

ΚΟΥΤΣΟΔΟΝΤΗΣ ΓΙΩΡΓΟΣ

Εργασία στα πλαίσια της πρακτικής άσκησης του διατμηματικού
μεταπτυχιακού προγράμματος
Μοριακής Βιολογίας-Βιοϊατρικής, Πανεπιστημίου Κρήτης
με τίτλο :

**«Λειτουργικός χαρακτηρισμός των θέσεων πρόσδεσης του
παράγοντα Sp1 στον υποκινητή του γονιδίου p21/WAF του
ανθρώπου και μελέτη του μηχανισμού μεταγραφικής
ενεργοποίησης από τις πρωτεΐνες SMAD και p300.»**

Επιβλέπων καθηγητής : Καρδάσης Δημήτρης

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2000

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	2
ABSTRACT	4
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
Μεταγραφική αύξηση του p21 εξαρτημένη από p53.....	14
Αύξηση της εξαρτημένης ή ανεξάρτητης μεταγραφής του p21 από ενεργοποιημένο RAS.	15
Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης του p21 ανεξάρτητα από p53.	16
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	27
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	28
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	45
Μεταγραφική ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου p21 του ανθρώπου από τον παράγοντα Sp1 σε κύτταρα SL2.....	45
Μεταλλαξιγένεση του υποκινητή του γονιδίου p21 του ανθρώπου	47
Επίδραση των μεταλλάξεων στην μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή του p21 παρουσία του παράγοντα Sp1.	53
Επίδραση των μεταλλάξεων στην μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή του p21 σε κύτταρα HepG2, COS-7 και HeLa.	55
Επίδραση των μεταλλάξεων στη μεταγραφική ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου p21 από τις πρωτεΐνες Smad3 και Smad4.	59
Ο ρόλος του παράγοντα p300 στη μεταγραφική ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από τις πρωτεΐνες Smad 3/4.	61
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	65
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	71

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου ελέγχεται από τις κινάσες που εξαρτώνται από κυκλίνες (CDKs). Οι κινάσες αυτές είναι οι καταλυτικοί συνεργάτες των κυκλινών. Το γονίδιο p21 χαρακτηρίστηκε ως πρωτεΐνη που συνδέεται στο σύμπλοκο κινάσης-κυκλίνης και αποδείχθηκε σημαντικός παράγοντας για τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, καθώς η έκφρασή του που προέρχεται από μιτιγόνα ερεθίσματα οδηγεί σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G₁. Το γονίδιο p21 αποτελεί στόχο διαφόρων σημάτων που προάγουν την αναστολή της ανάπτυξης και τη διαφοροποίηση. Η μεταγραφική ρύθμιση του p21 ελέγχεται από μηχανισμούς εξαρτημένους από p53 και μηχανισμούς ανεξάρτητους από p53. Μια πληθώρα από μεταγραφικούς παράγοντες συνδέονται σε συγκεκριμένες θέσεις απόκρισης που εντοπίζονται στον υποκινητή του p21 και ρυθμίζουν την έκφραση του p21 με τρόπο ανεξάρτητο του p53. Η περιοχή του p21 υποκινητή μεταξύ των βάσεων -119/+1 περιέχει 6 θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα Sp1 και παίζει πρωταρχικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής του p21.

Στην παρούσα εργασία κατασκευάσαμε μια σειρά μεταλλαγμένων υποκινητών για κάθε μια από τις Sp1 θέσεις με σκοπό τη μελέτη της σημασίας των θέσεων αυτών στη ρύθμιση του p21. Η σύνδεση του παράγοντα Sp1 με τον αγρίου τύπου και τους μεταλλαγμένους υποκινητές επιβεβαιώθηκε με τη μέθοδο της κινητικότητας συμπλόκου σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. Παρατηρήθηκαν, επίσης, διαφορές στην ενεργότητα των μεταλλαγμένων υποκινητών, χρησιμοποιώντας διάφορες κυτταρικές σειρές, όπως HepG2, COS-7 και HeLa. Τέλος, μελετήσαμε το ρόλο του παράγοντα p300 και των πρωτεϊνών SMAD στη μεταγραφή του p21 μέσω του Sp1.

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι οι θέσεις αυτές δεν είναι εξίσου ισοδύναμες στη ρύθμιση του p21 και καμία από αυτές δεν είναι αποκλειστικά υπεύθυνη για την ενεργοποίηση μέσω Sp1. Επιπλέον, όλοι οι μεταλλαγμένοι υποκινητές ενεργοποιούνται εξίσου από τις πρωτεΐνες SMADs (2 φορές), υποδεικνύοντας ότι οι SMADs ενεργοποιούν τον p21 υποκινητή μέσω άλλων παραγόντων που αναγνωρίζουν τις πλούσιες σε GC περιοχές.

Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις για το σχηματισμό ενός πολύ-πρωτεϊνικού συμπλόκου αποτελούμενο από Sp1, p300 και SMADs στην κοντινή περιοχή του p21 υποκινητή , που ελέγχει τη μεταγραφή του p21.

ABSTRACT

Cell cycle progression is controlled by the cyclin-dependent kinases (CDKs). CDKs are the catalytic partners of the cyclins. p21 was identified as a CDK binding protein and proved to be a key factor in regulating cell cycle, as its expression following mitogenic stimuli results in G1 cell cycle arrest. The p21 gene is a target for diverse signals that induce growth arrest and differentiation. The transcriptional regulation of p21 is controlled by p53-dependent and p53-independent mechanisms. A variety of transcription factors bind to specific *cis*-acting elements located within the p21 promoter regulating the expression of the p21 gene in a p53-independent way. The region between -119/+1 of the p21 promoter contains six Sp1 binding sites and plays a major role in the regulation of p21 transcription.

In the present work we constructed a series of point mutants of p21 promoter in each of Sp1 sites in order to study the importance of Sp1 sites in p21 regulation. Binding of Sp1 to the wild type and the mutated sites was confirmed by Gel Electrophoretic Mobility Shift Assay. Differences were observed in the activity of the mutated promoters using various cell lines, such as HepG2, COS-7 and HeLa. We further examined the role of the p300 factor and SMAD proteins for Sp1-mediated p21 transcription.

Our results show that these sites are not of equal importance in p21 regulation and none of them is essential for Sp1-mediated transactivation. In addition all of the mutated promoter were transactivated by SMADs to the same extent (2 folds) suggesting that SMADs transactivate the p21 promoter by other factors that bind to the GC-rich elements of the proximal promoter

Finally, there is evidence of a Sp1, p300 and SMAD multi-protein complex formation within the proximal region of p21 promoter, that controls the p21 transcription.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο ευκαρυωτικός κυτταρικός κύκλος χωρίζεται σε 4 διακριτές φάσεις οι οποίες διαρκούν 24 ώρες. Οι φάσεις αυτές είναι διαδοχικά η G_1 , η S, η G_2 και η M. Τα κύτταρα θηλαστικών μετά το διπλασιασμό είτε ξεκινούν ένα νέο κύκλο διπλασιασμού του DNA κατά τη διάρκεια της S φάσης, είτε παραμένουν στην πρώιμη φάση ανάπτυξης G_1 . Απουσία μιτογόνων παραγόντων ή σε περίπτωση πλήρως διαφοροποιημένων κυττάρων, τα κύτταρα αυτά εξέρχονται του κυτταρικού κύκλου και παραμένουν σε ένα πρώιμο στάδιο της G_1 φάσης, το οποίο ονομάζεται G_0 . Για τη συνεχή εξέλιξη των κυτταρικών κύκλων ή για την επιστροφή στον κυτταρικό κύκλο κυττάρων που είχαν παραμείνει στη G_1 φάση, απαιτείται συνεχής παρουσία αναπτυξιακών παραγόντων. Από την άλλη, ενδοκυττάρια σήματα, όπως η βλάβη του DNA, μπλοκάρουν τον κυτταρικό κύκλο στη G_1 φάση, παρέχοντας τον απαραίτητο χρόνο για επιδιόρθωση, αν είναι δυνατό, ή οδηγώντας σε απόπτωση. Το πέρασμα από τη μια φάση στην άλλη, καθώς και από τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, ελέγχονται από τη δράση διαφόρων κινασών εξαρτώμενων από κυκλίνες (CDKs). Επομένως, η ρύθμιση των CDKs είναι πολύ σημαντική για τη φυσιολογική λειτουργία του κυτταρικού κύκλου (Ravitz and Wenner, 1997).

Οι ενεργοποιημένες CDKs αποτελούνται από μια καταλυτική υπομονάδα, συχνότερα 34 kDa, και από μια ρυθμιστική υπομονάδα που ονομάζεται κυκλίνη. Στους μύκητες μια και μοναδική καταλυτική υπομονάδα είναι αρκετή για την ομαλή λειτουργία του κυτταρικού κύκλου, ενώ στους πολυκύτταρους ευκαρυώτες εμπλέκονται αρκετές, δομικά σχετικές, αλλά φυσικά διακριτές, καταλυτικές υπομονάδες. Έτσι, συναντάμε τις CDKs 2, 3, 4, 6, 7 και τη cdc2. Από την άλλη απαιτούνται διαφορετικές κυκλίνες για τις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου : G_1 κυκλίνες για τη μετάβαση από τη G_1 στη S, S φάσης κυκλίνες για την πρόοδο της φάσης S και G_2 ή μιτωτικές κυκλίνες για μετάβαση στη μίτωση. Οι κυκλίνες που συναντάμε στον κυτταρικό κύκλο είναι οι A, B, D(D_1 , D_2 , D_3), E και H.

Παρόλο που η σύνδεση της κυκλίνης από μόνη της προσδίδει κάποια ενζυμική δραστικότητα στη CDK (Conell-Crowley et al, 1993), εντούτοις για πλήρη ενεργοποίηση του συμπλόκου απαιτούνται επιπλέον γεγονότα. Η φωσφορυλίωση ενός συντηρημένου αμινοξέος θρεονίνης είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση. Στις cdc2, CDK2 και CDK4 τα αμινοξέα αυτά είναι τα Thr-161, Thr-160 και Thr-172 αντίστοιχα (Kato et al, 1994; Matsuoaka et al, 1994). Η φωσφορυλίωση αυτή καταλύεται από την κινάση ενεργοποιούμενη από CDK (CAK), η οποία επίσης ενεργοποιεί τον παράγοντα που προάγει τη μίτωση στο *Xenopus* (Ducommun et al., 1991; Fesquet et al., 1993; Poon et al., 1993; Solomon et al., 1993). Η CAK αυτή αργότερα ονομάσθηκε CDK7 αφού η δράση της εξαρτάται από τη σύνδεσή της με την κυκλίνη H (Fischer and Morgan, 1994; Makela et al., 1994). Η ενεργοποίηση της CDK 7 από την κυκλίνη H απαιτεί την ύπαρξη ενός συντηρημένου αμινοξέος, της Thr-170, το οποίο πιθανό να αποτελεί θέση φωσφορυλίωσης. Το συντηρημένο αμινοξύ θρεονίνης εντοπίζεται στη D θηλιά, μια περιοχή της CDK η οποία μπλοκάρει τη θέση πρόσδεσης του υποστρώματος. Η θηλιά αυτή είναι αρκετά ευκίνητη και η διαμόρφωσή της μπορεί να αλλάζει μετά της σύνδεση της κυκλίνης, επιτρέποντας έτσι τη φωσφορυλίωση του συγκεκριμένου αμινοξέος (De Bondt et al, 1993; Morgan and Bondt, 1994). Καθώς η σύνδεση της κυκλίνης επηρεάζει την πρόσβαση της CAK στο συντηρημένο αμινοξύ, είναι πιθανό ότι η φωσφορυλίωση του συγκεκριμένου αμινοξέος από την CAK επηρεάζει τη σταθερότητα της σύνδεσης της κυκλίνης. Πράγματι μεταλλάξεις στη Thr-161 στην ανθρώπινη cdc2 προκαλούν αδυναμία σύνδεσης με την κυκλίνη 2 (Ducommun et al., 1991; Desai et al., 1995). Από την άλλη τα σύμπλοκα κυκλίνη B-cdc2, κυκλίνη A-CDK2 και κυκλίνη E-CDK2 μπορούν να σχηματισθούν απουσία φωσφορυλίωσης ή άλλων κυτταρικών συστατικών (Desai et al, 1992, 1995; Solomon et al, 1992; Atherton-Fessler et al., 1993).

Οι ανθρώπινες cdc2 και CDK2 είναι δυνατό να ανασταλούν από φωσφορυλίωση σε δύο θέσεις κοντά στο άμινο τερματικό άκρο, Thr-14 και Tyr-15 (Gu et al., 1992). Αντίθετα η CDK4 έχει μόνο την τυροσίνη στην περιοχή αυτή (Matsushime et al., 1992).

Η ενεργοποιημένη, πλέον, CDK μπορεί να απενεργοποιηθεί με διάφορους τρόπους : τα επίπεδα των κυκλινών μπορούν να μειωθούν είτε με παύση της μεταγραφής τους είτε με αποδιάταξη της ίδιας της πρωτεΐνης, η

καταλυτική υπομονάδα μπορεί να αποφωσφορυλιωθεί στο ενεργοποιημένο αμινοξύ θρεονίνης ή τέλος η καταλυτική υπομονάδα μπορεί να μπλοκαρισθεί από φωσφορυλίωση στο αμινοξύ τυροσίνης (Matthias and Ira, 1994).

Καθώς, τα κύτταρα εισέρχονται στον κυτταρικό κύκλο μετά τη φάση G₀ οι κυκλίνες D και E συνθέτονται διαδοχικά κατά τη διάρκεια της G₁ φάσης (Koff et al., 1991; Lew et al., 1991; Matsushime et al., 1991) και πριν την έναρξη της S φάσης περιορίζονται (Ohtsubo and Roberts, 1993; Quelle et al., 1993; Resnitzky et al., 1994). Επειδή τα κύτταρα συνθέτουν διαφορετικούς συνδυασμούς των κυκλινών d τύπου, Δε φαίνεται κάποια από αυτές να είναι κρίσιμη για την πρόοδο της φάσης G₁. Η σύνδεσή τους με τις CDK4 και CDK6 (Matsushime et al., 1992; Bates et al., 1994; Meyerson and Harlow, 1994) ρυθμίζεται μετα-μεταφραστικά από μιτογόνα (Matsushime et al., 1994). Οι κυκλίνες τύπου D έχουν μικρή διάρκεια ζωής ($T_{1/2} < 25$ λεπτά) με αποτέλεσμα αφαίρεση των αναπτυξιακών παραγόντων κατά τη διάρκεια της G₁ φάσης να παρεμποδίζει τη σταθερή συσσώρευση των κυκλινών αυτών και να μην επιτρέπει στα κύτταρα να περάσουν το σημείο ελέγχου R. Αντίθετα, η καταστροφή τους αργότερα στον κυτταρικό κύκλο δεν έχει καμιά συνέπεια (Matsushime et al., 1991). Επομένως, ένα βασικό χαρακτηριστικό των D κυκλινών είναι η ρύθμισή τους από εξωκυττάρια σήματα, εν αντιθέσει με τις κυκλίνες E, A και B των οποίων η έκφραση στον κυτταρικό κύκλο είναι περιοδική.

Οι CDK4 και CDK6 των οποίων η δράση εξαρτάται από τις D κυκλίνες, εμφανίζονται αρχικά στο μέσο της G₁ φάσης και αυξάνονται καθώς τα κύτταρα οδεύουν προς τη μετάβαση από τη G₁ στην S φάση (Matsushime et al., 1994; Meyerson and Harlow, 1994). Αντίθετα με τις άλλες CDKs, οι κινάσες εξαρτώμενες από D κυκλίνες έχουν μια ιδιαίτερη προτίμηση στην πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος pRB ως υποστρώματος (Matsushime et al., 1992), γεγονός που φανερώνει την ικανότητα των D κυκλινών να συνδέονται άμεσα στην pRB (Dowdy et al., 1993; Ewen et al., 1993; Kato et al., 1993). Η pRB αποτελεί φυσιολογικό υπόστρωμα των CDK4 και CDK6, παρόλο που άλλες CDKs εμπλέκονται στη φωσφορυλίωση του pRB αργότερα στον κυτταρικό κύκλο. Με τη σειρά της η pRB συνδέεται και αναστέλλει μεταγραφικούς παράγοντες, όπως είναι ο E2F, των οποίων η δράση είναι απαραίτητη για τη μετάβαση στην S φάση (Nevins 1992; Hinds and Weinberg, 1994; Sherr,

1994). Η φωσφορυλίωση της pRB στο R σημείο ελέγχου αναστέλλει τη δράση της ως καταστολέας της ανάπτυξης, απελευθερώνοντας τους μεταγραφικούς παράγοντες από τον έλεγχο της pRB και επιτρέποντάς τους να ενεργοποιήσουν εκείνα τα γονίδια των οποίων τα προϊόντα είναι απαραίτητα για τη μετάβαση στη φάση S. Η κυκλίνη E εκφράζεται περιοδικά σε μέγιστα επίπεδα κοντά στο σημείο μετάβασης από τη G₁ στην S φάση, και συνδέεται με την καταλυτική υπομονάδα CDK2 (Dulic et al., 1992; Koff et al., 1992). Η τελευταία, επίσης, ενεργοποιείται από την CAK, ώστε να σχηματισθεί ένα λειτουργικό ολοένζυμο (Fischer and Morgan, 1994; Makela et al., 1994). Επιπλέον βιοχημικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η κυκλίνη E μπορεί να ενεργοποιήσει και την CDK3 (Harper et al., 1995), μια καταλυτική υπομονάδα παρόμοια με τη CDK2, η οποία επίσης παίζει σημαντικό ρόλο στην έξοδο από τη G₁ φάση (van den Heuvel and Harlow, 1993). Η κυκλίνη E ρυθμίζει μια διαφορετική διαδικασία από ότι η κυκλίνη D₁, αφού η E και όχι η D₁ (Lukas et al., 1994; Tam et al., 1994) είναι απαραίτητη για τη μετάβαση στην S φάση σε κύτταρα θηλαστικών απουσία λειτουργικής pRB (Ohtsubo et al., 1995). Πιθανόν, πάντως το σύμπλοκο κυκλίνη E-CDK2 να εμπλέκεται στη φωσφορυλίωση της pRB αργότερα στη G₁, σε συνεργασία, όμως, με τις εξαρτώμενες από D κυκλίνες κινάσες (Hinds et al., 1992; Hatakeyama et al., 1994), καθώς και στη φωσφορυλίωση άλλων σημαντικών υποστρωμάτων που ενεργοποιούν τους μηχανισμούς διπλασιασμού του DNA αμέσως μετά το πέρασμα του κυτάρου από το σημείο R. Όλα τα παραπάνω συνοψίζονται στην εικόνα 1 (Sherr and Roberts, 1995).

Από όλα τα παραπάνω φαίνεται ότι η ρύθμιση της δράσης των CDKs είναι πολύ σημαντική, αφού εξασφαλίζει την εύρυθμη λειτουργία του κυτταρικού κύκλου. Μέχρι τώρα είδαμε τη ρύθμιση που προσφέρουν οι φωσφορυλίωση και αποφωσφορυλίωση σε συγκεκριμένα αμινοξέα. Πέρα, όμως, από τις διαδικασίες αυτές υπάρχουν παράγοντες που αναστέλλουν τη δράση των CDKs. Οι παράγοντες αυτοί ονομάζονται αναστολείς των CDKs (CKIs) και οι κυριότεροι από αυτούς εμφανίζονται στον πίνακα 1 (Elledge and Harper, 1994; Matthias and Ira, 1994; Ravitz and Wenner,) :

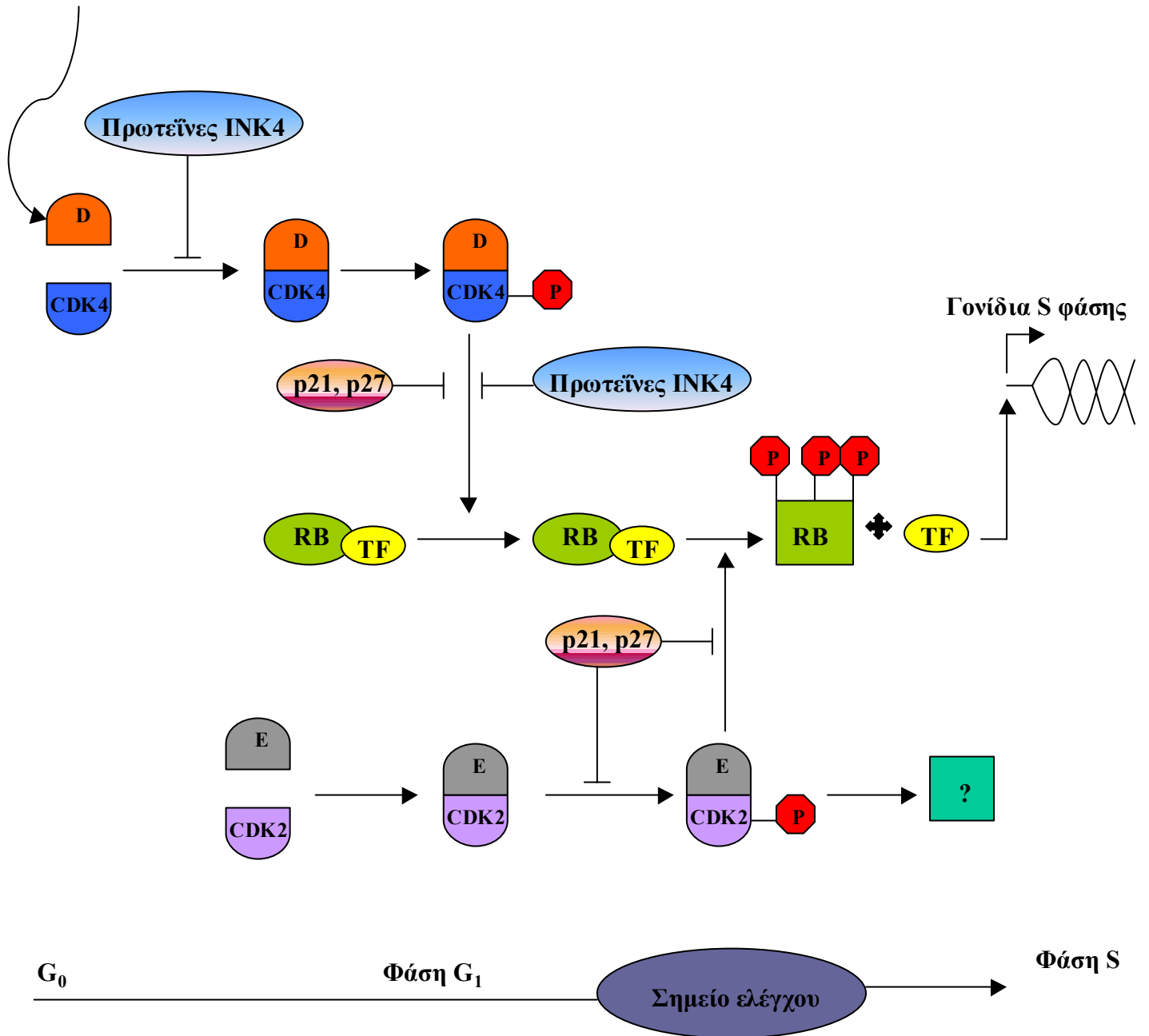
Πίνακας Error! Unknown switch argument. : Αναστολείς των CDKs

Αναστολέας	CDK στόχος
Far1	Cln-Cdc28
Sic1	Clb5,6-cdc28
Rum1	Cdc13-cdc2
p40	Clb-Cdc28
INK4	CDK4,CDK6
p21	Σύμπλοκα A, D και E κυκλινών
p27	Σύμπλοκα D και E κυκλινών

