

Πανεπιστήμιο Κρήτης
Σχολή Θετικών Επιστημών
Τμήμα Βιολογίας

Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας
και Βιοτεχνολογίας
Ίδρυμα Τεχνολογίας & Έρευνας

Ερευνητική εργασία

In vitro πειραματική προσέγγιση μελέτης του μηχανισμού κατάργησης της δράσης του συστατικά εκφραζόμενου μεταγραφικού ενεργοποιητή IRF 1 από την πρωτεΐνη E1A του αδενοϊού 5.

επιβλέπων καθηγητής κ. Ιωσήφ
Παπαματθαϊάκης

Τζωρτζακάκη Ελένη

Ηράκλειο , Σεπτέμβρης 1997

Φωτογραφία στον τοίχο
Κραυγή με δίχως ήχο
Κοράκι πεθαμένο
Σοκάκι στοιχειωμένο

*Αυτό το τραγούδι δεν είναι για σένα
μιλάει για ένα μικρό ζωτικό
μιλάει για φίλους μου παιδικούς,
για ανθρώπους που τα' χουνε χαμένα
μιλάει γι' αυτούς που μένουν πάντα παιδιά .*

Τα μάτια του δυό δρόμοι
κι όσο κοιτάει νυχτώνει .
Κατάμαυρη θητεία
Κλεμμένη αμαρτία

*Αυτό το τραγούδι δεν είναι για σένα
μιλάει για θυσίες και σταυρούς
κατάλαβες πράγματα που σου' ναι ξένα
αυτό το τραγούδι δεν είναι για σένα
και για κανέναν .*

Φωνή και δυναμώνει
ο χρόνος που τελειώνει
Γιορτή που αγριεύει
Δωμάτιο που στενεύει

Τη σκοτεινή, τη μαύρη μου την όψη χάρισέ μου
κι αν δεν την αγαπήσω πως θες να την νικήσω;
Με τις φωνές που άκουγες στον ύπνο μίλησέ μου
Καταραμένε φίλε μου κι Άγιε αδερφέ μου.

Σ' ένα σκυλί πνιγμένο
το μυστικό κρυμμένο.
Δυο λίρες η αλήθεια
και τρεις τα παραμύθια.

Εφιάλτες τα όνειρά του
μηνύματα θανάτου .
Δυο μαύρα περιστέρια
τού μάτωσαν τα χέρια.

Αίμα και τα γραφτά του
μα πότισαν κρυφά του
της ομορφιάς της γλάστρα
για να φυτρώσουν τ'άστρα.

Τη σκοτεινή, τη μαύρη μου την όψη χάρισέ μου
κι αν δεν την αγαπήσω πως θες να την νικήσω;
Με τις φωνές που άκουγες στον ύπνο μίλησέ μου
Καταραμένε φίλε μου κι Άγιε αδερφέ μου.

*Εδώ στου δρόμου τα μισά ,
έφτασε η ώρα να το πω
Άλλα είν' εκείνα που αγαπώ ,
γι' αλλού γι' αλλού ξεκίνησα*

Στ' αληθινά στα ψεύτικα το λέω και τ' ομολογώ

Σα να' μουν άλλος κι όχι εγώ μες στη ζωή πορεύτηκα .
Όσο κι αν κανείς προσέχει , όσο κι αν τα κνηγά
Πάντα πάντα θα' ναι αργά δεύτερη ζωή δεν έχει .

©Edgar Allan Poe , Οδυσσέας Ελύτης , Διάφανα Κρίνα

Ευχαριστίες

Η διεξαγωγή της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε κατά το ακαδημαϊκό έτος 1996-1997 , στο Εργαστήριο της ομάδας Μοριακής Βιολογίας Θηλαστικών , υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Ιωσήφ Παπαματθαϊάκη και στο πλαίσιο συνεργασίας του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης με το Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Ιδρύματος Τεχνολογίας Έρευνας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου και υπεύθυνο του εργαστηρίου κ. Ιωσήφ Παπαματθαϊάκη για την αμέριστη εμπιστοσύνη του , την καθοδήγηση και το επιστημονικό αλλά και προσωπικό ενδιαφέρον του στην ολοκλήρωση αυτής της δουλειάς .

Ιδιαίτερα οφείλω επίσης να ευχαριστήσω το συνεργαζόμενο ερευνητή του I.M.B.B. κ. Γιάννη Ταλιανίδη στον οποίο πολλάκις προσέτρεξα κατά τη διάρκεια του παρελθόντος έτους ενοχλώντας τον για απορίες , τεχνικές συμβουλές , ακόμη και παροχή αντιδραστηρίων . Η απaráμιλλη ευγένειά του έμελε - για κακή του τύχη - να επιβραβευτεί !!! με την επιπλέον επιφόρτισή του ως δεύτερου κριτή της παρούσης εργασίας .

Τα λόγια είναι πολύ μικρά για να εκφράσουν το μεγάλο ευχαριστώ που πρέπει να αποδοθεί στη Θεοδώρα Αγαλιώτη . Η εργασία αυτή μπορεί να μην της αφιερώνεται τυπικά όπως η προηγούμενη -απλά και μόνο για να μην κατηγορηθώ ότι υπερθεματίζω - ουσιαστικά όμως και δικαιωματικά θα έπρεπε . Την ευχαριστώ ιδιαίτερα για τις πολύτιμες επιστημονικές και άλλες συζητήσεις μας καθώς και για τις πάντα πρόθυμες τεχνικές υποδείξεις της ' ιδιαίτερα σε καινούργιες για μένα πειραματικές τεχνικές , όπως Western blot και co - immunoprecipitation .

Ευχαριστώ επίσης θερμά το Γιώργο Βρέντζο για την πάντα πρόθυμη, πολύτιμη υλικοτεχνική υποστήριξή του σε θέματα κυτταροκαλλιέργειών , χωρίς ποτέ να δυσανασχετίσει με τις μονίμως άκαιρες και απρόβλεπτες επιθυμίες μου .

Στα πειράματα της παρούσης εργασίας χρησιμοποιήθηκαν πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης που έχουν κατασκευαστεί στο παρελθόν από τη Θεοδώρα Αγαλιώτη, ενώ άλλοι ήταν ευγενική δωρεά του Δρ. Δημήτρη Θάνου (κάποιοι μάλιστα χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία νέων κατασκευών) . Τους ευχαριστώ και τους δύο για την ευγενική προσφορά και δυνατότητα χρήσης τους . Επίσης

τον κ. Γιάννη Ταλιανίδη για την παροχή των αντισωμάτων p300 -Ab και CBP-Ab .

Αν και τα ευκόλως εννοούμενα είθισται να παραλείπονται , θα ήταν σοβαρό παράπτωμα να παραλείψω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στη Θεοδώρα, την Κατερίνα , το Μπάμπη , τη Νίκη , τον Τάκη και τη Χριστιάννα για την υπομονή τους να με ανέχονται καθημερινά , την πολύτιμη βοήθειά τους και το ενδιαφέρον τους .

Ιδιαίτερα ευχαριστώ επίσης τα αδέρφια μου και τους γονείς μου για την ηθική και υλική υποστήριξή τους , την αγάπη , κατανόηση και ανοχή τους παρά τις ενστάσεις τους.

Ευχαριστώ τις καλές μου φίλες Σοφία και Ελευθερία για την ηθική συμπαράστασή τους και τις ουσιαστικές , ειλικρινείς παρατηρήσεις τους .

Τέλος ευχαριστώ τον Τάκη McAtun @ για την πολύτιμη βοήθειά του στην απόδοση των φωτογραφιών με το scanner του, την υπομονή και το χρόνο που αφιέρωσε , αντί για μένα , στη μορφοποίηση του κειμένου, τον κ. Τάσο Οικονόμου για το scanning των φιλμ και το μπαμπά μου που μου παραχώρησε τον υπολογιστή του για την ολοκλήρωση της συγγραφής της παρούσης εργασίας .

Αντι-ευχαριστίες

Δεν ευχαριστώ το Γιάννη Χατζηδάκη για το άγχος που μου καλλιέργησε κατά τη συγγραφή και μέχρι την περάτωση της παρούσης διατριβής .

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I. -Κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν

-Παροδική Διαμόλυνση/ μετασχηματισμός (transient transfection) κυττάρων σε καλλιέργεια με τη μέθοδο συγκατακρήμνισης Ca_3PO_4 - DNA.

- Δοκιμές μέτρησης ενζυμικής ενεργότητας

α) της ακετύλ - τρανσφεράσης της χλωραμφαινικόλης (CAT assay)

β) της β - γαλακτοσιδάσης (lac z assay)

II. - Παρασκευή ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων

(whole cell extracts) από κυτταρικές σειρές.

- Καθαρισμός συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων - Έκλουση DNA από πήκτωμα ακρυλαμίδης.

- Τεχνικές ραδιοσήμανσης γραμμικών μορίων DNA (labelling)

- Ανίχνευση *in vitro* αλληλεπιδράσεων DNA - Πρωτεΐνης με EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay), πειράματα μεταβολής της κινητικότητας DNA λόγω αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες (δοκιμές σύνδεσης).

III. -Western blot - Ηλεκτροφορετικός διαχωρισμός ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων σε αποδιατακτικό πήκτωμα SDS - ακρυλαμίδης και επώαση αντιγράφου - μεμβράνης με αντίσωμα για ταυτοποίηση πρωτεΐνης που ενδιαφέρει .

IV. - Συν - κατακρήμνιση (Co - immunoprecipitation) πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν από ολικό κυτταρικό εκχύλισμα .

V. - Τεχνικές κλωνοποίησης, απομόνωσης και ανάλυσης νουκλεϊνικών οξέων.

- Διαδικασίες υποκλωνοποίησης μορίων DNA (subcloning)

- Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με πλασμιδικές κατασκευές.
- Ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων βακτηριακών κλώνων
 - α) Με τη μέθοδο in situ υβριδοποίησης κατά Grunstein (υβριδοποίηση φίλτρων)
 - β) Ανάλυση DNA (απομονωμένου με τη μέθοδο βρασμού), με συνδυασμένη χρήση ενζύμων περιορισμού (restriction enzymes)
- Απομόνωση πλασμιδικού DNA σε μικρή κλίμακα με τη μέθοδο βρασμού (boiling mini - prep)
- Απομόνωση πλασμιδικού DNA σε μεγάλη κλίμακα με την αλκαλική μέθοδο (alkaline lysis)
- Καθαρισμός πλασμιδικού DNA σε διαβάθμιση πυκνότητας χλωριούχου καισίου (CsCl), παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EthBr)
- Ποσοτικοποίηση DNA
- Προσδιορισμός της πρωτογενούς νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μορίων πλασμιδικού DNA (sequencing)
- Απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης

I. Κυτταρικές σειρές

Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα **HeLa** και **COS 1**.

Τα **HeLa** είναι ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα απομονωμένα από αδενοκαρκίνωμα τραχήλου μήτρας. Τα **COS 1** είναι πιθηκίσια επιθηλιακά κύτταρα νεφρού μετασχηματισμένα με τον ιό SV 40.

Παροδική Διαμολυνση / μετασχηματισμός **(transient transfection) κυττάρων με τη μέθοδο** **συγκατακρήμνισης Ca_3PO_4 - DNA** **(calcium phosphate transfection)**

Η μέθοδος εφαρμόζεται σε πειράματα τόσο παροδικής (transient) όσο και μόνιμης (stable) διαμολυνσης κυτταρικών σειρών.

Το πλασμιδιακό DNA που θέλουμε να εισαχθεί συγκατακρημνίζεται με μόρια αλάτων Ca_3PO_4 (125 mM) και το λεπτόκοκκο ίζημα εισάγεται στο θρεπτικό μέσο DMEM της κυτταρικής καλλιέργειας. Το ίζημα προσκολλάται στην κυτταρική επιφάνεια και μέσω αδιευκρίνιστου μηχανισμού επιτυγχάνεται είσοδος του πλασμιδιακού DNA στα κύτταρα.

Ο όγκος του ιζήματος εξαρτάται από τον όγκο του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας που χρησιμοποιείται στα κύτταρα (το ίζημα αποτελεί το 1/10 του όγκου αυτού). Έτσι σε πηγάδι με 1ml θρεπτικό αντιστοιχούν 100 ml ίζημα που περιέχει 50 ml Hebs και 50 ml μείγματος d H_2O , DNA, Ca Cl_2 .

Το παρασκευαζόμενο ίζημα αποτελείται συγκεκριμένα απο
Hebs 2X → τελική συγκέντρωση 1X

Ca Cl_2 2,5M → τελική συγκέντρωση στο ίζημα 125 mM

d H₂O και πλασμιδικές κατασκευές που ενδιαφέρουν. Παράλληλα συνδιαμολώνουμε με πλασμιδικές κατασκευές που φέρουν το CAT γονίδιο αναφοράς καθώς και με cmv lacz (πλασμίδιο με γονίδιο αναφοράς τη β-γαλακτοσιδάση) για να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα του πειράματος (transfection efficiency) με lacz assay. Μετά την ανάμειξη των παραπάνω, προσθέτουμε το Hebs σταγόνα σταγόνα και το συνολικό διάλυμα αφήνεται 20΄σε θερμοκρασία δωματίου (RT).

Στο διάστημα αυτό ανανεώνεται το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας DMEM με φρέσκο στα κύτταρα που πρόκειται να μετασχηματιστούν.

Στη συνέχεια πιπετάρεται το ίζημα στο θρεπτικό μέσο και αφήνεται να επωαστεί με τα κύτταρα.

Την επόμενη μέρα το κοκκιώδες ίζημα που έχει εισέλθει στα κύτταρα θα πρέπει να είναι ορατό με το μικροσκόπιο. Τα κύτταρα ξεπλένονται με Hanks ή με PBS χωρίς EDTA (δεν ξεκολλάνε τα κύτταρα) και ανανεώνεται το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας.

Τη δεύτερη μέρα τα κύτταρα έχουν πολ/στεί αρκετά και είναι έτοιμα να συλλεχθούν.

Αφαιρείται το θρεπτικό υγρό και ακολουθεί πλύσιμο με 1ml ισότονο διάλυμα PBS + EDTA / πηγάδι (γρήγορα για να μην ξεκολλήσουν τα κύτταρα). Το υγρό αφαιρείται και προσθέτουμε εκ νέου από 1ml PBS + EDTA σε κάθε πηγάδι, αφήνοντας 10΄- 15΄για να ξεκολλήσουν τα κύτταρα (βοηθητικά μπορεί να " ξυστούν " με ειδικό εργαλείο).

Τα κύτταρα συλλέγονται προσεκτικά χωρίς ποσοτικές απώλειες και φυγοκεντρώνονται στις 2000 rpm για 1΄. Απομακρύνουμε προσεκτικά το διαλυτό υπερκείμενο και το ίζημα των κυττάρων φυλάσσεται στους -20° C μέχρις ότου χρησιμοποιηθεί για CAT και lac z assay.

Η πελέττα επαναδιαλύεται σε 200λ Tris. Cl pH 7,8 mM. Ακολουθεί θραύση των κυτταρικών τοιχωμάτων με υπέρηχους (sonication) και

το εκχύλισμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τις δοκιμές ενζυμικής ενεργότητας που αναφέρονται στη συνέχεια.

2x Hebs (HEPES buffered saline solution)

16,4 gr Na Cl ρύθμιση σε pH 7,05 με 5N NaOH
11,9 gr Hepes acid συμπλήρωση με d H₂ O σε 1lt
0,21 gr Na₂ HPO₄
800ml d H₂O

Assay για τη μέτρηση της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης

Το πείραμα αυτό γίνεται ώστε εκτιμώντας την αποτελεσματικότητα του πειράματος διαμόλυνσης, να είναι δυνατή η διόρθωση, κανονικοποίηση και συγκριτική αξιολόγηση των μετρήσεων ενεργότητας του γονιδίου CAT.

Η β-γαλακτοσιδάση είναι ένζυμο που υδρολύει β-D-γαλακτοσίδια.

Μπορεί κανείς να μετρήσει τα επίπεδα του ενζύμου χρησιμοποιώντας ως μέτρο το βαθμό υδρόλυσης κατάλληλων άχρωμων υποστρωμάτων που βρίσκονται σε περίσσεια, σε έγχρωμα προϊόντα. Στην κατηγορία αυτή ανήκει το ONPG (O-nitrophenyl - β - D- galactoside) το οποίο υδρολυόμενο δίνει γαλακτόζη και o-nitrophenol (κίτρινο χρώμα που απορροφά στα 420 nm).

Η υδρόλυση του ONPG από τη β-γαλακτοσιδάση σταματά με την προσθήκη Na₂ CO₃ που μετατρέπει το διάλυμα σε αλκαλικό (pH 11). Στις συνθήκες αυτές το ένζυμο απενεργοποιείται. Η διαδικασία έχει ως εξής: Σε ποσότητα 50-70 ml κυτταρικού εκχυλίσματος προσθέτουμε 550 ml μείγματος αποτελούμενο από:

0,5ml lac z buffer

50 μl ONPG (4 mgr/ml) → 1/10 του όγκου

του lac z buffer

1 μl μερκαπτοαιθανόλη

Καλή ανάμειξη και επώαση στους 37° C για να γίνει η ενζυμική υδρόλυση του ONPG και εμφάνιση του κίτρινου χρώματος.

Το χρονικό διάστημα επώασης ποικίλλει, ανάλογα με την αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού (transfection efficiency). Όταν τα δείγματα έχουν ικανοποιητικό κίτρινο χρώμα, η αντίδραση σταματάει με την προσθήκη 200μl 1M Na₂CO₃ σε κάθε δείγμα. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης του o-nitrophenol που προκύπτει από την υδρόλυση, στα 420 nm.

lac z buffer

60mM Na H₂ PO₄ 7 H₂O

40 mM Na₃ PO₄

10 mM KCl

1mM Mg SO₄ - 7 H₂O

50 mM β-mercaptoethanol

Assay για την μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας του

CAT γονιδίου

Για να αξιολογηθεί η ενεργότητα, τα επίπεδα έκφρασης που ενεργοποιούν οι αλληλουχίες με τις οποίες διαμολύνουμε τις κυτταρικές σειρές, συνδιαμολύνουμε με κατάλληλες πλασμιδιακές κατασκευές που φέρουν το γονίδιο που κωδικοποιεί για το βακτηριακό ένζυμο CAT ακετυλτρανσφεράση της χλωραμφαινικόλης (γονίδιο αναφοράς).

Πλεονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι δεν υπάρχει ομοιομορφία του CAT γονιδίου σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Τα επίπεδα έκφρασης του CAT γονιδίου ρυθμίζονται από upstream αλληλουχίες. Για την ενεργοποίηση της μεταγραφής του πλασμιδίου αναφοράς απαιτείται η έκφραση στοιχείων του φορέα με το κλωνοποιημένο ένθεμα που μελετάμε. Έτσι τα επίπεδα CAT ενεργότητας που πειραματικά ανιχνεύουμε (δηλαδή τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αναφοράς) συσχετίζονται άμεσα με την μεταγραφική ενεργότητα των αλληλουχιών που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα παροδικής διαμόλυνσης.

Το κωδικοποιούμενο ένζυμο ακετυλτρανσφεράση της χλωραμφαινικόλης καταλύει την ακετυλίωση του αντιβιοτικού χλωραμφαινικόλη αρχικά στην 3-υδροξυ θέση (μεταφορά ακετυλοομάδας από το ακετυλοσυνένζυμο A (CoA) στην χλωραμφαινικόλη. Σε καταστάσεις υψηλής CAT ενεργότητας ακετυλιώνεται και η δεύτερη υδροξυλοομάδα του μορίου της χλωραμφαινικόλης. Η αντίδραση συνίσταται στην επώαση ποσότητας κυτταρικού εκχυλίσματος με ραδιοσημασμένο υπόστρωμα ^{14}C -χλωραμφαινικόλη και ακετυλο-συνένζυμο A (Co A). Οι ακετυλιωμένες από τις μη ακετυλιωμένες μορφές διαχωρίζονται χρωματογραφικά.

Η διαδικασία που ακολουθείται περιγράφεται παρακάτω:

- Μία ποσότητα εκχυλίσματος (ποικίλει ανάλογα με τον τύπο των κυττάρων) συνήθως 70λ για κύτταρα HeLa, θερμαίνεται στους 65°C , για 5-7 min, προκειμένου να αδρανοποιηθεί το ενδονενές CAT ένζυμο.
- Φυγοκέντρηση για 30sec-1min (spin) σε θερμοκρασία δωματίου.

- Προσθέτουμε 20λ μείγματος: 14λ Tris 1M pH 7,8
 - 5 λ Ακέτυλο - CoA (stock 20mM)
 - 1 λ C¹⁴ - χλωραμφαινικόλη (N100 μCurie)
- Αναμειγνύουμε καλά και επωάζουμε στους 37° C. Ο χρόνος επώασης εξαρτάται από την αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού όπως αυτή αξιολογείται με lac z assay, και μπορεί να κυμαίνεται από 1 - 1,5 ώρα έως και 8 - 12 ώρες (overnight).
- Μετά το τέλος της επώασης ακολουθεί spin φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τα δείγματα εκχυλίζονται σε 200λ ethylacetate και έντονο vortex. Εν συνεχεία τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 30 sec (spin) σε θερμοκρασία δωματίου και 150 - 160 λ από την οργανική (μη υδατική) φάση (υπερκείμενο) μεταφέρονται σε νέο eppendorf tube .
- Ακολουθεί στέγνωμα (εξάτμιση) των δειγμάτων σε speed vac.
- Τα δείγματα επαναδιαλύονται σε 10 - 15 λ ethylacetate και ακολουθεί spotting σε TLC plates (Thin Layer Chromotography).

Οι διάφορες ακετυλιωμένες μορφές της χλωραμφαινικόλης διαχωρίζονται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας που αναπτύσσεται σε οργανικό διαλύτη 95χλωροφόρμιο : 5 μεθανόλη. Όταν το μέτωπο του διαλύτη προχωρήσει αρκετά, φτάσει στην άλλη άκρη της πλάκας, σταματούμε τη χρωματογραφία, στεγνώνουμε και εκθέτουμε σε φωτογραφικό φιλμ για 12 - 15 ώρες (overnight) σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα που ενδιαφέρουν κόβονται από το TLC. Ακολουθεί μέτρησή τους σε Liquid Scintillation β - Counter και υπολογισμός του % ποσοστού ακετυλίωσης, ως σχετικός δείκτης ενεργότητας του CAT πλασμιδίου αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε (και έμμεσα των ρυθμιστικών παραγόντων ελέγχου της έκφρασής του). Οι μετρήσεις

κανονικοποιούνται για την αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης , σύμφωνα με τις μετρήσεις του lac z assay.

II.

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

Κύτταρα που έχουν πολ/στεί ικανοποιητικά μετά απο 48-60 ώρες επώασης, από τη στιγμή της διαμόλυνσης, πλένονται δύο φορές με ισότονο διάλυμα PBS χωρίς EDTA (δεν προκαλεί αποκόλληση των κυττάρων).

Τα κύτταρα " ξύνονται " με τη βοήθεια ειδικού εργαλείου και αποκολλώνται από τα τοιχώματα του τρυβλίου. Συλλέγονται προσεκτικά χωρίς ποσοτικές απώλειες και το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρείται για 2΄στις 3000 rpm στους 4°C.

Προσεκτικά απομακρύνουμε το υπερκείμενο και το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο buffer X.

Ακολουθεί επαναλαμβανόμενη (3 φορές) ψύξη και απόψυξη των δειγμάτων (freeze and thaw) που προκαλεί τη διάρρηξη κυτταρικών και πυρηνικών μεμβρανών.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση στο 4°C στις 13000 για 15΄προκειμένου να διαχωριστεί το διαλυτό πρωτεϊνικό εκχύλισμα από το γενωμικό DNA και τα μεμβρανικά debris που καθιζάνουν.

Μετά τη φυγοκέντρηση, το διαλυτό υπερκείμενο (εναιώρημα) μεταφέρεται σε νέους σωλήνες και φυλάσσεται στους -80°C μέχρις ότου χρησιμοποιηθεί.

buffer X

20 mM Hepes	<u>PBS</u>
100 mM KCl	
0,2 mM EDTA	8gr Na Cl
20% glycerol	0,2gr KCl
1 mM DTT	2,16gr Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O
1mM PMSF	0,2gr KH ₂ PO ₄
+αναστολείς πρωτασων	Διαλυση σε 900ml d H ₂ O
1mM pepstatin	ρύθμιση pH με NaOH στο 7,5
1mM Aprotinin	συμπλήρωση μέχρι τελικού
0,5mM leupeptin	όγκου 1000 ml με dH ₂ O

Καθορισμός συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων

Παραγγέλθηκε ένα 21bp συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο προκειμένου να σημανθεί και να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια ως ραδιενεργός ανιχνευτής (probe) στα EMSA πειράματα που έγιναν. Μετά από μελέτη της σχετικής βιβλιογραφίας, για γνωστές αλληλουχίες πρόσδεσης της Gal 4 πρωτεΐνης (**Gal 4 binding sites**) επιλέχθηκε μια συγκεκριμένη

17 bp αλληλουχία (εγγύς cis - στοιχείο του υποκινητή του Gal 10 γονιδίου του *S. cerevisiae* για την οποία είναι γνωστό ότι η Gal 4 πρωτεΐνη, έχει υψηλή συγγένεια σύνδεσης).

Η αλληλουχία είναι η ακόλουθη:

5' (GATC) CGGGTGACAGCCCTCCG 3'

(μονόκλωνη αλυσίδα, παραγγέλθηκε και η σύνθεση της συμπληρωματικής αλληλουχίας).

Τα ολιγονουκλεοτίδια παραδόθηκαν λυοφιλοποιημένα.

Πριν όμως χρησιμοποιηθούν, ήταν αναγκαίο να καθαριστούν (purification) σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης 15% [15% ακρυλαμίδα 38:2, 7M Urea, TBE]. Η διαδικασία καθαρισμού κρίνεται αναγκαία για να απομακρυνθούν ανεπιθύμητα παραπροϊόντα της οργανικής σύνθεσης των ολιγονουκλεοτιδίων και να διαχωριστούν τα μόρια επιθυμητού μήκους από μικρότερου μεγέθους, ημιτελή μόρια.

Οι μονοκλωνες αλυσίδες, επαναδιαλύονται σε oligos loading buffer [90% φορμαμίδη, 1 X TBE, zilent, bromophenol blue] και πριν φορτωθούν στο πήκτωμα βράζουν για 3-5 min και φυγοκεντρούνται για 10 - 20'' (spin).

Η χρονική διάρκεια του ηλεκτροφορήματος καθορίζεται από το μέγεθος του ολιγονουκλεοτιδίου.

Για 17-25 bp ολιγονουκλεοτίδια, τρέχουμε μέχρι το Bromophenol Blue να φτάσει στο τέλος.

Στη συνέχεια το πήκτωμα βάφεται για 30'- 60' σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 0,5μgr/ml (σε 7lt διάλυμα 1 X TBE + EthBr), προκειμένου να γίνουν ορατές οι ζώνες των μονόκλωνων αλυσίδων συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων σε UV transilluminator.

Έκλυση DNA από πήκτωμα ακρυλαμίδης

Φωτίζοντας το πήκτωμα σε UV transilluminator, κόβουμε προσεκτικά τις ζώνες των ολιγονουκλεοτιδίων και μεταφέρουμε κάθε μία σε σωλήνα

15ml που περιέχει 3-5ml elution buffer. Το διάλυμα στο οποίο γίνεται η έκλουση είναι 0,5 M NH₄Ac, 10mM MgAc, 0,1 %SDS και 0,1 mM EDTA.

Το DNA αφήνεται στο διάλυμα αυτό να εκλούεται overnight στους 37°C.

Την επόμενη μέρα το διάλυμα φυγοκεντρείται για 1΄στις 1000 rpm σε σύριγγες 1ml που έχουμε κλείσει με υαλοβάμβακα. Αυτό γίνεται για να απομακρυνθούν υπολείμματα ακρυλαμίδης.

Το διάλυμα στη συνέχεια συμπυκνώνεται με ισοβουτανόλη μέχρι τελικού όγκου 100-150λ.

Ακολουθούν επαναλαμβανόμενες εκχυλίσεις με φαινόλη: χλωροφόρμιο και στη συνέχεια καθαρισμός με μοριακή διήθηση σε κολώνα χρωματογραφίας G50 (κατακρατούνται ελεύθερα νουκλεοτίδια).

Το ολιγονουκλεοτίδιο κατακρημνίζεται παρουσία 2 όγκων αιθανόλης, και 3 M NaAc pH 5,2 σε 1/10 του όγκου.

Προσδιορίζεται φωτομετρικά η πυκνότητα, μετρώντας την απορρόφηση στα 260nm (O.D.=1 αντιστοιχεί σε 50μgr / ml δίκλωνου

ds DNA).

Στη συνέχεια πρέπει να γίνει επαναδιάταξη, reannealing. Ισομοριακές ποσότητες από τα δύο μονόκλινα ολιγονουκλεοτίδια επαναδιαλύονται σε κατάλληλο όγκο ώστε η τελική συγκέντρωσή τους σε αυτό να είναι 50ngr/λ. Το διάλυμα περιέχει και NaCl 5M σε τελική συγκέντρωση 0,2 M.

