



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
Τμήμα Ιατρικής

UNIVERSITY OF CRETE
Faculty of Medicine



Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών
«Κυτταρική κα Γενετική Αιτιολογία,
Διαγνωστική και Θεραπευτική των Ασθενειών του Ανθρώπου»

Graduate Program
“The molecular basis of
human diseases”

Μεταπτυχιακή διατριβή

**Μεταγραφική ρύθμιση του γενετικού τύπου
μίας κυτοκίνης και του υποδοχέα της μέσω
χρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων**

Δεληγιάννη Χρυσούλα

Υπεύθυνος ερευνητής: Σπηλιανάκης Χαράλαμπος
Υπεύθυνος καθηγητής: Παπαματθαϊάκης Ιωσήφ

Ηράκλειο 2008

*Μείνε πιστός στα όνειρα
της νιότης σου . . .*

Σίλλερ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
2.1 Οι ιντερφερόνες	6
2.2 Ιντερφερόνη γ (IFNγ)	8
2.3 Διαφοροποίηση των CD4+ T	9
2.4 Ο γενετικός τύπος και τα ρυθμιστικά στοιχεία της	11
2.5 Έσω-διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις και μεταγραφική ρύθμιση	13
2.6 Στόχος	14
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	15
4. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ	26
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	28
5.1 Διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων και έκφραση των IL4, IFNγ, IFNγR1 και IFNγR2	28
5.2 Πυρηνικός εντοπισμός των γενετικών τύπων IFNγ, IFNγR1 και IFNγR2	29
5.3 Λειτουργική σημασία των αλληλεπιδράσεων	33
5.4 Επιβεβαίωση των αλληλεπιδράσεων με ACT	34
5.5 Χρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις και υπο-πυρηνικά Οργανίδια	38
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	39
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	42

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος και η ανοσολογική απάντηση του ξενιστή στις μικροβιακές μολύνσεις, βασίζεται στη μεταγραφική ενεργοποίηση και τη σίγηση ποικίλων γονιδίων. Χρησιμοποιώντας τα CD4+ T λεμφοκυττάρων βοηθούς, εστιαστήκαμε στη μελέτη της μεταγραφικής ρύθμισης των γενετικών τόπων της Ιντερφερόνης γ (IFN γ , χρωμόσωμα ποντικού 10), του υποδοχέα 1 της Ιντερφερόνης, (IFN γ R1, χρωμόσωμα ποντικού 10) και του υποδοχέα 2 της Ιντερφερόνης (IFN γ R2, χρωμόσωμα ποντικού 16). Ο στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της συρρύθμισης στο γενωμικό επίπεδο των γονιδίων μίας κυτοκίνης και των υποδοχέων της. Πειράματα DNA-FISH έδειξαν ότι υπάρχει μια μονοαλληλική αλληλεπίδραση των γενετικών τόπων της IFN γ και του IFN γ R1 στους κυτταρικούς τύπους όπου τα παραπάνω γονίδια εκφράζονται, όπως στα άωρα και στα TH1 CD4+ T λεμφοκύτταρα. Επιπλέον, οι γενετικοί τόποι της IFN γ και του IFN γ R2 συνεντοπίζονται στα TH2 κύτταρα. Ο έλεγχος της έκφρασης των IFN γ και IFN γ R1 γονιδίων στο επίπεδο του ενός κυττάρου, φανέρωσε ότι η IFN γ εκφράζεται και από τα δύο αλληλόμορφα στα TH1 κύτταρα, ενώ ο IFN γ R1 μόνο από το ένα αλληλόμορφο στα άωρα και στα TH1 κύτταρα και πιο συγκεκριμένα από εκείνο που συνεντοπίζεται με το αλληλόμορφο της IFN γ . Συνεπώς, η προσέγγιση των παραπάνω (IFN γ και IFN γ R1) γενετικών τόπων έχει λειτουργική σημασία στη μεταγραφή τους, στους κυτταρικούς τύπους που πρόκειται να εκφράσουν τα παραπάνω γονίδια. Επιπρόσθετα, πειράματα ACT (Associated Chromosome Trap) στα οποία χρησιμοποιήθηκε ως 'δόλωμα' η περιοχή του υποκινητή του IFN γ R1, έδειξαν διαφορετικό πρότυπο αλληλεπιδρώντων κομματιών ανάμεσα στα άωρα TH1 και TH2 κύτταρα. Τέλος, έγινε μία προσπάθεια ελέγχου του υπο-πυρηνικού οργανιδίου στο οποίο λαμβάνουν χώρα οι αλληλεπιδράσεις, με κύριο υπονήφιο τα μεταγραφικά εργοστάσια της RNA πολυμεράσης II (RNA PolII factories). Στο μέλλον, η χρήση βιοχημικών πειραματικών διαδικασιών θα μας βοηθήσει να ταυτοποιήσουμε τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα που μεσολαβούν στη δημιουργία και διατήρηση αυτών των εσω- και δια-χρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων.

The development of the immune system and the host response to microbial infections rely on the activation and silencing of numerous, differentially expressed genes. Utilizing an in vivo immunological system, namely the differentiation of the naïve CD4+ helper T cells in T(helper)H1 and TH2 cells, we focused on the transcriptional regulation of interferon gamma (IFN γ , m.chr. 10), interferon gamma receptor 1 (IFN γ R1, m. chr.10) and interferon gamma receptor 2 (IFN γ R2, m. chr.16) genomic loci. Our goal was to investigate the hypothesis that a cytokine or a ligand and its receptors are co-regulated in the genomic level. DNA-FISH experiments revealed that the IFN γ and IFN γ R1 loci

are in close proximity in cell types that they are expressed such as Naïve and TH1 CD4⁺ cells, in a monoallelic manner, but they are apart in TH2 cells, where they are not expressed. Additionally, IFN γ and IFN γ R2 loci colocalize in Th2 cells. The expression profile of IFN γ and IFN γ R1 genes in the single cell level, performing RNA FISH experiments, demonstrated that IFN γ is expressed biallelically, in TH1 restimulated cells, whereas IFN γ R1 is expressed in Naïve and TH1 cells, solely from the allele that colocalizes with the IFN γ locus. Therefore, we showed that the physical approach of the two loci has a functional significance, in cell types which are developmentally predisposed or determined to express these genes. Moreover, ACT (Associated Chromosome Trap) experiments using the promoter region of IFN γ R1 showed a different pattern of interacting fragments between Naïve, TH1 and TH2 cells. Finally, it was hypothesized that the subnuclear compartment that IFN γ -IFN γ R1 interaction takes place is an RNA PolII factory, suggesting a role for this subnuclear compartment in the transcriptional regulation of these genetic loci. Further investigation utilizing biochemical approaches will help us identify the protein complexes that mediate this type of intra- and inter-chromosomal interactions.

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

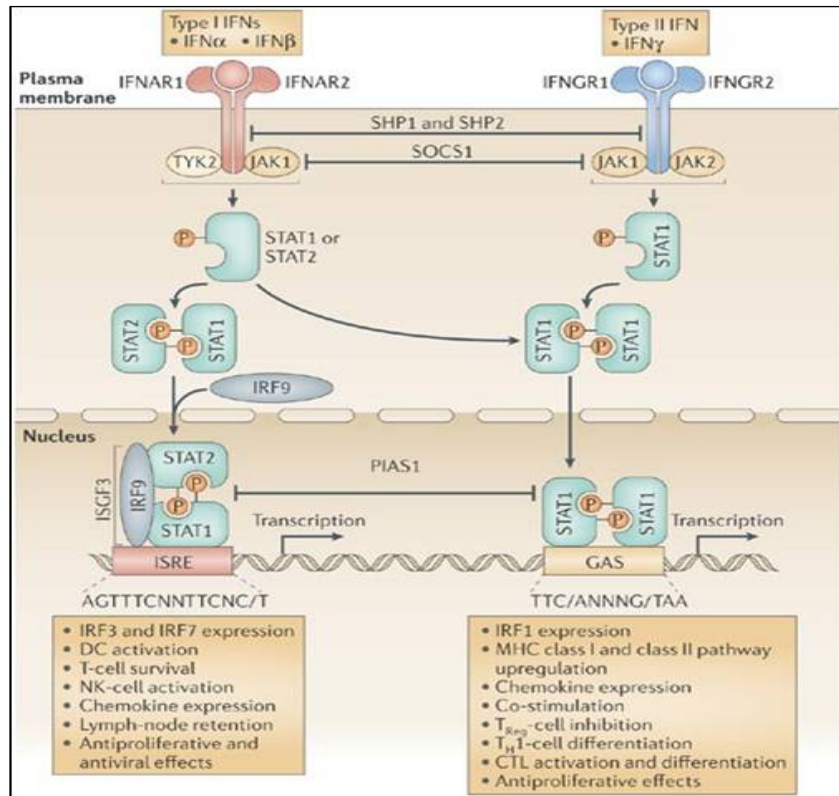
Μηχανισμοί για την άμυνα του ξενιστή ενάντια στους παθογόνους μικροοργανισμούς υπάρχουν σε όλους τους πολυκύτταρους οργανισμούς, σε διάφορες μορφές. Όλες οι αμυντικές διαδικασίες συνθέτουν το ανοσοποιητικό σύστημα. Στα σπονδυλωτά, το ανοσοποιητικό σύστημα διαιρείται σε δύο κατηγορίες: στην έμφυτη (innate) και την επίκτητη (adaptive) ανοσία. Ο διαχωρισμός αυτός είναι λειτουργικός, αφού οι παραπάνω μηχανισμοί χρησιμοποιούν διαφορετικά συστατικά του συστήματος και στρατολογούνται για την αντιμετώπιση διαφορετικών μικροοργανισμών. Η έμφυτη ανοσία δρα στην πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στους μολυσματικούς εισβολείς, ενώ η επίκτητη ενεργοποιείται όταν η πρώτη δεν είναι αρκετή για να προφυλάξει πλήρως τον οργανισμό ή /και παραβιάζεται. Η επίκτητη ανοσία αναπτύσσεται ειδικά ενάντια στο αντιγόνο και έχει την ικανότητα της εξειδίκευσης, της προσαρμογής και της μνήμης (Abbas, 2007).

2.1 Οι ιντερφερόνες

Το ανοσοποιητικό σύστημα των σπονδυλωτών αποτελείται από ένα αριθμό διαφόρων οργάνων και κυττάρων, τα οποία έχουν εξελιχθεί ώστε να αναγνωρίζουν και να καταπολεμούν ειδικά και με ακρίβεια κάθε ξένη ουσία, που καλείται αντιγόνο. Σημαντικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού έχουν και διάφορα διαλυτά μόρια που μπορούν και συμμετέχουν στην ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων, μέσω κατάλληλης σηματοδότησης. Μία κατηγορία τέτοιων μορίων είναι οι ιντερφερόνες (interferons-IFNs), των οποίων η ανακάλυψη χρονολογείται το 1957, οπότε και θεωρήθηκαν ως παράγοντες, ικανοί για την παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού των ιών (Isaacs and Lindenmann, 1957). Η σημασία τους στην προστασία του οργανισμού είναι μεγάλη, αφού, όπως αναφέρθηκε, αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στην ιική μόλυνση. Ο ρόλος τους ενισχύεται, με τη δυνατότά τους να αναστέλουν την κυτταρική ανάπτυξη, να ελέγχουν την απόπτωση και να παρουσιάζουν ανοσορυθμιστικές ιδιότητες, επηρεάζοντας έτσι, όλες τις φάσεις των έμφυτων και επίκτητων ανοσολογικών μηχανισμών (Stark et al., 1998).

Οι ιντερφερόνες ανήκουν σε μία πολυγονιδιακή οικογένεια η οποία έχει χωριστεί σε τρεις κατηγορίες και έχουν προκύψει οι τύπου I, τύπου II και τύπου III ιντερφερόνες. Οι τύπου I IFNs περιλαμβάνουν τις IFN- α , - β , - ω , - ϵ , - κ , καθώς και τις IFN- δ , - τ και - λ (limitin), παρόλο που οι τελευταίες έχουν ανιχνευτεί μόνο στα γουρούνια, τα μυρικαστικά και τα ποντίκια, αντίστοιχα. Τα παραπάνω μόρια, εκφράζονται στα κύτταρα που έχουν μολυνθεί με ιό και επάγουν μία αντιική απόκριση στα υγιή κύτταρα (Takaoka and Yanai, 2006). Η μεταγωγή του σήματος στα κύτταρα γίνεται μέσω της αλληλεπίδρασής τους με έναν ετεροδιμερή υποδοχέα, που αποτελείται από δύο υπομονάδες, την IFN α R-1 και την IFN α R-2 και την ενεργοποίηση του Jak/STAT μονοπατιού. Οι περισσότερες μελέτες στις τύπου I ιντερφερόνες έχουν πραγματοποιηθεί κυρίως

πάνω στις IFN- α και β , οι οποίες εκτός των άλλων, έχουν και θεραπευτικές ιδιότητες, αφού μπορούν να καταστείλουν με έμμεσο ή άμεσο τρόπο καρκινικούς όγκους (Parmar and Plataniias, 2003). Ακόμα, έκφραση των τύπου I ιντερφερονών, έχει παρατηρηθεί σε χαμηλά επίπεδα σχεδόν σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, παρόλα αυτά, τα κύτταρα της αιμοποιητικής σειράς είναι οι βασικοί παραγωγοί των IFN- α και ω , ενώ οι ινοβλάστες της IFN- β (Bach et al., 1997).



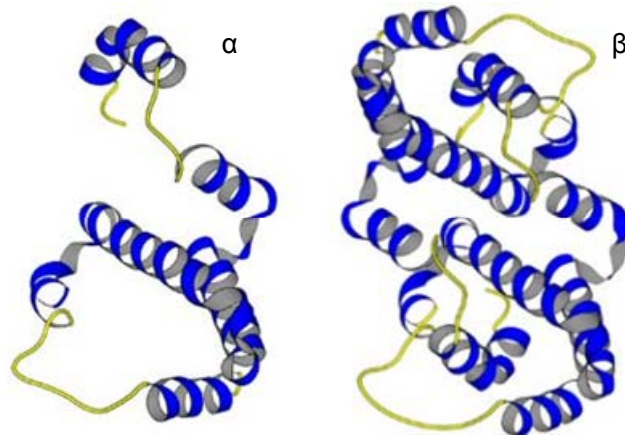
Εικόνα 1: Μονοπάτι σηματοδότησης των τύπου I και τύπου II ιντερφερονών.

Η τύπου II κατηγορία περιλαμβάνει ένα μόνο μέλος, την IFN- γ . Αυτή η κυτοκίνη εκφράζεται έντονα στα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα και NK κύτταρα, αλλά όχι στα μολυσμένα με ιό κύτταρα. Η σηματοδότηση της IFN- γ , μέσω του υποδοχέα της (IFN γ R-1-IFN γ R-2), είναι ουσιαστική για την ενεργοποίηση των μακροφάγων και την αποτελεσματική αντιμετώπιση των ενδοκυττάρων παθογόνων μικροοργανισμών, όπως το *Mycobacterium* και η *Listeria*, καθώς επίσης και για την ανάπτυξη των CD8⁺ κυττάρων και την διαφοροποίηση των CD4⁺ προς T κύτταρα βοηθούς (Th1) (Ikeda et al., 2002).

Πρόσφατα ανακαλύφθηκαν από δύο διαφορετικές επιστημονικές ομάδες οι IFN- λ ή IL-28/29, που ανήκουν στις τυπου III ιντερφερόνες (Kotenko et al., 2003; Sheppard et al., 2003). Στον άνθρωπο, υπάρχουν τρεις ομόλογες πρωτεΐνες, οι IFN- λ 1-3 ενώ στον ποντικό υπάρχουν δύο, η IFN- λ 2 και η IFN- λ 3 (Bartlett et al., 2005). Όμοια με τις τύπου I, οι τύπου III ιντερφερόνες επάγονται έπειτα από ιική μόλυνση και έχουν αντική δράση, ενεργοποιώντας τα IFN-επαγόμενα γονίδια, μέσω του ISGF3 (IFN-stimulated gene factor 3) συμπλόκου. Βέβαια διαφέρουν από τις τύπου I, καθώς έχουν διαφορετική δομή και χρησιμοποιούν άλλον υποδοχέα, το ετεροδιμερές IFN- λ R1 και IL-10R2.

2.2 Ιντερφερόνη γ (IFN γ)

Τόσο το ανθρώπινο όσο και το ποντικίσιο IFN γ γονίδιο κωδικοποιούν ένα 1.2 kb mRNA το οποίο κωδικοποιεί μία πολυπεπτιδική αλυσίδα 166 και 134 αμινοξέων αντίστοιχα (Boehm et al., 1997). Η IFN γ πρωτεΐνη αποτελείται από δύο όμοιες πολυπεπτιδικές αλυσίδες που είναι ενωμένες μεταξύ τους και είναι διατεταγμένες αντιπαράλληλα (Bach et al., 1997). Το διμερές αυτό, είναι βιολογικά ενεργό, πιθανότατα διότι είναι η μόνη στερεοδιάταξη του μορίου που είναι ικανή να επάγει τον διμερισμό του υποδοχέα της IFN γ και κατά συνέπεια να γίνει η μεταγωγή του σήματος (Schreiber and Farrar, 1993).



Εικόνα 2: Δομή της IFN γ : α) Το μονομέρες της ανθρώπινης IFN γ πρωτεΐνης αποτελείται από 6 α -έλικες, β) Δύο α -έλικες ενώνονται αντιπαράλληλα και περιελίσσονται η μία με την άλλη, δημιουργώντας το διμερές.

Το μονοπάτι της σηματοδότησης ξεκινά με την πρόσδεση του ομοδιμερούς IFN γ στις δύο α αλυσίδες του υποδοχέα., οπότε και επάγεται ο διμερισμός τους και ακολουθεί η στρατολόγηση των δύο β αλυσίδων στο παραπάνω σύμπλοκο. Κάθε αλυσίδα είναι συνεχώς ενωμένη με μία συγκεκριμένη Janus κινάση (JAK) (η α αλυσίδα με την JAK1 και η β αλυσίδα με την JAK2) (Igarashi et al., 1994). Η γεινίαση των συστατικών του υποδοχέα έχει ως αποτέλεσμα οι ανενεργές JAK να έρχονται κοντά και να ενεργοποιούν η μία την άλλη μέσω διαδοχικής αυτο- και δια-φωσφορυλίωσης. Στη συνέχεια, οι JAKs φωσφορυλιώνουν τον IFN γ R1 σε ένα συγκεκριμένο αμινοξικό κατάλοιπο κοντά στο C τελικό άκρο του, το οποίο αποτελεί σημείο πρόσδεσης του STAT1 (μεταγωγός σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής 1) (Heim et al., 1995). Έπειτα σπό την στρατολόγησή του, ο STAT1 φωσφορυλιώνεται στην τυροσίνη 701 από τις κινάσες JAK, ενεργοποιείται, φεύγει από τον υποδοχέα και σχηματίζει ομοδιμερή (Greenlund et al., 1995). Κατόπιν μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου προσδένεται σε συγκεκριμένες DNA αλληλουχίες, που είναι γνωστές ως GAS (gamma-activated site) και ρυθμίζει την ενεργοποίηση ή την καταστολή των γονιδίων που ρυθμίζονται από IFN γ (Darnell et al., 1994).

Εκτός από το JAK/STAT μονοπάτι μεταγωγής σήματος, υπάρχουν και άλλα μονοπάτια, τα οποία έχει δειχθεί ότι ενεργοποιούνται με IFN- γ , αλλά ο ρόλος τους στην ενεργοποίηση IFN- γ -ρυθμιζομένων γονιδίων δεν έχει μελετηθεί σε βάθος. Ανάμεσα στις πρωτεΐνες που ενεργοποιούνται περιλαμβάνονται οι Pyk2 και ERK1/2 που ανήκουν στην κατηγορία των MAPK (mitogen activated protein kinases), η κινάση τυροσίνης Fyn, της οικογένειας των Src-κινασών, τα

συνοδά μόρια c-Cbl, CrkL και Vav, και οι φωσφατάσες τυροσίνης SHP-1 και SHP-2 (Ramana et al., 2002). Επιπλέον, η IFN β και η IFN γ επάγουν τη φωσφορυλίωση της Akt κινάσης, στο μονοπάτι της κινάσης PI-3K (phosphatidylinositol 3-kinase), ανεξάρτητα από τον STAT1 και αναστολή της σηματοδότησης μέσω PI-3K, αποτρέπει την IFN γ -επαγόμενη πρόσδεση των μονοκυτάρων (Navarro et al., 2003).

