

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-  
ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ  
ΚΑΤΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ERF

Μιχάλης Βερυκοκάκης

Επιβλέπων Καθηγητής: Γιώργος Μαυροθαλασσίτης

ΗΡΑΚΛΕΙΟ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2001

# ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρώτα απ' όλους, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου Γιώργο Μαυροθαλασσίτη, του οποίου η καθοδήγηση συνέβαλε τα μέγιστα για τη διεκπεραίωση αυτής της εργασίας.

Πολύτιμη βοήθεια παρείχαν και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, η Πόπη, η Χαρούλα και ο Σαράντης, που ανέχτηκαν την ακατάστατη παρουσία μου στο χώρο.

Ιδιαίτερα, θέλω να ευχαριστήσω την Ειρήνη Τοπαλίδου και το Γιάννη Χατζηδάκη, που με βοήθησαν στα πρώτα μου βήματα και η παρουσία τους μου έδωσε το κίνητρο να συνεχίσω με όρεξη, καθώς και τη Μυρτώ Δεναξά για τη συνεισφορά της στη συγγραφή της εργασίας.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τους συμπαίκτες μου στην ποδοσφαιρική ομάδα του "Δαρβίνου", τον Τάσο, το Θάνο, το Χατζηδημητράκη, τον Κουμπανάκη, το Γιωργάκη και τον Παντελή, οι οποίοι, αν και δεν ξέρουν ποδόσφαιρο, γίνονται πολύ διασκεδαστικοί όταν προσπαθούν να με πείσουν για το αντίθετο. Ο Βασίλης, η Σάννου και ο Δημητράκης είναι τυχεροί που με γνώρισαν, οπότε μάλλον αυτοί πρέπει να με ευχαριστήσουν, παρά εγώ.

Τέλος ένα μεγάλο, εκ βαθέων, ευχαριστώ οφείλω στους φίλους μου, που προσπαθούν εδώ και πολλά χρόνια να γίνω καλύτερος άνθρωπος, στο Νίκο, το Γιώργο, τον Τάσο, την Τζωρτζίνα και τη Μαρία, καθώς και τους γονείς μου, που ταλαιπωρώ εδώ και 25 χρόνια.

# ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσης μελέτης είναι να διερευνηθεί ο μηχανισμός της μεταγραφικής καταστολής από τον ERF. Ο ERF είναι ένας καταστολέας της μεταγραφής και ανήκει στην οικογένεια των ETS μεταγραφικών παραγόντων. Στο καρβόξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης βρίσκεται μία περιοχή 58 αμινοξέων που μπορεί αυτόνομα να καταστείλει τη μεταγραφή.

Σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης ευκαρυωτικών κυττάρων, δείχθηκε ότι η κατασταλτική δράση του ERF δεν είναι ευαίσθητη στη δράση ενός ειδικού αναστολέα των απακετυλασών των ιστονών, της τριχοστατίνης A, υποδηλώνοντας ότι πιθανόν δεν συμμετέχουν HDACs στο μηχανισμό της καταστολής. Επιπλέον, δείχθηκε ότι ο ERF μπορεί να καταστείλει τη μεταγραφή σε διαφορετικούς υποκινητές, ενώ για να ασκήσει τη δράση του είναι απαραίτητο να είναι προσδεδεδμένος σε αλληλουχίες DNA, υποδεικνύοντας ότι λειτουργεί ανεξάρτητα από ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Τέλος, δείχθηκε ότι έχει την ικανότητα να καταστέλλει τη μεταγραφή εξίσου αποτελεσματικά, ανεξάρτητα αν είναι προσδεδεδμένος κοντά ή μακριά από το σημείο έναρξης της μεταγραφής.

Είναι, λοιπόν, πιθανό ο ERF να ασκεί την κατασταλτική του δράση παρεμβαίνοντας στη συγκρότηση ή την ενεργοποίηση του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής ή να εμποδίζει την επιμήκυνση της μεταγραφής ή να δρα μέσω ενός άγνωστου μέχρι στιγμής μηχανισμού. Περαιτέρω *in vitro* πειράματα, όπως *in vitro* μεταγραφή, GST pull-down και πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης πρωτεϊνών θα αποκαλύψουν σε μεγαλύτερη λεπτομέρεια το μηχανισμό μεταγραφικής καταστολής του ERF.

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## Γενικά

Ο συντονισμός των πολύπλοκων κυτταρικών διεργασιών, από την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση μέχρι την απόκριση σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα, επιτυγχάνεται σε μεγάλο βαθμό μέσω της τροποποίησης του μεταγραφικού προγράμματος του κυττάρου. Η διαδικασία αυτή συνεπάγεται την ενεργοποίηση ή την καταστολή της μεταγραφής συγκεκριμένων γονιδίων. Η ενεργοποίηση της μεταγραφής είναι μία πολύ καλά μελετημένη διαδικασία, η οποία περιλαμβάνει τη σύνδεση των πρωτεϊνών πάνω στις αντίστοιχες αλληλουχίες DNA, τη στρατολόγηση της RNA πολυμεράσης II και των γενικών μεταγραφικών παραγόντων και την ενεργοποίηση του συμπλόκου έναρξης, που οδηγεί τελικά στην έναρξη της μεταγραφής (Berk 1999). Σε μερικές περιπτώσεις ευκαρυωτικών οργανισμών απαιτείται και η δράση ATP-εξαρτώμενων μηχανών αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης στην περιοχή του υποκινητή (Peterson and Workman 2000; Sudarsanam and Winston 2000), καθώς και η χημική τροποποίηση (ακετυλίωση, φωσφορυλίωση) των ιστονών της χρωματίνης (Struhl 1998).

Αντίθετα, η καταστολή της μεταγραφής είναι λιγότερο σαφής, αφού ένα γονίδιο μπορεί να θεωρηθεί κατεσταλμένο από τη στιγμή που στον υποκινητή του δεν υπάρχει προσδεδεδεμένος κάποιος ενεργοποιητής. Αν, επιπλέον, λάβουμε υπόψιν ότι η συμπαγής δομή της χρωματίνης παίζει από μόνη της κατασταλτικό ρόλο στην έκφραση των γονιδίων, μπορεί κάποιος να οδηγηθεί στο συμπέρασμα, ότι οι πρωτεΐνες-καταστολείς δεν είναι απαραίτητες για τη ρύθμιση της μεταγραφής. Στις παραπάνω περιπτώσεις, τα γονίδια είναι απλά σιωπηλά. Η καταστολή, όμως είναι μια πιο ενεργή διαδικασία που ελέγχει αυστηρά τη μεταγραφή τους και δεν επιτρέπει την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων, ενώ μπορεί και να σταματήσει τη μεταγραφή ενός ήδη ενεργοποιημένου γονιδίου. Για αυτό το λόγο το κύτταρο έχει αναπτύξει πολλαπλούς μηχανισμούς καταστολής της μεταγραφής που εξαρτώνται τόσο από τον τύπο του καταστολέα, όσο και από τον υποκινητή του προς καταστολή γονιδίου.

## Μηχανισμοί μεταγραφικής καταστολής

Μπορούμε να θεωρήσουμε δύο διαφορετικές κατηγορίες μηχανισμών μεταγραφικής καταστολής: αυτή που δρα επηρεάζοντας την κατάσταση της χρωματίνης μέσω απακετυλίωσης ή/και μεθυλίωσης και αυτή που δρα μέσω αλληλεπίδρασης του καταστολέα με ενεργοποιητές ή με πρωτεΐνες της βασικής μεταγραφικής μηχανής.

Ένας ικανός αριθμός μεταγραφικών καταστολέων έχει βρεθεί ότι δρα μέσω αλλαγής της δομής της χρωματίνης (Pazin and Kadonaga 1997). Η χρωματινική δομή παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταγραφική ρύθμιση, αφού είναι δυνατόν ένας υποκινητή να βρίσκεται «θαμμένος» κάτω από τα νουκλεοσώματα, με αποτέλεσμα οι μεταγραφικοί παράγοντες να μην έχουν πρόσβαση στις αντίστοιχες αλληλουχίες. Η ακετυλίωση των ουρών των ιστονών επιτρέπει το «άνοιγμα» της δομής της χρωματίνης και τη χαλάρωση της δέσμευσης των ιστονών στο DNA, με αποτέλεσμα να αποσταθεροποιείται η δομή του νουκλεοσώματος και έτσι επιτρέπεται η έναρξη της μεταγραφής. Το γεγονός ότι η ακετυλίωση διευκολύνει τη μεταγραφική ενεργοποίηση επιβεβαιώθηκε όταν μεταγραφικοί παράγοντες όπως το Gcn5, το TAFII250 και το CBP/P300 βρέθηκε να έχουν δράση ακετυλασών. Θα μπορούσε, λοιπόν, κάποιος να σκεφτεί αντίστροφα, ότι δηλαδή η απακετυλίωση των ιστονών οδηγεί σε μεταγραφική καταστολή. Πράγματι, βρέθηκε ότι μία απακετυλάση των ιστονών (histone deacetylase, HDAC) στα θηλαστικά, η HDAC 2, σε σύντηξη με την περιοχή πρόσδεσης, στο DNA, του GAL4 μπορεί να καταστείλει τη μεταγραφή σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης ευκαρυωτικών κυττάρων (Yang, Inouye et al. 1996).

Δύο διαφορετικές κατηγορίες απακετυλασών των ιστονών έχουν περιγραφεί στα θηλαστικά, με βάση την ομολογία τους προς τις απακετυλάσες του σακχαρομύκητα. Έτσι, οι HDACs 1-3 κατατάσσονται στην κατηγορία I και είναι ομόλογες με την Rpd3 του σακχαρομύκητα, ενώ οι HDACs 4-6 ανήκουν στην κατηγορία II και είναι ομόλογες της Hda 1 του σακχαρομύκητα. Οι απακετυλάσες της πρώτης κατηγορίας HDAC1 και 2 συμμετέχουν σε δύο κυρίως σύμπλοκα συν-καταστολέων που περιέχουν τις πρωτεΐνες RbAp46/48

(πυρηνικό σύμπλοκο των HDAC). Στη μία περίπτωση το σύμπλοκο αυτό αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Sin3 (σακχαρομύκτης) ή mSin3 (θηλαστικά), ενώ στη άλλη με το συν-καταστολέα Mi2-NuRD, ο οποίος κατέχει δραστικότητα ATP-εξαρτώμενης αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης και περιέχει και την πρωτεΐνη MBD3, που προσδένεται σε μεθυλιωμένο DNA. Αυτοί οι συν-καταστολείς μπορούν να αλληλεπιδρούν με πλήθος μορίων, όπως μεταγραφικοί παράγοντες που προσδένονται ή όχι στο DNA, με άλλους συν-καταστολείς ή και άλλα μόρια που διευκολύνουν αυτές τις αλληλεπιδράσεις (εικόνα 1) (Knoepfler and Eisenman 1999).

Οι HDACs δεν προσδένονται απευθείας στο DNA, αλλά πάνω σε άλλους καταστολείς. Αυτού του τύπου οι καταστολείς στρατολογούν, στους υποκινητές που δρουν, τις απακετυλάσες των ιστονών, οι οποίες με τη δράση τους ισχυροποιούν τη σύνδεση του DNA με τις ιστόνες και οι ενεργοποιητές δεν μπορούν να έχουν πρόσβαση στον υποκινητή ή τροποποιούν τις πρωτεΐνες συμπλόκων ενεργοποίησης, με αποτέλεσμα να χάνουν τη δραστικότητά τους. Υπάρχουν καταστολείς, που μπορούν να προσδένονται απευθείας στο DNA και να αλληλεπιδρούν συγχρόνως με τις απακετυλάσες, όπως για παράδειγμα το διμερές Mad-Max (Laherty, Yang et al. 1997), μη συνδεδεμένοι πυρηνικοί υποδοχείς στα θηλαστικά (Nagy, Kao et al. 1997) και η πρωτεΐνη Ume6 στο σακχαρομύκτη (Kadosh and Struhl 1997). Στα παραπάνω παραδείγματα, οι πρωτεΐνες προσδένονται σε γυμνό, χημικά μη τροποποιημένο DNA. Ωστόσο, υπάρχουν περιπτώσεις, όπως αυτή της πρωτεΐνης MeCP2 και του συμπλόκου MeCP1 που προσδένονται σε μεθυλιωμένο DNA. Έτσι η MeCP2 στρατολογεί τον συν-καταστολέα mSIN3, ο οποίος στη συνέχεια αλληλεπιδρά με απακετυλάσες ιστονών (Nan, Ng et al. 1998), ενώ το σύμπλοκο MeCP1 αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο NURD, που περιέχει τις απακετυλάσες HDAC1/2 (Feng and Zhang 2001). Επιπλέον, άλλες πρωτεΐνες που δεν δένονται σε ειδικές αλληλουχίες του DNA, αλλά προσδένονται σε άλλες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με το DNA, όπως οι η ομάδα Polycomb στη *Drosophila* και άλλα μετόζωα (Pirrotta 1995) και το σύμπλοκο TUP1-SSN6 στο σακχαρομύκτη, δρουν σταθεροποιώντας τη δομή της χρωματίνης μέσω απακετυλίωσης των ιστονών (Smith and Johnson 2000).

Ένας διαφορετικός μηχανισμός μεταγραφικής καταστολής έχει να κάνει με απευθείας αλληλεπίδραση του καταστολέα με άλλους μεταγραφικούς



Εικόνα 1. Απακετυλάσες των ιστονών και μέρη με τα οποία αλληλεπιδρούν (Knoepfler and Eisenman 1999).

παράγοντες. Για παράδειγμα, ένας καταστολέας μπορεί να δεσμεύεται πάνω σε κάποιον ενεργοποιητή και να τον αποκλείει από την αλληλεπίδραση του με τη βασική μεταγραφική μηχανή, όπως είναι η περίπτωση της πρωτεΐνης Kγürpel της *Drosophila* (Licht, Ro et al. 1993) ή της YY1 στα θηλαστικά (Zhou, Gedrich et al. 1995). Άλλο παράδειγμα αποτελεί αυτό της πρωτεΐνης IRF2, η οποία καταστέλλει το γονίδιο της ιντερφερόνης-β (IFN-β), αποκλείοντας τη στρατολόγηση του συν-ενεργοποιητή CBP στον υποκινητή από την IRF1 (Senger, Merika et al. 2000). Σε αυτή την περίπτωση, οι μεταγραφικοί παράγοντες μπορούν να δράσουν είτε ως καταστολείς, είτε ως ενεργοποιητές, ανάλογα με τον υποκινητή στον οποίο βρίσκονται και τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν. Επίσης, ο συγκεκριμένος τρόπος μεταγραφικής καταστολής είναι χρήσιμος σε γονίδια με πολύπλοκη ρύθμιση, που περιέχουν υποκινητές με στοιχεία δέσμευσης για διαφορετικούς ενεργοποιητές και χρειάζεται να ανταποκρίνονται σε διαφορετικά ερεθίσματα. Έτσι, είναι δυνατόν να καταστέλλεται η δράση ενός μόνο ενεργοποιητή μέσω της αλληλεπίδρασής του με τον καταστολέα, ενώ επιτρέπεται η δράση κάποιου άλλου, σε απάντηση ενός διαφορετικού μηνύματος.

Μία διαφορετική κατηγορία μεταγραφικών καταστολέων αποτελείται από πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τους γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες, μην επιτρέποντας το σχηματισμό του ολοενζύμου της RNA πολυμεράσης II ή την αλληλεπίδραση με ειδικούς μεταγραφικούς ενεργοποιητές και συν-ενεργοποιητές. Για παράδειγμα, το ετεροδιμερές Dr1/Drp1 παρεμβάλλεται στην αλληλεπίδραση του TBP με το TFIIB και του TBP με το TFIIA· ανταγωνίζεται με το TFIIB για την πρόσδεση στο TBP, ενώ ταυτόχρονα προκαλεί μία δομική αλλαγή στο TBP ή στο DNA, με αποτέλεσμα το TFIIA να μην μπορεί να προσδεθεί στο TBP (Kim, Na et al. 1997; Maldonado, Hampsey et al. 1999). Ο Mot1 είναι ένας άλλος καταστολέας του σακχαρομύκητα, ο οποίος επίσης αλληλεπιδρά με το TBP, αλλά σε αυτή την περίπτωση αποκλείεται η πρόσδεση του TBP στο DNA (Auble, Hansen et al. 1994). Τα παραπάνω μόρια αποτελούν περιπτώσεις γενικών καταστολέων που δεν προσδένονται στο DNA. Έχουν, όμως περιγραφεί και ειδικοί καταστολείς που αλληλεπιδρούν με το DNA και με τα συστατικά της



βασικής μεταγραφικής μηχανής. Για παράδειγμα η πρωτεΐνη Even-skipped (Eve) στη *Drosophila* αλληλεπιδρά απευθείας με το TBP και εμποδίζει τη σύνδεση του TFIID με το TATA στοιχείο (Li and Manley 1998). Άλλοι καταστολείς που αλληλεπιδρούν με TBP είναι ο μη συνδεδεμένος θυρεοειδικός υποδοχέας (Fondell, Brunel et al. 1996), η πρωτεΐνη Msx1 του ποντικίου (Zhang, Catron et al. 1996), καθώς και η MDM2 που αλληλεπιδρά και με το TFII E (Thut, Goodrich et al. 1997). Οι καταστολείς αυτού του τύπου δεν απαιτούν τη παρουσία κάποιου ειδικού ενεργοποιητή ή συν-ενεργοποιητή στον υποκινητή του γονιδίου-στόχου, ή κάποιας ειδικής αλληλουχίας ή στοιχείου (πέρα βέβαια από αυτή στην οποία προσδένονται), παρά μόνο ένα λειτουργικό TATA στοιχείο και επίσης δρουν μόνο ως καταστολείς ανεξάρτητα από τις αλληλουχίες του υποκινητή. Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι το ετεροδιμερές Dr1/Drap1 (NC2) της *Drosophila* μπορεί να ενεργοποιήσει *in vitro* υποκινητές που περιέχουν στοιχεία υποκινητή downstream (downstream promoter element, DPE-driven promoters) του σημείου έναρξης της μεταγραφής (Willy, Kobayashi et al. 2000).

