

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

**ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΡΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ**

**ΣΟΥΤΟΓΛΟΥ ΕΥΑΝΘΙΑ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ  
ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ HNF-4  
ΚΑΙ HNF-1**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ : ΤΑΛΙΑΝΙΔΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ  
ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : ΠΑΠΑΜΑΤΘΑΙΑΚΗΣ ΙΩΣΗΦ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ, ΜΑΡΤΙΟΣ 2002**

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>4</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ</b>	<b>6</b>
Ανατομία και ανάπτυξη του ήπατος	6
Οι κυριότεροι ρυθμιστές του ηπατικού φαινοτύπου και ο πιθανός τους ρόλος σε άλλους ιστούς	8
Το δίκτυο των μεταγραφικών παραγόντων που καθορίζουν τον ηπατικό φαινότυπο	17
<b>Μηχανισμοί μεταγραφικής ρύθμισης</b>	<b>24</b>
<b>ΕΙΔΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b>	<b>46</b>
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>47</b>
1. Μέθοδοι	47
2. Υλικά	67
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>69</b>
<b>Ειδικός στόχος 1</b>	
Αποτελέσματα	69
Εικόνες	74
Συζήτηση	82
<b>Ειδικός στόχος 2</b>	
Αποτελέσματα	86
Εικόνες	95
Συζήτηση	106
<b>Ειδικός στόχος 3</b>	
Αποτελέσματα	111
Εικόνες	116
Συζήτηση	120
<b>ΕΠΙΛΟΓΟΣ</b>	<b>125</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>127</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του μηχανισμού μεταγραφικής ενεργοποίησης από τους παράγοντες HNF-4 και HNF-1.

Οι HNF-4 και HNF-1 είναι ηπατοειδικοί μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν γονίδια που παίζουν ρόλο σε ποικίλα μεταβολικά μονοπάτια στο ενήλικο ήπαρ. Στον άνθρωπο ετερόζυγες μεταλλαγές στα γονίδια HNF-4 και HNF-1 έχουν συνδεθεί με την μορφή του νεανικού διαβήτη τύπου II που ονομάζεται MODY (MODY I και II αντίστοιχα), αποδεικνύοντας την σημασία των παραγόντων αυτών στη λειτουργία των β-κυττάρων του παγκρέατος. Η εργασία αυτή χωρίζεται σε τρία μέρη.

Στο πρώτο μέρος μελετάται η λειτουργική σημασία της αλληλεπίδρασης του HNF-4 με τον συνενεργοποιητή CBP που έχει ενεργότητα ακετυλοτρανσφεράσης των ιστονών. Στη εργασία αυτή δείχθηκε ότι ο μεταγραφικός παράγοντας HNF-4 ακετυλιώνεται από τον συνενεργοποιητή CBP σε αμινοξικά κατάλοιπα (λυσίνες) που εντοπίζονται στην περιοχή που είναι υπεύθυνη για την είσοδο του παράγοντα στον πυρήνα του κυττάρου (NLS). In vitro πειράματα και πειράματα παραδοικής διαμόλυνσης έδειξαν ότι η μετα-μεταφραστική αυτή τροποποίηση αυξάνει την ικανότητα πρόσδεσης του HNF-4 στο DNA και την συγγένεια της αλληλεπίδρασης με τον ίδιο τον συνενεργοποιητή CBP και είναι απαραίτητη για την μεταγραφική ενεργότητα του HNF-4. Η πιο ενδιαφέρουσα παρατήρηση της εργασίας αυτής είναι ότι η ακετυλίωση του HNF-4 είναι πολύ σημαντική για την συγκράτηση του παράγοντα στον πυρήνα του κυττάρου. Από τα πειράματα είναι φανερό ότι όταν ο παράγοντας δεν είναι ακετυλιωμένος εξέρχεται από τον πυρήνα του κυττάρου στο κυτταρόπλασμα μέσω της πρωτεΐνης CRM1 που αλληλεπιδρά με μεγαλύτερη συγγένεια με την μη-ακετυλιωμένη μορφή του HNF-4. Τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας προτείνουν ότι η ακετυλίωση είναι μια σημαντική μετα-μεταφραστική τροποποίηση που επηρεάζει πολλές ιδιότητες του μεταγραφικού παράγοντα HNF-4, σημαντικές για την δράση του.

Στο δεύτερο κομμάτι της εργασίας μελετάται ο μηχανισμός με τον οποίο ο παράγοντας HNF-1 ενεργοποιεί την μεταγραφή. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι ο HNF-1 αλληλεπιδρά in vivo και in vitro με τις ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών CBP, P/CAF, SRC-1 και RAC3 και ότι η συνεργιστική δράση των συνενεργοποιητών αυτών αυξάνει την HNF-1 εξαρτώμενη μεταγραφική ενεργοποίηση. Πιο λεπτομερής

μελέτη έδειξε ότι ο παράγοντας CBP προσδένεται στο αμινοτελικό άκρο του HNF-1 που αντιστοιχεί στην περιοχή με την οποία προσδένεται στο DNA, ενώ οι άλλοι τρεις στην καρβοξυτελική περιοχή που είναι υπεύθυνη για την ενεργοποιητική του δράση (Activation domain). Η μελέτη εστιάστηκε περισσότερο στην συνέργια που παρατηρήθηκε μεταξύ των συνενεργοποιητών CBP και P/CAF. Η μεταγραφική ενεργότητα του HNF-1 σε υποκινητή που έχει εντεθεί στο γένωμα των κυττάρων φαίνεται ότι εξαρτάται αυστηρά από την συνεργιστική δράση των δύο παραπάνω συνενεργοποιητών και απαιτεί τις HAT ενζυμικές ενεργότητες και των δύο σε αντίθεση με την επιλεκτική απαίτηση της HAT του P/CAF για την HNF-1-εξαρτώμενη μεταγραφική ενεργοποίηση παροδικά διαμολυσμένου γονιδίου αναφοράς. Με *in vitro* πειράματα δείχθηκε ότι η πρόσδεση του CBP στο αμινοτελικό τμήμα του HNF-1 αυξάνει την συγγένεια πρόσδεσης του P/CAF στο καρβοξυτελικό γεγονός που παρέχει μία πιθανή εξήγηση για την παρατηρούμενη συνέργια μεταξύ των δύο συνενεργοποιητών. Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν ένα μοντέλο σύμφωνα με το οποίο ο HNF-1 ενεργοποιεί την μεταγραφή στρατολογώντας διαφορετικούς συνενεργοποιητές οι οποίοι συμμετέχουν στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και διευκολύνουν πιθανότατα την μετέπειτα στρατολόγηση της γενικής μεταγραφικής μηχανής.

Μελετώντας στη συνέχεια τον μηχανισμό έλλειψης μεταγραφικής ενεργότητας δύο φυσικών μεταλλαγών του HNF-1 των P519L και P447L που έχουν βρεθεί σε ασθενείς με νεανικό διαβήτη (MODY III), παρατηρήθηκε ότι οι μεταλλαγές αυτές αλληλεπιδρούν με μεγαλύτερη συγγένεια και με τους δύο συνενεργοποιητές CBP και P/CAF σε σύγκριση με την πρωτεΐνη αγρίου τύπου. Πιο λεπτομερής μελέτη έδειξε ότι η έλλειψη της μεταγραφικής ενεργότητας των μεταλλαγών αυτών δεν οφείλεται σε επιλεκτική αλληλεπίδραση τους με τον συγκαταστολέα NcoR ή την απακετυλάση HDAC1 αλλά οι συνενεργοποιητές CBP και P/CAF όταν βρίσκονται σε σύμπλοκο με τις μεταλλαγές εμφανίζουν μειωμένη HAT ενζυμική ενεργότητα. Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι η πρωτεΐνη αγρίου τύπου - και όχι οι μεταλλαγές - αυξάνει την HAT ενζυμική ενεργότητα του CBP *in vitro*. Στη συνέχεια δείχθηκε ότι και άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες όπως Sp1 και HNF-4 επάγουν την ενζυμική ενεργότητα του CBP. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών προσδίδουν στους μεταγραφικούς παράγοντες ένα πιο δυναμικό ρόλο στην διαδικασία της μεταγραφικής ενεργοποίησης. Δεν απαιτούνται μόνο για την στρατολόγηση συνενεργοποιητών στους υποκινητές αλλά φαίνεται πως τροποποιούν και την ενζυμική τους ενεργότητα.

Στο τρίτο κομμάτι της εργασίας μελετάται ο ρόλος των HNF-4 και HNF-1 στις διαδικασίες συγκρότησης του προενακτήριου συμπλόκου και αναδιαμόρφωσης της χρωματινικής δομής στον υποκινητή φυσικού γονιδίου-στόχου τους. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε η σειρά στρατολόγησης των παραγόντων στον υποκινητή του γονιδίου της  $\alpha 1$ -αντιτρυψίνης κατά την ενεργοποίηση του στη διάρκεια της διαφοροποίησης των εντερικής προέλευσης CaCo2 κυττάρων. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι ένα ολοκληρωμένο προενακτήριο σύμπλοκο που περιλαμβάνει τους δύο ενεργοποιητές HNF-4 και HNF-1, συστατικά του TFIIID, τον γενικό μεταγραφικό παράγοντα TFIIH, το σύμπλοκο των διαμεσολαβητών, καθώς και την φωσφορυλιωμένη μορφή της PNA II πολυμεράσης συγκροτείται στον συγκεκριμένο υποκινητή πολύ πριν από την χρονική στιγμή της μεταγραφικής έναρξης. Ακολουθεί η στρατολόγηση των ακετυλοτρανσφερασών CBP και P/CAF ενώ η παρατηρούμενη υπερακετυλίωση της ιστόνης H3 δεν συνοδεύει άμεσα την παραπάνω διαδικασία. Τέλος η παροδική στρατολόγηση του παράγοντα hBtm και η αναδιαμόρφωση του νουκλεοσώματος που καλύπτει το σημείο έναρξης της μεταγραφής συμπίπτουν με την χρονική στιγμή μεταγραφικής έναρξης. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης στον υποκινητή του γονιδίου της  $\alpha 1$ -αντιτρυψίνης είναι το τελευταίο καθοριστικό βήμα στη διαδικασία έναρξης της μεταγραφής μετά από την συγκρότηση του προενακτήριου συμπλόκου.

## Summary

My studies were focused on different mechanistic aspects of tissue specific gene regulation by HNF-1 and HNF-4.

HNF-4 and HNF-1 (Hepatic Nuclear Factor 4 and 1) are liver-enriched transcription factors which regulate genes that play important roles in various metabolic pathways in the adult liver. In humans, heterozygous mutations in the HNF-4 and HNF-1 genes are associated with an early onset form of type II diabetes called Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY I and III, respectively), also proving the importance of these factors in pancreatic b-cell function.

First, in an effort to explore the functional importance of the interaction between HNF-4 and the known coactivator CBP, which possesses histone acetyltransferase activity, we found that CBP acetylates HNF-4 DNA-binding activity and its affinity of interaction with CBP itself and is required for target gene activation. The most interesting observation of this work is that this modification is crucial for the proper nuclear retention of HNF-4, which binds preferentially to non-acetylated HNF-4. The results of this study suggest that acetylation is a key posttranslational modification that affects several properties of HNF-4 critical for its biological functions.

Secondly, while studying the molecular mechanism involved in HNF-1-dependent gene activation, we found that HNF-1 can physically interact with the histone acetyltransferases (HATs) CBP, P/CAF, SRC1 and RAC3 and that the synergistic action between these co-activators enhances HNF-1-dependent transcriptional activation. Our studies were mainly focused on the synergism observed between the more robust HATs CBP and P/CAF, which can independently interact with the N-terminal and the C-terminal domain of HNF-1, respectively. The transcriptional activation potential of HNF-1 on a genome integrated promoter was strictly dependent on the synergistic action of CBP and P/Caf and requirement for P/CAF HAT activity for HNF-1-dependent activation from a transiently transfected reporter. Employing *in vitro* assays, we found that the interaction of CBP with the N-terminal domain of HNF-1 greatly increased the binding affinity of P/CAF for the C-terminal activation domain, which provides a potential mechanism for the observed functional synergism. These results support a model which involves the combined action of multiple co-

activator recruited by HNF-1 to activate transcription by coupling nucleosome modification and recruitment of the general transcription machinery.

Thirdly, exploring the mechanism behind the impaired transactivation potential of two dominant-negative mutants of HNF-1 (P447L), occurring in maturity onset diabetes of the young (MODY3) patients, we found that they paradoxically exhibit stronger interactions with either CBP or P/CAF than the wild type protein both in vivo and in vitro. Further in vivo studies showed that the dominant-negative effect of MODY3 mutants is not due to a preferential recruitment of the corepressor NCOR or the deacetylase protein HDAC1, but not the MODY3 mutants, stimulated the HAT activity of CBP in vitro. Other transcription factors such as Sp1 And HNF-4 also stimulated the HAT activity of CBP, demonstrating a more dynamic role for DNA-binding proteins in the transcription process. They are not only required for the recruitment of coactivators to the promoter, but they may also modulate their enzymatic activity.

Finally, in order to explore the role/involvement of the HNF4 and HNF-1 preinitiation complex assembly and chromatin remodeling processes in a natural target gene, we analyzed the order of recruitment of factors to the alpha-1-antitrypsin (a1-AT) promoter upon the initial activation of the gene during enterocyte differentiation. We found that a complete preinitiation complex, including the HNF-1 and HNF-4 transcription factors, components of TFIID, TFIIF and the mediator complex, as well as, phosphorylated RNA pol-II, was assembled at the promoter long before transcriptional activation. The histone acetyltransferases CBP and P/CAF were recruited subsequently, but local histone hyperacetylation was delayed. After transient recruitment of hBrm, remodeling of the neighboring nucleosome coincided with transcription initiation. The results suggest that at this promoter chromatin reconfiguration is a defining step of the initiation process, acting after the assembly of the Pol II machinery.

## **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Το ήπαρ είναι το μεγαλύτερο εσωτερικό όργανο του ανθρώπινου σώματος. Ο κύριος ρόλος του είναι η αποτοξίνωση των ζημιογόνων παραπροϊόντων του μεταβολισμού, ο μεταβολισμός των υδατανθράκων, λιπών, στεροειδών και προσταγλαδινών, η αποθήκευση βιταμινών και σιδήρου, καθώς και η παραγωγή πρωτεϊνών του ορού. Λειτουργεί σαν εξωκρινές και σαν ενδοκρινές όργανο. Πιο συγκεκριμένα, εκκρίνει χολικά οξέα, βασικά προϊόντα μεταβολισμού της χοληστερόλης, τα οποία μεταφέρονται στο έντερο με τα χοληφόρα σωληνάρια και βοηθούν στην εντερική απορρόφηση. Οι ενδοκρινείς ιδιότητες συνίστανται στην πρόσληψη εκκρινόμενων παραγόντων του ορού όπως η αλβουμίνη, προθρομβίνη και οι απολιποπρωτεΐνες.

Η ανατομία του συκωτιού αναδεικνύει τη σπουδαιότητα των ιδιοτήτων του. Το ενήλικο ήπαρ αποτελείται από τέσσερις λοβούς που περιβάλλονται από ινώδη συνδετικό ιστό που ονομάζεται κάψουλα του Glisson. Κάθε λοβός είναι οργανωμένος γύρο από μία κεντρολόβια ηπατική φλέβα. Στην περιφέρεια του λοβού το αίμα εισέρχεται από κλάδους της πυλαίας φλέβας και της ηπατικής αρτηρίας και εξέρχεται μέσω της κεντρολόβιας φλέβας. Έτσι το ήπαρ ρυθμίζει τον ρυθμό της κυκλοφορίας του αίματος από το έντερο και το πάγκρεας προς το υπόλοιπο σώμα. Η στενή επαφή του με το αίμα συντελεί στην ικανότητα του να το καθαρίζει αποτελεσματικά από ορισμένες κατηγορίες ουσιών. Η χολή που εκκρίνεται από το ήπαρ ως προϊόν μεταβολισμού της χοληστερόλης συσσωρεύεται στα χοληφόρα σωληνάρια τα οποία κείνται μεταξύ παρακείμενων ηπατικών κυττάρων και εκβάλλουν στους χοληφόρους πόρους που βρίσκονται στην περιφέρεια του λοβού (εικόνα 1).

Τα ηπατοκύτταρα επιτελούν τις κυριότερες λειτουργίες του ήπατος και είναι ο πολυπληθέστερος ( 80%) αλλά όχι και ο μόνος κυτταρικός τύπος. Συναντάμε ακόμα επιθηλιακά, παρεγχυματικά, μακροφάγα (Kupffer cells), και ινοβλάστες (Ito cells). Η παρουσία σχετικά μικρού αριθμού διαφοροποιημένων κυτταρικών τύπων έκανε το ήπαρ πολύ καλό σύστημα στη μελέτη της οργανογένεσης και των μηχανισμών διαφοροποίησης του. Η ηπατογένεση σαν διαδικασία έχει χωριστεί για ευκολία σε διακριτά αναπτυξιακά στάδια. Το πρώτο στάδιο που ονομάζεται competence χαρακτηρίζεται από την επιδεκτικότητα (competence) ενός ιστού κατά την ανάπτυξη να ακολουθήσει την ηπατική τύχη. Τέτοιου είδους επιδεκτικότητα παρουσιάζει το



κοιλιακό (ventral) τμήμα του ενδοδέρματος του προσέντερου (foregut) που έρχεται σε επαφή με την προκαρδιακό μεσόδερμα. Πιο συγκεκριμένα, το τμήμα αυτό του ενδοδέρματος εκφράζει κάποιους παράγοντες (πχ.HNF-3) που το καθιστούν επιδεκτικό στο να ακολουθήσει την ηπατική τύχη και στη συνέχεια δεχόμενο κάποια σήματα από το παρακείμενο καρδιακό μεσόδερμα (κυρίως αυξητικούς παράγοντες FGF1,2,8), οδηγείται στην έκφραση κάποιων παραγόντων χαρακτηριστικών των ηπατικών κυττάρων (πχ.αλβουμίνης, alpha-fetoprotein ). Το στάδιο αυτό ονομάζεται στάδιο καθορισμού ηπατικής τύχης [(εικόνα 2), (39 ,217, 216, 82)].

Από την στιγμή αυτή ξεκινά η διαδικασία της διαφοροποίησης όπου είναι η βαθμιαία μετάβαση σε έναν πολύ εξειδικευμένο κυτταρικό τύπο που εκφράζει μια μεγάλη ποικιλία πρωτεϊνών απαραίτητων για την τελική μορφολογία και λειτουργία του. Η διαφοροποίηση του ηπατικού κυττάρου πιο συγκεκριμένα απαιτεί την έκφραση γονιδίων που ρυθμίζουν τον μεταβολισμό, την αποτοξίνωση και παραγωγή πρωτεϊνών του ορού. Παρόλο που έχουν βρεθεί πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες να ρυθμίζουν τη έκφραση των παραπάνω γονιδίων στο ενήλικο ήπαρ, δεν έχει δοθεί σαφής απάντηση για το ποιος παράγοντας συγκεκριμένα δίνει το έναυσμα για την διαφοροποίηση των ηπατικών κυττάρων. Η δυσκολία στην απάντηση βρίσκεται στο γεγονός ότι η απενεργοποίηση (knock out) καθενός από τους παραπάνω παράγοντες σε ποντίκι οδηγεί στη δημιουργία ενός ζώου μη βιώσιμου (lethal) προφανώς γιατί οι παράγοντες αυτοί που περιγράφονται με λεπτομέρεια στη συνέχεια παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια κατά την ανάπτυξη του ποντικού (39).

Η διαφοροποίηση του ηπατικού κυττάρου συνοδεύεται από δραματική αύξηση του διπλασιασμού των κυττάρων που θα αποτελέσουν το τελικό όργανο. Μιτογόνοι καθώς και αυξητικοί παράγοντες των μεσεγχυματικών κυττάρων που περιβάλλουν τα ηπατικά αποτελούν τα σήματα τα οποία ενεργοποιούν γονίδια για τη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των ηπατικών κυττάρων.

Στο ενήλικο πια ήπαρ η διατήρηση του ηπατικού φαινοτύπου συνίσταται στην έκφραση μιας συγκεκριμένης ομάδας γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες αναγκαίες για την ηπατική λειτουργία. Η ρύθμιση των παραπάνω γονιδίων γίνεται κύρια στο επίπεδο της μεταγραφής από ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες που παρόλο που δεν εκφράζονται αποκλειστικά στο ήπαρ, ο συνδυασμός τους και οι σχετικές ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις φαίνεται πως είναι καθοριστικές. Η μέχρι τώρα μελέτη στοιχείων των υποκινητών και ενισχυτών των γονιδίων αυτών ανέδειξε

4 οικογένειες πρωτεϊνών υπεύθυνες για τον καθορισμό και την διατήρηση του ηπατικού φαινοτύπου:

α) Η οικογένεια του ηπατικού πυρηνικού παράγοντα 1 (HNF-1 hepatic nuclear factor 1) όπου το μοτίβο με το οποίο προσδένεται στο DNA μοιάζει με αυτό των ομοιοτικών γονιδίων (homeodomain family). Ανακαλύφθηκε αρχικά από την πρόσδεση του σε συντηρημένα στοιχεία του υποκινητή της αλβουμίνης και της α1-αντιτροψίνης. Αποτελείται από τρεις λειτουργικά διακριτές περιοχές. Μια αμινοτελική περιοχή που είναι υπεύθυνη για τον διμερισμό του μορίου, μια περιοχή με την οποία προσδένεται στο DNA (homeobox-like,44) και μία καρβοξυτελική περιοχή, υπεύθυνη για την ενεργοποιητική του δράση (transactivation domain). Η καρβοξυτελική περιοχή χωρίζεται σε τρία διακριτά μέρη (ADI,II and III AD:activation domain) όπου και τα τρία έχουν αποδειχθεί σημαντικά για την ενεργοποιητική δράση του HNF-1, αφού σε έλλειψη καθενός από αυτά ο παράγοντας είναι ανενεργός.(Εικόνα 3Α.) Η περιοχή διμερισμού αλληλεπιδρά με μία πρωτεΐνη 11-kDa που ονομάζεται DcoH (dimerization cofactor of HNF-1, 80) και η αλληλεπίδραση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την σταθεροποίηση του διμερούς. Από πειράματα παροδικής διαμόλυνσης έχει βρεθεί ότι ο HNF-1 ρυθμίζει τους υποκινητές πολλών γονιδίων όπως της αμινοπεπτιδάσης N, των απολιποπρωτεϊνών ApoA2 και ApoB, α-φετοπρωτεΐνης, της ινσουλίνης, της υδροξυλάσης της φαινυλαλανίνης (PAH), και άλλα.. Εκτός από το ήπαρ ο HNF-1 εκφράζεται στο πάγκρεας, στα νεφρά και στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (20).

Δύο διαφορετικά knock out του HNF-1 έχουν αναλυθεί από δύο διαφορετικές ερευνητικές ομάδες. Και από τις δύο εργασίες είναι εμφανές πως ο παράγοντας δεν επηρεάζει την ανάπτυξη του ζώου αφού ομόζυγα ζώα γεννιούνται κανονικά. Τα ομόζυγα ποντίκια σύμφωνα με την πρώτη εργασία εμφανίζουν ηπατομεγαλία, γεγονός που υποδηλώνει ότι πολλές από τις λειτουργίες του οργάνου δεν είναι φυσιολογικές. Πράγματι, στα ζώα αυτά ανιχνεύονται υψηλά επίπεδα φαινυλαλανίνης στον ορό που ομοιάζουν με τα επίπεδα του αμινοξέος σε άτομα που πάσχουν από φαινυλκετονουρία (PKU).Στη συνέχεια με ανάλυση κατά Northern έγινε σύγκριση των επιπέδων mRNA, μεταξύ των ζώων αγρίου τύπου και των knock out, γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες σημαντικές στην ηπατική λειτουργία και που έχουν βρεθεί στον υποκινητή τους στοιχεία υπεύθυνα για την πρόσδεση του παράγοντα. Έτσι από μία πληθώρα γονιδίων που εξετάστηκαν, τα επίπεδα του mRNA του γονιδίου της υδροξυλάσης της φαινυλαλανίνης (PAH) πέφτουν δραματικά (γεγονός

που εξηγεί τα υψηλά φαινυλαλανίνης στο ορό) ενώ μικρότερη μείωση εμφανίζουν τα επίπεδα αλβουμίνης και α1-αντιτρυψίνης. Για τα δύο τελευταία γονίδια φαίνεται πως ο HNF-1 είναι περιττός (redundant) και σε έλλειψή του κάποιος άλλος παράγοντας τον αντικαθιστά. Το ίδιο ποντίκι εμφανίζει το σύνδρομο Fanconi που χαρακτηρίζεται από πολουρία, γλυκοσουρία και φωσφατουρία. Το σύνδρομο αυτό οφείλεται στην αδυναμία των νεφρών να απορροφήσουν μικρά μόρια του πλάσματος (γλυκόζη, φώσφορο και αμινοξέα) με αποτέλεσμα να αποβάλλονται αμέσως από τον οργανισμό με τα ούρα. Είναι γνωστό ότι η γλυκόζη επαναπροσλαμβάνεται από την μεμβράνη των σωληνοειδών κυττάρων του νεφρού με τη βοήθεια κάποιων μεταφορέων (SGLT1,2: Sodium-dependent glucose transporters) που δεσμεύουν γλυκόζη και νάτριο ταυτόχρονα και τα μεταφέρουν στο εσωτερικό του κυττάρου. Η ανικανότητα των νεφρών να επαναπροσλάβουν την γλυκόζη του αίματος στα knock out ποντίκια οφείλεται στην μειωμένη έκφραση ενός από αυτούς τους μεταφορείς γλυκόζης (SGLT2). Η περαιτέρω κλωνοποίηση του υποκινητή του γονιδίου αυτού έδειξε την ύπαρξη δύο θέσεων στις οποίες ο HNF-1 έχει την ικανότητα να προσδένεται τουλάχιστον *in vitro*, υποδηλώνοντας ότι παίζει άμεσο ρόλο στην μεταγραφική ενεργοποίηση του SGLT2 γονιδίου. Το ίδιο ποντίκι παρουσιάζει υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα (υπεργλυκαιμία) χωρίς το γεγονός αυτό να συνοδεύεται από αυξημένη έκκριση ινσουλίνης, φαινότυπος που προσομοιάζει με τον διαβήτη στον άνθρωπο [(Non –insulin dependent Diabetes type 2) (150), (152)].

Το knock out ποντίκι που αναλύθηκε από την δεύτερη ερευνητική ομάδα εμφανίζει παρόμοιο φαινότυπο με το προηγούμενο, ως αναφορά τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης και φαινυλαλανίνης στο αίμα. Ζει όμως περισσότερο και δεν παρουσιάζει το σύνδρομο Fanconi. Περαιτέρω μελέτες, στις οποίες χρησιμοποιήθηκε το εν λόγω ποντίκι, έδειξαν ότι τα επίπεδα mRNA του μεταφορέα γλυκόζης στα β κύτταρα του παγκρέατος που κωδικοποιείται από το γονίδιο GLUT2 ( Glucose Transporter 2) είναι αισθητά μειωμένα και ότι ο HNF-1 προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου *in vivo*. Το ίδιο knock out εμφανίζει χοληστεριναιμία, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο HNF-1 παίζει κύριο ρόλο στην ομοίωση της χοληστερόλης. Πράγματι βρέθηκε ότι ο HNF-1 ρυθμίζει την έκφραση των μεταφορέων (transporters) χολικών οξέων της βασοπλευρικής (basolateral) μεμβράνης στο ήπαρ, καθώς και μεταφορέων της κορυφαίας (apical) μεμβράνης των κυττάρων του εντέρου και των νεφρών. Σε έλλειψη του HNF-1 τα χολικά οξέα δεν επαναπροσλαμβάνονται από το ήπαρ, το έντερο και τα νεφρά με αποτέλεσμα να αποβάλλονται με τα ούρα. Τα χολικά οξέα

είναι κύριοι ρυθμιστές του μεταβολισμού της χοληστερόλης στο ήπαρ. Η χοληστερόλη μεταβολίζεται σε χολικά οξέα και το πρώτο ένζυμο που συμμετέχει στη διαδικασία αυτή είναι η υδροξυλάση της χοληστερόλης 7α (CYP-7a). Στο knock out του HNF-1 τα επίπεδα αυτού εμφανίζονται αυξημένα. Βρέθηκε λοιπόν πως ο HNF-1 ρυθμίζει την έκφραση ενός πυρηνικού υποδοχέα του FXR (Farnesoid X Receptor για τον οποίο είναι γνωστό ότι τα χολικά οξέα είναι ειδικοί συνδέτες, ligands), ο οποίος με την σειρά του ρυθμίζει θετικά την έκφραση ενός ορφανού πυρηνικού υποδοχέα που έχει την ικανότητα να ετεροδιμερίζεται με άλλους πυρηνικούς υποδοχείς (SHP: small heterodimer partner) και να αναστέλλει την έκφραση του CYP7a (εικόνα 4). Σε έλλειψη λοιπόν του HNF-1 τα επίπεδα του FXR μειώνονται και επομένως και τα επίπεδα του SHP με αποτέλεσμα να αυξάνονται τα επίπεδα του CYP7a. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να παράγονται στο ήπαρ αυξημένα επίπεδα χολικών οξέων τα οποία εξέρχονται και επειδή δεν έχουν την ικανότητα να επαναπροσληφθούν από το ήπαρ συσσωρεύονται στο πλάσμα ή όπως προαναφέρθηκε αποβάλλονται από τα ούρα. Τα υψηλά επίπεδα χοληστερόλης εξηγούνται επίσης από την μειωμένη έκφραση ενζύμων που συμβάλουν στην υδρόλυση της HDL χοληστερόλης (πχ Lipase) γεγονός που υποδηλώνει τον άμεσο ρόλο του HNF-1 στη ρύθμιση αυτών (171).

Η ανάλυση των δύο Knock outs έδειξε πόσο σημαντικό ρόλο παίζει ο HNF-1 και σε άλλα όργανα εκτός από το συκώτι. Αυτό επιβεβαιώνεται πιο πολύ από την συσχέτιση μεταλλαγών του HNF-1 με τον νεανικό διαβήτη MODYIII (Maturity Onset diabetes of the Young). Στα άτομα που πάσχουν από την ασθένεια αυτή, (αυτοσωμική υπερέχουσα μεταλλαγή) τα β κύτταρα του παγκρέατος δεν απαντούν με έκκριση ινσουλίνης στα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα τους, φαινότυπος που μοιάζει πολύ με τον φαινότυπο του HNF-1<sup>-/-</sup>. Πάνω από 80 μεταλλαγές (207) έχουν βρεθεί μέχρι τώρα, πολλές από τις οποίες επηρεάζουν αμινοξέα αρκετά συντηρημένα. Κάποιες μεταλλαγές οδηγούν σε πρωτεΐνες κομμένες (truncated) που είναι ανενεργές είτε γιατί είναι ασταθείς, είτε γιατί δεν προσδένονται στο DNA, είτε γιατί δεν εισέρχονται στον πυρήνα, είτε γιατί τους λείπει η καρβοξυτελική περιοχή που είναι υπεύθυνη για την ενεργότητα του μορίου. Ακόμα και στις περιπτώσεις που η μεταλλαγή είναι μία αμινοξική αντικατάσταση πολλές από τις μορφές που προκύπτουν έχουν ένα ή περισσότερα από τα παραπάνω χαρακτηριστικά λόγω της πιθανής αλλαγής στη διαμόρφωσή τους. Τέλος, κάποιες από τις μεταλλαγές εμφανίζουν επικρατή αρνητική δράση (dominant negative) και αναστέλλουν την ενεργότητα του HNF-1 αγρίου τύπου. Οι περισσότερες από τις μελέτες που αφορούν

τις MODY III μεταλλάξεις περιλαμβάνουν πειράματα παροδικής διαμόλυνσης σε ετερόλογες κυτταρικές σειρές (196, 197). Κάποιες πρόσφατες εργασίες στις οποίες κάποιες dominant negative μεταλλάξεις έχουν εντεθεί μόνιμα στο γένωμα (stable cell line) κυτταρικής σειράς παγκρεατικής προέλευσης (INS: Insulinoma cell line) έδειξαν ότι πολλά από τα ένζυμα που παίζουν ρόλο στον μεταβολισμό της γλυκόζης, τα προϊόντα του οποίου αποτελούν σήματα για την έκκριση ινσουλίνης από τα κύτταρα, επηρεάζονται από την μεταλλαγή, μειώνοντας τα επίπεδά τους (202).

Άλλο μέλος της οικογένειας είναι ο HNF-1β ή vHNF-1 (variant HNF-1) που εμφανίζει μεγάλη ομολογία με τον HNF-1α στην αμινοτελική περιοχή, που περιλαμβάνει την περιοχή διμερισμού και την περιοχή πρόσδεσης στο DNA. Η καρβοξυτελική περιοχή του μορίου δεν είναι τόσο ομόλογη αφού η ADI περιοχή λείπει ενώ η AD III έχει μόνο 61% ομοιότητα με την αντίστοιχη του HNF-1α (20). Το πρότυπο έκφρασης των δύο πρωτεϊνών στο ποντίκι είναι διαφορετικό. Κατά την ανάπτυξη η έκφραση του vHNF-1 προηγείται της έκφρασης του HNF-1 (21). Το πόσο σημαντική είναι η vHNF-1 πρωτεΐνη στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια φαίνεται από το γεγονός ότι το knock out σε ποντίκι είναι μη βιώσιμο και παίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση του σπλαχνικού (visceral) ενδοδέρματος. Στο ενήλικο ποντίκι τα επίπεδα του vHNF-1 στο ήπαρ είναι χαμηλά σε σχέση με του HNF-1 ενώ το ανάποδο συμβαίνει στα νεφρά. Εκτός από το έντερο και το πάγκρεας που εκφράζονται στα ίδια επίπεδα, ο vHNF-1 εκφράζεται επίσης στο στομάχι, στο θύμο και τις γονάδες χωρίς να έχει διασαφηνιστεί ο ρόλος του σε αυτά τα όργανα (30, 10).

β) Η οικογένεια των ορφανών πυρηνικών υποδοχέων (HNF-4, COUPTFI/Ear3, COUPTFII/Arg-1) που περιέχουν μία zinc finger περιοχή και προσδέονται στο DNA ως διμερή. Ο HNF-4α (Hepatic nuclear factor 4) έχει δύο περιοχές μεταγραφικής ενεργοποίησης, μία στο αμινοτελικό άκρο (AF1: Activation function 1) που συμβάλει στην πλήρη ενεργότητα του μορίου και μία καρβοξυτελική που είναι τελείως απαραίτητη για την μεταγραφική ενεργοποίησή του και η ίδια είναι υπεύθυνη για το διμερισμό του (AF2: Activation Function 2) (174). Παρακείμενη της AF-1 περιοχής είναι η περιοχή με την οποία ο HNF-4 προσδέεται στο DNA. Στο καρβοξυτελικό άκρο παρακείμενη της AF2 υπάρχει η F περιοχή που παρόλο που δεν έχει μελετηθεί η λειτουργία της όσο των άλλων έχει προταθεί ότι προσδίδει ανασταλτική δράση στο μόριο αφού όταν λείπει ο HNF-4α είναι πιο ενεργός, τουλάχιστον σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης (εικόνα 3B). Αρκετά πρόσφατα μία εργασία πρότεινε ότι η F περιοχή καλύπτει την AF 2 περιοχή δημιουργώντας

τέτοια διαμόρφωση στην πρωτεΐνη που εμποδίζει την πρόσδεση συνενεργοποιητών στην AF-2 περιοχή (173). Μία σειρά από συνενεργοποιητές έχει βρεθεί να αλληλεπιδρά και με τις δύο περιοχές ενεργοποίησης αλλά κυρίως με την AF-2. Αυτοί είναι ο CBP (CREB binding protein) (55, 211) GRIP 1 (μέλος της οικογένειας των Steroid Receptor Coactivators, 204), γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες (TFIIB, TAFII<sub>32</sub> του TFIID) κ.τ.λ., χωρίς να έχει διασαφηνιστεί σε ποιους συγκεκριμένα HNF-4-εξαρτώμενους φυσικούς υποκινητές υφίσταται οι αλληλεπιδράσεις αυτές (51). Σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης έχει βρεθεί ότι ρυθμίζει τους υποκινητές πολλών γονιδίων όπως απολιποπρωτεϊνών (ApoCIII, ApoB), του HNF-1 καθώς και πολλών ηπατικών ενζύμων [(CYP7a, PEPCK, TAT ), (20)].

Η μεταγραφική ενεργότητα του HNF-4 έχει βρεθεί ότι ρυθμίζεται από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως φωσφορυλίωση και ακετυλίωση (βλέπε αποτελέσματα). Πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν μελετήσει την φωσφορυλίωση του HNF-4 που φαίνεται να γίνεται σε πολλές διαφορετικές θέσεις του μορίου από διαφορετικές κινάσες. Έτσι έχει βρεθεί ότι η φωσφορυλίωση του HNF-4 από PKA (Protein Kinase A) στο μοτίβο RRSS ( DNA binding domain) μειώνει την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA και επακόλουθα την μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων αναφοράς (reporters) που βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο υποκινητή εξαρτώμενου από HNF-4 (198), σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης. Από την άλλη, έχει περιγραφεί ότι η φωσφορυλίωση του σε κατάλοιπα τυροσίνης αυξάνει την ικανότητα της μεταγραφικής ενεργοποίησης, αυξάνοντας στην περίπτωση αυτή την συγγένεια ως προς το DNA και αλλάζοντας την ενδοπυρηνική του τοποθέτηση (90). (προσθήκη Genistein ενός αναστολέα κινάσων τυροσίνης οδηγεί σε μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης του HNF-4 στο DNA και στην διάχυσή του στον πυρήνα που οδηγεί στην απενεργοποίησή του).

Παρόλο που για τους άλλους πυρηνικούς υποδοχείς έχει βρεθεί ότι ετεροδιμερίζονται κυρίως με τον RXR (Retinoic X Receptor) ο HNF-4 προσδένεται στο DNA μόνο ως ομοδιμερές (78). Ανήκει στην οικογένεια των ορφανών υποδοχέων γιατί δεν έχει βρεθεί για αυτόν ακόμα συνδέτης (ligand). Μία πρόσφατη εργασία έδειξε ότι κάποια προϊόντα μεταβολισμού λιπαρών οξέων (fatty acylCoA thioesters) έχουν την ικανότητα να αυξάνουν την ενεργότητα του HNF-4 σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης καθώς και την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA *in vitro* (66). Περαιτέρω μελέτες όμως, από άλλη ερευνητική ομάδα έδειξαν πως τα μόρια αυτά δεν είναι κλασσικοί συνδέτες αφού δεν αυξάνουν την ικανότητα του HNF-4 να

αλληλεπιδρά με συνενεργοποιητές (πχ.GRIP 1) ούτε αλλάζουν την διαμόρφωση του μορίου όπως έχει δείχθει για τους συνδέτες άλλων πυρηνικών υποδοχέων [(πχ.Retinoic acid για RXR) (14)].

Ο HNF-4 εκφράζεται κατά την ανάπτυξη του ποντικού νωρίτερα από ότι ο HNF-1. Η απενεργοποίηση του παράγοντα στο ποντίκι οδηγεί σε μη βιώσιμο ζώο. Βρέθηκε λοιπόν πως τα έμβρυα αυτά πεθαίνουν γιατί δεν μπορούν να ολοκληρώσουν την γαστριδίωση (gastrulation), πιθανότατα λόγω δυσλειτουργίας του έξτρα-εμβρυϊκού σπλαχνικού ενδοδέρματος. Έτσι ήταν αδύνατο να μελετηθεί στα ποντίκια αυτά ο ρόλος του HNF-4 στο ήπαρ καθώς και στους άλλους ιστούς στους οποίους εκφράζεται. Τα ποντίκια αυτά μπορούν να προχωρήσουν στη γαστριδίωση αν τους προσφερθεί HNF-4<sup>+/+</sup> σπλαχνικό ενδόδερμα με την μέθοδο που είναι γνωστή ως tetraploid rescue. Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή, ES HNF-4<sup>-/-</sup> κύτταρα συναθροίζονται με HNF-4<sup>+/+</sup> και δημιουργούνται τετραπλοειδή με ηλεκτροσύντηξη (electro fusion). Τα έμβρυα αυτά εμφυτεύονται στη μήτρα ψευδοέγκυου ποντικού, και τα αναπτυσσόμενα έμβρυα που έχουν έξωεμβρυϊκούς ιστούς (πχ σπλαχνικό ενδόδερμα) HNF-4<sup>+/+</sup> μπορούν να προχωρήσουν σε περαιτέρω αναπτυξιακά στάδια. Σε τέτοια λοιπόν έμβρυα έγινε αρχικά έλεγχος αν υπάρχουν πρόδρομα ηπατικά κύτταρα τα οποία όπως προαναφέρθηκε είναι επιδεκτικά (competent) στο να ακολουθήσουν την ηπατική τύχη, δηλαδή εκφράζουν κάποιες πρωτεΐνες όπως τον μεταγραφικό παράγοντα HNF-3α και αλβουμίνη. Βρέθηκε λοιπόν ότι δεν υπάρχει καμία διαφορά ανάμεσα στα HNF-4<sup>+/+</sup> και HNF-4<sup>-/-</sup> έμβρυα γεγονός που υποδηλώνει ότι ο HNF-4 δεν παίζει ρόλο στον καθορισμό της ηπατικής τύχης. Στη συνέχεια όταν τα έμβρυα αυτά αφέθηκαν να αναπτυχθούν περισσότερο (12 ημέρες μετά την κύηση) δεν παρατηρήθηκε καμία ουσιαστική διαφορά στη μορφολογία του ήπατος των εμβρύων των δύο γονότυπων (28).

Η έκφραση κάποιων πρωτεϊνών πολύ σημαντικών για την τελική λειτουργία του οργάνου είναι δείκτης έναρξης της διαφοροποίησης των ηπατικών κυττάρων. Για να ελεγχθεί αν ο HNF-4 συμμετέχει στην έκφραση των παραπάνω γονιδίων και επομένως αν παίζει ρόλο στην διαφοροποίηση, χρησιμοποιήθηκαν τα παραπάνω HNF-4<sup>-/-</sup> έμβρυα. Σε σύγκριση λοιπόν με του αγρίου τύπου τα επίπεδα πολλών ηπατικών πρωτεϊνών μειώνονται δραματικά. Αυτά είναι γονίδια πολλών απολιποπρωτεϊνών ApoAI, ApoAII, ApoB, ApoCIII, ApoCII, ηπατικών ενζύμων Andolase B, PAH, ερυθροποιητίνης EPO και δύο μεταγραφικών παραγόντων του HNF-1 και PXR. Φάνηκε λοιπόν ότι πολλά από τα γονίδια-markers της

διαφοροποίησης επηρεάζονται από την απουσία του HNF-4 γεγονός που προσδίδει στον παράγοντα σημαντικό ρόλο στην διαφοροποίηση των ηπατικών κυττάρων χωρίς αυτό να σημαίνει ότι είναι και αποκλειστικός, αφού πολλά άλλα γονίδια παραμένουν ανέπαφα τονίζοντας για άλλη μία φορά πως η συνδυασμένη δράση πολλών ηπατοειδικών μεταγραφικών παραγόντων είναι αυτή που καθορίζει τελικά τον ηπατικό φαινότυπο (106).

Η δημιουργία ποντικού με απενεργοποίηση του HNF-4 μόνο στο ήπαρ (tissue-specific knock out) έδωσε περισσότερες απαντήσεις για τον ρόλο του HNF-4 στη διατήρηση του ηπατικού προφίλ. Το ήπαρ των ζώων αυτών είναι μεγαλύτερο από του αγρίου τύπου. Τα ηπατοκύτταρα είναι υπερτροφικά και στο κυτταρόπλασμά τους εμφανίζονται πολλά κυστίδια γεμάτα λίπος, τα οποία δεν υπάρχουν στο ήπαρ του ποντικού αγρίου τύπου. Περαιτέρω ανάλυση έδειξε, ότι τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης, της HDL χοληστερόλης και των τρυγλυκεριδίων είναι αισθητά μειωμένα στον ορό ενώ αντίθετα τα επίπεδα των χολικών οξέων είναι αυξημένα. Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στα επίπεδα γλυκόζης, αλβουμίνης, λιπαρών οξέων και άλλων ηπατικών δεικτών. Έτσι φαίνεται ότι ο HNF-4 παίζει ρόλο περισσότερο στον μεταβολισμό των λιπών και στη μεταφορά τους. Η συσσώρευση λιπιδίων στα ηπατοκύτταρα οφείλεται σε μειωμένη έκφραση της απολιποπρωτεΐνης ApoB, που παίζει ρόλο στην έκκριση από τα ηπατοκύτταρα της VLDL (Very-Low-Density Lipoprotein), και στην αυξημένη έκφραση του μεταφορέα HDL χοληστερόλης SR-BI που όπως φαίνεται είναι άμεσα (ApoB) και έμμεσα (SR-BI) γονίδια στόχοι του HNF-4. Επιπλέον τα επίπεδα mRNA πολλών απολιποπρωτεϊνών ( ApoCIII, ApoCII, ApoAII, ApoA-IV) μειώνονται δραματικά από την απουσία του HNF-4 γεγονός που υποδηλώνει ότι ρυθμίζονται άμεσα από αυτόν (62).

Τα αυξημένα επίπεδα χολικών οξέων στον ορό του αίματος οφείλονται στην αισθητά μειωμένη έκφραση των μεταφορέων αυτών (Ntcp, Oatp) στα ηπατοκύτταρα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τα χολικά οξέα που μεταφέρονται από το έντερο στην κυκλοφορία με σκοπό να επαναπροσβληθούν από το ήπαρ δεν εισέρχονται τελικά στα ηπατοκύτταρα με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται στο πλάσμα. Άμεση συσχέτιση φαίνεται να υπάρχει επίσης μεταξύ HNF-4 και CYP7a1 (εικόνα 4) που όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω είναι το πρώτο σε σειρά ένζυμο στο μονοπάτι μεταβολισμού της χοληστερόλης που την υδροξυλιώνει σε 7α-υδροξυχοληστερόλη που στη συνέχεια θα μεταβλιστεί σε χολικά οξέα. Έτσι σε έλλειψη HNF-4 τα επίπεδα του CYP7a1 μειώνονται δραματικά γεγονός που συμφωνεί με τα πειράματα



παροδικής διαμόλυνσης είτε σε ηπατικές είτε σε ετερόλογες κυτταρικές σειρές και δίνει εξηγήσεις για τα αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης στα ηπατοκύτταρα (62).

Εκτός από το ήπαρ, ο HNF-4 εκφράζεται στα νεφρά στο έντερο στο στομάχι και στα β-κύτταρα του παγκρέατος. Ο σημαντικός του ρόλος στο πάγκρεας φαίνεται από την συσχέτιση μεταλλαγών του HNF-4 με τον τύπου I νεανικό διαβήτη (MODY I: Maturity Onset Diabetes of the Young I). Όπως και στην περίπτωση του MODYIII η ασθένεια αυτή εμφανίζεται σε νεαρά άτομα (μέχρι την ηλικία των 25) και τα β κύτταρα του παγκρέατος δεν αποκρίνονται με έκκριση ινσουλίνης στα υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Λίγα είναι τα δεδομένα που συνδέουν άμεσα τον HNF-4 με καίριες λειτουργίες των β-κυττάρων. Μία πρόσφατη εργασία στην οποία μία μεταλλαγμένη μορφή του HNF-4 με αρνητική επικρατή δράση έχει εντεθεί μόνιμα στο γένωμα κυττάρων παγκρεατικής προέλευσης (Insulinoma cell line) έδειξε ότι πολλά γλυκολυτικά ένζυμα επηρεάζονται, καθώς και ο μεταφορέας γλυκόζης GLUT2, φαινότυπος που ομοιάζει με την αντίστοιχη έλλειψη του HNF-1 στα ίδια κύτταρα. Οι συγγραφείς δείχνουν ότι και στα κύτταρα αυτά έλλειψη του HNF-4 οδηγεί σε δραματική μείωση του HNF-1 οπότε είναι αρκετά δύσκολο να διασαφηνιστεί αν ο ρόλος του HNF-4 είναι άμεσος ή μέσω του HNF-1 (180, 201).

Πρέπει να ληφθεί όμως υπόψη τα άτομα με MODY είναι ετερόζυγα ως προς την μεταλλαγή δηλαδή το ένα αλληλόμορφο οδηγεί στην έκφραση λειτουργικής πρωτεΐνης. Φαίνεται λοιπόν ότι τα επίπεδα του HNF-4 αλλά και του HNF-1 στο πάγκρεας είναι κρίσιμα για την επιτέλεση των λειτουργιών του οργάνου αφού και μείωση των επιπέδων στο μισό οδηγεί σε δραματικό φαινότυπο, κάτι που δεν ισχύει στα ποντίκια αφού τα ετερόζυγα, τουλάχιστον στην περίπτωση του HNF-1<sup>-/-</sup> εμφανίζονται απόλυτα φυσιολογικά. Ένα άλλο ερώτημα που παραμένει είναι γιατί οι ασθενείς με νεανικό διαβήτη τύπου MODY εμφανίζουν την ασθένεια στα 20 χρόνια τους ενώ φέρουν τις μεταλλαγές από την αρχή της ύπαρξής τους που σημαίνει πιθανότατα ότι η ποσότητα των δύο πρωτεϊνών στο πάγκρεας είναι κρίσιμη από την ηλικία αυτή και μετά.

Άλλο μέλος της οικογένειας των ορφανών πυρηνικών υποδοχέων, που προσδένεται στα ίδια μοτίβα στα οποία προσδένεται και ο HNF-4 στους υποκινητές, είναι ο COUPTF (Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor I:Ear3 and II: Arp-1)ο οποίος ρυθμίζει όμως αρνητικά τα γονίδια στόχους του (20). Ο μηχανισμός καταστολής δεν είναι πλήρως γνωστός. Παλαιότερες εργασίες δείχνουν να αλληλεπιδρά με τον γενικό μεταγραφικό παράγοντα TFIIIB οδηγώντας σε

ανενεργή διαμόρφωση του προ-εναρκτήριου συμπλόκου (Pre Initiation Complex:PIC). Από την άλλη, έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με συγκαταστολείς και πιθανότατα τους στρατολογεί στους υποκινητές των γονιδίων –στόχων. Αξιοσημείωτη είναι η παρατήρηση ότι σε υποκινητές που οι COUPTF<sub>3</sub> δεν προσδένονται στο DNA η προσθήκη τους οδηγεί σε υπερενεργοποίηση των γονιδίων στόχων του HNF-4 μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με αυτόν (91).

γ) Η οικογένεια των HNF-3 που παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία κυρίως στην περιοχή με την οποία προσδένονται στο DNA, με το προϊόν του ομοιοτικού γονιδίου forkhead στη δροσόφιλα (winged-helix motif). Το πρώτο γονίδιο αυτής της οικογένειας που κλωνοποιήθηκε ήταν το HNF-3α και ακολούθησαν το HNF-3β και HNF-3γ. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι πολύ ομόλογες κυρίως στην περιοχή πρόσδεσης στο DNA και προσδένονται σε αυτό ως μονομερή. Ομολογία επίσης παρουσιάζουν στην αμινοτελική περιοχή καθώς και σε δύο μικρά τμήματα της καρβοξυτελικής που είναι αναγκαίες για την πλήρη ενεργοποίηση του παράγοντα. Κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του ποντικού ο HNF-3β είναι αυτός που εκφράζεται πρώτος, ακολουθεί ο HNF-3α και στη συνέχεια ο HNF-3γ (40).

Ο πρώτος φαίνεται ότι παίζει κύριο ρόλο στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια του ποντικού για αυτό το Knock out του είναι μη βιώσιμο. Για τον HNF-3α έχει βρεθεί ότι είναι υπεύθυνος για τον καθορισμό της ηπατικής τύχης που χαρακτηρίζεται από την έκφραση αλβουμίνης. Έτσι έχει προταθεί ότι ο HNF-3α αναδιοργανώνει την χρωματινική δομή του υποκινητή του γονιδίου της αλβουμίνης και επιτρέπει με τον τρόπο αυτό την πρόσδεση επιπλέον παραγόντων [(πχ.GATA 4) (216, 82)]. Αργότερα βρέθηκε πως ο παράγοντας έχει μεγαλύτερη συγγένεια για πρόσδεση σε νουκλεοσώματα παρά σε “γυμνό DNA”(29). Το Knock out του HNF-3α έδειξε επίσης την σημασία του στην ομοιόσταση της γλυκόζης και στην έκφραση γλουκαγόνου στα β-κύτταρα του παγκρέατος (83, 172). Υπερέκφραση τέλος του HNF-3β στο ήπαρ ποντικού έδειξε ότι επηρεάζει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην ομοιόσταση της γλυκόζης και των χολικών οξέων (158).

δ) Η οικογένεια των ONECUT πρωτεϊνών που η περιοχή πρόσδεσης στο DNA είναι διμερής (bipartite) και αποτελείται από μία cut και μία homeodomain περιοχή. Η πρώτη είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση του παράγοντα σε όλες τις γνωστές HNF-6 θέσεις ενώ η δεύτερη σε ορισμένες μόνο από αυτές. Πειράματα παροδικής διαμόλυνσης έχουν δείξει ότι ρυθμίζει την μεταγραφή πολλών γονιδίων όπως του HNF-3β και του HNF-4, πρωτεϊνών μεταφορέων του πλάσματος (

transferrin,  $\alpha$ -fetoprotein), ενζύμων που ρυθμίζουν τον μεταβολισμό της γλυκόζης (20). Κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης ο HNF-6 αρχίζει να εκφράζεται κατά την έναρξη της ανάπτυξης του παγκρέατος και το Knock out του επιβεβαιώνει τον σημαντικό ρόλο του παράγοντα στη διαφοροποίηση των κυττάρων του ενδοκρινούς παγκρέατος (75).