Το μείγμα βράζει για 5 λεπτά στους 100° C προκειμένου να χωριστούν πλήρως οι αλυσίδες (DNA σε μονόκλινη μορφή) και στη συνέχεια αφήνεται σε κατάλληλη θερμοκρασία, τουλάχιστον για 8 ώρες (ή overnight) να επαναδιαταχθεί (reannealing). Εν συνεχεία το δίκλινο πλέον ολιγονουκλεοτίδιο φυλάσσεται στους -20°C.

Η θερμοκρασία στην οποία γίνεται επαναδιάταξη υπολογίζεται από τη σχέση: $T_d = T_m - 13^\circ \text{C}$

όπου T_m = η θερμοκρασία (melting temperature) όπου το 50% των μορίων έχει αποδιαταχθεί (σε μονόκλινη μορφή)

$$T_m = 81,5 + [16,6 * \log_{10}[\text{Na}]] + 0,41 \times \text{G+C\%} / \text{N} - 600 / \text{N}$$

$[\text{Na}] = 0,2 \text{ M}$, $\text{N} =$ αριθμός νουκλεοτιδίων, G+C \% ποσοστό C+G

Για το Gal4 ολιγονουκλεοτίδιο η επαναδιάταξη έγινε overnight στους $57,6^\circ \text{C}$.

Τεχνικές ραδιοσήμανσης γραμμικών μορίων DNA (labeling)

Η μέθοδος που εφαρμόζεται σε κάθε περίπτωση επιλέγεται με κριτήριο το μήκος και τη φύση (δίκλωνο, μονόκλωνο) του μορίου που θα σημανθεί καθώς και την επιθυμητή ειδική ενεργότητα (cpm/μgr).

α) Σήμανση δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων με το klenow

ενζυμικό κλάσμα της DNA - πολυμεράσης I

Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε για τη ραδιοσήμανση συνθετικών δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν ως ανιχνευτές σε EMSA πειράματα. Το ενζυμικό κλάσμα της Klenow πολυμεράσης συμπληρώνει τα 3' προεξέχοντα άκρα του δίκλωνου ολιγονουκλεοτιδίου με ραδιενεργά νουκλεοτίδια (αντίδραση fill-in:

3' ακραία σήμανση μικρών κομματιών ds DNA με Klenow). Οι ακραία ραδιοσημασμένοι δίκλωνοι ανιχνευτές που προκύπτουν έχουν ειδική ενεργότητα της τάξης των 10^8 cpm/μgr.

Η αντίδραση γίνεται σε τελικό όγκο 25 μl:

50 ngr DNA (δίκλωνο ολιγονουκλεοτίδιο)

2,5 λ nick mix (10x)

2,5 λ d GTP, dTTP 1mM

2λ α-³²P-d ATP* (800 μ Ci/mM)

2λ α-³²P-d CTP*

1λ Klenow (5u/l)

συμπληρώνουμε με d H₂O

Η αντίδραση επωάζεται για 15' σε θερμοκρασία δωματίου RT.

β) Μετάφραση εγκοπής - Nick translation

Η μέθοδος αυτή επιλέχθηκε για τη ραδιοσήμανση γραμμικών DNA αλληλουχιών που χρησιμοποιήθηκαν ως ανιχνευτές για την ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων βακτηριακών κλώνων με in situ υβριδοποίηση κατά Grunstein.

Γενικότερα η μέθοδος αυτή επιτρέπει τη σύντομη χρονικά ραδιοσήμανση αλληλουχιών DNA μεγάλου μήκους με χαμηλή όμως ειδική ενεργότητα < $5 \cdot 10^8$ cpm/μgr. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην επιδιόρθωση και πολυμερισμό των τυχαίων μονόκλωνων θραυσμάτων (single strand breaks, nicks) που δημιουργούνται κατά τη διαδικασία απομόνωσης και καθαρισμού γραμμικών τμημάτων DNA.

Η αντίδραση γίνεται σε τελικό όγκο 30μl: 100ngr DNA

3λ nick mix (10x)

3λ dGTP, dTTP 1mM

2λ α-³²P-dATP

2λ α-³²P-dCTP(800μCi/mM)

1λ P_oI I E.coli (100u/λ)
συμπληρώνουμε με d H₂O

Το μείγμα επωάζεται για 90΄ στους 16° C για να αποφευχθεί το snap - back (να γράψει προς τα πίσω η πολυμεράση).

Η αντίδραση σταματάει με την προσθήκη EDTA σε τελική συγκέντρωση 10mM.

γ. Σήμανση συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων με την T₄

πολυνουκλεοτιδική κινάση

Η μέθοδος αυτή προσφέρει πολύ υψηλή ειδική ενεργότητα > 5.10⁹ και εφαρμόζεται για τη σήμανση μικρών κομματιών DNA, συνήθως συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, είτε μονόκλωνων είτε δίκλωνων για χρησιμοποίησή τους σε διάφορα πειράματα.

Η T₄ πολυνουκλεοδική κινάση προσθέτει μια φωσφορική ομάδα σε 5΄προεξέχων άκρο (protruding) του αποφωσφορυλιωμένου συνθετικού ολιγονουκλεοτιδίου.

Η αντίδραση φωσφορυλίωσης γίνεται στα 50 μl

100 ngr DNA (συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο)

2λ ligase / Kinase buffer

5 λ γ- ³²P ATP

1 λ T₄ polynucleotide kinase (5u/λ)

συμπληρώνουμε με d H₂O

Ακολουθεί επώαση για 1 ώρα στους 37° C.

Αφού ολοκληρωθεί η επώαση της αντίδρασης ραδιοσήμανσης συμπληρώνουμε με dH₂O μέχρι τελικό όγκο 100μl.

Για να διαχωριστούν τα ελεύθερα από τα ενσωματωμένα νουκλεοτίδια, ο όγκος της αντίδρασης διηθείται από κολώνα χρωματογραφίας G50 (ή G25 για < 20 nt κομμάτια DNA). Σε σύριγγα 1ml (ινσουλίνης) που κλείνουμε με υαλοβάμβακα, πακετάρουμε υδατικό εναιώρημα G50, φυγοκεντρώντας για 5min στις 2000 rpm. Για να επιτευχθεί ικανοποιητικός διαχωρισμός, ο όγκος της πακεταρισμένης G50 θα πρέπει να υπερβαίνει τα 0,9ml. Αφού πακεταριστεί η κολώνα, προσθέτουμε τα 100λ της αντίδρασης και φυγοκεντρούμε στις ίδιες συνθήκες. Το ραδιενεργό DNA συλλέγεται σε σωλήνα erpendorf.

Η ειδική του ενεργότητα (specific activity) υπολογίζεται με μέτρηση σε Liquid Scintillation β - Counter και ανάγεται σε cpm/μgr.

10 x nick translation mix

0,1M Mg Cl₂

0,5M Tris·Cl pH 7,4

10mM DTT

Μέθοδος ανίχνευσης in vitro αλληλεπιδράσεων DNA - Πρωτεΐνης με δοκιμές σύνδεσης και μεταβολής της κινητικότητας του DNA

(Electrophoretic Mobility Shift Assay: EMSA)

Η μέθοδος αυτή αποτελεί γρήγορο, ευαίσθητο και αξιόπιστο τρόπο ανίχνευσης των μοριακών αλληλεπιδράσεων των μεταγραφικών

πρωτεϊνικών trans παραγόντων με τις αντίστοιχες cis-ρυθμιστικές αλληλουχίες-στόχους τους.

Η σχετική πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει:

- Ραδιοσήμανση της δίκλωνης συνθετικής cis - αλληλουχίας σύνδεσης (για την περίπτωση μας η αλληλουχία σύνδεσης της Gal4 πρωτεΐνης: ολιγονουκλεοτίδιο της Gal 4 binding site)
- Επώαση in vitro του ραδιενεργά σημασμένου ανιχνευτή με τα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα για 15΄ στο 25-30°C.

Ασθενείς διαμοριακές αλληλεπιδράσεις DNA - Πρωτεΐνης σταθεροποιούνται και είναι ανιχνεύσιμες όταν η επώαση των αντιδράσεων σύνδεσης και ο ηλεκτροφορετικός διαχωρισμός των συμπλόκων γίνει στους 4° C, προσθεθεί χαμηλή συγκέντρωση αλβουμίνης (BSA) ή χρησιμοποιηθεί Tris - Glycine αντί TBE διάλυμα ηλεκτροφόρησης (υψηλή ιοντική ισχύς).

- Ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων σύνδεσης (binding reactions) σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα 39:1 ακρυλαμίδης 6%, 2% γλυκερόλης, 4% TBE (χαμηλές συνθήκες ιοντικής ισχύος για διατήρηση της μοριακής σταθερότητας των συμπλοκών DNA-Πρωτεΐνης). Με την ηλεκτροφόρηση, επιτυγχάνεται διαχωρισμός των μοριακών συμπλεγμάτων DNA-Πρωτεΐνης.
- Το πήκτωμα στεγνώνεται, ξεραίνεται σε ειδική συσκευή και ακολούθως το εκθέτουμε για κατάλληλο χρόνο σε φωτογραφικό φιλμ στο 80°C (αυτοραδιογραφία).

Προκειμένου να εξακριβωθεί η ταυτότητα τέτοιων DNA-Πρωτεϊνικών συμπλόκων (εμφανιζόμενα ως ζώνωση στο πήκτωμα) καθώς και η ειδικότητα σύνδεσής τους (binding specificity) έγιναν δοκιμές κρύου

ανταγωνισμού, προσθέτοντας μη ραδιενεργό δίκλωνο ανιχνευτή (competitor) σε περίσσεια στην αντίδραση σύνδεσης.

Η προκαλούμενη με αυτόν τον τρόπο μείωση της έντασης ή και εξαφάνιση κάποιων ζωνών στο παρατηρούμενο ηλεκτροφορητικό πρότυπο, αποδεικνύει την ειδική (specific) σύνδεση των συγκεκριμένων πρωτεϊνών στην αλληλουχία-στόχο.

Εναλλακτικά μπορεί κανείς να ταυτοποιήσει τον προσδεόμενο παράγοντα, εάν στην αντίδραση σύνδεσης και πριν προσθέσουμε τη ραδιοσημασμένη αλληλουχία - στόχο του προσδεόμενου παράγοντα, συμπεριλάβουμε αντίσωμα για την πιθανολογούμενα γνωστή πρωτεΐνη και επωάσουμε για 15'- 60' στον πάγο. Η ειδική αντίδραση πρωτεΐνης - αντισώματος αποτρέπει τη διαθεσιμότητά της για πρόσδεση στην αλληλουχία στόχο ή μεταβάλλει την κινητικότητα του σχηματιζόμενου συμπλόκου με αποτέλεσμα την κατάργηση ή supershift της ζώνης που αντιστοιχεί στο εν λόγω σύμπλοκο.

Μια τυπική αντίδραση σύνδεσης (binding reaction) περιέχει:

- $10^5 - 2 \times 10^5$ cpm δίκλωνης ραδιοσημασμένης cis-αλληλουχίας σύνδεσης
- 100 - 500 ngr poly d[I] - d[C] (2μgr/μl) για παρεμπόδιση των μη ειδικών αλληλεπιδράσεων
- 5 - 10μgr ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος
- διάλυμα σύνδεσης (binding buffer) μέχρι τελικό όγκο 40μl

Σύσταση του διαλύματος σύνδεσης (**binding buffer**) :

12mM Hepes - KOH pH 7,9

4mM Tris - Cl pH 8

60mM KCl

1mM EDTA

1mM DTT

5mM $MgCl_2$

12% glycerol

- Προαιρετικά 1 -2 μl αντίσωμα (supershift) ή κατάλληλη ποσότητα περίσσειας «κρύου» ολιγονουκλεοτιδίου (competition).

III . Western blot

Σε κατάλληλη ποσότητα ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος (5-30 μgr πρωτεΐνης) προσθέτω ίσο όγκο 2 X loading buffer .

Ο επιτρεπόμενος τελικός όγκος εξαρτάται από το πάχος, τη χωρητικότητα των πηγαδιών του πήκτωματος (συνήθως 30- 50 μl) Πριν φορτωθούν τα δείγματα και ο marker των μεγεθών βράζονται για 5' - 7' . Οι εκφραζόμενες πρωτεΐνες διαχωρίζονται ηλεκτροφορητικά αρχικά στα 60 Volt (Stacking gel) και κατόπιν στα 80- 120 Volt (Separating gel), σε αποδιατακτικό πήκτωμα SDS- ακρυλαμίδης διπλής σύστασης . Αρχικά το δείγμα «συμπυκνώνεται» διερχόμενο από τη στρώση του αραιότερου Stacking gel (συνήθως 4,5 % περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδα 30%) και εν συνεχεία οι περιεχόμενες πρωτεΐνες διαχωρίζονται στο πυκνότερο Separating gel (η περιεκτικότητά του σε ακρυλαμίδα 30% κυμαίνεται από 5%- 15%, ανάλογα με την επιθυμητή διαχωριστική κλίμακα μεγεθών , M.B.)

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα μεταφέρεται , «αποτυπώνεται» σε συνθετική μεμβράνη υβριδοποίησης PVDF

(polyvinyl- difluoride). Η μεταφορά γίνεται σε συσκευή ημιξηραντή semi- dryer για 60' - 90' σε transfer buffer και ρεύμα $0,8 \text{ mA} \times \text{cm}^2 \text{ gel}$ (συνήθως 80 -120 mA), με φορά από το πήκτωμα στη μεμβράνη. Η μεμβράνη, επειδή είναι υδρόφοβη πρέπει να διαβραχεί αρχικά σε μεθανόλη και μετά σε transfer buffer. Σε transfer buffer διαποτίζονται τα Whattman τα οποία τοποθετούμε στις πλάκες γραφίτη της συσκευής , καθώς και τα Whattman στα οποία εναποθέτουμε τη μεμβράνη και το πήκτωμα , σχηματίζοντας sandwich (αποφεύγουμε τη δημιουργία φυσαλίδων- κενών αέρα που εμποδίζουν το transfer). Θα πρέπει το transfer buffer να είναι, ει δυνατόν φρέσκο γιατί η μεθανόλη εξατμίζεται , δημιουργώντας πρόβλημα στη μεταφορά.

Στη συνέχεια η μεμβράνη διαβρέχεται σε διάλυμα TTBS για 15' και επώάζεται αναδευόμενη σε διάλυμα προϋβριδοποίησης -blocking (TTBS + 5% nonfat dry milk) για 1-10 ώρες στους 4°C .

Μετά προσθέτουμε το 1ο αντίσωμα σε κατάλληλη αραίωση , συνήθως 1:500 και αφήνουμε για περίπου 4-8 ώρες ακόμη.

Για την απομάκρυνση του μη ειδικά συνδεδεμένου, καθώς και της περίσσειας του ελεύθερου αντισώματος, ξεπλένουμε τη μεμβράνη αναδευόμενη σε TTBS για $2 \times 20'$.

Ακολουθεί επώαση με το 2ο αντίσωμα σε κατάλληλη αραίωση , σε TTBS+5% nonfat dry milk , για 90'-180' (συνήθως 1 : 3000 anti-Rabbit IgG peroxidase) και μετά άλλα δύο 20' πλυσίματα σε TTBS. Το 2ο αντίσωμα πολ/ ζει την ισχύ του σήματος και επιτρέπει ουσιαστικά την ανίχνευση των ειδικών συμπλόκων αντιγόνου - 1ου αντισώματος .

Η έκθεση του blot μπορεί να γίνει είτε chemiluminescently με ECL, είτε chromogenically με DAB (diaminobenzidine) και 30% H₂O₂.

5x Running buffer

15 gr Tris Base

72 gr Glycine

5gr SDS

dH₂O to 1 lt

2x SDS - loading buffer (20 ml)

5ml 0,5 Tris, pH 6,8

4ml 20% SDS

1ml 2- mercaptoethanol

4ml 50% glycerol

0,004 gr bromophenol blue

6ml dH₂O

Transfer buffer

20% methanol

1x Tris -glycine

(24mM Tris, 194 mM glycine)

dH₂O

φυλάσσεται στους 4° C.

TTBS (0,5 lt)

10ml Tris pH 7,5

9ml NaCl 5M

2,5ml Tween 10%

dH₂O

IV. Co - immunoprecipitation / Συν - κατακρήμνιση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν από ολικό κυτταρικό εκχύλισμα .

Κύτταρα **COS1** που έχουν διαμολυνθεί παροδικά για έκφραση των επιθυμητών πρωτεϊνών , της τάξης των $2 - 5 \times 10^7$ (80% - 90% επικάλυψη τρυβλίων διαμέτρου 100mm) ξεπλένονται και συλλέγονται σε παγωμένο PBS. Συγκεντρώνονται με φυγοκέντρηση στις 3000 rpm σε 15ml δοκιμαστικούς σωλήνες και στο εξής διατηρούνται και μεταχειρίζονται στον πάγο.

Η πελλέτα επαναδιαλύεται σε 1,5ml lysis buffer (στο οποίο προσθέτουμε πριν τη χρήση αναστολείς πρωτεασών) και χρησιμοποιώντας βελόνα gauge 21 (5-7 φορές) σπάμε τα κύτταρα.

Απομακρύνουμε τα κυτταρικά debris φυγοκεντρώντας στις 2500rpm και το διαλυτό ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα μεταφέρεται σε erpendorf σωληνάκια και φυγοκεντρείται 30' ακόμη στις 14000rpm.

Φυλάσσεται στους -80°C (lysate) και καλό είναι να χρησιμοποιηθεί εντός 15 ημερών.

Στη συνέχεια επωάζουμε αναδευόμενη κατάλληλη ποσότητα εκχυλίσματος με 60 μl Protein A-Sepharose beads, για 1- 2 ώρες στους 4°C , προκειμένου να απαλλαγούμε από μη ειδικές αλληλεπιδράσεις (preclearing step).Φυγοκεντρούμε για 5' ,στοις 4°C , στις 14000 rpm (απομάκρυνση των beads) και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf σωληνάκι.

Προσθέτουμε το αντίσωμα - στην περίπτωσή μας 10 μl (1 μgr) πολυκλωνικού E1A-Ab και επωάζουμε αναδεύοντας για 3 - 5 ώρες στους 4°C .

Προσθέτουμε 50μl Protein A-Sepharose beads και αφήνουμε ακόμη 1- 3 ώρες.

Φυγοκεντρούμε για 5' , στοις 4°C , στις 14000 rpm για να συγκεντρώσουμε τα σύμπλοκα beads- αντισώματος -συν-κατακρημιζόμενων πρωτεϊνών .

Ξεπλένουμε τα beads 4 -5 φορές με lysis buffer για την απομάκρυνση μη ειδικά συνδεδεμένων αντιγόνων . Σε κάθε πλύσιμο

επαναδιαλύουμε με vortex και ακολούθως φυγοκεντρούμε για να συγκεντρώσουμε τα beads (5', στους 4° C , 14000 rpm).

Τελικά επαναδιαλύουμε σε 20μl PBS και προσθέτουμε ίσο όγκο 2 X SDS loading buffer.

Τα δείγματα πριν αναλυθούν σε SDS- acrylamide gel βράζονται για 5'- 10' για να απελευθερωθούν οι πρωτεΐνες από τα beads. Το blot επωάζεται με Gal -Ab, για να διαπιστωθεί εάν η πρωτεΐνη Gal IRFact συν- κατακρημνίστηκε με E1A.

lysis buffer (επιλέγεται ανάλογα με τη 'φύση' του αντιγόνου)

I) PBSTDS	II)	III)
100ml 10 X PBS	50 mM Tris pH 8,0	50 mM Tris pH 8,0
10ml 100% Triton X- 100	1% NP-40	170mM NaCl
5 gr sodium deoxycholate	2mM EDTA	50mM NaF
1gr SDS		0,5% NP- 40

V. Τεχνικές κλωνοποίησης, απομόνωσης και ανάλυσης νουκλεϊνικών οξέων

Διαδικασίες υποκλωνοποίησης μορίων DNA (subcloning)

α. Αντιδράσεις σύνδεσης μορίων DNA (ligation)

- Δημιουργία ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με συμβατά προεξέχοντα άκρα (cohesive ends).

Η αντίδραση γίνεται σε όγκο 20 μl και περιλαμβάνει 2λ ligation buffer 10 X (με ATP που απαιτείται για τη δράση του ενζύμου), 1λ T₄ Dna λιγάσης 5 Weiss u / μl, d H₂O και τα DNAs. Συνήθως χρησιμοποιείται ποσότητα 50 - 100 ngr φορέα (vector) ενώ η ποσότητα του ενθέματος (insert) εξαρτάται από το σχετικό μέγεθος του σε σχέση με το φορέα και την επιλεγόμενη αναλογία μορίων (συνήθως 1:5 αναλογία φορέα:ενθέματος).

Η αντίδραση επωάζεται για 1,5 - 2 ώρες στους 16°C και ακολουθεί μετασχηματισμός (transformation) ικανών (competent) βακτηριακών στελεχών.

- Δημιουργία ανασυνδυσμένων πλασμιδίων από τυφλά (blunt ends) άκρα.

Το παραπάνω πρωτόκολλο τροποποιείται ελαφρά. Χρησιμοποιούμε μεγαλύτερο ποσό T₄ λιγάσης και αυξάνουμε το χρόνο επώασης της αντίδρασης (θερμοκρασία δωματίου για 4- 6 ώρες).

β. Δημιουργία τυφλών άκρων (blunt ends) - Αντίδραση fill - in.

Όταν τα προεξέχοντα άκρα του ενθέματος δεν είναι συμβατά με τα άκρα του φορέα στον οποίο πρόκειται να γίνει η κλωνοποίηση (ligation), υπάρχει η δυνατότητα ένθεσης του κομματιού με τυφλά άκρα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται το ενζυμικό κλάσμα Klenow της DNA πολυμεράσης I, που προεκτείνει, γεμίζει 5'→3' τα προεξέχοντα άκρα και τα μετατρέπει σε τυφλά (blunt). Εναλλακτικά, λόγω της 3'→5' εξωνουκλεολυτικής της δράσης μπορεί να μετατρέπει και 3' προεξέχοντα άκρα σε τυφλά.

Η αντίδραση γίνεται στα 20 - 40 μl με ποσότητες φορέα και ενθέματος που υπολογίζονται όπως και για την αντίδραση σύνδεσης

(ligation), dH₂O, 1/10 όγκου nick translation mix, 1/10 όγκου dNTPs (νουκλεοτίδια) και 1-2λ Klenow 5u/λ. Η αντίδραση επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 15'. Στη συνέχεια με 2 όγκους αιθανόλη και 1/10 όγκου οξικό νάτριο 3M pH 5,2 επωάζουμε στον πάγο 30'- 60' και φυγοκεντρούμε 5' στους 4° C και 11000 rpm για να κατακρημνιστεί και να αδρανοποιηθεί η Klenow.

Το ίζημα επανδιαλύεται σε 17λ T.E. ή d H₂O και προχωρούμε σε αντίδραση σύνδεσης (ligation) DNA κομματιών με τυφλά άκρα .

Αφού προσθέσουμε T₄ DNA λιγάση και ligation buffer με ATP, επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου τουλάχιστον 4 ώρες (το DNA υπάρχει ήδη στο διάλυμα).

10 X ligation buffer

150mM DTT	660mM Tris·Cl pH 7,6
100mM Mg Cl ₂	1mg / ml BSA
10mM spermidine	20mM ATP

Ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων βακτηριακών κλώνων

α. Υβριδοποίηση in situ με τη μέθοδο Grunstein

- Τα τρυβλία με τις βακτηριακές αποικίες που έχουν αναπτυχθεί σε ικανοποιητικό βαθμό επωάζοντας στους 37°C για 16 ώρες, μεταφέρονται τουλάχιστον για 1 ώρα στους 4°C.
- Σε κάθε τρυβλίο τοποθετείται, προσεκτικά με λαβίδα ώστε να μη σχηματιστούν φυσαλίδες, φίλτρο νιτροκυτταρίνης. Με σινική μελάνη σημειώνεται ασύμμετρα στα άκρα, η θέση του φίλτρου στο τρυβλίο.
- Αφαιρούμε το φίλτρο μετά από 2'-3' και έχοντας την πλευρά στην οποία έχουν " αποτυπωθεί ", μεταφερθεί οι αποικίες προς τα πάνω, το μεταφέρουμε διαδοχικά και για 5' σε κάθε στάδιο σε χαρτί Whattman

διαποτισμένο με 10% SDS

(λύση μεμβρανών)

IX Denaturation buffer

(αποδιάταξη γενωμικού βακτηριακού

DNA)

IX Neutralization buffer

(εξουδετέρωση)

100mM διάλυμα φωσφορικών αλάτων

(απομάκρυνση

περίσσειας

αλάτων)

Τα τρυβλία μετά την αποτύπωση των αποικιών στο φίλτρο νιτροκυτταρίνης επωάζονται για 2η φορά στους 37°C ώστε να αναπτυχθούν και πάλι οι βακτηριακές αποικίες σε ικανοποιητικό βαθμό.

Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με πλασμιδιακές

DNA κατασκευές

(transformation)

Τα βακτηριακά κύτταρα που πρόκειται να μετασχηματιστούν πρέπει προηγουμένα να έχουν υποστεί μια επεξεργασία που αυξάνει τη διαπερατότητα των μεμβρανικών τοιχωμάτων. Έτσι τα βακτηριακά κύτταρα μπορούν αποτελεσματικότερα να απορροφήσουν DNA. Αυτό γίνεται με τη μέθοδο $CaCl_2 - RbCl_2$.

Μια ποσότητα "ικανών" (competent) κυττάρων (150-200 μ l) επωάζεται με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που επιθυμούμε να τους εισάγουμε για 20 - 30 min στον πάγο.

Ακολουθεί θερμικό σοκ (heat shock) για 10'' στους 42°C και επιστροφή του σωλήνα με το μείγμα βακτηριακών κυττάρων DNA στον πάγο.

Προσθέτουμε 800 μ l LB θρεπτικό μέσο καλλιέργειας χωρίς αντιβιοτικό και το μείγμα αφήνεται για 1-2 ώρες στους 37°C ("ανάρρωση" των

βακτηριακών κυττάρων: χρονικό μεσοδιάστημα που επιτρέπει την έκφραση του γονιδίου ανθεκτικότητας προτού έλθουν τα βακτήρια σε επαφή με την αμπικιλίνη).

Το μείγμα φυγοκεντρείται (spin) στις 1500 rpm για 10´. Κατάλληλη ποσότητα ~ 100λ απλώνεται σε τρυβλία LB + αμπικιλίνη, και ακολουθεί επώαση στους 37°C για 15 - 20 ώρες.

Αφού το φίλτρο στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου, ξεραίνεται στους 100°C για 1½ -2 ώρες, ώστε το DNA να μονιμοποιηθεί στη μεμβράνη.

Στη συνέχεια τα φίλτρα υγραίνονται σε διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100mM και με ελαφρύ τρίψιμο απομακρύνουμε τα κυτταρικά υπολείμματα (debris) από τη μεμβράνη.

Ακολουθεί *in situ* υβριδοποίηση των φίλτρων με κατάλληλο ραδιοενεργά σημασμένο μοριο-ανιχνευτή σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Church και Gilbert.

Τα διαλύματα Denaturation και Neutralization υπάρχουν σε stock 2x

1lt Denaturation buffer 2x

175,5 gr NaCl

40ml NaOH 3M

d H₂O

1lt Neutralization buffer 2x

175,5 gr NaCl

153,8 gr Trismabase

d H₂O

In situ υβριδοποίηση νουκλεϊνικών οξέων

Τα φίλτρα προϋβριδοποιούνται για 30-60 min στους 65°C σε ~10ml διάλυμα υβριδοποίησης Church (hybridization buffer: 7% SDS, 500mM Na₂ HPO₄/Na H₂ PO₄ pH 7,2 (φωσφορικού), 1% BSA, 1mM EDTA).

Ο ραδιοσημασμένος ανιχνευτής αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 100°C για 3-5 min και προστίθεται στο διάλυμα υβριδοποίησης. Ακολουθεί επώαση των φίλτρων για 16-24 ώρες στους 65° με το ραδιοσημασμένο ανιχνευτή (συνθήκες ίδιες με την προϋβριδοποίηση).

Στο τελικό στάδιο, τα φίλτρα " ξεπλένονται " με περίσσεια φωσφορικού διαλύματος έκπλυσης (Wash solution: 5% SDS, 40mM διάλυμα φωσφορικών αλάτων, 0,5 mM EDTA). Επαναλήψεις των 10' για την απομάκρυνση της περίσσειας του ραδιοσημασμένου ανιχνευτή.

Ακολουθεί αυτοραδιογραφία (έκθεση του φωτογραφικού φιλμ στους -80°C).

β. Ανάλυση DNA απομονωμένου από βακτηριακές αποικίες με τη μέθοδο βρασμού, χρησιμοποιώντας περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Η συνδυασμένη χρήση κατάλληλων ενζύμων περιορισμού που συν-επωαζόμενα (σε καθορισμένες συνθήκες), αναγνωρίζουν και κόβουν το DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες, σε συνδυασμό με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαροζης κατάλληλης πυκνότητας για διαχωρισμό των περιοριστικών θραυσμάτων με βάση το μέγεθός τους, μας επιτρέπουν τη γρήγορη ταυτοποίηση των επιθυμητών ανασυνδυασμένων βακτηριακών κλώνων.

