

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

**Μηχανισμοί μεταγραφικής ρύθμισης του γονιδίου του
αναστολέα του κυτταρικού κύκλου p21^{WAF1/Cip-1} του
ανθρώπου**

Διδακτορική Διατριβή
ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΟΥΤΣΟΔΟΝΤΗΣ

Εργαστήριο Βιοχημείας
Επιβλέπων Καθηγητής: Δ. Καρδάσης

Ιούνιος 2004

Ολοκληρώνοντας την παρούσα διδακτορική διατριβή θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δημήτρη Καρδάση, για την άψογη συνεργασία μας και την καθοδήγησή του όλα αυτά τα χρόνια. Ο Δημήτρης δεν ήταν απλώς ο επιβλέπωντας καθηγητής, αλλά κάτι παραπάνω. Η σχέση μας δεν ήταν η τυπική σχέση φοιτητή-καθηγητή. Συζητούσαμε όχι μόνο για πειράματα και βιολογικά μοντέλα, αλλά και για καθημερινές μας ασχολίες, χόμπι, ενδιαφέροντα. Θεωρώ, λοιπόν, ότι η σχέση μας ήταν περισσότερο φιλική, παρά επαγγελματική.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ζαννή Β. και τον κ. Στουρνάρα Χ. οι οποίοι ως μέλη της τριμελούς επιτροπής μου παρακολούθησαν την πορεία της διατριβής μου και με τις επιστημονικές τους συμβουλές συνέβαλλαν αποφασιστικά στην ολοκλήρωση, καθώς και στη συγγραφή της.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα 4 μέλη της 7μελούς εξεταστικής επιτροπής, τον κ. Γραβάνη Α., τον κ. Μοσχονά Ν., τον κ. Τζαμαρία Α. και τον κ. Τσατσάνη Χ. οι οποίοι με τις συμβουλές τους συνέβαλλαν στην αρτιότερη συγγραφή της παρούσας διατριβής.

Στη συνέχεια θέλω να ευχαριστήσω τη φίλη μου, τη Βίκυ, με την οποία είχαμε παράλληλη πορεία. Ξεκινήσαμε μαζί πριν 6 περίπου χρόνια, αντιμετωπίσαμε τις χαρές και τις λύπες του master μαζί, συνεχίσαμε στο διδακτορικό μαζί και τελικά ολοκληρώσαμε τις διατριβές μας μαζί. Όλα αυτά τα χρόνια ο ένας βοηθούσε τον άλλο, δίνανε κουράγιο ο ένας στον άλλο και χαιρόμασταν ο ένας με τις χαρές του άλλου.

Εξίσου σημαντική ήταν και η βοήθεια της Βέτας. Πέρασαμε περισσότερα από 6 χρόνια μαζί. Δεν ήταν μόνο η βοήθεια της στην εκτέλεση των πειραμάτων και στην κατανόηση των αποτελεσμάτων. Ήταν η ευχάριστη παρέα της εντός και εκτός εργαστηρίου. Βέβαια, αντιμετώπιζα πρόβλημα με τις μουσικές της προτιμήσεις στο εργαστήριο, καθώς και με την επιλογή εστιατορίων-μεζεδοπωλείων, εντούτοις θέλω να την ευχαριστήσω για όλα όσα έκανε για μένα.

Στη συνέχεια θέλω να ευχαριστήσω όλα τα παιδιά που πέρασαν από το εργαστήριο όλα αυτά τα χρόνια για την άψογη συνεργασία μας, το Γιώργο Κούκο, τον Κώστα Δροσάτο, την Έφη, τη Βαρβάρα, την Christine, την Anca, τη Σόφη, τον Κώστα Χαριτάκη, τη Ρένα, την Κική.

Θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα το Θωμά όχι μόνο για τη συνεργασία μας στο εργαστήριο, αλλά και για την παρέα του εκτός εργαστηρίου, καθώς και την Ελευθερία, η οποία όχι μόνο συνέβαλλε αποφασιστικά στην ολοκλήρωση πειραμάτων, αλλά μου έφτιαχνε τη διάθεση κάθε πρωί με το κέφι και το γέλιο της.

Στη συνέχεια ευχαριστώ τα κορίτσια από το εργαστήριο του κ. Στουρνάρα, τη Λίνα, τη Λίτσα, την Άννα και τη Γαλάτσια, όχι μόνο για τη βοήθεια τους στην εκτέλεση πειραμάτων με την παροχή εξοπλισμού και αντιδραστηρίων, αλλά και για την καθημερινή τους παρέα εντός και εκτός εργαστηρίου.

Επίσης, ευχαριστώ τα παιδιά από το εργαστήριο του κ. Ανάγνου, το Θοδωρή, τη Σμάρω, το Μιχάλη, τη Μαρία και το Γιάννη για τη συμβολή τους στην πραγματοποίηση των πειραμάτων της διατριβής μου, αλλά και για την παρέα τους εκτός εργαστηρίου.

Τέλος, ευχαριστώ όλα τα παιδιά των εργαστηρίων του τομέα για τη συνεργασία και τη βοήθεια τους όλα αυτά τα χρόνια.

Εκτός, όμως, από τους φίλους και συνεργάτες μου στα εργαστήρια, θέλω να ευχαριστήσω πραγματικά τους 4 καλύτερους μου φίλους με τους οποίους πέρασα υπέροχες στιγμές όλα αυτά τα χρόνια, το Γιώργο, το Δάκη, το Λευτέρη και φυσικά τον κουμπάρο μου, το Νεκτάριο. Όλα αυτά τα χρόνια ήταν δίπλα μου σε όλες τις ευχάριστες και τις δυσάρεστες στιγμές. Χωρίς αυτούς πραγματικά δεν ξέρω πως θα περνούσαν όλα αυτά τα χρόνια. Γι' αυτό δεν τους θεωρώ απλά φίλους μου, αλλά πολύ περισσότερο από φίλους. Τους νιώθω σαν αδέρφια μου.

Στο τέλος άφησα 3 ανθρώπους, όχι γιατί συνέβαλλαν λιγότερο από τους υπόλοιπους στην ολοκλήρωση της διατριβής μου, αλλά αντίθετα γιατί χωρίς αυτούς δε θα είχα καταφέρει τίποτε από όλα αυτά : τους γονείς μου και την Αλέκα μου. Χωρίς τους γονείς μου, σίγουρα, δε θα είχα ολοκληρώσει τη συγκεκριμένη διατριβή. Δεν τους ευχαριστώ μόνο για την οικονομική τους βοήθεια, ούτε γιατί στερήθηκαν πράγματα προκειμένου εγώ να σπουδάσω υπό τις καλύτερες προϋποθέσεις. Τους ευχαριστώ για την ψυχολογική τους υποστήριξη όλα αυτά τα χρόνια. Τους ευχαριστώ για το κουράγιο που μου έδιναν σε κάθε δύσκολη στιγμή, για την επιβράβευσή τους μετά από κάθε επιτυχία. Τους ευχαριστώ γιατί ενώ έμεναν τόσο μακριά, εντούτοις ήταν τόσο κοντά μου.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την Αλέκα μου. Όχι μόνο για την υπομονή της όλα αυτά τα χρόνια, αλλά κυρίως για την υποστήριξή της. Σε περιπτώσεις που είχα αρχίσει να αμφιβάλω για τον εαυτό μου η Αλέκα με έκανε να πιστεύω στον εαυτό μου και να τα καταφέρνω. Πριν από κάθε εξέταση μου έδινε κουράγιο και μου έδειχνε ότι υπάρχουν πιο σημαντικά πράγματα από μια αποτυχία ή μια επιτυχία. Σε κάθε δύσκολη στιγμή ήταν κοντά μου και με μια μόνο κουβέντα της μου έφτιαχνε τη διάθεση. Ήξερα ότι κάθε στιγμή βρίσκεται δίπλα μου, παρόλο που δεν μπορούσα να τη δω. Όλα αυτά τα καταφέραμε μαζί.

Γι' αυτό αφιερώνω τη διατριβή αυτή στους γονείς μου και στην Αλέκα μου και ελπίζω κάποτε να μπορέσω να τους ανταποδώσω έστω ένα μικρό μέρος από όσα μου προσέφεραν.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT	11
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	14
Ο ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ.....	15
p21.....	18
<i>p21 και έλεγχος του κυτταρικού κύκλου</i>	19
<i>Περιοχές της πρωτεΐνης p21 που αλληλεπιδρούν με τις CDKs.....</i>	21
<i>Η πρωτεΐνη p21 ρυθμίζει την εξαρτώμενη από τον παράγοντα E2F μεταγραφή ...</i>	22
<i>Αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης p21 με το μεταγραφικό παράγοντα Myc.....</i>	22
<i>Η πρωτεΐνη p21 ρυθμίζει τη δράση μεταγραφικών συνενεργοποιητών</i>	23
<i>Η πρωτεΐνη p21 ρυθμίζει τη σύνθεση του DNA.....</i>	23
<i>Η p21 ως παράγοντας συναρμολόγησης των συμπλόκων CDK-κυκλινών</i>	26
<i>Η p21 ως αναστολέας της απόπτωσης.....</i>	28
<i>Η p21 ως προαγωγέας της απόπτωσης.....</i>	33
<i>Η p21 ως μεταγραφικός συνενεργοποιητής</i>	33
<i>Το p21 γονίδιο και η p21 πρωτεΐνη.....</i>	35
Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ Sp/CHKLF	42
<i>Οι παράγοντες Sp.....</i>	43
<i>Οι λειτουργικές περιοχές των πρωτεϊνών Sp.....</i>	45
<i>Λειτουργικές διαφορές μεταξύ των παραγόντων Sp1-4</i>	46

<i>Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του παράγοντα Sp1</i>	48
p53	50
<i>Οι λειτουργικές περιοχές της πρωτεΐνης p53</i>	50
<i>Οι πρωτεΐνες p63 και p73</i>	53
<i>Ομολογία και διαφορές μεταξύ των μελών της οικογένειας p53</i>	55
<i>Ρύθμιση της πρωτεΐνης p53</i>	56
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ	63
ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ	65
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	107
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΚΟΝΤΙΝΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ p21 ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ Sp1 ΚΑΙ Sp3	108
<i>Οι παράγοντες Sp1 και Sp3 προσδένονται στην κοντινή περιοχή του p21 υποκινητή με διαφορετική συνάφεια</i>	108
<i>Συμβολή των GC μοτίβων της κοντινής περιοχής του p21 υποκινητή στην ενεργοποίησή του από Sp1 και Sp3</i>	118
<i>Οι 6 θέσεις πρόσδεσης των πρωτεϊνών Sp1 και Sp3 δεν είναι λειτουργικά ισοδύναμες σε κύτταρα θηλαστικών</i>	120
<i>Συνεργασία μεταξύ παραγόντων Sp1 που προσδένονται σε γειτονικές θέσεις του p21 υποκινητή</i>	122
Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ Sp1 ΣΤΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ p21 ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΑΠΟ ΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ TGF-β ΚΑΙ ΤΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ Smad	126
<i>Οι πρωτεΐνες Smad ενεργοποιούν τον p21 υποκινητή μέσω λειτουργικής συνεργασίας με τον παράγοντα Sp1 αλλά όχι με τον Sp3</i>	126
<i>Η ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από τις πρωτεΐνες Smad δεν επηρεάζεται από μεταλλάξεις σε κάθε μια από τις θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα Sp1</i>	128
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΜΑΚΡΙΝΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΟΥ p21 ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ : ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑΚΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕ ΤΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ Sp1 ΚΑΙ Sp3 ΠΟΥ ΠΡΟΣΔΕΝΟΝΤΑΙ ΣΤΗ ΘΕΣΗ 3 ΤΗΣ ΚΟΝΤΙΝΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ	132
<i>Η μακρινή περιοχή του p21 υποκινητή -2325/-2260, η οποία περιέχει μια θέση πρόσδεσης της p53, λειτουργεί ως μεταγραφικός ενισχυτής της κοντινής περιοχής</i>	132
<i>Η σημασία της θέσης 3 στη μεταγραφική ενεργότητα του p21 υποκινητή</i>	136

Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ Sp1 ΣΤΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ p21 ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΑΠΟ ΤΗΝ p53	140
<i>Η ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 απαιτεί τις κοντινές θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα Sp1</i>	<i>140</i>
<i>Η ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από την p53 επιτυγχάνεται με λειτουργική συνεργασία μεταξύ της p53 και του Sp1 που προσδένεται στη θέση 3.....</i>	<i>140</i>
<i>Η πρόσδεση της p53 στο DNA είναι απαραίτητη για τη λειτουργική της συνεργασία με τον Sp1.....</i>	<i>144</i>
<i>Η μεταγραφική ενεργότητα της p53 είναι απαραίτητη για τη λειτουργική συνεργασία της πρωτεΐνης με τον Sp1 για την ενεργοποίηση του p21 υποκινητή</i>	<i>146</i>
<i>Η p53 αλληλεπιδρά άμεσα με την Sp1 in vitro.....</i>	<i>148</i>
<i>Η p53 αλληλεπιδρά άμεσα με την Sp1 in vivo</i>	<i>148</i>
<i>Οι περιοχές A, B και DBD της πρωτεΐνης Sp1 αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη p53.....</i>	<i>150</i>
<i>Περιοχές της πρωτεΐνης Sp1 που συμβάλλουν στη λειτουργική συνεργασία της με την p53 για την ενεργοποίηση του p21 υποκινητή.....</i>	<i>156</i>
<i>Η καρβοξυ-τερματική περιοχή της p53 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Sp1</i>	<i>158</i>
<i>Η σημασία των λειτουργικών περιοχών της p53 στην ενεργοποίηση του p21 υποκινητή</i>	<i>160</i>
<i>Η πρωτεΐνη Sp3 συνεργάζεται λειτουργικά με την p53 για την ενεργοποίηση του p21 υποκινητή.....</i>	<i>162</i>
<i>Η p53 αλληλεπιδρά άμεσα με την Sp3 in vivo</i>	<i>165</i>
<i>Η καρβοξυ-τερματική περιοχή της p53 προσδένεται στον παράγοντα Sp3</i>	<i>167</i>
<i>Η Sp1 αλληλεπιδρά φυσικά και λειτουργικά με την p73.....</i>	<i>171</i>
Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ Sp1 ΣΤΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΠΟ ΓΕΝΟΤΟΞΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	175
<i>Η μεταγραφική ενεργοποίηση του p21 γονιδίου από χημειοθεραπευτικούς παράγοντες απαιτεί την κοντινή περιοχή του p21 υποκινητή.....</i>	<i>175</i>
<i>Σημασία της κοντινής περιοχής του p21 υποκινητή στην ενεργοποίησή του από χημειοθεραπευτικούς παράγοντες</i>	<i>177</i>
<i>Η Μιθραμυκίνη παρεμποδίζει τη μεταγραφική ενεργοποίηση του p21 γονιδίου από 5-FU.....</i>	<i>183</i>
<i>Η Μιθραμυκίνη δεν επηρεάζει τη σταθερότητα της p21 πρωτεΐνης.....</i>	<i>185</i>
<i>Η σημασία της p53 στην ενεργοποίηση του p21 γονιδίου από 5-FU</i>	<i>185</i>

<i>Η ενεργοποίηση της p53 από τα φάρμακα 5-FU και Μιθραμυκίνη οφείλεται στη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης.....</i>	187
<i>Η Μιθραμυκίνη παρεμποδίζει την πρόσδεση του παράγοντα Sp1 στην κοντινή περιοχή του p21 υποκινητή.....</i>	189
<i>Η Μιθραμυκίνη δεν επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των Sp1 και p53</i>	193
<i>Η Μιθραμυκίνη αυξάνει την απόπτωση σε κύτταρα HepG2</i>	193
<i>Η Μιθραμυκίνη αναστέλλει τη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου PUMA από την p53.....</i>	196
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	200
<i>Τα GC μοτίβα της κοντινής περιοχής του p21 υποκινητή προσδένουν επιλεκτικά μέλη της οικογένειας του παράγοντα Sp1.....</i>	201
<i>Συνεισφορά των θέσεων πρόσδεσης των παραγόντων Sp1/Sp3 στην εξαρτημένη από Smad ενεργοποίηση του p21 υποκινητή.....</i>	204
<i>Η περιοχή -2325/-2260 ενεργεί ως μεταγραφικός ενισχυτής σε κύτταρα HepG2.....</i>	205
<i>Η πρόσδεση των p53 και Sp1 στις αντίστοιχες θέσεις τους στον p21 υποκινητή οδηγεί σε λειτουργική συνεργασία των δύο πρωτεϊνών και συνεργασιακή ενεργοποίηση του p21 υποκινητή.....</i>	206
<i>Η θέση 3 είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από p53.....</i>	207
<i>Η συνεργασιακή ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από τους παράγοντες p53 και Sp1 απαιτεί πρόσδεση και των δύο παραγόντων στις αντίστοιχες θέσεις τους στον υποκινητή, καθώς και μεταγραφικά λειτουργική p53.....</i>	208
<i>Η πρωτεΐνη p53 αλληλεπιδρά άμεσα με την πρωτεΐνη Sp1</i>	209
<i>Η πρωτεΐνη Sp1 αλληλεπιδρά και με άλλα μέλη της οικογένειας p53</i>	211
<i>Η p53 οδηγεί είτε σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου είτε σε απόπτωση.....</i>	212
ΣΥΝΟΨΗ.....	217
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	219
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	241

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πρωτεΐνη p21^{WAF1/Cip1} (p21) παίζει σημαντικό ρόλο σε βιολογικές διεργασίες όπως η κυτταρική ανάπτυξη, η διαφοροποίηση κ.α. δρώντας ως αναστολέας του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G1 και G2. Σε συνθήκες επαγωγής της έκφρασης της p21 από εξωκυττάριους παράγοντες όπως κυτταροκίνες, γενετοξικό στρές ή παράγοντες διαφοροποίησης, η p21 καταστέλλει την δράση των συμπλόκων που σχηματίζονται μεταξύ κυκλινών και κινασών που εξαρτώνται από τις κυκλινες (cyclin/CDKs) και την λειτουργία της πρωτεΐνης PCNA η οποία αποτελεί υπομονάδα της DNA πολυμεράσης δ με αποτέλεσμα την καταστολή της σύνθεσης του DNA κατά την φάση S και την αναστολή του κυτταρικού κύκλου.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήσαμε τους μοριακούς μηχανισμούς με τους οποίους ρυθμίζεται η έκφραση του γονιδίου p21 σε μεταγραφικό επίπεδο. Στο πρώτο μέρος της διατριβής εκπονήσαμε τον λειτουργικό χαρακτηρισμό της κοντινής περιοχής του υποκινητή του γονιδίου p21 και βρήκαμε ότι δυο μέλη της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων Sp1 (Sp1 και Sp3) προσδένονται, με διαφορετική συνάφεια, σε έξι διαφορετικές θέσεις που ονομάστηκαν Sp1 θέσεις 1-6 και χαρτογραφούνται στην περιοχή του υποκινητή που περιλαμβάνεται μεταξύ των νουκλεοτιδίων -120 και -45. Με μεταλλαξιογένεση των θέσεων αυτών και παροδικές επιμολύνσεις κυττάρων SL2 τα οποία στερούνται ενδογενών Sp1 παραγόντων, δείξαμε ότι οι θέσεις 1 και 2 είναι απαραίτητες για την μεταγραφική ενεργοποίηση από τους παράγοντες Sp1 και Sp3. Χρησιμοποιώντας μια μεταλλαγμένη μορφή του παράγοντα Sp1 η οποία στερείται της περιοχής ολιγομερισμού (Sp1 ΔD) δείξαμε ότι η μεταγραφική ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου p21 επιτυγχάνεται μέσω συνεργασιακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ Sp1 πρωτεϊνών που προσδένονται σε γειτονικές θέσεις του κοντινού υποκινητή.

Στο δεύτερο μέρος της διατριβής αναλύσαμε την μακρινή περιοχή του p21 υποκινητή με μεταλλαξιογένεση και με την δημιουργία συνθετικών υποκινητών και βρήκαμε ότι η περιοχή -2,325 έως -2,280, η οποία περιλαμβάνει μια θέσης πρόσδεσης της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53, δρα σαν μεταγραφικός ενισχυτής του γονιδίου σε κύτταρα ηπατώματος HepG2. Βρήκαμε ότι η μεταγραφική ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου p21 από την p53 δεν μπορεί να επιτευχθεί σε κύτταρα SL2 που στερούνται

ενδογενών Sp1 παραγόντων και ότι καταστέλεται από την μεταλλαξιογέννεση της Sp1 θέσης 3 στον κοντινό υποκινητή. Παράλληλα δείξαμε ότι καμία από τις 6 θέσεις πρόσδεσης του Sp1 δεν είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από τις πρωτεΐνες Smad που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι του TGFβ. Τα παραπάνω αποτελέσματα μας οδήγησαν στην υπόθεση ότι η ενεργοποίηση του p21 υποκινητή απαιτεί λειτουργικές και φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της p53 που προσδένεται στον ενισχυτή και των παραγόντων Sp1 και Sp3 που προσδένονται στην κοντινό υποκινητή. Η άμεση πρόσδεση των Sp1 και Sp3 στην p53 αποδείχθηκε με αναλύσεις πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων τόσο σε συνθήκες *in vitro* όσο και *in vivo*. Βρήκαμε ότι οι περιοχές A, B και DBD της Sp1 αλληλεπιδρούν με την C-τερματική περιοχή 293-393 της p53 ενώ μια μεταλλαγμένη μορφή της p53 η οποία στερούνταν της ανωτέρω περιοχής δεν είχε την δυνατότητα μεταγραφικής ενεργοποίησης του p21 υποκινητή. Δείξαμε επίσης ότι οι πρωτεΐνες Sp1 και Sp3 αλληλεπιδρούν φυσικά και λειτουργικά και με την p73 η οποία είναι ομόλογη της p53 αλλά εκφράζεται σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων.

Στο τρίτο μέρος της διατριβής, διερευνήσαμε την σημασία του παράγοντα Sp1 σε κυτταρικές διεργασίες που διαμεσολαβούνται από την p53 όπως το γενotoξικό στρες. Βρήκαμε ότι η χημειοθεραπευτική ένωση 5-φθοροουρακίλη (5-FU) προκαλεί μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου p21 μόνο σε κύτταρα που εκφράζουν φυσιολογική p53. Η ενεργοποίηση της p53 από την 5-FU επιτελείται μέσω φωσφορυλίωσης στην σερίνη 15. Βρήκαμε επίσης ότι η ένωση Μιθραμυκίνη, η οποία χρησιμοποιείται για την θεραπεία της νόσου του Paget και ως αντικαρκινικό, έχει διπλή δράση στα κύτταρα στόχους. Από τη μια μεριά ενεργοποιεί ισχυρά την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 με μηχανισμό παρόμοιο με αυτόν της 5-FU δηλ. με το να προκαλεί τη φωσφορυλίωσή της στη σερίνη 15. Από την άλλη μεριά, η Μιθραμυκίνη, λόγω της ικανότητάς της να παρεμποδίζει την πρόσδεση του παράγοντα Sp1 σε πλούσια σε GC μοτίβα στους υποκινητές γονιδίων, καταστέλλει τη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων p21 και PUMA από ενώσεις όπως η 5-FU ενώ δεν επηρεάζει τα βασικά επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων αυτών. Τέλος, βρήκαμε ότι η Μιθραμυκίνη προκαλεί ισχυρή

απόπτωση στα κύτταρα HepG2 πιθανόν λόγω της ιδιότητάς της να καταστέλει την έκφραση της p21.

Συνοπτικά, τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής δείχνουν ότι η μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου p21 απαιτεί ένα σύνολο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ παραγόντων που προσδένονται στη μακρινή περιοχή και παραγόντων που προσδένονται στην κοντινή περιοχή του υποκινητή του γονιδίου. Αναστολή των αλληλεπιδράσεων αυτών δεν επιτρέπει τη βιολογική απόκριση του γονιδίου p21, με συνέπεια να παρεμποδίζεται η αναστολή του κυτταρικού κύκλου και να ευνοείται ο ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός.

Επίσης, τα αποτελέσματά μας ενισχύουν το ρόλο του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 τόσο στην βασική έκφραση του γονιδίου p21 όσο και στην επαγόμενη έκφραση από κυτταροκίνες όπως ο TGFβ και χημειοθεραπευτικές ενώσεις όπως η 5-FU. Η πρωτεΐνη p21, λόγω της ικανότητάς της να αναστέλει τον κυτταρικό κύκλο, αποτελεί ένα πρώτης τάξεως εργαλείο για την καταπολέμηση νοσημάτων που χαρακτηρίζονται από ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό όπως ο καρκίνος και κατά συνέπεια η γνώση των μοριακών μηχανισμών ρύθμισης της έκφρασης του γονιδίου p21 είναι πρωταρχικής σημασίας για την αντικαρκινική έρευνα.

ABSTRACT

p21^{WAF1/Cip1} (p21) plays an essential role in important biological processes such as cell growth, differentiation etc. acting as an inhibitor of the cell cycle in G1 and G2. Under conditions of p21 gene induction by extracellular factors such as cytokines, genotoxic stress or differentiation factors, p21 represses the activity of cyclin/CDK (Cyclin-Dependent Kinase) complexes and the activity of PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) which is a subunit of DNA Polymerase δ , resulting in the inhibition of DNA synthesis during S phase.

In the present dissertation, we studied the molecular mechanisms that control p21 gene expression at the transcriptional level. In the first part, we have undertaken a functional characterization of the proximal p21 promoter and we found that two members of the Sp1 family of transcription factors (Sp1 and Sp3) bound, with different affinity, to six binding sites present in the proximal region between nucleotides -120 and -45 that were named Sp1 sites 1-6. Mutagenesis of these sites combined with transient transfections of SL2 cells that lack endogenous Sp1 or related activities, showed that sites 1 and 2 are important for the transactivation of the p21 promoter by Sp1 and Sp3. Utilizing a mutant Sp1 lacking the oligomerization domain D (Sp1 Δ D) we showed that the transactivation of the p21 promoter is accomplished by synergistic interactions between Sp1 proteins bound to adjacent sites on the proximal region.

In the second part, we characterized the distal region of the p21 promoter by mutagenesis and by constructing artificial promoters and we found that the region between nucleotides -2,325 to -2,280, that includes a binding site for the tumor suppressor p53 protein, is a strong transcriptional enhancer of the p21 gene in human hepatome HepG2 cells. We showed that p53 cannot transactivate the p21 promoter in SL2 cells that lack endogenous Sp1 and Sp3 and that the p53-mediated transactivation of the p21 promoter is inhibited by mutations in Sp1 site 3. In parallel, we showed that none of the 6 Sp1 sites is necessary for the transactivation of the p21 promoter by Smad proteins which are mediators of the Transforming Growth Factor β (TGF β) signaling pathway. Based on these findings, we proposed that p21 promoter is regulated by physical and functional interactions between p53 bound to the distal region and Sp1 or Sp3 bound to the proximal promoter region. Direct

binding of Sp1 and Sp3 to p53 was shown both *in vitro* and *in vivo*. We found that Sp1 domains A, B and DBD interact with the C-terminal region of p53 (amino acids 293-393) whereas a mutant p53 that lacks the above region could not transactivate the p21 promoter. We also found that Sp1 and Sp3 physically and functionally interact with p73 which is homologous to p53 but is expressed in a cell specific manner.

In the third part of the dissertation, we investigated the importance of Sp1 in cell processes that are mediated by p53 such as genotoxic stress induced by chemotherapeutic drugs. We found that the anticancer drug 5-Fluorouracil (5-FU) induces the transcription of the p21 gene only in cells that express a functional p53 protein. p53 activation by 5-FU is caused by the site-specific phosphorylation at serine 15. We also found that Mithramycin, a compound that is used for the treatment of Paget 's disease and in certain forms of cancer, has a dual effect on cells. On one hand, it strongly activates p53 by a similar mechanism to 5-FU i.e. by phosphorylation at serine 15. On the other hand, Mithramycin, due to its property to inhibit the binding of Sp1 to GC-rich motives in the promoters of genes, represses the transcriptional induction of the p21 and PUMA (p53-Upregulated Mediator of Apoptosis) genes by 5-FU but has no effect on the basal levels of transcription of the above genes. Finally, we showed that Mithramycin is a strong apoptotic inducer in HepG2 cells presumably due to the inhibition of p21 gene induction by this drug.

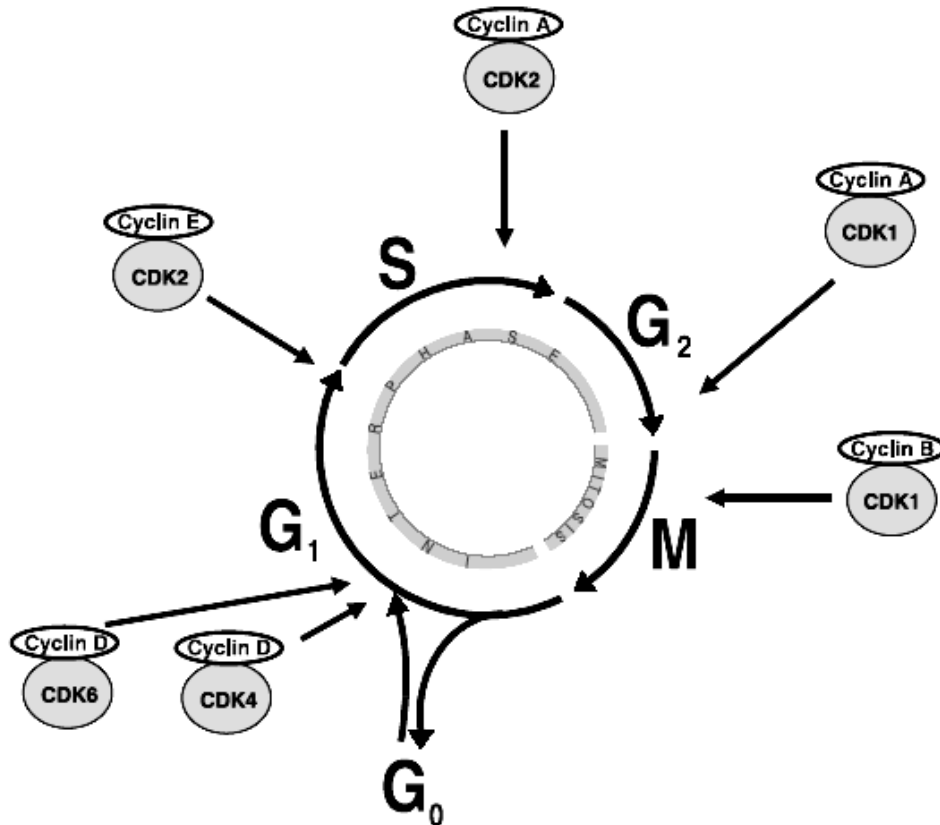
In summary, the results of the present dissertation show that transcriptional activation of p21 gene requires a number of protein-protein interactions between factors that bind to the distal p21 promoter region and factors that bind to the proximal p21 promoter region. Repression of these interactions inhibits cell cycle arrest by p21, resulting in uncontrolled cell proliferation.

These results also support an important role of Sp1 transcription factor in the basal and the inducible activity of the p21 gene. The p21 protein, due to its cell cycle inhibitory properties, is a prime tool for the treatment of disease of uncontrolled cell proliferation. Understanding the molecular mechanisms of p21 gene regulation is of utmost importance for anticancer research.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

Η μετάβαση από τη μία φάση του κυτταρικού κύκλου στην άλλη συμβαίνει με συγκεκριμένη σειρά και ρυθμίζεται από διαφορετικές κυτταρικές πρωτεΐνες (Εικόνα 1). Οι κύριες ρυθμιστικές πρωτεΐνες είναι οι εξαρτώμενες από κυκλίνες κινάσες (CDK), μια οικογένεια κινασών σερίνης/θρεονίνης οι



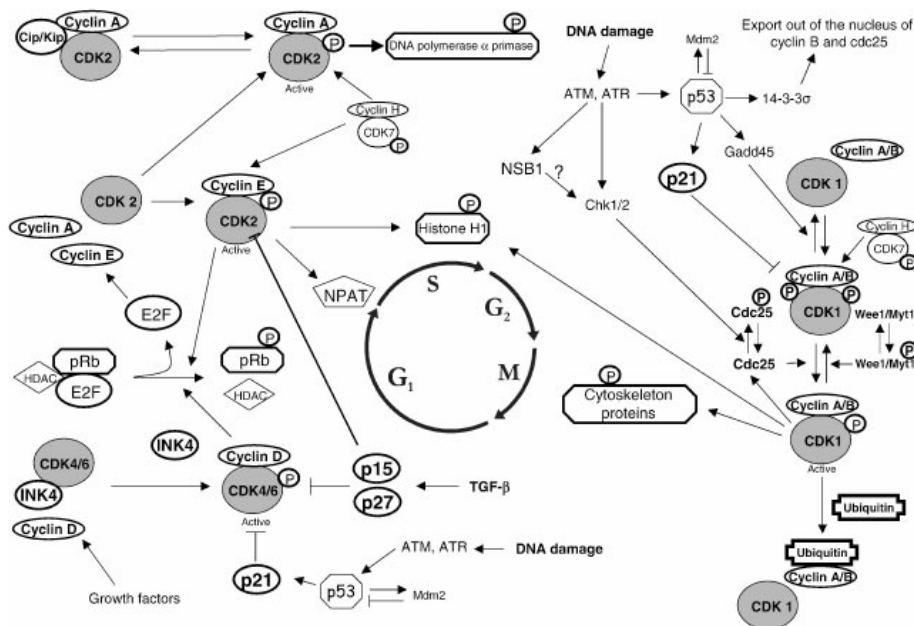
Εικόνα 1 : Τα στάδια του κυτταρικού κύκλου και ο ρυθμιστικός ρόλος των συμπλόκων μεταξύ κυκλινών και CDKs. Η δράση των συμπλόκων αυτών στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου δείχνεται με βέλη (Vermeulen et al, 2003)

οποίες ενεργοποιούνται σε συγκεκριμένα σημεία του κυτταρικού κύκλου (εικόνα 2). Μέχρι σήμερα, έχουν ταυτοποιηθεί 9 CDK και οι 5 από αυτές είναι ενεργές κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, οι CDK4, CDK6 και CDK2 κατά τη G₁ φάση, η CDK2 κατά την S και η CDK1 κατά τις G₂ και M (Πίνακας 1). Μετά την ενεργοποίησή τους οι CDK επάγουν κυτταρικές διαδικασίες φωσφορυλιώνοντας συγκεκριμένες πρωτεΐνες (Morgan, 1995; Pines, 1995). Τα πρωτεϊνικά επίπεδα των CDK παραμένουν σταθερά κατά τον κυτταρικό

κύκλο, σε αντίθεση με αυτά των ενεργοποιητικών τους πρωτεϊνών, των κυκλινών, τα επίπεδα των οποίων αυξάνονται ή μειώνονται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και με αυτόν τον τρόπο ενεργοποιούν περιοδικά τις CDK (Evans et al, 1983; Pines, 1991). Διαφορετικές κυκλίνες απαιτούνται σε διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Τα σύμπλοκα κυκλινών-CDK τα οποία ενεργοποιούνται σε συγκεκριμένα σημεία του κυτταρικού κύκλου

CDK	κυκλίνη	Φάση κυτταρικού κύκλου
CDK4	Κυκλίνη D ₁ ,D ₂ ,D ₃	G ₁
CDK6	Κυκλίνη D ₁ ,D ₂ ,D ₃	G ₁
CDK2	Κυκλίνη E	G ₁ /S μετάβαση
CDK2	Κυκλίνη A	S
CDK1	Κυκλίνη A	G ₂ /M μετάβαση
CDK1	Κυκλίνη B	Μίτωση
CDK7	Κυκλίνη H	CAK, σε όλες τις φάσεις



Εικόνα 2 : Σχηματική αναπαράσταση των κυριότερων σταδίων στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (Vermeulen et al, 2003)

Η ενεργότητα των CDK μπορεί να ρυθμιστεί από πρωτεΐνες-αναστολείς του κυτταρικού κύκλου (CKI) οι οποίες προσδένονται είτε στη CDK είτε στο σύμπλοκο CDK-κυκλίνη. Μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί 2 διακριτές οικογένειες CDK αναστολέων, η INK4 οικογένεια και η Cip/Kip οικογένεια (Πίνακας 2) (Sherr and Roberts, 1995). Η INK4 οικογένεια περιλαμβάνει τις p15 (INK4b), p16 (INK4a), p18 (INK4c) και p19 (INK4d), οι οποίες απενεργοποιούν τις CDK της φάσης G₁ (CDK4 και CDK6). Αυτές οι CKI σχηματίζουν σταθερά σύμπλοκα με τις CDK πριν την πρόσδεση των κυκλινών, αποτρέποντας πρόσδεση με την κυκλίνη D (Carnero and Hannon, 1998). Η δεύτερη οικογένεια αναστολέων περιλαμβάνει τις p21 (WAF1, Cip1), p27 (Cip2) και p57 (Kip2). Οι αναστολείς αυτοί απενεργοποιούν τα σύμπλοκα CDK-κυκλινών (Polyak et al, 1994; Harper et al, 1995; Lee et al, 1995). Αναστέλλουν κυρίως τα σύμπλοκα CDK κυκλινών της G₁, και σε μικρότερο βαθμό τα σύμπλοκα CDK1-κυκλίνη B (Hengst and Reed, 1998). Οι CKI ρυθμίζονται τόσο από εσωτερικά όσο και από εξωτερικά σήματα. Η έκφραση της p21 βρίσκεται κάτω από το μεταγραφικό έλεγχο του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 (el Deiry et al, 1993), ενώ η έκφραση και η ενεργοποίηση των p15 και p27, αντίστοιχα, αυξάνουν μετά την επίδραση του μετασχηματίζοντα αυξητικού παράγοντα β (TGF-β), συνεισφέροντας με αυτόν τον τρόπο στην αναστολή της ανάπτυξης (Hannon and Beach, 1994; Reynisdottir et al, 1995).

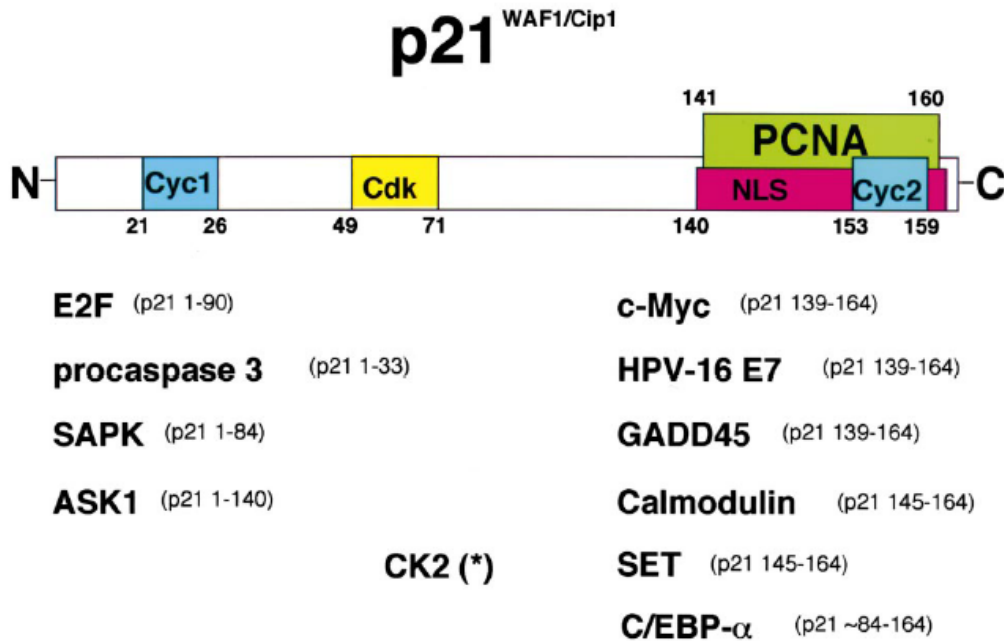
Πίνακας 2 : Αναστολείς των CDK και η δράση τους

CKI οικογένεια	Δράση	Μέλη οικογένειας	
INK4	Απενεργοποίηση των G ₁ CDK (CDK4, CDK6)	p15	INK4b
		p16	INK4a
		p18	INK4c
		p19	INK4d
Cip/Kip	Απενεργοποίηση των G ₁ συμπλόκων CDK-κυκλινών και του CDK1-κυκλίνη B	p21	WAF1, Cip1
		p27	Cip2
		p57	Kip2

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή θα ασχοληθούμε με τη μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου p21, και για το λόγο αυτό θα αναφέρουμε ορισμένα στοιχεία τόσο για το γονίδιο και τη ρύθμισή του, όσο και για την πρωτεΐνη που κωδικοποιεί.

p21

Η πρωτεΐνη p21^{WAF1/Cip1} αποτελεί τον πρώτο αναστολέα κυκλινών-CDK που ταυτοποιήθηκε. Η πρωτεΐνη αυτή θεωρείται ως διαμεσολαβητής της αναστολής του κυτταρικού κύκλου από την p53 (el-Deiry et al, 1993) και ως άμεσος ρυθμιστής της ενεργότητας των CDKs (Harper et al, 1993), ενώ το p21 γονίδιο αναγνωρίζεται ως γονίδιο του οποίου η έκφραση αυξάνεται ως επακόλουθο της κυτταρικής γήρανσης (Noda et al, 1994). Η p21, όπως αναφέραμε και νωρίτερα, ανήκει στην οικογένεια Cip/Kip των αναστολέων των CDKs (p21^{WAF1/Cip1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip2}), οι οποίες εμφανίζουν ομολογία στην αμινο-τερματική τους ακολουθία και αναγνωρίζουν ένα ευρύ φάσμα CDK-κυκλινών (Sherr and Roberts, 1999). Η αμινο-τερματική περιοχή της p21 είναι αναγκαία και ικανή να αναστείλει τη δράση των συμπλόκων CDK-κυκλινών τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Η μοναδική καρβοξυ-τερματική περιοχή της p21 αλληλεπιδρά με το πυρηνικό αντιγόνο πολλαπλασιασμού κυττάρων (PCNA), που αποτελεί υπομονάδα της DNA πολυμεράσης δ και μπορεί να αναστείλει άμεσα την αντιγραφή του DNA, χωρίς να επηρεάσει την επιδιόρθωση του DNA (Li R. et al, 1994; Shivji et al, 1994; Chen et al, 1995; Luo et al, 1995). Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι η πρόσδεση του PCNA στην p21 μπορεί να ρυθμιστεί από αντιστρέψιμη φωσφορυλίωση της p21 στην καρβοξυ-τερματική της περιοχή (Scott et al, 2000). Εκτός από την αλληλεπίδρασή της με τα σύμπλοκα CDK-κυκλινών και το PCNA, η p21 βρέθηκε να συμμετέχει και σε έναν αριθμό διαφορετικών πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων (Εικόνα 3). Κάποιες από αυτές παίζουν, επίσης, ρόλο στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, ενώ οι άλλες σχετίζονται με διαφορετικές λειτουργίες της πρωτεΐνης.



Εικόνα 3 : Σχηματική αναπαράσταση της p21 πρωτεΐνης και των άμεσων πρωτεϊνικών της αλληλεπιδράσεων. Οι στοιχίσεις δεξιά και αριστερά αντιστοιχούν σε πρωτεϊνικές προσδέσεις στην αμινο- και καρβοξυ-τερματική περιοχή της p21, ενώ οι αριθμοί στις παρενθέσεις αντιστοιχούν στα αμινοξέα της p21 που είναι υπεύθυνα για τις προσδέσεις αυτές. Cyc1 και 2 : περιοχές πρόσδεσης κυκλινών. NLS : σήμα πυρηνικού εντοπισμού (Dotto, 2000)

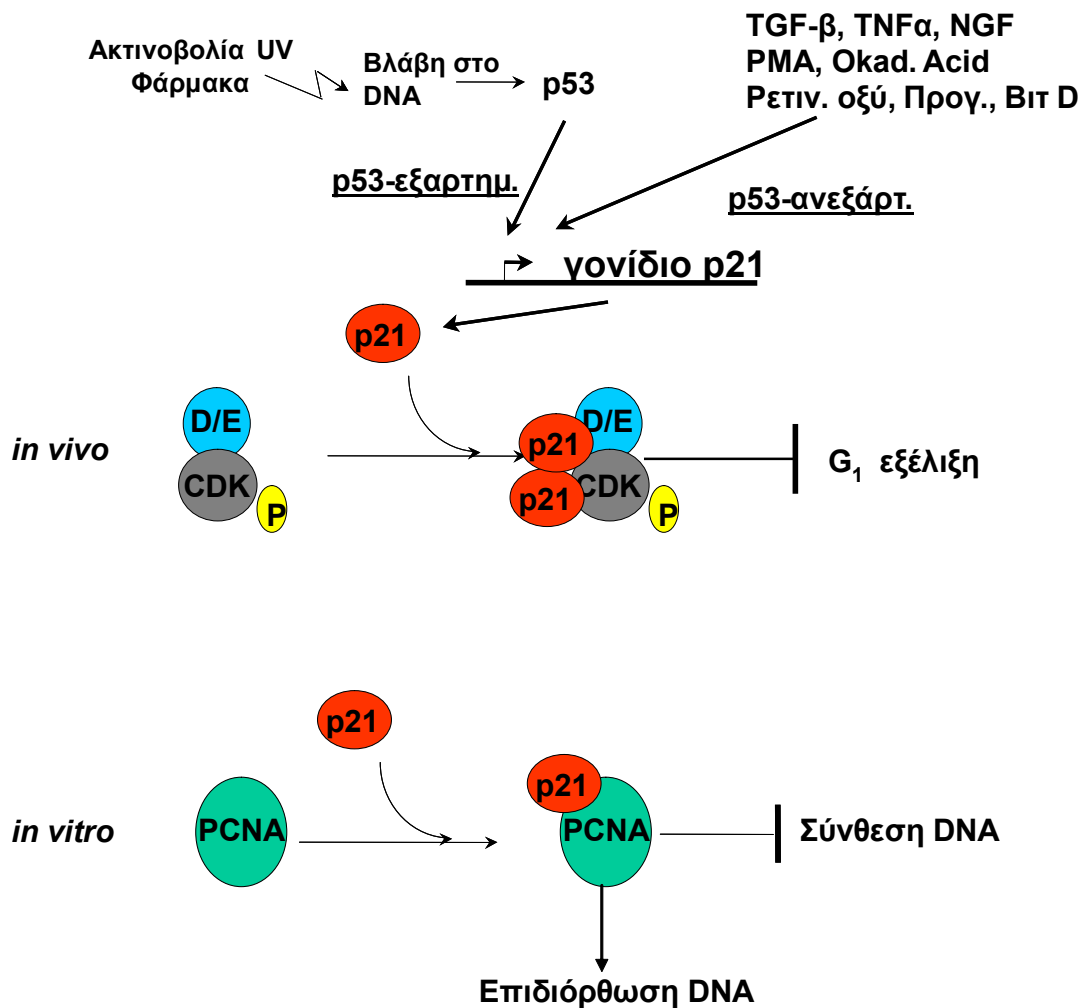
p21 και έλεγχος του κυτταρικού κύκλου

Σε φυσιολογικούς ινοβλάστες, η πλειονότητα των CDKs απαντάται σε τετραμερή σύμπλοκα τα οποία εκτός από την κυκλίνη και την καταλυτική υπομονάδα CDK, περιλαμβάνουν το πυρηνικό αντιγόνο πολλαπλασιασμού κυττάρων (PCNA) και μια πρωτεΐνη με MB 21000 Da, την p21 (Xiong et al., 1992; Zhang et al., 1993). Η p21 συνδέεται απευθείας στις cdc2, CDK2 και CDK4 (Harper et al., 1993; Xiong et al., 1993a,b; Zhang et al., 1993; Dulic et al., 1994) και απομονώνεται μαζί με αυτές σε ενεργά σύμπλοκα που σχηματίζονται με τις κυκλίνες A, B, D και E (Xiong et al., 1993a; Zhang et al., 1993, 1994). Η κλωνοποίηση του γονιδίου της p21, η επανασύνδεση καθαρής πρωτεΐνης p21 με σύμπλοκα κυκλίνης-CDK in vitro και η υπερέκφρασή της σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών απέδειξαν ότι η πρωτεΐνη αυτή είναι ένας αναστολέας της δράσης των CDKs, ικανός να αναστείλει τον κυτταρικό κύκλο (el-Deiry et al., 1993; Y Gu et al., 1993; Harper et al., 1993; Xiong et al., 1993b; Noda et al., 1994).

Η ικανότητα της p21 να παρεμποδίζει την ενεργότητα του συμπλόκου κυκλίνη-CDK έρχεται σε αντίθεση με την παρουσία της σε όλα σχεδόν τα σύμπλοκα αυτού του τύπου σε κύτταρα που έχουν φυσιολογικό κυτταρικό κύκλο. Η p21 αυξάνεται όταν ινοβλάστες σε “λήθαργο” και T λεμφοκύτταρα οδηγούνται σε πολλαπλασιασμό από μιτογόνους παράγοντες (Firpo et al., 1994; Li Y. et al., 1994; Noda et al., 1994; Nourse et al., 1994; Sheikh et al., 1994). Αυτό το παράδοξο διαλευκάνθηκε όταν βρέθηκε ότι τα σύμπλοκα p21-κυκλίνη-CDK σε διπλασιαζόμενα κύτταρα διατηρούσαν την ενεργότητα κινάσης, η οποία χανόταν με την προσθήκη επιπλέον p21 (Zhang et al., 1994; Harper et al., 1995). Επομένως, η μετατροπή των συμπλόκων ενεργούς μορφής σε ανενεργά επιτυγχάνεται μεταβάλλοντας τη στοιχειομετρία μεταξύ της p21 των συμπλόκων κυκλινών-CDK. Έτσι τα ενεργά σύμπλοκα κυκλίνης-CDK περιέχουν ένα μόριο p21, ενώ τα ανενεργά περιέχουν περισσότερες υπομονάδες p21. Αύξηση της ποσότητας της p21 ή μείωση των επιπέδων κυκλίνης-CDK, οδηγεί σε σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου.

Το γεγονός ότι τα σύμπλοκα που περιέχουν p21 και κυκλίνη-CDK περιέχουν επίσης PCNA, προτείνει ότι η p21 μπορεί να ρυθμίζει την επίδραση των CDKs στον κυτταρικό κύκλο μέσω επεμβάσεων στην αντιγραφή ή/και την επιδιόρθωση του DNA. Η p21 συνδέεται ανεξάρτητα στο PCNA και η συμμετοχή του τελευταίου δε φαίνεται να παίζει ρόλο στην αναστολή των κυκλινών-CDKs (Zhang et al., 1994). Η p21 παρεμποδίζει το PCNA να ενεργοποιήσει την DNA πολυμεράση δ (Flores-Rozas et al., 1994). Η p21 και το PCNA αλληλεπιδρούν άμεσα μεταξύ τους και ο ρόλος της p21 είναι να παρεμποδίζει τη μετακίνηση της DNA πολυμεράσης δ κατά τη διαδικασία επιμήκυνσης της αλυσίδας του DNA, χωρίς να επηρεάζει το σχηματισμό του ολοενζύμου που περιέχει και το PCNA. Από την άλλη, η p21 δεν επηρεάζει τη δυνατότητα επιδιόρθωσης του DNA που διαθέτει το PCNA (R. Li et al, 1994; Shivji et al, 1994), με συνέπεια η p21 να προσφέρει μια ισορροπία μεταξύ του διπλασιασμού του DNA και της μηχανής επιδιόρθωσης βλαβών κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.

Όλα τα στοιχεία που αναφέραμε για τη δράση της p21 ως αναστολέα του κυτταρικού κύκλου συνοψίζονται στην Εικόνα 4 (Sherr and Roberts, 1995).



Εικόνα 4: Μηχανισμοί δράσης και μεταγραφικής ρύθμισης του γονιδίου p21/WAF1 του ανθρώπου. TGF-β: Μετασχηματίζων Αυξητικός Παράγοντας- β, NGF: Αυξητικός Παράγοντας Νεύρων, TNF-α: Παράγοντας Νέκρωσης Όγκων-α, PMA: φορβολικοί εστέρες, D/E: κυκλίνες D ή E, CDK: Κινάση εξαρτώμενη από κυκλίνες, PCNA: Πυρηνικό αντιγόνο πολλαπλασιασμού κυττάρων (υπομονάδα της DNA πολυμεράσης δ).

Περιοχές της πρωτεΐνης p21 που αλληλεπιδρούν με τις CDKs

Η p21 αλληλεπιδρά άμεσα με τις κυκλίνες μέσω μιας συντηρημένης περιοχής κοντά στο αμινο-τερματικό άκρο (αμινοξέα 17-24; Cys1) (Chen et al, 1996a). Επίσης, διαθέτει μια δεύτερη, ασθενική περιοχή αλληλεπίδρασης με κυκλίνες (Cys 2) η οποία εντοπίζεται κοντά στο καρβοξυ-τερματικό άκρο και αλληλεπικαλύπτεται με την περιοχή πρόσδεσης του PCNA (Εικόνα 3). Επιπλέον, η p21 διαθέτει μια ξεχωριστή περιοχή πρόσδεσης της CDK2 στο αμινο-τερματικό άκρο (αμινοξέα 53-58) και η ιδανική αναστολή του συμπλόκου CDK-κυκλίνη απαιτεί πρόσδεση στη θέση αυτή ταυτόχρονα με πρόσδεση στη μια θέση πρόσδεσης των κυκλινών (Chen et al, 1996a). Μια τυπική Cys1 ακολουθία, αποτελούμενη από δύο βασικά αμινοξέα που

ακολουθούνται από δύο μη πολικά αμινοξέα (RRLFG στην p21), υπάρχει και στις p27 και p57, καθώς και σε θετικούς ρυθμιστές των συμπλόκων CDK-κυκλινών, όπως είναι οι φωσφατάση Cdc25 και τα υποστρώματα των συμπλόκων CDK-κυκλινών, p107, p130 και E2F (Saha et al, 1997). Έχει βρεθεί ότι η p21 ανταγωνίζεται τις p107 και p130 για τα σύμπλοκα CDK-κυκλινών και αποδιατάσσει ήδη σχηματισμένα σύμπλοκα μεταξύ των μορίων αυτών (Shiyanov et al, 1996).

Η πρωτεΐνη p21 ρυθμίζει την εξαρτώμενη από τον παράγοντα E2F μεταγραφή.

Είναι γνωστό ότι η p21 μπορεί να παρεμποδίσει, επίσης, τη μεταγραφή που εξαρτάται από τον παράγοντα E2F (Shiyanov et al, 1996). Το πιο αποδεκτό μοντέλο υποστηρίζει ότι η p21 ελέγχει τη μεταγραφή αυτή μέσω της επίδρασής της στη δράση των συμπλόκων CDK-κυκλινών και στη συσχέτισή τους με τα υποστρώματα. Παρόλα αυτά, πρόσφατα, αναφέρθηκε μια πολύ ενδιαφέρουσα θεωρία σύμφωνα με την οποία η p21 αλληλεπιδρά άμεσα με τον E2F (Delavaine and Thangue, 1999). Αυτό υποδηλώνει ότι ο E2F λειτουργεί ως άγκυρα για την p21, φέρνοντας τη σε επαφή με το σύμπλοκο έναρξης της μεταγραφής που εξαρτάται από E2F, αναστέλλοντας με αυτόν τον τρόπο τη δράση του. Η πιθανότητα η p21 να δρα ως άμεσος ρυθμιστής της μεταγραφής, ανεξάρτητα από τη ρύθμιση των συμπλόκων CDK-κυκλινών, ενισχύεται από πρόσφατες μελέτες που δείχνουν τον αρνητικό ρόλο της p21 στη διαφοροποίηση (Di Cunto et al, 1998).

Αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης p21 με το μεταγραφικό παράγοντα Myc.

Επίσης, έχει αναφερθεί και η αλληλεπίδραση της p21 με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, με αποτέλεσμα τη ρύθμιση της δράσης τους. Πρόσφατα, βρέθηκε ότι η p21 προσδένεται στην αμινο-τερματική περιοχή της c-Myc, επεμβαίνει στη διαμόρφωση του συμπλόκου c-Myc-Max και καταστέλλει την εξαρτώμενη από c-Myc μεταγραφή. Ταυτόχρονα, η αλληλεπίδραση της c-Myc με την p21 μπορεί να εξουδετερώσει την αναστολή

της σύνθεσης του DNA από την p21, εφόσον η c-Myc προσδένεται στην καρβοξυ-τερματική περιοχή της p21 και ανταγωνίζεται με το PCNA (Kitaura et al, 2000).

Η πρωτεΐνη p21 ρυθμίζει τη δράση μεταγραφικών συνενεργοποιητών.

Πέρα από τους μεταγραφικούς παράγοντες, η p21 ρυθμίζει και μεταγραφικούς συνενεργοποιητές, όπως ο p300 ή ο CBP, ενισχύοντας τη δράση τους. Η λειτουργία αυτή σχετίζεται άμεσα με τη ρύθμιση των συμπλόκων CDK-κυκλινών. Η δυνατότητα αλληλεπίδρασης της p300 με τον μεταγραφικό παράγοντα NFκB και η πρόοδος της εξαρτώμενης από NFκB μεταγραφής, ρυθμίζεται αρνητικά από την αλληλεπίδραση της p300 με τα σύμπλοκα CDK-κυκλινών. Επομένως, η αναστολή της δράσης των συμπλόκων CDK-κυκλινών από p21 εξηγεί την ικανότητα της τελευταίας να ενεργοποιεί την εξαρτώμενη από p300 μεταγραφή (Perkins et al, 1997). Πιθανά, όμως, η p21 να επηρεάζει τη δράση της p300 μέσω αλληλεπίδρασης με μια προς το παρόν άγνωστη περιοχή της p300, που παρεμποδίζει τη μεταγραφή. Αυτό στηρίζεται στο ότι η ενεργοποίηση της δράσης της p300 από την p21 συμβαίνει ανεξάρτητα από την ενδογενή ικανότητα ακετυλίωσης ιστονών που διαθέτει ο συνενεργοποιητής καθώς και από την περιοχή πρόσδεσής του στα σύμπλοκα CDK-κυκλινών (Snowden et al, 2000).

Η πρωτεΐνη p21 ρυθμίζει τη σύνθεση του DNA.

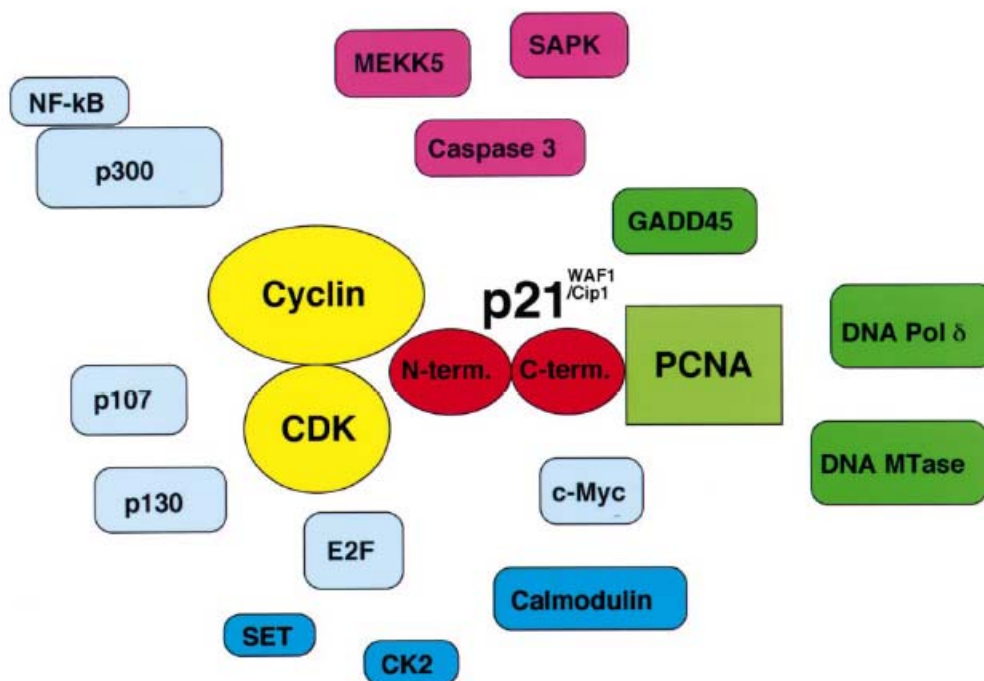
Εκτός από τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες της μεταγραφής, η p21 αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που εμπλέκονται άμεσα στην ανάπτυξη και τον έλεγχο της σύνθεσης του DNA. Η ογκοπρωτεΐνη E7 του ανθρώπινου ιού papilloma 16 (HPV-16) προσδένεται στην p21 (Funk et al, 1997; Jones et al, 1997). Όπως αναφέραμε και παραπάνω, σε φυσιολογικά πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, η p21 που προσδένεται στα σύμπλοκα CDK-κυκλινών, ταυτόχρονα συνδέεται και στο PCNA (Zhang et al, 1994). Με τον τρόπο αυτό η p21 πιθανά να λειτουργεί ως γέφυρα μεταξύ των CDK-κυκλινών και του μηχανισμού σύνθεσης του DNA, η οποία γέφυρα αποτελεί άμεσο στόχο της

πρωτεΐνης HPV-E7. Στην πραγματικότητα, η αλληλεπίδραση με την E7 παρεμποδίζει την ικανότητα της p21 να αναστέλλει τη δράση των συμπλόκων CDK-κυκλινών, καθώς και την εξαρτώμενη από PCNA σύνθεση του DNA. Η E7 ανταγωνίζεται με το PCNA για την πρόσδεση στην καρβοξυ-τερματική περιοχή της p21, αποτρέποντας έτσι την αναστολή του PCNA από την p21. Αντίθετα, η E7 δε διαταράσσει την αλληλεπίδραση της p21 με τα σύμπλοκα CDK-κυκλινών, αλλά αποτρέπει την καταστολή της ενεργότητας των συμπλόκων αυτών με έναν άγνωστο ακόμη μηχανισμό (Funk et al, 1997; Jones et al, 1997). Μια ενδιαφέρουσα εξήγηση είναι ότι η πρόσδεση της p21 στα σύμπλοκα CDK-κυκλινών αυτή καθ' αυτή δεν είναι αρκετή για αναστολή της δράσης των συμπλόκων, αλλά απαιτείται και κάποια άλλη περιοχή της p21, η οποία λόγω της πρόσδεσης της E7 είναι παραμορφωμένη. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή είναι και η ταυτοποίηση μιας μεταλλαγμένης μορφής p21 με μια αντικατάσταση αμινοξέος (αμινοξύ 94), η οποία μορφή δεν μπορεί να αναστείλει τη δράση των συμπλόκων CDK-κυκλινών, αλλά είναι ικανή να προσδεθεί ισχυρά στα σύμπλοκα αυτά (Balbin et al, 1996).

Οι πρωτεΐνες E7 και c-Myc δεν είναι οι μόνες που προσδέονται στην p21 και ανταγωνίζονται το PCNA (Εικόνα 3). Η p21 ανήκει σε μια κατηγορία πρωτεϊνών που περιέχουν μια συντηρημένη θέση πρόσδεσης του PCNA, των οποίων οι άμεσες αλληλεπιδράσεις με το PCNA αλληλοεξουδετερώνονται. Το PCNA περιβάλλει τη διπλή έλικα του DNA σε μια ομοτριμερή μορφή και λειτουργεί ως ένας κυλιόμενος σφιγκτήρας που απαιτείται για τη δράση των DNA πολυμερασών δ και ϵ (Kelman et al, 1998). Εκτός από το ρόλο του στην αντιγραφή του DNA, το PCNA απαιτείται και για την επιδιόρθωση με αποκοπή νουκλεοτιδίου, τουλάχιστο σε συστήματα ελεύθερων κυττάρων (Shivji et al, 1994; Nichols et al, 1992). Θεωρείται ότι ο διπλός αυτός ρόλος του PCNA διαμεσολαβείται από πρωτεΐνες ειδικές για κάθε μια από τις λειτουργίες αυτές. Η πρόσδεση της p21 αρχικά αποδείχθηκε ότι αναστέλλει την αντιγραφή του DNA που εξαρτάται από PCNA, αφήνοντας ανεπηρέαστη τη λειτουργία επιδιόρθωσης του DNA (Li R. et al, 1994; Shivji et al, 1994), παρόλο που έχει αναφερθεί, επίσης, αναστολή της εξαρτώμενης από PCNA επιδιόρθωσης από την p21 (Pan et al, 1995). Τόσο η πρόσδεση του PCNA στο DNA, όσο και η ικανότητά του να μετακινείται κατά μήκος του DNA δεν επηρεάζονται από την p21 (Podust et al, 1995), γεγονός που δείχνει ότι η αναστολή της δράσης του

PCNA από την p21 οφείλεται στην παρεμπόδιση αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες. Τουλάχιστο δύο μεταβολικά ένζυμα του DNA έχουν βρεθεί να ανταγωνίζονται για πρόσδεση στην ίδια περιοχή του PCNA με την p21 (Warbrick et al, 1997; Chuang et al, 1997). Η Fen1 (Flap endonuclease 1) είναι μια 5'-3' εξωνουκλεάση, υπεύθυνη στην αντιγραφή του DNA για την ένωση των τμημάτων Okazaki και για τη συμπλήρωση της σύνθεσης της καθυστερημένης αλυσίδας (Siegal et al, 1992; Waga et al, 1994). Το PCNA αλληλεπιδρά φυσιολογικά με τη Fen1 και υποκινεί την ενζυμική δραστηριότητά της (Li X. et al, 1995; Wu et al, 1996). Πρόσφατα, αναφέρθηκε η δομή ενός συμπλόκου μεταξύ του PCNA και ενός πεπτιδίου 22 αμινοξέων που αντιστοιχεί στην καρβοξυ-τερματική περιοχή της p21 (Gulbis et al, 1996). Τα κεντρικά αμινοξέα της περιοχής πρόσδεσης με τον PCNA της p21 είναι τα πιο συντηρημένα με τη Fen1 και πιθανά διαμεσολαβούν την κοινή πρόσδεσή του στο PCNA (Warbrick et al, 1997). Επομένως, η παρεμπόδιση της πρόσδεσης του PCNA με τη Fen1 μπορεί να εξηγήσει ικανοποιητικά το μηχανισμό παρεμπόδισης του διπλασιασμού του DNA από την p21. Πάντως, παρόμοιες εξηγήσεις θα μπορούσαν να προσφέρουν οι αλληλεπιδράσεις της p21 με άλλα ένζυμα που εμπλέκονται στο διπλασιασμό του DNA, όπως η DNA(κυτοσίνη-5) μεθυλο-τρανφεράση (MCMT) (Chuang et al, 1997).

Πέρα από τα μεταβολικά ένζυμα του DNA, η GADD45 και τα μέλη της οικογένειάς της αποτελούν μια δεύτερη ομάδα πρωτεϊνών που εμπλέκονται στις αλληλεπιδράσεις p21-PCNA (Εικόνα 5) (Dotto, 2000). Η GADD45 είναι μια πρωτεΐνη 165 αμινοξέων η οποία εντοπίστηκε σε κύτταρα μετά από αναστολή της ανάπτυξης ή βλάβη του DNA (Fornace, 1992). Όπως και η p21, η GADD45 είναι μια πυρηνική πρωτεΐνη η οποία εμπλέκεται στην αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης, στην απόπτωση, στην επιδιόρθωση με αποκοπή και στην σταθερότητα του DNA (Smith et al, 1994; Kearsley et al, 1995; Hollander et al, 1999). Η GADD45 αλληλεπιδρά με το PCNA μέσω μιας περιοχής η οποία διαφέρει από αυτή που αναγνωρίζει η p21 (Smith et al, 1994; Hall et al, 1995; Warbrick et al, 1995). Παρά το γεγονός αυτό, τα δύο μόρια ανταγωνίζονται για την πρόσδεση με το PCNA. Η GADD45 και η ομόλογή της, MyD118, μπορούν να αλληλεπιδράσουν άμεσα με την p21 (Kearsley et al, 1995; Vairapandi et al, 1996).



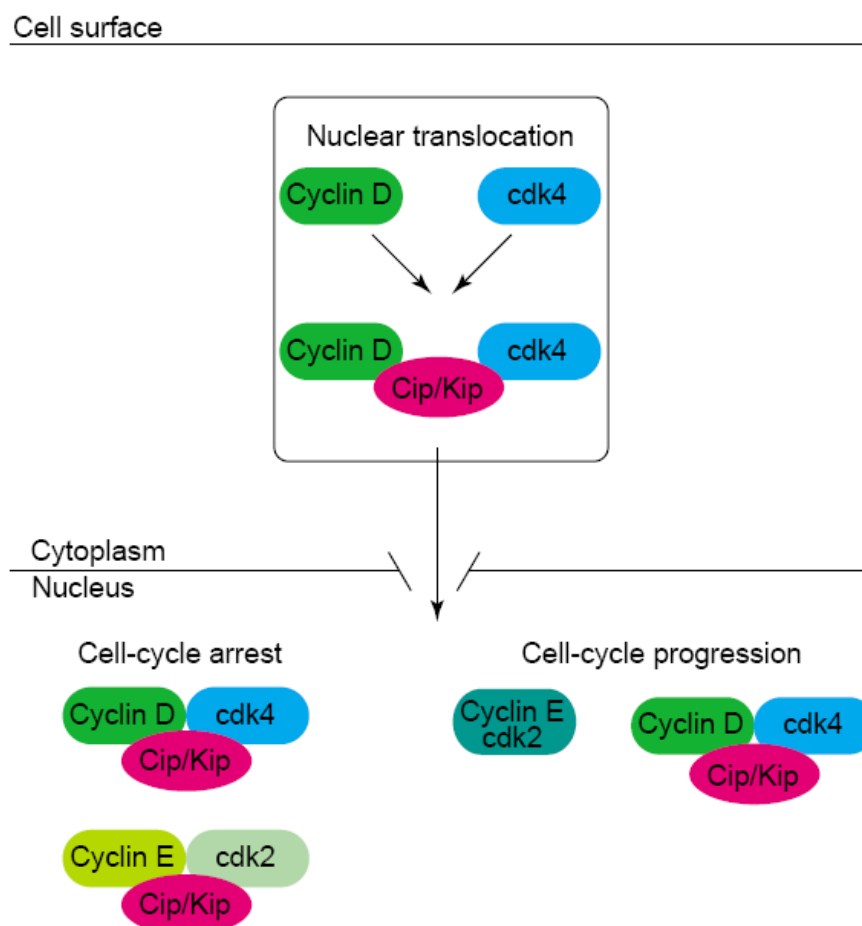
Εικόνα 5 : Άμεσες και έμμεσες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις στις οποίες συμμετέχει η p21 (Dotto, 2000)

Η p21 ως παράγοντας συναρμολόγησης των συμπλόκων CDK-κυκλινών

Έχει βρεθεί ότι σε πρωτογενείς ινοβλάστες που δεν εκφράζουν ενδογενώς p21 ή p27 δεν είναι εφικτή η δημιουργία συμπλόκων cdk4-κυκλίνη D1 (Cheng et al, 1999). Φαίνεται, λοιπόν, ότι οι Cip/Kip πρωτεΐνες λειτουργούν ως γέφυρα μεταξύ των δύο υπομονάδων, ώστε να ενισχυθεί η πρόσδεση της κυκλίνης D1 στη CDK. Οι πρωτεΐνες αυτές δρουν ως παράγοντες συναρμολόγησης στο κυτταρόπλασμα, όπου πιθανά προσδένονται στη cdk4 αμέσως μετά την πρωτεϊνική σύνθεση και διαμόρφωση (Cheng et al, 1999). Επιπλέον, οι κυτταροπλασματικές Cip/Kip πρωτεΐνες προάγουν την πυρηνική είσοδο των συμπλόκων τύπου D τα οποία δε διαθέτουν ακολουθίες πυρηνικού εντοπισμού. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι χαμηλά επίπεδα κυκλίνης D1 μπορούν να εισέλθουν στον πυρήνα απουσία p21 και p27, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι Cip/Kip πρωτεΐνες μάλλον ενισχύουν την πυρηνική είσοδο της κυκλίνης D1 (Cheng et al, 1999). Πάντως, οι πρωτεΐνες αυτές αλληλεπιδρούν με διαμεσολαβητές που

εμπλέκονται στην επικοινωνία μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα. Η p21 παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση μεταξύ της κυκλίνης D1 και της εξπορτίνης CRM1, οδηγώντας σε υψηλά επίπεδα κυκλίνης D στον πυρήνα (Alt et al, 2002).

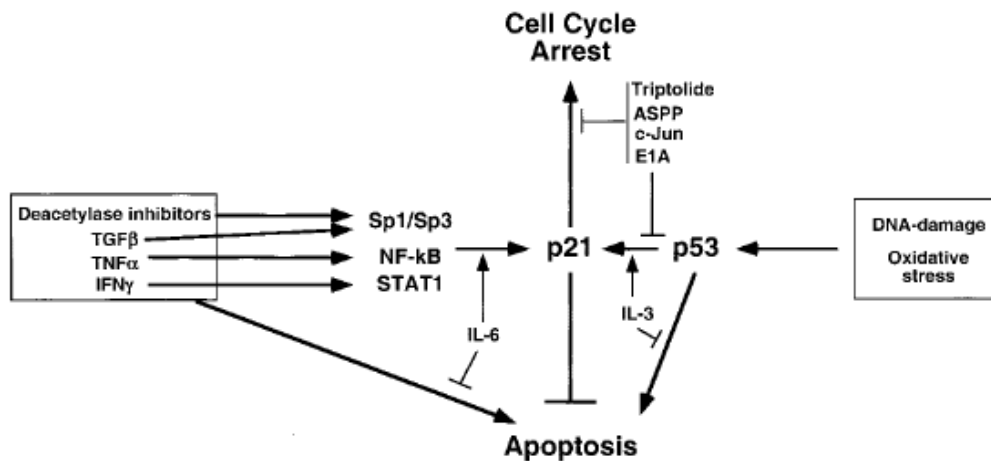
Επομένως, οι Cip/Kip πρωτεΐνες πέρα από την πυρηνική ανασταλτική τους δράση, ενεργοποιούν τα σύμπλοκα CDK και κυκλινών τύπου D, ενισχύοντας τη συνεργασία και την πυρηνική τους συσσώρευση. Η δράση αυτή της κυτταροπλασματικής p21 συνοψίζεται στην Εικόνα 6 (Coqueret, 2003).



Εικόνα 6 : Οι Cip/Kip πρωτεΐνες ρυθμίζουν τα σύμπλοκα CDK-κυκλινών στο κυτταρόπλασμα. Οι p21 και p27 λειτουργούν ως γέφυρα μεταξύ της κυκλίνης D και της cdk4, ώστε να ενισχύσει την πρόσδεσή τους. Μετά την πρόσδεση, οι Cip/Kip πρωτεΐνες προάγουν τον πυρηνικό εντοπισμό του συμπλόκου (Coqueret, 2003)

Η p21 ως αναστολέας της απόπτωσης

Μετά από επίδραση ακτινοβολίας και χημειοθεραπευτικών παραγόντων, η πρωτεΐνη p53 σταθεροποιείται και οδηγεί σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου και απόπτωση. Παρόλο που οι μηχανισμοί της εξαρτώμενης από p53 απόπτωσης δεν είναι ακόμη κατανοητοί, η αναστολή του κυτταρικού κύκλου από p53 γίνεται μέσω της p21. Δεν είναι ακόμη γνωστός ο τρόπος με τον οποίο το κύτταρο επιλέγει μεταξύ της απόπτωσης και της αναστολής του κυτταρικού κύκλου μετά από βλάβη στο DNA, αλλά υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η p21 αποτελεί κύριο αναστολέα της απόπτωσης που οφείλεται σε p53 (Εικόνα 7) (Gartel and Tyner, 2002).