Το ολοένζυμο της RNA πολυμεράσης II έχει την ικανότητα να αυτορυθμίζεται. Ένας μηχανισμός είναι ο διμερισμός του TBP, που έχει ως αποτέλεσμα να μειώνεται η δέσμευσή του στο DNA, καθώς και η αποικοδόμησή του (Pugh 2000). Ακόμα, ο TAFII250 των θηλαστικών στοχεύει στο TBP για να καταστείλει τη μεταγραφή, αφού ανταγωνίζεται με το DNA για τη δέσμευση του TBP (Liu, Ishima et al. 1998). Το διμερές Srb10/Srb11 του σακχαρομύκητα και το ομόλογό του στα θηλαστικά cdk8/cyclin E, φωσφορυλιώνοντας την καρβοξυτελική ουρά της μεγάλης υπομονάδας της RNA πολυμεράσης II στις σερίνες 2 και 5, δεν επιτρέπει τη φωσφορυλίωση της σερίνης 5 από το TFIIH. Η cdk8/cyclin E δρα πριν από το σχηματισμό του συμπλόκου προ-έναρξης, και αποκλείει τη συγκρότησή του, γεγονός που οδηγεί σε μεταγραφική καταστολή (Maldonado, Hampsey et al. 1999). Εναλλακτικά, το διμερές cdk8/cyclin E μπορεί να φωσφορυλιώσει τις α-έλικες στις αμινο- και καρβόξυ-τελικές περιοχές υπομονάδας cdk7/cyclin H του TFIIH, με συνέπεια να καταστέλλεται η ενεργότητα κινάσης του TFIIH και επομένως η μεταγραφή (Akoulitchev, Chuiikov et al. 2000). Τέλος, έχει δειχθεί σε κύτταρα σακχαρομύκητα ότι το Srb10/Srb11 φωσφορυλιώνει το μεταγραφικό παράγοντα Gcn4 και τον οδηγεί σε αποικοδόμηση μέσω του συστήματος της ουμπικουιλίνης. Το ολοένζυμο της RNA

πολυμεράσης II έχει την ικανότητα να αυτορυθμίζεται μέσω των συστατικών του, επιτρέποντας στο κύτταρο να αναπτύξει μηχανισμούς πολλαπλού ελέγχου της μεταγραφής, αφού έτσι μπορεί να καταστείλει ακόμα και τα βασικά επίπεδα της. Επομένως, παράγεται μετάγραφο, μόνο κατόπιν ενεργοποίησης του υποκινητή από κάποιο εξωκυττάριο ή ενδοκυττάριο σήμα.

Υπάρχουν, επίσης και καταστολείς, οι οποίοι μπορούν να δρουν με διαφορετικούς μηχανισμούς ανάλογα με τον υποκινητή στον οποίο βρίσκονται. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το ρετινοβλάστωμα (RB). Αυτό καταστέλλει τον MLP υποκινητή του αδενοϊού και τον υποκινητή της κυκλίνης E στρατολογώντας απακετυλάσες των ιστονών και συγκεκριμένα την HDAC 1, ενώ αντίθετα, ο υποκινητής της κινάσης της θυμιδίνης και ο ενισχυτής του SV40 δεν εξαρτώνται από την HDAC 1, παρά τη δέσμευση του RB στον υποκινητή (Brehm, Miska et al. 1998; Luo, Postigo et al. 1998). Πρόσφατα, βρέθηκε ότι το ρετινοβλάστωμα αλληλεπιδρά με τη μεθυλ-τρανσφεράση των ιστονών Suv39H1, η οποία βρίσκεται σε ετεροχρωματινικές περιοχές και συμβάλλει στη μεταγραφική καταστολή. Επιπλέον, σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης κυττάρων HeLa, δείχθηκε ότι το σύμπλοκο E2F-Rb-Suv39H1 μπορεί να καταστέλλει ένα E2F/TK-οδηγούμενο υποκινητή (Vandel, Nicolas et al. 2001). Επίσης, το σύμπλοκο SSN6/TUP1 καταστέλλει τη μεταγραφή και μέσω απευθείας αλληλεπίδρασης με ενεργοποιητές όπως ο GAL4, αλλά και μέσω αλληλεπίδρασης με τη γενική μεταγραφική μηχανή, όπως δείχτηκε με γενετική ανάλυση στο σακχαρομύκητα, όπου ταυτοποιήθηκαν πρωτεΐνες να τροποποιούν τη δράση του SSN6/TUP1, όπως οι Srb8/9/10/11 (Smith and Johnson 2000). Το Krüppel έχει δειχθεί ότι μπορεί να αλληλεπιδρά με το γενικό μεταγραφικό παράγοντα TFIIIE (Sauer, Fondell et al. 1995), ενώ το YY1 ασκεί τη δράση του είτε με αλληλεπίδραση με κάποιο μεταγραφικό ενεργοποιητή (Galvin and Shi 1997), είτε στρατολογώντας τον συν-καταστολέα RPD3 (Yang, Inouye et al. 1996), είτε επιδρώντας στη δομή του DNA του υποκινητή του γονιδίου c-fos (Natesan and Gilman 1993).

### **Οικογένεια ETS πρωτεϊνών**

Η συντονισμένη δράση των μεταγραφικών ενεργοποιητών και καταστολέων είναι αυτή που επιτρέπει την ομαλή ανάπτυξη και διαφοροποίηση

του κυττάρου. Το κύτταρο έχει αναπτύξει τους παραπάνω μηχανισμούς μεταγραφικής καταστολής, προκειμένου να ικανοποιήσει τις απαιτήσεις όλων των υποκινητών και να επιτύχει τη σωστή ιστό-ειδική και χρόνο-ειδική έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων ή ομάδων γονιδίων.

Σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό και την αύξηση των κυττάρων παίζουν οι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας ETS. Το πρώτο γονίδιο της οικογένειας των ETS γονιδίων που ταυτοποιήθηκε ήταν το *v-ets* του ιού της λευχαιμίας των πτηνών E26 (avian leukemia virus) (Leprince, Gegonne et al. 1983; Nunn, Seeburg et al. 1983). Στη συνέχεια κλωνοποιήθηκαν και κυτταρικά ETS γονίδια που σήμερα ο αριθμός τους πλησιάζει τα 50. Το χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών αυτών είναι μία συντηρημένη αλληλουχία 85 αμινοξέων που προσδένεται στο DNA (ETS-binding domain, EBD), στην αλληλουχία GGAA/T (ETS-binding site, EBS) και έχει τη δομή έλικας-στροφής-έλικας □ ADDIN ENRfu □□(Werner, Clore et al. 1995)□. Οι γειτονικές αλληλουχίες του DNA προσδίδουν ειδικότητα στην αλληλεπίδραση των ETS παραγόντων με συγκεκριμένους υποκινητές. Ακόμα, η ικανότητα πρόσδεσης της EBD τροποποιείται μέσω αλληλεπίδρασης με άλλες περιοχές των ETS πρωτεϊνών. Αυτό εμποδίζει το ανεξέλεγκτο δέσιμο των πολλαπλών ETS πρωτεϊνών στους υποκινητές, προσφέροντας μέρος της εξειδίκευσης της δράσης κάθε μέλους της οικογένειας, που δεν παρέχεται από τις συντηρημένες EBDs, οι οποίες αναγνωρίζουν παρόμοιες αλληλουχίες.

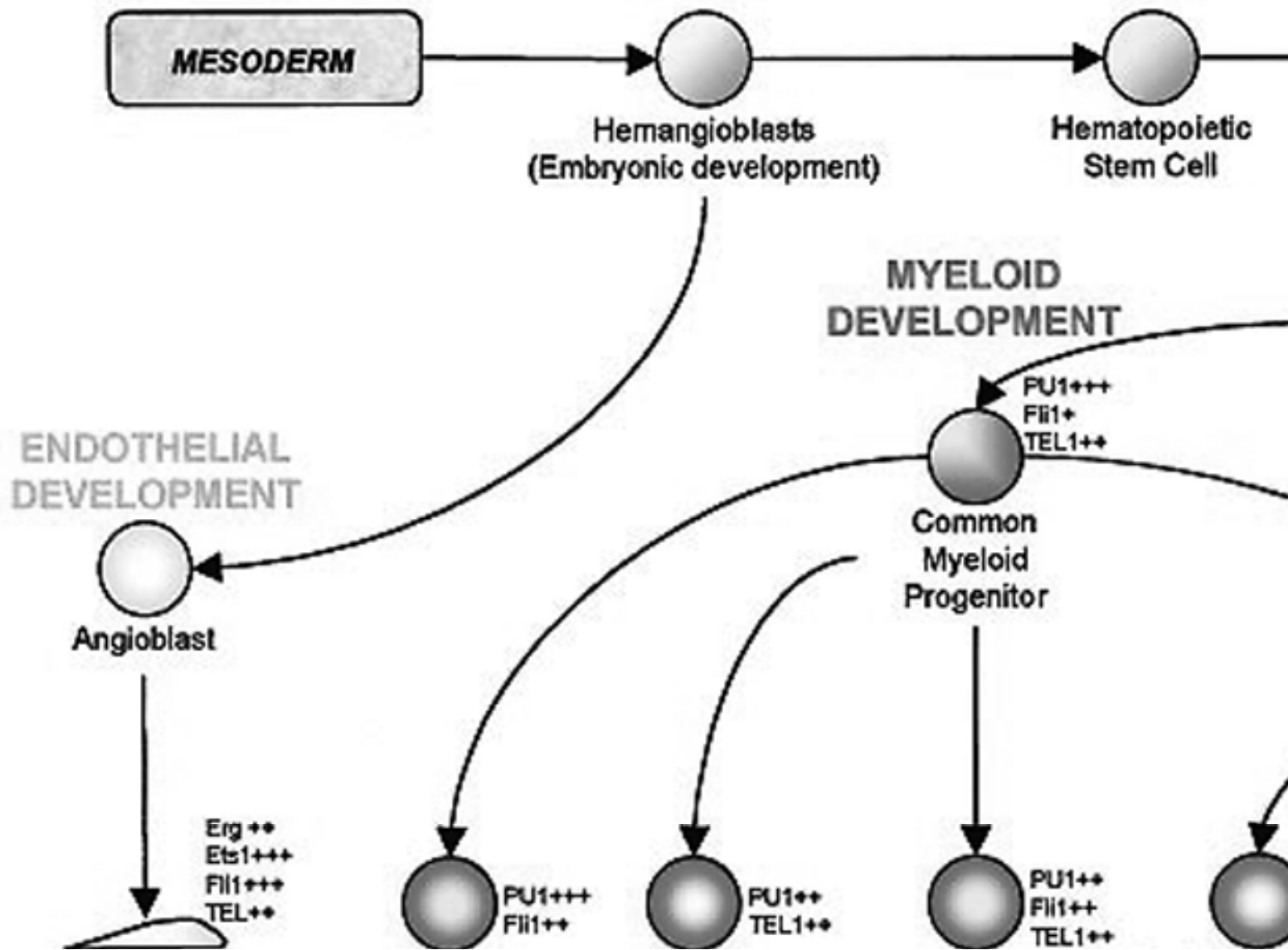
Οι ETS πρωτεΐνες είναι κάποιοι από τους τελικούς αποδέκτες στον πυρήνα της σηματοδότησης από το Ras/MAPK μονοπάτι □ ADDIN ENRfu □□(Wasylyk, Hagman et al. 1998)□. Η φωσφορυλίωσή τους από τις MAPK κινάσες ρυθμίζει τη δράση τους, τις πρωτεΐνες με τις οποίες θα αλληλεπιδράσουν, τον υποκινητή στον οποίο θα προσδεθούν και τον υποκυτταρικό τους εντοπισμό. Διαμέσου των μονοπατιών που ενεργοποιούνται από το Ras και της μεταξύ τους επικοινωνίας, οι ETS πρωτεΐνες λαμβάνουν εξωκυτταρικά σήματα και τα μεταφέρουν στον πυρήνα του κυττάρου, ρυθμίζοντας την αντίδραση του στα εκάστοτε ερεθίσματα. Έτσι έχει δειχθεί ότι οι πρωτεΐνες της οικογένειας ETS παίζουν ρόλο στον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, τη μετανάστευση, την απόπτωση καθώς και στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του επιθηλίου και του μεσεγχύματος. Οι ιδιότητες τους

αυτές, κάνουν τις ETS πρωτεΐνες μόρια πρωτεύοντος σημασίας στη βιολογία του καρκίνου, καθώς σε κυτταρικό επίπεδο προωθούν τον πολλαπλασιασμό και επίσης συμβάλλουν στην επέκταση του όγκου προωθώντας την αγγειογένεση και τη μετάσταση. Για αυτό το λόγο, διερεύνηση της ρύθμισης και του μηχανισμού δράσης των ETS πρωτεϊνών μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στην κατανόηση όχι μόνο θεμελιακών βιολογικών μηχανισμών, αλλά και των μηχανισμών ανάπτυξης των νεοπλασιών.

Οι ETS πρωτεΐνες παίζουν κύριο ρόλο στην αιμοποίηση και στη διαφοροποίηση, τόσο των ερυθροκυττάρων, όσο και των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Χρησιμοποιώντας μεθοδολογία στοχευμένης έλλειψης γονιδίων σε ποντίκια (knockout mouse models), βρέθηκε ότι η έλλειψη της πρωτεΐνης PU.1 έδειξε τις πιο σοβαρές διαταραχές στην ανάπτυξη του αιμοποιητικού συστήματος □ ADDIN ENRfu □□(Scott, Simon et al. 1994; McKercher, Torbett et al. 1996)□. Καταρχήν, στο πρώτο knockout, το ποντίκι πέθαινε κατά την εμβρυική ζωή, ενώ στο δεύτερο ζούσε για 48 ώρες μετά τη γέννα (με χρήση αντιβιοτικών ζούσε για περίπου 17 μέρες). Συγκεκριμένα, τα ποντίκια παρουσίασαν ανώμαλη μορφολογία των B κυττάρων και των μακροφάγων και ανώμαλη T-λεμφοποίηση. Επίσης, δεν παράχθηκαν λειτουργικά ουδετερόφιλα και παρατηρήθηκε μειωμένος αριθμός ώριμων ερυθροκυττάρων. Με τη στρατηγική των knockout ποντικίων αποκαλύφθηκε και ο ρόλος του Ets1 στην αιμοποίηση και συγκεκριμένα στη παραγωγή ώριμων T και B λεμφοκυττάρων και NK κυττάρων □ ADDIN ENRfu □□(Bories, Willerford et al. 1995; Muthusamy, Barton et al. 1995)□. Ο Ets1 φαίνεται ότι είναι σημαντικός στην επιβίωση και την ωρίμανση των T κυττάρων και στη διατήρηση ανενεργών T κυττάρων στη Go φάση του κυτταρικού κύκλου, όπου και η έκφρασή του είναι υψηλή, ενώ αντίθετα κατά την ενεργοποίησή τους, η έκφρασή του μειώνεται. Η απουσία του Ets1 οδηγεί τα T κύτταρα σε απόπτωση. Στα B κύτταρα, ο Ets1 εμποδίζει τη διαφοροποίησή τους σε πλασματοκύτταρα, ρυθμίζει δηλαδή και σε αυτή την περίπτωση την ωρίμανση και ενεργοποίησή τους. Ο Ets2 έχει την ακριβώς αντίθετη δράση στα T κύτταρα, δηλαδή δεν εκφράζεται σε ανενεργά T κύτταρα, ενώ η έκφρασή του αυξάνεται πολύ κατά την ενεργοποίησή τους □ ADDIN ENRfu □□(Bhat, Fisher et al. 1987)□. Ωστόσο, τα πιο σοβαρά ελαττώματα σε Ets2 knockout ποντίκια είχαν να κάνουν με εξωεμβρυικούς

ιστούς, όπως την ανάπτυξη του τροφοεκτοδέρματος, με αποτέλεσμα το έμβρυο, μην μπορώντας να τραφεί, να πεθαίνει (Yamamoto, Flannery et al. 1998)□. Παράλληλα, στην επιβίωση και ενεργοποίηση των B και T κυττάρων συμβάλλει και ένα άλλο μέλος της ETS οικογένειας, ο Fli1. Σε ανενεργά T κύτταρα εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα, ενώ ύστερα από ενεργοποίησή τους μειώνεται η έκφρασή του, όπως συμβαίνει και με το Ets1. Αντίθετα, στα B κύτταρα η έκφρασή του αυξάνεται όταν αυτά διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα. Επίσης, ο Fli1 παίζει ιδιαίτερο ρόλο στην μεγακαρυοποίηση, που οδηγεί στη δημιουργία των αιμοπεταλίων. Το Fli1 knockout ποντίκι παρουσίασε έντονη αιμορραγία στον εγκέφαλο, αλλά και μειωμένο αριθμό αρχέγονων ερυθροκυττάρων □ ADDIN ENRfu □□(Spyropoulos, Pharr et al. 2000)□, ενώ υπερέκφραση του σε K562 κύτταρα προάγει τη διαφοροποίηση των μεγακαρυοκυττάρων □ ADDIN ENRfu □□(Athanasίου, Clausen et al. 1996)□. Ακόμα, η απουσία του Tel1, ενός μεταγραφικού καταστολέα της οικογένειας ETS, οδηγεί σε ανώμαλη ανάπτυξη των T και B λεμφοκυττάρων. Συγκεκριμένα, η απουσία του έχει ως αποτέλεσμα την επανεγκαθύδριση της αιμοποίησης στα ενήλικα άτομα από το συκώτι στο μυελό των οστών □ ADDIN ENRfu □□(Wang, Swat et al. 1998)□. Σημαντικό ρόλο όμως παίζει και στην ανάπτυξη αγγειακού δικτύου στο λεκιθικό σάκο του εμβρύου και έλλειψή του οδηγεί τελικά στο θάνατο □ ADDIN ENRfu □□(Maroulakou and Bowe 2000)□. Στη διαδικασία της αγγειογένεσης συμβάλλει και ο Ets1, αφού η έκφρασή του είναι αυξημένη στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα του εμβρύου και στα αιμοφόρα αγγεία του ενήλικα κατά την αγγειογένεση □ ADDIN ENRfu □□(Wernert, Raes et al. 1992)□. Γενικότερα, ο Ets1 εκφράζεται στα κύτταρα του μεσοδέρματος, γεγονός που υποδηλώνει ότι μπορεί να παίζει ρόλο στην αγγειακή οργάνωση □ ADDIN ENRfu □□(Maroulakou and Bowe 2000)□. Όπως φαίνεται από τα παραπάνω, οι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας ETS συντονίζουν τη δράση τους για την ανάπτυξη και διαφοροποίηση του αιμοποιητικού ιστού και πολλές φορές τα πρότυπα έκφρασής τους αλληλοεπικαλύπτονται, δημιουργώντας ένα ανώτερο επίπεδο πολυπλοκότητας στη ρύθμισή τους. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται η ανάπτυξη του αιμοποιητικού ιστού και των ενδοθηλιακών κυττάρων και σε ποια σημεία ρυθμίζονται αυτές οι διαδικασίες από ETS πρωτεΐνες.

