ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΕΡΕΥΝΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ ΤΑΞΗΣ ΙΙ Εα ΚΑΙ Εβ ΤΟΥ ΠΟΝΤΙΚΟΥ

Δημήτριος Ι. Στραβοπόδης

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 1995

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΕΡΕΥΝΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ ΤΑΞΗΣ ΙΙ Εα ΚΑΙ Εβ ΤΟΥ ΠΟΝΤΙΚΟΥ

Δημήτριος Ι. Στραβοπόδης

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 1995

Εξάλειψη των μολυσματικών βακτηριακών πληθυσμών (μπλε κυλινδρικοί σχηματισμοί) μέσω της ενεργοποίησης των φαγοκυτταρικών μηχανισμών των μακροφάγων λεμφοειδικών κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος (κίτρινοι σφαιρικοί σχηματισμοί) [Scientific American, Αύγουστος 1994].

στην οικογένειά μου

Επιδίωξή μας είναι να φωτίσουμε τη φύση,
όχι να τη δαμάσουμε...
Γ.Θ.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε εξ' ολοκλήρου στο εργαστήριο της Ομάδας Μοριακής Βιολογίας Θηλαστικών του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (Ι.Μ.Β.Β.) του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Ερευνας (Ι.Τ.Ε.), υπό την διαρκή επίβλεψη του Καθηγ. Ιωσήφ Παπαματθαιάκη, τον οποίον ευχαριστώ θερμά τόσο για την ευκαιρία που μου προσέφερε να ασχοληθώ με τον τομέα της Μοριακής Γενετικής, όσο και για την αδιάκοπη επιστημονική του υποστήριξη και συνεργασία του τα πέντε χρόνια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Θερμά ευχαριστώ τον Διευθυντή του Ι.Μ.Β.Β., Καθηγ. Γ. Θηραίο, τόσο για την επιστημονική αλλά και προσωπική του συμμετοχή στην περάτωση της παρούσας ερευνητικής μελέτης, όσο και για την ενθάρρυνση και συμβολή του στο ξεκίνημα των μεταδιδακτορικών μου σπουδών στις Η.Π.Α.

Θα ήθελα ακόμη, να ευχαριστήσω τον Διευθυντή του EMBL, Καθηγ. Φ. Καφάτο, καθώς και τον Καθηγ. Ν. Μοσχονά, που μου έδωσαν την ευκαιρία τον Σεπτέμβριο του 1989, να ενσωματωθώ στο ερευνητικό μεταπτυχιακό πρόγραμμα του Ι.Μ.Β.Β.

Ευχαριστώ την συνάδελφο Δρ. Μ. Γρηγορίου για την τεχνική της καθοδήγηση και την επιστημονική της προσφορά στα πρώτα χρόνια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Θερμά ευχαριστώ τους φίλους και συναδέλφους Δρ. Α. Αργυροκαστρίτη, Ν. Παπαδοπούλου και Μ. Καψετάκη για την ασταμάτητη επιστημονική τους ή μη επικοινωνία και συνεχή τους συμπαράσταση όλα αυτά τα χρόνια. Η συμβολή τους στην ολοκλήρωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν ανεκτίμητη.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της ομάδας των Θηλαστικών για την βοήθειά τους, τόσο σε επιστημονικό όσο και προσωπικό επίπεδο, καθώς και τον συνάδελφο Ν. Ταβερναράκη για την καταλυτική συμμετοχή του στην επίλυση τεχνικών προβλημάτων.

Θερμά ευχαριστώ επίσης την Λ. Καλογεράκη για την καθοριστική συμβολή της στην παρουσίαση των φωτογραφιών της παρούσας μελέτης, καθώς και την Γ. Χουλάκη, τόσο για την άριστη τεχνική επεξεργασία του κειμένου, όσο και για την άψογη εμφάνιση γραφικών και διαγραμμάτων.

Ευχαριστώ επίσης τους Δρς. Δ. Θάνο, Α. Μουστάκα, J. Darnell, K. Ozato και A. Van Der Eb για την ευγενική προσφορά τους να μας προμηθεύσουν με τις απαιτούμενες πλασμιδιακές κατασκευές για την ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την βαθειά μου ευγνωμοσύνη στην οικογένειά μου και ιδιαίτερα στους γονείς μου για την συνεχή ηθική και υλική τους υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Ιδιαίτερα επίσης, ευχαριστώ την φιλόλογο Δρ. Ε. Στραβοπόδη για την επιμέλεια του παρόντος κειμένου.

Δ. Ι. Στραβοπόδης
17/2/1995

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ
ΓΛΩΣΣΑΡΙΟ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ - ΓΛΩΣΣΑΡΙΟ

A: αδενίνη (Adenine)

aa: αμινοξύ (aminoacid)

A/B: αντίσωμα (Antibody)

Activity: ενεργότητα

Adaptors - Mediators: διαμεσολαβητικά μόρια προσαρμογής

Alkaline: Αλκαλικός

AMP(ampicilin): γονίδιο που κωδικοποιεί τον φαινότυπο της ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη

Annealing: επαναδιάταξη

Antigen: αντιγόνο

Antisense: αντικωδικός (as)

AP: αμινοπουρίνη (Aminopurin)

APC: κύτταρο που παρουσιάζει το αντιγόνο (Antigen Presenting Cell)

B: δεσμευμένο (Bound)

Bacto: βακτηριακός (bacterial)

BGHpA: Bovine Growth Hormone poly[A+]: σήμα πολυαδενυλίωσης του γονιδίου της αυξητικής ορμόνης βοός

Binding reaction: αντίδραση σύνδεσης

Blunt end: 'τυφλό' άκρο

bp: ζεύγη(ος) βάσεων (base pair)

BSA: αλβουμίνη ορού βοός (Bovine Serum Albumin)

c: κεντρικός πυρήνας (core)

C: κυτοσίνη (Cytocine)

°C: βαθμοί κελσίου

Ca/CaM: μοριακό μονοπάτι ασβεστίου - καλμοδουλίνης

CaM: καλμοδουλίνη (Calmodulin)

cAMP: κυκλικό - AMP

CAT: ακετυλοτρανσφεράση της χλωραμφαινικόλης

CHX: κυκλοεξιμίδη (Cycloheximide)

CID: Combined Immunodeficiency: Οξεία Συγγενής Ανοσοανεπάρκεια

CIP: αλκαλική φωσφατάση μικρού βοός (Calf Intestine Phosphatase)

- cis - : δια μέσου αλληλουχίας

CMV: κυτταρομεγαλοϊός (υποκινητής του κυτταρομεγαλοϊού)

Comp: ανταγωνιστής (Competitor)

Complex: σύμπλεγμα-σύμπλοκο

CON(constitutive): συστατικός - συνεχής

Consensus: συνισταμένη αλληλουχία

Conversion: μετατροπή

cpm: counts per minute: κρούσεις ανά λεπτό

Crosslinking: διαμοριακή σύνδεση

CsCl: χλωριούχο καίσιο

Cytoplasmic: κυτταροπλασματικός (C)

Deletion: έλλειψη (dl)

Distal: απόμακρη

Domain: λειτουργικός πυρήνας

Drug: φάρμακο

DTT: διθειοθρεϊτόλη

Duplication: διπλασιασμός

EDTA: αιθύλενο-διάμινο- τετραοξικό οξύ

EMSA: μεταβολή κινητικότητας λόγω αλληλεπίδρασης (Electrophoretic Mobility Shift Assay)

Electroelution: ηλεκτροέκλουση

Enhancer: ενισχυτής

EtBr: θρωμιούχο αιθίδιο

Extract: εκχύλισμα

F: ελεύθερος ανιχνευτής (Free)

Fragment: θραύσμα DNA

G: γουανίνη (Guanine)

GAF: (Interferon)Gamma Activation Factor: παράγοντας ενεργοποιημένος από IFN-γ

GAPDH: δεϋδρογενάση της φωσφορικής γλυκεριναλδεΰδης

GAS: Gamma Activation Site, ή Gamma Activating Sequence: περιοχή που ενεργοποιείται από IFN- γ

GASL: GAS Large: Μεγάλο GAS -cis- στοιχείο (ανταπόκριση σε IFN- γ και IFN- α/ β)

GASS: GAS Small: Μικρό GAS -cis- στοιχείο (ανταπόκριση μόνο σε IFN- γ)

GEN: γενιστεΐνη(G) (Genistein)

Histocompatibility: Ιστοσυμβατότητα

Hour{h(r)}: ώρα

Iγ(Invariant- γ chain): αμετάβλητη- γ αλυσίδα

ICSBP: Interferon Consensus Sequence Binding Protein: συνδετική πρωτεΐνη της κοινής (ομόλογης) αλληλουχίας που ρυθμίζεται από IFN

IFN: ιντερφερόνη (Interferon)

IFN- α: ιντερφερόνη- α

IFN- β: ιντερφερόνη- β

IFN- γ: ιντερφερόνη- γ

Immune response(Ir): ανοσολογική απόκριση

IND: επαγόμενο(ς) (Inducible)

Inhibition: αναστολή

Insert: ένθεμα

IRF: Interferon Regulatory Factor: παράγοντας ρυθμιζόμενος από IFN

ISF: Interferon Stimulated Factor: παράγοντας ενεργοποιημένος από IFN

ISG(s): Interferon Stimulated Gene(s): γονίδιο(α) ενεργοποιημένο(α) από IFN(α/ β ή γ)

ISGF: Interferon Stimulated Gene Factor: παράγοντας γονίδιου ενεργοποιημένου από IFN

ISR: Interferon Stimulated Region: περιοχή ενεργοποιημένη από IFN

ISRE: Interferon Stimulated Response Element: περιοχή που ανταποκρίνεται και ενεργοποιείται από IFN

JAK: Just(Janus) Another Kinase: ακόμα μια κινάση ή μια κινάση 'Ιανός'

JH: JAK Homology domains: λειτουργικοί πυρήνες που εμφανίζουν ομολογία ανάμεσα στα μέλη της JAK οικογένειας

Kb: κιλοβάση (Kilobase) (Kβ)

Kd: κιλοδαλτόνιο (Kilodalton)

Labelling: σήμανση

Ligand: μοριακός σηματοδότης - συνδεόμενο μόριο

Ligation: σύνδεση

Li/Urea: λίθιο/ουρία

Lymphocytes: λεμφοκύτταρα

M: μοριακότητα (Molarity)

Mb: μεγαβάση (Megabase): 1.000.000 βάσεις (Mβ)

μgr: μικρογραμμάριο: 1/ 1.000.000 του γραμμαρίου

Minimum promoter: υποκινητής ελάχιστης μεταγραφικής ενεργότητας

μl(λ): μικρόλιτρο: 1/ 1.000.000 του λίτρου

Mutation: μεταλλαγή (mt)

MW: μοριακό βάρος (MB) (Molecular Weight)

N: τυχαία νουκλεοτιδική βάση (A, G, C, T)

NEM: ν-αιθύλ-μαλεϊμίδη

NEO: νεομυκίνη (Neomycin)

Nick Translation: ραδιοσήμανση μέσω πολυμερισμού τυχαίων μονόκλωνων σπασιμάτων DNA

NS: μη ειδικός (Non Specific)

Nuclear: πυρηνικός (N)

O/N: καθ' όλη την διάρκεια της νύχτας (overnight: 16h)

ONPG: ο- νιτροφαινύλ- β- D- γαλακτοσίδιο

ORI: γονίδιο υπεύθυνο για τον διπλασιασμό πλασμιδίων

PCR: αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)

PEG: πολύ- αιθυλενική γλυκόλη

Pellet: ίζημα

PKC: Protein Kinase - C: πρωτεϊνική κινάση - C

Plasmid: πλασμίδιο

Polylinker: πολυσυνδέτης (PL)

Pool: μίγμα, συνοθύλευμα

Pr: πολυκλωνικός αντιορός προ της ανοσοποίησης

Probe: ανιχνευτής- ιχνηθέτης

Promoter: υποκινητής

Proximal: εγγύς

PTK: Protein Tyrosine Kinase: πρωτεΐνη με ιδιότητες κινάσης τυροσίνης

PTP: Protein Tyrosine Phosphatase: πρωτεΐνη με ιδιότητες φωσφατάσης τυροσίνης

P-Y: φωσφοτυροσίνη (Phosphotyrosine): τροποποιημένο αμινοξύ

Py: πυριμιδίνη (Pyrimidine)

RA: ρετινοϊκό οξύ (Retinoic Acid)

Randomn priming: ραδιοσήμανση με την βοήθεια τυχαίων εναρκτών

Relative: σχετικός

Relative CAT Activity: Σχετική ειδική ενεργότητα του CAT ενζύμου

Repressor: καταστολέας

Resistance: ανθεκτικότητα (re)

Restriction enzyme(s): ένζυμο(α) περιορισμού

RNAases: ένζυμα που υδρολύουν RNA

RSV - LTR: Rous Sarcoma Virus - Long Terminal Repeat: μακριά ακραία επανάληψη του RSV ιού

Sense: κωδικός (s)

Sensitivity: ευαισθησία

Sequencing: προσδιορισμός πρωτοδιάταξης αλληλουχίας DNA ή Πρωτεΐνης

Silencing: σιώπηση

sp: ειδικό(ς) (specific)

SPH: σφιγγοσίνη(Sp) (Sphigoshine)

STAT(s): Signal Transducer(s) and Activator(s) of Transcription: μεταδότης(-ες) μηνυμάτων και ενεργοποιητής(-ές) μεταγραφής

Sticky ends: προεξέχοντα άκρα (συμβατά μεταξύ τους)

STR: σταυροσπορίνη(S) (Staurosporin)

Subcloning: υποκλωνοποίηση

Substrate: μοριακό υπόστρωμα

Supercoiled: υπερελικωμένος

Superinduction: υπερεπαγωγή

SV40pA: μήνυμα πολυαδενυλίωσης προερχόμενο από τον ιό SV40

T: θυμίνη (Thymidine)

TAP(s): Transporter(s) associated with antigen presentation: μεταφορέας(-είς) επεξεργασμένων αντιγόνων

THEO: θεοφιλίνη(T) (Theophilin)

Titration: τιτλοδότηση

- trans - : με παρέμβαση πρωτεΐνης

Transcription factor: μεταγραφικός παράγοντας

Transformation: μετασχηματισμός

Truncation: μοριακός ακρωτηριασμός

Transient Transfection: παροδική διαμόλυνση

Tyrosine kinase(s): κινάση(ες) τυροσίνης

"u": μονάδα μέτρησης ενζυμικής ενεργότητας (unit)

VAN: βαναδικό οξύ(V) ([o]-Vanadate acid)

Vector: φορέας

vs: έναντι (versus)

"x": φορές (fold)

Yield: απόδοση

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΤΟ ΜΕΙΖΟΝ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ ΤΑΞΗΣ II (Major Histocompatibility Complex class II: MHC-II)

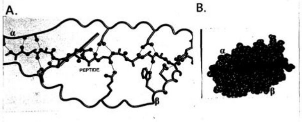
1.1. Βιολογικές δράσεις των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξης II

Μία από τις κυριότερες διαφορές που χαρακτηρίζει την ανατομική και λειτουργική οργάνωση των ανώτερων σπονδυλωτών, από τους κατώτερους εξελικτικά πολυκύτταρους οργανισμούς, είναι η ανάπτυξη ενός άρτια διαμορφωμένου αμυντικού συστήματος, το οποίον μπορεί να διακρίνει τα εξωγενή παθογόνα (pathogens) από τα ενδογενή αντιγόνα (antigens) του ξενιστή (host) και να τα εξαλείψει. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα αυτής της εκλεκτικής ανοσολογικής απόκρισης (Immune response: Ir), είναι η γρήγορη προσαρμογή στις νεοσχηματιζόμενες παθογενείς συνθήκες και η επακόλουθη ενεργοποίηση φυσιολογικών μηχανισμών άμυνας με σκοπό την τελική εξαφάνιση των εξωγενών αντιγόνων.

Η κυτταρική οργάνωση του ανοσολογικού συστήματος συνίσταται στην συνεργατική δραστηριότητα δύο παρόμοιων αλλά διακριτών πληθυσμών Β- και Τ-λεμφοκυττάρων (lymphocytes), τα οποία εμφανίζουν υψηλή ειδικότητα αναγνώρισης και εξάλειψης όλων των δυνατών διαφορετικών μοριακών δομών αντιγόνων[1,3,10,12,18].

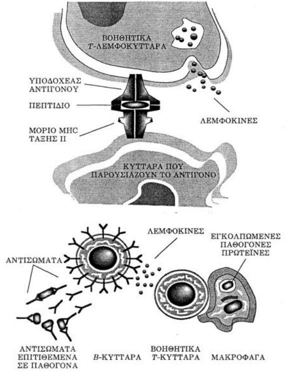
Τα Β-λεμφοκύτταρα (B-cells) σε συνεργασία με τον λεμφοειδικό πληθυσμό των μακροφάγων (macrophages) εγκολπώνουν-ενδοκυττώνουν τα μολυσματικά παθογόνα (βακτήρια, παράσιτα), τα οποία αφού επεξεργαστούν ενδοσωματικά (endosomes) μέσω της ενεργοποίησης ειδικών ενζυμικών πρωτεολυτικών μηχανισμών, τα παρουσιάζουν στην κυτταρική μεμβράνη σαν τροποποιημένα αντιγόνα (processed antigens)[1,12,18]. Σκοπός αυτής της μοριακής επεξεργασίας είναι η μείωση της δομικής ποικιλομορφίας των ανοσοενεργών αντιγόνων στον βαθμό της εύκολης αλλά και ειδικής τους αναγνώρισης από τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες του Μείζονος Συστήματος Ιστοσυμβατότητας τάξης II (MHC-II).

Τα αντιγόνα τάξης II συνίστανται από δύο διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες (α, β)[1,5,11,12], των οποίων η τριτοταγής συνεργατική αλληλεπίδραση δημιουργεί ειδικές θέσεις μοριακής αναγνώρισης (pockets) μετασχηματισμένων αντιγόνων υψηλής συγγένειας για τον συγκεκριμένο πολυμορφικό συνδυασμό των ετεροδιμερών πρωτεϊνών MHC-II (εικόνα 1)[1,11,12,18].



Εικόνα 1: Η ειδικότητα αλληλεπίδρασης αντιγόνου-τάξης ΙΙ συμπλέγματος εντοπίζεται στην κεντρική περιοχή της αλληλουχίας του επεξεργασμένου αντιγόνου που αναγνωρίζει το συγκεκριμένο α/β ετεροδιμερές, ενώ τα ακραία τμήματα του δεκαπεπτιδίου (peptide) παραμένουν ευλύγιστα και συνήθως εμφανίζουν ποικιλομορφία μοριακού μήκους[1,2].

Το σύμπλεγμα αντιγόνου/MHC-II συνιστά τον κυριότερο μοριακό πληροφοριοδότη της ανοσολογικής απόκρισης, αφού η επακόλουθη στερεοειδική του αναγνώριση από τον διμερή (α/β) υποδοχέα (TcR) των Τ-βοηθητικών (TH) επιλεγμένων κυτταρικών κλώνων, παρουσία του μη πολυμορφικού CD4 συνυποδοχέα, οδηγεί στην ενεργοποίηση των μονοπατιών σύνθεσης και έκκρισης της ειδικής λεμφοκίνης IL-4 από τα TH κύτταρα[5,12,18], η οποία συνδεόμενη με τους αντίστοιχους υποδοχείς των ώριμων Β-κυττάρων επάγει την μιτωτική διαίρεση αυτών καθώς και την διαδοχική έκκριση μονομορφικών πληθυσμών διαλυτών υποδοχέων αντιγόνων -αντισωμάτων- οι οποίοι μπορούν να ουδετεροποιήσουν και να εξαλείψουν την παθογόνο δράση των εξωγενών αντιγόνων (εικόνα 2)[12,18].



Εικόνα 2: Μοντέλο κυτταρομεσολαβητικής ανοσίας της ανοσολογικής απάντησης έναντι επεξεργασμένου αντιγόνου[1,2].

Σε περιπτώσεις ιϊκών, αλλά και ενδοκυτταρικών παθογενών μολύνσεων βακτηρίων και πρωτοζώων (όπως αυτών που προκαλούν μαλάρια ή λεϊσμάνια) του ξενιστή, η ανοσολογική απάντηση διαμορφώνεται πάλι μέσω της αντιγονικής επεξεργασίας των ξένων (non-self) παθογόνων μορίων και της διαδοχικής εμφάνισης αυτών στην εξωτερική μεμβράνη του προσβεβλημένου κυττάρου (antigen presenting cell) μέσω διαφορικής ενεργοποίησης ειδικών πρωτεολυτικών συστημάτων (πρωτεασώματα)[195] και μηχανισμών μεταφοράς διαμέσου του ενδοπλασματικού δικτύου (TAP: Transporter associated with Antigen Processing) και του δικτύου Golgi. Ακολουθεί αναγνώριση του μετασχηματισμένου αντιγόνου από τις διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες του Μείζονος Συστήματος

Ιστοσυμβατότητας τάξης I (MHC-I), η οποία σταθεροποιείται μετά την αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα (TcR) των T-κυτταροτοξικών κλώνων (Tc) παρουσία του CD8 μη πολυμορφικού συνενεργοποιητή, γεγονός που οδηγεί στην τελική παραγωγή και έκκριση κυτταροτοξικών χημικών διαμεσολαβητικών ουσιών, που αποικοδομούν τους μολυσμένους κυτταρικούς πληθυσμούς (κυτταρομεσολαβητική ανοσία)[12,18].

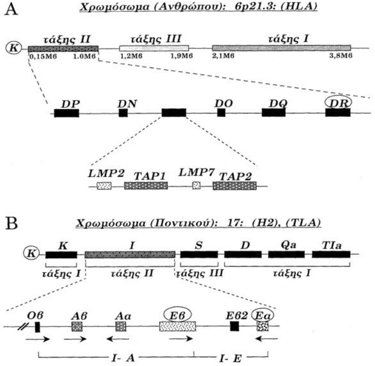
Ενώ η διαμοριακή αυτοσυγκρότηση των α/β ετεροδιμερών λαμβάνει χώρα εντός του ενδοπλασματικού δικτύου παρουσία της αμετάβλητης αλυσίδας (Iγ: Invariant gamma chain)[6,11,12], η οποία δρα σαν 'καταλύτης' της ορθής στερεοδιαμόρφωσης του τάξης II συμπλέγματος, η πρωταρχική αλληλεπίδραση με το επεξεργασμένο αντιγόνο γίνεται εντός των ενδοσωμάτων μετά την εκλεκτική πρωτεόλυση της Iγ πρωτεΐνης σε μικρότερα πεπτιδικά θραύσματα (CLIPs), με τελικό σκοπό την απομάκρυνσή της μέσω της δράσης του -DM-τάξης II πρωτεϊνικού μορίου και την επακόλουθη απελευθέρωση-αποκάλυψη της μοριακής θέσης πρόσδεσης του αντιγόνου (cleft) στην κορυφή του τάξης II α/β ετεροδιμερούς συμπλέγματος[12].

Ο οντογενετικός καθορισμός της αναπτυξιακής πορείας διαφοροποίησης των ανώριμων $CD4^+$, $CD8^+$ T-κυττάρων σε $CD4^+$ $CD8^-$ (T_H) ή $CD8^+$ $CD4^-$ (Tc) διακριτούς υποπληθυσμούς, εξαρτάται από την πρωτοταγή αλληλεπίδραση αυτών με άλλους κυτταρικούς τύπους (δενδριτικά κύτταρα, θυμικό επιθήλιο)[1,5], τα οποία φέρουν στην επιφάνειά τους είτε τάξης II, είτε τάξης I μεμβρανικά αντιγόνα ιστοσυμβατότητας αντίστοιχα[3,10,18]. Αυτή η διαδικασία κυτταρικής διαφοροποίησης, ανεξάρτητα του αν είναι κατευθυνόμενη ή στοχαστική[3], συνιστά μαζί με τον μηχανισμό θετικής ή αρνητικής επιλογής (θεωρία κλωνικής επιλογής) χρήσιμων (non-self), ή άχρηστων (self) T-κυτταρικών κλώνων την σημαντικότερη λειτουργία του θύμου αδένα των ανώτερων σπονδυλοζώων[10,18]. Οι μοριακοί μηχανισμοί ωρίμανσης των T-κυττάρων (thymic education), οι οποίοι κατευθύνονται από την δομική ποικιλομορφία των τάξης II και I αντιγόνων, είναι αυτοί που κατέχουν τον σημαντικότερο ρόλο στην αποφυγή δημιουργίας ανοσοανεπαρκειών και αυτοάνοσων ασθενειών και που προσφέρουν μεγάλη ευελιξία απόκρισης και ειδικότητα αναγνώρισης αντιγόνου στην ανοσολογική απάντηση[10,18].