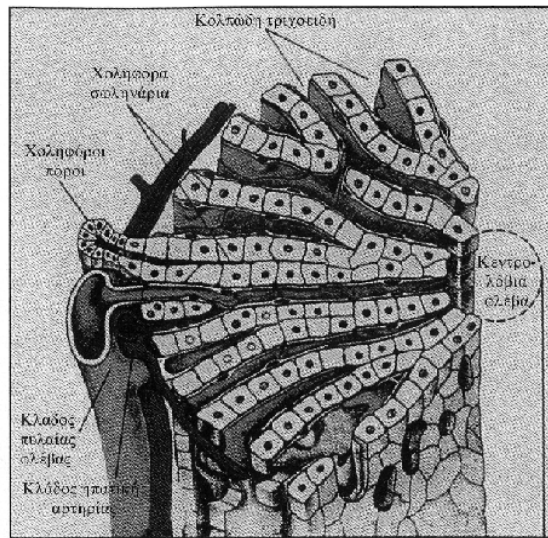
Η τελική μεταβολική κατάσταση ενός ηπατικού κυττάρου που καθορίζει τον ηπατικό φαινότυπο είναι ένα πολυπαραγοντικό σύστημα στο οποίο συμμετέχει ένα δίκτυο των παραπάνω μεταγραφικών παραγόντων που το αποτέλεσμα δράσης τους καθορίζεται από τις σχετικές τους συγκεντρώσεις, τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους και τα εξωκυτταρικά σήματα στα οποία απαντούν. Τα μέχρι τώρα δεδομένα σκιαγραφούν ένα δίκτυο των ηπατοειδικών μεταγραφικών παραγόντων στο οποίο ο HNF-4 βρίσκεται στην κορυφή της ιεραρχίας και ρυθμίζει θετικά τον HNF-1. Έτσι σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης έχειδειχθεί ότι σε ηπατικές και σε ετερόλογες κυτταρικές σειρές η υπερέκφραση του HNF-4 επάγει την έκφραση γονιδίου αναφοράς που βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του HNF-1 υποκινητή στον οποίο έχει βρεθεί μία συντηρημένη θέση πρόσδεσης του HNF-4. Στα έμβρυα HNF-4<sup>-/-</sup> μετά από tetraploid rescue τα επίπεδα του HNF-1 μειώνονται δραματικά καθώς επίσης και σε κύτταρα που έχουν χάσει τον ηπατικό φαινότυπο (αποδιαφοροποιημένα) και επομένως δεν εκφράζουν ηπατικούς δείκτες και ορισμένους ηπατικούς μεταγραφικούς παράγοντες (HNF-4, HNF-1), η προσθήκη εξωγενώς HNF-4 οδηγεί στην επανέκφραση του HNF-1 (177). Από την άλλη όμως, στο HNF-4 liver-specific knock out δεν γίνεται αναφορά στα επίπεδα της έκφρασης του HNF-1 που θα ενίσχυε τα παραπάνω δεδομένα χωρίς όμως να μπορεί κάποιος να ισχυριστεί ότι δεν ισχύουν.

Θέσεις πρόσδεσης HNF-1 έχουν βρεθεί και στον υποκινητή του HNF-4 (ποντικού και ανθρώπου) και επίσης σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης τα γονίδια αναφοράς που βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή του HNF-4 επάγονται από την υπερέκφραση του HNF-1 (61). Από την άλλη όμως στο HNF-1<sup>-/-</sup> ποντίκι τα επίπεδα του HNF-4 δεν αλλάζουν. Αυτό μπορεί να συμβαίνει είτε επειδή στο ήπαρ του ενήλικου ποντικού ο HNF-1 δεν είναι τόσο καθοριστικός για την έκφραση του HNF-4 είτε γιατί σε έλλειψη του κάποιος άλλος παράγοντας (πχ. vHNF-1) του οποίου τα επίπεδα αυξάνονται παίρνει τη θέση του. Έτσι λοιπόν ο HNF-4 επάγει αρχικά την έκφραση του HNF-1 και αυτός με την σειρά του συμμετέχει στη διατήρηση της έκφρασης του πρώτου (positive feedback regulation). Όταν όμως τα επίπεδα του HNF-1 αυξηθούν αρκετά ο ίδιος ρυθμίζει αρνητικά τα γονίδια στόχους του HNF-4

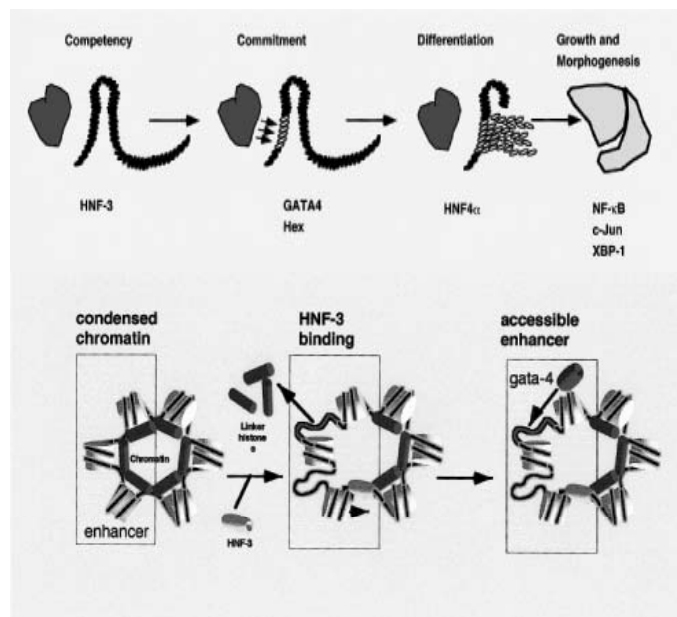
ακόμα και τον εαυτό του, μέσω αλληλεπίδρασης με τον αυτόν. Άλλος ένας παράγοντας που έχει βρεθεί ότι προσδένεται στον υποκινητή του HNF-4 και συμβάλει στη διατήρηση των επιπέδων έκφρασης του είναι ο HNF-6 (61).

Στον COUPTF όμως έχει αποδοθεί ένας παρεμβατικός ρόλος σε αυτό το δίκτυο. Από την μία ρυθμίζει αρνητικά τα γονίδια στόχους του HNF-4, ανταγωνιζόμενος ως προς τις ίδιες θέσεις πρόσδεσης στο DNA, ενώ από την άλλη ενεργοποιεί άλλα γονίδια-στόχους του HNF-4 (στους υποκινητές των οποίων δεν έχει ικανότητα πρόσδεσης) μέσω αλληλεπίδρασης με τον αυτόν.

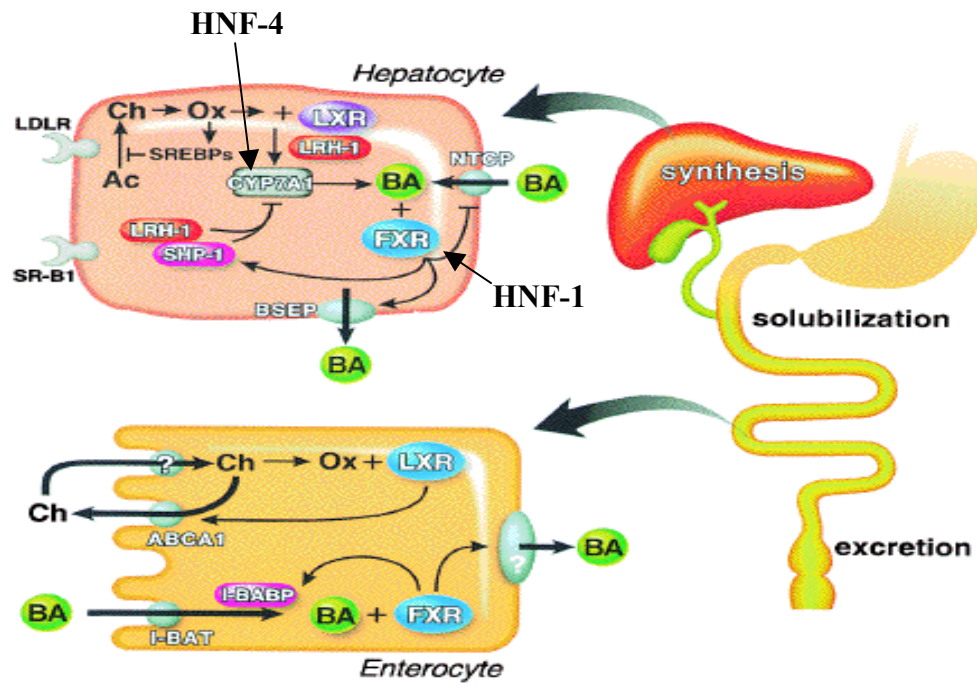
Φαίνεται λοιπόν ότι το δίκτυο είναι “σχεδιασμένο” με τέτοιο τρόπο ώστε να διατηρούνται τα επίπεδα των ηπατοειδικών μεταγραφικών παραγόντων σταθερά κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Όταν κάποιο κομμάτι αυτού του δικτύου διαταραχθεί (όπως συμβαίνει σε κάποιο knock out είτε διαγονιδιακό στο οποίο υπερεκφράζεται κάποιος παράγοντας) συνήθως ο φαινότυπος είναι αρκετά πολύπλοκος και δεν εξηγείται πάντα με απλές αντιστοιχίσεις γεγονόσ που τονίζει την πολυπλοκότητα του δικτύου (εικόνα 5).



Εικόνα 1. Εγκάρσια τομή ήπατος



Εικόνα 2. Διακριτά στάδια στην ανάπτυξη του ήπατος



Εικόνα 3. Ρόλος του HNF-4 και HNF-1 στην ομοίσταση της χοληστερόλης

## HNF-1

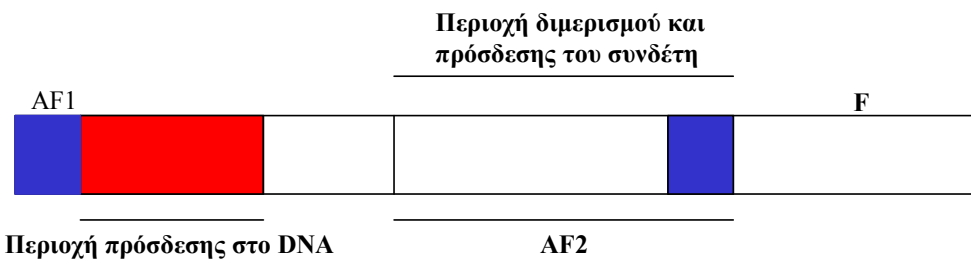
Περιοχή διμερισμού



Περιοχή πρόσδεσης στο DNA

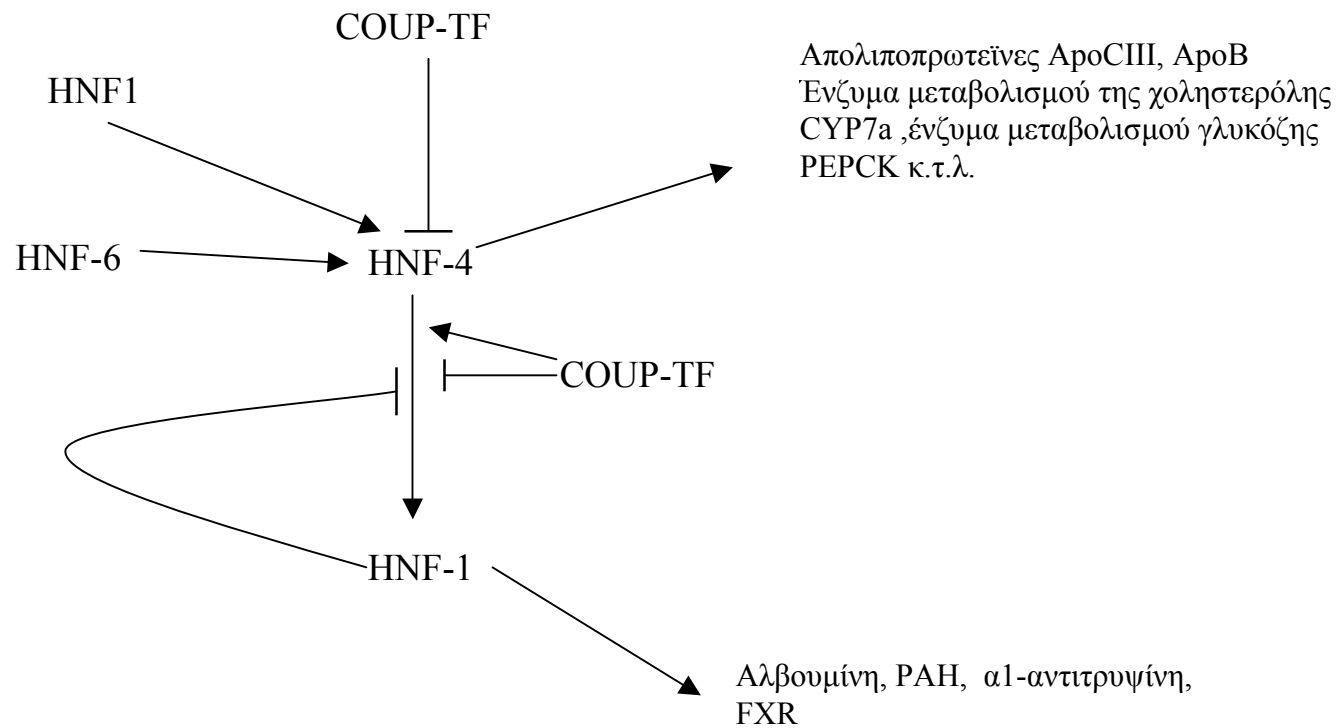
A. Σχηματική αναπαράσταση του HNF1

## HNF-4



B. Σχηματική αναπαράσταση του HNF4

**ΕΙΚΟΝΑ 1**



**Εικόνα 5.** Το δίκτυο των παραγόντων που καθορίζουν τον ηπατικό



## Μεταγραφική ρύθμιση

Μία μεγάλη πληθώρα εργασιών τις τελευταίες δεκαετίες έδειξε ότι η μεταγραφή των γονιδίων ευκαρυωτικών οργανισμών είναι μία ιδιαίτερα πολύπλοκη βιοχημική διαδικασία που ρυθμίζεται αυστηρά σε πολλά επίπεδα. Βιοχημικές και γενετικές αναλύσεις ποικίλων οργανισμών–μοντέλων έχουν αναδείξει ένα εντυπωσιακό αριθμό παραγόντων που παίζουν ρόλο στην μεταγραφική ρύθμιση. Εκτός από την μεγάλη ποικιλία μεταγραφικών παραγόντων που έχουν την ικανότητα να προσδένονται στο DNA και να ρυθμίζουν συγκεκριμένα γονίδια, που είναι σχετικά αναμενόμενη σε σχέση με τους προκαρυωτικούς οργανισμούς, ενδιαφέρον παρουσιάζει η πολυπλοκότητα των γενικών μεταγραφικών παραγόντων, συνενεργοποιητών και συγκαταστολέων, μερικοί από τους οποίους έχουν και ενζυμικές ιδιότητες. Επίσης, έχουν μελετηθεί εκτενώς αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραπάνω παραγόντων και η κρισιμότητά τους στην μεταγραφική ενεργοποίηση. Από την άλλη όμως, πολύ λίγα είναι γνωστά για τον ακριβή μηχανισμό με τον οποίο κάθε γονίδιο ενεργοποιείται ή καταστέλλεται σε ένα συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο. Πρόσφατα στοιχεία προτείνουν ότι υπάρχει μία αλληλουχία από γεγονότα που οδηγούν στη σύνθεση RNA και ότι πολύ σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο παίζει η δομή του πυρήνα του ευκαρυωτικού κυττάρου που περιλαμβάνει τόσο την διαμερισματοποίηση του, όσο και την υψηλής οργάνωσης χρωματινική δομή. Στη συνέχεια περιγράφονται πρόσφατα ευρήματα και συζητούνται διάφορα μοντέλα που έχουν προταθεί για την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε μεταγραφικό επίπεδο.

Το γονιδίωμα των ευκαρυωτικών κυττάρων περιέχει πληθώρα *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων υπεύθυνων για τον καθορισμό των προτύπων γονιδιακής έκφρασης (στο χρόνο και σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους) με βάση τις μεταβολικές απαιτήσεις, τα αναπτυξιακά προγράμματα και τα εξωτερικά σήματα που δέχονται. Για να ελέγχουν την τεράστια γενετική πληροφορία οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί έχουν το γραμμικό τους DNA οργανωμένο σε διακριτά χρωμοσώματα που το κάθε ένα είναι «πακεταρισμένο» σε χρωματίνη, η μικρότερη μονάδα της οποίας ορίζεται ως νουκλεόσωμα. Αυτό περιλαμβάνει 146 βάσεις DNA που τυλίγουν με 1.65 στροφές ένα οκταμερές ιστονών. Περιλαμβάνει επίσης ένα τμήμα DNA (linker) που συνδέει τα παρακείμενα οκταμερή, και ιστόνες (H1) που προσδένονται στο linker DNA. Η συν-κρυστάλλωση του συμπλόκου DNA- οκταμερούς έδειξε ότι οι ιστόνες δημιουργούν έναν κύλινδρο που αποτελείται από δύο ετεροδιμερή των

ιστονών H3 και H4 που περιβάλλονται από δύο ετεροδιμερή των ιστονών H2A και H2B. Οι τέσσερις αυτές ιστόνες που απαρτίζουν τον πυρήνα του νουκλεοσώματος είναι οι πιο συντηρημένες πρωτεΐνες των ευκαρυωτικών οργανισμών (101, 115). Η κρυσταλλική δομή ανέδειξε τρία βασικά χαρακτηριστικά των νουκλεοσωμάτων: Πρώτον, το DNA τυλίγεται γύρω από τον πυρήνα του νουκλεοσώματος (οκταμερές ιστονών) και η τοποθέτησή του εξαρτάται από ποικίλες αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις ιστόνες και τις φωσφορικές ομάδες ή τις δεσοξυριβόζες. Δεύτερον, η περιέλιξη του DNA στο νουκλεόσωμα επιτρέπει την αλληλεπίδραση ανάμεσα στις αμινοτελικές ουρές των ιστονών με τα παρακείμενα νουκλεοσώματα και τρίτον, η αλληλεπίδραση DNA-οκταμερούς είναι περισσότερο δυναμική παρά στατική με αποτέλεσμα οποιαδήποτε τοπική διατάραξη αυτής της αλληλεπίδρασης να είναι βασικής σημασίας για τη γονιδιακή έκφραση (88, 114, 113). Τα νουκλεοσώματα συσπειρώνονται σε χρωματινικές ίνες που αποτελούν την δομική βάση των χρωμοσωμάτων. Η ιστόνη H1 που βρίσκεται στο τμήμα του DNA που συνδέει δύο νουκλεοσώματα (linker) φαίνεται να παίζει ρόλο στην οργάνωση της ίνας. Οι προεξέχουσες αμινοτελικές ουρές των νουκλεοσωμάτων παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην προώθηση της δημιουργίας της χρωματινικής ίνας είτε μέσω των άμεσων επαφών με τα παρακείμενα νουκλεοσώματα είτε μέσω της αλληλεπίδρασής τους με το συνδέτη (linker) DNA.

Το «πακετάρισμα» των υποκινητών σε χρωματίνη έχει θεωρηθεί ευρέως ως γενικός ρυθμιστής της μεταγραφής. Παλαιότερα πειράματα *in vitro* μεταγραφής σε μήτρα στην οποία έχει προηγηθεί ανασύσταση νουκλεοσωμάτων δείχθηκε ότι τα νουκλεοσώματα αναστέλλουν την μεταγραφική ενεργοποίηση, ενώ προ-επώαση της μήτρας με την μεταγραφική μηχανή πριν την χρωματινική ανασύσταση επιτρέπει την έναρξη της μεταγραφής (86). Επίσης, αφαίρεση των ιστονών στον σακχαρομύκητα οδηγεί σε ενεργοποίηση ορισμένων γονιδίων (138) γεγονός που δείχνει ότι και *in vivo* πειράματα υποστηρίζουν το παραπάνω μοντέλο. Πρόσφατες εργασίες έδειξαν ότι αποδιοργάνωση της νουκλεοσωμικής δομής αυξάνει την πρόσδεση των ενεργοποιητών και συστατικών της γενικής μεταγραφικής μηχανής στο DNA υποδηλώνοντας ότι η δομή των νουκλεοσωμάτων είναι απαγορευτική για την πρόσβαση των παραγόντων που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση της μεταγραφής (32, 143) και ότι η χρωματίνη είναι δυναμικός συμμετέχων στην μεταγραφική ρύθμιση.

Το καθοριστικό στάδιο για την έναρξη της μεταγραφής είναι η μορφοποίηση του προενακτήριου συμπλόκου (PIC: preinitiation Complex) στον υποκινητή που περιλαμβάνει έναν ή περισσότερους ενεργοποιητές οι οποίοι προσδένονται σε ειδικές

θέσεις και στρατολογούν στη συνέχεια την RNA πολυμεράση II με την μορφή ολοενζύμου που περιλαμβάνει τους γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες (GTFs: General Transcription Factors) και το σύμπλοκο των μεσολαβητών (Mediator Complex). Εκτός από την γενική μεταγραφική μηχανή οι ενεργοποιητές είναι υπεύθυνοι για την στρατολόγηση παραγόντων που αναδιαμορφώνουν τοπικά την δομή της χρωματίνης (chromatin modifying enzymes) και επομένως επιτρέπουν την περαιτέρω στρατολόγηση της γενικής μεταγραφικής μηχανής.

Οι παράγοντες που έχουν την ικανότητα να αναδιαμορφώνουν την χρωματινική δομή χωρίζονται σε δύο γενικές κατηγορίες: Στην πρώτη ανήκουν αυτοί που έχουν ενζυμική ενεργότητα και τροποποιούν ομοιοπολικά τις αμινοτελικές ουρές των ιστονών μέσω ακετυλίωσης, μεθυλίωσης και φωσφορυλίωσης ενώ στη δεύτερη ανήκουν αυτοί που ανακατασκευάζουν τα νουκλεοσώματα χωρίς να τροποποιούν την πρωτεϊνική τους μονάδα (Remodeling Complexes). Σε πολλές περιπτώσεις οι ακριβείς θέσεις των τροποποιήσεων αυτών έχουν καθοριστεί. Για παράδειγμα η ιστόνη H3 έχει βρεθεί ότι ακετυλιώνεται στην λυσίνη 9, 14, 18 και 23, φωσφορυλιώνεται στην σερίνη 10 και μεθυλιώνεται στις λυσίνες 9 και 27. Διάφοροι συνδυασμοί των παραπάνω τροποποιήσεων απαντώνται στους διαφορετικούς υποκινητές και αποτελούν έναν <<κώδικα >> (histone code) βάσει του οποίου καθορίζεται η μετέπειτα στρατολόγηση διαφορετικών προενακτήριων συμπλόκων που θα χαρακτηρίζουν κάθε έναν από τους υποκινητές (101).

Από τις τροποποιήσεις ιστονών η ακετυλίωση είναι η καλύτερα μελετημένη και από την άποψη των αμινοξικών καταλοίπων που τροποποιούνται αλλά και των συνεπειών που έχουν οι αλλαγές αυτές στην μεταγραφική ενεργοποίηση. Σύμφωνα με πρόσφατα πειραματικά δεδομένα υπάρχει άμεση συσχέτιση ανάμεσα στην ακετυλίωση των ουρών των ιστονών και της μεταγραφικής ενεργοποίησης. Υπερακετυλιωμένες ιστόνες απαντώνται σταθερά προσδεδεμένες σε μεταγραφικά ενεργές περιοχές και περισσότερο <<προσβάσιμες>> χρωματινικές δομές, ενώ υποακετυλιωμένες ιστόνες απαντώνται σε περιοχές μεταγραφικά ανενεργές. (63, 64). Η σχέση της μεταγραφικής ενεργοποίησης και της ακετυλίωσης των ιστονών πιθανότατα περιλαμβάνει περισσότερους από έναν μηχανισμούς. Έτσι, πιστεύεται ότι η ακετυλίωση αποδιοργανώνει την υψηλής οργάνωσης χρωματινική δομή, ουδετεροποιώντας το φορτίο των θετικά φορτισμένων λυσινών των ιστονών μειώνοντας έτσι την συγγένεια τους με το DNA ή τα παρακείμενα νουκλεοσώματα, (48) και παρέχει με τον τρόπο αυτό καλύτερη πρόσβαση σε μεταγραφικούς ρυθμιστές

και την γενική μεταγραφική μηχανή (52). Πρόσφατες εργασίες δείχνουν επίσης ότι πολλοί παράγοντες αλληλεπιδρούν με μεγαλύτερη συγγένεια με τις υπερακετυλιωμένες ιστόνες συμβάλλοντας στην μορφοποίηση ενός σταθερότερου προενακτήριου συμπλόκου (74). Οι ουρές των ιστονών τροποποιούνται επίσης με φωσφορυλίωση. Η φωσφορυλίωση της ιστόνης H3 έχει συνδεθεί με την μεταγραφική ενεργοποίηση και κινάσες ιστονών έχειδειχθεί ότι στρατολογούνται σε μεταγραφικά ενεργούς υποκινητές. Στα κύτταρα η έλλειψη της Rsk-2 κινάσης οδηγεί σε διαφορετικό πρότυπο έκφρασης πολλών γονιδίων (36,167). Οι ιστόνες H2B, H3 και H4 μεθυλιώνονται αλλά η επίδραση της τροποποίησης αυτής στην μεταγραφική ενεργοποίηση δεν έχει μελετηθεί με λεπτομέρεια. Η μεθυλίωση συνήθως πραγματοποιείται σε ακετυλιωμένες ιστόνες H3 και H4 προτείνοντας ότι σε ορισμένες περιπτώσεις οι δύο αυτές τροποποιήσεις συνδέονται άμεσα και πιθανότατα οδηγούν σε ενεργοποίηση της μεταγραφής. Για παράδειγμα πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι η μεθυλοτρανσφεράση CARM1 είναι απαραίτητη για την μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων από ορισμένους πυρηνικούς υποδοχείς μετά από προσθήκη ορμόνης (23).

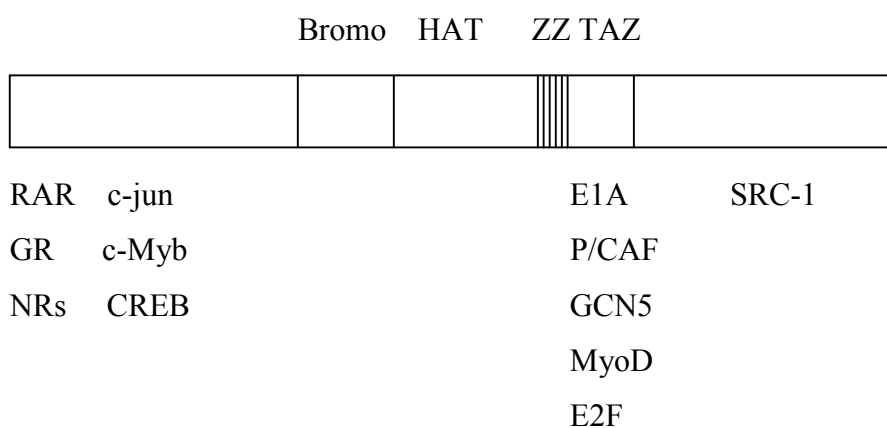
Γενικά οι πρωτεΐνες που έχουν HAT (histone acetyltransferase) ενζυμική ενεργότητα χωρίζονται ανάλογα με τον κυτταρικό εντοπισμό τους σε δύο κατηγορίες: Σε HATs τύπου A που εντοπίζονται στον πυρήνα του κυττάρου και ακετυλιώνουν τοπικά τις ιστόνες στους υποκινητές καθώς και πυρηνικούς παράγοντες και σε HATs τύπου B που είναι κυτταροπλασματικές και πιστεύεται ότι ακετυλιώνουν τις νεοσυντιθέμενες ιστόνες ως μέρος της διαδικασίας συγκρότησης (assembly) του οκταμερούς των ιστονών. Η πρωτεΐνη Hat1 είναι η καταλυτική υπομονάδα του HAT B συμπλόκου και έχει βρεθεί ότι ακετυλιώνει νεοσυντιθέμενη ιστόνη H4 στις λυσίνες 5 και 12. Το ίδιο σύμπλοκο περιλαμβάνει την Hat 2 πρωτεΐνη ομόλογη με τις Rbar46/48 που απαντώνται σε σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης (remodeling complexes) καθώς και ορισμένες υπομονάδες του CAF1 συμπλόκου που είναι γνωστό ότι παίζει ρόλο στην ανασύσταση της χρωματίνης (chromatin assembly) (162). Παρόλο λοιπόν που υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις για τον ρόλο της ακετυλίωσης των ιστονών από Hat1 στην εναπόθεση των ιστονών και την ανασύσταση της χρωματίνης, μεμονωμένες μεταλλάξεις της Hat 1 και Hat 2 απέτυχαν στο να αποδώσουν στο HAT B σύμπλοκο έναν σαφή ρόλο στις παραπάνω διαδικασίες.

Η πρώτη ένδειξη που συνέδεε την HAT ενζυμική ενεργότητα με την μεταγραφική συνενεργοποίηση ήρθε από την ανακάλυψη της ακετυλοτρανσφεράσης των ιστονών A (HAT A) στην *Tetrahymena* η οποία βρέθηκε ότι είναι ομόλογη με την πρωτεΐνη GCN5, έναν μεταγραφικό συνενεργοποιητή στον σακχαρομύκητα (17). Έτσι βρέθηκε λοιπόν ότι οι ιστόνες σε υποκινητές που εξαρτώνται από GCN5 είναι υπερακετυλιωμένες ενώ μεταλλαγές στην HAT καταλυτική περιοχή του GCN5 επηρεάζει την ικανότητα του παράγοντα να επάγει μεταγραφή καθώς και την ακετυλίωση των ιστονών στην περιοχή του υποκινητή (94, 205).

Στη συνέχεια ένας μεγάλος αριθμός συνενεργοποιητών, που αρχικά ταυτοποιήθηκαν ως πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τις ενεργοποιητικές περιοχές (activation domains) των μεταγραφικών παραγόντων, βρέθηκε ότι έχουν HAT ενζυμική ενεργότητα. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται οι συνενεργοποιητές CBP (CREB-binding protein) και p300 (7), oP/CAF (140) και η οικογένεια των συνενεργοποιητών p160 (SRC-1, TIF2/GRIP1, RAC3/TRAM1/AIB1/PCIP/ACTR) που αρχικά βρέθηκε ότι αλληλεπιδρούν με ορμονικούς πυρηνικούς υποδοχείς (104, 178).

Οι CBP και p300 είναι δύο πρωτεΐνες που απομονώθηκαν ανεξάρτητα ως παράγοντες που αλληλεπιδρούν με την E1A πρωτεΐνη του αδενοϊού (p300, 116, 208) ή την φωσφορυλιωμένη μορφή του μεταγραφικού παράγοντα CREB (CBP, 208) αλλά πολύ σύντομα τους αποδόθηκε παρόμοια λειτουργία στην μεταγραφική ενεργοποίηση (4). Περιλαμβάνουν τρεις διακριτές zinc finger περιοχές (γνωστές ως cys, ZZ και TAZ περιοχές), μία περιοχή γνωστή ως Bromodomain, την περιοχή που είναι υπεύθυνη για την ενεργότητα ακετυλοτρανσφεράσης (HAT domain) και τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες περιοχές αλληλεπίδρασης με πολλούς μεταγραφικούς ενεργοποιητές. [(76.), (Εικόνα 1)] Μερικοί από τους παράγοντες αυτούς είναι οι c-jun (9), c-Myb(34), TFIIID (162), MyoD (165, 166), E2F( 125), πυρηνικοί υποδοχείς (84) και πολλοί άλλοι. Η HAT ενζυμική ενεργότητα του CBP/p300 φαίνεται να είναι απαραίτητη για την μεταγραφική ενεργοποίηση που εξαρτάται από τους παραπάνω παράγοντες αφού μεταλλαγές στην HAT περιοχή του καταργούν την μεταγραφική τους ενεργότητα (125, 140, 7).

## Εικόνα 1 p300/CBP



Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό πολλών αν όχι όλων των HATs που έχουν ανακαλυφθεί ως σήμερα είναι ότι δεν δρουν μόνες τους *in vivo*. Έτσι σε πολλές περιπτώσεις ορισμένες ακετυλοτρανσφεράσες φαίνεται ότι αλληλεπιδρούν με άλλες HATs και συνενεργοποιητές στον ίδιο υποκινητή χωρίς να έχει διασαφηνιστεί πλήρως ο ακριβής τους ρόλος. Σε άλλες περιπτώσεις, μία ακετυλοτρανσφεράση είναι η καταλυτική υπομονάδα πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων. Τα καλύτερα χαρακτηρισμένα HAT σύμπλοκα είναι αυτά που περιλαμβάνουν την πρωτεΐνη GCN5 του σακχαρομύκητα (SAGA, ADA 50, 168) και τις ομόλογες πρωτεΐνες στα θηλαστικά P/CAF (195, 139) και hGCN5 long ( STAGA, TFTC 123, 16). Στα πλαίσια των συμπλόκων αυτών οι παραπάνω ακετυλοτρανσφεράσες έχουν την ικανότητα να ακετυλιώνουν νουκλεοσώματα και όχι μόνο ελεύθερες ιστόνες που ακετυλιώνουν οι ανασυνδιασμένες μορφές τους (94, 95). Στον πίνακα 1 αναφέρονται οι κυριότερες πρωτεΐνες που έχουν HAT ενζυμική ενεργότητα σε πιο οργανισμό υφίστανται, σε πιο πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο ανήκουν και περιγράφονται συνοπτικά κάποια χαρακτηριστικά τους (πχ ειδικότητα σε κάποιο υπόστρωμα,101).

### Πίνακας 1.

<u>Πρωτεΐνη</u>	<u>Σύμπλοκο</u>	<u>Οργανισμός</u>	<u>Υπόστρωμα</u>
Hat1	Hat1	S.cerevisiae	Free H4, not nucleosomal
GCN5	ADA	S.cerevisiae	Nucleosomal H3
GCN5	SAGA	S.cerevisiae	Nucleosomal H3, H2B

Sas3	NuA3	S.cerevisiae	Nucleosomal H3
Esa1	NuA4	S.cerevisiae	Nucleosomal H4, H2A
TAF II 145	yTFIID	S.cerevisiae	Free H3, H4
Elp3	Elongator	S.cerevisiae	Free H2A, H2B, H3, H4
Hat B	Hat B complex	Z.mays	Free H4
dTAFII230	dTFIID	D.melanogaster	Free H3, H4
hTAFII250	hTFIID	H.sapiens	Free H3, H4
GCN5-L	TFTC	H.sapiens	Nucleosomal H3
GCN5-L	STAGA	H.sapiens	-
PCAF	PCAF	H.sapiens	Nucleosomal H3
P300/CBP	-	H.sapiens	Free H3, H4, H2A, H2B
SRC-1	-	H.sapiens	FreeH3>H4
ACTR	-	H.sapiens	FreeH3>H4
Tip60	Tip60	H.sapiens	Free H4, H2A

Πρόσφατα βρέθηκε πως οι ακετυλοτρανσφεράσες μπορούν και ακετυλιώνουν και άλλες πρωτεΐνες εκτός από ιστόνες. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται μεταγραφικοί ενεργοποιητές όπως p53(54), E2F1(124), EKLF(218), GATA1 (15), συνενεργοποιητές ACTR (24) και CIITA (179), γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες TFIIIE και TFIIIF (72), πρωτεΐνες δομής όπως η τουμπουλίνη (117) και πρωτεΐνες που παίζουν ρόλο στην μεταφορά των πρωτεϊνών στον πυρήνα του κυττάρου όπως η importin a (8). Η ακετυλίωση φαίνεται πως επηρεάζει πολλές από τις ιδιότητες των παραπάνω παραγόντων όπως την συγγένεια τους ως προς το DNA (E2F1, p53, EKLF, Sp1), την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με άλλους παράγοντες( ACTR), την μεταγραφική τους ενεργότητα (GAT1-3). Έχουν περιγραφεί και περιπτώσεις που η ακετυλίωση της ίδιας πρωτεΐνης παίζει και θετικό και αρνητικό ρόλο στην μεταγραφική ενεργοποίηση ακόμα και στον ίδιο υποκινητή. Έτσι η ακετυλίωση της HMG I(Y) πρωτεΐνης στη λυσίνη 71 από P/CAF είναι σημαντική για την δημιουργία του ‘ενισχυτοσώματος’ (enhanceosome) και την μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της ιντερφερόνης β (IFNβ). Από την άλλη, φαίνεται πως η τροποποίηση

αυτή στη λυσίνη 65 από CBP είναι εξίσου σημαντική για την μείωση της συγγένειας του παράγοντα με το DNA και την μετέπειτα αποσταθεροποίηση του συμπλόκου στον υποκινητή και την μεταγραφική καταστολή (134, 135). Στον πίνακα 2 συνοψίζονται οι πρωτεΐνες που ακετυλιώνονται, ποια ακετυλάση τις ακετυλιώνει (*in vitro*) και η επίδραση που έχει η τροποποίηση αυτή στη λειτουργία τους (26).

## Πίνακας 2.

Πρωτεΐνη	Λειτουργία	Ακετυλάση	Επίδραση της ακετυλίωσης
p53	Μεταγραφικός παράγοντας	CBP/p300, P/CAF	Αυξάνει την συγγένεια ως προς το DNA.
GATA 1/3	Μεταγραφικός παράγοντας	CBP/p300	Αύξηση της μεταγραφικής ενεργοποίησης
EKLF	Μεταγραφικός παράγοντας	CBP/p300	Αυξάνει την συγγένεια ως προς το DNA.
MyoD	Μεταγραφικός παράγοντας	P/CAF	Αυξάνει την συγγένεια ως προς το DNA.
E2F1	Μεταγραφικός παράγοντας	P/CAF	Αυξάνει τον χρόνο ημι-ζωής του παράγοντα.
c-Myb	Μεταγραφικός παράγοντας	CBP/p300, GCN5	Αυξάνει την συγγένεια ως προς το DNA.
CDP/cut	Μεταγραφικός παράγοντας	CBP/p300	Μειώνει την συγγένεια ως προς το DNA.
CIITA	Συνενεργοποιητής	CBP P/CAF	Αύξηση της μεταγραφικής ενεργοποίησης Αύξηση του πυρηνικού εντοπισμού
ACTR	Συνενεργοποιητής	CBP/p300	Μείωση της αλληλεπίδρασης με ER
TCF	Μεταγραφικός παράγοντας	CBP	Μείωση της αλληλεπίδρασης με συνενεργοποιητές.
Tat	HIV συνενεργοποιητής	CBP/p300, P/CAF	Τροποποίηση της αλληλεπίδρασης με CDK9



TFIIE	Γενικοί μεταγραφικοί παράγοντας	CBP/p300, P/CAF, TAFII250	Άγνωστη
TFIIF	παράγοντας	CBP/p300, P/CAF	
HMG-14	Chromatin-associated	CBP/p300	Μειώνει την συγγένεια ως προς το νουκλεόσωμα.
HMG-17	Chromatin-associated	P/CAF	Μειώνει την συγγένεια ως προς το νουκλεόσωμα.
HMG I(Y)	Chromatin-associated	CBP/p300,P/CAF	Επάγει την συγκρότηση και από συγκρότηση του ενισχυτοσώματος στον υποκινητή της INFb.
Importin a	Παράγοντας εισόδου πρωτεϊνών στον πυρήνα	CBP/p300	Άγνωστη
Rch1	Παράγοντας εισόδου πρωτεϊνών στον πυρήνα	CBP/p300	Άγνωστη

Η σημασία της ακετυλίωσης στην γονιδιακή ρύθμιση έκανε το ενδιαφέρον των επιστημόνων να στραφεί σε μηχανισμούς που ρυθμίζουν την ενζυμική ενεργότητα των HATs. Πρόσφατα λοιπόν δεδομένα δείχνουν ότι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ίδιων των Hats επηρεάζουν την λειτουργία τους. Για παράδειγμα η φωσφορυλίωση του CBP από Cdk2 (2) επάγει την HAT ενεργότητά του ενώ η φωσφορυλίωση του GCN5 από DNA-dependent πρωτεϊνική κινάση (11) την αναστέλλει. Επίσης έχει βρεθεί ότι πολλές πρωτεΐνες τροποποιούν την HAT ενεργότητα των ακετυλασών. Πιο συγκεκριμένα η πρόσδεση της πρωτεΐνης του αδενοϊού E1A στο CBP έχει δειχθεί από δύο διαφορετικές εργασίες ότι και αυξάνει (2) και μειώνει (22, 57) την HAT ενεργότητα του, ενώ η αλληλεπίδραση του με P/CAF μειώνει την ικανότητα του παράγοντα να ακετυλιώνει ιστόνες και άλλες πρωτεΐνες (22). Τελευταία βρέθηκε ότι οι ιικοί (viral interferon regulatory factor vIRF 107) και κυτταρικοί ρυθμιστές (twist 57) αναστέλλουν την ενζυμική ενεργότητα του CBP και του P/CAF ή από την άλλη αυξάνουν την ικανότητα του CBP να ακετυλιώνει νουκλεοσώματα. Τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν ότι το ίδιο

ένζυμο μπορεί να ρυθμιστεί με ποικίλους τρόπους ακόμα και από τον ίδιο ρυθμιστή (E1A) και να οδηγήσει σε διαφορετικό αποτέλεσμα κάτω από διαφορετικές κυτταρικές συνθήκες.

Παράλληλα με τις ακετυλοτρανσφεράσες άρχισαν στη βιβλιογραφία να περιγράφονται και ένζυμα που έχουν την ικανότητα να αφαιρούν ακετυλομάδες από τις ακετυλιωμένες πρωτεΐνες κυρίως ιστόνες. Οι απακετυλάσες των ιστονών (Histone deacetylases:HDACs) συνδέθηκαν με την μεταγραφή όταν το πρώτο πεπτίδιο που καθарίστηκε και αποδείχθηκε ότι έχει την ενζυμική αυτή ενεργότητα εμφάνιζε μεγάλη ομολογία με έναν μεταγραφικό καταστολέα στον σακχαρομύκητα (Rpd3 585 Young). Μεταλλαγές στο γονίδιο της Rpd3 οδηγούν σε υπερακετυλίωση των αμινοτελικών ουρών των ιστονών H3 και H4 (163). Στον σακχαρομύκητα υπάρχουν τουλάχιστον πέντε απακετυλάσες ,Rpd3, Hda1, Hos1, Hos2 και Hos3 και χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, την I (Rpd3-like) και την II (Hda1-like). Στον άνθρωπο έχουν βρεθεί οκτώ μέχρι σήμερα και κατατάσσονται και αυτές σε δύο κατηγορίες την I που περιλαμβάνει την HDAC1,2,3 και 8 (101) και την II που περιλαμβάνει την HDAC4,5,6,7 (101). Σταδιακά έγινε φανερό από τις διάφορες εργασίες ότι όπως και οι ακετυλοτρανσφεράσες μέσα στα κύτταρα υφίσταται με την μορφή πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων που περιλαμβάνουν πρωτεΐνες που είναι γνωστές ως συγκαταστολείς και στρατολογούνται στους υποκινητές μέσω της αλληλεπίδρασής τους με μεταγραφικούς καταστολείς. Στον πίνακα 3 αναφέρονται τα πιο γνωστά σύμπλοκα απακετυλασών και παραδείγματα παραγόντων με τους οποίους αλληλεπιδρούν (101).

### **Πίνακας 3.**

<b>Πρωτεΐνη</b>	<b>Οργανισμός</b>	<b>Σχόλιο</b>
Rpd3	S.cerevisiae	Μεταγραφική καταστολή
Hda1	S.cerevisiae	Έλλειψη επηρεάζει τα επίπεδα ακετυλίωσης <i>in vivo</i>
Hos3	S.cerevisiae	
ySir2	S.cerevisiae	Εμπλέκεται στην γήρανση Εξαρτάται από NAD <sup>+</sup>
dRpd3	D. melanogaster	Εμπλέκεται στη μεταγραφική καταστολή και σε position

		effect variegation φαινόμενα.
dHDAC3	D. melanogaster	
mHda2	M. musculus	Περιέχει δύο HDAC περιοχές.
mHDAC1	M. musculus	
mHDAC2	M. musculus	
mHDAC3	M. musculus	
mHDAC5	M. musculus	
hHDAC1	H. sapiens	Στρατολογείται από καταστολείς που προσδένονται στο DNA
hHDAC1	H. sapiens	Στρατολογείται από καταστολείς που προσδένονται στο DNA
hHDAC3	H. sapiens	Αλληλεπιδρά με HDAC4 και HDAC5.
hHDAC4	H. sapiens	Ο κυτταρικός εντοπισμός της επηρεάζει τη λειτουργία της.
hHDAC5	H. sapiens	Προσδένεται στους συγγαταστολείς NCoR, SMRT
hHDAC6	H. sapiens	
hHDAC7	H. sapiens	Προσδένεται σε SMRT
hHDAC8	H. sapiens	Ιστοειδική έκφραση που διαφέρει από τις άλλες HDACs
hSir2	H. sapiens	Εμπλέκεται στην γήρανση Εξαρτάται από NAD <sup>+</sup>

Τα νουκλεοσώματα μπορούν επίσης να αλλάζουν την διαμόρφωσή τους χωρίς να τροποποιηθεί ομοιοπολικά η πρωτεϊνική τους υπομονάδα. Η ανακατασκευή αυτή περιλαμβάνει αποσταθεροποίηση και επαναδημιουργία των επαφών μεταξύ DNA και ιστονών που έχει ως τελικό αποτέλεσμα είτε την αλλαγή της διαμόρφωσης του

νουκλεοσώματος είτε την μετακίνησή του ως προς το DNA. Παρόλο που ο ακριβής μηχανισμός της χρωματινικής ανακατασκευής δεν έχει διασαφηνιστεί αρκετά, διαφορετικά κυτταρικά σύμπλοκα που συμβάλουν στη διαδικασία αυτή έχουν περιγραφεί. Γενετικές μελέτες στον σακχαρομύκητα ανέδειξαν τα πρώτα μέλη της οικογένειας των συμπλόκων αυτών (SWI/SNF). Μετέπειτα βιοχημικές μελέτες έδειξαν ότι στα κύτταρα απαντώνται ως υπομονάδες δύο διαφορετικών πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων. Οι πιο χαρακτηριστικές υπομονάδες αυτών, οι SWI2/SNF2, έχουν εγγενή ικανότητα να ανακατασκευάζουν τα νουκλεοσώματα αντλώντας ενέργεια από την υδρόλυση ATP (ATPase activity 100). Στη συνέχεια βρέθηκε ένας μεγάλος αριθμός συμπλόκων που περιέχουν ομόλογες με τις SWI2/SNF2 υπομονάδες σε διάφορους οργανισμούς. Για παράδειγμα η πρωτεΐνη STH1 στον σακχαρομύκητα είναι ομόλογη των SWI2/SNF2 και βρέθηκε ότι είναι η καταλυτική υπομονάδα του RSC συμπλόκου που φαίνεται να έχει πολλά κοινά λειτουργικά χαρακτηριστικά με το σύμπλοκο SWI/SNF (18, 19, 111). Επίσης ο παράγοντας Brahma (Brm), που αρχικά ανακαλύφθηκε σε γενετικές μελέτες στη δροσόφιλα σαν παράγοντας που απαιτείται για την ενεργοποίηση των ομοιοτικών γονιδίων, είναι ομόλογη με τις SWI2/SNF2 (186). Στη συνέχεια βρέθηκαν ομόλογες πρωτεΐνες του Brahma στον άνθρωπο οι hBRM/SNF2a και BRG1/SNF2b (186) και απομονώθηκαν τα σύμπλοκα στα οποία ανήκουν και τα οποία περιλαμβάνουν πολυπεπτίδια ομόλογα με υπομονάδες του SWI/SNF συμπλόκου στον σακχαρομύκητα, αλλά και νέες πρωτεΐνες (19, 141, 144).

Βιοχημικές μελέτες έδειξαν τα παραπάνω σύμπλοκα αναδιαμορφώνουν τα νουκλεοσώματα *in vitro* και διευκολύνουν την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων και στη διαδικασία αυτή η παρουσία ATP είναι απαραίτητη (32, 71). Πρόσφατα επίσης δεδομένα δείχνουν ότι τα εν λόγω σύμπλοκα στρατολογούνται στους υποκινητές μέσω ορισμένων μεταγραφικών ενεργοποιητών με τους αλληλεπιδρούν.(148). Για παράδειγμα το σύμπλοκο SWI/SNF στα θηλαστικά φαίνεται πως είναι απαραίτητο για την μεταγραφική ενεργοποίηση από ορμονικούς πυρηνικούς υποδοχείς μετά από προσθήκη ορμόνης και υπάρχει άμεση αλληλεπίδραση του συμπλόκου με τους μεταγραφικούς αυτούς ενεργοποιητές (132, 199, 214).

Μία δεύτερη οικογένεια συμπλόκων αναδιαμόρφωσης χρωματίνης που η δράση τους εξαρτάται επίσης από την υδρόλυση ATP ανακαλύφθηκε αρχικά στα μετάρζωα και η καταλυτική υπομονάδα τους (ATPase) ονομάζεται ISWI (imitation

switch). Το πρώτο σύμπλοκο που περιέχει την υπομονάδα ISWI βρέθηκε στη δροσόφιλα (NURF: nucleosome remodeling factor) βάση της ικανότητάς του να επάγει την πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα GAGA σε νουκλεοσωμικό υπόστρωμα με τρόπο που εξαρτάται από την παρουσία ATP (191, 192). Στη συνέχεια απομονώθηκε ένας μεγάλος αριθμός συμπλόκων που περιείχαν ISWI τόσο στη δροσόφιλα (ACF:ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor, CHRAC:chromatin accessibility complex ) όσο τον σακχαρομύκητα (ISW1, ISW2) και τον άνθρωπο (hACF, RSF: remodeling and spacing factor). Τα σύμπλοκα NURF και CHRAC έχει βρεθεί ότι αναδιαμορφώνουν την χρωματίνη *in vitro* μέσω ενός μηχανισμού ολίσθησης (sliding) του νουκλεοσώματος πάνω το DNA με αποτέλεσμα την ανακατανομή των νουκλεοσωμάτων σε διαφορετικές θέσεις από τις αρχικές.(58, 98). Επίσης έχει περιγραφεί ότι τα σύμπλοκα NURF και ACF αυξάνουν την μεταγραφική ενεργοποίηση σε χρωματινικά υποστρώματα *in vitro*. Στον πίνακα 4 περιγράφονται τα σημαντικότερα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, σε ποιον οργανισμό υπάρχουν και ορισμένα από τα χαρακτηριστικά τους (101).

#### Πίνακας 4.

Σύμπλοκο	Οργανισμός	Υπομονάδες	Χαρακτηριστικά
<b>Οικογένεια SWI/SNF</b>			
SWI/SNF Chromatin remodeling activity	S.cerevisiae	Swi1 Swi2/Snf2 Swi3 Snf5/Swi10 Snf11,Snf12 Swp82,Swp59, Swp61,Swp29	ATPase activity, not essential
RSC Chromatin remodeling activity	S.cerevisiae	Sth1 RSC1-15 Sfh1	ATPase, essential
hSWI/SNF Chromatin remodeling activity	H.sapiens	Brg1or Brm BAF 250 BAF 170, 155, 110,	ATPase, essential ATPase, not essential

		60a, 60b, 60c, 57, 53, 47	
dSwi/Snf Chromatin remodeling activity	D.melanogaster	Brahma BAP155, 111, 74, 60, 55, 47, 45	ATPase, essential
<b>Οικογένεια ISWI</b>			
ISWI Nucleosome remodeling and spacing activity	S.cerevisiae	IswI p110, 105,74	ATPase, not essential
ISW2 Nucleosome spacing activity	S.cerevisiae	Isw2 p140	ATPase, not essential
NURF Nucleosome spacing activity	D.melanogaster	ISWI NURF-215 NURF-55 NURF-38	ATPase
ACF Chromatin assembly, spacing and remodeling activity	D.melanogaster	ISWI AcfI	ATPase
CHRAC Nucleosome remodeling and spacing activity	D.melanogaster	ISWI p175, 160, 20, 18	ATPase
hACF Chromatin assembly and remodeling activity	H.sapiens	hSnf2h BAZIA	ATPase
RSF Enhances transcription from chromatin templates	H.sapiens	hSnf2h p325	ATPase

Σύμφωνα με τα υπάρχοντα στη βιβλιογραφία μοντέλα το τελευταίο και κρίσιμο στάδιο για την έναρξη της μεταγραφής είναι η στρατολόγηση στον υποκινητή της RNA πολυμεράσης II με την μορφή ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου (ολοένζυμο) που περιλαμβάνει τις υπομονάδες του ενζύμου της RNA πολυμεράσης, τους γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες και σύμπλοκα διαμεσολαβητών (Mediators). Η RNA polII αποτελείται από 12 υπομονάδες τις Rpb1-Rpb12 (101). Τα γονίδια που κωδικοποιούν και για τις 12 υπομονάδες στον σακχαρομύκητα είναι σημαντικά για την κανονική ανάπτυξη του οργανισμού. Τα ίδια γονίδια έχουν κλωνοποιηθεί και στον άνθρωπο και φαίνεται να έχουν αξιοσημείωτη ομολογία με τα αντίστοιχα του σακχαρομύκητα αφού τα περισσότερα μπορούν να αντικατασταθούν λειτουργικά από αυτά. Η μεγαλύτερη υπομονάδα της RNA πολυμεράσης II περιέχει μία μοναδική καρβοξυτελική περιοχή που αποτελείται από πολλές επαναλήψεις στη σειρά ενός επταπεπτιδίου (Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser). Το επταπεπτίδιο αυτό είναι πολύ συντηρημένο στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς αλλά ο αριθμός των επαναλήψεων ποικίλει από 26 ή 27 στον σακχαρομύκητα ως 52 στον άνθρωπο (101). Η λειτουργία της καρβοξυτελικής περιοχής εξαρτάται από την φωσφορυλίωσή της. Έτσι μόρια RNA πολυμεράσης που δε είναι φωσφορυλιωμένα στην καρβοξυτελική τους περιοχή απαντώνται σε σύμπλοκα που αφορούν την έναρξη της μεταγραφής ενώ μόρια που σχετίζονται με την επιμήκυνση των μετάγραφων είναι υπερφωσφορυλιωμένα στην καρβοξυτελική τους περιοχή (33).

Δύο κινάσες έχουν βρεθεί ότι φωσφορυλιώνουν το καρβοξυτελικό τμήμα (CTD) της RNA polII και συμμετέχουν στη ρύθμιση της έναρξης της μεταγραφής. Η μία είναι η Cdk7 κινάση που είναι υπομονάδα του γενικού μεταγραφικού παράγοντα TFIIH (42, 112, 169). Μεταλλαγές στην κινάση αυτή επηρεάζουν την φωσφορυλίωση της πολυμεράσης *in vitro* (189) και *in vivo* (118). Μεταλλαγές στην ομόλογη πρωτεΐνη της Cdk7 στον σακχαρομύκητα (Kin28) οδηγεί σε πλήρη απώλεια μεταγραφής των γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες (67). Η κινάση Cdk8/Srb10 που είναι και υπομονάδα του συμπλόκου των μεσολαβητών (Srb/Mediator complex) είναι η δεύτερη.(73, 110, 184). Πρόσφατες μελέτες στον σακχαρομύκητα έδειξαν ότι η κινάση Srb10 έχει αρνητικό ρόλο στην μεταγραφική έναρξη (184).