Εικόνα 7 : Η p21 αποτελεί κύριο αναστολέα της εξαρτημένης και ανεξάρτητης από p53 απόπτωσης. Η βλάβη του DNA και το οξειδωτικό στρες (H_2O_2) ενεργοποιούν δύο μονοπάτια, αυτό που εμπλέκει την εξαρτημένη από p53 απόπτωση και αυτό που εμπλέκει την εξαρτημένη από p53 ενεργοποίηση της p21 που προστατεύει τα κύτταρα από απόπτωση. Καταστολή ή εξάλειψη της p21 ευνοεί την αποπτωτική δράση της p53, ενώ αύξηση της p21 καταστέλλει την εξαρτημένη από p53 απόπτωση (Gartel and Tyner, 2002)

Καταστολή της εξαρτημένης από p53 αύξησης της μεταγραφής της p21 ή διάσπαση της p21 από κασπάση (Εικόνα 8) συνήθως οδηγεί σε αυξημένη απόπτωση που είναι εξαρτημένη από p53. Για παράδειγμα, ανθρώπινες καρκινικές σειρές που επεξεργάσθηκαν με παράγοντες που προκαλούν βλάβη στο DNA, ανέστειλαν τον κυτταρικό τους κύκλο μέσω p21, ενώ οδηγήθηκαν σε απόπτωση μετά από διάσπαση της p21 από την κασπάση 3 (Εικόνα 8B) (Zhang et al, 1999). Παρομοίως, μεταλλαγμένες μορφές της p53

που δεν ενεργοποιούν το γονίδιο της p21 αύξησαν την απόπτωση από την p53 αγρίου τύπου (Kaneuchi et al 1999; Okaichi et al, 1999; Kokontis et al, 2001). Κύτταρα A431 τα οποία εκφράζουν μεταλλαγμένη p53 η οποία δεν ενεργοποιεί την p21, οδηγούνται σε απόπτωση μετά από επίδραση με ακτινοβολία γ ή υπέρυθρη, ενώ η αύξηση της p21 μετά από επίδραση της ουσίας mimosine προστατεύει τα κύτταρα αυτά από απόπτωση (Bissonnette et al, 1998).

Η ουσία triptolide, ένας παράγοντας ανοσοκαταστολής, ενισχύει την απόπτωση που οφείλεται στο φάρμακο Adriamycin μέσω αύξησης της έκφρασης της p53 πρωτεΐνης και ταυτόχρονη καταστολή της μεταγραφής της p21 (Εικόνα 7) (Chang et al, 2001).

Η ουσία Adriamycin αυξάνει την εξαρτημένη και ανεξάρτητη από p53 απόπτωση και η αύξηση της p21 προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση που προκαλεί η Adriamycin (Bunz et al, 1999). Άμεση πρόσδεση και απενεργοποίηση της p21 από την ογκοπρωτεΐνη E1A οδηγεί σε αυξημένη ενεργότητα της Cdk2 σε κύτταρα με βλάβες στο DNA και έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της απόπτωσης μετά από βλάβη του DNA σε κύτταρα HCT116 (Εικόνα 7) (Chattopadhyay et al, 2001). Αξιοσημείωτο είναι ότι η αυξημένη από Adriamycin απόπτωση παρεμποδίζεται από p21 που διαθέτει ανασταλτική δράση για Cdk, και όχι από p21 που δε διαθέτει τη δυνατότητα αυτή σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου που δεν εκφράζουν p21 (Lu et al, 2000).

Η ουσία Etoposide, ένας αναστολέας της τοποϊσομεράσης II, είναι ένα κυτταροτοξικό φάρμακο που χρησιμοποιείται συχνά σε χημειοθεραπεία έναντι του καρκίνου. Υπερέκφραση p21 σε ανθρώπινα κύτταρα οστεοσαρκώματος που εκφράζουν p53 αγρίου τύπου, πριν και μετά την επίδραση με Etoposide εμπόδισε τον κυτταρικό θάνατο των κυττάρων αυτών (Prabhu et al, 1999).

Παρομοίως, το οξειδωτικό στρες (H_2O_2) ενεργοποιεί δύο μονοπάτια : το ένα εμπλέκει εξαρτημένη από p53 απόπτωση και το άλλο εξαρτημένη και ανεξάρτητη από p53 ενεργοποίηση της p21 που προστατεύει τα κύτταρα από απόπτωση (Εικόνα 7) (Migliaccio et al, 1999). Σε μακροφάγα κύτταρα, τα νιτρικά οξέα αυξάνουν την εξαρτημένη από p53 ενεργοποίηση της p21 και την αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Έκφραση antisense p21 μειώνει την

έκφραση της p21, καταργεί την αναστολή στη φάση G₁ και οδηγεί τα κύτταρα σε απόπτωση (Yang et al, 2000).

Όλα τα παραπάνω δείχνουν ότι η εξαρτημένη από p53 αύξηση της p21 ακυρώνει την αποπτωτική δράση της p53. Καταστολή ή εξάλειψη της έκφρασης της p21 από antisense p21, E1A, triptolide ή έκφραση πρωτεΐνης p53 η οποία δεν ενεργοποιεί την p21 ευνοεί τον αποπτωτικό ρόλο της p53, ενώ η υπερέκφραση εξωγενούς p21 ή η αύξηση της ενδογενούς p21 αναστέλλει την εξαρτημένη από p53 απόπτωση (Εικόνα 7).

Εκτός, όμως, από τους παράγοντες που επάγουν την εξαρτημένη από p53 απόπτωση, διάφορα άλλα σήματα, όπως ο TGF-β, ο TNF-α, οι αναστολείς των απακετυλασών ιστονών, η IFN-γ και άλλοι, μπορούν να αυξήσουν την απόπτωση και να ενεργοποιήσουν την p21 ανεξάρτητα της p53 (Εικόνα 7) (Gartel and Tyner, 1999). Στις περιπτώσεις αυτές η p21 προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση που προκαλούν οι παράγοντες αυτοί ανεξάρτητα της p53. Ο TGF-β παρεμποδίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω αναστολής του κυτταρικού κύκλου ή απόπτωσης. Η αναστολή του κυτταρικού κύκλου από τον TGF-β διαμεσολαβείται από την ανεξάρτητη από p53 ενεργοποίηση των αναστολέων των CDK p15 και p21 (Εικόνα 7).

Ο παράγοντας TNF-α και ο συνδέτης CD95 είναι μέλη της οικογένειας των κυτταροκινών που είναι τοξικές για συγκεκριμένα καρκινικά κύτταρα. Αλληλεπιδρούν με διάφορους μεμβρανικούς υποδοχείς και οδηγούν σε ενεργοποίηση των κασπασών και απελευθέρωση του κυτοχρώματος c. Ο TNF-α ευνοεί την απόπτωση και την έκφραση της p21 σε κάποιες κυτταρικές σειρές με ένα ανεξάρτητο από p53 μονοπάτι (Εικόνα 7). Η αύξηση της p21 στα κύτταρα αυτά εξαρτάται από τον παράγοντα NF-κB και η αναστολή του NF-κB έχει ως αποτέλεσμα τα κύτταρα αυτά να οδηγούνται σε απόπτωση από τον TNF-α. Επειδή, η υπερέκφραση της p21 στα κύτταρα αυτά προστατεύει από την απόπτωση που προκαλεί ο TNF-α, η p21 θεωρείται ως κύριος διαμεσολαβητής του αντιαποπτωτικού ρόλου του NF-κB, στα κύτταρα αυτά (Javelaud et al, 2000).

Η IFN-γ αυξάνει, επίσης, την p21 με ένα μηχανισμό που εξαρτάται από τον παράγοντα STAT1 και είναι ανεξάρτητος από p53 (Εικόνα 7) (Gartel et al, 1999). Στη συνέχεια η p21 προστατεύει τα ανθρώπινα αδenoκαρκινώματα

παχέος εντέρου από την εξαρτημένη από IFN- γ απόπτωση (Hobeika et al, 1999).

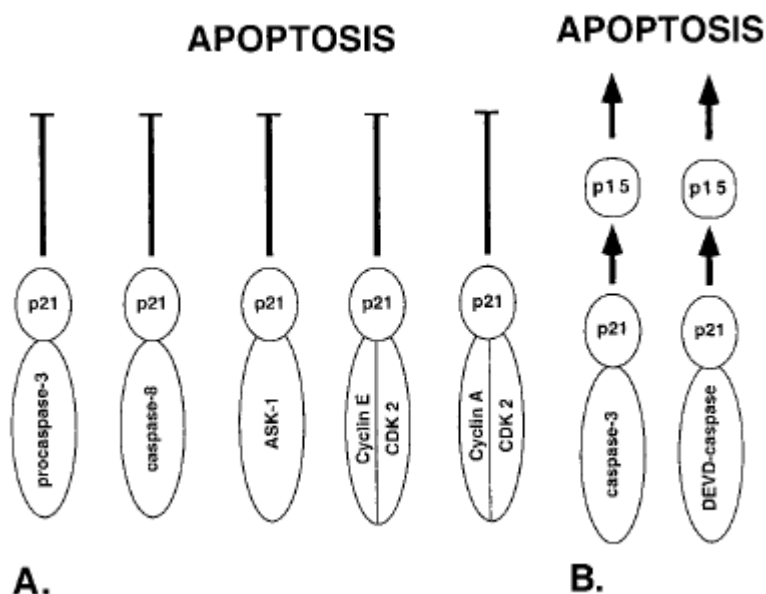
Τα επίπεδα της p21 συχνά καθορίζουν την κυτταρική απόκριση σε διαφορετικά φάρμακα. Για παράδειγμα, βρέθηκε ότι σε μια ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά που οδηγείται σε απόπτωση μετά από επίδραση με το φάρμακο prostaglandin A₂, τα επίπεδα της p21 είναι χαμηλά (Gorospe et al, 1996). Αντίθετα, άλλες κυτταρικές σειρές που εκφράζουν υψηλά επίπεδα p21 αναστέλλουν τον κυτταρικό τους κύκλο στη φάση G₁ μετά από επίδραση με το ίδιο φάρμακο (Gorospe et al, 1996; Hitomi et al, 1996).

Βέβαια, ο μηχανισμός με τον οποίο η p21 αποτρέπει την απόπτωση των κυττάρων δεν είναι ακόμη απόλυτα κατανοητός. Ένας μηχανισμός εικάζεται ότι είναι η αναστολή του κυτταρικού κύκλου από την p21 (κυρίως στο σημείο ελέγχου G₂/M) η οποία επιτρέπει την επιδιόρθωση ή αποτρέπει τη βλάβη του DNA (Εικόνα 8A). Για παράδειγμα, αδeno-σχετιζόμενοι ιοί αυξάνουν επιλεκτικά την απόπτωση σε κύτταρα που δεν εκφράζουν p53 και p21. Κύτταρα με ενεργές p21 και p53 δεν πεθαίνουν αλλά αναστέλλουν τον κυτταρικό τους κύκλο στη φάση G₂, γεγονός που χαρακτηρίζεται από αύξηση στην ενεργότητα της p53 και στα επίπεδα της p21 (Raj et al, 2001). Κύτταρα με ενεργές p53 και p21 σταματούν στη G₂, ώστε να εξαλείψουν το γένωμα των ιών και ακολούθως να συνεχίσουν την κυτταρική διαίρεση. Κύτταρα χωρίς p53 και p21 δεν μπορούν να διατηρηθούν στη φάση G₂ και ξεκινούν την καταστροφική πυρηνική διαίρεση που οδηγεί τελικά σε κυτταρικό θάνατο (Vogelstein and Kinzler, 2001). Στην περίπτωση αυτή, η ικανότητα της p21 να διαμεσολαβεί την εξαρτημένη από p53 αναστολή στη φάση G₂ μετά από βλάβη στο DNA, προστατεύει τα κύτταρα από απόπτωση. Παρόμοιες παρατηρήσεις έχουν αναφερθεί και για άλλους παράγοντες που αυξάνουν την p21 και προστατεύουν έτσι από απόπτωση (Lin et al, 2000; Schmidt et al, 2001).

Ένας διαφορετικός μηχανισμός είναι αυτός που βασίζεται στη δυνατότητα της p21 να προσδένεται και απενεργοποιεί τα σύμπλοκα Cdk2-κυκλίνης A (Εικόνα 8A). Έχει δειχθεί ότι η διάσπαση της p21 από την κασπάση 3 είναι ένας σημαντικός μηχανισμός για την ενεργοποίηση του συμπλόκου Cdk2-κυκλίνης A, το οποίο σχετίζεται με το θάνατο σε διάφορες κυτταρικές σειρές (Εικόνα 8B) (Levkau et al, 1998; Gervais et al, 1998; Jin et

al, 2000; Adachi et al, 2001). Η ενεργότητα της Cdk2 είναι απαραίτητος παράγοντας για τον αποπτωτικό θάνατο και πιθανά να είναι αναγκαία για τη συμπύκνωση της χρωματίνης, το ζάρωμα του κυττάρου και την απώλεια πρόσδεσης στο υπόστρωμα που παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της απόπτωσης (Harvey et al, 2000).

Πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν και άλλους μηχανισμούς μέσω των οποίων η p21 μπορεί να αναστείλει τον κυτταρικό θάνατο. Αυτοί περιλαμβάνουν αναστολή της αρχικής διάσπασης της p21 από κασπάση (Εικόνα 8A) (Xu and El-Deiry, 2000), αλληλεπίδραση της p21 με την προκασπάση 3 που οδηγεί σε ανθεκτικότητα στον εξαρτημένο από Fas κυτταρικό θάνατο (Εικόνα 8A) (Suzuki et al, 1998) και σταθεροποίηση του αναστολέα της απόπτωσης c-IAP1 (Steinman and Johnson, 2000).



Εικόνα 8 : Πιθανοί μηχανισμοί αναστολής της απόπτωσης από p21. A) Η p21 μπορεί να παρεμποδίζει την απόπτωση είτε αλληλεπιδρώντας με προαποπτωτικά μόρια όπως η προκασπάση-3, η κασπάση-8 και η κινάση-1 που ρυθμίζει το εξαρτημένο από κινάσες μονοπάτι απόπτωσης (ASK-1), είτε με αναστολή του κυτταρικού κύκλου μετά από πρόσδεση στα σύμπλοκα Cdk2-κυκλίνης A και Cdk2-κυκλίνης E. B) Η απόπτωση σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές διαμεσολαβείται από διάσπαση της p21 από την κασπάση 3 και αύξηση της ενεργότητας του συμπλόκου Cdk2-κυκλίνης A. Η διάσπαση της p21 από κασπάση 3 και DEVD-κασπάση οδηγεί στην εμφάνιση ενός προϊόντος p15 και στη μείωση της δραστηριότητας της p21 (Gartel and Tyner, 2002)

Η p21 ως προαγωγέας της απόπτωσης

Μια πληθώρα τύπων κυτταρικού στρες οδηγεί σε αύξηση της p21 η οποία μπορεί να είναι ανεξάρτητη ή εξαρτημένη από p53. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η αναστολή του κυτταρικού κύκλου που οφείλεται στην αύξηση της p21 προστατεύει τα κύτταρα και παρεμποδίζει την απόπτωση. Ωστόσο, μια σειρά δημοσιεύσεων προτείνουν ότι η p21 μπορεί να διαδραματίσει και προαποπτωτικό ρόλο κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες σε συγκεκριμένα συστήματα. Υπερέκφραση της p21 σε θυμοκύτταρα οδήγησε σε αυξημένο κυτταρικό θάνατο εξαρτημένο από p53 μετά την επίδραση με ακτινοβολία, αλλά όχι μετά την επίδραση με dexamethasone σε διαγενετικά ζώα (Fotedar et al, 1999). Υπερέκφραση της p21 σε καρκινικά κύτταρα που δεν εκφράζουν p53 αύξησε την απόπτωση (Shibata et al, 2001). Επίσης, υπερέκφραση της p21 σε κυτταρικές σειρές που έχουν επεξεργασθεί με την ουσία cisplatin οδηγήθηκαν σε απόπτωση (Kondo et al, 1996; Lincet et al, 2000).

Σε άλλες καρκινικές σειρές, η υπερέκφραση της p21 οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης της προαποπτωτικής πρωτεΐνης Bax, γεγονός που μεταβάλλει τη μοριακή αναλογία Bcl-2:Bax (Kang et al, 1999; Hsu et al, 1999; Y. Li et al, 1999).

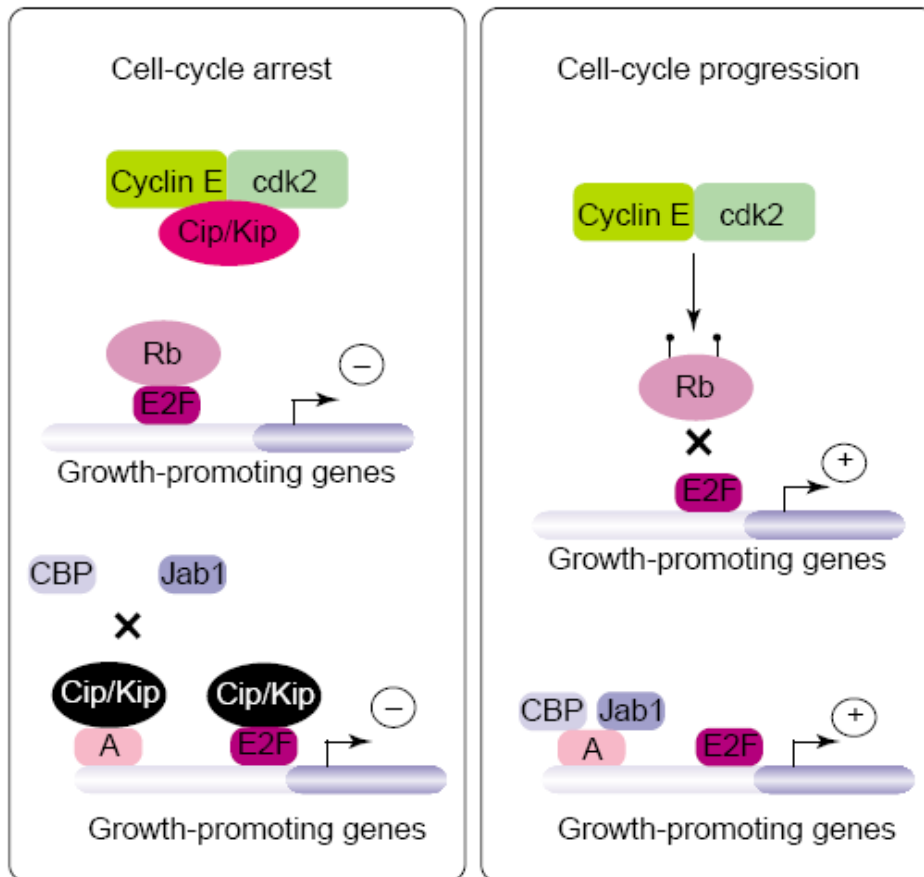
Στην πλειοψηφία των παραπάνω μελετών, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η υπερέκφραση της p21 αυξάνει την απόπτωση, ενώ η αναστολή της δράσης της οδηγεί σε μείωση της απόπτωσης. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα συστήματα που χρησιμοποιήθηκαν δε διαθέτουν λειτουργική p53. Οι μηχανισμοί με τους οποίους η p21 ευνοεί την απόπτωση δεν είναι ακόμη κατανοητοί, αλλά πιθανά να σχετίζονται με την ικανότητά της να αλληλεπιδρά και να ρυθμίζει συστατικά της μηχανής επιδιόρθωσης του DNA. Συνολικά, πάντως, οι αναφορές που υποστηρίζουν αντιαποπτωτικό ρόλο για την p21 είναι πολύ περισσότερες από αυτές που αποδίδουν αποπτωτικές ιδιότητες στην πρωτεΐνη αυτή (Gartel and Tyner, 2002).

Η p21 ως μεταγραφικός συνενεργοποιητής

Διάφορες μελέτες προτείνουν ότι η p21 μπορεί να δράσει ως μεταγραφικός συνενεργοποιητής. Η p21 ρυθμίζει τη δράση των NF-κB, STAT3, Myc, C/EBP και E2F (Kitaura et al, 2000; Coqueret and Gascan, 2000;

Harris et al, 2001), ενώ η έκφρασή της καταστέλλει την έκφραση διαφόρων γονιδίων που εμπλέκονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, όπως αυτά που κωδικοποιούν για την DNA πολυμεράση α, την τοποϊσομεράση II, την κυκλίνη B1 και τη cdk1 (Chang et al., 2000). Επιπλέον, η p21 αλληλεπιδρά με την ακετυλάση των ιστονών CBP/p300 (Snowden et al., 2000), γεγονός που υποδεικνύει ότι μπορεί να δρα ως γενικός ρυθμιστής της δυνατότητας ακετυλίωσης των ιστονών του παράγοντα CBP ή της αλληλεπίδρασής του με τις DNA πολυμεράσες. Επίσης, η p21 λειτουργεί ως μεταγραφικός αναστολέας όταν προσδένεται τεχνητά στο DNA (Delavaine and La Thangue, 1999). Αυτό οδηγεί στην ενδιαφέρουσα υπόθεση ότι η πυρηνική μορφή του αναστολέα στοχεύει τη cdk2 και ταυτόχρονα παρεμποδίζει τα γονίδια που προάγουν την ανάπτυξη (Εικόνα 9). Μέσω των E2F, Myc και STAT3, η p21 μπορεί να ρυθμίζει αρνητικά γονίδια που εμπλέκονται σε μιτογονικές αποκρίσεις.

Στο σημείο αυτό πρέπει να διευκρινιστεί ότι δεν είναι γνωστό αν αυτές οι μεταγραφικές δραστηριότητες είναι άμεσες. Για παράδειγμα, η p21 ρυθμίζει έμμεσα τον NF-κB αναστέλλοντας την εξαρτημένη από cdk2 δράση του. Επιπλέον, η υψηλή έκφραση των Cip/Kip πρωτεϊνών ενισχύει την ανασταλτική δράση του συμπλόκου Rb-E2F, υποδεικνύοντας ότι αυτή η μεταγραφική δραστηριότητα μπορεί να διαμεσολαβείται έμμεσα από τον E2F και την αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Ωστόσο, μεταλλαγμένες p21 πρωτεΐνες που δε διαθέτουν δυνατότητα πρόσδεσης στις CDK, μπορούν να αναστείλουν τη μεταγραφή (Delavaine and La Thangue, 1999). Επίσης, η p21 αλληλεπιδρά άμεσα με τους παράγοντες Myc, STAT3 και C/EBPα, γεγονός που υποδεικνύει ότι αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι σε θέση να οδηγήσουν την πρωτεΐνη στο DNA. Γι' αυτό η μεταγραφική δραστηριότητα της p21 πιθανά να είναι ανεξάρτητη του μονοπατιού των CDK και της αναστολής του κυτταρικού κύκλου. Πιο συγκεκριμένα, η μεταγραφική δράση αναστέλλει ή οδηγεί σε επανατροφοδότηση γονιδίων που εμπλέκονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Ο μηχανισμός αυτός μπορεί να δρα παράλληλα με την αρνητική ρύθμιση της δράσης των CDK και να οδηγεί σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου (Coqueret, 2003).



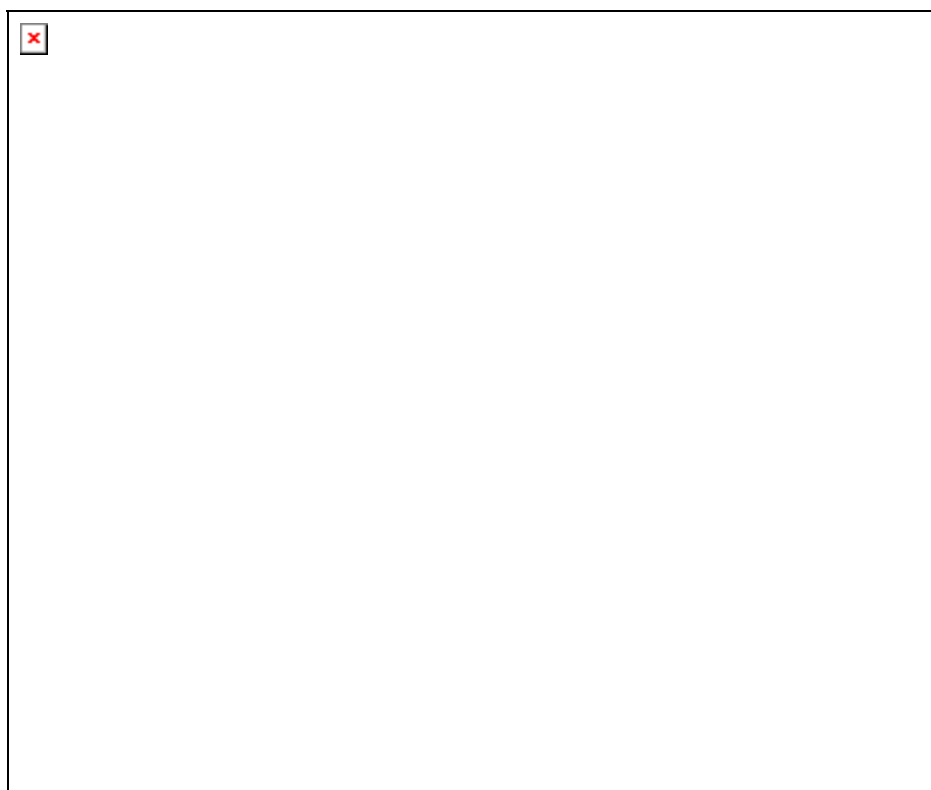
Εικόνα 9 : Οι Cip/Kip πρωτεΐνες αποτρέπουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου μέσω αναστολής των cdk και αρνητικής μεταγραφικής ρύθμισης γονιδίων που προάγουν την κυτταρική αύξηση. A : ενεργοποιητές (Coqueret, 2003)

Το p21 γονίδιο και η p21 πρωτεΐνη

Το γονίδιο p21 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6, στη θέση 6p21.2. Η ακολουθία και η δομή του είναι συντηρημένη στα τρωκτικά. Ο υποκινητής του γονιδίου μπορεί να διαχωρισθεί σε δύο διακριτές περιοχές : την κοντινή περιοχή, που περιλαμβάνει 6 θέσεις πρόσδεσης του Sp1 και μια θέση πρόσδεσης του παράγοντα Miz-1 και τη μακρινή περιοχή, που περιλαμβάνει δύο θέσεις πρόσδεσης της πρωτεΐνης p53 (Εικόνα 10). Οι θέσεις πρόσδεσης της πρωτεΐνης Sp1 ονομάζονται 1-6 και οι δύο από αυτές (5 και 6) είναι αλληλεπικαλυπτόμενες.

Το προϊόν του γονιδίου αυτού είναι μια πρωτεΐνη 164 αμινοξέων σε μήκος. Η ανασταλτική δράση των CDKs και η θέση σύνδεσης με το PCNA είναι διακριτές και εντοπίζονται στο αμινο-τερματικό και καρβοξυ-τερματικό άκρο του μορίου της p21, αντίστοιχα. Πιο συγκεκριμένα η περιοχή αναστολής των

CDKs και της σύνθεσης του DNA είναι μεταξύ των αμινοξέων 1-71, ενώ αυτή που συνδέεται με το PCNA έχει μήκος 20 αμινοξέων και βρίσκεται στη θέση 141-160 (Εικόνα 3) (Chen et al., 1995; Luo et al., 1995; Nakanishi et al., 1995; Warbrick et al., 1995).



Εικόνα 10 : Ο υποκινητής του γονιδίου p21. Οι θέσεις πρόσδεσης της p53 συμβολίζονται με κόκκινα οβάλς και αυτές της Sp1 με μπλε οβάλς. Επίσης, φαίνεται η κοντινή περιοχή με μεγαλύτερη λεπτομέρεια. Με μπλε χρώμα φαίνεται η ακολουθία των 6 θέσεων πρόσδεσης της Sp1, ενώ με πράσινο αυτή του παράγοντα Miz-1. Με κόκκινο φαίνονται οι παράγοντες που δρουν μέσω των διαφόρων θέσεων πρόσδεσης της Sp1. Με πορτοκαλί χρώμα φαίνονται οι θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα E2F και τα κουτιά E.

Όλες οι παραπάνω παρατηρήσεις προήλθαν από *in vitro* πειράματα. Πέρα, όμως, από τα συγκεκριμένα δεδομένα υπάρχουν και *in vivo* μελέτες για τα χαρακτηριστικά της p21, που είναι υπεύθυνα για την αναστολή της ανάπτυξης (Chen et al., 1995; Strausfeld et al., 1994; Chen et al., 1995; Luo et al., 1995; Nakanishi et al., 1995).

Η ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου p21 ελέγχεται σε μεταγραφικό επίπεδο από μηχανισμούς είτε ανεξάρτητους από την p53, είτε εξαρτημένους από το μόριο αυτό, καθώς και σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο. Στη συνέχεια

θα περιγράψουμε τους μηχανισμούς ρύθμισης της μεταγραφής του p21, είτε αυτοί εξαρτώνται είτε όχι από την p53.

Μεταγραφική αύξηση του γονιδίου p21 από την p53.

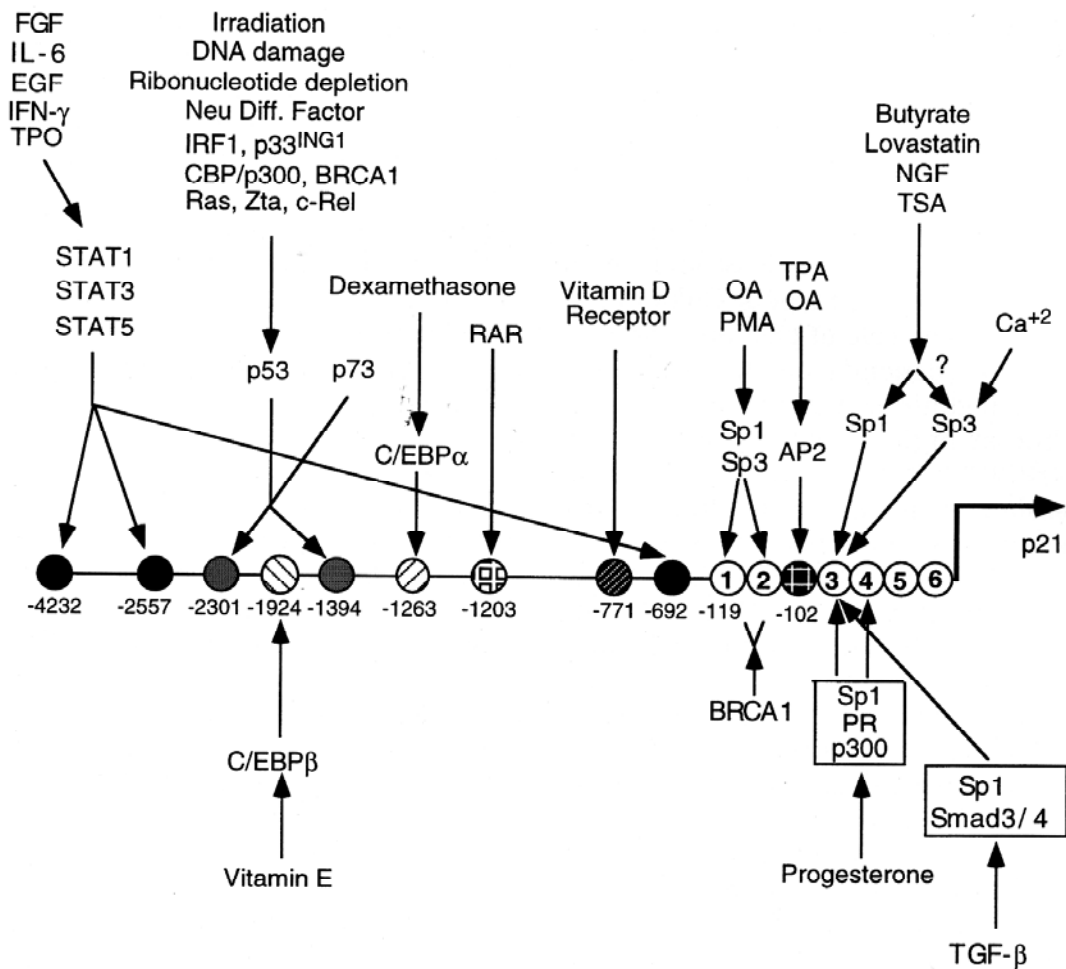
Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, υπεύθυνος για την ενεργοποίηση πολλών γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο (Wiman et al., 1997). Σύγκριση της ακολουθίας του υποκινητή του γονιδίου p21 σε αρουραίο, ποντίκι και άνθρωπο, αποκάλυψε την ύπαρξη δύο θέσεων πρόσδεσης της p53 σε κάθε έναν από τους υποκινητές αυτούς και τουλάχιστον μια από τις θέσεις αυτές απαιτείται για την απόκριση στην p53 (El-Deiry et al., 1995). Αν και η p53 δεν είναι απαραίτητη για την προαγωγή της μεταγραφής του p21 κατά την ανάπτυξη και στους περισσότερους ιστούς του ώριμου ατόμου, εντούτοις έκθεση σε γ-ακτινοβολία ποντικών των οποίων το γονίδιο p53 είχε απενεργοποιηθεί έδειξε ότι σε περιπτώσεις βλάβης του DNA απαιτείται ρύθμιση του γονιδίου p21 από την p53 (Macleod et al., 1995). Ακτινοβόληση ανθρώπινων κυτταρικών σειρών οδηγεί σε αύξηση της μεταγραφής του γονιδίου p21 από την p53 και σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου (Dulic et al., 1994; Namba et al., 1995). Αρκετοί παράγοντες, όπως οι Zta, NDF, c-Rel ή αναστολείς της σύνθεσης ριβονουκλεοτιδίων ευνοούν την αύξηση της μεταγραφής του γονιδίου p21 από την p53, ενεργοποιώντας ή σταθεροποιώντας το RNA ή την πρωτεΐνη p53. Ο Zta ευνοεί την αναστολή του κυτταρικού κύκλου μέσω μετα-μεταφραστικής ρύθμισης της p53 και κατ' επέκταση της μεταγραφής του γονιδίου p21 (Caryol et al., 1996). Ο παράγοντας διαφοροποίησης Neu (NDF) σταθεροποιεί την p53 και έτσι προάγει τη μεταγραφή του γονιδίου p21 (Bacus et al., 1996). Αναστολείς της σύνθεσης ριβονουκλεοτιδίων αυξάνουν την έκφραση του γονιδίου p21 με τρόπο εξαρτημένο της p53 απουσία βλάβης στο DNA, οδηγώντας σε υποφωσφορυλίωση της pRB σε φυσιολογικούς ανθρώπινους ινοβλάστες και τελικά σε παύση του κυτταρικού κύκλου (Linke et al., 1996). Στην περίπτωση αυτή η p53 δρα ως μεταβολικός αισθητήρας που ενεργοποιείται από την έλλειψη νουκλεοτιδίων, αλλά ο ακριβής μηχανισμός είναι ακόμη άγνωστος. Η c-Rel, ένα μέλος της οικογένειας των Rel/NF-κB, σταματά τον

πολλαπλασιασμό κυττάρων HeLa στη μετάβαση από τη G₁ στην S φάση μέσω αύξησης της σταθερότητας της p53 και τελικά αύξηση της έκφρασης του p21 γονιδίου (Bash et al., 1997).

Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης του γονιδίου p21 ανεξάρτητα από p53.

Μια πληθώρα παραγόντων που προάγουν τη διαφοροποίηση, ταυτόχρονα ενεργοποιούν και τη μεταγραφή του γονιδίου p21 με μηχανισμούς ανεξάρτητους από p53. Οι παράγοντες αυτοί ευνοούν τη σύνδεση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων σε συγκεκριμένα στοιχεία του υποκινητή του γονιδίου p21 (Εικόνα 11). Ο παράγοντας Sp1 συμμετέχει στην αύξηση της p21 μέσω των θέσεων πρόσδεσης 1 και 2 ως απόκριση σε φορβολικούς εστέρες (PMA) και οκαδαϊκό οξύ σε ανθρώπινα λευχαιμικά κύτταρα U937 κατά τη μεταμόρφωσή τους σε μακροφάγα (Biggs et al., 1996) (Εικόνες 10 και 11; Πίνακας 3). Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη BRCA1 ενεργοποιεί την p21 με τρόπο ανεξάρτητο από p53 μέσω της περιοχής του υποκινητή -143 έως -93 η οποία περιέχει τις θέσεις πρόσδεσης 1 και 2.

Η θέση 3 του υποκινητή απαιτείται για την αύξηση της p21 από τον μετασχηματίζοντα αυξητικό παράγοντα-β (TGF-β) (Datto et al., 1995), το Ca²⁺ (Prowse et al., 1997), το βουτυρικό οξύ (Nakano et al., 1997), τη λοβαστατίνη (Lee et al., 1998), τον αναστολέα της απακετυλάσης ιστονών, την τριχοστατίνη A (TSA) (Nakano et al, 1997) και τον NGF (Εικόνα 11). Η αλληλεπίδραση του Sp1 με τις πρωτεΐνες Smad προάγει την αύξηση του υποκινητή του p21 από TGF-β (Li et al., 1998; Moustakas and Kardassis, 1998).



Εικόνα 11 : Εξωκυτάρια σήματα που ενεργοποιούν τη μεταγραφή του γονιδίου p21. Μια σχηματική αναπαράσταση που παρουσιάζει τα ενεργά συστατικά του υποκινητή του p21, συμπεριλαμβανομένων και των 6 Sp1 θέσεων (1-6). Λεπτομέρειες υπάρχουν στο κείμενο, καθώς και στην Εικόνα 8 και στον Πίνακα 1 (Gartel and Tyner, 1999).

Πίνακας 3 : Ενεργοποιητές της μεταγραφής του γονιδίου p21 που δρουν ανεξάρτητα από την p53

Σήμα	Μεταγραφικοί παράγοντες	Ενεργά στοιχεία
Βουτυρικό	Sp1, Sp3	-82/-77; -69/-64
Λοβαστατίνη	Sp1, Sp3	-82/-77
Τριχοστατίνη A	Sp1, Sp3	-82/-77; -69/-64
RGF-β	Sp1, Smad3/4 Smad2/4 p300	-82/-77
NGF	Sp1, Sp3, p300	-82/-77
Ασβέστιο	Sp3	-82/-77
Προγεστερόνη	Sp1, p300	-82/-77; -69/-64
Οκαδαϊκό οξύ	Sp1, Sp3(?)	-119/-114; -109/-104; -82/-77; -69/-64
	AP2	-102/-94
TPA	Ap2	-102/-94
PMA	Sp1, Sp3(?)	-119/-114; -109/-104
-	BRCA1	-143/-93
-	E2A	-162/-157; -20/-15; -5/+1
Βιταμίνη D3	VDR	-779/-765
Ρετινοϊκό οξύ	RAR	-1212/-1194
Δεξαμεθασόνη	C/EBPα	-1270/-1256
Βιταμίνη E	C/EBPβ	-1928/-1920
EGF	STAT1, STAT3	-4236/-4228; -2561/-2553; -696/-688
IFN-γ	STAT1	-4236/-4228; -2561/-2553; -696/-688
TPO	STAT5	-4236/-4228; -2561/-2553
IL6	STAT3	-696/688

Ο bHLH μεταγραφικός παράγοντας E2A προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης σε κύτταρα NIH3T3 και ευνοεί την έκφραση του γονιδίου p21 μέσω 3 κουτιών-E, δύο από τα οποία βρίσκονται πριν το κουτί-TATA (Εικόνα 10; Πίνακας 3) (Prabhu et al., 1997).

Η αναστολή της ανάπτυξης από προγεστερόνη συνοδεύεται από μια αύξηση 10-15 φορές στα επίπεδα της p21 και μια θέση πρόσδεσης της προγεστερόνης εντοπίσθηκε στις θέσεις 3 και 4 του υποκινητή του p21 γονιδίου (Εικόνες 10 και 11) (Owen et al., 1998).

Οι παράγοντες E2F1 και E2F3, αλλά όχι ο E2F4, ενεργοποιούν ισχυρά την p21 μέσω των θέσεων πρόσδεσης τους στην περιοχή -199 έως +16 του υποκινητή του γονιδίου p21 (Εικόνα 10) (Gartel et al., 1999; Hiyama et al., 1998).

Επίσης, γνωρίζουμε ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι JAK-STAT παίζει ρόλο στην αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης ως απόκριση σε διάφορους παράγοντες. Οι EGF και IFN- γ ευνοούν την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης και την αύξηση της p21 από τον παράγοντα STAT1 μέσω 3 θέσεων πρόσδεσης των STATs στον υποκινητή του γονιδίου p21 που εντοπίζονται στις βάσεις -690, -2590 και -4233 (Εικόνα 11; Πίνακας 3) (Chin et al., 1996). Η θρομβοποιητίνη (TPO) αυξάνει την διαφοροποίηση μεγακαρυοκυττάρων και τη μεταγραφή του γονιδίου p21 από την STAT5 μέσω 2 απομακρυσμένων θέσεων πρόσδεσης των STATs στον υποκινητή του γονιδίου p21 (Εικόνα 11; Πίνακας 3) (Matsumura et al., 1997).

Ο παράγοντας C/EBP α ενεργοποιεί τον υποκινητή του p21 γονιδίου και αυξάνει τη μετα-μεταφραστική σταθερότητα της πρωτεΐνης p21 σε λιποκύτταρα (Timchenko et al., 1996). Ο C/EBP β ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου p21 στο μεταγραφικό επίπεδο (Chinery et al., 1997). Ο παράγοντας gax σε ινοβλάστες ρυθμίζει την p21 με μηχανισμό άγνωστο, αλλά σίγουρα ανεξάρτητο από p53 (Smith et al., 1997).

Η βιταμίνη D ενεργοποιεί τον υποκινητή του p21 γονιδίου και οδηγεί σε διαφοροποίηση. Μία θέση πρόσδεσης της βιταμίνης D3 βρέθηκε στη θέση -771 του υποκινητή του γονιδίου p21 (Εικόνα 11; Πίνακας 3) (Liu et al., 1996b).

Η μεταγραφή του p21 γονιδίου, επίσης, επηρεάζεται από το ρετινοϊκό οξύ, καθώς υπάρχει ενεργή θέση σύνδεσης του ρετινοϊκού μεταξύ των βάσεων -1212 και -1194 στον υποκινητή του γονιδίου p21 (Εικόνα 11; Πίνακας 3) (Liu et al., 1996a).

Ακόμη, ο μεταγραφικός παράγοντας c-jun φαίνεται να ενεργοποιεί τον υποκινητή του p21 γονιδίου, παρόλο που δεν υπάρχει συγκεκριμένη θέση πρόσδεσης για τον παράγοντα αυτό στον υποκινητή. Αυτό γίνεται μέσω του παράγοντα Sp1 με ένα μηχανισμό που δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστός (Kardassis et al., 1999).

Τέλος, στην περιοχή -103/-83 του p21 υποκινητή εντοπίζεται μια θέση πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα Miz-1 (Εικόνα 10). Ο παράγοντας αυτός προσδένεται στον p21 υποκινητή και αλληλεπιδρά με τον παράγοντα Myc. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της ενεργοποίησης του p21 υποκινητή από τον παράγοντα Myc. Αντίθετα, σε συνθήκες χαμηλών

επιπέδων του παράγοντα Myc ο παράγοντας Miz-1 ενεργοποιεί τον p21 υποκινητή (Wu et al, 2003).

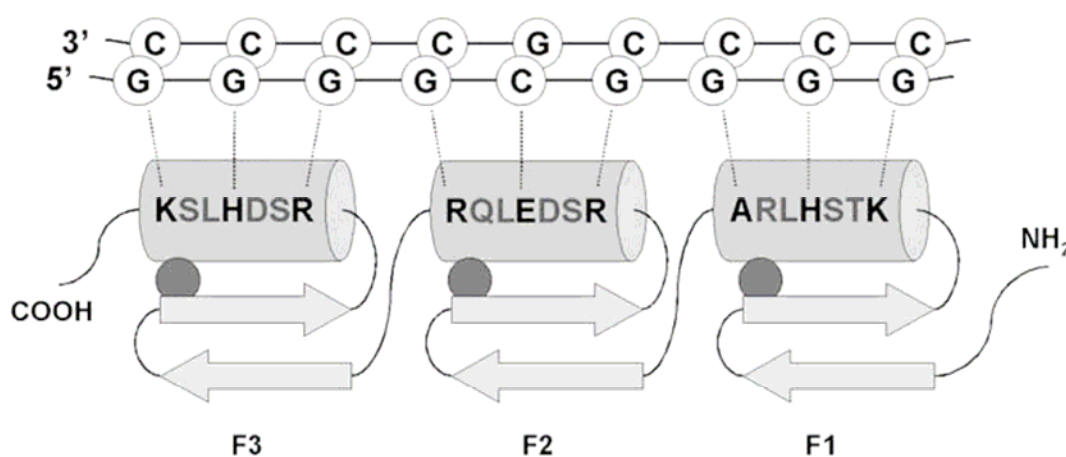
Συμπερασματικά, μια πληθώρα διαφορετικών εξωκυττάριων σημάτων ρυθμίζει τον υποκινητή του γονιδίου p21, συχνά μέσω των ίδιων μεταγραφικών παραγόντων και ενεργοποιητικών συστατικών. Ο υποκινητής του γονιδίου p21 εμφανίζεται ως μοναδικός αισθητήρας ο οποίος είναι ικανός να μετατρέψει εξωκυττάρια σήματα σε αποφάσεις που οδηγούν σε πολλαπλασιασμό ή αναστολή του κυτταρικού κύκλου (Gartel and Tyner, 1999).

Πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου p21, όπως είδαμε, διαδραματίζει ο παράγοντας Sp1. Στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή μελετήσαμε τη σημασία του παράγοντα αυτού στην έκφραση του γονιδίου p21 και για το λόγο αυτό θα ήταν χρήσιμο να αναφέρουμε ορισμένα στοιχεία για το συγκεκριμένο παράγοντα.

Η οικογένεια Sp/XKLF

Ο Sp1 ανήκει στην οικογένεια των Sp/XKLF (specificity protein/Krüppel-like factor) μεταγραφικών παραγόντων. Τα μέλη της συγκεκριμένης οικογένειας διακρίνονται από ένα συνδυασμό 3 συντηρημένων Cys2His2 δακτυλίων ψευδαργύρου οι οποίοι σχηματίζουν την περιοχή πρόσδεσης στο DNA των παραγόντων αυτών (Philipsen and Suske, 1999). Οι παράγοντες αυτοί ονομάστηκαν «παρόμοιοι με τους Krüppel παράγοντες», επειδή το γονίδιο κατάτμησης της Δροσόφιλας Krüppel παρουσιάζει παρόμοια διάταξη δακτυλίων ψευδαργύρου (Schuh et al, 1986). Στον άνθρωπο, το μοτίβο αυτό παρατηρήθηκε αρχικά στον παράγοντα Sp1 (Kadonaga et al, 1987). Ο Sp1 βρέθηκε να συνδέεται στο DNA μέσω των αμινοξέων KHA του πρώτου, των αμινοξέων RER του δεύτερου και των αμινοξέων RHK του τρίτου δακτυλίου ψευδαργύρου (Εικόνα 12). Τα μέλη της οικογένειας Sp1/XKLF αναγνωρίζουν στο DNA τις ακολουθίες GC-(GGGGCGGGG) και GT-(GGTGTGGGG) με διαφορετική συνάφεια, λόγω διαφορών στα αμινοξέα των δακτυλίων. Οι ακολουθίες GC και GT είναι σημαντικές για την έκφραση

αρκετών γονιδίων του κυττάρου (Philipsen and Suske, 1999). Επιπλέον, τα μοτίβα αυτά είναι απαραίτητα για την αποτροπή της μεθυλίωσης σε CpG περιοχές, όπως βρέθηκε για το γονίδιο APRT (Brandeis et al, 1994; Macleod et al, 1994).



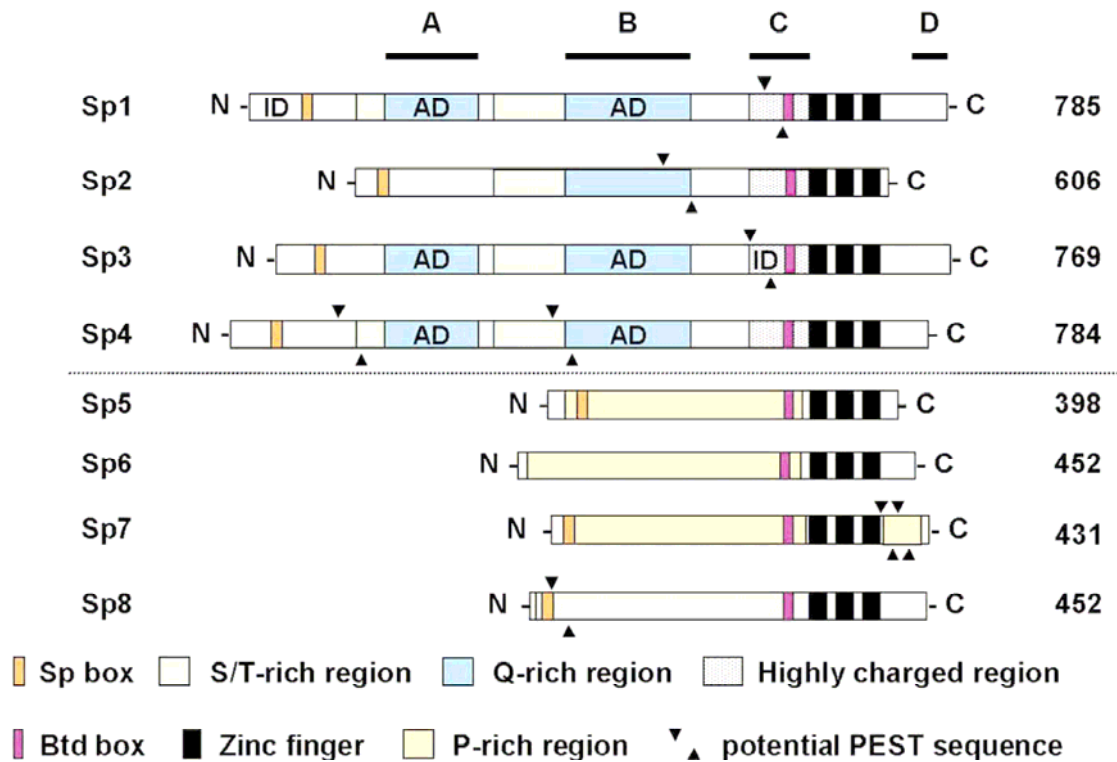
Εικόνα 12 : Οι δακτύλιοι ψευδαργύρου των Sp/XKLF μεταγραφικών παραγόντων. Οι ανεξάρτητοι δακτύλιοι (F1, F2 και F3) παρουσιάζονται ως ένα β-φύλλο (βέλη) και μια α-έλικα (κύλινδρος) που συνδέονται με ένα ιόν ψευδαργύρου (σφαίρα). Το τμήμα του DNA που περιέχει ένα κλασικό GC κουτί (5'-GGGGCGGG-3') παρουσιάζεται ως μια διπλή σειρά σφαιριδίων σε κλωστή με τις νουκλεοτιδικές βάσεις να αλληλεπικαλύπτονται μερικώς. Τα αμινοξέα των α-ελίκων σημειώνονται και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κρίσιμων αμινοξέων (μαύρα) του κάθε δακτυλίου και της συγκεκριμένης τριπλέτας βάσεων συμβολίζονται με διακεκομμένη γραμμή. Ο προσανατολισμός των πρωτεϊνών και του DNA σημειώνονται (Bouwman and Philipsen, 2002)

Το όνομα της οικογένειας υποδηλώνει ότι χωρίζεται σε δύο κύριες υποομάδες. Η πρώτη, οι πρωτεΐνες Sp, πήραν την ονομασία τους από τον παράγοντα Sp1 και διαθέτουν όχι μόνο παρόμοιους δακτυλίους ψευδαργύρου, αλλά και παρόμοια αμινο-τερματικά μοτίβα (Εικόνα 13). Η δεύτερη περιλαμβάνει περισσότερο ετερογενείς πρωτεΐνες, οι οποίες είναι γνωστές ως KLFs (Philipsen and Suske, 1999).

Οι παράγοντες Sp.

Η οικογένεια Sp/XKLF περιλαμβάνει ένα σημαντικό αριθμό ομόλογων μεταγραφικών παραγόντων. Μέχρι σήμερα είναι γνωστά 23 μέλη της συγκεκριμένης οικογένειας : 8 παράγοντες Sp και 15 παράγοντες KLF. Η ένταξη των παραγόντων στην Sp οικογένεια βασίζεται στην ομολογία και στο χρωμοσωμικό εντοπισμό τους. Οι παράγοντες 1-8 εντοπίζονται κοντά στο σύμπλεγμα γονιδίων HOX (Philipsen and Suske, 1999). Οι Sp1 και Sp7

εντοπίζονται στη θέση 12q13.13 (HOX C), οι Sp2 και Sp6 στη θέση 17q21.31/32 (HOXB), οι Sp3 και Sp5 στη θέση 2q31.1 (HOX D) και ο Sp4 και ο λιγότερο γνωστός Sp8 στη θέση 7p21.2 (HOX A).



Εικόνα 13 : Δομικά μοτίβα των Sp παραγόντων. AD : περιοχή ενεργοποίησης, D : περιοχή ολιγομερισμού, C: ρυθμιστική περιοχή, Zinc finger : περιοχή πρόσδεσης το DNA. Στο αριστερό μέρος της εικόνας σημειώνονται τα μήκη της κάθε πρωτεΐνης (Bouwman and Philipsen, 2002)

Παρόλο που οι Sp παράγοντες έχουν παρόμοια δομή, εντούτοις παρουσιάζουν λειτουργικές διαφορές. Έτσι οι Sp4 και Sp7 δείχνουν μια ιστοεξαρτώμενη έκφραση και η *in vivo* σημασία τους προσδιορίστηκε μετά από γονιδιακές αναλύσεις σε ποντίκια (Gollner et al, 2001a; Nakashima et al, 2002; Nguyen et al, 2000; Nuez et al, 1995; Perkins et al, 1995; Supp et al, 1996). Αντίθετα, οι Sp1 και Sp3 εκφράζονται σε όλα τα κύτταρα, αλλά παρόλα αυτά έχουν συγκεκριμένες λειτουργίες (Bouwman et al, 2000; Gollner et al, 2001b; Marin et al, 1997).

Ο παράγοντας Sp1, το πρώτο μέλος της οικογένειας που κλωνοποιήθηκε (Kadonaga et al, 1987, 1988), αναγνωρίστηκε ως ενεργοποιητής γονιδίων του ιού SV40 (Simian Virus 40) (Dynan and Tjian, 1983). Επικρατούσε για καιρό η άποψη ότι ο παράγοντας Sp1 είναι

απαραίτητος για τη μεταγραφική ρύθμιση όλων των γονιδίων που περιέχουν GC ή GT μοτίβα. Η άποψη αυτή απορρίφθηκε όταν κλωνοποιήθηκαν οι παράγοντες Sp2, Sp3 και Sp4 (Hagen et al, 1992; Kingsley and Winoto, 1992). Στη συνέχεια αναγνωρίστηκαν οι Sp5 (Harrison et al, 2000), Sp6 (Schohy et al, 2000), Sp7 (Nakashima et al, 2002) και Sp8 (P. Bouwman and S. Philipsen, αδημοσίευτες παρατηρήσεις). Οι Sp5-8 παρουσιάζουν αρκετές κοινές περιοχές με τις Sp1-4 (Εικόνα 13).

Οι λειτουργικές περιοχές των πρωτεϊνών Sp.

Οι Sp1, Sp2, Sp3 και Sp4 αποτελούν μια υποκατηγορία μέσα στην Sp οικογένεια, εξαιτίας της παρόμοιας δομής τους (Εικόνα 13). Οι Sp1, Sp3 και Sp4 διαθέτουν 2 περιοχές ενεργοποίησης, A και B, πλούσιες σε γλουταμίνη και οι οποίες είναι απαραίτητες για τη μεταγραφική ενεργοποίηση. Δίπλα στις περιοχές αυτές βρίσκονται περιοχές πλούσιες σε Ser/Thr οι οποίες πιθανά να αποτελούν στόχους μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Ο παράγοντας Sp2 διαθέτει μόνο μια περιοχή ενεργοποίησης, καθώς και μια περιοχή πλούσια σε Ser/Thr. Επίσης, ο παράγοντας αυτός διαθέτει διαφορετική ακολουθία πρόσδεσης στο DNA έναντι των Sp1, Sp3 και Sp4, εξαιτίας μιας λευκίνης αντί για ιστιδίνη στο δακτύλιο 1 (Kingsley and Winoto, 1992).

Επίσης, οι παράγοντες Sp περιέχουν μια περιοχή που ονομάζεται Buttonhead, αμέσως αμινο-τερματικά των δακτυλίων ψευδαργύρου (Harrison et al, 2000). Η περιοχή αυτή των 11 αμινοξέων αρχικά ανακαλύφθηκε στο ομόλογο γονίδιο Buttonhead του παράγοντα Sp1 της Δροσόφιλας (Wimmer et al, 1993). Η περιοχή αυτή πιθανά να συνεισφέρει στη δυνατότητα ενεργοποίησης των παραγόντων, καθώς απαλοιφή της οδηγεί σε μειωμένη ενεργότητα του Sp1 *in vitro* (Courey and Tjian, 1988).

Η περιοχή C (Yieh et al, 1995) και πιο συγκεκριμένα το στοιχείο Btd της περιοχής C (Athaniakar et al, 1997) είναι υπεύθυνη για τη συνεργασιακή αλληλεπίδραση των Sp1/Sp3 με τις πρωτεΐνες SREBP (sterol-regulatory element-binding proteins).

Επίσης, βρέθηκε μια ακόμη συντηρημένη ακολουθία αμινοξέων (Harrison et al, 2000), SPLALLAATCSR/KI (Sp box) η οποία εντοπίζεται στην αμινο-τερματική περιοχή της πρωτεΐνης. Η περιοχή αυτή περιέχει μια θέση πρωτεόλυσης και εντοπίζεται δίπλα σε μια περιοχή που είναι υπεύθυνη για

την αποικοδόμηση της Sp1 από πρωτεασώματα *in vitro* (Su et al, 1999). Παρόλο που η περιοχή αυτή δεν είναι απαραίτητη άμεσα για την πρωτεόλυση, το γεγονός ότι είναι συντηρημένη σε τέτοιο βαθμό υποδεικνύει ότι ρυθμίζει την πρωτεόλυση των Sp παραγόντων. Ένας ακόμη ρόλος που αποδίδεται στην ακολουθία αυτή είναι η ρύθμιση της ενεργότητας των παραγόντων μέσω αλληλεπίδρασης με έναν ανασταλτικό παράγοντα (Murata et al, 1994). Αν και η λειτουργία των περιοχών Sp και Btd δεν είναι ακόμη ξεκάθαρη, το γεγονός ότι απουσιάζουν από την υποκατηγορία XKLF επιβεβαιώνει τη σημασία τους για τους Sp μεταγραφικούς παράγοντες.

Όσον αφορά τους παράγοντες Sp5-8, πέραν των ακολουθιών Sp και Btd, τα αμινο-τερματικά τους άκρα είναι τελείως διαφορετικά από αυτά των Sp1-4, ενώ δεν έχουν μελετηθεί ακόμη τα βιοχημικά χαρακτηριστικά των παραγόντων αυτών.

Λειτουργικές διαφορές μεταξύ των παραγόντων Sp1-4.

Ο Sp1 μπορεί να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή, τόσο από κοντινές περιοχές υποκινητών, όσο και από μακρινές περιοχές ενίσχυσης (Courey et al, 1989). *In vitro* αναλύσεις έδειξαν ότι τα τετραμερή του Sp1 εμπλέκονται σε συνεργασιακές ενεργοποιήσεις μέσω απομακρυσμένων περιοχών (Mastrangelo et al, 1991), προκαλώντας κάμψη του DNA (Li et al., 1991; Mastrangelo et al., 1991; Su et al., 1991). Επίσης, βρέθηκε ότι η περιοχή ενεργοποίησης B είναι σημαντική για τον πολυμερισμό του παράγοντα Sp1 (Pascal and Tjian, 1991). Επιπλέον, η περιοχή B σε συνεργασία με την περιοχή A είναι υπεύθυνες για την υπερενεργοποίηση (superactivation) της μεταγραφής που επιτυγχάνεται από μεταλλαγμένες μορφές Sp1 οι οποίες δεν έχουν τη δυνατότητα πρόσδεσης στο DNA, σε υποκινητές που φέρουν πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης της Sp1 (Courey et al., 1989; Hagen et al., 1995). Αντίθετα, για συνεργασιακή ενεργοποίηση μέσω πολλαπλών θέσεων πρόσδεσης πέραν των δύο περιοχών ενεργοποίησης είναι αναγκαία και η περιοχή D (Pascal and Tjian, 1991).

Όπως είδαμε παραπάνω, η νουκλεοτιδική ακολουθία πρόσδεσης του Sp2 διαφέρει σε σχέση με εκείνη των άλλων Sp πρωτεϊνών (Kingsley and Winoto, 1992), γεγονός που δικαιολογεί την αδυναμία του παράγοντα αυτού να ενεργοποιεί υποκινητές που περιέχουν GC ακολουθίες (Chen et al., 1994,

1998; Rotheneder et al., 1999). Τα ελάχιστα δεδομένα που υπάρχουν για τον παράγοντα αυτόν υποδεικνύουν μια πιθανή, κυτταροειδική λειτουργία του, καθώς σε κύτταρα Δροσόφιλας αναστέλλει την ενεργοποίηση υποκινητών από Sp1/Sp3, ενώ σε κύτταρα θηλαστικών ενεργοποιεί τη μεταγραφή (Baković et al., 2000). Φαίνεται ότι ο παράγοντας Sp2 διαθέτει διαφορετικά χαρακτηριστικά από τους Sp1, Sp3 και Sp4, καθώς διαθέτει μόνο μια περιοχή ενεργοποίησης, ενώ οι δύο περιοχές ενεργοποίησης είναι απαραίτητες για την υπερνεργοποίηση και τη συνεργασιακή ενεργοποίηση από τον Sp1 (Pascal and Tjian, 1991).

Παρόλο που ο παράγοντας Sp3 παρουσιάζει υψηλή ομολογία με τον Sp1, καθώς και παρόμοια συνάφεια για περιοχές GC και GT, εντούτοις εμφανίζει σημαντικές λειτουργικές διαφορές. Ο Sp3 ενεργοποιεί διάφορους υποκινητές σε κύτταρα Δροσόφιλας SL2, καθώς και σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές θηλαστικών (Ding et al., 1999; Galvagni et al., 2001; Ihn and Trojanowska, 1997; Udvadia et al., 1995). Μετά από συνεπιμόλυνση κυττάρων με Sp1, παρατηρήθηκε τόσο προσθετική (Ihn and Trojanowska, 1997; Ko et al., 1998), όσο και συνεργασιακή ενεργοποίηση (Bigger et al., 1997; Netzker et al., 1997). Παρόλα αυτά κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες ο παράγοντας Sp3 είναι λιγότερο δραστικός και σε περιπτώσεις υποκινητών με πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης αυτών των παραγόντων ο Sp3 αναστέλλει την ενεργοποίηση από Sp1 ή άλλους μεταγραφικούς παράγοντες (Birnbaum et al., 1995; Dennig et al., 1996; Majello et al., 1997).

Επίσης, υπάρχει μια αναφορά ότι ο παράγοντας Sp1 αναστέλλει την ενεργοποίηση του υποκινητή της αναπτυξιακής ορμόνης L2 του ποντικού από Sp3 σε κύτταρα SL2 (Yu et al., 1999). Πρέπει, ακόμη, να αναφερθεί ότι κάποιοι υποκινητές ενεργοποιούνται από τον παράγοντα Sp3 σε κύτταρα SL2, αλλά όχι σε κύτταρα θηλαστικών και το αντίστροφο (Hansen et al., 199; Sjøttem et al., 1996).

Όπως συμβαίνει και με τον παράγοντα Sp3, έτσι και ο Sp4 παρουσιάζει διαφορετικές λειτουργικές ιδιότητες με αυτές του Sp1. Ο παράγοντας Sp4 παρουσιάζει παρόμοιες με τον Sp1 δυνατότητες ενεργοποίησης, ενώ μπορεί να υπερενεργοποιείται από Sp1, που δε διαθέτει δακτυλίους ψευδαργύρου και να αναστέλλεται από τον Sp3 (Hagen et al., 1995). Από την άλλη, ενώ ο παράγοντας Sp1 είναι ικανός να ενεργοποιεί

συνεργασιακά υποκινητές που διαθέτουν πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης, ο Sp4 μπορεί να ενεργοποιήσει μόνον αθροιστικά τέτοιους υποκινητές (Hagen et al., 1995). Βέβαια, οι δυνατότητες ενεργοποίησης διαφορετικών υποκινητών από τον Sp4 δεν έχουν μελετηθεί τόσο καλά όσο αυτές των Sp1/Sp3. Πάντως, αρκετοί υποκινητές ενεργοποιούνται από τον παράγοντα Sp4, τόσο σε κύτταρα θηλαστικών, όσο και σε κύτταρα Δροσόφιλας, ενώ άλλοι φαίνεται να ανταποκρίνονται σε άλλα μέλη της οικογένειας Sp (Kwon et al., 1999; Yan et al., 2000).

Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του παράγοντα Sp1.

Όπως πολλοί άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες, έτσι και ο Sp1 υπόκειται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις οι οποίες επηρεάζουν τη δράση του. Οι πρώτες ενδείξεις προήλθαν από τη διαπίστωση ότι η ανθρώπινη Sp1 που συντέθηκε σε *E.coli* αποδείχθηκε λιγότερο αποτελεσματική στην ενεργοποίηση *in vitro* από την Sp1 που απομονώθηκε από κύτταρα HeLa (Kadonaga et al., 1988). Οι κυριότεροι μηχανισμοί μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που εμπλέκονται στη μεταγραφική δράση της Sp1 είναι η γλυκοσυλίωση και η φωσφορυλίωση. Πέραν της Sp1 δεν υπάρχουν άλλα δημοσιευμένα δεδομένα για γλυκοσυλίωση των άλλων Sp πρωτεϊνών, παρόλο που περιέχουν πιθανές θέσεις γλυκοσυλίωσης (Hagen et al., 1992; Kingsley and Winoto, 1992). Αυτό πιθανά να σημαίνει ότι η γλυκοσυλίωση δεν είναι απαραίτητη για τη μεταγραφική δράση των Sp παραγόντων. Η Ο-γλυκοσυλίωση έχει συσχετισθεί με τον πυρηνικό εντοπισμό της Sp1 πρωτεΐνης, τη σταθερότητα και/ή τη μεταγραφική της δυνατότητα. Η τελευταία ιδιότητα είναι ανεσταλμένη στην πρωτεΐνη Sp1 που εκφράσθηκε σε *E.coli* (Kadonaga et al., 1988) και όταν η Ο-συνδεδεμένη Ν-ακετυλογλυκοζαμίνη (GlcNAc) προσδένεται με λεκτίνη (Jackson and Tjian, 1988). Εντούτοις, δεν υπάρχουν ισχυρές αποδείξεις για το ρόλο της γλυκοσυλίωσης στη λειτουργία της Sp1, ενώ όσον αφορά τη μεταγραφική ιδιότητα της συγκεκριμένης πρωτεΐνης, όπως βρέθηκε, η γλυκοσυλίωση μπορεί να επιφέρει αντίθετα αποτελέσματα (Roos et al., 1997; Yang et al., 2001).

Πολλές από τις Ο-γλυκοσυλιωμένες πρωτεΐνες είναι ταυτόχρονα και φωσφοπρωτεΐνες και υπάρχουν ενδείξεις ότι και οι δύο τύποι τροποποιήσεων ρυθμίζονται αμοιβαία στον παράγοντα Sp1 (Du et al., 2000; Haltiwanger et al.,

1998). Η πρωτεΐνη Sp1 φωσφορυλιώνεται στο αμινο-τερματικό της άκρο από την εξαρτημένη από το DNA πρωτεϊνική κινάση μετά την πρόσδεσή της στο DNA (Gottlieb and Jackson, 1993; Jackson et al., 1990). Επίσης, και το καρβοξυ-τερματικό άκρο της Sp1 μπορεί να φωσφορυλιωθεί. *In vitro* δεδομένα προτείνουν ότι μια άγνωστη προς το παρόν κινάση είναι υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση σερινών στους δακτυλίους 1 και 2 (Black et al., 1999). Ενώ οι συγκεκριμένες φωσφορυλίώσεις δεν επηρεάζουν την πρόσδεση στο DNA, η φωσφορυλίωση θρεονινών στην περιοχή των δακτυλίων από την κινάση καζεΐνης II οδηγεί σε μειωμένη πρόσδεση της Sp1 στο DNA (Armstrong et al., 1997). Επιπλέον μελέτες συσχετίζουν τη φωσφορυλίωση της Sp1 με μειωμένη πρόσδεση στο DNA (Borellini et al., 1990; Zhu and Liao, 2000), ενώ άλλες τη συσχετίζουν με αυξημένη πρόσδεση (Haidweger et al., 2001; Rafty and Khachigian, 2001).

Αναλύσεις με μεταλλαγμένες πρωτεΐνες έδειξαν ότι η μεταγραφική ιδιότητα της Sp3 επηρεάζεται από μια ανασταλτική περιοχή (Dennig et al., 1996). Η περιοχή αυτή εντοπίζεται σε μια ομάδα φορτισμένων αμινοξέων η οποία δεν υπάρχει στην αντίστοιχη περιοχή της Sp1 (περιοχή C, Εικόνα 13). Η ύπαρξη της ανασταλτικής αυτής περιοχής δικαιολογεί την αδυναμία του αμινο-τερματικού τμήματος της Sp3 να ενεργοποιεί υποκινητές, παρόλο που διαθέτει τις περιοχές ενεργοποίησης A και B (Hagen et al., 1994). Οι μεταλλάξεις στην αμινοξική τριπλέτα KEE οδηγούν σε παρεμπόδιση της αναστολής και επιτρέπουν την ενεργοποίηση από Sp3 κυρίως υποκινητών με πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης της πρωτεΐνης αυτής (Dennig et al., 1996). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η λυσίνη της τριπλέτας αυτής είναι ακετυλιωμένη *in vivo*. Μια μεταλλαγμένη μορφή της Sp3, που δε διέθετε τη συγκεκριμένη λυσίνη είχε μεγάλη μεταγραφική ενεργότητα *in vivo*. Το γεγονός ότι η μεταλλαγμένη αυτή μορφή δεν μπορεί να ακετυλιωθεί *in vivo*, υποδεικνύει ότι η ακετυλίωση ρυθμίζει τη μεταγραφική δράση της Sp3 (Braun et al., 2001).

Συνοψίζοντας, τα λειτουργικά χαρακτηριστικά των Sp παραγόντων είναι εν μέρει παρόμοια, παρόλο τον υψηλό βαθμό ομολογία τους. Οι μεταγραφικές τους λειτουργίες ρυθμίζονται και εξαρτώνται από τις κυτταρικές συνθήκες, τη σύσταση του υποκινητή και τα βιοχημικά χαρακτηριστικά των παραγόντων αυτών (Bouwman and Philipsen, 2002).

p53

Εκτός, όμως, από τον παράγοντα Sp1 παρατηρήσαμε ότι και η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου p21. Στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή μελετήσαμε τη σημασία της p53, καθώς και τη συνεργασιακή της αλληλεπίδραση με τον παράγοντα Sp1 για τη μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου p21.

Το γονίδιο p53 είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο και αποτελεί τον πιο συχνό στόχο των γενετικών αλλαγών που συναντώνται στους ανθρώπινους όγκους (Hollstein et al., 1991, 1996). Διαγενετικά ποντίκια που εκφράζουν μεταλλαγμένη p53 ή ποντίκια που δεν εκφράζουν καθόλου p53 είναι επιρρεπή σε εμφάνιση όγκων (Donehower et al., 1992). Ο παράγοντας p53 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση μετά την επίδραση γενετικών βλαβών ή κυτταρικού στρες (Ko and Prives, 1996; Levine, 1997; Choisy-Rossi and Yonish-Rouach, 1998; el-Deiry, 1998; Prives and Hall, 1999; Oren, 1999). Η αναστολή του κυτταρικού κύκλου ή ο κυτταρικός θάνατος που προκαλείται από την ενεργοποίηση της p53 αποτρέπει την αντιγραφή του κατεστραμμένου DNA και τον πολλαπλασιασμό. Για το λόγο αυτό, η πρωτεΐνη p53 έχει χαρακτηριστεί ως «φύλακας του γενώματος» (Lane, 1992). Η δράση της αυτή είναι απαραίτητη για την απόκριση των καρκινικών κυττάρων σε αντικαρκινικά φάρμακα, τα οποία ευνοούν την απόπτωση προκαλώντας βλάβη στο DNA. Πράγματι, απενεργοποίηση της p53 λόγω απαλοιφής, μετάλλαξης ή αλληλεπίδρασης με κυτταρικές και ιϊκές πρωτεΐνες αποτελεί τη βασικότερη προϋπόθεση για την ανάπτυξη τουλάχιστον του 50% των ανθρώπινων όγκων.

Οι λειτουργικές περιοχές της πρωτεΐνης p53.

Το ανθρώπινο γονίδιο p53 αποτελείται από 11 εξόνια και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17p13.1. Εναλλακτικό μάτισμα του ιντρονίου 9 στο ανθρώπινο p53 mRNA οδηγεί σε μια ελλιπή στο καρβοξυ-τερματικό άκρο μορφή (p53AS) (Arai et al, 1986) (Εικόνα 14). Η ανθρώπινη p53 πρωτεΐνη αποτελείται από 393 αμινοξέα και περιλαμβάνει διακριτές δομικά και λειτουργικά περιοχές : την περιοχή ενεργοποίησης, την περιοχή αναστολής

της ανάπτυξης, την περιοχή πρόσδεσης στο DNA, την περιοχή πυρηνικού εντοπισμού (NLS), την περιοχή ολιγομερισμού και τη ρυθμιστική περιοχή (Εικόνα 14) (Ko and Prives, 1996). Η περιοχή ενεργοποίησης (AD) διακρίνεται στις AD1 και AD2 οι οποίες περιλαμβάνουν τα αμινοξέα 1-42 και 43-63 αντίστοιχα (Zhu et al, 1998; Candau et al, 1997). Η περιοχή αυτή αλληλεπιδρά με τη βασική μεταγραφική μηχανή, ώστε να αυξήσει την έκφραση των γονιδίων. Τα αμινοξέα 13-23 της πρωτεΐνης p53 είναι αρκετά συντηρημένα σε αρκετά είδη. Επίσης, βρέθηκε ότι τα αμινοξέα F19, L22 και W23 είναι απαραίτητα για τη μεταγραφική ενεργοποίηση από την p53 *in vivo* (Lin et al, 1995). Επιπλέον, τα αμινοξέα αυτά προσδένονται, *in vitro*, με τους παράγοντες TAF_{II}70 και TAF_{II}31, οι οποίοι αποτελούν υπομονάδες του TFIID (Lu and Levine, 1995; Thut et al, 1995).

Η περιοχή αναστολής της ανάπτυξης εντοπίζεται μεταξύ των αμινοξέων 64-90 και περιλαμβάνει 5 μοτίβα πλούσια σε προλίνη (PXXP, όπου P προλίνη και X οποιοδήποτε αμινοξύ). Απαλοιφή της περιοχής αυτής μειώνει την ικανότητα της p53 να αναστέλλει την ανάπτυξη όγκων (Walker and Levine, 1996).

