έντονη ανάδευση για 10 δευτερόλεπτα. Φυγοκέντρωση στις 12,000g για 12 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφορά της άνω φάσης σε νέο σωληνάκι erpendorf.

18. Μεταφορά της άνω φάσης σε νέο σωληνάκι erpendorf. Προσθήκη 1/10 του όγκου 3M οξικό νάτριο pH 5,2, 2 όγκους 100% αιθανόλη και 20 μg γλυκογόνου και έντονη ανάδευση.

19. Επώαση στους -80 °C για 60 λεπτά. Φυγοκέντρωση στις 12,000g για 15 λεπτά στους 4 °C.

20. Αφαίρεση του υπερκείμενου και πλύση με 500 μl 70% αιθανόλη.

21. Αφαίρεση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση σε 20 μl H₂O.

22. Μέτρηση της συγκέντρωσης DNA στο μηχάνημα ανίχνευσης φθορισμού Qubit (Thermo Fischer Scientific).

23. Ηλεκτροφόρηση 500 ng DNA σε 2% πήκτωμα αραρόζης για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας του κατακερματισμού της χρωματίνης με υπερήχους. Το μέγεθος των κομματιών DNA πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 100-1000 ζευγών βάσεων, με τη πλειοψηφία των κομματιών DNA να είναι μεταξύ 300-500 ζευγών βάσεων.

Απομόνωση του FAIRE DNA

24. Πραγματοποιείται φυγοκέντρωση μιας ποσότητας 500 μl από το δείγμα στις 13,000g για 5 λεπτά στους 4 °C για την κατακρήμνιση πιθανών ιζημάτων.

25. Προσθήκη 500 μl φαινόλης/χλωροφόρμιου και έντονη ανάδευση για δέκα δευτερόλεπτα.

26. Φυγοκέντρωση στις 12,000g για 12 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφορά της άνω φάσης σε νέο σωληνάκι erpendorf.

27. Προσθήκη ενός όγκου φαινόλης/χλωροφόρμιου και έντονη ανάδευση για 10 δευτερόλεπτα. Φυγοκέντρωση στις 12,000g για 12 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφορά της άνω φάσης σε νέο σωληνάκι erpendorf.

28. Προσθήκη ίσου όγκου χλωροφόρμιου και έντονη ανάδευση για 10 δευτερόλεπτα. Φυγοκέντρωση στις 12,000g για 12 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφορά της άνω φάσης σε νέο σωληνάκι erpendorf.

29. Προσθήκη 1/10 του όγκου 3M οξικό νάτριο pH 5,2, 2 όγκους 100% αιθανόλη και 20 μg γλυκογόνου και έντονη ανάδευση.
30. Επώαση στους -80 °C για 60 λεπτά. Φυγοκέντρωση στις 12,000g για 15 λεπτά στους 4 °C.
31. Αφαίρεση του υπερκείμενου και πλύση με 500 μl 70% αιθανόλη.
32. Αφαίρεση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση σε 20 μl H₂O.
33. Μέτρηση της συγκέντρωσης DNA στο μηχάνημα ανίχνευσης φθορισμού Qubit (Thermo Fischer Scientific).
34. Προσθήκη 24 μg RNaseA και επώαση για 30 λεπτά στους 37 °C.
35. Στη συνέχεια προστίθενται 40 μg proteinase K και γίνεται επώαση στους 55 °C για 1 ώρα και έπειτα ολονύκτια επώαση στους 65 °C.
36. Καθαρισμός της αντίδρασης με προσθήκη 125 μl Agencourt Ampure XP beads (Beckman Coulter) και πιπετάρισμα για ομοιόμορφη κατανομή. Επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
37. Μεταφορά των eppendorfs σε μαγνήτη και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
38. Αφαίρεση του υπερκείμενου και 2 πλύσεις με 80% αιθανόλη, με τα σωληνάκια να βρίσκονται στο μαγνήτη και τη διάρκεια της πλύσης να είναι 30 δευτερόλεπτα.
39. Τα σωληνάκια αφαιρούνται από το μαγνήτη και αφού στεγνώσουν από τα ίχνη αιθανόλης, προστίθενται σε αυτά 50 μl H₂O. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
40. Τα σωληνάκια μεταφέρονται στο μαγνήτη για 5 λεπτά. Ακολουθεί αφαίρεση του υπερκείμενου και μεταφορά του σε νέο σωληνάκι.
41. Πραγματοποιείται μέτρηση της συγκέντρωσης DNA με το μηχάνημα μέτρησης φθορισμού Qubit (Thermo Fischer Scientific).
42. Πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση 100 ng FAIRE DNA και αντίστοιχης ποσότητας input DNA σε 2% πήκτωμα αγαρόζης στα 120V για 1 ώρα. Το μέγεθος των κομματιών DNA πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 70 και 200 ζευγών βάσεων.
43. Ακολουθεί κατασκευή γενωμικής βιβλιοθήκης και ευρείας κλίμακας αλληλούχιση των δειγμάτων σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Illumina όπως περιγράφεται στην ενότητα του CHIP-seq.

Διαλύματα

Διάλυμα λύσης A

10 mM Tris-HCl pH 8.0

2% Triton X-100

1% SDS

100 mM NaCl

1 mM EDTA

Διάλυμα λύσης B

10 mM Tris-HCl pH 7.4

15 mM NaCl

60 mM KCl

1 mM EDTA

0.1% NP-40

5% σουκρόζη

Διάλυμα σουκρόζης

10mM Tris pH 7.4

15 mM NaCl

60 mM KCl

10% σουκρόζη

Το πρωτόκολλο DNaseI-seq

Καλλιέργεια κυττάρων και απομόνωση πυρήνων

1. Καλλιέργεια κυττάρων σε ένα πιάτο 15 mm² για κάθε πειραματική συνθήκη μέχρι η πυκνότητα των κυττάρων να είναι 90-100%. Μόλυνση των κυττάρων με ιό Sendai για 3 και 6 ώρες, ενώ ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που δεν είχαν μολυνθεί.
2. Στη περίπτωση που τα κύτταρα προσκολλώνται στο υπόστρωμα πραγματοποιείται αποκόλλησή τους με χρήση θρυψίνης και απενεργοποίησή της με θρεπτικό μέσο που περιέχει ορό νεογνού βοός. Εναλλακτικά τα κύτταρα επωάζονται για 5 λεπτά σε διάλυμα PBS-2mM EDTA και αποκολλώνται με πιπετάρισμα.

3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 2000 rpm για 5 λεπτά στους 4°C και απόρριψη του υπερκείμενου.
4. Πλύση των κυττάρων με PBS δύο φορές και απόρριψη του υπερκείμενου. Επαναδιάλυση της πελέτας στο διάλυμα A σε πυκνότητα 5 εκατομμυρίων κυττάρων ανα ml και μεταφορά σε 1.5 ml eppendorfs.
5. Προσθήκη του απορρυπαντικού IGEPAL630 σε τελική συγκέντρωση 0.05-0,2% ανάλογα με το κυτταρικό τύπο. Αναστροφή των eppendorfs 10 φορές για ομοιόμορφη κατανομή του απορρυπαντικού. Επώαση στο πάγο για 8 λεπτά. **Από το στάδιο αυτό και μετά το πιπετάρισμα γίνεται μόνο με κομμένα tips και μόνο όπου είναι απαραίτητο για να μην προκληθούν μηχανικά σπασίματα στο DNA.**
6. Ακολουθεί έλεγχος της αποτελεσματικότητας της λύσης της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων με χρήση της χρωστικής Trypan blue και παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Η λύση των κυττάρων πρέπει να κυμαίνεται στο 90-100% του πληθυσμού.
7. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 2000 rpm στους 4°C.

Αντίδραση πέψης με DNaseI

8. Επαναδιάλυση σε 500 μl διαλύματος πέψης ανά 2,5 εκατομμύρια κύτταρα. Σε κάθε σωληνάκι προστίθενται διαφορετικές ποσότητες DNaseI (DNaseI recombinant,Roche) (40U,80U,120U)
9. Επώαση της αντίδρασης για 3 λεπτά στους 37°C.
10. Προσθήκη του διαλύματος αναστολής της αντίδρασης και επώαση στους 55°C για 15 λεπτά.
11. Προσθήκη 40 μg πρωτεΐνης K και ολονύκτια επώαση στους 55°C.

Καθαρισμός DNA

12. Προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος φαινόλης-χλωροφόρμιου και ήπια ανάδευση.
13. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μεταφορά της άνω φάσης σε νέο σωληνάκι. Προσθήκη 1/10 του όγκου 3M οξικό νάτριο pH 5,2, 20μg γλυκογόνου και 3 όγκων απόλυτης αιθανόλης. Ανάδευση και επώαση στους -80°C για 30 λεπτά.
14. Φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές για 15 λεπτά στους 4°C. Αφαίρεση του υπερκείμενου.

15. Πλύση με 70% αιθανόλη, φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές για 5 λεπτά στους 4°C.
16. Απόρριψη του υπερκείμενου και επαναδιάλυση σε 30 μl H₂O.

Έλεγχοι ποιότητας και απομόνωση DNA

17. Έλεγχος ποιότητας 1: Φόρτωση 2 μl από το δείγμα σε 2% πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιώντας κομμένα tips και ηλεκτροφόρηση για 1 ώρα στα 120V. Αν το πείραμα είναι επιτυχημένο το δείγμα DNA που δεν έχει υποστεί πέψη με DNaseI είναι υψηλού μοριακού βάρους, χωρίς σημάδια αποικοδόμησης, ενώ στα δείγματα που έχουν υποστεί κατεργασία με DNaseI παρατηρείται εκτός από το υψηλού μοριακού βάρους DNA και ασθενής αποικοδόμηση του DNA που αυξάνεται προοδευτικά καθώς αυξάνεται η ποσότητα της DNaseI.
18. Έλεγχος ποιότητας 2: Για την εύρεση της ιδανικής ποσότητας DNaseI πραγματοποιείται ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο με ένα ζεύγος εκκινητών (RDSN) που στοχεύουν μια αλληλουχία του DNA που καλύπτεται από νουκλεοσώματα και επομένως δεν είναι ευαίσθητη στη δράση της DNaseI και 2 ζεύγη εκκινητών (CNS8966 και CNS28539) που στοχεύουν αλληλουχίες του DNA που στερούνται νουκλεοσωμάτων και επομένως είναι ευαίσθητες στη δράση της DNaseI. Οι συγκεκριμένες περιοχές έχουν επιλεγθεί επειδή παρουσιάζουν σταθερό πρότυπο σε πειράματα DNaseI-seq που έχουν πραγματοποιηθεί σε πλήθος διαφορετικών κυτταρικών σειρών. Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιούνται 5 ng DNA και 40 κύκλοι πολλαπλασιασμού με κάθε κύκλο να περιλαμβάνει επώαση στους 95°C για 15 δευτερά και στη συνέχεια επώαση στους 60°C για 45 δευτερόλεπτα. Η ανίχνευση του σήματος πραγματοποιείται στο μηχάνημα CFX96 της Biorad με χρήση του μίγματος αντίδρασης KAPA SYBR FAST 2x PCR master mix. Ένα επιτυχημένο πείραμα εμφανίζει προοδευτική μείωση της ικανότητας πολλαπλασιασμού των περιοχών που είναι ευαίσθητες στη DNaseI, καθώς αυξάνεται η ποσότητα του ενζύμου ενώ ταυτόχρονα είναι σταθερή η ικανότητα πολλαπλασιασμού της περιοχής που δεν είναι ευαίσθητη στη δράση της DNaseI. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η ποσότητα του ενζύμου που δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα είναι αυτή στην οποία παρατηρείται μείωση της ικανότητας πολλαπλασιασμού των περιοχών που είναι ευαίσθητες στη DNaseI κατά 60-80%.

19. Μετά την εύρεση της ιδανικής ποσότητας ενζύμου πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε 2% πήκτωμα αγαρόζης για 30 λεπτά στα 120 V.
20. Στη συνέχεια πραγματοποιείται αποκοπή από το gel μιας ζώνης που περιέχει κομμάτια DNA από 50 μέχρι 300 ζεύγη βάσεων.
21. Ακολουθεί καθαρισμός του DNA από το gel με τη χρήση του kit Nucleospin Gel and PCR cleanup (Macherey-Nagel).
22. Έλεγχος ποιότητας 3:Πραγματοποιείται ποσοτική αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο για τον έλεγχο της ενίσχυσης των περιοχών DNA που είναι ευαίσθητες στη δράση της DNaseI στα απομονωμένα από το gel κομμάτια DNA μεγέθους 50-300 ζευγών βάσεων σε σύγκριση με το ολικό DNA της αντίδρασης πέψης πριν την απομόνωση. Γίνεται χρήση ενός ζεύγους εκκινητών (RDSN) που στοχεύει μια περιοχή του DNA που δεν είναι ευαίσθητη στη DNaseI και δύο ζευγών (8966,28539) που στοχεύουν περιοχές ευαίσθητες στη DNaseI. Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιούνται 500 pg DNA και 40 κύκλοι πολλαπλασιασμού με κάθε κύκλο να περιλαμβάνει επώαση στους 95°C για 15 δεύτερα και στη συνέχεια επώαση στους 60°C για 45 δευτερόλεπτα. Η ανίχνευση του σήματος πραγματοποιείται στο μηχάνημα CFX96 της Biorad με χρήση του μίγματος αντίδρασης KAPA SYBR FAST 2x PCR master mix. Για ένα επιτυχημένο πείραμα η ενίσχυση των περιοχών που είναι ευαίσθητες στη δράση της DNaseI σε σχέση με τη περιοχή που δεν είναι ευαίσθητη πρέπει να είναι τουλάχιστον 15 με 20 φορές μεγαλύτερη στα απομονωμένα από το gel κομμάτια από ότι στο ολικό DNA.

Κατασκευή βιβλιοθήκης και αλληλούχιση νέας γενιάς

23. Κατασκευή βιβλιοθήκης σύμφωνα με το πρωτόκολλο Truseq ChIP Sample Prep Kit της Illumina και αλληλούχιση των δειγμάτων στο μηχάνημα NextSeq 500 της Illumina στο Greek Genome Center στο ΙΙΒΕΑΑ όπως περιγράφεται στην ενότητα του ChIP-seq.

Διαλύματα

Διάλυμα Α

15mM Tris pH 8

15mM NaCl

60 mM KCl

1mM EDTA

0.5 mM spermidine

Διάλυμα αναστολής της αντίδρασης

50mM Tris pH 8

100 mM NaCl

0,1% SDS

100mM EDTA

Προσθέτουμε 20 μg ανα ml RNaseA πριν τη χρήση

Διάλυμα πέψης

40 mM Tris pH 8

10 mM NaCl

6 mM MgCl₂

1mM CaCl₂

Το πρωτόκολλο ChIP-seq

Παρασκευή χρωματίνης

Καλλιέργεια, μόλυνση και μονιμοποίηση των κυττάρων

1. Καλλιέργεια κυττάρων HeLa και Namalwa, χρησιμοποιώντας συνολικά 20 πιάτα των 150mm ανά χρονικό σημείο του πειράματος.
2. Όταν η πυκνότητα τους έφτασε το 80-90% ακολούθησε μόλυνσή τους με ιό Sendai για 3 και 6 ώρες, ενώ ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που δεν είχαν υποστεί μόλυνση.
3. Μονιμοποίηση των κυττάρων για 25 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προσθέτοντας το κατάλληλο όγκο διαλύματος κατακερματισμού ώστε η τελική συγκέντρωση της φορμαλδεΰδης να είναι 1%.
4. Απενεργοποίηση της αντίδρασης μονιμοποίησης με προσθήκη διαλύματος γλυκίνης ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 0,125M. Επώση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.

Συλλογή και λύση των κυττάρων

5. Ακολουθεί η συλλογή των κυττάρων (Namalwa) και η φυγοκέντρησή τους για 5 λεπτά στις 4000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Στη περίπτωση των κυττάρων HeLa πραγματοποιείται απόρριψη του υπερκείμενου και εις διπλούν πλύση των πιάτων με 10 ml διαλύματος PBS. Ακολουθεί απόξεση των κυττάρων σε 10 ml διαλύματος PBS και φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 4000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Το υπερκείμενο αφαιρείται και πραγματοποιείται εις διπλούν πλύση με διάλυμα PBS και φυγοκέντρωση των κυττάρων για 5 λεπτά στις 4000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Πραγματοποιείται πλύση των κυττάρων προσθέτοντας 15 mL διαλύματος λύσης A και επωάζοντας για 10 λεπτά στο πάγο.
8. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 4000 rpm για 8 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Το υπερκείμενο αφαιρείται και ακολουθεί πλύση των κυττάρων με το διάλυμα λύσης B και επώαση στο πάγο για 10 λεπτά.
10. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 4000 rpm για 8 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
11. Το υπερκείμενο αφαιρείται και η χρωματίνη διαλύεται σε 5 ml διαλύματος κατακερματισμού.

Κατακερματισμός της χρωματίνης και διαπίστωση της κατανομής του μήκους των κομματιών DNA

12. Η αντίδραση κατακερματισμού της χρωματίνης πραγματοποιήθηκε στο μηχάνημα Sonics Vibra με συνολικά 8 κύκλους διάρκειας 60 δευτερολέπτων, επωάζοντας στο πάγο για μερικά λεπτά μετά την ολοκλήρωση κάθε κύκλου. Το amplitude που χρησιμοποιήθηκε ήταν 40%.
13. Ακολουθεί μέτρηση της συγκέντρωσης της χρωματίνης με φωτομέτρηση στο μηχάνημα Nanodrop 1000.
14. Σε 50 μg χρωματίνης προστίθενται 20 μg πρωτεΐνης K για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών και το δείγμα επωάζεται στους 55°C για 1 ώρα.

15. Έπεται ολονύκτια επώαση του δείγματος στους 72°C για την εξουδετέρωση των σταυροσυνδέσεων μεταξύ πρωτεϊνών και DNA.
16. Ακολουθεί προσθήκη 50% του αρχικού όγκου διαλύματος φαινόλης και 50% διαλύματος χλωροφόρμιου και έντονη ανάδευση σε vortex.
17. Στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
18. Μεταφορά της υδατικής άνω φάσης σε νέο eppendorf και προσθήκη 3 όγκων 100% αιθανόλης, 1/10 του όγκου οξικό νάτριο pH 5,2 και 20 µg γλυκογόνου.
19. Ακολουθεί έντονη ανάδευση και επώαση στους -80°C για 30 λεπτά.
20. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 13,000 rpm για 15 λεπτά στους 4°C.
21. Αφαίρεση του υπερκείμενου και πλύση με 500 µl 75% αιθανόλης.
22. Φυγοκέντρηση στις 13,000 rpm για 5 λεπτά στους 4°C.
23. Αφαίρεση του υπερκείμενου, στέγνωμα της πελλέτας και επαναδιάλυση σε 60 µl H₂O.
24. Μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA στο μηχάνημα Nanodrop 1000.
25. Ηλεκτροφόρηση σε 2% πήκτωμα αραρόζης 5 µg DNA χρησιμοποιώντας διάλυμα χρωστικής που περιέχει 0,1 µg/µl RNaseA για την αποικοδόμηση του RNA.
26. Εφόσον η πλειοψηφία των κομματιών της χρωματίνης δεν είναι μικρότερα των 1000 ζευγών βάσεων, θα ακολουθήσουν επιπλέον γύροι κατακερματισμού της χρωματίνης και έλεγχος του μεγέθους των κομματιών DNA που προκύπτουν.

Υπερφυγοκέντρηση και διαπίδυση της χρωματίνης

27. Προσθήκη σε κάθε δείγμα sarcosyl σε τελική συγκέντρωση 0,5% και 0,565g CsCl ανά ml δείγματος και ανακίνηση μέχρι να διαλυθεί.
28. Μεταφορά 5 ml του δείγματος σε ειδικούς σωλήνες φυγοκέντρησης (polyallomer centrifuge tubes, 13x51mm, Beckman Coulter) και στη συνέχεια στα buckets της κεφαλής AH-650 Swinging Bucket Rotor (Thermo Fisher Scientific). Ακολουθεί ισοζύγισμα των δειγμάτων με ακρίβεια mg.
29. Έπεται φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 40.000 rpm στην υπερφυγόκεντρο Sorvall Discovery 100SE (Hitachi) για 48 ώρες στους 25°C.

30. Πραγματοποιείται συλλογή κλασμάτων 1 ml ξεκινώντας από πάνω προς τα κάτω και ηλεκτροφόρηση 10 ml από κάθε κλάσμα σε 1% πήκτωμα αραρόζης.
31. Επιλογή των κλασμάτων που περιέχουν τη μεγαλύτερη ποσότητα χρωματίνης, ενώ δεν χρησιμοποιείται τυχόν κλάσμα που περιέχει υλικό μεγέθους μικρότερου από 200 βάσεις που πιθανότατα δεν είναι σωστά μονιμοποιημένο.
32. Μεταφορά των επιθυμητών κλασμάτων σε σάκους διάλυσης και ολονύκτια διαπίδυση στους 4°C έναντι 1 λίτρου του διαλύματος διαπίδυσης.
33. Ακολουθεί μεταφορά του υλικού σε σωλήνες erpendorf και φυγοκέντρηση στις 13,000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C για την αφαίρεση τυχόν αδιάλυτων συστατικών.
34. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέους σωλήνες και μέτρηση της συγκέντρωσης των δειγμάτων.
35. Ακολουθεί εξέταση του μεγέθους του DNA της χρωματίνης όπως περιγράφηκε παραπάνω.
36. Φύλαξη της χρωματίνης στους -80°C.

Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης

37. Σε σωλήνα erpendorf προσθέτουμε:
 - 20-100 μg χρωματίνης ανάλογα με το στόχο του πειράματος
 - 250 μl 2x διάλυμα RIPA
 - 2-6 μg αντίσωμα ή αντίστοιχη ποσότητα IgG
 - 1x RIPA διάλυμα μέχρι τα 500 μl
38. Το δείγμα αφήνεται να περιστρέφεται στους 4°C για ολονύκτια επώαση.
39. Πραγματοποιούνται επίσης 3 πλύσεις 9-12 ml σφαιριδίων πρωτεΐνης G (Dynabeads, Life technologies) ανά δείγμα με διάλυμα 1x wash και τη χρήση μαγνήτη.
40. Τα σφαιρίδια διαλύονται σε 100 μl διάλυμα RIPA ανά αντίδραση και αφήνονται να περιστρέφονται στους 4°C για ολονύκτια επώαση.
41. Προσθήκη 100 μl διαλύματος σφαιριδίων σε κάθε αντίδραση και επώαση για 3 ώρες με περιστροφή στους 4°C.
42. Πραγματοποιούνται 4 με 7 πλύσεις των σφαιριδίων με 1ml διάλυμα RIPA και επώαση 5 λεπτά στο πάγο μετά από κάθε πλύση.
43. Προσθήκη 96 μl H₂O, 2 μl 10% SDS και 20μg πρωτεΐνάσης K ανά δείγμα και επώαση στους 55°C για 1 ώρα.

44. Ολονύκτια επώαση του δείγματος στους 72°C για να εξουδετερωθούν οι σταυροσυνδέσεις μεταξύ DNA και πρωτεϊνών.
45. Μετακίνηση των δειγμάτων στο μαγνήτη και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέους σωλήνες.
46. Αντίδραση φαινόλης-χλωροφόρμιου και κατακρήμνιση του DNA όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Διαλύματα

Διάλυμα μονιμοποίησης

- 11% φορμαλδεύδη
- 0,1 M NaCl
- 1 mM EDTA
- 50 mM Hepes pH 8

Διάλυμα λύσης A

- 0.25% Triton X-100
- 10 mM EDTA
- 10 mM Tris-HCl, pH 8.0

Διάλυμα λύσης B

- 0.2 M NaCl
- 1 mM EDTA
- 10 mM Tris-HCl, pH 8.0

Διάλυμα κατακερματισμού

- 1 mM EDTA
- 10 mM Tris-HCl, pH 8.0

Διάλυμα διαπίδυσης

- 10 mM Tris pH 8
- 1 mM EDTA
- 5% γλυκερόλη

Διάλυμα 2x WASH

10 mM Tris-Cl (pH 7.6)

1 mM EDTA

0.1% sodium deoxycholate

1% Triton X-100

Διάλυμα RIPA-WASH

10 mM Tris-Cl (pH 7.6)

1 mM EDTA

0.1% SDS (sodium dodecyl sulfate)

0.1% sodium deoxycholate

1% Triton X-100

Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο για τη διαπίστωση της επιτυχίας των αντιδράσεων ανοσοκατακρήμνισης

Μετά το πέρας των πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real time qPCR) για να διαπιστωθεί η επιτυχία των πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί στόχοι περιοχές στο γονιδίωμα όπου αναμένεται να προσδένεται η πρωτεΐνη-στόχος έναντι της οποίας πραγματοποιείται η ανοσοκατακρήμνιση και ως αρνητικοί περιοχές στις οποίες δεν αναμένεται να υπάρχει παρουσία της προς μελέτη πρωτεΐνης. Για τους θετικούς και αρνητικούς στόχους σχεδιάστηκαν εκκινητές, η ειδικότητα και αποδοτικότητα των οποίων ελέγχθηκαν όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο

Κάθε αντίδραση qPCR περιελάμβανε τα εξής:

10 μ L KAPA SYBR FAST qPCR Mater Mix (2x)

5 ng DNA

50 ng πρόσθιο εκκινητή

50 ng ανάστροφο εκκινητή

H₂O μέχρι τα 20 μ l

Πολλαπλασιασμός με το ακόλουθο πρωτόκολλο:

95°C για 45 δευτερόλεπτα
95°C για 15 δευτερόλεπτα
58-66°C για 45 δευτερόλεπτα } 40 κύκλοι

Η κατάλληλη θερμοκρασία υβριδισμού και επέκτασης για το εκάστοτε ζευγάρι εκκινητών έχει προκύψει από πιλοτικά πειράματα ελέγχου. Οι εκκινητές πολλαπλασιάζουν περιοχές του DNA που λειτουργούν ως θετικοί ή αρνητικοί στόχοι για το εκάστοτε πείραμα ανοσοκατακρήμνισης.

Κατασκευή Βιβλιοθήκης και Αλληλούχιση Ευρείας Κλίμακας

Επιδιόρθωση των άκρων του DNA

1. Μίξη σε PCR σωληνάριο των ακόλουθων συστατικών:

3-50 ng ChIP DNA
5 μl T4 DNA ligase buffer (NEB)
0,5 μl End Repair Mix
2 μl 10mM dNTPs
H₂O μέχρι τα 50 μl

2. Επώαση σε μηχανήμα PCR στους 20°C για 30 λεπτά.

Καθαρισμός της αντίδρασης με τα σφαιρίδια Ampure XP

1. Ο καθαρισμός της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με τα σφαιρίδια Agencourt AMPure XP. Συγκεκριμένα προστέθηκε διπλάσιος όγκος σφαιριδίων και το δείγμα επώαστηκε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

2. Ο σωλήνας eppendorf τοποθετήθηκε σε μαγνήτη για 5 λεπτά.

3. Ακολούθησε αφαίρεση του υπερκείμενου, προσθήκη 200 μl 80% αιθανόλης και επώαση για 30 δευτερόλεπτα στο μαγνήτη.

4. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και πραγματοποιήθηκε μία ακόμα πλύση με 80% αιθανόλη.

5. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και ο σωλήνας αφέθηκε να στεγνώσει για μερικά λεπτά, αφού αφαιρέθηκε από το μαγνήτη.
6. Προσθήκη 18 μl H₂O και επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Μεταφορά στο μαγνήτη και επώαση για 5 λεπτά.
8. Αφαίρεση 16,5 μl από το υπερκείμενο και μεταφορά σε νέο σωλήνα.

Προσθήκη αδενίνης στα άκρα του DNA

1. Μίξη σε PCR σωληνάριο των ακόλουθων συστατικών:
16,5 μl DNA από το προηγούμενο βήμα
2 μl NEB 2 (10x) buffer
1 μl 4mM dATP
0,5 μl 5U/μl Klenow Fragment (3' → 5' exo-) (NEB)
2. Επώαση σε μηχανήμα PCR στους 37°C για 30 λεπτά

Αντίδραση λιγάσης για την προσθήκη ανταπτόρων στα άκρα του DNA

1. Μίξη σε PCR σωληνάριο των ακόλουθων συστατικών:
20 μl DNA από το προηγούμενο βήμα
25 μl Quick Ligation Reaction Buffer (NEB)
1 μl Truseq Adapters (0,25 μM)
1 μl H₂O
1,5 μl Quick T4 DNA ligase (NEB)
2. Επώαση σε μηχανήμα PCR στους 20°C για 20 λεπτά
3. Προσθήκη 5 μl 0.5 M EDTA pH 8.0
4. Ο καθαρισμός της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με τα σφαιρίδια Agencourt AMPure XP. Συγκεκριμένα προστέθηκε διπλάσιος όγκος σφαιριδίων και το δείγμα επώαστηκε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Ο σωλήνας eppendorf τοποθετήθηκε σε μαγνήτη για 5 λεπτά
6. Ακολούθησε αφαίρεση του υπερκείμενου, προσθήκη 500 μl 80% αιθανόλης και επώαση για 30 δευτερόλεπτα στο μαγνήτη.
7. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και πραγματοποιήθηκε μία ακόμα πλύση με 80% αιθανόλη.

8. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και ο σωλήνας αφέθηκε να στεγνώσει για μερικά λεπτά, αφού αφαιρέθηκε από το μαγνήτη.
9. Προσθήκη 15,5 μl H₂O και επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Μεταφορά στο μαγνήτη και επώαση για 5 λεπτά.
11. Αφαίρεση 14 μl από το υπερκείμενο και μεταφορά σε νέο σωλήνα.

Περιορισμένος Πολλαπλασιασμός της βιβλιοθήκης με PCR

Πραγματοποιείται περιορισμένος πολλαπλασιασμός της βιβλιοθήκης για 5 κύκλους για την μετατροπή των άκρων των ανταπτόρων που έχουν σχήμα Y σε δίκλωνο DNA το οποίο και διαχωρίζεται σύμφωνα με το μέγεθος του σε πήκτωμα αγαρόζης.

1. Προσθήκη: 14 μl DNA από το προηγούμενο βήμα
 - 1 μl από το μείγμα εκκινητών Truseq
 - 15 μl 2X Kapa HiFi Hotstart Ready Mix
2. Πολλαπλασιασμός με το ακόλουθο πρωτόκολλο:
 - 45 δευτερόλεπτα στους 98°C
 - 15 δευτερολέπτων στους 98°C
 - 30 δευτερολέπτων στους 63°C
 - 30 δευτερολέπτων στους 72°C
 } 5 κύκλοι
 - 60 δευτερόλεπτα στους 72°C
 - Επώαση στους 4°C μέχρι την αφαίρεση από το μηχάνημα
3. Προσθήκη 60 μl σφαιριδίων Ampure XP και επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Ο σωλήνας erpendorf τοποθετήθηκε σε μαγνήτη για 5 λεπτά
5. Ακολούθησε αφαίρεση του υπερκείμενου, προσθήκη 500 μl 80% αιθανόλης και επώαση για 30 δευτερόλεπτα στο μαγνήτη.
6. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και πραγματοποιήθηκε μία ακόμα πλύση με 80% αιθανόλη.
7. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και ο σωλήνας αφέθηκε να στεγνώσει για μερικά λεπτά, αφού αφαιρέθηκε από το μαγνήτη.
8. Προσθήκη 11,5 μl H₂O και επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

9. Μεταφορά στο μαγνήτη και επώαση για 5 λεπτά.
10. Αφαίρεση 10 μl από το υπερκείμενο και μεταφορά σε νέο σωλήνα.

Ηλεκτροφόρηση και επιλογή συγκεκριμένου εύρους μεγεθών

1. Προετοιμασία ενός πηκτώματος αгарόζης 2.5% χρησιμοποιώντας 3:1 αναλογία MetaPhor/SeaKem LE αгарόζη.
2. Προσθήκη 5X χρωστικής στα δείγματα που περιέχει xylene cyanol και bromophenol blue.
3. Φόρτωση των δειγμάτων αφήνοντας κενά μεταξύ τους καθώς και φόρτωση 200 ng 100 bp μάρτυρα.
4. Ηλεκτροφόρηση στα 120V για 30 λεπτά.
5. Απομόνωση του τμήματος του πηκτώματος που περιέχει υλικό μεταξύ 250 και 450 bp χρησιμοποιώντας αποστειρωμένη λεπίδα και μεταφορά σε eppendorf του 1,5ml.
6. Ογκομέτρηση του δείγματος και προσθήκη 5 όγκων Qiagen Buffer QG.
7. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να λιώσει το πήκτωμα. Ανακίνηση αναμερικά λεπτά.
8. Προσθήκη 1 όγκου ισοπροπανόλη και πιπετάρισμα
9. Μεταφορά 650 μl στη στήλη Qiagen minElute.
10. Φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στις 13,000 rpm
11. Απόρριψη του υγρού από το σωληνάριο συλλογής
12. Επανάληψη των τριών προηγούμενων βημάτων μέχρι να περάσει όλο το υλικό από τη στήλη.
13. Προσθήκη στη στήλη 500 μl Qiagen Buffer QG.
14. Φυγοκέντρηση για 60 δευτερόλεπτα στις 13,000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
15. Απόρριψη του υγρού από το σωληνάριο συλλογής
16. Προσθήκη στη στήλη 750 μl Qiagen buffer PE
17. Επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
18. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13,000 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου.
19. Απόρριψη του υγρού από το σωληνάριο συλλογής
20. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13,000 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου.
21. Μεταφορά της στήλης σε νέο 1,5 ml eppendorf
22. Προσθήκη 10 μl H₂O στη στήλη και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

23. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13,000 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου.
24. Προσθήκη επιπλέον 10 μl H₂O, επώαση για 5 λεπτά και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13,000 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου.
24. Μεταφορά του εκλουσμένου υλικού σε σωληνάκι PCR

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο για την εύρεση του ιδανικού αριθμού κύκλων πολλαπλασιασμού

Ο υπερβολικός πολλαπλασιασμός της βιβλιοθήκης μπορεί να οδηγήσει στη παραγωγή ανεπιθύμητων παραπροϊόντων και στην αλλαγή της σχετικής κατανομής των κομματιών DNA. Για την εύρεση του ιδανικού αριθμού κύκλων πολλαπλασιασμού, εκεί όπου η αντίδραση βρίσκεται ακόμα στο στάδιο της εκθετικής φάσης πραγματοποιήθηκε ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρησιμοποιώντας τα εξής αντιδραστήρια:

- 1 μl της ποσότητας DNA που προέκυψε από το προηγούμενο βήμα
10μl KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal
1 μl μείγμα των Truseq εκκινητών (25μM)
8 μl H₂O

Ο πολλαπλασιασμός πραγματοποιήθηκε με το ακόλουθο πρωτόκολλο:

- 95°C για 180 δευτερόλεπτα
20 κύκλους 95°C για 15 δευτερόλεπτα
63°C για 30 δευτερόλεπτα
72°C για 30 δευτερόλεπτα

Ο αριθμός των κύκλων που είναι απαραίτητοι για το πολλαπλασιασμό του συνολικού DNA είναι αυτός στον οποίο η αντίδραση βρίσκεται στο μέσο της εκθετικής φάσης. Γνωρίζοντας τον αριθμό αυτό στη συνέχεια ακολούθησε ο πολλαπλασιασμός του ολικού υλικού.

Πολλαπλασιασμός της βιβλιοθήκης με PCR

1. Μίξη σε PCR σωληνάριο των ακόλουθων αντιδραστηρίων:
19 μl DNA που έχει απομονωθεί από το πήκτωμα αγαρόζης
20 μl Kapa Hifi Hot Start Ready Mix

- 1 μl μείγμα των Truseq εκκινητών (25μM)
- 2.Πολλαπλασιασμός με το ακόλουθο πρωτόκολλο:
98°C για 45 δευτερόλεπτα
5-13 κύκλους 98°C για 15 δευτερόλεπτα
63°C για 30 δευτερόλεπτα
72°C για 120 δευτερόλεπτα
72°C για 300 δευτερόλεπτα
- 3.Προσθήκη 60 μl σφαιριδίων Ampure XP και επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 4.Ο σωλήνας erpendorf τοποθετήθηκε σε μαγνήτη για 5 λεπτά
- 5.Ακολούθησε αφαίρεση του υπερκείμενου, προσθήκη 500 μl 80% αιθανόλης και επώαση για 30 δευτερόλεπτα στο μαγνήτη.
- 6.Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και πραγματοποιήθηκε μία ακόμα πλύση με 80% αιθανόλη.
- 7.Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και ο σωλήνας αφέθηκε να στεγνώσει για μερικά λεπτά, αφού αφαιρέθηκε από το μαγνήτη.
- 8.Προσθήκη 12 μl H₂O και επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 9.Μεταφορά στο μαγνήτη και επώαση για 5 λεπτά.
10. Αφαίρεση 10 μl από το υπερκείμενο και μεταφορά σε νέο σωλήνα.

Έλεγχος των βιβλιοθηκών και αλληλούχιση ευρείας κλίμακας

Πραγματοποιήθηκε μέτρηση της συγκέντρωσης των βιβλιοθηκών στο μηχάνημα Qubit fluorometer χρησιμοποιώντας το Qubit dsDNA HS Assay Kit και 1 μl από κάθε δείγμα. Επίσης πραγματοποιήθηκε ποιοτικός έλεγχος των βιβλιοθηκών στο μηχάνημα Agilent Bioanalyzer 2100 χρησιμοποιώντας το Agilent DNA 1000 kit και 1 μl από κάθε βιβλιοθήκη και διαπιστώθηκε το μέγεθος τους και η απουσία διμερών εκκινητών. Τέλος έγινε προετοιμασία των δειγμάτων για αλληλούχιση, φόρτωση ίσης συγκέντρωσης από τα όλα τα δείγματα στο μηχάνημα NextSeq 500 της Illumina και αλληλούχιση ευρείας κλίμακας. Αξίζει να σημειωθεί ότι επιλέχθηκε διάβασμα των αλληλουχιών μήκους 75 βάσεων μόνο από τη μία πλευρά των αλληλουχιών χρησιμοποιώντας το kit NextSeq 500/550 High Output v2 kit (75 cycles), Illumina.

Πρωτόκολλο υβριδισμού των ανταπτόρων

1. Επαναδιάλυση των ανταπτόρων-ολιγονουκλεοτιδίων σε συγκέντρωση 100 μΜ σε: 10 mM Tris-HCl pH 7.8, 0,1 mM EDTA, pH 8, 50mM NaCl
2. Μίξη 25 μl Truseq Universal Adapter με 25 μl indexed adapter
3. Υβριδισμός των ολιγονουκλεοτιδίων σε μηχανήμα PCR με το ακόλουθο πρόγραμμα:

2 λεπτά στους 95°C

140 κύκλους των 30 δευτερολέπτων ξεκινώντας από τους 95°C και μειώνοντας τη θερμοκρασία κατά 0,5 °C σε κάθε κύκλο

Επώαση στους 4°C μέχρι την αφαίρεση των δειγμάτων από το μηχανήμα

Μείγμα Truseq PCR εκκινητών

1. Επαναδιάλυση των Truseq PCR Primer 1 και Primer 2 σε διάλυμα 10 mM TrisHCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA σε συγκέντρωση 100μΜ.
2. Μίξη σε νέο σωληνάκι 25 μl Truseq PCR Primer 1 (100μΜ)
25 μl Truseq PCR Primer 2 (100μΜ)
50 μl H₂O

Μείγμα ενζύμων για την επιδιόρθωση των άκρων του DNA

30 μl 3U/μl T4 DNA Polymerase (NEB)

6 μl 5 U/μl Klenow Fragment (NEB)

30 μl 10U/μl T4 DNA Polynucleotide Kinase (NEB)

* = Φωσφοροθειικός δεσμός

Αλληλουχίες Truseq ανταπτόρων και εκκινητών

TruSeq Universal

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTT
CCGATC*T

TruSeq Adapter, Index 1
/5Phos/GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACATCACGATCTCGT
ATGCCGTCTTCTGCTT*G

TruSeq	Adapter,	Index	2
/5Phos/GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACCGATGTATCTCGT			
ATGCCGTCTTCTGCTT*G			
TruSeq	Adapter,	Index	3
/5Phos/GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACTTAGGCATCTCGT			
ATGCCGTCTTCTGCTT*G			
TruSeq	Adapter,	Index	4
/5Phos/GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACTGACCAATCTCGT			
ATGCCGTCTTCTGCTT*G			
TruSeq	Adapter,	Index	5
/5Phos/GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACACAGTGATCTCGT			
ATGCCGTCTTCTGCTT*G			
TruSeq	Adapter,	Index	6
/5Phos/GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACGCCAATATCTCGT			
ATGCCGTCTTCTGCTT*G			
TruSeq	Adapter,	Index	7
/5Phos/GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACCAGATCATCTCGT			
ATGCCGTCTTCTGCTT*G			
TruSeq	Adapter,	Index	8
/5Phos/GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACACTTGAATCTCGT			
ATGCCGTCTTCTGCTT*G			
TruSeq	Adapter,	Index	9
/5Phos/GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACGATCAGATCTCGT			
ATGCCGTCTTCTGCTT*G			
TruSeq	Adapter,	Index	10
/5Phos/GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACTAGCTTATCTCGT			
ATGCCGTCTTCTGCTT*G			
TruSeq	Adapter,	Index	11
/5Phos/GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACGGCTACATCTCGT			
ATGCCGTCTTCTGCTT*G			
TruSeq	Adapter,	Index	12
/5Phos/GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACCTTGTAATCTCGT			
ATGCCGTCTTCTGCTT*G			

TruSeq	Adapter,	Index	13
/5Phos/GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACAGTCAAATCTCGT ATGCCGTCTTCTGCTT*G			
TruSeq	Adapter,	Index	14
/5Phos/GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACAGTTCATCTCGT ATGCCGTCTTCTGCTT*G			
TruSeq	Adapter,	Index	15
/5Phos/GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACATGTCAATCTCGT ATGCCGTCTTCTGCTT*G			
TruSeq	Adapter,	Index	16
/5Phos/GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACCCGTCCATCTCGT ATGCCGTCTTCTGCTT*G			
TruSeq	Adapter,	Index	18
/5Phos/GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACGTCCGCATCTCGT ATGCCGTCTTCTGCTT*G			
TruSeq	Adapter,	Index	19
/5Phos/GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACGTGAAAATCTCGT ATGCCGTCTTCTGCTT*G			
TruSeq PCR 1			
AATGATACGGCGACCACCGA*G			
TruSeq PCR 2			
CAAGCAGAAGACGGCATAACGA*G			

Παρασκευή χρωματίνης για ανοσοκατακρήμνιση μεταγραφικών παραγόντων και συνενεργοποιητών

1. Καλλιέργεια κυττάρων μέχρι η πυκνότητα τους να φτάσει το 100%. Συνήθως καλλιεργούνται 8-10 15cm πιάτα ανά χρονικό σημείο μελέτης
2. Μόλυνση των κυττάρων με ιό Sendai για 3 και 6 ώρες με ποσότητα 1/10 του όγκου κάθε πιάτου
3. Προσθήκη φορμαλδεΰδης σε κάθε πιάτο σε τελική συγκέντρωση 1% και καλή ανάδευση ώστε η φορμαλδεΰδη να μοιραστεί ομοιόμορφα σε όλο το τρυβλίο
4. Επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου

5. Προσθήκη διαλύματος γλυκίνης σε τελική συγκέντρωση 0,125M για απενεργοποίηση της φορμαλδεΐδης και καλή ανάδευση ώστε να πάει σε όλο το τρυβλίο
6. Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου

7.A Στη περίπτωση προσκολλητικών κυττάρων (πχ. κύτταρα HeLa) ακολουθούνται τα εξής βήματα:

Απόρριψη του διαλύματος που περιέχεται σε κάθε πιάτο

2 πλύσεις των κυττάρων με 10 mL 1X PBS και απόρριψη του διαλύματος

Προσθήκη 10 mL 1X PBS στο κάθε τρυβλίο

Απόξεση των κυττάρων με τη βοήθεια scraper

Συλλογή κυττάρων σε falcon των 50 mL

Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 3000 rpm στους 4°C

Απόρριψη υπερκείμενου

Φύλαξη των δειγμάτων στους -80°C έως το επόμενο βήμα

7.B Στη περίπτωση αιωρούμενων κυττάρων ακολουθούνται τα εξής βήματα:

Συλλογή των κυττάρων σε falcon των 50 mL

Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 3000 rpm στους 4°C

Απόρριψη του υπερκείμενου και πλύση με 10 mL PBS

Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 3000 rpm στους 4°C

Απόρριψη του υπερκείμενου και πλύση με 10 mL PBS

Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 3000 rpm στους 4°C

Απόρριψη του υπερκείμενου και φύλαξη των δειγμάτων στους -80°C έως το επόμενο βήμα

Λύση των κυττάρων

8.Επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας σε 15 mL διαλύματος λύσης A

9.Επώαση για 10 λεπτά στον πάγο

10.Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 3500 rpm στους 4°C

11.Απόρριψη υπερκείμενου

12.Επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας σε 15 mL διαλύματος λύσης B

13.Επώαση για 10 λεπτά στον πάγο

14.Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 3500 rpm στους 4°C

- 15.Απόρριψη του υπερκείμενου
- 16.Προσθήκη 1,6 mL διαλύματος κατακερματισμού και διαλυτοποίηση της πελέτας
- 17.Αποθήκευση των δειγμάτων στους 4°C ως το επόμενο βήμα της κατεργασίας με υπερήχους

Κατακερματισμός χρωματίνης με τη χρήση υπερήχων

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

1. Ανοίγεται η συσκευή Covaris και το πρόγραμμα του Covaris στον ηλεκτρονικό υπολογιστή
2. Το δοχείο της συσκευής γεμίζεται με ddH₂O μέχρι την ένδειξη 12 που υπάρχει στο τοίχωμα
3. Αναμονή του απαιτούμενου χρονικού διαστήματος ώστε να ολοκληρωθούν οι διαδικασίες της εξαέρωσης και της ψύξης
4. Τα δείγματα μοιράζονται σε ειδικά Covaris tubes του 1 mL
5. Μετά την ολοκλήρωση των παραπάνω διαδικασιών της συσκευής, το tube τοποθετείται στην ειδική υποδοχή της συσκευής και κλείνεται το καπάκι
6. Μέσω του προγράμματος στον ηλεκτρονικό υπολογιστή ρυθμίζονται οι παράμετροι για να ξεκινήσει η διαδικασία. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιείται αρχικά είναι το εξής: Peak Power 140, Duty Factor 5, Cycles/Burst 200, Time 20 minutes
7. Μετά το τέλος της διαδικασίας, γίνεται μεταφορά του δείγματος σε eppendorf tubes των 1,5 mL
8. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 5 λεπτά στις 3.000 rpm στους 4°C. Αυτό γίνεται για να απομακρυνθούν τα θραύσματα και τα υπολείμματα των κυττάρων τα οποία εμποδίζουν το περαιτέρω κατακερματισμό του υλικού
9. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέα eppendorf tubes
10. Ακολουθεί μια ακόμα φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 5 λεπτά στις 6.000 rpm στους 4°C. Οι φυγοκεντρήσεις πραγματοποιούνται σε χαμηλές στροφές έτσι

- ώστε να μην γίνει παγίδευση χρωματίνης στον πυθμένα του eppendorf tube με τα υπόλοιπα υπολείμματα
11. Ακολουθεί μια ακόμα φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 5 λεπτά στις 13.000 rpm στους 4°C.
 12. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέα eppendorf tubes
 13. Ακολουθεί νέος γύρος κατακερματισμού της χρωματίνης στο Covaris S220 χρησιμοποιώντας το εξής πρωτόκολλο: Peak Power 175, Duty Factor 10, Cycles/Burst 200, Time 10 minutes
 14. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 rpm στους 4°C
 15. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωληνάριο και φύλαξη του υλικού στους -80°C
 16. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας του κατακερματισμού για ολόκληρη την ποσότητα των δειγμάτων, γίνεται απενεργοποίηση του προγράμματος του Covaris, απόρριψη του νερού από το δοχείο και καλό στέγνωμα

Στη συνέχεια, μπορεί να γίνει έλεγχος της αποτελεσματικότητας του κατακερματισμού της χρωματίνης μετά από πέψη με πρωτεϊνάση K, εξουδετέρωση των σταυροσυνδέσεων, καθαρισμό με φαινόλη-χλωροφόρμιο και ηλεκτροφόρηση του υλικού σε πήκτωμα αγαρόζης ώστε να διαπιστωθεί το εύρος των κομματιών DNA της κατακερματισμένης χρωματίνης.

Έλεγχος της αποτελεσματικότητας του κατακερματισμού της χρωματίνης

Ύστερα από τον κατακερματισμό της χρωματίνης, οι πρωτεΐνες των δειγμάτων υφίστανται πέψη από την πρωτεϊνάση K, μια εξωκυτταρική ενδοπεπτιδάση, η οποία διασπά τους πεπτιδικούς δεσμούς σε συγκεκριμένα σημεία. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται απομάκρυνση των πρωτεϊνών από το δείγμα DNA. Στη συνέχεια το δείγμα θερμαίνεται για να αντιστραφούν οι σταυροσυνδέσεις (reverse of cross-linking). Ο διαχωρισμός των συστατικών μετά την πέψη των πρωτεϊνών από την πρωτεϊνάση K πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας βαθμίδωση φαινόλης-χλωροφόρμιου. Πιο συγκεκριμένα, δημιουργείται ένα διφασικό διάλυμα στο οποίο η υδατική φάση (πάνω φάση) περιέχει καθαρή χρωματίνη ενώ η οργανική φάση (κάτω φάση) περιέχει τις πρωτεΐνες που διασπάστηκαν καθώς και ανεπιθύμητα συστατικά που πρέπει να

απομακρυνθούν. Με τον παραπάνω τρόπο γίνεται έλεγχος της αποτελεσματικότητας του κατακερματισμού (fragmentation) σε ένα μικρό ποσοστό της συνολικής χρωματίνης.

Πειραματική διαδικασία

Για την αντίδραση πέψης με πρωτεϊνάση K πραγματοποιούνται τα εξής βήματα:

1. Από τα δείγματα της κατακερματισμένης χρωματίνης μεταφέρονται 50 μg σε νέα erpendorf tubes
2. Προστίθενται 5 μL 10% SDS, 5 μL Proteinase K της Roche (100 μg)
3. Προστίθεται H₂O μέχρι τα 100 μL
4. Τα erpendorf tubes τοποθετούνται σε υδατόλουτρο και επωάζονται στους 55°C για 1 ώρα
5. Ακολουθεί ολονύκτια επώαση στους 65°C
6. Μετά την ολονύκτια επώαση στους 65°C, γίνεται προσθήκη μισού όγκου δείγματος, δηλαδή 50 μL χλωροφόρμιο (Chloroform biochemica της PanReac AppliChem) στα erpendorf tubes με την χρωματίνη
7. Προσθήκη μισού όγκου δείγματος, δηλαδή 50 μL φαινόλης (Phenol της PanReac AppliChem)
8. Πραγματοποιείται ανάδευση σε συσκευή vortex για περίπου 10 δευτερόλεπτα
9. Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου
10. Σε νέα erpendorf tubes προστίθεται 1/10 του όγκου του δείγματος 3 M οξικό νάτριο (CH₃COONa) pH5,2.
11. Προσθήκη 1 μL γλυκογόνου στο καπάκι του νέου erpendorf ώστε να μην έρθει σε άμεση επαφή με το οξικό νάτριο.
12. Μεταφορά της υδατικής φάσης (πάνω φάση) σε νέα erpendorf tubes (100 μL)
13. Προσθήκη 3 όγκων 100% αιθανόλη (Ethanol Absolute της BDH Chemicals)
14. Έντονη ανάδευση των δειγμάτων
15. Επώαση των δειγμάτων για 30 λεπτά στους -80°C (το βήμα αυτό γίνεται ώστε να υπάρχει καλύτερη απόδοση της κατακρήμνισης του DNA)
16. Φυγοκέντρηση των erpendorf tubes για 15 λεπτά στις 13.000 rpm στους 4°C
17. Απομάκρυνση του υπερκείμενου
18. Πλύση με 500 μL 70% αιθανόλη (Ethanol Absolute της BDH Chemicals)

19. Φυγοκέντρωση των δειγμάτων 5 λεπτά στις 13.000 rpm στους 4°C
20. Απομάκρυνση όσο το δυνατόν περισσότερης ποσότητας του υπερκείμενου και στέγνωμα των δειγμάτων με ανοιχτά καπάκια
- 21.. Επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας σε 50 μ L ddH₂O

Μετά την ολοκλήρωση του καθαρισμού του DNA σύμφωνα με την παραπάνω διαδικασία, τα δείγματα μπορούν να ηλεκτροφορηθούν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% μαζί με έναν δείκτη γνωστών μοριακών βαρών (1 Kb) ώστε να παρατηρηθεί το μέγεθος των κομματιών DNA που έχουν προκύψει μετά τον κατακερματισμό της χρωματίνης με την χρήση υπερήχων.

Για την πειραματική πορεία της απομόνωσης χρωματίνης είναι απαραίτητη η παρασκευή των εξής διαλυμάτων:

Διάλυμα Γλυκίνης 2,5M

- 9,37 gr γλυκίνη από 75,07 g/mol stock (Glycine Molecular Biology grade της AppliChem)
- DdH₂O μέχρι τα 50 ml

Διάλυμα Λύσης A

- 10 mM Tris pH8,0 (C_{αρχικό} = 1 M)
- 10 mM EDTA (C_{αρχικό} = 0,5 M)
- 0,25% Triton X-100 της PanReac AppliChem
- ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 50 mL

Διάλυμα Λύσης B

- 10 mM Tris pH8,0 (C_{αρχικό}= 1 M)
- 200 mM NaCl (C_{αρχικό}= 5 M)
- 1 mM EDTA (C_{αρχικό} = 0,5 M)
- ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 50 mL

Διάλυμα κατακερματισμού

- 10 mM Tris pH8,0 (C_{αρχικό}= 1 M)
- 1 mM EDTA (C_{αρχικό} =0,5 M)
- ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 50 mL

Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation) για μεταγραφικούς παράγοντες και συνενεργοποιητές

Πειραματική πορεία

1^η ημέρα

Την πρώτη μέρα γίνεται προετοιμασία του διαλύματος RIPA για την πλύση των μαγνητικών σφαιριδίων ώστε να είναι έτοιμα να χρησιμοποιηθούν για το preclearing της χρωματίνης. Επίσης, γίνεται επώαση της κατακερματισμένης χρωματίνης με μαγνητικά σφαιρίδια έτσι ώστε να αποφευχθούν διάφορες ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους, οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά τα αποτελέσματα της ανοσοκατακρήμισης σε χρωματίνη. Τέλος, γίνεται προσθήκη του επιθυμητού αντισώματος στη χρωματίνη, το οποίο έχει την ικανότητα να προσδένεται στην αντίστοιχη πρωτεΐνη-αντιγόνο-στόχο που βρίσκεται πάνω στην χρωματίνη ώστε να μπορέσουν στη συνέχεια να απομονωθούν μόνο τα σύμπλοκα DNA- αντίσωμα-πρωτεΐνη.

2X RIPA Buffer

- 1 mL Triton X-100
- 1 mL Tris pH8,0 ($C_{\text{αρχικό}} = 1 \text{ M}$)
- 2,8 mL NaCl ($C_{\text{αρχικό}} = 5 \text{ M}$)
- 0,12 g DOC (Sodium Deoxycholate της PanReac AppliChem)
- ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 50 mL

1X RIPA Buffer

- 25 mL 2X RIPA Buffer
- 25 mL ddH₂O

Πειραματική διαδικασία

1. Σε ένα eppendorf tube προστίθενται 200 μL μαγνητικών σφαιριδίων (protein A και protein G της Invitrogen) (Dynabeads Protein G) ανά δείγμα. 100 μL θα χρησιμοποιηθούν για preclearing και 110 μl θα χρησιμοποιηθούν για το coupling.
2. Το eppendorf tube με τα μαγνητικά σφαιρίδια τοποθετείται σε μαγνητική βάση για 2 λεπτά
3. Απομάκρυνση του υπερκείμενου
4. Προστίθεται 1 mL 1X RIPA Buffer και πραγματοποιείται καλή ανάδευση για ομογενοποίηση
5. Επώαση των μαγνητικών σφαιριδίων στον πάγο για 5 λεπτά
6. Τοποθέτηση του eppendorf tube σε μαγνητική βάση για 2 λεπτά
7. Γίνεται απομάκρυνση του υπερκείμενου
8. Τα βήματα 4,5,6 και 7 για την πλύση των μαγνητικών σφαιριδίων επαναλαμβάνονται άλλες 2 φορές
9. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου, γίνεται προσθήκη 1,5 mL 1X RIPA Buffer και ακολουθεί καλή ανάδευση για ομογενοποίηση
10. Σε 3 νέα eppendorf tubes μοιράζεται κατάλληλη ποσότητα μαγνητικών σφαιριδίων που αντιστοιχεί σε 100 μl αρχικού όγκου σφαιριδίων, ενώ το υπόλοιπο αφήνεται για επώαση σε ρότορα στους 4 °C ολονυκτίς
11. Τα eppendorf tubes τοποθετούνται στην μαγνητική βάση για 1 λεπτό
12. Απομάκρυνση του υπερκείμενου από τα μαγνητικά σφαιρίδια
13. Πάνω στα μαγνητικά σφαιρίδια προστίθενται κατάλληλη ποσότητα χρωματίνης από τα διαφορετικά χρονικά σημεία και πραγματοποιείται ανάδευση (900 μg χρωματίνη)
14. Σε κάθε eppendorf tube με μαγνητικά σφαιρίδια και χρωματίνη προστίθενται 500 μL 2X RIPA Buffer και συμπληρώνονται με ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 1 mL
15. Τα eppendorf tubes τοποθετούνται σε ρότορα για 30 λεπτά στους 4 °C στο cold room
16. Τα eppendorf tubes με τα μαγνητικά σφαιρίδια και τη χρωματίνη μεταφέρεται από τον ρότορα σε μαγνητική βάση για 4 λεπτά

17. Σε νέα eppendorf tubes μοιράζεται επιθυμητή ποσότητα χρωματίνης (450μg) από το κάθε δείγμα ανά χρονικό σημείο
18. Προσθήκη 300 μL 1X RIPA Buffer
19. Προστίθεται κατάλληλη ποσότητα αντισώματος που προορίζεται για την ανοσοκατακρήμνιση των δειγμάτων χρωματίνης (πχ. 4 μg αντισώματος για το IRF3 και 7 μg για το p65(Abcam) στο κάθε δείγμα)
20. Σε νέα eppendorf tubes προστίθενται το 1/20 της ποσότητας της χρωματίνης που υπάρχει σε κάθε αντίδραση ως input control από την αρχική ποσότητα της χρωματίνης
21. Τα eppendorf tubes με τη χρωματίνη και το αντίστοιχο αντίσωμα και το eppendorf tube με την υπόλοιπη ποσότητα μαγνητικών σφαιριδίων μεταφέρονται σε ρότορα στους 4 °C ολονυκτίς
22. Τα eppendorf tubes με τα input control μεταφέρονται στους 4 °C

2^η ημέρα

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

2X Wash RIPA Buffer

- 1 mL Triton X-100
- 1 mL Tris pH8,0 ($C_{\text{αρχικό}} = 1 \text{ M}$)
- 1 mL 10% SDS
- 5 mL NaCl ($C_{\text{αρχικό}} = 5 \text{ M}$)
- 0,14 g DOC (Sodium Deoxycholate της PanReac AppliChem)
- ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 50 mL

1X Wash RIPA Buffer

- 25 mL 2X Wash RIPA
- 25 mL ddH₂O

Πειραματική διαδικασία

1. Τα eppendorf tubes με τη χρωματίνη και τα αντισώματα και τα input control καθώς και το eppendorf tube με τα μαγνητικά σφαιρίδια μεταφέρονται σε πάγο
2. Στα eppendorf tubes με τη χρωματίνη και τα αντισώματα γίνεται προσθήκη μαγνητικών σφαιριδίων (προσοχή δεν γίνεται προσθήκη σφαιριδίων στα input)
3. Τα eppendorf tubes τοποθετούνται σε ρότορα στους 4 °C στο cold room για 3 ώρες
4. Μεταφορά των eppendorf tubes σε πάγο και στη συνέχεια σε μαγνητική βάση για 2 λεπτά
5. Απομάκρυνση του υπερκείμενου
6. Προσθήκη 1 mL 1X Wash RIPA Buffer
7. Απαλή επαναδιάλυση με το χέρι και επώαση στο πάγο για 3 λεπτά
8. Μεταφορά στο μαγνήτη για 2 λεπτά και απομάκρυνση υπερκείμενου
9. Τα βήματα 6,7,8 και 9 επαναλαμβάνονται άλλες 2 φορές για την πλύση των μαγνητικών σφαιριδίων
10. Ακολουθεί πέψη με Proteinase K (της Roche) τόσο για τα δείγματα χρωματίνης όσο και για τα input control
11. Σε κάθε eppendorf tube προστίθενται 4 μL 25 mg/mL PK, 2,5 μL 10% SDS και γίνεται συμπλήρωση του όγκου με ddH₂O μέχρι τα 50 μL και ακολουθεί ανάδευση*
12. Μεταφορά των eppendorf tubes σε υδατόλουτρο στους 55 °C για 2,5 ώρες
13. Ακολουθεί ολονύκτια επώαση στους 67 °C

*Ο τελικός όγκος της κάθε αντίδρασης είναι 100 μL. Όταν παρασκευάζονται τα PK mix πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η ποσότητα των input control που έχουν κρατηθεί.

Για τον λόγο αυτό φτιάχνεται διαφορετικό mix για τα δείγματα και διαφορετικό για τα input control.

3^η ημέρα

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

Πειραματική διαδικασία

1. Αφαίρεση των δειγμάτων από το υδατόλουτρο
2. Έντονη ανάδευση για 5 δευτερόλεπτα και σύντομη φυγοκέντρηση (quick spin)
3. Τοποθέτηση των δειγμάτων (εκτός από τα input control καθώς δεν έχουν μαγνητικά σφαιρίδια) σε μαγνητική βάση για 5 λεπτά
4. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο eppendorff
5. Προσθήκη 2 όγκων (100 μ L) Nucleomag SPRI beads σε όλα τα δείγματα
6. Επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
7. Τοποθέτηση των δειγμάτων σε μαγνητική βάση για 5 λεπτά
8. Πλύση με 80% αιθανόλη με όγκο που καλύπτει τα σφαιρίδια
9. Απομάκρυνση της αιθανόλης με προσοχή μην παρθούν σφαιρίδια
10. Πλύση με 80% αιθανόλη
11. Απομάκρυνση αιθανόλης
12. Καλό στέγνωμα με ανοιχτά καπάκια για λίγα λεπτά
13. Προσθήκη 52 μ L ddH₂O και καλή ομογενοποίηση-πιπετάρισμα με τα σφαιρίδια
14. Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
15. Τοποθέτηση των δειγμάτων σε μαγνητική βάση για 3 λεπτά
16. Μεταφορά του υπερκείμενου (50 μ L) σε καινούργια eppendorf tubes

Κατασκευή γενομικής βιβλιοθήκης και αλληλούχιση ευρείας κλίμακας

Επιδιόρθωση των άκρων του DNA

1.Μίξη σε PCR σωληνάριο των ακόλουθων συστατικών:

1-50 ng ChIPed material

5 µl T4 DNA ligase buffer (NEB)

1 µl T4 DNA polymerase (NEB)

1 µl Polynucleotide kinase (NEB)

2 µl 10mM dNTPs

1 µl DNA polymerase I Klenow large fragment (NEB)

H₂O μέχρι τα 50 µl

2. Επώαση σε μηχανήμα PCR στους 20°C για 30 λεπτά.

Καθαρισμός της αντίδρασης με τα μαγνητικά σφαιρίδια NucleoMag

1.Ο καθαρισμός της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με τα μαγνητικά σφαιρίδια NucleoMag NGS Clean-up and Size Select, Macherey Nagel.

Συγκεκριμένα προστέθηκε διπλάσιος όγκος σφαιριδίων και το δείγμα επώαστηκε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

2. Ο σωλήνας erppendorf τοποθετήθηκε σε μαγνήτη για 5 λεπτά

3.Ακολούθησε αφαίρεση του υπερκείμενου, προσθήκη 200 µl 80% αιθανόλης και επώαση για 30 δευτερόλεπτα στο μαγνήτη.

4.Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και πραγματοποιήθηκε μία ακόμα πλύση με 80% αιθανόλη.

5.Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και ο σωλήνας αφέθηκε να στεγνώσει για μερικά λεπτά, αφού αφαιρέθηκε από το μαγνήτη.

6.Προσθήκη 36 µl H₂O και επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

7.Μεταφορά στο μαγνήτη και επώαση για 5 λεπτά.

8. Αφαίρεση 34 µl από το υπερκείμενο και μεταφορά σε νέο σωλήνα.

Προσθήκη αδενίνης στα άκρα του DNA

1.Μίξη σε PCR σωληνάριο των ακόλουθων συστατικών:

34 μl DNA από το προηγούμενο βήμα
5 μl NEB 2 (10x) buffer
10 μl 1mM dATP
1 μl Klenow Fragment (3'→5' exo-) (NEB)

2. Επώαση σε μηχανήμα PCR στους 37°C για 30 λεπτά
3. Καθαρισμός της αντίδρασης με τα σφαιρίδια Nucleomag σύμφωνα με το πρωτόκολλο που έχει περιγραφεί παραπάνω. Η έκλυση πραγματοποιήθηκε προσθέτοντας 11 μl H₂O.

Αντίδραση λιγάσης για την προσθήκη ανταπτόρων στα άκρα του DNA

1. Μίξη σε PCR σωληνάριο των ακόλουθων συστατικών:

10 μl DNA από το προηγούμενο βήμα
15 μl Quick Ligation Reaction Buffer (NEB)
1 μl NEBNext adaptor ((NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (Index Primers Set 1)

3 μl Quick T4 DNA ligase (NEB)
2 μl H₂O

2. Επώαση σε μηχανήμα PCR στους 20°C για 30 λεπτά
3. Προσθήκη 3 μl USER™ Enzyme Mix ((NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (Index Primers Set 1)
5. Επώαση στους 37°C για 30 λεπτά.
4. Καθαρισμός της αντίδρασης με τα σφαιρίδια Nucleomag, χρησιμοποιώντας 1,6:1 αναλογία του όγκου του διαλύματος των σφαιριδίων προς τον όγκο του διαλύματος του DNA. Έκλυση σε 20 μl H₂O.

Περιορισμένος Πολλαπλασιασμός της βιβλιοθήκης με PCR

Πραγματοποιείται περιορισμένος πολλαπλασιασμός της βιβλιοθήκης για 5 κύκλους για την μετατροπή των άκρων των ανταπτόρων που έχουν σχήμα Y σε

δίκλωνο DNA το οποίο και διαχωρίζεται σύμφωνα με το μέγεθος του σε πήκτωμα αγαρόζης.

4. Προσθήκη: 19 μl DNA από το προηγούμενο βήμα
1 μl NebNext Universal primer
1 μl NebNext Index primer
25 μl 2X Kapa HiFi Hotstart Ready Mix
5. Πολλαπλασιασμός με το ακόλουθο πρωτόκολλο:
45 δευτερόλεπτα στους 98°C
15 δευτερολέπτων στους 98°C
30 δευτερολέπτων στους 63°C
30 δευτερολέπτων στους 72°C } 5 κύκλοι
300 δευτερόλεπτα στους 72°C

Επώαση στους 4°C μέχρι την αφαίρεση από το μηχάνημα

6. Προσθήκη 80 μl σφαιριδίων NucleoMag και επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Ο σωλήνας erppendorf τοποθετήθηκε σε μαγνήτη για 5 λεπτά
5. Ακολούθησε αφαίρεση του υπερκείμενου, προσθήκη 500 μl 80% αιθανόλης και επώαση για 30 δευτερόλεπτα στο μαγνήτη.
6. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και πραγματοποιήθηκε μία ακόμα πλύση με 80% αιθανόλη.
7. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και ο σωλήνας αφέθηκε να στεγνώσει για μερικά λεπτά, αφού αφαιρέθηκε από το μαγνήτη.
8. Προσθήκη 11,5 μl H₂O και επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Μεταφορά στο μαγνήτη και επώαση για 5 λεπτά.
10. Αφαίρεση 10 μl από το υπερκείμενο και μεταφορά σε νέο σωλήνα.

Ηλεκτροφόρηση και επιλογή συγκεκριμένου εύρους μεγεθών

1. Προετοιμασία ενός πήκτωματος αγαρόζης 2%.
2. Προσθήκη 6X χρωστικής στα δείγματα που περιέχει xylene cyanol και bromophenol blue.
3. Φόρτωση των δειγμάτων αφήνοντας κενά μεταξύ τους καθώς και φόρτωση 200 ng 100 bp μάρτυρα.

4. Ηλεκτροφόρηση στα 100V για 40 λεπτά.
5. Απομόνωση του τμήματος του πηκτώματος που περιέχει υλικό μεταξύ 200 και 400 bp χρησιμοποιώντας αποστειρωμένη λεπίδα και μεταφορά σε erpendorf του 1,5ml.
6. Καθαρισμός των δειγμάτων με το kit Nucleospin Gel and PCR cleanup (Macherey-Nagel). Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε μέτρηση του βάρους του δείγματος και προσθήκη 4 όγκων διαλύματος NT1.
7. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να λιώσει το πήκτωμα. Ανακίνηση ανα μερικά λεπτά.
8. Μεταφορά μέχρι 700 μ L σε στήλη, φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στις 13,000 rpm και απόρριψη του υγρού από το σωληνάριο συλλογής. Ακολουθείται η ίδια διαδικασία μέχρι να φυγοκεντρηθεί όλο το υλικό.
9. Προσθήκη στη στήλη 750 μ L διαλύματος NT3.
10. Φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στις 13,000 rpm
11. Επανάληψη των βημάτων 9 και 10.
12. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13,000 rpm για να αφαιρεθούν τα υπολείμματα αιθανόλης από τη στήλη.
13. Μεταφορά της στήλης σε νέο 1,5 ml σωληνάκι Eppendorf και προσθήκη 30 μ L H₂O.
14. Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
18. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13,000 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου.
19. Απόρριψη της στήλης και φύλαξη του δείγματος.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο για την εύρεση του ιδανικού αριθμού κύκλων πολλαπλασιασμού

Ο υπερβολικός πολλαπλασιασμός της βιβλιοθήκης μπορεί να οδηγήσει στη παραγωγή ανεπιθύμητων παραπροϊόντων και στην αλλαγή της σχετικής κατανομής των κομματιών DNA. Για την εύρεση του ιδανικού αριθμού κύκλων πολλαπλασιασμού, εκεί όπου η αντίδραση βρίσκεται ακόμα στο στάδιο της εκθετικής φάσης πραγματοποιήθηκε ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρησιμοποιώντας τα εξής αντιδραστήρια:

1 μ l της ποσότητας DNA που προέκυψε από το προηγούμενο βήμα
10 μ l KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal

0,5 μl NebNext Universal primer
0,5 μl NebNext Index primer
8 μl H₂O

Ο πολλαπλασιασμός πραγματοποιήθηκε με το ακόλουθο πρωτόκολλο:

95°C για 45 δευτερόλεπτα
95°C για 15 δευτερόλεπτα }
63°C για 30 δευτερόλεπτα } 20 κύκλοι
72°C για 30 δευτερόλεπτα }

Ο αριθμός των κύκλων που είναι απαραίτητοι για το πολλαπλασιασμό του συνολικού DNA είναι αυτός στον οποίο η αντίδραση βρίσκεται στο μέσο της εκθετικής φάσης. Γνωρίζοντας τον αριθμό αυτό στη συνέχεια ακολούθησε ο πολλαπλασιασμός του ολικού υλικού.

Πολλαπλασιασμός της βιβλιοθήκης με PCR

1. Μίξη σε PCR σωληνάρια των ακόλουθων αντιδραστηρίων:

18 μl DNA που έχει απομονωθεί από το πήκτωμα αγαρόζης
20 μl Kapa Hifi Hot Start Ready Mix
2,5 μl NebNext Universal primer
2,5 μl NebNext Index primer
7 μl H₂O

2. Πολλαπλασιασμός με το ακόλουθο πρωτόκολλο:

98°C για 45 δευτερόλεπτα
98°C για 15 δευτερόλεπτα
63°C για 30 δευτερόλεπτα } αριθμός κύκλων όπως προκύπτει
72°C για 30 δευτερόλεπτα } από τη qPCR
72°C για 300 δευτερόλεπτα

3. Προσθήκη 60 μl σφαιριδίων NucleoMag και επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Ο σωλήνας erpendorf τοποθετήθηκε σε μαγνήτη για 5 λεπτά
5. Ακολούθησε αφαίρεση του υπερκείμενου, προσθήκη 200 μl 80% αιθανόλης και επώαση για 30 δευτερόλεπτα στο μαγνήτη.
6. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και πραγματοποιήθηκε μία ακόμα πλύση με 80% αιθανόλη.
7. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και ο σωλήνας αφέθηκε να στεγνώσει για μερικά λεπτά, αφού αφαιρέθηκε από το μαγνήτη.
8. Προσθήκη 42 μl H₂O και επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Μεταφορά στο μαγνήτη και επώαση για 5 λεπτά.
10. Αφαίρεση 40 μl από το υπερκείμενο και μεταφορά σε νέο σωλήνα.
11. Προσθήκη 48 μl σφαιριδίων NucleoMag και επανάληψη του πρωτόκολλου καθαρισμού. Έκλυση σε 11 μL H₂O.

Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο για τη διαπίστωση της ποιότητας των βιβλιοθηκών

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

Κάθε αντίδραση qPCR περιελάμβανε τα εξής:

10 μL KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x)

5 ng από τη πολλαπλασιασμένη βιβλιοθήκη

50 ng πρόσθιο εκκινητή

50 ng ανάστροφο εκκινητή

H₂O μέχρι τα 20 μl

Πολλαπλασιασμός με το ακόλουθο πρωτόκολλο:

95°C για 45 δευτερόλεπτα	}	40 κύκλοι
95°C για 15 δευτερόλεπτα		
58-66°C για 45 δευτερόλεπτα		

Η κατάλληλη θερμοκρασία υβριδισμού και επέκτασης για το εκάστοτε ζευγάρι εκκινητών έχει βρεθεί από πιλοτικά πειράματα. Οι εκκινητές πολλαπλασιάζουν περιοχές του DNA που λειτουργούν ως θετικοί ή αρνητικοί στόχοι για το εκάστοτε πείραμα ανοσοκατακρήμνισης.

Έλεγχος των βιβλιοθηκών και αλληλούχιση ευρείας κλίμακας

Πραγματοποιήθηκε μέτρηση της συγκέντρωσης των βιβλιοθηκών στο μηχάνημα Qubit fluorometer χρησιμοποιώντας το Qubit dsDNA HS Assay Kit και 1 μl από κάθε δείγμα. Επίσης πραγματοποιήθηκε ποιοτικός έλεγχος των βιβλιοθηκών στο μηχάνημα Agilent Bioanalyzer 2100 χρησιμοποιώντας το Agilent DNA 1000 kit και 1 μl από κάθε βιβλιοθήκη και διαπιστώθηκε το μέγεθος τους και η απουσία διμερών εκκινητών. Τέλος έγινε προετοιμασία των δειγμάτων για αλληλούχιση, φόρτωση ίσης συγκέντρωσης από τα όλα τα δείγματα στο μηχάνημα NextSeq 500 της Illumina και αλληλούχιση ευρείας κλίμακας. Αξίζει να σημειωθεί ότι επιλέχθηκε διάβασμα των αλληλουχιών μήκους 75 βάσεων μόνο από τη μία πλευρά των αλληλουχιών χρησιμοποιώντας το kit NextSeq 500/550 High Output v2 kit (75 cycles), Illumina.

Το πρωτόκολλο ChIP-STARR-seq

Ο πλασμιδιακός φορέας STARR

Ο σκελετός του STARR φορέα βασίζεται στο πλασμίδιο pGL4.10 (Promega) στο οποίο αντικαταστάθηκε η αλληλουχία μεταξύ SacI και AfeI με αλληλουχία που φέρει ένα ισχυρό συνθετικό υποκινητή Super Core Promoter1 (SCP1), ένα συνθετικό ιντρόνιο (pIRESpuro3, Clontech), αλληλουχία που κωδικοποιεί για GFP (sgGFP, Qbiogene, Inc), το γονίδιο επιλογής ccdB και το SV40 polyA -σήμα. Η αλλαγή που πραγματοποιήσαμε στο παραπάνω φορέα ήταν η εισαγωγή μίας θέσης πρόσδεσης άνωθεν του υποκινητή για το μεταγραφικό παράγοντα Sp1 ο οποίος διευκολύνει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ υποκινητή και ενισχυτή.

Κατασκευή γενομικής βιβλιοθήκης

Επιδιόρθωση των άκρων του DNA

1. Μίξη σε PCR σωληνάριο των ακόλουθων συστατικών:

40% της απομονωμένης ποσότητας DNA από το πείραμα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης για τον IRF3 6 ώρες μετά τη μόλυνση με ιό Sendai.

5 μl T4 DNA ligase buffer (NEB)

1 μl T4 DNA polymerase (NEB)

1 μl Polynucleotide kinase (NEB)

2 μl 10mM dNTPs

1 μl DNA polymerase I Klenow large fragment (NEB)

H₂O μέχρι τα 50 μl

2. Επώαση σε μηχανήμα PCR στους 20°C για 30 λεπτά.

Καθαρισμός της αντίδρασης με τα σφαιρίδια Ampure Xp

1. Ο καθαρισμός της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με τα μαγνητικά σφαιρίδια Nucleomag. Συγκεκριμένα προστέθηκε διπλάσιος όγκος σφαιριδίων και το δείγμα επώαστηκε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

2. Ο σωλήνας erppendorf τοποθετήθηκε σε μαγνήτη για 5 λεπτά

3. Ακολούθησε αφαίρεση του υπερκείμενου, προσθήκη 500 μl 80% αιθανόλης και επώαση για 30 δευτερόλεπτα στο μαγνήτη.

4. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και πραγματοποιήθηκε μία ακόμα πλύση με 80% αιθανόλη.

5. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και ο σωλήνας αφέθηκε να στεγνώσει για μερικά λεπτά, αφού αφαιρέθηκε από το μαγνήτη.

6. Προσθήκη 36 μl H₂O και επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

7. Μεταφορά στο μαγνήτη και επώαση για 5 λεπτά.

8. Αφαίρεση 34 μl από το υπερκείμενο και μεταφορά σε νέο σωλήνα.

Προσθήκη αδερίνης στα άκρα του DNA

1. Μίξη σε PCR σωληνάριο των ακόλουθων συστατικών:

34 μl DNA από το προηγούμενο βήμα

5 μl NEB 2 (10x) buffer
10 μl 1mM dATP
1 μl Klenow Fragment (3'→5' exo-) (NEB)

2. Επώαση σε μηχανήμα PCR στους 37°C για 30 λεπτά
3. Καθαρισμός της αντίδρασης με τα σφαιρίδια Nucleomag σύμφωνα με το πρωτόκολλο που έχει περιγραφεί παραπάνω. Η έκλυση πραγματοποιήθηκε προσθέτοντας 11 μl H₂O.

Αντίδραση λιγάσης για την προσθήκη ανταπτόρων στα άκρα του DNA

1. Μίξη σε PCR σωληνάριο των ακόλουθων συστατικών:

10 μl DNA από το προηγούμενο βήμα
16 μl Quick Ligation Reaction Buffer (NEB)
1 μl NEBNext adaptor ((NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (Index Primers Set 1)
3 μl Quick T4 DNA ligase (NEB)
2 μl H₂O

2. Επώαση σε μηχανήμα PCR στους 20°C για 30 λεπτά
3. Προσθήκη 3 μl USER™ Enzyme Mix ((NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (Index Primers Set 1)
5. Επώαση στους 37°C για 30 λεπτά.
4. Καθαρισμός της αντίδρασης με τα σφαιρίδια Nucleomag, χρησιμοποιώντας 1,6:1 αναλογία του όγκου του διαλύματος των σφαιριδίων προς τον όγκο του διαλύματος του DNA.

Πολλαπλασιασμός για 5 κύκλους

25μl Kapa Hifi
1μl universal primer
1μl index primer
19 μl ligated IRF3 library

4 μl H₂O

Πολλαπλασιασμός για 5 κύκλους:

45 sec στους 95°C

5 cycles of 15sec at 95°C, 30sec at 63°C, 30sec at 72°C

Καθαρισμός της αντίδρασης με τα σφαιρίδια Nucleomag, χρησιμοποιώντας 1,6:1 αναλογία του όγκου του διαλύματος των σφαιριδίων προς τον όγκο του διαλύματος του DNA και έκλυση σε 11 μl H₂O.

Ηλεκτροφόρηση και επιλογή συγκεκριμένου εύρους μεγεθών

1. Προετοιμασία ενός πηκτώματος αгарόζης 2%.
2. Προσθήκη 6X χρωστικής στα δείγματα που περιέχει xylene cyanol και bromophenol blue.
3. Φόρτωση των δειγμάτων αφήνοντας κενά μεταξύ τους καθώς και φόρτωση 200 ng 100 bp μάρτυρα.
4. Ηλεκτροφόρηση στα 100V για 40 λεπτά.
5. Απομόνωση του τμήματος του πηκτώματος που περιέχει υλικό μεταξύ 200 και 400 bp και σε ξεχωριστό σωληνάκι του τμήματος μεταξύ 400-700 bp χρησιμοποιώντας αποστειρωμένη λεπίδα και μεταφορά σε eppendorf του 1,5ml.
6. Καθαρισμός των δειγμάτων με το kit Nucleospin Gel and PCR cleanup (Macherey-Nagel). Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε μέτρηση του βάρους του δείγματος και προσθήκη 4 όγκων διαλύματος NT1.
7. Επώση σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να λιώσει το πήκτωμα. Ανακίνηση ανά μερικά λεπτά.
8. Μεταφορά μέχρι 700 μL σε στήλη, φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στις 13,000 rpm και απόρριψη του υγρού από το σωληνάριο συλλογής. Ακολουθείται η ίδια διαδικασία μέχρι να φυγοκεντρηθεί όλο το υλικό.
9. Προσθήκη στη στήλη 750 μL διαλύματος NT3.
10. Φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στις 13,000 rpm
11. Επανάληψη των βημάτων 9 και 10.
12. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13,000 rpm για να αφαιρεθούν τα υπολείμματα αιθανόλης από τη στήλη.

13. Μεταφορά της στήλης σε νέο 1,5 ml σωληνάκι Eppendorf και προσθήκη 30 μ L H₂O.

14. Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

18. Φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 13,000 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου.

19. Απόρριψη της στήλης και φύλαξη του δείγματος.

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση κομματιών μεγέθους 400-700 bp από την IRF3 6h βιβλιοθήκη μετά τον αρχικό πολλαπλασιασμό για 5 κύκλους, ενώ τα κομμάτια από 200-400 bp χρησιμοποιήθηκαν για ChIP-seq.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο για την εύρεση του ιδανικού αριθμού κύκλων πολλαπλασιασμού

Ο υπερβολικός πολλαπλασιασμός της βιβλιοθήκης μπορεί να οδηγήσει στη παραγωγή ανεπιθύμητων παραπροϊόντων και στην αλλαγή της σχετικής κατανομής των κομματιών DNA. Για την εύρεση του ιδανικού αριθμού κύκλων πολλαπλασιασμού, εκεί όπου η αντίδραση βρίσκεται ακόμα στο στάδιο της εκθετικής φάσης πραγματοποιήθηκε ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρησιμοποιώντας τα εξής αντιδραστήρια:

1 μ l της ποσότητας DNA που προέκυψε από το προηγούμενο βήμα
10 μ l KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal
0,5 μ l recombination primer F
0,5 μ l recombination primer R
8 μ l H₂O

Ο πολλαπλασιασμός πραγματοποιήθηκε με το ακόλουθο πρωτόκολλο:

95°C για 45 δευτερόλεπτα	} 20 κύκλοι
95°C για 15 δευτερόλεπτα	
65°C για 30 δευτερόλεπτα	
72°C για 30 δευτερόλεπτα	

Ο αριθμός των κύκλων που είναι απαραίτητοι για το πολλαπλασιασμό του συνολικού DNA είναι αυτός στον οποίο η αντίδραση βρίσκεται στο μέσο της εκθετικής φάσης.

Λαμβάνοντας υπόψιν ότι πρέπει να παραχθεί επαρκής ποσότητα προϊόντος για τις αντιδράσεις ανασυνδυασμού με το 1xSP1_STARR φορέα (1,2 μg καθαρισμένης βιβλιοθήκης για 20 αντιδράσεις ανασυνδυασμού) στο αριθμό των κύκλων που προέκυψαν από τη qPCR ανάλυση προστέθηκαν 4 επιπλέον κύκλοι.

Μετά τα αποτελέσματα της qPCR αποφασίστηκε η βιβλιοθήκη να πολλαπλασιαστεί για επιπλέον 14 κύκλους (5 αρχικούς και 14 επιπλέον κύκλους)

Πραγματοποιήθηκαν 3 αντιδράσεις πολλαπλασιασμού με το εξής πρωτόκολλο:

25μl Kara Hifi Hot Start Ready Mix

1μl recombination primer F

1μl recombination primer R

5 cycle pre-amplified library

Up to 50 μl with H2O

Πολλαπλασιασμός για 14 κύκλους στο μηχάνημα της qpcr :

45 sec στους 95C

14 cycles 15sec at 95C, 30sec at 65C, 30sec at 72C

Ένωση των αντιδράσεων και καθαρισμός με τα σφαιρίδια NucleoMag NGS Clean-up and Size Select, Macherey Nagel, χρησιμοποιώντας 1,2:1 αναλογία του όγκου του διαλύματος των σφαιριδίων προς τον όγκο του διαλύματος του DNA. Έπειτα πραγματοποιήθηκε περαιτέρω καθαρισμός του φορέα με το MinElute PCR Purification Kit της QIAGEN ακολουθώντας το προτεινόμενο πρωτόκολλο. Το βήμα αυτό είναι απαραίτητο για να βελτιωθεί η καθαρότητα του DNA και να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα των αντιδράσεων ανασυνδυασμού.

Αντίδραση πέψης του STARR πλασμιδιακού φορέα

Πραγματοποιήθηκε αντίδραση πέψης του STARR πλασμιδίου με τα περιοριστικά ένζυμα AgeI-HF και SalI-HF ώστε σε επόμενο στάδιο να καταστεί εφικτή

η εισαγωγή της IRF3 6h βιβλιοθήκης που φέρει άκρα συμπληρωματικά με αυτά του κομμένου φορέα.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε πέψη του φορέα STARR με το ένζυμο AgeI-HF. Κάθε αντίδραση πέψης περιελάμβανε τα εξής:

5 μl CutSmart buffer

5 μg STARR φορέα

40 units AgeI-HF

H₂O μέχρι τα 50 μl

Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 5 ώρες

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 8 αντιδράσεις πέψης.

Ακολούθησε καθαρισμός των αντιδράσεων με το QIAquick PCR Purification kit ακολουθώντας το προτεινόμενο πρωτόκολλο. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 3 στήλες για το καθαρισμό των 8 αντιδράσεων πέψης. Φύλαξη των αντιδράσεων στους -20°C.

Έπειτα πραγματοποιήθηκε αντίδραση πέψης του κομμένου με AgeI-HF φορέα STARR με το ένζυμο SaII-HF

Κάθε αντίδραση πέψης περιελάμβανε τα εξής:

5 μl CutSmart buffer

5 μg STARR φορέα

50 units SaII-HF

H₂O μέχρι τα 50 μl

Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 5 ώρες

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 5 αντιδράσεις πέψης

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση του υλικού της πέψης σε 1% πήκτωμα αγαρόζης και απομόνωση του κομμένου φορέα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του φορέα με το NucleoSpin Gel and PCR cleanup της Macherey Nagel. Έπειτα πραγματοποιήθηκε περαιτέρω καθαρισμός του φορέα με το MinElute PCR Purification Kit της QIAGEN ακολουθώντας το προτεινόμενο πρωτόκολλο. Το βήμα αυτό είναι

απαραίτητο για να βελτιωθεί η καθαρότητα του DNA και να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα των αντιδράσεων ανασυνδυασμού.

Αντίδραση ανασυνδυασμού

Η εισαγωγή της IRF3 6h βιβλιοθήκης στο πλασμιδιακό φορέα του STARR-seq πραγματοποιήθηκε με αντίδραση ανασυνδυασμού με τη χρήση του κιτ Clontech InFusion HD. Η θέση εισαγωγής της βιβλιοθήκης βρίσκεται κάτωθεν της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για το GFP έτσι ώστε να μεταγράφονται και να μεταφράζονται χημικαί μέρια GFP σε σύντηξη με το εκάστοτε τμήμα DNA με ενεργότητα ενισχυτή. Κάθε αντίδραση περιελάμβανε τα εξής:

60 ng ένθεμα από τη IRF3 6h βιβλιοθήκη
150 ng φορέα που έχει υποστεί πέψη με AgeI-HF και SalI-HF
2 μl In-Fusion HD Enzyme Premix
dH₂O μέχρι τελικό όγκο 10 μl.

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

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 18 αντιδράσεις ανασυνδυασμού.

Επίσης πραγματοποιήθηκε αντίδραση ελέγχου (control reaction) χρησιμοποιώντας το DNA του ενθέματος και του φορέα που παρέχεται από το κιτ σύμφωνα με το παρακάτω πρόγραμμα:

1 μl φορέας
2 μ ένθεμα
5 μ H₂O
2 μ In-Fusion HD Enzyme Premix
2 μl dH₂O

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

Μετασχηματισμός και καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων

Από κάθε αντίδραση ανασυνδυασμού χρησιμοποιήθηκαν 3 μλ για το μετασχηματισμό 50μl υψηλής επιδεκτικότητας βακτηριακών κυττάρων DH10beta (NEB). Επομένως για 18 αντιδράσεις ανασυνδυασμού χρησιμοποιήθηκαν 54 aliquots κυττάρων. Το πρωτόκολλο μετασχηματισμού περιελάμβανε τα εξής βήματα:

Επώαση στο πάγο για 30 λεπτά

Θερμικό σοκ των κυττάρων για 45 δευτερόλεπτα στους 42°C

Επώαση για 5 λεπτά στο πάγο

Προσθήκη 1000 μl SOC θρεπτικού μέσου και μεταφορά σε σωλήνες FACS

Επώαση στους 37°C για 60 λεπτά στις 220 rpm

Ένωση όλων των καλλιιεργειών σε 50 ml falcon και επίστρωση σε τρυβλίο petri 5μl, 10μl, 20μl, 50, 100 and 200μl από το σύνολο των 53.000 μl του συνολικού πειράματος για το υπολογισμό του συνολικού αριθμού των μοναδικών κλώνων. Μεταφορά του υπόλοιπου της καλλιέργειας σε 1 λίτρο LB, μοίρασμα σε δύο 2Lt φλάσκες και ολονύκτια επώαση στους 37°C 220 rpm. Την επόμενη μέρα πραγματοποιείται μέτρηση του αριθμού των αποικιών που μεγάλωσαν και εκτίμηση του συνολικού αριθμού των μοναδικών αποικιών-κλώνων του πειράματος. Για ένα ChIP-STARR-seq πείραμα σε κύτταρα θηλαστικών είναι απαραίτητο ο αριθμός των συνολικών κλώνων να είναι τουλάχιστον 2-3 εκατομμύρια για να αντιπροσωπεύονται επαρκώς στη πλασμιδιακή βιβλιοθήκη οι περιοχές πρόσδεσης στο DNA του εκάστοτε παράγοντα έναντι του οποίου πραγματοποιήθηκε η ανοσοκατακρήνηση.

Απομόνωση πλασμιδιακής βιβλιοθήκης

Η απομόνωση της πλασμιδιακής STARR βιβλιοθήκης πραγματοποιήθηκε με το Macherey Nagel Midiprep kit σύμφωνα με το προτεινόμενο πρωτόκολλο, χρησιμοποιώντας 200 ml καλλιέργειας ανά στήλη.

Διαμόλυνση HeLa κυττάρων

Πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση HeLa κυττάρων με τη STARR IRF3 πλασμιδιακή βιβλιοθήκη με τη χρήση λιποσωμάτων και συγκεκριμένα του αντιδραστηρίου lipofectamine 2000. Το πρωτόκολλο περιελάμβανε τα εξής βήματα:

1. Καλλιέργεια κυττάρων HeLa σε 4 πιάτα των 100 mm² μέχρι η πυκνότητά τους να φτάσει το 90-100%.

2. Για κάθε πιάτο με κύτταρα HeLa χρησιμοποιούνται 90 μl lipofectamine 2000 και 36 μg από τη STARR πλασμιδιακή βιβλιοθήκη. Συγκεκριμένα για κάθε πιάτο πραγματοποιείται προσθήκη 22,5 μl lipofectamine 2000 σε 500 μl καλλιεργητικού μέσου DMEM χωρίς ορό και αντιβιοτικό σε 4 διαφορετικά erpendorf. Επίσης πραγματοποιείται προσθήκη 9 μg από τη πλασμιδιακή βιβλιοθήκη σε 500 μl DMEM χωρίς ορό και αντιβιοτικό σε 4 διαφορετικά erpendorf. Οι σωλήνες επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.

3. Πραγματοποιείται μίξη του περιεχόμενου των σωλήνων που περιέχουν τη lipofectamine 2000 με αυτούς που περιέχουν τη πλασμιδιακή βιβλιοθήκη με απαλό πιπετάρισμα και χρήση κομμένων στην άκρη pipette tips. Στη συνέχεια το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά.

4. Αφαιρείται το θρεπτικό υλικό από τα κύτταρα και προστίθεται 6 ml θρεπτικό υλικό χωρίς αντιβιοτικό και ορό.

5. Το μίγμα της λιποφεκταμίνης και του DNA μεταφέρεται στάγδην σε κάθε πιάτο με τη χρήση πιπέττας με κομμένο tip. Χρειάζεται προσοχή να μην αναδευτεί το περιεχόμενο του πιάτου για να μην διαταραχθούν τα σύμπλοκα λιποφεκταμίνης-DNA.

6. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 4 ώρες. Στη συνέχεια αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και προστίθεται σε κάθε πιάτο 10 ml DMEM που περιέχει ορό και αντιβιοτικά.

Μόλυνση των κυττάρων με ιό Sendai

Μετά το πέρας 24 ωρών από τη διαμόλυνση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε μόλυνση για 6 ώρες με ιό Sendai δύο 10mm² πιάτων. Σε κάθε πιάτο προστέθηκαν 1,5 ml ιού (1/10 του όγκου της αρχικής καλλιέργειας).

Συλλογή και φύλαξη κυττάρων μετά τη μόλυνση

1. Απόρριψη του θρεπτικού υλικού και δύο φορές πλύση με 5 ml 1x PBS για κάθε πιάτο καλλιέργειας.
2. Προσθήκη 5 ml 1x PBS με 2mM EDTA και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
3. Πιπετάρισμα για την αποκόλληση των κυττάρων, συλλογή τους σε σωλήνα 15 ml falcon και φυγοκέντρησή τους για 5 λεπτά στις 3000 rpm.
4. Αφαίρεση του υπερκείμενου, πλύση με 5 ml PBS και συλλογή διαλύματος που αντιστοιχεί σε μισό εκατομμύριο κύτταρα σε ξεχωριστό Eppendorf για απομόνωση της πλασμιδιακής βιβλιοθήκης.
5. Φυγοκέντρωση των δειγμάτων για 5 λεπτά στις 3000 rpm, αφαίρεση του υπερκείμενου και αποθήκευση της πελλέτας στους -80°C .

Απομόνωση πλασμιδιακής βιβλιοθήκης από HeLa κύτταρα

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μισό εκατομμύριο κύτταρα HeLa που είχαν διαμολυνθεί με τη STARR-IRF3 βιβλιοθήκη με τη χρήση ειδικού για το σκοπό κιτ (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen) ακολουθώντας το προτεινόμενο πρωτόκολλο. Από το συγκεκριμένο υλικό πραγματοποιήθηκε κατασκευή βιβλιοθήκης και αλληλούχιση ευρείας κλίμακας για τον έλεγχο τυχών αλλαγών στη πολυπλοκότητα της βιβλιοθήκης μετά τη διαμόλυνση στα κύτταρα. Συγκεκριμένα το πρωτόκολλο περιελάμβανε τα εξής βήματα:

1. Επαναδιάλυση της πελέτας των κυττάρων σε 250 μl διαλύματος P1.
2. Προσθήκη 250 μl διαλύματος P2, ανακίνηση για 4-6 φορές μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
3. Προσθήκη 350 μl διαλύματος N3 και άμεση ανακίνηση 4-6 φορές.
4. Φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 13,000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Μεταφορά του υπερκείμενου στη στήλη και φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 13,000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Πλύση της στήλης με 500 μl διάλυμα PB και φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 13,000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.

7. Πλύση της στήλης με 750 μl διάλυμα PE και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13,000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13,000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Μεταφορά σε νέο Eppendorf και έκλουση με 50 μl H₂O.
10. Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13,000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
11. Απόρριψη της στήλης και φύλαξη του δείγματος στους -20°C

Απομόνωση του ολικού RNA

1. Επαναδιάλυση του ιζήματος (πελέττας) σε 1 ml διαλύματος TRI reagent (Sigma Aldrich) για κάθε 3 εκατομμύρια κύτταρα με έντονο πιπετάρισμα και ανάδευση σε συσκευή vortex για 15 δευτερόλεπτα σε υψηλή ταχύτητα.
2. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 5 λεπτά.
3. Προσθήκη 200 μl χλωροφορμίου και ανάδευση στο vortex για 15 δευτερόλεπτα σε υψηλή ταχύτητα.
4. Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13.000rpm στους 4°C.
5. Μεταφορά 500 μl του υπερκείμενου που περιέχει το RNA σε νέο σωληνάκι eppendorf και προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης.
6. Επώαση στους -80°C για 20 λεπτά.
7. Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13.000rpm στους 4°C.
8. Απόρριψη του υπερκείμενου.
9. Έκπλυση του ιζήματος (πελέττας) με 500 μl διαλύματος αιθανόλης 70%.
10. Φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 13.000rpm στους 4°C.
11. Απόρριψη του υπερκείμενου. Το ίζημα (πελέττα) αφήνεται να στεγνώσει.
12. Επαναδιάλυση του ιζήματος (πελέττας) σε 100 μl RNase-free H₂O για κάθε 3 εκατομμύρια αρχικού αριθμού κυττάρων και προσθήκη 1 μl RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor, Thermo Fisher Scientific.

Επιλογή του Poly-A RNA

Η επιλογή του polyA RNA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του αντιδραστηρίου Dynabeads® Oligo (dT)25, Thermo Fisher Scientific. Συγκεκριμένα ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο:

Διαλύματα

Binding Buffer

20mM Tris-HCl pH 7,5

1M LiCl

2mM EDTA

Washing Buffer B

10mM Tris-HCl pH 7,5

0,15M LiCl

1mM EDTA

Reconditioning Buffer

0,1 M NaOH

Storage Buffer Oligo (dT)₂₅:

250mM Tris-HCl pH 7,5

20mM EDTA

0,1% Tween® -20

Παρατηρήσεις :

- Τα διαλύματα παρασκευάζονται φρέσκα πριν από κάθε πείραμα και αποστειρώνονται πριν από τη χρήση τους (εκτός από το Reconditioning buffer).

Διαδικασία

Πλύση των σφαιριδίων:

1. Επαναιώρηση των σφαιριδίων στο διάλυμα στο οποίο περιέχονται μέσω χρήσης Vortex για τουλάχιστον 30 δευτερόλεπτα
2. Μεταφορά του επιθυμητού όγκου διαλύματος σφαιριδίων σε νέο eppendorf
3. Προσθήκη ίσου όγκου Binding Buffer
4. Μεταφορά του eppendorf στον μαγνήτη , επώαση για 1 λεπτό και απόρριψη υπερκειμένου

5. Αφαίρεση του eppendorf που περιέχει τα σφαιρίδια από τον μαγνήτη, και επαναδιάλυση των σφαιριδίων σε όγκο Binding Buffer, ίσο με τον αρχικό όγκο του διαλύματος των σφαιριδίων

Διαδικασία καθαρισμού mRNA από ολικό RNA

1. Προσθήκη ίσου όγκου Binding Buffer στο διάλυμα του RNA
2. Θέρμανση του δείγματος στους 65°C για 2 λεπτά, για την διάσπαση των δευτεροταγών δομών και άμεση μεταφορά στον πάγο
3. Προσθήκη διαλύματος beads (ίσος όγκος με τον όγκο του διαλύματος RNA πριν την προσθήκη Binding Buffer) στο διάλυμα του RNA και καλή ανάδευση
4. Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
5. Μεταφορά του eppendorf στον μαγνήτη και επώαση για 1-2 λεπτά
6. Απομάκρυνση του υπερκειμένου
7. Απομάκρυνση του eppendorf που περιέχει το δείγμα από τον μαγνήτη και προσθήκη 200 μ L Washing Buffer B. Προσεκτική ανάδευση με πιπετάρισμα 1-2 φορές
8. Επιστροφή στο μαγνήτη και απόρριψη υπερκειμένου
9. Επανάληψη των βημάτων 7 και 8
10. Για την έκλυση του mRNA από τα σφαιρίδια γίνεται προσθήκη 20 μ L ddH₂O. Ακολουθεί επώαση για 2 λεπτά στους 75°C. Στη συνέχεια το eppendorf μεταφέρεται στον μαγνήτη και το διάλυμα του mRNA που έχει προκύψει μεταφέρεται γρήγορα σε νέο eppendorf.

Παρατήρηση:

Ο γενικός κανόνας για την αναλογία μαγνητικών σφαιριδίων προς RNA είναι 1 mg σφαιριδίων ανά 75 μ g συνολικού RNA. Το 1 mg σφαιριδίων έχει προηγουμένως πλυθεί και επαναδιαλυτοποιηθεί σε 100 μ L Binding Buffer σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω.

Ανασύσταση των σφαιριδίων

Τα μαγνητικά σφαιρίδια που χρησιμοποιήθηκαν για τον καθαρισμό του mRNA με την διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω είναι δυνατό να φυλαχθούν και να

επαναχρησιμοποιηθούν σε μελλοντικό καθαρισμό εάν πρώτα υποβληθούν στην διαδικασία που περιγράφεται ακολούθως.

- 1) Επαναδιάλυση των σφαιριδίων σε 200 μ L Reconditioning Buffer
 - 2) Επώαση στους 65°C για 2 λεπτά
 - 3) Μεταφορά στον μαγνήτη και απομάκρυνση του υπερκειμένου
 - 4) Επαναδιάλυση σε 200 μ L Reconditioning Buffer
 - 5) Μεταφορά στον μαγνήτη και απομάκρυνση του υπερκειμένου
 - 6) Επαναδιαλυτοποίηση σε 100 μ L Storage buffer
- } 2X

Παρατήρηση: Μετά από την λήξη της διαδικασίας αυτής τα σφαιρίδια αποθηκεύονται στους 4°C

Πέψη με DNaseI

Πραγματοποιήθηκε κατεργασία του polyA RNA με DNaseI. Κάθε αντίδραση πέψης περιελάμβανε:

10 μ l DNaseI διάλυμα αντίδρασης

2 μ g polyA RNA

5 Units DNaseI (RQ1 Promega)

H₂O μέχρι τα 100 μ l

Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 30 λεπτά. Ο καθαρισμός των αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε με το kit RNeasy Mini ακολουθώντας το προτεινόμενο πρωτόκολλο. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε:

1. Προσθήκη 350 μ l διαλύματος RLT και καλή ανάμειξη με χρήση πιπέτας.
2. Προσθήκη 250 μ l 100% αιθανόλης και καλή ανάμειξη με χρήση πιπέτας.
3. Μεταφορά του δείγματος (700 μ l) σε RNeasy Mini στήλη που έχει τοποθετηθεί σε σωληνάκι συλλογής των 2 ml. Φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα στις 13000rpm. Απόρριψη του διηθήματος (flow-through).
4. Προσθήκη 500 μ l διαλύματος RPE που περιέχει αιθανόλη στη RNeasy στήλη. Φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα στις 13.000rpm ώστε να γίνει ξέπλυμα της μεμβράνης της στήλης. Απομάκρυνση του διηθήματος (flow-through).

5. Προσθήκη 500 µl διαλύματος RPE που περιέχει αιθανόλη στην RNeasy στήλη. Φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 13000rpm ώστε να ξεπλυθεί η μεμβράνη της στήλης.
6. Μεταφορά της στήλης RNeasy σε νέο σωληνάκι συλλογής των 2 ml και απόρριψη του παλιού σωλήνα συλλογής με το διήθημα (flow-through). Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13.000rpm.
7. Μεταφορά της στήλης RNeasy σε νέο σωληνάκι συλλογής των 1.5 ml. Προσθήκη 30 µl RNase-free H₂O πάνω στη μεμβράνη της στήλης. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 2 λεπτά.
8. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13.000rpm, ώστε να έχουμε έκλυση του RNA.
9. Απόρριψη της στήλης και προσθήκη 1 µl RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor

Αντίδραση cDNA για το πρωτόκολλο STARR-seq

Για την επιλεκτική μετατροπή σε cDNA μόνο των μετάγραφων που προέρχονται από το STARR φορέα στην αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιήθηκε εκκινητής που προσδέεται κάτωθεν της θέσης ένθεσης της βιβλιοθήκης στο φορέα.

Κάθε αντίδραση cDNA περιελάμβανε τα εξής:

200 ng poly-A RNA

0,1 µl 100µM reporter specific primer

1 µl 10mM μείγμα dNTP

H₂O μέχρι τα 14 µl

Επώαση στους 65°C για 5 λεπτά και μεταφορά στο πάγο για τουλάχιστον 1 λεπτό.

Προσθήκη:

4 µl 5X First-Strand Buffer

1 µl 0.1 M DTT

1 µl of SuperScript™ III RT (200 units/µl)

Επώαση στους 50°C για 60 λεπτά και στη συνέχεια στους 70°C για 15 λεπτά.

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 8 αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής ανά δείγμα για τη διατήρηση της πολυπλοκότητας της STARR βιβλιοθήκης. Επίσης πραγματοποιήθηκε αντίδραση ελέγχου -RT στην οποία δεν συμπεριλήφθηκε η SuperScript™ III.

Ακολούθησε συνένωση των 8 αντιδράσεων ανά δείγμα, προσθήκη 30μg RNaseA και επώαση στους 37°C για 30 λεπτά. Στην αντίδραση -RT προστέθηκαν 10 μg RNaseA. Τέλος πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των αντιδράσεων με 2 όγκους μαγνητικά σφαιρίδια NucleoMag NGS Clean-up and Size Select, Macherey Nagel και έκλουση σε 20 μl H₂O.

