

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ**

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Μελέτη της μεταγραφικής ρύθμισης του IRF1 και γονιδίων που συμμετέχουν στην MHC I αντιγονοπαρουσίαση σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές

Μοσχονάς Αριστείδης

Επιβλέπων

**Αναπληρωτής Καθηγητής
Ηλιόπουλος Αριστείδης**

**Σεπτέμβρης 2008
Ηράκλειο Κρήτης**

*Αφιερωμένο
στον Πατέρα μου
Σπύρο*

Ευχαριστίες

Κι όμως περάσαν 4 ολόκληρα χρόνια πριν την ολοκλήρωση αυτού του μεταπτυχιακού. Τέσσερα χρόνια στα οποία μεσολάβησαν πολλά και δύσκολα. Έστω και καθυστερημένα, λοιπόν, τα κατάφερα και είμαι επιτέλους στην ευχάριστη θέση να ευχαριστήσω όλους όσους βοήθησαν άμεσα ή έμμεσα στην ολοκλήρωση αυτής της δουλειάς.

Θα ήθελα πρώτα από όλους να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, ένα μεγάλο μερίδιο της επιτυχίας αυτής της δουλειάς τους ανήκει αποκλειστικά. Τους ευχαριστώ για την στήριξη των επιλογών μου ακόμη και όταν δεν τις καταλαβαίνουν απόλυτα.

Στην συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Κο Ηλιόπουλο, γιατί πίστεψε σε μένα όταν όλοι οι υπόλοιποι με αντιμετώπισαν με αρκετή δυσπιστία. Η βοήθεια του τόσο σε πρακτικό όσο και σε θεωρητικό επίπεδο ήταν καταλυτική. Αυτό που εκτίμησα ιδιαίτερος ήταν η διαρκώς ανοιχτή πόρτα του γραφείου του και οι ατέλειωτες συζητήσεις μας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω, επίσης, τον Κο Καρδάση για τις συμβουλές και τις παρατηρήσεις του οι οποίες αποδείχτηκαν ιδιαίτερα χρήσιμες για την επιτυχή ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Πολλά ευχαριστώ στα παιδιά του εργαστηρίου, που με υποδέχτηκαν πολύ φιλικά. Η παρουσία τους τόσο σε φιλικό όσο και σε επιστημονικό επίπεδο διευκόλυνε και έκανε ευχάριστη την εργαστηριακή καθημερινότητα. Θέλω να ευχαριστήσω προσωπικά την Έφη χωρίς την βοήθεια της οποίας μάλλον ακόμα θα πάλευα να στήσω τα ChIPακια μου! Και την Αριάδνη για την αμέριστη βοήθεια με τα EMSA, και την κατανόηση.

Όσο για τους φίλους μου τι να πω, έκαναν τα πάντα για να με παρασύρουν μακριά από τη δουλειά μου, Βάσια, Κατερίνα, Λήδα, Τάσο, Γιώργο Β, Δημήτρη, Μαριάννα, Ειρήνη σας ευχαριστώ θερμά!. Ειδική μνεία φυσικά στα αδέρφια μου Γιώργο και Πάνο.

Περιεχόμενα

1. Περιεχόμενα	Σελ 1
2. Περίληψη	Σελ 2
3. Εισαγωγή	Σελ 3-7
3.1 Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων IRF	Σελ 3-4
3.2 Ο ρόλος του IRF-1 στο ανοσοποιητικό σύστημα και τον καρκίνο	Σελ 4
3.3 Ο υποδοχέας CD40 και ο ρόλος του στην ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος	Σελ 4-5
3.4 Ο ρόλος του CD40 υποδοχέα στον καρκίνο	Σελ 5
3.5 Σκοπός της μελέτης	Σελ 5
4. Αποτελέσματα	Σελ 7-19
4.1 Η ενεργοποίηση του CD40 μονοπατιού επάγει την ταχύτερη επαγωγή της έκφρασης του IRF-1 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές.	Σελ 7-8
4.2 Η πρόσδεση του CD40L στον υποδοχέα του ενεργοποιεί τις κινάσες MAPK και τον NF-κB, αλλά όχι τον STAT1 πριν την επαγωγή της έκφρασης του IRF-1	Σελ 8-9
4.3 Η επαγωγή του IRF-1 από το μονοπάτι CD40 εξαρτάται από την NF-κB σηματοδότηση και συγκεκριμένα η p65 υπομονάδα του NF-κB προσδένεται στον υποκινητή του IRF-1 γονιδίου	Σελ 9-11
4.4 Η πρόσδεση της p65 υπομονάδας του NF-κB στον υποκινητή του IRF-1 γονιδίου ρυθμίζει την μεταγραφική ενεργοποίηση του από το μονοπάτι του CD40	Σελ 12-13
4.5 Συντονισμένη επαγωγή των γονιδίων αντιγονικής μεταφοράς και των συστατικών του αντιγονοπρωτεασώματος σε απόκριση της CD40 σηματοδότησης	Σελ 14-15
4.6 Οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-κB και IRF-1 προσδένονται στους υποκινητές των γονιδίων που εμπλέκονται στην αντιγονική επεξεργασία και μεταφορά	Σελ 15-17
4.7 Η πρόσδεση του IRF-1 έχει διαφορετικό αντίκτυπο στην ρύθμιση των TAP1 και LMP2 γονιδίων σε σχέση με αυτή του NF-κB σε απόκριση της σηματοδότησης του CD40	Σελ 17-19
5. Συζήτηση	Σελ 19-22
6. Υλικά και μέθοδοι	Σελ 22-27
6.1 Κυτταρικές καλλιέργειες και αντιδραστήρια	Σελ 22
6.2 Αντισώματα και Ανοσοαποτύπωση κατά Western	Σελ 23
6.3 Απομόνωση πυρηνικών εκχυλισμάτων και δοκιμασία μεταβολής της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (EMSAs)	Σελ 23-24
6.4 Δοκιμασία ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP)	Σελ 24-25
6.5 Δοκιμασίες φορέων με γονίδια αναφοράς	Σελ 25-26
6.6 Δοκιμασία RNA παρεμβολής (RNA i)	Σελ 27
7. Αναφορές	Σελ 28-36

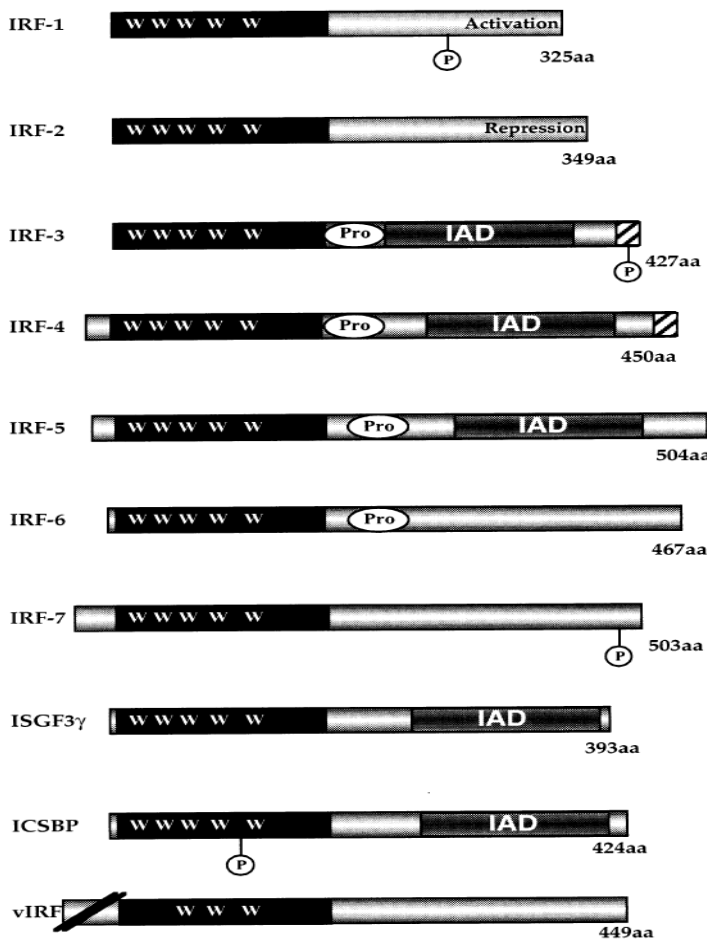
Περίληψη

Τα καρκινικά κύτταρα διαφεύγουν από τις αποκρίσεις του ανοσοποιητικού συστήματος λόγω της απορύθμισης των λειτουργιών της αντιγονικής επεξεργασίας και παρουσίασης. Στην παρούσα μελέτη καταδεικνύουμε ότι η πρόσδεση του CD40 προσδέτη στον υποδοχέα του παρακάμπει αυτό το πρόβλημα μέσω της συντονισμένης δράσης των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB και IRF-1. Δείχνουμε επίσης ότι, αντίθετα με το σηματοδοτικό μονοπάτι της IFN-γ το οποίο επάγει την μεταγραφική ενεργοποίηση του IRF-1 μέσω του STAT1 μεταγραφικού παράγοντα, το μονοπάτι του CD40 επάγει την ταχύτερη ενεργοποίηση του IRF-1 μέσω του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η μεταγραφική ενεργοποίηση του IRF-1 ελέγχεται από την πρόσδεση της p65 (RelA) υπομονάδας του NF-κB στον υποκινητή του IRF-1 γονιδίου της οποίας προηγείται η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού TAK1 / IKKβ / IκBa καθοδικά του CD40. Εν συνεχεία ο NF-κB μαζί με τον επαγόμενο IRF-1 συγκλίνουν προκειμένου να ρυθμίσουν την εκφράση γονιδίων που συμμετέχουν στην αντιγονική επεξεργασία και παρουσίαση, όπως αποδεικνύεται από την διαδοχική πρόσδεση τους στους υποκινητές των γονιδίων TAP-1, TAP2, tapasin, LMP2 and LMP10. Επιπλέον η χρήση RNAi ειδικό για τον IRF-1 ελάττωσε, ενώ η χρήση ενός ειδικού χημικού αναστολέα για τον NF-κB εξαφάνισε την επίδραση του CD40 στην ενεργοποίηση των TAP1 και LMP2 γονιδίων σε καρκινικά κύτταρα. Συνοψίζοντας, αυτά τα δεδομένα αποκαλύπτουν ένα νέο μηχανισμό ο οποίος επάγεται από τον NF-κB και εξασφαλίζει ότι η νεοσυντιθέμενη IRF-1 πρωτεΐνη λειτουργεί μαζί με τον NF-κB προκειμένου να πολλαπλασιάσει τη δράση του CD40 σε ότι αφορά την επαγωγή των γονιδίων που μετέχουν στις λειτουργίες της αντιγονικής επεξεργασίας και παρουσίασης.

Εισαγωγή

Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων IRF

Οι ιντερφερόνες (IFNs) είναι μια οικογένεια πολυλειτουργικών κυτοκινών που αρχικά ανακαλύφθηκαν ως ρυθμιστές της κυτταρικής απόκρισης στις ιϊκές μολύνσεις και αργότερα αποκαλύφθηκε ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις ανοσοαποκρίσεις σε παθογόνα, στην ρύθμιση του ανοσοποιητικού



Εικόνα 1: Η οικογένεια των IRF μεταγραφικών παραγόντων

συστήματος και στην ανάπτυξη του αιμοποιητικού συστήματος(1). Οι τύπου I ιντερφερόνες (IFN α και IFN β) παράγονται από μολυσμένα με ιούς κύτταρα και αποτελούν την πρωταρχική απόκριση στις ιϊκές μολύνσεις, ενώ η τύπου II ιντερφερόνη γ (IFN γ) παράγεται από ενεργοποιημένα T κύτταρα και είναι καθοριστικής σημασίας για τις ανοσοαποκρίσεις και την απομάκρυνση των παθογόνων(1). Οι ιντερφερόνες μεσολαβούν τις δράσεις τους επάγοντας μεταγραφικά γονίδια που περιλαμβάνουν στους υποκινητές τους ειδικά μοτίβα πρόσδεσης. Αυτά τα γονίδια ρυθμίζονται από το σηματοδοτικό μονοπάτι JAK-STAT και τους μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας IRF που εμπλέκονται σε πολλές και σημαντικές λειτουργίες. Τα καλύτερα χαρακτηρισμένα μέλη της οικογένειας είναι τα IRF1 και

IRF2 που ανακαλύφθηκαν σε μεταγραφικές μελέτες του γονιδίου της IFN β . Σε αυτά έχουν προστεθεί και άλλα 7 μέλη: ICSBP, ISGF3c/p48, IRF-3, IRF-4 (Pip/LSIRF/ICSAT), IRF-5, IRF-6 και IRF-7 (Εικόνα1). Όλα τα μέλη της οικογένειας χαρακτηρίζονται από μια ομόλογη περιοχή πρόσδεσης στο DNA που εντοπίζεται στα 115 πρώτα αμινοξέα των πρωτεϊνών, η οποία περιέχει χαρακτηριστικές επαναλήψεις 5 καταλοίπων τρυπτοφάνης στις οποίες μεσολαβούν 10-18 αμινοξέα (1). Οι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας αναγνωρίζουν και προσδένονται σε 3 διαφορετικά μοτίβα που

περιλαμβάνονται στους υποκινητές των γονιδίων στόχων τους ISRE, ICS και IRF-E με αλληλουχίες AGTTTCNNCNY, G/A G/C TTTC, G(A)AAA G/C T/C GAAAG/C T/C αντίστοιχα(1).

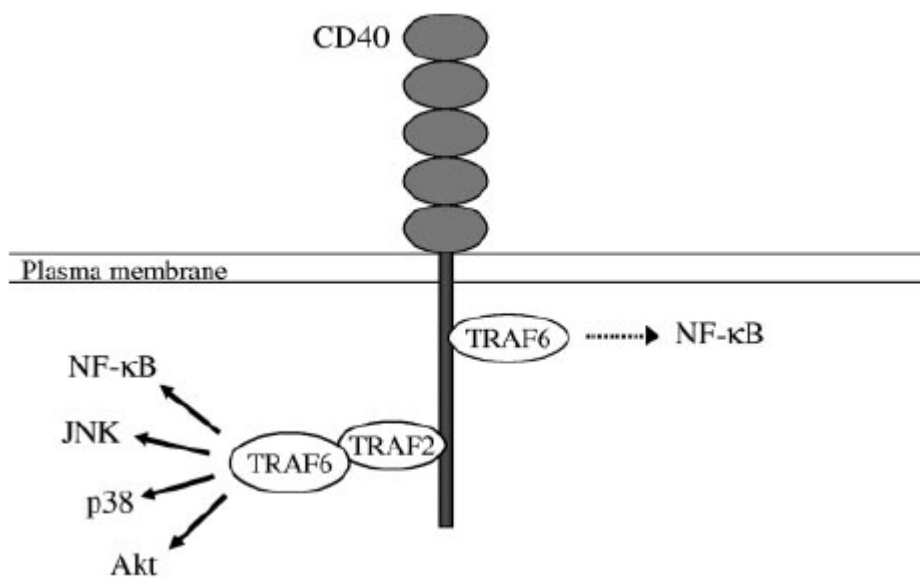
Ο ρόλος του IRF-1 στο ανοσοποιητικό σύστημα και τον καρκίνο

Ανάμεσα στα 9 γνωστά μέλη της IRF οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων, ο IRF-1 έχει τραβήξει την προσοχή ως κυρίαρχος ρυθμιστής γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της έμφυτης και επίκτητης ανοσίας (1). Πράγματι, μελέτες σε ποντίκια με απενεργοποιητικές μεταλλάξεις στα *irf-1* αλληλόμορφα (*irf-1*^{-/-}) αποκάλυψαν τον κρίσιμο ρόλο του IRF-1 στις αντι-ϊικές και αντι-βακτηριακές αποκρίσεις που επάγονται από την ιντερφερόνη-γ. Τα συγκεκριμένα ποντίκια όταν εκτίθενται σε παθογόνα παρουσιάζουν προβληματική διαφοροποίηση των Th1 κυττάρων που οφείλεται στην μειωμένη επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων της p35 υπομονάδας της IL-12 (IL-12p35) και της iNOS στα μακροφάγα, σε συνδυασμό με μειωμένη απόκριση των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων και των φυσικών φονιάδων κυττάρων στην ιντερλευκίνη-12 (2,3). Σε συμφωνία με αυτή την παρατήρηση οι υποκινητές των γονιδίων τόσο της IL-12 όσο και της iNOS περιλαμβάνουν μοτίβα πρόσδεσης για τον IRF-1 (4). Ακόμη, ο IRF-1 παίζει σημαντικό ρόλο στην μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων TAP1 και LMP2 τα οποία συμμετέχουν στην διαδικασία της αντιγονοπαρουσίασης σε απόκριση της σηματοδότησης της IFN-γ (5,6), επηρεάζοντας έτσι την παρουσίαση ιϊκών και καρκινικών αντιγόνων στα CD8⁺ T κύτταρα. Επιπλέον, ο IRF-1 συμμετέχει σε έναν αυτορυθμιστικό κύκλο στα πλαίσια της σηματοδότησης τύπου I ιντερφερονών, στον οποίο ο IRF-1 είναι τόσο στόχος όσο και μεταγραφικός ενεργοποιητής της IFN-β (7,8,9). Πέρα από το ρόλο του στις ανοσοαποκρίσεις στα παθογόνα, ο IRF-1 έχει βρεθεί ότι λειτουργεί ογκοκατασταλτικά (1) και ότι επηρεάζει την ενεργότητα του p53 (10). Έτσι, η απώλεια του αυξάνει δραματικά την προδιάθεση για άναπτυξη όγκων σε μοντέλα ογκογένεσης *in vivo* (11), ενώ η υπερέκφραση του εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό και επιβίωση καρκινικών κυττάρων *in vitro* και *in vivo* (12,13,14).