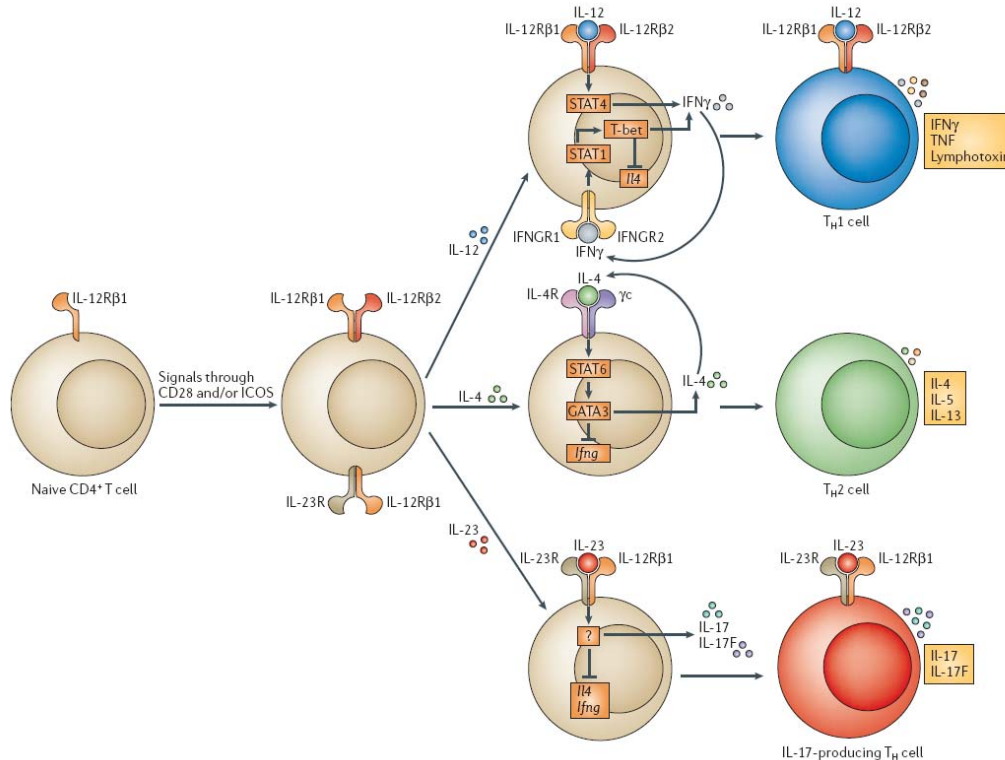
Η IFN- γ είναι απαραίτητη τόσο για την έμφυτη όσο και για την κυτταρική ανοσία ενάντια στα ενδοκυττάρια βακτήρια και ιούς. Εκφράζεται σε πολλά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως στα ενεργοποιημένα κύτταρα φυσικοί-φονιάδες (NK), τα CD4⁺ T κύτταρα βοηθοί 1, τα CD8⁺ κυτταροροξικά, τα δενδριτικά και τα T κύτταρα φυσικοί-φονιάδες (NKT). Γενετικές ανωμαλίες στο IL-12/IL-23/ IFN- γ μονοπάτι, στους ανθρώπους, έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη επαγωγή IFN- γ ή ανεπαρκή σηματοδότηση και έχει συσχετιστεί με αυξημένη επιδεκτικότητα σε μολύνσεις από μυκοβακτήρια (Filipe-Santos et al., 2006). Σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια, που δεν γίνεται επαγωγή σήματος, παραγωγή ή και απάντηση στην IFN- γ , παρουσιάζουν και αυτά μεγάλη ευαισθησία σε μολύνσεις από ενδοκυττάρια βακτήρια, συμπεριλαμβανομένων των μυκοβακτηρίων, της *Salmonella*, της *Listeria*, ενδοκυττάρων πρωτοζώων και ορισμένων ιών (Schoenborn and Wilson, 2007).

Υπολογίζεται ότι η IFN- γ ρυθμίζει την έκφραση εκατοντάδων γονιδίων σε πολλούς κυτταρικούς τύπους (Ramana et al., 2002) και η χρήση των DNA μικροσυστοιχιών αποδείχθηκε ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο για την ανάλυση του προτύπου έκφρασης, σε κύτταρα που έχουν επωαστεί με IFN- γ . (Ehrt et al., 2001). Έτσι φαίνεται ότι συμμετέχει στην επαγωγή της μεταγραφής διαφόρων γονιδίων όπως του iNOS (inducible nitric oxide synthase) που εμπλέκεται στην εξάλειψη των βακτηρίων από τα μακροφάγα, των μεταγραφικών παραγόντων IRF-1 (interferon regulatory factor-1), IRF-9, IRF-8/ICSBP, και CIITA (MHC class II transactivator), SOCS-1 (suppressor of cytokine signalling-1), των TAP1 και TAP2 (transporters associated with antigen presentation) που είναι μόρια ενεχόμενα στο μονοπάτι αντιγονοπαρουσίασης των MHC (μείζον σύμπλοκο ιστοσυμβατότητας) ταξης II, καθώς και διαφόρων χημοκινών (Decker et al., 2002; Shtrichman and Samuel, 2001). Ακόμα, υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων, τα οποία καταστέλλονται από την IFN- γ , συμπεριλαμβανομένων και γονιδίων του κυτταρικού κύκλου (κυκλίνες D και A και CDC25A) και μεταλλοπρωτεϊνών (matrix metalloproteases) (Ramana et al., 2000).

2.2 Διαφοροποίηση των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων

Κεντρικό ρόλο στις ανοσολογικές αποκρίσεις σε συγκεκριμένους παθογόνους μικροοργανισμούς έχει η διαφοροποίηση των CD4⁺ λεμφοκυττάρων προς διαφοροποιημένα T δραστικά κύτταρα. Έτσι λοιπόν, τα άωρα (naïve) T κύτταρα μπορούν να ακολουθήσουν τρεις διαφορετικές κατευθύνσεις και να παράγουν τα T-βοηθητικά 1 (T helper 1, Th1), τα T-βοηθητικά 2 (Th2) και τα T-βοηθητικά 17 (Th17) κύτταρα, τα οποία διαφέρουν ως προς τις κυτοκίνες που παράγουν και ως προς τη δράση τους. Τα Th1 κύτταρα παράγουν κυρίως IFN γ και συμμετέχουν στην αποτελεσματική καταπολέμηση των ιών και των

ενδοκυττάρων παθογόνων. Τα Th2 παράγουν IL-4, IL-5 και IL-13, δρώντας στην χημική ανοσία ενάντια στους εξωκυττάρους μικροοργανισμούς. Επιπρόσθετα, ο πρόσφατα ταυτοποιημένος πληθυσμός των TH17 κυττάρων παράγει μεγάλες ποσότητες προ-φλεγμονοδών κυτοκινών, όπως IL-17α και



Εικόνα 3: Μοντέλο διαφοροποίησης των CD4+ T λεμφοκυττάρων. Το περιβάλλον των κυτοκινών είναι αυτό που τελικά καθορίζει την κατεύθυνση της διαφοροποίησης και το πρότυπο έκφρασης των κυτοκινών στα Th1, Th2 και Th17 κύτταρα.

IL17F, και φαίνεται να έχει αντιβακτηριακή δράση. Δυσλειτουργία των παραπάνω κυτταρικών τύπων έχει συνδυαστεί με διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως σε καρκίνους και σε αυτοάνοσα νοσήματα (π.χ. αρθρίτιδα, φλεγμονώση κοιλίτιδα, αλλεργίες κλπ) (Cooke, 2006)

Η απόφαση που καθορίζει την κατεύθυνση της διαφοροποίησης επηρεάζεται από τα σήματα που δέχονται τα άωρα CD4+ λεμφοκύτταρα από το περιβάλλον τους. Έπειτα από την ενεργοποίησή τους από κάποιο αντιγόνο, τα κύτταρα επαγγελματίες αντιγονοπαρουσιαστές (APCs) ενεργοποιούν τα άωρα CD4+ κύτταρα, αλληλεπιδρώντας με τον υποδοχέα των T κυττάρων (TCR) και το συνενεργοποιητικό μόριο CD28 και ταυτόχρονα παράγουν IL-12. Η σηματοδότηση μέσω IL-12 έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα STAT4, ο οποίος οδηγεί στην έκφραση της IFN γ . Η IFN γ , δρώντας αυτοκρινώς και μέσω του STAT1, επάγει την έκφραση του T-bet. Ο τελευταίος είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας ειδικός για τα Th1 κύτταρα ο οποίος συμμετέχει στη μεταγραφική ενεργοποίηση μιας πληθώρας Th1- εκφραζόμενων γονιδίων και κυρίως της IFN γ , ενώ ταυτόχρονα σε συνεργασία με τον Runx3 προσδένεται στον ενισχυτή του IL-4 γονιδίου για να καταστείλει την έκφρασή του (Djuretic et al., 2007).

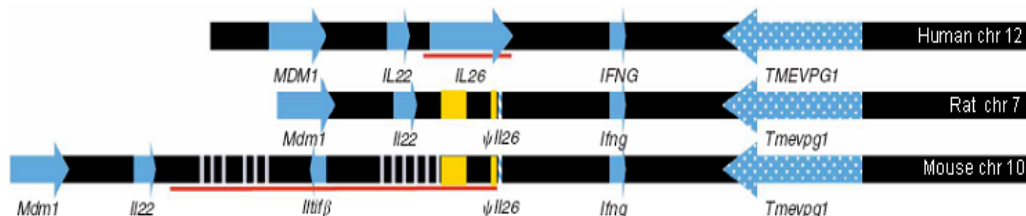
Η διαφοροποίηση των Th2 λεμφοκυττάρων ξεκινά με τη σηματοδότηση μέσω ιντερλευκίνης 4 (IL-4) και STAT6 και επαγωγής του Th2 ειδικού

μεταγραφικού παράγοντα GATA-3 (Zheng and Flavell, 1997). Παρόλο που το αρχικό σήμα για τη διαφοροποίηση δίνεται από την IL-4, η προέλευση της δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα, αν και πιστεύεται ότι παράγεται από τα ιστιοκύτταρα (mast cells) (Yagi et al., 2007). Ο GATA-3 δρα ως μεταγραφικός παράγοντας και ταυτόχρονα μπορεί και προκαλεί αναδιάταξη της χρωματίνης, με αποτέλεσμα να ενεργοποιεί τα γονίδια IL4, IL13 και IL5. Ο γενετικός τόπος των τριών γονιδίων εδράζεται στο χρωμόσωμα 11 του ποντικού, σε περιοχή που έχει χαρακτηριστεί ως γενετικός τόπος των Th2 κυτοκινών (Th2 cytokine locus) (Ansel et al., 2006).

Τα μονοπάτια που συμμετέχουν στη διαφοροποίηση των Th17 κυττάρων δεν έχουν ακόμα ερευνηθεί σε βάθος, όμως φαίνεται ότι η δράση των TGF-β και IL-6 είναι απαραίτητη. (Weaver et al., 2006). Άλλα μόρια που έχουν συνδεθεί με τα Th17 είναι οι STAT3, RORα και RORγ (retinoic acid receptor-related orphan receptors (Dong, 2008). Επίσης, τα Th17 δεν εκφράζουν T-bet και GATA-3 σε σχέση με τα Th1 και Th2 κύτταρα, αντίστοιχα, γεγονός που ενισχύει την υπόθεση ότι πρόκειται για ένα ξεχωριστό τύπο CD4+ T κυττάρων (Weaver et al., 2006).

2.4 Ο γενετικός τόπος και τα ρυθμιστικά στοιχεία της IFNγ

Όπως αναφέρθηκε, η IFNγ έχει σημαντικό ρόλο στις ανοσολογικές αποκρίσεις και στη διαφοροποίηση των Th1 κυττάρων. Το γονίδιο της IFNγ στο ποντίκι αποτελείται από τέσσερα εξόνια, καταλαμβάνει περίπου 5kb στο χρωμόσωμα 10 και πριν από το πρώτο εξόνιο και με έκταση 2kb βρίσκεται ο υποκινητής (Cho et al., 2003). Στους ανθρώπους και τα τρωκτικά, κοντά και

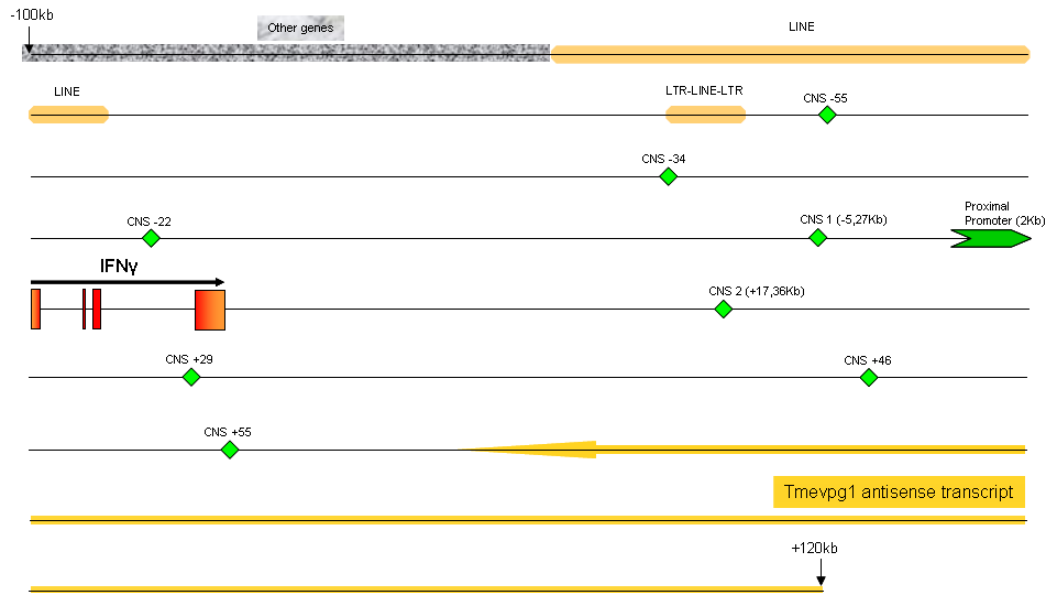


Εικόνα 4: Συστοίχιση 600kb εκατέρωθεν της IFNγ στο χρωμόσωμα 10 του ποντικού, με τις αντίστοιχες περιοχές στον άνθρωπο και στον αρουραίο. Τα μπλέ βέλη δείχνουν τα γονίδια και την κατεύθυνση της μεταγραφής, οι κόκκινες γραμμές υποδεικνύουν περιοχές με πολύπλοκους διπλασιασμούς στο ποντικίσιο γονιδίωμα, οι κίτρινες μπάρες δείχνουν ενθέσεις επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών LINE, LTR-LINE-LTR.

πριν από την IFNγ εντοπίζονται τα γονίδια IL-22 (προφλεγμονώδη κυτοκίνη) και Mdm1 (συστατικά εκφραζόμενο- housekeeping γονίδιο), ενώ μετά την IFNγ υπάρχει ένα μεγάλο αντικωδικό (antisense) μετάγραφο, το Tmevpg1. Η περιοχή αυτή είναι αρκετά συντηρημένη μεταξύ των ειδών και στα τρωκτικά περιλαμβάνει και το ψευδογονίδιο IL-26 (Schoenborn and Wilson, 2007).

Σε ότι αφορά στη ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργοποίησης της IFNγ, έχουν ταυτοποιηθεί διάφορα ρυθμιστικά στοιχεία που φαίνεται να έχουν λειτουργική σημασία. Με τη χρήση τεχνικών όπως η υπερευαισθησία σε DNase I (DNase I hypersensitivity) και η ομολογία αλληλουχιών που ανήκουν σε διαφορετικά είδη βρέθηκε ότι υπάρχουν περιοχές με πολύ συντηρημένη αλληλουχία, εκατέρωθεν του γενετικού τόπου της IFNγ, καθώς και αρκετές θέσεις υπερευαισθησίας σε DNase I. Μέχρι τώρα, έχει εξεταστεί μία περιοχή

120kb που περιλαμβάνει και το γονίδιο και έχουν χαρακτηριστεί οκτώ συντηρημένες περιοχές, οι οποίες αναφέρονται ως CNSs (συντηρημένες αλληλουχίες). Από τις πρώτες που ανακαλύφθηκαν ήταν η CNS1 (6 kb πριν από το γονίδιο) και η CNS2 (18-20 kb μετά από το σημείο έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου της IFN γ) (Lee et al., 2004; Shnyreva et al., 2004). Η



Εικόνα 5: Περιοχή του χρωμοσώματος 10 του ποντικού που βρίσκεται η IFN γ υπό κλίμακα 25000 βάσεις/ σειρά. Με πορτοκαλί φαίνεται ο γενετικός τύπος της IFN γ , οι πράσινοι ρόμβοι είναι οι συντηρημένες περιοχές και τα ταυτοποιημένα συντηρημένα ρυθμιστικά στοιχεία.

CNS1 παρουσιάζει ιδιότητες ενισχυτή και σε αυτή προσδένονται οι παράγοντες NFAT και T-bet, οι οποίοι ενισχύουν την δράση της ως ενισχυτή (Lee et al., 2004). Σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης κυττάρων φαίνεται ότι και η CNS2 έχει δράση ενισχυτή. Επίσης, και σε αυτή τη θέση προσδένεται ο T-bet και επηρεάζει τη δομή της χρωματίνης, διευκολύνοντας τη μεταγραφή (Shnyreva et al., 2004). Άλλες συντηρημένες περιοχές στις οποίες προσδένεται ο T-bet είναι ο υποκινητής, η CNS-22, CNS-34 και CNS-55, αν και η πρόσδεσή του είναι σημαντική για την ενίσχυση της μεταγραφής της IFN γ μόνο στον υποκινητή, στη CNS-22 και λιγότερο στη CNS-34 (Hatton et al., 2006). Συστηματική ανάλυση όλων των συντηρημένων περιοχών έγινε από την ομάδα του C. Wilson (Schoenborn et al., 2007). Με σύγκριση αλληλουχιών εντοπίστηκαν όλες οι παραπάνω συντηρημένες περιοχές και τρεις ακόμα, οι οποίες ονομάστηκαν CNS+29, CNS+46 και CNS+55, με βάση την απόστασή τους σε kb από το σημείο έναρξης της μεταγραφής της IFN γ . Από τα προαναφερθέντα συντηρημένα στοιχεία φαίνεται ότι η CNS+29 είναι ενισχυτής, η CNS+46 έχει δράση μονωτή (insulator) και οι CNS-54, CNS-34, CNS-22 εμφανίζουν και λειτουργία παρεμπόδισης ενισχυτών (enhancer-blocking).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι υπάρχουν τρεις θέσεις υπερευαισθησίας σε DNase I, HS1 και HS2 στο εσώνιο 1 και HS3 στο εσώνιο 3 της IFN γ (Agarwal and Rao, 1998). Συνδυασμός του εσωνίου 1 και 3, σε πειράματα διαγονιδιακών ποντικών (transgenic reporter assay), έδειξε ότι έχει ισχυρή δράση ενισχυτή, αλλά δεν προσδίδει ειδικότητα ως προς την έκφραση

της IFN γ στον κατάλληλο ιστό (Soutto et al., 2002). Στα άωρα, Th1 και Th2 CD4⁺ T κύτταρα χαρτογραφήθηκαν οι θέσεις υπερευαισθησίας σε DNase I στην περιοχή της IFN γ και παρατηρήθηκε ότι διαφέρουν ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, γεγονός που πιθανά να σχετίζεται με τη ρύθμιση του γονιδίου με ιστοειδικό και αναπτυξιακό τρόπο (Schoenborn et al., 2007).

2.5 Έσω-διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις και μεταγραφική ρύθμιση

Η ενεργοποίηση της μεταγραφής είναι μία πολύπλοκη διαδικασία η οποία βασίζεται στις RNA πολυμεράσες και σε μεταγραφικούς παράγοντες που προσδένονται στην περιοχή του υποκινητή. Επιπλέον, υπάρχουν διάφορα ρυθμιστικά στοιχεία που δρουν από απόσταση και στρατολογούνται στο σύμπλοκο έναρξης της μεταγραφής (pre-initiation complex), βοηθώντας να πραγματοποιηθεί η μεταγραφή με ακρίβεια και ειδικότητα. Τέτοια στοιχεία είναι οι ενισχυτές και οι περιοχές ελέγχου του γενετικού τόπου (locus control regions, LCRs). Ο τρόπος με το οποίο δρουν δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί, όμως για την περίπτωση των ενισχυτών είναι γνωστό ότι μπορούν να βρίσκονται εκατέρωθεν του γενετικού τόπου, ακόμα και μέσα στα εσώνια, ενώ οι LCRs δρουν με τρόπο που εξαρτάται από τη θέση στο χρωμόσωμα. Άλλα ρυθμιστικά στοιχεία από απόσταση είναι οι αποσιωπητές (silencers) και οι μονωτές (insulators) που έχουν αρνητική λειτουργία και μπορούν να μειώνουν ή να καταργούν πλήρως τη μεταγραφή ενός γονιδίου στόχου.