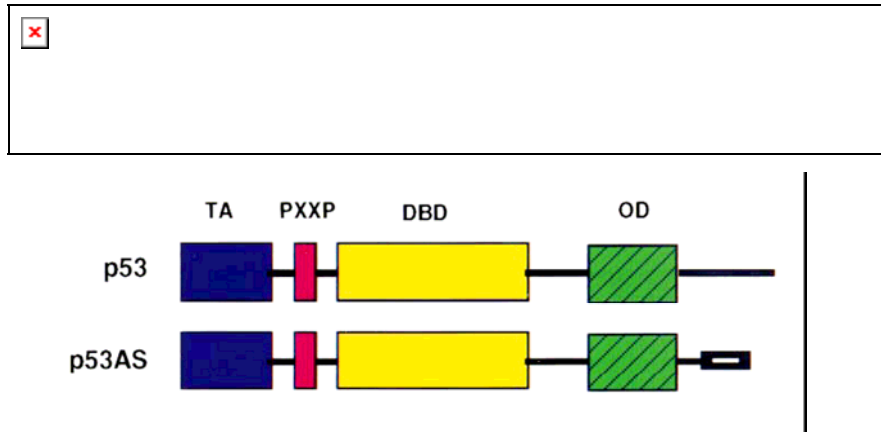
Η περιοχή πρόσδεσης στο DNA εντοπίζεται μεταξύ των αμινοξέων 102 και 292. Η περιοχή αυτή είναι ανθεκτική στη δράση πρωτεασών και αναδιπλώνεται ανεξάρτητα. Περιέχει ένα ιόν Zn^{2+} το οποίο είναι υπεύθυνο για την ικανότητα της p53 να προσδένεται αποκλειστικά σε συγκεκριμένη ακολουθία DNA. Η περιοχή αυτή αναδιπλώνεται σε αντιπαράλληλα β-φύλλα τεσσάρων και πέντε αλυσίδων, τα οποία με τη σειρά τους αποτελούν σκελετό για δύο βρόχους α-ελίκων οι οποίες προσδένονται άμεσα στο DNA (Cho et al, 1994). Η τετραμερής p53, η οποία είναι ένα διμερές από διμερή, προσδένεται αποκλειστικά στη νουκλεοτιδική περιοχή που περιλαμβάνει 4 επαναλήψεις της ακολουθίας 5'-PuPuPuC(A/T)-3', οι οποίες εντοπίζονται σε ζευγάρια με αντίθετη φορά, δηλαδή της μορφής $\rightarrow\leftarrow\rightarrow\leftarrow$, όπου \rightarrow η παραπάνω ακολουθία. Τα αμινοξέα K120, S241, R273, A276 και R283 σχηματίζουν δεσμούς με τη φωσφορική ραχοκοκαλιά της μεγάλης αύλακας, ενώ τα K120, C277 και R280 αλληλεπιδρούν μέσω δεσμών υδρογόνου με τις βάσεις του DNA. Στη συνέχεια το αμινοξύ R248 σχηματίζει πολλαπλούς δεσμούς υδρογόνου με τη μικρή αύλακα της έλικας του DNA (Cho et al, 1994). Περισσότερο από το 90% των μεταλλάξεων απαλοιφής βάσεων της p53

εντοπίζεται στην περιοχή αυτή πρόσδεσης στο DNA. Κάποιες από τις μεταλλάξεις αυτές μειώνουν την ικανότητα πρόσδεσης της p53 στο DNA και κατ' επέκταση τη μεταγραφική της δράση, ενώ κάποιες άλλες αλλάζουν ολόκληρη τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης (Cho et al, 1994; Hollstein et al, 1994).

Η περιοχή που είναι υπεύθυνη για την είσοδο της p53 στον πυρήνα εντοπίζεται μεταξύ των αμινοξέων 316-325.

Όπως αναφέραμε παραπάνω, η πρωτεΐνη p53 απαντάται με τη μορφή τετραμερών στα κύτταρα. Υπεύθυνη για το σχηματισμό του τετραμερούς αυτού είναι η περιοχή ολιγομερισμού που αποτελείται από τα αμινοξέα 324-355 (Jeffrey et al, 1995).

Τέλος, τα τελευταία 30 καρβοξυ-τερματικά αμινοξέα αποτελούν μια ρυθμιστική περιοχή ευαίσθητη στην πρωτεάση, που περιλαμβάνει 9 βασικά αμινοξέα, τα οποία έχουν τη δυνατότητα να προσδένονται τόσο στο DNA όσο και στο RNA (Lee et al, 1995). Υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι η πρωτεΐνη p53 που προέρχεται από αρκετές πηγές απαιτεί αλλαγή της διαμόρφωσής της, ώστε να μπορέσει να συνδεθεί ειδικά στις αντίστοιχες θέσεις στο DNA. Η μορφή αυτή της p53 ρυθμίζεται από την καρβοξυ-τερματική ρυθμιστική περιοχή. Απαλοιφή της περιοχής αυτή, φωσφορυλίωση του αμινοξέος S378 από την πρωτεϊνική κινάση C ή του αμινοξέος S392 από κινάση καζείνης II ή πρόσδεση του αντισώματος PAb421 στην περιοχή 370-378, όλα ευνοούν την πρόσδεση της συγκεκριμένης p53 στο DNA μέσω της κεντρικής περιοχής της (αμινοξέα 102-292) (Hupp and Lane, 1994). Επίσης, η περιοχή αυτή καταλύει την επαναδιάταξη απλών αλυσίδων DNA ή RNA σε δίκλωνες. Τέλος, η καρβοξυ-τερματική αυτή περιοχή προσδένεται στα άκρα του DNA και σε εσωτερικούς βρόχους, που προέρχονται από λάθη κατά την αντιγραφή του DNA, και οι οποίοι με τον τρόπο αυτό ανιχνεύονται και διορθώνονται από τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του κυττάρου (Lee et al, 1995).



Εικόνα 14 : Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης p53, καθώς και της ελλειμματικής στο καρβοξυ-τερματικό άκρο μορφής. AD : περιοχή ενεργοποίησης, PXXP : μοτίβο πλούσιο σε προλίνη, DNA binding : περιοχή πρόσδεση το DNA, NLS : σήμα πυρηνικού εντοπισμού, Oligo : περιοχή ολιγομερισμού, Basic : ρυθμιστική περιοχή. Οι αριθμοί στο πάνω μέρος δείχνουν τον αριθμό των αμινοξέων.

Οι πρωτεΐνες p63 και p73.

Αρκετά χρόνια μετά την ανακάλυψη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53, κλωνοποιήθηκαν δύο ακόμη γονίδια, τα p63 και p73, τα οποία ανήκουν στην οικογένεια της p53. Οι ακολουθίες των p63 και p73 παρουσιάζουν περισσότερες ομοιότητες μεταξύ τους παρά με αυτή του p53 γονιδίου. Φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι το γονίδιο p53 πρέπει να προέρχεται από αρχέγονο γονίδιο, παρόμοιο με τα p63/p73 (Kaghad et al, 1997; Yang et al, 1998). Το p63 γονίδιο περιέχει 15 εξόνια (Yang et al, 1998) και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 3q27-29, ενώ το p73 έχει μήκος περίπου 65kb, περιέχει 14 εξόνια (Kaghad et al, 1997) και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1p36. Υπάρχουν αρκετά κοινά σημεία ανάμεσα στα γονίδια της οικογένειας p53 :

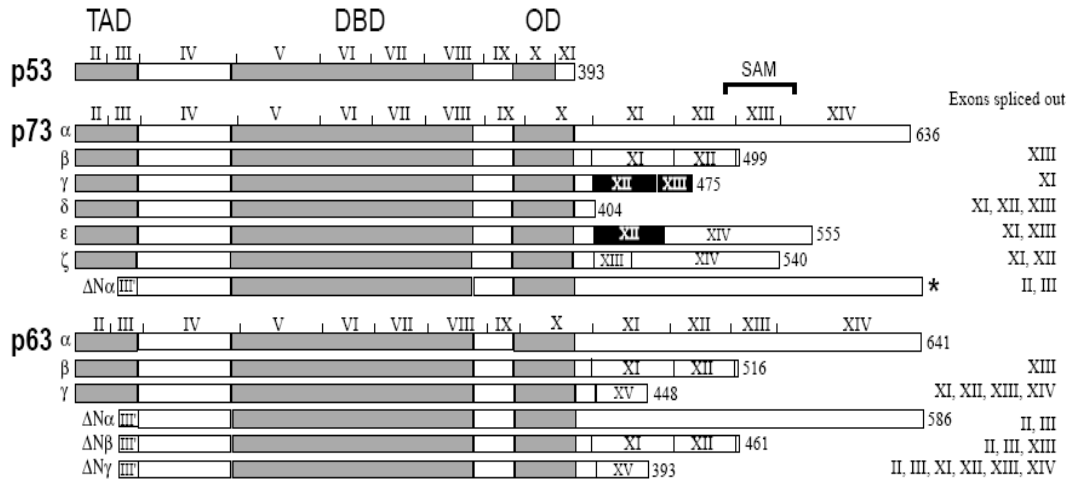
α) Όλα περιέχουν μεγάλα ιντρόνια (Mai et al, 1998). Το γονίδιο p53 των θηλαστικών περιέχει ένα ιντρόνιο 10,7 kb μεταξύ των εξονίων 1 και 2, ενώ το ανθρώπινο p73 περιέχει 3 μεγάλα ιντρόνια : το ιντρόνιο 1 (>32kb), το ιντρόνιο 3 (12kb) και το ιντρόνιο 4 (8kb). Το p63, παρομοίως, περιέχει 2 μεγάλα ιντρόνια, τα 1 και 3.

β) Το εξόνιο 1 δεν κωδικοποιεί σε καμιά περίπτωση. Η περιοχή αυτή στο γονίδιο p53, και θεωρητικά και στο p73, κωδικοποιεί μια κατασκευή βρόχου η οποία πιθανά να επηρεάζει τη μετάφραση (Kaghad et al, 1997; Mosner et al, 1995).

γ) Η οργάνωση των εξονίων και των ιντρονίων είναι παρόμοια σε όλα τα μέλη της οικογένειας.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, υπάρχουν δύο μορφές p53 mRNA, που προέρχονται από διαφορετικό μάτισμα. Σε αντιστοιχία και τα γονίδια p63 και p73 παράγουν πολλαπλά mRNA μετάγραφα, που προέρχονται από διαφορετικό μάτισμα. Τα περισσότερα ματίσματα συμβαίνουν στο 3' άκρο και δημιουργούν πρωτεΐνες με διαφορετικά καρβοξυ-τερματικά άκρα (Εικόνα 15). Υπάρχουν τουλάχιστον 6 διαφορετικές p73 πρωτεΐνες (α-ζ) στα φυσιολογικά κύτταρα (Kaghad et al., 1997; De Laurenzi et al., 1998, 1999; Ueda et al., 1999). Οι β και δ ισομορφές είναι ελλειπείς μορφές της α : τα εναλλακτικά αναγνωστικά πλαίσια από τα διαφορετικά ματίσματα δημιουργούν ένα κωδικόνιο λήξης. Η ισομορφή δ δε διαθέτει το μεγαλύτερο τμήμα της καρβοξυ-τερματικής περιοχής, και για το λόγο αυτό μοιάζει περισσότερο με την p53. Η ισομορφή ζ διαθέτει μια εσωτερική απαλοιφή μεταξύ των αμινοξέων 400-496 της μορφής α. Η ισομορφή γ περιέχει ένα μεγάλο εναλλακτικό αναγνωστικό πλαίσιο το οποίο οδηγεί στη δημιουργία ενός διαφορετικού καρβοξυ-τερματικού άκρου μήκους 75 αμινοξέων. Η ισομορφή ε διαθέτει μια καρβοξυ-τερματική περιοχή που αποτελείται από τμήματα των αναγνωστικών πλαισίων των α και γ ισομορφών (Εικόνα 15). Επιπλέον ισομορφές ανιχνεύθηκαν με RT-PCR τόσο σε καρκινικά όσο και σε φυσιολογικά κύτταρα, αλλά δεν έχουν κλωνοποιηθεί ακόμη.

Παρόμοια με το γονίδιο p73, το γονίδιο p63 δημιουργεί 3 διαφορετικά στο καρβοξυ-τερματικό τους άκρο μετάγραφα. Από αυτά προκύπτει μια φυσιολογικού μήκους α ισομορφή, μια β ισομορφή που είναι ελλειπής μετά το εξόνιο 12 και μια γ ισομορφή η οποία δε διαθέτει τα εξόνια 12-14, ενώ περιέχει ένα επιπλέον εξόνιο, το 15. Επίσης, οι ισομορφές της πρωτεΐνης p63 διακρίνονται ανάλογα με το αν περιέχουν την περιοχή ενεργοποίησης (μορφές TA) ή όχι (μορφές ΔN). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η μεταγραφή μπορεί να αρχίσει είτε από το εξόνιο 1 (μορφές TA) είτε από το εξόνιο 3 (μορφές ΔN). Οι ΔN ισομορφές δεν μπορούν να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή, αλλά αντίθετα δρουν ως αρνητικά επικρατούσες και παρεμποδίζουν την ενεργοποίηση από τις TA ισομορφές, καθώς και από την p53 (Yang et al., 1998).



Εικόνα 15 : Σχηματική αναπαράσταση των εξονίων των p53, p63 και p73. Οι περιοχές ενεργοποίησης (TAD), οι περιοχές πρόσδεσης στο DNA (DBD) και η περιοχή ολιγομερισμού (OD) σημειώνονται με γκρι χρώμα. Η περιοχή SAM, επίσης, σημειώνεται. Ο αριθμός του κάθε εξονίου σημειώνεται με λατινική αρίθμηση στο πάνω μέρος της κάθε ισομορφής. Τα εξόνια με διαφορετικό αναγνωστικό πλαίσιο από την ισομορφή α σημειώνονται με μαύρο χρώμα. Τα εξόνια που απουσιάζουν από κάθε ισομορφή σημειώνονται στο δεξί τμήμα της εικόνας. * Η μορφή ΔNp73 έχει περιγραφεί μόνο στον ποντικό (Levrero et al, 2000)

Ομολογία και διαφορές μεταξύ των μελών της οικογένειας p53.

Τα 3 μέλη της οικογένειας p53 παρουσιάζουν σημαντική ομολογία, τόσο σε γενωμικό όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Με εξαίρεση τις ισομορφές ΔN των p63 και p73, όλες οι άλλες ισομορφές διαθέτουν τις περιοχές που περιέχει και η p53. Το υψηλότερο επίπεδο ομολογίας παρατηρείται στην περιοχή πρόσδεσης στο DNA. Μεταξύ των p53 και p73 παρατηρείται 63% ομολογία, ενώ μεταξύ των p53 και p63 60% ομολογία. Αυτό υποδεικνύει ότι οι 3 αυτές πρωτεΐνες προσδένονται στις ίδιες ακολουθίες DNA και ενεργοποιούν τους ίδιους υποκινητές. Παρόλα αυτά, υπάρχει εξειδίκευση στους υποκινητές που ενεργοποιεί η κάθε πρωτεΐνη.

Επίσης, η υψηλή ομολογία που υπάρχει ανάμεσα στις περιοχές ολιγομερισμού των 3 πρωτεϊνών υποδεικνύει ότι αυτές είναι ικανές να σχηματίσουν εκτός από ομο-ολιγομερή και ετερο-ολιγομερή. Παρόλα αυτά διάφορες αναλύσεις έδειξαν ότι οι περιοχές ολιγομερισμού των πρωτεϊνών αυτών τείνουν να σχηματίζουν ομο-ολιγομερή και όχι ετερο-ολιγομερή (Kaghad et al., 1997; De Laurenzi et al., 1998; Davison et al., 1999; Di Como et al., 1999).

Οι μεγάλες διαφορές μεταξύ των 3 πρωτεϊνών εντοπίζονται στο καρβοξυ-τερματικό τους άκρο. Λόγω του διαφορετικού ματίσματος οι p63 και

p73 έχουν πιο επιμήκη καρβοξυ-τερματικά άκρα. Στα άκρα αυτά έχουν εντοπισθεί επιπλέον λειτουργικές περιοχές. Έτσι, έχει περιγραφεί μια δεύτερη περιοχή ενεργοποίησης στην p73 μεταξύ των αμινοξέων 382 και 491 (Takeda et al, 1994). Επίσης, κάποιες ισομορφές των p63 και p73 διαθέτουν μια περιοχή SAM (Sterile Alpha Motif) (Thanos and Bowie, 1999; Bork and Koonin, 1999). Η περιοχή αυτή είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών (Chi et al., 1999) και πιο συγκεκριμένα πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση. Βέβαια σε αντίθεση με άλλες περιοχές SAM, αυτές που εντοπίζονται στις p63 και p73 δεν παίζουν ρόλο στον ομο- ή ετερο-διμερισμό (Chi et al., 1999), το οποίο σημαίνει ότι είναι σημαντικές για αλληλεπιδράσεις με άλλες, άγνωστες προς το παρόν πρωτεΐνες (Levrero et al, 2000).

Ρύθμιση της πρωτεΐνης p53

Καθώς η p53 αποτελεί τον κύριο αναστολέα του κυτταρικού κύκλου, η δράση της πρέπει να ρυθμίζεται αυστηρά. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω διάφορων μηχανισμών που περιλαμβάνουν ρύθμιση της μεταγραφής και της μετάφρασης της p53, της πρωτεϊνικής σταθερότητας, του υποκυτταρικού εντοπισμού και της ενεργότητας (Woods and Vousden 2001).

A) Μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου p53.

Λόγω της μεγάλης σημασίας των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στη δράση της p53, η μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου αυτού δεν έτυχε ευρείας προσοχής τα τελευταία χρόνια. Αυτό φυσικά δε σημαίνει ότι η ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου p53 είναι ασήμαντη. Αντίθετα, είχε παρατηρηθεί παλιότερα ότι τα επίπεδα του p53 mRNA αυξάνονται μετά από προσθήκη ορού (Reich and Levine, 1984). Αυτό πιθανά να οφείλεται στην παρουσία θέσεων πρόσδεσης παραγόντων του ορού στον p53 υποκινητή (Ginsberg et al, 1990), καθώς και στην ικανότητα του p53 γονιδίου να προσδένει την πρωτεΐνη c-Myc και να ενεργοποιείται η μεταγραφή του από περίσσεια c-Myc (Reisman et al, 1993). Βέβαια, εκ πρώτης άποψης η αύξηση του αντι-πολλαπλασιαστικού γονιδίου p53 από ορό και αναπτυξιακούς παράγοντες φαίνεται παράλογη. Εντούτοις, είναι απόλυτα φυσιολογική. Τα κύτταρα που πολλαπλασιάζονται με γρήγορο ρυθμό παρουσιάζουν αυξημένες πιθανότητες

βλάβης του DNA και κατ' επέκταση ανάπτυξης εστιών καρκίνου. Υψηλά επίπεδα p53 mRNA στα κύτταρα αυτά, αυτόματα τα καθιστά σε ετοιμότητα. Εφόσον, δεν υπάρχουν βλάβες στο DNA η p53 παραμένει ανενεργή και δεν εμπλέκεται στις φυσιολογικές κυτταρικές διεργασίες. Αν, όμως, οι συνθήκες απαιτούν άμεση p53 απόκριση, τότε τα υψηλά επίπεδα p53 mRNA εξασφαλίζουν γρήγορη και αποτελεσματική απόκριση (Oren, 1999).

Επίσης, έκθεση των κυττάρων σε σήματα που ενεργοποιούν την p53 είναι ικανά να οδηγήσουν σε ελάχιστο χρόνο σε αύξηση των επιπέδων της p53 πρωτεΐνης. Μέχρι ενός σημείου αυτό δικαιολογείται από αύξηση της μετάφρασης του p53 mRNA, αναστέλλοντας έναν μηχανισμό παρεμπόδισης της μετάφρασης (Fu et al, 1996). Υπάρχουν, επίσης, ενδείξεις ότι η p53 είναι ικανή να αναστέλλει την ίδια της τη σύνθεση, αλληλεπιδρώντας με το mRNA της (Mosner et al, 1995; Fontoura et al, (1997).

B) Μετα-μεταφραστικοί μηχανισμοί τροποποίησης της πρωτεΐνης p53.

Παρόλα αυτά, είναι γενικά αποδεκτό ότι η συσσώρευση ενεργής p53 ως απόκριση σε στρες οφείλεται, κυρίως, σε μετα-μεταφραστικούς μηχανισμούς. Ιδιαίτερα κρίσιμη είναι η αύξηση του χρόνου ημιζωής της p53 πρωτεΐνης. Η p53 έχει φυσιολογικά χρόνο ημιζωής περίπου 20 λεπτά (Rogel et al, 1985). Μετά από βλάβες στο DNA ή επίδραση παραγόντων που πιέζουν τα κύτταρα, η p53 εμφανίζει μια αξιοσημείωτη σταθερότητα (Kastan et al, 1991; Maltzman and Czyzyk, 1984). Η γρήγορη αύξηση της συγκέντρωσης της p53 χωρίς να απαιτείται *de novo* σύνθεσή της, αποτελεί πλεονέκτημα για τα κύτταρα με σοβαρές βλάβες στο γένωμά τους. Επιπρόσθετα, συμβαίνει μια γρήγορη μετάβαση από την ανενεργή στην ενεργή μορφή.

Η καλύτερα τεκμηριωμένη αλλαγή αφορά την ικανότητα πρόσδεσης της p53 σε συγκεκριμένες θέσεις του DNA. Η p53 αποτελεί ένα μεταγραφικό ενεργοποιητή συγκεκριμένων γονιδίων και η δράση της αυτή βασίζεται στην ικανότητά της να προσδένεται αποκλειστικά σε ειδικές θέσεις στους υποκινητές των γονιδίων στόχων (Hansen and Oren, 1997; Levine, 1997; Agarwal et al, 1998; Almog and Rotter, 1998; Prives and Hall, 1999). Η ειδική πρόσδεση της p53 στο DNA αποτελεί στόχο αρνητικής ρύθμισης, αρχικά μέσω της ανασταλτικής καρβοξυ-τερματικής περιοχής της ίδιας της p53 (Hupp et al, 1992; Bayle et al, 1995; Wolkowicz et al, 1995). Αναστολή αυτής της

παρεμπόδισης οδηγεί σε αυξημένη πρόσδεση στο DNA (Hupp and Lane, 1995; Gu and Roeder, 1997; Waterman et al, 1998) και κατ' επέκταση αυξημένη βιολογική δραστηριότητα. Η αύξηση στη μεταγραφική δραστηριότητα της p53 μπορεί να οφείλεται, επίσης, σε αλλαγές σε άλλες περιοχές, όπως είναι τροποποιήσεις στην αμινο-τερματική περιοχή ενεργοποίησης, επιτρέποντας αποδοτικότερη στρατολόγηση παραγόντων της μεταγραφικής μηχανής (Lambert et al, 1998).

Τέλος, η ενεργοποίηση της p53 μπορεί να προϋποθέτει και αλλαγή στον υποκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης. Πράγματι, ενώ η ανενεργή μορφή είναι κυτταροπλασματική, τουλάχιστον σε κάποιο μέρος του κυτταρικού κύκλου, μετά την επίδραση γενοτοξικών παραγόντων η p53 συσσωρεύεται στον πυρήνα (Shaulsky et al, 1990).

Ο ρόλος της πρωτεΐνης Mdm2 στη ρύθμιση της πρωτεΐνης p53.

Ένας πολύ σημαντικός παράγοντας της ρύθμισης της p53 είναι η πρωτεΐνη Mdm2. Η πρωτεΐνη αυτή είναι προϊόν ενός ογκογονιδίου, του οποίου η δράση ευθύνεται για αρκετούς τύπους ανθρώπινων όγκων (Lozano and Montes de Oca Luna, 1998; Freedman and Levine, 1999; Juven-Gershon and Oren, 1999). Η πρωτεΐνη Mdm2 παρουσιάζει μια εξαιρετική σχέση με την p53. Από τη μια μεριά η Mdm2 προσδένεται στην p53 και την απενεργοποιεί (Momand et al, 1992; Chen et al, 1996b; Haupt et al, 1996). Η πρόσδεση πραγματοποιείται μέσω της περιοχής ενεργοποίησης της p53, επηρεάζοντας την αλληλεπίδραση με τους παράγοντες της βασικής μεταγραφικής μηχανής (Thut et al., 1995; Lu and Levine, 1995). Επιπλέον, η Mdm2 μπορεί να αναστείλει η ίδια τη μεταγραφή, όταν προσδεθεί στην p53 (Thut et al, 1997). Επίσης, η πρόσδεση της Mdm2 οδηγεί στην πρωτεολυτική αποικοδόμηση της p53. Ταυτόχρονα, η p53 προσδένεται ειδικά στον υποκινητή του Mdm2 γονιδίου και αυξάνει τη μεταγραφή του (Barak et al, 1993; Wu et al, 1993). Η δράση αυτή υποδεικνύει έναν αρνητικό αναδραστικό μηχανισμό ρύθμισης, ο οποίος πιθανά διατηρεί την p53 κάτω από αυστηρό έλεγχο και αναστέλλει τη δράση της p53 αμέσως μόλις εξαφανισθεί ο παράγοντας στρες (Oren, 1999). Βέβαια, σε κάποιες περιπτώσεις η μεταγραφή του Mdm2 γονιδίου αυξάνεται αργότερα από τη μεταγραφή των άλλων γονιδίων στόχων της p53 (Perry et al, 1993; Wu and Levine, 1997).

Αυτό προφανώς προφέρει τον απαιτούμενο χρόνο στην p53 να δράσει αποτελεσματικά.

Ο πιο σημαντικός, όμως, παράγοντας για την ενεργοποίηση της p53 είναι η σταθεροποίηση της πρωτεΐνης. Η διαπίστωση αυτή οδήγησε την έρευνα στη ρύθμιση της αποικοδόμησης της p53. Σήμερα, είναι τεκμηριωμένο ότι η αποικοδόμηση της p53 συμβαίνει μέσω του μονοπατιού ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος (Maki et al, 1996), παρόλο που έχει αναφερθεί η δυνατότητα και άλλων πρωτεολυτικών ενζύμων να αποικοδομούν την p53, όπως η καλπαΐνη (Kubbutat and Vousden, 1997a). Η Mdm2 παίζει, και στη διεργασία αυτή, βασικό ρόλο. Αυξημένα επίπεδα Mdm2 οδηγούν σε γρήγορη αποικοδόμηση της p53, η οποία εξαρτάται από την ικανότητα των δύο πρωτεϊνών να προσδένονται άμεσα (Haupt et al, 1997; Kubbutat et al, 1997b). Αυτό υποδεικνύει ότι τα χαμηλά επίπεδα της p53 κάτω από φυσιολογικές συνθήκες οφείλονται πρωταρχικά στη συνεχή, εξαρτημένη από Mdm2, αποικοδόμησή της. Η Mdm2 ευνοεί την ουβικουιτινίωση της p53, η οποία στη συνέχεια πρωτεολύεται από τα πρωτεασώματα (Haupt et al, 1997; Kubbutat et al, 1997b). Παρόλο που η πρωτεΐνη Mdm2 αποτελεί σημαντικό παράγοντα ρύθμισης της σταθερότητας της p53, υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί ουβικουιτινίωσης και αποικοδόμησης της πρωτεΐνης αυτής. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο ρόλος της κινάσης JNK-1 (c-Jun N-terminal Kinase). Δεδομένα *in vivo* και *in vitro* αναλύσεων δείχνουν ότι η πρόσδεση της JNK στην p53 οδηγεί στην ουβικουιτινίωση και την πρωτεολυτική διάσπαση της τελευταίας (Fuchs et al, 1998a).

Ο ρόλος της φωσφορυλίωσης στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης p53.

Είναι γνωστό ότι η μετα-μεταφραστική ενεργοποίηση σηματοδοτικών πρωτεϊνών επιτυγχάνεται, κυρίως, μέσω τροποποιήσεων, με πιο συχνή τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών. Επομένως, ήταν αναμενόμενο η σταθεροποίηση και η ενεργοποίηση της p53 να οφείλονται σε τροποποιήσεις του μορίου της. Πράγματι, η p53 φωσφορυλιώνεται σε πολλαπλές θέσεις *in vivo*, τόσο στο αμινο-τερματικό όσο και στο καρβοξυ-τερματικό άκρο, μετά την επίδραση παραγόντων στρες. Επίσης, έχουν εντοπισθεί πολλές κινάσες που είναι ικανές να φωσφορυλιώνουν *in vitro* την p53 (Fuchs et al, 1998b; Meek, 1998; Giaccia and Kastan, 1998; Jayaraman and Prives, 1999). Το

αναμενόμενο αποτέλεσμα της φωσφορυλίωσης αυτής είναι η σταθεροποίηση της πρωτεΐνης p53, μέσω αναστολής της ουβικουιτινίωσης και της αποικοδόμησης. Επειδή η αποικοδόμηση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης απαιτεί πρόσδεση με την Mdm2 (Haupt et al, 1997; Kubbutat et al, 1997b), η φωσφορυλίωση αμινοξέων που συμμετέχουν στην πρόσδεση αυτή θα ανέστειλε την πρόσδεση και θα επέτρεπε τη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης p53. Πράγματι έχουν εντοπισθεί συγκεκριμένα αμινοξέα της p53 που συμμετέχουν στην πρόσδεση με την Mdm2, η φωσφορυλίωση των οποίων μειώνει τη συνάφεια της p53 για την Mdm2 (Shieh et al, 1997; Shieh et al, 1999; Unger et al, 1999). Παρόλο που η θεωρία της φωσφορυλίωσης φαντάζει αρκετά πειστική, εντούτοις τα πρόσφατα *in vivo* δεδομένα την έθεσαν υπό αμφισβήτηση (Ashcroft et al, 1999; Blattner et al, 1999). Έτσι, το αποτέλεσμα της φωσφορυλίωσης στη σταθερότητα της p53 μπορεί να εξαρτάται από το ενδοκυτταρικό περιβάλλον και πιο συγκεκριμένα από την ύπαρξη εναλλακτικών μηχανισμών αποικοδόμησης της p53. Επίσης, η σταθεροποίηση της p53 μπορεί να επιτυγχάνεται όχι μόνο από την τροποποίηση της ίδιας, αλλά και από την τροποποίηση της Mdm2. Η φωσφορυλίωση της Mdm2 μπορεί να αναστέλλει την πρόσδεσή της με την p53, και μια τέτοια θέση φωσφορυλίωσης έχει εντοπισθεί (Mayo et al, 1997). Εναλλακτικά, η φωσφορυλίωση της Mdm2 μπορεί να αναστέλλει τη δράση λιγάσης ουβικουιτίνης που διαθέτει (Honda et al, 1997; Kubbutat et al, 1999).

Η σημασία του πυρηνικού εντοπισμού της πρωτεΐνης p53 για τη λειτουργία της.

Εκτός, όμως, από τους παραπάνω μηχανισμούς ρύθμισης, η λειτουργία της p53 εξαρτάται και από τον πυρηνικό εντοπισμό της και οι διαδικασίες εισόδου και εξόδου της p53 από τον πυρήνα ρυθμίζονται αυστηρά (Vousden and Vande Woude, 2000). Η είσοδος της πρωτεΐνης p53 στον πυρήνα εξαρτάται από την αλληλεπίδρασή της με το δίκτυο των μικροσωληνίσκων και της δυνείνης (Giannakakou et al, 2000), υποδηλώνοντας ότι η p53 εισέρχεται ενεργητικά στον πυρήνα με τη βοήθεια του σήματος πυρηνικού εντοπισμού που διαθέτει στην καρβοξυ-τερματική της περιοχή. Η p53 περιέχει επίσης και σήμα εξόδου από τον πυρήνα, το οποίο εντοπίζεται, ομοίως, στην καρβοξυ-τερματική περιοχή (Stommel et al, 1999),

και η έξοδος της p53 από τον πυρήνα εξαρτάται από την Mdm2. Όπως η p53, έτσι και η Mdm2 μετακινείται συνεχώς από και προς τον πυρήνα (Roth et al, 1998) και η μετακίνηση αυτή, πιθανά, να είναι υπεύθυνη για την έξοδο της p53 από τον πυρήνα. Πάντως, τελευταίες μελέτες υποστηρίζουν ότι η λειτουργία λιγάσης ουβικουιτίνης της Mdm2 είναι υπεύθυνη για την έξοδο της p53 από τον πυρήνα (Boyd et al, 2000; Geyer et al, 2000). Πιθανά, η ουβικουιτινίωση της p53 από την Mdm2 στον πυρήνα (Yu et al, 2000) αποκαλύπτει ή ενεργοποιεί το σήμα εξόδου από τον πυρήνα, επηρεάζοντας το επίπεδο ολιγομερισμού της p53 (Stommel et al, 1999).

Η σημασία της φωσφορυλίωσης, της ακετυλίωσης, της γλυκοσυλίωσης και της σουμοϋλίωσης στην πρόσδεση της πρωτεΐνης p53 στο DNA.

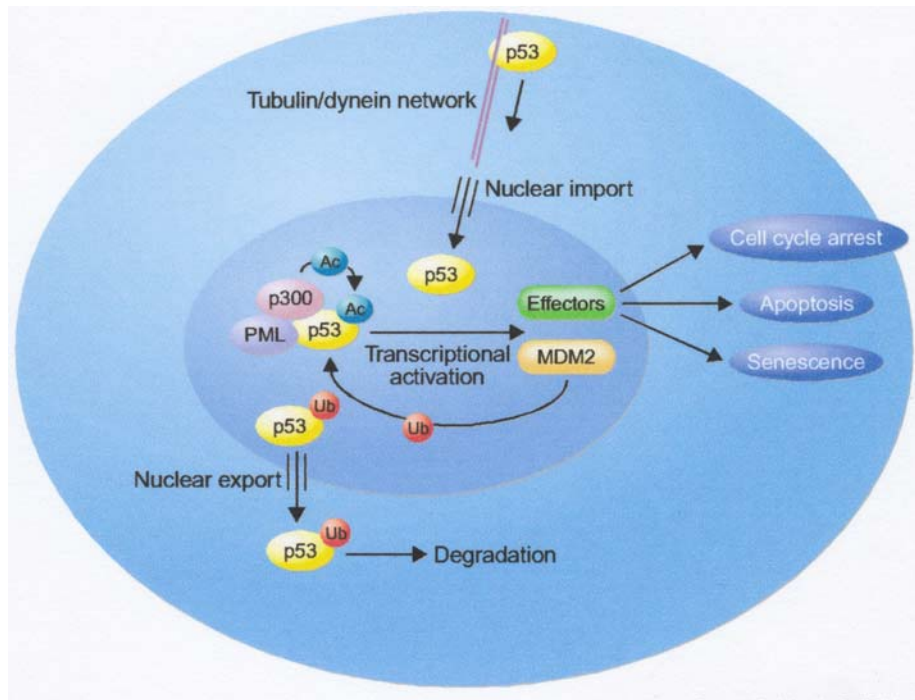
Επίσης, είναι δυνατή η ρύθμιση της πρόσδεσης της p53 στο DNA, ώστε να μπορέσει να δράσει ως μεταγραφικός παράγοντας. Έχουν αναφερθεί αρκετές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στο καρβοξυ-τερματικό άκρο της p53, οι οποίες ενισχύουν την ειδική πρόσδεσή της στο DNA και τις μεταγραφικές της ιδιότητες. Τέτοιες τροποποιήσεις είναι η φωσφορυλίωση (Meek, 1999), η σουμοϋλίωση (Gostissa et al, 1999; Rodriguez et al, 1999) και η ακετυλίωση (Gu and Roeder, 1997). Η ακετυλίωση των λυσινών του καρβοξυ-τερματικού άκρου πραγματοποιείται από τις ακετυλοτρανφεράσες των ιστονών, όπως είναι η p300/CBP και η pCAF, οι οποίες προσδένονται στο αμινο-τερματικό άκρο της p53 (Gu and Roeder, 1997; Liu et al, 1999). Η φωσφορυλίωση της αμινο-τερματικής περιοχής ενισχύει την πρόσδεση των ακετυλοτρανσφερασών, υποδεικνύοντας μια άμεση συνεργασία φωσφορυλίωσης/ακετυλίωσης στην ενίσχυση της δράσης της p53 (Sakaguchi et al, 1998). Αντίστροφα, η παρεμπόδιση της ακετυλίωσης της p53, είτε από την αναστολή των ακετυλοτρανσφερασών από την Mdm2 (Kobet et al, 2000) είτε από την άμεση πρόσδεση της p53 με σύμπλοκο απακετυλασών (Luo et al, 2000) μειώνει τη δράση της πρωτεΐνης αυτής.

Ακόμη, έχει αναφερθεί ότι η γλυκοσυλίωση της p53 είναι ικανή να ενισχύσει την πρόσδεση στο DNA (Shaw et al, 1996).

Τέλος, εκτός από τις παραπάνω τροποποιήσεις, σημαντικό ρόλο παίζουν και οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις στη ρύθμιση των επιπέδων της

p53 στα κύτταρα και στην ενεργότητα της πρωτεΐνης αυτής (Prives and Hall, 1999; Jayaraman and Prives, 1999; Hupp, 1999).

Οι περισσότεροι μηχανισμοί ρύθμισης της δράσης της p53 συνοψίζονται στην αναπαράσταση της Εικόνας 16



Εικόνα 16 : Σχηματική αναπαράσταση μερικών μηχανισμών ρύθμισης των επιπέδων και της δραστηριότητας της πρωτεΐνης p53 (Ryan et al, 2001)

Πειραματικοί στόχοι

Από τα εισαγωγικά στοιχεία συνειδητοποιούμε ότι η πρωτεΐνη p21 διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ομαλή πορεία της ζωής του κυττάρου. Η πρωτεΐνη p21 είναι αυτή που κυρίως ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο και κατά συνέπεια την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Ταυτόχρονα, η ικανότητά της να αναστέλλει με έναν ακόμη άγνωστο τρόπο το αποπτωτικό μονοπάτι που ενεργοποιείται από την πρωτεΐνη p53, προσφέρει τη δυνατότητα στο κύτταρο να επιδιορθώσει τις γενετικές του ανωμαλίες, αποτρέποντας με τον τρόπο αυτό τον κυτταρικό θάνατο. Επομένως, η διαλεύκανση των μηχανισμών μεταγραφικής ρύθμισης του γονιδίου p21 αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την καταπολέμηση νοσημάτων που χαρακτηρίζονται από ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό όπως ο καρκίνος.

Στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή επιδιώξαμε να αναδείξουμε σημαντικούς μηχανισμούς μεταγραφικής ρύθμισης του γονιδίου αυτού. Για το σκοπό αυτό θέσαμε συγκεκριμένους πειραματικούς στόχους, τους οποίους προσπαθήσαμε να επιτύχουμε, προκειμένου να συμβάλλουμε στην κατανόηση της ρύθμισης του γονιδίου του αναστολέα του κυτταρικού κύκλου p21 του ανθρώπου.

Στόχος 1 : Αρχικά, θελήσαμε να προσδιορίσουμε τη σημασία της κοντινής περιοχής του p21 υποκινητή στη μεταγραφική ενεργοποίησή του. Όπως είδαμε, η περιοχή αυτή αποτελεί στόχο αρκετών σηματοδοτικών μονοπατιών που επηρεάζουν την έκφραση του γονιδίου p21. Είναι απαραίτητη, επομένως, η περιοχή αυτή για την ενεργοποίηση του p21 υποκινητή ή η ενεργοποίηση είναι δυνατό να επιτευχθεί και απουσία της συγκεκριμένης περιοχής;

Στόχος 2 : Αφού προσδιορίσαμε τη σημασία της κοντινής περιοχής στην ενεργοποίηση του p21 υποκινητή, προσπαθήσαμε να προσδιορίσουμε τους παράγοντες που έχουν τη δυνατότητα να προσδένονται στην περιοχή αυτή, καθώς και το ρόλο των παραγόντων αυτών τόσο στην βασική έκφραση του γονιδίου p21 όσο και στην επαγόμενη έκφρασή του από κυτταροκίνες όπως ο TGFβ.

Στόχος 3 : Εκτός από την κοντινή περιοχή, υπάρχει και η μακρινή περιοχή του p21 υποκινητή η οποία είναι σημαντική για την ενεργοποίησή του. Προσπαθήσαμε να προσδιορίσουμε το ρόλο της περιοχής αυτής στη μεταγραφική ρύθμιση του υποκινητή αυτού, καθώς και της θέσης πρόσδεσης της πρωτεΐνης p53 που εντοπίζεται στην περιοχή αυτή.

Στόχος 4 : Αφού μελετήσαμε τόσο τη συνεισφορά της κοντινής, όσο και της μακρινής περιοχής στην ενεργοποίηση του p21 υποκινητή, θελήσαμε να προσδιορίσουμε τη λειτουργική αλληλεπίδραση μεταξύ της Sp1, που προσδένεται στην κοντινή περιοχή, και της p53 που προσδένεται στη μακρινή περιοχή, στη μεταγραφική ρύθμιση του p21 υποκινητή.

Στόχος 5 : Οι λειτουργικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών p53 και Sp1 υποδεικνύουν φυσικές και άμεσες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών αυτών. Προσπαθήσαμε να επιβεβαιώσουμε τις αλληλεπιδράσεις αυτές και να προσδιορίσουμε τις περιοχές της κάθε πρωτεΐνης που είναι υπεύθυνες για τις συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις.

Στόχος 6 : Θελήσαμε να ελέγξουμε αν η συνεργασιακή ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από τις πρωτεΐνες Sp1 και p53 μπορεί να επιτευχθεί και με άλλα μέλη των δύο αυτών οικογενειών.

Στόχος 7 : Αφού προσδιορίσαμε το ρόλο των Sp1/Sp3 στην ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από την p53, θελήσαμε να μελετήσουμε το ρόλο του παράγοντα Sp1 σε βιολογικές διεργασίες που εξαρτώνται από την πρωτεΐνη p53.

Στόχος 8 : Τέλος, θελήσαμε να επιβεβαιώσουμε τη σημασία του παράγοντα Sp1 στην ενεργοποίηση και άλλων εκτός του p21 γονιδίων των οποίων η απόκριση σε γενετοξικούς παράγοντες εξαρτάται από την p53.

ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

Υλικά.

Τα ένζυμα περιορισμού, τα τροποποιητικά ένζυμα (T4 DNA ligase, T4 polynucleotide kinase, Klenow fragment of DNA polymerase I, calf intestinal alkaline phosphatase) και οι DNA πολυμεράσες προέρχονται από τις Minotech, New England Biolabs και GIBCO/BRL. Τα [C-32P]ATP and [R-32P]dCTP προέρχονται από την Amersham ή τη New England Nuclear. Το GeneEditor *in vitro* Site-Directed Mutagenesis System, καθώς και το υπόστρωμα της λουσιφεράσης από την Promega, το poly(dI/dC) και τα dNTPs από τη Pharmacia, όλα τα ολιγονουκλεοτίδια από το Εργαστήριο Μικροχημείας του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας. Το Dc Protein Assay kit προέρχεται από τη BioRad Laboratories. Τα διαλύματα των κυτταροκαλλιιεργειών, η geneticin, η DNase I και το Superscript Reverse Transcription kit προέρχονται από την Invitrogen/Life Technologies. Τα O-nitrophenyl-galactopyranoside (ONPG), phenylmethyl-sulfonyl fluoride (PMSF), mithramycin, 5-Fluorouracil, Protein G Sepharose και το anti-myc (9E10) μονοκλωνικό αντίσωμα προέρχονται από τη Sigma-Aldrich. Τα μονοκλωνικά αντισώματα anti-p53 (DO-1) και anti-p63, καθώς και τα πολυκλωνικά anti-Sp1 (PEP-2), anti-Sp2 (K-20) και anti-Sp3 (D-20) προέρχονται από τη Santa Cruz Biotechnology, το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-Cip1 από την Transduction Laboratories, το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-β-tubulin ήταν μια ευγενική προσφορά του κου Στουρνάρα, το πολυκλωνικό αντίσωμα anti-PUMA ήταν μια ευγενική προσφορά του Dr. J. Yu. Το phospho-p53 antibody sampler kit προέρχεται από τη Cell Signaling Technology και τέλος όλα τα υπόλοιπα χημικά αντιδραστήρια από το εμπόριο με το μεγαλύτερο διαθέσιμο δείκτη ποιότητας.

Κυτταροκαλλιέργειες και επεξεργασία αυτών.

Για την πραγματοποίηση αυτής της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν 5 διαφορετικές κυτταρικές σειρές. Αυτές είναι ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα HepG2, κύτταρα από νεφρό πιθήκου COS-7, κύτταρα καρκινώματος τραχήλου HeLa, κερατινοκύτταρα δέρματος ανθρώπου HaCaT, καθώς και κύτταρα εμβρύων *Drosophila* SL2 (Schneider's). Τα HepG2, COS-7, HaCaT και HeLa μεγάλωσαν σε DMEM εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου μύσχου και πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη, ενώ τα SL2 (Schneider's) μεγάλωσαν σε θρεπτικό μέσο ειδικό για κύτταρα Schneider's εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου μύσχου και πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη.

Πλασμιδιακές κατασκευές.

Για την πραγματοποίηση της σειράς των πειραμάτων αυτών χρησιμοποιήθηκε κατά κύριο λόγο το πλασμίδιο -2300WAF-luc το οποίο περιέχει ολόκληρο τον υποκινητή του p21 -2300/+8 κλωνοποιημένο στο φορέα pGL3 basic. Αρχικά στο εργαστήριο υπήρχε το πλασμίδιο -2300/+8WAF-CAT. Από αυτό αφαιρέθηκε το Hind III κομμάτι το οποίο στη συνέχεια κλωνοποιήθηκε στο φορέα pGL3 basic στη θέση Hind III.

Εκτός από το παραπάνω πλασμίδιο στη συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν, εκτεταμένα, και τα πλασμίδια -215WAF-luc και -143WAF-luc. Το -215WAF-luc προήλθε από την κλωνοποίηση του τμήματος Pst I- Xho I του υποκινητή -2300WAF σε pGL3 basic στις αντίστοιχες θέσεις. Το -143WAF-luc προήλθε από την κλωνοποίηση του τμήματος Kpn I - Xho I του υποκινητή -2300WAF σε pGL3 basic στις αντίστοιχες θέσεις (εικόνα 17).

Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια -115WAF-luc, -105WAF-luc και -78WAF-luc. Το -115WAF-luc προήλθε από αφαίρεση του τμήματος Xho I-Xho I από το φορέα p21 (-2325/+8)Mut1-luc. Το πλασμίδιο -105WAF-luc προήλθε από αφαίρεση του τμήματος Kpn I-Kpn I από το φορέα p21 (-2325/+8)Mut2-luc. Το πλασμίδιο -78WAF-luc προήλθε από κλωνοποίηση του τμήματος Sal I-Hind III από το φορέα p21 (-2325/+8)Mut3-luc, στο φορέα pGL3 basic στις θέσεις XhoI-HindIII (εικόνα 17).

Το πλασμίδιο -215Mut3-luc προήλθε από την αφαίρεση του τμήματος Pst I-Xho I από το φορέα p21(-2325/+8)Mut3-luc (εικόνα 18).

Το πλασμίδιο -215Mut1-luc προήλθε από την αφαίρεση του τμήματος Pst I-Kpn I από το φορέα p21(-2325/+8)Mut1-luc (εικόνα 18).

Το πλασμίδιο p53(-215/+8)-luc προήλθε από την κλωνοποίηση του τμήματος Sac I-Sac I του φορέα (-2325/+8)p21-luc στη θέση Sac I του φορέα -215Mut3-luc (εικόνα 18).

Το πλασμίδιο (-2325/+8 Δ -122/-60)p21-luc προήλθε από την αφαίρεση του τμήματος Sma I-Sma I του φορέα (-2325/+8)p21-luc (εικόνα 18).

Το πλασμίδιο (-1890/+8)p21-CAT προήλθε από αφαίρεση του τμήματος Sac I-Sac I από το φορέα (-2325/+8)p21-CAT.

Τα πλασμίδια (-2325/-1890)p21-tk και (-1890/-2325)p21-tk προήλθαν, αρχικά, από την κλωνοποίηση του τμήματος Hind III-Ssp I στο φορέα pBS στη θέση EcoRV και στους δύο προσανατολισμούς και στη συνέχεια με την κλωνοποίηση του τμήματος Xba I-Kpn I στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα tk-85 CAT.

Τα πλασμίδια (-2260/-1890)p21-tk και (-2325/-2260)p21-tk προήλθαν, αρχικά, από την κλωνοποίηση του τμήματος EcoRI-Sac I των παραπάνω πλασμιδίων στη θέση EcoRV και στη συνέχεια με την κλωνοποίηση του τμήματος XbaI-KpnI στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα tk-85 CAT.

Οι φορείς έκφρασης των p73α και p73β ήταν μια ευγενική προσφορά του Dr Kaelin.

Οι φορείς που εκφράζουν χιμαιρικές πρωτεΐνες GST και p53 αγρίου τύπου, καθώς και GST και μεταλλαγμένες p53 ήταν μια ευγενική προσφορά του Δρ Χαλαζονίτη. Οι φορείς έκφρασης της αγρίου τύπου p53, καθώς και των μεταλλαγμένων p53, προήλθαν με κλωνοποίηση του τμήματος EcoR I-Hind III από τα παραπάνω πλασμίδια στη θέση EcoR I - Hind III του φορέα pRK5 (εικόνα 19).

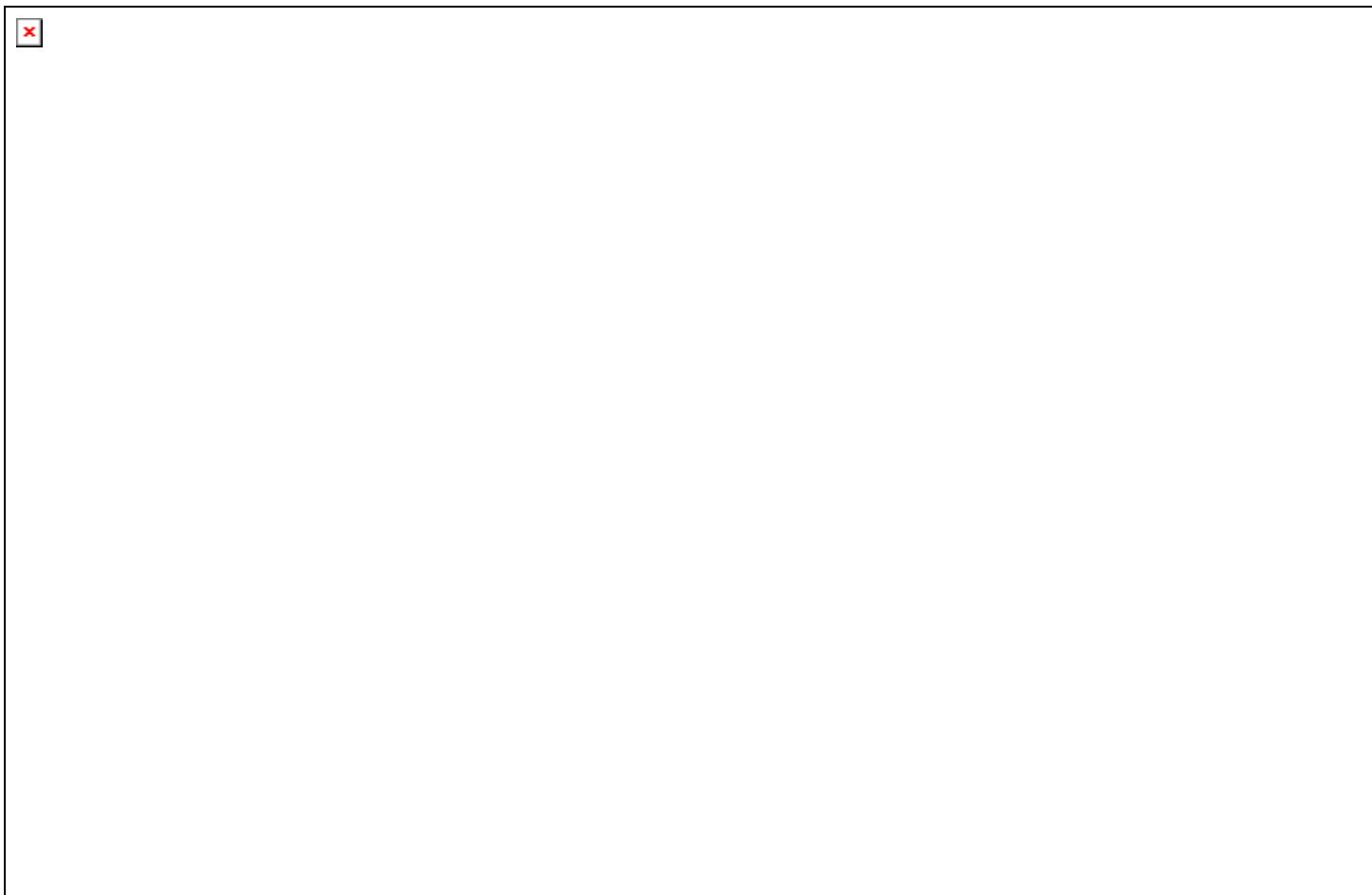
Οι φορείς που εκφράζουν τις χιμαιρικές πρωτεΐνες GST και του Sp1 αγρίου τύπου, καθώς και GST και κάθε υποπεριοχής του παράγοντα Sp1 ήταν μια ευγενική προσφορά της Βασιλάκης Ελευθερίας.

Ο φορέας έκφρασης της p21 ήταν μια ευγενική προσφορά της Θυμιακού Έφης.

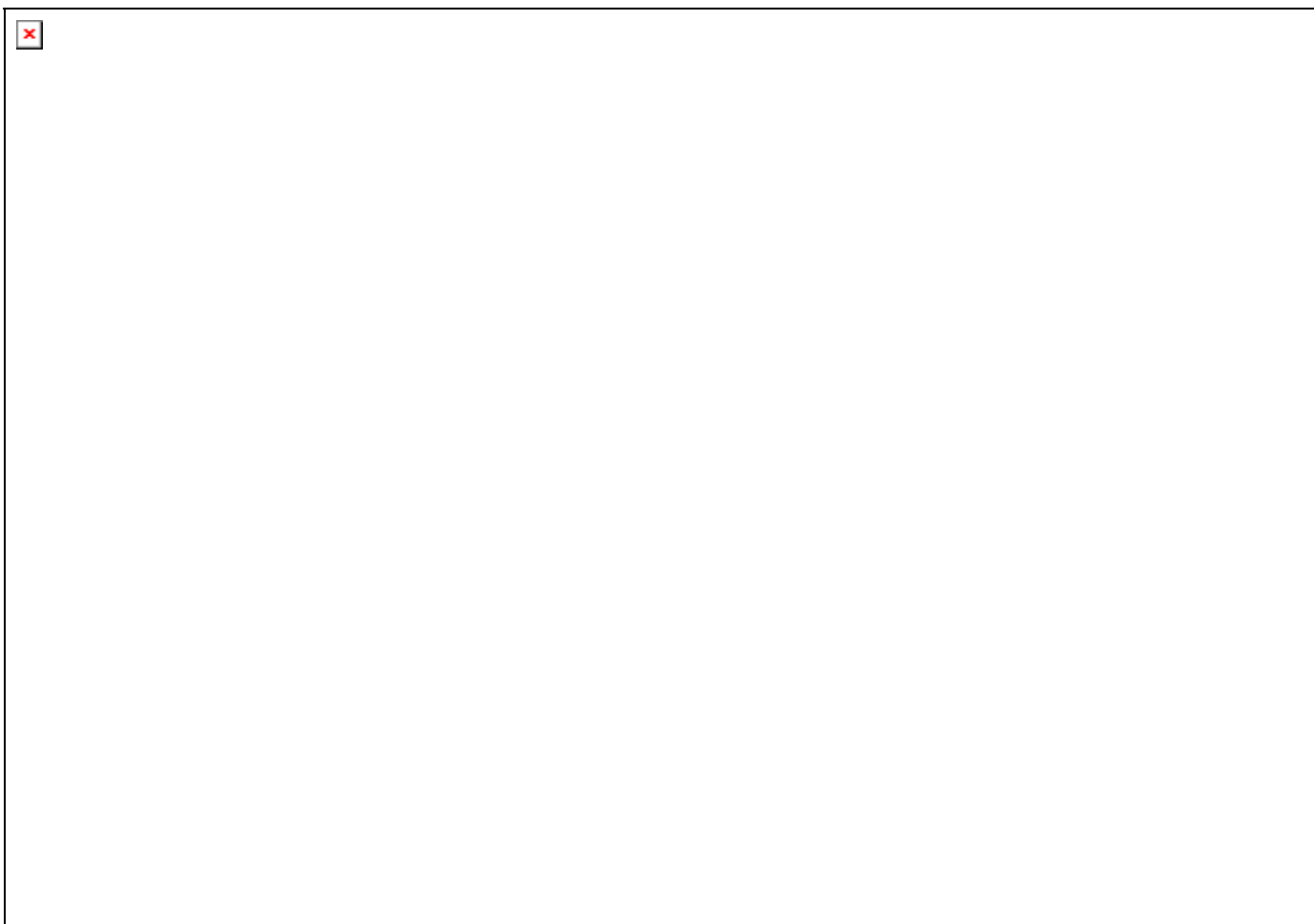
Ο φορέας έκφρασης pPac-Sp1 ήταν μια ευγενική προσφορά του Dr John Noti, ενώ ο φορέας έκφρασης hsp-lacZ, που χρησιμοποιήθηκε για την ομαλοποίηση των παροδικών επιμολύνσεων ήταν μια ευγενική προσφορά του Dr. C. Delidakis.

Οι φορείς έκφρασης των μεταλλαγμένων Sp1 ήταν μια ευγενική προσφορά

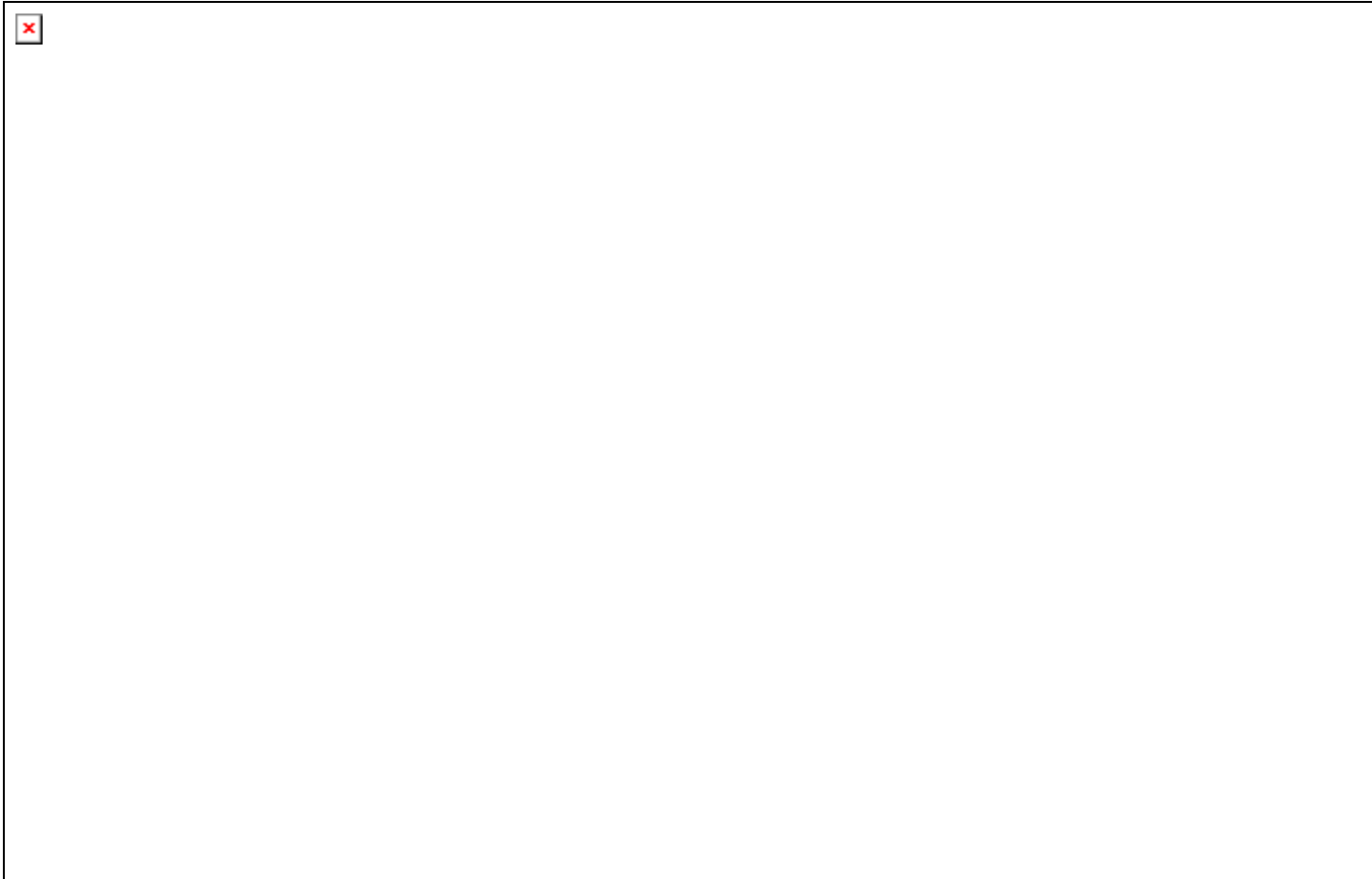
Το πλασμίδιο (-336/+157)PUMA-luc ήταν μια ευγενική προσφορά του Dr Vogelstein. Το πλασμίδιο (-336/+157 Δ-126/-25)PUMA-luc προήλθε από αφαίρεση του τμήματος Sac I - Sma I από το φορέα (-336/+157)PUMA-luc.



Εικόνα 17 : Σχηματική αναπαράσταση πλασμιδίων που φέρουν τον αγρίου τύπου ή ελλειμματικούς p21 υποκινητές που ελέγχουν την έκφραση του γονιδίου της λουσιφεράσης. Με κόκκινο βέλος φαίνεται το γονίδιο της λουσιφεράσης και με πράσινο βέλος το γονίδιο ανθεκτικότητας απέναντι στην Amp. Στο πάνω τμήμα του κάθε φορέα φαίνεται ο p21 υποκινητής. Με κόκκινα οβάλ σημειώνονται οι θέσεις πρόσδεσης της p53 και με μπλε οβάλ οι θέσεις πρόσδεσης της Sp1.



Εικόνα 18 : Σχηματική αναπαράσταση πλασμιδίων που φέρουν ελλειμματικούς ή μεταλλαγμένους p21 υποκινητές που ελέγχουν την έκφραση του γονιδίου της λουσιφεράσης. Με κόκκινο βέλος φαίνεται το γονίδιο της λουσιφεράσης και με πράσινο βέλος το γονίδιο ανθεκτικότητας απέναντι στην Amp. Στο πάνω τμήμα του κάθε φορέα φαίνεται ο p21 υποκινητής. Με κόκκινα οβάλς σημειώνονται οι θέσεις πρόσδεσης της p53 και με μπλε οβάλς οι θέσεις πρόσδεσης της Sp1. Με κόκκινο X συμβολίζεται η μετάλλαξη της αντίστοιχης θέσης πρόσδεσης της Sp1.



Εικόνα 19 : Σχηματική αναπαράσταση φορέων έκφρασης της αγρίου τύπου ή ελλειμματικών μορφών της p53. Με μαύρο βέλος φαίνεται ο υποκινητής SP6, που ελέγχει την έκφραση των p53 μορφών, με κόκκινο βέλος ο CMV υποκινητής/ενισχυτής και με πράσινο βέλος το γονίδιο ανθεκτικότητας απέναντι στην Amp. Στο πάνω τμήμα του κάθε φορέα φαίνεται η p53 πρωτεΐνη που εκφράζει ο κάθε φορέας.

Απομόνωση τμήματος DNA.

Μετά την πέψη, τρέχουμε της αντίδραση της πέψης σε παρασκευαστική πηκτή 0,4-0,6% αγαρόζης για περίπου 2 ώρες στα 50V. Στη συνέχεια αφαιρούμε το τμήμα της πηκτής που περιέχει το κομμάτι που μας ενδιαφέρει και με τη βοήθεια λεπίδας το κόβουμε σε όσο το δυνατό μικρότερα κομμάτια. Κατόπιν τα κομμάτια αυτά τα τοποθετούμε σε κολώνες που προετοιμάζουμε ως εξής : στον κέντρο του πάτου μικροσωλήνα 0,5ml κάνουμε μια τρύπα με τη βοήθεια βελόνας. Τοποθετούμε στο εσωτερικό του σωλήνα ψαρόμαλλο και προσθέτουμε 150μl σφαιρίδια G-10. Τοποθετούμε το σωλήνα αυτό σε άλλο των 2ml και φυγοκεντρούμε στις 12000 στροφές για 2 λεπτά. Μεταφέρουμε το σωλήνα του 0,5ml σε καθαρό των 2ml και προσθέτουμε την πηκτή. Φυγοκεντρούμε στις 12000 στροφές για 10 λεπτά. Μεταφέρουμε το διάλυμα του DNA σε καθαρό μικροσωλήνα των 1,5ml και προσθέτουμε 1/10 όγκου 3M οξικού νατρίου και 0,7 του όγκου παγωμένη ισοπροπανόλη. Φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 12000 στροφές. Ξέπλυμα 2 φορές με 70% αιθανόλη. Στέγνωμα του DNA και τελικά επαναδιάλυσή του σε TE.

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες μικρής κλίμακας.

- Μεταφορά 1,5ml καλλιέργειας σε σωλήνα 1,5ml
- Φυγοκέντρωση στις 12000 στροφές για 1 λεπτό
- Αφαίρεση υπερκείμενου στον απαγωγό
- Επαναδιάλυση πελέττας σε 600λ διαλύματος λύσης με έντονη ανάδευση
- Προσθήκη 20μl λυσοζύμης (10mg/ml). Ανάδευση
- Αφήνουμε την αντίδραση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Βράζουμε την αντίδραση για 1,5 λεπτό
- Επώαση σε πάγο για περίπου 10 λεπτά
- Φυγοκέντρωση στις 12000 στροφές για 15 λεπτά
- Αφαίρεση πελέττας με οδοντογλυφίδα
- Προσθήκη 600 παγωμένης ισοπροπανόλης. Ανάδευση

- Επώαση στους -20°C το λιγότερο για 30 λεπτά
- Αφαίρεση υπερκλειμένου
- Προσθήκη 1ml 70% αιθανόλης
- Φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 5 λεπτά
- Αφαίρεση υπερκλειμένου
- Στέγνωμα της πελέττας
- Επαναδιάλυση σε 20μl H_2O

Απομόνωση DNA από καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας.

Η απομόνωση DNA από καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας έγινε με τη χρήση κολώνων QIAGEN και σύμφωνα με το εγχειρίδιο της εταιρείας.

Αποφωσφορυλίωση DNA.

Η αντίδραση που προετοιμάζουμε είναι η εξής :

20μl πλασμίδιο κομμένο με περιοριστικά ένζυμα (0,5-1 μg/μl)

3μl 10x CIAP buffer

3μl ένζυμο CIAP

2μl H_2O

Στη συνέχεια ακολουθούμε την παρακάτω διαδικασία

- Επώαση της αντίδρασης στους 37°C για 30 λεπτά
- Προσθήκη 2μl ενζύμου CIAP
- Επώαση της αντίδρασης στους 37°C για 30 λεπτά
- Προσθήκη 70μl H_2O
- Προσθήκη 50μl φαινόλης και 50μl χλωροφορμίου. Ανάδευση
- Φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 5 λεπτά
- Μεταφορά υδατικής φάσης σε καθαρό σωλήνα 1,5ml
- Προσθήκη ίσου όγκου χλωροφόρμιο. Ανάδευση και φυγοκέντρηση όπως προηγουμένως (προαιρετικό).
- Προσθήκη 1/10 του όγκου 3M οξικού νατρίου και 2,5 όγκων 100% αιθανόλης

- Τοποθέτηση για 5 λεπτά στους -80°C
- Φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 10 λεπτά
- Αφαίρεση υπερκλειμένου
- Ξέπλυμα 2 φορές με 70% αιθανόλη
- Αφαίρεση υπερκλειμένου και στέγνωμα της πελέττας
- Επαναδιάλυση σε H_2O

Συγκόλληση τμημάτων DNA.

1μl φορέας (1μg/μl)

χμl ένθεμα

1μl ligation buffer

1μl T4 DNA ligase

H_2O μέχρι τα 10μl

Η ποσότητα του ενθέματος υπολογίζεται από τον εξής τύπο :
(500 x ζεύγη βάσεων ενθέματος/ζεύγη βάσεων φορέα) (ng)

Επώαση της αντίδρασης στους 16°C όλη νύχτα

Μετασχηματισμός βακτηρίων με τη μέθοδο του θερμικού “σοκ”.

- Τοποθετούμε 100μl βακτηρίων σε σωλήνα των 15ml
- Προσθήκη 0,5μg καθαρού πλασμιδίου ή 10μl αντίδραση συγκόλλησης
- Τοποθέτηση στον πάγο για 30 λεπτά
- Θέρμανση στους 42°C για 45 δευτερόλεπτα
- Τοποθέτηση για 2 λεπτά σε πάγο
- Προσθήκη 900μl LB
- Επώαση για 1 ώρα στους 37°C στις 225 στροφές
- Άπλωμα σε πιάτο LB+Amp και επώαση στους 37°C όλη νύχτα

Μεταλλαξιγένεση Sp1 θέσεων.

Οι μεταλλάξεις των Sp1 θέσεων του υποκινητή του p21 πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του GeneEditor *in vitro* Site-Directed Mutagenesis System της Promega. Η διαδικασία αυτή στηρίζεται στην ύπαρξη ενός ολιγονουκλεοτιδίου που περιέχει την επιθυμητή μετάλλαξη στο κέντρο της ακολουθίας και άκρα τμήματα της νουκλεοτιδικής ακολουθίας άγριου τύπου. Τα στάδια που ακολουθήθηκαν είναι σύμφωνα με το εγχειρίδιο της εταιρείας και είναι τα εξής:

Φωσφορυλίωση του ολιγονουκλεοτιδίου. Αυτή έγινε σύμφωνα με το εγχειρίδιο της εταιρείας και έχει ως εξής:

Ολιγονουκλεοτίδιο	—————>	100pmol
kinase 10x buffer	—————>	2,5 μl
T ₄ polynucleotide kinase	—————>	5u
ATP, 10mM	—————>	2,5 μl
H ₂ O	—————>	μέχρι 25 μl

Επώαση στους 37°C για 30 λεπτά.

Επώαση στους 70°C για απενεργοποίηση των κινασών.

Αλκαλική αποδιάταξη του προς μετάλλαξη DNA.

- Ετοιμασία της αντίδρασης αποδιάταξης

dsDNA template	0,5pmol (2μg)
2M NaOH, 2mM EDTA	2 μl
αποστειρωμένο νερό	μέχρι 20 μl

- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- Προσθήκη 2μl 2M οξικού αμμωνίου (pH 4,6) και 75μl 100% αιθανόλης.
- Επώαση στους -70°C για 30 λεπτά.

- Φυγόκεντρης σε μέγιστη ταχύτητα περιστροφής για 15 λεπτά στους 4°C.
- Αφαίρεση υπερκείμενου και πλύσιμο της πελέττας με 200μl 70% αιθανόλης. Φυγοκέντρωση όπως στο προηγούμενο στάδιο.
- Στέγνωμα της πελέττας.
- Επαναδιάλυση της πελέττας σε 100μl TE (pH 8). Ανάλυση 10μl του αποδιαταγμένου DNA σε πηκτική αгарόζης για έλεγχο της ποσότητας DNA μετά το τέλος της αποδιάταξης πριν τη μετάβαση στο επόμενο στάδιο

Αντίδραση υβριδισμού. Η αντίδραση αυτή περιγράφεται ως εξής:

Template DNA	10μl (0,005 pmol)
Ολιγονουκλ. Επιλογής(2,9 ng/μl), φωσφορυλιωμένο	1 μl (0,25pmol)
Ολιγονουκλ. Μετάλλαξης, φωσφορυλιωμένο	1,25 pmol
Annealing 10x buffer	2μl
Αποστειρωμένο νερό	μέχρι 20μl

Επώαση της αντίδρασης στους 75°C για 5 λεπτά και στη συνέχεια σταδιακό πάγωμα (περίπου 1,5°C ανά λεπτό) μέχρι τους 37°C.

Σύνθεση μεταλλαγμένης αλυσίδας και σύνδεση των άκρων. Εφόσον η αντίδραση υβριδοποίησης κρύωσε μέχρι τους 37°C , προσθέτουμε τα ακόλουθα:

Αποστειρωμένο νερό	5μl
Synthesis 10x buffer	3μl
T4 DNA polymerase	1μl (5-10u)
T4 DNA ligase	1μl (1-3u)
Τελ.όγκος	30μl

Επώαση της αντίδρασης στους 37°C για 90 λεπτά

Μετασχηματισμός BMH 71-18 κυττάρων.

Αυτή η βακτηριακή σειρά δε διαθέτει μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA με αποτέλεσμα να αποτρέπει την επιδιόρθωση της νεοσυντιθέμενης μεταλλαγμένης αλυσίδας. Ταυτόχρονα, όμως η σειρά αυτή είναι ασταθής, γι' αυτό πρέπει το μεταλλαγμένο πλασμίδιο στη συνέχεια να μεταφερθεί σε άλλη βακτηριακή σειρά. Η μέθοδος του μετασχηματισμού γίνεται με τη γνωστή μέθοδο του "θερμικού σοκ" προσθέτοντας 1,5 μl από την αντίδραση μεταλλαξιγένεσης σε 100 μl κυττάρων BMH 71-18. Στο τέλος της διαδικασίας ετοιμάζουμε καλλιέργειες προσθέτοντας 4ml LB που περιέχει 100 μl από το GeneEditor Antibiotic Selection Mix. Αναδεύουμε τις καλλιέργειες αυτές στους 37°C σε 225 στροφές για 16-18 ώρες.

Απομόνωση DNA από καλλιέργειες μικρής κλίμακας. Η απομόνωση του DNA έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Promega το οποίο είναι το εξής :

- Τοποθέτηση 1,5 ml της καλλιέργειας σε μικροσωλήνα φυγοκέντρησης και φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 1 λεπτό.
- Αφαίρεση υπερκείμενου.
- Επαναδιάλυση πελέττας σε 100μl παγωμένου αντιδραστήριου επαναδιάλυσης
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- Προσθήκη 200μl φρέσκου διαλύματος 0,2M NaOH, 1% SDS για λύση κυττάρων. Ήπια ανακίνηση. Επώαση σε πάγο για 5 λεπτά.
- Προσθήκη 150μl παγωμένου 3M οξικού καλίου (pH 4,8), για εξουδετέρωση της λύσης. Ήπια ανακίνηση. Επώαση σε πάγο για 5 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 5 λεπτά.
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε καθαρό μικροσωλήνα.
- Προσθήκη 1 όγκου διαλύματος φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1). Ανάδευση για 1 λεπτό και φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 5 λεπτά.

- Μεταφορά υδατικής φάσης σε καθαρό μικροσωλήνα και προσθήκη 1 όγκου διαλύματος χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη (24:1). Ανάδευση για 1 λεπτό και φυγοκέντρηση όπως προηγούμενα.
- Μεταφορά υδατικής φάσης σε καθαρό μικροσωλήνα και προσθήκη 2,5 όγκων 100% αιθανόλης. Ανάδευση και επώαση στους -80°C για 5 λεπτά
- Φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 5 λεπτά. Αφαίρεση υπερκειμένου και ξέπλυμα της πελέττας με 70% αιθανόλη.
- Στέγνωμα της πελέττας και επαναδιάλυση αυτής σε 50μl αποστειρωμένου νερού.
- Εξέταση του DNA σε πηκτή αγαρόζης για εκτίμηση της ποσότητας.

Μετασχηματισμός DH-10b κυτάρων.

Πριν την έναρξη της διαδικασίας προετοιμάζουμε πιάτα LB που περιέχουν 150λ GeneEditor Antibiotic Selection Mix και 2,5mg αμπικιλίνης. Η διαδικασία έγινε με τη μέθοδο του “θερμικού σοκ” προσθέτοντας 100ng από το απομονωμένο DNA σε 100μl κυτάρων DH-10b.

Σύνθεση διαλυμάτων

2 M οξικό αμμώνιο (pH 4,6)

15,4 g οξικού αμμωνίου σε 50 ml αποστειρωμένου νερού, σταθεροποίηση του pH στο 4,6 με υγρό οξικό οξύ και προσθήκη αποστειρωμένου νερού μέχρι τα 100ml.

Annealing 10x buffer

200mM Tris-HCl (pH 7,5)
100mM MgCl₂
500mM NaCl

Kinase 10x buffer

700mM Tris-HCl (pH 7,6)
100mM MgCl₂
50mM DTT

Διάλυμα επαναδιάλυσης

καλλιιεργειών

25mM Tris-HCl (pH 8)

10mM EDTA

50mM γλυκόζη

3M οξικό κάλιο (pH 4,8)

Προσθήκη 29,44g οξικό κάλιο σε 30ml νερό, σταθεροποίηση του pH στο 4,8 με υγρό οξικό οξύ και προσθήκη νερού μέχρι τα 100ml.