Ο προτεινόμενος ρόλος της φωσφορύλιωσης της καρβοξυτελικής ουράς της RNA πολυμεράσης στην μεταγραφική επιμήκυνση ενισχύθηκε από στοιχεία που δείχνουν ότι ο μεταγραφικός ενεργοποιητής Tat του ιού HIV-1 αυξάνει την επιμήκυνση της μεταγραφής αλληλεπιδρώντας με δύο CTD κινάσες την TFIIF και P-TEFb (positive transcriptio elongation factor b) και επάγοντας την CTD φωσφορύλιωση (47). Η πρωτεΐνη P-TEFb απομονώθηκε αρχικά στη δροσόφιλα ως παράγοντας που έχει την ικανότητα να επάγει την επιμήκυνση της μεταγραφής *in vitro*(122) περιλαμβάνει ένα ζευγάρι κινάσης /κυκλίνης Cdk9/cycinT (219).

Όπως προαναφέρθηκε το ολοένζυμο της RNA polIII περιλαμβάνει και ένα σύνολο παραγόντων που ονομάζονται βασικοί (basal) ή γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες που, παρόλο το όνομα τους, δεν έχει διασαφηνιστεί πλήρως αν καθένας από αυτούς στρατολογείται σε όλα τα γονίδια *in vivo* ή υπάρχει επιλεκτικότητα. Σε αυτούς ανήκουν οι πρωτεΐνες TFIIA, TFIIB, TFIIID, TFIIE, TFIIF, TFIIF. Στον πίνακα 5 περιγράφονται αναλυτικά οι υπομονάδες των παραπάνω παραγόντων και αναφέρονται ορισμένες από τις χαρακτηριστικές λειτουργίες τους (101).

### Πίνακας 5.

Παράγοντας	Υπομονάδες	Χαρακτηριστικά
TFIIA	TFIIA α, β, γ	Μεταγραφική ενεργοποίηση και σταθεροποίηση της αλληλεπίδρασης TBP-DNA
TFIIB	TFIIB	Καθορισμός σημείου εκκίνησης μεταγραφής, πρόσδεση στον υποκινητή. Αλληλεπιδρά και στρατολογεί TFIIF-polIII.
TFIIF	RAP74 RAP30	Αλληλεπιδρά με την RNA πολυμεράση II και αποτρέπει μη ειδική πρόσδεση με το DNA.
TFIIE	TFIIEa TFIIEb	Αλληλεπιδρά και στρατολογεί τον παράγοντα TFIIF, συμμετέχει στο 'άνοιγμα' του υποκινητή
TFIIH	p62	Nucleotide excision repair



	<p>p52 MAT1 p34 XPD/ERCC2 p44  XPB/ERCC3  CdK7  Cyclin H</p>	<p>Nucleotide excision repair Nucleotide excision repair Nucleotide excision repair 5'-3' DNA helicase, ATPase Επάγει την ενεργότητα του XPD/ERCC2  3'-5' DNA helicase, ATPase, promoter opening  Κινάση που φωσφορυλιώνει το καρβοξυτελικό άκρο της RNA polIII (CTD)  Cyclin subunit of cyclin – dependent CTD kinase</p>
TFIID	<p>TBP hTAFII 250 hTAFII 130/135 hTAFII100  hTAFII70/80  hTAFII31/32  hTAFII20 hTAFII28 hTAFII68  hTAFII55</p>	<p>TATA-binding protein Κινάση και HAT πρωτεΐνη Αλληλεπιδρά με ενεργοποιητές Μεταλλαγές στο αντίστοιχο γονίδιο του σακχαρομύκητα μπλοκάρει την μετάβαση του κυττάρου από την G2 φάση στην μίτωση (M).  Ομολογία με την ιστόνη H4. Προσδένεται σε DPEs (Down stream promoter elements).  Ομολογία με την ιστόνη H3. Αλληλεπιδρά με p53.  Ομολογία με την ιστόνη H2A.  Ομολογία με την ιστόνη H3. Περιέχει συντηρημένες περιοχές πρόσδεσης σε RNA. Προσδένεται σε RNA και μονόκλωνο DNA.  Αλληλεπιδρά με ποικίλους</p>

	hTAFII30  hTAFII18 hTAFII105	ενεργοποιητές.
--	---------------------------------------	----------------

Το ολοένζυμο επίσης περιλαμβάνει το σύμπλοκο των μεσολαβητών (mediator) πολλά από τα συστατικά του οποίου παίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταγραφική ενεργοποίηση αλληλεπιδρώντας με τον μεταγραφικό ενεργοποιητή ή και άλλους παράγοντες του προενακτήριου συμπλόκου. Στον σακχαρομύκητα το σύμπλοκο των μεσολαβητών μπορεί να απομονωθεί με συμβατικές χρωματογραφικές μεθόδους και ο πυρήνας του συμπλόκου αποτελείται από 20 πολυπεπτίδια :Srb2, Srb4, Srb5, Srb6, Srb7, Med1,2,4,6,7,8,1, Cse2, Gal11, Pgd1, Rgr1, Rox3, Sin4, Nut2 (136).

Στα μετόξω τα ολοένζυμα της RNA πολυμεράσης έχουν πολλά από τα χαρακτηριστικά του αντίστοιχου στον σακχαρομύκητα αλλά είναι λιγότερο σταθερά στις συμβατικές μεθόδους καθαρισμού και εμφανίζουν μεγαλύτερη ποικιλία. Τα σύμπλοκα μεσολαβητών στα μετόξω περιλαμβάνουν το TRAP/SMCC (53, 73), ARC (137), DRIP (157), CRSP (164), murine mediator (79) και NAT (184). Το καλύτερα χαρακτηρισμένο από αυτά είναι το SMCC (Srb and Med Cofactor Complex) που απομονώθηκε από ανθρώπινες κυτταρικές σειρές και περιλαμβάνει 25 υπομονάδες πολλές από τις οποίες είναι ομόλογες με υπομονάδες Srb συμπλόκου στον σακχαρομύκητα. Το σύμπλοκο αυτό είναι στην ουσία όμοιο με το σύμπλοκο TRAP (Thyroid Receptor Associated Protein) που απομονώθηκε ανεξάρτητα λόγω της ικανότητάς του να αλληλεπιδρά με τον ορμονικό πυρηνικό υποδοχέα TR (Thyroid Receptor) και να επάγει μέσω αυτού μεταγραφική ενεργοποίηση. Το σύμπλοκο ARC (Activator-Recruited Cofactor) απομονώθηκε σαν συνπαράγοντας για την συνεργιστική μεταγραφική ενεργοποίηση από τους ενεργοποιητές Sp1 και SREBP-1a. Το DRIP (Vitamin D-Receptor Interacting Protein) αρχικά απομονώθηκε σαν σύμπλοκο που αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα της Vitamin D μετά από προσθήκη του συνδέτη ( ligand). Ο καθαρισμός των παραπάνω δύο συμπλόκων και η ταυτοποίηση των υπομονάδων τους απέδειξε ότι ουσιαστικά πρόκειται για το ίδιο

σύμπλοκο και στη συνέχεια βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά με πολλούς ορμονικούς υποδοχείς και άλλους μεταγραφικούς ενεργοποιητές (137, 157). Τέλος το σύμπλοκο NAT (Negative Regulator of Activated Transcription) απομονώθηκε σε καθαρισμό συγγένειας του ομόλογου στο άνθρωπο παράγοντα με τον Srb10 στον σακχαρομύκητα (184). *In vitro* πειράματα δείχνουν ότι το σύμπλοκο αυτό έχει την ικανότητα να καταστέλλει την επαγόμενη μεταγραφή κάτω από ορισμένες συνθήκες. Παρόμοια λειτουργία έχει αποδοθεί και στις υπομονάδες Srb10,11 του συμπλόκου μεσολαβητών στον σακχαρομύκητα (65). Στον πίνακα 6 αναφέρονται τα διάφορα σύμπλοκα μεσολαβητών και οι διαφορετικές υπομονάδες τους (101).

### Πίνακας 6

<u>Yeast</u>	<u>Human</u>					<u>Mouse</u>
SRB/ Mediator	TRAP/ SMCC	DRIP	ARC	CRSP	NAT	mMED
Srb8	240	250	250			
Srb9	230	240	240		230	160a
Nut1	220	205	205	200		160b
Rgr1	170	150	150	150	150	110
Gal11	150a	130	130	130	140	
Sin4	150b		105			
Srb4	100	100	100	100		
Med1	97	97			95	96a
Srb10	95				90	96b
Med2	93	92	92	85		
Pgd1	80	77	77	77		78
Srd5	78	70	70	70	70	55
Med7	Cdk8		42		Cdk8	
Srb11	37	36	36		45	
Med6	36/28	34	34		37	34
Med4	hMed7	33	33	34	hMed7	mMed7
Med8	cyclinC		32	33	cyclinC	mMed6
Rox3	hMed6				30	
Srb2	TRFP				23	TRFP
Srb7	24				22	

Soh1	22				21	
Nut2	hSrb7				hSrb7	mSrb7
Cse2	hSoh1				hNut2	
Med11	hNut2					
Srb6	12					

Μία μεγάλη πληθώρα εργασιών στη βιβλιογραφία μελετά την σπουδαιότητα όλων των παραγόντων που περιγράφηκαν στη δημιουργία ενός σταθερού προενακτήριου συμπλόκου που θα οδηγήσει σε μεταγραφική ενεργοποίηση. Εκτός όμως από τους παράγοντες αυτούς κάθε αυτούς το ενδιαφέρον των επιστημόνων έχει στραφεί και στην αλληλουχία των γεγονότων που οδηγούν σε συγκρότηση του προενακτήριου συμπλόκου και τελικά σε μεταγραφή. Μία μερίδα ερευνητών υποστηρίζει ότι το προενακτήριο σύμπλοκο προ-συγκροτείται (pre-assembly model) στον πυρήνα του κυττάρου σε διάλυμα και στη συνέχεια στρατολογείται στους διάφορους υποκινητές μέσω των αλληλεπιδράσεών του με μεταγραφικούς ενεργοποιητές. Το μοντέλο αυτό προτάθηκε όταν με βιοχημικές μεθόδους απομονώθηκαν σύμπλοκα που μαζί με την RNA πολυμεράση περιλαμβάνουν ορισμένους γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες και παράγοντες που αναδιαμορφώνουν την χρωματινική δομή όπως SWI/SNF και CBP (87, 119). Από τη μία ένα τέτοιο σύμπλοκο εξυπηρετεί το κύτταρο στο να απαντά άμεσα σε εξωτερικά σήματα, με μεταγραφική ενεργοποίηση ορισμένων γονιδίων. Από την άλλη όμως, η στρατολόγηση ενός ‘μονολιθικού’ καθολικού συμπλόκου δεν συμφωνεί με την παρατηρούμενη ανάγκη για μεγάλη ποικιλία ρυθμιστών στα κύτταρα.

Τα τελευταία χρόνια αρκετές εργασίες υποστηρίζουν το μοντέλο της διαδοχικής στρατολόγησης των παραγόντων που απαρτίζουν το προενακτήριο σύμπλοκο. Οι περισσότερες μελέτες μέχρι σήμερα δείχνουν ότι η νουκλεοσωμική αναδιοργάνωση στους υποκινητές που περιλαμβάνει την ακετυλίωση των αμινοτελικών ουρών των ιστονών και την αναδιαμόρφωση της νουκλεοσωμικής δομής (remodeling) προαπαιτείται για την επιπλέον στρατολόγηση παραγόντων που θα αποτελέσουν το προενακτήριο σύμπλοκο. Έτσι ένα ερώτημα που απασχόλησε είναι ποια από τις παραπάνω διαδικασίες διαδέχεται την άλλη.

Η αλληλουχία των δύο αυτών γεγονότων δηλαδή της ακετυλίωσης των νουκλεοσωμάτων και της νουκλεοσωμικής αναδιοργάνωσης σε σχέση με την

μεταγραφική ενεργοποίηση έχει μελετηθεί σε δύο τύπους υποκινητών. Έτσι στον υποκινητή του HO γονιδίου στον σακχαρομύκητα η ρύθμιση του οποίου εξαρτάται από τον κυτταρικό κύκλο του οργανισμού, ο ενεργοποιητής Swi5 στρατολογεί το σύμπλοκο SWI/SNF που είναι υπεύθυνο για την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης που στη συνέχεια επιτρέπει την στρατολόγηση του συμπλόκου SAGA που έχει HAT ενεργότητα. Η έλευση των δύο αυτών συμπλόκων διευκολύνει την πρόσδεση ενός δεύτερου ενεργοποιητή του SBF στον υποκινητή που οδηγεί σε μεταγραφική ενεργοποίηση (31). Στην περίπτωση όμως του υποκινητή της ιντερφερόνης β, που επάγεται μετά από επιμόλυνση με ιό, και φαίνεται ότι δεν περιέχει νουκλεοσώματα τουλάχιστον στην περιοχή που προσδέεται το σύμπλοκο των ενεργοποιητών του γονιδίου (enhancesome), τα γεγονότα αυτά συμβαίνουν με αντίθετη σειρά. Πιο συγκεκριμένα, εδώ η υπερακετυλίωση της ιστόνης H4 είναι απαραίτητη για την στρατολόγηση του BRG-1 συμπλόκου (ομόλογου του SWI/SNF στα θηλαστικά) και η αναδιοργάνωση του γειτονικού νουκλεοσώματος που καλύπτει το στοιχείο TATA είναι κρίσιμη για την πρόσδεση του TFIID και τελικά την έναρξη της μεταγραφής (1).

Τα δύο παραπάνω παραδείγματα φανερώνουν πως πιθανότατα η αλληλουχία των δύο γεγονότων που οδηγούν σε ανακατασκευή της χρωματίνης είναι διαφορετική σε κάθε υποκινητή και εξαρτάται από την δομή του και την φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία απαιτείται η έκφραση του γονιδίου. Παρόλο που όλες οι μέχρι τώρα εργασίες που μελετούν την μεταγραφική ρύθμιση οδήγησαν τους επιστήμονες σε χρήσιμα συμπεράσματα και μοντέλα για την μεταγραφική έναρξη πολλά ακόμα ερωτήματα παραμένουν αναπάντητα. Ποια είναι η νουκλεοσωμική οργάνωση κάθε υποκινητή και πως ακριβώς τα σύμπλοκα που περιγράφηκαν πιο πάνω την τροποποιούν; Ποιος συνδυασμός παραγόντων ή και μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των ίδιων παραγόντων απαρτίζουν το προενακτήριο σύμπλοκο σε κάθε υποκινητή; Είναι φανερό πως προσεχείς μελέτες θα εστιαστούν στην απάντηση των παραπάνω ερωτημάτων.

## **Ειδικοί στόχοι της παρούσας εργασίας:**

- **Μελέτη του μηχανισμού μεταγραφικής ενεργοποίησης από τον ηπατικό πυρηνικό παράγοντα 4 (HNF-4).**
- **Μελέτη του μηχανισμού μεταγραφικής ενεργοποίησης από τον ηπατικό πυρηνικό παράγοντα 1 (HNF-1).**
- **Μελέτη της σχέσης μεταξύ της μεταγραφικής ενεργοποίησης και μορφοποίησης του προενακτηρίου συμπλόκου σε φυσικό γονίδιο-στόχο του HNF-4 και HNF-1.**

# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## 1.ΜΕΘΟΔΟΙ

### Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (small scale) DNA preparation

Για την παρασκευή σε μικρή κλίμακα υπερελικομένου πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης, ακολουθούμενης από τρεις εκχυλίσεις με μίγμα Ph/CHCL<sub>3</sub>/iaa, σε αναλογία 25/24/1 και από μία με μίγμα CHCL<sub>3</sub>/iaa σε αναλογία 24/1, καθώς και από κατακρήμνιση με 2,5 όγκους απόλυτης αιθανόλης παρουσία 1/10 του όγκου διαλύματος 3M οξικού νατρίου pH=5,29 (Sambrook et al).

### Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα (large scale DNA preparation)

Χρησιμοποιήθηκε κυρίως η αλκαλική μέθοδος της κυτταρικής λύσης με συνδυασμό διαδοχικών υπερφυγοκεντρήσεων κλίσης χλωριούχου καισίου (CsCl gradient) παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr),όπως περιγράφεται από τους Sambrook et al.

Εναλλακτικά έγινε χρήση της κολώνας QIAGEN tip 500 σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας (QIAGEN GmbH).

### Απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης.

Βασικό κριτήριο για την επιλογή της μεθόδου απομόνωσης και καθαρισμού τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης, ήταν η διαθέσιμη ποσότητα και το μοριακό μέγεθος του προς καθαρισμό τμήματος.. Έτσι σε περιπτώσεις που η ποσότητα ξεπερνούσε τα 20-30 μg και το μέγεθος του τμήματος ξεπερνούσε τις 500 bp επιλεγόταν η μέθοδος της ηλεκτροέκλουσης σε μεμβράνες διαπίδυσης ή σε ειδική συσκευή (elutrap της S&S) με τη χρήση κατάλληλων μεμβρανών.

Σε άλλες περιπτώσεις και ειδικά σε αυτές που απομονώθηκαν μικρά τμήματα DNA χρησιμοποιήθηκαν ενεργοποιημένες DEAE μεμβράνες. Ο τρόπος ενεργοποίησης και χρήσης τους περιγράφεται από τους Sambrook et al. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε το QIAquick gel extraction kit, σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών(QIAGEN).

### **Ραδιοσήμανση γραμμικών μορίων DNA(labelling)**

Χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι: Α)η μέθοδος των τυχαίων εκκινήτων.

Η βάση της μεθόδου στηρίζεται στην παροδική αποδιάταξη του δίκλωνου τμήματος DNA που πρόκειται να σημειωθεί και στην επακόλουθη βαθμιαία αναδιάταξη της κάθε αλυσίδας με μία σειρά τυχαίων εξαμερών εκκινήτων . Δηλαδή γίνεται ανάμειξη του DNA (100ng) με 11.5μl LS και 1μl BSA (10mg/ml) και το μίγμα βράζεται για 3 λεπτά ώστε να γίνει η αποδιάταξη του DNA. Στη συνέχεια το μήκος των τοπικά σχηματιζόμενων δίκλωνων περιοχών αυξάνεται με τη δράση της πολυμεριστικής ιδιότητας του Klenow(5u/μl) ενζυμικού κλάσματος παρουσία α[ P]-dATP(5μl) και α[ P]-dATP(5μl) ραδιοσημασμένων νουκλεοτιδίων. Επώαζουμε στους 37°C για τρεις ώρες. Ακολουθώς κάνουμε εκχύλιση με μίγμα Ph/CHCl<sub>3</sub>/iaa και περνάμε την υδατική φάση από 2 G-50 κολώνες για να απομακρυνθούν τα μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια. Τέλος μετράμε τα cpm του ανιχνευτή.

Β)η μέθοδος μετάφρασης εγκοπής.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην επιδιόρθωση και στον πολυμερισμό των τυχαίων εγκοπών που δημιουργούνται στο δίκλωνο κομμάτι DNA που πρόκειται να σημειωθεί. Η ραδιοσήμανση γίνεται σε 100ng DNA στο οποίο προσθέτονται 2μl μη ραδιοσημασμένα νουκλεοτίδια dTTP και 2μl dGTP συγκέντρωσης 1mM, 2μl ραδιοσημασμένα νουκλεοτίδια α-[ P]dATP και 2μl α-[ P]dCTP συγκέντρωσης 1mM , 2μl ρυθμιστικού διαλύματος μετάφρασης εγκοπής(100mM Tris-HCl pH7.5, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 7.5mM διθειοτριτόλη), 1.5μl DNA πολυμεράσης (E.coli) και 1μl DNase I η οποία έχει αραιωθεί 17000 φορές σε νερό από αρχική συγκέντρωση 10mg/ml. Ο τελικός όγκος του διαλύματος είναι 20μl και η επώαση της αντίδρασης γίνεται στους 16°C για μία ώρα. Ακολουθεί μοριακή διήθηση του διαλύματος σε κολώνα χρωματογραφίας G-50 ώστε να κατακρατηθούν τα μη ενσωματωμένα ραδιενεργά νουκλεοτίδια.



## **Ραδιοσήμανση νουκλεοτιδίων**

A) Ραδιοσήμανση συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων με τη χρήση της T4 πολυνουκλεοτιδικής κινάσης. 100μM συνθετικού ολιγονουκλεοτιδίου επωάζονται στους 37 °C για μισή ώρα παρουσία 50μCi  $\gamma$ -P<sup>32</sup> και 10u T4 κινάσης. Ακολουθεί εκχύλιση με φαινόλη και περαιτέρω καθαρισμός με G-50 κολώνες.

B) Ραδιοσήμανση δίκλωνων συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων με DNA πολυμεράση T7 (Sequenase). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για τη σήμανση δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων με σκοπό να χρησιμοποιηθούν ως ανιχνευτές σε πειράματα μεταβολής της κινητικότητας του DNA λόγω αλληλεπίδρασής του με πρωτεΐνες (EMSA).

Η Sequenase μέσω της πολυμεριστικής ιδιότητας της προσθέτει ραδιοσημασμένα νουκλεοτίδια  $\alpha$ [<sup>32</sup>P]-dATP και  $\alpha$ [<sup>32</sup>P]-dATP στα άκρα των δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων. Ακολουθεί και εδώ εκχύλιση με φαινόλη και καθαρισμός με 2 G-50 κολώνες.

## **Ανάλυση γενωμικού DNA κατά Southern (Southern blot)**

Το απομονωμένο γενωμικό DNA (10μg) υφίσταται πέψη διάρκειας 16 ωρών με το κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο. Στη συνέχεια ηλεκτροφορούμε το κομμένο DNA σε πήκτωμα αγαρόζης (0.8%). Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα αναδεύεται για 45 λεπτά σε διάλυμα που περιέχει NaOH 0.5N και 1.5M NaCl αλκαλικού χαρακτήρα ικανό να αποδιατάξει το DNA καθιστώντας ικανή τη μεταφορά και την παραμονή του σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης. Μετά την αποδιάταξη ακολουθεί ανάδευση του πηκτώματος σε ουδέτερο διάλυμα (0.5M Tris-HCl pH7.4 1.5NaCl) για 45 λεπτά. Στη συνέχεια το πήκτωμα τοποθετείται πάνω σε γέφυρα από διηθητικό χαρτί Whatman 3MM του οποίου τα δύο άκρα είναι βυθισμένα σε διάλυμα 20XSSC (3M NaCl, 0.3M κιτρικό νάτριο).

Επάνω στο πήκτωμα τοποθετείται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και τρία φύλλα από διηθητικό χαρτί Whatman 3MM τα οποία μαζί με την μεμβράνη είχαν εμβαπτιστεί σε διάλυμα 2XSSC. Πάνω από αυτά τοποθετούνται χαρτοπετσέτες και ένα βάρος 1 κιλό περίπου. Μετά από 8 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ολοκληρώνεται η μεταφορά του DNA στη μεμβράνη η οποία ξεπλένεται σε διάλυμα 6XSSC και ψήνεται στους 80°C για 2 ώρες προκειμένου να μονιμοποιηθούν τα νουκλεϊκά οξέα πάνω σε αυτή

### **Παρασκευή κυττάρων ικανών να μετασχηματίζονται –Επιδεκτικά κύτταρα(competent cells)**

Αποστειρωμένο θρεπτικό διάλυμα SOB(2% tryptone 0.5%yeast extract 0.4mM NaCl 0.1mM KCl) εμπλουτισμένο με MgCl<sub>2</sub> και MgSO<sub>4</sub> συγκέντρωσης 1M το κάθε ένα μολύνεται με 1-2 αποικίες από φρέσκο πιάτο στο οποίο καλλιεργήθηκε το βακτηριακό στέλεχος που θέλουμε να μετατρέψουμε σε επιδεκτικό. Η επώαση γίνεται στους 25°C υπό έντονη ανάδευση μέχρι η απορρόφηση των κυττάρων (OD) να φτάσει 0.35-0.4(περίπου 20-25 ώρες).Στη συνέχεια φυγοκεντρούμε τα κύτταρα για 10 λεπτά στους 4°C και στις 4000 στροφές. Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 40ml διαλύματος μετασχηματισμού(transformation buffer 10mM Pipes 15mM CaCl<sub>2</sub> 250mM KCl pH6.7 55mM MnCl<sub>2</sub>).Ακολουθώς επωάζουμε για 10 λεπτά στον πάγο και επαναλαμβάνουμε την πιο πάνω φυγοκέντρωση. Επαναδιαλύουμε το ίζημα των κυττάρων σε 10ml διαλύματος μετασχηματισμού προσθέτοντας συγχρόνως DMSO μέχρι τελική συγκέντρωση 7%.Μοιράζουμε τα κύτταρα σε μικρές ποσότητες (aliquots)και τα διατηρούμε στους -80°C μέχρι να τα χρησιμοποιήσουμε.

### **Αντίδραση συρραφής(ligation) πλασμιαδικού φορέα με το υπό εξέταση DNA.**

Η αντίδραση συρραφής πραγματοποιείται αναμιγνύοντας κατάλληλες ποσότητες DNA από το φορέα και το υπό εξέταση DNA ώστε η αναλογία μορίων φορέα /DNA να είναι 1/5.Στην αντίδραση προστίθεται 10X διαλύματος συρραφής(ligation buffer) ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 1X και 4u/ml T4 λιγάση (ligase).Το μίγμα επωάζεται στους 16°C για 16 ώρες περίπου.

### **Μετασχηματισμός βακτηριακών πλασμιαδικές στελεχών από κατασκευές.**

Σε 200μl επιδεκτικών κυττάρων προσθέτουμε ένα μέρος από την αντίδραση συρραφής(5-10μl) και αφήνουμε το μίγμα στον πάγο για 30 λεπτά. Ακολουθεί θερμικό σοκ για 45 δευτερόλεπτα στους 42°C και τοποθετούμε το μίγμα σε πάγο για 2 λεπτά. Στη συνέχεια προσθέτουμε 800μl θρεπτικού μέσου SOC και επωάζουμε μία ώρα στους 37°C υπό ανάδευση. Στη συνέχεια επιστρώνουμε το δείγμα μας υπό

στείρες συνθήκες σε πιάτο με θρεπτικό μέσο LB(Sambrook et al )το οποίο έχει κατάλληλη ποσότητα του αντιβιοτικού με το οποίο κάνουμε την επιλογή (π.χ.αμπικιλίνη) Τα πιάτα τοποθετούνται στους 37°C για 16 ώρες προκειμένου να αναπτυχθούν οι αποικίες των βακτηρίων.

### **Προσδιορισμός της πρωτοταγούς αλληλουχίας νουκλεοτιδίων**

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων γίνεται σε περίπου 5μg DNA τα οποία πρέπει να είναι αποδιαταγμένα προκειμένου να υβριδοποιηθεί ο εκκινητής με την συμπληρωματική του περιοχή στο πλασμίδιο. Η αποδιάταξη γίνεται με 5μl διαλύματος NaOH 1.2M και βρασμό για 5 λεπτά στους 85°C. Στο διάλυμα προσθέτονται 75μl αιθανόλης 100% και 3μl διαλύματος οξικού αμμωνίου συγκέντρωσης 2M pH4.0.Ακολουθεί κατακρήμνιση και πλύση με 75% αιθανόλη. Αφού αποξηρανθεί το ίζημα του πλασμιδίου προστίθενται σε αυτό 1μl εκκινητή (10ng/μl),2μl 5X ρυθμιστικού διαλύματος(200mMTris-HCl pH7.5, 100mM MgCl<sub>2</sub> 250 mM NaCl )και 7μl διαλύματος TE. Γίνεται επώαση για 15 λεπτά στους 37 C και στη συνέχεια για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Εντωμεταξύ σε πιάτο με ειδικά πηγαδάκια μοιράζονται ανά πηγάδι2.5μl από κάθε ddNTP τα οποία προκαλούν σταμάτημα της αντιγραφής. Τα ddNTPs βρίσκονται σε διάλυμα που περιέχουν 80μM από κάθε dNTP, 8μM από το αντίστοιχο dNTP και 50mM NaCl.

Στη συνέχεια το DNA αναμειγνύεται με το ακόλουθο διάλυμα:

- 2μl labelling mix αραιωμένο σε νερό 8 φορές(7.5μM dGTP 7.5μM dCTP 7.5μM dTTP)
- 6.5u ένζυμο Sequenase αραιωμένο σε TE 8 φορές
- 1μ διθειοτριτόλη 0.1M
- 0.5μl <sup>35</sup>S-ATP

Από το διάλυμα που προκύπτει μοιράζονται 4μl σε κάθε πηγάδι. Γίνεται επώαση στους 37°C για 10 λεπτά και τέλος σε κάθε πηγάδι προστίθενται 4μl διαλύματος διακοπής της αντίδρασης(95% φορμαμίδιο 20mM EDTA 0.05% Bromophenol blue 0.05 Xylene Cyanol FF).Οι αντιδράσεις ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 6% αφού πρώτα αποδιαταχθούν με θέρμανση για 7 λεπτά στους 100°C. Το πήκτωμα στη συνέχεια στεγνώνει και εκτίθεται σε φιλμ (αυτοραδιογραφία).

### **Μεταλλαξογένεση σε σημείο (site-directed mutagenesis).**

Η μέθοδος στηρίζεται στην δημιουργία ενός εκκινητή που να περιλαμβάνει τις αλλαγές στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων που θέλουμε να εισάγουμε στο πλασμιδιακό DNA και στη χρήση ενός δευτέρου εκκινητή που παρέχεται από Kit (Gene Editor, Promega) ο οποίος κατά την υβριδοποίησή του με το εν λόγω DNA προσδίδει στα βακτήρια τα οποία μετασχηματίζει ανθεκτικότητα σε ένα αντιβιοτικό (antibiotic mix) επιπλέον της αμπικιλίνης. Επιλέγοντας λοιπόν τα βακτήρια που είναι ανθεκτικά στο antibiotic mix του οποίου η σύσταση δεν παρέχεται από την εταιρία επιλέγουμε τα βακτήρια που περιέχουν το πλασμιδιακό DNA που είναι μεταλλαγμένο στο γονίδιο της β-λακταμάσης (υπεύθυνης για την διάσπαση της αμπικιλίνης ) και πιθανότατα και στο γονίδιο για το οποίο σχεδιάστηκε ο πρώτος εκκινητής. Η παρουσία της μεταλλαγής επιβεβαιώνεται με τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων του πλασμιδιακού DNA (Sequencing).

### **Παρασκευή ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων (whole cell extracts) από κυτταρικές σειρές**

Τα κύτταρα πριν τη συλλογή τους ξεπλένονται τρεις φορές με 1XPBS(KCl 0.2gr/lit,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2gr/lit, NaCl 8.00gr/lit,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.15gr/lit pH 7.4) και στη συνέχεια αποκολλώνται από το τρυβλίο με την βοήθεια ειδικού εργαλείου. Συλλέγονται προσεκτικά χωρίς ποσοτικές απώλειες και το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρείται για 2 λεπτά στις 3.000rpm στους 4°C. Προσεκτικά απομακρύνουμε το υπερκείμενο και το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο buffer X (20mM HEPES, 100mM KCl, 0.2mM EDTA, 20% glycerol, 1mM DTT, 1mM PMSF, 10mg/ml Aprotinin). Ακολουθεί επαναλαμβανόμενη (3φορές) ψύξη και απόψυξη των δειγμάτων (freeze and thaw) που προκαλεί διάρρηξη κυτταρικών και πυρηνικών μεμβρανών. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στους 4°C στις 13.000rpm για 5 λεπτά προκειμένου να διαχωριστεί το διαλυτό πρωτεϊνικό εκχύλισμα από το γενωμικό DNA και τα μεμβρανικά debris που καθιζάνουν. Μετά τη φυγοκέντρωση , το διαλυτό υπερκείμενο (εναιώρημα) μεταφέρεται σε νέους σωλήνες και φυλάσσεται στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

**Συν-κατακρήμιση (Co-immunoprecipitation) πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν από πυρηνικό εκχύλισμα.**

Κύτταρα της τάξης  $2 \times 10^8$  ξεπλένονται και συλλέγονται σε 1XPBS. Συγκεντρώνονται με φυγοκέντρηση στις 1.000rpm για 5 λεπτά και η πελλέτα επαναδιαλύεται σε 5 όγκους buffer A ( 25mM Hepes pH 7.9, 1.5mM  $MgCl_2$ , 10mM KCl, 0.1% NP40, 1mM DTT, 0.5mM PMSF 10μg/ml aprotinin). Μετά από 10 λεπτά παραμονή σε πάγο ακολουθεί ομογενοποίηση με τη χρήση ομογενοποιητή (dounce) και στη συνέχεια φυγοκέντρηση στις 2.000rpm για 5 λεπτά στους 4°C. Η πελλέτα επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο buffer A και στη συνέχεια προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος NLB 800( 25mM Hepes pH7.9, 10% glycerol, 0.8M KCl, 0.2mM EDTA, 0.1%NP40, 1mM DTT, 0.5mM PMSF, 10μg/ml aprotinin, 10mM NaF) και το δείγμα αναδεύεται στους 4°C για μισή ώρα και τέλος φυγοκεντρείται στις 14.000rpm για άλλη μισή ώρα. Το υπερκείμενο που αποτελεί και το πυρηνικό εκχύλισμα αραιώνεται τρεις φορές με Extract dilution Buffer(25mM Hepes pH7.9, 2mMEDTA, 0.1%NP40, 1mM DTT, 0.5mM PMSF, 10μg/ml aprotinin, 10 mM NaF) ώστε να αραιωθεί η συγκέντρωση του NaCl και είναι τελικά αυτό που θα χρησιμοποιηθεί περαιτέρω στην ανοσοκατακρήμιση. Στη συνέχεια επωάζουμε αναδεύομενη κατάλληλη ποσότητα εκχυλίσματος με 50 μl Protein A-sepharose beads, για 1 ώρα στους 4°C, προκειμένου να απαλλαγούμε από μη ειδικές αλληλεπιδράσεις (preclearing step). Φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά στους 4°C στις 14.000rpm (απομάκρυνση των beads) και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο eppendorf σωληνάκι. Προσθέτουμε στη συνέχεια το αντίσωμα (10μg) και επωάζουμε αναδεύοντας για 1 ώρα στους 4°C. Στη συνέχεια προσθέτουμε 50 μl Protein A,G-Sepharose beads ( για πολυκλωνικό και μονοκλωνικό αντίσωμα αντίστοιχα) και επωάζουμε αναδεύοντας 6 ώρες στους 4°C. Ξεπλένουμε τέλος τα beads 4-5 φορές με Wash buffer (25 mM Hepes pH 7.9, 1% glycerol, 100 mM KCl, 2 mM EDTA, 0.1% NP40, 1mM DTT, 0.5 mM PMSF, 10 μg/ml aprotinin, 10 mM NaF) για την απομάκρυνση μη ειδικά συνδεδεμένων αντιγόνων. Κάθε πλύσιμο γίνεται με ανάδευση στους 4°C για 10 λεπτά και ακολουθεί φυγοκέντρηση για να συγκεντρώσουμε τα beads στις 6.000 rpm στους 4°C για τρία λεπτά. Τελικά αφαιρούμαι όλο το υπερκείμενο και προσθέτουμε ίσο όγκο 2X SDS loading buffer.

**Western blot**

Σε κατάλληλη ποσότητα ολικού ή πυρηνικού εκχυλίσματος προσθέτουμε ίσο όγκο 2XSDS loading buffer(100 mM Tris, 200 mM DTT, 4% SDS 0.2% Bromophenol blue, 20% glycerol) και βράζουμε το δείγμα για 5 λεπτά. Οι εκφραζόμενες πρωτεΐνες διαχωρίζονται ηλεκτροφορητικά αρχικά στα 60 volt (stacking gel) και κατόπιν στα 80-120 volt (separating gel), σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης διπλής σύστασης. Αρχικά το δείγμα «συμπυκνώνεται» διερχόμενο από τη στρώση του αραιότερου stacking gel (4%) και εν συνεχεία οι περιεχόμενες πρωτεΐνες διαχωρίζονται στο πυκνότερο Separating gel (6-15% ανάλογα με την επιθυμητή διαχωριστική κλίμακα μεγεθών). Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες του πηκτώματος μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η μεταφορά γίνεται σε ειδική συσκευή της Biorad σε transfer buffer (20% methanol, 24mM Tris, 194 mM glycine) στους 4 °C για μία ώρα σε 350 mA. Στο ίδιο διάλυμα διαποτίζονται και τα σφουγγαράκια τα οποία τοποθετούμε στις πλάκες της συσκευής και τα Whatman στα οποία επανατοποθετούμε την μεμβράνη και το πήκτωμα σχηματίζοντας sandwich (αποφεύγουμε τη δημιουργία φυσαλίδων-κενών αέρα που εμποδίζουν την μεταφορά).

Στη συνέχεια η μεμβράνη διαβρέχεται σε διάλυμα TBST (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 1ml/l Tween-20) βάφεται με διάλυμα Ponceau S (0.1% Ponceau, 5% Acetic acid) για να βεβαιωθούμε για τη μεταφορά πρωτεϊνών, και ξεπλένεται τέλος με περιοδικές αναδύσεις σε TBST. Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα προϋβριδοποίησης ( TBST που περιέχει 5% άπαχο ξηρό γάλα) για 1ώρα –O/N .Μετά ξεπλένουμε την μεμβράνη τέσσερις φορές με TBST για 15 λεπτά υπό ανάδευση. Στη συνέχεια προσθέτουμε το πρώτο αντίσωμα σε κατάλληλη αραιώση που είναι ειδική για το κάθε αντίσωμα και το επωάζουμε υπό ανάδευση για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Για την απομάκρυνση του μη ειδικά συνδεδεμένου καθώς και της περίσσειας του ελεύθερου αντισώματος ξεπλένουμε τη μεμβράνη αναδεδόμενη για 4X15 λεπτά. Ακολουθεί επώαση με το δεύτερο αντίσωμα (anti-rabbit, anti-goat, anti-mouse IgG peroxidase) σε κατάλληλη αραιώση για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και τα αντίστοιχα ξεπλύματα (4X15 λεπτά) με TBST.Το δεύτερο αντίσωμα επιτρέπει την ανίχνευση των ειδικών συμπλόκων αντιγόνου-αντισώματος. Η έκθεση της υβριδοποίησης γίνεται με τη χρήση ECL (χημειοφωταύγεια).

### Μεταβολή κινητικότητας του DNA λόγω της αλληλεπίδρασης του με πρωτεΐνες (Electrophoretic Mobility Shift Assay).

Δίκλιωνα ολιγονουκλεοτίδια σημάνθηκαν με τη βοήθεια της πολυμεράσης T7 (sequenase) παρουσία [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP και [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP και απαλλάχθηκαν από την περίσσεια ισotόπου με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις σε κολώνες Sephadex G-50. Οι αντιδράσεις πρόσδεσης έγιναν για 20 λεπτά στον πάγο σε 15  $\mu$ l τελικό όγκο που περιείχε 20 mM Hepes pH 7.9, 50 mM KCl, 4 mM spermidine, 0.02 mM Zn-acetate, 0.1 $\mu$ g/ml BSA, 10% glycerol, 0.5 mM DTT, 2 $\mu$ g/ml poly (dIdC) και 5-10 $\mu$ g πρωτεϊνικού εκχυλίσματος. Το σύμπλοκο πρωτεΐνης-ανιχνευτή διαχωρίστηκε από τον ελεύθερο ανιχνευτή σε 4% πήκτωμα ακρυλαμίδης στους 4 °C. Ακολούθησε σταθεροποίηση των συμπλόκων με την επίδραση διαλύματος (50% μεθανόλη-10% οξικό οξύ) στο πήκτωμα ακρυλαμίδης για 10 λεπτά στέγνωμα και αυτοραδιογραφία.

### Πειράματα ανοσοφθορισμού έμμεσου in situ (In situ indirect immunofluorescence)

Μία μέρα μετά τη διαμόλυνσή τους, με την κατασκευή που εκφράζει την υπό έλεγχο πρωτεΐνη, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε καλυπτρίδες (cover slips) και συνεχίστηκε η επώασή τους στον CO<sub>2</sub> επωαστήρα. Μετά από 24 ώρες, ξεπλύναμε τις καλυπτρίδες δύο φορές με 1XPBS και τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν (fixing) πάνω στις καλυπτρίδες με την επίδραση κρύας μεθανόλης (-20°C) για 10 λεπτά. Ακολούθησε σύντομο ξέπλυμα με 1XPBS και επώαση σε διάλυμα που περιείχε 1%BSA σε 1XPBS σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Στη συνέχεια επιδράσαμε με κατάλληλη αραίωση του πρώτου αντισώματος σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα. Η περίσσεια του αντισώματος απομακρύνθηκε με τρεις διαδοχικές δεκαπεντάλεπτες πλύσεις σε 1% BSA σε 1XPBS. Ακολούθησε επώαση με 1/100 αραίωση του fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-rabbit ή anti-mouse δεύτερου αντισώματος (GaM-FITC ή GaR-FITC ανάλογα με το ποιο ήταν το πρώτο αντίσωμα), σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, οι καλυπτρίδες ξεπλύθηκαν τρεις φορές από 5 λεπτά με 1XPBS και μία φορά με ddH<sub>2</sub>O. Τέλος οι καλυπτρίδες αναστράφηκαν πάνω σε μία σταγόνα Mowiol πάνω σε αντικειμενοφόρο. Η παρατήρηση των δειγμάτων έγινε σε Leitz Dilux 20 EB μικροσκόπιο εφοδιασμένο

με ενσωματωμένη φωτογραφική μηχανή για τη φωτογράφιση των δειγμάτων φθορισμού.

### **Μέθοδος για τη μέτρηση της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης**

Το πείραμα αυτό γίνεται ώστε εκτιμώντας την αποτελεσματικότητα του πειράματος διαμόλυνσης, να είναι δυνατή η διόρθωση, κανονικοποίηση και συγκριτική αξιολόγηση των μετρήσεων ενεργότητας του γονιδίου CAT (chloramphenicol acetyltransferases). Η β-γαλακτοσιδάση είναι ένζυμο που υδρολύει τα β-D-γαλακτοσίδια. Μπορεί κανείς να μετρήσει τα επίπεδα του ενζύμου χρησιμοποιώντας ως μέτρο το βαθμό υδρόλυσης κατάλληλων άχρωμων υποστρωμάτων που βρίσκονται σε περίσσεια, σε έγχρωμα προϊόντα. Στην κατηγορία αυτή ανήκει το ONPG (O-nitrophenyl-β-D-galactoside) το οποίο υδρολυόμενο δίνει γαλακτόζη και o-nitrophenol (κίτρινο χρώμα που απορροφά στα 420 nm). Η υδρόλυση του ONPG από την β-γαλακτοσιδάση σταματά με την προσθήκη  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (1M) που μετατρέπει το διάλυμα σε αλκαλικό (pH11). Στις συνθήκες αυτές το ένζυμο απενεργοποιείται. Η διαδικασία έχει ως εξής: Σε ποσότητα 10μl κυτταρικού εκχυλίσματος προσθέτουμε 290 μl μείγματος αποτελούμενο από: 3μl 100X Mg buffer(100mM  $\text{MgCl}_2$ , 5M 2-mercaptoethanol, 1M KCl), 66 μl ONPG (4mg/ml), 221μl Sodium phosphate buffer (0.1M). Καλή ανάμειξη και επώαση στους 37 °C για να γίνει η ενζυμική υδρόλυση του ONPG και εμφάνιση του κίτρινου χρώματος. Το χρονικό διάστημα επώασης ποικίλλει, ανάλογα με την αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού (transfection efficiency). Όταν τα δείγματα έχουν ικανοποιητικό κίτρινο χρώμα, η αντίδραση σταματάει με την προσθήκη 500μl  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 420nm.

### **Προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου CAT (CAT assay)**

Για να μετρηθεί η μεταγραφική ενεργότητα των παραγόντων που μελετάμε χρησιμοποιήθηκαν κατασκευές οι οποίες περιέχουν συγκεκριμένους υποκινητή ή θέσεις πρόσδεσης για τους παράγοντες αυτούς που ελέγχουν την έκφραση του γονιδίου αναφοράς CAT (ακετυλοτρανσφεράση της χλωραμφαινικόλης). Έτσι τα επίπεδα CAT ενεργότητας που πειραματικά ανιχνεύουμε συσχετίζονται άμεσα με την μεταγραφική ενεργότητα των αλληλουχιών που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα



παροδικής διαμόλυνσης. Πλεονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι το CAT είναι ένα βακτηριακό ένζυμο που δεν υπάρχει ομόλογό του σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Το κωδικοποιούμενο ένζυμο ακετυλοτρανσφεράση της χλωραμφαινικόλης καταλύει την ακετυλίωση του αντιβιοτικού χλωραμφαινικόλη αρχικά στην 3-υδροξυ θέση (μεταφορά ακετυλομάδας) από το ακετυλοσυνένζυμο A (CoA) στην χλωραμφαινικόλη. Σε καταστάσεις υψηλής CAT ενεργότητας ακετυλιώνεται και η δεύτερη υδροξυλομάδα του μορίου της χλωραμφαινικόλης. Η αντίδραση συνίσταται στην επώαση ποσότητας κυτταρικού εκχυλίσματος με ραδιοσημασμένο υπόστρωμα  $^{14}\text{C}$ -χλωραμφαινικόλη και ακετυλοσυνένζυμο A. Οι ακετυλιωμένες από τις μη ακετυλιωμένες μορφές διαχωρίζονται χρωματογραφικά.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

-Μία ποσότητα εκχυλίσματος που ποικίλει ανάλογα με τον τύπο των κυττάρων που βρίσκεται σε διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 250mM Tris επωάζεται με 4μl  $^{14}\text{C}$ -χλωραμφαινικόλης (100μCurie) και 5μl Ακέτυλο-CoA (20mM stock).

-Αναμειγνύουμε καλά και επωάζουμε στους 37 °C. Ο χρόνος επώασης εξαρτάται από την αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού και μπορεί να κυμαίνεται από ½-1ώρα.

-Στη συνέχεια τα δείγματα εκχυλίζονται σε 1000λ ethylacetate και έντονο vortex.

-Τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και 800μl από την οργανική (μη υδατική) φάση μεταφέρονται σε νέο tube.

-Ακολουθεί στέγνωμα των δειγμάτων υπό κενό (speed vac).

- Τα δείγματα επαναδιαλύονται σε 15μl ethylacetate και ακολουθεί spotting σε TLC plates (Thin Layer Chromatography).

Οι διάφορες ακετυλιωμένες μορφές της χλωραμφαινικόλης διαχωρίζονται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας που αναπτύσσεται σε οργανικό διαλύτη 95:5 χλωροφόρμιο:μεθανόλη. Όταν το μέτωπο του διαλύτη προχωρήσει αρκετά σταματούμε τη χρωματογραφία, τη στεγνώνουμε και εκθέτουμε σε φωτογραφικό φιλμ για 16 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

### **Απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από βακτήρια**

Όλες οι πρωτεΐνες που καθαρίστηκαν από βακτήρια στην παρούσα εργασία ήταν σε σύντηξη με ιστιδίνες (6XHis) ή με την βακτηριακή πρωτεΐνη GST (Glutathione S Transferase). Η έκφραση όλων των πρωτεϊνών έγινε στο E.coli

βακτηριακό στέλεχος που ονομάζεται BL21plys. Το στέλεχος αυτό έχει το χαρακτηριστικό ότι η έκφραση της T7 πολυμεράσης από την οποία εξαρτάται η μεταγραφή και επομένως και η έκφρασης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης, βρίσκεται κάτω από αυστηρό έλεγχο και επάγεται μόνο με την προσθήκη IPTG (συναγωνιστής της δράσης του lacI repressor). Σε καλλιέργεια οπτικής πυκνότητας (OD) 0.8 προστίθεται IPTG τελικής συγκέντρωσης 0.2 mM. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 3 ώρες ή στους 22°C για 6 ώρες. Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέγονται και φυγοκεντρώνονται για 5 λεπτά σε 5.000rpm στους 4°C. Η πελλέτα επαναδιαλύεται σε Sonication buffer I (20mM Tris pH8.0, 200mM NaCl, 0.5% Triton, 5mM Imidazole, 1mM PMSF, 10μg/ml aprotinin) στην περίπτωση που η πρωτεΐνη βρίσκεται σε σύντηξη με His και επαναδιαλύεται σε Sonication buffer II (1XPBS 0.5mg/ml BSA) στην περίπτωση της σύντηξης με GST. Ακολουθεί διάρρηξη των κυττάρων και σπάσιμο του DNA με υπέρηχους (Sonication) και φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές για 30 λεπτά. Το υπερκείμενο αποτελεί το πρωτεϊνικό εκχύλισμα που θεωρητικά περιέχει υπερεκφρασμένη την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει. Ακολουθεί απομόνωση της πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας με Ni-NTA Agarose (QIAGEN) στην πρώτη περίπτωση και Glutathione Sepharose 4B (Pharmacia) στην δεύτερη. Οι πρωτεΐνες που προσδέονται μη ειδικά στην κάθε κολώνα απομακρύνονται με 4 ξεπλύματα με τα παραπάνω διαλύματα ( 10φορές ο όγκος της κολώνας) για 10 λεπτά το καθένα, στους 4°C υπό ανάδευση. Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες εκλούνται από την κολώνα μετά από προσθήκη ίσου όγκου Elution Buffer I (20mM Tris pH8.0, 200mM NaCl, 0.5% Triton, 200mM Imidazole, 1mM PMSF) και Elution Buffer II (10mM Glutathione, 50mM Tris pH8.0, 1mM PMSF) αντίστοιχα. Η διαδικασία της έκλουσης επαναλαμβάνεται 5 φορές και τα προϊόντα συλλέγονται είτε συγκεντρώνονται με centricon είτε μεταφέρονται σε κατάλληλο διάλυμα (20 mM Tris pH8.0, 50mM KCl, 0.5mM DTT, 0.5mM PMSF 10% glycerol) με τη μέθοδο της διαπίδυσης (dialysis).

### **In vitro αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών ( In vitro protein-protein interactions)**

<sup>35</sup>S σημασμένες ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες συντίθενται *in vitro* με τη χρήση του TNT συστήματος της Promega σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών. 2μg από κάθε πρωτεΐνη που είναι σε σύντηξη με GST φορτώθηκε σε κολώνα Gutathione Sepharose η οποία είχε προηγουμένως εξισορροπηθεί με 0.5%

BSA/PBS. Στη συνέχεια, κάθε κολώνα ξεπλύθηκε τρεις φορές με PBS και ακολούθησε αντίδραση αλληλεπίδρασης στους 4°C για 5 ώρες υπό συνεχή ανακίνηση (rotation) σε ειδικό διάλυμα ( 100mM KCl, 20mM HEPES pH 7.9, 0.1%NP-40, 5mM MgCl<sub>2</sub> 0.2% BSA, 10% glycerol, 0.1mM PMSF, 10μg/ml aprotinin). Μετά από εκτεταμένο ξέπλυμα της κολώνας με το διάλυμα έκπλυσης A (100mM KCl, 20mM HEPES pH 7.9, 0.1%NP-40, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM PMSF, 10μg/ml aprotinin) την επαναδιαλύουμε σε 20μl SDS loading buffer. Στη συνέχεια τα δείγματα αναλύονται σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης.

### **Ενζυμική αντίδραση ακετυλίωσης**

Ένα μg βακτηριακά εκφρασμένης πρωτεΐνης ή ιστονών επωάζεται με το κατάλληλο ένζυμο (50ng His-CBP ή His-P/CAF εκφρασμένου με βακουλιο-ιό σε κύτταρα λεπιδοπτέρων SF9) στους 30°C για μία ώρα παρουσία 0.25μCi [<sup>3</sup>H] acetylCoA (5 Ci/nmol) σε διάλυμα που περιέχει 50mM HEPES pH8.0, 10%glycerol, 1mM DTT, 1mM PMSF. Οι αντιδράσεις αναλύονται σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης.

Για την *in vivo* ακετυλίωση επώασαμε HepG2 ή Cos1 κύτταρα με <sup>3</sup>[H] οξικό οξύ (1mCi/ml) για μία ώρα και στη συνέχεια ακολούθησαν ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα και ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα κατάλληλο για την πρωτεΐνη που ελέγχουμε αν ακετυλιώνεται, και τα δείγματα αναλύονται σε πήκτωμα ακρυλαμίδης και ακολουθεί αυτοραδιογραφία.

### **Μερική πέψη με πρωτεάσες (Partial protein digestion)**

Ολικά εκχυλίσματα Cos1 κυττάρων που έχουν παροδικά διαμολυνθεί με φορείς έκφρασης για τις πρωτεΐνες των οποίων την αλλαγή στη διαμόρφωση θέλουμε να ελέγξουμε ή *in vitro* εκφρασμένες επωάζονται με κατάλληλες ποσότητες αλκαλικής πρωτεάσης (Promega) ή V8 πρωτεάσης (Sigma) σε διάλυμα που περιέχει 25mM HEPES pH7.9, 40mM KCl, 10%glycerol στους 25°C για 5-10 min. Στη συνέχεια σταματάμε την αντίδραση με την προσθήκη SDS loading buffer και αναλύουμε τα δείγματα σε πήκτωμα ακρυλαμίδης.

## **Ανοσοκατακρήμνιση σε χρωματίνη (Chromatin Immunoprecipitation)**

Αρχικά τα κύτταρα επωάζονται με 1% φορμαλδεΰδη για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με σκοπό την μονιμοποίηση των συμπλόκων πρωτεϊνών πάνω στο DNA. Την αντίδραση αυτή τη σταματάμε με την προσθήκη 0.125M γλυκίνης. Τα κύτταρα ξεπλένονται 3 φορές με 1XPBS, συλλέγονται σε PBS και φυγοκεντρούνται στις 1.000 rpm για 5 λεπτά. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται στο διάλυμα A (25mM Hepes pH7.8, 1.5MgCl<sub>2</sub>, 10mM KCl, 0.1% NP40, 1mM DTT, protease inhibitor cocktail) και επωάζεται στον πάγο για 10 λεπτά όπου μέσω ώσμωσης εισέρχεται νερό μέσα στα κύτταρα και «φουσκώνουν». Ακολουθεί ομογενοποίηση των κυττάρων και φυγοκέντρωση στις 2.000 rpm για 5λεπτά στους 4°C. Το ίζημα που αποτελεί τους πυρήνες επαναδιαλύεται στο Sonication buffer ( 50mM Hepes pH7.9, 140mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton, 0.1% Sodium deoxycolate, 0.1%SDS and protease inhibitors) και ακολουθεί διάσπαση του DNA με υπέρηχους στον πάγο ώστε το δείγμα να περιέχει κομμάτια DNA μήκους 200-1000bp. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρούνται και επωάζονται με protein A/G sepharose για 1 ώρα στους 4°C, προκειμένου να απαλλαγούμε από μη ειδικές αλληλεπιδράσεις (preclearing step) παρουσία 2μg sonicated λDNA και 1mg/ml BSA και 25 A<sub>260</sub> μονάδες (units) χρωματίνης υποβάλλεται σε ανοσοκατακρήμνιση με την κατάλληλη ποσότητα αντισώματος ειδικού για την πρωτεΐνη που μελετάμε και τελικά προσθέτουμε 50 μl Protein A,G-Sepharose beads ( για πολυκλωνικό και μονοκλωνικό αντίσωμα αντίστοιχα) και επωάζουμε αναδεύοντας 16 ώρες στους 4°C. Στη συνέχεια τα beads ξεπλένονται δύο φορές για 10 λεπτά υπό ανάδευση στους 4°C με Sonication buffer, δυο φορές με Sonication buffer που περιέχει 500mM NaCl, άλλες δύο με Wash buffer I (20mM Tris pH8.0, 0.1mM EDTA, 250mM LiCl, 0.5% NP40, 0.5% sodium deoxycolate) και δύο φορές με TE buffer ( 10mM Tris pH8.0, 1mM EDTA). Τα άνοσο-σύμπλοκα εκλούνται από την κολώνα με 20mM Tris pH8.0, 1mM EDTA, 1%SDS στους 65°C για 10 λεπτά και επωάζονται για 5 ώρες στους 65°C για να αντιστραφούν οι συνδέσεις πρωτεϊνών-DNA (cross-links). Στη συνέχεια επεξεργαζόμαστε τα δείγματα με 10μg/ml RNAase A και 20μg/ml ProteinaseK και τα εκχυλίζουμε με διάλυμα φαινόλης-χλωροφόρμιου (25:24) και τα κατακρημνίζουμε με αιθανόλη. Το τμήμα του DNA που μας ενδιαφέρει το ανιχνεύουμε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με τη χρήση συγκεκριμένων εκκινητών και 10μCi [α-

$^{32}\text{P}$ dCTP και τα δείγματα αναλύονται σε 4% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης μη αποδιατακτικό (native).