Συγκρίνοντας το ηλεκτροφορητικό πρότυπο περιοριστικών θραυσμάτων του DNA-φορέα κλωνοποίησης, με το πρότυπο περιοριστικής πέψης που προκύπτει από πέψη με τις ίδιες ενδονουκλεάσεις του DNA που απομονώθηκε από διάφορες βακτηριακές αποικίες μπορεί κανείς να ταυτοποιήσει ποιοί βακτηριακοί κλώνοι φέρουν το κλωνοποιημένο ένθεμα που επιθυμούσαμε να εκφράσουμε σε βακτηριακά κύτταρα .

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα με τη μέθοδο βρασμού **(boiling mini-prep)**

Το πλασμιδιακό DNA που απομονώνεται με τη μέθοδο αυτή είναι της τάξης των 3-5μgr και στη συνέχεια αναλύεται με ένζυμα περιορισμού προκειμένου να τυατοποιηθούν οι φέρουσες την ανασυνδυασμένη πλασμιδιακή κατασκευή βακτηριακές αποικίες.

- 1,5 ml βακτηριακής καλλιέργειας (overnight, 37 °C) τοποθετείται σε σωλήνα erpendorf και φυγοκεντρείται για 15´´.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας και επαναδιαλύουμε το βακτηριακό ίζημα (pellet) σε 700μl ισονικού STET διαλύματος. Για την επαναδιάλυση χρησιμοποιείται vortex.
- Προσθέτουμε 50μl λυσοζύμης (10mgr/ml) και μεταφέρουμε το σωλήνα σε βραστό νερό για 2´.
- Φυγοκεντρούμε για 5-10´στις 13000rpm και ακολούθως μεταφέρουμε 500λ από το υπερκείμενο σε νέο σωλήνα, αποφεύγοντας την ιξώδη μεσόφαση.
- Κατακρημνίζουμε το DNA με ίσο όγκο 500 μl ισοπροπανόλη, επώαζοντας για 30´στους -20°C και φυγοκεντρώντας στις 11.000 rpm , στους 4°C για 10´.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε το DNA (ίζημα, pellet) σε 25μl d H₂O.
- Παίρνω 5-10 μl για να αναλυθεί με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού.

STET

8% sucrose

5% Triton

50mM EDTA

50mM Tris.Cl pH8

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα με την
αλκαλική μέθοδο
(alkaline lysis)

Η μέθοδος αυτή (αλκαλικής κυτταρική λύσης) εφαρμόστηκε για την απομόνωση από βακτηριακές καλλιέργειες πλασμιδιακών κατασκευών DNA σε ικανές ποσότητες και με υψηλό βαθμό καθαρότητας, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης κυτταρικών σειρών αλλά και για ανάλυση/προσδιορισμό της πρωτογενούς νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τους με sequencing.

- Βακτηριακή καλλιέργεια του 1lt που βρίσκεται σε εκθετική φάση ανάπτυξης (μετά από ~16 ώρες επώασης στους 37°C) φυγοκεντρείται για 10΄ στους 4°C στις 5000rpm.
- Απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας και η βακτηριακή πελλέτα επαναδιαλύεται σε 20 ml lysis buffer. (50mM γλυκόζη, 25mM Tris.Cl pH 8.0 , 10mM EDTA pH 8.0)
- Προσθέτουμε 5mgr/ml λυσοζύμη και επωάζουμε για 5΄ σε θερμοκρασία δωματίου για να " λυθούν " τα βακτηριακά κυτταρικά τοιχώματα .
- Επαναφέρουμε τα δείγματα σε πάγο και προσθέτουμε 40ml διάλυμα II (0,2 N Na OH, 1% SPS). Αφήνουμε για 10΄ στον πάγο για να

αποδιαταχθεί το γραμμικό, χρωμοσωμικό, βακτηριακό DNA, αναδεύοντας ήπια .

Για την εξουδετέρωση του αλκαλικού διαλύματος II, προσθέτουμε 30ml από το όξινο διάλυμα III (3M CH₃ COOK, 5M CH₃ COOH), ανακατεύουμε έντονα και αφήνουμε 10΄ στον πάγο.

- Φυγοκεντρούμε στις 5000rpm, 4°C για 10΄ και διηθούμε με υαλοβά-

μβακα, το DNA διάλυμα σε νέους σωλήνες.

- Προσθέτουμε ίσο όγκο ισοπροπανόλης (90ml) που αφυδατώνει και κατακρημνίζει το DNA. Μετά από 15' επώαση στον πάγο, φύγοκεντρούμε στις 5000 rpm, 4°C, για 15.
- Το κατακρημνισμένο DNA-ίζημα επαναδιαλύεται σε T.E. ή d H₂O και προσθέτουμε ίσο όγκο LiCl 5M. Επωάζουμε για 30' σε πάγο και φυγοκεντρούμε για 20' στους 4°C, 11000rpm. Το LiCl κατακρημνίζει επιλεκτικά το RNA, αυξάνοντας έτσι την καθαρότητα του DNA διαλύματος (το DNA παραμένει στο υπερκείμενο).
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα. Προσθέτουμε 2 όγκους αιθανόλη και φυγοκεντρούμε στις 11000 rpm, 4°C, για 15' - 20', για να κατακρημνιστεί το DNA (Στην περίπτωση αυτή η παρουσία οξικού νατρίου δεν είναι απαραίτητη γιατί υπάρχει ήδη άλας στο διάλυμα, το LiCl).
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και το DNA ίζημα διαλυτοποιείται σε d H₂O ή σε T.E. (10mM Tris.Cl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0).

Καθαρισμός πλασμιδιακού DNA σε διαβάθμιση της πυκνότητας χλωριούχου καισίου (CsCl) παρουσία βρωμιούχου αιθιλίου (Eth Br)

Το DNA που απομονώθηκε με την αλκαλική μέθοδο κυτταρικής λύσης ακολούθως καθαρίζεται και εμπλουτίζεται σε υπερελικωμένες πλασμιδιακές διαμορφώσεις (supercoiled plasmid DNA) με 2 διαδοχικές υπερφυγοκεντρήσεις σε κλίση, διαβάθμιση (gradient) πυκνότητας CsCl παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου, για τουλάχιστον 6 ώρες σε κάθε επανάληψη.

Κατά την υπερφυγοκέντρωση το EthBr (μεταλλαξιγόνο) παρεμβάλλεται και προσδένεται στις αλυσίδες του γραμμικού βακτηριακού DNA και σε μικρότερο βαθμό στο κλειστό κυκλικό

πλασμιδιακό DNA. Έτσι είναι δυνατή η διάκριση του γραμμικού από το πλασμιδιακό DNA (το οποίο μας ενδιαφέρει) (διακριτή ζώνωση του " πυκνότερου, βαρύτερου " πλασμιδιακού DNA κάτω από το γραμμικό, σε γραμμική διαβάθμιση CsCl).

Επιτυγχάνεται επίσης καθαρισμός του DNA από τυχόν RNA και πρωτεϊνικά debris.

Μετά το πέρας των υπερφυγοκεντρήσεων παίρνουμε τη ζώνη του υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA με σύριγγα. Ακολουθούν 5 τουλάχιστον διαδοχικές εκχυλίσσεις με ίσο όγκο ισοπροπανόλης κορεσμένης σε καΐσιο για την πλήρη απομάκρυνση του EthBr από το DNA.

Στη συνέχεια το δείγμα αραιώνεται 2 φορές με νερό για να αποφύγουμε κατακρήμνιση της περίσσειας αλατιού που περιέχεται (Cs Cl) και κατακρημνίζουμε το DNA με 2 όγκους αιθανόλης. (Στην περίπτωση αυτή η παρουσία οξικού νατρίου δεν είναι απαραίτητη γιατί υπάρχει ήδη άλας στο διάλυμα).

Φυγοκεντρούμε για 15' στους 4°C, 11000rpm. Το DNA κατακρημνίζεται και στη συνέχεια επαναδιαλύεται σε d H₂O ή T.E.

Ακολουθεί καθαρισμός του με διαδοχικές εκχυλίσσεις: φαινόλη - χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με προσθήκη 2 όγκων αιθανόλης, 1/10 όγκου οξικού νατρίου pH 5,2, επώαση στους -20°C για 30' και φυγοκέντρηση για 15' στους 4°C, 11000 rpm.

Τελική επαναδιαλυτοποίηση της πελλέτας σε T.E. ή d H₂O.

Ποσοτικοποίηση DNA

Το δείγμα του DNA αραιώνεται 1:1000 σε d H₂O και μετράται η απορρόφηση του δείγματος σε φωτόμετρο διαδοχικά σε μήκη κύματος 260 και 280nm. Στα 260 nm (UV) απορροφούν τα νουκλεϊνικά οξέα και η απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης.

Η συγκέντρωση του DNA υπολογίζεται με βάση την ένδειξη του φωτόμετρου και την αραιώση που έγινε, με βάση το δεδομένο ότι $O.D. = 1$ αντιστοιχεί σε συγκέντρωση του διαλυμένου DNA 50μgr/ml. Προσεγγιστικά η συγκέντρωση του DNA μπορεί να εκτιμηθεί ηλεκτροφορετικά σε πήκτωμα αγαροζης 0,8% από την ένταση της παρατηρούμενης ζώνης του υπερελικωμένου πλασμιδίου. Υπολογίζεται επίσης ο λόγος $O.D. 260 / 280$ προκειμένου να εκτιμηθεί η καθαρότητα του δείγματος (ο λόγος θα πρέπει να κυμαίνεται ~2 και εάν είναι $< 1,5$ σημαίνει ότι το διάλυμα του DNA περιέχει πρωτεΐνες, άλατα ή και οργανικούς διαλύτες π.χ. φαινόλη που απορροφούν στα 280nm).

Προσδιορισμός της πρωτοταγούς νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μορίων πλασμιδιακού DNA (sequencing)

Εφαρμόστηκε η μέθοδος τερματισμού της επιμήκυνσης της DNA αλυσίδας που " γράφει " το ένζυμο Sequenase με ενσωμάτωση τριφωσφορικών δι-δεοξυνουκλεοτιδίων, που συνιστούν δομικά ανάλογα των φυσικών μονομερών αλλά είναι και αναστολείς του μηχανισμού επιμήκυνσης του πολυμερισμού (μέθοδος Sanger / Edman).

Η ακολουθούμενη διαδικασία έχει ως εξής:

- 5μgr υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA διαλύεται σε τελικό όγκο 40μl (d H₂O).
- Προσθέτουμε 1,6 μl NaOH 5N και επωάζουμε 5' σε θερμοκρασία δωματίου (Denaturation).
- Προσθέτουμε για εξουδετέρωση του NaOH, 16,6 μl CH₃COO NH₄ 5M και 230 μl αιθανόλη και επωάζουμε για 30' στους - 80°C (Neutralization).
- Φυγοκεντρούμε στις 11000rpm, 15' στους 4°C για να κατακρημνιστεί

το DNA. Το ίζημα καθαρίζεται από περίσσεια αλάτων με αιθανόλη 70% και ξηραίνεται, στεγνώνει σε Speed Vac.

- Η πελλέτα επαναδιαλύεται σε 7μl d H₂O.
- Προσθέτουμε 2 μl Sequencing buffer και 1μl κατάλληλου εκκινητή (primer).
- Επωάζουμε στο υδατόλουτρο των 65° C για 5' και ακολούθως αφήνουμε να κρυώσει το διαλύμα σε θερμοκρασία δωματίου (διαδικασία Annealing: πρόσδεσης του εκκινητή (primer) στη συμπληρωματική πλασμιδιακή αλληλουχία).
- Προσθέτουμε 1μl 100mM DTT, 0,5 μl ³⁵S-d ATP* , 2μl labeling mix σε κατάλληλη αραίωση (ανάλογα με το πόσο κοντά ή μακριά από τον εκκινητή επιθυμούμε να " διαβάσουμε "), 2 μl ενζύμου Sequenase που έχει αραιωθεί 1:8.

Επωάζουμε 5' σε θερμοκρασία δωματίου (RT).

Σε διαδοχικά πηγάδια του microtiter μεταφέρουμε 2,5 μl απο τα διδεοξυνουκλεοτίδια dd ATP, dd GTP, dd TTP, dd CTP.

Σε κάθε πηγάδι προσθέτουμε 3,5μl της αντίδρασης και επωάζουμε για 15' στους 42° C (ή στους 37° C) (extrensiion reaction).

Προσθέτουμε 4 μl stop buffer σε κάθε πηγάδι.

Οι αντιδράσεις φυλάσσονται στους -80° C.

Όταν πρόκειται να φορτωθούν σε πήκτωμα 38:2 ακρυλαμίδης 6%, 8M

ουρίας, θερμαίνονται στους 65° C για 5' και τοποθετούνται σε πάγο.

Ακολούθως φορτώνονται στο πήκτωμα και ηλεκτροφορούνται στα 2770 Volt σε running buffer 0,5 X TBE για το χρονικό διάστημα που κρίνεται αναγκαίο.

Το πήκτωμα στη συνέχεια " στεγνώνει ", ξηραίνεται (σε dryer) και εκθέτεται σε φωτογραφικό φιλμ για 1-2 μέρες σε θερμοκρασία δωματίου (αυτοραδιογραφία).

Απομόνωση κομματιών DNA από πήκτωμα αγαρόζης ηλεκτροέκλουση

Σε UV transilluminator εντοπίζουμε και κόβουμε από το πήκτωμα τη ζώνη - περιοριστικό θραύσμα (DNA fragment) που μας ενδιαφέρει. Η ζώνη στη συνέχεια τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδωσης (dialysis) σε νερό ή TBE, χωρίς να δημιουργούνται φουσαλίδες αέρα.

Η μεμβράνη dialysis τοποθετείται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης και ηλεκτροφορείται σε 1lt TBE 0,5 X.

Ελέγχουμε σε UV transilluminator σε τακτά χρονικά διαστήματα και όταν το DNA εκλουστεί πλήρως από την αγαρόζη, αντιστρέφουμε τους πόλους της ηλεκτροφόρησης για 30΄΄. Με τον τρόπο αυτό αποκολλάται το DNA που τυχόν έχει προσκολληθεί στη μεμβράνη διαπίδωσης.

Στη συνέχεια, το υγρό περιεχόμενο της μεμβράνης μεταφέρεται σε σωλήμα 15ml όπου συμπυκνώνεται με ίσο όγκο ισοβουτανόλης. Αυτό επαναλαμβάνεται μέχρι να μειωθεί ο όγκος στα 100-150μl. Ακολουθεί καθαρισμός με διαδοχικές εκχυλίσεις: φαινόλη, χλωροφόρμιο. Το υπερκείμενο της τελευταίας εκχύλισης φυγοκεντρείται σε κολώνα χρωματογραφίας G50 και στη συνέχεια κατακρημνίζεται το DNA προσθέτοντας 2 όγκους αιθανόλης και 1/10 όγκου οξικό νάτριο 3M pH 5,2.

Καταψύχουμε στους -20°C για 30΄- 60΄ και φυγοκεντρούμε στις 11000 rpm, στους 4°C για 15΄- 20΄.

Η πελλέτα επαναδιαλύεται σε dH_2O και το DNA διάλυμα ποσοτικοποιείται ηλεκτροφορητικά σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8%.

VI. Πλασμιδιακές κατασκευές

Κατά τους μήνες εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας
κατέστει

αναγκαίο να δημιουργηθούν και να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης συγκεκριμένες πλασμιδιακές κατασκευές. Συγκεκριμένα η αλληλουχία του IRF 1 μεταφέρθηκε από τον PRSET (από όπου αφαιρέθηκε με άκρα BamHI) και κλωνοποιήθηκε στον PBXGI (κομμένο με BamHI). Ο σωστός προσανατολισμός (orientation) του ενθέματος προσδιορίστηκε με προσδιορισμό της πρωτοταγούς αλληλουχίας (sequencing) χρησιμοποιώντας Gal 4 εκκινητή. Εξάλλου αργότερα κρίθηκε απαραίτητη η μεταφορά τόσο του Gal IRF 1 ολόκληρου, όσο και του Gal IRFactivation domain από το pBXGI (κόβοντας με Hind III x Xba I) και κλωνοποίησή τους σε άλλο πλασμιδιακό φορέα στον οποίο δεν υπάρχουν SV40 αλληλουχίες για ρύθμιση της μεταγραφής (τέτοιες αλληλουχίες υπάρχουν στο pBXGI, pXM φορέα και άλλους και επηρεάζονται από το EIA ογκοαντιγόνο). Κατάλληλος κρίθηκε ο φορέας pRc/RSV στον οποίο το ένθεμα κλωνοποιήθηκε κατευθυνόμενα με άκρα Hind III x Xba I στις αντίστοιχες περιοριστικές θέσεις του polylinker του φορέα. Θετικοί κλώνοι επελέγησαν με περιοριστική πέψη του DNA που απομονώθηκε από minipreps: Hind III x Xba I καθώς και Bgl II x Xba I για επιβεβαίωση του ορθού προσανατολισμού του κλωνοποιημένου ενθέματος.

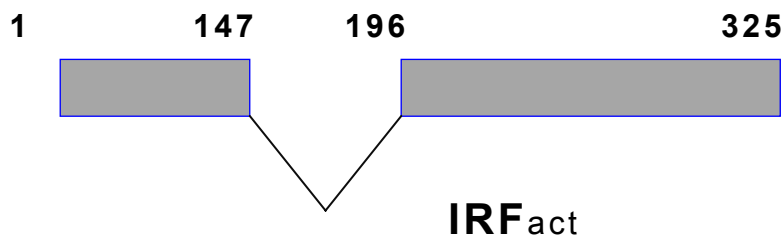
Πρωτοταγής ακολουθία Gal εκκινητή :

5' CATAGAATAAGTGCGACATCATC 3'

Gal4 Binding Domain (σε SV / RSV υποκινητή)



Gal- IRFact (σε SV / RSV υποκινητή)



Αμινοξική αλληλουχία IRF_{act} activation domain

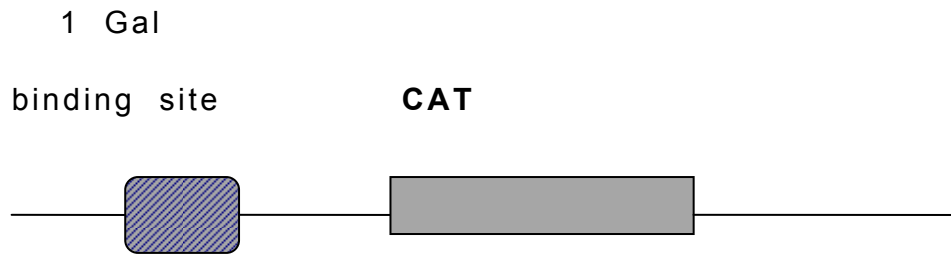
196

PDWHIPVEVVPDSTSDLYNFQVSPMPSTATTTDEDEEGKL
PEDIMKLLSEQSEWQPTNVDGKGYLLNEPGVQPTSVY
GDFSCKEEPESPGGDIGLSLQRVFTDLKNMDATWLDS
LLTPVRLPSIQAIPCAP

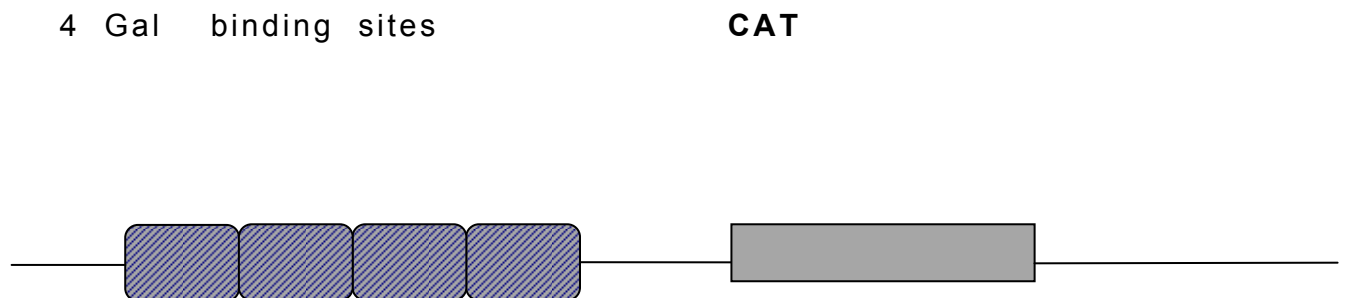
325

IRF accession number : X14454

G1 - CAT



G4 - CAT



Τα πλασμίδια pBXG1, G1- CAT, G4- CAT , Gal - IRFact / SV, RSV / p300, RSV/ mCBP ήταν ευγενική παραχώρηση του Δρ. Δημήτρη Θάνου.

Τα πλασμίδια CMV / p300, CMV/ del30 (έλλειψη αα 1737-1809) μας έχουν διατεθεί από το εργαστήριο του David Livingston.

Οι εσωτερικές ελλείψεις του E1A : RSV / CR1 , RSV / CR3 , RSV / N term **OLD** είναι κατασκευές της Θεοδώρας Αγαλιώτη.

N term **OLD** : έλλειψη των αμινοξέων 1 - 14, ενώ για τα αμινοξέα 15 - 19 ισχύει :

15	16	17	18	19	
Meth-	Ala	- Ala	- Ser	- Leu	<i>wt E1A</i>
		↓	↓	↓	
"	- "	- Glu-	Phe-	Asp	<i>N term OLD</i>

CR1 : έλλειψη των αμινοξέων 38 - 65.

CR3 : έλλειψη των αμινοξέων 140 - 185.

Η καινούργια αμινοτελική έλλειψη του E1A (αα 1- 22), N_{term} **NEW** δημιουργήθηκε υποκλωνοποιώντας ένα Pvu II θραύσμα από το PUC19/ CR3 deletion of E1A ,στις Sma I x filled Nco linker (συνδεδεμένου στην EcoR V θέση)polylinker θέσεις του pBluescript KS. Στη συνέχεια θραύσμα με άκρα Hind III x Spe I μεταφέρθηκε από το pBluescript και κλωνοποιήθηκε κατευθυνόμενα στις αντίστοιχες θέσεις του pRC/ RSV.

Λίγα λόγια.....

..... για το E1A

Οι αδενοϊοί είναι ds DNA ιοί με γένωμα ~37 kb και περισσότερα από 80 μέλη στις τάξεις τους. Πιο καλά χαρακτηρισμένοι είναι οι αδενοϊοί με ξενιστή τον άνθρωπο. Τα ανθρώπινα κύτταρα επιτρέπουν λυτικό κύκλο πολ/μού του ιού (permissive), κάτι που σχετίζεται με φλεγμονώδεις μολύνσεις του αναπνευστικού συστήματος. Αντίθετα σε κυτταρικές σειρές τροφικών (non-permissive) μόλυνση με αδενοϊό συνεπάγεται ογκογενετικό μετασχηματισμό τους, δηλαδή μη ελεγχόμενη κυττ. διαίρεση και αύξηση. Η ικανότητα των αδενοϊών για ογκογενετικό μετασχηματισμό κυττάρων, αποδίδεται στην έκφραση της πρώιμης περιοχής 1 (E1 - μία από τις τέσσερις που έχουν χαρακτηριστεί) του ιικού γενώματος και συγκεκριμένα στη συνδυασμένη έκφραση των γονιδίων E1A και E1B. Έκφραση του E1A προκαλεί αθανатоποίηση (συνεχή, ανεξέλεγκτο πολ/μό), ενώ απαιτείται ταυτόχρονη έκφραση και του E1B για τον πλήρη ογκογενετικό μετασχηματισμό.

Το πρώιμα εκφραζόμενο (early) ογκογονίδιο E1A του αδενοϊού με εναλλακτικό splicing δίνει 5 mRNAs. Από τη μετάφραση των δύο πιο άφθονων μηνυμάτων, 12s και 13s συνθέτονται πρωτεΐνες 243R και 289R αντίστοιχα. Η δομική διαφορά τους είναι μία εσωτερική αλληλουχία 46 αα που απουσιάζει από τη 243aa πρωτεΐνη. Είναι όξινες πρωτεΐνες (υψηλό ποσοστό προλινών), με μικρό χρόνο ημίσειας ζωής. Υπόκεινται σε φωσφορυλίωση σε συγκεκριμένες σερίνες (συνχές τέτοιες θέσεις είναι τα κατάλοιπα 89 και 219).

Μεταξύ διαφόρων τύπων αδενοϊών έχουν χαρακτηριστεί τρεις συντηρημένες περιοχές, conserved region: CR1 αα 40-80, CR2 αα 120-138 και CR3 αα 140-188, ενώ υπάρχει μία λειτουργικά σημαντική, λιγότερο αυστηρά συντηρημένη περιοχή στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης: N_{terminus} αα 1-25. Οι περιοχές αυτές που συγκροτούν το αρθρωτό λειτουργικό E1A αποτελούν σημεία επαφής και αλληλεπίδρασης με άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες. Για κάποιες επιτελούμενες από το E1A βιολογικές λειτουργίες που έχουν μελετηθεί έχει προσδιοριστεί η περιοχή εκείνη (domain) που θεωρείται κρίσιμη για αλληλεπίδραση με χαρακτηρισμένο ή όχι πεπτίδιο.

Η CR3 περιοχή - χαρακτηριστικά μοναδική στο 13s μετάγραφο δεν θεωρείται αναγκαία για την εκδήλωση κυτταρικού μετασχηματισμού, θεωρείται όμως υπεύθυνη για τη λειτουργία της E1A πρωτεΐνης ως μεταγραφικού ενεργοποιητή άλλων γονιδίων. Άλλωστε είναι γνωστό ότι κατά την αδενοϊκή μόλυνση η ενεργοποίηση του πρώιμα εκφραζόμενου γενετικού τόπου E1A προηγείται και είναι αναγκαία για την έκφραση και των υπολοίπων πρώιμα εκφραζόμενων γονιδίων E1B, E2, E3, E4.

Για τον ογκογενετικό μετασχηματισμό κυττάρων αναγκαίες θεωρούνται οι περιοχές CR1, CR2 και N_{terminus}. Μπορεί κανείς να διακρίνει λειτουργικά δύο υποπεριοχές:

α) N_{terminus} και καρβοξυ-τελικό τμήμα της CR1 και β) αμινο-τελικό τμήμα της CR1 και CR2. Η πρώτη χαρακτηρίζεται από την ικανότητα αλληλεπίδρασης, επαφής με p300 μεταγραφικό «εξομοιωτή», συνενεργοποιητή (βλέπε και παρακάτω), προάγοντας είσοδο στη φάση S του κυττ. κύκλου (DNA synthesis). Η δεύτερη θεωρείται αναγκαία για αλληλεπίδραση του E1A με μία σειρά πρωτεϊνών - ρυθμιστών του κυττ. κύκλου: p105, p107, p130, pRb cyclin A, cdk 2. Σε μεγάλο βαθμό ο φαινότυπος μόλυνσης κυττάρων με αδενοϊό - αναστολή προγράμματος διαφοροποίησης και αύξηση του πολ/σμού- οφείλεται στην αλληλεπίδραση E1A με αυτές τις πρωτεΐνες, που συνεπάγεται απελευθέρωση του μεταγραφικού παράγοντα E2F και ρύθμιση των γονιδίων - στόχων του.

Μέσω των ίδιων αυτών περιοχών (CR1, CR2 και N_{terminus}) έχει διαπιστωθεί ότι το E1A μπορεί να καταστέλλει, να καταργεί την έκφραση μίας σειράς ιικών και κυτταρικών υποκινητών / ενισχυτών. Τέτοια περίπτωση αποτελούν τα επαγόμενα κατά τη μυογένεση γονίδια, των οποίων η έκφραση καταργείται παρουσία E1A. Το ίδιο ισχύει και για μια σειρά άλλων ιστοειδικών γονιδίων. Πρόσφατα η αρνητική αυτή δράση του E1A έχει συνδυαστεί με την πρόσδεση p300, παρεμποδίζοντας τη λειτουργία της ως συνενεργοποιητή της μεταγραφής. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται αναστολή της διαφοροποίησης ευνοώντας τον πολ/μό, κάτι απόλυτα σύμφωνο με τις ανάγκες του αδενοϊού.

Το πρώιμο εκφραζόμενο (early) ογκογονίδιο E1A του αδενοϊού αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα trans ρυθμιστικού παράγοντα - τόσο θετικού όσο και αρνητικού & οι ακριβείς μηχανισμοί δράσης όμως, πρόσφατα μόνο άρχισαν να αποκαλύπτονται στη λεπτομέρειά τους. Είναι πάντως γνωστό ότι η όποια δράση του E1A ασκείται χωρίς το ίδιο να προσδένεται άμεσα στο DNA. Ούτε έχουν χαρακτηριστεί E1A- ειδικά ρυθμιστικά cis στοιχεία (DNA motifs για πρόσδεση E1A). Αντίθετα από συγκριτική μελέτη υποκινητών διαφόρων γονιδίων που ενεργοποιούνται από E1A διαπιστώθηκε ότι η κρίσιμη αλληλουχία στόχος δεν είναι μοναδική. E1A- εξαρτώμενη trans- ενεργοποίηση ασκείται μέσω θέσεων πρόσδεσης για ATF, AP-1, E2F ή ακόμη και μέσω TATAA στοιχείων.