0,2M NaOH 1% SDS

200μl 10M NaOH

1ml 10% SDS

8,8ml νερό

Synthesis 10x buffer

100mM Tris-HCl (pH 7,5)

5mM dNTPs

10mM ATP

20mM DTT

2M NaOH 2mM EDTA

2ml 10M NaOH

40μl 500mM EDTA

7,96ml νερό

Ολιγονουκλεοτίδια.

Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήσαμε για την πραγματοποίηση των σημειακών μεταλλάξεων στον p21 υποκινητή φαίνονται στον πίνακα 4.

Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήσαμε στις αναλύσεις ηλεκτροφορητικής κινητικότητας συμπλόκου φαίνονται στον πίνακα 5.

Για να γίνουν δίκλινα τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά προσθέσαμε 10μg από το κάθε συμπληρωματικό ολιγονουκλεοτίδιο, 2μl 10x kinase buffer και νερό μέχρι τα 20μl. Στα συνέχεια βράσαμε την αντίδραση για 2 λεπτά, την αφήσαμε σταδιακά να κρυώσει περίπου μέχρι τους 20°C και την αραιώσαμε 10 φορές. Τα προκύπτοντα δίκλινα μόρια σημάνθηκαν με ³²P με τη βοήθεια πολυμεράσης Klenow.

Πίνακας 4 : ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στη σημειακή μεταλλαξιγένεση του p21 υποκινητή		
όνομα ολιγονουκλεοτιδίου	ακολουθία	σκοπός
Sp1-1	5'-GCC TGG GCC CCG GGG <u>CTC GAG</u> GTC CCG GGC GGC GC-3'	εκκινητής για μεταλλαξιγένεση της περιοχής - 119/-114 του p21 υποκινητή (θέση 2). Οι σημειακές μεταλλάξεις φαίνονται με κόκκινο χρώμα. Η θέση περιορισμού Xho I είναι υπογραμμισμένη
Sp1-2	5'-GAG GGC GGT CCC <u>GGG TAC</u> CGC GGT GGG CCG AGC-3'	εκκινητής για μεταλλαξιγένεση της περιοχής - 109/-104 του p21 υποκινητή (θέση 1). Οι σημειακές μεταλλάξεις φαίνονται με κόκκινο χρώμα. Η θέση περιορισμού Kpn I είναι υπογραμμισμένη
Sp1-3	5'-GGC CGA GCG CGG <u>GTC GAC</u> CCT CCT TGA GGC GGG-3'	εκκινητής για μεταλλαξιγένεση της περιοχής - 82/-77 του p21 υποκινητή (θέση 3). Οι σημειακές μεταλλάξεις φαίνονται με κόκκινο χρώμα. Η θέση περιορισμού Sal I είναι υπογραμμισμένη
Sp1-4	5'-CCC GCC TCC TTG AGG <u>AAT TCC</u> CGG GCG GGG CGG T-3'	εκκινητής για μεταλλαξιγένεση της περιοχής - 69/-64 του p21 υποκινητή (θέση 4). Οι σημειακές μεταλλάξεις φαίνονται με κόκκινο χρώμα. Η θέση περιορισμού EcoR I είναι υπογραμμισμένη
Sp1-5/6	5'-TTG AGG CGG GCC CGG <u>TCT AGA</u> CGG TTG TAT ATC AGG-3'	εκκινητής για μεταλλαξιγένεση της περιοχής - 59/-50 του p21 υποκινητή (θέση 5). Οι σημειακές μεταλλάξεις φαίνονται με κόκκινο χρώμα. Η θέση περιορισμού Xba I είναι υπογραμμισμένη

Πίνακας 5 : ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ως ανιχνευτές σε ανάλυση ηλεκτροφορητικής κινητικότητας συμπλόκου

όνομα ολιγονουκλεοτιδίου	ακολουθία	θέση
p21 (-124/-109) sense	5'-TTT GGG GAG GGC GGT CCC G-3'	Αντιστοιχεί στην περιοχή -124/-109 του p21 υποκινητή
p21 (-124/-109)mut1 sense	5'-TTT GGG GCT CGA GGT CCC G-3'	Αντιστοιχεί στην περιοχή -124/-109 του p21 υποκινητή με μεταλλαγμένη τη θέση 1. Οι μεταλλάξεις φαίνονται με κόκκινο
p21 (-115/-95) sense	5'-TTT GGT CCC GGG CGG CGC GGT GGG-3'	Αντιστοιχεί στην περιοχή -115/-95 του p21 υποκινητή
p21 (-115/-95)mut2 sense	5'-TTT-GGTCCC GGGTAC CGCGGTGGG-3'	Αντιστοιχεί στην περιοχή -115/-95 του p21 υποκινητή με μεταλλαγμένη τη θέση 2. Οι μεταλλάξεις φαίνονται με κόκκινο
p21 (-123/-97) sense	5'-GGG AGG GCG GTC CCG GGC GGC GCG GTG-3'	Αντιστοιχεί στην περιοχή -123/-97 του p21 υποκινητή
p21 (-123/-97)mut2 sense	5'-GGG AGG GCG GTC CCG GGT ACC GCG GTG-3'	Αντιστοιχεί στην περιοχή -123/-97 του p21 υποκινητή με μεταλλαγμένη τη θέση 2. Οι μεταλλάξεις φαίνονται με κόκκινο
p21 (-123/-97)mut1 sense	5'-GGG CTC GAG GTC CCG GGC GGC GCG GTG-3'	Αντιστοιχεί στην περιοχή -123/-97 του p21 υποκινητή με μεταλλαγμένη τη θέση 1. μεταλλάξεις φαίνονται με κόκκινο
p21 (-86/-70) sense	5'-GGG GGA CCC GCC TCC TTG A-3'	Αντιστοιχεί στην περιοχή -86/-70 του p21 υποκινητή
p21 (-86/-70)mut3 sense	5'-GGG GGT CGA CCC TCC TTG A-3'	Αντιστοιχεί στην περιοχή -86/-70 του p21 υποκινητή με μεταλλαγμένη τη θέση 3. μεταλλάξεις φαίνονται με κόκκινο
p21 (-76/-58) sense	5'-TTT TCC TTG AGG CGG GCC CGG G-3'	Αντιστοιχεί στην περιοχή -76/-58 του p21 υποκινητή
p21 (-76/-58)mut4 sense	5'-TTT TCC TTG AGG AAT TCC CCG G-3'	Αντιστοιχεί στην περιοχή -76/-58 του p21 υποκινητή με μεταλλαγμένη τη θέση 4. Οι μεταλλάξεις φαίνονται με κόκκινο
p21 (-63/-45) sense	5'-TTT CCC GGG CGG GGC GGT TGT A-3'	Αντιστοιχεί στην περιοχή -63/-45 του p21 υποκινητή
p21 (-63/-45)mut5/6 sense	5'-TTT CCC GGT CTA GAC GGT TGT A-3'	Αντιστοιχεί στην περιοχή -63/-45 του p21 υποκινητή με μεταλλαγμένες τις θέσεις 5/6. Οι μεταλλάξεις φαίνονται με κόκκινο

Ηλεκτροφορητική κινητικότητα συμπλόκου σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.

Οι αντιδράσεις αυτές έγιναν με πυρηνικό εκχύλισμα από κύτταρα Schneider's που προηγουμένως είχαν επιμολυνθεί με το πλασμίδιο pPacSp1 και με πυρηνικά εκχυλίσματα από ήπαρ αρουραίου.

- Προσθήκη 2,5μl H₂O
- Προσθήκη 2μl 10x binding buffer
- Προσθήκη 0,5μl dl/dC 3μg/μl
- Προσθήκη εκχυλίσματος
- Συμπλήρωση μέχρι τα 13μl με D-buffer
- 15 λεπτά στον πάγο
- Προσθήκη ανταγωνιστών ή αντισωμάτων
- 15 λεπτά στον πάγο
- Προσθήκη ραδιοσημασμένου ανιχνευτή
- 30 λεπτά στον πάγο
- Φόρτωμα της αντίδρασης σε μη αποδιατακτική πηκτή 5-6% πολυακρυλαμίδης
- 3-4 ώρες στα 150V
- Στέγνωμα της πηκτής
- Έκθεση σε φιλμ στους -80°C για όλη τη νύχτα

Σύνθεση διαλυμάτων.

10x Binding Buffer

100mM Hepes pH 7,9
0,5 M KCl
20mM MgCl₂
40mM spermidine
1mg/ml BSA
0,2mM Zn acetate
0,5% NP₄O
dH₂O

D-buffer

20mM Hepes pH 7,9
10% glycerol
40mM KCl
0,5mM DTT

Ετοιμασία κυττάρων για επιμόλυνση.

Η διαδικασία αυτή είναι κοινή για τα HepG2, HeLa και COS-7, ενώ διαφέρει στα SL2.

A) HepG2, HeLa, COS-7, HaCaT

- Αφαίρεση θρεπτικού από τη φλάσκα
- Πλύσιμο με 2ml τρυψίνη
- Αφαίρεση τρυψίνης
- Προσθήκη 2ml τρυψίνη και επώαση στους 37°C για 5 λεπτά
- Προσθήκη 2ml θρεπτικού 10% και μεταφορά σε σωλήνα των 15ml
- Σπάσιμο συσσωματωμάτων
- Αραίωση μέχρι τα 12ml με θρεπτικό 10%
- Μέτρηση κυττάρων
- Αραίωση κυττάρων σε 10^6 κύτταρα/ml με θρεπτικό 10%
- Προσθήκη 5×10^5 κύτταρα/πηγάδι για HepG2 και HeLa και $2,5 \times 10^5$ κύτταρα/πηγάδι για COS-7 και HaCaT.
- Προσθήκη 2,5ml κυττάρων σε φλάσκα

B) SL2

- Μεταφορά κυττάρων από φλάσκα σε σωλήνες των 15ml
- Φυγοκέντρηση στις 2000 στροφές για 5 λεπτά
- Αφαίρεση υπερκειμένου
- Προσθήκη 2ml θρεπτικού 10% σε κάθε σωλήνα και σπάσιμο συσσωματωμάτων
- Αραίωση μέχρι τα 10ml με θρεπτικό 10%
- Μέτρηση κυττάρων
- Αραίωση κυττάρων σε 10^6 κύτταρα/ml με θρεπτικό 10%
- Προσθήκη 10^6 κύτταρα/πηγάδι
- Προσθήκη 2ml σε φλάσκα

Επιμόλυνση κυτταρικών σειρών.

Όλες οι κυτταρικές σειρές επιμολύνθηκαν με τη μέθοδο του χλωριούχου ασβεστίου. Τα HepG2, και HeLa κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πιάτα 6-well με πυκνότητα 5×10^5 κύτταρα ανά πηγάδι, τα κύτταρα COS-7 και HaCaT τοποθετήθηκαν σε πιάτα 6-well με πυκνότητα $2,5 \times 10^5$ κύτταρα ανά πηγάδι, ενώ τα Schneider's τοποθετήθηκαν σε πιάτα 12-well με πυκνότητα 10^6 κύτταρα ανά πηγάδι. Για την εξομάλυνση της απόδοσης της επιμόλυνσης χρησιμοποιήσαμε για τα μεν Schneider's το πλασμίδιο p-hs-lacZ, ενώ για τις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές το pCMV-β-gal. Τα μίγματα του DNA προστέθηκαν σε ίσο όγκο διαλύματος 2xHBS.

Σύνθεση διαλύματος 2xHBS.

274mM NaCl

10mM KCl

1,5mM Na₂HPO₄·H₂O

12mM dextrose

42mM Hepes

ρύθμιση του pH στο $7,1 \pm 0,1$

Συλλογή κυττάρων HepG2, COS-7, HeLa, HaCaT μετά την επιμόλυνση.

48 ώρες μετά την επιμόλυνση συλλέγουμε τα κύτταρα με τον παρακάτω τρόπο :

- Αφαίρεση θρεπτικού στον απαγωγό
- Προσθήκη 1ml διαλύματος PBS
- Αφαίρεση PBS στον απαγωγό
- Προσθήκη 300μl ειδικού διαλύματος λύσης για λουσιφεράση
- Ξύσιμο πιάτων και μεταφορά του διαλύματος σε μικροσωλήνες του 1,5ml
- Τοποθέτηση για 10 λεπτά στους -80°C
- Επώαση για 2 λεπτά στους 37°C
- Έντονη ανάδευση

- Φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 5 λεπτά
- Μεταφορά του υπερκλειμένου σε καθαρό μικροσωλήνα

Συλλογή κυττάρων Schneider's μετά την επιμόλυνση.

48 ώρες μετά την επιμόλυνση συλλέγουμε τα κύτταρα με τον παρακάτω τρόπο :

- Αφαίρεση θρεπτικού από πιάτα με τη χρήση μικροπιπέτας
- Φυγοκέντρηση στις 5000 στροφές για 5 λεπτά
- Αφαίρεση υπερκλειμένου στον απαγωγό
- Προσθήκη 500μl διαλύματος PBS
- Έντονη ανάδευση
- Φυγοκέντρηση στις 5000 στροφές για 5 λεπτά
- Αφαίρεση υπερκλειμένου στον απαγωγό
- Προσθήκη 150μl ειδικού διαλύματος λύσης για λουσιφεράση
- Τοποθέτηση για 10 λεπτά στους -80°C
- Επώαση για 2 λεπτά στους 37°C
- Έντονη ανάδευση
- Φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 5 λεπτά
- Μεταφορά του υπερκλειμένου σε καθαρό μικροσωλήνα

Μέτρηση της απόδοσης της επιμόλυνσης με τη μέθοδο της β-γαλακτοσιδάσης.

Συνθέτουμε την αντίδραση :

0,1 M P-buffer	456 μl
ONPG	132 μl
100x salt	6 μl
κυτ. Εκχύλισμα	6 μl

Επώαση της αντίδρασης στους 37°C μέχρι τα δείγματα να κιτρινίσουν. Σταμάτημα της αντίδρασης με προσθήκη 200μl διαλύματος 1M Na_2CO_3 . Στη

συνέχεια μετράμε την οπτική απορρόφηση στα 410nm. Εξομαλύνουμε τα αποτελέσματα με βάση τη μεγαλύτερη τιμή οπτικής πυκνότητας.

Σύνθεση διαλυμάτων για την αντίδραση της β-γαλακτοσιδάσης.

Sodium Phosphate buffer (Na_2HPO_4) 0,1M pH 7,3 (ρύθμιση του pH στο 7,3 προσθέτοντας 0,1m NaH_2PO_4)

100x salt

3M KCl	333 μl
1M MgCl_2	100 μl
b-mercapto.	352 μl
H_2O	215 μl

ONPG 8mg/ml σε 0,1M P buffer.

Μέτρηση της δράσης της λουσιφεράσης σε ειδικό ανιχνευτή.

Μετά το τέλος της β-γαλακτοσιδάσης, τις εξομαλυμένες τιμές τις χρησιμοποιούμε ως ποσότητες που θα προσθέσουμε από το κάθε δείγμα στη μέτρηση της λουσιφεράσης. Τις ποσότητες αυτές τις προσθέτουμε σε 100 μl υποστρώματος λουσιφεράσης και αφού αναδεύσουμε, μετράμε τις μονάδες φωτός που απελευθερώνει η αντίδραση της λουσιφεράσης στο λουμινόμετρο.

Δημιουργία μόνιμων κυτταρικών σειρών HepG2

Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν με 7,5μg φορέα έκφρασης του γονιδίου neo και 7,5μg με πλασμίδιο που περιέχει τον υποκινητή (-2325/+8)p21-luc ή τον (-2325/+8 Δ -122/-60)p21-luc. Την επόμενη μέρα τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε πιάτα p-100 σε αραιώσεις 1:5, 1:10 και 1:20. Η επιλογή των κλώνων που ενσωμάτωσαν τα πλασμίδια έγινε αρχικά με το φάρμακο Geneticin (G418). Οι κλώνοι που επιβίωσαν παρουσία του φαρμάκου ελέγχθηκαν για την έκφραση των υποκινητών που ελέγχουν την έκφραση της λουσιφεράσης.

Συλλογή εκχυλίσματος εμπλουτισμένου με Sp1.

48 ώρες μετά την επιμόλυνση τα κύτταρα συλλέγονται και επαναδιαλύονται σε 400μl διαλύματος 20mM Tris-HCl, pH 7 / 0,4M KCl / 2mMDTT / 10% glycerol. Στη συνέχεια τα κύτταρα έσπασαν με 3 διαδοχικά παγώματα-ξεπαγώματα και το εκχύλισμα απομονώθηκε μετά από φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 5 λεπτά στους 0°C.

Μέθοδος ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP)

Ετοιμάσα 4 p-100 πιάτα με 5×10^6 κύτ./πιάτο. 48 ώρες αργότερα πρόσθεσα στο ένα πιάτο 50μg/ml 5-FU, στο άλλο 200ng/ml Mithramycin, στο τρίτο και τα δύο φάρμακα ταυτόχρονα, ενώ στο τελευταίο τα κύτταρα μεγάλωσαν χωρίς την επίδραση φαρμάκου. 24 ώρες αργότερα ξεκίνησε η διαδικασία ως εξής :

- Απομάκρυνση θρεπτικού
- Ξέπλυμα με 7ml θρεπτικό για HepG2
- Προσθήκη 9ml θρεπτικό
- Προσθήκη 1ml formaldehyde (10%) σταγόνα-σταγόνα (γρήγορα) και ανακάτεμα
- 10 min σε RT
- Προσθήκη 1ml Glycine (1,375M) σταγόνα-σταγόνα (γρήγορα) και ανακάτεμα
- Αφαίρεση υπερκειμένου

- 3 πλυσίματα με 10 ml 1xPBS/0,5mM PMSF το καθένα
- Προσθήκη 7 ml 1xPBS/0,5% NP-40/0,5mM PMSF και ξύσιμο των κυττάρων με scraper.
- Φυγοκέντρηση στις 1000 στροφές για 5min στους 4°C
- Επαναδιάλυση πελέττας σε 5ml Swelling buffer
- Στον πάγο για 10 λεπτά
- Σπάσιμο των κυττάρων με το μηχάνημα “Dounce”. 20 φορές για κάθε δείγμα
- Προσθήκη 5μl από το κάθε δείγμα σε 5μl Trypan Blue και έλεγχος σε μικροσκόπιο, αν έσπασαν τα κύτταρα και ελευθερώθηκαν οι πυρήνες
- Φυγοκέντρηση στις 2000 στροφές για 5 λεπτά στους 4°C
- Επαναδιάλυση πελέττας σε 2ml Sonication buffer
- 11 sonications των 30sec για κάθε δείγμα με 5 λεπτά στον πάγο ανάμεσα σε κάθε sonication
- Φυγοκέντρηση στις 14000 στροφές για 15 λεπτά στους 4°C
- Μεταφορά υπερκειμένου σε καθαρά tubes
- Επαναλαμβάνω μια φορά τα δύο προηγούμενα στάδια
- Μεταφορά 40μl από το κάθε δείγμα σε καθαρό tube. Αποθήκευση του υπόλοιπου στους -80°C.
- Προσθήκη 160μl H₂O και 10,5μl NaCl 4M
- 65°C o/n
- Καθάρισμα με φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική 25:24:1
- Καθάρισμα με χλωροφόρμιο:ισοαμυλική 24:1
- Κατακρήμνιση με αιθανόλη
- Επαναδιάλυση σε 20μl H₂O
- Έλεγχος σε πηκτή 1,5%

Αν η χρωματίνη έχει σπάσει σε κομμάτια μικρότερα των 1000 βάσεων, συνεχίζουμε με τα δείγματά μας.

Ετοιμασία των beads

Για το κάθε δείγμα αρχικά χρησιμοποιώ 250μl καθαρά protein G beads (50μl για το +p53, 50μl για το +Sp1, 50μl για το -ab και 100μl για το preclearing).

- Προσθήκη 1,5ml sonication buffer+inhibitors
- Περιστροφή για 10 λεπτά στους 4°C
- Φυγοκέντρηση στις 6000 στροφές για 3 λεπτά στους 4°C
- Αφαίρεση υπερκειμένου
- Επαναλαμβάνω 2 φορές τα 4 παραπάνω στάδια
- Προσθήκη 494μl dialysis buffer (+inhibitors) + 5μl BSA (100mg/ml) + 1μl λDNA (0,5μg/μl)
- Περιστροφή για 2 ώρες στους 4°C
- Μεταφορά από 150μl beads σε 3 καθαρά tubes και αποθήκευση στους 4°C
- Φυγοκέντρηση των υπόλοιπων beads (για preclearing) στις 6000 στροφές για 3 λεπτά στους 4°C
- Αφαίρεση υπερκειμένου
- Ξεπάγωμα των δειγμάτων από τους -80°C
- Φωτομέτρηση κάθε δείγματος στα 260nm και 280nm
- Διάρθρωση της κάθε OD₂₆₀ με τη μικρότερη OD₂₆₀ (λόγος)
- Προσθήκη στα preclearing beads 1500μl από το δείγμα με τη μικρότερη OD₂₆₀ και 1500/λόγος μl για τα υπόλοιπα. Προσθήκη sonication buffer μέχρι τα 1500μl
- Προσθήκη 15μl BSA (100mg/ml) και 3μl λ DNA (0,5μg/μl)
- Περιστροφή για 2 ώρες στους 4°C
- Φυγοκέντρηση στις 6000 στροφές για 3 λεπτά στους 4°C
- Μεταφορά υπερκειμένου σε νέα tubes
- Μέτρηση του όγκου του κάθε δείγματος
- Το κάθε δείγμα μοιράζεται εξίσου σε 3 νέα tubes, ενώ σε τρίτο tube αποθηκεύεται στους -20°C το 1/10 του όγκου που μεταφέρθηκε σε κάθε tube (input)
- Στο πρώτο tube προστίθενται 5μl α-p53 (+p53), στο δεύτερο 5μl α-Sp1 (+Sp1), ενώ στο τρίτο τίποτα (-ab)

- Περιστροφή για 2 ώρες στους 4°C
- Φυγοκέντρηση των beads από τους 4°C
- Αφαίρεση υπερκειμένου
- Προσθήκη των δειγμάτων (+ab, -ab) στα καθαρά beads
- Περιστροφή στους 4°C o/n
- 2 πλυσίματα με το Wash buffer A. Το κάθε πλύσιμο περιλαμβάνει 10 λεπτά περιστροφή στους 4°C και φυγοκέντρηση στις 6000 στροφές για 3 λεπτά στους 4°C
- 2 πλυσίματα με το Wash buffer B
- 2 πλυσίματα με το Wash buffer C
- 2 πλυσίματα με το TE buffer
- Προσθήκη 150μl Elution buffer
- Vortex
- Επώαση στους 65°C για 10 λεπτά
- Vortex
- Φυγοκέντρηση στις 14000 στροφές για 1 λεπτό
- Μεταφορά υπερκειμένου (150μl) σε καθαρό tube
- Προσθήκη 150μl Elution buffer
- Vortex
- Επώαση στους 65°C για 10 λεπτά
- Vortex
- Φυγοκέντρηση στις 14000 στροφές για 1 λεπτό
- Μεταφορά υπερκειμένου στο tube του προηγούμενου υπερκειμένου (300μl τελικά)
- Προσθήκη 100μl H₂O και 21μl NaCl 4M
- Για τα inputs προσθήκη μέχρι τα 300μl Elution buffer, 100μl H₂O και 21μl NaCl 4M
- Ανάδευση, flash spin και επώαση στους 65°C για 5 ώρες
- Προσθήκη 1μl RNase A (10mg/ml, DNase-free)
- Επώαση στους 37°C για ώρα
- Προσθήκη 2μl EDTA (0,5M) και 2μl Proteinase K (10mg/ml)
- Επώαση στους 42°C για 2 ώρες

- Προσθήκη 200μl H₂O
- Προσθήκη 1/10 του όγκου CH₃COONa 3M
- Καθάρισμα με φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική 25:24:1
- Καθάρισμα με χλωροφόρμιο:ισοαμυλική 24:1
- Προσθήκη 1μl glycogen (20 mg/ml)
- Κατακρήμνιση με αιθανόλη ο/n
- Επαναδιάλυση των inputs σε 100μl 10mM Tris (pH 7,5) και των δειγμάτων σε 50μl 10mM Tris (pH 7,5)

Swelling buffer

25mM Hepes pH 7,9
 1,5mM MgCl₂
 10mM KCl
 0,5% NP-40

1mM DTT
 0,5mM PMSF
 2μg/ml aprotinin

Sonication buffer

50mM Hepes pH 7,9
 140mM NaCl
 1mM EDTA
 1% Triton X-100
 0,1% Na-deoxycholate
 0,1% SDS

0,5mM PMSF
 10μg/ml aprotinin

Wash buffer A

50 mM Hepes pH 7,9
 140 mM NaCl
 1mM EDTA
 1% Triton X-100
 0,1% Na-deoxycholate
 0,1% SDS

0,5 mM PMSF
 2μg/ml aprotinin

Wash buffer B

Same as Wash buffer A but contains 500mM NaCl

Wash buffer C

20 mM Tris pH 8
1 mM EDTA
250 mM LiCl
0,5% NP-40
0,5% Na-deoxycholate

0,5mM PMSF
2μg/ml aprotinin

TE

+ inhibitors

Elution buffer (prepare freshly)

50mM Tris pH 8
1mM EDTA
1% SDS
50mM NaHCO₃

no inhibitors

PCR για CHIP

Αντίδραση PCR

Σε PCR tube αρχικά βάζω 8μl H₂O και 2μl από το δείγμα μου.

Στη συνέχεια ετοιμάζω την υπόλοιπη αντίδραση :

10μM sense primer	2μl
10μM antisense primer	2μl
10mM dNTPs	1μl
25mM MgCl ₂	3μl
10x Taq buffer	5μl
Taq polymerase	0,5μl
H ₂ O	26,5μl

Πρόγραμμα PCR

94°C για 3 λεπτά
94°C για 30sec
Annealing για 30sec
72°C για 2 λεπτά
72°C για 5 λεπτά



35 κύκλοι

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των διαφόρων περιοχών του ρ21 υποκινητή στο συγκεκριμένο πείραμα φαίνονται στον πίνακα 6.

Πίνακας 6 : ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση περιοχών του p21 υποκινητή στο πείραμα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης		
Όνομα ολιγονουκλεοτιδίου	ακολουθία	σκοπός
p21 prox sense	5'-TGTGTCCTCCTGGAGAGTGC-3'	Ενίσχυση της περιοχής (-343/-159) του p21 υποκινητή, που περιέχει τις θέσεις πρόσδεσης του Sp1
p21 prox antisense	5'-AGCTTGCTGAGCCTGGCCGAGTTGCAGCA-3'	
p21 MID sense	5'-GAGGTCAGCTGCGTTAGAGG-3'	Ενίσχυση της περιοχής (-1416/-1263) του p21 υποκινητή, που περιέχει την κοντινή θέση πρόσδεσης της p53
p21 MID antisense	5'-TGCAGAGGATGGATTGTTCA-3'	
p21 UP sense	5'-CCTATGCTGCCTGCTTCCCAGGAA-3'	Ενίσχυση της περιοχής (-2355/-2235) του p21 υποκινητή, που περιέχει την απομακρυσμένη θέση πρόσδεσης της p53
p21 UP antisense	5'-TAGCCACCAGCCTCTTCTATGCCAG-3'	
p21 CONTROL sense	5'-GATGAGGTTCCCTATCTATGGAAAG-3'	Ενίσχυση της περιοχής (-3555/-3415) του p21 υποκινητή, που βρίσκεται ~1000 βάσεις πριν την απομακρυσμένη θέση πρόσδεσης της p53
p21 CONTROL antisense	5'-CAACTGTCCAATTTAAGACAGAGTG-3'	

Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών

Αρχικά υπολογίζω τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών, ώστε να φορτώσω ίδιες ποσότητες από το κάθε δείγμα. Αυτό γίνεται με τα αντιδραστήρια της Bio-Rad σύμφωνα με το εγχειρίδιο της εταιρείας. Ετοιμάζω μια αντίδραση που περιέχει 190μl H₂O, 10μl δείγμα και 100μl reagent A' (reagent A' = 1ml reagent A + 20μl S). Προσθέτω 800μl reagent B και επωάζω για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Για κάθε δείγμα ετοιμάζω τουλάχιστο 2 αντιδράσεις. Φωτομέτρηση στα 750nm. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης υπολογίζεται από τη σχέση : $y = a + bx$, όπου $y = OD$ και $x = \mu g$ πρωτεΐνης. Τα a και b υπολογίζονται από την πρότυπη καμπύλη η οποία δημιουργείται από τη φωτομέτρηση γνωστών συγκεντρώσεων BSA.

Αφού προσδιορίσουμε τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών του κάθε δείγματος, υπολογίζουμε τους όγκους που πρέπει να χρησιμοποιήσουμε για να έχουμε ίδιες ποσότητες. Αραιώνουμε σε ίσο όγκο 2x sample buffer και βράζουμε για 5 λεπτά. Στη συνέχεια φορτώνουμε τα δείγματα σε πηκτή πολυακρυλαμίδης, η οποία αποτελείται από δύο τμήματα. Το κατώτερο μέρος ονομάζεται Running gel και το ανώτερο ονομάζεται Stacking gel. Η σύσταση των δύο gels ανάλογα με την πυκνότητα της πολυακρυλαμίδης φαίνεται στον πίνακα 7 :

Running gel			Stacking gel	
πυκνότητα	8,5%	12,5%		
H₂O	4,6ml	3,2ml	H₂O	3,6ml
30% acrylamide	2,8ml	4,2ml	30% acrylamide	0,9ml
Separating buffer	2,5ml	2,5ml	Stacking buffer	1,5
10% APS	160μl	160μl	10% APS	60μl
Temed	8μl	8μl	Temed	6μl

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, μεταφέρουμε τις πρωτεΐνες σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

Στη συνέχεια ακολουθούμε το παρακάτω πρωτόκολλο :

- Πλύσιμο της μεμβράνης με H₂O
- Ανάδευση της μεμβράνης σε TBS-T (1x TBS + 0,05% Tween 20) για 10 λεπτά
- Ανάδευση της μεμβράνης σε TBS-T + 5% w/v γάλα για 1 ώρα
- Προσθήκη 1^{ου} αντισώματος
- Ανάδευση στους 4°C όλη τη νύχτα
- 3 πλυσίματα της μεμβράνης σε TBS-T με ανάδευση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Προσθήκη 2^{ου} αντισώματος
- Ανάδευση της μεμβράνης για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου
- 3 πλυσίματα της μεμβράνης σε TBS-T με ανάδευση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 1 πλύσιμο της μεμβράνης σε TBS με ανάδευση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- αποκάλυψη πρωτεϊνών με τη μέθοδο του ECL

Απομόνωση GST-πρωτεϊνών από E.coli

- Μετασχηματισμός DH5a ή BL21 E.coli με το πλασμίδιο έκφρασης
- Μεταφορά αποικίας σε 20 ml θρεπτικό LB+Amp
- Επώαση στους 37°C ο/ν
- Μεταφορά της καλλιέργειας σε 200 ml θρεπτικό LB+Amp
- Επώαση στους 37°C, εωσότου η οπτική απορρόφηση OD₆₀₀=0,6-0,8
- Προσθήκη IPTG και επώαση στους 37°C για ~4 ώρες
- Φυγοκέντρηση στις 3500 στροφές για 30 λεπτά στους 4°C
- Επαναδιάλυση πελέτας σε 10 ml κρύο 1xPBS
- Διαχωρισμός σε 3 falcons των 15ml
- 6 sonications των 30sec με 30 sec κενό ενδιάμεσα για κάθε δείγμα
- Προσθήκη Triton X-1000 (τελ. συγκέντρωση 1%)
- Περιστροφή για 30 λεπτά στους 4°C
- Διαχωρισμός σε μικροσωλήνες 1,5ml
- Φυγοκέντρηση στις 10000 στροφές για 10 λεπτά στους 4°C
- Αποθήκευση υπερκειμένου (1°)

- Επαναδιάλυση πελεπτών σε 400μl “Solubilization buffer”
- Περιστροφή για 10 λεπτά στους 4°C
- Προσθήκη Triton X-1000 και CaCl₂ (τελικές συγκεντρώσεις 2% και 1mM αντίστοιχα)
- Φυγοκέντρηση στις 10000 στροφές για 10 λεπτά στους 4°C
- Αποθήκευση υπερκειμένου (2°)
- Έλεγχος σε gel, ώστε να προσδιορισθεί σε ποιο υπερκείμενο εντοπίζεται η πρωτεΐνη
- Προσθήκη glutathione sepharose beads τα οποία είχαν εξισορροπηθεί σε 1xPBS
- Περιστροφή o/n στους 4°C
- Φυγοκέντρηση στις 2000 στροφές για 5 λεπτά στους 4°C
- Αφαίρεση υπερκειμένου
- Προσθήκη κρύου 1xPBS/1% Triton (10 φορές τον όγκο των beads)
- Περιστροφή για 5 λεπτά στους 4°C
- Φυγοκέντρηση στις 2000 στροφές για 5 λεπτά στους 4°C
- Επανάληψη των 4 παραπάνω σταδίων 2 φορές
- Προσθήκη κρύου 1xPBS και μεταφορά των beads σε καθαρό μικροσωλήνα 1,5ml
- Flash spin
- Αφαίρεση υπερκειμένου
- Προσθήκη ίσου όγκου 1xPBS
- Ανάλυση σε gel

Solubilization buffer

25mM triethenolamine (7,51M)

1,5% (w/v) Sarcosyl

1mM EDTA

Εξισορρόπηση beads

- Προσθήκη των beads σε falcon 15ml
- Φυγοκέντρηση στις 3500 στροφές για 5 λεπτά

- Αφαίρεση υπερκλειμένου
- Προσθήκη 10 όγκων 1xPBS
- Ανάδευση
- Φυγοκέντρηση στις 3500 στροφές για 5 λεπτά
- Αφαίρεση υπερκλειμένου
- Προσθήκη ίσου όγκου 1xPBS

GST-pull down assay

- Προσθήκη των απαιτούμενων beads σε μικροσωλήνα 1,5ml
- Flash spin
- Αφαίρεση υπερκλειμένου
- Προσθήκη 1ml κρύου 2x Interaction buffer
- Ανάδευση
- Flash spin
- Αφαίρεση υπερκλειμένου
- Προσθήκη 200μl 2x Interaction buffer
- Προσθήκη της απαιτούμενης ποσότητας κυτταρικού εκχυλίσματος ή πρωτεΐνης που παράχθηκε με *in vitro* transcription/translation
- Προσθήκη H₂O μέχρι τα 400μl
- Περιστροφή o/n στους 4°C
- Flash spin
- Αφαίρεση υπερκλειμένου
- Προσθήκη 1ml washing buffer 100mM KCl
- Περιστροφή για 10 λεπτά στους 4°C
- Flash spin
- Αφαίρεση υπερκλειμένου
- Προσθήκη 1ml washing buffer 250mM KCl
- Περιστροφή για 10 λεπτά στους 4°C
- Αφαίρεση υπερκλειμένου
- Προσθήκη 2x protein loading buffer

Σημείωση : για πρωτεΐνη που παράχθηκε με *in vitro* transcription/translation κάνουμε 3 πλυσίματα με washing buffer 250mM KCl, όπως παραπάνω

2x Interaction buffer

40mM Hepes pH 7,9

10mM MgCl₂

0,4% NP₄₀

0,4% BSA

15% Glycerol

PMSF

Benzamidine

Aprotinin

Washing buffer

100mM KCl (250mM KCl)

20mM Hepes pH 7,9

5mM MgCl₂

0,2% NP₄₀

PMSF

Benzamidine

Aprotinin

Παραγωγή πρωτεϊνών *in vitro*

Για τη διαδικασία αυτή έγιναν διαδοχικά αντιδράσεις *in vitro* transcription και *in vitro* translation.

in vitro transcription

4μl transcription buffer

2μl DTT

0,5μl RNasin

4μl NTP mix (2,5mM)

1μl DNA (0,5μg/μl)

1μl T7 DNA polymerase

7,5μl H₂O

Επώαση στους 37°C για 1 ώρα

in vitro translation

60μl Rabbit Reticulocyte Lysate

3μl Amino Acide Mixture, Minus Methionine

3μl [³⁵S]Methionine

20μl RNA substrate

Επώαση στους 30°C για 1,5 ώρα

Απομόνωση πρωτεϊνών σημασμένων με επίτοπο Tag

- Μετασχηματισμός BL21 E.coli με το πλασμίδιο έκφρασης
- Μεταφορά αποικίας σε 5 ml θρεπτικό LB+Amp
- Επώαση στους 37°C ο/η
- Μεταφορά της καλλιέργειας σε 200 ml θρεπτικό LB+Amp
- Επώαση στους 37°C, εωσότου η οπτική απορρόφηση $OD_{600}=0,6-0,8$
- Προσθήκη IPTG 1mM και επώαση στους 37°C για ~3 ώρες
- Φυγοκέντρηση στις 3500 στροφές για 30 λεπτά στους 4°C
- Επαναδιάλυση πελέττας σε 12ml Buffer A (+inhibitors)
- Προσθήκη λυσοζύμης σε τελική συγκέντρωση 1mg/ml
- Μεταφορά σε πάγο για 30 λεπτά
- 6 sonications των 20sec με 20sec κενό ενδιάμεσα
- Πέρασμα του διαλύματος από σύριγγα ινσουλίνης
- Φυγοκέντρηση στις 14000 στροφές για 30 λεπτά στους 4 °C
- Αποθήκευση υπερκειμένου (1^ο)
- Επαναδιάλυση πελεττών σε 400μl “Solubilization buffer” (βλέπε GST)
- Περιστροφή για 10 λεπτά στους 4°C
- Προσθήκη Triton X-1000 και CaCl₂ (τελικές συγκεντρώσεις 2% και 1mM αντίστοιχα)
- Φυγοκέντρηση στις 10000 στροφές για 10 λεπτά στους 4°C
- Αποθήκευση υπερκειμένου (2^ο)
- Προσθήκη 600μl σφαιριδίων Ni-NTA εξισορροπημένων σε Buffer A
- Περιστροφή για 3 ώρες στους 4 °C
- Φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές για 5 λεπτά στους 4 °C
- Αφαίρεση υπερκειμένου
- Προσθήκη 1ml Buffer B(+inhibitors)
- Περιστροφή για 10 λεπτά στους 4 °C
- Φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές για 5 λεπτά στους 4 °C
- Αφαίρεση υπερκειμένου
- Προσθήκη 1ml Buffer B
- Περιστροφή για 5 λεπτά στους 4 °C
- Φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές για 5 λεπτά στους 4 °C

- Επανάληψη των 4 παραπάνω σταδίων 2 φορές
- Προσθήκη 600μl Elution Buffer(+inhibitors)
- Περιστροφή για 10 λεπτά στους 4 °C
- Φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 1 λεπτό σε RT
- Αποθήκευση υπερκειμένου (1^ο)
- Επανάληψη διαδικασίας elution
- Αποθήκευση υπερκειμένου (2^ο)
- Έλεγχος σε πηκτή ακρυλαμίδης 10,5%

Buffer A

50mM Hepes-KOH pH 7,9

0,15M NaCl

20% Glycerol

0,1% NP-40

5mM Imidazol

0,5% BSA

10μl β-mercaptoethanol/10ml buffer A

Buffer B

50mM Hepes-KOH pH 7,9

0,5M NaCl

10% Glycerol

0,1% NP-40

50mM Imidazol

Elution buffer

50mM Tris pH 8

0,5M NaCl

10% Glycerol

0,1% NP-40

150-300mM Imidazol

Απομόνωση RNA

Ετοίμασα 4 p-100 πιάτα με 5×10^6 κύτ./πιάτο. 48 ώρες αργότερα πρόσθεσα στο ένα πιάτο 50μg/ml 5-FU, στο άλλο 200ng/ml Mithramycin, στο τρίτο και τα δύο φάρμακα ταυτόχρονα, ενώ στο τελευταίο τα κύτταρα μεγάλωσαν χωρίς την επίδραση φαρμάκου. 24 ώρες αργότερα ξεκίνησε η διαδικασία ως εξής :

- Αφαίρεση θρεπτικού
- Προσθήκη 1ml Trypsin
- Επώαση για 5 λεπτά στους 37°C
- Προσθήκη 1ml θρεπτικού
- Μάζεμα κυττάρων με scraper
- Φυγοκέντρηση στις 5000 στροφές για 5 λεπτά
- Αφαίρεση υπερκειμένου
- Προσθήκη 1ml 1xPBS
- Ανάδευση
- Φυγοκέντρηση στις 5000 στροφές για 5 λεπτά
- Αφαίρεση υπερκειμένου
- Προσθήκη 500μl Trizol
- Vortex
- 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Προσθήκη 300μl CHCl_3
- Vortex
- 1-2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Φυγοκέντρηση στις 14000 στροφές για 15 λεπτά στους 4°C
- Μεταφορά υπερκειμένου σε καθαρό μικροσωλήνα 1,5ml
- Προσθήκη 500μl ισοπροπανόλη και 10 μg γλυκογόνο
- Ανάδευση και αποθήκευση στους -20°C o/n
- Φυγοκέντρηση στις 14000 στροφές για 15 λεπτά στους 4°C
- Αφαίρεση υπερκειμένου
- Προσθήκη 1ml αιθανόλη 70%
- Vortex
- Φυγοκέντρηση στις 14000 στροφές για 20 λεπτά στους 4°C

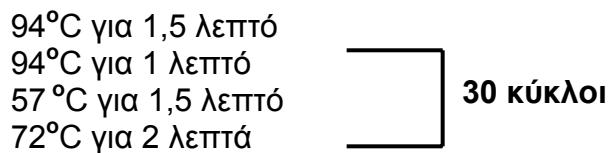
- Αφαίρεση υπερκλειμένου
- Στέγνωμα πελέττας
- Προσθήκη 25μl H₂O
- Φωτομέτρηση στα 260nm
- Υπολογισμός μg RNA με τη βοήθεια του τύπου :

$$\mu\text{g}/\mu\text{l RNA} = (\text{OD}_{260} \times 40 \times 200) / 1000$$

Αντίδραση ανάστροφης μεταγραφής

- 1μg RNA
- H₂O ως τα 30,5μl
- 3μl oligo-dT random examer primers 100ng/μl
- 10μl 5x Reverse Transcription buffer
- 5μl dNTP's mix 2mM
- Επώαση για 5 λεπτά στους 65°C
- Σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά
- 1μl M-MLV reverse transcriptase
- 0,5μl RNase inhibitor
- Flash spin
- Επώαση για 1-2 ώρες στους 37°C

Πρόγραμμα PCR ανάστροφης μεταγραφής



Οι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παραπάνω αντίδραση φαίνονται στον πίνακα 8 :

Πίνακας 8 : εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση PCR ανάστροφης μεταγραφής	
Όνομα εκκινητή	ακολουθία
p21 sense	5'-CTGCCCAAGCTCTACCTTCC-3'
p21 anti-sense	5'-CAGGTCCACATGGTCTTCCT-3'

Μέθοδος συνανοσοκατακρήμνισης πρωτεϊνών

- Πλύσιμο πιάτων με 1xPBS
- Προσθήκη 1ml lysis byffer και ήπια ανάδευση για 20 λεπτά στους 4°C
- Ξύσιμο κυττάρων και μεταφορά τους σε μικροσωλήνες στον πάγο
- Φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 5 λεπτά στους 4°C
- Μεταφορά υπερκειμένου σε καθαρά μικροσωλήνες
- Αποθήκευση 100μl ως control στην ανοσοανίχνευση
- Προσθήκη 50μl ανά δείγμα 50% καθαρών σφαιριδίων protein A, εξισορροπημένων σε PBS
- Περιστροφή για 30 λεπτά στους 4°C
- Σύντομη φυγοκέντρηση
- Μεταφορά υπερκειμένου σε καθαρούς μικροσωλήνες
- Προσθήκη αντισώματος στα δείγματα (30μl για Santa Cruz, 1μl για Sigma)
- Περιστροφή δειγμάτων για 2 ώρες στους 4°C
- Προσθήκη 50μl 50% καθαρών σφαιριδίων protein G, εξισορροπημένων σε PBS
- Περιστροφή για 30 λεπτά στους 4°C
- Προσθήκη ένα 1ml lysis buffer
- Περιστροφή για 10 λεπτά στους 4°C
- Σύντομη φυγοκέντρηση
- Αφαίρεση υπερκειμένου
- Επανάληψη των 4 παραπάνω σταδίων για 2 φορές ακόμη
- Προσθήκη 50μl 2x sample buffer
- Βράσιμο για 5-10 λεπτά
- Μεταφορά σε πηκτή πολυακρυλαμίδης
- Ανοσοανίχνευση με το δεύτερο αντίσωμα

Ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου CAT

- Ετοιμασία της εξής αντίδρασης :
66μl 250mM Tris
10μl Acetyl-CoA
4μl C₁₄-Chlor
20μl κυτταρικό εκχύλισμα
- Επώαση στους 37°C για 30 λεπτά
- Προσθήκη 200μl Ethyl Acetate
- Ισχυρή ανάδευση
- Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 14000 στροφές
- Μεταφορά υπερκλειμένου σε καθαρό μικροσωλήνα
- Στέγνωμα σε κενό για 15 λεπτά
- Προσθήκη 15μl Ethyl Acetate
- Ισχυρή ανάδευση
- Σύντομη φυγοκέντρηση
- Μεταφορά δειγμάτων σε TLC
- Μεταφορά του TLC σε διάλυμα Meth-Chlor
- Έκθεση σε φωτογραφικό φιλμ για όλη τη νύχτα

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

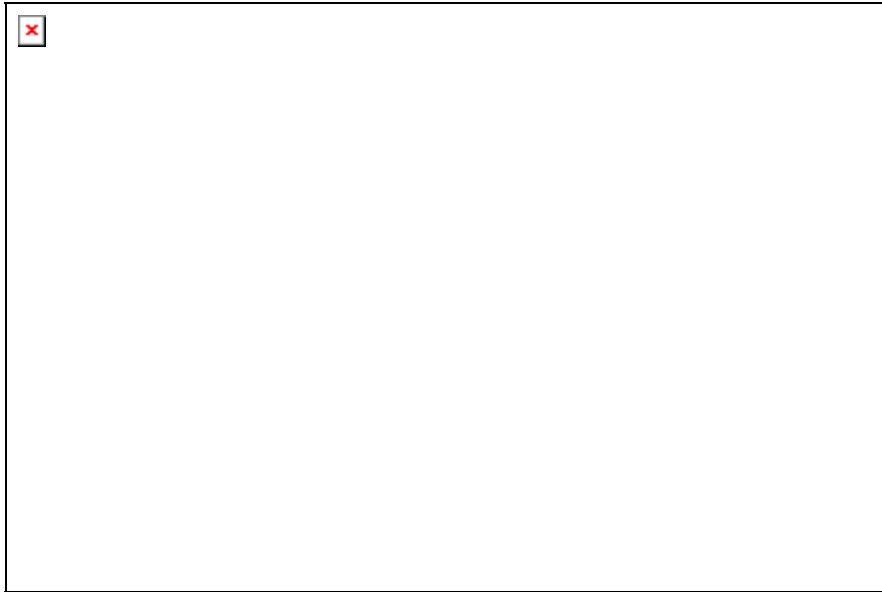
Λειτουργικός χαρακτηρισμός της κοντινής περιοχής του υποκινητή του γονιδίου p21 του ανθρώπου και ο ρόλος των παραγόντων Sp1 και Sp3.

Οι παράγοντες Sp1 και Sp3 προσδένονται στην κοντινή περιοχή του p21 υποκινητή με διαφορετική συνάφεια.

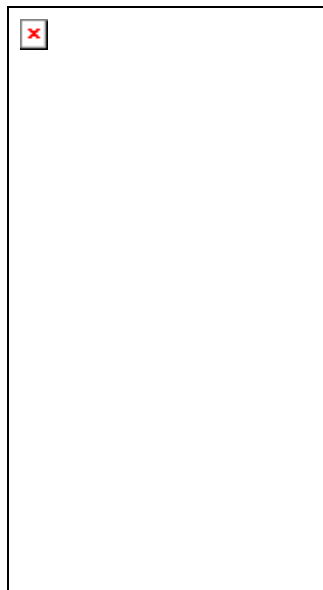
Η πρόσδεση των πυρηνικών ηπατικών παραγόντων στην κοντινή περιοχή του υποκινητή του γονιδίου p21(-130/-33) μελετήθηκε με ανάλυση ηλεκτροφορητικής κινητικότητας συμπλόκου. Για το σκοπό αυτό συντέθηκαν 6 ολιγονουκλεοτίδια που αλληλεπικαλύπτονται μερικώς και καλύπτουν την περιοχή -124/-45 του p21 υποκινητή (Εικόνα 20 και Πίνακας 5 (υλικά και μέθοδοι)). Η περιοχή -124/-45 περιέχει 6 πιθανές θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα Sp1 που ονομάστηκαν θέσεις 1-6. Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής : p21 (-123/-97) που περιλαμβάνει τις θέσεις 1 και 2, p21 (-124/-109) που περιλαμβάνει τη θέση 1, p21 (-115/-95) που περιλαμβάνει τη θέση 2, p21 (-86/-70) που περιλαμβάνει τη θέση 3, p21 (-76/-58) που περιλαμβάνει τη θέση 4 και p21 (-63/-45) που περιλαμβάνει τις αλληλεπικαλυπτόμενες θέσεις 5 και 6.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 21, η επώαση πυρηνικών εκχυλισμάτων ήπατος αρουραίου με το ολιγονουκλεοτίδιο p21(-86/-70) (θέση 3) οδήγησε στο σχηματισμό τριών συμπλόκων DNA-πρωτεΐνης. Η χρήση αντισωμάτων ειδικών έναντι των Sp1 και Sp3, αποκάλυψε ότι το σύμπλοκο DNA-πρωτεΐνης που μετακινείται με τη μικρότερη ταχύτητα αντιστοιχεί αποκλειστικά στον Sp1, ενώ τα δύο άλλα σύμπλοκα που μετακινούνται ταχύτερα αντιστοιχούν στον Sp3 αγρίου τύπου και πιθανά σε μια κομμένη μορφή ή ισομορφή εναλλακτικού ματίσματος του παράγοντα αυτού.

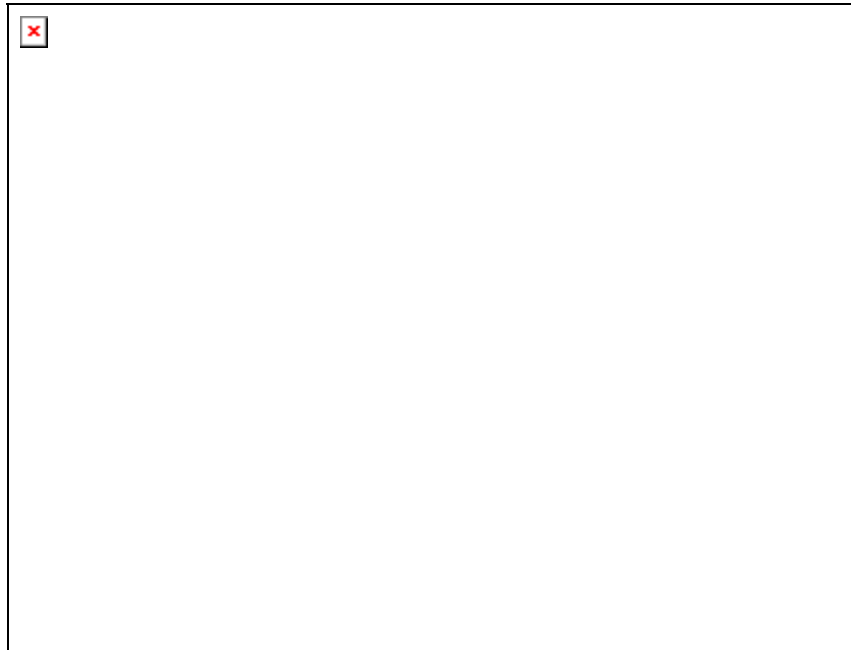
Προκειμένου να μελετήσουμε περαιτέρω την πρόσδεση των Sp1 και Sp3 στην περιοχή p21(-86/-70) χρησιμοποιήσαμε πρωτεΐνες που εκφράστηκαν στην κυτταρική σειρά SL2. Αυτή αποτελείται από κύτταρα εμβρύων Δροσόφιλας τα οποία δεν εκφράζουν ενδογενώς παράγοντες της οικογένειας Sp1 και γι' αυτό αποτελούν χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη μηχανισμών μεταγραφικής ενεργοποίησης που εξαρτώνται από τον παράγοντα Sp1. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 22A, τόσο ο παράγοντας Sp1



Εικόνα 20 : Νουκλεοτιδική ακολουθία της περιοχής -133/-33 του υποκινητή του γονιδίου p21 του ανθρώπου. Οι σημειακές μεταλλάξεις που εισαγάγαμε στις θέσεις πρόσδεσης του Sp1 φαίνονται με κόκκινο χρώμα και χαρακτηρίζονται ως Mut1-Mut5/6. Οι παχιές γραμμές αντιστοιχούν στα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση ηλεκτροφορητικής κινητικότητας συμπλόκου.



Εικόνα 21 : Οι Sp1/Sp3 που εκφράζονται ενδογενώς σε πυρηνικά εκχυλίσματα ήπατος αρουραίου προσδένονται στον p21 υποκινητή. Ανάλυση ηλεκτροφορητικής κινητικότητας συμπλόκου χρησιμοποιώντας το ολιγονουκλεοτίδιο p21(-86/-70) ως ανιχνευτή και πυρηνικό εκχύλισμα ήπατος αρουραίου (RLNE) απουσία και παρουσία αντισωμάτων ειδικών έναντι των Sp1 (anti-Sp1) και Sp3 (anti-Sp3). Τα βέλη δείχνουν τη θέση των συμπλόκων του DNA με τους Sp1 και Sp3.



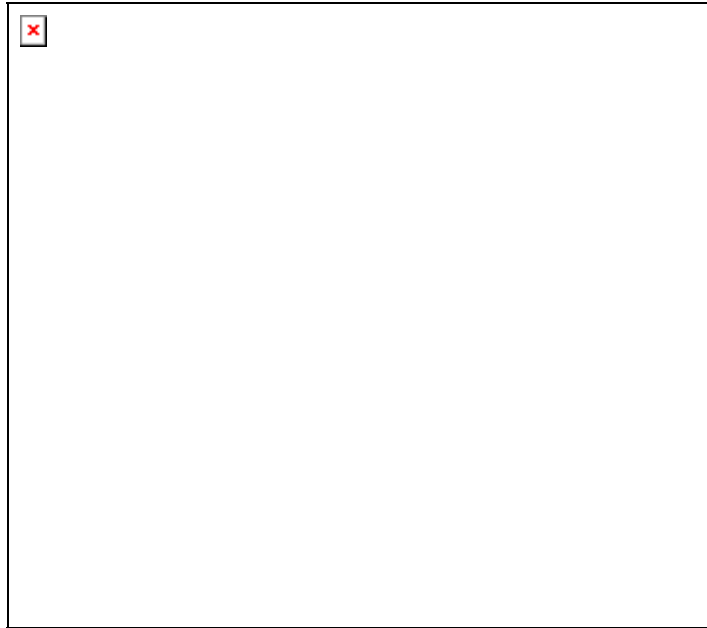
Εικόνα 22 : Οι Sp1/Sp3 που εκφράζονται σε ετερόλογο σύστημα κυτάρων SL2 προσδένονται στον p21 υποκινητή και τον ενεργοποιούν. Α) Ανάλυση ηλεκτροφορητικής κινητικότητας συμπλόκου χρησιμοποιώντας το ολιγονουκλεοτίδιο p21(-86/-70) ως ανιχνευτή και πρωτεΐνες Sp1, Sp2 και Sp3 εκφρασμένες σε κύτταρα SL2. Τα βέλη δείχνουν τη θέση των συμπλόκων DNA και πρωτεϊνών Sp1 και Sp3. Β) Κύτταρα SL2 επιμολύνθηκαν παροδικά με τον (-2325/+8)p21 υποκινητή και φορείς έκφρασης των Sp1, Sp2 και Sp3. Ο βαθμός ενεργοποίησης του p21 υποκινητή φαίνεται στο πάνω μέρος της κάθε ράβδου.

όσο και ο Sp3 αλλά όχι ο Sp2, οι οποίοι εκφράζονται σε ετερόλογο σύστημα κυττάρων SL2, προσδένονται ισχυρά στον ανιχνευτή p21(-86/-70). Επίσης, με παροδικές επιμολύνσεις κυττάρων SL2 με τον (-2325/+8)p21 υποκινητή και φορείς έκφρασης των Sp1, Sp2 και Sp3 παρατηρήσαμε ότι τόσο ο παράγοντας Sp1 όσο και ο Sp3 ενεργοποιούν σημαντικά τον p21 υποκινητή, ενώ ο Sp2 δεν είναι σε θέση να ενεργοποιήσει το συγκεκριμένο υποκινητή (εικόνα 22B). Αυτό, προφανώς οφείλεται στην αδυναμία του παράγοντα Sp2 να προσδεθεί στον p21 υποκινητή.

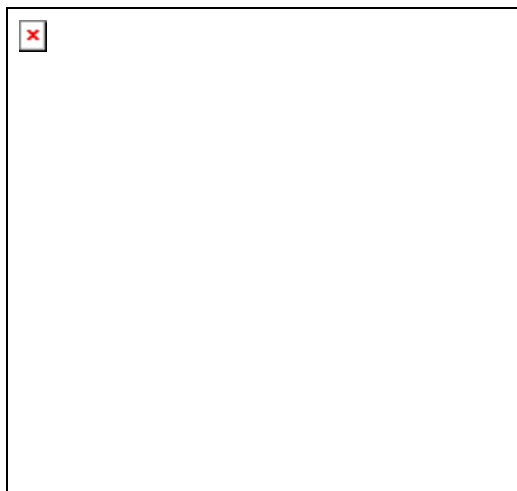
Σε πειράματα ελέγχου, το αντίσωμα anti-Sp1 εντόπισε αποκλειστικά το σύμπλοκο που σχηματίστηκε από τον Sp1 που εκφράστηκε σε κύτταρα SL2 και την περιοχή p21(-86/-70), ενώ δεν μπόρεσε να εντοπίσει το σύμπλοκο που σχηματίστηκε από τον Sp3. Το αντίστροφο πείραμα, δηλαδή η χρήση του anti-Sp3 με τις πρωτεΐνες Sp1 και Sp3 που εκφράστηκαν σε κύτταρα SL2, επιβεβαίωσε την ειδικότητα του αντισώματος έναντι του παράγοντα Sp3 (Εικόνα 23).

Η ανάλυση ανοσοεντοπισμού φανέρωσε παρόμοια επίπεδα έκφρασης των Sp1, Sp2 και Sp3 πρωτεϊνών σε κύτταρα SL2 (Εικόνα 24).

Στη συνέχεια θελήσαμε να χαρακτηρίσουμε με μεγαλύτερη λεπτομέρεια τις ιδιότητες πρόσδεσης των πρωτεϊνών Sp1 και Sp3 στα GC μοτίβα που εντοπίζονται στην κοντινή περιοχή του p21 υποκινητή (θέσεις 1-6). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 25, η επώαση των ολιγονουκλεοτιδίων p21(-63/-45), p21(-76/-58) και p21(-124/-109) με πυρηνικό εκχύλισμα ήπατος αρουραίου, οδήγησε στο σχηματισμό παρόμοιων συμπλόκων DNA-πρωτεΐνης με αυτά που σχηματίστηκαν με την περιοχή p21(-86/-70) (Εικόνα 25, σύγκριση διαδρομών 1, 3 και 9 με τη διαδρομή 5). Η μόνη διαφορά είναι η εμφάνιση μιας επιπλέον ζώνης που μετακινείται γρηγορότερα από τα σύμπλοκα DNA-Sp1/Sp3 (Εικόνα 25, διαδρομή 1). Η ζώνη αυτή πρέπει να οφείλεται στην εκτέλεση του συγκεκριμένου πειράματος, καθώς δεν εμφανίσθηκε σε άλλα πειράματα. Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι ότι η πρόσδεση των Sp1 και Sp3 ήταν πολύ ασθενική στην περιοχή p21(-115/-95) (θέση 2), γεγονός που δείχνει ότι οι δύο αυτοί παράγοντες εμφανίζουν πολύ χαμηλή συνάφεια για την περιοχή αυτή, τουλάχιστον στις *in vitro* συνθήκες που πραγματοποιήθηκε το πείραμα.



Εικόνα 23 : Ειδικότητα των αντισωμάτων anti-Sp1 και anti-Sp3 για τις αντίστοιχες πρωτεΐνες. Ανάλυση ηλεκτροφορητικής κινητικότητας συμπλόκου χρησιμοποιώντας το ολιγονουκλεοτίδιο p21(-86/-70) ως ανιχνευτή και εκχυλίσματα κυττάρων SL2 πλούσιων σε Sp1 και Sp3, απουσία και παρουσία αντισωμάτων ειδικών έναντι των Sp1 (anti-Sp1) και Sp3 (anti-Sp3). Τα βέλη δείχνουν τη θέση των συμπλόκων του DNA με τους Sp1 και Sp3, καθώς και τη θέση των τριμερών συμπλόκων που σχηματίζονται από το DNA, τους παράγοντες Sp1/Sp3 και τα αντίστοιχα αντισώματα αυτών (supershifts).



Εικόνα 24 : Πρότυπα έκφρασης των Sp1, Sp2 και Sp3 σε κύτταρα SL2. Τα κύτταρα SL2 επιμολύνθηκαν παροδικά με 17μg των φορέων pPacSp1, pPacSp2 και pPacSp3. Περίπου 40 ώρες μετά την επιμόλυνση τα κύτταρα λύθηκαν και η έκφραση των Sp1, Sp2 και Sp3 ανιχνεύθηκε με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιώντας αντισώματα ειδικά για τις πρωτεΐνες αυτές, όπως φαίνεται στο κάτω μέρος της Εικόνας. Οι θέσεις των πρωτεϊνών σημειώνονται με βέλη. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών σημειώνονται στο αριστερό μέρος της Εικόνας.



Εικόνα 25 : Δυνατότητα πρόσδεσης των Sp1/Sp3 στις διάφορες θέσεις της κοντινής περιοχής του p21 υποκινητή. Τα σημασμένα αγρίου τύπου ή μεταλλαγμένα ολιγονουκλεοτίδια που φαίνονται στο πάνω μέρος της Εικόνας επωάσθησαν με πυρηνικά εκχυλίσματα ήπατος αρουραίου (RLNE). Ο ελεύθερος από τον προσδεμένο ανιχνευτή ξεχώρισαν με μη αποδιατακτική πηκτική πολυακρυλαμίδης και εμφανίσθηκαν με αυτοραδιογραφία. Τα βέλη δηλώνουν τη θέση των συμπλόκων DNA-Sp1/Sp3. Ο αστερίσκος στη διαδρομή 1 σημειώνει μια ζώνη που δεν εμφανίσθηκε σε επόμενα πειράματα.

Προκειμένου να χαρακτηρίσουμε περαιτέρω την πρόσδεση των παραγόντων Sp1 και Sp3 στις θέσεις 1 και 2, συνθέσαμε ένα επιπλέον ολιγονουκλεοτίδιο που περιλαμβάνει και τις δύο αυτές θέσεις, το p21(-123/-97). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 25, η επώαση του ολιγονουκλεοτιδίου αυτού με πυρηνικά εκχυλίσματα ήπατος αρουραίου οδήγησε στο σχηματισμό συμπλόκων όμοιας ηλεκτροφορητικής κινητικότητας με αυτήν που εμφάνισαν τα ολιγονουκλεοτίδια που περιείχαν μόνο τη θέση πρόσδεσης 1 (διαδρομές 11 και 9). Το εύρημα αυτό επιβεβαίωσε τη χαμηλή συνάφεια των παραγόντων Sp1 και Sp3 για τη θέση 2.

Στη συνέχεια εισαγάγαμε σημειακές μεταλλάξεις στα p21 ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση ηλεκτροφορητικής κινητικότητας συμπλόκου της Εικόνας 25. Όλες οι μεταλλάξεις στόχευαν τις θέσεις πρόσδεσης των Sp1 και Sp3, όπως φαίνεται στην Εικόνα 20. Οι μεταλλάξεις χαρακτηρίστηκαν ως Mut1 (θέση 1), Mut2 (θέση 2), Mut3 (θέση 3), Mut4 (θέση 4) και Mut5/6 (θέσεις 5/6). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 25 κανένα από τα μεταλλαγμένα ολιγονουκλεοτίδια δεν μπορεί να προσδέσει τους παράγοντες Sp1 και Sp3 σε πειράματα ηλεκτροφορητικής κινητικότητας συμπλόκου (διαδρομές 2, 4, 6, 8 και 10). Αξιοσημείωτο είναι ότι η πρόσδεση των Sp1 και Sp3 στο ολιγονουκλεοτίδιο p21(-123/-97) (θέσεις 1 και 2) παρεμποδίσθηκε από την μετάλλαξη σε οποιαδήποτε από τις δύο θέσεις (διαδρομές 12 και 13).

Η σχετική συνάφεια των πρωτεϊνών Sp1 και Sp3 για τις θέσεις πρόσδεσής τους στην κοντινή περιοχή του p21 υποκινητή αναλύθηκε με πειράματα ανταγωνισμού ηλεκτροφορητικής κινητικότητας συμπλόκου. Η πρόσδεση των πρωτεϊνών Sp1 και Sp3, που περιέχονται σε πυρηνικό εκχύλισμα ήπατος αρουραίου, στην περιοχή p21(-86/-70) ανταγωνίσθηκε με αυξανόμενες συγκεντρώσεις μη σημασμένων ολιγονουκλεοτιδίων. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 26, τα ολιγονουκλεοτίδια p21(-63/-45)(θέσεις 5/6, διαδρομές 2-5), p21(-76/-58)(θέση 4, διαδρομές 6-9), p21(-86/-70)(θέση 3, διαδρομές 10-13) και p21(-124/-109)(θέση 1, διαδρομές 18-21) ανταγωνίζονται σε μεγάλο βαθμό την πρόσδεση στη σημασμένη p21(-86/-70) περιοχή, ενώ το ολιγονουκλεοτίδιο p21(-115/-95)(θέση 2, διαδρομές 14-17) δεν παρουσιάζει σημαντική ανταγωνιστική δράση έναντι της σημασμένης περιοχής. Η ποσοτικοποίηση της παραπάνω ανάλυσης με τη βοήθεια

απεικόνισης φωσφόρου έδειξε ότι η συγγένεια πρόσδεσης των Sp1 και Sp3 στις 6 θέσεις πρόσδεσης του p21 υποκινητή ακολουθεί την παρακάτω σειρά : θέση 3 > θέση 1 = θέση 4 = θέσεις 5/6 >> θέση 2 (Εικόνα 27).

Στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε παρόμοια ανάλυση ανταγωνισμού χρησιμοποιώντας πρωτεΐνες Sp1 και Sp3 που εκφράσθηκαν σε ετερόλογο σύστημα κυτάρων SL2. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 28, η πρόσδεση των Sp1 (Εικόνα Α) και Sp3 (Εικόνα Β) στο σημασμένο p21(-86/-70) ανιχνευτή ανταγωνίσθηκε σε μεγάλο βαθμό από 100 φορές περίσσεια των μη σημασμένων ολιγονουκλεοτιδίων p21(-63/-45), p21(-76/-58), p21(-86/-70) και p21(-124/-109), ενώ παρατηρήθηκε μικρός ανταγωνισμός με το ολιγονουκλεοτίδιο p21(-115/-95). Οι παρατηρήσεις αυτές είναι απόλυτα σύμφωνες με αυτές της Εικόνας 27.

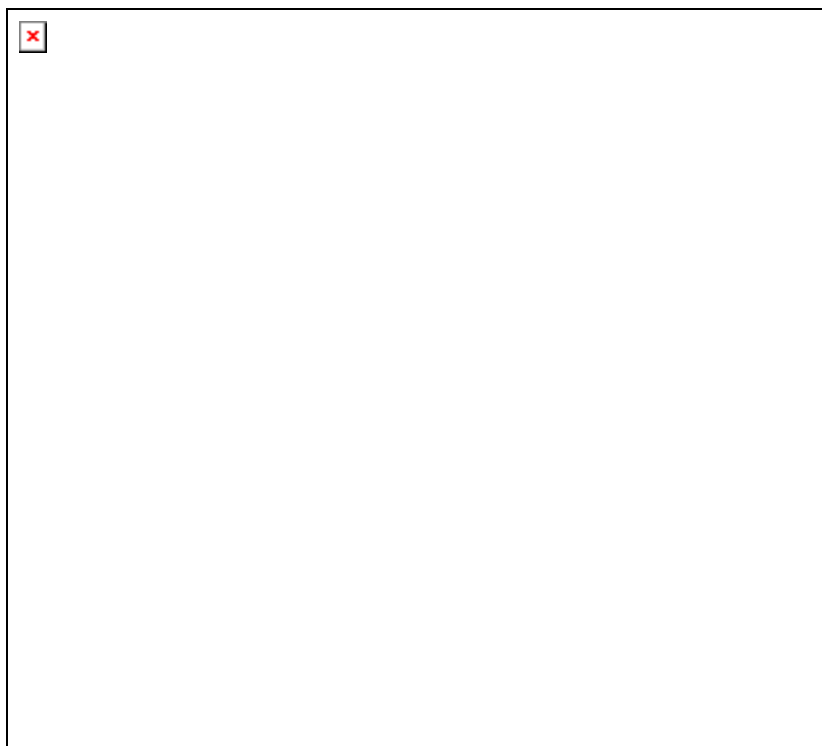
Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στις Εικόνες 20-28 δείχνουν ότι τα 6 μοτίβα GC που εντοπίζονται στην κοντινή περιοχή του p21 υποκινητή καταλαμβάνονται από δύο μέλη της οικογένειας Sp1, τις Sp1 και Sp3, με διαφορετική συνάφεια. Επίσης, κάτω από τις *in vitro* συνθήκες των συγκεκριμένων πειραμάτων, κανένας άλλος παράγοντας, τόσο του πυρηνικού εκχυλίσματος ήπατος αρουραίου, όσο και κυττάρων SL2 δεν προσδέθηκε στην περιοχή αυτή.



Εικόνα 26 : Σχετική συνάφεια των πρωτεϊνών Sp1 και Sp3 που περιέχονται σε πυρηνικό εκχύλισμα ήπατος αρουραίου για τις θέσεις 1-6 του κοντινού p21 υποκινητή. Ανάλυση ηλεκτροφορητικής κινητικότητας συμπλόκου χρησιμοποιώντας σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο p21(-86/-70) και πυρηνικό εκχύλισμα ήπατος αρουραίου (RLNE) απουσία και παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων μη σημασμένων ολιγονουκλεοτιδίων που αντιστοιχούν στις θέσεις πρόσδεσης 1-6 του p21 υποκινητή, όπως φαίνεται και στο πάνω μέρος του αυτοραδιογραφήματος. Ο ελεύθερος από τους σημασμένους ανιχνευτές ξεχώρισαν σε μη αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης και απεικονίσθηκε με αυτοραδιογραφία. Τα βέλη φανερώνουν τη θέση των συμπλόκων DNA και πρωτεϊνών Sp1 και Sp3.



Εικόνα 27 : Ποσοτικοποίηση της ανάλυσης ανταγωνισμού ηλεκτροφορητικής κινητικότητας συμπλόκου της Εικόνας 7. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με απεικόνιση φωσφόρου. Το πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Στο διάγραμμα φαίνονται οι μέσοι όροι των 3 πειραμάτων για κάθε συγκέντρωση.

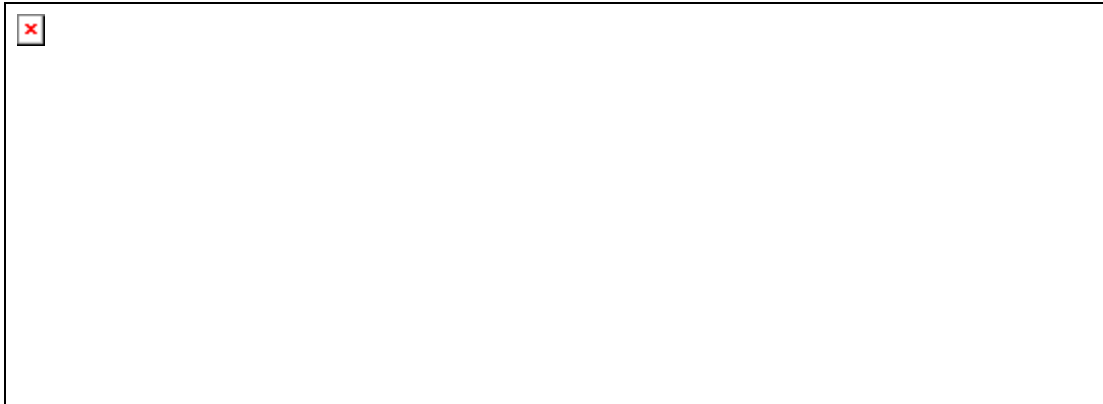


Εικόνα 28 : Σχετική συνάφεια πρόσδεσης των πρωτεϊνών Sp1 και Sp3 που εκφράζονται σε ετερόλογο σύστημα κυττάρων SL2, για τον p21 υποκινητή. Ανάλυση ηλεκτροφορητικής κινητικότητας συμπλόκου χρησιμοποιώντας σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο p21(-86/-70) και εκχύλισμα πλούσιο στους παράγοντες Sp1 (Εικόνα A) ή Sp3 (Εικόνα B) οι οποίοι έχουν εκφρασθεί σε ετερόλογο σύστημα κυττάρων SL2 απουσία ή παρουσία περίσσειας (100 φορές) μη σημασμένων ολιγονουκλεοτιδίων που αντιστοιχούν στις θέσεις πρόσδεσης 1-6 του p21 υποκινητή, όπως φαίνεται στο πάνω μέρος των αυτοραδιογραφημάτων

Συμβολή των GC μοτίβων της κοντινής περιοχής του p21 υποκινητή στην ενεργοποίησή του από Sp1 και Sp3.

Προκειμένου να αξιολογήσουμε τη σχετική συνεισφορά του κάθε GC μοτίβου της κοντινής περιοχής του p21 υποκινητή στην ενεργοποίηση του p21 γονιδίου σε ηπατικά κύτταρα, δημιουργήσαμε μια σειρά από ελλειμματικούς p21 υποκινητές. Οι υποκινητές αυτοί στη συνέχεια τοποθετήθηκαν αμέσως πριν το γονίδιο της λουσιφεράσης και χρησιμοποιήθηκαν σε παροδικές επιμολύνσεις κυττάρων. Οι κατασκευές αυτές περιλαμβάνουν τα τμήματα του p21 υποκινητή από τα νουκλεοτίδια -143, -115, -103 και -78 μέχρι το νουκλεοτίδιο +8 (Εικόνα 29). Το τμήμα -143/+8 περιλαμβάνει και τα 6 GC μοτίβα, ενώ τα τμήματα -115/+8, -103/+8 και -78/+8 δε διαθέτουν τα μοτίβα 1, 2 και 3 αντίστοιχα. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 29, η μετάβαση από το τμήμα (-2325/+8) του υποκινητή σε αυτό του (-143/+8) είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της ενεργότητας του p21 υποκινητή κατά 90% σε ηπατικά κύτταρα HepG2. Απαλοιφή του μοτίβου 1 προκάλεσε μία επιπλέον πτώση στο 3,3% της αρχικής ενεργότητας, υποδεικνύοντας ότι η θέση 1 είναι σημαντική για την ενεργότητα της κοντινής περιοχής σε ηπατικά κύτταρα. Περαιτέρω απαλοιφή των θέσεων 2 και 3 δεν επηρέασε σημαντικά την ενεργότητα του p21 υποκινητή. Επομένως, συμπεραίνουμε ότι η πρόσδεση των Sp1 και Sp3 στη θέση 1 συνεισφέρει σημαντικά στη βασική ενεργότητα της κοντινής περιοχής του p21 υποκινητή σε κύτταρα HepG2.