Επιπλέον, οι πρωτεΐνες της οικογένειας ETS μπορούν να ενεργοποιούν πρωτεάσες που αποικοδομούν τη μεσοκυττάρια ουσία και οδηγούν σε



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση της ανάπτυξης του αιμοποιητικού ιστού και των ενδοθηλιακών κυττάρων (Maroulakou, 2000).

αναδιαμόρφωσή της, καθώς και μόρια όπως οι ιντεγκρίνες, οι καδερίνες και μόρια πρόσφυσης μεταξύ των κυττάρων παίζοντας έτσι ρόλο στην κυτταρική μετανάστευση (Lelievre, Lionneton et al. 2001). Οι ETS πρωτεΐνες ρυθμίζουν την έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών της μεσοκυττάριας ουσίας (matrix metalloproteinases, MMPs) και με αυτό τον τρόπο επιτρέπουν στα κύτταρα να μεταναστεύσουν. Τα καρκινικά κύτταρα μεταναστεύουν αποικοδομώντας τη μεσοκυττάρια ουσία, υπερεκφράζοντας τις μεταλλοπρωτεϊνάσες και συγχρόνως χάνουν την ικανότητα πρόσφυσης μεταξύ τους. Οι ETS μεταγραφικοί παράγοντες ρυθμίζουν και τις δύο αυτές κατηγορίες μορίων, οπότε απορύθμισή τους οδηγεί σε μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων (Trojanowska 2000). Σε συνδυασμό με το γεγονός ότι κάποια μέλη προωθούν την αγγειογένεση, είναι φανερό ότι οι ETS πρωτεΐνες συμβάλλουν σημαντικά στην ανάπτυξη και επέκταση του όγκου. Επίσης, αυξημένη έκφραση μεταλλοπρωτεϊνών έχει αναφερθεί σε αυτοάνοσες ασθένειες, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα και οστεοαρθρίτιδα. Ανώμαλη έκφραση της πρωτεΐνης Ets2 έχει παρατηρηθεί στη ρευματοειδή αρθρίτιδα, ενώ στο συστημικό ερυθεματώδη λύκο και στο σύνδρομο του Sjorgen, τόσο η Ets2 όσο και το Fli1 δεν παρουσιάζουν το φυσιολογικό πρότυπο έκφρασής τους (Trojanowska 2000). Σε φυσιολογικές καταστάσεις, αναδιοργάνωση της εξωκυττάριας ουσίας και αύξηση στην παραγωγή μεταλλοπρωτεϊνών συμβαίνει στο μηχανισμό επούλωσης των τραυμάτων. Μελέτες έχουν δείξει αυξημένη έκφραση του Ets1 και της κολλαγενάσης 1 σε ινοβλάστες και ενδοθηλιακά κύτταρα, στα πρώτα στάδια της επούλωσης του έλκους του στομάχου (Ito, Nakayama et al. 1998).

Οι ETS μεταγραφικοί παράγοντες είναι σημαντικοί ρυθμιστές βασικών αναπτυξιακών μηχανισμών, όπως η αιμοποίηση και η οστεογένεση. Επιπλέον, υπερέκφραση των ETS πρωτεϊνών και ανασυνδυασμός ETS γονιδίων έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη όγκων σε ανθρώπους. Είναι, λοιπόν, απαραίτητο να διαλευκανθούν οι μηχανισμοί δράσης των μελών της οικογένειας, οι πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρούν, καθώς και γονίδια-στόχοι. Μελέτη περισσότερο του δικτύου των ETS πρωτεϊνών, παρά ενός μόνο μέλους, σε μοντέλα ποντικών, θα αποκαλύψει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μελών της οικογένειας και τις



λειτουργικές αλληλοεπικαλύψεις μεταξύ τους και θα παρέχει σαφέστερη εικόνα για τη φυσιολογία τους.

### **Μεταγραφικοί καταστολείς της οικογένειας ETS**

Οι περισσότερες από τις γνωστές ETS πρωτεΐνες είναι μεταγραφικοί ενεργοποιητές, ωστόσο τα τελευταία χρόνια έχουν ανακαλυφθεί και καταστολείς. Ο πρώτος καταστολέας που βρέθηκε είναι ο *yap* στη *Drosophila* (O'Neill, Rebay et al. 1994). Αυτό που είναι γνωστό για το *yap* είναι ότι ρυθμίζει αρνητικά τη διαφοροποίηση του R7 φωτοϋποδοχέα στο μάτι της *Drosophila* καθώς επίσης και τα μονοπάτια του FGF και EGF. Στο αναπτυσσόμενο μάτι της *Drosophila* ο *yap* είναι παρών σε όλα τα αδιαφοροποίητα κύτταρα και η έκφρασή του πέφτει όσο τα κύτταρα διαφοροποιούνται (Mavrothalassitis and Ghysdael 2000). Ο *yap* ρυθμίζεται μέσω φωσφορυλίωσης όταν ενεργοποιείται ο υποδοχέας κινάσης της τυροσίνης, οπότε και εξέρχεται από τον πυρήνα και αποικοδομείται στο κυτταρόπλασμα (Rebay and Rubin 1995). Έχει δειχθεί με παροδική διαμόλυνση σε κυτταροκαλιέργειες ότι ανταγωνίζεται τη δράση ενός ETS ενεργοποιητή, του Pointed-P2 (O'Neill, Rebay et al. 1994), αλλά δεν είναι τίποτα περισσότερο γνωστό σχετικά με την κατασταλτική περιοχή της πρωτεΐνης και το μηχανισμό της μεταγραφικής καταστολής. Έτσι, όταν το *yap* φωσφορυλιώνεται, το Pointed-P2 μπορεί να ενεργοποιήσει τα γονίδια-στόχους του, παρέχοντας ένα δυαδικό σύστημα ρύθμισης, όπου ένας ενεργοποιητής παίρνει τη θέση ενός καταστολέα και αποκαταστέλλει τα γονίδια-στόχους, υπό την επίδραση του ίδιου σήματος.

Ο NET (Giovane, Pintzas et al. 1994) είναι ένας ETS μεταγραφικός καταστολέας των θηλαστικών (Maira, Wurtz et al. 1996), ο οποίος μπορεί και σχηματίζει τριμερή σύμπλοκα με το DNA και τον παράγοντα απόκρισης στον ορό (Serum Response Factor, SRF). Ο NET περιέχει δύο ξεχωριστές και αυτόνομες περιοχές με κατασταλτική δράση. Η μία από αυτές έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά με το συν-καταστολέα CtBP, ο οποίος με τη σειρά του στρατολογεί στον υποκινητή απακετυλάσες των ιστονών και συγκεκριμένα την HDAC 1 (Cricqui-Filipe, Ducret et al. 1999). Για την άλλη περιοχή δεν είναι ακόμη γνωστό με ποιες πρωτεΐνες αλληλεπιδρά, προκειμένου να ασκήσει κατασταλτική δράση. Ωστόσο, ύστερα από φωσφορυλίωση από MAPKs, ο NET μπορεί να ενεργοποιήσει τα

γονίδια-στόχους του, παρέχοντας ένα μηχανισμό άμεσης αλλαγής δράσης κάτω από την επίδραση ενός εξωκυτταρικού μηνύματος, ασκώντας πολύ αυστηρή ρύθμιση στους υποκινητές-στόχους.

Παρόμοια συμπεριφορά έχει και ένα άλλο μέλος των ETS γονιδίων, που επίσης σχηματίζει τριμερή σύμπλοκα με το DNA και το SRF, ο Elk-1. Ο Elk-1 ταυτοποιήθηκε αρχικά ως μεταγραφικός ενεργοποιητής της οικογένειας ETS (Rao and Reddy 1992) και η δράση του επάγεται ύστερα από φωσφορυλίωσή του από τις MAPK κινάσες. Τελευταία, δείχθηκε ότι ο Elk-1, μέσω της EBD μπορεί να αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο mSin3A/HDAC 1 στον υποκινητή το γονιδίου c-fos, με αποτέλεσμα την καταστολή της έκφρασής του (Yang, Vickers et al. 2001). Συγκεκριμένα, ταυτοποιήθηκε μία κατασταλτική περιοχή στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης, η οποία αποτελεί και την ETS-δεσμευόμενη περιοχή και μέσω αυτής αλληλεπιδρά με το συν-καταστολέα mSin3A. Η αλληλεπίδραση αυτή λαμβάνει χώρα 30 λεπτά μετά την επίδραση του EGF και διατηρείται τουλάχιστον για 1h, χρόνος που συμπίπτει με την ενεργοποίηση (στα πρώτα 30 λεπτά) και εν συνεχεία καταστολή του c-fos. Έτσι, ο Elk-1 είναι πιθανό να ενεργοποιεί και να καταστέλλει c-fos, ύστερα από την επίδραση του ίδιου σήματος και του μονοπατιού της ERK κινάσης. Το ερώτημα που χρειάζεται απάντηση είναι αν ο Elk-1 καταστέλλει και τα βασικά επίπεδα μεταγραφής του c-fos, χωρίς δηλαδή να είναι φωσφορυλιωμένος.

Ο TEL είναι μία από τις λίγες ETS πρωτεΐνες που είναι γνωστό ότι ενέχονται σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες και η μόνη από αυτές που έχει δράση μεταγραφικού καταστολέα. Ο TEL περιέχει την περιοχή Pointed, η οποία είναι απαραίτητη για τον ολιγομερισμό του και χωρίς αυτή δεν μπορεί να ασκήσει την κατασταλτική του δράση (Lopez, Carron et al. 1999), (Kim, Phillips et al. 2001). Επίσης απαραίτητη για τη δράση του είναι και η κεντρική περιοχή της πρωτεΐνης, η οποία είναι υπεύθυνη για την in vivo πρόσδεση των συν-καταστολέων N-coR, mSin3A και SMRT. Αυτοί στη συνέχεια, στρατολογούν στον εκάστοτε υποκινητή απακευλάσες των ιστονών (Chakrabarti and Nucifora 1999; Fenrick, Amann et al. 1999) (Guidez, Petrie et al. 2000).

Ο ERF είναι ο πρώτος μεταγραφικός καταστολέας της οικογένειας ETS που κλωνοποιήθηκε στα θηλαστικά (Sgouras, Athanasiou et al. 1995). Εκτός από τη συντηρημένη ETS-δεσμευόμενη περιοχή, ο ERF δεν περιέχει άλλη

ομόλογη περιοχή με κάποια ETS πρωτεΐνη. Είναι μία πρωτεΐνη 548 αμινοξέων και το mRNA εκφράζεται σε όλα τους ιστούς που έχουν ελεγχθεί (Liu, Papanicolaou et al. 1997). Επίσης, τα επίπεδα της πρωτεΐνης παραμένουν σταθερά σε όλα τα στάδια του κυτταρικού κύκλου, οπότε η δράση και η έκφρασή της ρυθμίζεται από ένα μηχανισμό διαφορετικό από την αποικοδόμηση. Αυτό που αλλάζει κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου είναι τα επίπεδα φωσφορυλίωσής του. Στη φάση Go του κυτταρικού κύκλου δεν είναι φωσφορυλιωμένος, ενώ κατά την είσοδο στη G1 φάση είναι έντονα φωσφορυλιωμένος, όπως και κατά τη μετάβαση από τη G2 στην M φάση (Sgouras, Athanasiou et al. 1995). Η κεντρική περιοχή της πρωτεΐνης περιέχει έξι δυνητικές θέσεις φωσφορυλίωσης από την Erk κινάση, ενώ μία έβδομη βρίσκεται και στην κατασταλτική περιοχή. Έτσι, ύστερα από ενεργοποίηση του παραπάνω μονοπατιού, ο ERF φωσφορυλιώνεται σε αυτές τις θέσεις, εξέρχεται από τον πυρήνα και παραμένει στο κυτταρόπλασμα (Le Gallic, Sgouras et al. 1999). Τα παραπάνω αποτελούν ενδείξεις ότι ο ERF ίσως να ρυθμίζει γονίδια που προωθούν ή αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο, αλλά και ότι και η δράση του ρυθμίζεται από τον κυτταρικό κύκλο. Ισχυροποιούνται δε από αδημοσίευτα αποτελέσματα ότι η καταστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων μέσω του ERF απαιτεί αγρίου τύπου Rb και αποκαταστέλλεται μέσω υπερέκφρασης κυκλινών. Η λειτουργία του ERF ρυθμίζεται από το Ras/Erk μονοπάτι και μπορεί να αναστρέψει το μετασχηματισμένο φαινότυπο κυττάρων που εκφράζουν το ογκογονίδιο του ιού E26 gag-myb-ets (Sgouras, Athanasiou et al. 1995), ενώ μία μεταλλαγμένη μορφή του που εντοπίζεται μονίμως στον πυρήνα, αναστρέφει και το φαινότυπο κυττάρων μετασχηματισμένων από συνεχώς ενεργοποιημένο Ras, ενώ συγχρόνως σταματάει τα κύτταρα στη φάση Go του κυτταρικού κύκλου (Le Gallic, Sgouras et al. 1999).

Η περιοχή με την κατασταλτική δράση της πρωτεΐνης έχει εντοπιστεί στο καρβόξυ-τελικό άκρο της και δεν περιέχει κάποια χαρακτηριστική, για το μηχανισμό της καταστολής, αλληλουχία. Η περιοχή αυτή αποτελείται από 58 αμινοξέα και μπορεί αυτόνομα να καταστείλει τη μεταγραφή, αφού μεταφορά της σε περιοχές που δεσμεύονται στο DNA άλλων πρωτεϊνών-ενεργοποιητών (GAL4, Fli1, NFκB, Myc, Ets1) προσδίδει σε αυτές τις πρωτεΐνες κατασταλτικές ιδιότητες (Sgouras, Athanasiou et al. 1995). Επίσης, σύντηξη της κατασταλτικής

και της ενδιάμεσης ρυθμιστικής περιοχής στην περιοχή που δεσμεύεται στο DNA του Fli1 αναστρέφει το νεοπλασματικό φαινότυπο ποντικών που πάσχουν από σάρκωμα Ewing (Athanasίου, LeGallic et al. 2000). Η κατασταλτική ικανότητα του ERF φαίνεται ότι ρυθμίζεται από φωσφορυλίωση της θρεονίνης 526, της μοναδικής θέσης φωσφορυλίωσης που υπάρχει στην κατασταλτική περιοχή, αφού όταν μεταλλάσσεται σε γλουταμικό οξύ αυτή χάνεται χωρίς να αλλάζει ο υποκυτταρικός εντοπισμός του ERF (Sgouras, Athanasίου et al. 1995; Le Gallic, Sgouras et al. 1999).

Ο σκοπός της παρούσης μελέτης είναι να διασαφηνιστεί ο μηχανισμός με τον οποίο ο ERF καταστέλλει τα γονίδια-στόχους του. Με άλλα λόγια με ποιες πρωτεΐνες αλληλεπιδρά στον πυρήνα και ποια αμινοξέα είναι υπεύθυνα για αυτές τις αλληλεπιδράσεις. Ο ρόλος του ERF στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, αλλά και το γεγονός ότι αυτός ρυθμίζεται από ένα ισχυρό μιτογόνο μονοπάτι όπως το Ras και ότι μπορεί να αναστρέφει το φαινότυπο μετασχηματισμένων κυττάρων σε φυσιολογικά, τον καθιστά ένα άμεσο στόχο για γονιδιακή θεραπεία. Αποκάλυψη του μηχανισμού καταστολής, αλλά και των γονιδίων-στόχων του μπορεί να επιταχύνει αυτές τις προσπάθειες.

# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

**Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα από βακτηριακά στελέχη E. coli.**

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του χλωριούχου καισίου όπως περιγράφεται στους Maniatis et al, 1982.

**Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.**

Η πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες πραγματοποιήθηκε κατά Maniatis et al, 1982

**Παροδική διαμόλυνση πλασμιδίων σε καλλιέργειες ευκαρυωτικών κυττάρων.**

**A) Κύτταρα HeLa.**

Η παροδική διαμόλυνση των κυττάρων HeLa πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του φωσφορικού ασβεστίου.

1.  $10^5$  κύτταρα ανά πηγάδι 35 mM (well) μεγαλώνουν σε πλήρες θρεπτικό υλικό (DMEM+10% ορός βοδιού+1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη)
2. Την επόμενη μέρα αλλάζεται το θρεπτικό υλικό και προστίθενται 3 ml πλήρους θρεπτικού υλικού εμπλουτισμένου με 10% HEPES pH 7, 1-4 ώρες πριν τη διαμόλυνση
3. Τα δείγματα προετοιμάζονται ως εξής: 3μg συνολικού πλασμιδιακού DNA αναμιγνύονται με νερό ώστε ο τελικός όγκος να είναι 75 μl. Προστίθενται άλλα 75 μl 0.5M προσφάτως παρασκευασμένου χλωριούχου ασβεστίου και το μείγμα προστίθεται σε 150 μl παγωμένου διαλύματος H. Η διαδικασία γίνεται ως εξής: σε 150 μl μίγματος DNA και χλωριούχου ασβεστίου προστίθενται στάγδην σε 150 μl παγωμένου διαλύματος H, που βρίσκονται σε ένα πηγάδι ενός 48-well plate.
4. Το ίζημα αφήνεται να σχηματιστεί για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθεται στάγδην στα κύτταρα.

5. Ύστερα από 4 ώρες αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και προστίθεται 1 ml διαλύματος 15% γλυκερόλης σε HBSS για 100 sec. Τα κύτταρα ξεπλένονται για 1 λεπτό με 2 ml πλήρους θρεπτικού και τελικά προστίθενται 3 ml πλήρους θρεπτικού υλικού και τα κύτταρα αφήνονται να μεγαλώσουν για 40 ώρες.

## **B) Κύτταρα Ref1**

$10^5$  κύτταρα διαμολύνονται με 1 μg συνολικού πλασμιδιακού DNA. Η παροδική διαμόλυνση των κυττάρων Ref1 πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της λιποφεκταμίνης κατά GIBCO.

## **Κατεργασία ευκαρυωτικών κυττάρων με τριχοστατίνη A**

Η κατεργασία, τόσο των HeLa, όσο και των Ref1 κυττάρων με τριχοστατίνη A πραγματοποιήθηκε 16 ώρες μετά τη διαμόλυνση και αυτή παρέμεινε στα κύτταρα για 14 ώρες.