Η p300 αρχικά χαρακτηρίστηκε ως πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με το E1A. Τότε όμως δεν υπήρχαν δεδομένα που να έθεταν τη λειτουργική βάση, το φυσιολογικό πλαίσιο στο οποίο εντάσσεται η αλληλεπίδραση αυτή. Η p300 πιστεύεται ότι διαδραματίζει καταλυτικό ρόλο σταματώντας τον κυτταρικό κύκλο στη G0/G1 φάση. Η κλωνοποίηση που ακολούθησε αρκετά χρόνια μετά αποκάλυψε συντηρημένα μοτίβα, χαρακτηριστικά πρωτεϊνών που είναι μεταγραφικοί ρυθμιστές. Στο πεπτίδιο των ~2400aa εντοπίζει κανείς μεταξύ άλλων, περιοχές που ονομάζονται βρωμοπυρήνες (bromodomain), άλλες πλούσιες σε κατάλοιπα κυστεΐνης ιστιδίνης (CH 1-3). Η επαφή p300- E1A εντοπίζεται στο καρβοξύ - τελικό zinc-finger της p300, περιοχή υψηλής συντήρησης μεταξύ p300 - CBP(p300 : aa552-660 και CBP:aa 572- 680).

Η 265 kD πυρηνική πρωτεΐνη CBP ταυτοποιήθηκε ως συνενεργοποιητής του φωσφορυλιωμένου (Ser 133) από την PKA μεταγραφικού παράγοντα CREB. Ο CREB είναι ο τελικός μεσολαβητής στο μονοπάτι μετάδοσης σήματος cAMP , η πρωτεΐνη που προσδέεται στο cAMP response element (CRE). Το CBP και η p300 μπορούν να προσδένονται με παρόμοια συγγένεια σύνδεσης στο CREB και η p300 μπορεί να αντικαταστήσει λειτουργικά το CBP στο CREB-επαγόμενο μονοπάτι μεταγραφικής ενεργοποίησης. Η πρόσδεση E1A σε p300/CBP εμποδίζει την πρόοδο του μονοπατιού αυτού μετάδοσης σήματος. Φαίνεται λοιπόν ότι το E1A δρα παρεμποδίζοντας τη λειτουργία, αδρανοποιώντας δευτερογενείς μεταβιβαστές, μεσολαβητές «εξομειωτές» της μεταγραφής, όπως η p300.

Σύγκριση της αμινοξικής σύστασης- αλληλουχίας των δύο πρωτεϊνών αποκάλυψε 75 % ομοιότητα και 63% ταυτότητα, συνολικά, για το πλήρες μόριο, ποσοστό σημαντικό, αν αναλογιστεί κανείς και το μεγάλο μήκος των πεπτιδίων. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες p300 / CBP είναι συντηρημένες σε *C. elegans*, *Drosophila* και θηλαστικά. Αν και καμία από τις δύο δεν μπορεί αυτοδύναμα να προσδέεται στο DNA, «στρατολογούνται» σε πλειάδα υποκινητών μέσω επαφής τους με ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες, συμβάλλοντας στην ενεργοποιητική δράση τους. Γι' αυτό τους δόθηκε το όνομα συνενεργοποιητές: coactivators ή adaptors - bridging factors: «εξομοιωτές» - μόρια γέφυρες αφού πιστεύεται ότι αυτό το ρόλο επιτελούν, μεσολαβώντας μεταξύ μεταγραφικού παράγοντα και βασικής μεταγραφικής μηχανής.

Έχουν λοιπόν χαρακτηριστεί μέχρι τώρα οι αλληλεπιδράσεις p300-CREB, CBP-CREB, CBP- cJun, p300-YY1, CBP-Fos, CBP-cMyb, p300 / CBP -p53, CBP- STAT1,2, p300-Myo-D, p300 / CBP - NFκB p65, CBP- nuclear receptors. Αν και κάποιες από τις αλληλεπιδράσεις αυτές έχουν χαρακτηριστεί μόνο για p300 ή CBP, δεδομένης της ισχυρής δομικής συσχέτισής τους θεωρούνται και λειτουργικά ισοδύναμοι, πρακτικά ανταλλάξιμοι παράγοντες. Για το λόγο αυτό αναφέρονται μοναδιαία ως p300 / CBP, αν και δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως αν αυτό ισχύει σε όλες τις περιπτώσεις. Υπάρχουν πειραματικές ενδείξεις που αφήνουν ανοικτό το ενδεχόμενο, το CBP και η p300, παρά την εκτεταμένη ομολογία και λειτουργική αναλογία τους σε ότι αφορά αλληλεπίδραση με E1A και CREB, να διαφοροποιούνται ελαφρά ως προς τις προτιμήσεις τους για επαφή με συγκεκριμένους παράγοντες *in vivo*. Αυτό διαφαίνεται από τη διαφορετική αποτελεσματικότητα υπερέκφρασης CBP-p300 στην αποκατάσταση της ενεργότητας των cJun και Jun B, παρουσία E1A ' το CBP δεν αναστρέφει την E1A- επιφερόμενη καταστολή το ίδιο αποτελεσματικά με την p300. Σίγουρα το αν υφίσταται ή όχι θέμα διαφορετικής λειτουργικής εξειδίκευσης, «εξειδίκευσης υποστρώματος» των p300 και CBP είναι κάτι που θα διερευνηθεί εκτενέστερα στο εγγύς μέλλον.

Παράλληλα αρχικές μελέτες είχαν καταδείξει την αλληλεπίδραση p300 / CBP με στοιχεία της βασικής μεταγραφικής μηχανής, όπως ο TFIIIB, το TBP και RNA pol II συνηγορώντας στο ρόλο τους ως ενδιάμεσα μόρια -γέφυρες. Μάλιστα η περιοχή επαφής του

p300 / CBP με TFIIIB είναι αλληλεπικαλυπτόμενη με την περιοχή που απαιτείται για σύνδεση του E1A , με αποτέλεσμα ο σχηματισμός συμπλόκου E1A- p300 / CBP να αποκλείει τη δυνατότητα πρόσβασης του TFIIIB στην ίδια περιοχή , παρεμποδίζοντας έναρξη της μεταγραφής .

p300/CBP και ακετυλίωση

Οι ακετυλιωμένες ιστόνες είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα της μεταγραφικά ενεργής χρωματίνης. Σε μεταγραφικά σιωπηλές περιοχές χρωματίνης οι ιστόνες είναι υποακετυλιωμένες, ενώ αντίθετα σε περιοχές που μεταγράφονται κυριαρχούν υπερακετυλιωμένες ιστόνες . Η αντίδραση καταλύεται από ένζυμα που καλούνται ακετυλ-τρανσφεράσες ιστονών : ακετυλάσες (HAT) και απακετυλάσες . Ενεργότητα ακετυλάσης έχει να επιδείξει και ο γενικός μεταγραφικός παράγοντας TAF_{II} 250 . Η ακετυλίωση των ιστονών οδηγεί σε αποσταθεροποίηση της δομής των νουκλεοσωμάτων και αναδιαμόρφωση της χρωματινικής δομής, με τρόπο τέτοιο που να καθιστά ευκολότερη την πρόσβαση και πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων στο DNA . Αντίθετα οι απακετυλάσες δρουν σταθεροποιώντας το νουκλεοσωμικό πακετάρισμα του DNA .

Τελευταία έχουν χαρακτηριστεί μία σειρά παραγόντων με βάση την φυσική σύνδεσή τους με p300/CBP , ήδη γνωστοί συνενεργοποιητές, αλλά και νέες πρωτεΐνες. Φαίνεται δε ότι κάποιοι τέτοιοι συμπαραγόντες έχουν ενεργότητα ακετυλάσης .

Ο πρώτος τέτοιος παράγοντας που χαρακτηρίστηκε ήταν ο P/CAF (p300/CBP associated factor) κατ'αναλογία του GCN5 στα θηλαστικά . Είναι γνωστό ότι για τη μεταγραφική ενεργότητα του c- Jun χρειάζεται p300, ενώ το ανάλογο του c- Jun γονίδιο στη ζύμη , το GCN4 σχηματίζει σύμπλοκο με μία σειρά παραγόντων : GCN5 , ADA2, ADA3. Επιπλέον, υπάρχει μία περιοχή 50aa - μοτίβο δάκτυλου πρόσδεσης ψευδαργύρου που είναι συντηρημένο μεταξύ p300-ADA2 . Αναζητήθηκε λοιπόν με σύγκριση αλληλουχιών το ανθρώπινο GCN5 και προέκυψαν δύο νέες αλληλουχίες, P/CAF και hGCN5. Η πρώτη δείχτηκε ικανή να αλληλεπιδρά με p300/CBP τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* και μάλιστα χρησιμοποιεί και συναγωνίζεται για πρόσδεση στην ίδια περιοχή της p300/CBP (~aa 1800-1850) με το E1A .

Πρόσφατα κλωνοποιήθηκε με βάση την ικανότητα αλληλεπίδρασης με CBP , ένα νέο μέλος της οικογένειας συμπαραγόντων που απαιτούνται για τη λειτουργικότητα πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων NCoA , ο p / CIP. Στην ίδια κατηγορία ανήκουν επίσης SRC-1 /NCoA-1 , TIF2/ NCoA-2/ GRIP1 , TIF1 . Φαίνεται ότι ο p / CIP είναι γενικότερης χρήσης συμπαραγόντας , σε αντίθεση με άλλα μέλη που χρησιμοποιούνται εξειδικευμένα στο μονοπάτι σηματοδότησης πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων ' τέτοια περίπτωση είναι ο SRC-1. Η πρωτεΐνη SRC-1/NCoA-1 αρχικά απομονώθηκε λόγω της ικανότητας σύνδεσής της στον υποδοχέα προγεστερόνης , αργότερα όμως αποδείχτηκε η δυνατότητα αλληλεπίδρασής της και με άλλους πυρηνικούς ορμονικούς υποδοχείς (GR, ER, TR, RXR) . Πρόσφατα χαρακτηρίστηκε η δυνατότητα αλληλεπίδρασής του και με CBP. Αντίθετα ο p / CIP φαίνεται ότι συμμετέχει σε σύμπλοκο με το CBP και σε περιπτώσεις άλλων p300/CBP ρυθμιζόμενων μεταγραφικών παραγόντων εκτός των πυρηνικών υποδοχέων , όπως AP-1, STATs .

Ταυτοποιήθηκε επίσης τελευταία στην ίδια οικογένεια ο παράγοντας ACTR , ο οποίος μπορεί να σχηματίζει σύμπλοκο με την P/CAF και CBP / p300 και έχει και ο ίδιος ενεργότητα ακετυλάσης . Τα διαθέσιμα μέχρι τώρα στοιχεία συνηγορούν σε ένα μοντέλο δράσης των ορμονικών πυρηνικών υποδοχέων που εκμεταλλεύεται ειδικούς συμπαραγόντες (SRC-1 /NCoA-1) και τη συνδυασμένη δράση διαφόρων τύπων ακετυλασών (p300 / CBP, ACTR, P/CAF) με τελικό αποτέλεσμα τη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων -στόχων.

Πρόσφατα δείχτηκε ότι πέραν της επιστράτευσης άλλων πρωτεϊνών με ενεργότητα ακετυλάσης των ιστονών (HAT) , όπως P/CAF και το ίδιο το CBP έχει ενδογενή HAT ενεργότητα (διαφορετικού τύπου από της P/CAF- τα HAT domain τους δεν είναι ομόλογα), στην πλούσια σε κυστεΐνες περιοχή του μορίου του (aa 1099-1877) , δίπλα στην περιοχή πρόσδεσης με το E1A. Έτσι παρ'όλο που η σύνδεση E1A στο CBP συνεπάγεται

απομάκρυνση του P/CAF (υπάρχει μεταξύ τους ανταγωνισμός για πρόσδεση στην ίδια περιοχή του CBP), αυτό δεν σημαίνει και κατάργηση της HAT ενεργότητάς του. Μειώνεται μεν σημαντικά με την απομάκρυνση του P/CAF, το σύμπλοκο όμως CBP-E1A διατηρεί την ενδογενή HAT ενεργότητα του CBP. Πιθανά έτσι να εξηγείται μηχανιστικά η δράση του E1A ως μεταγραφικού ενεργοποιητή σε κάποιες περιπτώσεις' «επιστρατεύοντας» CBP, αποκτά δυνατότητα επέμβασης, τροποποίησης της δομής της χρωματίνης.

Τελευταία μάλιστα δημοσίευση δίνει μία νέα διάσταση σε ότι μέχρι σήμερα ήταν γνωστό για τη συμμετοχή συνενεργοποιητών /ακετυλ- τρανσφερασών στο μοριακό μηχανισμό μεταγραφικής ενεργοποίησης. Τα πειραματικά δεδομένα που παραθέτονται, συνιστούν μία νέα παράμετρο δράσης των συνενεργοποιητών, όπως p300 / CBP: υποστηρίζεται ότι η ενεργότητα ακετυλάσης που τους χαρακτηρίζει, μπορεί να χρησιμοποιεί εκτός από ιστόνες και μεταγραφικούς παράγοντες, ως υπόστρωμα ακετυλίωσης. Εκτός δηλαδή από HAT ενεργότητα αποδεικνύεται και λειτουργικότητα FAT (transcription factor acetyltransferase activity). Μόρια λοιπόν συνενεργοποιητές - «εξομοιωτές» της μεταγραφής έχουν την ενδογενή - και όχι μόνο - ενζυμική ενεργότητα ακετυλάσης, την οποία εκμεταλλεύονται για να επέμβουν στη δομή της χρωματίνης, αλλά και για να ρυθμίσουν τη δράση μεταγραφικών παραγόντων. Τέτοια περίπτωση αποτελεί το p53, το οποίο όταν ακετυλιωθεί στο καρβόξυ-τελικό άκρο του από p300, επιτρέπεται, ενισχύεται η πρόσδεσή του στο DNA, γιατί η ακετυλίωση αναιρεί την αρνητική, αλλοστερική αυτορύθμιση που το C-terminal end ασκεί.

Σταδιακά αρχίζει να αποκαλύπτεται ο πολύπτυχος μηχανισμός δράσης των p300/CBP ως συνενεργοποιητές της μεταγραφής. Μπορούν να αποσυμπιέζουν τις συμπυκνωμένες δομές, ακετυλιώνοντας κατάλοιπα λυσίνης στις ιστόνες, επιτρέποντας έτσι είτε την ευκολότερη πρόσβαση -στις χαλαρές πλέον δομές- και πρόσδεση άλλων μεταγραφικών παραγόντων στο DNA, είτε τη συγκρότηση και ενεργοποίηση του βασικού μεταγραφικού συμπλόκου στη χρωματινική αυτή περιοχή. Η ακετυλίωση αυτή δε, μπορεί να επιτελείται είτε από τα ίδια τα p300 / CBP, είτε να ενισχύεται από την ανάλογη δράση άλλων παραγόντων που «επιστρατεύονται» από p300 / CBP. Δεν είναι πάντως ακόμη γνωστό πώς «προσελκύεται» p300 / CBP στον υποκινητή, τι ενεργοποιεί ακετυλίωση και πώς τελικά ενεργοποιείται μεταγραφή αναδιαμορφώνοντας τη χρωματίνη. Εξάλλου μπορούν ακετυλιώνοντας εκτός από ιστόνες και μεταγραφικούς παράγοντες να επηρεάζουν, μεταβάλλουν την ενεργότητά τους (ακετυλίωση του p53 βελτιώνει τη συγγένεια σύνδεσής του στο DNA). Πρόκειται τέλος για μεγάλου μεγέθους πρωτεΐνες που έχουν χαρακτηριστεί ως scaffold proteins, ακριβώς γιατί προσφέρουν μεγάλη επιφάνεια- «υπόστρωμα» για ταυτόχρονη πρόσδεση παραγόντων, φέρνοντας τους σε επαφή. Ενεργοποιούνται δε δυναμικά σε πολλά διακριτά μονοπάτια σηματοδότησης (AP-1, πυρηνικοί ορμονικοί υποδοχείς, cAMP), με αποτέλεσμα να υπάρχει πρόβλημα περιορισμένης διάθεσής τους και επομένως, ανταγωνισμός. Πού τελικά θα χρησιμοποιηθεί ιεραρχείται με βάση τις εκάστοτε επικρατούσες συνθήκες και ανάγκες του κυττάρου.

Γενετικές ενδείξεις εξάλλου υπογραμμίζουν την κρισιμότητα και αναγκαιότητα αυστηρού κυτταρικού ελέγχου των εκφραζόμενων επιπέδων CBP για ομαλή ανάπτυξη. Ασθενείς με το σύνδρομο Rubinstein-Taybi (νοητική καθυστέρηση, κρανιακές κακώσεις, πεπλατυσμένα δάκτυλα) φέρουν μεταλλαγή στο CBP γονίδιο. Πρόκειται για αυτοσωμική κυρίαρχη ασθένεια' αυτό σημαίνει ότι η ασθένεια εκδηλώνεται παρά την ύπαρξη του δεύτερου λειτουργικού αλληλομόρφου. Οι πάσχοντες έχουν «ένδεια» σε CBP και είναι σημαντικό ότι φυσιολογικά, *in vivo*, δεν υφίσταται λειτουργική αναπλήρωση από p300. Αυτό υπογραμμίζει την αναγκαιότητα διατήρησης κρίσιμων επιπέδων έκφρασης CBP για τον οργανισμό.

Από μία σειρά άλλων παρατηρήσεων, μπορεί κανείς να αξιολογήσει την πιθανή συμμετοχή του CBP σε καρκινογένεση. Σε περιπτώσεις καλπάζουσας μυελοειδούς λευχαιμίας έχει χαρακτηριστεί χρωμοσωμική μετατόπιση που περιλαμβάνει το CBP και το φέρνει δίπλα στο γονίδιο *Moz* χωρίς να έχει ακόμη διευκρινιστεί πώς η χιμαιρική πρωτεΐνη συμβάλλει, οδηγεί σε λευχαιμία. Πάντως η *Moz* πρωτεΐνη έχει περιοχές χαρακτηριστικές των ακετυλ- τρανσφερασών' πιθανά λοιπόν σύντηξη του με CBP να του προσδίδει μία συστατική υπέρ-ενεργότητα ακετυλάσης, ανατρέποντας τους κυτταρικούς εξισορροπιστικούς μηχανισμούς που βασίζονται ακριβώς στην περιοριστική διαθεσιμότητά του και εκ περιτροπής χρησιμοποίησή του, ανάλογα με τις συγκυρίες, από διάφορα λειτουργικά κυτταρικά συστήματα.

Σε καρκινώματα του εντέρου έχουν επίσης διαπιστωθεί μεταλλαγές στο γονίδιο p300, συνδυαζόμενες με έλλειψη του δεύτερου αλληλομόρφου. Οι μεταλλαγές αυτές εντοπίζονται στην καρβόξυ-τελική C/H-πλούσια περιοχή και θα είναι σίγουρα ενδιαφέρον να μελετηθεί ποιές κρίσιμες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις επηρεάζονται και πώς εμπλέκονται στην εμφάνιση όγκων.

.....για τον *IRF 1*

Οι ιντερφερόνες (IFNs) συνιστούν μία ετερογενή οικογένεια κυτοκινών που ενεργοποιούν, μετά από πρόσδεσή τους σε ειδικούς διαμεμβρανικούς υποδοχείς, ενδοκυτταρικά μονοπάτια μετάδοσης σήματος προκαλώντας σταμάτημα του κυττ. πολ/μού και διέγερση αντιϊκής ανοσολογικής απόκρισης. Οι ιϊκές μολύνσεις κατά κανόνα προκαλούν επαγωγή των γονιδίων ιντερφερόνης τύπου I (IFN- α και IFN- β) και οι πρωτεΐνες αυτές μετά τη σύνθεση και έκκρισή τους, ενεργοποιούν με τη σειρά τους μία σειρά IFN-επαγόμενων γονιδίων (ISGs- interferon stimulated genes). Η παρουσία αντιγόνων, αντίθετα, ενεργοποιεί την μεταγραφή και έκφραση των γονιδίων ιντερφερόνης τύπου II (IFN- γ).

Κατά τη μελέτη του υποκινητή του γονιδίου της IFN- β του ανθρώπου χαρακτηρίστηκαν δύο νέοι μεταγραφικοί παράγοντες ο IRF 1 και ο IRF2 (Interferon Regulatory Factor 1&2). Ο IRF1 «ψαρεύτηκε» από βιβλιοθήκη έκφρασης cDNA με βάση τη συγγένεια σύνδεσης για το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο (AAGTGA)₄, ενώ ο IRF2 κλωνοποιήθηκε με βάση τη δομική ομολογία του με IRF1. Και οι δύο παράγοντες προσδένονται στο ίδιο cis-στοιχείο, αλληλουχία πλούσια σε πουρίνες: G(A)AAAG/CT/CGAAAG/CT/C. Τέτοια στοιχεία: IRF-Es έχουν χαρακτηριστεί στους υποκινητές των γονιδίων των ιντερφερονών IFN α s και IFN β . Η αλληλουχία των IRF-Es αργότερα διαπιστώθηκε ότι είναι αλληλεπικαλυπτόμενη με την αλληλουχία ISRE στοιχείων (cis-στοιχεία απόκρισης σε IFN) που υπάρχουν στους υποκινητές ISGs-γονιδίων που η έκφρασή τους επάγεται από IFN. Πράγματι στην πορεία αποδείχτηκε ότι ο IRF1 μπορεί να προσδέεται σε ISRE στοιχεία.

Ο IRF1 στην αρχή θεωρήθηκε ο κρίσιμος παράγοντας για την ενεργοποίηση μεταγραφής από τον υποκινητή του γονιδίου της IFN β , σε περιπτώσεις ιϊκής μόλυνσης, καθώς και για τη μεταγραφική ενεργοποίηση άλλων γονιδίων που επάγονται από IFN α/β . Οι αρχικές υποθέσεις αποδείχτηκαν λανθασμένες όταν αργότερα βρέθηκε ότι για την ενεργοποίηση του γονιδίου της IFN β , μετά από ιϊκή μόλυνση κυρίως ευθύνεται ο NF κ B, ενώ η ενεργοποίηση IFN-επαγόμενων γονιδίων επιτυγχάνεται με τη δράση του σύνθετου παράγοντα ISGF3. Επιπλέον στοιχείο ήταν εξάλλου και ο φαινότυπος ποντικών IRF1-/-, τα οποία έχουν κανονική IFN α/β απόκριση σε ιϊκή μόλυνση και έκφραση ISGs. Απρόσμενη ήταν η παρατηρηθείσα σημαντική μείωση των θυμοκυττάρων CD8+.

Όπως και στην περίπτωση του IRF1, φαίνεται πως τα πρώτα συμπεράσματα για το φυσιολογικό ρόλο και του IRF2 υπήρξαν ατυχή. Είχε θεωρηθεί υπεύθυνος τόσο για τη συστατική «αποσιώπηση» όσο και για την μεταγραφική καταστολή των γονιδίων των IFN (που έπεται της επαγωγής τους). Όμως η λειτουργία αυτή επιτελείται, τουλάχιστον στο γονίδιο της IFN- β , από πρωτεΐνες που δεν ανήκουν στην IRF οικογένεια και προσδένονται στα cis-ρυθμιστικά στοιχεία PRD I και PRD II. Τα ποντίκια IRF2-/- εμφανίζουν πρόβλημα στην αιμοποίηση που γίνεται στο μυελό των οστών, χαρακτηρίζονται από μειωμένους πληθυσμούς B και T κυττάρων.

Ο IRF 2 εξακολουθεί πάντως να θεωρείται εν πολλοίς ο λειτουργικός ανταγωνιστής του IRF1: ο IRF 1 δρα ως ενεργοποιητής, ενώ ο IRF2 ως καταστολέας του IRF 1. Φαίνεται όμως ότι διαθέτει μία λανθάνουσα μεταγραφικά ενεργή περιοχή, καθώς έχουν μελετηθεί και περιπτώσεις στις οποίες ο IRF 2 δρα ως θετικός μεταγραφικός ρυθμιστής, συνεργαζόμενος και όχι ανταγωνιζόμενος με τον IRF1.

Τέτοια παραδείγματα αποτελούν το γονίδιο ιστόνης H4 → FO 108 και ο υικός υποκινητής Qp (type I latency EBNA 1 promoter) του γονιδίου EBNA 1 (Epstein Barr Nuclear Antigen). Ο τελευταίος μοιάζει με τους υποκινητές των γονιδίων IFN β και VCAM-1 που έχουν θέσεις πρόσδεσης για HMG-I(Y) (DNA bending protein) και IRF1 - IRF2. Μπορεί κανείς να υποθέσει κάποιο έμμεσο ρόλο των IRF1 - IRF2 στη ρύθμιση του μηχανισμού αντιγραφής DNA καθώς ελέγχουν μεταγραφικά σχετιζόμενα με αυτόν γονίδια (FO 108, EBNA 1).

Σήμερα έχει χαρακτηριστεί μία ολόκληρη οικογένεια IRF μεταγραφικών παραγόντων (Interferon Regulatory Factors) με ικανότητα πρόσδεσης σε IRF -Es ή ISRE στοιχεία, που στρατολογούνται συμμετέχοντας στα μονοπάτια μεταγραφικής ενεργοποίησης που πυροδοτούνται από ιντερφερόνες. Σ' αυτήν ανήκουν, εκτός από τον IRF 1 και IRF 2, ο IRF-3, ο IRF 4 / PIP / LSIRF, ο ISGF3γ και ο ICSBP.

Το αμινοτελικό άκρο που είναι υπεύθυνο για την πρόσδεση στο DNA είναι περισσότερο δομικά συντηρημένο σε σχέση με άλλα τμήματα του πεπτιδίου. Είναι χαρακτηριστική η επανάληψη τρυπτοφανών στο συγκεκριμένο domain, που πιστεύεται ότι αναδιπλώνεται σύμφωνα με το γνωστό μοτίβο αναγνώρισης και πρόσδεσης στο DNA: helix-turn-helix (έλικα-στροφή-έλικα). Ανάλογο μοτίβο επαναλαμβανόμενων τρυπτοφανών χαρακτηρίζει και την οικογένεια ογκοπρωτεϊνών Myb.

Ο παράγοντας ISGF3γ ή p48 (IFN α-stimulated gene factor 3) είναι μέλος της IRF οικογένειας με χαμηλή συγγένεια αυτόνομης πρόσδεσης στο DNA. Παρουσία όμως IFNα η p48 συγκροτεί σύμπλοκο με μέλη της STAT οικογένειας (Signal Transducers and Activators of Transcription) που έχουν προηγούμενα φωσφορυλιωθεί. Συγκεκριμένα συνδέεται με STAT2 (p113), STAT 1α (p91), STAT1β (p84). Το σχηματιζόμενο σύμπλοκο αποτελεί το μεταγραφικό παράγοντα ISGF3, ο οποίος μεταφέρεται στον πυρήνα, προσδένεται μέσω της ISGF3γ υπομονάδας σε ISRE στοιχεία και ενεργοποιεί μεταγραφή των downstream αλληλουχιών. Ο IRF 3 κλωνοποιήθηκε από κοτόπουλο και η έκφρασή του επάγεται ταχύτατα παρουσία dsRNA.

Ο IRF4 είναι λεμφοειδικά εκφραζόμενος. Για το λόγο αυτό καλείται και LS IRF (lymphocyte specific IRF). Επίσης αναφέρεται και ως PIP (PU.1 interaction factor), γιατί αλληλεπιδρώντας με τον Ets παράγοντα PU.1 προσδένεται και ενεργοποιεί μεταγραφικά γονίδια της ελαφριάς Ig αλυσίδας. Αυτόνομα ο IRF4 δρα ως μεταγραφικός καταστολέας. Ποντίκια IRF4^{-/-} αναπτύσσουν λεμφοαδενοπάθειες, καταδεικνύοντας έτσι το σημαντικό ρόλο που επιτελεί ο IRF4 στη λειτουργική διαφοροποίηση και διατήρηση, ομοιόσταση B και T κυττάρων.

Λεμφοειδικά εκφράζεται και ο ICSBP (Interferon Consensus Sequence Binding Protein) 'σε λεμφοκύτταρα και μακροφάγα. Επάγεται δε από IFN γ αλλά όχι από IFN α/β και μοιάζει περισσότερο με τον ISGF3γ, παρά με άλλα μέλη της οικογένειας IRF. Από τα υπάρχοντα στοιχεία φαίνεται ότι αλληλεπιδρώντας με τα υπόλοιπα μέλη, λειτουργεί ως μεταγραφικός καταστολέας. Ο ICSBP έχει χαμηλή συγγένεια σύνδεσης στο DNA-στόχο, έχει όμως αποδειχτεί η ικανότητά του να συνδέεται και να σχηματίζει σύμπλοκα μόρια, in vivo όσο και in vitro, με IRF1, IRF2, ενώ εμποδίζει και την πρόσδεση της ISGF3γ υπομονάδας του σύμπλοκου ενεργοποιητή ISGF3 στο DNA. Η σύνδεση με το IRF2 ενισχύει την πρόσδεση και των δύο στο DNA, κάτι που δεν ισχύει για το σύμπλοκο ICSBP-IRF1. Ο ICSBP δημιουργώντας τέτοια ισχυρά ετεροδιμερή σύμπλοκα, καταργεί τη μεταγραφή γονιδίων που επάγονται από ιντερφερόνες (dominant negative regulator).