Προκειμένου να μελετήσουμε λεπτομερέστερα τη συνεισφορά των GC μοτίβων στην εξαρτημένη από Sp1/Sp3 ενεργοποίηση του κοντινού p21 υποκινητή, πραγματοποιήσαμε παροδικές επιμολύνσεις σε κύτταρα εμβρύων Δροσόφιλας SL2. Αρχικά, πραγματοποιήσαμε παροδικές επιμολύνσεις κυττάρων SL2 χρησιμοποιώντας διάφορα τμήματα της κοντινής περιοχής του p21 υποκινητή μαζί με φορείς έκφρασης των ανθρώπινων πρωτεϊνών Sp1 και Sp3 (Εικόνα 30). Όπως φαίνεται, τόσο ο Sp1 όσο και ο Sp3 ενεργοποίησαν το τμήμα p21(-143/+8) κατά 160 και 216 φορές αντίστοιχα. Η απαλοιφή της θέσης 1 οδήγησε σε ραγδαία μείωση της ενεργοποίησης του p21 από Sp1 και Sp3 σε 25 και 21 φορές αντίστοιχα. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί απόλυτα με αυτό που παρουσιάστηκε στην Εικόνα 29 για τα ηπατικά κύτταρα. Περαιτέρω απαλοιφή των θέσεων 2 και 3 μείωσε την ενεργοποίηση του p21 από Sp1 και Sp3 σε 12 και 8,5 φορές αντίστοιχα.



Εικόνα 29 : Σημασία των θέσεων πρόσδεσης των Sp1/Sp3 στην ενεργότητα της κοντινής περιοχής του p21 υποκινητή σε ηπατικά κύτταρα HepG2. Στο αριστερό μέρος της Εικόνας βρίσκεται η σχηματική αναπαράσταση των κατασκευών που φέρουν τους διάφορους p21 υποκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις παροδικές επιμολύνσεις. Οι θέσεις πρόσδεσης 1-6 των Sp1/Sp3 συμβολίζονται με μπλε οβάλς. Οι p53 θέσεις πρόσδεσης συμβολίζονται με κόκκινα οβάλς.



Εικόνα 30 : Σημασία των θέσεων πρόσδεσης των Sp1/Sp3 στην ενεργότητα της κοντινής περιοχής του p21 υποκινητή σε κύτταρα SL2. Στο αριστερό μέρος της Εικόνας βρίσκεται η σχηματική αναπαράσταση των κατασκευών που φέρουν τους διάφορους p21 υποκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις παροδικές επιμολύνσεις. Οι θέσεις πρόσδεσης 1-6 των Sp1/Sp3 συμβολίζονται με μπλε οβάλς. Οι θέσεις πρόσδεσης της p53 συμβολίζονται με κόκκινα οβάλς.

Στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε παροδικές επιμολύνσεις κυττάρων SL2 με το τμήμα p21(-215/+8), αγρίου τύπου ή με αντίστοιχο τμήμα που φέρει σημειακές μεταλλάξεις στις θέσεις 1 και 3, ταυτόχρονα με φορείς έκφρασης των πρωτεϊνών Sp1 και Sp3 (Εικόνα 31). Όπως είδαμε και νωρίτερα οι μεταλλάξεις αυτές είναι ικανές να παρεμποδίσουν την πρόσδεση των Sp1 και Sp3 στις θέσεις 1 και 3 της κοντινής περιοχής του p21 υποκινητή (Εικόνα 25). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 31, οι Sp1 και Sp3 ενεργοποιούν το αγρίου τύπου τμήμα p21(-215/+8) κατά 70 και 65 φορές αντίστοιχα. Από την άλλη, οι μεταλλάξεις στη θέση 1 παρεμπόδισαν την εξαρτημένη από Sp1/Sp3 ενεργοποίηση του p21 κατά 77% και 72% αντίστοιχα. Αντίθετα, οι μεταλλάξεις στη θέση 3 ενίσχυσαν ελαφρά την ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από Sp1/Sp3 (1,4 και 2,4 φορές αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαίωσαν τη σημασία της θέσης 1 για τη μεταγραφική ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από τους παράγοντες Sp1 και Sp3.

Οι 6 θέσεις πρόσδεσης των πρωτεϊνών Sp1 και Sp3 δεν είναι λειτουργικά ισοδύναμες σε κύτταρα θηλαστικών.

Τα πειράματα που παρουσιάστηκαν στις Εικόνες 29-31 πραγματοποιήθηκαν προκειμένου να αξιολογηθεί η συνεισφορά των θέσεων πρόσδεσης των Sp1 και Sp3 στη μεταγραφική ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από τους παράγοντες Sp1/Sp3 απουσία των στοιχείων του ενισχυτή. Όμως, όπως φάνηκε στην Εικόνα 29 και θα αναλυθεί περισσότερο παρακάτω, η περιοχή -143/+8 του p21 υποκινητή που περιλαμβάνει τις θέσεις 1-6 συμβάλλει μόνο στο 10% της ενεργότητας του υποκινητή αυτού σε ηπατικά κύτταρα. Το υπόλοιπο 90% οφείλεται στα στοιχεία του ενισχυτή. Προκειμένου να μελετήσουμε τη σημασία των μεταλλάξεων στις θέσεις 1-6 στην ενεργότητα της κοντινής περιοχής παρουσία του ενισχυτή αυτήν τη φορά, οι μεταλλάξεις των θέσεων 1-6 που εμφανίζονται στη Εικόνα 20 πραγματοποιήθηκαν στον ολικού μήκους p21 υποκινητή (-2325/+8) (Εικόνα 32).

Η ενεργότητα του κάθε μεταλλαγμένου υποκινητή αξιολογήθηκε με παροδικές επιμολύνσεις κυττάρων ανθρώπινου ηπατώματος HepG2 και ινοβλαστών νεφρού πιθήκου COS-7. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 32, οι



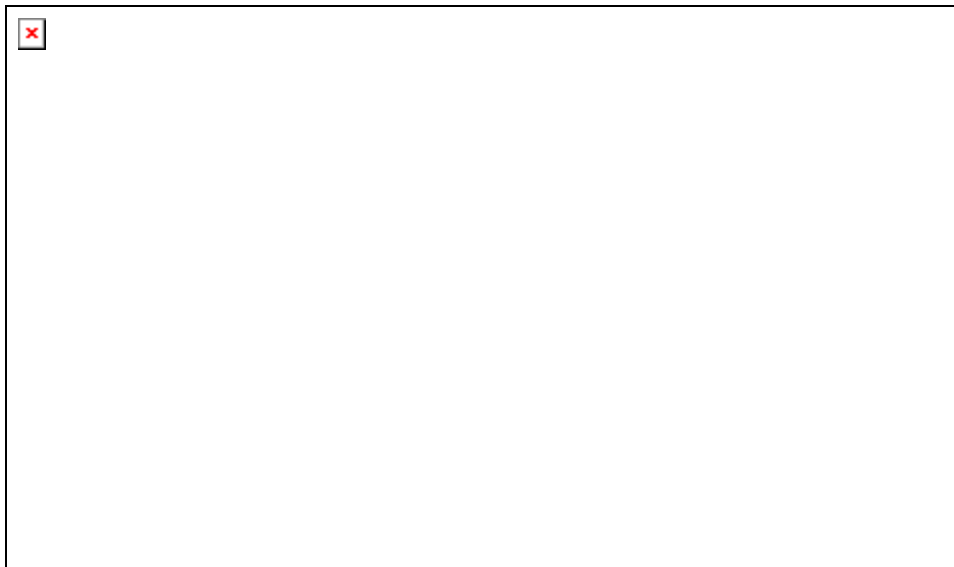
Εικόνα 31 : Σημασία των θέσεων πρόσδεσης 1 και 3 των Sp1/Sp3 στην ενεργότητα της κοντινής περιοχής του p21 υποκινητή σε κύτταρα SL2. Στο αριστερό μέρος της Εικόνας βρίσκεται η σχηματική αναπαράσταση των κατασκευών που φέρουν τους p21 υποκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις παροδικές επιμολύνσεις.

μεταλλάξεις στις θέσεις 5/6 (MUT 5/6) δεν επηρέασαν τα βασικά επίπεδα ενεργότητας του p21 υποκινητή. Στην πραγματικότητα οι μεταλλάξεις αυτές προκάλεσαν μια ελαφρά αύξηση της ενεργότητας του υποκινητή (110% έναντι 100% του αγρίου τύπου p21 υποκινητή). Αυτό πιθανά να σημαίνει ότι οι Sp1/Sp3 που προσδένονται στις θέσεις 5/6 είτε δε συνεισφέρουν στην ενεργοποίηση του p21 υποκινητή είτε παίζουν έναν μικρής σημασίας παρεμποδιστικό ρόλο. Αντίθετα οι μεταλλάξεις στις θέσεις 4, 3, 2 και 1 προκάλεσαν σημαντική μείωση στην ενεργότητα του p21 υποκινητή και στις δύο κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα. Πιο συγκεκριμένα, οι μεταλλάξεις στη θέση 4 μείωσαν την ενεργότητα του υποκινητή στο 38% και 66% σχετικά με τον αγρίου τύπου υποκινητή στα κύτταρα HepG2 και COS-7 αντίστοιχα. Οι μεταλλάξεις στη θέση 3 είχαν το πιο δραστικό αποτέλεσμα, καθώς μείωσαν την ενεργότητα στο 13% και 18% στις δύο κυτταρικές σειρές αντίστοιχα. Οι μεταλλάξεις στη θέση 2 μείωσαν την ενεργότητα στο 43% και 24% αντίστοιχα και τέλος, οι μεταλλάξεις στη θέση 1 είχαν λιγότερο δραστικό φαινότυπο, καθώς οδήγησαν σε μείωση στο 77% και 95% στις δύο κυτταρικές σειρές αντίστοιχα (Εικόνα 32).

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην Εικόνα 32 υποδηλώνουν ότι οι θέσεις πρόσδεσης των Sp1/Sp3 του p21 υποκινητή δεν είναι λειτουργικά ισοδύναμες, τουλάχιστον στα δύο διαφορετικά κυτταρικά υποστρώματα που εξετάσαμε, τα ηπατοκύτταρα και τους ινοβλάστες.

Συνεργασία μεταξύ παραγόντων Sp1 που προσδένονται σε γειτονικές θέσεις του p21 υποκινητή.

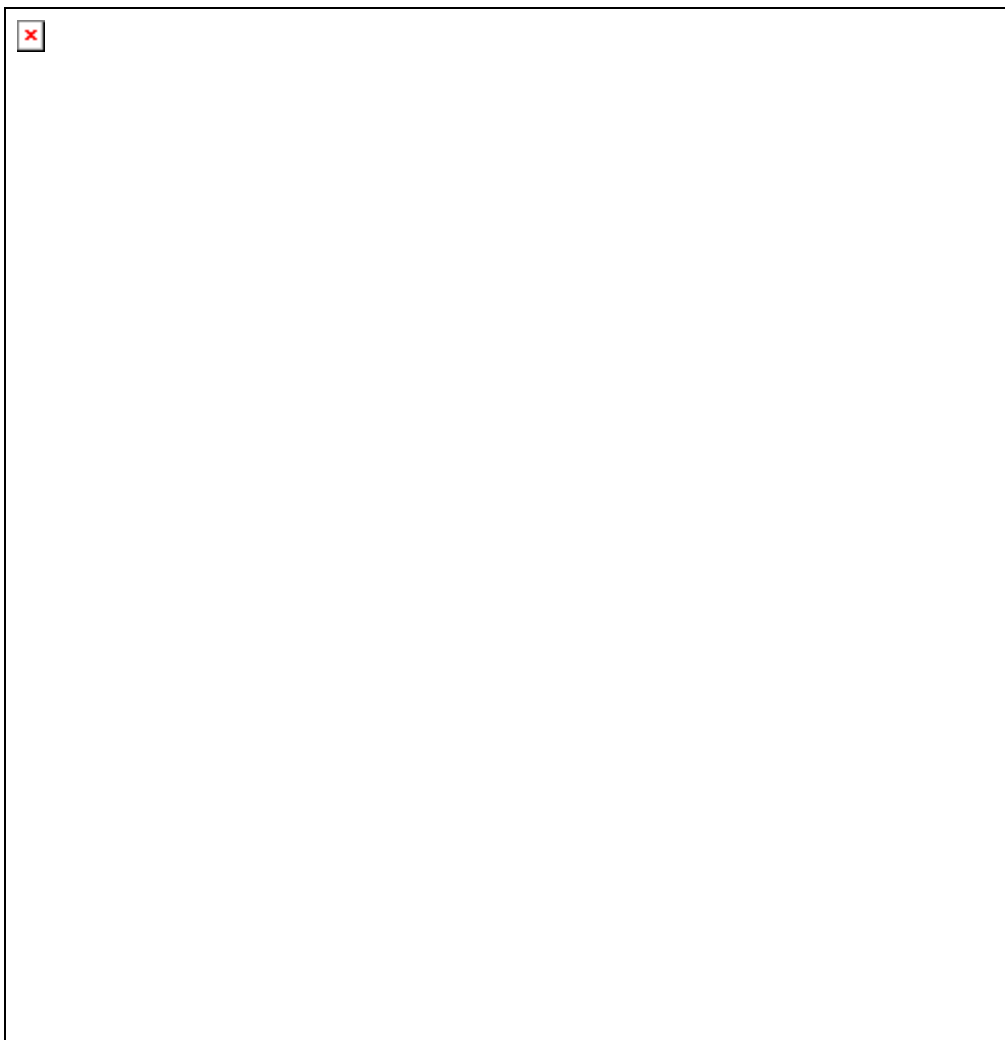
Για να εξετάσουμε πιθανές λειτουργικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ Sp1 παραγόντων που προσδένονται στον p21 υποκινητή χρησιμοποιήσαμε μια μεταλλαγμένη μορφή του παράγοντα Sp1 που δε διαθέτει την καρβοξυτερματική περιοχή D (aa 703-778) (Εικόνα 33A). Η μορφή αυτή του Sp1 είναι ικανή να προσδεθεί σε GC μοτίβα και να ενεργοποιήσει υποκινητές οι οποίοι διαθέτουν μόνο μία θέση πρόσδεσης του Sp1 στον ίδιο βαθμό με τον Sp1 αγρίου τύπου. Η μεταλλαγμένη αυτή μορφή του Sp1 δεν μπορεί να συνεργαστεί με άλλους Sp1 παράγοντες σε υποκινητές που διαθέτουν πολλαπλά GC μοτίβα, λόγω έλλειψης της περιοχής D, η οποία είναι



Εικόνα 32 : Ο ρόλος των θέσεων πρόσδεσης 1-6 των παραγόντων Sp1/Sp3 στην ενεργότητα του p21 υποκινητή σε κύτταρα HepG2 και COS-7. Στο αριστερό μέρος της Εικόνας απεικονίζονται ο αγρίου τύπου p21 υποκινητής ή οι μεταλλαγμένοι σε κάθε μια από τις θέσεις 1-6 υποκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις παροδικές επιμολύνσεις του πειράματος. Οι σημειακές μεταλλάξεις απεικονίζονται με ένα X. Με μπλε χρώμα είναι τα αποτελέσματα των επιμολύνσεων στα κύτταρα HepG2 και με κόκκινο χρώμα αυτών στα κύτταρα COS-7

σημαντική για λειτουργικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ Sp1 παραγόντων, όπως έχει δειχθεί προηγουμένως (Courey et al, 1989). Χρησιμοποιήσαμε τη μεταλλαγμένη αυτή μορφή σε παροδικές επιμολύνσεις κυττάρων SL2 και όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 33B η απαλοιφή της περιοχής D παρεμπόδισε την ενεργοποίηση του p21(-2325/+8) υποκινητή κατά 75% (12 φορές έναντι 47 της ενεργοποίησης που οφείλεται στον αγρίου τύπου Sp1). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η περιοχή D του παράγοντα Sp1, η οποία εμπλέκεται στη συνεργασία μεταξύ Sp1 μορίων που προσδένονται σε παραπλήσιες θέσεις, απαιτείται για τα υψηλά επίπεδα ενεργοποίησης του p21 υποκινητή από Sp1. Επιπλέον, η συνεπιμόλυνση των παραπάνω κυττάρων με τη μεταλλαγμένη αυτή μορφή, καθώς και με την πρωτεΐνη αγρίου τύπου, παρεμπόδισε την ενεργοποίηση του p21 υποκινητή με ένα δόσοεξαρτώμενο τρόπο (Εικόνα 33B). Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφέρουμε ότι με πειράματα ηλεκτροφορητικής κινητικότητας συμπλόκου επιβεβαιώσαμε ότι η μεταλλαγμένη μορφή του Sp1 που εκφράσθηκε σε κύτταρα SL2, προσδένεται στη θέση 3 τόσο ισχυρά όσο και αγρίου τύπου μορφή (Εικόνα 33C). Έτσι αποκλείσαμε την περίπτωση η μειωμένη ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από τη μεταλλαγμένη μορφή να οφείλεται σε μειωμένη πρόσδεσή της στον υποκινητή αυτόν. Τέλος, με ανάλυση ανοσοεντοπισμού εξασφάλισαμε ότι η μεταλλαγμένη μορφή εκφράζεται στον ίδιο βαθμό με την αγρίου τύπου (Εικόνα 33D). Τα αποτελέσματα της Εικόνας 33 υποδεικνύουν ότι ο παράγοντας Sp1 ενεργοποιεί τον p21 υποκινητή κατά ένα συνεργασιακό τρόπο, λόγω της ταυτόχρονης πρόσδεσής του σε γειτονικές θέσεις.

Επιπρόσθετα, τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η μεταλλαγμένη μορφή του Sp1, η οποία δε διαθέτει την περιοχή D (aa 703-778) δρα ως κυρίαρχος αρνητικός παράγοντας και παρεμποδίζει την ενεργότητα του p21 υποκινητή, πιθανά μέσω ανταγωνισμού με τον αγρίου τύπου Sp1 για την πρόσδεση στις ίδιες θέσεις του p21 υποκινητή.



Εικόνα 33 : Η περιοχή D του παράγοντα Sp1 είναι σημαντική για την ενεργοποίηση του p21 υποκινητή. Α) Σχηματική αναπαράσταση των Sp1 μορφών που χρησιμοποιήθηκαν στα παρακάτω πειράματα. Β) Κύτταρα SL2 επιμολύνθηκαν παροδικά με τον p21 υποκινητή και φορείς έκφρασης των παραπάνω Sp1 μορφών, ανεξάρτητα και σε συνδυασμό, όπως φαίνεται στο κάτω μέρος του ραβδογράμματος. Ο βαθμός ενεργοποίησης σε κάθε περίπτωση εμφανίζεται στο πάνω μέρος της κάθε ράβδου. Γ) Ανάλυση ηλεκτροφορητικής κινητικότητας συμπλόκου. Εκχυλίσματα κυττάρων SL2, πλούσιων στις Sp1 μορφές επώασθησαν με σημασμένο ανιχνευτή που αντιστοιχεί στη θέση 3. Η θέση των συμπλόκων του ανιχνευτή με τις Sp1 μορφές σημειώνεται με βέλος. Δ) Πρότυπα έκφρασης των Sp1 μορφών σε κύτταρα SL2 μετά από τις παροδικές επιμολύνσεις. Η ανίχνευση της κάθε μορφής έγινε με αντίσωμα έναντι της Sp1. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών σημειώνονται στο αριστερό μέρος της Εικόνας. Οι θέσεις των Sp1 μορφών σημειώνονται με βέλος.

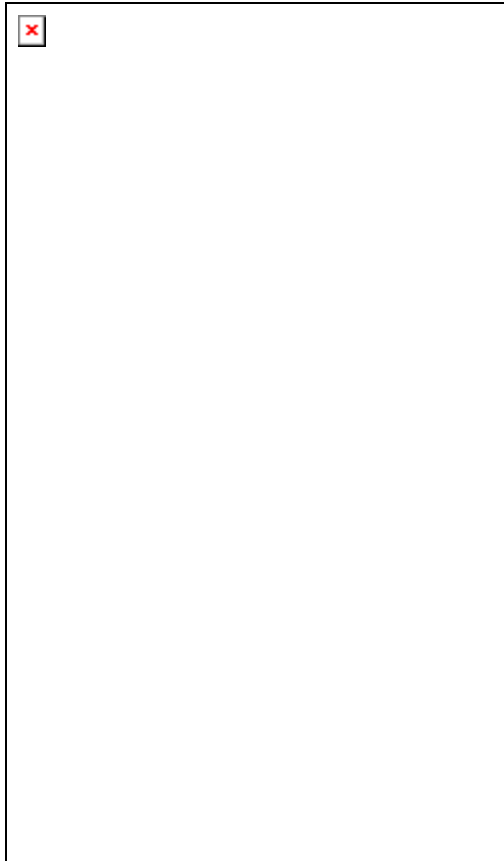
Η σημασία των παραγόντων της οικογένειας Sp1 στη μεταγραφική ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από το σηματοδοτικό μονοπάτι TGF-β και τις πρωτεΐνες Smad.

Οι πρωτεΐνες Smad ενεργοποιούν τον p21 υποκινητή μέσω λειτουργικής συνεργασίας με τον παράγοντα Sp1 αλλά όχι με τον Sp3.

Όπως αναφέραμε στην εισαγωγή, η κοντινή περιοχή του p21 υποκινητή αποτελεί στόχο διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών, που επηρεάζουν την ενεργότητα του υποκινητή αυτού. Ένα από τα μονοπάτια είναι και αυτό του TGF-β. Είναι γνωστό ότι ο TGF-β και οι πρωτεΐνες Smad δρουν στην κοντινή περιοχή του p21 υποκινητή και επηρεάζουν την ενεργότητά του σε κύτταρα HepG2 (Moustakas and Kardassis, 1998). Στην παρούσα μελέτη θελήσαμε να προσδιορίσουμε τη σχετική συνεισφορά των παραγόντων Sp1 και Sp3, καθώς και των θέσεων 1-6, στην ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από τις πρωτεΐνες Smad3 και Smad4.

Αρχικά, επικεντρωθήκαμε στη σημασία της κοντινής περιοχής στην εξαρτώμενη από Smad3/Smad4 ενεργοποίηση του p21 υποκινητή. Σε παροδικές επιμολύνσεις κυττάρων HepG2 χρησιμοποιήσαμε φορείς που διαθέτουν το γονίδιο της λουσιφεράσης το οποίο ελέγχεται από τον p21 υποκινητή αγρίου τύπου (p21(-2325/+8)) ή τον p21 υποκινητή που δε διαθέτει τις 4 από τις 6 θέσεις πρόσδεσης του Sp1 (p21(Δ-125/-60)). Όπως βλέπουμε στην Εικόνα 34, οι πρωτεΐνες Smad3/Smad4, που υπερεκφράζονται σε κύτταρα HepG2, είναι ικανές να ενεργοποιήσουν 2,5 φορές τον p21 υποκινητή, ενώ δε συμβαίνει το ίδιο με τον υποκινητή από τον οποίο έχει αφαιρεθεί το μεγαλύτερο τμήμα της κοντινής περιοχής.

Αφού επιβεβαιώσαμε ότι η κοντινή περιοχή του p21 υποκινητή είναι απαραίτητη για την ενεργοποίησή του από τις πρωτεΐνες Smad3/Smad4, πραγματοποιήσαμε παροδικές επιμολύνσεις κυττάρων SL2, ώστε να προσδιορίσουμε τη συνεισφορά του παράγοντα Sp1 που προσδένεται στην περιοχή αυτή στη μεταγραφική ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από τις πρωτεΐνες Smad. Στις επιμολύνσεις αυτές χρησιμοποιήσαμε τους p21(-2325/+8) και p21(Δ-125/-60) υποκινητές. Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 35,



Εικόνα 34 : Η κοντινή περιοχή του p21 υποκινητή είναι απαραίτητη για την ενεργοποίησή του από τις πρωτεΐνες **Smad3/Smad4**. Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με τους υποκινητές p21(-2325/+8) και p21(-2325/+8)(Δ-125/-60) απουσία και παρουσία φορέων έκφρασης των Smad3/Smad4, όπως φαίνεται στο κάτω μέρος του ραδιογράμματος. Η μεταγραφική ενεργότητα του αγρίου τύπου ή του μεταλλαγμένου p21 υποκινητή από τις πρωτεΐνες Smad φαίνεται στην κορυφή κάθε ράβδου.

ο παράγοντας Sp1 που εκφράζεται στο ετερόλογο σύστημα των κυττάρων αυτών ενεργοποιεί μόνο τον υποκινητή αγρίου τύπου και όχι αυτόν που δε διαθέτει την κοντινή περιοχή (-125/-60). Επίσης, οι πρωτεΐνες Smad3/Smad4 που εκφράζονται στο ετερόλογο σύστημα των κυττάρων SL2 δεν μπορούν να ενεργοποιήσουν κανέναν από τους δύο υποκινητές. Τέλος, παρατηρούμε ότι ο Sp1 μαζί με τις Smad3/Smad4 ενεργοποιούν συνεργασιακά τον υποκινητή αγρίου τύπου (125 φορές έναντι 36 του Sp1 μόνου του). Αντίθετα, η απαλοιφή της κοντινής περιοχής παρεμπόδισε τη συνεργασιακή αυτή ενεργοποίηση του p21 υποκινητή (Εικόνα 35). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαίωσαν τις προηγούμενες μελέτες μας (Moustakas and Kardassis, 1998) και ανέδειξαν τη σημασία των λειτουργικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των παραγόντων Sp1 και Smad για τη ρύθμιση του γονιδίου p21 από την κυτταροκίνη TGF-β.

Προκειμένου να μελετήσουμε περαιτέρω τη συνεργασία μεταξύ των Sp1 και Smad3/Smad4 πρωτεϊνών χρησιμοποιήσαμε μόνον την κοντινή περιοχή του p21 υποκινητή p21(-143/+8). Όπως μπορούμε να διακρίνουμε στην Εικόνα 36, η συνέκφραση των Sp1 και Smad3/Smad4 προκάλεσε μια σημαντική αύξηση του p21 υποκινητή κατά 1575 φορές, σε σχέση με τις 150 φορές και 2 φορές ενεργοποίηση που προκαλούν ο Sp1 και οι Smad3/Smad4 από μόνους στην κοντινή περιοχή. Πάντως, σε αντίθεση με τον Sp1, ο Sp3 δεν μπορεί να συνεργαστεί με τις Smad3/Smad4 για την ενεργοποίηση της κοντινής περιοχής του p21 υποκινητή στα κύτταρα SL2. Αυτό υποδεικνύει ότι η ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από τις Smad/Smad4 διαμεσολαβείται αποκλειστικά από τον παράγοντα Sp1.

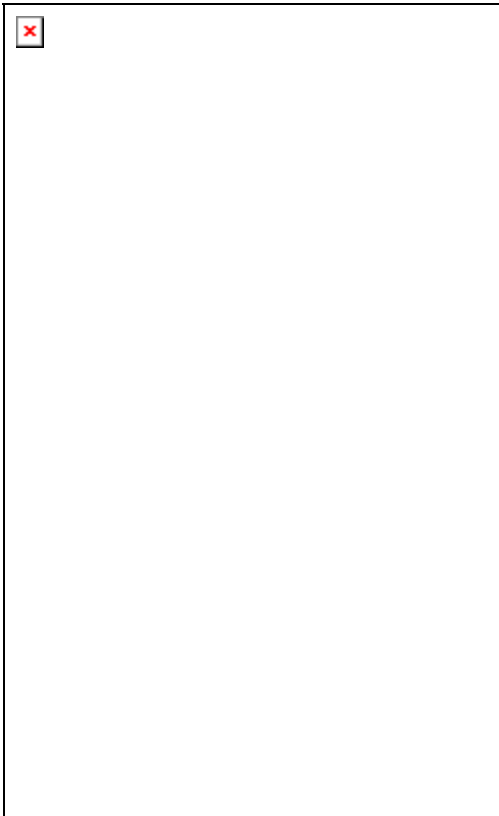
Η ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από τις πρωτεΐνες Smad δεν επηρεάζεται από μεταλλάξεις σε κάθε μια από τις θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα Sp1.

Αφού επιβεβαιώσαμε τη σημασία της κοντινής περιοχής, καθώς και της παρουσίας του παράγοντα Sp1, στην ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από τις πρωτεΐνες Smad, θελήσαμε να μελετήσουμε τη συνεισφορά της κάθε μιας από τις 6 θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα Sp1 στην ενεργοποίηση αυτή. Για το σκοπό αυτό επιμολύναμε παροδικά κύτταρα HepG2 με τους p21

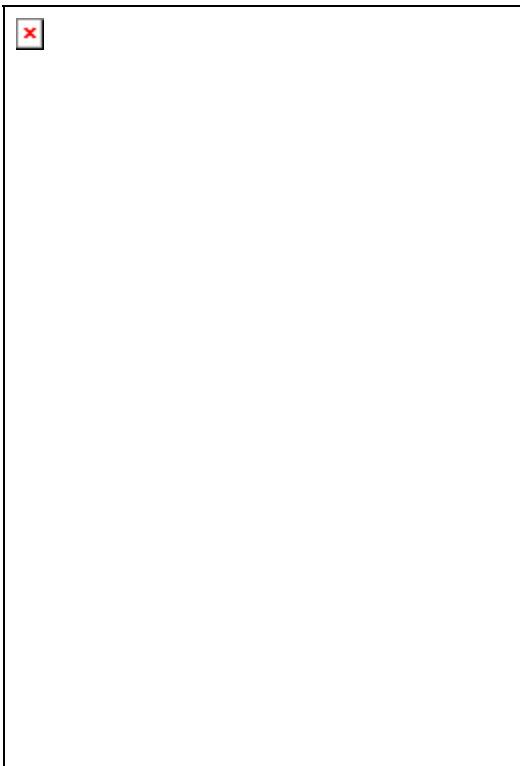
υποκινητές που φέρουν μεταλλάξεις σε κάθε μια από τις θέσεις αυτές, καθώς

και με αυτόν του αγρίου τύπου.

Ταυτόχρονα υπερεκφράσαμε και τις



Εικόνα 35 : Η ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από τις Smad3/Smad4 απαιτεί τον παράγοντα Sp1. Κύτταρα SL2 επιμολύνθηκαν παροδικά με τους υποκινητές p21(-2325/+8) και p21(-2325/+8)(Δ-125/-60) απουσία και παρουσία φορέων έκφρασης του Sp1 και των Smad3/Smad4, όπως φαίνεται στο κάτω μέρος του ραβδογράμματος. Η μεταγραφική ενεργοποίηση του αγρίου τύπου και του μεταλλαγμένου p21 υποκινητή από συνεργασιακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών Sp1 και Smad3/4 φαίνεται στην κορυφή των αντίστοιχων ράβδων. Η βασική ενεργότητα του p21 υποκινητή στα κύτταρα SL2 θεωρήθηκε ως μονάδα.



Εικόνα 36 : Η ενεργοποίηση της κοντινής περιοχής του p21 υποκινητή από τις πρωτεΐνες Smad διαμεσολαβείται από τον Sp1 και όχι τον Sp3. Κύτταρα SL2 επιμολύνθηκαν παροδικά με την κοντινή περιοχή p21(-143/+8) απουσία και παρουσία φορέων έκφρασης των Sp1 και Smad3/Smad4 ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό, όπως φαίνεται στο κάτω μέρος του ραβδογράμματος. Η ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από τις πρωτεΐνες Sp1 και Smad3/4 φαίνεται στην κορυφή της κάθε ράβδου. Η ενεργότητα του p21 υποκινητή στα κύτταρα SL2 απουσία των παραγόντων Sp1 και Smad3/4 θεωρήθηκε ως μονάδα.

πρωτεΐνες Smad3/Smad4. Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 37, όλοι οι μεταλλαγμένοι υποκινητές διατηρούν τη δυνατότητα να ενεργοποιούνται από τις πρωτεΐνες Smad στον ίδιο βαθμό όπως και ο υποκινητής αγρίου τύπου (2-3 φορές). Επομένως, η ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από τις πρωτεΐνες Smad δεν απαιτεί κάποια συγκεκριμένη θέση πρόσδεσης του Sp1, αλλά όλες είναι εξίσου ισοδύναμες στο να διαμεσολαβούν τη συγκεκριμένη ενεργοποίηση.



Εικόνα 37 : Η ενεργοποίηση του (-2325/+8)p21 υποκινητή από τις πρωτεΐνες Smad δεν επηρεάζεται από μεταλλάξεις στις θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα Sp1 1-6. Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με τον αγρίου τύπου και τους μεταλλαγμένους σε κάθε μια από τις θέσεις 1-6 υποκινητές, απουσία και παρουσία φορέων έκφρασης των πρωτεϊνών Smad3/Smad4, όπως φαίνεται στο κάτω μέρος του ραβδογράμματος. Η σχετική ενεργότητα του κάθε υποκινητή απουσία και παρουσία των πρωτεϊνών Smad φαίνεται στην κορυφή της κάθε ράβδου. Ο βαθμός ενεργοποίησης κάθε p21 υποκινητή από τις πρωτεΐνες Smad σημειώνεται στο πάνω μέρος του ραβδογράμματος.

Λειτουργική ανάλυση της μακρινής περιοχής του p21 υποκινητή : Συνεργασιακές αλληλεπιδράσεις με τους παράγοντες Sp1 και Sp3 που προσδένονται στη θέση 3 της κοντινής περιοχής

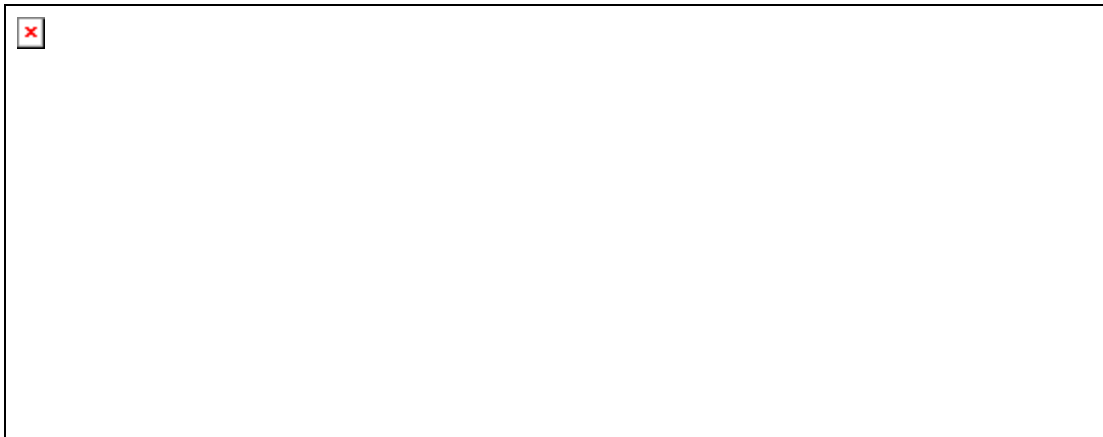
Η μακρινή περιοχή του p21 υποκινητή -2325/-2260, η οποία περιέχει μια θέση πρόσδεσης της p53, λειτουργεί ως μεταγραφικός ενισχυτής της κοντινής περιοχής.

Μέχρι τώρα μελετήσαμε τη συνεισφορά της κοντινής περιοχής στην ενεργότητα του p21 υποκινητή. Εκτός, όμως, από την περιοχή αυτή η ενεργοποίηση του p21 υποκινητή εξαρτάται και από τη δράση μιας δεύτερης περιοχής η οποία εντοπίζεται στην περιοχή -2325/-1890 του υποκινητή αυτού. Η περιοχή αυτή φαίνεται να δρα ως ενισχυτής του p21 υποκινητή. Απαλοιφή είτε της κοντινής (-122/-60) είτε της μακρινής (-2325/-1890) περιοχής του p21 υποκινητή είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της ενεργότητας του υποκινητή αυτού κατά 95% και 70% αντίστοιχα σε σχέση με τον υποκινητή αγρίου τύπου (Εικόνα 38). Στο συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκαν παροδικές επιμολύνσεις κυττάρων HepG2 με τους υποκινητές που φαίνονται στην Εικόνα 38, και οι οποίοι ήλεγχαν την έκφραση του γονιδίου CAT. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν μια λειτουργική συνεργασία μεταξύ παραγόντων που προσδένονται στην μακρινή και στην κοντινή περιοχή του p21 υποκινητή.

Προκειμένου να μελετήσουμε περαιτέρω τη μακρινή περιοχή του p21 υποκινητή και να ταυτοποιήσουμε ρυθμιστικές ακολουθίες που είναι υπεύθυνες για τη δράση της ως μεταγραφικού ενισχυτή, δημιουργήσαμε μια σειρά από φορείς που φέρουν διάφορα τμήματα της περιοχής -2325/-1890 τοποθετημένα πριν από τον ετερόλογο, ελάχιστο υποκινητή του γονιδίου της κινάσης της θυμιδίνης (tk) του ιού Herpes Simplex (HSV). Ο υποκινητής αυτός εκτείνεται μεταξύ των νουκλεοτιδίων -85 και +1 και περιλαμβάνει μια θέση πρόσδεσης του Sp1. Τα τμήματα του p21 υποκινητή που μελετήθηκαν ήταν τα -2325/-1890, -2260/-1890 και -2325/-2260 (Εικόνα 39). Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με τους φορείς αυτούς και η ενεργότητα των διαφόρων τμημάτων προσδιορίστηκε με ανάλυση CAT. Όπως βλέπουμε στην Εικόνα 39, η περιοχή -2325/-1890 του p21 υποκινητή προκάλεσε μια



Εικόνα 38 : Η περιοχή -2325/-1890 του p21 υποκινητή δρα ως μεταγραφικός ενισχυτής σε ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα HepG2. Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με τους υποκινητές που φαίνονται στην Εικόνα, από τους οποίους ο πρώτος αντιστοιχεί στον αγρίου τύπου p21, ο δεύτερος δε διαθέτει τις 4 από τις 6 θέσεις πρόσδεσης του Sp1 και ο τελευταίος δε διαθέτει την περιοχή -2325/-1890. Με κόκκινα οβάλ συμβολίζονται οι θέσεις πρόσδεσης της p53 και με μπλε αυτές του Sp1. Στο αριστερό μέρος της Εικόνας φαίνεται η σχετική ενεργότητα του κάθε τμήματος σε σχέση με τον υποκινητή αγρίου τύπου. Οι διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν απαλοιφές του υποκινητή.



Εικόνα 39 : Η περιοχή -2325/-2260 του p21 υποκινητή δρα ως μεταγραφικός ενισχυτής σε ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα HepG2. Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με τους υποκινητές που φαίνονται στην Εικόνα. Με κόκκινο οβάλ συμβολίζεται η θέση πρόσδεσης της p53 και με μπλε αυτή του Sp1. Στο αριστερό μέρος της Εικόνας εμφανίζονται τα επίπεδα ενεργοποίησης του tk υποκινητή εξαιτίας της μεταγραφικής ενίσχυσης από τα τμήματα της μακρινής περιοχής του p21 υποκινητή. Οι διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν απαλοιφές του υποκινητή.

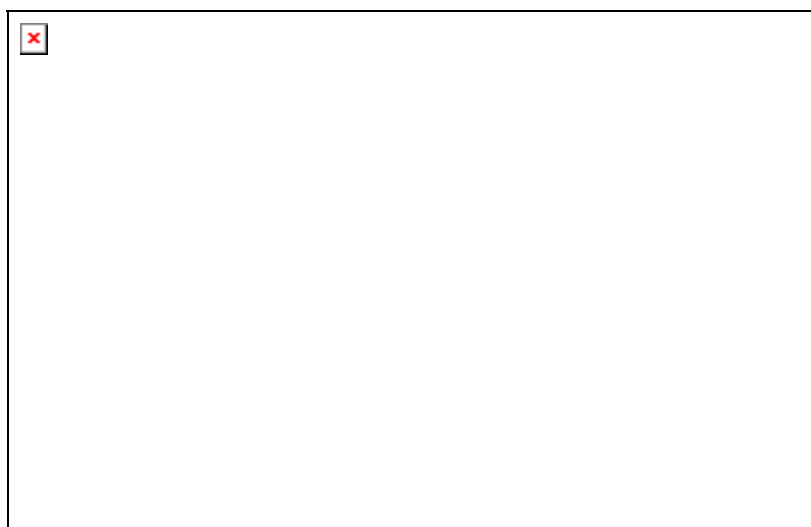
μεταγραφική αύξηση του tk υποκινητή κατά 43,5 και 51,5 φορές, όταν αυτή τοποθετήθηκε στην ίδια ή στην αντίθετη φορά αντίστοιχα με αυτήν του tk υποκινητή και του γονιδίου CAT. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει το ρόλο της περιοχής -2325/-1890 του p21 υποκινητή ως μεταγραφικού ενισχυτή σε κύτταρα HepG2.

Η περιοχή -2325/-1890 του p21 υποκινητή περιλαμβάνει μια καλά χαρακτηρισμένη θέση πρόσδεσης της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53. Όπως φαίνεται στις Εικόνες 40A και 40B η πρωτεΐνη p53 που εκφράζεται σε κύτταρα HepG2 μπορεί να προσδεθεί ικανοποιητικά στην περιοχή αυτή του p21 υποκινητή.

Προκειμένου να μελετήσουμε τη συνεισφορά αυτής της θέσης πρόσδεσης της p53 στην ενισχυτική δράση της περιοχής -2325/-1890 δημιουργήσαμε επιπλέον πλασμιδιακούς φορείς. Στους φορείς αυτούς, η περιοχή -2325/-1890 διαχωρίσθηκε σε δύο μικρότερα τμήματα : το -2325/-2260, το οποίο περιλαμβάνει τη θέση πρόσδεσης της p53 και το -2260/-1890, το οποίο δεν την περιλαμβάνει. Και οι δύο περιοχές τοποθετήθηκαν πριν τον tk υποκινητή και το γονίδιο CAT (Εικόνα 39). Παροδικές επιμολύνσεις κυττάρων HepG2 με τους παραπάνω φορείς και ακόλουθη ανάλυση δραστηριότητας του ενζύμου CAT, έδειξε ότι το τμήμα -2325/-2260 που περιέχει τη θέση πρόσδεσης της p53 διαθέτει τη δυνατότητα μεταγραφικής ενίσχυσης, αντίθετα με την υπόλοιπη περιοχή -2260/-1890 η οποία δεν μπορεί να ενεργοποιήσει τον tk υποκινητή.

Στη συνέχεια θελήσαμε να ελέγξουμε τη δυνατότητα της περιοχής p21(-2325/-2260) να δρα ως μεταγραφικός ενισχυτής στον ομόλογό της υποκινητή. Για το λόγο αυτό τοποθετήσαμε την περιοχή αυτή αμέσως πριν τον υποκινητή p21(-215/+8) (Εικόνα 41). Επιμολύναμε παροδικά κύτταρα HepG2 και παρατηρήσαμε ότι η περιοχή -2325/-2260 του p21 υποκινητή ενεργοποίησε σε σημαντικό βαθμό (28 φορές) την κοντινή περιοχή του υποκινητή αυτού. Αν λάβουμε υπόψη μας τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στις Εικόνες 38, 39 και 41, συμπεραίνουμε ότι η μακρινή περιοχή -2325/-2260 του p21 υποκινητή, η οποία περιλαμβάνει μια θέση πρόσδεσης της p53, λειτουργεί ως μεταγραφικός ενισχυτής της κοντινής περιοχής του ίδιου υποκινητή, η οποία περιέχει πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα Sp1. Αυτό υποδεικνύει

μια λειτουργική συνεργασία μεταξύ των p53 και Sp1 στην ενεργοποίηση του p21 υποκινητή.



Εικόνα 40 : Α. Ανίχνευση της πρωτεΐνης p53 που εκφράζεται στα κύτταρα HepG2. Εκχύλισμα από τα συγκεκριμένα κύτταρα χρησιμοποιήθηκε σε ηλεκτροφόρηση αποδιατακτικής πηκτής πολυακρυλαμίδης και σε ανάλυση ανοσοεντοπισμού με το μονοκλωνικό αντίσωμα DO-1 έναντι της p53. Η θέση της p53 φαίνεται με ένα βέλος. Β. Πρόσδεση της p53 που εκφράζεται σε κύτταρα HepG2 στη μακρινή περιοχή του p21 υποκινητή. Εκχύλισμα από τα συγκεκριμένα κύτταρα επώασθη με σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο που αντιστοιχεί στην περιοχή p21(-2281/-2269), που περιλαμβάνει τη θέση πρόσδεσης της p53, απουσία και παρουσία του αντισώματος DO-1. Οι θέσεις των συμπλόκων DNA-p53 απουσία και παρουσία του αντισώματος φαίνονται με τα βέλη.

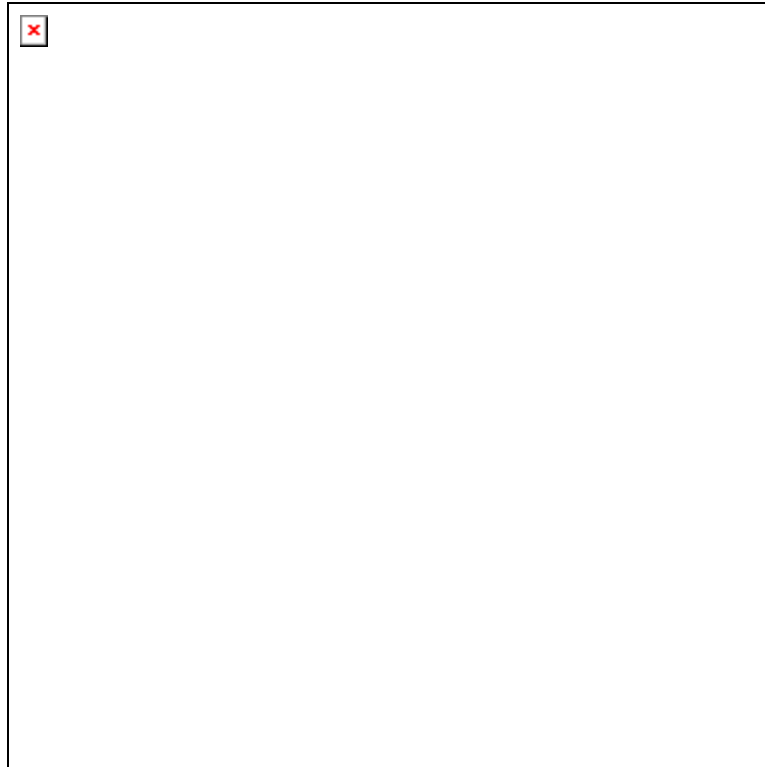


Εικόνα 41 : Η περιοχή -2325/-2260 του p21 υποκινητή δρα ως μεταγραφικός ενισχυτής σε ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα HepG2. Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με τους υποκινητές που φαίνονται στην Εικόνα. Με κόκκινο οβάλ συμβολίζεται η θέση πρόσδεσης της p53 και με μπλε αυτές του Sp1. Στο αριστερό μέρος της Εικόνα φαίνονται τα επίπεδα ενεργοποίησης του κοντινού p21 υποκινητή από τη μακρινή περιοχή -2325/-2260. Οι διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν απαλοιφές του υποκινητή.

Η σημασία της θέσης 3 στη μεταγραφική ενεργότητα του p21 υποκινητή.

Από την ανάλυση που φαίνεται στην Εικόνα 32, διαπιστώνουμε ότι η θέση 3 είναι λειτουργικά η πιο σημαντική θέση για την ηπατική λειτουργία του p21 υποκινητή. Η δραματική μείωση της ενεργότητας του p21 υποκινητή κατά 87% από τη μεταλλαξιγένεση της θέσης 3 μπορεί να οφείλεται είτε στην ανικανότητα των Sp1 και Sp3 να ενεργοποιήσουν τον p21 υποκινητή είτε στην ανικανότητά τους να συνεργαστούν με παράγοντες που προσδένονται στον ενισχυτή του p21 γονιδίου. Προκειμένου να ερευνήσουμε ποιες από τις δύο υποθέσεις ισχύει, πραγματοποιήσαμε, αρχικά, παροδικές επιμολύνσεις κυττάρων SL2. Χρησιμοποιήσαμε τον (-2325/+8) p21 υποκινητή αγρίου τύπου, καθώς και αυτόν που φέρει μεταλλάξεις στη θέση 3, απουσία και παρουσία φορέων έκφρασης των παραγόντων Sp1, Sp2 και Sp3. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 42, ο Sp1 ενεργοποιεί σε μεγάλο βαθμό τον p21 υποκινητή (41 φορές), ενώ ο Sp3 σε μικρότερο, αλλά σημαντικό βαθμό (17,5 φορές). Αντίθετα ο Sp2 δεν είναι ικανός να ενεργοποιήσει τον υποκινητή αυτό, γεγονός που βρίσκεται σε απόλυτη συμφωνία με την Εικόνα 22, όπου φαίνεται ότι ο Sp2 δεν είναι ικανός να προσδεθεί στον p21 υποκινητή. Όταν μεταλλάξαμε τη θέση 3, που όπως είδαμε εμφανίζει το δραματικότερο φαινότυπο, όσον αφορά την ενεργοποίηση του p21 υποκινητή σε άλλες κυτταρικές σειρές, όχι μόνο δεν είχαμε μείωση της ενεργοποίησης του μεταλλαγμένου p21 υποκινητή, αλλά αντίθετα αύξηση αυτής από τους Sp1 και Sp3 (Εικόνα 42). Επομένως, η θέση 3 δε φαίνεται να απαιτείται για τη μεταγραφική ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από τους παράγοντες Sp1 και Sp3 σε κύτταρα SL2. Είναι πιθανό ότι στην περίπτωση της μετάλλαξης στη θέση 3, οι υπόλοιπες περιοχές 1, 2 4 και 5/6 μεσολαβούν για την ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από τους παράγοντες Sp1 και Sp3.

Από την άλλη μεριά, η αρνητική επίδραση της μεταλλαξιγένεσης της θέσης 3 στην ηπατική λειτουργία του p21 υποκινητή μπορεί να οφείλεται στην απώλεια συνεργασίας μεταξύ των Sp1 και Sp3 με παράγοντες που προσδένονται στη μακρινή περιοχή του p21 υποκινητή. Προκειμένου να αξιολογήσουμε την υπόθεση αυτή, καταφύγαμε σε παροδικές επιμολύνσεις κυττάρων HepG2, χρησιμοποιώντας τον αγρίου τύπου ή μεταλλαγμένους p21 υποκινητές. Ο πρώτος περιείχε μόνο την κοντινή περιοχή του p21 υποκινητή



Εικόνα 42 : Η σημασία της θέσης 3 στη μεταγραφική ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από τους παράγοντες Sp1/Sp3 σε κύτταρα SL2. Κύτταρα SL2 επιμολύνθηκαν παροδικά με πλασμιδιακούς φορείς που έφεραν το γονίδιο της λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο του αγρίου τύπου)-2325/+8)p21 υποκινητή ή του αντίστοιχου μεταλλαγμένου υποκινητή στη θέση 3, όπως φαίνεται και στο κάτω μέρος του ραβδογράμματος, απουσία και παρουσία φορέων έκφρασης των Sp1, Sp2 και Sp3. Ο βαθμός ενεργοποίησης του κάθε υποκινητή από τους παράγοντες αυτούς φαίνεται στο πάνω μέρος της κάθε ράβδου.

(-215/+8), ο δεύτερος ήταν ο αγρίου τύπου (-2325/+8), ενώ οι άλλοι δύο ήταν οι δύο παραπάνω με μεταλλάξεις στη θέση 3 (Εικόνα 43). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 43, οι μεταλλάξεις στη θέση 3 μείωσαν κατά 50% την ενεργότητα του p21(-215/+8) απουσία της ενισχυτικής περιοχής. Η ενεργότητα του μεταλλαγμένου υποκινητή δεν μπόρεσε να αυξηθεί από τη μακρινή περιοχή (-2325/-216) του p21 υποκινητή. Αντίθετα, ο αγρίου τύπου p21(-215/+8) υποκινητής ενισχύθηκε κατά 5 φορές όταν προσθέσαμε και τη μακρινή περιοχή. Τα αποτελέσματα των συγκεκριμένων επιμολύνσεων δείχνουν ότι οι μεταλλάξεις στη θέση 3 παρεμποδίζουν τις συνεργασιακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των Sp1 και Sp3 που προσδένονται στην κοντινή περιοχή του p21 υποκινητή και παραγόντων που προσδένονται στη μακρινή περιοχή του p21 υποκινητή.



Εικόνα 43 : Η σημασία της θέσης 3 στην ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από τον ενισχυτή. Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με τους υποκινητές που φαίνονται στο αριστερό μέρος της Εικόνας. Ο βαθμός ενεργοποίησης του αγρίου τύπου και του μεταλλαγμένου στη θέση 3 p21 υποκινητή από τη μακρινή περιοχή φαίνεται δίπλα στην αντίστοιχη ράβδο.

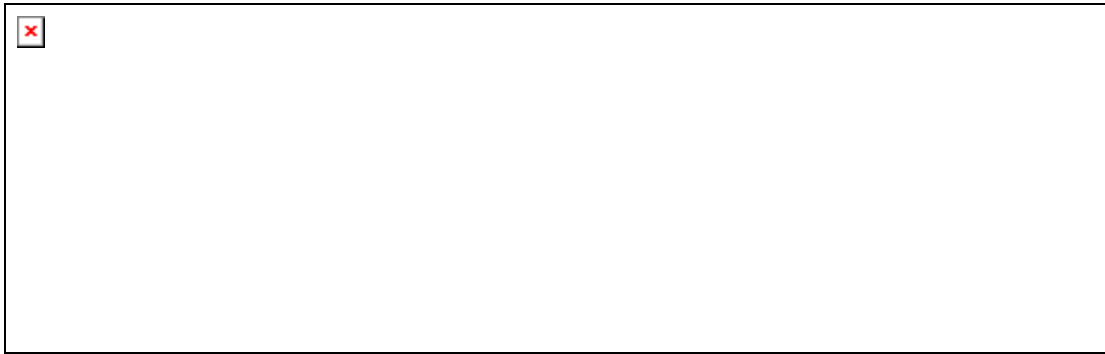
Η σημασία των παραγόντων της οικογένειας Sp1 στη μεταγραφική ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από την p53

Η ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 απαιτεί τις κοντινές θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα Sp1.

Αφού επιβεβαιώσαμε τη σημασία τόσο της μακρινής όσο και της κοντινής περιοχής του p21 υποκινητή στη βασική ενεργότητα του, θελήσαμε να μελετήσουμε πιο λεπτομερειακά τη σχέση που πιθανά να έχουν οι δύο αυτές περιοχές μεταξύ τους, στην περίπτωση της μεταγραφικής ενεργοποίησης του p21 υποκινητή από την πρωτεΐνη p53 που είδαμε ότι προσδένεται στην περιοχή του ενισχυτή. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήσαμε την ανθρώπινη κυτταρική σειρά κερατινοκυττάρων HaCaT. Τα κύτταρα αυτά περιέχουν δύο μεταλλαγμένα αλληλόμορφα του γονιδίου p53, τα οποία δεν είναι ικανά να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή του p21 υποκινητή (Datto et al, 1995). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 44, υπερέκφραση λειτουργικής p53 στα κύτταρα αυτά έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενεργότητας του p21 υποκινητή κατά 7 φορές. Όπως ήταν αναμενόμενο, η ενεργοποίηση αυτή χάθηκε όταν απαλείψαμε την μακρινή περιοχή -2325/-144 του p21 υποκινητή που φέρει τις δύο θέσεις πρόσδεσης της πρωτεΐνης p53. Το ίδιο αποτέλεσμα, όμως, είχε και η απαλοιφή της κοντινής περιοχής -122/-60 του p21 υποκινητή, που φέρει θέσεις πρόσδεσης του Sp1. Το αποτέλεσμα αυτό έδειξε ότι η ύπαρξη των δύο θέσεων πρόσδεσης της p53 στη μακρινή περιοχή δεν είναι αρκετή για την ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από την p53, αλλά απαιτούνται και οι θέσεις πρόσδεσης του Sp1 που εντοπίζονται στην κοντινή περιοχή.

Η ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από την p53 επιτυγχάνεται με λειτουργική συνεργασία μεταξύ της p53 και του Sp1 που προσδένεται στη θέση 3.

Όπως είδαμε παραπάνω, η p53 απαιτεί την κοντινή περιοχή του p21 υποκινητή προκειμένου να μπορέσει να τον ενεργοποιήσει. Το επόμενο ερώτημα που προκύπτει είναι αν όλες οι θέσεις πρόσδεσης του Sp1 είναι ικανές να διαμεσολαβήσουν την ενεργοποίηση αυτή ή μόνον κάποιες από



Εικόνα 44 : Η ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από την p53 απαιτεί την κοντινή περιοχή, που περιλαμβάνει τις θέσεις πρόσδεσης του Sp1. Κύτταρα HaCaT επιμολύνθηκαν παροδικά με τους υποκινητές που φαίνονται στο σχήμα, απουσία και παρουσία φορέα έκφρασης της p53. Ο βαθμός ενεργοποίησης του κάθε υποκινητή παρουσιάζεται στο αριστερό μέρος της Εικόνας. Οι θέσεις πρόσδεσης της p53 συμβολίζονται με κόκκινα οβάλς, ενώ αυτές του Sp1 με μπλε οβάλς. Οι διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν απαλοιφές του υποκινητή.

αυτές. Για να απαντήσουμε στο ερώτημα αυτό, χρησιμοποιήσαμε τους υποκινητές που φαίνονται στην Εικόνα 32, σε παροδικές επιμολύνσεις κυττάρων HaCaT, απουσία και παρουσία φορέα έκφρασης της p53. Όσον αφορά τα βασικά επίπεδα έκφρασης της p21, παρατηρούμε ότι οι διάφορες θέσεις πρόσδεσης του Sp1 δεν είναι ισοδύναμες μεταξύ τους, φαινόμενο που παρατηρήσαμε και στα κύτταρα HepG2 και COS-7 (Εικόνα 32). Και στην περίπτωση αυτή η μετάλλαξη στη θέση 3 (-82/-77) είχε τον πιο δραματικό φαινότυπο (μείωση στο 18% σε σχέση με την ενεργότητα του υποκινητή αγρίου τύπου) (Εικόνα 45). Επίσης, η μετάλλαξη στη θέση αυτή μείωσε αισθητά και την εξαρτημένη από p53 ενεργοποίηση του p21 υποκινητή (4,2 φορές έναντι 7 φορές του υποκινητή αγρίου τύπου). Αντίθετα, οι μεταλλάξεις στις υπόλοιπες θέσεις πρόσδεσης του Sp1, μείωσαν σε μικρότερο βαθμό τη βασική ενεργότητα του υποκινητή (40%-60%), ενώ δεν επηρέασαν σημαντικά ή και σε κάποιες περιπτώσεις αύξησαν την ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από p53 (Εικόνα 45). Τα αποτελέσματα της Εικόνας 45 δείχνουν ότι η θέση 3 είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 σε κύτταρα HaCaT.

Στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε παροδικές επιμολύνσεις κυττάρων SL2. Χρησιμοποιήσαμε τον αγρίου τύπου (-2325/+8) p21 υποκινητή, αυτόν που φέρει μεταλλάξεις στη θέση 3 και αυτόν που δε διαθέτει τις 4 από τις 6 θέσεις πρόσδεσης του Sp1 (Εικόνα 46). Παρατηρούμε ότι ο αγρίου τύπου υποκινητής p21(-2325/+8) έχει εξαιρετικά χαμηλή ενεργότητα στα κύτταρα αυτά κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Η υπερέκφραση του Sp1 οδηγεί σε μια δραστική αύξηση στην ενεργότητα του συγκεκριμένου υποκινητή (81 φορές σε σχέση με την ενεργοποίηση χωρίς Sp1). Από την άλλη μεριά, η υπερέκφραση της p53 δεν έχει κανένα αποτέλεσμα στην ενεργότητα του υποκινητή αυτού. Τέλος, η συνέκφραση των δύο παραγόντων (Sp1 και p53) έχει ως αποτέλεσμα τη συνεργασιακή ενεργοποίηση του p21 υποκινητή η οποία ήταν κατά 7 φορές ισχυρότερη από την αθροιστική ενεργοποίηση που προκύπτει από την ανεξάρτητη ενεργοποίηση του υποκινητή από τους δύο παράγοντες. Αυτό σημαίνει ότι ο Sp1 είναι απαραίτητος για την εξαρτημένη από p53 ενεργοποίηση του p21 υποκινητή.

Στη συνέχεια χρησιμοποιήσαμε το μεταλλαγμένο στη θέση 3 (-2325/+8) p21 υποκινητή και παρατηρήσαμε ότι η καταστροφή της συγκεκριμένης θέσης



Εικόνα 45 : Η θέση πρόσδεσης 3 του Sp1 είναι υπεύθυνη για την εξαρτημένη από την p53 ενεργοποίηση του p21 υποκινητή. Κύτταρα HaCaT επιμολύνθηκαν παροδικά με τους υποκινητές που φαίνονται στο κάτω μέρος του ραβδογράμματος (περισσότερες λεπτομέρειες στην Εικόνα 13), απουσία και παρουσία φορέα έκφρασης της p53. Τα επίπεδα ενεργοποίησης του κάθε υποκινητή από την p53 φαίνονται στο πάνω μέρος του ραβδογράμματος.



Εικόνα 46 : Σημασία του παράγοντα Sp1 στην εξαρτημένη από p53 ενεργοποίηση του p21 υποκινητή. Κύτταρα SL2 επιμολύνθηκαν παροδικά με τους υποκινητές που εμφανίζονται στο κάτω μέρος του ραβδογράμματος, απουσία και παρουσία φορέων έκφρασης του Sp1 και της p53, ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό. Ο βαθμός ενεργοποίησης των υποκινητών, καθώς και η ενίσχυση της ενεργοποίησης από την p53 φαίνονται στο πάνω μέρος του ραβδογράμματος.

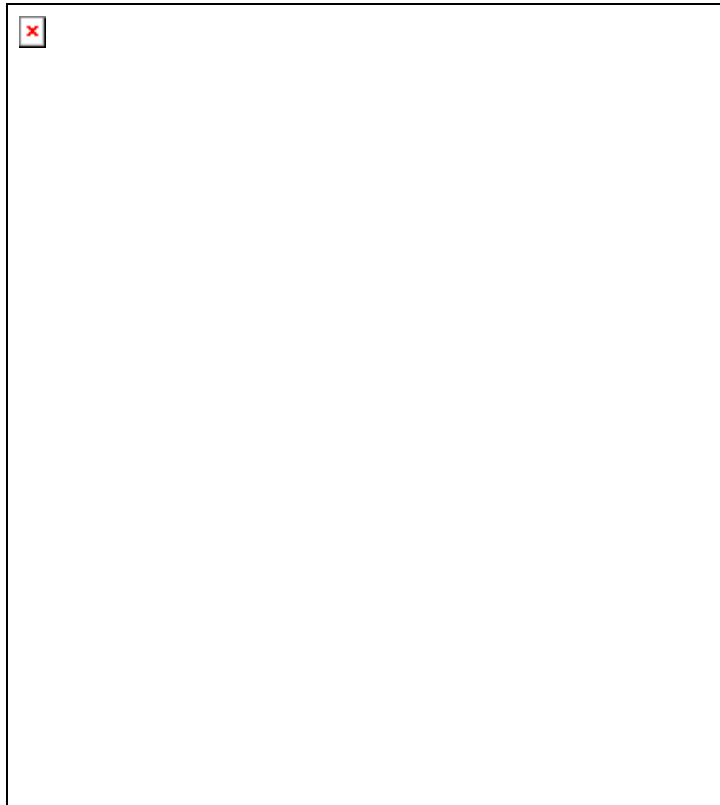
δεν επηρέασε την ενεργοποίηση του υποκινητή αυτού από τον Sp1, αλλά αντίθετα μείωσε σημαντικά τη συνεργασιακή ενεργοποίηση του p21 υποκινητή τους παράγοντες Sp1 και p53 (2,7 φορές), σε σχέση με την ενεργοποίηση του υποκινητή αγρίου τύπου από τους δύο αυτούς παράγοντες (7 φορές).

Τέλος, η απαλοιφή της κοντινής περιοχής (-122/-60) του p21 υποκινητή παρεμπόδισε την ενεργοποίησή του τόσο από τον Sp1 όσο και από τη συνεργασία των Sp1 και p53.

Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν μια λειτουργική συνεργασία μεταξύ του παράγοντα Sp1 και της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53, στη μεταγραφική ρύθμιση του p21 υποκινητή.

Η πρόσδεση της p53 στο DNA είναι απαραίτητη για τη λειτουργική της συνεργασία με τον Sp1.

Το ερώτημα που προκύπτει μετά από τις παραπάνω παρατηρήσεις είναι αν η πρόσδεση της p53 στο DNA είναι απαραίτητη για τη λειτουργική της αλληλεπίδραση με τον παράγοντα Sp1. Για να απαντήσουμε στο ερώτημα αυτό πραγματοποιήσαμε παροδικές επιμολύνσεις κυττάρων SL2, χρησιμοποιώντας τον (-215/+8)p21 υποκινητή ο οποίος περιλαμβάνει μόνο την κοντινή περιοχή, καθώς και τον (-2325/-2260)(-215/+8)p21 υποκινητή, ο οποίος περιλαμβάνει την κοντινή περιοχή (-215/+8) και τη μακρινή περιοχή (-2325/-2260), η οποία αποτελεί θέση πρόσδεσης της πρωτεΐνης p53 (Εικόνα 47). Όπως βλέπουμε στην Εικόνα 47A, η p53 δεν είναι ικανή να ενεργοποιήσει την κοντινή περιοχή του p21 υποκινητή, ακόμη και παρουσία Sp1. Αντίθετα, όταν στην κοντινή περιοχή προσαρτηθεί και τουλάχιστο μία θέση πρόσδεσης της p53, τότε ο συνδυασμός p53 και Sp1 ενεργοποιεί σε σημαντικό βαθμό τον υποκινητή αυτό (3 φορές περισσότερο από το άθροισμα της ενεργοποίησης του κάθε παράγοντα ανεξάρτητα). Όλα τα παραπάνω απεικονίζονται σχηματικά στην Εικόνα 47(B-C), όπου φαίνεται ότι η p53 δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον Sp1 που προσδέεται στην κοντινή περιοχή του p21 υποκινητή, αν προηγουμένως δεν έχει προσδεθεί και η ίδια στη θέση πρόσδεσής της.



Εικόνα 47 : Η πρόσδεση της p53 στον p21 υποκινητή είναι αναγκαία για τη λειτουργική συνεργασία με τον Sp1. A) Κύτταρα SL2 επιμολύνθηκαν παροδικά με τους υποκινητές που φαίνονται στο κάτω μέρος του ραβδογράμματος, απουσία και παρουσία φορέων έκφρασης των Sp1 και p53, ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό. Ο βαθμός ενεργοποίησης των υποκινητών, καθώς και η ενίσχυση της ενεργοποίησης από την p53 φαίνονται στο πάνω μέρος του ραβδογράμματος. B-C) Σχηματική αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης των p53 και Sp1 στον p21 υποκινητή. Οι θέσεις πρόσδεσης του Sp1 συμβολίζονται με μπλε οβάλ και αυτή της p53 με κίτρινο οβάλ. Με X συμβολίζονται οι αλληλεπιδράσεις που δεν υφίστανται.

Η μεταγραφική ενεργότητα της p53 είναι απαραίτητη για τη λειτουργική συνεργασία της πρωτεΐνης με τον Sp1 για την ενεργοποίηση του p21 υποκινητή.

Είναι, όμως, αρκετή η πρόσδεση της p53 στη μακρινή περιοχή του p21 υποκινητή, ώστε να αλληλεπιδράσει με τον Sp1 και να ενεργοποιήσουν συνεργιστικά τον υποκινητή αυτόν ή πρέπει η p53 να είναι και λειτουργικά ενεργή; Για να εξακριβώσουμε τι ακριβώς συμβαίνει, χρησιμοποιήσαμε μια μεταλλαγμένη μορφή της p53, η οποία περιέχει μια διπλή σημειακή μετάλλαξη στην περιοχή ενεργοποίησής της. Η Leu²³ έχει αντικατασταθεί με Gln, και η Trp²³ με Ser (Εικόνα 48A). Η μορφή αυτή χρησιμοποιήθηκε σε παροδικές επιμολύνσεις κυττάρων Saos-2, τα οποία δεν εκφράζουν ενδογενώς πρωτεΐνη p53. Η υπερέκφραση της μορφής αυτής δεν κατάφερε να ενεργοποιήσει τον p21 υποκινητή, σε αντίθεση με την υπερέκφραση της p53 αγρίου τύπου, η οποία ενεργοποιεί το συγκεκριμένο υποκινητή κατά 8,2 φορές (Εικόνα 48B).

Στη συνέχεια χρησιμοποιήσαμε τα κύτταρα SL2, στα οποία με παροδικές επιμολύνσεις παρατηρήσαμε ότι η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη (p53^{22,23}) δεν μπορεί να συνεργαστεί με τον Sp1, προκειμένου να ενεργοποιήσουν συνεργασιακά τον p21 υποκινητή (Εικόνα 48C), παρόλο που όπως θα δούμε παρακάτω η p53^{22,23} αλληλεπιδρά με τον Sp1 στον ίδιο βαθμό με αυτόν που αλληλεπιδρά και η αγρίου τύπου p53 (Εικόνα 49C). Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην Εικόνα 48 συμπεραίνουμε ότι η συνεργασιακή ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από τις πρωτεΐνες p53 και Sp1 συμβαίνει μόνον όταν η πρωτεΐνη p53 είναι μεταγραφικά ενεργή.



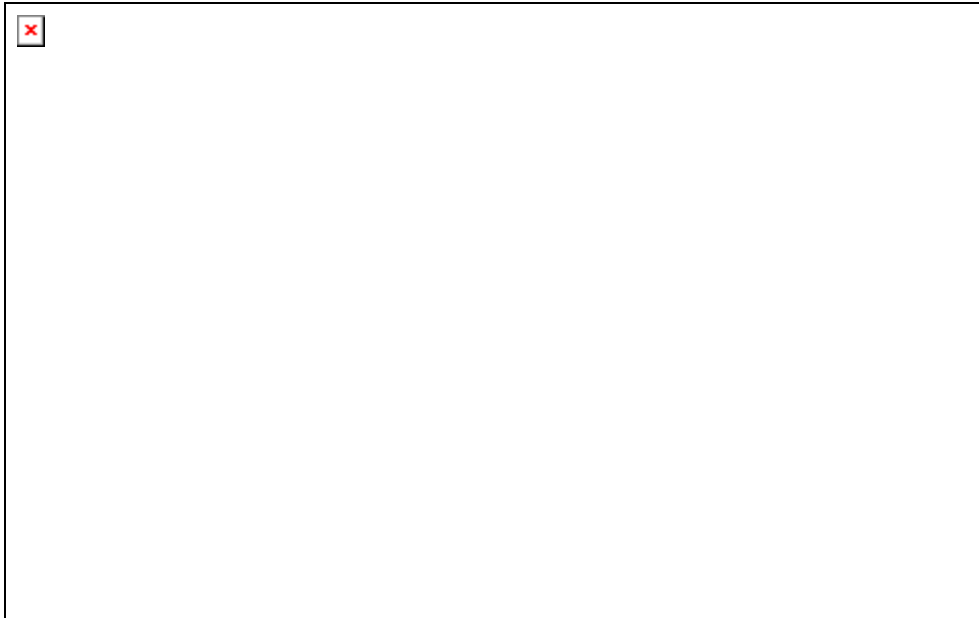
Εικόνα 48 : Η συνεργιστική ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από Sp1 και p53 απαιτεί μεταγραφικά ενεργή p53. A) Σχηματική αναπαράσταση των μορφών της p53 που χρησιμοποιήθηκαν στις επιμολύνσεις κυττάρων Saos-2 και SL2. Σε παρένθεση φαίνονται οι μεταλλάξεις της αμινο-τερματικής περιοχής της p53. B) Κύτταρα Sao-2 επιμολύνθηκαν παροδικά με τον p21 υποκινητή, απουσία και παρουσία των δύο μορφών της p53. Η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη δεν είναι ικανή να ενεργοποιήσει τον p21, υποκινητή σε αντίθεση με την πρωτεΐνη αγρίου τύπου. Ο βαθμός ενεργοποίησης του υποκινητή από την κάθε μορφή της p53 φαίνεται στο πάνω μέρος του ραβδογράμματος. C) Κύτταρα SL2 επιμολύνθηκαν παροδικά με τον p21 υποκινητή, απουσία και παρουσία φορέων έκφρασης των Sp1, p53 και p53^{22,23}, ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό. Η μεταλλαγμένη p53 δεν μπορεί να συνεργασθεί με τον Sp1 και να ενεργοποιήσουν τον p21 υποκινητή, σε αντίθεση με αυτήν αγρίου τύπου που ενισχύει 11 φορές την αθροιστική ενεργοποίηση του υποκινητή από τον κάθε παράγοντα ανεξάρτητα.

Η p53 αλληλεπιδρά άμεσα με την Sp1 in vitro.

Η λειτουργική συνεργασία μεταξύ του Sp1 και της p53 που λαμβάνει χώρα στον p21 υποκινητή, υποδεικνύει ότι οι δύο αυτοί παράγοντες αλληλεπιδρούν και άμεσα μεταξύ τους. Αρχικά, μελετήσαμε τις φυσικές αλληλεπιδράσεις των δύο παραγόντων *in vitro* με ανάλυση GST pull down. Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκε ένας πλασμιδιακός φορέας που έφερε την πρωτεΐνη Sp1 (αμινοξέα 83-778) ενωμένη στο αμινο-τερματικό άκρο της με την GST (Εικόνα 49A). Τόσο η χιμαιρική αυτή πρωτεΐνη, όσο και η GST μόνη της εκφράστηκαν σε βακτήρια, καθαρίστηκαν και ενώθηκαν σε σφαιρίδια γλουταθιόνης-αγαρόζης (Εικόνα 49B). Τα σφαιρίδια που φέρουν τη χιμαιρική GST-Sp1 και την GST χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα για την πρόσδεση των πρωτεϊνών p53 και p53^{22,23} που μεταγράφηκαν και μεταφράστηκαν *in vitro* παρουσία σημασμένης μεθειονίνης. Όπως βλέπουμε και στην Εικόνα 49C, τόσο η p53, όσο και η p53^{22,23} προσδένονται ισχυρά και άμεσα στην πρωτεΐνη GST-Sp1, αλλά όχι και στη GST, γεγονός που υποδηλώνει ειδικές φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ p53 και Sp1. Τα ευρήματα αυτά δείχνουν, επίσης, ότι η διπλή μετάλλαξη στην περιοχή ενεργοποίησης της p53 (p53^{22,23}) δεν επηρέασε την άμεση, φυσική αλληλεπίδρασή της με την πρωτεΐνη Sp1.

Η p53 αλληλεπιδρά άμεσα με την Sp1 in vivo.