Ο υποδοχέας CD40 και ο ρόλος του στην ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι το εύρος των λειτουργιών του IRF-1 παρουσιάζει ομοιότητες με αυτό του CD40 υποδοχέα, ένα μέλος της οικογένειας των TNF υποδοχέων με σημαντικό ρόλο στην επαγωγή των έμφυτων και επίκτητων ανοσοαποκρίσεων (15). Έτσι η διέγερση του CD40 στα μακροφάγα και στα δενδριτικά κύτταρα επάγει την ενεργοποίησή τους και οδηγεί στην παραγωγή κυτοκινών και άλλων παραγόντων που μετέχουν στην ανοσοαπόκριση, συμπεριλαμβανομένων των IL-12p35 και iNOS (16), καθώς επίσης ρυθμίζει την αντιγονική επεξεργασία και παρουσίαση. Σε ότι

αφορά το ανθρώπινο είδος, άτομα με μεταλλάξεις στο γονίδιο του CD40 προσδέτη (CD40L), εμφανίζουν μια σπάνια ασθένεια του ανοσοποιητικού συστήματος που ονομάζεται X-συνδεδεμένο υπερ IgM (HIGM) σύνδρομο, το οποίο χαρακτηρίζεται από την απορύθμιση της λειτουργίας των μακροφάγων, δενδριτικών και B κυττάρων και εκδηλώνεται κλινικά από επανεμφανιζόμενες ιικές και βακτηριακές μολύνσεις και αυξημένη προδιάθεση στην εμφάνιση κακοήθων όγκων(17, 18). Οι ποικίλες λειτουργίες του CD40 υποδοχέα έχουν οδηγήσει στην αναζήτηση των μηχανισμών μεταγωγής της σηματοδότησης του. Μελέτες σε φυσιολογικά B λεμφοκύτταρα, σε B κυτταρικές σειρές και σε



Εικόνα 2: Σηματοδότηση του CD40 υποδοχέα

καρκινικές κυτταρικές σειρές έχουν δείξει ότι η πρόσδεση CD40L/CD154 στον υποδοχέα οδηγεί στην ενεργοποίηση των μονοπατιών των MAP κινασών ERK, JNK και p38, της κινάσης 3 της φωσφατιδυλοϊνositόλης (PI3K) και του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB ((Εικόνα 2),(15)). Η κυτταροπλασματική πρωτεϊνική ουρά του CD40 δεν παρουσιάζει ενεργότητα κινάσης επομένως για την σηματοδότηση είναι απαραίτητη η συμμετοχή μιας οικογένειας πρωτεϊνών που ονομάζονται παράγοντες που αλληλεπιδρούν με τον TNF υποδοχέα (TRAFs). Αυτές προσδένονται στον υποδοχέα και μεσολαβούν την ενεργοποίηση των καθοδικών σηματοδοτικών μονοπατιών. Από τα 6 γνωστά μέλη της οικογένειας των TRAFs, στα θηλαστικά μόνο τα TRAF2 και TRAF3 προσδένονται σε μια κυτταροπλασματική πρωτεϊνική περιοχή του υποδοχέα που εντοπίζεται κοντά στην κυτταρική μεμβράνη (15), ενώ το TRAF6 αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα είτε άμεσα μέσω της πρόσδεσης του σε μια μεμβρανικά απομακρυσμένη περιοχή του είτε έμμεσα μέσω της πρόσδεσης στο TRAF2 ((Εικόνα 2),(15)).

Ο ρόλος του CD40 υποδοχέα στον καρκίνο

Η ευρέως διαδεδομένη έκφραση του CD40 σε διάφορους τύπους καρκινωμάτων και λεμφωμάτων έχει τραβήξει την προσοχή σε αυτόν διότι τον καθιστά πιθανό στόχο για την θεραπεία του καρκίνου (19, 20). Όπως και η υπερέκφραση του IRF-1, έτσι και η ενεργοποίηση του CD40 μονοπατιού εμποδίζει

τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση καρκινικών κυττάρων *in vitro* και *in vivo* (21, 22, 23, 24). Επιπλέον, ο CD40L ενεργοποιεί μια μεσολαβούμενη από δενδριτικά κύτταρα Th1 αντικαρκινική ανοσοαπόκριση η οποία καταστέλει την καρκινική αύξηση ακόμη και κατά την απουσία της έκφρασης CD40 υποδοχέα σε καρκινικά κύτταρα (25,26,27). Πρόσφατες εργασίες έχουν δείξει ότι ο CD40L μπορεί να έχει επιπλέον λειτουργίες ενισχύοντας την αντιγονοπαρουσίαση σε CD40 θετικά καρκινικά κύτταρα, οδηγώντας στην αυξημένη αναγνώριση και θανάτωση από αντιγονοειδικά CD8⁺ κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (CTLs) (28,29). Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι ενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου TAP1 από τον CD40L είναι αναγκαία για την επαγωγή CTL αποκρίσεων σε τουλάχιστον κάποια από τα καρκινικά αντιγόνα (28). Ωστόσο ο ακριβής μηχανισμός επαγωγής των γονιδίων που μετέχουν στην αντιγονική επεξεργασία και παρουσίαση από το σηματοδοτικό μονοπάτι του CD40 παραμένει άγνωστος.

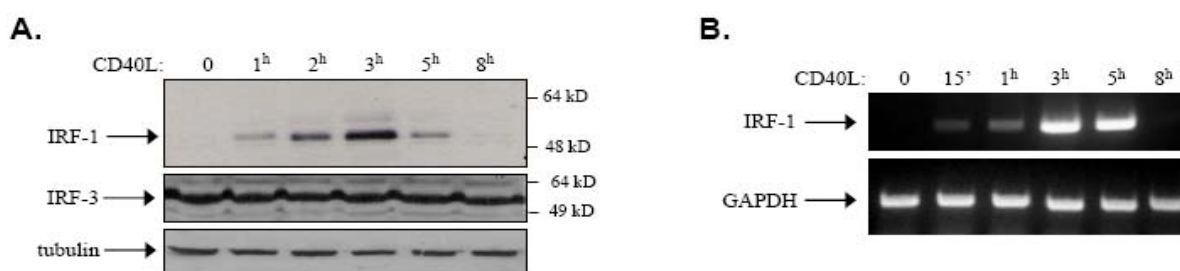
Σκοπός της μελέτης

Οι προαναφερθείσες λειτουργικές ομοιότητες παρέχουν μια θεωρητική σύνδεση μεταξύ του CD40 και του IRF-1 η οποία μας ώθησε να αξιολογήσουμε την υπόθεση ότι ο IRF-1 είναι φυσιολογικός στόχος του CD40 μονοπατιού. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία επιβεβαιώνουν αυτή την υπόθεση και καταδεικνύουν ότι το γονίδιο του IRF-1 επάγεται άμεσα από τον CD40L σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα. Ενώ οι τύπου I ιντερφερόνες επάγουν το συγκεκριμένο γονίδιο μέσω του (JAK)-STAT μονοπατιού το οποίο επάγει την STAT1 μεσολαβούμενη μεταγραφική ενεργοποίηση του IRF-1 (30), ο CD40L επάγει τον IRF-1 μέσω της ενεργοποίησης του NF-κB μονοπατιού που ακολουθείται από την πρόσδεση του p65-p50 ετεροδιμερούς σε ένα ρυθμιστικό στοιχείο του υποκινητή του που εντοπίζεται κοντά στο σημείο εκκίνησης της μεταγραφής. Επιπλέον, δείχνουμε ότι ο νεοσυντιθέμενος IRF-1 δρα σε συνεργασία με τον NF-κB προκειμένου μαζί να ρυθμίσουν την έκφραση γονιδίων υπεύθυνα για την αντιγονική επεξεργασία και μεταφορά όπως τα TAP1, TAP2, tapasin, LMP2 and LMP10. Αυτός ο μηχανισμός της διαδοχικής κινητοποίησης του NF-κB και του IRF-1 από το CD40L έτσι εξασφαλίζει την αποτελεσματική ενεργοποίηση συστατικών του αντιγονοπαρουσιαστικού μηχανισμού, η συγχρονισμένη σύνθεση των οποίων είναι απαραίτητη για τις αντικαρκινικές ανοσολογικές αποκρίσεις και για την ευρύτερη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος

Αποτελέσματα

Η ενεργοποίηση του CD40 μονοπατιού επάγει την ταχύτατη επαγωγή της έκφρασης του IRF-1 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές.

Η εκτοπική έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα IRF-1 σε καρκινικά κύτταρα έχει αναφερθεί ότι αποφέρει αντι-αυξητικές, προαποπτωτικές και/ή ανοσορυθμιστικές ιδιότητες, παρόμοιες με αυτές που



Εικόνα 3: Η διέγερση του CD40 επάγει την έκφραση του IRF-1

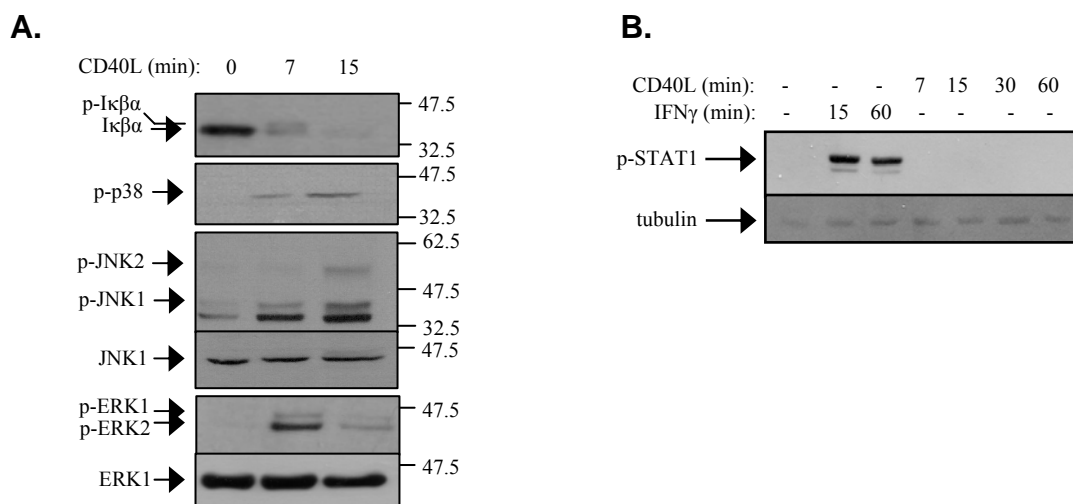
(A) Η πρόσδεση του CD40L επάγει την πρωτεϊνική έκφραση του IRF-1 στα EJ καρκινικά κύτταρα. EJ κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με ανασυνδυασμένο διαλυτό CD40 προσδέτη (CD40L) σε τελική συγκέντρωση 0.5μg/ml για τα αναγραφόμενα χρονικά διαστήματα και τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για τα πρωτεϊνικά επίπεδα των IRF-1, IRF-3 και β-tubulin με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης. (B) Η ενεργοποίηση του CD40 οδηγεί στην ταχύτατη επαγωγή του IRF-1 RNA. EJ κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με ανασυνδυασμένο διαλυτό CD40L σε τελική συγκέντρωση 0.5μg/ml για τα αναγραφόμενα χρονικά διαστήματα πριν την απόμωση του RNA. cDNA συντέθηκε και χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για την μέθοδο της PCR χρησιμοποιώντας συγκεκριμένους εκκινητές για τον IRF-1 ή το σταθερά εκφραζόμενο γονίδιο GAPDH το οποίο χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να ελεγχούν η ισοφόρτωση των δειγμάτων και η διαδικασία πολλαπλασιασμού του DNA. Τα αποτελέσματα είναι εδεικτικά 3 ανεξαρτήτων πειραμάτων.

παρατηρούνται μετά από ενεργοποίηση του CD40 μονοπατιού. Αυτή η παρατήρηση προσέδωσε μια θεωρητική σύνδεση μεταξύ των CD40 και IRF-1 η οποία μας οδήγησε να εξετάσουμε τις επιπτώσεις της CD40 μονοπατιού στην έκφραση του IRF-1. Σε αυτή την κατεύθυνση EJ κύτταρα, μια κυτταρική σειρά καρκίνου της ουροδόχου κύστης, τα οποία φυσιολογικά εκφράζουν το CD40 υποδοχέα (31), διεγέρθηκαν με διαλυτό ανασυνδυασμένο CD40 προσδέτη (CD40L) για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (0, 1, 2, 3, 5 ή 8 ώρες). Ακολούθησε κυτταρική λύση και συλλογή των κυτταρικών εκχυλισμάτων. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα του IRF-1 καθορίστηκαν με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ενώ ο IRF-1 ήταν απών σε μη διεγερμένα κύτταρα, η επώαση των κυττάρων με CD40L οδήγησε στην επαγωγή της IRF-1 πρωτεΐνης η οποία εντοπίζεται μια ώρα μετά την επώαση, φθάνει στα μέγιστα επίπεδα 2 ώρες αργότερα και ελαττώνεται από εκεί και έπειτα (Εικόνα 3A). Η γενικότητα αυτής της παρατήρησης επιβεβαιώθηκε σε 2 ακόμη κυτταρικές σειρές την VM-CUB1 και την AGE-60 (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται). Αντίθετα με τον IRF-1, τα επίπεδα του IRF-3, ενός άλλου μέλους της οικογένειας το οποίο είναι γνωστό ότι εφράζεται συστατικά

σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους (1), και της β -tubulin παρέμειναν ανεπηρέαστα κατά την επώαση με CD40L (Εικόνα 3A). Προκειμένου να καθορίσουμε αν η αύξηση στα πρωτεϊνικά επίπεδα του IRF-1 αντανακλά μεταβολές στα επίπεδα του RNA, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφάσης ακολουθούμενη από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR) σε RNA που απομονώθηκε από EJ κύτταρα τα οποία είτε εκτέθηκαν σε CD40L είτε όχι. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3B, ο CD40L οδήγησε στην επαγωγή των επιπέδων του IRF-1 RNA μόλις 15 λεπτά μετά την έναρξη της επώασης, τα οποία κορυφώθηκαν στις 3 ώρες και σταδιακά μειώθηκαν από εκεί και έπειτα.