Το γονίδιο IRF1 εδράζεται στο χρωμόσωμα 5q31.1 και το IRF 2 στο 4q35.1. Στον υποκινητή και των δύο έχουν χαρακτηριστεί θέσεις πρόσδεσης NFκB παραγόντων, ενώ ενεργοποίηση του IRF2 προαπαιτεί την επαγωγή σύνθεσης IRF1 παράγοντα (στον IRF 2 υποκινητή υπάρχει θέση πρόσδεσης IRF1). Ο IRF 2 προσδένεται στο DNA πολύ ισχυρότερα από ότι ο IRF 1. Ο χρόνος ημίσειας ζωής είναι 30 min για τον IRF 1 και 8 hours για τον IRF 2.

Η περιοχή του IRF 1 που ευθύνεται για τη μεταγραφική δράση του εντοπίζεται στο καρβοξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης και μέχρι το κατάλοιπο 250, ενώ φωσφορυλίωση

ενισχύει περαιτέρω την ενεργότητά του. Ο IRF 2 είναι σύνθετος, «μωσαϊκός» μεταγραφικός παράγοντας με περιοχές ικανές τόσο για ενεργοποίηση, όσο και για κατάργηση της μεταγραφής. Σε φυσιολογικά κύτταρα ο IRF 2 είναι σε αφθονία συγκριτικά με τον IRF 1. Παρουσία όμως κατάλληλου ερεθίσματος (IFN α/β , TNF- α , IL-1, IL-6, prolactin, leukemia inhibitory factor, ιών) επάγεται μεταγραφή και σύνθεση IRF 1 πρωτεΐνης μεταβάλλοντας την κρίσιμη αναλογία IRF1 / IRF 2, επιτρέποντας έτσι την έκφραση IFN -επαγόμενων γονιδίων.

IRF 1 και απόπτωση, κυττ.κύκλος και καρκίνος

Το ανθρώπινο IRF 1 γονίδιο εδράζεται στο χρωμόσωμα 5q31.1 και έχει παρατηρηθεί ότι λείπει ή είναι ανενεργό το ένα ή και τα δύο αλληλόμορφα σε 13 ασθενείς με λευχαιμική και προλευχαιμική μυελογενή δυσπλασία. Με βάση την παραπάνω διαπίστωση ο IRF 1 θεωρείται ογκοκατασταλτικό γονίδιο που η απουσία του σχετίζεται με νεοπλασμάτα του αιμοποιητικού συστήματος και ο IRF 2 ογκογονίδιο. Επιπλέον ένδειξη σ' αυτό ήταν το γεγονός ότι υπερέκφραση του IRF 2 προκαλεί μετασχηματισμό NIH 3T3 κυττάρων σε καλλιέργεια. Ποντίκια στα οποία έχουν μεταμοσχευτεί τέτοια κύτταρα έχουν αυξημένη ογκογενετική προδιάθεση, ενώ ο μετασχηματισμός των NIH 3T3 κυττάρων είναι αντιστρεπτός με ταυτόχρονη έκφραση IRF1. Επιπλέον ινοβλάστες IRF -/- ποντικών μετασχηματίζονται in vitro εκφράζοντας ενεργοποιημένο ογκογονίδιο όπως το H-Ha ras. Συνεκφράζοντας IRF 1 cDNA ο μετασχηματισμένος φαινότυπος υποχωρεί. Σε φυσιολογικούς ινοβλάστες το H-Ha ras δεν μπορεί από μόνο του να προκαλέσει μετασχηματισμό ' απαιτείται έκφραση και δεύτερου ογκογονιδίου ή όπως φάνηκε στη συγκεκριμένη μελέτη απώλεια λειτουργίας ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου, όπως το IRF1 ή το p53. Δηλαδή ο IRF1 λειτουργεί ογκοκατασταλτικά σε περιπτώσεις ενεργοποίησης ογκογονιδίων σηματοδοτώντας αποπτωτικά μονοπάτια κυτταρικού θανάτου. Τα μονοπάτια αυτά δεν ενεργοποιούνται σε ικανοποιητικό βαθμό σε ποντίκια IRF -/-, με αποτέλεσμα να ευνοείται ο κυττ. μετασχηματισμός και καρκινογένεση στα ζώα αυτά. Πιθανά θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθεί η λειτουργικότητα του IRF 1 και σε άλλες περιπτώσεις καρκινωμάτων - έχοντας υπόψη μας το παράδειγμα ενός άλλου ογκοκατασταλτικού γονιδίου, του p53 που είναι μεταλλαγμένο σε πολλές περιπτώσεις καρκίνων.

Άλλες ερευνητικές προσπάθειες έδωσαν πρόσφατα μία νέα διάσταση στο πεδίο δράσης του IRF 1 ως μεταγραφικού παράγοντα in vivo. Εμβρυικοί ινοβλάστες ποντικών με ανενεργοποιημένο το IRF 1 ή το p53 γονίδιο (IRF -/- ή p53 -/- ποντίκια) όταν ακτινοβοληθούν δεν σταματούν τον κυτταρικό τους κύκλο όπως συμβαίνει σε φυσιολογικά κύτταρα.

Η απόκριση φυσιολογικών κυττάρων κάτω από την επίδραση στρες (όπως γ ακτινοβολία) είναι να σταματήσει η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου (cell cycle arrest) πριν την S φάση, στο καλούμενο «σημείο περιορισμού» G1/S, μέχρι να διορθωθούν τυχόν βλάβες που προκλήθηκαν στο DNA. Έτσι αποφεύγεται η συσσώρευση μεταλλαγών που θα ήταν μοιραίες για την επιβίωση του κυττάρου αν αυτό προχωρούσε ανεξέλεγκτα σε διπλασιασμό του γενετικού υλικού του. Το σταμάτημα του κυττ. κύκλου επιτυγχάνεται με τη δράση αναστολέων (CKI) που ανενεργοποιούν τα σύμπλοκα κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών CDKs με κυκλίνες. Η ομαλή πρόοδος του κυτταρικού κύκλου εξασφαλίζεται από τη δράση τέτοιων συμπλόκων, χαρακτηριστικών για κάθε φάση του. Είναι γνωστό ότι στη G1 φάση είναι ενεργά σύμπλοκα cyclin D1/ cdk 4,6, στη G1/S σύμπλοκα cyclin E /cdk 2 ενώ στην S φάση ρυθμιστικό ρόλο έχουν κυρίως σύμπλοκα cyclin A /cdk 2.

Εμβρυικοί ινοβλάστες IRF -/- και p53 -/- ποντικών είχαν τον ίδιο φαινότυπο : δεν σταματούσαν τον κυτταρικό τους κύκλο μετά από ακτινοβολία με ακτίνες γ. Στα κύτταρα αυτά όπως διαπιστώθηκε οι κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες cdk 2,4 παραμένουν ενεργές μετά την ακτινοβολία, ενώ σε φυσιολογικούς ινοβλάστες αδρανοποιούνται με επίδραση αναστολέων (CKI) και ιδιαίτερα της p21. Σε ινοβλάστες ποντικών IRF -/- ή p53 -/-

διαπιστώθηκε ότι το γονίδιο p21 δεν ενεργοποιείται μεταγραφικά μετά από ακτινοβολία και από μελέτες του υποκινητή του στη συνέχεια ,εκτός από την ήδη γνωστή θέση πρόσδεσης για p53 χαρακτηρίστηκαν και τρεις πιθανές θέσεις πρόσδεσης του IRF.

Τα λεμφοκύτταρα σε περιπτώσεις έκθεσής τους σε μεταλλαξιγόνους παράγοντες είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοποιημένα σε απόπτωση προκειμένου να αποφευχθεί εξάπλωση των όποιων γενετικών βλαβών με τον κλωνικό πολ/μό τους . Στα λεμφοκύτταρα της T γενεαλογίας είναι γνωστά δύο ανεξάρτητα αποπτωτικά μονοπάτια :ένα που απαιτεί p53 , στα θυμοκύτταρα και ένα στο οποίο εμπλέκεται ο IRF και λειτουργεί σε ώριμα T κύτταρα μετά από μιτογονική διέγερση π.χ. με concanavalin , etoposide. Ο IRF1 και το p53 ελέγχουν μεταγραφικά την έκφραση διαφορετικών γονιδίων του αποπτωτικού μηχανισμού :το bax(θετικός ρυθμιστής) ενεργοποιείται ενώ το bcl 2 (αρνητικός ρυθμιστής) καταστέλεται μέσω δράσης του p53 , ενώ πρόσφατα σχετικά διαπιστώθηκε ότι ο IRF1 ελέγχει μεταγραφικά τόσο τα βασικά όσο και τα επαγόμενα - μετά από μιτογονική διέγερση και ακτινοβολία - επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ICE (interleukin - 1 converting enzyme , ομόλογο του γονιδίου ced3(cell death 3) του *C. elegans* προάγει απόπτωση). Σε IRF-/- ποντίκια, στα μεν ώριμα T, μετά από μιτογονική διέγερση και έκθεση σε γ ακτινοβολία ,η απόπτωση ήταν σημαντικά χαμηλότερη από ότι σε φυσιολογικά ποντίκια, στα δε θυμοκύτταρα η απόπτωση κυμαινόταν στα επίπεδα των WT κυττάρων(το p53-εξαρτώμενο μονοπάτι παραμένει λειτουργικό -διακριτό από το IRF-1- εξαρτώμενο μονοπάτι).Τέλος έκτοπη υπερέκφραση του IRF οδηγεί σε μεταγραφική ενεργοποίηση του ICE και ευαίσθητοποίηση των κυττάρων σε αποπτωτικό θάνατο (η εκδήλωση του οποίου απαιτεί συνδυασμό και με άλλα σήματα).

Διαφαίνεται λοιπόν ότι πρωτεΐνες με πολύπλευρη ενεργό συμμετοχή σε πολλές ζωτικές κυτταρικές λειτουργίες, σε διακριτά όμως λειτουργικά πεδία ,όπως ο IRF και η p53 μπορεί σε μερικές περιπτώσεις μέσα από παράλληλα και ανεξάρτητα μονοπάτια να συγκλίνουν λειτουργικά, όπως πιθανολογείται ότι ισχύει στη συνεργασία των δύο μεταγραφικών παραγόντων για την επαγόμενη από ακτινοβολία μεταγραφή του αναστολέα p21, προκαλώντας έτσι άμεσα σταμάτημα του κυττ. κύκλου σε περιπτώσεις βλάβης του γενετικού υλικού. Ενδιαφέρον θα ήταν επομένως να διερευνηθεί τυχόν από κοινού δράση των δύο παραγόντων p53 και IRF 1 σε ρύθμιση γονιδιακής έκφρασης, πέρα από την περίπτωση του p21.

Άλλα ένζυμα τα οποία ρυθμίζονται μεταγραφικά από IRF 1 είναι η 2-5 ολιγοαδενυλική συνθετάση και ds RNA - dependent protein kinase PKR .Τα ένζυμα αυτά ενέχονται στην αναστολή κυτταρικού πολ/μού. Η 2-5 ολιγοαδενυλική συνθετάση αυξομειώνεται κατά τη διάρκεια του κυττ. κύκλου,σύνμφωνα με το πρότυπο έκφρασης του IRF 1 ενώ η ds RNA dependent protein kinase PKR έχει αντιογκογενετικές ιδιότητες .

IRF ως μεταγραφικός ρυθμιστής των γονιδίων κυρίου συμπλόκου ιστοσυμβατότητας - MHC

Η έκφραση των γονιδίων του κυρίου συμπλόκου ιστοσυμβατότητας MHC και η λειτουργική παρουσίαση αντιγονικών επιτόπων από τους αντιστοιχούς υποδοχείς τάξης I και II στην επιφάνεια ειδικών κυττάρων - APCs (antigen presenting cells) είναι κρίσιμης σπουδαιότητας για πολλές λειτουργικές πτυχές του ανοσολογικού συστήματος όπως απόρριψη μολυσμένου , φλεγμονή, host defence, αυτοανοσία , ανάπτυξη και διαφοροποίηση των T κυττάρων .

Η επαγωγή της έκφρασης των MHC γονιδίων γίνεται κυρίως μέσω μονοπατιών σηματοδότησης που ενεργοποιούν οι ιντερφερόνες IFN : οι IFN α/β επάγουν έκφραση των τάξης I - class I MHC γονιδίων ενώ η IFN γ επάγει την έκφραση τόσο των τάξης I όσο και τάξης II- class I ,II MHC.

Η ενεργοποίηση των τάξης I γονιδίων είναι άμεση, σε μεταγραφικό επίπεδο, δηλαδή ενεργοποιείται η πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων σε ρυθμιστικές περιοχές του

υποκινητή των τάξης I. Μία τέτοια περιοχή είναι το στοιχείο ISRE στο οποίο προσδένονται μεταγραφικοί παράγοντες της IRF οικογένειας και συγκεκριμένα ο IRF 1 στον υποκινητή των τάξης I. Άλλη τέτοια ρυθμιστική περιοχή είναι το κουτί α στο οποίο προσδένονται μέλη της οικογένειας ATF/CREB, καθώς και το στοιχείο CRE στο οποίο προσδέεται NFκB.

Πιθανολογείται ότι καθοριστικό ρόλο στη μεταγραφική ρύθμιση των τάξης I παίζουν οι θετικές και αρνητικές πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραγόντων που προσδένονται στα ISRE και CRE cis στοιχεία, δηλαδή μεταξύ IRF 1 και NFκB.

Η επαγωγή των τάξης II είναι έμμεση, προαπαιτείται δηλαδή πρωτεϊνοσύνθεση. Πρωτεΐνη - κλειδί είναι το CIITA (Class II transactivator), χωρίς αυτόνομη ικανότητα πρόσδεσης στο DNA, η σύνθεση της οποίας επάγεται με ιντερφερόνη γ. Δρα ενεργοποιητικά σε σύμπλοκο με άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες που προσδέονται στον υποκινητή των τάξης II.

Αναφορικά με τη λειτουργική σημασία και ρόλο του IRF in vivo, μελέτες σε ποντίκια με ανενεργά IRF γονίδια (knockout-targeted disruption), IRF -/-, αποκάλυψαν πιθανή εμπλοκή του IRF ως έμμεσου ρυθμιστή της επαγόμενης έκφρασης και των τάξης II MHC γονιδίων, πέραν της αναμενόμενης επίδρασής του στην έκφραση των τάξης I. Συγκεκριμένα τα βασικά επίπεδα έκφρασης των τάξης I και τα επαγόμενα με IFN γ επίπεδα έκφρασης τόσο των τάξης I όσο και των τάξης II ήταν μειωμένα στα νεφρά και περιφερικά λεμφικά όργανα IRF1 KO (IRF -/-) σε σχέση με τα φυσιολογικά wt ποντίκια. Στα ποντίκια αυτά, σε ότι αφορά τα τάξης II, βρέθηκε ότι τα επίπεδα του CIITA mRNA ήταν επίσης σημαντικά χαμηλότερα. Επιπλέον σε WT ποντίκια το IRF mRNA αυξάνεται πριν του CIITA. Πιθανά λοιπόν η επαγωγή έκφρασης των τάξης II από IFN γ γίνεται με ενεργοποίηση STAT1, που επάγει έκφραση IRF 1, το οποίο στη συνέχεια συμβάλλει με άλλους παράγοντες (πιθανά και με STAT1) στην επαγωγή έκφρασης από το CIITA υποκινητή.

Η μειωμένη επιφανειακή έκφραση των τάξης I μπορεί να αποδοθεί (εκτός των μειωμένων επιπέδων μεταγραφής, όπου έχει χαρακτηριστεί συμμετοχή του IRF) και σε πάσης φύσεως πρόβλημα μπορεί να ενσκήψει κατά την πρόοδο του μονοπατιού επεξεργασίας του αντιγόνου καθιστώντας προβληματική τη συγκρότηση του τάξης I τριμερούς που εξέρχεται στην κυτταρική επιφάνεια από τα επιμέρους συστατικά του: πεπτιδίο, β2 μικροσφαιρίνη και βαριά αλυσίδα.

Τα γονίδια TAP 1 και LMP 2 μεταγράφονται από κοινό υποκινητή, στον οποίο πρόσφατα χαρακτηρίστηκε με in vivo footprinting ISRE στοιχείο στο οποίο μετά από IFN γ προσδέεται ο IRF. Οι IFN γ - επαγόμενης έκφρασης υπομονάδες LMP 2 και LMP 7 συνδέονται με την 20 S υπομονάδα του πρωτεασώματος υποσκελίζοντας υπομονάδες συστατικά εκφραζόμενες και αλλάζουν την εξειδίκευση κοψίματος των πεπτιδίων: αυξάνει η συγγένεια για υδρόφοβα και βασικά κατάλοιπα. Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία στην αποτελεσματικότητα παρουσίασης των πεπτιδίων από τάξης I ετεροδιμερή. Αντίστοιχο περιοριστικό σημείο για την έκφραση των τάξης II δεν υφίσταται, με την προϋπόθεση ότι εκφράζεται το πεπτιδίο CLIP.

Επιπλέον, στο μονοπάτι παρουσίασης των τάξης I κρίσιμης σημασίας είναι η έκφραση των TAP 1 και TAP 2 γονιδίων που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες - μεταφορείς των αποικοδομημένων πεπτιδίων στο εσωτερικό του ενδοπλασματικού δικτύου (ER lumen), όπου θα συνδυαστούν σε τριμερές με τη βαριά αλυσίδα και τη β2 μικροσφαιρίνη. Εάν τα TAP 1 και TAP 2 δεν εκφράζονται (δηλαδή σε TAP 1 -/- και TAP 2 -/- ποντίκια) λειτουργικά τάξης I MHC δεν παρουσιάζονται στην επιφάνεια των APCs.

Στα IRF-/- ποντίκια (που δεν εκφράζεται IRF πεπτιδίο) η μειωμένη έκφραση και παρουσία των τάξης I στην κυττ. επιφάνεια, μετά από επαγωγή με IFN γ μπορεί να αποδοθεί και στην αδυναμία επαγωγής μεταγραφής των TAP 1 και LMP 2, η σωστή έκφραση των οποίων αποτελεί περιοριστικό σημείο στην ομαλή πρόοδο του μονοπατιού επεξεργασίας και παρουσίασης πεπτιδίων από τάξης I υποδοχείς.

IRF, εκπαίδευση και διαφοροποίηση των T

Η απόκριση του ανοσοποιητικού μας συστήματος σε παθογόνα, μεταφράζεται αρχικά με επιλεκτική διαφοροποίηση του πληθυσμού των T βοηθών σε τύπου I Th1 ή τύπου II Th2 (ανάλογα με το παθογόνο) και ακολούθως γρήγορο πολ/μό τους ώστε να αντιμετωπιστεί αποτελεσματικά η μόλυνση. Η διαφοροποίηση λοιπόν των αρχέγονων T CD4+ κυττάρων στον ένα ή τον άλλο τύπο είναι καθοριστικής σημασίας γιατί κάθε τύπος ενεργοποιεί διαφορετικού τύπου ανοσολογική απόκριση.

Το μονοπάτι ωρίμανσης, διαφοροποίησης των T ελέγχεται από τις εκκρινόμενες κυτοκίνες. Η ιντερλευκίνη 4 ευνοεί διαφοροποίηση σε τύπου I: IL-4 → Th1, ενώ η ιντερλευκίνη 12 διαφοροποίηση σε τύπου II κύτταρα - βοηθούς: IL-12 → Th2. Η πορεία διαφοροποίησης προς τύπου I κύτταρα - βοηθούς έχει ως εξής: μακροφάγα εκκρίνουν IL-12 η οποία ενεργοποιεί την παραγωγή IFN γ από τα κύτταρα φυσικούς φονιάδες (NK). Η IFN γ επάγει την παρουσίαση αντιγονικών πεπτιδίων στην κυττ. επιφάνεια μακροφάγων από σύμπλοκα τάξης I ή II υποδοχέων. Τα σύμπλοκα αυτά αναγνωρίζονται από ειδικούς επιφανειακούς υποδοχείς των T κυττάρων ενεργοποιώντας το μονοπάτι διαφοροποίησής τους. Παράλληλα υπάρχει και θετική ανάδρομη αυτορύθμιση: εκκρίνεται περισσότερη IL-12 από τα μακροφάγα, ώστε να μεγεθυνθεί το φαινόμενο. Γνωρίζουμε τέλος ότι στο μονοπάτι διαφοροποίησης των Th1 η IL-12 ενεργοποιεί STAT4 και STAT3 και αντίστοιχα στο μονοπάτι των Th2 από την IL4 ενεργοποιείται STAT6. Δραστηριοποιούνται δηλαδή στην πορεία μεταγραφικοί παράγοντες, χωρίς να είναι όμως ακόμη γνωστή η ταυτότητα των γονιδίων των οποίων την έκφραση ρυθμίζουν.

Σε πρόσφατες δημοσιεύσεις χαρτογραφείται μια περιοχή στο ποντικίσιο χρωμόσωμα 11 στην οποία εδράζεται γονίδιο με ρόλο κλειδί στο μονοπάτι διαφοροποίησης αρχέγονων CD4+ T κυττάρων σε Th1/Th2. Άλλοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι απαιτείται συνδυασμένη έκφραση περισσότερων γενετικών τόπων, αναγνωρίζουν όμως ότι ένας από αυτούς είναι στην εν λόγω περιοχή του χρωμοσώματος 11. Τα γονίδια που εδράζονται εκεί δεν έχουν ακόμη χαρακτηριστεί, δεν αποκλείεται όμως να πρόκειται για το IRF1, αφού η συγκεκριμένη περιοχή στο ποντικίσιο χρωμόσωμα 11 είναι συνταϊνική με το ανθρώπινο 5q31.1 (όπου χαρτογραφείται ο IRF1).

In vitro μελέτες που έγιναν σε ποντίκια διαγονιδιακά για έκφραση TCR, με ή χωρίς έκφραση του IRF1 γονιδίου στοιχειοθετούν πιθανό ρόλο του IRF ως ρυθμιστικού παράγοντα γονιδίων που εμπλέκονται στην πορεία διαφοροποίησης των αρχέγονων CD4+ T κυττάρων σε Th1/Th2. Σε ποντίκια IRF-/- in vitro επαγωγή διαφοροποίησης των CD4+ T κυττάρων δεν υποστήριζε Th1-εξαρτώμενη ανοσολογική απόκριση (κύριο χαρακτηριστικό της η αυξημένη έκκριση IFN γ).

Συγκεκριμένα κύτταρα σπλήνας από ποντίκια διαγονιδιακά για TCR T- υποδοχέα ειδικό για οβαλβουμίνη μετά από έκθεση στο πεπτίδιο, που συνεπάγεται επαγωγή διαφοροποίησης των T, υιοθετούσαν Th1- εξαρτώμενη ανοσολογική απόκριση εάν ήταν IRF+/+, ενώ σε IRF-/- κυριαρχούσε παραγωγή IL-4, δηλαδή Th2- εξαρτώμενη ανοσολογική απόκριση. Δηλαδή ο IRF υποάγει το μονοπάτι διαφοροποίησης σε Th1 και απουσία του επωφελείται το μονοπάτι για Th2. Η αδυναμία υιοθέτησης του Th1 μονοπατιού, απουσία IRF, όπως διαπιστώθηκε οφείλεται κυρίως στο ότι τα μακροφάγα (APCs) δεν παράγουν IL-12 ενώ για άγνωστο ακόμη λόγο τα κύτταρα - φονιάδες (NK) δεν είναι λειτουργικά και είναι αριθμητικά μειωμένα.

Ακόμη και αν το αρχικό σήμα, η IL-12 χορηγηθεί εξωγενώς, τα NK αδυνατούν να εκκρίνουν IFN γ . Επίσης τα CD4+ T φαίνεται ότι χαρακτηρίζονται από μειωμένης αποτελεσματικότητας ικανότητα απόκρισης σε IL-12 (χαμηλότερη έκκριση IFN γ). Απουσία IRF επηρεάζονται επομένως αρνητικά κυτταρικοί υποπληθυσμοί με ρόλους- κλειδιά στο μονοπάτι Th1- εξαρτώμενης ανοσολογικής απόκρισης: APCs, NKs, CD4+ T κύτταρα, οπότε

ευνοείται υιοθέτηση απόκρισης τύπου II (Th2- εξαρτώμενη). Πώς ο IRF, μέσω ποιών μηχανισμών επηρεάζει τη λειτουργικότητα των NK και πώς εμπλέκεται στο μονοπάτι απόκρισης των CD4+ T κυττάρων σε IL -12 δεν είναι ακόμη γνωστό. Σε ότι αφορά όμως την έκκριση IL -12 (IL - 12 p70 = p35 +p40) από τα μακροφάγα, φαίνεται ότι η μία τουλάχιστον από τις δύο υπομονάδες της ετεροδιμερούς κυτοκίνης, η IL - 12 p40 ελέγχεται μεταγραφικά από IRF. Έχει αναγνωρισθεί πιθανή θέση πρόσδεσής του στον υποκινητή της IL - 12 p40, όπου έχει χαρακτηριστεί ακόμη μη τυπική θέση πρόσδεσης NFκ B. Είναι πιθανό όπως στην περίπτωση του γονιδίου VCAM το οποίο ρυθμίζεται μεταγραφικά με αλληλεπίδραση IRF- NFκ B , η έκφραση της IL - 12 p40 να ενεργοποιείται μέσω IFN γ→ ενεργοποίηση STAT1→ →επαγωγή IRF 1 γονιδίου →ανάλογου τύπου IRF- NFκ B πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις στον υποκινητή με αποτέλεσμα τη μεταγραφή της IL - 12 p40.

Η αντι-ϊική Th 1 - εξαρτώμενη ανοσολογική απόκριση που επάγεται σε περίπτωση μόλυνσης με το παράσιτο *Leishmania major* συνίσταται σε έκκριση IFN γ από τα κύτταρα Th1 προκειμένου να ενεργοποιηθούν τα μακροφάγα για να φαγοκυττώσουν και να εξοντώσουν τα παράσιτα παράγοντας μεταξύ άλλων και NO. Είναι γνωστό ότι η επαγωγή έκφρασης του iNOS (nitric oxide synthase) γονιδίου απαιτεί πρόσδεση του IRF 1 στον υποκινητή του - άλλο ένα επίπεδο ρύθμισης ανοσολογικών μονοπατιών από IRF 1.

IRF 1-/- ποντίκια είναι πιο ευαίσθητα σε συγκεκριμένες ιικές μολύνσεις π.χ. από ιό εγκεφαλομυελίτιδας , ένδειξη ότι η αντι-ϊική δράση της IFN γ που σηματοδοτείται μέσω IRF 1 ευθύνεται για την απόκριση του οργανισμού σε μερικούς, όχι όμως όλους τους ιούς. Επίσης σε σχέση με τα μονοπάτια μεταγραφικής ενεργοποίησης που κωδικοποιούν οι τύπου I ιντερφερόνες φάνηκε από μελέτες σε IRF1-/- ποντίκια ότι υπάρχει ένα μονοπάτι εξαρτώμενο και ένα ανεξάρτητο από IRF 1. Η αντιβακτηριακή δράση του IRF 1 είναι λοιπόν ειδική και αυτό οφείλεται ίσως και στο μεταγραφικό έλεγχο που ασκεί σε γονίδια όπως το iNOS και το LMP 2 . Ειδικά η έκφραση του τελευταίου είναι κρίσιμη για την παρουσίαση ειδικών ιικών αντιγόνων από τάξης I MHC υποδοχείς στην επιφάνεια APCs.

Αντίθετα σε IRF2 -/- ποντίκια σε ότι αφορά τα μονοπάτια μεταγραφικής ενεργοποίησης που κωδικοποιούν οι τύπου I ιντερφερόνες φαίνεται ότι είναι λειτουργικά και υπερενεργά σε κάποιο βαθμό, απουσία ενός αρνητικού ρυθμιστή όπως ο IRF 2 . Από τους φαινότυπους IRF 1 -/- , IRF 2 -/- ποντικών φαίνεται πάντως ότι in vivo υπάρχει αλληλεπικάλυψη και λειτουργική συμπλήρωση τόσο για τον IRF 1 όσο και για τον IRF 2 από άλλους θετικούς και αρνητικούς μεταγραφικούς ρυθμιστές αντίστοιχα .