1.2. Γενωμική οργάνωση και λειτουργία του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας (MHC)

(α) Ανθρώπου (HLA) (εικόνα 3Α): Η δομική οργάνωση των γονιδίων του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας (MHC) συνίσταται στην ομαδοποιημένη κατανομή τριών διακριτών οικογενειών - τάξης I, II και III - ανοσολογικών ή μη γονιδίων, οι οποίες καταλαμβάνουν επί του μικρού βραχίονα του έκτου ανθρώπινου χρωμοσώματος (6p.21) μια εκτεταμένη γενωμική περιοχή μήκους 4Mb[2,4,208]. Τα τάξης II γονίδια DP, DQ και DR εμφανίζουν υψηλή ομολογία στις πρωτοταγείς, τόσο ρυθμιστικές όσο και κωδικές τους αλληλουχίες[2,11], γεγονός που αιτιολογείται από την ύπαρξη μοριακών εξελικτικών μηχανισμών γονιδιακού διπλασιασμού και επιλογής ή γονιδιακής μετατροπής (gene conversion) ενός αρχέγονου μη πολυμορφικού πρόδρομου γονιδίου. Με παρόμοιες διαδικασίες διπλασιασμού και μετάθεσης (duplication και translocation) δικαιολογείται η εμβόλιμη χρωμοσωμική παρουσία των 'τάξης Ι' γονιδίων ανάμεσα στα DN και DO μη πολυμορφικά μέλη της τάξης ΙΙ οικογένειας[2,4]. Τα TAP1,2 γονίδια (Transporter(s) associated with Antigen Presentation) κωδικοποιούν διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς των επεξεργασμένων αντιγόνων από το κυτταρόπλασμα στις δεξαμενές του ενδοπλασματικού δικτύου, ενώ τα LMP2,7 γονίδια συνθέτουν πρωτεολυτικά μόρια που συγκροτούν το κυλινδρικό υπερμοριακό σύμπλεγμα του πρωτεασώματος (βλ. κεφάλαιο 1.1..)[2,12]. Αντίθετα μάλιστα με ότι παρατηρείται με άλλα μέλη της οικογένειας των πρωτεασών, τόσο τα LMP2,7 όσο και τα τάξης Ι γονίδια επάγονται ισχυρά μέσω μηχανισμών διαφορικής μεταγραφής μετά από την επίδραση της ιντερφερόνης-γ (IFN-γ)[2,4], γεγονός που συνιστά και το πρώτο βήμα για την ανοσολογική απόκριση έναντι του εξωγενούς αντιγόνου. Ο μοριακός χαρακτηρισμός της τάξης ΙΙΙ οικογένειας κατέδειξε την ύπαρξη πολλών καινούργιων μη ανοσολογικών γονιδίων, όπως αυτών που κωδικοποιούν την σύνθεση των πρωτεϊνών του συμπληρώματος (σύστημα πήξης: C_2, C_4) καθώς και την παραγωγή των πρωτεϊνών TNF-α,β (Tumour Necrosis Factor) και HSP70 (Heat Shock Protein)[2,4].

(β) Ποντικού (εικόνα 3Β): Ο γενετικός τόπος του MHC στο ποντίκι εντοπίζεται στο κεντρομερικό τμήμα του χρωμοσώματος 17 και οργανώνεται με παρόμοιο τρόπο με αυτόν του ανθρώπου, παρουσιάζοντας ομαδοποίηση κατά διακριτές οικογένειες των τάξης Ι, ΙΙ και ΙΙΙ γονιδίων[5,108]. Ειδικώτερα η τάξης ΙΙ ανοσολογική οικογένεια εμπεριέχει τα Αβ, Αα και Εβ, Εα πολυμορφικά ζεύγη γονιδίων σε αντίθετους προσανατολισμούς μεταγραφικής σύνθεσης (όπως και τα νεοχαρακτηρισμένα ζεύγη Οβ, Οα και Μβ, Μα), καθώς και τα $Aβ_3$, $Eβ_2$ ψευδογονίδια των οποίων η λειτουργία παραμένει ακόμα άγνωστη[11,208,228]. Η δομική ομοιότητα τόσο των ρυθμιστικών στοιχείων όσο και των κωδικοποιών αλληλουχιών, των Εβ (Αβ) και Εα (Αα) γονιδίων καθώς και των DRα, Εα αντίστοιχα[5,45] υποδηλώνει ξανά την ύπαρξη εξελικτικών μηχανισμών διπλασιασμού και μοριακής επιλογής ή ακόμα και γονιδιακής μετατροπής ενός αρχέγονου πρόδρομου μορίου. Αυτό μάλιστα συνιστά και μια αξιόπιστη εξήγηση για την ομαδοποίηση των MHC γονιδίων, γεγονός που τους προσφέρει το ισχυρό πλεονέκτημα ελαχιστοποίησης των γενετικών ανασυνδυασμών μεταξύ των ήδη επιλεγμένων πολυμορφικών μελών της οικογένειας (coevolution of function), πράγμα που οδηγεί σε μια πληθυσμιακά ισορροπημένη και δομικά σταθερή γονιδιακή εξέλιξη[2]. Η οργάνωση των γενετικών τόπων του MHC του ανθρώπου και του ποντικού περιγράφεται ως ακολούθως στις εικόνες 3Α και 3Β αντίστοιχα.



Εικόνα 3: Μοριακή οργάνωση της γενωμικής περιοχής του MHC, στον άνθρωπο (A) και στον ποντικό (B). Οι ελλειψοειδείς σχηματισμοί προσδιορίζουν τα γονίδια που θα αναλυθούν στην παρούσα μελέτη[2,4,208].

1.3. Μοριακοί μηχανισμοί ρύθμισης της έκφρασης των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξης II

1.3.1. Β-ιστοειδική και επαγόμενη από ιντερφερόνη-γ (IFN-γ) έκφραση των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξης II

Τα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας τάξης II εκφράζονται σε ένα πολύ περιορισμένο φάσμα κυτταρικών υποπληθυσμών του ανοσολογικού συστήματος, όπως αυτών των Β-κυττάρων, δενδριτικών κυττάρων, κυττάρων θυμικού επιθηλίου, ενεργοποιημένων ανθρώπινων Τ-κυττάρων και ειδικών τύπων μακροφάγων συμπεριλαμβανομένων των σπληνικών κυττάρων, μακροφάγων δέρματος τύπου Langerhans και των Kupffer κυττάρων του ήπατος[5,9,13,45]. Τα επίπεδα έκφρασης των τάξης II αντιγόνων στους προαναφερόμενους κυτταρικούς τύπους, ρυθμίζονται θετικά ή αρνητικά από ένα πλήθος εξωτερικών φυσιολογικών ερεθισμάτων, τα οποία ανάλογα με το στάδιο διαφοροποίησης[44] ή την ιστοειδικότητα του κυτταρικού πληθυσμού[20], εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία ελέγχου και καθορισμού των μηχανισμών της μεταγραφικής ενεργοποίησης των τάξης II γονιδίων[5,9,27,44].

Στην Β-λεμφοειδική σειρά η τάξης II γονιδιακή έκφραση ρυθμίζεται ανάλογα με το στάδιο διαφοροποίησης του κυτταρικού κλώνου[27,44]· ανώριμα προ-Β-κύτταρα εμφανίζουν αρνητικό μεμβρανικό χαρακτήρα II⁻, ενώ ώριμοι Β-πληθυσμοί εκφράζουν συνεχώς τάξης II αντιγόνα (II⁺) σε υψηλά συστατικά επίπεδα (constitutive expression)[43,56]. Τελικώς κατά την διαφοροποίηση των Β-κυττάρων σε περιφερειακά πλασματοκύτταρα παρατηρείται αναστολή της μεταγραφικής δράσης των τάξης II γονιδίων[56], πιθανότατα μέσω της ενεργοποίησης ενός κυρίαρχου κυτταροκατασταλτικού ρυθμιστικού μηχανισμού (Dominant Suppressive Mechanism), φαινόμενο που αναλύθηκε με πειράματα μεμβρανικών συντήξεων (cell fusion) και δημιουργίας παροδικών ετεροκάρυων (heterokaryon) μεταξύ ώριμων Β-κυττάρων και πλασματοκυττάρων[5,9,27,44].

Η έκφραση των τάξης II αντιγόνων μπορεί να αυξηθεί 10-15 φορές μετά την επίδραση της IL-4 λεμφοκίνης σε μη ενεργοποιημένα Β-κύτταρα (resting cells)[1,56], ενώ η ανταγωνιστική δράση της IFN-γ μπορεί να καταστείλει ισχυρά την λειτουργία της IL-4 στους Β-υποπληθυσμούς[5,9].

Ενώ λοιπόν στα Β-κύτταρα παρατηρείται υψηλή συστατική έκφραση των τάξης II αντιγόνων[5,9,13,17], σε κυτταρικούς υποπληθυσμούς μακροφάγων - οι οποίοι εμφανίζουν II⁻ φαινότυπο - η παρουσία της IFN-γ μπορεί να επάγει ισχυρά την μεταγραφική ενεργοποίηση των τάξης II γονιδίων[5,9]. Κινητικές μελέτες της επαγόμενης από IFN-γ έκφρασης του DRα γονιδίου, κατέδειξαν την ύπαρξη μιας συνεχώς χρονικά αυξανόμενης μεταγραφικής δραστηριότητας η οποία φθάνει στο μέγιστο της ενεργότητάς της μεταξύ 24-48 ωρών επώασης με IFN-γ[9,29,44]. Κυτταρικοί πληθυσμοί, όπως επιδερμικοί ινοβλάστες, μελανοκύτταρα, φλεβικό επιθήλιο, κερατινοκύτταρα του δέρματος, ειδικά επιθήλια (HeLa) και αστροκύτταρα, αν και εμφανίζουν μεμβρανικό II⁻ φαινότυπο, μπορούν να επάγουν υψηλά επίπεδα των ενδογενών τους τάξης II mRNAs μετά από την συνεχή επίδραση της IFN-γ[5,9].

Η επώαση μονοκυτταρικών κλώνων-μακροφάγων (II⁻) καθώς και άλλων αστροκυτταρικών επιθηλιακών σειρών με τον TNF-α παράγοντα, οδηγεί σε χαμηλή επαγωγή των τάξης II γονιδίων[34], ενώ η συμπαρουσία της IFN-γ υπερπαράγει συνεργατικά τα ενδογενή τάξης II αντιγόνα, δημιουργώντας έτσι ένα ισχυρό II⁺ μεμβρανικό φαινότυπο[5,9,34,37,51,200].

Αντίθετα από την δράση της IFN-γ, η τύπου-I IFN-α/θ καταστέλει την επαγόμενη δραστηριότητα των τάξης II γονιδίων σε πληθυσμούς μακροφάγων, ενώ η δράση των προσταγλανδινών, κορτικοστεροειδών εμφανίζεται ανασταλτική, τόσο σε Β-κλώνους όσο και σε κυτταρικές σειρές μακροφάγων[5,9]. Η ιστοειδικότητα της έκφρασης καθώς και οι μοριακοί σηματοδότες (ligands) της επαγωγής ή καταστολής των ενδογενών τάξης II γονιδίων περιγράφονται στον πίνακα 1.

ΙΣΤΟΕΙΔΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΤΑΞΗΣ II ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ
(5,9,44,54)

Β-λεμφοκύτταρα
Μακροφάγα
Δενδριτικά κύτταρα
Θυμικό επιθήλιο
Ενεργοποιημένα Τ-κύτταρα

ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΕΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΤΑΞΗΣ II ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ
(5,9,13,14,15,16,17,21,34,37,43,47,51,200)

IFN-γ:	Μακροφάγα, ινοβλάστες, γλιοβλαστώματα, επιθηλιακά κύτταρα
IL-4:	Β-κύτταρα, μακροφάγα
TNF-α:	Μακροφάγα
GM-CSF:	Μακροφάγα
IL-2:	Τ-κύτταρα

ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΤΑΞΗΣ II ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ
(5,9,16,55,58)

IFN-α/θ:	Μακροφάγα, ενδοθηλιακά κύτταρα
CSF-1:	Μακροφάγα
Δεξαμεθαζόνη:	Β-κύτταρα
PGE2:	Β-κύτταρα
LPS:	Μακροφάγα

Πίνακας 1: Ιστοειδικότητα και μοριακοί σηματοδότες της έκφρασης των τάξης II αντιγόνων σε πλήθος κυτταρικών σειρών.

1.3.2. Αυτοανοσία - Ανοσοανεπάρκειες

Η εκτοπική έκφραση των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξης II σε ακατάλληλους (inappropriate) κυτταρικούς τύπους οδηγεί στην μεμβρανική παρουσίαση ενδοκυτταρικών αντιγόνων εαυτού (self), προκαλώντας έτσι την ενεργοποίηση των TH βοηθητικών και επακόλουθα των Tc κυτταροτοξικών υποπληθυσμών και την διαδοχική καταστροφή των κλώνων που εμφανίζουν το αντιγόνο (APC)[5,10,18,89]. Υψηλή έκφραση των τάξης II ετεροδιμερών πρωτεϊνών σε μη φυσιολογικά συναντώμενους κυτταρικούς τύπους, όπως στις Β-παγκρεατικές νησίδες ή σε θυρεοκύτταρα, επάγει την εμφάνιση αυτοάνοσων παθολογικών ασθενειών, όπως ινσουλινοεξαρτώμενου διαβήτη και θυρεοειδίτιδας αντίστοιχα[5,9,42,208]. Αντίθετα, η απουσία της ιστοειδικά ελεγχόμενης έκφρασης των τάξης II αντιγόνων[44,48] προκαλεί σοβαρές καταστάσεις οξείας ανοσοανεπάρκειας[5,75,84,85] (CID), μια και η αδυναμία μεμβρανικής παρουσίασης του επεξεργασμένου αντιγόνου οδηγεί σε ανοσολογική αδράνεια και αδυναμία ανοσοαπόκρισης σε μολυσματικά ιικά ή βακτηριακά παθογόνα[5,9].

Η *in vitro* κατανόηση των μηχανισμών που οδηγούν σε σύνδρομα ανοσοανεπάρκειας (immunodeficiency) επιτεύχθηκε μετά από πειράματα κυτταρικών μεμβρανικών συντήξεων Β-κυττάρων ασθενών οξείας λεμφοκυτταρικής αυτοανοσίας (BLS: Bare Lymphocyte Syndrome) με Β-κλώνους υγειών μελών, τα οποία οδήγησαν στην δημιουργία ενός παροδικού ετεροκάρυου II^{+} μεμβρανικού φαινότυπου[89], προσδιορίζοντας έτσι την μοριακή αλλοίωση των BLS ασθενών στην απουσία ενός *trans*-μεταγραφικού παράγοντα (σήματος στο μονοπάτι μετάδοσης της πληροφορίας της IFN-γ) υπεύθυνου για την υψηλή ιστοειδική δραστηριότητα των τάξης II γονιδίων[75,84,85,87,89,90].

Το ανάλογο II^{-} πειραματικό μοντέλο του BLS αυτοάνοσου συνδρόμου, δημιουργήθηκε από την χημική μεταλλαξογένεση ή γ-ακτινοβόληση και επακόλουθη ανοσοεπιλογή υγειών Β-κυτταρικών πληθυσμών II^{+} μεμβανικού φαινοτύπου. Η ανοσοανεπαρκής σειρά RJ2.2.5[88] (ομάδα συμπληρωματικότητας τύπου A), η οποία προήλθε από Β-λέμφωμα Raji, αδυνατεί να εκφράσει οποιοδήποτε ισότυπο τάξης II αντιγόνου ($DR^{-}DQ^{-}$, DP^{-})[76,84,88,92], ενώ μετά από την μοριακή ανάλυση και ανοσοεπιλογή ενός μεγάλου φάσματος κυτταρικών υβριδίων RJ2.2.5.xB-κύτταρα, που περιέχουν διαφορετικά χρωμοσώματα ποντικού, φάνηκε ότι η μοριακή αλλοίωση της μεταλλαγμένης σειράς προσδιορίζεται στην έλλειψη ενός *trans*-μεταγραφικού παράγοντα που τοπογραφείται στο χρωμόσωμα 16[5,77,84]. Με πειράματα σταθερής διαμόλυνσης (stable transfection) των RJ2.2.5. ανοσοανεπαρκών κυτταρικών σειρών με cDNA διβλιοθήκες από υγιείς Β-πληθυσμούς και επακόλουθη ανοσοεπιλογή για τάξης II θετικούς (II^{+}) μεμβρανικούς φαινότυπους (HLA resque), απομονώθηκε και χαρακτηρίσθηκε ένας cDNA κλώνος -CIITA- ο οποίος ευθύνεται για τον μεταλλαγμένο φαινότυπο της RJ2.2.5. σειράς[76,84]. Η μοριακή αλλοίωση του CIITA (Class II Trans-Activator) ενεργοποιητή σε ανοσοανεπαρκείς σειρές τύπου A (BLS-2) ταυτοποιήθηκε στην εσωτερική έλλειψη τμήματος της κωδικής γονιδιακής περιοχής -εξώνιο μήκους 72 βάσεων-, ενώ η αναενσωμάτωσή του είτε σε BLS-2 παθολογικούς κλώνους, είτε σε RJ2.2.5. μεταλλαγμένες κυτταρικές σειρές επανέφερε την Β-ιστοειδική έκφραση των τάξης ΙΙ αντιγόνων στην μεμβράνη[76,84]. Η ικανότητα επαγωγής του CIITA γονιδίου μετά από IFN-γ σε μονοκυτταρικές σειρές THP-1, καθώς και η δυνατότητα, μετά την υπερέκφρασή του σε ανοσοανεπαρκείς κυτταρικές σειρές (και σε μελανώματα), μεταγραφικής ενεργοποίησης των τάξης ΙΙ γονιδίων καθιστά τον CIITA παράγοντα ένα σημαντικό ρυθμιστή τόσο της Β-ιστοειδικής όσο και της επαγόμενης από IFN-γ συμπεριφοράς των MHC-II γονιδίων στον άνθρωπο[76,77,84].

Μοριακή ανάλυση άλλων ομάδων ανοσοανεπάρκειας (complementation groups: B, C) προσδιόρισε την αδυναμία έκφρασης μεμβρανικών τάξης ΙΙ αντιγόνων, στην μεταλλαγμένη ανενεργό μορφή του RFX5 μεταγραφικού παράγοντα[84,212], καθώς και στην δημιουργία ανενεργών RFX ετεροδιμερών συμπλόκων[75,84,88,93,94,95] (βλ. κεφάλαιο 1.3.3.2.), τα οποία ανήκουν στην οικογένεια των 'X-box' συντηρημένων πρωτεϊνών, που αλληλεπιδρούν με την X *cis*-ρυθμιστική αλληλουχία των τάξης ΙΙ υποκινητών[5,20,75,95] (βλ. κεφάλαιο 1.3.3.1.). Η μοριακή ταξινόμηση των ομάδων συμπληρωματικότητας, καθώς και η αντίστοιχη γονιδιακή αλλοίωση περιγράφονται στον πίνακα 2.

Ομάδα συμπληρωματικότητας (76,84,85,86,87,88,89,92,94)	**Μοριακή κατάληψη από μεταγραφικά σύμπλοκα του υποκινητή** (48,84,85)	**Γονιδιακή μεταλαγή** (75,76,77,84,85,88,93,94,95,212)
A		
BLS2	+	
BCH	+/-	ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΛΛΟΙΩΣΗ
RJ2.2.5.	+	ΤΟΥ CIITA
B		
BLS1	-	
Ramia	-	ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ RFX
Nacera	-	
C		
SJO	-	
Robert	-	RFX5
6.1.6.	-	ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ RFX

Πίνακας 2: Ταξινόμηση των ομάδων συμπληρωματικότητας και περιγραφή των αντίστοιχων γονιδιακών αλλοιώσεων που ευθύνονται για τον μεμβρανικό φαινότυπο ΙΙ-.

1.3.3. Μεταγραφική γονιδιακή ρύθμιση των τάξης II υποκινητών

Τόσο η Β-ιστοειδική έκφραση, όσο και η επαγόμενη από IFN-γ υψηλή μεμβρανική αντιπροσώπευση των τάξης II αντιγόνων φαίνεται να συνδυάζεται απόλυτα με τα επίπεδα των ενδοκυτταρικών τάξης II mRNAs και μάλιστα να εξαρτάται από την διαφορική ενεργότητα των αντίστοιχων υποκινητών, οι οποίοι μπορούν εκλεκτικά να αποκρίνονται στα μοριακά μηνύματα (ligands) δράσης και ελέγχου του μηχανισμού ενεργοποίησης των τάξης II γονιδίων[1,5,9,39,49]. Αν και ο ρόλος των μετα-μεταγραφικών γεγονότων, που αφορούν την δομική σταθερότητα (half-life time) των τάξης II mRNAs εμφανίζεται υψηλής σημασίας, η ιστοειδικά και 'λεμφοκινικά' ελεγχόμενη δράση των τάξης II γονιδίων αποδίδεται αποκλειστικά στην μεταγραφική ενεργότητα των εγγύς (proximal) ρυθμιστικών περιοχών των αντίστοιχων υποκινητών, οι οποίες δρώντας συνεργατικά και συντονισμένα προσφέρουν την απαιτούμενη Β-κυτταροειδική ή/και την ισχυρά επαγόμενη από IFN-γ τάξης II γονιδιακή δραστηριότητα[5,39].

Η μεταγραφική ενεργότητα των τάξης II υποκινητών μέσω της δράσης της IFN-γ σε μακροφάγες ή επιθηλιακές κυτταρικές σειρές φθάνει σε ένα μέγιστο επίπεδο μετά από επώαση με την λεμφοκίνη για 24-48 ώρες[29,44], ενώ 'run on' πειράματα *in vitro* μεταγραφής παρουσία κυκλοεξειμίδης (CHX), κατέδειξαν την εξάρτηση του μηχανισμού επαγωγής - για συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους - από την εκ νέου *(de novo)* πρωτεϊνική σύνθεση ενός ενδιαμέσου μεταγραφικού ενεργοποιητή (πιθανώς η CIITA πρωτεΐνη)[29,76,77,84], ο οποίος φαίνεται να ρυθμίζει τόσο την Β-ιστοειδική, όσο και την επαγόμενη από IFN-γ μεταγραφική συμπεριφορά των τάξης II υποκινητών[77,84]. Τα πειραματικά στοιχεία για την αναστολή της επαγωγής μέσω IFN-γ των τάξης II γονιδίων, από την δράση της κυκλοεξιμίδης εμφανίζονται αντιφατικά, γεγονός που αποδίδεται στην χρήση κυτταρικών σειρών διαφορετικής φυσιολογίας και συμπεριφοράς, καθώς και στον ποικίλο χρόνο προσθήκης της κυκλοεξιμίδης σε σχέση με την IFN-γ στην κυτταρική καλλιέργεια· πιθανολογείται μάλιστα ότι ο αναστολέας δεν καταργεί τα πρώϊμα μοριακά γεγονότα μεταγραφικής έναρξης, αλλά αυτά της επακόλουθης επιμήκυνσης των ήδη συντιθέμενων μικρών κλώνων mRNA[16].

1.3.3.1. *Cis*-ρυθμιστικά στοιχεία

Κλωνοποίηση και επακόλουθη μοριακή ανάλυση της πρωτοταγούς νουκλεοτιδικής αλληλουχίας όλων των τάξης II υποκινητών στον άνθρωπο και στον ποντικό αντίστοιχα αποκάλυψε την ύπαρξη τριών δομικά συντηρημένων *-cis*-στοιχείων (X, Y και H), τα οποία τοπολογούνται στις εγγύς περιοχές -40 έως -160 των αντίστοιχων υποκινητών και τα οποία απαιτούνται για την συστατική (B) και επαγόμενη (IFN-γ) δραστηριότητα των τάξης II γονιδίων[5,23,26,41,79]. Το ευκαρυωτικό λειτουργικά πρωτοχαρακτηρισμένο TATA *cis*-στοιχείο[82], δεν φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στους μηχανισμούς μεταγραφικής έναρξης των τάξης II γονιδίων, μια και μεταλλαγές σάρωσης (linker scanning mutations) αυτού στα Aα, Eα[39], DRα γονίδια δεν αλλοίωναν ούτε ποιοτικά (θέση έναρξης) ούτε και ποσοτικά (επίπεδο έκφρασης) τον μεταγραφικό μηχανισμό, ενώ σε άλλους υποκινητές τάξης II, όπου εκλείπει τελείως (ή εμφανίζεται ανενεργό), υπάρχουν ενδείξεις ισχυρού λειτουργικού ελέγχου από τις συντηρημένες X- και Y- ρυθμιστικές περιοχές[5,9,28,45].

Η Y *cis*-(B-box) αλληλουχία τοπολογείται 40-90 βάσεις 5΄ του σημείου έναρξης της μεταγραφής και συνίσταται από ένα συντηρημένο μοτίβο (motif) δέκα βάσεων με κεντρικό πυρήνα (core) την CCAAT αλληλουχία (CAT-box) σε αντίστροφο προσανατολισμό[1,5,9,28].

Η X *cis*-(A-box) συντηρημένη αλληλουχία προσδιορίζεται πάντα σε συγκεκριμένη στερεοειδική ευθυγράμμιση (stereospecific alignement) με την Y-περιοχή, διατηρώντας έτσι σταθερή την φάση της έλικας (2-στροφές) μεταξύ των X-Y αλληλουχιών (19-20 ζεύγη βάσεων)[5,35,36], γεγονός που ευνοεί την διαπρωτεϊνική αλληλεπίδραση (protein-protein interaction) των *trans*-μεταγραφικών παραγόντων που συνδέοται στις X- και Y- ρυθμιστικές περιοχές αντίστοιχα (βλ. κεφάλαιο 1.3.3.2.)[5,31]. Η X- περιοχή συνίσταται από δεκατέσσερα συντηρημένα ζευγάρια βάσεων, τα οποία συνθέτουν τα δύο λειτουργικά και δομικά αλληλοεξαρτώμενα ρυθμιστικά υποστοιχεία X_1 και X_2[5,34,47]. Ενώ, το X_1 υποστοιχείο αναταυτοποιήθηκε σαν η πρωτογενώς χαρακτηρισμένη X-περιοχή των τάξης II υποκινητών, το X_2 προσδιορίσθηκε να τοπολογείται μεταξύ της 5΄ X-Y ενδιάμεσης αλληλουχίας και να παρουσιάζει ισχυρή επικάλυψη με την 3΄ περιοχή του X_1 υποστοιχείου.

Η υψηλή δομική ομολογία του X_2 με τις TRE/CRE (TPA Response Element / CAMP Response Element) αλληλουχίες[8,32], ενδεικνύει την υψηλής σημασίας λειτουργική συμμετοχή των c-jun/fos αντιγονικά και δομικά ομόλογων *trans*-μεταγραφικών συμπλόκων στην ιστοειδική και επαγόμενη δραστηριότητα των τάξης II υποκινητών (βλ. κεφάλαιο 1.3.3.2.)[5,88].

Με πειραματικές δοκιμές παροδικής διαμόλυνσης B-κυτταρικών σειρών με την χρήση ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών κατασκευών, που φέρουν την εγγύς περιοχή του DRα υποκινητή μπροστά από το CAT γονίδιο αναφοράς, αποκαλύφθηκε η B-ιστοειδική ενεργότητα ενισχυτή (enhancer activity) της X-Y περιοχής, καθώς και η επαγόμενη από IFN-γ μεταγραφική δραστικότητα των X-Y-W/Z(S/H) ρυθμιστικών αλληλουχιών του DRα γονιδίου[5,9,22,23,25,28,31,42,43].