Η πρόσδεση του CD40L στον υποδοχέα του ενεργοποιεί τις κινάσες MAPK και τον NF- κ B, αλλά όχι τον STAT1 πριν την επαγωγή της έκφρασης του IRF-1

Η σηματοδότηση του CD40 σε καρκινικά κύτταρα ενεργοποιεί πολλαπλά μονοπάτια, συμπεριλαμβανομένου του NF- κ B και των JNK, p38 και ERK πρωτεϊνικών κινασών ενεργοποιούμενες από μιτογόνα (MAPK). Υπό το φως της παρατήρησης ότι το mRNA του IRF-1 επάγεται μόλις 15 λεπτά μετά την πρόσδεση του CD40L (Εικόνα 3B), ελέγχθηκε η ενεργοποίηση των προαναφερθέντων μονοπατιών 7 και 15 λεπτά μετά την επώαση με CD40L. Τα αποτελέσματα της μεθόδου την ανοσοαποτύπωσης κατά Western καταδεικνύουν ότι και τα 4 μονοπάτια ενεργοποιούνται



Εικόνα 4: Η ενεργοποίηση του CD40 επάγει τις MAPK και τον NF- κ B αλλά όχι τον STAT1 πριν την επαγωγή της έκφρασης του IRF-1

(A) EJ κύτταρα διέγερθηκαν με 0.5 μ g/ml CD40L για 7 ή 15 λεπτά ή παρέμειναν χωρίς διέγερση και τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για την έκφραση του Iκβα και των φωσφορυλιωμένων ενεργών μορφών των p38, JNK και ERK με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Τα συνολικά πρωτεϊνικά επίπεδα των JNK1 και ERK1 αναλύθηκαν προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως έλεγχος της ίσης φόρτωσης των δειγμάτων και της πρωτεϊνικής έκφρασης. (B) Ο CD40L δεν επάγει την φωσφορυλίωση του STAT1. EJ κύτταρα διέγερθηκαν με 0.5 μ g/ml CD40L για τις αναγραφόμενες χρονικές περιόδους και εκχυλίσματα αναλύθηκαν για την έκφραση του φωσφορυλιωμένου στο κατάλοιπο Tyr⁷⁰¹ STAT1. Δείγματα

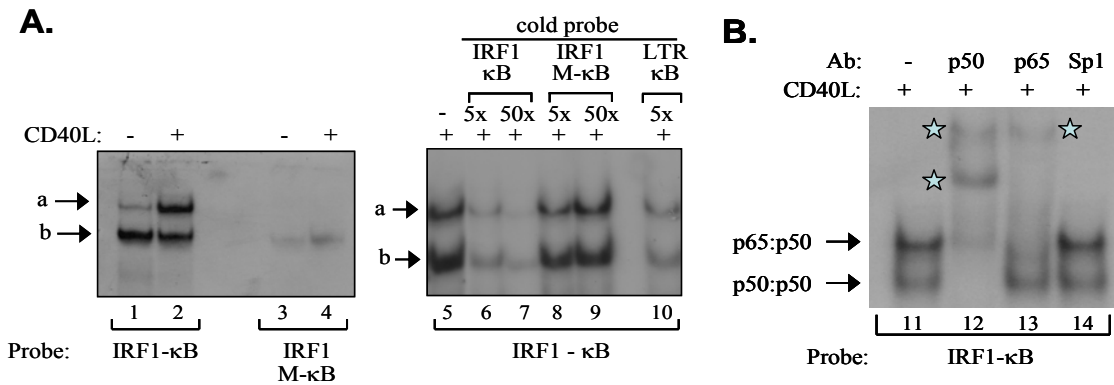
πριν την επαγωγή του IRF-1 mRNA ((Εικόνα 4A),(32)). Από την άλλη είναι γνωστό ότι η IFN γ επάγει

την έκφραση του IRF-1 μέσω της ενεργοποίησης του JAK-STAT μονοπατιού. Συγκεκριμένα το STAT1 φωσφορυλιώνεται και προσδένεται στην IFN- γ ρυθμιζόμενη αλληλουχία που εντοπίζεται στον υποκινητή του IRF-1(33). Θεωρητικά, λοιπόν, το CD40 μονοπάτι θα μπορούσε να ελέγχει την μεταγραφική ρύθμιση του IRF-1 μέσω του STAT1. Προκειμένου να ελεγχθεί αυτή η υπόθεση αναλύσαμε τα επίπεδα του φωσφορυλιωμένου STAT1 στην τυροσίνη 701 (Tyr⁷⁰¹), μια τροποποίηση κρίσιμη για την ενεργοποίησή του. Σε αυτή την κατεύθυνση EJ κύτταρα επωάστηκαν χωρίς και με CD40L για 7, 15, 30 ή 60 λεπτά. Ως θετικός έλεγχος του πειράματος κυτταρικά πρωτεϊνικά εκχυλισματα απομονώθηκαν από EJ κύτταρα που επωάστηκαν με IFN γ . Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης δείχνουν ότι η IFN γ αλλά όχι ο CD40L επάγει την φωσφορυλίωση του STAT1 (Εικόνα 4B). Συνολικά αυτά τα δεδομένα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η πρόσδεση του CD40L ενεργοποιεί τα μονοπάτια MAPK και NF- κ B αλλά όχι τον STAT1 πριν ή ταυτόχρονα με την μεταγραφική ενεργοποίηση του IRF-1.

Η επαγωγή του IRF-1 από το CD40 μονοπάτι εξαρτάται από την NF- κ B σηματοδότηση και συγκεκριμένα η p65 υπομονάδα του NF- κ B προσδένεται στον υποκινητή του IRF-1 γονιδίου

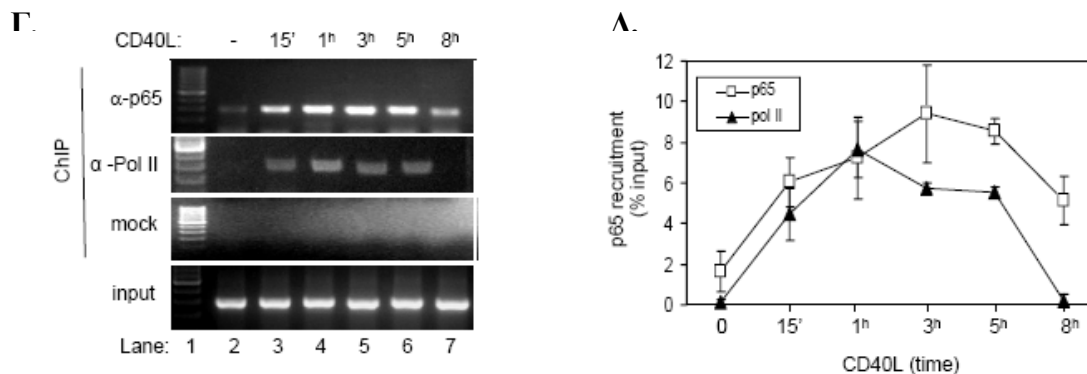
Με βάση τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν στην Εικόνα 4 προχωρήσαμε προκειμένου να εξακριβωθεί το μονοπάτι που είναι υπεύθυνο για την επαγωγή του IRF-1. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε μια προσέγγιση με χημικούς αναστολείς ειδικούς για κάθενα από τα προαναφερθέντα μονοπάτια, η οποία μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι μόνο το NF- κ B μονοπάτι είναι υπεύθυνο για την επαγωγή της έκφρασης του IRF-1 (32). Εν συνεχεία δύο ακόμη προσεγγίσεις επιβεβαίωσαν το συγκεκριμένο αποτέλεσμα. Αρχικά η χρήση ενός αδενοϊού που υπερεκφράζει μια μεταλλαγμένη μορφή του I κ B α , ο οποίος είναι ο βασικός αναστολέας του NF- κ B μονοπατιού, ελαττώνει την επαγωγή του IRF-1 από το CD40 μονοπάτι (32). Εν συνεχεία EJ κύτταρα διαμολύνθηκαν με ένα siRNA ειδικό για την p65 υπομονάδα του NF- κ B το οποίο διαπιστώθηκε ότι ελάττωσε τα πρωτεϊνικά επίπεδα του p65 και αυτή η ελάττωση εμπόδισε την επαγωγή του IRF-1 από το CD40 μονοπάτι (32). Βασιζόμενοι στα προαναφερθέντα αποτελέσματα αξιολογήσαμε την υπόθεση ότι ο NF- κ B ρυθμίζει άμεσα την ενεργοποίηση του υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου του IRF-1. Αρχικά, χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων TRANSFAC εντοπίστηκε ένα μοτίβο κ B με αλληλουχία, GGGGAATCCC, περίπου 30 βάσεις ανοδικά από το σημείο εκκίνησης της μεταγραφής

του IRF-1. Στην συνέχεια ένας ραδιοσημασμένος μάρτυρας που περιείχε την συγκεκριμένη αλληλουχία (IRF-1 κB) χρησιμοποιήθηκε σε δοκιμασία μεταβολής της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (EMSA), προκειμένου να καθοριστούν αλληλεπιδράσεις με πυρηνικά εκχυλίσματα που απομονώθηκαν από ΕJ κύτταρα που επώαστηκαν με ή χωρίς CD40L.



Εικόνα 5: Ηπρόσδεση της p65 υπομονάδας του NF-κB στον υποκινητή του IRF-1 έπεται της ενεργοποίησης του CD40 (A) Δοκιμασίες μεταβολής της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (EMSA) καταδεικνύουν την *in vitro* πρόσδεση πυρηνικών πρωτεϊνών (σύμπλοκα α και β) σε ραδιοσημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο το οποίο περιέχει το κB μοτίβο του IRF-1 υποκινητή (IRF-1κB) (στήλες 1-2 και 5-10). Η πρόσδεση δεν παρατηρήθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε ένα ραδιοσημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο μεταλλαγμένο στο κB μοτίβο ((IRF-1 M-κB),(στήλες3-4)) Η χρήση σε υπεραφθονία μη σημασμένου IRF-1κB και HIV LTR κB αλλά όχι IRF-1 M-κB ανταγωνίστηκαν αποτελεσματικά την πρόσδεση των πρωτεϊνικών συμπλόκων α και β (στήλες 5-10). (B) Πειράμα EMSA που καταδεικνύει την επίδραση αντισώματος ειδικά για την p65, p50 και SP1 στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα των συμπλόκων α και β, σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (στήλη 11-14). Τα δεδομένα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το σύμπλοκο α αποτελείται από το ετεροδιμερές p65:p50 και το β από το ομοδιμερές p50:p50.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 5A, αυτή η ανάλυση κατέδειξε την παρουσία δύο DNA:πρωτεϊνικών συμπλόκων, ένα εκ των οποίων (σύμπλοκο α, Εικόνα 5A, στήλες 1 & 2) βρέθηκε να επάγεται μετά από την επώαση με CD40L. Αντίθετα, όταν χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ένα ολιγονουκλεοτίδιο στο οποίο εισήχθησαν 4 σημειακές μεταλλαγές σε σχέση με την αγρίου τύπου αλληλουχία κB μοτίβου (GCGTAATAGC; IRF-1 M-κB) τα προαναφερθέντα σύμπλοκα δεν εμφανίστηκαν (Εικόνα 5A, στήλες 3

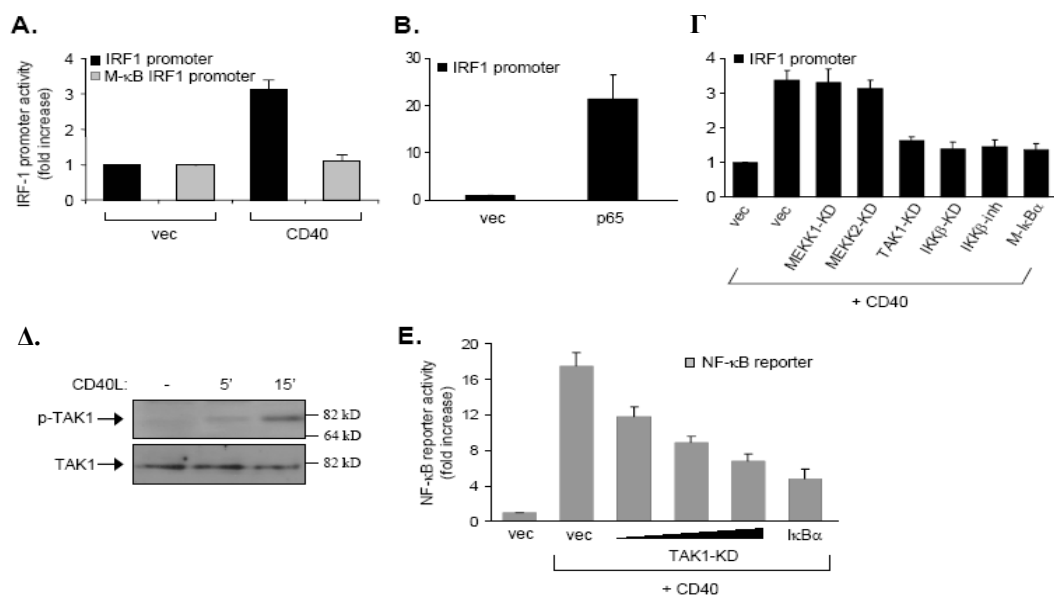


Εικόνα 5: Ηπρόσδεση της p65 υπομονάδας του NF-κB στον υποκινητή του IRF-1 έπεται της ενεργοποίησης του CD40 (Γ & Δ) Αντιπροσωπευτικό πείραμα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης(ChIP),(Γ), και συδναστικά δεδομένα όπως προκύπτουν από 4 πειράματα (Δ) τα οποία δείχνουν τη κινητική της πρόσδεσης της p65 και της RNA polymerase II στον IRF-1 υποκινητή *in vivo*. Το 1/10 της χρωματίνης χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος της αρχικής ποσότητας χρωματίνης των δειγμάτων (input), ενώ το υπόλοιπο κατακρήμνιστηκε με ειδικά αντισώματα για τις παραπάνω πρωτεΐνες, ενώ δείγματα χωρίς προσθήκη αντισώματος χρησιμοποιήθηκαν ως έλεγχος. Η παρουσία του υποκινητή IRF-1 στο DNA που απομονώθηκε επιβεβαιώθηκε με PCR. Η ποσοτικοποίηση των δεδομένων έγινε με την μέτρηση της έντασης των ζωνών με την βοήθεια του λογισμικού Tinascan v.2 και παρουσιάζονται ως ποσοστά πρόσδεσης σε σχέση input (Δ).

& 4). Για να αναλυθεί περαιτέρω η φύση των προσδεδεμένων στο DNA πρωτεϊνών, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανταγωνισμού χρησιμοποιώντας μη ραδιοσημασμένα ολιγονουκλεοτίδια IRF-1 κB or IRF-1 M-κB σε υπεραφθονία 5 ή 50 φορών. Παράλληλα, ως έλεγχος, χρησιμοποιήθηκε σε υπεραφθονία 5 φορών κB μοτίβο από το LTR του ιού HIV (HIV LTR κB), στο οποίο, όπως έχει δειχθεί, προσδένεται ο NF-κB (34). Τα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι τόσο ο IRF-1 κB όσο και ο HIV LTR κB ανταγωνιστές ελάττωσαν τις αλληλεπιδράσεις των πυρηνικών πρωτεϊνών με τον ραδιοσημασμένο IRF-1 κB μάρτυρα, ενώ όταν χρησιμοποιήθηκε σε υπεραφθονία το μεταλλαγμένο ολιγονουκλεοτίδιο IRF-1 M-κB οι αλληλεπιδράσεις παρέμειναν αμετάβλητες (Εικόνα 5A, στήλες 5-10). Επιπλέον, η επώαση των πυρηνικών πρωτεϊνών με ένα αντίσωμα ειδικό για την p65 υπομονάδα του NF-κB οδήγησε στην μείωση της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας του συμπλόκου α , το οποίο ανιχνεύεται ψηλότερα σε σχέση με το δείγμα ελέγχου και επισημαίνεται με αστερίσκο (Εικόνα 5B, στήλη 13). Ακόμη, η κινητικότητα και των δύο σύμπλοκων α και β ελαττώθηκε όταν προστέθηκε αντίσωμα για την p50 υπομονάδα του NF-κB, όπως επισημαίνεται από τους αστερίσκους (Εικόνα 5A, στήλη 12). Αντίθετα, η προσθήκη αντισώματος για τον Sp1 δεν μετέβαλλε την ηλεκτροφορητική συμπεριφορά των συμπλόκων (Εικόνα 5A, στήλη 14). Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το σύμπλοκο α αποτελείται από το ετεροδιμερές p65:p50 και το β από το ομοδιμερές p50:p50. Καταλήγουμε, λοιπόν, ότι η p65 υπομονάδα προσδένεται στην IRF-1 κB αλληλουχία *in vitro* και ότι αυτή η πρόσδεση αυξάνεται σημαντικά από την σηματοδότηση του CD40. Για να επιβεβαιωθεί ότι η p65 προσδένεται στον υποκινητή του IRF-1 γονιδίου *in vivo*, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ανοσοκατακρήμνησης χρωματίνης. Συγκεκριμένα χρωματίνη που απομονώθηκε από EJ κύτταρα τα οποία, είτε επώαστηκαν με CD40L για διαφορετικές χρονικές περιόδους είτε όχι, ανοσοκατακρήμνηστικαν με ειδικά αντισώματα που αναγνωρίζουν p65 υπομονάδα και την RNA Πολυμεράση II (RNA Polymerase II) αντίστοιχα και το DNA που απομονώθηκε ελέγχθηκε για την παρουσία της αλληλουχίας IRF-1 κB με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Τα αποτελέσματα (Εικόνα 5Γ) έδειξαν χαμηλά επίπεδα της p65 προσδεδεμένα στον IRF-1 υποκινητή σε μη διεγερμένα κύτταρα. Η πρόσδεση της p65 αυξήθηκε δραματικά μόλις 15 λεπτά μετά την επώαση με CD40L, έφθασε στα μέγιστα επίπεδα στις 3 ώρες και ελαττώθηκε σταδιακά από εκεί και έπειτα (Εικόνες 5Γ και 5Δ). Παρόμοια, η πρόσδεση της RNA Polymerase II αυξάνεται 15 λεπτά μετά την έναρξη της επώασης, κορυφώνεται στη 1 ώρα και και επιστρέφει σε βασικά επίπεδα στις 8 ώρες (Εικόνες 5Γ και 5Δ). Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν ότι η p65 υπομονάδα του NF-κB προσδένεται στο κB μοτίβο που εντοπίζεται στον IRF-1 υποκινητή τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*.