Από τους αναστολείς αυτούς, θα αναλύσουμε τον p21, ο οποίος αποτελεί και το αντικείμενο της εργασίας αυτής. Σε φυσιολογικούς ινοβλάστες, η πλειονότητα των CDKs απαντάται σε τετραμερή σύμπλοκα τα οποία εκτός από την κυκλίνη και την καταλυτικά υπομονάδα, περιλαμβάνουν το πυρηνικό αντιγόνο πολλαπλασιασμού κυττάρων (PCNA), μια υπομονάδα της DNA πολυμεράσης δ , 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 μορίου του p21, επανασύνδεση καθαρών πρωτεϊνών με σύμπλοκα κυκλίνης-CDK in vitro και υπερέκφραση του σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών απέδειξαν ότι η πρωτεΐνη αυτή είναι ένας αναστολέας της δράσης των CDKs, ικανός να μπλοκάρει 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 Τα λεμφοκύτταρα οδηγούνται σε πολλαπλασιασμό από μιτογόνους παράγοντες (Firpo et al., 1994; Y. Li 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-

Μιτογόνα

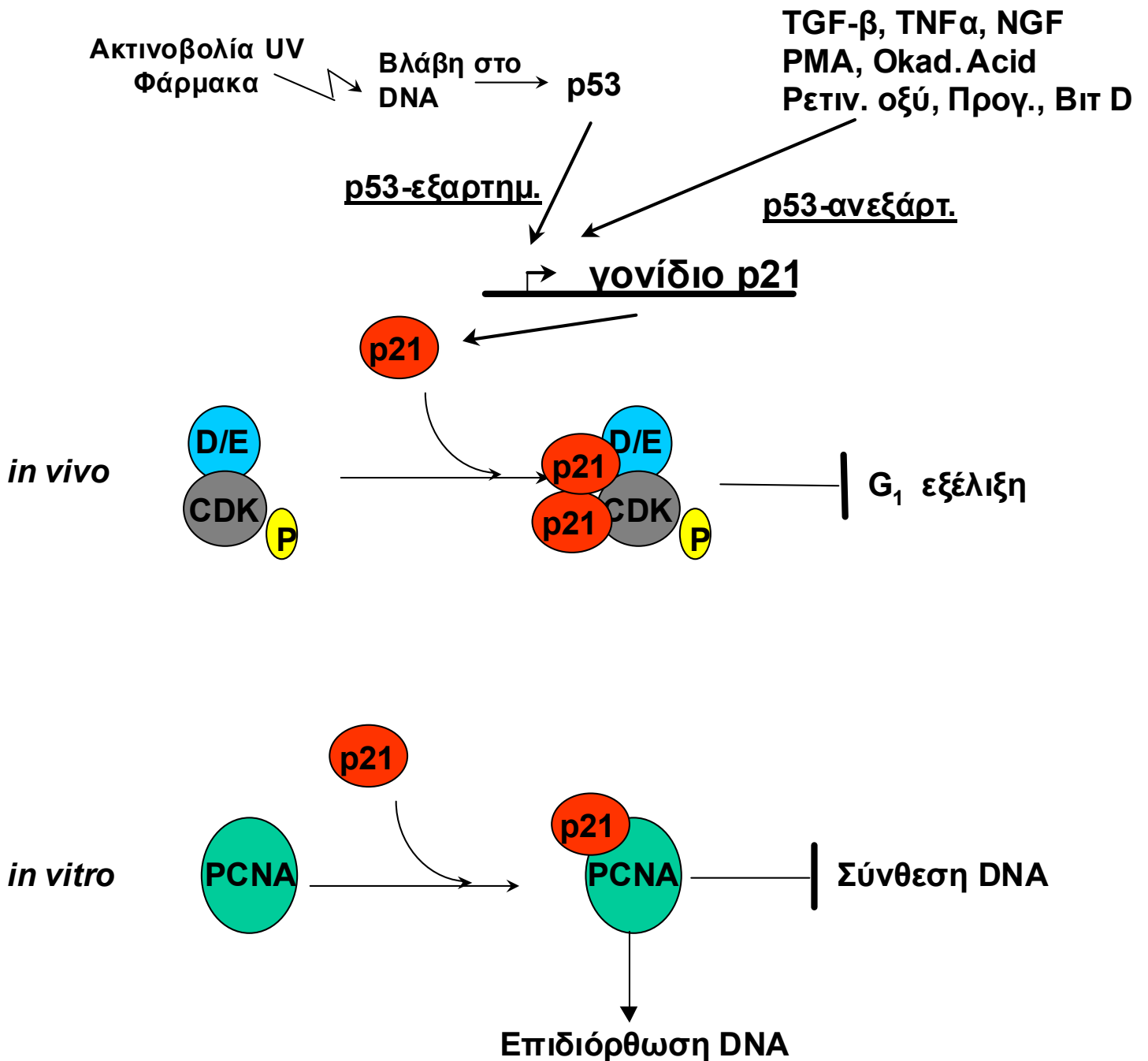


Εικόνα 1 : Θετικοί και αρνητικοί μηχανισμοί ρύθμισης της εξέλιξης της G₁ φάσης. Το μήκος της G₁ απεικονίζεται με το βέλος στο κάτω μέρος της εικόνας. Στην αρχή της G₁ τα μιτογόνα ενεργοποιούν τη σύνθεση των D κυκλινών οι οποίες συνδέονται με τις CDK4 και CDK6. Η κυκλίνη E εκφράζεται αργότερα στη G₁ φάση από ότι οι D κυκλίνες και σχηματίζει σύμπλοκο με την CDK2. Και οι δύο τάξεις συμπλόκων απαιτούν φωσφορυλίωση από την CAK για να ενεργοποιηθούν. Οι D τύπου CDKs φωσφορυλιώνουν το pRB, απελευθερώνοντας δεσμευμένους μεταγραφικούς παράγοντες (TFs), όπως είναι ο E₂F, οι οποίοι ενεργοποιούν τα γονίδια που απαιτούνται για τη μετάβαση στην S φάση. Οι αναστολείς των CDKs INK4, όταν εκφράζονται νωρίς στη φάση G₁ συναγωνίζονται τις κυκλίνες CDK4 και CDK6, για το σχηματισμό ανεξάρτητων συμπλόκων και παρεμποδίζουν τη δράση των ενεργοποιημένων από CAK συμπλόκων. Συνδεόμενες με τις ενεργοποιημένες CDKs οι p21 και p27, επίσης, αναστέλλουν σε δύο σημεία τη δράση των ενεργοποιημένων ολοενζύμων.

Κυκλίνη-CDK από 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 σχέση της ποσότητας της p21 προς την ποσότητα του κυκλίνη-CDK. Έτσι τα ενεργά σύμπλοκα 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, συνιστά 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 αντιδρούν άμεσα μεταξύ τους και ο ρόλος της p21 είναι να παρεμποδίζει τη μετακίνηση της 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 2 (Sherr and Roberts, 1995), στην οποία υπάρχουν επιπλέον στοιχεία για τον τρόπο ρύθμισης της p21. Τα στοιχεία αυτά θα αναλυθούν παρακάτω.



Εικόνα 2: 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).

Στο σημείο αυτό θα ήταν χρήσιμο να αναφέρουμε κάποια στοιχεία για το γονίδιο p21. Το γονίδιο αυτό εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6, στη θέση 6p21.2 και η ακολουθία, κατασκευή και ενεργοποίηση από το p53 είναι συντηρημένη στα τρωκτικά. 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-τελικό και καρβοξυ-τελικό 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 (Chen et al., 1995; Luo et al., 1995; Nakanishi et al., 1995; Warbrick et al., 1995).

Εκτός, όμως, από τις παραπάνω παρατηρήσεις που προήλθαν από *in vitro* πειράματα, είναι σημαντικό να αναφέρουμε ποια είναι εκείνα τα χαρακτηριστικά της p21 που είναι υπεύθυνα για την αναστολή της ανάπτυξης *in vivo*. Σε εκχυλίσματα από *Xenopus* η αντιγραφή του DNA διακόπηκε από την προσθήκη μόνο της ανασταλτικής για CDKs περιοχής της p21 σε ποσότητα παρόμοια με αυτή του κυκλίνης E-CDK2 (Chen et al., 1995). Η p21 διακόπτει ένα πρώιμο στάδιο της σύνθεσης του DNA στο σύστημα αυτό, αλλά όχι την επιμήκυνση προϋπαρχόντων βρόγχων αντιγραφής, και η αναστολή της αντιγραφής μπορεί να αποκατασταθεί με την προσθήκη κυκλίνης A ή E, αλλά όχι CDK2 ή PCNA (Strausfeld et al., 1994). Παρομοίως, προσθήκη της αμινο-τελικής και όχι της καρβοξυ-τελικής περιοχής της p21 σε αρνητικά για p53 ανθρώπινα κύτταρα οστεοσαρκώματος Saos-2 παρεμποδίζει το σχηματισμό αποικιών (Chen et al., 1995). Επιμόλυνση κυττάρων από πνεύμονα νυφίτσας με την αμινο-τελική ή της καρβοξυ-τελική περιοχή της p21 ανέστειλε τη σύνθεση του DNA, παρόλο που το καρβοξυ-τελικό τμήμα ήταν λιγότερο αποτελεσματικό (Luo et al., 1995). Απαλοιφή των αμινοξέων 66-71 της p21 δημιουργεί μια πρωτεΐνη που δε διαθέτει πλέον την ανασταλτική δράση έναντι της CDK2 δράσης *in vitro* αλλά διατηρεί την δυνατότητα παρεμπόδισης της σύνθεσης του DNA σε ανθρώπινους, αρνητικούς για p53, ινοβλάστες (Nakanishi et al., 1995).

Η ρύθμιση της έκφρασης του p21 ελέγχεται σε μεταγραφικό επίπεδο από μηχανισμούς είτε ανεξάρτητους από την p53, είτε εξαρτημένους από το μόριο αυτό, και σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο. Για παράδειγμα, μικρού

μήκους κύματος ακτινοβολία UV αυξάνει τα επίπεδα της p21 με εξαρτώμενο από p53 τρόπο μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που ενισχύουν τη σταθερότητα του mRNA του p21 (Gorospe et al., 1998). Έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα C/EBP σε λιποκύτταρα οδηγεί σε μετα-μεταφραστική σταθεροποίηση της πρωτεΐνης p21 (Timchenko et al., 1996). Σε ηπατοκύτταρα ο C/EBP αντιδρά με την p21 και την προστατεύει από πρωτεολυτική αποικοδόμηση (Timchenko et al., 1997). Η p21 αποτελεί στόχο για διάφορα σήματα που προάγουν την παύση του κυτταρικού κύκλου και τη διαφοροποίηση. Στη συνέχεια θα περιγράψουμε τους μηχανισμούς ρύθμισης της μεταγραφής του p21, είτε αυτοί εξαρτώνται είτε όχι από το p53.

Μεταγραφική αύξηση του p21 εξαρτημένη από 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 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 σε 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 με καταστροφή του γονιδίου p53 έδειξε ότι σε περιπτώσεις βλάβης του DNA απαιτείται ρύθμιση του p21 από την p53 (Macleod et al., 1995). Ακτινοβόληση ανθρώπινων κυτταρικών σειρών οδηγεί σε εξαρτημένη από p53 αύξηση της μεταγραφής του p21 και σε σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου (Dulic et al., 1994; Namba et al., 1995). Αρκετοί παράγοντες, όπως οι Zta, NDF, c-Rel ή αναστολείς σύνθεσης ριβονουκλεοτιδίων ευνοούν την εξαρτημένη από p53 αύξηση της μεταγραφής του p21, ενεργοποιώντας ή σταθεροποιώντας το p53 RNA ή την πρωτεΐνη. Ο Zta ευνοεί το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου μέσω μετα-μεταφραστικής ρύθμισης του p53 και κατ' επέκταση της μεταγραφής του p21 (Caryol et al., 1996). Ο παράγοντας διαφοροποίησης Neu (NDF) σταθεροποιεί την p53 και έτσι προάγει τη μεταγραφή του p21 (Bacus et al., 1996). Αναστολείς

σύνθεσης ριβονουκλεοτιδίων αυξάνουν την έκφραση του p21 με τρόπο εξαρτώμενο του 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 της p21 (Bash et al., 1997).

Αύξηση της εξαρτημένης ή ανεξάρτητης μεταγραφής του p21 από ενεργοποιημένο RAS.

Η ογκογόνος πρωτεΐνη RAS προκαλεί πρόωμη παύση της G₁ σε πρωτογενείς ινοβλάστες, η οποία παύση ακολουθείται από συσσώρευση των p53, p21 και p16 (Serrano et al., 1997). Προσθήκη αρνητικών υπερεχόντων p53, E1A, μεγάλο Τα αντιγόνο του SV40 ή antisense p21 αποτρέπουν την αύξηση της p21 και το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου και οδηγούν σε κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Serrano et al., 1997; Lloyd et al., 1997). Κυτταρικός πολλαπλασιασμός επιτυγχάνεται, επίσης, μετά από απενεργοποίηση της p16 (Serrano et al., 1997). Ενεργοποίηση της p21 από RAS και p53 πιθανά να είναι μηχανισμοί που επιτρέπουν στο κύτταρο να διαφύγει της καρκινογένεσης (Gartel and Tyner, 1999). Σηματοδότηση από τις μικρές GTPάσες Rho απαιτείται για μετασχηματισμό κυττάρων από το RAS (Khosravi-Far et al., 1995; Qiu et al., 1995). Οι ενεργές Rho καταστέλλουν την ενεργοποίηση της p21 από την ενεργή RAS και έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση στη σύνθεση του DNA από τη RAS. Ενεργή RAS αυξάνει τη σύνθεση του DNA σε κύτταρα χωρίς p21, απουσία δράσης Rho πρωτεϊνών, αποδεικνύοντας ότι η εκ των Rho σηματοδότηση αναστέλλει της αύξηση της p21 από τη RAS (Olson et al., 1998).

Η κινάση σερίνης θρεονίνης RAF αποτελεί στόχο της RAS. Έκφραση αυξανόμενης RAF σε κύτταρα Schwann αρουραίου οδηγεί σε εξαρτώμενη από p53 αύξηση της p21 σε επίπεδα παρόμοια με αυτά που προκαλεί η γ-

ακτινοβολία, με αποτέλεσμα ακόλουθη αναστολή της φάσης G1 (Lloyd et al., 1997). Από την άλλη σε κύτταρα ποντικού NIH3τα3 αυξημένα επίπεδα της RAF οδηγούν σε ανεξάρτητη από p53 αύξηση της p21 και αναστολή του κυτταρικού κύκλου (Sewing et al., 1997; Woods et al., 1997). Ταυτόχρονα, χαμηλά επίπεδα RAF αυξάνουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και όχι την αναστολή του κύκλου (Woods et al., 1997).

Ο αυξητικός παράγοντας των νεύρων (NGF) προάγει την αναστολή του κυτταρικού κύκλου και την έκφραση της p21 στα κύτταρα NIH3τα3 που εκφράζουν τον NGF υποδοχέα TrkA (Decker, 1995). Η σύνδεση του NGF στον υποδοχέα του ενεργοποιεί το μονοπάτι RAS/RAF/MAP κινασών και αυτό είναι υπεύθυνο για την αύξηση της p21 (Pumiglia et al., 1997).

Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης του p21 ανεξάρτητα από p53.

Μια πληθώρα παραγόντων που προάγουν τη διαφοροποίηση ενεργοποιούν τη μεταγραφή του p21 με μηχανισμούς ανεξάρτητους του p53. Οι παράγοντες αυτοί ευνοούν τη σύνδεση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων σε συγκεκριμένα στοιχεία του υποκινητή του p21 (εικόνα 3). Η περιοχή του υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου p21 μεταξύ των βάσεων – 119 και +1 περιέχει 6 θέσεις σύνδεσης του παράγοντα Sp1 και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής του p21. Οι δύο από αυτές είναι αλληλεπικαλυπτόμενες, ενώ οι άλλες 4 όχι (εικόνα 4). Ο Sp1 συμμετέχει στην αύξηση της p21 μέσω των Sp1-1 και Sp1-2 ως απόκριση σε φορβολικούς εστέρες (PMA) και οκαδαϊκό οξύ σε ανθρώπινα λευχαιμικά κύτταρα U937 κατά τη μεταμόρφωσή τους σε μακροφάγα (Biggs et al., 1996) (εικόνα 3 και 4; πίνακας 1). Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη BRCA1 ενεργοποιεί την p21 με τρόπο ανεξάρτητο του p53 μέσω της περιοχής –143 έως –93 η οποία περιέχει τις θέσεις Sp1-1 και Sp1-2. Προσθήκη της BRCA1 σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές που περιέχουν λειτουργικό p21 έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της σύνθεσης του DNA (εικόνα 3 και 4; πίνακας 1) (Somasundaram et al., 1997).

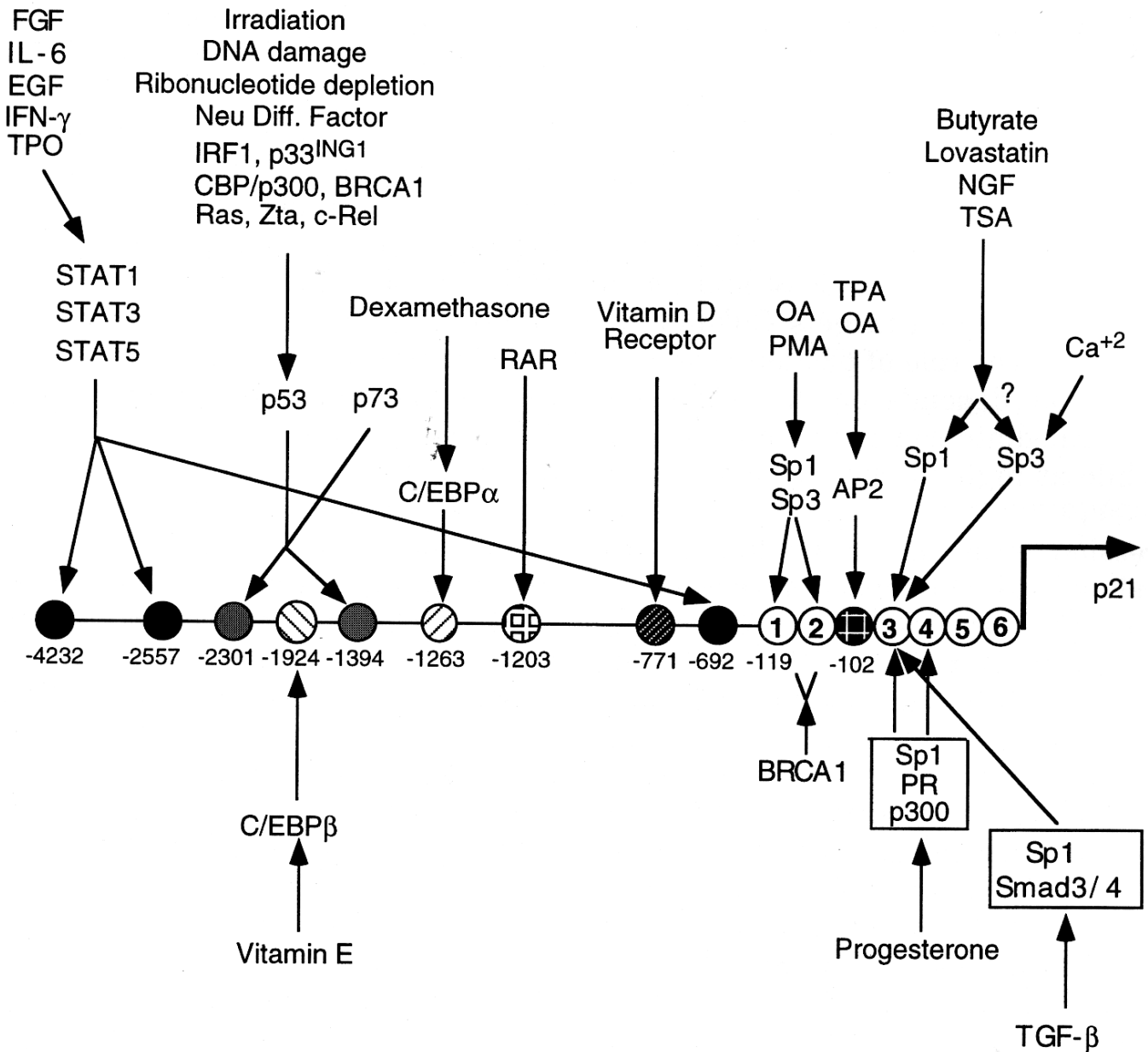
Η Sp1-3 του υποκινητή απαιτείται για την αύξηση της p21 από τον μετασχηματίζοντα αυξητικό παράγοντα-β (TGF-β) (Datto et al., 1995), το Ca²⁺ (Prowse et al., 1997), το βουτυρικό (Nakano et al., 1997), τη

λοβαστατίνη (Lee et al., 1998), τον αναστολέα της δεακετυλάσης ιστονών, την τριχοστατίνη A (TSA) (76a) και τον NGF (εικόνα 1 και 2). Ο TGF-β και το βουτυρικό παρεμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό και ευνοούν την αναστολή του κύκλου στη G1 σε διάφορους κυτταρικούς τύπους (Datto et al., 1995; Nakano et al., 1997), ενώ το Ca²⁺ αυξάνει τη διαφοροποίηση κερατινοκυττάρων ποντικού σε καλλιέργειες (Prowse et al., 1997). Η λοβαστατίνη ευνοεί την αναστολή του κύκλου σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη που Δε διαθέτουν p53 (Lee et al., 1998). 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).

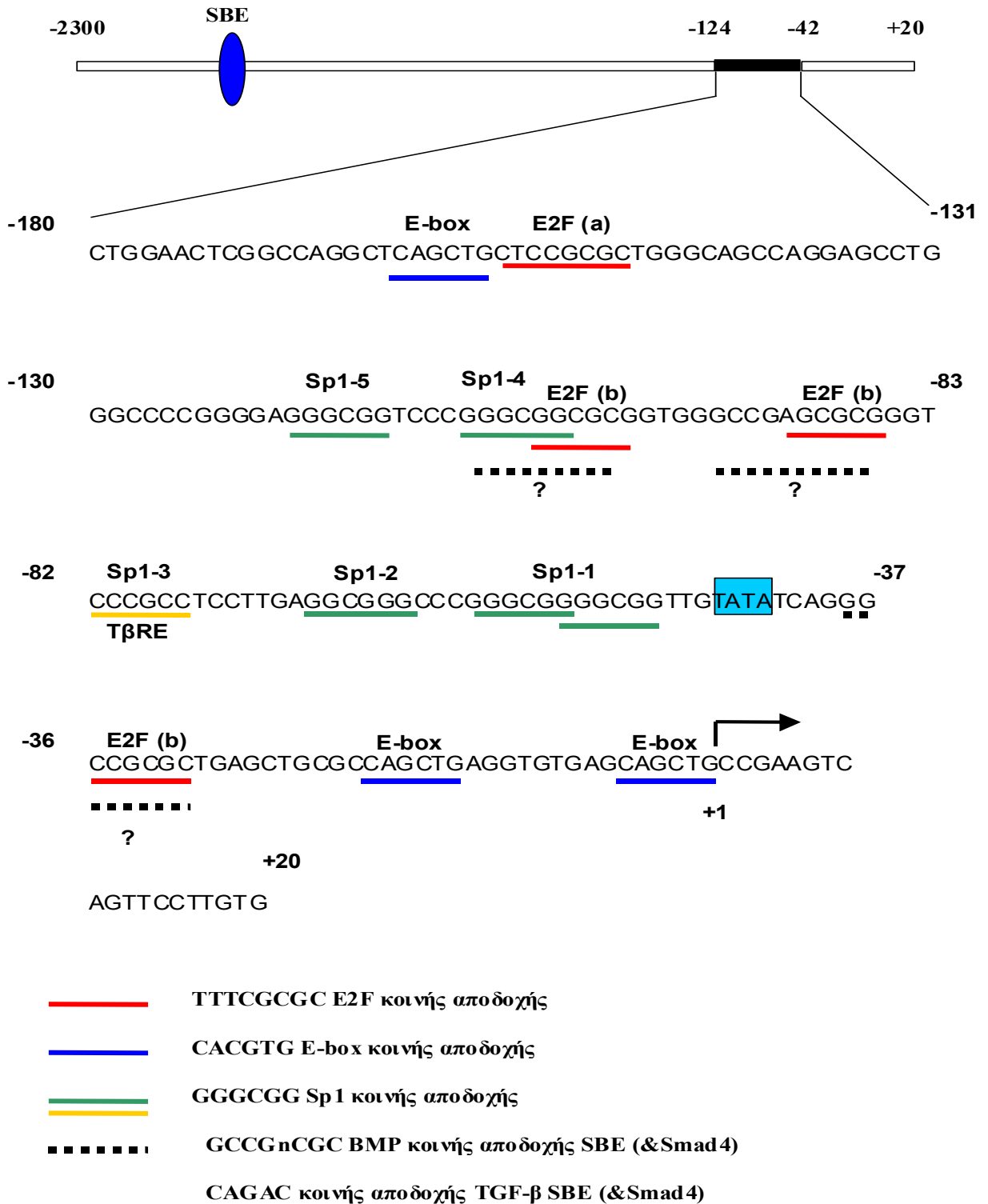
Οι μεταγραφικοί συνενεργοποιητές p300 και CBP διαθέτουν δράση ακετυλο-τρανσφεράσης ιστονών και αλληλεπιδρούν με άλλους μεταγραφικούς

Πίνακας 1 : Ενεργοποιητές της μεταγραφής του p21 ανεξάρτητα από το p53

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



Εικόνα 3 : 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 στη εικόνα 4 και στον πίνακα 1.