Τα σύμπλοκα πεπτιδίων- τάξης I υποδοχέων MHC είναι αναγκαία για την εκπαίδευση των CD8+ T κυττάρων στο θύμο , καθώς και για την ενεργοποίησή τους σε ανάγκη κυτταροτοξικής ανοσολογικής απόκρισης . Μελέτη IRF -/- ποντικών αποκάλυψε απρόσμενα χαμηλά επίπεδα CD8+ T κυττάρων στο περιφερειακό αίμα , θύμο , σπλήνα και λεμφαδένες . Είναι γνωστό ότι στην εκπαίδευση των T , σημαντικό ρόλο παίζουν τα τάξης I MHC πεπτίδια που εκφράζονται στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων του θύμου . Αυτά αλληλεπιδρούν με ειδικούς TCR υποδοχείς στην επιφάνεια των ανώριμων διπλών θετικών T κυττάρων (CD3^{lo} CD4⁺CD8⁺) και έτσι τα τελευταία γλιτώνουν από αποπτωτικό θάνατο, κατά τη θετική επιλογή .Επαφή TCR με τάξης II σύμπλοκο οδηγεί σε διαφοροποίηση των T σε T βοηθούς : CD4⁺CD8⁻, ενώ επαφή με τάξης I ,σε διαφοροποίηση CD4⁻CD8⁺ ,δηλαδή κυτταροτοξικών T κυττάρων .Ακολουθεί η αρνητική επιλογή με την οποία ο πληθυσμός των T αποπτωτικά απαλλάσσεται από τους κλώνους εκείνους που αναγνωρίζουν πεπτίδια του « εαυτού» (ελαχιστοποιώντας τον κίνδυνο αυτοάνοσων αποκρίσεων).

Η αλληλεπίδραση TCR των ανώριμων T κυττάρων με σύμπλοκα πεπτιδίου - τάξης I υποδοχέα είναι κρίσιμης σημασίας -όπως αναφέρθηκε παραπάνω- για την διαφοροποίηση, ωρίμανση αλλά και την αποτελεσματική ενεργοποίηση CD8+ T κυττάρων (κυτταροτοξικών). Σε θυμοκύτταρα IRF1-/- ποντικών τα CD8+ T κύτταρα ήταν 2,5 φορές λιγότερα σε σχέση με τα φυσιολογικά (εκφράζουν IRF1), ενώ αισθητά μειωμένα ήταν και τα επίπεδα των επιφανειακά εκφραζόμενων τάξης I συμπλόκων . Με RT - PCR διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα mRNA για τα τάξης I κυμαίνονταν σε φυσιολογικά επίπεδα . Επομένως η μειωμένη επιφανειακή έκθεση αντιγονικών επιτόπων από τους τάξης I υποδοχείς σε IRF1-/- ποντίκια

οφείλεται σε ελαττωματική λειτουργία του κυτταρικού μηχανισμού επεξεργασίας και παρουσίασης του επιτόπου. Στο συγκεκριμένο μηχανισμό περιοριστικό βήμα αποτελεί η ορθή έκφραση των TAP 1 και LMP2 γονιδίων .

Είναι αξιοσημείωτο ότι τόσο ποντίκια IRF1^{-/-} , όσο και TAP 1^{-/-} καθώς και LMP2^{-/-} χαρακτηρίζονται φαινοτυπικά από ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα CD8⁺ T κυττάρων . Ελλείψει του πεπτιδικού μεταφορέα TAP 1 είναι αδύνατο να ολοκληρωθεί το μονοπάτι παρουσίασης λειτουργικών συμπλόκων τάξης I -πεπτιδίου στην κυττ.επιφάνεια , άρα καθίσταται αδύνατη η εκπαίδευση κυτταροτοξικών T κυττάρων . Το LMP2 έχει ρόλο στην επεξεργασία του αντιγόνου, η οποία αν δεν γίνει σωστά αυτό έχει αντίκτυπο στη θετική επιλογή των T' έχει δηλαδή σημασία το είδος του πεπτιδίου που παρουσιάζεται από το τάξης I ετεροδιμερές . Σε IRF1^{-/-} ποντίκια μπορεί λοιπόν να θεωρηθεί ότι η ελαττωματική εκπαίδευση των CD8⁺ T είναι έμμεσο αποτέλεσμα που απορρέει από τη μειωμένη έκφραση των TAP 1 και LMP2 , λόγω απουσίας του προσδεόμενου στον κοινό τους υποκινητή θετικού ρυθμιστή IRF 1.

Τα επίπεδα των CD8⁺ T κυττάρων παρουσιάζονται φυσιολογικά σε IRF 2^{-/-} ποντίκια, στα οποία φαίνεται ότι μέσω άγνωστων ακόμη μηχανισμών διαταράσσεται το αναπτυξιακό μονοπάτι της αιματοποίησης στο μυελό των οστών, ιδιαίτερα η ωρίμανση των B κυττάρων.

Ο IRF 1 όπως αναλύθηκε παραπάνω εμπλέκεται στην πορεία οντογένεσης των T CD8⁺ κυττάρων και συγκεκριμένα στο κομβικό σημείο μετάπτωσης των διπλά θετικών T σε μονά θετικά CD8⁺ ή CD4⁺ .

Σκοπός της εργασίας

Μας ενδιαφέρει να μελετήσουμε το μηχανισμό κατάργησης της θετικής, ενεργοποιητικής δράσης του IRF από την πρωτεΐνη E1A του αδενοϊού.

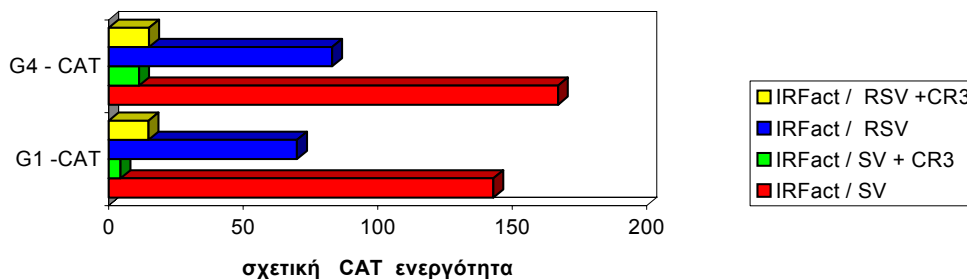
Αποτελέσματα - Συζήτηση

Η πρωτεΐνη E1A είναι ένα πολυδύναμο ρυθμιστικό μόριο που, χωρίς να προσδένεται άμεσα στο DNA μπορεί να επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων, με διττή υπόσταση 'άλλα ως ενεργοποιητής, άλλα ως καταστολέας. Αν και σε πολλές περιπτώσεις έχει χαρακτηριστεί ποιές περιοχές του E1A είναι κρίσιμες, ευθύνονται για τη δράση του, εντούτοις οι μηχανισμοί τώρα έχουν αρχίσει να γίνονται γνωστοί.

Τα αποτελέσματα αρχικών πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριό μας κατά το παρελθόν, οδήγησαν στην υπόθεση ότι στόχος του E1A πιθανά είναι και ο IRF 1 (Interferon Regulatory Factor 1). Σε πειράματα παροδικής συνδιαμόλυνσης κυτταρικής σειράς, με πλασμίδιο αναφοράς ISRE -872 CAT, παράλληλη έκφραση του IRF 1 ενεργοποιεί υψηλά επίπεδα έκφρασης του CAT γονιδίου- αναφοράς (όπως ποσοτικά αυτή εκτιμάται από σχετικές μετρήσεις ενζυμικής ενεργότητας). Η ταυτόχρονη παρουσία E1A καταργεί πλήρως την IRF 1- επαγόμενη μεταγραφική ενεργοποίηση σε ποσοστό > 90%. Η προκαλούμενη μείωση είναι μάλιστα μεγαλύτερη της αντίστοιχης που επιφέρει η ταυτόχρονη έκφραση του «φυσικού» καταστολέα του συστήματος ICSBP (μείωση της τάξης ~ 75%). Τα παραπάνω απεικονίζονται στο γράφημα 1.

Ξεκινώντας από την πρώτη αυτή παρατήρηση, αποφασίσαμε να μελετήσουμε το φαινόμενο αυτό πιο επισταμένα, επιχειρώντας να προσεγγίσουμε και προσδοκώντας να κατανοήσουμε ει δυνατόν το μηχανισμό με τον οποίο ο E1A δρα στην προκειμένη περίπτωση (δηλαδή στον IRF 1). Με την προοπτική αυτή, κρίθηκε σκόπιμο να εκφραστεί το μεταγραφικά ενεργό τμήμα του IRF 1 (IRF_{act}: aa 196 - 325) ως χμιαρικό μόριο σε σύντηξη με την περιοχή της Gal πρωτεΐνης με ιδιότητα / ικανότητα πρόσδεσης στο DNA (Gal binding domain aa 1 - 147). Με τον τρόπο αυτό αποκτούσαμε ένα in vitro μεν, εντελώς «εξωπραγματικό» (artificial) σύστημα μελέτης που είναι εντούτοις καλά χαρακτηρισμένο, ελεγχόμενο και προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα, αφού υπάρχει και διατίθεται στο εμπόριο GAL-Ab, ενώ είναι γνωστή και η πρωτοταγής αλληλουχία του DNA στην θέση πρόσδεσης της Gal4 πρωτεΐνης. Τα εργαλεία αυτά δίνουν τη δυνατότητα in vitro μελέτης πρωτεϊνικής έκφρασης και χαρακτηρισμού πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, με Western, Southern /Western, IP-Western, co-immunoprecipitation, πειράματα binding (EMSA), two hybrid κ.α.

Χρησιμοποιώντας το χμιαρικό μόριο Gal - IRF_{act} και πλασμίδια αναφοράς τα G1-CAT ή G4-CAT (1x και 4x θέσεις πρόσδεσης για Gal πρωτεΐνη πριν το γονίδιο CAT) αναπαράγαμε το ίδιο φαινόμενο. Παράλληλη έκφραση E1A συνεπάγεται πρακτικά κατάργηση της μεταγραφικής ενεργότητας που επιφέρει η έκφραση του IRF, όπως φαίνεται και στο γράφημα 2.



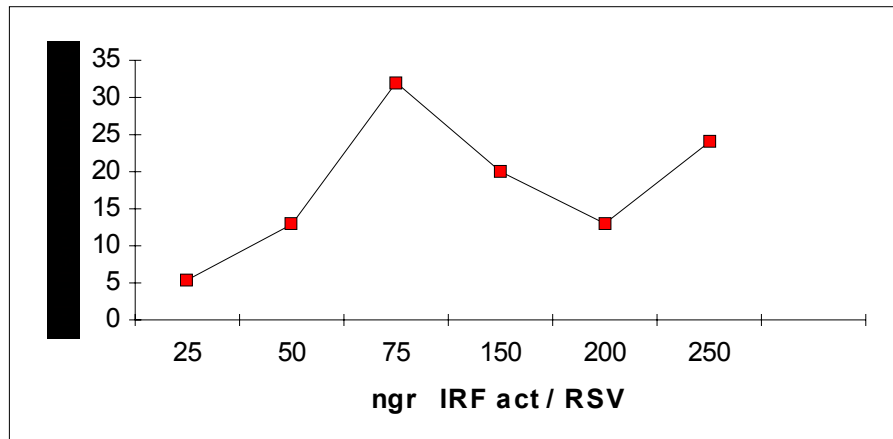
γράφημα 2

HeLa κύτταρα σε καλλιέργεια διαμολώνονται παροδικά με πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο αναφοράς CAT υπό τον έλεγχο 1 ή 4 θέσεων πρόσδεσης Gal 4 πρωτεΐνης (1 μgr / well), μαζί με 200 ngr πλασμιδιακού φορέα έκφρασης της χιμαιρικής πρωτεΐνης **Gal B.D.- IRFact**. Η προκαλούμενη με αυτό τον τρόπο μεταγραφική ενεργοποίηση του CAT γονιδίου μειώνεται σημαντικά όταν παράλληλα προσθέσουμε 100ngr RSV/ CR3. Η παρατηρούμενη μείωση υφίσταται εκφράζοντας Gal B.D.- IRFact είτε από SV (E1A-επηρεαζόμενο) είτε από RSV (E1A- ανεξάρτητο) υποκινητή. Οι σχετικές μετρήσεις διορθώνονται για την αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης με βάση τις τιμές lac z assay (χρησιμοποιήθηκε και 2ο πλασμίδιο αναφοράς CMV/ lac z (0,8 μgr / well) ως εσωτερικό control). Το συνολικό ποσό DNA εξισορροπείται για όλες τις δοκιμές με pRC / RSV.

	G1 -CAT	G4 - CAT
IRFact / SV	143	167
IRFact / SV + CR3	4,37	11,3
IRFact / RSV	70	83
IRFact / RSV +CR3	14,8	15

Είναι γνωστό ότι η πρωτεΐνη E1A αλληλεπιδρά με το μεγάλο T αντιγόνο και έτσι επηρεάζει αρνητικά, καταργεί την έκφραση γονιδίων υπό τον έλεγχο SV40 υποκινητών / ενισχυτών (Simian Virus 40). Αντίθετα η έκφραση υπό τον έλεγχο ρυθμιστικών στοιχείων του RSV (Rous Sarcoma Virus) δεν επηρεάζεται από την παρουσία E1A (βλέπε διάγραμμα 1). Ο πλασμιδιακός φορέας έκφρασης της Gal - IRF_{act} πρωτεΐνης χρησιμοποιεί SV40 ρυθμιστικά στοιχεία ' μπορεί λοιπόν κάποιος να αμφισβητήσει την αληθοφάνεια των όσων έχουν μέχρι τώρα υποστηριχθεί, θεωρώντας ότι πρόκειται για πλασματικό φαινόμενο, έμμεσο αποτέλεσμα της προαναφερθείσης χαρακτηρισμένης αλληλεπίδρασης E1A - μεγάλου T αντιγόνου. Κρίθηκε λοιπόν αναγκαίο να εκφραστεί η Gal - IRF_{act} πρωτεΐνη σε νέο πλασμιδιακό φορέα, υπό τον έλεγχο ισχυρού υποκινητή από τον RSV (RSV LTR - στοιχείο μη επηρεαζόμενο από E1A). Το αντίστοιχο πείραμα παραστατικά φαίνεται στο γράφημα 2 και αποδεικνύει, πέρα από κάθε αμφιβολία ότι η παρατηρούμενη **καταστολή της δράσης του IRF από το E1A είναι φαινόμενο πραγματικό και ειδικό.**

Πριν προχωρήσουμε, κρίθηκε σκόπιμο να γίνει τιτλοδότηση της μετρούμενης σχετικής CAT ενεργότητας υπό αυξανόμενη έκφραση Gal - IRF_{act} πρωτεΐνης, ώστε να προσδιοριστεί το σημείο κορεσμού του συστήματος, καθώς και σε σχέση με βαθμιαία αυξανόμενη έκφραση του καταστολέα -E1A (χρησιμοποιήθηκε η έλλειψη CR3) προκειμένου να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα της καταστολής. Στα σχετικά διαγράμματα φαίνεται ότι ποσό ~80 -100 ngr Gal - IRF_{act} αρκεί για την παρατήρηση optimum ενεργοποίησης (διάγραμμα 2), ενώ στατιστικά σημαντική καταστολή παρατηρείται συν - εκφράζοντας E1A στη μισή περίπου αναλογία, δηλαδή 50 ng (διάγραμμα 3)



διάγραμμα 2

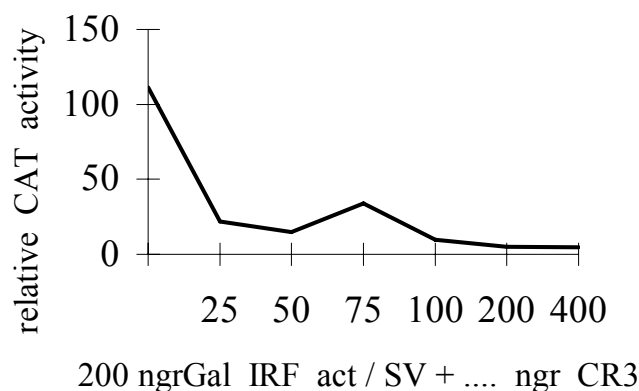
Τιτλοδότηση της μετρούμενης CAT ενεργότητας, σε αυξανόμενη συγκέντρωση της χιμαιρικής πρωτεΐνης Gal B.D.-IRFact, σε κυτταρική καλλιέργεια HeLa, με 1 μgr πλασμίδιο αναφοράς **G1-CAT** και 1 μgr **CMV/lac z** ως εσωτερικό control, ανά δοκιμή.

ngr IRF act / RSV	Relative CAT activity
25	5,4
50	12,9
75	32
150	20
200	13
250	24

διάγραμμα 3

Τιτλοδότηση της μείωσης της Gal B.D.-IRFact-επαγόμενης CAT ενεργότητας σε αυξανόμενη συγκέντρωση RSV/CR3. Το πείραμα έγινε σε COS1 κύτταρα, με 1 μ gr G4-CAT , 0,8 μ gr CMV/lacz , 200 ngr SV/ Gal B.D.-IRFact ανά δοκιμή.

ngr	RSV/ CR3	Relative CAT activity
	0	111,35
	25	21,8
	50	14,7
	75	34
	100	9,6
	200	5
	400	4,8

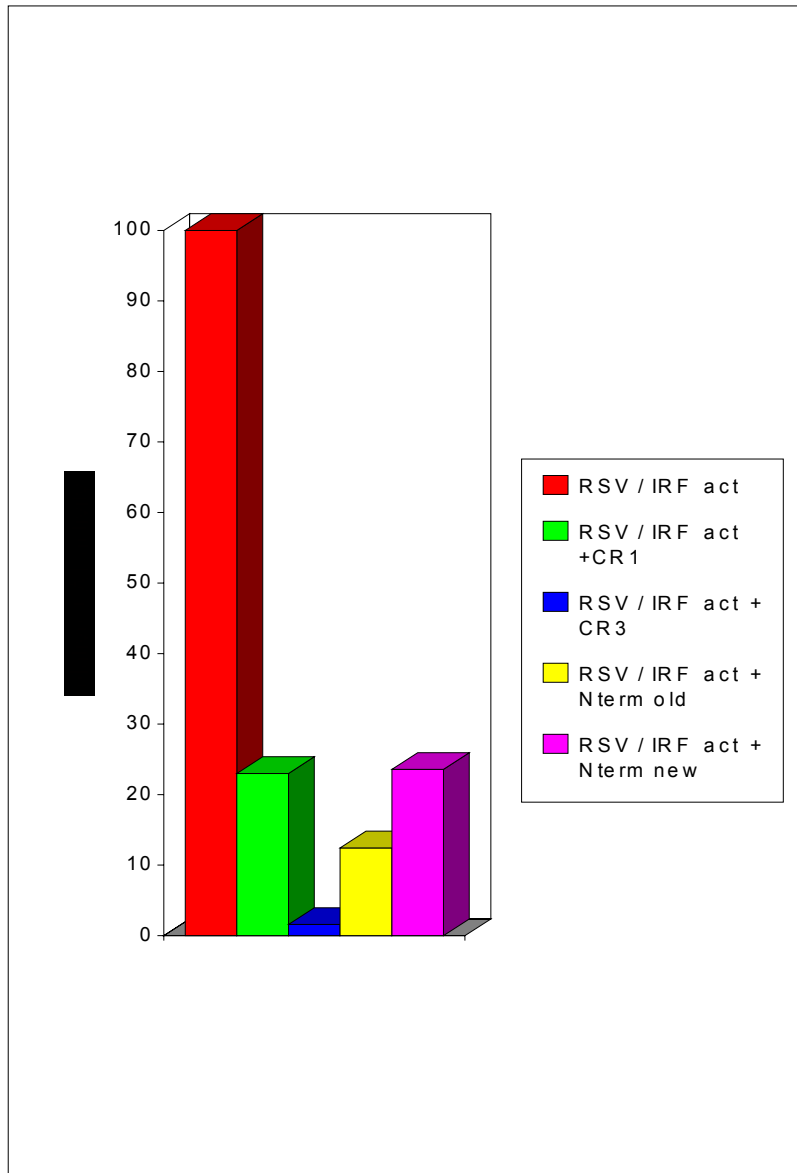


Επόμενο βήμα ήταν να προσδιορίσουμε μέσω ποιάς περιοχής εκδηλώνεται η δράση αυτή της E1A πρωτεΐνης . Για τη « χαρτογράφηση » αυτή χρησιμοποιήσαμε αντί για πλασμιδιακό φορέα έκφρασης ολόκληρου του E1A πεπτιδίου, εσωτερικές ελλείψεις σύμφωνα με τα όσα είναι γνωστά από τη βιβλιογραφία για χαρακτηρισμένες, λειτουργικά σημαντικές περιοχές της πρωτεΐνης .

Έτσι η έκφραση έλλειψης της CR1 περιοχής (αα 38 -65) επιφέρει σχεδόν αμελητέα καταστολή (σε μικρό βαθμό, όχι στατιστικά σημαντική συγκριτικά με τη δράση του πλήρους πεπτιδίου) , ενώ E1A πεπτίδια ελλειματικά για τη CR3 περιοχή (αα 140 -185) καταργούν την IRF-εξαρτώμενη μεταγραφική ενεργοποίηση το ίδιο αποτελεσματικά με ολόκληρο το E1A . Επομένως η CR3 περιοχή, η οποία έχει λειτουργικά χαρακτηριστεί και αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως υπεύθυνη για trans-ενεργοποίηση γονιδίων από το E1A, κρίνουμε ότι είναι dispensable αναφορικά με τη μελετούμενη δράση του E1A ' η πρωτεΐνη είναι απόλυτα λειτουργική και χωρίς αυτήν . Αντίθετα η παρουσία της CR1 συντηρημένης περιοχής φαίνεται να είναι αναγκαία για την εκδήλωση του συγκεκριμένου φαινοτύπου. Όπως παρατηρεί κανείς και στο γράφημα 3, η απουσία της συνεπάγεται δραστική μείωση της προκαλούμενης από το E1A καταστολής . Για την εσωτερική έλλειψη της CR2 περιοχής (αα 125-133) ισχύουν όσα έχουν ειπωθεί στην περίπτωση της CR3 - έλλειψης .

Έλλειψη του αμινοτελικού άκρου ($N_{\text{terminus}}^{\text{old}}$: έλλειψη αα 1 -14) του E1A πεπτιδίου είναι λειτουργική (διατηρεί την ιδιότητα κατάργησης της θετικής δράσης του IRF 1), λιγότερο αποτελεσματική από τη CR3- έλλειψη ' σαφώς όμως δραστικότερη της CR1- έλλειψης, όπως εύκολα προκύπτει από το γράφημα 3 . Η αμινοτελική περιοχή (αμινοξέα 1 - 25), αν και λιγότερο αυστηρά συντηρημένη μεταξύ διαφόρων τύπων αδενοϊών , είναι λειτουργικά σημαντική γιατί μέσω κυρίως αυτής αλληλεπιδρά η E1A πρωτεΐνη με p300 (συμμετέχει και αμινοτελικό άκρο της CR1). Τα αρχικά μας αποτελέσματα υποδείκνυαν την πιθανή παρατήρηση ενός p300- ανεξάρτητου φαινοτύπου αρνητικής δράσης του E1A , κάτι που θα ήταν εξαιρετικά ενδιαφέρον αφού κάτι ανάλογο δεν έχει χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα . Επειδή όμως εκ των υστέρων αξιολογήσαμε ότι η χρησιμοποιούμενη $N_{\text{terminus}}^{\text{old}}$ έλλειψη δεν ήταν επαρκώς εκτεταμένη και προκειμένου να διευκρινιστεί ένα τόσο λεπτής σημασίας ερώτημα , κρίναμε αναγκαία τη δημιουργία νέας μεγαλύτερης N_{terminus} έλλειψης ($N_{\text{terminus}}^{\text{new}}$: αα 1 - 22).

Η νέα πλασμιδιακή κατασκευή δοκιμάστηκε παράλληλα με την παλιά και φαίνεται ανίσχυρη να επιφέρει στατιστικά σημαντική κατάργησης της θετικής δράσης του IRF 1 (γράφημα 3, 4) ' η δράση της είναι ανάλογη της CR1- έλλειψης.

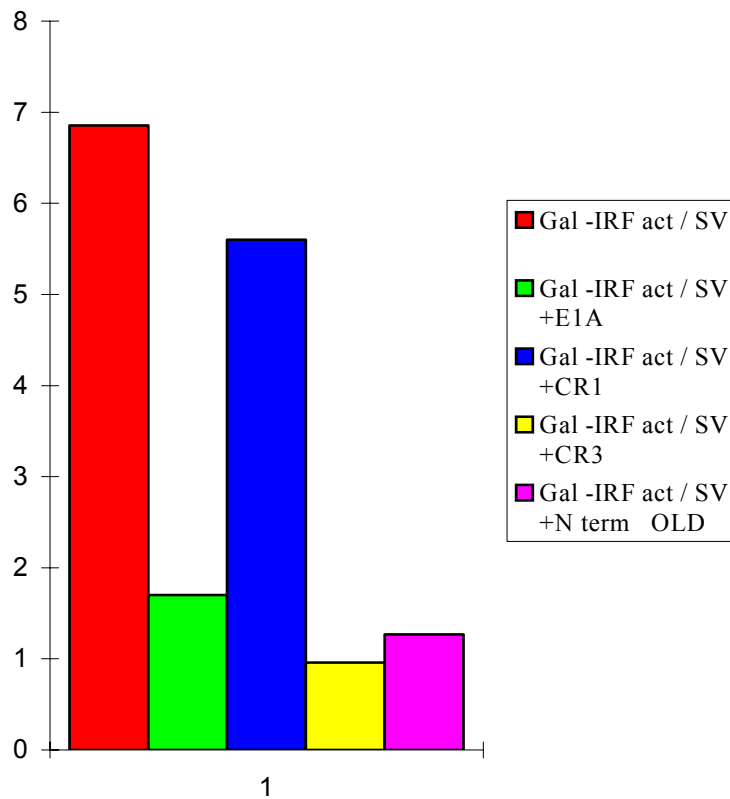


γράφημα 3.1

Πείραμα παροδικής διαμόλυνσης HeLa κυττάρων σε καλλιέργεια με 1μgr G1-CAT, 1μgr CMV/lacZ, 50ngr Gal B.D.-IRFact/RSV, ανά δοκιμή και 50ngr διαφορετικής εσωτερικής έλλειψης του E1A. Απουσία της CR3 περιοχής εξακολουθεί αποτελεσματική κατάργηση της Gal B.D.-IRFact-προκαλούμενης CAT ενεργότητας ενώ αντίθετα αφαίρεση των aa 1-22 ή της CR1 περιοχής αναιρεί σημαντικά και την επιφερόμενη καταστολή.

transfected plasmids	relative CAT activity
RSV / IRF act	100
RSV / IRF act +CR1	23
RSV / IRF act + CR3	1,6
RSV / IRF act + N _{term} old	12,45
RSV / IRF act + N _{term} new	23,585

γράφημα 3.2



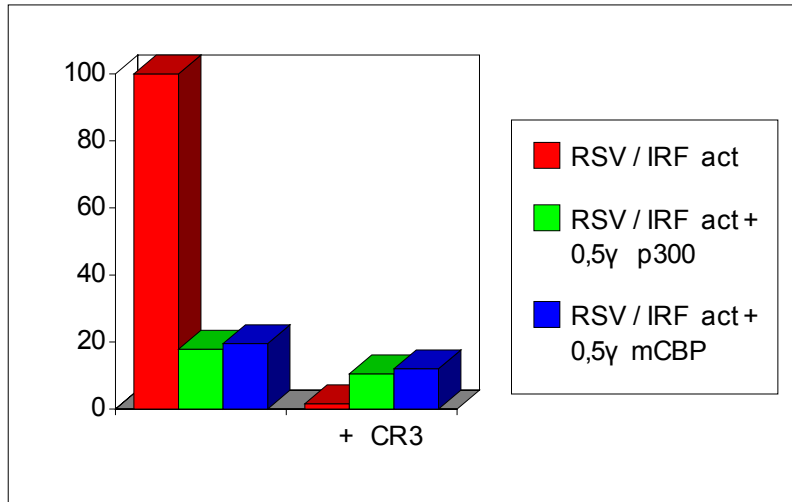
Ανάλογο με το 3.1 γράφημα πειράματος παροδικής διαμόλυνσης *COS 1* κυττάρων σε καλλιέργεια, με 1μgr *G4-CAT*, 0,8μgr *CMV/lacZ*, **100ngr Gal B.D.-IRFact/SV**, ανά δοκιμή και 100ngr διαφορετικής εσωτερικής έλλειψης του *E1A*.

	relative CAT activity
Gal -IRF act / SV	7
Gal -IRF act / SV +E1A	1,7
Gal -IRF act / SV +CR1	5,6
Gal -IRF act / SV +CR3	0,96
Gal -IRF act / SV +N _{term} OLD	1,27
Gal -IRF act / SV +N _{term} NEW	7,357

Η αρνητική επίδραση του *E1A* στον *IRF 1* αποδίδεται επομένως στις ιδιότητες, τη δράση που ασκεί η N_{terminus} (κυρίως μέσω της υποπεριοχής αα 15- 22) και η *CR1* περιοχή της πρωτεΐνης. Το πιθανότερο είναι η δράση αυτή να είναι λόγω αλληλεπίδρασης του *E1A*, μέσω των περιοχών αυτών με p300 / *CBP*.

Αν πράγματι η τελευταία υπόθεση ισχύει, θα πρέπει η υπερέκφραση p300 / CBP να αναστρέφει, να υπερνικά την E1A - προκαλούμενη καταστολή της δράσης του IRF 1. Πράγματι αυτό συμβαίνει σε κάποιο βαθμό, όπως φαίνεται στα γραφήματα 4 - 8.