Η πρόσδεση της p65 υπομονάδας του NF-κB στον υποκινητή του IRF-1 γονιδίου ρυθμίζει την μεταγραφική ενεργοποίησή του από το μονοπάτι του CD40

Για να εξακριβωθεί ο λειτουργικός ρόλος της πρόσδεσης της p65 σε ότι αφορά την μεταγραφική ρύθμιση του IRF-1 κατά την σηματοδότηση του CD40 υποδοχέα, κλωνοποιήθηκαν 600 νουκλεοτίδια από τον υποκινητή του IRF-1 γονιδίου σε ένα φορέα αναφοράς ανοδικά από το γονίδιο της λουσιφεράσης. Συμπληρωματικά, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης (site-directed mutagenesis) για να μεταλλάξουμε το μοτίβο κB στον IRF-1 υποκινητή στην αλληλουχία M-κB στην οποία δεν μπορεί να προσδεθεί ο NF-κB (Εικόνα 5A).

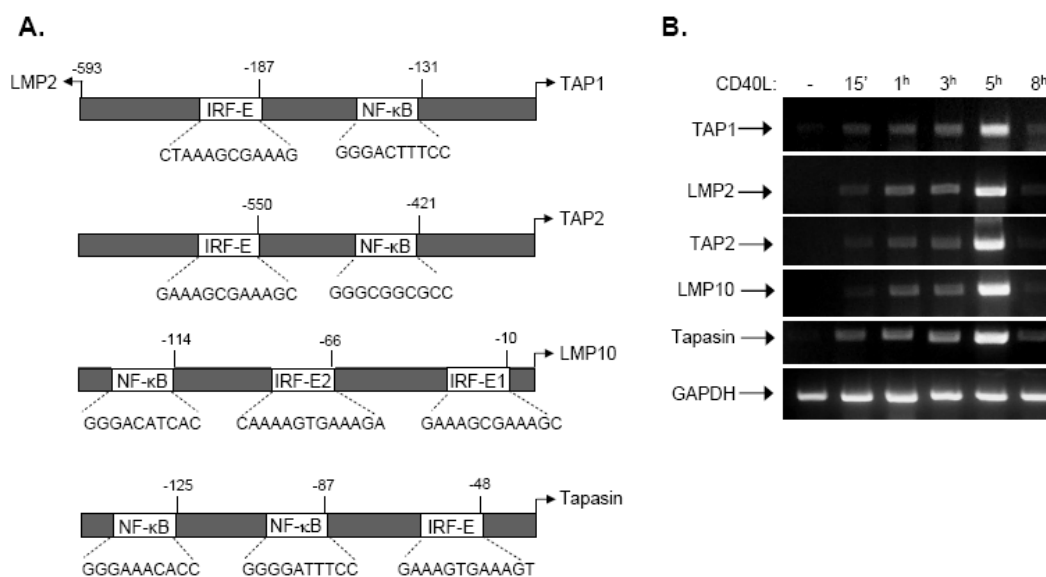


Εικόνα 6: Η p65 υπομονάδα του NF-κB ρυθμίζει την ενεργότητα του IRF-1 υποκινητή σε CD40 διεγερμένα καρκινικά κύτταρα. (A) Το κB μοτίβο στον IRF-1 υποκινητή είναι απαραίτητο για την ενεργοποίηση του υποκινητή από τον CD40: Κύτταρα HEK 293 (1×10^5) διαμολύνθηκαν με 50ng ενός φορέα αναφοράς λουσιφεράσης ο οποίος περιέχει 600 νουκλεοτίδια από τον IRF-1 υποκινητή ή με έναν άλλο φορέα αναφοράς στον οποίο το κB μοτίβο έχει μεταλλαχθεί ώστε να μην είναι δυνατή η πρόσβαση του NF-κB, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της εικόνας 3A. Ένας φορέας που εκφράζει τον CD40 υποδοχέα ή ένας άδειος φορέας ελέγχου συνδιαμολύνθηκαν στα 500ng. Η αποτελεσματικότητα της διαμολύνσης ελέγχθηκε με ένα φορέα έκφρασης Renilla. Οι δραστηριότητες των δύο ενζύμων αναλύθηκαν 30 ώρες μετά την διαμολύνση και εκφράζονται ως φορές αύξησης της ενεργότητας του γονιδίου αναφοράς (λόγος των τιμών της λουσιφεράσης προς Renilla) σε σύγκριση με το άδειο φορέα που δεν εκφράζει CD40. Οι μέσες τιμές \pm SD από 3 ανεξάρτητα πειράματα παρουσιάζονται. (B) Η εκτοπική έκφραση του p65 επάγει την ενεργοποίηση του IRF-1 υποκινητή: HEK 293 κύτταρα (1×10^5) διαμολύνθηκαν με 50ng με τον IRF-1/λουσιφεράση φορέα, 50 ng Renilla και 100ng p65 RelA και οι ενεργότητες μετρήθηκαν όπως και στο (A). Ο άξονας ψ αναπαριστά τις φορές αύξησης της ενεργότητας του IRF-1 υποκινητή. (Γ) Οι κινάσες TAK1 και IKKβ μετέχουν στην CD40 μεσολαβούμενη επαγωγή του IRF-1: Κύτταρα διαμολύνθηκαν με 100ng από τον IRF-1/λουσιφεράση φορέα, 100 ng Renilla, 250 ng CD40 και 100 ng μεταλλαγμάτων ανενεργών σε ότι αφορά την δραστηριότητα κινάσης των TAK1, MEK1, MEK2 ή IKKβ πριν την λύση και την μέτρηση της ενεργότητας των γονιδίων αναφοράς. Σε παράλληλα πειράματα, κύτταρα διαμολύνθηκαν με CD40 και φορείς αναφοράς και επωάστηκαν με ένα ειδικό για τον IKKβ χημικό αναστολέα (35) για 6 ώρες πριν από την λύση και την μέτρηση ενεργότητας των γονιδίων αναφοράς. Ως έλεγχος χρησιμοποιήθηκε μια μεταλλαγμένη μορφή του IκBα (MκBα) που φέρει δύο μεταλλάξεις σε δύο κατάλοιπα σερίνης σημαντικά για την φωσφορυλίωση και την μετέπειτα αποδόμηση του (Ser³²→Ala / Ser³⁶→Ala), και μετρήθηκε η CD40 μεσολαβούμενη επαγωγή του IRF-1 υποκινητή. Οι τιμές αντικατοπτρίζουν τον μέσο όρο 4 πειραμάτων \pm SD. Στον ψ άξονα φαίνεται η αύξηση της ενεργότητας του IRF-1 υποκινητή. (Δ) Η ενεργοποίηση του CD40 μονοπατιού οδηγεί στην φωσφορυλίωση του TAK1: EJ κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με 0.5mg/ml CD40L για τα αναγραφόμενα χρονικά σημεία ή παρέμειναν ως είχαν πριν λυθούν και αναλυθούν τόσο τα επίπεδα της συνολικής TAK1 και της φωσφορυλιωμένης ενεργούς μορφής στο κατάλοιπο Thr¹⁸⁷ με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης. Παρουσιάζονται ενδεικτικά αποτελέσματα από 3 ανεξάρτητα πειράματα. (E) Η κινάση TAK1 συμμετέχει στην CD40 εξαρτώμενη ενεργοποίηση του NF-κB: Κύτταρα HEK 293 (1×10^5) διαμολύνθηκαν με 50ng φορέα αναφοράς NF-κB/λουσιφεράση, 50 ng Renilla, 250 ng CD40 και 50, 100 or 200 ng ενός μεταλλάγματος της TAK1 ανενεργό για την ενεργότητα κινάσης και 100ng (MκBα) ως δείγμα ελέγχου. Στην συνέχεια ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται στο (A). Οι μέσες τιμές από 3 ανεξάρτητα πειράματα \pm SD παρουσιάζονται.

Αυτοί οι φορείς διαμολύνθηκαν παροδικά σε ενθρόπινα εμβρυονικά κύτταρα του νεφρού (HEK 293) μαζί με 2 φορείς έκφρασης για τις πρωτεΐνες CD40 και *Renilla* αντίστοιχα, ο δεύτερος εκ των οποίων χρησιμοποιείται για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης. Οι ενεργότητες τόσο της λουσιφεράσης όσο και του *Renilla* μετρήθηκαν 24 ώρες μετά την διαμόλυνση. Τα αποτελέσματα πολλαπλών μετρήσεων έδειξαν ότι το CD40 μονοπάτι επάγει περίπου 3 φορές την ενεργότητα του υποκινητή του IRF-1 σε σχέση με τον φορέα ελέγχου και αυτή η επαγωγή εξαφανίζεται στο M-κΒ μετάλλαγμα (Εικόνα 6Α). Ως θετικός έλεγχος, χρησιμοποιήθηκε ένας φορέας έκφρασης της p65 πρωτεΐνης, ο οποίος οδήγησε στην επαγωγή του γονιδίου αναφοράς κατά περίπου 20 φορές (Εικόνα 6B). Για να επιβεβαιωθεί ο ρόλος της ενεργοποίησης του NF-κΒ μονοπατιού από τον CD40 στην μεταγραφική ρύθμιση του IRF1, 3 φορείς, ένας που εκφράζει μια μεταλλαγμένη μορφή του IκΒα (M-IκΒα), ένας που εκφράζει τον CD40 και φυσικά ο φορέας με τον κλωνοποιημένο υποκινητή του IRF-1 χρησιμοποιήθηκαν για τη διαμόλυνση HEK 293 κυττάρων. Βρέθηκε ότι ο M-IκΒα ελάττωσε την ενεργοποίηση του IRF-1 υποκινητή από τον CD40 (Εικόνα 6Γ). Παράλληλα μελετήθηκε η συμβολή διαφόρων παραγόντων που εμπλέκονται στο NF-κΒ μονοπάτι σε ότι αφορά την ενεργοποίηση του IRF-1 υποκινητή. Σε αυτή την κατεύθυνση κύτταρα διαμολύνθηκαν με τους φορείς αναφοράς λουσιφεράσης και *renilla* και τον φορέα έκφρασης CD40, παρουσία ή απουσία μεταλλαγμάτων -τα οποία χαρακτηρίζονται από αναποτελεσματική ενζυμική δραστηριότητα κινάσης- των IKKβ, TAK1, MEKK1 ή MEKK2 και ενός χημικού αναστολέα που στοχεύει τον IKKβ. Οι TAK1 και MEKKs επιλέχθηκαν επειδή έχει βρεθεί ότι δρουν ανοδικά του IKKβ σε απόκριση πολλών σημάτων που οδηγούν στην ενεργοποίηση του NF-κΒ μονοπατιού (36,37). Επιπλέον η MEKK1 έχει εμπλακεί στην CD40 επαγόμενη ενεργοποίηση των JNK και p38 μονοπατιών (38). Συμπληρωματικά έχουμε παρατηρήσει ότι η φωσφορυλίωση του κατάλοιπου Thr¹⁸⁷ της TAK1 αυξάνεται 5 λεπτά μετά από την έναρξη της σηματοδότησης του CD40 (Εικόνα 6Δ) και ότι η υπερέκφραση μιας μεταλλαγμένης ανενεργούς μορφής της TAK1 κινάσης (39) αναστέλει την CD40 επαγόμενη και NF-κΒ μεσολαβούμενη ενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς (Εικόνα 6Ε). Συγχρόνως βρέθηκε ότι η παρεμπόδιση των IKKβ και TAK1 οδήγησαν στην μείωση της επαγωγής του IRF-1 υποκινητή από τον CD40 (Εικόνα 6Γ). Αντίθετα οι μεταλλαγμένες MEKK1 και MEKK2 δεν είχαν καμία επίδραση σε ότι αφορά την ενεργοποίηση φορέων αναφοράς των IRF-1 και NF-κΒ (Εικόνα 6Γ και δεδομένα που δεν δείχνονται). Τα παραπάνω δεδομένα συνδυαζόμενα με αυτά που παρουσιάζονται στην Εικόνα 3 δείχνουν ότι η πρόσδεση της p65 υπομονάδας του NF-κΒ στον IRF-1 υποκινητή οδηγεί στην μεταγραφική ρύθμιση του IRF-1 η οποία εξαρτάται από το TAK1 / IKKβ / IκΒα / p65 NF-κΒ μονοπάτι.

Συντονισμένη επαγωγή των γονιδίων αντιγονικής μεταφοράς και των συστατικών του αντιγονοπρωτεασώματος σε απόκριση της CD40 σηματοδότησης

Η αντιγονική επεξεργασία και παρουσίαση παίζουν σημαντικό ρόλο στις αντικαρκινικές αποκρίσεις. Τα πεπτίδια που προκύπτουν από ογκο-συσχετιζόμενες πρωτεΐνες παράγονται στο κυτταρόπλασμα από την δράση ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου πρωτεασών, του αντιγονοπρωτεασώματος, το οποίο περιέχει τα μικρής μάζας πολυπεπτίδια 2 και 10 (LMP2 and LMP10) μεταξύ άλλων. Οι μεταφορείς που σχετίζονται με την αντιγονική παρουσίαση 1 και 2 (TAP1 και TAP2), λειτουργούν μεταφέροντας αυτά τα πεπτίδια από το κυτταρόπλασμα στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου, εκεί που το κάθε πεπτίδιο δημιουργεί ένα τεταρτοταγές σύμπλοκο με την βαριά αλυσίδα του MHC τάξης I και την h-2-microglobulin, μια διαδικασία που προάγεται από πρωτεΐνες συνοδούς όπως οι tapasin, ERp57 και



Εικόνα 7: Συγχρονισμένη επαγωγή των γονιδίων των αντιγονικών μεταφορέων και των συστατικών του αντιγονοπρωτεασώματος σε απόκριση της CD40 σηματοδότησης. (A) Σχηματική αναπαράσταση του υποκινητή διπλής κατεύθυνσης TAP1/LMP2 και των υποκινητών των γονιδίων TAP2, tapasin και LMP10. Οι αλληλουχίες και οι σχετικές θέσεις των μοτίβων πρόσδεσης IRF-E και κB, σε σχέση με το σημείο έναρξης της μεταγραφής απεικονίζονται. Η τυπική αλληλουχία στην οποία προσδέεται ο IRF-1 είναι (G/C)(A)AAA(N)₂₋₃AAA(G/C)(T/C) (40) ενώ ο NF-κB προσδέεται στην αλληλουχία GGRNNYYCC, όπου R αντιστοιχεί σε πουρίνη, Y σε πυριμιδίνη και N σε οποιαδήποτε βάση (34). (B) Επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων των αντιγονικών μεταφορέων και των συστατικών του αντιγονοπρωτεασώματος σε απόκριση της CD40 σηματοδότησης. E.J. κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με CD40L για τις αναγραφόμενες χρονικές περιόδους και το RNA που απομονώθηκε χρησιμοποιήθηκε για τη μέθοδο RT-PCR με ειδικούς εκκνητές για τα γονίδια TAP1, LMP2, TAP2, tapasin, LMP10, ή για το σταθερά εκφραζόμενο γονίδιο GAPDH. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά για 5 ανεξάρτητα πειράματα για το TAP1 και 3 για τα LMP2, TAP2, tapasin και LMP10.