Το W/Z *cis*-στοιχείο τοπολογείται 30 ζεύγη βάσεων 5΄ της X-περιοχής του DRα υποκινητή και περιλαμβάνει την συντηρημένη H/S (Heptamer/Servenius seq.) επταμερή (H) αλληλουχία $\underline{\mathrm{GGACC}}\,\frac{\mathrm{T}}{\mathrm{C}}\,\frac{\overline{\mathrm{T}}\ \mathrm{G}}{\mathrm{C}}$, η οποία συναντάται σε ομόλογες θέσεις σε όλα σχεδόν τα λειτουργικά τάξης II γονίδια (DR, DQ, DP, E_α^{β}, A_α^{β})[5,47] και η οποία είναι αναγκαία - αλλά όχι ικανή - τόσο για την IFN-γ επαγόμενη όσο και για την Β-ιστοειδική μεταγραφική ενεργότητα του αντίστοιχου τάξης ΙΙ υποκινητή.

Μοριακή ανάλυση μεταλλαξογένεσης των W (H/S), X_{1-2} και Y περιοχών ξεχωριστά, είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας του DRα υποκινητή σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης[8,39], ενώ σημειακές μεταλλαγές ή μικρές υποκαταστάσεις της W(H)-X_1 ενδιάμεσης ρυθμιστικής περιοχής προσδιόρισαν την ύπαρξη ενός νέου θετικού στοιχείου J πλούσιου σε βάσεις πυριμιδίνης (Py: rich), το οποίον δρα ενισχυτικά στην ενεργότητα του υποκινητή, σταθεροποιώντας τις μοριακές αλληλεπιδράσεις των -*trans*-μεταγραφικών παραγόντων που συνδέονται στις X και W(H) ρυθμιστικές αλληλουχίες αντίστοιχα[5,25,31,79].

Η συνεργατική και συνδυαστική μοριακή φύση όλων των *cis*-ρυθμιστικών περιοχών $X_{1,2}$, W(H), J και Y των τάξης ΙΙ υποκινητών διαφαίνεται τόσο από την δομικά συντηρημένη σύνθεση των επί μέρους στοιχείων, όσο και από λειτουργικά πειράματα σημειακών μεταλλαγών και ελλείψεων (5΄ ή εσωτερικών), όπου η μοριακή αλλοίωση οποιασδήποτε από τις *cis*-περιοχές οδηγεί σε μεγάλη πτώση της μεταγραφικής -ιστοειδικής ή επαγόμενης- ενεργότητας του αντίστοιχου τάξης ΙΙ υποκινητή[5,23,215].

Εκτός από τις κοινές *cis*-ρυθμιστικές αλληλουχίες των τάξης ΙΙ γονιδίων, που εξασφαλίζουν την συντονισμένη έκφραση των DRα/β, Εα/β, Αα/β ζευγών αντιγόνων στην μεμβράνη, κάποια μέλη παρουσιάζουν πρόσθετα λειτουργικά στοιχεία στους υποκινητές τους, τα οποία τους προσφέρουν και ιδιαίτερα χαρακτηριστικά μεταγραφικής συμπεριφοράς:

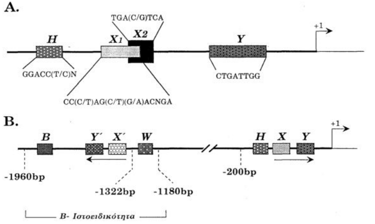
α) *DRα:* Περιλαμβάνει 3΄ της Y-περιοχής μια 'οκταμερή' TGCA αλληλουχία απαραίτητη για την Β-ιστοειδική μεταγραφική δραστηριότητα[5,22].

β) *DPα:* 5΄ της X-περιοχής (-102 έως -107), εμπεριέχει μια πενταμερή αλληλουχία ομόλογη του J-στοιχείου (CTTTA) απαραίτητη για την IFN-γ επαγόμενη ενεργότητα του υποκινητή[21,31(DRα)].

γ) *Αα:* 3΄ της Y *cis*-ρυθμιστικής αλληλουχίας εντοπίσθηκε μια νέα περιοχή, η T, η οποία ευθύνεται για την TNF-α επαγόμενη μεταγραφική απόκριση του υποκινητή σε WEHI-3 κυτταρικές σειρές μακροφάγων[5,51].

δ) *Iγ:* Το γονίδιο της Iγ (Invariant gamma chain) μη πολυμορφικής πρωτεΐνης, αν και τοπογραφείται σε διαφορετική χρωμοσωμική περιοχή από αυτή των τάξης ΙΙ γονιδίων, εμφανίζει, λόγω της μοριακής φυσιολογίας του προϊόντος του (βλ. κεφάλαιο 1.1.), ομόλογη μεταγραφική συμπεριφορά μ' αυτή των τάξης ΙΙ υποκινητών. Εκτός όμως από τα X, Y και H ρυθμιστικά στοιχεία περιέχει 3΄ της Y- συντηρημένης περιοχής δύο 'NFκB-μοτίβα' (Iγ2 και Iγ3), τα οποία προσφέρουν στον υποκινητή τόσο Β-ιστοειδική ενεργότητα, όσο και υψηλή απόκριση στην δράση του TNF-α μοριακού σηματοδότη. Πρόσθετα ιδιαίτερα μοριακά χαρακτηριστικά του Iγ υποκινητή είναι η παρουσία των Sp1 και CAT ρυθμιστικών στοιχείων, των οποίων ο ρόλος εντοπίζεται στην βασική συστατική έκφραση του Iγ γονιδίου[5,50,53].

ε) *Εα:* Η εγγύς περιοχή του υποκινητή του Εα γονιδίου αποτελείται από τα τρία X, Y και H συντηρημένα στοιχεία[41], ενώ οι 5΄ απόμακρες (-1180 έως -1960) *cis*-ρυθμιστικές αλληλουχίες εμφανίζουν μια κατοπτρική αντίστροφη οργάνωση της εγγύς περιοχής, περιλαμβάνοντας διπλά X, Y και H αντίγραφα (X΄,Y΄και W)[40], τα οποία παίζουν καθοριστικό ρόλο στην B-ιστοειδική δραστηριότητα του Eα υποκινητή, όταν αυτός ενσωματωθεί σε ομόζυγους Eα-/Eα- τρανσγενωμικούς ποντικούς[1,5,7,9]. Η λειτουργική σημασία του 'NFκB'-στοιχείου (B) στην 5΄ περιοχή της Y΄-αλληλουχίας παραμένει ακόμη αδιευκρίνιστη[1,46]. Η μοριακή περιγραφή ενός κλασικού υποκινητή τάξης II γονιδίου, καθώς και η διαγραμματική παρουσίαση της οργάνωσης του Eα υποκινητή του ποντικού (βασική θεματολογία της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής), παραθέτονται στην εικόνα 4A και 4B αντίστοιχα.



Εικόνα 4: (A): Οργάνωση και δομή ενός κλασικού υποκινητή τάξης II γονιδίου. (B): Μοριακή περιγραφή της εγγύς και απόμακρης 5΄ ρυθμιστικής πειροχής του Eα υποκινητή[1,5,25,46].

1.3.3.2. *Trans-μεταγραφικοί παράγοντες*

Η πολυπλοκότητα της οργάνωσης και η συνδυαστική φύση των επιμέρους λειτουργικών στοιχείων ενός κλασικού τάξης II υποκινητή διαφαίνεται στο πλήθος και στην ποικιλία των *trans*-μεταγραφικών παραγόντων, που συνδέονται στις αντίστοιχες *cis*-αλληλουχίες του γονιδίου στόχου[5,9,30,24]. Η συνεργατική φύση πλήθους διαμοριακών πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων στην εγγύς περιοχή κάθε τάξης II υποκινητή συνιστά και τον βασικό μηχανισμό ιστοειδικής ή/και

επαγόμενης έκφρασης των MHC-αντιγόνων ιστοσυμβατότητας στην μεμβράνη[5,72].
Αν και πλήθος πυρηνικών συμπλεγμάτων έχει ταυτοποιηθεί να αναγνωρίζει τις X_1, X_2 και Y ρυθμιστικές αλληλουχίες[5,24,30], η μοριακή κλωνοποίηση και ο λειτουργικός χαρακτηρισμός αυτών βρίσκεται ακόμη σε πρώϊμο στάδιο μια και ο γενικός μηχανισμός ρύθμισης της μεταγραφικής έκφρασης των τάξης II γονιδίων, μπορεί να εντοπίζεται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (φωσφορυλίωση) και όχι στην εκ νέου σύνθεση *(de novo)* ενός *trans*-μεταγραφικού παράγοντα, γεγονός που καθιστά αδύνατη την απομόνωση και την ανάλυση του αντίστοιχου ρυθμιστικού γονιδίου.

Δοκιμές σάρωσης έκφρασης (expression screening) λgt11 ανασυνδυασμένων cDNA βιβλιοθηκών με μια σειρά πολυμερισμένων ολιγονουκλεοτιδίων από τις X_1, X_2 και Y περιοχές αντίστοιχα, κατέληξαν στην κλωνοποίηση και στην επακόλουθη λειτουργική ανάλυση τριών τουλάχιστον μεταγραφικών παραγόντων[60-63], των οποίων οι μοριακές ιδιότητες δίδονται ως ακολούθως:

α) <u>*RFX-1*</u>[5,9,60,73,74,215]: Συνιστά ένα νέο μεταγραφικό παράγοντα μοριακού μεγέθους 979 αμινοξέων, ο οποίος εμφανίζει υψηλή συγγένεια σύνδεσης με την συντηρημένη X_1 *cis*-αλληλουχία του DRα υποκινητή, με την οποία μπορεί να αλληλεπιδρά είτε με την μορφή μονομερούς είτε ομοδιμερούς-ετεροδιμερούς συμπλέγματος. Τόσο η περιοχή διμερισμού, όσο και σύνδεσης με το DNA δεν εμφανίζει καμία δομική ομολογία με άλλο μεταγραφικό παράγοντα, ενώ τα κλωνοποιημένα ομόλογα μέλη της οικογένειας RFX (RFX1, 2, 3, 4) παρουσιάζουν τουλάχιστον σε ότι αφορά τις συντηρημένες λειτουργίες, ομοιότητα στην πρωτοταγή τους αμινοξική αλληλουχία από 70% μέχρι και 90% (P. Emery και B. Mach: προσωπική επικοινωνία).

Η ανασυνδυασμένη RFX-1 πρωτεΐνη παρουσιάζει μια διαφορική συγγένεια *in vitro* αλληλεπίδρασης με τα X_1 *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία της τάξης: DRα>DPα>DQα, ενώ πολυκλωνικοί αντιοροί έναντι αυτής φαίνεται να αναγνωρίζουν ασθενώς τα φυσικά (native) πυρηνικά σύμπλοκα των X-πρωτεϊνών, ενδεικνύοντας έτσι την ενεργό συμμετοχή του RFX-1 παράγοντα στην *trans*-μεταγραφική πρωτεϊνική οργάνωση του DRα υποκινητή. Η λειτουργική συμπεριφορά του RFX-1 προσδιορίσθηκε μέσω της δημιουργίας σταθερών διαμολυσμένων κυτταρικών σειρών οστεοσαρκώματος όπου εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα RFX-mRNA αντικωδικής κατεύθυνσης μεταγραφής (antisense), τα οποία μετά από την δράση της IFN-γ φαίνεται να τιτλοδοτούν και να αποσταθεροποιούν το ενδογενώς παραγόμενο κωδικό RFX-mRNA, καταστέλοντας έτσι την επαγόμενη δραστηριότητα του DRα υποκινητή[5].

Κυτταρικές σειρές προερχόμενες από BLS (SCID) ασθενείς ή από τις B και <u>C</u> ανοσοανεπαρκείς ομάδες συμπληρωματικότητας εμφανίζουν μοριακές αλλοιώσεις στην δομή και την λειτουργία (αδυναμία σύνδεσης με την X_1-περιοχή) του RFX-5 ετεροδιμερούς μεταγραφικού παράγοντα, ενώ η προσθήκη εξωγενούς ημικαθαρισμένου RFX-5 σε BLS πυρηνικά εκχυλίσματα επαναφέρει όλο το μεταγραφικό δυναμικό αυτών, τόσο στο επίπεδο των αλληλεπιδράσεων τους με *cis*-στοιχεία όσο και σε αυτό της ρύθμισης της διαφορικής μεταγραφικής έναρξης[84].

Η ικανότητα αναγνώρισης από την RFX-1 πρωτεΐνη X_1-ομόλογων *cis*-αλληλουχιών ιϊκών υποκινητών και ενισχυτών συνιστά το νέο φαινόμενο υψηλής βιολογικής σημασίας της μοριακής παρεμβολής του παθογόνου στην ανοσοαπόκριση του ξενιστή, το οποίον μόλις πρόσφατα άρχισε να διερευνάται[73,74].

β) *NF-Y*[5,215]: Βιοχημικός καθαρισμός των Υ-συνδεόμενων μεταγραφικών παραγόντων κατέδειξε την ύπαρξη ενός ετεροδιμερούς συμπλόκου NF-YA και NF-YB[63], το οποίον εμφανίζει μεγάλη εξελικτική συντήρηση (υψηλή δομική ομολογία με τα αντίστοιχα HAP-2, 3 ομόλογα του σακχαρομύκητα)[64,65], καθώς και υψηλή συγγένεια σύνδεσης με την Υ-περιοχή -Εα, Αα, DRα- ανεξάρτητα από την νουκλεοτιδική σύνθεση των παράπλευρων αλληλουχιών (flanking sequences)[5,66-68]. Η μη ειδική γονιδιακή έκφραση των NF-Y γονιδίων, ανεξαρτήτως του Ια φαινότυπου, ταυτοποιεί αυτούς του μεταγραφικούς παράγοντες στην κατηγορία των βασικών συστατικών της μεταγραφικής μηχανής και όχι σε αυτή που ρυθμίζει τόσο την ιστοειδική όσο και την επαγόμενη δραστηριότητα των τάξης ΙΙ υποκινητών[5].

Η πιθανή ομόλογη Υ-πρωτεΐνη του ανθρώπου YEBP εμφανίζει πολύ παρόμοιες λειτουργικές ιδιότητες με τους NF-Y παράγοντες και μάλιστα δύναται να επαναφέρει την *in vitro* υψηλή μεταγραφική δραστικότητα πυρηνικών εκχυλισμάτων, που έχουν 'ανοσοαφαιμαχθεί' από τις Υ-πρωτεΐνες, όταν αυτή προστεθεί εξωγενώς[5,67].

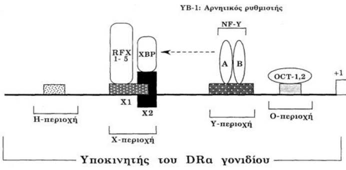
Η ΥΒ-1 συνιστά μια άλλη ανθρώπινη μεταγραφική πρωτεΐνη η οποία εμφανίζει υψηλή αλλά όχι ειδική συγγένεια σύνδεσης με την Υ-περιοχή του DRα γονιδίου. Ο πιθανός ρόλος του ΥΒ1 παράγοντα προσδιορίζεται στην καταστολή της ιστοειδικής έκφρασης των τάξης ΙΙ γονιδίων, μια και τα επίπεδα των ΥΒ-1 mRNA και DRα mRNA εμφανίζουν αντίστροφη σχέση[5,62,215].

γ) *hXBP*[5,9,215]: Κλωνοποιήθηκε με πειράματα σάρωσης Β-ιστοειδικών ανθρώπινων βιβλιοθηκών έκφρασης, εμφανίζοντας μεγάλη συγγένεια σύνδεσης με την X_2 *cis*-ρυθμιστική αλληλουχία του DRα γονιδίου[61]. Η ανάλυση της μοριακής της δομής την κατέταξε στην οικογένεια των πρωτεϊνών που εμφανίζουν τα 'μοριακά φερμουάρ της λευκίνης', ενώ η ικανότητα ετεροδιμερισμού της με τον c-fos μεταγραφικό παράγοντα και η επακόλουθη αλληλεπίδραση του ετεροδιμερούς με το TRE-ομόλογο στοιχείο -X_2- του DRα υποκινητή, ταξινομεί την hXBP πρωτεΐνη στην μεγάλη οικογένεια των jun/fos παραγόντων[5,61]. Αν και το hXBP γονίδιο εκφράζεται μη-ιστοειδικά, πειράματα παροδικής διαμόλυνσης 'antisense' κατασκευών κατέδειξαν τον υψηλής σημασίας ρυθμιστικό ρόλο του hXBP μεταγραφικού παράγοντα, τόσο στην Β-κυτταροειδική όσο και στην IFN-γ επαγόμενη ενεργότητα των DR και DP τάξης ΙΙ γονιδίων[5,9].

Η ομόλογη πρωτεΐνη του ποντικού -mXBP- εμφανίζει παρόμοια δομικά χαρακτηριστικά[5,69,70], ενώ η ικανότητα ετεροδιμερισμού της με τον c-jun παράγοντα και η επακόλουθη αναγνώριση της CRE (X_2) *cis*-ρυθμιστικής αλληλουχίας, αιτιολογεί την ικανότητα επαγόμενης ρύθμισης του Αα γονιδίου από τους μοριακούς σηματοδότες των φορβολικών εστέρων, οι οποίοι δρουν μέσω της ενεργοποίησης των TRE/CRE συνδεόμενων μεταγραφικών παραγόντων[5,32,70,71].

Η οκταμερής αλληλουχία του DRα υποκινητή φαίνεται να αλληλεπιδρά με τους δύο καλά χαρακτηρισμένους μεταγραφικούς παράγοντες Oct-1 και Oct-2[5,9,215]. Αν και ακόμα δεν έχει αποδειχθεί βιοχημικά, η Oct-2 πρωτεΐνη φαίνεται να ευθύνεται για την λεμφοειδική δράση της οκταμερούς περιοχής του DRα γονιδίου, ενώ ο Oct-1 παράγοντας για την συστατική βασική μεταγραφική ενεργοποίηση του αντίστοιχου DRα υποκινητή[5,215].

Η αδυναμία μοριακής κατάληψης από μεταγραφικά σύμπλοκα (occupation) των υποκινητών DRα και DPα σε ανοσοανεπαρκείς κυτταρικές σειρές (B και C) ή σε κλώνους αρνητικού -II⁻- τάξης II μεμβρανικού φαινότυπου, υποδεικνύει την συνεργατική φύση των *trans*-μεταγραφικών παραγόντων των τάξης II υποκινητών, τόσο σε επίπεδο σύνδεσης όσο και μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου στόχου. Πράγματι, οι *in vitro* ενεργότητες σύνδεσης της X_1-περιοχής φαίνονται να σταθεροποιούνται από την ύπαρξη των NF-Y παραγόντων[72], ενώ δοκιμές ανοσοκατακρήμνισης αποδεικνύουν την διαμοριακή πρωτεϊνική αλληλεπίδραση των X και Y πυρηνικών παραγόντων. Η στερεοχημική ευθυγράμμιση των X και Y ρυθμιστικών *cis*-στοιχείων φαίνεται να απαιτείται για το μοριακό λύγισμα (bending) της ενδιάμεσης συνδετικής περιοχής των δύο στροφών έλικας 19 βάσεων[35,36], που κύριο στόχο έχει την προσέγγιση και δομική αλληλεπίδραση των NF-Y και mXBP/mRFX μεταγραφικών συμπλόκων[72]. Η μοριακή περιγραφή της πρωτεϊνικής οργάνωσης ενός κλασικού τάξης II υποκινητή φαίνεται στην εικόνα 5.



Εικόνα 5: Μοριακή περιγραφή της *trans*-πρωτεϊνικής οργάνωσης ενός τυπικού τάξης II υποκινητή (DRα). Το διακεκομένο βέλος ενδεικνύει την διαμοριακή συνεργατική αλληλεπίδραση των X και Y πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων[5,60-63,215].

2. ΠΡΩΙΜΑ ΜΟΡΙΑΚΑ ΓΕΓΟΝΟΤΑ ΤΗΣ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΗΣ (IFN) (IFN-signalling)

2.1. Ενεργοποίηση γονιδίων μέσω IFN-α/β

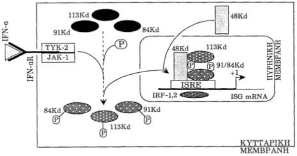
Ενα από τα κυριότερα βήματα τόσο της ρύθμισης της κυτταρικής διαφοροποίησης όσο και του ελέγχου της μιτογενετικής (mitogenic) κυτταρικής δραστηριότητας, είναι η σύνδεση πολυπεπτιδικών σηματοδοτών (ligands) στους αντίστοιχους διαμεμβρανικούς τους υποδοχείς και η επακόλουθη μετάδοση της μοριακής πληροφορίας (signal transduction) από την μεμβράνη προς τον κυτταρικό πυρήνα. Οι IFN-α/β και IFN-γ, αν και συνδέονται σε διακριτούς υποδοχείς, ενεργοποιούν διαφορετικές αλλά επικαλυπτόμενες ομάδες γονιδίων, των οποίων ο χρόνος της μεταγραφικής επαγωγής ποικίλει από 30′ έως και 8 h[13,14,16,110,128] (βλ. πίνακα 3). Μοριακή γενετική ανάλυση των γονιδίων που ενεργοποιούνται από IFN-α[ISG(S): Interferon Stimulated Gene(s)], κατέδειξε την ύπαρξη ενός συντηρημένου *cis*-ρυθμιστικού στοιχείου (ISRE), στην εγγύς περιοχή του επαγόμενου υποκινητή του κάθε μέλους της ISG-οικογένειας, το οποίον εμφανίζεται ικανό και αναγκαίο για την μεταγραφική ενεργοποίηση του αντίστοιχου γονιδίου[100,102,103,111,119,162,205] (πίνακας 3).

ΓΟΝΙΔΙΟ	*cis*-ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΣΤΟΙΧΕΙΟ
	→ →
ISG15	cagTTTCggTTTCcc
ISG54	tagTTTCacTTTCcc
GBP	tacTTTCagTTTCat
9-27	aagTTTCtaTTTCct
6-16	gagTTTCatTTTCcc
HLA-class I	cagTTTCttTTCTcc
ISRE: ΚΟΙΝΗ ΠΕΡΙΟΧΗ (consensus):	TTTCNNTTTC

Πίνακας 3: Μοριακή συνταξινόμηση των ISGs γονιδίων που επάγονται από IFN-α. Η δομική συντήρηση της ISRE (Interferon Stimulated Response Element) ρυθμιστικής περιοχής είναι εμφανής και περιλαμβάνει την συγγραμμική επανάληψη του 'TTTC' υποστοιχείου (μαύρα βέλη)[104,107,118,141,204].

Επακόλουθος χαρακτηρισμός των *trans*-μεταγραφικών παραγόντων που αλληλεπιδρούν με το ISRE ρυθμιστικό στοιχείο αποκάλυψε την ύπαρξη υπερμοριακών πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων τα οποία συνίστανται από τέσσερα πολυπεπτίδια μοριακού βάρους 113 kd, 91 kd, 84 kd και 48 kd αντίστοιχα [101,108,110,123,127].

Η υπομονάδα των 48 kd αποτελεί το μεταγραφικό συστατικό του ISGF-3 υπερσυμπλέγματος (Interferon Stimulated Response Factor-3) που αλληλεπιδρά ισχυρά με το DNA, ενώ οι 113 kd και 91/84 kd πρωτεϊνικοί παράγοντες φαίνεται ότι συνιστούν τον πυρήνα του δυναμικού της μεταγραφικής ενεργοποίησης (transcriptional activators) του ISGF-3 συμπλόκου[108,110,123,128,141]. Μοριακή κλωνοποίηση και δομικός χαρακτηρισμός των αντίστοιχων γονιδίων ταξινόμησε την 48 kd πρωτεΐνη (ISGF-3γ υπομονάδα) στην οικογένεια των IRF-μεταγραφικών παραγόντων[139] (βλ. κεφάλαιο 2.6.), που αναγνωρίζουν άμεσα τις *cis*-ρυθμιστικές τους αλληλουχίες, ενώ αποκάλυψε ότι οι 113 kd και 91/84 kd (ISGF-3α υπομονάδα) μεταγραφικοί ενεργοποιητές συγκροτούν μια νέα οικογένεια ομόλογων πρωτεϊνών[137,138], των οποίων ο κυριότερος ρόλος εντοπίζεται στην διαμεσολαβητική μεταβίβαση του σήματος της IFN-α από τον μεμβρανικό υποδοχέα στο ISRE *cis*-ρυθμιστικό στοιχείο των ISGs γονιδίων αναφοράς[129,135,145,172,177]. Το πολύ πρώϊμο μοριακό γεγονός της μετάδοσης του σήματος της IFN-α συνίσταται στον πιθανό ολιγομερισμό των διαμεμβρανικών υποδοχέων αμέσως μετά την σύνδεση της λεμφοκίνης και στην επακόλουθη - στερεοδιατακτικά επαγόμενη - λειτουργική ενεργοποίηση ενός ζεύγους κινασών της JAK-οικογένειας (TYK2 και JAK1: βλ. κεφάλαιο 2.4.)[169-173,177,181], το οποίον φαίνεται να διατηρεί μια διαμοριακή σχέση δομικής αλληλεπίδρασης με το κυτταροπλασματικό τμήμα του υποδοχέα της IFN-α. Η ενεργοποιημένη μορφή του διμερούς συμπλόκου της κινάσης μπορεί να φωσφορυλιώνει εκλεκτικά τόσο τον διαμεμβρανικό υποδοχέα, όσο και 'πλήθος' άλλων ενδοκυτταρικών υποστρωμάτων, τα σημαντικότερα των οποίων εντοπίζονται στα συστατικά πρωτεϊνικά μέλη της ISGF-3α υπομονάδας[141,171]. Η φωσφορυλίωση των 113 kd, 91 kd και 84 kd παραγόντων λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα[81,105,150], όπου ανιχνεύονται και οι ανενεργείς μορφές αυτών, ενώ η αποκάλυψη των δυναμικών μεταγραφικής ενεργοποίησής τους γίνεται μετά την είσοδό τους στον κυτταρικό πυρήνα[83,171,191], όπου και αυτοσυγκροτούνται (self-assembly) μαζί με την ISGF-3γ υπομονάδα, η οποία δύναται να διαχέεται παθητικά σε μη φωσφορυλιωμένη μορφή ανάμεσα στα δύο κυτταρικά διαμερίσματα τόσο του κυτταροπλάσματος όσο και του πυρήνα[81,83,105,141,171]. Το τελικό λειτουργικό αποτέλεσμα είναι η διαμοριακή συγκρότηση του ISGF-3 υπερσυμπλέγματος, το οποίον εμφανίζει 30 φορές μεγαλύτερη συγγένεια σύνδεσης με το ISRE *cis*-στοιχείο από την αντίστοιχη της ISGF-3γ υπομονάδας, καθώς και πολύ υψηλή ενεργότητα μεταγραφικής επαγωγής των αντίστοιχων ISGs γονιδίων στόχων[110,122]. Ο υψηλής σημασίας λειτουργικός ρόλος της ISGF-3α υπομονάδας στην μετάδοση του σήματος της IFN-α[138,144] οδήγησε στην νέα ονοματολογία που προσδιορίζει τα συστατικά της μέλη, η οποία είναι: 113 kd: STAT-2, 91 kd: STAT1α και 84 kd: STAT1β[141]. Η μοριακή περιγραφή της μετάδοσης του σήματος της IFN-α στα ISGs γονίδια αποκριτές δίδεται στην εικόνα 6. Ενώ οι θέσεις αλληλεπίδρασης του ISGF-3 μεταγραφικού συμπλόκου περιλαμβάνουν και τα 14 ζεύγη βάσεων του ISRE *cis*-στοιχείου, οι IRF-1 και 2 μεταγραφικοί παράγοντες συνδέονται εκλεκτικά στην κεντρική περιοχή (core) αυτού (εικόνα 6), τροποποιώντας έτσι (θετικά ή αρνητικά αντίστοιχα) την τελική μεταγραφική απόκριση[13,14,106,110,122] του αντίστοιχου ISG γονιδίου με μηχανισμούς που παραμένουν άγνωστοι αλλά που διερευνώνται εντατικά (βλ. κεφάλαιο 2.6.).