Πρώτη αντίδραση PCR

Για το πολλαπλασιασμό του cDNA που προέκυψε από τις αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής ακολουθήθηκε ένα πρωτόκολλο nested PCR. Στο πρώτο στάδιο πολλαπλασιασμού χρησιμοποιήθηκε εκκινητής που διασχίζει τη θέση ματίσματος του συνθετικού ιντρόνιου mhc16 που βρίσκεται πριν από την αλληλουχία του GFP. Με τον τρόπο αυτό καταστέλλεται ο πολλαπλασιασμός τυχόν υπολειμμάτων πλασμιδιακού DNA. Συγκεκριμένα η πρώτη αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε ως εξής:

1. 2,3 μL cDNA
25 μl Kapa Hifi Hot Start Ready Mix
1 μl 100 μM GGGCCAGCTGTTGGGGTG*T*C*C*A*C
1 μl 100μM CTTATCATGTCTGCTCGA*A*G*C
H₂O μέχρι τα 50 μl

* Φωσφοροθεικός δεσμός για τη προστασία από τη δράση νουκλεασών

2. Επώαση: 98°C για 45 δευτερόλεπτα
98°C για 15 δευτερόλεπτα
65°C για 30 δευτερόλεπτα
72°C για 70 δευτερόλεπτα } 15 κύκλοι
72°C για 300 δευτερόλεπτα.

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 8 αντιδράσεις PCR για κάθε δείγμα για τη διατήρηση της πολυπλοκότητας της STARR βιβλιοθήκης. Ακολούθησε ένωση μέχρι 4

αντιδράσεων ανά erpendorff και καθαρισμός τους με 1,2 όγκους μαγνητικά σφαιρίδια NucleoMag NGS Clean-up and Size Select, Macherey Nagel

Συγκεκριμένα:

1. Προστέθηκαν 1,2 όγκοι σφαιριδίων και το δείγμα επώαστηκε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Ο σωλήνας erpendorf τοποθετήθηκε σε μαγνήτη για 5 λεπτά
 3. Ακολούθησε αφαίρεση του υπερκείμενου, προσθήκη 500 μl 80% αιθανόλης και επώαση για 30 δευτερόλεπτα στο μαγνήτη.
 4. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και πραγματοποιήθηκε μία ακόμα πλύση με 80% αιθανόλη.
 5. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και ο σωλήνας αφέθηκε να στεγνώσει για μερικά λεπτά, αφού αφαιρέθηκε από το μαγνήτη.
 6. Προσθήκη 20 μl H₂O και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
 7. Μεταφορά στο μαγνήτη και επώαση για 5 λεπτά.
 8. Αφαίρεση 19 μl από το υπερκείμενο και μεταφορά σε νέο σωλήνα.

Δεύτερη αντίδραση PCR

Πραγματοποιήθηκε για την εισαγωγή αλληλουχιών (Barcodes) που επιτρέπουν τη ταυτόχρονη αλληλούχιση διαφορετικών δειγμάτων, καθώς και αλληλουχιών που επιτρέπουν τη πρόσδεση του προς αλληλούχιση υλικού στο μηχανήμα αλληλούχισης. Αρχικά πραγματοποιήθηκε αντίδραση qPCR για τον υπολογισμό του αριθμού των κύκλων πολλαπλασιασμού που είναι απαραίτητοι ώστε να μην παρατηρηθεί υπερβολικός πολλαπλασιασμός του υλικού και επακόλουθη μείωση της πολυπλοκότητας της βιβλιοθήκης. Κάθε αντίδραση qPCR περιελάμβανε τα εξής:

10 μl 2x Kappa SYBR Fast Mix

1 ng προϊόντος από τη πρώτη PCR

0,5 μl NebNext Universal primer

0,5 μl NebNext Index primer

H₂O μέχρι τα 20 μl

Το πρόγραμμα πολλαπλασιασμού ήταν το εξής:

95°C για 45 δευτερόλεπτα

95°C για 15 δευτερόλεπτα

63°C για 30 δευτερόλεπτα

72°C για 30 δευτερόλεπτα

} 20 κύκλοι

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της qPCR πραγματοποιήθηκαν 6 κύκλοι πολλαπλασιασμού της βιβλιοθήκης σε 4 αντιδράσεις PCR ανά δείγμα χρησιμοποιώντας 30 ng DNA από τη πρώτη PCR για κάθε αντίδραση.

Κάθε αντίδραση περιελάμβανε τα εξής:

30 ng DNA από τη πρώτη PCR

25 μl Kara Hifi Hot Start Ready Mix

1 μl NEBNext Universal PCR Primer for Illumina (NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (Index Primers Set 1)

1 μl NEBNext ((NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (Index Primers Set 2). Για κάθε δείγμα χρησιμοποιείται διαφορετικός index primer.

H₂O μέχρι τα 50 μl

Οι αντιδράσεις επώαστηκαν ως εξής:

98°C για 45 δευτερόλεπτα

98°C για 15 δευτερόλεπτα

63°C για 30 δευτερόλεπτα

72°C για 30 δευτερόλεπτα

} 6 κύκλοι

72°C για 300 δευτερόλεπτα

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των αντιδράσεων με 1,2 όγκους σφαιριδίων Agencourt Ampure XP όπως περιγράφεται παραπάνω. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε 2% πήκτωμα αγαρόζης, απομόνωση των κομματιών DNA μεγέθους 500-600 bp και καθαρισμός του υλικού με το kit Nucleospin Gel and PCR cleanup (Macherey-Nagel). Έπειτα πραγματοποιήθηκε διπλός καθαρισμός των αντιδράσεων με 1,2 όγκους σφαιρίδια Nucleomag και τελική έκλυση σε 12 μl H₂O.

Πολλαπλασιασμός των πλασμιδιακών βιβλιοθηκών πριν και μετά την διαμόλυνση στα κύτταρα

Για τον υπολογισμό της πολυπλοκότητας της STARR βιβλιοθήκης, δηλαδή των μοναδικών κομματιών DNA που αυτή περιέχει πραγματοποιήθηκε αντίδραση nested PCR ακολουθώντας το ίδιο πρωτόκολλο με αυτό που περιγράφηκε προηγουμένως για το STARR πείραμα και στη συνέχεια αλληλούχιση ευρείας κλίμακας. Επίσης πραγματοποιήθηκε πολλαπλασιασμός και αλληλούχιση της πλασμιδιακής βιβλιοθήκης μετά την διαμόλυνση στα κύτταρα για τον υπολογισμό τυχόν αλλαγών στην αντιπροσώπευση των διαφορετικών κομματιών DNA. Τα δύο αυτά δείγματα αποτέλεσαν τα δείγματα αναφοράς (input) έναντι των οποίων υπολογίστηκε η ενεργότητα ενισχυτή κάθε κομματιού DNA. Πραγματοποιήθηκαν 2 αντιδράσεις ανά δείγμα.

Συγκεκριμένα η πρώτη αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε ως εξής:

1. Προσθήκη 4 ng πλασμιδιακής βιβλιοθήκης

25 μl Kara Hifi Hot Start Ready Mix

1 μl 100 μM GGGCCAGCTGTTGGGGTG*A*G*T*A*C

1 μl 100 μM CTTATCATGTCTGCTCGA*A*G*C

H₂O μέχρι τα 50 μl

* Φωσφοροθεικός δεσμός για τη προστασία από τη δράση νουκλεασών

2. Επώαση: 98°C για 45 δευτερόλεπτα

15 κύκλους επώασης στους: 98°C για 15 δευτερόλεπτα

65°C για 30 δευτερόλεπτα

72°C για 70 δευτερόλεπτα

72°C για 300 δευτερόλεπτα

3. Ακολούθησε μίξη όλων των αντιδράσεων και καθαρισμός με σφαιρίδια Agencourt AMPure XP. Συγκεκριμένα προστέθηκαν 1,2 όγκοι σφαιριδίων και το δείγμα επώαστηκε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

4. Ο σωλήνας erpendorf τοποθετήθηκε σε μαγνήτη για 5 λεπτά

5. Ακολούθησε αφαίρεση του υπερκείμενου, προσθήκη 500 μl 80% αιθανόλης και επώαση για 30 δευτερόλεπτα στο μαγνήτη.

6. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και πραγματοποιήθηκε μία ακόμα πλύση με 80% αιθανόλη.
7. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και ο σωλήνας αφέθηκε να στεγνώσει για μερικά λεπτά, αφού αφαιρέθηκε από το μαγνήτη.
8. Προσθήκη 50 μl H_2O και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Μεταφορά στο μαγνήτη και επώαση για 5 λεπτά.
10. Αφαίρεση 49 μl από το υπερκείμενο και μεταφορά σε νέο σωλήνα.

Η δεύτερη αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε για την εισαγωγή αλληλουχιών (Barcodes) που επιτρέπουν τη ταυτόχρονη αλληλούχιση διαφορετικών δειγμάτων, καθώς και αλληλουχιών που επιτρέπουν τη πρόσδεση του προς αλληλούχιση υλικού στο μηχανήμα αλληλούχισης. Αρχικά πραγματοποιήθηκε αντίδραση qPCR για τον υπολογισμό του αριθμού των κύκλων πολλαπλασιασμού που είναι απαραίτητοι ώστε να μην παρατηρηθεί υπερβολικός πολλαπλασιασμός του υλικού και επακόλουθη μείωση της πολυπλοκότητας της βιβλιοθήκης. Κάθε αντίδραση qPCR περιελάμβανε τα εξής:

10 μl 2x Kappa SYBR Fast Mix
 1 ng προϊόντος από τη πρώτη PCR
 0,5 μl NebNext Universal primer
 0,5 μl NebNext Index primer
 H_2O μέχρι τα 20 μl

Το πρόγραμμα πολλαπλασιασμού ήταν το εξής:

95°C για 45 δευτερόλεπτα	}	20 κύκλοι
95°C για 15 δευτερόλεπτα		
63°C για 30 δευτερόλεπτα		
72°C για 30 δευτερόλεπτα		

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της qPCR πραγματοποιήθηκαν 6 κύκλοι πολλαπλασιασμού της βιβλιοθήκης, 4 αντιδράσεις PCR ανά δείγμα χρησιμοποιώντας 30 ng DNA από τη πρώτη PCR.

Κάθε αντίδραση περιελάμβανε τα εξής:

30 ng DNA από τη πρώτη PCR

25 μl Kapa Hifi Hot Start Ready Mix

1 μl NEBNext Universal PCR Primer for Illumina (NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (Index Primers Set 1)

1 μl NEBNext ((NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (Index Primers Set 2).

H₂O μέχρι τα 50 μl

Οι αντιδράσεις επώστηκαν ως εξής:

98°C για 45 δευτερόλεπτα

98°C για 15 δευτερόλεπτα }
63°C για 30 δευτερόλεπτα } 6 κύκλοι
72°C για 30 δευτερόλεπτα }

72°C για 300 δευτερόλεπτα

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των αντιδράσεων με 1,2 όγκους σφαιριδίων Agencourt Ampure XP όπως περιγράφεται παραπάνω. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε 2% πήκτωμα αγαρόζης, απομόνωση των κομματιών DNA μεγέθους 500-600 bp και καθαρισμός του υλικού με το kit Nucleospin Gel and PCR cleanup (Macherey-Nagel). Έπειτα πραγματοποιήθηκε διπλός καθαρισμός των αντιδράσεων με 1,2 όγκους σφαιρίδια Nucleomag και τελική έκλυση σε 12 μl H₂O.

Έλεγχος των βιβλιοθηκών και αλληλούχιση ευρείας κλίμακας

Πραγματοποιήθηκε μέτρηση της συγκέντρωσης των βιβλιοθηκών στο μηχάνημα Qubit fluorometer χρησιμοποιώντας το Qubit dsDNA HS Assay Kit. Επίσης με το ποιοτικό έλεγχο των βιβλιοθηκών στο μηχάνημα Agilent Bioanalyzer 2100 χρησιμοποιώντας το Agilent DNA 1000 kit διαπιστώθηκε το μέγεθος τους και η απουσία διμερών εκκινητών. Τέλος πραγματοποιήθηκε προετοιμασία των δειγμάτων, φόρτωση ίσης συγκέντρωσης από τα όλα τα δείγματα στο μηχάνημα NextSeq 500 της Illumina και αλληλούχιση ευρείας κλίμακας. Αξίζει να σημειωθεί ότι επιλέχθηκε διάβασμα των αλληλουχιών μήκους 75 βάσεων μόνο από τη μία πλευρά των αλληλουχιών χρησιμοποιώντας το kit NextSeq 500/550 High Output v2 kit (75 cycles), Illumina.

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

LB (Lysogenic Broth) + ΑΓΑΡ

- 10g Τρυπτόνη (Tryptone Biochemica της PanReac AppliChem)
- 5g εκχύλισμα ζυμομύκητα (Yeast Extract granular της Melford)
- 10g NaCl της AppliChem
- 15g Άγαρ (Agar Bacteriology Grade της PanReac AppliChem)
- Προσθήκη H₂O μέχρι τελικό όγκο 1L

*Το βάζουμε κατευθείαν στην αποστείρωση για να μην αρχίσει να πήζει το άγαρ και μετά μόλις βγει φτιάχνουμε τα πιάτα petri (με αμπικιλίνη ή χωρίς) και τα αφήνουμε να πήξουν.

10X PBS (500ml)

- 40 g NaCl της AppliChem
- 7,2 g Na₂HPO₄ της AppliChem
- 1,2 g KH₂PO₄ της lach:ner
- 1 g KCl της SIGMA

5X TBE

- 216 g Tris Base της Fisher Chemical
- 110 g Βορικό οξύ (Boric acid της Fisher Chemical)
- 14,9 g EDTA Biochemica της PanReac AppliChem
- Προσθήκη dH₂O μέχρι τελικό όγκο 4L

Πίνακες με τις αλληλουχίες των εκκινητών

Πίνακας: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις Real Time qPCR στο ολικό υλικό των πειραμάτων DNaseI-seq

RDSN	F	5'- GGACATCCACCAAGACCTACTGAT -3'
	R	5'- ATGTTCTCCCTTCCCATTTCATTCC -3'
CNS8966	F	5'- ACCCACCTAAGATCGTCATCTCTC -3'
	R	5'- GGGGACTCAGTCGTCCTACTGG -3'

CNS28539	F	5'- GAAGCTGCCGGACTAACACTC -3'
	R	5'- GATATCGCCGATCACAATTAGCA -3'

Πίνακας: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις Real Time qPCR στο απομονωμένο από gel υλικό των πειραμάτων DNaseI-seq

RDSN	F	5'- GGACATCCACCAAGACCTACTGAT -3'
	R	5'- GCCTTGGGGAACGTGGGACT -3'
CNS8966	F	5'- ACCCACCTAAGATCGTCATCTCTC -3'
	R	5'- CCTGTTCGGCGGGACTGTGAT -3'
CNS28539	F	5'- GAAGCTGCCGGACTAACACTC -3'
	R	5'- CGGCCTCGGTCTCCATGGAA -3'

Πίνακας: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις Real Time qPCR των πειραμάτων ChIP

ACTB_core_promoter	F	5'-CGGCAAAGGCTAGGCTCTGT-3'
	R	5'-ATTCAGCGTGCGCCGTTCCGAA-3'
ACTB	F	5'-CCCCAACACCACACTCTACC-3'
	R	5'-CTGGGTTCTGTACGCTCCTG-3'
MYOD1	F	5'-GGACGACTTCTATGACGACCC-3'
	R	5'-TTGGTGGTCTTGCGCTTGC-3'
GAPDH PROMOTER	F	5'-GCCTCTCAGCCTTTGAAAGAAAGA-3'
	R	5'-ACGACTGAGATGGGGAATTGGAGC-3'
IFNB1 PROXIMAL ENHANCER	F	5'-GCTTTCCTTTGCTTTCTCCCAAGT-3'
	R	5'-CCTTTCTCCATGGGTATGGCC-3'
IFNB1 -20kb	F	5'-TCCCTCTGCTAGAAAGCTCCA-3'
	R	5'-AGCTCAGAGAAATGCCTGGT-3'
IFNB_long	F	5'-GCTTTCCTTTGCTTTCTCCCAAGTC-3'
	R	5'-CCTTTCTCCATGGGTATGGCC-3'
IFNB_coding	F	5'-TCCTGTGTGCTTCTCCACTAC-3'
	R	5'-GCAGTATTCAAGCCTCCCATTC-3'

CCL5	F	5'-AGAGGATCAAGACAGCACGTGGAC-3'
	R	5'-AGCGCAGAGGGCAGTAGCAATGAG-3'
OASL	F	5'-CCCGTCACACCTGGTTTCCTCTCT-3'
	R	5'-CATCTCTGTCCCGAGAGTACCGCT-3'
HERC6	F	5'- TCCTCTCGTGCGGAGACAACAGC-3'
	R	5'-CATGTACTGGGGTCCTCACACCCT-3'
USP18	F	5'-GGCTGGAAGTCTGGAGCAGGT3'
	R	5'-CCCAGCTTTCGTTTTTCCACTGAA3'
C04	F	5'-GAAGGAGTGCTCTGAGGCTGA-3'
	R	5'-GAACGCCCAAGACCTTTTCC-3'
SCN4A	F	5'-GATTCGAGGGCATGAGGGTGG-3'
	R	5'-GTGGTGCCAAGCTCTCTGCTTC-3'

Πίνακας: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σε Real Time qPCR για τον έλεγχο της έκφρασης γονιδίων

IFNB1	F	5'-TCCTGTTGTGCTTCTCCACTAC-3'
	R	5'-GCAGTATTCAAGCCTCCCATTC-3'
GAPDH	F	5'-AGGGCTGCTTTTAACTCTGGT-3'
	R	5'-CCCCACTTGATTTTGGAGGGA-3'
MX1	F	5'-AAGCCCTGCAGAGAGAGAAGATC-3'
	R	5'-TATGTGTGATGAGCTCGCTGGTAAG-3'
IFIH1	F	5'-ATGACCCAGAATTCAAGGAACT-3'
	R	5'-CCATCATTGTTCCCAAGCC-3'
ISG15	F	5'-GAGAGGCAGCGAACTCATCT-3'
	R	5'-CTTCAGCTCTGACACCGACA-3'

Πίνακας: Εκκινητές για το πρωτόκολλο ChIP-STARR-seq

NebNext adaptor		5'-Phos/GAT CGG AAG AGC ACA CGT CTG AAC TCC AGT CdUA CAC TCT TTC CCT ACA CGA CGC TCT TCC GAT C-s-T-3'
Recombination primer	F	TAGAGCATGCACCGGACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
Recombination primer	R	GGCCGAATTCGTCGAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT
Reporter RNA specific primer		CAAACATCAATGTATCTTATCATG
Reporter-specific primer	F	GGGCCAGCTGTTGGGGTG*T*C*C*A*C *phosphothioate bonds
Reporter-specific primer_input	F	GGGCCAGCTGTTGGGGTG*A*G*T*A*C
Reporter-specific primer	R	CTTATCATGTCTGCTCGA*A*G*C
NEBNext Universal PCR Primer for Illumina 5'-		AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACT CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATC-s-T-3'
NEBNext Index 2 Primer		5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACATCGGTGACTG GAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3'
NEBNext Index 3 Primer		5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCCTAAGTGACTG GAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3'
NEBNext Index 4 Primer		5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGGTCAGTGACTG GAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3'

NEBNext Index 5 Primer	5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCACTGTGTGACTG GAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3'
NEBNext Index 6 Primer	5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATATTGGCGTGACTG GAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3'
NEBNext Index 7 Primer	5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGATCTGGTGACTG GAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3'
NEBNext Index 8 Primer	5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCAAGTGTGACTG GAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3'
NEBNext Index 9 Primer	5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTGATCGTGACTG GAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3'
NEBNext Index 10 Primer	5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAAGCTAGTGACTG GAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3'
NEBNext Index 11 Primer	5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTAGCCGTGACTG GAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3'
NEBNext Index 12 Primer	5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTACAAGGTGACTG GAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3'
NEBNext Index 13 Primer	5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGTTGACTGTGACT GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3'
NEBNext Index 14 Primer	5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACGGAACGTGAC TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3'
NEBNext Index 15 Primer	5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCTGACATGTGACT GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3'
NEBNext Index 16 Primer	5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCGGACGGGTGAC TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3'
NEBNext Index 18 Primer	5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTGCGGACGTGAC TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3'
NEBNext Index 19 Primer	5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGTTTCACGTGACT GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3'
NEBNext Index 20 Primer	5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAAGGCCACGTGAC TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3'
NEBNext Index 21 Primer	5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCCGAAACGTGAC TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3'

NEBNext Index 22 Primer	5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTACGTACGGTGACT GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3'
NEBNext Index 23 Primer	5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATATCCACTCGTGACT GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3'
NEBNext Index 25 Primer	5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATATATCAGTGTGACT GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3'
NEBNext Index 27 Primer	5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAAAGGAATGTGACT GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3'

Πίνακας: Εκκινητές για το πολλαπλασιασμό των μεμοιωμένων ενισχυτών πριν την κλωνοποίηση τους στο φορέα STARR

OTUD1_human	F	5'-TAAGCAACCGGTGGTCAGAGTAGTTAAAGGTGGCA-3'
OTUD1_human	R	5'-TGCTTAGTCGACGACCAGCCTCTTCTTCAAAGC-3'
IL7R_human	F	5'-TAAGCAACCGGTATCCAGTGCTTTGCAAGTGCTCT-3'
IL7R_human	R	5'-TGCTTAGTCGACGCAAGAGAATCACTGTCTTGGTAAC-3'
IRF1_human	F	5'-TAAGCAACCGGTAGGTGTGCTCTAGCTGTTCTGATGG-3'
IRF1_human	R	5'-TGCTTAGTCGACTGAGCACAGCCGGTATGAAATGGCC-3'
PMAIP1_human	F	5'-TAAGCAACCGGTGACCCAAGCCTCCTTTAGCCCAAAG-3'
PMAIP1_human	R	5'-TGCTTAGTCGACCAAAAGACCATTCTAAAATGAGG-3'
OASL_20kb_human	F	5'-TAAGCAACCGGTACGGAAGAATCACTAAGCTTACTT-3'

OASL_20kb_human	R	5'-TGCTTAGTTCGACTACGCAACAAAACAAGTAGTAAAGG-3'
96_Mouse	F	5'-TAAGCAACCGGTGACCTGACTCTTAAGTTTTGCTCTAC-3'
	R	5'-TGCTTAGTTCGACTGATACTGGGCTGGACAAAGGTC-3'
11_Mouse	F	5'- TAAGCAACCGGTTAGAATGAAGGAGCATTGTCACTG-3'
	R	5'-TGCTTAGTTCGACTAGCCGTTCAAAACTGTATAGCTAC -3'
12_Mouse	F	5'- TAAGCAACCGGTTGGTGCTTGAAACACATTGTGTTTCATATGC -3'
	R	5'- TGCTTAGTTCGACAGGGTGAGGACAGAGGGCACCTCAGCA T -3'
85_Drosophila	F	5'-TAAGCAACCGGTGTTCACTCGTTCACAGAAATAGAAAGAG-3'
	R	5'-TGCTTAGTTCGACTAGGTTCTACCTAGGCCACTTGTATG-3'
50_Zebrafish	F	5'-TAAGCAACCGGTTGTGGAAAAGCTAAAAGAAAAGGAAAATG-3'
	R	5'-TGCTTAGTTCGACCTTTCCTTCCTTTCCTTTCCTTTCCTTTC-3'

Ανάλυση των αποτελεσμάτων αλληλούχισης νέας γενιάς με μεθόδους Βιοπληροφορικής

Ανάλυση πειραμάτων RNA-seq

Ο κύριος όγκος της ανάλυσης των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω της διαδικτυακής πλατφόρμας αναλύσεων Galaxy (<https://usegalaxy.org>) (Afgan *et al.*,2018). Αρχικά πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ποιότητας των αλληλουχιών που περιέχονται στα αρχεία Fastq με το πρόγραμμα FastQC. Ακολούθησε στοίχιση των αλληλουχιών στο ανθρώπινο γονιδίωμα (hg19 version) με τον αλγόριθμο TopHat2 (Kim *et al.*,2013). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μέτρηση του σήματος στα γονίδια με το πρόγραμμα htseq-count (Anders *et al.*,2015). Έπειτα τα γονίδια με διαφορετική έκφραση μετά τη μόλυνση βρέθηκαν με τη χρήση του αλγόριθμου DESeq (Love *et al.*,2014). Η ανάλυση γονιδιακής οντολογίας πραγματοποιήθηκε με τα προγράμματα DAVID (Huang *et al.*,2009) και Enrichr (Kuleshov *et al.*,2016). Για την απεικόνιση των σημάτων σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος χρησιμοποιήθηκαν το πρόγραμμα IGV (Integrative Genomics Viewer) (Robinson *et al.*,2011) καθώς και ο

UCSC Genome Browser (Kent *et al.*,2002). Για την ευκολότερη απεικόνιση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε μετατροπή των φακέλων bam στη μορφή bigwig με την εντολή bamCoverage από το πακέτο deeptools (Ramirez *et al.*,2014). Η σύγκριση ανάμεσα σε λίστες γονιδίων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Venny (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

Ανάλυση πειραμάτων DNaseI-seq, FAIRE-seq, ChIP-seq

Ο κύριος όγκος της ανάλυσης των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω της διαδικτυακής πλατφόρμας αναλύσεων Galaxy (<https://usegalaxy.org>). Αρχικά πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ποιότητας των αλληλουχιών που περιέχονται στα αρχεία Fastq με το πρόγραμμα FastQC. Έπειτα πραγματοποιήθηκε στοίχιση των αλληλουχιών στο ανθρώπινο γονιδίωμα (hg19 version) με τον αλγόριθμο Bowtie2 χρησιμοποιώντας τις παραμέτρους very sensitive end to end (Langmead and Salzberg,2012). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αφαίρεση των πανομοιότυπων αλληλουχιών (duplicates) με την εντολή RmDup από το πρόγραμμα SAMTOOLS (Li *et al.*,2009). Ακολούθησε κανονικοποίηση των δειγμάτων 0,3,6 ωρών στο ίδιο βάθος αλληλούχισης (αριθμός sequencing reads) με την εντολή Downsample SAM/BAM από το πακέτο Picard. Η εύρεση των κορυφών πραγματοποιήθηκε με την εντολή callpeak του αλγόριθμου MACS2 (Feng *et al.*,2012) χρησιμοποιώντας τις παραμέτρους band width=150 bp, lower mfold=5, upper mfold=50 και q value=0.05. Για τη ταυτοποίηση των κορυφών με διαφορεικά επίπεδα σήματος σε ένα χρονικό σημείο πραγματοποιήθηκε μέτρηση του σήματος σε κάθε χρονικό σημείο για τις συντεταγμένες των κορυφών με την εντολή MultiCovBed από το πακέτο bedtools (Quinlan and Hall,2010) και χρησιμοποιήθηκε ένα κατώφλι 2fold διαφορά σήματος ανάμεσα στις καταστάσεις και ελάχιστος αριθμός reads=15. Για την απεικόνιση των σημάτων σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος χρησιμοποιήθηκαν το πρόγραμμα IGV (Integrative Genomics Viewer) καθώς και ο UCSC Genome Browser. Για την ευκολότερη απεικόνιση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε μετατροπή των φακέλων bam στη μορφή bigwig με την εντολή bamCoverage από το πακέτο deeptools. Για τη κατασκευή και απεικόνιση των heatmaps χρησιμοποιήθηκαν οι εντολές computeMatrix και plotHeatmap αντίστοιχα από το πακέτο deeptools. Για την εύρεση των πλησιέστερων γονιδίων στις κορυφές και των βιολογικών διεργασιών με

τις οποίες σχετίζονται χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα GREAT (<http://great.stanford.edu/public/html/>) (McLean *et al.*,2010) με τις παραμέτρους Single nearest gene within 1000 kb για τις κορυφές που βρίσκονται μακριά από θέσεις έναρξης της μεταγραφής και Single nearest gene within 10 kb για τις κορυφές που βρίσκονται κοντά σε θέσεις έναρξης της μεταγραφής. Εναλλακτικά για την εύρεση των κοντινότερων γονιδίων στις κορυφές δόθηκε η εντολή ClosestBed από το πακέτο bedtools. Για την ανάλυση μοτίβων μεταγραφικών παραγόντων χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα MEME-ChIP (<http://meme-suite.org/tools/meme-ChIP>) (Bailey *et al.*,2009) και RSAT (<http://rsat.sb-roscoff.fr/>) (Nguyen *et al.*,2018). Η σύγκριση ανάμεσα σε λίστες γονιδίων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Venny (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

Ανάλυση πειραμάτων ChIP-STARR-seq

Ο κύριος όγκος της ανάλυσης των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω της διαδικτυακής πλατφόρμας αναλύσεων Galaxy (<https://usegalaxy.org>). Αρχικά πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ποιότητας των αλληλουχιών που περιέχονται στα αρχεία Fastq με το πρόγραμμα FastQC. Έπειτα πραγματοποιήθηκε στοίχιση των αλληλουχιών στο ανθρώπινο γονιδίωμα (hg19 version) με τον αλγόριθμο Bowtie2 χρησιμοποιώντας τις παραμέτρους very sensitive end to end. Ακολούθησε κανονικοποίηση των δειγμάτων 0,3,6 ωρών στο ίδιο βάθος αλληλούχισης (αριθμός sequencing reads) με την εντολή Downsamle SAM/BAM από το πακέτο Picard. Για τη ταυτοποίηση των ενεργών και επαγόμενων ενισχυτών πραγματοποιήθηκε μέτρηση του σήματος για τα δείγματα input, STARR 0h και STARR 6h που περιέχεται στις συντεταγμένες των επαγόμενων θέσεων πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα με την εντολή MultiConBed από το πακέτο bedtools. Ως κατώφλι για να θεωρηθεί ένας ενισχυτής ενεργός και επαγόμενος χρησιμοποιήθηκε η συνθήκη τουλάχιστον 2 φορές αυξημένο σήμα στις 6 ώρες σε σχέση με τα δείγματα input και ταυτόχρονα τουλάχιστον διπλάσιο σήμα στο δείγμα των 6 ωρών σε σχέση με το δείγμα χωρίς μόλυνση. Για την απεικόνιση των σημάτων σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος χρησιμοποιήθηκαν το πρόγραμμα IGV (Integrative Genomics Viewer) καθώς και ο UCSC Genome Browser. Για την ευκολότερη απεικόνιση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε μετατροπή των φακέλων bam στη μορφή bigwig με την εντολή bamCoverage από το πακέτο deeptools. Για τη κατασκευή και απεικόνιση των heatmaps χρησιμοποιήθηκαν οι εντολές computeMatrix και plotHeatmap αντίστοιχα

από το πακέτο deeptools. Για την εύρεση των πλησιέστερων γονιδίων στους επαγόμενους ενισχυτές δόθηκε η εντολή ClosestBed από το πακέτο bedtools. Για την ανάλυση μοτίβων μεταγραφικών παραγόντων χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα MEME-ChIP (<http://meme-suite.org/tools/meme-ChIP>) και RSAT (<http://rsat.sb-roscoff.fr/>). Η σύγκριση ανάμεσα σε λίστες γονιδίων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Venny (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

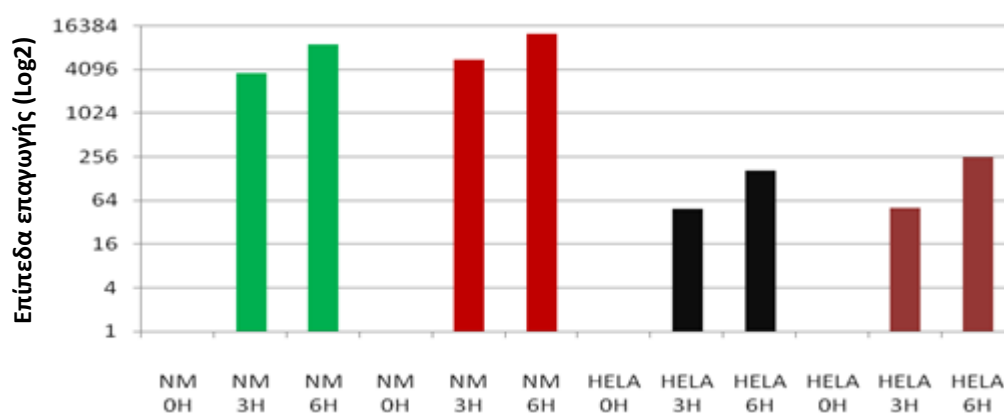
Εύρεση συντηρημένων αλληλουχιών με μοτίβα IRF

Για την εύρεση αλληλουχιών με συντηρημένα μοτίβα IRF αρχικά βρέθηκε το consensus μοτίβο από την ανάλυση των 20 ενισχυτών που οι αλληλουχίες τους έχουν τα περισσότερα μοτίβα IRF χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα MEME-ChIP. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε σάρωση των γονιδιωμάτων ειδών από διάφορα στάδια της εξέλιξης με το πρόγραμμα PWMScan (Ambrosini *et al.*,2018) χρησιμοποιώντας το consensus μοτίβο. Το μοτίβο αυτό φέρει μόνο 3 θέσεις πρόσδεσης IRF και αποτελεί τη δομική μονάδα των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών. Επομένως για να εντοπιστούν οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες πραγματοποιήθηκε συνένωση των μοτίβων που απέχουν μεταξύ τους μέχρι 50 βάσεις με την εντολή operate on genomic intervals-cluster από τη πλατφόρμα Galaxy και διατηρήθηκαν μόνο όσες αλληλουχίες φέρουν τουλάχιστον 5 φορές το consensus μοτίβο. Για την εύρεση συντηρημένων αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε επικουρικά το πρόγραμμα BLASTn (Altschul *et al.*,1990) χρησιμοποιώντας τις παραμέτρους word size 7 without masking and filtering low complexity regions.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

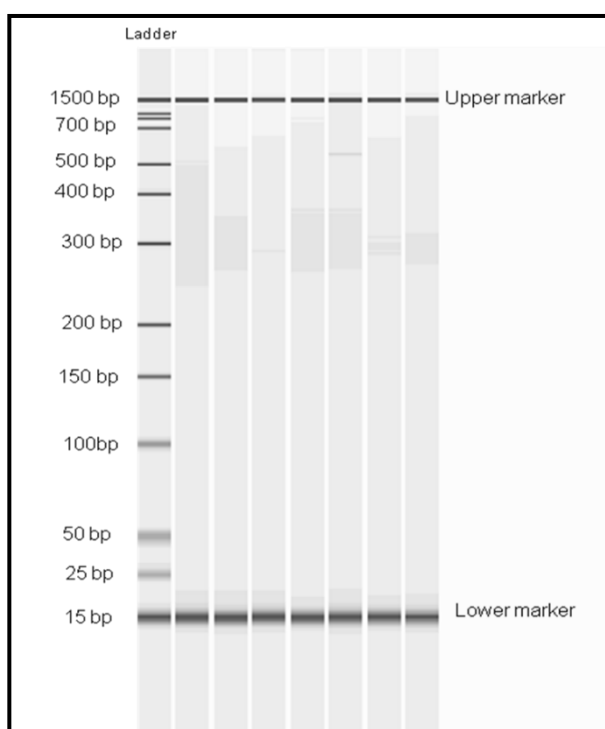
Ανάλυση πειραμάτων RNA-seq

Για την μελέτη και τη κατάρτιση ενός καταλόγου των γονιδίων που επάγονται μετά από μόλυνση με τον ιό Sendai πραγματοποιήθηκαν πειράματα RNA-seq στις κυτταρικές σειρές HeLa και Namalwa. Για την καλύτερη κατανόηση της δυναμικής του φαινομένου της επαγόμενης γονιδιακής έκφρασης έγινε μελέτη της γονιδιακής έκφρασης τόσο στις τρεις ώρες που αντιπροσωπεύουν ένα πρώιμο στάδιο της κυτταρικής απόκρισης όσο και στις έξι ώρες μετά την μόλυνση με Sendai, σημείο όπου η ανοσολογική απόκριση βρίσκεται σε πλήρη εξέλιξη. Μετά τον έλεγχο της ποιότητας του RNA και πριν την πραγματοποίηση των πειραμάτων RNA-seq για να διασφαλιστεί κατά το δυνατόν ότι τα κύτταρα έχουν επάγει την αναμενόμενη ανοσολογική απόκριση μετά την μόλυνση από τον ιό, πραγματοποιήθηκε πείραμα ελέγχου στο οποίο μετρήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της Ιντερφερόνης-β πριν και μετά την μόλυνση με Sendai με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής σε πραγματικό χρόνο. Όπως φαίνεται στην εικόνα 8 η έκφραση του γονιδίου της Ιντερφερόνης-β επάγεται προοδευτικά κατά τη διάρκεια της *ϊικής* μόλυνσης τόσο στα HeLa όσο και στα Namalwa, με την μέγιστη έκφραση στα Namalwa να είναι περίπου μια τάξη μεγέθους μεγαλύτερη από ότι στα HeLa.

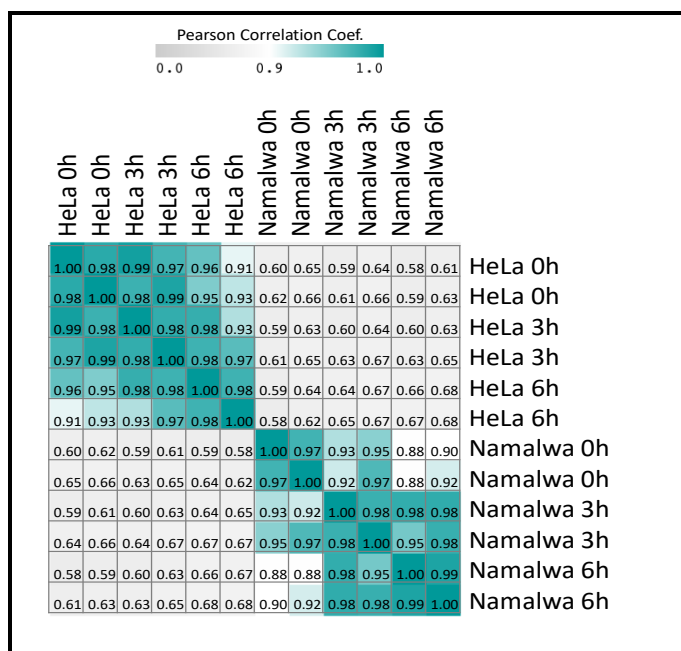


Εικόνα 8: Στην εικόνα αποτυπώνεται η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου *IFNBI* κατά τη διάρκεια της μόλυνσης με Sendai, για δύο διαφορετικές επαναλήψεις του πειράματος στις κυτταρικές σειρές Namalwa και HeLa.

Στη συνέχεια κατασκευάστηκαν βιβλιοθήκες σύμφωνα με το πρωτόκολλο TruSeq RNA Library Prep Kit v2 της illumina. Για το έλεγχο της ποιότητας των βιβλιοθηκών πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση τους στο μηχάνημα Bioanalyzer 2100. Στην εικόνα 9 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για ορισμένα από τα δείγματα, όπου παρατηρείται το αναμενόμενο μέγεθος των βιβλιοθηκών (300-500 bp) και η απουσία ανεπιθύμητων παραπροϊόντων. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση των βιβλιοθηκών στο μηχάνημα NextSeq500 της Illumina στο Greek Genome Center στο ΙΙΒΕΑΑ. Από τη ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι σε κάθε δείγμα αντιστοιχούσαν 16-24 εκατομμύρια αλληλουχίες οι οποίες στοιχίστηκαν στο γονιδίωμα και η έκφραση των γονιδίων αναλύθηκε όπως περιγράφεται στις Μεθόδους. Από περαιτέρω ανάλυση προέκυψε ο υψηλός βαθμός συσχέτισης μεταξύ των δύο επαναλήψεων του ίδιου πειράματος (εικόνα 10).

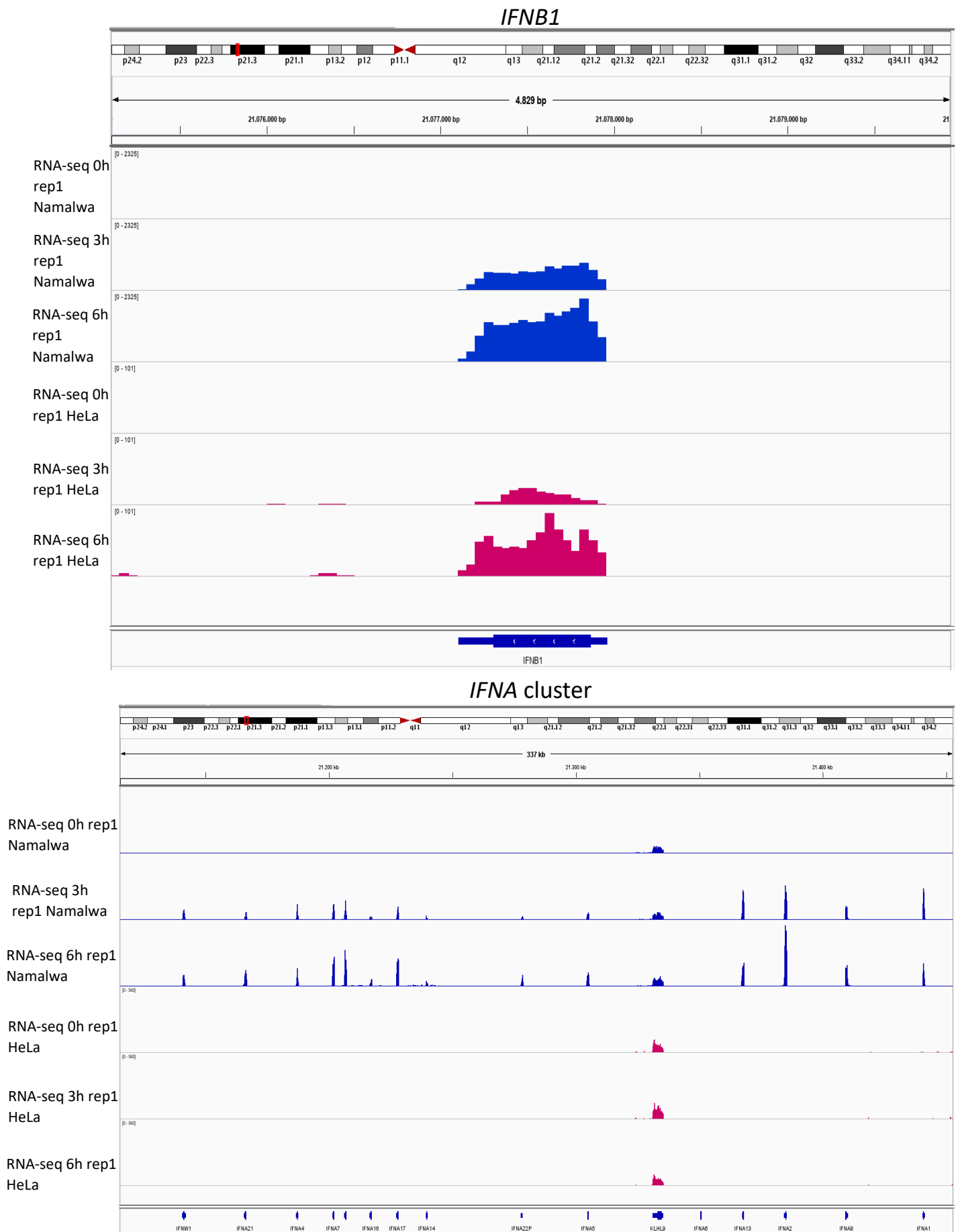


Εικόνα 9: Στη συγκεκριμένη εικόνα παρουσιάζονται χαρακτηριστικά αποτελέσματα της ανάλυσης των RNA-seq βιβλιοθηκών στο μηχάνημα Bioanalyzer 2100. Στο πρώτο lane εμφανίζονται κομμάτια DNA γνωστού μοριακού βάρους. Το μέγεθος των βιβλιοθηκών κυμαίνεται μεταξύ 250 και 600 bp, ενώ απουσιάζουν παραπροϊόντα διαφορετικών μοριακών βαρών.



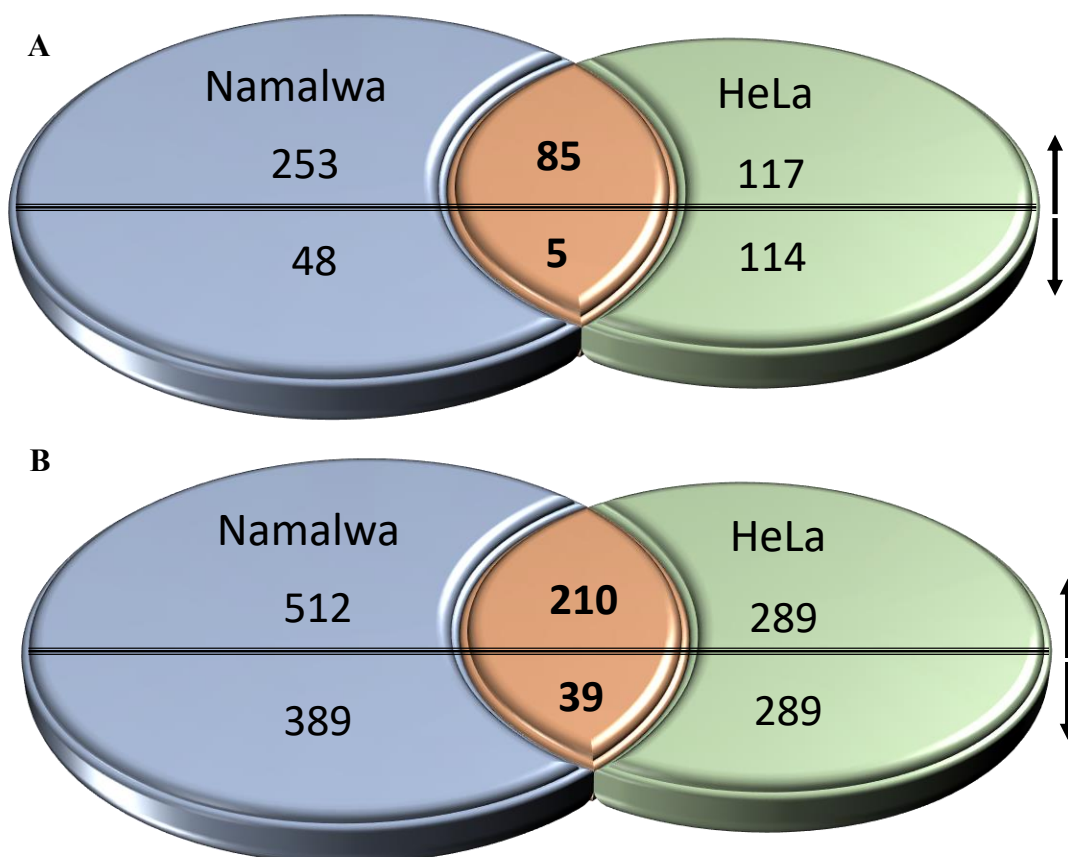
Εικόνα 10: Παρουσιάζεται η συσχέτιση ανάμεσα στις δύο επαναλήψεις κάθε πειράματος RNA-seq σε κύτταρα HeLa και Namalwa.

Στη συνέχεια ακολούθησε η εξέταση της επαγωγής της έκφρασης γνωστών και καλά μελετημένων ρυθμιστών της ανοσολογικής απόκρισης. Συγκεκριμένα, το γονίδιο της Ιντερφερόνης-β επάγεται σημαντικά κατά τη διάρκεια της *ϊικής* μόλυνσης και στους δύο κυτταρικούς τύπους (εικόνα 11). Αντίθετα οι Ιντερφερόνες Α επάγονται στα Namalwa και δεν επάγονται στα HeLa.



Εικόνα 11: Στην εικόνα απεικονίζεται το σήμα που προκύπτει από τα πειράματα RNA-seq γύρω από το γενετικό τόπο της Ιντερφερόνης β

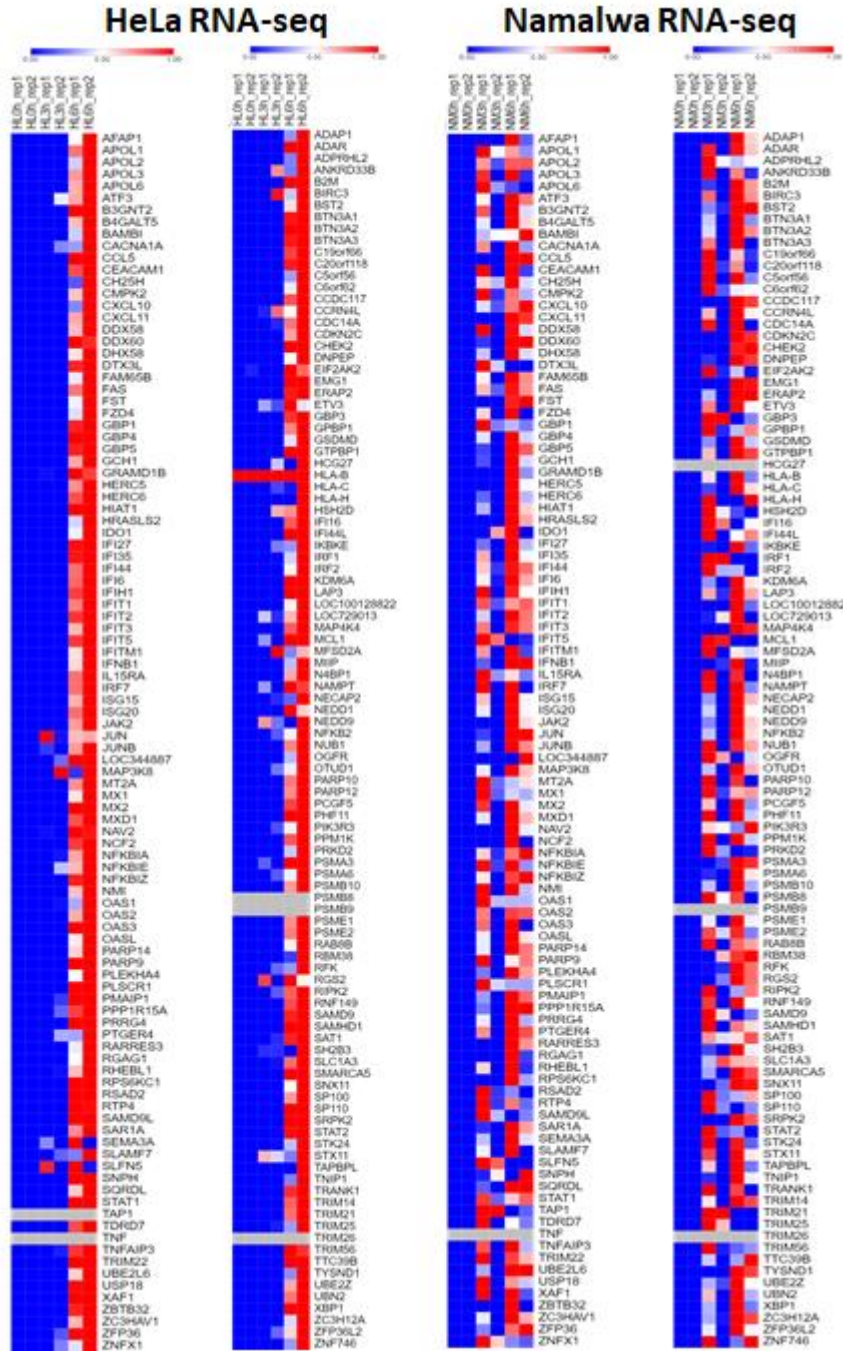
Από την ανάλυση του συνόλου των γονιδίων των οποίων η έκφραση μεταβάλλεται μετά την μόλυνση των κυττάρων με ιό παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές. Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 12 στο κυτταρικό τύπο HeLa παρατηρήθηκε υπερέκφραση 202 γονιδίων στις 3 ώρες (>1.4fold change, pvalue<0.05) μετά τη μόλυνση και 499 μετά την μόλυνση με ιό, με 170 από αυτά να υπερεκφράζονται και στα δύο χρονικά διαστήματα. Αντίθετα μειωμένη παρατηρείται η έκφραση 53 γονιδίων στις 3 ώρες και 328 στις 6 ώρες μετά την ιική μόλυνση. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων για τα Namalwa φανέρωσε την αυξημένη έκφραση 338 γονιδίων στις 3 ώρες και 722 στις 6 ώρες μετά την μόλυνση, ενώ τα γονίδια με μειωμένη έκφραση ήταν 119 και 432 αντίστοιχα (εικόνα 12). Διαπιστώθηκε επομένως ότι στο χρονικό σημείο των έξι ωρών μετά την μόλυνση ο αριθμός των γονιδίων των οποίων η έκφραση μεταβάλλεται είναι μεγαλύτερος σε σχέση με τις τρεις ώρες τόσο στα HeLa όσο και στα Namalwa, επιβεβαιώνοντας ότι μετά το πέρας 3 ωρών η κυτταρική απόκριση βρίσκεται ακόμα σε πρώιμο στάδιο.



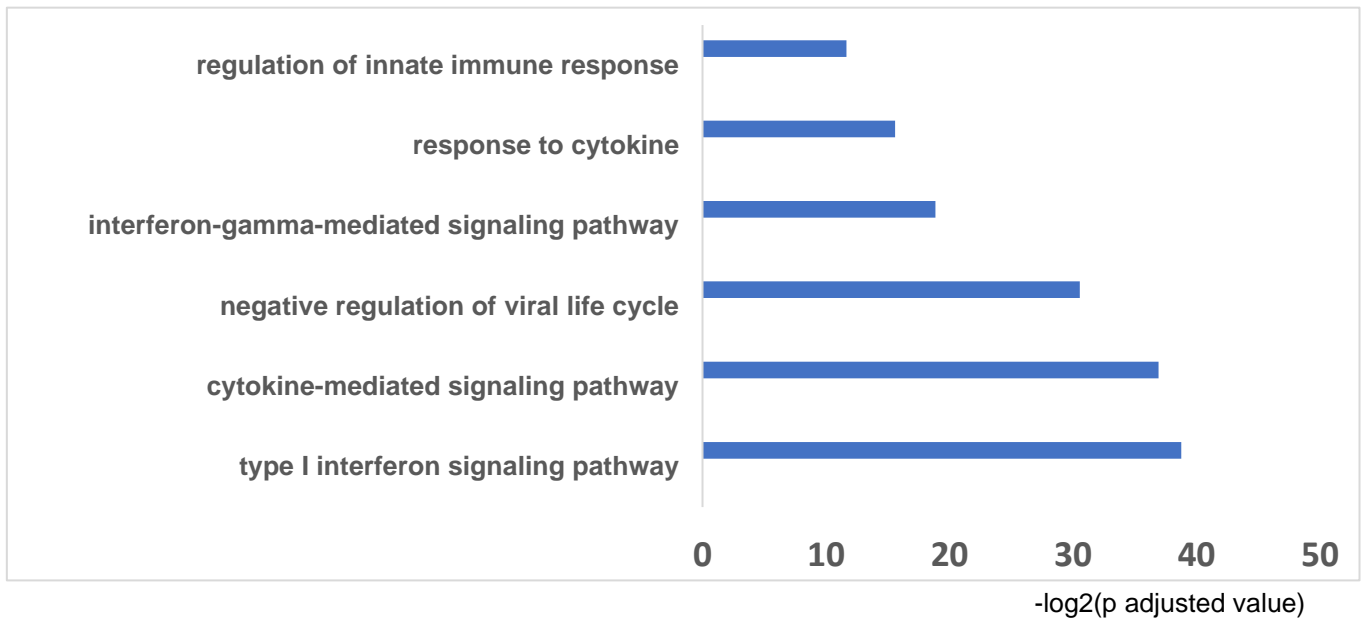
Εικόνα 12: Παρουσιάζονται τα γονίδια με κοινό και κυτταροειδικό πρότυπο μεταβολής των επιπέδων έκφρασης τους 3(A) και 6(B) ώρες μετά τη μόλυνση των κυττάρων με ιό Sendai.

Αναζητώντας τα κοινά γονίδια των οποίων η έκφραση αυξάνεται και στις δύο κυτταρικές σειρές παρατηρήθηκε ότι 210 γονίδια υπερεκφράζονται 6 ώρες μετά την ιική μόλυνση και μπορούν να χαρακτηριστούν ως ο πυρήνας του μεταγραφικού δικτύου απόκρισης των κυττάρων στον ιό (εικόνα 13). Διαπιστώνεται από την απεικόνιση αυτή η ταχύτερη επαγωγή των γονιδίων αυτών στα Namalwa καθώς ήδη στο χρονικό σημείο των 3 ωρών μετά τη μόλυνση αρκετά γονίδια έχουν επίπεδα που φτάνουν αυτά των 6 ωρών. Μελετώντας τη συσχέτιση των γονιδίων αυτών με συγκεκριμένα μονοπάτια σηματοδότησης και κυτταρικές διαδικασίες διαπιστώθηκε ότι τα γονίδια των οποίων η έκφραση επάγεται από κοινού στις δύο κυτταρικές σειρές μετά από ιική μόλυνση συμμετέχουν όπως ήταν αναμενόμενο σε κυτταρικές διαδικασίες όπως το μονοπάτι των ιντερφερονών, το μονοπάτι των κυτοκινών και γενικότερα σε διεργασίες της ανοσολογικής απόκρισης (εικόνα 14). Στις εικόνες 15 και 16 παρουσιάζονται τα γονίδια που επάγονται μόνο στα κύτταρα Namalwa και HeLa αντίστοιχα. Χαρακτηριστικά παραδείγματα γονιδίων με κοινό πρότυπο επαγωγής είναι μεταξύ άλλων τα γονίδια *IFNB1*, *OASL*, *CCL5*, *MX1*, *MX2*, *IFIT1*, *IFIT2*, *IFIT3*, *IFIT4*, *IFIT5* (εικόνα 17). Γονίδια που επάγονται μόνο στα HeLa είναι μεταξύ άλλων τα *IL6*, *IL8* και *IL7R*, ενώ τα *IFNA2*, *IFNA5*, *IFNA7* και *CHITA* αποτελούν παραδείγματα γονιδίων που επάγονται μόνο στα Namalwa.

Κοινά επαγόμενα γονίδια

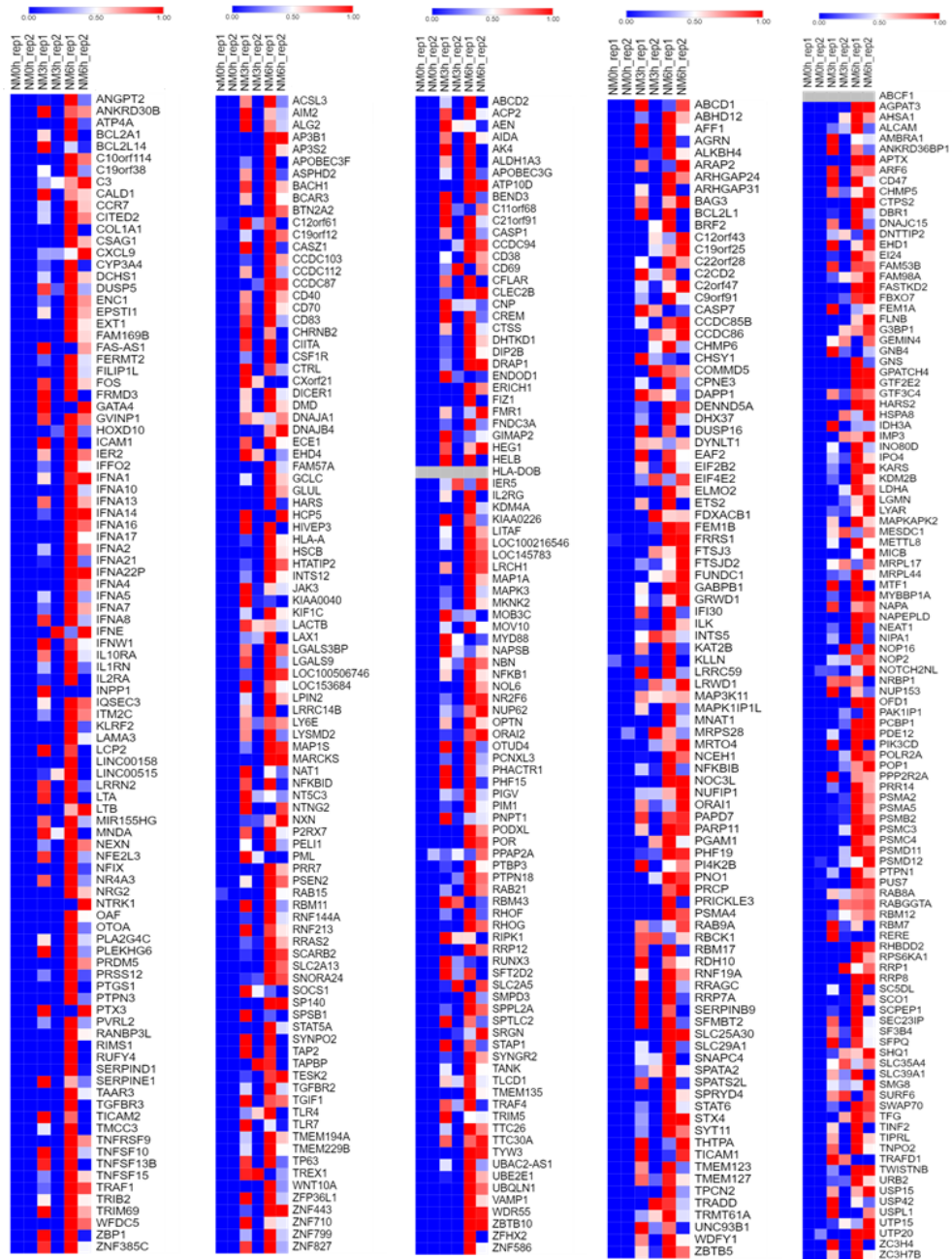


Εικόνα 13: Παρουσιάζονται τα κοινά ιικά επαγόμενα γονίδια σε κύτταρα HeLa και Namalwa με επίπεδα επαγωγής μεγαλύτερα από 2 fold. Στα αριστερά παρουσιάζονται τα επίπεδα σήματος πριν και μετά η μόλυνση στα κύτταρα HeLa και δεξιά στα Namalwa.



Εικόνα 14: Παρουσιάζονται οι πιο στατιστικά σημαντικές γονιδιακές οντολογίες για τα 210 κοινά γονίδια που επάγονται στα κύτταρα HeLa και Namalwa 6 ώρες μετά τη μόλυνση με ιό Sendai.

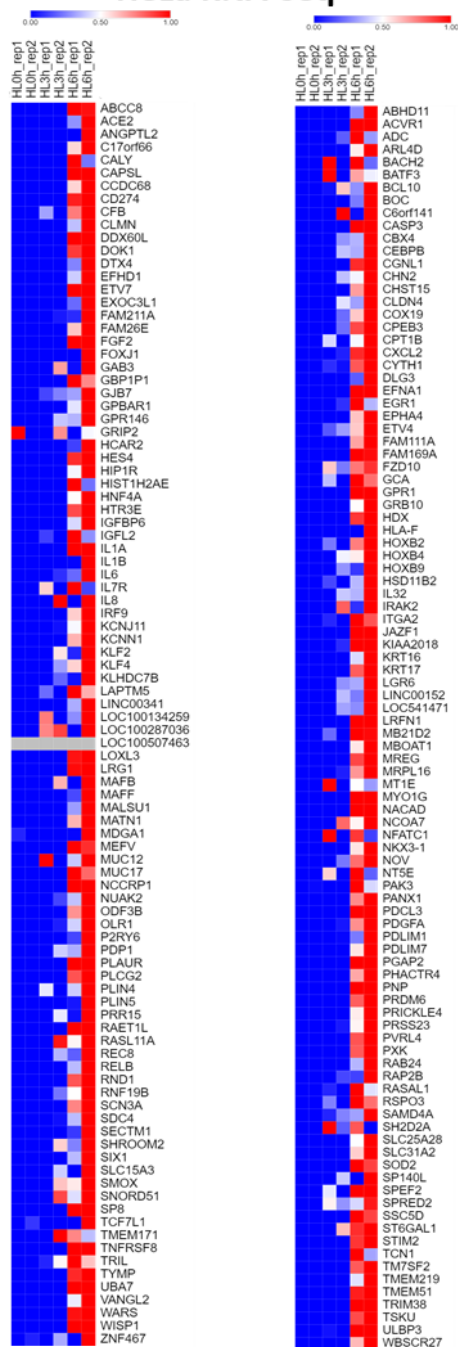
Ιικά επαγόμενα γονίδια μόνο στα Namalwa Namalwa RNA-seq



Εικόνα 15: Παρουσιάζονται οι ιικά επαγόμενες αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που επάγονται (>2fold) μόνο σε κύτταρα Namalwa.

Ιικά επαγόμενα γονίδια μόνο στα HeLa

HeLa RNA-seq



Εικόνα 16: Παρουσιάζονται οι ιικά επαγόμενες αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που επάγονται (>2fold) μόνο σε κύτταρα HeLa.

Γονίδια που επάγονται μόνο στα HeLa			Κοινά γονίδια				Γονίδια που επάγονται μόνο στα Namalwa	
<i>BCL10</i>	<i>IL1A</i>	<i>ITGA2</i>	<i>APOL1</i>	<i>IFI44</i>	<i>IFNB1</i>	<i>MX1</i>	<i>IFNA1</i>	<i>IFNA5</i>
<i>CXCL2</i>	<i>IL1B</i>	<i>KRT16</i>	<i>APOL2</i>	<i>IFI6</i>	<i>IFNL1</i>	<i>MX2</i>	<i>IFNA10</i>	<i>IFNA7</i>
<i>CYLD</i>	<i>IL32</i>	<i>KRT17</i>	<i>APOL3</i>	<i>IFIH1</i>	<i>IRF1</i>	<i>NFKB2</i>	<i>IFNA13</i>	<i>IFNA8</i>
<i>EGR1</i>	<i>IL6</i>	<i>LIF</i>	<i>APOL6</i>	<i>IFIT1</i>	<i>IRF7</i>	<i>NFKBIZ</i>	<i>CIITA</i>	<i>RIPK1</i>
<i>IFNGR2</i>	<i>IL8</i>	<i>IGFBP6</i>	<i>CCL5</i>	<i>IFIT2</i>	<i>ISG15</i>	<i>OAS1</i>	<i>OTUD4</i>	<i>FOS</i>
<i>IGFL2</i>	<i>IL7R</i>	<i>IRAK2</i>	<i>CXCL10</i>	<i>IFIT3</i>	<i>JUN</i>	<i>OAS2</i>		
			<i>CXCL11</i>	<i>IFIT5</i>	<i>JUNB</i>	<i>OASL</i>		

Εικόνα 17. Απεικονίζονται χαρακτηριστικά παραδείγματα γονιδίων με κοινό και κυτταροεδικό πρότυπο επαγωγής της έκφρασης τους 6 ώρες μετά τη μόλυνση.

Πειράματα ChIP-seq

Το εργαστήριό μας έχει μακρά παράδοση στη μελέτη των μοριακών γεγονότων που διαδραματίζονται κατά μήκος των επιφανειών της χρωματίνης των ανθρώπινων κυττάρων στη διάρκεια Ιικών μολύνσεων (Agelopoulos and Thanos.,2006, Lavigne et al.,2015 Lomvardas and Thanos,2001). Για τη διαλεύκανση της ρυθμιστικής λογικής που διέπει το αντιϊκό πρόγραμμα γονιδιακής έκφρασης των ανθρώπινων κυττάρων πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμισης χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation; ChIP) με αντισώματα που αναγνωρίζουν ένα ευρύ φάσμα μεταγραφικών παραγόντων (ενεργοποιητών ή συν-ενεργοποιητών), ιστονικών τροποποιήσεων, συμπλόκων τροποποίησης της χρωματίνης, και στοιχείων της μεταγραφικής μηχανής σε συνδυασμό με βαθιά αλληλούχιση νέας γενιάς (Next Generation Sequencing; NGS). Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκαν πειράματα ChIP-seq έναντι των μεταγραφικών παραγόντων IRF3, NF-κB (p65) και Stat2 που αποτελούν κάποιους από τους κύριους ρυθμιστές της ανοσολογικής απόκρισης, των συνενεργοποιητών Med1 και CBP, της RNA pol II, της κοχεσίνης (Rad21), των χαρακτηριστικών των ενισχυτών ιστονικών

τροποποιήσεων H3K27ac και H3K4me1 και της ιστονικής τροποποίησης H3K4me3 που βρίσκεται γύρω από ενεργούς υποκινητές. Μετά την εκτέλεση των πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης ακολουθούσε πάντα λεπτομερής έλεγχος της ποιότητας τους με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο χρησιμοποιώντας γνωστούς θετικούς και αρνητικούς στόχους. Τα δείγματα που παρουσίαζαν υψηλό εμπλουτισμό στους θετικούς σε σχέση με τους αρνητικούς στόχους προχωρούσαν περαιτέρω στο στάδιο της αλληλούχισης ευρείας κλίμακας νέας γενιάς. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τόσο πριν όσο και 3 και 6 ώρες μετά τη μόλυνση των κυττάρων με ιό Sendai και μετά από συνδυαστική ανάλυση με μεθόδους βιοπληροφορικής οδήγησαν στη κατάρτιση του πλέον λεπτομερούς άτλαντα ρυθμιστικών στοιχείων που ελέγχουν την αντίκρημνιστική απόκριση των κυττάρων που έχει καταγραφεί ως σήμερα στο πεδίο. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αλληλούχισης ήταν ιδιαίτερα υψηλής ποιότητας και τα σχετικά σκορ ποιότητας ξεπερνάνε αυστηρά διεθνή κριτήρια (Παράρτημα) (Encode Project Consortium, 2012). Συγκεκριμένα η υψηλή ποιότητα των δεδομένων αλληλούχισης διαπιστώθηκε από το υψηλό Phred quality score (Q score) που είναι ενδεικτικό της ακρίβειας της αλληλούχισης και το υψηλό ποσοστό στοίχισης των reads στο γονιδίωμα. Η ποιότητα και η υψηλή πολυπλοκότητα των DNA βιβλιοθηκών διαπιστώθηκε από το χαμηλό ποσοστό παρουσίας duplicates. Τέλος η επιτυχία του σταδίου της ανοσοκατακρήμνισης έγινε φανερή από το υψηλό ποσοστό σήματος σε κορυφές (FRIP score) και το υψηλό μέσο εμπλουτισμό σήματος στις κορυφές σε σχέση με το αν η κατανομή του σήματος ήταν τυχαία στο γονιδίωμα. Επίσης πραγματοποιήθηκε ενδεδειγμένος έλεγχος ποιότητας των αποτελεσμάτων μέσω ελέγχου παρουσίας σήματος σε γνωστούς θετικούς και αρνητικούς στόχους και έλεγχος ύπαρξης μοτίβων για γνωστούς μεταγραφικούς παράγοντες της ανοσολογικής απόκρισης.

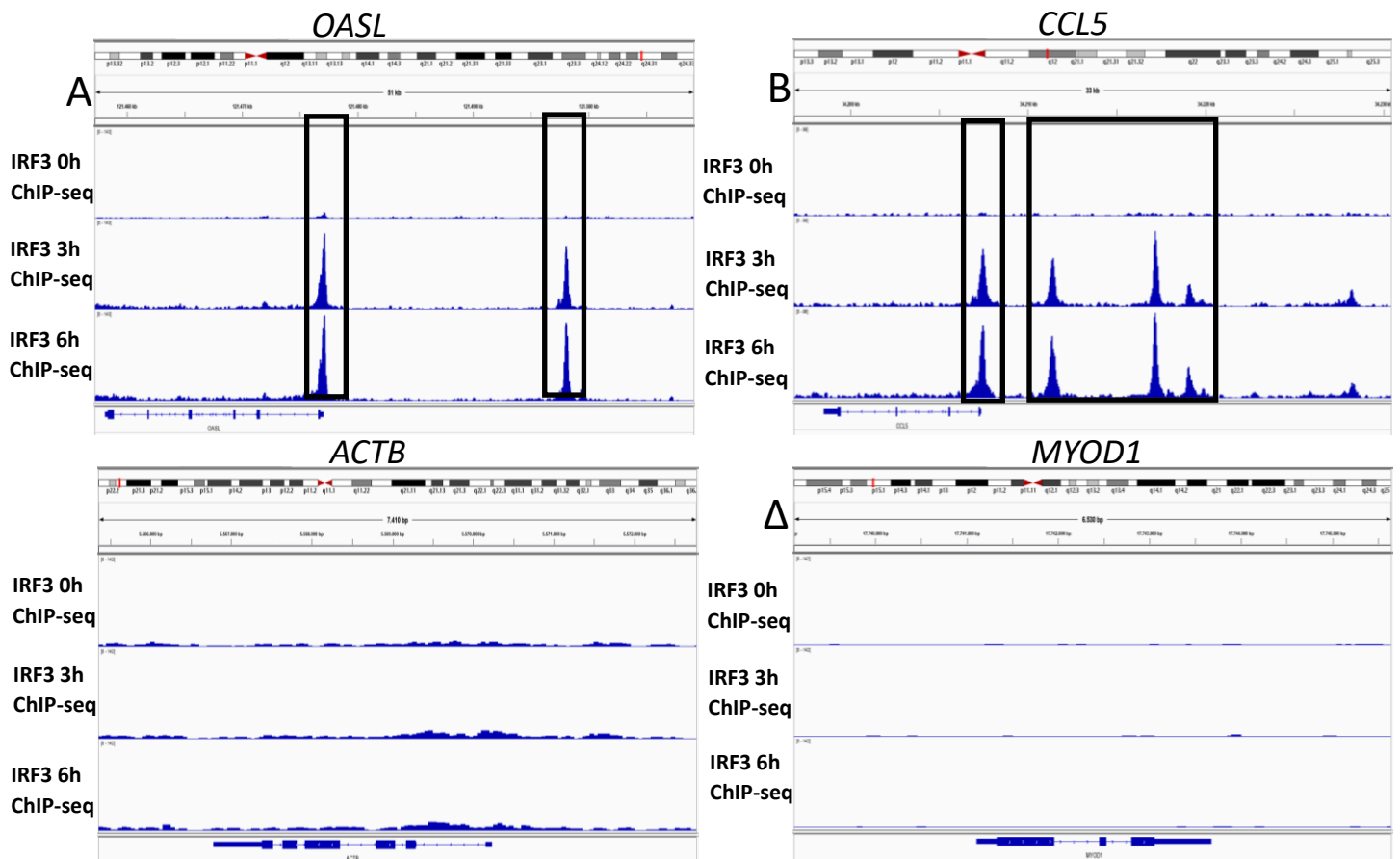
Πειράματα IRF3 ChIP-seq σε κύτταρα HeLa

Για τη μελέτη της ανακατανομής των θέσεων πρόσδεσης στο γονιδίωμα του IRF3, ενός από τους κύριους ρυθμιστές της *αντιικής* απόκρισης (Tamura *et al.*, 2008), πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκακρήμνισης χρωματίνης σε συνδυασμό με αλληλούχιση νέας γενιάς (ChIP-seq) τόσο πριν όσο και 3 και 6 ώρες μετά τη μόλυνση με ιό Sendai σε κύτταρα HeLa. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων με μεθόδους βιοπληροφορικής παρατηρήθηκε αύξηση στην ένταση και στον αριθμό των θέσεων πρόσδεσης του IRF3 στο γονιδίωμα μετά τη μόλυνση, ένα αναμενόμενο

εύρημα αφού ο IRF3 υφίσταται ενεργοποιητικές μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις μετά τη μόλυνση και εισέρχεται στο πυρήνα (Fitzgerald *et al.*,2003). Για να εξακριβώσουμε τη ποιότητα των πειραμάτων στα κύτταρα HeLa αρχικά μελετήσαμε τα επίπεδα IRF3 γύρω από αναμενόμενους θετικούς και αρνητικούς στόχους (εικόνα 18). Τα πειράματα απέδειξαν αρχικά την πρόσδεση του IRF3 κοντά στον υποκινητή και σε απομακρυσμένους πιθανούς ενισχυτές των *ϊικά* επαγόμενων γονιδίων *OASL* και *CCL5* σε ισχυρά επίπεδα και επαγόμενο πρότυπο στη διάρκεια της *ϊικής* μόλυνσης. Αντίθετα, τα επίπεδα πρόσδεσης του IRF3 ήταν χαμηλά και σταθερά πριν και κατά την εξέλιξη της μόλυνσης γύρω από τις θέσεις έναρξης της μεταγραφής των γονιδίων *ACTB* και *MYOD1* γεγονός ορθό καθώς το γονίδιο *ACTB* είναι γονίδιο κυτταρικής οικονομίας και δεν ρυθμίζεται από τον IRF3, ενώ το γονίδιο *MYOD1* δεν εκφράζεται στα κύτταρα HeLa. Τα παραπάνω αρχικά συμπεράσματα υπογραμμίζουν την αρτιότητα του κυτταρικού συστήματος καλλιέργειας και μόλυνσης ανθρώπινων κυττάρων και την ορθή εκτέλεση βιοχημικών πειραμάτων ανοσοκατακρύμνισης σε χρωματίνη ακολουθούμενη από βαθια αλληλούχιση και βιοπληροφορική ανάλυση.

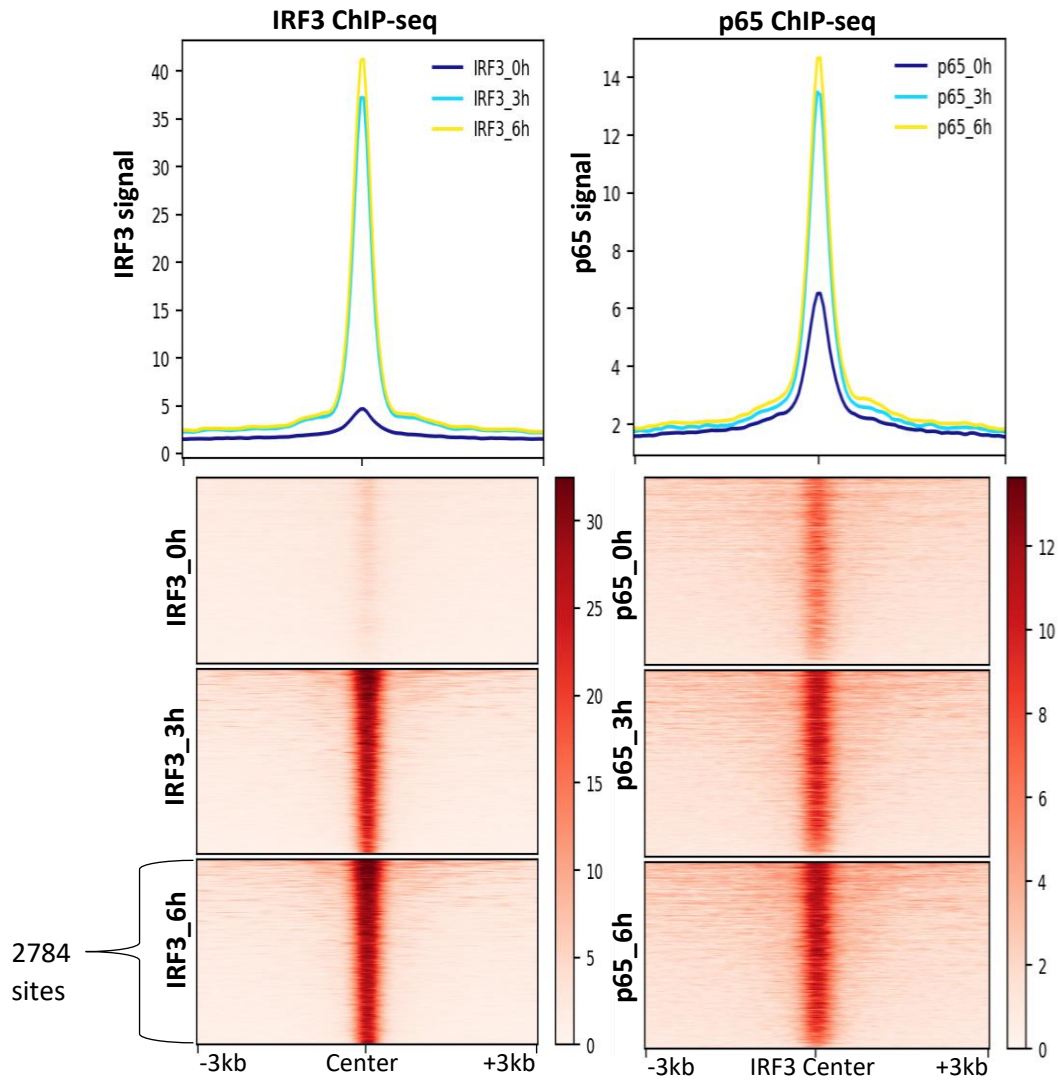
Στη συνέχεια εστίασαμε τη προσοχή μας σε ισχυρά επαγόμενες θέσεις πρόσδεσης του IRF3 που βρίσκονται μακριά (>2κβ) από θέσεις έναρξης της μεταγραφής. Παρατηρήθηκαν 2784 πιθανοί ενισχυτές για τους οποίους η ένταση της πρόσδεσης του IRF3 κατά τη πρόοδο της *αντιϊκής* απόκρισης παρουσιάζεται αυξημένη όπως περιγράφεται στην εικόνα 19. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι το πρότυπο επαγόμενης πρόσδεσης του IRF3 είναι σε απόλυτη συμφωνία με το προφίλ έκφρασης των αντικών γονιδίων όπως καταγράφεται από συγκριτική βιοπληροφορική ανάλυση πειραμάτων IRF3-ChIP-seq/RNA-seq.

Στη συνέχεια μελετήθηκε το επιγενωμικό προφίλ των παραπάνω περιοχών. Διαπιστώθηκε συνεντοπισμός του IRF3 με το μεταγραφικό παράγοντα p65 σε 600 περίπου θέσεις.



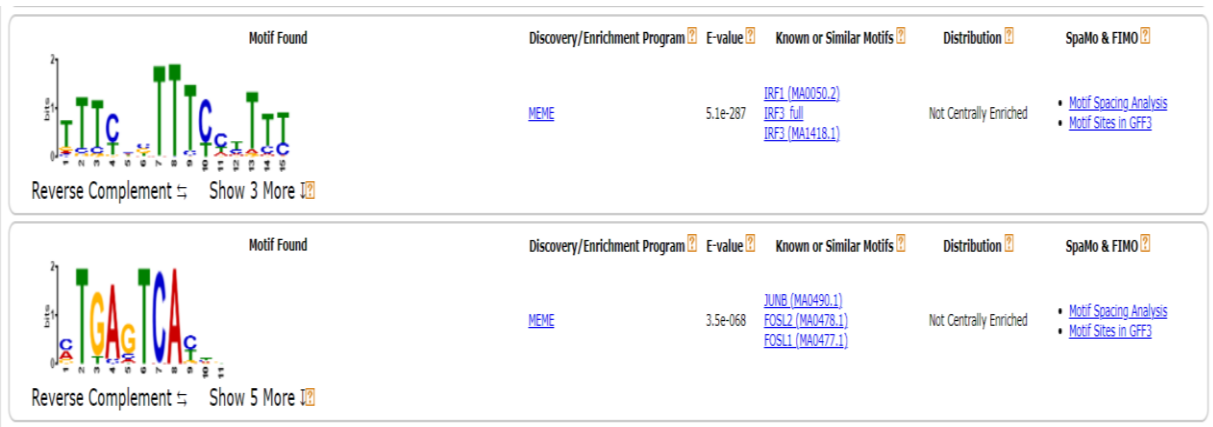
Εικόνα 18: Παρουσιάζονται τα επίπεδα πρόσδεσης του IRF3 γύρω από το γονίδιο *OASL* (A), *CCL5* (B) *ACTB* (Γ) και *MYOD1*(Δ) πριν καθώς και 3 και 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα HeLa.

Έπειτα εξετάστηκαν τα υποκείμενα μοτίβα μεταγραφικών παραγόντων στις θέσεις πρόσδεσης του IRF3. Ως πιο στατιστικά σημαντικά μοτίβα βρέθηκαν αυτά της οικογένειας των IRF, επιβεβαιώνοντας περαιτέρω την αρτιότητα του πειράματος (εικόνα 20). Επιπλέον βρέθηκαν μοτίβα πρόσδεσης για τους παράγοντες Jun/Fos, που συμμετέχουν στη ρύθμιση της αντιϊκής απόκρισης. Στη συνέχεια εξετάσαμε τις βιολογικές διεργασίες στις οποίες συμμετέχουν τα γονίδια που βρίσκονται εγγύτερα στις επαγόμενες αυτές θέσεις πρόσδεσης του IRF3. Διαπιστώθηκε ότι τα γονίδια αυτά σχετίζονται με διεργασίες όπως η παραγωγή κυτοκινών, η ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης και γενικότερα με διεργασίες που σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση. Πράγματι από τη σύγκριση με τα πειράματα RNA-seq προέκυψε ότι από τη λίστα με τα κοντινότερα γονίδια στις 2754 περιοχές πρόσδεσης του IRF3, 158 είναι επαγόμενα από τον ιό 6 ώρες μετά τη μόλυνση. Χαρακτηριστικά είναι τα παραδείγματα των γονιδίων *IFNB1*, *OASL*, *IRF1* και *CCL5*.

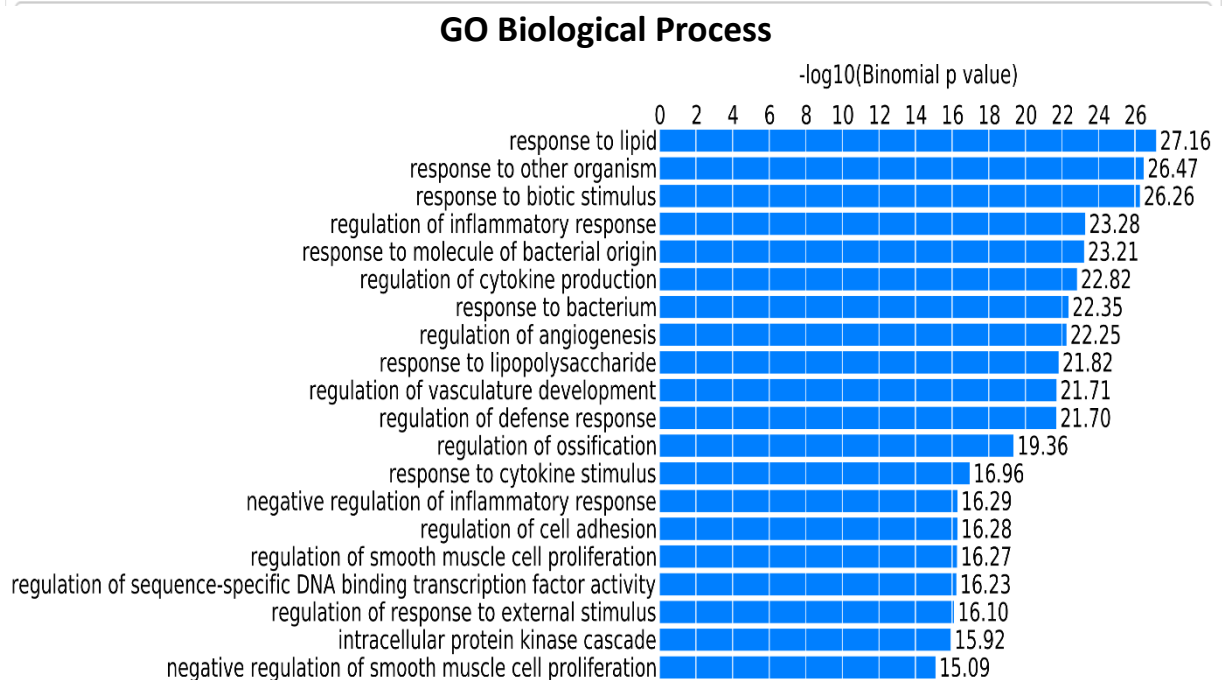


Εικόνα 19: Στα αριστερά παρουσιάζεται η κατανομή της πρόσδεσης του IRF3 γύρω από τις 2784 απομακρυσμένες από υποκινητές περιοχές με επαγόμενη πρόσδεση του IRF3 σε κύτταρα HeLa. Στα δεξιά απεικονίζονται τα επίπεδα του p65 γύρω από τις 2784 περιοχές.

A



B

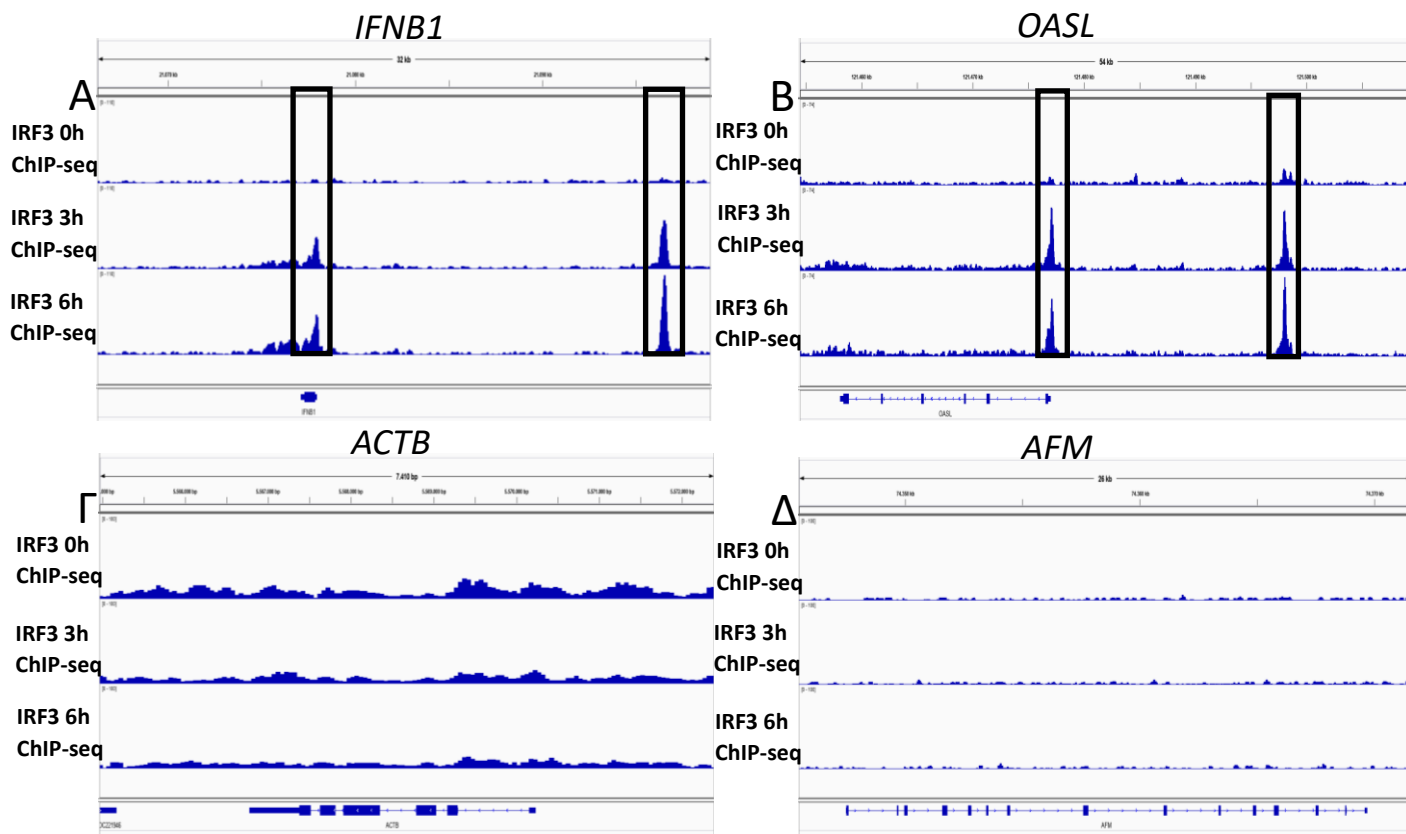


Εικόνα 20:Α) Μοτίβα πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων για τις απομακρυσμένες από υποκινητές περιοχές πρόσδεσης του IRF3 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα HeLa. Β) Τα αποτελέσματα της ανάλυσης βιολογικών διεργασιών για τα γονίδια που βρίσκονται κοντά στις promoter-distal περιοχές πρόσδεσης του IRF3 6 ώρες μετά τη μόλυνση.

Πειράματα IRF3 ChIP-seq σε κύτταρα Namalwa

Για τη μελέτη της ανακατανομής του IRF3 κατά τη διάρκεια της *αντίκριξης* απόκρισης σε κύτταρα Namalwa πραγματοποιήθηκαν πειράματα ChIP-seq πριν καθώς και 3 και 6 ώρες μετά από μόλυνση με ιό Sendai. Αρχικά για να εξακριβώσουμε τη ποιότητα των πειραμάτων μελετήσαμε τα επίπεδα IRF3 γύρω από αναμενόμενους θετικούς και αρνητικούς στόχους. Παρατηρήθηκαν ισχυρά επαγόμενα επίπεδα πρόσδεσης του IRF3 κοντά στον υποκινητή και σε απομακρυσμένους πιθανούς

ενισχυτές των *ϊικά* επαγόμενων γονιδίων *IFNB1* και *OASL*. Αντίθετα, τα επίπεδα πρόσδεσης του IRF3 ήταν χαμηλά και σταθερά πριν και κατά την εξέλιξη της μόλυνσης γύρω από τις θέσεις έναρξης της μεταγραφής των αρνητικών στόχων *ACTB* και *AFM* (εικόνα 21).

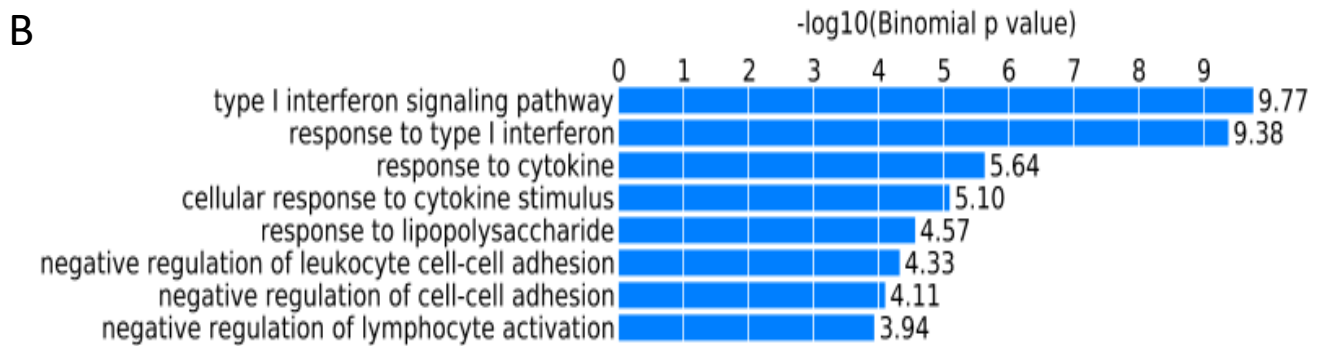


Εικόνα 21: Παρουσιάζονται τα επίπεδα πρόσδεσης του IRF3 γύρω από το γονίδιο *IFNB1* (Α), *OASL* (Β) *ACTB* (Γ) και *AFM* (Δ) πριν καθώς και 3 και 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα Namalwa.

Μελετώντας τις επαγόμενες θέσεις πρόσδεσης του IRF3 6 ώρες μετά τη μόλυνση που βρίσκονται μακριά από υποκινητές βρέθηκαν 502 θέσεις οι οποίες είναι εμπλουτισμένες για τα μοτίβα των μεταγραφικών παραγόντων IRF και Jun/Fos (εικόνα 22). Επιπλέον τα κοντινότερα γονίδια σχετίζονται με διεργασίες όπως το μονοπάτι των ιντερφερονών τύπου I και η απόκριση σε κυτοκίνες υποδηλώνοντας ότι οι επαγόμενες αυτές θέσεις πρόσδεσης του IRF3 πιθανόν συμμετέχουν στη ρύθμιση της *αντίικης* απόκρισης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα επαγόμενων γονιδίων που βρίσκονται κοντά σε επαγόμενες θέσεις πρόσδεσης του IRF3 είναι τα *IFNB1*, *OASL*, και *IRF1*.

A

oligos_6nt_mkv3_m1		versus_jaspar_core_nonredundant Vertebrates: STAT1_STAT2,
oligos_6nt_mkv3_m2		versus_jaspar_core_nonredundant Vertebrates: ZEB1, MXI1, NEUROD1,
oligos_6nt_mkv3_m3		versus_jaspar_core_nonredundant Vertebrates: Ascl2, NHLH1, TFAP4,
oligos_6nt_mkv3_m4		versus_jaspar_core_nonredundant Vertebrates: TFAP2A, TFAP2B_var_2_, TFAP2C_var_2_,
oligos_6nt_mkv3_m5		versus_jaspar_core_nonredundant Vertebrates: IRF8, IRF5, IRF7,
oligos_7nt_mkv4_m1		versus_jaspar_core_nonredundant Vertebrates: IRF3, IRF1, STAT1_STAT2,
oligos_7nt_mkv4_m2		versus_jaspar_core_nonredundant Vertebrates: IRF7, STAT1_STAT2, IRF8,
oligos_7nt_mkv4_m3		versus_jaspar_core_nonredundant Vertebrates: IRF7, STAT1_STAT2, IRF2,
oligos_7nt_mkv4_m4		versus_jaspar_core_nonredundant Vertebrates: ASCL1, ZEB1, Myod1,
oligos_7nt_mkv4_m5		versus_jaspar_core_nonredundant Vertebrates: TEAD2, TEAD3, NFATC1,

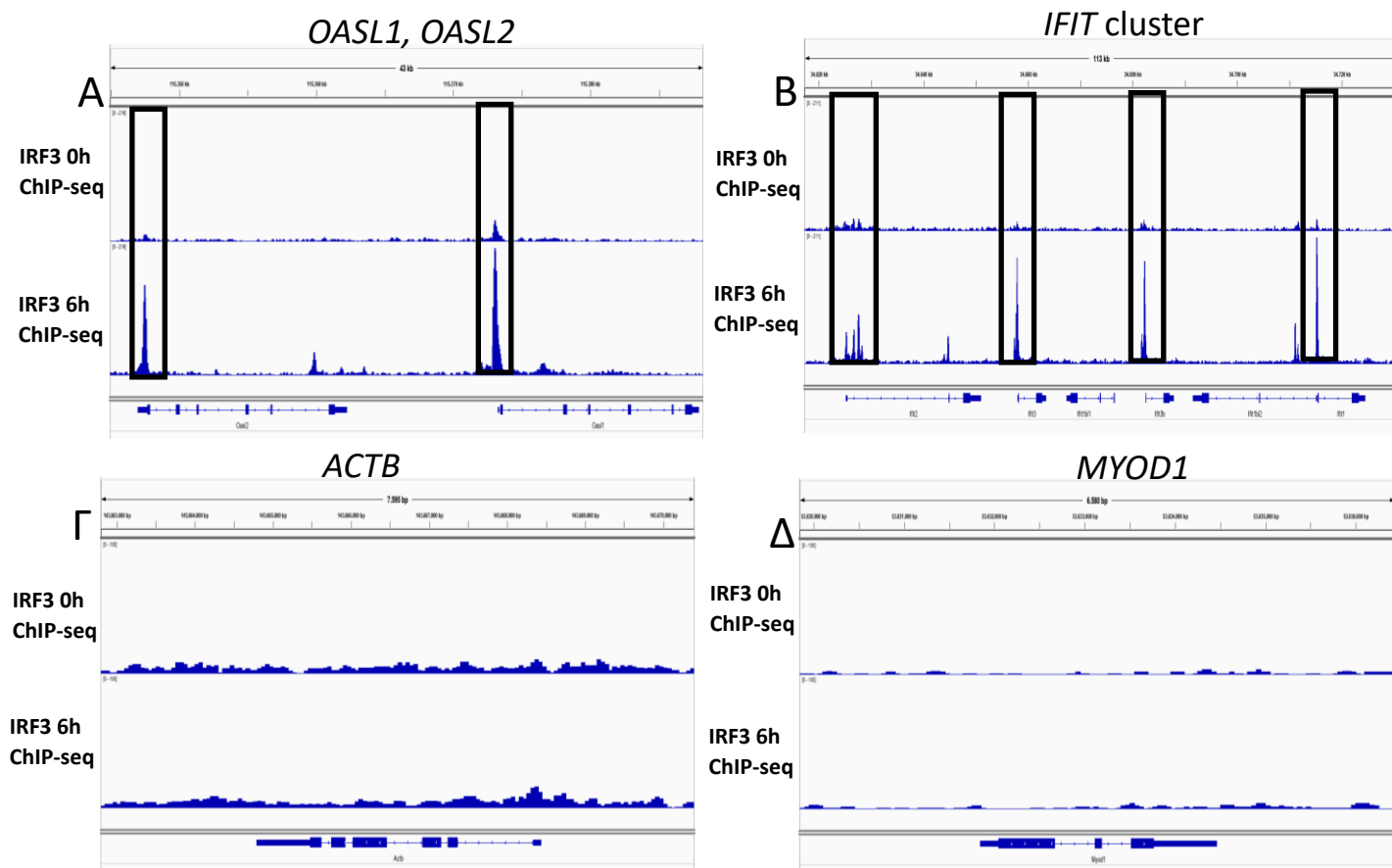


Εικόνα 22: Α) Μοτίβα πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων για τις απομακρυσμένες από υποκινητές περιοχές πρόσδεσης του IRF3 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα Namalwa. Β) Ανάλυση βιολογικών διεργασιών για τα γονίδια που βρίσκονται κοντά στις promoter-distal περιοχές πρόσδεσης του IRF3 6 ώρες μετά τη μόλυνση.

Πειράματα IRF3 ChIP-seq σε κύτταρα NIH3T3

Για τη μελέτη της κατανομής του IRF3 στο γονιδίωμα κατά την εξέλιξη της αντιικής απόκρισης σε κύτταρα ποντικού πραγματοποιήθηκαν ChIP-seq πειράματα έναντι του IRF3 σε NIH3T3 κύτταρα πριν καθώς και 6 ώρες μετά τη μόλυνση των κυττάρων με ιό Sendai. Για να εξακριβώσουμε τη ποιότητα των πειραμάτων στα κύτταρα NIH3T3 αρχικά μελετήσαμε τα επίπεδα IRF3 γύρω από αναμενόμενους θετικούς και αρνητικούς στόχους. Διαπιστώθηκαν ισχυρά επαγόμενα επίπεδα πρόσδεσης του IRF3 κοντά στους υποκινητές των γονιδίων *Oas11* και *Oas12* που έχουν γνωστό ρόλο στην αντιική απόκριση, καθώς και στους υποκινητές των γονιδίων *Ifit1*, *Ifit2*, *Ifit3* και *Ifit3b*. Αντίθετα τα επίπεδα πρόσδεσης του IRF3 ήταν

χαμηλά πριν και κατά την εξέλιξη της μόλυνσης γύρω από τις θέσεις έναρξης της μεταγραφής των αρνητικών στόχων *Actb* και *Myod1* (εικόνα 23).



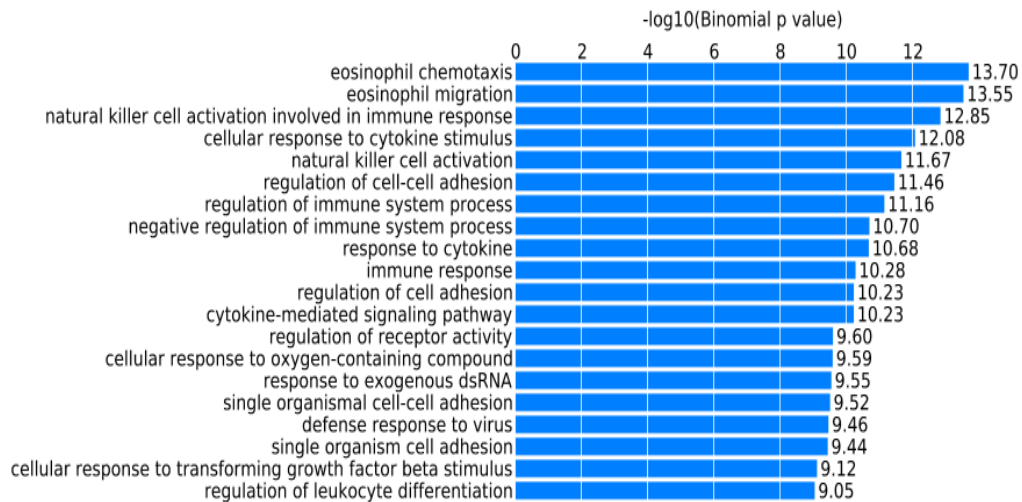
Εικόνα 23: Απεικονίζονται τα επίπεδα πρόσδεσης του IRF3 γύρω από το γονίδιο *Actb* (A), *Myod1* (B) *Oasl1* και *Oasl2*(Γ) και γύρω από το *Ifit* cluster (Δ) πριν καθώς και 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα NIH3T3.

Στη συνέχεια εστίασαμε τη προσοχή μας σε ισχυρά επαγόμενες θέσεις πρόσδεσης του IRF3 που βρίσκονται μακριά (>2κβ) από θέσεις έναρξης της μεταγραφής. Εντοπίστηκαν 819 επαγόμενες θέσεις πρόσδεσης του IRF3 και διαπιστώθηκε ότι βρίσκονται κοντά σε γονίδια που συμμετέχουν σε διεργασίες της ανοσολογικής απόκρισης (εικόνα 24). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι επαγόμενες θέσεις του IRF3 που βρίσκονται κοντά στα γονίδια *Ifnb1*, *Ccl5* και *Zc3hav1*. Επιπλέον οι 819 αυτές θέσεις είναι εμπλουτισμένες για μοτίβα πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων IRF και Jun/Fos.