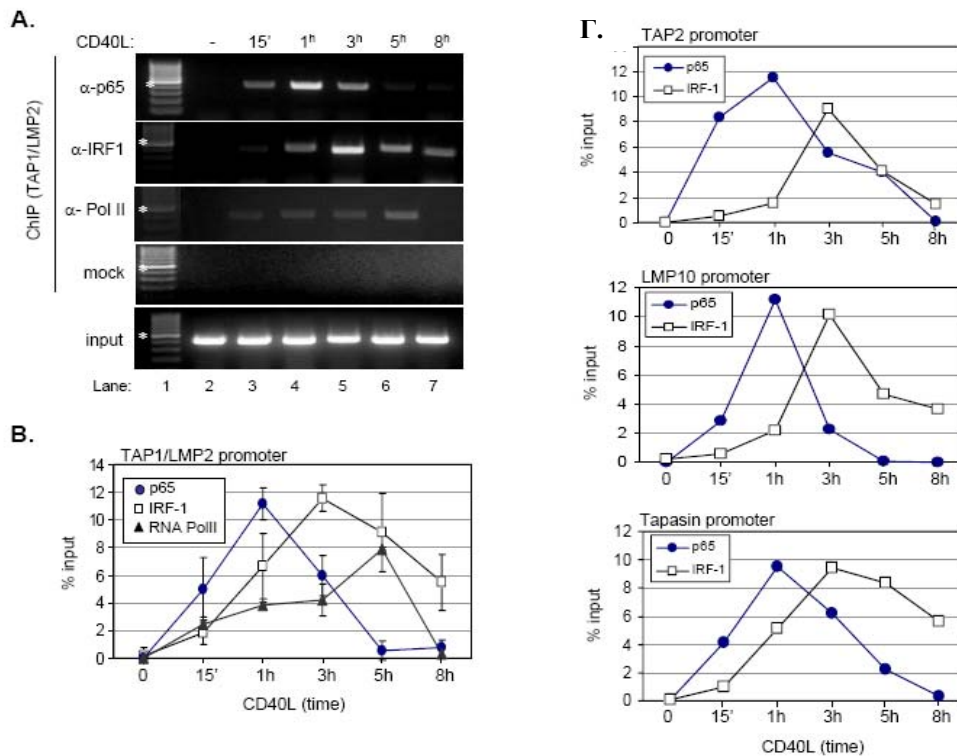
calreticulin (41,42). Αυτά τα σύμπλοκα στην συνέχεια μεταφέρονται στην κυτταρική μεμβράνη όπου αναγνωρίζονται από τα T κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα (CTLs) τα οποία καταστρέφουν τα κύτταρα που τα παρουσιάζουν. Πρόσφατα δημοσιεύτηκε μια εργασία που αναφέρει ότι η ενεργοποίηση του

CD40 σε καρκινικά κύτταρα ενισχύει την δεκτικότητά τους σε κυτταροτοξικό θάνατο από τα CTLs μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από την επαγωγή της έκφρασης του TAP1 (28). Τα TAP1 και LMP2 γονίδια ρυθμίζονται από ένα κοινό υποκινητή δύο κατευθύνσεων που περιέχει ένα λειτουργικό κB μοτίβο 130 βάσεις ανοδικά του σημείου εκκίνησης της μεταγραφής του TAP1 ((Εικόνα 7A), (43)). Άλλες μελέτες έχουν αναγνωρίσει ένα μοτίβο πρόσδεσης του IRF-1 που ονομάζεται IRF-E κοντά στο σημείο εκκίνησης της μεταγραφής του LMP2 το οποίο είναι σημαντικό για την μεταγραφική ρύθμιση και των 2 γονιδίων από το IFN γ /STAT σηματοδοτικό μονοπάτι (6). Μαζί, αυτά τα δεδομένα οδήγησαν στην υπόθεση ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-κB και IRF-1 μπορεί να συνεργάζονται για την επαγωγή των TAP1 και LMP2 κατά την CD40 σηματοδότηση. Βασιζόμενοι σε αυτή την ιδέα αναζητήσαμε μοτίβα πρόσδεσης των 2 προαναφερθέντων παραγόντων στους υποκινητές των γονιδίων που εμπλέκονται στην αντιγονική παρουσίαση και μεταφορά. Η ανίχνευση της βάσης δεδομένων TRANSFAC οδήγησε στην αναγνώριση κB και IRF-E μοτίβων στους υποκινητές των γονιδίων LMP10, TAP2 και tapasin (Εικόνα 7A). Σε συμφωνία με αυτή την παρατήρηση, οι υποκινητές του ανθρώπινου γονιδίου LMP10 και του ποντικίσου TAP2, που έχει υψηλά επίπεδα ομολογίας με τον ανθρώπινο, έχουν αναφερθεί ότι περιλαμβάνουν λειτουργικές IRF-E αλληλουχίες που ρυθμίζουν την μεταγραφική ενεργοποίηση τους από την IFN γ (44, 45). Αυτές οι παρατηρήσεις μας οδήγησαν στην υπόθεση εργασίας ότι ο CD40L επαγόμενος NF-κB μαζί με τον νεοσυντιθέμενο IRF-1 μπορούν να λειτουργήσουν συγχρονισμένα προκειμένου να ρυθμίσουν την μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στην αντιγονική επεξεργασία και μεταφορά. Αρχικά, λοιπόν, εξετάστηκαν τα επίπεδα του mRNA των γονιδίων TAP1, TAP2, LMP2, LMP10 και tapasin σε EJ κύτταρα μετά από επώαση με CD40L με την μέθοδο RT-PCR. Αυτή η ανάλυση αποκάλυψε εντυπωσιακά παρόμοια κινητικά πρότυπα επαγωγής των παραπάνω γονιδίων, με την μέγιστη επαγωγή να λαμβάνει χώρα 5 ώρες μετά από την επώαση με τον CD40L (Εικόνα 7B). Αξιοσημείωτο, είναι το γεγονός, ότι η μέγιστη πρωτεϊνική έκφραση του IRF-1 (Εικόνα 3A) προηγείται χρονικά αυτής των παρουσιαζόμενων γονιδίων.

Οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-κB και IRF-1 προσδένονται στους υποκινητές των γονιδίων που εμπλέκονται στην αντιγονική επεξεργασία και μεταφορά

Με βάση τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην εικόνα 5, μελετήσαμε την πρόσδεση των NF-κB και IRF-1, όπως και της RNA polymerase II, στον υποκινητή TAP1/LMP2 με τη μέθοδο ChIP. Απομονώθηκε χρωματίνη από EJ κύτταρα που επώαστηκαν με CD40L για διαφορετικά χρονικά διαστήματα και από δείγματα ελέγχου στα οποία δεν χορηγήθηκε CD40L.

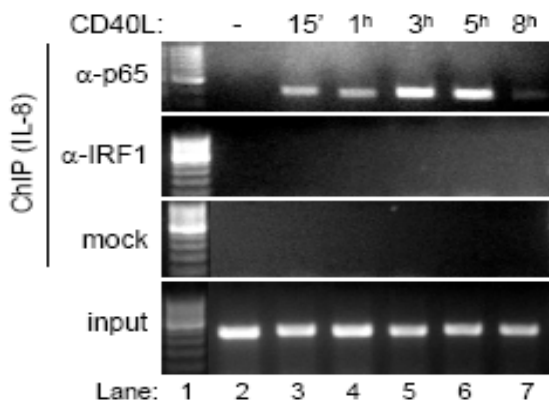
Για την κατακρήμνιση του DNA χρησιμοποιήθηκαν ειδικά αντισώματα για τα p65, IRF-1 και RNA Polymerase II και η παρουσία του υποκινητή TAP1/LMP2 ελέγχθηκε με την μέθοδο της PCR. Ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα παρουσιάζεται στην εικόνα 8Α και τα δεδομένα από 4 ανεξάρτητα



Εικόνα 8: Οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-κB και IRF-1 στρατολογούνται διαδοχικά στους υποκινητές των γονιδίων που μετέχουν στην αντιγονική επεξεργασία και μεταφορά. (A & B) Αντιπροσωπευτικό πείραμα ChIP (A), και συγκεντρωτικά αποτελέσματα από 4 ανεξάρτητα πειράματα (B), τα οποία καταδεικνύουν το κινητικό πρότυπο πρόσδεσης των p65, IRF-1 και RNA polymerase II *in vivo*, στον υποκινητή διπλής κατεύθυνσης TAP1/LMP2 μετά από διέγερση με CD40L. Το 1/10 του όγκου της χρωματίνης που απομονώθηκε χρησιμοποιήθηκε για PCR ως έλεγχος της αρχικής ποσότητας χρωματίνης των δειγμάτων (input), και ο υπόλοιπος όγκος κατακρημνίστηκε με ειδικά αντισώματα για τα p65, IRF-1 or RNA Polymerase II ή χωρίς αντίσωμα. Η παρουσία του υποκινητή TAP1/LMP2 στο DNA που απομονώθηκε επιβεβαιώθηκε με PCR. Η ποσοτικοποίηση των δεδομένων έγινε με την μέτρηση της έντασης των ζωνών με την βοήθεια του λογισμικού Tinascan v.2 και παρουσιάζονται ως ποσοστά πρόσδεσης σε σχέση με το input. Η στήλη 1 απεικονίζει ένα DNA μάρτυρα μοριακού βάρους και η ζώνη με τον αστερίσκο αντιπροσωπεύει το μοριακό βάρος 500 νουκλεοτιδίων. (Γ) Η κινητική της πρόσδεσης των p65 και IRF-1 στους υποκινητές των γονιδίων TAP2, LMP10 και tapasin. Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή 2 ανεξαρτήτων πειραμάτων.

πειράματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 6B. Η πρόσδεση του p65 στον TAP1/LMP2 καταγράφηκε μόλις 15 λεπτά μετά την χορήγηση CD40L, κορυφώθηκε 45 λεπτά αργότερα, μειώθηκε ελάχιστα στις 3 ώρες και ελαττώθηκε δραματικά από κει και έπειτα (Εικόνα 8B). Η πρόσδεση του IRF-1 ανιχνεύθηκε στο δείγμα που συλλέχθηκε 1 ώρα μετά την χορήγηση του CD40L, κορυφώθηκε 2 ώρες αργότερα, μειώθηκε ελαφρά στις 5 ώρες και ελαττώθηκε ακόμη περισσότερο στις 8 ώρες. Απο την άλλη, η πρόσδεση της RNA Polymerase II αυξήθηκε σταδιακά παρουσιάζοντας μέγιστα επίπεδα στο δείγμα των 5 ωρών, επιστρέφοντας σε βασικά επίπεδα 3 ώρες αργότερα (Εικόνες 8A & 8B). Το πρότυπο πρόσδεσης της RNA polymerase II ταιριάζει κινητικά με αυτό της επαγωγής του RNA του γονιδίου TAP1(Εικόνα 7B).

Παρόμοια με τον TAP1/LMP2, οι υποκινητές των γονιδίων LMP10, TAP2 και tapasin βρέθηκε ότι προσδένουν τους p65 και IRF-1 (Εικόνα 8Γ). Σημαντικό είναι το γεγονός ότι η πρόσδεση του IRF-1 ακολουθεί αυτή του p65 κάτι που αντανάκλα την αναγκαιότητα της σύνθεσης του IRF-1 πριν την αναγνώριση των μοτίβων IRF-E και την πρόσδεση στους υποκινητές των προαναφερθέντων γονιδίων. Προκειμένου να ελεγχθεί η ακρίβεια των ChIP πειραμάτων μελετήθηκε η πρόσδεση του p65 και του IRF-1 στον υποκινητή της IL-8 που είναι γνωστό ότι αποκρίνεται στην διέγερση με CD40L (46). Σε



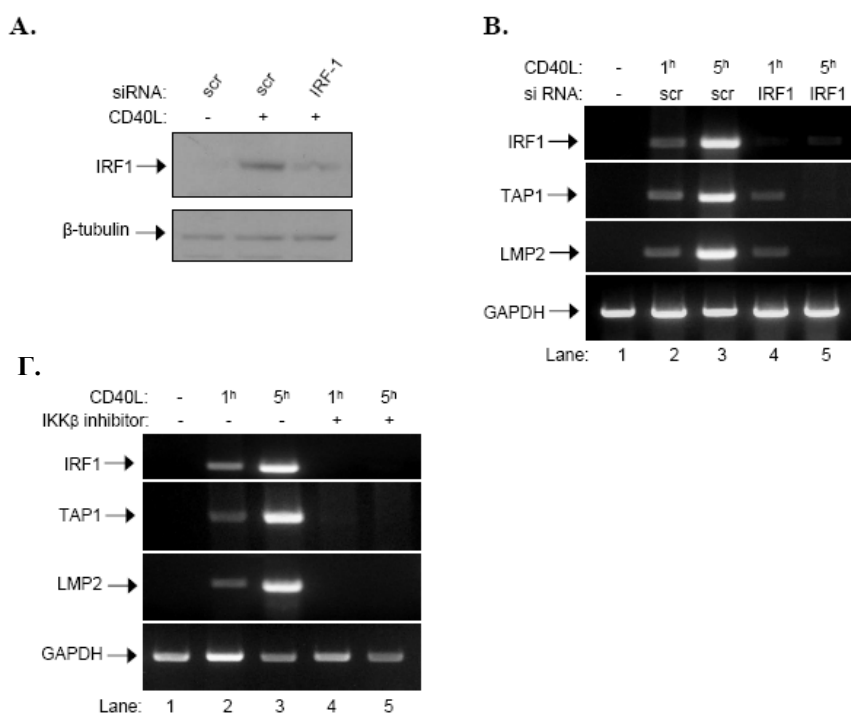
Εικόνα 9: Ο IRF-1 δεν προσδένεται στον υποκινητή της IL-8 σε καρκινικά κύτταρα μετά από διέγερση με CD40L. ΕΙ κύτταρα διέγερθηκαν με CD40L για τα σημειούμενα χρονικά σημεία πριν αναλυθούν με τη μέθοδο ChIP. Το 1/10 του όγκου της χρωματίνης που απομονώθηκε χρησιμοποιήθηκε για PCR ως έλεγχος της αρχικής ποσότητας χρωματίνης των δειγμάτων (input), και ο υπόλοιπος όγκος κατακρημνίστηκε με ειδικά αντισώματα για τα anti-p65 και IRF-1 ή χωρίς αντισώματα. Το DNA που απομονώθηκε ελέγχθηκε για την παρουσία του υποκινητή της IL-8 με PCR. Η στήλη 1 δείχνει ένα DNA μάρτυρα μοριακού βάρους.

συμφωνία με δημοσιευμένα αποτελέσματα (46), βρήκαμε ότι το p65 γρήγορα προσδένεται στον υποκινητή της IL-8, και η πρόσδεση αυξάνεται σταδιακά φθάνοντας σε μέγιστα επίπεδα στις 3 και 5 ώρες μετά την διέγερση. Αντίθετα ο IRF-1 δεν βρέθηκε να προσδένεται στον συγκεκριμένο υποκινητή κατά την επώαση με CD40L (Εικόνα 9). Συμπεραίνουμε ότι τόσο ο NF-κΒ όσο και ο IRF-1 προσδένονται στους υποκινητές των γονιδίων που εμπλέκονται στην αντιγονική επεξεργασία και μεταφορά, αλλά με διαφορετικά κινητικά πρότυπα. Επιπλέον η αυξημένη πρόσδεση του IRF-1 στους υποκινητές των γονιδίων αυτών συσχετίζεται με την μέγιστη επαγωγή της μεταγραφής τους

Η πρόσδεση του IRF-1 έχει διαφορετικό αντίκτυπο στην ρύθμιση των TAP1 και LMP2 γονιδίων σε σχέση με αυτή του NF-κΒ σε απόκριση της σηματοδότησης του CD40

Προκειμένου να καθοριστεί η σχετική συμβολή του IRF-1 στην CD40 μεσολαβούμενη επαγωγή των γονιδίων TAP1 και LMP2, τα επίπεδα του IRF-1 μειώθηκαν σε ΕΙ κύτταρα χρησιμοποιώντας την μέθοδο του RNAi. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 10Α, στο πάνω πλαίσιο, ένα siRNA ειδικό για τον IRF-1 ελάττωσε σημαντικά την επαγόμενη έκφραση του σε σύγκριση με δείγματα ελέγχου

Παράλληλα, RNA που απομονώθηκε από κύτταρα που διαμολύνθηκαν με siRNA πριν και 1 ή 5 ώρες μετά την διέγερση με CD40L χρησιμοποιήθηκε για να εφαρμοστεί η μέθοδος RT-PCR με εκκινητές ειδικούς για τα cDNA των γονιδίων IRF-1, TAP1, LMP2 και του σταθερά εκφραζόμενου γονιδίου GAPDH. Βρέθηκε ότι ελάττωση της έκφρασης του IRF-1 είχε μικρό αντίκτυπο στην CD40L μεσολαβούμενη επαγωγή των TAP1 και LMP2 στο πρώτο χρονικό σημείο της 1 ώρας, αλλά την εκμηδένισε στις 5 ώρες μετά την επώαση (Εικόνα 10B). Στην συνέχεια μελετήθηκε η συμβολή του NF-κB στην επαγωγή των TAP1 και LMP2 από το CD40 μονοπάτι. Συγκεκριμένα κύτταρα EJ προεπώαστηκαν με ή χωρίς έναν χημικό αναστολέα ειδικό για τον IKKβ και ακολούθως χορηγήθηκε CD40L για 1 ή 5 ώρες. Το RNA που απομονώθηκε από αυτές τις καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκε στην μέθοδο RT-PCR με ειδικούς εκκινητές για τα cDNA των παραπάνω γονιδίων. Όπως αναμενόταν από τα αποτελέσματα της Εικόνας 3B, η χορήγηση του IKKβ αναστολέα ελάττωσε δραματικά την επαγωγή του IRF-1 mRNA από το CD40 (Εικόνα 10Γ). Επίσης ο αναστολέας αυτός σχεδόν εκμηδένισε την επαγωγή των TAP1 και LMP2 από το CD40 αλλά δεν επηρέασε τα επίπεδα του RNA του GAPDH



Εικόνα 10: Η πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων IRF-1 and NF-κB ρυθμίζει διαφορετικά στάδια της μεταγραφικής ενεργοποίησης των γονιδίων TAP1 and LMP2 σε απόκριση της σηματοδότησης του CD40. (A & B) Οι επιδράσεις της μείωσης των πρωτεϊνικών επιπέδων του IRF-1 στην CD40 επαγόμενη ρύθμιση των γονιδίων TAP1 και LMP2: EJ κύτταρα διαμολύνθηκαν με ένα siRNA ειδικό είτε για τον IRF-1 είτε για ένα γονίδιο ελέγχου και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με CD40L και λύθηκαν. Τα επίπεδα της έκφρασης του IRF-1 μελετήθηκαν με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western (A). Εναλλακτικά, RNA απομονώθηκε και χρησιμοποιήθηκε για την μέθοδο RT-PCR με ειδικούς εκκινητές για τα γονίδια IRF-1, TAP1, LMP2 ή το σταθερά εκφραζόμενο GAPDH το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος πολλαπλασιασμού των προϊόντων της αντίδρασης(B). Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά για 3 ανεξάρτητα πειράματα. (Γ) Τα αποτελέσματα της αναστολής του CD40 επαγόμενου NF-κB στην ρύθμιση των TAP1 και LMP2: EJ κύτταρα προεπώαστηκαν με ή χωρίς έναν ειδικό χημικό αναστολέα για τον IKKβ (στήλες 1- 5) και στην συνέχεια χορηγήθηκε CD40L για 1 ή 5 ώρες όπως σημειώνεται στην εικόνα. Απομονώθηκε RNA το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην μέθοδο RT-PCR με ειδικούς εκκινητές για τα γονίδια IRF-1, TAP1, LMP2 και GAPDH. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά 4 ανεξαρτήτων πειραμάτων

(Εικόνα 10Γ). Όλες μαζί αυτές οι παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η πρόσδεση του NF-κB ελέγχει τα πρώτα στάδια της επαγωγής των TAP1 και LMP2 από τον CD40L, ενώ ο IRF-1 ευθύνεται για την μέγιστη επαγωγή που σημειώνεται στα επόμενα στάδια.