Εικόνα 6: Μοριακή περιγραφή των πρώϊμων γεγονότων της μετάδοσης του σήματος της IFN-α από τον μεμβρανικό υποδοχέα στο ISRE ρυθμιστικό στοιχείο, διαμέσου της εκλεκτικής φωσφορυλίωσης των STAT(s) (Signal Transducer(s) and Activator(s) of Transcription) μεταγραφικών παραγόντων[81,105,141,144,145,150,177].

2.2. Ενεργοποίηση γονιδίων μέσω IFN-γ

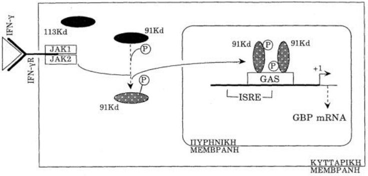
Μοριακή κλωνοποίηση και δομικός χαρακτηρισμός των υποκινητών των γονιδίων που επάγονται μεταγραφικά από την δράση της IFN-γ[112], αποκάλυψε την ύπαρξη ενός συντηρημένου *cis*-ρυθμιστικού στοιχείου GAS (Gamma Activation Site), το οποίον εμφανίζεται ικανό και αναγκαίο για την επαγόμενη από IFN-γ λειτουργική συμπεριφορά του κάθε υποκινητή[100,102,109,111]. Η GAS περιοχή πρωτοπροσδιορίσθηκε στις 5΄ εγγύς ρυθμιστικές αλληλουχίες του ανθρώπινου GBP γονιδίου (GBP: Guanylate Binding Protein, μόριο κυτταροπλασματικής εντόπισης και διακριτής λειτουργίας/δομής από τις G-πρωτεΐνες), όπου και φάνηκε να επικαλύπτεται δομικά με το ISRE *cis*-στοιχείο, στο οποίον οφείλεται η IFN-α επαγόμενη συμπεριφορά του GBP υποκινητή[111,112,154] (βλ. κεφάλαιο 2.2.). Η μοριακή περιγραφή των GAS *cis*-στοιχείων σε πλήθος επαγόμενων από IFN-γ υποκινητών φαίνεται στον πίνακα 4.

ΓΟΝΙΔΙΟ	*cis*-ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΣΤΟΙΧΕΙΟ
	↓↓ ↓ ↓↓
GBP	aTTaCtctAAA
FcγR	tTTcCcagAAA
ICSBP	tTTcTcggAAA
IFP-53	aTTcTcagAAA
IRF-1	tTTcCccgAAA
Ly6E	tTTcCccgAAA
Keratin	-TTtCtccAA-
GAS: ΚΟΙΝΗ ΠΕΡΙΟΧΗ (consensus):	TTNCNNNAA

Πίνακας 4: Παράθεση των GAS συντηρημένων αλληλουχιών σε ένα πλήθος γονιδιακών υποκινητών που ρυθμίζονται μεταγραφικά από την IFN-γ. Αξιοσημείωτη εμφανίζεται η συντήρηση του GAS *cis*-λειτουργικού στοιχείου στις 5΄ και 3΄ ακραίες του υποπεριοχές, ενώ η κεντρική αλληλουχία του ποικίλει σε νουκλεοτιδική σύσταση[107,118,132,204,214].

Μοριακή γενετική ανάλυση του μονοπατιού μετάδοσης του σήματος της IFN-γ από την μεμβράνη στον πυρήνα κατέδειξε εκπληκτικές ομοιότητες, με αυτό της IFN-α κατά την μεταγραφική ενεργοποίηση των ISGs γονιδίων[141,171]. Η σύνδεση του σηματοδότη (IFN-γ) στον λεμφοκινικό του υποδοχέα φαίνεται να επάγει τον ολιγομερισμό αυτού, καθώς και την επακόλουθη λειτουργική ενεργοποίηση δύο κινασών τυροσίνης της JAK- οικογένειας, των JAK-1, 2, (βλ. κεφάλαιο 2.4.), οι οποίες ευρίσκονται σε άμεση σχέση δομικής αλληλεπίδρασης με το κυτταροπλασματικό τμήμα του υποδοχέα της IFN-γ[169,171,181]. Το 'JAK-γ' διμερές δύναται επακόλουθα να φωσφορυλιώνει εκλεκτικά τον ίδιο τον υποδοχέα (τροποποιώντας έτσι την συγγένεια σύνδεσης αυτού με τον μοριακό σηματοδότη)[131,171,181], καθώς και τον STAT1α (p91) κυτταροπλασματικό μεταγραφικό παράγοντα, ο οποίος στην νέα του μοριακή μορφή εμφανίζει υψηλή ειδικότητα αναγνώρισης και συγγένεια σύνδεσης με το GAS *cis*-ρυθμιστικό στοιχείο[135,141,154,171]. Η STAT1α φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη δύναται να συνδέεται σαν ομοδιμερές[141,145,171] (βλ. κεφάλαιο 2.5.) στις μικρές αντίστροφες νουκλεοτιδικές επαναλήψεις του GAS *cis*-ρυθμιστικού στοιχείου, εκδηλώνοντας έτσι το ισχυρό δυναμικό μεταγραφικής ενεργοποίησης του αντίστοιχου γονιδίου στόχου της (strong transcriptional activator).

In vitro πειράματα καταστολής της ικανότητας σύνδεσης των ενεργοποιημένων απο IFN-γ πυρηνικών GAF (Gamma Activated Factor) μεταγραφικών παραγόντων σε πλήθος ποικίλων δομικά GAS ρυθμιστικών στοιχείων, με την χρήση πολυκλωνικών αντιορών της STAT1α πρωτεΐνης, αποκάλυψαν την παρουσία αυτής σε όλα τα επαγόμενα συμπλέγματα, χωρίς όμως να αποκλείουν και την πιθανή συμμετοχή άγνωστων συνοδευτικών πρωτεϊνικών μορίων ομόλογης λειτουργίας[116,117,121,132,136,156]. Η μοριακή περιγραφή του μονοπατιού μετάδοσης του σήματος της IFN-γ φαίνεται στην εικόνα 7.



Εικόνα 7: Καταγραφή των πρώϊμων μοριακών γεγονότων μετάδοσης του σήματος της IFN-γ από τον μεμβρανικό υποδοχέα στο GAS *cis*-ρυθμιστικό στοιχείο του GBP υποκινητή, μέσω της εκλεκτικής φωσφορυλίωσης και επακόλουθης ενεργοποίησης του STAT1α (p91) μεταγραφικού παράγοντα[141,154,204].

2.3. Μεταλλαγμένες κυτταρικές σειρές που αδυνατούν να ανταποκριθούν στην δράση της IFN

Ενώ οι βιοχημικές τεχνικές έχουν αποδειχθεί εξαιρετικά εύχρηστες για την ταυτοποίηση και κλωνοποίηση πλήθους καινούργιων γονιδίων, ο ακριβής λειτουργικός ρόλος των αντίστοιχων πρωτεϊνικών προϊόντων μπορεί να προσεγγισθεί μόνο μέσω της μελέτης συγκεκριμένων γενετικών μεταλλαγών επαρκώς χαρακτηρισμένου φαινότυπου.

Μια από τις μοριακές στρατηγικές που ακολουθήθηκε ήταν η αναζήτηση μη αποκρινόμενων σε IFN-α/β κυτταρικών κλώνων, που φέρουν το βακτηριακό γονίδιο αναφοράς gpt (guanine-phosphorybosyl-transferase) σαν δείκτη επιλογής, καθοδηγούμενο μεταγραφικά από τον υποκινητή ενός από τα μέλη της ISG-οικογένειας, του 6-16 γονιδίου[96-98]. Η τελική διάκριση των μεταλλαγμένων πληθυσμών, επιτεύχθηκε τόσο με αυξοτροφικά κριτήρια όσο και με την παρουσία ή/μη μοριακών μεμβρανικών δεικτών (τάξης I και II αντιγόνα), γεγονός που ενίσχυσε την άποψη περί λειτουργικής συνεργασίας των μονοπατιών μετάδοσης της πληροφορίας της IFN-α/β και IFN-γ από την μεμβράνη στον πυρήνα. Αντίστροφη πορεία μεταλλαξογένεσης, όπου χρησιμοποιήθηκε ο υποκινητής του DRα γονιδίου σαν μοριακή μήτρα επιλογής IFN-γ ανεξάρτητων μεταλλαγών[113], επιβεβαίωσε πάλι την επικαλυπτόμενη λειτουργική σχέση των IFN-α/β και IFN-γ μηχανισμών μετάδοσης του σήματος[91,130].

Η αποκατάσταση του μεταλλαγμένου φαινότυπου (rescue) στις πέντε συμπληρωματικές ομάδες (complementation groups) των επιλεγμένων μη αποκρινόμενων στην IFN-α/β κυτταρικών πληθυσμών, μετά την γενωμική αναενσωμάτωση διαφορετικών κλωνοποιημένων cDNAs αντίστοιχα, αποτέλεσε το βασικό κριτήριο τόσο για την επακόλουθη μοριακή τους ταξινόμηση όσο και για τον λειτουργικό τους χαρακτηρισμό (πίνακας 5)[134,168,172,173].

Ομάδα συμπληρωματικότητας	Μοριακός σηματοδότης		Γονιδιακή αλλοίωση
	IFN-α	IFN-γ	
U1	-	+	TYK2
U2	-	+/-	p48 (ISGF-3γ)
U3	-	-	STAT1α (p91)
U4	-	-	JAK1
γ1	+	-	JAK2

Πίνακας 5: Περιγραφή των πέντε ομάδων συμπληρωματικότητας που αδυνατούν να απαντήσουν στην IFN-α/β και γ, καθώς και προσδιορισμός της ενδογενούς γενετικής τους αλλοίωσης, όπως αναλύθηκε με πειράματα διαμόλυνσης ανασυνδυασμένων κατασκευών έκφρασης και επακόλουθης αναστροφής φαινοτύπου[107,141,204]. Η λειτουργική συσχέτιση με τις ανοσοανεπαρκείς ομάδες συμπληρωματικότητας των τάξης II γονιδίων (βλ. κεφάλαιο 1.3.2.) παραμένει ακόμη άγνωστη.

2.4. Συμμετοχή των JAKs (Just Another Kinases) κινασών τυροσίνης στο μονοπάτι μετάδοσης του σήματος πλήθους διαφορετικών λεμφοκινών

Η εκλεκτική σύνδεση των αυξητικών παραγόντων (Growth Factors) στους αντίστοιχους διαμεμβρανικούς τους υποδοχείς επάγει την λειτουργική ενεργοποίηση των κυτταροπλασματικών τμημάτων αυτών, τα οποία εμφανίζοντας ιδιότητες κινάσης τυροσίνης, φωσφορυλιώνουν τόσο τους ίδιους τους εαυτούς τους όσο και πλήθος άλλων κυτταρικών υποστρωμάτων, ενισχύοντας και μεταφέροντας έτσι το μοριακό σήμα από την μεμβράνη προς τον πυρήνα[144,168,171].

Αντίθετα, ο μεγαλύτερος αριθμός των λεμφοκινικών υποδοχέων (IFN, TNF, ερυθροποιητίνη) δεν παρουσιάζει ενδομοριακές καταλυτικές ενεργότητες κινάσης της τυροσίνης, γι' αυτό και απαιτεί την συνεργατική αλληλεπίδραση με μεμβρανοσυνδεόμενα πρωτεϊνικά μόρια κινασών, τα οποία δύνανται τόσο να μεταφράζουν όσο και να μεταδίδουν την πληροφορία από τον υποδοχέα προς τον γονιδιακό υποκινητή-στόχο[148,170,175,176,180-184].

Με πειράματα αναστροφής και συμπληρωματικότητας του μεταλλαγμένου φαινότυπου στην απόκριση στην IFN-α/β, φάνηκε ότι η νέα οικογένεια των JAK(s) [Just Another Kinase(s) ή Janus Another Kinase(s)] κινασών τυροσίνης είναι αυτή που ευθύνεται για την γρήγορη και αξιόπιστη μετάδοση του μοριακού σήματος τόσο της IFN-α/β όσο και αυτού της IFN-γ (πίνακας 5)[171-173]. Η εκλεκτική ενεργοποίηση του μοριακού μονοπατιού βασίζεται στην διαφορική συγγένεια αλληλεπίδρασης των TYK2 και JAK2 κινασών τυροσίνης με τις συστατικές υπομονάδες των IFN-α και IFN-γ μεμβρανικών υποδοχέων αντίστοιχα[141,168,170,171,181]. Συγκριτική ανάλυση των πρωτοταγών αμινοξικών δομών των TYK2, JAK1 και JAK2 κινασών κατέδειξε την ύπαρξη επτά διακριτών συντηρημένων δομικών πυρήνων JH (Jak Homology domains), οι οποίοι φαίνεται να ταξινομούνται λειτουργικά ως ακολούθως: JH1: καταλυτικός πυρήνας με υψηλή ενεργότητας κινάσης τυροσίνης, JH2: περιοχή δομικά ομόλογη με την JH1 αλλά χωρίς σαφή λειτουργία, JH3 και JH4: περιοχές απαραίτητες για τον ετεροδιμερισμό διαφορετικών μελών της JAK-οικογένειας και JH5, JH6 και JH7: δομικοί πυρήνες υπεύθυνοι για την διαμοριακή αλληλεπίδραση με το κυτταροπλασματικό τμήμα του υποδοχέα.

Η ύπαρξη τουλάχιστον δύο μελών (JAK1, 2 για την IFN-γ και TYK2 και JAK1 για την IFN-α) της JAK-οικογένειας στα μονοπάτια μετάδοσης των σημάτων διαφορετικών λεμφοκινών δεν έχει ακόμα προσδιορισθεί αν αφορά μια λειτουργική κατάσταση μοριακού πλεονασμού (redundancy) ή ένα συνεργατικό φαινόμενο υψηλής καταλυτικής ειδικότητας[168,171].

Πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR: Polymerase Chain Reaction) με χαμηλό κριτήριο υβριδοποίησης του μοριακού εκκινητή (primer), οδήγησαν στην κλωνοποίηση και στον τελικό χαρακτηρισμό ενός νέου μέλους της JAK οικογένειας, της JAK3, η οποία φωσφορυλιώνεται εκλεκτικά μέσω της σύνδεσης των IL-2 και IL-4 λεμφοκινών στους αντίστοιχους διαμεμβρανικούς τους υποδοχείς[178,179α,179β]. Δοκιμές διαφορικής -JAK- ανοσοκατακρήμνισης και επακόλουθης ταυτοποίησης της παρουσίας ή μη φωσφορυλιωμένων καταλοίπων τυροσίνης, σε ένα μεγάλο πλήθος ενεργοποιημένων κυτταρικών πληθυσμών μετά την επίδραση διαφορετικών λεμφοκινών, ταξινόμησε τις τέσσερεις JAK-κινάσες, ανάλογα με το μονοπάτι που επιλέγουν για να μεταδώσουν την μοριακή πληροφορία, ως ακολούθως (πίνακας 6):

ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ-ΛΕΜΦΟΚΙΝΗ	JAK-ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ
IFN-α/β	
IFN-γ	JAK1, TYK2
Ερυθροποιητίνη	JAK1, JAK2
Αυξητική Ορμόνη	JAK2
Προλακτίνη	JAK2
G-CSF	JAK2
IL-6, LIF	JAK1, JAK2, TYK2
IL-3, IL-5	JAK2
IL-2, IL-4	JAK3, JAK1

Πίνακας 6: Παράθεση του μονοπατιού επιλογής της μετάδοσης της μοριακής πληροφορίας κάθε μέλους της JAK-οικογένειας σε ένα πλήθος διαφορετικών λεμφοκινών. Οι βραχυγραφίες (abbreviations) αντιστοιχούν στις ακόλουθες ονομασίες: G-CSF: παράγοντας διέγερσης για δημιουργία αποικιών κοκκιοκυττάρων, IL-: Ιντερλευκίνη και LIF: παράγοντας αναστολής λευχαιμίας[99,141,148,168-184].

Αξίζει τέλος να σημειωθεί, ότι ο ακριβής μηχανισμός φωσφορυλίωσης και επακόλουθης ενεργοποίησης της καταλυτικής δραστικότητας των μελών της JAK-οικογένειας παραμένει ακόμα αδιερεύνητος, ενώ η διαμοριακή σχέση δομικής αλληλεπίδρασης κινάσης-υποδοχέα έχει αδιαμφισβήτητα δειχθεί για την περίπτωση της JAK2 κινάσης με τον μονομερή υποδοχέα της ερυθροποιητίνης αντίστοιχα[168,171,175,184]. Ο μέσος μάλιστα 'μοριακός χρόνος' για την μετάδοση του σήματος από τον μεμβρανικό υποδοχέα στην κυτταροπλασματική κινάση είναι της τάξης των 15"-30"[149,150,154].

2.5. Δομή και λειτουργία των STATs (Signal Transducers and Activators of Transcription) μεταγραφικών παραγόντων

Η φωσφορυλιωμένη μοριακή μορφή του υποδοχέα της IFN-γ καθώς και αυτή της JAK2 κινάσης ευνοούν την διαμοριακή αλληλεπίδραση με τον STAT1α μεταγραφικο παράγοντα, ο οποίος διαμέσου του συντηρημένου $-SH_2-$ (Src-Homology) λειτουργικού του πυρήνα (domain) αναγνωρίζει τα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα τόσο του μεμβρανικού υποδοχέα[131,171,220] όσο και της JAK2 κινάσης[141,144,170,171], δημιουργώντας έτσι ένα σταθερό υπερμοριακό σύμπλεγμα, που τελικός του σκοπός είναι η φωσφορυλίωση της STAT1α (p91) πρωτεΐνης στην -701-συντηρημένη θέση της τυροσίνης και η επακόλουθη στερεοδιατακτική της ενεργοποίηση[129,141,171]. Η υψηλή δομική ομολογία (~40%) των STAT1 και STAT2[137,141,171] πρωτεϊνών μεταξύ τους ενδεικνύει πιθανούς εξελικτικούς μηχανισμούς γονιδιακού αναδιπλασιασμού, ενώ η διαφορική σύνθεση της STAT1β (p84) φαίνεται να ρυθμίζεται από διαφορικό μάτισμα και ωρίμανση (splicing) του πρόδρομου μηνύματος της STAT1α πρωτεΐνης, γεγονός που οδηγεί στην σύνθεση ενός ακρωτηριασμένου κατά 38 αμινοξέα μορίου στο καρβοξυτελικό του άκρο[137,138,141].

Ενώ η U3 μεταλλαγμένη ινοβλαστική σειρά μπορεί να επαναφερθεί ως προς την απόκρισή της σε IFN-α/β είτε με STAT1α είτε με STAT1β ανασυνδυασμένο ευκαρυωτικό φορέα έκφρασης, η αντίστοιχη επαναφορά του φαινοτύπου της σε IFN-γ επιτυγχάνεται μόνο με την διαμόλυνση του STAT1α γονιδίου, γεγονός που αποδίδεται στην αδυναμία του STAT1β (p84) μεταγραφικού παράγοντα να αναγνωρίζει τις GAS *cis*-ρυθμιστικές αλληλουχίες των IFN-γ αποκρινόμενων γονιδίων στόχων[107,134,141,204]. Η υπεύθυνη περιοχή για την διαμοριακή αλληλεπίδραση των STAT1α και STAT1β μεταγραφικών παραγόντων κατά τον σχηματισμό του ISGF-3 υπερσυμπλέγματος φαίνεται να εντοπίζεται τόσο στην πλούσια σε λευκίνες αμινοτελική περιοχή των δύο μορίων, όσο και τους $-SH_2-$ λειτουργικούς τους πυρήνες, οι οποίοι αναγνωρίζουν εκλεκτικά τα φωσφορυλιωμένα τυροσινικά κατάλοιπα του αντίστοιχου μοριακού εταίρου[141,144,145,171,204].

Σάρωση ενός μεγάλου αριθμού βιβλιοθηκών cDNA (PCR: ανιχνευτές) ή/και δοκιμές βιοχημικού καθαρισμού μεταγραφικών παραγόντων ομόλογων με τις STAT1, 2, αποκάλυψαν την ύπαρξη μιας μεγάλης οικογένειας STAT γονιδίων[142,143,220], της οποίας το αντίστοιχο πρωτεϊνικό μέλος φαίνεται να ανταποκρίνεται εκλεκτικά σε διαφορετικούς μοριακούς σηματοδότες-λεμφοκίνες, ενισχύοντας έτσι τον βαθμό ειδικότητας (specificity) της μετάδοσης της πληροφορίας από την μεμβράνη στον πυρήνα και τελικά στον γονιδιακό-υποκινητή στόχο[105,147,148,154,220]. Η περιγραφή της διαφορικής φωσφορυλίωσης του κάθε μέλους της STAT οικογένειας από ετερογενείς μοριακούς σηματοδότες[115,118,133,146,149,164,185,206] φαίνεται στον πίνακα 7:

ΜΕΛΟΣ STAT-ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ	ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣ
STAT1α, STAT1β, STAT2	IFN-α/β
STAT1α	IFN-γ
STAT3 (APRF)	IL-6
STAT4	-
STAT5	Προλακτίνη
IL-4 STAT (STAT6)	IL-4

Πίνακας 7: Μοριακή περιγραφή της εκλεκτικής απόκρισης του κάθε μέλους της STAT οικογένειας σε διαφορετικούς λεμφοκινικούς σηματοδότες. Η διαφορική φωσφορυλίωση επάγει και την επακόλουθη μεταγραφική ενεργοποίηση του αντίστοιχου μεταγραφικού παράγοντα, γεγονός που όμως δεν έχει δειχθεί για όλα τα μέλη της STAT οικογένειας[99,135,142,147,153,154,171,220].

2.6. Δομή και λειτουργία των IRFs (Interferon Regulatory Factors) μεταγραφικών παραγόντων

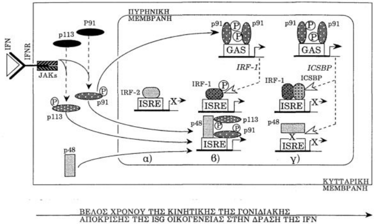
Συγκριτική μοριακή ανάλυση της πρωτοταγούς αμινοξικής αλληλουχίας της p48 (ISGF-3γ) συστατικής υπομονάδας του ISGF-3 μεταγραφικού υπερσυμπλόκου με πλήθος άλλων γνωστών πρωτεϊνών κατέδειξε την ύπαρξη ενός συντηρημένου αμινοτελικού (-NH_2) δομικού πυρήνα, ο οποίος ευθύνεται για την ειδική αλληλεπίδραση των IRF-1, IRF-2, ICSBP[161] (βλ. Συντμήσεις-Γλωσσάριο), p48 και c-Myb μεταγραφικών παραγόντων με την αντίστοιχη *cis*-αλληλουχία στόχο[139,141].

Η υψηλή λοιπόν δομική ομολογία των p48, ICSBP, IRF-1, 2 ενδεικνύει την ύπαρξη εξελικτικών μηχανισμών γονιδιακού αναδιπλασιασμού και επακόλουθης διαφορικής μεταλλαξογένεσης, γεγονός που αιτιολογεί τόσο την κοινή (consensus) *cis*-αναγνωριστική αλληλουχία σύνδεσης αυτών όσο και τις διακριτές τους τροποιητικές λειτουργικές μεταγραφικές ιδιότητες αντίστοιχα.