## **Μάζεμα κυττάρων μετά τη διαμόλυνση**

Τόσο τα HeLa, όσο και τα Ref1 κύτταρα μαζεύτηκαν με τον εξής τρόπο:

1. Ξέπλυμα 2 φορές με 2 ml διαλύματος 1X PBS-0.5mM EDTA
2. Τα κύτταρα αφήνονται σε 1 ml διαλύματος 1X PBS-0.5mM EDTA για 1 περίπου λεπτό και, αφού αναμιγνύονται με πιπέτα πάνω-κάτω, μεταφέρονται σε σωληνάκια erpendorf.
3. Φυγοκέντρηση για μισό λεπτό.
4. Αφαίρεση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 100 μl διαλύματος λύσης (Promega).
5. Το διάλυμα αφήνεται στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για 20-30 λεπτά και μεταφέρεται κατευθείαν στους  $37^{\circ}\text{C}$  για ένα λεπτό, μέχρι να ξεπαγώσει το διάλυμα.
6. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό.
7. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε άλλο σωληνάκι erpendorf και μπορεί να διατηρηθεί στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## **Μέτρηση ενεργότητας λουσιφεράσης.**

Σε 10 μl του παραπάνω εκχυλίσματος κυττάρων προστίθενται 40 μl αντιδραστήριου λουσιφεράσης (Promega) και πραγματοποιείται μέτρηση αμέσως σε ειδικό όργανο (luminometer).

### **Μέτρηση ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης.**

Σε 40 μl από το κυτταρικό εκχύλισμα προστίθενται 550 μl διαλύματος αντίδρασης (reaction buffer), 100 μl διαλύματος ONPG (ο-νιτρο-φαινυλο-β-D-γαλακτο-πυρανοσίδιο, stock 4mg/ml) και 1.25 μl β-μερκαπτοαιθανόλης (stock 14.3M). Το διάλυμα αφήνεται στους 37 °C μέχρι να κιτρινίσει και η αντίδραση σταματάει με 200 μl διαλύματος 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Τέλος, μετρείται η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 420 nm.

### **Σύσταση διαλυμάτων:**

#### *Διάλυμα αντίδρασης β-GAL*

60mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

40mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

10mM KCl

1mM MgSO<sub>4</sub>

#### *Διάλυμα H*

38 ml H<sub>2</sub>O

10 ml 10X HBSS

2 ml HEPES pH 7

το pH ρυθμίζεται στο 7-7.1 με HCl

όλα τα διαλύματα είναι φιλτραρισμένα σε 0.22μm φιλτράκια.

#### *Διάλυμα 10X HBSS*

1.37M NaCl

0.05M KCl

0.007M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O

0.06 Δεξτρόζη

#### *Διάλυμα 15% γλυκερόλης σε HBSS*

5 ml διάλυμα H

3.5 ml αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O

1.5 ml γλυκερόλη

### **Απομόνωση και καθαρισμός της ανασυνδρασμένης πρωτεΐνης GAL4/RD.**

Κύτταρα E. coli ER2566 μεγαλώνουν σε 50 ml καλλιέργεια για ένα βράδυ, σε θρεπτικό 2XYT που περιείχε 1% γλυκόζη. Λόγω του γεγονότος ότι ο T7 υποκινητής του πλασμιδίου pTYB11 περιέχει και το οπερόνιο της λακτόζης, προσθήκη γλυκόζης στο θρεπτικό υλικό συνεισφέρει σε πιο αυστηρή ρύθμιση της έκφρασης της ανασυνδρασμένης πρωτεΐνης. Το επόμενο πρωί μέρος της καλλιέργειας εμβολιάζεται σε 1lt θρεπτικού υλικού και όταν η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος φτάνει την τιμή 0.8, προστίθεται 0.3mM IPTG. 4 ώρες μετά, τα κύτταρα μαζεύονται και κατεργάζονται ως εξής:

1. Φυγοκέντρηση 10 λεπτά, 5000 rpm, 4oC
2. Ξέπλυμα των κυττάρων 1 φορά με 40 ml παγωμένου διαλύματος 1X PBS και φυγοκέντρηση 10 λεπτά, 3800 rpm, 4 oC
3. Επαναδιάλυση των κυττάρων σε 40 ml παγωμένου column buffer που περιείχε 20μM PMSF.
4. 8 κύκλοι sonication των 15 δευτερολέπτων.
5. Προστίθεται 0.1% triton X-100 και το διάλυμα αφήνεται 20-30 λεπτά στον πάγο.
6. Φυγοκέντρηση 30 λεπτά, 10000 rpm, 4oC.
7. Στο μεταξύ 5 ml σφαιριδίων χιτίνης με εξισορροπούνται 5 φορές με 15 ml column buffer που περιέχει 20μM PMSF και 0.1% triton X-100, φυγοκεντρώντας 2 λεπτά στις 1500 rpm.
8. Στο υπερκείμενο από το βήμα 6 και προστίθενται τα 5 ml εξισορροπημένων σφαιριδίων χιτίνης. Το μίγμα αυτό αναδεύεται στους 4oC για ένα βράδυ.
9. Στη συνέχεια, τα σφαιρίδια “πακετάρονται” σε κολώνα και ξεπλένονται με 100 ml column buffer-0.1% triton x-100.
10. Προστίθενται 15 ml column buffer που περιέχει 50 mM DTT και αφήνονται να περάσουν από την κολώνα για 30-40 λεπτά και η κολώνα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου (23-25 °C) για 40-42 ώρες.
11. Τέλος, η κολώνα εκλούεται με 15 ml column buffer/0.1% triton x-100/20 μM PMSF και το διάλυμα μαζεύεται σε τμήματα του 1 ml.
12. Πραγματοποιείται διαπίδυση των τμημάτων που περιέχουν την πρωτεΐνη σε διάλυμα διαπίδυσης (dialysis buffer) για ένα βράδυ. Το διάλυμα αλλάζεται και η διαπίδυση συνεχίζεται για 6-8 ώρες ακόμη.
13. Η πρωτεΐνη συμπυκνώνεται σε centricon, με φυγοκέντρηση 5 ώρες, 7500 rpm, 4oC.

### **Σύσταση διαλυμάτων**

*Column buffer:*

20 mM Tris pH 8

500 mM NaCl

1 mM EDTA

*Dialysis buffer:*

1mM DTT

10 mM HEPES pH 7

20 mM KCl

10% γλυκερόλη



## **Ανάλυση EMSA (electrophoretic mobility shift assay)**

### Κατασκευή ανιχνευτή (probe)

Χρησιμοποιήθηκε ένα ολιγονουκλεοτίδιο 21 νουκλεοτιδίων, που περιέχει μία θέση πρόσδεσης για την GAL4-DNA binding domain (GAL4(DBD)). Ισομοριακές ποσότητες (2 pmoles) από τα δύο μονόκλινα και συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια αναμιγνύονται σε διάλυμα 50 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8 σε τελικό όγκο 40 μl και αφήνονται 3 λεπτά στους 95 °C. Μετά η θερμοκρασία αφήνεται να πέσει έτσι, ώστε να αναδιαταχθούν οι δύο κλώνοι του DNA. Η αντίδραση σήμανσης του ολιγονουκλεοτιδίου με ραδιενεργό [32]PCTP είναι η εξής (τελικός όγκος 60 μl):

2 pmoles ολιγονουκλεοτιδίου

125 μM μίγματος δεοξυνουκλεοτιδίων dATP, dTTP, dGTP (stock 1.25mM)

1 μl Klenow

4 μl [32]PCTP (20μCi/pmole ολιγονουκλεοτιδίου)

6 μl NEB1

### Αντίδραση πρόσδεσης

Η αντίδραση πρόσδεσης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης GAL4/RD στο ολιγονουκλεοτίδιο πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10 μl ως εξής:

2 μl ανασυνδυασμένου GAL4/RD

1 μl ραδιοσημασμένου ανιχνευτή

1 μl salomon sperm DNA (1 μg)

1 μl BSA (1 μg)

Το δείγμα που δεν περιέχει πρωτεΐνη, περιέχει 2 μl dialysis buffer.

Τα δείγματα επωάζονται για 30 λεπτά στον πάγο και ηλεκτροφορούνται σε 6% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης που περιέχει 0.5X διαλύματος TBE. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 120 V για 2 ώρες.

## **Ανοσοαποτύπωση (Western blot)**

Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη GAL4/RD ηλεκτροφορείται σε 14% αποδιατακτικό SDS-PAGE πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και ανιχνεύεται με αντίσωμα έναντι στην GAL4(DBD). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 135 V για 1.5 ώρα. Στη συνέχεια, η πρωτεΐνη μεταφέρεται σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης με τη μέθοδο

του electro-blotting. Η μεταφορά πραγματοποιείται σε 1.5 ώρα σε 0.8 mA/cm<sup>2</sup> πηκτώματος. Η μεμβράνη μπλοκάρεται για 1 ώρα με διάλυμα PBS-5% γάλα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά, προστίθεται το πρωτεΐον αντίσωμα α-GAL4 (ποντικού, Santa Cruz) σε συγκέντρωση 1/500 σε διάλυμα PBS-5% γάλα, για όλο το βράδυ σε θερμοκρασία 4 οC. Η μεμβράνη ξεπλένεται 4 φορές με PBS. Προστίθεται το δευτερεύον αντίσωμα α-mouse (KPL), συζευγμένο με HRPO, σε συγκέντρωση 1/10000 σε PBS-5% γάλα, για 1.5 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Η μεμβράνη ξεπλένεται 4 φορές με PBS και προστίθεται το αντιδραστήριο ECL (Amersham Pharmacia Biotech). Το φιλμ εκτίθεται από 5 δευτερόλεπτα μέχρι 5 λεπτά και ύστερα εμφανίζεται.

### **Απομόνωση πυρηνικού εκχυλίσματος πρωτεϊνών από κύτταρα HeLa**

1. 10<sup>8</sup> κύτταρα πλένονται 3 φορές με παγωμένο PBS/MgCl<sub>2</sub>, φυγοκεντρώντας 5' στις 1200 rpm.
2. Επαναδιάλυση των κυττάρων σε 4 όγκους κυτταρικού ιζήματος διαλύματος TED.
3. Το εναιώρημα των κυττάρων αφήνεται στον πάγο για 20 λεπτά και μετά προστίθεται 1 μl 0.1M PMSF ανά ml διαλύματος.
4. Ομογενοποίηση των κυττάρων σε γυάλινο ομογενοποιητή με έμβολο τύπου B.
5. Προσθήκη 4 όγκων διαλύματος TMSG.
6. Προσθήκη στάγδην 1 όγκου κορεσμένου διαλύματος θειικού αμμωνίου με ταυτόχρονη ανάδευση στον πάγο. Μετά την προσθήκη συνεχίζεται η ανάδευση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία 4 οC.
7. Φυγοκέντρηση 4 ώρες, 35000 rpm, 4οC
8. Το υπερκείμενο ογκομετρείται και προστίθενται 0.3gr στερεού θειικού αμμωνίου/ml υπερκείμενου, με ταυτόχρονη ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Προσθήκη 20 μl 1N NaOH/10 gr θειικού αμμωνίου και ανάδευση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία 4 οC.
10. Φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στις 14000 rpm, 4οC.
11. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε φρέσκο διάλυμα HKMEDG.

12. Διαπίδυση για ένα βράδυ σε θερμοκρασία 4oC έναντι 1lt του ίδιου διαλύματος. Αλλαγή διαλύματος και διαπίδυση για 6-8 ώρες επιπλέον.
13. Φυγοκέντρωση για 15 λεπτά, 12000 rpm, 4oC
14. Το πυρηνικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα διατηρείται στους –80 oC για 2- 4 μήνες.

### **Σύσταση διαλυμάτων**

#### *Διάλυμα TED*

- 10 mM Tris-HCL pH 7.9
- 1 mM EDTA
- 5 mM DTT
- 0.1 mM PMSF
- 2 µl/ml leupeptin, pepstatin, aprotinin

#### *Διάλυμα TMSG*

- 50 mM Tris-Hcl pH 7.9
- 10 mM MgCl<sub>2</sub>
- 25% σουκρόζη
- 50% γλυκερόλη
- 2 mM DTT
- 2 µl/ml leupeptin, pepstatin, aprotinin

#### *Διάλυμα HKMEGD*

- 20 mM HEPES pH 7.9
- 100 mM KCl
- 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 0.1 mM EDTA
- 17% γλυκερόλη
- 2 mM DTT
- 1 µg/ml leupeptin
- 0.1 mM PMSF
- 0.5 µg/ml aprotinin

# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

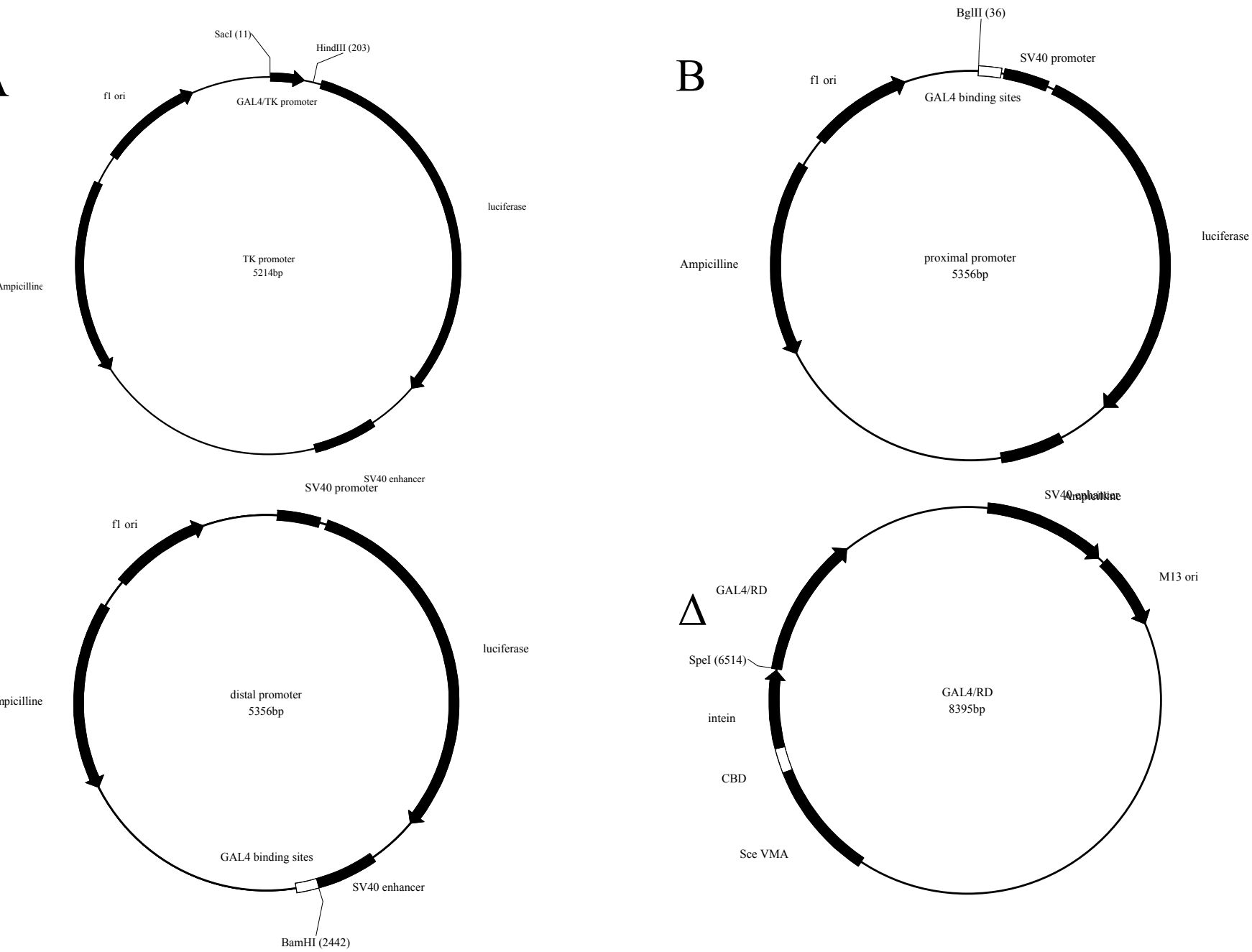
## 1. Επίδραση της τριχοστατίνης Α στην κατασταλτική δράση του ERF.

Ένας από τους γνωστούς μηχανισμούς μεταγραφικής καταστολής είναι η απακετυλίωση των ιστονών από τις HDACs. Η δράση των HDAC αναστέλλεται ειδικά από την τριχοστατίνη Α (TSA) (Yoshida, Horinouchi et al. 1995). Προκειμένου να διευκρινίσουμε αν ο ERF καταστέλλει τη μεταγραφή μέσω απακετυλίωσης των ιστονών πραγματοποιήθηκαν παροδικές διαμολύνσεις κυτταρικών σειρών με τον ERF ή την κατασταλτική του μόνο περιοχή (repression domain, RD) συντηγμένα με την περιοχή δέσμευσης στο DNA του GAL4 [GAL4 DNA-binding domain, GAL4(DBD)] μαζί με ένα γονίδιο-δείκτη της μεταγραφικής ενεργότητας, παρουσία ή απουσία της τριχοστατίνης Α. Ως γονίδιο-δείκτης της μεταγραφικής ενεργότητας χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της λουσιφεράσης. Πιθανή ευαισθησία στην TSA της κατασταλτικής δράσης του ERF αποτελεί ένδειξη ότι ο ERF καταστέλλει μέσω στρατολόγησης των απακετυλασών των ιστονών στους υποκινητές-στόχους του. Χρησιμοποιήθηκαν υβριδικές πρωτεΐνες μεταξύ του ERF και της GAL4(DBD), ώστε να μειωθεί η παρεμβολή των ενδογενών ETS πρωτεϊνών που μπορεί να δεσμεύονται στα EBS του πλασμιδίου-δείκτη και ανταγωνίζονται τη δέσμευση της EBD του ERF.

Προκειμένου να μελετηθεί αν ο ERF μπορεί να καταστείλει τη μεταγραφή ενός ελάχιστου υποκινητή, όπως αυτός της κινάσης της θυμιδίνης (TK promoter, περιέχει μόνο ένα CAAT στοιχείο και ένα TATA στοιχείο), ενσωματώθηκαν στο πλασμίδιο pGL3 enhancer 5 επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες πρόσδεσης στο DNA του GAL4, καθώς και ο προαναφερόμενος υποκινητής (εικόνα 3α). Το pGL3 enhancer περιέχει τον SV40 ενισχυτή αμέσως μετά το 3' άκρο του γονιδίου της λουσιφεράσης, κάτι που αυξάνει τα βασικά επίπεδα της μεταγραφής του γονιδίου και επιτρέπει την εύκολη ταυτοποίηση της κατασταλτικής δράσης. Ο τεχνητός υποκινητής GAL4/TK εντέθηκε στο 5' άκρο του γονιδίου της λουσιφεράσης. Συγκεκριμένα, το GAL4/TK κομμάτι κόπηκε με τα ένζυμα HindIII/SstI από το πλασμίδιο pG5Bluc και εντέθηκε στις αντίστοιχες θέσεις του πλασμιδίου pGL3 enhancer.