Συζήτηση

Τα δεδομένα που παρουσιάζονται σε αυτήν την εργασία κατοχυρώνουν τον ρόλο του CD40L ως ένα νέου ρυθμιστή του μεταγραφικού παράγοντα IRF-1 σε καρκινικά κύτταρα. Δείχνουμε ότι αντίθετα με την σηματοδότηση των τύπου I ιντερφερονών που επάγει την STAT-1 μεσολαβούμενη επαγωγή του IRF-1, η αλληλεπίδραση του CD40 υποδοχέα με τον προσδέτη του επάγει τον IRF-1 μέσω του NF-κB. Αυτό στηρίζεται σε πολλές παρατηρήσεις. Αρχικά η επαγωγή του IRF-1 συμβαίνει κυρίως μέσω σημάτων που ξεκινούν από τον TRAF2/TRAF3 τομέα πρόσδεσης του CD40 υποδοχέα, και σε μικρότερο βαθμό από την περιοχή πρόσδεσης του TRAF6 (32), ευρήματα που συσχετίζονται με την συμβολή αυτών των πρωτεϊνικών περιοχών του υποδοχέα στην ενεργοποίηση του NF-κB, αλλά όχι των MAPK σε καρκινικά κύτταρα (47). Ακόμη, η CD40 επαγόμενη αποδόμηση του IκBα και η μετακίνηση της p65 υπομονάδας του NF-κB προηγείται της μεταγραφικής επαγωγής και της πρωτεϊνικής έκφρασης του IRF-1, ενώ η ενεργότητα του STAT1 παραμένει ανεπηρέαστη από την CD40 σηματοδότηση (Εικόνα 2). Τέλος, η αναστολή του NF-κB μονοπατιού κατά την ενεργοποίηση του CD40 υποδοχέα, είτε με την υπερέκφραση μίας μη αποικοδομήσιμης μορφής του IκBα, είτε με τη χρήση ενός χημικού αναστολέα ο οποίος στοχεύει ειδικά την κινάση IKKβ, εμπόδισαν την επαγωγή του IRF-1. Στο ίδιο αποτέλεσμα οδήγησε και η χρήση RNAi που στοχεύει την p65 υπομονάδα (32). Στην ίδια κατεύθυνση αναγνωρίστηκε ένα μοτίβο πρόσδεσης κB κοντά στο σημείο εκκίνησης της μεταγραφής του IRF-1, στο οποίο βρέθηκε ότι προσδέεται η p65 τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (Εικόνα 5). Το συγκεκριμένο μοτίβο δείχθηκε ότι είναι απαραίτητο για την μεταγραφική επαγωγή του IRF-1, καθώς η εισαγωγή μεταλλάξεων που παρεμποδίζουν την προσδεση της p65 σχεδόν εκμηδενίζουν την απόκριση του υποκινητή στο CD40 μονοπάτι (Εικόνα 6Α). Επιπλέον η παρεμπόδιση των IKKβ / IκBα ή της κινάσης TAK1, ελάττωσε την ενεργοποίηση του IRF-1 υποκινητή (Εικόνα 6Γ). Σε αυτή την μελέτη παρουσιάζεται για πρώτη φορά η συμμετοχή της τελευταίας στην ενεργοποίηση του NF-κB μονοπατιού από τον CD40. Συγκεκριμένα η ενεργοποίηση του CD40 βρέθηκε να επάγει την φωσφορλίωση της

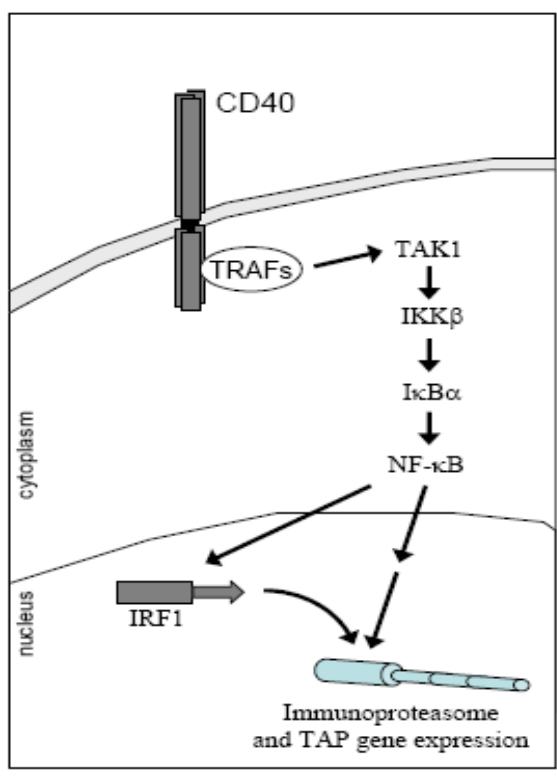
TAK1, ενώ μια μεταλλάξιμη ανενεργή μορφή της ελάττωσε την ενεργοποίηση του NF-κB (Εικόνες 6Δ & 6Ε). Αυτά τα αποτελέσματα μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο CD40 μέσω της πρόσδεσης των TRAFs δίνει το έναυσμα για την ενεργοποίηση του μονοπατιού TAK1 / IKKβ / IκBα / p65 NF-κB που τελικά οδηγεί στην μεταγραφική επαγωγή του IRF-1 (Εικόνα 11). Πάραυτα, εντοπίστηκαν χαμηλά επίπεδα πρόσδεσης της p65 στον υποκινητή του IRF-1 ακόμη και κατά την απουσία CD40L (Εικόνα 5). Σε αυτές τις συνθήκες, δεν εντοπίστηκε ούτε πρόσδεση της RNA polymerase II, ούτε έκφραση IRF-1 RNA. Εικάζουμε ότι η πρόσδεση της p65 σε επίπεδα παραπάνω από τα βασικά είναι απαραίτητη για την εκκίνηση της μεταγραφικής έναρξης. Εναλλακτικά, το CD40 μονοπάτι είναι πιθανό να επάγει μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις στο μεταγραφικό σύμπλοκο του NF-κB, ή στις ιστόνες που περιβάλλουν το μοτίβο κB στον IRF-1 υποκινητή που μπορεί να συμβάλουν στην έναρξη της μεταγραφής. Μάλιστα έχει βρεθεί ότι η IKKβ φωσφορυλιώνει την p65 στο κατάλοιπο Ser⁵³⁶ μετά από σηματοδότηση επαγόμενη από τον TNF ή το LPS, οδηγώντας σε ενισχυμένη μεταγραφική ενεργότητα του NF-κB (48, 49). Ο ρόλος των μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων του p65 στην μεταγραφική ρύθμιση του IRF-1 βρίσκεται υπό μελέτη.

Το μονοπάτι του CD40 φαίνεται ένας ιδιαίτερα υποσχόμενος στόχος για την ανοσοθεραπεία για διάφορους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων των, μη Hodgkin's λεμφώματος (50), χρόνιας λεμφολυτικής λευκαίμιας (51) και καρκινωμάτων (25,26). Επίσης ο CD40L έχει ήδη εισέλθει σε κλινικές δοκιμασίες με ενθαρρυντικά αποτελέσματα (52). Οι θεραπευτικές δυνατότητες του CD40 μονοπατιού αποδίδονται κυρίως στον ρόλο του στην ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων και στην επαγωγή των αποκρίσεων των T κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων (CTL) ανεξάρτητα από την έκφραση του CD40 υποδοχέα σε καρκινικά κύτταρα (25, 27, 51,53).

Η επεξεργασία και η παρουσίαση των καρκινικών αντιγόνων στα CD8⁺ CTLs εξαρτάται από την έκφραση των μεταφορέων για την αντιγονική παρουσίαση, TAP1 και TAP2, και των συστατικών ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου που ονομάζεται αντιγονοπρωτεάσωμα. Σε αυτό, μεταξύ άλλων, συμμετέχουν οι LMP2 και LMP10 υπομονάδες (42). Η πρωτεΐνη συνοδός tapasin συμμετέχει σε αυτή την διαδικασία προωθώντας τον σχηματισμό των MHC τάξης I φορτωτικών συμπλόκων και λειτουργεί γεφυρώνοντας τον αντιγονικό μεταφορέα με τα τάξης I μόρια. Αρκετές δημοσιευμένες εργασίες έχουν δείξει ότι η έκφραση συστατικών του μονοπατιού αντιγονοπαρουσίασης είναι πολλές φορές απορυθμισμένη σε ανθρώπινους όγκους (54).

Συγκεκριμένα, χαμηλή ή βασική έκφραση των TAP1, TAP2 και tapasin είναι κοινό χαρακτηριστικό πρωτογενών όγκων και καρκινικών κυτταρικών σειρών (55,56) και έχει αποδοθεί κατά ένα μέρος σε ελαττωμένη μεταγραφή των γονιδίων (57). Με αυτό τον τρόπο τα καρκινικά κύτταρα φαίνεται ότι διαφεύγουν του ανοσοποιητικού συστήματος αφού δεν αναγνωρίζονται από τα CTLs (58). Σε πρόσφατες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο μας έχει δειχθεί ότι ο CD40L υπερνικά την

προβληματική έκφραση του TAP αποκαθιστώντας έτσι την ανοσοαναγνώριση των καρκινικών κυττάρων (28). Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας καταδεικνύουν ότι η ενεργοποίηση του CD40 μονοπατιού επάγει την μεταγραφή πολλών γονιδίων που εμπλέκονται σε όλα τα στάδια της αντιγονοπαρουσίασης μέσω των MHC I μορίων όπως τα TAP1, TAP2, LMP2, LMP10 και tapasin(Εικόνα 5B). Μάλιστα τα όμοια κινητικά χαρακτηριστικά της επαγωγής του RNA(Εικόνα 7B), υποδηλώνουν ένα κοινό μηχανισμό ρύθμισης. Σε συμφωνία με αυτό το εύρημα οι υποκινητές όλων αυτών των γονιδίων περιλαμβάνουν μοτίβα πρόσδεσης κB



Εικόνα 11: Ο NF-κB ενορρηστρώνει την συντονισμένη έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στις διαδικασίες της αντιγονικής επεξεργασίας και μεταφοράς μέσω της επαγωγής του IRF-1: Ένα προτεινόμενο μοντέλο. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης καταδεικνύουν ότι ο ενεργοποιημένος CD40, μέσω της αλληλεπίδρασης με τα TRAFs, πυροδοτεί το μονοπάτι TAK1 / IKKβ / IκBα το οποίο καταλήγει στην πυρηνική μετατόπιση του p65. Ακολουθεί η πρόσδεση του p65 στον υποκινητή του IRF-1 και η άμεση επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου. Στην συνέχεια οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-κB και IRF-1 συγκλίνουν προκειμένου να ρυθμίσουν από κοινού την μεταγραφή των γονιδίων που μετέχουν στην αντιγονική επεξεργασία και μεταφορά, εξασφαλίζοντας έτσι την αποδοτική επαγωγή του μηχανισμού αντιγονοπαρουσίασης στα καρκινικά κύτταρα που έχουν διεγερθεί με CD40L

και IRF-E στα οποία διαδοχικά προσδένονται οι p65 και IRF-1 μεταγραφικοί παράγοντες σε απόκριση της ενεργοποίησης του CD40 μονοπατιού (Εικόνα 8). Αυτό το πρότυπο πρόσδεσης πιθανόν αντανακλά την αναγκαιότητα NF-κB εξαρτούμενης πρωτεϊνικής σύνθεσης IRF-1 προτού προσδεθεί στις IRF-E αλληλουχίες. Παρότι η κινητική της πρόσδεσης της RNA polymerase II είναι πιθανό να επηρεάζεται από διάφορους μεταγραφικούς συμπαράγοντες, σε αυτή την εργασία δείχνουμε ότι οι NF-κB και IRF-1 παίζουν καθοριστικό ρόλο στην μεταγραφική επαγωγή των TAP και LMP. Επιπλέον η αξιολόγηση της

σχετικής συνεισφοράς των δύο αυτών μεταγραφικών παραγόντων στην ρύθμιση των TAP1 και LMP2 έδειξε ότι ενώ η πρόσδεση NF-κB οδηγεί τα αρχικά στάδια της μεταγραφής, η σύνθεση και πρόσδεση του IRF-1 είναι απαραίτητη για την μέγιστη επαγωγή που παρατηρείται στα τελευταία στάδια (Εικόνα 10).

Ο περιγραφόμενος ρυθμιστικός ρόλος του NF-κB σε ότι αφορά την έκφραση των TAP και LMP υποδηλώνει τη θετική συνεισφορά του μορίου στην θεραπευτική χρήση του CD40L, ελέγχοντας την αντιγονοπαρουσίαση στα καρκινικά κύτταρα. Αυτή η παρατήρηση υπογραμμίζει τον διττή φύση του NF-κB, ο οποίος μπορεί είτε να προάγει είτε να ανταγωνίζεται τον καρκίνο ανάλογα με τον ιστό ή το ερέθισμα (36,59). Ακόμη το γονίδιο του CD40 υπόκειται στη ρύθμιση του IRF-1 σε επιθηλιακά ή ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία έχουν διεγερθεί με IFN γ (60,61). Είναι επομένως πιθανό ότι η ενεργοποίηση του CD40 μονοπατιού στα καρκινικά κύτταρα να οδηγεί στην επαγωγή του υποδοχέα μέσω του IRF-1, ενισχύοντας έτσι τις ποικίλες επιδράσεις του CD40L σε αυτά. Οι έρευνες πάνω στην σηματοδότηση του CD40 μονοπατιού έχουν τυπικά επικεντρωθεί σε άμεσα γεγονότα γονιδιακής επαγωγής (ενός βήματος). Τα δεδομένα αυτής της εργασίας αποκαλύπτουν ένα νέο μηχανισμό που λαμβάνει χώρα σε 2 βήματα μέσω του οποίου προάγεται η μεταγωγή των CD40 σημάτων (Εικόνα 11). Η διαδοχική κινητοποίηση του NF-κB και του IRF-1 εξασφαλίζει έτσι την συντονισμένη και ενισχυμένη επαγωγή των συστατικών του αντιγονοπαρουσιαστικού μηχανισμού, η σύνθεση των οποίων είναι απαραίτητη για την αντικαρκινική ανοσοαπόκριση που επάγεται από τον CD40L. Τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας θα μπορούσαν για τον λόγο αυτό να έχουν ευρύτερες εφαρμογές στην αξιολόγηση των μηχανισμών προώθησης της σηματοδότησης στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης

Υλικά και μέθοδοι

Κυτταρικές καλλιέργειες και αντιδραστήρια

Οι καρκινικές κυτταρικές σειρές της ουροδόχου κύστης EJ και VM-CUB1 διατηρήθηκαν σε θρεπτικό υλικό RPMI με 10% FCS. Η κυτταρική σειρά καρκίνου του τραχήλου HeLa και η ανθρώπινη

εμβρυονική σειρά του νεφρού HEK 293 καλλιεργήθηκαν σε DMEM με 10% FCS (Gibco). Ο ανθρώπινος ανασυνδυασμένος διαλυτός CD40L αγοράστηκε από την Bender MedSystems, Austria. Οι χημικοί αναστολείς αγοράστηκαν από την Calbiochem και διαλύθηκαν σε DMSO πριν τη χρήση.