Μεγάλη καινοτομία στην έρευνα των ρυθμιστικών στοιχείων έγινε με την ανάπτυξη της τεχνικής προσδιορισμού της δομής της χρωματίνης (chromosome conformation capture, 3C). Περιληπτικά, η μέθοδος περιλαμβάνει τη μονιμοποίηση των κυττάρων με φορμαλδεΰδη, την απομόνωση των πυρήνων και την πέψη της χρωματίνης με ένα κατάλληλα επιλεγμένο περιοριστικό ένζυμο. Στη συνέχεια τα κομμάτια της χρωματίνης συγκολλούνται, ώστε να εντοπιστούν τα τμήματα που γειτνιάζουν. Η σχετική συχνότητα των αλληλεπιδρώντων τμημάτων, ποσοτικοποιείται με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (real time PCR), με τη βοήθεια εκκινητών, ειδικά σχεδιασμένων για τον εντοπισμό των επιθυμητών χιμαιρικών κομματιών DNA. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από τον Job Dekker και τους συνεργάτες του σε μονιμοποιημένους πυρήνες από *Saccharomyces cerevisiae*, για τη μελέτη της δομής του χρωμοσώματος 3 του σακχαρομύκητα (Dekker et al., 2002).

Η ανεύρεση καινούργιων χρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων είναι ένα ενδιαφέρον πεδίο έρευνας. Έτσι αναπτύχθηκαν και άλλες μέθοδοι που βασίζονται στη 3C για να εμπλουτίσουν τις γνώσεις μας στον τομέα αυτό. Μία από τις τεχνικές είναι η 3C- carbon copy (5C), στην οποία τα προϊόντα από τη 3C πολλαπλασιάζονται με ένα επιπλέον βήμα PCR και στη συνέχεια αναλύονται με μικροσυστοιχίες ή με αλληλούχιση μεγάλης κλίμακας (Dostie and Dekker, 2007; Dostie et al., 2006).

Άλλη εξέλιξη της 3C είναι οι 4C τεχνολογίες για τον εντοπισμό των αλληλεπιδρώντων κομματιών, όπου κανείς δεν χρειάζεται να ξέρει από την αρχή ποια κομμάτια θα επιλέξει για να μελετήσει, όπως γίνεται στη 3C. Η στρατηγική που ακολουθείται περιλαμβάνει τη χρήση ενός επιθυμητού τμήματος DNA ως 'δόλωμα' για την ανίχνευση όλων των υπόλοιπων κομματιών με τα οποία αλληλεπιδρά. Όλα, λοιπόν τα τμήματα που προκύπτουν

από τη 3C κυκλοποιούνται σε μία επιπλέον αντίδραση συγκόλλησης και πολλαπλασιάζονται με αντίστροφη PCR (inverse PCR). Το ζευγάρι των εκκινητών για την PCR είναι σχεδιασμένο πάνω στο κομμάτι 'δόλωμα' (Simonis et al., 2006; Zhao et al., 2006). Μία τεχνική ανάλογη της 4C είναι η ACT (Associated Chromosome Trap). Σε αυτή υπάρχει πάλι ένα κομμάτι DNA που λειτουργεί ως 'δόλωμα'. Η διαφορά είναι ότι τα προϊόντα της 3C δεν κυκλοποιούνται, αλλά συγκολλούνται στα άκρα τους ολιγονουκλεοτίδια και η PCR γίνεται με έναν εκκινητή ειδικό για το 'δόλωμα' και έναν εκκινητή ειδικό για το ολιγονουκλεοτίδιο (εικόνα 18).

Όπως αναφέρθηκε, τα γεγονότα σηματοδότησης για τη διαφοροποίηση των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων σε Th1 και Th2 κύτταρα περιλαμβάνουν την έκφραση της IFN γ και της IL-4 κυτοκίνης, αντίστοιχα. Ανάλυση 3C στην χρωματίνη από T κύτταρα έκανε εμφανή τόσο την ύπαρξη θηλιάς στον Th2 γενετικό τόπο των κυτοκινών (χρωμόσωμα 11) (Spilianakis and Flavell, 2004), όσο και την γεινιάσή του με τον Th1 γενετικό τόπο, της IFN γ (χρωμόσωμα 10) (Spilianakis et al., 2005). Για πρώτη φορά παρουσιάστηκε ότι οι υποκινητές των γονιδίων IL4, IL5 και IL13 βρίσκονται κοντά στα T, τα B, τα NK κύτταρα, αλλά όχι στους ινοβλάστες. Και οι τρεις αυτοί υποκινητές αλληλεπιδρούν με τον Th2 LCR στα T και τα NK κύτταρα. Σημαντικό ρόλο στη συγκεκριμένη διαμόρφωση έχει η θέση υπερευαισθησίας 7 (RHS-7) του Th2 LCR, αφού οι αλληλεπιδράσεις υποκινητών – LCR ήταν μειωμένες σε CD4⁺ T κύτταρα από γενετικά τροποποιημένα ποντίκια όπου έλειπε η RHS7 (Lee et al., 2005). Η μελέτη συνεχίστηκε και βρέθηκε ότι στα άωρα CD4⁺ T κύτταρα ο γενετικός τόπος της IFN γ συνεντοπίζεται με τους υποκινητές της IL5 και του Rad50 και με τη θέση υπερευαισθησίας 6 του Th2 LCR. Κατά τη διαφοροποίηση προς Th1 και Th2 οι ισχυρές δια-χρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις αντικαθίστανται από εσω-χρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις της IFN γ με μία δεύτερη περιοχή, την CNS2, σημαντική για την έκφραση του IFN γ γονιδίου (Spilianakis et al., 2005).

2.6 Στόχος

Η μελέτη των χρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων στο χώρο και σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, πιστεύεται ότι θα παρέχει πληροφορίες που θα βοηθήσουν στη βαθύτερη κατανόηση των πολύπλοκων γεγονότων που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της ρύθμισης της μεταγραφής. Ο στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της ύπαρξης συρρύθμισης σε γενωμικό επίπεδο, γενετικών τόπων που ανήκουν στο ίδιο σηματοδοτικό μονοπάτι. Τα γονίδια που μελετήθηκαν ήταν της IFN γ (χρωμόσωμα 10) και των υποδοχέων της IFN γ R1 (χρωμόσωμα 10) και IFN γ R2 (χρωμόσωμα 16). Ειδικότερα, εξετάστηκε εάν οι γενετικοί τόποι ή οι ρυθμιστικές τους περιοχές γεινιάζουν στον κυτταρικό πυρήνα, σε κυτταρικούς τύπους όπου τα παραπάνω γονίδια εκφράζονται ή καταστέλλονται. Επίσης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για το χαρακτηρισμό των υποπυρηνικών οργανιδίων στα οποία πραγματοποιούνται οι γενωμικές αλληλεπιδράσεις καθώς και των πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε αυτές.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Κυτταρικές σειρές

Τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται είναι πρωτογενή CD4⁺ T λεμφοκύτταρα, τα οποία απομονώνονται από σπλήνα και περιφερικούς λεμφαδένες C57/Black 6 θυληκών ποντικών, ηλικίας 4-6 εβδομάδων. Τα κύτταρα διαφοροποιούνται για 4 ημέρες κάτω από Th1 (IL-2, α-IL-4, IL12) και Th2 (IL-2, IL-4, αIFN γ) συνθήκες και επανενεργοποιούνται για 1h με σύγχρονη ενεργοποίηση του TCR.

Κυτοκίνες

Ανασυνδυασμένη από ποντίκι IL-2: BD Pharmingen, Cat:550069, 20 $\mu\text{g/ml}$ = 10^7 units/ml, αραιώση: 20-50 units/ml, 1:1000000

Ανασυνδυασμένη από ποντίκι IL-4: BD Pharmingen, Cat:550067, 10 $\mu\text{g/ml}$ αραιώση: 1000 units/ml, 1:1000

Ανασυνδυασμένη από ποντίκι IL-12 (p70): BD Pharmingen, Cat:554592, 3,5 $\mu\text{g/ml}$, 1:100

Αντισώματα

Για την ενεργοποίηση των CD4⁺ κυττάρων χρησιμοποιούνται τα αντισώματα:

Anti-mouse CD3e (145-2C11): BD Pharmingen, Cat: 553057, 10 $\mu\text{g/mL}$, 1:100

Anti-mouse CD28 (37.51): BD Pharmingen, Cat: 553294, 10 $\mu\text{g/mL}$, 1: 500

Για τη διαφοροποίηση των κυττάρων χρησιμοποιούνται τα αντισώματα:

XMG1.2: Rat anti-mouse IFN γ monoclonal, BD Pharmingen, Cat: 559065, 10 mg/mL , 1:100

11B11: Rat anti-mouse IL-4 monoclonal, BD Pharmingen, Cat: 559065, 10 mg/mL , 1:50

Για τα πειράματα ανοσοϊστοχημείας χρησιμοποιούνται τα αντισώματα:

Mouse anti-PolIII-CTD448: Covance, 1:200.000

Goat anti-mouse 594: Invitrogen, LOT: 54433A, 2 $\mu\text{g/ml}$, 1:500

Απομόνωση CD4⁺ T λεμφοκυττάρων

Απομόνωση των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων γίνεται με τη χρήση μικροσφαιριδίων CD4(L3T4), Microbeads, και μαγνητικών κολώνων για διαχωρισμό MACS (separation columns), της εταιρείας Miltenyi Biotec. Για τα πλυσίματα

χρησιμοποιείται το διάλυμα MACS (0,5% w/v BSA, 2mM EDTA in 1x PBS) και ακολουθείται το πρωτόκολλο της εταιρείας.

Θρεπτικά μέσα καλλιέργειας βακτηριών και ευκαρυωτικών κυττάρων.

Τα βακτήρια καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο LB το οποίο περιέχει 1% Bacto tryptone, 0,5% yeast extract, 1% NaCl. Για τις στερεές καλλιέργειες χρησιμοποιούνται επιπλέον και 1,5% άγαρ.

Για τη δημιουργία επιδεκτικών κυττάρων DH5a χρησιμοποιείται θρεπτικό Psi broth το οποίο περιέχει 0,5% Bacto yeast extract, 2% Bacto tryptone, 0,5% MgSO₄. Το pH του ρυθμίζεται στο 7,6 με KOH.

Για τα πρωτογενή CD4⁺ T λεμφοκύτταρα χρησιμοποιείται θρεπτικό 1x Click's (Sigma), το οποίο περιέχει και 100μg/ml Pen/Strep, 0,05mM β-mercaptoethanol, 2mM Glutamine.

Πήκτωμα αγαρόζης

Η πηκτή αγαρόζης χρησιμεύει για τον διαχωρισμό των τμημάτων νουκλεϊκών οξέων βάση του μεγέθους τους. Επιπλέον, επιτρέπει την εξακρίβωση της ποιότητάς τους και την ποσοτικοποίησή τους.

Η περιεκτικότητα της αγαρόζης καθορίζεται ανάλογα με την περίπτωση του μεγέθους των τμημάτων DNA που πρόκειται να διαχωριστούν. Όσο για το TBE τόσο στο πήκτωμα όσο και στο running buffer είναι 0.5X, ενώ η ποσότητα του νερού είναι ανάλογη με το μέγεθος του πηκτώματος.

Για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, το DNA φορτώνεται στα πηγαδάκια με loading buffer – orange G 6x (τελική συγκέντρωση 1x).

Πέψη και συγκόλληση μορίων DNA

Οι πέψεις DNA με ένζυμα περιορισμού παραγματοποιούνται σε κατάλληλες συνθήκες όπως περιγράφονται στον κατάλογο της Minotech από την οποία προέρχονται τα ένζυμα. Σε καμία περίπτωση ο συνολικός όγκος του ενζύμου δεν υπερβαίνει το 10% του συνολικού όγκου της αντίδρασης.

Η συγκόλληση τμημάτων DNA γίνεται με το ένζυμο T4 DNA ligase της Minotech σε συνθήκες αλατότητας που η εταιρία υποδεικνύει. Το ένθεμα στην αντίδραση έχει 10πλάσια μοριακότητα σε σχέση με το φορέα. Η αντίδραση επωάζεται για 2 ώρες στους 16⁰C.

Ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε για κλωνοποιήσεις ήταν ο pCR 2.1 από την εταιρεία Invitrogen.

Οι αλληλουχίσεις των ανασυνδυασμένων μορίων γίνονται στο εργαστήριο Μικροχημείας του ΙΤΕ

Μετασηματισμός επιδεικτικών DH5α κυττάρων

DH5α κύτταρα επωάζονται με τη μισή αντίδραση συγκόλλησης για 30 λεπτά στον πάγο και έπειτα υπόκεινται σε θερμικό σοκ για 90 δευτερόλεπτα στους 42⁰C. Μεταφέρονται έπειτα στον πάγο και κατόπιν απλώνονται σε πιάτα με στερεό LB και αμπικιλίνη 100μg/ml. Επωάζονται στη συνέχεια στους 37⁰C για τουλάχιστον 16 ώρες.

Τα DH5α κύτταρα γίνονται επιδεικτικά με μια συγκεκριμένη διαδικασία. Από κορεσμένη καλλιέργεια των κυττάρων αυτών χρησιμοποιούνται 3ml για την επιμόλυνση 200ml Psi broth. Ακολουθεί επώαση στους 30⁰C μέχρι η οπτική απορρόφηση να φτάσει τα 0,48 στα 550nm. Τα κύτταρα απομονώνονται με φυγοκέντρηση στις 2000rpm για 10 λεπτά και πλένονται με διάλυμα TfbI που περιέχει 30mM οξικό κάλιο, 100mM χλωριούχο ρουβίδιο, 10 mM ένυδρο χλωριούχο ασβέστιο, 50mM χλωριούχο μαγγάνιο και 15% v/v γλυκερόλη σε pH 5.8. Στη συνέχεια επαναδιαλύονται σε διάλυμα TfbII που περιέχει 10mM MOPS, 75mM χλωριούχο ασβέστιο, 10mM χλωριούχο ρουβίδιο και 15% v/v γλυκερόλη σε pH 6,5 και φυλάσσονται σε ποσότητες των 100μl στους -80⁰C.

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες μετασηματισμένων βακτηρίων

Οι πελλέτες των κυττάρων από ολονύκτιες καλλιέργειες επαναδιαλύονται σε έναν όγκο διαλύματος I που περιέχει 50mM γλυκόζη, 25mM Tris pH 8 και 10mM EDTA. Στη συνέχεια προσθέτονται δύο όγκοι διαλύματος II (διάλυμα λύσης) που περιέχει 0,2N NaOH και 1% SDS και επωάζονται για 5 λεπτά. Έπειτα προστίθεται και 1,5 όγκος διαλύματος III (διάλυμα εξουδετέρωσης) που περιέχει 3M οξικό κάλιο και 11,5% οξικό οξύ.

Στη συνέχεια, ο τρόπος απομόνωσης του πλασμιδιακού DNA διαφέρει ανάλογα με το σκοπό για τον οποίο αυτό προορίζονται. Όταν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί απλά για πέψη σαν διαγνωστικό μέσο ή σαν ενδιάμεσο βήμα πολλαπλασιασμού σε κάποια κλωνοποίηση, γίνεται απλά κατακρήμνιση με αιθανόλη. Όταν όμως το DNA αυτό πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σε πειράματα διαμόλυνσης ευκαρυωτικών κυττάρων γίνεται καθαρισμός κλώνων από την εταιρία Nucleobond, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρίας.

Glycerol stock

Όταν αποκτηθεί η βακτηριακή καλλιέργεια που περιέχει το επιθυμητό ανασυνδυασμένο μόριο DNA (πλασμίδιο), τότε αυτό διατηρείται για μεγάλα

χρονικά διαστήματα σε γλυκερόλη. Έτσι, προστίθενται σε στείρες συνθήκες 800mL καλλιέργειας και 300mL 87% αποστειρωμένης γλυκερόλης, το μείγμα αναμειγνύεται καλά και φυλάσσεται σε συνθήκες υπερ-κατάψυξης στους -80°C

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιείται για την απομόνωση και κλωνοποίηση συγκεκριμένων DNAs και για την εξακρίβωση του κατάλληλου BAC κλώνου. Η αντίδραση γίνεται σε συγκέντρωση 2,5mM MgCl_2 με 0,25mM dNTPs, 200ng από τον κάθε εκκινητή και 0,5U Taq πολυμεράσης. Στις αντιδράσεις με παρασκευαστικό χαρακτήρα πραγματοποιούνται 30 τουλάχιστον κύκλοι με μεγάλο χρόνο επιμήκυνσης ανάλογα με το μέγεθος του πολλαπλασιαζόμενου κομματιού (1min/1000bp). Τα ολιγονουκλεοτίδια προέρχονται από το εργαστήριο Μικροχημείας του ΙΤΕ

Για την απομόνωση των cDNAs για κλωνοποίηση χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω ολιγονουκλεοτίδια.

IFNγR cDNA	IFN γ R1 Up	5'
	CGCGGGTCCCCTGTCAGAGGT 3'	
	IFN γ R1 Down	5'
	TTAGGACAGCTCCTGGGCCTC 3'	
IFNγR2cDNA	IFN γ R2 Up	5'
	TGCGAGTCTGAGCGGCGTCCA 3'	
	IFN γ R2 Down	5'
	TCACGGTGTGGAGCACATC 3'	

Για τον έλεγχο των BAC κλώνων χρησιμοποιούνται τα παρακάτω ολιγονουκλεοτίδια:

IFNγR2BAC	IFN γ R2 Up	5'TGCGAGTCTGAGCGGCGTCCA 3'
	IFN γ R2intron-1Low	5' CAGGTTGGTGACAAAAGTGGG 3'

Απομόνωση συνολικού RNA από τα κύτταρα.

Η απομόνωση συνολικού RNA από τα κύτταρα γίνεται με τη βοήθεια του αντιδραστηρίου TRIzol της εταιρίας GibcoBRL. Χρησιμοποιείται 1ml αντιδραστηρίου για περίπου 10^6 κύτταρα τα οποία έχουν πλυθεί με PBS. Τα κύτταρα επωάζονται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να λυθούν. Στη συνέχεια προστίθενται 200 μl CHCl_3 και έπειτα από ισχυρή ανάδευση φυγοκεντρώνται στις 14000rpm για 15 λεπτά στους 4°C . Το υπερκείμενο που περιέχει το RNA απομονώνεται και κατακρημνίζεται με 500 μl ισοπροπανόλης και

φυγοκέντρωση στις 14000rpm για 20 λεπτά στους 4⁰C. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης αφαιρείται και η πελλέτα του RNA επαναδιαλύεται σε DEPC treated νερό. Η συγκέντρωση υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 260nm και έχοντας σαν δεδομένο ότι 1 OD αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 40mg/ml.

Σχηματισμός cDNA από RNA (Αντίστροφη μεταγραφή ή reverse transcription ή RT)

Για τη δημιουργία cDNA χρησιμοποιείται το πλήρες σετ iScript Select cDNA Synthesis Kit της BIO-RAD που περιέχει ένζυμο RT, διάλυμα βέλτιστης λειτουργίας του ενζύμου, Oligo dT εκκινητές και dNTPs.

Για κάθε αντίδραση RT χρησιμοποιούνται 2μg συνολικού RNA. Η αντίδραση γίνεται σε τελικό όγκο 20μl. Σε κάθε αντίδραση προστίθεται το RNA, το H₂O και οι εκκινητές και θερμαίνεται για 7 λεπτά στους 65⁰C για την αποδιάταξη τυχών δευτεροταγών δομών. Στη συνέχεια προστίθενται 4μl διάλυμα αντίδρασης συγκεντρωμένο 10x, dNTPs σε τελική συγκέντρωση 0,5mM, 10U RNasin και 0,5μl ένζυμο RTase και η αντίδραση πραγματοποιείται στους 37⁰C για 2 ώρες.

Για κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε 10% από κάθε αντίδραση RT.

Για τις αντιδράσεις με ποσοτικό χαρακτήρα (πχ RT-PCR) γίνεται ποσοτική PCR με 10% cDNA από κάθε αντίδραση RT και η ανάλυση των δεδομένων γίνεται με τη βοήθεια του προγράμματος Opticon Monitor. Όπου χρειάζεται, προστίθεται επιπλέον φθορίζουσα χρωστική SYBR Green I. εναλλακτικά χρησιμοποιούνταν Taqman ανιχνευτές.

Το πρόγραμμα που ακολουθείται για το real time PCR είναι το ακόλουθο: 94⁰C για 5 λεπτά, 35 κύκλοι στους 94⁰C για 30 δευτερόλεπτα, 60⁰C για 30 δευτερόλεπτα, 72⁰C για 30 δευτερόλεπτα, 72⁰C για 2 λεπτά, σχηματισμός καμπύλης τήξης από τους 72⁰C μέχρι τους 94⁰C με μέτρηση ανά 0,5⁰C.