### **Απομόνωση RNA από κύτταρα**

Το RNA παρασκευάστηκε με τη μέθοδο της όξινης φαινόλης από κύτταρα που βρίσκονται σε Solution D (4M θειοκυανικό γουανίδιο, 25mM κιτρικό νάτριο pH 7.0, 0.5% σαρκosύλιο. Σε αυτό προστίθεται πριν από τη χρήση του 0.72% β-μερκαπτοαιθανόλη (14.3M). Τα κύτταρα ακολούθως ομογενοποιούνται με σύριγγα και βελόνη και προστίθενται κατά σειρά 1/10 του όγκου 2M οξικό αμμώνιο, 1 όγκος φαινόλης pH 4, και 0.2 όγκοι Senaq (χλωροφόρμιο και ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 24/1). Ακολουθεί επώαση 15 λεπτά σε πάγο και φυγοκέντρηση σε 1000g για 20 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο εκχυλίζεται με ίσο όγκο φαινόλης pH 7.5. Στο νέο υπερκείμενο προστίθεται ίσος όγκος ισοπροπανόλης και τοποθετείται στους -20°C για περισσότερο από μία ώρα. Κατόπιν φυγοκεντρείται για 20 λεπτά στους 4°C στις 14.000rpm, απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα ξεπλένεται με 75% αιθανόλη. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και η πελλέτα στεγνώνεται από τα ίχνη της αλκοόλης και επαναδιαλύεται σε 200-300μl ddH<sub>2</sub>O που περιέχει RNasin (40u/l Promega) που είναι αναστολέας Rnάσης A. Μετά την πλήρη επαναϊώρησή του το RNA ποσοτικοποιείται με φωτομέτρηση στα 260nm και η ποιότητά του ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτική πηκτή αγαρόζης 2%.

### **Κατεργασία με Dnάση και αντίστροφη μεταγραφή (DNase treatment and RT)**

2-10γ RNA επώαζονται με 1λ Dnάση (10u/l απαλλαγμένη Rnάσης), 5X ρυθμιστικό διάλυμα Dnάσης (200mM Tris pH8.0, 50mM NaCl, 30mM MgCl<sub>2</sub>) και 0.5λ RNasin σε τελικό όγκο 130μl στους 37°C για 1 ώρα. Μετά την επώαση γίνεται εκχύλιση φαινόλης/ χλωροφορμίου/ ισοαμυλικής αλκοόλης (25/24/1). Στο υπερκείμενο προστίθενται 3,5 όγκοι μίγματος απόλυτης αιθανόλης/ οξικού αμμωνίου 7.5M (6/1), επώάζεται στους -80°C για 20 λεπτά και φυγοκεντρείται σε μικροφυγόκεντρο για 20 λεπτά στις 14.000 rpm. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου το ίζημα ξεπλένεται με 75% αιθανόλη, στεγνώνεται και επαναδιαλύεται σε 20μl ddH<sub>2</sub>O που περιέχει RNasin. Για την αντίστροφη μεταγραφή χρησιμοποιούνται 2γ RNA κατεργασμένου με Dnάση. Σε αυτά προστίθενται 2λ

τυχαίοι εξαμερείς εκκινητές(Pd(6)100rpm/μl) και ddH<sub>2</sub>O σε τελικό όγκο 27.5μl και επωάζονται στους 65°C για 5 λεπτά. Στο μίγμα προστίθενται 8μl ρυθμιστικό διάλυμα 5X MMLV RT, 2μl MMLV Reverse transcriptase Rnase H<sup>-</sup> (200u/μl), 0.5μl RNasin και 2μl μείγματος των τεσσάρων dNTPs συγκέντρωσης 10mM για το καθένα, και ακολουθεί επώαση στους 37°C για 2 ώρες.

### **Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)**

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε διάλυμα που περιέχει 50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8.5, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% TritonX-100, 0.1mM dNTPs, 10μCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dATP και σε αυτό προσθέτουμε 0.4μM από κάθε εκκινητή και 50ng από το DNA που θέλουμε να ανιχνεύσουμε ή να πολλαπλασιάσουμε την ποσότητά του και 2.5u Taq πολυμεράση (Minotech). Η διαδικασία που ακολουθεί είναι αυτοματοποιημένη και πραγματοποιείται από ειδικό μηχάνημα. Αυτή περιλαμβάνει ένα πρώτο στάδιο στο οποίο γίνεται η αποδιάταξη του DNA συνήθως στους 94°C, ακολουθεί η υβριδοποίηση του εκκινητή στο DNA-μήτρα και τέλος αρχίζει η αντίδραση πολυμερισμού της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας DNA (75°C). Η θερμοκρασία στην οποία γίνεται η υβριδοποίηση του εκκινητή εξαρτάται από το μέγεθός του και το είδος των νουκλεοτιδίων που περιέχει (πουρίνες ή πυριμιδίνες).

### **Χαρτογράφηση νουκλεοσωμάτων ( Nucleosome mapping)**

Αρχικά επωάζουμε τα κύτταρα με 1% φορμαλδεΰδη για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και σταματάμε την αντίδραση μονιμοποίησης (crosslinking) με την προσθήκη γλυκίνης 0.125M. Στη συνέχεια ξεπλένουμε 3 φορές με 1XPBS συλλέγονται σε κρύο PBS και φυγοκεντρώνονται στις 1.000rpm για 5 λεπτά. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 5 όγκους Sucrose buffer A (0.32M Sucrose, 15mM Hepes pH7.9, 60mM KCl, 2mM EDTA, 0.5mM EGTA, 0.5% BSA, 0.5mM spermidine, 0.15mM spermine, 0.5mM DTT) και ομογενοποιείται με τη χρήση ομογενοποιητή (Dounce). Στο εναιώρημα αυτό προσθέτουμε προσεχτικά ίσο όγκο Sucrose buffer B (Sucrose buffer A χωρίς BSA και με 30% Sucrose). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 3.000rpm για 15 λεπτά και αφαίρεση του υπερκείμενου. Το ίζημα αποτελείται από τους πυρήνες των κυττάρων και επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο buffer Nuc (15mM Hepes pH7.5, 60mM KCl, 15mM NaCl, 0.34mM sucrose, 10% glycerol, 0.15mM

mercaptoethanol, 0.15mM spermine, 0.5mM spermidine). Παίρνουμε μία ποσότητα από το παραπάνω εναιώρημα και το διαλύουμε σε 1ml NaOH και μετράμε την οπτική του πυκνότητα και το αραιώνουμε προσθέτοντας buffer Nuc μέχρι να φτάσει τελική συγκέντρωση 100μg/ml. Σε 200μl από το παραπάνω εναιώρημα προσθέτουμε αυξανόμενες ποσότητες μικροκοκικής νουκλεάσης (Mnase) 0, 0.02, 0.04, 0.08, 0.1, 0.2, 0.4, 1, 2 units παρουσία 3mM CaCl<sub>2</sub> τα επωάζουμε στους 37°C για δύο λεπτά. Σταματάμε την αντίδραση με την προσθήκη Lysis buffer (20mM Tris pH7.5, 0.2M NaCl, 2mM EDTA, 2% SDS, 0.2mg/ml Proteinase K) επώαση στους 37°C για δύο ώρες και στη συνέχεια στους 65°C για να αντιστραφεί η μονιμοποίηση που επιτεύχθηκε με την προσθήκη φορμαλδεΐδης. Ακολουθεί προσθήκη TE, εκχυλίσες με φαινόλη και φαινόλη-χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση του DNA με αιθανόλη και οξικό νάτριο (1/10 του όγκου). Η διαδικασία της κατακρήμνισης επαναλαμβάνεται τουλάχιστον τρεις φορές και τελικά το DNA επαναδιαλύεται σε TE. Το DNA αυτό χρησιμοποιείται στη συνέχεια σε δύο διαφορετικές διαδικασίες χαρτογράφησης νουκλεοσωμάτων. Η πρώτη διαδικασία είναι χαμηλής διακριτικής ικανότητας (low resolution) και περιλαμβάνει πέψη με ένζυμο περιορισμού που βρίσκεται στην άκρη της περιοχής που χαρτογραφείται. Ακολουθεί Southern blot ανάλυση και η υβριδοποίηση γίνεται με ανιχνευτή που περιλαμβάνει ένα μικρό τμήμα του γενώματος που ξεκινά από το σημείο που κόβει το ένζυμο περιορισμού (indirect end labeling). Η δεύτερη είναι υψηλής διακριτικής ικανότητας και περιλαμβάνει φωσφορύλιωση του DNA (5μg) με T4 πολυνουκλεοτιδική κινάση παρουσία 5mM ATP και kinase buffer (70mM Tris pH7.6, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM DTT) στους 37°C για μισή ώρα. Ακολουθεί εκχύλιση με φαινόλη-χλωροφόρμιο, κατακρήμνιση του DNA και επαναδιάλυση σε κατάλληλο όγκο ddH<sub>2</sub>O ώστε ο τελική συγκέντρωση να είναι 0.1-0.2μg/ml. 1-2 μg από το DNA υποβάλλεται σε αντίδραση σύνδεσης με αλληλουχία συνδέτη (linker που προέρχεται από την υβριδοποίηση δύο μη ολικά επικαλυπτόμενων μονόκλωνων τμημάτων DNA 25 και 11 νουκλεοτιδίων). Ακολουθεί αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) στην οποία χρησιμοποιούνται δύο εκκινητές ο ένας από τους οποίους είναι σημασμένος και υβριδοποιείται με περιοχή του υποκινητή που θέλουμε να χαρτογραφήσουμε ενώ ο δεύτερος υβριδοποιείται με την αλληλουχία του συνδέτη. Οι αντιδράσεις αναλύονται σε αποδιατακτικό πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμίδης (8%).

### Ανάλυση νεοσυντιθέμενου RNA σε πυρήνες κυττάρων (Nuclear run-off)

Απομονώνουμε πυρήνες με την μέθοδο που περιγράφηκε πιο πάνω (sucrose-gradient method). Μετράμε στο μικροσκόπιο (με τη χρήση του αιμοκυττόμετρου) τους πυρήνες και τους χωρίζουμε σε aliquotes ώστε το κάθε ένα να περιέχει  $5 \times 10^7$  από αυτούς. Φυγοκεντρούμε τα δείγματα στις 1.000 στροφές για 5 λεπτά στους  $4^\circ\text{C}$ . Το ίζημα το επαναδιαλύουμε σε 250μl 'Glycerol Storage Buffer' (50mM Tris pH8.3, 40% glycerol, 5mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1mM EDTA) και παγώνουμε τα δείγματα σε υγρό άζωτο όπου μπορούν να διατηρηθούν για πολύ καιρό. Όταν θέλουμε να ξεκινήσουμε την διαδικασία ξεπαγώνουμε ένα aliquot και προσθέτουμε αμέσως ίσο όγκο (250μl) 2X Complete transcription buffer [1ml transcription buffer (10mM Tris pH8.0, 5mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.3MKCl) +10μl 100mM ATP+10μl 100mM CTP+10μl 100mM GTP+5μl 1M DTT)] και 10μl  $\alpha$   $^{32}\text{P}$ -UTP (10mCi/ml). Επωάζουμε στους  $30^\circ\text{C}$  για μισή ώρα. Στη συνέχεια προσθέτουμε 2.5μl 1M  $\text{MgCl}_2$ , 1μl 0.5M  $\text{CaCl}_2$  και 5μl DNase I/RNase free (10u/μl) και επωάζουμε για άλλα πέντε λεπτά στους  $30^\circ\text{C}$ . Ακολούθως προσθέτουμε 100μl 5X SDS buffer (5% SDS, 0.5M Tris pH7.4, 0.125M EDTA) και 20 μl Proteinase K (10mg/ml) και επωάζουμε στους  $42^\circ\text{C}$  για μισή ώρα. Ακολουθεί εκχύλιση με ίσο όγκο όξινης φαινόλης (pH 4.0) και στη συνέχεια εκχύλιση με ίσο όγκο διαλύματος φαινόλης (ουδέτερη )/χλωροφόρμιο/ ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογίες 25/24/1 και κατακρήμνιση με προσθήκη 1/10 του όγκου 3M οξικού νατρίου pH 5.2 και 0.6 όγκων ισοπροπανόλης. Μετά την φυγοκέντρωση το ίζημα ξεπλένεται με 70% αιθανόλη στεγνώνεται και διαλυτοποιείται σε 0.5 ml DNase I buffer (20mM Hepes pH 7.5, 5mM  $\text{MgCl}_2$ , 1mM  $\text{CaCl}_2$ ) και σε αυτό προστίθενται 5μl DNase I/RNase free. Ακολουθεί επώαση στους  $37^\circ\text{C}$  για 20 λεπτά και η αντίδραση διακόπτεται με την προσθήκη 5μl 0.5M EDTA. Ακολουθεί εκχύλιση με ίσο όγκο διαλύματος φαινόλης (ουδέτερη )/χλωροφόρμιο/ ισοαμυλική αλκοόλη και κατακρήμνιση με προσθήκη 1μl γλυκογόνου, 1/10 του όγκου 3M οξικού νατρίου pH 5.2 και 2.5 όγκων απόλυτης αιθανόλης. Μετά την φυγοκέντρωση το ίζημα ξεπλένεται με 70% αιθανόλη, στεγνώνεται και διαλυτοποιείται σε 200μl  $\text{H}_2\text{O}$ . Ακολουθεί υδρόλυση του δείγματος με την προσθήκη 4μl 10M NaOH για 10 λεπτά στον πάγο η οποία διακόπτεται μετά από προσθήκη 300μl 1M Hepes pH 7.5. Ακολουθεί κατακρήμνιση με την κλασσική διαδικασία. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 100μl  $\text{H}_2\text{O}$  και μετριέται η περιεκτικότητά του σε cpm (Απαιτούνται  $5 \times 10^6$  cpm/ml για κάθε υβριδοποίηση). Ακολουθεί βρασμός του δείγματος και προσθήκη 0.4 ml



Hybridization buffer (6.25X SSC, 12.5mM Tris pH7.5, 1.25mM EDTA 6.25X Denhearts, 0.125% SDS, 62.5µg/ml yeast tRNA, 125µg/ml salmon sperm DNA). Αυτό χρησιμοποιείται ως ανιχνευτής σε υβριδοποίηση με μεμβράνη νιτροκυτταρίνης στην οποία έχει προηγηθεί ακινητοποίηση (dot blot) πλασμιδίου που περιέχει το cDNA του γονιδίου, την έκφραση του οποίου θέλουμε να ελέγξουμε.

Η διαδικασία αυτή έχει ως εξής: Αραιώνουμε 50µg του εν λόγω πλασμιδίου το οποίο το έχουμε κάνει γραμμικό (linear) σε 110µl H<sub>2</sub>O, προσθέτουμε 13µl 1M NaOH και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Στη συνέχεια προσθέτουμε 1.2ml 6XSSC και τοποθετούμε το δείγμα στον πάγο. Διαβρέχουμε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με 6XSSC σε ειδική συσκευή dot-blot και στα πηγαδάκια αυτής τοποθετούμε 125µl από το παραπάνω δείγμα. Στη συνέχεια ξεπλένουμε τα ίδια πηγάδια μία φορά με 6XSSC και αφήνουμε την μεμβράνη να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου και στην συνέχεια την τοποθετούμε σε φούρνο 80°C για δύο ώρες. Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης (προϋβριδοποίηση) για 3-6 ώρες στους 65°C με Pre-Hybridization buffer (5X SSC, 10mM Tris pH7.5, 1mM EDTA 5X Denhardt's, 0.1% SDS, 50µg/ml yeast tRNA, 100µg/ml salmon sperm DNA). Στη συνέχεια προστίθεται το παραπάνω βρασμένο δείγμα και ακολουθεί υβριδοποίηση στους 65°C για 52 ώρες. Η μεμβράνη ξεπλένεται με 2XSSC στους 65°C για 30 λεπτά και με 2XSSC, 0.1% SDS σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Ακολουθεί στέγνωμα της μεμβράνης και αυτοραδιογραφία.

### **Ανάλυση προστασίας RNA από την S-1 νουκλεάση μετά από υβριδοποίηση με ραδιοσημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο**

50µg ολικού RNA (σε 20µl) που απομονώνονται με την μέθοδο που περιγράφεται πιο πάνω επωάζονται με 9µl 3X aqueous hybridization solution (3M NaCl, 0.5M Hepes pH7.5, 1mM EDTA pH8.0) και 1µl (2pmol ή 100.000 cpms) ραδιοσημασμένου ολιγονουκλεοτιδίου (antisense) αρχικά στους 75°C για 10 λεπτά και στην συνέχεια στους 55°C για 16 ώρες (Overnight). Στα δείγματα στη συνέχεια προστίθενται 270µl Reaction buffer [150µl 2X S-1nuclease buffer (0.56 M NaCl, 0.1M sodium acetate, 9mM ZnSO<sub>4</sub>) + 3µl 2mg/ml single-stranded salmon sperm DNA + 147µl H<sub>2</sub>O + 300U S-1 nuclease] και ακολουθεί επώαση στους 37°C για 45 λεπτά. Στην ίδια διαδικασία υπόκεινται και 100.000 cpms ολιγονουκλεοτιδίου που δεν έχει υβριδοποιηθεί με RNA (θετικό control για τον έλεγχο της ποιότητας της S-1

νουκλεάσης). Η αντίδραση διακόπτεται μετά από προσθήκη 3μl 0.5M EDTA και ακολουθεί κατακρήμνιση των δειγμάτων σύμφωνα με τη γνωστή διαδικασία.. Μετά την κατακρήμνιση τα ιζήματα ξεπλένονται με 70% αιθανόλη και επαναδιαλύονται σε 10μl 0.1M NaOH. Σε ένα μέρος των δειγμάτων (3μl) προστίθεται ίσος όγκος Stop Solution (95% φορμαμίδιο 20mM EDTA 0.05% Bromophenol blue 0.05 Xylene Cyanol FF).ακολουθεί ηλεκτροφόρηση αυτών σε αποδιατακτικό πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμίδης 12% αφού πρώτα αποδιαταχθούν με θέρμανση για 7 λεπτά στους 100°C.Ακολουθεί αυτοραδιογραφία.

### **Παροδική διαμόλυνση (transient transfection) κυττάρων με τη μέθοδο συγκατακρήμνισης $\text{Ca}_3\text{PO}_4$ -DNA.(calcium phosphate transfection).**

Η μέθοδος εφαρμόζεται σε πειράματα τόσο παροδικής (transient) όσο και μόνιμης (Stable) διαμόλυνσης κυτταρικών σειρών. Το πλασμιδιακό DNA που θέλουμε να εισαχθεί συγκατακρημνίζεται με μόρια αλάτων  $\text{Ca}_3\text{PO}_4$  (125mM) και το λεπτόκοκκο ίζημα εισάγεται στο θρεπτικό μέσο της κυτταρικής καλλιέργειας. Το ίζημα προσκολλάται στην κυτταρική επιφάνεια και μέσω αδιευκρίνιστου μηχανισμού επιτυγχάνεται είσοδος του πλασμιδιακού DNA στα κύτταρα.

Ο όγκος του ιζήματος εξαρτάται από τον όγκο του θρεπτικού μέσου και το ίζημα αποτελεί το 1/10 του όγκου αυτού.Έτσι σε πηγάδι με 1ml θρεπτικού αντιστοιχούν 100μl ιζήματος που αποτελείται από 50μl 2X Hebs (Hepes Buffered saline solution: 16.4 gr NaCl, 11.9 gr Hpes acid, 0.21 gr  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  σε τελικό όγκο 1lit) και 50μl μείγματος DNA-H<sub>2</sub>O-CaCl<sub>2</sub> (125mM final).

Παράλληλα συνδιαμολύνουμε με πλασμιδιακές κατασκευές που φέρουν το CAT γονίδιο αναφοράς καθώς και το lacZ (πλασμίδιο με γονίδιο αναφοράς την β-γαλακτοσιδάση) για να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα του πειράματος (transfection efficiency) με toIacZ assay που περιγράφηκε πιο πάνω.

Μετά από 12 ώρες τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS και ανανεώνεται το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας.

## 2.ΥΛΙΚΑ

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι προϊόντα των εταιρειών :SIGMA, MERCK, PROMEGA, NEW ENGLAND BIOLABS, BRL, PHARMACIA, SANTA CRUZ, USB, STRATAGENE, QIAGEN, BOEHRINGER MANNHEIM, BIORAD.

Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν παρασκευής της MINOTECH, της NEW ENGLAD BIOLABS και της PROMEGA.

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:HNF-1(Santa Cruz, sc-8986, sc10791), HNF-4a (1), TBP (ευγενική προσφορά από τον Dr Tora ), TFIIB (sc-274), TAFII-250 (sc-735), TAFII-30 (ευγενική προσφορά από τον Dr Tora ), p89 (sc-293), TRAP-220 (sc8998), TRAP-100 (sc5341), Pol-II-N-terminal peptide (sc-9001), Pol-II CTD-Ser5-P (H-14, Covance), Pol-II CTD-Ser-2P (H5, Covance), CBP (sc-369), P/CAF (HL2404 ευγενική προσφορά από τον Dr Nakatani και sc8999), GCN5 (HL2617ευγενική προσφορά από τον Dr Nakatani), Brg-1 (sc-10768 και16011346 GENEKA), hBrm (sc-6449, sc-6450), Acetyl-H3 (Upstate Biotechn. 06-599), Acetyl-H4 (Upstate Biotechn. 06-866), fulllength histone H3 (sc10809), flag (Kodak), anti-rabbit (Rockland), anti-mouse (Jackson), anti-goat (Santa-Cruz).

Τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο Μικροχημείας του IMBB.

Τα ειδικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι παρασκευής των παρακάτω εταιριών:[<sup>14</sup>C]-chloramphenicol (Amersham), RT-PCR kit (ProStar Ultra HF, Stratagene), TALON (Clontech), Ni-NTA Agarose (Qiagen), Glutathione Sepharose-4B (Pharmacia), Gene Editor Site-directed Mutagenesis System (Promega), Protein A Sepharose CL-4B (Pharmacia),Protein G Sepharose 4 Fast Flow (Pharmacia), ECL (Amersham), TNT In vitro Transcription-Translation Kit (Promega), <sup>35</sup>S Metionine (Amersham), [<sup>3</sup>H] AcetylCoA (Amersham), Micrococcal Nuclease (USB), Advantage-GC cDNA Polymerase Mix (Clontech), Glutathione (Sigma).

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για τις κλωνοποιήσεις ήταν Ecoli (DH5α) και για την έκφραση πρωτεϊνών Ecoli (DH5α, B121plys, B121-19 Novagen).

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήσαμε για την καλλιέργεια των ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών ήταν DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) παραγωγής GIBCO, εμπλουτισμένο με μερικά απενεργοποιημένο ορό εμβρύου βοός σε περιεκτικότητα τέτοια που απαιτεί κάθε κυτταρική σειρά.

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν HepG2 (Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα ανθρώπου), Cos-1 (Νεφρικά κύτταρα πιθήκου), NIH3T3 (Ινοβλάστες ποντικού), CaCo-2 (Αδενοκαρκίνωμα στο κόλον ανθρώπου).

## Ειδικός στόχος 1:

### **Αποτελέσματα**

Ο μηχανισμός μεταγραφικής ενεργοποίησης από HNF-4 δεν έχει μελετηθεί με λεπτομέρεια. Αυτό που είχε παρατηρηθεί από πολλές ερευνητικές ομάδες είναι ότι σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης η προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων του εν λόγω ενεργοποιητή οδηγεί σε σταδιακή μείωση της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς που βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο HNF-4-εξαρτώμενου υποκινητή (squelching effect). Αυτή η παρατήρηση δείχνει ότι ο HNF-4 δεν δρα αυτόνομα αλλά χρειάζεται και άλλους παράγοντες-συνενεργοποιητές και επομένως είναι μέρος ενός συμπλόκου, η στρατολόγηση του οποίου, προσδίδει στο γονίδιο-στόχο την μέγιστη μεταγραφική ενεργότητα. Θελήσαμε λοιπόν να μελετήσουμε την δυνατότητα αλληλεπίδρασης του HNF-4 με τον γνωστό συνενεργοποιητή CBP και επιπλέον να δούμε πως η αλληλεπίδραση αυτή συμβάλει στην μεταγραφική ενεργότητα του παράγοντα.

Αρχικά, με πειράματα ανοσοκατακρύμησης σε ηπατικό περιβάλλον (HepG2), και σε κύτταρα που δεν εκφράζουν ηπατικούς παράγοντες αλλά τους προσθέτουμε εξωγενώς (Cos-1), δείχθηκε ότι ο HNF-4 αλληλεπιδρά *in vivo* με τον συνενεργοποιητή CBP. Πιο συγκεκριμένα, πυρηνικά εκχυλίσματα που απομονώθηκαν από HepG2 κύτταρα και Cos-1 κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν παροδικά με φορείς έκφρασης για HNF-4 και CBP, υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμιση με HNF-4 αντίσωμα και η παρουσία του CBP ανιχνεύτηκε με Western blot ανάλυση (εικόνα 1).

Στην συνέχεια δύο ανεξάρτητες εργασίες έδειξαν ότι ο παράγοντας CBP αλληλεπιδρά *in vitro* με την AF-1 και AF-2 περιοχή του HNF-4 και η υπερέκφρασή του σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης αυξάνει την HNF-4-εξαρτώμενη μεταγραφική ενεργοποίηση (55, 211). Δεδομένου ότι ο συνενεργοποιητής CBP έχει ενζυμική ενεργότητα ακετυλοτρανσφεράσης και έχει βρεθεί ότι ακετυλιώνει εκτός από ιστόνες και ορισμένους μεταγραφικούς παράγοντες, τέθηκε το ερώτημα είναι αν ο HNF-4 ακετυλιώνεται από CBP και αν η μετα-μεταφραστική αυτή τροποποίηση ρυθμίζει την ικανότητα της μεταγραφικής ενεργοποίησης του.

Αρχικά λοιπόν με *in vitro* ακετυλίωση δείχθηκε ότι βακτηριακά εκφρασμένη και καθαρισμένη με χρωματογραφία συγγένειας πρωτεΐνη His-HNF-4 ακετυλιώνεται

από CBP (εικόνα 2A). Πιο λεπτομερής ανάλυση στην οποία χρησιμοποιήθηκαν διάφορα τμήματα του HNF-4 σε σύντηξη με GST (GST-HNF-4 1-90, 91-142, 130-368, 130-455) έδειξε ότι η περιοχή του HNF-4 που ακετυλιώνεται είναι αυτή που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 91-142 και που είναι υπεύθυνη για την είσοδο και τον εντοπισμό του HNF-4 στον πυρήνα του κυττάρου (Nuclear localization signal:NLS) (Εικόνα 2B). Μεταλλαγές στις λυσίνες που περιλαμβάνει η περιοχή αυτή απέδειξαν ότι οι λυσίνες 97, 99 και 117, 118 είναι πιθανές θέσεις ακετυλίωσης του μορίου (Εικόνα2Γ μεταλλαγή M4)

Με σκοπό να διαπιστώσουμε αν η ακετυλίωση συμβαίνει και *in vivo*, κύτταρα HepG2 και Cos1 που είχαν διαμολυνθεί με HNF-4,καλλιιεργήθηκαν παρουσία [<sup>3</sup>H ] οξικού οξέος και από αυτά απομονώθηκαν ολικά εκχυλίσματα τα οποία υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα που αναγνωρίζει επιλεκτικά την πρωτεΐνη HNF-4 και μετά από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων, ακολούθησε αυτοραδιογραφία. Στην εικόνα 2Δ φαίνεται ότι τόσο ο ενδογενής παράγοντας στα HepG2, όσο και ο εξωγενώς προστιθέμενος στα Cos1, βρίσκεται σε ακετυλιωμένη μορφή. Στην περίπτωση όμως που υπερεκφράζουμε στα Cos1 κύτταρα μία μεταλλαγμένη μορφή του CBP (CBP HAT<sup>-</sup>) που έχει χάσει την ενζυμική της ενεργότητα και η οποία ανταγωνίζεται την ενδογενή αγρίου τύπου (wtCBP) ως προς την αλληλεπίδραση με HNF-4, παρατηρείται μείωση της ακετυλίωσης του HNF-4, ενώ η M4 μεταλλαγμένη μορφή (οι λυσίνες 97,99 και 117,118 έχουν αλλάξει σε αλανίνες) δεν ακετυλιώνεται καθόλου.

Για να ελέγξουμε την σημασία της τροποποίησης αυτής στην ενεργοποίηση γονιδίων-στόχων του HNF-4 στο πλαίσιο της χρωματινικής δομής χρησιμοποιήσαμε ινοβλάστες (NIH 3T3), οι οποίοι δεν εκφράζουν HNF-4 αλλά ούτε και τα γονίδια που ρυθμίζονται από αυτόν, και τους διαμολύναμε, με φορείς έκφρασης για τον HNF-4 αγρίου τύπου και την μεταλλαγή M4 σε συνδυασμό με CBP και CBP HAT<sup>-</sup>, με σκοπό να εντεθούν μόνιμα στο γένωμα των κυττάρων (stable integration). Στη συνέχεια με ανάλυση Western ελέγξαμε την έκφραση του HNF-1 γνωστού γονιδίου-στόχου του HNF-4 (Εικόνα 3A). Φαίνεται λοιπόν ότι μόνο η συνυπερέκφραση του wt HNF-4 και wt CBP οδηγεί στην επαγωγή του HNF-1, γεγονός που τονίζει την σημασία της ακετυλίωσης του παράγοντα για την δράση του σε φυσικούς υποκινητές με νουκλεοσωμική οργάνωση.

Παρόμοια είναι και τα αποτελέσματα σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης στην ίδια κυτταρική σειρά. Πιο συγκεκριμένα, υπερέκφραση wtCBP αυξάνει την

HNF-4-εξαρτώμενη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίου αναφοράς, που βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο συνθετικού υποκινητή με μία θέση πρόσδεσης του HNF-4 (1XTRH-TK-CAT), 18 φορές. Στα ίδια πειράματα η M4 μεταλλαγή είναι ουσιαστικά ανενεργή. Η ικανότητα μεταγραφικής ενεργοποίησης των δύο άλλων μεταλλαγών M2 και M3 που ακετυλιώνονται μερικώς (μόνο στο ένα από τα δύο ζευγάρια λυσινών) επάγεται από την προσθήκη CBP 5.5 και 3 φορές αντίστοιχα. Η υπερέκφραση του CBP HAT<sup>-</sup> μείωσε την μεταγραφική ενεργότητα του wtHNF-4, 2.5 φορές (εικόνα 3B).

Στη συνέχεια ακολούθησαν πειράματα παροδικής διαμόλυνσης σε NIH3T3 κύτταρα στα οποία χρησιμοποιήθηκε όλο το μόριο ή ελλείψεις του HNF-4 σε σύντηξη με την περιοχή του μεταγραφικού παράγοντα GAL4, που είναι υπεύθυνη για την πρόσδεσή του στο DNA (GAL4 DNA-binding domain) και για την είσοδό του στον πυρήνα (Gal4 NLS). Η υπερέκφραση wtCBP αυξάνει την GAL4-HNF-4FL(1-455)-εξαρτώμενη μεταγραφή 7 φορές, ενώ η υπερέκφραση CBP HAT<sup>-</sup> μόνο 3.5 φορές. Από την άλλη καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε όταν η παραπάνω σύγκριση έγινε με την χρήση της GAL4-HNF-4(130-455) κατασκευής (εικόνα 3Γ).

Το γεγονός ότι η CBP-εξαρτώμενη επαγωγή της μεταγραφικής ενεργοποίησης του HNF-4 είναι πολύ μεγαλύτερη όταν χρησιμοποιούμε σύστημα αναφορά με θέσεις πρόσδεσης για τον ίδιο τον HNF-4 από το σύστημα με θέσεις πρόσδεσης για GAL4 (18 φορές και 7 φορές αντίστοιχα Εικόνα 1B-2Γ) μας ώθησε να μελετήσουμε τον ρόλο της ακετυλίωσης στην ικανότητα πρόσδεσης του παράγοντα στο DNA. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ηλεκτροφόρησης υστέρησης κινητικότητας (EMSA) η οποία έδειξε ότι η *in vitro* ακετυλίωση του HNF-4 αυξάνει την πρόσδεσή του στο DNA 4-6 φορές (Εικόνα 4A). Το ίδιο πείραμα έγινε με την χρήση ολικών εκχυλισμάτων από Cos1 κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με φορείς έκφρασης για HNF-4, HNF-4 σε συνδυασμό με CBPHAT<sup>-</sup>, και M4 HNF-4. Παρατηρήθηκε λοιπόν πως η υπερέκφραση του CBPHAT<sup>-</sup> (που όπως προαναφέρθηκε μειώνει την ακετυλίωση του HNF-4) οδηγεί σε μειωμένη δυνατότητα πρόσδεσης του HNF-4 στο DNA ενώ η M4 μεταλλαγή δεν προσδέεται στο DNA (εικόνα 4B) γεγονός που ενισχύει την προηγούμενη παρατήρηση, χωρίς όμως να μπορούμε να αποκλείσουμε την πιθανότητα ότι η μεταλλαγή αλλάζει δραματικά την διαμόρφωση του μορίου και για το λόγο αυτό χάνει την ικανότητα πρόσδεσης του στο DNA.

Η παρατήρηση ότι η υπερέκφραση wt CBP αυξάνει την GAL4-HNF-4(130-455)-εξαρτώμενη μεταγραφή 2.1 φορές λιγότερο από την GAL4-HNF-4FL

(3.4φορές) και το γεγονός ότι για την ενεργοποίηση αυτή δεν απαιτείται η περιοχή στην οποία ακετυλιώνεται ο HNF-4 ούτε η ενζυμική ενεργότητα του CBP (εικόνα 3Γ), μας οδήγησε στο να μελετήσουμε την πιθανότητα η ακετυλίωση του HNF-4 να επηρεάζει την συγγένεια πρόσδεσης του με τον ίδιο τον συνενεργοποιητή CBP. Η πρωτεΐνη HNF-4(1-455) σε σύντηξη με GST αφέθηκε αρχικά να αλληλεπιδράσει με CBP και το σύμπλοκο GST-HNF-4-CBP υποβλήθηκε σε *in vitro* ακετυλίωση παρουσία και απουσία ακετυλοσυνένζυμου A (acetyl-CoA). Στη συνέχεια ακολούθησαν ξεπλύματα με διαλύματα που περιείχαν αυξανόμενες ποσότητες άλατος. Παρατηρήθηκε λοιπόν ότι ακόμα και σε αυστηρές συνθήκες αλατότητας (800mM KCl) ανιχνεύεται το σύμπλοκο HNF-4-CBP, μόνο όμως στην περίπτωση που έχει προηγηθεί ακετυλίωση του HNF-4 (εικόνα 5A). Το πείραμα αυτό αποδεικνύει ότι η ακετυλίωση του παράγοντα αυξάνει την συγγένεια πρόσδεσης του στον συνενεργοποιητή.

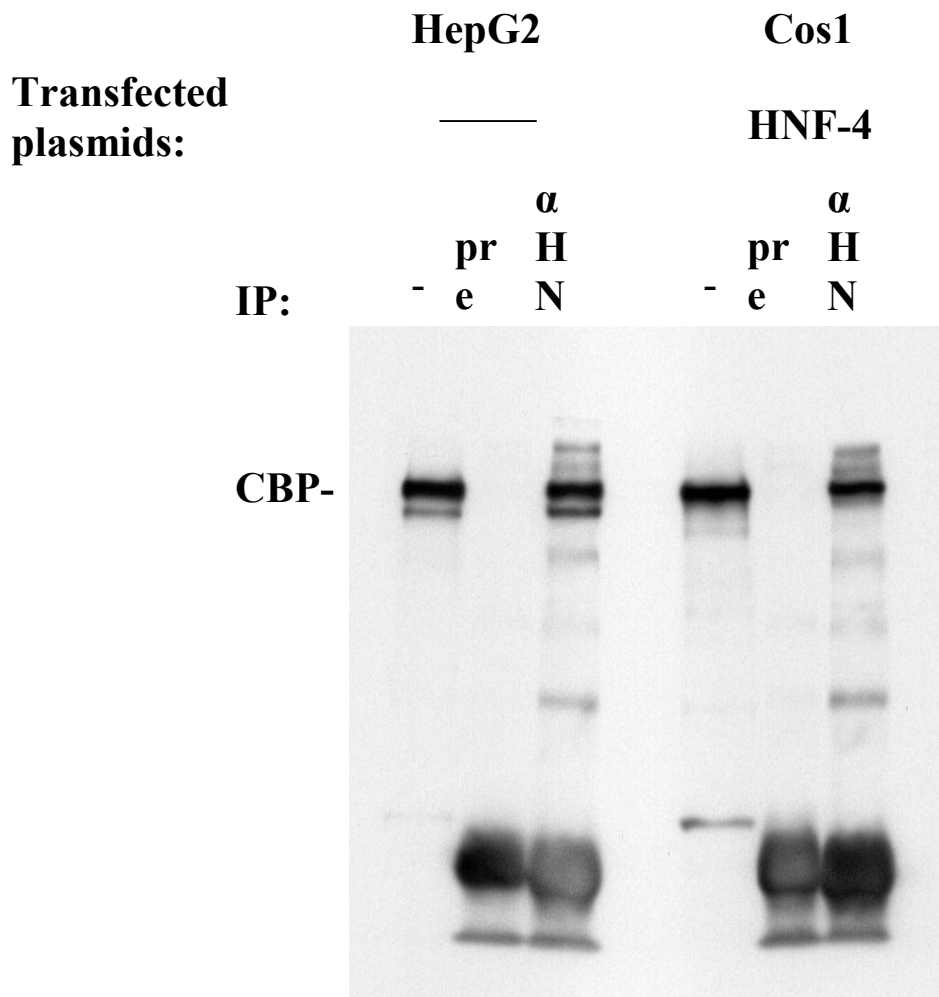
Για να διερευνήσουμε την πιθανότητα η ακετυλίωση να αλλάζει την διαμόρφωση του HNF-4, ολικά εκχυλίσματα από Cos1 κύτταρα παροδικά διαμολυσμένα με φορέα έκφρασης για HNF-4, HNF-4 και CBPHAT<sup>-</sup> και HNF-4 M4 χρησιμοποιήθηκαν σε αντίδραση μερικής πέψης με αλκαλική πρωτεάση και τα πρωτεολυτικά προϊόντα του HNF-4 στην κάθε περίπτωση, ανιχνεύτηκαν με Western blot ανάλυση. Στην εικόνα 5B φαίνεται το διαφορετικό πρότυπο πρωτεόλυσης της ακετυλιωμένης και μη ακετυλιωμένης μορφής του HNF-4, υποδηλώνοντας το ρόλο της τροποποίησης αυτής στην αλλαγή της διαμόρφωσης του.

Επειδή το τμήμα του HNF-4 που ακετυλιώνεται εντοπίζεται στην περιοχή που είναι υπεύθυνη για την είσοδο και τον εντοπισμό του παράγοντα στον πυρήνα του κυττάρου θελήσαμε να εξετάσουμε αν η ακετυλίωση του επηρεάζει τον πυρηνικό εντοπισμό του. Πειράματα *in situ* ανοσοφθορισμού και βιοχημικής διαμερισματοποίησης Cos1 κυττάρων διαμολυσμένων με φορέα έκφρασης HNF-4, έδειξαν ότι ο παράγοντας είναι πυρηνικός. Ενδιαφέρουσα ήταν όμως η παρατήρηση ότι κατά την συνυπερέκφραση CBPHAT<sup>-</sup> ένα σημαντικό μέρος της πρωτεΐνης HNF-4 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, και την ίδια κατανομή παρουσιάζει και η M4 μεταλλαγή που δεν ακετυλιώνεται. Μετά από προσθήκη στα κύτταρα λεπτομυκίνης B (Leptomycin B, LMB) ενός ειδικού αναστολέα του μονοπατιού εξόδου πρωτεϊνών από τον πυρήνα μέσω της πρωτεΐνης CRM1, ο HNF-4 εντοπίζεται μόνο στον πυρήνα. Αυτό υποδηλώνει ότι ο κυτταροπλασματικός εντοπισμός της μορφής του HNF-4 που δεν ακετυλιώνεται προέρχεται από την έξοδο της πρωτεΐνης από τον πυρήνα και όχι



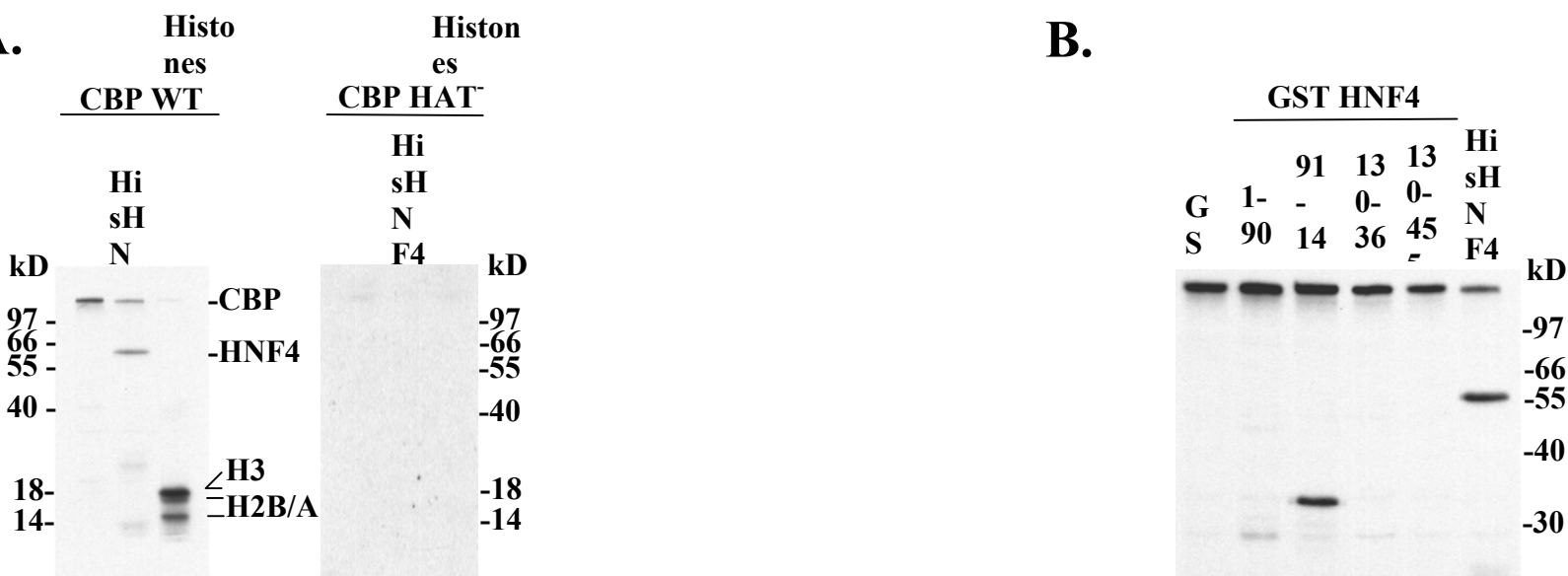
λόγω έλλειψης ικανότητας εισόδου σε αυτόν. Υπερέκφραση CBPHAT<sup>-</sup> είτε προσθήκη LMB δεν άλλαξε τον εντοπισμό της GAL4-HNF-4(130-455) πρωτεΐνης η οποία δεν περιλαμβάνει την περιοχή ακετυλίωσης του παράγοντα και εισέρχεται στον πυρήνα μέσω GAL4 NLS γεγονός που σημαίνει ότι η επίδραση του φαρμάκου και της υπερέκφρασης CBPHAT<sup>-</sup> στον εντοπισμό του HNF-4 είναι ειδική (εικόνα 6Α και 6Β).

Για να επιβεβαιώσουμε ότι η έξοδος της μη ακετυλιωμένης μορφής του HNF-4 από τον πυρήνα γίνεται μέσω του CRM1-μονοπατιού χρησιμοποιήσαμε Cos1 κύτταρα διαμολυσμένα με τους παραπάνω συνδυασμούς φορέων έκφρασης (HNF-4, HNF-4 και CBPHAT<sup>-</sup>, HNF-4 M4) στα οποία υπερεκφράσαμε CRM1 και με ανοσοφθορισμό ελέγξαμε τον εντοπισμό του HNF-4 στην κάθε περίπτωση παρουσία και απουσία LMB. Παρατηρήσαμε λοιπόν ότι πολύ μικρό ποσοστό του wt HNF-4 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα ενώ στις άλλες δύο περιπτώσεις το μεγαλύτερο ποσοστό της πρωτεΐνης εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα ενώ το πρότυπο αυτό είναι αναστρέψιμο με την προσθήκη LMB, γεγονός που ενισχύει την ιδέα ότι η μη ακετυλιωμένη μορφή του HNF-4 εξέρχεται από τον πυρήνα μέσω CRM1 (εικόνα 7Α). Επιπλέον, για να επιβεβαιωθεί αν η αλληλεπίδραση αυτή είναι άμεση, His-CRM1 πρωτεΐνη βακτηριακά εκφρασμένη και καθαρισμένη με χρωματογραφία συγγένειας αφέθηκε να αλληλεπιδράσει με ολικά εκχυλίσματα Cos1 κυττάρων τα οποία είχαν διαμολυνθεί με HNF-4, HNF-4 και CBPHAT<sup>-</sup> και HNF-4 M4 και η παρουσία της πρωτεΐνης HNF-4 που αλληλεπίδρασε ανιχνεύτηκε με ανάλυση Western. Φαίνεται λοιπόν ότι πολύ μικρή αλληλεπίδραση ανιχνεύεται ανάμεσα στην CRM1 και την wtHNF-4 η οποία αυξάνεται στις περιπτώσεις που τα εκχυλίσματα περιέχουν την μη ακετυλιωμένη μορφή του HNF-4 ((HNF-4 + CBPHAT<sup>-</sup> και HNF-4 M4) Εικόνα 7Β).



**Εικόνα 1. Ο παράγοντας HNF-4 αλληλεπιδρά *in vivo* με CBP.**

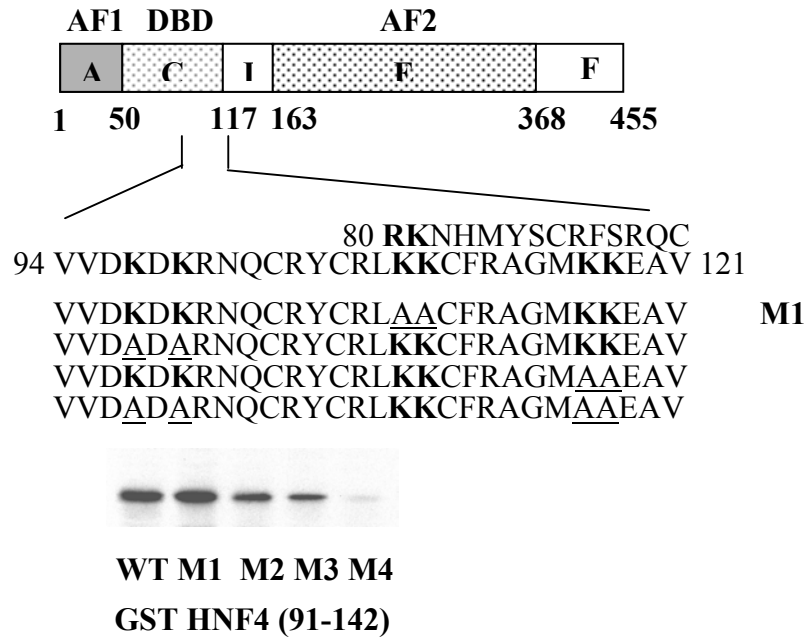
Πυρηνικά εκχυλίσματα από HepG2 κύτταρα και Cos-1 κύτταρα που έχουν διαμολυνθεί με φορείς έκφρασης HNF-4 και CBP υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμιση με HNF-4 αντίσωμα ή με ορό κουνελιού που δεν έχει ανοσοποιηθεί (pre-immune). Η παρουσία του CBP σε κάθε δείγμα ανιχνεύεται με Western blot ανάλυση με τη χρήση  $\alpha$ -CBP αντισώματος. Η πρώτη στήλη κάθε πάνελ αντιπροσωπεύει το 2% της ποσότητας της πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε ανοσοκατακρήμιση (input).



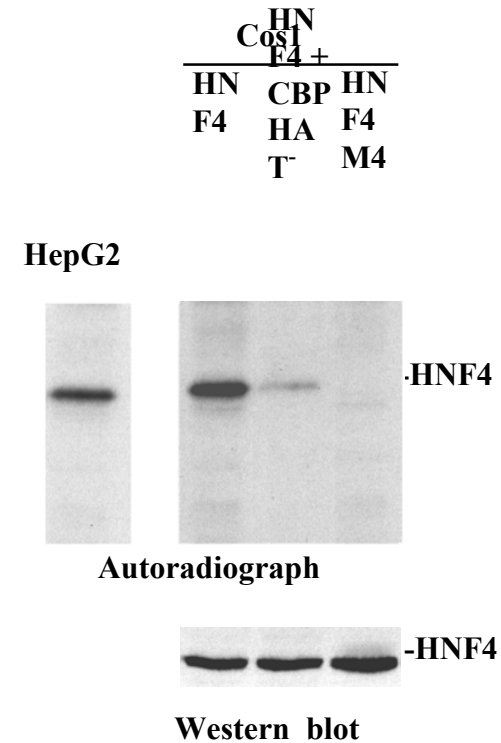
**Εικόνα 2. Ο HNF-4 ακετυλιώνεται από CBP**

(Α και Β) 1μg καθαρής ανασυνδυασμένης (recombinant) 6XHisHNF-4 πρωτεΐνης, 10μg ιστονών (H3, H4, H2A, H2B) και 1μg από τις αναγραφόμενες GST-HNF-4 πρωτεΐνες υποβλήθηκαν σε αντίδραση ακετυλίωσης *in vitro* με 50ng wt CBP (baculo-expressed) ή με την μεταλλαγή CBP HAT-(L1690K, C1691L) και ακολούθησε ανάλυση σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (SDS-PAGE) και αυτοραδιογραφία.

**Γ.**

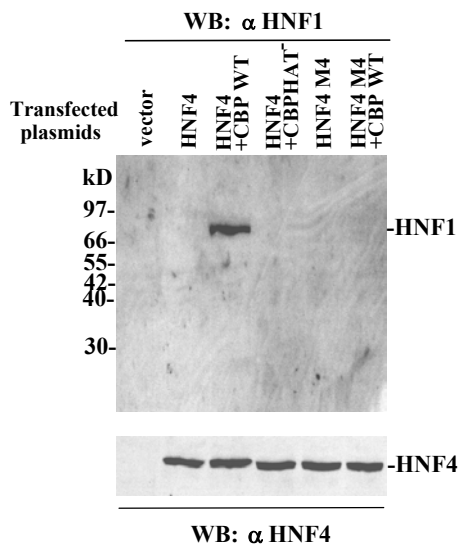


**Δ.**

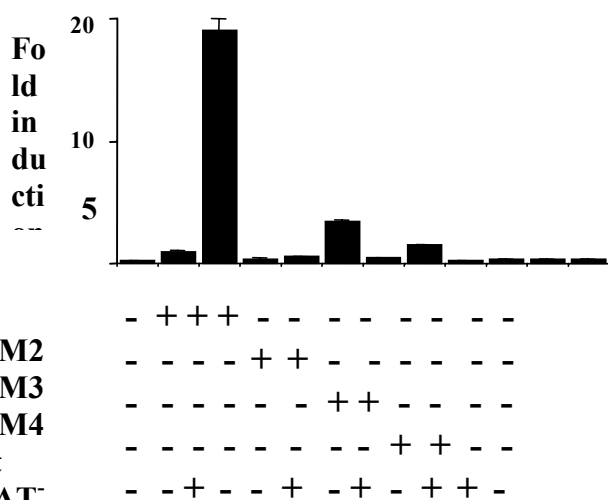


**Εικόνα 2 (συνέχεια).** (Γ) Σχηματική απεικόνιση του HNF-4 μορίου και η αλληλουχία της περιοχής που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 80-121 και αντιστοιχεί στο NLS (Nuclear localization signal). Τα αμινοξικά κατάλοιπα που έχουν μεταλλαχθεί είναι υπογραμμισμένα. Για την ακετυλίωση των GSTHNF-4 (91-142) wt και μεταλλαγών ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία. (Δ) In vivo ακετυλίωση του HNF-4. HepG2 κύτταρα και Cos-1 κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με pCDNA φορείς έκφρασης που περιέχουν τα αναγραφόμενα cDNAs καλλιεργήθηκαν παρουσία [3H] οξικού οξέος, απομονώθηκαν ολικά εκχυλίσματα τα οποία υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμνιση με HNF-4 αντίσωμα. Ακολούθησε ανάλυση σε SDS-PAGE και αυτοραδιογραφία. Μέρος των ολικών εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε σε Western blot με το ίδιο αντίσωμα όπου επιβεβαιώθηκε ότι η έκφραση του HNF-4 είναι ισόποση.