Αντισώματα και Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Τα φωσφοειδικά αντισώματα διαλύθηκαν σε 5% BSA σε TBS+0.1% v/v Tween-20 (TBS-T). Τα υπόλοιπα αντισώματα διαλύθηκαν σε 5% milk σε TBS-T. Τα φωσφοειδικά αντισώματα p-JNK (Ser 473), p-p42/p44 MAP kinase (Thr202/Tyr204), p-p38 MAP kinase (Thr180/Tyr182), p-STAT1 (Tyr701), p-TAK1 (Thr187) και τα αντίστοιχα που αναγνωρίζουν την συνολική πρωτεΐνη τόσο φωσφορυλιωμένη όσο και μη φωσφορυλιωμένη αγοράστηκαν από την Cell Signalling Technology και χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώσεις 1:500-1:1000. Τα αντισώματα IκBα/MAD3 (C-21), IRF-1 (C-20), IRF-3, p65 (C-20) and RNA polymerase II (N-20) αγοράστηκαν από την Santa-Cruz Biotechnology και χρησιμοποιήθηκαν σε ανάλογες αραιώσεις. Το αντίσωμα για την tubulin αγοράστηκε από την Sigma και χρησιμοποιήθηκε σε αραιώση 1:1000. Αντι-κουνελίου IgG HRP (1:2000) αγοράστηκε από την Cell Signalling Technology και αντι-ποντικού IgG HRP (1:1000) από την Sigma. Για την ανοσοαποτύπωση 15-40μg πρωτεΐνης διαχωρίστηκαν με SDS-PAGE, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη PVDF (0.45μM, Millipore), η οποία στη συνέχεια εμβαπτίστηκε σε 5% γάλα διαλυμένο σε TBS-T για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από 3 πλυσίματα με TBS-T, οι μεμβράνες επώαστηκαν όλη την νύχτα με πρωτεύον αντίσωμα στους 4°C. Την επόμενη μέρα οι μεμβράνες επώαστηκαν για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με το κατάλληλο δευτερεύον αντίσωμα και τέλος χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του χημειοφθορισμού (ECL, Amersham) για την ανίχνευση των πρωτεϊνών.

Προετοιμασία πυρηνικών εκχυλισμάτων και δοκιμασία μεταβολής της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (EMSAs)

Κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 5 όγκους διαλύματος ομογενοποίησης (10mM Hepes-KOH pH 7.9, 1.5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0.5mM DTT) στο οποίο προστέθηκαν αναστολείς πρωτεασών (0.1 mM sodium orthovanadate, 10 mM sodium glycerophosphate, 2μg/ml leupeptin and 2μg/ml aprotinin) ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 1200 rpm για 10 λεπτά. Η πελέτα επαναδιαλύθηκε σε 3 όγκους παγωμένου διαλύματος ομογενοποίησης το οποίο αυτή τη φορά περιέχει απορρυπαντικό 0.05% NP40

και ακολούθησε ομογενοποίηση σε ειδικό ομογενοποιητή Dounce σε θερμοκρασία 4° C. Μετά από φυγοκέντρηση στις 1200 rpm για 10 min στους 4°C συλλέχθηκε το κυτταροπλασματικό κλάσμα. Οι πυρήνες ξεπλύθηκαν με διάλυμα ομογενοποίησης και στην συνέχεια επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα που περιέχει 40mM Hepes-KOH pH 7.9, 0.4 M KCl, 1mM DTT και 10% γλυκερόλη καθώς και αναστολείς πρωτεασών. Στην συνέχεια προστέθηκε NaCl σε τελική συγκέντρωση 300mM, το διάλυμα ανακατεύθηκε και τοποθετήθηκε στον πάγο για 30 λεπτά. Μετά από αυτό τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 24,000 rpm για 30 λεπτά. Τα υπερκείμενα αφαιρέθηκαν και παγώθηκαν στους -80°C όπως περιγράφεται (62). Οι αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν ως ανιχωευτές είναι: IRF-1 κB 5'-AGGGCTGGGGAATCCCGCTAA-3' and IRF-1 M-κB 5'-AGGGCTGCGTAATAG CGCTAA-3'. Πριν την ραδιασήμανση τα παραπάνω ολιγονουκλεότιδια τοποθετήθηκαν στους 100°C μαζί τα συμπληρωματικά τους προκειμένου να σχηματιστούν δίκλιωνα μόρια.

Δοκιμασία ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP)

EJ κύτταρα επώαστηκαν με CD40L σε τελική συγκέντρωση 0.5μg/ml για διάφορες χρονικές περιόδους. Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν για 10 λεπτά στους 37°C με 1% HCHO, διαδικασία που διακόπηκε με την προσθήκη γλυκίνη σε τελική συγκέντρωση 137.5 μM. Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν 3 φορές με PBS και 0.5 μM PMSF και συλλέχθηκαν σε διάλυμα PBS με 0.5% NP-40 και 0.5 μM PMSF. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 1000 rpm για 5 min στους 4 °C. Οι πελέτες επαναδιαλύθηκαν σε διογκωτικό διάλυμα (25 mM Hepes, pH 7.8, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5% NP-40, 1 mM DTT, 0.5 μM PMSF, 2 μg/mL aprotinin) και αφέθηκαν στον πάγο για 10 λεπτά. Ακολούθησε ομογενοποίηση σε ομογενοποιητή Dounce και φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 5 min στους 4 °C. Εν συνεχεία οι πυρήνες επαναδιάλυθηκαν σε διάλυμα το οποίο περιέχει (50 mM Hepes, pH 7.8, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 0.5 mM PMSF, 2 μg/mL aprotinin) και τοποθετήθηκαν σε ειδικό μηχάνημα παραγωγής υπερήχων για 15 φορές για 30 δευτερόλεπτα στον 50% της έντασης. Αυτή η διαδικασία οδήγησε σε παραγωγή κομματιών DNA μέσου μεγέθους 0.5 kb. Τα δείγματα καθαρίστηκαν με φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 15 min στους 4°C. Το υπερκείμενο προ-καθαρήστηκς με περιστροφή στους για 2 ώρες με G-πρωτεϊνικά σφαιρίδια. Το 1/10 του όγκου της χρωματίνης που απομονώθηκε χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος της αρχικής ποσότητας χρωματίνης των δειγμάτων (input) και ο υπόλοιπος όγκος ανοσοκατακρημνιστηκς με ειδικά αντισώματα για τις πρωτεΐνες p65, IRF1 or RNA Polymerase II στους 4°C κατά τη διάρκεια της νύχτας. Τα δείγματα πλύθηκαν ενταντικά με διάλυμα A (50 mM Hepes, pH 7.9, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 0.5 mM PMSF, 2 μg/mL aprotinin), διάλυμα B (50 mM Hepes, pH 7.9, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS,

0.5 mM PMSF, 2 µg/mL aprotinin), διάλυμα Γ(20 mM Tris-Cl, pH 8, 1 mM EDTA, 250 mM LiCl, 0.5% sodium deoxycholate, 0.5 mM PMSF, 2 µg/mL aprotinin) και TE (10 mM Tris-Cl, pH 8, 1 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 2 µg/mL aprotinin). Το DNA εκλούστηκε σε 300 µl κατάλληλου διαλύματος (50 mM Tris- Cl, pH 8, 1 mM EDTA, 1% SDS, 50mM NaHCO₃) και οι ομοιοπολικοί δεσμοί μεταξύ πρωτεϊνών και DNA καταστράφηκαν με θέρμανση στους 65 °C για 5 ώρες. Τα δείγματα επώαστηκαν με RNase A για 1 ώρα στους 37 °C και πρωτεϊνάση K για 2 ώρες στους 42 °C. Το DNA απομονώθηκε με την χρήση βασικών πρωτοκόλλων και οι πελλέτες επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα 10 mM Tris-Cl, pH 7.5. Η περαιτέρω ανάλυση έγινε με την μέθοδο PCR με ειδικού εκκινητές για τους υποκινητές των γονιδίων IRF1, TAP1, TAP2, tapasin, LMP10 και IL-8. Οι αλληλουχίες τους είναι οι ακόλουθες:

IRF-1(Forw) 5'-GAGCAGGGGTGGATTGG-3',
IRF-1(Rev) 5'-GCACGTCTTGCCTCGACTA-3',
TAP1(forw)5'-AACTGGTGCAAGTGGAAAGG-3',
TAP1(rev)5'-GGGACACCTAGAGCTAGCCATT-3'
TAP2(forw) 5'-CCTGTACAGTGCGAACCAGA-3',
TAP2 (rev) 5'-TGGAGTGGGTAGTCACTTGG-3',
LMP10(forw)5'-AGCTATGCCTGATGCTACTGG-3',
LMP10(rev)5'-GATGAGTCGGCCAGACAAG-3',
tapasin(forw) 5'-GGAAGCCGGAGTAATGGTTT-3',
tapasin(rev)5'-TGAAGCCTCCTCTTCCTCCT-3',
IL-8(forw)5'-GTTGTAGTATGCCCCCTAAGAG-3',
IL-8 (rev) 5'-CTCAGGGCAAACCTGAGTCATC-3'.

Τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης. Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με τη μέτρηση της έντασης των ζωνών του DNA με τη βοήθεια του λογισμικού Tinascan v.2

Δοκιμασίες φορέων με γονίδια αναφοράς

Περίπου 600 βάσεις του IRF-1 υποκινητή πολλαπλασιάστηκαν με την μέθοδο PCR από γενωμικό DNA χρησιμοποιώντας εκκινητές με αλληλουχία 5'-TACCCTCGAGCTTTCTGCCTCCTTCACTTCC-3' και 5'-ACGTAAGATCTGCCAGGGCAGCGGCCCCACCGA-3'. Το προϊόν κλωνοποιήθηκε αρχικά στον φορέα pCR2.1 της (Invitrogen) και μετά στις θέσεις περιορισμού KpnI/BglIII του φορέα pGL2-Basic της (Promega), ανοδικά από το γονίδιο της λουσιφεράσης. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε ένα προϊόν της εταιρείας (Stratagene) κατάλληλο για την εισαγωγή σημειακών μεταλλάξεων (Quick Change Site-Directed Mutagenesis kit) προκειμένου να μεταλλαχθεί το μοτίβο κB του IRF-1 υποκινητή. Οι κλώνοι

που προέκυψαν αλληλουχίστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμασίες αναφοράς. Αυτές πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας 1×10^5 HEK293 κύτταρα σε κάθε πηγάδι σε πιάτο 24 πηγαδίων. Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με 50ng φορέα αναφοράς NF-κB/λουσιφεράσης 3Enh.κB-ConALuc το οποίο περιέχει 3 αντιπαράλληλα μοτίβα κB από τον υποκινητή Igκ ή 50ng φορέα αναφοράς IRF1/λουσιφεράσης και 50ng ενός φορέα που σταθερά εκφράζει το ένζυμο Renilla με τη χρήση λιποφεκταμίνης Lipofectamine (Invitrogen Corp.) σε θρεπτικό υλικό Optimem (Invitrogen Corp.) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Μετά από 10 ώρες επώασης με το μείγμα διαμόλυνσης, τα κύτταρα επώαστηκαν με θρεπτικό υλικό DMEM με 10% FCS. Οι τιμές των λουσιφεράση και Renilla μετρήθηκαν 24-30 ώρες αργότερα, όπως περιγράφεται (47).

Δοκιμασία RNA παρεμβολής (RNA i)

Προκειμένου να χορηγηθούν μικρά RNA παρεμβολής (siRNA), 1×10^5 EJ κύτταρα στρώθηκαν σε πιατάκια 24 πηγαδίων (Costar) και την επόμενη μέρα δίκλωνο siRNA διαμολύνθηκαν με κατάλληλο αντιδραστήριο διαμόλυνσης που ονομάζεται siIMPORTER (Upstate Biotechnology), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ο IRF-1 στοχεύθηκε με το δίκλωνο siRNA με αλληλουχία GGGCUCaucUGGAUUAUAUU και το συμπληρωματικό του (Dharmacon, USA). Ως έλεγχος χρησιμοποιήθηκε το δίκλωνο siRNA με αλληλουχία CGUACGCGGAAUACUUCGAUU και το συμπληρωματικό του. Το p65 (RelA) αγοράστηκε από την Cell Signaling Technology. Τα siRNA για τον IRF-1 και για τον έλεγχο διαμολύνθηκαν και τα κύτταρα επώαστηκαν κατά την διάρκεια της νύχτας. Το μείγμα διαμόλυνσης αφαιρέθηκε και φρέσκο θρεπτικό υλικό με ή χωρίς CD40L προστέθηκε. Για το p65 siRNA, κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 6 ώρες με το μείγμα διαμόλυνσης και μετά ίσος όγκος φρέσκου θρεπτικού προστέθηκε. Τα κύτταρα αφήθηκαν για 10 ώρες και μετά μεταφέρθηκαν σε πιατάκια 24 πηγαδίων. Την επόμενη μέρα, υποβλήθηκαν σε δεύτερη διαμόλυνση για να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα της ελάττωσης της έκφρασης του γονιδίου. 24 ώρες αργότερα οι καλλιέργειες ενεργοποιήθηκαν με CD40L, πριν τη λύση τους και την περαιτέρω ανάλυση.

Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης ακολουθούμενη από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR)

RNA απομονώθηκε με το αντιδραστήριο Trizol[®] (Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. 2μg RNA χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση cDNA με την αντίστροφη μεταγραφάση AMV και το σύστημα Reverse Transcription System της Promega. Ακολούθησαν αντιδράσεις PCR με το 1/10 του cDNA και ειδικούς εκκινητές με αλληλουχίες:

IRF-1 (forw): 5'-ATGCAGATTAATTCCAAC-3'

IRF-1(rev): 5'-GCTCTGGTCTTTTCACCTC -3'

TAP1(forw): 5'-CCTGACCCAGAAGCCAACATA-3'

TAP1 (rev): 5'-CCCTTTTTCTCCATGAGCTG-3'

TAP2(forw): 5'-AGGAGGCTGC TTCACCTACA 3'

TAP2(rev): 5'-GCGGGTGTGTACACCTTCT -3'

LMP2(forw): 5' GTTG TGATGGGTCTGATTC-3'

LMP2(rev): 5'-CACCAATGGCAAAAGGCT-3'

LMP10(forw): 5'-GGGCTTCTCCTTCGAGAACT-3'

LMP10(rev): 5'-AACGCGTGTA GCTCCATCTT-3'

Tapasin (forw): 5'-GCTCTGCTGGACTTGAGCTT-3'

Tapasin (rev): 5'-TTGCAGGTATGGCAGGTGTA-3'

GAPDH (forw): 5'-ACCACAGTCCATGCCA TCAC-3'

GAPDH (rev): 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

Αναφορές

1. **Tamura, T., H. Yanai, D. Savitsky, and T. Taniguchi.** 2007. The IRF Family Transcription Factors in Immunity and Oncogenesis. *Annu Rev Immunol*.
2. **Galon, J., C. Sudarshan, S. Ito, D. Finbloom, and J. J. O'Shea.** 1999. IL-12 induces IFN regulating factor-1 (IRF-1) gene expression in human NK and T cells. *J Immunol* **162**:7256-62.
3. **Liu, J., S. Cao, L. M. Herman, and X. Ma.** 2003. Differential regulation of interleukin (IL)-12 p35 and p40 gene expression and interferon (IFN)-gamma-primed IL-12 production by IFN regulatory factor 1. *J Exp Med* **198**:1265-76.
4. **Negishi, H., Y. Fujita, H. Yanai, S. Sakaguchi, X. Ouyang, M. Shinohara, H. Takayanagi, Y. Ohba, T. Taniguchi, and K. Honda.** 2006. Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:15136-41.
5. **Min, W., J. S. Pober, and D. R. Johnson.** 1996. Kinetically coordinated induction of TAP1 and HLA class I by IFN-gamma: the rapid induction of TAP1 by IFN-gamma is mediated by Stat1 alpha. *J Immunol* **156**:3174-83.
6. **White, L. C., K. L. Wright, N. J. Felix, H. Ruffner, L. F. Reis, R. Pine, and J. P. Ting.** 1996. Regulation of LMP2 and TAP1 genes by IRF-1 explains the paucity of CD8+ T cells in IRF-1^{-/-} mice. *Immunity* **5**:365-76.
7. **Fujita, T., Y. Kimura, M. Miyamoto, E. L. Barsoumian, and T. Taniguchi.** 1989. Induction of endogenous IFN-alpha and IFN-beta genes by a regulatory transcription factor, IRF-1. *Nature* **337**:270-2.
8. **Fujita, T., L. F. Reis, N. Watanabe, Y. Kimura, T. Taniguchi, and J. Vilcek.** 1989. Induction of the transcription factor IRF-1 and interferon-beta mRNAs by cytokines and activators of second-messenger pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:9936-40. 8