Για τον εντοπισμό του μηνύματος των IFN γ R1 και IFN γ R2 χρησιμοποιούνται TaqMan probes από την Applied Biosystems.

IFN γ R1 MmUU 599890_m2

IFN γ R2 MmUU 492626_m1

Για τον εντοπισμό του μηνύματος των HPRT, IL-4 και IFN γ χρησιμοποιούνται τα παρακάτω ολιγονουκεοτίδια:

HPRT sense 5' CTGGTGAAAAGGACCTCTCG 3'

HPRT antisense 5' TGAAGTACTCATTATAGTCAAGGGCA 3'

HPRT probe VIC-5' TGTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTGGAT
3' -6-carboxytetramethylrodamine (TAMRA)

IL-4 sense 5' AGATCATCGGCATTTTGAACG 3'

IL-4 antisense	5' TTTGGCACATCCATCTCCG 3'
IL-4 probe	6-carboxyfluorescein (FAM)- 5' TCACAGGAGAAGGGACGCCATGC 3'- TAMRA
IFNγ sense	5' GGATGCATTCATGAGTATTGC 3'
IFNγ antisense	5' CCTTTTCCGCTTCCTGAGG 3'
IFNγ probe	FAM-5' TTTGAGGTCAACAACCCACAGGTCCA 3'-6-carboxytetramethylrodamine (TAMRA)

DNA FISH

Παρασκευή ιχνηθέτη (probe)

Ο ιχνηθέτης παρασκευάζεται με τη μέθοδο της μετάφρασης εγκοπής (nick translation), με την χρήση του Nick translation reagent kit από την εταιρεία Abbott Molecular Inc (Cat. No. 32-801300). Η αντίδραση πραγματοποιείται με 2 μ g DNA-υπόστρωμα σε τελικό όγκο 50 μ l, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας.

Οι ιχνηθέτες καθαρίζονται με κολώνες, με τη χρήση του QIAquick Gel extraction Kit (50) (Cat. No. 28704), σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας.

Επεξεργασία και μονιμοποίηση κυττάρων για DNA FISH

Σε ένα 24-well πιάτο (Costar, Cat. 3524), εισάγεται ο κατάλληλος αριθμός coverslips (Fisherbrand Microscope Cover Glass, 12-545-82 12CIR-1D) και προσθετονται 300 μ l με 6-800.000 κύτταρα. Επώζονται για 6min, σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν για άλλα 6min στους 37°C. Τα κύτταρα πλένονται με 500 μ l 1x PBS (παγωμένο) και γίνεται μονιμοποίηση για 12min, σε θερμοκρασία δωματίου (RT) με 4% PFA (παραφορμαλδεΰση 16% διάλυμα, EM Grade, Electron Microscopy Sciences, Cat. No. 15710) σε 1x PBS. Ακολουθούν 3x πλυσίματα από 5min το κάθε ένα, με 1x PBS. Η διαπερατοποίηση πραγματοποιείται με 0,5% Triton X-100 σε 1x PBS για 10min και μετά επώζονται για 30min σε 20% glycerol σε 1x PBS. Γίνονται 3 παγώματα (freeze thaws) σε υγρό άζωτο, ένα πλύσιμο με 1x PBS και ένα πλύσιμο με 2x SSC (20x SSC = 3M NaCl₂, 0,3M Sodium Pyruvate). Τα κύτταρα φυλάσσονται σε 800 μ l 70% EtOH, στους 4°C.

ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ

Προετοιμασία ιχνηθέτη

Σε σκουρόχρωμο eppendorf εισάγονται 100ng από τον κάθε BAC ιχνηθέτη, μαζί με 1 μ g mouse COT-1 DNA (Invitrogen, Cat. No. 18440-016) και ακολουθεί

λυοφιλοποίηση υπό κενό. Εισάγονται 5 µl Formamide (Molecular biology grade, Promega, Cat. No. H5051) και επαναδιαλύονται για 30min στους 37°C. Στη συνέχεια αποδιατάσσονται για 8min στους 80°C και κρατώνται στον πάγο, μέχρι την υβριδοποίηση.

Προετοιμασία κυττάρων.

Προθήκη 70% EtOH σε μία 12-well plate και εισαγωγή των coverslips με τα κύτταρα σε αυτή. Τέσσερα διαδοχικά πλυσίματα με 800µl 70-80-95-100% EtOH, 3min το κάθε ένα και στέγνωμα των coverslips πάνω σε ένα heating block (37-42°C). Εισαγωγή των coverslips σε μία στεγνή 12-well plate και αποδιάταξή τους με προζεσταμένο στους 73°C διάλυμα αποδιάταξης (70% απιονισμένη φορμαμίδη -de-ionized formamide, 2x SSC pH 5.3, με τελικό pH 7) σε υδατόλουτρο στους 73°C. Αφαίρεση του διαλυματος αποδιάταξης και επώαση των κυττάρων σε 70% EtOH (ice cold) για 3min, στον πάγο. Τρία διαδοχικά πλυσίματα με 800µl 80-95-100% EtOH, 3min το κάθε ένα και στέγνωμα των coverslips πάνω σε ένα heating block (37-42°C).

Όταν είναι έτοιμα τα κύτταρα, εισάγονται στον ιχνηθέτη 5 µl 2x διαλύματος υβριδοποίησης (4x SSC, 20% Dextran sulfate από την Eppendorf AG με Cat. No. 955155653, 50mM Sodium Phosphate, H₂O). Ο ιχνηθέτης απλώνεται σε μία γυάλινη πλάκα (Microscope slides, Marienfeld, Cat. No. 10 006 12) και από πάνω τα coverslips. Γίνεται μόνωση (sealing) με ξυλόκολλα (paper cement, Premium, Best-Test, A real Acid Free Adhesive), αφήνεται να στεγνώσει για 15-30min, ακολουθεί αποδιάταξη για 5min στους 73°C και επώαση για 16h (overnight) στους 37 °C, σε ένα κουτί υβριδοποίησης (σκοτεινό και με υγρασία)

Την επόμενη ημέρα τα coverslips απομακρύνονται από τις γυάλινες αντικειμενοφόρους και εισάγονται σε μία 12-well plate. Γίνονται τρία διαδοχικά πλυσίματα των 5min, με 2xSSC σε RT και 2xSSC προθερμασμένο στους 37°C. Όταν χρειάζεται γίνεται χρώση του πυρήνα με ToPro3 (αρχική συγκέντρωση 1mM → αραιώση 1/8000 σε 2x SSC), για 1min και μετά πλήσιμο των κυττάρων με 2xSSC για 5min. Έπειτα, οι coverlips αφήνονται να στεγνώσουν και τοποθετούνται σε καινούργια glass slide, σε ένα μέσο μονιμοποίησης (Prolong Gold antifade reagent with DAPI, Invotrogen, Cat. No. P36935) για τουλάχιστον 16h. Η ανάλυση των εικόνων γίνεται με συνεστιακή μικροσκοπία (Confocal Microscopy) στις εγκαταστάσεις του Ι.Τ.Ε. και η επεξεργασία και μέτρηση των αποστάσεων, με τη χρήση του προγράμματος Volocity 4 (Improvision).

RNA FISH

Παρασκευή ιχνηθέτη (probe)

Η διαδικασία παρασκευής ιχνηθέτη είναι παρόμοια με το DNA-FISH, με τη διαφορά ότι για το RNA-FISH χρησιμοποιείται πλασμιδιακή κατασκευή που περιέχει το επιθυμητό cDNA αντί για BAC και ότι γίνεται σήμανση του ιχνηθέτη με βιοτίνη (Biotin Nick translation mix, Roche, Cat. No. 1 745 824).

Επεξεργασία και μονιμοποίηση κυττάρων για RNA FISH

Σε ένα 24-well πιάτο (Costar, Cat. 3524), εισάγεται ο κατάλληλος αριθμός coverslips καλυμένων με πολυ-λυσίνη (poly-L-lysine Cellware 12mm round coverslips, BD BioCoat, Cat. No 354085) και προστίθενται 500 µl με 800.000 κύτταρα. Φυγοκεντρώνονται για 1min, στις 450rpm, σε θερμοκρασία δωματίου και επωάζονται για 6min στους 37°C. Τα κύτταρα πλένονται με 500 µl 1x PBS (ice cold) και επωάζονται για 3min σε 500 µl CSK (Cytoskeletal buffer, pH 6,8) διαλύματος (100mM NaCl, 300mM sucrose, 3mM MgCl₂, 10mM PIPES, 0,5% Triton X-100, 1mM EGTA, 2mM Vanadyl Ribonucleoside) στον πάγο. Κατόπιν μονιμοποιούνται για 10min, σε πάγο με 500 µl 4% PFA (παραφορμαλδεΐδη 16% διάλυμα, EM Grade, Electron Microscopy Sciences, Cat. No. 15710) σε 1x PBS. Πλένονται 3x από 5min το κάθε ένα, με 70% EtOH. Φυλάσσονται σε 800 ml 70% EtOH, στους -20°C.

ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ

Προετοιμασία ιχνηθέτη

Σε σκουρόχρωμο eppendorf εισάγονται 1-2 µl από τον κάθε cDNA ιχνηθέτη, μαζί με 1µg mouse COT-1 DNA (Invitrogen, Cat. No. 18440-016), 20µg ytRNA (Ribonucleic acid, transfer, from Backers, SIGMA, Cat. No. R5636) και γίνεται λυοφιλοποίηση υπό κενό. Εισάγονται 5ml Formamide (Molecular biology grade, Promega, Cat. No. H5051) και επαναδιαλύονται για 20min στους 37°C. Αποδιατάσσονται για 7min στους 75°C και επωάζονται στον πάγο, μέχρι την υβριδοποίηση.

Προετοιμασία κυττάρων.

Προθήκη 70% EtOH σε μία 12-well plate και εισαγωγή των coverslips με τα κύτταρα σε αυτή. Τέσσερα διαδοχικά πλησίματα με 800 ml 70-80-95-100%EtOH, 3min το κάθε ένα και στέγνωμα των coverslips (37-42°C).

Όταν είναι έτοιμα τα κύτταρα, εισάγονται στον ιχνηθέτη 5µl 2x διαλύματος υβριδοποίησης για RNA (για 1 mL διαλύματος: 200µl 20x SSC, 20% Dextran sulfate από την Eppendorf AG με Cat. No. 955155653, 100µl BSA-acetylated από την Ambion με Cat. No. 2614G1, 10µg Vanadyl ribonucleoside, 200µl H₂O). Ο ιχνηθέτης απλώνεται σε μία γυάλινη πλάκα (Microscope slides, Marienfeld, Cat. No. 10 006 12) και από πάνω τα coverslips. Γίνεται sealing με ξυλόκολλα (paper cement, Premium, Best-Test, A real Acid Free Adhesive), αφήνεται να στεγνώσει για 15-30min, ακολουθεί αποδιάταξη για 5min στους 73°C και επώαση για 16h (overnight) στους 37 °C, σε ένα κουτί υβριδοποίησης (σκοτεινό και με υγρασία).

Την επόμενη ημέρα τα coverslips απομακρύνονται από τις glass slides και εισάγονται σε μία 12-well plate. Γίνονται τέσσερα διαδοχικά πλησίματα των 10min, με 2xSSC/50% formamide στους 37°C, 2xSSC στους 37°C, 1xSSC στους 37°C και με 4xSSC σε θερμοκρασία δωματίου.

Ακολουθεί ανίχνευση του μυνήματος και ενίσχυση του σήματος με τη χρήση του TSA Biotin System, Renaissance, PerkinElmer), σύμφωνα με το οποία γινόταν blocking με TNB διάλυμα (0,1M Tris-HCl pH 7.5, 0,15M NaCl), για 30min, RT. Επώαση των κυττάρων για 30min σε SA-HRP σε TNB (1:200), RT. Τρία πλησίματα των 5min με TNT διάλυμα (0,1M TRIS-HCL pH 7.5, 0,15M

NaCl, 0,05% Tween 20) και επώαση των κυττάρων με βιοτινυλιωμένο τυραμίδιο (1:50) για 10min, RT. Τρία πλύσιμα των 5min με TNT διάλυμα και επώαση στο SA-488 σε TNB (1:200), για 30min, RT. Δύο πλύσιμα των 5min με TNT διάλυμα. Όταν χρειάζεται γίνεται χρώση του πυρήνα με ToPro3, για 1min και μετά πλύσιμο των κυττάρων με TNT για 3min.

Έπειτα, οι coverlips ξεπλένονται σε 1xPBS, αφήνονται να στεγνώσουν και τοποθετούνται σε καινούργια glass slide, σε Prolong Gold για τουλάχιστον 16h.

Immuno-DNA FISH

Τα κύτταρα προετοιμάζονται όπως στο RNA FISH και οι DNA ιχνηθέτες όπως στο DNA FISH. Η υβριδοποίηση γίνεται όπως στο RNA FISH.

Μετά από την υβριδοποίηση τα κύτταρα πλένονται τρεις φορές διαδοχικά με 800μl 2x SSC, 5min, RT, 2x SSC, 5min, 42°C και 2x SSC, 5min, RT. Ακολουθεί blocking (1mL blocking buffer: 200μl 20x SSC, 10μl 10% Tween, 200μl BSA, 590μl H₂O) για 30min στους 37°C. Επώαση με το πρώτο αντίσωμα anti-PolII (Covance a-PolII-CTD448 mouse) 1:200.000 σε detection buffer (1mL detection buffer: 200μl 20x SSC, 10μl 10% Tween, 50μl BSA, 740μl H₂O) για 1h σε RT. Κατόπιν τα κύτταρα πλένονται τρεις φορές, για 2min με 0,1% Tween 20 σε 4x SSC, προθερμασμένο στους 37°C και μετά επώάζονται στο δεύτερο αντίσωμα για 30min σε RT. Τα κύτταρα πλένονται πάλι τρεις φορές, για 2min με 0,1% Tween 20 σε 4x SSC, προθερμασμένο στους 37°C. Οι coverslips ξεπλένονται σε 1x PBS, αφήνονται να στεγνώσουν και τοποθετούνταν σε καινούργια glass slide, σε Prolong Gold για τουλάχιστον 16h.

Χρώση Χρωμοσωμάτων (chromosome paints)

Κατά τη διαδικασία της χρώσης συγκεκριμένου χρωμοσώματος, τα κύτταρα προετοιμάζονται όπως στο DNA FISH και η σήμανση των ιχνηθετών γίνεται με Nick translation.

ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ

Προετοιμασία ιχνηθέτη

Σε σκουρόχρωμο eppendorf εισάγονται 3 μl από τον κάθε BAC ιχνηθέτη, μαζί με 10 μl mouse COT-1 DNA και ακολουθεί φυγοκέντρηση υπό κενό. Τα paints (CONC mouse chromosome 10 paint, Cambio, FITC ή Cy3 σημασμένα) ζεσταίνονται στους 37°C και εισάγονται (3μl) στον ιχνηθέτη. Τα παραπάνω επώάζονται στους 37°C για 10min και προστίθενται 9μl από το διάλυμα υβριδοποίησης της εταιρείας. Γίνεται αποδιάταξη στους 70°C για 10min και επώαση στους 37°C για 30min.

Προετοιμασία κυττάρων.

Τα κύτταρα πλένονται 2 φορές με 70% EtOH για 2min, 2 φορές με 90% EtOH για 2min και 1 φορά με 100% EtOH για 5min, και στεγνώνονται οι coverslips πάνω σε ένα heating block (37-42°C).

Έπειτα οι coverslips εισάγονται σε μία στεγνή 12-well plate και αποδιατάσσονται με προξεσταμένο στους 73°C διάλυμα αποδιάταξης (70% απιονισμένη φορμαμίδη, 2x SSC pH 5.3, με τελικό pH 7) σε υδατόλουτρο στους 73°C. Αφαιρείται το διάλυμα αποδιάταξης και πλένονται με σε 70% EtOH (ice cold) για 4min, στον πάγο. Οι coverslips πλένονται 2 φορές με 70% EtOH για 2min, 2 φορές με 90% EtOH για 2min και 1 φορά με 100% EtOH για 5min, και στεγνώνονται (37-42°C).

Τέλος, ο ιχθυήτης απλώνεται σε μία γυάλινη πλάκα και από πάνω τα coverslips. Sealing με ξυλόκολλα και επώαση για 16h (overnight) στους 37 °C, σε ένα κουτί υβριδοποίησης (σκοτεινό και με υγρασία).

Την επόμενη μέρα γίνονται 3 πλυσίματα για 8min στους 42°C, το κάθε ένα με 50% formamide σε 2x SSC (pH 7), 3 πλυσίματα για 10min στους 60°C με 0,1x SSC (pH 7), και 1 πλύσιμο για 10min στους 42°C με 0,1% Tween20 σε 4x SSC (pH 7). Έπειτα, οι coverslips αφήνονται να στεγνώνουν και τοποθετούνται σε καινούργια glass slide, σε ένα μέσο μονιμοποίησης για τουλάχιστον 16h.

ACT (Associated Chromosome Trap)

Το ACT είναι μία παραλλαγή της 3C (chromosome conformation capture) τεχνικής. Τα κύτταρα, μονιμοποιούνται με 2% παραφορμαλδεΐδη. Τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 50ml διάλυμα λύσης με αναστολείς πρωτεασών και επωάζονται στον πάγο για 90min και ταυτόχρονα αναδεύονται. Στη συνέχεια τα κύτταρα φυγοκεντρούνται και η πελλέτα επαναδιαλύεται σε 1ml 1x NEB buffer 3. Δεκαπέντε μg πυρήνων κόβονται με το περιοριστικό ένζυμο BglIII στους 37°C, για 16h και παράλληλα αναδεύονται. Δύο μg κομένου DNA προστίθενται σε 800μl διαλύματος συγκόλλησης. Η διαδικασία της συγκόλλησης πραγματοποιείται στους 16°C με 30 weiss units από την T4 DNA λιγάση για 4h. Μετά από τη συγκόλληση, το DNA επωάζεται με πρωτεΐνωση K και έπειτα καθαρίζεται με φαινόλη χλωροφόρμιο. Ένα μg καθαρισμένου DNA επωάζεται με 5 units BsiBI (MspI) στους 37°C, για 6h, και κατακρημνίζεται με EtOH.

Σε ένα μg MspI κομένου DNA προστίθενται τα ολιγονουκλεοτίδια-συνδέτες (2μl από το 20μM ολιονουκλεοτίδιο 2965 και 1μl από το 20μM ολιονουκλεοτίδιο 2962) και 1μl από 10x T4 DNA λιγάση. Το διάλυμα αποδιατάσσεται στους 50 °C για 1min και αφήνεται να κρυώσει σταδιακά στους 10 °C με διαβάθμιση 0.5 °C ανά 1 λεπτό. Ένα μl T4 DNA λιγάσης προστίθεται στο μείγμα και επωάζεται στους 15 °C για 16h. Έπειτα το DNA καθαρίζεται με κολώνα με το QIAquick Gel extraction Kit και επαναδιαλύεται στα 50μl. Ένα μl από το καθαρισμένο DNA χρησιμοποιείται σε μία πρώτη PCR αντίδραση με τον linker ειδικό εκκινητή 2963 και με έναν εκκινητή ειδικό για την περιοχή του υποκινητή του IFN γ R1, ACTIfngR1prBglIII. Το πρόγραμμα της PCR που ακολουθείται είναι το εξής: 95 °C για 2min, 18 κύκλοι στους 95 °C για 20sec, 65 °C για 40sec, 72 °C για 1min, και 72 °C για 5min. Το πρώτο PCR προϊόν καθαρίζεται με κολώνα με το QIAquick Gel extraction Kit και επαναδιαλύεται στα 30μl H₂O. Ένα μl από το καθαρισμένο DNA χρησιμοποιείται σε μία δεύτερη PCR αντίδραση με τον εσωτερικό linker ειδικό εκκινητή 2961 και με έναν εσωτερικό εκκινητή ειδικό για την περιοχή του υποκινητή του IFN γ R1, ACTIfngR1prnestBglIII. Το πρόγραμμα της PCR που ακολουθείται αυτή τη φορά

είναι το εξής: 95 °C για 2min, 30 κύκλοι στους 95 °C για 20sec, 65 °C για 40sec, 72 °C για 40sec, και 72 °C για 5min. Τα PCR προϊόντα έγιναν εμφανή σε μία πηκτή αγαρόζης 2%.