Προκειμένου, ακόμα, να μελετηθεί αν ο ERF καταστέλλει τη μεταγραφή και όταν προσδένεται μακριά από την περιοχή του υποκινητή της λουσιφεράσης, κατασκευάστηκαν δύο πλασμίδια που περιείχαν τις θέσεις πρόσδεσης στο DNA του GAL4 δίπλα στον SV40 υποκινητή (εικόνα 3β) και περίπου 3 kb πιο μακριά από αυτόν, δίπλα στον SV40 ενισχυτή (εικόνα 3γ). Το πλασμίδιο pGL3 control περιέχει τον SV40 υποκινητή στο 5' άκρο του γονιδίου της λουσιφεράσης και τον SV40 ενισχυτή 500 βάσεις μακριά από το 3' άκρο της λουσιφεράσης. Συγκεκριμένα, το κομμάτι που περιέχει την αλληλουχία του GAL4 που προσδένεται στο DNA αφαιρέθηκε από το πλασμίδιο pG5Bcat μετά από πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα HindIII/XbaI, και κατεργασία με Klenow για να παραχθούν τυφλά άκρα, και εντέθηκε στο πλασμίδιο pGL3 control στη θέση BglII, στη μία περίπτωση, και στη θέση BamHI στη δεύτερη, όπου επίσης είχε πραγματοποιηθεί κατεργασία με Klenow. Η θέση BglII βρίσκεται δίπλα στον υποκινητή, ενώ η θέση BamHI βρίσκεται ακριβώς δίπλα στον ενισχυτή. Στο εξής, η κατασκευή, όπου η αλληλουχία δέσμευσης στο DNA του GAL4 βρίσκεται δίπλα στον υποκινητή της λουσιφεράσης θα ονομάζεται proximal, ενώ η κατασκευή, όπου βρίσκεται κοντά στον ενισχυτή αλλά μακριά από τον υποκινητή θα ονομάζεται distal. Σύγκριση του SV40 με τον GAL4/TK υποκινητή, επιτρέπει, επιπλέον, να διαπιστώσουμε, αν η καταστολή από τον ERF παρουσιάζει ειδικότητα ως προς το είδος του υποκινητή.

Τα πλασμίδια αυτά χρησιμοποιήθηκαν σε τεχνικές παροδικής διαμόλυνσης κυτταρικών σειρών Ref1 και HeLa, μαζί με πλασμίδια που περιείχαν τη συντηγμένη πρωτεΐνη GAL4/ERF ή GAL4/RD ή τη GAL4 μόνη της, προκειμένου να μετρηθεί η μεταγραφική ενεργότητα (εικόνα 4). Ταυτόχρονα, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με ένα πλασμίδιο που περιέχει το γονίδιο β-GAL (παράγει β-γαλακτοσιδάση, η οποία μεταβολίζει το ONPG και παράγει προϊόν χρώματος κίτρινου) κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή RSV, για να μετρηθεί η ικανότητα των κυττάρων να διαμολυνθούν. Έτσι, πραγματοποιήθηκαν διαμολύνσεις 3 πλασμιδίων ταυτόχρονα: ενός που περιέχει το γονίδιο-δείκτη (λουσιφεράση), ενός πλασμιδίου έκφρασης των υπό μελέτη πρωτεϊνών (effector plasmid) (GAL4, GAL4/ERF, GAL4/RD) και του πλασμιδίου αναφοράς της β-γαλακτοσιδάσης (RSV-βGAL).



Εικόνα 3. Α,Β,Γ. Πλασμίδια που περιέχουν το γονίδιο-δείκτη της λουσιφεράσης και τις GAL4 αλληλουχίες πρόσδεσης σε διαφορετικά

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα χρησιμοποιώντας και τους τρεις διαφορετικούς υποκινητές, παρουσία ή απουσία της TSA. Διαμολύνθηκαν κυτταρικές σειρές Ref1 και HeLa με τη μέθοδο της λιποφεκταμίνης και του φωσφωρικού ασβεστίου, αντίστοιχα. Δεκαέξι ώρες μετά τη διαμόλυνση, έγινε κατεργασία των κυττάρων με τριχοστατίνη A και τα κύτταρα μαζεύτηκαν δεκατέσσερις ώρες αργότερα. Πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων και μέτρηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης και της β-γαλακτοσιδάσης. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται ο λόγος των διορθωμένων τιμών της ενεργότητας λουσιφεράσης του GAL4(DBD) προς την τιμή του αναφερόμενου πλασμιδίου, ενώ στην εικόνα 4 φαίνονται οι αντίστοιχες γραφικές παραστάσεις για κάθε υποκινητή ξεχωριστά. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον τεσσάρων διαφορετικών πειραμάτων για τα HeLa και τριών για τα Ref1.

A.	HeLa		
	TK promoter	proximal promoter	distal promoter
424/ERF -TSA	19.854614	3.1625057	4.3352031
424/ERF +TSA	20.101244	3.0744874	4.1015141
424/RD -TSA	74.987598	26.034610	10.164884
424/RD +TSA	5.0252276	2.9492844	2.5170156

B.	Ref1		
	TK promoter	proximal promoter	distal promoter
424/ERF -TSA	13.184173	4.170357	4.87548488
424/ERF +TSA	10.208850	2.1440786	1.33200813
424/RD -TSA	36.362992	24.699795	20.1436615
424/RD +TSA	8.8615111	3.9603771	2.72273849

**Πίνακας 1.. Οι τιμές αποτελούν το λόγο της διορθωμένης τιμής της ενεργότητας λουσιφεράσης του φορέα έκφρασης του GAL4(DBD) προς την αντίστοιχη τιμή του αναφερόμενου πλασμιδίου στις ίδιες συνθήκες (+/- TSA) και δείχνουν φορές καταστολής .**

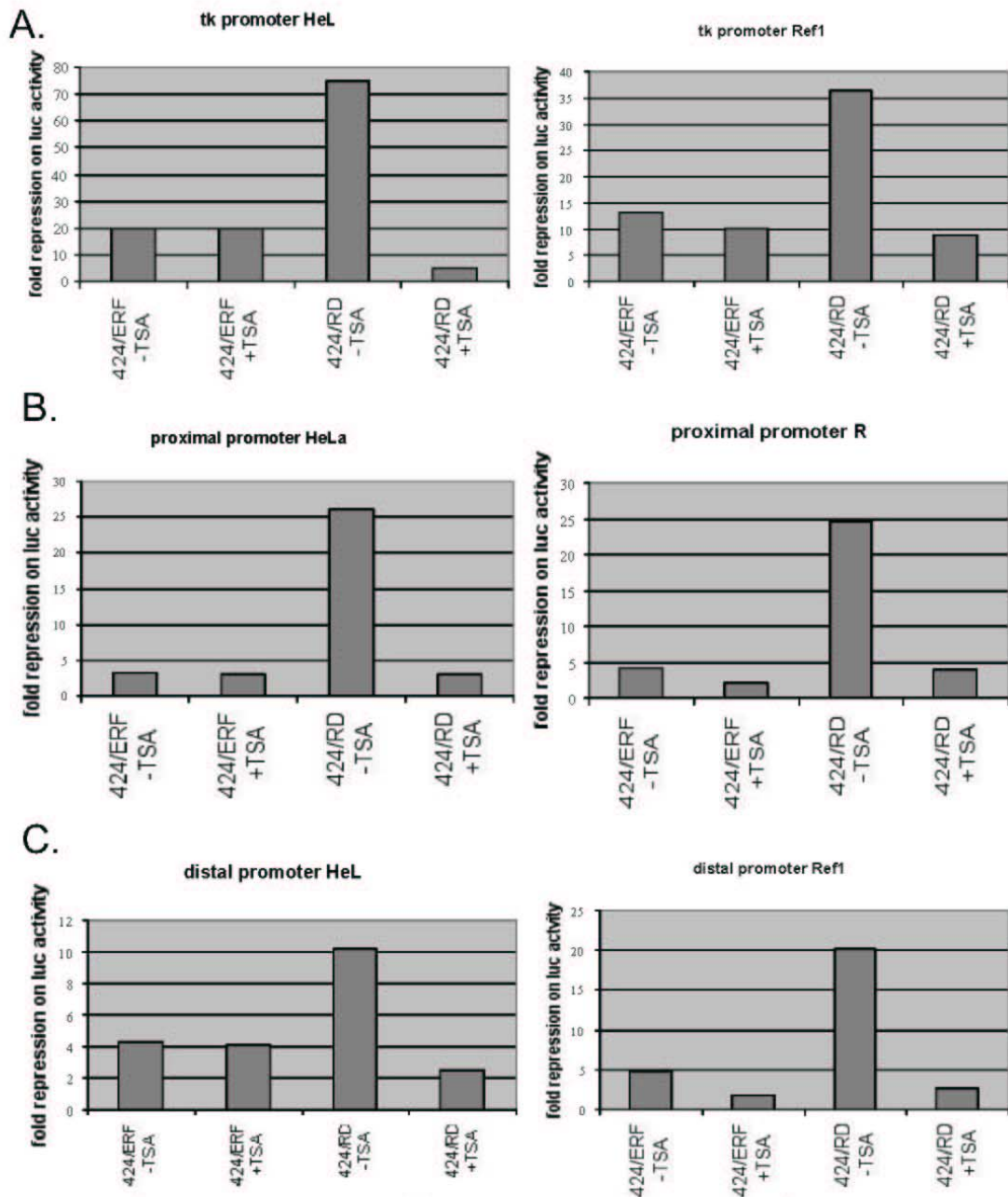
Από τις τιμές του πίνακα 1 και τις γραφικές παραστάσεις της εικόνας 4, φαίνεται ότι η δράση του ERF δεν επηρεάζεται από την τριχοστατίνη A, στα HeLa, (εικόνα 4, κολώνες 1 και 2 στα γραφήματα της αριστερής στήλης και πίνακας 1A). Στα κύτταρα Ref1 φαίνεται ότι χάνεται ελαφρώς η κατασταλτική ικανότητα ολόκληρου του ERF στον proximal promoter (μειώνεται στο μισό), ενώ στον distal χάνεται εντελώς (πίνακας 1β).

Η δράση της κατασταλτικής περιοχής του ERF, όταν είναι μόνο αυτή υβριδοποιημένη στην GAL4(DBD), επηρεάζεται σε όλες τις περιπτώσεις από την τριχοστατίνη A (κολώνες 3 και 4 σε όλα τα γραφήματα) και μειώνεται κατά μέσο όρο 5 φορές και στις δύο κυτταρικές σειρές, σε όλους τους υποκινητές. Αυτό που, επίσης, παρατηρούμε είναι ότι τόσο ο ERF, όσο και το RD, μπορούν να καταστείλουν και τους τρεις υποκινητές και στις 2 κυτταρικές σειρές, γεγονός που δείχνει ότι η καταστολή της μεταγραφής από τον ERF δεν είναι ειδική για κάποιο τύπο υποκινητή, ούτε για ένα τύπο κυττάρων (σύγκριση όλων των μπαρών μεταξύ των εικόνων 4α, 4β και 4c). Ωστόσο, παρατηρείται διαφορά στο ποσοστό της καταστολής μεταξύ του TK και του SV40 υποκινητή. Έτσι, ο TK υποκινητής καταστέλλεται 3-6 φορές περισσότερο από τον SV40. Επιπλέον, τόσο ο ERF, όσο και το RD μόνο του καταστέλλουν τη μεταγραφή του proximal και του distal promoter, εξίσου (εικόνα 4β και 4c). Τέλος, η κατασταλτική ικανότητα της RD περιοχής φαίνεται ότι είναι 5 φορές μεγαλύτερη από του ERF, γεγονός που πιθανώς να οφείλεται στη διαφορετική πυρηνική συγκέντρωση των δύο πρωτεϊνών.

Η τριχοστατίνη A, ωστόσο, επηρέαζε στα παραπάνω πειράματα, είτε την ενεργοποίηση του RSV υποκινητή της β-γαλακτοσιδάσης, είτε τη σταθερότητά της στο κύτταρο, με αποτέλεσμα η ενεργότητά της να αυξάνει 20 με 90 φορές στα κύτταρα HeLa (πίνακας 2A) και περίπου 2 με 10 φορές στα Ref1 (πίνακας 2B).

Στα κύτταρα HeLa, η TSA αυξάνει την ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης 50-90 φορές παρουσία, είτε του GAL4(DBD), είτε του GAL4/ERF (πίνακας 2A). παρουσία, όμως, του GAL4/RD η αύξηση είναι η μισή σχετικά με την αύξηση που παρατηρείται παρουσία μόνο του GAL4(DBD) ή του GAL4/ERF (σύγκριση μεταξύ του 424 και του 424/RD).





Εικόνα 4. Οι τιμές αποτελούν το λόγο της διορθωμένης τιμής της ανεργότητας λουσιφάσης του φορέα εκφρασης του GAL4(DBD) προς την αντίστοιχη τιμή του αναπρόμενου πλασμιδίου στις ίδιες συνθήκες (+/- TSA) και δείχνουν φορές καταστολής. A. TK promoter σε HeLa και Ref1. B. proximal promoter σε HeLa και Ref1. C. distal promoter σε HeLa και Ref1.

Στα κύτταρα Ref1, η αύξηση της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης, παρουσία TSA, είναι πολύ μικρότερη από τα HeLa. Τα αποτελέσματα όμως μεταξύ του GAL4(DBD) και του GAL4/ERF είναι συγκρίσιμα, ενώ η αύξηση της β-γαλακτοσιδάσης παρουσία του GAL4/RD είναι μειωμένη μέχρι και 5 φορές σε σχέση με το Gal4(DBD) (πίνακας 2B). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, την εμφάνιση μειωμένης κατασταλτικής ικανότητας του GAL4/RD, παρουσία TSA, όταν λαμβάνεται υπόψη ο λόγος της ενεργότητας λουσιφεράσης προς την ενεργότητα β-γαλακτοσιδάσης.

A.	<b>M.O. lacZ value +/-TSA HeLa</b>		
	TK	proximal	Distal
424	50.520205	85.186583	86.122668
424/ERF	46.937015	93.699219	92.619158
424/RD	23.006880	52.544520	64.756129

B.	<b>M.O. lacZ value +/-TSA Ref1</b>		
	TK	proximal	Distal
424	5.1866396	10.37489	6.4141627
424/ERF	5.3430404	4.5947727	5.3261026
424/RD	3.7148010	1.7173439	2.4659334

**Πίνακας 2. Λόγος των τιμών β-γαλακτοσιδάσης παρουσία τριχοστατίνης A προς τις τιμές απουσία τριχοστατίνης A**

Το γεγονός αυτό δημιούργησε πρόβλημα στην εκτίμηση της κατασταλτικής δράσης του ERF στους υποκινητές της λουσιφεράσης, παρουσία TSA, για αυτό πραγματοποιήθηκε αντίστοιχη ανάλυση των καθαρών τιμών της λουσιφεράσης παρουσία και απουσία τριχοστατίνης (πίνακας 3), σε ζεύγη δειγμάτων που είχαν διαμολυνθεί με το ίδιο DNA. Με αυτό τον τρόπο αφαιρείται από την ανάλυση μία παράμετρος που επηρεάζει το σύστημα και εξετάζεται αποκλειστικά η αναλογία των τιμών λουσιφεράσης.

A.		M.O. luc value +/-TSA HeLa		
		TK	proximal	distal
	424	0.847992	2.7271642	3.1070525
	424/ERF	2.24968	3.0611448	4.2102899
	424/RD	4.434317	10.051797	7.8567761

B.		M.O. luc value +/-TSA Ref1		
		TK	proximal	distal
	424	0.92437	1.15626	0.78236
	424/ERF	1.0008	1.12031	2.06463
	424/RD	1.24305	1.4978	1.02253

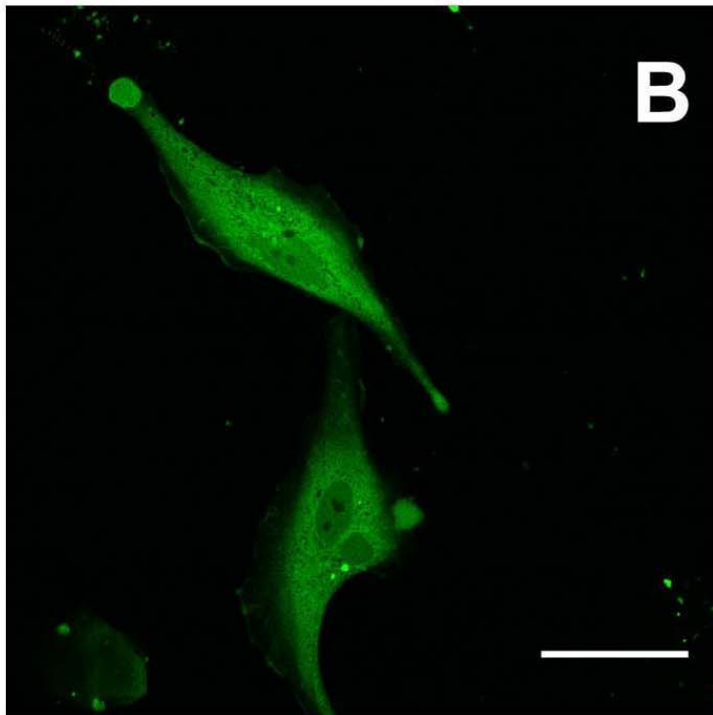
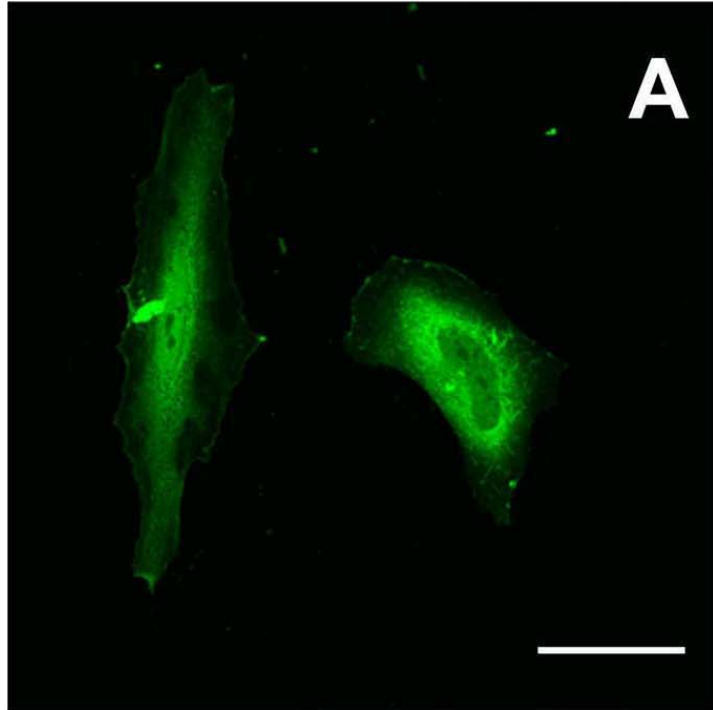
**Πίνακας 3** Λόγος των τιμών λουσιφεράσης παρουσία τριχοστατίνης A προς τις τιμές απουσία τριχοστατίνης A

Από τον πίνακα 3 φαίνεται ότι ο λόγος των τιμών της λουσιφεράσης παρουσία TSA προς την απουσία της δεν αλλάζει σημαντικά στα κύτταρα Ref1, στους υποκινητές TK και proximal (πίνακας 3β), υποδηλώνοντας ότι η TSA δεν μεταβάλλει την κατασταλτική ικανότητα του ERF ή του RD και ότι οι παρατηρούμενες αλλαγές, σε αυτό το σύστημα (πίνακας 1, εικόνα 4), είναι αποτέλεσμα της μεταβολής της τιμής της β-γαλακτοσιδάσης παρουσία TSA. Ωστόσο, στον distal promoter η τιμή της λουσιφεράσης αυξάνεται 3 φορές παρουσία TSA και GAL4/ERF (πίνακας 3β, σύγκριση 424 και 424/ERF). Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με το δεδομένο ότι δεν παρατηρείται αύξηση της ενεργότητας β-γαλακτοσιδάσης παρουσία GAL4/ERF, σε σχέση με το GAL4(DBD) (πίνακας 2β), υποδεικνύει ότι η δράση του ERF σε αυτά τα κύτταρα και για το συγκεκριμένο υποκινητή μπορεί να είναι ευαίσθητη στην TSA. Παρόλ'αυτά, στον ίδιο υποκινητή δεν παρατηρείται επίδραση της TSA, της κατασταλτική μόνο περιοχής του ERF.