Αφού επιβεβαιώσαμε σε πρώτο στάδιο ότι η p53 μπορεί να αλληλεπιδράσει άμεσα με τον παράγοντα Sp1 *in vitro*, θελήσαμε να ελέγξουμε ότι αυτό συμβαίνει και σε *in vivo* συνθήκες. Για το λόγο αυτό καταφύγαμε στη μέθοδο της συν-ανοσοκατακρήμνισης πρωτεϊνών. Απομονώσαμε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από ινοβλάστες νεφρού πιθήκου (COS-7), τα οποία είναι πλούσια στις πρωτεΐνες Sp1 και p53. Τα εκχυλίσματα αυτά τα επώασαμε με αντίσωμα ειδικό έναντι της Sp1, ώστε να ανοσοκατακρημνίσουμε τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη μαζί με όλους τους παράγοντες που προσδένονται με αυτήν. Στο πείραμα ελέγχου χρησιμοποιήσαμε τα ίδια εκχυλίσματα, χωρίς αντίσωμα έναντι της Sp1. Στη συνέχεια τα σύμπλοκα αντίσωμα-Sp1 ενώθηκαν σε σφαιρίδια σεφαρόζης πρωτεΐνης-G και οι πρωτεΐνες που



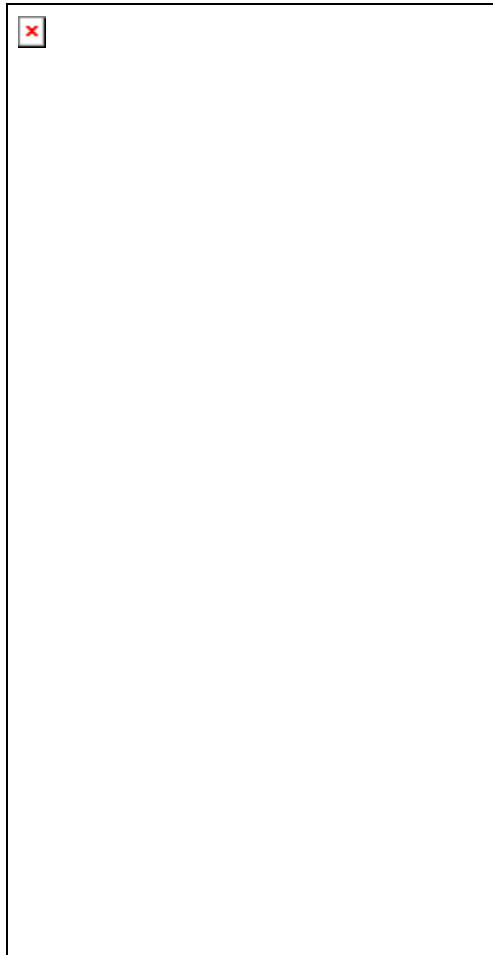
Εικόνα 49 : Φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ Sp1 και p53 *in vitro*. A) Σχηματική αναπαράσταση του Sp1 αγρίου τύπου, που χρησιμοποιήθηκε στις αναλύσεις GST pull down που παρουσιάζονται στο τμήμα C. Οι περιοχές Ser/Thr συμβολίζονται με γαλάζιο ορθογώνιο, οι περιοχές Glu με πράσινο. Οι δακτύλιοι ψευδαργύρου, που απαρτίζουν την περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DBD) συμβολίζονται με 3 κόκκινα ορθογώνια ενώ με +/- συμβολίζονται φορτισμένες ακολουθίες που ρυθμίζουν τη μεταγραφική ενεργότητα του Sp1. Τέλος, με κίτρινα ορθογώνια συμβολίζεται η GST πρωτεΐνη. B) πρότυπα έκφρασης των GST και GST-Sp1 πρωτεϊνών που εκφράστηκαν σε βακτήρια DH10β, όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών φαίνονται στο αριστερό τμήμα της Εικόνας (σε kDa), ενώ οι αστερίσκοι σημειώνουν τη θέση των GST-Sp1 πρωτεϊνών. C) Οι πρωτεΐνες p53 και p53(22,23) εκφράστηκαν *in vitro*, παρουσία σημασμένης Μεθειονίνης (Υλικά-Μέθοδοι) και επωάσθηκαν με τις GST και GST-Sp1, που είχαν προηγουμένως προσδεθεί σε σφαιρίδια. Τόσο η p53, όσο και p53(22,23) προσδένονται αποκλειστικά στη GST-Sp1 και όχι στη GST. Η θέση των p53 μορφών σημειώνεται με βέλη. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών φαίνονται στο αριστερό μέρος της Εικόνας. Το Input αντιπροσωπεύει του 20% της πρωτεΐνης που επωάσθηκε με τα σφαιρίδια.

κατακρημνίσθηκαν χρησιμοποιήθηκαν σε ανάλυση ανοσοεντοπισμού με αντίσωμα έναντι της p53. Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 50A, η πρωτεΐνη p53 ανοσοκατακρημνίσθηκε μαζί με τον παράγοντα Sp1. Αντίθετα, δεν ανιχνεύθηκε πρωτεΐνη p53 στην αντίδραση ελέγχου, όπου δε χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της Sp1. Η ανοσοκατακρήμνιση της Sp1 ελέγχθηκε στην ίδια μεμβράνη με ανάλυση ανοσοεντοπισμού με αντίσωμα έναντι της Sp1 (Εικόνα 50B). Επίσης, η p53 δεν ανιχνεύθηκε σε ακόμη μια αντίδραση ελέγχου, όπου αντί για αντίσωμα έναντι της Sp1 προστέθηκε αντίσωμα έναντι του μεταγραφικού παράγοντα του σακχαρομύκητα GAL4. Όλα τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν φυσικές και άμεσες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ενδογενών πρωτεϊνών Sp1 και p53 *in vivo*.

Οι περιοχές A, B και DBD της πρωτεΐνης Sp1 αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη p53.

Αφού επιβεβαιώσαμε ότι η Sp1 αλληλεπιδρά άμεσα με την p53, θελήσαμε να εντοπίσουμε τις περιοχές της πρωτεΐνης αυτής που είναι υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση αυτή. Για τον εντοπισμό αυτόν, καταφύγαμε σε *in vitro* πειράματα GST pull down, στα οποία διάφορα τμήματα της Sp1 ενώθηκαν σε σειρά με την GST στο αμινο-τερματικό τους άκρο και στη συνέχεια αναλύθηκαν ως προς την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη p53.

Αρχικά, χρησιμοποιήσαμε τις μεταλλαγμένες μορφές της Sp1, Sp1 516C (ΔA), η οποία δε διαθέτει την περιοχή ενεργοποίησης A, Sp1 Δint349 (ΔB+C), η οποία δε διαθέτει την περιοχή ενεργοποίησης B και τη ρυθμιστική περιοχή C και Sp1 N619 (ΔD), η οποία δε διαθέτει την περιοχή D που είναι υπεύθυνη για τη συνεργασία μεταξύ των Sp1 μορίων (Εικόνα 51A). Όλες αυτές οι μεταλλαγμένες μορφές που βρίσκονται σε σειρά με τη GST, εκφράσθηκαν σε βακτήρια και ενώθηκαν με σφαιρίδια γλουταθιόνης-αγαρόζης (Εικόνα 51B). Στη συνέχεια επώασθηκαν με πρωτεΐνη p53, που εκφράσθηκε *in vitro*, παρουσία σημασμένης μεθειονίνης. Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 51C, όλες οι μεταλλαγμένες μορφές της πρωτεΐνης Sp1 προσδένονται ισχυρά στην p53 και μάλιστα στον ίδιο βαθμό με την αγρίου τύπου Sp1 πρωτεΐνη (Εικόνα 50C). Τα αποτελέσματα αυτά μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι



Εικόνα 50 : Φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ Sp1 και p53 *in vivo*. A-B) εκχυλίσματα από κύτταρα COS-7 χρησιμοποιήθηκαν σε ανάλυση ανοσοκατακρήμνισης είτε με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του Sp1 είτε χωρίς αντίσωμα είτε με αντίσωμα έναντι του GAL4. Οι πρωτεΐνες που ανοσοκατακρήμνίσθηκαν χρησιμοποιήθηκαν σε ανάλυση ανοσοεντοπισμού με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της p53 (A) ή του αντισώματος έναντι του Sp1 που χρησιμοποιήθηκε αρχικά στην ανοσοκατακρήμνιση (B). Οι θέσεις των p53 και Sp1 σημειώνονται με βέλη. IgG(HC), βαριά αλυσίδα του IgG αντισώματος.



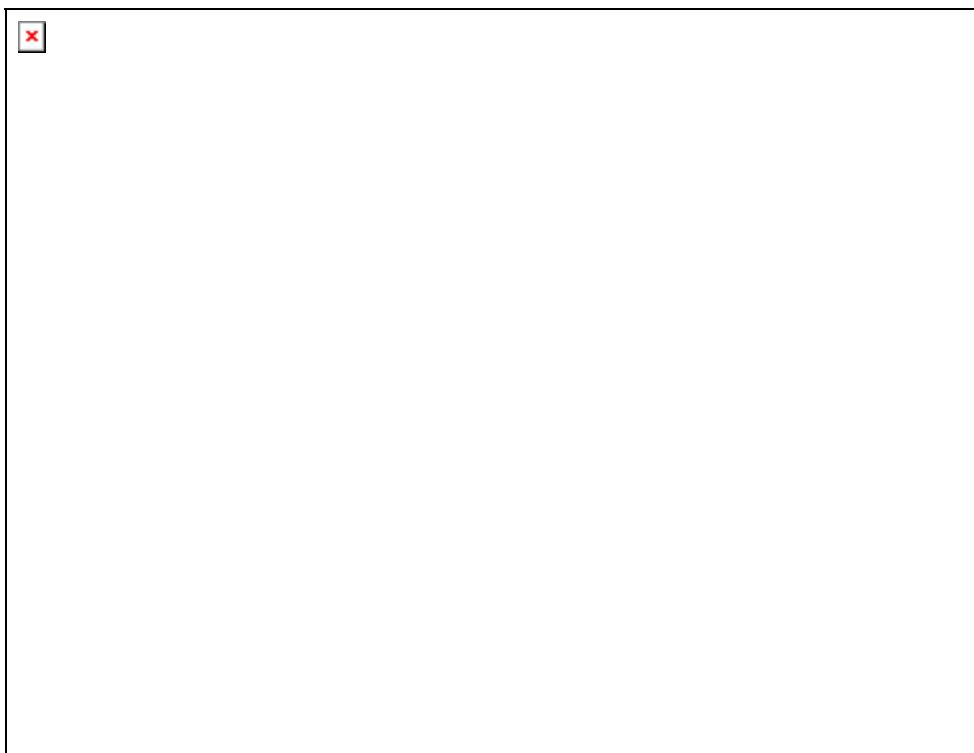
Εικόνα 51 : Φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ Sp1 και p53 *in vitro*. A) Σχηματική αναπαράσταση του Sp1 αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις GST που παρουσιάζονται παρακάτω. Οι περιοχές Ser/Thr συμβολίζονται με γαλάζιο ορθογώνιο, οι περιοχές Glu με πράσινο. Οι δακτύλιοι ψευδαργύρου συμβολίζονται με 3 κόκκινα ορθογώνια (περιοχή πρόσδεσης στο DNA, ενώ με +/- συμβολίζονται ακολουθίες που ρυθμίζουν τη μεταγραφική ενεργότητα του Sp1. Τέλος, με κίτρινα ορθογώνια είναι η GST πρωτεΐνη. B) πρότυπα έκφρασης των GST και των μεταλλαγμένων GST-Sp1 πρωτεϊνών που εκφράστηκαν σε βακτήρια DH10β, όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών φαίνονται στο αριστερό τμήμα της Εικόνας (σε kDa), ενώ οι αστερίσκοι σημειώνουν τη θέση των μεταλλαγμένων GST-Sp1 πρωτεϊνών. C) Η πρωτεΐνη p53 εκφράστηκε *in vitro*, παρουσία σημασμένης Μεθειονίνης (Υλικά-Μέθοδοι) και επωάσθηκε με τις GST και τις μεταλλαγμένες GST-Sp1, που είχαν προηγουμένως προσδεθεί σε σφαιρίδια. Η p53 προσδένεται αποκλειστικά στις μεταλλαγμένες GST-Sp1 και όχι στη GST. Η θέση της p53 σημειώνεται με βέλη. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών φαίνονται στο αριστερό μέρος της Εικόνας. Το Input αντιπροσωπεύει του 20% της πρωτεΐνης που επωάσθηκε με τα σφαιρίδια.

αλληλεπιδράσεις της p53 με την Sp1 γίνονται μέσω της περιοχής πρόσδεσης στο DNA της τελευταίας, η οποία είναι κοινή σε όλες τις μεταλλαγμένες μορφές και πιθανά μέσω των περιοχών ενεργοποίησης A και B, εφόσον τουλάχιστον μία από αυτές υπάρχει σε κάθε μεταλλαγμένη μορφή.

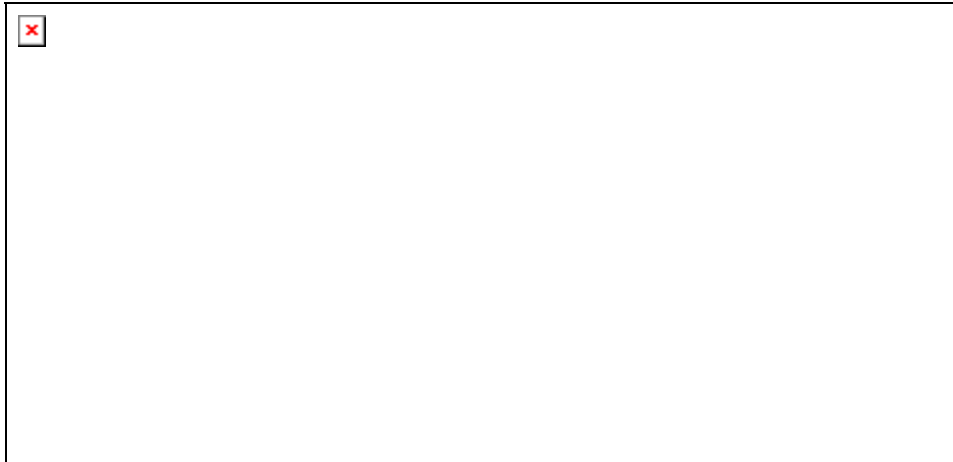
Προκειμένου να χαρακτηρίσουμε με μεγαλύτερη σαφήνεια τις περιοχές της Sp1 που είναι υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση με την p53, δημιουργήσαμε χιμαιρικές πρωτεΐνες GST με κάθε μια από τις περιοχές της πρωτεΐνης Sp1. Έτσι δημιουργήσαμε τις GST-Sp1A (aa 83-62), GST-Sp1B (aa 263-542), GST-Sp1C (aa 543-610), GST-Sp1DBD (aa 611-701) και GST-Sp1D (aa 702-778) (Εικόνα 52A). Οι πρωτεΐνες αυτές εκφράστηκαν σε βακτήρια και ενώθηκαν με σφαιρίδια γλουταθιόνης-αγαρόζης (Εικόνα 52B). Στη συνέχεια επώασθησαν με πρωτεΐνη p53 που εκφράστηκε *in vitro* παρουσία σημασμένης μεθειονίνης. Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 52C, σε επιβεβαίωση των προηγούμενων πειραμάτων μας, οι περιοχές ενεργοποίησης A και B, καθώς και η περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DBD) της πρωτεΐνης Sp1 είναι αυτές που αλληλεπιδρούν με την p53.

Για να επιβεβαιώσουμε με μεγαλύτερη ακρίβεια ότι οι παραπάνω περιοχές της Sp1 είναι ικανές για την πρόσδεση στην p53, χρησιμοποιήσαμε p53 πρωτεΐνη, η οποία έφερε στο αμινο-τερματικό της άκρο τον επίτοπο 6-His. Η πρωτεΐνη 6His-p53 εκφράστηκε στα βακτήρια και απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας, χρησιμοποιώντας στήλη Ni²⁺ (Εικόνα 53A και Υλικά-Μέθοδοι) και χρησιμοποιήθηκε σε ανάλυση GST pull down, όπου επώασθη με GST και GST-Sp1 αγρίου τύπου και GST-Sp1 που φέρουν τις περιοχές A και B. Η αλληλεπίδραση αναλύθηκε με ανοσοεντοπισμό χρησιμοποιώντας μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του επιτόπου 6His. Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 53B, η p53 προσδένεται επιλεκτικά και ισχυρά τόσο με την Sp1 αγρίου τύπου, όσο και με τις περιοχές A και B της Sp1. Περαιτέρω διαχωρισμός της περιοχής ενεργοποίησης B (Εικόνες 52A και 52B), έδειξε ότι το τμήμα που είναι πλούσιο σε Ser-Thr (αμινοξέα 263-424), είναι ικανό να προσδεθεί άμεσα στην p53 (Εικόνα 53C).

Σε παράλληλο πείραμα, η περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DBD) της πρωτεΐνης Sp1 ενώθηκε σε σειρά με τον επίτοπο 6His, εκφράστηκε σε βακτήρια και απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας (Εικόνα 54A). Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε σε ανάλυση GST pull down, όπου επώασθη με



Εικόνα 52 : Φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ Sp1 και p53 *in vitro*. A) Σχηματική αναπαράσταση του Sp1 αγρίου τύπου και των υποπεριοχών του, που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις GST που παρουσιάζονται παρακάτω. Οι περιοχές Ser/Thr συμβολίζονται με γαλάζιο ορθογώνιο, οι περιοχές Glu με πράσινο. Οι δακτύλιοι ψευδαργύρου συμβολίζονται με 3 κόκκινα ορθογώνια (περιοχή πρόσδεσης στο DNA, ενώ μ +/- συμβολίζονται ακολουθίες που ρυθμίζουν τη μεταγραφική ενεργότητα του Sp1. Τέλος, με κίτρινα ορθογώνια είναι η GST πρωτεΐνη. B) πρότυπα έκφρασης των GST, GST-Sp1 και GST-Sp1 υποπεριοχών πρωτεϊνών που εκφράστηκαν σε βακτήρια DH10β, όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών φαίνονται στο αριστερό τμήμα της Εικόνας (σε kDa), ενώ οι αστερίσκοι σημειώνουν τη θέση των GST-Sp1 πρωτεϊνών. C) Η πρωτεΐνη p53 εκφράστηκε *in vitro*, παρουσία σημασμένης Μεθειονίνης (Υλικά-Μέθοδοι) και επωάσθηκε με τις GST, GST-Sp1 και GST-Sp1 υποπεριοχές, που είχαν προηγουμένως προσδεθεί σε σφαιρίδια. Η p53 προσδένεται αποκλειστικά στις GST-Sp1 και όχι στη GST. Η θέση της p53 σημειώνεται με βέλη. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών φαίνονται στο αριστερό μέρος της Εικόνας. Το Input αντιπροσωπεύει του 20% της πρωτεΐνης που επωάσθηκε με τα σφαιρίδια.



Εικόνα 53 : Φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ Sp1 και p53 *in vitro*. A) πρότυπο έκφρασης της p53 που εκφράστηκε σε βακτήρια και απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας. B) Η p53 επώασθηκε με τις GST, GST-Sp1 αγρίου τύπου και GST-Sp1 που έφεραν τις περιοχές A και B, που είχαν προηγουμένως προσδεθεί σε σφαιρίδια. Η p53 προσδένεται αποκλειστικά στις GST-Sp1 πρωτεΐνες και όχι στη GST. C) Η p53 επώασθηκε με τη GST και τις περιοχές της B, B_n(263-424) και B_c(242-542), οι οποίες έχουν ενωθεί με την GST. Η p53 προσδένεται αποκλειστικά στην περιοχή Sp1-B_n, που είναι πλούσια σε Ser/Thr. Η θέση της p53 σημειώνεται με βέλη. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών φαίνονται στο αριστερό μέρος της Εικόνας (σε kDa). Το Input αντιπροσωπεύει του 20% της πρωτεΐνης που επώασθηκε με τα σφαιρίδια.



Εικόνα 54 : Φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ Sp1 και p53 *in vitro*. A) πρότυπο έκφρασης της Sp1-DBD που εκφράστηκε σε βακτήρια και απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας. B) Η Sp1-DBD επώασθηκε με τις GST και GST-p53, που είχαν προηγουμένως προσδεθεί σε σφαιρίδια. Η Sp1-DBD προσδένεται αποκλειστικά στη GST-p53 πρωτεΐνες και όχι στη GST. Η θέση της Sp1-DBD σημειώνεται με βέλη. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών φαίνονται στο αριστερό μέρος της Εικόνας (σε kDa). Το Input αντιπροσωπεύει του 20% της πρωτεΐνης που επώασθηκε με τα σφαιρίδια.

GST και GST-p53, που είχαν προηγουμένως συνδεθεί σε σφαιρίδια γλουταθιόνης-αγαρόζης. Και στη περίπτωση αυτή η περιοχή πρόσδεσης στο DNA της πρωτεΐνης Sp1 προσδέθηκε ειδικά και ισχυρά με την p53 (Εικόνα 54B), επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της Εικόνας 52C.

Περιοχές της πρωτεΐνης Sp1 που συμβάλλουν στη λειτουργική συνεργασία της με την p53 για την ενεργοποίηση του p21 υποκινητή.

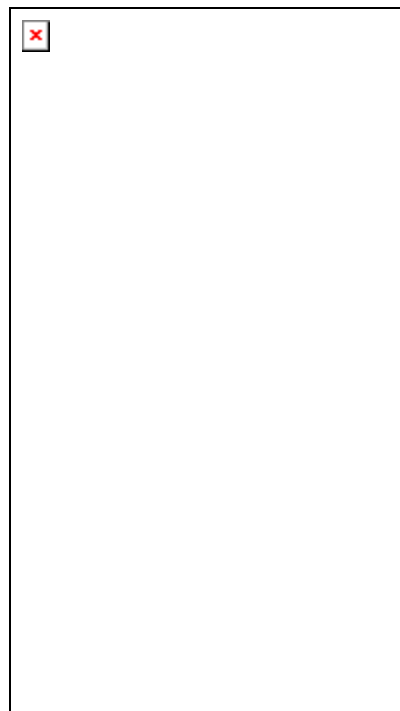
Αφού επιβεβαιώσαμε ότι οι περιοχές ενεργοποίησης A και B, καθώς και η περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DBD) της Sp1 πρωτεΐνης είναι υπεύθυνες για την πρόσδεση στην p53, θελήσαμε να ελέγξουμε τη συνεισφορά των διαφόρων λειτουργικών περιοχών στη λειτουργική συνεργασία της Sp1 με την p53, προκειμένου να ενεργοποιήσουν τον p21 υποκινητή. Έτσι χρησιμοποιήσαμε μεταλλαγμένες μορφές του παράγοντα Sp1, οι οποίες διαθέτουν απαλοιφές συγκεκριμένων περιοχών (Εικόνα 55A) και οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να προσδένονται στον p21 υποκινητή (Εικόνα 55B).

Οι μεταλλαγμένες αυτές μορφές του Sp1 χρησιμοποιήθηκαν σε παροδικές επιμολύνσεις κυττάρων SL2. Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 56, η μεταλλαγμένη μορφή Sp1 (ΔC), η οποία περιλαμβάνει μια εσωτερική απαλοιφή της ρυθμιστικής περιοχής C, ενεργοποιεί τον p21 υποκινητή σε πολύ μεγάλο βαθμό, ο οποίος ξεπερνάει περίπου κατά 8 φορές αυτόν της ενεργοποίησης του συγκεκριμένου υποκινητή από τον Sp1 αγρίου τύπου. Αυτό πιθανά να οφείλεται στην απαλοιφή μιας κατασταλτικής ακολουθίας που εντοπίζεται στη συγκεκριμένη περιοχή του Sp1. Είναι αξιοσημείωτο να αναφέρουμε, ότι στην αντίστοιχη θέση της πρωτεΐνης Sp3 εντοπίζεται μια κατασταλτική περιοχή ή οποία είναι υπεύθυνη για την ακετυλίωση και τη σουμυλίωση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης (Braun et al, 2001; Ross et al, 2002; Sapetschnig et al, 2002).

Η ταυτόχρονη απαλοιφή των περιοχών B και C της Sp1, οδήγησε σε αύξηση της ενεργότητας του p21 υποκινητή κατά 3 φορές σε σχέση με την ενεργοποίηση από τον Sp1 αγρίου τύπου, γεγονός που πιθανό να οφείλεται στο ότι η μορφή αυτή δε διαθέτει πλέον την περιοχή ενεργοποίησης B. Τέλος, η μεταλλαγμένη μορφή που δε διαθέτει την περιοχή ενεργοποίησης A, δεν



Εικόνα 55 : Συνεισφορά των λειτουργικών περιοχών του παράγοντα Sp1 στη μεταγραφική συνεργασία με την p53 για την ενεργοποίηση του p21 υποκινητή. Α) Σχηματική αναπαράσταση των Sp1 αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών, που χρησιμοποιήθηκαν στις παροδικές επιμολύνσεις της Εικόνας 37. Β) Ο Sp1 αγρίου τύπου και οι μεταλλαγμένες μορφές εκφράστηκαν σε κύτταρα SL2, και το πρωτεϊνικό εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε σε πείραμα ηλεκτροφορητικής κινητικότητας συμπλόκου, ώστε να επιβεβαιωθεί η ικανότητα των μορφών αυτών να προσδένονται στον p21 υποκινητή. Ως ανιχνευτής χρησιμοποιήθηκε σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο που αντιστοιχεί στη θέση 3 του p21 υποκινητή.



Εικόνα 56 : Η σημασία των λειτουργικών περιοχών του Sp1 στην ενεργοποίηση του p21 υποκινητή. Κύτταρα SL2 επιμολύνθηκαν παροδικά με τις μεταλλαγμένες μορφές του Sp1, που φαίνονται στην Εικόνα 36Α. Η μεταγραφική ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από την αγρίου τύπου Sp1 και τις ελλειμματικές μορφές της Sp1, παρουσιάζεται με τη μορφή ράβδων.

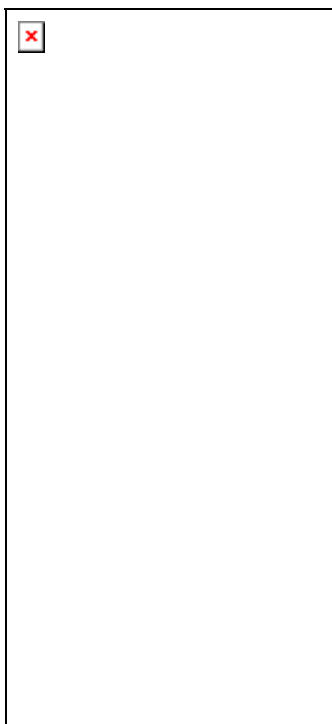
είναι ικανή να ενεργοποιήσει τον p21 υποκινητή, γεγονός που συμφωνεί απόλυτα με προηγούμενες μελέτες (Persengiev et al, 1995).

Στη συνέχεια θελήσαμε να μελετήσουμε την ικανότητα αυτών των Sp1 μορφών στην ενεργοποίηση του p21 υποκινητή σε συνεργασία με την p53. Πραγματοποιήσαμε παροδικές επιμολύνσεις κυττάρων SL2, χρησιμοποιώντας τις Sp1 μορφές της Εικόνας 55A, παρουσία φορέα έκφρασης της p53 (Εικόνα 57). Στο ραβδόγραμμα αυτό εμφανίζεται ο βαθμός ενεργοποίησης του p21 υποκινητή από τη συνεργασία της κάθε Sp1 μορφής και με την p53, ο οποίος υπολογίζεται ως ο λόγος του βαθμού ενεργοποίησης και από τις δύο πρωτεΐνες ταυτόχρονα προς το άθροισμα της ενεργοποίησης από την κάθε πρωτεΐνη χωριστά. Ο βαθμός ενεργοποίησης για την Sp1 αγρίου τύπου ήταν 10 φορές, ενώ η απαλοιφή περιοχών της Sp1 οδήγησε στη μείωση της ενεργοποίησης κατά 2,5-3 φορές. Αυτό συνεπάγεται ότι η ακεραιότητα του Sp1 είναι απαραίτητη για τη λειτουργική του συνεργασία με την p53 με σκοπό την ενεργοποίηση του p21 υποκινητή.

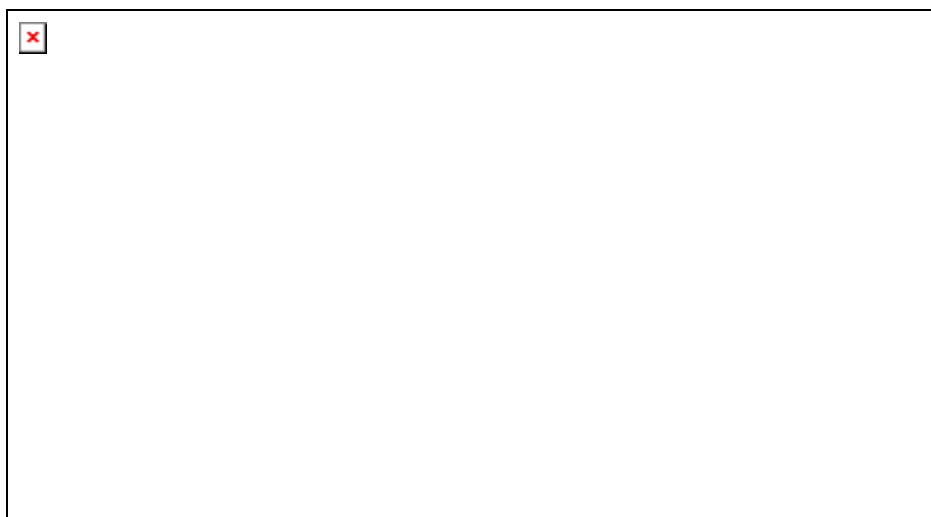
Η καρβοξυ-τερματική περιοχή της p53 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Sp1.

Αφού επιβεβαιώσαμε ότι οι πρωτεΐνες Sp1 και p53 μπορούν να αλληλεπιδράσουν άμεσα μέσω των περιοχών A, B και DBD της πρωτεΐνης Sp1, θελήσαμε να προσδιορίσουμε τις περιοχές της p53 που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση αυτή. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε μια σειρά από μεταλλαγμένες μορφές της p53 με ελλείμματα είτε στο αμινο-τερματικό άκρο, είτε στο καρβοξυ-τερματικό άκρο, είτε εσωτερικά. Οι περιοχές στις οποίες πραγματοποιήθηκαν τα ελλείμματα ήταν η περιοχή ενεργοποίησης (TAD, aa 20-60), η περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DBD, aa 102-292), η περιοχή ολιγομερισμού (OD, aa 324-355) και η καρβοξυ-τερματική ρυθμιστική περιοχή (RD, aa367-393) (Εικόνα 58).

Τόσο η αγρίου τύπου μορφή, όσο και οι ελλειμματικές χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα GST pull down. Οι πρωτεΐνες αυτές εκφράστηκαν *in vitro*, παρουσία σημασμένης μεθειονίνης και επωάσθηκαν με GST και GST-Sp1, που εκφράστηκαν σε βακτήρια, αφού προηγουμένως είχαν ενωθεί σε σφαιρίδια γλουταθιόνης-αγαρόζης. Όπως παρατηρούμε στην



Εικόνα 57 : Σημασία των λειτουργικών περιοχών της Sp1 στην ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από την p53. Κύτταρα SL2 επιμολύνθηκαν παροδικά με τις μορφές της Sp1, που φαίνονται στην Εικόνα 36A, παρουσία φορέα έκφρασης της p53. Ο βαθμός ενεργοποίησης από τη συνεργασία των δύο πρωτεϊνών φαίνεται στο πάνω μέρος της κάθε ράβδου.



Εικόνα 58 : Σχηματική αναπαράσταση των μεταλλαγμένων μορφών της p53, που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της περιοχής αλληλεπίδρασης με τον Sp1. TAD : περιοχή ενεργοποίησης, DBD : περιοχή πρόσδεσης στο DNA, OD : περιοχή ολιγομερισμού, RD : ρυθμιστική περιοχή.

Εικόνα 59Α, οι μεταλλαγμένες μορφές p53Δ(3-79), p53Δ(13-19) και p53Δ(34-70), που εμφανίζουν ελλείμματα στο αμινο-τερματικό άκρο, έχουν τη δυνατότητα να προσδένονται στην πρωτεΐνη Sp1, στον ίδιο βαθμό που προσδένεται και η p53 αγρίου τύπου.

Από την άλλη μεριά, η απαλοιφή περιοχών στο καρβοξυ-τερματικό άκρο της p53 πρωτεΐνης είχε ως αποτέλεσμα είτε τη μείωση της πρόσδεσης στην πρωτεΐνη Sp1 [p53Δ(300-321) και p53Δ(363-393)], είτε την ολική αδυναμία πρόσδεσης στην πρωτεΐνη αυτή [p53Δ(293-393)].

Προς επιβεβαίωση των παραπάνω, χρησιμοποιήσαμε δύο μορφές της p53, από τις οποίες η πρώτη φέρει την αμινο-τερματική περιοχή (αμινοξέα 1-160) και η δεύτερη την καρβοξυ-τερματική (αμινοξέα 160-393). Η περιοχή που περιέχει τα αμινοξέα 1-160 δεν είναι ικανή να προσδεθεί στην Sp1, ενώ αυτή που διαθέτει τα αμινοξέα 160-393 προσδένεται στον ίδιο βαθμό με αυτόν της αγρίου τύπου p53 (Εικόνα 59Β). Από τα αποτελέσματα της Εικόνας 59 συμπεραίνουμε ότι η καρβοξυ-τερματική περιοχή της p53 είναι αυτή που συμμετέχει στην άμεση αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη Sp1.

Η σημασία των λειτουργικών περιοχών της p53 στην ενεργοποίηση του p21 υποκινητή.

Αφού επιβεβαιώσαμε ότι η καρβοξυ-τερματική περιοχή της πρωτεΐνης p53 είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση στον παράγοντα Sp1, θελήσαμε να προσδιορίσουμε τη σημασία της κάθε περιοχής στη λειτουργική συνεργασία της πρωτεΐνης με τον Sp1, προκειμένου να ενεργοποιήσουν τον p21 υποκινητή. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήσαμε τις ελλειμματικές μορφές της p53 (Εικόνα 59) σε παροδικές επιμολύνσεις κυττάρων COS-7, ώστε να ελέγξουμε αν είναι ικανές να ενεργοποιήσουν τον p21 υποκινητή. Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 60Α, η υπερέκφραση της p53 αγρίου τύπου ενεργοποιεί τον υποκινητή κατά 24 φορές. Η ελλειμματική μορφή p53Δ(13-19), στην οποία η περιοχή ενεργοποίησης παραμένει άθικτη, ενεργοποιεί τον p21 υποκινητή σε σημαντικό βαθμό (16 φορές). Αντίθετα, τα ελλείμματα που περικλείουν όλη ή μέρος της περιοχής ενεργοποίησης (Δ3-74, Δ34-78) δεν είναι σε θέση να ενεργοποιήσουν το συγκεκριμένο υποκινητή ή τον ενεργοποιούν σε ελάχιστο βαθμό.



Εικόνα 59: Φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ Sp1 και p53 *in vitro*. Οι πρωτεΐνες p53, αγρίου τύπου και ελλειμματικές που φαίνονται στην Εικόνα 39, εκφράσθηκαν *in vitro*, παρουσία σημασμένης μεθειονίνης και επωάσθηκαν με GST και GST-Sp1, εκφρασμένων σε βακτήρια και συνδεδεμένων σε σφαιρίδια γλουταθιόνης-αγαρόζης. Τόσο η αγρίου τύπου p53, όσο και οι ελλειμματικές στο αμινο-τερματικό άκρο, προσδένονται στον ίδιο βαθμό με την Sp1 και όχι με τη GST. Από την άλλη, οι ελλειμματικές στο καρβοξυ-τερματικό άκρο μορφές, είτε προσδένονται ασθενικά [p53Δ(300-321), p53Δ(363-393)], είτε δεν προσδένονται καθόλου [p53Δ(293-393)] στην Sp1. Η θέση των p53 μορφών σημειώνεται με αγκύλη (A) ή με βέλος (B). Το Input αντιπροσωπεύει του 20% της πρωτεΐνης που επωάσθηκε με τα σφαιρίδια.

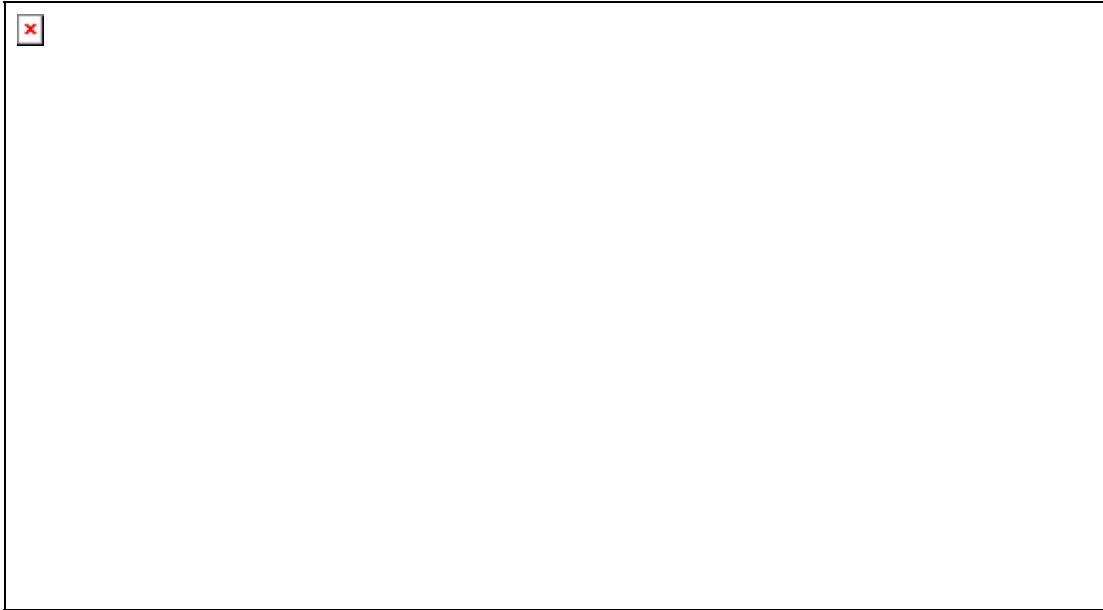
Όσον αφορά τα καρβοξυ-τερματικά ελλείμματα, οι μορφές p53Δ(300-321) και p53Δ(363-393) είναι σε θέση να ενεργοποιήσουν τον υποκινητή σε σημαντικό βαθμό, παρόλο που από τη δεύτερη απουσιάζει η ρυθμιστική περιοχή. Όταν, όμως, αφαιρέθηκαν τα 100 τελευταία αμινοξέα, τα οποία περιλαμβάνουν τόσο τη ρυθμιστική, όσο και την περιοχή ολιγομερισμού, η ενεργοποίηση μειώθηκε σε πολύ σημαντικό βαθμό (κατά 6 φορές). Επομένως, φαίνεται ότι πέρα από την περιοχή ενεργοποίησης, και η καρβοξυ-τερματική περιοχή της p53 είναι σημαντική για την ενεργοποίηση του p21 υποκινητή, πιθανά γιατί διαμεσολαβεί στην πρόσδεση και τη λειτουργική συνεργασία με τον παράγοντα Sp1.

Για να ελέγξουμε ότι οι παραπάνω διαφορές στην ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από τις ελλειμματικές μορφές της p53 δεν οφείλονται σε διαφορετική έκφραση των πρωτεϊνών μετά την παροδική επιμόλυνση, χρησιμοποιήσαμε ανάλυση ανοσοεντοπισμού και επιβεβαιώσαμε ότι όλες οι p53 μορφές εκφράζονται στον ίδιο βαθμό (Εικόνα 60B).

Η πρωτεΐνη Sp3 συνεργάζεται λειτουργικά με την p53 για την ενεργοποίηση του p21 υποκινητή.

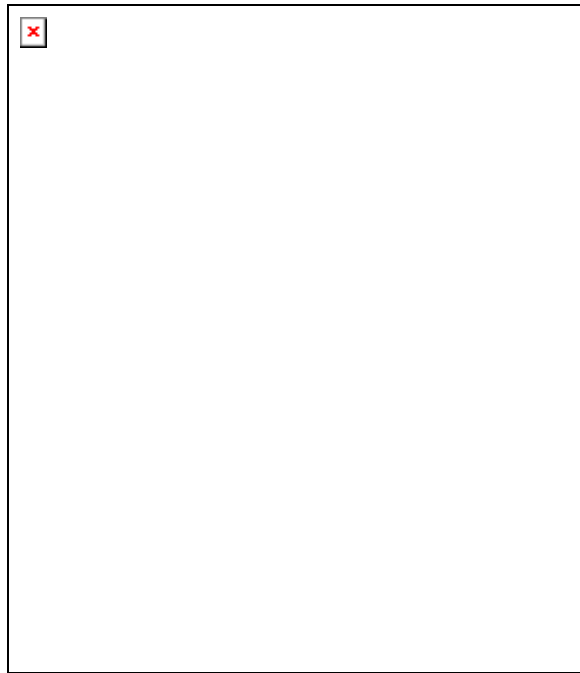
Όπως, είδαμε στις Εικόνες 21 και 22, στην κοντινή περιοχή του p21 υποκινητή δεν προσδένεται μόνον ο παράγοντας Sp1, αλλά και ο Sp3 με την ίδια συγγένεια, ενώ ο Sp2 δεν έχει τη δυνατότητα πρόσδεσης στην περιοχή αυτή. Για το λόγο αυτό θελήσαμε να μελετήσουμε αν ο Sp3 μπορεί να αλληλεπιδράσει άμεσα με την p53, ώστε να ενεργοποιήσουν συνεργασιακά τον p21 υποκινητή. Αρχικά, εξετάσαμε το κατά πόσο οι δύο αυτοί παράγοντες (Sp3 και p53) συνεργάζονται για την ενεργοποίηση του συγκεκριμένου υποκινητή. Επιμόλυνουμε παροδικά κύτταρα SL2 με φορείς έκφρασης των Sp1, Sp2 και Sp3 ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό με φορέα έκφρασης της p53. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 61, τόσο ο Sp1, όσο και ο Sp3 ενεργοποιούν σημαντικά τον (2325/+8)p21 υποκινητή σε παρόμοιο βαθμό, ενώ ο Sp2 αδυνατεί να ενεργοποιήσει τον υποκινητή αυτό.

Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της Εικόνας 46, η p53 δεν είναι ικανή από μόνη της να ενεργοποιήσει τον p21 υποκινητή, αλλά σε συνδυασμό με τον Sp1 ενεργοποιούν συνεργασιακά τον p21 υποκινητή. Εκτός, όμως, από



Εικόνα 60 : Η σημασία των περιοχών της p53 στην ενεργοποίηση του p21 υποκινητή.

A) κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης που έφεραν την αγρίου τύπου και τις ελλειμματικές μορφές της p53, που φαίνονται στην Εικόνα 39. Τα αμινο-τερματικά ελλείμματα που απαλοΐφουν όλη ή μέρος της περιοχής ενεργοποίησης [p53Δ(3-74), p53Δ(34-78)] ελαττώνουν σε σημαντικό βαθμό την ενεργοποίηση του p21 υποκινητή, ενώ η μορφή που αφήνει άθικτη την περιοχή αυτή δεν επηρεάζει το βαθμό ενεργοποίησης. Τα καρβοξυ-τερματικά ελλείμματα p53Δ(300-321) και p53Δ(363-393) δεν επηρεάζουν την ενεργοποίηση του υποκινητή, ενώ η απαλοιφή των 100 τελευταίων αμινοξέων [p53Δ(293-393)] οδηγεί σε σημαντική μείωση της ενεργοποίησης. B) Πρότυπο έκφρασης των ελλειμματικών μορφών της p53 σε κύτταρα COS-7. Η ανάλυση ανοσοεντοπισμού με αντίσωμα έναντι των p53, δείχνει ίδιο βαθμό έκφρασης της αγρίου τύπου και των ελλειμματικών p53. Με αστερίσκο χαρακτηρίζεται η ελλειμματική μορφή η οποία δεν εντοπίζεται από το συγκεκριμένο αντίσωμα, καθώς δε διαθέτει τον επίτοπο τον οποίο αναγνωρίζει το συγκεκριμένο αντίσωμα.



Εικόνα 61 : Λειτουργική συνεργασία των Sp3 και p53 στην ενεργοποίηση του p21 υποκινητή. Κύτταρα SL2 επιμολύνθηκαν με φορείς έκφρασης των Sp1, Sp2 και Sp3 ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό με φορέα έκφρασης της p53. Ο p21 υποκινητής, που χρησιμοποιήθηκε ως υποκινητής αναφοράς, ενεργοποιείται από τους παράγοντες Sp1 και Sp3, αλλά όχι από τον Sp2. Τόσο ο Sp1, όσο και ο Sp3 έχουν τη δυνατότητα να συνεργάζονται με την p53 και να ενεργοποιούν συνεργασιακά το συγκεκριμένο υποκινητή.

τον Sp1 παρατηρούμε ότι και ο Sp3 έχει τη δυνατότητα να συνεργάζεται λειτουργικά με την p53 και να ενεργοποιούν τον p21 υποκινητή κατά ένα συνεργασιακό τρόπο, στον ίδιο μάλιστα βαθμό με αυτόν του Sp1 (Εικόνα 61). Επίσης, όπως αναμενόταν, με βάση τα αποτελέσματα της Εικόνας 22, ο Sp2 δε συνεργάζεται με την p53 για την ενεργοποίηση του p21 υποκινητή, καθώς δεν προσδένεται στον p21 υποκινητή.

Η p53 αλληλεπιδρά άμεσα με την Sp3 in vivo.

Αυτή η λειτουργική συνεργασία μεταξύ των Sp3 και p53 υποδεικνύει και μια άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Για να επιβεβαιώσουμε την υπόθεση αυτή, πραγματοποιήσαμε ανάλυση συν-ανοσοκατακρήμνισης, χρησιμοποιώντας τις ενδογενείς Sp3 και p53 που εκφράζουν τα κύτταρα COS-7. Τα εκχυλίσματα των κυττάρων αυτών τα επώασαμε με αντίσωμα ειδικό έναντι της p53, ώστε να ανοσοκατακρημνίσουμε τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη μαζί με όλους τους παράγοντες που προσδένονται με αυτήν. Στο πείραμα ελέγχου χρησιμοποιήσαμε τα ίδια εκχυλίσματα, με αντίσωμα έναντι του παράγοντα Myc. Στη συνέχεια τα σύμπλοκα αντίσωμα-p53 ενώθηκαν σε σφαιρίδια σεφαρόζης πρωτεΐνης-G και οι πρωτεΐνες που κατακρημνίσθηκαν χρησιμοποιήθηκαν σε ανάλυση ανοσοεντοπισμού με αντίσωμα έναντι της Sp3. Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 62A, η πρωτεΐνη Sp3 ανοσοκατακρημνίσθηκε μαζί με την πρωτεΐνη p53. Αντίθετα, δεν ανιχνεύθηκε πρωτεΐνη Sp3 στην αντίδραση ελέγχου, όπου χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι του Myc. Η ανοσοκατακρήμνιση της p53 ελέγχθηκε στην ίδια μεμβράνη με ανάλυση ανοσοεντοπισμού με αντίσωμα έναντι της p53 (Εικόνα 62B). Όλα τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν φυσικές και άμεσες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ενδογενών πρωτεϊνών Sp3 και p53 *in vivo*.

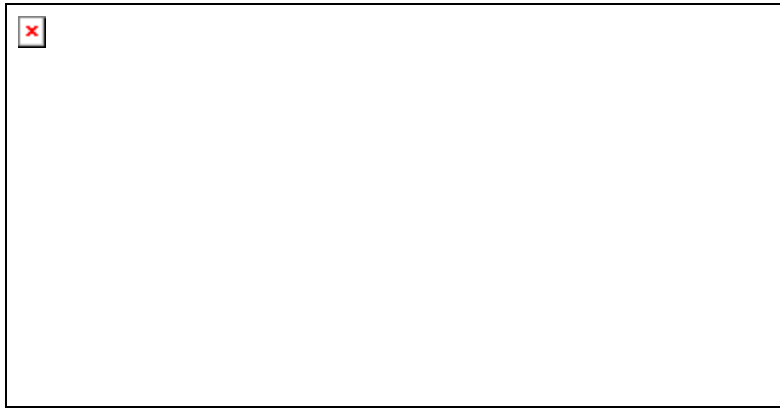


Εικόνα 62 : Φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ Sp3 και p53 *in vivo*. A-B) εκχυλίσματα από κύτταρα COS-7 χρησιμοποιήθηκαν σε ανάλυση ανοσοκατακρήμισης είτε με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της p53 είτε με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης Myc. Οι πρωτεΐνες που ανοσοκατακρημνίσθηκαν χρησιμοποιήθηκαν σε ανάλυση ανοσοεντοπισμού με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της Sp3 (A) ή του αντισώματος έναντι της p53 που χρησιμοποιήθηκε αρχικά στην ανοσοκατακρήμιση (B). Οι θέσεις των p53 και Sp3 σημειώνονται με βέλη.

Η καρβοξυ-τερματική περιοχή της p53 προσδένεται στον παράγοντα Sp3.

Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ των Sp3 και p53 είναι άμεση και δε διαμεσολαβείται από άλλους παράγοντες, που πιθανά παίζουν το ρόλο της γέφυρας, πραγματοποιήσαμε αναλύσεις GST pull down, χρησιμοποιώντας πρωτεΐνες GST και GST-Sp3 που εκφράστηκαν σε βακτήρια και ενώθηκαν σε σφαιρίδια γλουταθιόνης-αγαρόζης. Αυτές επωάσθηκαν με p53 εκφρασμένη *in vitro* παρουσία σημασμένης μεθειονίνης. Όπως παρατηρούμε στις πρώτες 3 διαδρομές της Εικόνας 63, η πρωτεΐνη p53 προσδένεται άμεσα στην GST-Sp3, αλλά όχι στη GST. Αυτό υποδηλώνει άμεση και ειδικά αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο αυτών πρωτεϊνών.

Αφού επιβεβαιώσαμε την άμεση πρόσδεση της p53 στην Sp3, θελήσαμε να ελέγξουμε ποιες περιοχές της p53 είναι υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση αυτή. Πραγματοποιήσαμε αναλύσεις GST pull down, χρησιμοποιώντας πρωτεΐνες GST και GST-Sp3 που εκφράστηκαν σε βακτήρια και ενώθηκαν σε σφαιρίδια γλουταθιόνης-αγαρόζης. Αυτές επωάσθηκαν με τις ελλειμματικές p53 μορφές (Εικόνα 58), οι οποίες εκφράστηκαν *in vitro*, παρουσία σημασμένης μεθειονίνης. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 63, τα ελλείμματα στο αμινο-τερματικό άκρο της p53 (Δ 3-79, Δ 34-78) δεν επηρεάζουν την πρόσδεσή της στην Sp3. Αντίθετα, τα ελλείμματα στο καρβοξυ-τερματικό άκρο (Δ 300-321, Δ 293-393, Δ 363-393) παρεμποδίζουν την πρόσδεση των δύο πρωτεϊνών. Επομένως, και στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ Sp3 και p53, η καρβοξυ-τερματική περιοχή της τελευταίας είναι αυτή που συμμετέχει.



Εικόνα 63 : Φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ Sp3 και p53 *in vitro*. Οι πρωτεΐνες p53, αγρίου τύπου και ελλειμματικές, εκφράσθηκαν *in vitro*, παρουσία σημασμένης μεθειονίνης και επώασθηκαν με GST και GST-Sp3, εκφρασμένων σε βακτήρια και συνδεδεμένων σε σφαιρίδια γλουταθιόνης-αγαρόζης. Τόσο η αγρίου τύπου p53, όσο και οι ελλειμματικές στο αμινο-τερματικό άκρο, προσδένονται στον ίδιο βαθμό με την Sp3, αλλά όχι με τη GST. Από την άλλη, οι ελλειμματικές στο καρβοξυ-τερματικό άκρο μορφές της p53 δεν προσδένονται καθόλου στην Sp3. Το Input αντιπροσωπεύει το 20% της πρωτεΐνης που επώασθηκε με τα σφαιρίδια.

Σημασία της καρβοξυ-τερματικής περιοχής της p53 στη λειτουργική συνεργασία της με τις Sp1/Sp3.

Προκειμένου να μελετήσουμε λεπτομερέστερα τη σημασία των 100 τελευταίων καρβοξυ-τερματικών αμινοξέων της p53 στη λειτουργική συνεργασία της με τις Sp1/Sp3, πραγματοποιήσαμε παροδικές επιμολύνσεις κυτάρων SL2, χρησιμοποιώντας τον υποκινητή που διαθέτει μόνον την κοντινή περιοχή του p21 υποκινητή και μια θέση πρόσδεσης της p53, ενωμένη στο αμινο-τερματικό άκρο της πρώτης (Εικόνα 64A).

Ο υποκινητής αυτός επιμολύνθηκε μαζί με φορείς έκφρασης των Sp1, Sp3, p53 και p53Δ(293-393) ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό. Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 64B, οι παράγοντες Sp1/Sp3 είναι ικανοί να ενεργοποιήσουν το συγκεκριμένο υποκινητή. Η συνέκφραση της p53 ενισχύει σημαντικά την ενεργοποίηση αυτή, γεγονός που συμφωνεί απόλυτα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην Εικόνα 61, όπου χρησιμοποιήσαμε τον p21 υποκινητή αγρίου τύπου. Η απαλοιφή, όμως, των 100 καρβοξυ-τερματικών αμινοξέων στη μορφή p53Δ(293-393) παρεμπόδισε τη λειτουργική συνεργασία της μορφής αυτής με τους παράγοντες Sp1/Sp3 και κατ' επέκταση τη συνεργασιακή ενεργοποίηση του υποκινητή αυτού. Έτσι, επιβεβαιώθηκε η σημασία της καρβοξυ-τερματικής περιοχής της p53 στις φυσικές και λειτουργικές αλληλεπιδράσεις με τα μέλη της οικογένειας Sp1.



Εικόνα 64 : Σημασία της καρβοξυ-τερματικής περιοχής της p53 στη λειτουργική συνεργασία με τα μέλη της οικογένειας Sp1. Α) Σχηματική αναπαράσταση του υποκινητή που χρησιμοποιήθηκε στις παροδικές επιμολύνσεις του πειράματος. Οι θέσεις πρόσδεσης των Sp1/Sp3 συμβολίζονται με μπλε οβάλς και της p53 με κόκκινο οβάλ. Β) Κύτταρα SL2 επιμολύνθηκαν παροδικά με τον υποκινητή της Εικόνας Α και φορείς έκφρασης των Sp1, Sp3, p53 και p53Δ(293-393) ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό, όπως φαίνεται στο κάτω μέρος του ραβδογράμματος.

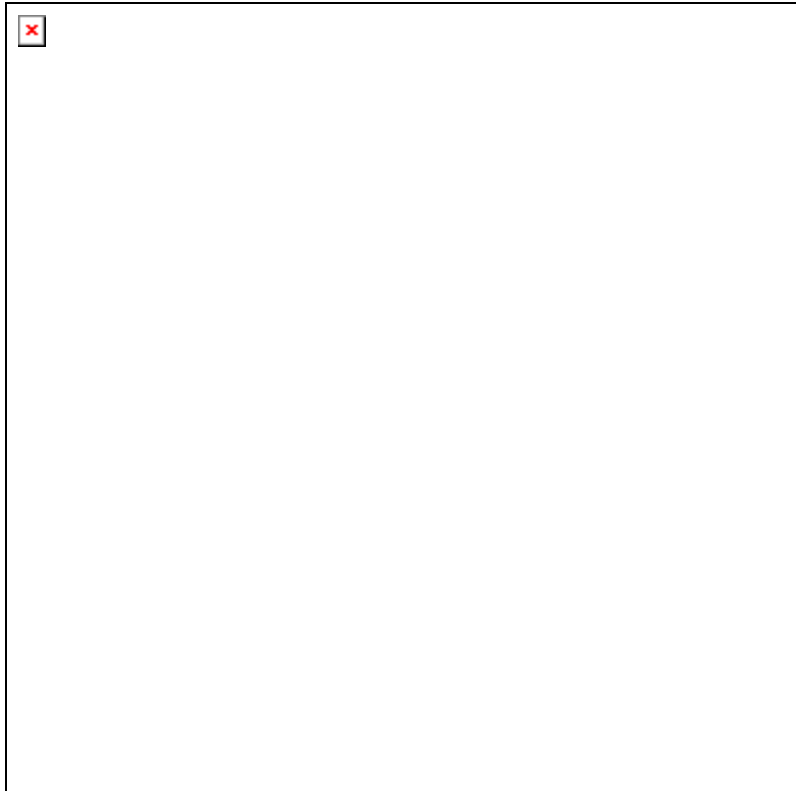
Η Sp1 αλληλεπιδρά φυσικά και λειτουργικά με την p73.

Αφού μελετήσαμε τις άμεσες και λειτουργικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ Sp1 και p53, καθώς και της p53 με τα άλλα μέλη της οικογένειας Sp1, θελήσαμε να προχωρήσουμε λίγο παραπάνω και να ελέγξουμε αν και η Sp1 μπορεί να αλληλεπιδράσει με άλλα μέλη της οικογένειας p53. Πιο συγκεκριμένα μελετήσαμε τις αλληλεπιδράσεις της Sp1 με την ομόλογη της p53 πρωτεΐνη, την p73, και μάλιστα με τις ισομορφές p73α και p73β. Οι ισομορφές αυτές διαθέτουν μια επιπλέον περιοχή ενεργοποίησης (TAD2) στο καρβοξυ-τερματικό τους άκρο, σε σχέση με την p53, ενώ η ισομορφή p73α διαθέτει μια επιπλέον περιοχή (SAM) που είναι υπεύθυνη για τις αλληλεπιδράσεις της με άλλες πρωτεΐνες (Εικόνα 65A).

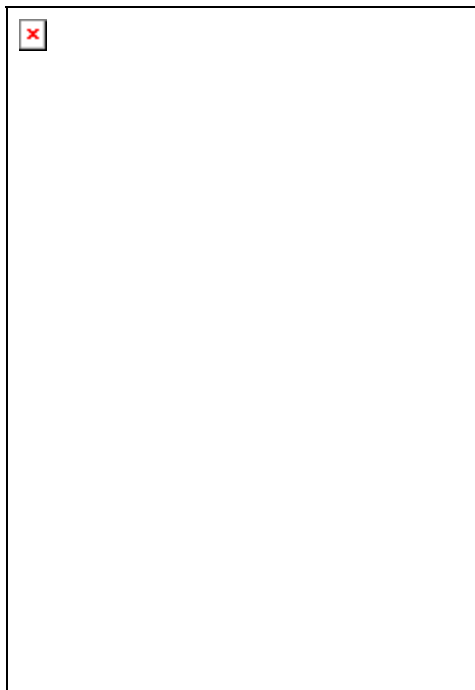
Στην αρχή ελέγξαμε το πρότυπο έκφρασης αυτών των δύο ισομορφών της p73 σε παροδικές επιμολύνσεις κυττάρων COS-7 και παρατηρήσαμε με ανοσοεντοπισμό, χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της p73, ότι και οι δύο ισομορφές εκφράζονται σε υψηλό και συγκρίσιμο βαθμό (Εικόνα 65B). Παρατηρήσαμε, επίσης, ότι τα κύτταρα COS-7, σε αντίθεση με την έκφραση της p53, δεν εκφράζουν ενδογενώς καμία από τις ισομορφές της p73.

Στη συνέχεια θελήσαμε να ελέγξουμε τη δυνατότητα των δύο ισομορφών της p73 να ενεργοποιήσουν τον p21 υποκινητή. Πραγματοποιήσαμε παροδικές επιμολύνσεις κυττάρων Saos-2, που όπως αναφέραμε δεν εκφράζουν ενδογενώς πρωτεΐνες της οικογένειας της p53. Όπως παρατηρούμε και στην Εικόνα 65C, και οι δύο μορφές (p73α και p73β) είναι ικανές να ενεργοποιούν σε μεγάλο βαθμό τον p21 υποκινητή (26 και 22 φορές, αντίστοιχα).

Στη συνέχεια διερευνήσαμε τη δυνατότητα των δύο αυτών ισομορφών να συνεργάζονται λειτουργικά με τον Sp1 στην ενεργοποίηση του p21 υποκινητή. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήσαμε παροδικές επιμολύνσεις κυττάρων SL2, χρησιμοποιώντας τον (-2325/+8)p21 υποκινητή και φορείς έκφρασης των Sp1, p73α και p73β, ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό. Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 66, οι ισομορφές της p73 από μόνες τους δεν είναι ικανές να ενεργοποιήσουν τον p21 υποκινητή στα κύτταρα αυτά, που δε διαθέτουν Sp1. Αντίθετα, παρουσία Sp1 και οι δύο ισομορφές της p73 ενεργοποιούν σε σημαντικό βαθμό τον p21 υποκινητή, γεγονός που



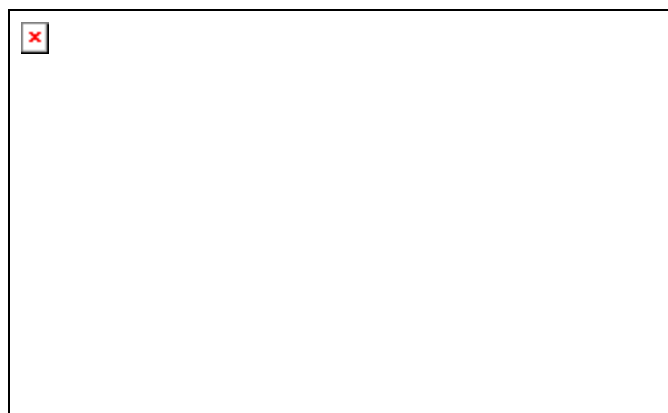
Εικόνα 65 : Η p73 ενεργοποιεί τον p21 υποκινητή. Α) Σχηματική αναπαράσταση της p53 και των ισομορφών p73α και p73β. Οι p73 διαθέτουν μια επιπλέον περιοχή ενεργοποίησης (TAD2), μια περιοχή SH3 (PXXP), ενώ η ισομορφή α διαθέτει και μια περιοχή που είναι υπεύθυνη για τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις (SAM). Β) Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με φορείς έκφρασης των p73α και p73β. Οι δύο ισομορφές εκφράζονται σε ικανοποιητικά επίπεδα και η θέση τους σημειώνεται με βέλη. Γ) Κύτταρα Saos-2 επιμολύνθηκαν παροδικά με τον p21 υποκινητή και φορείς έκφρασης των δύο ισομορφών της p73. Η ενεργότητα του p21 υποκινητή προσδιορίστηκε με αναλύσεις δραστηριότητας λουσιφεράσης. Και οι δύο ισομορφές ενεργοποιούν σημαντικά τον p21 υποκινητή.



Εικόνα 66 : Λειτουργική συνεργασία των p73 ισομορφών και της Sp1. Κύτταρα SL2 επιμολύνθηκαν παροδικά με τον p21 υποκινητή και φορείς έκφρασης των Sp1, p73α και p73β, ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό, όπως φαίνεται στο κάτω μέρος του ραβδογράμματος. Η σχετική δραστηριότητα (%) της λουσιφεράσης στα εκχυλίσματα των επιμολυσμένων κυττάρων παρουσιάζεται υπό τη μορφή ραβδογράμματος.

υποδηλώνει λειτουργική συνεργασία μεταξύ των πρωτεϊνών αυτών, ώστε να ενεργοποιήσουν συνεργασιακά τον παραπάνω υποκινητή.

Προκειμένου να εξακριβώσουμε ότι η λειτουργική αυτή συνεργασία οφείλεται σε άμεσες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των p73 ισομορφών και των Sp1/Sp3, πραγματοποιήσαμε ανάλυση GST pull down. Για το σκοπό αυτό, οι ισομορφές p73α και p73β εκφράστηκαν *in vitro* παρουσία σημασμένης μεθειονίνης. Στη συνέχεια επωάσθηκαν με πρωτεΐνες GST, GST-Sp1 και GST-Sp3, οι οποίες εκφράστηκαν σε βακτήρια και ενώθηκαν σε σφαιρίδια γλουταθιόνης-αγαρόζης. Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 67, και οι δύο p73 ισομορφές προσδένονται στις GST-Sp1 και GST-Sp3, αλλά όχι στη GST. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στις Εικόνες 65-67 δείχνουν ότι οι παράγοντες Sp1/Sp3 έχουν τη δυνατότητα να αλληλεπιδρούν άμεσα και να συνεργάζονται για την ενεργοποίηση του p21 υποκινητή, όχι μόνο με την p53, αλλά και με ένα άλλο μέλος της οικογένειας της p53, την p73.



Εικόνα 67 : Οι Sp1/Sp3 αλληλεπιδρούν άμεσα με τις p73 ισομορφές *in vitro*. Οι ισομορφές της p73 εκφράστηκαν *in vitro* παρουσία σημασμένης μεθειονίνης και επώασθηκαν με τις GST και GST-Sp1/GST-Sp3, που είχαν προηγουμένως προσδεθεί σε σφαιρίδια. Οι p73 προσδένονται αποκλειστικά στις GST-Sp1 και GST-Sp3, και όχι στη GST. Η θέση των p73 σημειώνεται με βέλη. Το Input αντιπροσωπεύει του 20% της πρωτεΐνης που επώασθηκε με τα σφαιρίδια.

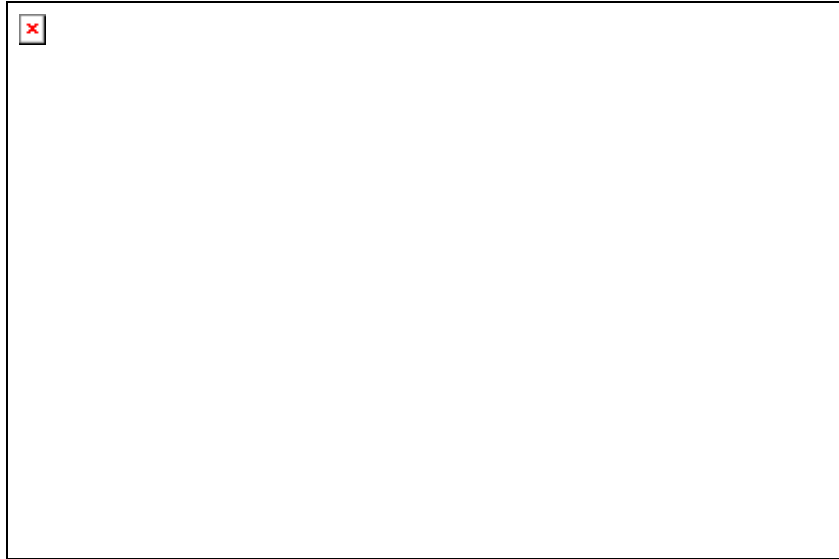
Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 στη μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων από γενετοξικό στρες

Η μεταγραφική ενεργοποίηση του p21 γονιδίου από χημειοθεραπευτικούς παράγοντες απαιτεί την κοντινή περιοχή του p21 υποκινητή.

Τα μέχρι τώρα αποτελέσματα μας ενισχύουν το σημαντικό ρόλο του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 και άλλων μελών της οικογένειάς του (Sp3) στην ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53. Για να διερευνήσουμε τον πιθανό ρόλο της Sp1 σε βιολογικές διεργασίες που εξαρτώνται από την πρωτεΐνη p53, όπως π.χ. η κυτταρική απόκριση στο γενετοξικό στρες που επάγεται από χημειοθεραπευτικές ενώσεις, χρησιμοποιήσαμε την ένωση 5-Fluorouracil (5-FU), η οποία έχει την ιδιότητα να προκαλεί βλάβες στο DNA και στο μεταβολισμό του RNA (Daher et al, 1990). Η 5-FU χρησιμοποιείται ευρύτατα ως χημειοθεραπευτική ουσία σε ποικίλες μορφές καρκίνων, όπως ο καρκίνος του πνεύμονα, του ορθού κ.α. (Macdonald and Gohmann, 1988).

Αρχικά, θελήσαμε να ελέγξουμε τη δράση της 5-FU στην αύξηση της p53 στα κύτταρα ηπατώματος HepG2, τα οποία χρησιμοποιήσαμε ως κυτταρικό σύστημα-μοντέλο στην έρευνά μας. Έτσι, επεξεργασθήκαμε κύτταρα HepG2 με τη 5-FU σε συγκέντρωση 50μg/ml για διαφορετικά χρονικά διαστήματα και πραγματοποιήσαμε ανάλυση ανοσοεντοπισμού με αντίσωμα έναντι της p53. Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 68, η 5-FU προκαλεί μια αύξηση της έκφρασης της p53 περίπου 4 ώρες μετά τη χορήγησή της. Η αύξηση αυτή συνεχίζεται με την πάροδο του χρόνου και φθάνει στο μέγιστο επίπεδο της μετά από 30 ώρες.

Στη συνέχεια χρησιμοποιήσαμε αντίσωμα έναντι της p21, προκειμένου να ελέγξουμε την έκφρασή της, σε σχέση με την έκφραση της p53. Παρατηρούμε μια καθυστερημένη αύξηση της p21 (περίπου 24 ώρες μετά τη χορήγηση της 5-FU), η οποία φθάνει σε μέγιστο επίπεδο περίπου στις 36 ώρες. Στο κάτω μέρος Εικόνας 68 παρατηρούμε τα επίπεδα έκφρασης της *α-tubulin* τα οποία παραμένουν σταθερά καθόλη τη διάρκεια του πειράματος.



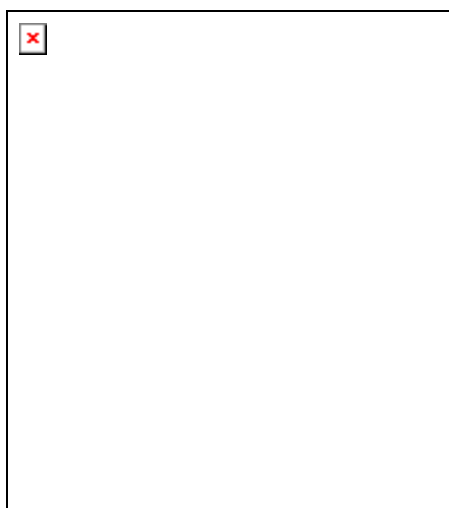
Εικόνα 68 : Η αύξηση της έκφρασης της p53 σε κύτταρα HepG2 συνοδεύεται από μια καθυστερημένη αύξηση της έκφρασης της p21, μετά από την επίδραση χημειοθεραπευτικού παράγοντα 5-FU. Κύτταρα HepG2 επεξεργάσθηκαν με 50 µg/ml 5-FU για διάφορα χρονικά διαστήματα, όπως 1, 2, 4, 8, 12, 24, 30 και 36 ώρες. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν σε ανάλυση ανοσοεντοπισμού. Ανώτερο τμήμα : ανοσοεντοπισμός με αντίσωμα έναντι της p53. Μεσαίο τμήμα : ανοσοεντοπισμός με αντίσωμα έναντι της p21. Κατώτερο τμήμα : ανοσοεντοπισμός με αντίσωμα έναντι της α -tubulin. Οι θέσεις των πρωτεϊνών σημειώνονται με βέλη.

Η αύξηση της p21 από 5-FU συμβαίνει σε μεταγραφικό επίπεδο.

Στη συνέχεια θελήσαμε να ελέγξουμε αν αυτή η αύξηση της p21 συμβαίνει σε μεταγραφικό ή μετα-μεταφραστικό επίπεδο. Πραγματοποιήσαμε ανάλυση PCR ανάστροφης μεταγραφής σε κύτταρα HepG2, στα οποία είχαμε επιδράσει με 5-FU για 24 ώρες. Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 69, 24 ώρες μετά τη χορήγηση του φαρμάκου έχουμε σημαντική αύξηση στα επίπεδα του mRNA του p21 γονιδίου. Ως πρωτεΐνη ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η όξινη ριβοσωμική φωσφοπρωτεΐνη ARPP0, τα επίπεδα μεταγραφής της οποίας παραμένουν σταθερά ακόμη και μετά τη χορήγηση του φαρμάκου.

Σημασία της κοντινής περιοχής του p21 υποκινητή στην ενεργοποίησή του από χημειοθεραπευτικούς παράγοντες.

Προκειμένου να μελετήσουμε τη σημασία της κοντινής περιοχής του p21 υποκινητή στην ενεργοποίησή του από το φάρμακο 5-FU, δημιουργήσαμε αρχικά μια μόνιμη κυτταρική σειρά HepG2, στο γένωμα της οποίας ενσωματώθηκε το γονίδιο της λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο του (-2325/+8)p21 υποκινητή (Εικόνα 70A). Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 70B, ο (-2325/+8)p21 υποκινητής ενεργοποιείται από 5-FU με ένα δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Στη συνέχεια δημιουργήσαμε μια νέα μόνιμη κυτταρική σειρά HepG2 στο γένωμα της οποίας ενσωματώθηκε πάλι το γονίδιο της λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο ενός p21 υποκινητή ο οποίος δε διαθέτει τις 4 από τις 6 θέσεις πρόσδεσης του Sp1 ((-2325/+8)Δ(-125/-60)p21-luc) (Εικόνα 70A). Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 70C, το φάρμακο 5-FU δεν μπορεί να ενεργοποιήσει τον υποκινητή αυτό, ακόμη και στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν. Τα αποτελέσματα της Εικόνας 70 δείχνουν ότι η κοντινή περιοχή του p21 υποκινητή, η οποία περιέχει πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα Sp1, είναι σημαντική για την ενεργοποίηση του υποκινητή από το φάρμακο 5-FU.



Εικόνα 69 : Η επαγωγή του p21 γονιδίου μετά την επίδραση χημειοθεραπευτικών παραγόντων συμβαίνει σε μεταγραφικό επίπεδο. Κύτταρα HepG2 επεξεργάστηκαν για 24 ώρες με 50μg/ml 5-FU και στη συνέχεια απομονώθηκε το RNA τους. Με εκκινητές ειδικούς για το mRNA του p21 γονιδίου και με PCR ανάστροφης μεταγραφής προσδιορίσαμε τα επίπεδα μεταγραφής του p21 πριν και μετά τη χορήγηση του φαρμάκου. Στο κάτω τμήμα της Εικόνας φαίνονται τα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου ελέγχου (ARFPO), πριν και μετά τη χορήγηση του φαρμάκου.



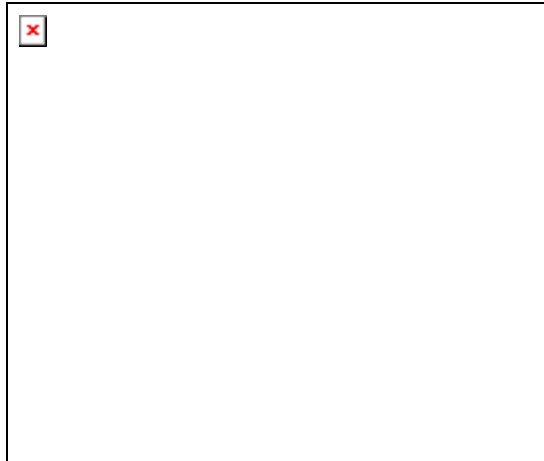
Εικόνα 70 : Η σημασία της κοντινής περιοχής του p21 υποκινητή στην ενεργοποίησή του από 5-FU. A) Σχηματική αναπαράσταση των p21 υποκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία των μόνιμων κυτταρικών σειρών HepG2. Οι θέσεις πρόσδεσης της p53 συμβολίζονται με κόκκινα οβάλς και αυτές των Sp1/Sp3 με μπλε οβάλς. B) Η μόνιμη κυτταρική σειρά HepG2 με τον (-2325/+8)p21 υποκινητή αγρίου τύπου επεξεργάστηκε με αυξανόμενες συγκεντρώσεις 5-FU για 24 ώρες, όπως φαίνεται στο κάτω μέρος του ραβδογράμματος. C) Η μόνιμη κυτταρική σειρά HepG2 με τον ελλειμματικό p21 υποκινητή επεξεργάστηκε με αυξανόμενες συγκεντρώσεις 5-FU για 24 ώρες, όπως φαίνεται στο κάτω μέρος του ραβδογράμματος.

Η Μιθραμυκίνη (Mith) παρεμποδίζει την πρόσδεση των Sp1/Sp3 στο DNA, χωρίς να επηρεάζει την πρόσδεση της p53.

Για να επιβεβαιώσουμε τη σημασία των Sp1/Sp3, καθώς και των θέσεων πρόσδεσής τους, στην ενεργοποίηση του p21 υποκινητή χρησιμοποιήσαμε την ένωση Μιθραμυκίνη (Mith) (Εικόνα 71), η οποία έχει την ικανότητα να ενσωματώνεται σε περιοχές του DNA, πλούσιες σε GC, και να παρεμποδίζει την πρόσδεση παραγόντων στις περιοχές αυτές (Goldberg and Friedmann, 1971).