A

Motif	Logo	3 Top hits in databases
oligos_6nt_mkv3_m1		versus.jaspar_core_nonredundant Vertebrates: Bach1_Mafk, Nfe2l2, FOS_JUND,
oligos_6nt_mkv3_m2		versus.jaspar_core_nonredundant Vertebrates: Sox3, SOX15, ZNF384,
oligos_6nt_mkv3_m3		versus.jaspar_core_nonredundant Vertebrates: IRF3, STAT1_STAT2, IRF1,
oligos_6nt_mkv3_m4		versus.jaspar_core_nonredundant Vertebrates: SP1, KLF5, E2F6,
oligos_6nt_mkv3_m5		versus.jaspar_core_nonredundant Vertebrates: FOS_JUND, FOSL1_JUN, FOSL1_JUNB,
positions_6nt		versus.jaspar_core_nonredundant Vertebrates: NFATC3, NFATC1, STAT1_STAT2,
oligos_7nt_mkv4_m1		versus.jaspar_core_nonredundant Vertebrates: FOS_JUND, FOSL1_JUN, FOSL1_JUNB,
oligos_7nt_mkv4_m2		versus.jaspar_core_nonredundant Vertebrates: IRF9, IRF8, IRF5,
oligos_7nt_mkv4_m3		versus.jaspar_core_nonredundant Vertebrates: STAT1_STAT2, IRF2, IRF1,
oligos_7nt_mkv4_m4		versus.jaspar_core_nonredundant Vertebrates: SP1, KLF9, KLF5,
oligos_7nt_mkv4_m5		versus.jaspar_core_nonredundant Vertebrates: FOS, JUND, FOSL1,
positions_7nt		versus.jaspar_core_nonredundant Vertebrates: NFATC3, NFATC1, IRF9,

B

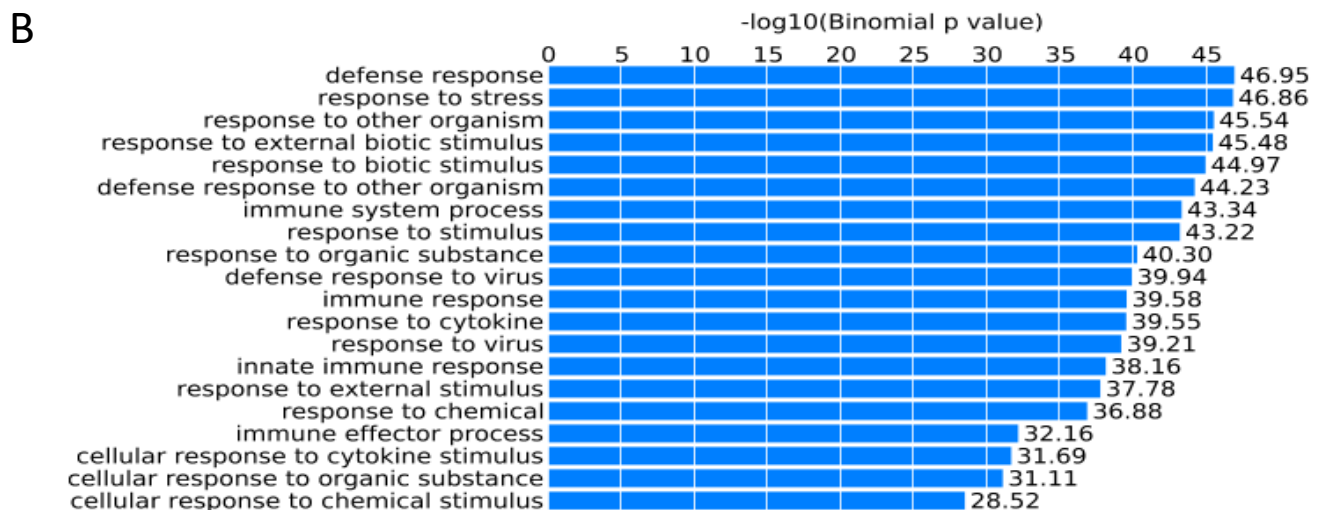


Εικόνα 24:A) Μοτίβα πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων για τις 819 απομακρυσμένες από υποκινητές περιοχές πρόσδεσης του IRF3 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα NIH3T3. Β) Τα αποτελέσματα της ανάλυσης βιολογικών διεργασιών για τα γονίδια που βρίσκονται κοντά στις promoter-distal περιοχές πρόσδεσης του IRF3 6 ώρες μετά τη μόλυνση.

Εξετάζοντας στη συνέχεια τις 86 ισχυρά επαγόμενες θέσεις πρόσδεσης του IRF3 που ήταν κοντά σε υποκινητές βρέθηκε να σχετίζονται με γονίδια που συμμετέχουν στην ανοσολογική απόκριση, ενώ επίσης έφεραν μοτίβα πρόσδεσης για τους μεταγραφικούς παράγοντες IRF και Jun/Fos (εικόνα 25). Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι αυτά των γονιδίων *Ccl5*, *Oasl1*, *Oasl2* και *Mx2*.

A

Motif	Logo	3 Top hits in databases
oligos_6nt_mkv2_m1		versus_jaspar_core_nonredundant Vertebrates: IRF9, IRF3, IRF1,
oligos_6nt_mkv2_m2		versus_jaspar_core_nonredundant Vertebrates: SP1, SP3, KLF16,
oligos_6nt_mkv2_m3		versus_jaspar_core_nonredundant Vertebrates: FOS_JUNB, FOSL1_JUN, FOS_JUND,
oligos_6nt_mkv2_m4		versus_jaspar_core_nonredundant Vertebrates: STAT1_STAT2, IRF2, IRF3,
oligos_6nt_mkv2_m5		versus_jaspar_core_nonredundant Vertebrates: FOXK2, FOXP2, FOXC2,
positions_6nt		versus_jaspar_core_nonredundant Vertebrates: PRDM1, IRF8, IRF5,
oligos_7nt_mkv2_m1		versus_jaspar_core_nonredundant Vertebrates: IRF9, IRF8, IRF7,
oligos_7nt_mkv2_m2		versus_jaspar_core_nonredundant Vertebrates: SP1, SP8, SP3,
oligos_7nt_mkv2_m3		versus_jaspar_core_nonredundant Vertebrates: IRF3, IRF9, IRF1,
oligos_7nt_mkv2_m4		versus_jaspar_core_nonredundant Vertebrates: IRF8, IRF5, IRF7,
oligos_7nt_mkv2_m5		versus_jaspar_core_nonredundant Vertebrates: FOS_JUND, FOSL1_JUN, FOSL1_JUNB,

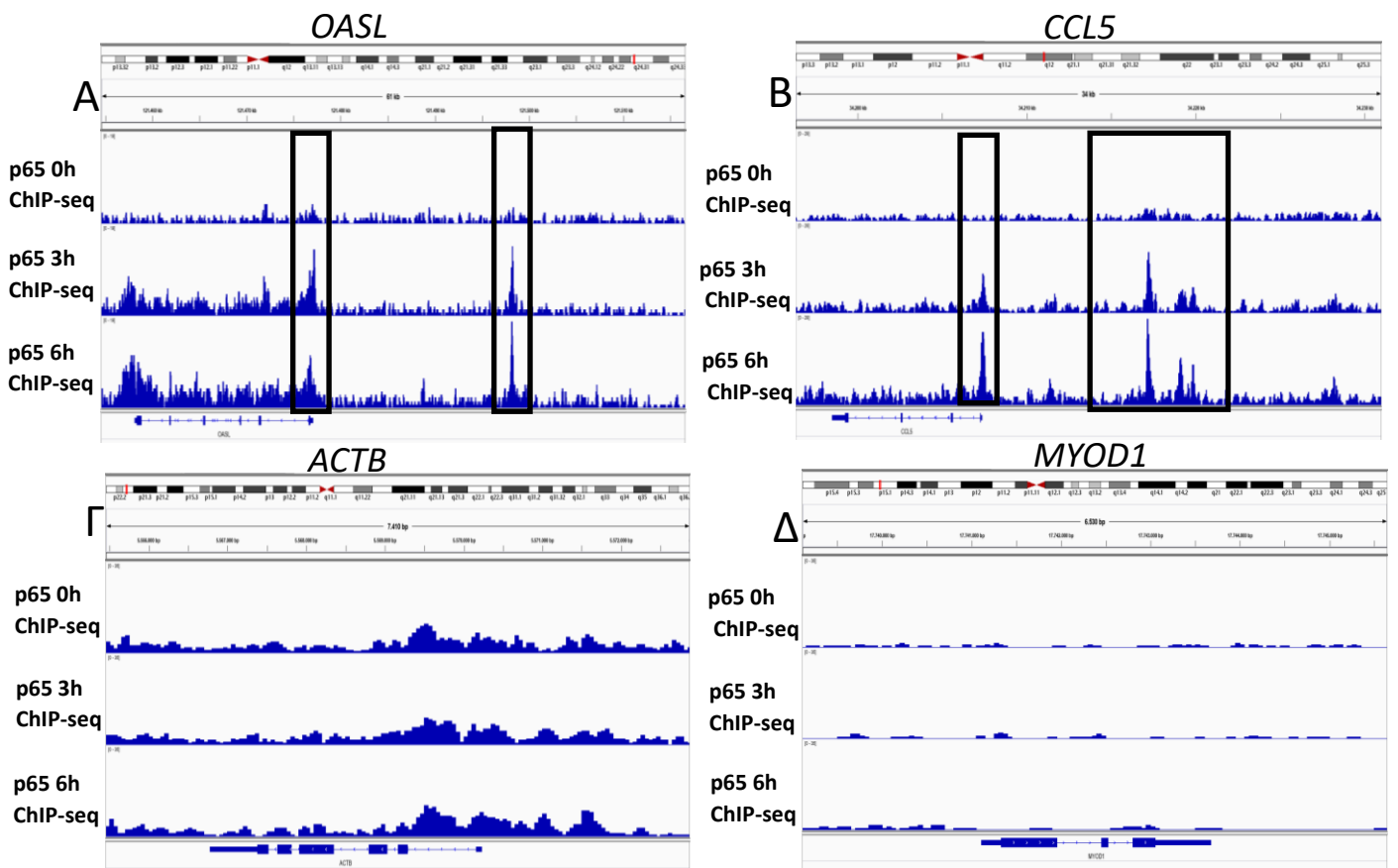


Εικόνα 25:Α) Μοτίβα πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων για τις 86 κοντά σε υποκινητές περιοχές πρόσδεσης του IRF3 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα NIH3T3. Β) Τα αποτελέσματα της ανάλυσης βιολογικών διεργασιών για τα γονίδια που βρίσκονται κοντά στις promoter-proximal περιοχές πρόσδεσης του IRF3 6 ώρες μετά τη μόλυνση.

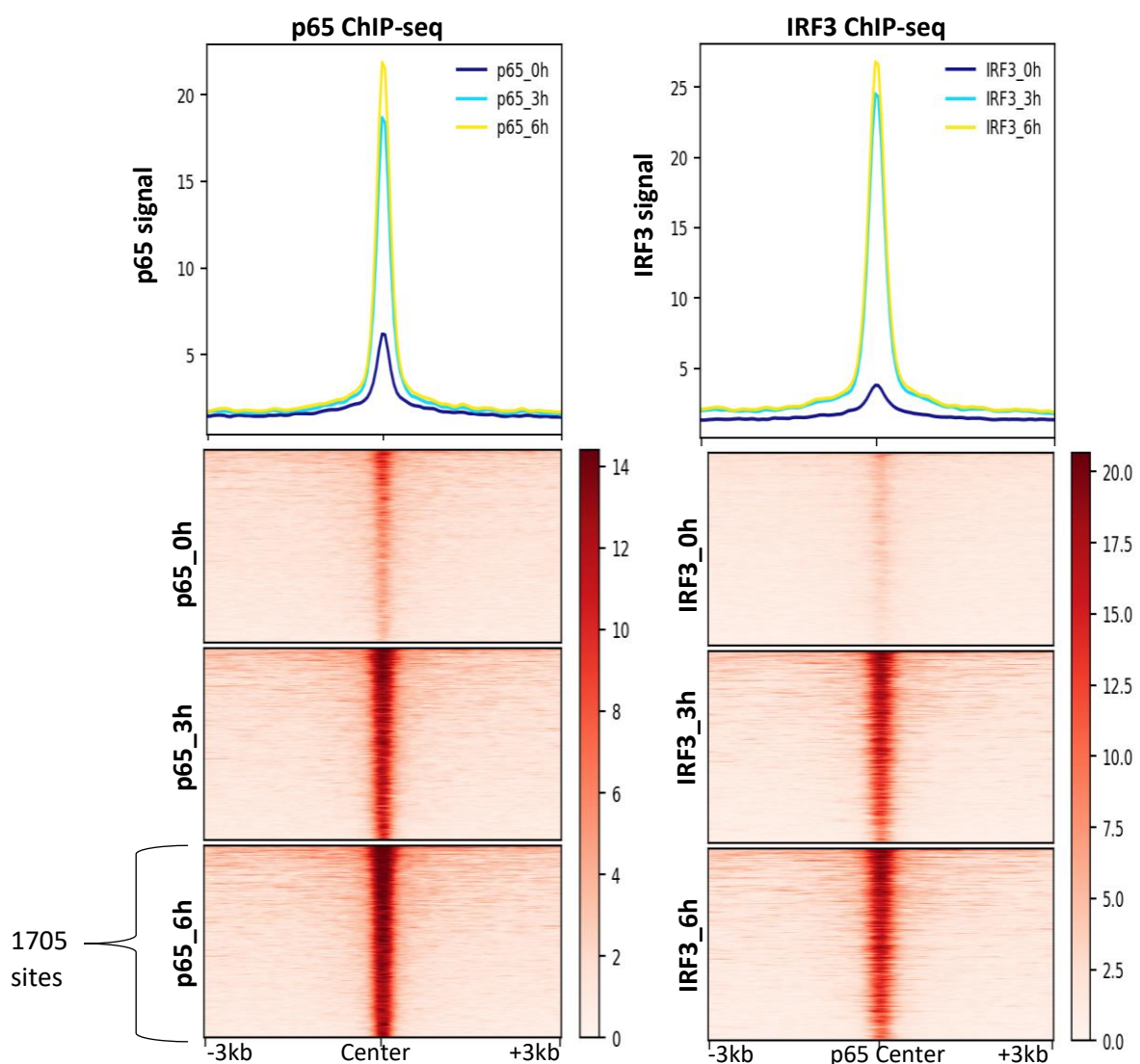
Πειράματα p65 ChIP-seq σε κύτταρα HeLa

Για να μελετήσουμε την ανακατανομή των θέσεων πρόσδεσης του NF-κB κατά τη εξέλιξη της *αντιϊκής* απόκρισης πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης έναντι της υπομονάδας p65 σε συνδυασμό με αλληλούχιση νέας γενιάς (ChIP-seq) πριν όσο και 3 και 6 ώρες μετά τη μόλυνση των κυττάρων με ιό Sendai σε κύτταρα HeLa. Παρατηρήθηκε αύξηση των θέσεων πρόσδεσης του p65 στο γονιδίωμα μετά τη μόλυνση, γεγονός αναμενόμενο αφού μετά τη μόλυνση ο p65 απελευθερώνεται από τη πρωτεΐνη IκB στο

κυτταρόπλασμα και εισέρχεται στο πυρήνα. Στην εικόνα 26 απεικονίζονται τα ισχυρά ιικά επαγόμενα επίπεδα του p65 γύρω από τα γονίδια *OASL* και *CCL5*, ενώ οι αρνητικοί στόχοι, *ACTB* και *MYOD1* παρουσιάζουν χαμηλά πρόσδεσης του p65. Στη συνέχεια η προσοχή εστιάστηκε σε 1705 περιοχές στο γονιδίωμα που παρουσίασαν ισχυρά επαγόμενη πρόσδεση του p65 6 ώρες μετά τη μόλυνση και βρίσκονται απομακρυσμένες από θέσεις έναρξης της μεταγραφής (>2κβ). Στην εικόνα 27 παρουσιάζεται η κατανομή του p65 σήματος γύρω από αυτές τις περιοχές πριν και κατά την εξέλιξη της αντιϊκής απόκρισης. Στη συνέχεια εξετάσαμε τη κατανομή του IRF3 σήματος γύρω από αυτές τις 1705 περιοχές. Παρατηρήθηκε ότι υπάρχει συνεντοπισμός των δύο παραγόντων σε περίπου 600 περιοχές.



Εικόνα 26: Απεικονίζονται τα επίπεδα πρόσδεσης του p65 γύρω από το γονίδιο *OASL* (Α), *CCL5* (Β) *ACTB* (Γ) και *MYOD1* (Δ) πριν καθώς και 3 και 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα HeLa.

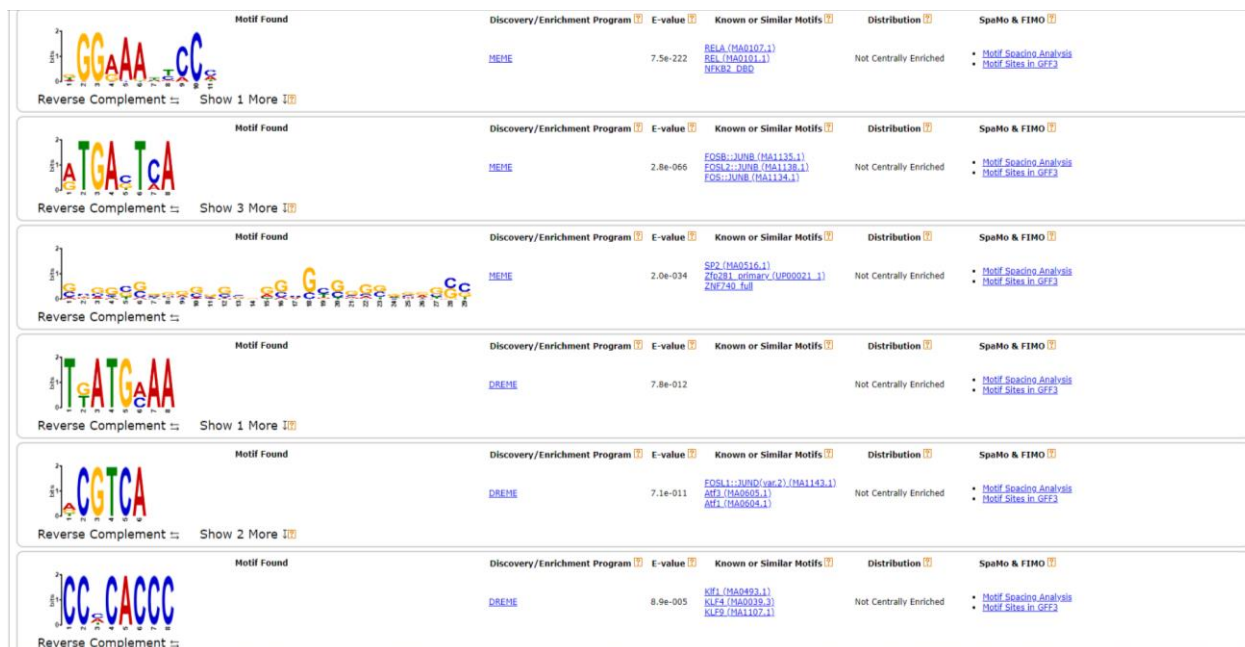


Εικόνα 27: Στα αριστερά παρουσιάζεται η κατανομή της πρόσδεσης του p65 γύρω από τις 1705 απομακρυσμένες από υποκινητές περιοχές με επαγόμενη πρόσδεση του p65 σε κύτταρα HeLa. Στα δεξιά απεικονίζονται τα επίπεδα του IRF3 γύρω από τις 1705 περιοχές.

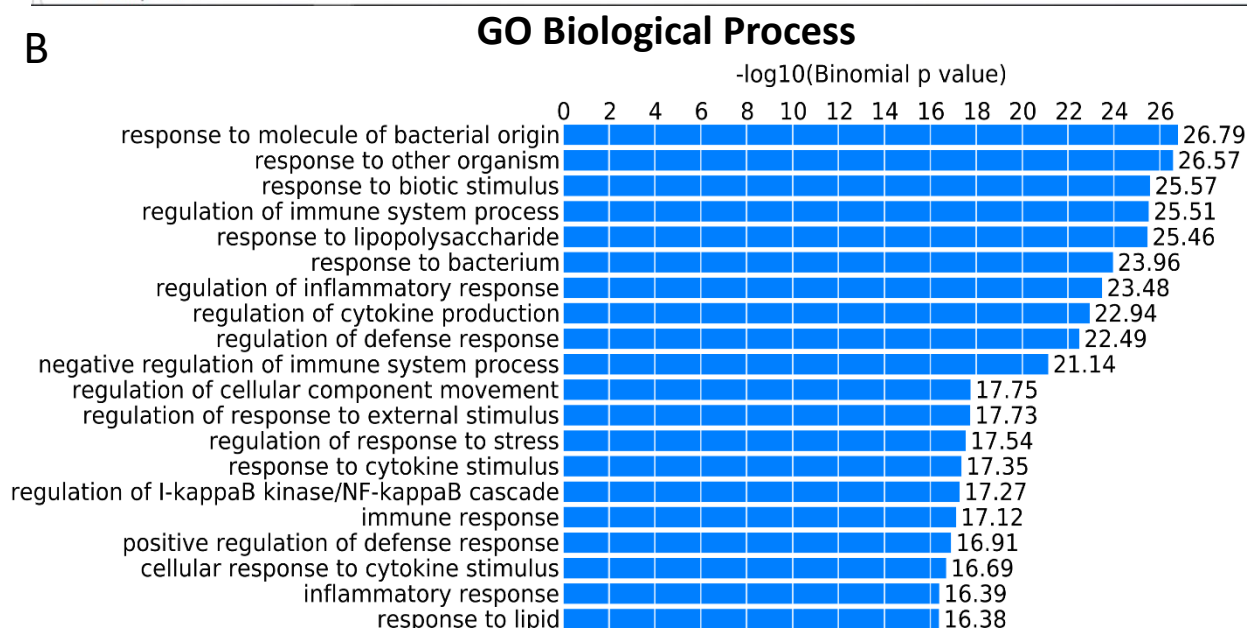
Στη συνέχεια εξετάστηκαν τα υποκείμενα μοτίβα μεταγραφικών παραγόντων στις θέσεις πρόσδεσης του p65. Ως πιο στατιστικά σημαντικό μοτίβο βρέθηκε αυτό του RELA (p65), επιβεβαιώνοντας περαιτέρω την αρτιότητα του πειράματος (εικόνα 28). Επιπλέον βρέθηκαν μοτίβα πρόσδεσης για τους παράγοντες Jun/Fos, που συμμετέχουν στη ρύθμιση της αντιϊκής απόκρισης. Στη συνέχεια εξετάσαμε τις βιολογικές διεργασίες στις οποίες συμμετέχουν τα γονίδια που βρίσκονται εγγύτερα στις επαγόμενες αυτές θέσεις πρόσδεσης του p65. Διαπιστώθηκε ότι τα γονίδια αυτά σχετίζονται με διεργασίες όπως η ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης και γενικότερα με διεργασίες που σχετίζονται με την ανοσολογική

απόκριση. Πράγματι από τη σύγκριση με τα πειράματα RNA-seq προέκυψε ότι από τη λίστα με τα κοντινότερα γονίδια στις 1705 περιοχές πρόσδεσης του p65, 99 είναι επαγόμενα από τον ιό 6 ώρες μετά τη μόλυνση.

A



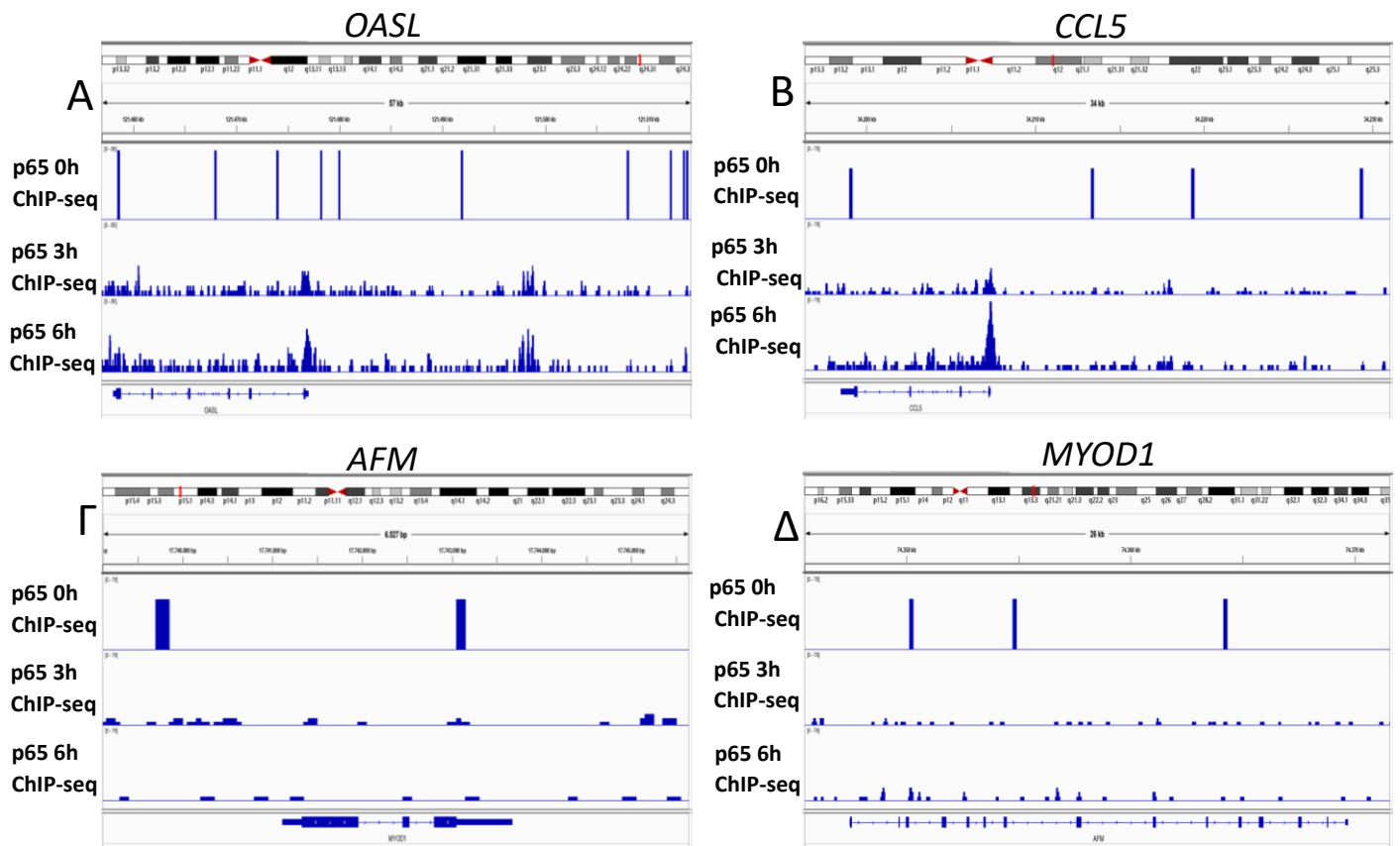
B



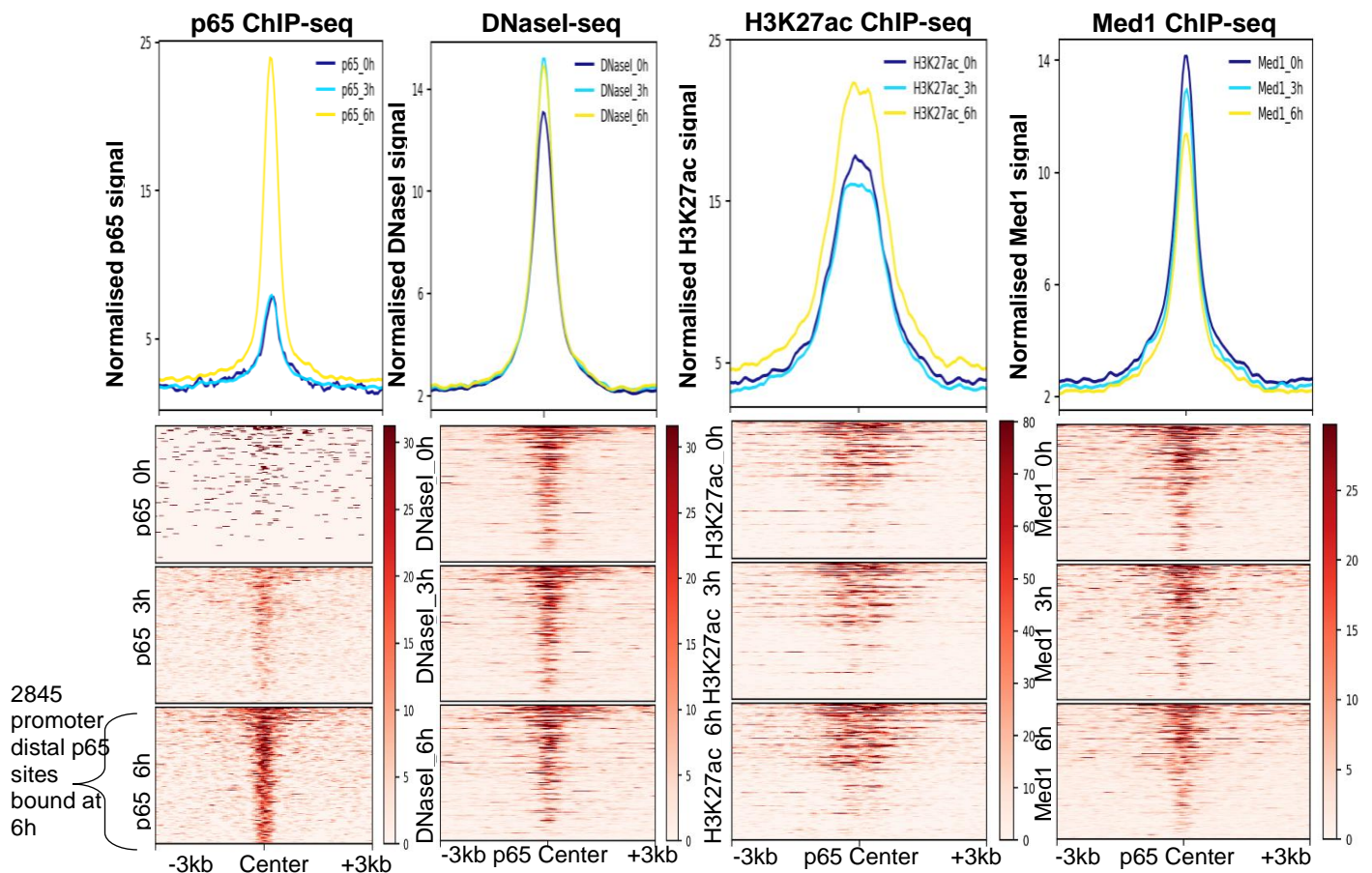
Εικόνα 28: Α) Μοτίβα πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων για τις απομακρυσμένες από υποκινητές περιοχές πρόσδεσης του p65 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα HeLa. Β) Τα αποτελέσματα της ανάλυσης βιολογικών διεργασιών για τα γονίδια που βρίσκονται κοντά στις promoter-distal περιοχές πρόσδεσης του p65 6 ώρες μετά τη μόλυνση.

Πειράματα p65 ChIP-seq σε κύτταρα Namalwa

Για την εύρεση των θέσεων πρόσδεσης του NFκB, ενός από τους κύριους ρυθμιστές της *αντίικης* απόκρισης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ChIP-seq έναντι της υπομονάδας p65 πριν καθώς και 3 και 6 ώρες μετά την *ϊική* μόλυνση. Ανιχνεύτηκαν ισχυρά *ϊικά* επαγόμενα επίπεδα του p65 γύρω από τα γονίδια *OASL* και *CCL5*, ενώ οι αρνητικοί στόχοι, *ACTB* και *MYOD1* παρουσίασαν χαμηλά πρόσδεσης του p65 (εικόνα 29). Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψαν 2845 θέσεις πρόσδεσης του p65 6 ώρες μετά την *ϊική* μόλυνση σε περιοχές απομακρυσμένες από υποκινητές. Για να διαπιστωθεί αν οι θέσεις αυτές φέρουν χαρακτηριστικά των ενεργών ενισχυτών πραγματοποιήθηκε ανάλυση της κατανομής του σήματος των πειραμάτων μας γύρω από αυτές τις περιοχές (εικόνα 30). Προέκυψε ότι η πλειοψηφία των θέσεων πρόσδεσης του NFκB χαρακτηρίζεται από επιπλέον δείκτες των ενεργών ενισχυτών όπως οι τροποποιήσεις H3K27ac και H3K4me1, υψηλά επίπεδα πρόσδεσης του Med1, καθώς επίσης και αυξημένη προσβασιμότητα σύμφωνα με τα πειράματα DNaseI-seq. Αξίζει να σημειωθεί ότι στις περισσότερες από αυτές τις περιοχές τα επίπεδα των δεικτών Med1, H3K27ac, H3K4me1 και DNaseI προϋπάρχουν της μόλυνσης, επομένως φαίνεται ότι ο p65 μετά την είσοδο του στον πυρήνα προσδένεται σε pre-accessible περιοχές της χρωματίνης που φέρουν τροποποιήσεις χαρακτηριστικές των ενεργών ενισχυτών.

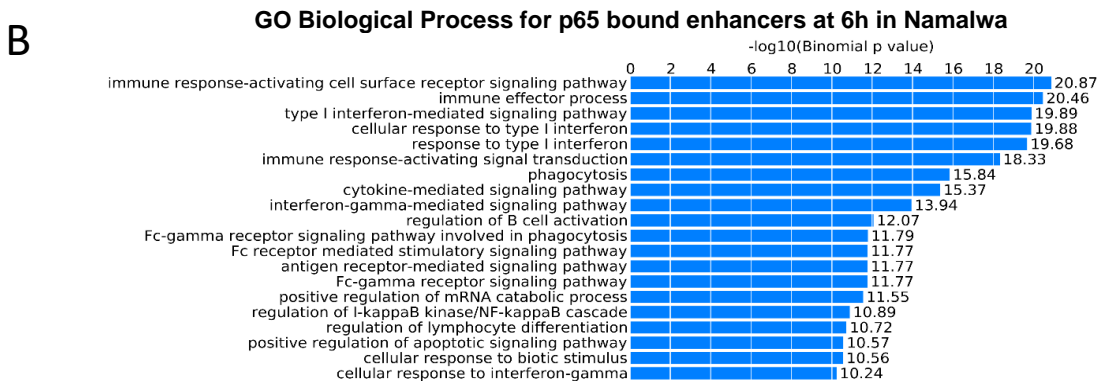
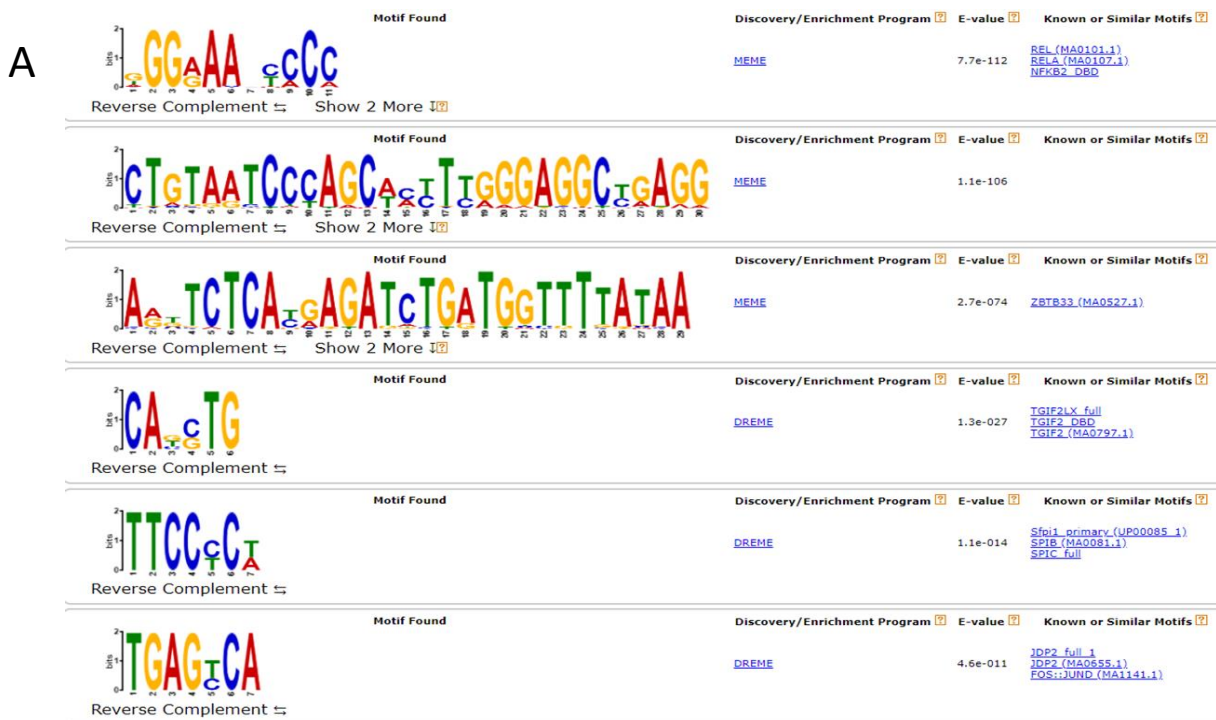


Εικόνα 29 : Απεικονίζονται τα επίπεδα πρόσδεσης του p65 γύρω από το γονίδιο *OASL* (A), *CCL5* (B) *AFM* (Γ) και *MYOD1* (Δ) πριν καθώς και 3 και 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα HeLa.



Εικόνα 30: Παρουσιάζεται η ανακατανομή δεικτών χαρακτηριστικών των ενισχυτών γύρω από τις 2845 απομακρυσμένες από ενισχυτές περιοχές με πρόσδεση του p65 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα Namalwa. Παρατηρήθηκε ότι οι περισσότερες από τις θέσεις αυτές φέρουν υψηλά επίπεδα σήματος για τους δείκτες H3K27ac και Med1 και είναι προσβάσιμες σύμφωνα με πειράματα DNaseI-seq ήδη πριν τη μόλυνση των κυττάρων από τον ιό.

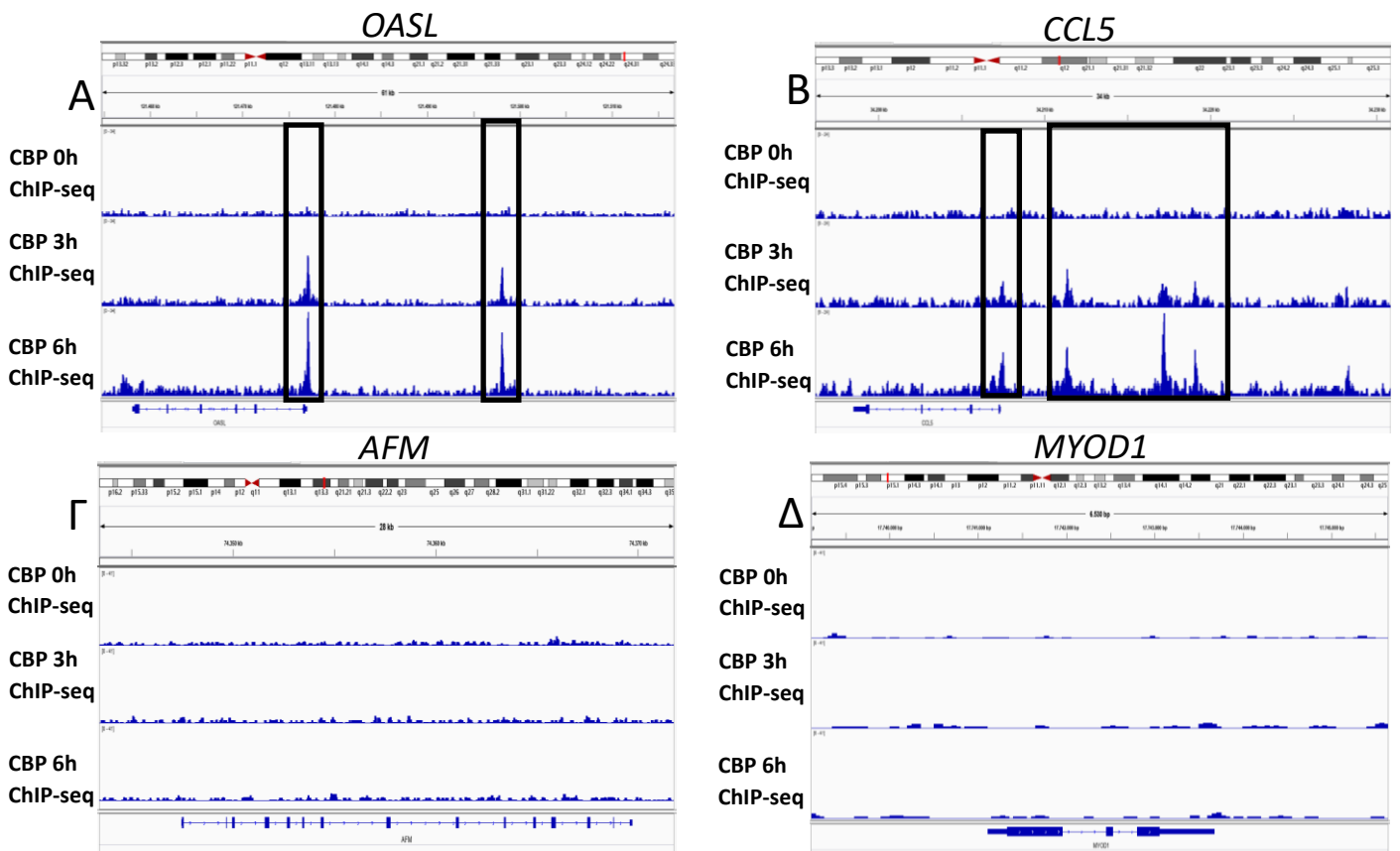
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση μοτίβων για μεταγραφικούς παράγοντες στις θέσεις πρόσδεσης του p65 6 ώρες μετά τη μόλυνση. Διαπιστώθηκε ότι το πιο στατιστικά σημαντικό μοτίβο ήταν αυτό του p65, γεγονός που φανερώνει την αξιοπιστία του πειράματος (εικόνα 31). Από τη λίστα των μοτίβων ξεχωρίζει και αυτό για τους παράγοντες Fos/Jun που συμμετέχουν στην αντίκη απόκριση. Τέλος βρέθηκε ότι οι βιολογικές διεργασίες για τα γονίδια που βρίσκονται κοντά στις θέσεις πρόσδεσης του p65 σχετίζονται με την απόκριση σε τύπου I ιντερφερόνες, με το μονοπάτι των κυτοκινών και γενικότερα με διεργασίες του ανοσοποιητικού συστήματος (εικόνα 31).



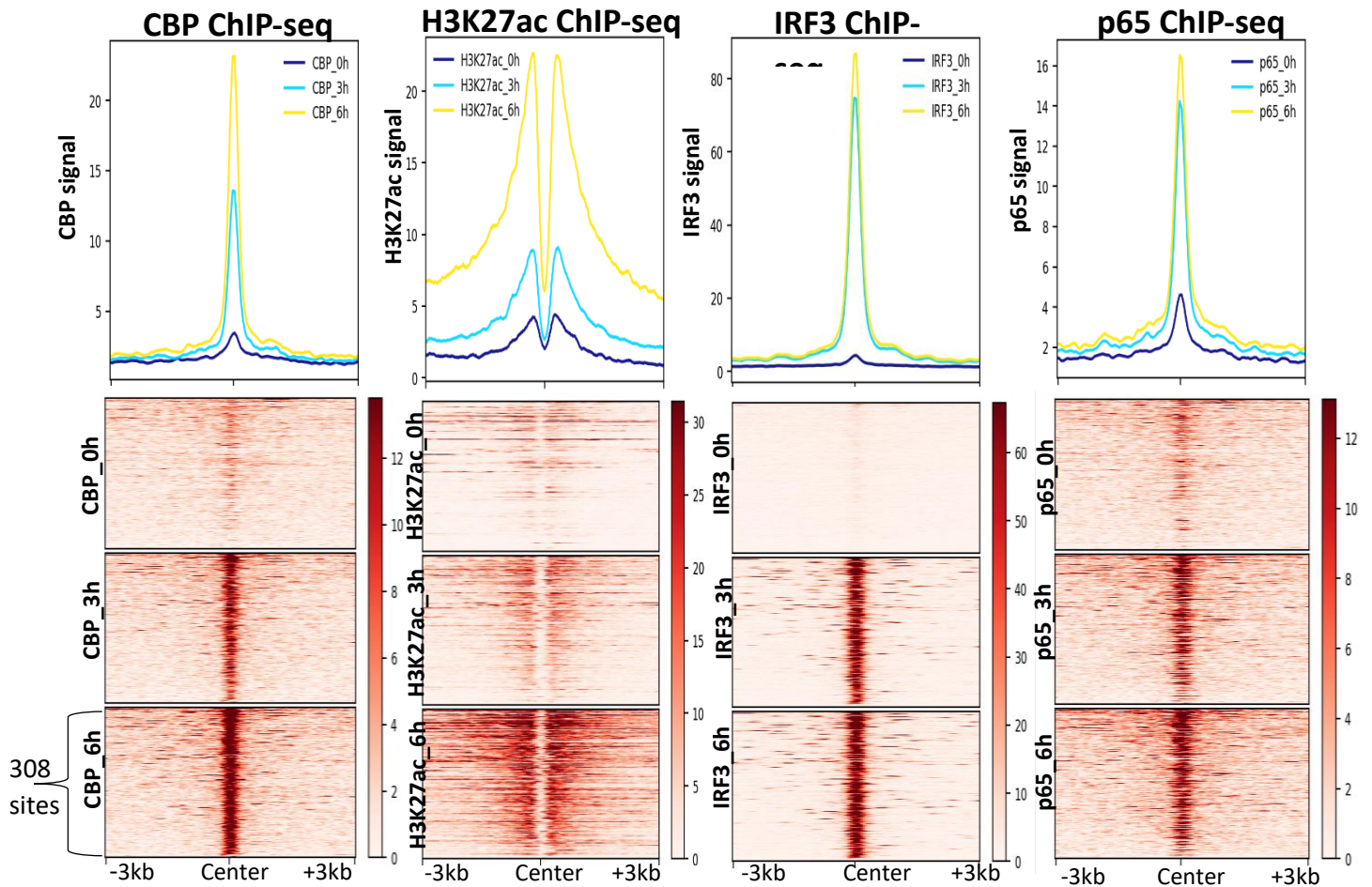
Εικόνα 31: Α) Μοτίβα πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων για τις απομακρυσμένες από υποκινητές περιοχές πρόσδεσης του p65 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα Namalwa. Β) Τα αποτελέσματα της ανάλυσης βιολογικών διεργασιών για τα γονίδια που βρίσκονται κοντά στις promoter-distal περιοχές πρόσδεσης του p65 6 ώρες μετά τη μόλυνση.

Πειράματα CBP ChIP-seq σε κύτταρα HeLa

Για να μελετήσουμε την ανακατανομή των θέσεων πρόσδεσης του CBP κατά τη εξέλιξη της αντιϊκής απόκρισης πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης σε συνδυασμό με αλληλούχιση νέας γενιάς (ChIP-seq) πριν όσο και 3 και 6 ώρες μετά τη μόλυνση των κυττάρων με ιό Sendai σε κύτταρα HeLa. Μετά τον έλεγχο του CBP σήματος σε γονίδια δείκτες (εικόνα 32) η προσοχή εστιάστηκε σε 308 περιοχές στο γονιδίωμα που παρουσίασαν ισχυρά επαγόμενη πρόσδεση του CBP 6 ώρες μετά τη μόλυνση και βρίσκονται απομακρυσμένες από θέσεις έναρξης της μεταγραφής (>2κβ). Στην εικόνα 33 παρουσιάζεται η κατανομή του CBP σήματος γύρω από αυτές τις περιοχές πριν και κατά την εξέλιξη της αντιϊκής απόκρισης. Αρχικά εξετάστηκε η κατανομή του H3K27ac σήματος γύρω από τις 308 περιοχές και διαπιστώθηκε ότι η πλειοψηφία των επαγόμενων θέσεων πρόσδεσης του CBP φέρει και επαγόμενα επίπεδα H3K27ac. Το γεγονός ότι η επαγόμενη στρατολόγηση του CBP συνοδεύεται από επαγόμενα επίπεδα H3K27ac υποδηλώνει ότι ο CBP έχει πιθανότατα λειτουργικό ρόλο στις παραπάνω θέσεις καταλύοντας την εναπόθεση της H3K27ac. Στη συνέχεια εξετάσαμε τη κατανομή των IRF3 και p65 σημάτων γύρω από αυτές τις 308 περιοχές. Παρατηρήθηκε ότι υπάρχει συνεντοπισμός των τριών παραγόντων σε πολλές θέσεις.

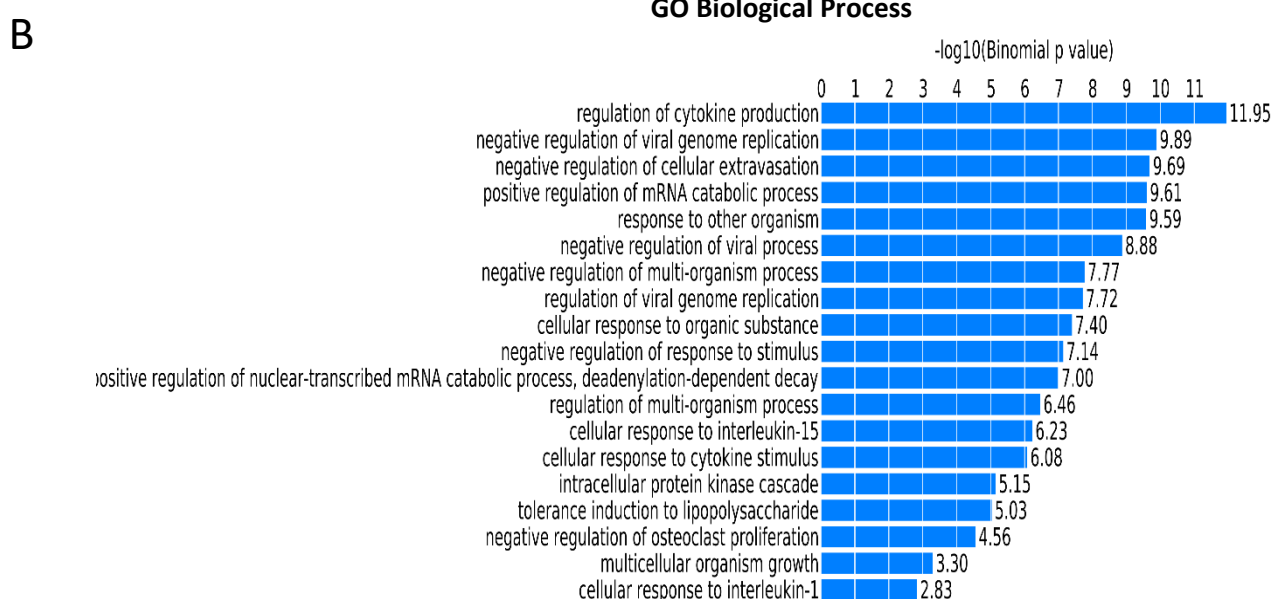
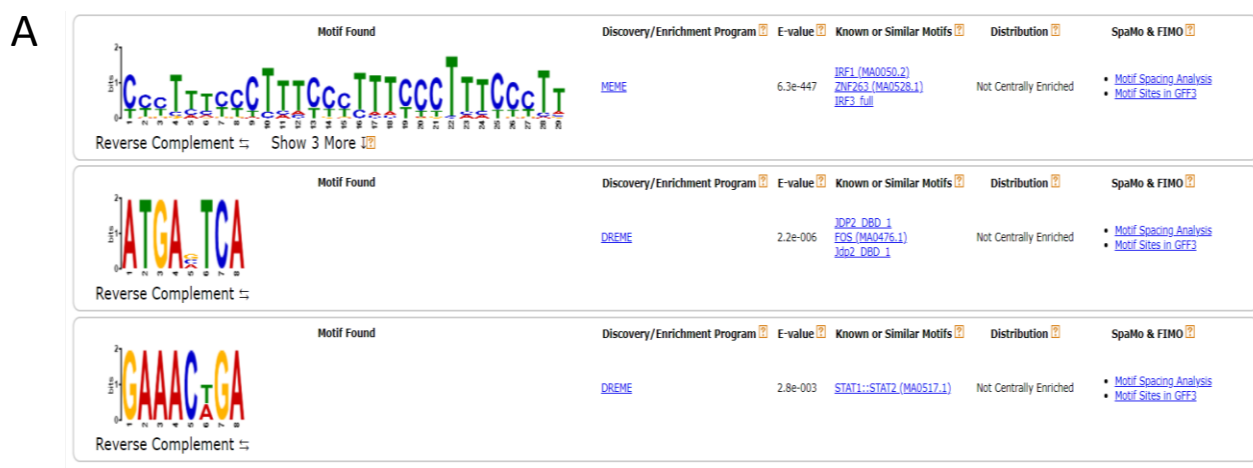


Εικόνα 32: Απεικονίζονται τα επίπεδα πρόσδεσης του CBP γύρω από το γονίδιο *OASL* (A), *CCL5* (B) *AFM* (Γ) και *MYOD1* (Δ) πριν καθώς και 3 και 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα HeLa.



Εικόνα 33: Στα αριστερά παρουσιάζεται η κατανομή της πρόσδεσης του CBP γύρω από τις 308 απομακρυσμένες από υποκινητές περιοχές με επαγόμενη πρόσδεση του CBP σε κύτταρα HeLa. Στο κέντρο απεικονίζονται τα επίπεδα των H3K27ac και IRF3 και δεξιά τα επίπεδα του p65 γύρω από τις 308 περιοχές.

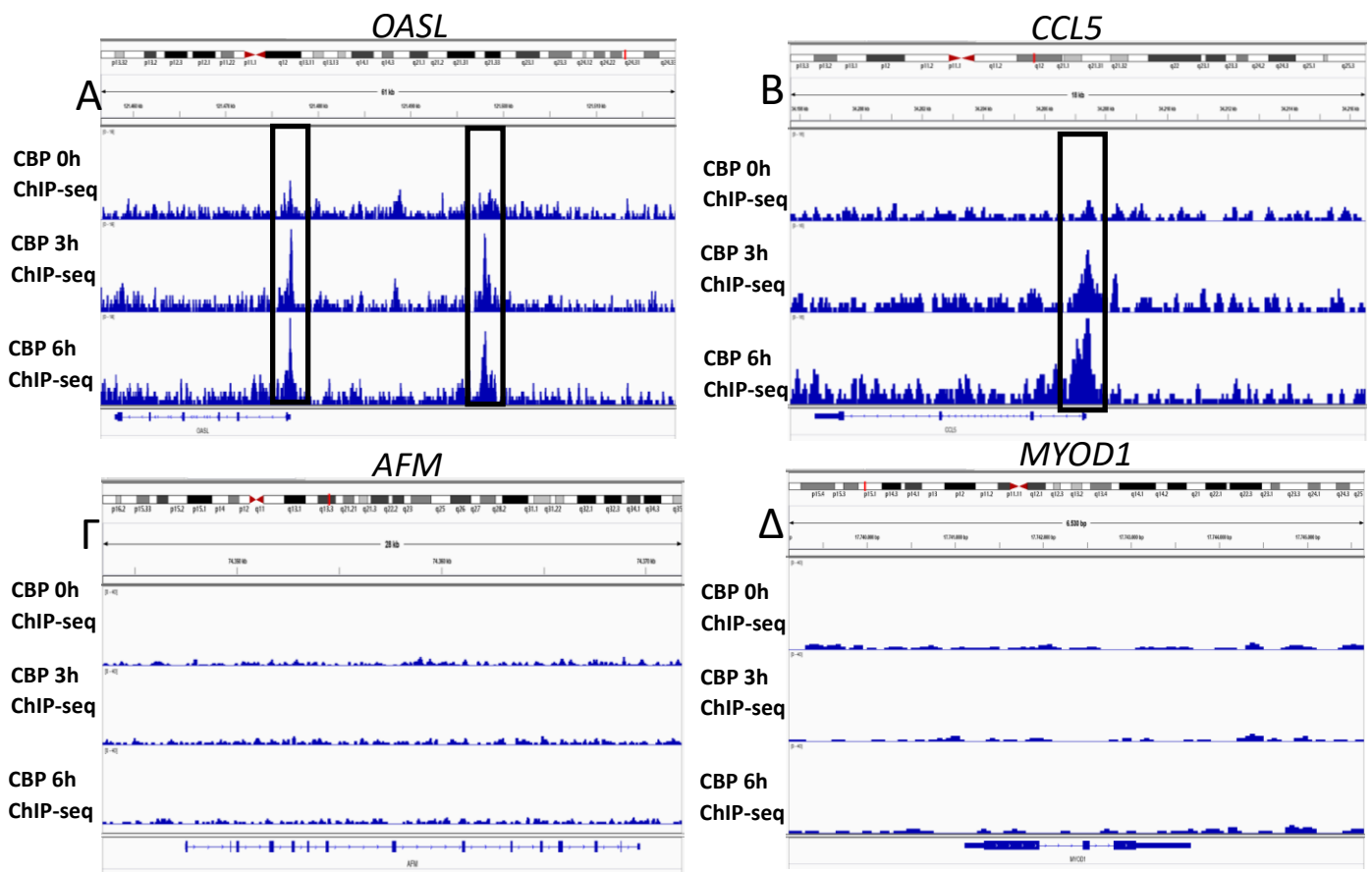
Έπειτα εξετάστηκαν τα υποκείμενα μοτίβα μεταγραφικών παραγόντων στις θέσεις πρόσδεσης του CBP. Ως πιο στατιστικά σημαντικό μοτίβο βρέθηκε αυτό της οικογένειας των IRF (εικόνα 34). Επιπλέον βρέθηκαν μοτίβα πρόσδεσης για τους παράγοντες Jun/Fos, που συμμετέχουν στη ρύθμιση της αντιϊκής απόκρισης. Στη συνέχεια εξετάσαμε τις βιολογικές διεργασίες στις οποίες συμμετέχουν τα γονίδια που βρίσκονται εγγύτερα στις επαγόμενες αυτές θέσεις πρόσδεσης του CBP. Διαπιστώθηκε ότι τα γονίδια αυτά σχετίζονται με διεργασίες όπως η παραγωγή κυτοκινών, η ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης και γενικότερα με διεργασίες που σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση. Πράγματι από τη σύγκριση με τα πειράματα RNA-seq προέκυψε ότι από τη λίστα με τα κοντινότερα γονίδια στις 308 περιοχές πρόσδεσης του CBP, 106 είναι επαγόμενα από τον ιό 6 ώρες μετά τη μόλυνση.



Εικόνα 34: A) Μοτίβα πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων για τις απομακρυσμένες από υποκινητές περιοχές πρόσδεσης του CBP 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα HeLa. B) Τα αποτελέσματα της ανάλυσης βιολογικών διεργασιών για τα γονίδια που βρίσκονται κοντά στις promoter-distal περιοχές πρόσδεσης του CBP 6 ώρες μετά τη μόλυνση.

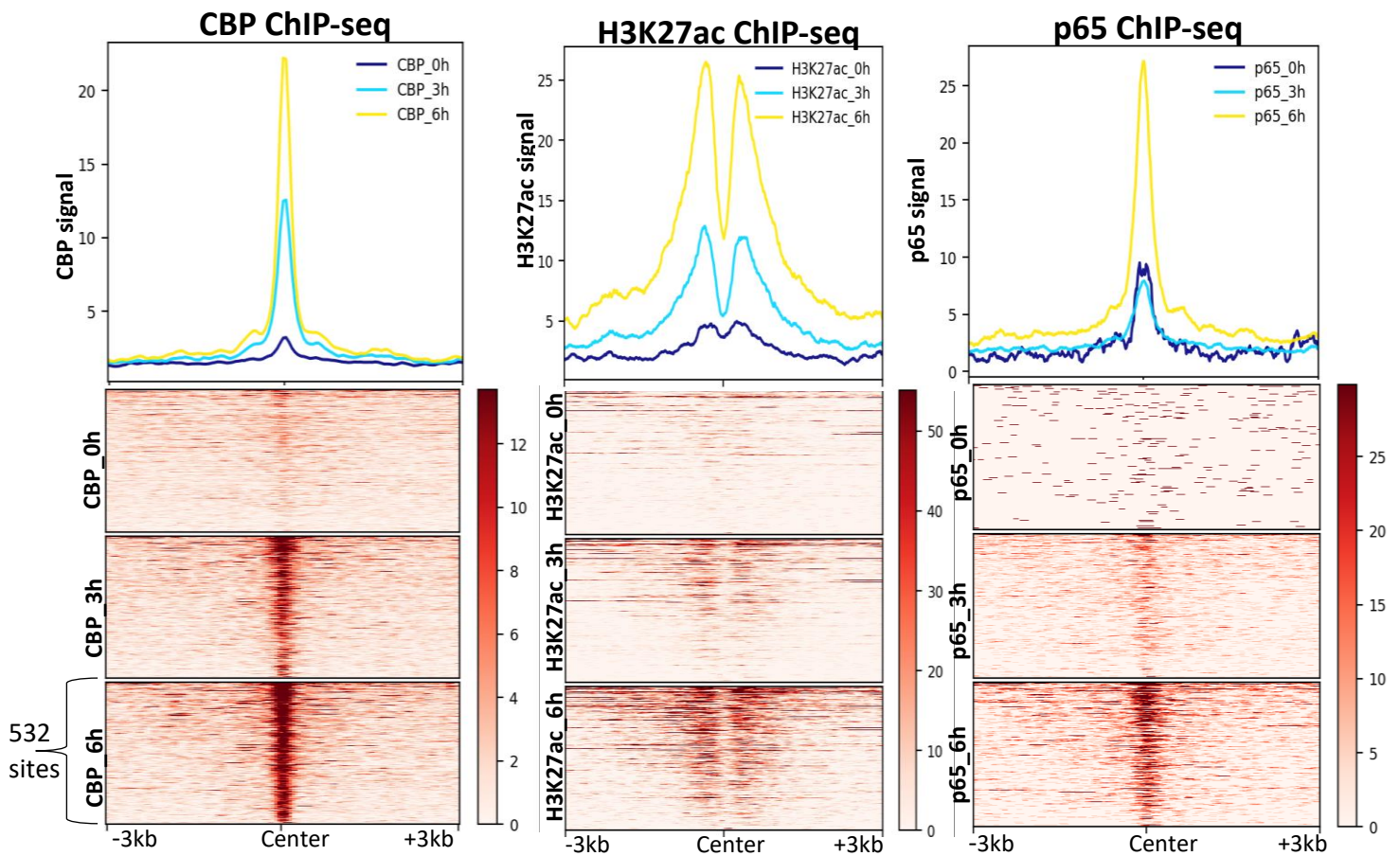
Πειράματα CBP ChIP-seq σε κύτταρα Namalwa

Για να μελετήσουμε την ανακατανομή των θέσεων πρόσδεσης του CBP κατά τη εξέλιξη της αντιϊκής απόκρισης πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης σε συνδυασμό με αλληλούχιση νέας γενιάς (ChIP-seq) πριν όσο και 3 και 6 ώρες μετά τη μόλυνση των κυττάρων με ιό Sendai σε κύτταρα Namalwa. Μετα τον αρχικό έλεγχο ποιότητας με απεικόνιση του CBP σήματος γύρω από χαρακτηριστικά γονίδια (εικόνα 35) εντοπίστηκαν 532 περιοχές στο γονιδίωμα που παρουσίασαν ισχυρά επαγόμενη πρόσδεση του CBP 6 ώρες μετά τη μόλυνση και βρίσκονται απομακρυσμένες από θέσεις έναρξης της μεταγραφής (>2κβ). Στην εικόνα 36 παρουσιάζεται η κατανομή του CBP σήματος γύρω από αυτές τις περιοχές πριν και κατά την εξέλιξη της αντιϊκής απόκρισης.



Εικόνα 35: Παρουσιάζονται τα επίπεδα πρόσδεσης του CBP γύρω από το γονίδιο *OASL* (A), *CCL5* (B) *AFM* (Γ) και *MYOD1* (Δ) πριν καθώς και 3 και 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα Namalwa.

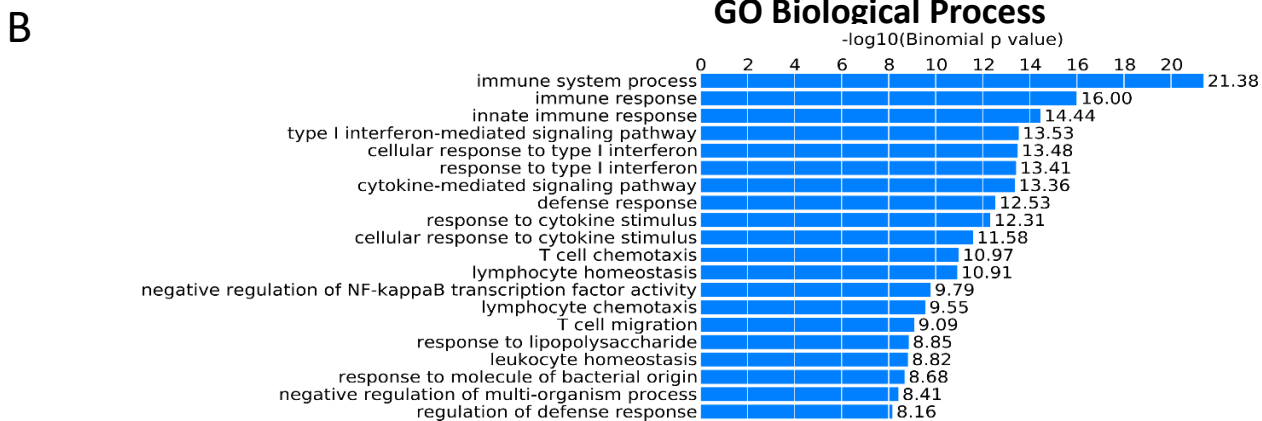
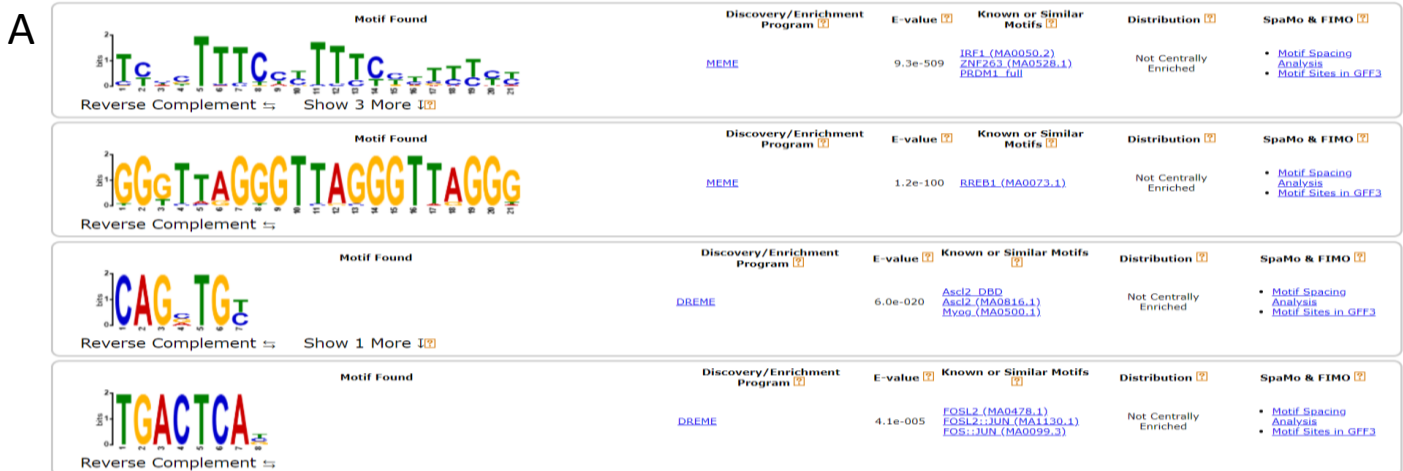
Αρχικά εξετάστηκε η κατανομή του H3K27ac σήματος γύρω από τις 532 περιοχές και διαπιστώθηκε ότι η πλειοψηφία των επαγόμενων θέσεων πρόσδεσης του CBP φέρει και επαγόμενα επίπεδα H3K27ac. Το γεγονός ότι η επαγόμενη στρατολόγηση του CBP συνοδεύεται από επαγόμενα επίπεδα H3K27ac υποδηλώνει ότι ο CBP έχει πιθανότατα λειτουργικό ρόλο στις παραπάνω θέσεις καταλύοντας την εναπόθεση της H3K27ac.



Εικόνα 36: Στα αριστερά παρουσιάζεται η κατανομή της πρόσδεσης του CBP γύρω από τις 532 απομακρυσμένες από υποκινητές περιοχές με επαγόμενη πρόσδεση του CBP σε κύτταρα Namalwa. Στα δεξιά απεικονίζονται τα επίπεδα του p65 γύρω από τις 532 περιοχές.

Στη συνέχεια εξετάσαμε τη κατανομή των επιπέδων p65 γύρω από αυτές τις 532 περιοχές. Παρατηρήθηκε ότι υπάρχει συνεντοπισμός του CBP και του p65 σε πολλές θέσεις. Έπειτα εξετάστηκαν τα υποκείμενα μοτίβα μεταγραφικών παραγόντων στις θέσεις πρόσδεσης του CBP. Ως πιο στατιστικά σημαντικό μοτίβο βρέθηκε αυτό της οικογένειας των IRF (εικόνα 37). Επιπλέον βρέθηκαν μοτίβα πρόσδεσης για τους παράγοντες Jun/Fos, που συμμετέχουν στη ρύθμιση της *αντιϊκής*

απόκρισης. Στη συνέχεια εξετάσαμε τις βιολογικές διεργασίες στις οποίες συμμετέχουν τα γονίδια που βρίσκονται εγγύτερα στις επαγόμενες αυτές θέσεις πρόσδεσης του CBP. Διαπιστώθηκε ότι τα γονίδια αυτά σχετίζονται με διεργασίες όπως το μονοπάτι των ιντερφερονών, η παραγωγή κυτοκινών και γενικότερα με διεργασίες που σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση. Πράγματι από τη σύγκριση με τα πειράματα RNA-seq προέκυψε ότι από τη λίστα με τα κοντινότερα γονίδια στις 532 περιοχές πρόσδεσης του CBP, 80 είναι επαγόμενα από τον ιό 6 ώρες μετά τη μόλυνση.

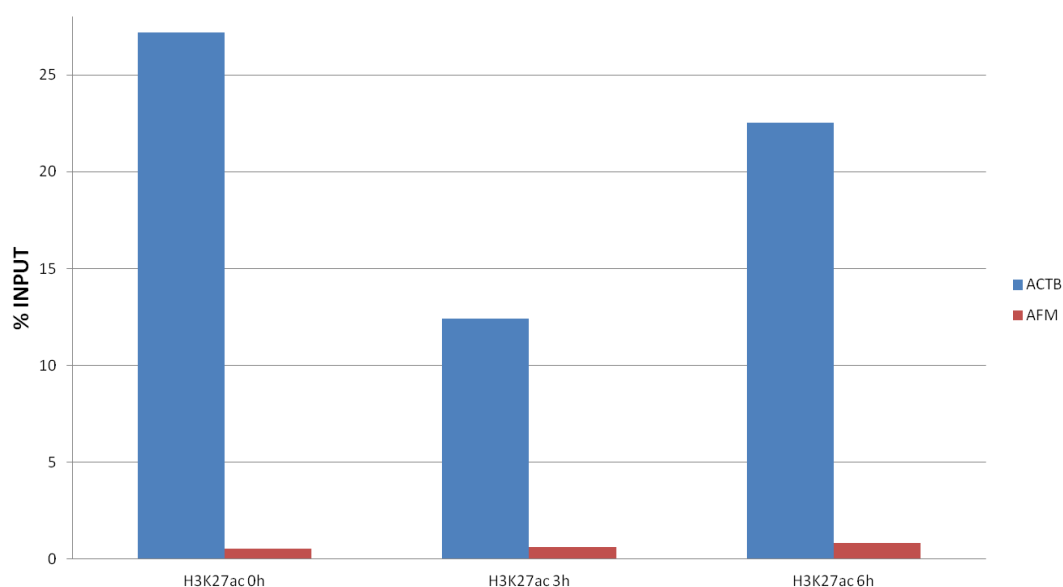


Εικόνα 37: Α) Μοτίβα πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων για τις απομακρυσμένες από υποκινητές περιοχές πρόσδεσης του CBP 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα Namalwa. Β) Τα αποτελέσματα της ανάλυσης βιολογικών διεργασιών για τα γονίδια που βρίσκονται κοντά στις promoter-distal περιοχές πρόσδεσης του CBP 6 ώρες μετά τη μόλυνση.

Πειράματα H3K27ac ChIP-seq σε κύτταρα Namalwa

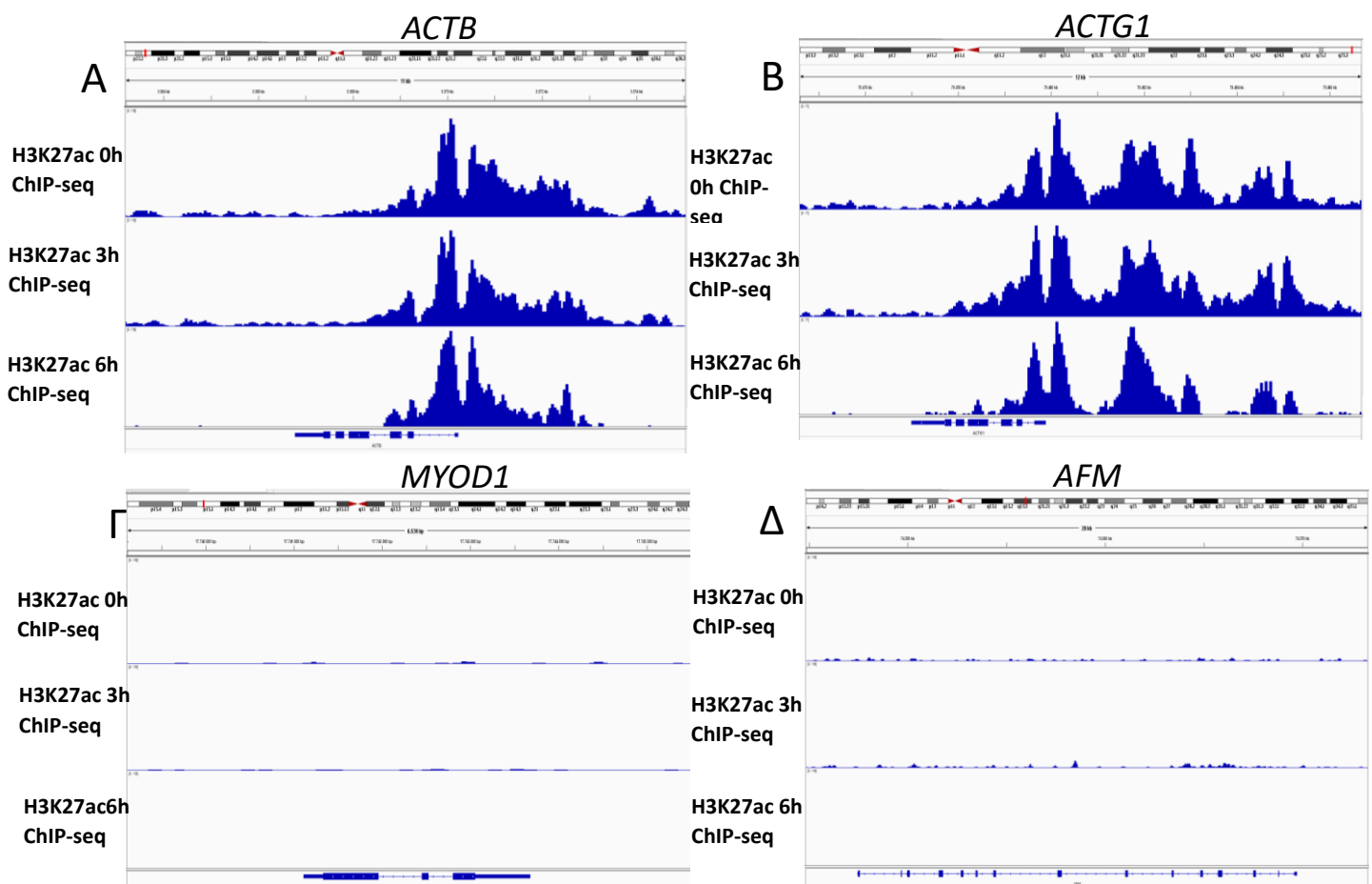
Για την ταυτοποίηση των ενισχυτών που συντονίζουν την *αντιική* κυτταρική απόκριση πραγματοποιήθηκαν πειράματα ChIP-seq έναντι της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac που αποτελεί δείκτη των ενεργών ενισχυτών. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στα χρονικά σημεία 0 ώρες (μη μολυσμένα κύτταρα), 3 και 6

ώρες μετά τη μόλυνση των κυττάρων με ιό Sendai. Πριν το στάδιο της αλληλούχισης πραγματοποιήθηκε έλεγχος για την εξακρίβωση της αποτελεσματικότητας του σταδίου της ανοσοκατακρήμισης με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο χρησιμοποιώντας γνωστούς θετικούς και αρνητικούς στόχους (εικόνα 38). Διαπιστώθηκε ισχυρός και ανεξάρτητος της ιϊκής μόλυνσης εμπλουτισμός για το στόχο που βρίσκεται στον υποκινητή του γονιδίου κυτταρικής οικονομίας *ACTB*. Αντίθετα ο εμπλουτισμός ήταν σταθερά χαμηλός πριν και κατά τη διάρκεια της μόλυνσης για τον αρνητικό στόχο που βρίσκεται μέσα στο μη εκφραζόμενο γονίδιο *MYOD1*. Μετά το πέρας της αλληλούχισης για να εξακριβώσουμε τη ποιότητα των πειραμάτων στα κύτταρα Namalwa αρχικά μελετήσαμε τα επίπεδα H3K27c γύρω από αναμενόμενους θετικούς και αρνητικούς στόχους (εικόνα 39). Τα επίπεδα πρόσδεσης της H3K27ac ήταν υψηλά και σταθερά πριν και κατά την εξέλιξη της μόλυνσης γύρω από τις θέσεις έναρξης της μεταγραφής των γονιδίων *ACTB* και *ACTG1*, γεγονός αναμενόμενο καθώς τα συγκεκριμένα είναι γονίδια κυτταρικής οικονομίας με σταθερά και υψηλά επίπεδα έκφρασης ανεξάρτητα της μόλυνσης. Αντίθετα τα επίπεδα H3K27ac ήταν χαμηλά γύρω από τις θέσεις έναρξης της μεταγραφής των γονιδίων *MYOD1* και *AFM* καθώς τα συγκεκριμένα γονίδια εκφράζονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα στα κύτταρα Namalwa.

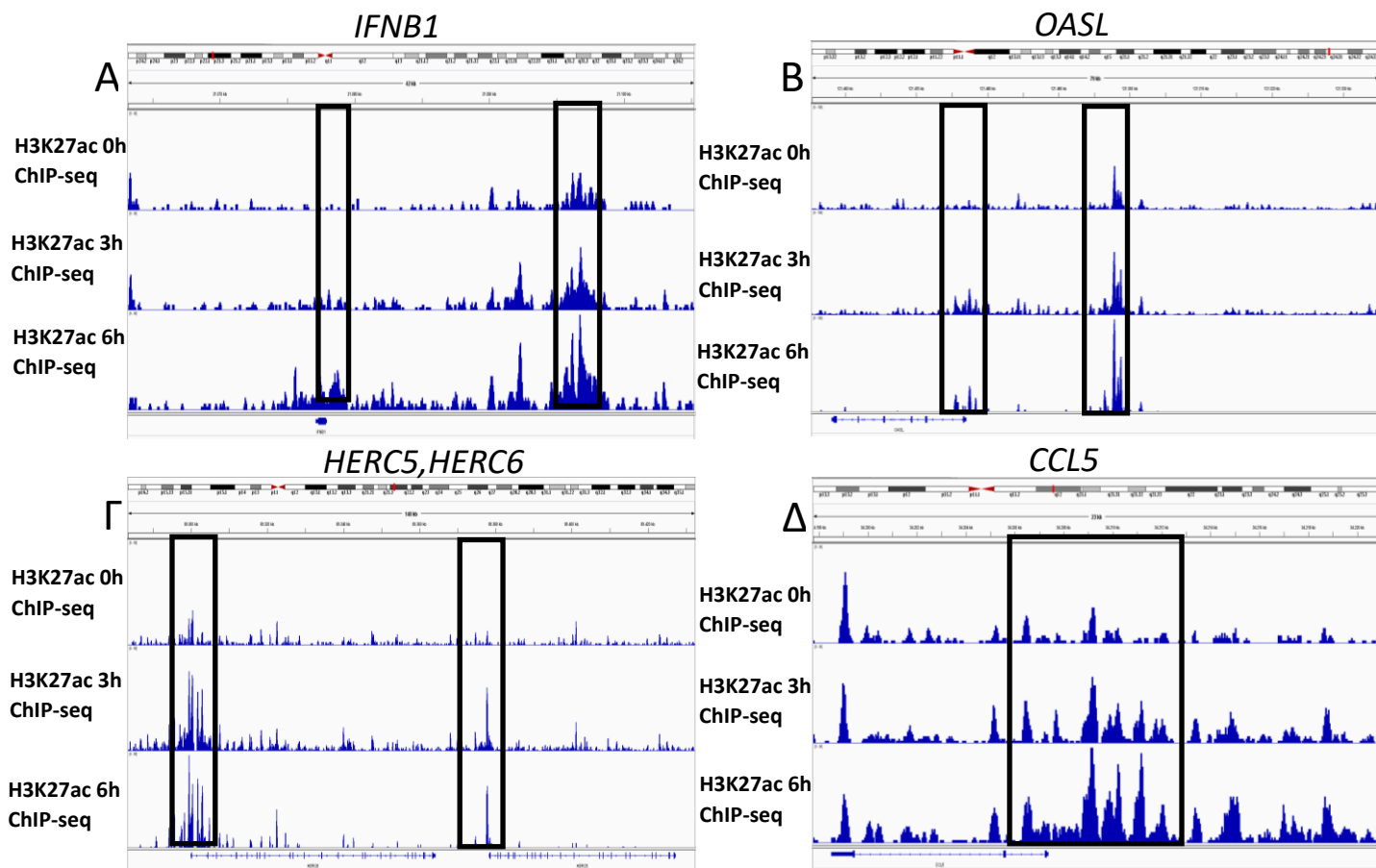


Εικόνα 38 : Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο για την εξακρίβωση της ποιότητας της ανοσοκατακρήμισης έναντι της H3K27ac σε κύτταρα Namalwa.

Στη συνέχεια μέσω ανάλυσης των αποτελεσμάτων με μεθόδους βιοπληροφορικής ταυτοποιήθηκαν οι περιοχές του γονιδιώματος με επαγόμενα επίπεδα H3K27ac 6 ώρες μετά τη μόλυνση. Στην εικόνα 40 απεικονίζονται τα επαγόμενα επίπεδα H3K27ac γύρω από το χαρακτηρισμένο ενισχυτή που βρίσκεται 20 κβ ανοδικά του *IFNB1* και τον ενισχυτή που βρίσκεται 20 κβ ανοδικά του *OASL*. Επιπλέον απεικονίζονται τα επίπεδα H3K27ac γύρω από τους υποκινητές των επαγόμενων γονιδίων *HERC5*, *HERC6* και *CCL5*. Από την ανάλυση αυτή προέκυψαν 2021 απομακρυσμένες από υποκινητές περιοχές που παρουσιάζουν επαγόμενα επίπεδα H3K27ac 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα Namalwa και αποτελούν πιθανούς επαγόμενους ενισχυτές. Τα επίπεδα H3K27ac γύρω από αυτούς τους 2021 ενισχυτές παρουσιάζονται στην εικόνα 41A.

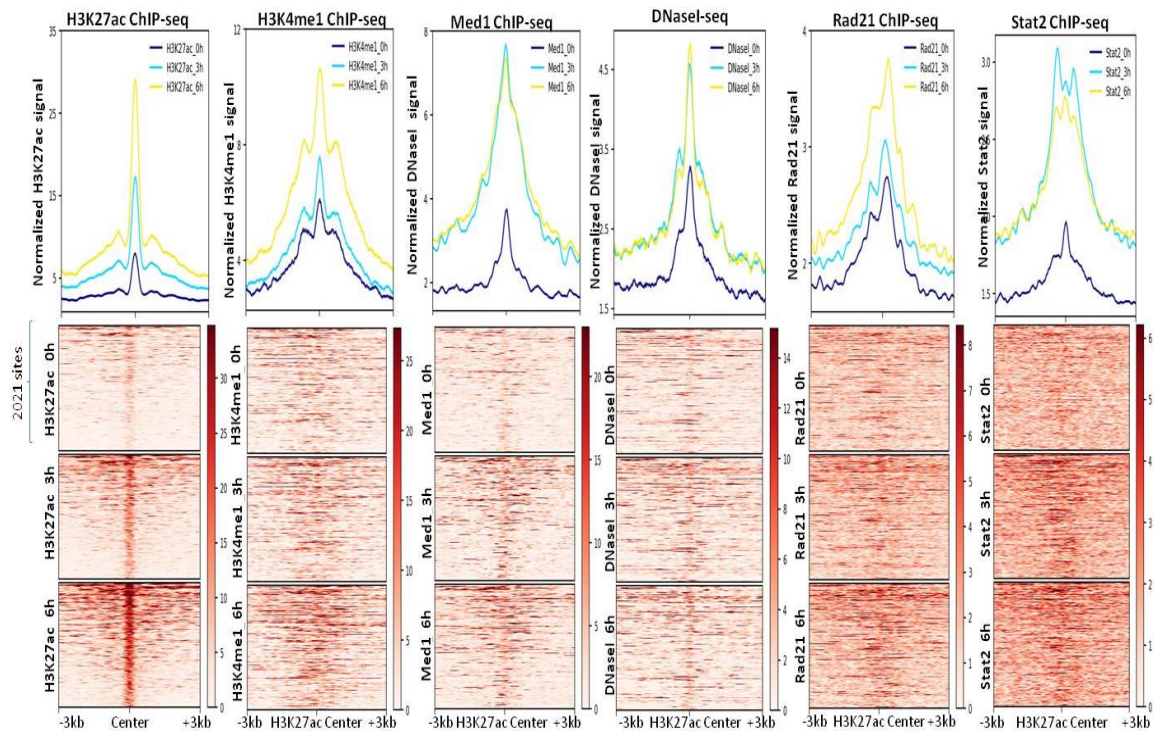


Εικόνα 39: Παρουσιάζονται τα επίπεδα H3K27ac στους υποκινητές των γονιδίων *ACTB*, *ACTG1*, *MYOD1* και *AFM* πριν καθώς και 3 και 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα Namalwa.

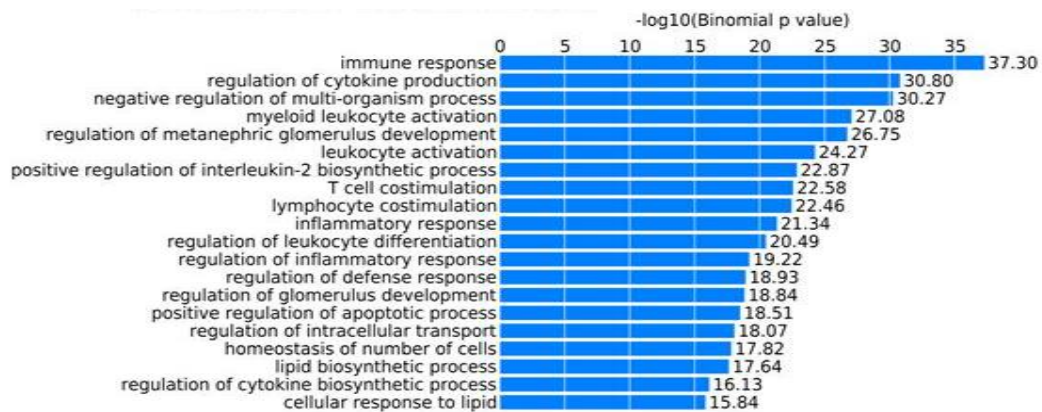


Εικόνα 40: Παρουσιάζονται τα επαγόμενα επίπεδα H3K27ac στους ενισχυτές των γονιδίων *IFNB1*, *OASL*, *HERC5*, *HERC6*, *CCL5* πριν καθώς και 3 και 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα Namalwa.

A



B



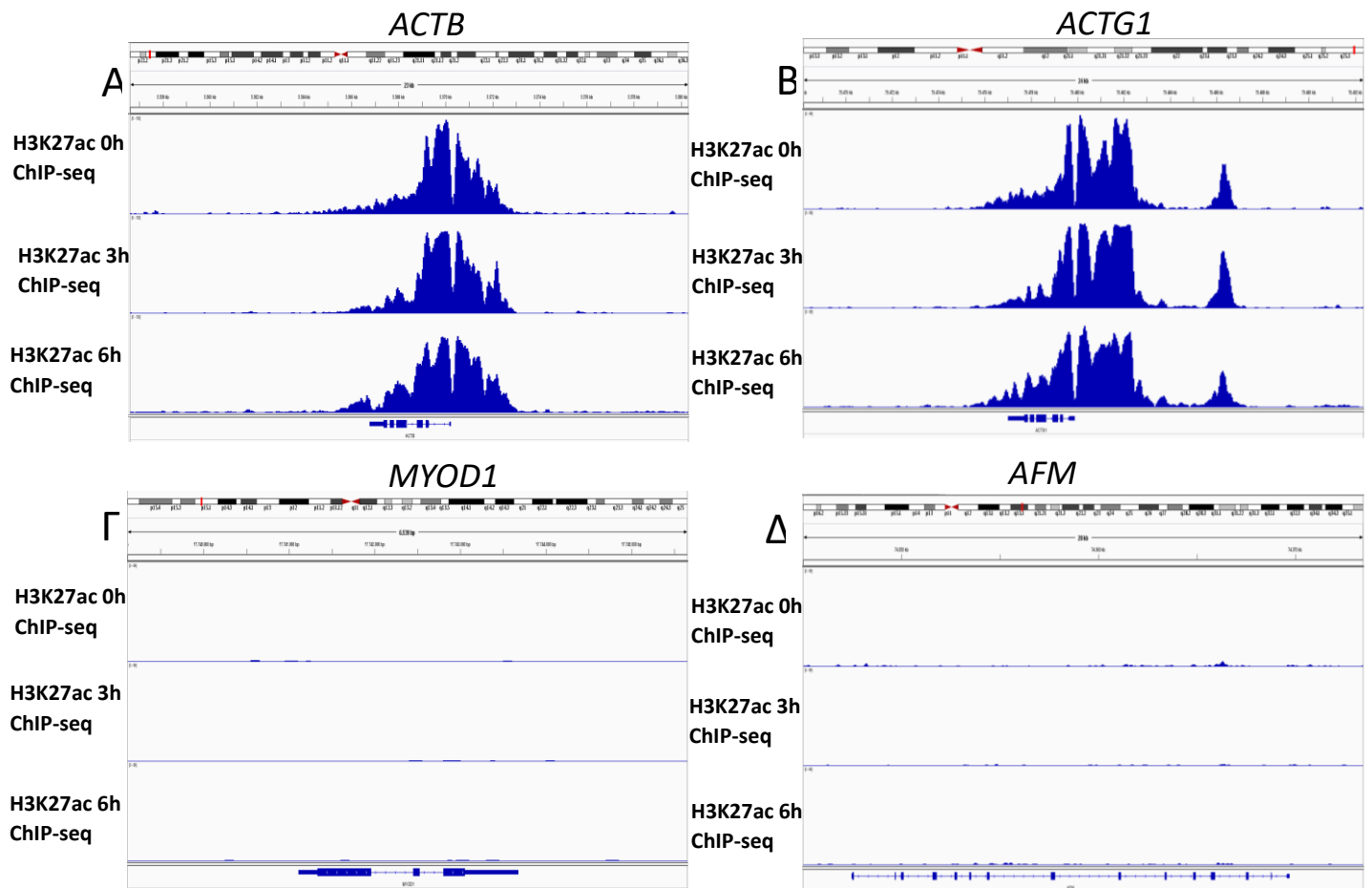
Εικόνα 41:Α) Παρουσιάζεται η ανακατανομή επιγονιδιωματικών δεικτών γύρω από τις 2021 απομακρυσμένες από υποκινητές περιοχές με επαγόμενα επίπεδα H3K27ac 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα Namalwa. Παρατηρείται ότι οι περιοχές αυτές φέρουν επιπλέον δείκτες χαρακτηριστικούς των ενεργών ενισχυτών όπως H3K4me1, Med1, Rad21, Stat2 και είναι προσβάσιμες σύμφωνα με τα πειράματα DNaseI-seq. Σε πολλές από τις περιοχές αυτές οι δείκτες εμφανίζουν επαγόμενα επίπεδα μετά τη μόλυνση. Β) Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των βιολογικών διεργασιών για τα γονίδια που βρίσκονται κοντά στις περιοχές με επαγόμενα επίπεδα H3K27ac.

Στη λίστα αυτών των πιθανών ενισχυτών περιλαμβάνονται ο χαρακτηρισμένος, επαγόμενος ενισχυτής που βρίσκεται 20kb άνωθεν του υποκινητή της *IFNB1* (Banerjee *et al.*, 2014), καθώς και αυτός που βρίσκεται 8 kb άνωθεν του TNF (Chow *et al.*, 2014). Στη συνέχεια εξετάστηκε αν οι περιοχές με επαγόμενα επίπεδα H3K27ac φέρουν επιπλέον δείκτες χαρακτηριστικούς των ενισχυτών μέσω αξιολόγησης του σήματος από τα πειράματα Med1 ChIP-seq, H3K4me1 ChIP-seq, Rad21 ChIP-seq, Stat2 ChIP-seq και DNaseI-seq γύρω από το κέντρο των 2021 περιοχών με επαγόμενα επίπεδα H3K27ac (εικόνα 41). Αρχικά παρατηρήθηκε ότι ένας μεγάλος αριθμός των θέσεων αυτών (381 περιοχές) παρουσιάζει επαγόμενη στρατολόγηση του συνεργοποιητή Med1. Επιπλέον οι περιοχές αυτές φέρουν το χαρακτηριστικό δείκτη των ενισχυτών H3K4me1 και είναι επίσης προσβάσιμες σύμφωνα με τα πειράματα DNaseI-seq. Τέλος ένα ποσοστό των περιοχών αυτών χαρακτηρίζεται από πρόσδεση της υπομονάδας Rad21 της cohesin καθώς και από επαγόμενη πρόσδεση των παραγόντων Stat2 και p65. Διαπιστώθηκε επομένως ότι οι περιοχές που παρουσιάζουν επαγόμενα επίπεδα H3K27ac φέρουν και επιπλέον δείκτες χαρακτηριστικούς των ενισχυτών γεγονός που ενισχύει το πιθανό ρυθμιστικό ρόλο τους στην *αντιϊκή* απόκριση. Για την περαιτέρω εξακρίβωση αυτού του ενδεχόμενου πραγματοποιήθηκε ανάλυση γονιδιακής οντολογίας για τα κοντινότερα γονίδια στις 2021 περιοχές με επαγόμενα επίπεδα H3K27ac (εικόνα 41B). Διαπιστώθηκε ότι η λίστα των γονιδίων αυτών είναι εμπλουτισμένη για γονίδια που συμμετέχουν μεταξύ άλλων στην παραγωγή κυτοκινών, στη φλεγμονώδη απόκριση και γενικότερα στην ανοσολογική απόκριση των κυττάρων. Για την επιβεβαίωση των παραπάνω πραγματοποιήθηκε σύγκριση των γονιδίων που βρίσκονται κοντά σε επαγόμενες H3K27ac θέσεις με τα γονίδια των οποίων η έκφραση επάγεται 6 ώρες μετά τη μόλυνση σύμφωνα με τα πειράματα RNA-seq. Παρατηρήθηκε ότι 160 από τα 722 γονίδια με επαγόμενα επίπεδα έκφρασης διαθέτουν επίσης πιθανούς ενισχυτές με επαγόμενα επίπεδα H3K27ac. Ο αριθμός αυτός είναι διπλάσιος από τον αναμενόμενο αν η κατανομή των θέσεων με επαγόμενο H3K27ac σήμα ήταν τυχαία στο γονιδίωμα. Επομένως η επιλεκτική παρουσία των επαγόμενων H3K27ac περιοχών κοντά σε επαγόμενα γονίδια καθώς και ο συνεντοπισμός μιας σειράς δεικτών που χαρακτηρίζουν τους ενισχυτές είναι ενδεικτικά για το πιθανό ρυθμιστικό ρόλο των παραπάνω αλληλουχιών κατά την *αντιϊκή* κυτταρική απόκριση.

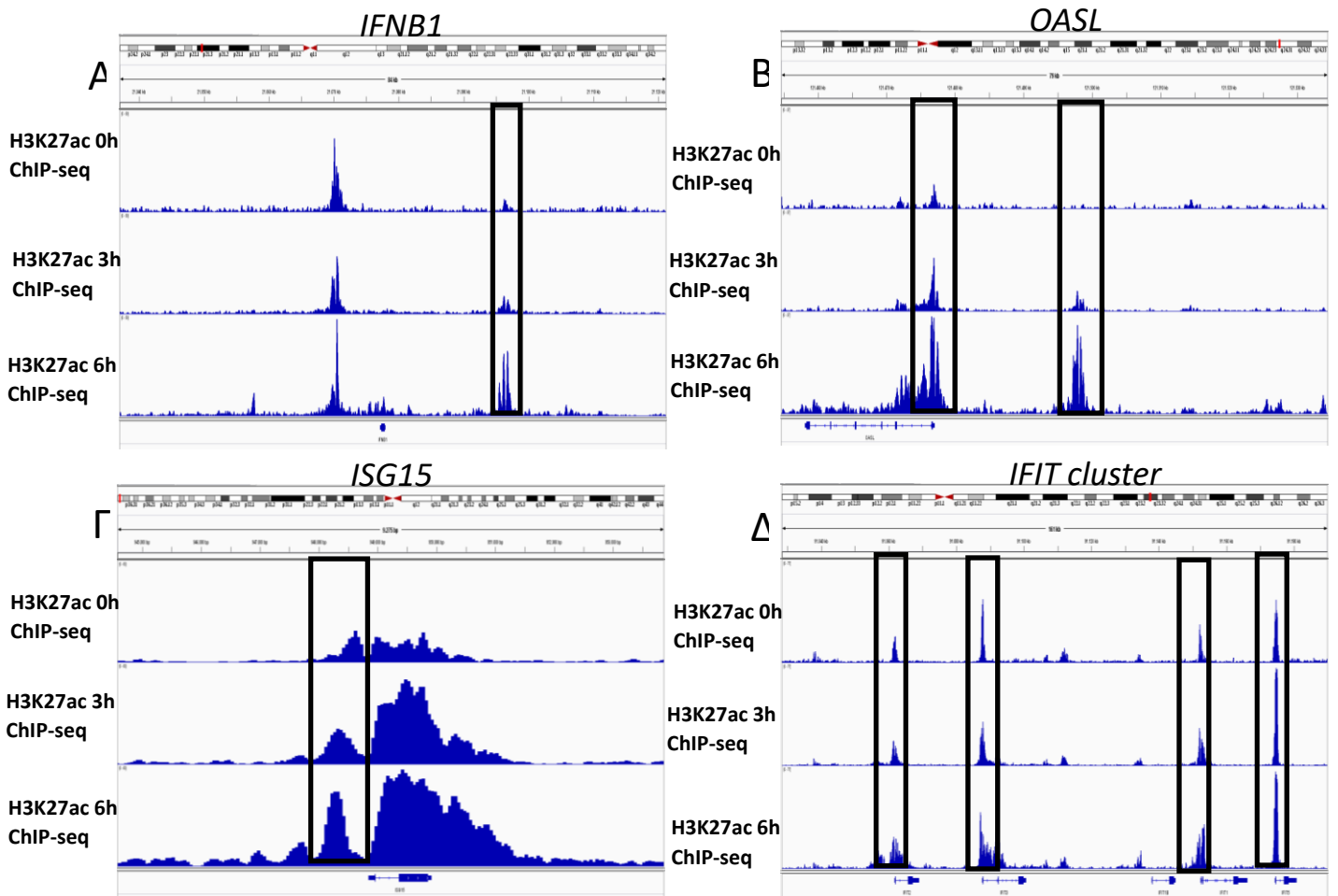
Πειράματα H3K27ac ChIP-seq σε κύτταρα HeLa

Για να εξακριβώσουμε τη ποιότητα των πειραμάτων στα κύτταρα HeLa αρχικά μελετήσαμε τα επίπεδα της H3K27ac γύρω από αναμενόμενους θετικούς και αρνητικούς στόχους. Τα επίπεδα της H3K27ac ήταν υψηλά και σταθερά πριν και κατά την εξέλιξη της μόλυνσης γύρω από τις θέσεις έναρξης της μεταγραφής των γονιδίων *ACTB* και *ACTG1*, γεγονός αναμενόμενο καθώς τα συγκεκριμένα είναι γονίδια κυτταρικής οικονομίας με σταθερά και υψηλά επίπεδα έκφρασης ανεξάρτητα της μόλυνσης (εικόνα 42). Αντίθετα τα επίπεδα H3K27ac ήταν χαμηλά γύρω από τις θέσεις έναρξης της μεταγραφής των γονιδίων *MYOD1* και *AFM* καθώς τα συγκεκριμένα γονίδια εκφράζονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα στα κύτταρα HeLa. Στη συνέχεια μέσω ανάλυσης των αποτελεσμάτων με μεθόδους βιοπληροφορικής ταυτοποιήθηκαν οι περιοχές του γονιδιώματος με επαγόμενα επίπεδα H3K27ac 6 ώρες μετά τη μόλυνση. Στην εικόνα 43 παρουσιάζονται τα επαγόμενα επίπεδα H3K27ac γύρω από το χαρακτηρισμένο ενισχυτή που βρίσκεται 20 κβ ανοδικά του *IFNB1* και τον ενισχυτή που βρίσκεται 20 κβ ανοδικά του *OASL*. Επιπλέον απεικονίζονται τα επίπεδα H3K27ac γύρω από τους υποκινητές των επαγόμενων γονιδίων *ISG15* και *IFIT2* cluster. Τα επίπεδα H3K27ac γύρω από τις συνολικά 2978 περιοχές με επαγόμενα επίπεδα H3K27ac που δεν βρίσκονται κοντά σε θέσεις έναρξης της μεταγραφής (putative distal enhancers) παρουσιάζονται στην εικόνα 44A. Στη συνέχεια εξετάστηκε αν αυτές οι περιοχές φέρουν και επιπλέον χαρακτηριστικούς δείκτες των ενισχυτών μέσω αξιολόγησης του σήματος από τα πειράματα Med1 ChIP-seq, H3K4me1 ChIP-seq και DNaseI-seq γύρω από το κέντρο των 2978 περιοχών με επαγόμενα επίπεδα H3K27ac. Αρχικά παρατηρήθηκε ότι ένας μεγάλος αριθμός των θέσεων αυτών (327 περιοχές) παρουσιάζει επαγόμενα επίπεδα του συνεργοποιητή Med1. Επιπλέον οι περιοχές αυτές των ενισχυτών φέρουν αυξημένα επίπεδα H3K4me1 και είναι προσβάσιμες σύμφωνα με τα πειράματα DNaseI-seq, γεγονός που ενισχύει τον πιθανό ρυθμιστικό ρόλο τους στην *αντιική* απόκριση. Για την περαιτέρω εξακρίβωση αυτού του ενδεχόμενου πραγματοποιήθηκε ανάλυση γονιδιακής οντολογίας για τα κοντινότερα γονίδια στις 2978 περιοχές με επαγόμενα επίπεδα H3K27ac (εικόνα 44B). Διαπιστώθηκε ότι η λίστα των γονιδίων αυτών είναι εμπλουτισμένη με γονίδια που συμμετέχουν μεταξύ άλλων στο μονοπάτι των κυτοκινών και του τύπου I ιντερφερονών και γενικότερα στην ανοσολογική απόκριση των κυττάρων. Για την επιβεβαίωση των παραπάνω

πραγματοποιήθηκε σύγκριση των γονιδίων που βρίσκονται κοντά σε επαγόμενες H3K27ac θέσεις με τα γονίδια των οποίων η έκφραση επάγεται 6 ώρες μετά



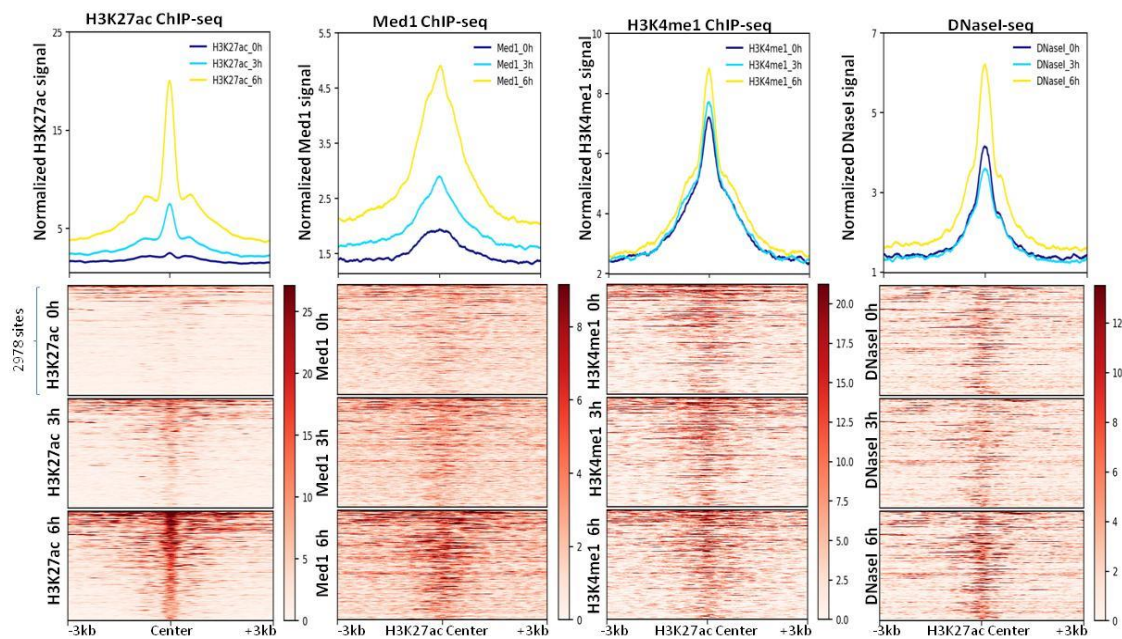
Εικόνα 42: Παρουσιάζονται τα επίπεδα H3K27ac γύρω από τα γονίδια *ACTB*, *ACTG1*, *MYOD1* και *AFM* πριν καθώς και 3 και 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα HeLa.



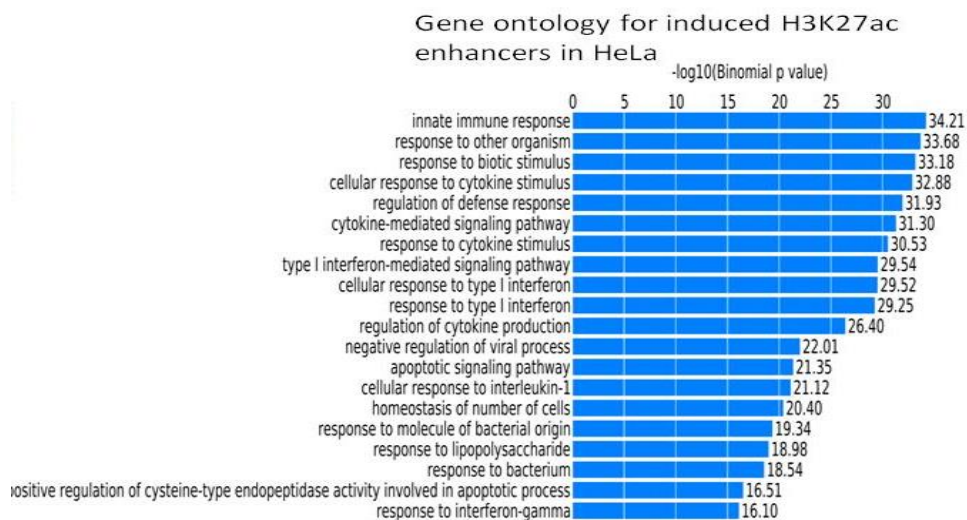
Εικόνα 43: Παρουσιάζονται τα επίπεδα H3K27ac στον -20kb ενισχυτή του γονιδίου IFNB1 (A), στον απομακρυσμένο ενισχυτή του OASL, στον υποκινητή του γονιδίου ISG15 (Γ) και στους υποκινητές των γονιδίων IFIT1, IFIT2, IFIT3 και IFIT5 (Δ) πριν καθώς και 3 και 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα HeLa.