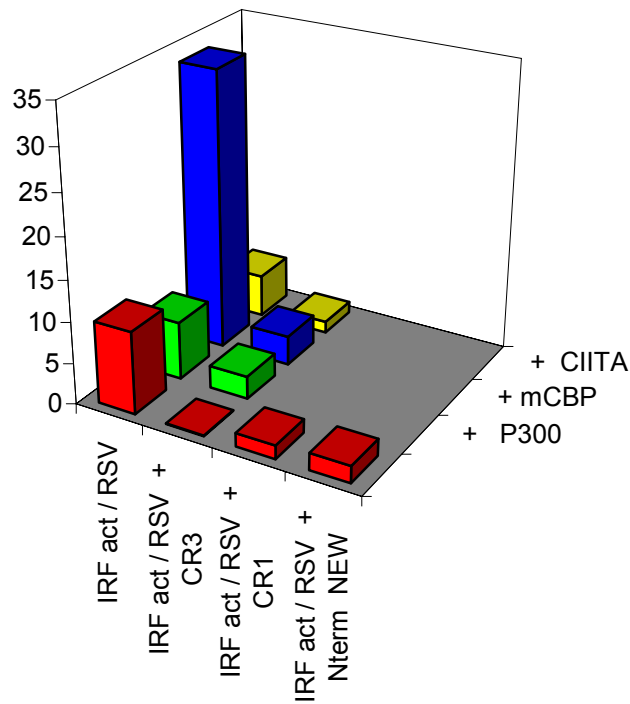
γράφημα 4



		+ CR3
RSV / IRF act	100	1,6
RSV / IRF act + 0,5γ p300	17,88	10,5
RSV / IRF act + 0,5γ mCBP	19,5	12

Γραφική απεικόνιση πειράματος παροδικής διαμόλυνσης καλλιέργειας HeLa κυττάρων με 1μgr G1-CAT, 1μgr CMV/lacZ, 50ngr Gal B.D.-IRFact/RSV, ανά δοκιμή, απουσία/παρουσία 50 ngr RSV/CR3. Η CR3- επιφερόμενη μείωση βελτιώνεται αισθητά όταν παρέχουμε παράλληλα περίσσεια (>10 X) των ενεργοποιητών -βοηθών, «εξομοιωτών» RSV p300 / mCBP. Το συνολικό ποσό DNA εξισορροπείται για όλες τις δοκιμές με pRC/RSV.

γράφημα 5



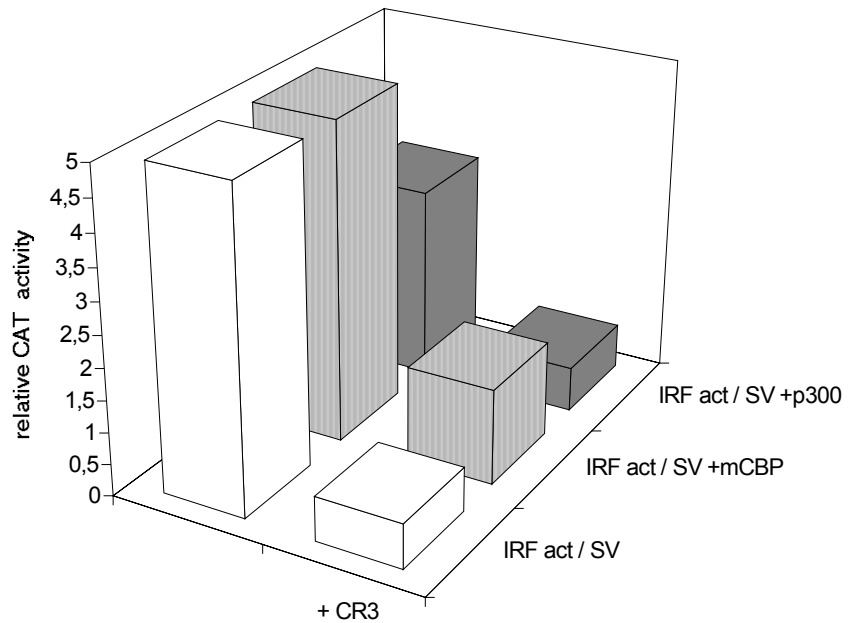
		+ P300	+ mCBP	+ CIITA
IRF act / RSV	10	7	33,7	5,12
IRF act / RSV + CR3	0,08	2,755	3,52	1,37
IRF act / RSV + CR1	1,65			
IRF act / RSV + N _{term} NEW	2,04			

Γραφική απεικόνιση πειράματος παροδικής διαμόλυνσης καλλιέργειας HeLa κυττάρων με 1μgr G4-CAT, 0,8μgr CMV/lacZ, 75ngr Gal B.D.-IRFact/RSV, ανά δοκιμή, σε συνδυασμό με 75 ngr διαφορετικής εσωτερικής έλλειψης του E1A.). Το συνολικό ποσό DNA εξισορροπείται για όλες τις δοκιμές με pRC/RSV, pRC/CMV.

Αφαίρεση της CR1 ή της Nterm περιοχής δεν μειώνει σημαντικά την IRFact προκαλούμενη ενεργοποίηση, συγκριτικά με την CR3- έλλειψη.

Η CR3- επιφερόμενη μείωση βελτιώνεται αισθητά όταν παρέχουμε παράλληλα περίσσεια (>10 X) mCBP (750 ngr). Σε μικρότερο βαθμό ανάλογο αποτέλεσμα έχει και υπερέκφραση CMV/ p300 αλλά και pCDNA 3/CIITA (trans-ενεργοποιητής, πιθανά δρα μέσω p300, χωρίς να προσδένεται άμεσα στο DNA. Χρησιμοποιήθηκε ως μη ειδικό, αρνητικό ? control). Η παρατήρηση αυτή πρέπει να ελεγχθεί και να αξιολογηθεί περαιτέρω στο μέλλον.

γράφημα 6



IRF act / SV	5
IRF act / SV +CR3	0,7
IRF act / SV +mCBP	5
IRF act / SV +mCBP +CR3	1,496
IRF act / SV +p300	3
IRF act / SV +p300 +CR3	0,7

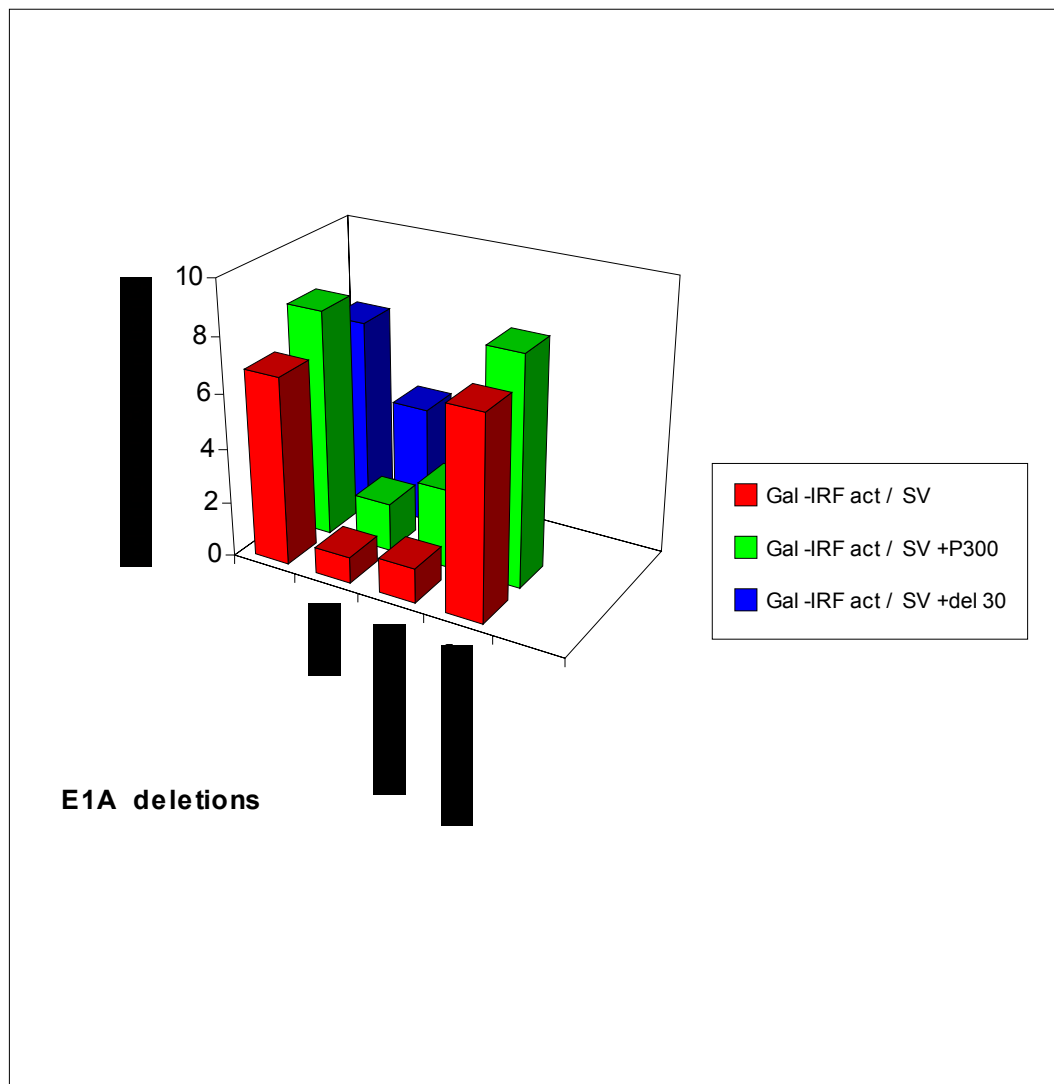
Πείραμα παροδικής διαμόλυνσης COS 1 κυττάρων με 1μgr G4-CAT, 0,8μgr CMV/lacZ, 100ngr Gal B.D.-IRFact / SV, ανά δοκιμή και 4μgr mCBP/p300 (RSV) παρουσία / απουσία CR3 έλλειψης του E1A.

Υπρέκφραση mCBP φαίνεται να έχει συγκριτικά καλύτερα αποτελέσματα από p300, σε ότι αφορά μείωση της δραστηριότητας του E1A.

Πιθανά μάλιστα έκφραση του mCBP είναι πίο αποτελεσματική από την p300 αναφορικά με την « αποκατάσταση » της καταστολής από E1A , σύμφωνα με πρόσφατες αρχικές ενδείξεις. Δεν πρόκειται όμως για κάτι απόλυτα τεκμηριωμένο ' χρειάζονται παραπάνω δοκιμές που να επιβεβαιώνουν τις αρχικές μετρήσεις .

Επίσης η del 30 εσωτερική έλλειψη της p300 (έλλειψη των αμινοξέων 1737-1809), συμπεριφέρεται καλύτερα από την p300, γιατί μπορεί να δρα ως «εξομειωτής», συνενεργοποιητής χωρίς να παρεμποδίζεται άμεσα από το E1A, καθώς έχει αφαιρεθεί κρίσιμο τμήμα της χαρακτηρισμένης ακριβώς περιοχής αλληλεπίδρασης τους, στην τρίτη C /H πλούσια περιοχή της p300 (περιοχή πρόσδεσης του E1A στην p300: αμινοξέα 1572-1818).

γράφημα 7

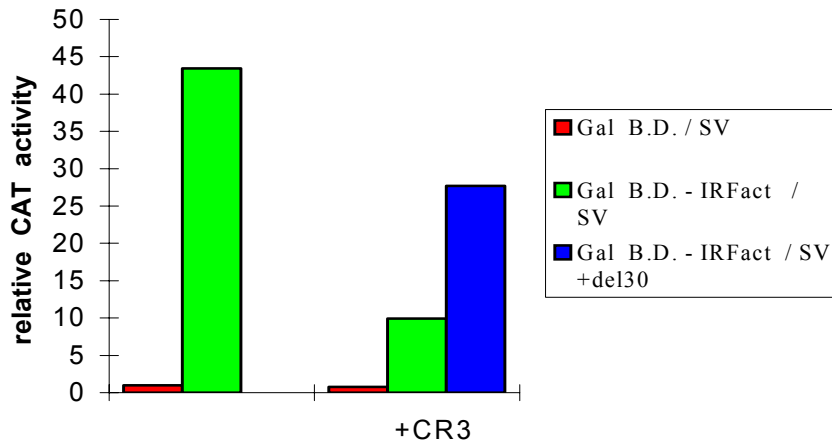


Πείραμα παροδικής διαμόλυνσης COS 1 κυττάρων με 1μgr G4-CAT, 0,8μgr CMV/lacZ, 100ngr Gal B.D.-IRFact/SV, ανά δοκιμή και 4μgr del 30/p300 (CMV) παρουσία/απουσία RSV/CR3 έλλειψης του E1A.

Υπερέκφραση del 30 φαίνεται να έχει συγκριτικά καλύτερα αποτελέσματα από p300, σε ότι αφορά μείωση της δραστηριότητας του E1A.

		+CR3	+N term OLD	+N term NEW
Gal -IRF act / SV	6,855	0,96	1,27	7,357
Gal -IRF act / SV +P300	8,28	1,769	2,9	8,3389
Gal -IRF act / SV +del 30	7	4,278		

γράφημα 8



Πείραμα παροδικής διαμόλυνσης COS 1 κυττάρων με 4μgr G1-CAT, 2μgr CMV/lac z, 4μgr Gal B.D.-IRFact/SV και 10μgr del 30 (CMV) παρουσία 2μgr RSV/CR3 έλλειψης του E1A. Το συνολικό DNA εξισορροπείται με pRC/CMV.

Υπερέκφραση del 30 φαίνεται να αναστρέφει την E1A- προκαλούμενη μείωση.

		+CR3
Gal B.D. / SV	1	0,77
Gal B.D. - IRFact / SV	43,43	9,928
Gal B.D. - IRFact / SV +del30		27,705

Πάντως η σε κάποιο βαθμό αναστροφή της δράσης του E1A συνηγορεί στο ότι ο συγκεκριμένος φαινότυπος είναι έμμεσο αποτέλεσμα της επαφής του με ενδιάμεσο μόριο «γέφυρα». Βέβαια η εν λόγω πιθανολογούμενη εκδοχή θα είναι πιο πιστευτή και αληθοφανής εάν και όταν υπάρξουν, παρατεθούν περισσότερο αξιόλογα, αξιόπιστα στοιχεία ότι υπάρχει εμπλοκή / συμμετοχή p300 / CBP σε IRF - εξαρτώμενη μεταγραφική ενεργοποίηση, ή έστω in vitro απόδειξη της εικαζόμενης υφιστάμενης αλληλεπίδρασής τους.

Το γεγονός ότι υπερέκφραση της p300 / CBP σώζει εν μέρει μόνο, βελτιώνει αλλά δεν καταργεί πλήρως την E1A - προκαλούμενη καταστολή επισημαίνεται και από άλλους ερευνητές. Η εξήγηση που δίνεται δεν είναι μία: επειδή η p300 / CBP έχει την τάση να σχηματίζει συσσωματώματα, πιθανολογείται ότι δεν επιτυγχάνονται τελικά τα επιθυμητά επίπεδα υπερέκφρασης ενεργής p300 / CBP. Εναλλακτικά το E1A μπορεί να στοχεύει εκτός από την p300 / CBP και κάποια άλλη, μη χαρακτηρισμένη μέχρι σήμερα πρωτεΐνη, απαραίτητη για την μεταγραφική ενεργοποίηση από IRF 1, που να δρα παράλληλα, αθροιστικά με την p300 / CBP. Σε μία τέτοια περίπτωση η υπερέκφραση του ενός μόνο από τους απαιτούμενους συνεργαζόμενους παράγοντες δεν αρκεί για 100% ανάκτηση της αρχικής ενεργότητας.

Κάτι τέτοιο δεν αποκλείεται και από τα δικά μας πειραματικά δεδομένα καθώς τόσο η CR1 όσο και η N_{term} NEW έλλειψη δεν αναιρούν την καταστολή πλήρως 'απλά καταστέλουν σε μειωμένο βαθμό συγκριτικά με την πιό δραστική CR3 έλλειψη. Επειδή όμως η επαφή του E1A με p300 / CBP γίνεται μέσω και των δύο περιοχών, CR1 όσο και N_{term} μπορεί κανείς να ισχυριστεί ότι εξαλείφοντας τη μία μόνο εκ των δύο, το E1A διατηρεί μέσω της άλλης μία υπολειμματική ικανότητα χαλαρότερης ίσως αλληλεπίδρασης

με p300 / CBP και άρα δυνατότητα δράσης ως καταστολέα - μειωμένης όμως αποτελεσματικότητας .

Σκόπιμο λοιπόν θα είναι να διευκρινιστεί το σημείο αυτό μελλοντικά με την κατασκευή μιάς διπλής έλλειψης N_{term} - CR1. Εάν η νέα συνδυασμένη αυτή έλλειψη δεν επιφέρει καταστολή τότε συμπεραίνει κανείς ότι το E1A δρα αποκλειστικά μέσω p300/CBP' εάν αντίθετα εξακολουθούμε να έχουμε μειωμένου βαθμού καταστολή, αυτό συνηγορεί στη στόχευση από το E1A και ενός δεύτερου πρωτεϊνικού συμπαράγοντα που απαιτείται μαζί με p300/CBP για την IRF - εξαρτώμενη μεταγραφική ενεργοποίηση.

Εν πάσει περιπτώσει, η παρατηρούμενη από εμάς «βελτίωση» της καταστολής από E1A, υπερεκφράζοντας μόρια- γέφυρες, κυμαίνεται στα επίπεδα που αναφέρονται και από άλλους. Η επίτευξη της αναστροφής αυτής απαιτεί ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα έκφρασης των «εξομοιωτών», γιατί ας μην ξεχνάμε είναι μόρια διαθέσιμα σε περιοριστικά ποσά στο κύτταρο και υπάρχει λειτουργικός ανταγωνισμός μεταξύ διαφόρων συστημάτων για τη διαθεσιμότητά της.

Η p300 αρχικά ταυτοποιήθηκε ως partner - πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με το E1A, πριν αρκετά χρόνια, όμως το εξαιρετικά έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον που εκδηλώθηκε τα δύο τελευταία χρόνια έφερε στο προσκήνιο το ρόλο πρωτεϊνών - «εξομοιωτών», όπως p300/CBP στη μεταγραφή καθώς και τη λειτουργική τους συσχέτιση με το μηχανισμό δράσης του E1A, δίνοντας νέα πνοή στο πεδίο μελέτης τους. Πριν την εκδήλωση της μεγάλης αυτής «έκρηξης», διατυπώνονταν υποθέσεις και προτεινόταν μοντέλα δράσης του E1A βασισμένα σε *in vitro* ενδείξεις της «εν δυνάμει» άμεσης επαφής του με στοιχεία της βασικής μεταγραφικής μηχανής (TFIIB, TFIID) ή γίνονταν εικασίες για άγνωστους ακόμη ή novel μηχανισμούς.

Την περίοδο εκείνη προκειμένου να επιχειρήσουμε να δώσουμε κάποιες απαντήσεις αναφορικά με το μηχανισμό καταστολής του IRF1 από E1A, καταλήξαμε στην επιλογή του συγκεκριμένου πειραματικού συστήματος μελέτης γιατί ακριβώς προσφερόταν για *in vitro* πειραματικές προσεγγίσεις από τις οποίες πιθανά θα προέκυπταν νέα, διαφωτιστικά στοιχεία. Προγραμματίστηκε λοιπόν μία σειρά μικρών *in vitro* πειραμάτων για να διαπιστωθεί η ισχύς κάποιων «μηχανιστικών» υποθέσεων.

☺ Με Western blot ελέγξαμε ότι τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Gal - IRF_{act} δεν επηρεάζονταν αρνητικά από την ταυτόχρονη έκφραση του E1A - καταστολέα.

↳ φωτογραφία 1

☺ Με EMSA ελέγχθηκε εάν *in vitro* επηρεάζεται το binding της πρωτεΐνης Gal - IRF_{act} σε Gal ολιγονουκλεοτίδιο. Το πείραμα έγινε και για τις δύο κατασκευές του Gal - IRF_{act}: SV και RSV. Φαίνεται ότι η συγγένεια σύνδεσης του Gal - IRF_{act} για τη Gal θέση πρόσδεσης μειώνεται σε κάποιο βαθμό, παρουσία της CR3- έλλειψης (ισοδύναμα δραστικής με ολόκληρο το E1A), ανάλογη όμως μείωση παρατηρείται και στην πρόσδεση της «σκέτης» DNA-binding περιοχής της Gal πρωτεΐνης.

↳ φωτογραφία 2

Δεν μπορεί επομένως κάποιος να υποστηρίξει αξιόπιστα ότι η καταστολή του IRF1 από E1A οφείλεται σε «ειδική» κατάργηση της ικανότητας πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα στην αναγνωριζόμενη DNA - αλληλουχία -στόχο. Για να εξάγει κάποιος ασφαλέστερο συμπέρασμα θα πρέπει να αξιολογήσει ποσοτικά την παρατηρούμενη μεταβολή της συγγένειας πρόσδεσης, παρουσία E1A συγκριτικά για Gal - IRF_{act} και Gal-B.D. (DNA-binding domain). Κρίνεται λοιπόν σκόπιμο, εφόσον θεωρηθεί ενδιαφέρον, να επαναληφθεί το πείραμα και η εικόνα να ερμηνευτεί ποσοτικά χρησιμοποιώντας phosphorimager.

⊕ Παράλληλα σε EMSA πείραμα δοκιμάστηκε εάν προ-επώαση του κυτταρικού ολικού εκχυλίσματος με αντίσωμα p300 ή CBP (ευγενική δωρεά από κ. Ταλιανίδη) προκαλούσε supershift, δηλαδή αναίρεση του ανιχνευόμενου προσδεόμενου συμπλόκου. Επειδή η ποιότητα και ποσότητα των εκχυλισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν δεν ήταν ικανοποιητικά, το πείραμα θα πρέπει να επαναληφθεί σε πρώτη ευκαιρία ' το αποτέλεσμα πάντως της αρχικής δοκιμής ήταν αρνητικό.

↳ φωτογραφία 3

Εάν παρατηρούσε κανείς supershift του ανιχνευόμενου Gal-IRF_{act} συμπλόκου σίγουρα θα αποτελούσε αξιόλογη, έμμεση απόδειξη της in vivo απαίτησης, επιστράτευσης p300 / CBP σε IRF - επαγόμενη μεταγραφική ενεργοποίηση. Το αρνητικό αποτέλεσμα δε σημαίνει όμως κατ' ανάγκη το αντίστροφο. Άλλωστε το ανιχνευόμενο Gal-IRF_{act} σύμπλοκο είναι αρκετά ασθενές (πιθανά λόγω αστάθειας του Gal-IRF_{act} μηνύματος) από μόνο του ' πόσο μάλλον πιο δύσκολο θα είναι να ανιχνευτούν σε αυτό τυχόν προσελκυστικά - μόρια γέφυρες, χωρίς δυνατότητα άμεσης πρόσδεσης στο DNA, που «προσεδαφίζονται» και χαλαρά συνδέονται με προσδεόμενους παράγοντες του συμπλόκου.

⊕ Τέλος επειδή τα αποτελέσματα των EMSA πειραμάτων δεν ήταν ιδιαίτερα αξιολογήσιμα αποφασίστηκε να γίνει πείραμα συνδυασμένης ανοσοκατακρήμνισης προκειμένου να διευκρινιστεί εάν η δράση του E1A ασκείται μέσω άμεσης φυσικής επαφής - αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη - στόχο, τον IRF 1 (και ειδικότερα με τη μεταγραφικά ενεργή περιοχή του).

Σε εκχυλίσματα κυττάρων που διαμολύναμε παροδικά για έκφραση Gal - IRF_{act} και E1A, ανοσοκατακρήμνιση με E1A - Ab δεν συγκατακρημνίζει Gal - IRF_{act}. Θετικό control θεωρήθηκε η καλά χαρακτηρισμένη αλληλεπίδραση E1A και p300.

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεν υπάρχει άμεση φυσική επαφή IRF_{act} - E1A, η **κατασταλτική δράση του E1A είναι έμμεση**. Σ' αυτό συνηγορούν και πειράματα παροδικής συνδιαμόλυνσης σειριακών ελλείψεων του IRF - activation domain σε συνδυασμένη έκφραση E1A. Εάν υφίσταται πράγματι άμεση φυσική αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών, θα είναι δυνατός έτσι ο προσδιορισμός της περιοχής αλληλεπίδρασης, καθώς απάλειψή της θα συνεπάγεται απώλεια της δυνατότητας καταστολής από E1A. Κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε στα πειράματα που έγιναν. Εάν όμως η καταστολή γίνεται έμμεσα, μέσω τρίτων μορίων - γέφυρες, ένα τέτοιο σύστημα μελέτης (σειριακές ελλείψεις) με το συγκεκριμένο πειραματικό σχεδιασμό δεν προσφέρεται για τον χαρακτηρισμό του μελετούμενου μηχανισμού.

Η αρνητική επίδραση του E1A στον IRF1 αποδίδεται επομένως στις ιδιότητες, τη δράση που ασκεί η N_{terminus} (κυρίως μέσω των αα 15-22) και η CR1 περιοχή της πρωτεΐνης. Το πιθανότερο είναι η δράση αυτή να είναι λόγω αλληλεπίδρασης του E1A, μέσω των περιοχών αυτών με p300 / CBP, παρεμποδίζοντας τη θετική συμβολή τους στη μεταγραφική ενεργοποίηση από IRF1.

γράφημα 1.1

διάγραμμα 1

γράφημα 1.2

Περίληψη

Οι αδενοϊοί είναι ds DNA ιοί με ~37 kb γένωμα, ικανοί να προκαλέσουν ογκογενετικό μετασχηματισμό κυττάρων, μέσω της συνδυασμένης δράσης των ογκοαντιγόνων E1A και E1B. Το πρώτο εκφραζόμενο (early) ογκογονίδιο E1A του αδενοϊού αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα trans ρυθμιστικού παράγοντα - τόσο θετικού όσο και αρνητικού - χωρίς να προσδένεται άμεσα στο DNA. Η πλειοτροπική δράση του E1A (άμεση ή έμμεση) αφορά μια πλειάδα γονιδίων εμπλεκόμενων σε ζωτικής σημασίας κυττ. λειτουργίες όπως διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό (ρύθμιση κυττ. κύκλου). Σε μεγάλο βαθμό ο φαινότυπος μόλυνσης κυττάρων με αδενοϊό - αναστολή προγράμματος διαφοροποίησης και αύξηση του πολ/σμού- οφείλεται στην αλληλεπίδραση E1A - pRb που συνεπάγεται απελευθέρωση του μεταγραφικού παράγοντα E2F και ρύθμιση των γονιδίων- στόχων του.

Μεταξύ διαφόρων τύπων αδενοϊών έχουν χαρακτηριστεί τρεις συντηρημένες περιοχές, conserved region: CR1 αα 40-80, CR2 αα 120-138 και CR3 140-188 αα, ενώ υπάρχει μία λειτουργικά σημαντική, λιγότερο αυστηρά συντηρημένη περιοχή στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης: N_{terminus} αα 1-25. Οι περιοχές αυτές που συγκροτούν το αρθρωτό λειτουργικό E1A αποτελούν σημεία επαφής και αλληλεπίδρασης με άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες. Για κάποιες επιτελούμενες από το E1A βιολογικές λειτουργίες - που έχουν μελετηθεί έχει προσδιοριστεί η περιοχή εκείνη (domain) που θεωρείται κρίσιμη για αλληλεπίδραση με χαρακτηρισμένο ή όχι πεπτιδίο & οι ακριβείς μηχανισμοί όμως πρόσφατα μόνο άρχισαν να αποκαλύπτονται στη λεπτομέρειά τους.

Ο IRF 1 (Interferon Regulatory Factor 1) είναι θετικός μεταγραφικός παράγοντας που εμπλέκεται στη ρύθμιση των γονιδίων του κυρίου συμπλόκου ιστοσυμβατότητας MHC είτε άμεσα →τάξης I είτε έμμεσα →τάξης II MHC γονίδια. Επίσης είναι μεταγραφικός ρυθμιστής γονιδίων (LMP 7, TAP 1) που τα προϊόντα τους εμπλέκονται στο μονοπάτι παρουσίασης αντιγονικών πεπτιδίων στην κυτταρική επιφάνεια ειδικών κυττάρων - APCs (antigen presenting cells). Το συγκεκριμένο μονοπάτι είναι θεμελιώδους σημασίας για την αποτελεσματική ενεργοποίηση ανοσοαπόκρισης, είναι όμως και αναπτυξιακά σημαντικό κατά την «εκπαίδευση» T κυτταροτοξικών κυττάρων και τη διαφοροποίηση των T βοηθών τύπου I.