Ενώ λοιπόν η IRF-ομόλογη αμινοτελική περιοχή εμφανίζεται υπεύθυνη για την εκλεκτική της σύνδεση με την κεντρική περιοχή (core) του ISRE ρυθμιστικού στοιχείου των ISGs γονιδίων[104,110,111,122,158], το μη-συντηρημένο καρβοξυτελικό τμήμα του κάθε πρωτεϊνικού μορίου διαφοροποιεί την μεταγραφική συμπεριφορά του κάθε μέλους της IRF-οικογένειας[140,162] ως ακολούθως: <u>IRF-1</u>: μεταγραφικός ενεργοποιητής του μονοπατιού της IFN[152,155,162], <u>IRF-2</u>: μεταγραφικός καταστολέας του μονοπατιού της IFN[152,155,162], <u>ICSBP</u>: μεταγραφικός ιστοειδικός καταστολέας του μονοπατιού της IFN[162,163] και <u>p48</u> (<u>ISGF-3γ</u>): έμμεσος μεταγραφικός ενεργοποιητής του μονοπατιού της IFN-α, μέσω της ενίσχυσης της συγγένειας σύνδεσης του ISGF-3 μεταγραφικού συμπλόκου με την ISRE ευρύτερη (14 bp) αλληλουχία σύνδεσης λόγω της διαμοριακής αλληλεπίδρασης των -α- και -γ- υπομονάδων[105,110,128].

Η ύπαρξη θετικού μεταγραφικού ελέγχου των IRF-1 και ICSBP γονιδίων από την δράση της IFN-γ διαμέσου της ενεργοποίησης των 'GAS' στοιχείων των αντίστοιχων υποκινητών τους, οι οποίοι συνδέονται εκλεκτικά με την φωσφορυλιωμένη μορφή της STAT1α πρωτεΐνης[136,156,157], δημιουργεί ένα πολύπλοκο ρυθμιστικό δίκτυο λειτουργικού ελέγχου, του οποίου η διαλεύκανση δεν μπορεί να επιτευχθεί με σύνθεση απλοποιημένων μηχανιστικών μοντέλων, γεγονός που ενισχύεται ακόμη περισσότερο από την αντίθετη μεταγραφική λειτουργία των IRF ('θετική') και ICSBP ('αρνητική') παραγόντων[125,152,155,157,162].

Παρ' όλα αυτά η πιο σύγχρονη μοριακή εικόνα της μεταγραφικής συμπεριφοράς των μελών των IRF-οικογένειας φαίνεται να εντοπίζεται στα ακόλουθα διαδοχικά βήματα: α) μοριακή κατάληψη (occupation) του IRF-2 κατασταλτικού παράγοντα στην κεντρική περιοχή των ISRE ή ISRE-ομόλογων (PRDI: IFN-β) *cis*-αλληλουχιών των ISGs (π.χ. ISG15) γονιδίων· η χαμηλή συγγένεια σύνδεσης της p48 υπομονάδας στην cISRE (core ISRE) περιοχή ίσως στερείται βιολογικής σημασίας και παρατηρείται πιθανώς μόνο *in vitro*. β) Με την δράση της IFN-α/β και IFN-γ φωσφορυλιώνονται οι STAT υπομονάδες και ενεργοποιούν μεταγραφικά τα IRF-1 και ICSBP γονίδια. Εν συνεχεία, η φωσφορυλίωση της IRF-1 πρωτεΐνης που παράγεται αυξάνει ακόμα περισσότερο το μεταγραφικό της δυναμικό[151], καθώς και την ικανότητά της να εκτοπίζει (συναγωνίζεται) τον IRF-2 αρνητικό παράγοντα από τις cISRE *cis*-θέσεις. Παράλληλα η συγκρότηση του ISGF-3 συμπλόκου έχει <u>ήδη</u> εκτοπίσει (συναγωνιστεί) <u>ταχύτατα</u> τον IRF-2, έχοντας τελικά ενεργοποιήσει την άμεση μεταγραφική απόκριση των ISGs γονιδίων. γ) Η *de novo* σύνθεση τελικά του ICSBP καταστολέα οδηγεί στην απομάκρυνση της p48 υπομονάδας απ' την ISRE αλληλουχία, ενώ τα διαμοριακά σύμπλοκα IRF-1/ICSBP και IRF-2/ICSBP φαίνεται να προάγουν τόσο την αυξημένη συγγένεια σύνδεσης του καταστολέα με το ISRE *cis*-στοιχείο, όσο και την δυνατότητα *trans*-αρνητικής ρύθμισης του IRF-1 μεταγραφικού ενεργοποιητή από τον ICSBP ιστοειδικό καταστολέα -dominant negative regulation- (εικόνα 8)[135,136,141,152,155,156,163,171].



Εικονα 8: Περιγραφή της πιο σύγχρονης μοριακής γνώσης των πρώϊμων (β), αλλά και όψιμων (γ) μεταγραφικών γεγονότων, που αφορούν την γονιδιακή απόκριση- συμπεριφορά των ISGs πριν (α) και κατά (β και γ) την δέσμευση της IFN-(α και γ) στον αντίστοιχο διαμεμβρανικό της υποδοχέα IFNR (βλ. κείμενο).

3. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ Ε1Α ΟΓΚΟΑΝΤΙΓΟΝΟΥ (Ε1Α and Interferons)

Οι μικροί DNA-ογκογόνοι ιοί και ειδικότερα αυτοί της οικογένειας των αδενοϊών (Ad) έχουν εξελικτικά υιοθετήσει ποικίλους μηχανισμούς μοριακής άμυνας, έναντι τόσο της κατασταλτικής δράσης των ιντερφερονών (IFN) όσο και του ρυθμιστικού ελέγχου της συχνότητας των μιτωτικών διαιρέσεων του κυττάρου ξενιστή[191,193].

Το πρώϊμα συντιθέμενο Ε1Α ογκοαντιγόνο του Ad5 αδενοϊού παρουσιάζει υψηλή συγγένεια σύνδεσης με ένα ετερόκλητο πλήθος μορίων του ξενιστή, των οποίων η κύρια φυσιολογική λειτουργία είναι ο ακριβής έλεγχος του κυτταρικού κύκλου, της κυτταρικής διαφοροποίησης[194,218], καθώς και του προγραμματισμένου αποπτωτικού θανάτου[197]. Η συντηρημένη CR3 περιοχή ενεργοποίησης της Ε1Α ογκοπρωτεΐνης αλληλεπιδρά εκλεκτικά με τον ATF2 μεταγραφικό παράγοντα[216], ενώ οι CR1 και CR2 μοριακοί πυρήνες τιτλοδοτούν τις ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες της οικογένειας του ρετινοβλαστώματος (Rb: p105 και p107)[191,193,194,196,218], ελευθερώνοντας έτσι τους E2F- μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι ενεργοποιούν ανάδρομα τόσο τους αδενοϊικούς υποκινητές (Ε2)[203] όσο και τα γονίδια που θεωρούνται υπεύθυνα για την ρύθμιση της μιτωτικής διαίρεσης και του αναδιπλασιασμού του DNA (DHFR)[191,218]. Η CR1 συντηρημένη περιοχή φαίνεται υπεύθυνη για την ενεργοποίηση του c-jun μεταγραφικού παράγοντα, γεγονός που εξαρτάται τόσο από τα υπερμοριακά AP-1 σύμπλοκα που συμμετέχει, όσο και από την DNA-αναγνωριστική αλληλουχία σύνδεσης στα γονίδια στόχους[189,190,192].

Η διαμοριακή φυσική αλληλεπίδραση του CR1 δομικού πυρήνα με τον Myf-5 μεταγραφικό παράγοντα φαίνεται ότι συνιστά την κυριότερη μοριακή αιτία για την E1A-κατευθυνόμενη καταστολή της μυογένεσης σε πρόδρομες μυοβλαστικές κυτταρικές σειρές[218].

Η δομική ομολογία του E1A, T-αντιγόνου και H7 ογκοαντιγόνου του Ad5 αδενοϊού, SV40 'Simian Virus' και HPV16 ιού θηλώματος αντίστοιχα, επιτρέπει την αρνητική ρύθμιση των p105, p107 ογκοκατασταλτικών παραγόντων τόσο από το E1A όσο και από τα T και H7 αντιγόνα, γεγονός που συνιστά το πρώτο μοριακό θήμα για την ανεξέλεγκτη κυτταρική διαίρεση και επακόλουθη κακοήθη ιϊκή νεοπλασία[194,218].

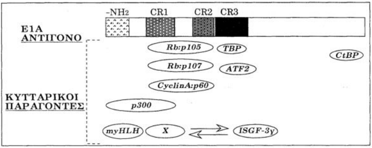
Εκτός όμως από την απορύθμιση του μιτωτικού ελέγχου, το επόμενο επίπεδο ιϊκής άμυνας είναι η καταστολή της διαφορικά επαγόμενης από ιντερφερόνη (IFN) έκφρασης των τάξης I αντιγόνων στην μεμβράνη[187,218]. Η λειτουργική απορύθμιση της ενεργότητας σύνδεσης των NFκB[187] και ISGF-3[165,186,188,217] μεταγραφικών παραγόντων στις αντίστοιχες *cis*-ρυθμιστικές αλληλουχίες σύνδεσης των IFN-β και ISG15, τάξης I γονιδίων από την διαφορική έκφραση της E1A ογκοπρωτεΐνης, οδηγεί πρωτογενώς στην αδυναμία σύνθεσης IFN-β[187] και δευτερογενώς στην επακόλουθη αναστολή της μεταγραφικής ενεργοποίησης - μέσω του ISRE στοιχείου - των τάξης I αποκρινόμενων γονιδίων.

In vitro πειράματα συμπληρωματικότητας κατέδειξαν ότι το E1A αντιγόνο του αδενοϊού τύπου-5 δύναται, μέσω της CR1 συντηρημένης αλληλουχίας του, να καταργεί-συναγωνίζεται (έμμεσα) την ικανότητα σύνδεσης της ISGF-3γ υπομονάδας στην DNA *cis*-αναγνωριστική της αλληλουχία, αφήνοντας λειτουργικά άθικτο το ISGF-3α μεταγραφικό σύμπλοκο[165,188,217].

Πειράματα μοριακού βιοχημικού καθαρισμού από νεοπλαστικές κυτταρικές σειρές τραχήλου μήτρας της κατασταλτικής ενεργότητας σύνδεσης του ISGF-3 συμπλόκου στην ISRE *cis*-αλληλουχία, κατέδειξαν την ύπαρξη ενός πρωτεϊνικού μορίου 19 kd (TKO: Transcriptional KnockOut), το οποίον δημιουργεί ετεροδιμερή ανενεργά σύμπλοκα με τους IRF-1, IRF-2 και ISGF-3γ (p48) μεταγραφικούς παράγοντες αντίστοιχα, παρεμβαίνοντας έτσι στην σύνδεση αυτών στην ISRE -*cis*-ρυθμιστική περιοχή[124]. Η ικανότητα του TKO-19 kd μορίου να αδρανοποιεί λειτουργικά την p48 υπομονάδα του ISGF-3 υπερσυμπλόκου συνιστά ουσιαστικά τον κυριότερο γνωστό μοριακό μηχανισμό μεταγραφικής αναστολής της έκφρασης των τάξης I γονιδιακών υποκινητών σε κακοήθεις νεοπλασίες[124], φαινόμενο που πιθανώς να μιμείται και ο ογκογενετικός μολυσματικός μηχανισμός του DNA αδενοϊού[194].

Η μοριακή περιγραφή όλων των δυνατών διαμοριακών αλληλεπιδράσεων της E1A ογκοπρωτεΐνης με κυτταρικούς παράγοντες φαίνεται στην εικόνα 9.

Η πρόσφατη κλωνοποίηση της E1A-συνδεόμενης κυτταρικής πρωτεΐνης p300 (τόσο με την CR1, όσο και με την αμινοτερματική περιοχή της E1A πρωτεΐνης), αποκάλυψε την ύπαρξη μιας νέας οικογένειας μορίων (φέρουσες τον 'βρωμοπυρήνα'), που κατέχουν διπλό ρυθμιστικό ρόλο, τόσο με το να συνδέονται με την TBP συστατική υπομονάδα της βασικής μεταγραφικής μηχανής όσο και με το να αναγνωρίζουν ειδικές *cis*-ρυθμιστικές αλληλουχίες στόχους[218].



Εικόνα 9: Παράθεση όλων των δυνατών διαμοριακών αλληλεπιδράσεων του E1A ογκοαντιγόνου. Η 'X'-πρωτεΐνη συμβολίζει το CR1 ενεργοποιούμενο πρωτεϊνικό μόριο, που δύναται να τιτλοδοτήσει-συναγωνιστεί λειτουργικά (ά-έμμεσα) την δράση της ISGF-3γ υπομονάδας[165,186,196,216,218].

4. ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΟΥ ΡΕΤΙΝΟΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (R.A.)

Οι στεροειδείς ορμόνες, οι θυρεοειδείς ορμόνες, η βιταμίνη-D και το ρετινοϊκό οξύ συνδέονται εκλεκτικά στους αντίστοιχους ενδοκυτταρικούς τους υποδοχείς, ρυθμίζοντας έτσι ένα μεγάλο πλήθος αναπτυξιακών (developmental) και ιστοειδικών-φυσιολογικών διαδικασιών, όπως την μορφογένεση του νευρικού συστήματος των σπονδυλωτών, την διαμόρφωση των άκρων (limbs), τον σχηματισμό κρανιομετωπικών δομών, κλπ[201,211].

Οι 'N-tera' τερατοκαρκινικές εμβρυϊκές σειρές έχουν αποτελέσει ένα μοντέλο κυτταρικό σύστημα *in vitro* διαφοροποίησης, όπου η εκτεταμένη παρουσία ρετινοϊκού οξέος (R.A.: Retinoic Acid) στην καλλιέργεια προάγει την διαφοροποίηση αυτών σε νευρικά κύτταρα, ενεργοποιώντας ένα πλήθος ετερογενών μεταξύ τους γονιδίων όπως θ_2-μικροσφαιρίνη, AP-2, Oct-3, Hox-γονίδια, 'NFκB', καθώς και μερικές ισομορφές της οικογένειας των υποδοχέων του ρετινοϊκού οξέος[52,199,201,202].

Τα τρία γονίδια των υποδοχέων του ρετινοϊκού οξέος (RARα, RARβ και RARγ: Retinoic Acid Receptor) κωδικοποιούν την σύνθεση τουλάχιστον δώδεκα διαφορετικών πρωτεϊνικών ισομορφών ($α_7$, $β_3$, $γ_2$), οι οποίες ετεροδιμεριζόμενες με τους RXRα, β και γ ομόλογους ρετινοϊκούς υποδοχείς αντίστοιχα, συγκροτούν μια πολυπληθή οικογένεια ετεροδιμερών μεταγραφικών συμπλόκων, η οποία αναγνωρίζει τις γραμμικές ή ανάστροφες επαναλήψεις του 'AGPu$^{A}/_{T}$CA' *cis*-ρυθμιστικού στοιχείου[198,199,221] ενός μεγάλου αριθμού επαγόμενων με ρετινοϊκό οξύ γονιδιακών υποκινητών[199,201,202,221].

Η μεταγραφική ενεργοποίηση των τάξης Ι γονιδίων μετά από την συνεχή επίδραση R.A. σε αδιαφοροποίητες N-tera2 εμβρυϊκές σειρές φάνηκε να καθορίζεται από την *de novo* μεταγραφική ενεργοποίηση των p50 και p65 γονιδίων, που κωδικοποιούν τις συστατικές υπομονάδες του 'NFκB' μεταγραφικού συμπλόκου, καθώς και από την επαγόμενη από R.A. γονιδιακή δραστηριότητα του RARβ υποκινητή. Επακόλουθα λοιπόν, το ετεροδιμερές του RARβ πυρηνικού υποδοχέα με την 'ρυθμιστική' RXRβ υπομονάδα αναγνωρίζει τις RARE (R. A. Response Element) αλληλουχίες της εγγύς περιοχής των τάξης Ι υποκινητών και σε συνεργασία με το 'NFκB' μεταγραφικό σύμπλοκο ενεργοποιεί τον υποκινητή[199].

Η μοριακή οργάνωση των R.A.R. μεταγραφικών παραγόντων συνίσταται στην συντηρημένη εξελικτικά ύπαρξη έξι (A-F) διακριτών λειτουργικών πυρήνων, που εμφανίζουν τις ακόλουθες ιδιότητες[201,202,219,221]:

A: η λιγότερο συντηρημένη περιοχή που θεωρείται υπεύθυνη για την εκλεκτική γονιδιακή μεταγραφική ενεργοποίηση του κάθε υποκινητή.

B: μία περιοχή απαραίτητη για την ποσοτικά υψηλή και ποιοτικά ειδική μεταγραφική ενεργοποίηση.

C: ένας πολύ συντηρημένος πυρήνας που ευθύνεται για την εκλεκτική σύνδεση του υποδοχέα στην *cis*-αναγνωριστική του αλληλουχία· η C μάλιστα περιοχή των RAR, RXR υποδοχέων των σπονδυλωτών εμφανίζει ~60% ομολογία με τον αντίστοιχο πυρήνα του Δροσοφιλικού CF-1 (ultraspiracle) μεταγραφικού χοριονικού παράγοντα[219,221].

E: μία περιοχή απαραίτητη για την σύνδεση του πυρηνικού μοριακού σηματοδότη (ligand).

D και F: περιοχές άγνωστης λειτουργίας, ενώ ο πυρήνας του ετεροδιμερισμού φαίνεται να εντοπίζεται στην (μετά την) E περιοχή[198].

5. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε εξ' ολοκλήρου στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας Θηλαστικών του Ι.Μ.Β.Β., κατά την περίοδο 1989-1995, υπό την διαρκή επίβλεψη του Καθηγ. Ιωσήφ Παπαματθαιάκη. Το κύριο ερευνητικό ενδιαφέρον της συγκεκριμένης ομάδας εστιάζεται στην διερεύνηση και ανάλυση των μοριακών μηχανισμών μεταγραφικής ενεργοποίησης των γονιδίων ιστοσυμβατότητας τάξης II στον ποντικό και στον άνθρωπο. Στα πλαίσια λοιπόν της ειδικής θεματολογίας του εργαστηρίου (Εισαγωγή, κεφάλαιο 1) και της συσωρευμένης γνώσης των τελευταίων χρόνων των μηχανισμών δράσης της IFN-γ (Εισαγωγή, κεφάλαιο 2), αποφασίσαμε να μελετήσουμε τους μοριακούς μηχανισμούς μετάδοσης του σήματος της IFN-γ από τον διαμεμβρανικό της υποδοχέα στους γονιδιακούς υποκινητές στόχους Εα και Εβ.

Η λεπτομερής δομική ανάλυση της εγγύς *cis*-ρυθμιστικής περιοχής του Εα υποκινητή (κεφάλαιο 1) και η μελέτη των *trans*-μεταγραφικών παραγόντων που συνδέονται στις 5΄ ρυθμιστικές περιοχές αυτού (κεφάλαιο 2) θα αποκαλύψουν τόσο τα λειτουργικά *cis*-στοιχεία όσο και τα αντίστοιχα μεταγραφικά συμπλέγματα, που καθορίζουν την Β-ιστοειδική και την επαγόμενη από IFN-γ μεταγραφική απόκριση του Εα υποκινητή.

Η συγκριτική μελέτη των Εα, ISG54 και GBP υποκινητών (όλοι ενεργοποιούνται από IFN-γ ή/και IFN-α) αποσκοπεί τόσο στην αποκάλυψη κοινών μονοπατιών μεταβίβασης της πληροφορίας της IFN από την μεμβράνη στον πυρήνα (κεφάλαια 3, 4 και 7) όσο και στην διαλεύκανση των μηχανισμών μεταγραφικής ενεργοποίησης των γονιδίων ιστοσυμβατότητας τάξης II (κεφάλαια 3-7).

Τα λειτουργικά συστατικά στοιχεία του μονοπατιού της IFN-γ από τον μεμβρανικό υποδοχέα στους Εα και Εβ υποκινητές προσδιορίζονται κυρίως στην ύπαρξη επαγόμενων από IFN μεταγραφικών συμπλόκων (κεφάλαια 2 και 8) καθώς και στην διαμεσολαβητική συμμετοχή πρωτεϊνικών μορίων κινασών τυροσίνης (κεφάλαια 4-6), τα οποία ενεργοποιούν τα μεταγραφικά εκείνα υποστρώματα (ISF) που ευθύνονται για την ρυθμιζόμενη δραστηριότητα των γονιδίων ιστοσυμβατότητας τάξης II.

Η προσπάθεια συγκριτικής ανάλυσης των ISF και STAT μεταγραφικών συμπλόκων μεταξύ τους (κεφάλαια 2 και 8), λειτουργικής συνταξινόμησης των Εα, ISG54 και GBP γονιδίων (κεφάλαια 3 και 4), καθώς και μελέτης των μηχανισμών μεταγραφικής καταστολής των γονιδίων ιστοσυμβατότητας τάξης II [κεφάλαια 4, 5 (φάρμακα) και 10 (ιοί)] ανοίγει νέους ορίζοντες τόσο στην κατανόηση των ρυθμιστικών μηχανισμών ελέγχου της ενεργοποίησης των γονιδίων του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας τάξης II, όσο και γενικότερα στην διαλεύκανση των λειτουργιών του ανοσολογικού συστήματος, από το επίπεδο της πρωταρχικής αναγνώρισης του επεξεργασμένου αντιγόνου μέχρι και την δυνατότητα γενετικής επέμβασης και χειρισμού καταστάσεων οξείας ανοσοανεπάρκειας ή/και αυτοάνοσης ιστικής καταστροφής.

ΥΛΙΚΑ
&
ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΥΛΙΚΑ

1.1. ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΥΛΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης προήλθαν από τις ακόλουθες εταιρείες: PROMEGA, MERK, UBI, BOEHRINGER MANNHEIM, BRL, BIORAD, ALDRICH Co., B.D.H., SIGMA CHEMICALS, SANTA CRUZ, PHARMACIA, UNITED STATES BIOCHEMICALS (USB) και STRATAGENE.

Τα περιοριστικά και τροποποιητικά ένζυμα των νουκλεϊνικών οξέων προήλθαν από τις εταιρείες MINOTECH, NEW ENGLAND BIOLABS, BRL, PHARMACIA, PROMEGA και STRATAGENE.

Τα θρεπτικά υλικά καλλιέργειας βακτηριακών στελεχών αγοράστηκαν από τις εταιρείες DIFCO και MERK, ανώ αυτά των κυτταρικών σειρών από τις GIPCO/BRL και ICN.

Τα ραδιοσημασμένα νουκλεοτίδια α[^{32}P]-dATP, α[^{32}P]-dCTP, γ[^{32}P]-dATP, α[^{35}S]-dATP προήλθαν από τις εταιρείες ICN, NEN και AMERSHAM όπως και το ραδιενεργό αντιδραστήριο της [^{14}C]-χλωραμφαινικόλης.

Οι νάϋλον μεμβάνες υβριδοποίησης αγοράστηκαν από την εταιρεία DU PONT, ενώ οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης από την SCHLEICHER και SCHUELL.

Τέλος, τα φιλμ αυτοραδιογραφίας προήλθαν από την KODAK.

1.2. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΚΑΙ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ

Για την δημιουργία ανασυνδυασμένων κατασκευών, χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς pLSV0[41], pUC18/19 (PHARMACIA), pRC/CMV (INVITROGEN), pBluescript KS/SK+ (STRATAGENE), 872(-40IFN6)CAT[1], οι οποίοι αναπτύχθηκαν σε βακτηριακά στελέχη *E. coli* K-12: DH5α, JM101, JM109 και HB101, των οποίων οι γονότυποι καθώς και οι σχετικές αναφορές ευρίσκονται στους Sambrook *et al.*[58].

1.3. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Για την καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών *E. coli* K-12 (βλ. κεφάλαιο 1.2.) χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο LB (Luria και Bertani), τόσο σε υγρή όσο και σε στερεά μορφή. Ολα τα θρεπτικά υλικά, στερεά και υγρά, παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τους Sambrook *et al.*[58]. Τα διαλύματα των αντιβιοτικών παρασκευάσθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τους Sambrook *et al.*[58].

[1]Ευγενώς προσφερόμενος από τον Δρ. Δ. Θάνο.

1.4. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

α) Ανθρώπου: Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες κυτταρικές σειρές: HeLa, Raji, Jurkat, HL60 και N-terra2. Η HeLa κυτταρική σειρά αντιπροσωπεύει επιθηλιακά κύτταρα, απομονωμένα από αδενοκαρκίνωμα τραχήλου μήτρας. Τα Raji κύτταρα προέρχονται από λέμφωμα Burkitt και εμφανίζουν χαρακτηριστικά τελικής διαφοροποίησης Β-κυττάρων. Τα N-terra2 θεωρούνται εμβρυονικά τερατοκαρκινώματα, ενώ τα HL60 προμυελωτικά λευχαιμικά κύτταρα. Τα Jurkat τέλος, είναι Τ-κύτταρα προερχόμενα από οξείες λευχαιμίες Τ-κυττάρων.

β) Ποντικού: Χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές: A_{20}, $LMTK^-$, WEHI και F_9. Τα A_{20} προέρχονται από λέμφωμα Burkitt και εμφανίζουν χαρακτηριστικά τελικής διαφοροποίησης Β-κυττάρων.
Τα $LMTK^-$ είναι κλώνος κυττάρων συνδετικού ιστού, ενώ τα WEHI είναι μυελωμονοκυτταρική σειρά που εμφανίζει χαρακτήρα μακροφάγων. Τέλος, η F_9 κύτταρική σειρά είναι εμβρυονικού χαρακτήρα προερχόμενη από τερατοκαρκίνωμα ποντικού.

Περισσότερες πληροφορίες για όλες τις κυτταρικές σειρές, καθώς και σχετικές αναφορές περιέχονται στον κατάλογο της ATCC (American Type Culture Collection), η οποία ήταν και η κύρια προμηθεύτρια εταιρεία.

1.5. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

Για τις κυτταρικές σειρές λεμφοβλαστικής προέλευσης χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό RPMI (GIPCO) με την προσθήκη 10% ορού εμβρύου βοός, 50 μgr/ml γενταμυκίνης και 50 μM β-μερκαπτοαιθανόλης[41,79]. Ολες οι υπόλοιπες κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε MEM θρεπτικό μέσο τροποποιημένο από τους Dulbecco *et al.*[57], με την προσθήκη 10% ορού εμβρύου βοός και 50 μgr/ml γενταμυκίνης.