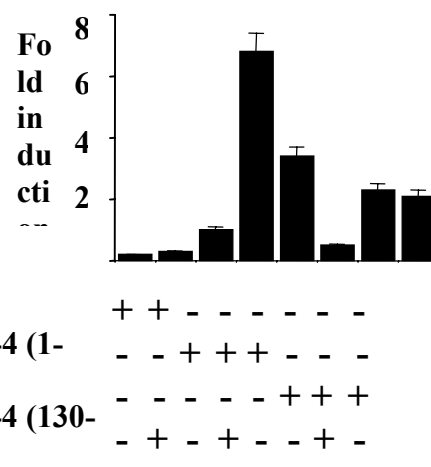
**A.**



**B.**



**Γ.**

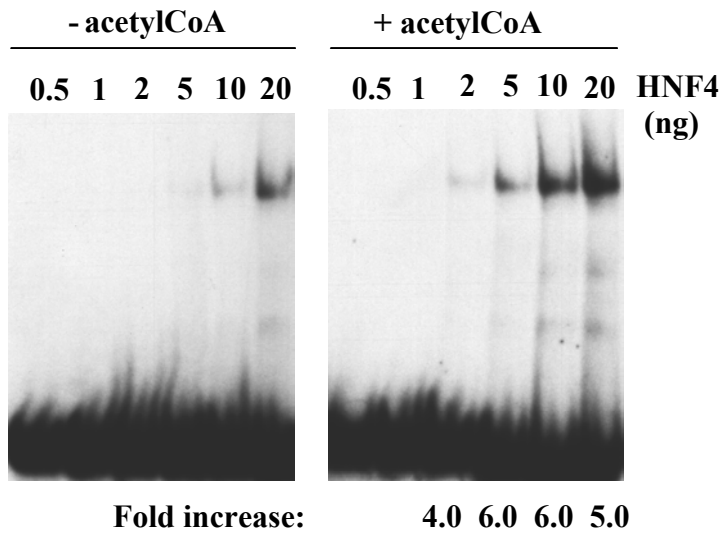
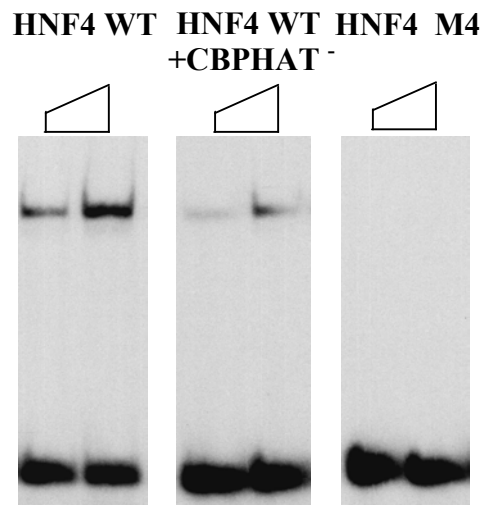


**Εικόνα 3.** Η ακετυλίωση του HNF-4 από CBP είναι σημαντική για την HNF-4-εξαρτώμενη μεταγραφική ενεργοποίηση.

(Α). Δημιουργία μόνιμων NIH3T3 κυτταρικών σειρών με τους αναγραφόμενους φορείς έκφρασης. Παρασκευάστηκαν ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα από την κάθε σειρά και η παρουσία των HNF-4 και HNF-1 ανιχνεύτηκε με Western blot ανάλυση, χρησιμοποιώντας  $\alpha$ -HNF-4 και  $\alpha$ -HNF-1 αντισώματα αντίστοιχα.

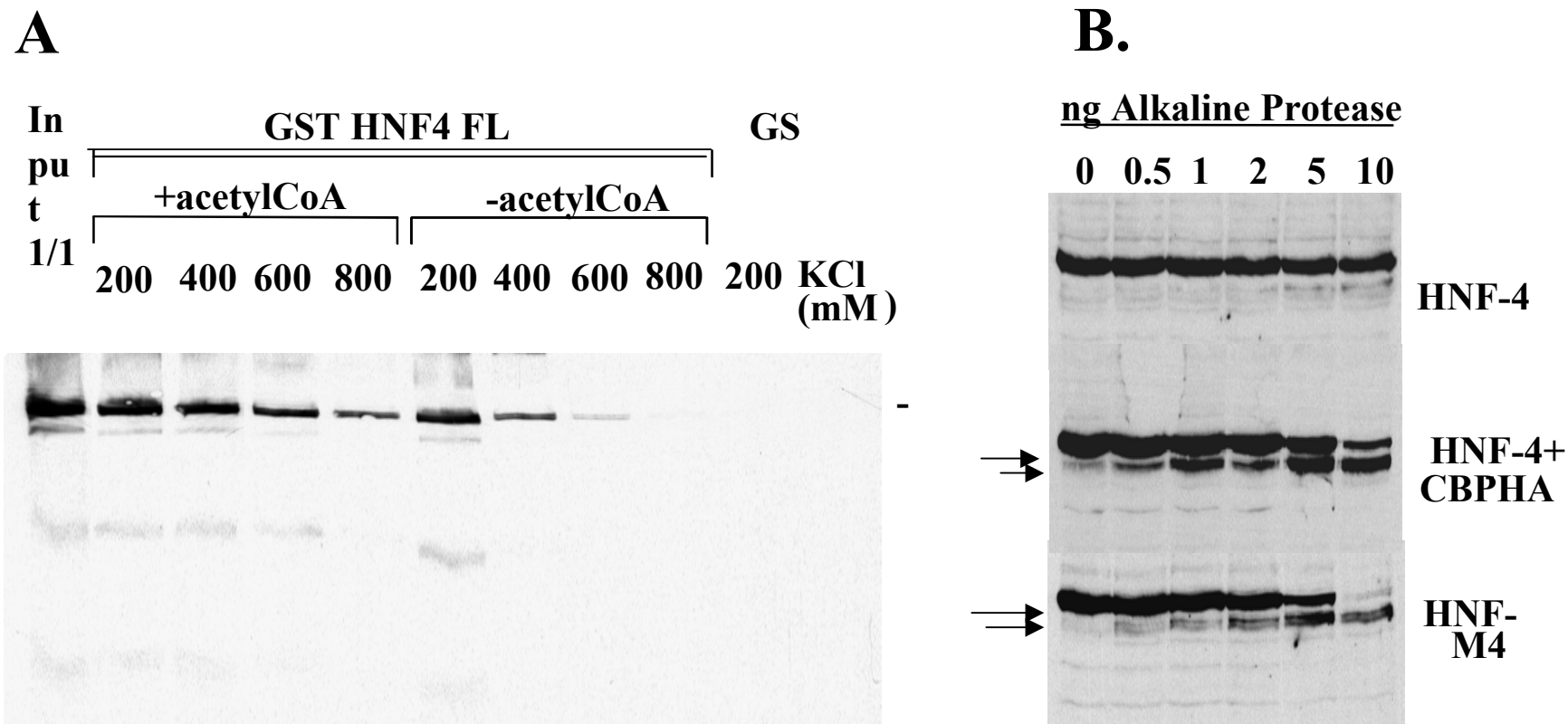
(Β). NIH3T3 κύτταρα διαμολύνθηκαν παροδικά με 2 $\mu$ g του HNF-4-εξαρτώμενου γονιδίου αναφοράς 1XA-TK-CAT, 0.2 $\mu$ g πλασμίδιου wt HNF-4 και των μεταλλαγών του και 0.2 $\mu$ g φορέων έκφρασης wt CBP και CBPHAT<sup>-</sup> με τους συνδυασμούς που αναγράφονται.

(Γ). NIH3T3 κύτταρα διαμολύνθηκαν παροδικά με 2 $\mu$ g G4-CAT γονιδίου αναφοράς, 0.2 $\mu$ g από τις αναγραφόμενες GAL4HNF-4 κατασκευές και 0.2 $\mu$ g φορέων έκφρασης wt CBP και CBPHAT<sup>-</sup> με τους συνδυασμούς που αναγράφονται.

**A.****B.****Εικόνα 4. Η ακετυλίωση αυξάνει της συγγένεια πρόσδεσης του HNF-4 στο DNA**

(A) Οι αναγραφόμενες ποσότητες ανασυνδυασμένης HNF-4 πρωτεΐνης επωάστηκαν με 50 ng CBP ( baculo-expressed) παρουσία και απουσία ακετυλοσυνένζυμου A (1mM) για μία ώρα στους 30 C και στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση υστέρησης κινητικότητας (EMSA) με την χρήση της συντηρημένης θέσης A στην οποία προσδέεται ο HNF-4 ως ανιχνευτή (probe).

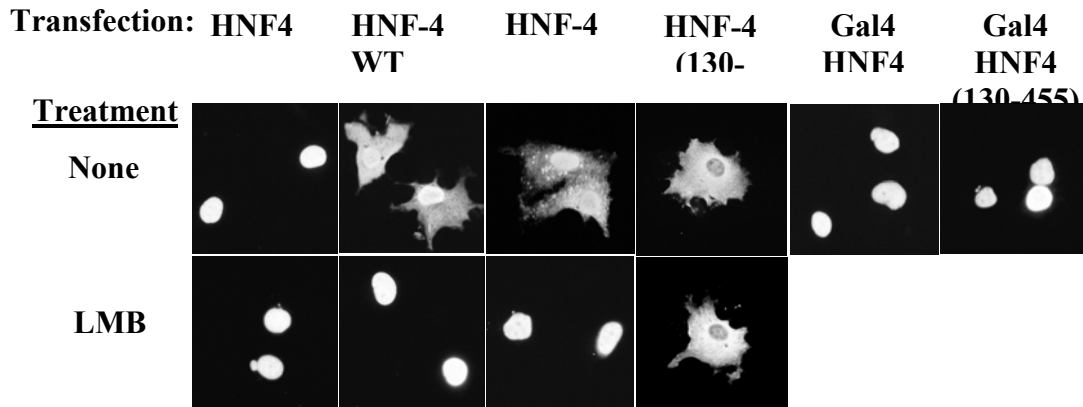
(B) Ολικά εκχυλίσματα από Cos1 κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με τους αναγραφόμενους φορείς έκφρασης υποβλήθηκαν στην παραπάνω διαδικασία. Στην ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές ποσότητες από τα παραπάνω εκχυλίσματα.



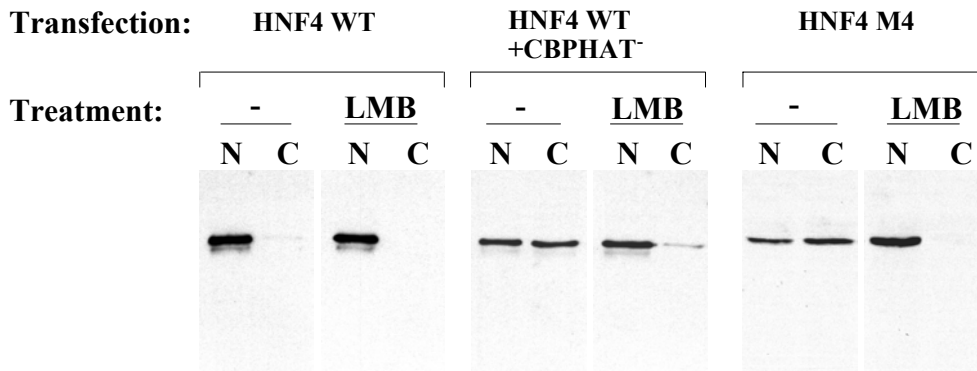
**Εικόνα 5. Η ακετυλίωση του HNF-4 αυξάνει την συγγένεια αλληλεπίδρασης με CBP *in vitro* και αλλάζει την διαμόρφωσή του.**

(A). Glutathione-Sepharose κολώνα που περιέχει 2 μg GST HNF-4FL επώαστηκε με εκχύλισμα SF9 κυττάρων που περιέχουν CBP (baculo-expressed) σε διάλυμα αλληλεπίδρασης για 5 ώρες στους 4 C. Μετά από διεξοδικά ξεπλύματα η κολώνα επώάζεται σε διάλυμα ακετυλίωσης παρουσία και απουσία ακετυλοσυνένζυμου A (1mM) για μία ώρα στους 30 C. Μετά την αντίδραση ακετυλίωσης η κολώνα ξεπλένεται διαδοχικά με διαλύματα που περιέχουν τις συγκεντρώσεις KCl που αναγράφονται. Η παρουσία του CBP που αλληλεπιδρά με HNF-4 στην κάθε περίπτωση ανιχνεύεται με Western blot ανάλυση με τη χρήση του αCBP-22 αντισώματος (Santa-Cruz). (B). Ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα από Cos1 κύτταρα τα οποία έχουν παροδικά διαμολυνθεί με τους φορείς έκφρασης που αναγράφονται, επώαστηκαν με τις αναγραφόμενες ποσότητες αλκαλικής πρωτεάσης (Promega) για 10 λεπτά στους 25 C και τα πρωτεολυτικά προϊόντα αναλύθηκαν σε Western blot ανάλυση με την χρήση του HNF-4 αντισώματος. Τα βέλη υποδεικνύουν τις ζώνες που δημιουργούνται μετά από πρωτεολυτική πέψη.

**A.**



**B.**

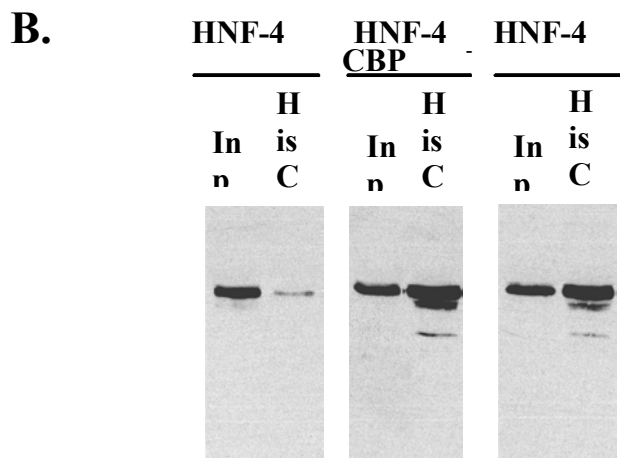
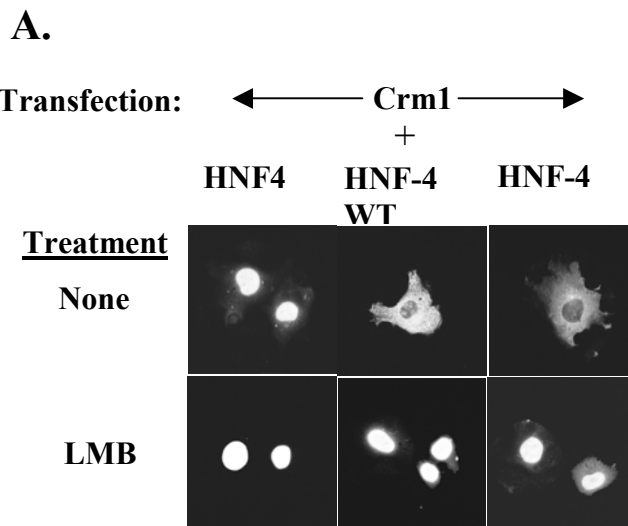


**Εικόνα 6.** Η ακετυλίωση του HNF-4 από CBP είναι σημαντική για την συγκράτηση της πρωτεΐνης στον πυρήνα του κυττάρου.

(A). Cos1 κύτταρα διαμολύνθηκαν με τους αναγραφόμενους φορείς έκφρασης μεταφέρθηκαν σε καλυπτρίδες και υποβλήθηκαν σε in situ ανοσοφθορισμό με HNF-4 αντίσωμα. Παράλληλα, σε όμοια δείγματα προστέθηκαν 10ng/ml λεπτομυκίνης B για 4 ώρες πριν την μονιμοποίησή τους.

(B). Παρασκευάστηκαν πυρηνικά και κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα από Cos 1 κύτταρα που διαμολύνθηκαν με τα αναγραφόμενα πλασμίδια και αναλύθηκαν με Western blot με HNF-4 αντίσωμα.





**Εικόνα 7. Η πρωτεΐνη CRM1 συμμετέχει στην έξοδο της μη ακετυλιωμένης μορφής του HNF-4 στο κυτταρόπλασμα.**

(Α). Cos 1 κύτταρα συνδιαμολύνθηκαν με τους αναγραφόμενους φορείς έκφρασης και φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης CRM1. Η διαδικασία που ακολούθησε είναι όμοια με αυτή που περιγράφεται στην λεζάντα της εικόνας 6Α.

(Β). Άμεση αλληλεπίδραση CRM1 και HNF-4. Ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα από Cos1 κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί με τα πλασμίδια που αναγράφονται, επώαστηκαν με ρεζίνη TALON (Clontech) στην οποία προηγήθηκε πρόσδεση της ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης His-CRM1. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (SDS-PAGE) και η ποσότητα της πρωτεΐνης HNF-4 που αλληλεπίδρασε ανιχνεύτηκε με Western blot.

## Συζήτηση

Η μεταγραφική ενεργοποίηση από CBP πιστεύεται ότι περιλαμβάνει αναδιαμόρφωση της χρωματίνης μέσω ακετυλίωσης των αμινοτελικών ουρών των ιστονών στα νουκλεοσώματα των υποκινητών στους οποίους στρατολογείται από τους διάφορους ενεργοποιητές . Αυτή η άποψη ενισχύεται από το μία εργασία που δείχνει ότι η ενζυμική ενεργότητα του CBP ως ακετυλοτρανσφεράση είναι απαραίτητη για την παροδική υπερακετυλίωση των ιστονών σε υποκινητές που ρυθμίζονται από πυρηνικούς υποδοχείς μετά από την προσθήκη ορμόνης (ER, RAR και VDR γονίδια-στόχους 25).

Από την άλλη, μελέτες πάνω στο ρόλο της μεταγραφικής ενεργοποίησης από τον πυρηνικό υποδοχέα TR (Thyroid Receptor) στον βάτραχο, και στην μεταγραφική επαγωγή του γονιδίου της ιντερφερόνης β μετά από επιμόλυνση με ιό, έδειξαν πως ο συνενεργοποιητής CBP δεν παίζει βασικό ρόλο στην ακετυλίωση των ιστονών και επομένως στην αναδιαμόρφωση των νουκλεοσωμάτων, αλλά πιθανότατα δρα σε ένα μετέπειτα στάδιο στο οποίο η HAT ενεργότητά του είναι σημαντική (109). Επίσης σε δοκιμές *in vitro* μεταγραφής στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγεία (templates) γονίδια με κανονική νουκλεοσωμική οργάνωση (*in vitro* nucleosome reconstitution) δείχθηκε ότι σε ένα στάδιο μετά τη ακετυλίωση των ιστονών η προσθήκη ακετυλοσυνένζυμου A και καθαρής πρωτεΐνης CBP αυξάνει δραματικά την μεταγραφή, γεγονός που δείχνει τον σημαντικό ρόλο της HAT ενεργότητας του συγκεκριμένου συνενεργοποιητή στη σταθεροποίηση του προενακτίριου συμπλόκου(101).

Είναι λοιπόν φανερό πως η ακετυλίωση των ιστονών δεν είναι πάντοτε αρκετή για να επάγει μεταγραφή και η ακετυλίωση άλλων πρωτεϊνών από CBP συμμετέχει στην μεταγραφική ενεργοποίηση. Αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες που αλληλεπιδρούν με CBP έχει βρεθεί ότι ακετυλιώνονται. Μερικοί από αυτούς είναι ο p53, GATA-1, NF-Y, EKLF και MyoD (15, 54, 218, 165, 108). Στις περισσότερες περιπτώσεις (p53, NF-Y, MyoD) η ακετυλίωση αυξάνει τη συγγένεια του μεταγραφικού παράγοντα ως προς το DNA ενώ στην περίπτωση του EKLF και GATA-1 (218, 70) η ακετυλίωση είναι σημαντική για την μεταγραφική ενεργοποίηση χωρίς να επηρεάζει την ικανότητα των παραγόντων να προσδένονται στο DNA, που σημαίνει πως η ακετυλίωση επηρεάζει διαφορετικές ιδιότητες των παραγόντων αυτών.

Η εργασία αυτή παρέχει δύο νέους μηχανισμούς με τους οποίους η ακετυλίωση ενός μεταγραφικού παράγοντα επηρεάζει τη λειτουργία του. Η ακετυλίωση του HNF-4 από CBP εκτός από ότι αυξάνει την ικανότητα πρόσδεσής του στο DNA, αυξάνει και την συγγένεια αλληλεπίδρασης του με τον ίδιο τον συνενεργοποιητή. Πράγματι, στα πειράματα παροδικής διαμόλυνσης στα οποία χρησιμοποιήθηκε γονίδιο αναφοράς που βρισκόταν κάτω από τον έλεγχο υποκινητή με φυσικές θέσεις πρόσδεσης για τον HNF-4, η HAT ενεργότητα του CBP φαίνεται ότι είναι τελείως απαραίτητη για την μεταγραφική ενεργοποίηση (υπερέκφραση CBP HAT<sup>-</sup> μειώνει 2.5 φορές την HNF-4-εξαρτώμενη μεταγραφική ενεργοποίηση). Όταν όμως η πρόσδεση του HNF-4 στο DNA γίνεται μέσω GAL4, η υπερέκφραση CBPHAT<sup>-</sup> αυξάνει κατά ένα ποσοστό την GAL-4 HNF-4 (1-455)-εξαρτώμενη μεταγραφική ενεργοποίηση. Από την άλλη, η ενεργοποίηση αυτή (3.4 φορές) είναι μικρότερη από την αντίστοιχη που προκύπτει από την υπερέκφραση του wt CBP (6.8 φορές), γεγονός που υποδηλώνει πως ανεξάρτητα από την πρόσδεση του HNF-4 στο DNA η ακετυλίωση του εξακολουθεί να είναι σημαντική για την πλήρη μεταγραφική ενεργότητα, πιθανότατα γιατί σταθεροποιεί το σύμπλοκο HNF-4-CBP.

Τα παραπάνω επιβεβαιώνουν και τα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε μία έλλειψη του HNF-4 (130-455) σε σύντηξη με GAL-4 που δεν περιλαμβάνει την περιοχή ακετυλίωσης του παράγοντα. Στην περίπτωση λοιπόν αυτή, η υπερέκφραση του wt CBP αυξάνει την GAL-4 HNF-4 (130-455)-εξαρτώμενη μεταγραφική ενεργοποίηση σε μικρότερο βαθμό από ότι την αντίστοιχη GAL-4 HNF-4 (1-455) παρόλο που θεωρητικά η πρόσδεση του παράγοντα στο DNA και στις δύο περιπτώσεις δεν διαφέρει. Επιπλέον η υπερέκφραση του CBPHAT<sup>-</sup> αυξάνει την GAL-4 HNF-4 (130-455)-εξαρτώμενη μεταγραφική ενεργοποίηση στο ίδιο βαθμό γεγονός που σημαίνει πως η HAT ενεργότητα του CBP δεν είναι πλέον αναγκαία αφού η περιοχή ακετυλίωσης του παράγοντα λείπει, αποκλείοντας τον πιθανό ρόλο της στην ακετυλίωση των ιστονών και στην αναδιαμόρφωση μιας πιθανής νουκλεοσωμικής οργάνωσης του υποκινητή του επισωματικού φορέα έκφρασης του γονιδίου αναφοράς.

Ο δεύτερος μηχανισμός με τον οποίο η ακετυλίωση του HNF-4 επηρεάζει την λειτουργία του, που ίσως είναι και ο πιο ενδιαφέρον, είναι η διατήρηση του στον πυρήνα του κυττάρου. Είναι φανερό πως ο χρόνος που ένας μεταγραφικός παράγοντας παραμένει ενεργός στον πυρήνα ενός κυττάρου είναι κρίσιμος για την έκφραση των γονιδίων-στόχων του. Το ευκαρυωτικό κύτταρο έχει επιστρατεύσει

πολλούς μηχανισμούς που ρυθμίζουν την είσοδο και την έξοδο πρωτεϊνών από τον πυρήνα και εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και πολλών μονοπατιών σηματοδότησης. Ο HNF-4 είναι μία πυρηνική πρωτεΐνη που παίζει ρόλο στην διατήρηση του ηπατικού φαινοτύπου ρυθμίζοντας μία πληθώρα γονιδίων σημαντικών στη λειτουργία του ηπατοκύτταρου (93, 92, 40). Αλλαγή στην τοπολογία του παράγοντα μπορεί να έχει δραματικές συνέπειες γεγονός που σημαίνει ότι ένας πιθανός μηχανισμός που κρατά τον HNF-4 έξω από τον πυρήνα είναι μεγάλης βιολογικής σημασίας. Η παρατήρηση ότι η μη ακετυλιωμένη μορφή του HNF-4 (που δημιουργείται από υπερέκφραση του CBPHAT<sup>-</sup> είτε από μεταλλαγή των λυσινών όπου ακετυλιώνονται σε αλανίνες) εξέρχεται από τον πυρήνα με ενεργό μεταφορά μέσω CRM1 είναι ένδειξη για τον ρυθμιστικό ρόλο της ακετυλίωσης στην πυρηνοκυτταροπλασματική μεταφορά.

Πιστεύουμε λοιπόν πως το που εντοπίζεται τελικά ο HNF-4 είναι το αποτέλεσμα μίας ισορροπίας μεταξύ της εισόδου της πρωτεΐνης στον πυρήνα του κυττάρου μέσω ενός μηχανισμού που δεν έχει μελετηθεί με λεπτομέρεια, και εξόδου μέσω του CRM-1 μονοπατιού. Η ακετυλίωση επηρεάζει την παραπάνω ισορροπία οδηγώντας την προς την συγκράτηση της πρωτεΐνης στον πυρήνα. Το ενδιαφέρον είναι ότι παρόλο που ο HNF-4 ακετυλιώνεται στην περιοχή που είναι υπεύθυνη για την είσοδό του στον πυρήνα, οι μεταλλαγές στις λυσίνες που ακετυλιώνονται δεν επηρεάζουν την είσοδο της πρωτεΐνης σε αυτόν. Η ακετυλίωση λοιπόν στην συγκεκριμένη περιοχή μπορεί να μην έχει άμεση σχέση με την έξοδο της πρωτεΐνης αλλά ίσως αλλάζει την διαμόρφωση της με τέτοιο τρόπο ώστε να αλληλεπιδρά πιο αποτελεσματικά με το σύμπλοκο που συμμετέχει στην μεταφορά πυρηνικών πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα. Η αλληλεπίδραση αυτή είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι πραγματοποιείται συνήθως μέσω κάποιων μοτίβων που είναι πλούσια σε λευκίνες ( Nuclear Export Sequences :NES, 43) ενώ αρκετές τέτοιες αλληλουχίες εντοπίζει κανείς στην AF-2 περιοχή του HNF-4 χωρίς να έχει διασαφηνιστεί ποια συγκεκριμένα περιοχή είναι υπεύθυνη για την έξοδο της μη ακετυλιωμένης μορφής στο κυτταρόπλασμα.

Έτσι κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ο HNF-4 εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου προσδένεται στους υποκινητές των γονιδίων –στόχων του, αλληλεπιδρά με CBP, ακετυλιώνεται από αυτόν και η ακετυλίωση σταθεροποιεί το σύμπλοκο DNA-ενεργοποιητής–συνενεργοποιητής, αποκλείοντας πιθανή αλληλεπίδρασή του με CRM1. Όταν όμως κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες η HAT ενεργότητα του CBP

τροποποιηθεί και ο HNF-4 δεν ακετυλιωθεί, η αλληλεπίδρασή του με τον συνενεργοποιητή δεν είναι αρκετά σταθερή, με αποτέλεσμα ο παράγοντας να είναι εύκολα προσβάσιμος στις πρωτεΐνες που ευθύνονται για την έξοδό του στο κυτταρόπλασμα και να εξέρχεται από τον πυρήνα του κυττάρου.

Πρόσφατες εργασίες έχουν δείξει ότι η ενζυμική ενεργότητα πολλών συνενεργοποιητών ρυθμίζεται από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και αλληλεπιδράσεις τους με άλλες πρωτεΐνες. Για παράδειγμα η φωσφορυλίωση του CBP από Cdk2 (2) επάγει την ενζυμική ενεργότητα του παράγοντα ενώ η φωσφορυλίωση του GCN5 από μία DNA-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση αναστέλλει την HAT ενεργότητά του (11). Επίσης έχουν βρεθεί πρωτεΐνες που τροποποιούν την ενζυμική ενεργότητα του CBP και αυτές περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες του αδενοϊού E1A και E1B, την bHLH πρωτεΐνη Twist και τον ρυθμιστή της p53 MDM2 (22, 57, 107, 26).

Παρόμοιος φαίνεται να είναι και ο μηχανισμός συγκράτησης της ακετυλιωμένης μορφής της πρωτεΐνης CIITA, του κύριου ρυθμιστή των τάξης II γονιδίων του κύριου συμπλόκου ιστοσυμβατότητας (MHC classII), που έχει βρεθεί ότι ακετυλιώνεται από P/CAF, στον πυρήνα του κυττάρου (179). Επίσης η απακετυλίωση (deacetylation) της RelA (p65) υπομονάδας του παράγοντα NF-kB από HDAC3 αυξάνει την συγγένειά του με τον παράγοντα Iκ-B και οδηγεί στην έξοδο του συμπλόκου RelA-Iκ-B στο κυτταρόπλασμα μέσω της πρωτεΐνης CRM-1 (27). Τέλος, πρόσφατες εργασίες δείχνουν ότι δύο παράγοντες που συμμετέχουν στην μεταφορά πρωτεϊνών στον πυρήνα (importin-α, Rch1, 26) ακετυλιώνονται από CBP και παρόλο που δεν έχει εξεταστεί με λεπτομέρεια ο ρόλος της ακετυλίωσης στην λειτουργία τους αποτελεί μία επιπλέον ένδειξη για τον ρόλο της μετα-μεταφραστικής αυτής τροποποίησης στην πυρήνο-κυτταροπλασματική μεταφορά πρωτεϊνών.

## Ειδικός στόχος 2:

### Αποτελέσματα

Ο δεύτερος στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση του μηχανισμού της μεταγραφικής ενεργοποίησης από HNF-1, που περιλαμβάνει την δυνατότητα αλληλεπίδρασής του με τέσσερις γνωστούς συνενεργοποιητές τους CBP, P/CAF, Src-1 και RAC3.

Αρχικά λοιπόν εξετάστηκε η ικανότητα του HNF-1 να αλληλεπιδρά *in vivo* με τις παραπάνω πρωτεΐνες. Έτσι, Cos1 κύτταρα συνδιαμολύνθηκαν παροδικά με φορείς έκφρασης για HNF-1 και CBP ή flag-P/CAF, ή flag-Src-1, ή flag-RAC3 και τα πυρηνικά εκχυλίσματα που απομονώθηκαν σε κάθε μία από τις παραπάνω περιπτώσεις, ανοσοκατακρημνίστηκαν με flag αντίσωμα ή αντίσωμα ειδικό για CBP. Η παρουσία του HNF-1 ανιχνεύτηκε με Western blot ανάλυση. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 1 αρκετά μεγάλο ποσοστό του HNF-1 ανοσοκατακρημνίζεται με το CBP και το flag αντίσωμα, δείχνοντας ότι ο HNF-1 αλληλεπιδρά *in vivo* και με τους τέσσερις συνενεργοποιητές.

Για να ελέγξουμε αν οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι άμεσες, ελλείψεις του HNF-1 (1-295, 95-295, 283-493, 493-628) σε σύντηξη με την βακτηριακή πρωτεΐνη GST (Glutathione-S-Transferase) εκφράστηκαν σε βακτήρια, απομονώθηκαν με χρωματογραφία συγγένειας σε Glutathione Sepharose και επώαστηκαν με <sup>35</sup>S-CBP, ή P/CAF, ή Src-1, ή RAC3 (*In vitro* GST pull-down). Στην εικόνα 2Α φαίνεται ότι ο CBP αλληλεπιδρά ειδικά με την αμινοτελική περιοχή του HNF-1(1-195), ενώ οι άλλοι τρεις συνενεργοποιητές με την καρβοξυτελική. Η μικρότερη αμινοτελική περιοχή αλληλεπίδρασης με CBP περιλαμβάνει τα αμινοξέα 95-295 και αντιστοιχεί στην περιοχή με την οποία ο HNF-1 προσδέεται στο DNA (homeodomain). Οι P/CAF, Src-1 και RAC3 αλληλεπιδρούν με την περιοχή που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 493-628 και αντιστοιχεί στην ADI περιοχή (εικόνα 2B).

Το ανάποδο πείραμα στο οποίο χρησιμοποιήθηκαν τμήματα του CBP και του P/CAF σε σύντηξη με GST και <sup>35</sup>S-HNF-1, έδειξε ότι ο HNF-1 αλληλεπιδρά με δύο διαφορετικές περιοχές του CBP, μία αμινοτελική, που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 1-706 και μία κεντρική, που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 1620-1877. Και οι δύο περιοχές επικαλύπτονται με περιοχές αλληλεπίδρασης του μορίου με P/CAF. Η μικρότερη περιοχή του P/CAF με την οποία αλληλεπιδρά ο HNF-1 περιλαμβάνει τα αμινοξέα 653-736 (εικόνα 2Γ και Δ).

Για να μελετηθεί ο ρόλος των παραπάνω αλληλεπιδράσεων στην HNF-1-εξαρτώμενη μεταγραφική ενεργοποίηση έγιναν πειράματα παροδικής διαμόλυνσης σε NIH3T3 κύτταρα που δεν εκφράζουν HNF-1 και που έχει βρεθεί ότι έχουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης CBP και P/CAF, συγκριτικά με άλλες μη ηπατικές κυτταρικές σειρές. Σαν γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο ακετυλοτρανσφεράσης της χλωραμφενικόλης (Chloramphenicol Acetyl Transferase: CAT) που βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο συνθετικού υποκινητή με τρεις θέσεις πρόσδεσης για τον παράγοντα HNF-1. Έτσι, ενώ ο HNF-1 από μόνος του ενεργοποιεί την μεταγραφή του γονιδίου αναφοράς 5 φορές πάνω από τα βασικά επίπεδα, συνυπερέκφραση CBP, P/CAF, SRC1a και RAC3 είχε σαν αποτέλεσμα επιπλέον ενεργοποίηση της HNF-1-εξαρτώμενης μεταγραφής κατά 20, 44, 26 και 19 φορές αντίστοιχα (εικόνα 3A). Ταυτόχρονη έκφραση συνδυασμών των συνενεργοποιητών ανά δύο, είχαν συνεργιστικό αποτέλεσμα. Πιο συγκεκριμένα, ο συνδυασμός CBP με P/CAF, ή SRC1a, ή RAC3 οδηγεί σε 135, 121 και 89 φορές ενεργοποίηση της μεταγραφής πάνω από τα επίπεδα ενεργοποίησης του HNF-1 αντίστοιχα. Παρόμοια, ταυτόχρονη έκφραση P/CAF με SRC1a ή RAC3 έδωσε αντίστοιχα 132-και 152 φορές ενεργοποίηση (εικόνα 3B).

Η συνέργια ανάμεσα στο CBP και το P/CAF πιθανά οφείλεται στο ότι και οι δύο συνενεργοποιητές αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με τον HNF-1 ταυτόχρονα, δημιουργώντας ένα τριμερές σύμπλοκο αρκετά σταθερό ώστε να οδηγεί σε μέγιστη ενεργοποίηση. Η παραπάνω υπόθεση επιβεβαιώθηκε ως εξής: Σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης ινοβλαστών (NIH3T3) με φορείς έκφρασης δύο ανενεργών μορφών του HNF-1 (1-280 και 1-440), συνυπερέκφραση CBP ή P/CAF δεν ενεργοποιεί την έκφραση του γονιδίου αναφοράς. Ταυτόχρονη όμως έκφραση των δύο συνενεργοποιητών μαζί με τους φορείς έκφρασης του HNF-1 (1-280) και (1-440) έδωσαν ενεργοποίηση 16 και 18 φορές αντίστοιχα (εικόνα 3Γ). Αυτή η ενεργοποίηση υποδηλώνει πως ο CBP μπορεί να στρατολογήσει τον P/CAF στον υποκινητή ελλείψει της περιοχής αλληλεπίδρασης του με HNF-1, αλλά είναι ολοφάνερο ότι η περιοχή αυτή (493-628) είναι απαραίτητη για την πλήρη ενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς [εικόνα 2B στήλη 5 (135 fold activation)]. Η ικανότητα του CBP να στρατολογεί τον P/CAF όταν είναι προσδεμένος στον HNF-1 αποδείχθηκε και με *in vitro* GST pull-down πείραμα στο οποίο μικρή ποσότητα P/CAF φαίνεται να αλληλεπιδρά με την αμινοτελική περιοχή του HNF-1 (95-295) παρουσία CBP (εικόνα 4A).

Για να εξετάσουμε στη συνέχεια αν η πρόσδεση του CBP στο αμινοτελικό τμήμα του HNF-1 αυξάνει την συγγένεια πρόσδεσης του P/CAF στο καρβοξυτελικό, πρωτεΐνη GST-HNF-1(1-628) επώαστηκε με <sup>35</sup>S-P/CAF παρουσία και απουσία περίσσειας CBP (cold). Παρατηρήσαμε λοιπόν πως ικανοποιητική ποσότητα P/CAF αλληλεπιδρά με τον HNF-1 και στις δύο περιπτώσεις. Ξεπλένοντας όμως διαδοχικά τα δείγματα με διαλύματα συνεχώς αυξανόμενης αλατότητας (KCl) το σύμπλοκο HNF-1- P/CAF παρουσία CBP διατηρείται και σε υψηλές συγκεντρώσεις αλατότητας (800mM) (εικόνα 4B). Φαίνεται λοιπόν, ότι η πρόσδεση του CBP στο αμινοτελικό τμήμα του HNF-1 αυξάνει την συγγένεια πρόσδεσης του P/CAF στο καρβοξυτελικό και η δημιουργία αυτού του σταθερού τριμερούς συμπλόκου είναι υπεύθυνη για την συνέργια που βλέπουμε στα πειράματα παροδικής διαμόλυνσης.

Στη συνέχεια ελέγξαμε αν η συνέργια CBP και P/CAF είναι σημαντική για την HNF-1-εξαρτώμενη μεταγραφική ενεργοποίηση σε ηπατικό περιβάλλον. Παρατηρήσαμε λοιπόν, πως η υπερέκφραση CBP ή P/CAF σε HepG2 κύτταρα αύξησε 2.1 και 1.8 φορές την HNF-1-εξαρτώμενη μεταγραφική ενεργοποίηση. Συνυπερέκφραση CBP και P/CAF αύξησε 9 φορές την HNF-1-εξαρτώμενη μεταγραφική ενεργοποίηση, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι δύο αυτοί συνενεργοποιητές δρουν συνεργιστικά με τον HNF-1 και σε ηπατικά κύτταρα (εικόνα 5A). Η σημασία του ρόλου του κάθε συνενεργοποιητή στην ίδια κυτταρική σειρά τεκμηριώθηκε με την χρήση της ογκοπρωτεΐνης E1A που έχει βρεθεί ότι έχει την ικανότητα να απομακρύνει τους συνενεργοποιητές CBP και P/CAF από τους υποκινητές που δρουν, και να μειώνει την HAT ενεργότητά τους.. Έτσι η υπερέκφραση E1A wt οδηγεί σε πλήρη καταστολή της HNF-1-εξαρτώμενης μεταγραφής, ενώ υπερέκφραση της E1AΔN (έλλειψη της αμινοτελικής περιοχής που δεν αλληλεπιδρά με κανένα από τους δύο συνενεργοποιητές) δεν επηρεάζει την έκφραση του γονιδίου αναφοράς. Σημαντική καταστολή παρατηρήθηκε και με τη χρήση δύο E1A σημειακών μεταλλαγών ( E1ACBPmut, E1AP/CAFmut) που κάθε μία από αυτές αλληλεπιδρά μόνο με τον έναν συνενεργοποιητή, αποδεικνύοντας την σημασία και των δύο συνενεργοποιητών ταυτόχρονα στην μεταγραφική ενεργοποίηση από HNF-1 (εικόνα 5B).

Στην συνέχεια μελετήσαμε την σημασία της ενζυμικής ενεργότητας των συνενεργοποιητών CBP και P/CAF στην μεταγραφική ενεργότητα του HNF-1, συγκρίνοντας την ικανότητα συνενεργοποίησης των wt CBP και wt P/CAF με δύο μεταλλαγές τους [CBP (CBPL1690K/C1691L) και P/CAF (Y616A/F617A)] που



αδυνατούν να ακετυλιώσουν τα υποστρώματά τους (HAT<sup>-</sup>). Έτσι φαίνεται ότι η CBP HAT<sup>-</sup> μεταλλαγή είναι το ίδιο ενεργή με το wt CBP μόριο ενώ η P/CAF HAT<sup>-</sup> δεν έχει ενεργοποιητική δράση και δεν συνεργάζεται με CBP (εικόνα 6 Β, και Γ). Υπερέκφραση της ογκοπρωτεΐνης E1A ανέστειλε την CBP-και P/CAF-εξαρτώμενη συνενεργοποίηση σε διαφορετικό βαθμό - 25 και 6% αντίστοιχα. Επιπλέον προσθήκη TSA (trichostatinA) που δρα ως αναστολέας των απακετυλασών (HDACs) ανέστρεψε την κατασταλτική δράση του P/CAF HAT<sup>-</sup> χωρίς να επηρεάσει τα επίπεδα ενεργοποίησης του CBP HAT<sup>-</sup>. Όλα τα παραπάνω δείχνουν ότι σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης η ενεργότητα ακετυλοτρανσφεράσης του P/CAF είναι σημαντική και όχι του CBP.

Επειδή όμως ως γνωστό οι επισωματικοί φορείς στα κύτταρα δεν έχουν την χρωματινική δομή που υπάρχει στο γένωμα, τα ίδια πειράματα έγιναν και σε κύτταρα NIH3T3 μόνιμα διαμολυσμένα (stably transfected) με το ίδιο γονίδιο αναφοράς κάτω από τον έλεγχο του ίδιου συνθετικού υποκινητή. Στο σύστημα αυτό, υπερέκφραση των τεσσάρων συνενεργοποιητών ξεχωριστά οδήγησε σε πολύ μικρή αύξηση της HNF-1-εξαρτώμενης μεταγραφικής ενεργοποίησης (CBP 2.5, P/CAF 3.0, Src-1 1.5 RAC3 1.7 φορές εικόνα 7). Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει η παρατήρηση ότι και οι δύο HAT ενεργότητες (CBP και P/CAF) είναι πολύ σημαντικές για την ενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς που είναι ενσωματωμένο στο γένωμα του κυττάρου. Υψηλά επίπεδα ενεργοποίησης παρατηρήθηκαν μετά από ταυτόχρονη υπερέκφραση CBP και P/CAF (23 φορές πάνω από την HNF-1-εξαρτώμενη μεταγραφική ενεργοποίηση) ενώ οι συνδυασμοί CBP/Src-1, CBP/RAC3, Src-1/RAC3, P/CAF/ Src-1 είχαν προσθετική δράση και όχι συνεργιστική. Παρόμοια προσθετική δράση παρατηρήθηκε και κατά την ταυτόχρονη υπερέκφραση των συνδυασμών wtCBP/P/CAFHAT<sup>-</sup> και wt P/CAF/CBP HAT<sup>-</sup> υποδηλώνοντας ότι και οι δύο HAT ενεργότητες είναι πολύ σημαντικές για την πλήρη μεταγραφική ενεργοποίηση στο συγκεκριμένο σύστημα (εικόνα 7).

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή το πόσο σημαντική είναι η λειτουργία του HNF-1 στα β-κύτταρα του παγκρέατος επιβεβαιώνεται και από την ύπαρξη πάνω από 80 μεταλλαγών σε ασθενείς με την οικογενή μορφή διαβήτη τύπου 2 που είναι γνωστός ως MODY3 (Maturity Onset Diabetes of the Young, type 3). Πολλές από τις μεταλλαγές αυτές εμφανίζουν μειωμένη ικανότητα μεταγραφικής ενεργοποίησης ενώ κάποιες άλλες έχουν επικρατή αρνητική δράση. Θελήσαμε να διερευνήσουμε που οφείλεται η μειωμένη μεταγραφική ενεργότητα και αρνητική επικρατή δράση

ορισμένων από τις γνωστές MODY 3 μεταλλάξεις. Δεδομένου λοιπόν, ότι το αγρίου τύπου μόριο αλληλεπιδρά με τους συνενεργοποιητές που περιέγραψα, η μείωση ή η έλλειψη αλληλεπίδρασης με κάποιον ή κάποιους από αυτούς, θα αποτελούσε μία λογική εξήγηση της μειωμένης δραστηριότητας τους. Όλες οι μεταλλάξεις που μελετήθηκαν φέρουν μία αμινοξική αντικατάσταση και σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης μπορούν να χωριστούν σε δύο κυρίως κατηγορίες :α)σε αυτές που έχουν μειωμένη μεταγραφική ενεργότητα (R272H, K205Q, R159Q, R131Q, Y122C) και β)σε αυτές που είναι τελείως ανενεργές (P519L, P447L). Θα πρέπει να επισημανθεί ότι όλες οι παραπάνω μεταλλάξεις δεν έχουν χάσει την ικανότητα πρόσδεσης *in vitro* στο DNA και όταν υπερεκφράζονται στα κύτταρα εισέρχονται στον πυρήνα του κυττάρου.

Αρχικά λοιπόν, ελέγχθηκε η ικανότητα επαγωγής του γονιδίου αναφοράς- που είναι ενσωματωμένο στο γονιδίωμα των NIH3T3 κυττάρων (3XAlbPE TK-CAT) και έχει στον υποκινητή του τρεις θέσεις πρόσδεσης για HNF-1- από τις μεταλλάξεις αυτές. Και στην περίπτωση λοιπόν αυτή που ο υποκινητής έχει διαφορετική νουκλεοσωμική οργάνωση από τον επισωματικό, οι παραπάνω μεταλλάξεις έχουν παρόμοια συμπεριφορά. Έτσι οι μεταλλάξεις P519L, P447L είναι ανενεργές ενώ οι R272H, K205Q, R159Q, R131Q, Y122C έχουν μειωμένη ικανότητα μεταγραφικής ενεργοποίησης (εικόνα 8A). Ταυτόχρονη διαμόλυνση με φορέα έκφρασης για CBP ή P/CAF αύξησε 1-2.1 φορές τα επίπεδα της μεταγραφικής ενεργοποίησης των μεταλλαγών της α' κατηγορίας ενώ οι P519L, P447L παρέμειναν ανενεργές (εικόνα 8B και Γ). Συνδυασμένη δράση CBP και P/CAF αυξάνει την R272H, K205Q, R159Q, R131Q, Y122C-εξαρτώμενη μεταγραφική ενεργοποίηση 2, 9.1, 9.7, 15 και 14 φορές αντίστοιχα αλλά δεν επηρεάζει καθόλου την μεταγραφική ενεργότητα των P519L, P447L (εικόνα 8Δ).

Για να εξετάσουμε αν η μειωμένη μεταγραφική ενεργοποίηση των παραπάνω μεταλλαγών οφείλεται σε μειωμένη ικανότητα αλληλεπίδρασης με τους συνενεργοποιητές CBP και P/CAF πραγματοποιήσαμε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης, σε Cos1 κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν παροδικά με φορέα έκφρασης wtHNF-1 και καθεμιάς από τις παραπάνω μεταλλάξεις σε συνδυασμό με CBP ή flag-P/CAF. Η ανοσοκατακρήμνιση έγινε με α-flag αντίσωμα ή α-CBP αντίσωμα και το ποσοστό της HNF-1 πρωτεΐνης που αλληλεπίδρασε, ανιχνεύεται με ανάλυση Western (εικόνα 9). Όπως αναμενόταν το ποσοστό των K205Q, R159Q, R131Q, Y122C HNF-1 που αλληλεπιδρά και με τους δύο συνενεργοποιητές είναι

μικρότερο από το αντίστοιχο του wtHNF-1. Από την άλλη, ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός ότι παρόλο που η πρωτεΐνη R272H είχε μειωμένη μεταγραφική ενεργότητα, αλληλεπιδρά ικανοποιητικά με P/CAF γεγονός που υποδηλώνει για ακόμα μία φορά ότι η αλληλεπίδραση με τον έναν από τους δύο συνεργοποιητές δεν αρκεί.

Με έκπληξη όμως είδαμε ότι οι δύο ανενεργές μεταλλάξεις του HNF-1, P519L, P447L αλληλεπιδρούν πιο ισχυρά και με τους δύο συνεργοποιητές από ότι η πρωτεΐνη αγρίου τύπου (wtHNF-1) αλλά είναι προφανές ότι η αλληλεπίδραση αυτή δεν είναι ικανή να οδηγήσει σε μεταγραφική ενεργοποίηση. Οι αμινοξικές αντικαταστάσεις (προλίνη σε λευκίνη) των P519L, P447L μεταλλαγμένων μορίων εντοπίζονται στην καρβοξυτελική περιοχή, που ως γνωστό είναι η περιοχή που προσδίδει την μεταγραφική ενεργότητα στο μόριο αγρίου τύπου (activation domain). Έχοντας σαν δεδομένο ότι η αμινοτελική περιοχή του HNF-1 έρχεται σε άμεση επαφή με CBP, ενώ η καρβοξυτελική με P/CAF, θελήσαμε να δούμε αν οι επιφάνειες αλληλεπίδρασης των HNF-1 P519L, P447L με τους δύο αυτούς συνεργοποιητές διατηρούνται ίδιες ή η ισχυρότερη αλληλεπίδραση με αυτούς οφείλεται στη δημιουργία μιας επιπλέον επιφάνειας επαφής. Για το σκοπό αυτό, αρχικά His-HNF-1wt, HisHNF-1 519 και His-HNF-1 447 εκφράστηκαν σε βακτήρια, απομονώθηκαν με χρωματογραφία συγγένειας και επώαστηκαν με  $^{35}\text{S}$ -CBP και  $^{35}\text{S}$ -P/CAF. Η αυτοραδιογραφία απέδειξε ότι και *in vitro* οι δύο συνεργοποιητές αλληλεπιδρούν ισχυρότερα με τις HNF-1 μεταλλάξεις σε σύγκριση με το wt μόριο (εικόνα 10A). Ακολούθησε το ίδιο πείραμα στο οποίο οι  $^{35}\text{S}$ -CBP και  $^{35}\text{S}$ -P/CAF πρωτεΐνες υπόκεινται σε αντίδραση αλληλεπίδρασης με τις GSTwtHNF-1(370-628), GSTHNF-1P519L(370-628) και GSTHNF-1P447L(370-628). Όπως αναμενόταν ο P/CAF αλληλεπιδρά ισχυρότερα με τις P519L και P447L καρβοξυτελικές περιοχές σε σύγκριση με την αντίστοιχη της wt πρωτεΐνης. Από την άλλη όμως, ο CBP δεν αλληλεπιδρά άμεσα με τις καρβοξυτελικές περιοχές των μεταλλαγών ούτε και με του αγρίου τύπου (εικόνα 10A), προτείνοντας ότι η ισχυρή αλληλεπίδραση που παρατηρείται με ολόκληρα τα μεταλλαγμένα μόρια οφείλεται σε μία πιθανή αλλαγή στη διαμόρφωση των μεταλλαγών που αυξάνει την συγγένεια του CBP ως προς την αμινοτελική τους περιοχή.

Το πρωτεολυτικό πρότυπο των HNF-1P519L και HNF-1P447L πρωτεϊνών μετά από μερική πέψη με την πρωτεάση V8 είναι διαφορετικό από το αντίστοιχο της HNF-1 αγρίου τύπου (εικόνα 10B) δίνοντας μία ένδειξη ότι οι μεταλλάξεις αλλάζουν την διαμόρφωση της πρωτεΐνης.

Η έλλειψη όμως μεταγραφικής ενεργοποίησης μας οδήγησε στο να ερευνήσουμε αν οι μεταλλαγμένες αυτές μορφές της πρωτεΐνης HNF-1 αλληλεπιδρούν με συγκαταστολείς. Έτσι πειράματα ανοσοκατακρύμησης σε Cos1 κύτταρα, που όλοι παράγοντες προστίθενται εξωγενώς, έδειξαν ότι οι HNF-1 P447L και P519L και η HNF-1wt αλληλεπιδρούν εξίσου με τον συγκαταστολέα NcoR (Nuclear receptor Corepressor) και το πρώτο μέλος της οικογένειας των απακετυλασών HDAC1 (εικόνα 11A). Το πείραμα αυτό έδειξε ότι δεν υπάρχει ουσιαστική διαφορά ανάμεσα στην HNF-1wt και HNF-1 P447L και P519L ως προς την ικανότητα πρόσδεσης τους στους συγκεκριμένους συγκαταστολείς in vivo

Επιπλέον εξετάστηκε η δυνατότητα μεταγραφικής ενεργοποίησης του 3XalbPE TK-CAT γονιδίου αναφοράς από HNF-1wt και τις μεταλλαγές μετά από προσθήκη TSA (Trichostatin A). Παραδόξως, όταν προστέθηκε TSA σε κύτταρα που διαμολύνθηκαν με την HNF-1wt παρατηρήθηκε δραματική ενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς, που δεν αυξάνεται από την επιπλέον προσθήκη CBP και P/CAF, ενώ οι μεταλλαγμένες μορφές παρέμειναν ανενεργές (εικόνα 11B). Για να δούμε όμως αν τα σύμπλοκα HNF-1-συγκαταστολέων διατηρούνται παρουσία του αναστολέα έγιναν πειράματα ανοσοκατακρύμησης μετά από επεξεργασία των κυττάρων με TSA και παρατηρήθηκε ότι και όσο και στην περίπτωση του HNF-1wt όσο και σε αυτή των μεταλλαγών HNF-1 P447L και P519L τα σύμπλοκα αναδιοργανώνονται γεγονός που εξηγεί την HNF-1wt –εξαρτώμενη ενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς όχι όμως και την διατήρηση των μεταλλαγών HNF-1 P447L και P519L σε ανενεργή μορφή (εικόνα 11A).

Όπως προαναφέρθηκε, μεγάλη σημασία για την μέγιστη μεταγραφική ενεργοποίηση από wt HNF-1 παίζει η ταυτόχρονη αλληλεπίδραση του παράγοντα και με τους δύο συνενεργοποιητές. Με βάση το δεδομένο αυτό, θελήσαμε να εξετάσουμε την δυνατότητα μορφοποίησης ενός τριμερούς συμπλόκου και στην περίπτωση των μεταλλαγών. Έτσι κύτταρα Cos-1 διαμολύνθηκαν ταυτόχρονα με HNF-1wt ή HNF-1 P447L ή P519L και CBP και flag-P/CAF και αρχικά πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμιση με CBP αντίσωμα για να αποκλειστούν τα διμερή σύμπλοκα HNF-1- P/CAF. Οι ανοσοκατακρυμνησμένες πρωτεΐνες εκλούστηκαν από την κολώνα (Protein A Sepharose) με τη χρήση CBP πεπτιδίου και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν σε περαιτέρω ανοσοκατακρήμιση με flag αντίσωμα για να αποκλειστούν τα διμερή HNF-1- CBP. Τελικά με Western blot ανάλυση ανιχνεύεται η παρουσία HNF-1 στα τριμερή μόνο σύμπλοκα HNF-1- CBP- P/CAF (εικόνα 12A).

Το πείραμα αυτό έδειξε ότι τόσο η HNF-1wt όσο και οι μεταλλαγές έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν ταυτόχρονα και με τους δύο συνενεργοποιητές.