τη μόλυνση σύμφωνα με τα πειράματα RNA-seq. Παρατηρήθηκε ότι 172 από τα 500 γονίδια με επαγόμενα επίπεδα έκφρασης διαθέτουν επίσης πιθανούς ενισχυτές με επαγόμενα επίπεδα H3K27ac. Ο αριθμός αυτός είναι 3,6 φορές μεγαλύτερος από τον αναμενόμενο αν η κατανομή των θέσεων με επαγόμενο H3K27ac σήμα ήταν τυχαία στο γονιδίωμα. Επομένως η επιλεκτική παρουσία των επαγόμενων H3K27ac περιοχών κοντά σε επαγόμενα γονίδια καθώς και ο συνεντοπισμός μιας σειράς δεικτών που χαρακτηρίζουν τους ενισχυτές είναι ενδεικτικά στοιχεία για τον πιθανό ρυθμιστικό ρόλο των παραπάνω αλληλουχιών κατά την αντίκη κυτταρική απόκριση.

A



B

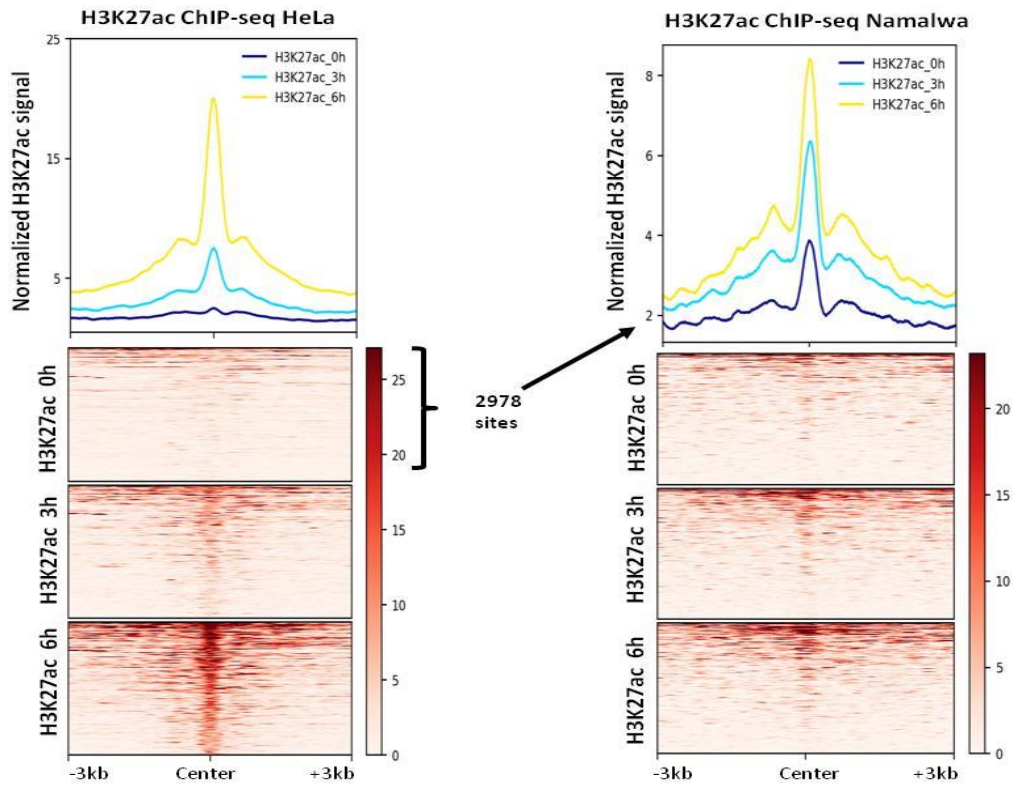


Εικόνα 44:Α) Παρουσιάζεται η ανακατανομή επιγονιδιωματικών δεικτών γύρω από τις 2978 απομακρυσμένες από υποκινητές περιοχές με επαγόμενα επίπεδα H3K27ac 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα HeLa. Παρατηρείται ότι οι περιοχές αυτές φέρουν επιπλέον δείκτες των ενεργών ενισχυτών όπως H3K4me1 και Med1 και είναι προσβάσιμες σύμφωνα με τα πειράματα DNaseI-seq. Σε πολλές από τις περιοχές αυτές οι δείκτες εμφανίζουν επαγόμενα επίπεδα μετά τη μόλυνση. Β) Τα αποτελέσματα της ανάλυσης βιολογικών διεργασιών για τα γονίδια που βρίσκονται κοντά στις περιοχές με επαγόμενα επίπεδα H3K27ac.

Στη συνέχεια εξετάστηκε εάν οι επαγόμενοι ενισχυτές στον έναν κυτταρικό τύπο ενεργοποιούνται κατά την *ιική* μόλυνση και στον άλλο κυτταρικό τύπο. Από τη σύγκριση των πιθανών ενισχυτών με επαγόμενα επίπεδα H3K27ac σε HeLa και Namalwa βρέθηκαν 328 πιθανοί ενισχυτές που είναι επαγόμενοι και στους δύο

κυτταρικούς τύπους (ποσοστό 16,2% των συνολικών επαγόμενων ενισχυτών στα Namalwa). Για την αναπαράσταση αυτού του ευρήματος παρουσιάζεται στην εικόνα 45A η κατανομή των επιπέδων H3K27ac γύρω από τους 2017 επαγόμενους ενισχυτές στα HeLa και τα επίπεδα H3K27ac στις ίδιες αυτές περιοχές στα Namalwa. Έπειτα πραγματοποιήθηκε σύγκριση των γονιδίων που βρίσκονται κοντά στις κοινές επαγόμενες H3K27ac θέσεις με τα γονίδια των οποίων η έκφραση επάγεται 6 ώρες μετά τη μόλυνση και στους δύο κυτταρικούς τύπους σύμφωνα με τα πειράματα RNA-seq. Παρατηρήθηκε ότι 28 από τα 210 κοινά επαγόμενα γονίδια διαθέτουν επίσης πιθανούς ενισχυτές με επαγόμενα επίπεδα H3K27ac (εικόνα 45B). Ο αριθμός αυτός είναι 11,6 φορές μεγαλύτερος από τον αναμενόμενο αν η κατανομή των κοινών θέσεων με επαγόμενο H3K27ac σήμα ήταν τυχαία στο γονιδίωμα. Στη λίστα αυτή περιλαμβάνονται τα γονίδια *IFNB1*, *CCL5*, *IFIT2*, *OASL* και *IRFI* τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιϊκή απόκριση των κυττάρων. Από τα παραπάνω διαπιστώνεται ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των επαγόμενων ενισχυτών είναι ειδικό για κάθε κυτταρικό τύπο. Παρόλα αυτά οι κοινοί επαγόμενοι ενισχυτές φαίνεται να ρυθμίζουν επαγόμενα γονίδια που είναι σημαντικά για την αντιϊκή απόκριση και στους δύο κυτταρικούς τύπους.

A



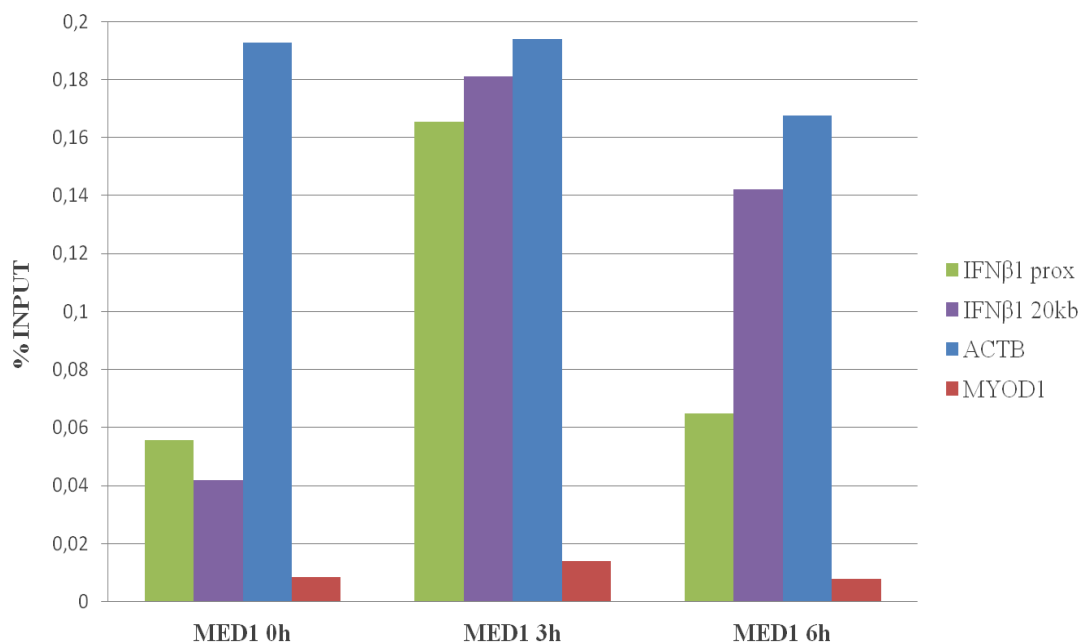
B

<i>IFIT2</i>	<i>OASL</i>	<i>CCL5</i>	<i>IRF1</i>	<i>IFNB1</i>	<i>ADAP1</i>	<i>NEDD9</i>
<i>ZBTB32</i>	<i>CHEK2</i>	<i>NFKBIZ</i>	<i>ANKRD33B</i>	<i>GPBP1</i>	<i>SRPK2</i>	<i>TTC39B</i>
<i>RBM38</i>	<i>NAV2</i>	<i>PIK3R3</i>	<i>RPS6KC1</i>	<i>OTUD1</i>	<i>SARIA</i>	<i>GRAMD1B</i>
<i>NEDD1</i>	<i>GCH1</i>	<i>UBE2Z</i>	<i>PMAIP1</i>	<i>B3GNT2</i>	<i>MAP4K4</i>	<i>B4GALT5</i>

Εικόνα 45: A) Συγκριτική ανάλυση των απομακρυσμένων από υποκινητές περιοχών με επαγόμενα επίπεδα H3K27ac μεταξύ κυττάρων HeLa και Namalwa. Στα αριστερά παρουσιάζονται οι 2978 περιοχές με επαγόμενα επίπεδα H3K27ac 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα HeLa. Στα δεξιά παρουσιάζεται η κατανομή των επιπέδων H3K27ac γύρω από αυτές τις περιοχές στα Namalwa. Εντοπίστηκαν 328 πιθανοί ενισχυτές με επαγόμενα επίπεδα H3K27ac και στους δύο κυτταρικούς τύπους. B) Κοινά επαγόμενα γονίδια μεταξύ HeLa και Namalwa που βρίσκονται κοντά σε περιοχές με επαγόμενα επίπεδα H3K27ac και στους δύο κυτταρικούς τύπους.

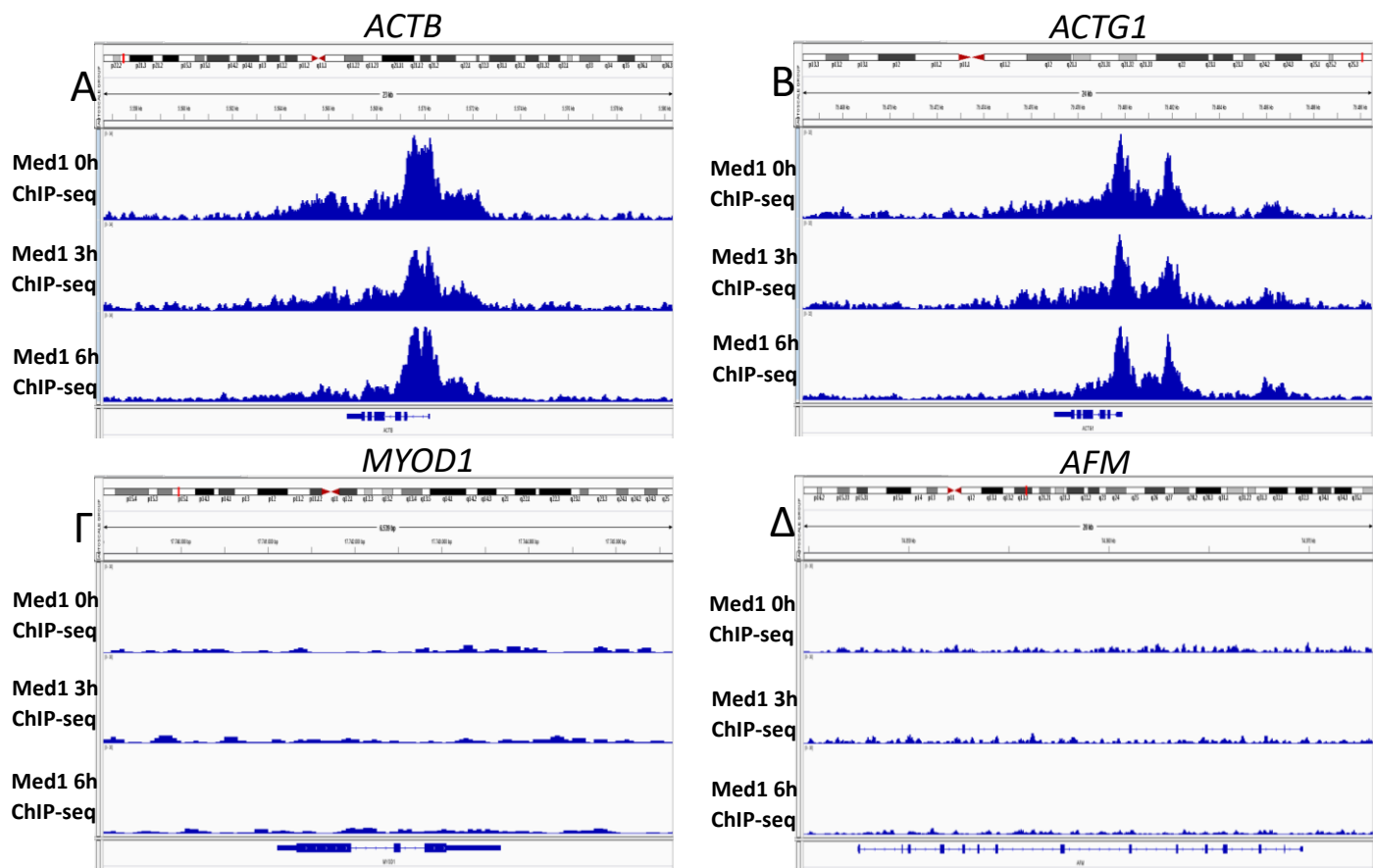
Πειράματα Med1 ChIP-seq σε κύτταρα HeLa

Για τη μελέτη της ανακατανομής των θέσεων πρόσδεσης του Mediator κατά την εξέλιξη της αντιϊκής απόκρισης πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης σε συνδυασμό με αλληλούχιση νέας γενιάς (ChIP-seq) έναντι της υπομονάδας Med1 πριν καθώς και 3 και 6 ώρες μετά τη μόλυνση με ιό Sendai σε κύτταρα HeLa και Namalwa. Πριν το στάδιο της αλληλούχισης πραγματοποιήθηκε έλεγχος για την εξακρίβωση της αποτελεσματικότητας του σταδίου της ανοσοκατακρήμνισης με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο χρησιμοποιώντας γνωστούς θετικούς και αρνητικούς στόχους. Διαπιστώθηκε ισχυρά επαγόμενος εμπλουτισμός για τους θετικούς στόχους που βρίσκονται στο πρόσθιο και στον απομακρυσμένο (-20kb) ενισχυτή της Ιντερφερόνης-β (εικόνα 46). Επίσης παρατηρήθηκε ισχυρός και ανεξάρτητος της ιϊκής μόλυνσης εμπλουτισμός για το στόχο που βρίσκεται στον υποκινητή του γονιδίου κυτταρικής οικονομίας *ACTB*. Αντίθετα ο εμπλουτισμός ήταν σταθερά χαμηλός πριν και κατά τη διάρκεια της μόλυνσης για τον αρνητικό στόχο που βρίσκεται μέσα στο μη εκφραζόμενο γονίδιο *MYOD1*. Για να εξακριβώσουμε τη ποιότητα των πειραμάτων στα κύτταρα HeLa αρχικά μελετήσαμε τα επίπεδα πρόσδεσης του Med1 γύρω από αναμενόμενους θετικούς και αρνητικούς στόχους (εικόνα 47). Τα επίπεδα πρόσδεσης του Med1 ήταν υψηλά και σταθερά πριν και κατά την εξέλιξη της μόλυνσης γύρω από τις θέσεις έναρξης της μεταγραφής των γονιδίων *ACTB* και *ACTG1*, γεγονός αναμενόμενο καθώς τα συγκεκριμένα είναι γονίδια κυτταρικής οικονομίας με σταθερά και υψηλά επίπεδα έκφρασης ανεξάρτητα της μόλυνσης. Αντίθετα τα επίπεδα πρόσδεσης του Med1 ήταν χαμηλά γύρω από τις θέσεις έναρξης της μεταγραφής των γονιδίων *MYOD1* και *AFM* καθώς τα συγκεκριμένα γονίδια εκφράζονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα στα κύτταρα HeLa.

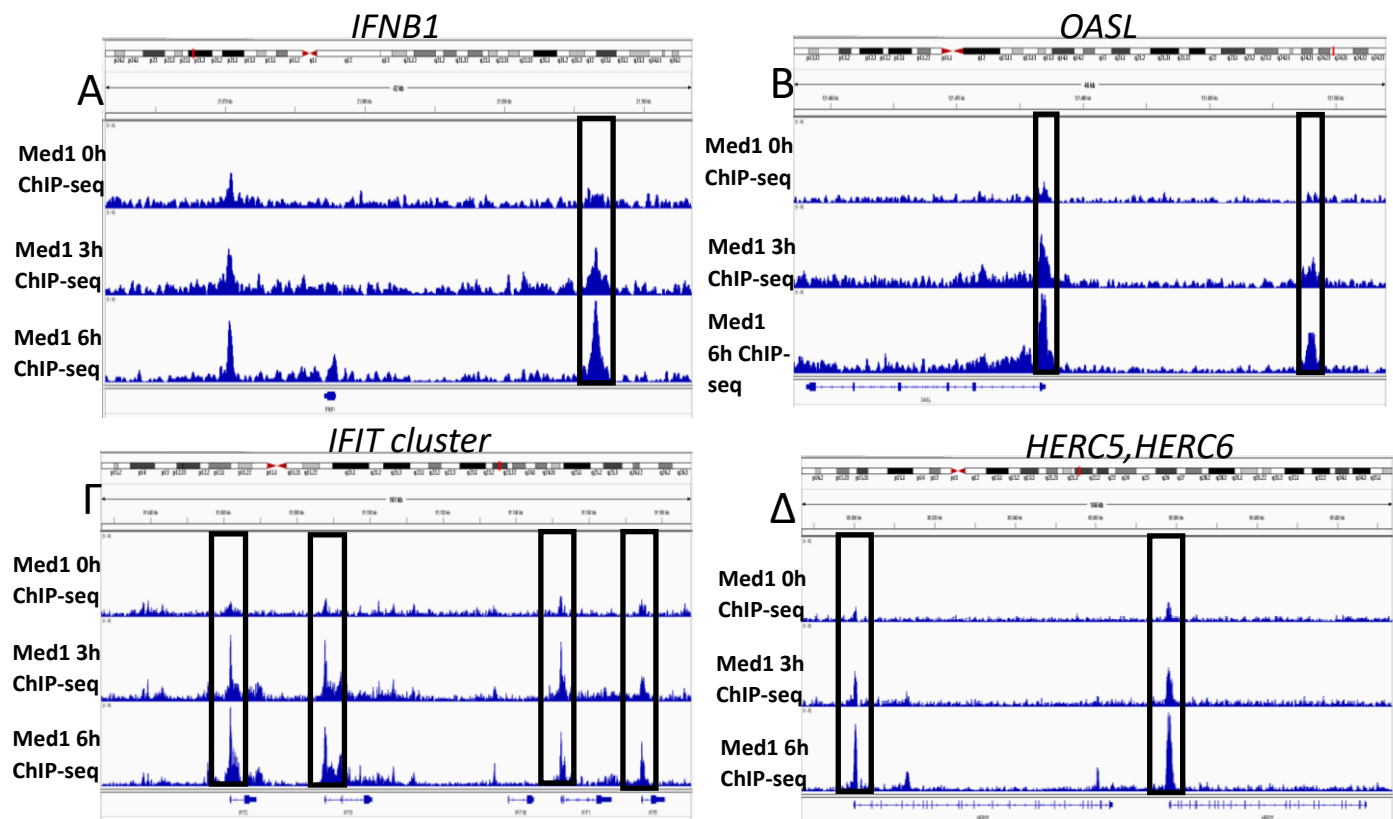


Εικόνα 46 : Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο για την εξακρίβωση της ποιότητας της ανοσοκατακρήμνισης έναντι του παράγοντα Med1 σε κύτταρα HeLa.

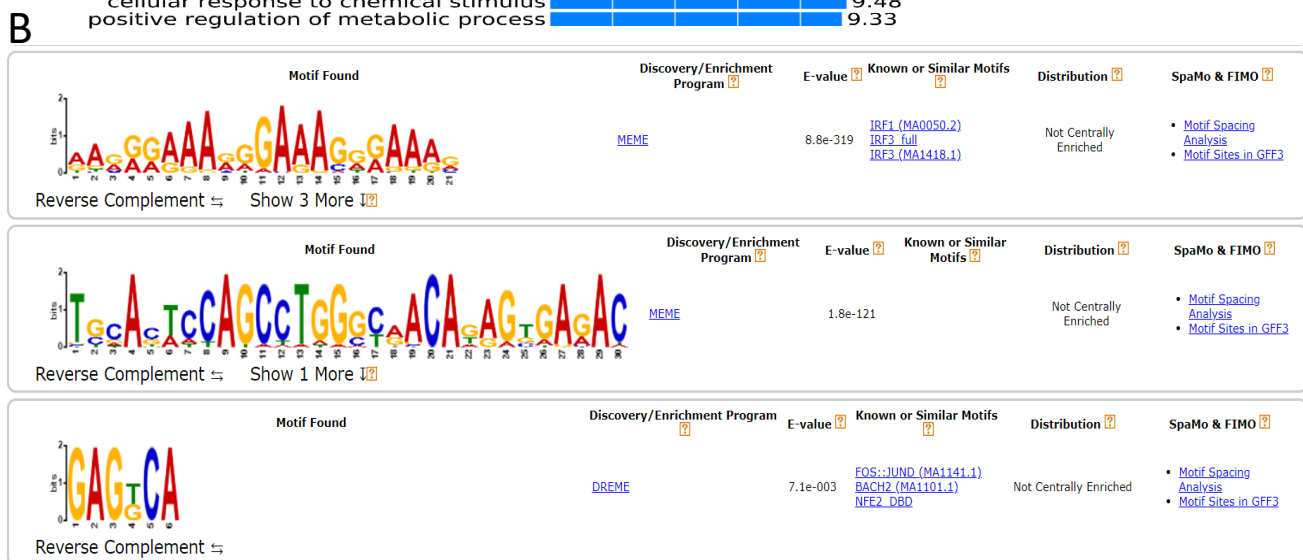
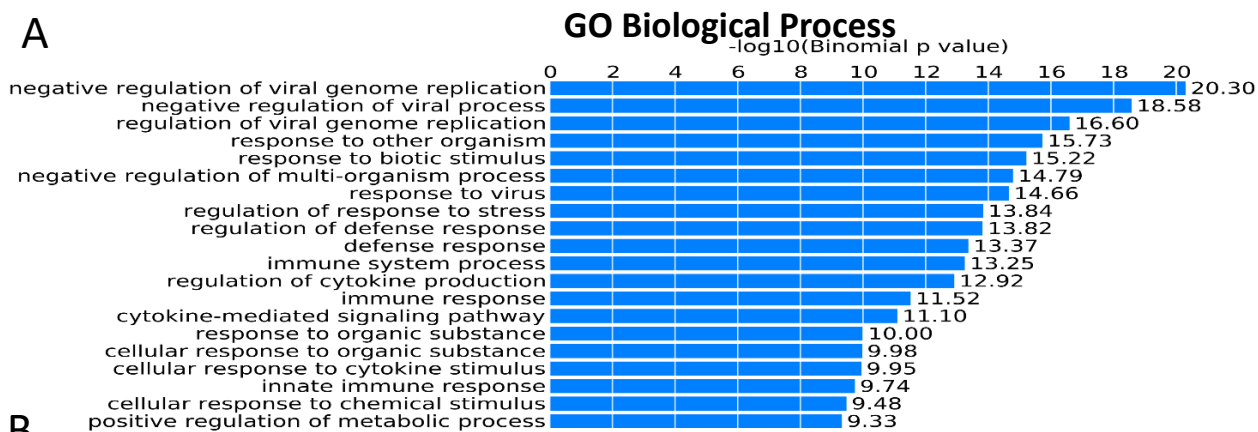
Από τη διαφορική ανάλυση των αλλαγών στην ένταση της πρόσδεσης του Med1 βρέθηκαν 265 απομακρυσμένες από υποκινητές περιοχές στο γονιδίωμα με επαγόμενα επίπεδα πρόσδεσης του Med1 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα HeLa. Στην εικόνα 48 παρουσιάζονται τα επαγόμενα επίπεδα Med1 γύρω από το χαρακτηρισμένο ενισχυτή που βρίσκεται 20 κβ ανοδικά του *IFNB1* και τον ενισχυτή που βρίσκεται 20 κβ ανοδικά του *OASL*. Η ανάλυση γονιδιακών οντολογιών για τα κοντινότερα γονίδια σε αυτές τις περιοχές έδειξε ότι αυτά σχετίζονται με διεργασίες όπως η απόκριση έναντι ιικών μολύνσεων, το μονοπάτι των κυτοκινών και γενικότερα με διεργασίες του ανοσοποιητικού συστήματος (εικόνα 49A). Πράγματι από τη λίστα των εγγύτερων γονιδίων στις επαγόμενες περιοχές πρόσδεσης του Med1 70 είναι *ιικά* επαγόμενα γονίδια 6 ώρες μετά τη μόλυνση σύμφωνα με τα πειράματα RNA-seq. Για να διαπιστωθεί ποιοι μεταγραφικοί παράγοντες προσδένονται στις παραπάνω περιοχές πραγματοποιήθηκε ανάλυση μοτίβων μεταγραφικών παραγόντων, η οποία κατέδειξε ως κορυφαία μοτίβα αυτά της οικογένειας IRF και JUN/FOS παραγόντων που είναι γνωστό ότι συμμετέχουν στην ανοσολογική απόκριση (εικόνα 49B).



Εικόνα 47: Παρουσιάζονται τα επίπεδα πρόσδεσης του Med1 στους υποκινητές των γονιδίων *ACTB*, *ACTG1*, *MYOD1* και *AFM* πριν καθώς και 3 και 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα HeLa.

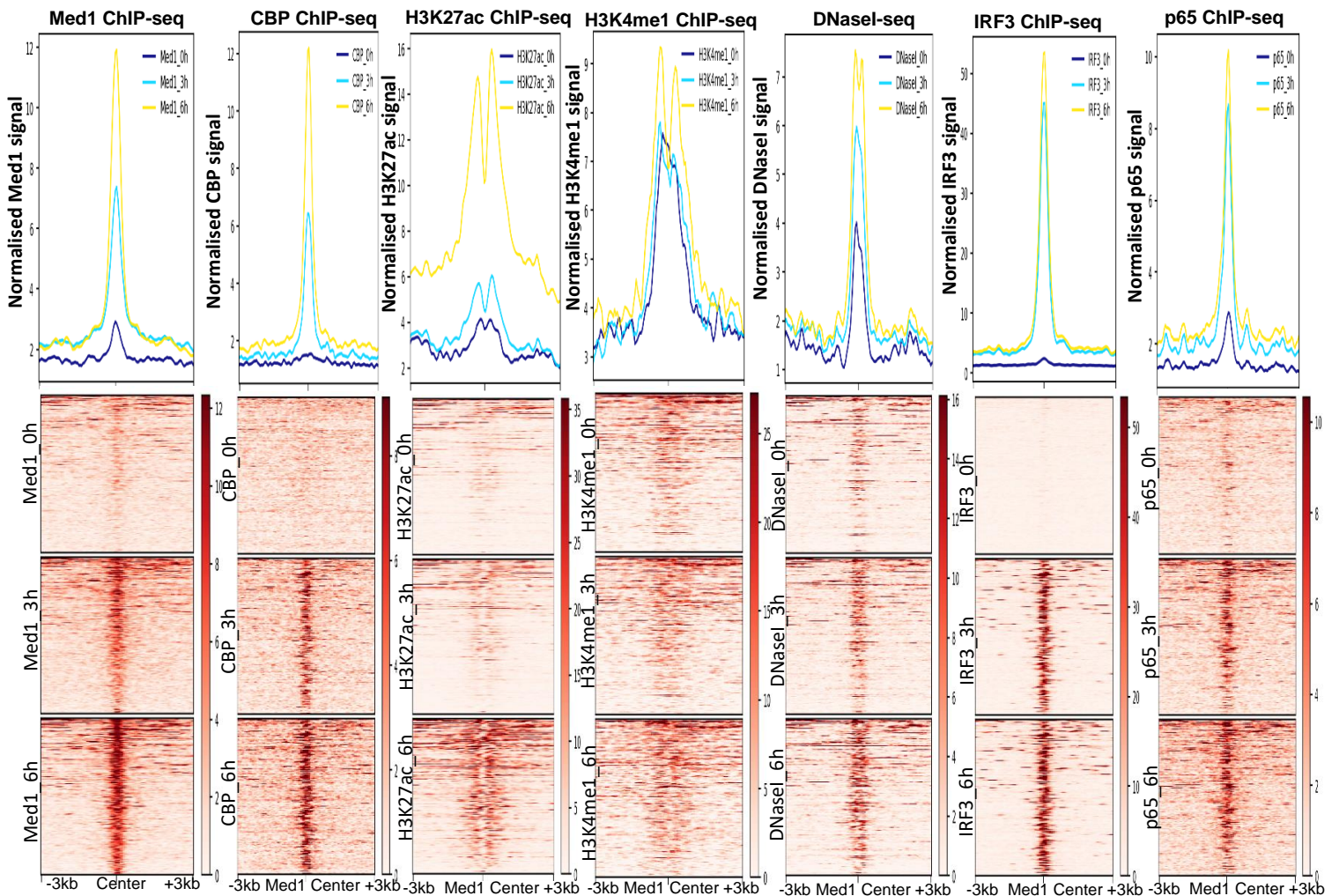


Εικόνα 48: Παρουσιάζονται τα επίπεδα πρόσδεσης του Med1 στον -20kb ενισχυτή του γονιδίου *IFNB1* (A), στον απομακρυσμένο ενισχυτή του *OASL*, στους υποκινητές των γονιδίων *IFIT1*, *IFIT2*, *IFIT3*, *IFIT5* (Γ) και στους υποκινητές των γονιδίων *HERC5* και *HERC6* πριν καθώς και 3 και 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα HeLa.



Εικόνα 49: Απεικονίζονται οι πιο στατιστικά σημαντικές βιολογικές διεργασίες στις οποίες συμμετέχουν τα γονίδια που βρίσκονται σε απομακρυσμένες από θέσεις έναρξης της μεταγραφής περιοχές επαγόμενης πρόσδεσης του Med1 σε κύτταρα HeLa. (A) και τα πιο στατιστικά σημαντικά μοτίβα μεταγραφικών παραγόντων (B).

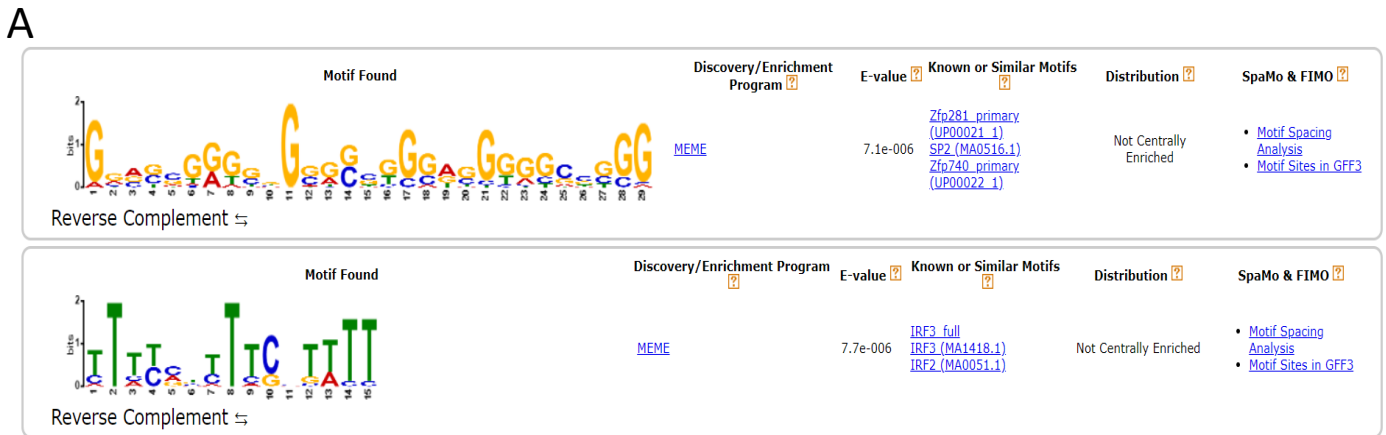
Στη συνέχεια εξετάσαμε τις πιθανές αλλαγές στη χρωματινική διαμόρφωση και στο προφίλ πρόσδεσης συν-ενεργοποιητών, μεταγραφικών παραγόντων και ιστονικών τροποποιήσεων γύρω από τις 265 περιοχές με επαγόμενη πρόσδεση του Med1 (εικόνα 50). Παρατηρήθηκε επαγόμενη πρόσδεση τόσο των μεταγραφικών παραγόντων p65 και IRF3 καθώς και του συνενεργοποιητή CBP και της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac και σταθερά επίπεδα H3K4me1 σε πολλές από τις περιοχές αυτές. Επιπλέον οι περιοχές αυτές απέκτησαν αυξημένη προσβασιμότητα μετά την ιική μόλυνση. Παρατηρήθηκε επομένως ταυτόχρονη επαγόμενη παρουσία πολλών δομικών δεικτών χαρακτηριστικών των ενισχυτών. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη παρουσία μοτίβων για μεταγραφικούς παράγοντες με γνωστό ρόλο στην ανοσολογική απόκριση και τη γεινίαση των παραπάνω περιοχών σε επαγόμενα γονίδια ενισχύει τη πιθανότητα να δρουν ως ενισχυτές που ρυθμίζουν την αντίκη κυτταρική απόκριση. Στη συνέχεια



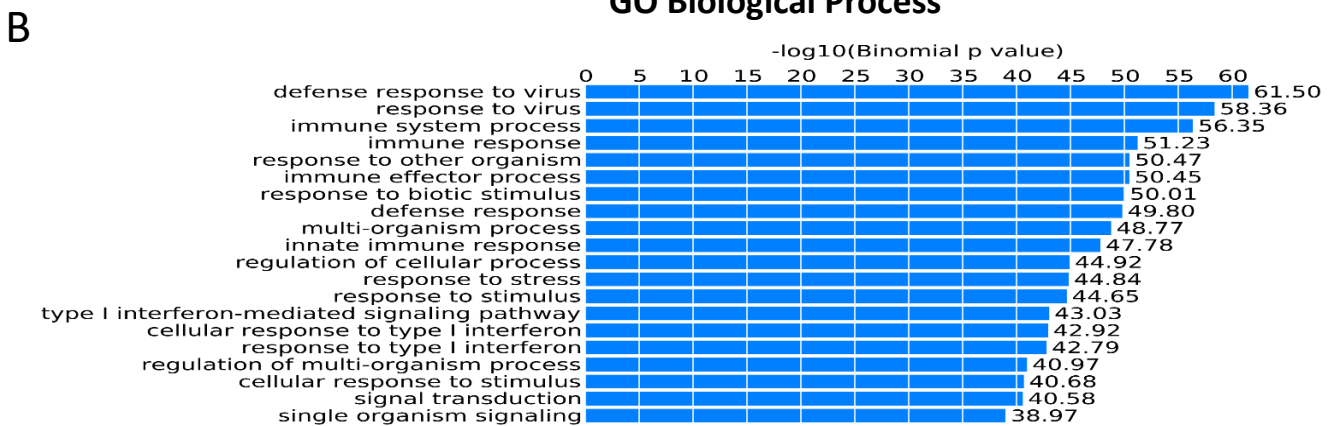
Εικόνα 50: Παρουσιάζονται οι αλλαγές στα επίπεδα της προσβασιμότητας του DNA, στη πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων, συνενεργοποιητών και ιστονικών τροποποιήσεων που συμβαίνουν κατά την εξέλιξη της αντιϊκής απόκρισης γύρω από τις 265 περιοχές με επαγόμενη πρόσδεση του Med1 σε κύτταρα HeLa.

εξετάζοντας τις περιοχές που βρίσκονται κοντά σε θέσεις έναρξης της μεταγραφής (<2κβ) βρέθηκαν μόνο 63 περιοχές με επαγόμενα επίπεδα πρόσδεσης του Med1 6 ώρες μετά τη μόλυνση. Η ανάλυση γονιδιακών οντολογιών έδειξε ότι αυτές οι περιοχές σχετίζονται μεταξύ άλλων με την άμυνα απέναντι σε ιούς και το μονοπάτι των ιντερφερονών (εικόνα 51A). Πράγματι συνδυάζοντας πληροφορία από τα πειράματα RNA-seq διαπιστώθηκε ότι από τα 55 κοντινότερα γονίδια σε αυτές τις περιοχές τα 45 είναι *ικά* επαγόμενα φανερώνοντας την υψηλή ειδικότητα του Med1 να προσδένεται

μετά τη μόλυνση σε *ϊικά* επαγόμενα γονίδια συμμετέχοντας πιθανότατα στην επαγωγή της έκφρασης τους. Οι περιοχές αυτές φέρουν μοτίβα της οικογένειας Sp1 και IRF. Στην εικόνα 48 παρουσιάζονται τα επαγόμενα επίπεδα Med1 γύρω από τις θέσεις έναρξης της μεταγραφής των *ϊικά* επαγόμενων γονιδίων *IFIT1*, *IFIT2*, *IFIT3*, *IFIT5* (Γ) και *HERC5*, *HERC6* (Δ).



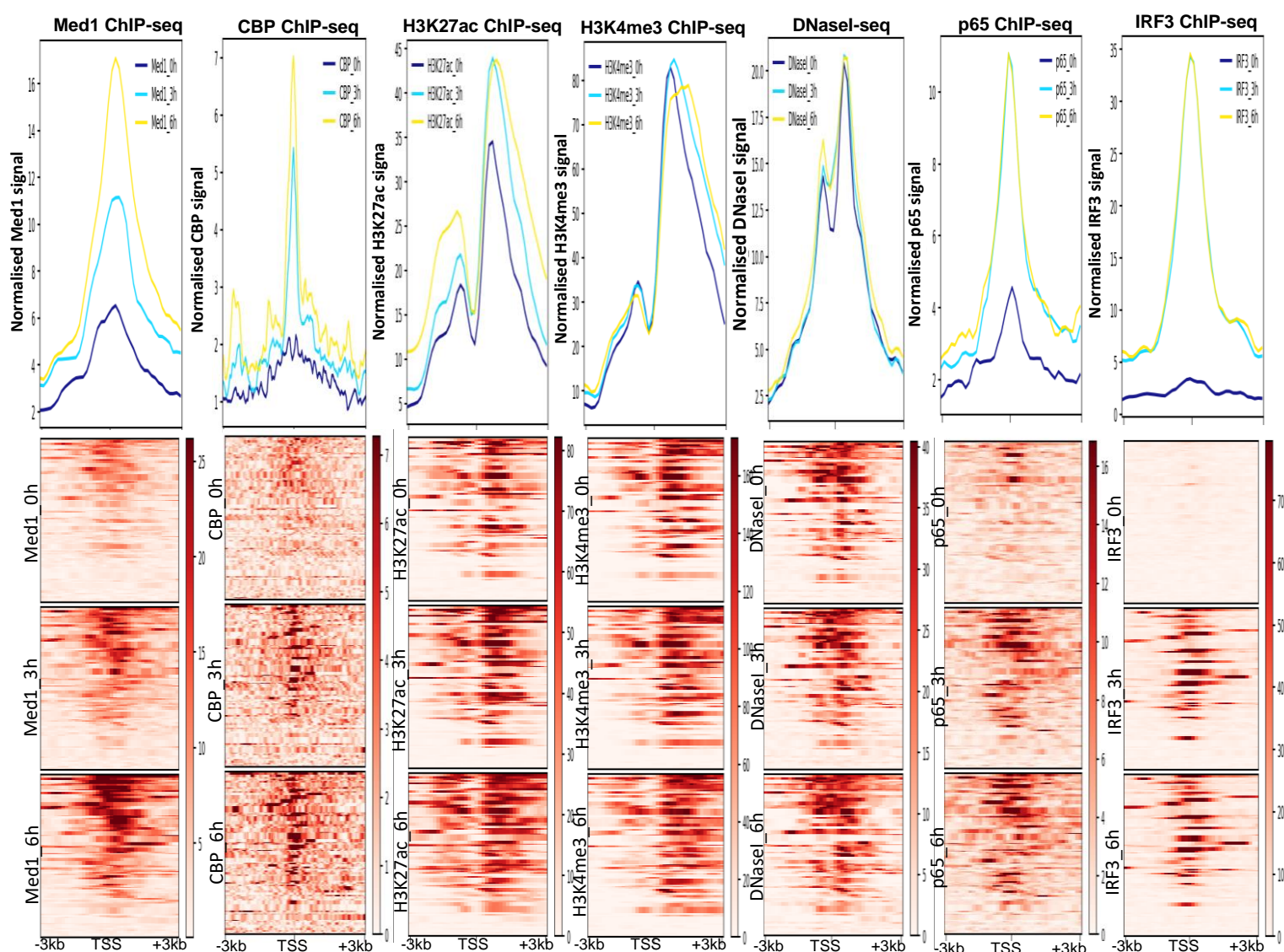
GO Biological Process



Εικόνα 51: Απεικονίζονται τα πιο στατιστικά σημαντικά μοτίβα μεταγραφικών παραγόντων (A) καθώς και οι βιολογικές διεργασίες (B) στις οποίες συμμετέχουν τα γονίδια που βρίσκονται εγγύτερα στις κοντινές σε θέσεις έναρξης της μεταγραφής περιοχές επαγόμενης πρόσδεσης του Med1 σε κύτταρα HeLa.

Στη συνέχεια εξετάσαμε τις πιθανές αλλαγές στη χρωματινική διαμόρφωση και στο προφίλ πρόσδεσης συν-ενεργοποιητών, μεταγραφικών παραγόντων και ιστονικών τροποποιήσεων γύρω από τις 63 περιοχές με επαγόμενη πρόσδεση του Med1 (εικόνα 52). Παρατηρήθηκε επαγόμενη πρόσδεση τόσο των μεταγραφικών παραγόντων p65 και IRF3 καθώς και του συνενεργοποιητή CBP και της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac και σταθερά επίπεδα H3K4me3 σε πολλές από τις περιοχές αυτές. Οι περισσότερες από τις περιοχές αυτές ήταν προσβάσιμες ήδη πριν από την *ϊική* μόλυνση. Παρατηρήθηκε επομένως ταυτόχρονη επαγόμενη παρουσία πολλών δομικών δεικτών

χαρακτηριστικών των ενισχυτών, γεγονός που υποδεικνύει το πιθανό ρυθμιστικό ρόλο τους στην αντίκη κυτταρική απόκριση.

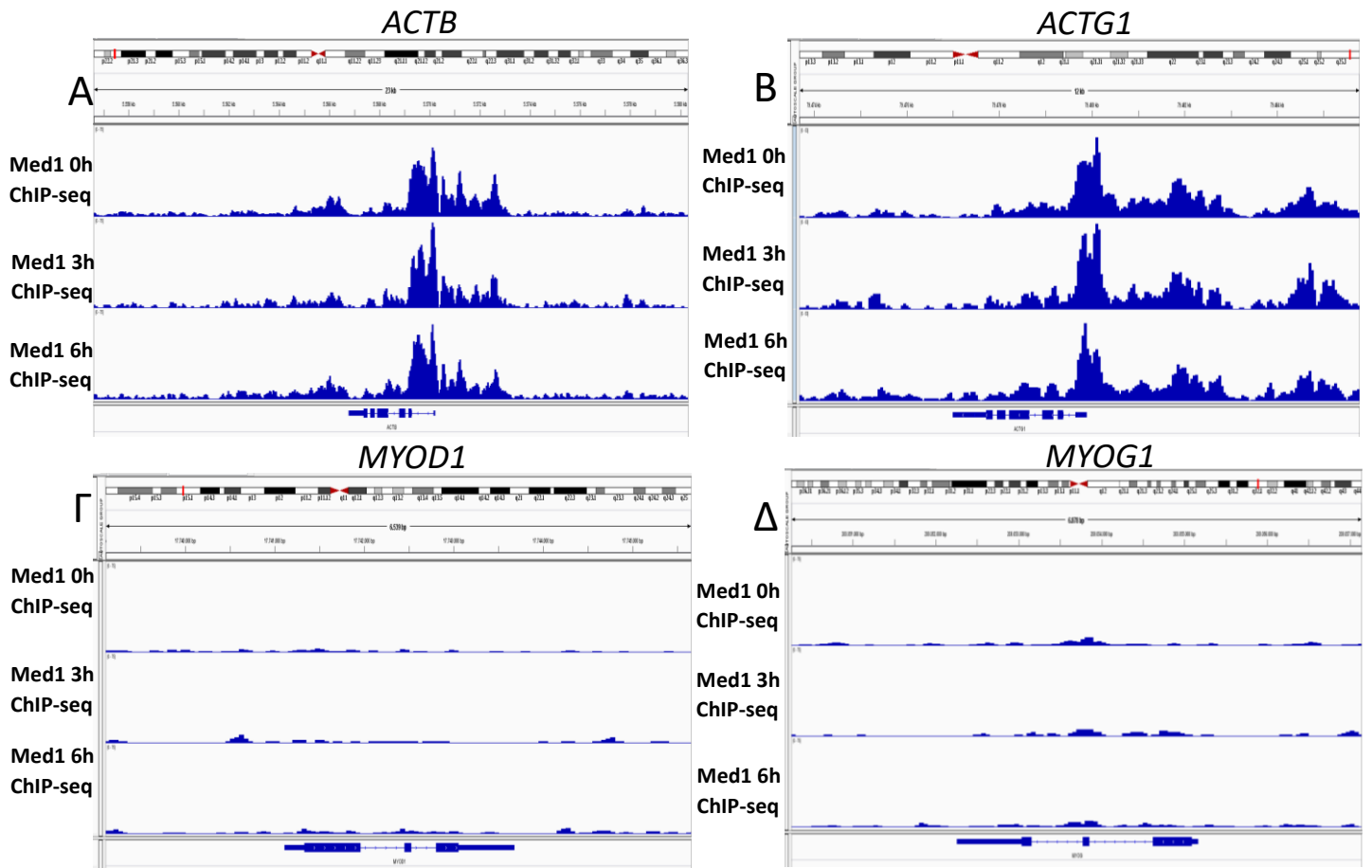


Εικόνα 52: Απεικονίζονται τα επίπεδα Med1, CBP, H3K27ac, H3K4me3, προσβασιμότητας της χρωματίνης (DNaseI), p65 και IRF3 γύρω από τις 63 κοντινές σε θέσεις έναρξης της μεταγραφής περιοχές με επαγόμενο πρότυπο πρόσδεσης Med1 σε κύτταρα HeLa.

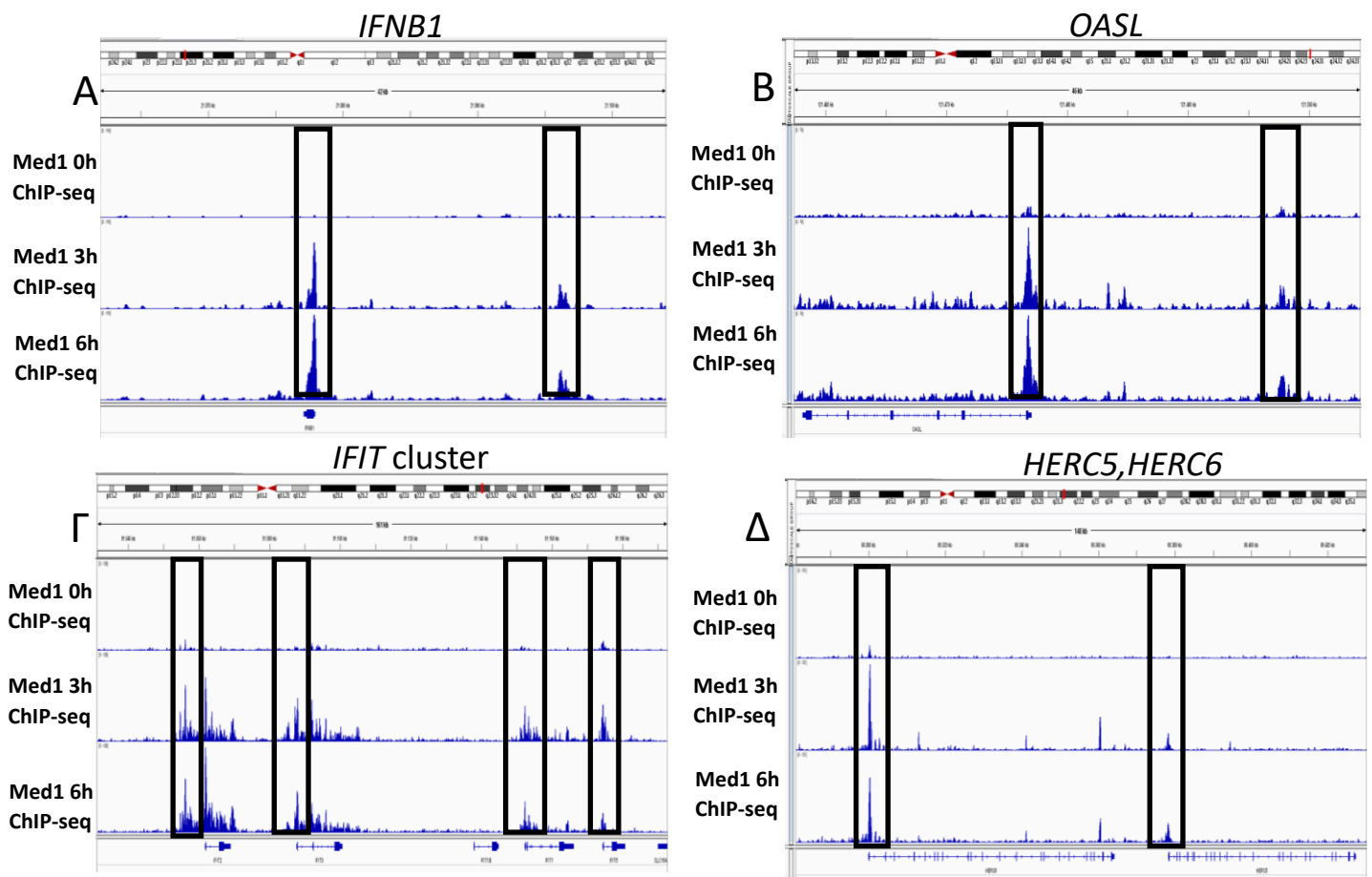
Πειράματα Med1 ChIP-seq σε κύτταρα Namalwa

Περνώντας στην ανάλυση των πειραμάτων ChIP-seq στα κύτταρα Namalwa για να εξακριβώσουμε τη ποιότητα των πειραμάτων αρχικά μελετήσαμε τα επίπεδα πρόσδεσης του Med1 γύρω από αναμενόμενους θετικούς και αρνητικούς στόχους (εικόνα 53). Τα επίπεδα πρόσδεσης του Med1 ήταν υψηλά και σταθερά πριν και κατά την εξέλιξη της μόλυνσης γύρω από τις θέσεις έναρξης της μεταγραφής των γονιδίων *ACTB* και *ACTG1*, γεγονός αναμενόμενο καθώς τα συγκεκριμένα είναι γονίδια κυτταρικής οικονομίας με σταθερά και υψηλά επίπεδα έκφρασης ανεξάρτητα της

μόλυνσης. Αντίθετα τα επίπεδα πρόσδεσης του Med1 ήταν χαμηλά γύρω από τις θέσεις έναρξης της μεταγραφής των γονιδίων *MYOD1* και *MYOG* καθώς τα συγκεκριμένα γονίδια εκφράζονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα στα κύτταρα HeLa.



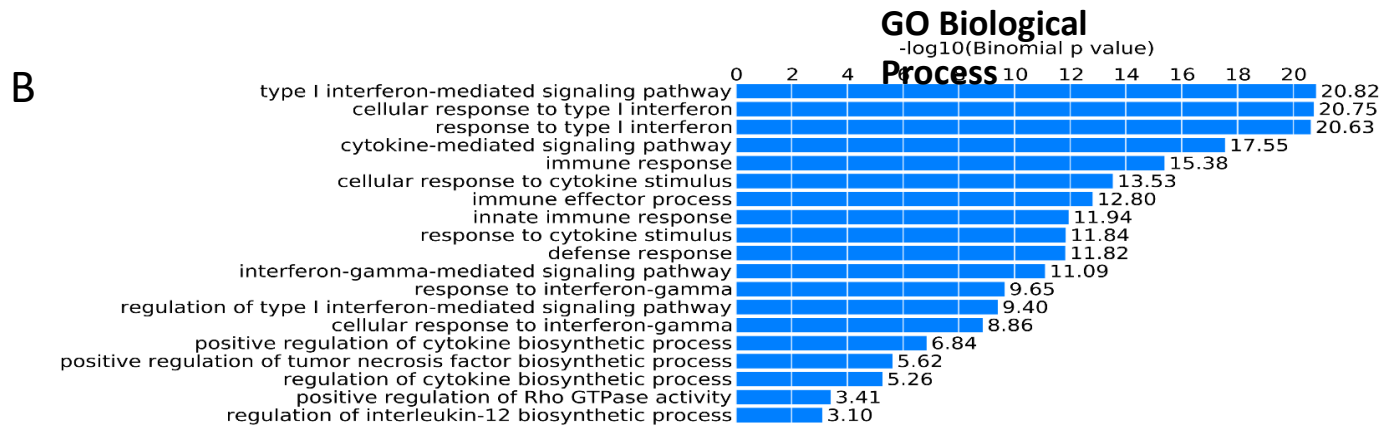
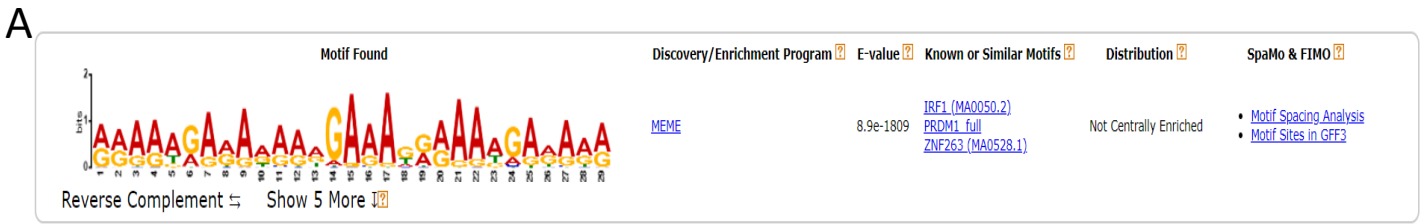
Εικόνα 53: Παρουσιάζονται τα επίπεδα πρόσδεσης του Med1 στους υποκινητές των γονιδίων *ACTB*, *ACTG1*, *MYOD1* και *MYOG* πριν καθώς και 3 και 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα Namalwa



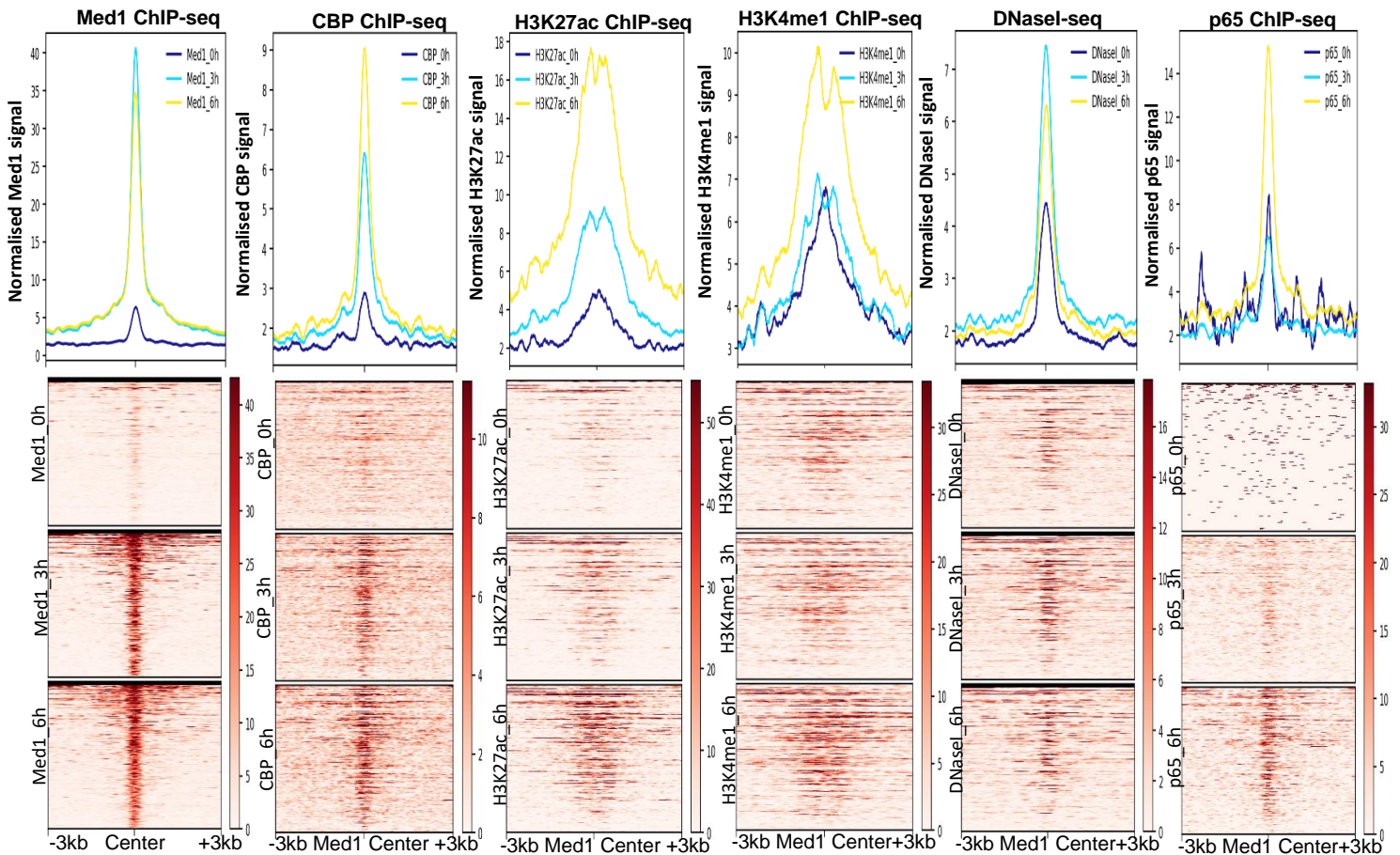
Εικόνα 54: Παρουσιάζονται τα επίπεδα πρόσδεσης του Med1 στον -20kb ενισχυτή του γονιδίου *IFNB1* (A), στον απομακρυσμένο ενισχυτή του *OASL*, στους υποκινητές των γονιδίων *IFIT1*, *IFIT2*, *IFIT3*, *IFIT5* (Γ) και στους υποκινητές των γονιδίων *HERC5* και *HERC6* πριν καθώς και 3 και 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα *Namalwa*.

Από τη διαφορική ανάλυση των αλλαγών στην ένταση της πρόσδεσης του Med1 κατά την εξέλιξη της μόλυνσης βρέθηκαν 995 απομακρυσμένες περιοχές με επαγόμενη πρόσδεση Med1 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα *Namalwa*. Στην εικόνα 54 παρουσιάζονται τα επαγόμενα επίπεδα Med1 γύρω από το χαρακτηρισμένο ενισχυτή που βρίσκεται 20 κβ ανοδικά του *IFNB1* και τον ενισχυτή που βρίσκεται 20 κβ ανοδικά του *OASL*. Η ανάλυση γονιδιακών οντολογιών για τα κοντινότερα γονίδια σε αυτές τις περιοχές έδειξε ότι αυτά σχετίζονται με διεργασίες όπως το μονοπάτι των ιντερφερονών, η παραγωγή κυτοκινών και γενικότερα με διεργασίες του ανοσοποιητικού συστήματος (εικόνα 55B). Πράγματι από τη λίστα των εγγύτερων γονιδίων στις επαγόμενες περιοχές πρόσδεσης του Med1 111 είναι *ικκ* επαγόμενα γονίδια 6 ώρες μετά τη μόλυνση σύμφωνα με τα πειράματα RNA-seq. Από την

ανάλυση για μοτίβα μεταγραφικών παραγόντων προέκυψε ως κορυφαίο μοτίβο αυτό της οικογένειας IRF (εικόνα 55A).



Εικόνα 55: Απεικονίζονται τα πιο στατιστικά σημαντικά μοτίβα μεταγραφικών παραγόντων (A) καθώς και οι βιολογικές διεργασίες (B) στις οποίες συμμετέχουν τα γονίδια που βρίσκονται εγγύτερα στις απομακρυσμένες από θέσεις έναρξης της μεταγραφής περιοχές επαγόμενης πρόσδεσης του Med1 σε κύτταρα Namalwa.

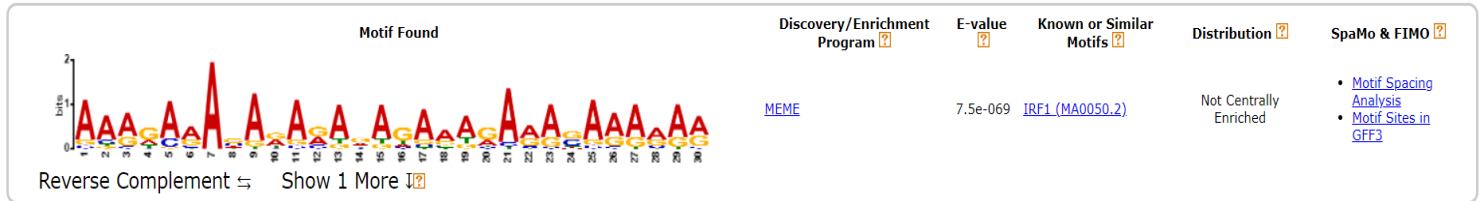


Εικόνα 56: Απεικονίζονται τα επίπεδα Med1, CBP, H3K27ac, H3K4me1, προσβασιμότητας της χρωματίνης (DNaseI) και p65 γύρω από τις 995 απομακρυσμένες θέσεις έναρξης της μεταγραφής περιοχές με επαγόμενο πρότυπο πρόσδεσης Med1 σε κύτταρα Namalwa.

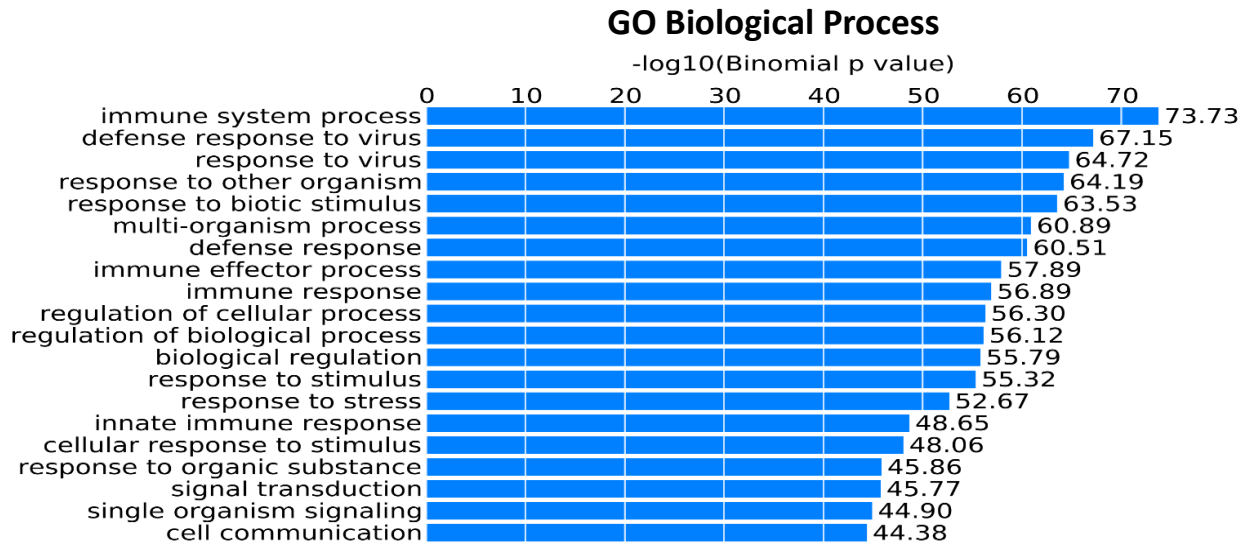
Έπειτα μελετήσαμε τις πιθανές αλλαγές στη χρωματινική διαμόρφωση και στο προφίλ πρόσδεσης συν-ενεργοποιητών, μεταγραφικών παραγόντων και ιστονικών τροποποιήσεων γύρω από τις 995 περιοχές με επαγόμενη πρόσδεση του Med1 (εικόνα 56). Παρατηρήθηκε επαγόμενη πρόσδεση τόσο του μεταγραφικού παράγοντα p65 καθώς και του συνενεργοποιητή CBP και της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac και σχετικά σταθερά επίπεδα H3K4me1 σε πολλές από τις περιοχές αυτές. Επιπλέον κάποιες από τις περιοχές αυτές απέκτησαν αυξημένη προσβασιμότητα μετά την ιική μόλυνση. Παρατηρήθηκε επομένως ταυτόχρονη επαγόμενη παρουσία πολλών δομικών δεικτών χαρακτηριστικών των ενισχυτών. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη εύρεση μοτίβων της οικογένειας IRF και τη παρουσία των παραπάνω περιοχών κοντά σε επαγόμενα γονίδια είναι ενδεικτικά του πιθανού ρόλου των παραπάνω περιοχών ως ενισχυτών επαγόμενων γονιδίων κατά την αντίκη κυτταρική απόκριση.

Στρέφοντας τη προσοχή μας στις περιοχές που βρίσκονται κοντά σε θέσεις έναρξης της μεταγραφής (<2κβ) βρήκαμε 128 περιοχές με επαγόμενα επίπεδα πρόσδεσης του Med1 6 ώρες μετά τη μόλυνση. Η ανάλυση γονιδιακών οντολογιών έδειξε ότι αυτές οι περιοχές σχετίζονται μεταξύ άλλων με την άμυνα απέναντι σε ιούς και γενικότερα με διεργασίες του ανοσοποιητικού συστήματος (εικόνα 57B). Πράγματι από την ανάλυση των πειραμάτων RNA-seq προέκυψε ότι από τα 114 κοντινότερα γονίδια σε αυτές τις περιοχές τα 73 είναι ιικά επαγόμενα φανερώνοντας την υψηλή ειδικότητα του Med1 να προσδέεται μετά τη μόλυνση σε ιικά επαγόμενα γονίδια συμμετέχοντας πιθανότατα στην επαγωγή της έκφρασης τους. Οι περιοχές αυτές φέρουν μοτίβα της οικογένειας IRF (εικόνα 57A). Στην εικόνα 54 παρουσιάζονται τα επαγόμενα επίπεδα Med1 γύρω από τις θέσεις έναρξης της μεταγραφής των *ιικά* επαγόμενων γονιδίων *IFIT1*, *IFIT2*, *IFIT3*, *IFIT5* (Γ) και *HERC5*, *HERC6* (Δ).

A

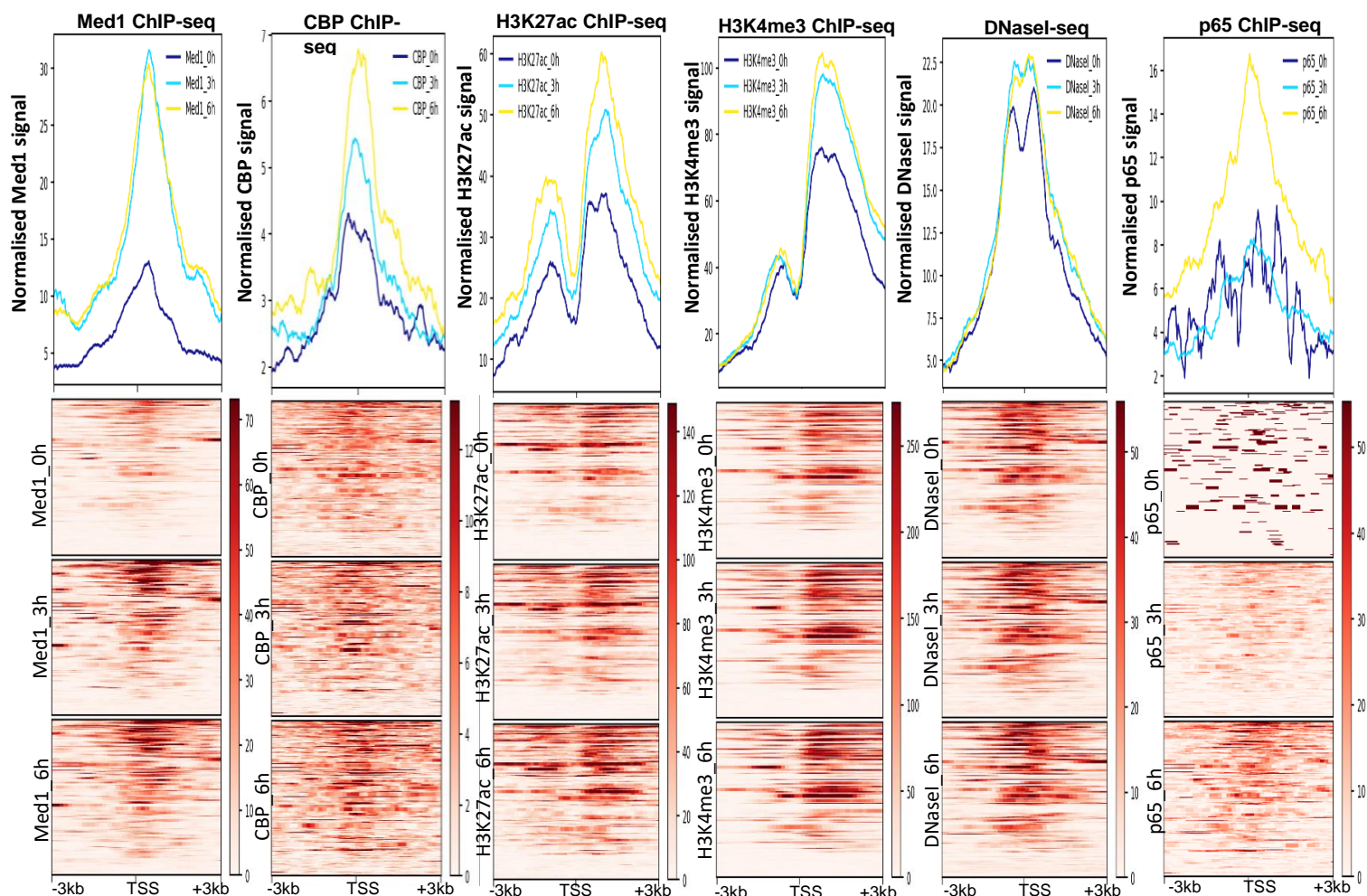


B



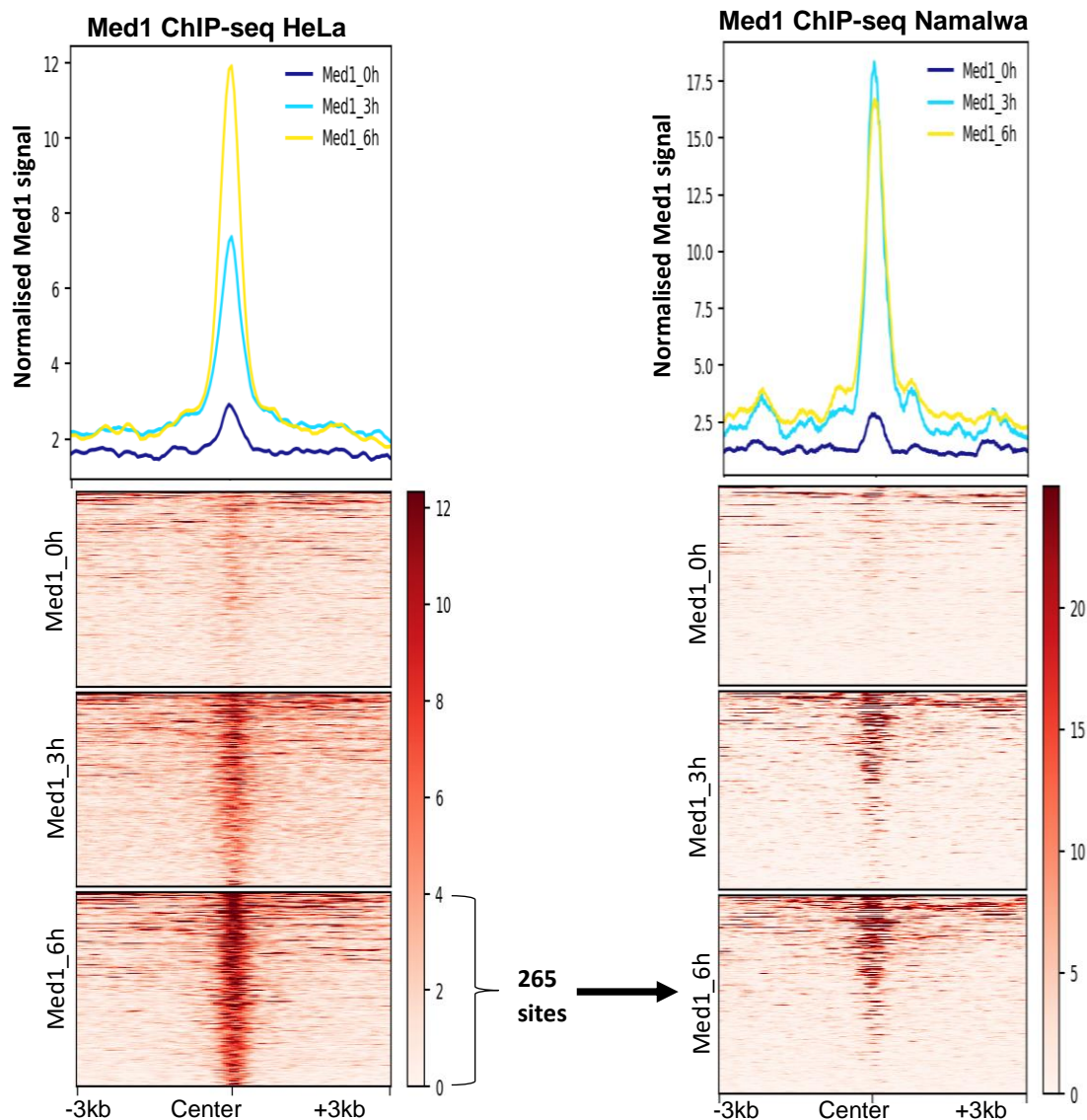
Εικόνα 57: Απεικονίζονται τα πιο στατιστικά σημαντικά μοτίβα μεταγραφικών παραγόντων (A) καθώς και οι βιολογικές διεργασίες (B) στις οποίες συμμετέχουν τα γονίδια που βρίσκονται εγγύτερα στις κοντινές σε θέσεις έναρξης της μεταγραφής περιοχές επαγόμενης πρόσδεσης του Med1 σε κύτταρα *Namalwa*.

Στη συνέχεια εξετάσαμε τις πιθανές αλλαγές στη χρωματινική διαμόρφωση και στο προφίλ πρόσδεσης συν-ενεργοποιητών, μεταγραφικών παραγόντων και ιστονικών τροποποιήσεων γύρω από τις 128 περιοχές με επαγόμενη πρόσδεση του Med1 (εικόνα 58). Παρατηρήθηκε επαγόμενη πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα p65 καθώς και του συνενεργοποιητή CBP και της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac και σταθερά επίπεδα H3K4me3 σε πολλές από τις περιοχές αυτές. Οι περισσότερες από τις περιοχές ήταν προσβάσιμες ήδη πριν από την *ϊική* μόλυνση. Διαπιστώθηκε επομένως ταυτόχρονη επαγόμενη παρουσία πολλών δομικών δεικτών χαρακτηριστικών των ενισχυτών, γεγονός που υποδεικνύει το πιθανό ρυθμιστικό ρόλο τους στην *αντιική* κυτταρική απόκριση.



Εικόνα 58: Απεικονίζονται τα επίπεδα Med1, CBP, H3K27ac, H3K4me3, προσβασιμότητας της χρωματίνης (DNaseI) και p65 γύρω από τις 128 περιοχές με επαγόμενο πρότυπο πρόσδεσης Med1 κοντά σε θέσεις έναρξης της μεταγραφής σε κύτταρα Namalwa.

Στη συνέχεια εξετάστηκε εάν το επαγόμενο πρότυπο πρόσδεσης του Med1 είναι συντηρημένο στους δύο κυτταρικούς τύπους. Διαπιστώθηκε ότι ένας μεγάλος αριθμός από τους 265 απομακρυσμένους πιθανούς ενισχυτές που έχουν επαγόμενο πρότυπο πρόσδεσης του Med1 στα κύτταρα HeLa παρουσιάζουν επαγόμενα επίπεδα Med1 και στα Namalwa (εικόνα 59). Συγκεκριμένα 70 πιθανοί ενισχυτές έχουν επαγόμενα πρότυπα πρόσδεσης του Med1 6 ώρες μετά τη μόλυνση και στους δύο κυτταρικούς τύπους. Αναζητώντας τα κοντινότερα γονίδια σε αυτούς τους πιθανούς ενισχυτές βρέθηκαν 17 *ικά* επαγόμενα γονίδια (εικόνα 60). Χαρακτηριστικά είναι τα παραδείγματα των γονιδίων *IFNB1* και *OASL*.

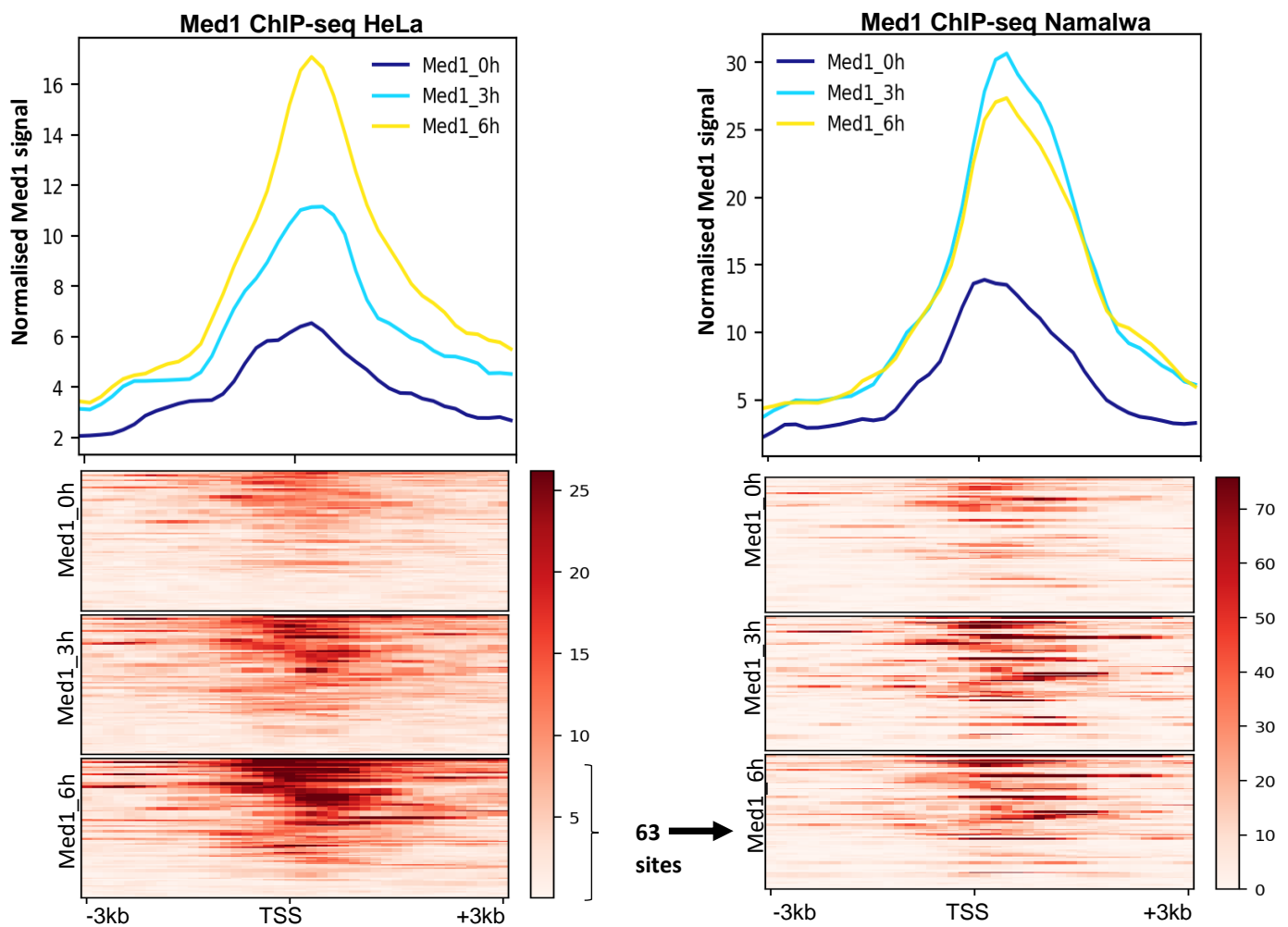


Εικόνα 59: Α) Συγκριτική ανάλυση των απομακρυσμένων από υποκινητές περιοχών με επαγόμενα επίπεδα Med1 μεταξύ κυττάρων HeLa και Namalwa. Στα αριστερά παρουσιάζονται οι 265 περιοχές με επαγόμενα επίπεδα Med1 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα HeLa. Στα δεξιά παρουσιάζεται η κατανομή των επιπέδων Med1 γύρω από αυτές τις περιοχές στα Namalwa. Εντοπίστηκαν 70 πιθανοί ενισχυτές με επαγόμενα επίπεδα Med1 και στους δύο κυτταρικούς τύπους.

<i>IFNB1</i>	<i>OASL</i>	<i>IFIT2</i>	<i>PMAIP1</i>
<i>HERC5</i>	<i>B4GALT5</i>	<i>NAV2</i>	<i>NEDD1</i>
<i>IRF1</i>	<i>SARIA</i>	<i>CH25H</i>	<i>B2M</i>
<i>ZC3HAV1</i>	<i>CHEK2</i>	<i>GPBP1</i>	<i>SRPK2</i>
<i>TNIP1</i>			

Εικόνα 60: Απεικονίζονται τα κοινά *ϊκ*α επαγόμενα γονίδια τα οποία αποτελούν τα εγγύτερα γονίδια στις 70 απομακρυσμένες από θέσεις έναρξης της μεταγραφής περιοχές με επαγόμενο πρότυπο πρόσδεσης του Med1 τόσο στα HeLa όσο και στα Namalwa.

Μελετώντας τις περιοχές με επαγόμενη πρόσδεση του Med1 που βρίσκονται κοντά σε θέσεις έναρξης της μεταγραφής διαπιστώθηκε ότι από τις 63 περιοχές με επαγόμενα επίπεδα Med1 στα HeLa, στις 18 ο Med1 έχει επαγόμενα επίπεδα πρόσδεσης και στα Namalwa (εικόνα 61). Αναζητώντας τα κοντινότερα γονίδια σε αυτούς τους πιθανούς ενισχυτές βρέθηκαν 15 *ϊκ*α επαγόμενα γονίδια (εικόνα 62). Χαρακτηριστικά είναι τα παραδείγματα των γονιδίων *IFNB1*, *CCL5* και *OASL*.



Εικόνα 61: Στο αριστερό μέρος παρουσιάζονται τα επίπεδα Med1 στα HeLa πριν καθώς και 3 και 6 ώρες μετά τη μόλυνση γύρω από τις 63 γειτνιαζουσες σε θέσεις έναρξης της μεταγραφής περιοχές πρόσδεσης του στα HeLa. Στο δεξί μέρος απεικονίζονται τα επίπεδα Med1 στα Namalwa γύρω από τις 63 επαγόμενες θέσεις των HeLa.

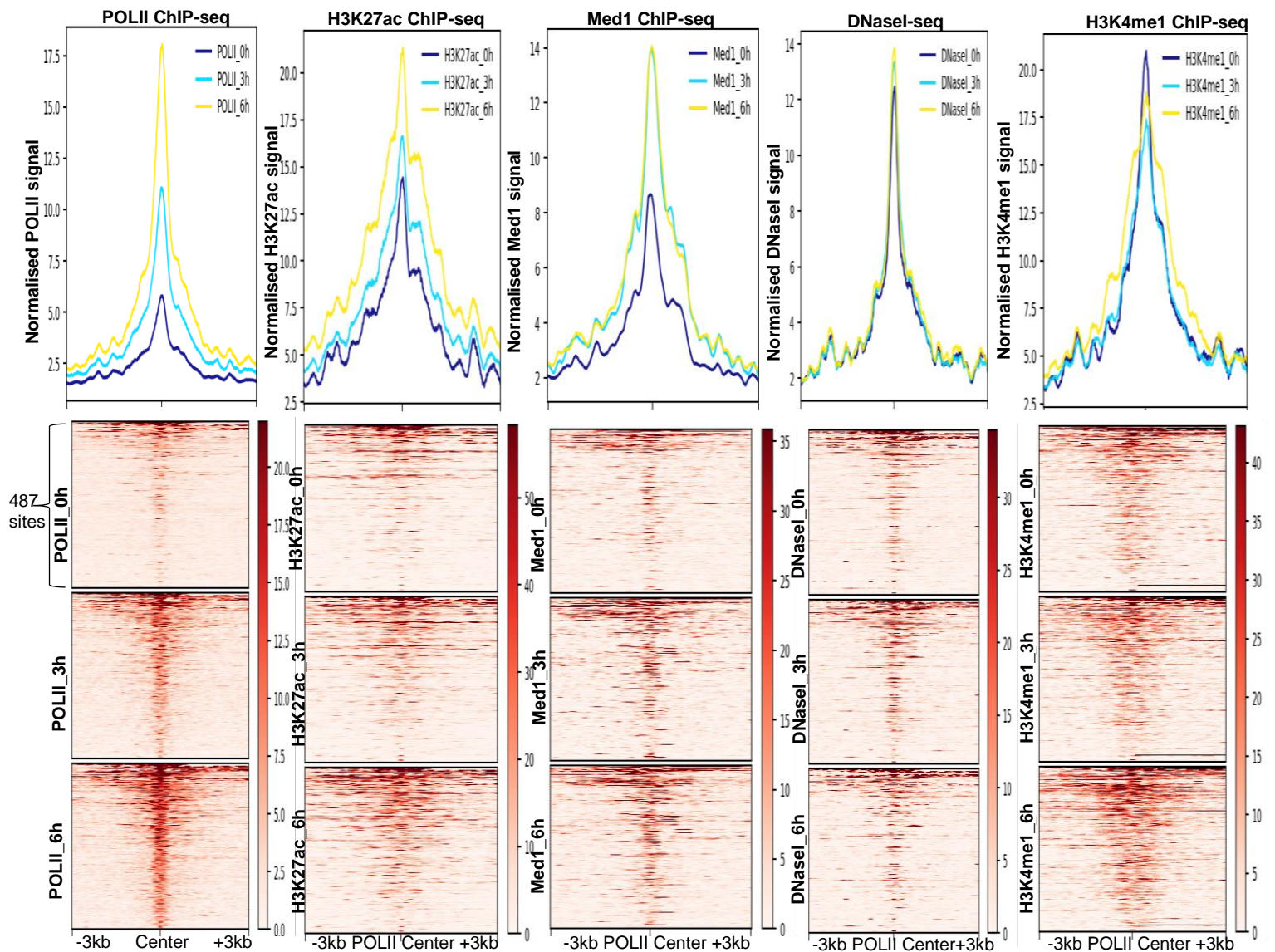
<i>IFNB1</i>	<i>OASL</i>	<i>CCL5</i>
<i>ISG15</i>	<i>IFIT2</i>	<i>IFIT3</i>
<i>ISG20</i>	<i>DHX58</i>	<i>PMAIP1</i>
<i>IFIH1</i>	<i>HERC6</i>	<i>HERC5</i>
<i>DDX60</i>	<i>ZC3HAV1</i>	<i>DDX58</i>

Εικόνα 62: Απεικονίζονται τα κοινά *ϊικά* επαγόμενα γονίδια τα οποία αποτελούν τα εγγύτερα γονίδια στις 18 κοντινές σε θέσεις έναρξης της μεταγραφής περιοχές με επαγόμενο πρότυπο πρόσδεσης του Med1 τόσο στα HeLa όσο και στα Namalwa.

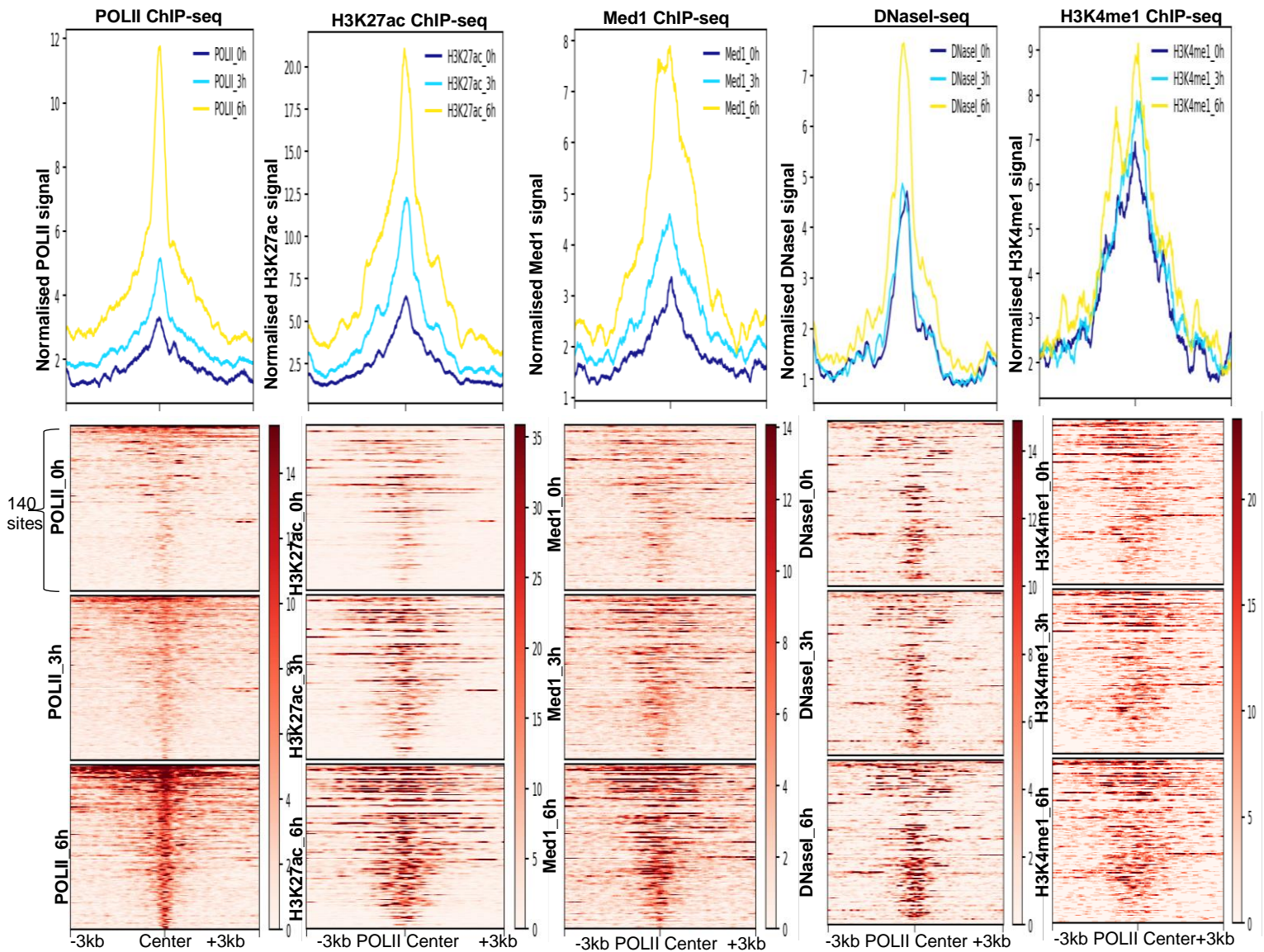
Μελέτη της πρόσδεσης της RNAPOLII σε πιθανούς ενισχυτές

Για τη διερεύνηση της ανακατανομής της μεταγραφικής μηχανής κατά την πρόοδο της αντιϊκής απόκρισης πραγματοποιήθηκαν πειράματα ChIP-seq έναντι της RNAPOLII πριν καθώς και 3 και 6 ώρες μετά την *ϊική* μόλυνση σε κύτταρα HeLa και Namalwa. Αξίζει να σημειωθεί ότι το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε αναγνωρίζει τα ολικά επίπεδα της παραπάνω πρωτεΐνης. Εκτός από τους υποκινητές και τις κωδικές περιοχές των γονιδίων που μεταγράφονται έχει βρεθεί ότι η RNA πολυμεράση προσδένεται και σε ενεργούς ενισχυτές και οδηγεί στη παραγωγή ασταθών μεταγράφων από τις αλληλουχίες των ενισχυτών (eRNAs) (Kim *et al.*, 2010). Επομένως έγινε αναζήτηση των απομακρυσμένων από γονίδια θέσεων με επαγόμενη πρόσδεση της RNAPOLII 6 ώρες μετά τη μόλυνση (487 θέσεις στα Namalwa και 140 θέσεις στα HeLa). Στις εικόνες 63 και 64 παρουσιάζεται η ανακατανομή της έντασης του σήματος δεικτών χαρακτηριστικών των ενισχυτών κατά τη διάρκεια της αντιϊκής απόκρισης γύρω από τις επαγόμενες θέσεις πρόσδεσης της RNAPOLII σε κύτταρα Namalwa και HeLa αντίστοιχα. Παρατηρήθηκε ότι οι θέσεις αυτές φέρουν χαρακτηριστικά των ενεργών ενισχυτών όπως υψηλά επίπεδα H3K27ac, H3K4me1, Med1 και είναι προσβάσιμες σύμφωνα με τα πειράματα DNaseI-seq. Επιπλέον ένα ποσοστό των περιοχών αυτών εμφανίζει επαγόμενα επίπεδα των δεικτών H3K27ac και Med1. Στην εικόνα 65 (A,B) παρουσιάζονται τα παραδείγματα της επαγόμενης πρόσδεσης της RNAPOLII στο -20kb ενισχυτή της *IFNB1* και στο πιθανό ενισχυτή που βρίσκεται περίπου 20 kb άνωθεν του γονιδίου *OASL* σε κύτταρα HeLa και Namalwa. Τέλος βρέθηκε ότι οι βιολογικές διεργασίες για τα γονίδια που βρίσκονται κοντά στις θέσεις με επαγόμενη πρόσδεση της RNAPOLII σχετίζονται με διεργασίες

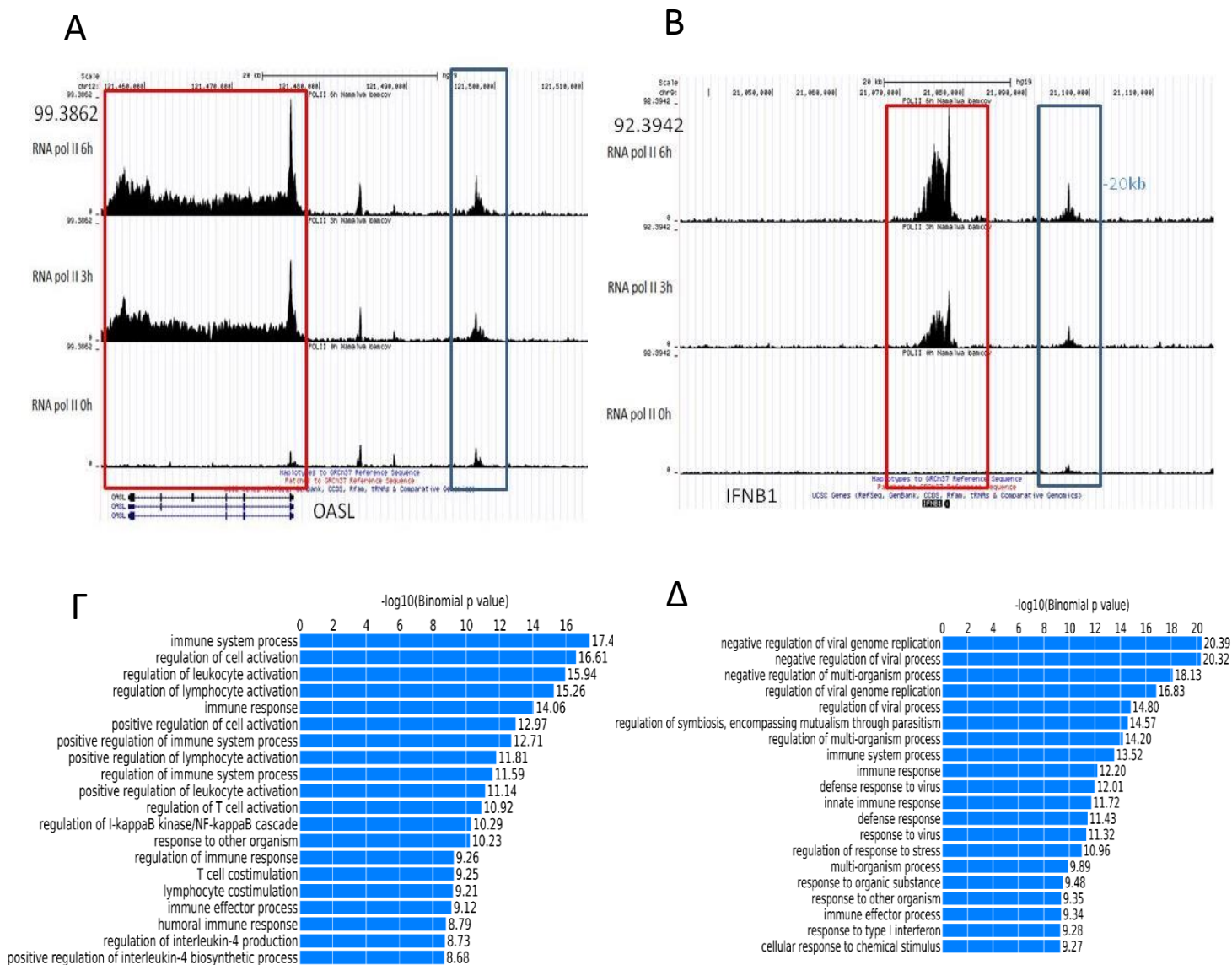
της ανοσολογικής απόκρισης τόσο στα κύτταρα Namalwa όσο και στα HeLa (εικόνα 65 (Γ,Δ)).



Εικόνα 63: Παρουσιάζεται η ανακατανομή της έντασης του σήματος δεικτών χαρακτηριστικών των ενισχυτών κατά τη διάρκεια της αντίικης απόκρισης γύρω από τις επαγόμενες, απομακρυσμένες από γονίδια, θέσεις πρόσδεσης της RNAPOLII σε κύτταρα Namalwa.



Εικόνα 64: Παρουσιάζεται η ανακατανομή της έντασης του σήματος δεικτών χαρακτηριστικών των ενισχυτών κατά τη διάρκεια της αντίκκης απόκρισης γύρω από τις επαγόμενες, απομακρυσμένες από γονίδια, θέσεις πρόσδεσης της RNAPOLII σε κύτταρα HeLa.

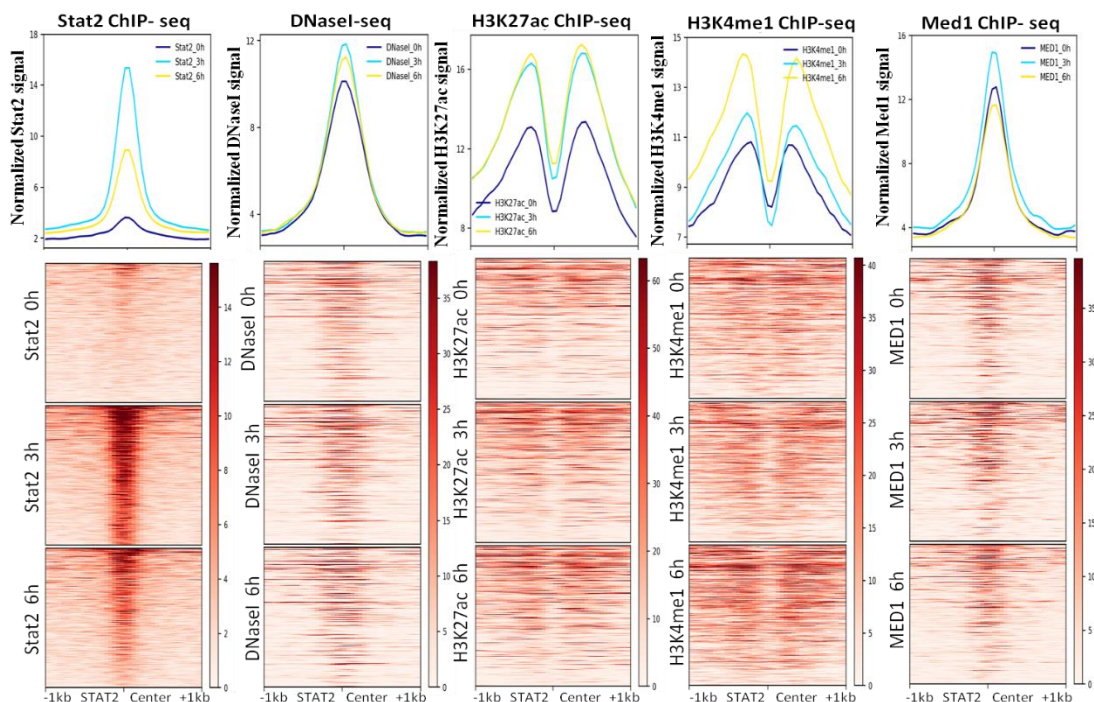


Εικόνα 65: Παραδείγματα επαγόμενης πρόσδεσης της RNA POLII σε intergenic περιοχές γύρω από τα επαγόμενα γονίδια *OASL* (A) και *IFNB1* σε κύτταρα Namalwa (B). Ανάλυση των βιολογικών διεργασιών για τα γονίδια που βρίσκονται κοντά στις επαγόμενες intergenic θέσεις πρόσδεσης της RNA POLII σε κύτταρα Namalwa (Γ) και HeLa (Δ).

Μελέτη της πρόσδεσης του Stat2 σε πιθανούς ενισχυτές

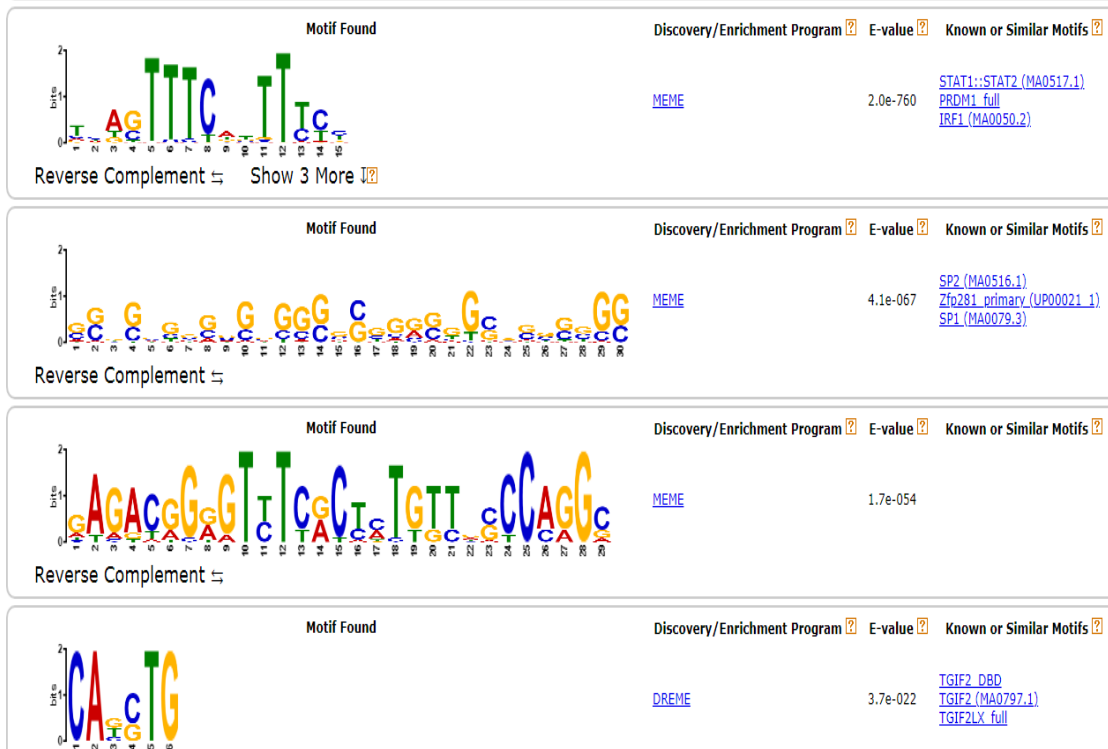
Για την ταυτοποίηση των ρυθμιστικών στοιχείων που επάγονται από το δεύτερο κύμα σηματοδότησης μέσω του μονοπατιού των ιντερφερονών πραγματοποιήθηκαν πειράματα ChIP-seq έναντι του μεταγραφικού παράγοντα Stat2, μέλος του τριμερούς συμπλόκου ISGF3 που ενεργοποιείται από τις ιντερφερόνες πριν καθώς και 3 και ώρες μετά τη μόλυνση με ιό Sendai σε κύτταρα Namalwa. Παρατηρήθηκαν 1351 περιοχές

που παρουσιάζουν επαγόμενη πρόσδεση του Stat2 3 ώρες μετά την *ιική* μόλυνση και αποτελούν πιθανούς ενισχυτές που ρυθμίζουν την *αντιική* απόκριση. Για να εξακριβωθεί το τελευταίο, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του προτύπου πρόσδεσης των δεικτών χαρακτηριστικών των ενισχυτών που περιλαμβάνονται στη μελέτη μας γύρω από αυτές τις 1351 θέσεις με επαγόμενη πρόσδεση του Stat2 (εικόνα 66). Παρατηρήθηκε ότι οι περιοχές με επαγόμενη πρόσδεση του Stat2 φέρουν στη πλειοψηφία τους δείκτες χαρακτηριστικούς των ενισχυτών όπως πρόσδεση του Med1, υψηλά επίπεδα H3K27ac και H3K4me1 καθώς επίσης είναι προσβάσιμοι σύμφωνα με τα πειράματα DNaseI-seq. Αξίζει να σημειωθεί ότι στη πλειοψηφία τους οι θέσεις αυτές φέρουν υψηλά επίπεδα των δεικτών ήδη πριν τη μόλυνση, επομένως μπορούμε να συμπεράνουμε ότι ο Stat2 προσδένεται κυρίως σε pre-accessible χρωματίνη και σε ενισχυτές που είναι ενεργοί πριν ακόμα παρουσιαστεί το *ϊικό* ερέθισμα. Στη συνέχεια για τις περιοχές αυτές με επαγόμενη πρόσδεση του Stat2 αναζητήθηκαν μοτίβα πρόσδεσης και άλλων μεταγραφικών παραγόντων (εικόνα 67A,B). Από την ανάλυση αυτή προέκυψαν ως πιο στατιστικά σημαντικά μοτίβα αυτά των παραγόντων Stat καθώς και των IRF σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία. Επιπλέον από την ανάλυση των βιολογικών διεργασιών στις οποίες εμπλέκονται τα πιο κοντινά γονίδια σε αυτές τις περιοχές (εικόνα 67Γ) διαπιστώθηκε ότι συμμετέχουν σε διεργασίες όπως η απόκριση σε τύπου I ιντερφερόνες, η απόκριση σε κυτοκίνες και γενικότερα σε διεργασίες της ανοσολογικής απόκρισης

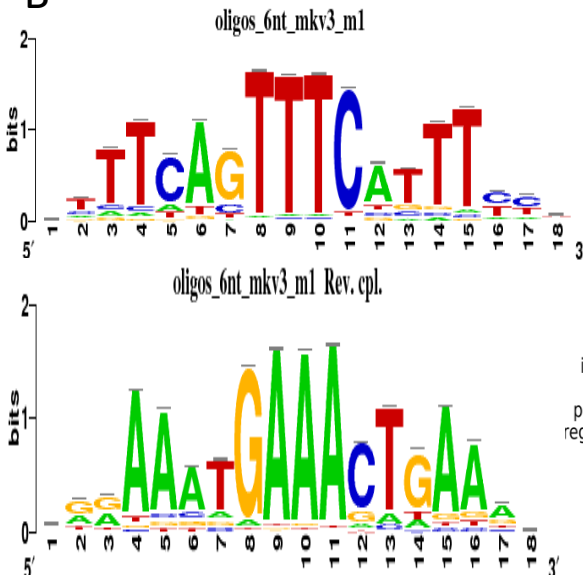


Εικόνα 66: Παρουσιάζεται η ανακατανομή δεικτών χαρακτηριστικών των ενισχυτών γύρω από τις 1351 απομακρυσμένες από ενισχυτές περιοχές με επαγόμενη πρόσδεση του Stat2 3 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα Namalwa. Παρατηρήθηκε ότι οι περισσότερες από τις θέσεις αυτές φέρουν υψηλά επίπεδα σήματος για τους δείκτες H3K27ac, H3K4me1 και Med1 και είναι προσβάσιμες σύμφωνα με πειράματα DNaseI-seq ήδη πριν τη μόλυνση των κυττάρων από τον ιό.