2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΟΥΚΛΕΙΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

2.1.1. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα

Για την παρασκευή σε μικρή κλίμακα υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες μέθοδοι:

α) Μέθοδος βρασμού (boiling mini-prep): Η μέθοδος αυτή επιλέχθηκε για την γρήγορη ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων κατασκευών. Η ποσότητα του πλασμιδιακού DNA που απομονώνεται είναι της τάξης των 3-5 μgr, ενώ η σχετική καθαρότητα της παρασκευής κρίνεται ποιοτικά επαρκώς κατάλληλη για την επακόλουθη ανάλυσή της με ένζυμα περιορισμού (restriction enzymes).

β) Μέθοδος αλκαλικής λύσης (alkaline lysis): Χρησιμοποιήθηκε ως εναλλακτική μέθοδος καθαρισμού πλασμιδιακών κατασκευών για την απομόνωση, τόσο μεγαλύτερης ποσότητας DNA (10-15 μgr) όσο και υψηλότερης καθαρότητας, με σκοπό τον τελικό προσδιορισμό της πρωτοταγούς νουκλεοτιδικής αλληλουχίας αυτού. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε και για τα δύο είδη παρασκευών περιγράφεται αναλυτικά από τους Sambrook *et al.*[58].

2.1.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα

Για τα πειράματα παροδικής διαμόλυνσης κυτταρικών σειρών θηλαστικών χρησιμοποιήθηκε η αλκαλική μέθοδος της κυτταρικής λύσης με συνδυασμό διαδοχικών υπερφυγοκεντρήσεων κλίσης χλωριούχου καισίου (CsCl gradient) παρουσία θρωμιούχου αιθιδίου (EtBr), η οποία εμπλουτίζει τις DNA παρασκευές με υπερελικωμένες πλασμιδιακές διαμορφώσεις (supercoiled plasmid conformations). Εναλλακτικά, για την ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ανασυνδυασμένων κατασκευών, ακολουθήθηκε η μέθοδος της εκλεκτικής κατακρήμνισης του πλασμιδιακού DNA παρουσία χημικών πολυμερών σακχαριτών, όπως της πολυαιθυλενικής γλυκόλης (PEG) 8.000. Οι αναλυτικές διαδικασίες περιγράφονται από τους Sambrook *et al.*[58].

2.1.3. Απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Βασικό κριτήριο για την επιλογή της μεθόδου απομόνωσης και καθαρισμού τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης ήταν, τόσο η διαθέσιμη ποσότητα της κατασκευής όσο και το μοριακό μέγεθος του προς καθαρισμό τμήματος. Ετσι, σε περιπτώσεις που η διαθέσιμη ποσότητα του αρχικού ανασυνδυασμένου πλασμιδίου ξεπερνούσε τα 20-30 μgr και το μέγεθος του απομονωμένου τμήματος ήταν άνω των 500 bp, επιλέγονταν η μέθοδος της ηλεκτροέκλουσης (electroelution) σε μεμβράνες διαπίδυσης, ενώ όταν δεν ικανοποιούνταν οι προαναφερόμενες συνθήκες, εφαρμόζονταν η τεχνική του χαμηλού σημείου τήξης της αγαρόζης (Low Melting Point Agarose: BRL). Τέλος, σε ακραίες περιπτώσεις όπου η προς απομόνωση ποσότητα του τμήματος του DNA ήταν ελάχιστη, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της εκλεκτικής δέσμευσης σε ιοντοανταλλακτική ρητίνη DEAE-52 (SCHLEICHER και SCHUELL) η οποία, λόγω της υψηλής μοριακής της χωρητικότητας, προσέφερε μεγαλύτερα ποσοστά τελικής απόδοσης (yield). Ολες οι αναλυτικές διαδικασίες περιγράφονται από τους Sambrook *et al.*[58].

2.1.4. Καθαρισμός συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων από πήκτωμα ακρυλαμίδης

Με σκοπό την απομάκρυνση ανεπιθύμητων παραπροϊόντων της οργανικής σύνθεσης ολιγονουκλεοτιδίων, καθώς και τον διαχωρισμό των τεχνητά ακρωτηριασμένων (truncated) μορίων από αυτά του επιθυμητού μεγέθους, εφαρμόσθηκε μέθοδος καθαρισμού μονόκλωνων αλυσίδων ολιγονουκλεοτιδίων, η οποία βασίζεται στην χρήση αποδιατακτικών πηκτωμάτων ακρυλαμίδης 12-20%. Ετσι παρασκευάσθηκαν ολιγονουκλεοτίδια υψηλής καθαρότητας και μοριακής ομοιογένειας, τα οποία κρίθηκαν κατάλληλα για επακόλουθη χρήση τους σε πειράματα: (α) καθυστέρησης της κινητικότητας λόγω αλληλεπίδρασης, (β) εκλεκτικής μερικής μεθυλίωσης και (γ) ανάλυσης πρωτοδιάταξης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (βλ. κεφάλαια 2.2.6., 2.3.3. και 2.3.4.). Η διακριτική ικανότητα της μεθόδου, προσδιορίζεται στο ένα νουκλεοτίδιο, ενώ η τελική της απόδοση φθάνει το 80%. Οι λεπτομέρειες της μεθόδου περιγράφονται από τους Sambrook *et al.*[58].

2.1.5. Απομόνωση ολικού RNA από κυτταρικές σειρές

Χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι:

α) Μέθοδος Λιθίου-Ουρίας (Li-Urea): Αυτή η τεχνική πλεονεκτεί τόσο στον εμπλουτισμό της τελικής παρασκευής σε πολύ[A+] μηνύματα (poly[A+]-mRNAs) όσο και στην καθαρότητα αυτής από νουκλεολυτικά ένζυμα (RNAses), ή υπολείμματα γενωμικών θραυσμάτων, που παρεμποδίζουν τον αξιόπιστο χειρισμό της RNA παρασκευής. Οι λεπτομέρειες της μεθόδου, καθώς και οι σχετικές της αναφορές περιγράφονται από τους Sambrook *et al.*[58].

β) Μέθοδος θερμής όξινης φαινόλης (hot phenol): Χρησιμοποιήθηκε σε περιπτώσεις υψηλής αντιπροσώπευσης του προς ανίχνευση μηνύματος στην RNA παρασκευή μας, όπως αυτές των GAPDH-(αφυδρογονάσης της φωσφορικής γλυκεριναλδεΰδης) μηνυμάτων, τα οποία λειτουργούν σαν εσωτερικοί μάρτυρες ποσοτικής εκτίμησης των διαφορών των RNA δειγμάτων στις αναλύσεις κατά Northern. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται από τους Sambrook *et al.*[58].

2.2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΙΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

2.2.1. Ραδιοσήμανση γραμμικών μορίων DNA (labelling)

Για την ραδιοσήμανση γραμμικών μορίων DNA χρησιμοποιήθηκαν διάφορες τεχνικές, η επιλογή των οποίων κάθε φορά γινόταν με βάση το είδος του μορίου που επρόκειτο να σημανθεί (μονόκλωνο ή δίκλωνο ολιγονουκλεοτίδιο, ή τμήμα DNA), καθώς και την ειδική ενεργότητα (cpm/μgr) που θέλαμε να επιτευχθεί. Αναλυτικότερα, οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

α) Σήμανση δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων με το Klenow ενζυμικό κλάσμα της DNA-πολυμεράσης I.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία ακραία ραδιοσημασμένων δίκλωνων ανιχνευτών, των οποίων η ειδική ενεργότητα δεν ξεπερνούσε τα $5x10^8$ cpm/μgr. Το ενζυμικό κλάσμα της Klenow πολυμεράσης συμπληρώνει τα 3΄ υπολειπόμενα άκρα, τα οποία δημιουργούνται από την μη ομοιοπολική σύνδεση (annealing: βλέπε γλωσσάριο) των δύο συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων. Η χρήση αυτής της μεθόδου βρίσκει άμεση εφαρμογή στην ραδιοσήμανση ολιγονουκλεοτιδίων, που χρησιμοποιούνται σε πειράματα μεταβολής της κινητικότητας λόγω αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνη[58] (βλ. κεφάλαιο 2.3.3.).

β) Σήμανση συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων με την T_4 πολυνουκλεοτιδική κινάση (T_4 Kinase).

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε σε περιπτώσεις ανάγκης δημιουργίας μονόκλωνα ραδιοσημασμένων ανιχνευτών (single stand labelling), οι οποίοι βρίσκουν άμεση εφαρμογή σε πειράματα παρεμβολής σύνδεσης λόγω μεθυλίωσης (βλ. κεφάλαιο 2.3.4.). Η T_4 πολυνουκλεοτιδική κινάση προσθέτει ένα μόριο ραδιοσημασμένου φωσφόρου στο 5΄ προεξέχον (protruding) άκρο του αποφωσφορυλιωμένου συνθετικού ολιγονουκλεοτιδίου, προσφέροντας έτσι μια πολύ υψηλή ειδική ενεργότητα σήμανσης που ξεπερνά τα $5x10^9$ cpm/μgr. Η ακραία ραδιοσήμανση δίκλωνων μορίων συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, μέσω της T_4 κινάσης, βρήκε αποκλειστική εφαρμογή σε πειράματα συνδυασμένης UV/Χημικής διαμοριακής σύνδεσης DNA-Πρωτεΐνης (βλ. κεφάλαιο 2.3.5.) Οι αναλυτικές λεπτομέρειες περιγράφονται από τους Sambrook *et al.*[58].

γ) Σήμανση τμημάτων DNA με την βοήθεια τυχαίων εκκινητών (random priming labelling).

Η μέθοδος αυτή επιλέγχθηκε για περιπτώσεις όπου υπήρξε ανάγκη δημιουργίας ραδιοσημασμένων ανιχνευτών DNA υψηλής ειδικής ενεργότητας (>$5x10^9$ cpm/μgr). Η βάση της μεθόδου στηρίζεται στην παροδική αποδιάταξη του δίκλωνου τμήματος DNA και στην επακόλουθη βαθμιαία αναδιάταξη της κάθε αλυσίδας με μια σειρά τυχαίων εξαμερών εκκινητών μεγάλης ποικιλομορφίας στην πρωτοταγή τους οργάνωση. Το μήκος των τοπικά σχηματιζόμενων δίκλωνων περιοχών αυξάνεται με την δράση της πολυμεριστικής ιδιότητας του Klenow ενζυμικού κλάσματος παρουσία α[^{32}P]-

dATP, α[^{32}P]-dCTP, ραδιοσημασμένων νουκλεοτιδίων. Χρησιμοποιήθηκε σε ανάλυση κατά Northern, για την ανίχνευση μηνυμάτων χαμηλής αντιπροσώπευσης στις RNA παρασκευές μας. Οι λεπτομέρειες της μεθόδου περιγράφονται από τους Sambrook *et al.*[58].

δ) Nick Translation.

Η μέθοδος αυτή προσφέρει την δυνατότητα δημιουργίας ραδιοσημασμένων μορίων DNA σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα, παρουσιάζοντας όμως το βασικό μειονέκτημα της χαμηλής ειδικής ενεργότητας σήμανσης (<5x10^8 cpm/μgr). Επιλέχθηκε για περιπτώσεις ανίχνευσης πλούσιων μηνυμάτων στις RNA παρασκευές μας. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην επιδιόρθωση και στον πολυμερισμό των τυχαίων μονόκλωνων σπασιμάτων (single stand breaks), που δημιουργούνται κατά την διαδικασία απομόνωσης και καθαρισμού γραμμικών τμημάτων DNA. Οι τεχνικές λεπτομέρειες της μεθόδου περιγράφονται από τους Sambrook *et al.*[58].

2.2.2. Υβριδοποίηση νουκλεϊνικών οξέων (hybridization)

Ολες οι υβριδοποιήσεις των μεμβρανών έγιναν με βάση το πρωτόκολλο των Church και Gilbert[86]. Συνοπτικά παραθέτουμε τα ακόλουθα βήματα:

1) Προϋβριδοποίηση των μεμβρανών, για χρόνο μεγαλύτερο από έξι ώρες, σε διάλυμα υβριδοποίησης το οποίον περιέχει: 7% SDS, 0.5 M Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH: 7.2, 1% BSA, 1 mM EDTA. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης προσδιορίζονταν ανάλογα με την σύνθεση και το μέγεθος του ανιχνευτή σε σχέση με την προς υβριδοποίηση αλληλουχία. Κατά κανόνα πάντως στις αναλύσεις κατά Northern η θερμοκρασία παρέμενε σταθερή στους 65°C.
2) Αποδιάταξη του ραδιοσημασμένου ανιχνευτή με θέρμανση 5΄ στους 100°C και επακόλουθη υβριδοποίηση κάτω από τις ίδιες συνθήκες για 16-24 ώρες. Η απόλυτη ενεργότητα του διαλύματος υβριδοποίησης του ανιχνευτή ξεπερνούσε τα 10^6 cpm/ml.
3) Τελικό ξέπλυμα των μεμβρανών υβριδοποίησης με περίσσεια φωσφορικού διαλύματος έκπλυσης (5% SDS, 40 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4, 1 mM EDTA) και επακόλουθη αυτοραδιογραφία.

2.2.3. Ανάλυση κατά Northern ολικού RNA

Η αρχή της μεθόδου περιλαμβάνει ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό του RNA σε αποδιατακτικό πήκτωμα αγαρόζης παρουσία φορμαλδεΰδης (2,2 M) και επακόλουθη μεταφορά του σε νάϋλον μεμβράνη GENESCREEN (NEN) με την χρήση περίσσειας διαλύματος μεταφοράς (transfer buffer) 50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH: 7.2. Για την ακινητοποίηση των αποδιαταγμένων μορίων RNA στην μεμβράνη ακολουθεί έκθεση αυτής σε UV (312 mm) ακτινοβολία για 2΄ και τελική τοποθέτηση στους 80°C για 2 ώρες. Οι λεπτομέρειες της μεθόδου περιγράφονται αναλυτικά από τους Sambrook *et al.*[58].

2.2.4. Πέψη πλασμιδιακών κατασκευών με ένζυμα περιορισμού (restriction digest)

Στο σύνολό τους οι πέψεις όλων των πλασμιδιακών κατασκευών, πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες της προμηθεύτριας εταιρείας και με βάση τα πρωτόκολλα που περιγράφονται στους Sambrook *et al.*[58].

2.2.5. Κατασκευή ελλείψεων τμημάτων DNA ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών κατασκευών (deletion analysis)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία σειριακών ελλείψεων ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών κατασκευών, με σκοπό την λειτουργική ανάλυση των υποκινητών των τάξης II γονιδίων[41,79]. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην ιδιότητα του ενζύμου της εξωνουκλεάσης III (Exo III) να υδρολύει, με αφετηρία 5΄-προεξέχοντα άκρα, γραμμικά τμήματα DNA κάτι που αδυνατεί όμως να κάνει σε μόρια με 5΄-υπολειπόμενα άκρα. Επακόλουθα λοιπόν, για την δημιουργία διαδοχικών ελλείψεων, απαιτούνται διπλές περιοριστικές υδρολύσεις· μία που να δημιουργεί 5΄-προεξέχοντα άκρα προς την κατεύθυνση που θέλουμε να γίνουν οι ελλείψεις και μία που να αφήνει 3΄-προεξέχοντα άκρα, ώστε να προστατευθεί η κατασκευή από την υδρόλυση της Exo III νουκλεάσης προς την αντίθετη κατεύθυνση. Εναλλακτικά χρησιμοποιήθηκε η νουκλεάση BAL31, η οποία συνδυάζει μια 3΄ εξωνουκλεολυτική δραστηριότητα καθώς και μια ισχυρή δράση ενδονουκλεάσης. Ετσι, το μονόκλωνο DNA που δημιουργείται από την ενζυμική υδρόλυση του 3΄ άκρου, αποδομείται στη συνέχεια από την ενδονουκλεολυτική δραστικότητα της BAL31. Τα ακριβή πρωτόκολλα που εφαρμόσθηκαν περιγράφονται αναλυτικά από τους Sambrook *et al.*[58].

2.2.6. Προσδιορισμός της πρωτοταγούς νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μορίων πλασμιδιακού DNA (sequencing)

Επιλέγχθηκε η μέθοδος του τερματισμού της επιμήκυνσης της αλυσίδας του DNA, μέσω της ενσωμάτωσης τριφωσφορικών δι-δεοξυνουκλεοτιδίων, τα οποία συνιστούν δομικά ανάλογα των φυσικών μονομερών αλλά και αναστολείς του μηχανισμού επιμήκυνσης του πολυμερισμού[117]. Σαν μοριακές μήτρες χρησιμοποιήθηκαν υπερελικωμένες πλασμιδιακές κατασκευές, ενώ η σήμανση των μορίων έγινε με την χρήση α[^{35}S]-dATP. Σε όλες τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο Sequenase (USB), ενώ το ακριβές πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε προήλθε από την προμηθεύτρια εταιρεία και περιγράφεται στο σχετικό εγχειρίδιο (USB: Sequenase TM kit, Version 2.0).

2.2.7. Διαδικασίες υποκλωνοποίησης μορίων DNA (subcloning)

Για την τροποποίηση των άκρων των προς κλωνοποίηση τμημάτων εφαρμόσθηκαν οι ακόλουθες τεχνικές:

α) Δημιουργία τυφλών άκρων (blunt ends), με την χρήση του ενζυμικού κλάσματος Klenow (N.E.BIOLABS). Εκμεταλλευόμενοι την 5΄→3΄ πολυμεριστική της ικανότητα κατασκευάσαμε τυφλά άκρα, από 5΄προεξέχουσες θέσεις περιοριστικής υδρόλυσης. Εναλλακτικά, η εξωνουκλεοτική 3΄→5΄ δραστικότητα της Klenow μπορεί να δημιουργήσει τυφλά άκρα από 3΄προεξέχουσες αλυσίδες μετά την περιοριστική πέψη.

β) Τροποποίηση των άκρων με την χρήση των νουκλεασών S1 και Mung Bean (BOEHRINGER M.). Εκμεταλλευόμενοι την ιδιότητα της υψηλής υδρολυτικής ενεργότητας, των S1 και Mung Bean νουκλεασών σε μονόκλωνο DNA, κατασκευάσαμε τυφλά άκρα από 5΄ ή 3΄ προεξέχουσες θέσεις περιοριστικής υδρόλυσης, με την συνεπώαση χαμηλών συγκεντρώσεων S1/Mung Bean ενζύμων και υψηλών ποσοτήτων γραμμικών DNA κατασκευών. Ολες οι τεχνικές λεπτομέρειες περιγράφονται στους Sambrook *et al.*[58].

γ) Αντιδράσεις σύνδεσης μορίων DNA (ligation). Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται κάτω από διαφορετικές συνθήκες, ανάλογα με το είδος των άκρων (τυφλά ή προεξέχοντα) που θέλουμε να συνδεθούν και το επιθυμητό προϊόν της τελικής αντίδρασης. Ετσι διακρίνουμε τις ακόλουθες περιπτώσεις:

1) Μονομοριακή επανακυκλοποίηση πλασμιδίου με προεξέχοντα συμβατά άκρα (5΄sticky ends): Σ' αυτή την περίπτωση η συγκέντρωση της κατασκευής δεν ξεπερνούσε τα 50 ngr, για πλασμίδια μεγέθους 3-8 kbp, ενώ η ποσότητα της λιγάσης (N.E. BIOLABS) ήταν 5 u Weiss/μl· η θερμοκρασία που γινόταν η αντίδραση ήταν 30°C, ενώ ο χρόνος επώασης δεν ξεπερνούσε τις 3 ώρες.
2) Μονομοριακή επανακυκλοποίηση πλασμιδίου με τυφλά άκρα (religation): Οι μόνες διαφορές με την προηγούμενη περίπτωση [1.], ήταν η αύξηση της συγκέντρωσης του πλασμιδίου μέχρι και 500 ngr, καθώς και η αύξηση της ποσότητας της χρησιμοποιούμενης λιγάσης κατά 10 φορές.
3) Δημιουργία ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με συμβατά προεξέχοντα άκρα: Σ' αυτές τις περιπτώσεις η αναλογία μορίων φορέα (vector)/ενθέματος (insert) ήταν 1/5-1/10. Σ' όλες τις αντιδράσεις σύνδεσης χρησιμοποιούσαμε ποσότητα φορέα 50 ngr σε τελικό όγκο αντίδρασης 25 μl. Η συγκέντρωση της T_4 λιγάσης ήταν 5 u Weiss/μl. Για τις ειδικές περιπτώσεις ολιγομερισμού δίκλωνων συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, γινόταν προεπώαση αυτών 30΄ στους 16°C απουσία φορέα, ενώ μετά την ακόλουθη προσθήκη 10 ngr φορέα συμβαντών άκρων περιορισμού, η επώαση συνεχίζονταν για 3 ώρες στους 30°C. Η ποσότητα της λιγάσης και εδώ δεν ξεπερνούσε τα 5 u Weiss/μl.
4) Κατασκευή ανασυνδυασμένων πλασμιδίων από τυφλά άκρα: Διατηρούσαμε τις παραπάνω [3.] μοριακές αναλογίες, αυξάνοντας μόνο τον χρόνο επώασης

και την ποσότητα της T_4 λιγάσης (μέχρι και 20 φορές). Η αναλυτική περιγραφή όλων των προαναφερόμενων διαδικασιών ευρίσκεται στους Sambrook *et al.*[58].

2.2.8. Μετασχηματισμός βακτηριακών καλλιεργειών με την χρήση πλασμιδιακών κατασκευών (transformation)

Ο μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων έγινε με την μέθοδο $CaCl_2$-$RbCl_2$ και η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται από τους Sambrook *et al.*[58] με τις ακόλουθες τροποποιήσεις:

1) Επώαση 10^8 κυττάρων/ml (οπτική πυκνότητα: 0.5) με διάλυμα μετασχηματισμού-Ι, για 10΄ στους 4°C, το οποίον περιέχει 15 mM MOPS pH: 7.0 και 20 mM $RbCl_2$.
2) Επακόλουθη επαναδιάλυση του βακτηριακού ιζήματος (bacterial pellet) σε διάλυμα μετασχηματισμού-ΙΙ για 30΄ στους 4°C, το οποίον περιέχει 150 mM MOPS pH: 6.5, 75 mM $CaCl_2$ και 20 mM $RbCl_2$.
3) Διαδοχικό θερμικό σοκ (heat shock) στους 42°C για 3΄, μετά την προσθήκη του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου και τελική τοποθέτηση σε θερμοκρασία 4°C για 45΄.
4) Η τελική ανάκαμψη της κυτταρικής φυσιολογίας επιτυγχάνεται, με την προσθήκη περίσσειας LB θρεπτικού μέσου καλλιέργειας, ενώ η διάκριση των θετικών κλώνων γίνεται, είτε με χρωματική επιλογή (αν την προσφέρει ο φορέας), είτε με μεθόδους *in situ* υβριδοποίησης (βλ. κεφάλαιο 2.2.9.).

2.2.9. Ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων βακτηριακών κλώνων

Το πρωτόκολλο της *in situ* υβριδοποίησης των ανασυνδυασμένων βακτηριακών κλώνων, μετά την μεταφορά τους σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (SCHLEICHER και SCHUELL) και με ανιχνευτή το προς κλωνοποίηση ένθεμα (δίκλωνα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια ή απομονωμένα τμήματα DNA), περιγράφεται λεπτομερώς από τους Grunstein και Hogness[165].

2.3. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ *IN VITRO* ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ DNA - ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ

2.3.1. Παρασκευή κυτταροπλασματικού (cytoplasmic) και πυρηνικού (nuclear) πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από κυτταρικές σειρές

Για την παρασκευή πυρηνικών και κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων κυτταρικών σειρών ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο των Dignam *et al.*[120], με μοναδική τροποποίηση την προσθήκη επιπλέον αναστολέων πρωτεασών, μια και οι λεμφοειδικές σειρές που μελετήσαμε περιείχαν υψηλά ποσοστά τέτοιων ενδογενών ενεργοτήτων. Οι τελικές συγκεντρώσεις των αναστολέων ήταν: Pepstatin 1 mM, Leupeptin 0.5 mM και Aprotinin 1 mM. Ειδικότερα, για την παρασκευή καθαρών κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων χωρίς πυρηνικές προσμίξεις, καταφύγαμε στις ακόλουθες τροποποιήσεις: 1) ελαχιστοποίηση (5-7 strokes) των χτυπημάτων ομογενοποίησης των κυτταρικών εναιωρημάτων και 2) διαχωρισμός του διαλυτού κυτταροπλάσματος από το ίζημα των κυτταρικών πυρήνων, μέσω διαδοχικών φυγοκεντρήσεων χαμηλών (2.000 rpm) και υψηλών (15.000 rpm) στροφών αντίστοιχα[108,110]. Σε κάθε περίπτωση παρασκευής ακολουθούσε αφαλάτωση (desalting) 16 ωρών σε ειδικά διαλύματα διαπίδυσης (διάλυμα D), που ευνοούσαν την μοριακή σταθερότητα του πρωτεϊνικού κλάσματος[108,120].

2.3.2. Παρασκευή ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος (whole cell extract) από κυτταρικές σειρές

Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε βασίσθηκε στην διαδοχική και επαναλαμβανόμενη (3 φορές) ψύξη και απόψυξη (freeze και thaw) εναιωρημάτων κυτταρικών παρασκευών, η οποία οδηγεί στην διάρρηξη τόσο των πυρηνικών όσο και των κυτταρικών μεμβρανών[108,213]. Ο διαχωρισμός του γενωμικού DNA από το διαλυτό πρωτεϊνικό κλάσμα επιτυγχάνεται μέσω υψηλών στροφών φυγοκέντρησης (15.000 rpm) στους 4°C για 15΄. Το διάλυμα κυτταρικής εναιώρησης περιέχει 40 mM Tris pH: 7.4, 1 mM EDTA, 20% glycerol, 1 mM DTT και 1 mM PMSF. Τελικά, τα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα διαμοιράζονται σε μικρές ποσότητες και φυλάσσονται στους -80°C.