Οι PCR εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το πείραμα και οι συνδέτες αναφέρονται παρακάτω:

2963 5' GCTGACCCTGAATTCGCACGTGCCT 3'

2961 5' GTCGTTAGCGGACACAGGGCGATTC 3'

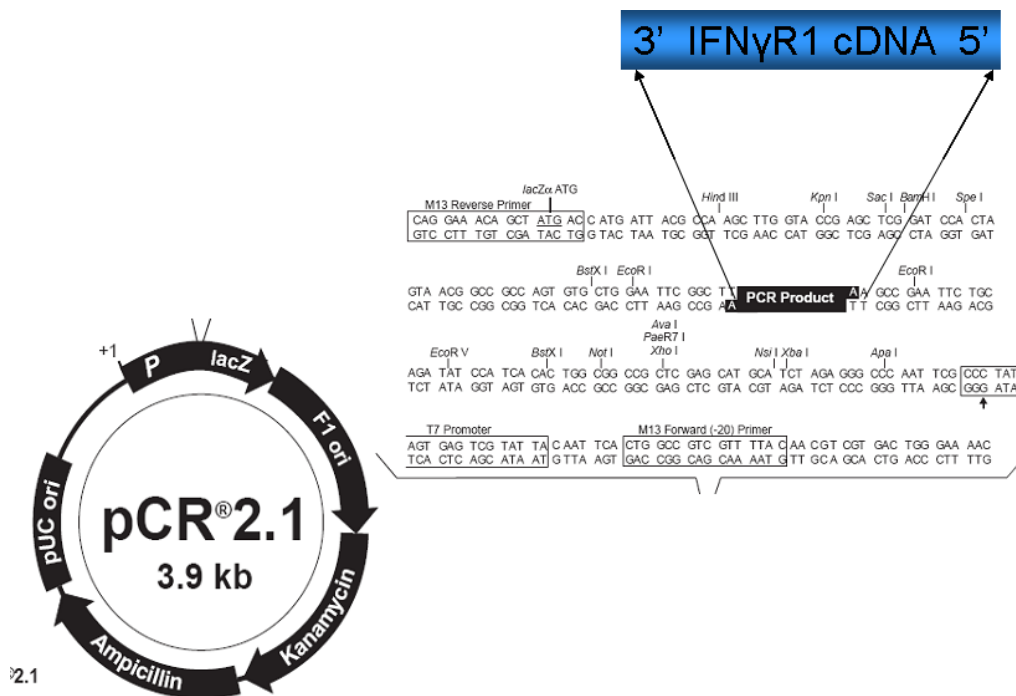
ACTIfngR1prnestBglII 5' ACTCCATGTGCCCCAGGCTGGCTTA 3'

ACTIfngR1prBglII 5' GCGGCTTGCAGATTTTGTGTAGTT 3'

2962 MspI linker 5' CGGTGAATC 3'

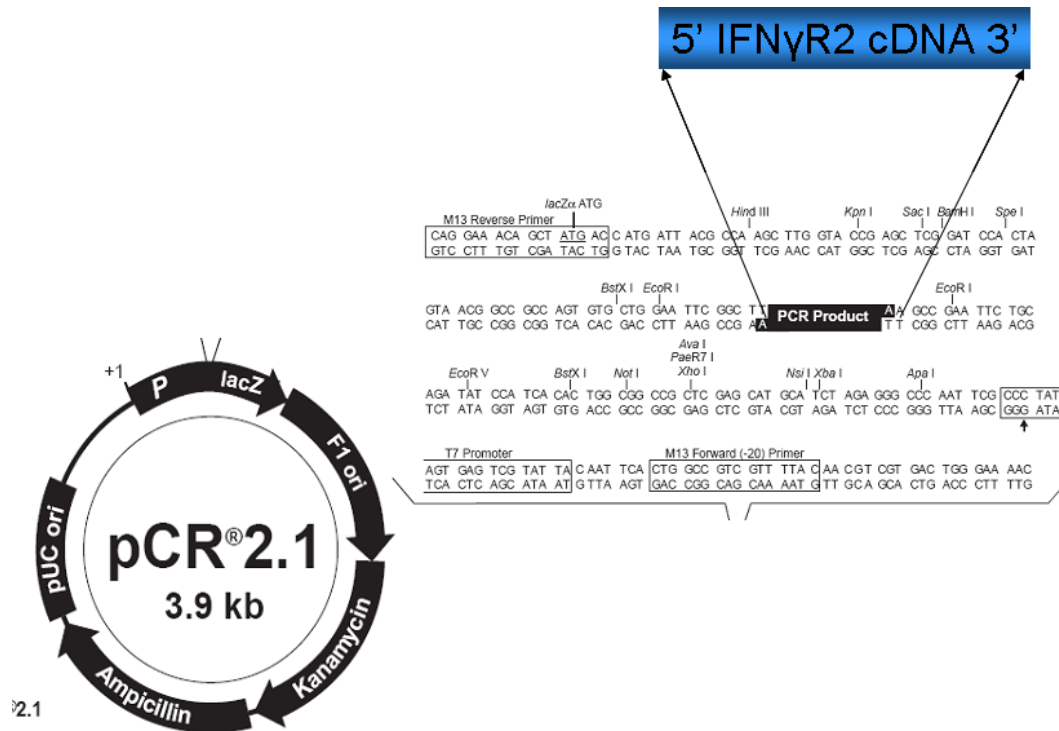
4. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ

Με PCR με Ταq πολυμεράση απομονώθηκε το mRNA του IFN γ R1 γονιδίου με μήκος 1470 bp. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στις μεθόδους και τα υλικά. Το cDNA κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pCR 2.1, όπως φαίνεται στον χάρτη.



Χάρτης 6: cDNA του IFN γ R1. Το τμήμα κλωνοποιήθηκε στα T προεξέχοντα άκρα του πλασμιδιακού φορέα pCR 2.1 με προσανατολισμό 3' \rightarrow 5'.

Με PCR με Ταq πολυμεράση απομονώθηκε το mRNA του IFN γ R2 γονιδίου με μήκος 1046 bp. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στις μεθόδους και τα υλικά. Το cDNA κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pCR 2.1, όπως φαίνεται στον χάρτη.

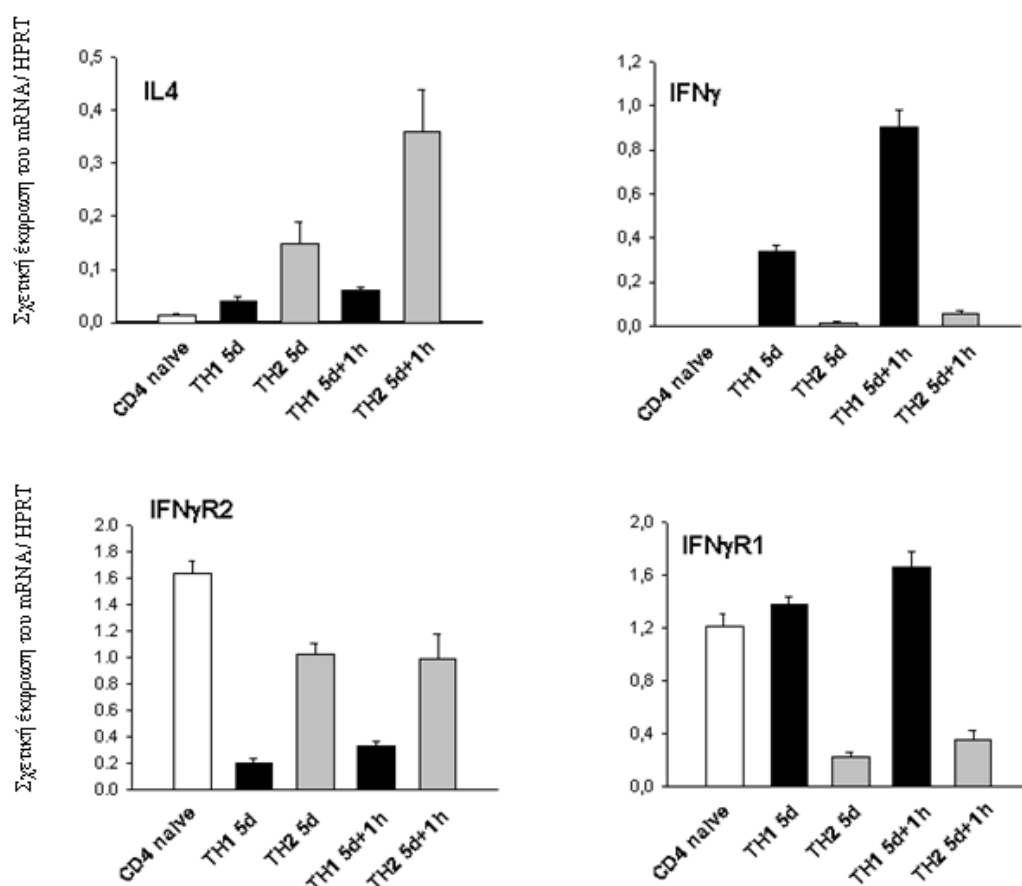


Χάρτης 2: cDNA του IFN γ R2. Το τμήμα κλωνοποιήθηκε στα T προεξέχοντα άκρα του πλασμιδιακού φορέα pCR 2.1 με προσανατολισμό 5' \rightarrow 3'.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 Διαφοροποίηση των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων και έκφραση των IL4, IFN γ , IFN γ R1 και IFN γ R2

Για τη μελέτη της συρρύθμιση των γονιδίων IFN γ , IFN γ R1 και IFN γ R2, των οποίων τα πρωτεϊνικά προϊόντα ανήκουν στο ίδιο σηματοδοτικό μονοπάτι, χρησιμοποιήσαμε το σύστημα των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων. Έγινε απομόνωση άωρων CD4⁺ T κυττάρων από σπλήνα και λεμφαδένες C57BL/6 θυληκών ποντικών και ακολούθησε διαφοροποίησή τους για τέσσερις ημέρες προς T βοηθητικά 1 (Th1) και T βοηθητικά 2 (Th2). Μετά τη διαφοροποίηση ακολούθησε επανενεργοποίηση των δευτέρων για μία ώρα, όπως περιγράφεται στα 'υλικά και μέθοδοι'. Για να πιστοποιηθεί ότι τα κύτταρα έχουν διαφοροποιηθεί πλήρως προς τη μία ή την άλλη κατεύθυνση, μετά από κάθε διαφοροποίηση ελεγχόταν η έκφραση συγκεκριμένων κυτοκινών με ποσοτικό



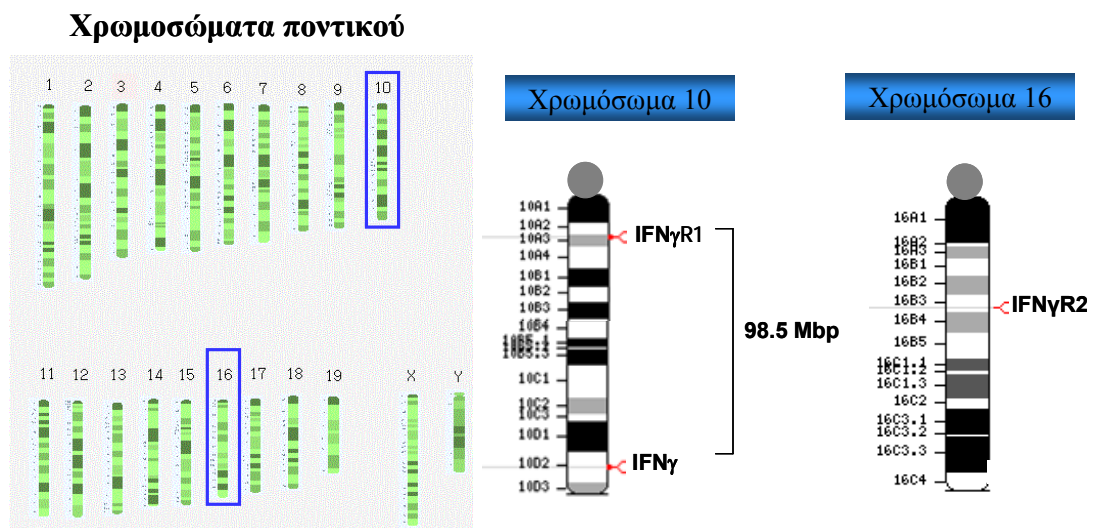
Εικόνα 6: Αποτελέσματα μέτρησης της σχετικής έκφρασης του mRNA των γονιδίων IL4, IFN γ , IFN γ R1 και IFN γ R2 με Real time PCR. Η διόρθωση έχει γίνει με μέτρηση του συστατικά εκφραζόμενου γονιδίου HPRT.

PCR, για τα Th1 κύτταρα η IFN γ και για τα Th2 η IL4. Βρήκαμε σε συμφωνία με τη δημοσιευμένη βιβλιογραφία ότι τα διαφοροποιημένα Th1 κύτταρα και τα Th1 που είχαν επανενεργοποιηθεί για μία ώρα (Th1 + 1h) εκφράζουν μόνο IFN γ , ενώ τα διαφοροποιημένα Th2 κύτταρα και τα Th2 που είχαν επανενεργοποιηθεί για μία (Th2 + 1h) ώρα εκφράζουν μόνο IL4. Τα άωρα T κύτταρα δεν εκφράζουν καμία από τις παραπάνω κυτοκίνες (εικόνα 1).

Βρήκαμε, λοιπόν, ότι η διαδικασία της διαφοροποίησης πραγματοποιήθηκε σωστά, αφού δεν παρατηρείται έκφραση των κυτοκινών στα άωρα κύτταρα, ενώ η IL4 εκφράζεται μόνο στα Th2 και τα Th2 + 1h και η IFN γ στα Th1 και τα Th1 + 1h. Εκτός από τις IL4 και IFN γ , εξετάστηκε η έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν τις δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες του υποδοχέα της IFN γ , IFN γ R1 και IFN γ R2. Παρόμοιο πρότυπο έκφρασης με την IL4 έχει ο IFN γ R2, ενώ ο IFN γ R1 συμβαδίζει με την IFN γ . Ακόμα, φαίνεται να υπάρχει παραγωγή IFN γ R1 και IFN γ R2 mRNA στα άωρα CD4⁺ T κύτταρα, γεγονός που μπορεί να υποδηλώνει ότι τα άωρα κύτταρα προετοιμάζονται για να δεχτούν το σήμα για διαφοροποίηση.

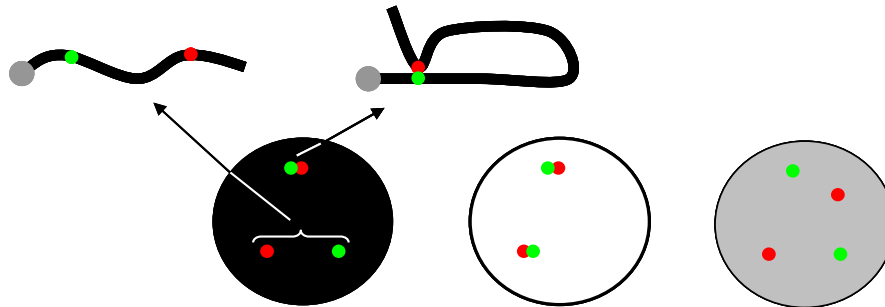
5.2 Πυρηνικός εντοπισμός των γενετικών τόπων IFN γ , IFN γ R1 και IFN γ R2

Για να δούμε την οργάνωση στον τρισδιάστατο χώρο του πυρήνα των υπό μελέτη γενετικών τόπων (IFN γ , IFN γ R1 και IFN γ R2) σε τρισδιάστατους πυρήνες, πραγματοποιήθηκε DNA φθορίζουσα εν σώματι υβριδοποίηση (fluorescent in situ hybridization). Η θέση των γονιδίων είναι γνωστή και όπως φαίνεται στη εικόνα 7, η IFN γ και ο IFN γ R1 είναι στο χρωμόσωμα 10 του ποντικού και απέχουν μεταξύ τους περίπου 98,5 Mb, ασφαλής απόσταση για τη διεξαγωγή πειραμάτων συνεντοπισμού. Ο IFN γ R2 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 16.

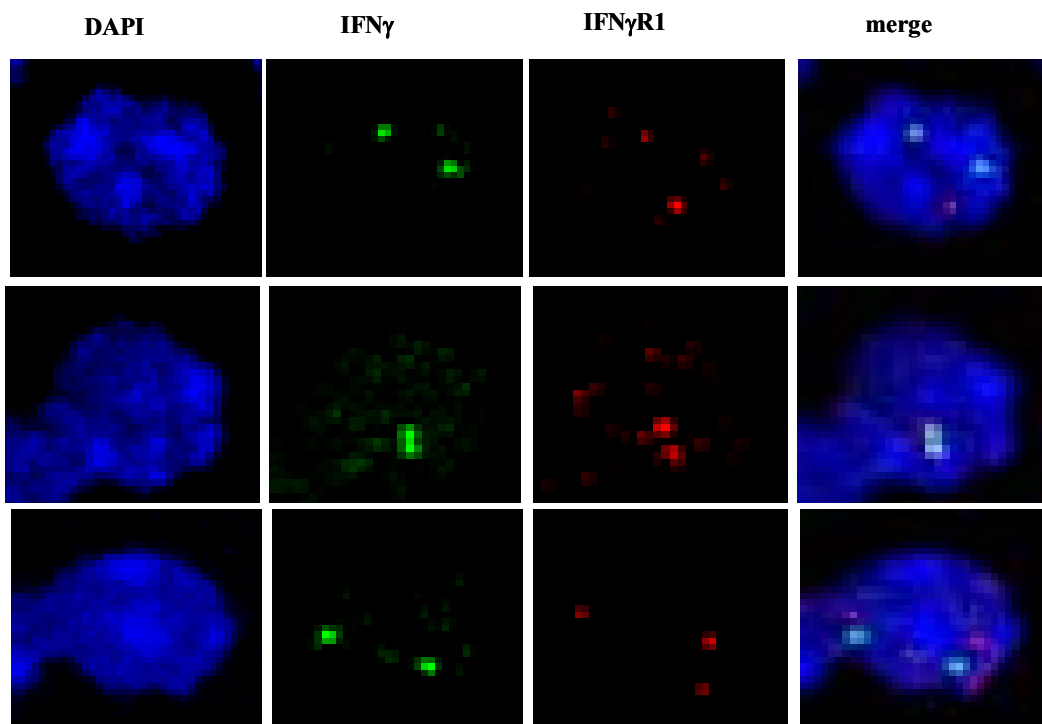


Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση των χρωμοσωμάτων του ποντικού και θέση των γενετικών τόπων IFN γ , IFN γ R1 και IFN γ R2.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι για κάθε γενετικό τόπο υπάρχουν δύο αλληλόμορφα, στα πειράματα DNA-FISH είναι δυνατόν να υπάρχουν τρία πρότυπα για δύο γενετικούς τόπους, : μπορεί να είναι όλοι χωριστά, ανά δύο μαζί ή δύο μαζί και δύο χωριστά.

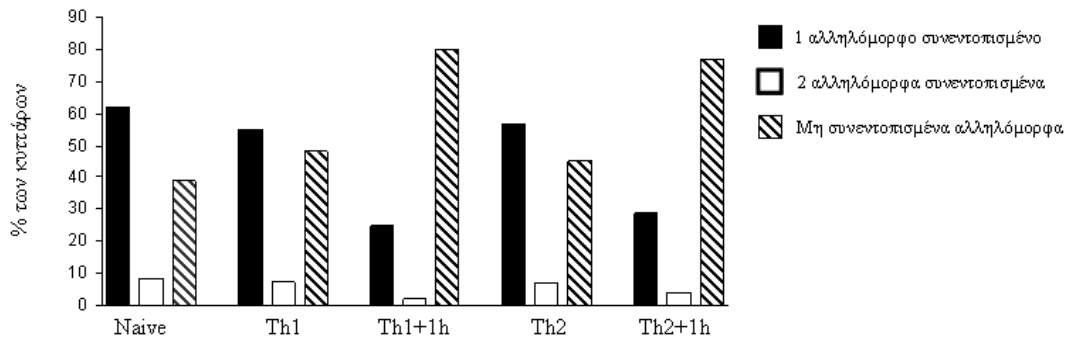


Εικόνα 8: Τα τρία πρότυπα συνεντοπισμού μεταξύ δύο γενετικών τόπων.