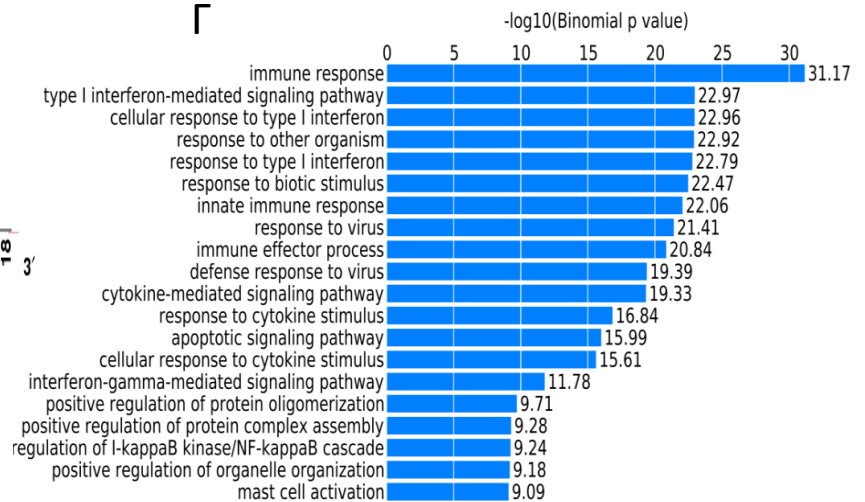
A



B



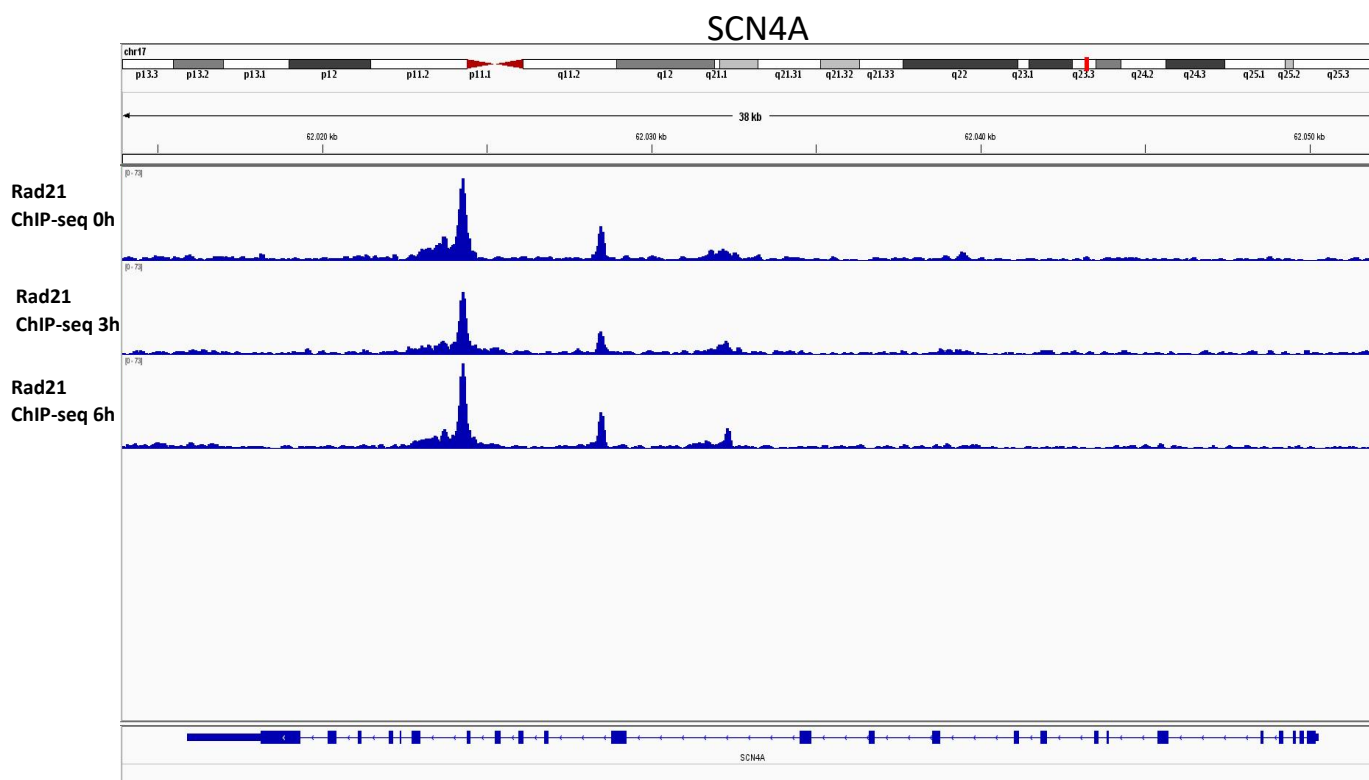
Γ



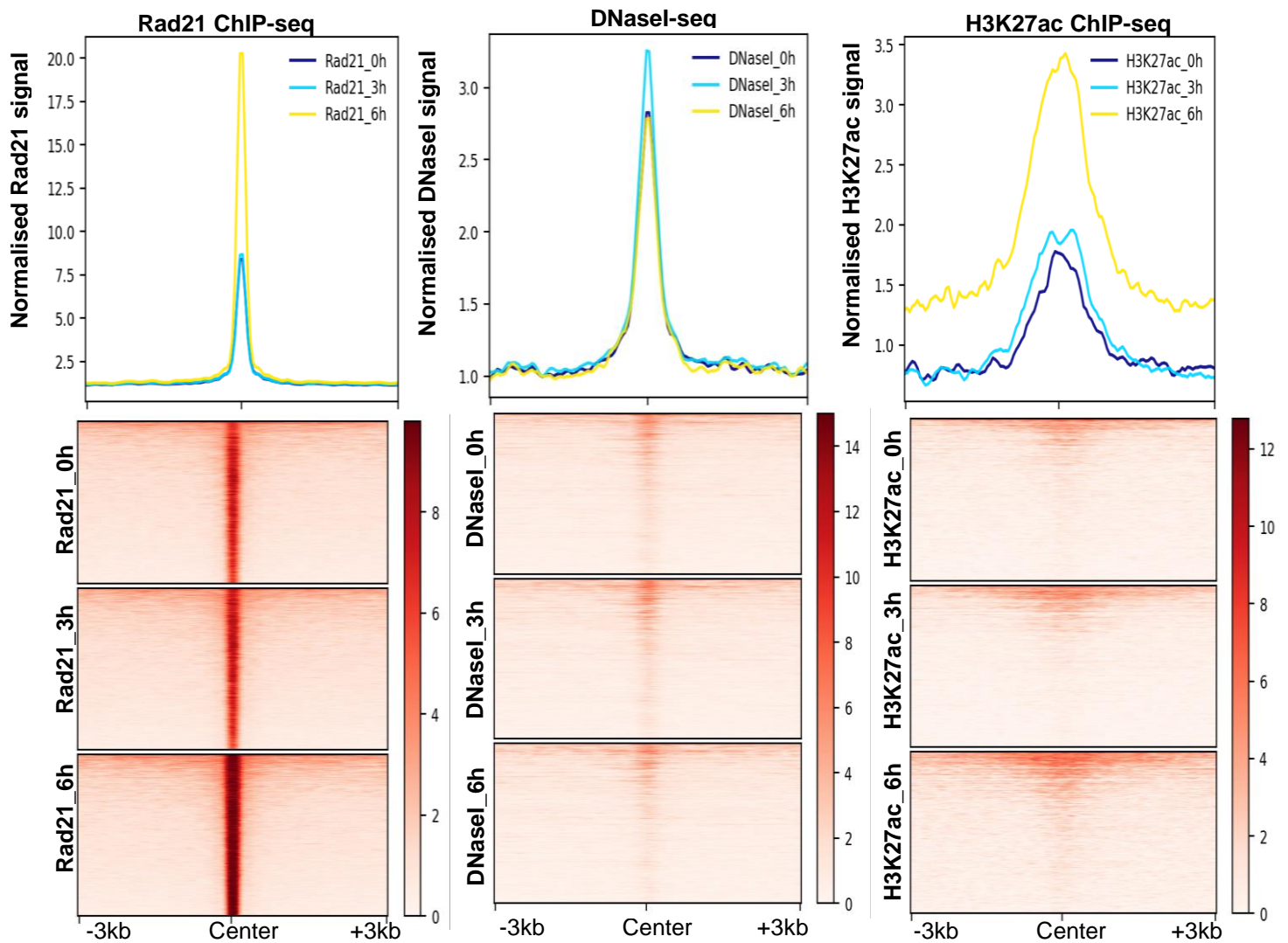
Εικόνα 67: A) Μοτίβα πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων στις 1351 απομακρυσμένες από ενισχυτές περιοχές με επαγόμενη πρόσδεση του Stat2 3 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα Namalwa σύμφωνα με το πρόγραμμα MEME-ChIP. B) Sequence logos για τα κορυφαία μοτίβα στις παραπάνω θέσεις σύμφωνα με το πρόγραμμα RSAT tools. Ως κορυφαία μοτίβα προέκυψαν αυτά των Stat (πάνω) και IRF (κάτω). Γ) Τα αποτελέσματα της ανάλυσης βιολογικών διεργασιών για τα γονίδια που βρίσκονται κοντά στις περιοχές με επαγόμενη πρόσδεση του Stat2 3 ώρες μετά τη μόλυνση.

Πειράματα Rad21 ChIP-seq

Για τη μελέτη της ανακατανομής της κοχεσίνης κατά την πρόοδο της αντιϊκής απόκρισης πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνησης χρωματίνης σε συνδυασμό με αλληλούχιση νέας γενιάς (ChIP-seq) για την υπομονάδα Rad21 της κοχεσίνης πριν καθώς και 3 και 6 ώρες μετά τη μόλυνση με ιό Sendai σε κύτταρα Namalwa. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψαν 56.842 θέσεις πρόσδεσης της Rad21 στο γονιδίωμα πριν από τη μόλυνση, 51.423 θέσεις 3 ώρες μετά τη μόλυνση και 68.404 θέσεις 6 ώρες μετά τη μόλυνση. Στην εικόνα 68 παρουσιάζονται δύο ισχυρές θέσεις πρόσδεσης της Rad21 εντός του γονιδίου *SCN4A*, στις οποίες θέσεις προσδένεται η Rad21 σε διάφορους κυτταρικούς τύπους σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. Από τη διαφορική ανάλυση της έντασης της πρόσδεσης της Rad21 προέκυψε ότι σε 3882 απομακρυσμένες (>2κβ) από θέσεις έναρξης της μεταγραφής περιοχές παρατηρείται επαγόμενη πρόσδεση της Rad21 6 ώρες μετά τη μόλυνση.



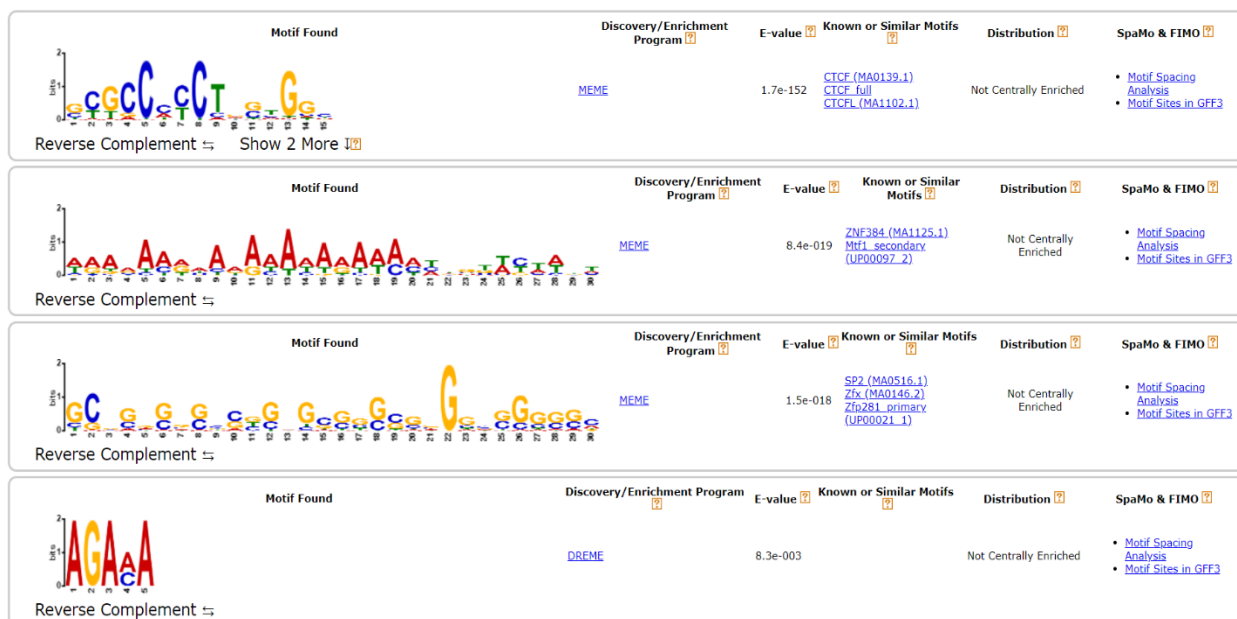
Εικόνα 68: Στην εικόνα απεικονίζονται τα επίπεδα πρόσδεσης της Rad21 γύρω από δύο ισχυρές κορυφές εντός του γονιδίου *SCN4A*.



Εικόνα 69: Απεικονίζονται τα επίπεδα προσβασιμότητας (DNaseI-seq) και H3K27ac γύρω από τις 3882 περιοχές με επαγόμενη πρόσδεση της Rad21 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα Namalwa.

Στην εικόνα 69 παρουσιάζονται τα επίπεδα πρόσδεσης της Rad21 γύρω από τις 3882 επαγόμενες θέσεις πρόσδεσης της 6 ώρες μετά τη μόλυνση. Στη συνέχεια εξετάστηκαν τα επίπεδα προσβασιμότητας της χρωματίνης γύρω από αυτές τις θέσεις και παρατηρήθηκε ότι ένα μεγάλο ποσοστό των θέσεων αυτών δεν είναι προσβάσιμο. Επιπλέον η απεικόνιση των επιπέδων H3K27ac κατέδειξε ότι η πλειοψηφία των θέσεων αυτών δεν φέρει το συγκεκριμένο δείκτη των ενεργών ενισχυτών τόσο πριν όσο και μετά τη μόλυνση. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι οι περισσότερες από τις επαγόμενες θέσεις πρόσδεσης της Rad21 δεν φέρουν δείκτες χαρακτηριστικούς των ενεργών ενισχυτών. Είναι πιθανό οι θέσεις αυτές να έχουν ένα δομικό ρόλο στη αναδιαμόρφωση της τρισδιάστατης αρχιτεκτονικής του γονιδιώματος σε συνεργασία με το παράγοντα CTCF.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση μοτίβων μεταγραφικών παραγόντων για τις παραπάνω περιοχές. Ως πιο στατιστικά σημαντικό μοτίβο προέκυψε αυτό του CTCF, ένα αναμενόμενο εύρημα καθώς σύμφωνα με τη βιβλιογραφία το σύμπλοκο της κοχεσίνης συνεντοπίζεται με το CTCF σε χιλιάδες περιοχές στο γονιδίωμα και μαζί οργανώνουν τη πολύπλοκη τρισδιάστατη διαμόρφωση του γονιδιώματος (εικόνα 70).






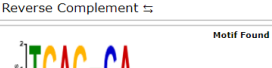
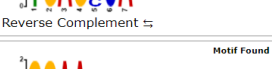

Εικόνα 70: Παρουσιάζεται η ανάλυση μοτίβων μεταγραφικών παραγόντων για τις περιοχές με επαγόμενη πρόσδεση της Rad21 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα Namalwa.

Μελέτη της προσβασιμότητας της χρωματίνης με τη μέθοδο DNaseI-seq

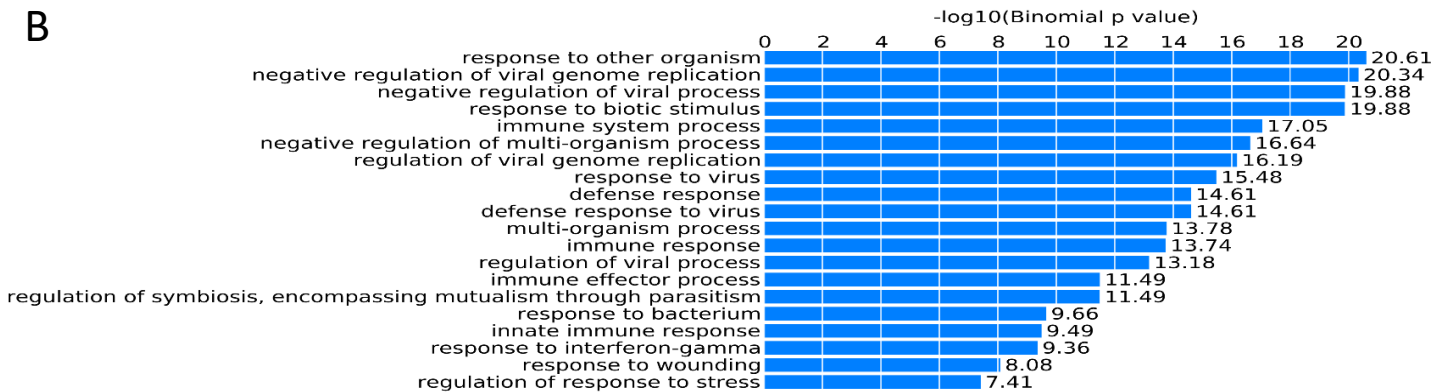
Για την εύρεση των περιοχών της χρωματίνης των οποίων η προσβασιμότητα μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της αντιϊκής απόκρισης πραγματοποιήθηκαν πειράματα DNaseI-seq πριν καθώς και 3 και 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα HeLa και Namalwa. Από τη διαφορική ανάλυση των επιπέδων προσβασιμότητας προέκυψε ότι σε 425 απομακρυσμένες (>2κβ) από θέσεις έναρξης της μεταγραφής περιοχές σε κύτταρα HeLa παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα προσβασιμότητας 6 ώρες μετά τη μόλυνση. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση μοτίβων μεταγραφικών παραγόντων για τις παραπάνω περιοχές. Ανάμεσα στα πιο στατιστικά σημαντικά μοτίβα βρέθηκαν αυτά των παραγόντων της οικογένειας IRF και

αυτά της οικογένειας Fos παραγόντων που είναι γνωστό πως συμμετέχουν στην ανοσολογική απόκριση επιβεβαιώνοντας την αρτιότητα των πειραμάτων μας (εικόνα 71A). Εξετάζοντας τις βιολογικές λειτουργίες στις οποίες συμμετέχουν τα κοντινότερα σε αυτές τις περιοχές γονίδια βρέθηκε ότι αυτά εμπλέκονται μεταξύ άλλων στην άμυνα απέναντι σε ιούς και γενικότερα σε ανοσολογικές λειτουργίες (71B).

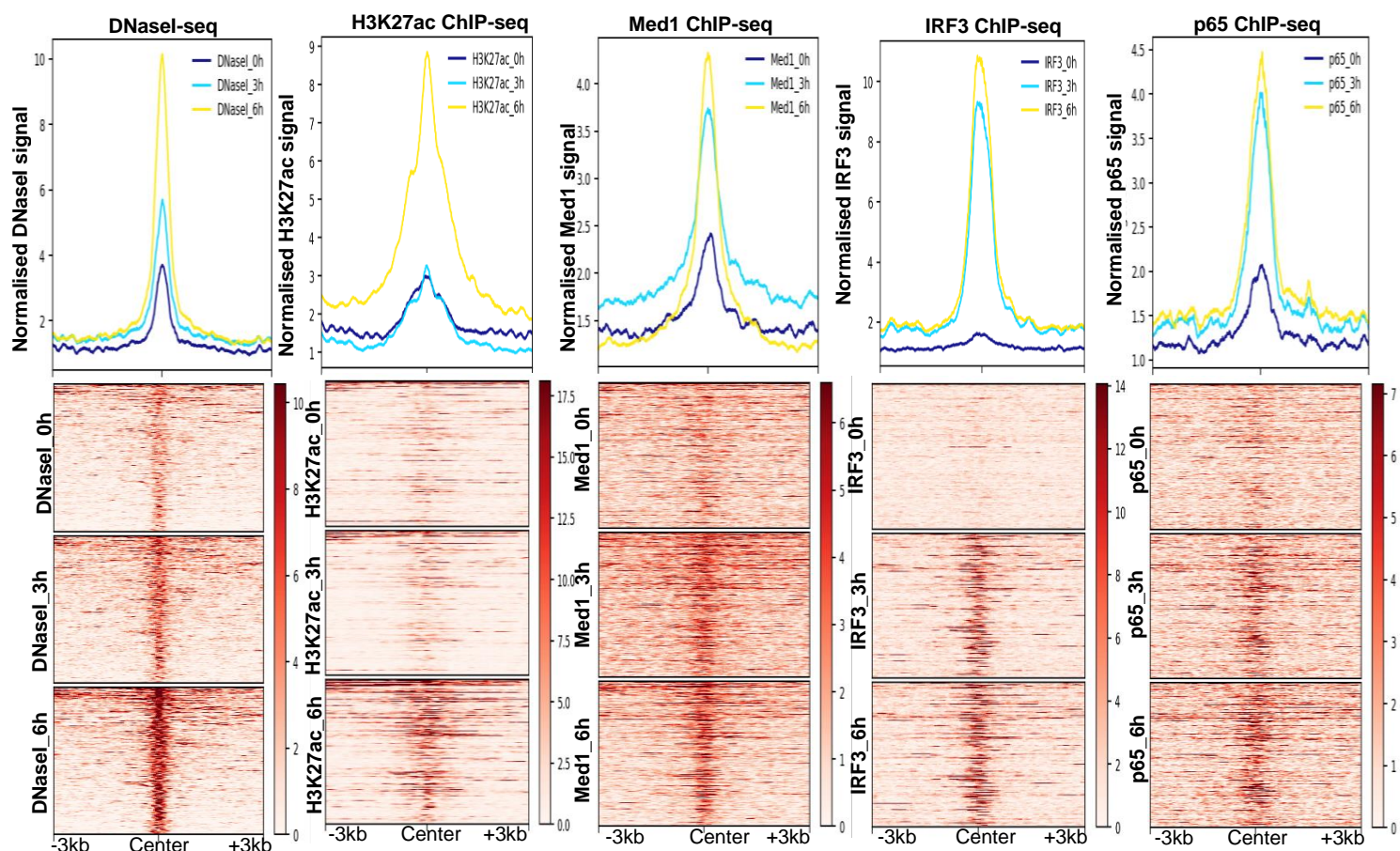
A

 <p>Reverse Complement ⇅</p>	<p>Discovery/Enrichment Program MEME</p> <p>E-value 4.9e-071</p> <p>Known or Similar Motifs IBF1 (MA0050_2) IBF3 (JUL) IBF3 (Ma1415_1)</p> <p>Distribution Not Centrally Enriched</p> <p>SpaMo & FIMO Motif Scoring Analysis Motif Sites in GFF3</p>
 <p>Reverse Complement ⇅</p>	<p>Discovery/Enrichment Program MEME</p> <p>E-value 5.1e-051</p> <p>Known or Similar Motifs</p> <p>Distribution Not Centrally Enriched</p> <p>SpaMo & FIMO Motif Scoring Analysis Motif Sites in GFF3</p>
 <p>Reverse Complement ⇅</p>	<p>Discovery/Enrichment Program MEME</p> <p>E-value 2.1e-047</p> <p>Known or Similar Motifs</p> <p>Distribution Not Centrally Enriched</p> <p>SpaMo & FIMO Motif Scoring Analysis Motif Sites in GFF3</p>
 <p>Reverse Complement ⇅</p>	<p>Discovery/Enrichment Program DREME</p> <p>E-value 3.5e-008</p> <p>Known or Similar Motifs JDP2_full_1 JDP2_DBP_1 JDP2 (MA0655_1)</p> <p>Distribution Not Centrally Enriched</p> <p>SpaMo & FIMO Motif Scoring Analysis Motif Sites in GFF3</p>
 <p>Reverse Complement ⇅</p>	<p>Discovery/Enrichment Program DREME</p> <p>E-value 2.7e-005</p> <p>Known or Similar Motifs F111_full_1 F111 (MA0476_2) F193_primary_(UP000999_1)</p> <p>Distribution Not Centrally Enriched</p> <p>SpaMo & FIMO Motif Scoring Analysis Motif Sites in GFF3</p>
 <p>Reverse Complement ⇅</p>	<p>Discovery/Enrichment Program DREME</p> <p>E-value 3.5e-004</p> <p>Known or Similar Motifs KLF5 (MA0599_1) Sox13_secondary_(UP000986_2)</p> <p>Distribution Not Centrally Enriched</p> <p>SpaMo & FIMO Motif Scoring Analysis Motif Sites in GFF3</p>

GO Biological Process

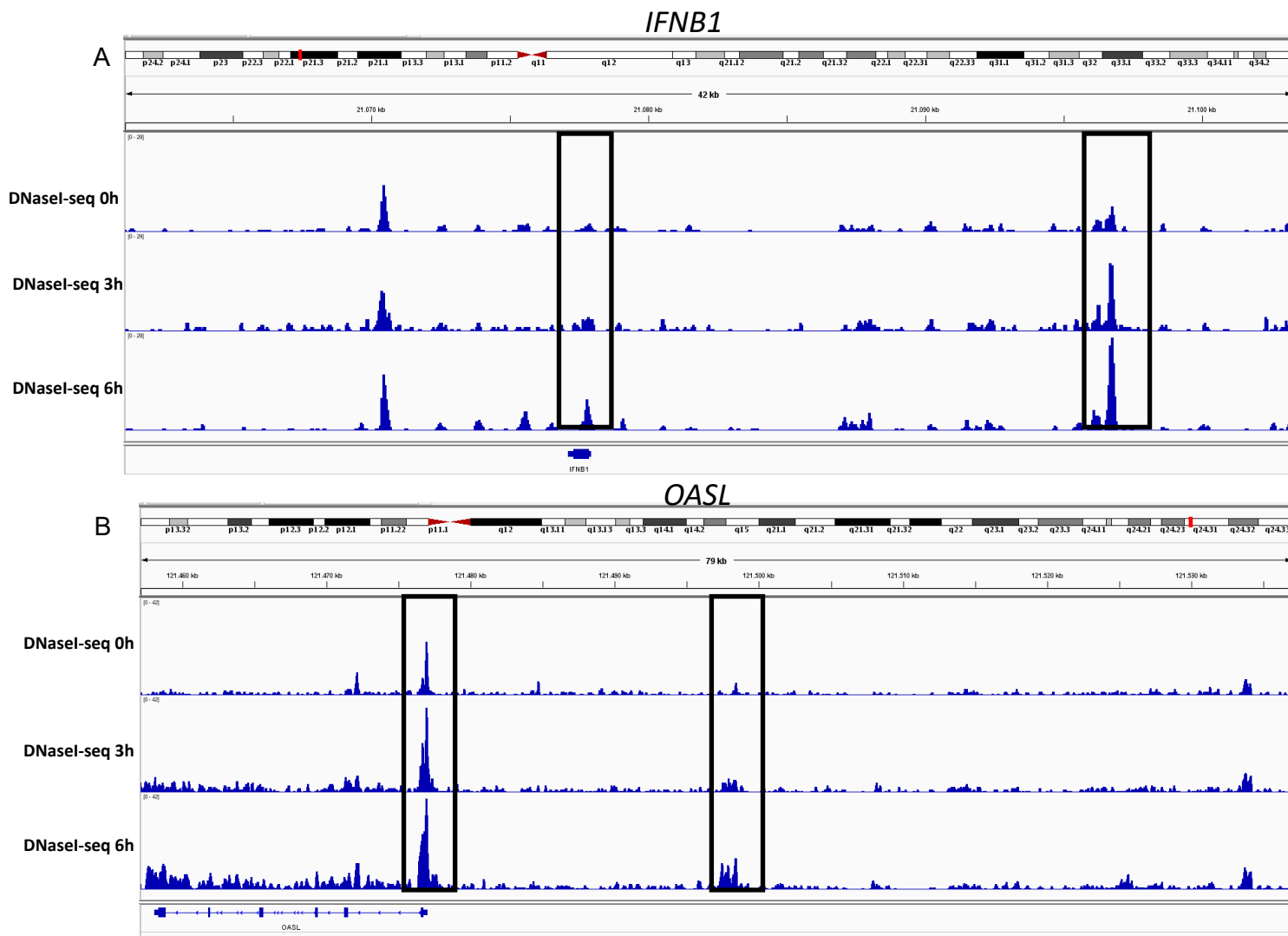


Εικόνα 71: Απεικονίζονται τα πιο στατιστικά σημαντικά μοτίβα μεταγραφικών παραγόντων (A) καθώς και οι βιολογικές διεργασίες (B) στις οποίες συμμετέχουν τα γονίδια που βρίσκονται εγγύτερα στις απομακρυσμένες από θέσεις έναρξης της μεταγραφής περιοχές με επαγόμενη προσβασιμότητα 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα HeLa.



Εικόνα 72: Απεικονίζονται τα επίπεδα H3K27ac, Med1, IRF3 και p65 γύρω από τις 425 περιοχές με επαγόμενα επίπεδα Προσβασιμότητας (DNaseI-seq) 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα HeLa.

Πράγματι από την συνδυαστική ανάλυση των πειραμάτων DNaseI-seq και RNA-seq προέκυψαν 62 επαγόμενα γονίδια 6 ώρες μετά τη μόλυνση με ιό τα οποία είναι τα εγγύτερα στις απομακρυσμένες περιοχές με επαγόμενα επίπεδα προσβασιμότητας. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι ενισχυτές των γονιδίων *OASL* και *IFNB1* των οποίων τα επίπεδα προσβασιμότητας απεικονίζονται στην εικόνα 73.

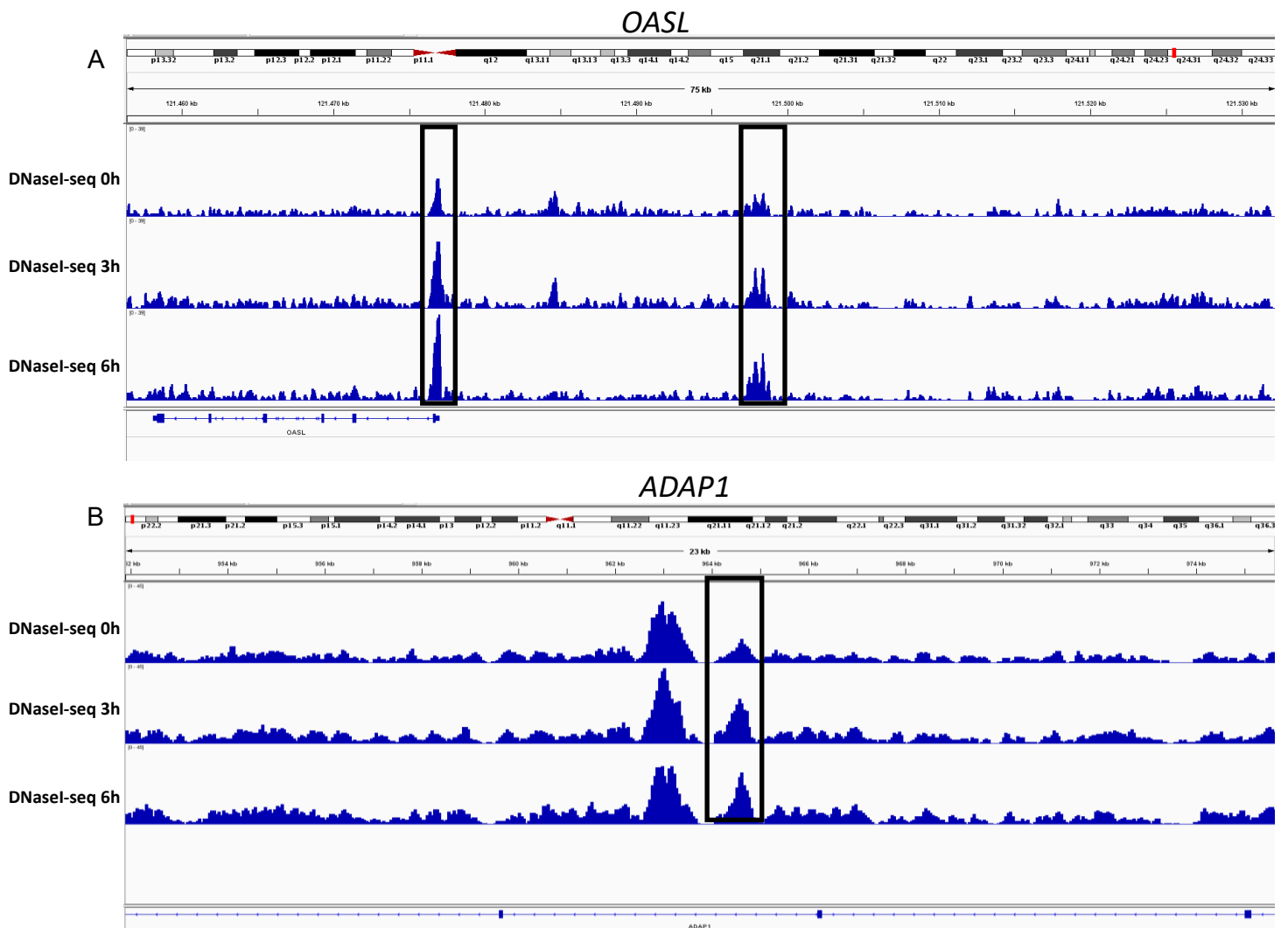


Εικόνα 73: Απεικονίζονται τα επαγόμενα επίπεδα προσβασιμότητας (DNaseI-seq) γύρω από τον υποκινητή και τον -20κβ ενισχυτή των γονιδίων *IFNB1* (A) και *OASL* (B) σε κύτταρα HeLa.

Επικεντρώνοντας τη προσοχή μας γύρω από υποκινητές βρήκαμε μόνο 54 περιοχές στο γονιδίωμα των οποίων η προσβασιμότητα επάγεται 6 ώρες μετά τη μόλυνση. Από αυτές τις περιοχές οι 28 ανήκουν σε υποκινητές *ικά* επαγόμενων γονιδίων με χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτά των *OASL*, *CCL5* και *MX1*.

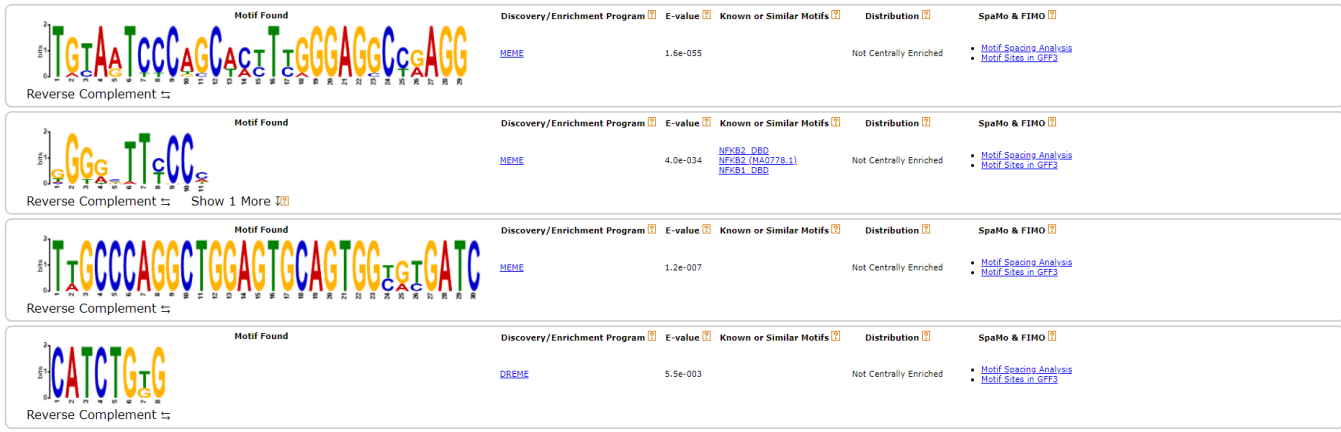
Από τη διαφορική ανάλυση των επιπέδων προσβασιμότητας σε κύτταρα Namalwa προέκυψε ότι σε 628 απομακρυσμένες (>2κβ) από θέσεις έναρξης της μεταγραφής περιοχές παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα προσβασιμότητας 6 ώρες μετά τη μόλυνση. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι ενισχυτές των γονιδίων *OASL* και *ADAP1* των οποίων τα επίπεδα προσβασιμότητας απεικονίζονται στην εικόνα 74. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση μοτίβων μεταγραφικών

παραγόντων για τις παραπάνω περιοχές. Ανάμεσα στα πιο στατιστικά σημαντικά μοτίβα βρέθηκε αυτό του παράγοντα REL που είναι γνωστό πως συμμετέχει στην ανοσολογική απόκριση επιβεβαιώνοντας την αρτιότητα των πειραμάτων μας (εικόνα 75A). Εξετάζοντας τις βιολογικές λειτουργίες στις οποίες συμμετέχουν τα κοντινότερα σε αυτές τις περιοχές γονίδια βρέθηκε ότι αυτά εμπλέκονται μεταξύ άλλων στην άμυνα απέναντι σε ιούς και γενικότερα σε ανοσολογικές λειτουργίες (εικόνα 75B). Πράγματι από την συνδυαστική ανάλυση των πειραμάτων DNaseI-seq και RNA-seq προέκυψαν 44 επαγόμενα γονίδια 6 ώρες μετά τη μόλυνση με ιό τα οποία είναι τα εγγύτερα στις απομακρυσμένες περιοχές με επαγόμενα επίπεδα προσβασιμότητας. Επικεντρώνοντας τη προσοχή μας γύρω από υποκινητές βρήκαμε 124 περιοχές στο γονιδίωμα των οποίων η προσβασιμότητα επάγεται 6 ώρες μετά τη μόλυνση. Από αυτές τις περιοχές οι 21 ανήκουν σε υποκινητές ιικά επαγόμενων γονιδίων με χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτά των *OASL*, *CCL5* και *HERC5*.

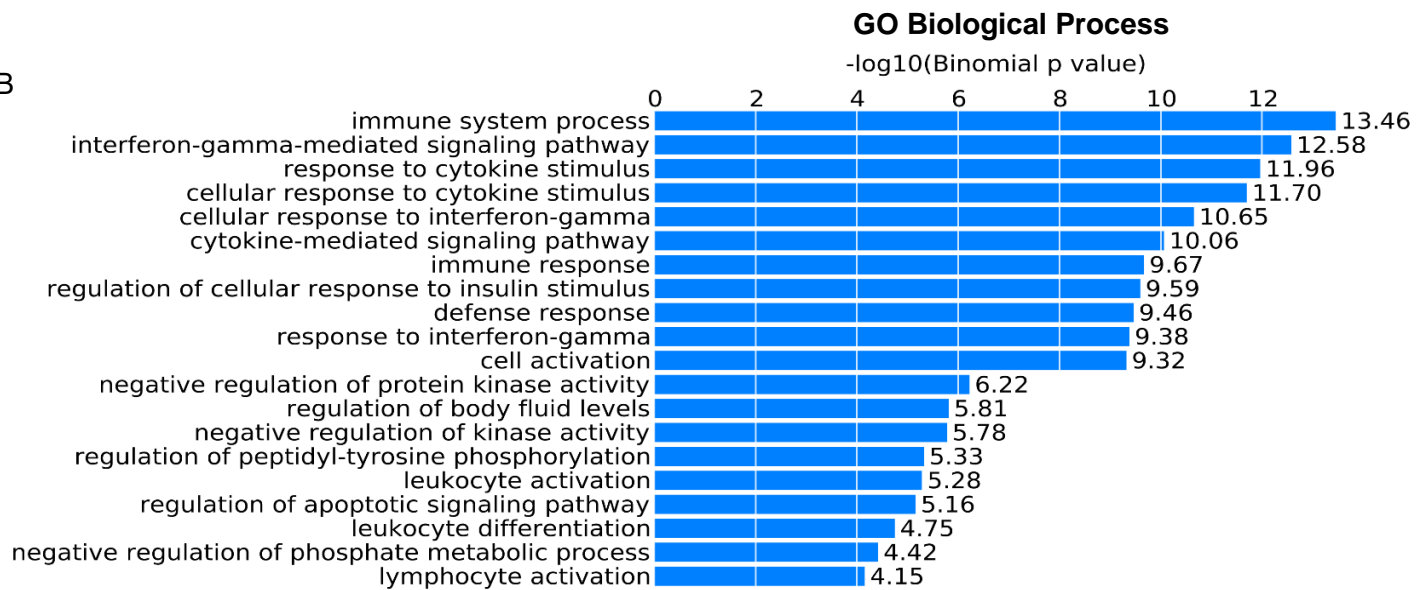


Εικόνα 74: Απεικονίζονται τα επαγόμενα επίπεδα προσβασιμότητας (DNaseI-seq) γύρω από τον υποκινητή και τον -20κβ ενισχυτή του γονιδίου *IFNBI* (A) και μια περιοχή με επαγόμενη προσβασιμότητα εντός του γονιδίου *ADAP1* (B) σε κύτταρα Namalwa.

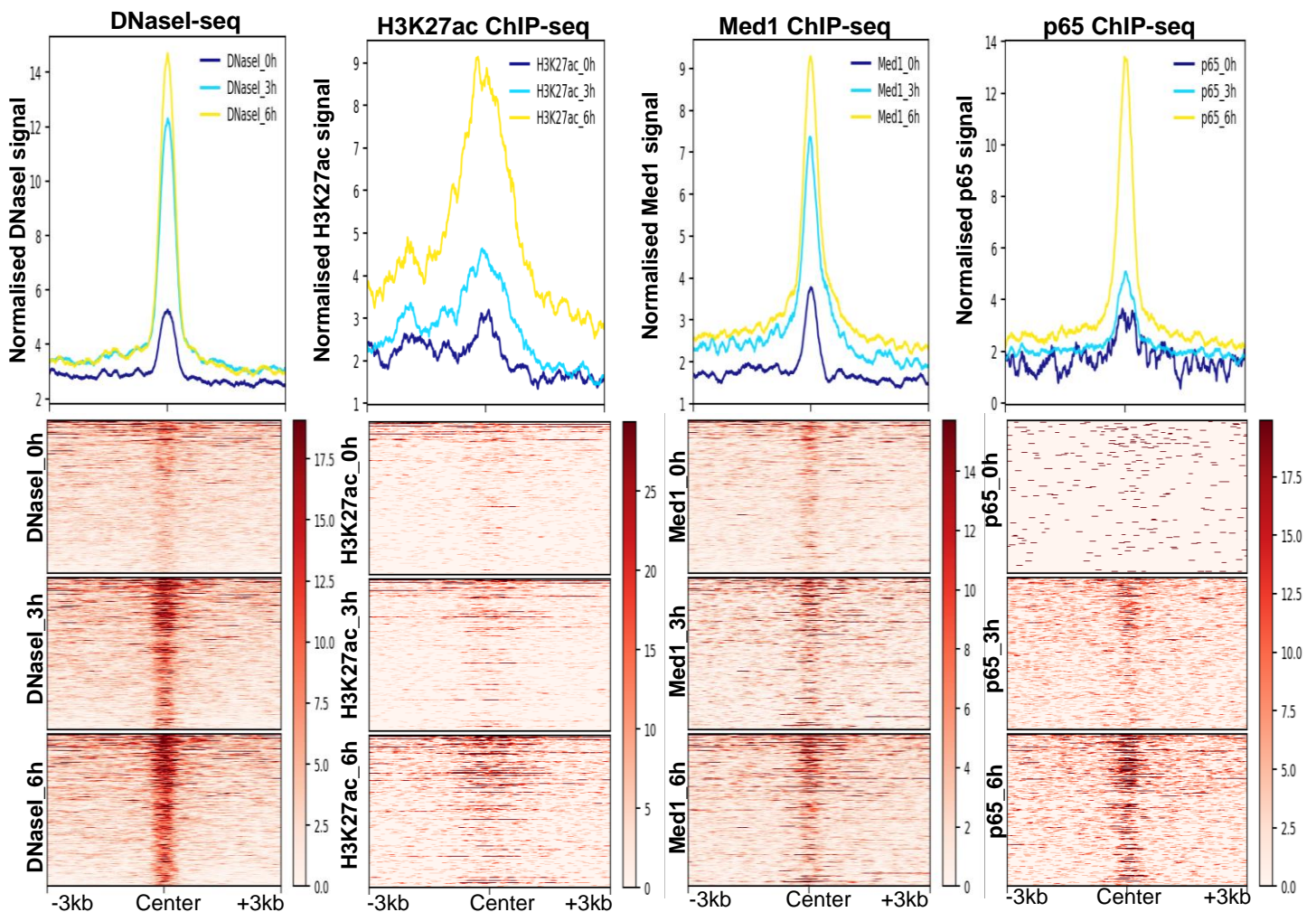
A



B



Εικόνα 75: Απεικονίζονται τα πιο στατιστικά σημαντικά μοτίβα μεταγραφικών παραγόντων (A) καθώς και οι βιολογικές διεργασίες (B) στις οποίες συμμετέχουν τα γονίδια που βρίσκονται εγγύτερα στις απομακρυσμένες από θέσεις έναρξης της μεταγραφής περιοχές με επαγόμενη προσβασιμότητα (DNaseI-seq) 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα Namalwa.



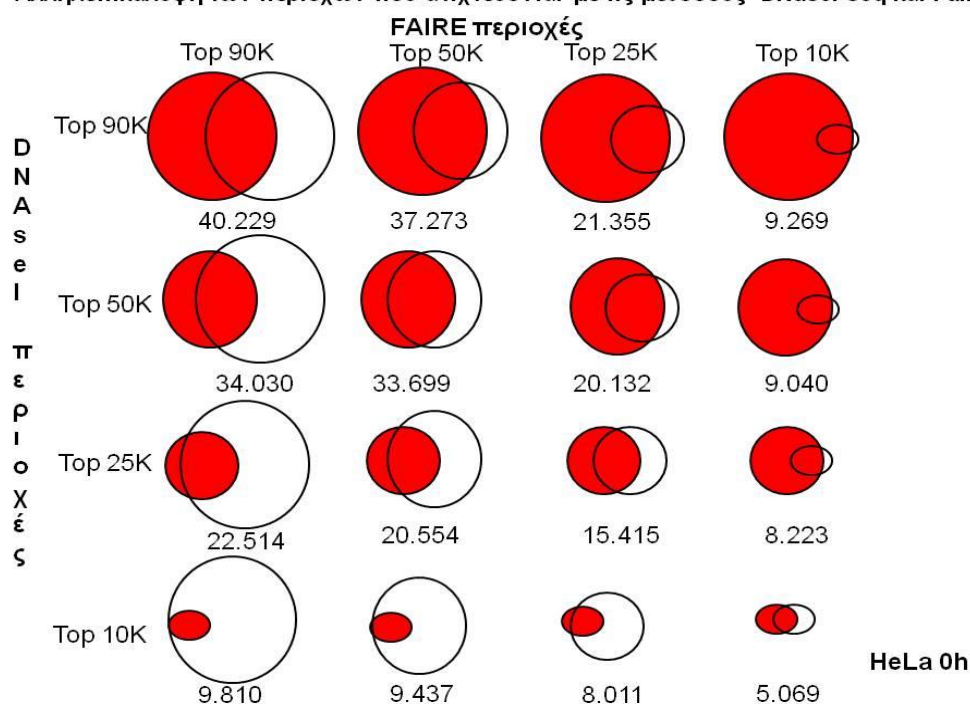
Εικόνα 76: Απεικονίζονται τα επίπεδα H3K27ac, Med1 και p65 γύρω από τις 628 περιοχές με επαγόμενα επίπεδα προσβασιμότητας (DNaseI-seq) 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα Namalwa.

Μελέτη της προσβασιμότητας της χρωματίνης με τη μέθοδο FAIRE-seq

Για την ανίχνευση των προσβάσιμων περιοχών στο γονιδίωμα εκτός από τη τεχνική DNaseI-seq χρησιμοποιήσαμε ως συμπληρωματική τη μέθοδο FAIRE-seq. Επομένως πραγματοποιήσαμε πειράματα FAIRE-seq σε κύτταρα HeLa και Namalwa πριν καθώς και 3 και 6 ώρες μετά από μόλυνση με ιό Sendai. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων αποκάλυψε περίπου 100.000 προσβάσιμες περιοχές και στους δύο κυτταρικούς τύπους. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε σύγκριση των προσβάσιμων περιοχών που ανιχνεύτηκαν με τη μέθοδο FAIRE-seq με αυτές που ανιχνεύτηκαν με τη μέθοδο DNaseI-seq. Στην εικόνα 77 παρουσιάζεται η αλληλεπικάλυψη των αποτελεσμάτων των τεχνικών FAIRE-seq (Simon *et al.*, 2012) και DNaseI-seq (John *et*

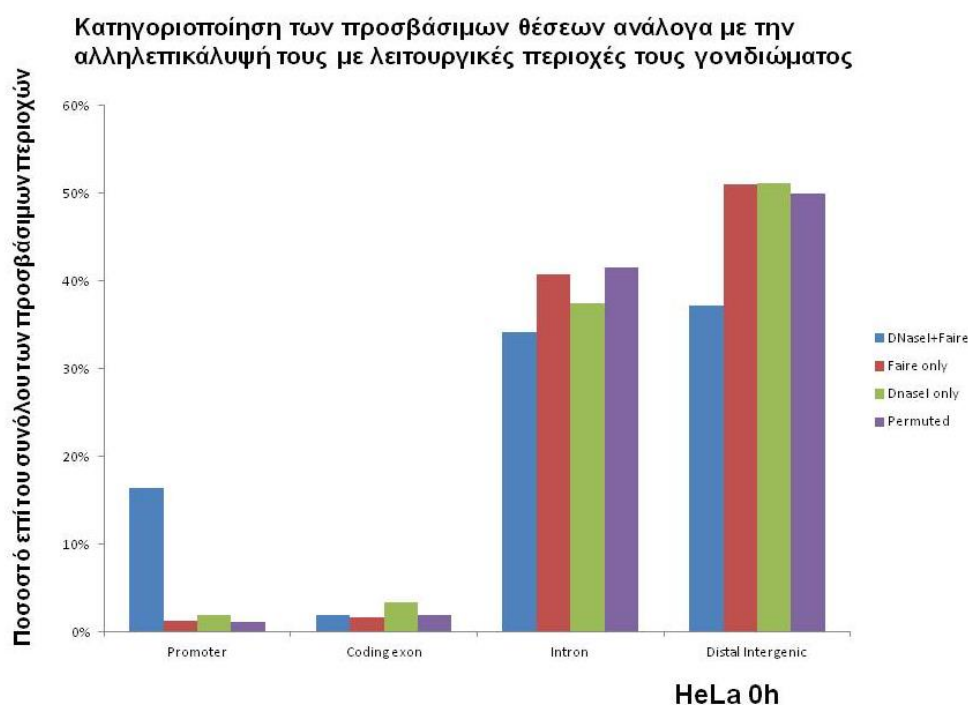
al., 2013). Παρατηρείται ότι 45% από τις 90.000 πιο προσβάσιμες περιοχές που ανιχνεύονται με κάθε μέθοδο αλληλεπικαλύπτονται. Επίσης είναι φανερό ότι οι πλέον προσβάσιμες περιοχές που ανιχνεύονται με τη μία μέθοδο βρίσκονται μέσα σε περιοχές που ανιχνεύονται με την άλλη μέθοδο. Ως παράδειγμα το 90% από τις 25.000 πιο προσβάσιμες περιοχές όπως προκύπτουν από τη μέθοδο DNaseI-seq είναι ανοικτές σύμφωνα με τη μέθοδο FAIRE-seq. Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με τη δημοσιευμένη αναλυτική σύγκριση των δύο μεθόδων σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους και αποτελούν ισχυρή ένδειξη για την υψηλή ποιότητα των πειραμάτων μας (Song *et al.*, 2011).

Αλληλεπικάλυψη των περιοχών που ανιχνεύονται με τις μεθόδους DNaseI-seq και Faire-seq



Εικόνα 77: Στη συγκεκριμένη εικόνα παρουσιάζεται ο αριθμός των αλληλοεπικαλυπτόμενων περιοχών που προκύπτουν από τη σύγκριση των τεχνικών FAIRE-seq και DNaseI-seq σε κύτταρα HeLa πριν την *ιική* μόλυνση. Παρατηρείται σημαντική επικάλυψη των θέσεων που προκύπτουν από τις δύο μεθόδους με ένα ποσοστό 44,7% (40229/90000) των πλέον ισχυρών θέσεων να είναι προσβάσιμο σύμφωνα και με τις δύο τεχνικές. Επίσης η συντριπτική πλειοψηφία των πλέον ισχυρών θέσεων με βάση την ένταση του σήματος που προκύπτουν από τη μία τεχνική βρίσκονται μέσα στις κορυφαίες 90000 θέσεις που προκύπτουν από την άλλη τεχνική. Για παράδειγμα 90% (22514/25000) των πλέον ισχυρών DNaseI-seq περιοχών αλληλεπικαλύπτονται με τις 90000 πλέον ισχυρές FAIRE-seq περιοχές.

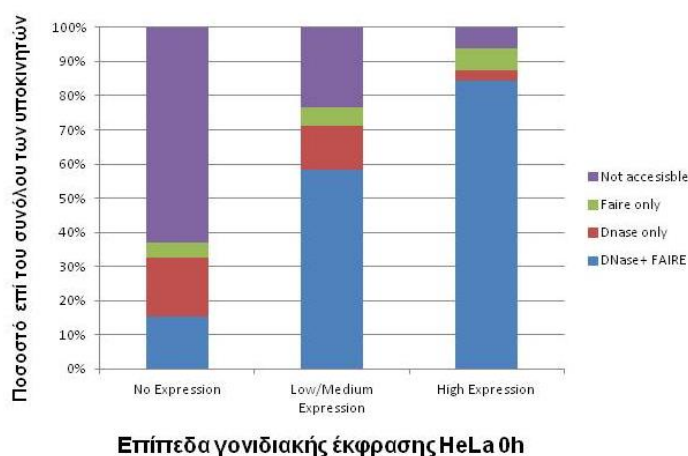
Στη συνέχεια έγινε κατηγοριοποίηση των προσβάσιμων περιοχών ανάλογα με τη επικάλυψή τους με λειτουργικά χαρακτηριστικά του γονιδιώματος που έχουν σταθερές συντεταγμένες. Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 78 ένα ποσοστό 16% των προσβάσιμων θέσεων όπως προκύπτουν και από τις δύο τεχνικές βρίσκεται σε υποκινητές. Το ποσοστό αυτό είναι αρκετά υψηλότερο από αυτό το οποίο θα προέκυπτε από μια τυχαία κατανομή. Επομένως η παρουσία προσβάσιμων περιοχών στους υποκινητές και η αυξημένη σε ποσοστό αντιπροσώπευση αποτελούν ισχυρές ενδείξεις για την επιτυχία των παραπάνω πειραματικών διαδικασιών. Επίσης παρατηρούμε ότι ένα ποσοστό περίπου 35% των ανοικτών περιοχών βρίσκεται σε εσώνια, 2% βρίσκεται σε εξώνια, ενώ ένα ποσοστό περίπου 37% βρίσκεται σε περιοχές μεταξύ των γονιδίων. Αντίθετα οι περιοχές που ανιχνεύονται μόνο με μία από τις δύο τεχνικές δεν βρίσκονται σε υποκινητές, αλλά εδράζονται κυρίως σε εσώνια και μεταξύ των γονιδίων.



Εικόνα 78: Στη συγκεκριμένη εικόνα παρουσιάζεται η κατανομή των προσβάσιμων περιοχών, όπως προκύπτει από το συνδυασμό των τεχνικών FAIRE-seq και DNaseI-seq, καθώς και αυτών που προκύπτουν μόνο από μία από τις δύο τεχνικές σε λειτουργικές περιοχές του γονιδιώματος με σταθερές συντεταγμένες.

Η υψηλή συγκέντρωση σήματος FAIRE και DNaseI σε περιοχές υποκινητών, η οποία συμφωνεί με τη βιβλιογραφία μας οδήγησε στη συνέχεια να εξετάσουμε τη σχέση ανάμεσα στη προσβασιμότητα της χρωματινικής δομής γύρω από τους υποκινητές και στη έκφραση των γονιδίων όπως αυτή ανιχνεύεται από τα πειράματα RNA-seq. Παρατηρήσαμε ότι τα γονίδια τα οποία δεν εκφράζονται, έχουν κλειστή χρωματινική διάταξη στους υποκινητές σε ποσοστό 63% και επομένως μόνο το 37% αυτών είναι προσβάσιμοι (εικόνα 79). Σε αντίθεση με αυτό οι υποκινητές των γονιδίων που εκφράζονται σε ενδιάμεσα επίπεδα είναι προσβάσιμοι σε ποσοστό 76,5% και οι υποκινητές των γονιδίων που εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα είναι προσβάσιμοι σε ποσοστό 94%.

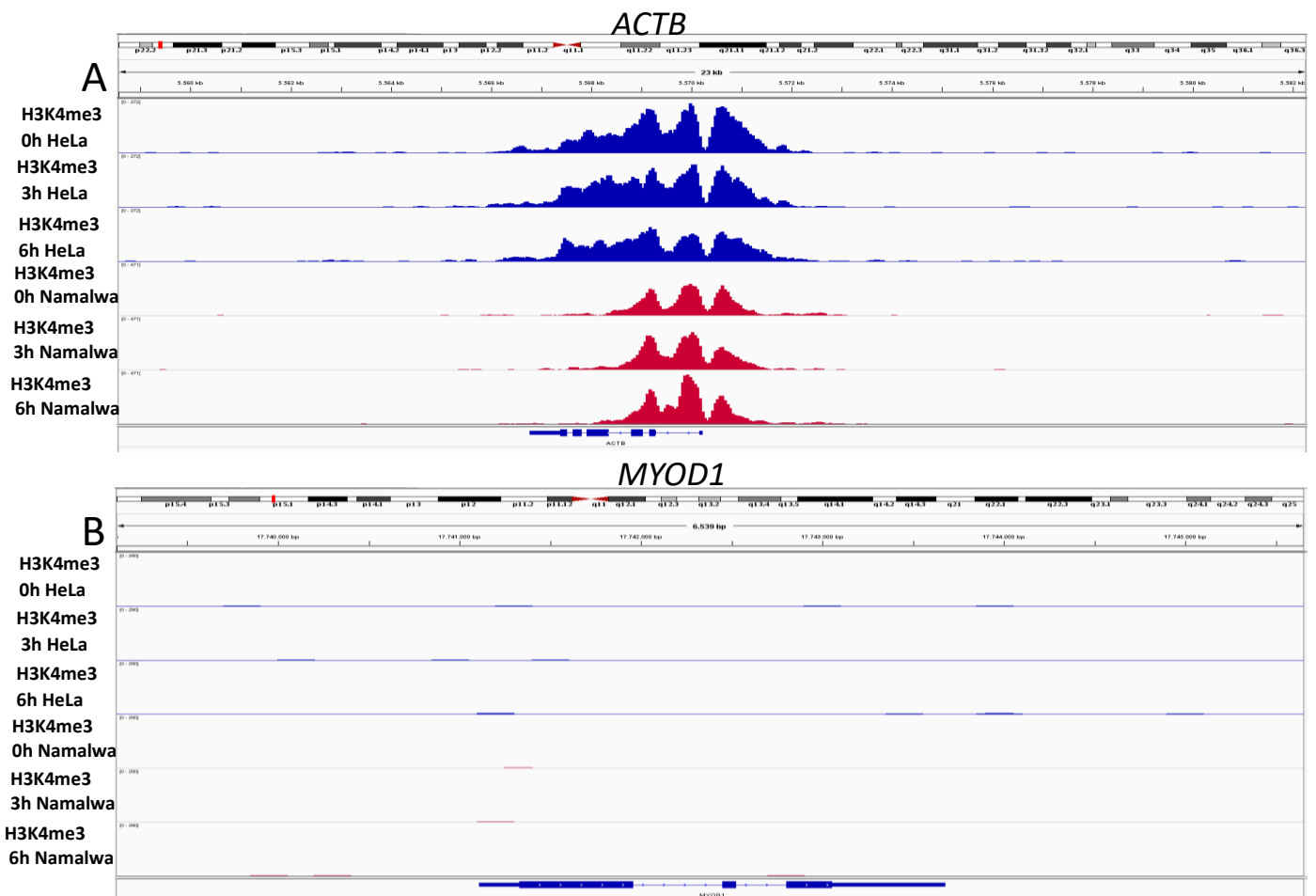
Συσχέτιση της προσβασιμότητας των υποκινητών με τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης



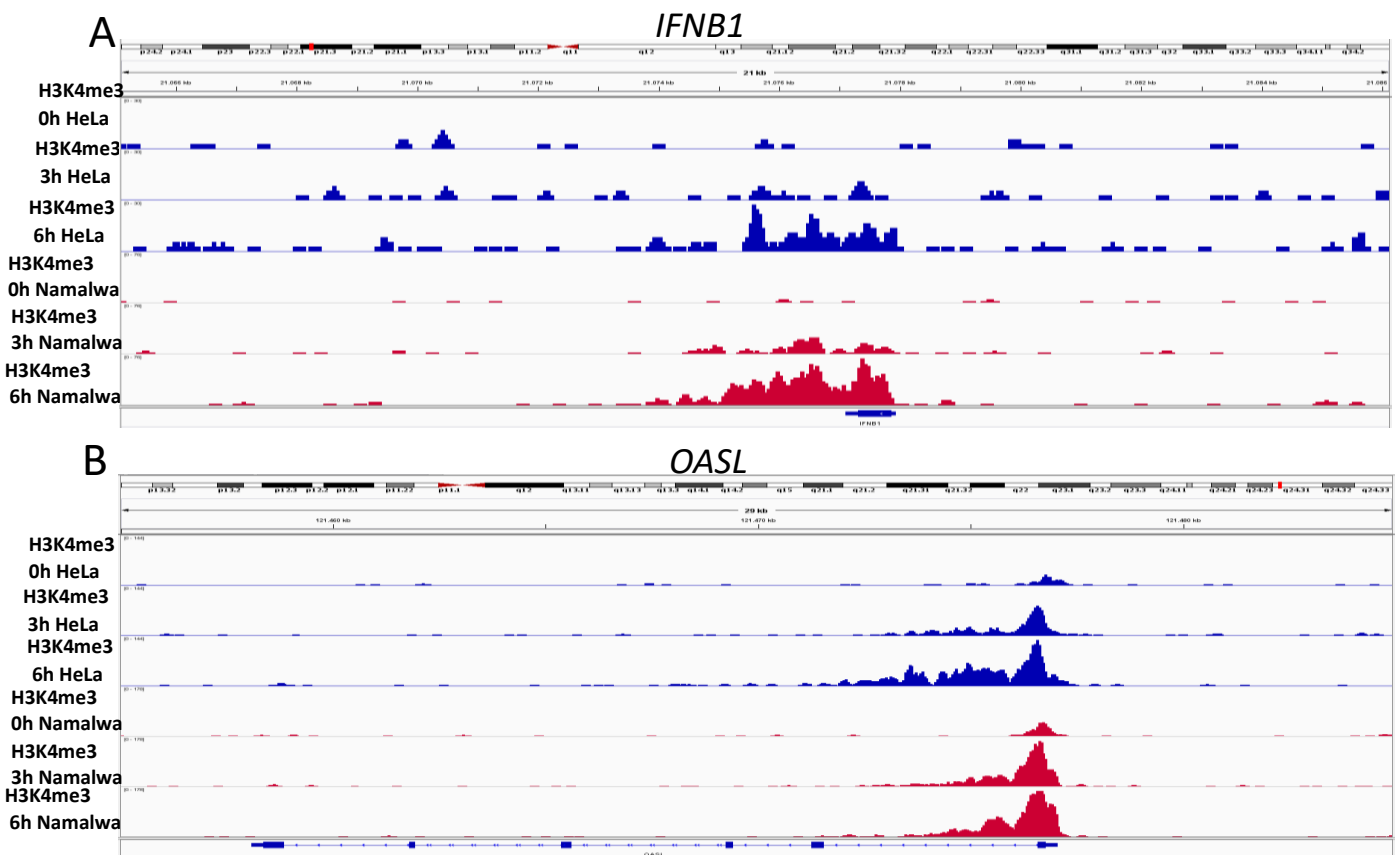
Εικόνα 79: Στη συγκεκριμένη εικόνα παρουσιάζεται η προσβασιμότητα των υποκινητών του συνόλου των γονιδίων ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων σε κύτταρα HeLa πριν την *ιική* μόλυνση. Συγκεκριμένα το σύνολο των γονιδίων χωρίστηκε σε τρεις ισάριθμες κατηγορίες ανάλογα με τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης. Παρατηρήθηκε ότι η πλειοψηφία των γονιδίων που δεν εκφράζονται δεν έχουν προσβάσιμη χρωματίνη στον υποκινητή τους. Αντίθετα η συντριπτική πλειοψηφία των γονιδίων με υψηλή έκφραση έχουν προσβάσιμη χρωματίνη όπως προκύπτει τόσο από τα DNaseI-seq όσο και από τα FAIRE-seq πειράματα.

Ανάλυση πειραμάτων H3K4me3 ChIP-seq

Η ιστονική τροποποίηση H3K4me3 αποτελεί χαρακτηριστικό δείκτη των ενεργών υποκινητών. Για τη μελέτη της ανακατανομής των επιπέδων της στο γονιδίωμα κατά την εξέλιξη της αντίικης απόκρισης πραγματοποιήθηκαν πειράματα ChIP-seq πριν καθώς και 3 και ώρες μετά τη μόλυνση κυττάρων HeLa και Namalwa με ιό Sendai. Αρχικά για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα της ανοσοκατακρήμισης υπολογίστηκε το ποσοστό του σήματος που βρίσκεται σε κορυφές (FRIP score). Για παράδειγμα το FRIP score για το δείγμα H3K4me3 6h στα HeLa ήταν 0,40. Αν δεν είχε γίνει ανοσοκατακρήμιση και η κατανομή του σήματος ήταν τυχαία στο γονιδίωμα το score αυτό θα ήταν 0,005. Επομένως το μέσο επίπεδο εμπλουτισμού του σήματος στις περιοχές με H3K4me3 είναι 80 (0,40/0,005) γεγονός που φανερώνει την υψηλή ποιότητα της ανοσοκατακρήμισης (υψηλός λόγος σήματος προς θόρυβο υποβάθρου). Στη συνέχεια διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα H3K4me3 είναι υψηλά και σταθερά γύρω από τους υποκινητές γονιδίων κυτταρικής οικονομίας όπως αυτό της ACTB και σχεδόν μηδενικά στους υποκινητές γονιδίων που δεν εκφράζονται (εικόνα 80). Εξετάζοντας την κατανομή των περιοχών με H3K4me3 στο γονιδίωμα 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα HeLa βρέθηκε ότι η μεγάλη πλειοψηφία (77,1%) από το σύνολο των 23.441 περιοχών βρίσκεται κοντά σε γνωστές θέσεις έναρξης της μεταγραφής γεγονός αναμενόμενο καθώς ο δείκτης H3K4me3 είναι χαρακτηριστικός των ενεργών υποκινητών. Από τη διαφορική ανάλυση των αλλαγών στα επίπεδα H3K4me3 στα κύτταρα HeLa προέκυψαν μόνο 76 περιοχές με επαγόμενα επίπεδα H3K4me3 6 ώρες μετά τη μόλυνση. Η συνδυαστική ανάλυση με τα πειράματα RNA-seq φανέρωσε ότι 51 από τις περιοχές αυτές βρίσκονται κοντά σε *ικά* επαγόμενα γονίδια υποδεικνύοντας την υψηλή ειδικότητα των αλλαγών. Στην εικόνα 81 απεικονίζονται τα επαγόμενα επίπεδα H3K4me3 κοντά στους υποκινητές των γονιδίων *IFNB1* και *OASL*. Στα κύτταρα Namalwa εντοπίστηκαν 49 περιοχές με επαγόμενα επίπεδα H3K4me3 από τις οποίες 31 βρίσκονται κοντά σε *ικά* επαγόμενα γονίδια με χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτά των *IFNB1* και *OASL*.



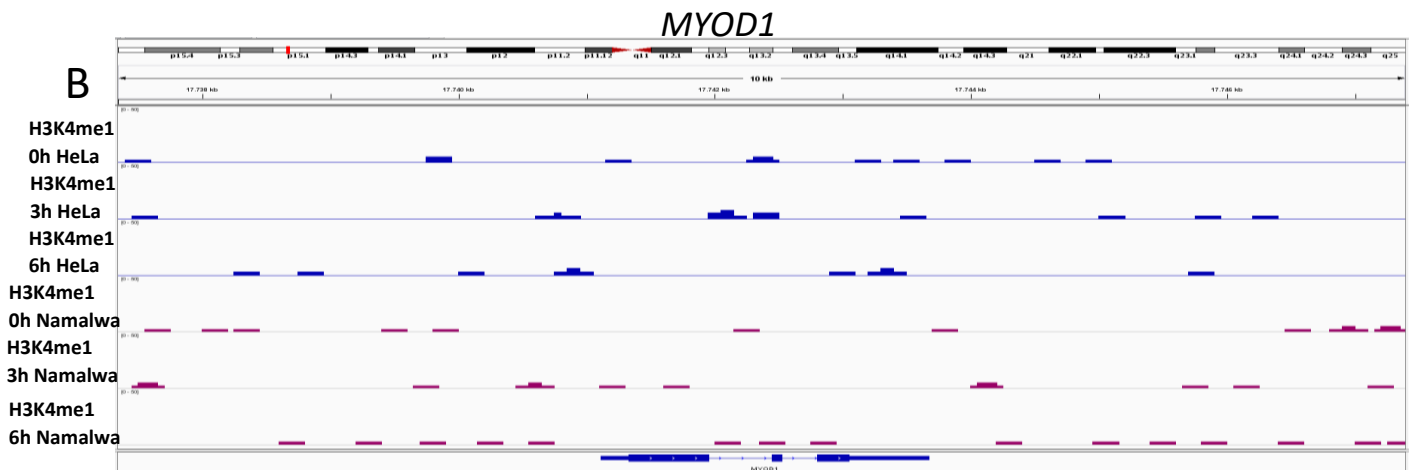
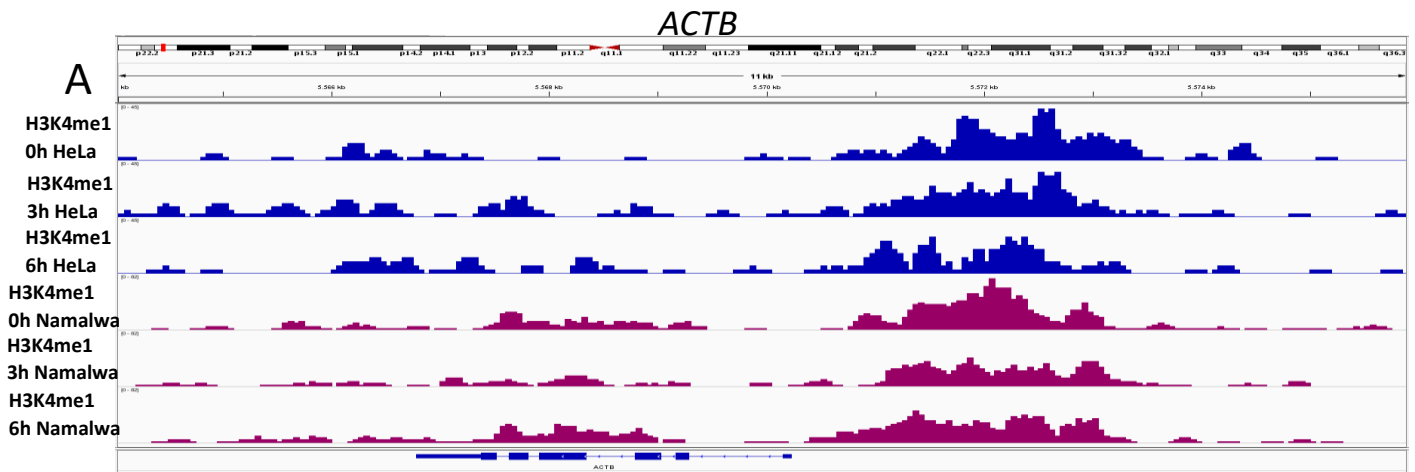
Εικόνα 80: Παρουσιάζονται τα επίπεδα H3K4me3 στους υποκινητές των γονιδίων *ACTB* και *MYOD1* πριν καθώς και 3 και 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα HeLa και Namalwa.



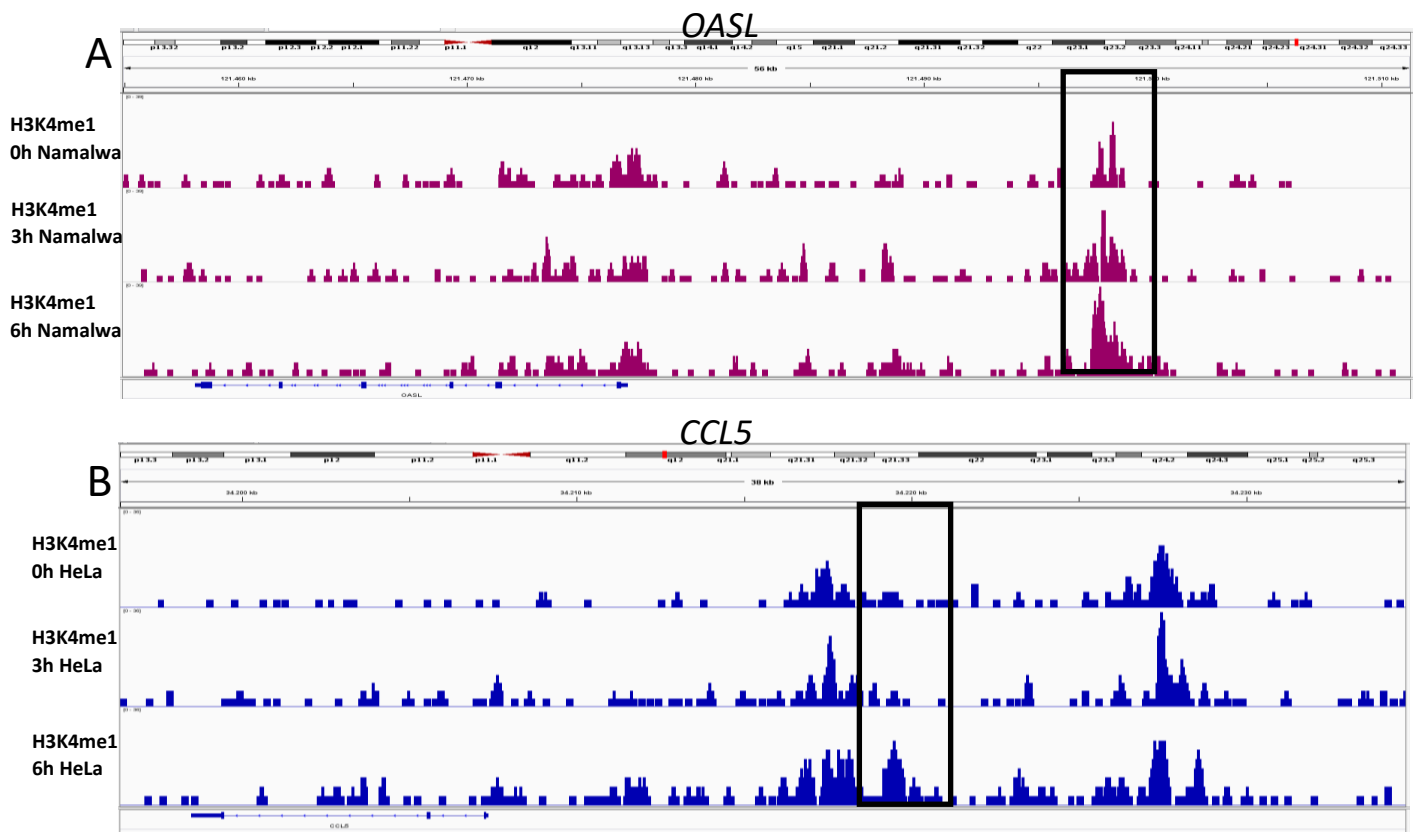
Εικόνα 81: Παρουσιάζονται τα επίπεδα H3K4me3 στους υποκινητές των γονιδίων *IFNB1* και *OASL* πριν καθώς και 3 και 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα HeLa και Namalwa.

Ανάλυση πειραμάτων H3K4me1 ChIP-seq

Η ιστονική τροποποίηση H3K4me1 αποτελεί χαρακτηριστικό δείκτη των ρυθμιστικών στοιχείων του DNA που έχουν ρόλο ενισχυτή. Για τη μελέτη της ανακατανομής των επιπέδων της στο γονιδίωμα κατά την εξέλιξη της αντιϊκής απόκρισης πραγματοποιήθηκαν πειράματα ChIP-seq πριν καθώς και 3 και 6 ώρες μετά τη μόλυνση κυττάρων HeLa και Namalwa με ιό Sendai. Αρχικά εκτελώντας έλεγχο ποιότητας διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα H3K4me1 είναι υψηλά και σταθερά σε περιοχή άνωθεν του υποκινητή του γονιδίου ACTB και σχεδόν μηδενικά γύρω από το γενετικό τόπο του γονιδίου MYOD1 το οποίο δεν εκφράζεται (εικόνα 82). Από τη διαφορική ανάλυση των αλλαγών στα επίπεδα H3K4me1 στα κύτταρα HeLa προέκυψαν 205 περιοχές με επαγόμενα επίπεδα H3K4me1 6 ώρες μετά τη μόλυνση. Η συνδυαστική ανάλυση με τα πειράματα RNA-seq κατέδειξε ότι 38 από τις περιοχές αυτές βρίσκονται κοντά σε ιικά επαγόμενα γονίδια υποδεικνύοντας την υψηλή ειδικότητα των αλλαγών. Στην εικόνα 83A απεικονίζονται τα επαγόμενα επίπεδα H3K4me1 στο πιθανό ενισχυτή που βρίσκεται 20 κβ άνωθεν του ιικά επαγόμενου γονιδίου *OASL*. Στα κύτταρα Namalwa εντοπίστηκαν μόνο 40 περιοχές με επαγόμενα επίπεδα H3K4me1 από τις οποίες 4 βρίσκονται κοντά στα ιικά επαγόμενα γονίδια *CCL5*, *IRF1*, *PODXL* και *LY6E*. Τα επαγόμενα επίπεδα H3K4me1 στο πιθανό ενισχυτή που βρίσκεται άνωθεν του ιικά επαγόμενου γονιδίου *CCL5* απεικονίζονται στην εικόνα 83B.



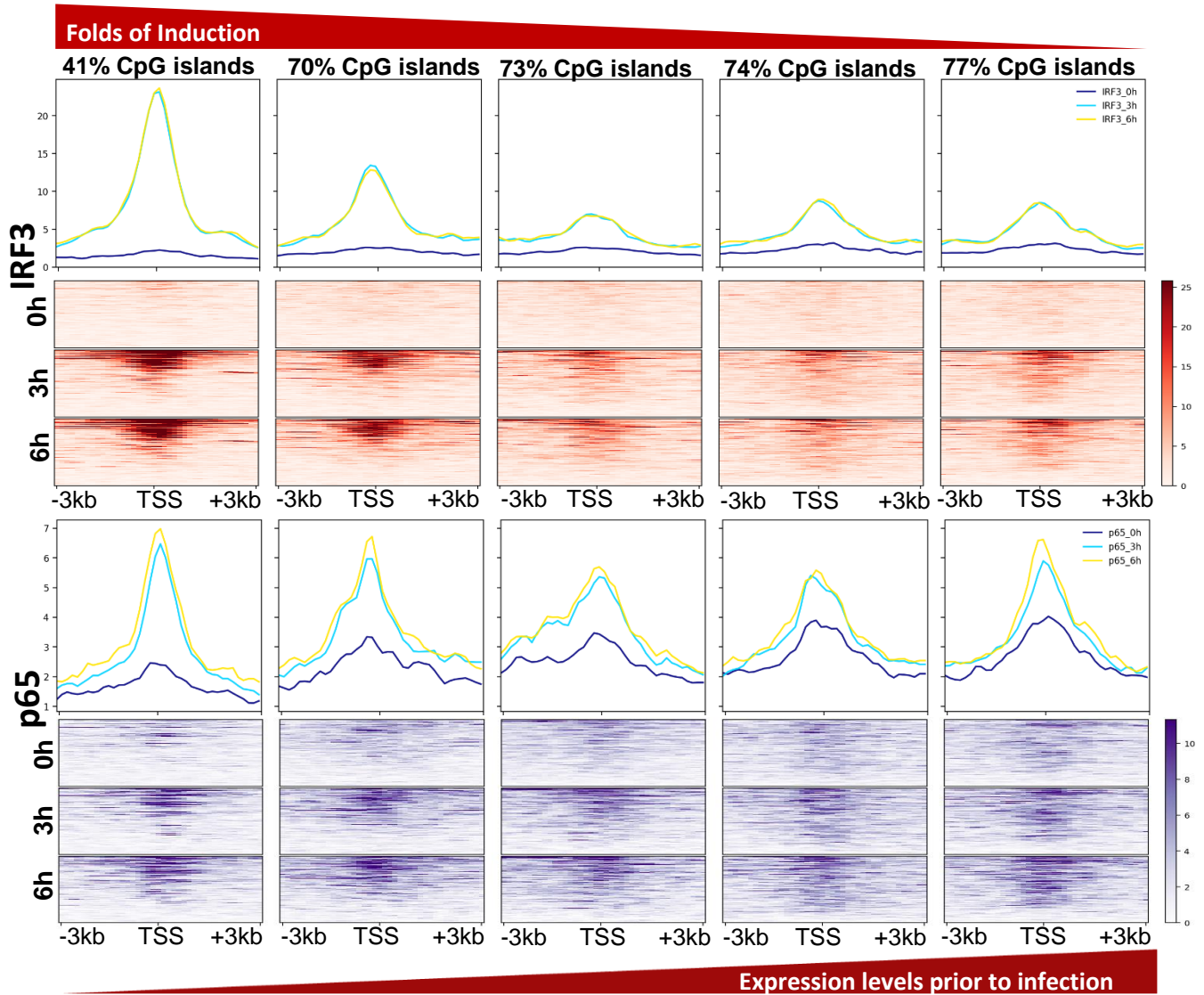
Εικόνα 82: Παρουσιάζονται τα επίπεδα H3K4me1 γύρω από τα γονίδια *ACTB* (A) και *MYOD1* (B) πριν καθώς και 3 και 6 ώρες μετά τη μόλυνση σε κύτταρα HeLa και Namalwa.



Εικόνα 83: Απεικονίζονται τα επίπεδα H3K4me1 στον πιθανό ενισχυτή του γονιδίου *OASL* σε κύτταρα Namalwa (A) και στο πιθανό ενισχυτή του γονιδίου *CCL5* σε κύτταρα HeLa (B) πριν καθώς και 3 και 6 ώρες μετά τη μόλυνση.

Συνδυαστική ανάλυση του επιγονιδιωματικού προφίλ γύρω από τους υποκινητές των *ϊκ*ά επαγόμενων γονιδίων στα HeLa

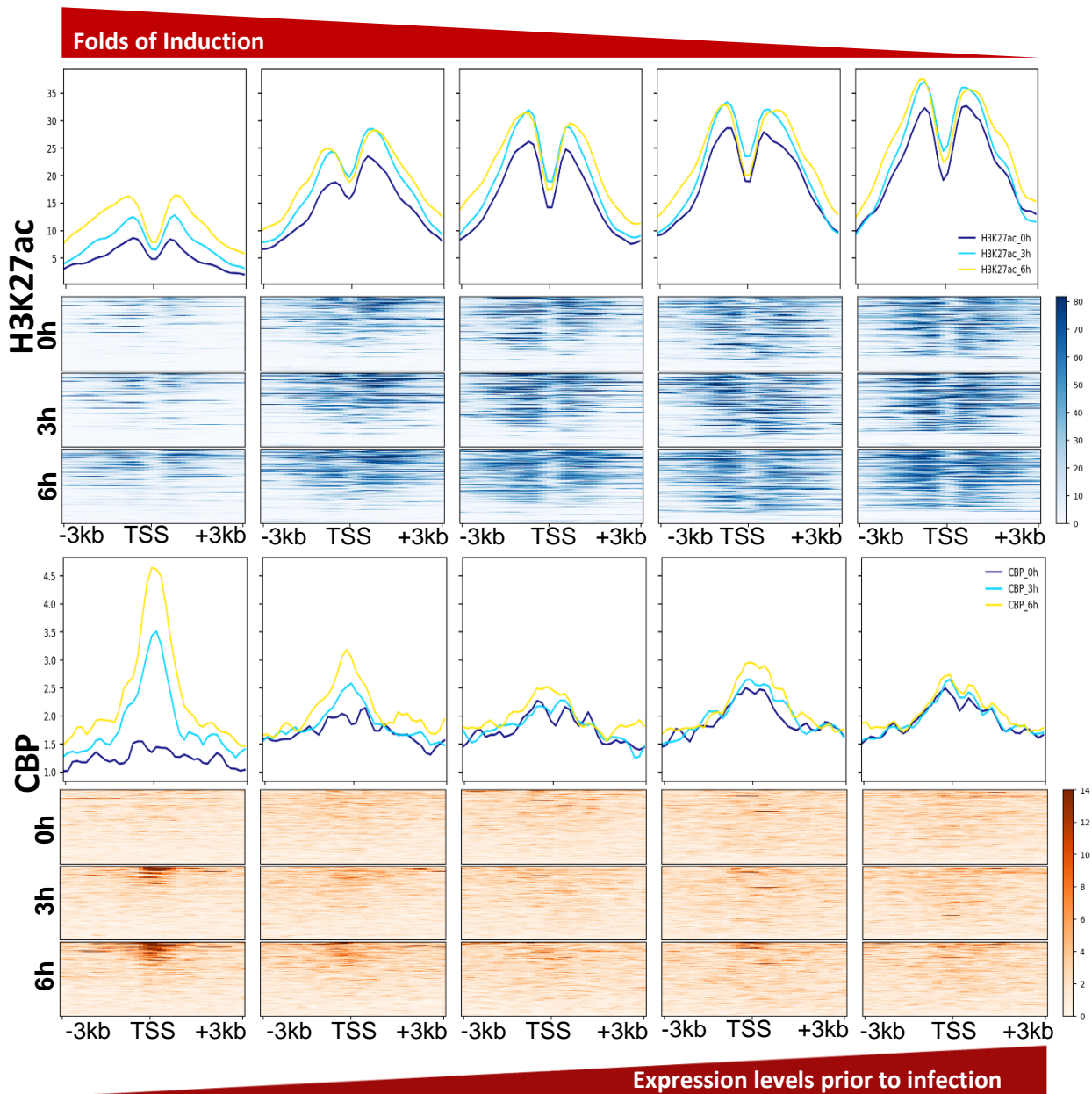
Για να εξεταστεί το πως τα επίπεδα επαγωγής των γονιδίων σχετίζονται με τα επαγόμενα επίπεδα προσβασιμότητας της χρωματίνης και πρόσδεσης γύρω από τους υποκινητές των κύριων μεταγραφικών παραγόντων της αντιϊικής απόκρισης p65 και IRF3, ιστονικών τροποποιήσεων και συνενεργοποιητών πραγματοποιήθηκε ομαδοποίηση των *ϊκ*ά επαγόμενων γονιδίων σε 5 κατηγορίες ανάλογα με τα επίπεδα επαγωγής τους με κάθε κατηγορία να περιλαμβάνει 100 γονίδια. Συγκεκριμένα η κατηγορία με τα μεγαλύτερα επίπεδα επαγωγής περιλαμβάνει γονίδια με επίπεδα επαγωγής μεγαλύτερα από 9,67 φορές, η επόμενη κατηγορία από 3,73 μέχρι 9,66 φορές, η επόμενη από 2,35 μέχρι 3,72, η επόμενη από 1,74 μέχρι 2,34 και η τελευταία από 1,41 μέχρι 1,71. Αρχικά παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα επαγωγής των γονιδίων ήταν αντιστρόφως ανάλογα με τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης πριν από τη μόλυνση, δηλαδή γονίδια με μεγάλα επίπεδα επαγωγής μετά τη μόλυνση είχαν χαμηλά επίπεδα έκφρασης πριν από τη μόλυνση, ενώ γονίδια με μικρά επίπεδα επαγωγής παρουσίαζαν υψηλά επίπεδα έκφρασης πριν από τη μόλυνση.



Εικόνα 84: Παρουσιάζονται τα επίπεδα πρόσδεσης του IRF3 (επάνω) και του p65 (κάτω) γύρω από τους υποκινητές γονιδίων που έχουν κατηγοριοποιηθεί ανάλογα με τα επίπεδα επαγωγής τους πριν και κατά τη διάρκεια της μόλυνσης σε κύτταρα HeLa.

Στη συνέχεια εξετάστηκε το ποσοστό των γονιδίων στις διαφορετικές κατηγορίες επαγωγής που φέρουν CpG νησίδες (CpG islands) (εικόνα 84). Παρατηρήθηκε ότι μικρότερο ποσοστό των γονιδίων που επάγονται ισχυρά φέρει CpG νησίδες στους υποκινητές τους σε αντίθεση με τα γονίδια που επάγονται ασθενώς και τα οποία φέρουν στη πλειοψηφία τους CpG νησίδες. Το εύρημα αυτό είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία καθώς η παρουσία των CpG νησίδων σχετίζεται με αποσταθεροποίηση των νουκλεοσωμάτων, υψηλά επίπεδα προσβασιμότητας της χρωματίνης και υψηλά επίπεδα έκφρασης (Ramirez-Carrozzi *et al.*, 2009). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μέτρηση και απεικόνιση του σήματος των επιγενετικών δεικτών γύρω από τους υποκινητές των γονιδίων κάθε κατηγορίας πριν και κατά τη διάρκεια

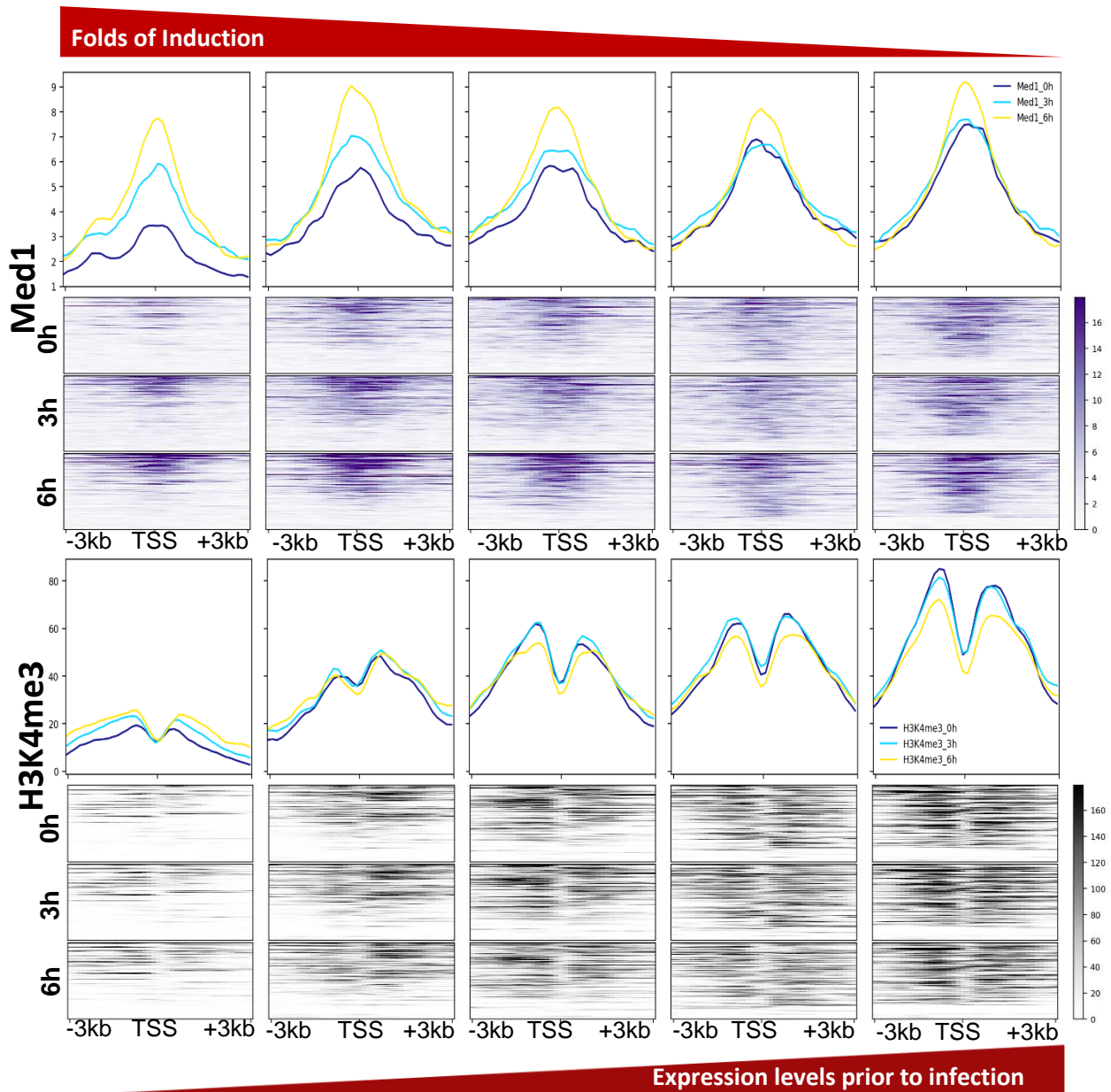
της *ϊικής* μόλυνσης. Αρχικά πραγματοποιήθηκε μέτρηση των επιπέδων IRF3 γύρω από τις θέσεις έναρξης της μεταγραφής για τις διαφορετικές κατηγορίες επαγόμενων γονιδίων (εικόνα 84). Παρατηρήθηκε ότι η επαγόμενη πρόσδεση του IRF3 ήταν ισχυρότερη γύρω από τους υποκινητές των γονιδίων με τα μεγαλύτερα επίπεδα επαγωγής της γονιδιακής έκφρασης και πιο ασθενής γύρω από τους υποκινητές των γονιδίων με μικρότερα επίπεδα επαγωγής. Αντίστοιχη ήταν η εικόνα και για το μεταγραφικό παράγοντα p65 (εικόνα 84).



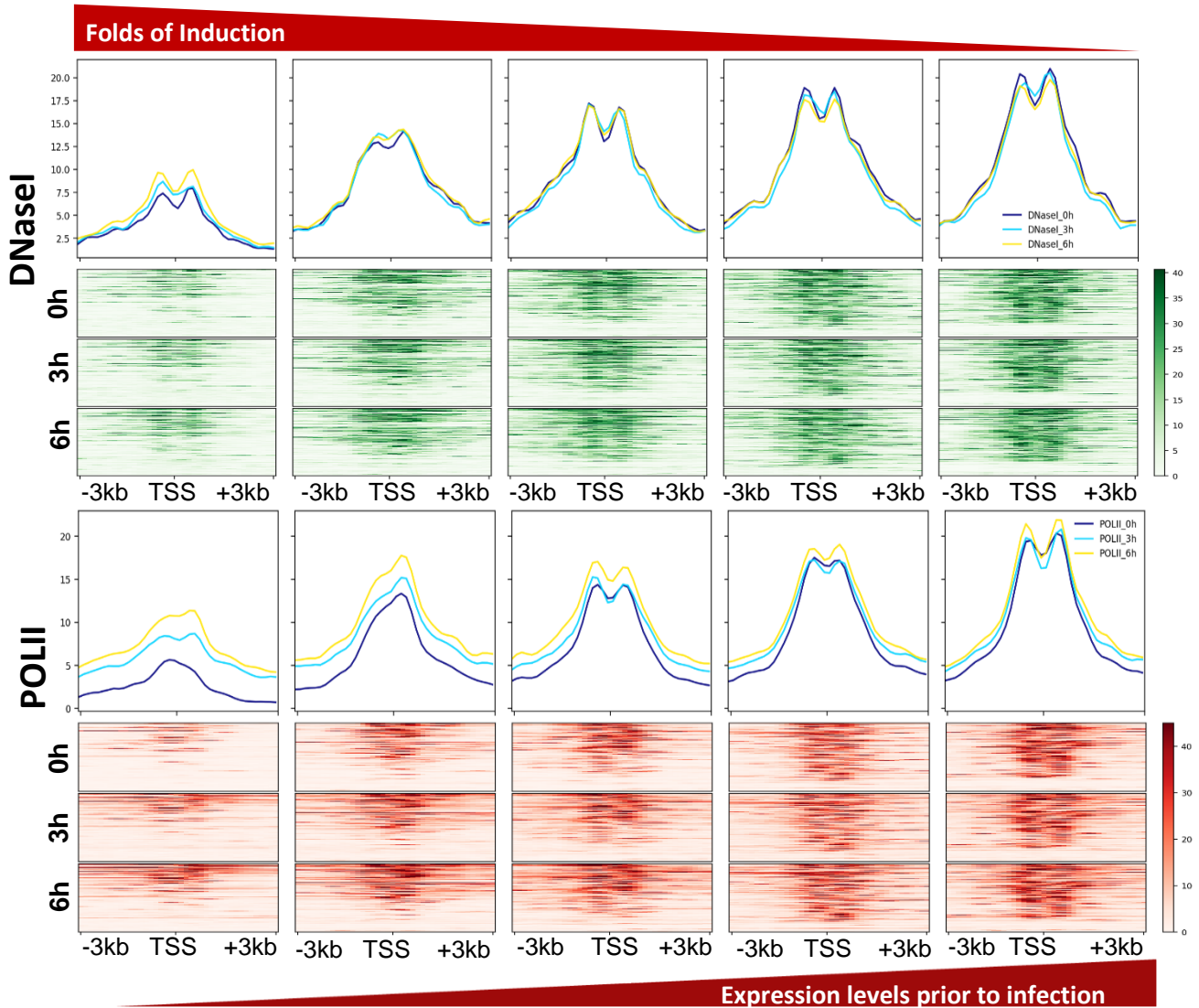
Εικόνα 85: Παρουσιάζονται τα επίπεδα της H3K27ac (επάνω) και του CBP (κάτω) γύρω από τους υποκινητές γονιδίων που έχουν κατηγοριοποιηθεί ανάλογα με τα επίπεδα επαγωγής τους πριν και κατά τη διάρκεια της μόλυνσης σε κύτταρα HeLa.

Εξετάζοντας την κατανομή των επιπέδων H3K27ac γύρω από τους υποκινητές των ισχυρά επαγόμενων γονιδίων διαπιστώθηκαν χαμηλά επίπεδα H3K27ac πριν από τη μόλυνση τα οποία αυξάνονται μετά τη μόλυνση. Αντίθετα τα γονίδια με μικρά επίπεδα επαγωγής φέρουν υψηλά επίπεδα H3K27ac ήδη πριν από τη μόλυνση τα οποία παραμένουν σταθερά (εικόνα 85). Στη περίπτωση του μεταγραφικού συνενεργοποιητή CBP παρατηρείται επαγόμενη πρόσδεση του γύρω από τους υποκινητές των ισχυρά επαγόμενων γονιδίων και χαμηλά μη επαγόμενα επίπεδα γύρω από τους υποκινητές των γονιδίων που επάγονται ασθενώς (εικόνα 85). Εξετάζοντας τη κατανομή του συνενεργοποιητή Med1 διαπιστώθηκε η επαγόμενη πρόσδεση του γύρω από τους υποκινητές των ισχυρά επαγόμενων γονιδίων και τα υψηλά και σταθερά επίπεδα του γύρω από τους υποκινητές των ασθενώς επαγόμενων γονιδίων. Η απεικόνιση των επιπέδων H3K4me3, ενός δείκτη των ενεργών υποκινητών, ανέδειξε τα χαμηλά επίπεδα του συγκεκριμένου δείκτη πριν από τη μόλυνση γύρω από τους υποκινητές των ισχυρά επαγόμενων γονιδίων και την επαγωγή των επιπέδων H3K4me3 για ένα μικρό αριθμό γονιδίων (εικόνα 86). Αντίθετα τα επίπεδα H3K4me3 ήταν υψηλά και σταθερά γύρω από τους υποκινητές των ασθενώς επαγόμενων γονιδίων.

Μελετώντας τα επίπεδα προσβασιμότητας της χρωματίνης με τη μέθοδο DNaseI-seq, διαπιστώθηκαν χαμηλά επίπεδα προσβασιμότητας πριν από τη μόλυνση γύρω από τους υποκινητές των ισχυρά επαγόμενων γονιδίων και αύξηση της προσβασιμότητας για ένα μικρό αριθμό υποκινητών (εικόνα 87). Αντίθετα η προσβασιμότητα ήταν και διατηρήθηκε υψηλή γύρω από τους υποκινητές των ασθενώς επαγόμενων γονιδίων. Εξετάζοντας τα επίπεδα της RNA pol II βρήκαμε επαγόμενα επίπεδα πρόσδεσης γύρω από τους υποκινητές των ισχυρά επαγόμενων γονιδίων, ενώ στη περίπτωση των γονιδίων με μικρά επίπεδα επαγωγής τα επίπεδα της RNA pol II ήταν υψηλά πριν και διατηρήθηκαν μετά τη μόλυνση (εικόνα 87).

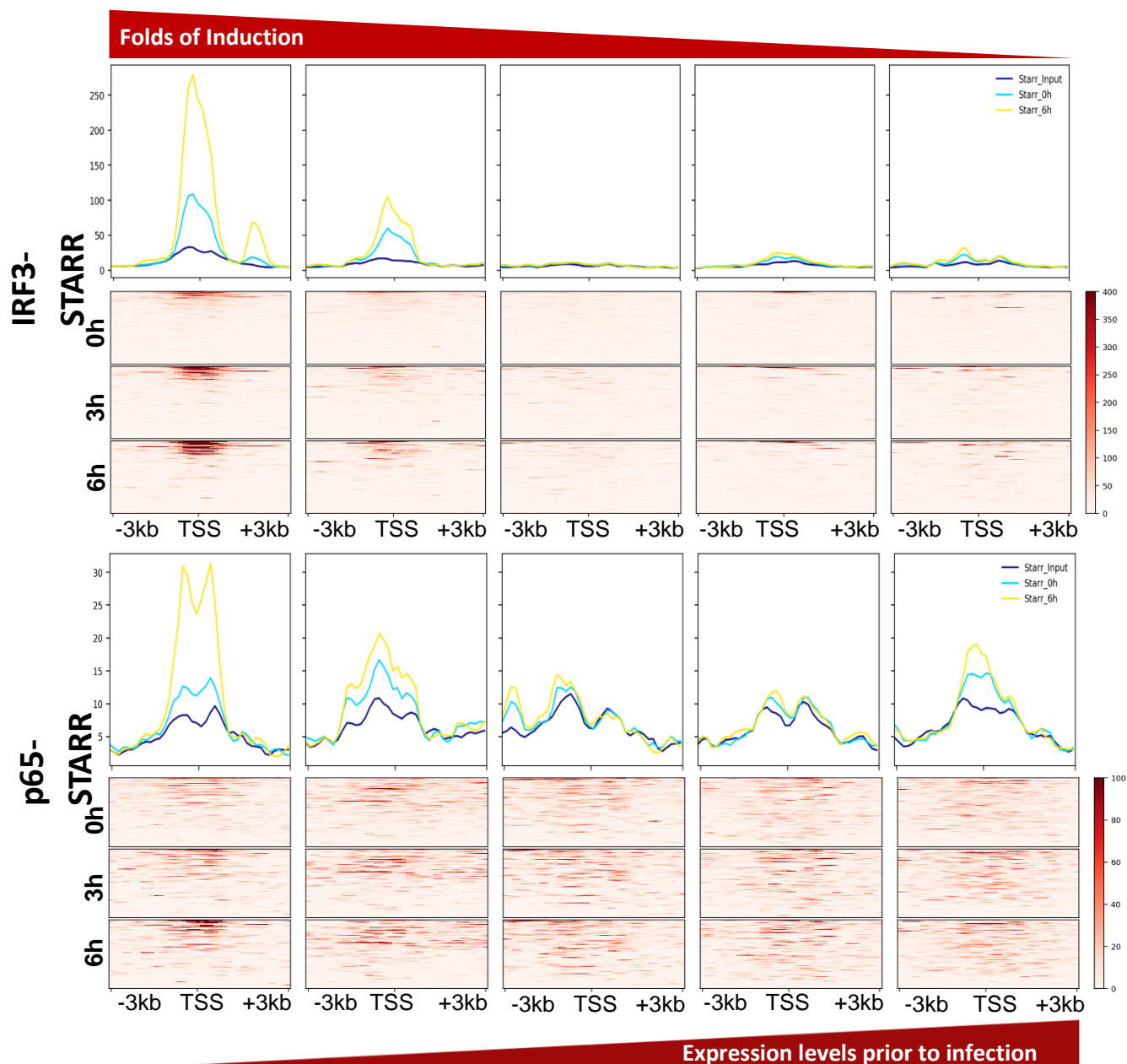


Εικόνα 86: Παρουσιάζονται τα επίπεδα του Med1 (επάνω) και της H3K4me3 (κάτω) γύρω από τους υποκινητές γονιδίων που έχουν κατηγοριοποιηθεί ανάλογα με τα επίπεδα επαγωγής τους πριν και κατά τη διάρκεια της μόλυνσης σε κύτταρα HeLa.