Η αξιοπιστία της πληροφορίας που συνάγεται από την χρήση των ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων είναι συγκρίσιμη με αυτή των πυρηνικών παρασκευών, ενώ η συχνή τους χρήση αιτιολογείται από την μεγάλη τεχνική ευκολία προετοιμασίας τους.

2.3.3. Πειράματα μεταβολής της κινητικότητας DNA λόγω αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες (δοκιμές σύνδεσης) (Electrophoretic Mobility Shift Assay: EMSA)

Η μέθοδος αυτή προσφέρει ένα γρήγορο αλλά και εξαιρετικά αξιόπιστο και ευαίσθητο τρόπο ανίχνευσης των μοριακών αλληλεπιδράσεων των μεταγραφικών πρωτεϊνικών παραγόντων με τις αντίστοιχες *cis*-ρυθμιστικές αλληλουχίες-στόχους τους[210]. Τα βασικά βήματα που ακολουθήθηκαν περιγράφονται ως ακολούθως[108,210]:

α) Ακραία ραδιοσήμανση της δίκλωνης συνθετικής *cis*-αλληλουχίας σύνδεσης (βλ. κεφάλαια 2.2.1.α,β).

β) *In vitro* επώαση του σημασμένου ανιχνευτή, με το προς μελέτη πυρηνικό ή κυτταροπλασματικό εκχύλισμα σε τελικό όγκο αντίδρασης 25 μl, για χρόνο 15΄ στους 30°C.

γ) Διαχωρισμός των διαμοριακών συμπλεγμάτων DNA-Πρωτεΐνης, σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα (39:1) ακρυλαμίδης 4%, παρουσία 25% γλυκερόλης σε χαμηλές συνθήκες ιοντικής ισχύος, που σκοπό είχαν την διατήρηση της μέγιστης δυνατής μοριακής σταθερότητας του συμπλόκου DNA-Πρωτεΐνης.

Μια τυπική αντίδραση σύνδεσης (binding reaction) περιείχε τα ακόλουθα συστατικά:

1) 10^5-$2x10^5$ cpm δίκλωνης *cis*-αλληλουχίας σύνδεσης ειδικής ενεργότητας ~10^8 cpm/μgr.
2) 100-500 ngr poly d[I]-d[C] (4 μgr/μl) για την τιτλοδότηση μη ειδικών αλληλεπιδράσεων.
3) 5-10 μgr συνολικού πυρηνικού ή κυτταροπλασματικού εκχυλίσματος και
4) διάλυμα σύνδεσης (binding buffer) μέχρι την συμπλήρωση του τελικού όγκου της αντίδρασης.

Το διάλυμα σύνδεσης είχε την ακόλουθη σύσταση:

12 mM Hepes-KOH, pH: 7.9
4 mM TRIS·Cl, pH: 7.9
60 mM KCl
1 mM EDTA
1 mM DTT
12% glycerol

Σε περιπτώσεις ασταθών συμπλόκων DNA-Πρωτεΐνης, η προσθήκη χαμηλών συγκεντρώσεων αλβουμίνης ορού βοός (BSA), ή/και η μείωση της θερμοκρασίας της αντίδρασης σύνδεσης στους 4°C, βελτίωσε σημαντικά το αναλυτικό πρότυπο της ηλεκτροφορητικής εικόνας, αφού σταθεροποίησε όλες τις ασθενείς διαμοριακές αλληλεπιδράσεις.

Για την ταυτοποίηση της μοριακής φύσης των συμπλεγμάτων DNA-Πρωτεΐνης, καθώς και για την ανάλυση της ειδικότητας σύνδεσης (binding specificity) αυτών, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές κρύου ανταγωνισμού, όπου μέσα στην αντίδραση σύνδεσης προσθέταμε περίσσεια (10-500 φορές) μη ραδιενεργού δίκλωνου ανιχνευτή (competitor), με τελικό στόχο την τιτλοδότηση των πυρηνικών συμπλεγμάτων και την εξαφάνιση των ειδικών (specific) ραδιενεργών ζωνών-συμπλόκων που αναλύαμε κατά την ηλεκτροφορητική διαδικασία.

Σε περιπτώσεις προσδιορισμού των βιοχημικών ιδιοτήτων (φωσφορυλίωση) πρωτεϊνικών συμπλόκων, γινόταν προεπώαση των πυρηνικών εκχυλισμάτων με χαμηλές συγκεντρώσεις των κατάλληλων αντιδραστηρίων - φωσφατάσης, αντίσωμα φωσφοτυροσίνης - για 30΄ στην απαιτούμενη θερμοκρασία, ενώ μετά την προσθήκη του ραδιενεργού ανιχνευτή η αντίδραση σύνδεσης συνεχιζόταν για 15΄ στους 30°C.

2.3.4. Πειράματα παρεμβολής σύνδεσης λόγω μεθυλίωσης (DMS methylation interference analysis)

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην αδυναμία των πυρηνικών συμπλεγμάτων να αλληλεπιδρούν ειδικά με τις αντίστοιχες *cis*-αλληλουχίες σύνδεσης, οι οποίες έχουν προϋποστεί επεξεργασία διαφορικής μεθυλίωσης βάσης[19,210]. Σ' αντίθεση με την τεχνική προστασίας από DNAse (DNAse footprinting), τα πειράματα παρεμβολής σύνδεσης λόγω μεθυλίωσης, προσφέρουν ένα πολύ αναλυτικό και λεπτομερές μοριακό πρότυπο (αποτύπωμα: footprint) προστασίας των βάσεων γουανίνης (G: guanine) της *cis*-αλληλουχίας, από το μεταγραφικό πρωτεϊνικό σύμπλοκο. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται ως ακολούθως[78,79,207,210]:

α) Ακραία 5΄ σήμανση του κάθε μονόκλωνου συνθετικού ολιγονουκλεοτιδίου με την χρήση της T_4 κινάσης.

β) Αντίδραση μη ομοιοπολικής σύνδεσης ("υβριδοποίησης") των δύο συμπληρωματικών συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (annealing).

γ) Διαφορική μεθυλίωση (με την χρήση di-methyl-sulfate: DMS) (NEN) των βάσεων γουανίνης, με τρόπο που στατιστικά να μεθυλιώνεται μόνο μία βάση ανά δίκλωνο συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο (η μοριακή συγκέντρωση και ο χρόνος επώασης του DMS επιλέγονται εμπειρικά).

δ) Καθαρισμός του μεθυλιωμένου ανιχνευτή και επακόλουθη παρασκευαστική αντίδραση μεταβολής της κινητικότητας λόγω αλληλεπίδρασης με το προς μελέτη πυρηνικό εκχύλισμα (EMSA).

ε) Απομόνωση και καθαρισμός των διαμοριακών συμπλόκων DNA-Πρωτεΐνης καθώς και του ελεύθερου (Free) μη συνδεόμενου ανιχνευτή με το ακόλουθο διάλυμα έκλουσης:

Διάλυμα έκλουσης
0.5 M NH_4COOH
0.1 M $Mg(COOH)_2$
1% SDS
1 mM EDTA

στ) Συμπύκνωση των ανιχνευτών με την χρήση βουτανόλης-2, αφαλάτωση από κολώνα μοριακής διήθησης (G50 ή G25), επακόλουθος καθαρισμός από κολώνα ιοντοανταλλαγής DE52 και τελική κατακρήμνιση με διπλάσιο όγκο αιθανόλης παρουσία 10-20 μgr tRNA.

ζ) Επεξεργασία των ραδιοσημασμένων δειγμάτων με 1 M πιπεριδίνης (NEN) για 60΄ στους 90°C και επακόλουθος τελικός προσδιορισμός των προστατευμένων (υδρολυμένων) βάσεων, σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (38:2) 12-20%.

2.3.5. Συνδυασμένη UV/Χημική διαμοριακή σύνδεση DNA- Πρωτεΐνης (crosslinking)

Με σκοπό την διατήρηση του αναλυτικού πρότυπου των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων DNA-Πρωτεΐνης και την αποφυγή χρήσης δαπανηρών βρωμοϋποκατεστημένων ολιγονουκλεοτιδίων (δίκλωνων περιοχών σύνδεσης), αναπτύξαμε μια καινούργια τεχνική συνδυασμένης φωτοχημικής ομοιοπολικής σύνδεσης DNA-Πρωτεΐνης, η οποία εκτός του φθηνού κόστους της δεν απαιτεί τροποποιημένες περιοχές σύνδεσης και επακόλουθα δεν αλλοιώνει το αναλυτικό προφίλ των δοκιμών σύνδεσης (EMSA)[40,110,210]. Συνοπτικά το πρωτόκολλο που εφαρμόσθηκε δίδεται ως ακολούθως:

α) Ακραία 5΄ σήμανση των δίκλωνων συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων σύνδεσης με την χρήση γ[^{32}P]-dATP και T_4 πολυνουκλεοτιδικής κινάσης.

β) Παρασκευαστικό πήκτωμα ακρυλαμίδης, διαχωρισμού των πυρηνικών συμπλόκων αλληλεπίδρασης DNA-Πρωτεΐνης.

γ) Αυτοραδιογραφία και επακόλουθος τεμαχισμός των ραδιενεργών ζωνών ακρυλαμίδης.

δ) Εκθεση αυτών σε UV-ακτινοβολία μήκους κύματος 312 nm για 20΄ και επακόλουθος εμβαπτισμός σε μονιμοποιητικό διάλυμα σύνδεσης (crosslinking buffer) για 2 ώρες στους 4°C, το οποίον αποτελείται από τα ακόλουθα συστατικά:
4% φορμαλδεΰδη (MERK)
100 mM Tris, pH: 8.0
100 mM Boric Acid
2 mM EDTA, pH: 8.0

ε) Ηλεκτροέκλουση των ραδιενεργών συμπλεγμάτων σε μεμβράνες διαπίδυσης για 2 ώρες κάτω από την επίδραση προσανατολισμένου ηλεκτρικού πεδίου τάσης 200 V και επακόλουθη αντιστροφή της φοράς αυτού για 10΄ στις ίδιες πειραματικές συνθήκες.

στ) Κατακρήμνιση των πρωτεϊνικών δειγμάτων-συμπλόκων DNA παρουσία 20 μgr αλβουμίνης ορού βοός (BSA: N.E. BIOLABS) και 5 όγκων προψυγμένης ακετόνης (MERK) σε υψηλές στροφές (15.000 rpm) φυγοκέντρησης, για 60΄ στους 4°C.

ζ) Επαναδιάλυση του ιζήματος σε διάλυμα φορτώματος (loading buffer) πρωτεϊνών (50 mM Tris, pH: 8.0, 2% SDS, 100 mM DTT, 10% glycerol) και επακόλουθος τελικός διαχωρισμός των διαμοριακά συνδεδεμένων συμπλόκων DNA-Πρωτεΐνης σε αποδιατακτικό SDS πήκτωμα ακρυλαμίδης (29.2:0.8) 12-17%.

2.4. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ *IN VITRO* ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ DNA - ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ (ειδικές μέθοδοι)

2.4.1. Δοκιμές παροδικής διαμόλυνσης (Transient Transfection) κυτταρικών σειρών θηλαστικών

Η αρχή της τεχνικής της παροδικής διαμόλυνσης κυτταρικών σειρών, βασίζεται στην συγκατακρήμνιση της υπερελικωμένης πλασμιδιακής κατασκευής με μόρια αλάτων Ca_3PO_4 (250 mM) ή DEAE-δεξτράνης (0.6 mgr/ml) και στην επακόλουθη εισαγωγή του λεπτόκοκκου ιζήματος στον κυτταρικό πληθυσμό[41,79,209]. Τόσο η διαδικασία διαμόλυνσης όσο και ο μετέπειτα προσδιορισμός της CAT (ακετυλοτρανσφεράση της χλωραμφαινικόλης) ενεργότητας, περιγράφονται αναλυτικά από τους Graham και Van Der Eb[209].

Η αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης ελέγχοταν από πειράματα συγκατακρήμνισης της προς μελέτη πλασμιδιακής κατασκευής με τον φορέα $pCMV_β$-lacZ, ο οποίος κωδικοποιεί για την σύνθεση του ενζύμου της β-γαλακτοσιδάσης, της οποίας η ενεργότητα μπορούσε να προσδιορισθεί εύκολα σε *in vitro* δοκιμές (assays) παρασκευών ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων, με την χρήση του δομικού ανάλογου του φυσικού ενζυμικού υποστρώματος O.N.P.G. (O-nitrophenyl-β-D-galactoside)[211].

3. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

3.1. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ

3.1.1. Ο φορέας pLSV$_0$CAT (pLSV0)

Ο φορέας pLSV$_0$CAT χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση του εγγύς τμήματος του υποκινητή του Εα γονιδίου, καθώς και για την επακόλουθη δημιουργία των 5΄-σειριακών ελλείψεων της -140, +14 ρυθμιστικής περιοχής με την βοήθεια της Exo III νουκλεάσης.

Η χωρίς υποκινητή κατασκευή pLSV$_0$CAT δημιουργήθηκε από τον φορέα pL51 CAT, ο οποίος προήλθε από τον pSV2CAT μετά από αντικατάσταση του τμήματος Acc I - Sph I (350 bp) με τον πολυσυνδέτη (polylinker) του pUC19[41]. Η απομάκρυνση του τμήματος του πολυσυνδέτη Sma I - Hind III του pL51CAT οδήγησε στην δημιουργία του pLSV$_0$CAT[41, 79]. Το πρωτόκολλο που επιλέχθηκε για την δημιουργία των 5΄- διαδοχικών ελλείψεων δίδεται ως ακολούθως:

α) Κλωνοποίηση της εγγύς περιοχής του υποκινητή του Εα γονιδίου στην Xba I περιοριστική θέση του πολυσυνδέτη του pLSV$_0$CAT φορέα.

β) Γραμμοποίηση της ανασυνδυασμένης κατασκευής με Acc I περιοριστική υδρόλυση.

γ) Αντίδραση τυφλής διαμοριακής σύνδεσης (blunt cloning), με ένα πολυσυνδέτη (adaptor) που φέρει την Sph I περιοριστική θέση.

δ) Γραμμοποίηση με Sph I για μοριακή προστασία της κατασκευής και

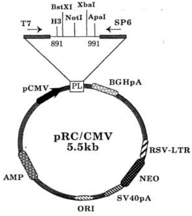
ε) Τελική δημιουργία ενός 5΄-προεξέχοντος μονόκλωνου άκρου στην Xba I περιοριστική θέση, απ' όπου θα αρχίσει η υδρολυτική δραστηριότητα της Exo III νουκλεάσης.

3.1.2. Ο φορέας pGSCAT

Ο φορέας pGSCAT δημιουργήθηκε από την κλωνοποίηση του Pst I - Dde I τμήματος DNA του υποκινητή της α-σφαιρίνης (-500 bp, + 20 bp) στην Xba I περιοριστική θέση του pLSV$_0$CAT πολυσυνδέτη και την διαδοχική απομάκρυνση του Sma I κομματιού DNA, που περιλαμβάνει τις θέσεις από -235 bp έως -85 bp του υποκινητή του γονιδίου της α-σφαιρίνης[41,79]. Η εγγύς περιοχή του υποκινητή του Εα κλωνοποιήθηκε στην Sma I περιοριστική θέση, ενώ οι 3΄-ελλείψεις δημιουργήθηκαν με την βοήθεια της 3΄ υδρολυτικής δραστηριότητας της BAL 31 νουκλεάσης, διατηρώντας πάντα άθικτο το 5΄ Rsa I άκρο της Rsa I - Pvu I ένθεσης του Εα υποκινητή στο pGSCAT φορέα.

3.1.3. Ο φορέας pRC/CMV

Ο φορέας pRC/CMV χρησιμοποιήθηκε για την παροδική υπερέκφραση (transient overexpression) των JAK2 και STAT1 (p91) cDNAs, τα οποία μετέχουν στο μονοπάτι μετάδοσης του σήματος της IFN-γ από την μεμβράνη στον πυρήνα[141,168,170,171]. Το cDNA της JAK2 κινάσης (Just Another Kinase[168,171]) εντέθηκε στην Xba I περιοριστική θέση του πολυσυνδέτη του φορέα pRC/CMV[2], ενώ το cDNA του STAT1 μεταγραφικού παράγοντα (Signal Transducer(s) and Activator(s) of Transcription[141]) υποκλωνοποιήθηκε από τον Bluescript SK+/- φορέα[3], κατευθυνόμενα (directed cloning) και προσανατολισμένα στις Not I - Apa I θέσεις του πολυσυνδέτη του pRC/CMV[143]. Ο pRC/CMV (INVITROGEN) ευκαρυωτικός φορέας έκφρασης προσφέρει: (α) υψηλή ενεργότητα ρυθμιζόμενης μεταγραφικής έκφρασης του κλωνοποιημένου cDNA κάτω από τον συνεχή (constitutive) έλεγχο του υποκινητή (promoter-enhancer) του CMV κυτταρομεγαλοϊού, (β) ισχυρά σήματα πολυαδενυλίωσης και μεταγραφικής ολοκλήρωσης και τερματισμού του συντιθέμενου μηνύματος (polyadenylation and termination signals) από το γονίδιο της αυξητικής ορμόνης βοός (BGH), (γ) αντιβιοτική ανθεκτικότητα σε αμπικιλίνη και (δ) γονίδιο ανθεκτικότητας στην νεομυκίνη, για γρήγορη επιλογή των G418 θετικών σταθερών κλώνων (stable clones). Η μοριακή οργάνωση του φορέα δίδεται ως ακολούθως (Σχήμα 1):

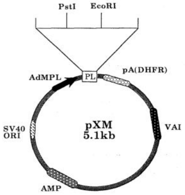


Σχήμα 1: Μοριακή ανατομία του pRC/CMV φορέα

[2] Ευγενώς προσφερόμενος από τον Δρ. Αρη Μουστάκα.
[3] Ευγενώς προσφερόμενος από τον Δρ. J. Darnell.

3.1.4. Ο φορέας pXM

Ο pXM ευκαρυωτικός φορέας έκφρασης επιλέγχθηκε για την υπερέκφραση, σε πειράματα παροδικής συνδιαμόλυνσης HeLa κυτταρικών σειρών, του IRF-1 (Interferon Regulatory Factor - 1) μεταγραφικού παράγοντα[4]. Το cDNA της IRF-1 πρωτεΐνης κλωνοποιημένο στην EcoRI περιοριστική θέση του πολυσυνδέτη του pXM φορέα, βρίσκεται κάτω από τον συνεχή ρυθμιστικό έλεγχο του υποκινητή του όψιμου γονιδίου του αδενοϊού τύπου 5 (Adenovirus-5, major late promoter: AdMPL) και εκφράζεται σε πολύ υψηλά επίπεδα σε όλες τις δοκιμές παροδικής διαμόλυνσης. Η μοριακή οργάνωση του φορέα δίδεται ως ακολούθως (Σχήμα 2):

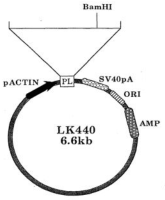


Σχήμα 2: Μοριακή ανατομία του pXM φορέα.

3.1.5. Ο φορέας LK440

Ο φορέας pUE5 χρησιμοποιήθηκε για την παροδική υπερέκφραση του μεταγραφικού πρωτεϊνικού καταστολέα ICSBP[5] (Interferon Consensus Sequence Binding Protein)[162]. Η πλασμιδιακή ανασυνδυασμένη pUE5 κατασκευή προέρχεται από την κλωνοποίηση του ICSBP cDNA στην BamHI περιοριστική θέση του πολυσυνδέτη του LK440 φορέα[162]. Επακόλουθα λοιπόν το γονίδιο του ICSBP μεταγραφικού παράγοντα βρίσκεται κάτω από τον συνεχή ρυθμιστικό έλεγχο του ισχυρού υποκινητή της ακτίνης, που συνιστά και το σημαντικότερο κριτήριο επιλογής του LK440 φορέα για την χρησιμοποίησή του σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης έκφρασης. Η μοριακή οργάνωση του LK440 φορέα δίδεται ως ακολούθως (Σχήμα 3):

[4] Ευγενώς προσφερόμενος από τον Δρ. Δ. Θάνο.
[5] Ευγενώς προσφερόμενος από την Δρ. K. Ozato.

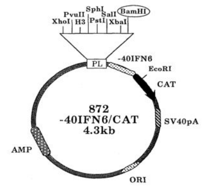


Σχήμα 3: Μοριακή ανατομία του LK440 φορέα.

3.1.6. Ο φορέας 872(-40IFN6)CAT

Ο χωρίς υποκινητή (promoterless) φορέας 872(-40IFN6)CAT[6] χρησιμοποιήθηκε για την διερεύνηση της μεταγραφικής συμπεριφοράς των ISRE και GASL *cis*-ρυθμιστικών περιοχών των ISG54 και GBP γονιδίων αντίστοιχα, στο να προσφέρουν ενισχυτική (enhancer) ιστοειδική ενεργότητα σε ετερόλογους υποκινητές ελάχιστης δραστηριότητας (minimum promoter), οι οποίοι αποτελούνται μόνο από την TATA συντηρημένη αλληλουχία και η οποία θεωρείται απαραίτητη για την έναρξη της μεταγραφικής διαδικασίας (transcription initiation events)[80,81,82]. Επακόλουθα λοιπόν, διατηρώντας άθικτη την περιοχή ελάχιστης μεταγραφικής ενεργότητας του γονιδίου της IFN-6 (-40), κλωνοποιήσαμε τις GASL και ISRE περιοχές σύνδεσης στην BamHI θέση του πολυσυνδέτη του φορέα 872(-40IFN6)CAT δημιουργώντας ανασυνδυασμένες κατασκευές, των οποίων η CAT ενεργότητα σε δοκιμές παροδικής διαμόλυνσης παρουσία ιντερφερόνης (IFN) ήταν ιδιαίτερα υψηλή. Ενώ για την κλωνοποίηση των GASL και ISRE περιοχών πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις σύνδεσης συμβατών προεξέχοντων άκρων, για την αντίστοιχη κλωνοποίηση της GASS συνδετικής περιοχής οι αντιδράσεις σύνδεσης προεπωάσθηκαν απουσία του φορέα 872(-40IFN6)CAT και είχαν τον χαρακτήρα των διαμοριακών αντιδράσεων τυφλών άκρων. Η μοριακή οργάνωση του φορέα 872(-40IFN6)CAT φαίνεται ως ακολούθως (Σχήμα 4):

[6] Ευγενώς προσφερόμενος από τον Δρ. Δ. Θάνο.



Σχήμα 4: Μοριακή οργάνωση του φορέα 872(-40IFN6)CAT

3.1.7. Αλλοι φορείς

Ολοι οι άλλοι φορείς που χρησιμοποιήθηκαν, είτε για ενδιάμεσα στάδια κλωνοποίησης, είτε για ανάλυση αλληλουχίας όπως: pUC18, pUC19, pBluescript KSII+ και pBluescript SKII+ περιγράφονται λεπτομερώς από τους Sambrook *et al.*[58], όπου παρατίθενται και οι αντίστοιχοι λεπτομερείς χάρτες.

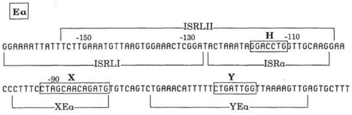
Ειδικότερα για την περίπτωση του RSV φορέα[7], αναφέρουμε ότι επιλέχθηκε για την υπερέκφραση του E1A ογκοαντιγόνου[7] καθώς και της CR1 μεταλλαγής[7] αυτού και ότι το ιϊκό cDNA βρίσκεται κάτω από τον ισχυρό μεταγραφικό έλεγχο μιας LTR (Long Terminal Repeat) περιοχής, γεγονός που προσφέρει υψηλά επίπεδα έκφρασης EIA mRNA και ακόλουθης παραγωγής ογκοπρωτεΐνης σε όλες τις περιπτώσεις παροδικής διαμόλυνσης (βλ. Αποτελέσματα-Συζήτηση, κεφάλαιο 10.1.2.).

[7] Ευγενώς προσφερόμενος από τον Δρ. Α. Van Der Eb.

3.2. ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ

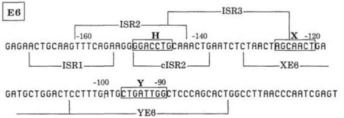
3.2.1. Ανιχνευτές του υποκινητή του Eα γονιδίου

Τα δίκλωνα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη περιγράφονται ως ακολούθως (οι αγκύλες προσδιορίζουν τα άκρα του κάθε ανιχνευτή στο συνολικό μήκος του Eα υποκινητή, ενώ τα Y, X και H οριοθετημένα τμήματα, τις συντηρημένες *cis*-ρυθμιστικές αλληλουχίες των υποκινητών τάξης II [5,9,78,215]):



3.2.2. Ανιχνευτές του υποκινητή του Eβ γονιδίου

Οι δίκλωνες συνθετικές θέσεις σύνδεσης (binding sites) του Eβ υποκινητή περιγράφονται ως ακολούθως (μεταξύ των αγκυλών προσδιορίζονται τα όρια του κάθε ανιχνευτή, ενώ οι Y, X και H περιοχές αντιστοιχούν στις συντηρημένες *cis*-ρυθμιστικές αλληλουχίες των υποκινητών τάξης II [5,9,79,215]):



3.2.3. Ανιχνευτές άλλων υποκινητών

Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από τις ρυθμιστικές αλληλουχίες των υποκινητών των ISG54 (<u>I</u>nterferon <u>S</u>timulated <u>G</u>ene-54) και GBP (<u>G</u>uanylate <u>B</u>inding <u>P</u>rotein) γονιδίων και περιγράφονται ως ακολούθως:

α) ISRE (Interferon Stimulated Response Element) του ISG54 υποκινητή (-109, -80)[100,101,107,123].

ISG54

gatcTCACTTTCTAGTTTCACTTTCCCTTTTGTA

β) GASL (Gamma Activated Sequence: Large element) του GBP υποκινητή (-138, -104)[111,119].