Εικόνα 4 : Σχηματική αναπαράσταση της κοντινής περιοχής του υποκινητή του p21, όπου φαίνονται τα διάφορα λειτουργικά του στοιχεία. Λεπτομέρειες αναφέρονται στο κείμενο.

Παράγοντες, ώστε να ρυθμίσουν την έκφραση γονιδίων (Giles et al., 1998). Οι p300/CBP συνεργάζονται με το Sp1 και/ή το Sp3 για την αύξηση της έκφρασης του υποκινητή του p21. Προσθήκη NGF σε κύτταρα PC12 αυξάνει τη νευρική διαφοροποίηση και την έκφραση του p21 (Yan et al., 1997; Billon et al., 1996). Ο NGF αυξάνει τη μεταγραφή του p21 μέσω ρύθμισης της ενεργότητας του p300 και της συνεργασίας του με το Sp1. Επιμόλυνση με την πρωτεΐνη E1A του αδενοϊού αναστέλλει την αύξηση του p21 σε κύτταρα PC12 και υπερέκφραση του p300 αναστρέφει το φαινόμενο (Billon et al., 1996). Παρόμοια αποτελέσματα εξήχθησαν όταν ελέγχθηκε η ενεργοποίηση της μεταγραφής του p21 σε καλλιέργειες κερατινοκυττάρων (Missero et al., 1995).

Ο p300/CBP συνεργάζεται επίσης με μέλη της βασικής έλικα-βρόγχος-έλικα οικογένειας (bHLH). Σε μυϊκά κύτταρα που διαφοροποιούνται ο bHLH μεταγραφικός παράγοντας MyoD συνεργάζεται με την p300 και ρυθμίζει την έκφραση του p21 κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαφοροποίησης (Halevy et al., 1995; Puri et al., 1997). Ομοίως, ο bHLH μεταγραφικός παράγοντας BETA2 αλληλεπιδρά με το p300/CBP για την ενεργοποίηση του p21 και την αναστολή του κυτταρικού κύκλου και τη διαφοροποίηση εντεροενδοκρινών κυττάρων που παράγουν σεκρετίνη (Mutoh et al., 1998). Ο bHLH μεταγραφικός παράγοντας E2A προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης σε κύτταρα NIH3τα3 και ευνοεί της έκφραση του p21 μέσω 3 κουτιών-E, δύο από τα οποία βρίσκονται πριν το κουτί-TATA (εικόνα 3; πίνακας 1)(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 εντοπίστηκε στις θέσεις Sp1-3 και Sp1-4 του υποκινητή του p21 (Owen et al., 1998) (εικόνα 3). Ο υποδοχέας της προγεστερόνης (PR) εντοπίστηκε σε σύμπλοκο με p300/CBP και Sp1, ενώ ο p300/CBP είναι απαραίτητος για την ενεργοποίηση του υποκινητή του p21 από προγεστερόνη (εικόνα 3; πίνακας 1)(Owen et al., 1998).

Όπως συμβαίνει και με τους μεταγραφικούς συνενεργοποιητές p300/CBP, το ογκοκατασταλτικό BRCA1, το p33^{ING1} και ο ρυθμιστικός παράγοντας της ιντερφερόνης (IRF-1) μπορούν να συνεργασθούν με το p53 για την ενεργοποίηση του p21 (εικόνα 3)(Zhang et al., 1998; Gargavtsev et al., 1998; Avantaggiati et al., 1997; Lill et al., 1997; Gu et al., 1997; Tanaka et

al., 1996). Οι παράγοντες αυτοί μπορούν να προάγουν την εξαρτώμενη από p53 ενεργοποίηση του υποκινητή του p21 και πιθανά να είναι σημαντικοί για τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και το σημείο ελέγχου της G₁.

Μια πληθώρα άλλων παραγόντων όπως οι AP2, E2Fs, STATs, C/EBPα, C/EBPβ και ο μεταγραφικός παράγοντας gax είναι σε θέση να αυξάνουν της έκφραση του p21 ως απόκριση σε διαφορετικά σήματα (εικόνα 3). Για παράδειγμα, η ενεργοποιητική πρωτεΐνη 2 (AP2) αυξάνει τη μεταγραφή του p21 και την αναστολή της ανάπτυξης μετά από επεξεργασία ανθρώπινων λευχαιμικών κυττάρων K562 με φορβολικούς εστέρες ή με οκαδαϊκό οξύ. Αυτή η ενεργοποίηση γίνεται μέσω της θέσης σύνδεσης της AP2 που εντοπίζεται μεταξύ των θέσεων -103 και -95 (εικόνα 3, 4; πίνακας 1) (Zeng et al., 1997).

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 p21 (εικόνα 4)(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 p21 που εντοπίζονται στις βάσεις -690, -2590 και -4233 (εικόνα 3; πίνακας 1)(Chin et al., 1996). Η θρομβοποιητίνη (TPO) αυξάνει την διαφοροποίηση μεγακαρυοκυττάρων και τη μεταγραφή του p21 από το STAT5 μέσω 2 απομακρυσμένων θέσεων πρόσδεσης των STATs (εικόνα 3; πίνακας 1)(Matsumura et al., 1997).

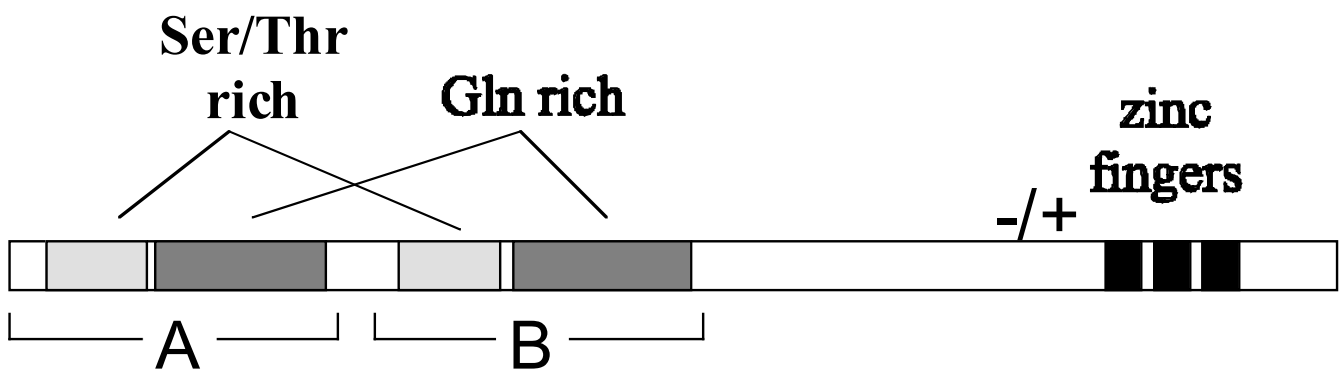
Ο παράγοντας C/EBPα ενεργοποιεί τον υποκινητή του p21 και αυξάνει τη μετα-μεταφραστική σταθερότητα της πρωτεΐνης p21 σε λιποκύτταρα (Timchenko et al., 1996). Ο C/EBPβ ρυθμίζει την έκφραση του p21 στο μεταγραφικό επίπεδο (Chinery et al., 1997). Ο παράγοντας gax σε ινοβλάστες ρυθμίζει την p21 με μηχανισμό άγνωστο, αλλά σίγουρα ανεξάρτητο από p53 (Smith et al., 1997). Η βιταμίνη D ενεργοποιεί τον υποκινητή του p21 και οδηγεί σε διαφοροποίηση. Θέση πρόσδεσης της βιταμίνης D3 βρέθηκε στη θέση -771 του υποκινητή του p21 (εικόνα 3; πίνακας 1) (Liu et al., 1996). Η μεταγραφή του p21 επίσης επηρεάζεται από το ρετινοϊκό οξύ, καθώς υπάρχει ενεργή θέση σύνδεσης του ρετινοϊκού μεταξύ των βάσεων -1212 και -1194 στον υποκινητή του p21 (εικόνα 3; πίνακας 1) (Liu et al., 1996). Τέλος, το c-

jun φαίνεται να ενεργοποιεί τον υποκινητή του p21, 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).

Συμπερασματικά, μια πληθώρα διαφορετικών εξωκυττάρων σημάτων ρυθμίζει τον υποκινητή του p21, συχνά μέσω των ίδιων μεταγραφικών παραγόντων και ενεργοποιητικών συστατικών. Ταυτόχρονα, μεταφορά ενός συγκεκριμένου σήματος πραγματοποιείται από διαφορετικούς μεταγραφικούς παράγοντες σε διαφορετικά περιβάλλοντα. Ο υποκινητής του 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).

Όπως είδαμε μέχρι τώρα πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του p21 από τους διάφορους παράγοντες παίζει ο παράγοντας Sp1. Ο Sp1 ανήκει στην κατηγορία των με δακτύλιο ψευδαργύρου μεταγραφικών παραγόντων που αναγνωρίζουν ακολουθίες DNA πλούσιες σε GC (Berg, 1992; Lania et al., 1997). Ο Sp1 παίζει πολύ σπουδαίο ρόλο στην πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη και απαιτείται για τη διατήρηση της τελικής κυτταρικής διαφοροποίησης ρυθμίζοντας τα επίπεδα μεθυλίωσης στις πλούσιες σε GC περιοχές του DNA (Marin et al., 1997). Η σύνδεση στο DNA και οι δυνατότητες ενεργοποίησης του Sp1 ρυθμίζονται από φωσφορυλίωση (Black et al., 1999). Η πρωτεΐνη Sp1 σταθεροποιείται από Ο-γλυκοσυλίωση, η οποία προσφέρει ανθεκτικότητα σε αποδιάταξη εξαρτώμενη από πρωτεάσωμα (Han and Kudlow, 1997). Η Sp1 έχει βρεθεί ότι σχετίζεται άμεσα με μέλη της βασικής μεταγραφικής μηχανής, όπως τα συστατικά του TFIID (Gill et al., 1994; Saluja et al., 1998). Από την άλλη, ο Sp1 αλληλεπιδρά φυσικά και συνεργάζεται λειτουργικά με αρκετούς μεταγραφικούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένων των NFK-β, GATA, YY1, E2F1, pRB, SREBP-1 (Lee et al., 1993; Udvalia et al., 1995; Lin et al., 1996; Hirano et al., 1998)., μέσω σχηματισμών συμπλόκων των οποίων δεν είναι γνωστή η σύνθεση (Naar et al., 1998). Επομένως, ο Sp1 συμμετέχει σε διάφορες περιπτώσεις ρύθμισης μεταγραφής γονιδίων από αρκετά σηματοδοτικά μονοπάτια και φαινόμενα μεταβολικά ή διαφοροποιητικά (Kardassis et al., 1999).

Ο παράγοντας Sp1 μπορούμε να πούμε ότι αποτελείται από 4 διακριτές περιοχές (εικόνα 5). Μια περιοχή πλούσια σε σερίνες-θρεονίνες, μια περιοχή πλούσια σε γλουταμίνες, μια περιοχή πλούσια σε φορτισμένα αμινοξέα και μια περιοχή που περιλαμβάνει τους δακτυλίους ψευδαργύρου. Η τελευταία είναι και η υπεύθυνη για την πρόσδεση του Sp1 στο DNA.

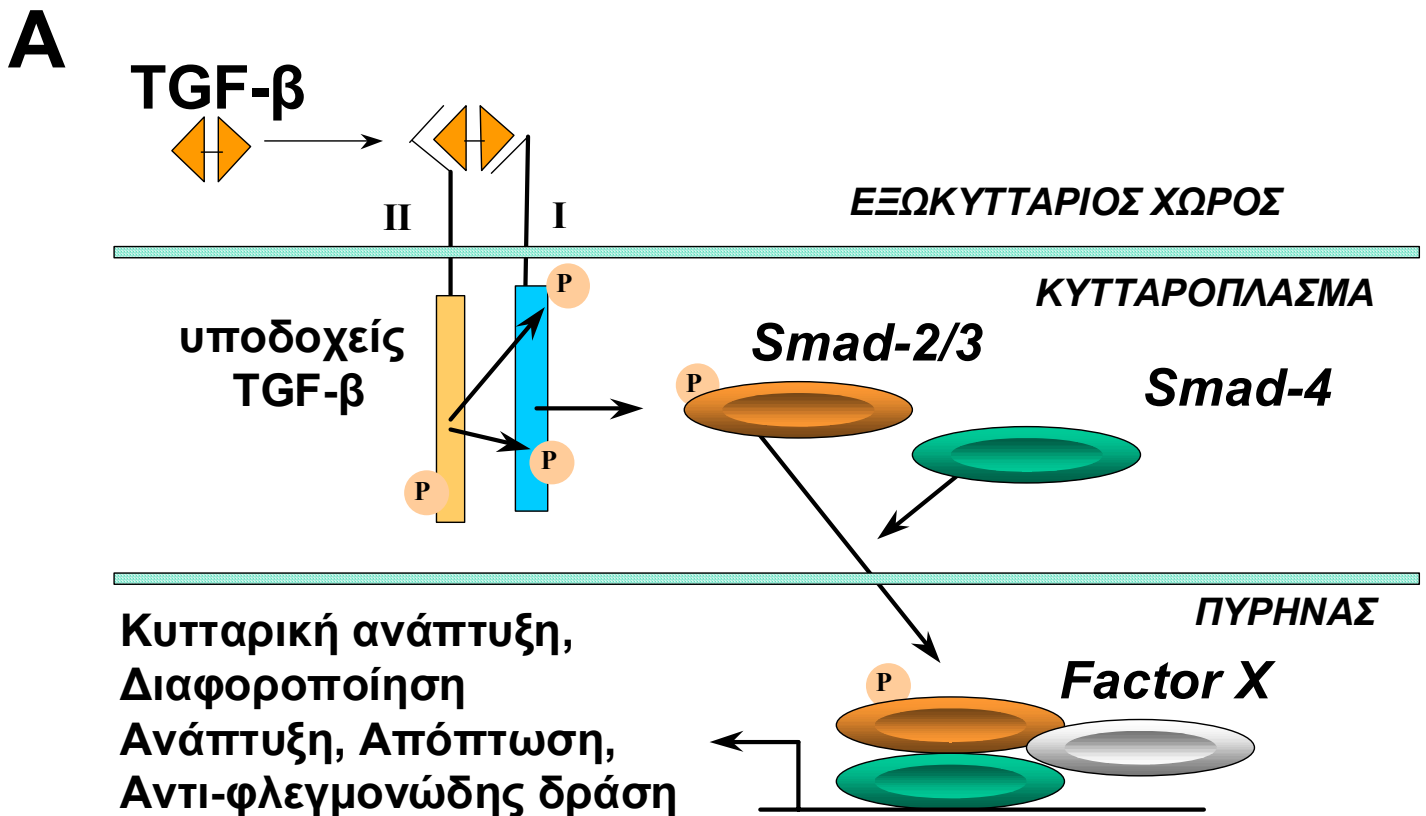


Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση της σχέσης δομής λειτουργίας του μεταγραφικού παράγοντα Sp1. Ser/Thr rich: Περιοχή πλούσια σε σερίνες και θρεονίνες.. Gln- rich: Περιοχή πλούσια σε γλουταμίνες. -/+ : Περιοχή πλούσια σε φορτισμένα αμινοξέα. Zinc-fingers: Περιοχή που αποτελείται από δακτυλίους ψευδαργύρου και που είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση του παράγοντα Sp1 στο DNA. A και B: Ομόλογες περιοχές μεταγραφικής ενεργοποίησης.

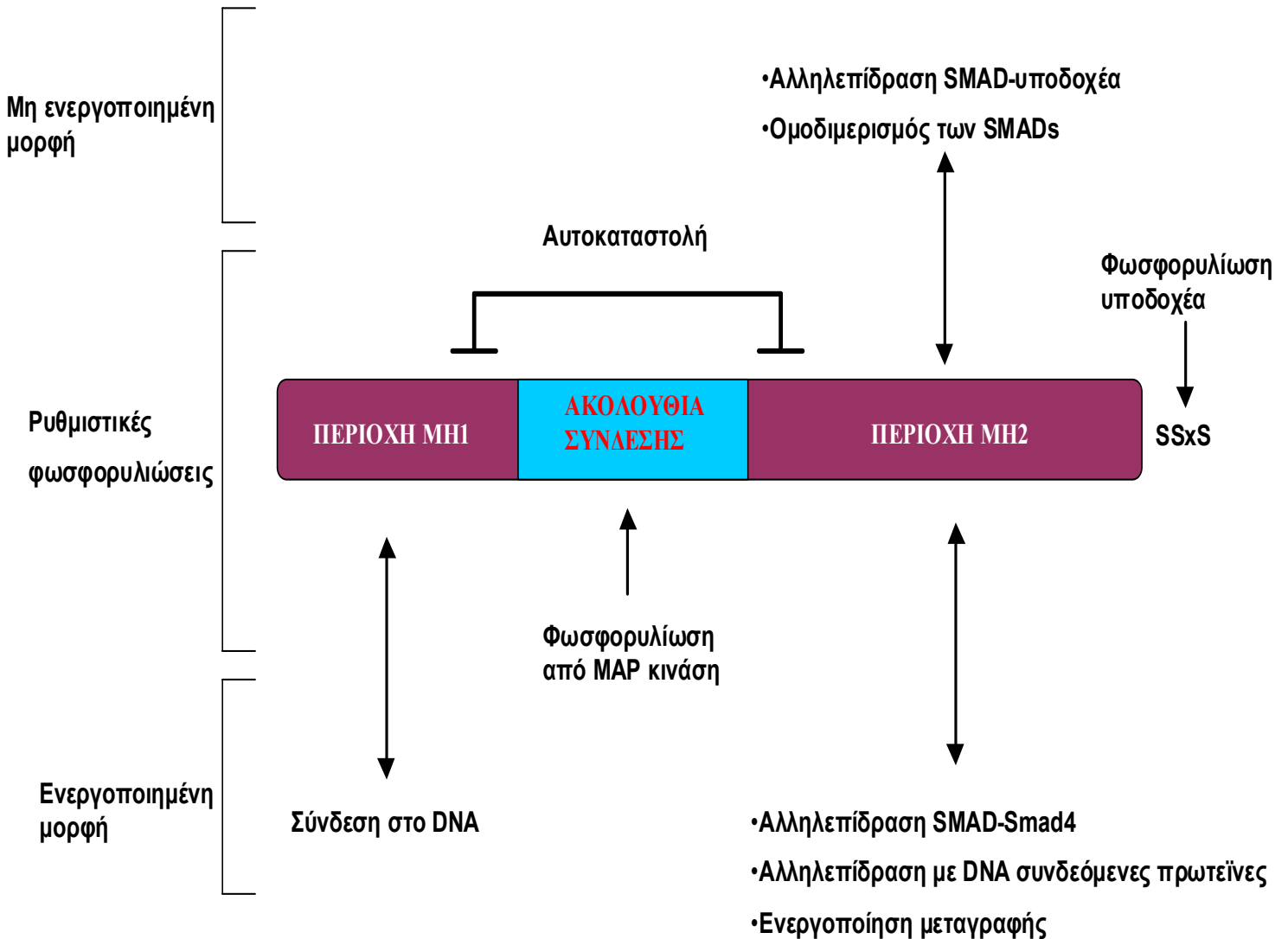
Καταλήγοντας θα αναφέρουμε κάποια στοιχεία για το σηματοδοτικό μονοπάτι του Μετασχηματίζοντα Αυξητικού Παράγοντα (TGF-β), καθώς και των πρωτεϊνών SMAD. Η οικογένεια των TGF-β μεταγραφικών παραγόντων ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο, τη διαφοροποίηση, την κινητικότητα, την προσκόλληση και το θάνατο σε όλους τους ιστούς των μεταζώων (Massague 1990; Roberts and Sporn, 1990; Kingsley 1994; Gaddy-Kurten et al., 1995; Hogan 1996; Mehler et al., 1997). Τα μέλη της οικογένειας αυτής περιλαμβάνουν τους TGF-βs, τις ακτιβίνες, τις μορφογενετικές πρωτεΐνες οστών (BMPs) και άλλους σχετικούς παράγοντες. Η μεταγωγή σήματος από τους παράγοντες αυτούς εμπλέκει 3 ομάδες μορίων : μια οικογένεια μεμβρανικών υποδοχέων κινάσης σερίνης/θρεονίνης, μια οικογένεια κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, τις SMADs, που αποτελούν υπόστρωμα των υποδοχέων, και τέλος, πυρηνικούς παράγοντες που συνδέονται στο DNA και οι οποίοι σχηματίζουν μεταγραφικά σύμπλοκα με τις SMADs (Heldin et al., 1997; Massague, 1998). Η μεταγωγή του σήματος αρχίζει με σύνδεση του TGF-β σε ένα συγκεκριμένο ζευγάρι υποδοχέων κινάσης. Το ζευγάρι αυτό αποτελείται από τους υποδοχείς τύπου I και τύπου II. Η σύνδεση του μεταγραφικού παράγοντα έχει ως αποτέλεσμα την αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα τύπου II. Ο φωσφορυλιωμένος αυτός υποδοχέας με τη σειρά του φωσφορυλιώνει τον τύπου I υποδοχέα σε δύο θέσεις (Wrana et al., 1994). Ο τελευταίος, ενεργοποιημένος πλέον, φωσφορυλιώνει τις SMAD 2/3, γνωστές και ως ρυθμιστικές SMADs (R-SMADs), οι οποίες στη συνέχεια μετακινούνται στον πυρήνα (Heldin et al., 1997; Massague, 1998). Κατά τη μετακίνησή τους στον πυρήνα οι SMAD 2/3 συνδέονται με τη SMAD 4 (Lagna et al., 1996), ένα προϊόν ογκοκατασταλτικού γονιδίου (Hahn et al., 1996). Στον πυρήνα το σύμπλοκο αυτό είτε αλληλεπιδρά με συγκεκριμένες πρωτεΐνες που έχουν τη δυνατότητα σύνδεσης με το DNA, με αποτέλεσμα να οδηγείται στη ρυθμιστική περιοχή των γονιδίων-στόχων (Chen et al., 1998), είτε συνδέεται απευθείας στο DNA. Στην εικόνα 6^A εμφανίζεται το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-β, όπως το περιγράψαμε.