Εικόνα 87: Παρουσιάζονται τα επίπεδα προσβασιμότητας σύμφωνα με τη μέθοδο DNaseI-seq (επάνω) και η πρόσδεση της RNA pol II (κάτω) γύρω από τους υποκινητές γονιδίων που έχουν κατηγοριοποιηθεί ανάλογα με τα επίπεδα επαγωγής τους πριν και κατά τη διάρκεια της μόλυνσης σε κύτταρα HeLa.

Τέλος μετρώντας τα επίπεδα ενεργότητας ενισχυτή όπως προκύπτουν από τις τεχνικές IRF3-STARR-seq και p65-STARR-seq (αναλύονται σε μεταγενέστερο κεφάλαιο) διαπιστώθηκαν τα επαγόμενα επίπεδα ενεργότητας ενισχυτή γύρω από τις θέσεις έναρξης της μεταγραφής των ισχυρά επαγόμενων γονιδίων, ενώ οι περιοχές γύρω από τους υποκινητές των ασθενώς επαγόμενων γονιδίων δεν παρουσίαζαν επαγόμενη ενεργότητα ενισχυτή (εικόνα 88).

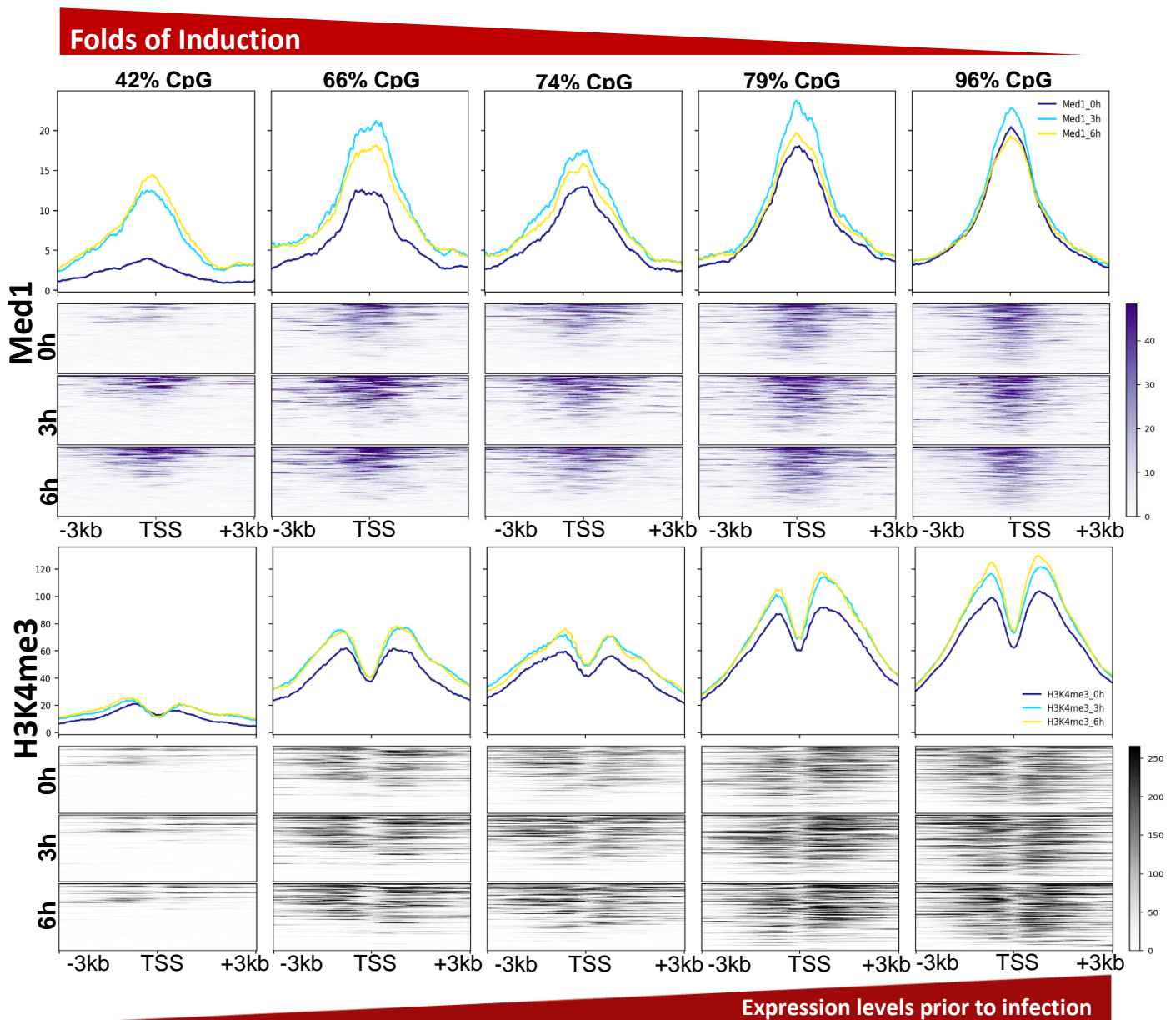


Εικόνα 88: Παρουσιάζονται τα επίπεδα ενεργότητας ενισχυτή σύμφωνα με τη μέθοδο IRF3-STARR-seq (επάνω) και p65-STARR-seq (κάτω) για τις περιοχές γύρω από τους υποκινητές γονιδίων που έχουν κατηγοριοποιηθεί ανάλογα με τα επίπεδα επαγωγής τους πριν και κατά τη διάρκεια της μόλυνσης σε κύτταρα HeLa.

Συνδυαστική ανάλυση του επιγονιδιωματικού προφίλ γύρω από τους υποκινητές των *ϊικά* επαγόμενων γονιδίων στα Namalwa

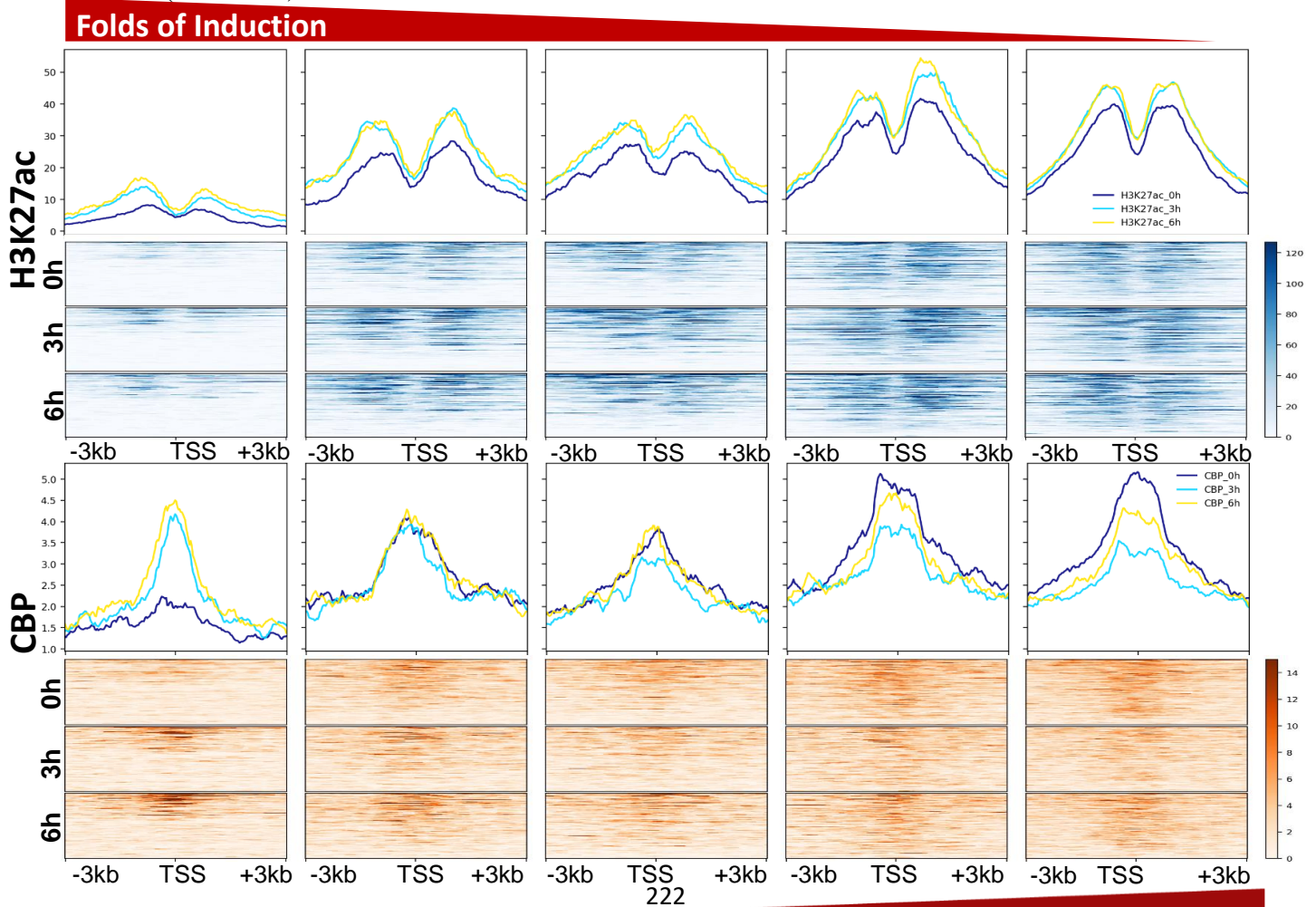
Για τη συσχέτιση των επιπέδων επαγωγής των γονιδίων με τα επαγόμενα επίπεδα προσβασιμότητας της χρωματίνης και πρόσδεσης γύρω από τους υποκινητές συνενεργοποιητών και ιστονικών τροποποιήσεων και πραγματοποιήθηκε ομαδοποίηση των *ϊικά* επαγόμενων γονιδίων σε 5 κατηγορίες ανάλογα με τα επίπεδα

επαγωγής τους. Συγκεκριμένα η κατηγορία με τα μεγαλύτερα επίπεδα επαγωγής περιλαμβάνει γονίδια με επίπεδα επαγωγής μεγαλύτερα από 9,67 φορές, η επόμενη κατηγορία από 3,73 μέχρι 9,66 φορές, η επόμενη από 2,35 μέχρι 3,72, η επόμενη από 1,74 μέχρι 2,34 και η τελευταία από 1,34 μέχρι 1,71. Όπως και στα HeLa παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα επαγωγής των γονιδίων ήταν αντιστρόφως ανάλογα με τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης πριν από τη μόλυνση, δηλαδή γονίδια με μεγάλα επίπεδα επαγωγής μετά τη μόλυνση είχαν χαμηλά επίπεδα έκφρασης πριν από τη μόλυνση, ενώ γονίδια με μικρά επίπεδα επαγωγής παρουσίαζαν υψηλά επίπεδα έκφρασης πριν από τη μόλυνση.



Εικόνα 89: Παρουσιάζονται τα επίπεδα του Med1 (επάνω) και της H3K4me3 (κάτω) γύρω από τους υποκινητές γονιδίων που έχουν κατηγοριοποιηθεί ανάλογα με τα επίπεδα επαγωγής τους πριν και κατά τη διάρκεια της μόλυνσης σε κύτταρα Namalwa.

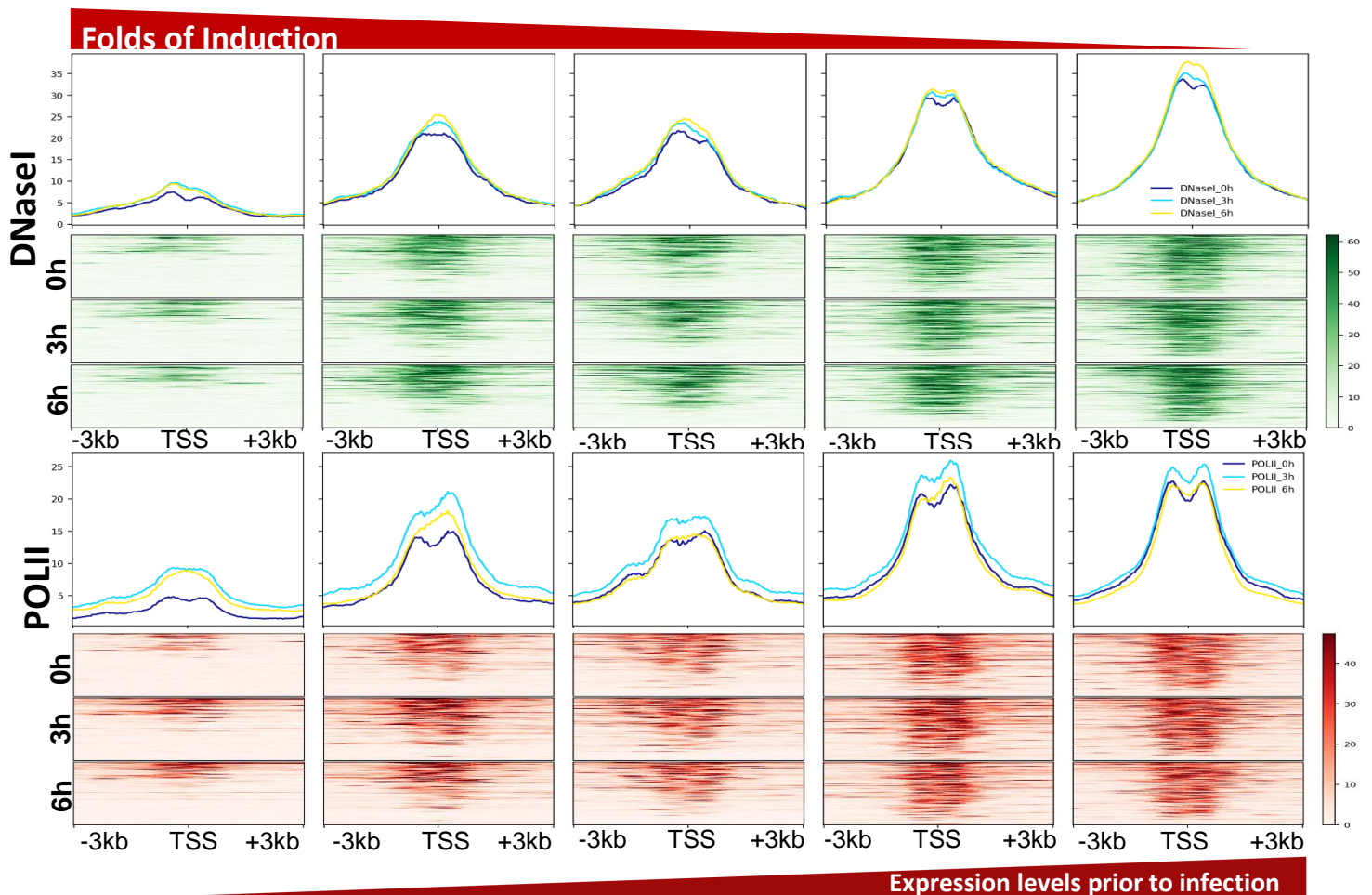
Στη συνέχεια εξετάστηκε το ποσοστό των γονιδίων στις διαφορετικές κατηγορίες επαγωγής που φέρουν CpG νησίδες (CpG islands) (εικόνα 89). Παρατηρήθηκε ότι μικρότερο ποσοστό των γονιδίων που επάγονται ισχυρά φέρει CpG νησίδες στους υποκινητές τους σε αντίθεση με τα γονίδια που επάγονται ασθενώς και τα οποία φέρουν στη πλειοψηφία τους CpG νησίδες. Έπειτα μελετήθηκε η ανακατανομή του συνενεργοποιητή Med1 και διαπιστώθηκε η επαγόμενη πρόσδεση του γύρω από τους υποκινητές των ισχυρά επαγόμενων γονιδίων και τα υψηλά και σταθερά επίπεδα του κατά την εξέλιξη της μόλυνσης γύρω από τους υποκινητές των ασθενώς επαγόμενων γονιδίων. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απεικόνιση των επιπέδων H3K4me3 και αναδείχθηκαν τα χαμηλά επίπεδα του συγκεκριμένου δείκτη πριν από τη μόλυνση γύρω από τους υποκινητές των ισχυρά επαγόμενων γονιδίων και η επαγωγή των επιπέδων H3K4me3 για ένα μικρό αριθμό γονιδίων (εικόνα 89). Αντίθετα τα επίπεδα H3K4me3 ήταν υψηλά και σταθερά γύρω από τους υποκινητές των ασθενώς επαγόμενων γονιδίων. Εξετάζοντας την κατανομή των επιπέδων H3K27ac γύρω από τους υποκινητές των ισχυρά επαγόμενων γονιδίων διαπιστώθηκαν χαμηλά επίπεδα H3K27ac πριν από τη μόλυνση τα οποία αυξάνονται μετά τη μόλυνση (εικόνα 90).



Εικόνα 90: Παρουσιάζονται τα επίπεδα της H3K27ac (επάνω) και του CBP (κάτω) γύρω από τους υποκινητές γονιδίων που έχουν κατηγοριοποιηθεί ανάλογα με τα επίπεδα επαγωγής τους πριν και κατά τη διάρκεια της μόλυνσης σε κύτταρα Namalwa.

Αντίθετα τα γονίδια με μικρά επίπεδα επαγωγής φέρουν υψηλά επίπεδα H3K27ac ήδη πριν από τη μόλυνση τα οποία παραμένουν σταθερά (εικόνα 90). Στη περίπτωση του μεταγραφικού συνενεργοποιητή CBP παρατηρείται επαγόμενη πρόσδεση του γύρω από τους υποκινητές των ισχυρά επαγόμενων γονιδίων και μη επαγόμενα επίπεδα γύρω από τους υποκινητές των γονιδίων που επάγονται ασθενώς (εικόνα 90).

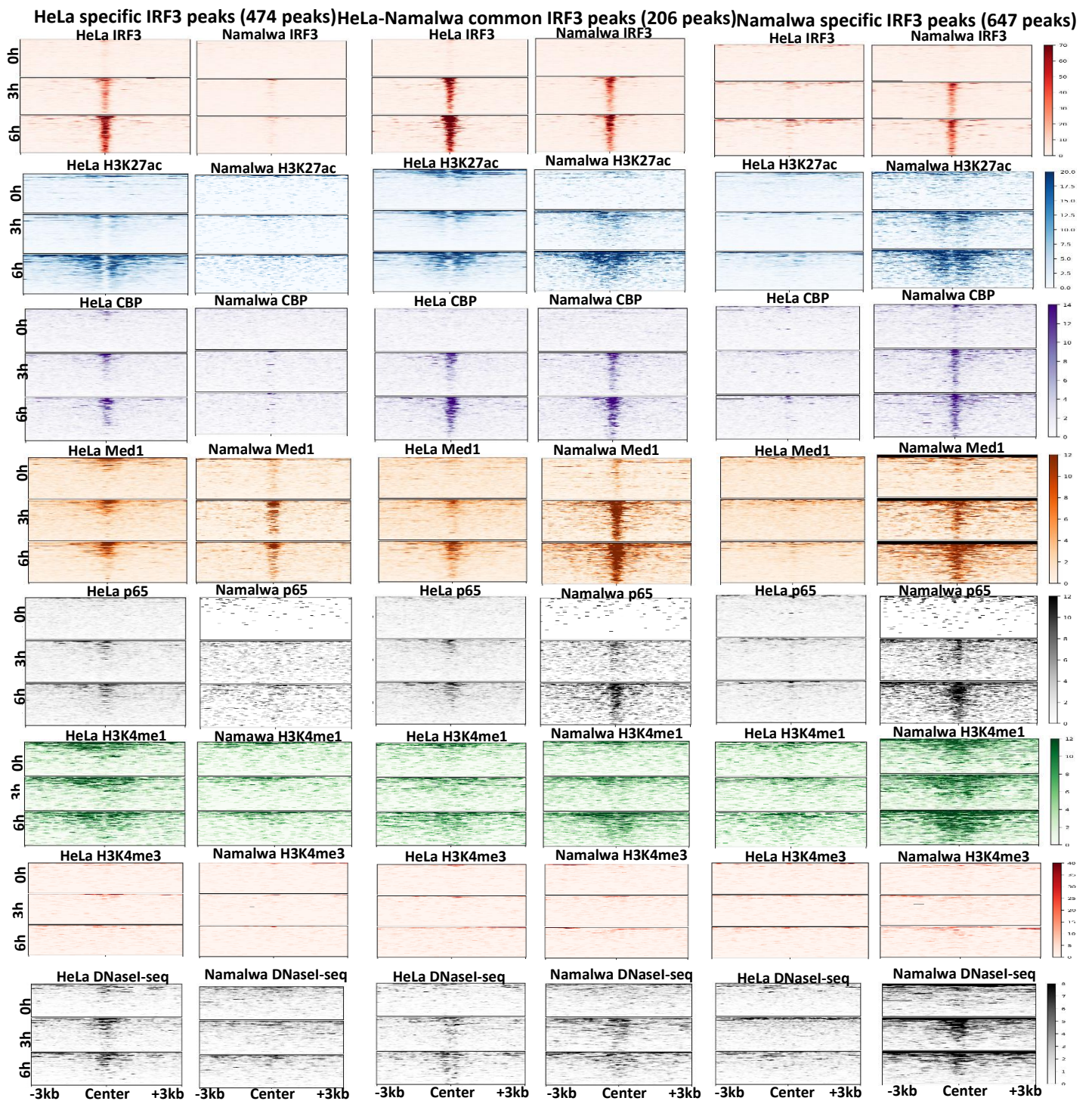
Μελετώντας τα επίπεδα προσβασιμότητας της χρωματίνης με τη μέθοδο DNaseI-seq, διαπιστώθηκαν χαμηλά επίπεδα προσβασιμότητας πριν από τη μόλυνση γύρω από τους υποκινητές των ισχυρά επαγόμενων γονιδίων και αύξηση της προσβασιμότητας για ένα μικρό αριθμό υποκινητών (εικόνα 91). Αντίθετα η προσβασιμότητα ήταν και διατηρήθηκε υψηλή γύρω από τους υποκινητές των ασθενώς επαγόμενων γονιδίων. Τέλος από την εξέταση των επιπέδων της RNA pol II παρατηρήθηκε επαγόμενη πρόσδεση γύρω από τους υποκινητές των ισχυρά επαγόμενων γονιδίων, ενώ στη περίπτωση των γονιδίων με μικρά επίπεδα επαγωγής τα επίπεδα της RNA pol II ήταν υψηλά ήδη πριν από τη μόλυνση (εικόνα 91).



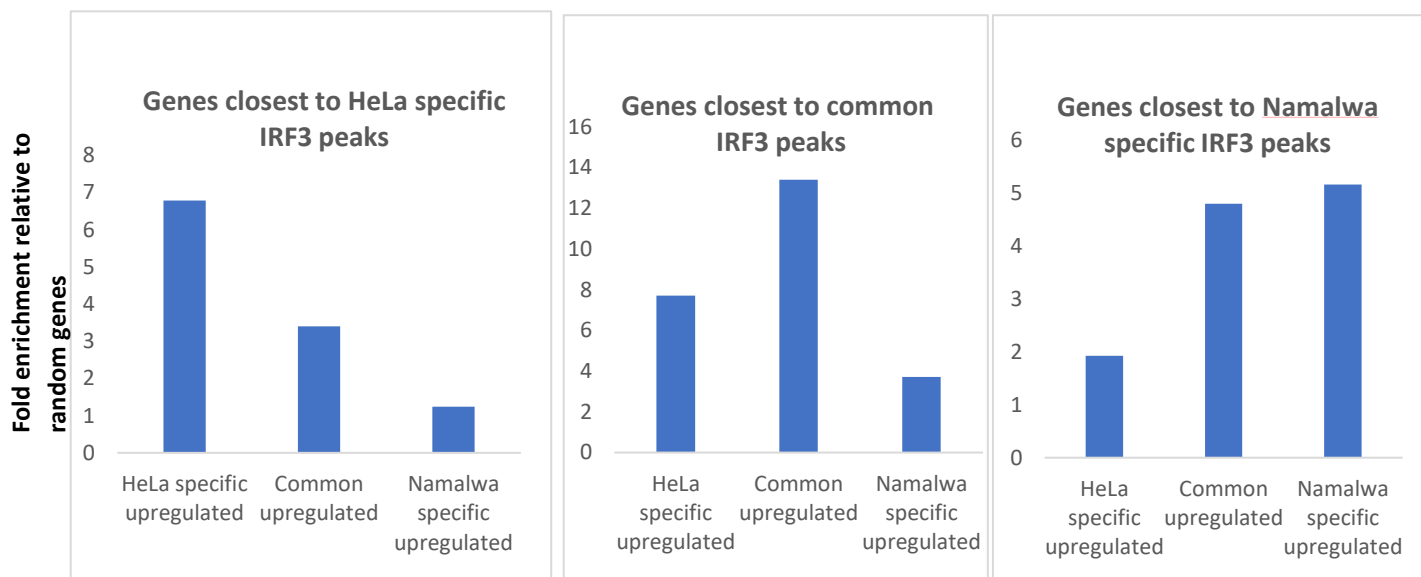
Εικόνα 91: Παρουσιάζονται τα επίπεδα προσβασιμότητας σύμφωνα με τη μέθοδο DNaseI-seq (επάνω) και τα επίπεδα της RNA pol II (κάτω) γύρω από τους υποκινητές γονιδίων που έχουν κατηγοριοποιηθεί ανάλογα με τα επίπεδα επαγωγής τους πριν και κατά τη διάρκεια της μόλυνσης σε κύτταρα Namalwa.

Το κοινό και κυτταροειδικό πρόγραμμα της αντιϊκής απόκρισης

Η πραγματοποίηση πληθώρας πειραμάτων γονιδιωματικής σε δύο διαφορετικούς κυτταρικούς κατά τη διάρκεια της αντιϊκής απόκρισης παρέχει τη μοναδική δυνατότητα αποκάλυψης και σύγκρισης του κοινού και του κυτταροειδικού προγράμματος της αντιϊκής απόκρισης στο επίπεδο της χρωματίνης και της γονιδιακής έκφρασης. Για το σκοπό αυτό έγινε κατηγοριοποίηση των επαγόμενων απομακρυσμένων από υποκινητές περιοχών πρόσδεσης του IRF3 στο γονιδίωμα σε περιοχές στις οποίες προσδέεται και στους δύο κυτταρικούς τύπους και σε περιοχές με κυτταροειδικό πρότυπο πρόσδεσης. Βρέθηκαν 206 περιοχές με κοινό πρότυπο πρόσδεσης, 474 περιοχές που ανιχνεύονται μόνο στα HeLa και 647 περιοχές που εντοπίζονται μόνο στα Namalwa. Στη συνέχεια για να εξετάσουμε αν αυτές οι περιοχές φέρουν επιπλέον χαρακτηριστικά των ενεργών ενισχυτών με όμοια κοινή και κυτταροειδική κατανομή με αυτή του IRF3 πραγματοποιήσαμε απεικόνιση της έντασης του σήματος γύρω από τις περιοχές πρόσδεσης του IRF3 για διάφορους επιγονιδιωματικούς δείκτες όπως τα επίπεδα H3K27ac, CBP, Med1, H3K4me1, H3K4me3, p65 και προσβασιμότητας της χρωματίνης (εικόνα 92). Τα αποτελέσματα ήταν εντυπωσιακά και φανέρωσαν το υψηλό βαθμό συνεντοπισμού όλων αυτών των δεικτών των ενισχυτών με κοινό και συντονισμένο κοινό και κυτταροειδικό πρότυπο επαγόμενου συνεντοπισμού. Το επόμενο ερώτημα αφορούσε στο κατά πόσο αυτή η συντονισμένη ενεργοποίηση ενισχυτών που έχει κοινή και κυτταροειδική μοίρα συνοδεύεται από αντίστοιχες κοινές και κυτταροειδικές αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση γεγονός που θα υποστήριζε ότι αυτή η κατηγοριοποίηση των ενισχυτών έχει λειτουργικό ρόλο στη αντιϊκή απόκριση. Πράγματι βρέθηκε ότι οι ενισχυτές που επάγονται και στους δύο κυτταρικούς τύπους ρυθμίζουν κατά προτίμηση γονίδια με κοινό πρότυπο επαγωγής, ενώ αντίθετα οι κυτταροειδικοί ενισχυτές ρυθμίζουν γονίδια που επάγονται μόνο στον ένα κυτταρικό τύπο (εικόνα 93).



Εικόνα 92: Παρουσιάζονται οι κοινές και κυτταροειδικές επαγόμενες περιοχές πρόσδεσης του IRF3 σε κύτταρα HeLa και Namalwa οι οποίες εντοπίζονται σε απόσταση μεγαλύτερη από 2kb από τη θέση έναρξης της μεταγραφής. Στις περιοχές αυτές συνεντοπίζονται με επαγόμενο πρότυπο δείκτες χαρακτηριστικοί των ενισχυτών όπως η H3K27ac, ο CBP, ο Med1 και ο p65 και αυξάνεται η προσβασιμότητά τους κατά την εξέλιξη της αντιϊκής απόκρισης.

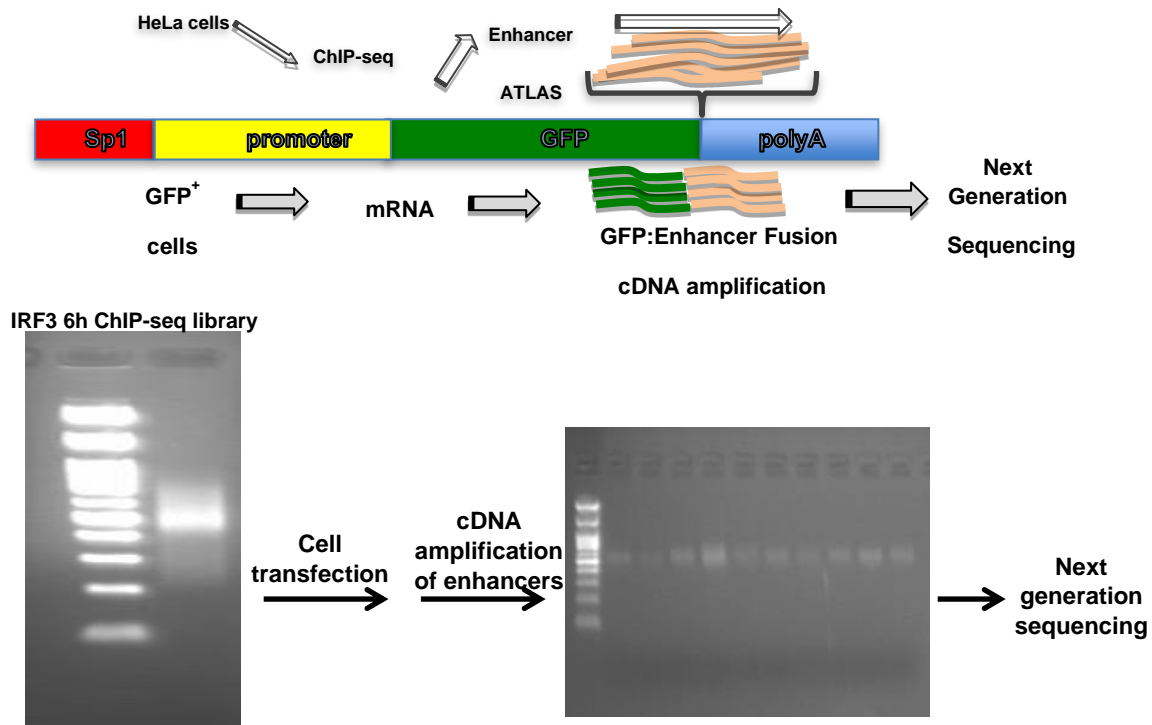


Εικόνα 93: Παρουσιάζεται η τάση των γονιδίων που βρίσκονται εγγύτερα στις κοινές και κυτταροειδικές επαγόμενες περιοχές πρόσδεσης του IRF3 να έχουν κοινά και κυτταροειδικά πρότυπα επαγωγής αντίστοιχα.

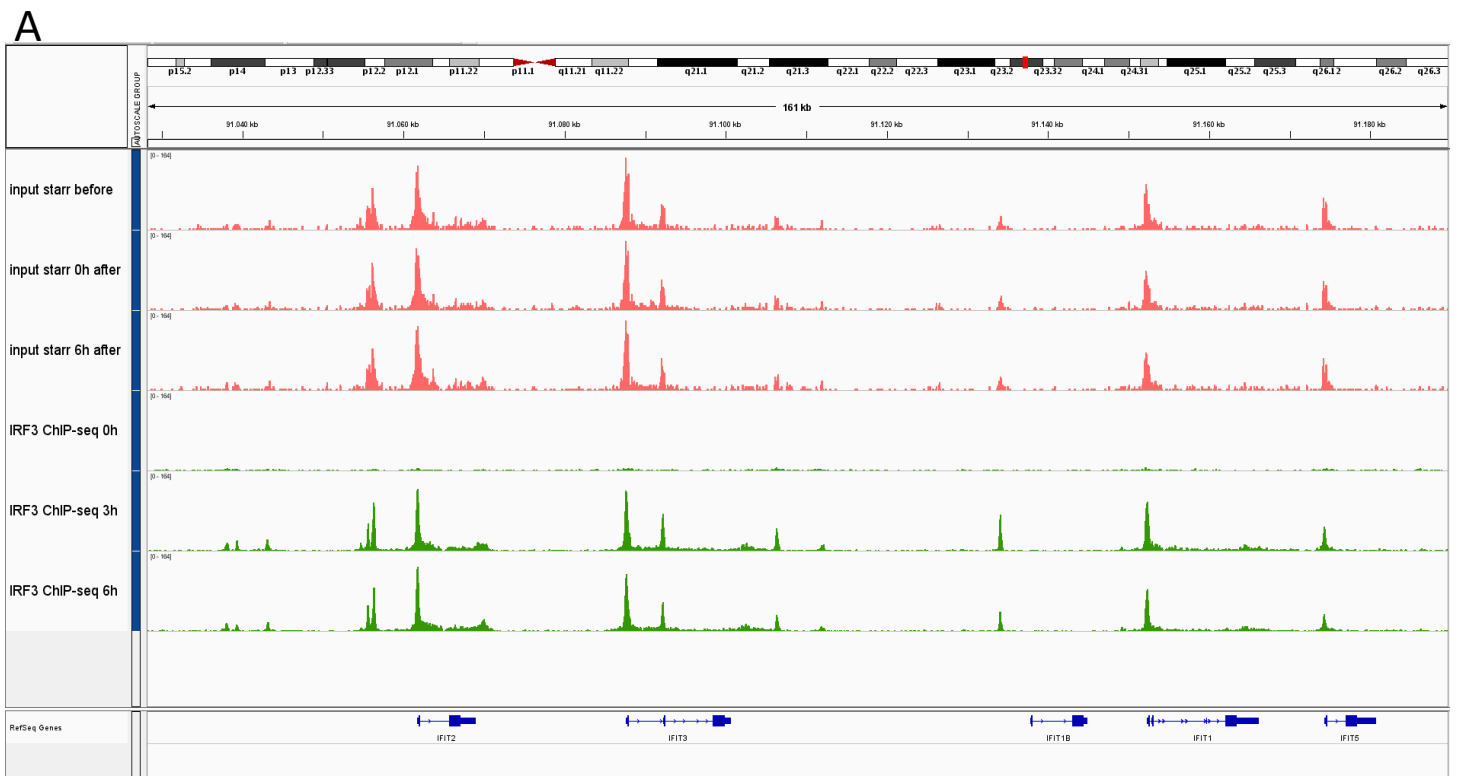
IRF3-ChIP-STARR-seq

Η ύπαρξη θέσεων πρόσδεσης για τον IRF3 αποτελεί ένδειξη αλλά όχι απόδειξη για τη λειτουργία των στοιχείων ως ενισχυτών. Αυτό είναι γεγονός και για κάθε μεταγραφικό παράγοντα καθώς η πρόσδεση αποτελεί ένα μόνο από τα αναγκαία γεγονότα για την ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων στόχων. Για την εξέταση της λειτουργικότητας των ρυθμιστικών στοιχείων ως ενισχυτών εφαρμόσαμε το πρωτοποριακό πρωτόκολλο IRF3-ChIP-STARR-seq σε κύτταρα HeLa. Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι η μοναδική που παρέχει τη δυνατότητα ταυτόχρονης εξέτασης της ενεργότητας ενισχυτή για χιλιάδες αλληλουχίες DNA. Αξίζει να αναφερθεί ότι τροποποιήσαμε και βελτιώσαμε το αρχικά δημοσιευμένο STARR-seq πρωτόκολλο εισάγοντας μια θέση πρόσδεσης για το μεταγραφικό παράγοντα Sp1 ακριβώς άνωθεν του υποκινητή στο STARR πλασμίδιο. Η τροποποίηση αυτή όπως έχει δείξει παλιότερα το εργαστήριό μας βοηθάει την επικοινωνία του υποκινητή με τον απομακρυσμένο ενισχυτή μέσω της δημιουργίας θηλιάς (Nolis et al.,2009). Συγκεκριμένα το πειραματικό πρωτόκολλο περιελάμβανε μαζική κλωνοποίηση μέσω

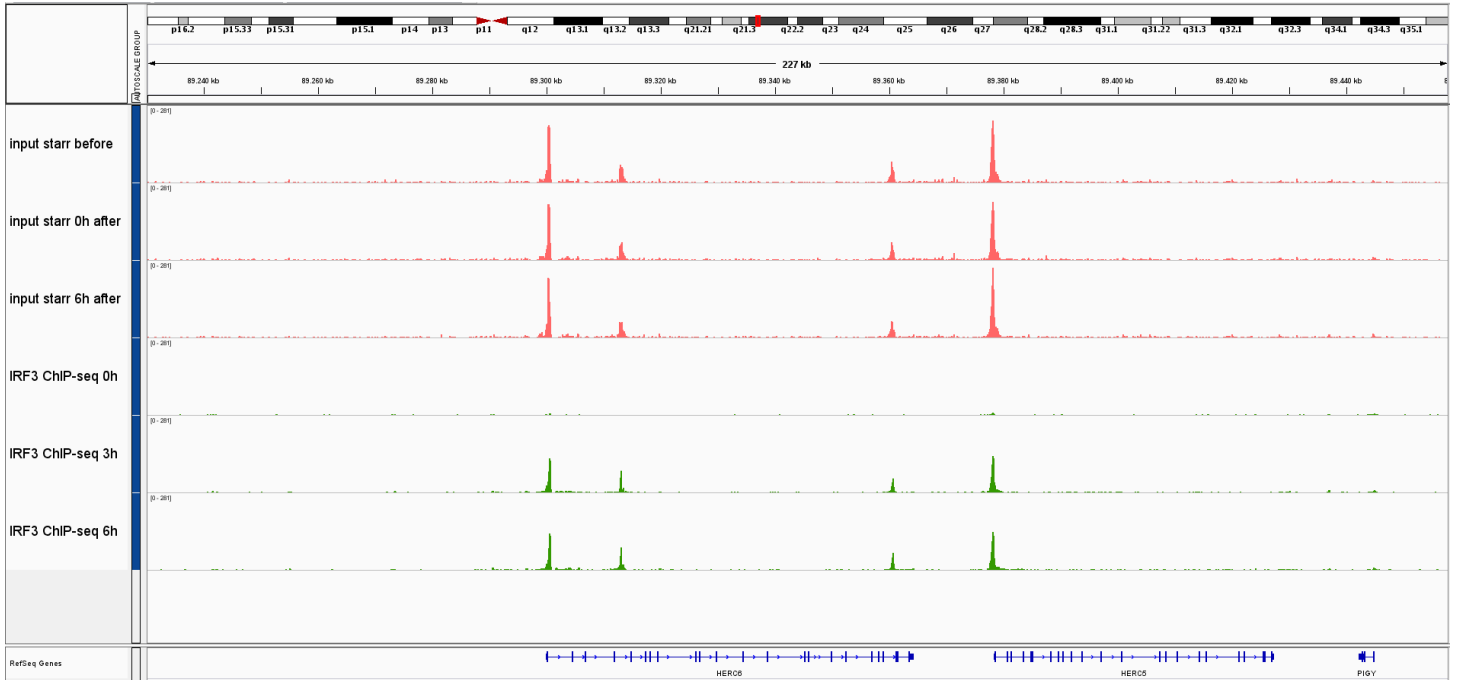
ομόλογου ανασυνδυασμού του απομονωμένου DNA από το πείραμα ανοσοκατακρήμισης έναντι του IRF3 σε κύτταρα HeLa που είχαν μολυνθεί για 6 ώρες με ιό Sendai στο τροποποιημένο πλασμιδιακό φορέα 1xSp1-STARR-seq (εικόνα 94). Υπολογίστηκε ότι ο αριθμός των αποικιών που μεγάλωσαν έφθασε τα 5 εκατομμύρια. Επομένως η πλασμιδιακή βιβλιοθήκη που δημιουργήθηκε περιελάμβανε 5 εκατομμύρια μοναδικά τμήματα DNA, αριθμός ικανός να αντιπροσωπεύσει πολλαπλές φορές τις θέσεις πρόσδεσης του IRF3 στο γονιδίωμα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση της βιβλιοθήκης σε 40 εκατομμύρια κύτταρα. Ακολούθησε μόλυνση του μισού κυτταρικού πληθυσμού με ιό Sendai για 6 ώρες, συλλογή του RNA από μολυσμένα και μη μολυσμένα κύτταρα, επιλεκτική κατασκευή cDNA από τα μετάγραφα που προέρχονται από το STARR φορέα, επιλεκτικός πολλαπλασιασμός του υλικού με κατασκευή γονιδιωματικών βιβλιοθηκών και ευρείας κλίμακας αλληλούχιση του υλικού. Ως δείγματα σύγκρισης αλληλουχίστηκε η πλασμιδιακή βιβλιοθήκη πριν από τη διαμόλυνση στα κύτταρα καθώς και μετά τη διαμόλυνση για την εύρεση τυχόν αλλαγών στην αντιπροσώπευση των διαφορετικών τμημάτων DNA. Αξίζει να αναφερθεί ότι η παραπάνω διαδικασία από το στάδιο της διαμόλυνσης και μετά πραγματοποιήθηκε εις διπλούν για να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων. Μετά το ποιοτικό και ποσοτικό έλεγχο όλων των βιβλιοθηκών που κατασκευάστηκαν πραγματοποιήθηκε ευρείας κλίμακας αλληλούχιση τους στο μηχάνημα NextSeq500 της illumina. Από την αλληλούχιση προέκυψαν περίπου 450 εκατομμύρια διαβασμένες αλληλουχίες (reads) μήκους 75 ζευγών βάσεων η καθεμία οι οποίες όπως διαπιστώθηκε περίπου ισο-μοιράστηκαν ανάμεσα στα 10 δείγματα που υπέστησαν αλληλούχιση. Ακολούθησε ανάλυση των αποτελεσμάτων με μεθόδους βιοπληροφορικής. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε ποιοτικός έλεγχος των αλληλουχιών με το πρόγραμμα FastQC, στοίχιση των αλληλουχιών στο γονιδίωμα με τον αλγόριθμο Bowtie2 και μέτρηση του αριθμού των reads στις περιοχές πρόσδεσης του IRF3 με την εντολή Multicon από το πακέτο Bedtools. Αρχικά διαπιστώθηκε ότι η αντιπροσώπευση του γονιδιώματος από τις IRF3-ChIP-STARR-seq πλασμιδιακές βιβλιοθήκες προσομοιάζει αυτή του πειράματος IRF3 6h ChIP-seq (εικόνα 95), επομένως οι STARR πλασμιδιακές βιβλιοθήκες αντιπροσωπεύουν πιστά τις θέσεις πρόσδεσης του IRF3 στο γονιδίωμα 6 ώρες μετά τη μόλυνση.



Εικόνα 94Α. Παρουσιάζεται η αρχιτεκτονική του φορέα STARR και τα βασικά στάδια του πρωτόκολλου ChIP-STARR-seq. Β. Παρουσιάζεται η IRF3 6h ChIP-seq βιβλιοθήκη που κλωνοποιήθηκε στο φορέα STARR καθώς και οι τελικές STARR βιβλιοθήκες πριν την αλληλούχισή τους.



B



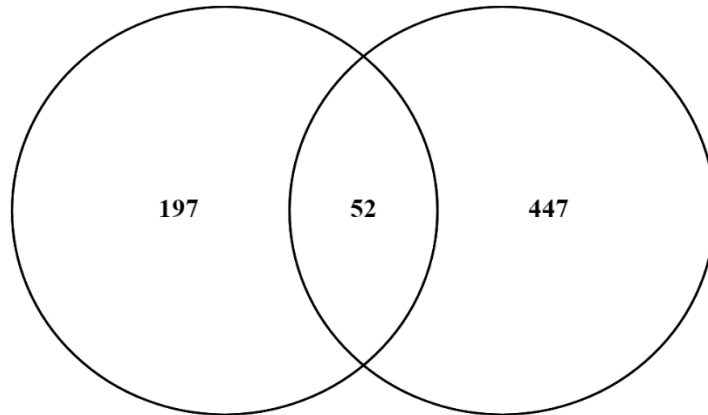
Εικόνα 95: Παρουσιάζεται η κάλυψη του γονιδιώματος όπως αυτή προκύπτει από την αλληλούχιση των πλασμιδιακών βιβλιοθηκών IRF3-STARR πριν και μετά τη διαμόλυνση στα κύτταρα και των πειραμάτων IRF3 ChIP-seq γύρω από τους γενετικούς τόπους των γονιδίων *IFIT* (A) και *HERC5*, *HERC6* (B).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εύρεση των επαγόμενων STARR ενισχυτών. Ως επαγόμενος θεωρήθηκε ένας ενισχυτής όταν το σήμα STARR από το δείγμα των 6 ωρών ήταν τουλάχιστον διπλάσιο από τα σήματα των πλασμιδιακών βιβλιοθηκών και ταυτόχρονα τουλάχιστον διπλάσιο από το STARR σήμα του δείγματος που δεν είχε μολυνθεί. Ακολούθησε ανάλυση των αποτελεσμάτων με μεθόδους βιοπληροφορικής ως εξής: [1] Ανάλυση μοτίβων μεταγραφικών παραγόντων για τις IRF3-STARR ενεργές περιοχές η οποία πραγματοποιήθηκε με τους αλγόριθμους RSATtools και MEME-ChIP. [2] Εύρεση του κοντινότερου γονιδίου. Η εντολή ClosestBed από το Bedtools χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση του κοντινότερου γονιδίου για κάθε STARR ενεργό ενισχυτή. [3] Το πρόγραμμα Venny χρησιμοποιήθηκε για την σύγκριση της λίστας των γονιδίων που είναι τα κοντινότερα στους STARR ενεργούς ενισχυτές με τη λίστα του συνόλου των επαγόμενων γονιδίων. Από την ανάλυση προέκυψε ότι 7229 θέσεις πρόσδεσης του IRF3 αντιπροσωπεύονται με 10 ή περισσότερα μοναδικά

τμήματα DNA στη πλασμιδιακή βιβλιοθήκη και μπορεί να εξεταστεί η ενεργότητά τους με αξιόπιστο τρόπο. Αν η STARR βιβλιοθήκη περιείχε τυχαία κομμάτια DNA τότε με την ίδια πολυπλοκότητα βιβλιοθήκης θα είχαμε μόνο 26 περιοχές στο γονιδίωμα να αντιπροσωπεύονται με 10 ή περισσότερα μοναδικά κομμάτια DNA. Επομένως η στρατηγική ChIP-STARR-seq σε σχέση με τη κλωνοποίηση ολόκληρου του γονιδιώματος με τυχαία κομμάτια DNA επιτρέπει το κατά 278 φορές (7229:26) εμπλουτισμό της βιβλιοθήκης με περιοχές (θέσεις πρόσδεσης του IRF3) που αντιπροσωπεύονται με 10 ή περισσότερα μοναδικά τμήματα. Επομένως επιτυγχάνεται σημαντική μείωση της έκτασης και του κόστους του πειράματος, καθώς η μείωση του αριθμού των απαραίτητων μοναδικών κλώνων συνεπάγεται ρεαλιστικά επίπεδα κόστους για τη κατασκευή των βιβλιοθηκών, τη διαμόλυνση των κυττάρων, το πολλαπλασιασμό και την αλληλούχιση του υλικού.

Επικεντρώνοντας τη προσοχή μας στις 2784 πλέον ισχυρές επαγόμενες περιοχές πρόσδεσης του IRF3 στο DNA που βρίσκονται μακριά από τη θέση έναρξης της μεταγραφής (>2kb) παρατηρήθηκε ότι 258 (9,2%) από αυτές τις περιοχές έχουν επαγόμενη ενεργότητα ενισχυτή με βάση τη μέθοδο STARR-seq. Από την ανάλυση των κοντινότερων γονιδίων σε αυτούς τους STARR ενεργούς ενισχυτές προέκυψε ότι 52 ιικά επαγόμενα γονίδια είναι τα κοντινότερα σε αυτούς τους ενισχυτές και επομένως πιθανόν να ρυθμίζονται από αυτούς. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι αυτά των γονιδίων *IFNB1*, *OASL* και *IRF1* (εικόνα 96).

Closest genes to distal STARR enhancers Virus induced genes



List of virus induced genes with distal STARR enhancers

<i>TNFRSF8</i>	<i>ACVR1</i>
<i>PHACTR4</i>	<i>SCN3A</i>
<i>LPTM5</i>	<i>EPHA4</i>
<i>PIK3R3</i>	<i>SP100</i>
<i>RGS2</i>	<i>B4GALT5</i>
<i>RPS6KC1</i>	<i>CHEK2</i>
<i>OTUD1</i>	<i>PXK</i>
<i>SVIL</i>	<i>NFKBIZ</i>
<i>CCDC6</i>	<i>STIM2</i>
<i>SARIA</i>	<i>FGF2</i>
<i>CPEB3</i>	<i>IL7R</i>
<i>CHST15</i>	<i>PTGER4</i>
<i>NAV2</i>	<i>ITGA2</i>
<i>TCN1</i>	<i>GPBP1</i>
<i>PRSS23</i>	<i>PRDM6</i>
<i>NEDD1</i>	<i>IRF1</i>
<i>OASL</i>	<i>RAB24</i>
<i>GCH1</i>	<i>CCND3</i>
<i>ITPRIPL2</i>	<i>ADAP1</i>
<i>PLCG2</i>	<i>PRR15</i>
<i>SPAG9</i>	<i>GRB10</i>
<i>PMAIP1</i>	<i>SRPK2</i>
<i>LINC00152</i>	<i>ZNF704</i>
<i>PDCL3</i>	<i>IFNB1</i>
<i>MAP4K4</i>	<i>KLF4</i>
<i>IL1A</i>	<i>RP2</i>

Εικόνα 96:Α. Παρουσιάζονται τα γονίδια που βρίσκονται εγγύτερα στους STARR ενεργούς ενισχυτές και συγκαταλέγονται στα *ϊικά* επαγόμενα γονίδια 6 ώρες μετά τη μόλυνση με ιό Sendai. Στην εικόνα Β παρουσιάζεται η λίστα των *ϊικά* επαγόμενων γονιδίων τα οποία αποτελούν τα εγγύτερα γονίδια σε απομακρυσμένους από το TSS STARR ενεργούς ενισχυτές.

ISG15	ZFAS1
IFI44	ZNFX1
GBP5	MX1
MCL1	APOL1
IFIT2	HERC6
IFIT3	HERC5
IFIT1	SMARCA5
OAS3	DDX60
OASL	SAMD9
DHX58	ZC3HAV1
RNF149	DDX58
IFIH1	

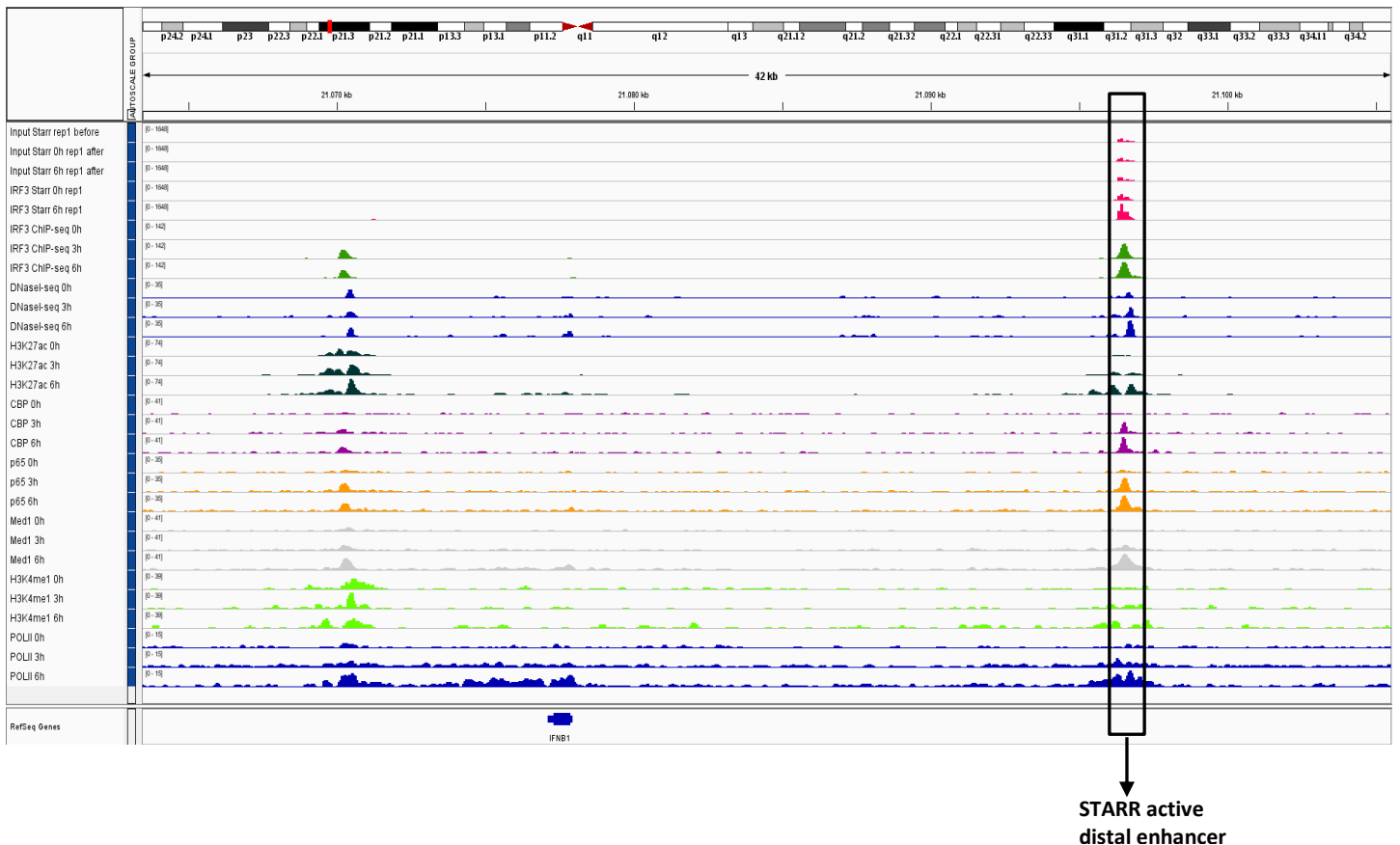
Εικόνα 97. Λίστα με τα 23 *ϊικά* επαγόμενα γονίδια που ρυθμίζονται από *ϊικά* επαγόμενους STARR ενισχυτές που βρίσκονται κοντά στη θέση έναρξης της μεταγραφής τους.

Στη συνέχεια εξετάστηκε αν τα *ϊικά* επαγόμενα γονίδια που βρίσκονται κοντά σε IRF3-STARR ενεργούς ενισχυτές ανήκουν στο κοινό πυρήνα των γονιδίων που επάγονται σε Namalwa και HeLa ή έχουν κυτταροειδικό πρότυπο επαγωγής. Διαπιστώθηκε ότι από τα 52 γονίδια τα 21 ανήκουν στον κοινό αντιϊικό πυρήνα ενώ τα 31 έχουν κυτταροειδικό πρότυπο επαγωγής. Στα κοινά *ϊικά* επαγόμενα γονίδια με IRF3-STARR ενεργούς ενισχυτές περιλαμβάνονται μεταξύ άλλων τα *OASL*, *CHEK2*, *PMAIP1*, *IFNB1* και *IRF1*, ενώ επαγόμενα μόνο στα HeLa γονίδια με IRF3-STARR ενεργούς ενισχυτές είναι μεταξύ άλλων το *CCDC6*, *IL7R*, *SVIL* και *KLF4*. Επομένως οι *ϊικά* επαγόμενοι IRF3-STARR ενισχυτές ρυθμίζουν τόσο κοινά αντιϊικά όσο και κυτταροειδικά επαγόμενα γονίδια.

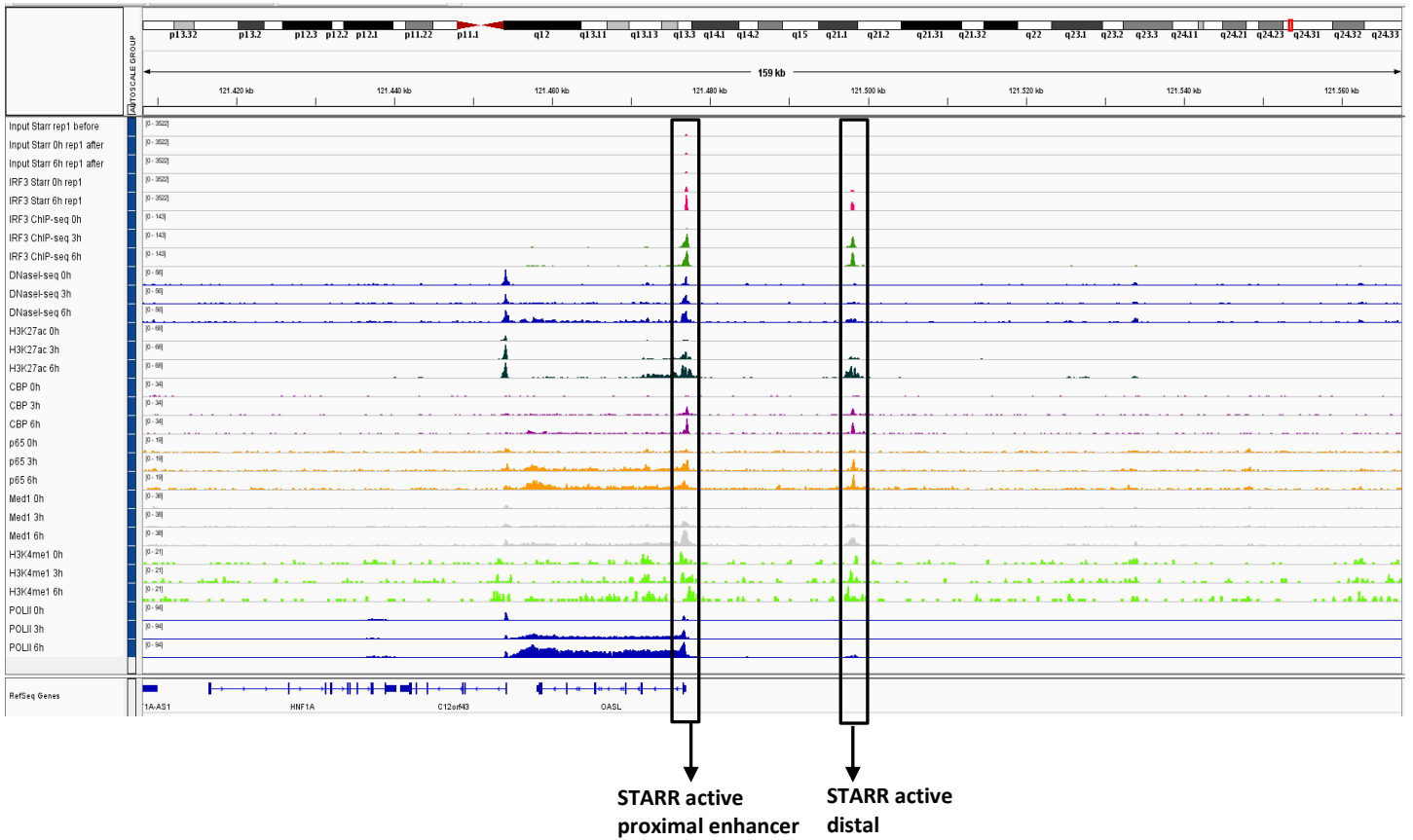
Στρέφοντας τη προσοχή μας στους ενισχυτές που βρίσκονται κοντά στη θέση έναρξης της μεταγραφής (<2kb) βρέθηκαν 23 ενισχυτές που ρυθμίζουν *ϊικά* επαγόμενα γονίδια. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν αυτά των γονιδίων *OASL*, *ISG15*, *IFIT2* και *DDX58* (εικόνα 97). Παρατηρήθηκε ότι 22 από τα 23 αυτά *ϊικά* επαγόμενα

γονίδια ανήκουν στο κοινό αντιϊκό πυρήνα των γονιδίων που επάγονται και στα Namalwa. Παρατηρείται επομένως ότι καίρια για την αντιϊκή απόκριση γονίδια με συντηρημένο πρότυπο επαγωγής ρυθμίζονται κυρίως από ενισχυτές που βρίσκονται κοντά στη θέση έναρξης της μεταγραφής, ενώ τα επαγόμενα γονίδια με κυτταροειδικό πρότυπο φαίνεται να ρυθμίζονται από απομακρυσμένους ενισχυτές. Στην εικόνα 98 παρουσιάζονται χαρακτηριστικά παραδείγματα επαγόμενων ενισχυτών σύμφωνα με τα πειράματα IRF3-STARR-seq οι οποίοι βρίσκονται κοντά στους υποκινητές των *ϊικά* επαγόμενων γονιδίων *IFIT1*, *IFIT2* και *IFIT3*. Στη συνέχεια εξετάσαμε τις διαφορές στο πρότυπο της πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, ιστονικών τροποποιήσεων και προσβασιμότητας της χρωματίνης για τις περιοχές με ισχυρά επαγόμενη πρόσδεση του IRF3 που παρουσιάζουν ή όχι ενεργότητα με βάση τη μέθοδο STARR-seq. Στην εικόνα 99 παρουσιάζονται τα επίπεδα STARR σήματος για τις θέσεις πρόσδεσης του IRF3 που έχουν STARR ενεργότητα (αριστερά) και για αυτές χωρίς ενεργότητα (δεξιά). Διαπιστώθηκε ότι οι περιοχές που παρουσιάζουν STARR ενεργότητα έχουν ισχυρότερα επαγόμενα επίπεδα πρόσδεσης του IRF3. Στη συνέχεια έγινε σύγκριση του προτύπου πρόσδεσης του p65 στις περιοχές με η χωρίς STARR ενεργότητα (εικόνα 103).

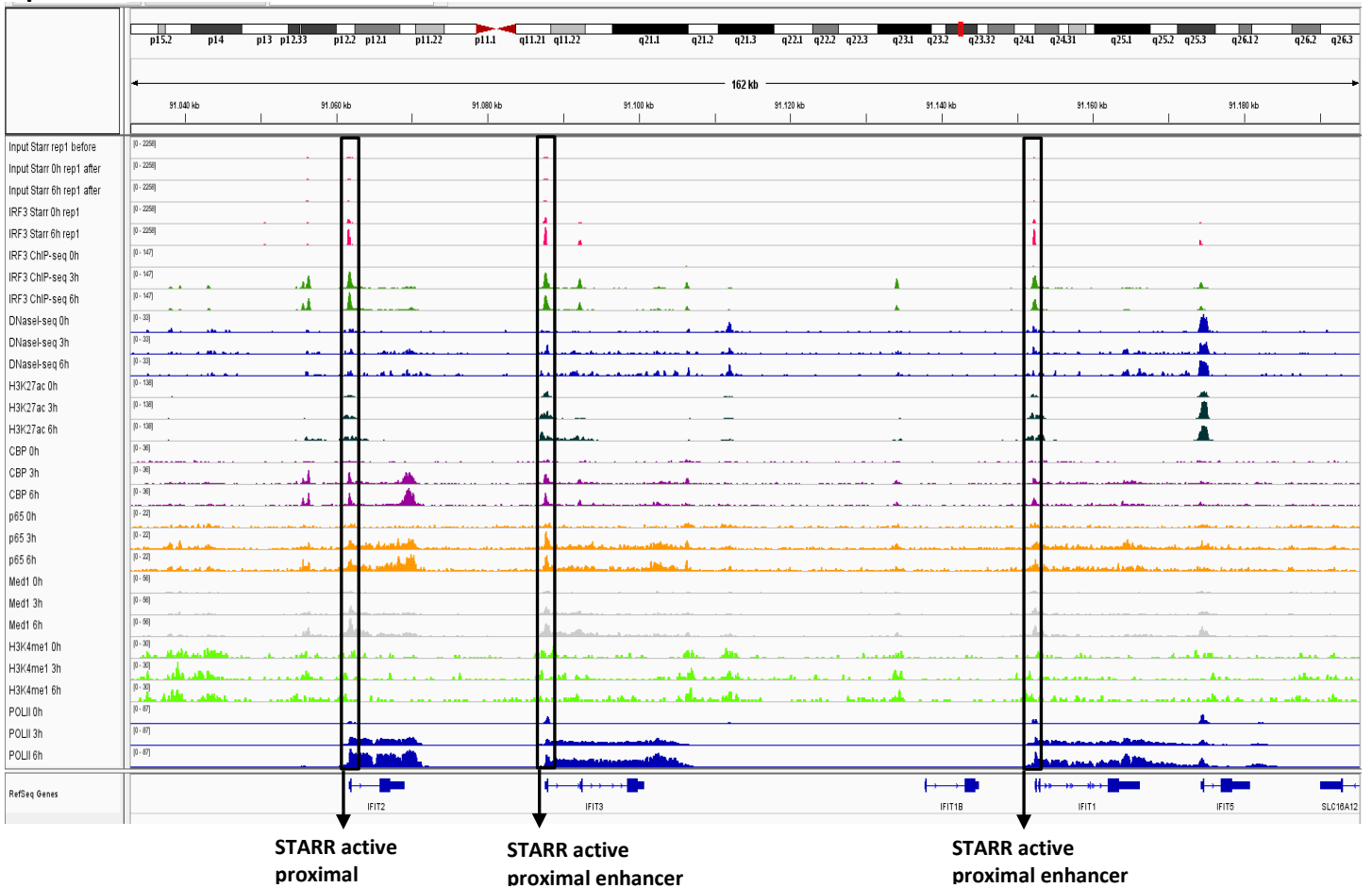
A



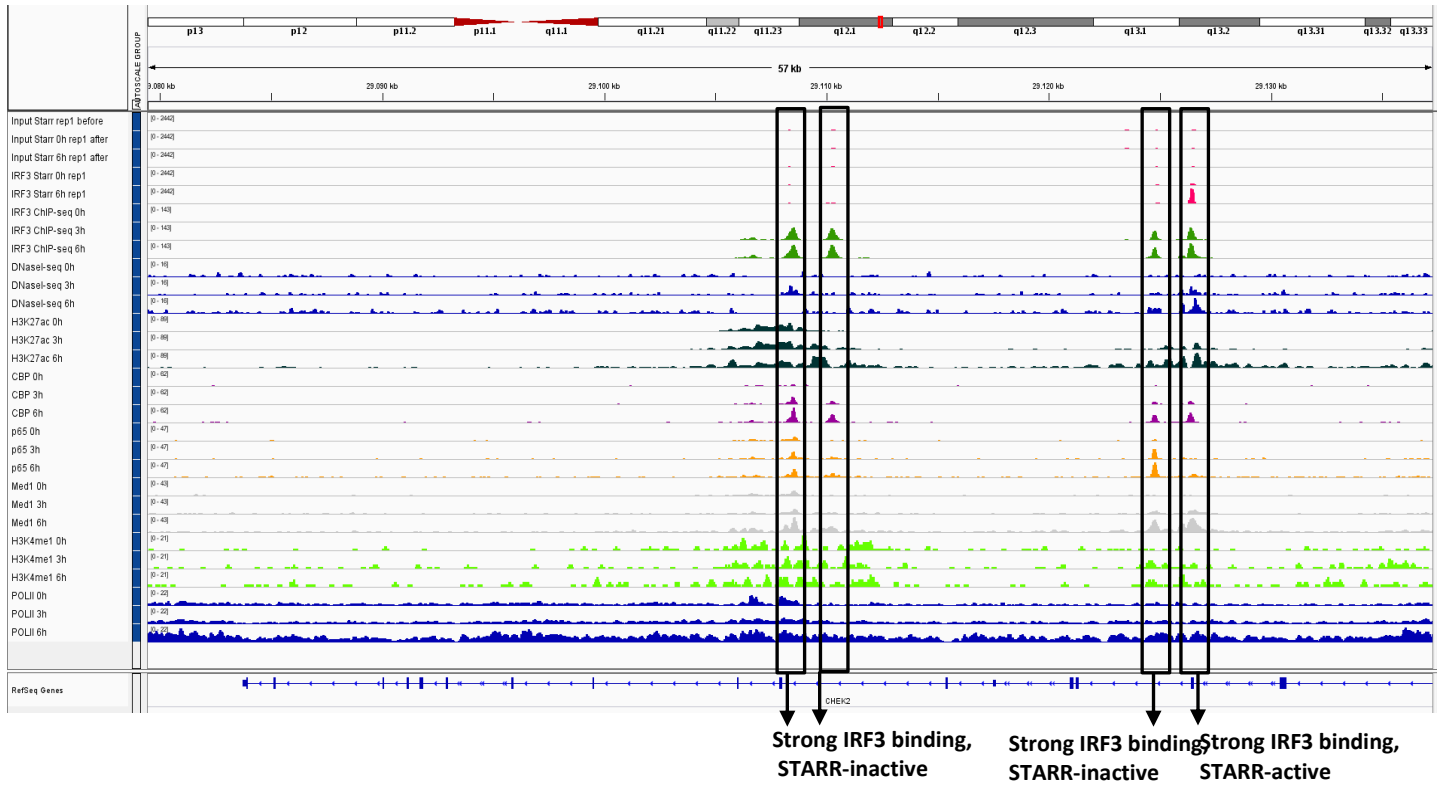
B



C



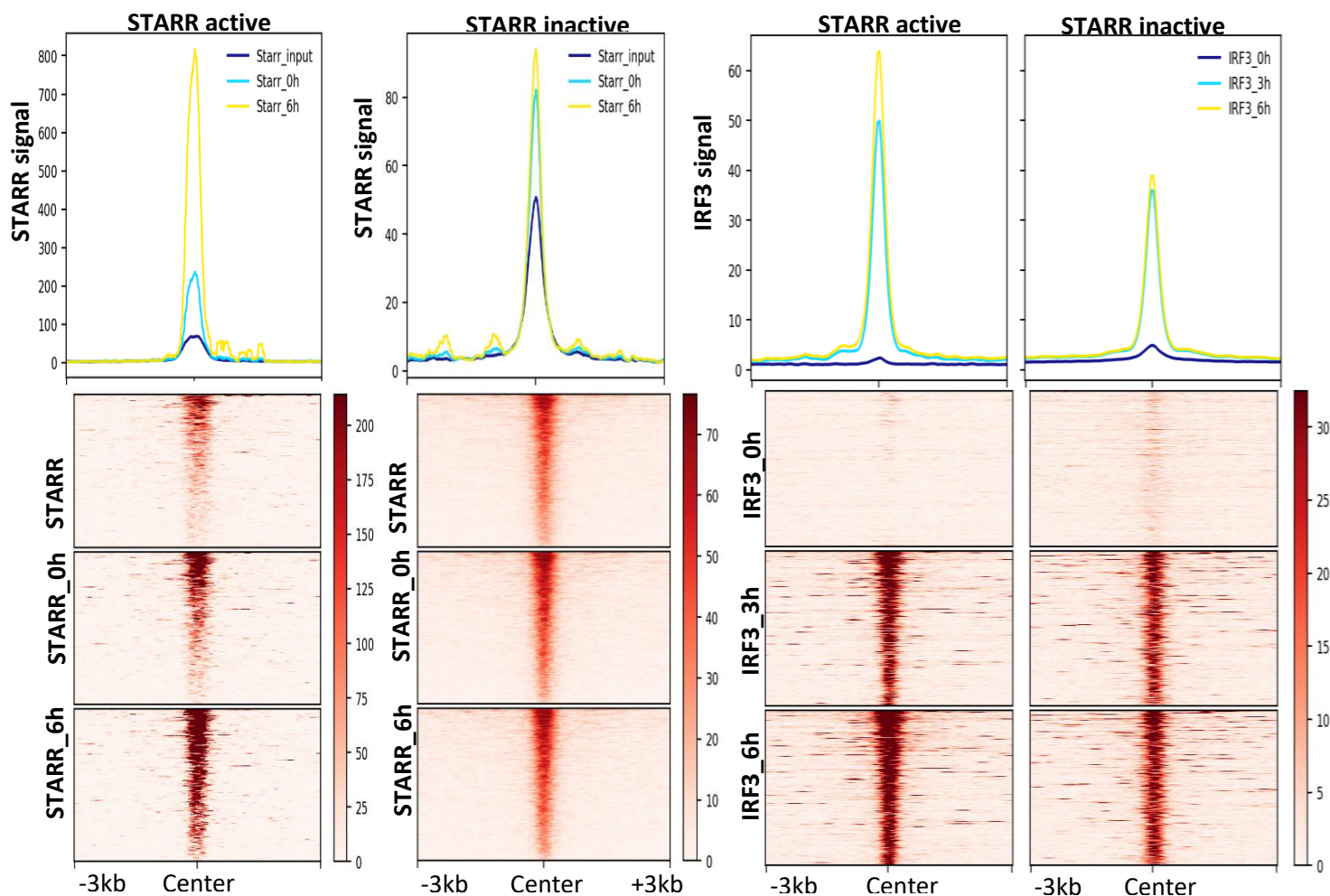
Δ



Εικόνα 98.A. Παρουσιάζεται ο STARR ενεργός ενισχυτής 20 kb άνωθεν του γονιδίου IFNB1. Ο συγκεκριμένος ενισχυτής έχει χαρακτηριστεί προσφάτως (Banerjee *et al.*,2013). Β. Παρουσιάζεται ο STARR ενεργός ενισχυτής κοντά στη θέση έναρξης της μεταγραφής του *ϊκκά* επαγόμενου γονιδίου OASL και ένας ακόμα περίπου 20 kb άνωθεν του γονιδίου. Ο τελευταίος έχει μελετηθεί προσφάτως (Borghini *et al.*,2018). Γ. Απεικονίζονται οι STARR ενεργοί ενισχυτές που βρίσκονται κοντά στις θέσεις έναρξης της μεταγραφής των *ϊκκά* επαγόμενων γονιδίων IFIT2,IFIT3,IFIT1 και IFIT5. Δ. Παρουσιάζεται ένας STARR ενεργός ενισχυτής εντός του *ϊκκά* επαγόμενου γονιδίου CHEK2. Οι επιπλέον γειτονικές περιοχές πρόσδεσης του IRF3 δεν φαίνεται να είναι ενεργές σύμφωνα με τη μέθοδο STARR-seq.

Παρατηρήθηκε ότι ο p65 δεν συμμετέχει ιδιαίτερα στη ρύθμιση των IRF3-STARR ενεργών περιοχών, αφού τα επίπεδα πρόσδεσης του σε αυτές είναι χαμηλότερα από τις IRF3-STARR ανενεργές περιοχές. Πιο συγκεκριμένα ισχυρή πρόσδεση του p65 παρατηρείται μόνο σε 35 από τις 258 IRF3-STARR ενεργές περιοχές. Επιπλέον, μελετώντας τα επίπεδα H3K27ac για τις IRF3-STARR ενεργές και ανενεργές περιοχές

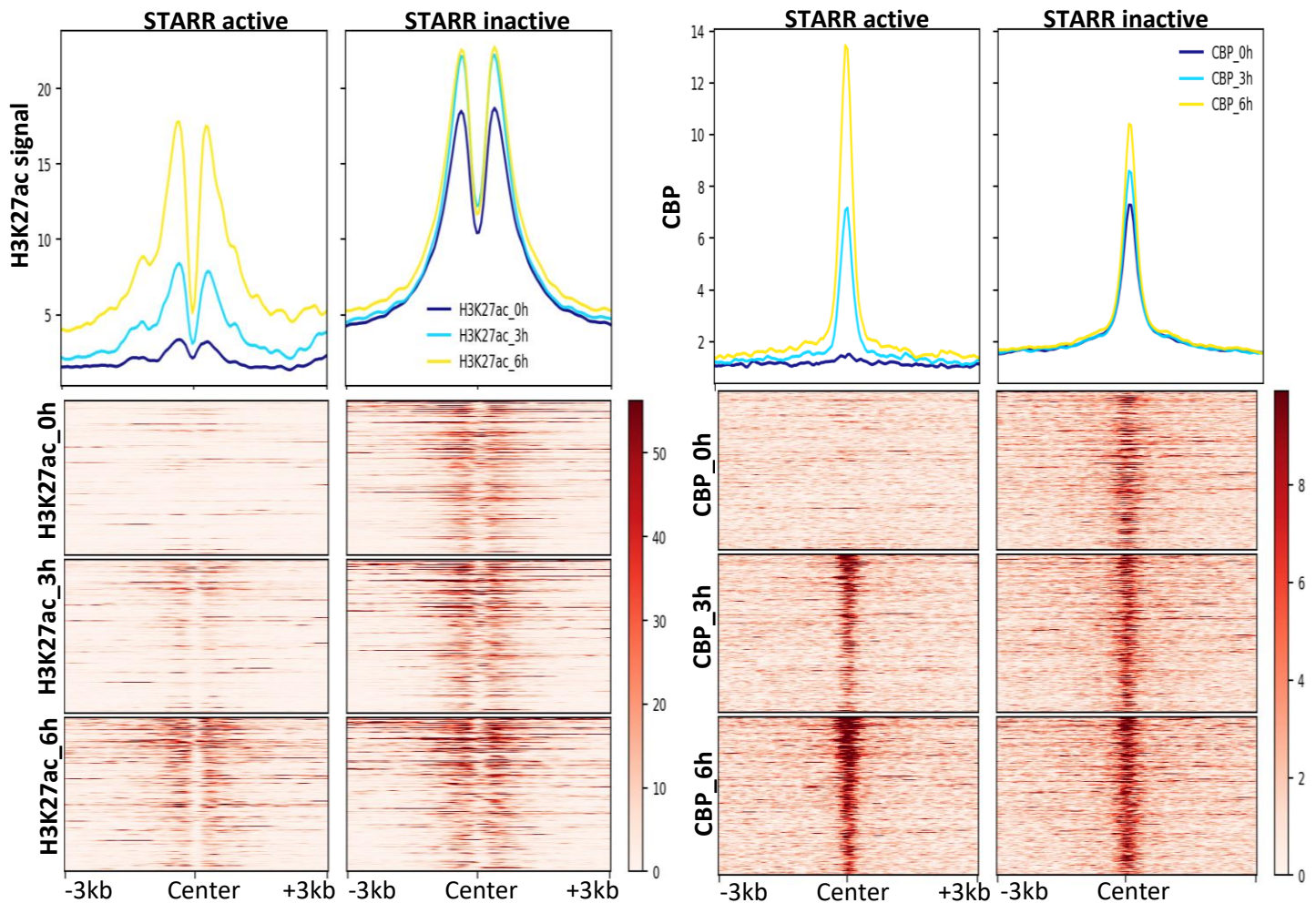
διαπιστώθηκε ότι οι ενεργές βρίσκονται σε χρωματίνη που δεν φέρει H3K27ac πριν τη μόλυνση (εικόνα 100). Μετά τη μόλυνση όμως παρατηρείται έντονη αύξηση των επιπέδων του συγκεκριμένου δείκτη. Αντίθετα οι IRF3-STARR ανενεργές περιοχές βρίσκονται σε χρωματίνη που φέρει υψηλά επίπεδα H3K27ac ήδη πριν από τη μόλυνση τα οποία και διατηρούνται κατά τη διάρκεια της *αντιϊκής* απόκρισης. Παρόμοιο είναι και το πρότυπο πρόσδεσης στις παραπάνω θέσεις του συνενεργοποιητή CBP, που είναι υπεύθυνος για την εναπόθεση της H3K27ac, καθώς και για το συνενεργοποιητή Med1, γεγονός που καταδεικνύει τη αρτιότητα του ευρήματος (εικόνες 101,102). Εξετάζοντας τα επίπεδα προσβασιμότητας της χρωματίνης με τη τεχνική DNaseI-seq γύρω από τις παραπάνω θέσεις, διαπιστώθηκε ότι οι IRF3-STARR ενεργές περιοχές βρίσκονται σε χρωματίνη που είναι μη προσβάσιμη πριν από τη μόλυνση (εικόνα 103). Από τους 258 IRF3-STARR ενεργούς ενισχυτές 109 αποκτούν αυξημένη προσβασιμότητα κατά τη πρόοδο της *αντιϊκής* απόκρισης. Αντίθετα οι θέσεις πρόσδεσης του IRF3 χωρίς STARR ενεργότητα είναι εξίσου προσβάσιμες τόσο πριν όσο και κατά τη διάρκεια της *αντιϊκής* απόκρισης. Τέλος οι STARR ενεργοί ενισχυτές χαρακτηρίζονται από την επαγόμενη πρόσδεση της RNA POLII κατά τη πρόοδο της *αντιϊκής* απόκρισης, σε αντίθεση με τους STARR ανενεργούς ενισχυτές όπου προϋπάρχει της μόλυνσης (εικόνα 102). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι οι ενεργοί επαγόμενοι ενισχυτές σύμφωνα με τη μέθοδο STARR βρίσκονται σε χρωματίνη που είναι κλειστή και δεν φέρει ενεργοποιητικές τροποποιήσεις πριν τη μόλυνση. Κατά την εξέλιξη όμως της *αντιϊκής* απόκρισης οι περιοχές αυτές αποκτούν όλα τα χαρακτηριστικά των επαγόμενων ενισχυτών όπως αυξημένη προσβασιμότητα, πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων (IRF3), συνενεργοποιητών (CBP,Med1), και αυξημένα επίπεδα της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac. Αντίθετα παρά το γεγονός ότι η πλειοψηφία των ισχυρών θέσεων πρόσδεσης του IRF3 βρίσκεται σε περιοχές της χρωματίνης που φέρουν ενεργοποιητικούς δείκτες ήδη πριν από τη μόλυνση οι περιοχές αυτές δεν φαίνεται να δρουν ως επαγόμενοι ενισχυτές.



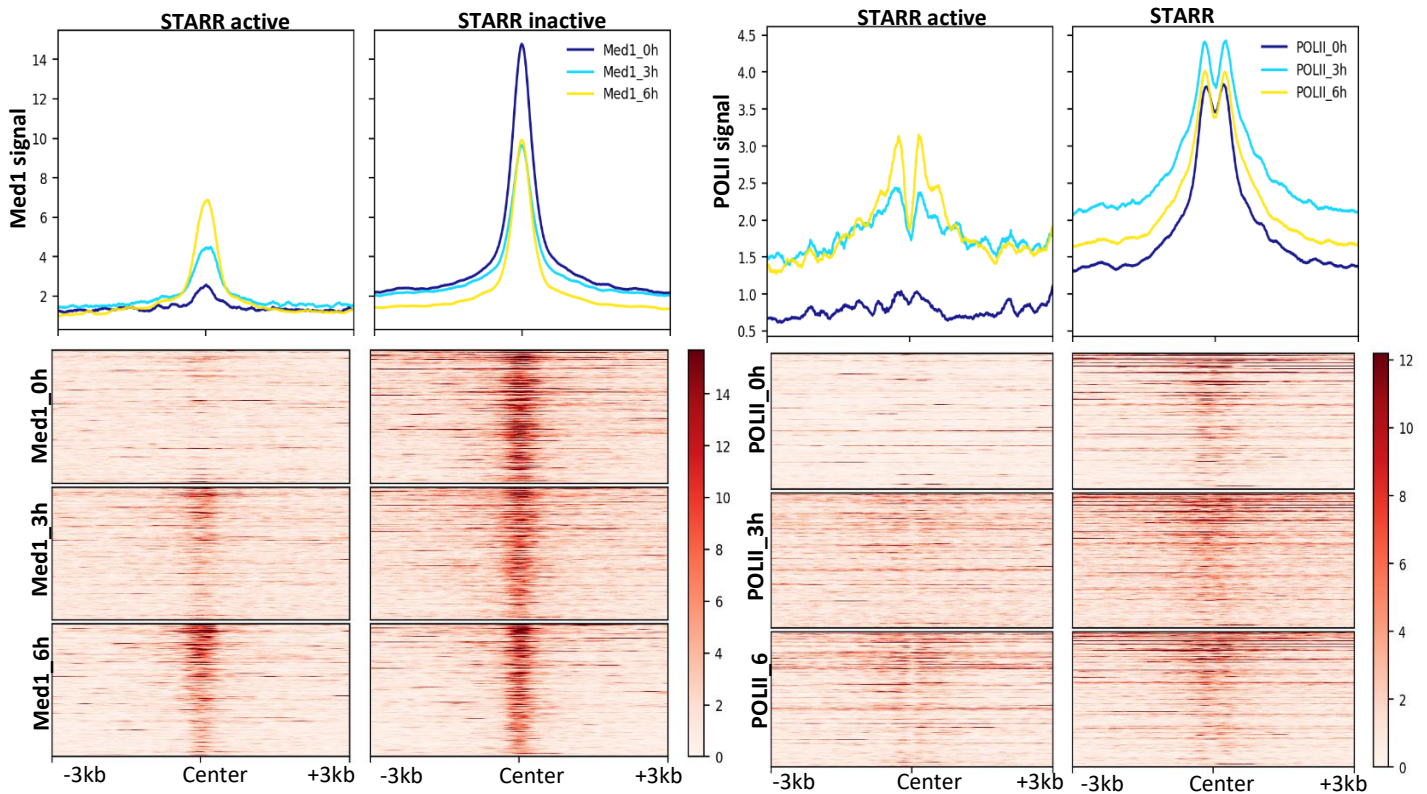
Εικόνα 99. Στο αριστερό μισό της εικόνας παρουσιάζεται η κατανομή του STARR σήματος (RPKM) για τις 258 απομακρυσμένες από το TSS STARR ενεργές περιοχές πρόσδεσης του IRF3 (αριστερά) και τις 2526 STARR ανενεργές περιοχές (δεξιά). Στο δεξί μισό της εικόνας απεικονίζεται η κατανομή του IRF3 σήματος γύρω από τις STARR ενεργές και STARR ανενεργές περιοχές.

Έπειτα πήραμε τις IRF3-STARR ενεργές και ανενεργές αλληλουχίες όπως προέκυψαν από την εφαρμογή της μεθόδου STARR-seq στα HeLa και μελετήσαμε το επιγονιδιωματικό τους προφίλ στα Namalwa για να δούμε το κατά πόσο είναι συντηρημένο. Παρατηρήθηκε ότι οι STARR ενεργοί ενισχυτές έχουν επαγόμενο πρότυπο H3K27ac, ενώ αντίθετα οι STARR ανενεργοί ενισχυτές φέρουν χαμηλά και μη επαγόμενα επίπεδα H3K27ac (εικόνα 104). Επομένως οι IRF3-STARR ενεργοί ενισχυτές στο κυτταρικό τύπο HeLa σε αντίθεση με τους IRF3-STARR ανενεργούς ενισχυτές φαίνεται να έχουν επαγόμενο πρότυπο πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, συνενεργοποιητών και H3K27ac και στα Namalwa. Από την ανάλυση για μοτίβα μεταγραφικών παραγόντων προέκυψε ότι οι STARR ενεργοί ενισχυτές φέρουν

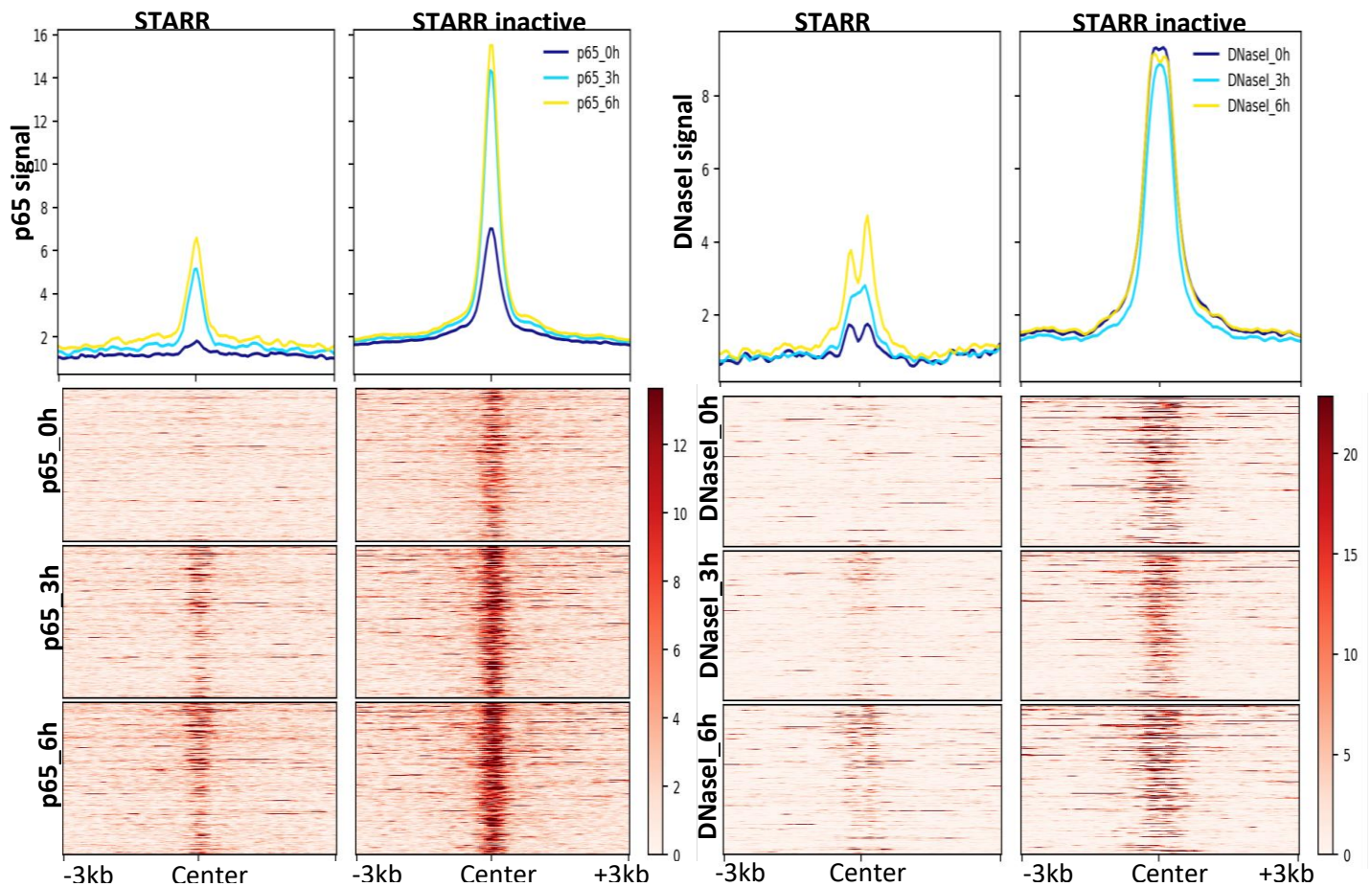
συστοιχίες μοτίβων για μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας IRF σε αντίθεση με τις STARR ανενεργές θέσεις πρόσδεσης του IRF3 που φέρουν μεμονωμένα μοτίβα των IRF (εικόνα 105). Στην εικόνα 106 παρουσιάζεται ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα ενισχυτή που φέρει πολλαπλά γειτονικά μοτίβα IRF και βρίσκεται εντός του ιικά επαγόμενου γονιδίου *ADAP1*.



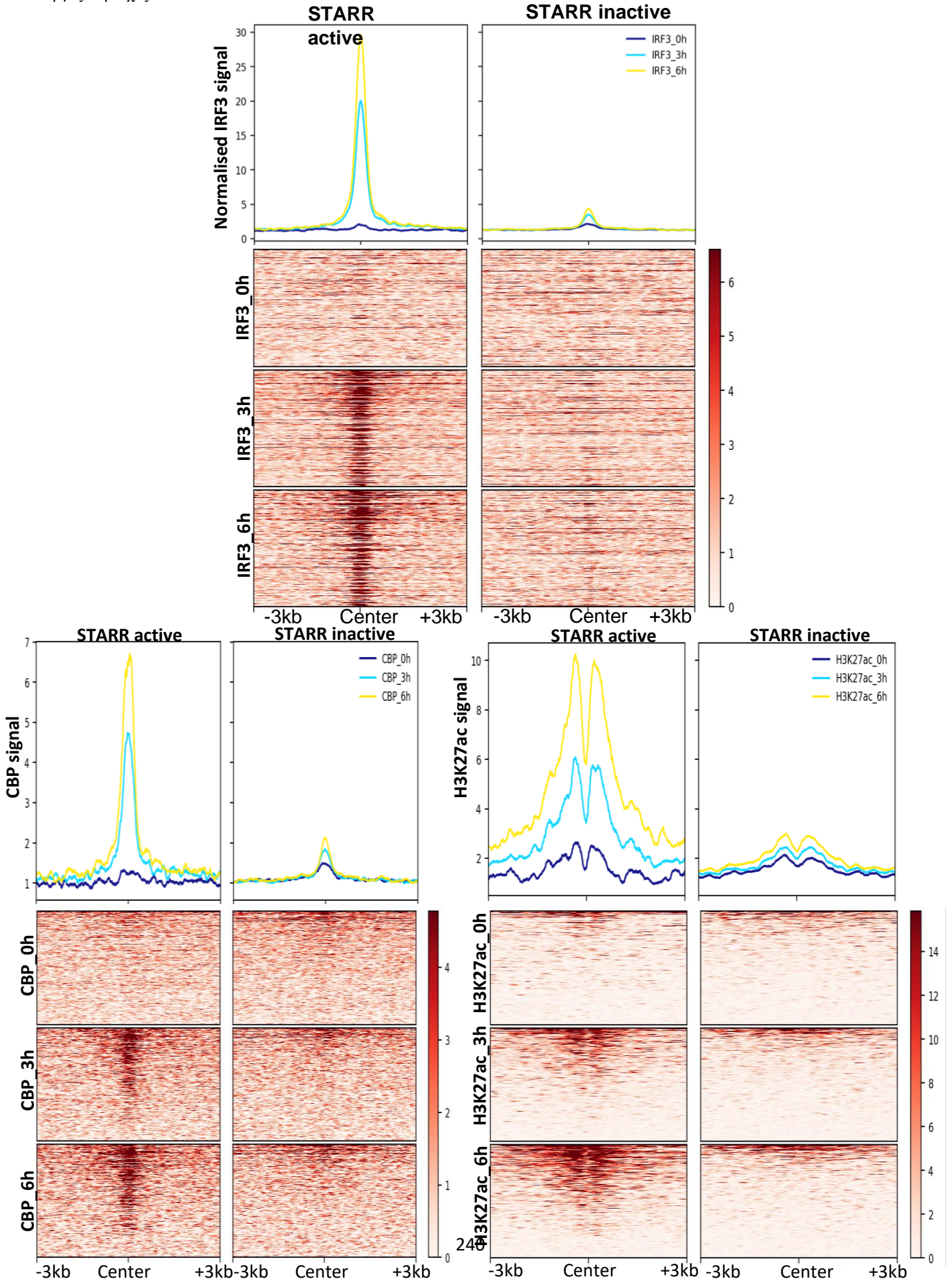
Εικόνα 101. Στο αριστερό μισό της εικόνας παρουσιάζεται η κατανομή του H3K27ac σήματος (RPKM) για τις 258 απομακρυσμένες από το TSS STARR ενεργές περιοχές πρόσδεσης του IRF3 (αριστερά) και τις 2526 STARR ανενεργές περιοχές (δεξιά). Στο δεξί μισό της εικόνας απεικονίζεται η κατανομή του CBP σήματος γύρω από τις STARR ενεργές και STARR ανενεργές περιοχές.



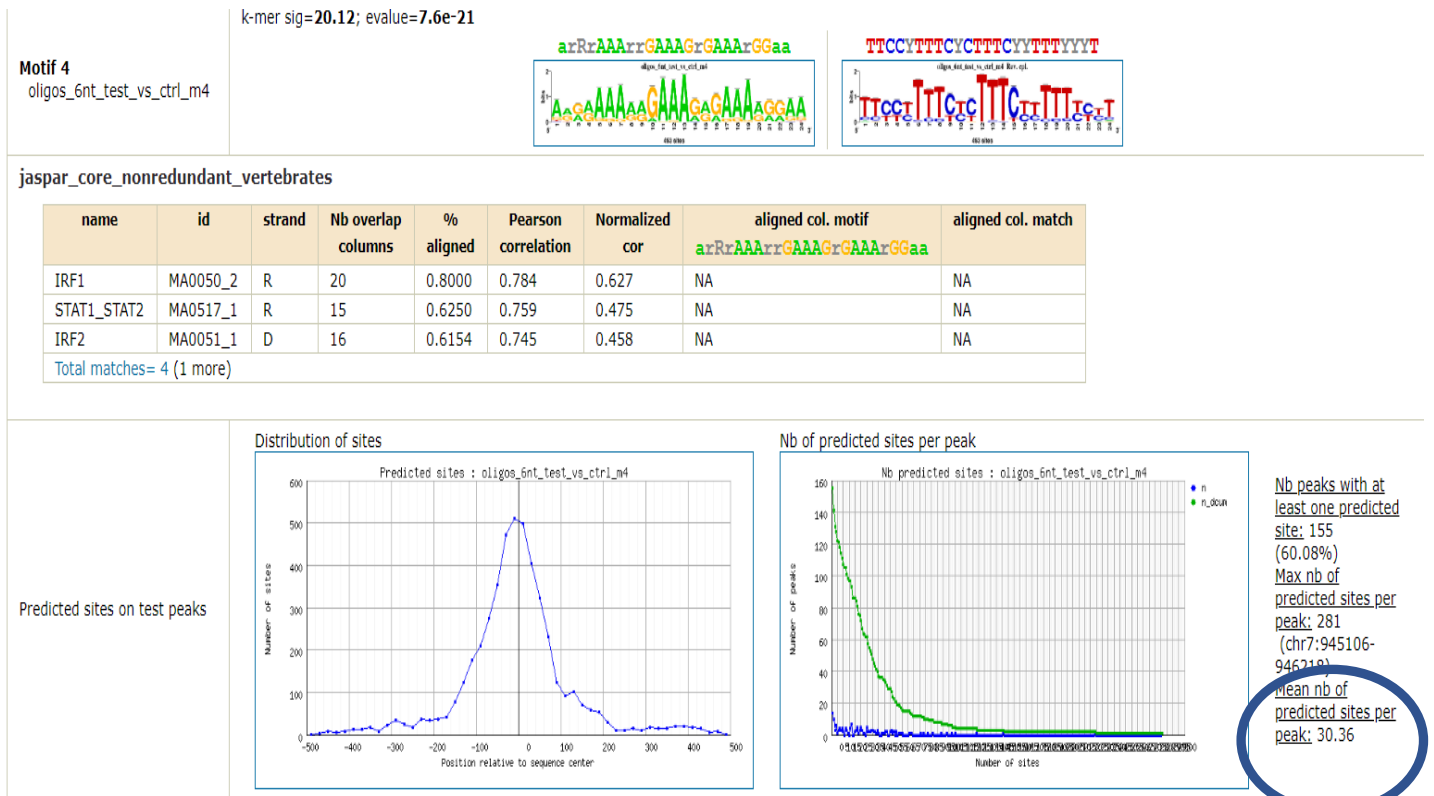
Εικόνα 102. Στο αριστερό μισό της εικόνας παρουσιάζεται η κατανομή του Med1 σήματος (RPKM) για τις 258 απομακρυσμένες από το TSS STARR ενεργές περιοχές πρόσδεσης του IRF3 (αριστερά) και τις 2526 STARR ανενεργές περιοχές (δεξιά). Στο δεξί μισό της εικόνας απεικονίζεται η κατανομή του POLII σήματος γύρω από τις STARR ενεργές και STARR ανενεργές περιοχές.



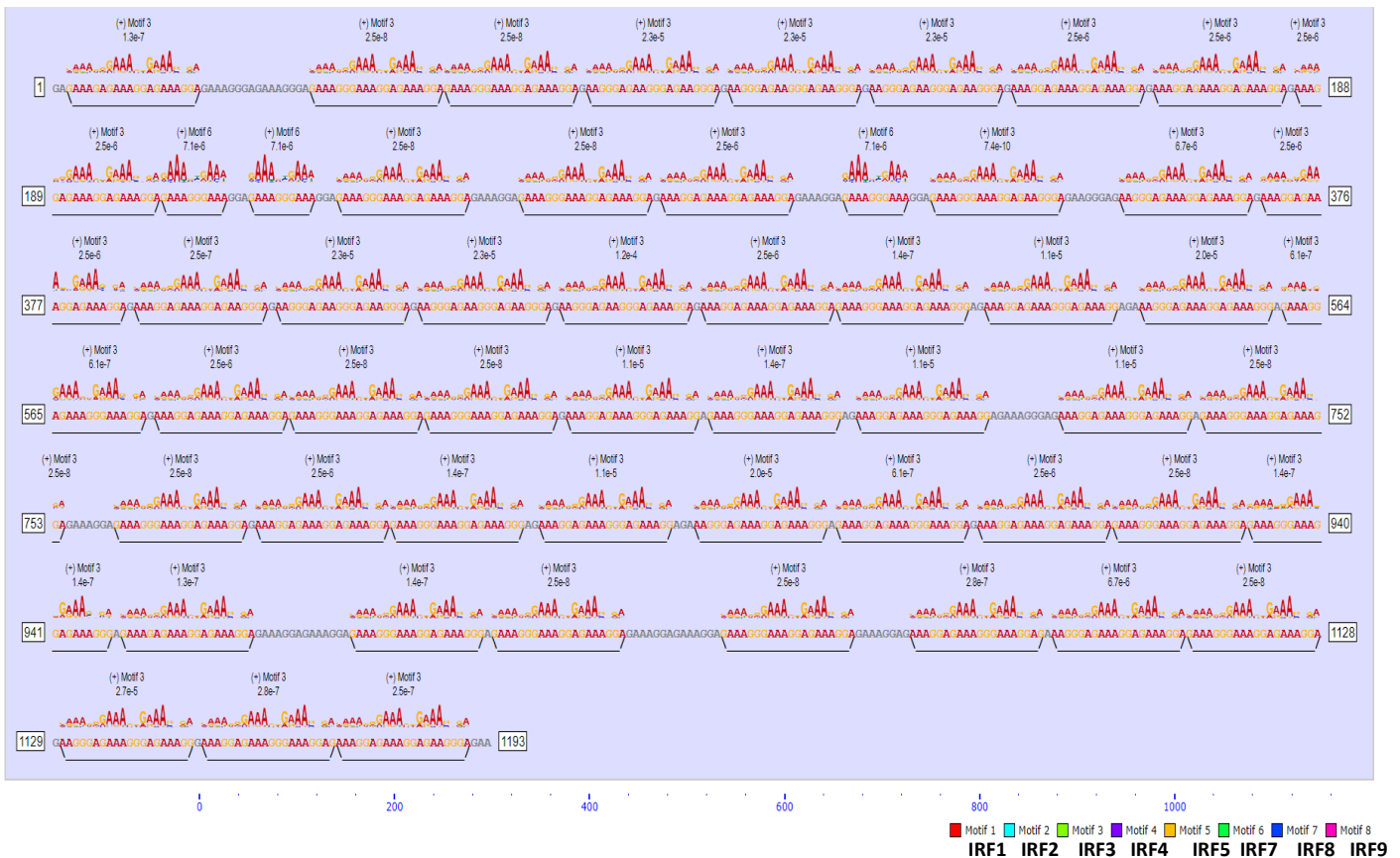
Εικόνα 103. Στο αριστερό μισό της εικόνας παρουσιάζεται η κατανομή του ρ_{65} σήματος (RPKM) για τις 258 απομακρυσμένες από το TSS STARR ενεργές περιοχές πρόσδεσης του IRF3 (αριστερά) και τις 2526 STARR ανενεργές περιοχές (δεξιά). Στο δεξί μισό της εικόνας απεικονίζεται η κατανομή του DNaseI-seq σήματος γύρω από τις STARR ενεργές και STARR ανενεργές περιοχές.



Εικόνα 104: Παρουσιάζεται η κατανομή του σήματος για το CBP, τη H3K27ac και το IRF3 στα Namalwa, γύρω από τις από τις περιοχές που στα κύτταρα HeLa είχαν STARR ενεργότητα ή ήταν ανενεργές.