Τέτοιες περιοχές υπάρχουν και στην κοντινή περιοχή του p21 υποκινητή, συνεπώς αναμένουμε ότι η Mith θα παρεμποδίζει την πρόσδεση των Sp1/Sp3 στην περιοχή αυτή. Για να το επιβεβαιώσουμε, πραγματοποιήσαμε ανάλυση ηλεκτροφορητικής κινητικότητας συμπλόκου, όπου χρησιμοποιήσαμε πυρηνικά εκχυλίσματα ήπατος αρουραίου, τα οποία τα επώασαμε με σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο που αντιστοιχεί στη θέση 3 της κοντινής περιοχής του p21 υποκινητή, απουσία και παρουσία Mith (Εικόνα 72A). Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 72B, τόσο ο Sp1, όσο και ο Sp3 προσδένονται στη θέση 3 με μεγάλη συγγένεια, απουσία Mith. Όταν, όμως προσθέσαμε Mith, τότε κανένας από τους δύο παράγοντες δεν μπόρεσε να προσδεθεί στον ανιχνευτή. Για να ελέγξουμε αν η Μιθραμυκίνη παρεμποδίζει την πρόσδεση της p53 στη μακρινή περιοχή του p21 υποκινητή πραγματοποιήσαμε παρόμοια ανάλυση ηλεκτροφορητικής κινητικότητας συμπλόκου με εκχυλίσματα κυττάρων COS-7, που είναι πλούσια σε p53, τα οποία επώασθηκαν με σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο που αντιστοιχεί στη μακρινή θέση πρόσδεσης της p53 στον p21 υποκινητή (Εικόνα 72A), απουσία και παρουσία Mith. Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 72B η Mith δεν επηρεάζει την πρόσδεση της p53 στον p21 υποκινητή.

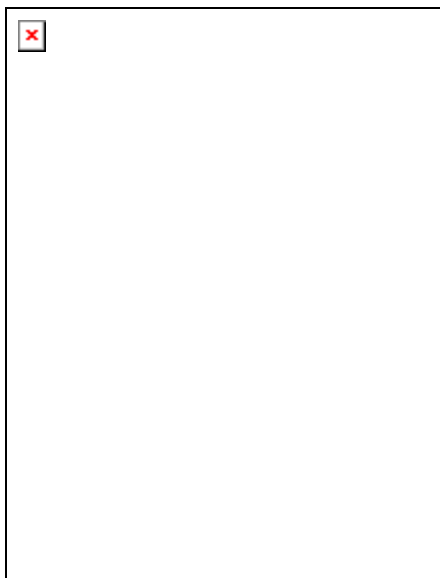
Στη συνέχεια θελήσαμε να μελετήσουμε την επίδραση της Μιθραμυκίνης στη συνεργασιακή ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από Sp1 και p53. Πραγματοποιήσαμε παροδικές επιμολύνσεις κυττάρων SL2, χρησιμοποιώντας τον (-2325/+8)p21 υποκινητή και φορείς έκφρασης των Sp1 και p53, ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό. Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 73, ενώ ο Sp1 είναι σε θέση φυσιολογικά να ενεργοποιήσει σε σημαντικό βαθμό τον p21 υποκινητή, εντούτοις παρουσία Μιθραμυκίνης δεν είναι πλέον σε θέση να πραγματοποιήσει την ενεργοποίηση αυτή. Από την άλλη μεριά, χωρίς



Εικόνα 71 : χημικός τύπος της Μιθραμυκίνης



Εικόνα 72 : Η Mith παρεμποδίζει την πρόσδεση των Sp1/Sp3 στον p21 υποκινητή, ενώ δεν επηρεάζει τη πρόσδεση της p53. Α) Σχηματική αναπαράσταση του p21 υποκινητή. Με παχιά μαύρη γραμμή σημειώνονται οι περιοχές του υποκινητή που χρησιμοποιήθηκαν ως ανιχνευτές στην ανάλυση ηλεκτροφορητικής κινητικότητας συμπλόκου. Οι θέσεις πρόσδεσης της p53 συμβολίζονται με κόκκινα οβάλ και αυτές των Sp1/Sp3 με μπλε οβάλ. Β) Ανάλυση ηλεκτροφορητικής κινητικότητας συμπλόκου. Πυρηνικά εκχυλίσματα ήπατος αρουραίου επώασθησαν με σημασμένο ανιχνευτή που αντιστοιχεί τη θέση 3 του p21 υποκινητή, απουσία και παρουσία Mith. Η Mith παρεμποδίζει την πρόσδεση των Sp1/Sp3 στον p21 υποκινητή. Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα COS-7 επώασθησαν με σημασμένο ανιχνευτή που αντιστοιχεί στη μακρινή περιοχή πρόσδεσης της p53, απουσία και παρουσία 200ng/ml Mith. Η Mith δεν επηρεάζει την πρόσδεση της p53 στον p21 υποκινητή.



Εικόνα 73 : Επίδραση της Μιθραμυκίνης στη συνεργασιακή ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από Sp1 και p53. Κύτταρα SL2 επιμολύνθηκαν παροδικά με τον p21 υποκινητή και φορείς έκφρασης των Sp1 και p53, ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό, απουσία και παρουσία 200ng/ml Μιθραμυκίνης, όπως φαίνεται στο κάτω μέρος του ραβδογράμματος. Η σχετική δραστηριότητα της λουσιφεράσης στα εκχυλίσματα των επιμολυσμένων κυττάρων παρουσιάζεται με τη ορφή ραβδογράμματος.

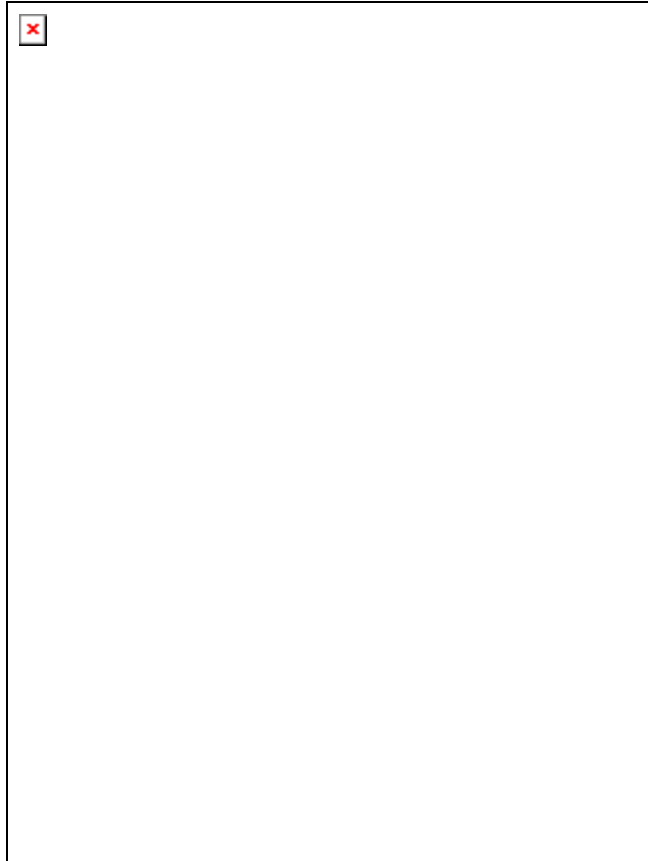
την επίδραση του φαρμάκου, ο Sp1 συνεργάζεται με την p53 και ενεργοποιούν συνεργασιακά τον p21 υποκινητή. Η επίδραση, όμως, με Μιθραμυκίνη έχει ως αποτέλεσμα να χάνεται η συνεργασία αυτή και να μην είναι δυνατή πλέον η ενεργοποίηση του p21 υποκινητή.

Η Μιθραμυκίνη παρεμποδίζει τη μεταγραφική ενεργοποίηση του p21 γονιδίου από 5-FU.

Αφού επιβεβαιώσαμε την παρεμποδιστική δράση της Μιθραμυκίνης στην πρόσδεση των Sp1/Sp3 και στη συνεργασιακή ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από Sp1 και p53, θελήσαμε να μελετήσουμε την επίδραση του συγκεκριμένου φαρμάκου στα επίπεδα έκφρασης της p53 και της p21. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε κύτταρα HepG2 τα οποία επεξεργασθήκαμε με 5-FU, Mith ή και με τα δύο φάρμακα ταυτόχρονα για 24 ώρες. Αρχικά, με ανάλυση ανοσοεντοπισμού και αντίσωμα έναντι της p53 ελέγξαμε τα επίπεδα έκφρασης της p53 μετά την επίδραση με τα φάρμακα. Όπως παρατηρούμε στο ανώτερο τμήμα της Εικόνας 74, τόσο η 5-FU όσο και η Mith έχουν τη δυνατότητα να αυξάνουν σε σημαντικό βαθμό τα επίπεδα έκφρασης της p53. Επίδραση και με τα δύο φάρμακα ταυτόχρονα δεν οδήγησε σε περαιτέρω αύξηση της έκφρασης.

Στη συνέχεια χρησιμοποιήσαμε αντίσωμα έναντι της p21 και όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 74, ενώ το 5-FU αυξάνει σημαντικά την αύξηση της έκφρασης της p21, η Mith δεν επιτρέπει την αύξηση αυτή, παρόλα τα υψηλά επίπεδα της p53. Το πιο σημαντικό, όμως, στην ανάλυση αυτή είναι ότι η Mith έχει τη δυνατότητα να παρεμποδίζει και την αύξηση της p21 από το 5-FU, όταν επιδράσαμε και με τα δύο φάρμακα ταυτόχρονα. Η ανασταλτική αυτή δράση της Mith δεν οφείλεται στη γενική αναστολή της μεταγραφής, αφού τα επίπεδα έκφρασης της Sp1 και της α -tubulin δεν επηρεάζονται από την επίδραση των φαρμάκων (Εικόνα 74).

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της Εικόνας 74 δείχνουν ότι η Μιθραμυκίνη είναι ένας ισχυρός αναστολέας της έκφρασης της p21, πιθανόν λόγω της ιδιότητάς της να παρεμποδίζει τη δράση των Sp1 πρωτεϊνών που προσδένονται στην κοντινή περιοχή του p21 υποκινητή.



Εικόνα 74 : Η Μιθραμυκίνη παρεμποδίζει την έκφραση της p21. Κύτταρα HepG2 επεξεργάσθηκαν με τα φάρμακα 5-FU (50μg/ml) και Mith (200ng/ml), ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό, ή παρέμειναν χωρίς φάρμακο, όπως φαίνεται στο πάνω μέρος της Εικόνας. Τα εκχυλίσματα από τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιήθηκαν σε αναλύσεις ανοσοεντοπισμού με αντισώματα έναντι των p53, p21, Sp1 και α -tubulin. Δίπλα σε κάθε ανάλυση φαίνεται το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε.

Η Μιθραμυκίνη αναστέλλει την αύξηση της έκφρασης της p21 και όχι τα βασικά επίπεδα αυτής.

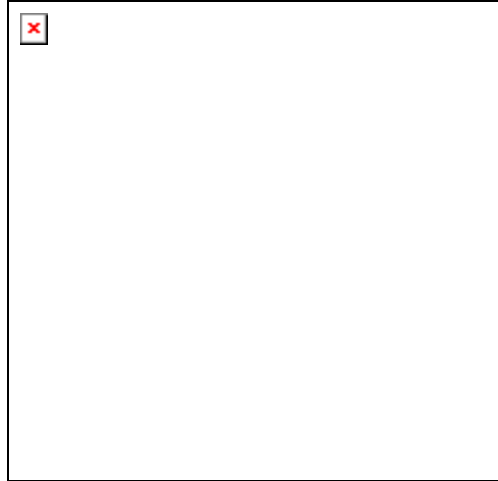
Αφού επιβεβαιώσαμε την ανασταλτική δράση της Μιθραμυκίνης στην έκφραση της p21, θελήσαμε να επιβεβαιώσουμε ότι η δράση αυτή συμβαίνει σε μεταγραφικό πλέον επίπεδο. Για το σκοπό αυτό κύτταρα HepG2 επεξεργάστηκαν με τα φάρμακα 5-FU και Mith, ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό ή παρέμειναν απουσία φαρμάκου. Στη συνέχεια απομονώθηκε το RNA τους και με ανάλυση PCR ανάστροφης μεταγραφής μελετήθηκαν τα επίπεδα του mRNA της p21 για την κάθε περίπτωση. Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 75, η Μιθραμυκίνη δεν αναστέλλει τη βασική μεταγραφή του p21 γονιδίου, αλλά αυτό που κάνει στην πραγματικότητα είναι να αναστέλλει την επαγωγή της έκφρασής της από το φάρμακο 5-FU.

Η Μιθραμυκίνη δεν επηρεάζει τη σταθερότητα της p21 πρωτεΐνης.

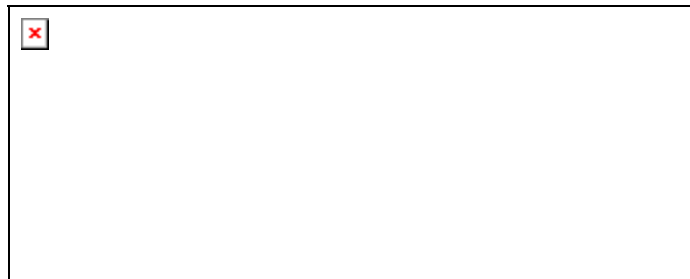
Στο σημείο αυτό, κάποιος θα μπορούσε να υποστηρίξει ότι η Μιθραμυκίνη αναστέλλει την έκφραση της p21, όχι γιατί παρεμποδίζει την πρόσδεση του Sp1 στον p21 υποκινητή, αλλά διότι επηρεάζει τη σταθερότητα της p21 πρωτεΐνης. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήσαμε ένα φορέα έκφρασης της p21, στον οποίο η έκφραση του p21 cDNA ελέγχεται από τον υποκινητή CMV, η ενεργότητα του οποίου δεν εξαρτάται από Sp1. Επιμολύναμε παροδικά κύτταρα COS-7 με το συγκεκριμένο φορέα, απουσία και παρουσία Μιθραμυκίνης. Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 76, η Μιθραμυκίνη δεν επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης της p21, που ελέγχεται από τον ετερόλογο υποκινητή και επομένως δεν έχει καμιά επίδραση στη σταθερότητα της p21 πρωτεΐνης αυτής καθ' αυτής.

Η σημασία της p53 στην ενεργοποίηση του p21 γονιδίου από 5-FU.

Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 74, η αύξηση της έκφρασης της p21, συνδέεται άμεσα με αύξηση της p53. Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε τη σημασία της p53 για την ενεργοποίηση της p21 από το φάρμακο 5-FU, χρησιμοποιήσαμε ανθρώπινα κερατινοκύτταρα HaCaT, τα οποία όπως έχουμε ήδη αναφέρει, εκφράζουν μεταλλαγμένη p53. Ταυτόχρονα, είναι



Εικόνα 75 : Η Μιθραμυκίνη αναστέλλει την αύξηση της έκφρασης του p21 γονιδίου, αλλά δεν επηρεάζει τα βασικά επίπεδα μεταγραφής του. Κύτταρα HepG2 επεξεργάσθηκαν για 24 ώρες με 50μg/ml 5-FU και 200ng/ml Μιθραμυκίνη, ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό και στη συνέχεια απομονώθηκε το RNA τους. Με εκκινητές ειδικούς για το mRNA του p21 γονιδίου και με PCR ανάστροφης μεταγραφής προσδιορίσαμε τα επίπεδα μεταγραφής του p21 πριν και μετά τη χορήγηση των φαρμάκων. Στο κάτω τμήμα της Εικόνας φαίνονται τα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου ελέγχου (ARPP0), πριν και μετά τη χορήγηση του φαρμάκου.



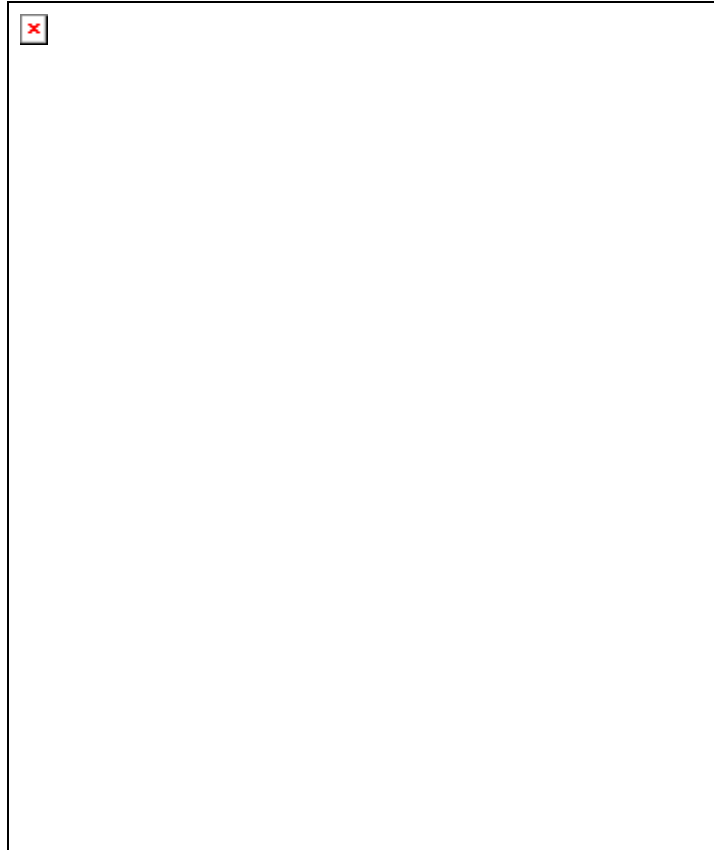
Εικόνα 76 : Η Μιθραμυκίνη δεν επηρεάζει τη σταθερότητα της πρωτεΐνης p21. Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με φορέα έκφρασης της p21, στον οποίο η έκφραση του p21 cDNA ελέγχεται από τον υποκινητή CMV, απουσία και παρουσία Μιθραμυκίνης. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν σε ανάλυση ανοσοεντοπισμού, με αντίσωμα έναντι του επιτόπου 6Myc που υπάρχει στο αμινο-τερματικό τμήμα της εκφραζόμενης p21 πρωτεΐνης. Τα επίπεδα έκφρασης της p21 παραμένουν σταθερά, ακόμη και μετά τη χορήγηση του φαρμάκου.

γνωστό ότι τα κύτταρα αυτά εκφράζουν p63, αγρίου τύπου (Hall et al, 2000). Επεξεργασθήκαμε τα κύτταρα αυτά με 5-FU και Mith, ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό για 24 ώρες και με ανάλυση ανοσοεντοπισμού, ελέγξαμε τα επίπεδα έκφρασης των p53, p63, p21 και α -tubulin, με τα αντίστοιχα αντισώματα. Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 77, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, τα κύτταρα αυτά εκφράζουν υψηλά επίπεδα μεταλλαγμένης p53, ενώ μετά τη χορήγηση των φαρμάκων δεν έχουμε μεταβολή στην έκφραση της p53. Επίσης, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, τα κύτταρα αυτά εκφράζουν p63 σε υψηλά επίπεδα και η έκφραση αυτή δεν επηρεάζεται από τη χορήγηση των φαρμάκων. Από την άλλη η p21 δεν εκφράζεται καθόλου στα κύτταρα αυτά, παρουσία των φαρμάκων, παρόλο που υπάρχουν πολύ υψηλά επίπεδα μεταλλαγμένης p53. Επομένως, η ενεργοποίηση της p21 από την ένωση 5-FU απαιτεί p53 αγρίου τύπου.

Επίσης, πολύ σημαντικό είναι και το γεγονός ότι η p63, παρόλο που εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα, εντούτοις δεν είναι σε θέση να αυξήσει την έκφραση της p21. Όπως παρατηρούμε στον ανοσοεντοπισμό ελέγχου, η επίδραση των φαρμάκων δεν επηρεάζει τη μεταγραφή γενικά, εφόσον τα επίπεδα έκφρασης της α -tubulin παραμένουν σταθερά καθόλη τη διάρκεια του πειράματος. Τέλος, για να αποκλείσουμε την περίπτωση ότι στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά για κάποιο λόγο το p21 γονίδιο δεν μπορεί να ενεργοποιηθεί, επιδράσαμε με τον παράγοντα TGF- β , ο οποίος είναι γνωστό ότι ενεργοποιεί το γονίδιο p21 (Pardali et al, 2000). Παρατηρούμε ότι το p21 γονίδιο ενεργοποιείται παρουσία του TGF- β , αν και όχι σε τόσο υψηλό βαθμό όσο στα κύτταρα HepG2 μετά την επίδραση 5-FU.

Η ενεργοποίηση της p53 από τα φάρμακα 5-FU και Μιθραμυκίνη οφείλεται στη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης.

Όπως είδαμε στην Εικόνα 74, η Μιθραμυκίνη είναι ικανή να ενεργοποιήσει την p53 24 ώρες μετά τη χορήγησή της, ενώ δεν ενεργοποιεί την p21 την ίδια χρονική στιγμή. Προκειμένου να μελετήσουμε λεπτομερέστερα τη δράση της Μιθραμυκίνης στην αύξηση της p53 και της p21 στα κύτταρα ηπατώματος HepG2, επεξεργασθήκαμε τα κύτταρα αυτά με τη Μιθραμυκίνη σε συγκέντρωση 200ng/ml για διαφορετικά χρονικά διαστήματα



Εικόνα 77 : Σημασία της p53 στην ενεργοποίηση της p21 από 5-FU. Κύτταρα HaCaT επεξεργάσθηκαν με 5-FU (50μg/ml) και Μιθραμυκίνη (200ng/ml), ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό. Τα εκχυλίσματα των κυττάρων αυτών αναλύθηκαν με ανοσοεντοπισμό χρησιμοποιώντας αντισώματα για τις p53, p63, p21 και α-tubulin, όπως φαίνεται σε κάθε περίπτωση. Επίσης, τα κύτταρα αυτά επεξεργάσθηκαν με TGF-β και ανιχνεύθηκε η έκφραση της p21 στην περίπτωση αυτή.

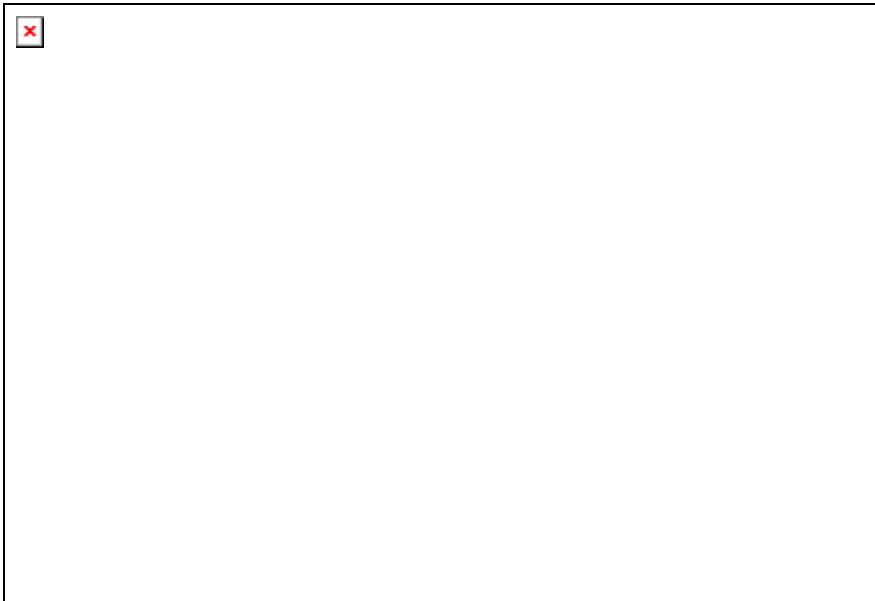
και πραγματοποιήσαμε ανάλυση ανοσοεντοπισμού με αντίσωμα έναντι της p53. Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 78Α, η Μιθραμυκίνη προκαλεί μια αύξηση της έκφρασης της p53 περίπου 2 ώρες μετά τη χορήγησή της. Η αύξηση αυτή συνεχίζεται με την πάροδο του χρόνου και φθάνει στο μέγιστο επίπεδο της μετά από 24 ώρες.

Στη συνέχεια χρησιμοποιήσαμε αντίσωμα έναντι της p21, προκειμένου να ελέγξουμε την έκφρασή της, σε σχέση με την έκφραση της p53. Παρατηρούμε ότι η p21 δεν εκφράζεται ακόμη και 36 ώρες μετά τη χορήγηση της Μιθραμυκίνης. Στο κάτω μέρος Εικόνας 78Α παρατηρούμε τα επίπεδα έκφρασης της α -tubulin τα οποία παραμένουν σταθερά καθόλη τη διάρκεια του πειράματος.

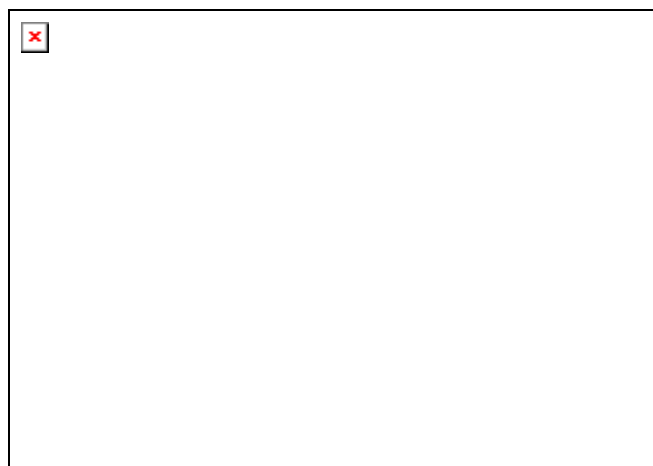
Με ποιον τρόπο, όμως, οι ενώσεις 5-FU και Μιθραμυκίνη ενεργοποιούν την p53; Αυτό μπορεί να συμβαίνει, τουλάχιστον εν μέρει, μέσω φωσφορυλίωσης της p53. Είναι γνωστό ότι η p53 μπορεί να φωσφορυλιωθεί σε συγκεκριμένα αμινοξέα τόσο στο αμινο-τερματικό, όσο και στο καρβοξυ-τερματικό άκρο της (Appella and Anderson, 2001). Χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι φωσφορυλιωμένων μορφών της p53 σε συγκεκριμένα αμινοξέα (αμινοξέα 6, 9, 15, 20, 37, 46 και 392), αναλύσαμε με ανοσοεντοπισμό εκχυλίσματα κυττάρων HepG2 τα οποία είχαν προηγουμένως επεξεργασθεί με 5-FU και Μιθραμυκίνη για 24 ώρες. Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 78Β, τόσο η 5-FU, όσο και η Μιθραμυκίνη, ευνοούν τη φωσφορυλίωση της p53 στη Ser-15. Δεν παρατηρήθηκε φωσφορυλίωση της p53 στις σερίνες 6, 9, 20, 37, 46 και 392 (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται). Αυτό, υποδεικνύει έναν πιθανό κοινό μηχανισμό ενεργοποίησης της p53 από τα δύο φάρμακα.

Η Μιθραμυκίνη παρεμποδίζει την πρόσδεση του παράγοντα Sp1 στην κοντινή περιοχή του p21 υποκινητή.

Αφού μελετήσαμε τη δράση της Μιθραμυκίνης *in vitro*, θελήσαμε να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματά μας και σε *in vivo* συνθήκες. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήσαμε ανάλυση ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης, στην οποία επεξεργασθήκαμε κύτταρα HepG2 με 5-FU και Μιθραμυκίνη, ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό για 24 ώρες. Στη συνέχεια χρησιμοποιήσαμε



B



Εικόνα 78 : Η 5-FU και η Μιθραμυκίνη ενεργοποιούν την p53 μέσω φωσφορυλίωσης της Ser-15. Α) Κύτταρα HepG2 επεξεργάστηκαν με 200 ng/ml Μιθραμυκίνης για διάφορα χρονικά διαστήματα, όπως 1, 2, 4, 8, 12, 24, 30 και 36 ώρες. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν σε ανάλυση ανοσοεντοπισμού. Ανώτερο τμήμα : ανοσοεντοπισμός με αντίσωμα έναντι της p53. Μεσαίο τμήμα : ανοσοεντοπισμός με αντίσωμα έναντι της p21. Κατώτερο τμήμα : ανοσοεντοπισμός με αντίσωμα έναντι της α -tubulin. Οι θέσεις των πρωτεϊνών σημειώνονται με βέλη. Β) Κύτταρα HepG2 επεξεργάστηκαν με 5-FU (50 μ g/ml) και Μιθραμυκίνη(200ng/ml), ανεξάρτητα για 24 ώρες. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν σε ανάλυση ανοσοεντοπισμού με αντισώματα έναντι φωσφορυλιωμένων μορφών της p53 σε συγκεκριμένα αμινοξέα. Στο αριστερό μέρος της Εικόνας είναι ο ανοσοεντοπισμός της p53 μετά την επίδραση των δύο φαρμάκων και στο δεξιό τμήμα ο ανοσοεντοπισμός με το αντίσωμα έναντι της φωσφορυλιωμένης μορφής στη Ser-15. Η θέση των p53 μορφών φαίνεται με βέλη. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνικών δεικτών φαίνονται ανάμεσα στις δύο Εικόνες.

αντισώματα έναντι των ενδογενών Sp1 και p53, καθώς και 4 διαφορετικά ζευγάρια εκκινητών, τα οποία αντιστοιχούν στην κοντινή περιοχή του p21 υποκινητή, στη μεσαία περιοχή που περιλαμβάνει την πρώτη θέση πρόσδεσης της p53, στη μακρινή περιοχή, που περιλαμβάνει τη δεύτερη θέση πρόσδεσης της p53 και τέλος σε μια περιοχή ελέγχου, περίπου 1000 βάσεις μακριά από τη μακρινή θέση πρόσδεσης της p53 (Εικόνα 79A).

Αρχικά, μελετήσαμε την στρατολόγηση της p53 στη μακρινή περιοχή του p21 υποκινητή, μετά την επίδραση των δύο φαρμάκων. Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 79B, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η p53 προσδένεται σε κάποιο βαθμό στη μακρινή θέση πρόσδεσής της. Μετά την επίδραση με 5-FU έχουμε σημαντική ενίσχυση της πρόσδεσης της p53 στη θέση αυτή. Παρομοίως, η Μιθραμυκίνη προκαλεί ενίσχυση της στρατολόγησης της p53 στη θέση αυτή. Τέλος, επίδραση και με τα δύο φάρμακα δεν επηρεάζει περαιτέρω την πρόσδεση.

Παρόμοια αποτελέσματα είχαμε και για τη μεσαία περιοχή του p21 υποκινητή που περιλαμβάνει τη δεύτερη θέση πρόσδεσης της p53. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η p53 προσδένεται στη θέση αυτή, ενώ τόσο η 5-FU, όσο και η Μιθραμυκίνη ενισχύουν την πρόσδεση στη συγκεκριμένη θέση και μάλιστα στον ίδιο βαθμό. Επίδραση και με τα δύο φάρμακα ταυτόχρονα δεν ενίσχυσε περισσότερο την πρόσδεση αυτή (Εικόνα 79C).

Στη συνέχεια μελετήσαμε την πρόσδεση του Sp1 στην κοντινή περιοχή του p21 υποκινητή. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, ο Sp1 προσδένεται πολύ ασθενικά στην περιοχή αυτή (Εικόνα 79D). Αντίθετα, μετά από την επίδραση της 5-FU έχουμε πολύ σημαντική ενίσχυση της στρατολόγησής του στη συγκεκριμένη περιοχή. Η χορήγηση, όμως, Μιθραμυκίνης παρεμπόδισε τελείως την πρόσδεση του Sp1 στην περιοχή αυτή, ακόμη και παρουσία της 5-FU, γεγονός που είναι απόλυτα σύμφωνο με τα *in vitro* δεδομένα μας (Εικόνα 79D).

Τέλος, παρατηρούμε ότι στη περιοχή ελέγχου, δεν προσδένεται ούτε ο Sp1, ούτε η p53, επομένως τα δεδομένα μας προέρχονται από τμήματα χρωματίνης μικρότερα των 1000 βάσεων (Εικόνα 79E).



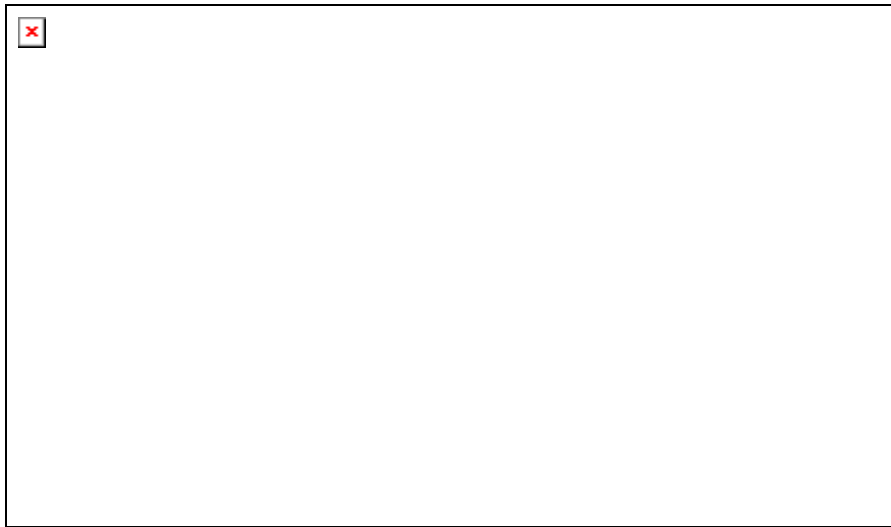
Εικόνα 79 : Η Μιθραμυκίνη ενισχύει την πρόσδεση της 53 και παρεμποδίζει την πρόσδεση του Sp1 στον p21 υποκινητή *in vivo*. A) Σχηματική αναπαράσταση του p21 υποκινητή, όπου φαίνονται οι περιοχές στις οποίες αντιστοιχούν τα ζευγάρια των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης. Οι θέσεις πρόσδεσης της p53 συμβολίζονται με κόκκινα οβάλ και αυτές του Sp1 με μπλε οβάλ. Κύτταρα HepG2 επεξεργάστηκαν με 5-FU και Mith, ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό, όπως φαίνεται στο πάνω μέρος της κάθε Εικόνας. B) Ανάλυση ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης με αντίσωμα έναντι της p53 και εκκινητές που αντιστοιχούν στη μακρινή θέση πρόσδεσής της. C) Ανάλυση ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης με αντίσωμα έναντι της p53 και εκκινητές που αντιστοιχούν στη μεσαία θέση πρόσδεσής της. D) Ανάλυση ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης με αντίσωμα έναντι της Sp1 και εκκινητές που αντιστοιχούν στην κοντινή θέση πρόσδεσής της. E) Ανάλυση ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης με αντίσωμα έναντι των Sp1 και p53 και εκκινητές που αντιστοιχούν στην περιοχή ελέγχου. Το Input αντιπροσωπεύει το 10% της χρωματίνης που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε ανοσοκατακρήμνιση, ενώ το (-) αντιστοιχεί στο πείραμα ελέγχου, όπου δε χρησιμοποιήθηκε καθόλου αντίσωμα.

Η Μιθραμυκίνη δεν επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των Sp1 και p53.

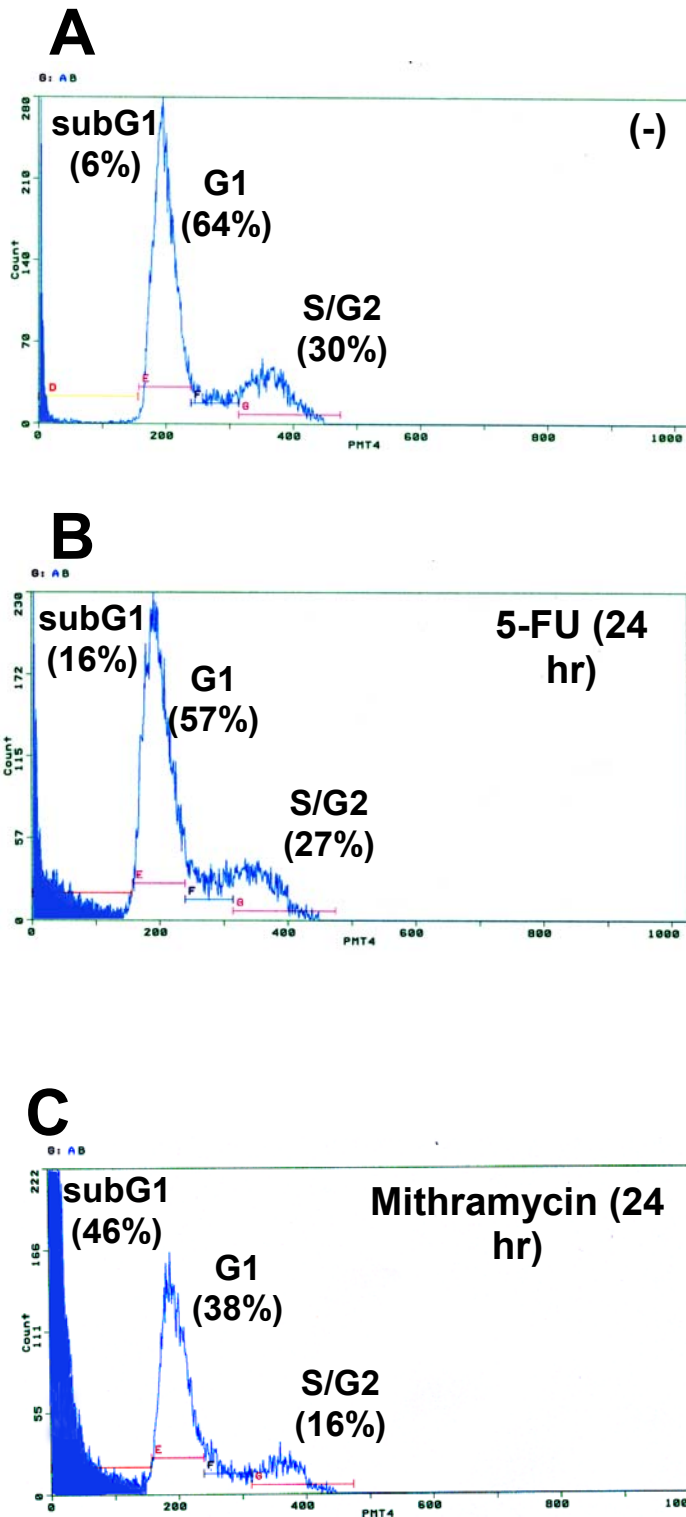
Αφού επιβεβαιώσαμε και *in vivo* ότι η Μιθραμυκίνη αναστέλλει την πρόσδεση του Sp1 στον p21 υποκινητή, ενώ δεν επηρεάζει την πρόσδεση της p53, θελήσαμε να αποκλείσουμε την περίπτωση το συγκεκριμένο φάρμακο να επηρεάζει τις φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο αυτών παραγόντων. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήσαμε ανάλυση GST pull down, χρησιμοποιώντας εκχυλίσματα κυττάρων HepG2, που είχαν προηγουμένως επεξεργασθεί με 5-FU και Μιθραμυκίνη για 24 ώρες για να ενεργοποιηθεί η ενδογενής p53 πρωτεΐνη. Τα εκχυλίσματα αυτά επώασθηκαν με GST και GST-Sp1 που εκφράσθηκαν σε βακτήρια και ενώθηκαν με σφαιρίδια γλουταθιόνης-αγαρόζης. Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 80, η p53 προσδένεται ισχυρά στην GST-Sp1, τόσο παρουσία 5-FU, όσο και παρουσία Μιθραμυκίνης. Αντίθετα, δεν προσδένεται στη GST, γεγονός που αποδεικνύει άμεσες και ειδικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ Sp1 και p53, οι οποίες δεν επηρεάζονται από 5-FU και Μιθραμυκίνη.

Η Μιθραμυκίνη αυξάνει την απόπτωση σε κύτταρα HepG2.

Όπως αναφέραμε ήδη η αύξηση της p53 από γενετοξικούς παράγοντες, προάγει είτε την αναστολή του κυτταρικού κύκλου είτε την απόπτωση, ανάλογα με το κυτταρικό υπόβαθρο (Vogelstein et al, 2000). Επίσης, η Μιθραμυκίνη είναι γενετοξικός παράγοντας και έχει την ιδιότητα, όπως είδαμε, να ενεργοποιεί την p53. Προκειμένου να μελετήσουμε την επίδραση των φαρμάκων 5-FU και Μιθραμυκίνης στην απόπτωση των κυττάρων HepG2, επεξεργασθήκαμε τα συγκεκριμένα κύτταρα με 5-FU και Μιθραμυκίνη για 24 ώρες. Στη συνέχεια με ανάλυση FACS υπολογίσαμε την απόπτωση που προκαλεί ο κάθε παράγοντας. Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 81A, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες μόνο το 6% των κυττάρων είναι αποπτωτικά (Εικόνα 81A). Μετά την επίδραση με 5-FU, μόνο 16% των κυττάρων είναι αποπτωτικά (Εικόνα 81B). Αντίθετα, η χορήγηση Μιθραμυκίνης έχει ως αποτέλεσμα μια ισχυρή αποπτωτική απόκριση, καθώς το 46% των κυττάρων είναι πλέον αποπτωτικά (Εικόνα 81C). Τα αποτελέσματα της Εικόνα 81 δείχνουν ότι η Μιθραμυκίνη είναι ένας ισχυρός επαγωγέας της απόπτωσης



Εικόνα 80 : Η Μιθραμυκίνη δεν επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ Sp1 και p53. Α) Πρότυπα έκφρασης των GST και GST-Sp1 πρωτεϊνών που εκφράσθηκαν σε βακτήρια. Οι θέσεις των πρωτεϊνών φαίνονται με έναν αστερίσκο. Β) Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα HepG2 που επεξεργάσθηκαν με 50μ/ml 5-FU ή 200ng/ml Μιθραμυκίνη επώασθηκαν με πρωτεΐνες GST και GST-Sp1 που εκφράσθηκαν σε βακτήρια και ενώθηκαν σε σφαιρίδια. Η ανάλυση έγινε με αντίσωμα έναντι της p53. Η p53 προσδένεται αποκλειστικά στη GST-Sp1, και όχι στη GST. Η θέση της p53 σημειώνεται με βέλος.



Εικόνα 81 : Η Μιθραμυκίνη προάγει την απόπτωση σε κύτταρα HepG2. Κύτταρα HepG2 επεξεργάστηκαν με (B) 50μg/ml 5-FU και (C) 200ng/ml Μιθραμυκίνη για 24 ώρες ή παρέμειναν απουσία φαρμάκου (A). Και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν σε ανάλυση FACS. Η φάση subG₁ περιλαμβάνει τα αποπτωτικά κύτταρα. Το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται σε κάθε φάση φαίνεται δίπλα σε κάθε κορυφή.

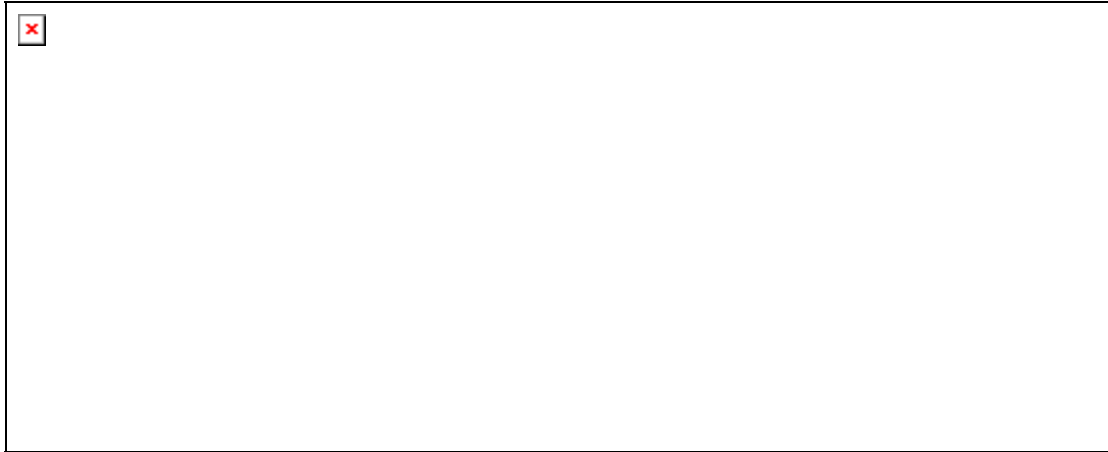
των κυττάρων HepG2, πιθανώς λόγω της ιδιότητάς της να ενεργοποιεί την p53 και ταυτόχρονα να παρεμποδίζει την ενεργοποίηση της p21, η οποία έχειδειχθεί ότι διαθέτει αντιαποπτωτική δράση.

Η Μιθραμυκίνη αναστέλλει τη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου PUMA από την p53.

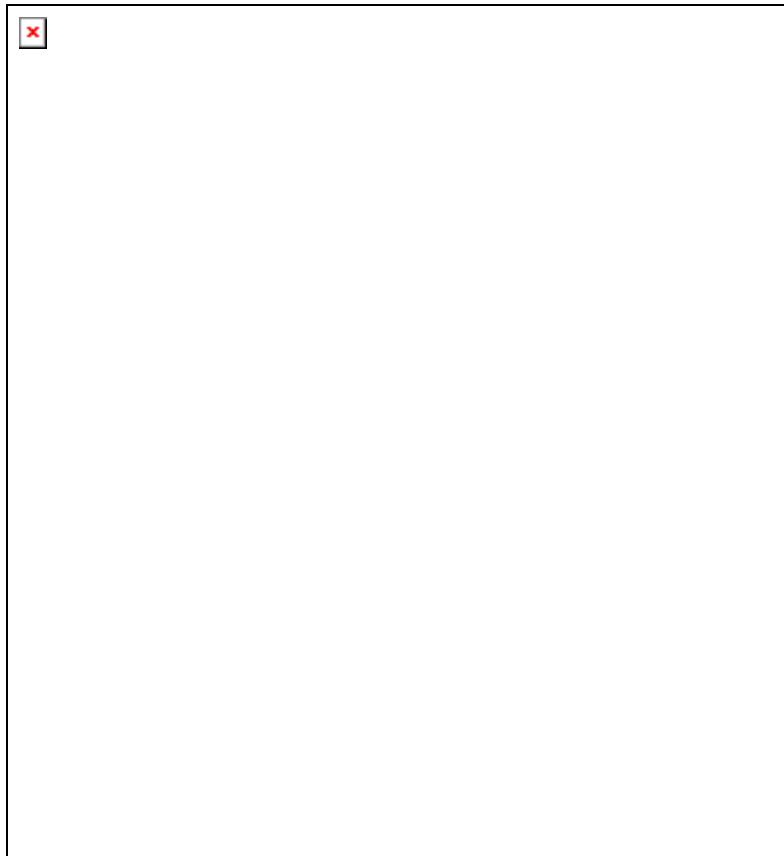
Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε τη σημασία του παράγοντα Sp1 στην ενεργοποίηση και άλλων εκτός του p21 γονιδίων των οποίων η απόκριση σε γενετοξικούς παράγοντες εξαρτάται από την p53, μελετήσαμε ένα ακόμη γονίδιο του οποίου η έκφραση ελέγχεται από την p53. Το γονίδιο αυτό ονομάζεται PUMA (p53-upregulated Modulator of Apoptosis) και παίζει σημαντικό ρόλο στην απόπτωση των κυττάρων που προκαλείται από την ενεργοποίηση της p53 (J. Yu et al, 2003). Ο υποκινητής του γονιδίου PUMA του ανθρώπου διαθέτει δύο θέσεις πρόσδεσης της p53 και πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης του Sp1 (Εικόνα 82). Επομένως, είναι δυνατό, σε αντιστοιχία με τον p21 υποκινητή, και ο υποκινητής του γονιδίου PUMA να αποτελεί παράδειγμα συνεργασιακής ενεργοποίησης από τις Sp1 και p53.

Αρχικά, πραγματοποιήσαμε παροδικές επιμολύνσεις κυττάρων SL2 με τους υποκινητές που φαίνονται στην Εικόνα 83A και φορείς έκφρασης των Sp1 και p53, ανεξάρτητα και σε συνδυασμό. Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 83B, η υπερέκφραση της p53 από μόνη της δεν είναι ικανή να ενεργοποιήσει τον PUMA(-336/+157) υποκινητή. Από την άλλη, υπερέκφραση του Sp1 ενεργοποιεί σε σημαντικό βαθμό τον υποκινητή αυτό. Τέλος, η υπερέκφραση και των δύο παραγόντων ταυτόχρονα οδηγεί σε συνεργασιακή ενεργοποίηση του συγκεκριμένου υποκινητή. Όταν, όμως, αφαιρέσαμε την περιοχή (-126/-25) η οποία περιλαμβάνει το σύνολο σχεδόν των Sp1 θέσεων πρόσδεσης (Εικόνα 83A), παρατηρούμε ότι ακόμη και η συνέκφραση των δύο παραγόντων δεν είναι ικανή να ενεργοποιήσει τον υποκινητή αυτόν. Επομένως, όπως και στην περίπτωση του p21 υποκινητή, η περιοχή που περιλαμβάνει τις θέσεις πρόσδεσης του Sp1 είναι αναγκαία για τη συνεργασιακή ενεργοποίηση του PUMA υποκινητή από τις πρωτεΐνες Sp1 και p53.

Τέλος, μελετήσαμε την έκφραση του γονιδίου PUMA με ανάλυση ανοσοεντοπισμού, χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της PUMA πρωτεΐνης.



Εικόνα 82 : Σχηματική αναπαράσταση του PUMA υποκινητή. Με μαύρες παχιές γραμμές σημειώνονται οι θέσεις πρόσδεσης της p53, ενώ με άσπρες αυτές του Sp1. Με διακεκομμένα βέλη σημειώνονται τα όρια της εσωτερικής απαλοιφής του PUMA υποκινητή που χρησιμοποιήθηκε στις παροδικές επιμολύνσεις.



Εικόνα 83 : Σημασία των θέσεων πρόσδεσης του Sp1 στη συνεργασιακή ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου PUMA του ανθρώπου από Sp1 και p53. Α) Σχηματική αναπαράσταση των PUMA υποκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις παροδικές επιμολύνσεις του τμήματος Β. Οι θέσεις πρόσδεσης της p53 συμβολίζονται με κόκκινα οβάλ και αυτές του Sp1 με μπλε οβάλ. Β) Κύτταρα SL2 επιμολύνθηκαν παροδικά με τους παραπάνω υποκινητές και φορείς έκφρασης των Sp1 και p53, ανεξάρτητα και σε συνδυασμό, όπως φαίνεται στο κάτω μέρος του ραβδογράμματος.

Για το σκοπό αυτό, επεξεργασθήκαμε κύτταρα HepG2 με 5-FU και Μιθραμυκίνη, ανεξάρτητα και σε συνδυασμό για 18 και 24 ώρες. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με ανοσοεντοπισμό, με αντισώματα έναντι της PUMA και της α -tubulin. Όπως και στην περίπτωση του p21, η 5-FU ενισχύει σημαντικά την έκφραση του γονιδίου PUMA 18 ώρες μετά τη χορήγηση του φαρμάκου 5-FU. Αντίθετα, η Μιθραμυκίνη όχι μόνο δεν επιτρέπει την ενεργοποίηση του γονιδίου, αλλά αναστέλλει και την επίδραση της 5-FU σε αυτό (Εικόνα 84). Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε απόλυτη συμφωνία με τα αντίστοιχα για το p21 γονίδιο και φανερώνουν ένα γενικό μηχανισμό συνεργασιακής ενεργοποίησης γονιδίων από Sp1 και p53 κάτω από συνθήκες γενοτοξικού στρες.



Εικόνα 84 : Η Μιθραμυκίνη παρεμποδίζει την ενεργοποίηση του γονιδίου PUMA από την 5-FU. Κύτταρα HepG2 επεξεργάστηκαν με 5-FU (50μg/ml) και Μιθραμυκίνη (200ng/ml), ανεξάρτητα και σε συνδυασμό και τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου PUMA ελέγχθηκαν με ανοσοεντοπισμό έναντι της συγκεκριμένης πρωτεΐνης που εκφράζεται από το γονίδιο αυτό. Επίσης, τα επίπεδα έκφρασης της α -tubulin ελέγχθηκαν με αντίσωμα έναντι της συγκεκριμένης πρωτεΐνης.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα GC μοτίβα της κοντινής περιοχής του p21 υποκινητή προσδένουν επιλεκτικά μέλη της οικογένειας του παράγοντα Sp1.

Με τα αποτελέσματα των αναλύσεων ηλεκτροφορητικής κινητικότητας συμπλόκου, απουσία και παρουσία αντισωμάτων, και ανταγωνισμού, επιβεβαιώσαμε ότι στην κοντινή περιοχή του p21 υποκινητή προσδένονται επιλεκτικά οι παράγοντες Sp1 και Sp3, και μάλιστα με διαφορετική συγγένεια για κάθε μια από τις 6 θέσεις πρόσδεσης. Πιο συγκεκριμένα, η συνάφεια των Sp1 και Sp3 για τις θέσεις αυτές ακολουθεί τη σειρά : θέση 3 > θέση 1 = θέση 4 = θέσεις 5/6 >> θέση 2. Αυτές οι διαφορές υποδεικνύουν ότι η συνάφεια και η ειδικότητα των Sp1/Sp3 για τα μοτίβα αυτά δεν είναι μόνον απόρροια της νουκλεοτιδικής τους ακολουθίας, αλλά και των ακολουθιών που βρίσκονται εκατέρωθεν των μοτίβων αυτών.

Επίσης, παρατηρούμε ότι στα εκχυλίσματα ήπατος αρουραίου υπάρχει και μια δεύτερη, μικρότερου μεγέθους, μορφή της Sp3, η οποία έχει τη δυνατότητα να συνδέεται στην κοντινή περιοχή του p21 υποκινητή με την ίδια συνάφεια με αυτήν της ολικού μήκους Sp3. Η μορφή αυτή, προφανώς, αποτελεί μια ισομορφή της Sp3, η οποία συναντάται στα ηπατικά κύτταρα, γεγονός που είναι σε απόλυτη συμφωνία με προηγούμενες μελέτες οι οποίες έδειξαν ότι εκτός από τη μήκους 115kDa Sp3, στα κύτταρα θηλαστικών υπάρχουν και δύο μικρότερες ισομορφές της, μήκους 70-80 kDa, οι οποίες προέρχονται από εσωτερικές θέσεις έναρξης της μετάφρασης (Suske, 1999). Εντούτοις, ο ρόλος αυτών των ισομορφών της Sp3 δεν είναι ακόμη γνωστός.

Η τόσο κοντινή γεινίαση των 6 θέσεων πρόσδεσης των Sp1/Sp3 στην κοντινή περιοχή του p21 υποκινητή, δημιουργεί το ερώτημα αν η πρόσδεση των Sp1/Sp3 συμβαίνει ταυτόχρονα σε όλες τις θέσεις ή αποκλειστικά σε κάποιες από αυτές, λόγω χωροταξικών περιορισμών. Η τελευταία υπόθεση είναι πολύ πιθανή σε περιπτώσεις, όπως αυτή των θέσεων 5 και 6 οι οποίες είναι αλληλεπικαλυπτόμενες. Όπως είδαμε, όμως, το ολιγονουκλεοτίδιο που αντιστοιχεί στις θέσεις 5 και 6 σχημάτισε σύμπλοκα με τις Sp1/Sp3 ίδιας ηλεκτροφορητικής κινητικότητας με αυτά που σχημάτισαν ολιγονουκλεοτίδια που αντιστοιχούν σε μία μόνο θέσης πρόσδεσης, όπως τα (-87/-70 θέση 3) και (-124/-109 θέση 1). Επομένως, οι θέσεις 5 και 6 προσδένουν ένα μόριο Sp1 ή Sp3.

Για να μελετήσουμε περαιτέρω την πρόσδεση των Sp1/Sp3 στις 6 θέσεις πρόσδεσής τους, χρησιμοποιήσαμε ένα ολιγονουκλεοτίδιο που περιλαμβάνει τις θέσεις πρόσδεσης 1 και 2 (-123/-97). Και στην περίπτωση αυτή παρατηρούμε ότι τα σύμπλοκα που σχηματίζονται έχουν την ίδια ηλεκτροφορητική κινητικότητα με αυτά που σχηματίζουν ολιγονουκλεοτίδια που περιλαμβάνουν μια μόνο θέση πρόσδεσης. Αυτό συνεπάγεται ότι στην περιοχή αυτή προσδένεται μόνον ένα μόριο Sp1 ή Sp3. Επομένως, οι θέσεις πρόσδεσης δεν είναι όλες κατειλημμένες από Sp1/Sp3, αλλά λόγω χωροταξικών περιορισμών μόνον κάποιες από αυτές έχουν τη δυνατότητα να προσδένουν παράγοντες Sp1/Sp3.

Επίσης, από τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας φαίνεται ότι η θέση 1 όχι μόνο προσδένει ισχυρά τους παράγοντες Sp1/Sp3, αλλά είναι και η πιο σημαντική για την ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από τους δύο αυτούς παράγοντες. Αντίθετα, η θέση 2, παρόλο που διαθέτει την απαραίτητη νουκλεοτιδική ακολουθία, προσδένει πολύ ασθενικά τους παράγοντες Sp1/Sp3. Το αξιοσημείωτο με τη θέση αυτή είναι το γεγονός ότι παρόλο που η πρόσδεση είναι τόσο ασθενική, η μεταλλαξιγένεση της θέσης αυτής οδηγεί σε απώλεια της ικανότητας πρόσδεσης των Sp1/Sp3 στην περιοχή (-123/-97), αν και η θέση 1 παραμένει ανέπαφη στην περίπτωση αυτή. Ταυτόχρονα, οι μεταλλάξεις στην περιοχή αυτή οδηγούν σε μείωση της ενεργότητας του -2325/+8 υποκινητή κατά 57% και 76% σε κύτταρα HepG2 και COS-7, αντίστοιχα, ενώ οι μεταλλάξεις στη θέση 1, οδηγούν σε μείωση κατά 23% και 5% στην ίδια περίπτωση. Συνεπώς, οι μεταλλάξεις στη θέση 2 δεν επηρεάζουν μόνον την πρόσδεση των Sp1/Sp3 στη συγκεκριμένη θέση, αλλά και στις γειτονικές θέσεις. Αυτό πιθανά να οφείλεται στην αλλαγή της δομής του DNA λόγω των σημειακών μεταλλάξεων, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η πρόσδεση παραγόντων σε αυτό.

Στη συνέχεια είδαμε ότι μια μεταλλαγμένη μορφή της Sp1 που δε διαθέτει την περιοχή D (αμινοξέα 730-778) προσδένεται στα GC μοτίβα με την ίδια συγγένεια, όπως και η αγρίου τύπου μορφή, αλλά δεν είναι ικανή να ενεργοποιήσει συνεργασιακά υποκινητές που περιέχουν πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης των Sp1/Sp3. Σε κύτταρα SL2, η μορφή αυτή ενεργοποιεί 12 φορές τον p21 υποκινητή, ενεργοποίηση η οποία είναι 75% χαμηλότερη από αυτήν που επιτυγχάνει η αγρίου τύπου μορφή. Επιπλέον, η μεταλλαγμένη

μορφή δρα ως αρνητικά επικρατούσα και παρεμποδίζει την ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από την Sp1, πιθανά λόγω ανταγωνισμού για τις ίδιες θέσεις πρόσδεσης στον υποκινητή αυτό. Όλα τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι η ισχυρή ενεργοποίηση του p21 υποκινητή οφείλεται στη συνεργασία μεταξύ των Sp1 μορίων τα οποία βρίσκονται την ίδια στιγμή προσδεμένα στο συγκεκριμένο υποκινητή.

Ένα άλλο σημείο στο οποίο πρέπει να εστιασθούμε είναι ο ρόλος της θέσης 3 στη ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από τις πρωτεΐνες Sp. Όπως είδαμε, η μεταλλαγμένη της θέσης 3 τόσο στον υποκινητή (-215/+8) όσο και στον (-2325/+8) αύξησε την εξαρτημένη από Sp1 και Sp3 ενεργοποίησή τους σε κύτταρα SL2. Από την άλλη μεριά, η ίδια μετάλλαξη προκάλεσε μια σημαντική μείωση της τάξης του 90% στην ενεργότητα του p21 υποκινητή σε κύτταρα HepG2. Πιθανά, οι διαφορές αυτές ανάμεσα στα δύο πειραματικά μοντέλα μας (HepG2 και SL2) να οφείλεται στα επίπεδα έκφρασης των Sp1/Sp3 στα κύτταρα αυτά. Η μετάλλαξη της θέσης 3, όντως έχει αρνητικό αποτέλεσμα στην εξαρτημένη από Sp1 και Sp3 ενεργοποίηση του p21 υποκινητή, στην περίπτωση που οι δύο αυτοί παράγοντες εκφράζονται σε χαμηλά και περισσότερο φυσιολογικά επίπεδα, όπως συμβαίνει στα κύτταρα HepG2, και όχι στις περιπτώσεις όπου οι δύο αυτοί παράγοντες υπερεκφράζονται, όπως συμβαίνει στα κύτταρα SL2.

Εναλλακτικά, τα αντικρουόμενα αποτελέσματα θα μπορούσαν να αποδοθούν στη λειτουργική κατάσταση των Sp1/Sp3 που προσδένονται στη συγκεκριμένη θέση σε διαφορετικά κυτταρικά υπόβαθρα. Είναι γνωστό ότι η Sp3 διαθέτει μια παρεμποδιστική λειτουργία η οποία οφείλεται στην περιοχή C της πρωτεΐνης (Dennig et al, 1996). Η περιοχή αυτή περιλαμβάνει ένα αμινοξύ λυσίνης, το οποίο ακετυλιώνεται *in vivo* και *in vitro* από CBP και p300 (Braun et al, 2001). Η ακετυλίωση, όμως, αυτή της Sp3 σχετίζεται με τη μεταγραφική της δράση, εφόσον η ακετυλιωμένη μορφή δρα ως καταστολέας και η μη ακετυλιωμένη μορφή ως ενεργοποιητής (Braun et al, 2001). Επίσης, είδαμε ότι η εξαρτημένη από Sp1 ενεργοποίηση του p21 υποκινητή ενισχύθηκε σημαντικά από μια μεταλλαγμένη μορφή της Sp1, που δεν περιλαμβάνει την περιοχή C. Επομένως και στην περίπτωση αυτή η περιοχή C θα μπορούσε να αποτελεί στόχο ακετυλίωσης, η οποία θα ρυθμίζει την ενεργότητά της. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η ακετυλίωση ή όχι των Sp1/Sp3 που

προσδένονται στην κοντινή περιοχή του p21 υποκινητή πιθανά παίζει σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στην ενεργοποίηση του συγκεκριμένου υποκινητή, ανάλογα με το κυτταρικό υπόβαθρο.

Συνεισφορά των θέσεων πρόσδεσης των παραγόντων Sp1/Sp3 στην εξαρτημένη από Smad ενεργοποίηση του p21 υποκινητή.

Ήταν ήδη γνωστό ότι συγκεκριμένα μέλη της οικογένειας Smad (Smad 2, 3 και 4), τα οποία δρουν ως διαμεσολαβητές της σηματοδότησης που επάγεται από τον παράγοντα TGF-β, ενεργοποιούν τον p21 υποκινητή σε κύτταρα HepG2 μέσω φυσικών και λειτουργικών αλληλεπιδράσεων με τον παράγοντα Sp1 που προσδένεται στην περιοχή (-125/-60) του συγκεκριμένου υποκινητή (Moustakas and Kardassis, 1998; Pardali et al, 2000). Σε άλλες μελέτες βρέθηκε ότι ο TGF-β αυξάνει την έκφραση της p21 σε κύτταρα HaCaT μέσω της θέσης 3, η οποία για το λόγο αυτό ονομάστηκε TβRE (TGF-β responsive element) (Datto and Wang, 1995).

Στη συγκεκριμένη εργασία, αρχικά δείξαμε ότι οι πρωτεΐνες Smad3/Smad4 ενεργοποιούν τον p21 υποκινητή σε κύτταρα SL2 μόνο παρουσία του παράγοντα Sp1. Επομένως, η ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από τις πρωτεΐνες Smad σε κύτταρα HepG2 βρίσκεται σε απόλυτη εξάρτηση από την παρουσία του Sp1 και οφείλεται στη λειτουργική συνεργασία μεταξύ των πρωτεϊνών Smad και του παράγοντα Sp1 που προσδένεται στην κοντινή περιοχή του υποκινητή.

Προχωρώντας περαιτέρω, τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας δείχνουν ότι η μεταλλαγμένη οποιοδήποτε G/C μοτίβου στον κοντινό p21 υποκινητή δεν επηρεάζει το βαθμό ενεργοποίησής του από τις πρωτεΐνες Smad, υποδεικνύοντας ότι καμία από τις θέσεις 1-6 δεν είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του παραπάνω υποκινητή από τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες, αλλά όλες είναι ισοδύναμες ως προς τη συγκεκριμένη λειτουργία. Υποθέτουμε ότι η καταστροφή κάποιας από τις θέσεις αναπληρώνεται από τις αλληλεπιδράσεις των Smad με τον Sp1 που προσδένεται στις γειτονικές θέσεις.

Παρόλο, όμως, που ο βαθμός ενεργοποίησης παραμένει ανεπηρέαστος από τις μεταλλάξεις των θέσεων 1-6, εντούτοις οι p21 υποκινητές που φέρουν μεταλλάξεις στις θέσεις 1-4 δεν είναι ικανοί να

φθάσουν τα επίπεδα ενεργοποίησης του αγρίου τύπου υποκινητή, ακόμη και παρουσία Smad3/Smad4. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι η απόκριση των κυττάρων στην κυτταροστατική δράση του παράγοντα TGF-β, η οποία μεσολαβείται και διεκπεραιώνεται από τον αναστολέα του κυτταρικού κύκλου p21, εξαρτάται από τα βασικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου p21 στα κύτταρα αυτά. Αν η έκφραση του γονιδίου είναι μειωμένη λόγω π.χ. κάποιας μετάλλαξης στον υποκινητή, τότε ο TGF-β, μέσω των πρωτεϊνών Smad, δεν είναι σε θέση να αποκαταστήσει τη μείωση της έκφρασης στα αρχικά επίπεδα προφανώς λόγω της ανικανότητας των Smad πρωτεϊνών να αλληλεπιδράσουν λειτουργικά με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι δεν μπορούν να στρατολογηθούν στον υποκινητή λόγω της μετάλλαξης. Όπως επισημάνθηκε στην εισαγωγή, τέτοιοι παράγοντες εκτός του Sp1, είναι η p53, ο υποδοχέας της βιταμίνης D (VitDR), ο υποδοχέας τους 9-cis ρετινοϊκού οξέος (RXR) κ.α.

Η περιοχή -2325/-2260 ενεργεί ως μεταγραφικός ενισχυτής σε κύτταρα HepG2.

Όπως προκύπτει από τις μελέτες μας, ο υποκινητής -2325/+8 του γονιδίου p21 παρουσιάζει πολύ υψηλά επίπεδα μεταγραφικής ενεργότητας στα κύτταρα HepG2. Για να διερευνήσουμε τους μηχανισμούς που συμβάλλουν στην επίτευξη αυτής της ενεργοποίησης, χρησιμοποιήσαμε μεταλλάξεις που αφορούν διάφορα τμήματα του p21 υποκινητή. Βρήκαμε, λοιπόν, ότι η απαλοιφή της περιοχής -120/-60 η οποία περιλαμβάνει τις 4 από τις 6 θέσεις πρόσδεσης των Sp1/Sp3 είχε ως αποτέλεσμα μια δραματική μείωση στην ενεργότητα του (-2325/+8)p21 υποκινητή σε κύτταρα HepG2. Επιπλέον, η απαλοιφή της μακρινής περιοχής -2325/-1890 οδήγησε σε σημαντική απώλεια της ενεργότητας του υποκινητή, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι παράγοντες που προσδένονται στη μακρινή περιοχή αλληλεπιδρούν με τον Sp1 που προσδένεται στην κοντινή περιοχή.

Με τα πειράματα απαλοιφών δείξαμε ότι η περιοχή -2325/-2260 είναι ικανή να ενισχύσει τη μεταγραφή τόσο του ομόλογου p21 υποκινητή, όσο και του ετερόλογου υποκινητή κινάσης-θυμιδίνης. Η περιοχή αυτή περιλαμβάνει την ακολουθία 5'-GAACATGTCCCAACATGTTG-3' μεταξύ των νουκλεοτιδίων -2281/-2262, η οποία είναι ομόλογη με την τυπική θέση πρόσδεσης της p53

5'-RRRCATGYYYRRRCATGYYY-3' όπου R είναι πουρίνη και Y είναι πυριμιδίνη (El-Deiry et al, 1993). Η απαλοιφή της περιοχής αυτής είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια της εξαρτημένης από p53 ενεργοποίησης του p21 υποκινητή τόσο σε κύτταρα HepG2, όσο και σε κύτταρα HaCaT. Επομένως, η περιοχή -2325/-2260 λόγω της δυνατότητάς της να προσδένει την p53 ενεργεί ως μεταγραφικός ενισχυτής της κοντινής περιοχής μέσω ενός μηχανισμού που εμπλέκει λειτουργική συνεργασία μεταξύ του Sp1 που προσδένεται στην κοντινή περιοχή και της p53 που προσδένεται στη μακρινή περιοχή.

Η ικανότητα της p53 να ενισχύει μεταγραφικά γονίδια από μεγάλες αποστάσεις περιγράφηκε στα γονίδια GADD45 και MDM2, στα οποία οι θέσεις πρόσδεσης της p53 εντοπίζονται σε ιντρόνια (Kastan et al, 1992; Zauberman et al, 1995). Στο γονίδιο κινάσης της μυϊκής κρεατίνης, η θέση πρόσδεσης της p53 εντοπίζεται σε μια περιοχή ενισχυτή, 3,3 kbp πριν τη θέση έναρξης της μεταγραφής (Weintraub et al, 1991). Στις περιπτώσεις αυτές δεν είναι ξεκάθαρο αν η p53 συνεργάζεται με παράγοντες που προσδένονται στην κοντινή περιοχή των γονιδίων αυτών ή δρα ανεξάρτητη.

Η πρόσδεση των p53 και Sp1 στις αντίστοιχες θέσεις τους στον p21 υποκινητή οδηγεί σε λειτουργική συνεργασία των δύο πρωτεϊνών και συνεργασιακή ενεργοποίηση του p21 υποκινητή.

Όπως παρατηρήσαμε στα πειράματά μας, τα κύτταρα HepG2 εκφράζουν φυσιολογικά λειτουργική p53. Υποθέσαμε ότι η συνεργασία μεταξύ της p53 που προσδένεται στη μακρινή περιοχή και του Sp1 που προσδένεται στην κοντινή περιοχή θα μπορούσε να είναι υπεύθυνη για τα υψηλά επίπεδα ενεργοποίησης του p21 υποκινητή στα κύτταρα αυτά, καθώς και σε άλλα που εκφράζουν και τις δύο αυτές πρωτεΐνες. Εφόσον η υπόθεση αυτή ισχύει, τότε η ενεργότητα του p21 υποκινητή θα πρέπει να είναι πολύ χαμηλή σε κύτταρα που εκφράζουν μεταλλαγμένη p53 ή δεν εκφράζουν ενδογενώς p53 ή Sp1. Πράγματι, οι παροδικές επιμολύνσεις κερατινοκυττάρων HaCaT, τα οποία εκφράζουν μεταλλαγμένη και μεταγραφικά ανενεργή p53 (Lehman et al, 1993) έδειξαν ότι η ενεργότητα του p21 υποκινητή είναι πολύ χαμηλή. Μετά, όμως, την υπερέκφραση λειτουργικής p53 η ενεργότητα του συγκεκριμένου υποκινητή αυξήθηκε σημαντικά στα κύτταρα αυτά. Επιπλέον, η εξαρτημένη

από p53 ενεργοποίηση του p21 υποκινητή χάθηκε μετά από απαλοιφή της μακρινής ή της κοντινής περιοχής του p21 υποκινητή. Τα δεδομένα αυτά ενισχύουν την υπόθεση ότι στον p21 υποκινητή λαμβάνει χώρα συνεργασία μεταξύ της p53 και της Sp1.

Η θέση 3 είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από p53.

Η κοντινή περιοχή του p21 υποκινητή, όπως δείξαμε προηγουμένως, περιλαμβάνει 6 θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα Sp1 και του Sp3 (θέσεις 1-6). Η θέση 3 έχει αναφερθεί προηγουμένως ότι είναι υπεύθυνη για την αύξηση της έκφρασης του γονιδίου p21 μέσω παραγόντων όπως ο TGF- β (Datto and Wang, 1995), το βουτυρικό οξύ (Nakano et al, 1997), η τριχοστατίνη A (Sowa et al, 1997), η λοβαστατίνη (Lee et al, 1998) και το Ca²⁺ (Prowse et al, 1997). Από την άλλη, οι θέσεις 1 και 2 διαμεσολαβούν τη μεταγραφική ενεργοποίηση από εστέρες της φορβόλης και οκαδαϊκό οξύ (Biggs et al, 1996), από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη BRCA1 (Somasundaram et al, 1997) και τον παράγοντα GKLF (KLF4) (Zhang et al, 2000). Τέλος, δεν υπάρχουν ξεκάθαροι ρόλοι για τις θέσεις 4, 5 και 6.

Στη συγκεκριμένη μελέτη αναλύσαμε κάθε μια από τις θέσεις αυτές για τη δυνατότητά τους να διαμεσολαβούν στην ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από p53. Η ανάλυση των θέσεων αυτών με την εισαγωγή μεταλλάξεων έδειξε ότι η θέση 3, η οποία εντοπίζεται στην περιοχή -82/-77 του υποκινητή, είναι απαραίτητη για την εξαρτημένη από p53 ενεργοποίηση του συγκεκριμένου υποκινητή. Αντίθετα, οι μεταλλάξεις στις άλλες θέσεις δεν επηρέασαν ή αύξησαν ελάχιστα την ενεργοποίηση αυτή. Τα δεδομένα αυτά αποδεικνύουν ότι η εξαρτημένη από p53 ενεργοποίηση του p21 υποκινητή επιτυγχάνεται από τη λειτουργική συνεργασία μεταξύ της p53, που προσδένεται στη μακρινή περιοχή, και την Sp1 που προσδένεται στη θέση 3 της κοντινής περιοχής. Υποθέτουμε ότι τα μόρια της Sp1 που προσδένονται στις υπόλοιπες θέσεις (θέσεις 1, 2, 4 και 5/6) είναι υπεύθυνα για την p53-ανεξάρτητη ενεργοποίηση του υποκινητή, καθώς και για την ενεργοποίηση του υποκινητή μέσω άλλων παραγόντων. Για παράδειγμα, είχε αναφερθεί προηγουμένως ότι υπάρχει λειτουργική συνεργασία μεταξύ της Sp1 και του πυρηνικού υποδοχέα RXR

που προσδένεται στην περιοχή -1212/-1194 του p21 υποκινητή (Liu et al, 1996a).

Όλες οι παραπάνω παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι η κάθε θέση πρόσδεσης της Sp1 είναι σημαντική για τη ρύθμιση του p21 γονιδίου κάτω από διάφορες συνθήκες. Ο μηχανισμός που καθορίζει την αντιστοιχία αυτή είναι ακόμη άγνωστος. Πιθανόν, η απόσταση της κάθε θέσης από το κουτί TATA του p21 υποκινητή, το οποίο αποτελεί σημείο συνάθροισης των παραγόντων της βασικής μεταγραφικής μηχανής, να είναι αυτή που καθορίζει την ταυτότητα των συνενεργοποιητών που αλληλεπιδρούν με την κάθε θέση. Από την άλλη, πιθανόν, να παίζει ρόλο και η τοποθέτηση της κάθε θέσης πάνω στην έλικα του DNA. Με υπολογισμό των βάσεων που μεσολαβούν μεταξύ των θέσεων πρόσδεσης της Sp1, βρήκαμε ότι η θέση 3 θα πρέπει να βρίσκεται στην αντίθετη μεριά της έλικας από αυτήν που βρίσκονται όλες οι άλλες θέσεις. Ίσως η τοποθέτηση αυτή είναι που κάνει τη συγκεκριμένη θέση απαραίτητη για την ενεργοποίηση του p21 από p53, ενώ δε συμβάλλει στη βασική ενεργότητα του υποκινητή αυτού.

Η συνεργασιακή ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από τους παράγοντες p53 και Sp1 απαιτεί πρόσδεση και των δύο παραγόντων στις αντίστοιχες θέσεις τους στον υποκινητή, καθώς και μεταγραφικά λειτουργική p53.