Όσον αφορά τη δομή των πρωτεϊνών SMADs μπορούμε να διακρίνουμε 3 ανεξάρτητες περιοχές. Η περιοχή MH1 παρουσιάζει ομολογία με την πρωτεΐνη MAD και είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση στο DNA, όταν η πρωτεΐνη βρίσκεται στην ενεργοποιημένη μορφή της. Η περιοχή MH2

παρουσιάζει, ομοίως, ομολογία με τη MAD και είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση μεταξύ των SMADs, την αλληλεπίδραση με DNA συνδεόμενες πρωτεΐνες και την ενεργοποίηση της μεταγραφής, όταν η πρωτεΐνη βρίσκεται στην ενεργοποιημένη μορφή της . Επίσης, είναι αυτή που συνδέεται με τον υποδοχέα, περιέχει τη θέση φωσφορλίωσης από αυτόν και συμμετέχει στον ομοδιμερισμό, όταν η πρωτεΐνη βρίσκεται στη μη-ενεργοποιημένη μορφή της. Τέλος, υπάρχει η περιοχή σύνδεσης των δύο άλλων περιοχών η οποία αποτελεί και θέση φωσφορλίωσης από τη MAP κινάση. Η δομή των SMADs φαίνεται στην εικόνα 6B.



B



Εικόνα 6: Το σηματοδοτικό μονοπάτι του Μετασχηματίζοντα Αυξητικού Παράγοντα β (TGFβ) και η δομή των πρωτεϊνών SMAD. A: Σχηματική αναπαράσταση του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGFβ. P: Θέσεις φωσφορυλίωσης από τους υποδοχείς του TGFβ. Factor X: Μεταγραφικός παράγοντας που αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες Smad. B: Σχηματική αναπαράσταση της σχέσης δομής λειτουργίας των πρωτεϊνών Smad. MH1: Περιοχή ομολογίας 1 (MAD Homology Domain 1), MH2: Περιοχή ομολογίας 2 (MAD Homology Domain 2), Linker: Περιοχή που συνδέει τις MH1 και MH2 περιοχές. Οι διάφορες λειτουργίες των πρωτεϊνών SMAD που αποδίδονται σε συγκεκριμένες δομικές περιοχές δείχνονται με βέλη.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης είναι η αποσαφήνιση της σημασίας των θέσεων πρόσδεσης του παράγοντα Sp1 που εντοπίζονται στον υποκινητή του γονιδίου p21/WAF του ανθρώπου, στην ενεργοποίηση του p21 υποκινητή.

Εκτός από αυτό, επιδιώξαμε και τη μελέτη του μηχανισμού ενεργοποίησης της μεταγραφής του γονιδίου p21/WAF του ανθρώπου από τις πρωτεΐνες SMAD και p300.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Υλικά. Τα αντιδραστήρια προμηθεύθηκαν από τις παρακάτω πηγές : Ένζυμα περιορισμού, τροποποιητικά ένζυμα και DNA πολυμεράσες από τις **Minotech**, **New England Biolabs** και **GIBCO/BRL**, το GeneEditor *in vitro* Site-Directed Mutagenesis System από την **Promega**, τα dNTPs από τη **Pharmacia**, τα αντιδραστήρια των κυτταροκαλλιιεργειών από την **GIBCO/BRL**, το υπόστρωμα της λουσιφεράσης από την **Promega**, όλα τα ολιγονουκλεοτίδια από το **Εργαστήριο Μικροχημείας του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας**, 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 4 διαφορετικές κυτταρικές σειρές. Αυτές είναι ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα HepG2, κύτταρα από νεφρό πιθήκου COS-7, κύτταρα καρκινώματος τραχήλου HeLa, καθώς και κύτταρα εμβρύων *Drosophila* SL2 (Schneider's). Τα HepG2, COS-7 και HeLa μεγάλωσαν σε DMEM εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου μόσχου και πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη, ενώ τα SL2 (Schneider's) μεγάλωσαν σε θρεπτικό μέσο ειδικό για κύτταρα Schneider's εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου μόσχου 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. Ο φορέας αυτός είχε κοπεί με το ένζυμο Hind III και στη συνέχεια αποφωσφορυλιωθεί με το CIAP ένζυμο.

Εκτός από το παραπάνω πλασμίδιο στη συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν δύο ακόμη πλασμίδια. Το –215p21-luc και το –143WAF-luc. Το –215WAF-luc προήλθε από την κλωνοποίηση του τμήματος Pst I – Xho I του υποκινητή –2300WAF σε pGL3 basic. Το –143WAF-luc προήλθε από την κλωνοποίηση του τμήματος Kpn I – Xho I του υποκινητή –2300WAF σε pGL3 basic.

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 150λ 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 20λ 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
- Φυγοκέντρηση 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 υπερκείμενου
- Προσθήκη 1ml 70% αιθανόλης
- Φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 5 λεπτά
- Αφαίρεση υπερκείμενου
- Στέγνωμα της πελέττας
- Επαναδιάλυση σε 20 λ 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 :

20λ πλασμίδιο κομμένο με περιοριστικά ένζυμα (0,5-1 γ/λ)

3λ 10x CIAP buffer

3λ ένζυμο CIAP

2λ H_2O

Στη συνέχεια ακολουθούμε την παρακάτω διαδικασία

- Επώαση της αντίδρασης στους 37°C για 30 λεπτά

- Προσθήκη 2λ ενζύμου CIAP
- Επώαση της αντίδρασης στους 37°C για 30 λεπτά
- Προσθήκη 70 λ H₂O
- Προσθήκη 50λ φαινόλης και 50λ 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 υπερκείμενου
- Ξέπλυμα 2 φορές με 70% αιθανόλη
- Αφαίρεση υπερκείμενου και στέγνωμα της πελέττας
- Επαναδιάλυση σε H₂O

Συγκόλληση τμημάτων DNA.

1λ φορέας (1γ/λ)

x λ ένθεμα

1λ ligation buffer

1λ T4 DNA ligase

H₂O μέχρι τα 10λ

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 100λ βακτηρίων σε σωλήνα των 15ml
- Προσθήκη 0,5 καθαρού πλασμιδίου ή 10λ αντίδραση συγκόλλησης
- Τοποθέτηση στον πάγο για 30 λεπτά
- Θέρμανση στους 42 °C για 45 δευτερόλεπτα
- Τοποθέτηση για 2 λεπτά σε πάγο
- Προσθήκη 900λ 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	—————>	2,5λ
T ₄ polynucleotide kinase	—————>	5u
ATP, 10mM	—————>	2,5λ
H ₂ O	—————>	μέχρι 25λ

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 υπερκειμένου και πλύσιμο της πελλέτας με 200μl 70% αιθανόλης. Φυγοκέντρωση όπως στο προηγούμενο στάδιο.
- Στέγνωμα της πελλέτας.
- Επαναδιάλυση της πελέτας σε 100μl TE (pH 8). Ανάλυση 10μl του αποδιαταγμένου DNA σε πηκτική αγαρόζης 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	10λ (0,005 pmol)
Ολιγονουκλ. Επιλογής(2,9 ng/μl), φωσφορυλιωμένο	1λ (0,25pmol)
Ολιγονουκλ. Μετάλλαξης, φωσφορυλιωμένο	1,25 pmol
Annealing 10x buffer	2λ
Αποστειρωμένο νερό	μέχρι 20λ

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

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 υπερκλειμένου.
- Επαναδιάλυση πελλέτας σε 100λ παγωμένου αντιδραστηρίου επαναδιάλυσης
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- Προσθήκη 200λ φρέσκου διαλύματος 0,2M NaOH, 1% SDS για λύση κυττάρων. Ήπια ανακίνηση. Επώαση σε πάγο για 5 λεπτά.
- Προσθήκη 150λ 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 υπερκλειμένου 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 υπερκλειμένου και ξέπλυμα της πελλέτας με 70% αιθανόλη.
- Στέγνωμα της πελλέτας και επαναδιάλυση αυτής σε 50λ αποστειρωμένου νερού.
- Εξέταση του DNA σε πηκτή αγαρόζης για εκτίμηση της ποσότητας.

Μετασχηματισμός DH-10b κυττάρων. 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 100λ κυττάρων 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 καλλιερχειών

25mM Tris-HCl (pH 8)
10mM EDTA
50mM γλυκόζη

0,2M NaOH 1% SDS

200μl 10M NaOH
1ml 10% SDS
8,8ml νερό

2M NaOH 2mM EDTA

2ml 10M NaOH
40μl 500mM EDTA
7,96ml νερό

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.

Synthesis 10x buffer

100mM Tris-HCl (pH 7,5)
5mM dNTPs
10mM ATP
20mM DTT

Ολιγονουκλεοτίδια. Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήσαμε για την πραγματοποίηση των μεταλλάξεων είναι τα εξής:

Sp1-1

5'-TTGAGGCGGGCCCGGT**CTAG**ACGGTTGTATATCAGG-3'

Sp1-2

5'-CCCGCCTCCTTGAGG**AATT**CCCGGGCGGGGCGGT-3'

Sp1-3

5'-GGCCGAGCGCGGGT**CGAC**CCTCCTTGAGGCGGG-3'

Sp1-4

5'-GAGGGCGGTCCCGGGT**TAC**CGCGGTGGGCCGAGC-3'

Sp1-5

5'-GCCTGGGCCCCCGGG**CTCG**AGGTCCCGGGCGGGCGC-3'

Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήσαμε για τα band-shifts είναι τα παρακάτω:

Sp1-1

5'-TTT-CCCGGGCGGGGCGGT**TGTA**-3'

Sp1-1c

3'-GGGCCCGCCCCG**CCAACAT**-TTT-5'

Sp1-Mut1

5'-TTT-CCCGGTCTAGACGGTTGTA

Sp1-Mut1c

3'-GGGCCAGATCTGCCAACAT-TT-5'

Sp1-2

5'-TTT-TCCTTGAGGCGGGCCCGGG-3'

Sp1-2c

3'-AGGAACTCCGCCCGGGCCC-TTT-5'

Sp1-Mut2

5'-TTT-TCCTTGAGGAATTCCCCGG-3'

Sp1-Mut2c

3'-AGGAACTCCTTAAGGGCCC-TTT-5'

Sp1-3

5'-GG-GGGACCCGCCTCCTTGA-3'

Sp1-3c

3'-CCAGGGCGGAGGAACT-GGG-5'

Sp1-Mut3

5'-GG-GGGTCGACCCTCCTTGA-3'

Sp1-Mut3c

3'-CCAGCTGGGAGGAACT-GGG-5'

Sp1-4

5'-TTT-GGTCCCGGGCGGCGCGGTGGG-3'

Sp1-4c

3'-CCAGGGCCCGCCGCGCCACCC-TTT-5'

Sp1-Mut4

5'-TTT-GGTCCCGGGTACCGCGGTGGG-3'

Sp1-Mut4c

3'-CCAGGGCCCATGGCGCCACCC-TTT-5'

Sp1-5

5'-TTT-GGGGAGGGCGGTCCCG-3'

Sp1-5c

3'-CCCCTCCCGCCACCCG-TTT-5'

Sp1-Mut5

5'-TTT-GGGGCTCGAGGTCCCG-3'

Sp1-Mut5c

3'-CCCC**GAG**CTCCAGGGC-TTT-5'

Σημείωση : το c αναφέρεται στη συμπληρωματική αλυσίδα

Για να γίνουν δίκλινα τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά προσθέσαμε 10γ από το κάθε συμπληρωματικό ολιγονουκλεοτίδιο, 2λ 10x kinase buffer και νερό μέχρι τα 20λ. 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.

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. Τα εκχυλίσματα αυτά επωάσθηκαν μαζί με 2λ binding buffer και 1,5γ/λ dl/dC για 15 λεπτά σε πάγο. Στη συνέχεια προσθέσαμε τους ανταγωνιστές και πάλι επωάσαμε για 15 λεπτά σε πάγο. Τέλος, προσθέσαμε το ραδιενεργό ανιχνευτή και επωάσαμε για 30 λεπτά σε πάγο. Φορτώσαμε την αντίδραση σε μη αποδιατακτική πηκτή 5-6% πολυακρυλαμίδης και το τρέξαμε για 3-4 ώρες στα 150V. Στη συνέχεια στεγνώσαμε την πηκτή και την εκθέσαμε 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

- 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
- 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, COS-7 και HeLa κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πιάτα 6-well με πυκνότητα 5×10^5 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 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 300λ 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 μικροπιππέτας
- Φυγοκέντρηση στις 5000 στροφές για 5 λεπτά
- Αφαίρεση υπερκλειμένου στον απαγωγό
- Προσθήκη 500λ διαλύματος PBS
- Έντονη ανάδευση
- Φυγοκέντρηση στις 5000 στροφές για 5 λεπτά
- Αφαίρεση υπερκλειμένου στον απαγωγό
- Προσθήκη 150λ 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	456λ
ONPG	132λ
100x salt	6λ
κυτ. Εκχύλισμα	6λ

Επώαση της αντίδρασης στους 37°C μέχρι τα δείγματα να κιτρινίσουν. Σταμάτημα της αντίδρασης με προσθήκη 200λ διαλύματος $1\text{M Na}_2\text{CO}_3$. 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	333λ
1M MgCl_2	100λ
b-mercapto.	352λ
H_2O	215λ

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 100λ υποστρώματος λουσιφεράσης και αφού αναδεύσουμε, μετράμε τις μονάδες φωτός που απελευθερώνει η αντίδραση της λουσιφεράσης στο λουμινόμετρο.

Συλλογή εκχύλισματος εμπλουτισμένου με Sp1. 48 ώρες μετά την επιμόλυνση τα κύτταρα συλλέγονται και επαναδιαλύονται σε 400λ 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.

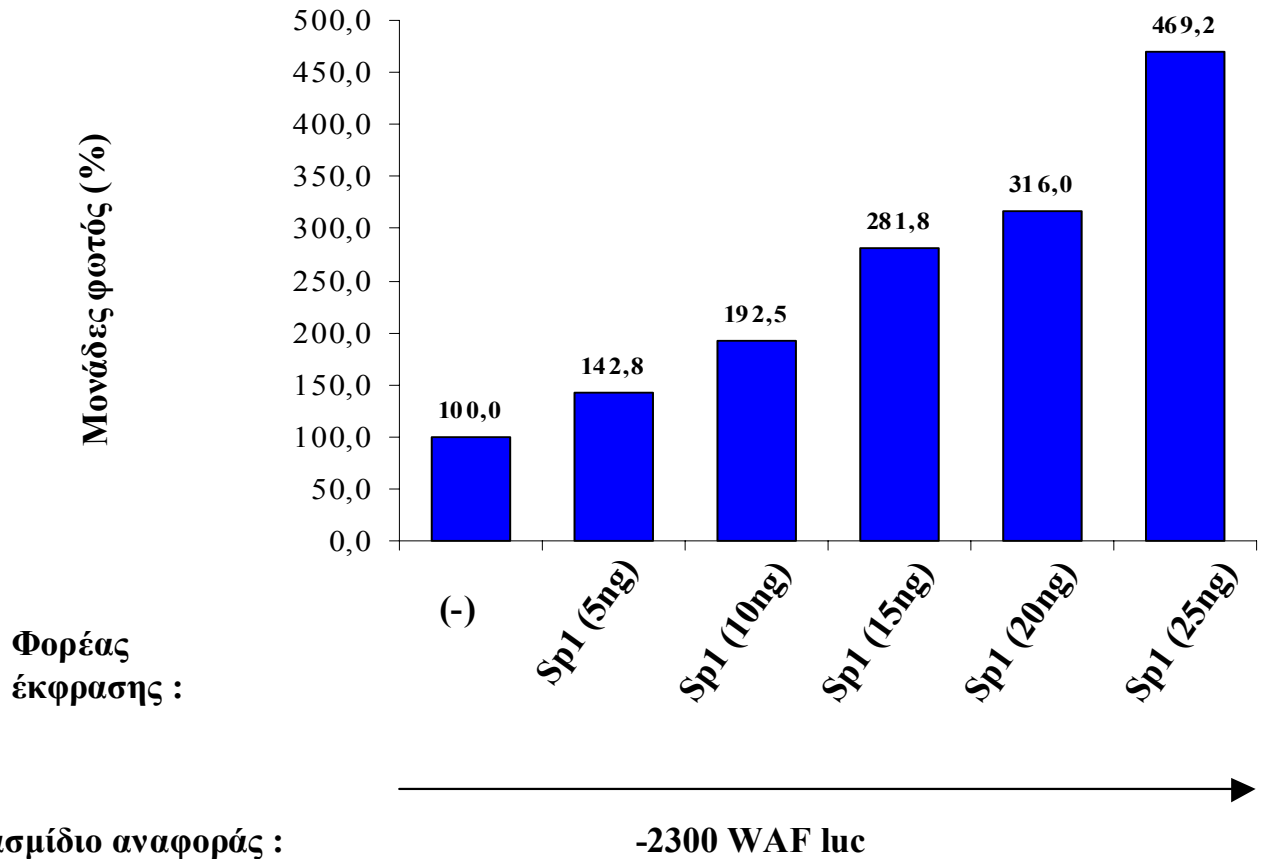
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μεταγραφική ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου p21 του ανθρώπου από τον παράγοντα Sp1 σε κύτταρα SL2.

Όπως περιγράφηκε εκτενώς στο κεφάλαιο «Εισαγωγή», ο υποκινητής του γονιδίου του αναστολέα του κυτταρικού κύκλου p21/WAF περιέχει στην κοντινή του περιοχή που καθορίζεται από τα νουκλεοτίδια -122 και -64, πέντε θέσεις πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα Sp1. Οι θέσεις αυτές ονομάστηκαν από εμάς και άλλους ερευνητές Sp1-1 έως Sp1-5 (Εικόνα 4). Η περιοχή αυτή η πλούσια σε θέσεις πρόσδεσης του Sp1 έχει δείξει ότι παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην συστατική όσο και στην επαγόμενη μεταγραφή του γονιδίου του p21 από τον μετασχηματίζοντα αυξητικό παράγοντα-β (TGFβ) (Moustakas and Kardassis, Pardali et al) καθώς και άλλους παράγοντες (Εικόνα 3). Η σημασία όμως της συσσώρευσης τόσων πολλών θέσεων πρόσδεσης του ίδιου παράγοντα σε μια μικρή περιοχή καθώς και ο ιδιαίτερος ρόλος της κάθε θέσης στην λειτουργία του υποκινητή του p21 παραμένει άγνωστος.

Για να απαντήσουμε σε αυτά τα ερωτήματα, κατασκευάσαμε μια σειρά από μεταλλαγμένους υποκινητές στις θέσεις Sp1 και αναλύσαμε την ικανότητα των μεταλλαγμένων υποκινητών να προσδένονται στον Sp1 και ενεργοποιούνται από αυτόν τον παράγοντα καθώς και από άλλους παράγοντες που δρουν μέσω του Sp1 όπως οι πρωτεΐνες Smad, c-Jun, c-fos p300. Για τον σκοπό αυτό, εκμεταλλευτήκαμε την ύπαρξη μιας κυτταρικής σειράς που έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία η οποία χαρακτηρίζεται από παντελή έλλειψη του παράγοντα Sp1 καθώς και παραγόντων της ίδια οικογένειας και ομόλογες με αυτόν (Sp2, Sp3). Η κυτταρική αυτή σειρά ονομάζεται SL2 και προέρχεται από κύτταρα Schneider εμβρύων Drosophila.

Ξεκινήσαμε την μελέτη μας με το να αναλύσουμε την ικανότητα του παράγοντα Sp1 να ενεργοποιεί τον υποκινητή του γονιδίου p21 στα κύτταρα SL2. Στην **Εικόνα 7** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ενός πειράματος στο οποίο κύτταρα SL2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς



Εικόνα 7: Μεταγραφική ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου p21/WAF από τον μεταγραφικό παράγοντα Sp1. Κύτταρα SL2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς -2300 WAF-luc (1 µg), αυξανόμενες συγκεντρώσεις (5-25 ng) του φορέα έκφρασης pPac-Sp1 και το πλασμίδιο εξομάλυνσης hsp-LacZ (1 µg). Εκχυλίσματα από τα επιμολυσμένα κύτταρα αναλύθηκαν με την δοκιμασία της λουσιφεράσης. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης (\pm σταθερή απόκλιση) παρουσιάζονται με την μορφή ραβδογράμματος. Η εξομάλυνση των αποτελεσμάτων έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης.

-2300 WAF luc το οποίο αποτελείται από το γονίδιο αναφοράς λουσιφεράση υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου p21 του ανθρώπου μεταξύ των νουκλεοτιδίων -2300 και +8, απουσία (-) ή παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης (5-25 ng) του πλασμιδίου pPac-Sp1. Το πλασμίδιο pPac-Sp1 είναι ένας φορέας έκφρασης ο οποίος φέρει το cDNA του ανθρώπινου Sp1 αμινοξέα (83-778) (η περιοχή αυτή του παράγοντα Sp1 επιτελεί όλες τις λειτουργίες του αγρίου τύπου Sp1. Το πλασμίδιο αυτό αποτελεί ευγενική χορηγία του Tjian R.) υπό τον έλεγχο του υποκινητή της ακτίνης της *Drosophila*. Όπως φαίνεται στην εικόνα 7, ο παράγοντας Sp1 προκαλεί μια δόσοεξαρτώμενη αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας του υποκινητή του p21 (1,5 – 4,5 φορές) η οποία δεν φθάνει σε πλατώ ακόμη και με την μεγαλύτερη συγκέντρωση του πλασμιδίου pPac-Sp1 που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα αυτό (25 ng). Αξιοσημείωτη αύξηση παρατηρήθηκε ακόμη και με μικρές συγκεντρώσεις του πλασμιδίου (10-15 ng) ενώ η δραστικότητα του υποκινητή του p21 απουσία Sp1 ήταν εξαιρετικά χαμηλή. Στα επόμενα πειράματα χρησιμοποιήσαμε συγκέντρωση 12,5ng από το πλασμίδιο pPacSp1, εκτός από κάποια πειράματα που χρησιμοποιήσαμε 50ng.

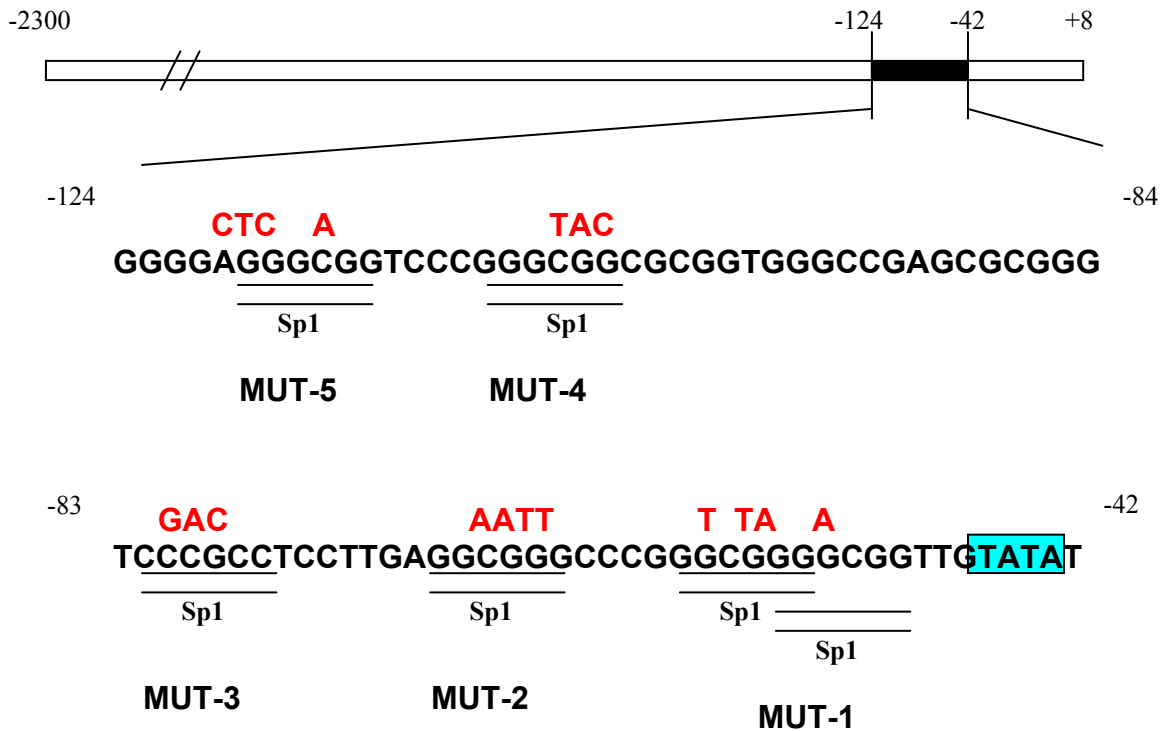
Συμπερασματικά, τα δεδομένα της εικόνας 7 δείχνουν ότι η ενεργότητα του υποκινητή του p21 σε μια κυτταρική σειρά με έλλειψη σε Sp1 είναι πολύ χαμηλή ενώ αυξάνει σημαντικά έπειτα από προσθήκη εξωγενούς Sp1 επιβεβαιώνοντας έτσι τον σημαντικό ρόλο που παίζει ο παράγοντας αυτός στην ρύθμιση του γονιδίου p21 του ανθρώπου.