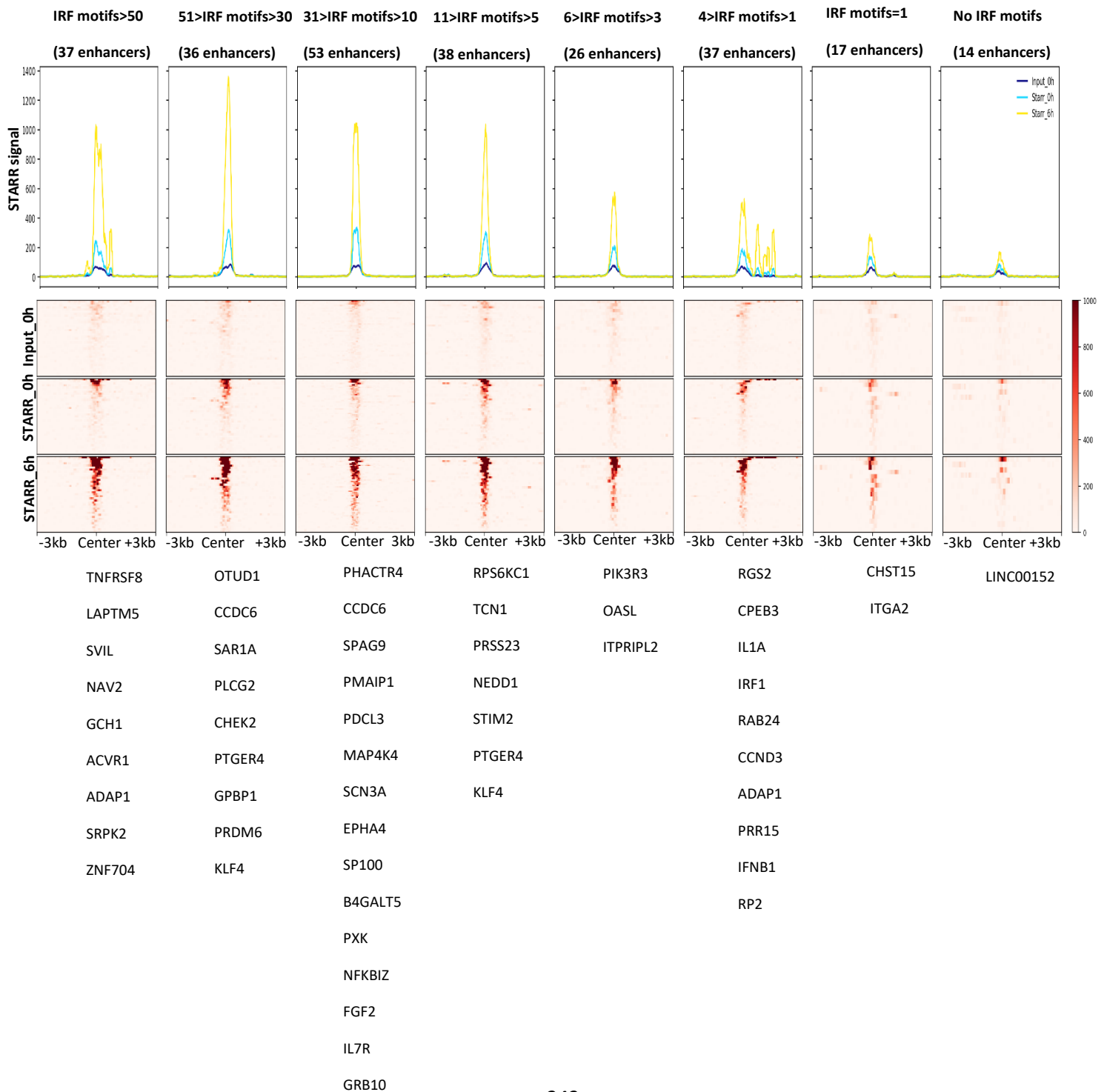
Εικόνα 105: Παρουσιάζεται η ανάλυση μοτίβων μεταγραφικών παραγόντων για τις IRF3 STARR ενεργές περιοχές. Η ανάλυση φάνερωσε τον υψηλό κατά μέσο όρο αριθμό μοτίβων IRF που φέρουν οι συγκεκριμένες περιοχές.



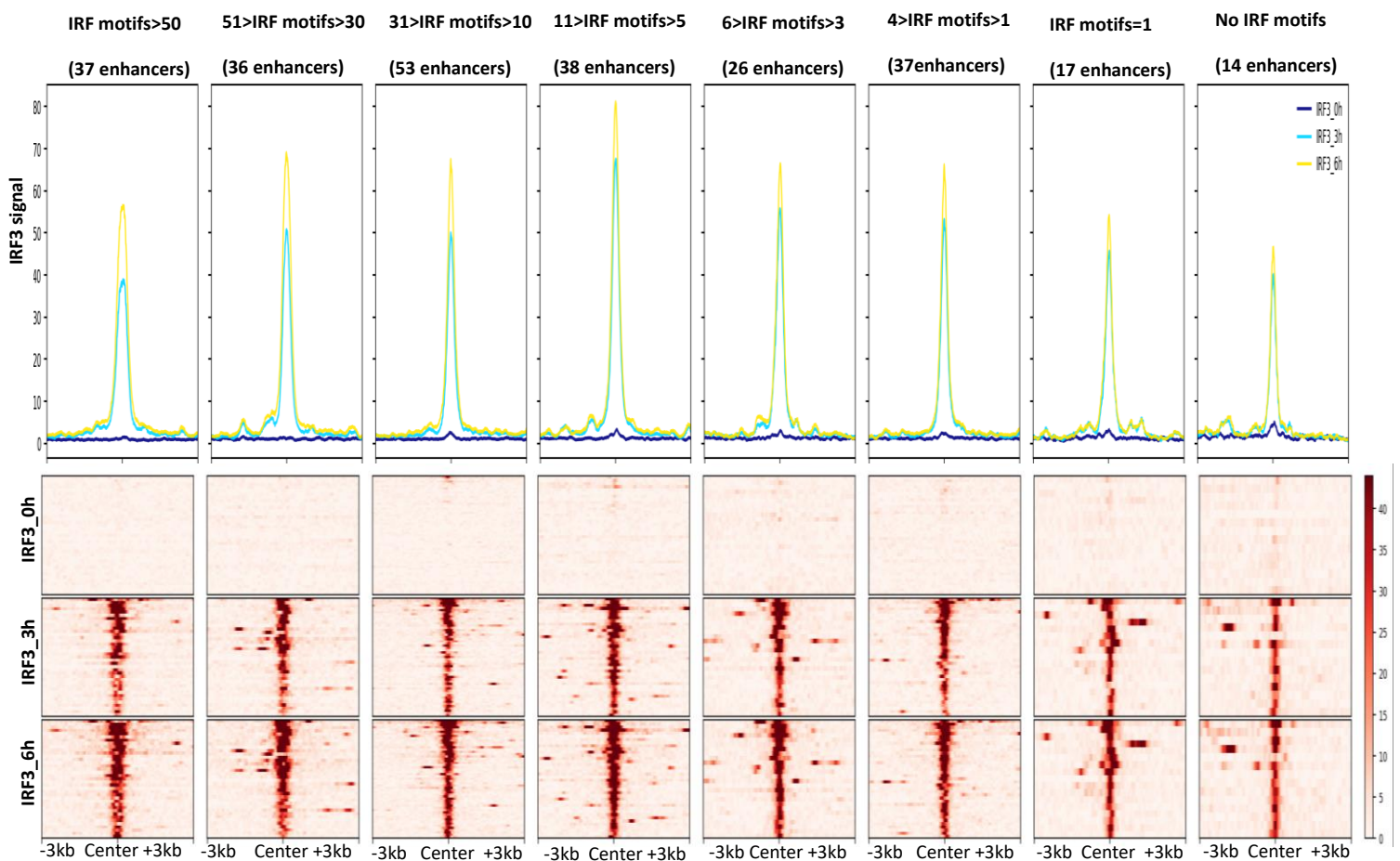
Εικόνα 106: Παρουσιάζονται τα πολλαπλά μοτίβα IRF τα οποία εδράζονται στην αλληλουχία του IRF3-STARR επαγόμενου ενισχυτή που βρίσκεται εντός του *h2k* επαγόμενου γονιδίου *ADAP1*.

Στη συνέχεια για να εξετάσουμε αν ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων μοτίβων IRF που φέρει κάθε αλληλουχία ενισχυτή σχετίζεται με τα επίπεδα ενεργότητάς του χωρίσαμε τους επαγόμενους IRF3-STARR ενισχυτές σε κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των μοτίβων IRF που φέρουν και μετρήθηκαν τα επίπεδα ενεργότητας των ενισχυτών σε κάθε κατηγορία. Διαπιστώθηκε ότι οι ενισχυτές που φέρουν από ένα ορισμένο αριθμό μοτίβων και πάνω (>4-5) έχουν υψηλότερα επίπεδα ενεργότητας από τους ενισχυτές που φέρουν μικρότερο αριθμό μοτίβων IRF (εικόνα 107). Εξετάζοντας στη συνέχεια τα επίπεδα πρόσδεσης του IRF3 στις παραπάνω κατηγορίες ενισχυτών διαπιστώθηκε ότι όλες οι κατηγορίες μοτίβων παρουσίαζαν υψηλά επίπεδα πρόσδεσης του IRF3 (εικόνα 108). Αντίθετα τα επίπεδα πρόσδεσης του p65 ήταν ιδιαίτερα χαμηλά στις κατηγορίες των STARR επαγόμενων ενισχυτών με υψηλό αριθμό μοτίβων και πιο υψηλά στους ενισχυτές με μικρότερο αριθμό μοτίβων IRF (εικόνα 109). Επομένως ο p65 δεν φαίνεται να συμμετέχει στη ρύθμιση των ισχυρών ενισχυτών που φέρουν μεγάλο αριθμό μοτίβων IRF. Συμπερασματικά από τις

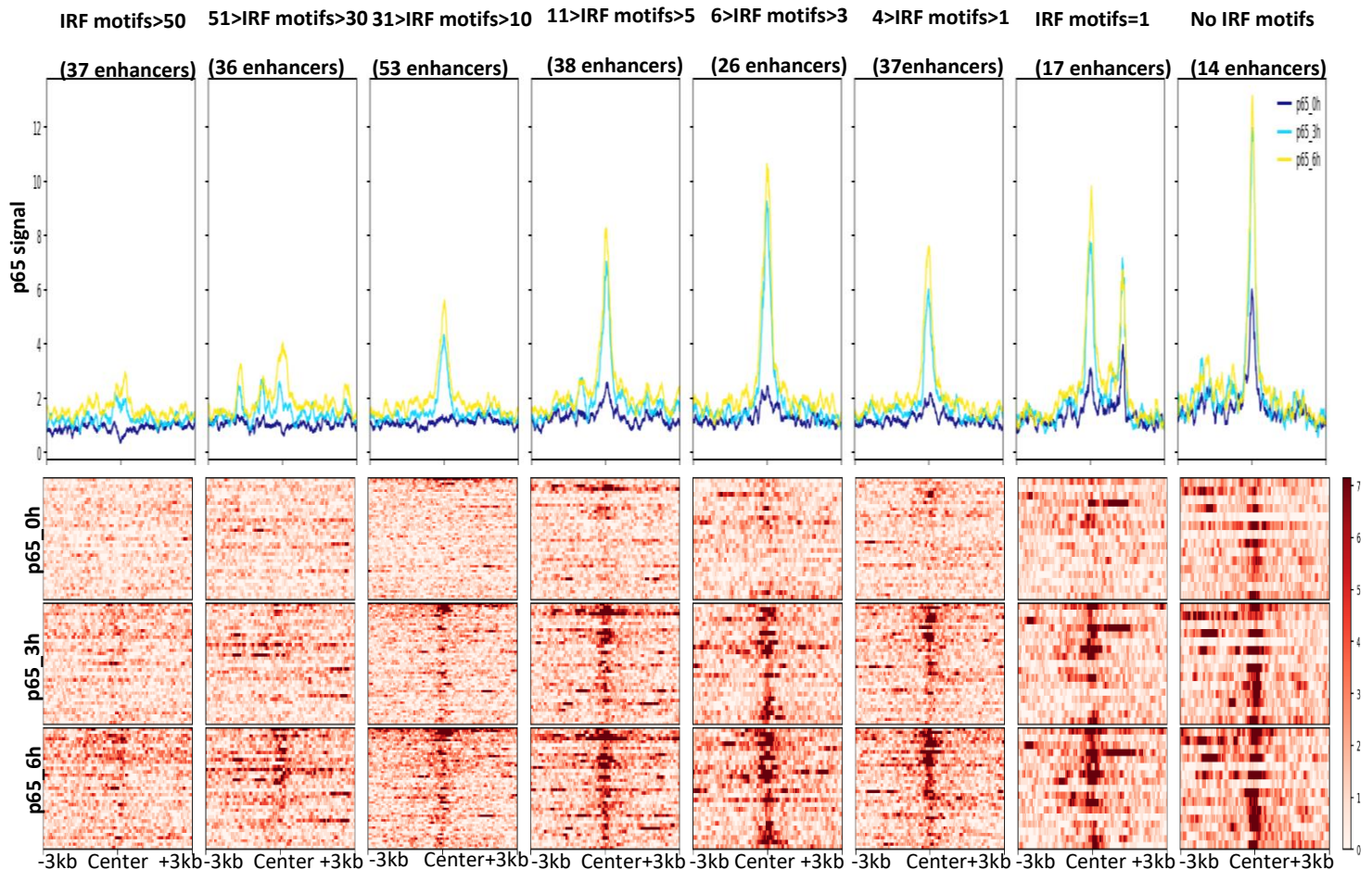
παραπάνω αναλύσεις διαπιστώσαμε ότι η υψηλή συγκέντρωση μοτίβων IRF στις STARR ενεργές περιοχές οδηγεί σε ισχυρή πρόσδεση του IRF3, αυξημένη προσβασιμότητα της χρωματίνης, προσέλκυση συνενεργοποιητών (Med1,CBP) και της μεταγραφικής μηχανής (RNA pol II) με αποτέλεσμα την έναρξη της μεταγραφής. Η τοπική αυτή υψηλή συγκέντρωση του IRF3 στις παραπάνω περιοχές θα μπορούσε να δρα ως μέσο διαμοίρασης του IRF3 σε γειτονικούς ενισχυτές που δεν φέρουν ισχυρές θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα.



Εικόνα 107: Απεικονίζονται τα επίπεδα σήματος του IRF3-STARR-seq πειράματος γύρω από τους STARR επαγόμενους ενισχυτές, οι οποίοι και έχουν διαχωριστεί σε κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των IRF μοτίβων που φέρουν. Στο κάτω μέρος της εικόνας παρουσιάζονται τα *ϊικά* επαγόμενα γονίδια τα οποία αποτελούν τα εγγύτερα γονίδια στους ενισχυτές των συγκεκριμένων κατηγοριών.



Εικόνα 108: Απεικονίζονται τα επίπεδα πρόσδεσης του IRF3 γύρω από τους επαγόμενους IRF3-STARR ενισχυτές, οι οποίοι έχουν χωριστεί σε κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των IRF μοτίβων που φέρουν.



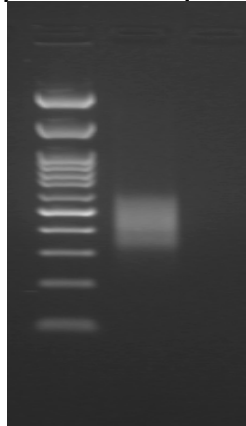
Εικόνα 109: Απεικονίζονται τα επίπεδα πρόσδεσης του p65 γύρω από τους επαγόμενους IRF3-STARR ενισχυτές, οι οποίοι έχουν χωριστεί σε κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των IRF μοτίβων που φέρουν.

p65-ChIP-STARR-seq

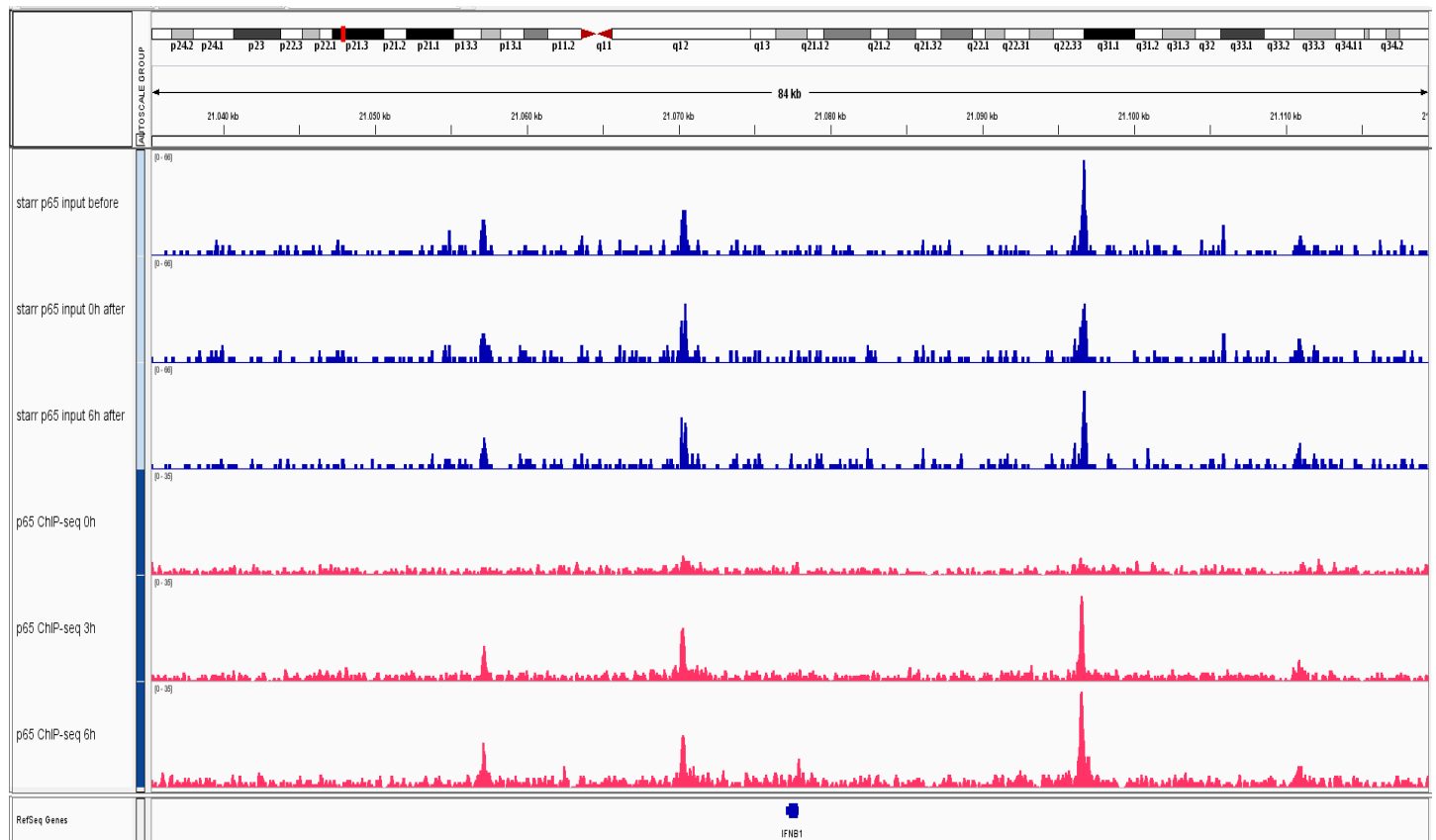
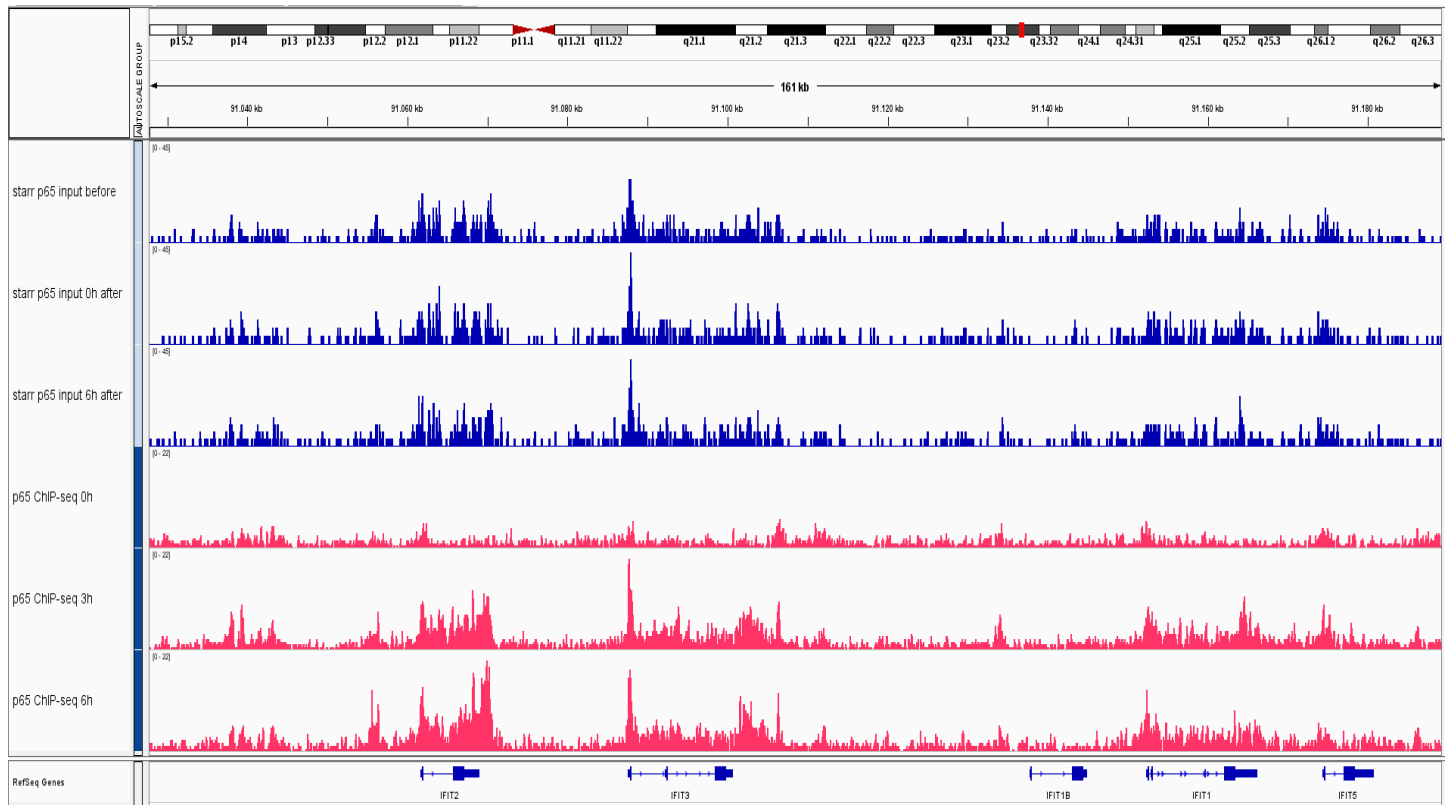
Για να μελετήσουμε ποιες από τις θέσεις πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα p65 έχουν ενεργότητα ενισχυτή εφαρμόσαμε το πρωτόκολλο p65-ChIP-STARR-seq σε κύτταρα HeLa με ανάλογη πειραματική στρατηγική όπως περιγράφηκε παραπάνω για τα IRF3-ChIP-seq πειράματα. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε μαζική κλωνοποίηση της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης από το πείραμα ανοσοκατακρήμισης έναντι του p65 σε κύτταρα που είχαν μολυνθεί 6 ώρες με ιό Sendai στο τροποποιημένο πλασμιδιακό φορέα 1xSp1-STARR-seq (εικόνα 110). Αρχικά διαπιστώθηκε ότι ο αριθμός των αποικιών που αναπτύχθηκαν έφθασε περίπου τα 5 εκατομμύρια. Επομένως η πλασμιδιακή βιβλιοθήκη που δημιουργήθηκε περιελάμβανε 5 εκατομμύρια μοναδικά τμήματα DNA, αριθμός ικανός να αντιπροσωπεύσει πολλαπλές φορές τα τεμάχια DNA που κλωνοποιήθηκαν. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση της βιβλιοθήκης σε 40 περίπου εκατομμύρια κύτταρα HeLa. Ακολούθησε μόλυνση του μισού κυτταρικού πληθυσμού με ιό Sendai για 6 ώρες (μη-μολυσμένα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου), συλλογή του RNA από μολυσμένα

και μη μολυσμένα κύτταρα, επιλεκτική κατασκευή cDNA από τα μετάγραφα που προέρχονται από το STARR φορέα, επιλεκτικός πολλαπλασιασμός του υλικού με κατασκευή γονιδιωματικών βιβλιοθηκών και ευρείας κλίμακας αλληλούχιση του υλικού. Ως δείγματα σύγκρισης αλληλουχίστηκε η πλασμιδιακή βιβλιοθήκη πριν από τη διαμόλυνση στα κύτταρα καθώς και μετά τη διαμόλυνση για την εύρεση τυχόν αλλαγών στην αντιπροσώπευση των διαφορετικών τμημάτων DNA. Τα πειράματα από το στάδιο της διαμόλυνσης και μετά πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν για να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων. Μετά το ποιοτικό και ποσοτικό έλεγχο όλων των βιβλιοθηκών που κατασκευάστηκαν πραγματοποιήθηκε ευρείας κλίμακας αλληλούχιση τους στο μηχάνημα NextSeq500 της illumine στο Ελληνικό Κέντρο Γονιδιωματικής του ΙΙΒΕΑΑ. Από την αλληλούχιση προέκυψαν περίπου 200 εκατομμύρια διαβασμένες αλληλουχίες (reads) μήκους 75 ζευγών βάσεων η καθεμία οι οποίες όπως διαπιστώθηκε ήταν σχεδόν ισοκατανεμημένες ανάμεσα στα 10 δείγματα που υπέστησαν αλληλούχιση. Ακολούθησε ανάλυση των αποτελεσμάτων με μεθόδους βιοπληροφορικής. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε ποιοτικός έλεγχος των αλληλουχιών με το πρόγραμμα FastQC, στοίχιση των αλληλουχιών στο γονιδίωμα με τον αλγόριθμο Bowtie2 και μέτρηση του αριθμού των reads στις περιοχές πρόσδεσης του p65 με την εντολή Multicon από το πακέτο Bedtools. Αρχικά διαπιστώθηκε ότι η αντιπροσώπευση του γονιδιώματος από τις p65-ChIP-STARR-seq πλασμιδιακές βιβλιοθήκες προσομοιάζει αυτή του πειράματος p65 6h ChIP-seq (εικόνα 111), επομένως οι STARR πλασμιδιακές βιβλιοθήκες αντιπροσωπεύουν πιστά τις θέσεις πρόσδεσης του p65 στο γονιδίωμα 6 ώρες μετά τη μόλυνση.

p65 6h ChIP-seq library



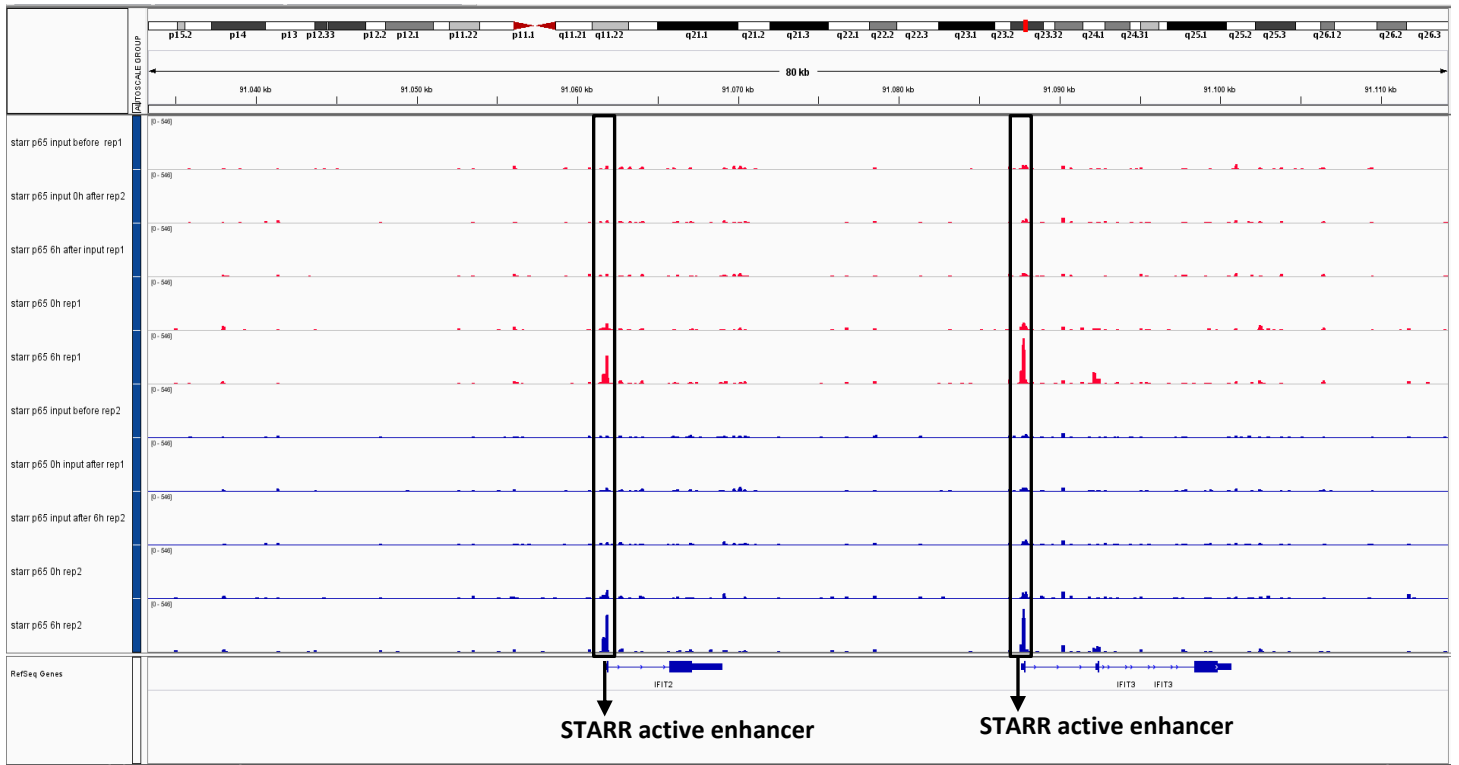
Εικόνα 110: Παρουσιάζεται η p65 6h HeLa ChIP-seq βιβλιοθήκη πριν τη κλωνοποίησή της στο φορέα STARR.



Εικόνα 111: Απεικονίζεται η κάλυψη του γονιδιώματος όπως αυτή προκύπτει από την αλληλούχιση των πλασμιδιακών βιβλιοθηκών p65-STARR πριν και μετά τη διαμόλυνση στα κύτταρα και των πειραμάτων p65 ChIP-seq γύρω από τους γενετικούς τόπους των γονιδίων *IFIT* (επάνω) και *IFNB1* (κάτω).

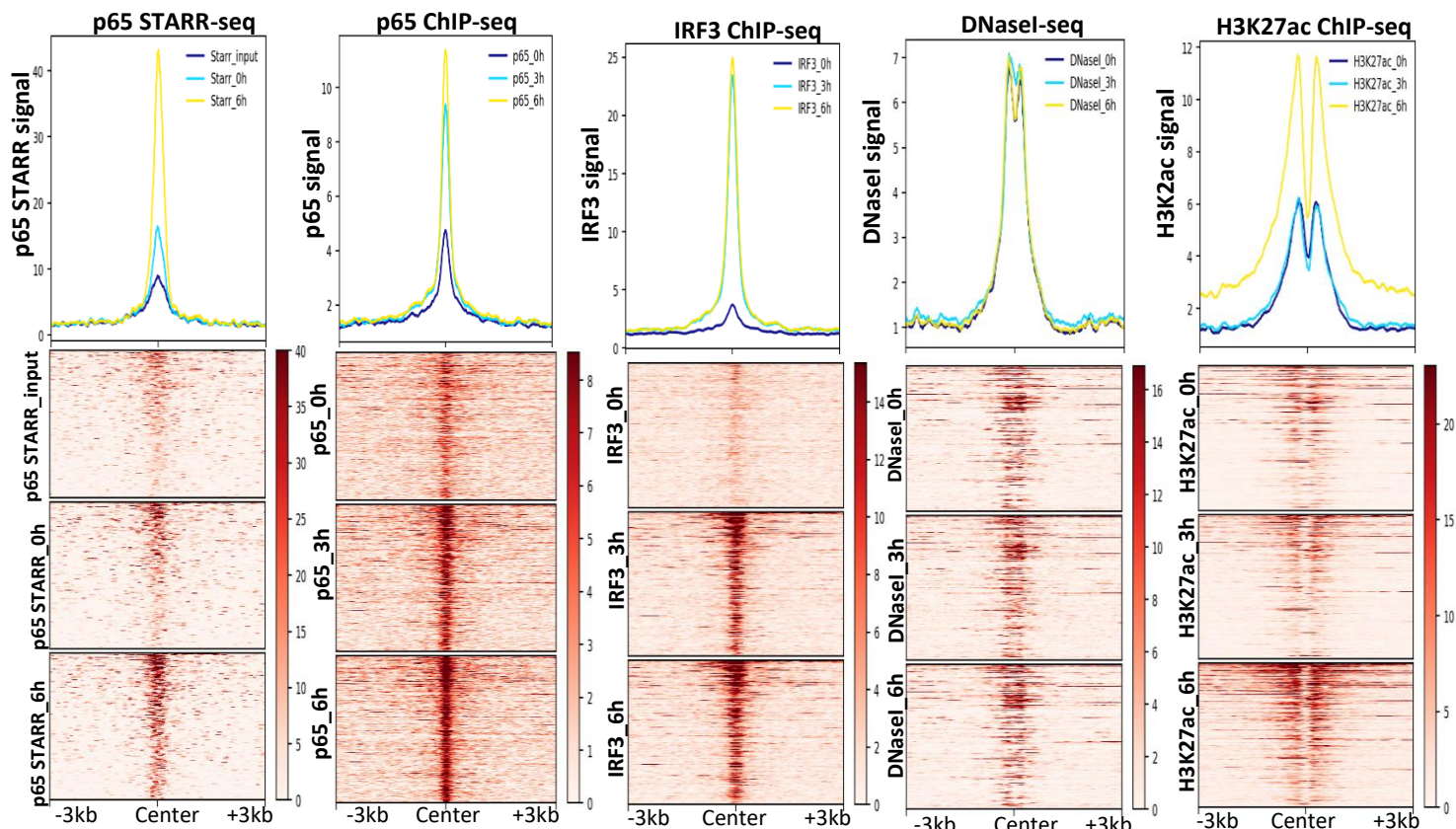
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εύρεση των επαγόμενων p65-STARR ενισχυτών. Ως επαγόμενος θεωρήθηκε ένας ενισχυτής όταν το σήμα STARR από το δείγμα των 6 ωρών ήταν τουλάχιστον διπλάσιο από τα σήματα των πλασμιδιακών βιβλιοθηκών και ταυτόχρονα τουλάχιστον διπλάσιο από το STARR σήμα του δείγματος που δεν είχε μολυνθεί. Από την ανάλυση προέκυψε ότι 7451 θέσεις πρόσδεσης του p65 αντιπροσωπεύονται με 10 ή περισσότερα μοναδικά τμήματα DNA στη πλασμιδιακή βιβλιοθήκη και μπορεί να εξεταστεί η ενεργότητά τους με αξιόπιστο τρόπο. Αν επιλέγαμε η STARR βιβλιοθήκη να περιείχε τυχαία κομμάτια DNA τότε με την ίδια πολυπλοκότητα βιβλιοθήκης θα είχαμε μόνο 54 περιοχές στο γονιδίωμα να αντιπροσωπεύονται με 10 ή περισσότερα μοναδικά κομμάτια DNA. Επομένως η στρατηγική ChIP-STARR-seq σε σχέση με τη κλωνοποίηση ολόκληρου του γονιδιώματος με τυχαία κομμάτια DNA επιτρέπει το κατά 137 φορές (7451:54) εμπλουτισμό της βιβλιοθήκης με περιοχές (θέσεις πρόσδεσης του p65) που αντιπροσωπεύονται με 10 ή περισσότερα μοναδικά τμήματα.

Επικεντρώνοντας τη προσοχή μας κοντά σε θέσεις έναρξης της μεταγραφής βρέθηκαν 12 *ικά* επαγόμενα γονίδια να έχουν STARR επαγόμενους ενισχυτές. Στην εικόνα 112 παρουσιάζονται δύο χαρακτηριστικά παραδείγματα STARR επαγόμενων ενισχυτών στα γονίδια *IFIT2* και *IFIT3*. Αξίζει να σημειωθεί ότι 10 από τους 12 αυτούς ενισχυτές είναι επαγόμενοι σύμφωνα με τα πειράματα IRF3-STARR-seq. Συγκεκριμένα οι επαγόμενοι ενισχυτές που ανιχνεύονται τόσο με τα πειράματα IRF3-STARR-seq όσο και με τα πειράματα p65-STARR-seq βρίσκονται κοντά στις θέσεις έναρξης της μεταγραφής των γονιδίων *ISG15*, *DDX58*, *HERC5*, *IFIT2*, *IFIT3*, *IFIH1*, *DHX58*, *OAS3*, *GBP5*, και *HERC6*.

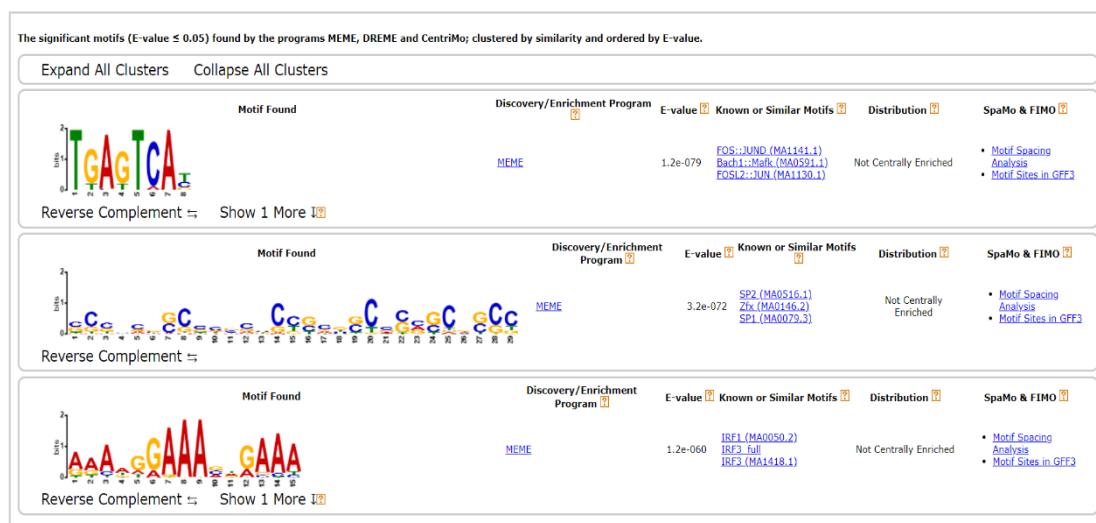


Εικόνα 112: Παρουσιάζονται δύο επαγόμενοι ενισχυτές σύμφωνα με τα πειράματα p65-STARR-seq οι οποίοι βρίσκονται κοντά στις θέσεις έναρξης της μεταγραφής των *ικά* επαγόμενων γονιδίων *IFIT2* και *IFIT3*.

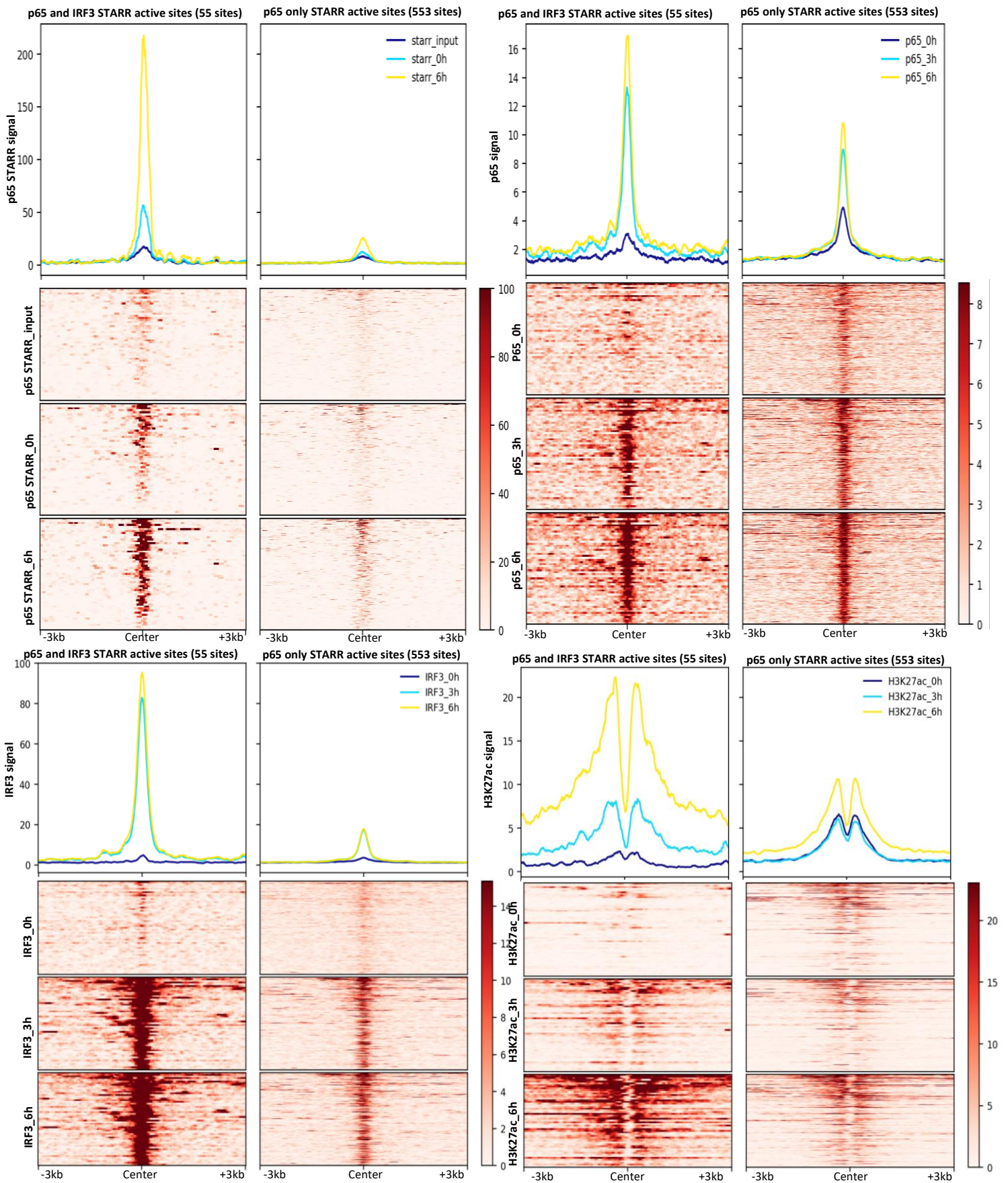
Στη συνέχεια εξετάστηκε πόσες από τις 21.183 θέσεις πρόσδεσης του p65 6 ώρες μετά τη μόλυνση και οι οποίες βρίσκονται μακριά από θέσεις έναρξης της μεταγραφής παρουσιάζουν επαγόμενη ενεργότητα σύμφωνα με τα πειράματα p65-STARR-seq. Διαπιστώθηκε ότι 598 περιοχές έχουν επαγόμενα επίπεδα ενεργότητας ενισχυτή (εικόνα 113). Στη συνέχεια βρέθηκε ότι 41 *ικά* επαγόμενα γονίδια είναι τα κοντινότερα σε αυτούς τους ενισχυτές και επομένως πιθανόν να ρυθμίζονται από αυτούς. Χαρακτηριστικά είναι τα παραδείγματα των γονιδίων *OASL*, *IFNB1*, *CCL5*, *IL7R* και *IRF1*. Από την ανάλυση για μοτίβα μεταγραφικών παραγόντων προέκυψε ότι υπεραντιπροσωπεύονται αυτά των παραγόντων FOS, Sp1 και IRF (εικόνα 114). Έπειτα πραγματοποιήθηκε μελέτη της χρωματινικής διαμόρφωσης και των επιγονιδιωματικών δεικτών που φέρουν οι 598 περιοχές που παρουσιάζουν ενεργότητα ενισχυτή σύμφωνα με τα πειράματα p65-STARR-seq (εικόνα 113). Παρατηρήθηκε ότι πολλές από τις p65-STARR ενεργές περιοχές φέρουν επαγόμενα επίπεδα πρόσδεσης των παραγόντων IRF3 και p65 και της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac.



Εικόνα 113: Απεικονίζονται τα επίπεδα πρόσδεσης των p65 και IRF3, τα επίπεδα προσβασιμότητας (DNaseI-seq) και της H3K27ac γύρω από τους 598 απομακρυσμένους ενισχυτές που παρουσιάζουν επαγόμενα επίπεδα ενεργότητας 6 ώρες μετά τη μόλυνση σύμφωνα με τα πειράματα p65-STARR-seq.



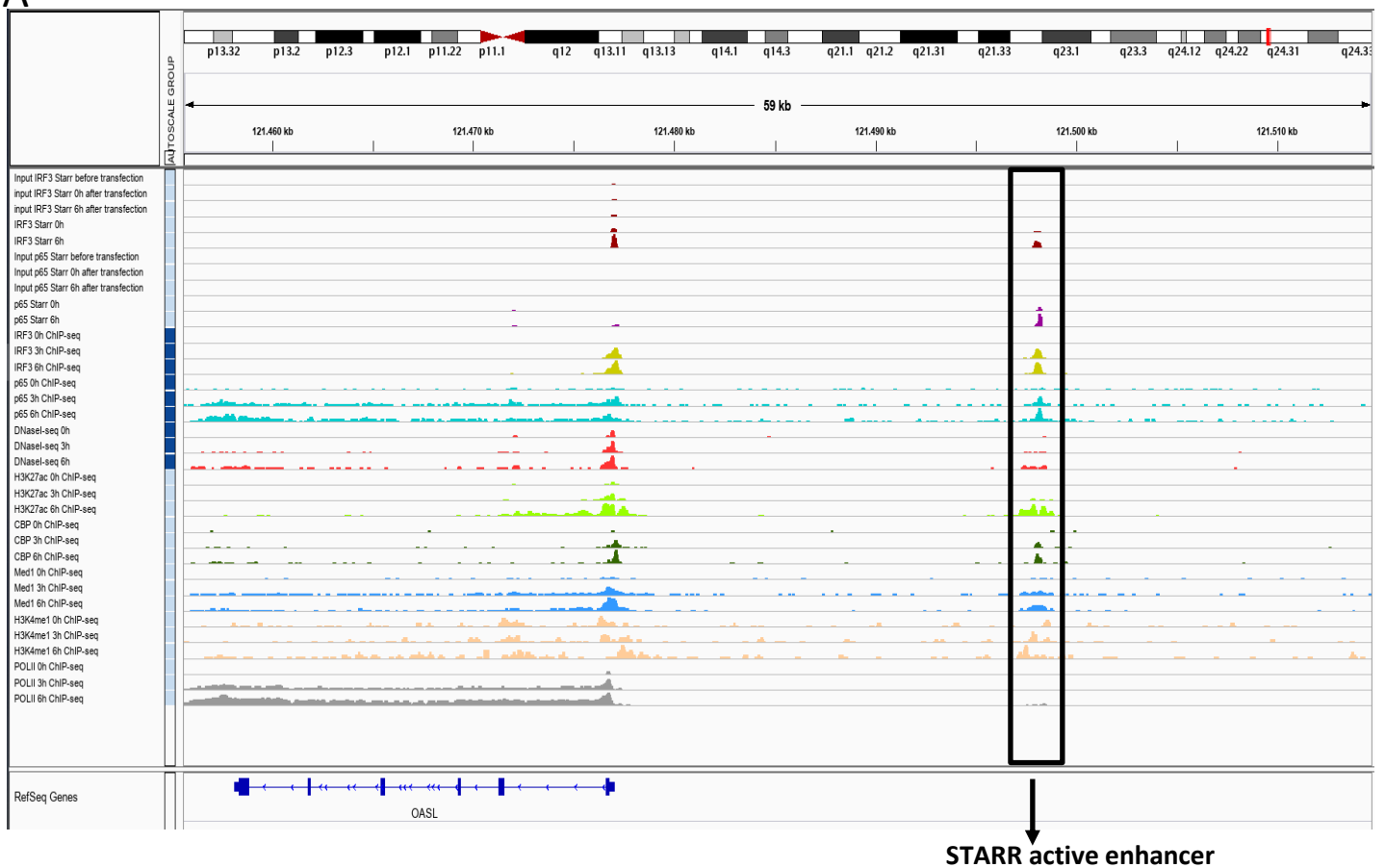
Εικόνα 114: Παρουσιάζεται η ανάλυση για μοτίβα μεταγραφικών παραγόντων για τις αλληλουχίες των p65-STARR-seq επαγόμενων ενισχυτών.

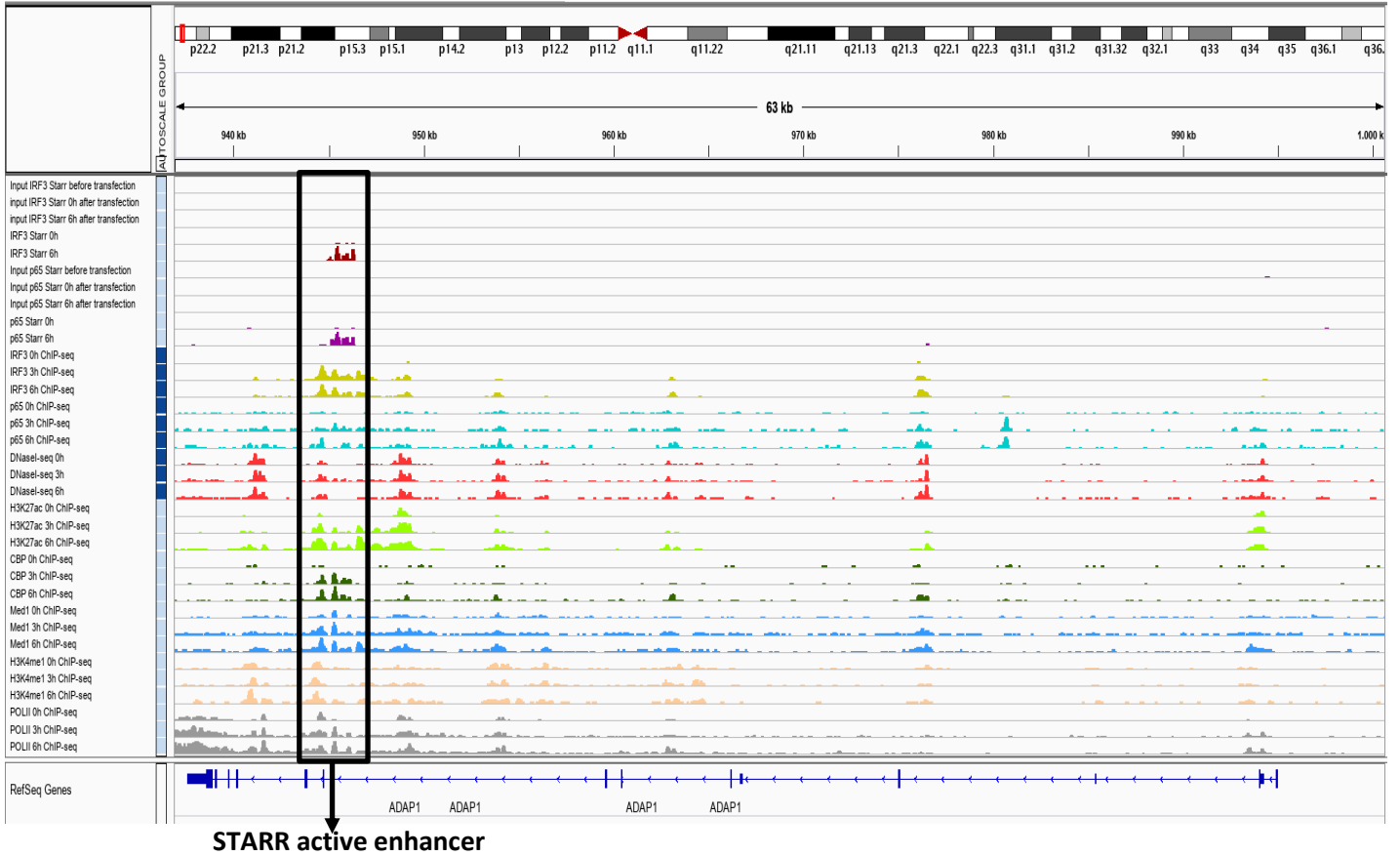
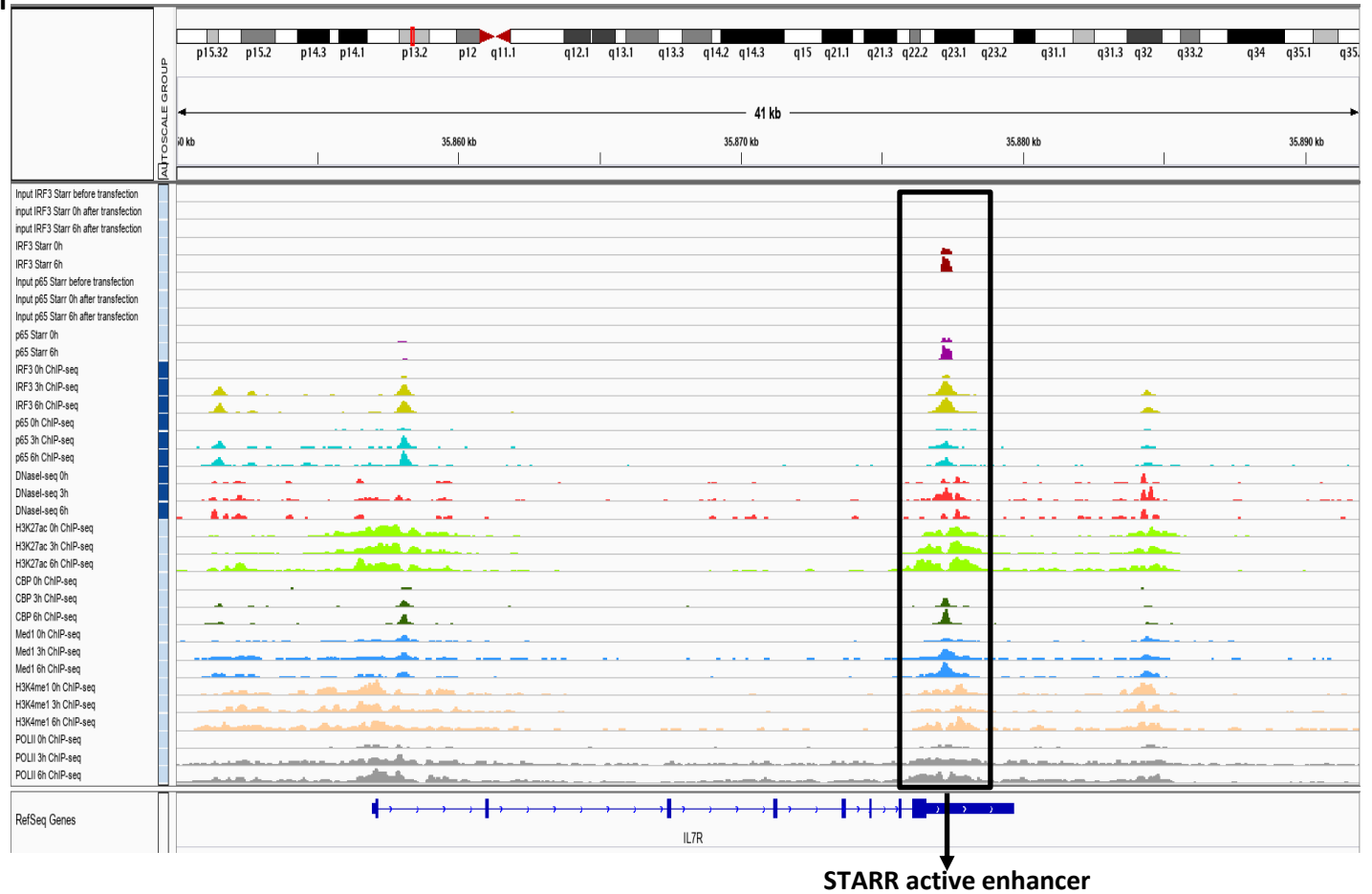


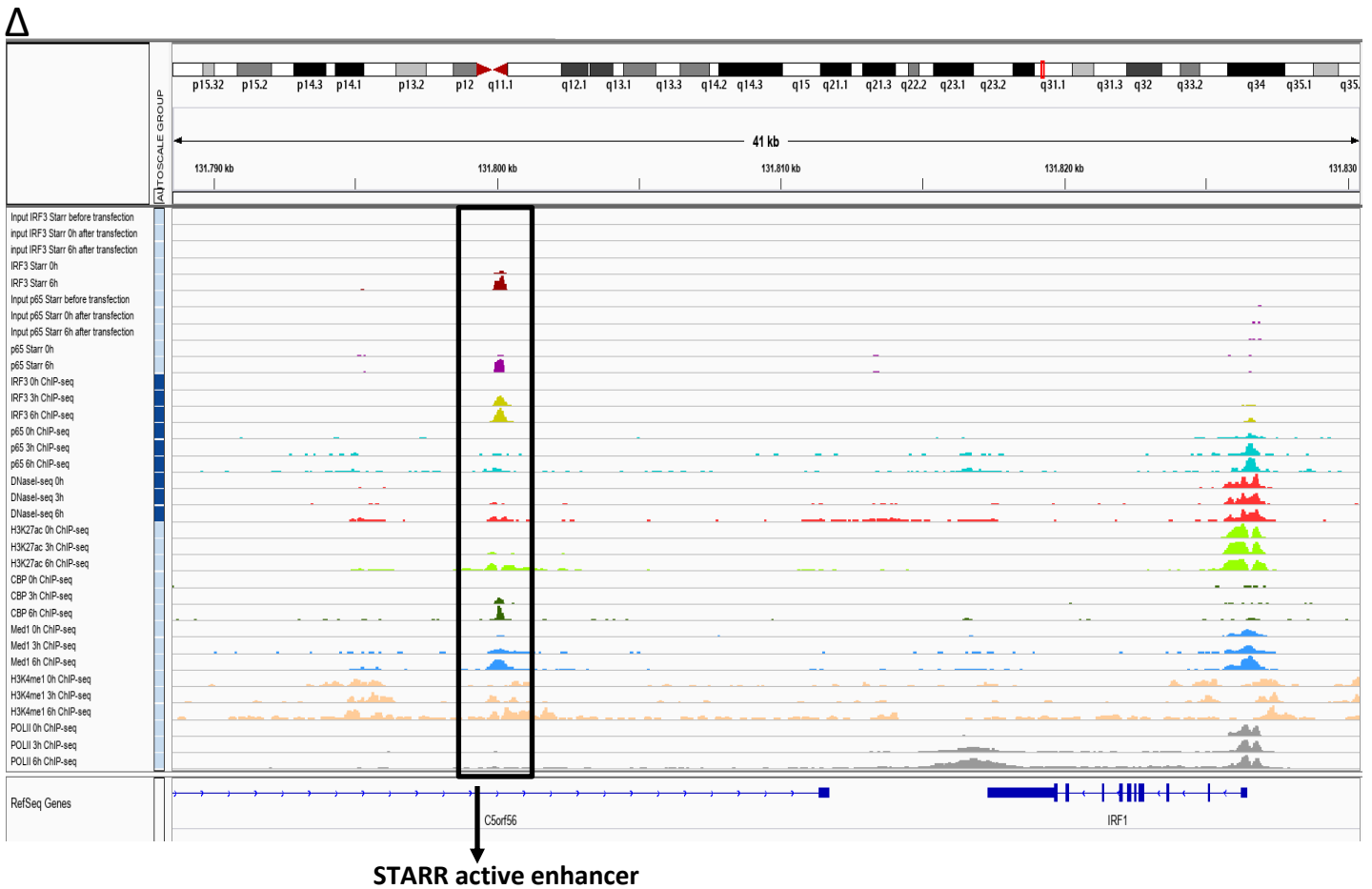
Εικόνα 115: Απεικονίζονται τα επίπεδα ενεργότητας των ενισχυτών σύμφωνα με τα πειράματα p65-STARR-seq για τους 55 ενισχυτές που παρουσιάζουν ενεργότητα σύμφωνα με τα πειράματα IRF3-STARR-seq και p65-STARR-seq (αριστερά) και τους 553 ενισχυτές που είναι ενεργοί σύμφωνα μόνο με τα πειράματα p65-STARR-seq. Στις κάτω εικόνες παρουσιάζονται αντίστοιχα τα επίπεδα πρόσδεσης των p65, IRF3 και της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac γύρω από τους ενισχυτές των δύο αυτών κατηγοριών.

Έπειτα ελέγξαμε πόσοι από τους p65-STARR-seq επαγόμενους ενισχυτές ανιχνεύονται ως επαγόμενοι σύμφωνα με τα πειράματα IRF3-STARR-seq. Από τους 598 p65-STARR-seq επαγόμενους ενισχυτές βρέθηκε ότι 55 είναι επαγόμενοι σύμφωνα και με το πρωτόκολλο IRF3-STARR-seq. Μετρώντας τα επίπεδα ενεργότητας των ενισχυτών αυτών βρέθηκε ότι είναι πολύ υψηλότερα από αυτά των 553 ενισχυτών που παρουσιάζουν ενεργότητα μόνο σύμφωνα με τα πειράματα IRF3-STARR-seq (εικόνα 115). Επιπλέον πολλοί από τους 55 αυτούς ενισχυτές φέρουν επαγόμενα επίπεδα πρόσδεσης των παραγόντων p65 και IRF3, καθώς και της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac.

A



B**C**



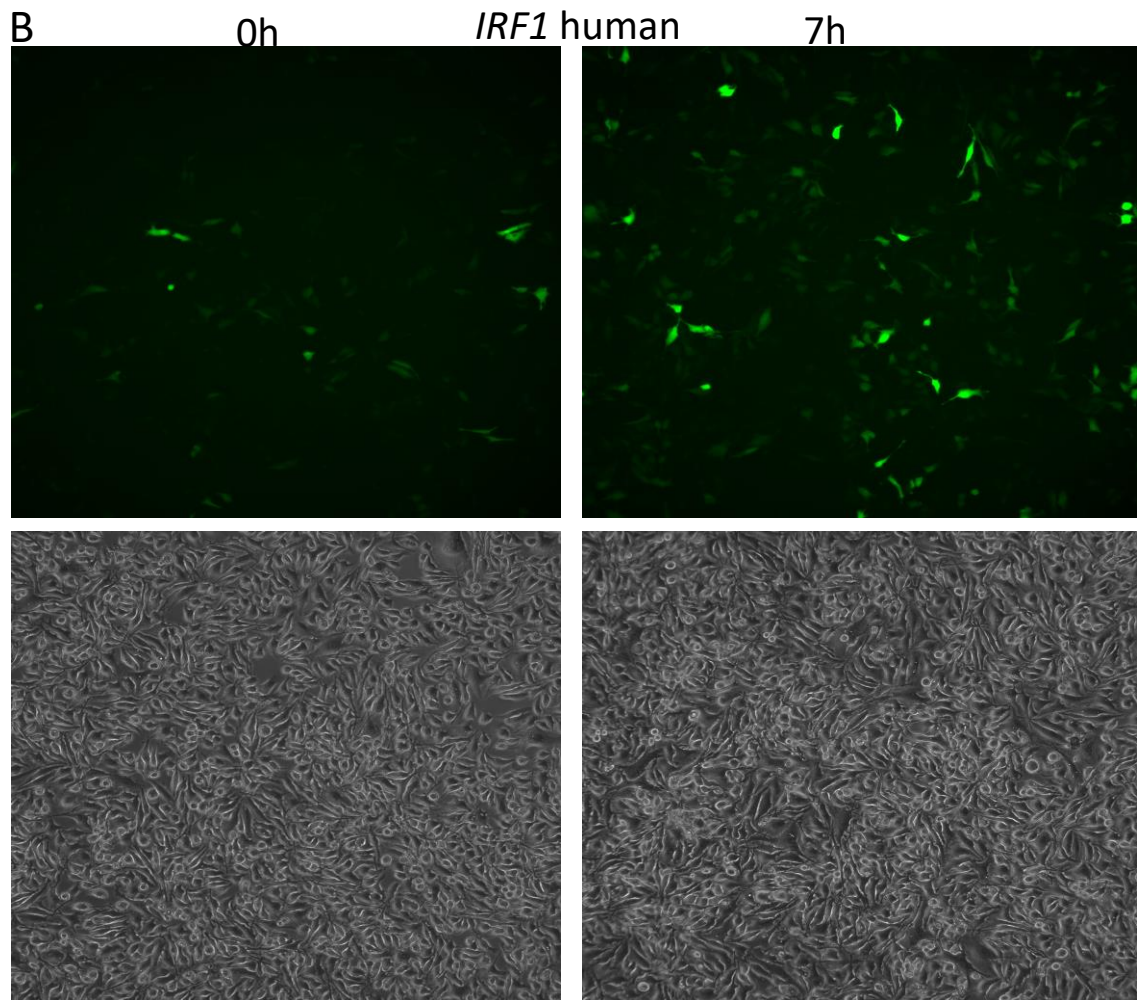
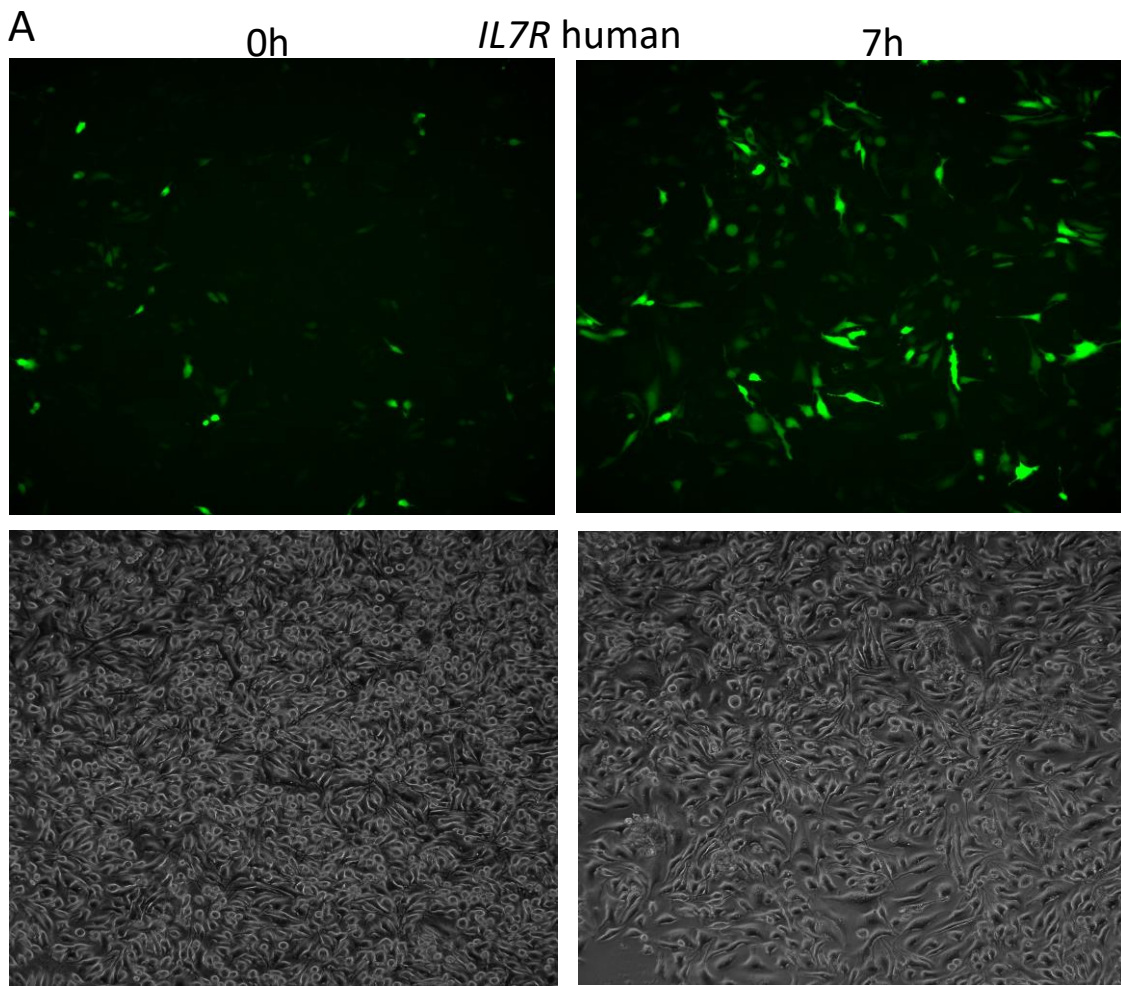
Εικόνα 116: Παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά παραδείγματα των ενισχυτών *OASL* (A) και *ADAP1* (B), *IL7R* (Γ), *IRF1* (Δ) οι οποίοι παρουσιάζουν επαγόμενη ενεργότητα σύμφωνα τόσο με τα πειράματα IRF3-STARR-seq όσο και με τα πειράματα p65-STARR-seq.

Στην εικόνα 116 παρουσιάζονται τέσσερα χαρακτηριστικά παραδείγματα επαγόμενων (ενεργών) STARR ενισχυτών τόσο με βάση τα πειράματα IRF3-STARR-seq όσο και τα πειράματα p65-STARR-seq σε κύτταρα HeLa και οι οποίοι βρίσκονται κοντά σε ικά επαγόμενα γονίδια. Οι ενισχυτές αυτοί φέρουν επιπλέον επαγόμενα επίπεδα πρόσδεσης των παραγόντων IRF3 και p65, και επαγόμενα επίπεδα πρόσδεσης των συνενεργοποιητών Med1 και CBP, καθώς και της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac.

Πειράματα επιβεβαίωσης της ενεργότητας μεμονωμένων ενισχυτών

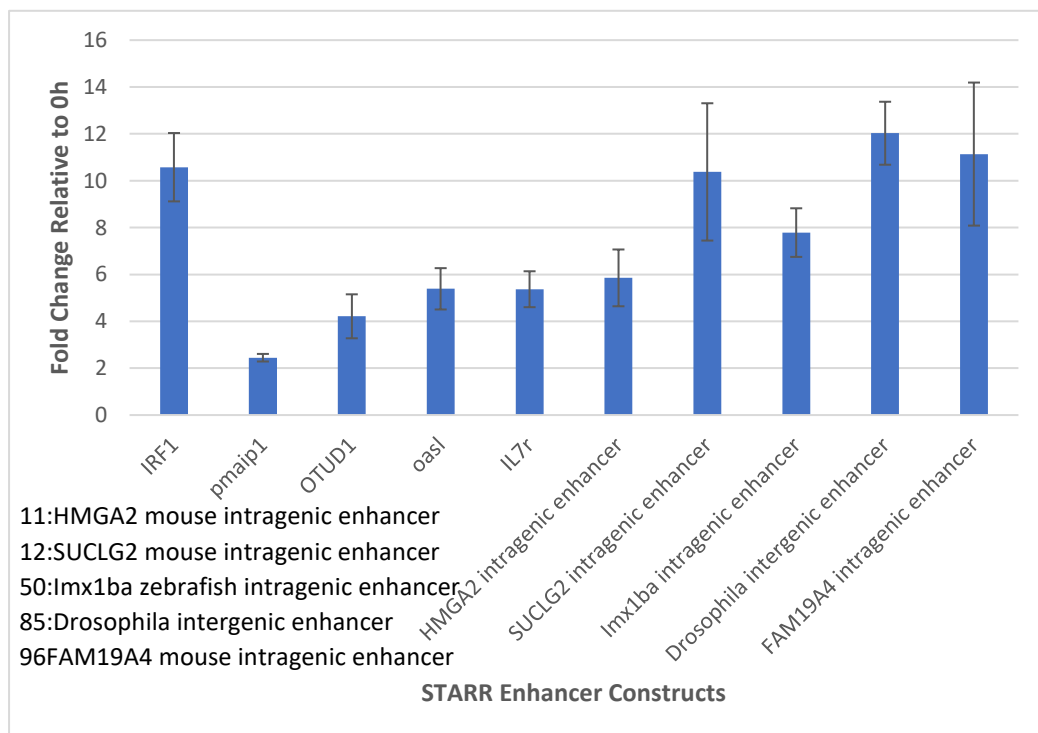
Για την επιβεβαίωση της ορθότητας των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την ανάλυση με μεθόδους βιοπληροφορικής των δεδομένων από τα πειράματα ChIP-STARR-seq πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση μεμονωμένων ενισχυτών στο πλασμίδιο STARR, διαμόλυνση τους σε κύτταρα HeLa, οπτικοποίηση του GFP σήματος και μέτρηση των μεταγράφων που προέρχονται από κάθε ένα

ενισχυτή πριν και μετά τη μόλυνση με ιό Sendai. Με αυτή τη στρατηγική επιλέγουμε να εξετάσουμε τις συγκεκριμένες αλληλουχίες ενισχυτών εκτός του πλαισίου της συνολικής πολύπλοκης βιβλιοθήκης που συμπεριλαμβάνει εκατομμύρια άλλα κομάτια γενετικού υλικού. Τα αποτελέσματα που θα προκύψουν θα δώσουν ακόμα μια επιβεβαίωση για τη λειτουργία των στοιχείων ως ενισχυτών *in vivo*. Συγκεκριμένα επιλέχθηκαν πέντε ενισχυτές που παρουσίασαν επαγόμενα επίπεδα μεταγραφής μετά τη μόλυνση με Sendai σύμφωνα με τα πειράματα ChIP-STARR-seq και οι οποίοι βρίσκονται κοντά στα *ικα* επαγόμενα γονίδια *IL7R*, *OASL*, *OTUD1*, *IRF1* και *PMAIP1*. Αρχικά πραγματοποιήθηκε πολλαπλασιασμός της αλληλουχίας τους με PCR και κλωνοποίηση τους στο φορέα STARR-seq στη ίδια θέση που είχαν κλωνοποιηθεί και οι DNA βιβλιοθήκες στα πειράματα STARR-seq. Επομένως η ενεργοποίηση κάθε ενισχυτή που είναι κλωνοποιημένος στο φορέα θα οδηγήσει στη παραγωγή χιμαιρικών μεταγράφων GFP σε σύντηξη με την αλληλουχία του ενισχυτή. Ακολούθησε διαμόλυνση των κυττάρων HeLa μεμονωμένα με κάθε ένα από τους κλωνοποιημένους ενισχυτές και μετά από 24 ώρες μόλυνση των κυττάρων με ιό Sendai για 6 ώρες. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε οπτικοποίηση του GFP σήματος σε μικροσκόπιο φθορισμού και σύγκριση του με το GFP σήμα κυττάρων που δεν είχαν μολυνθεί με ιό. Στην εικόνα 117 παρουσιάζονται τα επαγόμενα επίπεδα GFP φθορισμού και κατά συνέπεια επαγόμενης ενεργότητας για 2 χαρακτηριστικούς ενισχυτές. Συνολικά παρατηρήθηκαν επαγόμενα επίπεδα GFP μετά τη μόλυνση με Sendai και για τους 5 ενισχυτές.



Εικόνα 117: Παρουσιάζονται τα επαγόμενα επίπεδα GFP και επομένως η επαγόμενη ενεργότητα μετά από μόλυνση με ιό Sendai για δύο χαρακτηριστικούς ενισχυτές του ανθρώπινου γονιδιώματος κοντά στα γονίδια A) *IL7R* και B) *IRF1* που έχουν κλωνοποιηθεί στο πλασμίδιο STARR και έχουν εισαχθεί σε κύτταρα HeLa.

Για την ακριβή ποσοτικοποίηση των επαγόμενων επιπέδων μεταγραφής κάθε ενισχυτή πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA από τα κύτταρα, κατασκευή cDNA και ποσοτική αντίδραση PCR σε πραγματικό χρόνο. Ο πρόσθιος εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε προσδέεται εκατέρωθεν της θέσης ματίσματος του ιντρονίου στο STARR φορέα εμποδίζοντας το πολλαπλασιασμό από πλασμιδιακό DNA και ο ανάστροφος ενισχυτής προσδέεται εντός της GFP αλληλουχίας. Παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα μεταγραφής των ενισχυτών μετά τη μόλυνση με τα επίπεδα επαγωγής να κυμαίνονται από 2,4 μέχρι 10,5 φορές (εικόνα 118).

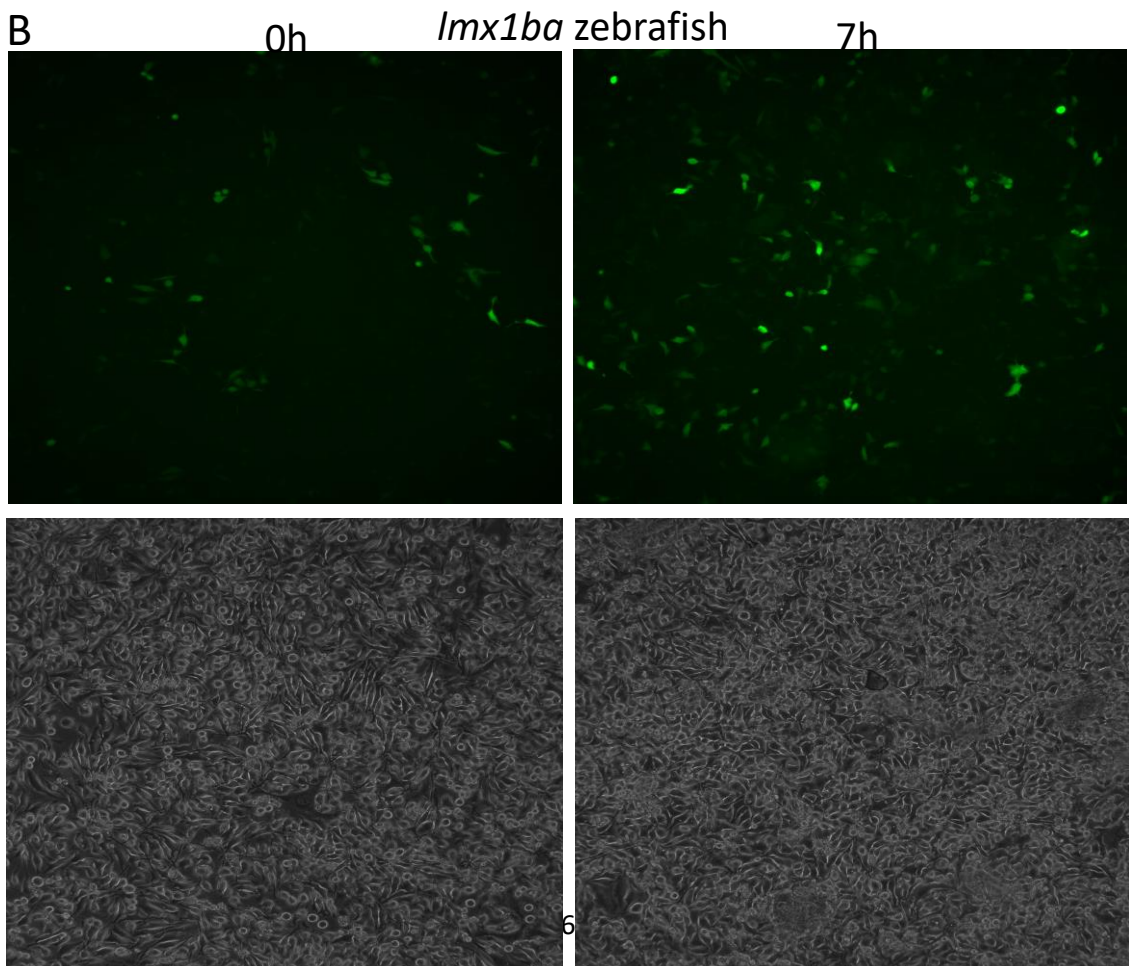
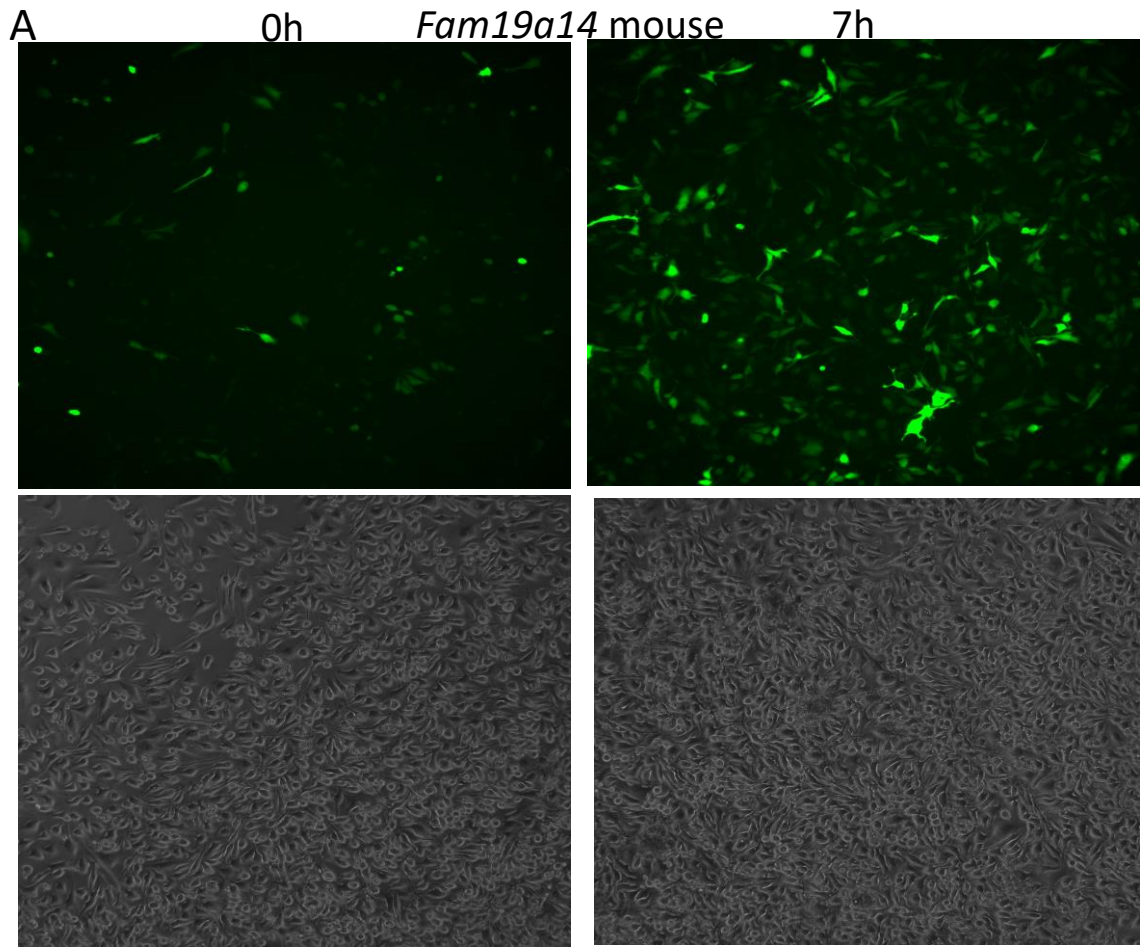


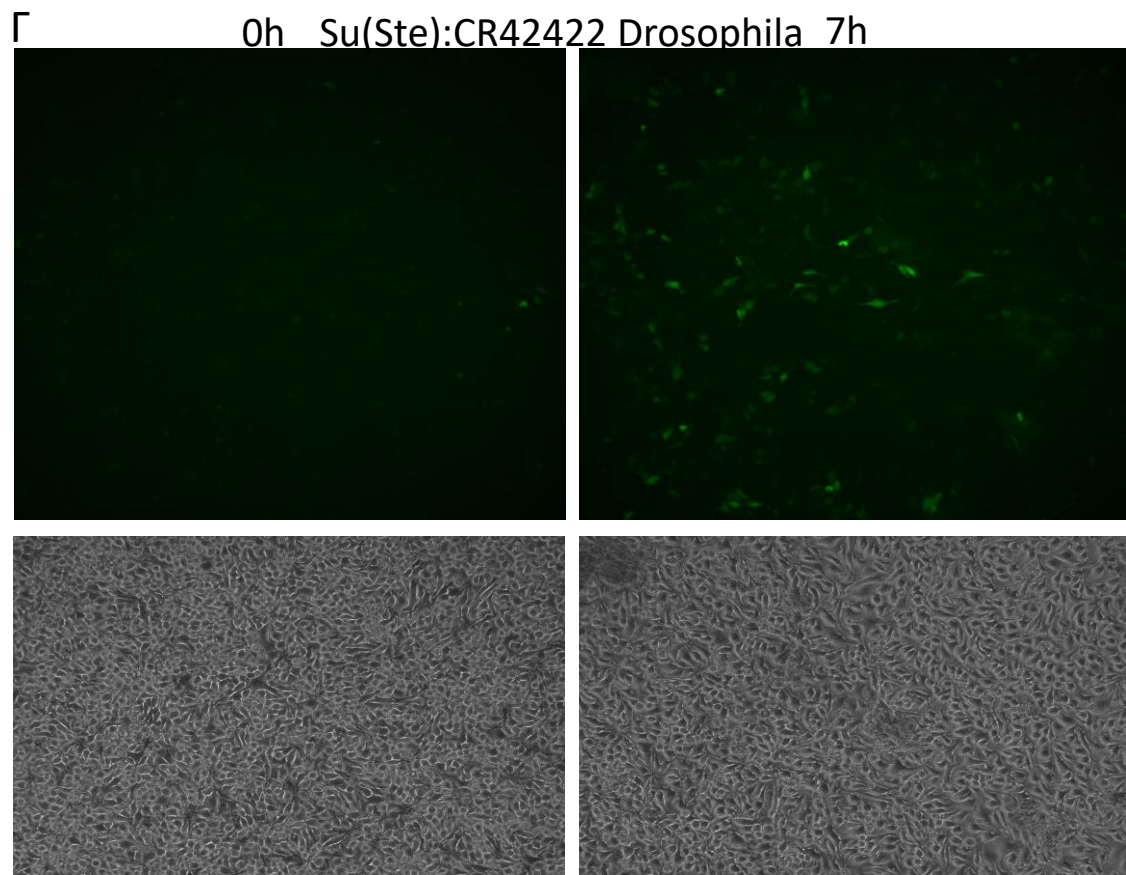
Εικόνα 118: Απεικονίζονται τα επίπεδα επαγωγής της ενεργότητας των ενισχυτών που εξετάστηκαν όπως προκύπτουν από τη μέτρηση των επιπέδων των μεταγράφων τους με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο.

Οι αλληλουχίες που φέρουν επαναλαμβανόμενα μοτίβα IRF ανιχνεύονται στα γονιδιώματα ειδών από όλα τα στάδια της εξέλιξης

Το σημαντικό ερώτημα που δημιουργήθηκε μετά την ανακάλυψη της ύπαρξης *ϊικά* επαγόμενων ενισχυτών με μεγάλο αριθμό επαναλαμβανόμενων στη σειρά μοτίβων IRF ήταν αν οι αλληλουχίες αυτές υπάρχουν και στα γονιδιώματα άλλων ειδών και επομένως πιθανόν να έχουν ένα συντηρημένο λειτουργικό ρόλο στην *αντίκλή* απόκριση. Επίσης κρίθηκε χρήσιμο να προσδιοριστεί ο αριθμός των αλληλουχιών αυτών σε γονιδιώματα διαφορετικών ειδών.

Η συγκεκριμένη εξελικτική ανάλυση στηρίχτηκε σε εργαλεία υπολογιστικής βιολογίας και στόχος ήταν να αποκαλύψει το βαθμό συντήρησης των ενεργών ενισχυτών σε άλλους οργανισμούς και να δώσει στοιχεία για την εξελικτική προέλευσή τους. Για να εξεταστεί το παραπάνω ερώτημα αρχικά βρέθηκε μετά από ανάλυση των επαναλαμβανόμενων μοτίβων IRF των επαγόμενων ενισχυτών ένα consensus μοτίβο το οποίο παρουσιάζεται στην εικόνα 96. Με αυτό το μοτίβο πραγματοποιήθηκε σάρωση αρχικά του γονιδιώματος του ανθρώπου. Το μοτίβο αυτό φέρει μόνο 3 θέσεις πρόσδεσης IRF και αποτελεί τη δομική μονάδα των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών. Επομένως για να εντοπιστούν οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες πραγματοποιήθηκε συνένωση των μοτίβων που απέχουν μεταξύ τους μέχρι 50 βάσεις και διατηρήθηκαν μόνο όσες αλληλουχίες φέρουν τουλάχιστον 5 φορές το consensus μοτίβο. Από την ανάλυση αυτή προέκυψε ότι ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών στο γονιδίωμα του ανθρώπου είναι περίπου 8000 (εικόνα 119). Στη συνέχεια έγινε σάρωση με το ίδιο consensus μοτίβο των γονιδιωμάτων διαφόρων ειδών στη πορεία της εξέλιξης. Διαπιστώθηκε ότι οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες εντοπίζονται σε όλους τους οργανισμούς που εξετάστηκαν. Χαρακτηριστικά ο αριθμός τους φτάνει τις περίπου 30.000 στο γονιδίωμα του ποντικού, 2000 στο γονιδίωμα του zebrafish, 500 στο γονιδίωμα του *zea mays*, ενώ περιορίζονται σε διψήφιο αριθμό στα γονιδιώματα του *C. elegans* και της *Drosophila*. Αξίζει να αναφερθεί ότι μεμονωμένες αλληλουχίες με επαναλαμβανόμενα μοτίβα IRF εντοπίζονται και στα γονιδιώματα ιών. Ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων μοτίβων είναι πιο περιορισμένος και συνήθως εντοπίζονται σε ιούς με σχετικά μεγάλου μεγέθους γονιδιώματα όπως οι ερπητοϊοί και μέλη των Giant Viruses.





Εικόνα 120: Παρουσιάζονται τα επαγόμενα επίπεδα GFP και επομένως η επαγόμενη ενεργότητα μετά από μόλυνση με ιό Sendai για ένα χαρακτηριστικό ενισχυτή του γονιδιώματος του ποντικού A), του zebrafish B) και της Drosophila Γ) που έχουν κλωνοποιηθεί στο πλασμίδιο STARR και έχουν εισαχθεί σε κύτταρα HeLa.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή είχε ως αντικείμενο μελέτης τους μηχανισμούς γονιδιακής έκφρασης που διέπουν την απόκριση των ανθρώπινων κυττάρων κατά τη διάρκεια Ιικών μολύνσεων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε κατά μόνας ή σε συνδυασμό ο πλέον σύγχρονος και πρωτοποριακός τρόπος εφαρμογής των τεχνικών της *γονιδιωματικής*, μοριακής βιολογίας, βιοχημείας και υπολογιστικής βιολογίας. Κύριοι στόχοι ήταν [1] η καταγραφή των ανθρώπινων γονιδίων των οποίων η έκφραση μεταβάλλεται, [2] η ταυτοποίηση των ενισχυτών του DNA που ρυθμίζουν την έκφραση αυτών των γονιδίων καθώς και [3] η ενδεδειγμένη μελέτη των μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν το συντονισμό του φαινομένου της αντιϊκής κυτταρικής λειτουργίας. Το βασικό σύστημα μελέτης αποτέλεσαν οι δυο καλά χαρακτηρισμένοι κυτταρικοί τύποι HeLa (επιθηλιακά κύτταρα) και Namalwa (B-λεμφοκύτταρα) και ως περιβαλλοντικό ερέθισμα της Ιϊκής μόλυνσης χορηγήθηκε ιός Sendai στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων. Συγκεκριμένα με τη μέθοδο RNA-seq έγινε ανάλυση του συνόλου του μεταγραφώματος των κυττάρων και κατόπιν βιοπληροφορικής ανάλυσης ταυτοποιήθηκαν τα κοινά και τα κυτταρο-ειδικά επαγόμενα από Ιό γονίδια σε HeLa και Namalwa κατά την εξέλιξη της αντιϊκής απόκρισης. Ακολούθησαν μελέτες ανάλυσης της προσβασιμότητας της χρωματίνης και χαρτογράφηση της παρουσίας ενός συνόλου μεταγραφικών ενεργοποιητών, συνενεργοποιητών, ιστονικών τροποποιήσεων και πρόσδεσης της μεταγραφικής μηχανής σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος. Η οριστική επιβεβαίωση για τη σημασία των παραπάνω γεγονότων δόθηκε μέσω λειτουργικής αξιολόγησης της δράσης των αλληλουχιών που απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν ως πιθανοί ενισχυτές σε ευρεία κλίμακα μέσω μαζικού ελέγχου της *in vivo* ενεργοποίησής τους σε ανθρώπινα κύτταρα. Στη συνέχεια με τις τεχνικές FAIRE-seq και DNaseI-seq εντοπίστηκαν οι αλλαγές στη προσβασιμότητα της χρωματίνης ενώ με τη μέθοδο ChIP-seq μελετήθηκε η ανακατανομή κύριων ρυθμιστών της αντιϊκής απόκρισης, συνενεργοποιητών, της μεταγραφικής μηχανής καθώς και ιστονικών τροποποιήσεων χαρακτηριστικών των ενισχυτών. Τέλος με τη τεχνική ChIP-STARR-seq βρέθηκαν ποιες αλληλουχίες από το σύνολο των χιλιάδων περιοχών πρόσδεσης των μεταγραφικών ρυθμιστών IRF3 και p65 λειτουργούν πραγματικά ως ενισχυτές. Ο όγκος, το εύρος, η ποιότητα των δεδομένων και τα ευρήματα καθιστούν τη συγκεκριμένη μελέτη μια από τις πιο λεπτομερές και

πρωτοπόρες στο τομέα της επαγόμενης γονιδιακής έκφρασης μετά από ανοσολογικό ερέθισμα.

Ξεκινώντας, μελετήσαμε με τη μέθοδο RNA-seq τις αλλαγές στο μεταγραφικό προφίλ όλων των γονιδίων που προκαλούνται κατά τη κυτταρική αντιϊκή απόκριση σε Namalwa και HeLa κύτταρα. Εντοπίστηκε ένας πυρήνας περίπου 200 γονιδίων που επάγονται και στους δύο κυτταρικούς τύπους και σχετίζονται με ανοσολογικές λειτουργίες όπως το μονοπάτι των ιντερφερονών και η απόκριση σε κυτοκίνες. Επίσης ανιχνεύτηκαν γονίδια με κυτταροειδικό πρότυπο επαγωγής, όπως η IL8 στα HeLa και οι ιντερφερόνες α στα Namalwa σε συμφωνία με δημοσιευμένα και αδημοσίευτα δεδομένα του εργαστηρίου. Στη συνέχεια με τις τεχνικές FAIRE-seq και DNaseI-seq εντοπίσαμε τις προσβάσιμες περιοχές στο γονιδίωμα και τις μεταβολές στη προσβασιμότητά τους κατά την εξέλιξη της αντιϊκής απόκρισης. Εντοπίστηκαν εκατοντάδες περιοχές με αυξημένη προσβασιμότητα κατά τη διάρκεια της αντιϊκής απόκρισης, οι οποίες είχαν τη τάση να βρίσκονται κοντά σε ιϊκά επαγόμενα γονίδια σύμφωνα με τα πειράματα RNA-seq και να φέρουν μοτίβα για σημαντικούς ρυθμιστές της αντιϊκής απόκρισης όπως οι παράγοντες IRF. Έπειτα για να μελετήσουμε την ανακατανομή δύο καίριων μεταγραφικών παραγόντων για την αντιϊκή απόκριση, του IRF3 και του p65 πραγματοποιήσαμε πειράματα ChIP-seq από τα οποία διαπιστώθηκε ο ιϊκά επαγόμενος συνεντοπισμός των δύο παραγόντων σε εκατοντάδες περιοχές στο γονιδίωμα, γεγονός που υποδηλώνει πιθανή συνέργεια των δύο παραγόντων στη ρύθμιση της αντιϊκής απόκρισης. Η πλειοψηφία των επαγόμενων θέσεων πρόσδεσης για τους παράγοντες IRF3 και p65 ήταν σε περιοχές χρωματίνης που ήταν προσβάσιμες ήδη πριν από την ιϊκή μόλυνση και έφεραν επιπλέον χαρακτηριστικά των ενεργών ενισχυτών όπως πρόσδεση των συνενεργοποιητών CBP, Med1 καθώς και παρουσία της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac. Παρόλα αυτά αξίζει να τονιστεί ιδιαίτερα η ύπαρξη περιοχών επαγόμενης πρόσδεσης του IRF3 με ή χωρίς το p65 σε περιοχές της χρωματίνης που είναι μη προσβάσιμες πριν από τη ιϊκή μόλυνση και οι οποίες επιπλέον δεν φέρουν χαρακτηριστικούς δείκτες όπως CBP, Med1 και H3K27ac. Στις περιοχές αυτές όμως παρατηρείται αύξηση της προσβασιμότητας της χρωματίνης και επαγόμενος συνεντοπισμός των παραπάνω δεικτών μετά την ιϊκή μόλυνση. Επομένως, θέτοντας τον IRF3 ως κέντρο της γονιδιωματικής μελέτης ανακαλύψαμε πως η επαγόμενη γονιδιακή έκφραση που συμβαίνει κατά την Ιϊκή μόλυνση συνοδεύεται σε πολλές περιπτώσεις από αύξηση της προσβασιμότητας των ενισχυτών, της παρουσίας μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των ιστονών και σε κάποιες περιπτώσεις

επαγόμενη πρόσδεση του p65. Επιπλέον οι αλληλουχίες αυτές έχουν τη τάση να βρίσκονται κοντά σε ιϊκά επαγόμενα γονίδια και να φέρουν μοτίβα για ρυθμιστές της αντιϊκής απόκρισης όπως οι παράγοντες IRF και Jun/Fos, γεγονός που ενισχύει περαιτέρω τη πιθανότητα να ρυθμίζουν κρίσιμα αντιϊκά γονίδια. Η εύρεση των περιοχών αυτών του γονιδιώματος που φέρουν δομικά χαρακτηριστικά και δείκτες των ενισχυτών με επαγόμενο πρότυπο είναι σε πλήρη συμφωνία με τη βιβλιογραφία σε άλλα επαγόμενα συστήματα μελέτης της ανοσολογικής απόκρισης στα οποία αντίστοιχου τύπου πιθανά ρυθμιστικά στοιχεία χαρακτηρίζονται ως κρυπτικοί (latent or de novo enhancers) ενισχυτές (Ostuni et al., 2013). Παρατηρείται επομένως ότι ένα ανοσολογικό ερέθισμα μπορεί να αναγνωριστεί από το κύτταρο μέσω ενεργοποίησης κατάλληλων σηματοδοτικών μονοπατιών και να οδηγήσει στην προσέλκυση μεταγραφικών παραγόντων και της μεταγραφικής μηχανής σε περιοχές του γονιδιώματος που δεν είχαν καμία ένδειξη ενεργότητας πριν από την εμφάνιση του ερεθίσματος. Ανάλογα με τη φύση του ερεθίσματος και το κυτταρικό τύπο κινητοποιείται κοινή και ειδική για κάθε περίπτωση ρυθμιστική μοίρα του γονιδιώματος που οδηγεί στη κατάλληλη χωροχρονική απόκριση των κυττάρων. Για να ελέγξουμε αν οι πιθανοί ενισχυτές που ενεργοποιούνται από το ιϊκό ερέθισμα είναι κοινοί ή κυτταροειδικοί χρησιμοποιήσαμε ως κριτήριο την επαγόμενη πρόσδεση του IRF3 και χωρίσαμε τις περιοχές πρόσδεσης σε κοινές σε HeLa και Namalwa και σε περιοχές που εντοπίζονται μόνο στον ένα κυτταρικό τύπο. Διαπιστώθηκε ότι στις περιοχές πρόσδεσης του IRF3 συνεντοπίζονται με ανάλογο, κοινό και κυτταροειδικό πρότυπο δείκτες χαρακτηριστικοί των επαγόμενων ενισχυτών όπως οι συνενεργοποιητές CBP και Med1 και οι ιστονικές τροποποιήσεις H3K4me1 και H3K27ac. Επιπλέον από τη συνδυαστική ανάλυση των επιγονιδιωματικών δεικτών και των πειραμάτων RNA-seq διαπιστώθηκε ότι οι κοινοί πιθανοί ενισχυτές βρίσκονται κατά προτίμηση κοντά σε επαγόμενα και στους δύο κυτταρικούς τύπους γονίδια, ενώ οι κυτταροειδικοί πιθανοί ενισχυτές βρίσκονται κοντά σε κυτταροειδικά επαγόμενα γονίδια. Επομένως το ιϊκό ερέθισμα οδηγεί στην ενεργοποίηση κοινών και ειδικών για κάθε κυτταρικό τύπο ενισχυτών που ρυθμίζουν τα κοινά και κυτταροειδικά επαγόμενα μεταγραφικά προγράμματα της αντιϊκής απόκρισης.

Με τις τεχνικές FAIRE-seq, DNaseI-seq και ChIP-seq εντοπίστηκαν πιθανοί επαγόμενοι ενισχυτές με βάση αλλαγές σε δομικά χαρακτηριστικά της χρωματίνης όπως η αύξηση στη προσβασιμότητα της χρωματίνης και η πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων. Παρόλο που οι συγκεκριμένοι δείκτες σύμφωνα και με τη βιβλιογραφία

χαρακτηρίζουν τους ενισχυτές, δεν αποδεικνύουν την ενεργότητά τους. Για καλύψουμε αυτό το κενό και να μπορέσουμε να ελέγξουμε την ενεργότητα των πιθανών ενισχυτών τροποποιήσαμε και εφαρμόσαμε τη πρωτοποριακή τεχνική ChIP-STARR-seq, μια ευρείας κλίμακας δοκιμασία αναφοράς (reporter assay) με την οποία εξετάσαμε ταυτόχρονα την ιϊκά επαγόμενη ενεργότητα των χιλιάδων περιοχών πρόσδεσης των μεταγραφικών ρυθμιστών της αντιϊκής απόκρισης IRF3 και p65. Οι κλασσικές δοκιμασίες αναφοράς όπως η δοκιμασία λουσιφεράσης αποτελούν τη πλέον γνωστή μέθοδο για την εξακρίβωση της ενεργότητας ενισχυτή μιας αλληλουχίας DNA. Η μέθοδος αυτή όμως μπορεί να εξετάσει μόνο ένα ρυθμιστικό στοιχείο ανά πείραμα και λόγω της φύσεως της καθίσταται μη πρακτική η εφαρμογή της για τον έλεγχο της ενεργότητας των χιλιάδων πιθανών επαγόμενων ενισχυτών που έχουν προκύψει από την εφαρμογή των μεθόδων FAIRE-seq, DNaseI-seq και ChIP-seq. Η μέθοδος STARR-seq βασίζεται στο γεγονός ότι οι αλληλουχίες που λειτουργούν ως ενισχυτές θα προκαλέσουν τη μεταγραφή του εαυτού τους όταν τοποθετηθούν κάτωθεν ενός υποκινητή. Επομένως μπορούν να κλωνοποιηθούν μαζικά και να ελεγχθούν ταυτόχρονα εκατομμύρια αλληλουχίες DNA και μέσω αλληλούχισης ευρείας κλίμακας των μεταγράφων που προέρχονται από τους ενισχυτές να ανιχνευτούν τα ενεργά ρυθμιστικά στοιχεία. Αρχικά κλωνοποιήσαμε το υλικό από την ανοσοκατακρήμιση έναντι του IRF3 6h μετά τη μόλυνση με ιό Sendai σε κύτταρα HeLa στο φορέα STARR και διαμολύναμε με τη βιβλιοθήκη αυτή κύτταρα HeLa. Στο μισό κυτταρικό πληθυσμό πραγματοποιήθηκε μόλυνση για 6 ώρες και ο υπόλοιπος χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα ελέγχου. Ακολούθησε απομόνωση των μεταγράφων που προέρχονταν από το πλασμιδιακό φορέα, κατασκευή cDNA και nested PCR για το πολλαπλασιασμό της βιβλιοθήκης πριν την αλληλούχιση ευρείας κλίμακας. Χρησιμοποιώντας ως κριτήριο επιλογής περιοχές του DNA που παρουσιάζουν τουλάχιστον διπλάσια επίπεδα σήματος (reads) στο δείγμα των 6 ωρών σε σχέση με το δείγμα που δεν είχε υποστεί μόλυνση καθώς και σε σχέση με το σήμα από τη πλασμιδιακή βιβλιοθήκη καταλήξαμε περίπου σε 300 περιοχές που παρουσιάζουν επαγόμενη ενεργότητα ενισχυτή. Το πολύ ενδιαφέρον εύρημα επομένως είναι ότι μόνο ένα ποσοστό περίπου 10% από τις περίπου 3000 αλληλουχίες με ισχυρή πρόσδεση του IRF3 λειτουργούν ως ενεργοί επαγόμενοι ενισχυτές. Βλέπουμε δηλαδή ότι ο χαρακτηρισμός αλληλουχιών ως ενισχυτές αποκλειστικά με βάση τη παρουσία επιγονιδιωματικών δεικτών μπορεί να μην έχει απόλυτη ειδικότητα και η εφαρμογή της τεχνικής STARR-seq καλύπτει αυτό το κενό στο τομέα της επιγονιδιωματικής ανιχνεύοντας και επιβεβαιώνοντας τις πραγματικά

λειτουργικές αλληλουχίες. Τα παραπάνω επιβεβαιώνονται και από τη πρώτη δημοσιευμένη εφαρμογή της τεχνικής ChIP-STARR-seq όπου διαπιστώθηκε ότι ένα μικρό μόνο ποσοστό (12%) των περιοχών πρόσδεσης του Glucocorticoid Receptor παρουσιάζει επαγόμενη ενεργότητα ενισχυτή μετά από χορήγηση δεξαμεθαζόνης (Vockley et al., 2016). Εξετάζοντας τι διαφορές στο επιγονιδιωματικό προφίλ μεταξύ των STARR ενεργών και ανενεργών περιοχών πρόσδεσης του IRF3 διαπιστώθηκε ότι οι ενεργές περιοχές χαρακτηρίζονται από απουσία δεικτών που χαρακτηρίζουν τους ενεργούς ενισχυτές και από κλειστή χρωματίνη πριν από τη μόλυνση, η οποία καθίσταται προσβάσιμη μετά τη μόλυνση και παρουσιάζει επαγόμενο συνεντοπισμό δεικτών όπως οι συνενεργοποιητές Med1 και CBP και η ιστονική τροποποίηση H3K27ac. Αντίθετα για τις ανενεργές περιοχές πρόσδεσης του IRF3 παρατηρούνται κάποια basal levels των παραπάνω δεικτών πριν από τη μόλυνση τα οποία δεν μεταβάλλονται κατά την εξέλιξη της αντιϊκής κυτταρικής απόκρισης. Περνώντας στο επίπεδο της αλληλουχίας διαπιστώσαμε ότι οι ενεργές περιοχές είναι πιο εμπλουτισμένες σε μοτίβα πρόσδεσης σημαντικών για την ανοσολογική απόκριση παραγόντων όπως αυτά της οικογένειας IRF και Jun/Fos. Στη συνέχεια εκτελέσαμε και αναλύσαμε με τον ίδιο τρόπο το p65 ChIP-STARR-seq πείραμα και διαπιστώσαμε και σε αυτή τη περίπτωση ότι μόνο ένα μικρό ποσοστό από τις περιοχές πρόσδεσης του παράγοντα είναι ενεργοί επαγόμενοι ενισχυτές. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με αυτά του IRF3-ChIP-STARR-seq πειράματος βρήκαμε ότι οι περισσότερες από τις ισχυρά επαγόμενες περιοχές στο p65 ChIP-STARR-seq πείραμα είναι ενεργές σύμφωνα και με το IRF3-ChIP-STARR-seq ενισχύοντας την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων μας. Ένα επιπλέον εύρημα από τα ChIP-STARR-seq πειράματα είναι ότι οι περιοχές που προσδένεται ο p65 χωρίς τη παρουσία του IRF3 δεν έχουν επαγόμενη ενεργότητα ενισχυτή και δεν παρουσιάζουν επαγόμενη πρόσδεση επιγονιδιωματικών δεικτών. Αντίθετα υπάρχουν περιοχές πρόσδεσης του IRF3 από τις οποίες απουσιάζει ο p65 και οι οποίες παρουσιάζουν ισχυρά επαγόμενη ενεργότητα ενισχυτή. Τα παραπάνω είναι δηλωτικά για τον καθοριστικό ρόλο του IRF3 στην ενεργοποίηση των ιικά επαγόμενων ενισχυτών, με το παράγοντα p65 να έχει πιθανόν επικουρικό ρόλο συν-ρυθμίζοντας περιοχές στις οποίες προσδένεται και ο IRF3.