Οι παροδικές επιμολύνσεις των κυττάρων SL2 με υποκινητές που δε διαθέτουν είτε τη θέση πρόσδεσης της p53 είτε τις θέσεις πρόσδεσης του Sp1, απέδειξαν ξεκάθαρα ότι η συνεργασιακή ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από τους δύο αυτούς παράγοντες απαιτεί, αρχικά την πρόσδεσή τους στις αντίστοιχες θέσεις τους, και στη συνέχεια την αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Βέβαια, υπάρχουν άλλες εργασίες που δείχνουν ότι η p53 και η Sp1 έχουν τη δυνατότητα να σχηματίζουν σύμπλοκα στον πυρήνα, χωρίς να είναι απαραίτητη η προηγούμενη πρόσδεσή τους στο DNA (Schavinsky-Kharpunsky et al, 2003). Αυτό είναι απόλυτα σύμφωνο με τα δικά μας δεδομένα από τις αναλύσεις συνανοσοκατακρήμνισης, όπου παρατηρούμε ότι

οι δύο αυτές πρωτεΐνες σχηματίζουν σύμπλοκα, ανεξάρτητα από την πρόσδεσή τους στο DNA.

Στο σημείο αυτό τέθηκε το εξής ερώτημα : είναι αρκετή η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραγόντων, ώστε να ενεργοποιηθεί συνεργασιακά ο συγκεκριμένος υποκινητής ή απαιτούνται και περαιτέρω προϋποθέσεις; Όπως είδαμε, η p53 από μόνη της δεν είναι ικανή να ενεργοποιήσει τον p21 υποκινητή. Αντίθετα, η Sp1 είναι σε θέση να ενεργοποιήσει τον υποκινητή αυτό σε σημαντικό βαθμό. Αυτό μας οδηγεί στο πιθανό σενάριο ότι ο ρόλος της p53 είναι να αυξάνει με κάποιον τρόπο την ενεργότητα του Sp1, χωρίς η ίδια να συμμετέχει άμεσα στην ενεργοποίηση. Αν πράγματι συνέβαινε αυτό, τότε μια μεταλλαγμένη μορφή της p53, η οποία είναι ικανή να αλληλεπιδράσει με την Sp1 και να την ενεργοποιήσει, χωρίς η ίδια να είναι λειτουργικά ικανή, θα ήταν σε θέση να οδηγήσει σε συνεργασιακή ενεργοποίηση του p21 υποκινητή. Όπως, όμως, προκύπτει από τα αποτελέσματά μας, η μεταλλαγμένη στην περιοχή ενεργοποίησης p53, παρόλο που αλληλεπιδρά με την Sp1 στον ίδιο βαθμό που αλληλεπιδρά και η αγρίου τύπου, εντούτοις δεν είναι ικανή να ενεργοποιήσει τον p21 υποκινητή, αφού η ίδια δεν είναι μεταγραφικά ενεργή. Επομένως, η συνεργασιακή ενεργοποίηση δεν είναι απλώς μια ενίσχυση της ικανότητας της Sp1, αλλά αποτέλεσμα μια αλληλεπίδρασης μεταξύ δύο μεταγραφικά ενεργών πρωτεϊνών.

Η πρωτεΐνη p53 αλληλεπιδρά άμεσα με την πρωτεΐνη Sp1.

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιώντας έναν αριθμό ελλειμματικών μορφών των Sp1 και p53, εντοπίσαμε τις περιοχές που λαμβάνουν μέρος στην άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο αυτών παραγόντων. Αρχικά, δείξαμε ότι η καρβοξυ-τερματική περιοχή της p53 είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με τους Sp1/Sp3 τόσο *in vitro*, όσο και σε αναλύσεις ενεργοποίησης σε κύτταρα SL2 και COS-7. Η περιοχή αυτή περιλαμβάνει την περιοχή ολιγομερισμού της p53 και επομένως τα αποτελέσματά μας θα μπορούσαν να εξηγηθούν με τις παρακάτω θεωρίες : **α) Η περιοχή ολιγομερισμού της p53 εμπλέκεται άμεσα στην αλληλεπίδραση με την Sp1.** Παρόλο που η θεωρία αυτή ισχύει *in vitro* (Lagger et al, 2003), φαίνεται

δύσκολο να ισχύει και *in vivo*, καθώς ο ρόλος της περιοχής αυτής είναι καλά χαρακτηρισμένος και η δημιουργία συμπλόκων p53-p53 δεν αφήνει χώρο για πρόσδεση και άλλων παραγόντων, όπως είναι ο Sp1. **β) Ο ολιγομερισμός της p53 είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την αλληλεπίδραση κάποιας άλλης περιοχής της p53 με τους Sp1/Sp3.** Ο σχηματισμός συμπλόκων p53, πιθανά, να επιτρέπει στην καρβοξυ-τερματική περιοχή της περιοχής πρόσδεσης στο DNA (αμινοξέα 160-293) να προσδεθεί στους Sp1/Sp3. Η θεωρία αυτή συμβαδίζει και με τα αποτελέσματά μας, καθώς και με τα αποτελέσματα των Lagger et al, οι οποίοι έδειξαν ότι και μια δεύτερη περιοχή της p53 που ορίζεται από τα αμινοξέα 145-292 είναι ικανή να προσδένεται στον Sp1 *in vitro* (Lagger et al, 2003).

Εκτός από την p53, και η πρωτεΐνη Sp1 προσδένεται στο DNA και ενισχύει τη μεταγραφή ως ολιγομερές, ενώ η περιοχή D είναι απαραίτητη για τη λειτουργική συνεργασία μεταξύ Sp1 μορίων σε υποκινητές που διαθέτουν πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης του συγκεκριμένου παράγοντα (Pascal and Tjian, 1991; Mastrangelo et al, 1991). Ο p21 υποκινητής περιέχει 6 θέσεις πρόσδεσης των Sp1/Sp3 και τα μόρια του Sp1 που προσδένονται σε αυτές ενεργοποιούν συνεργασιακά τον υποκινητή, ενώ η απαλοιφή της περιοχής D οδηγεί σε παρεμπόδιση αυτής της συνεργασίας.

Επίσης, δε θα πρέπει να περνάει απαρατήρητη η πιθανότητα σχηματισμού πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων στη σύνθεση των οποίων συμμετέχουν ολιγομερή από Sp1, p53 και πιθανά και από άλλους παράγοντες. Τέτοια πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα, η σύνθεση των οποίων εξαρτάται από το κυτταρικό υπόβαθρο και τις συνθήκες, μπορεί να είναι πιθανόν θέσεις σύγκλισης πολλαπλών ρυθμιστικών σημάτων που φθάνουν στον p21 υποκινητή και να ρυθμίζουν την κυτταρική απόκριση (κυτταρική αύξηση, αναστολή ή απόπτωση). Η συμμετοχή συνενεργοποιητών ή συγκαταστολέων στα σύμπλοκα αυτά μπορεί να είναι ένας επιπλέον ρυθμιστικός παράγοντας. Είναι, πλέον, γνωστό ότι η πρωτεΐνη Sp1 προσδένεται μέσω της περιοχής πρόσδεσης στο DNA με το συνενεργοποιητή p300 (Suzuki et al, 2000). Επιπλέον, πρόσφατα, βρέθηκε ότι η Sp1 σχηματίζει σύμπλοκα με την απακετυλάση ιστονών HDAC μέσω της καρβοξυ-τερματικής περιοχής της (Lagger et al, 2002), ενώ η p53 μπορεί να αντικαταστήσει την

HDAC στα ετερόλογα σύμπλοκα με την Sp1, αποκαθιστώντας έτσι τη μεταγραφική δραστηριότητα της Sp1 (Lagger et al, 2003).

Οι αναλύσεις μας για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των Sp1 και p53 έδειξαν ότι οι περιοχές ενεργοποίησης (A και B), καθώς και η περιοχή πρόσδεσης στο DNA της Sp1 (DBD) είναι αυτές που προσδένονται άμεσα στην p53. Βέβαια δεν είναι ακόμη ξεκάθαρος ο τρόπος με τον οποίο αυτές οι 3 περιοχές αλληλεπιδρούν με την καρβοξυ-τερματική περιοχή της p53. Η πρώτη πιθανότητα είναι να σχηματίζουν μια κοινή επιφάνεια πάνω στην οποία προσδένεται η p53. Η εναλλακτική υπόθεση είναι ότι στην περίπτωση των πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων, κάθε μόριο της p53 προσδένεται σε διαφορετική περιοχή του κάθε μορίου της Sp1. Έτσι, ένα μόριο p53 σε ένα τετραμερές μπορεί να προσδένεται στην περιοχή A ενός μορίου Sp1, τη στιγμή που το άλλο μόριο p53 προσδένεται στην περιοχή DBD του άλλου μορίου Sp1, με αποτέλεσμα να ισχυροποιείται το σύμπλοκο. Αυτός πιθανόν να είναι και ο λόγος ύπαρξης πολλαπλών θέσεων πρόσδεσης της p53 στον παράγοντα Sp1.

Η πρωτεΐνη Sp1 αλληλεπιδρά και με άλλα μέλη της οικογένειας p53.

Πέρα από την p53, η πρωτεΐνη Sp1 αλληλεπιδρά άμεσα και με ένα ακόμη μέλος της p53 οικογένειας, την p73. Τα μέλη της συγκεκριμένης οικογένειας, τα οποία προς το παρόν είναι 3 (p53, p63 και p73), χαρακτηρίζονται από ομολογία στην περιοχή ενεργοποίησης, την περιοχή πρόσδεσης στο DNA και την περιοχή ολιγομερισμού (Kaghad et al, 1997; Yang et al, 1998; Osada et al, 1998). Οι καρβοξυ-τερματικές περιοχές των p63 και p73 διαθέτουν και μια δεύτερη περιοχή ενεργοποίησης (Takeda et al, 1994), καθώς και την περιοχή SAM (Sterile Alpha Motif), η οποία εμπλέκεται στις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις (Thanos and Bowie, 1999; Bork and Koonin, 1999). Εκτός από την p73, προκαταρκτικά αποτελέσματα στο εργαστήριό μας δείχνουν ότι και η p63 έχει τη δυνατότητα να αλληλεπιδρά λειτουργικά με την Sp1 (αδημοσίευτα αποτελέσματα). Αυτή η δυνατότητα αλληλεπίδρασης της Sp1 και με άλλα μέλη της οικογένειας της p53 πιθανά να παίζει σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, όπου τα μέλη αυτής

της οικογένειας εκφράζονται σε διαφορετικά επίπεδα ή δεν εκφράζονται καθόλου (Marin and Kaelin , 2000). Επίσης, η αλληλεπίδραση της Sp1 με διαφορετικά μέλη της οικογένειας p53 στο ίδιο κύτταρο μπορεί να οδηγεί στη μεταγραφική ενεργοποίηση διαφορετικών γονιδίων στόχων από το κάθε σύμπλοκο πρωτεϊνών. Η τεχνολογία της επιλεκτικής γονιδιακής αποσιώπησης μέσω μικρών κατασταλακτικών RNA μας δίνει σήμερα τη δυνατότητα να πάρουμε απαντήσεις στα παραπάνω σημαντικά ερωτήματα.

Η p53 οδηγεί είτε σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου είτε σε απόπτωση.

Όπως είναι γνωστό, η αύξηση της p53 είναι ικανή να ενεργοποιήσει γονίδια που αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο, όπως η p21. Από την άλλη, η p53 έχει τη δυνατότητα να προσδένεται σε υποκινητές γονιδίων που προάγουν την απόπτωση, και έτσι να οδηγούν τα κύτταρα σε προγραμματισμένο θάνατο. Ποιος είναι, όμως, ο μηχανισμός με τον οποίο η p53 επιλέγει ανάμεσα στα δύο αυτά αντικρουόμενα μονοπάτια; Είναι πλέον γνωστό ότι βασικό ρόλο στην απόφαση αυτή διαδραματίζει το γονίδιο p21. Καταστροφή του γονιδίου αυτού με ομόλογο ανασυνδυασμό σε καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της απόπτωσης ως απόκριση σε υπερέκφραση της p53 σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου (Yu et al, 2003). Η αποπτωτική αυτή απόκριση αντιστράφηκε από την ταυτόχρονη καταστροφή του γονιδίου PUMA, στα κύτταρα που ήδη δε διέθεταν p21. Επομένως, η ισορροπία στην έκφραση των γονιδίων p21 και PUMA είναι σημαντική για την κυτταρική απόκριση στην ενεργοποίηση της p53.

Μια δεύτερη εργασία έδειξε ότι το ογκογονίδιο c-myc παρεμποδίζει την ενεργοποίηση του p21 από p53, ευνοώντας έτσι την απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου (Seoane et al, 2002). Επομένως, όταν η έκφραση του γονιδίου p21 παρεμποδίζεται από μεταλλάξεις ή ογκογονίδια, τότε ευνοείται ο κυτταρικός θάνατος ως απόκριση στην αύξηση της p53.

Στηριζόμενοι στις παρατηρήσεις αυτές, καθώς και στα δικά μας αποτελέσματα, θεωρήσαμε ότι οι παράγοντες Sp1/Sp3 πρέπει να παίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική απόκριση, αφού ρυθμίζουν άμεσα την έκφραση του γονιδίου p21. Για να μελετήσουμε το ρόλο αυτό,

χρησιμοποιήσαμε το φάρμακο 5-Fluorouracil. Η δράση του συγκεκριμένου φαρμάκου έγκειται στη λανθασμένη ενσωμάτωσή του στο DNA και στο RNA, κατά τη διάρκεια της αντιγραφής και της μεταγραφής. Ταυτόχρονα, αναστέλλει και το ένζυμο συνθάση του θυμιδικού, η οποία καταλύει το σχηματισμό των νουκλεοτιδίων δεοξυ-θυμιδίνης (Longley et al, 2003). Σήμερα, η 5-FU χρησιμοποιείται ευρέως σε θεραπεία έναντι διαφόρων ειδών καρκίνου (Longley et al, 2003).

Στην παρούσα εργασία, η 5-FU ενεργοποίησε σε σημαντικό βαθμό την p53 σε κύτταρα HepG2, ενώ ταυτόχρονα προκάλεσε μια καθυστερημένη αύξηση και της p21, η οποία αύξηση συνέβη σε μεταγραφικό επίπεδο. Η απαλοιφή, όμως, της κοντινής περιοχής του p21 υποκινητή παρεμπόδισε την απόκριση του συγκεκριμένου υποκινητή στο παραπάνω φάρμακο.

Στη συνέχεια, προκειμένου να μελετήσουμε εκτενέστερα τη σημασία του Sp1 στην κυτταρική απόκριση μετά την επίδραση γενετοξικών παραγόντων, χρησιμοποιήσαμε την ένωση Μιθραμυκίνη (Mithramycin). Η ουσία αυτή προέρχεται από το βακτήριο *Streptomyces argilaceus* (Jayasuriya et al, 2002). Η Μιθραμυκίνη είναι ένας παράγοντας που ενσωματώνεται σε περιοχές του DNA πλούσιες σε GC και επηρεάζει τη μεταγραφή γονιδίων που φέρουν τέτοιες ακολουθίες στον υποκινητή τους. Τα γονίδια που είναι γνωστά μέχρι σήμερα ότι αναστέλλονται από τη Μιθραμυκίνη είναι τα c-myc, διϋδροφολική ρεδοκτάση και κολλαγόνο-α1 (Blume et al, 1991; Ray et al, 1989; Aich and Dasgupta, 1995; Majee and Chakrabarti, 1999; Miller et al, 1987; Nehls et al, 1993; Snyder et al, 1991). Κλινικά η Μιθραμυκίνη χρησιμοποιείται στις Ηνωμένες Πολιτείες έναντι της ασθένειας Paget και του καρκινώματος όρχεος (Majee et al, 1999; Elias and Evans, 1972; Brown and Kennedy, 1965; Ryan et al, 1970).

Όπως παρατηρούμε από τα πειράματά μας, η Μιθραμυκίνη ενεργοποιεί σημαντικά την p53 σε κύτταρα HepG2, τα οποία εκφράζουν λειτουργική p53. Η ενεργοποίηση αυτή βρίσκεται στα ίδια επίπεδα με αυτήν που προκαλείται από τη 5-FU, ενώ ξεκινάει λίγο νωρίτερα σε σχέση με τη δεύτερη (2 ώρες μετά την επίδραση της Μιθραμυκίνης σε σχέση με τις 4 ώρες που απαιτούνται από τη 5-FU). Οι παρατηρήσεις αυτές υποδεικνύουν μια μετα-μεταφραστική ενεργοποίηση της p53 από τη Μιθραμυκίνη, που λαμβάνει χώρα στην αρχή της διαδικασίας ενεργοποίησης. Πράγματι, οι αναλύσεις μας

έδειξαν ότι η πρωτεΐνη p53 φωσφορυλιώνεται επιλεκτικά στη Ser-15 τόσο από τη Μιθραμυκίνη, όσο και από τη 5-FU, και η φωσφορυλίωση αυτή πρέπει να είναι υπεύθυνη, τουλάχιστο σε ένα βαθμό, για τη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης. Αυτό βρίσκεται σε απόλυτη συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που απέδειξαν ότι η φωσφορυλίωση σταθεροποιεί την p53, αποτρέποντας την πρόσδεσή της με την Mdm2 και την ακόλουθη αποικοδόμησή της από τα πρωτεασώματα (Levine, 1997; Vogelstein et al, 2000). Επτά σερίνες και 2 θρεονίνες στην αμινο-τερματική περιοχή της p53 (Ser-6, 9, 15, 20, 33, 37, 46 και Thr-18, 81) φωσφορυλιώνονται μετά από την επίδραση ιονικής ή υπεριώδους ακτινοβολίας. Αντίστοιχα, στην καρβοξυ-τερματική περιοχή οι Ser-315 και Ser-392 φωσφορυλιώνονται μετά από βλάβη στο DNA (Waterman et al, 1998).

Η αποτελεσματικότητα των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων στη θεραπεία του καρκίνου επηρεάζεται από διάφορες παραμέτρους, όπως το κυτταρικό υπόβαθρο, η παρουσία μεταλλάξεων σε πρωτεΐνες-κλειδιά και η μεταγραφική απόκριση των γονιδίων-στόχων. Η σημασία των παραπάνω παραμέτρων επιβεβαιώθηκε στη συγκεκριμένη εργασία. Η 5-FU και η Μιθραμυκίνη είναι ισχυροί ενεργοποιητικοί παράγοντες της p53 σε κάποιο κυτταρικό υπόβαθρο (HepG2), αλλά όχι σε άλλο (HaCaT). Η κυριότερη διαφορά ανάμεσα στις δύο αυτές κυτταρικές σειρές είναι ότι η πρώτη εκφράζει φυσιολογική p53 και κανένα άλλο μέλος της συγκεκριμένης οικογένειας, ενώ η δεύτερη εκφράζει μεταλλαγμένη p53, με τη διπλή μετάλλαξη Y179/W282 (Whitesell et al, 1998). Η μετάλλαξη αυτή σταθεροποιεί την πρωτεΐνη και είναι υπεύθυνη για τα υψηλά επίπεδα έκφρασης της p53 κάτω από φυσιολογικές συνθήκες.

Επίσης, τα HaCaT κύτταρα εκφράζουν υψηλά επίπεδα της p63 ακόμη και κάτω από συνθήκες μη ενεργοποίησης από εξωκυττάρους παράγοντες, όπως η 5-FU. Δεν είναι ακόμη γνωστό αν η συγκεκριμένη p63 που εκφράζεται στα HaCaT φέρει παρόμοιες μεταλλάξεις με αυτές της p53, ώστε να είναι τόσο σταθερή. Εντούτοις, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι η p63 δεν είναι ικανή να αντικαταστήσει την p53 στα κύτταρα αυτά μετά την επίδραση της 5-FU. Αυτό μπορεί να δικαιολογηθεί με δύο πιθανές εξηγήσεις. Η πρώτη από αυτές είναι ότι η p63 σε αντίθεση με την p53 δεν είναι ικανή να αλληλεπιδράσει άμεσα με τον παράγοντα Sp1 και επομένως δεν είναι σε θέση να

ενεργοποιήσει το γονίδιο p21. Κάτι τέτοιο δεν είναι γνωστό μέχρι σήμερα και θα αποκλειστεί σύμφωνα με τα προκαταρκτικά μας αποτελέσματα που υποστηρίζουν τη συνεργασία μεταξύ των δύο παραγόντων. Επίσης, υπάρχουν αναφορές που υποστηρίζουν ότι κάποιες ισομορφές της p63 ενεργοποιούν σε σημαντικό βαθμό το γονίδιο p21 και επομένως δεν πρέπει να τίθεται θέμα αλληλεπίδρασης με τον Sp1 (Yang et al, 1998). Η δεύτερη εκδοχή υποστηρίζει ότι η διπλή μετάλλαξη της p53 της προσφέρει έναν αρνητικό, επικρατώντα φαινότυπο στη δράση της p63. Η εκδοχή αυτή είναι σύμφωνη με πρόσφατες έρευνες που δείχνουν ότι οι μεταλλαγμένες p53, που προέρχονται από όγκους, προσδένονται *in vitro* και *in vivo* με την p63 και η αλληλεπίδραση αυτή επηρεάζει την πρόσδεση της p63 στο DNA, καθώς και τη μεταγραφική της ενεργότητα (Strano et al, 2002; Blandino et al,).

Οι αναλύσεις της ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης αποκάλυψαν σημαντικές πληροφορίες όσον αφορά την πρόσδεση των p53 και Sp1 στον p21 υποκινητή, *in vivo* πλέον, κάτω από συνθήκες γενοτοξικής πίεσης. Σύμφωνα με αυτές, ο παράγοντας Sp1 και πιθανά και άλλα μέλη της οικογένειας αυτής, δεν προσδένεται ισχυρά κάτω από φυσιολογικές συνθήκες στον p21 υποκινητή σε κύτταρα HepG2. Αντίθετα, μετά την επίδραση με 5-FU παρατηρούμε σημαντική ενίσχυση στη συγκεκριμένη πρόσδεση. Μηχανιστικά το παραπάνω φαινόμενο μπορεί να εξηγηθεί με πιθανή μετα-μεταφραστική τροποποίηση της πρωτεΐνης Sp1, όπως φωσφορυλίωση ή ακετυλίωση, από ένζυμα που ενεργοποιούνται από 5-FU, η οποία θα επιτρέπει την ενισχυμένη πρόσδεση της Sp1 στο DNA. Αυτό επιβεβαιώνεται εν μέρει από την ανακάλυψη μιας καινούριας οικογένειας αντικαρκινικών παραγόντων, τα αλκυλοφωσφολιπίδια, τα οποία αυξάνουν την έκφραση της p21 μέσω ενός μονοπατιού το οποίο φωσφορυλιώνει την Sp1 και ενισχύει την πρόσδεσή της στην κοντινή περιοχή του p21 υποκινητή (De Siervi et al, 2004). Επίσης, είναι γνωστό ότι η ακετυλίωση της Sp1 επιτυγχάνεται μέσω του συνενεργοποιητή p300 (Suzuki et al, 2000), ο οποίος, ταυτόχρονα, ακετυλιώνει την p53 (Gu and Roeder, 1997). Είναι πιθανό, λοιπόν, η ακετυλίωση των πρωτεϊνών p53 και Sp1 από τον παράγοντα p300 να ενισχύει την πρόσδεσή τους στον p21 υποκινητή.

Εναλλακτικά, η 5-FU είναι πιθανό να ενισχύει ή να σταθεροποιεί τα σύμπλοκα Sp1/p53 μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Έτσι, η 5-FU θα

μπορούσε να ενισχύει την ταυτόχρονη πρόσδεση των προσχηματισμένων συμπλόκων στην κοντινή και στη μακρινή περιοχή του p21 υποκινητή. Άλλωστε, ο σχηματισμός συμπλόκων Sp1/p53 ανεξαρτήτα από την πρόσδεσή τους στο DNA είναι ήδη γνωστός (Schavinsky-Khrapunsky et al, 2003).

Από την άλλη είδαμε ότι η Μιθραμυκίνη αναστέλλει την αύξηση του p21 υποκινητή και όχι τα βασικά επίπεδα έκφρασης αυτού σε κύτταρα HepG2. Αυτό συμφωνεί και με τα αποτελέσματα από τις αναλύσεις ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης, όπου παρατηρούμε ότι η Sp1 προσδένεται στον υποκινητή μόνο μετά από ενεργοποίηση από τη 5-FU. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι ο Sp1 δεν είναι σημαντικός για τα χαμηλά, βασικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου p21, αλλά είναι αναγκαίος για την ενεργοποίηση του γονιδίου, αλληλεπιδρώντας άμεσα και λειτουργικά με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως είναι η p53. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές μπορεί να είναι απαραίτητες για τη σταθεροποίηση των πρωτεϊνικών συμπλόκων τα οποία πρέπει να προσδεθούν ταυτόχρονα σε διαφορετικές περιοχές του υποκινητή, όπως είναι η κοντινή και η μακρινή περιοχή, προκειμένου να ενεργοποιηθεί η μεταγραφή.

Συνοπτικά, δείξαμε ότι η χημειοθεραπευτική ένωση Μιθραμυκίνη έχει διπλή δράση στα κύτταρα στόχους. Από τη μια μεριά ενεργοποιεί ισχυρά την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 με το να προκαλεί τη φωσφορυλίωσή της στη σερίνη 15. Από την άλλη μεριά, η Μιθραμυκίνη, λόγω της ικανότητάς της να παρεμποδίζει την πρόσδεση του παράγοντα Sp1 σε πλούσια σε GC μοτίβα στους υποκινητές γονιδίων, καταστέλλει τη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων στόχων που εξαρτώνται από τον παράγοντα Sp1 για την έκφρασή τους, όπως τα γονίδια p21 και PUMA. Δεν είναι ακόμη γνωστό πόσα διαφορετικά γονίδια-στόχοι της p53 εξαρτώνται από την Sp1. Αναλύσεις γονιδιακής έκφρασης σε μεγάλη κλίμακα χρησιμοποιώντας μικροσυστοιχίες θα μπορούσαν να παρέχουν σημαντική πληροφορία όσον αφορά την ταυτότητα των γονιδίων που επηρεάζονται μεταγραφικά από το κάθε ένα φάρμακο ή από συνδυασμούς φαρμάκων. Η γνώση της ταυτότητας αυτών των γονιδίων είναι σημαντική για την ανάπτυξη βελτιωμένων χημειοθεραπευτικών πρωτοκόλλων.

Σύνοψη

Συνοψίζοντας, από τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας παρατηρούμε ότι η ενεργοποίηση του p21 υποκινητή απαιτεί την ύπαρξη τόσο της κοντινής όσο και της μακρινής περιοχής αυτού. Η απαλοιφή μιας εκ των δύο περιοχών αναστέλλει την ενεργοποίηση του συγκεκριμένου υποκινητή. Η διαπίστωση αυτή είναι πολύ σημαντική, καθώς υποδεικνύει τη σημασία των διάφορων περιοχών του p21 υποκινητή για τη βιολογική απόκριση του γονιδίου p21, δηλαδή για την αναστολή του κυτταρικού κύκλου και την παρεμπόδιση φαινομένων ανεξέλεγκτου κυτταρικού πολλαπλασιασμού, που παρατηρούνται σε περιπτώσεις καρκίνου.

Επίσης, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η ενεργοποίηση του p21 υποκινητή δεν οφείλεται σε ανεξάρτητα σήματα, αλλά απαιτεί ένα σύνολο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, προκειμένου να επιτευχθεί η πλήρης και συνεργασιακή έκφραση του γονιδίου p21. Αρχικά απαιτείται συνεργασία μεταξύ των μορίων Sp1/Sp3 που προσδένονται στην κοντινή περιοχή του p21 υποκινητή. Στη συνέχεια είναι απαραίτητες οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της πρωτεΐνης p53 και άλλων μεταγραφικών παραγόντων που προσδένονται στον ενισχυτή του p21 υποκινητή με τα μόρια Sp1/Sp3 που προσδένονται στην κοντινή περιοχή του ίδιου υποκινητή. Τέλος, απαιτούνται αλληλεπιδράσεις μεταξύ παραγόντων, όπως οι Smad3/4, και των μορίων Sp1 που προσδένονται στην κοντινή περιοχή. Το σύνολο των συγκεκριμένων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων επιτρέπει τη βιολογική απόκριση του γονιδίου p21 κάτω από επαγωγικές συνθήκες.

Αφού επιβεβαιώσαμε τις λειτουργικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της p53 και της Sp1, προσδιορίσαμε τις περιοχές των δύο πρωτεϊνών που είναι υπεύθυνες για τις συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις. Γνωρίζοντας τις περιοχές αυτές είναι δυνατό να αναστείλουμε τις λειτουργικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών αυτών και κατ' επέκταση την ενεργοποίηση του γονιδίου p21. Αυτό είναι βιολογικά σημαντικό καθώς αναστέλλεται η παρεμποδιστική δράση της p21 έναντι του αποπτωτικού μονοπατιού που ενεργοποιείται από την πρωτεΐνη p53 και ευνοείται ο

κυτταρικός θάνατος κυττάρων που πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα, και διαθέτουν, φυσικά, ενεργό αποπτωτικό μονοπάτι.

Εφόσον μελετήσαμε το ρόλο του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 στην ενεργοποίηση του p21 υποκινητή σπό την πρωτεΐνη p53, προσδιορίσαμε τη σημασία του παράγοντα αυτού σε βιολογικές διεργασίες που εξαρτώνται από την πρωτεΐνη p53, όπως π.χ. η κυτταρική απόκριση στο γενετοξικό στρες που επάγεται από χημειοθεραπευτικές ενώσεις. Η πρόσδεση του παράγοντα Sp1 στην κοντινή περιοχή του p21 υποκινητή δεν είναι απαραίτητη για τη βασική μεταγραφή του συγκεκριμένου υποκινητή, αλλά είναι απαραίτητη για την επαγόμενη έκφρασή του από γενετοξικό στρες. Η συγκεκριμένη διαπίστωση παρουσιάζει εξαιρετικό βιολογικό ενδιαφέρον, αφού η αναστολή της πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 στον p21 υποκινητή ευνοεί το αποπτωτικό μονοπάτι που ενεργοποιείται από την p53 και τα ανεξέλεγκτα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα οδηγούνται σε προγραμματισμένο θάνατο.

Τέλος, επιβεβαιώσαμε τη σημασία του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 στην ενεργοποίηση του γονιδίου PUMA, του οποίου η έκφραση εξαρτάται από την p53. Τα αποτελέσματα αυτά φανερώνουν ένα γενικό μηχανισμό συνεργασιακής ενεργοποίησης γονιδίων από Sp1 και p53 κάτω από συνθήκες γενετοξικού στρες. Η ταυτοποίηση τέτοιων γονιδίων είναι πολύ σημαντική για την ανάπτυξη βελτιωμένων χημειοθεραπευτικών πρωτοκόλλων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adachi, S., Ito, H., Tamamori-Adachi, M., Ono, Y., Nozato, T., Abe, S., Ikeda, M., Marumo, F., and Hiroe, M. *Circ. Res.*, **88**: 408–414, 2001
- Agarwal ML, Taylor WR, Chernov MV, Chernova OB, Stark GR (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 1-4.
- Aich, P., and Dasgupta, D. (1995) *Biochemistry* **34**, 1376-1385
- Almog, N., and Rotter, V. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1378**, R43–54
- Alt, J.R. et al. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 8517–8523
- Appella, E., and Anderson, C.W. *Eur. J. Biochem.*, **268**: 2764–2772, 2001
- Arai N., D. Nomura, K. Yokota, D. Wolf, E. Brill, O. Shohat, V. Rotter, *Mol. Cell. Biol.* **6** (1986) 3232-3239
- Armstrong, S.A., Barry, D.A., Leggett, R.W., Mueller, C.R., 1997. *J. Biol. Chem.* **272**, 13489-13495
- Ashcroft, M., Kubbutat, M. H., and Vousden, K. H. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1751–1758
- Athanikar, J.N., Sanchez, H.B., Osborne, T.F., (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5193-5200
- Bacus S.S., Yarden Y., Oren M et al., (1996) *Oncogene* **12**, 2535-2547
- Bakovic, M., Waite, K.A., Vance, D.E., (2000) *J. Lipid Res.* **41**, 583-594
- Balbin M., Hannon G.J, Pendas A.M., Ferrando A.A., Vizoso F., Fueyo A., Lopez-Otin C., *J. Biol. Chem.* **271** (1996) 15782-15786
- Barak, Y., Juven, T., Haffner, R., and Oren, M. (1993) *EMBO J.* **12**, 461–468
- Bash J., Zong W.X., and Gelinias C., (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6526-6536
- Bayle, J. H., Elenbaas, B., and Levine, A. J. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 5729–5733
- Bigger, C.B., Melnikova, I.N., Gardner, P.D., (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 25976-25982
- Biggs, J. R., Kudlow, J. E., and Kraft, A. S. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 901–906

- Birnbaum, M.J., van Wijnen, A.J., Odgren, P.R., Last, T.J., Suske, G., Stein, G.S., Stein, J.L., (1995) *Biochemistry* 34, 16503-16508
- Bissonnette, N., and Hunting, D. J. (1998) *Oncogene*, 16: 3461–3469
- Black, A.R., Jensen, D., Lin, S.Y., Azizkhan, J.C., (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 1207-1215
- Blattner, C., Tobiasch, E., Litfen, M., Rahmsdorf, H. J., and Herrlich, P. (1999) *Oncogene* 18, 1723–1732
- Blume, S.W., Snyder, R.C., Ray, R., Thomas, S., Koller, C.A., and Miller, D.M. (1991) *J Clin Invest.* 88, 1613-1621
- Borellini, F., Aquino, A., Josephs, S.F., Glazer, R.I., (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10, 5541-5547
- Bork P and Koonin EV. (1999) *Nature Genet.* 18, 313–318
- Bouwman, P., Gollner, H., Elsasser, H.P., Eckhoff, G., Karis, A., Grosveld, F., Philipsen, S., Suske, G., (2000) *EMBO J.* 19, 655-661
- Bouwman, Peter and Philipsen Sjaak, (2002) *Molecular and Cellular Endocrinology* 195 27-38
- Boyd SD, Tsai KY, Jacks T (2000) *Nat Cell Biol* 2 : 563-568
- Brandeis, M., Frank, D., Keshet, I., Siegfried, Z., Mendelsohn, M., Nemes, A., Temper, V., Razin, A., Cedar, H., (1994) *Nature* 371, 435-438
- Braun H, Koop R, Ertmer A, Nacht S and Suske G. (2001) *Nucleic Acids Res.* 29, 4994-5000
- Brown, J. H., and Kennedy, B. J. (1965) *N. Engl. J. Med.* 272, 111-118
- Bunz, F., Hwang, P. M., Torrance, C., Waldman, T., Zhang, Y., Dillehay, L., Williams, J., Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1999) *J. Clin. Investig.*, 104: 263–269
- Candau, R. *et al.* (1997) *Oncogene* 15, 807–816
- Carnero A, Hannon GJ (1998) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 227, 43
- Cayrol C., and Flemington E.K., (1996) *Embo J.* 15, 2748-2759
- Chang, B.D. *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 4291–4296

- Chang, W. T., Kang, J. J., Lee, K. Y., Wei, K., Anderson, E., Gotmare, S., Ross, J. A., and Rosen, G. D. T (2001) *J. Biol. Chem.*, 276: 2221–2227
- Chattopadhyay, D., Ghosh, M. K., Mal, A., and Harter, M. L. (2001) *J. Virol.*, 75: 9844–9856
- Chen J., Jackson P.K, Kirschner M.W., Dutta A., (1995) *Nature* 374 386-388
- Chen J., Saha P., Kornbluth S., Dynlacht B.D., Dutta A., (1996) *Mol. Cell Biol.* 16 4673-4682
- Chen, J. D., Wu, X. W., Lin, J. Y., and Levine, A. J. (1996) *Mol. Cell. Biol.* 16, 2445–2452
- Chen, L.I., Nishinaka, T., Kwan, K., Kitabayashi, I., Yokoyama, K., Fu, Y.H., Grunwald, S., Chiu, R., (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14, 4380-4389.
- Chen, S.J., Artlett, C.M., Jimenez, S.A., Varga, J., (1998) *Gene* 215, 101-110
- Cheng, M. et al. (1999) *EMBO J.* 18, 1571–1583
- Chi, S.-W., Ayeda, A. and Arrowsmith, C. H. (1999) *EMBO J.* 18, 4438-4445
- Chin Y.E., Kitagawa M., Su W.C.S., You Z.H., Iwamoto Y., and Fu X.Y., (1996) *Science* 272, 719-722
- Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich (1994) *Science* 265 : 346-355
- Choisy-Rossi, C. and Yonish-Rouach, E. (1998). *Cell Death Differ.* 5, 129-131
- Chuang L.S.-H., H.-I. Ian, T.-W. Koh, H.-H. Nam, G. Xu, B.F.L. Li, (1997) *Science* 277 : 1996-2000
- Coqueret, O. and Gascan, H. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 18794–18800
- Coqueret O. *TRENDS in Cell Biology* Vol.13 No.2 February 2003
- Courey, A.J., Tjian, R., (1988) *Cell* 55, 887-898
- Courey, A. J., Holtzman, D. A., Jackson, S. P., and Tjian, R. (1989) *Cell* 59, 827-836
- Daher GC, Harris BE, Diasio RB. (1990) *Pharmacol Ther* 48: 189–222

- Datto, M. B., Li, Y., Panus, J. F., Howe, D. J., Xiong, Y., and Wang, X. F. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 5545–5549
- Datto, M. B., Yu, Y., and Wang, X.-F. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 28623-28628
- Davison, T. S., Vagner, C., Kaghad, M., Ayed, A., Caput, D. and Arrowsmith, C. H. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 18709-18714
- el Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B (1993) *Cell* 75, 817-825
- El-Deiry W.S., Tokino T., Waldman T., Oliner J.D., Velculescu V.E., Burrell M., Hill D.E., Healy E., Rees J.L., Hamilton S.R., Kinzler K.W., and Vogelstein B., (1995) *Cancer Res.* 55, 2910-2919
- el-Deiry, W. S. (1998) *Semin. Cancer Biol.* 8, 345-357
- Delavaine L., and N.B. La Thangue, (1999) *Oncogene* 18 5381-5392
- Dennig, J., Beato, M., and Suske, G. (1996) *EMBO J.* 15, 5659-5667
- De Laurenzi, V., Costanzo, A., Barcaroli, D., Terrinoni, A., Falco, M., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Levrero, M. and Melino, G. (1998) *J. Exp. Med.* 188, 763-1768.
- De Laurenzi, V., Catani, M. V., Costanzo, A., Terrinoni, A., Corazzari, M., Levrero, M., Knight, R. A. and Melino, G. (1999) *Cell Death Differ.* 6, 389-390
- Dennig, J., Beato, M., Suske, G., (1996) *EMBO J.* 15, 5659-5667
- Di Como, C. J., Gaiddon, C. and Prives, C. (1999) *Mol. Cell. Biol.* 19, 1438-1449
- Di Cunto F., G. Topley, E. Calautti, J. Hsiao, L. Ong, P.K. Seth, G.P. Dotto, (1998) *Science* 280 1069-1072
- Ding, H., Benotmane, A.M., Suske, G., Collen, D., Belayew, A., (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 19573-19580
- Donehower, L. A., Harvey, M., Slagle, B. L., McArthur, M. J., Montgomery, C. A. Jr, Butel, J. S., Bradley, A. (1992) *Nature* 356, 215-221
- Dotto G. P.. (2000) *Biochimica et Biophysica Acta* 1471 M43-M56

- Du, X.L., Edelstein, D., Rossetti, L., Fantus, I.G., Goldberg, H., Ziyadeh, F., Wu, J., Brownlee, M., (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 12222-12226
- Dulic V., Kaufmann W.K., Wilson S.J., Tlsty T.D., Lees E., Harper J.W., Elledge S.J., and Reed S.I., (1994) *Cell* 76, 1013-1023
- Dynan, W.S., Tjian, R., (1983) *Cell* 32, 669-680
- Elias, E.G., and Evans, J.T. (1972) *J. Bone Joint Surg.* 54-A, 1730-1736
- Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T (1983) *Cell* 33, 389
- Firpo E.J., Koff A., Solomon M.J., and Roberts J.M., (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14, 4889-4901
- Freedman, D. A., Wu, L., and Levine, A. J. (1999) *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 96–107
- Flores-Rozas H., Kelman Z., Dean F.B., Pan Z., Harper W.J., Elledge S.J., O'Donnell M., and Hurwitz J., (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 8655-8659
- Fontoura, B. M. A., Atienza, C. A., Sorokina, E. A., Morimoto, T., and Carroll, R. B. (1997) *Mol. Cell. Biol.* 17, 3146–3154
- Fornace Jr. A.J., (1992) *Annu. Rev. Genet.* 26 507-26
- Fotedar, R., Brickner, H., Saadatmandi, N., Rousselle, T., Diederich, L., Munshi, A., Jung, B., Reed, J. C., and Fotedar, A. (1999) *Oncogene*, 18: 3652–3658
- Fu, L. N., Minden, M. D., and Benchimol, S. (1996) *EMBO J.* 15, 4392–4401
- Fuchs, S. Y., Adler, V., Buschmann, T., Yin, Z., Wu, X., Jones, S. N., and Ronai, Z. (1998) *Genes Dev.* 12, 2658–2663
- Fuchs, S. Y., Fried, V. A., and Ronai, Z. (1998) *Oncogene* 17, 1483–1490
- Funk J.O., S. Waga, J.B. Harry, E. Espling, B. Stillman, D.A. Galloway, (1997) *Genes Dev.* 11 2090-2100
- Galvagni, F., Capo, S., Oliviero, S., (2001) *J. Mol. Biol.* 306, 985-996
- Gartel, A. L., and Tyner, A. L. (1999) *Exp. Cell Res.*, 246: 280–289

- Gartel A. L. and Angela L. Tyner, (2002) *Molecular Cancer Therapeutics*, Vol. 1, 639–649
- Gervais, J. L., Seth, P., and Zhang, H. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273: 19207–19212
- Geyer RK, Yu ZK, Maki CG (2000) *Nat Cell Biol* 2 : 569-573
- Giaccia, A. J., and Kastan, M. B. (1998) *Genes Dev.* **12**, 2973–2983
- Gainnakakou P, Sackett DL, Ward Y, Webster KR, Blagosklonny MV, Fojo T (2000) *Nat Cell Biol* 2 : 709-717
- Ginsberg, D., Oren, M., Yaniv, M., and Piette, J. (1990) *Oncogene* 5, 1285–1290
- Goldberg, I. H., and Friedmann, P. A. (1971) *Annu. Rev. Biochem.* **40**, 775–779
- Gollner, H., Bouwman, P., Mangold, M., Karis, A., Braun, H., Rohner, I., Del Rey, A., Besedovsky, H.O., Meinhardt, A., van Den Broek, M., Cutforth, T., Grosveld, F., Philipsen, S., Suske, G., (2001) *Genes Cells* 6, 689-697
- Gollner, H., Dani, C., Phillips, B., Philipsen, S., Suske, G., (2001) *Mech. Dev.* 106, 77-83
- Gorospe, M., Wang, X., Guyton, K., and Holbrook, N. (1996) *Mol. Cell. Biol.*, 16: 6654–6660
- Gostissa M, Hengstermann A, Fogal V, Sandy P, Schwarz SE, Scheffner M, Del Sal G (1999) *EMBO J* 18 : 6462-6471
- Gottlieb, T.M., Jackson, S.P., (1993) *Cell* 72, 131-142
- Gu W, Roeder RG (1997) *Cell* 90 : 595-606
- Gu Y., Turek C,W., and Morgan D.O., (1993) *Nature* 366, 707-710
- Gulbis J.M., Z. Kelman, J. Hurwitz, M. O'Donnell, J. Kuriyan, (1996) *Cell* 87 297-306
- Hagen, G., Muller, S., Beato, M., Suske, G., (1992) *Nucleic Acids Res.* 20, 5519-5525
- Hagen, G., Muller, S., Beato, M., Suske, G., (1994) *EMBO J.* 13, 3843-3851

- Hagen, G., Dennig, J., Preiss, A., Beato, M., Suske, G., (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 24989-24994
- Haidweger, E., Novy, M., Rotheneder, H., (2001) *J. Mol. Biol.* 306, 201-212
- Hall P.A., J.M. Kearsley, P.J. Coates, D.G. Norman, E. Warbrick, L.S. Cox, (1995) *Oncogene* 10 2427-433
- Hall, P.A., Campbell, S.J., O'Neill, M., Royston, D.J., Nylander, K., Carey, F.A., and Kernohan, N.M. (2000) *Carcinogenesis*, 21: 153-160
- Haltiwanger, R.S., Grove, K., Philipsberg, G.A., (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 3611-3617
- Hannon GJ, Beach D (1994) *Nature* 371, 257
- Hansen, R., and Oren, M. (1997) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 46–51
- Hansen, T.O., Bundgaard, J.R., Nielsen, F.C., Rehfeld, J.F., (1999) *Mol. Cell. Endocrinol.* 155, 1-8
- Harper J.W., Adami G.R., Wei N., Keyomarsi K., and Elledge S.J., (1993) *Cell* 75, 805-816
- Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai LH, Zhang P, Dobrowolski S, Bai C, Connell CL, Swindell E, *et al.* (1995) *Mol. Biol. Cell* 6, 387
- Harris, T.E. et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 29200–29209
- Harrison, S.M., Houzelstein, D., Dunwoodie, S.L., Beddington, R.S., (2000) *Dev. Biol.* 227, 358-372
- Harvey, K. J., Lukovic, D., and Ucker, D. S. (2000) *J. Cell Biol.*, 148: 59–72
- Haupt, Y., Barak, Y., and Oren, M. (1996) *EMBO J.* 15, 1596–1606
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., and Oren, M. (1997) *Nature* 387, 296–299
- Hengst L, Reed SI (1998) Inhibitors of the Cip /Kip family. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 227, 25
- Hitomi, M., Shu, J., Strom, D., Hiebert, S. W., Harter, M. L., and Stacey, D. W. (1996) *J. Biol. Chem.*, 271: 9376–9383

- Hiyama H., Iavarone A., and Reeves S.A., (1998) *Oncogene* 16, 1513-1523
- Hobeika, A. C., Etienne, W., Torres, B. A., Johnson, H. M., and Subramaniam, P. S. (1999) *J. Interferon Cytokine Res.*, 19: 1351–1361
- Hollander M.C., M.S. Sheikh, D.V. Bulavin, K. Lundgren, L. Augeri-Henmueller, R. Shehee, T.A. Molinaro, K.E. Kim, E. Tolosa, J.D. Ashwell, M.P. Rosenberg, Q. Zhan, P.M. Fernandez-Salguero, W.F. Morgan, C.X. Deng, A.J.Fornace Jr., (1999) *Nat. Genet.* 23 176-84
- Hollstein, M., Sidransky, D. and Vogelstein, C. C. (1991) *Science* 253, 49-53.
- Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sorlie T, Hovig E, Smith-Sorensen B, Montesano R, Harris CC (1994) *Nucleic Acids Res* 22 : 3551-3555
- Hollstein, M., Shomer, B., Greenblatt, M., Soussi, T., Hovig, E., Montesano, R. and Harris, C. C. (1996) *Nucl. Acids Res.* 24, 141-146
- Honda, R., Tanaka, H., and Yasuda, H. (1997) *FEBS Lett.* **420**, 25–27
- Hsu, S. L., Chen, M. C., Chou, Y. H., Hwang, G. Y., and Yin, S. C. (1999) *Exp. Cell. Res.*, 248: 87–96
- Hupp, T. R., Meek, D. W., Midgley, C. A., and Lane, D. P. (1992) *Cell* 71, 875–886
- Hupp TR, Lane DP (1994) *Curr Biol* 4 : 865-875
- Hupp, T. R., and Lane, D. P. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 18165–18174
- Hupp, T. R. (1999) *Cell Mol. Life Sci.* **55**, 88–95
- Ihn, H., Trojanowska, M., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25, 3712-3717
- Jackson, S.P., Tjian, R., 1988 *Cell* 55, 125-133
- Jackson, S.P., MacDonald, J.J., Lees-Miller, S., Tjian, R., (1990) *Cell* 63, 155-165
- Javelaud, D., Wietzerbin, J., Delattre, O., and Besancon, F. (2000) *Oncogene*, 19: 61–68
- Jayaraman, L., and Prives, C. (1999) *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 76–87

- Jayasuriya, H., Lingham, R.B., Graham, P., Quamina, D., Herranz, L., Genilloud, O., Gagliardi, M., Danzeisen, R., Tomassini, J.E., Zink, D.L., Guan, Z.Q., and Singh, S.B. (2002) *J. Nat. Prod.* 65,1091-1095
- Jeffrey PD, Gorina A Pavletich NP (1995) *Science* 267 : 1498-1502
- Jin, Y. H., Yoo, K. J., Lee, Y. H., and Lee, S. K. (2000) *J. Biol. Chem.*, 275: 30256–30263
- Jones D.L., R.M. Alani, K. Munger, *Genes Dev.* 11 (1997) 2101-2111
- Juven-Gershon, T., and Oren, M. (1999) *Mol. Med.* 5, 71–83
- Kadonaga, J.T., Carner, K.R., Masiarz, F.R., Tjian, R., (1987) *Cell* 51, 1079-1090
- Kadonaga, J.T., Courey, A.J., Ladika, J., Tjian, R., (1988) *Science* 242, 1566-1570
- Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F and Caput D. (1997) *Cell* 90, 809–819
- Kang, K. H., Kim, W. H., and Choi, K. H. (1999) *Exp. Cell Res.*, 253: 403–412
- Kaneuchi, M., Yamashita, T., Shindoh, M., Segawa, K., Takahashi, S., Furuta, I., Fujimoto, S., and Fujinaga, K. (1999) *Mol. Carcinog.*, 26: 44–52
- Kardassis D., Papakosta P., Pardali K., and Moustakas A., (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 29572-29581
- Kastan, M. B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Craig, R. W. (1991) *Cancer Res.* 51, 6304–6311
- Kastan, M. B., Zhan, Q., El-Deiry, W. S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W. V., Plunkett, B. S., Vogelstein, B., and Fornace, A. J., Jr. (1992) *Cell* 71, 587–597
- Kearsey J.M., P.J. Coates, A.R. Prescott, E. Warbrick, P.A. Hall, *Oncogene* 11 (1995) 1675-1683
- Kelman Z., J. Hurwitz, *Trends Biochem. Sci.* 23 (1998) 236-238
- Kingsley, C., Winoto, A., (1992) *Mol. Cell. Biol.* 12, 4251-4261

- Kitaura H., M. Shinshi, Y. Uchikoshi, T. Ono, T. Tsurimoto, H. Yoshikawa, S.M. Iguchi-Arigo, H. Ariga, (2000) *J. Biol. Chem.* 275 10477-10483
- Ko LJ, and Prives C (1996) *Genes Dev.* 10, 1054.
- Ko, J.L., Liu, H.C., Minnerath, S.R., Loh, H.H., (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 27678-27685
- Kobet E, Zeng X, Zhu Y, Keller D, Lu H (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97 : 12547-12552
- Kokontis, J. M., Wagner, A. J., O'Leary, M., Liao, S., and Hay, N. (2001) *Oncogene*, 20: 659–668
- Kondo, S., Barna, B. P., Kondo, Y., Tanaka, Y., Casey, G., Liu, J., Morimura, T., Kaakaji, R., Peterson, J. W., Werbel, B., and Barnett, G. H. (1996) *Oncogene*, 13: 1279–1285
- Kubbutat, M. H. G., and Vousden, K. H. (1997) *Mol. Cell. Biol.* 17, 460–468
- Kubbutat, M. H. G., Jones, S. N., and Vousden, K. H. (1997) *Nature* 387, 299–303
- Kubbutat, M. H., Ludwig, R. L., Levine, A. J., and Vousden, K. H. (1999) *Cell Growth Differ.* 10, 87–92
- Kwon, H.S., Kim, M.S., Edenberg, H.J., Hur, M.W., (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 20-28
- Lagger G, O'Carroll D, Rembold M, Khier H, Tischler J, Weitzer G, Schuettengruber B, Hauser C, Brunmeir R, Jenuwein T and Seiser C. (2002) *EMBO J.* 21, 2672-81
- Lagger G, Doetzlhofer A, Schuettengruber B, Haidweger E, Simboeck E, Tischler J, Chiocca S, Suske G, Rotheneder H, Wintersberger E, and Seiser C. (2003) *Mol Cell Biol.* 23, 2669-2679
- Lambert, P. F., Kashanchi, F., Radonovich, M. F., Shiekhattar, R., and Brady, J. N. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 33048–33053
- Lane, D. P. (1992) *Nature* 358, 15-16
- Lee MH, Reynisdottir I, Massague J (1995) *Genes Dev.* 9, 639
- Lee, S. J., Ha, M. J., Lee, J., Nguyen, P., Choi, Y. H., Pirnia, F., Kang, W. K., Wang, X. F., Kim, S. J., and Trepel, J. B. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 10618–10623

- Lehman, T. A., Modali, R., Boukamp, P., Stanek, J., Bennet, W. P., Welsh, R. A., Metcalf, R. A., Stampfer, M. R., Fusening, N., Rogan, E. M., and Harris, C. C. (1993) *Carcinogenesis* **14**, 833–839
- Levine AJ (1997) *Cell* 88, 323-331
- Levkau, B., Koyama, H., Raines, E. W., Clurman, B. E., Herren, B., Orth, K., Roberts, J. M., and Ross, R. *Mol. Cell*, 1: 553–563, 1998
- Levrero M., V. De Laurenzi, A. Costanzo, S. Sabatini, J. Gong, J. Y. J. Wang and G. Melino (2000) *Journal of Cell Science* 113, 1661-1670
- Li J.M., Datto M., Shen X., Hu P., Yu Y., and Wang X.F., (1998) *Nucleic Acids Res.* 26, 2449-2456
- Li, R., Knight, J.D., Jackson, S.P., Tjian, R., Botchan, M.R., (1991) *Cell* 65, 493-505
- Li R., Waga S., Hannon G.J., Beach D., and Stillman B., (1994) *Nature* 371, 534-537
- Li X., J. Li, J. Harrington, M.R. Lieber, P.M. Burgers, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 22109-22112
- Li Y., Jenkins C.W., Nichols M.A., and Xiong Y., (1994) *Oncogene* 9, 2261-2268
- Li, Y., Upadhyay, S., Bhuiyan, M., and Sarkar, F. H. (1999) *Oncogene*, 18: 3166–3172
- Lin, J., Wu, X., Chen, J., Chang, A., and Levine, A.J. (1995). *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* LIX, 215-223
- Linke S.P., Clarkin K.C., Di Leonardo A., Tsou A., and Wahl G.M., (1996) *Genes Dev.* 10, 934-947
- Lin, H. M., Moon, B. K., Yu, F., and Kim, H. R. (2000) *Carcinogenesis (Lond.)*, 21: 1941–1945
- Lincet, H., Poulain, L., Remy, J. S., Deslandes, E., Duigou, F., Gauduchon, P., and Staedel, (2000) *C. Cancer Lett.*, 161: 17–26
- Liu L, Scolnick DM, Trievel RC, Zhang HB, Marmorstein R, Halazonetis TD, Berger SL (1999) *Mol Cell Biol* 19 : 1202-1209
- Liu, M., Iavarone, A., and Freedman, L. P. (1996). *J. Biol. Chem.* **271**, 31723–1728

- Liu M., Lee M.H., Cohen M., Bommakanti M., and Freedman (1996) *Genes Dev.* 10, 142-153
- Longley, D.B., Harkin, D.P., and Johnston, P.G. (2003) *Nat Rev Cancer.* 3, 330-8
- Lozano, G., and Montes de Oca Luna, R. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* 1377, M55–9
- Lu H, Levine AJ (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 5154-5158
- Lu, Y., Tatsuka, M., Takebe, H., and Yagi, T. (2000) *Mol. Carcinog.*, 29: 1–7
- Lu, H., and Levine, A. J. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 5154–5158
- Luo J, Chen D, Shiloh A, Gu W (2000) *Nature* 408 : 377-381
- Luo Y., J. Hurwitz, J. Massague, *Nature* 375 (1995) 159-161
- Macdonald J.S. and Gohmann J.J., (1988) *Semin. Oncol.* **15** Suppl. 4, 42–49
- Macleod, D., Charlton, J., Mullins, J., Bird, A.P., (1994) *Genes Dev.* 8, 2282-2292
- Macleod K., Sherry N., Hannon G., Beach D., Tokino T., Kinzler K., Vogelstein B., and Jacks T (1995) *Genes Dev.* 9, 935-944
- Mai M., H. Huang, C. Reed, C. Qian, J. Smith, B. Alderete, R. Jenkins, D. Smith, W. Liu, (1998) *Genomics* 51 359-363
- Majee, S., and Chakrabarti, A. (1999) *Biochem. Pharmacol.* 57, 981-987
- Majee, S., Dasgupta, D., and Chakrabarti, A. (1999) *Eur. J. Biochem.* 260, 619-626
- Majello, B., De Luca, P., Lania, L., (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 4021-4026
- Maltzman, W., and Czyzyk, L. (1984) *Mol. Cell. Biol.* 4, 1689–1694
- Maki, C. G., Huibregtse, J. M., and Howley, P. M. (1996) *Cancer Res.* **56**, 2649–2654
- Marin, M., Karis, A., Visser, P., Grosveld, F., Philipsen, S., (1997) *Cell* 89, 619-628

- Marin MC and Kaelin WG Jr (2000) *Biochim Biophys Acta* 1470, M93-M100
- Mastrangelo IA, Courey AJ, Wall JS, Jacsdon SP and Hough PVC (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5670–5674
- Matsumura I., Ishikawa J., Nakajima K., Oritani K., Tomiyama Y., Miyagawa J., Kato T., Miyazaki H., Matsuzawa Y., and Kanakura Y (1997) *Mol. Cell. Biol.* 17, 2933-2943
- Mayo, L. D., Turchi, J. J., and Berberich, S. J. (1997) *Cancer Res.* **57**, 5013–5016
- Meek, D. W. (1998) *Cell. Signal.* **10**, 159–166
- Meek DW (1999) *Oncogene* 18 : 7666-7675
- Migliaccio, E., Giorgio, M., Mele, S., Pelicci, G., Reboldi, P., Pandolfi, P. P., Lanfrancone, L., and Pelicci, P. G. (1999) *Nature (Lond.)*, **402**: 309–313
- Miller, D.M., Polansky, D.A., Thomas, D.D., Ray, R., Campbell, V.W., Sanchez, J. and Koller, C.A. (1987) *Am J Med Sci.* 294, 388-394
- Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D., and Levine, A. J. (1992) *Cell* **69**, 1237–1245
- Morgan DO (1995) *Nature* 374, 131
- Mosner J., T. Mummbenbrauer, C. Bauer, G. Sczakiel, F. Grosse, W. Deppert, (1995) *EMBO J.* 14 4442-4449
- Moustakas, A., and Kardassis, D. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 6733-6738
- Murata, Y., Kim, H.G., Rogers, K.T., Udvardia, A.J., Horowitz, J.M., (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 20674-20681
- Nakanishi M., Robetorge R.S., Adami G.R., Pereira-Smith O.M., and Smith J.R., (1995) *Embo J* 14, 555-563
- Nakano, K., Mizuno, T., Sowa, Y., Orita, T., Yoshino, T., Okuyama, Y., Fujita, T., Ohtani-Fujita, N., Matsukawa, Y., Tokino, T., Yamagishi, H., Oka, T., Nomura, H., and Sakai, T. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 22199–22206
- Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., de Crombrughe, B., (2002) *Cell* 108, 17-29

- Namba H., Hara T., Tukazaki T., Migita K., Ishikawa N., Ito K., Nagataki S., and Yamashita S., (1995) *Cancer Res.* 55, 2075-2080
- Nehls, M. C., Brenner, D. A., Gruss, H. J., Dierbach, H., Mertelsmann, R., and Herrmann, F. (1993) *J. Clin. Invest.* 92, 2916-2921
- Netzker, R., Weigert, C., Brand, K., (1997) *Eur. J. Biochem.* 245, 174-181
- Nguyen-Tran, V.T., Kubalak, S.W., Minamisawa, S., Fiset, C., Wollert, K.C., Brown, A.B., Ruiz-Lozano, P., Barrere-Lemaire, S., Kondo, R., Norman, L.W., Gourdie, R.G., Rahme, M.M., Feld, G.K., Clark, R.B., Giles, W.R., Chien, K.R., (2000) *Cell* 102, 671-682
- Nichols A.F., A. Sancar, (1992) *Nucleic Acids Res.* 20 2441-2446
- Noda A., Ning Y., Venable S.F., Pereira-Smith O.M., and Smith J.R., (1994) *Exp. Cell Res.* 211, 90-98
- Nourse J., Firpo E., Flanagan W.M., Coats S., Polyak K., Lee M.H., Massague J., Crabtree G., and Roberts J., (1994) *Nature* 372, 570-573
- Nuez, B., Michalovich, D., Bygrave, A., Ploemacher, R., Grosveld, F., (1995) *Nature* 375, 316-318
- Okaichi, K., Wang, L. H., Sasaki, J., Saya, H., Tada, M., and Okumura, Y. (1999) *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 45: 975–980
- Oren M (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 36031-36034.
- Osada M, Ohba M, Kawahara C, Ishioka C, Kanamaru R, Katoh I, Ikawa Y, Nimura Y, Nakagawara A, Obinata M and Ikawa, S.(1998) *Nature Med.* 4, 839–843
- Owen G.I., Richer J.K., Tung L., Takimoto G., and Horwitz K.B., (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 10696-10701
- Pan Z.Q., J.T. Reardon, L. Li, H. Flores-Rozas, R. Legerski, A. Sancar, J. Hurwitz, (1995) *J. Biol. Chem.* 270 22008-22016
- Pardali, K., Kurisaki, A., Moren, A., ten Dijke, P., Kardassis, D., and Moustakas, A. (2000) *J Biol Chem.*, 275: 29244-29256
- Pascal E and Tjian R. (1991) *Genes Dev.* 5, 1646–1656
- Perkins, A.C., Sharpe, A.H., Orkin, S.H., (1995) *Nature* 375, 318-322
- Perkins N.D., L.K. Felzien, J.C. Betts, K. Leung, D.H. Beach, G.J. Nabel, (1997) *Science* 275 523-527

- Perry, M. E., Piette, J., Zawadzki, J. A., Harvey, D., and Levine, A. J. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 11623–11627
- Persengiev SP, Saffer JD and Kilpatrick DL (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9107–9111
- Philipsen, S., Suske, G., (1999) *Nucleic Acids Res.* **27**, 2991-3000
- Pines J (1991) *Cell Growth Differ.* **2**, 305
- Pines J (1995) *Adv. Cancer Res.* **66**, 181
- Podust V.N., L.M. Podust, F. Goubin, B. Ducommun, U. Hubscher, (1995) *Biochemistry* **34** : 8869-8875
- Polyak K, Lee MH, Erdjument BH, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J (1994) *Cell* **78**, 59
- Prabhu S., Ignatova A., Park S.T., and Sun X.H., (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5888-5896
- Prabhu, N. S., Somasundaram, K., Tian, H., Enders, G. H., Satyamoorthy, K., Herlyn, M., and El-Deiry, W. S. (1999) *Int. J. Oncol.*, **15**: 209–216
- Prives, C. and Hall, P. A. (1999) *J. Pathol.* **187**, 112-126
- Prowse, D. M., Bolgan, L., Molnar, A., and Dotto, G. P. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 1308–1314
- Rafty, L.A., Khachigian, L.M., (2001) *Nucleic Acids Res.* **29**, 1027-1033
- Raj, K., Ogston, P., and Beard, P. (2001) *Nature (Lond.)*, **412**: 914–917
- Ray, R., Snyder, R.C., Thomas, S. Koller, C.A., and Miller, D.M. (1989) *J Clin Invest.* **83**, 2003-2007
- Reich, N. C., and Levine, A. J. (1984) *Nature* **308**, 199–201
- Reisman, D., Elkind, N. B., Roy, B., Beamon, J., and Rotter, V. (1993) *Cell Growth Differ.* **4**, 57–65
- Reynisdottir I, Polyak K, Iavarone Massague J (1995) *Genes Dev.* **9**, 1831
- Rodriguez MS, Desterro JM, Lain S, Midgley CA, Lane DP, Hay RT (1999) *EMBO J* **18** : 6455-6461
- Rogel, A., Popliker, M., Webb, C. A., and Oren, M. (1985) *Mol. Cell. Biol.* **5**, 2851–2855

- Roos, M.D., Su, K., Baker, J.R., Kudlow, J.E., (1997) *Mol. Cell. Biol.* 17, 6472-6480
- Ross S, Best JL, Zon LI and Gill G. (2002) *Mol Cell* 10, 831-842
- Roth J, Dobbelstein M, Freedman DA, Shenk T, Levine AJ (1998) *EMBO J* 17 : 554-564
- Ryan K.M., Philips A.C, and Vousden K.H., (2001) *Current Opinion in Cell Biology*, 13 : 332-337
- Ryan, W. G., Schwartz, T. B., and Northrop, G. (1970) *J. Am. Med. Assoc.* 213, 1153-1157
- Saha P., Eichbaum Q., Silberman E.D., Mayer B.J., Dutta A., (1997) *Mol. Cell Biol.* 17 4338-345
- Sakaguchi, K., Herrera, J. E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C. W., and Appella, E. (1998) *Genes Dev.* 12, 2831–2841
- Sapetschnig A, Rischitor G, Braun H, Doll A, Schergaut M, Melchior F and Suske G. (2002) *EMBO J.* 21, 5206-5215
- Schavinsky-Khrapunsky, Y., Huleihel, M., Aboud, M., and Torgeman, A. (2003) *Oncogene* 22, 5315-5324
- Schmidt, M., and Fan, Z. (2001) *Oncogene*, 20: 6164–6171
- Schuh, R., Aicher, W., Gaul, U., Cote, S., Preiss, A., Maier, D., Seifert, E., Nauber, U., Schroder, C., Kemler, R., et al., (1986) *Cell* 47, 1025-1032
- Scohy, S., Gabant, P., Van Reeth, T., Hertveldt, V., Dreze, P.L., Van Vooren, P., Riviere, M., Szpirer, J., Szpirer, C., (2000) *Genomics* 70, 93-101
- Scott M.T., N. Morrice, K.L. Ball, (2000) *J. Biol. Chem.* 275 11529-11537
- Seoane J, Le H-V and Massague, J. (2002) *Nature* 419, 729-734
- Shaulsky, G., Ben-Zeev, A., and Rotter, V. (1990) *Oncogene* 5, 1707–1711
- Shaw, P., Freeman, J., Bovey, R., and Iggo, R. (1996) *Oncogene* 12, 921–930
- Sheikh M.D., Li X., Chen J., Shao Z., Ordonez J.V., and Fontana J.A., (1994) *Oncogene* 9, 3407-3415

- Sherr CJ, Roberts JM (1995) *Genes Dev.* 9, 1149
- Sherr C.J., Roberts J.M., (1999) *Genes Dev.* 13 1501-1512
- Shibata, M. A., Yoshidome, K., Shibata, E., Jorcyk, C. L., and Green, J. E. (2001) *Cancer Gene Ther.*, 8: 23–35
- Shieh, S. Y., Ikeda, M., Taya, Y., and Prives, C. (1997) *Cell.* **91**, 325–334
- Shieh, S. Y., Taya, Y., and Prives, C. (1999) *EMBO J.* **18**, 1815–1823
- Shivji C.J., (1993) *Curr. Biol.* 4, 1062-1068
- Shivji M.K., S.J. Grey, U.P. Strausfeld, R.D. Wood, J.J. Blow, (1994) *Curr. Biol.* 4 1062-1068
- Shiyanov P., S. Bagchi, G. Adami, J. Kokontis, N. Hay, M. Arroyo, A. Morozov, P. Raychaudhuri, (1996) *Mol. Cell Biol.* 16 737-744
- Siegal G., J.J. Turchi, T.W. Myers, R.A. Bambara, (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 9377-9381
- De Siervi, A., Marinissen, M., Diggs, J., Wang, X.F., Pages, G., and Senderowicz, A. (2004) *Cancer Res.* 64, 743-750
- Sjøttem, E., Anderssen, S., Johansen, T., (1996) *J. Virol.* 70, 188_ 198
- Smith M.L., I.T. Chen, Q. Zhan, I. Bae, C.Y. Chen, T.M. Gilmer, M.B. Kastan, P.M. O'Connor, A.J. Fornace Jr., (1994) *Science* 266 1376-1380
- Snowden A.W., L.A. Anderson, G.A. Webster, N.D. Perkins, (2000) *Mol. Cell Biol.* 20 2676-2686
- Snyder, R. C., Ray, R., Blume, S., and Miller, D. M. (1991) *Biochemistry* 30, 4290-4297
- Somasundaram, K., Zhang, H., Zeng, Y. X., Houvras, Y., Peng, Y., Zhang, H., Wu, G. S., Licht, J. D., Weber, B. L., and El-Deiry, W. S. (1997) *Nature* 389, 187–190
- Sowa, Y., Orita, T., Minamikawa, S., Nakano, K., Mizuno, T., Nomura, H., and Sakai, T. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241, 142–150
- Steinman, R. A., and Johnson, D. E. (2000) *Mol. Med.*, 6: 736–749

- Stommel JM, Marchenko ND, Jimenez GS, Moll UM, Hope TJ, Wahl GM (1999) *EMBO J* 18 : 1660-1672
- Strano, S., Fontemaggi, G., Costanzo, A., Rizzo, M.G., Monti, O., Baccarini, A., Del Sal, G., Levrero, M., Sacchi, A., Oren, M, and Blandino, G. (2002) *J Biol Chem.* 277, 18817-18826
- Strausfeld UP, Howell M, Rempel R, Maller JL, Hunt T, Blow JJ. (1994) *Curr Biol.* Oct 1;4(10):876-83
- Su, K., Roos, M.D., Yang, X., Han, I., Paterson, A.J., Kudlow, J.E., (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 15194-15202
- Su, W., Jackson, S., Tjian, R., Echols, H., (1991) *Genes Dev.* 5, 820-826
- Supp, D.M., Witte, D.P., Branford, W.W., Smith, E.P., Potter, S.S., (1996) *Dev. Biol.* 176, 284-299
- Suske, G. (1999) *Gene* 238, 291-300
- Suzuki, A., Tsutomi, Y., Akahane, K., Araki, T., and Miura, M. (1998) *Oncogene*, 17: 931–939
- Suzuki T, Kimura A, Nagai R and Horikoshi M. (2000) *Genes Cells* 5, 29-41
- Suzuki, T., Yokozaki, H., Kuniyasu, H., Hayashi, K., Naka, K., Ono, S., Ishikawa, T., Tahara, E., and Yasui, W. (2000) *Int. J. Cancer*, 88: 992–997
- Takeda O, Homma C, Maseki N, Sakurai M, Kanda N, Schwab M, Nakamura Y and Kaneko, Y. (1994) *Genes Chromosomes Cancer* 10, 30–39
- Thanos C and Bowie J (1999) *Protein Sci.* 8, 1708–1710
- Thut, C. J., Chen, J. L., Klemm, R., and Tjian, R. (1995) *Science* **267**, 100–104
- Thut, C. J., Goodrich, J. A., and Tjian, R. (1997) *Gene Dev.* **11**, 1974–1986
- Timchenko N.A., Wilde M., Nakanishi M., Smith J.R., and Darlington G.J., (1996) *Genes Dev.* 10, 804-815
- Udvadia, A.J., Templeton, D.J., Horowitz, J.M., (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 3953-3957

- Ueda, Y., Hijikata, M., Takagi, S., Chiba, T. and Shimotohno, K. (1999) *Oncogene* 18, 4993-4998
- Unger, T., Juven-Gershon, T., Moallem, E., Berger, M., Vogt Sionov, R., Lozano, G., Oren, M., and Haupt, Y. (1999) *EMBO J.* 18, 1805–1814
- Vairapandi M., A.G. Balliet, A.J. Fornace Jr., B. Hojman, D.A. Liebermann, (1996) *Oncogene* 12 2579-2594
- Vermeulen Katrien, Van Bockstaele Dirk R. and Berneman Zwi N., (2003) *Cell Prolif.* 36, 131–149
- Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A.J. (2000) *Nature*, 408: 307-310
- Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (2001) *Nature (Lond.)*, 412: 865–866
- Vousden KH and Nande Woude GF, (2000) *Nat Cell Biol* 2 ; E178-E180
- Waga S., G. Bauer, B. Stillman, (1994) *J. Biol. Chem.* 269 10923-10934
- Walker, K.K. and Levine, A.J. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 15335–15340
- Warbrick E., D.P. Lane, D.M. Glover, L.S. Cox, (1995) *Curr. Biol.* 5 275-282
- Warbrick E., D.P. Lane, D.M. Glover, L.S. Cox, (1997) *Oncogene* 14 2313-2321
- Waterman, M.J.F., Stavridi, E.S., Waterman, J.L.F., and Halazonetis, T.D. (1998) *Nat. Genet.* 19, 175-178
- Weintraub, H., Hauschka, S., and Tapscott, S. J. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 4570–4571
- Whitesell, L., Sutphin, P. D., Pulcini, E. J., Martinez, J. D., and Cook, P. H. (1998) *Mol. Cell. Biol.* 18, 1517–1524
- Wiman K.G., (1997) *Exp. Cell. Res.* 237, 14-18
- Wimmer, E.A., Jackle, H., Pfeifle, C., Cohen, S.M., (1993) *Nature* 366, 690-694
- Wolkowicz, R., Peled, A., Elkind, N. B., and Rotter, V. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 6842–6846
- Woods DB and Vousden KH (2001) 264 : 56-66

- Wu, L., and Levine, A. J. (1997) *Mol. Med.* **3**, 441–451
- Wu S, Cetinkaya C, Munoz-Alonso MJ, von der Lehr N, Bahram F, Beuger V, Eilers M, Leon J, Larsson LG, (2003) *Oncogene* Jan 23;22(3):351-60
- Wu X., J. Li, X. Li, C.L. Hsieh, P.M. Burgers, M.R. Lieber, (1996) *Nucleic Acids Res.* **24** 2036-2043
- Wu, X. W., Bayle, J. H., Olson, D., and Levine, A. J. (1993) *Genes Dev.* **7**, 1126–1132
- Xiong Y., Zhang H., and Beach D., (1992) *Cell* **71**, 505-514
- Xiong Y., Zhang H., and Beach D., (1993a) *Cell* **71**, 505-514
- Xiong Y., Hannon G.J., Zhang H., Casso D., Kobayashi R., and Beach D., (1993b) *Nature* **366**, 701-704
- Yan, S., Berquin, I.M., Troen, B.R., Sloane, B.F., (2000) *DNA Cell Biol.* **19**, 79-91
- Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gilleett E, Fleming MD, Dotsch V, Andrews NC, Caput D and McKeon, F. (1998) *Mol. Cell* **2**, 305–316
- Yang, F., von Knethen, A., and Brune, B. (2000) *J. Leukocyte Biol.*, **68**: 916–922,
- Yang, X., Su, K., Roos, M.D., Chang, Q., Paterson, A.J., Kudlow, J.E., (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 6611-6616
- Yieh, L., Sanchez, H.B., Osborne, T.F., (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6102-6106
- Yu, J.H., Schwartzbauer, G., Kazlman, A., Menon, R.K., (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 34327-34336
- Yu J, Wang Z, Kinzler KW, Vogelstein B, and Zhang L. (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 1931-1936
- Yu ZK, Geyer RK, Maki CG (2000) *Oncogene* **19** : 5892-5897
- Zauberman, A., Flusberg, D., Haupt, Y., Barak, Y., and Oren, M. (1995) *Nucleic Acids Res.* **23**, 2584–2592
- Zhang H., Xiong Y., and Beach D., (1993) *Mol. Biol. Cell* **4**, 897-906
- Zhang H., Hannon G.J., and Beach D., (1994) *Genes & Dev.* **8**, 1750-1758

- Zhang, W., Geiman, D. E., Shields, J. M., Dang, D. T., Mahatan, C. S., Kaestner, K. H., Biggs, J. R., Kraft, A. S., and Yang, V. W. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 18391–18398
- Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG (1998) *Cell* 92, 725
- Zhang, Y., Fujita, N., and Tsuruo, T. (1999) *Oncogene*, 18: 1131–1138
- Zhu, J., Zhou, W., Jiang, J. and Chen, X. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 13030–13036
- Zhu, Q., Liao, K., (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271, 100-106

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