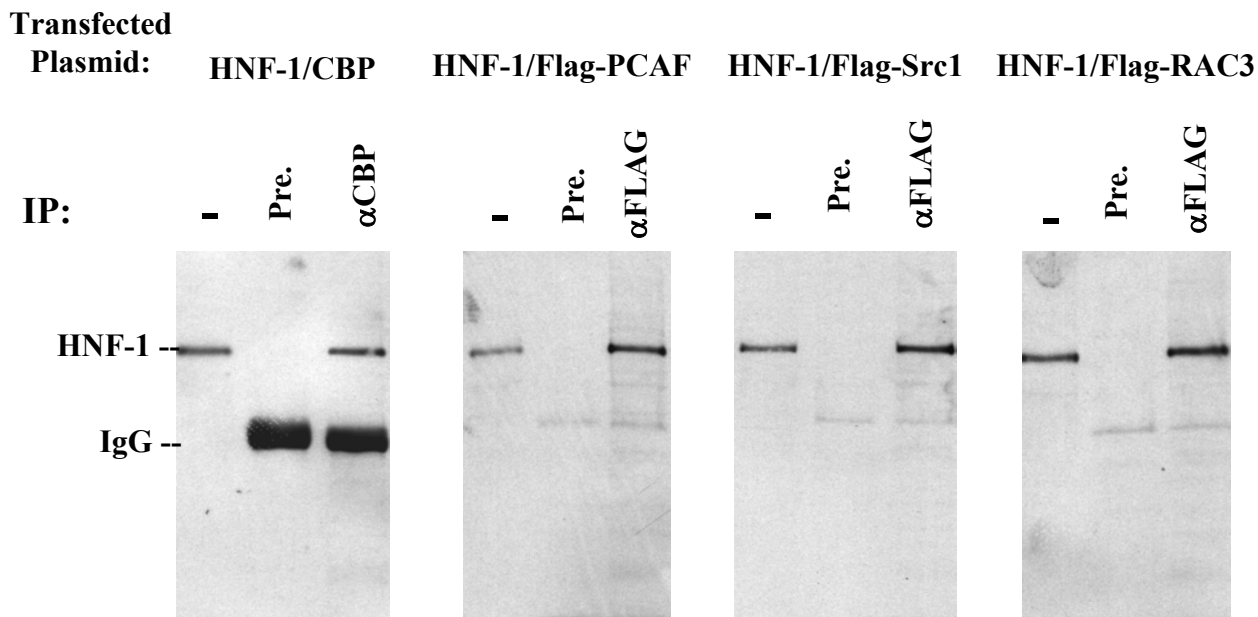
Το γεγονός όμως ότι τα τριμερή αυτά σύμπλοκα στην περίπτωση των HNF-1P519L και HNF-1P447L πρωτεϊνών δεν οδηγούν σε μεταγραφική ενεργοποίηση, καθώς και η προηγούμενη παρατήρησή μας ότι οι HAT ενεργότητες των CBP και P/CAF είναι πολύ σημαντικές στην ενεργοποίηση του wt HNF-1, μας οδήγησε στο να εξετάσουμε αν οι συνενεργοποιητές είναι ενζυμικά ενεργοί όταν βρίσκονται σε αυτά τα σύμπλοκα. Έτσι πυρηνικά εκχυλίσματα από Cos-1, που διαμολύνθηκαν παροδικά με HNF-1wt ή HNF-1 P447L ή P519L και CBP ή flag-P/CAF, υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμνιση με HNF-1 αντίσωμα και το ποσοστό των συνενεργοποιητών που κατακρημνίσθηκε χρησιμοποιήθηκε σε αντίδραση ακετυλίωσης *in vitro* με υπόστρωμα ιστόνες. Αυτό που παρατηρήθηκε λοιπόν (εικόνα 12B) είναι ότι η ικανότητα ακετυλίωσης ιστονών από τους συνενεργοποιητές που βρίσκονται σε σύμπλοκο με κάθε μία από τις δύο μεταλλαγές του HNF-1 εμφανίζεται αισθητά μειωμένη σε σχέση με του HNF-1wt, παρά το γεγονός ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ τους είναι όπως περιέγραφα πριν πιο ισχυρή (εικόνα 12B)

Οι παραπάνω παρατηρήσεις επιβεβαιώθηκαν με *in vitro* πειράματα. Έτσι η παρουσία βακτηριακά εκφρασμένης HisHNF-1wt πρωτεΐνης σε αντίδραση ακετυλίωσης όπου σαν ένζυμο χρησιμοποιείται His CBP ή HisP/CAF (baculo-expressed), το ποσοστό των ιστονών, που ακετυλιώνεται είναι μεγαλύτερο από εκείνο που παρατηρείται όταν η επώαση γίνεται με μία άσχετη πρωτεΐνη π.χ. BSA. Από την άλλη, η παρουσία των μεταλλαγών μειώνει παρά να αυξάνει το ποσοστό ακετυλίωσης (εικόνα 13A και B). Παρόλο που τα παραπάνω πειράματα είναι *in vitro* είναι μία πρώτη ένδειξη πως ο HNF-1 σαν ενεργοποιητής ρυθμίζει κατά κάποιο τρόπο την ενζυμική ενεργότητα του συνενεργοποιητή με τον οποίο αλληλεπιδρά. Για να εξετάσουμε λοιπόν αν αυτό το φαινόμενο είναι γενικότερο δηλ. αν ισχύει και για άλλους ενεργοποιητές κάναμε το ίδιο πείραμα χρησιμοποιώντας HNF-4 και SP1, που είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρούν με CBP, στη μορφή βακτηριακά εκφρασμένων πρωτεϊνών. Αυτό που προέκυψε λοιπόν είναι ότι σε σχέση με την παρουσία BSA στην αντίδραση, η παρουσία των δύο παραπάνω παραγόντων αυξάνει την ενζυμική ενεργότητα του CBP σε μικρότερο όμως βαθμό από ότι ο HNF-1 (εικόνα 13A). Η μοριακή βάση της ικανότητας ενός μεταγραφικού παράγοντα να αυξάνει ή να μειώνει την ενζυμική ενεργότητα του CBP ή του P/CAF βρίσκεται πιθανότατα στον

διαφορετικό τρόπο που κάθε παράγοντας αλληλεπιδρά με τον συγκεκριμένο συνενεργοποιητή.

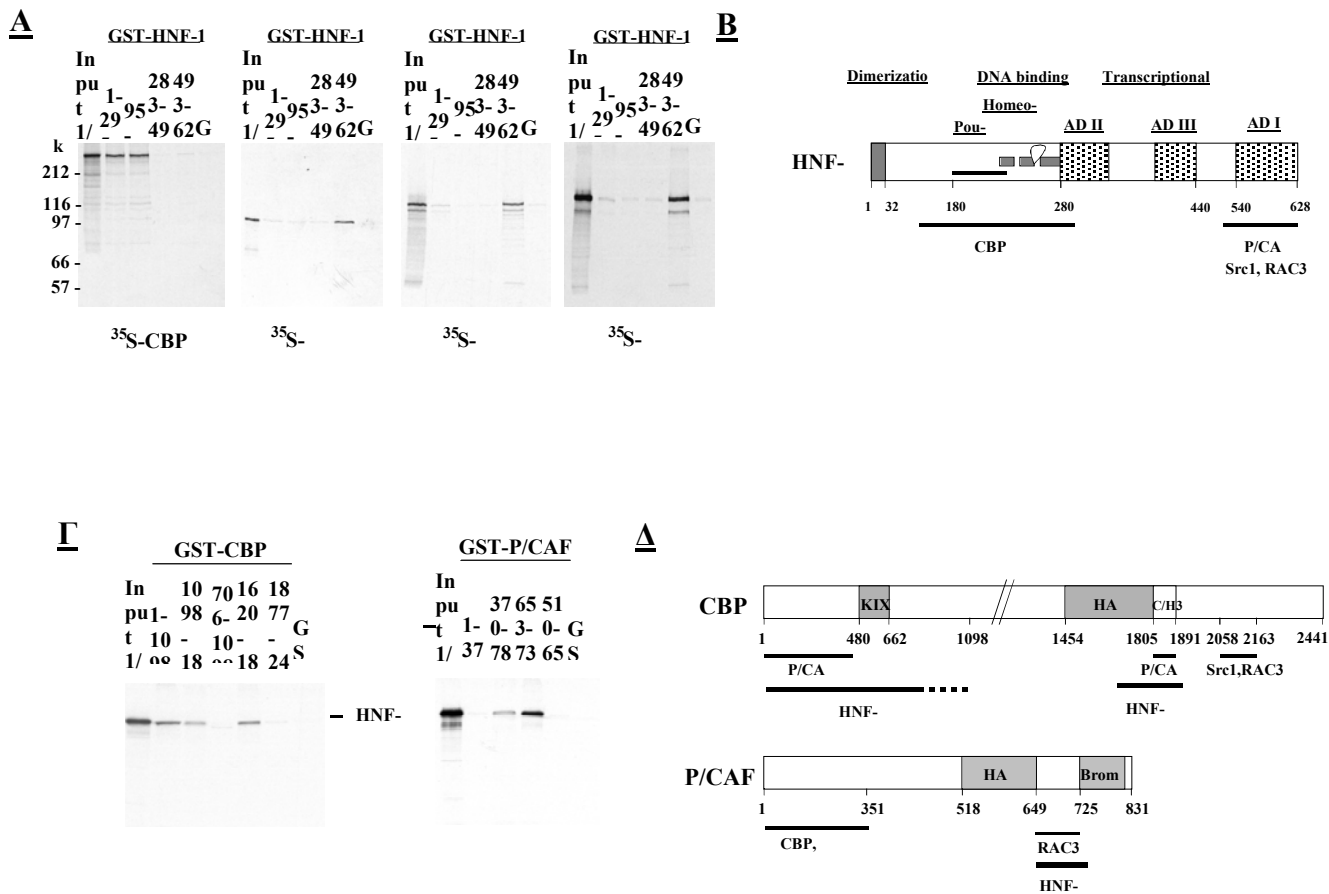
Έτσι και στην περίπτωση των HNF-1 P519L και P447L πρωτεϊνών η αλληλεπίδρασή τους με CBP και P/CAF πιθανότατα αλλάζει την διαμόρφωση των συνενεργοποιητών με τέτοιο τρόπο ώστε αδυνατούν να ακετυλιώσουν τα υποστρώματά τους. Για να ελέγξουμε την υπόθεση αυτή, συγκρίναμε το πρωτεολυτικό πρότυπο των CBP και P/CAF όταν αλληλεπιδρούν με HNF-1wt και HNF-1P447L. Πιο συγκεκριμένα  $^{35}\text{S}$ -CBP και  $^{35}\text{S}$ -P/CAF επωάστηκαν με His HNF-1wt ή His HNF-1P447L και μετά από διεξοδικά ξεπλύματα το ποσό του συνενεργοποιητή που αλληλεπιδρά και στις δύο περιπτώσεις υποβλήθηκε σε μερική πέψη με V8 πρωτεάση. Στην εικόνα 13B παρατηρούμε ότι και οι δύο συνενεργοποιητές όταν αλληλεπιδρούν με HNF-1P447L είναι πιο ανθεκτικοί (resistant) στην πέψη με την πρωτεάση από όταν αλληλεπιδρούν με wt HNF-1, γεγονός που υποδηλώνει αλλαγή στη διαμόρφωσή τους.

Τέλος, για να αποδειχθεί ότι τα παραπάνω ευρήματα ισχύουν και *in vivo* στα πλαίσια της υψηλής χρωματινικής οργάνωσης των υποκινητών, πραγματοποιήσαμε πειράματα ανοσοκατακρύμησης σε χρωματίνη (Chips:Chromatin Immunoprecipitations) χρησιμοποιώντας την 3X AlbPE TK-CAT NIH3T3 κυτταρική σειρά που περιγράφηκε πιο πριν. Το πείραμα αυτό έδειξε ότι οι HNF-1P447L και P519L πρωτεΐνες προσδένονται στο συνθετικό υποκινητή όπως και η wt και τα επίπεδα των συνενεργοποιητών CBP και P/CAF που στρατολογούνται από αυτές είναι αυξημένα (2-3 φορές) σε σχέση με τα αντίστοιχα της wt. Από την άλλη όμως, ενώ στα κύτταρα που έχουν διαμολυνθεί παροδικά με wt HNF1, οι ιστόνες των γειτονικών νουκλεοσωμάτων είναι εμφανώς υπερακετυλιωμένες δεν ισχύει το ίδιο και στους υποκινητές των κυττάρων που έχουν διαμολυνθεί με HNF-1P519L ή HNF-1P447L όπου το ποσοστό υπερακετυλίωσης ιδιαίτερα της H4 είναι μειωμένο, γεγονός στο οποίο πιθανά οφείλεται η έλλειψη της μεταγραφικής ενεργότητας των μεταλλαγών (εικόνα 14).



**Εικόνα 1.** Οι συνενεργοποιητές CBP, P/CAF, Src-1 και RAC3 αλληλεπιδρούν με HNF-1 *in vivo*.

Πυρηνικά εκχυλίσματα από Cos-1 κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με τα αναγραφόμενα πλασμίδια, ανοσοκατακρημνίστηκαν (IP) με μη ανοσοποιημένο ορό (pre), το πολυκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει CBP (αCBP), ή το μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει τον επίτοπο flag (αFLAG). Τα δείγματα αναπτύχθηκαν σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης 10%, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης η οποία υβριδοποιήθηκε με πολυκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει επιλεκτικά την HNF-1 πρωτεΐνη. Η πρώτη στήλη του κάθε πάνελ αντιπροσωπεύει το 2% της ποσότητας της πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε στην παραπάνω διαδικασία.



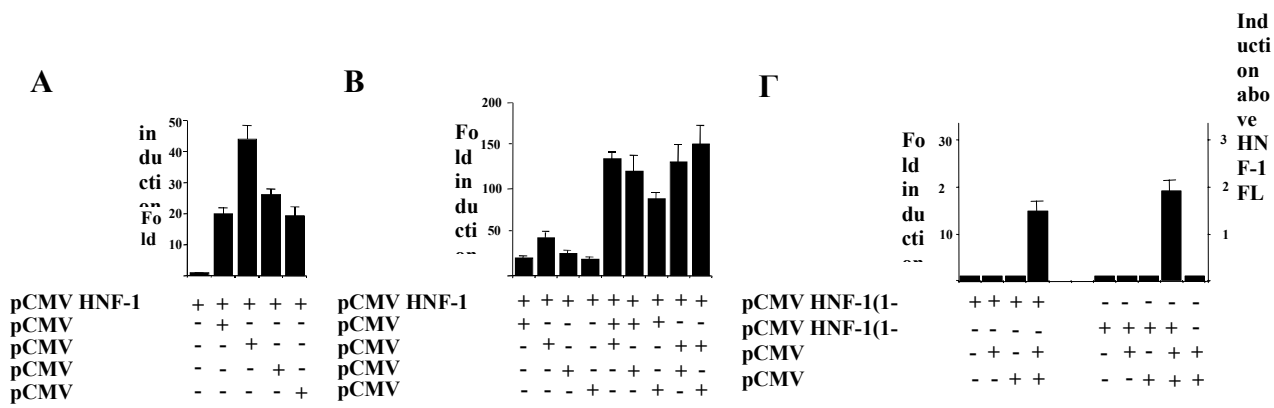
**Εικόνα 2. Προσδιορισμός της περιοχής αλληλεπίδρασης του HNF-1 με CBP, P/CAF, SRC-1 και RAC3.**

(A) *In vitro* GST pull-down πειράματα στα οποία ελλείψεις του HNF-1 (1-295, 95-295, 283-493, 493-628) σε σύντηξη με GST επωάζονται με τις πρωτεΐνες CBP, P/CAF, Src-1 και RAC3 που παράχθηκαν και ραδιοσημάνθηκαν *in vitro* με <sup>35</sup>S- μεθειονίνη.

(B) Σχηματική αναπαράσταση των τμημάτων του HNF-1 που αλληλεπιδρούν με τους τέσσερις συνενεργοποιητές. (Γ). *In vitro* GST pull-down πειράματα στα οποία οι αναγραφόμενες περιοχές των CBP και P/CAF σε σύντηξη με GST επωάζεται με <sup>35</sup>S HNF-1.

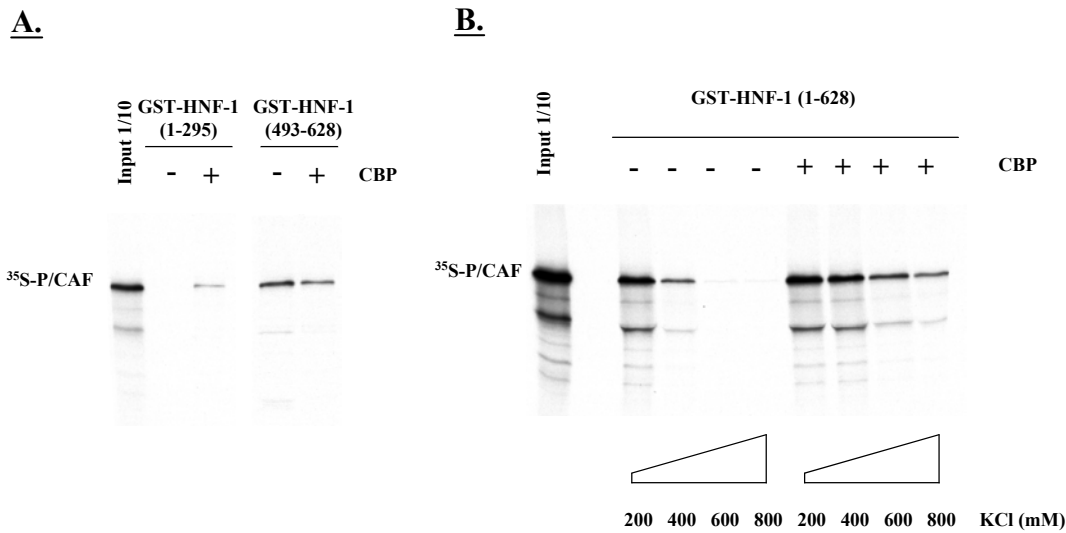
(Δ). Σχηματική απεικόνιση των περιοχών του CBP και P/CAF που αλληλεπιδρούν με HNF-1.





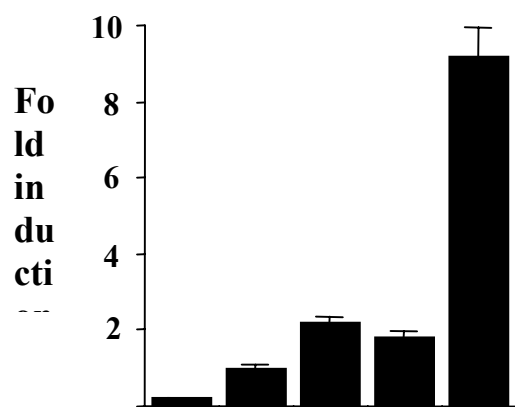
**Εικόνα 3. Συνεργιστική δράση των συνενεργοποιητών στην HNF-1-εξαρτώμενη μεταγραφική ενεργοποίηση.**

(A και B). Συνδιαμόλυνση NIH3T3 κυττάρων με 2μg πλασμιδίου αναφοράς 3XAlbPE TK-CAT, 0.2μg πλασμιδίου HNF-1 και 2μg φορέων έκφρασης των συνενεργοποιητών CBP, P/CAF, Src-1 και RAC3 με τους συνδυασμούς που αναγράφονται. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τις κανονικοποιημένες τιμές CAT ενεργότητας που προκύπτουν από τον μέσο όρο των τιμών τεσσάρων διαφορετικών επαναλήψεων του κάθε πειράματος και αναφέρονται στο μέγεθος της επαγωγής της μεταγραφικής ενεργοποίησης πάνω από τα επίπεδα που προκαλεί η προσθήκη μόνο HNF-1. (Γ). Διαμόλυνση NIH3T3 κυττάρων με φορείς έκφρασης δύο διαφορετικών τμημάτων του HNF-1(1-280) και (1-440) και συνδιαμόλυνση αυτών με τους συνενεργοποιητές CBP και P/CAF.

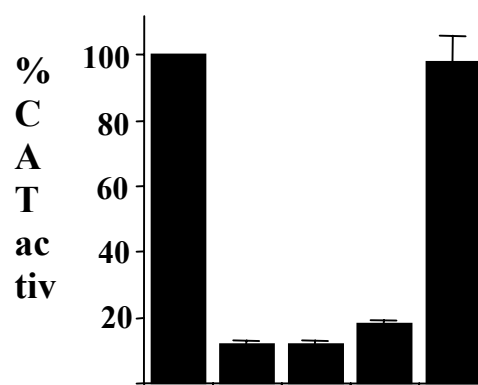


**Εικόνα 4. Η πρόσδεση του CBP στο αμινοτελικό τμήμα του HNF-1 αυξάνει την συγγένεια πρόσδεσης του P/CAF στο καρβοξυτελικό.**

GST pull-down πειράματα με <sup>35</sup>SP/CAF και CBP και τμήματα του HNF-1 [N-terminal(1-295), C-terminal (493-628), full length (1-628)] σε σύντηξη με GST παρουσία (+) και απουσία (-) 100ng CBP (baculovirus expressed). Μετά την αντίδραση ακετυλίωσης η κολώνα (glutathione Sepharose beads) ξεπλένεται με διάλυμα που περιέχει 200mMKCl (A) ή αυξανόμενες συγκεντρώσεις (200-800mM) KCl (B).

**A.**

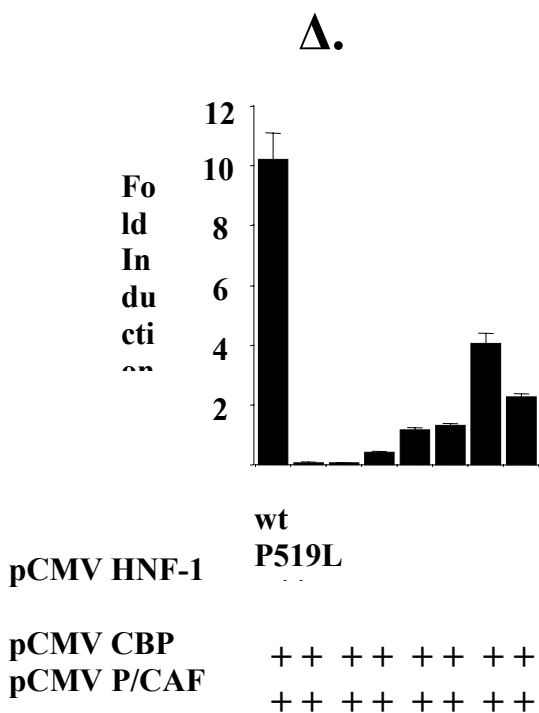
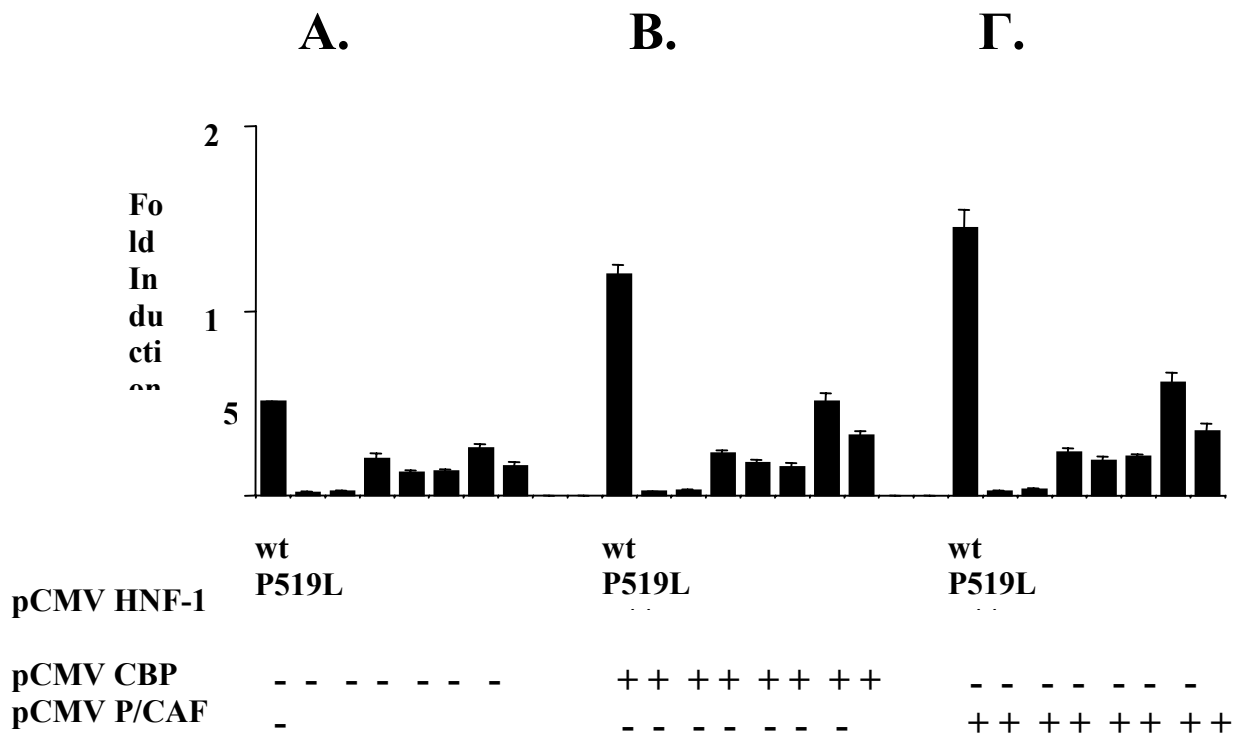
pCMV HNF-1	-	+	+	+	+
pCMV CBP	-	-	+	-	+
pCMV P/CAF	-	-	-	+	+

**B.**

pCMV HNF-1	+	+	+	+	+
RSV E1A	-	+	-	-	-
RSV E1A CBPMut	-	-	+	-	-
P/CAFMut	-	-	-	+	-

**Εικόνα 5. Η ταυτόχρονη αλληλεπίδραση CBP και P/CAF με HNF-1 απαιτείται για την επαγωγή της HNF-1-εξαρτώμενης μεταγραφικής ενεργοποίησης σε ηπατικό περιβάλλον.** HepG2 κύτταρα διαμολύνθηκαν με 2μg πλασμίδιου του γονιδίου αναφοράς 3XAlbPE TK-CAT, 0.2μg HNF-1 και 2μg CBP και P/CAF (A) ή 0.2μg HNF-1 μαζί με 0.2μg E1A, ή E1ACBP Mut (μεταλλαγή που δεν αλληλεπιδρά με CBP), ή E1A P/CAF mut (μεταλλαγή που δεν αλληλεπιδρά με P/CAF), ή E1AΔN (δεν αλληλεπιδρά με CBP και P/CAF) (B) με τους συνδυασμούς που αναφέρονται. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τις κανονικοποιημένες τιμές CAT ενεργότητας που προκύπτουν από τον μέσο όρο των τιμών τεσσάρων διαφορετικών επαναλήψεων του κάθε πειράματος και αναφέρονται στο μέγεθος της επαγωγής της μεταγραφικής ενεργοποίησης πάνω από τα επίπεδα που προκαλεί η προσθήκη μόνο HNF-1(A) ή στο ποσοστό της HNF-1-εξαρτώμενης CAT ενεργότητας.





**Εικόνα 8.** Λειτουργική ανάλυση των αλληλεπιδράσεων CBP και P/CAF με τις HNF-1 μεταλλάξεις. (A, B, Γ, Δ). NIH3T3 κυτταρική σειρά που περιέχει στο γονιδίωμα της το γονίδιο αναφοράς 3XAlbPE CAT διαμολύθηκε παροδικά με 0.5μg από τα CMV HNF-1 φορείς έκφρασης των αναγραφόμενων μεταλλαγών σε συνδυασμό με 2μg CMV CBP ή CMV P/CAF.

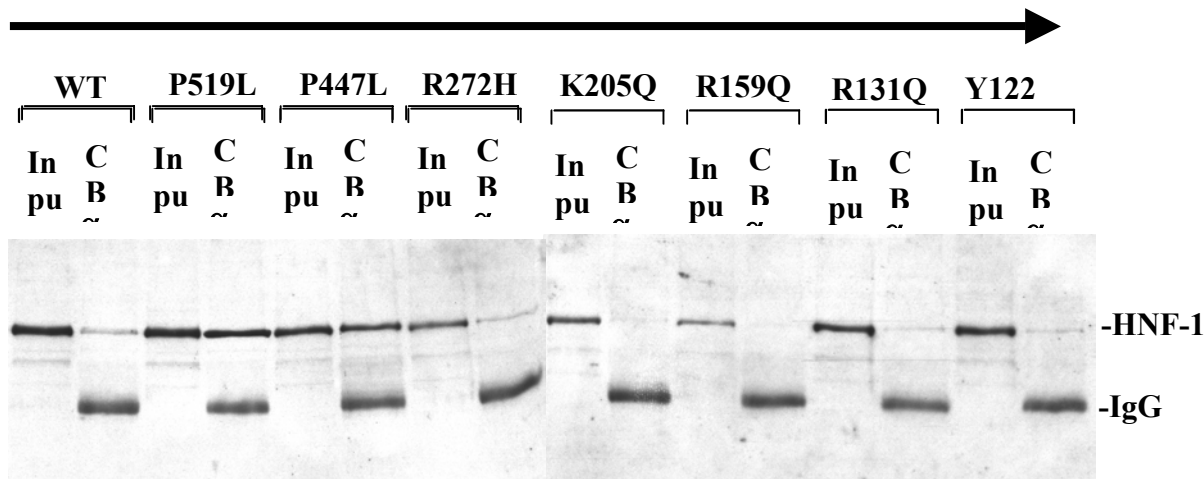
**A.**

Transfection:

CMV-

CMV-HNF-1

IP:

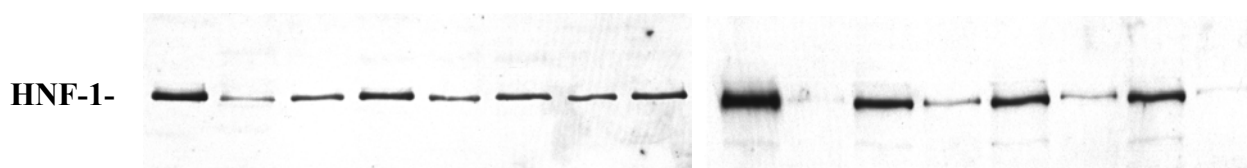
**B.**

Transfection:

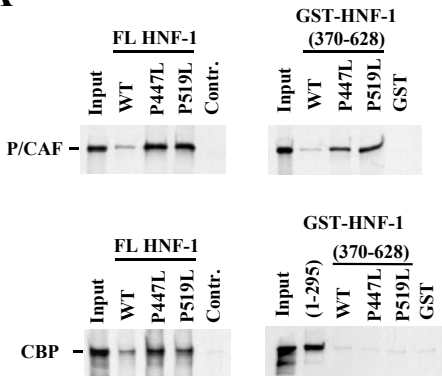
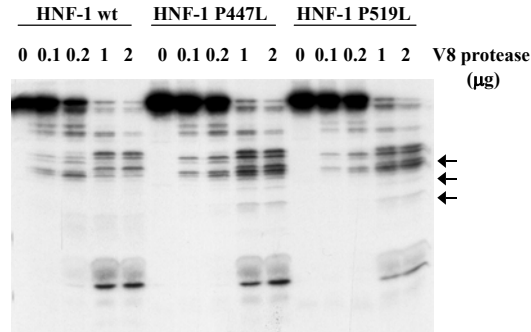
CMV-FlagP/CAF

CMV-HNF-1

IP:

**Εικόνα 9. *In vivo* αλληλεπίδραση CBP και P/CAF με τις HNF-1 μεταλλάξεις.**

(Α και Β). Πυρηνικά εκχυλίσματα από Cos1 κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί με τα αναγραφόμενα πλασμίδια υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμνιση (IP) με  $\alpha$ -CBP και  $\alpha$ -flag αντισώματα και η παρουσία του HNF-1 ανιχνεύεται σε Western blot ανάλυση με  $\alpha$ -HNF-1 αντίσωμα. Οι στήλες που αναφέρονται ως input αντιπροσωπεύουν το 15% της ποσότητας του εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκε στην ανοσοκατακρήμνιση.

**A****B**

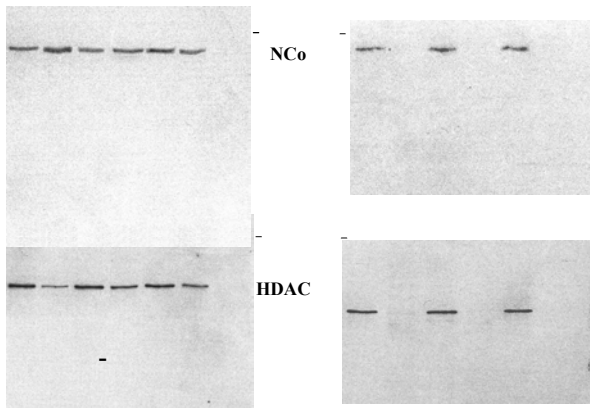
### Εικόνα 10. *In vitro* αλληλεπίδραση CBP και P/CAF με τις HNF-1 μεταλλαγές.

(A). Ολόκληρα τα μόρια των μεταλλαγών σε σύντηξη με τον επίτοπο His ή τμήματα αυτών (370-628) σε σύντηξη με GST εκφράστηκαν σε βακτήρια και ακινητοποιήθηκαν σε ρεζίνη TALON (Clontech) και GST (Glutathione Sepharose Pharmacia) αντίστοιχα και επώαστηκαν με 35S ραδιοσημασμένες πρωτεΐνες CBP και P/CAF. Σαν τυφλό (control) χρησιμοποιήθηκε κολώνα (TALON) στην οποία έχει προσδεθεί μία μη σχετική πρωτεΐνη (HrpE) ή η βακτηριακή πρωτεΐνη GST.

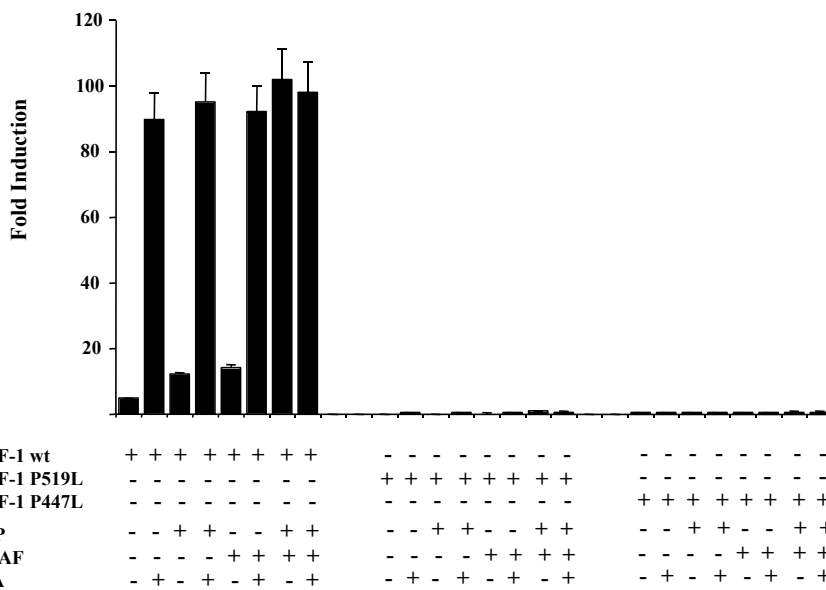
(B). 35 S ραδιοσημασμένη HNF-1 πρωτεΐνη και οι μεταλλαγές υποβλήθηκαν σε μερική πέψη με V8 πρωτεάση και τα προϊόντα της πέψης αναλύθηκαν σε SDS αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (SDS-PAGE). Τα βελάκια υποδεικνύουν τις ζώνες (πρωτεολυτικά προϊόντα) που εμφανίζονται κατά την πρωτεόλυση των μεταλλαγών και που διαφέρουν από του wt HNF-1.

# A

Transfectio													
NCoR + HDAC-1		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HNF-1 wt		+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
HNF-1 P519L		-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
HNF-1 P447L		-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
In pu	H N	In pu	H N	In pu	H N	In pu	H N	In pu	H N	In pu	H N	In pu	H N
t 5	e.	t 5	e.	t 5	e.	t 5	e.	t 5	e.	t 5	e.	t 5	e.



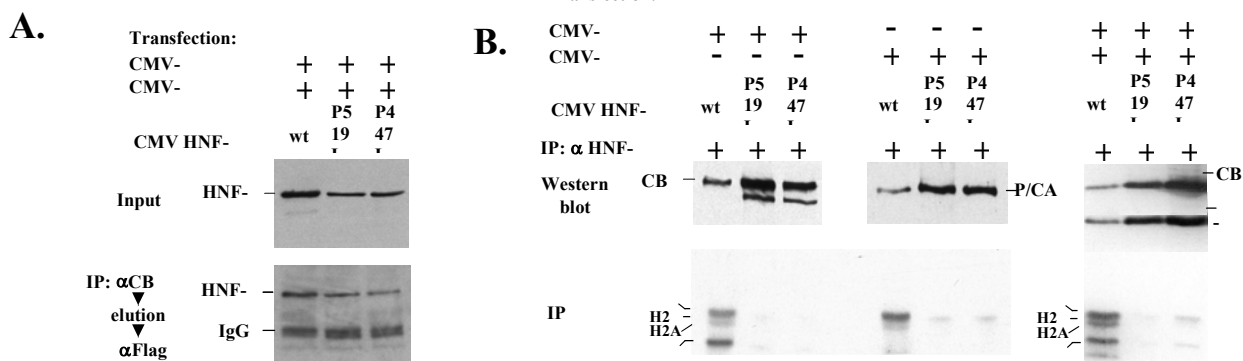
# B



## Εικόνα 11. *In vivo* αλληλεπίδραση των NCoR και HDAC-1 με τις HNF-1 μεταλλαγές.

(A). Cos-1 κύτταρα διαμολύνθηκαν παροδικά με τις κατασκευές που αναγράφονται και επώαστηκαν με 1μM TSA για 12 ώρες πριν την συλλογή τους. Απομονώθηκαν πυρηνικά εκχυλίσματα και ανοσοκατακρημνίστηκαν με α-HNF-1 αντίσωμα. Ακολούθησε Western blot ανάλυση με τα α-NCoR και α-HDAC-1 αντισώματα (Santa-Cruz).

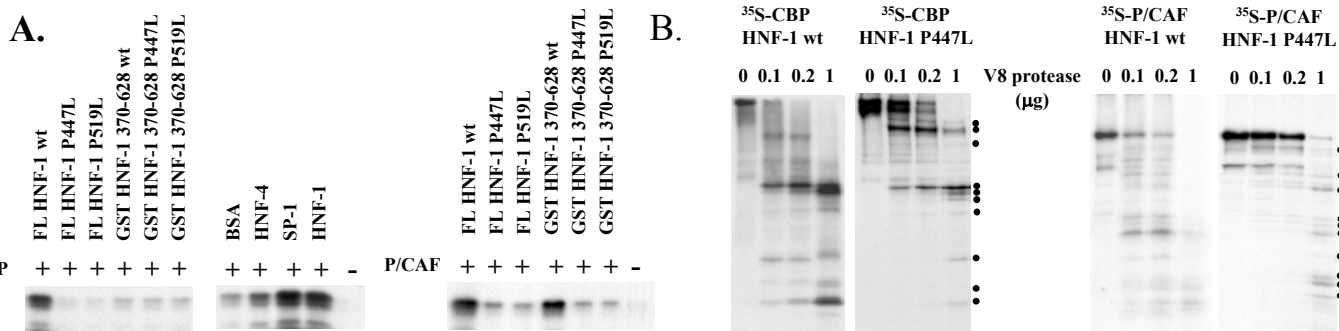
(B). Επίδραση του TSA στην HNF-1-εξαρτώμενη μεταγραφική ενεργοποίηση. Κύτταρα από την NIH3T3 3XAlbPE TK-CAT κυτταρική σειρά (stable) διαμολύνθηκαν παροδικά με 0.5μg wt CMV HNF-1, CMVHNF-1 P519L, CMVHNF-1 P447L μαζί με 2μg από τα πλασμίδια CMVCBP, CMVP/CAF ή CMVCBP+ CMVP/CAF. Όπου αναγράφεται τα κύτταρα επώαστηκαν με 1μM TSA 12 ώρες πριν την συλλογή τους.



**Εικόνα 12.** Λειτουργική ανάλυση του τριμερούς συμπλόκου HNF-1-CBP-P/CAF και εξέταση των HAT ενζυμικών ενεργοτήτων των CBP και P/CAF στα πλαίσια του συμπλόκου αυτού.

(A). Εκχυλίσματα από Cos 1 κύτταρα τα οποία έχουν διαμολυνθεί παροδικά με τις κατασκευές που αναγράφονται, ανοσοκατακρημνίστηκαν αρχικά με α-CBP αντίσωμα. Τα ανοσο-σύμπλοκα εκλούστηκαν από την κολώνα (protein A Sepharose:Pharmacia) με 0.1mg/ml CBP πεπτίδιο (Santa Cruz). Τα προϊόντα της έκλουσης υποβλήθηκαν σε δεύτερη ανοσοκατακρήμνιση με α-flag αντίσωμα. Η παρουσία της πρωτεΐνης HNF-1 στο τριμερές σύμπλοκο HNF-1-CBP-P/CAF ανιχνεύτηκε σε Western blot με α-HNF-1 αντίσωμα.

(B). Cos 1 κύτταρα τα οποία έχουν διαμολυνθεί παροδικά με τις κατασκευές που αναγράφονται, ανοσοκατακρημνίστηκαν με α-HNF-1 αντίσωμα. Οι ποσότητες των CBP και P/CAF που ανοσοκατακρημνίστηκαν ανιχνεύονται σε Western blot ένα μέρος από αυτές χρησιμοποιήθηκε σε αντίδραση ακετυλίωσης με υπόστρωμα ιστόνες (IP HAT).



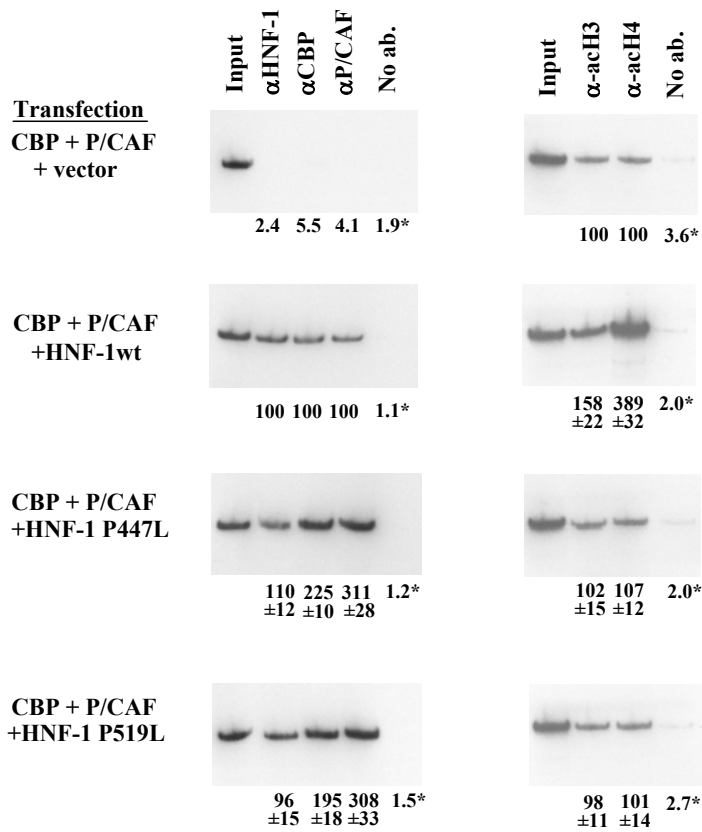
**Εικόνα 13.** Ανάλυση της επίδρασης του HNF-1 και των μεταλλαγών του στην ενζυμική ενεργότητα (HAT) και στη διαμόρφωση των συνενεργοποιητών CBP και P/CAF, *in vitro*.

60ng CBP (baculovirus-expressed) (A) ή P/CAF (baculovirus-expressed) επώαστηκε με 1μg των αναγραφόμενων ανασυνδυασμένων και βακτηριακά εκφρασμένων πρωτεϊνών με 1X HAT διάλυμα (Υλικά και μέθοδοι) για μία ώρα στους 4 C υπό ανάδευση. Μετά την προσθήκη ιστονών και [<sup>3</sup>H] acetyl-CoA τα δείγματα επώαστηκαν στους 30 C για μία ώρα και στη συνέχεια αναλύθηκαν σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης και ακολούθησε αυτοραδιογραφία.

(Γ και Δ). <sup>35</sup>S CBP και P/CAF επώαστηκαν με προσδεσμένες σε κολώνα TALON His-HNF-1wt και His-HNF-1P447L. Ύστερα από διεξοδικά ξεπλύματα το ποσό των ραδιενεργών πρωτεϊνών που παρέμεινε στην κολώνα (CBP και P/CAF) υποβλήθηκε σε μερική πέψη με V8 πρωτεάση (Sigma). Οι τελίτσες υποδηλώνουν τα πρωτεολυτικά προϊόντα των CBP και P/CAF.



**Immunoprecipitation**



**Εικόνα 14.** Ανάλυση της HNF-1-εξαρτώμενης στρατολόγησης του CBP και P/CAF σε χρωματινικό υπόστρωμα (chromatin template) και της κατάστασης ακετυλίωσης των γειτονικών νουκλεοσωμάτων. Χρωματίνη από cross-linked (με 1% φορμαλδεΰδη) κύτταρα της 3X AlbPE TK-CAT μόνιμης NIH3T3 σειράς που έχουν διαμολυνθεί με τους αναγραφόμενους φορείς έκφρασης υποβλήθηκε σε ανοσοκατακρήμνιση με (A) α-HNF-1, α-CBP, ή α-P/CAF (B) anti-acetyl H3 ή anti-acetyl H4 αντισώματα. Ακολούθησε PCR ανάλυση (βλέπε μεθόδους) και τα προϊόντα των 271 βάσεων, που αντιπροσωπεύουν ένα τμήμα του συνθετικού υποκινητή 3X AlbPE, ποσοτικοποιήθηκαν σε phosphoimager. Οι αναγραφόμενες τιμές αντιπροσωπεύουν ποσοστά σε σχέση με την τιμή που παίρνουν στα δείγματα που έχει προηγηθεί διαμόλυνση με wtHNF-1+CBP+P/CAF (100).

## Συζήτηση

Σε προηγούμενες μελέτες με πειράματα *in vitro* μεταγραφής ή παροδικής διαμόλυνσης βρέθηκε μία πληθώρα γονιδίων που ρυθμίζονται από HNF-1. Αυτές οι μελέτες δίνουν σημαντικές πληροφορίες για τον ρόλο του HNF-1 σε κάθε υποκινητή και για την συνεργασία του με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες (190) αλλά δεν αποκαλύπτουν τον μηχανισμό με τον οποίο ενεργοποιεί τα γονίδια στόχους στα πλαίσια της υψηλής χρωματινικής δομής.

Η πρώτη ένδειξη ότι η έκφραση των HNF-1 γονιδίων-στόχων περιλαμβάνει αναδιοργάνωση της χρωματίνης που εξαρτάται άμεσα από την παρουσία του HNF-1 ήρθε από δύο πρόσφατες εργασίες. Στην πρώτη, χαρτογράφηση θέσεων ευαίσθητων σε DnaseI του υποκινητή του γονιδίου της υδροξυλάσης της φαινυλαλανίνης (PAH), έδειξε σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε ποντίκια αγρίου τύπου και HNF-1<sup>-/-</sup> (151). Στην δεύτερη, μελέτες πάνω στη συστοιχία (cluster) των γονιδίων της α1-antitrypsin-CBG έδειξαν διαφορετικό πρότυπο θέσεων ευαίσθητων σε DnaseI σε διαφορετικούς ηπατικούς κλώνους (variants) ανάλογα με το αν εξέφραζαν HNF-1 και HNF-4 (161). Οι παραπάνω παρατηρήσεις μας οδήγησαν στο ερώτημα αν οι αλλαγές στη χρωματινική δομή είναι έμμεση συνέπεια της έκφρασης του HNF-1, μέσω ενεργοποίησης άλλων γονιδίων, ή αν ο ίδιος ο παράγοντας συμμετέχει ενεργά και άμεσα στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν πιο πάνω και που αφορούν την αλληλεπίδραση του HNF-1 με συνενεργοποιητές που έχουν την ικανότητα να τροποποιούν την οργάνωση των νουκλεοσωμάτων, ταιριάζουν πολύ περισσότερο με το δεύτερο σενάριο. Δείχθηκε λοιπόν ότι οι συνενεργοποιητές CBP, P/CAF, Src-1 και RAC3 αλληλεπιδρούν με διαφορετικές περιοχές του HNF-1 και αυξάνουν συνεργιστικά την HNF-1-εξαρτώμενη μεταγραφική ενεργοποίηση. Η συνέργια μεταξύ των συνενεργοποιητών αυτών οφείλεται στην ικανότητα τους αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και να συμμετέχουν ταυτόχρονα στη συνενεργοποίηση του ίδιου διμερούς HNF-1 σε ένα μόριο υποκινητή.

Γνωρίζουμε από την βιβλιογραφία, ότι στην περίπτωση των ορμονικών πυρηνικών υποδοχέων, οι συνενεργοποιητές P/CAF και Src-1 δρουν σαν μοριακή πλατφόρμα για την περαιτέρω στρατολόγηση του CBP και τελικά την δημιουργία ενός πολύ ενεργού συμπλόκου συνενεργοποιητών (89, 96, 105, 209). Στην περίπτωση του HNF-1 ο μηχανισμός συνενεργοποίησης από CBP και P/CAF είναι διαφορετικός.

Εδώ, η αλληλεπίδραση του CBP με την αμινοτελική περιοχή του HNF-1 αυξάνει την συγγένεια πρόσδεσης του P/CAF στην καρβοξυτελική. Φαίνεται λοιπόν πως η πρόσδεση του CBP στον HNF-1 αλλάζει την διαμόρφωση του δεύτερου, αυξάνοντας την συγγένειά του για P/CAF ή δημιουργεί μία επιπλέον επιφάνεια αλληλεπίδρασης μεταξύ των συνενεργοποιητών. Το τελικό όμως αποτέλεσμα είναι η δημιουργία ενός τριμερούς συμπλόκου που προφανώς είναι αρκετά σταθερό και οδηγεί στη μέγιστη μεταγραφική ενεργοποίηση.

Παρόλο που η εργασία εστιάζεται στον μηχανισμό συνέργιας μεταξύ CBP και P/CAF πιστεύουμε ότι η συνέργια ανάμεσα σε CBP και Src-1 ή RAC3 περιλαμβάνει παρόμοιο μηχανισμό. Πιο δύσκολα μπορεί να εξηγηθεί η συνέργια ανάμεσα στους συνενεργοποιητές P/CAF και Src-1 ή RAC3 επειδή αλληλεπιδρούν με την ίδια περιοχή του HNF-1, χωρίς όμως να αποκλείεται η πιθανότητα οι παραπάνω συνενεργοποιητές να αλληλεπιδρούν ανά δύο με τις δύο ADI περιοχές ενός HNF-1 διμερούς, ή ο κάθε ένας μετά από την πρόσδεσή του στον HNF-1 να στρατολογεί τον δεύτερο.

Η ικανότητα του HNF-1 να αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που έχουν HAT ενζυμική ενεργότητα υποδηλώνει ότι η ακετυλίωση των ιστονών παίζει σημαντικό ρόλο στην HNF-1- εξαρτώμενη μεταγραφική ενεργοποίηση. Η πρώτη ένδειξη που ενισχύει την παραπάνω παρατήρηση είναι ότι προσθήκη TSA (212, 213) που είναι αναστολέας των HDACs αυξάνει δραματικά την έκφραση του γονιδίου αναφοράς που εξαρτάται από HNF-1. Η ικανότητα του HNF-1 να αλληλεπιδρά και με συγκαταστολείς υποδηλώνει ότι η μεταγραφική ενεργότητα του είναι το αποτέλεσμα μίας ισορροπίας μεταξύ της θετικής επίδρασης συνενεργοποιητών και αρνητικής επίδρασης συγκαταστολέων. Η ισορροπία αυτή μπορεί να μετατοπιστεί προς την μία ή την άλλη κατεύθυνση μετά από υπερέκφραση των πρώτων ή των δεύτερων ή με προσθήκη TSA.

Διαφορετικές οικογένειες μεταγραφικών παραγόντων έχουν δειχθεί να αλληλεπιδρούν με μία ποικιλία συνενεργοποιητών όπου σε κάθε περίπτωση η HAT ενεργότητα ορισμένων μόνο από αυτούς είναι απαραίτητη για την μεταγραφική τους ενεργότητα. Για παράδειγμα η HAT ενεργότητα του P/CAF και όχι του CBP φαίνεται ότι είναι σημαντική για την επαγωγή της μεταγραφικής ενεργοποίησης που εξαρτάται από τους ορμονικούς πυρηνικούς υποδοχείς και τους μεταγραφικούς παράγοντες MyoD και NFκ-B (156, 170). Από την άλλη, μόνο η HAT ενεργότητα του CBP είναι σημαντική για την CREB- και STAT-1-εξαρτώμενη μεταγραφική ενεργοποίηση (89,

96). Στην περίπτωση του HNF-1, οι HAT ενεργότητες και των δύο των συνενεργοποιητών είναι σημαντικές για την πλήρη μεταγραφική ενεργοποίηση του HNF-1-εξαρτώμενου γονιδίου αναφοράς που είναι ενσωματωμένο στο γονιδίωμα των NIH3T3 κυττάρων και έχει πιθανότατα διαφορετική νουκλεοσωμική οργάνωση από το ίδιο γονίδιο αναφοράς στην μορφή επισώματος, για του οποίου την ενεργοποίηση η HAT ενεργότητα του P/CAF αρκεί. Επιπλέον, στην περίπτωση του ενσωματωμένου γονιδίου αναφοράς η ταυτόχρονη μόνο έκφραση και των δύο συνενεργοποιητών ήταν ικανή να επάγει υψηλά επίπεδα μεταγραφής, προτείνοντας ότι ο υποκινητής στα πλαίσια του γενώματος αποκτά τέτοια νουκλεοσωμική οργάνωση που αποτελεί φραγμό για την έναρξη της μεταγραφής σε σχέση με την δομή του υποκινητή του επισωματικού φορέα έκφρασης. Για τον ίδιο λόγο φαίνεται πως ταυτόχρονη υπερέκφραση Src-1 και RAC3 που έχουν ασθενέστερη HAT ενεργότητα από τους CBP και P/CAF δεν είναι αρκετή για να δημιουργήσει διαμόρφωση στον υποκινητή ικανή να οδηγήσει στη μέγιστη μεταγραφική ενεργοποίηση. Η κατανόηση λοιπόν μηχανισμών που τροποποιούν την ενζυμική ενεργότητα των συνενεργοποιητών είναι ιδιαίτερης σημασίας, μια και η ακετυλίωση των ιστονών που οδηγεί σε γενικότερη νουκλεοσωμική αναδιοργάνωση είναι καθοριστική για την έναρξη της μεταγραφής.