Μεταλλαξιγένεση του υποκινητή του γονιδίου p21 του ανθρώπου

Όπως έχει δειχθεί σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας (Moustakas and Kardassis, 1998), ο υποκινητής του γονιδίου p21 είναι πολύ δραστικός σε κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος HepG2 ενώ η δραστικότητά του μειώνεται δραστικά εάν απαλοιφεί η περιοχή του υποκινητή μεταξύ των νουκλεοτιδίων -122 και -64 η οποία περιλαμβάνει τις 5 θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα Sp1. Για να μελετήσουμε τον ρόλο της περιοχής αυτής με μεγαλύτερη λεπτομέρεια και να χαρτογραφήσουμε τα σημαντικά ρυθμιστικά στοιχεία που υπάρχουν σε αυτήν, εκπονήσαμε μεταλλαξιγένεση *in vitro* σε κάθε μια από τις 5 θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα Sp1. Η

μεταλλαξιγέννεση έγινε χρησιμοποιώντας το σύστημα Gene Editor της εταιρείας Promega όπως περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι». Οι αντικαταστάσεις σημείου έγιναν στον υποκινητή -2300/+8 του γονιδίου p21 και αναπαρίστανται σχηματικά στην **Εικόνα 8 Α**. Οι μεταλλάξεις ονομάστηκαν MUT-1 έως MUT-5 και σχεδιάστηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να εισάγεται μια νέα θέση περιορισμού στον υποκινητή μαζί με την μετάλλαξη για να διευκολυνθεί η αναγνώριση των μεταλλαγμένων μορφών κατά την κλωνοποίηση στον φορέα pGL3 Basic. Οι νέες θέσεις προσδιορισμού που εισήχθησαν στον υποκινητή του p21 με αυτόν τον τρόπο παρουσιάζονται στην **Εικόνα 8 Β**.

Οι μεταλλάξεις Mut-1 έως Mut-5 ελέγχθηκαν κατ' αρχήν ως προς την ικανότητά τους να δεσμεύουν τον παράγοντα Sp1 σε αναλύσεις ηλεκτροφορητικής ικανότητας συμπλόκου σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (GEMSA). Για τον σκοπό αυτό, ο παράγοντας Sp1 εκφράσθηκε σε κύτταρα SL2 και κυτταρικά εκχυλίσματα από τα επιμολυσμένα κύτταρα επωάσθηκαν με ραδιοσημασμένα αγρίου τύπου ή μεταλλαγμένα ολιγονουκλεοτίδια, απουσία ή παρουσία μη-ραδιοσημασμένων ολιγονουκλεοτιδίων ανταγωνιστών σε περίσσεια. Τα αποτελέσματα από τις αναλύσεις αυτές παρουσιάζονται στην **Εικόνα 9 Α-Ε**. Στην εικόνα αυτή, η κάθε φωτογραφία αντιστοιχεί σε μια συγκεκριμένη μετάλλαξη και περιλαμβάνει τα εξής δεδομένα: δοκιμασία πρόσδεσης του παράγοντα Sp1 στο αγρίου τύπου ραδιοσημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο (στήλες 1 και 2), παρουσία περίσσειας (50-200 φορές) μη-ραδιοσημασμένου αγρίου τύπου (στήλες 3-5) ή μεταλλαγμένου (στήλες 6-8) ολιγονουκλεοτιδίου και τέλος δοκιμασία πρόσδεσης του Sp1 απ' ευθείας στο μεταλλαγμένο ολιγονουκλεοτίδιο (στήλες 9,10). Τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια σε όλα τα ολιγονουκλεοτίδια που δοκιμάσθηκαν και συνοψίζονται ως εξής: ο παράγοντας Sp1 προσδένεται με μεγάλη συγγένεια στις περιοχές Sp1-1 (-60/-50 φωτογραφία Α), Sp1-2 (-69/-64 φωτογραφία Β) Sp1-3 (-82/-77 φωτογραφία Γ) και Sp1-5 (-119/-114 φωτογραφία Ε), ενώ προσδένεται με πολύ μικρή συγγένεια στην περιοχή Sp1-4 (-109/-104 φωτογραφία Δ). Σε κάθε φωτογραφία, η πρόσδεση του παράγοντα Sp1 παρεμποδίσθηκε αποτελεσματικά παρουσία περίσσειας του αντίστοιχου αγρίου τύπου ολιγονουκλεοτιδίου, ενώ δεν παρεμποδίσθηκε με ανάλογες συγκεντρώσεις από το ολιγονουκλεοτίδιο που φέρει την μετάλλαξη. Τέλος, δεν παρατηρήθηκε

A**B**

Sp1-1
5'-TTGAGGCGGGCCCGGTCTAGACGGTTGTATATCAGG-3'
Xba I

Sp1-2
5'-CCC GCCTCCTTGAGGAATTCCCGGGCGGGGCGGT-3'
EcoR I

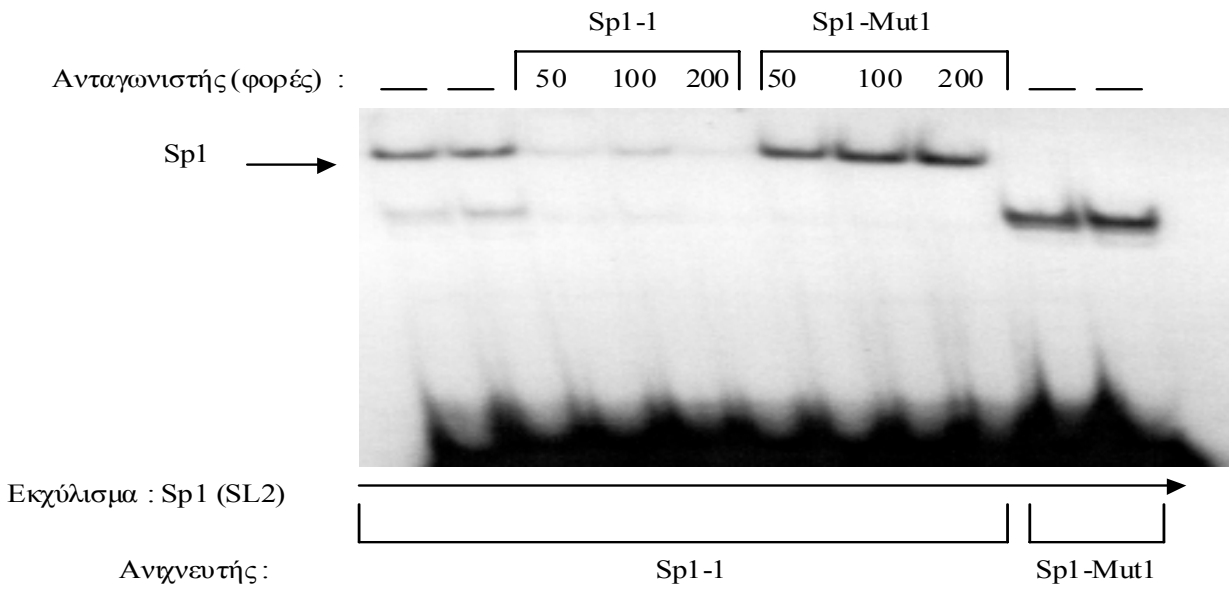
Sp1-3
5'-GGCCGAGCGCGGGGTCGACCCTCCTTGAGGCGGG-3'
Sal I

Sp1-4
5'-GAGGGCGGTCCC GGTACCGCGGTGGGCCGAGC-3'
Kpn I

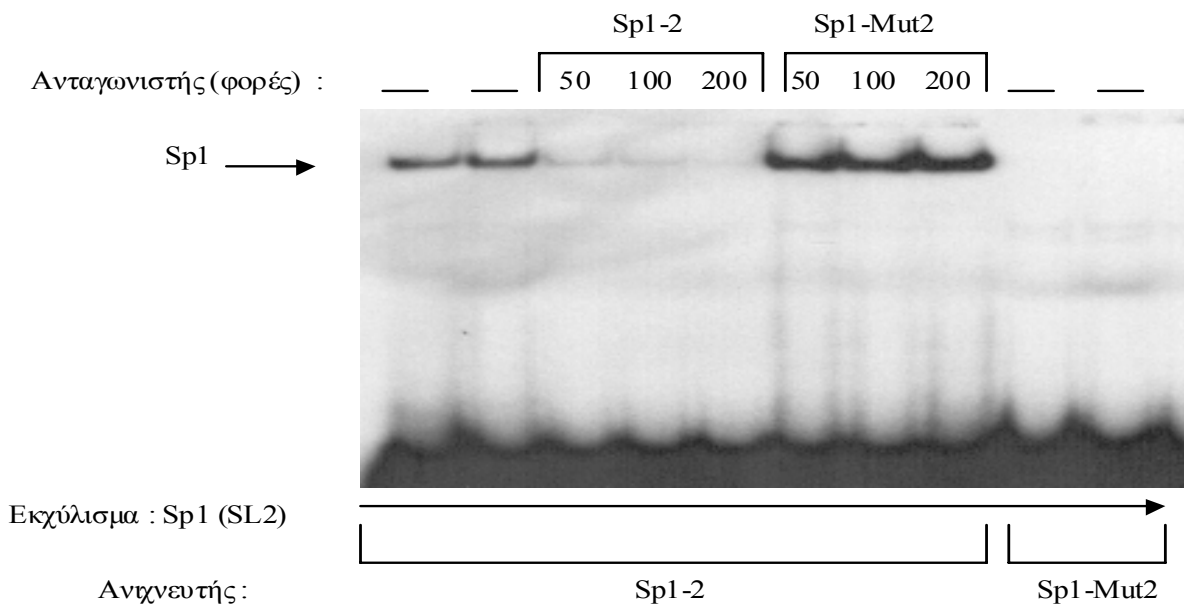
Sp1-5
5'-GCCTGGGCCCGGGGCTCGAGGTCCC GGGCGGC-3'
Xho I

Εικόνα 8 A,B : Μεταλλαξιγένεση των Sp1 θέσεων που υπάρχουν στην κοντινή περιοχή του υποκινητή του γονιδίου p21/WAF. A: Δείχνεται η νουκλεοτιδική ακολουθία του υποκινητή του γονιδίου p21/WAF μεταξύ των νουκλεοτιδίων -124 και -42 σε σχέση με την θέση έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου (+1). Με την ετικέτα MUT-# απεικονίζουμε το κάθε ένα μετάλλαγμα που προκύπτει. Με κόκκινο χρώμα είναι οι μεταλλαγμένες βάσεις. B: Νεοσυντιθέμενες θέσεις περιορισμού στις μεταλλαγμένες Sp1 θέσεις.

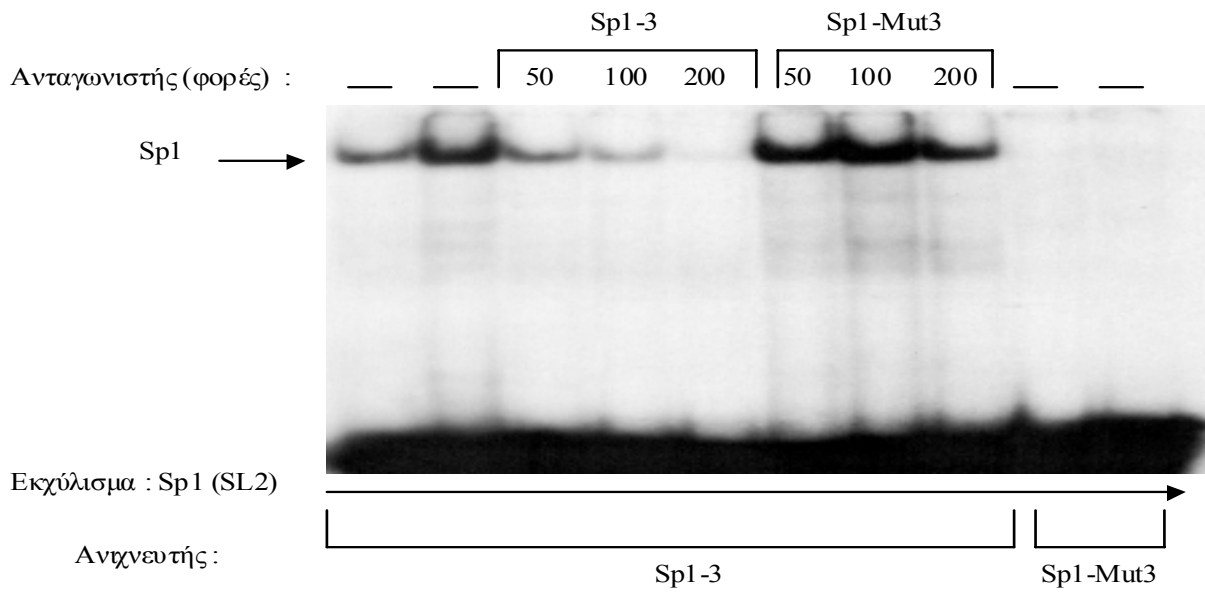
A



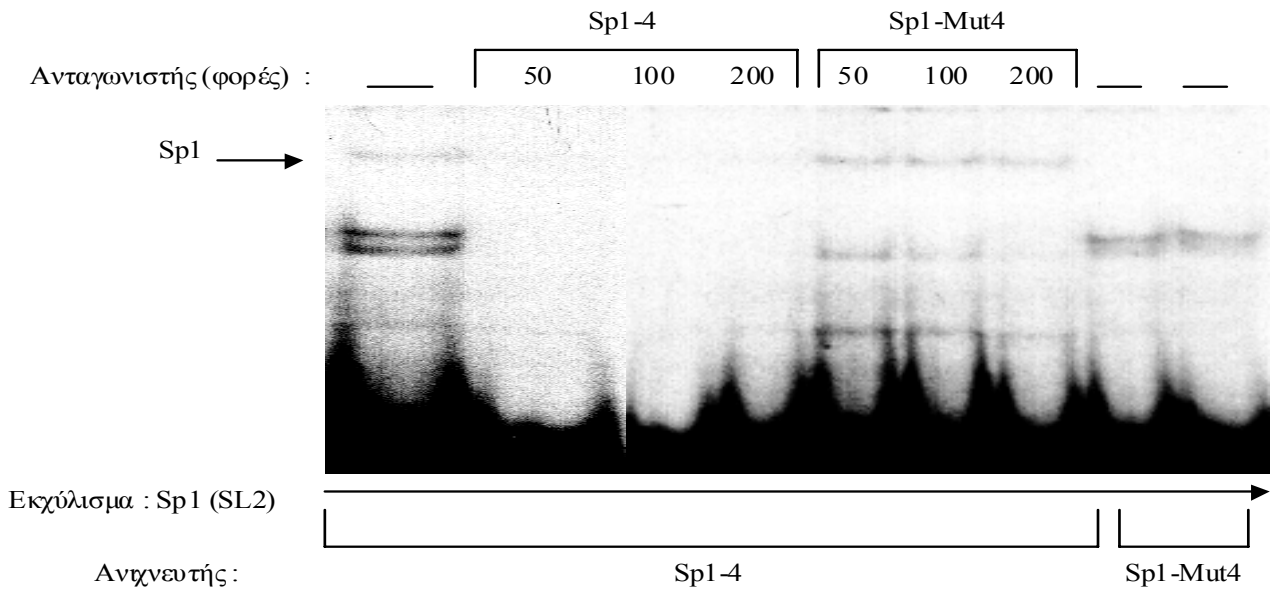
B

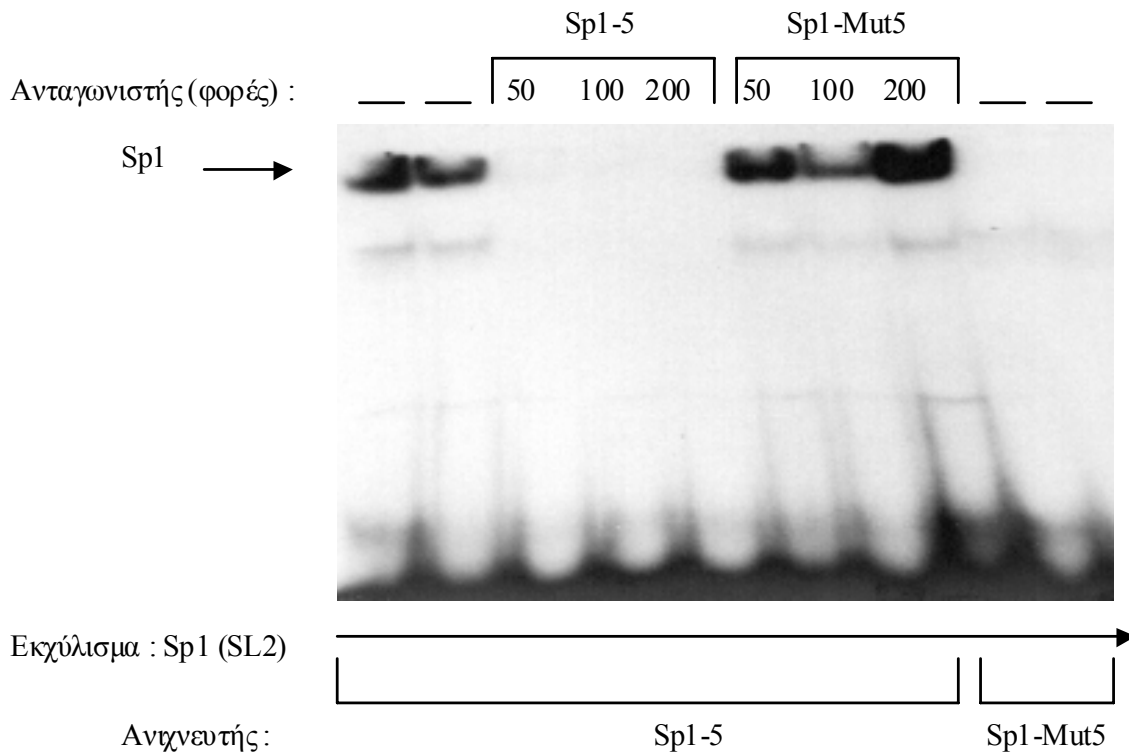


Γ



Δ



E

Εικόνα 9 A-E: Επίδραση μεταλλάξεων στην πρόσδεση του παράγοντα Sp1 στον υποκινητή του γονιδίου p21 *in vitro*. Δίκλινα ολιγονουκλεοτίδια που αντιστοιχούν στις αγρίου (Sp1-1 έως 5) ή τις μεταλλαγμένες περιοχές Sp1-mut1 (Α), Sp1-mut2 (Β), Sp21-mut3 (Γ), Sp1-mut4 (Δ) και Sp1-mut5 (Ε) του υποκινητή του γονιδίου p21/WAF ραδιοσημάνθηκαν με ^{32}P [dCTP] ή ^{32}P [dATP] και ένζυμο Klenow και στην συνέχεια επώασθησαν με εκχυλίσματα (2 μλ και 4 μλ για τους ανιχνευτές Sp1-1,2,3 και 5 και Sp1-mut 1-5 ή 4 μλ για τον ανιχνευτή Sp1-4) κυττάρων SL2 τα οποία είχαν επιμολυνθεί παροδικά με τον φορέα έκφρασης pPac-Sp1. Η πρόσδεση του παράγοντα Sp1 δοκιμάστηκε στην κάθε περίπτωση με την προσθήκη των αντίστοιχων μη ραδιοσημασμένων αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων ολιγονουκλεοτιδίων ανταγωνιστών σε περίσσεια (50-200 φορές) όπως δείχνεται στο πάνω μέρος του κάθε αυτοραδιογραφήματος. Ο συναγωνισμός έγινε με 4 μλ κυτταρικού εκχυλίσματος στην κάθε περίπτωση. Σε κάθε αυτοραδιογράφημα, η κάτω ζώνη αντιστοιχεί στον ελεύθερο ανιχνευτή και η πάνω ζώνη (βέλος) αντιστοιχεί σε σύμπλοκο μεταξύ του ανιχνευτή και του παράγοντα Sp1.

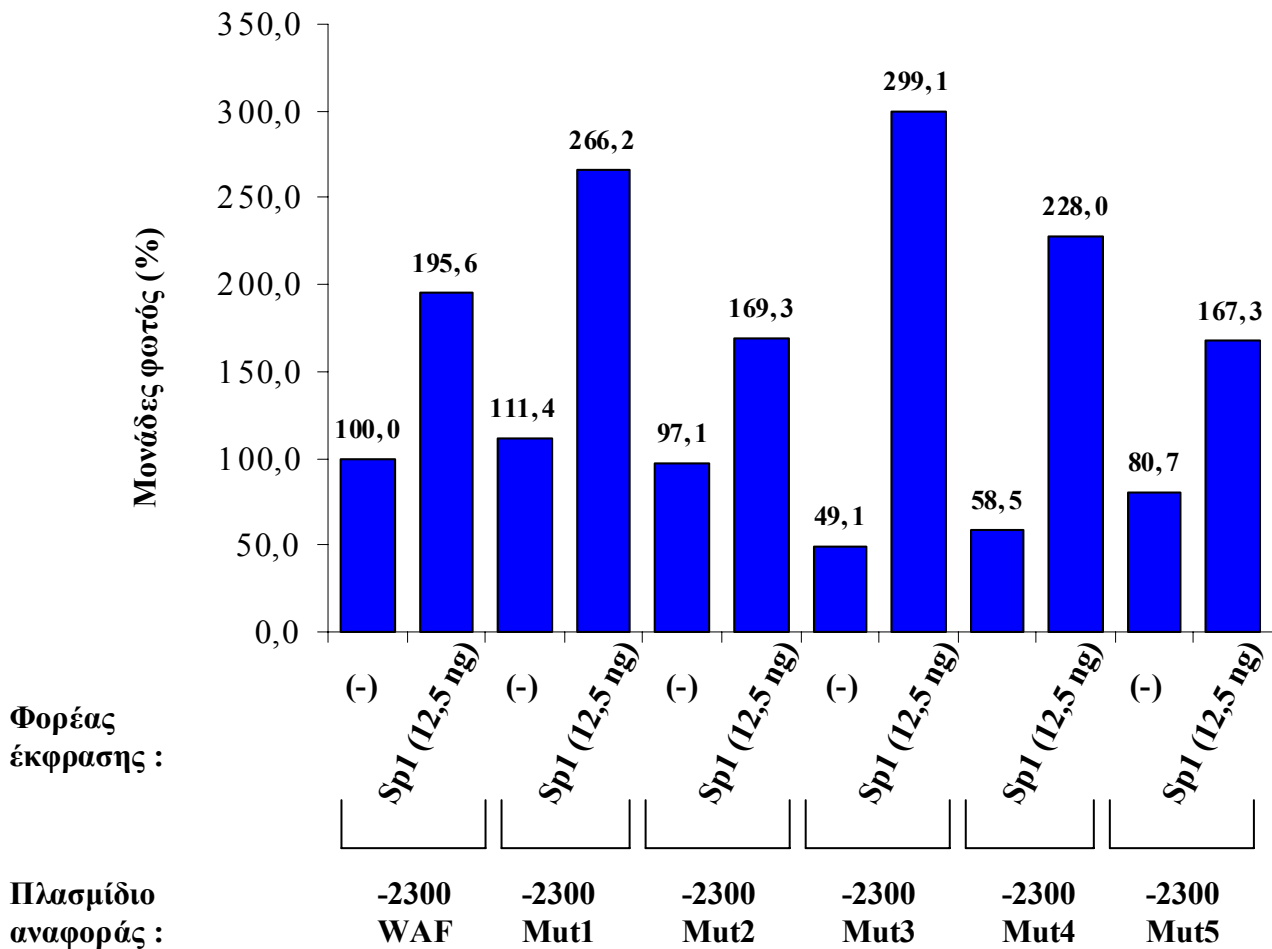
ειδική πρόσδεση του παράγοντα Sp1 σε κανένα από τα μεταλλαγμένα ολιγονουκλεοτίδια Sp1-Mu1-5 όταν αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως ανιχνευτές.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα των αναλύσεων GEMSA που παρουσιάστηκαν στην Εικόνα 9 δείχνουν ότι οι σημειακές μεταλλάξεις που εισήχθησαν στον υποκινητή του γονιδίου p21 κατέστρεψαν πλήρως την πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 στις αντίστοιχες περιοχές. Θεωρήσαμε αναγκαία την επιβεβαίωση αυτή πριν προχωρήσουμε στα πειράματα μεταγραφικής ενεργοποίησης των μεταλλαγμένων υποκινητών που παρουσιάζονται στη συνέχεια.