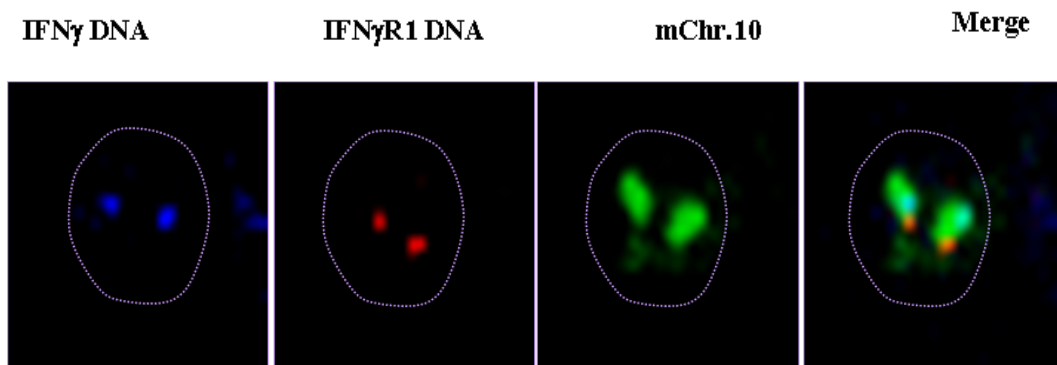
Εικόνα 9: Εικόνες από συνεστιακή μικροσκοπία, όπου φαίνονται οι τρεις συνδυασμοί που ανιχνεύσαμε μεταξύ δύο γενετικών τόπων Με χρώση DAPI υποδεικνύεται ο πυρήνας, με πράσινο ο γενετικός τόπος της IFN γ και με κόκκινο ο γενετικός τόπος του IFN γ R1.

Έπειτα από μέτρηση των αποστάσεων των γενετικών τόπων με τη χρήση του προγράμματος Volocity 4, προέκυψε ότι στα άωρα, τα Th1 και τα Th1 + 1h κύτταρα, πάνω από το 50% των κυττάρων εμφανίζουν μονοαλληλική αλληλεπίδραση, ενώ στην πλειοψηφία των Th2 και Th2 + 1h κυττάρων όλα τα αλληλόμορφα είναι χωριστά (εικόνα 10). Για κάθε κυτταρικό τύπο γίνονταν τρία ανεξάρτητα πειράματα, στα οποία μετρούνταν τουλάχιστον 100 κύτταρα. Ως συνεντοπισμός θεωρείται απόσταση μικρότερη ή ίση των 0,6μm, με κατά μέσο όρο διάμετρο πυρήνα 5,5-6,5μm και διάμετρο κάθε σήματος $\leq 0.3\mu\text{m}$ (άρα 0,6μm αντιστοιχεί σε σήματα που τουλάχιστον ακουμπούν).



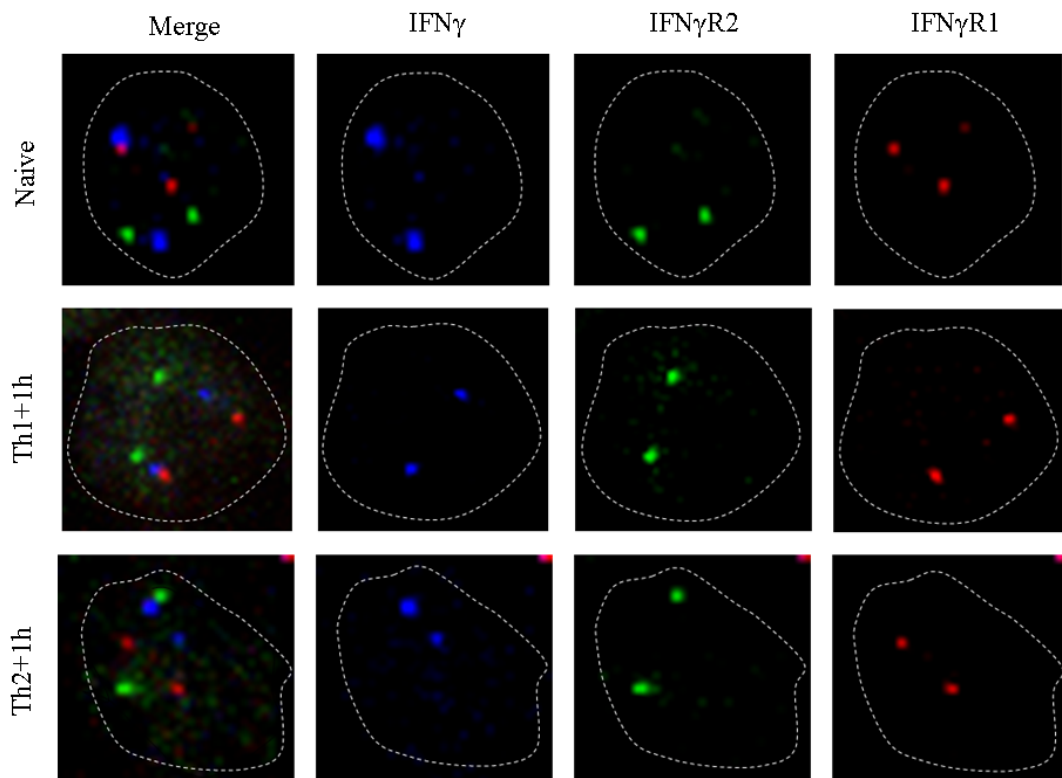
Εικόνα 10: Ποσοστά συνεντοπισμού στα άωρα, Th1, Th2, Th1 + 1h, Th2 + 1h κύτταρα. Με μαύρο χρώμα είναι ο μονοαλληλικός συνεντοπισμός, με άσπρο ο διαλληλικός και με τις μαύρες γραμμές τα κύτταρα χωρίς συνεντοπισμό αλληλίων.

Το επόμενο ερώτημα που έπρεπε να απαντηθεί ήταν εάν οι αλληλεπιδράσεις λαμβάνουν χώρα ανάμεσα στα γονίδια του ίδιου χρωμοσώματος ή των δύο ομόλογων χρωμοσωμάτων καθώς και να επιβεβαιωθεί ότι οι ιχνηθέτες υβριδοποιούν στο σωστό χρωμόσωμα. Έτσι, λοιπόν, έγινε DNA-FISH για τους γενετικούς τόπους IFN γ , IFN γ R1 και το χρωμόσωμα 10. Έπειτα από ανάλυση της χρώσης των χρωμοσωμάτων σε άωρα και Th1 κύτταρα, παρατηρήθηκε ότι οι αλληλεπιδράσεις είναι ενδο-χρωμοσωμικές, δηλαδή συμβαίνουν μέσα στο ίδιο χρωμόσωμα.

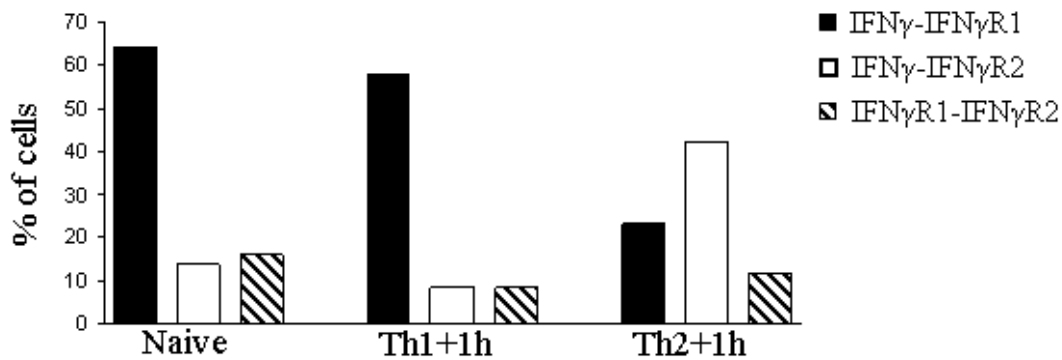


Εικόνα 11 : Εικόνες από συνεστιακή μικροσκοπία σε Th1 κύτταρα. Με μπλέ έχει σημειωθεί ο γενετικός τόπος της IFN γ , με κόκκινο του IFN γ R1 και με πράσινο τα δύο ομόλογα χρωμοσώματα 10 του ποντικού. Μπλε: IFN γ DNA, Κόκκινο: IFN γ R1 DNA, Πράσινο: χρωμόσωμα 10 ποντικού.

Στη συνέχεια για να εξετάσουμε αν και ο γενετικός τόπος που κωδικοποιεί για την πολυπεπτιδική αλυσίδα IFN γ R2 του υποδοχέα της IFN γ αλληλεπιδρά με το γενετικό τόπο της IFN γ ή του IFN γ R1, πραγματοποιήθηκαν DNA-FISH πειράματα και για τους τρεις γενετικούς τόπους, της IFN γ , του IFN γ R1 και του IFN γ R2, στα ώρα στα Th1+1h και τα Th2+1h κύτταρα, για να μελετηθεί ο σχετικός υποπυρηνικός εντοπισμός τους. Από αυτά τα πειράματα προέκυψε ότι στα ώρα και τα Th1+1h κύτταρα, υπάρχει γεινίαση μόνο μεταξύ της IFN γ και του IFN γ R1, σε συμφωνία με τα πρώτα DNA-FISH πειράματα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στην πλειοψηφία των Th2+1h κυττάρων, ο IFN γ R2 έρχεται κοντά με το ένα αλληλόμορφο της IFN γ , ενώ όλοι οι υπόλοιποι γενετικοί τόποι είναι χωριστά. Τα αποτελέσματα από τις τριπλές υβριδοποιήσεις επαληθεύτηκαν και με ανεξάρτητα πειράματα που είχαν συνδυασμούς των παραπάνω γενετικών τόπων ανα δύο, σε όλους τους κυτταρικούς τύπους. Οι αλληλεπιδράσεις ήταν στην πλειοψηφία τους μονοαλληλικές.



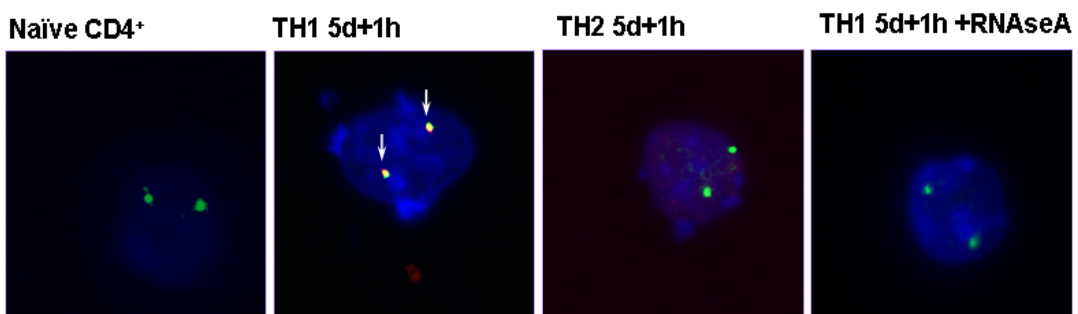
Εικόνα 12: Εικόνες από συνεστιακή μικροσκοπία (confocal microscopy) από ώρα, Th1+1h, Th2+1h κύτταρα, στα οποία έχει γίνει υβριδοποίηση για την ανίχνευση τριών γενετικών τόπων, με DNA-FISH. Στα ώρα και τα Th1+1h κύτταρα υπάρχει μόνοαλληλική αλληλεπίδραση μεταξύ της IFN γ και του IFN γ R1. Στα Th2+1h κύτταρα η IFN γ έρχεται κοντά με τον IFN γ R2. Σε αυτές τις εικόνες το μπλέ χρώμα δείχνει το γενετικό τόπο της IFN γ , με πράσινο του IFN γ R2 και με κόκκινο του IFN γ R1.



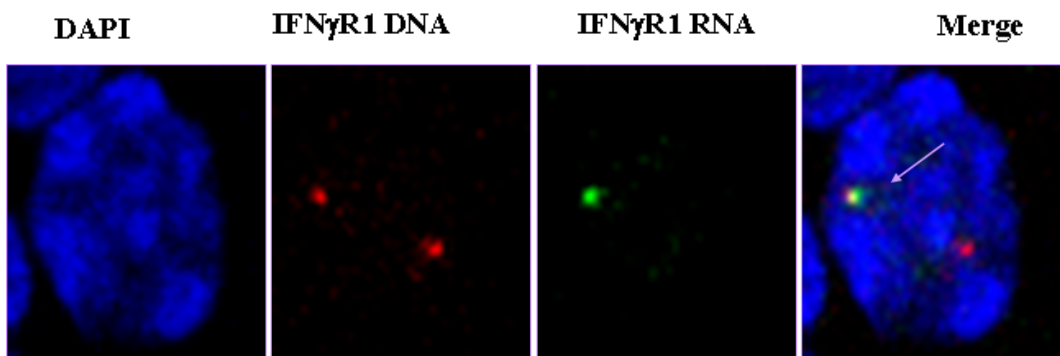
Εικόνα 13: Αποτελέσματα μετρήσεων από τα τριπλά DNA-FISH πειράματα σε άωρα, Th1+1h και Th2+1h κύτταρα, όπου φαίνεται το ποσοστό των κυττάρων με αλληλεπίδραση μεταξύ των γενετικών τόπων, συνδυασμένων ανα δύο. Στα άωρα και τα Th1+1h Η πλειοψηφία των κυττάρων εμφανίζει αλληλεπίδραση μεταξύ των γενετικών τόπων IFN γ -IFN γ R1, ενώ στα Th2+1h, μεταξύ IFN γ -IFN γ R2.

5.3 Λειτουργική σημασία των αλληλεπιδράσεων

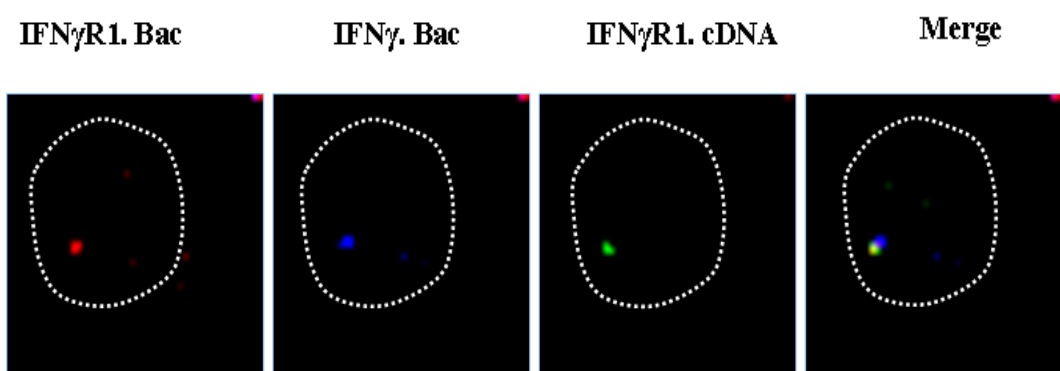
Η παρατήρηση ότι υπάρχουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ συγκεκριμένων περιοχών στο γονιδίωμα ενισχύει την αντίληψη ότι η χρωματίνη δεν είναι τυχαία κατανομημένη στον πυρήνα των κυττάρων, αλλά αποκτά συγκεκριμένη υποπυρηνική εντόπιση. Για να δούμε εάν ο τοπικός εντοπισμός έχει σημασία στη γονιδιακή ρύθμιση των εμπλεκόμενων γενετικών τόπων, αναλύσαμε το πρότυπο έκφρασής τους στο επίπεδο του ενός κυττάρου με ταυτόχρονη ανίχνευση του νέο-παραγομένου RNA μηνύματος και των γενετικών τόπων. Το πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής σε σχέση με την ποσοτική PCR, με την οποία βλέπουμε πληθυσμούς κυττάρων, είναι ότι μας δίνει τη δυνατότητα να μελετήσουμε το αλληλικό πρότυπο έκφρασης. Δηλαδή, μπορούμε να καταλάβουμε εάν εκφράζονται και τα δύο αλληλόμορφα ή μόνο το ένα. Έτσι, λοιπόν, βρήκαμε ότι η IFN γ εκφράζεται και από τα δύο αλληλόμορφα στα Th1 + 1h κύτταρα, ενώ ο IFN γ R1 εκφράζεται στα άωρα και τα Th1 + 1h κύτταρα μόνο από το ένα αλληλόμορφο. Με διπλό DNA-FISH για τα παραπάνω γονίδια και παράλληλη ανίχνευση του μηνύματος του IFN γ R1 δείχθηκε ότι η γεινίαση έχει λειτουργικό ρόλο, αφού η παραγωγή IFN γ R1 mRNA γινόταν από τους γενετικούς τόπους που αλληλεπιδρούσαν.



Εικόνα 14: RNA-DNA FISH σε άωρα, Th1+1h, Th2+1h κύτταρα, για το γενετικό τόπο (πράσινο) και το RNA της IFN γ (κόκκινο). Επώαση με RNase A καταστρέφει το παραγόμενο RNA στα Th1+1h κύτταρα, άρα δεν ανιχνεύουμε RNA με τον cDNA ανιχνευτή.



Εικόνα 15: RNA-DNA FISH σε Th1+1h, κύτταρα, για το γενετικό τόπο (κόκκινο) και το RNA του IFN γ R1 (πράσινο).

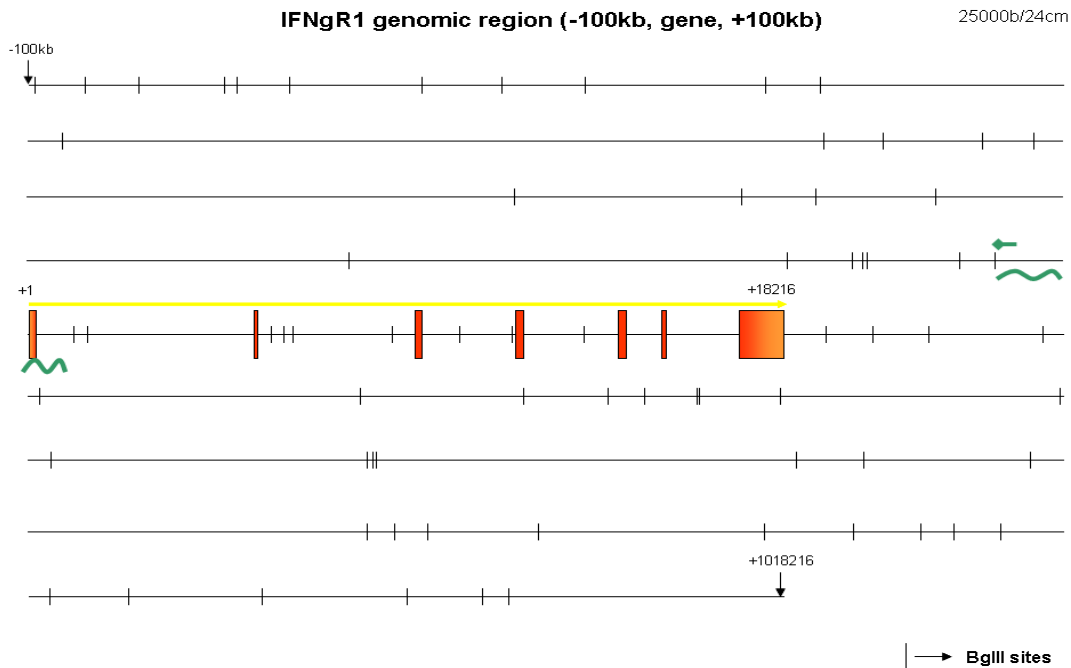


Εικόνα 16: Διπλό DNAFISH για την IFN γ (μπλέ) και τον IFN γ R1 (κόκκινο) και RNA-FISH για τον IFN γ R1 (πράσινο). Ενδεικτική εικόνα, όπου φαίνεται μόνο το ένα χρωμόσωμα.

5.4 Ανίχνευση αλληλεπιδράσεων με ACT

Τα στοιχεία για τις χρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις που έχουν βρεθεί, έχουν προκύψει από δύο ειδών αναλύσεις: από πειράματα DNA FISH και από πειράματα 3C τα οποία ανιχνεύουν αλληλουχίες που βρίσκονται κοντά ώστε να μπορέσουν να ανιχνευτούν έπειτα από μονιμοποίηση με παραφορμαλδεΐδη και ένωσή τους με λιγάση. Επειδή οι τεχνικές που περιλαμβάνουν *in situ* υβριδοποίηση είναι χαμηλής ανάλυσης όσον αφορά τις εμπλεκόμενες DNA αλληλουχίες, οι αλληλεπιδράσεις θα μελετηθούν και με 3C. Στο εργαστήριο επιλέξαμε να πραγματοποιήσουμε μία παραλλαγή της 3C, την ACT (Associated Chromosome Trap) τεχνική, όπου χρησιμοποιώντας μία περιοχή ως «δόλωμα» μπορεί κανείς να ανιχνεύσει όλες τις άλλες αλληλουχίες με τις οποίες αυτή αλληλεπιδρά. Για «δόλωμα» επιλέχθηκε μία περιοχή από τον IFN γ R1 η οποία περιλαμβάνει τον υποκινητή και το πρώτο εξόνιο του γονιδίου, όπως φαίνεται στον χάρτη 1.