Στα HeLa κύτταρα παρατηρείται μία αύξηση των τιμών λουσιφεράσης, παρουσία TSA και Gal4(DBD) στον proximal και στον distal promoter, ενώ στον TK υποκινητή παρατηρείται μία ελαφρά ενεργοποίηση. Οι τιμές είναι συγκρίσιμες και για το GAL4/ERF, όσον αφορά στους δύο πρώτους υποκινητές, αλλά στον TK υποκινητή παρατηρείται μία αποκαταστολή κατά περίπου 3 φορές. Περαιτέρω αύξηση της τιμής της λουσιφεράσης κατά 3-5 φορές παρατηρείται παρουσία του GAL4/RD (πίνακας 3A) και στους τρεις υποκινητές.

Είναι, λοιπόν, πιθανό ότι στο παραπάνω σύστημα, η κατασταλτική δράση του ERF να περιλαμβάνει σε κάποιο βαθμό τη δραστηριότητα HDAC. Το γεγονός, όμως, ότι απαιτούνται συγκεκριμένοι συνδυασμοί πλασμιδίων αναφοράς, πλασμιδίων έκφρασης και κυτταρικών σειρών για να παρατηρηθεί μερική αποκαταστολή των υποκινητών παρουσία τριχοστατίνης A, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η TSA πιθανώς επιδρά σε μηχανισμούς ανεξάρτητους της μεταγραφικής καταστολής και να επηρεάζει έμμεσα την κατασταλτική δράση του ERF.

Είναι γνωστό ότι η τριχοστατίνη A αυξάνει τα επίπεδα των κινασών στο κύτταρο (Espinosa, Le Van Thai et al. 1999), καθώς και ότι αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο (Wharton, Savell et al. 2000). Η δράση του ERF και η υποκυτταρική του κατανομή ελέγχεται από τα επίπεδα της φωσφορυλίωσης του και τον κυτταρικό κύκλο (Sgouras, Athanasiou et al. 1995; Le Gallic, Sgouras et al. 1999). Για να ελεγχθεί αν η υποκυτταρική κατανομή του ERF μεταβάλλεται παρουσία τριχοστατίνης, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση κυττάρων HeLa με τον ERF ή την κατασταλτική του περιοχή μόνο, συντηγμένα σε πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (green fluorescent protein, GFP). Προστέθηκε στα κύτταρα τριχοστατίνη για δεκατέσσερις ώρες, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν σαράντα ώρες μετά τη διαμόλυνση και ύστερα παρατηρήθηκαν σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (confocal microscopy). Ο ERF, σε συνθήκες που τα κύτταρα μεγαλώνουν λογαριθμικά βρίσκεται, κυρίως, στο κυτταρόπλασμα, ενώ η κατασταλτική περιοχή μόνη της βρίσκεται διαρκώς στον πυρήνα (Le Gallic, Sgouras et al. 1999). Το πρότυπο αυτό της κατανομής δεν άλλαξε, κατά προφανή τρόπο, παρουσία της τριχοστατίνης A, τόσο για τον ERF (εικόνα 5), όσο και για την κατασταλτική του περιοχή (δεδομένα που δεν παρατίθενται).



Εικόνα 5 : Υποκυτταρική κατανομή του ERF σε κύτταρα HeLa  
απουσία τριχοστατίνης A (A) ή παρουσία τριχοστατίνης A (B).  
scale bar: 50μm

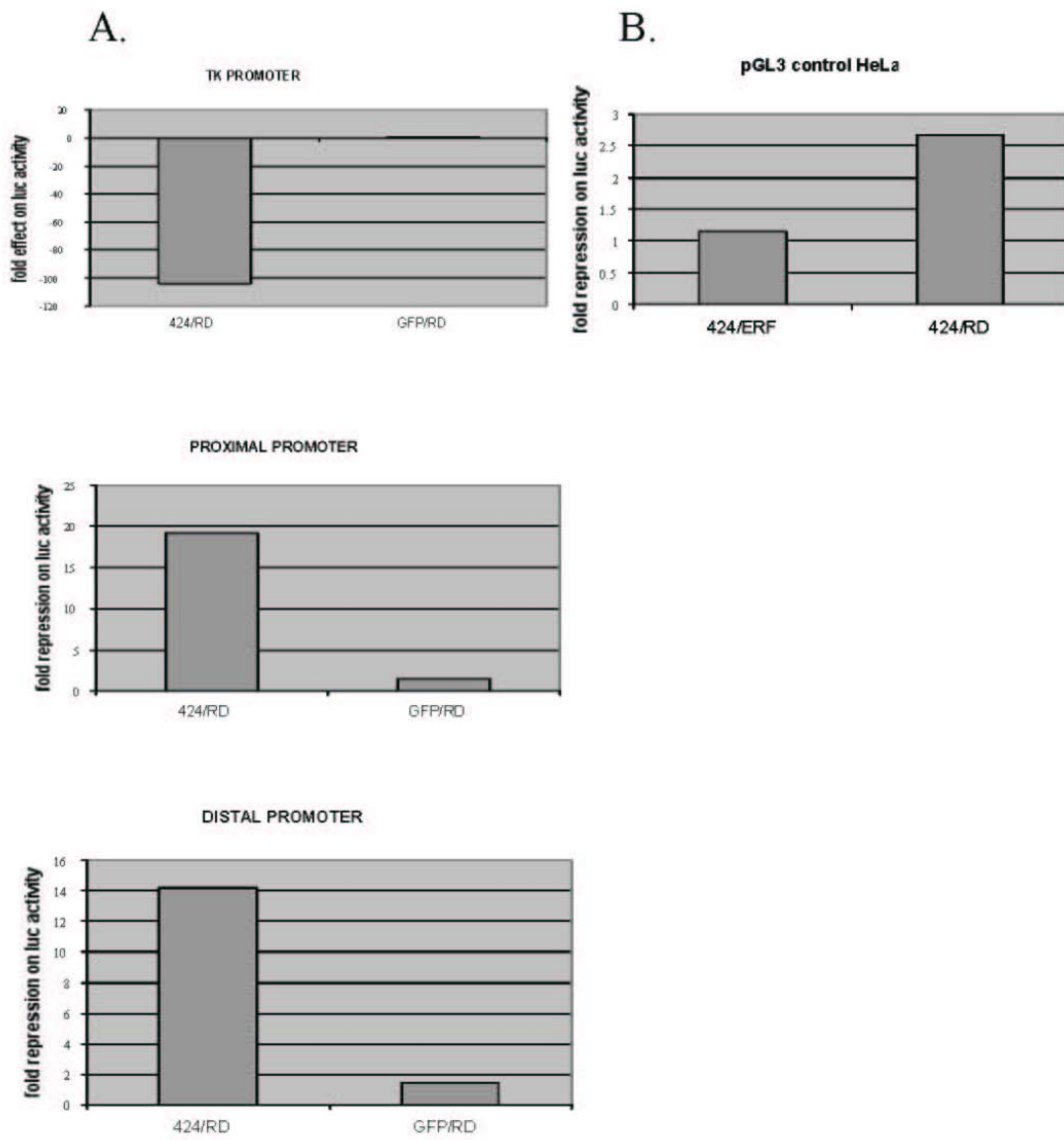
## **2. Η πρόσδεση του ERF στον υποκινητή είναι απαραίτητη για να ασκήσει την κατασταλτική του δράση.**

Με τη μεθοδολογία των παροδικών διαμόλυνσεων, μελετήθηκε αν ο ERF μπορεί να καταστείλει τη μεταγραφή, χωρίς να προσδένεται στις αλληλουχίες του υποκινητή. Πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση κυττάρων HeLa με πλασμίδια έκφρασης του GAL4/RD και του GFP/RD, χρησιμοποιώντας τα πλασμίδια TK promoter, proximal promoter και distal promoter ως πλασμίδια-δείκτες. Οι τιμές φαίνονται στον πίνακα 4 και οι αντίστοιχες γραφικές παραστάσεις στην εικόνα 6A. Συγκρίνοντας τις τιμές μεταξύ του GAL4/RD και του GFP/RD, παρατηρούμε ότι όταν η κατασταλτική περιοχή προσδένεται στο DNA (GAL4/RD) επιτρέπει τη μεταγραφή σε ένα ποσοστό 1%-6%, ενώ όταν δεν μπορεί να προσδεθεί (GFP/RD) παύει να καταστέλλει.

	<b>HeLa</b>		
	TK	proximal	distal
	promoter	promoter	promoter
424/RD	104.05471	19.153709	14.209131
GFP/RD	0.6701378	1.4660875	1.4818548

**Πίνακας 4. Οι τιμές αποτελούν το λόγο της διορθωμένης τιμής της ενεργότητας λουσιφεράσης του φορέα έκφρασης του GAL4(DBD) προς την αντίστοιχη τιμή του αναφερόμενου πλασμιδίου και δείχνουν φορές καταστολής. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο 3 διαφορετικών πειραμάτων.**

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε παροδική διαμόλυνση κυττάρων HeLa με πλασμίδιο-δείκτη που δεν περιείχε τις αλληλουχίες πρόσδεσης του GAL4 (εικόνα 6B). Και σε αυτή την περίπτωση, ούτε ο ERF, ούτε η κατασταλτική περιοχή του από μόνη της μπορούν να καταστείλουν τη μεταγραφή πάνω από 2.5 φορές (εικόνα 6B).



**Ε**ικόνα 6. Οι τιμές απορρίπτονται λόγω της διασποράς των αποτελεσμάτων των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων του πειράματος. Η εικόνα παρουσιάζει τα αποτελέσματα της δοκιμής των κατασκευών GAL4 (DBD) με την κεντροειδή τιμή του ενεοτρήσιμου πλεονίστου και αξιοποιούν επίσης κεντρικές Α. Χρησιμοποιήθηκε το πλεονίστο εκφρασης GFP/RD που δεν απορρίπτεται προεπιλεγμένα αλλά λουζις προεπιλεγμένα GAL4 (DBD) και Β. Χρησιμοποιήθηκε πλεονίστο-δίκτυο της βασικής κεντροειδούς τιμής του πλεονίστου pGL3 control, που δεν απορρίπτεται αλλά λουζις προεπιλεγμένα του GAL4 (DBD).

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η κατασταλτική περιοχή του ERF δεν μπορεί να ασκήσει τη δράση της αν δεν προσδένεται στον υποκινητή, κάτι το οποίο συμφωνεί και με παλαιότερα δεδομένα (Sgouras, Athanasiou et al. 1995). Επιπλέον, το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη ότι η κατασταλτική περιοχή του ERF δεν δρα μέσω ενός μηχανισμού απομάκρυνσης κάποιου ενεργοποιητή από το σύμπλοκο έναρξης της μεταγραφής (squelching), λόγω υπερέκφρασης.

### **3. Απομόνωση και καθαρισμός της συντηγμένης πρωτεΐνης GAL4/RD από βακτήρια.**

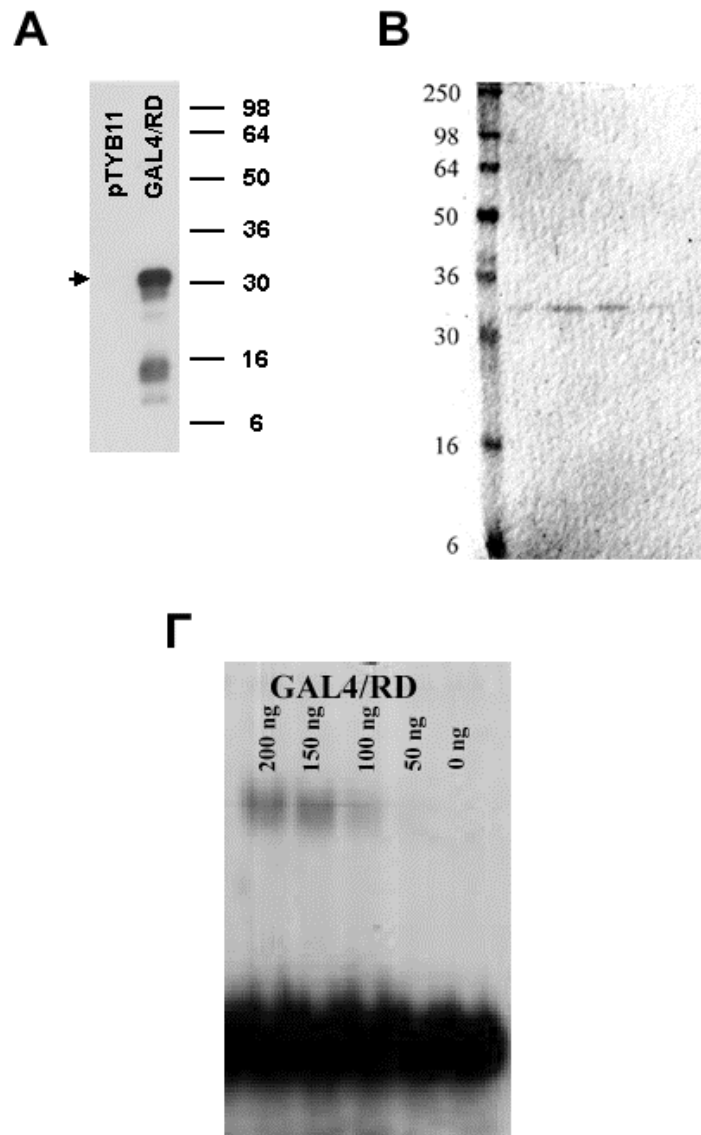
Μία διαφορετική προσέγγιση που επιλέχθηκε για τη μελέτη του μηχανισμού μεταγραφικής καταστολής του ERF περιλαμβάνει την παραγωγή καθαρής πρωτεΐνης GAL4/RD, ώστε να χρησιμοποιηθεί σε πειράματα *in vitro* transcription. Στο “*in vitro* transcription” σύστημα, θα εξεταστεί αν η συντηγμένη πρωτεΐνη GAL4/RD μπορεί να καταστείλει τη μεταγραφή “γυμνού” DNA. Χρησιμοποιώντας ως μήτρα πλασμιδιακό DNA και πυρηνικό εκχύλισμα από κύτταρα HeLa, που παρέχει όλους τους γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες και την RNA πολυμεράση II, μπορούμε να διαπιστώσουμε αν ο μηχανισμός της καταστολής από τον ERF απαιτεί την ύπαρξη νουκλεοσωμάτων.

Για να απομονωθεί και να καθαριστεί η παραπάνω πρωτεΐνη χρησιμοποιήθηκε το σύστημα της ιντεΐνης (Biolabs). Η ιντεΐνη επάγει την αυτοτομή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης από τον επίτοπο κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες (βλ. υλικά και μέθοδοι), οπότε δεν απαιτείται ένα ξεχωριστό βήμα κατεργασίας με πρωτεάσες για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης. Αναλυτικότερα, το GAL4/RD κομμάτι κόπηκε πρώτα με το ένζυμο XbaI ολοκληρωτικά και στη συνέχεια με το BbsI μερικώς, για να απομονωθεί ένα κομμάτι 981 νουκλεοτιδίων. Το κομμάτι αυτό εντέθηκε στο φορέα έκφρασης ρTYB11, που περιέχει τον επίτοπο της ιντεΐνης και μία περιοχή πρόσδεσης σε χιτίνη που επιτρέπει τον καθαρισμό της πρωτεΐνης από κλώνα χιτίνης. Συγκεκριμένα, το GAL4/RD εντέθηκε στη θέση SpeI του ρTYB11, αφού προηγουμένως δημιουργήθηκαν τυφλά άκρα, τόσο στο κομμάτι όσο και στο πλασμίδιο. Η θέση αυτή επιλέχθηκε, επειδή βρίσκεται στο σωστό πλαίσιο



ανάγνωσης και είναι κοντά στο σημείο έναρξης της μετάφρασης. Η κατασκευή ονομάστηκε GAL4/RD construct και φαίνεται στην εικόνα 1δ.