Μία σημαντική παρατήρηση αυτής της εργασίας είναι ότι ο ίδιος ο μεταγραφικός παράγοντας μπορεί να επηρεάσει την ενζυμική ενεργότητα του συνενεργοποιητή που στρατολογεί στον υποκινητή του γονιδίου που ρυθμίζει. Σε αυτό το συμπέρασμα καταλήξαμε μελετώντας τον μοριακό μηχανισμό της μειωμένης μεταγραφικής ενεργότητας ορισμένων μεταλλαγών του HNF-1 που έχουν βρεθεί σε ασθενείς με νεανικό διαβήτη τύπου MODYIII. Αρχικά λοιπόν με δεδομένο ότι η συνεργιστική δράση CBP και P/CAF είναι απολύτως απαραίτητη για την HNF-1-εξαρτώμενη μεταγραφή, μελετήσαμε την πιθανότητα η μειωμένη μεταγραφική ενεργότητα των μεταλλαγών να οφείλεται σε μειωμένη αλληλεπίδραση με τους συνενεργοποιητές αυτούς. Πράγματι, βρέθηκε ότι στις πέντε από τις επτά μεταλλαγές που μελετήθηκαν υπάρχει άμεση συσχέτιση ανάμεσα στην μειωμένη δραστηριότητά τους και την συγγένειά τους με έναν από τους δύο ή και τους δύο παραπάνω συνενεργοποιητές. Ενδιαφέρον όμως ήταν το γεγονός ότι δύο ανενεργές μεταλλαγές του HNF-1 οι P519L και P447L δεν ακολουθούν τον παραπάνω κανόνα, αλλά φαίνεται να αλληλεπιδρούν πιο ισχυρά και με CBP και με P/CAF.

Από την άλλη, η έλλειψη μεταγραφικής ενεργοποίησης δεν φαίνεται να οφείλεται σε αυξημένη αλληλεπίδραση τους με συγκαταστολείς. Επίσης προσθήκη

TSA δεν αυξάνει την μεταγραφική ενεργότητα των P519L και P447L παρόλο που κάτω από αυτές τις συνθήκες η αλληλεπίδρασή τους με συγκαταστολείς δεν υφίσταται.

Είναι λοιπόν φανερό ότι όπως και στην περίπτωση της πρωτεΐνης του αγρίου τύπου υπάρχει μία εναλλαγή μεταξύ ενός συμπλόκου συγκαταστολέων και ενός συνενεργοποιητών, μόνο που στην περίπτωση των P519L και P447L πρωτεϊνών το τελευταίο δεν είναι αρκετό για να επάγει μεταγραφή. Επομένως, γίνεται φανερό πως οι συνενεργοποιητές δεν μπορούν να θεωρηθούν ως συνεχώς ενεργές πρωτεΐνες που πρέπει απλά να στρατολογηθούν στους υποκινητές, αλλά ως παράγοντες που η τελική ενεργή τους διαμόρφωση εξαρτάται πολύ από την αλληλεπίδρασή τους με τους μεταγραφικούς παράγοντες που τους στρατολογούν.

Σε συμφωνία με την παραπάνω υπόθεση βρίσκεται η παρατήρηση μίας αρκετά πρόσφατης εργασίας ότι η πρόσδεση του συνενεργοποιητή PGC-1 (155) στον πυρηνικό υποδοχέα PPAR $\gamma$  αλλάζει την διαμόρφωσή του με τέτοιο τρόπο ώστε να επιτρέπει την επιπλέον πρόσδεση CBP και Src-1 και τελικά τη δημιουργία ενός σταθερού συμπλόκου ικανού να επάγει υψηλά επίπεδα μεταγραφής. Η παραπάνω περίπτωση αποτελεί ένα παράδειγμα ρύθμισης της λειτουργίας ενός συνενεργοποιητή από έναν μεταγραφικό παράγοντα με την στρατολόγηση ενός επιπλέον συνενεργοποιητή.

Η παρούσα εργασία αποκαλύπτει έναν διαφορετικό τύπο ρύθμισης που περιλαμβάνει την αλλοστερική τροποποίηση της HAT ενεργότητας των συνενεργοποιητών CBP και P/CAF σαν αποτέλεσμα διαφορικών αλληλεπιδράσεων με μεταγραφικούς παράγοντες. Έτσι οι συνενεργοποιητές CBP και P/CAF ακετυλιώνουν ικανοποιητικά ιστόνες όταν βρίσκονται σε σύμπλοκο με την HNF-1 πρωτεΐνη αγρίου τύπου. Από την άλλη όμως, η HAT ενεργότητά τους μειώνεται δραματικά όταν αλληλεπιδρούν με HNF-1 P519L και P447L. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην αλλαγμένη διαμόρφωση των μεταλλαγών που μπορεί να καλύπτει την καταλυτική περιοχή των συνενεργοποιητών με τέτοιο τρόπο ώστε καθίστανται ανίκανοι να αναγνωρίσουν τις ιστόνες ως υποστρώματά τους. Από την άλλη, οι ίδιοι οι συνενεργοποιητές όταν αλληλεπιδρούν με wtHNF-1 ή με τις μεταλλαγές μπορεί να αποκτούν ανάλογη διαμόρφωση που οδηγεί σε αύξηση ή μείωση της ενζυμικής τους ενεργότητας με αντίστοιχη ικανότητα μεταγραφικής ενεργοποίησης. Από τα αποτελέσματα είναι επίσης φανερό ότι η επαγωγή της ενζυμικής ενεργότητας ενός συνενεργοποιητή σαν αποτέλεσμα αλληλεπίδρασής του με έναν ενεργοποιητή δεν

περιορίζεται μόνο στην περίπτωση του HNF-1. Αύξηση της HAT ενεργότητας του CBP *in vitro* παρατηρήθηκε και μετά από προσθήκη Sp1 και HNF-4 υποδηλώνοντας ότι ο μηχανισμός αυτός ρύθμισης είναι γενικότερο φαινόμενο.

Πράγματι πρόσφατες εργασίες περιγράφουν και άλλες πρωτεΐνες που ρυθμίζουν την ενζυμική ενεργότητα των συγκεκριμένων συνενεργοποιητών, όπως οι πρωτεΐνες του αδενοϊού E1A και E1B, η πρωτεΐνη του ιού του σαρκώματος Karosi, η vIRF (viral interferon regulatory factor), η bHLH πρωτεΐνη Twist και η ρυθμιστική πρωτεΐνη της p53, MDM2. Πιο αναλυτικά η E1A, η Twist και η vIRF αναστέλλουν ισχυρά την ικανότητα ακετυλίωσης ιστονών και άλλων υποστρωμάτων από CBP και P/CAF ενώ η E1B και η MDM2 αναστέλλουν μόνο την ακετυλίωση του p53 από P/CAF και CBP. Από την άλλη, η ομόλογη πρωτεΐνη του Src-1, pCIP έχειδειχθεί ότι ρυθμίζει την δράση του CBP αυξάνοντας ή μειώνοντας την HAT ενεργότητά του ως προς διαφορετικά υποστρώματα (26, 146).

Ένας δεύτερος μηχανισμός τροποποίησης της HAT ενεργότητας των διαφόρων συνενεργοποιητών που περιγράφεται στη βιβλιογραφία αφορά μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις των ίδιων των συνενεργοποιητών. Για παράδειγμα, η φωσφορυλίωση του CBP από την Cdk2 αυξάνει την ενζυμική του ενεργότητα ενώ η φωσφορυλίωση της περιοχής του GCN5 που είναι γνωστή ως Bromodomain από την DNA-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση αναστέλλει την ικανότητά του να ακετυλιώνει τα υποστρώματά του. (26)

Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκε ένας συνθετικός υποκινητής που έχει θέσεις πρόσδεσης για τον HNF-1 για να αποφευχθεί η πολυπλοκότητα των φυσικών υποκινητών που έχουν θέσεις πρόσδεσης και για άλλους μεταγραφικούς παράγοντες. Αυτό μας επιτρέπει να μελετήσουμε τον μηχανισμό της HNF-1-εξαρτώμενης μεταγραφικής ενεργοποίησης γεγονός που θα μας βοηθήσει να διαλευκάνουμε στη συνέχεια την *in vivo* δράση του παράγοντα σε φυσικά γονίδια-στόχους του. Έτσι πιστεύουμε λοιπόν ότι η τελική διαμόρφωση του συμπλόκου των συνενεργοποιητών που στρατολογείται από HNF-1 καθορίζεται από τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των τεσσάρων συνενεργοποιητών σε έναν δεδομένο κυτταρικό τύπο καθώς και από την συγκεκριμένη διαμόρφωση του υποκινητή.

### **Ειδικός στόχος 3:**

#### **Αποτελέσματα**

Μετά την μηχανιστική μελέτη του τρόπου της μεταγραφικής ενεργοποίησης από HNF-1 και HNF-4 το επόμενο ερώτημα που τέθηκε είναι πως οι παράγοντες αυτοί συντονίζουν την νουκλεοσωμική αναδιοργάνωση και τη δημιουργία του προενακτήριου συμπλόκου (preinitiation complex) σε φυσικά γονίδια-στόχους τους μέσα στα κύτταρα. Για το σκοπό αυτό διαλέξαμε να μελετήσουμε τον μηχανισμό μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου της  $\alpha 1$ -αντιτρυψίνης που έχει στον υποκινητή του θέσεις πρόσδεσης για HNF-1 και HNF-4. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στα CaCo-2 (colon carcinoma) κύτταρα τα οποία κατά την παραμονή τους σε καλλιέργεια, και από την στιγμή που γίνουν confluent, ξεκινούν ένα πρόγραμμα τελικής διαφοροποίησης στη διάρκεια της οποίας διάφορα γονίδια-δείκτες αρχίζουν να εκφράζονται, μιμούμενα το πρότυπο γονιδιακής έκφρασης των διαφοροποιημένων κυττάρων του εντέρου (147, 149, 160).

Ένα από τα γονίδια-δείκτες της διαφοροποίησης των CaCo-2 κυττάρων είναι και αυτό της  $\alpha 1$ -αντιτρυψίνης, του οποίου η έκφραση έχει βρεθεί ότι εξαρτάται από την συνεργιστική δράση του HNF-1 και HNF-4 (69, 131, 161). Αναλύσαμε λοιπόν την νουκλεοσωμική οργάνωση και την σειρά με την οποία στρατολογούνται οι διάφοροι ρυθμιστικοί παράγοντες στον υποκινητή της  $\alpha 1$ -αντιτρυψίνης κατά την διάρκεια της διαφοροποίησης των CaCo-2 κυττάρων, γύρω από την χρονική στιγμή που το γονίδιο ενεργοποιείται.

Αρχικά, προσπαθήσαμε να χαρακτηρίσουμε την κυτταρική αυτή σειρά πραγματοποιώντας μία σειρά από Western blots αναλύσεις, ώστε να δούμε το πρότυπο έκφρασης κάποιων πρωτεϊνών που πιθανότατα παίζουν ρόλο στην ενεργοποίηση του γονιδίου της  $\alpha 1$ -αντιτρυψίνης. Το πείραμα αυτό (εικόνα 1) έδειξε ότι, ο παράγοντας HNF-1, ένας από τους κύριους ενεργοποιητές του γονιδίου, εκφράζεται σε όλα τα στάδια διαφοροποίησης ( ημέρα 0-ημέρα 11) ενώ η έκφραση του HNF-4 ξεκινά την ημέρα 2 και σταδιακά αυξάνεται φτάνοντας σε πλατό την ημέρα 6 (Ημέρα 0:αρχή της διαφοροποίησης όπου τα κύτταρα είναι confluent). Το πρότυπο έκφρασης άλλων πρωτεϊνών όπως συνενεργοποιητών, αλλά και παραγόντων που παίζουν ρόλο γενικά στη μεταγραφή ( RNA pol II και πρωτεΐνες την γενικής μεταγραφικής μηχανής), δεν φαίνεται να αλλάζει (εικόνα1).

Στη συνέχεια καθορίστηκε η χρονική στιγμή κατά την διαφοροποίηση που αρχίζει η έκφραση του γονιδίου της  $\alpha 1$ -αντιτρυψίνης. Πιο συγκεκριμένα, RT-PCR ανάλυση ( steady state-mRNA), ανάλυση νεοσυντιθέμενου mRNA σε κυτταρικούς πυρήνες (nuclear run off), και δοκιμή προστασίας του mRNA από την S1 νουκλεάση (S1 nuclease protection assay), έδειξε ότι το συγκεκριμένο γονίδιο αρχίζει να εκφράζεται την 5.5 ημέρα της διαφοροποίησης των CaCo-2 κυττάρων (εικόνα 2A). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι παρόλο που το ραδιοσημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο που χρησιμοποιήθηκε στην δεύτερη μέθοδο (S1 nuclease protection assay) αντιστοιχεί σε περιοχή του mRNA που βρίσκεται πολύ κοντά στο 5' άκρο του (5' untranslated region), δεν ανιχνεύεται κανένα προϊόν υβριδοποίησης του ολιγονουκλεοτιδίου με mRNA πριν την ημέρα 5.5, γεγονός που αποκλείει την ύπαρξη μικρών, ελλιπών (truncated) μετάγραφων της  $\alpha 1$ -αντιτρυψίνης, που θα ήταν αποτέλεσμα μη αποτελεσματικής μεταγραφικής επιμήκυνσης (Elongation pausing).

Με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης σε χρωματίνη (Chips) στα οποία χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα που αναγνωρίζουν ακετυλιωμένες λυσίνες των ιστονών H3 και H4 φαίνεται ότι η επιλεκτική υπερακετυλίωση της H3 προηγείται της μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου (ημέρα 5, εικόνα 1B) επιβεβαιώνοντας την γενικότερη υπόθεση ότι η ακετυλίωση των νουκλεοσωμάτων προαπαιτείται για την έναρξη της μεταγραφής.

Χαμηλής ανάλυσης χαρτογράφηση των θέσεων των νουκλεοσωμάτων με την μέθοδο έμμεσης σήμανσης άκρου (Indirect end-labeling), σε χρωματίνη η οποία έχει υποβληθεί σε μερική πέψη με μικροκοκική νουκλεάση (MNase:Micrococcal nuclease), έδειξε ότι ο υποκινητής το γονιδίου της  $\alpha 1$ -αντιτρυψίνης υφίσταται με την μορφή μιας σειράς 'ακριβώς' τοποθετημένων νουκλεοσωμάτων (precisely positioned) σε όλη την διάρκεια του προγράμματος της διαφοροποίησης των CaCo-2 κυττάρων (εικόνα3A).

Για να βρούμε όμως την ακριβή θέση των ορίων του νουκλεοσωμάτων στον εγγύ υποκινητή πραγματοποιήσαμε υψηλής ανάλυσης χαρτογράφηση με την μέθοδο LM-PCR (Ligation-mediated PCR) μετά από παρασκευή μονονουκλεοσωμάτων. Έτσι όπως φαίνεται στις εικόνες 3B και Δ, το νουκλεόσωμα 1 (NUC1) εκτείνεται από την θέση -213 ως τη θέση -63 σε σχέση με την θέση έναρξης της μεταγραφής, ενώ το νουκλεόσωμα 2 (NUC2) εκτείνεται ανάμεσα στις θέσεις -33 ως στην +112. Οι θέσεις πρόσδεσης για HNF-1 (-73 ως -66) και HNF-4 (-119 ως -108) βρίσκονται στη περιοχή που καλύπτονται από το νουκλεόσωμα 1 ενώ το TATA στοιχείο (-25 ως -19)



και το σημείο έναρξης της μεταγραφής καλύπτονται από το νουκλεόσωμα 2. Στην εικόνα 3B είναι φανερό ότι δεν παρατηρείται αλλαγή της θέσεως των νουκλεοσωμάτων κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης ανεξάρτητα από την μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου, ή την υπερακετυλίωση της H3 που παρατηρείται στον υποκινητή του.

Στην συνέχεια, δοκιμές υπερευαισθησίας θέσεων σε ένζυμα περιορισμού (Restriction Enzyme accessibility assay) σε απομονωμένους πυρήνες CaCo-2 κυττάρων διαφόρων σταδίων διαφοροποίησης, έδειξαν αλλαγές στην διαμόρφωση του νουκλεοσώματος 2. Πιο συγκεκριμένα, ευαισθησία στη θέση BamHI παρατηρείται σε όλα τα δείγματα (εικόνα 3Γ) αφού η θέση αυτή στον υποκινητή βρίσκεται σε περιοχή που συνδέει δύο νουκλεοσώματα (linker). Από την άλλη, η θέση ApaI που εντοπίζεται μέσα στο νουκλεόσωμα 2 και είναι αρκετά κοντά στη θέση έναρξης της μεταγραφής, εμφανίζεται ευαίσθητη στο αντίστοιχο ένζυμο περιορισμού μόνο σε πυρήνες των ημερών 5.5, 6 και 8. Επομένως τη στιγμή της έναρξης της μεταγραφής δύο γεγονότα συμβαίνουν: ακετυλίωση των νουκλεοσωμάτων και αλλαγή της διαμόρφωσης του νουκλεοσώματος 2.

Για να διερευνήσουμε πως αυτά τα γεγονότα σχετίζονται με την μορφοποίηση του προενακτήριου συμπλόκου πραγματοποιήσαμε μία σειρά από πειράματα ανοσοκατακρήμνισης σε χρωματίνη χρησιμοποιώντας αντισώματα για υποψήφιους παράγοντες που στρατολογούνται στον συγκεκριμένο υποκινητή. Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στην εικόνα 4, ο HNF-1 βρίσκεται συνεχώς προσδεδεμένος στον υποκινητή του γονιδίου της  $\alpha 1$ -αντιτρυψίνης (ημέρα 0-11) ενώ η πρόσδεση του HNF-4 αυξάνει σταδιακά από την ημέρα 2 φτάνοντας σε πλατό την ημέρα 6, πρότυπο που συμβαδίζει με την βαθμιαία αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης (εικόνα1). Παρόμοια με τον HNF-1, οι γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες TBP και TFIIB ανιχνεύονται στον υποκινητή σε όλες τις ημέρες της διαφοροποίησης.. Ενδιαφέρον παρουσιάζει όμως η παρατήρηση ότι δύο άλλα συστατικά του γενικού μεταγραφικού παράγοντα TFIID, τα TAFII250 και TAFII30 δεν ανιχνεύονται στον υποκινητή στην αρχή της διαφοροποίησης (ημέρα 0) γεγονός που υποδηλώνει ότι ο παράγοντας TBP που ανιχνεύουμε σε αυτή τη χρονική στιγμή δεν είναι μέρος του κλασσικού TFIID συμπλόκου όπως έχει περιγραφεί μέχρι σήμερα.

Η στρατολόγηση των TAFs και του γενικού μεταγραφικού παράγοντα TFIID, που ως γνωστό από την βιβλιογραφία είναι υπεύθυνος για την φωσφορυλίωση της καρβοξυτελικής περιοχής της RNA πολυμεράσης, πραγματοποιείται την δεύτερη

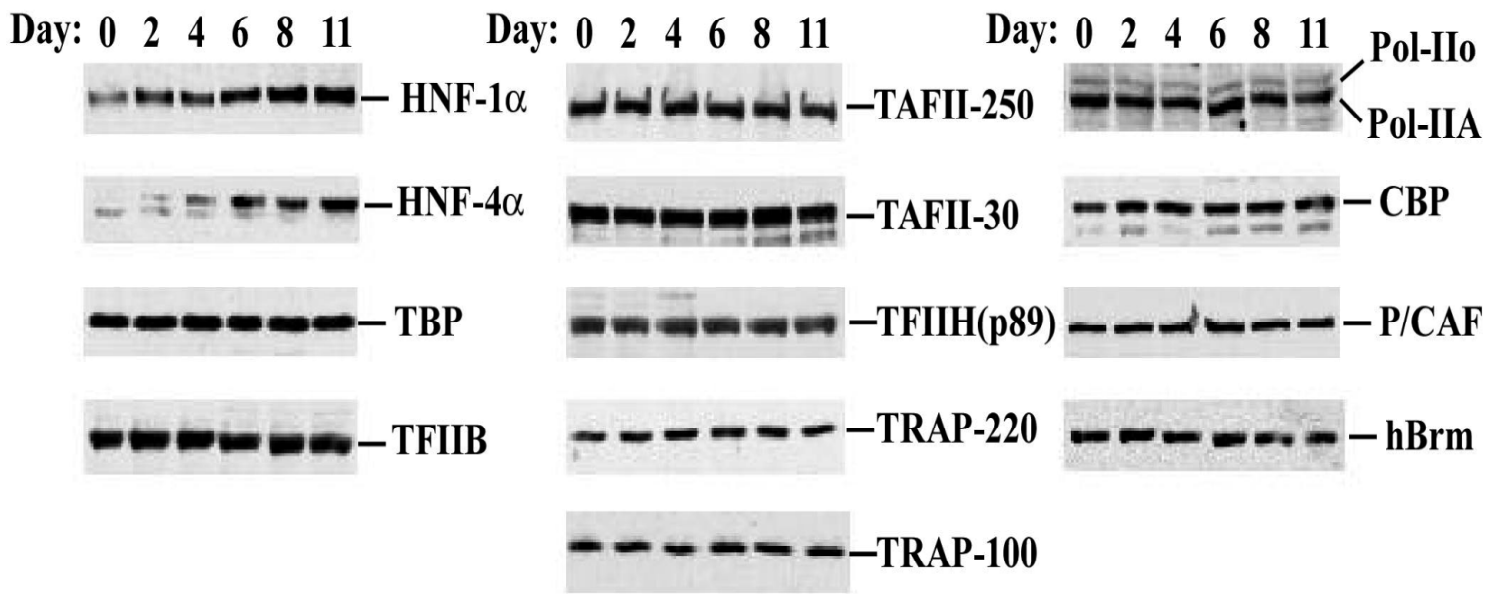
ημέρα. Από την χρονική αυτή στιγμή και μετά ανιχνεύονται ικανοποιητικά επίπεδα RNA πολυμεράσης II στον υποκινητή καθώς και δύο συστατικά του συμπλόκου μεσολαβητών (Mediators), TRAP220 και TRAP100.

Επειδή το στοιχείο TATA βρίσκεται σε περιοχή στον υποκινητή που καλύπτεται από νουκλεόσωμα (NUC2) θελήσαμε να δείξουμε ότι ο παράγοντας TBP προσδένεται σε νουκλεοσωμικό και όχι σε 'γυμνό' DNA σε μικρό ποσοστό κυττάρων. Για το σκοπό αυτό χρωματίνη από CaCo-2 κύτταρα (ημέρα 0 και 6) στην οποία προηγήθηκε ολική πέψη με μικροκοκική νουκλεάση ώστε να προκύψουν μονονουκλεοσώματα (εικόνα 4Γ), υποβλήθηκε σε ανοσοκατακρήμιση με  $\alpha$ -TBP αντίσωμα. Ακολούθησε PCR ανάλυση στα προϊόντα της ανοσοκατακρήμισης με την οποία ανιχνεύονται ικανοποιητικά ποσά του NUC2 και όχι της περιοχής που αντιστοιχεί σε linker DNA. (εικόνα 4Δ) καθώς και ένα μικρό ποσοστό του NUC1. Αυτό οφείλεται πιθανά στο γεγονός ότι η μονιμοποίηση των κυττάρων (cross linking), που γίνεται με σκοπό να διατηρηθούν ανέπαφα τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα και τα σύμπλοκα DNA-πρωτεϊνών, συνδέει τα δύο νουκλεοσώματα μέσω των παραγόντων που αλληλεπιδρούν έμμεσα με αυτά. Στη συνέχεια επαναλάβουμε το παραπάνω πείραμα αλλά μετά την ανοσοκατακρήμιση ακολούθησε έκλυση από την κολώνα και τα προϊόντα αυτής υποβλήθηκαν σε δεύτερη ανοσοκατακρήμιση με  $\alpha$ -H3 αντίσωμα. Στα προϊόντα της δεύτερης ανοσοκατακρήμισης ανιχνεύεται πάλι το νουκλεόσωμα 2, γεγονός που ενισχύει την αντίληψη ότι ο παράγοντας TBP προσδένεται σε νουκλεοσωμικό DNA στον συγκεκριμένο υποκινητή.

Η υπερακετυλίωση της ιστόνης H3 την ημέρα 5 της διαφοροποίησης των CaCo-2 κυττάρων καθώς και η αλλαγή της διαμόρφωσης του νουκλεοσώματος 2 μας οδήγησε στο να ελέγξουμε την πιθανή στρατολόγηση συνενεργοποιητών με HAT ενζυμική ενεργότητα καθώς και παραγόντων που έχουν την ικανότητα να τροποποιούν την διαμόρφωση των νουκλεοσωμάτων (remodeling factors). Έχοντας ως δεδομένο ότι ο HNF-1 αλληλεπιδρά με CBP και P/CAF και ο HNF-4 με CBP, ελέγξαμε αρχικά την στρατολόγηση των δύο αυτών παραγόντων στον υποκινητή. Η παρουσία και των δύο παραγόντων γίνεται αισθητή από την τέταρτη ημέρα, αρκετά νωρίτερα από την χρονική στιγμή που είναι εμφανής η υπερακετυλίωση της H3, ενώ ο παράγοντας hBRM που είναι βασικό συστατικό συμπλόκου αναδιοργάνωσης της χρωματίνης hSWI/SNF αλληλεπιδρά μόνο παροδικά με τον υποκινητή (ημέρα 4-8) ενώ η παρουσία του είναι πιο έντονη την ημέρα 5.5 και 6 που συμπίπτει με την χρονική στιγμή στην οποία ανιχνεύουμε αναδιαμόρφωση του νουκλεοσώματος 2.

Στη συνέχεια, δεδομένης της παρουσίας της RNA πολυμεράσης II στον υποκινητή απουσία μεταγραφής θελήσαμε να ελέγξουμε την κατάσταση φωσφορυλίωσης της που στη βιβλιογραφία φαίνεται άμεσα συνδεδεμένη με την μεταγραφική έναρξη και επιμήκυνση. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης σε χρωματίνη στα οποία χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα που αναγνωρίζουν ειδικά τις φωσφορυλιωμένες μορφές της πολυμεράσης στη σερίνη 5 ( $\alpha$ -CTD-Ser5P) και σερίνη 2 ( $\alpha$ -CTD-Ser2P) της καρβοξυτελικής της περιοχής (CTD). Στην εικόνα 4B φαίνεται ότι και οι δύο μορφές ανιχνεύονται στον υποκινητή πολύ πριν την μεταγραφική έναρξη, προτείνοντας ότι η φωσφορυλίωση της RNA πολυμεράσης II στον υποκινητή της  $\alpha 1$ -αντιτρυψίνης δεν αρκεί για να επάγει την απελευθέρωσή της από το προενακτήριο σύμπλοκο και την μετάβασή της στην μορφή επιμήκυνσης (elongation form of polII). Σε συμφωνία με άλλες εργασίες η φωσφορυλιωμένη μορφή της πολυμεράσης στη σερίνη 5 δεν ανιχνεύεται σε κωδικές περιοχές του γονιδίου της  $\alpha 1$ -αντιτρυψίνης (εικόνα 4B U) ενώ από την ημέρα 5.5 είναι εμφανής η παρουσία της φωσφορυλιωμένης πολυμεράσης στη σερίνη 2 που συμβαδίζει με την ανίχνευση του mRNA του γονιδίου της  $\alpha 1$ -αντιτρυψίνης

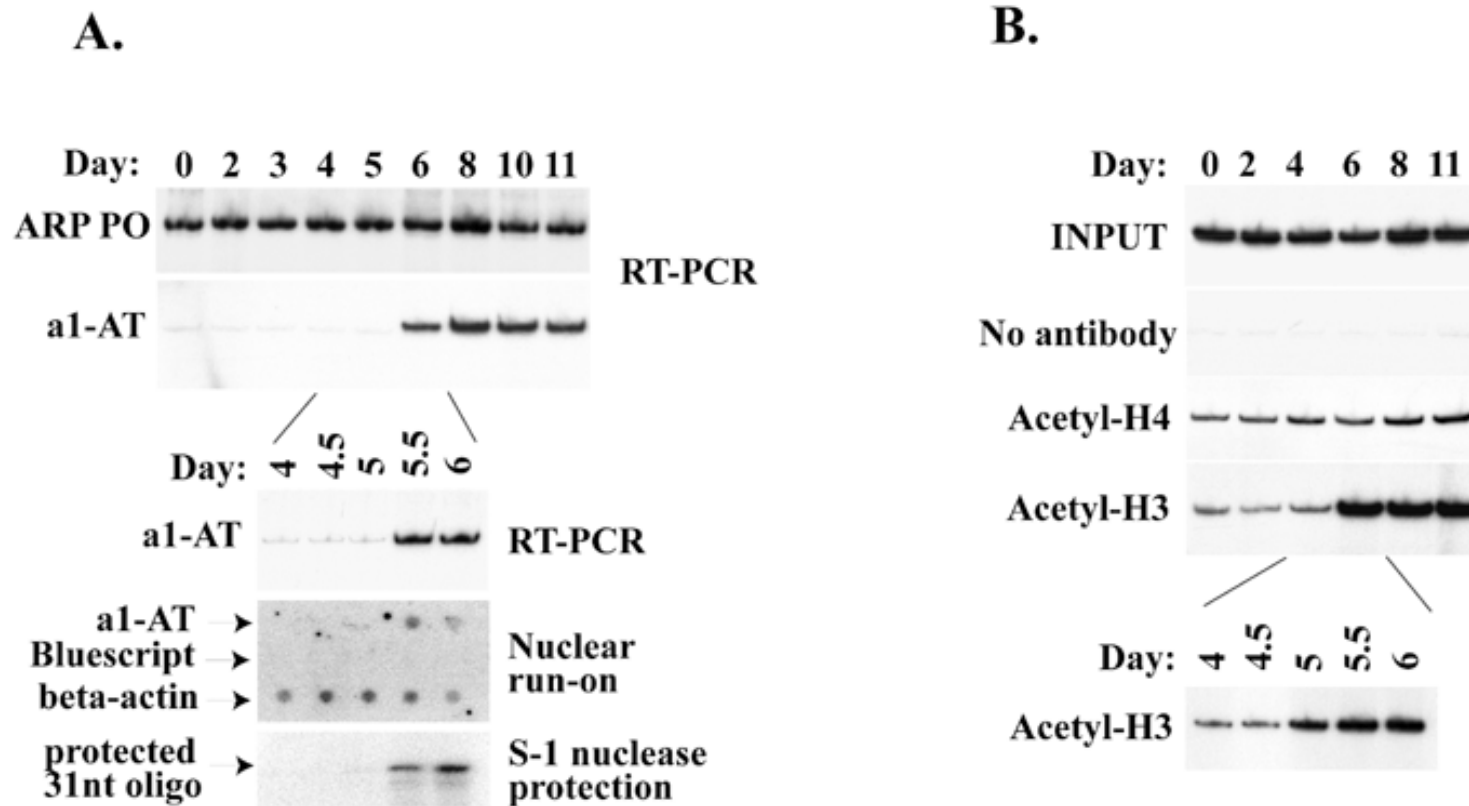
Από τη στιγμή που τα επίπεδα έκφρασης όλων των παραγόντων που εξετάστηκαν με τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης εκτός του HNF-4 είναι σταθερά σε όλη τη διάρκεια του προγράμματος διαφοροποίησης η σειριακή στρατολόγηση διαφόρων συμπλόκων στον υποκινητή δεν μπορεί να εξηγηθεί από τις αλλαγές στην πρωτεϊνική έκφραση, αλλά περιλαμβάνει διαφορικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών ανάλογα με τις διαφορετικές επιφάνειες που εκτίθενται στα διακριτά στάδια της διαδικασίας μορφοποίησης του προενακτήριου συμπλόκου.



**Εικόνα 1.** Πρότυπο έκφρασης ορισμένων ρυθμιστικών παραγόντων κατά τη διαφοροποίηση των CaCo-2 κυττάρων.

Πυρηνικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν από CaCo-2 κύτταρα των αναγραφόμενων ημερών και ακολούθησε Western blot ανάλυση.

**Fig. 1**



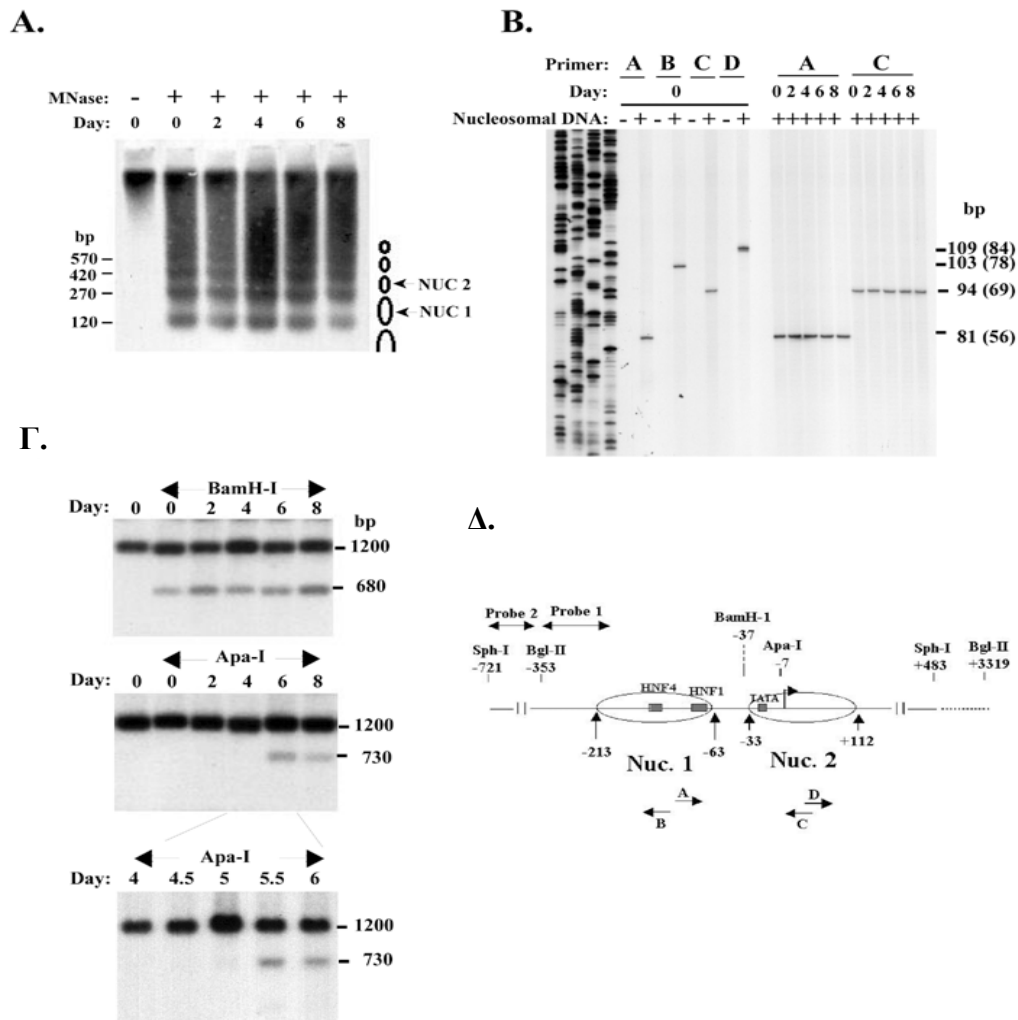
**Εικόνα 2.** Ενεργοποίηση του γονιδίου της α1-αντιτρυψίνης κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των CaCo-2 κυττάρων.

(A). Ολικό RNA απομονώθηκε από CaCo-2 κύτταρα στις αναγραφόμενες ημέρες και πραγματοποιήθηκε ανάλυση RT-PCR με τη χρήση εκκινητών που ανιχνεύουν την παρουσία του cDNA της α1-αντιτρυψίνης ή της όξινης ριβοσωμικής φωσφοπρωτεΐνης (ARPPPO) που χρησιμοποιείται ως control για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων. S-1 protection ανάλυση με τη χρήση ολιγονουκλεοτιδίου (antisense) που αντιστοιχεί στην +4 ως +35 περιοχή του γονιδίου της α1-αντιτρυψίνης και nuclear run-on ανάλυση όπου 10μg cDNA α1-AT, του πλασμιδιακού φορέα Bluescript (αρνητικό control) και cDNA β-ακτίνης (θετικό control) υβριδοποιήθηκε με ραδιοσημασμένο νεοσυντιθέμενο πυρηνικό RNA που απομονώθηκε από CaCo-2 κύτταρα των αναγραφόμενων ημερών.

(B). Ανοσοκατακρήμνιση σε χρωματίνη CaCo-2 κυττάρων των αναγραφόμενων ημερών με τη χρήση anti-acetyl-H3 και anti-acetyl-H4 αντισωμάτων (Upstate Biotechnology) και ανίχνευση του υποκινητή της α1-αντιτρυψίνης με PCR ανάλυση.



**Fig. 2**



**Εικόνα 3. Νουκλεοσωμική οργάνωση του υποκινητή της α1-αντιτρυψίνης κατά τη διαφοροποίηση των CaCo-2 κυττάρων.**

(Α). Πυρήνες από CaCo-2 κύτταρα υποβλήθηκαν σε μερική πέψη με 45 μονάδες (units) Μικροκοκικής νουκλεάσης (Mnase). Το ολικό DNA που απομονώθηκε υποβλήθηκε σε πέψη με το ένζυμο περιορισμού BglIII και ακολούθησε ανάλυση του γενωμικού DNA κατά Southern και υβριδοποίηση του με τον ανιχνευτή 1 (probe1). **Indirect end labeling.**

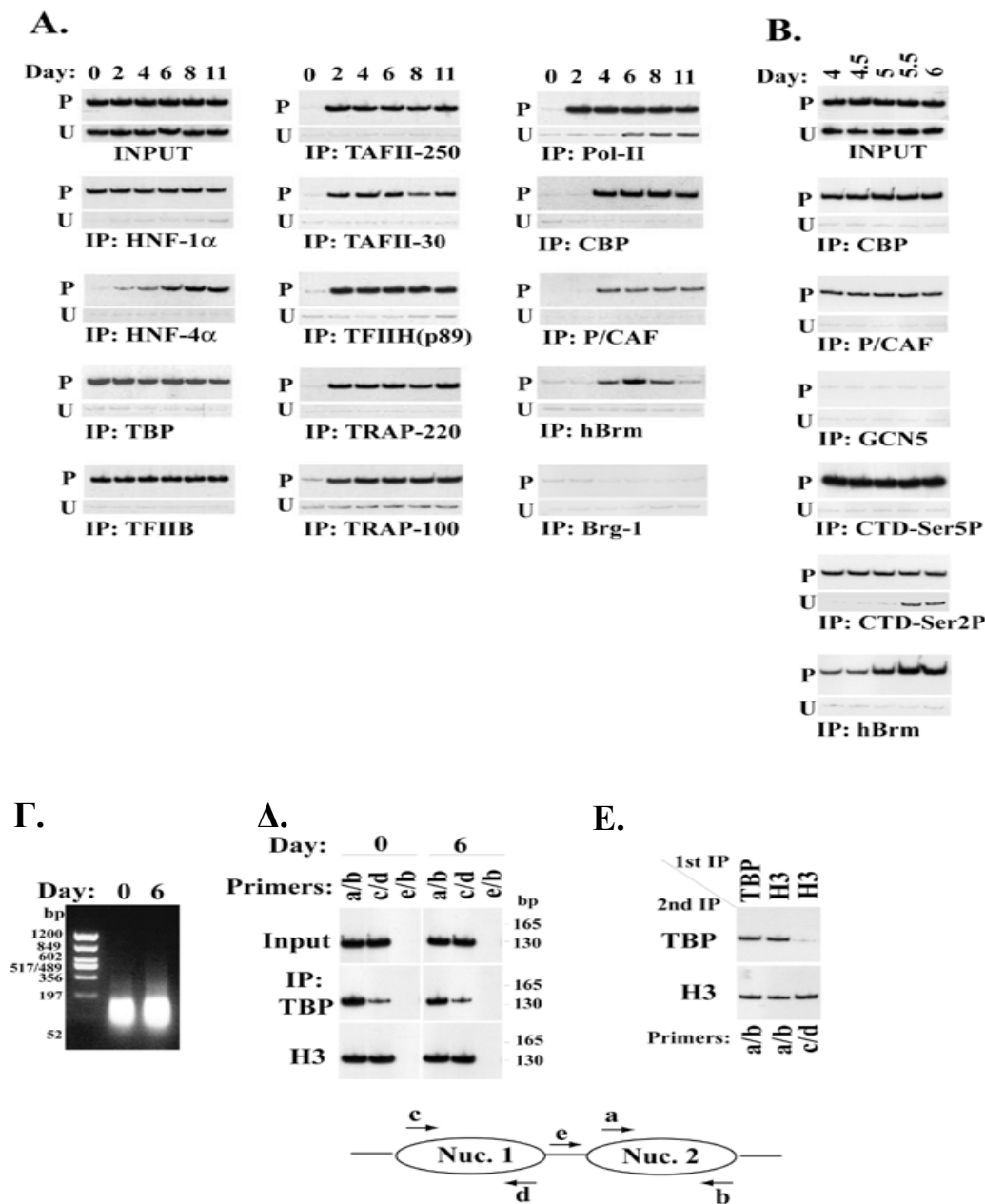
(Β). CaCo-2 κύτταρα μονιμοποιήθηκαν (crosslinking) παρουσία 1% φορμαλδεΐδης και στη συνέχεια από αυτά απομονώθηκαν πυρήνες οι οποίοι υποβλήθηκαν σε μερική πέψη με μικροκοκική νουκλεάση. DNA μεγέθους μονονουκλεοσώματος (146 bp) απομονώθηκε από πήκτωμα αγαρόζης και χρησιμοποιήθηκε σε ανάλυση LM-PCR (**Ligation-mediated PCR**). Η στήλη η οποία σημειώνεται ως (-) αντιπροσωπεύει δείγματα στα οποία οι πυρήνες δεν έχουν υποβληθεί σε πέψη με μικροκοκική νουκλεάση (αρνητικό control). Τα μεγέθη των προϊόντων της ανάλυσης LM-PCR αναγράφονται δεξιά. Τα νούμερα στην παρένθεση αντιπροσωπεύουν τα προϊόντα της ανάλυσης χωρίς τον 25-μερή linker.

(Γ). Ένα μέρος των απομονωμένων πυρήνων που χρησιμοποιήθηκαν στο (Α) υποβλήθηκε σε πέψη με 50 μονάδες (units) των ενζύμων περιορισμού BamHI και ApaI στους 25°C για 20 λεπτά. Στη συνέχεια απομονώθηκε γενωμικό DNA το υποβλήθηκε σε ολική πέψη με το ένζυμο SphI και ακολούθησε ανάλυση κατά Southern και υβριδοποίηση με τον ανιχνευτή 2 (probe 2). **Restriction enzyme accessibility assay.**

(Δ). Σχηματική αναπαράσταση του υποκινητή της α1-αντιτρυψίνης. Τα οριζόντια βέλη αντιπροσωπεύουν τις θέσεις των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση LM-PCR.





**Fig. 3****Εικόνα 4. Σειρά στρατολόγησης των συστατικών του προενακτηρίου συμπλόκου στον υποκινητή της  $\alpha 1$ -αντιτροψίνης στη διάρκεια της διαφοροποίησης των CaCo-2 κυττάρων.**

(A και B). Ανοσοκατακρήμιση σε χρωματίνη με τη χρήση των αντισωμάτων των αναγραφόμενων πρωτεϊνών (IP). Τα προϊόντα της ανάλυσης PCR αντιστοιχούν στον εγγύ υποκινητή της  $\alpha 1$ -αντιτροψίνης (P) και στην κωδική περιοχή του ίδιου γονιδίου [3' UTR (U)]. Τα νούμερα στην κορυφή αντιστοιχούν στη χρονική στιγμή συλλογής των κυττάρων (σε ημέρες) ύστερα από την στιγμή που γίνονται confluent (ημέρα 0). (Γ και Δ). CaCo-2 κύτταρα ημερών 0 και βμονιμοποιήθηκαν (crosslinking) παρουσία 1% φορμαλδεΰδης και στη συνέχεια από αυτά απομονώθηκαν πυρήνες οι οποίοι υποβλήθηκαν σε ολική πέψη με 850 units μικροκοκκικής νουκλεάσης για 30 λεπτά στους 37°C. Από ένα μέρος των πυρήνων απομονώθηκε DNA και αναλύθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης (Γ), ενώ το υπόλοιπο υποβλήθηκε σε ανοσοκατακρήμιση με  $\alpha$ -TBP και  $\alpha$ -H3 αντισώματα (Δ). (E). Τα σύμπλοκα που ανοσοκατακρημνίστηκαν παρουσία του αναγραφόμενου πρώτου αντισώματος (1<sup>st</sup> IP) εκλούστηκαν από την κολώνα (ProteinG Sepharose) και αφού αραιώθηκαν υποβλήθηκαν σε δεύτερη ανοσοκατακρήμιση με τον αναγραφόμενο δεύτερο αντίσωμα (2<sup>nd</sup> IP). Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν με τους συνδυασμούς εκκινητών που αναγράφονται στη βάση.

## Συζήτηση

Το κρίσιμο στάδιο στην ενεργοποίηση ενός γονιδίου είναι η δημιουργία ενεργού προενακτήριου συμπλόκου (PIC) στον υποκινητή του (103, 182, 183). Επειδή όμως όπως είναι γνωστό το DNA στα κύτταρα είναι με τη μορφή νουκλεοσωμάτων των οποίων η δομή είναι κατασταλτική για την πρόσδεση παραγόντων και την μεταγραφική ενεργοποίηση η αναδιοργάνωση της χρωματίνης φαίνεται πως είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό του προενακτήριου συμπλόκου και την έναρξη της μεταγραφής (46, 183).

Η αναδιοργάνωση αυτή επιτυγχάνεται από σύμπλοκα που έχουν την ικανότητα να αλλάζουν την διαμόρφωση των νουκλεοσωμάτων αντλώντας ενέργεια από την υδρόλυση ATP (85, 148) και από παράγοντες που ομοιοπολικά τροποποιούν τις ιστόνες των νουκλεοσωμάτων (HATs, 181). Σύμφωνα με την τρέχουσα άποψη, αυτές οι δύο κατηγορίες πρωτεϊνών στρατολογούνται από μεταγραφικούς παράγοντες, που ειδικά προσδέονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες των υποκινητών, και δημιουργούν τοπικά μία συγκεκριμένη χρωματινική δομή που επιτρέπει την μετέπειτα στρατολόγηση παραγόντων που συνιστούν το προενακτήριο σύμπλοκο συμπεριλαμβανομένης της RNA pol-II που είναι το καθοριστικό στάδιο για την έναρξη της μεταγραφής (103, 182).

Η αλληλουχία των δύο αυτών γεγονότων δηλαδή της ακετυλίωσης των νουκλεοσωμάτων και της νουκλεοσωμικής αναδιοργάνωσης σε σχέση με την μεταγραφική ενεργοποίηση έχει μελετηθεί σε δύο τύπους υποκινητών. Έτσι στον υποκινητή του HO γονιδίου στον σακχαρομύκητα η ρύθμιση του οποίου εξαρτάται από τον κυτταρικό κύκλο του οργανισμού, ο ενεργοποιητής Swi5 στρατολογεί το σύμπλοκο SWI/SNF που είναι υπεύθυνο για την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και που στη συνέχεια επιτρέπει την στρατολόγηση του συμπλόκου SAGA που έχει HAT ενεργότητα. Η έλευση των δύο αυτών συμπλόκων διευκολύνει την πρόσδεση ενός δεύτερου ενεργοποιητή του SBF στον υποκινητή που οδηγεί σε μεταγραφική ενεργοποίηση (31). Στην περίπτωση όμως του υποκινητή της ιντερφερόνης β που επάγεται μετά από επιμόλυνση με ιό και φαίνεται ότι δεν περιέχει νουκλεοσώματα τουλάχιστον στην περιοχή που προσδέεται το σύμπλοκο των ενεργοποιητών του γονιδίου (enhancesome), τα γεγονότα αυτά συμβαίνουν με αντίθετη σειρά. Πιο συγκεκριμένα, εδώ η υπερακετυλίωση της ιστόνης H4 είναι απαραίτητη για την στρατολόγηση του παράγοντα BRG-1 (καταλυτική υπομονάδα του hSWI/SNF

συμπλόκου) και η αναδιοργάνωση του γειτονικού νουκλεοσώματος που καλύπτει το στοιχείο TATA είναι κρίσιμη για την πρόσδεση του TFIIID και τελικά την έναρξη της μεταγραφής (1).

Ένας από τους βασικούς στόχους αυτής της εργασίας ήταν η μελέτη της σχέσης μεταξύ της χρωματινικής αναδιαμόρφωσης και της μορφοποίησης του προενακτήριου συμπλόκου σε υποκινητές που εξαρτώνται από HNF-1 και HNF-4, και του ρόλου των δύο αυτών ενεργοποιητών στις παραπάνω διαδικασίες. Η μελέτη έγινε στον υποκινητή του γονιδίου της  $\alpha 1$ -αντιτρυψίνης, η έκφραση του οποίου επάγεται κατά την διαφοροποίηση των CaCo-2 κυττάρων (147, 149, 160). Η χαρτογράφηση των νουκλεοσωμάτων έδειξε ότι αντίθετα από τον υποκινητή του γονιδίου της ιντερφερόνης  $\beta$ , και όπως στους περισσότερους ενεργούς υποκινητές (5) στα κύτταρα των θηλαστικών, ο εν λόγω υποκινητής υφίσταται με την μορφή μιας σειράς τοποθετημένων (positioned) νουκλεοσωμάτων και αυτή η νουκλεοσωμική οργάνωση διατηρείται σταθερή σε όλη τη διάρκεια του προγράμματος διαφοροποίησης.

Η μελέτη του υποκινητή της  $\alpha 1$ -αντιτρυψίνης οδήγησε σε ενδιαφέροντα ευρήματα σε σχέση με το ρόλο των διαφορετικών συμπλόκων στην μεταγραφική ενεργοποίηση, που πιθανότατα δεν αφορούν μόνο τον συγκεκριμένο υποκινητή, αλλά αποτελούν γενικό μηχανισμό επαγωγής γονιδίων τόσο στη διαδικασία της διαφοροποίησης όσο και σε άλλες κυτταρικές διαδικασίες. Αρχικά λοιπόν παρατηρήσαμε ότι στην αρχή της διαφοροποίησης ο ενεργοποιητής HNF-1 και δύο γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες οι TFIIIB και TBP βρίσκονται στον υποκινητή και μάλιστα προσδένονται σε θέσεις που καλύπτονται από νουκλεοσώματα προτείνοντας ότι η συγκεκριμένη χρωματινική δομή είναι προσβάσιμη σε μεταγραφικούς παράγοντες *in vivo*. Οι περισσότερες εργασίες περιγράφουν ότι είναι απαραίτητη κάποιου τύπου χρωματινική αναδιαμόρφωση για την στρατολόγηση παραγόντων στον υποκινητή και κυρίως την σταθεροποίηση της πρόσδεσης του TBP στο TATA στοιχείο. Από την άλλη, είναι γνωστά παραδείγματα ενεργοποιητών (HNF-3) που έχουν μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης σε νουκλεοσωμικό παρά σε «γυμνό» DNA (29) ενώ μία πρόσφατη εργασία δείχνει πρόσδεση του παράγοντα TBP και της RNAPol-II σε ετεροχρωματινικές περιοχές του γενώματος του σακχαρομύκητα απουσία μεταγραφής.

Το σύμπλοκο αυτό αντιπροσωπεύει μία στατική κατάσταση (poised state) στον υποκινητή που πιθανότατα τον κάνει δεκτικό στα γεγονότα που θα

ακολουθήσουν. Έτσι το επόμενο στάδιο περιλαμβάνει μία αλλαγή από ένα μη κλασσικό TFIIID (130, 194) σύμπλοκο στο οποίο δεν ανιχνεύονται TBP-associated παράγοντες ( TAFs:TBP Associated Factors) σε ένα TFIIID που περιλαμβάνει τουλάχιστον δύο TAFs, το TAFII250 και TAFII30 (3, 13) και συμπίπτει με την στρατολόγηση άλλων συστατικών του προενακτήριου συμπλόκου (TFIIH, TRAP220, TRAP100), συμπεριλαμβανομένης της RNA πολυμεράσης II. Επομένως, όπως φαίνεται τα κύρια συστατικά της γενικής μεταγραφικής μηχανής είναι σταθερά προσδεδεμένα στον υποκινητή αρκετές ημέρες πριν από την στρατολόγηση των συνενεργοποιητών, την ακετυλίωση των ιστονών, την χρωματινική αναδιαμόρφωση και την μεταγραφική έναρξη.

Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε αντίθεση με την κοινή άποψη που προέρχεται κυρίως από *in vitro* πειράματα ανασύστασης χρωματίνης τα οποία προτείνουν ότι για την δημιουργία του προενακτήριου συμπλόκου προαπαιτείται χρωματινική αναδιαμόρφωση. Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει το γεγονός ότι η στρατολόγηση CBP και P/CAF στον υποκινητή της  $\alpha 1$ -αντιτρυψίνης την ημέρα 4 δεν συνοδεύεται με άμεση αύξηση της ακετυλίωσης των νουκλεοσωμάτων στην περιοχή (ημέρα 5), γεγονός που σημαίνει είτε ότι τη χρονική αυτή στιγμή οι συγκεκριμένοι αυτοί συνενεργοποιητές δεν είναι ενζυματικά ενεργοί, είτε ότι δεν έχουν άμεση πρόσβαση στα υποστρώματά τους χωρίς να μπορεί να αποκλειστεί η περίπτωση ότι ένας άλλος παράγοντας με HAT ενζυμική ενεργότητα είναι απαραίτητος για την υπερακετυλίωση της H3 που ανιχνεύουμε την ημέρα 5.

Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει η παρατήρηση ότι η σταθερότερη πρόσδεση του hBrim στον υποκινητή την ημέρα 5.5 και 6 ακολουθεί άμεσα την υπερακετυλίωση της H3 και συμφωνεί με την ιδέα ότι υπάρχει λειτουργική σχέση μεταξύ των δύο αυτών διαδικασιών δηλαδή της ακετυλίωσης των ιστονών και της χρωματινικής αναδιαμόρφωσης (60, 185, 38) Επιπλέον, παρόλο που η υπερακετυλίωση της H3 στον υποκινητή διατηρείται σε όλη τη διάρκεια του προγράμματος της διαφοροποίησης των κυττάρων παρατηρούμε ότι ο hBrim δεν ανιχνεύεται στον υποκινητή μετά από την αναδιαμόρφωση του νουκλεοσώματος 2. Φαίνεται λοιπόν πως οι ακετυλιωμένες λυσίνες από μόνες τους δεν αρκούν για την σταθερή πρόσδεση του hBrim στο υποκινητή και πιθανότατα η διαφορετική διαμόρφωση που παίρνουν τα νουκλεοσώματα μετά την ακετυλίωση στην πραγματικότητα οδηγεί σε αποσταθεροποίηση του hBrim συμπλόκου. Η αποσταθεροποίηση αυτή υποδηλώνει ότι εκτός από την αρχική ενεργοποίηση του γονιδίου ο παράγοντας δεν είναι

απαραίτητος για τα μετέπειτα στάδια που αφορούν την μεταγραφική επανενεργοποίηση (re-initiation).