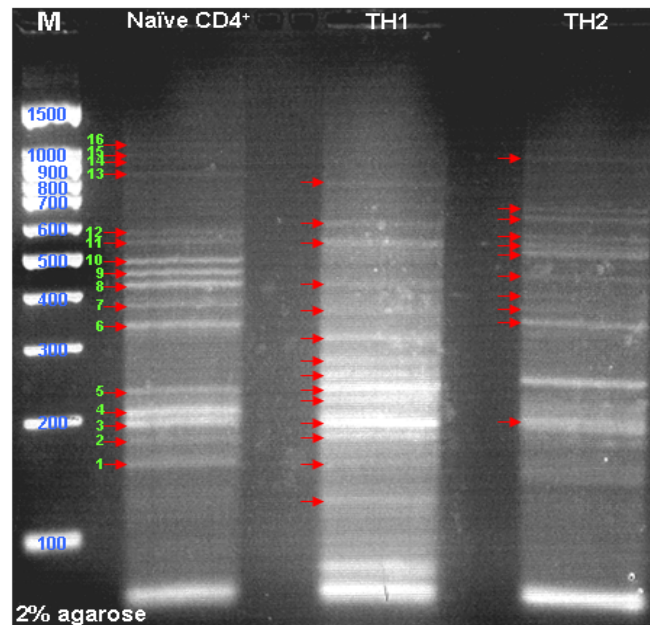
Η υπόθεση εργασίας ήταν ότι υπάρχει συν-ρύθμιση των γενετικών τόπων των IFN γ και IFN γ R1, των οποίων τα πρωτεϊνικά προϊόντα συμμετέχουν στο ίδιο σηματοδοτικό μονοπάτι. Με δεδομένο ότι ο γενετικός τόπος της IFN γ περιλαμβάνει διάφορα ρυθμιστικά στοιχεία εκτεινόμενα σε μία περιοχή περίπου



Χάρτης 1: Γενωμική περιοχή του IFN γ R1. Οι κάθετες γραμμές δείχνουν τις θέσεις περιορισμού του ενζύμου BglII, που χρησιμοποιήθηκε για την πρώτη πέψη στη διαδικασία του ACT. Η περιοχή «δόλωμα» περιλαμβάνει τμήμα του υποκινητή του υποδοχέα και το πρώτο εξόνιο και είναι υπογραμμισμένη στο χάρτη με μία πράσινη τεθλασμένη γραμμή. Με πράσινο βέλος φαίνεται ο εκκινητής πάνω στην περιοχή του «δολώματος», ενώ με κίτρινο βέλος είναι η κατεύθυνση της μεταγραφής του γονιδίου. Οι πορτοκαλί μπάρες συμβολίζουν τα εξόνια.

120kb (εισαγωγή), στόχος του πειράματος ήταν η ανίχνευση των στοιχείων που έχουν ρόλο και στην ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργοποίησης ή και καταστολής του υποδοχέα. Η διαδικασία του ACT (εικόνα 18), όπως περιγράφεται στις μεθόδους και τα υλικά, περιλαμβάνει την απομόνωση των πυρήνων, την μονιμοποίηση της χρωματίνης και την πέψη της με ένα πρισεκτικά επιλεγμένο περιοριστικό ένζυμο (εδώ χρησιμοποιήσαμε την BglII), την συγκόλληση των κομμένων κομματιών DNA με χαμηλή συγκέντρωση λιγάσης για να ευνοηθεί η ένωση των πολύ κοντινών κομματιών και την απελευθέρωση της χρωματίνης από τις πρωτεΐνες (de-crosslinking). Ακολουθεί μία δεύτερη πέψη με ένα περιοριστικό ένζυμο που απαντάται πιο συχνά στο DNA (MspI) και συγκόλληση του δείγματος με ολιγονουκλεοτίδια ειδικά σχεδιασμένα για τα άκρα που αφήνει το δεύτερο περιοριστικό ένζυμο. Η ανίχνευση του προϊόντος γίνεται με PCR, χρησιμοποιώντας εκκινητές πάνω στα ολιγονουκλεοτίδια και στην αλληλουχία «δόλωμα». Το αποτέλεσμα που προέκυψε από την PCR όταν πραγματοποιήθηκε το πείραμα σε άωρα, Th1 και Th2 κύτταρα, φανέρωσε ότι υπάρχει διαφορετικό πρότυπο αλληλεπιδράσεων μεταξύ των τριών τύπων κυττάρων, όπως φαίνεται στην εικόνα 15. Ένα μεγάλο ποσοστό από τα προϊόντα απομονώθηκε από το πήκτωμα αγαρόζης, κλωνοποιήθηκε στον pCR2.1 φορέα και αλληλουχίστηκε. Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης δεν προέκυψε κανένα τμήμα της γενωμικής περιοχής της IFN γ . Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη μεγάλων πρωτεϊνικών συμπλόκων στην περιοχή του υποκινητή του υποδοχέα, τα οποία ενδεχομένως να παρεμποδίζουν τη συγκόλληση των DNA τμημάτων. Υπάρχουν όμως, και άλλες παράμετροι που πρέπει να ληφθούν υπ'όψη, όπως ανίχνευση των κομματιών που αλληλεπιδρούν μόνο από τη μία πλευρά του BglII κομματιού

του υποκινητή (εμείς μελετήσαμε το 5' άκρο) ή ακόμα και η αδυναμία κλωνοποίησης των συγκεκριμένων τμημάτων, αφού κατά την απομόνωση από την πηκτή αгарόζης, δεν ήταν δυνατόν να ληφθούν όλες οι μπάντες, παρά μόνο οι πιο εμφανείς. Η προσπάθεια για τον εντοπισμό των αλληλεπιδρώντων κομματιών θα συνεχιστεί με τη διαδικασία 3C, όπου θα σχεδιαστούν ειδικοί εκκινητές για κάθε ένα από τα ρυθμιστικά στοιχεία της IFN γ , τα οποία εμπεριέχονται σε BgIII γενωμικά θραύσματα, και τον IFN γ R1.

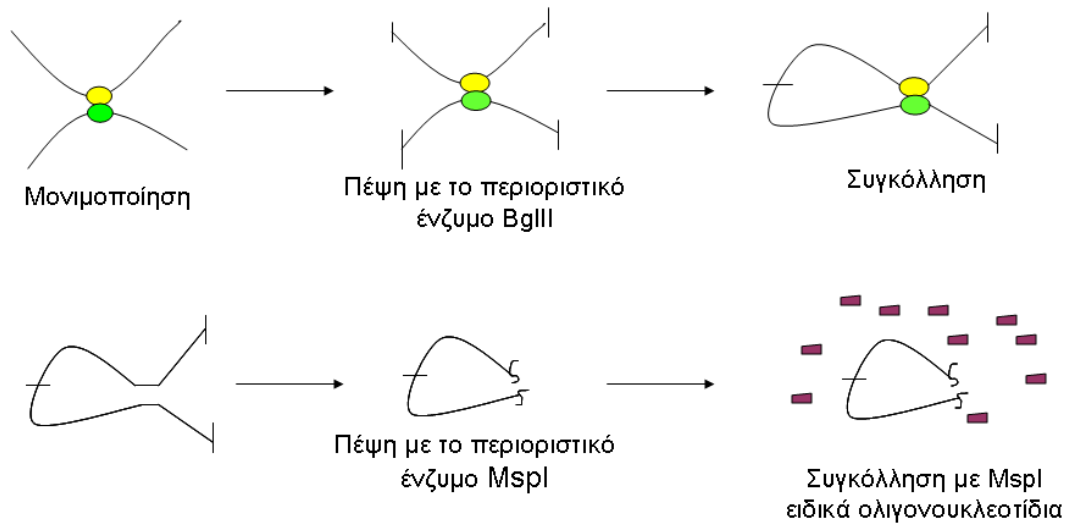


Εικόνα 17: PCR αντίδραση σε δείγματα ACT από άωρα, Th1 και Th2 κύτταρα. Με M συμβολίζεται ο μάρτυρας γνωστών μεγεθών. Το κόκκινο βέλος δείχνει τις μπάντες που απομονώθηκαν από την πηκτή αгарόζης και κλωνοποιήθηκαν.

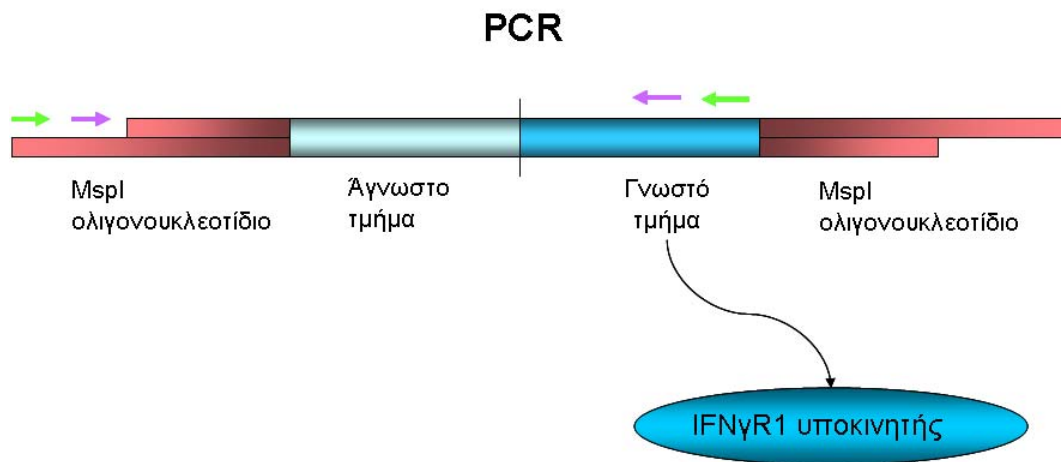
Άωρα		TH1		TH2	
Χρ	Γενετικός τύπος	Χρ	Γενετικός τύπος	X	Γενετικός τύπος
2	pKC binding pr. 1	4	Krupel like factor 4	ρ	
3	Hypoth pr. LOC109050	5	Coiled coil domain containing 63	2	pKC binding protein 1
5	Pr. Phosphatase 1	9	Solute carrier family 24	8	Ubiquitin specific protease 38
5	Ancyrin repeat domain pr 17, isoform b	10	IFN γ R1 (inside first intron)	14	Thyroid hormone receptor beta
7	Akap 13	17	VEFG a	X	Hypoth pr. LOC 547160
8	Hypoth pr. LOC672735	19	Calcium binding protein 2		
10	Serum/ glucocorticoid regulated kinase				
10	Region downstream of IFN γ R1 gene				
10	TNFa i pr				
17	S1 RNA binding pr				

Πίνακας 1: Αποτελέσματα από ACT σε άωρα TH1 και TH2 κύτταρα

ACT (Associated Chromosome Trap)



A

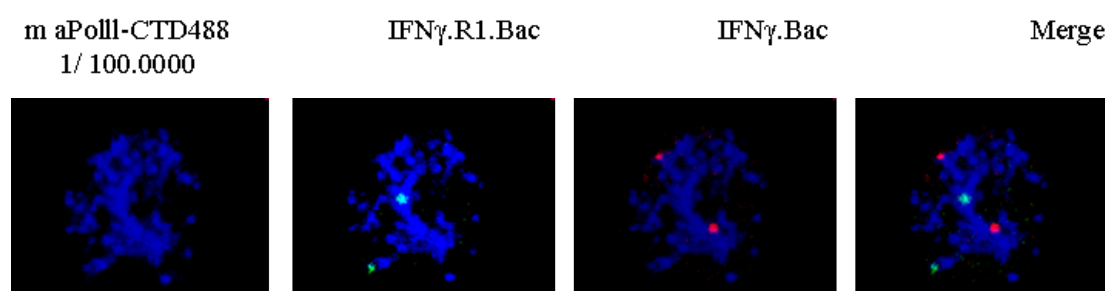


B

Εικόνα 18: Διαδικασία ACT. A) Μετά τα πρώτα βήματα που είναι ίδια με τη 3C, ακολουθεί μία δεύτερη πέψη με ένα συχνά απαντώμενο περιοριστικό ένζυμο (MspI) και συγκόλληση των μορίων με ειδικά γαι τα MspI άκρα ολιγονουκλεοτίδια. B) Για την ανίχνευση των συγκολλημένων προϊόντων γίνεται PCR με εκκινητές σχεδιασμένους πάνω στα ολιγονουκλεοτίδια και στην αλληλουχία «δόλωμα».

5.5 Χρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις και υπο-πυρηνικά οργανίδια

Τα τελευταία χρόνια έχει επικρατήσει η άποψη ότι το γένωμα είναι χωροταξικά οργανωμένο μέσα στον πυρήνα των κυττάρων, όπου τα χρωμοσώματα και τα γονίδια καταλαμβάνουν συγκεκριμένες θέσεις, ανάμεσα στις οποίες συγκαταλέγονται και τα διάφορα υπο-πυρηνικά οργανίδια ή υπο-πυρηνικές δομές, όπως οι πυρινίσκοι και τα μεταγραφικά εργοστάσια (transcription factories) (Carter et al., 2008; Mitchell and Fraser, 2008). Ο τρόπος δημιουργίας αυτής της οργάνωσης παραμένει άγνωστος παρ'ότι οι χρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφόρων περιοχών φαίνεται να έχουν κάποια σχέση. Επομένως, στην παρούσα εργασία ελέγχθηκε εάν οι αλληλεπιδράσεις αυτές γίνονται σε συγκεκριμένες υπο-πυρηνικές δομές καθώς και ο ρόλος τους στην καθιέρωση των αλληλεπιδράσεων. Η προσπάθεια εστιάστηκε στα μεταγραφικά εργοστάσια. Σύμφωνα με τον ορισμό τους, τα μεταγραφικά εργοστάσια είναι πυρηνικά συσσωματώματα που περιέχουν υψηλή συγκέντρωση RNA πολυμεράσης II και αποτελούν θέσεις μεταγραφής πολλών γονιδίων. Συνεπώς υπάρχει πιθανότητα οι γενετικοί τόποι που βρίσκονται κοντά και μεταγράφονται, να συνυπάρχουν σε ένα κοινό μεταγραφικό εργοστάσιο. Για να το αποδείξουμε, πραγματοποιήσαμε DNA-FISH πειράματα, όπου έγινε σύγχρονη χρώση με αντίσωμα για την ανίχνευση της φωσφορυλιωμένης, άρα ενεργοποιημένης, μορφής της RNA πολυμεράσης II και ταυτόχρονα οπτικοποίηση της θέσης επιλεγμένων γενετικών τόπων (IFN γ R1 και IFN γ). Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην εικόνα 19 προέρχονται από τα πρώτα πειράματα που έγιναν για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών και της συγκέντρωσης του αντισώματος. Πρέπει να παραγματοποιηθούν επιπλέον πειράματα σε όλους τους κυτταρικούς τύπους για τη εξαγωγή συμπερασμάτων. Εάν αποδειχθεί η υπόθεση του εντοπισμού των αλληλεπιδράσεων μέσα σε κάποιο PolII εργοστάσιο, θα μπορούσαν να γίνουν περαιτέρω πειράματα, στα οποία με τη χρήση διαφόρων φαρμάκων. Για παράδειγμα θα μπορούσαν τα κύτταρα να επωαστούν για μικρό χρονικό διάστημα με αμανιτίνη, η οποία προκαλεί αποσύνδεση της πολυμεράσης από το DNA, ώστε να φανεί εάν η πολυμεράση είναι αυτή που κρατά τους γενετικούς τόπους σε γειννίαση. Επιπρόσθετα, επώαση με DRB, το οποίο παρεμποδίζει τη μεταγραφή έπειτα από το στάδιο της έναρξης, επηρεάζει δηλαδή, τη διαδικασία της επιμήκυνσης (elongation). Το τελευταίο θα μας δείξει εάν η διαδικασία της μεταγραφής διατηρεί τις αλληλεπιδράσεις.



Εικόνα 19: Ανοσοϊστοχημική χρώση DNA πολυμεράσης II σε συνδυασμό με DNA-FISH. Με μπλέ χρώμα φαίνονται τα μεταγραφικά εργοστάσια (συγκέντρωση anti-PolII αντισώματος 1/100.000), με πράσινο είναι ο γενετικός τόπος του IFN γ R1 και με κόκκινο ο γενετικός τόπος της IFN γ .

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανακάλυψη λειτουργικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ γενετικών τόπων έχει αλλάξει την αντίληψη που είχαμε μέχρι τώρα για την οργάνωση του γονιδιώματος. Στις περισσότερες περιπτώσεις σχηματίζεται μία λούπα, που έχει ως κύριο ρόλο τη δημιουργία ενός απομονωμένου περιβάλλοντος, το οποίο βοηθά στην αναπτυξιακά ελεγχόμενη και ειδική για τα συγκεκριμένα γονίδια μεταγραφή, ενώ αποκλείονται από μεταγραφικά σύμπλοκα γονίδια που είναι κοντά. Συνεπώς, εκτός από το πρώτο επίπεδο ελέγχου που αφορά στις ρυθμιστικές πρωτεΐνες που εκφράζονται (μεταγραφικοί παράγοντες) και στην προσβασιμότητα που έχουν στην χρωματίνη, με τις χρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις παρέχεται και ένα δεύτερο επίπεδο ελέγχου της ενεργοποίησης των γονιδίων που ρυθμίζονται μεταγραφικά.

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται για πρώτη φορά η κοινή ρύθμιση μέσω γειτνίασης των γενετικών τους τόπων, γονιδίων που συμμετέχουν στο ίδιο σηματοδοτικό μονοπάτι. Από πειράματα φθορίζουσας *in situ* υβριδοποίησης, φάνηκε ότι το γονίδιο της IFN γ βρίσκεται πολύ κοντά στον πυρηνικό χώρο με αυτό του IFN γ R1 και ο συνεντοπισμός πιθανά συνεπάγεται τη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου του υποδοχέα. Το ερώτημα που γεννιέται είναι γιατί το γονίδιο του υποδοχέα χρειάζεται να βρεθεί δίπλα στην γενωμική περιοχή της IFN γ ώστε να μπορέσει να μεταγραφεί. Πιστεύουμε ότι για να εξασφαλιστεί κοινή ρύθμιση των γενετικών τόπων, το γονίδιο που κωδικοποιεί την πολυπεπτιδική αλυσίδα 1 του υποδοχέα της IFN γ , δανείζεται κάποια από τα ρυθμιστικά στοιχεία της IFN γ . Επιπλέον, ο υποκινητής του γονιδίου IFN γ R1 δεν περιέχει το κλασικό TATA κουτί που χρησιμεύει για τη στρατολήγηση του εναρκτήριου συμπλόκου (pre-initiation complex) της μεταγραφής, δηλαδή του πολυ-πρωτεϊνικού συμπλόκου TFIID μαζί με άλλους γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες και την RNA πολυμεράση II. Τα γονίδια των οποίων οι υποκινητές δεν διαθέτουν ένα TATA κουτί (TATA-less) 25-30 βάσεις πριν από το σημείο έναρξης της μεταγραφής διαθέτουν άλλα βοηθητικά στοιχεία (Smale, 1997). Ένα από αυτά είναι το Inr (εναρκτής), το οποίο είναι το μόνο γνωστό στοιχείο σε γονίδια ευκαρυωτικών οργανισμών που μπορεί να θεωρηθεί ανάλογο του κουτιού TATA και που μπορεί να οδηγήσει σε μεταγραφή μέσω της RNA πολυμεράσης II. Το Inr έχει φανεί ότι μπορεί να δρα σε συνεργασία με ένα κοντινό TATA κουτί ή με πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης του ενεργοποιητικού παράγοντα Sp1. Τόσο το TATA όσο και οι Sp1 θέσεις πρέπει να είναι εντοπισμένες πριν από το Inr και προσδίδουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στη μεταγραφή μέσω Inr. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ο T-bet, ένας μεταγραφικός παράγοντας ειδικός για τα Th1 κύτταρα μπορεί και αλληλεπιδρά με τον Sp1 (Lee et al., 2004). Υποθέτουμε λοιπόν, ότι στα άωρα T κύτταρα οι συντηρημένες περιοχές της Ifn γ έρχονται κοντά με το γενετικό τόπο του IFN γ R1, ώστε τα ρυθμιστικά στοιχεία της IFN γ να οδηγήσουν σε ισχυρή μεταγραφή του IFN γ R1 γονιδίου. Στα Th1 κύτταρα όπου εκφράζεται ο T-bet, μπορεί και σταθεροποιεί τη χρωμοσωμική θέση των γενετικών τόπων σε αυτά τα κύτταρα, μέσω αλληλεπίδρασής του με τον Sp1 και επιπλέον επάγει την μεταγραφή της IFN γ . Επιπρόσθετα, έχει

αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι κάποιοι υποκινητές, όπως του γονιδίου της p53, δεν έχουν κουτί TATA για να μην υπόκεινται σε μεταγραφική σίγηση (Smale, 1997). Συνεπώς, στην περίπτωση του IFN γ R1, η καταστολή της μεταγραφής μπορεί να μην προέρχεται από κάποιο κατασταλτικό παράγοντα, αλλά να εξαρτάται από την αλληλεπίδραση με τα ρυθμιστικά στοιχεία της IFN γ . Η παραπάνω υπόθεση συμφωνεί με τα αποτελέσματά μας, αφού στα Th2 κύτταρα που δεν υπάρχει IFN γ -IFN γ R1 αλληλεπίδραση, δεν υπάρχει και μεταγραφή του υποδοχέα.