Επίδραση των μεταλλάξεων στην μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή του p21 παρουσία του παράγοντα Sp1.

Για να μελετήσουμε την επίδραση των σημειακών μεταλλάξεων στην ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου p21 παρουσία του παράγοντα Sp1, κύτταρα SL2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το αγρίου τύπου πλασμίδιο αναφοράς -2300 WAF luc ή τις μεταλλαγμένες μορφές αυτού (Mut1-Mut5) απουσία (-) ή παρουσία (12,5 ng) του φορέα έκφρασης pPac-Sp1. Η ανάλυση αυτή η οποία παρουσιάζεται στην **Εικόνα 10** έδειξε ότι καμία από τις μεταλλάξεις που εισήχθησαν στον υποκινητή p21 δεν παρεμπόδισε τελείως την μεταγραφική ενεργοποίησή του από τον παράγοντα Sp1. Αναλυτικά, η ενεργοποίηση ήταν 2 φορές για τον αγρίου τύπου p21 υποκινητή, 2,4 φορές για τον Mut1, 1,7 φορές για τον Mut2, 6,1 φορές για τον Mut3, 3,9 φορές για τον Mut4 και 2 φορές για τον Mut5 p21 υποκινητή. Τέλος, παρατηρήθηκε πτώση στα επίπεδα ενεργότητας του p21 υποκινητή μεταλλαγμένου στις θέσεις 3, 4 και 5 με σημαντικότερη αυτή στην θέση 3 (49% σε σύγκριση με την ενεργότητα του αγρίου τύπου υποκινητή) στα κύτταρα SL2 απουσία Sp1.

Από τα αποτελέσματα της εικόνας 10 συμπεραίνουμε ότι η ενεργοποίηση του υποκινητή p21 από τον παράγοντα Sp1 δεν απαιτεί κάποια συγκεκριμένη θέση πρόσδεσης αλλά αντίθετα φαίνεται να είναι το συνεργατικό αποτέλεσμα της πρόσδεσης του Sp1 σε πολλαπλές θέσεις στην περιοχή -122/-64. Η ύπαρξη πολλαπλών θέσεων πρόσδεσης του παράγοντα Sp1 στον υποκινητή του p21 πιθανόν να αποτελεί έναν μηχανισμό ασφαλείας



Εικόνα 10: Επίδραση μεταλλάξεων στην μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου p21 παρουσία του παράγοντα Sp1. Κύτταρα SL2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το αγρίου τύπου πλασμίδιο αναφοράς -2300 WAF-luc ή τις μεταλλαγμένες μορφές αυτού (1 µg) όπως δείχνεται στο κάτω μέρος της εικόνας παρουσία ή απουσία του φορέα έκφρασης pPac-Sp1 (12,5 ng) και το πλασμίδιο εξομάλυνσης hsp-LacZ (0,5 µg). Εκχυλίσματα από τα επιμολυσμένα κύτταρα αναλύθηκαν με την δοκιμασία της λουσιφεράσης. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης (\pm σταθερή απόκλιση) παρουσιάζονται με την μορφή ραβδογράμματος. Η εξομάλυνση των αποτελεσμάτων έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης.

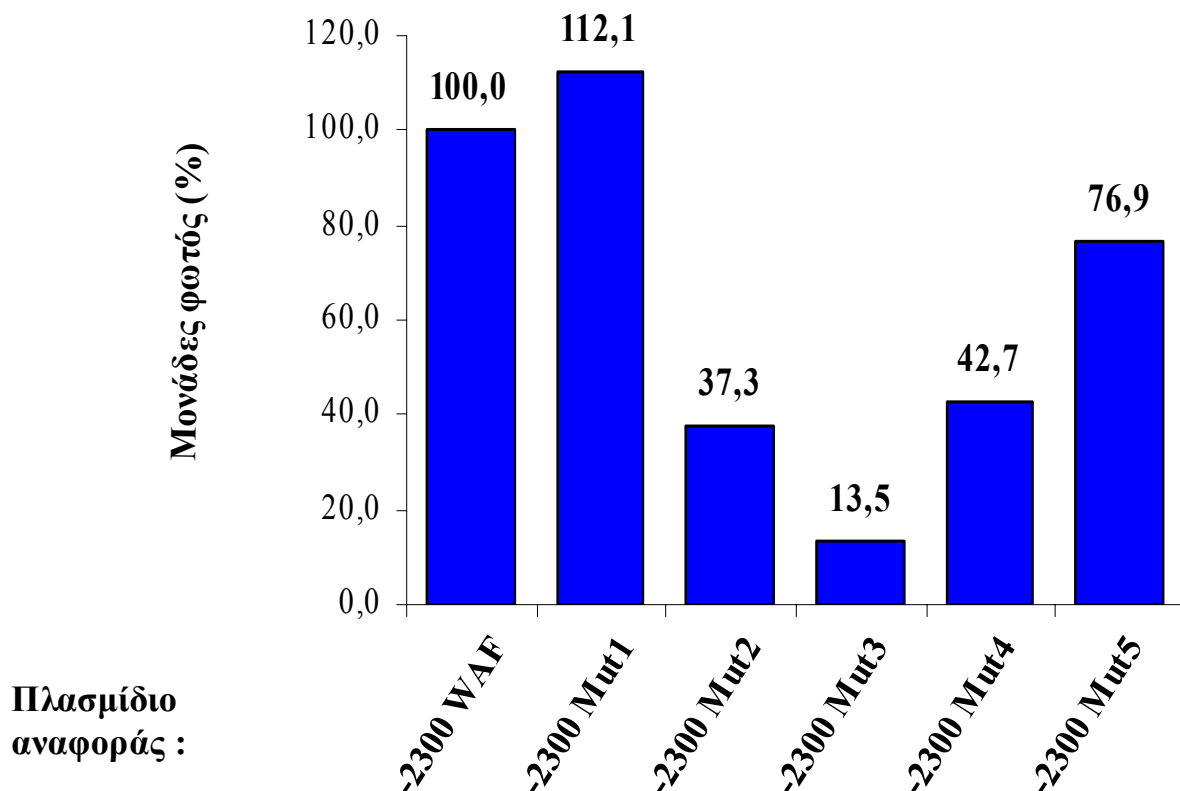
ο οποίος προστατεύει τον υποκινητή από πιθανές μεταλλάξεις σε μια κρίσιμη για την δραστικότητά του περιοχή.

Επίδραση των μεταλλάξεων στην μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή του p21 σε κύτταρα HepG2, COS-7 και HeLa.

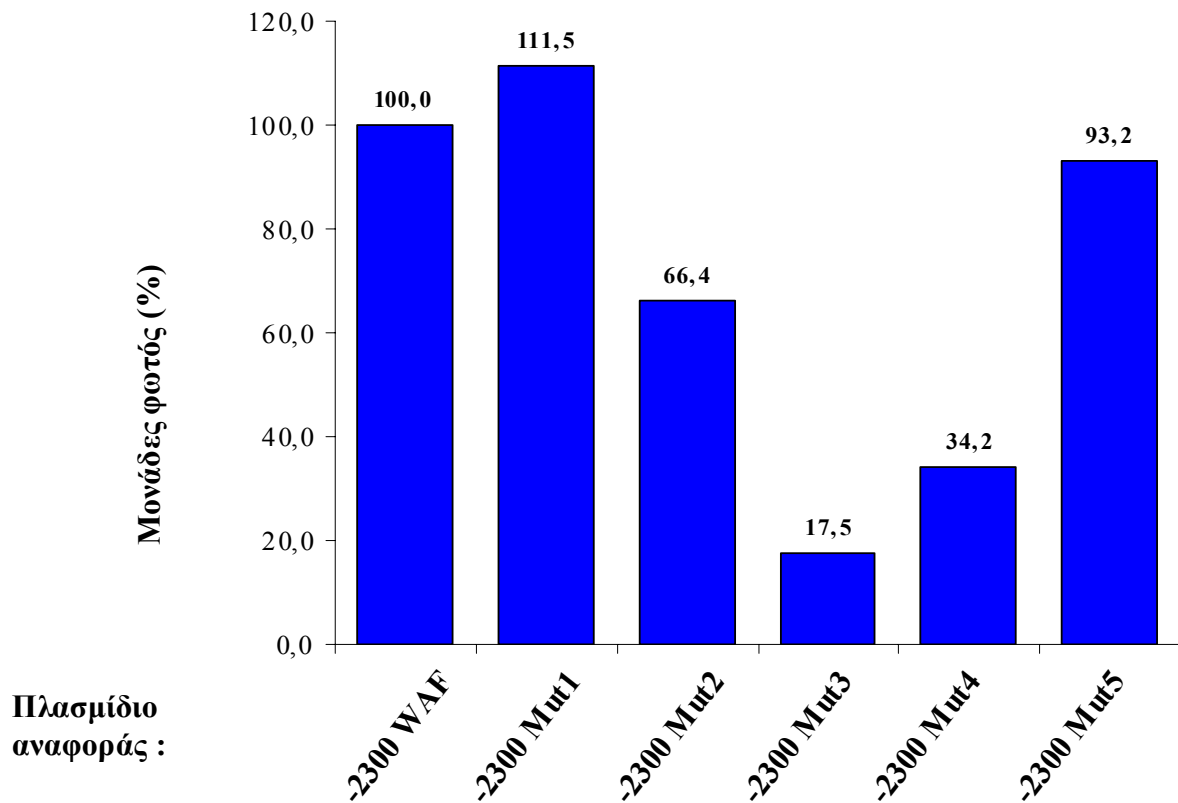
Για να μελετήσουμε την επίδραση των σημειακών μεταλλάξεων στην ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου p21 σε κύτταρα θηλαστικών στα οποία ο παράγοντας Sp1 εκφράζεται συστατικά σε υψηλές συγκεντρώσεις, πραγματοποιήσαμε παροδικές επιμολύνσεις κυττάρων HepG2 (ανθρώπινο ηπάτωμα), COS-7 (νεφρικά κύτταρα πιθήκου) και HeLa (καρκίνωμα ανθρώπινου τραχήλου) με το αγρίου τύπου πλασμίδιο αναφοράς -2300 WAF luc ή τις μεταλλαγμένες μορφές αυτού (Mut1-Mut5). Η ανάλυση στα κύτταρα HepG2 η οποία παρουσιάζεται στις **Εικόνα 11** έδειξε ότι η μεταλλαξιγένεση στις περιοχές 2, 3 και 4 του p21 υποκινητή προκάλεσε μείωση στα επίπεδα ενεργότητας του υποκινητή στο 37, 13 και 42 % αντίστοιχα σε σχέση με τα επίπεδα ενεργότητας του αγρίου τύπου υποκινητή η οποία ορίστηκε συμβατικά ως 100%. Μικρότερη πτώση στα επίπεδα ενεργότητας παρατηρήθηκε στην μετάλλαξη 5 (77%) ενώ τέλος, μικρή αύξηση (112%) στα επίπεδα ενεργότητας του p21 υποκινητή παρατηρήθηκε με την μετάλλαξη 1.

Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε παροδικές επιμολύνσεις κυττάρων COS-7. Όπως στα HepG2 έτσι και στα κύτταρα COS-7, η μεγαλύτερη πτώση ενεργότητας παρατηρήθηκε στις μετάλλαξη 2 (66%), 3 (17,5%) και 4 (34,2%). Η μετάλλαξη 1 ήταν και εδώ αυξημένη (111,5%) σε σχέση με τον αγρίου τύπου υποκινητή (**Εικόνα 12**).

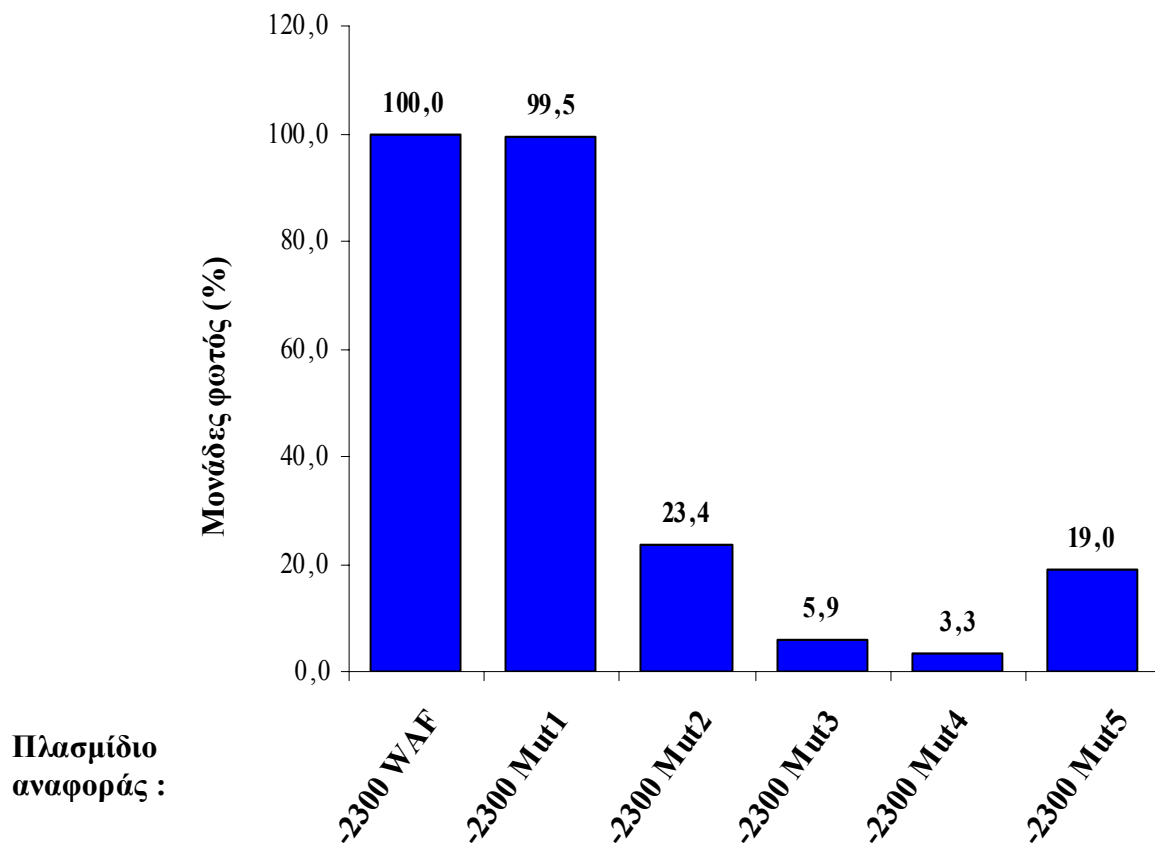
Κάπως διαφορετικό πρότυπο έκφρασης παρατηρήθηκε στα κύτταρα HeLa. Στα κύτταρα αυτά, η ενεργότητα των μεταλλαγμένων μορφών Mut2, 3 και 4 ήταν 23,4%, 5,9% και 3,3 % σε σχέση με τον αγρίου τύπου υποκινητή, η μετάλλαξη 1 δεν είχε κανέναν απολύτως φαινότυπο ενώ τέλος, η μετάλλαξη 5 παρουσίασε μια πτώση της τάξεως του 80% σε σχέση με τον φυσιολογικό υποκινητή (**Εικόνα 13**).



Εικόνα 11: Επίδραση μεταλλάξεων στην συστατική μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου p21/WAF σε κύτταρα ηπατώματος HepG2. Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το αγρίου τύπου πλασμίδιο αναφοράς -2300 WAF-luc ή τις μεταλλαγμένες μορφές αυτού (1 µg) όπως δείχνεται στο κάτω μέρος της εικόνας και το πλασμίδιο εξομάλυνσης CMV-βgal (1 µg). Εκχυλίσματα από τα επιμολυσμένα κύτταρα αναλύθηκαν με την δοκιμασία της λουσιφεράσης. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης (\pm σταθερή απόκλιση) παρουσιάζονται με την μορφή ραβδογράμματος. Η εξομάλυνση των αποτελεσμάτων έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης.



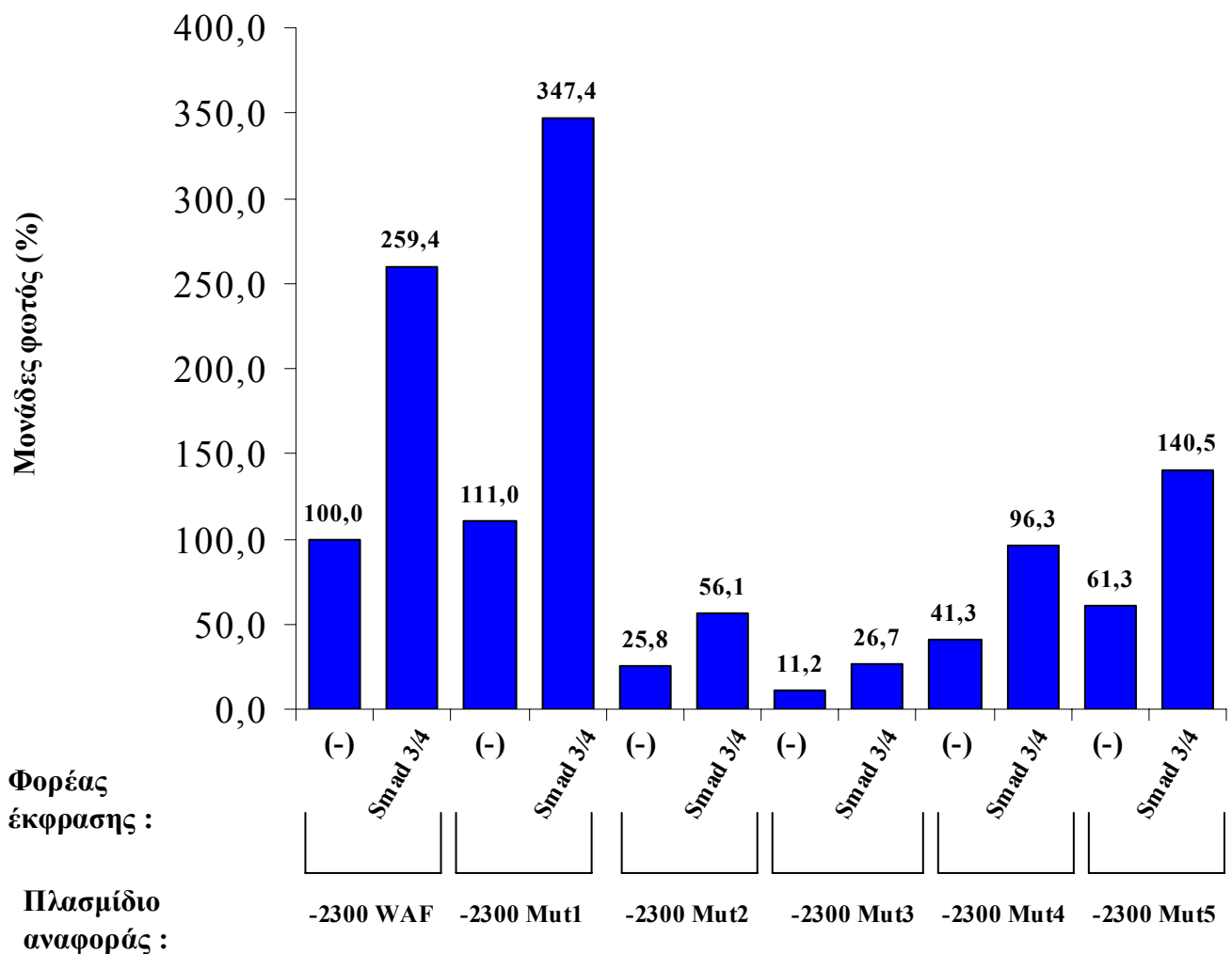
Εικόνα 12: Επίδραση μεταλλάξεων στην συστατική μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου p21/WAF σε νεφρικά κύτταρα πιθήκου COS-7. Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με το αγρίου τύπου πλασμίδιο αναφοράς -2300 WAF-luc ή τις μεταλλαγμένες μορφές αυτού (1 µg) όπως δείχνεται στο κάτω μέρος της εικόνας και το πλασμίδιο εξομάλυνσης CMV-βgal (1 µg). Εκχυλίσματα από τα επιμολυσμένα κύτταρα αναλύθηκαν με την δοκιμασία της λουσιφεράσης. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης (\pm σταθερή απόκλιση) παρουσιάζονται με την μορφή ραβδογράμματος. Η εξομάλυνση των αποτελεσμάτων έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης.



Εικόνα 13: Επίδραση μεταλλάξεων στην συστατική μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου p21/WAF σε ανθρώπινα κύτταρα καρκινώματος τραχήλου μήτρας HeLa. Κύτταρα HeLa επιμολύνθηκαν παροδικά με το αγρίου τύπου πλασμίδιο αναφοράς -2300 WAF-luc ή τις μεταλλαγμένες μορφές αυτού (1 µg) όπως δείχνεται στο κάτω μέρος της εικόνας και το πλασμίδιο εξομάλυνσης CMV-βgal (1 µg). Εκχυλίσματα από τα επιμολυσμένα κύτταρα αναλύθηκαν με την δοκιμασία της λουσιφεράσης. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης (\pm σταθερή απόκλιση) παρουσιάζονται με την μορφή ραβδογράμματος. Η εξομάλυνση των αποτελεσμάτων έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης.

Επίδραση των μεταλλάξεων στη μεταγραφική ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου p21 από τις πρωτεΐνες Smad3 και Smad4.

Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας είχαν δείξει ότι η ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από τον παράγοντα TGF- β επιτελείται μέσω των πρωτεϊνών Smad 3/4, οι οποίες αλληλεπιδρούν φυσικά και λειτουργικά με το μεταγραφικό παράγοντα Sp1 (Moustakas and Kardassis, 1998; Pardali et al., 2000). Για να μελετήσουμε, λοιπόν, το ρόλο που διαδραματίζει η κάθε θέση πρόσδεσης του Sp1 του υποκινητή του p21 στον παραπάνω μηχανισμό ενεργοποίησης από τον TGF- β , πραγματοποιήσαμε επιμολύνσεις κυττάρων HepG2 με τον άγριου τύπου και τους μεταλλαγμένους υποκινητές του p21 (Mut1-Mut5) απουσία και παρουσία των πρωτεϊνών Smad 3/4. Τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού παρουσιάζονται στην **Εικόνα 14** και συνοψίζονται ως εξής : α) Η ενεργότητα του -2300/+8 p21 υποκινητή αυξήθηκε κατά 2,6 φορές παρουσία των πρωτεϊνών Smad 3/4, αποτέλεσμα που συμφωνεί απόλυτα με προηγούμενη μελέτη (Moustakas and Kardassis, 1998). β) Η μεγαλύτερη ενεργοποίηση από τις Smads παρατηρήθηκε στον υποκινητή Mut1 (3,4 φορές), ο οποίος φέρει τη μετάλλαξη στη θέση Sp1-1. Αυτό πιθανό να σημαίνει ότι η πρόσδεση του Sp1 στη θέση αυτή παίζει ανασταλτικό ρόλο στη δράση των πρωτεϊνών Smad 3/4 στον αγρίου τύπου υποκινητή p21. γ) Παρόμοια μεταγραφική ενεργοποίηση της τάξης του 2-2,5 παρατηρήθηκε στους μεταλλαγμένους υποκινητές Mut 2-5(2,1 φορές στο Mut2, 2,4 φορές στο Mut3, 2,3 φορές στο Mut4 και 2,3 φορές στο Mut5). Στις περιπτώσεις, όμως, των Mut2-Mut5 η ενεργότητα του p21 υποκινητή παρουσία των πρωτεϊνών Smad 3/4 ήταν κατά πολύ μειωμένη σε σχέση με αυτήν του αγρίου τύπου υποκινητή. Συγκρίνοντας για παράδειγμα την ενεργότητα του μεταλλαγμένου υποκινητή Mut3 με αυτήν του αγρίου τύπου παρουσία Smad 3/4 , παρατηρούμε μια πτώση της τάξης του 90%.