Από τη μελέτη των αλληλουχιών DNA των επαγόμενων ενισχυτών που προέκυψαν από τη μέθοδο STARR-seq διαπιστώθηκε ότι ένας σημαντικός αριθμός από αυτούς φέρουν στη σειρά επαναλαμβανόμενα μοτίβα πρόσδεσης των παραγόντων IRF. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε 60 από τις 80 STARR επαγόμενες περιοχές στα HeLa που

φέρουν το μεγαλύτερο αριθμό μοτίβων IRF εντοπίζεται επαγόμενη πρόσδεση του παράγοντα IRF3 και στα Namalwa, ενώ οι περιοχές αυτές φέρουν επιπλέον και άλλους επαγόμενους δείκτες όπως Med1, CBP και H3K27ac ενισχύοντας την υπόθεση ότι οι αλληλουχίες αυτές ίσως έχουν ένα συντηρημένο ρόλο στην αντιϊκή απόκριση. Επιπλέον διαπιστώθηκε ότι ο παράγοντας Stat2 δεν προσδέεται σε αυτές τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες παρά το γεγονός ότι το μοτίβο πρόσδεσης του στο DNA μοιάζει πολύ με αυτό των IRF. Το γεγονός αυτό είναι πιθανό να οφείλεται σε μικροδιαφορές στο spacing των μοτίβων που αναγνωρίζουν οι παράγοντες IRF και Stat. Αποτελεί όμως ταυτόχρονα ένδειξη της ειδικότητας των αλληλουχιών αυτών να ρυθμίζονται μόνο από τους παράγοντες IRF. Ο αριθμός των μοτίβων αυτών σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να καλύπτει και όλη την αλληλουχία του ενισχυτή με τα μοτίβα να περιέχουν αρκετές δεκάδες δυνητικές θέσεις πρόσδεσης των IRF και να εκτείνονται σε εκατοντάδες ζεύγη βάσεων. Οι ενισχυτές αυτοί κατατάσσονται στις απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες του γονιδιώματος (simple tandem repeats), ομάδες διαφορετικών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών που συνολικά καταλαμβάνουν περίπου το 1-2% του γονιδιώματος. Το φαινόμενο αυτό της ύπαρξης ενισχυτών με τόσο επαναλαμβανόμενα μοτίβα δεν έχει περιγραφεί εκτενώς στη βιβλιογραφία των επαγόμενων συστημάτων γονιδιακής έκφρασης που σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση. Παρόλα αυτά είναι γνωστό ότι η σε σειρά παρουσία μοτίβων για τον ίδιο μεταγραφικό παράγοντα οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα ενεργότητας ενισχυτή σε δοκιμασίες γονιδίων αναφοράς (Thanos and Maniatis, 1995, Koutroubas et al., 2008, Smith et al., 2013). Για να εξετάσουμε αν ο αριθμός των μοτίβων πρόσδεσης IRF σχετίζεται με τα επίπεδα ενεργότητας του εκάστοτε ενισχυτή, χωρίσαμε τους STARR επαγόμενους ενισχυτές σε κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των θέσεων IRF που φέρουν. Διαπιστώθηκε ότι η μέχρι ενός σημείου προοδευτική αύξηση του αριθμού των μοτίβων IRF οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα ενεργότητας των ενισχυτών. Από ένα αριθμό μοτίβων και μετά (>10) επέρχεται κορεσμός και η περαιτέρω αύξηση του αριθμού των μοτίβων δεν οδηγεί σε ακόμα μεγαλύτερα επίπεδα ενεργότητας. Αντίθετα τα επίπεδα πρόσδεσης του IRF3 και συνενεργοποιητών δε φαίνεται να διαφέρουν ανάλογα με τον αριθμό μοτίβων. Αντίστροφη είναι η εικόνα για το παράγοντα p65 που παρουσιάζει χαμηλά επίπεδα πρόσδεσης στους ενισχυτές με μεγάλο αριθμό μοτίβων IRF, το οποίο δικαιολογείται από το γεγονός ότι οι αλληλουχίες αυτές δεν φέρουν μοτίβα για το παράγοντα p65. Το εύρημα της μέχρι ενός σημείου αύξησης της

ενεργότητας ανάλογα με τον αριθμό των μοτίβων έχει παρατηρηθεί σε μεμονωμένες δοκιμασίες αναφοράς για άλλους μεταγραφικούς παράγοντες κυρίως σε συνθετικές αλληλουχίες εν σειρά μοτίβων (Koutroubas et al.,2008, Smith et al.,2013) αλλά πρόσφατα και για κάποιες από τις ενδογενείς θέσεις πρόσδεσης του χιμαιρικού παράγοντα EWS-FLI1 (Gangwal et al.,2008).

Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι ορισμένοι μεταγραφικοί παράγοντες προσδέονται σε συστοιχίες μοτίβων τους στο γονιδίωμα οι οποίες ονομάζονται homotypic clusters of transcription factor binding sites (Gotea et al.,2010). Η εν σειρά παρουσία μοτίβων για τον ίδιο παράγοντα πιθανόν να καθιστά τους συγκεκριμένους ενισχυτές ανθεκτικούς σε μεταλλάξεις που απενεργοποιούν την ενεργότητά τους (Li et al.,2019). Επίσης σε άλλη μελέτη βρέθηκε ότι τα μοτίβα με επαναλήψεις δινουκλεοτιδίων αποτελούν ένα αρκετά κοινό χαρακτηριστικό των ενεργών ενισχυτών στη δροσόφιλα και στον άνθρωπο και στις μεμονωμένες περιπτώσεις που ελέγχθηκαν ήταν απαραίτητα για την ενεργότητα του ενισχυτή (Yáñez-Cuna et al.,2014). Επιπλέον ο χιμαιρικός μεταγραφικός παράγοντας EWS-FLI1 προσδέεται σε επαναλαμβανόμενες συστοιχίες μοτίβων με αλληλουχία GGAA. Οι αλληλουχίες αυτές έχουν ενεργότητα ενισχυτή και ρυθμίζουν κρίσιμα γονίδια στο σάρκωμα Ewing (Boulay et al.,2018). Απαραίτητη για την ενεργοποίηση των ενισχυτών με μοτίβα GGAA είναι η προσέλκυση από τον EWS-FLI1 του συμπλόκου αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης BAF (Boulay et al.,2017). Υπεύθυνη για αυτή τη προσέλκυση και για τη πρόσδεση του EWS-FLI1 στα μοτίβα GGAA είναι χαρακτηριστικά για τη χιμαιρική πρωτεΐνη κατάλοιπα τυροσίνης που δημιουργούν μια intrinsically disordered δομή που ομοιάζει με prion και δημιουργεί phase transition, πολυμερισμό και υψηλή τοπικά συγκέντρωση του παράγοντα. Σε άλλη μελέτη όπου εξετάστηκαν οι περιοχές που βρίσκονται γύρω από υποκινητές γονιδίων του ανθρώπου για την ύπαρξη συστοιχιών μοτίβων πρόσδεσης για τον NFκB βρέθηκαν 24 τέτοιες συστοιχίες με τις περισσότερες να έχουν από 4-5 μοτίβα πρόσδεσης (Giorgetti et al.,2010). Επιπλέον διατυπώθηκε και επιβεβαιώθηκε πειραματικά ένα μοντέλο που υποστηρίζει ότι η πρόσδεση του NFκB σε κάθε μία από τις θέσεις πρόσδεσης είναι ανεξάρτητη και λειτουργεί προσθετικά και όχι συνεργατικά στη προσέλκυση της RNA πολυμεράσης και στα επίπεδα ενεργοποίησης του γονιδίου.

Η εύρεση ιικά επαγόμενων ενισχυτών που φέρουν αποκλειστικά και μόνο συστοιχίες μοτίβων IRF αποτελεί πρωτογενή ανακάλυψη. Από όσο γνωρίζουμε

ουδέποτε στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί ανάλογο εύρημα πόσο μάλλον σε τέτοια έκταση όπως στη δική μας μελέτη. Επίσης σημαντικό είναι να τονιστεί πως οι ενισχυτές αυτοί αποτελούν εξαίρεση στο γενικό κανόνα ότι η ενεργότητα ενός ενισχυτή είναι η συνισταμένη της πρόσδεσης και των αλληλεπιδράσεων διαφορετικών μεταγραφικών παραγόντων σε διαφορετικούς συνδυασμούς μοτίβων. Αυτό που αξίζει να διερευνηθεί είναι σε πόσες από τις δυνητικές θέσεις πρόσδεσης των IRF σε κάθε ενισχυτή προσδένονται οι παράγοντες και αν η πρόσδεση είναι συνεργατική ή προσθετική για τη συνολική ενεργότητα κάθε ενισχυτή. Η ύπαρξη πολυάριθμων μοτίβων IRF σε κάθε ενισχυτή πιθανόν να είναι απαραίτητη για τη προσέλκυση μεγάλου αριθμού μορίων IRF για την αντιστάθμιση της απουσίας μοτίβων και επομένως πιθανώς της αδυναμίας προσέλκυσης άλλων μεταγραφικών παραγόντων. Τα μόρια των IRF με τη σειρά τους προσελκύουν συνενεργοποιητές και τη μεταγραφική μηχανή για την ενεργοποίηση του ενισχυτή. Η εύρεση αυτής της νέας κατηγορίας ενισχυτών με μεγάλο αριθμό μοτίβων γεννά το ερώτημα εάν αυτού του τύπου οι αλληλουχίες είναι συντηρημένες στο επίπεδο της αλληλουχίας και της λειτουργίας κατά τη διάρκεια της εξέλιξης των ειδών και εάν σχετίζονται εξελικτικά με την εμφάνιση των συστημάτων ανοσολογικής απόκρισης των οργανισμών.

Στη συνέχεια κρίθηκε σημαντικό να πραγματοποιηθεί μελέτη της πιθανής παρουσίας των αλληλουχιών αυτών στη σε γονιδιώματα οργανισμών από διάφορα εξελικτικά στάδια. Ονομάζουμε τη μέθοδο αυτή *Phylogenomics Footprinting* θέλοντας να δώσουμε έμφαση στο γεγονός ότι ο ρόλος των αλληλουχιών αυτών στον άνθρωπο ανακαλύφθηκε από εμάς μετά από λειτουργική διερεύνηση βασισμένη στη γονιδιωματική με επακόλουθο έλεγχο της ύπαρξης τους σε μεγάλο αριθμό γονιδιωμάτων. Για να εξεταστεί το παραπάνω ερώτημα πραγματοποιήθηκε σάρωση με το consensus μοτίβο που αποτελεί τη δομική μονάδα των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών γονιδιωμάτων από διαφορετικά είδη και συνένωση των γειτονικών μοτίβων που ανιχνεύτηκαν ώστε να βρεθούν οι αλληλουχίες που προσομοιάζουν τους ενισχυτές του ανθρώπινου γονιδιώματος με επαναλαμβανόμενα μοτίβα IRF. Διαπιστώθηκε ότι οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες εντοπίζονται σε όλους τους οργανισμούς που εξετάστηκαν. Χαρακτηριστικά ο αριθμός τους φτάνει τις περίπου 30.000 στο γονιδίωμα του ποντικού, 2000 στο γονιδίωμα του zebrafish, 500 στο γονιδίωμα του *zea mays*, ενώ περιορίζονται σε διψήφιο αριθμό στα γονιδιώματα του *C. elegans* και της *Drosophila*. Επιπλέον μεμονωμένες αλληλουχίες με επαναλαμβανόμενα μοτίβα IRF εντοπίζονται και στα γονιδιώματα διαφόρων ιών όπως

οι ερπητοιοί. Ο αριθμός των μοτίβων που υπάρχουν σε κάθε γονιδίωμα φαίνεται να σχετίζεται ως ένα βαθμό θετικά με το μέγεθος του γονιδιώματος, ενώ επιπλέον εξελικτικές πιέσεις πιθανόν να διαμορφώνουν το τελικό αριθμό. Συμπερασματικά, διαπιστώθηκε ότι οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες μοτίβων IRF αποτελούν ένα universal χαρακτηριστικό των γονιδιωμάτων καθόλη τη πορεία εξέλιξης των ειδών καθώς ανιχνεύονται από τους ιούς και τα φυτά μέχρι τα ανώτερα θηλαστικά.

Για να διαπιστωθεί εάν οι συντηρημένες αλληλουχίες έχουν και συντηρημένη ενεργότητα ενισχυτή πραγματοποιήθηκε κλωνοποίησή τους στο φορέα STARR και έλεγχοστης επαγωγής τους μετά από ιϊκή μόλυνση σε κύτταρα HeLa. Πράγματι διαπιστώθηκε ότι αρκετές από τις συντηρημένες αλληλουχίες στο ποντίκι λειτουργούν ως ιϊκά επαγόμενοι ενισχυτές σε ανθρώπινα κύτταρα. Επιπλέον ένδειξη για τη λειτουργικότητα των αλληλουχιών αυτών στο ποντίκι είναι η παρατήρηση ότι ο παράγοντας IRF3 προσδένεται σε δεκάδες από τις περιοχές αυτές 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση όπως προέκυψε από πειράματα ChIP-seq σε κύτταρα ποντικού NIH3T3. Επιπλέον προχωρήσαμε σε ανάλυση δημοσιευμένων πειραμάτων ChIP-seq (Tong et al., 2016) για το παράγοντα IRF3 μετά από κατεργασία με Irs σε μακροφάγα ποντικού και διαπιστώσαμε πρόσδεση του παράγοντα σε πάνω από 100 κοινές με τα πειράματά μας στα κύτταρα NIH3T3 περιοχές στο γονιδίωμα που φέρουν επαναλαμβανόμενα μοτίβα IRF. Τέλος εντοπίσαμε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες στα γονιδιώματα της *Drosophila* και του *Zebrafish* που λειτουργούν ως επαγόμενοι ενισχυτές στα ανθρώπινα κύτταρα αποδεικνύοντας τη δυναμική αυτού του τύπου των αλληλουχιών από ένα ευρύ φάσμα της εξέλιξης να λειτουργούν ως ιϊκά επαγόμενοι ενισχυτές. Αξίζει να μελετηθεί σε επόμενο στάδιο η λειτουργικότητα των αλληλουχιών αυτών και ο πιθανός ρόλος τους στην ανοσολογική απόκριση στο ίδιο τον οργανισμό από τον οποίο προέρχονται. Πολλά από τα στοιχεία του συστήματος της αντιϊκής απόκρισης είναι συντηρημένα κατά τη διάρκεια της εξέλιξης των σπονδυλωτών και συγκεκριμένα οι παράγοντες IRF εντοπίζονται για παράδειγμα στο *Zebrafish* αλλά και σε οργανισμούς όπως τα κνιδόζωα, επομένως οι αλληλουχίες αυτές μπορεί να έχουν ρόλο στην αντιϊκή απόκριση στους οργανισμούς αυτούς (Nehyba et al., 2009). Αντίθετα οι παράγοντες IRF και οι ιντερφερόνες δεν εντοπίζονται σε οργανισμούς όπως η *Drosophila* και ο *C. elegans*. Στους οργανισμούς αυτούς υπάρχουν συντηρημένα μέλη της οικογένειας Stat που θα μπορούσαν δυνητικά να προσδένονται στις αλληλουχίες με τα επαναλαμβανόμενα μοτίβα. Αξίζει να σημειωθεί ότι επαναλαμβανόμενα μοτίβα IRF συναντώνται και στα γονιδιώματα ιών όπως οι ερπητοιοί. Στους ιούς αυτούς υπάρχουν

παράγοντες που ομοιάζουν με τις πρωτεΐνες IRF και εμποδίζουν την αντιϊκή λειτουργία των ενδογενών μεταγραφικών παραγόντων (Lee et al.,2009). Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι η ύπαρξη των αλληλουχιών με επαναλαμβανόμενα μοτίβα IRF θα μπορούσε να αποτελεί ένα μηχανισμό συνεξέλιξης των ιών με τους ξενιστές τους για την εκμετάλλευση των ενδογενών μεταγραφικών παραγόντων των κυττάρων για τη μεταγραφή των ιικών γονιδίων όπως έχει πρόσφατα προταθεί για μεμονωμένους ιικούς ενισχυτές (Kropp et al.,2015). Επομένως είναι πιθανή η συνεξέλιξη του συστήματος των παραγόντων IRF και των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών στις οποίες αυτοί προσδένονται.

Το εύρημα της ύπαρξης ιικά επαγόμενων ενισχυτών με συντηρημένη αλληλουχία σε όλους τους κλάδους της εξέλιξης αποτελεί ένα από τα πρώτα παραδείγματα μαζικής εύρεσης τόσο βαθιά συντηρημένων αλληλουχιών. Μέχρι στιγμής έχουν βρεθεί ελάχιστοι ενισχυτές συντηρημένοι μεταξύ ειδών τόσο απομακρυσμένων εξελικτικά όπως ο άνθρωπος και η δροσόφιλα (Royo et al.,2011) ή μεταξύ του ανθρώπου και πρωτοστόμιων ειδών όπως η *Aplysia californica* (Clarke et al.,2012). Όπως προαναφέρθηκε οι ενισχυτές με επαναλαμβανόμενα μοτίβα IRF ανήκουν στην οικογένεια των απλών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, ένα κομμάτι του γονιδιώματος που παραμένει σχετικά ανεξερεύνητο εξαιτίας των τεχνικών δυσκολιών στη στοίχιση τέτοιου τύπου αλληλουχιών (Shrivastava et al.,2019). Είναι πιθανό και άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες με απλά-degenerate μοτίβα όπως για παράδειγμα ο Sp1 να προσδένονται σε τέτοιου τύπου αλληλουχίες, μια υπόθεση που αξίζει να μελετηθεί στο μέλλον. Λόγω της επαναλαμβανόμενης φύσεως τους τέτοιες αλληλουχίες αναμένεται να είναι συντηρημένες καθολικά κατά τη διάρκεια της εξέλιξης.

Η περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου των ιικά επαγόμενων ενισχυτών στη διαδικασία της κυτταρικής αντιϊκής απόκρισης μπορεί να περιλαμβάνει τη μελέτη των τρισδιάστατων αλληλεπιδράσεων στο χώρο του πυρήνα μεταξύ των ενισχυτών αυτών και του υπόλοιπου γονιδιώματος μέσω εφαρμογής τεχνικών όπως η HiChIP (Mumbach et al.,2016) και η μέθοδος Capture-C (Hughes et al.,2014). Επιπλέον για την εξακρίβωση του ρόλου των ενισχυτών στην έκφραση των ιικά επαγόμενων γονιδίων κρίνεται απαραίτητο να πραγματοποιηθούν πειράματα αποσιώπησης ή απαλοιφής μεμονωμένων ενισχυτών με τη τεχνολογία CRISPR-CAS και μελέτη των επιπτώσεων τους στην έκφραση των γειτονικών γονιδίων. Για την διαλεύκανση της ρυθμιστικής λογικής που διέπει τους ιικά επαγόμενους ενισχυτές μπορεί να πραγματοποιηθεί μαζική

σύνθεση τους με διάφορους συνδυασμούς μεταλλάξεων σε κρίσιμα μοτίβα και μελέτη της επίδρασης των μεταλλάξεων στην ενεργότητα των ενισχυτών με τη μέθοδο STARR-seq. Τέλος για να μελετηθεί αν οι ενισχυτές που φέρουν συστοιχίες μοτίβων IRF έχουν συντηρημένο ρόλο δύναται να πραγματοποιηθεί μαζική σύνθεση αλληλουχιών που φέρουν συστοιχίες μοτίβων από διάφορα είδη κατά τη πορεία της εξέλιξης και έλεγχος της ενεργότητάς τους με τη μέθοδο STARR-seq.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adli M, Bernstein BE. Whole-genome chromatin profiling from limited numbers of cells using nano-ChIP-seq. *Nat Protoc.* 2011 Sep 29;6(10):1656-68.

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

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

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

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

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

Allahyar A, Vermeulen C, Bouwman BAM, Krijger PHL, Verstegen MJAM, Geeven G, van Kranenburg M, Pieterse M, Straver R, Haarhuis JHI, Jalink K, Teunissen H, Renkens IJ, Kloosterman WP, Rowland BD, de Wit E, de Ridder J, de Laat W. Enhancer hubs and loop collisions identified from single-allele topologies. *Nat Genet.* 2018 Aug;50(8):1151-1160.

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

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

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

Antonaki A, Demetriades C, Polyzos A, Banos A, Vatsellas G, Lavigne MD, Apostolou E, Mantouvalou E, Papadopoulou D, Mosialos G, Thanos D. Genomic analysis reveals a novel nuclear factor- κ B (NF- κ B)-binding site in Alu-repetitive elements. *J Biol Chem*. 2011 Nov 4;286(44):38768-82.

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

Applied Biosystem, 2003. Real-time PCR Vs Traditional PCR. Applied Biosystem, pp 1-15.

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

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

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

Bartman CR, Hsu SC, Hsiung CC, Raj A, Blobel GA. Enhancer Regulation of Transcriptional Bursting Parameters Revealed by Forced Chromatin Looping. *Mol Cell*. 2016 Apr 21;62(2):237-247.

Beliveau BJ, Boettiger AN, Avendaño MS, Jungmann R, McCole RB, Joyce EF, Kim-Kiselak C, Bantignies F, Fonseka CY, Erceg J, Hannan MA, Hoang HG, Colognori D, Lee JT, Shih WM, Yin P, Zhuang X, Wu CT. Single-molecule super-resolution imaging of chromosomes and in situ haplotype visualization using Oligopaint FISH probes. *Nat Commun*. 2015 May 12;6:7147.

Boehning M, Dugast-Darzacq C, Rankovic M, Hansen AS, Yu T, Marie-Nelly H, McSwiggen DT, Kokic G, Dailey GM, Cramer P, Darzacq X, Zweckstetter M. RNA polymerase II clustering through carboxy-terminal domain phase separation. *Nat Struct Mol Biol.* 2018 Sep;25(9):833-840.

Bogdanović O, Smits AH, de la Calle Mustienes E, Tena JJ, Ford E, Williams R, Senanayake U, Schultz MD, Hontelez S, van Kruijsbergen I, Rayon T, Gnerlich F, Carell T, Veenstra GJ, Manzanares M, Sauka-Spengler T, Ecker JR, Vermeulen M, Gómez-Skarmeta JL, Lister R. Active DNA demethylation at enhancers during the vertebrate phylotypic period. *Nat Genet.* 2016 Apr;48(4):417-26.

Boulay G, Sandoval GJ, Riggi N, Iyer S, Buisson R, Naigles B, Awad ME, Rengarajan S, Volorio A, McBride MJ, Broye LC, Zou L, Stamenkovic I, Kadoch C, Rivera MN. Cancer-Specific Retargeting of BAF Complexes by a Prion-like Domain. *Cell.* 2017 Sep 21;171(1):163-178.e19.

Boulay G, Volorio A, Iyer S, Broye LC, Stamenkovic I, Riggi N, Rivera MN. Epigenome editing of microsatellite repeats defines tumor-specific enhancer functions and dependencies. *Genes Dev.* 2018 Aug 1;32(15-16):1008-1019.

Boyle AP, Davis S, Shulha HP, Meltzer P, Margulies EH, Weng Z, Furey TS, Crawford GE. High-resolution mapping and characterization of open chromatin across the genome. *Cell.* 2008 Jan 25;132(2):311-22.

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

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

Canver MC, Smith EC, Sher F, Pinello L, Sanjana NE, Shalem O, Chen DD, Schupp PG, Vinjamur DS, Garcia SP, Luc S, Kurita R, Nakamura Y, Fujiwara Y, Maeda T, Yuan GC, Zhang F, Orkin SH, Bauer DE. BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated in situ saturating mutagenesis. *Nature.* 2015 Nov 12;527(7577):192-7.

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

Chow NA, Jasenosky LD, Goldfeld AE. A distal locus element mediates IFN- γ priming of lipopolysaccharide-stimulated TNF gene expression. *Cell Rep.* 2014 Dec 11;9(5):1718-1728.

Clarke SL, VanderMeer JE, Wenger AM, Schaar BT, Ahituv N, Bejerano G. Human developmental enhancers conserved between deuterostomes and protostomes. *PLoS Genet.* 2012;8(8):e1002852.

Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 2013 Feb 15;339(6121):819-23.

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

Core LJ, Waterfall JJ, Lis JT. Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters. *Science.* 2008 Dec 19;322(5909):1845-8.

Donnard E, Vangala P, Afik S, McCauley S, Nowosielska A, Kucukural A, Tabak B, Zhu X, Diehl W, McDonel P, Yosef N, Luban J, Garber M. Comparative Analysis of Immune Cells Reveals a Conserved Regulatory Lexicon. *Cell Syst.* 2018 Mar 28;6(3):381-394.e7.

Dorigi KM, Swigut T, Henriques T, Bhanu NV, Scruggs BS, Nady N, Still CD 2nd, Garcia BA, Adelman K, Wysocka J. Mll3 and Mll4 Facilitate Enhancer RNA Synthesis and Transcription from Promoters Independently of H3K4 Monomethylation. *Mol Cell.* 2017 May 18;66(4):568-576.e4.

ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature.* 2012 Sep 6;489(7414):57-74.

Feldmann A, Ivanek R, Murr R, Gaidatzis D, Burger L, Schübeler D. Transcription factor occupancy can mediate active turnover of DNA methylation at regulatory regions. *PLoS Genet.* 2013;9(12):e1003994.

Feng J, Liu T, Qin B, Zhang Y, Liu XS. Identifying ChIP-seq enrichment using MACS. *Nat Protoc.* 2012 Sep;7(9):1728-40.

Ficz G, Branco MR, Seisenberger S, Santos F, Krueger F, Hore TA, Marques CJ, Andrews S, Reik W. Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature.* 2011 May 19;473(7347):398-402.

Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, Coyle AJ, Liao SM, Maniatis T. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol.* 2003 May;4(5):491-6.

Foxman EF, Iwasaki A. Genome-virome interactions: examining the role of common viral infections in complex disease. *Nat Rev Microbiol.* 2011 Apr;9(4):254-64.

Freaney JE, Kim R, Mandhana R, Horvath CM. Extensive cooperation of immune master regulators IRF3 and NFκB in RNA Pol II recruitment and pause release in human innate antiviral transcription. *Cell Rep.* 2013 Sep 12;4(5):959-73.

Gangwal K, Sankar S, Hollenhorst PC, Kinsey M, Haroldsen SC, Shah AA, Boucher KM, Watkins WS, Jorde LB, Graves BJ, Lessnick SL. Microsatellites as EWS/FLI response elements in Ewing's sarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008

Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, Torres SE, Stern-Ginossar N, Brandman O, Whitehead EH, Doudna JA, Lim WA, Weissman JS, Qi LS. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell.* 2013 Jul 18;154(2):442-51.

Giorgetti L, Siggers T, Tiana G, Caprara G, Notarbartolo S, Corona T, Pasparakis M, Milani P, Bulyk ML, Natoli G. Noncooperative interactions between transcription factors and clustered DNA binding sites enable graded transcriptional responses to environmental inputs. *Mol Cell.* 2010 Feb 12;37(3):418-28.

Goloborodko A, Imakaev MV, Marko JF, Mirny L. Compaction and segregation of sister chromatids via active loop extrusion. *Elife.* 2016 May 18;5. pii: e14864.

Gotea V, Visel A, Westlund JM, Nobrega MA, Pennacchio LA, Ovcharenko I. Homotypic clusters of transcription factor binding sites are a key component of human promoters and enhancers. *Genome Res.* 2010 May;20(5):565-77.

Grosveld F, van Assendelft GB, Greaves DR, Kollias G. Position-independent, high-level expression of the human beta-globin gene in transgenic mice. *Cell.* 1987 Dec 24;51(6):975-85

Haarhuis JHI, van der Weide RH, Blomen VA, Yáñez-Cuna JO, Amendola M, van Ruiten MS, Krijger PHL, Teunissen H, Medema RH, van Steensel B, Brummelkamp TR, de Wit E, Rowland BD. The Cohesin Release Factor WAPL Restricts Chromatin Loop Extension. *Cell.* 2017 May 4;169(4):693-707.e14.

Hardison RC, Taylor J. Genomic approaches towards finding cis-regulatory modules in animals. *Nat Rev Genet.* 2012 Jun 18;13(7):469-83.

Hay D, Hughes JR, Babbs C, Davies JOJ, Graham BJ, Hanssen L, Kassouf MT, Marieke Oudelaar AM, Sharpe JA, Suciuc MC, Telenius J, Williams R, Rode C, Li PS, Pennacchio LA, Sloane-Stanley JA, Ayyub H, Butler S, Sauka-Spengler T, Gibbons RJ, Smith AJH, Wood WG, Higgs DR. Genetic dissection of the α -globin super-enhancer in vivo. *Nat Genet.* 2016 Aug;48(8):895-903.

Hayden MS, West AP, Ghosh S. NF-kappaB and the immune response. *Oncogene.* 2006 Oct 30;25(51):6758-80.

Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jan;37(1):1-13.

Hughes JR, Roberts N, McGowan S, Hay D, Giannoulatou E, Lynch M, De Gobbi M, Taylor S, Gibbons R, Higgs DR. Analysis of hundreds of cis-regulatory landscapes at high resolution in a single, high-throughput experiment. *Nat Genet.* 2014 Feb;46(2):205-12.

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y).* 1993 Sep;11(9):1026-30.

Inoue F, Kircher M, Martin B, Cooper GM, Witten DM, McManus MT, Ahituv N, Shendure J. A systematic comparison reveals substantial differences in chromosomal versus episomal encoding of enhancer activity. *Genome Res.* 2017 Jan;27(1):38-52.

Jin F, Li Y, Dixon JR, Selvaraj S, Ye Z, Lee AY, Yen CA, Schmitt AD, Espinoza CA, Ren B. A high-resolution map of the three-dimensional chromatin interactome in human cells. *Nature.* 2013 Nov 14;503(7475):290-4.

John S, Sabo PJ, Canfield TK, Lee K, Vong S, Weaver M, Wang H, Vierstra J, Reynolds AP, Thurman RE, Stamatoyannopoulos JA. Genome-scale mapping of DNase I hypersensitivity. *Curr Protoc Mol Biol.* 2013 Jul;Chapter 27:Unit 21.27.

Kaikkonen MU, Spann NJ, Heinz S, Romanoski CE, Allison KA, Stender JD, Chun HB, Tough DF, Prinjha RK, Benner C, Glass CK. Remodeling of the enhancer landscape during macrophage activation is coupled to enhancer transcription. *Mol Cell.* 2013 Aug 8;51(3):310-25.

Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D. The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* 2002 Jun;12(6):996-1006.

Kim TK, Hemberg M, Gray JM, Costa AM, Bear DM, Wu J, Harmin DA, Laptewicz M, Barbara-Haley K, Kuersten S, Markenscoff-Papadimitriou E, Kuhl D, Bito H, Worley PF, Kreiman G, Greenberg ME. Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature.* 2010 May 13;465(7295):182-7.

Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* 2013 Apr 25;14(4):R36.

Kim MY, Woo EM, Chong YT, Homenko DR, Kraus WL. Acetylation of estrogen receptor alpha by p300 at lysines 266 and 268 enhances the deoxyribonucleic acid binding and transactivation activities of the receptor. *Mol Endocrinol.* 2006 Jul;20(7):1479-93.

Kitazawa H, Villena J. Modulation of Respiratory TLR3-Anti-Viral Response by Probiotic Microorganisms: Lessons Learned from *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505. *Front Immunol.* 2014 May 12;5:201.

Kropp KA, Hsieh WY, Isern E, Forster T, Krause E, Brune W, Angulo A, Ghazal P. A temporal gate for viral enhancers to co-opt Toll-like-receptor transcriptional activation pathways upon acute infection. *PLoS Pathog.* 2015 Apr 9;11(4):e1004737.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006 Apr-Jun;27(2-3):95-125.

Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, Fernandez NF, Duan Q, Wang Z, Koplev S, Jenkins SL, Jagodnik KM, Lachmann A, McDermott MG, Monteiro CD, Gundersen GW, Ma'ayan A. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jul 8;44(W1):W90-7.

Korkmaz G, Lopes R, Ugalde AP, Nevedomskaya E, Han R, Myacheva K, Zwart W, Elkon R, Agami R. Functional genetic screens for enhancer elements in the human genome using CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol.* 2016 Feb;34(2):192-8.

Koutroubas G, Merika M, Thanos D. Bypassing the requirements for epigenetic modifications in gene transcription by increasing enhancer strength. *Mol Cell Biol.* 2008 Feb;28(3):926-38.

Kvon EZ, Kamneva OK, Melo US, Barozzi I, Osterwalder M, Mannion BJ, Tissières V, Pickle CS, Plajzer-Frick I, Lee EA, Kato M, Garvin TH, Akiyama JA, Afzal V, Lopez-Rios J, Rubin EM, Dickel DE, Pennacchio LA, Visel A. Progressive Loss of Function in a Limb Enhancer during Snake Evolution. *Cell.* 2016 Oct 20;167(3):633-642.e11.

Kwak H, Fuda NJ, Core LJ, Lis JT. Precise maps of RNA polymerase reveal how promoters direct initiation and pausing. *Science.* 2013 Feb 22;339(6122):950-3.

Kwasnieski JC, Mogno I, Myers CA, Corbo JC, Cohen BA. Complex effects of nucleotide variants in a mammalian cis-regulatory element. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012 Nov 20;109(47):19498-503.

Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods.* 2012 Mar 4;9(4):357-9.

Lavigne MD, Vatsellas G, Polyzos A, Mantouvalou E, Sianidis G, Maraziotis I, Agelopoulos M, Thanos D. Composite macroH2A/NRF-1 Nucleosomes Suppress Noise and Generate Robustness in Gene Expression. *Cell Rep.* 2015 May 19;11(7):1090-101.

Lee HR, Kim MH, Lee JS, Liang C, Jung JU. Viral interferon regulatory factors. *J Interferon Cytokine Res.* 2009 Sep;29(9):621-7.

Lee JE, Wang C, Xu S, Cho YW, Wang L, Feng X, Baldrige A, Sartorelli V, Zhuang L, Peng W, Ge K. H3K4 mono- and di-methyltransferase MLL4 is required for enhancer activation during cell differentiation. *Elife.* 2013 Dec 24;2:e01503.

Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009 Aug 15;25(16):2078-9.

Li S, Kvon EZ, Visel A, Pennacchio LA, Ovcharenko I. Stable enhancers are active in development, and fragile enhancers are associated with evolutionary adaptation. *Genome Biol.* 2019 Jul 15;20(1):140.

Li W, Notani D, Ma Q, Tanasa B, Nunez E, Chen AY, Merkurjev D, Zhang J, Ohgi K, Song X, Oh S, Kim HS, Glass CK, Rosenfeld MG. Functional roles of enhancer RNAs for oestrogen-dependent transcriptional activation. *Nature.* 2013 Jun 27;498(7455):516-20.

Lin R, Heylbroeck C, Pitha PM, Hiscott J. Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol.* 1998 May;18(5):2986-96.

Liu Y, Yu S, Dhiman VK, Brunetti T, Eckart H, White KP. Functional assessment of human enhancer activities using whole-genome STARR-sequencing. *Genome Biol.* 2017 Nov 20;18(1):219.

Lomvardas S, Thanos D. Nucleosome sliding via TBP DNA binding in vivo. *Cell.* 2001 Sep 21;106(6):685-96.

Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550.

Lu H, Yu D, Hansen AS, Ganguly S, Liu R, Heckert A, Darzacq X, Zhou Q. Phase-separation mechanism for C-terminal hyperphosphorylation of RNA polymerase II. *Nature*. 2018 Jun;558(7709):318-323.

Maurano MT, Humbert R, Rynes E, Thurman RE, Haugen E, Wang H, Reynolds AP, Sandstrom R, Qu H, Brody J, Shafer A, Neri F, Lee K, Kutyaev T, Stehling-Sun S, Johnson AK, Canfield TK, Giste E, Diegel M, Bates D, Hansen RS, Neph S, Sabo PJ, Heimfeld S, Raubitschek A, Ziegler S, Cotsapas C, Sotoodehnia N, Glass I, Sunyaev SR, Kaul R, Stamatoyannopoulos JA. Systematic localization of common disease-associated variation in regulatory DNA. *Science*. 2012 Sep 7;337(6099):1190-5.

McLean CY, Bristor D, Hiller M, Clarke SL, Schaar BT, Lowe CB, Wenger AM, Bejerano G. GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions. *Nat Biotechnol*. 2010 May;28(5):495-501.

Meireles-Filho AC, Stark A. Comparative genomics of gene regulation-conservation and divergence of cis-regulatory information. *Curr Opin Genet Dev*. 2009 Dec;19(6):565-70.

Moore JM, Rabaia NA, Smith LE, Fagerlie S, Gurley K, Loukinov D, Disteché CM, Collins SJ, Kemp CJ, Lobanekov VV, Filippova GN. Loss of maternal CTCF is associated with peri-implantation lethality of Ctf null embryos. *PLoS One*. 2012;7(4):e34915.

Mostafavi S, Yoshida H, Moodley D, LeBoité H, Rothamel K, Raj T, Ye CJ, Chevrier N, Zhang SY, Feng T, Lee M, Casanova JL, Clark JD, Hegen M, Telliez JB, Hacohen N, De Jager PL, Regev A, Mathis D, Benoist C; Immunological Genome Project Consortium. Parsing the Interferon Transcriptional Network and Its Disease Associations. *Cell*. 2016 Jan 28;164(3):564-78.

Muerdter F, Boryń ŁM, Woodfin AR, Neumayr C, Rath M, Zabidi MA, Pagani M, Haberle V, Kazmar T, Catarino RR, Schernhuber K, Arnold CD, Stark A. Resolving systematic errors in widely used enhancer activity assays in human cells. *Nat Methods*. 2018 Feb;15(2):141-149.

Mumbach MR, Rubin AJ, Flynn RA, Dai C, Khavari PA, Greenleaf WJ, Chang HY. HiChIP: efficient and sensitive analysis of protein-directed genome architecture. *Nat Methods*. 2016 Nov;13(11):919-922.

Nehyba J, Hrdlicková R, Bose HR. Dynamic evolution of immune system regulators: the history of the interferon regulatory factor family. *Mol Biol Evol.* 2009 Nov;26(11):2539-50.

Nikopoulou C, Panagopoulos G, Sianidis G, Psarra E, Ford E, Thanos D. The Transcription Factor ThPOK Orchestrates Stochastic Interchromosomal Interactions Required for IFNB1 Virus-Inducible Gene Expression. *Mol Cell.* 2018 Jul 19;71(2):352-361.e5.

Nguyen NTT, Contreras-Moreira B, Castro-Mondragon JA, Santana-Garcia W, Ossio R, Robles-Espinoza CD, Bahin M, Collombet S, Vincens P, Thieffry D, van Helden J, Medina-Rivera A, Thomas-Chollier M. RSAT 2018: regulatory sequence analysis tools 20th anniversary. *Nucleic Acids Res.* 2018 Jul 2;46(W1):W209-W214.

Nolis IK, McKay DJ, Mantouvalou E, Lomvardas S, Merika M, Thanos D. Transcription factors mediate long-range enhancer-promoter interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Dec 1;106(48):20222-7.

Nora EP, Goloborodko A, Valton AL, Gibcus JH, Uebersohn A, Abdennur N, Dekker J, Mirny LA, Bruneau BG. Targeted Degradation of CTCF Decouples Local Insulation of Chromosome Domains from Genomic Compartmentalization. *Cell.* 2017 May 18;169(5):930-944.e22.

Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009 Oct;1(4):a000034.

Ostuni R, Piccolo V, Barozzi I, Polletti S, Termanini A, Bonifacio S, Curina A, Prosperini E, Ghisletti S, Natoli G. Latent enhancers activated by stimulation in differentiated cells. *Cell.* 2013 Jan 17;152(1-2):157-71.

Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene.* 1999 Nov 22;18(49):6853-66.

Parker SC, Stitzel ML, Taylor DL, Orozco JM, Erdos MR, Akiyama JA, van Bueren KL, Chines PS, Narisu N; NISC Comparative Sequencing Program, Black BL, Visel A, Pennacchio LA, Collins FS; National Institutes of Health Intramural Sequencing Center Comparative Sequencing Program Authors; NISC Comparative Sequencing Program Authors. Chromatin stretch enhancer states drive cell-specific gene regulation and harbor human disease risk variants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Oct 29;110(44):17921-6.

Pengelly AR, Copur Ö, Jäckle H, Herzig A, Müller J. A histone mutant reproduces the phenotype caused by loss of histone-modifying factor Polycomb.Science. 2013 Feb 8;339(6120):698-9.

Phanstiel DH, Van Bortle K, Spacek D, Hess GT, Shamim MS, Machol I, Love MI, Aiden EL, Bassik MC, Snyder MP. Static and Dynamic DNA Loops form AP-1-Bound Activation Hubs during Macrophage Development. Mol Cell. 2017 Sep 21;67(6):1037-1048.e6.

Pliatska M, Kapasa M, Kokkalis A, Polyzos A, Thanos D. The Histone Variant MacroH2A Blocks Cellular Reprogramming by Inhibiting Mesenchymal-to-Epithelial Transition. Mol Cell Biol. 2018 Apr 30;38(10).

Poppe M, Wittig S, Jurida L, Bartkuhn M, Wilhelm J, Müller H, Beuerlein K, Karl N, Bhujju S, Ziebuhr J, Schmitz ML, Kracht M. The NF- κ B-dependent and -independent transcriptome and chromatin landscapes of human coronavirus 229E-infected cells. PLoS Pathog. 2017 Mar 29;13(3):e1006286.

Pradeepa MM, Grimes GR, Kumar Y, Olley G, Taylor GC, Schneider R, Bickmore WA. Histone H3 globular domain acetylation identifies a new class of enhancers. Nat Genet. 2016 Jun;48(6):681-6.

Quinlan AR, Hall IM. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. Bioinformatics. 2010 Mar 15;26(6):841-2.

Raj A, Peskin CS, Tranchina D, Vargas DY, Tyagi S. Stochastic mRNA synthesis in mammalian cells. PLoS Biol. 2006 Oct;4(10):e309.

Ramirez-Carrozzi VR, Braas D, Bhatt DM, Cheng CS, Hong C, Doty KR, Black JC, Hoffmann A, Carey M, Smale ST. A unifying model for the selective regulation of inducible transcription by CpG islands and nucleosome remodeling. Cell. 2009 Jul 10;138(1):114-28.

Ramírez F, Dündar F, Diehl S, Grüning BA, Manke T. deepTools: a flexible platform for exploring deep-sequencing data. Nucleic Acids Res. 2014 Jul;42(Web Server issue):W187-91.

Rao SS, Huntley MH, Durand NC, Stamenova EK, Bochkov ID, Robinson JT, Sanborn AL, Machol I, Omer AD, Lander ES, Aiden EL. A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. Cell. 2014 Dec 18;159(7):1665-80.

Richardson SJ, Horwitz MS. Is type 1 diabetes "going viral"? *Diabetes*. 2014 Jul;63(7):2203-5.

Rickels R, Herz HM, Sze CC, Cao K, Morgan MA, Collings CK, Gause M, Takahashi YH, Wang L, Rendleman EJ, Marshall SA, Krueger A, Bartom ET, Piunti A, Smith ER, Abshiru NA, Kelleher NL, Dorsett D, Shilatifard A. Histone H3K4 monomethylation catalyzed by Trr and mammalian COMPASS-like proteins at enhancers is dispensable for development and viability. *Nat Genet*. 2017 Nov;49(11):1647-1653.

Risca VI, Greenleaf WJ. Unraveling the 3D genome: genomics tools for multiscale exploration. *Trends Genet*. 2015 Jul;31(7):357-72.

Robertson G, Hirst M, Bainbridge M, Bilenky M, Zhao Y, Zeng T, Euskirchen G, Bernier B, Varhol R, Delaney A, Thiessen N, Griffith OL, He A, Marra M, Snyder M, Jones S. Genome-wide profiles of STAT1 DNA association using chromatin immunoprecipitation and massively parallel sequencing. *Nat Methods*. 2007 Aug;4(8):651-7.

Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol*. 2011 Jan;29(1):24-6.

Rowley MJ, Corces VG. Organizational principles of 3D genome architecture. *Nat Rev Genet*. 2018 Dec;19(12):789-800.

Rowley MJ, Nichols MH, Lyu X, Ando-Kuri M, Rivera ISM, Hermetz K, Wang P, Ruan Y, Corces VG. Evolutionarily Conserved Principles Predict 3D Chromatin Organization. *Mol Cell*. 2017 Sep 7;67(5):837-852.e7.

Royo JL, Maeso I, Irimia M, Gao F, Peter IS, Lopes CS, D'Aniello S, Casares F, Davidson EH, Garcia-Fernández J, Gómez-Skarmeta JL. Transphyletic conservation of developmental regulatory state in animal evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Aug 23;108(34):14186-91.

Sabari BR, Dall'Agnes A, Boija A, Klein IA, Coffey EL, Shrinivas K, Abraham BJ, Hannett NM, Zamudio AV, Manteiga JC, Li CH, Guo YE, Day DS, Schuijers J, Vasile E, Malik S, Hnisz D, Lee TI, Cisse II, Roeder RG, Sharp PA, Chakraborty AK, Young RA. Coactivator

condensation at super-enhancers links phase separation and gene control. *Science*. 2018 Jul 27;361(6400). pii: eaar3958.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988 Jan 29;239(4839):487-91.

Sato M, Hata N, Asagiri M, Nakaya T, Taniguchi T, Tanaka N. Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. *FEBS Lett*. 1998 Dec 11;441(1):106-10.

Schöne S, Bothe M, Einfeldt E, Borschiwer M, Benner P, Vingron M, Thomas-Chollier M, Meijsing SH. Synthetic STARR-seq reveals how DNA shape and sequence modulate transcriptional output and noise. *PLoS Genet*. 2018 Nov 14;14(11):e1007793.

Schwarzer W, Abdennur N, Goloborodko A, Pekowska A, Fudenberg G, Loe-Mie Y, Fonseca NA, Huber W, Haering CH, Mirny L, Spitz F. Two independent modes of chromatin organization revealed by cohesin removal. *Nature*. 2017 Nov 2;551(7678):51-56.

Shlyueva D, Stampfel G, Stark A. Transcriptional enhancers: from properties to genome-wide predictions. *Nat Rev Genet*. 2014 Apr;15(4):272-86.

Shin HY. Targeting Super-Enhancers for Disease Treatment and Diagnosis. *Mol Cells*. 2018 Jun;41(6):506-514.

Shin HY, Willi M, HyunYoo K, Zeng X, Wang C, Metser G, Hennighausen L. Hierarchy within the mammary STAT5-driven Wap super-enhancer. *Nat Genet*. 2016 Aug;48(8):904-911.

Srivastava S, Avvaru AK, Sowpati DT, Mishra RK. Patterns of microsatellite distribution across eukaryotic genomes. *BMC Genomics*. 2019 Feb 22;20(1):153.

Simon, JM., Giresi, PG., Davis, II., and Lieb, JD. (2012). Using formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements (FAIRE) to isolate active regulatory DNA. *Nat Protoc*.7(2):256-67.

Smemo S, Tena JJ, Kim KH, Gamazon ER, Sakabe NJ, Gómez-Marín C, Aneas I, Credidio FL, Sobreira DR, Wasserman NF, Lee JH, Puviindran V, Tam D, Shen M, Son JE, Vakili NA, Sung

HK, Naranjo S, Acemel RD, Manzanares M, Nagy A, Cox NJ, Hui CC, Gomez-Skarmeta JL, Nóbrega MA. Obesity-associated variants within FTO form long-range functional connections with IRX3. *Nature*. 2014 Mar 20;507(7492):371-5.

Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet*. 2013 Mar;14(3):204-20.

Smith RP, Taher L, Patwardhan RP, Kim MJ, Inoue F, Shendure J, Ovcharenko I, Ahituv N. Massively parallel decoding of mammalian regulatory sequences supports a flexible organizational model. *Nat Genet*. 2013 Sep;45(9):1021-1028.

Song L, Zhang Z, Grasfeder LL, Boyle AP, Giresi PG, Lee BK, Sheffield NC, Gräf S, Huss M, Keefe D, Liu Z, London D, McDaniell RM, Shibata Y, Showers KA, Simon JM, Vales T, Wang T, Winter D, Zhang Z, Clarke ND, Birney E, Iyer VR, Crawford GE, Lieb JD, Furey TS. Open chromatin defined by DNaseI and FAIRE identifies regulatory elements that shape cell-type identity. *Genome Res*. 2011 Oct;21(10):1757-67.

Stampfel G, Kazmar T, Frank O, Wienerroither S, Reiter F, Stark A. Transcriptional regulators form diverse groups with context-dependent regulatory functions. *Nature*. 2015 Dec 3;528(7580):147-51.

Stevens TJ, Lando D, Basu S, Atkinson LP, Cao Y, Lee SF, Leeb M, Wohlfahrt KJ, Boucher W, O'Shaughnessy-Kirwan A, Cramard J, Faure AJ, Ralser M, Blanco E, Morey L, Sansó M, Palayret MGS, Lehner B, Di Croce L, Wutz A, Hendrich B, Klenerman D, Laue ED. 3D structures of individual mammalian genomes studied by single-cell Hi-C. *Nature*. 2017 Apr 6;544(7648):59-64.

Stratagene, 2007. *Introduction to Quantitative PCR: Methods and Applications Guide*. Stratagene, pp 4-7, 9-10, 21-22, 26-27, 29, 35-36.

Tamura T, Yanai H, Savitsky D, Taniguchi T. The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu Rev Immunol*. 2008; 26:535-84.

Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:623-55.

Tantale K, Mueller F, Kozulic-Pirher A, Lesne A, Victor JM, Robert MC, Capozzi S, Chouaib R, Bäcker V, Mateos-Langerak J, Darzacq X, Zimmer C, Basyuk E, Bertrand E. A single-

molecule view of transcription reveals convoys of RNA polymerases and multi-scale bursting. *Nat Commun.* 2016 Jul 27;7:12248.

Thakore PI, D'Ippolito AM, Song L, Safi A, Shivakumar NK, Kabadi AM, Reddy TE, Crawford GE, Gersbach CA. Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements. *Nat Methods.* 2015 Dec;12(12):1143-9.

Thanos D, Maniatis T. Virus induction of human IFN beta gene expression requires the assembly of an enhanceosome. *Cell.* 1995 Dec 29;83(7):1091-100.

Tong AJ, Liu X, Thomas BJ, Lissner MM, Baker MR, Senagolage MD, Allred AL, Barish GD, Smale ST. A Stringent Systems Approach Uncovers Gene-Specific Mechanisms Regulating Inflammation. *Cell.* 2016 Mar 24;165(1):165-179.

Vanhille L, Griffon A, Maqbool MA, Zacarias-Cabeza J, Dao LT, Fernandez N, Ballester B, Andrau JC, Spicuglia S. High-throughput and quantitative assessment of enhancer activity in mammals by CapSTARR-seq. *Nat Commun.* 2015 Apr 15;6:6905.

Vaquerizas JM, Kummerfeld SK, Teichmann SA, Luscombe NM. A census of human transcription factors: function, expression and evolution. *Nat Rev Genet.* 2009 Apr;10(4):252-63.

Vockley CM, D'Ippolito AM, McDowell IC, Majoros WH, Safi A, Song L, Crawford GE, Reddy TE. Direct GR Binding Sites Potentiate Clusters of TF Binding across the Human Genome. *Cell.* 2016 Aug 25;166(5):1269-1281.e19.

Wang X, He L, Goggin SM, Saadat A, Wang L, Sinnott-Armstrong N, Claussnitzer M, Kellis M. High-resolution genome-wide functional dissection of transcriptional regulatory regions and nucleotides in human. *Nat Commun.* 2018 Dec 19;9(1):5380.

Weintraub AS, Li CH, Zamudio AV, Sigova AA, Hannett NM, Day DS, Abraham BJ, Cohen MA, Nabet B, Buckley DL, Guo YE, Hnisz D, Jaenisch R, Bradner JE, Gray NS, Young RA. YY1 Is a Structural Regulator of Enhancer-Promoter Loops. *Cell.* 2017 Dec 14;171(7):1573-1588.e28.

Whyte WA, Orlando DA, Hnisz D, Abraham BJ, Lin CY, Kagey MH, Rahl PB, Lee TI, Young RA. Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell*. 2013 Apr 11;153(2):307-19.

Yáñez-Cuna JO, Dinh HQ, Kvon EZ, Shlyueva D, Stark A. Uncovering cis-regulatory sequence requirements for context-specific transcription factor binding. *Genome Res*. 2012 Oct;22(10):2018-30.

Yáñez-Cuna JO, Arnold CD, Stampfel G, Boryn LM, Gerlach D, Rath M, Stark A. Dissection of thousands of cell type-specific enhancers identifies dinucleotide repeat motifs as general enhancer features. *Genome Res*. 2014 Jul;24(7):1147-56.

Zabidi MA, Arnold CD, Schernhuber K, Pagani M, Rath M, Frank O, Stark A. Enhancer-core-promoter specificity separates developmental and housekeeping gene regulation. *Nature*. 2015 Feb 26;518(7540):556-9.

Zaret KS, Carroll JS. Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression. *Genes Dev*. 2011 Nov 1;25(21):2227-41.

Zhao B, Barrera LA, Ersing I, Willox B, Schmidt SC, Greenfeld H, Zhou H, Mollo SB, Shi TT, Takasaki K, Jiang S, Cahir-McFarland E, Kellis M, Bulyk ML, Kieff E, Gewurz BE. The NF- κ B genomic landscape in lymphoblastoid B cells. *Cell Rep*. 2014 Sep 11;8(5):1595-606.

Zheng H, Xie W. The role of 3D genome organization in development and cell differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019 Sep;20(9):535-550.

Zhou HY, Katsman Y, Dhaliwal NK, Davidson S, Macpherson NN, Sakthidevi M, Collura F, Mitchell JA. A Sox2 distal enhancer cluster regulates embryonic stem cell differentiation potential. *Genes Dev*. 2014 Dec 15;28(24):2699-711.

Παράρτημα: Παρουσιάζονται χαρακτηριστικοί έλεγχοι ποιότητας για τα δείγματα που έχουν υποστεί αλληλούχιση ευρείας κλίμακας.

Sample	Sequencing reads	Mapped reads (%)	Uniquely mapped reads (%)	Duplicate reads (%)	FRIP score	Mean fold enrichment compared to random read distribution
H3K27ac 0h replicate1 Namalwa	4308363	4212751 (97.78)	3397040 (78.85)	531544 (12.6)	0.397	54.38
H3K27ac 3h replicate1 Namalwa	4697444	4599436 (97.91)	3792744 (80.74)	743691 (16.1)	0.464	60.25
H3K27ac 6h replicate1 Namalwa	5327588	5120778 (96.11)	4110496 (77.15)	787909 (15.3)	0.257	51.4
H3K27ac 0h replicate2 Namalwa	109192157	102786908 (94.13)	61611256 (56.42)	78623738 (76.4)	0.34	15.45
H3K27ac 3h replicate2 Namalwa	138347281	130599438 (94.39)	82047619 (59.31)	103082827 (78.9)	0.319	15.19
H3K27ac 6h replicate2 Namalwa	99022385	92997245 (93.91)	58000618 (58.57)	70672043 (75.9)	0.324	16.2
H3K27ac 0h replicate3 Namalwa	32425929	31825460 (98.14)	25801226 (79.57)	4224577 (13.2)	0.428	33.7
H3K27ac 3h replicate3 Namalwa	32300501	31502149 (97.52)	25175907 (77.94)	8379914 (26.6)	0.475	49.47
H3K27ac 6h replicate3 Namalwa	28645639	28070641 (97.99)	22841321 (79.74)	6429073 (22.9)	0.565	56.5
H3K27ac 0h relicate1 HeLa	94674017	93041957 (98.27)	81679371 (86.27)	30506146 (32.7)	0.331	22.06
H3K27ac 3h relicate1 HeLa	70250644	68890370 (98.06)	61276142 (87.23)	31183251 (45.2)	0.519	34.2
H3K27ac 6h relicate1 HeLa	67752996	66529676 (98.19)	56797085 (83.83)	20279721 (30.4)	0.461	30.73
H3K27ac 0h relicate2 HeLa	40136506	39297039 (97.90)	33855657 (84.35)	7795773 (19.8)	0.459	35.3
H3K27ac 3h relicate2 HeLa	45833095	44563419 (97.22)	37082600 (80.91)	13802189 (30.9)	0.356	35.6
H3K27ac 6h relicate2 HeLa	47587202	46587935 (97.90)	38965245 (81.88)	5132881 (11.0)	0.273	19.5
H3K4me3 0h HeLa	19215638	18367927 (95.55)	16011725 (83.33)	6076302 (33.0)	0.553	65.83
H3K4me3 3h HeLa	25396037	22925966 (90.27)	19916483 (78.42)	6195096 (27.0)	0.561	60.32
H3K4me3 6h HeLa	44355077	41267785 (93.03)	35549132 (80.15)	16417137 (39.7)	0.494	55.5
H3K4me3 0h Namalwa	19998947	16131178 (80.66)	13895162 (69.48)	4943517 (30.6)	0.55	72.36
H3K4me3 3h Namalwa	19824957	18871613 (95.19)	16450802 (82.98)	5977033 (31.6)	0.593	80.13

H3K4me3 6h Namalwa	13973977	9215899 (65.95)	8015112 (57.36)	2095242 (22.7)	0.596	86.37
H3K4me1 0h HeLa	20661771	19948863 (96.54)	16591951 (80.30)	6194286 (31.0)	0.12	17.91
H3K4me1 3h HeLa	25568908	22201651 (86.83)	18331371 (71.69)	7464768 (33.6)	0.102	18.21
H3K4me1 6h HeLa	15413867	14658840 (95.10)	12083556 (78.39)	5426746 (37.0)	0.058	20.71
H3K4me1 0h Namalwa	18934379	17842016 (94.23)	14344032 (75.76)	12200320 (68.5)	0.048	12.97
H3K4me1 3h Namalwa	13502962	10747352 (79.59)	8682752 (64.30)	1964365 (18.2)	0.094	24.1
H3K4me1 6h Namalwa	21545495	19200966 (89.11)	15575363 (72.29)	5042103 (2.2)	0.145	20.13
Stat2 0h Namalwa	65460000	63573573 (97.11)	50254379 (76.77)	19370156 (30.4)	0.005	16.12
Stat2 3h Namalwa	77358477	74893042 (96.81)	60016050 (77.58)	22613786 (30.1)	0.023	9.58
Stat2 6h Namalwa	64025202	62170778 (97.10)	49266100 (76.95)	17724603 (28.5)	0.016	10.66
Rad21 0h Namalwa	61058687	59786624 (97.91)	48148180 (78.86)	12974369 (21.7)	0.098	14.2
Rad21 3h Namalwa	69204420	67396041 (97.38)	53477715 (77.27)	16680251 (24.7)	0.074	13.45
Rad21 6h Namalwa	85979713	82644599 (96.12)	66767465 (77.65)	34534295 (41.7)	0.131	17.23
Med1 0h replicate1 HeLa	59467067	57869762 (97.31)	46435516 (78.09)	12337511 (21.3)	0.068	9.71
Med1 3h replicate1 HeLa	56777956	54545830 (96.06)	42420983 (74.71)	7913533 (14.5)	0.046	9.2
Med1 6h replicate1 HeLa	59190453	56531116 (95.50)	43437475 (73.39)	14567691 (25.7)	0.095	12.09
Med1 0h replicate2 HeLa	35579898	33933525 (95.37)	25297454 (71.10)	12348538 (36.3)	0.049	17.5
Med1 3h replicate2 HeLa	30303360	27348998 (90.25)	21338755 (70.42)	13330783 (48.7)	0.079	24.68
Med1 6h replicate2 HeLa	33879933	309282214 (91.28)	21164680 (62.47)	13865098 (44.8)	0.018	15
Med1 0h Namalwa	62802073	58074221 (92.46)	39854599 (63.46)	34456167 (59.3)	0.178	24.72
Med1 3h Namalwa	55126836	46534701 (84.41)	31770254 (57.63)	31693633 (68.1)	0.172	21.77
Med1 6h Namalwa	65966125	58327603 (88.42)	41080042 (62.27)	28842267 (49.4)	0.097	21.08
POLII 0h HeLa	83680675	8204591 (98.02)	68060582 (81.33)	33775552 (41.1)	0.212	24.09
POLII 3h HeLa	78648397	76911455 (0.977)	62648563 (79.66)	18137484 (23.5)	0.09	17.24

POLII 6h HeLa	83521580	80684404 (96.60)	6617644 1(79.23)	29590344 (36.6)	0.159	22.08
POLII 0h Namalwa	182062976	177516653 (97.50)	139408499 (76.57)	77440777 (43.6)	0.093	18.23
POLII 3h Namalwa	146651314	140324184 (95.68)	110042717 (75.04)	67747005 (48.2)	0.103	19.8
POLII 6h Namalwa	88962618	86047957 (96.72)	69421711 (78.03)	45567451 (52.9)	0.132	23.57
CBP 0h HeLa	34756086	34160988 (98.28)	27394993 (78.82)	1974654 (5.7)	0.005	16.66
CBP 3h HeLa	33064445	31356657 (94.83)	25223506 (76.29)	1836394 (5.8)	0.004	16
CBP 6h HeLa	31422825	29254820 (93.10)	23495958 (74.77)	1898040 (6.4)	0.005	17.24
CBP 0h Namalwa	34309108	33548721 (97.78)	25142392 (73.28)	2977573 (8.8)	0.013	14.28
CBP 3h Namalwa	31650498	23407778 (73.95)	18007395 (56.89)	1290814 (5.5)	0.003	23.07
CBP 6h Namalwa	33190928	23223754 (69.97)	17656190 (53.20)	1906926 (8.2)	0.006	22.22
IRF3 0h replicate1 HeLa	35625347	34929026 (98.04)	27629605 (77.56)	2885389 (8.2)	0.0022	18.33
IRF3 3h replicate 1 HeLa	35943789	33822042 (94.09)	26986156 (75.08)	2165791 (6.4)	0.065	13
IRF3 6h replicate 1 HeLa	33304464	30790719 (92.45)	24725012 (74.24)	1808289 (5.8)	0.065	13.82
IRF3 0h replicate 2 HeLa	26508608	25310347 (95.47)	19094049 (72.03)	4706063 (18.5)	0.051	12.43
IRF3 3h replicate 2 HeLa	26410142	24513683 (92.81)	18100541 (68.54)	5614373 (22.9)	0.092	13.52
IRF3 6h replicate 2 HeLa	26542587	24055316 (90.62)	17180263 (64.73)	10776610 (44.8)	0.109	10.9
IRF3 0h Namalwa	33947723	33105858 (97.52)	27463559 (80.90)	4969131 (15.0)	0.058	14.5
IRF3 3h Namalwa	45570729	43264862(94.94)	34375093(75.43)	6185089 (14.4)	0.031	12.91
IRF3 6h Namalwa	29865593	28861578 (96.63)	22686898 (75.96)	3894607 (13.4)	0.026	18.57
IRF3 0h NIH3T3	29189870	27897935 (95.57)	21644910 (74.15)	5663445 (20.3)	0.00033	33.33
IRF3 6h NIH3T3	33055085	31874672 (96.42)	24886246 (75.29)	7290756 (22.8)	0.035	21.87
p65 0h Namalwa	5216022	4993569 (95.73)	3741822 (71.74)	4611256 (92.3)	0.0044	89.79
p65 3h Namalwa	5840084	5638303 (96.54)	4254351 (72.85)	594009 (10.5)	0.0042	11.66
p65 6h Namalwa	4933806	4695263 (95.16)	3561143 (72.18)	602531 (12.8)	0.038	16.52
p65 0h HeLa	36995428	36420895 (98.44)	28429427 (76.85)	2487522 (6.8)	0.011	11
p65 3h HeLa	33500459	32667924 (97.51)	25825465 (77.09)	1827313 (5.5)	0.035	11.29

p65 6h HeLa	30905853	29904522 (96.76)	23861897 (77.21)	1641365 (5.4)	0.036	12
DNaseI 0h HeLa	41314595	40364311 (97.69)	29787822 (72.10)	10694947 (26.5)	0.315	22.5
DNaseI 3h HeLa	50137041	48556672 (96.84)	34852874 (69.52)	16737076 (34.4)	0.208	18.4
DNaseI 6h HeLa	47046911	46237860 (98.28)	34209830 (72.71)	12211753 (26.4)	0.296	19.73
DNaseI 0h Namalwa	44437533	42277885 (95.14)	31643998 (71.21)	8516217 (20.1)	0.216	18.78
DNaseI 3h Namalwa	49822263	47216172 (94.76)	35048477 (70.35)	11984185 (25.3)	0.226	18.67
DNaseI 6h Namalwa	37946447	35444011 (93.40)	26621531 (70.16)	7745162 (21.8)	0.278	18.41
FAIRE-seq 0h HeLa	31531201	30742276 (97.49)	20641315 (65.46)	2462995 (8.0)	0.039	11.47
FAIRE-seq 3h HeLa	34013386	33004345 (97.03)	22003714 (64.69)	2693818 (8.1)	0.042	11.05
FAIRE-seq 6h HeLa	32288464	31113342 (96.36)	20715985 (64.16)	2779984 (8.9)	0.058	12.34
FAIRE-seq 0h Namalwa	32755684	32253594 (98.46)	20938077 (63.92)	2791902 (8.6)	0.09	13.63
FAIRE-seq 3h Namalwa	29031218	28099685 (96.79)	18318409 (63.10)	1915027 (6.8)	0.07	12.5
FAIRE-seq 6h Namalwa	30827555	29720435 (96.40)	17801710 (57.75)	3764499 (12.6)	0.157	15.7
IRF3-STARR 0h replicate1 HeLa	39279200	37712831 (96.01)	3040432 (77.57)	34349200 (91.0)	N/A	N/A
IRF3-STARR 6h replicate1 HeLa	35848790	34232368 (95.49)	27508845 (76.74)	31097415 (90.8)	N/A	N/A
IRF3-STARR 0h replicate2 HeLa	45409745	43621922 (96.06)	35271669 (77.67)	39220862 (89.9)	N/A	N/A
IRF3-STARR 6h replicate2 HeLa	51696395	49479763 (95.71)	39845839 (77.08)	44329906(89.5)	N/A	N/A
p65-STARR 0h replicate1 HeLa	20258207	19826498 (97.86)	16018445 (79.07)	15533048 (78.3)	N/A	N/A
p65-STARR 6h replicate1 HeLa	20766640	20321046 (97.85)	16402311 (78.98)	16013651 (78.8)	N/A	N/A
p65-STARR 0h replicate2 HeLa	21857931	21421900 (98.00)	17434801 (79.76)	17702030 (82.6)	N/A	N/A
p65-STARR 6h replicate2 HeLa	24899295	24422215 (98.08)	19837303 (79.67)	21358165 (87.4)	N/A	N/A
RNA-seq 0h replicate1 HeLa	16801209	15731581 (93.63)	14221003 (84.64)	9522717 (50.0)	N/A	N/A
RNA-seq 3h replicate1 HeLa	16049763	15028268 (93.63)	13643538 (85.00)	8946501 (49.5)	N/A	N/A
RNA-seq 6h replicate1 HeLa	26542504	24910939 (93.85)	19429474 (73.20)	21888962 (65.2)	N/A	N/A

RNA-seq 0h replicate2 HeLa	28410928	26644902 (93.78)	24118422 (84.89)	18062228 (56.2)	N/A	N/A
RNA-seq 3h replicate2 HeLa	15393517	14432519 (93.75)	13015946 (84.55)	8874761 (50.5)	N/A	N/A
RNA-seq 6h replicate2 HeLa	15322019	14286439 (93.24)	12830600 (83.73)	9333502 (53.2)	N/A	N/A
RNA-seq 0h replicate1 Namalwa	17356844	15926893 (91.76)	14084882 (81.14)	10002061 (49.8)	N/A	N/A
RNA-seq 3h replicate1 Namalwa	23205645	21325885 (91.89)	18757866 (80.83)	15202294 (56.1)	N/A	N/A
RNA-seq 6h replicate1 Namalwa	17791079	16423221 (92.31)	14511409 (81.56)	10548565 (50.7)	N/A	N/A
RNA-seq 0h replicate2 Namalwa	16163537	14804077 (91.58)	12942585 (80.07)	9825289 (52.2)	N/A	N/A
RNA-seq 3h replicate2 Namalwa	23205645	21325885 (91.89)	18757866 (80.83)	15202294 (56.1)	N/A	N/A
RNA-seq 6h replicate2 Namalwa	18426831	16961256 (92.04)	15005662 (81.43)	11242811 (52.5)	N/A	N/A

Original article

Increased *BCL2L12* expression predicts the short-term relapse of patients with TaT1 bladder cancer following transurethral resection of bladder tumors

Spyros Foutadakis, M.Sc.^a, Margaritis Avgeris, M.Sc.^a, Theodoros Tokas, M.D.^b,
Konstantinos Stravodimos, M.D., Ph.D.^b, Andreas Scorilas, Ph.D.^{a,*}

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Athens, Athens, Greece

^b First Department of Urology, "Laiko" General Hospital, Medical School, University of Athens, Athens, Greece

Received 8 January 2013; received in revised form 15 April 2013; accepted 15 April 2013

Abstract

Objectives: More than half of the diagnosed patients with bladder cancer (BCa) recur at least once following their initial treatment. Thus, patients' monitoring and prognosis is of utmost importance. However, the need for intensive surveillance of BCa significantly burdens patients' health-related quality of life. The aim of the present study is the expression analysis of *BCL2L12*, a recently identified member of the *BCL2* apoptosis-related gene family, in BCa and the evaluation of *BCL2L12* prognostic significance for the survival outcome of the patients.

Methods and materials: Our study included 115 patients with BCa, and tissue specimens were obtained from the tumor area as well as from adjacent normal bladder wall. *BCL2L12* expression was determined using quantitative real-time polymerase chain reaction assay, and was further correlated with patients' clinicopathological features and follow-up survival data.

Results: Up-regulated *BCL2L12* expression levels were detected in malignant bladder specimens compared with normal ones. The higher *BCL2L12* expression was further associated with shorter disease-free survival of the patients with BCa. Focusing on patients with TaT1 non-muscle invasive BCa, *BCL2L12* expression levels were correlated with higher recurrence rate at the first follow-up cystoscopy and were unveiled to be an independent unfavorable predictor of patients' short-term recurrence following transurethral resection. Finally, *BCL2L12* expression levels were also associated with poor disease-free survival of the high-grade TaT1 patients.

Conclusions: Our data highlight the unfavorable prognostic value of *BCL2L12* for patients with BCa and support its potential clinical use for the assessment of TaT1 patients' recurrence risk. © 2013 Published by Elsevier Inc.

Keywords: Bladder cancer; Bladder cancer relapse; Bladder cancer recurrence; TaT1 bladder cancer; Non-muscle invasive bladder cancer; High-grade TaT1 bladder tumors

1. Introduction

Bladder cancer (BCa) represents the fourth most common malignancy among men in the Western world and the second most frequently diagnosed urologic tumor, following that of prostate [1]. The majority of bladder tumors arising from the epithelial lining of bladder mucosa, referred as urothelial carcinomas [2]. Urothelial carcinomas comprise more than 90% of malignant bladder tumors and are clinically classified and managed according to their invasion

into the bladder wall. Approximately 70% to 80% of patients are diagnosed with non-muscle invasive (Ta, Tis, and T1 tumors) BCa (NMIBC), whereas the remaining 20% to 30% suffer from muscle-invasive (T2–T4 tumors) BCa (MIBC) [3].

Bladder tumors display a high recurrence propensity. However, the main tools available to clinicians for the detection and monitoring of patients with BCa, namely cystoscopy with bladder wall biopsy and urine cytology [4,5], have their inherent limitations. Repeated cystoscopies and bladder biopsies burdens patients' health-related quality of life, whereas cytology has low sensitivity for low-grade tumors and displays false-positive results in benign lesions, like infections and bladder lithiasis. Moreover, the

* Corresponding author. Tel.: +30-210-727-4306; fax: +30-210-727-4158.

E-mail address: ascorilas@biol.uoa.gr (A. Scorilas).

underlying molecular heterogeneity of bladder tumors, even between patients with similar clinicopathological characteristics and risk assessment, reduces their accuracy [6,7]. Among the biomarkers studied so far, high Ki-67 levels [8] and *TP53* mutations [9] are associated with an increased possibility of tumor recurrence, whereas mutations in *FGFR3* indicate a low risk of progression [10]. Nevertheless, these biomarkers need to be validated in larger studies before entering the clinical practice [3]. Thus, it is imperative to continue the efforts to identify novel biomarkers suitable for the early risk assessment and the accurate prognosis of the patients.

BCL2-like-12 (proline-rich) gene (*BCL2L12*), cloned by Scorilas et al. [11], is a newly discovered member of the *BCL2* family. *BCL2L12* is expressed in diverse tissues such as the breast, prostate, thymus, colon, placenta, and kidney, and encodes the BCL2L12 protein (334aa), which contains a BH-2 and a putative BH-3 domain. Moreover, our group have identified and cloned the majority of the 13 reported alternatively spliced variants of *BCL2L12* [11,12]. The potential use of *BCL2L12* as a tumor biomarker has already been highlighted in colon [13,14], breast [15,16], gastric [17], head and neck squamous cell carcinoma [18], and in nasopharyngeal carcinoma [19], as well as in hematological malignancies, including chronic lymphocytic leukemia [20] and acute myeloid leukemia [21].

This is the first study of *BCL2L12* clinical significance for BCa, trying to unravel its expression profile in bladder malignancy and to evaluate its ability to support the accurate prognosis and the beneficial risk stratification of the patients.

2. Materials and methods

2.1. Study population and bladder tissue specimens

Bladder tissue specimens from the tumor core were obtained from 115 patients with BCa having undergone transurethral resection of bladder tumors (TURBT) for primary NMIBC or radical cystectomy for primary MIBC, at “Laikon” General Hospital, Athens, Greece (Table 1). Additionally, 95 normal adjacent tissue specimens, from the same patients' cohort, were included in the study as reference samples, following the pathologist's evaluation for the absence of carcinoma in situ and dysplasia. All patients were diagnosed with urothelial carcinoma based on histopathological criteria and none of them had received therapy prior to surgery. Following the pathologist's evaluation of the tissue mirror-image specimen, samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further processing.

Following treatment, TURBT-treated NMIBC patients underwent adjuvant therapy according to the European Association of Urology guidelines for TaT1 bladder tumors, whereas radical cystectomy-treated MIBC patients did not receive neoadjuvant or adjuvant treatment. For the evaluation of the *BCL2L12* prognostic significance for outcome

Table 1
Bladder cancer patients' cohort

Variable	BCa patients (%)
Grade (WHO 1973)	
1	14 (12.2)
2	47 (40.9)
3	54 (47.0)
Grade (WHO 2004)	
Low	51 (44.3)
High	64 (55.7)
Muscle-invasion	
NMIBC (Ta, T1)	79 (68.7)
MIBC (T2, T3, and T4)	36 (31.3)
Disease stage	
Ta	43 (37.4)
T1	36 (31.3)
T2	18 (15.7)
T3	10 (8.7)
T4	8 (7.0)
Gender	
Male	108 (93.9)
Female	7 (6.1)

following treatment of patients with BCa, 97 patients with BCa were successfully followed up and included in the survival analysis, whereas 18 patients were excluded from the monitoring plan owing to insufficient and unclear monitoring data. Cystoscopy and urinary cytology took place, according to the European Association of Urology guidelines for NMIBC, for the follow-up of TaT1 patients and the detection of disease recurrence and progression. MIBC patients' follow-up included renal ultrasound at 3 months, thoracoabdominal computed tomography/magnetic resonance imaging every 6 months, and urinary cytology every 3 months. Bone scan or magnetic resonance imaging of the brain was only performed if symptoms are seen.

Our study was performed according to the ethical standards of the 1975 Declaration of Helsinki, as revised in 2008, and approved by the ethics committee of “Laiko” General Hospital. Informed consent was obtained from all the participating patients.

2.2. Tissue homogenization and total RNA extraction

Bladder tissue specimens (20–100 mg) were homogenized, and thereafter total RNA was extracted using TRI Reagent (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH) according to the manufacturer's instructions and stored at -80°C . RNA concentration and purity were determined spectrophotometrically at 260 and 280 nm, whereas RNA integrity was evaluated by agarose gel electrophoresis.

2.3. First-strand complementary DNA (cDNA) synthesis

Following RNA extraction, 1 μg of total RNA was reverse transcribed into first-strand cDNA using an oligo-dT primer.

The 20- μ l reaction mixture, containing 5- μ M oligo-dT primer, 50 U Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA), 10-U recombinant ribonuclease inhibitor and 0.5-mM dNTP mix (Invitrogen), was incubated at 37°C for 60 minutes, followed by an inactivation step of reverse transcriptase at 70°C for 15 minutes.

2.4. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR)

BCL2L12 mRNA levels were determined by a qPCR assay, using SYBR Green I fluorescent dye. Gene-specific primers were designed based on the published mRNA sequences for *HPRT1* (NM_000194.2) and *BCL2L12* (NM_138639.1). The combination of the *BCL2L12* forward 5'-CCCTCGGCCTTGCTCTCT-3' and reverse 5'-TCCGCAGTATGGCTTCCTTC-3' primers resulted in a 182 bp PCR product, whereas a 151-bp amplicon was produced by the *HPRT1* forward 5'-TGGAAAGGGTGTATTTCCTCAT-3' and reverse 5'-ATGTAATCCAGCAGGTCAGCAA-3' pair of primers.

The reactions were carried out in a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). The 10- μ l reaction volume consisted of 5- μ l KAPA SYBR FAST Universal qPCR Master Mix 2 \times (Kapa Biosystems, Inc., Woburn, MA), 50 nM or 75 nM of each *HPRT1* or *BCL2L12* primers, respectively, and 10-ng cDNA. Each reaction was performed in duplicate. The thermal protocol consisted of an initial polymerase activation step at 95°C for 3 minutes, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 seconds and primer annealing and extension at 60°C for 1 minute. After amplification, dissociation curves were generated to check the specificity of the reaction. The validation of our assay was performed by the generation of *BCL2L12* and *HPRT1* calibration curves using as template serial dilutions of a control cDNA.

The $2^{-\Delta\Delta Ct}$ relative quantification (RQ) method was applied for the quantification of *BCL2L12* expression levels. *HPRT1* was used as an endogenous reference gene for the normalization of *BCL2L12* expression, whereas the T24 bladder carcinoma cell line was served as our assay calibrator.

2.5. Statistical analysis

The nonparametric Wilcoxon signed-rank test was used to analyze the differences in *BCL2L12* expression profile between cancerous and normal bladder tissue samples. Receiver operating characteristic (ROC) curves were constructed to evaluate the ability to discriminate the malignant from the normal tissues, based on *BCL2L12* levels. The area under curve was analyzed using the Hanley and McNeil method. The nonparametric Mann-Whitney *U* and Kruskal-Wallis tests, where appropriate, were used for the assessment of any correlation between *BCL2L12* expression

levels and disease stage, grade (2004 WHO grading system), muscle-invasion, and their gender.

As there are no established cutoff points for *BCL2L12* expression in BCa, the X-tile algorithm was applied to obtain an optimal cutoff value of 6.07 RQ units, which corresponds to the 75th percentile of *BCL2L12* expression in cancerous tissues specimens. According to this cutoff, the examined tissues were classified into *BCL2L12*-positive (+) and *BCL2L12*-negative (–), which are characterized by higher or lower *BCL2L12* expression levels, respectively.

The univariate and multivariate Cox proportional hazards regression models were implemented to evaluate the prognostic significance of *BCL2L12* levels for the disease-free survival (DFS) of the 97 successfully followed up patient with BCa. The hazard ratio (HR) was calculated for *BCL2L12* expression, tumor grade, disease stage, and patients' gender. Moreover, Kaplan-Meier DFS curves, including the followed up patients, were generated by plotting the %DFS probability vs. the time interval following treatment and evaluated by the log-rank (Mantel-Cox) test.

3. Results

3.1. *BCL2L12* expression is increased in malignant bladder specimens

The analysis of *BCL2L12* mRNA levels in matched bladder tissue specimens ($n = 95$; Fig. 1A) revealed significantly up-regulated expression ($P = 0.0003$) in the malignant specimens (range: 0.14–15.77 RQ units; median: 3.70 RQ units) compared with the normal adjacent ones (range: 0.10–17.65 RQ units; median: 2.17 RQ units). Moreover, the ROC analysis (Fig. 1B) illustrated the ability of *BCL2L12* expression levels to discriminate the malignant from the normal bladder tissues (area under curve: 0.600; 95% confidence interval [CI]: 0.525–0.676; $P = 0.011$).

3.2. Association of *BCL2L12* expression levels with the clinicopathological features of patients with BCa

The study of clinicopathological features of patients with BCa did not reveal any significant association of *BCL2L12* expression levels with disease stage ($P = 0.494$), histological grade ($P = 0.356$), or muscle-invasion ($P = 0.795$), whereas a marginally significant ($P = 0.052$) expression increase was uncovered for the male patients relative to the female ones. The correlations values between *BCL2L12* expression, as bivariate, and the clinicopathological characteristics of the patients are presented in Table 2.

3.3. Increased *BCL2L12* expression predicts the unfavorable DFS of the patients with NMIBC

The significance of *BCL2L12* for the prognosis of patients with BCa following treatment was examined by

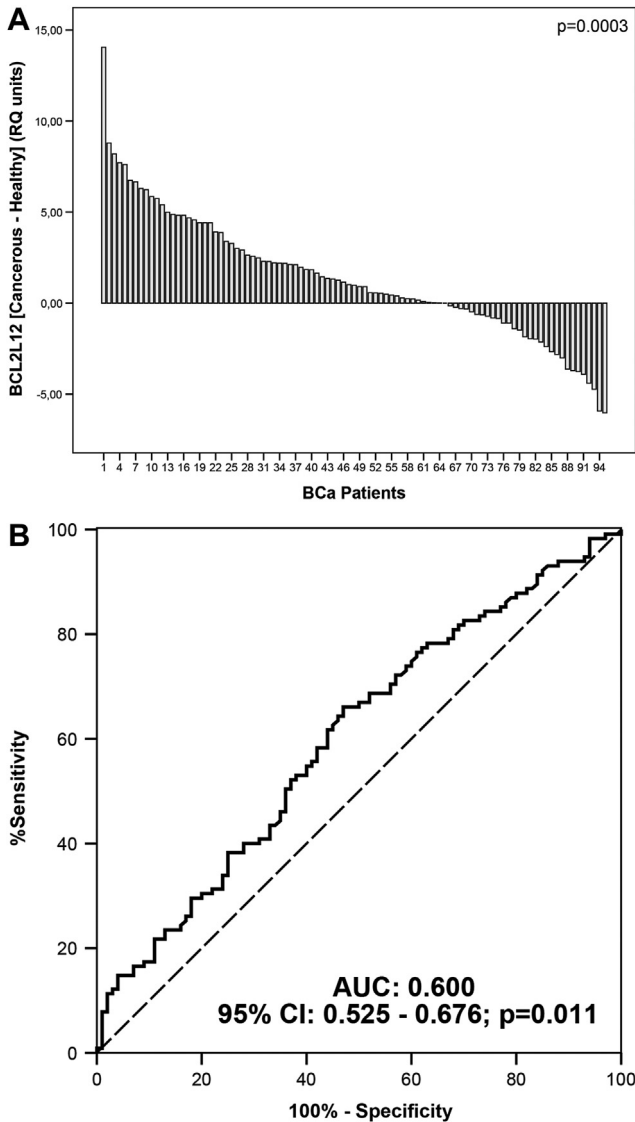


Fig. 1. Analysis of *BCL2L12* expression levels in malignant and normal adjacent bladder tissue specimens. (A) Bar graph of the difference in the *BCL2L12* expression levels between cancerous and normal adjacent tissue samples of the patients with BCa. The *P* value calculated by the “Wilcoxon signed-rank test.” (B) ROC curve of the *BCL2L12* expression. The area under curve (AUC) calculated by “Hanley and McNeil method.”

the Kaplan-Meier survival analysis (Figs. 2 and 3) and the Cox regression in the cohort of 97 successfully followed up patients (Table 3). A statistically significant reduction in DFS for the *BCL2L12* (+) patients (average-median DFS: 14.72–12.00 mo) compared with *BCL2L12* (–) ones (average-median DFS: 17.94–18.00 mo) was highlighted either by Kaplan-Meier curves ($P = 0.015$; Fig. 2A) or by Cox regression analysis (HR: 2.210; 95% CI: 1.121–4.356; $P = 0.022$). Moreover, multivariate Cox regression models revealed that *BCL2L12* expression (HR: 2.050; 95% CI: 1.009–4.163; $P = 0.047$) can predict patients' relapse independently from the grade, disease stage, and patients' gender, highlighting the unfavorable nature of *BCL2L12* expression for the DFS of patients with BCa.

Table 2

Correlation of *BCL2L12* expression profile with clinicopathological features of patients with BCa

Variable	No. of patients	No. of patients (%)		<i>P</i> value
		<i>BCL2L12</i> (–) ^a	<i>BCL2L12</i> (+) ^a	
Grade (WHO 1973)				
1	14	11 (78.6)	3 (21.4)	0.095 ^b
2	47	40 (85.1)	7 (14.9)	
3	54	36 (66.7)	18 (33.3)	
Grade (WHO 2004)				
Low	51	42 (82.4)	9 (17.6)	0.189 ^c
High	64	45 (70.3)	19 (29.7)	
Muscle-invasion				
NMIBC (Ta, T1)	79	62 (78.5)	17 (21.5)	0.351 ^c
MIBC (T2, T3, and T4)	36	25 (69.4)	11 (30.6)	
Stage				
Ta	43	36 (83.7)	7 (16.3)	
T1	36	26 (72.2)	10 (27.8)	0.417 ^b
T2	18	11 (61.1)	7 (38.9)	
T3	10	8 (80.0)	2 (20.0)	
T4	8	6 (75.0)	2 (25.0)	

^aCutoff = 6.07 RQ units, equal to the 75th percentile of the cancerous bladder tissues specimens' expression levels.

^bCalculated by the Pearson chi-square test.

^cCalculated by the Fisher Exact test.

As expected, disease stage confirmed to also be an independent indicator of poor outcome following treatment in patients with BCa.

Focusing on TaT1 patients, the Kaplan-Meier analysis (Fig. 2B) illustrated ($P = 0.011$) the poor DFS interval of the *BCL2L12* (+) patients (average-median DFS: 12.69–9.00 mo) compared with *BCL2L12* (–) cohort (average-median DFS: 18.39–18.50 mo). The higher risk for recurrence in patients with *BCL2L12* (+) NMIBC following TURBT was also revealed by the univariate Cox regression analysis (HR: 2.764; 95% CI: 1.175–6.504; $P = 0.020$). This unfavorable prognostic value of *BCL2L12* (+) was found to be independent from the invasion of subepithelial connective tissue (T1), tumor grade, and patients' gender, as indicated by the multivariate models (HR: 2.662; 95% CI: 1.080–6.559; $P = 0.033$). Although the presence of T1 tumors was found to enforce the risk for recurrence of patients with NMIBC (HR: 2.297; 95% CI: 1.004–5.257; $P = 0.049$) compared with Ta tumors, both disease stage and tumor grade lack statistical significance for the stratification of the TaT1 patients, according to their risk to relapse, in the multivariate Cox regression analysis models. These results clearly highlighted the ability of *BCL2L12* to indicate patients with NMIBC with high risk for relapse, independently from their pathological stage or grade. Focusing on MIBC, no differences in the DFS was indicated for the *BCL2L12* (+) and *BCL2L12* (–) patients, either by the Kaplan-Meier analysis ($P = 0.963$; Fig. 2C) or by the univariate Cox regression analysis (HR: 0.975; 95% CI: 0.318–2.987; $P = 0.965$).

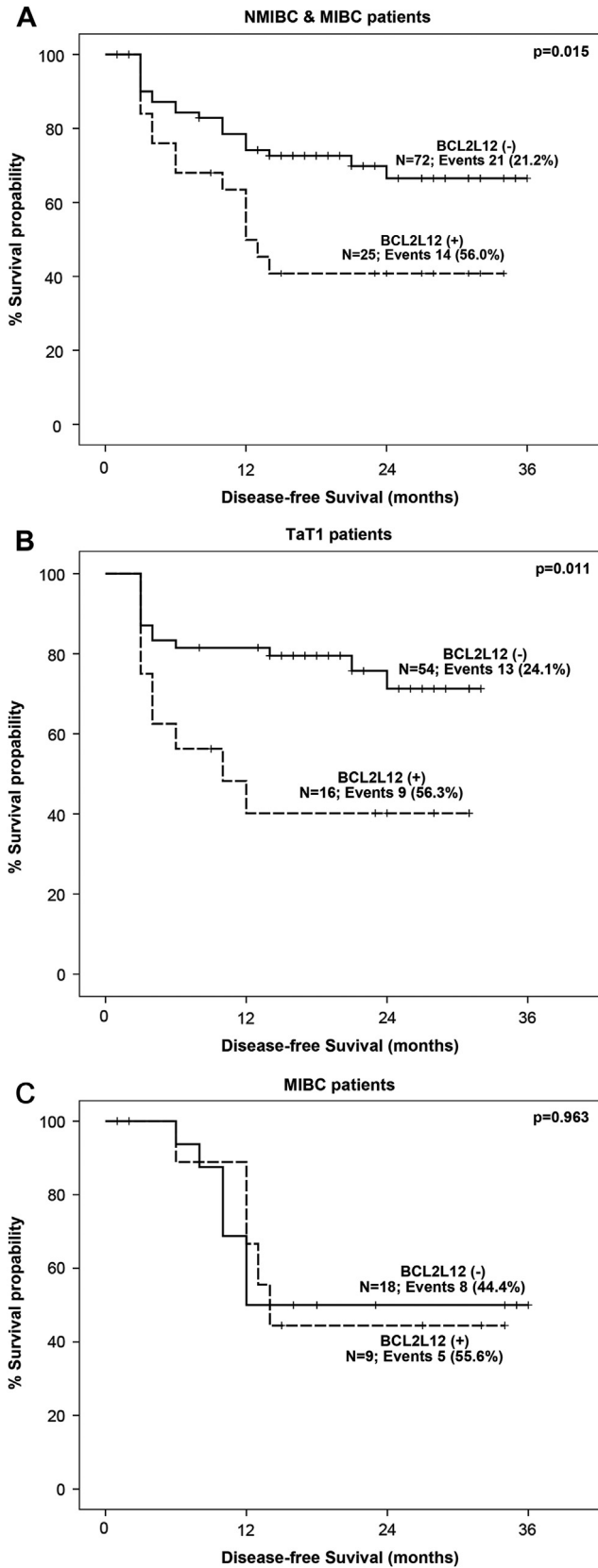


Fig. 2. Kaplan-Meier survival curves for the disease-free survival of patients with non-muscle invasive (TaT1) bladder cancer (NMIBC) and muscle-invasive (T2–T4) bladder cancer (MIBC) (A), TaT1 patients' cohort (B) and MIBC patients' cohort (C). The *P* value calculated by the “log-rank test.”

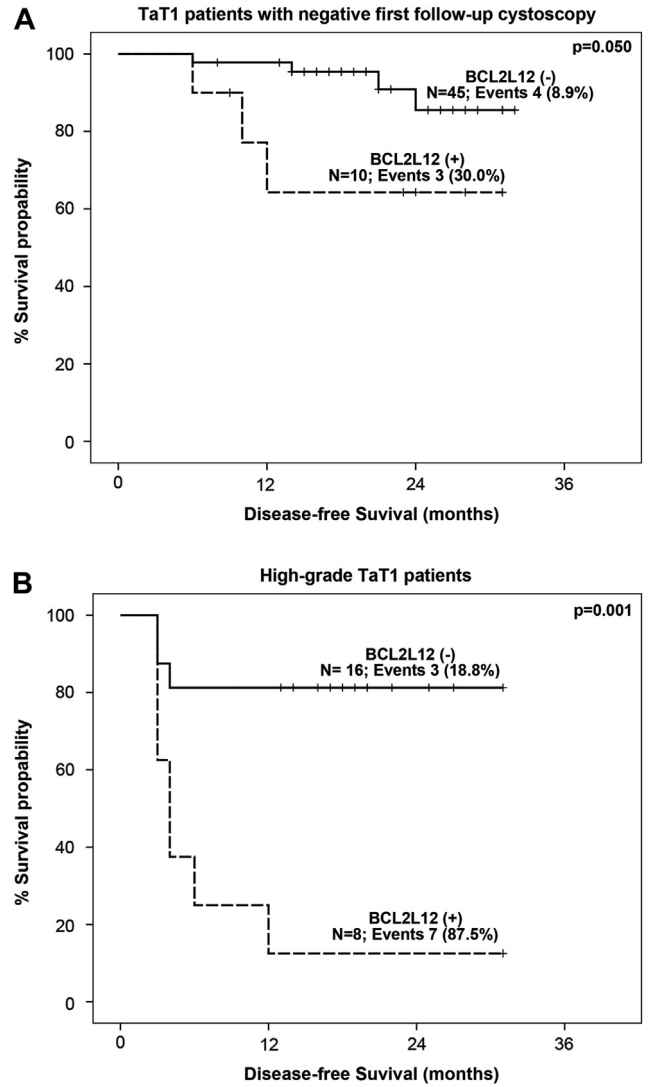


Fig. 3. Kaplan-Meier survival curves for the disease-free survival of TaT1 patients with negative first follow-up cystoscopy (A) and high-grade TaT1 patients (B). The *P* value calculated by the “log-rank test.”

3.4. *BCL2L12* expression correlates with higher recurrence rate at the first follow-up cystoscopy (RR-FFC)

Considering the enormous effect of the FFC for the DFS of the patients with NMIBC, we have further studied the correlation between *BCL2L12* expression and the RR-FFC. Recurrence was detected during the FFC in 6 of the 16 *BCL2L12* (+) TaT1 patients (RR-FFC: 37.5%), but in just 9 of 54 *BCL2L12* (-) patients (RR-FFC: 16.7%), confirming the unfavorable prognostic nature of *BCL2L12* for the NMIBC. Focusing on patients with negative FFC, *BCL2L12* expression was able to identify patients' group with higher risk for short-term relapse (Fig. 3A). More precisely, *BCL2L12* (+) patients were found to be at a higher risk for recurrence (average-median DFS: 18.30–17.50 mo) compared with the *BCL2L12* (-) ones (average-median DFS: 21.42–20.00 mo), as depicted by the respective Kaplan-Meier DFS curves (*P* = 0.050), highlighting, in this way, the

Table 3
Cox proportional regression analysis for the prediction of the relapse of patients with BCa

Covariant	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	HR	95% CI ^a	P value ^b	HR	95% CI ^a	P value ^b
NMIBC and MIBC patients						
<i>BCL2L12</i>						
Negative ^c	1.00			1.00		
Positive ^c	2.210	1.121–4.356	0.022	2.050	1.009–4.163	0.047
Stage	1.382	1.065–1.792	0.015	1.499	1.057–2.125	0.023
Grade	1.336	0.824–2.166	0.240	0.832	0.441–1.569	0.570
Gender						
Female	1.00			1.00		
Male	1.038	0.249–4.323	0.959	0.834	0.194–3.588	0.807
TaT1 patients						
<i>BCL2L12</i>						
Negative ^c	1.00			1.00		
Positive ^c	2.764	1.175–6.504	0.020	2.662	1.080–6.559	0.033
Stage	2.297	1.004–5.257	0.049	1.856	1.057–2.125	0.219
Grade	2.076	0.928–4.648	0.076	1.262	0.487–3.271	0.633
Gender						
Female	1.00			1.00		
Male	0.528	0.124–2.258	0.389	0.390	0.084–1.815	0.230
High-grade TaT1 patients						
<i>BCL2L12</i>						
Negative ^c	1.00			1.00		
Positive ^c	6.435	1.625–25.479	0.008	6.356	1.596–25.316	0.009
Stage	1.046	0.283–3.867	0.946	1.136	0.237–5.434	0.874

^aConfidence interval of the estimated HR.

^bTest for trend.

^cCutoff = 6.07 RQ units, equal to the 75th percentile of the cancerous bladder tissues specimens' expression levels.

independent, from the result of the FFC, unfavorable nature of *BCL2L12* expression levels for TaT1 patients.

3.5. *BCL2L12* expression correlates with short-term relapse of high-grade TaT1 patients

Taking advantage of the independent prognostic nature of *BCL2L12* for NMIBC patients and considering that among them high-grade tumors are of higher risk for short-term recurrence and progression, we evaluated the prognostic significance of *BCL2L12* expression for this particular cohort of patients. A significantly higher risk for short-term relapse was demonstrated for the *BCL2L12* (+) high-grade TaT1 patients (average-median DFS: 8.25–4.00 mo), compared with the *BCL2L12* (–) patients (average-median DFS: 16.63–17.50 mo), by the Kaplan-Meier survival analysis ($P = 0.001$; Fig. 3B). The univariate Cox proportional regression model pointed out the higher risk (HR: 6.435; 95% CI: 1.625–25.479; $P = 0.008$) for short-term recurrence of the *BCL2L12* (+) patients, which was revealed to be independent from the invasion of subepithelial connective tissue (T1), by the multivariate Cox

regression models (HR: 6.356; 95% CI: 1.596–25.316; $P = 0.009$). Moreover, Cox analysis clearly highlighted the weak clinical significance of the presence of T1 tumors for the prognosis of high-grade TaT1 patients. In the light of these findings, *BCL2L12* expression may be able to define TaT1 patients best suited for early aggressive surgical treatment independently from the presence of T1 tumors.

4. Discussion

Overcoming treatment, BCa displays a significantly high recurrence frequency. Consequently, the active surveillance of BCa affects patients' health-related quality of life [22,23]. The identification of novel markers to improve the stratification of the patients and to promote a more personalized monitoring plan is of first clinical priority.

Deregulation of apoptosis is one of the key mechanisms of tumorigenesis and many malignancies are characterized by altered expression of BCL2-family members [24]. *BCL2L12* expression was shown to be significantly up-regulated in cancerous tissue specimens of patients with

BCa compared with normal adjacent ones, whereas the ROC analysis highlighted the ability of *BCL2L12* expression levels to discriminate the malignant from the benign bladder tissues. The analysis of *BCL2L12* expression did not show any significant correlation with disease stage, grade, muscle-invasion status, and patients' gender.

BCL2L12 expression levels revealed to have a strongly unfavorable significance for BCa survival independent from disease stage and grade. More precisely, Kaplan-Meier curves highlighted the shorter DFS of the *BCL2L12* (+) patients, whereas the Cox regression analysis unveiled the elevated risk for disease recurrence of the patients with higher *BCL2L12* expression levels, independent from disease stage, grade, and patients' gender. A significantly higher risk to recur and shorter DFS interval following TURBT was indicated for the TaT1 patients expressing higher *BCL2L12* levels. This elevated risk for recurrence was independent from the invasion of the connective tissue of bladder wall (T1), the disease grade and the gender of the patients. Focusing on the patients with muscle-invasive tumors, the Kaplan-Meier analysis showed similar DFS expectancy for the *BCL2L12* (+) and *BCL2L12* (–) patients. An explanation of the dissimilar clinical significance of *BCL2L12* expression to designate patients' risk for recurrence between NMIBC and MIBC cohorts is the different underlying molecular mechanisms responsible for disease development and progression; therefore, a possible diverse effect of *BCL2L12* up-regulation upon cellular homeostasis of TaT1 tumors compared with muscle-invasive ones might explain the observed differences.

Identifying the effect of histological grade for the risk stratification of the patients with NMIBC [25], we further evaluated the prognostic significance of *BCL2L12* for the prediction of high-grade TaT1 patients' outcome. The worse DFS expectancy following TURBT was clearly demonstrated for the *BCL2L12* (+) patients by the Kaplan-Meier analysis. Moreover, the univariate Cox regression models indicated a significantly higher risk for short-term recurrence for *BCL2L12* (+) patients, which was revealed by multivariate models to be independent from the invasion of connective tissue (T1) and tumor grade. The unfavorable nature of *BCL2L12* expression levels for patients with NMIBC was also confirmed by the significantly higher RR-FFC [26], of the *BCL2L12* (+) compared with the *BCL2L12* (–) patients. In light of this view, higher *BCL2L12* expression levels correlated with poor DFS expectancy of the patients with NMIBC with negative FFC.

Although, the role of *BCL2L12* in the apoptotic machinery remains to be elucidated, a clear antiapoptotic function has been observed in glioblastoma multiforme, where *BCL2L12* hinders apoptosis through the inhibition of effectors caspase-3 and caspase-7 at the post-mitochondrial cascade and the neutralization of p53 transcriptional activity enables, in this way, cells to bypass p53-dependent cell cycle regulation [27–29]. Further studies disclosed that *BCL2L12* expression was an independent prognosticator

of relapse in nasopharyngeal carcinoma [19], and acute myeloid leukemia [21], whereas *BCL2L12* expression was associated with advanced clinical stage and shorter overall survival in chronic lymphocytic leukemia [20].

5. Conclusions

Our data highlight that significantly higher expression levels of *BCL2L12* in malignant bladder tissues enable their discrimination from normal specimens. Focusing on patients' prognosis, the high-*BCL2L12* expressing TaT1 patients were associated with higher RR-FFC, as well as poor DFS following TURBT. Moreover, *BCL2L12* expression was capable of designating the short-term relapse of the high-grade TaT1 patients. Overall, these findings highlight the unfavorable prognostic utility of *BCL2L12* in patients with BCa and future studies, incorporating larger number of patients and longer follow-up intervals, will further reinforce the clinical value of *BCL2L12* for the assessment of recurrence risk following treatment in patients with NMIBC.

Acknowledgments

This work has been carried out with the financial support of the Commission of the European Community through the INsPiRE project (EU-FP7-REGPOT-2011-1, Proposal no. 284460).

References

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012;62:10–29.
- [2] Castillo-Martin M, Domingo-Domenech J, Karni-Schmidt O, Matos T, Cordon-Cardo C. Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis. *Urol Oncol* 2010;28:401–8.
- [3] Jacobs BL, Lee CT, Montie JE. Bladder cancer in 2010: how far have we come? *CA Cancer J Clin* 2010;60:244–72.
- [4] Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Kaasinen E, Böhle A, Palou-Redorta J. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Eur Urol* 2008;54:303–14.
- [5] Stenzl A, Cowan NC, De Santis M, et al. The updated EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer. *Eur Urol* 2009;55:815–25.
- [6] Lokeshwar VB, Habuchi T, Grossman HB, et al. Bladder tumor markers beyond cytology: international consensus panel on bladder tumor markers. *Urology* 2005;66:35–63.
- [7] Cheng L, Zhang S, MacLennan GT, Williamson SR, Lopez-Beltran A, Montironi R. Bladder cancer: translating molecular genetic insights into clinical practice. *Hum Pathol* 2011;42:455–81.
- [8] Margulis V, Lotan Y, Karakiewicz PI, et al. Multi-institutional validation of the predictive value of ki-67 labeling index in patients with urinary bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:114–9.
- [9] Ecke TH, Sachs MD, Lenk SV, Loening SA, Schlechte HH. Tp53 gene mutations as an independent marker for urinary bladder cancer progression. *Int J Mol Med* 2008;21:655–61.
- [10] Knowles MA. Role of fgfr3 in urothelial cell carcinoma: biomarker and potential therapeutic target. *World J Urol* 2007;25:581–93.
- [11] Scorilas A, Kyriakopoulou L, Yousef GM, Ashworth LK, Kwamie A, Diamandis EP. Molecular cloning, physical mapping, and expression

- analysis of a novel gene, bcl2l12, encoding a proline-rich protein with a highly conserved bh2 domain of the bcl-2 family. *Genomics* 2001;72:217–21.
- [12] Kontos CK, Scorilas A. Molecular cloning of novel alternatively spliced variants of bcl2l12, a new member of the bcl2 gene family, and their expression analysis in cancer cells. *Gene* 2012;505:153–66.
- [13] Kontos CK, Papadopoulos IN, Scorilas A. Quantitative expression analysis and prognostic significance of the novel apoptosis-related gene bcl2l12 in colon cancer. *Biol Chem* 2008;389:1467–75.
- [14] Mathioudaki K, Scorilas A, Papadokostopoulou A, et al. Expression analysis of bcl2l12, a new member of apoptosis-related genes, in colon cancer. *Biol Chem* 2004;385:779–83.
- [15] Thomadaki H, Talieri M, Scorilas A. Prognostic value of the apoptosis related genes bcl2 and bcl2l12 in breast cancer. *Cancer Lett* 2007;247:48–55.
- [16] Talieri M, Diamandis EP, Katsaros N, Gourgiotis D, Scorilas A. Expression of bcl2l12, a new member of apoptosis-related genes, in breast tumors. *Thromb Haemost* 2003;89:1081–8.
- [17] Florou D, Papadopoulos IN, Scorilas A. Molecular analysis and prognostic impact of the novel apoptotic gene bcl2l12 in gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391:214–8.
- [18] Geomela PA, Kontos CK, Yiotakis I, Scorilas A. Quantitative expression analysis of the apoptosis-related gene, bcl2l12, in head and neck squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2012.
- [19] Fendri A, Kontos CK, Khabir A, Mokdad-Gargouri R, Scorilas A. Bcl2l12 is a novel biomarker for the prediction of short-term relapse in nasopharyngeal carcinoma. *Mol Med* 2011;17:163–71.
- [20] Papageorgiou SG, Kontos CK, Pappa V, et al. The novel member of the bcl2 gene family, bcl2l12, is substantially elevated in chronic lymphocytic leukemia patients, supporting its value as a significant biomarker. *Oncologist* 2011;16:1280–91.
- [21] Thomadaki H, Floros KV, Pavlovic S, et al. Overexpression of the novel member of the bcl2 gene family, bcl2l12, is associated with the disease outcome in patients with acute myeloid leukemia. *Clin Biochem* 2012;45:1362–7.
- [22] Botteman MF, Pashos CL, Redaelli A, Laskin B, Hauser R. The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature. *Pharmacoeconomics* 2003;21:1315–30.
- [23] Botteman MF, Pashos CL, Hauser RS, Laskin BL, Redaelli A. Quality of life aspects of bladder cancer: a review of the literature. *Qual Life Res* 2003;12:675–88.
- [24] Thomadaki H, Scorilas A. BCL2 family of apoptosis-related genes: functions and clinical implications in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2006;43:1–67.
- [25] Jordan AM, Weingarten J, Murphy WM. Transitional cell neoplasms of the urinary bladder. Can biologic potential be predicted from histologic grading? *Cancer* 1987;60:2766–74.
- [26] Brausi M, Collette L, Kurth K, et al. Variability in the recurrence rate at first follow-up cystoscopy after tur in stage Ta T1 transitional cell carcinoma of the bladder: a combined analysis of seven eortc studies. *Eur Urol* 2002;41:523–31.
- [27] Stegh AH, Kesari S, Mahoney JE, et al. BCL2L12-mediated inhibition of effector caspase-3 and caspase-7 via distinct mechanisms in glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:10703–8.
- [28] Stegh AH, Brennan C, Mahoney JA, et al. Glioma oncoprotein BCL2L12 inhibits the p53 tumor suppressor. *Genes Dev* 2010;24:2194–204.
- [29] Stegh AH, DePinho RA. Beyond effector caspase inhibition: BCL2L12 neutralizes p53 signaling in glioblastoma. *Cell Cycle* 2011;10:33–8.