9. **Yarilina, A., K. H. Park-Min, T. Antoniv, X. Hu, and L. B. Ivashkiv.** 2008. TNF activates an IRF1-dependent autocrine loop leading to sustained expression of chemokines and STAT1-dependent type I interferon-response genes. *Nat Immunol* **9**:378-87.
10. **Dornan, D., M. Eckert, M. Wallace, H. Shimizu, E. Ramsay, T. R. Hupp, and K. L. Ball.** 2004. Interferon regulatory factor 1 binding to p300 stimulates DNA-dependent acetylation of p53. *Mol Cell Biol* **24**:10083-98.
11. **Nozawa, H., E. Oda, K. Nakao, M. Ishihara, S. Ueda, T. Yokochi, K. Ogasawara, Y. Nakatsuru, S. Shimizu, Y. Ohira, K. Hioki, S. Aizawa, T. Ishikawa, M. Katsuki, T. Muto, T. Taniguchi, and N. Tanaka.** 1999. Loss of transcription factor IRF-1 affects tumor susceptibility in mice carrying the Ha-ras transgene or nullizyosity for p53. *Genes Dev* **13**:1240-5.
12. **Kim, P. K., M. Armstrong, Y. Liu, P. Yan, B. Bucher, B. S. Zuckerbraun, A. Gambotto, T. R. Billiar, and J. H. Yim.** 2004. IRF-1 expression induces apoptosis and inhibits tumor growth in mouse mammary cancer cells in vitro and in vivo. *Oncogene* **23**:1125-35.
13. **Kroger, A., A. Stirnweiss, J. E. Pulverer, K. Klages, M. Grashoff, J. Reimann, and H. Hauser.** 2007. Tumor suppression by IFN regulatory factor-1 is mediated by transcriptional down-regulation of cyclin D1. *Cancer Res* **67**:2972-81.
14. **Pizzoferrato, E., Y. Liu, A. Gambotto, M. J. Armstrong, M. T. Stang, W. E. Gooding, S. M. Alber, S. H. Shand, S. C. Watkins, W. J. Storkus, and J. H. Yim.** 2004. Ectopic expression of interferon regulatory factor-1 promotes human breast cancer cell death and results in reduced expression of survivin. *Cancer Res* **64**:8381-8.
15. **van Kooten, C., and J. Banchereau.** 2000. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* **67**:2-17.
16. **Kato, T., R. Hakamada, H. Yamane, and H. Nariuchi.** 1996. Induction of IL-12 p40 messenger RNA expression and IL-12 production of macrophages via CD40-CD40 ligand interaction. *J Immunol* **156**:3932-8. 16

17. **Callard, R. E., R. J. Armitage, W. C. Fanslow, and M. K. Spriggs.** 1993. CD40 ligand and its role in X-linked hyper-IgM syndrome. *Immunology Today* **14**:559-564.
18. **Hayward, A. R., J. Levy, F. Facchetti, L. Notarangelo, H. D. Ochs, A. Etzioni, J.-Y. Bonnefoy, M. Cosyns, and A. Weinberg.** 1997. Cholangiopathy and tumours of the pancreas, liver and biliary tree in boys with X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Journal of Immunology* **158**:977-983.
19. **Eliopoulos, A. G., and L. S. Young.** 2004. The role of the CD40 pathway in the pathogenesis and treatment of cancer. *Curr Opin Pharmacol* **4**:360-7.
20. **Tong, A. W., and M. J. Stone.** 2003. Prospects for CD40-directed experimental therapy of human cancer. *Cancer Gene Ther* **10**:1-13.
21. **Challa, A., A. G. Eliopoulos, M. J. Holder, A. S. Burguete, J. D. Pound, A. Chamba, G. Grafton, R. J. Armitage, C. D. Gregory, H. Martinez-Valdez, L. Young, and J. Gordon.** 2002. Population depletion activates autonomous CD154-dependent survival in biopsylike Burkitt lymphoma cells. *Blood* **99**:3411-8.
22. **Eliopoulos, A. G., C. W. Dawson, G. Mosialos, J. E. Floettmann, M. Rowe, R. J. Armitage, J. Dawson, J. M. Zapata, D. J. Kerr, M. J. O. Wakelam, J. C. Reed, E. Kieff, and L. S. Young.** 1996. CD40-induced growth inhibition in epithelial cells is mimicked by Epstein-Barr virus-encoded LMP1: involvement of TRAF3 as a common mediator. *Oncogene* **13**:2243-2254.
23. **Funakoshi, S., D. L. Longo, M. Beckwith, D. K. Conley, G. Tsarfaty, I. Tsarfaty, R. J. Armitage, W. C. Fanslow, M. K. Spriggs, and W. J. Murphy.** 1994. Inhibition of human B-cell lymphoma growth by CD40 stimulation. *Blood* **83**:2787-94.
24. **Ghamande, S., B. L. Hylander, E. Oflazoglu, S. Lele, W. Fanslow, and E. A. Repasky.** 2001. Recombinant CD40 Ligand Therapy Has Significant Antitumor Effects on CD40-positive Ovarian Tumor Xenografts Grown in SCID Mice and Demonstrates an Augmented Effect with Cisplatin. *Cancer Res* **61**:7556-62. 24

- 25 **Kikuchi, T., and R. G. Crystal.** 1999. Anti-tumor immunity induced by in vivo adenovirus vector-mediated expression of CD40 ligand in tumor cells. *Hum. Gene Ther.* **10**:1375-1387.
- 26 **Loskog, A., H. Dzojic, S. Vikman, C. Ninalga, M. Essand, O. Korsgren, and T. H. Totterman.** 2004. Adenovirus CD40 ligand gene therapy counteracts immune escape mechanisms in the tumor Microenvironment. *J Immunol* **172**:7200-5.
27. **Sun, Y., D. Peng, J. Lecanda, V. Schmitz, M. Barajas, C. Qian, and J. Prieto.** 2000. In vivo gene transfer of CD40 ligand into colon cancer cells induces local production of cytokines and chemokines, tumor eradication and protective antitumor immunity. *Gene Ther* **7**:1467-76.
- 28 **Hill, S. C., S. J. Youde, S. Man, G. R. Teale, A. J. Baxendale, A. Hislop, C. C. Davies, D. M. Luesley, A. M. Blom, A. B. Rickinson, L. S. Young, and A. G. Eliopoulos.** 2005. Activation of CD40 in Cervical Carcinoma Cells Facilitates CTL Responses and Augments Chemotherapy-Induced Apoptosis. *J Immunol* **174**:41-50.
- 29 **Khanna, R., L. Cooper, N. Kienzle, D. J. Moss, S. R. Burrows, and K. K. Khanna.** 1997. Engagement of CD40 antigen with soluble CD40 ligand up-regulates peptide transporter
- 30 **Chatterjee-Kishore, M., R. Kishore, D. J. Hicklin, F. M. Marincola, and S. Ferrone.** 1998. Different requirements for signal transducer and activator of transcription 1alpha and interferon regulatory factor 1 in the regulation of low molecular mass polypeptide 2 and transporter associated with antigen processing 1 gene expression. *J Biol Chem* **273**:16177-83.
- expression and restores endogenous processing function in Burkitt's lymphoma cells. *J Immunol*
- 31 **Stamenkovic, I., E. A. Clark, and B. Seed.** 1989. A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas. *Embo J* **8**:1403-10. **159**:5782-5.
- 32 **Moschonas, A., Kouraki, M., Knox, P., Thymiakou, E., Kardassis, D., Eliopoulos, A.** 2008 CD40 induces antigen transporter and immunoproteasome gene expression in

carcinomas via the coordinated action of NF- κ B and of NF- κ B mediated *de novo* synthesis of IRF-1. MCB (in press).

33. **Rothman, P., B. Kreider, M. Azam, D. Levy, U. Wegenka, A. Eilers, T. Decker, F. Horn, H. Kashleva, J. Ihle, and et al.** 1994. Cytokines and growth factors signal through tyrosine phosphorylation of a family of related transcription factors. *Immunity* **1**:457-68.

34. **Perkins, N. D.** 1997. Achieving transcriptional specificity with NF-kappa B. *Int J Biochem Cell Biol* **29**:1433-48.

35. **Kishore, N., C. Sommers, S. Mathialagan, J. Guzova, M. Yao, S. Hauser, K. Huynh, S. Bonar, C. Mielke, L. Albee, R. Weier, M. Graneto, C. Hanau, T. Perry, and C. S. Tripp.** 2003. A selective IKK-2 inhibitor blocks NF-kappa B-dependent gene expression in interleukin-1 beta-stimulated synovial fibroblasts. *J Biol Chem* **278**:32861-71.

36. **Hayden, M. S., and S. Ghosh.** 2004. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* **18**:2195-224.

37. **Ninomiya-Tsuji, J., K. Kishimoto, A. Hiyama, J. Inoue, Z. Cao, and K. Matsumoto.** 1999. The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* **398**:252-6.

38. **Gallagher, E., T. Enzler, A. Matsuzawa, A. Anzelon-Mills, D. Otero, R. Holzer, E. Janssen, M. Gao, and M. Karin.** 2007. Kinase MEKK1 is required for CD40-dependent activation of the kinases Jnk and p38, germinal center formation, B cell proliferation and antibody production. *Nat Immunol* **8**:57-63.

39. **Wan, J., L. Sun, J. W. Mendoza, Y. L. Chui, D. P. Huang, Z. J. Chen, N. Suzuki, S. Suzuki, W. C. Yeh, S. Akira, K. Matsumoto, Z. G. Liu, and Z. Wu.** 2004. Elucidation of the c-Jun N-terminal kinase pathway mediated by Estein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1. *Mol Cell Biol* **24**:192-9.

- 40 **Tanaka, N., T. Kawakami, and T. Taniguchi.** 1993. Recognition DNA sequences of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2, regulators of cell growth and the interferon system. *Mol Cell Biol* **13**:4531-8.
41. **Elliott, T., and A. Williams.** 2005. The optimization of peptide cargo bound to MHC class I molecules by the peptide-loading complex. *Immunol Rev* **207**:89-99.
42. **Williams, A., C. A. Peh, and T. Elliott.** 2002. The cell biology of MHC class I antigen presentation. *Tissue Antigens* **59**:3-17.
43. **Wright, K. L., L. C. White, A. Kelly, S. Beck, J. Trowsdale, and J. P. Ting.** 1995. Coordinate regulation of the human TAP1 and LMP2 genes from a shared bidirectional promoter. *J Exp Med* **181**:1459-71.
44. **Arons, E., V. Kunin, C. Schechter, and R. Ehrlich.** 2001. Organization and functional analysis of the mouse transporter associated with antigen processing 2 promoter. *J Immunol* **166**:3942-51. 40
- 45 **Foss, G. S., and H. Prydz.** 1999. Interferon regulatory factor 1 mediates the interferon-gamma induction of the human immunoproteasome subunit multicatalytic endopeptidase complex-like 1. *J Biol Chem* **274**:35196-202.
46. **Saccani, S., S. Pantano, and G. Natoli.** 2002. p38-Dependent marking of inflammatory genes for increased NF-kappa B recruitment. *Nat Immunol* **3**:69-75.
47. **Davies, C. C., T. W. Mak, L. S. Young, and A. G. Eliopoulos.** 2005. TRAF6 is required for TRAF2-dependent CD40 signal transduction in nonhemopoietic cells. *Mol Cell Biol* **25**:9806-19.
48. **Sakurai, H., S. Suzuki, N. Kawasaki, H. Nakano, T. Okazaki, A. Chino, T. Doi, and I. Saiki.** 2003. Tumor necrosis factor-alpha-induced IKK phosphorylation of NF-kappaB p65 on serine 536 is mediated through the TRAF2, TRAF5, and TAK1 signaling pathway. *J Biol Chem* **278**:36916-23.

- 49 **Yang, F., E. Tang, K. Guan, and C. Y. Wang.** 2003. IKK beta plays an essential role in the phosphorylation of RelA/p65 on serine 536 induced by lipopolysaccharide. *J Immunol* **170**:5630-5.
- 50 **French, R. R., H. T. C. Chan, A. L. Tutt, and M. J. Glennie.** 1999. CD40 antibody evokes a cytotoxic T-cell response that eradicates lymphoma and bypasses T cell help. *Nat. Med.* **5**:548-553.
- 51 **Takahashi, S., R. F. Rousseau, P. Yotnda, Z. Mei, G. Dotti, D. Rill, R. Hurwitz, F. Marini, M. Andreeff, and M. K. Brenner.** 2001. Autologous antileukemic immune response induced by chronic lymphocytic leukemia B cells expressing the CD40 ligand and interleukin 2 transgenes. *Hum Gene Ther* **12**:659-70.
- 52 **Vonderheide, R. H., J. P. Dutcher, J. E. Anderson, S. G. Eckhardt, K. F. Stephans, B. Razvillas, S. Garl, M. D. Butine, V. P. Perry, R. J. Armitage, R. Ghalie, D. A. Caron, and J. G. Gribben.** 2001. Phase I study of recombinant human CD40 ligand in cancer patients. *J Clin Oncol* **19**:3280-7. 48
- 53 **Mackey, M. F., J. R. Gunn, C. Maliszewski, H. Kikutani, R. J. Noelle, and R. J. Barth.** 1998. Dendritic cells require maturation via CD40 to generate protective anti-tumour immunity. *J. Immunol.* **161**:2094-2098.
- 54 **Seliger, B., M. J. Maeurer, and S. Ferrone.** 1997. TAP off--tumors on. *Immunol Today* **18**:292-9.
- 55 **Cromme, F. V., J. Airey, M. T. Heemels, H. L. Ploegh, P. J. Keating, P. L. Stern, C. J. Meijer, and J. M. Walboomers.** 1994. Loss of transporter protein, encoded by the TAP-1 gene, is highly correlated with loss of HLA expression in cervical carcinomas. *J Exp Med* **179**:335-40.
- 56 **Gabathuler, R., G. Reid, G. Kolaitis, J. Driscoll, and W. A. Jefferies.** 1994. Comparison of cell lines deficient in antigen presentation reveals a functional role for TAP-1 alone in antigen processing. *J Exp Med* **180**:1415-25.

- 57 **Setiadi, A. F., M. D. David, S. S. Chen, J. Hiscott, and W. A. Jefferies.** 2005. Identification of mechanisms underlying transporter associated with antigen processing deficiency in metastatic murine carcinomas. *Cancer Res* **65**:7485-92.
- 58 **Lou, Y., T. Z. Vitalis, G. Basha, B. Cai, S. S. Chen, K. B. Choi, A. P. Jeffries, W. M. Elliott, D. Atkins, B. Seliger, and W. A. Jefferies.** 2005. Restoration of the expression of transporters associated with antigen processing in lung carcinoma increases tumor-specific immune responses and survival. *Cancer Res* **65**:7926-33.
- 59 **Perkins, N. D.** 2004. NF-kappaB: tumor promoter or suppressor? *Trends Cell Biol* **14**:64-9.
- 60 **Wagner, A. H., M. Gebauer, B. Pollok-Kopp, and M. Hecker.** 2002. Cytokine-inducible CD40 expression in human endothelial cells is mediated by interferon regulatory factor-1. *Blood* **99**:520-5.
- 61 **Zhao, Z., Y. Qian, D. Wald, Y. F. Xia, J. G. Geng, and X. Li.** 2003. IFN regulatory factor-1 is required for the up-regulation of the CD40-NF-kappa B activator 1 axis during airway inflammation. *J Immunol* **170**:5674-80.
- 62 **Eliopoulos, A. G., C. C. Wang, C. D. Dumitru, and P. N. Tsihchlis.** 2003. Tpl2 transduces CD40 and TNF signals that activate ERK and regulates IgE induction by CD40. *EMBO J* **22**:3855-3864.