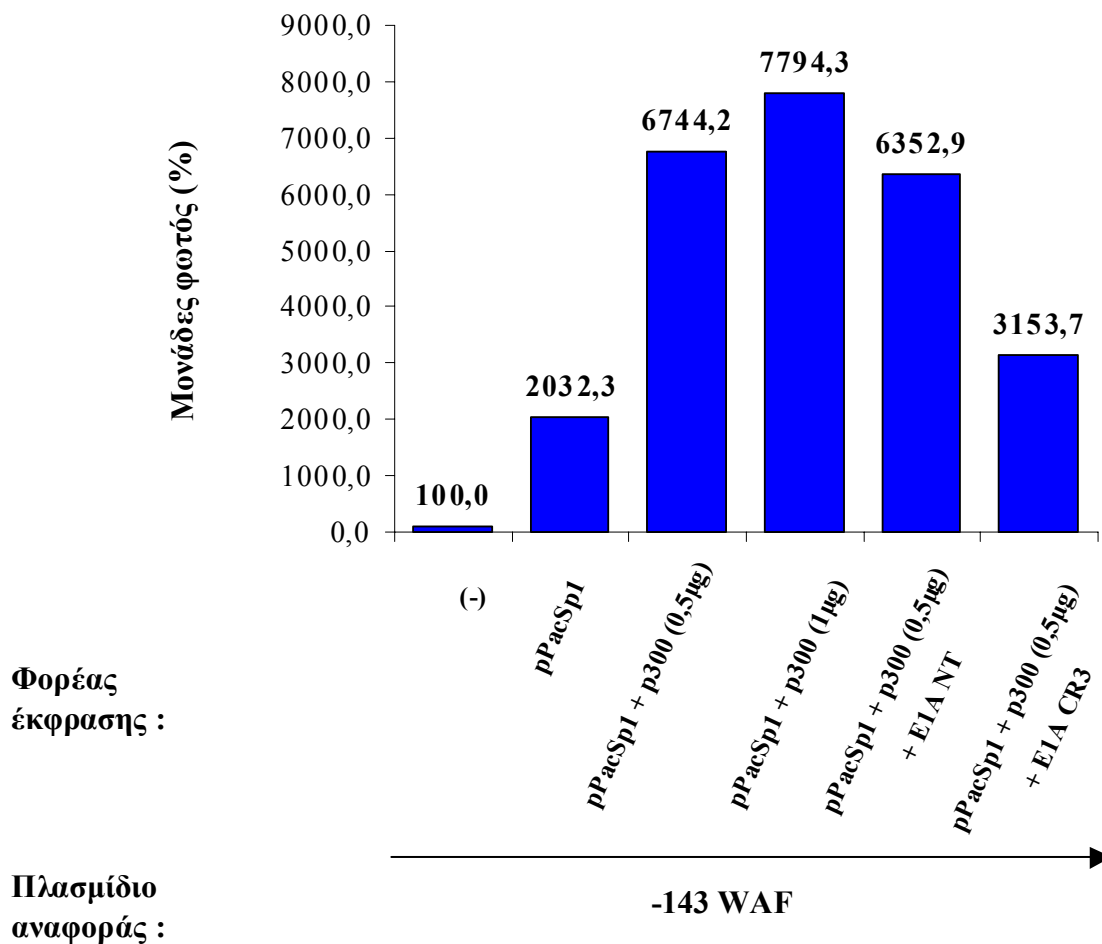


Εικόνα 14: Επίδραση μεταλλάξεων στην μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου p21 παρουσία των παραγόντων Smad3 και Smad4. Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το αγρίου τύπου πλασμίδιο αναφοράς -2300 WAF-luc ή τις μεταλλαγμένες μορφές αυτού (1 µg) όπως δείχνεται στο κάτω μέρος της εικόνας παρουσία ή απουσία των φορέων έκφρασης pCDNA 3xmyc SMAD3 (1 µg) και pCDNA 3xmyc SMAD4 (1 µg) καθώς και το πλασμίδιο εξομάλυνσης pCMV-βgal (1 µg). Εκχυλίσματα από τα επιμολυσμένα κύτταρα αναλύθηκαν με την δοκιμασία της λουσιφεράσης. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης (\pm σταθερή απόκλιση) παρουσιάζονται με την μορφή ραβδογράμματος. Η εξομάλυνση των αποτελεσμάτων έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης.

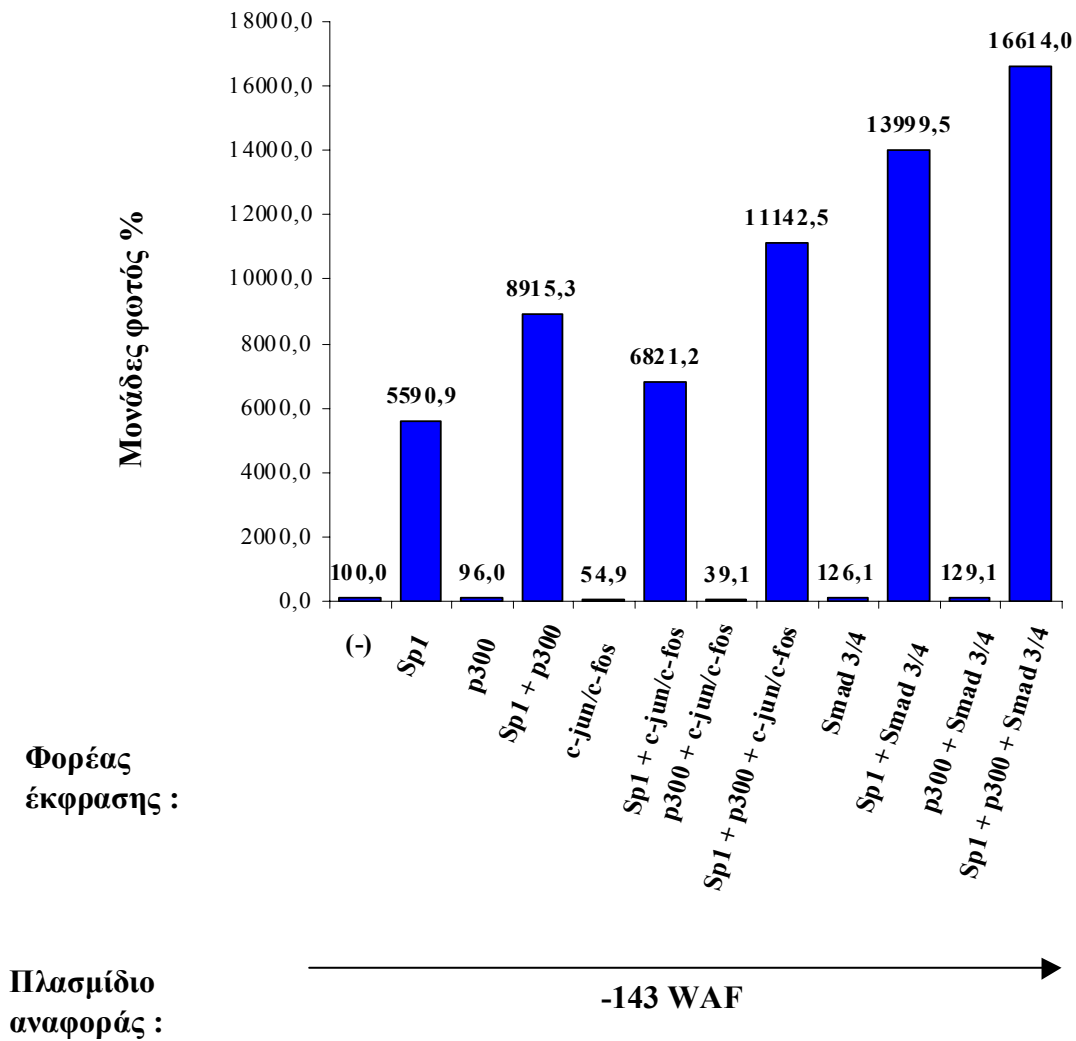
Ο ρόλος του παράγοντα p300 στη μεταγραφική ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από τις πρωτεΐνες Smad 3/4.

Πραγματοποιήσαμε μια σειρά αναλύσεων σε κύτταρα SL2 για τη μελέτη της πιθανής ανάμειξης του συνενεργοποιητή p300 στο μηχανισμό ρύθμισης του γονιδίου p21 από τις πρωτεΐνες Sp1, Smads και c-jun/c-fos. Στην **Εικόνα 15** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των αναλύσεών μας πάνω στην επίδραση της πρωτεΐνης p300 στη μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή p21 παρουσία Sp1. Παρατηρούμε ότι παρουσία p300, η ενεργότητα του Sp1 στον p21 υποκινητή αυξάνει κατά 3,8 φορές. Η αύξηση αυτή πιθανά να οφείλεται σε φυσική και λειτουργική αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών πάνω στον p21 υποκινητή. Για να επιβεβαιώσουμε την ανάμειξη του p300 στη ρύθμιση του υποκινητή αυτού από τον Sp1, χρησιμοποιήσαμε δύο μορφές της πρωτεΐνης E1A, μία αγρίου τύπου (NT) και μια μεταλλαγμένη (CR3) από την οποία απουσιάζει η περιοχή αλληλεπίδρασης με τον παράγοντα p300. Συνεπιμόλυνση κυττάρων SL2 με το πλασμίδιο αναφοράς – 143 p21 luc και φορείς έκφρασης για Sp1, p300 και E1A NT ή CR3 έδειξε της αδυναμία της πρωτεΐνης E1A NT να καταστείλει τη δράση του p300 στον p21 υποκινητή, ενώ αντίθετα παρατηρήθηκε μια σημαντική καταστολή της τάξης του 60% από τη μεταλλαγμένη CR3. Τα αξιοπερίεργα αυτά αποτελέσματα συζητούνται στο κεφάλαιο «ΣΥΖΗΤΗΣΗ».

Τέλος, για να μελετηθεί ο ρόλος του παράγοντα p300 στη ρύθμιση του p21 γονιδίου από τις πρωτεΐνες Smads και c-jun/c-fos, πραγματοποιήσαμε επιμολύνσεις σε κύτταρα SL2. Στην **Εικόνα 16** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των αναλύσεών μας. Παρατηρούμε ότι παρουσία του p300, η ενεργότητα του Sp1 στον p21 υποκινητή αυξάνει κατά 1,6 φορές, παρουσία των c-jun/c-fos η ενεργότητα του Sp1 παραμένει σχεδόν αναλλοίωτη, ενώ παρουσία των Smad 3/4 αυξάνει κατά 2,5 φορές. Απουσία του Sp1 οι c-jun/c-fos και Smad 3/4 όχι μόνο δεν αυξάνουν της ενεργότητα του p21 υποκινητή, αλλά αντίθετα τη μειώνουν στην περίπτωση των c-jun/c-fos. Ακόμη και παρουσία του p300 και απουσία του Sp1 οι παράγοντες αυτοί δεν επηρεάζουν τον υποκινητή. Επομένως, οι παράγοντες αυτοί φαίνεται να δρουν μέσω του Sp1. Αν τώρα, γίνει συνεπιμόλυνση με το πλασμίδιο αναφοράς –143 p21 luc και τους φορείς έκφρασης για Sp1, p300 και



Εικόνα 15: Επίδραση των παραγόντων p300 και E1A στην μεταγραφική ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου p21 (-143/+8) παρουσία του παράγοντα Sp1. Κύτταρα SL2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς -143/+8 WAF-luc (1 µg) παρουσία ή απουσία των φορέων pPac-Sp1 (50 ng), pCMV-p300 (1 µg), pRSV-E1A (1 µg), pRSV-E1A-CR3 (1 µg) καθώς και το πλασμίδιο εξομάλυνσης hsp-LacZ (0,5 µg). Εκχυλίσματα από τα επιμολυσμένα κύτταρα αναλύθηκαν με την δοκιμασία της λουσιφεράσης. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης (\pm σταθερή απόκλιση) παρουσιάζονται με την μορφή ραβδογράμματος. Η εξομάλυνση των αποτελεσμάτων έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης.



Εικόνα 16: Επίδραση του συνενεργοποιητή p300 στην μεταγραφική ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου p21 (-143/+8) παρουσία των παραγόντων Sp1, c-Jun/c-fos και Smad3/4.. Κύτταρα SL2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς -143/+8 WAF-luc (1 µg) παρουσία ή απουσία των φορέων pPac-Sp1 (50 ng), pCMV-p300 (1 µg), pPac-c-jun (50 ng), pPac-c-fos (50 ng), pCDNA 3xmyc SMAD3 (1 µg), pCDNA 3xmyc SMAD4 (1 µg) καθώς και το πλασμίδιο εξομάλυνσης hsp-LacZ (0,5 µg). Εκχυλίσματα από τα επιμολυσμένα κύτταρα αναλύθηκαν με την δοκιμασία της λουσιφεράσης. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης (\pm σταθερή απόκλιση) παρουσιάζονται με την μορφή ραβδογράμματος. Η εξομάλυνση των αποτελεσμάτων έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης.

c-jun/c-fos ή Smad 3/4, παρατηρούμε μια αύξηση στην ενεργότητα του p21 υποκινητή. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση του c-jun/c-fos η αύξηση είναι της τάξης του 2 και στην περίπτωση των Smad 3/4 της τάξης του 3 σε σχέση την ενεργότητα του υποκινητή στην παρουσία μόνο του Sp1.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της μελέτης αυτής είναι η διαλεύκανση της μεταγραφικής ενεργοποίησης του υποκινητή του γονιδίου p21 από τον παράγοντα Sp1 και τις πρωτεΐνες SMAD, καθώς και ο ρόλος που διαδραματίζει ο παράγοντας p300 στην ενεργοποίηση αυτή. Για την επίτευξη του στόχου αυτού ακολουθήσαμε συγκεκριμένη στρατηγική. Το πρώτο βήμα ήταν η μετάλλαξη κάθε μιας από τις θέσεις Sp1 στο p21 υποκινητή. Οι μεταλλάξεις αυτές ήταν σημειακές, με σκοπό την καταστροφή των θέσεων αυτών, ώστε να μην μπορούν πλέον να δεσμεύουν Sp1. Αφού κατασκευάστηκαν οι μεταλλαγμένοι υποκινητές έπρεπε να ελέγξουμε την ικανότητα σύνδεσης των υποκινητών αυτών για Sp1, ώστε να είμαστε σίγουροι ότι δε δεσμεύουν Sp1 και τα αποτελέσματά μας να είναι αξιόπιστα. Ο έλεγχος αυτός πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας συμπλόκου σε πηκτή πουλυακρυλαμίδης, όπως περιγράφηκε νωρίτερα. Τέλος, εξετάσαμε τη δραστικότητα του p21 υποκινητή παρουσία των Sp1, Smad 3/4 και p300.

Η διαλεύκανση του μηχανισμού ρύθμισης του γονιδίου p21 είναι πολύ σημαντική. Ο ρόλος της p21 είναι πολύ σημαντικός στην βιοϊατρική, γιατί όπως είδαμε η πρωτεΐνη αυτή συμμετέχει στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και τη σύνθεση του DNA. Με βάση το μηχανισμό αυτό πιθανό να οδηγηθούμε σε δημιουργία νέων φαρμάκων έναντι καρκινικών κυττάρων. Επίσης, η διαλεύκανση των μηχανισμών ρύθμισης του p21 θα οδηγήσει πιθανά σε νέες πρωτεΐνες οι οποίες μπορούν να χρησιμεύσουν στη γονιδιακή θεραπεία.

Προτού ξεκινήσουμε τα πειράματα για την εξακρίβωση του μηχανισμού έπρεπε να βρούμε τα ελάχιστα ποσά Sp1 που απαιτούνται για τη μεταγραφική ενεργοποίηση του p21, ώστε να αποφύγουμε κορεσμό των μεταλλαγμένων υποκινητών και πιθανά ψευδή αποτελέσματα από υπερβολική ποσότητα Sp1. Δηλαδή θέλαμε όσο ήταν δυνατό να μιμηθούμε τις φυσιολογικές συγκεντρώσεις Sp1 που υπάρχουν στα HepG2. Γι' αυτό πραγματοποιήσαμε δοσοεξαρτώμενη επαγωγή του υποκινητή από Sp1 σε κύτταρα SL2. Το σύστημα αυτό προσφέρεται για τέτοιου είδους πειράματα, αφού η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά δεν περιέχει ενδογενές Sp1. Μάλιστα,

έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για μελέτη δομής και λειτουργίας του Sp1 (Courey and Tjian, 1988; Courey et al., 1989).

Στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε τη μέθοδο της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας συμπλόκου σε πηκτές πολυακρυλαμίδης για τον έλεγχο της πρόσδεσης αποκλειστικά του Sp1 στους μεταλλαγμένους υποκινητές, και όχι άλλων πρωτεϊνών. Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων αυτών χρησιμοποιήσαμε πυρηνικά εκχυλίσματα από κύτταρα SL2, στα οποία είχε εκφρασθεί η Sp1 πρωτεΐνη. Παρόμοια πειράματα με πυρηνικά εκχυλίσματα από κύτταρα HepG2 εμφανίζουν 3 ζώνες. Από αυτές μόνον η μία απομακρύνεται με τη χρήση αντισώματος έναντι του Sp1. Επομένως, οι άλλες δύο ζώνες πιθανά να είναι Sp2, Sp3. Από αυτές ο Sp3 είναι καταστολέας και ίσως να ανταγωνίζεται με τον Sp1 κάτω από διάφορες συνθήκες επαγωγής.

Επίσης, από τις πηκτές παρατηρούμε ότι ο Sp1 προσδένεται πολύ ασθενικά στη θέση Sp1-4. Πιθανόν η παράπλευρη ακολουθία νουκλεοτιδίων της Sp1-4 να επηρεάζει τη συγγένεια σύνδεσης του Sp1 στη συγκεκριμένη θέση.

Τέλος, παρατηρούμε ότι στις φωτογραφίες A και Δ, εμφανίζεται, τόσο στην περίπτωση του νουκλεοτιδίου αγρίου τύπου, όσο και στο μεταλλαγμένο, μια ζώνη μεγαλύτερης κινητικότητας από αυτή του συμπλόκου DNA-Sp1. Η εμφάνιση της ζώνης αυτής δεν παρουσίασε επαναληψιμότητα στη μελέτη μας και με επιπλέον πειράματα ελέγχου, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι αποτελεί τεχνητό προϊόν της ηλεκτροφόρησης.

Αφού ελέγξαμε και την πρόσδεση του Sp1 στον υποκινητή, θελήσαμε να εξετάσουμε την επίδραση των μεταλλάξεων στην ενεργότητα του υποκινητή απουσία και παρουσία του παράγοντα Sp1. Έτσι, όλοι οι μεταλλαγμένοι υποκινητές ενεργοποιούνται από χαμηλές συγκεντρώσεις Sp1. Πιθανόν οι υπόλοιπες θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα αυτού να υποκαθιστούν την έλλειψη της μεταλλαγμένης. Όπως, αναφέραμε η p21 είναι πολύ σημαντική στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και όχι μόνο. Επομένως, απώλεια της δράσης της από μετάλλαξη σε μια και μόνο θέση Sp1 του υποκινητή του θα εξαφάνιζε τη ρυθμιστική του δράση. Η αποκατάσταση, έστω και εν μέρει, από τις υπόλοιπες θέσεις Sp1 πιθανά να δρα ως προστατευτικός μηχανισμός για την εύρυθμη λειτουργία του κυττάρου.

Από την άλλη μεριά απουσία του Sp1 οι μεταλλαγμένοι υποκινητές έχουν μειωμένη δραστικότητα στα κύτταρα SL2. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη άλλων παραγόντων που έχουν τη δυνατότητα πρόσδεσης σε περιοχές πλούσιες σε GC και ανταγωνίζονται τον Sp1. Έτσι απουσία του τελευταίου ευνοεί την πρόσδεση των πρωτεϊνών αυτών.

Η μελέτη της εικόνας 11 μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι μετάλλαξη στη θέση Sp1-3 έχει τον πιο δραστικό φαινότυπο. Πιθανά να παίζει ρόλο η απόσταση από τη θέση TATA και τη βασική μεταγραφική μηχανή. Παρόμοια, η θέση 1 παίζει ανασταλτικό ρόλο, λόγω ακριβώς της στενής γειτνιάσής της με το κουτί TATA. Πρόσδεση του Sp1 στη θέση αυτή ίσως παρεμποδίζει την κατάλληλη σύνδεση της βασικής μεταγραφικής μηχανής.

Στο σημείο αυτό πρέπει να σταθούμε σε ένα παράδοξο που προκύπτει. Στα HepG2 τα οποία περιέχουν Sp1 ο Mut3 έχει πολύ χαμηλά επίπεδα δραστικότητας. Εξετάζοντας, όμως την εικόνα 10 βλέπουμε ότι ύπαρξη χαμηλών συγκεντρώσεων Sp1 είναι σε θέση όχι μόνο να επαναφέρει το φαινότυπο, αλλά ακόμη και να δώσει ενεργότητα μεγαλύτερη και από τον υποκινητή αγρίου τύπου. Μια λογική εξήγηση είναι ότι στα HepG2 υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του υποκινητή. Εναλλακτικά, είναι δυνατό η συγκεκριμένη θέση Sp1 να αποτελεί επιλεκτικά στόχο κάποιου σηματοδοτικού μονοπατιού (π.χ. TGF- β) το οποίο και καθορίζει τα επίπεδα δραστικότητας στα HepG2 και το οποίο μονοπάτι απουσιάζει από τα SL2.

Παρόμοια αποτελέσματα με αυτά που παρατηρήθηκαν για τα HepG2 φαίνεται να ισχύουν και για τα COS-7. Στα κύτταρα HeLa παρατηρούμε ότι πολύ σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και η θέση 5. Αυτό εξηγείται με την πιθανή ύπαρξη κάποιας πρωτεΐνης η οποία αλληλεπιδρά με τη θέση αυτή μόνο σε αυτήν την κυτταρική σειρά.

Προηγούμενες μελέτες είχαν δείξει ότι μόνον η θέση 3, η οποία και ονομάσθηκε θέση απόκρισης στον TGF- β (T β RE), έχει τη δυνατότητα να αποκρίνεται στον TGF- β . Στην εικόνα 14 παρατηρούμε ότι οι θέσεις 2, 4 και 5 είναι εξίσου σημαντικές, αφού αν καταστραφεί μίας από αυτές, τότε παρουσία των SMADs η ενεργότητα του υποκινητή δεν μπορεί ούτε καν να προσεγγίσει τα επίπεδα ενεργότητας του υποκινητή αγρίου τύπου παρουσία των SMADs. Παρατηρούμε, επίσης, ότι σε περίπτωση καταστροφής κάποιας εκ των

θέσεων πρόσδεσης του Sp1, οι υπόλοιπες δεν είναι σε θέση να αντικαταστήσουν την απώλεια. Πιθανόν, για την επαγωγή από τον TGF- β και τις πρωτεΐνες SMAD να απαιτείται σχηματισμός ενός πολυ-πρωτεϊνικού συμπλόκου στον υποκινητή p21 που απαιτεί Sp1 δεσμευμένο σε όλες τις θέσεις, ταυτόχρονα. Απώλεια έστω και μιας από αυτές οδηγεί σε αποσταθεροποίηση του συμπλόκου αυτού. Στη αποσταθεροποίηση αυτή πιθανά να οδηγεί και η θέση 1, αφού καταστροφή της όχι μόνο δε μειώνει την ενεργότητα του p21 υποκινητή, αλλά την αυξάνει.