Στη συνέχεια, για να παραχθεί καθαρή πρωτεΐνη GAL4/RD, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli* ER2566 με την παραπάνω κατασκευή. Έγινε εμβολιασμός σε 1 λίτρο θρεπτικού υλικού 2X YT και επαγωγή της καλλιέργειας με IPTG για 4 ώρες (για περισσότερες λεπτομέρειες βλ. υλικά και μέθοδοι). Ανάλυση western, με αντίσωμα έναντι στην GAL4(DBD), έδειξε ότι παράγεται πρωτεΐνη μεγέθους περίπου 31 kD, που είναι και το αναμενόμενο (εικόνα 7A), ενώ χρώση με coomassie έδειξε ότι δεν υπάρχουν άλλες πρωτεΐνες (εικόνα 7B). Επίσης, σε ανάλυση αλλαγής της κινητικότητας σε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (electrophoretic mobility shift assay, EMSA) δείχθηκε ότι η ανασυνδυασμένη GAL4/RD μπορεί να προσδεθεί σε ολιγονουκλεοτίδιο που περιέχει μία αλληλουχία πρόσδεσης για την περιοχή δέσμευσης στο DNA του GAL4 (εικόνα 7Γ), υποδηλώνοντας τη δομική ακεραιότητα της πρωτεΐνης. Απαιτούνται τουλάχιστον 100 ng (3pmoles) ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, για να παρατηρηθεί πρόσδεση σε 3 nM ολιγονουκλεοτιδίου-στόχου, δηλαδή η σταθερά πρόσδεσης είναι περίπου  $10^{-5}$ .



**Εικόνα 7.** Ανίχνευση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης GAL4/RD με **A.** αντίσωμα anti-GAL4(DBD), με ανάλυση western και **B.** με χρώση με coomassie brilliant blue. **Γ.** Ανάλυση EMSA, όπου φαίνεται ότι η GAL4/RD προσδένεται σε ολιγονουκλεοτίδιο που περιέχει την αλληλουχία πρόσδεσης στο DNA του GAL4

# ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο ERF είναι ένας μεταγραφικός καταστολέας της οικογένειας των ETS γονιδίων. Στο καρβόξυ-τελικό άκρο του έχει ταυτοποιηθεί μία περιοχή 60 περίπου αμινοξέων, που μπορεί αυτόνομα να προκαλεί καταστολή της μεταγραφής (Sgouras, Athanasiou et al. 1995). Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διερευνηθεί ο μηχανισμός, με τον οποίο ο ERF καταστέλλει τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του.

Η ενεργός καταστολή της μεταγραφικής ενεργότητας επιτυγχάνεται βασικά μέσω δύο μηχανισμών· είτε με χημική τροποποίηση των ιστονών της χρωματίνης (απακετυλίωση, μεθυλίωση), είτε μέσω αλληλεπιδράσεων με γενικούς ή ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Στην πρώτη περίπτωση, η δομή της χρωματίνης γίνεται περισσότερο συμπαγής έτσι, ώστε να μην είναι προσβάσιμη από τους μεταγραφικούς ενεργοποιητές και τη βασική μεταγραφική μηχανή. Λειτουργεί, δηλαδή, η χρωματίνη ως ένα μηχανικό εμπόδιο στην πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων σε συγκεκριμένες αλληλουχίες. Στη δεύτερη περίπτωση ο μεταγραφικός καταστολέας παρεμβαίνει με κάποιο τρόπο (βλ. εισαγωγή) στη συγκρότηση και ενεργοποίηση του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής. Έτσι δημιουργείται ένα λειτουργικό εμπόδιο, που ουσιαστικά αποκλείει κάποιον από τους μεταγραφικούς παράγοντες να αλληλεπιδράσει αποτελεσματικά με το σύμπλοκο έναρξης της μεταγραφής.

Για να ξεχωρίσουμε μεταξύ των δύο παραπάνω μηχανισμών μεταγραφικής καταστολής, πραγματοποιήθηκαν πειράματα παροδικής διαμόλυνσης ευκαρυωτικών κυττάρων και μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας παρουσία τριχοστατίνης A. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι, κατά κανόνα, η κατασταλτική δράση του ERF δεν εξαρτάται από την παρουσία ενός ειδικού αναστολέα των απακετυλασών των ιστονών, της τριχοστατίνης A (εικόνα 4, πίνακες 1,2,3). Σε συγκεκριμένους συνδυασμούς πλασμιδίων αναφοράς, πλασμιδίων έκφρασης και κυτταρικών σειρών παρατηρήθηκε μείωση της κατασταλτικής δράσης του ERF, παρουσία TSA. Έτσι,

η κατασταλτική δράση ολόκληρου του ERF στον distal promoter, στα κύτταρα Ref1 και στον TK υποκινητή στα κύτταρα HeLa, καθώς και της καρβόξυ-τελικής περιοχής του ERF, στα κύτταρα HeLa, μειώνεται κατά 2-3 φορές παρουσία TSA. Υπάρχει, λοιπόν, πιθανότητα ο μηχανισμός της μεταγραφικής καταστολής από τον ERF να επηρεάζεται, σε κάποιο βαθμό, από τη δράση απακετυλασών των ιστονών. Ωστόσο, η κατά περίπτωση, ευαισθησία στην τριχοστατίνη μπορεί να οφείλεται σε δευτερογενή φαινόμενα, ανεξάρτητα του μηχανισμού καταστολής καθ'εαυτού.

Ο ERF μπορεί να καταστείλει τη μεταγραφή, τόσο του TK υποκινητή/SV40 ενισχυτή, όσο και του ισχυρότερου SV40 υποκινητή/ενισχυτή, παρόλο που η δράση του εμφανίζεται μειωμένη στον SV40 υποκινητή (3-6 φορές διαφορά, εικόνα 4, σύγκριση 4A με 4B και 4C). Επομένως, η δράση του δεν περιορίζεται σε ένα ειδικό τύπο υποκινητή, δεδομένο που συμφωνεί και με παλαιότερα αποτελέσματα (Sgouras, Athanasiou et al. 1995). Ο ERF καταστέλλει τη μεταγραφή εξίσου ικανοποιητικά, τόσο όταν βρίσκεται κοντά στο σημείο έναρξης της μεταγραφής, όσο και όταν βρίσκεται μακριά του (σύγκριση 4B με 4C). Επίσης, δείχθηκε ότι ο ERF ασκεί την κατασταλτική του δράση μόνο όταν είναι προσδεμένος σε αλληλουχίες του DNA και αυτή η δράση του χάνεται εντελώς, όταν δεν μπορεί να προσδεθεί (εικόνα 6). Τέλος, η καρβόξυ-τελική περιοχή του ERF έχει την ικανότητα να καταστέλλει αυτόνομα τη μεταγραφή, σε βαθμό μάλιστα πολύ μεγαλύτερο σε σχέση με ολόκληρη την πρωτεΐνη (εικόνα 4, σύγκριση μπαρών 1 και 3 σε όλα τα γραφήματα).

Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι, καταρχήν, ο ERF χρησιμοποιεί ένα ενεργό μηχανισμό καταστολής της μεταγραφής, αλληλεπιδρώντας με πρωτεΐνες στον υποκινητή ή στον ενισχυτή και όχι ένα παθητικό μηχανισμό, ανταγωνιζόμενος με ενεργοποιητές για την πρόσδεση σε κοινές ή αλληλοεπικαλυπτόμενες αλληλουχίες πρόσδεσης στο DNA. Βέβαια, δεν αποκλείεται ένας τέτοιος μηχανισμός να δρα συμπληρωματικά στην άσκηση της κατασταλτικής δράσης του, δεν αποτελεί όμως το βασικό τρόπο καταστολής. Επιπλέον, το γεγονός ότι ο ERF καταστέλλει διαφορετικούς υποκινητές, συνηγορεί στην άποψη ότι δεν αλληλεπιδρά με ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες, εμποδίζοντας τη συμμετοχή τους στη συγκρότηση ή στην ενεργοποίηση του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής. Το συμπέρασμα αυτό

ισχυροποιείται αν λάβουμε υπόψιν παλαιότερα δεδομένα, σύμφωνα με τα οποία η κατασταλτική περιοχή μπορεί να μεταφερθεί στην περιοχή δέσμευσης στο DNA ενεργοποιητών, όπως ο Fli1, ο c-Myc, ο NFκB, και ο ETS1 και να τους μετατρέψει σε καταστολείς (αδημοσίευτα δεδομένα). Τα παραπάνω δεδομένα, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η δράση του ERF χάνεται όταν δεν προσδένεται στο DNA, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι δεν δρα μέσω αλληλεπίδρασης με κάποιο ενεργοποιητή απομακρύνοντάς τον από το σύμπλοκο έναρξης της μεταγραφής. Επομένως, η κατασταλτική περιοχή του ERF μπορεί να δρα αυτόνομα, σε πληθώρα υποκινητών με μοναδική (γνωστή ως τώρα) προϋπόθεση να προσδένεται στο DNA. Συνολικά, με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, μπορούμε να ισχυριστούμε ότι η μεταγραφική καταστολή από τον ERF, ενώ δεν μπορεί να αποκλειστεί και η κατά περίπτωση δράση απακετυλασών των ιστονών, είναι πιθανότερο να παρεμβαίνει στη συγκρότηση ή στην ενεργοποίηση του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής ή ακόμα και στην επιμήκυνση της μεταγραφής. Βέβαια, δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο να δρα και με τους δύο προαναφερόμενους μηχανισμούς.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι στα κύτταρα HeLa, η δράση ολόκληρου του ERF δεν επηρεάζεται από την τριχοστατίνη, ενώ στα Ref1 φάνηκε να χάνεται ελαφρώς η κατασταλτική του ικανότητα, κυρίως όταν βρίσκεται μακριά από τον υποκινητή (εικόνα 4C). Αντίθετα, όταν χρησιμοποιήθηκε η κατασταλτική περιοχή του ERF μόνη της, φάνηκε ότι η δράση της επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την τριχοστατίνη, ανεξάρτητα από την κυτταρική σειρά και τον υποκινητή (εικόνα 4, μπάρες 3 και 4 σε όλα τα γραφήματα). Οι παρατηρήσεις αυτές, καταρχήν, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο ERF μπορεί να περιέχει τουλάχιστον δύο διαφορετικές περιοχές ικανές να καταστείλουν τη μεταγραφή. Έτσι, η καρβόξυ-τελική περιοχή του μπορεί να δρα μέσω των απακετυλασών των ιστονών, ενώ μπορεί να υπάρχει άλλη μία περιοχή στην πρωτεΐνη που να δρα ανεξάρτητα από αυτές. Ωστόσο, παλαιότερα δεδομένα δείχνουν ότι ο ERF χάνει την κατασταλτική του ικανότητα όταν αφαιρείται η καρβόξυ-τελική περιοχή του (Sgouras, Athanasiou et al. 1995), οπότε η παραπάνω εξήγηση είναι μάλλον απίθανη.

Παρατηρήσαμε, όμως, ότι η τριχοστατίνη A επηρέαζε την ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης, πιθανώς επηρεάζοντας τη μεταγραφή της από τον RSV

υποκινητή ή/και τη σταθερότητά της στο κύτταρο, οπότε παρουσιάστηκε αύξηση της ενεργότητάς της τουλάχιστον 20 φορές στα κύτταρα HeLa. Επειδή, ο βαθμός καταστολής του ERF μετρήθηκε με βάση το λόγο της ενεργότητας λουσιφεράσης προς την ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης, αποφασίσαμε να μετρήσουμε τη μεταβολή της ενεργότητας λουσιφεράσης και β-γαλακτοσιδάσης, παρουσία TSA, ξεχωριστά. Ανάλυση των τιμών της β-γαλακτοσιδάσης έδειξε ότι η ενεργότητά της αυξανόταν 20 με 90 φορές στα κύτταρα HeLa (πίνακας 2A), ενώ στα Ref1 η αύξηση κυμάνθηκε από 2 μέχρι 10 φορές (πίνακα 2B). Ωστόσο, η αύξηση αυτή ήταν μειωμένη, όταν τα κύτταρα είχαν διαμολυνθεί με την RD περιοχή σε σχέση με αυτά που είχαν διαμολυνθεί με ολόκληρο τον ERF ή με το GAL4, και στις δύο κυτταρικές σειρές (πίνακας 2). Αν και δεν είναι σαφής ο τρόπος με τον οποίο το GAL4/RD επηρεάζει την ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης, είναι εμφανές ότι η επίδραση αυτή μεταβάλλει τα δεδομένα της ανάλυσής μας. Έτσι, η αναντιστοιχία που παρατηρείται στη μεταγραφική ενεργότητα μεταξύ του ERF και της RD περιοχής μπορεί να οφείλεται εν μέρει στις τιμές της β-γαλακτοσιδάσης και όχι της λουσιφεράσης. Έτσι πραγματοποιήθηκε περαιτέρω ανάλυση των αποτελεσμάτων, διερευνώντας το λόγο των απόλυτων τιμών της λουσιφεράσης παρουσία της TSA προς απουσία της. Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι στα Ref1 κύτταρα, η απόλυτη τιμή της ενεργότητας λουσιφεράσης δεν αλλάζει καθόλου (πίνακας 3β), με εξαίρεση την ενεργότητα του distal promoter, όπου παρατηρείται αύξηση της τιμής της λουσιφεράσης, παρουσία TSA και GAL4/ERF, κατά 3 φορές, υποδηλώνοντας μία TSA-εξαρτώμενη καταστολή στο συγκεκριμένο υποκινητή από το συγκεκριμένο φορέα έκφρασης. Η ίδια παρατήρηση μπορεί να γίνει και για τον TK υποκινητή στα HeLa κύτταρα, με τον ίδιο φορέα έκφρασης. Σε αυτά τα κύτταρα παρατηρείται, επίσης, μία αύξηση της δραστηριότητας της λουσιφεράσης κατά 3 φορές παρουσία τριχοστατίνης και GAL4(DBD) μόνο (πίνακας 3A, proximal, distal promoter). Συγκρίσιμη αύξηση παρατηρείται και παρουσία του GAL4/ERF, υποδηλώνοντας ότι η κατασταλτική δράση του ERF είναι ανεξάρτητη της τριχοστατίνης A, αλλά και ότι ο ERF δεν μπορεί να καταστείλει εξίσου αποτελεσματικά την αυξημένη, λόγω της παρουσίας τριχοστατίνης, δραστηριότητα του TK ή του SV40 υποκινητή. Τέλος, παρουσία του GAL4/RD, η προσθήκη της τριχοστατίνης είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενεργότητας λουσιφεράσης κατά 8 φορές, ή κατά 2.5 φορές συγκριτικά με τα

GAL4(DBD) και GAL4/ERF. Επομένως, σε αυτή την περίπτωση, η κατασταλτική δράση του GAL4/RD μειώνεται στο μισό παρουσία τριχοστατίνης A, ενώ, όπως συμβαίνει και με ολόκληρο τον ERF, δεν μπορεί να καταστείλει εξίσου αποτελεσματικά την ενεργοποίηση του υποκινητή παρουσία TSA, .

Μία βασική διαφορά των HeLa κυττάρων από τα Ref1 κύτταρα είναι ότι τα HeLa περιέχουν στο γονιδίωμά τους τον ιό SV40, οπότε οι φορείς που χρησιμοποιήθηκαν έχουν τη δυνατότητα να πολλαπλασιάζονται πολύ περισσότερο σε αυτά τα κύτταρα σε σχέση με τα Ref1. Επίσης είναι γνωστό ότι η τριχοστατίνη αυξάνει τη δραστηριότητα του SV40 υποκινητή (Nakajima, Kim et al. 1998; Condreay, Witherspoon et al. 1999) και ως εκ τούτου αυξάνεται και η δραστηριότητα της λουσιφεράσης σε αυτά τα κύτταρα. Ο αυξημένος, λοιπόν, αριθμός αντιγράφων-στόχων, συγχρόνως με την ήδη αυξημένη ενεργότητα του SV40 υποκινητή/ενισχυτή μπορεί να εξηγήσει την αυξημένη μεταγραφή παρουσία τριχοστατίνης, καθώς και την αναλογική καταστολή του ERF. Ο ERF, δηλαδή, μπορεί να καταστέλλει το ίδιο ποσοστό υποκινητών, όμως ο πολλαπλάσιος αριθμός υποκινητών συνεπάγεται πολλαπλάσια δραστηριότητα λουσιφεράσης. Η αυξημένη μεταγραφική ενεργότητα του SV40 υποκινητή παρουσία της τριχοστατίνης μπορεί να εξηγήσει και την αυξημένη ενεργότητα της λουσιφεράσης στα Ref1 κύτταρα, στον distal promoter. Μία άλλη πιθανότητα είναι, ότι ο GAL4/ERF μπορεί να δεσμεύεται σε άλλες θέσεις ενδογενών υποκινητών, μέσω της EBD, οπότε αφ' ενός ελαττώνεται η ήδη περιορισμένη δραστική πυρηνική συγκέντρωσή του και αφ' εταίρου έχουμε δευτερογενή φαινόμενα από γονίδια που καταστέλλονται λόγω της έκφρασης του ERF.

Είναι ασαφές, αν η μείωση της κατασταλτικής ικανότητας, που παρατηρείται στην περίπτωση του GAL4/RD, παρουσία τριχοστατίνης A οφείλεται στο γεγονός ότι ενέχονται και οι HDACs στο μηχανισμό καταστολής ή σε άλλους λόγους. Δεδομένου ότι η αποκαταστολή του GAL4/RD, παρουσία TSA είναι πραγματικά μικρή (από 1-2% μεταγραφή έχουμε 3-5%, εικόνα 4, μπάρες 3 και 4 στα γραφήματα της πρώτης στήλης), είναι πολύ πιθανό να οφείλεται σε φαινόμενα ανεξάρτητα του μηχανισμού δράσης. Αυτό θα ήταν συμβατό και με τα αποτελέσματα στα κύτταρα Ref1, αλλά και με παλαιότερα δεδομένα, σύμφωνα με τα οποία, όταν αφαιρεθεί η καρβοξυ-τελική περιοχή του ERF, χάνεται η κατασταλτική του ικανότητα (Sgouras, Athanasiou et al. 1995).