Ο φαινότυπος IRF1^{-/-} ποντικών κατέδειξε τον κρίσιμο ρόλο που διαδραματίζει ο εν λόγω μεταγραφικός παράγοντας στις διαδικασίες αυτές. Όσα αναφέρθηκαν παραπάνω για την in vivo λειτουργία του IRF 1 αποτελούν πρόσφατα ευρήματα ' σε παλαιότερες αναφορές μνημονεύεται απλά ως αντικός και αντιβακτηριακός παράγοντας. Επίσης βιβλιογραφικά απαντάται ως ογκοκατασταλτικός ρυθμιστής σε αντιδιαστολή με τον IRF 2 που φέρεται ως ογκογενετικός. Πάντως πρόκειται για μεταγραφικό παράγοντα με ενεργό συμμετοχή και ρύθμιση σε πολλαπλά επίπεδα του ανοσοποιητικού συστήματος που συμμετέχει επίσης στη ρύθμιση γονιδίων κλειδιά στη ρύθμιση του κυττ. κύκλου (p21) και την απόπτωση (ICE).

Η πειραματική μας προσέγγιση αφορά in vitro μελέτη της επίδρασης του E1A στον IRF 1, χρησιμοποιώντας Gal-fusion based σύστημα αναφοράς. Με πλασμίδιο αναφοράς για έκφραση του CAT γονιδίου υπό τον έλεγχο μίας ή περισσότερων θέσεων πρόσδεσης Gal παραγόντων (G1-CAT, G4-CAT), σε πειράματα παροδικής συν- διαμόλυνσης σε κυτταρικές σειρές επιθηλιακών κυττάρων παρατηρήθηκε ότι χημική κατασκευή σύντηξης της μεταγραφικά ενεργής περιοχής του IRF 1 (IRF activation domain : αα 196-325) πίσω από την περιοχή της πρωτεΐνης GAL για πρόσδεση στο DNA (Gal binding domain : αα 1-147) ενεργοποιούσε μεταγραφή του γονιδίου αναφοράς - κάτι αναμενόμενο σύμφωνα με τα όσα είναι γνωστά για τον IRF 1.

Η μεταγραφική αυτή ενεργοποίηση καταργείται σημαντικά όταν συνεκφράζουμε την πρωτεΐνη E1A. Χρησιμοποιώντας επιμέρους εσωτερικές ελλείψεις του E1A, διαπιστώθηκε ότι για την καταστολή δεν απαιτείται η CR3. Αντίθετα κρίσιμης σημασίας θεωρείται η περιοχή CR1- έλλειψή της (αα 38-65) συνεπάγεται μειωμένη καταστολή.

Προσπαθώντας να δώσουμε κάποιες απαντήσεις διερευνώντας πιθανούς μηχανισμούς της παρατηρούμενης καταστολής διαπιστώσαμε τα εξής :

- με Western ελέγχθηκε ότι η παρουσία του αδενοϊκού αντιγόνου δεν επηρεάζει τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του χμιαρικού ενεργοποιητή Gal-IRF_{act}

- σε πειράματα EMSA διαπιστώθηκε ότι δεν επηρεάζεται σημαντικά η *in vitro* πρόσδεση της Gal-IRF_{act} πρωτεΐνης σε Gal ολιγονουκλεοτίδιο.

- σε Western μετά από ανοσοκατακρήμνιση (IP - Western) με E1A αντίσωμα δεν ανιχνεύτηκε IRF - σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων που είχαν συν- διαμολυνθεί και με τα δύο πλασμίδια έκφρασης .

Από τα παραπάνω διαφαίνεται ότι η πρωτεΐνη E1A ασκεί τη δράση της έμμεσα , πιθανά μέσω ενδιάμεσων μορίων - γέφυρα , χωρίς να έρχεται σε άμεση φυσική επαφή με τον IRF 1 (τουλάχιστον με το μεταγραφικά ενεργό domain).

Έλλειψη της αμινοτελικής περιοχής αα 1- 20 του E1A δεν επέφερε αλλαγή των επιπέδων μεταγραφικής ενεργοποίησης από τον IRF 1. Η παρατηρούμενη λοιπόν καταστολή που προκαλεί το E1A «χαρτογραφείται» στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης και στη CR1 περιοχή .

Η περιοχή N_{terminus} είναι λειτουργικά σημαντική γιατί όπως έχει γίνει πρόσφατα γνωστό κυρίως μέσω αυτής η E1A πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με θετικούς «εξομοιωτές» (συνενεργοποιητές) της μεταγραφής , adaptors p300 / CBP. Οι πρωτεΐνες αυτές χαρακτηρίζονται από ενδογενή ικανότητα ακετυλίωσης ιστονών & επιπλέον όμως αλληλεπιδρούν με ομοειδείς ενζυμικά ενεργές πρωτεΐνες (P / CAF) . Έτσι ο θετικός μεταγραφικός τους ρόλος πιθανολογείται ότι είναι απόρροια της καταλυτικής σημασίας επίδρασης που μπορούν να ασκούν στη δομή της χρωματίνης (ανάλογο του συστήματος ADA 2 / GCN 5 στη ζύμη) . Όταν λοιπόν αφαιρέσουμε την περιοχή επαφής τους (έλλειψη N_{terminus}) , αυτόματα καταργούμε την κατασταλτική επίδραση του E1A : οι εξομοιωτές μπορούν ανενόχλητοι να συνεπικουρήσουν τον ενεργοποιητή & αντίθετα , έκφραση του λειτουργικού μορίου παρεμποδίζει τη λειτουργία τους.

Ο συγκεκριμένος μηχανισμός έχει προταθεί σε πολλές περιπτώσεις για να ερμηνεύσει τη δράση του E1A, και πιθανολογούμε ότι ισχύει και στην περίπτωσή μας , ιδιαίτερα μάλιστα εάν δειχθεί στο μέλλον ότι για την επαγωγική δραστηριότητα του IRF απαιτείται, εμπλέκεται p300 / CBP. Πάντως όπως έχει δειχθεί και σε αντίστοιχες μελέτες , σε πειράματα παροδικής συνδιαμόλυνσης κυττάρων σε καλλιέργεια , υπερεκφράζοντας p300 / CBP παρατηρεί κανείς σε κάποιο βαθμό αναστροφή της καταστολής που ασκεί το E1A στην επαγωγική δράση του συστατικά εκφραζόμενου IRF 1 στο σύστημα αναφοράς που αναφέρθηκε - κάτι που συνηγορεί προς την κατεύθυνση αυτή .

Βιβλιογραφία

.....για E1A

1- Adenovirus E1A proteins and transformation (Review)

Stanley T. Bayley and Joe S. Mymryk, *International Journal of Oncology* 5 : 425-444, 1994.

2- Adenovirus E1A protein paradigm viral transactivator

Jane Flint and Thomas Shenk , *Annual Review of Genetics*, 23 :141-161, 1989.

3- Modulation of AP -1 / ATF transcription factor activity by the adenovirus - E1A oncogene products Bertine M. Hagmeyer, P. Angel and Hans van Dam , *BioEssays* 17 : 621- 629, 1995.

4- E1A - oncogene or tumor suppressor? Steven M. Frisch , *BioEssays* 17 : 1002, 1995.

5- Antioncogenic effect of adenovirus E1A in human tumor cells

Steven M. Frisch , *PNAs* 88 : 9077-9081, 1991.

6- Adenovirus E1A specifically blocks SWI / SNF - dependent transcriptional activation Mary E. Miller, Bradley R. Cairns, Randy S. Levinson , Keith R. Yamamoto, Daniel A. Engel, and M. Mitchell Smith, *Molecular and Cellular Biology* , 16: 5737-5743 , 1996.

7- mUBC9, a novel adenovirus E1A- interacting protein that complements a yeast cell cycle defect Guus Hateboer, E. Marielle Hijmans, Jeroen B. D. Nooij, Stephan Schlenker, Stefan Jentsch and Rene' Bernards , *The Journal of Biological Chemistry* , 271 : 25906 - 25911 , 1996.

8- Functional importance of complex formation between the retinoblastoma tumor suppressor family and adenovirus E1A proteins as determined by mutational analysis of E1A Conserved Region 2 Hugues B. Corbeil and Philip E. Branton, *Journal of Virology*, 68 : 6697 - 6709 , 1994.

9- Expression of E1A in terminally differentiated muscle cells reactivates the cell cycle and suppresses tissue - specific genes by separable mechanisms Marianne Tiainen, Dimitry Spitkovsky, Piddler Jansen- D r, Ada Sacchi and Marco Crescenzi, *Molecular and Cellular Biology* , 16 : 5302 - 5312 , 1996.

10- The adenovirus E1A repression domain disrupts the interaction between the TATA binding protein and the TATA box in a manner reversible by TFIIB Chao -Zhong Song, Paul M. Loewenstein, Karoly Toth, Qingquan Tang, Akira Nishikawa and Maurice Green, *Molecular and Cellular Biology* , 17: 2186 -2193 , 1997.

11- Binding of human virus oncoproteins to hDlg / SAP97, a mammalian homolog of the Drosophila discs large tumor suppressor protein Siu Sylvania Lee, Robert S. Weiss and Ronald T. Javier, *PNAS* , 94 : 6670 - 6675, 1997.

.....για *E1A - p300 /CBP*

12- A family of transcriptional adaptor proteins targeted by the E1A oncoprotein Zolt n Arany, David Newsome, Elizabeth Oldread, David M. Livingston and Richard Eckner, *Nature* , 374 : 81 - 84 , 1995.

13- Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A - associated 300- kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor Richard Eckner, Mark E. Ewen, David Newsome, Mike Gerdes, James A. De Caprio, Jeanne Bentley Lawrence and David M. Livingston, *Genes and Development* , 8 : 869 - 884 , 1994.

14- Adenoviral E1A - associated protein p300 as a functional homologue of the transcriptional co - activator CBP James R. Lundblad, Roland P. S. Kwok, Megan E. Lawrance, Marian L. Harter and Richard H. Goodman, *Nature* , 374 : 85 - 88 , 1995.

15- A novel E1A domain mediates skeletal - muscle - specific enhancer repression independently of pRB and p300 binding Andrea Sandm ller, Heiko Meents and Hans Henning Arnold , *Molecular and Cellular Biology* , 16: 5846 - 5856 , 1996.

16- Relief of YY1 transcriptional repression by adenovirus E1A is mediated by E1A - associated protein p300 Jeng - Shin Lee, Katherine M. Galvin, Raymond H. See, Richard Eckner, David Livingston, Elizabeth Moran and Yang Shi , *Genes and Development* , 9 : 1188 - 1198, 1995.

- 17- Differential interactions of the CREB / ATF family of transcription factors with p300 and adenovirus E1A** Jeng - Shin Lee, Xiaolin Zhang and Yang Shi , *The Journal of Biological Chemistry* , 271 : 17666 - 17674 , 1996.
- 18- Role of p300- family proteins in E1A oncogene induction of cytolytic susceptibility and tumor cell rejection** James L. Cook, Carol K. Krantz and Barbara A. Routes, *PNAS* , 93: 13985 - 13990, 1996.
- 19- A p300 / CBP - associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A** Xiang-Jiao Yang, Vasily V. Ogryzko, Jun- ichi Nishikawa, Bruce H. Howard and Yoshihiro Nakatani, *Nature*, 382 : 319 - 324 , 1996.
- 20- The adenovirus E1A - associated 300 kDa adaptor protein counteracts the inhibition of the collagenase promoter by E1A and represses transformation** Paul H. M. Smits, Linda de Wit, Alex J. van der Eb and Alt Zantema , *Oncogene* , 12 : 1529 - 1535 , 1996.
- 21- Adenovirus E1A downregulates cJun- and JunB- mediated transcription by targeting their coactivator p300** Jeng-Shin Lee, Raymond H. See, Tiliang Deng and Yang Shi , *Molecular and Cellular Biology* , 16 : 4312- 4326 , 1996.
- 22- Transcriptional coactivator cAMP response element binding protein mediates induction of the human proliferating cell nuclear antigen promoter by the adenovirus E1A oncoprotein** Benjamin H. Lee and Michael B. Mathews , *PNAs* , 94 : 4481 - 4486 , 1997.

..... για p300 /CBP

- 23- Transcriptional control : Versatile molecular glue** Ralf Janknecht and Tony Hunter *Current Biology*, 6 : 951 - 954 , 1996.
- 24- The p300 / CBP family : integrating signals with transcription factors and chromatin** Noriko Shikama , Jonathan Lyon and Nicholas B. La Thangue , *trends in Cell Biology*, 7 : 230 - 236 , 1997.
- 25- Nuclear receptor coactivators** Christopher K. Glass, David W. Rose and Michael G. Rosenfeld, *Current Opinion in Cell Biology*, 9 : 222 - 232 , 1997.
- 26- Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB** Roland P. S. Kwok, James R. Lundblad, John C. Chrivia, Jane P. Richards, Hans Peter B chinger, Richard G. Brennan, Stefan G.E. Roberts, Michael R. Green and Richard H. Goodman, *Nature* , 370 : 223 - 226 , 1994.

- 27- The CBP co - activator is a histone acetyltransferase** Andrew J. Bannister and Tony Kouzarides , *Nature* , 384 : 641 - 643 , 1996.
- 28- Interaction and functional collaboration of p300 / CBP and bHLH proteins in muscle and B- cell differentiation** Richard Eckner, Tso - Pang Yao , Elizabeth Oldread and David M. Livingston, *Genes and Development* , 10 : 2478 - 2490 , 1996.
- 29- Molecular mechanisms of myogenic coactivation by p300 : direct interaction with the activation domain of Myo D and with the MADS box of MEF2C** Vittorio Sartorelli, Jing Huang, Yasuo Hamamori and Larry Keddes , *Molecular and Cellular Biology* , 17 : 1010 - 1026 , 1997.
- 30- Regulation of NF- κ B by cyclin - dependent kinases associated with the p300 coactivator** Neil D. Perkins, Lisa K. Felzien, Jonathan C. Betts, Kwanyee Leung, David H. Beach, Gary J. Nabel , *Science* , 275 : 523 - 527 , 1997.
- 31- The signal - dependent coactivator CBP is a nuclear target for pp90_{RSK}** Toshihiro Nakajima, Akiyoshi Fukamizu, Jun Takahashi, Fred H. Gage, Tracy Fisher, John Blenis and Marc R. Montminy, *Cell* , 86 : 465 - 474 , 1996.
- 32- Cooperation of Stat2 and p300 / CBP in signalling induced by interferon - α** Shoumo Bhattacharya, Richard Eckner, Steven Grossman, Elizabeth Oldread, Zoltan Arany, Alan D' Andrea and David M. Livingston, *Nature* , 383 : 344 -347 , 1996.
- 33- Recruitment of p300 / CBP in p53 - dependent signal pathways** Maria Laura Avantaggiati, Vasily Ogryzko, Kevin Gardner, Antonio Giordano, Arthur S. Levine and Kathleen Kelly, *Cell* , 89 : 1175 - 1184 , 1997.
- 34- Binding and modulation of p53 by p300 / CBP coactivators** Nancy L. Lill, Steven R. Grossman, Doron Ginsberg, James De Caprio and David M. Livingston, *Nature* , 387 : 823 -827 , 1997.
- 35- Synergistic activation of transcription by CBP and p53** Wei Gu, Xiao - Lu Shi and Robert G. Roeder, *Nature* , 387 : 819 -823 , 1997.
- 36- Activation of p53 sequence - specific DNA binding by acetylation of the p53 C - terminal domain** Wei Gu and Robert G. Roeder, *Cell* , 90 : 595 - 606 , 1997.
- 37- Role of CBP / p300 in nuclear receptor signalling** Debabrata Chakravarti, Vickie J. LaMorte, Michael C. Nelson, Toshihiro Nakajima , Ira G. Schulman, Henry Juguilon, Marc Montminy and Ronald M. Evans , *Nature* , 383 : 99 - 103 , 1996.
- 38- CREB - binding protein / p300 are transcriptional coactivators of p65** Mary E. Gerritsen, Amy J. Williams, Andrew S. Neish, Sarah Moore, Yang Shi and Tucker Collins , *PNAs* , 94 : 2927 - 2932 , 1997.

39- A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP -1 inhibition by nuclear receptors Yasutomi Kamei , Lan Xu , Thorsten Heinzl, Joseph Torchia, Riki Kurokawa, Bernd Gloss, Sheng - Cai Lin , Richard A. Heyman, David W. Rose, Christopher K. Glass and Michael G. Rosenfeld , *Cell* , 85 : 403 - 414 , 1996.

40- Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P / CAF and CBP / p300 Hongwu Chen, Richard J. Lin, R. Louis Schiltz, Debabrata Chakravarti, Alyssa Nash, Laszlo Nagy, Martin L. Privalsky, Yoshihiro Nakatani and Ronald M. Evans, *Cell* , 90 : 569 - 580 , 1997.

41- Something new to hang your HAT on Marc Montminy , *Nature* , 387 : 654 - 655 , 1997.

42- The transcriptional co - activator p / CIP binds CBP and mediates nuclear - receptor function Joseph Torchia, David W. Rose, Juan Inostroza, Yasutomi Kamei , Stefan Westin, Christopher K. Glass and Michael G. Rosenfeld, *Nature* , 387 : 677 - 684 , 1997.

43- Sinful repression Alan P. Wolffe, *Nature* , 387 : 16 - 17 , 1997.

44- A complex containing N - CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression Thorsten Heinzl, Robert M. Lavinsky, Tina - Marie Mullen, Mats S derstr m, Carol D. Laherty, Joseph Torchia, Wen - Ming Yang, Gyan Brard, Sally D. Ngo, James R. Davie, Edward Seto , Robert N. Eisenman , David W. Rose, Christopher K. Glass and Michael G. Rosenfeld, *Nature* , 387 : 43 - 48 , 1997.

..... *via IRF 1*

45- Structure and regulation of the human Interferon Regulatory Factor 1 (IRF 1) and IRF 2 genes : implications for a gene network in the interferon system Hirashi Harada, Ei - Ichi Takahashi, Susumu Itoh, Kenji Harada, Tada - Aki Hori and Tadatsugu Taniguchi, *Molecular and Cellular Biology* , 14 : 1500 - 1509 , 1994.

46- Interferon - induced nuclear factors that bind a shared promoter element correlate with positive and negative transcriptional control David E. Levy, Daniel S. Kessler, Richard Pine, Nancy Reich and James E. Darnell, Jr. , *Genes and Development* , 2 : 383 - 393 , 1988.

- 47- Pip, a lymphoid - restricted IRF, contains a regulatory domain that is important for autoinhibition and ternary complex formation with the Ets factor PU.1** Abraham L. Brass, Eli Kehrl, Charles F. Eisenbeis, Ursula Storb and Harinder Singh , *Genes and Development* , 10 :2335 - 2347 , 1996.
- 48- Chicken interferon consensus sequence - binding protein (ICSBP) and interferon regulatory factor (IRF) 1 genes reveal evolutionary conservation in the IRF gene family** C. Jungwirth, M. Rebbert, K. Ozato, H. J. Degen, U. Schultz and I. B. Dawid, *PNAs* , 92 : 3105 - 3109, 1995.
- 49- cIRF - 3, a new member of the interferon regulatory factor (IRF) family that is rapidly and transiently induced by dsRNA** Caroline E. Grant, Monica Z. Vasa and Roger G. Deeley, *Nucleic Acids Research* , 23 : 2137 - 2146 , 1995.
- 50- Requirement for the transcription factor LSIRF / IRF4 for mature B and T lymphocyte function** Hans - Willi Mittr icker, Toshifumi Matsuyama, Alex Grossman, Thomas M. K ndig, Julia Potter, Arda Shahinian, Andrew Wakeham, Bruce Patterson, Pamela S. Ohashi, Tak W. Mak , *Science* , 275 : 540 - 543 , 1997.
- 51- Molecular mechanisms of interferon beta gene induction** John Hiscott, Hannah Nguyen and Rongtuan Lin *seminars in VIROLOGY*, 6 : 161 - 173 , 1995.
- 52- Formation of STAT1 - STAT2 heterodimers and their role in the activation of IRF - 1 gene transcription by interferon - α** Xiaoxia Li, Stewart Leung, Sajjad Qureshi, James E. Darnell, Jr, and George R. Stark , *The Journal of Biological Chemistry* , 271 : 5790 - 5794 , 1996.
- 53- Interferon Regulatory Factors and TFIIB cooperatively regulate Interferon-responsive promoter activity *in vivo* and *in vitro*** Li-Ming Wang, Jorge C. G. Blanco, Sophia Y. Tsai, Ming-Jer Tsai and Keico Ozato, *Molecular and Cellular Biology* , 16 : 6313 - 6324 , 1996.
- 54- Deficient cytokine signaling in mouse embryo fibroblasts with a targeted deletion in the PKR gene : role of IRF-1 and NF- κ B** Aseem Kumar, Yi-Li Yang , Vincenzo Flati , Sandy Der, Suzanne Kadereit, Amitabha Deb, Jaharul Haque, Luiz Reis, Charles Weissmann and Bryan R.G. Williams , *The EMBO Journal* , 16 : 406 - 416 , 1997.
- 55- Constitutive activation of Epstein-Barr Virus (EBV) nuclear antigen 1 gene transcription by IRF1 and IRF2 during restricted EBV latency** Brian C. Schaefer, Emily Paulson, Jack L. Strominger and Samuel H. Speck , *Molecular and Cellular Biology* , 17 : 873 - 886 , 1997.

56- Involvement of the IRF-1 transcription factor in antiviral responses to interferons Tohru Kimura, Katsutoshi Nakayama, Josef Penninger, Motoo Kitagawa, Hirashi Harada, Toshifumi Matsuyama, Nobuyuki Tanaka, Ryutaro Kamijo, Jan Vilcek, Tak W. Mak, Tadatsugu Taniguchi, *Science*, 264 : 1921 - 1924, 1994.

57- Anti-oncogenic and oncogenic potentials of Interferon Regulatory Factors - 1 and -2 Hirashi Harada, Motoo Kitagawa, Nobuyuki Tanaka, Hitomi Yamamoto, Kenji Harada, Masahiko Ishihara and Tadatsugu Taniguchi, *Science*, 259 : 971 - 974, 1993.

58- Cellular commitment to oncogene-induced transformation or apoptosis is dependent on the transcription factor IRF-1 Nobuyuki Tanaka, Masahiko Ishihara, Motoo Kitagawa, Hirashi Harada, Tohru Kimura, Toshifumi Matsuyama, Marc S. Lamphier, Shinichi Aizawa, Tak W. Mak and Tadatsugu Taniguchi, *Cell*, 77 : 829 - 839, 1994.

59- An IRF-1-dependent pathway of DNA damage - induced apoptosis in mitogen - activated T lymphocytes Tomohiko Tamura, Masahiko Ishihara, Marc S. Lamphier, Nobuyuki Tanaka, Isao Oishi, Shinichi Aizawa, Toshifumi Matsuyama, Tak W. Mak, Shinsuke Taki and Tadatsugu Taniguchi, *Nature*, 376 : 596 - 599, 1995.

60- Cooperation of the tumour suppressors IRF-1 and p53 in response to DNA damage Nobuyuki Tanaka, Masahiko Ishihara, Marc S. Lamphier, Hiroaki Nozawa, Toshifumi Matsuyama, Tak W. Mak, Shinichi Aizawa, Takashi Tokino, Moshe Oren and Tadatsugu Taniguchi, *Nature*, 382 : 816 - 818, 1996.

61- Deletion of IRF-1, mapping to 5q31.1, in Human leukemia and preleukemic myelodysplasia Cheryl L. Willman, Cordellia E. Sever, Maria G. Pallavicini, Hirashi Harada, Nobuyuki Tanaka, Marilyn L. Slovak, Hitomi Yamamoto, Kenji Harada, Timothy C. Meeker, Alan F. List and Tadatsugu Taniguchi, *Science*, 259 : 968 - 971, 1993.

62- Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages R. Kamijo, H. Harada, T. Matsuyama, M. Bosland, J. Gerecitano, D. Shapiro, J. Le, S. I. Koh, T. Kimura, S. J. Green, T. W. Mak, T. Taniguchi, J. Vilcek, *Science*, 263 : 1612 - 1615, 1994.

63- Targeted disruption of IRF-1 or IRF-2 results in abnormal type I IFN gene induction and aberrant lymphocyte development Toshifumi Matsuyama, Tohru Kimura, Motoo Kitagawa, Klaus Pfeffer, Takatoshi Kawakami, Nobumasa Watanabe, Thomas M. K. ndig, Ryuichi Amakawa, Kenji Kishihara, Andrew Wakeham, Julia Potter, Caren L. Furlonger, Arumugavadivel Narendran, Haruhiko Suzuki, Pamela S. Ohashi, Christopher J. Paige, Tadatsugu Taniguchi and Tak W. Mak, *Cell*, 75 : 83 - 97, 1993.

64- Mice devoid of Interferon regulatory factor 1 (IRF 1) show normal expression of type I interferon genes Luiz F. L. Reis, Heinz Ruffner,

Gerlinde Stark, Michael Aguet and Charles Weissmann, *The EMBO Journal*, 13 : 4798 - 4806 , 1994 .

65- Genomic structure and function in the MHC John Trowsdale, *TIG*, 9 :117 - 122 , 1993 .

66- MHC class II molecules : transport pathways for antigen presentation Richard Wubbolts, Mar Fernandez- Borja and Jacques Neefjes, *trends in CELL BIOLOGY*, 7: 115 - 118 , 1997 .

67- Molecular defects in the bare lymphocyte syndrome and regulation of MHC class II genes Walter Reith , Victor Steimle and Bernard Mach , *Immunology Today* , 16 : 539 - 546 , 1995 .

68- Regulation of MHC gene expression Jenny Pan-Yun Ting and Albert S. Baldwin, *Current Opinion in Immunology* , 5: 8 - 16 , 1993 .

69- The locus - specific enhancer activity of the class I major histocompatibility complex interferon - responsive element is associated with a γ - interferon (IFN) - inducible factor distinct from STAT1 α , p48, and IFN regulatory factor - 1 Abbe N. Vallejo and Larry R. Pease, *The Journal of Biological Chemistry* , 271 : 29813 - 29821, 1996.

70- TAP 1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules and CD4⁻CD8⁺ T cells Luc Van Kaer, Philip G. Ashton - Rickardt, Hidde L. Ploegh and Susumu Tonegawa, *Cell* , 71 : 1205 - 1214 , 1992 .

71- Regulation of LMP 2 and TAP 1 genes by IRF-1 explains the paucity of CD8⁺ T cells in IRF -/- mice Leigh C. White, Kenneth L. Wright, Nathan J. Felix, Heinz Ruffner, Luiz F. L. Reis, Richard Pine and Jenny P.-Y. Ting, *Immunity* , 5 : 365 - 376 , 1996 .

72- Induction of MHC class I expression by the MHC class II transactivator CIITA Brian K. Martin, Keh- Chuang Chin, John C. Olsen, Cheryl A. Skinner, Anup Dey, Keiko Ozato and Jenny P.-Y. Ting, *Immunity* , 6 : 591 -600 , 1997 .

73- Site α is crucial for two routes of IFN γ - induced MHC class I transactivation : the ISRE - mediated route and a novel pathway involving CIITA Sam J. Gobin, Ad Peijnenburg, Vivian Keijers and Peter J. van den Eisen, *Immunity*, 6 : 601 - 611, 1997.

74- IFN regulatory factor-1 plays a central role in the regulation of the expression of class I and II MHC genes *in vivo* Michael Hobart, Vido Ramassar, Nelson Goes, Joan Urmson and Philip F. Halloran , *The Journal of Immunology* , 158 : 4260 - 4269 , 1997 .

75- The Th 1 / Th 2 paradigm Sergio Romagnani, *Immunology Today*, 18: 263 - 266 , 1997 .

76- Functional diversity of helper T lymphocytes Abul K. Abbas, Kenneth M. Murphy and Alan Sher, *Nature*, 383 : 787-793 , 1996 .

77- Genetic mapping of a murine locus controlling development of T helper 1 / T helper 2 type responses James D. Gorham, Mehmet L. Guler,

Robert G. Steen, Aaron J. Mackey, Marc J. Daly, Kathy Frederick, William F. Dietrich and Kenneth M. Murphy, *PNAS*, 93 : 12467 - 12472, 1996.

78- Multistage regulation of the Th 1 - type Immune responses by the transcription factor IRF- 1 Shinsuke Taki, Takeo Sato, Kouetsu Ogasawara, Taeko Fukuda, Mitsuharu Sato, Shigeaki Hida, Gen Suzuki, Masao Mitsuyama, Eun-Hee Shin, Soumei Kojima, Tadatsugu Taniguchi and Yoshihiro Asano, *Immunity*, 6 : 673 - 679, 1997.

79- Interferon regulatory factor - 1 is required for a T helper 1 immune response in vivo Michael Lohoff, David Ferrick, Hans-Willi Mittr icker, Gordon S. Duncan, Susi Bischof, Martin R llinghoff and Tak W. Mak, *Immunity*, 6 : 681 - 689, 1997.

80- Mutational analysis of Interferon (IFN) Regulatory Factors 1 and 2- effects on the induction of IFN- β gene expression Rongtuan Lin, Amir Mustafa, Hannah Nguyen, Dirk Gewert and John Hiscott, *The Journal of Biological Chemistry*, 269 :17542 - 17549, 1994.

81- Molecular intractions between ICSBP and members of the interferon regulatory factor family Chiara Bovolenta, Paul H. Driggers, Michael S. Marks, Jeffrey A. Medin, Alexander D. Politis, Stefanie N. Vogel, David E. Levy, Kazuyasu Sagakuchi, Ettore Appella, John E. Coligan and Keiko Ozato