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ο Sp1 αλληλεπιδρά με τον παράγοντα p300 *in vitro*. Η δική μας ανάλυση, η οποία εμφανίζεται στην εικόνα 15, είναι η πρώτη που δείχνει την ύπαρξη συνεργατικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο αυτών παραγόντων *in vivo*. Στη μελέτη αυτή, όπως ήδη αναφέραμε, χρησιμοποιήσαμε το πλασμίδιο αναφοράς -143WAF. Παρατηρήσαμε ότι στα κύτταρα SL2 τόσο το πλασμίδιο -2300WAF όσο και το -143WAF είχαν την ίδια ακριβώς ενεργότητα. Θεωρήσαμε, λοιπόν, ως πιο «καθαρό» το σύστημα με τη χρήση του -143WF, αφού έτσι αποφεύγουμε όλους τους παράγοντες που δρουν μέσω της περιοχής -2300/-143 του υποκινητή και μπορούμε να εστιασθούμε μόνο στη σημασία των Sp1 θέσεων.

Επίσης, για την εκτέλεση του πειράματος βλέπουμε ότι χρησιμοποιούμε το φορέα έκφρασης για p300 σε πολύ μεγαλύτερη αναλογία από ότι αυτόν για έκφραση του Sp1. Ο φορέας έκφρασης του Sp1 (pPacSp1) είναι κατάλληλος για επιμόλυνση κυττάρων εντόμων και έτσι ακόμη και σε μικρές ποσότητες είναι πολύ δραστικός. Από την άλλη, ο φορέας έκφρασης του p300 (pCMV-p300) είναι κατάλληλος για επιμόλυνση κυττάρων θηλαστικών. Ξέραμε εκ των προτέρων, λοιπόν, ότι για να εκφρασθεί στα κύτταρα SL2 απαιτούνταν μεγαλύτερες ποσότητες του.

Επίσης, είναι γνωστό ότι η πρωτεΐνη E1A αλληλεπιδρά με την p300. Υπερέκφραση της E1A σε κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα τη δέσμευση όλης της ποσότητας της p300, με αποτέλεσμα απώλεια της δράσης της (φαινόμενο γνωστό ως «squenching»). Στη δική μας περίπτωση παρατηρούμε ακριβώς το αντίθετο, το οποίο φαίνεται στη εικόνα 15. Δηλαδή, η δέσμευση της p300 παρατηρείται από την υπερέκφραση της μεταλλαγμένης p300 και όχι του αγρίου τύπου. Πιθανά η αλληλεπίδραση της E1A με την p300 να απαιτεί φυσιολογικά κάποιον τρίτο παράγοντα, ο οποίος απουσιάζει από τα κύτταρα

SL2. Η απώλεια της δράσης του p300 παρουσία της μεταλλαγμένης E1A ίσως να οφείλεται στην απορρόφηση κάποιου άλλου παράγοντα.

Για να μπορέσει, όμως, ο παράγοντας p300 να ενεργοποιήσει τον p21 υποκινητή απαιτεί την ύπαρξη Sp1. Παρομοίως, οι παράγοντες c-jun/c-fos και Smad 3/4 δεν ενεργοποιούν τον υποκινητή του p21 απουσία Sp1 ακόμη και αν υπάρχει ο παράγοντας p300. Φαίνεται, λοιπόν, ότι οι παράγοντες αυτοί δε συνδέονται άμεσα στο DNA, αλλά μόνο μέσω του Sp1. Το τελευταίο συμπέρασμα όσον αφορά τις Smads βρίσκεται σε απόλυτη συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (Pardali et al., 2000).

Παρουσία του Sp1 ο παράγοντας p300 ενεργοποιεί περαιτέρω τα σύμπλοκα Sp1/c-jun/c-fos και Sp1/Smads. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε δημιουργία συμπλόκου μεταξύ των παραγόντων αυτών στην περιοχή -122/-50 του p21 υποκινητή.

Συμπερασματικά, μπορούμε να πούμε ότι οι 5 θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα Sp1 στον p21 υποκινητή δεν είναι ισοδύναμες μεταξύ τους ως προς τη δυνατότητα ενεργοποίησης της έκφρασης του γονιδίου p21. Κάποιες από αυτές φαίνεται να συμμετέχουν περισσότερο στο φαινόμενο της ενεργοποίησης, αφού καταστροφή τους επηρεάζει σε μεγαλύτερο βαθμό την ενεργότητα του p21 υποκινητή. Εντούτοις καμία από τις θέσεις αυτές δεν είναι αποκλειστικά υπεύθυνη για την ενεργοποίηση αυτή, αφού καμιά μετάλλαξη δεν ανέστειλε τελείως την έκφραση του γονιδίου. Πιθανά αυτό να αποτελεί ένα μηχανισμό προστασίας για την εξασφάλιση της φυσιολογικής λειτουργίας του γονιδίου p21. Επίσης, δείξαμε ότι εκτός από τη θέση 3, θέση απόκρισης στις πρωτεΐνες SMADs αποτελούν και οι θέσεις 2, 4 και 5. Τέλος, εμφανίστηκαν ενδείξεις για το σχηματισμό ενός συμπλόκου στην περιοχή -122/-50 του p21 υποκινητή που ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου p21.

Οι μελλοντικές μας επιδιώξεις είναι αρκετές. Πρώτα απ' όλα είναι απαραίτητο να ελέγξουμε αν οι μεταλλάξεις που πραγματοποιήσαμε, δημιουργούν καινούριες θέσεις απόκρισης για κάποιους παράγοντες, οι οποίοι θα μπορούν πλέον να επηρεάζουν την ενεργότητα του υποκινητή και να μας δίνουν ψευδή αποτελέσματα. Αν συμβαίνει αυτό πρέπει να χαρακτηρίσουμε τους παράγοντες αυτούς.

Επίσης, βασική μας επιδίωξη αποτελεί και η διαλεύκανση της ύπαρξης του συμπλόκου που αναφέραμε. Η επιβεβαίωση της ύπαρξης ενός τέτοιου

συμπλόκου θα προέλθει από πειράματα Συγγένειας Καθίζησης DNA (DNA Affinity Precipitation Assay) και πειράματα ανοσοκαθίζησης χρωματίνης (Chromatin immunoprecipitation Assays).

Ακόμα, σκοπεύουμε να χρησιμοποιήσουμε κύτταρα από ποντίκια στα οποία έχει καταστραφεί το Sp1 (knock out) για να επιβεβαιώσουμε τη σημασία του Sp1 στη ρύθμιση του p21 υποκινητή και πιθανά να διαλευκάνουμε το ρόλο άλλων πρωτεϊνών που υποκαθιστούν τον παράγοντα Sp1 στα ζώα αυτά.

Τέλος, επιθυμούμε να μελετήσουμε και άλλα μονοπάτια μεταγωγής σήματος, εκτός του TGF-β, που εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου p21, με πρώτο του μονοπάτι του TNF-α και ,ιδιαίτερα το ρόλο του παράγοντα NF-κΒ.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Avantaggiati** M.L., Ogryzko V., Gardner K., Giordano A., Levine A.S., and Kelly K., (1997) *Cell* 89, 1175-1184
- **Bacus** S.S., Yarden Y., Oren M et al., (1996) *Oncogene* 12, 2535-2547.
- **Bash** J., Zong W.X., and Gelinas C., (1997) *Mol. Cell. Biol.* 17, 6526-6536.
- **Bates** S., Bonetta L., Macallan D., Parry D., Holder A., Dickson C., and Peters G., (1994) *Oncogene* 9, 71-79
- **Berg** J.M., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 11109-11110
- **Biggs** J.R., Kudlow J.E., and Kraft A.S., (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 901-906.
- **Billon** N., van Grunsven L.A., and Rudkin B.B., (1996) *Oncogene* 13, 2047-2054.
- **Black** A.R., Jensen D., Lin S.Y., and Azizkhan J.C., (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 1207-1215.
- **Cayrol** C., and Flemington E.K., (1996) *Embo J.* 15, 2748-2759
- **Chen** J., Jackson P.K., Kirschner M.W., and Dutta A., (1995) *Nature* 374, 386-388.
- **Chen** Y., Hata A., Lo R.S., Wotton D., Shi Y., Pavletich N., and Massague J., (1998) *Genes & Dev.* 12, 2144-2152.
- **Chin** Y.E., Kitagawa M., Su W.C.S., You Z.H., Iwamoto Y., and Fu X.Y., (1996) *Science* 272, 719-722.
- **Chinery** R., Brockman J., Peeler M.O., Shyr Y., Beauchamp R.D., and Coffey R.J., (1997) *Nature Med.* 3, 1233-1241
- **Conell-Crowley** L., Solomon M.J., Wei N. and Harper J.W. (1993). *Mol. Biol. Cell* 4,79-92
- **Courey** A.J., and Tjian (1988) *Cell* 55, 887-898
- **Courey** A.J., Douglas A., Holtzman S., Jackson P., and Tjian R., (1989) *Cell* 59, 827-836

- **Datto** M.B., Tu Y., and Wang X.F., (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 28623-28628.
- **De Bondt** H.L., Rosenblatt J., Jancarik H.D., Jones D.O., and Kim S. (1993) *Nature (London)* 363, 595-602.
- **Desai** D., Gu Y., and Morgan D.O., (1992) *Mol. Cell. Biol.* 3, 571-582.
- **Desai** D., Wessling H.C., Fischer R.P., and Morgan D.O., (1995) *Mol. Cell Biol.* 15, 345-350.
- **Dowdy S.F.**, Hinds P.W., Louis K., Reed S.I., Arnold A., and Weinberg R.A., (1993) *Cell* 73, 499-511
- **Ducommun** B., Brambilla P., Felix M., Framnza B.R., Jr, Karsenti E. and Draetta G. (1991) *EMBO J.* 10, 3311-3319.
- **Dulic** V., Lees E., and Reed S.I., (1992) *Science* 257, 1958-1961
- **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.
- **El-Deiry** W.S., Tokino T., Velculescu V.E., Levy D.B., Parsons R., Trent J.M., Lin D., Mercer E., Kinzler K.W., and 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
- **Elledge** S.J., and Harper J.W., (1994) *Cur. Opin. Cell Biol.* 6, 847-852
- **Ewen** M.E., Sluss H.K., Sherr C.J., Matsushime H., Kato J., and Livingston D.M., (1993a) *Cell* 73, 487-497.
- **Ewen** M.E., Sluss H.K., Whitehouse L.L., and Livingston D.M., (1993b) *Cell* 74, 1009-1020.
- **Fesquet** D., Labbe J., Derancourt J., Capony J., Galas S., Girard F., Lorca T., Shuttleworth J., Doree M. and Cavadore J (1993) *EMBO J.* 12, 3111-3121.
- **Firpo** E.J., Koff A., Solomon M.J., and Roberts J.M., (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14, 4889-4901.
- **Fischer** R.P. and Morgan D.O. (1994) *Cell* 78, 713-724.

- **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.
- **Gaddy-Kurten** D., Tsuchida K., and Vale W., (1995) Recent Prog. Horm. Res. 50, 109-129.
- **Gargavtsev** I., Grigorian I.A., Ossovskaya V.S., Chernov M.V., Chumakov P.M., and Gudkov A.V., (1998) Nature 391, 295-298.
- **Gartel** A.L., Goufman E., Shih H., Tevosian S.G., Yee A.S., and Tyner A.L., (1998) Oncogene 17, 3463-3469
- **Giles** R.H., Peters D.J., and Breuning M.H., (1998) Trends Genet. 14, 178-183.
- **Gill** G., Pascal E., Tseng Z.H., and Tjian R., (1994) Proc. Natl. Acad. Scvi. USA 91, 192-196.
- **Gu** Y., Rosenblatt J., and Morgan D.O., (1992) EMBO J. 11, 3994-4005.
- **Gu** Y., Turek C.W., and Morgan D.O., (1993) Nature 366, 707-710.
- **Gu** W., Shi X.L., and Roeder R.G., (1997) Nature 387, 819-823.
- **Hahn** S.A., Schutte M., Hoque A.T.M.S., Moskaluk C.A., da Costa L.T., Rozenblum E., Weinstein C.L., Fischer A., Yeo C.J., Hruban R.H., and Kern S.E., (1996) Science 271, 350-353
- **Halevy** O., Novitch B.G., Spicer D.B., Skapek S.X., Rhee J., Hannon G.J., Beach D., and Lassar A.B., (1995) Science 267, 1018-1021.
- **Han** I., and Kudlow j.E., (1997) Mol. Cell. Biol. 17, 2550-2558.
- **Harper** J.W., Adami G.R., Wei N., Keyomarsi K., and Elledge S.J., (1993) Cell 75, 805-816.
- **Harper** J.W., Elledge S.J., Keyomarsi K., Dynlacht B., Tsai L.H., Zhang P., Dobrowolski S., Bai C., Conell-Crowley L., Swindell E., Fox M.P., and Wei N., (1995) Mol. Biol. Cell 6, 387-400
- **Hatakeyama** M., Brill J.A., Fink G.R., Weinberg R.A., (1994) Genes & Dev. 8, 1759-1771.
- **Heldin** C., Miyazono H.K., and Dijke P., (1997) Nature 390, 465-471.

- **Hinds** P.W., Mitnacht S., Dulic V., Arnold A., Reed S.I., and Weinberg R.A., (1992) *Cell* 70, 993-1006.
- **Hinds** P.W., and Weinberg R.A., (1994) *Curr.Opin.Genet.Dev.* 4, 135-141
- **Hirano** F., Tanaka H., Hirano Y., Hiramoto M., Handa H., Makino I., and Scheidereit C., (1998) *Mol. Cell. Biol.* 18, 1266-1274
- **Hiyama** H., Iavarone A., and Reeves S.A., (1998) *Oncogene* 16, 1513-1523.
- **Hogan** B.L.M., (1996) *Genes & Dev.* 10, 1580-1594.
- **Kardassis** D., Papakosta P., Pardali K., and Moustakas A., (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 29572-29581.
- **Kato** J., Matsushime H., Hiebert S.W., Ewen M.E., and Sherr C.J. (1993) *Genes and Dev.* 7, 331-342.
- **Kato** J., Matsuoka M., Polyak K., Massague J. and Sherr C.J. (1994). *Cell* 79, 487-496
- **Kingsley** D.M., (1994) *Genes & Dev.* 10, 16-21
- **Koff** A., Cross F., Fischer A., Schumacher J., Leguellec K., Phillippe M., Roberts J.M (1991) *Cell* 66, 1217-1228.
- **Koff** A., Giordano A., Desai D., Yamashita K., Harper J.W., Elledge S., Nishimoto T., Morgan D.O., Franza B.R., and Roberts J.M., (1992) *Science* 257, 1689-1694.
- **Lania** L., Majello B., and De Luca P., (1997) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 1313-1323.
- **Lee** J.S., Galvin K.M., and Shi Y., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6145-6149
- **Lee** S.J., Ha M.J., Lee J., Nguyen P.M., 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
- **Lew D.J.**, Dulic V., Reed S.I. (1991) *Cell* 66, 1197-1206.
- **Li** J.M., Datto M., Shen X., Hu P., Yu Y., and Wang X.F., (1998) *Nucleic Acids Res.* 26, 2449-2456
- **Li** R., Waga S., Hannon G.J., Beach D., and Stillman B., (1994) *Nature* 371, 534-537.

- **Li Y.**, Jenkins C.W., Nichols M.A., and Xiong Y., (1994) *Oncogene* 9, 2261-2268.
- **Lill N.L.**, Grossman S.R., Ginsberg D., DeCaprio A. and Livingston D.M., (1997) *Nature* 387, 823-827
- **Lin S.Y.**, Black A.R., Kostic D., Pajovic S., Hoover C.N., and Azizkhan J.C., (1996) *Mol. Cell. Biol.* 16, 1668-1675.
- **Linke S.P.**, Clarkin K.C., Di Leonardo A., Tsou A., and Wahl G.M., (1996) *Genes Dev.* 10, 934-947.
- **Liu M.**, Iavarone A., and Freedman L.P., (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 31723-31728.
- **Liu M.**, Lee M.H., Cohen M., Bommakanti M., and freedman (1996) *Genes Dev.* 10, 142-153.
- **Lukas J.**, Muller H., Bartkova J., Spitkovsky D., Kjerulff A.A., Jansen-Durr P., Strauss M., and Bartek J., (1994) *J. Cell Biol.* 125, 625-638
- **Luo Y.**, Hurwitz J., and Massague J., (1995) *Nature* 375, 159-161.
- **Macleod K.**, Sherry N., Hannon G., Beach D., Tokino T., Kinzler K., Vogelstein B., and Jacks T (1995) *Genes Dev.* 9, 935-944.
- **Makela T.P.**, Tassan J.P., Nigg E.A., Frutiger S., Hughes G.J. and Weinberg R.A. (1994) *Nature (London)* 371, 254-257.
- **Marin M.**, Karis A., Visser P., Grosveld F., and Philipsen S., (1997) *Cell* 89, 619-628
- **Massague J.**, (1990) *Ann. Rev. Cell. Biol.* 6, 597-641
- **Massague J.**, (1998) *Annu. Rev. Biochem.* 67, 753-791.
- **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
- **Matsuoka M.**, Kato J., Fischer R.P., Morgan D.O. and Scherr C.J (1994). *Mol. Cell. Biol.* 14, 7265-7275
- **Matsushime H.**, Roussel M.F., Ashmun R.A., Sherr C.J. (1991) *Cell* 65, 701-713.
- **Matsushime H.**, Ewen M.E., Strom D.K., Kato J.Y., Hanks S.K. Roussel M.F., and Sherr C.J., (1992) *Cell* 71, 323-334.

- **Matsushime** H., Quelle D.E., Shurtleff S.A., Shibuya M., Sherr C.J., and Kato J. (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14, 2066-2076.
- **Matthias** P. and Ira H. (1994) *Cell* 79, 181-184
- **Mehler** M.F., Mabie P.C., Zhang D., and Kessler J.A., (1997) *Trends Neurosci.* 20, 309-317
- **Meyerson** M., and Harlow E., (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14, 2077-2086
- **Missero** C., Calautti E., Echner R., Chin J., Tsai L., Livingston D., and Dotto G.P., (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5451-5455.
- **Morgan** D.O. and De Bondt H.L., (1994) *Curr. Opin Cell Biol.* 6, 239-246.
- **Moustakas** A., and Kardassis D., (1998) *Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6733-6738
- **Mutoh** H., Naya F.J., Tsai M.J., and Leiter A.B., (1998) *Genes Dev.* 12, 820-830.
- **Naar** A.M., Beurang P.A., Robinson K.M., Oliner J.D., Avizonis D., Sheek S., Zwicker J., Kadonaga J.T., and Tjian R., (1998) *Genes Dev.* 12, 3020-3031.
- **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
- **Namba** H., Hara T., Tukazaki T., Migita K., Ishikawa N., Ito K., Nagataki S., and Yamashita S., (1995) *Cancer Res.* 55, 2075-2080.
- **Nevins** J.R., (1992) *Science* 258, 424-429
- **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.
- **Ohtsubo** M., and Roberts J.M., (1993) *Science* 259, 1908-1912.

- **Ohtsubo** M., Theodoras A.M., Schumacher J., Roberts J.M., and Pagano M., (1995) *Mol. Cell. Biol.* 15, 2612-2624.
- **Owen** G.I., Richer J.K., Tung L., Takimoto G., and Horwitz K.B., (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 10696-10701.
- **Pardali** K., Kurisaki A, Moren A, ten Dijke P, Kardassis D, and Moustakas A., (2000) *J Biol Chem.* 275, 29244-29256
- **Poon** R.Y.C., Yamashita K., Adamczewski J.P., Hunt T. and Shuttleworth J (1993) *Cancer Res.* 55,1211-1214.
- **Prabhu** S., Ignatova A., Park S.T., and Sun X.H., (1997) *Mol. Cell. Biol.* 17, 5888-5896.
- **Prowse** D.M., Bolgan L., Molnar A., and Dotto G.P., (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 1308-1314
- **Puri** P.L., Avantaggiati M.L., Balsano C., Sang N., Graessmann A., Giordano A., and Levrero M., (1997) *EMBO J.* 16, 369-383
- **Quelle** D.E., Ascmun R.A., Shurtleff S.A., Kato J., Bar-Sagi D., Rousell M.F., and Sherr C.J., (1993) *Genes and Dev.* 7, 1559-1571.
- **Ravitz** M.J. and Wenner C.E (1997) *Adv. Cancer Res.* 165-207.
- **Resnitzky** D., Gossen M., Bujard H., and Reed S.I., (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14, 1669-1679.
- **Roberts** A.B., and Sporn M.B., (1990) *Peptide growth factors and their receptors*, 419-472.
- **Saluja** D., Vassallo M.F., and Tanese N., (1998) *Mol. Cell. Biol.* 18, 5734-5743.
- **Serrano** M., Lin A.W., McCurrach M.E., Beach D., and Lowe S.W., (1997) *Cell* 88, 593-602.
- **Sheikh** M.D., Li X., Chen J., Shao Z., Ordonez J.V., and Fontana J.A., (1994) *Oncogene* 9, 3407-3415.
- **Sherr** C.J. (1993) *Cell* 79, 551-555
- **Sherr** C.J. (1994) *Trends Cell Biol.* 4, 15-18
- **Sherr** C.J., and Roberts J.M., (1995) *Genes & Dev.* 9, 1149-1163
- **Shivji** C.J., (1993) *Curr. Biol.* 4, 1062-1068.

- **Smith** R.C., Branellec D., Gorski D.H., Guo K., Perlman H., Dedieu J.F., Pastore C., Mahfoudi A., Deneffe P., Isner J.M., and Walsh K., (1997) *Genes Dev.* 11, 1674-1689.
- **Solomon** M.J., Lee T., and Kirschner M.W., (1992) *Mol. Cell Biol.* 3, 13-27.
- **Solomon** M.J., Harper J.W. and Shuttleworth J. (1993) *EMBO J.* 12,3133-3142.
- **Somasundaram** K., Zhang H., Zeng Y.X., Houvras Y., Peng Y., 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
- **Tam** S.W., Theodoras A.M., Shay J.W., Draetta G.F., and Pagano M., (1994) *Oncogene* 9, 2663-2674.
- **Tanaka** N., Ishihara M., Lampier M.S., Nozawa H., Matsuyama T., Mak T.W., Aizawa S., Tokino T., Oren M., and Taniguchi T., (1996) *Nature* 382, 816-818.
- **Timchenko** N.A., Wilde M., Nakanishi M., Smith J.R., and Darlington G.J., (1996) *Genes Dev.* 10, 804-815.
- **Timchenko** N.A., Harris T.E., Wilde M., Bilyeu T.A., Burgess-Beusse B.L., Finegold M.J., and Darlington G.J., (1997) *Mol. Cell Biol.*, 17, 7353-7361.
- **Udvardia** A.J., Templeton D.J., and Horowitz J.M., (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 3953-3957.
- **van den Heuvel**, S., and Harlow E., (1993) *Science* 262, 2050-2054.
- **Warbrick** E., Lane D.P., Glover D.M., and Cox L.S., (1995) *Curr. Biol.* 5, 275-282.
- **Wiman** K.G., (1997) *Exp. Cell. Res.* 237, 14-18.
- **Wrana** J.L., Attisano L., Wieser R., Ventura F., and Massague J., (1994) *Nature* 370, 341-347.
- **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** G.Z., and Ziff E.B., (1997) *J. Neurosci.* 17, 6122-6132.
- **Zeng** Y.X., Somasundaram K., and El-Deiry W.S., (1997) *Nat. Gen.* 15, 78-82
- **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** H., Somasundaram K., Peng Y., Tian H., Zhang H., Bi D., Weber B.L., and El-Deiry W.S., (1998) *Oncogene* 16, 1713-1721.