. Τα κύρια γεγονότα που λαμβάνουν χώρα τη στιγμή της έναρξης της μεταγραφής είναι η σταθερή πρόσδεση του HNF-4 και του hBm στον υποκινητή και αλλαγή της δομής του νουκλεοσώματος 2. Παρόλο που το πρότυπο της στρατολόγησης του HNF-4 στον υποκινητή συμβαδίζει με το πρότυπο έκφρασης του στη διάρκεια της διαφοροποίησης των CaCo-2 κυττάρων κάποιοι άλλοι μηχανισμοί όπως η ακετυλίωση του από CBP, που αυξάνει την συγγένεια του παράγοντα με το DNA, μπορεί να συμβάλουν στην προοδευτική αύξηση της πρόσδεσης του στον υποκινητή (175).

Το γεγονός ότι η RNA πολυμεράση που ανιχνεύεται στον υποκινητή της  $\alpha 1$ -αντιτρυψίνης πολύ πριν την έναρξη της μεταγραφής είναι ήδη φωσφορυλιωμένη στη σερίνη 5 και 2 υποδηλώνει ότι η φωσφορυλίωση της καρβοξυτελικής ουράς της πολυμεράσης (CTD) δεν αρκεί για την απελευθέρωσή της από τον υποκινητή και την έναρξη της μεταγραφικής επιμήκυνσης. Για να συμβεί αυτό απαιτείται αναδιαμόρφωση του NUC2 που δρα ως φραγμός προσδίδοντας στην νουκλεοσωμική οργάνωση του υποκινητή έναν νέο και πολύ ενδιαφέρον ρυθμιστικό ρόλο, στην αποδέσμευση της RNA πολυμεράσης II και την έναρξη της μεταγραφής.

Τέλος, ενδιαφέρον χαρακτηριστικό όλης της παραπάνω διαδικασίας είναι ο αργός ρυθμός με τον οποίο πραγματοποιείται σε σχέση τις αντίστοιχες διαδικασίες που οδηγούν σε ενεργοποίηση γονιδίων που επάγονται στην διάρκεια του κυτταρικού κύκλου ή από την παρουσία σήματος. Αυτό πιθανότατα αντικατοπτρίζει τον ιδιαίτερο χρόνο που απαιτείται για να αποκτήσουν, τα διάφορα σύμπλοκα που στρατολογούνται στον υποκινητή -και που τελικά συγκλίνουν σε ένα υπέρ-σύμπλοκο-, την ιδανική και «ώριμη» διαμόρφωση, που είναι αυτή που θα οδηγήσει σε μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή στη διάρκεια της κυτταρικής διαφοροποίησης.

## Επίλογος

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε ο μηχανισμός με τον οποίο ενεργοποιούν την μεταγραφή οι ηπατοειδικοί παράγοντες HNF-4 και HNF-1. Το τρίτο κομμάτι της εργασίας που αφορά την μελέτη της σειράς στρατολόγησης των ρυθμιστικών παραγόντων στον υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιτρυψίνης αποκαλύπτει σημαντικά στοιχεία για την δράση των ενεργοποιητών αυτών στην επαγωγή ενός φυσικού-γονιδίου στόχου τους.

Αρχικά φαίνεται πως και οι δύο ενεργοποιητές έχουν την ικανότητα να προσδένονται σε νουκλεοσωμικό DNA τουλάχιστον στα πλαίσια του συγκεκριμένου υποκινητή. Στο σύστημα αυτό φαίνεται επίσης πως για την πρόσδεση των ενεργοποιητών στον υποκινητή δεν προαπαιτείται η στρατολόγηση παραγόντων που αναδιαμορφώνουν την χρωματίνη. Αναδιαμόρφωση της χρωματίνης δεν φαίνεται να απαιτείται για την στρατολόγηση της γενικής μεταγραφικής μηχανής, του συμπλόκου του μεσολαβητών και της RNA πολυμεράσης II.

Η στρατολόγηση των συνενεργοποιητών CBP και P/CAF παρατηρείται την ημέρα 4 της διαφοροποίησης που συμπίπτει με την σταθερότερη πρόσδεση του HNF-4 στον υποκινητή. Πιθανότατα, ο παράγοντας HNF-4 στρατολογεί την ακετυλοτρανσφεράση CBP στον υποκινητή και ακετυλιώνεται από αυτή γεγονός που συμβάλει όπως αποδείχθηκε στο πρώτο μέρος της εργασίας στην σταθερότερη πρόσδεσή του στο DNA και στον ίδιο τον συνενεργοποιητή και στην συγκράτησή του στον πυρήνα του κυττάρου. Ο ίδιος όμως συνενεργοποιητής αλληλεπιδρά και με τον ενεργοποιητή HNF-1 και πιθανά η αλληλεπίδραση αυτή συμβάλει στην ταυτόχρονη στρατολόγηση του P/CAF αφού όπως δείχθηκε στο δεύτερο μέρος της εργασίας η πρόσδεση του CBP στο αμινοτελικό άκρο του HNF-1 αυξάνει την συγγένεια πρόσδεσης του P/CAF για το καρβοξυτελικό.

Και οι δύο συνενεργοποιητές βρίσκονται στον υποκινητή από την ημέρα 4 της διαφοροποίησης. Δεν φαίνονται όμως να είναι ενζυματικά ενεργοί τουλάχιστον ως προς τις ιστόνες. Η υπερακετυλίωση της ιστόνης H3 παρατηρείται μία μέρα αργότερα γεγονός που σημαίνει πως την ημέρα 4 η διαμόρφωση των δύο συνενεργοποιητών δεν είναι κατάλληλη και πιθανότατα η αλληλεπίδραση τους με τους ίδιους τους ενεργοποιητές όπως φαίνεται και στο δεύτερο κομμάτι της εργασίας είναι αυτή που τους προσδίδει την κατάλληλη διαμόρφωση και επομένως την ενζυμική ενεργότητα.

Η παροδική στρατολόγηση του παράγοντα hBtm και η αναδιαμόρφωση του νουκλεοσώματος που καλύπτει το σημείο έναρξης της μεταγραφής συμπίπτει με την χρονική στιγμή της ενεργοποίησης του γονιδίου της  $\alpha 1$ -αντιτρυψίνης. Δεν είναι γνωστό αν ο παράγοντας αυτός αλληλεπιδρά με κάποιον ή και τους δύο ενεργοποιητές του γονιδίου είτε στρατολογείται από τον συνενεργοποιητή CBP που είναι γνωστό από την βιβλιογραφία ότι αλληλεπιδρά.

Ο ρόλος των ενεργοποιητών HNF-4 και HNF-1 στην ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου της  $\alpha 1$ -αντιτρυψίνης είναι διαφορετικός από τον μέχρι τώρα προτεινόμενο. Στον υποκινητή του HO γονιδίου στον σακχαρομύκητα ο ενεργοποιητής Swi5 στρατολογεί το σύμπλοκο αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης SWI/SNF, διαδικασία απαραίτητη για την περαιτέρω στρατολόγηση του δεύτερου ενεργοποιητή SBF ο οποίος είναι υπεύθυνος για την στρατολόγηση του συνενεργοποιητή GCN5 που έχει HAT ενζυμική ενεργότητα. Και τα δύο παραπάνω γεγονότα οδηγούν τελικά στην στρατολόγηση της γενικής μεταγραφικής μηχανής και της RNA pol II που είναι το κρίσιμο και τελικό στάδιο για την μεταγραφική έναρξη. Στην περίπτωση του υποκινητή του γονιδίου της  $\alpha 1$ -αντιτρυψίνης το προενακτήριο σύμπλοκο που περιλαμβάνει και τους ενεργοποιητές και την γενική μεταγραφική μηχανή συγκροτείται ανεξάρτητα από την χρωματινική αναδιαμόρφωση και επομένως οι ενεργοποιητές στη περίπτωση αυτή στρατολογούν τους συνενεργοποιητές όχι για να γίνει ο υποκινητής πιο προσβάσιμος σε συστατικά του προενακτηρίου συμπλόκου αλλά για να προκληθεί αναδιαμόρφωση του νουκλεοσώματος που καλύπτει το σημείο έναρξης της μεταγραφής που οδηγεί σε μεταγραφική έναρξη.

Το ερώτημα που εύλογα τίθεται στο σημείο αυτό είναι αν ο μηχανισμός μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου της  $\alpha 1$ -αντιτρυψίνης είναι γενικός ή χαρακτηρίζει μόνο το συγκεκριμένο γονίδιο, είτε γονίδια που εξαρτώνται από τους ενεργοποιητές HNF-4 και HNF-1. Θα ήταν λοιπόν πολύ ενδιαφέρον να μελετηθούν πολλά διαφορετικά φυσικά γονίδια-στόχοι των παραπάνω ενεργοποιητών στον ίδιο ή και σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους στους οποίους πιθανά η έκφραση/αναλογία των ρυθμιστικών παραγόντων πχ. των συνενεργοποιητών είναι διαφορετική. Η μελέτη μηχανισμού ρύθμισης γονιδίων που η έκφρασή τους δεν εξαρτάται από τους παραπάνω ενεργοποιητές θα αποδείξει επίσης αν πρόκειται για έναν γενικευμένο μηχανισμό μεταγραφικής ρύθμισης που χαρακτηρίζει μία μερίδα υποκινητών.





## **BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. 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, **103**:667-678.
2. Ait-Si-Ali S, Ramirez S, Barre FX, Dkhissi F, Magnaghi-Jaulin L, Girault JA, Robin P, Knibiehler M, Pritchard LL, Ducommun B, et al.: **Histone acetyltransferase activity of CBP is controlled by cycle- dependent kinases and oncoprotein E1A.** *Nature* 1998, **396**:184-186.
3. Albright SR, Tjian R: **TAFs revisited: more data reveal new twists and confirm old ideas.** *Gene* 2000, **242**:1-13.
4. Arany Z, Newsome D, Oldread E, Livingston DM, Eckner R: **A family of transcriptional adaptor proteins targeted by the E1A oncoprotein.** *Nature* 1995, **374**:81-84.
5. Archer TK, Lefebvre P, Wolford RG, Hager GL: **Transcription factor loading on the MMTV promoter: a bimodal mechanism for promoter activation.** *Science* 1992, **255**:1573-1576.
6. Bach I, Mattei MG, Cereghini S, Yaniv M: **Two members of an HNF1 homeoprotein family are expressed in human liver.** *Nucleic Acids Res* 1991, **19**:3553-3559.
7. Bannister AJ, Kouzarides T: **The CBP co-activator is a histone acetyltransferase.** *Nature* 1996, **384**:641-643.
8. Bannister AJ, Miska EA, Gorlich D, Kouzarides T: **Acetylation of importin-alpha nuclear import factors by CBP/p300.** *Curr Biol* 2000, **10**:467-470.
9. Bannister AJ, Oehler T, Wilhelm D, Angel P, Kouzarides T: **Stimulation of c-Jun activity by CBP: c-Jun residues Ser63/73 are required for CBP induced stimulation in vivo and CBP binding in vitro.** *Oncogene* 1995, **11**:2509-2514.
10. Barbacci E, Reber M, Ott MO, Breillat C, Huetz F, Cereghini S: **Variant hepatocyte nuclear factor 1 is required for visceral endoderm specification.** *Development* 1999, **126**:4795-4805.
11. Barlev NA, Poltoratsky V, Owen-Hughes T, Ying C, Liu L, Workman JL, Berger SL: **Repression of GCN5 histone acetyltransferase activity via bromodomain- mediated binding and phosphorylation by the Ku-DNA-dependent protein kinase complex.** *Mol Cell Biol* 1998, **18**:1349-1358.
12. Baumhueter S, Mendel DB, Conley PB, Kuo CJ, Turk C, Graves MK, Edwards CA, Courtois G, Crabtree GR: **HNF-1 shares three sequence motifs with the POU domain proteins and is identical to LF-B1 and APF.** *Genes Dev* 1990, **4**:372-379.
13. Bell B, Tora L: **Regulation of gene expression by multiple forms of TFIID and other novel TAFII-containing complexes.** *Exp Cell Res* 1999, **246**:11-19.
14. Bogan AA, Dallas-Yang Q, Ruse MD, Jr., Maeda Y, Jiang G, Nepomuceno L, Scanlan TS, Cohen FE, Sladek FM: **Analysis of protein dimerization and ligand binding of orphan receptor HNF4alpha.** *J Mol Biol* 2000, **302**:831-851.
15. Boyes J, Byfield P, Nakatani Y, Ogryzko V: **Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation.** *Nature* 1998, **396**:594-598.
16. Brand M, Yamamoto K, Staub A, Tora L: **Identification of TATA-binding protein-free TAFII-containing complex subunits suggests a role in**

- nucleosome acetylation and signal transduction.** *J Biol Chem* 1999, **274**:18285-18289.
17. Brownell JE, Zhou J, Ranalli T, Kobayashi R, Edmondson DG, Roth SY, Allis CD: **Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation.** *Cell* 1996, **84**:843-851.
  18. Cairns BR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Winston F, Kornberg RD: **Two actin-related proteins are shared functional components of the chromatin-remodeling complexes RSC and SWI/SNF.** *Mol Cell* 1998, **2**:639-651.
  19. Cairns BR, Lorch Y, Li Y, Zhang M, Lacomis L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Du J, Laurent B, Kornberg RD: **RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex.** *Cell* 1996, **87**:1249-1260.
  20. Cereghini S: **Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation.** *Faseb J* 1996, **10**:267-282.
  21. Cereghini S, Ott MO, Power S, Maury M: **Expression patterns of vHNF1 and HNF1 homeoproteins in early postimplantation embryos suggest distinct and sequential developmental roles.** *Development* 1992, **116**:783-797.
  22. Chakravarti D, Ogryzko V, Kao HY, Nash A, Chen H, Nakatani Y, Evans RM: **A viral mechanism for inhibition of p300 and PCAF acetyltransferase activity.** *Cell* 1999, **96**:393-403.
  23. Chen D, Ma H, Hong H, Koh SS, Huang SM, Schurter BT, Aswad DW, Stallcup MR: **Regulation of transcription by a protein methyltransferase.** *Science* 1999, **284**:2174-2177.
  24. Chen H, Lin RJ, Schiltz RL, Chakravarti D, Nash A, Nagy L, Privalsky ML, Nakatani Y, Evans RM: **Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300.** *Cell* 1997, **90**:569-580.
  25. Chen H, Lin RJ, Xie W, Wilpitz D, Evans RM: **Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase.** *Cell* 1999, **98**:675-686.
  26. Chen H, Tini M, Evans RM: **HATs on and beyond chromatin.** *Curr Opin Cell Biol* 2001, **13**:218-224.
  27. Chen L, Fischle W, Verdin E, Greene WC: **Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation.** *Science* 2001, **293**:1653-1657.
  28. Chen WS, Manova K, Weinstein DC, Duncan SA, Plump AS, Prezioso VR, Bachvarova RF, Darnell JE, Jr.: **Disruption of the HNF-4 gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos.** *Genes Dev* 1994, **8**:2466-2477.
  29. Cirillo LA, Zaret KS: **An early developmental transcription factor complex that is more stable on nucleosome core particles than on free DNA.** *Mol Cell* 1999, **4**:961-969.
  30. Coffinier C, Thepot D, Babinet C, Yaniv M, Barra J: **Essential role for the homeoprotein vHNF1/HNF1beta in visceral endoderm differentiation.** *Development* 1999, **126**:4785-4794.
  31. Cosma MP, Tanaka T, Nasmyth K: **Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter.** *Cell* 1999, **97**:299-311.
  32. Cote J, Quinn J, Workman JL, Peterson CL: **Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex.** *Science* 1994, **265**:53-60.

33. Dahmus ME: **Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II.** *J Biol Chem* 1996, **271**:19009-19012.
34. Dai P, Akimaru H, Tanaka Y, Hou DX, Yasukawa T, Kanei-Ishii C, Takahashi T, Ishii S: **CBP as a transcriptional coactivator of c-Myb.** *Genes Dev* 1996, **10**:528-540.
35. Dantanel JC, Quintin S, Lakatos L, Labouesse M, Tora L: **TBP-like factor is required for embryonic RNA polymerase II transcription in C. elegans.** *Mol Cell* 2000, **6**:715-722.
36. De Cesare D, Jacquot S, Hanauer A, Sassone-Corsi P: **Rsk-2 activity is necessary for epidermal growth factor-induced phosphorylation of CREB protein and transcription of c-fos gene.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:12202-12207.
37. Dell H, Hadzopoulou-Cladaras M: **CREB-binding protein is a transcriptional coactivator for hepatocyte nuclear factor-4 and enhances apolipoprotein gene expression.** *J Biol Chem* 1999, **274**:9013-9021.
38. Dilworth FJ, Fromental-Ramain C, Yamamoto K, Chambon P: **ATP-Driven chromatin remodeling activity and histone acetyltransferases act sequentially during transactivation by RAR/RXR In vitro.** *Mol Cell* 2000, **6**:1049-1058.
39. Duncan SA: **Transcriptional regulation of liver development.** *Dev Dyn* 2000, **219**:131-142.
40. Duncan SA, Navas MA, Dufort D, Rossant J, Stoffel M: **Regulation of a transcription factor network required for differentiation and metabolism.** *Science* 1998, **281**:692-695.
41. Durrin LK, Mann RK, Grunstein M: **Nucleosome loss activates CUP1 and HIS3 promoters to fully induced levels in the yeast Saccharomyces cerevisiae.** *Mol Cell Biol* 1992, **12**:1621-1629.
42. Feaver WJ, Gileadi O, Li Y, Kornberg RD: **CTD kinase associated with yeast RNA polymerase II initiation factor b.** *Cell* 1991, **67**:1223-1230.
43. Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, Mattaj JW: **CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals.** *Cell* 1997, **90**:1051-1060.
44. Fraire M, Swart G, Monaci P, Nicosia A, Stampfli S, Frank R, Cortese R: **The liver-specific transcription factor LF-B1 contains a highly diverged homeobox DNA binding domain.** *Cell* 1989, **59**:145-157.
45. Frayling TM, Bulamn MP, Ellard S, Appleton M, Dronsfield MJ, Mackie AD, Baird JD, Kaisaki PJ, Yamagata K, Bell GI, et al.: **Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene are a common cause of maturity-onset diabetes of the young in the U.K.** *Diabetes* 1997, **46**:720-725.
46. Fry CJ, Peterson CL: **Chromatin remodeling enzymes: who's on first?** *Curr Biol* 2001, **11**:R185-197.
47. Garber ME, Jones KA: **HIV-1 Tat: coping with negative elongation factors.** *Curr Opin Immunol* 1999, **11**:460-465.
48. Garcia-Ramirez M, Rocchini C, Ausio J: **Modulation of chromatin folding by histone acetylation.** *J Biol Chem* 1995, **270**:17923-17928.
49. Glucksmann MA, Lehto M, Tayber O, Scotti S, Berkemeier L, Pulido JC, Wu Y, Nir WJ, Fang L, Markel P, et al.: **Novel mutations and a mutational hotspot in the MODY3 gene.** *Diabetes* 1997, **46**:1081-1086.
50. Grant PA, Duggan L, Cote J, Roberts SM, Brownell JE, Candau R, Ohba R, Owen-Hughes T, Allis CD, Winston F, et al.: **Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones:**

- characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex.** *Genes Dev* 1997, **11**:1640-1650.
51. Green VJ, Kokkotou E, Ladias JA: **Critical structural elements and multitarget protein interactions of the transcriptional activator AF-1 of hepatocyte nuclear factor 4.** *J Biol Chem* 1998, **273**:29950-29957.
  52. Grunstein M: **Histone acetylation in chromatin structure and transcription.** *Nature* 1997, **389**:349-352.
  53. Gu W, Malik S, Ito M, Yuan CX, Fondell JD, Zhang X, Martinez E, Qin J, Roeder RG: **A novel human SRB/MED-containing cofactor complex, SMCC, involved in transcription regulation.** *Mol Cell* 1999, **3**:97-108.
  54. Gu W, Roeder RG: **Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain.** *Cell* 1997, **90**:595-606.
  55. Hadzopoulou-Cladaras M, Kistanova E, Evagelopoulou C, Zeng S, Cladaras C, Ladias JA: **Functional domains of the nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4.** *J Biol Chem* 1997, **272**:539-550.
  56. Hagenfeldt-Johansson KA, Herrera PL, Wang H, Gjinovci A, Ishihara H, Wollheim CB: **beta-Cell-Targeted Expression of a Dominant-Negative Hepatocyte Nuclear Factor-1alpha Induces a Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY)3- Like Phenotype in Transgenic Mice.** *Endocrinology* 2001, **142**:5311-5320.
  57. Hamamori Y, Sartorelli V, Ogryzko V, Puri PL, Wu HY, Wang JY, Nakatani Y, Kedes L: **Regulation of histone acetyltransferases p300 and PCAF by the bHLH protein twist and adenoviral oncoprotein E1A.** *Cell* 1999, **96**:405-413.
  58. Hamiche A, Sandaltzopoulos R, Gdula DA, Wu C: **ATP-dependent histone octamer sliding mediated by the chromatin remodeling complex NURF.** *Cell* 1999, **97**:833-842.
  59. Hansen T, Eiberg H, Rouard M, Vaxillaire M, Moller AM, Rasmussen SK, Fridberg M, Urhammer SA, Holst JJ, Almind K, et al.: **Novel MODY3 mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene: evidence for a hyperexcitability of pancreatic beta-cells to intravenous secretagogues in a glucose-tolerant carrier of a P447L mutation.** *Diabetes* 1997, **46**:726-730.
  60. Hassan AH, Neely KE, Workman JL: **Histone acetyltransferase complexes stabilize swi/snf binding to promoter nucleosomes.** *Cell* 2001, **104**:817-827.
  61. Hatzis P, Talianidis I: **Regulatory mechanisms controlling human hepatocyte nuclear factor 4alpha gene expression.** *Mol Cell Biol* 2001, **21**:7320-7330.
  62. Hayhurst GP, Lee YH, Lambert G, Ward JM, Gonzalez FJ: **Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis.** *Mol Cell Biol* 2001, **21**:1393-1403.
  63. Hebbes TR, Clayton AL, Thorne AW, Crane-Robinson C: **Core histone hyperacetylation co-maps with generalized DNase I sensitivity in the chicken beta-globin chromosomal domain.** *Embo J* 1994, **13**:1823-1830.
  64. Hebbes TR, Thorne AW, Crane-Robinson C: **A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin.** *Embo J* 1988, **7**:1395-1402.
  65. Hengartner CJ, Myer VE, Liao SM, Wilson CJ, Koh SS, Young RA: **Temporal regulation of RNA polymerase II by Srb10 and Kin28 cyclin- dependent kinases.** *Mol Cell* 1998, **2**:43-53.

66. Hertz R, Magenheim J, Berman I, Bar-Tana J: **Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4alpha**. *Nature* 1998, **392**:512-516.
67. Holstege FC, Jennings EG, Wyrick JJ, Lee TI, Hengartner CJ, Green MR, Golub TR, Lander ES, Young RA: **Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome**. *Cell* 1998, **95**:717-728.
68. Hood JK, Silver PA: **In or out? Regulating nuclear transport**. *Curr Opin Cell Biol* 1999, **11**:241-247.
69. Hu C, Perlmutter DH: **Regulation of alpha1-antitrypsin gene expression in human intestinal epithelial cell line caco-2 by HNF-1alpha and HNF-4**. *Am J Physiol* 1999, **276**:G1181-1194.
70. Hung HL, Lau J, Kim AY, Weiss MJ, Blobel GA: **CREB-Binding protein acetylates hematopoietic transcription factor GATA- 1 at functionally important sites**. *Mol Cell Biol* 1999, **19**:3496-3505.
71. Imbalzano AN, Kwon H, Green MR, Kingston RE: **Facilitated binding of TATA-binding protein to nucleosomal DNA**. *Nature* 1994, **370**:481-485.
72. Imhof A, Yang XJ, Ogryzko VV, Nakatani Y, Wolffe AP, Ge H: **Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases**. *Curr Biol* 1997, **7**:689-692.
73. Ito M, Yuan CX, Malik S, Gu W, Fondell JD, Yamamura S, Fu ZY, Zhang X, Qin J, Roeder RG: **Identity between TRAP and SMCC complexes indicates novel pathways for the function of nuclear receptors and diverse mammalian activators**. *Mol Cell* 1999, **3**:361-370.
74. Jacobson RH, Ladurner AG, King DS, Tjian R: **Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module**. *Science* 2000, **288**:1422-1425.
75. Jacquemin P, Durviaux SM, Jensen J, Godfraind C, Gradwohl G, Guillemot F, Madsen OD, Carmeliet P, Dewerchin M, Collen D, et al.: **Transcription factor hepatocyte nuclear factor 6 regulates pancreatic endocrine cell differentiation and controls expression of the proendocrine gene ngn3**. *Mol Cell Biol* 2000, **20**:4445-4454.
76. Janknecht R, Hunter T: **Transcription. A growing coactivator network**. *Nature* 1996, **383**:22-23.
77. Jenster G, Spencer TE, Burcin MM, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW: **Steroid receptor induction of gene transcription: a two-step model**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**:7879-7884.
78. Jiang G, Nepomuceno L, Hopkins K, Sladek FM: **Exclusive homodimerization of the orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4 defines a new subclass of nuclear receptors**. *Mol Cell Biol* 1995, **15**:5131-5143.
79. Jiang YW, Veschambre P, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Conaway JW, Conaway RC, Kornberg RD: **Mammalian mediator of transcriptional regulation and its possible role as an end-point of signal transduction pathways**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:8538-8543.
80. Johnen G, Kaufman S: **Studies on the enzymatic and transcriptional activity of the dimerization cofactor for hepatocyte nuclear factor 1**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**:13469-13474.
81. Johnson PF, Landschulz WH, Graves BJ, McKnight SL: **Identification of a rat liver nuclear protein that binds to the enhancer core element of three animal viruses**. *Genes Dev* 1987, **1**:133-146.

82. Jung J, Zheng M, Goldfarb M, Zaret KS: **Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors.** *Science* 1999, **284**:1998-2003.
83. Kaestner KH, Katz J, Liu Y, Drucker DJ, Schutz G: **Inactivation of the winged helix transcription factor HNF3alpha affects glucose homeostasis and islet glucagon gene expression in vivo.** *Genes Dev* 1999, **13**:495-504.
84. Kamei Y, Xu L, Heinzl T, Torchia J, Kurokawa R, Gloss B, Lin SC, Heyman RA, Rose DW, Glass CK, et al.: **A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors.** *Cell* 1996, **85**:403-414.
85. Kingston RE, Narlikar GJ: **ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity.** *Genes Dev* 1999, **13**:2339-2352.
86. Knezetic JA, Jacob GA, Luse DS: **Assembly of RNA polymerase II preinitiation complexes before assembly of nucleosomes allows efficient initiation of transcription on nucleosomal templates.** *Mol Cell Biol* 1988, **8**:3114-3121.
87. Koleske AJ, Young RA: **An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators.** *Nature* 1994, **368**:466-469.
88. Kornberg RD, Lorch Y: **Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome.** *Cell* 1999, **98**:285-294.
89. Korzus E, Torchia J, Rose DW, Xu L, Kurokawa R, McInerney EM, Mullen TM, Glass CK, Rosenfeld MG: **Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions.** *Science* 1998, **279**:703-707.
90. Ktistaki E, Ktistakis NT, Papadogeorgaki E, Talianidis I: **Recruitment of hepatocyte nuclear factor 4 into specific intranuclear compartments depends on tyrosine phosphorylation that affects its DNA- binding and transactivation potential.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**:9876-9880.
91. Ktistaki E, Talianidis I: **Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factors act as auxiliary cofactors for hepatocyte nuclear factor 4 and enhance hepatic gene expression.** *Mol Cell Biol* 1997, **17**:2790-2797.
92. Ktistaki E, Talianidis I: **Modulation of hepatic gene expression by hepatocyte nuclear factor 1.** *Science* 1997, **277**:109-112.
93. Kuo CJ, Conley PB, Chen L, Sladek FM, Darnell JE, Jr., Crabtree GR: **A transcriptional hierarchy involved in mammalian cell-type specification.** *Nature* 1992, **355**:457-461.
94. Kuo MH, Brownell JE, Sobel RE, Ranalli TA, Cook RG, Edmondson DG, Roth SY, Allis CD: **Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines.** *Nature* 1996, **383**:269-272.
95. Kuo MH, Zhou J, Jambeck P, Churchill ME, Allis CD: **Histone acetyltransferase activity of yeast Gcn5p is required for the activation of target genes in vivo.** *Genes Dev* 1998, **12**:627-639.
96. Kurokawa R, Kalafus D, Ogliaastro MH, Kioussi C, Xu L, Torchia J, Rosenfeld MG, Glass CK: **Differential use of CREB binding protein-coactivator complexes.** *Science* 1998, **279**:700-703.
97. Lai E, Prezioso VR, Tao WF, Chen WS, Darnell JE, Jr.: **Hepatocyte nuclear factor 3 alpha belongs to a gene family in mammals that is homologous to the Drosophila homeotic gene fork head.** *Genes Dev* 1991, **5**:416-427.

98. Langst G, Bonte EJ, Corona DF, Becker PB: **Nucleosome movement by CHRAC and ISWI without disruption or trans- displacement of the histone octamer.** *Cell* 1999, **97**:843-852.
99. Lannoy VJ, Rodolosse A, Pierreux CE, Rousseau GG, Lemaigre FP: **Transcriptional stimulation by hepatocyte nuclear factor-6. Target-specific recruitment of either CREB-binding protein (CBP) or p300/CBP-associated factor (p/CAF).** *J Biol Chem* 2000, **275**:22098-22103.
100. Laurent BC, Treich I, Carlson M: **The yeast SNF2/SWI2 protein has DNA-stimulated ATPase activity required for transcriptional activation.** *Genes Dev* 1993, **7**:583-591.
101. Lee TI, Young RA: **Transcription of eukaryotic protein-coding genes.** *Annu Rev Genet* 2000, **34**:77-137.
102. Lee YH, Sauer B, Gonzalez FJ: **Laron dwarfism and non-insulin-dependent diabetes mellitus in the Hnf- 1alpha knockout mouse.** *Mol Cell Biol* 1998, **18**:3059-3068.
103. Lemon B, Tjian R: **Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control.** *Genes Dev* 2000, **14**:2551-2569.
104. Leo C, Chen JD: **The SRC family of nuclear receptor coactivators.** *Gene* 2000, **245**:1-11.
105. Li H, Chen JD: **The receptor-associated coactivator 3 activates transcription through CREB-binding protein recruitment and autoregulation.** *J Biol Chem* 1998, **273**:5948-5954.
106. Li J, Ning G, Duncan SA: **Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4alpha.** *Genes Dev* 2000, **14**:464-474.
107. Li M, Damania B, Alvarez X, Ogryzko V, Ozato K, Jung JU: **Inhibition of p300 histone acetyltransferase by viral interferon regulatory factor.** *Mol Cell Biol* 2000, **20**:8254-8263.
108. Li Q, Herrler M, Landsberger N, Kaludov N, Ogryzko VV, Nakatani Y, Wolffe AP: **Xenopus NF-Y pre-sets chromatin to potentiate p300 and acetylation-responsive transcription from the Xenopus hsp70 promoter in vivo.** *Embo J* 1998, **17**:6300-6315.
109. Li Q, Imhof A, Collingwood TN, Urnov FD, Wolffe AP: **p300 stimulates transcription instigated by ligand-bound thyroid hormone receptor at a step subsequent to chromatin disruption.** *Embo J* 1999, **18**:5634-5652.
110. Liao SM, Zhang J, Jeffery DA, Koleske AJ, Thompson CM, Chao DM, Viljoen M, van Vuuren HJ, Young RA: **A kinase-cyclin pair in the RNA polymerase II holoenzyme.** *Nature* 1995, **374**:193-196.
111. Lorch Y, Cairns BR, Zhang M, Kornberg RD: **Activated RSC-nucleosome complex and persistently altered form of the nucleosome.** *Cell* 1998, **94**:29-34.
112. Lu H, Zawal L, Fisher L, Egly JM, Reinberg D: **Human general transcription factor IIIH phosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II.** *Nature* 1992, **358**:641-645.
113. Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ: **Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution.** *Nature* 1997, **389**:251-260.
114. Luger K, Rechsteiner TJ, Flaus AJ, Wayne MM, Richmond TJ: **Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria.** *J Mol Biol* 1997, **272**:301-311.

115. Luger K, Richmond TJ: **The histone tails of the nucleosome.** *Curr Opin Genet Dev* 1998, **8**:140-146.
116. Lundblad JR, Kwok RP, Lurance ME, Harter ML, Goodman RH: **Adenoviral E1A-associated protein p300 as a functional homologue of the transcriptional co-activator CBP.** *Nature* 1995, **374**:85-88.
117. MacRae TH: **Tubulin post-translational modifications--enzymes and their mechanisms of action.** *Eur J Biochem* 1997, **244**:265-278.
118. Makela TP, Parvin JD, Kim J, Huber LJ, Sharp PA, Weinberg RA: **A kinase-deficient transcription factor TFIIF is functional in basal and activated transcription.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**:5174-5178.
119. Maldonado E, Shiekhattar R, Sheldon M, Cho H, Drapkin R, Rickert P, Lees E, Anderson CW, Linn S, Reinberg D: **A human RNA polymerase II complex associated with SRB and DNA-repair proteins.** *Nature* 1996, **381**:86-89.
120. Malik S, Karathanasis S: **Transcriptional activation by the orphan nuclear receptor ARP-1.** *Nucleic Acids Res* 1995, **23**:1536-1543.
121. Malik S, Karathanasis SK: **TFIIB-directed transcriptional activation by the orphan nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4.** *Mol Cell Biol* 1996, **16**:1824-1831.
122. Marshall NF, Price DH: **Control of formation of two distinct classes of RNA polymerase II elongation complexes.** *Mol Cell Biol* 1992, **12**:2078-2090.
123. Martinez E, Kundu TK, Fu J, Roeder RG: **A human SPT3-TAFII31-GCN5-L acetylase complex distinct from transcription factor IID.** *J Biol Chem* 1998, **273**:23781-23785.
124. Martinez-Balbas MA, Bannister AJ, Martin K, Haus-Seuffert P, Meisterernst M, Kouzarides T: **The acetyltransferase activity of CBP stimulates transcription.** *Embo J* 1998, **17**:2886-2893.
125. Martinez-Balbas MA, Bauer UM, Nielsen SJ, Brehm A, Kouzarides T: **Regulation of E2F1 activity by acetylation.** *Embo J* 2000, **19**:662-671.
126. McPherson CE, Shim EY, Friedman DS, Zaret KS: **An active tissue-specific enhancer and bound transcription factors existing in a precisely positioned nucleosomal array.** *Cell* 1993, **75**:387-398.
127. Mendel DB, Hansen LP, Graves MK, Conley PB, Crabtree GR: **HNF-1 alpha and HNF-1 beta (vHNF-1) share dimerization and homeo domains, but not activation domains, and form heterodimers in vitro.** *Genes Dev* 1991, **5**:1042-1056.
128. Mendel DB, Khavari PA, Conley PB, Graves MK, Hansen LP, Admon A, Crabtree GR: **Characterization of a cofactor that regulates dimerization of a mammalian homeodomain protein.** *Science* 1991, **254**:1762-1767.
129. Mietus-Snyder M, Sladek FM, Ginsburg GS, Kuo CF, Ladias JA, Darnell JE, Jr., Karathanasis SK: **Antagonism between apolipoprotein AI regulatory protein 1, Ear3/COUP- TF, and hepatocyte nuclear factor 4 modulates apolipoprotein CIII gene expression in liver and intestinal cells.** *Mol Cell Biol* 1992, **12**:1708-1718.
130. Mitsiou DJ, Stunnenberg HG: **TAC, a TBP-sans-TAFs complex containing the unprocessed TFIIAalpha precursor and the TFIAGamma subunit.** *Mol Cell* 2000, **6**:527-537.
131. Monaci P, Nicosia A, Cortese R: **Two different liver-specific factors stimulate in vitro transcription from the human alpha 1-antitrypsin promoter.** *Embo J* 1988, **7**:2075-2087.



132. Muchardt C, Yaniv M: **A human homologue of *Saccharomyces cerevisiae* SNF2/SWI2 and *Drosophila* brm genes potentiates transcriptional activation by the glucocorticoid receptor.** *Embo J* 1993, **12**:4279-4290.
133. Muller C, Leutz A: **Chromatin remodeling in development and differentiation.** *Curr Opin Genet Dev* 2001, **11**:167-174.
134. Munshi N, Agaloti T, Lomvardas S, Merika M, Chen G, Thanos D: **Coordination of a transcriptional switch by HMG I(Y) acetylation.** *Science* 2001, **293**:1133-1136.
135. Munshi N, Merika M, Yie J, Senger K, Chen G, Thanos D: **Acetylation of HMG I(Y) by CBP turns off IFN beta expression by disrupting the enhanceosome.** *Mol Cell* 1998, **2**:457-467.
136. Myers LC, Gustafsson CM, Bushnell DA, Lui M, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Kornberg RD: **The Med proteins of yeast and their function through the RNA polymerase II carboxy-terminal domain.** *Genes Dev* 1998, **12**:45-54.
137. Naar AM, Beurang PA, Zhou S, Abraham S, Solomon W, Tjian R: **Composite co-activator ARC mediates chromatin-directed transcriptional activation.** *Nature* 1999, **398**:828-832.
138. Naar AM, Lemon BD, Tjian R: **Transcriptional Coactivator Complexes.** *Annu Rev Biochem* 2001, **70**:475-501.
139. Ogryzko VV, Kotani T, Zhang X, Schiltz RL, Howard T, Yang XJ, Howard BH, Qin J, Nakatani Y: **Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex.** *Cell* 1998, **94**:35-44.
140. Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y: **The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases.** *Cell* 1996, **87**:953-959.
141. Okabe I, Bailey LC, Attree O, Srinivasan S, Perkel JM, Laurent BC, Carlson M, Nelson DL, Nussbaum RL: **Cloning of human and bovine homologs of SNF2/SWI2: a global activator of transcription in yeast *S. cerevisiae*.** *Nucleic Acids Res* 1992, **20**:4649-4655.
142. Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW: **Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily.** *Science* 1995, **270**:1354-1357.
143. Owen-Hughes T, Workman JL: **Remodeling the chromatin structure of a nucleosome array by transcription factor-targeted trans-displacement of histones.** *Embo J* 1996, **15**:4702-4712.
144. Papoulas O, Beek SJ, Moseley SL, McCallum CM, Sarte M, Shearn A, Tamkun JW: **The *Drosophila* trithorax group proteins BRM, ASH1 and ASH2 are subunits of distinct protein complexes.** *Development* 1998, **125**:3955-3966.
145. Peng J, Marshall NF, Price DH: **Identification of a cyclin subunit required for the function of *Drosophila* P-TEFb.** *J Biol Chem* 1998, **273**:13855-13860.
146. Perissi V, Dasen JS, Kurokawa R, Wang Z, Korzus E, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG: **Factor-specific modulation of CREB-binding protein acetyltransferase activity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:3652-3657.
147. Perlmutter DH, Daniels JD, Auerbach HS, De Schryver-Kecskeneti K, Winter HS, Alpers DH: **The alpha 1-antitrypsin gene is expressed in a human intestinal epithelial cell line.** *J Biol Chem* 1989, **264**:9485-9490.
148. Peterson CL, Workman JL: **Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex.** *Curr Opin Genet Dev* 2000, **10**:187-192.

149. Peterson MD, Mooseker MS: **Characterization of the enterocyte-like brush border cytoskeleton of the C2BBE clones of the human intestinal cell line, Caco-2.** *J Cell Sci* 1992, **102**:581-600.
150. Pontoglio M, Barra J, Hadchouel M, Doyen A, Kress C, Bach JP, Babinet C, Yaniv M: **Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal Fanconi syndrome.** *Cell* 1996, **84**:575-585.
151. Pontoglio M, Faust DM, Doyen A, Yaniv M, Weiss MC: **Hepatocyte nuclear factor 1alpha gene inactivation impairs chromatin remodeling and demethylation of the phenylalanine hydroxylase gene.** *Mol Cell Biol* 1997, **17**:4948-4956.
152. Pontoglio M, Prie D, Cheret C, Doyen A, Leroy C, Froguel P, Velho G, Yaniv M, Friedlander G: **HNF1alpha controls renal glucose reabsorption in mouse and man.** *EMBO Rep* 2000, **1**:359-365.
153. Pontoglio M, Sreenan S, Roe M, Pugh W, Ostrega D, Doyen A, Pick AJ, Baldwin A, Velho G, Froguel P, et al.: **Defective insulin secretion in hepatocyte nuclear factor 1alpha- deficient mice.** *J Clin Invest* 1998, **101**:2215-2222.
154. Ptashne M, Gann A: **Imposing specificity by localization: mechanism and evolvability.** *Curr Biol* 1998, **8**:R812-822.
155. Puigserver P, Adelmant G, Wu Z, Fan M, Xu J, O'Malley B, Spiegelman BM: **Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking.** *Science* 1999, **286**:1368-1371.
156. Puri PL, Sartorelli V, Yang XJ, Hamamori Y, Ogryzko VV, Howard BH, Kedes L, Wang JY, Graessmann A, Nakatani Y, et al.: **Differential roles of p300 and PCAF acetyltransferases in muscle differentiation.** *Mol Cell* 1997, **1**:35-45.
157. Rachez C, Lemon BD, Suldan Z, Bromleigh V, Gamble M, Naar AM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Freedman LP: **Ligand-dependent transcription activation by nuclear receptors requires the DRIP complex.** *Nature* 1999, **398**:824-828.
158. Rausa FM, Tan Y, Zhou H, Yoo KW, Stolz DB, Watkins SC, Franks RR, Unterman TG, Costa RH: **Elevated levels of hepatocyte nuclear factor 3beta in mouse hepatocytes influence expression of genes involved in bile acid and glucose homeostasis.** *Mol Cell Biol* 2000, **20**:8264-8282.
159. Reid JL, Bannister AJ, Zegerman P, Martinez-Balbas MA, Kouzarides T: **E1A directly binds and regulates the P/CAF acetyltransferase.** *Embo J* 1998, **17**:4469-4477.
160. Reisher SR, Hughes TE, Ordovas JM, Schaefer EJ, Feinstein SI: **Increased expression of apolipoprotein genes accompanies differentiation in the intestinal cell line Caco-2.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, **90**:5757-5761.
161. Rollini P, Fournier RE: **The HNF-4/HNF-1alpha transactivation cascade regulates gene activity and chromatin structure of the human serine protease inhibitor gene cluster at 14q32.1.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:10308-10313.
162. Roth SY, Denu JM, Allis CD: **Histone Acetyltransferases.** *Annu Rev Biochem* 2001, **70**:81-120.
163. Rundlett SE, Carmen AA, Kobayashi R, Bavykin S, Turner BM, Grunstein M: **HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase**

- complexes that regulate silencing and transcription.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**:14503-14508.
164. Ryu S, Zhou S, Ladurner AG, Tjian R: **The transcriptional cofactor complex CRSP is required for activity of the enhancer-binding protein Sp1.** *Nature* 1999, **397**:446-450.
165. Sartorelli V, Huang J, Hamamori Y, Kedes L: **Molecular mechanisms of myogenic coactivation by p300: direct interaction with the activation domain of MyoD and with the MADS box of MEF2C.** *Mol Cell Biol* 1997, **17**:1010-1026.
166. Sartorelli V, Puri PL, Hamamori Y, Ogryzko V, Chung G, Nakatani Y, Wang JY, Kedes L: **Acetylation of MyoD directed by PCAF is necessary for the execution of the muscle program.** *Mol Cell* 1999, **4**:725-734.
167. Sassone-Corsi P, Mizzen CA, Cheung P, Crosio C, Monaco L, Jacquot S, Hanauer A, Allis CD: **Requirement of Rsk-2 for epidermal growth factor-activated phosphorylation of histone H3.** *Science* 1999, **285**:886-891.
168. Sendra R, Tse C, Hansen JC: **The yeast histone acetyltransferase A2 complex, but not free Gcn5p, binds stably to nucleosomal arrays.** *J Biol Chem* 2000, **275**:24928-24934.
169. Serizawa H, Conaway RC, Conaway JW: **A carboxyl-terminal-domain kinase associated with RNA polymerase II transcription factor delta from rat liver.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89**:7476-7480.
170. Sheppard KA, Rose DW, Haque ZK, Kurokawa R, McInerney E, Westin S, Thanos D, Rosenfeld MG, Glass CK, Collins T: **Transcriptional activation by NF-kappaB requires multiple coactivators.** *Mol Cell Biol* 1999, **19**:6367-6378.
171. Shih DQ, Bussen M, Sehayek E, Ananthanarayanan M, Shneider BL, Suchy FJ, Shefer S, Bollileni JS, Gonzalez FJ, Breslow JL, et al.: **Hepatocyte nuclear factor-1alpha is an essential regulator of bile acid and plasma cholesterol metabolism.** *Nat Genet* 2001, **27**:375-382.
172. Shih DQ, Navas MA, Kuwajima S, Duncan SA, Stoffel M: **Impaired glucose homeostasis and neonatal mortality in hepatocyte nuclear factor 3alpha-deficient mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:10152-10157.
173. Sladek FM, Ruse MD, Jr., Nepomuceno L, Huang SM, Stallcup MR: **Modulation of transcriptional activation and coactivator interaction by a splicing variation in the F domain of nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4alpha1.** *Mol Cell Biol* 1999, **19**:6509-6522.
174. Sladek FM, Zhong WM, Lai E, Darnell JE, Jr.: **Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily.** *Genes Dev* 1990, **4**:2353-2365.
175. Soutoglou E, Katrakili N, Talianidis I: **Acetylation regulates transcription factor activity at multiple levels.** *Mol Cell* 2000, **5**:745-751.
176. Soutoglou E, Papafotiou G, Katrakili N, Talianidis I: **Transcriptional activation by hepatocyte nuclear factor-1 requires synergism between multiple coactivator proteins.** *J Biol Chem* 2000, **275**:12515-12520.
177. Spath GF, Weiss MC: **Hepatocyte nuclear factor 4 expression overcomes repression of the hepatic phenotype in dedifferentiated hepatoma cells.** *Mol Cell Biol* 1997, **17**:1913-1922.
178. Spencer TE, Jenster G, Burcin MM, Allis CD, Zhou J, Mizzen CA, McKenna NJ, Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, et al.: **Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase.** *Nature* 1997, **389**:194-198.

179. Spilianakis C, Papamatheakis J, Kretsovali A: **Acetylation by PCAF enhances CIITA nuclear accumulation and transactivation of major histocompatibility complex class II genes.** *Mol Cell Biol* 2000, **20**:8489-8498.
180. Stoffel M, Duncan SA: **The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF4alpha regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**:13209-13214.
181. Strahl BD, Allis CD: **The language of covalent histone modifications.** *Nature* 2000, **403**:41-45.
182. Struhl K: **Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms.** *Genes Dev* 1998, **12**:599-606.
183. Struhl K: **Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes.** *Cell* 1999, **98**:1-4.
184. Sun X, Zhang Y, Cho H, Rickert P, Lees E, Lane W, Reinberg D: **NAT, a human complex containing Srb polypeptides that functions as a negative regulator of activated transcription.** *Mol Cell* 1998, **2**:213-222.
185. Syntichaki P, Topalidou I, Thireos G: **The Gen5 bromodomain co-ordinates nucleosome remodelling.** *Nature* 2000, **404**:414-417.
186. Tamkun JW, Deuring R, Scott MP, Kissinger M, Pattatucci AM, Kaufman TC, Kennison JA: **brahma: a regulator of Drosophila homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2.** *Cell* 1992, **68**:561-572.
187. Taunton J, Hassig CA, Schreiber SL: **A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p [see comments].** *Science* 1996, **272**:408-411.
188. Tian JM, Schibler U: **Tissue-specific expression of the gene encoding hepatocyte nuclear factor 1 may involve hepatocyte nuclear factor 4.** *Genes Dev* 1991, **5**:2225-2234.
189. Tirode F, Busso D, Coin F, Egly JM: **Reconstitution of the transcription factor TFIIF: assignment of functions for the three enzymatic subunits, XPB, XPD, and cdk7.** *Mol Cell* 1999, **3**:87-95.
190. Tronche F, Yaniv M: **HNF1, a homeoprotein member of the hepatic transcription regulatory network.** *Bioessays* 1992, **14**:579-587.
191. Tsukiyama T, Daniel C, Tamkun J, Wu C: **ISWI, a member of the SWI2/SNF2 ATPase family, encodes the 140 kDa subunit of the nucleosome remodeling factor.** *Cell* 1995, **83**:1021-1026.
192. Tsukiyama T, Wu C: **Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodeling factor.** *Cell* 1995, **83**:1011-1020.
193. Utley RT, Ikeda K, Grant PA, Cote J, Steger DJ, Eberharter A, John S, Workman JL: **Transcriptional activators direct histone acetyltransferase complexes to nucleosomes.** *Nature* 1998, **394**:498-502.
194. van der Knaap JA, Borst JW, van der Vliet PC, Gentz R, Timmers HT: **Cloning of the cDNA for the TATA-binding protein-associated factorII170 subunit of transcription factor B-TFIID reveals homology to global transcription regulators in yeast and Drosophila.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**:11827-11832.
195. Vassilev A, Yamauchi J, Kotani T, Prives C, Avantaggiati ML, Qin J, Nakatani Y: **The 400 kDa subunit of the PCAF histone acetylase complex belongs to the ATM superfamily.** *Mol Cell* 1998, **2**:869-875.

196. Vaxillaire M, Abderrahmani A, Boutin P, Bailleul B, Froguel P, Yaniv M, Pontoglio M: **Anatomy of a homeoprotein revealed by the analysis of human MODY3 mutations.** *J Biol Chem* 1999, **274**:35639-35646.
197. Vaxillaire M, Rouard M, Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Boriraj VV, Chevre JC, Boccio V, Cox RD, Lathrop GM, et al.: **Identification of nine novel mutations in the hepatocyte nuclear factor 1 alpha gene associated with maturity-onset diabetes of the young (MODY3).** *Hum Mol Genet* 1997, **6**:583-586.
198. Viollet B, Kahn A, Raymondjean M: **Protein kinase A-dependent phosphorylation modulates DNA-binding activity of hepatocyte nuclear factor 4.** *Mol Cell Biol* 1997, **17**:4208-4219.
199. Wallberg AE, Neely KE, Hassan AH, Gustafsson JA, Workman JL, Wright AP: **Recruitment of the SWI-SNF chromatin remodeling complex as a mechanism of gene activation by the glucocorticoid receptor tau1 activation domain.** *Mol Cell Biol* 2000, **20**:2004-2013.
200. Wang H, Antinozzi PA, Hagenfeldt KA, Maechler P, Wollheim CB: **Molecular targets of a human HNF1 alpha mutation responsible for pancreatic beta-cell dysfunction.** *Embo J* 2000, **19**:4257-4264.
201. Wang H, Maechler P, Antinozzi PA, Hagenfeldt KA, Wollheim CB: **Hepatocyte nuclear factor 4alpha regulates the expression of pancreatic beta -cell genes implicated in glucose metabolism and nutrient-induced insulin secretion.** *J Biol Chem* 2000, **275**:35953-35959.
202. Wang H, Maechler P, Hagenfeldt KA, Wollheim CB: **Dominant-negative suppression of HNF-1alpha function results in defective insulin gene transcription and impaired metabolism-secretion coupling in a pancreatic beta-cell line.** *Embo J* 1998, **17**:6701-6713.
203. Wang J, Hoshino T, Redner RL, Kajigaya S, Liu JM: **ETO, fusion partner in t(8;21) acute myeloid leukemia, represses transcription by interaction with the human N-CoR/mSin3/HDAC1 complex.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:10860-10865.
204. Wang JC, Stafford JM, Granner DK: **SRC-1 and GRIP1 coactivate transcription with hepatocyte nuclear factor 4.** *J Biol Chem* 1998, **273**:30847-30850.
205. Wang L, Mizzen C, Ying C, Candau R, Barlev N, Brownell J, Allis CD, Berger SL: **Histone acetyltransferase activity is conserved between yeast and human GCN5 and is required for complementation of growth and transcriptional activation.** *Mol Cell Biol* 1997, **17**:519-527.
206. Xanthopoulos KG, Prezioso VR, Chen WS, Sladek FM, Cortese R, Darnell JE, Jr.: **The different tissue transcription patterns of genes for HNF-1, C/EBP, HNF-3, and HNF-4, protein factors that govern liver-specific transcription.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, **88**:3807-3811.
207. Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Furuta H, Vaxillaire M, Southam L, Cox RD, Lathrop GM, Boriraj VV, et al.: **Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3) [see comments].** *Nature* 1996, **384**:455-458.
208. Yang XJ, Ogryzko VV, Nishikawa J, Howard BH, Nakatani Y: **A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A.** *Nature* 1996, **382**:319-324.

209. Yao TP, Ku G, Zhou N, Scully R, Livingston DM: **The nuclear hormone receptor coactivator SRC-1 is a specific target of p300.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**:10626-10631.
210. Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK, et al.: **Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1.** *Nature* 2001, **413**:131-138.
211. Yoshida E, Aratani S, Itou H, Miyagishi M, Takiguchi M, Osumu T, Murakami K, Fukamizu A: **Functional association between CBP and HNF4 in trans-activation.** *Biochem Biophys Res Commun* 1997, **241**:664-669.
212. Yoshida M, Horinouchi S, Beppu T: **Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function.** *Bioessays* 1995, **17**:423-430.
213. Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T: **Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A.** *J Biol Chem* 1990, **265**:17174-17179.
214. Yoshinaga SK, Peterson CL, Herskowitz I, Yamamoto KR: **Roles of SWI1, SWI2, and SWI3 proteins for transcriptional enhancement by steroid receptors.** *Science* 1992, **258**:1598-1604.
215. Zaret K: **Early liver differentiation: genetic potentiation and multilevel growth control.** *Curr Opin Genet Dev* 1998, **8**:526-531.
216. Zaret KS: **Liver specification and early morphogenesis.** *Mech Dev* 2000, **92**:83-88.
217. Zaret KS: **Hepatocyte differentiation: from the endoderm and beyond.** *Curr Opin Genet Dev* 2001, **11**:568-574.
218. Zhang W, Bieker JJ: **Acetylation and modulation of erythroid Kruppel-like factor (EKLF) activity by interaction with histone acetyltransferases.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:9855-9860.
219. Zhu Y, Pe'ery T, Peng J, Ramanathan Y, Marshall N, Marshall T, Amendt B, Mathews MB, Price DH: **Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 tat transactivation in vitro.** *Genes Dev* 1997, **11**:2622-2632.