Εναλλακτικά, η παραπάνω αποκαταστολή ενδέχεται να είναι ένα έμμεσο φαινόμενο, που δεν σχετίζεται με το μηχανισμό καταστολής, αλλά με αλλαγές που προκαλεί η τριχοστατίνη στη φυσιολογία του κυττάρου. Η τριχοστατίνη Α, αυξάνοντας τα επίπεδα της ενεργότητας των κινασών (Espinosa, Le Van Thai et al. 1999) και αναστέλλοντας τον κυτταρικό κύκλο (Wharton, Savell et al. 2000) ενδέχεται να επηρεάζει την κατάσταση φωσφορυλίωσης του ERF και την υποκυτταρική κατανομή του. Έτσι υπάρχουν δύο διαφορετικές εξηγήσεις για την αναντιστοιχία μεταξύ ολόκληρου του ERF και της RD περιοχής, όσον αφορά στην ικανότητά τους να καταστείλουν τη μεταγραφή παρουσία τριχοστατίνης Α. Στην περίπτωση της RD περιοχής, φωσφορυλίωση της θρεονίνης στη θέση 7 επηρεάζει τη δράση της, όπως έχει ήδη αναφερθεί (Sgouras, Athanasiou et al. 1995), ενώ ταυτόχρονη φωσφορυλίωση σε κάποια άλλη θέση σε ολόκληρο τον ERF δεν επιτρέπει την αναστολή της δράσης του. Επομένως, η τριχοστατίνη Α σε αυτή την περίπτωση δρα εμμέσως, οπότε ο ERF δεν αλληλεπιδρά με απακευλάσες ιστονών. Στην περίπτωση ολόκληρου του ERF, λόγω της αναστολής του κυτταρικού κύκλου από την TSA, ο ERF παραμένει στον πυρήνα του κυττάρου, αλλά λόγω της αυξημένης φωσφορυλίωσης οδηγείται στο κυτταρόπλασμα. Επομένως, μία ισορροπία μεταξύ αυτών των δύο καταστάσεων μπορεί να οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα του ERF στον πυρήνα, οπότε είναι πιθανή μία άμεση παρέμβαση της TSA στο μηχανισμό της δράσης του, λόγω ακριβώς των αυξημένων ποσοτήτων του ERF στον πυρήνα. Καταρχήν, πειράματα υποκυτταρικού εντοπισμού του ERF και της κατασταλτικής του περιοχής, έδειξαν ότι η κατανομή τους δεν επηρεάζεται από την τριχοστατίνη Α (εικόνα 5 και δεδομένα που δεν παρατίθενται). Δεδομένου ότι ο πυρηνικός εντοπισμός του ERF είναι ήδη περιορισμένος, θα χρειαστεί προσεκτική ποσοτική ανάλυση της κατανομής, πριν αποκλειστεί μία τέτοια πιθανότητα.

Συμπερασματικά, σύμφωνα με την παραπάνω ανάλυση, ο μηχανισμός της καταστολής του ERF πιθανόν να είναι ανεξάρτητος από τη δράση των απακευλασών των ιστονών και άρα η χρωματινική δομή δεν αποτελεί στόχο για την άσκηση της κατασταλτικής δράσης του. Επιπλέον, το γεγονός ότι μπορεί να “προσφέρει” την κατασταλτική του περιοχή σε DNA-δεσμευόμενες περιοχές μεταγραφικών ενεργοποιητών και να τους μετατρέψει σε καταστολείς, καθώς και ότι μπορεί να καταστείλει τη μεταγραφή διαφορετικών υποκινητών, οδηγεί στο



συμπέρασμα ότι η δράση του δεν είναι ειδική για συγκεκριμένους υποκινητές, ούτε για συγκεκριμένους ενεργοποιητές. Το συμπέρασμα αυτό ισχυροποιείται από το δεδομένο ότι ο ERF δεν είναι ικανός να καταστείλει τη μεταγραφή αν δεν είναι προσδεμένος στο DNA (εικόνα 6), οπότε φαίνεται ότι δεν μπορεί να αλληλεπιδρά με κάποιο ενεργοποιητή, απομακρύνοντας τον από την περιοχή του υποκινητή και του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής. Πιθανόν, ο ERF να στοχεύει και να αλληλεπιδρά με γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες ή την ίδια την RNA πολυμεράση II και ως εκ τούτου να καταστέλλει τη μεταγραφή παρεμβαίνοντας στη συγκρότηση του συμπλόκου έναρξης, ή στην ενεργοποίησή του ή ακόμα και στην επιμήκυνση της μεταγραφής.

Περαιτέρω μελέτες με την ανάπτυξη συστημάτων *in vitro* μεταγραφής, θα αποκαλύψουν και άλλα στοιχεία για το μηχανισμό της μεταγραφικής καταστολής του ERF. Με το παραπάνω σύστημα μπορεί να δειχθεί πειστικά και με σαφήνεια αν η καρβόξυ-τελική περιοχή του ERF μπορεί να ασκήσει τη δράση της όταν χρησιμοποιείται ως μήτρα για τη μεταγραφή “γυμνού” DNA, καθώς και αν αλληλεπιδρά λειτουργικά με κάποιον ή κάποιους γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Στο “*in vitro* transcription” σύστημα δεν παρεμβάλλονται δευτερογενή φαινόμενα όπως στα *in vivo* συστήματα (πχ φωσφορλίωση, υποκυτταρική κατανομή) που περιπλέκουν την ανάλυση των αποτελεσμάτων, οπότε μπορούμε να έχουμε πιο καθαρή εικόνα, σχετικά με το μηχανισμό καταστολής. Βέβαια, είναι πιθανό η πρωτεΐνη να δρα με διαφορετικούς μηχανισμούς, ανάλογα πχ με τον κυτταρικό τύπο, οι οποίοι δεν μπορούν να αποκαλυφθούν με ένα *in vitro* σύστημα. Ωστόσο, η *in vitro* ανάλυση παρέχει τη βάση για την διαλεύκανση του μηχανισμού μεταγραφικής καταστολής του ERF σε ένα σύστημα με βιολογική σημασία. Ταυτόχρονα, με τεχνικές αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνών (GST-pull down, συν-ανοσο-κατακρήμνιση πρωτεϊνών) είναι δυνατόν να ταυτοποιηθούν πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα με τον ERF. Τέλος, ανάπτυξη μοντέλων διαγονιδιακών και knock-out ποντικών και ταυτοποίηση γονιδίων-στόχων του ERF θα αποκαλύψει το φυσιολογικό του ρόλο στα θηλαστικά και θα επιτρέψει την ανάπτυξη αποτελεσματικών στρατηγικών για τη γονιδιακή θεραπεία των νεοπλασιών.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Akoulitchev, S., S. Chuikov, et al. (2000). "TFIIH is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes." Nature **407**(6800): 102-6.

Athanasiou, M., P. A. Clausen, et al. (1996). "Increased expression of the ETS-related transcription factor FLI-1/ERGB correlates with and can induce the megakaryocytic phenotype." Cell Growth Differ **7**(11): 1525-34.

Athanasiou, M., L. LeGallic, et al. (2000). "Suppression of the Ewing's sarcoma phenotype by FLI1/ERF repressor hybrids." Cancer Gene Ther **7**(8): 1188-95.

Auble, D. T., K. E. Hansen, et al. (1994). "Mot1, a global repressor of RNA polymerase II transcription, inhibits TBP binding to DNA by an ATP-dependent mechanism." Genes Dev **8**(16): 1920-34.

Berk, A. J. (1999). "Activation of RNA polymerase II transcription." Curr Opin Cell Biol **11**(3): 330-5.

Bhat, N. K., R. J. Fisher, et al. (1987). "Temporal and tissue-specific expression of mouse ets genes." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(10): 3161-5.

Bories, J. C., D. M. Willerford, et al. (1995). "Increased T-cell apoptosis and terminal B-cell differentiation induced by inactivation of the Ets-1 proto-oncogene." Nature **377**(6550): 635-8.

Brehm, A., E. A. Miska, et al. (1998). "Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription." Nature **391**(6667): 597-601.

Chakrabarti, S. R. and G. Nucifora (1999). "The leukemia-associated gene TEL encodes a transcription repressor which associates with SMRT and mSin3A." Biochem Biophys Res Commun **264**(3): 871-7.

Condreay, J. P., S. M. Witherspoon, et al. (1999). "Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(1): 127-32.

Criqui-Filipe, P., C. Ducret, et al. (1999). "Net, a negative Ras-switchable TCF, contains a second inhibition domain, the CID, that mediates repression through interactions with CtBP and de-acetylation." Embo J **18**(12): 3392-403.

Espinos, E., A. Le Van Thai, et al. (1999). "Cooperation between phosphorylation and acetylation processes in transcriptional control." Mol Cell Biol **19**(5): 3474-84.

Feng, Q. and Y. Zhang (2001). "The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes." Genes Dev **15**(7): 827-32.

Fenrick, R., J. M. Amann, et al. (1999). "Both TEL and AML-1 contribute repression domains to the t(12;21) fusion protein." Mol Cell Biol **19**(10): 6566-74.

Fondell, J. D., F. Brunel, et al. (1996). "Unliganded thyroid hormone receptor alpha can target TATA-binding protein for transcriptional repression." Mol Cell Biol **16**(1): 281-7.

Galvin, K. M. and Y. Shi (1997). "Multiple mechanisms of transcriptional repression by YY1." Mol Cell Biol **17**(7): 3723-32.

Giovane, A., A. Pintzas, et al. (1994). "Net, a new ets transcription factor that is activated by Ras." Genes Dev **8**(13): 1502-13.

Guidez, F., K. Petrie, et al. (2000). "Recruitment of the nuclear receptor corepressor N-CoR by the TEL moiety of the childhood leukemia-associated TEL-AML1 oncoprotein." Blood **96**(7): 2557-61.

Ito, M., T. Nakayama, et al. (1998). "Expression of Ets-1 transcription factor in relation to angiogenesis in the healing process of gastric ulcer." Biochem Biophys Res Commun **246**(1): 123-7.

Kadosh, D. and K. Struhl (1997). "Repression by Ume6 involves recruitment of a complex containing Sin3 corepressor and Rpd3 histone deacetylase to target promoters." Cell **89**(3): 365-71.

Kim, C. A., M. L. Phillips, et al. (2001). "Polymerization of the SAM domain of TEL in leukemogenesis and transcriptional repression." Embo J **20**(15): 4173-82.

Kim, S., J. G. Na, et al. (1997). "The Dr1/DRAP1 heterodimer is a global repressor of transcription in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(3): 820-5.

Knoepfler, P. S. and R. N. Eisenman (1999). "Sin meets NuRD and other tails of repression." Cell **99**(5): 447-50.

Laherty, C. D., W. M. Yang, et al. (1997). "Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression." Cell **89**(3): 349-56.

Le Gallic, L., D. Sgouras, et al. (1999). "Transcriptional repressor ERF is a Ras/mitogen-activated protein kinase target that regulates cellular proliferation." Mol Cell Biol **19**(6): 4121-33.

Lelievre, E., F. Lionneton, et al. (2001). "The Ets family contains transcriptional activators and repressors involved in angiogenesis." Int J Biochem Cell Biol **33**(4): 391-407.

Leprince, D., A. Gegonne, et al. (1983). "A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26." Nature **306**(5941): 395-7.

Li, C. and J. L. Manley (1998). "Even-skipped represses transcription by binding TATA binding protein and blocking the TFIID-TATA box interaction." Mol Cell Biol **18**(7): 3771-81.

Licht, J. D., M. Ro, et al. (1993). "Selective repression of transcriptional activators at a distance by the Drosophila Kruppel protein." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(23): 11361-5.

Liu, D., R. Ishima, et al. (1998). "Solution structure of a TBP-TAF(II)230 complex: protein mimicry of the minor groove surface of the TATA box unwound by TBP." Cell **94**(5): 573-83.

Liu, D., E. Pavlopoulos, et al. (1997). "ERF: genomic organization, chromosomal localization and promoter analysis of the human and mouse genes." Oncogene **14**(12): 1445-51.

Lopez, R. G., C. Carron, et al. (1999). "TEL is a sequence-specific transcriptional repressor." J Biol Chem **274**(42): 30132-8.

Luo, R. X., A. A. Postigo, et al. (1998). "Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription." Cell **92**(4): 463-73.

Maira, S. M., J. M. Wurtz, et al. (1996). "Net (ERP/SAP2) one of the Ras-inducible TCFs, has a novel inhibitory domain with resemblance to the helix-loop-helix motif." Embo J **15**(21): 5849-65.

Maldonado, E., M. Hampsey, et al. (1999). "Repression: targeting the heart of the matter." Cell **99**(5): 455-8.

Maroulakou, I. G. and D. B. Bowe (2000). "Expression and function of Ets transcription factors in mammalian development: a regulatory network." Oncogene **19**(55): 6432-42.

Mavrothalassitis, G. and J. Ghysdael (2000). "Proteins of the ETS family with transcriptional repressor activity." Oncogene **19**(55): 6524-32.

McKercher, S. R., B. E. Torbett, et al. (1996). "Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities." Embo J **15**(20): 5647-58.

Muthusamy, N., K. Barton, et al. (1995). "Defective activation and survival of T cells lacking the Ets-1 transcription factor." Nature **377**(6550): 639-42.

Nagy, L., H. Y. Kao, et al. (1997). "Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase." Cell **89**(3): 373-80.

Nakajima, H., Y. B. Kim, et al. (1998). "FR901228, a potent antitumor antibiotic, is a novel histone deacetylase inhibitor." Exp Cell Res **241**(1): 126-33.

Nan, X., H. H. Ng, et al. (1998). "Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex." Nature **393**(6683): 386-9.

Natesan, S. and M. Z. Gilman (1993). "DNA bending and orientation-dependent function of YY1 in the c-fos promoter." Genes Dev **7**(12B): 2497-509.

Nunn, M. F., P. H. Seeburg, et al. (1983). "Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene." Nature **306**(5941): 391-5.

O'Neill, E. M., I. Rebay, et al. (1994). "The activities of two Ets-related transcription factors required for Drosophila eye development are modulated by the Ras/MAPK pathway." Cell **78**(1): 137-47.

Pazin, M. J. and J. T. Kadonaga (1997). "What's up and down with histone deacetylation and transcription?" Cell **89**(3): 325-8.

Pirrotta, V. (1995). "Chromatin complexes regulating gene expression in Drosophila." Curr Opin Genet Dev **5**(4): 466-72.

Pugh, B. F. (2000). "Control of gene expression through regulation of the TATA-binding protein." Gene **255**(1): 1-14.

Rao, V. N. and E. S. Reddy (1992). "A divergent ets-related protein, elk-1, recognizes similar c-ets-1 proto-oncogene target sequences and acts as a transcriptional activator." Oncogene **7**(1): 65-70.

Rebay, I. and G. M. Rubin (1995). "Yan functions as a general inhibitor of differentiation and is negatively regulated by activation of the Ras1/MAPK pathway." Cell **81**(6): 857-66.

Sauer, F., J. D. Fondell, et al. (1995). "Control of transcription by Kruppel through interactions with TFIIB and TFIIE beta." Nature **375**(6527): 162-4.

Scott, E. W., M. C. Simon, et al. (1994). "Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages." Science **265**(5178): 1573-7.

Senger, K., M. Merika, et al. (2000). "Gene repression by coactivator repulsion." Mol Cell **6**(4): 931-7.

Sgouras, D. N., M. A. Athanasiou, et al. (1995). "ERF: an ETS domain protein with strong transcriptional repressor activity, can suppress ets-associated tumorigenesis and is regulated by phosphorylation during cell cycle and mitogenic stimulation." EMBO J **14**(19): 4781-93.

Smith, R. L. and A. D. Johnson (2000). "Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes." Trends Biochem Sci **25**(7): 325-30.

Spyropoulos, D. D., P. N. Pharr, et al. (2000). "Hemorrhage, impaired hematopoiesis, and lethality in mouse embryos carrying a targeted disruption of the Fli1 transcription factor." Mol Cell Biol **20**(15): 5643-52.

Struhl, K. (1998). "Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms." Genes Dev **12**(5): 599-606.

Sudarsanam, P. and F. Winston (2000). "The Swi/Snf family nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control." Trends Genet **16**(8): 345-51.

Thut, C. J., J. A. Goodrich, et al. (1997). "Repression of p53-mediated transcription by MDM2: a dual mechanism." Genes Dev **11**(15): 1974-86.

Trojanowska, M. (2000). "Ets factors and regulation of the extracellular matrix." Oncogene **19**(55): 6464-71.

Vandel, L., E. Nicolas, et al. (2001). "Transcriptional Repression by the Retinoblastoma Protein through the Recruitment of a Histone Methyltransferase." Mol Cell Biol **21**(19): 6484-94.

Wang, L. C., W. Swat, et al. (1998). "The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow." Genes Dev **12**(15): 2392-402.

Wasylyk, B., J. Hagman, et al. (1998). "Ets transcription factors: nuclear effectors of the Ras-MAP-kinase signaling pathway." Trends Biochem Sci **23**(6): 213-6.

Werner, M. H., M. Clore, et al. (1995). "The solution structure of the human ETS1-DNA complex reveals a novel mode of binding and true side chain intercalation." Cell **83**(5): 761-71.

Wernert, N., M. B. Raes, et al. (1992). "c-ets1 proto-oncogene is a transcription factor expressed in endothelial cells during tumor vascularization and other forms of angiogenesis in humans." Am J Pathol **140**(1): 119-27.

Willy, P. J., R. Kobayashi, et al. (2000). "A basal transcription factor that activates or represses transcription." Science **290**(5493): 982-5.

Wharton, W., J. Savell, et al. (2000). "Inhibition of mitogenesis in Balb/c-3T3 cells by Trichostatin A. Multiple alterations in the induction and activation of cyclin-cyclin- dependent kinase complexes." J Biol Chem **275**(43): 33981-7.

Yamamoto, H., M. L. Flannery, et al. (1998). "Defective trophoblast function in mice with a targeted mutation of Ets2." Genes Dev **12**(9): 1315-26.

Yang, S. H., E. Vickers, et al. (2001). "Temporal recruitment of the mSin3A-histone deacetylase corepressor complex to the ETS domain transcription factor Elk-1." Mol Cell Biol **21**(8): 2802-14.

Yang, W. M., C. Inouye, et al. (1996). "Transcriptional repression by YY1 is mediated by interaction with a mammalian homolog of the yeast global regulator RPD3." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(23): 12845-50.

Yoshida, M., S. Horinouchi, et al. (1995). "Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function." Bioessays **17**(5): 423-30.

Zhang, H., K. M. Catron, et al. (1996). "A role for the Msx-1 homeodomain in transcriptional regulation: residues in the N-terminal arm mediate TATA

binding protein interaction and transcriptional repression.” Proc Natl Acad Sci U S A **93**(5): 1764-9.

Zhou, Q., R. W. Gedrich, et al. (1995). “Transcriptional repression of the c-fos gene by YY1 is mediated by a direct interaction with ATF/CREB.” J Virol **69**(7): 4323-30.