Σημαντική παρατήρηση ήταν ότι και τα γονίδια που κωδικοποιούν τις δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες για ένα λειτουργικό υποδοχέα της IFN γ , εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στα άωρα T λεμφοκύτταρα ενώ ο IFN γ R1 εκφράζεται κυρίως στα Th1 και ο IFN γ R2 στα Th2 κύτταρα. Τα άωρα CD4+ T λεμφοκύτταρα διαθέτουν ένα βαθμό πολυδυναμικότητας, αφού μπορούν να διαφοροποιηθούν περαιτέρω προς Th1, Th2 και Th17 κύτταρα. Για να διαφοροποιηθούν προς κάποιο συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο και σχετικά γρήγορα ώστε να μπορέσει ο οργανισμός να αντιμετωπίσει σε μία ανοσολογική πρόκληση, πρέπει να είναι προετοιμασμένα να δεχτούν το κατάλληλο σήμα. Ένας ενδεχόμενος τρόπος, είναι με το να εκφράζουν τους υποδοχείς των σημάτων αυτών, όπως τους υποδοχείς της IFN γ . Τα Th1 κύτταρα δεν εκφράζουν και τους δύο υποδοχείς της IFN γ , διότι έπειτα από το αρχικό σήμα από την IFN γ που δίνεται κατά τη διαφοροποίησή τους, μπορεί να μην είναι απαραίτητη η δράση της μέσω του JAK-STAT μονοπατίου, εκτός από τις περιπτώσεις όπου η IFN γ μαζί με τον IFN γ R1 μπαίνουν μέσα στο κύτταρο ως σύμπλοκο και ρυθμίζουν τη μεταγραφή (Ahmed and Johnson, 2006). Ακόμη, έλλειψη σηματοδότησης από την IFN γ εξαιτίας της απουσίας της IFN γ R2 υπομονάδας του υποδοχέα, αποτελεί ένα μηχανισμό προστασίας του κυττάρου από το σήμα που σταματά τον πολλαπλασιασμό (anti-proliferative signals) και δίνεται από την ίδια την IFN γ και επιπλέον η απώλεια του υποδοχέα φαίνεται να είναι απόρροια της IFN γ σηματοδότησης (Bach et al., 1997).

Γιατί όμως ο IFN γ R2 εκφράζεται στα Th2 κύτταρα? Ίσως η έκφρασή του να σχετίζεται με την έλλειψη κάποιου κατασταλτικού μηχανισμού. Ο IFN γ R2 εκφράζεται στα άωρα T λεμφοκύτταρα και συνεχίζει να εκφράζεται στα Th2 κύτταρα επειδή δεν υπάρχει το αρνητικό σήμα της IFN γ που τον καταστέλει. Διαφορετικά θα μπορούσε να έχει ένα δεύτερο ανεξερεύνητο ρόλο σε κάποιο άλλο σηματοδοτικό μονοπάτι. Παρόλο που στο χρονικό πλαίσιο της μεταπτυχιακής εργασίας δεν πραγματοποιήθηκαν RNA-DNA FISH πειράματα για τον IFN γ R2 ώστε να γίνει κατανοητός ο λειτουργικός ρόλος των αλληλεπιδράσεων, τα DNA-FISH αποτελέσματα φανερώνουν ότι το ένα αλληλόμορφο του IFN γ R2 αλληλεπιδρά με το ένα αλληλόμορφο της IFN γ . Με δεδομένο ότι στα άωρα κύτταρα δεν παρατηρείται γεινίαση και ταυτόχρονα ο υποδοχέας εκφράζεται, είναι πιθανό αυτές οι δια-χρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις να έχουν ως αποτέλεσμα την καταστολή του ενός αλληλομόρφου του IFN γ R2 και να πραγματοποιούνται σε περιοχή του πυρήνα όπου ευνοείται η γονιδιακή σίγηση. Με τα παραπάνω συμβαδίζουν και οι παρατηρήσεις ότι στα άωρα κύτταρα που εκφράζεται ο υποδοχέας IFN γ R1 δεν υπάρχει κάποια αλληλεπίδραση και ότι στα Th1 κύτταρα που εκφράζεται η IFN γ πάλι δεν υπάρχει αλληλεπίδραση. Άρα, τα μεταγραφικά ενεργά αλληλόμορφα της IFN γ και του IFN γ R2 δε βρίσκονται κοντά.

Σημαντικό ρόλο στη χωροταξική διαμόρφωση της χρωματίνης έχουν ενδεχομένως και οι διάφορες υπο-πυρηνικές δομές. Αν και προς το παρόν δεν έχει

δοθεί μία σαφής απάντηση στο ερώτημα του ποιό φαινόμενο γίνεται πρώτο (εάν τα υπο-πυρηνικά οργανίδια ευθύνονται για τη δημιουργία των αλληλεπιδράσεων ή εάν η γειτνίαση των χρωμοσωμάτων πραγματοποιείται ανεξάρτητα, με κάποιο άλλο μηχανισμό και κατόπιν για λειτουργικούς λόγους τα χρωμοσώματα συνεντοπίζονται στους σχηματισμούς αυτούς) υπάρχουν παρατηρήσεις που δείχνουν το συνεντοπισμό υπο-πυρηνικών σωματιδίων και διαφόρων περιοχών του γονιδιώματος (Sexton et al., 2007). Ακόμα η επιλογή του οργανιδίου δεν πρέπει να είναι τυχαία, αλλά να πραγματοποιείται με συγκεκριμένο τρόπο (Roix et al., 2003). Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα του γενετικού τύπου των ανοσοσφαιρινών και του c-myc γονιδίου, όπου γειτνιάζουν στο ίδιο μεταγραφικό εργοστάσιο (Roix et al., 2003). Μάλιστα, η γειτνίαση αυτή οδηγεί πολλές φορές σε μετατοπίσεις και σε καρκινικούς όγκους. Αν και δεν υπάρχουν ακόμα πειραματικά δεδομένα που να στηρίζουν την υπόθεση, μπορεί και στην περίπτωση της IFN γ και του IFN γ R1, να συμβαίνει το ίδιο, δηλαδή, να βρίσκονται στο ίδιο μεταγραφικό εργοστάσιο. Εάν η RNA πολυμεράση συμμετέχει ενεργά στην καθιέρωση των αλληλεπιδράσεων, μπορεί να εξεταστεί με πειράματα όπου θα καταστρέφεται η πολυμεράση και παράλληλα θα μελετάται η απόσταση των γενετικών τόπων. Τέλος, θα μπορούσε κανείς να μελετήσει το ρόλο των οργανιδίων αυτών σε σχέση με τη μεταγραφική απορρύθμιση και την εμφάνιση παθήσεων όπως ο καρκίνος, τα αυτοάνοσα νοσήματα και η ευπάθεια σε συγκεκριμένους μικροοργανισμούς, με δεδομένο ότι τόσο η IFN γ και οι υποδοχείς της έχουν συσχετιστεί με τις παραπάνω παθολογικές καταστάσεις (Billiau, 1998; Garcia-Tunon et al., 2007).

Μια άλλη σημαντική παράμετρος στη μελέτη των χρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων είναι το κατά πόσο τα φαινόμενα αυτά είναι δυναμικά ή στατικά. Στο σύστημά μας οι αλληλεπιδράσεις φαίνεται να είναι δυναμικές, αφού IFN γ -IFN γ R1 γειτνίαση παρατηρείται μόνο στα άωρα και τα Th1 κύτταρα, ενώ IFN γ -IFN γ R2 μόνο στα Th2 κύτταρα. Παρόλα αυτά για να αποδειχθεί πλήρως η δυναμικότητα του φαινομένου, χρειάζεται να γίνουν πειράματα μικροσκοπίας σε ζωντανά κύτταρα. Δεν είναι ξεκάθαρο ακόμα ποιό είναι το εναρκτήριο σήμα ή με ποιο μηχανισμό δημιουργούνται, καθιερώνονται ή χάνονται, αλλά φαίνεται να είναι αναπτυξιακά ελεγχόμενες και να έχουν σημαντικό ρόλο στη μεταγραφή.

Είναι ξεκάθαρο πλέον ότι η θέση των χρωμοσωμάτων στον πυρηνικό χώρο δεν είναι τυχαία. Παρόλο που τα διάφορα γονίδια συμπεριφέρονται διαφορετικά και δεν είναι εύκολο να διεξάγει κανείς γενικευμένα συμπεράσματα, η κατανόηση της σχέσης μεταξύ της θέσης και της λειτουργίας αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο έρευνας. Προς αυτή την κατεύθυνση έχει βοηθήσει και η ανάπτυξη τεχνικών που βασίζονται στην οπτικοποίηση της θέσης, όπως η *in situ* υβριδοποίηση, και τεχνικών μεγαλύτερης ανάλυσης, όπως η 3C. Οι προαναφερθείσες μεθοδολογίες έχουν οδηγήσει στη συστηματική και αμερόληπτη μελέτη των κανόνων που διέπουν την οργάνωση της χρωματίνης και τη γονιδιακή ρύθμιση.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S. (2007) *Cellular and Molecular Immunology*.
- Agarwal, S. and Rao, A. (1998) Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation. *Immunity*, **9**, 765-775.
- Ahmed, C.M. and Johnson, H.M. (2006) IFN-gamma and its receptor subunit IFNGR1 are recruited to the IFN-gamma-activated sequence element at the promoter site of IFN-gamma-activated genes: evidence of transactivational activity in IFNGR1. *J Immunol*, **177**, 315-321.
- Ansel, K.M., Djuretic, I., Tanasa, B. and Rao, A. (2006) Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. *Annu Rev Immunol*, **24**, 607-656.
- Bach, E.A., Aguet, M. and Schreiber, R.D. (1997) The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol*, **15**, 563-591.
- Bartlett, N.W., Buttigieg, K., Kolenko, S.V. and Smith, G.L. (2005) Murine interferon lambdas (type III interferons) exhibit potent antiviral activity in vivo in a poxvirus infection model. *J Gen Virol*, **86**, 1589-1596.
- Billiau, A. (1998) [Interferon-gamma, the Th1/Th2 paradigm and autoimmune diseases]. *Verh K Acad Geneesk Belg*, **60**, 271-285.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. and Howard, J.C. (1997) Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*, **15**, 749-795.
- Carter, D.R., Eskiw, C. and Cook, P.R. (2008) Transcription factories. *Biochem Soc Trans*, **36**, 585-589.
- Cho, J.Y., Grigura, V., Murphy, T.L. and Murphy, K. (2003) Identification of cooperative monomeric Brachyury sites conferring T-bet responsiveness to the proximal IFN-gamma promoter. *Int Immunol*, **15**, 1149-1160.
- Cooke, A. (2006) Th17 cells in inflammatory conditions. *Rev Diabet Stud*, **3**, 72-75.
- Darnell, J.E., Jr., Kerr, I.M. and Stark, G.R. (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, **264**, 1415-1421.
- Decker, T., Stockinger, S., Karaghiosoff, M., Muller, M. and Kovarik, P. (2002) IFNs and STATs in innate immunity to microorganisms. *J Clin Invest*, **109**, 1271-1277.
- Dekker, J., Rippe, K., Dekker, M. and Kleckner, N. (2002) Capturing chromosome conformation. *Science*, **295**, 1306-1311.
- Djuretic, I.M., Levanon, D., Negreanu, V., Groner, Y., Rao, A. and Ansel, K.M. (2007) Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells. *Nat Immunol*, **8**, 145-153.
- Dong, C. (2008) TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol*, **8**, 337-348.
- Dostie, J. and Dekker, J. (2007) Mapping networks of physical interactions between genomic elements using 5C technology. *Nat Protoc*, **2**, 988-1002.

- Dostie, J., Richmond, T.A., Arnaout, R.A., Selzer, R.R., Lee, W.L., Honan, T.A., Rubio, E.D., Krumm, A., Lamb, J., Nusbaum, C., Green, R.D. and Dekker, J. (2006) Chromosome Conformation Capture Carbon Copy (5C): a massively parallel solution for mapping interactions between genomic elements. *Genome Res*, **16**, 1299-1309.
- Ehrt, S., Schnappinger, D., Bekiranov, S., Drenkow, J., Shi, S., Gingeras, T.R., Gaasterland, T., Schoolnik, G. and Nathan, C. (2001) Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon-gamma and Mycobacterium tuberculosis: signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase. *J Exp Med*, **194**, 1123-1140.
- Filipe-Santos, O., Bustamante, J., Chagnier, A., Vogt, G., de Beaucoudrey, L., Feinberg, J., Jouanguy, E., Boisson-Dupuis, S., Fieschi, C., Picard, C. and Casanova, J.L. (2006) Inborn errors of IL-12/23- and IFN-gamma-mediated immunity: molecular, cellular, and clinical features. *Semin Immunol*, **18**, 347-361.
- Garcia-Tunon, I., Ricote, M., Ruiz, A.A., Fraile, B., Paniagua, R. and Royuela, M. (2007) Influence of IFN-gamma and its receptors in human breast cancer. *BMC Cancer*, **7**, 158.
- Greenlund, A.C., Morales, M.O., Viviano, B.L., Yan, H., Krolewski, J. and Schreiber, R.D. (1995) Stat recruitment by tyrosine-phosphorylated cytokine receptors: an ordered reversible affinity-driven process. *Immunity*, **2**, 677-687.
- Hatton, R.D., Harrington, L.E., Luther, R.J., Wakefield, T., Janowski, K.M., Oliver, J.R., Lallone, R.L., Murphy, K.M. and Weaver, C.T. (2006) A distal conserved sequence element controls Ifng gene expression by T cells and NK cells. *Immunity*, **25**, 717-729.
- Heim, M.H., Kerr, I.M., Stark, G.R. and Darnell, J.E., Jr. (1995) Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway. *Science*, **267**, 1347-1349.
- Igarashi, K., Garotta, G., Ozmen, L., Ziemiecki, A., Wilks, A.F., Harpur, A.G., Lerner, A.C. and Finbloom, D.S. (1994) Interferon-gamma induces tyrosine phosphorylation of interferon-gamma receptor and regulated association of protein tyrosine kinases, Jak1 and Jak2, with its receptor. *J Biol Chem*, **269**, 14333-14336.
- Ikeda, H., Old, L.J. and Schreiber, R.D. (2002) The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev*, **13**, 95-109.
- Isaacs, A. and Lindenmann, J. (1957) Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **147**, 258-267.
- Kotenko, S.V., Gallagher, G., Baurin, V.V., Lewis-Antes, A., Shen, M., Shah, N.K., Langer, J.A., Sheikh, F., Dickensheets, H. and Donnelly, R.P. (2003) IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol*, **4**, 69-77.
- Lee, D.U., Avni, O., Chen, L. and Rao, A. (2004) A distal enhancer in the interferon-gamma (IFN-gamma) locus revealed by genome sequence comparison. *J Biol Chem*, **279**, 4802-4810.
- Lee, G.R., Spilianakis, C.G. and Flavell, R.A. (2005) Hypersensitive site 7 of the TH2 locus control region is essential for expressing TH2 cytokine genes and for long-range intrachromosomal interactions. *Nat Immunol*, **6**, 42-48.

- Mitchell, J.A. and Fraser, P. (2008) Transcription factories are nuclear subcompartments that remain in the absence of transcription. *Genes Dev*, **22**, 20-25.
- Navarro, A., Anand-Apte, B., Tanabe, Y., Feldman, G. and Lerner, A.C. (2003) A PI-3 kinase-dependent, Stat1-independent signaling pathway regulates interferon-stimulated monocyte adhesion. *J Leukoc Biol*, **73**, 540-545.
- Parmar, S. and Plataniias, L.C. (2003) Interferons: mechanisms of action and clinical applications. *Curr Opin Oncol*, **15**, 431-439.
- Ramana, C.V., Chatterjee-Kishore, M., Nguyen, H. and Stark, G.R. (2000) Complex roles of Stat1 in regulating gene expression. *Oncogene*, **19**, 2619-2627.
- Ramana, C.V., Gil, M.P., Schreiber, R.D. and Stark, G.R. (2002) Stat1-dependent and -independent pathways in IFN-gamma-dependent signaling. *Trends Immunol*, **23**, 96-101.
- Roix, J.J., McQueen, P.G., Munson, P.J., Parada, L.A. and Misteli, T. (2003) Spatial proximity of translocation-prone gene loci in human lymphomas. *Nat Genet*, **34**, 287-291.
- Schoenborn, J.R., Dorschner, M.O., Sekimata, M., Santer, D.M., Shnyreva, M., Fitzpatrick, D.R., Stamatoyannopoulos, J.A. and Wilson, C.B. (2007) Comprehensive epigenetic profiling identifies multiple distal regulatory elements directing transcription of the gene encoding interferon-gamma. *Nat Immunol*, **8**, 732-742.
- Schoenborn, J.R. and Wilson, C.B. (2007) Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol*, **96**, 41-101.
- Schreiber, R.D. and Farrar, M.A. (1993) The biology and biochemistry of interferon-gamma and its receptor. *Gastroenterol Jpn*, **28 Suppl 4**, 88-94; discussion 95-86.
- Sexton, T., Umlauf, D., Kurukuti, S. and Fraser, P. (2007) The role of transcription factories in large-scale structure and dynamics of interphase chromatin. *Semin Cell Dev Biol*, **18**, 691-697.
- Sheppard, P., Kindsvogel, W., Xu, W., Henderson, K., Schlutsmeyer, S., Whitmore, T.E., Kuestner, R., Garrigues, U., Birks, C., Roraback, J., Ostrander, C., Dong, D., Shin, J., Presnell, S., Fox, B., Haldeman, B., Cooper, E., Taft, D., Gilbert, T., Grant, F.J., Tackett, M., Krivan, W., McKnight, G., Clegg, C., Foster, D. and Klucher, K.M. (2003) IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol*, **4**, 63-68.
- Shnyreva, M., Weaver, W.M., Blanchette, M., Taylor, S.L., Tompa, M., Fitzpatrick, D.R. and Wilson, C.B. (2004) Evolutionarily conserved sequence elements that positively regulate IFN-gamma expression in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 12622-12627.
- Shtrichman, R. and Samuel, C.E. (2001) The role of gamma interferon in antimicrobial immunity. *Curr Opin Microbiol*, **4**, 251-259.
- Simonis, M., Klous, P., Splinter, E., Moshkin, Y., Willemsen, R., de Wit, E., van Steensel, B. and de Laat, W. (2006) Nuclear organization of active and inactive chromatin domains uncovered by chromosome conformation capture-on-chip (4C). *Nat Genet*, **38**, 1348-1354.
- Smale, S.T. (1997) Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes. *Biochim Biophys Acta*, **1351**, 73-88.

- Soutto, M., Zhou, W. and Aune, T.M. (2002) Cutting edge: distal regulatory elements are required to achieve selective expression of IFN-gamma in Th1/Tc1 effector cells. *J Immunol*, **169**, 6664-6667.
- Spilianakis, C.G. and Flavell, R.A. (2004) Long-range intrachromosomal interactions in the T helper type 2 cytokine locus. *Nat Immunol*, **5**, 1017-1027.
- Spilianakis, C.G., Lalioti, M.D., Town, T., Lee, G.R. and Flavell, R.A. (2005) Interchromosomal associations between alternatively expressed loci. *Nature*, **435**, 637-645.
- Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H. and Schreiber, R.D. (1998) How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*, **67**, 227-264.
- Takaoka, A. and Yanai, H. (2006) Interferon signalling network in innate defence. *Cell Microbiol*, **8**, 907-922.
- Weaver, C.T., Harrington, L.E., Mangan, P.R., Gavrieli, M. and Murphy, K.M. (2006) Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*, **24**, 677-688.
- Yagi, R., Tanaka, S., Motomura, Y. and Kubo, M. (2007) Regulation of the Il4 gene is independently controlled by proximal and distal 3' enhancers in mast cells and basophils. *Mol Cell Biol*, **27**, 8087-8097.
- Zhao, Z., Tavoosidana, G., Sjolinder, M., Gondor, A., Mariano, P., Wang, S., Kanduri, C., Lezcano, M., Sandhu, K.S., Singh, U., Pant, V., Tiwari, V., Kurukuti, S. and Ohlsson, R. (2006) Circular chromosome conformation capture (4C) uncovers extensive networks of epigenetically regulated intra- and interchromosomal interactions. *Nat Genet*, **38**, 1341-1347.
- Zheng, W. and Flavell, R.A. (1997) The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*, **89**, 587-596.