GBP

ISRE

gatcCGAAGTACTTTCAGTTTCATATTACTCTAAATCCA

GASS

γ) GASS (Gamma Activated Sequence: Small element) του GBP υποκινητή. Ενπεριέχεται στην GASL συνθετική δίκλωνη αλληλουχία σύνδεσης, αλλά μπορεί να ανταποκρίνεται μόνο στην δράση της IFN-γ, αντίθετα από την GASL περιοχή που απαντά τόσο σε IFN-α όσο και σε IFN-γ, επειδή εμφανίζει ισχυρή επικάλυψη αλληλουχίας με το ISRE στοιχείο, το οποίον ανταποκρίνεται εκλεκτικά μόνο στη δράση της IFN-α[111,154].

GBP

ctagAGTTTCATATTACTCTAAATC

Ολοι οι συνθετικοί ανιχνευτές μετά την διαδικασία της "υβριδοποίησης" με την συμπληρωματική τους αλυσίδα, ελέγχονταν για την αποδοτικότητα του "annealing" με ακραίο πολυμερισμό των ελεύθερων -gatc- άκρων (ο πυρήνας [core] αναγνώρισης του BamHI περιοριστικού ενζύμου), τα οποία χρησίμευαν τόσο για την ραδιοσήμανση των *cis*-περιοχών σύνδεσης όσο και για την κλωνοποίησή τους σε πλασμιδιακούς φορείς συμβατών και προεξέχοντων άκρων σύνδεσης, όπως του 872(-40IFNβ)CAT[114,210].

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ *cis*-ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ Eα ΓΟΝΙΔΙΟΥ

1.1. Πλασμιδιακές κατασκευές

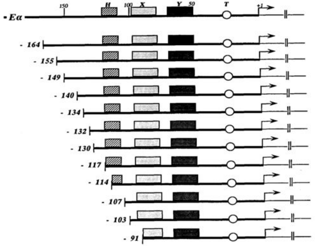
Για την λεπτομερή μελέτη της B-ιστοειδικής, αλλά και της επαγόμενης από IFN-γ μεταγραφικής απόκρισης της εγγύς περιοχής του υποκινητή του Eα γονιδίου δημιουργήθηκε μια νέα 'γενιά' ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών κατασκευών 5΄ σειριακών και 3΄ διαδοχικών ελλείψεων του Eα υποκινητή, των οποίων ο κυριότερος στόχος ήταν τόσο η ταυτοποίηση της 'ελάχιστης' δομικά *cis*-ρυθμιστικής περιοχής που απαιτείται για την ελεγχόμενη γονιδιακή δραστηριότητα όσο και ο προσδιορισμός νέων πιθανών *cis*-λειτουργικών στοιχείων, που ελέγχουν και καθορίζουν την συμπεριφορά του Eα γονιδίου.

1.1.1. *5΄σειριακές ελλείψεις (deletion constructs) του υποκινητή του Eα γονιδίου με την χρήση του ενζύμου της εξωνουκλεάσης III (Exo III)*

Ο 'ευκαρυωτικός φορέας' $pLSV_oCAT$ (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, κεφάλαιο 3.1.1.) χρησιμοποιήθηκε για την κατευθυνόμενη κλωνοποίηση (5΄→3΄) του Rsa I-Pvu I, (-343 έως +14 bp) τμήματος του Eα υποκινητή στην Xba I περιοριστική θέση του πολυσυνδέτη του $pLSV_oCAT$ φορέα[41,79].

Σαν μοριακή μήτρα, για την κατασκευή των 5΄ σειριακών ελλείψεων της εγγύς περιοχής του Eα υποκινητή, χρησιμοποιήθηκε η έλλειψη -164 CAT[41], όπου μετά από γραμμοποίηση μοριακής προστασίας με Sph I και δημιουργία Xba I 5΄ προεξέχοντων μονόκλωνων άκρων, πραγματοποιήθηκε νουκλεολυτική υδρόλυση από 20u/10μgr Exo III για χρόνους από 30" έως και 3΄. Οι ανασυνδυασμένοι φορείς ελέγχθηκαν με ανάλυση πρωτοδιάταξης αλληλουχίας κατά Sanger, ενώ η ονοματολογία της κάθε κατασκευής προσδιορίσθηκε από το είδος της έλλειψης του Eα υποκινητή και μάλιστα από την 5΄ θέση, σε σχέση με το +1 σημείο έναρξης της μεταγραφής της πρώτης βάσης που εμπεριέχεται στην κάθε έλλειψη (εικόνα 10).

Η διαφορική ρύθμιση - ανάλογα με το 5΄ όριο της αντίστοιχης έλλειψης - της μεταγραφικής έναρξης-συσσωμάτωσης (accumulation) CAT-mRNAs (ποσοτικά προσδιοριζόμενη από την ενζυμική *in vitro* CAT-ενεργότητα) σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης προσφέρει έναν αξιόπιστο και ευαίσθητο τρόπο καθορισμού και μελέτης της λειτουργικής συμπεριφοράς του Eα υποκινητή, τόσο σε B-ιστοειδικές όσο και σε επαγόμενες από IFN-γ κυτταρικές σειρές.

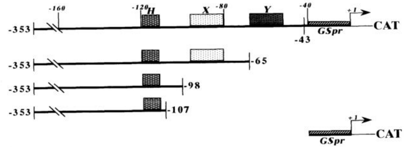


Εικόνα 10: Δομή των 5΄ ελλείψεων της εγγύς περιοχής του Εα υποκινητή. Τα τρία 'σκιασμένα' κουτιά αντιπροσωπεύουν τις Υ (σκούρο), Χ (ανοικτό) και Η (γραμμωτό) συντηρημένες αλληλουχίες των τάξης ΙΙ υποκινητών, ενώ ο λευκός κύκλος το ΤΑΤΑ (Τ) *cis*-ρυθμιστικό στοιχείο. Τα μαύρα βέλη ενδεικνύουν την θέση μεταγραφικής έναρξης του CAT γονιδίου αναφοράς, ενώ τα νούμερα (-164 έως -91) προσδιορίζουν τα 5΄ δομικά όρια της κάθε Εα-σειριακής έλλειψης αντίστοιχα. Η ονοματολογία που αποδίδεται λοιπόν είναι: από -164 CAT έως -91 CAT.

1.1.2. *Κατασκευές 3΄διαδοχικών ελλείψεων του υποκινητή του Εα γονιδίου με την χρήση του ενζύμου Bal31*

Το Rsa I-Pvu I (-353, +14) τμήμα της εγγύς (proximal) ρυθμιστικής περιοχής του Εα υποκινητή κλωνοποιημένο στον pUC19 βακτηριακό φορέα, υδρολύεται περιοριστικά στην EcoR I 3΄ αναγνωριστική θέση του pUC19 πολυσυνδέτη (polylinker), ενώ στη συνέχεια επωάζεται με 0,6 u/μgr Bal31 (N. E. BIOLABS) εξωνουκλεάσης για χρόνους από 0,5΄ έως και 4΄. Οι 3΄ διαδοχικές επιλεγμένες ελλείψεις κλωνοποιούνται στην Sma I περιοριστική θέση του pGSCAT 'ευκαρυωτικού' φορέα, ενώ η τελική ανασυνδυασμένη κατασκευή ελέγχεται με ανάλυση πρωτοδιάταξης αλληλουχίας κατά Sanger[41] (Διδακτορική Διατριβή Δρ. Δ. Θάνου).

Ολες οι 3΄ ελλείψεις εμφανίζουν ένα δομικά σταθερό 5΄ άκρο στην Rsa I περιοριστική θέση, ενώ τα ακραία όρια της τελευταίας θάσης της κάθε έλλειψης προσδιορίζονται από τα νούμερα -43, -65, -98, -107 αντίστοιχα, τα οποία μάλιστα προσδίδουν και την ονοματολογία του ανασυνδυασμένου φορέα (εικόνα 11)[41].



Εικόνα 11: Δομή των 3΄ διαδοχικών ελλείψεων του Eα υποκινητή (-353, +14)[41]. Τα τρία 'σκιασμένα' κουτιά Y (σκούρο), X (ανοικτό) και H (γκρί-άσπρο) καθορίζουν τις *cis*-συντηρημένες ρυθμιστικές αλληλουχίες των τάξης II υποκινητών, ενώ το GSpr τμήμα των 460 bp (πλάγια γραμμοσκιασμένο τμήμα) προσδιορίζει την περιοχή ελάχιστης μεταγραφικής ενεργότητας του υποκινητή της α-σφαιρίνης[41]. Το νούμερο -353 καθορίζει το 5΄ όριο των ελλείψεων, ενώ τα -43, -65, -98 και -107 τα αντίστοιχα 3΄ άκρα της κάθε έλλειψης.

Η κατασκευή GSprCAT φέρει την ελάχιστη δυνατή περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης του υποκινητή της α-σφαιρίνης, επιτρέποντας έτσι τον έλεγχο και την ταυτοποίηση της ύπαρξης ενισχυτικών δυναμικών (enhancer potential) ετερόλογων ρυθμιστικών περιοχών - όπως αυτών του Eα υποκινητή -, οι οποίες, αλληλεπιδρώντας *in trans* με το TATA-συντηρημένο στοιχείο της GSpr περιοχής, ενεργοποιούν μεταγραφικά την έκφραση του CAT γονιδίου αναφοράς[41,79].

1.2. Πειράματα παροδικής διαμόλυνσης

1.2.1. *Ταυτοποίηση τριών νέων cis-ρυθμιστικών στοιχείων υπεύθυνων για την ιστοειδική ή επαγόμενη από IFN-γ ενεργότητα του υποκινητή του Eα γονιδίου*

Οι προαναφερόμενες 5΄ σειριακές ελλείψεις -164 έως -91 CAT του Eα υποκινητή χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης B-λεμφοκυττάρων, καθώς και επωασμένων με IFN-γ επιθηλιακών κυτταρικών σειρών.

Τόσο ο B-ανθρώπινος Raji κυτταρικός κλώνος όσο και ο αντίστοιχος A_{20} του ποντικού εκφράζει σε υψηλά συστατικά επίπεδα (constitutively) τάξης II αντιγόνα παρουσιάζοντας ισχυρή μεταγραφική ενεργότητα των γονιδιακών τους υποκινητών. Για την μελέτη της απόκρισης της IFN-γ επιλέγχθηκε η HeLa κυτταρική σειρά, η οποία, αν και δεν εκφράζει ενδογενώς τάξης II αντιγόνα, μπορεί να ανταποκριθεί στην δράση της λεμφοκίνης και να υπερεπάγει τους αντίστοιχους υποκινητές[41,79].

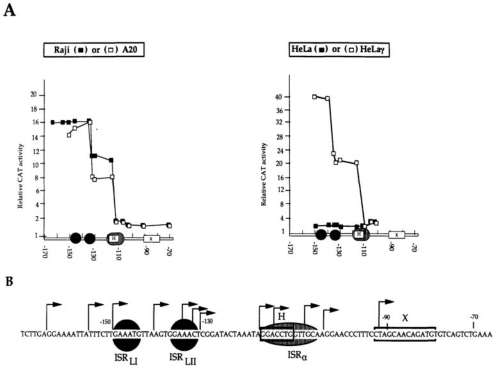
Για την είσοδο των ανασυνδυασμένων κατασκευών στις Raji και A_{20} κυτταρικές σειρές χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της DEAE-δεξτράνης, ενώ στις HeLa επιθηλιακές σειρές η μέθοδος της συγκατακρήμνισης με άλατα Ca_3PO_4[79]. Οι τιμές που αναλογούν στην σχετική CAT-ενεργότητα (Relative CAT activity: θλ. γλωσσάριο) αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών πειραματικών επαναλήψεων, ενώ το σχετικό σφάλμα προσδιορίζεται μικρότερο του 10% και γι' αυτό δεν αναγράφεται σε κανένα από τα παραστατικά διαγράμματα της παρούσας μελέτης (εικόνα 12).

Η σχετική ποσοτική εκτίμηση των CAT ενεργοτήτων των διαφόρων 5΄ σειριακών ελλείψεων γίνεται με βάση την -91 CAT κατασκευή, η οποία, έχοντας μεταλλαγμένο το X *cis*-ρυθμιστικό στοιχείο, παρουσιάζει ελάχιστη μεταγραφική ενεργότητα, συνιστώντας έτσι το σημείο αναφοράς (1) της σύγκρισης των ανασυνδυασμένων κατασκευών μεταξύ τους. Η κανονικοποίηση του βαθμού ενσωμάτωσης των υπερελικωμένων κατασκευών στις Raji, A_{20} και HeLa (-, +IFN-γ) γίνεται με την δοκιμή της β-γαλακτοσιδάσης από συγκατακρήμνιση του αντίστοιχου φορέα έκφρασης $pCMV_{\beta}$-lacZ.

Τα αποτελέσματα της δημιουργίας 5΄ σειριακών ελλείψεων του Εα υποκινητή εμφανίζουν ξεκάθαρα την συνεργατική φύση όλων των επιμέρους συστατικών στοιχείων του υποκινητή και αποκαλύπτουν την ύπαρξη τριών νέων *cis*-λειτουργικών στοιχείων που αναλύονται ως ακολούθως:

<u>$ISRL_I$</u>: Εμφανίζεται ως ελαφρά αρνητικό λειτουργικό στοιχείο (negative element), αφού η απουσία του - όπως προκύπτει από την συγκριτική ανάλυση των -155 CAT και -140 CAT 5΄ ελλείψεων - φαίνεται να επάγει μεταγραφικά τον Εα υποκινητή από 14x σε 16x φορές. Η Β-ιστοειδική του κατασταλτική μεταγραφική συμπεριφορά είναι εμφανής στα A_{20} κύτταρα του ποντικού, ενώ οι Raji ανθρώπινες σειρές εμφανίζουν λιγότερο έντονο τον αρνητικό αυτό χαρακτήρα.

Εικόνα 12: (βλ. όπισθεν σελίδα) Συνοπτική παρουσίαση της σχετικής CAT-ενεργότητας (Relative CAT activity) των 5΄ σειριακών ελλείψεων του Εα υποκινητή σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης Raji (μαύρο), A_{20} (άσπρο) και HeLa [-(μαύρο), +(άσπρο) IFN-γ] κυτταρικών σειρών (A). Τα H και X αντιπροσωπεύουν τις *cis*-συντηρημένες αλληλουχίες των τάξης II υποκινητών (A), ενώ τα σκιασμένα τμήματα $ISRL_I$, $ISRL_{II}$ (<u>I</u>nterferon <u>S</u>timulated <u>R</u>egion <u>L</u>ike) και ISR_{α} (<u>I</u>nterferon <u>S</u>timulated <u>R</u>egion - α) τις <u>νέες (novel) ταυτοποιημένες αλληλουχίες μεταγραφικής ρύθμισης του Εα υποκινητή.</u> Τα μαύρα βέλη προσδιορίζουν τα 5΄ άκρα της αντίστοιχης έλλειψης απ' όπου προκύπτει και η ονοματολογία της κάθε ανασυνδυασμένης κατασκευής (B).


A
Raji (■) or (□) A20
HeLa (■) or (□) HeLaγ
Relative CAT activity
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
1
40
36
32
28
24
20
16
12
8
4
1
-170
-150
-130
-110
-90
-70
H
x
B
-150
-130
H
-90
X
-70
TCTTGAGGAAAATTATTTCTTGAAATGTTAAGTGGAAACTCGGATACTAAATAGGACCTGGTTGCAAGGAACCCTTTCCTAGCAACAGATGTGTCAGTCTGAAA
ISR LI
ISR LII
ISRα

$ISRL_{II}$: Αν και εμφανίζει υψηλή δομική ομολογία με την $ISRL_I$ περιοχή (βλ. κεφάλαιο 1.2.4.) λειτουργεί σαν ένα ισχυρό θετικό ρυθμιστικό στοιχείο (positive element), μια και η έλλειψη του - όπως διαφαίνεται από την συγκριτική ποσοτική ανάλυση των -140 CAT και -130 CAT 5΄ ελλείψεων - προκαλεί πτώση της CAT μεταγραφικής ενεργότητας από 16x σε 11x φορές στα Raji κύτταρα, από 16x σε 8x φορές στα A_{20} κύτταρα και από 40x σε 20x φορές στους HeLa, IFN-γ κυτταρικούς πληθυσμούς.

ISR_{α}: Η σημαντικότερη λειτουργική περιοχή του Εα υποκινητή, αφού έλλειψη τριών ζευγών βάσεων (117G, 116G και 115A) προκαλεί δραματική πτώση τόσο της Β-λεμφοειδικής ενεργότητας όσο και της IFN-γ επαγόμενης HeLa μεταγραφικής δραστηριότητας. Συγκριτική ποσοτική ανάλυση των -117 CAT και -114 CAT ανασυνδυασμένων κατασκευών κατέδειξε την ύπαρξη ενός ισχυρού θετικού χαρακτήρα του ISRα *cis*-στοιχείου, αφού δομική αλλοίωση αυτού οδήγησε σε κατακόρυφη πτώση της CAT-ενεργότητας από 8x σε 1x για τις A_{20} κυτταρικές σειρές, από 10x σε 1x για τις Raji σειρές και από 20x σε 1,5x για τις HeLa, IFN-γ επιθηλιακές σειρές. Μαζί με τα στοιχεία θετικού μεταγραφικού ελέγχου $ISRL_{II}$ και ISR_{α}, η Χ-περιοχή - όπως διαφαίνεται και από την έλλειψη -91 CAT (βλ. κεφάλαιο 1.1.2.) - συνιστά το τρίτο ισχυρό αλλά και απαραίτητο λειτουργικό στοιχείο για την υψηλή ιστοειδική αλλά και IFN-γ επαγόμενη μεταγραφική συμπεριφορά του Εα υποκινητή, γεγονός που έχει επιβεβαιωθεί και από ανεξάρτητες μελέτες σε όλους τους τάξης II ενεργούς υποκινητές.

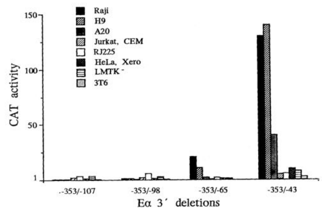
1.2.2. *Οι συντηρημένες Y-X-H περιοχές αρκούν για να προσφέρουν την Β-ιστοειδική δράση του Εα υποκινητή*

Η παροδική διαμόλυνση πλήθους κυτταρικών σειρών ποικίλου τάξης II μεμβρανικού φαινότυπου με τις ανασυνδυασμένες κατασκευές που φέρουν τις 3΄ διαδοχικές ελλείψεις του Εα υποκινητή μπροστά από το CAT-γονίδιο αναφοράς[41] (εικόνα 11) επιβεβαίωσε τα συμπεράσματα της μελέτης των 5΄ ελλείψεων, σε σχέση με ότι αφορά την συνεργατική φύση των επιμέρους Y-X-H δομικών στοιχείων για την υψηλή και αξιόπιστη μεταγραφική ενεργότητα του Εα υποκινητή (εικόνα 13).

Η απομάκρυνση του ΤΑΤΑ συντηρημένου στοιχείου (-353, -43 CAT) δεν φαίνεται να παίζει καθοριστικό λειτουργικό ρόλο, αφού η ανασυνδυασμένη κατασκευή -43 CAT εμφανίζει την μεγαλύτερη δυνατή μεταγραφική ενεργότητα σε όλους τους λεμφοειδικούς κυτταρικούς πληθυσμούς (Raji, H_9 και A_{20}) που ελέγχθηκαν, χρησιμοποιώντας πιθανώς το ισοδύναμο λειτουργικό στοιχείο ΤΑΤΑ της GSpr περιοχής του υποκινητή της α-σφαιρίνης (βλ. κεφάλαιο 1.1.2.).

Η επακόλουθη απομάκρυνση της Y περιοχής (-353, -65 CAT) οδηγεί σε ισχυρή μείωση της ιστοειδικής CAT δραστηριότητας, προσδίνοντάς της έτσι τον χαρακτήρα ενός ισχυρού θετικού ενισχυτικού λειτουργικού στοιχείου (enhancer element).

Οι -98 CAT και -107 CAT 3΄ διαδοχικές ελλείψεις, οι οποίες στερούνται της ενεργότητας των X και $ISR_α$ (θλ. κεφάλαιο 1.2.1.) λειτουργικών περιοχών αντίστοιχα εμφανίζουν ασήμαντη CAT μεταγραφική δραστηριότητα, επιβεβαιώνοντας έτσι την σημασία τόσο της X-περιοχής όσο και των άλλων Y και H-$ISR_α$ *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων στην εκλεκτική B-ιστοειδική μεταγραφική συμπεριφορά του Eα γονιδίου.



Εικόνα 13: Διαγραμματική περιγραφή της μεταγραφικής δραστηριότητας - ποσοτικά προσδιοριζόμενη σαν CAT ενεργότητα (CAT-activity) - των 3΄ ελλείψεων του Eα υποκινητή σ' ένα πλήθος διαφορετικών κυτταρικών σειρών ποικίλου τάξης II μεμβρανικού φαινότυπου: α) Raji: ανθρώπινα B-κύτταρα II^+, β) H_9: ανθρώπινη μετασχηματισμένη T-σειρά II^+, γ) A20: B-κύτταρα ποντικού II^-, δ) Jurkat, CEM: ανθρώπινες T-λεμφοβλαστικές σειρές II^-, ε) RJ225: ανθρώπινη B-ανοσοανεπαρκής σειρά II^- (βλ. Εισαγωγή, κεφάλαιο 1.3.2.), ζ) HeLa, Xero: επιθηλιακά κύτταρα ανθρώπου II^-, η) $LMTK^-$: ινοβλάστες ποντικού II^-, θ) 3T6: μετασχηματισμένοι ινοβλάστες ποντικού II^-.
Σημειώνεται ότι η πρωταρχική μελέτη και ανάλυση των φαινοτύπων των Raji, Jurkat, RJ2.2.5, κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκε από τον Δρ. Δ. Θάνο (Διδακτορική Διατριβή), ενώ η παρουσία τους στο διάγραμμα της εικόνας 13 εξυπηρετεί λόγους συγκριτικής συμπεριφοράς με τις A_{20} και H_9 σειρές.

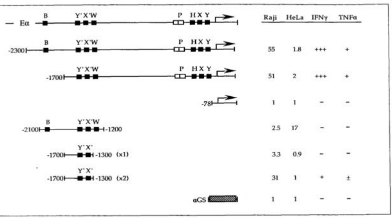
Η υψηλή μεταγραφική ενεργότητα του Εα υποκινητή στις A_{20}, H_9 και Raji κυτταρικές σειρές, σε αντίθεση με τις LMTK-, CEM και 3T6, συμφωνεί απόλυτα με την μηχανιστική άποψη της ύπαρξης ενός ισχυρού μονοπατιού μετάδοσης του σήματος της IFN-γ από τον υποδοχέα στον τάξης II υποκινητή, ενώ η *in trans* αλληλεπίδραση των μεταγραφικών παραγόντων των X-Y-$ISR_α$ *cis*-ρυθμιστικών περιοχών αντίστοιχα φαίνεται υπεύθυνη τόσο για την εκλεκτικά Β-ιστοειδική (A_{20}) όσο και για την ποσοτικά αυξημένη (-353, -43: >50x) Εα γονιδιακή ενεργότητα.

1.2.3. *Η απόκριση του Εα υποκινητή στην δράση του TNF-α είναι ανεξάρτητη από την παρουσία του NFκB στοιχείου*

Συγκριτική ανάλυση των κατασκευών -2300 CAT και -1700 CAT του Εα υποκινητή[41] σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης HeLa κυττάρων παρουσία TNF-α κατέδειξε την ανεξάρτητη από την ύπαρξη του NFκB-στοιχείου (Β-κουτί) μεταγραφική απόκριση του υποκινητή στην δράση του TNF-α (εικόνα 14). Αξιοσημείωτο είναι ότι και οι δύο κατασκευές εμφάνιζαν συγκρίσιμη συμπεριφορά τόσο στην Β-ιστοειδική τους δραστηριότητα (Raji) όσο και στην επαγόμενη CAT ενεργότητα της IFN-γ και του TNF-α.

Κλωνοποίηση της απόμακρης (distal) ρυθμιστικής περιοχής του Εα υποκινητή (-2100, -1200), η οποία περιλαμβάνει το NFκB (Β-κουτί) στοιχείο[46] καθώς και μια κατοπτρική δομή W-X΄-Y΄ του εγγύς υποκινητή[1,5,46] (βλ. Εισαγωγή, εικόνα 4), δίπλα στην GSpr περιοχή της α-σφαιρίνης, δημιούργησε μια νέα κατασκευή η οποία όμως δεν ανταποκρινόταν ούτε σε IFN-γ ούτε σε TNF-α, επιβεβαιώνοντας έτσι την λειτουργική αδυναμία του NFκB στοιχείου να αποκριθεί στην δράση του TNF-α.

Παρόμοια συμπεριφορά εμφάνισε και η κατασκευή (-1700, -1300) pGSCAT σε 1 αντίγραφο (1 copy), ενώ τα 2 αντίγραφα παρουσίασαν τόσο υψηλή Β-ιστοειδική ενεργότητα (Raji) όσο και ενδιάμεση απόκριση στην επίδραση του TNF-α (HeLa). Όλες οι ποσοτικές εκτιμήσεις της CAT ενεργότητας των διαφόρων ανασυνδυασμένων κατασκευών έγιναν με βάση την ελάχιστη μεταγραφική δραστηριότητα της έλλειψης -78 CAT και του pGSCAT υποκινητή (minimum) της α-σφαιρίνης.



Εικόνα 14: Περιγραφή της συμπεριφοράς των 5΄ ελλείψεων της απόμακρης περιοχής του Eα υποκινητή στην δράση του TNF-α (επάνω μέρος). Συνοπτική παρουσία των κατασκευών υποκατάστασης της απόμακρης περιοχής του Eα υποκινητή σε σχέση με την επαγόμενη απόκριση σε IFN-γ και TNF-α (κάτω μέρος). Η λειτουργική αδράνεια του NFκB στοιχείου (B μαύρο κουτί) στην TNF-α απόκριση είναι εμφανής. Τα P (άσπρα κουτιά) στοιχεία έχουν πια αναπροσδιορισθεί ως $ISRL_{I,II}$ (βλ. κεφάλαιο 1.1.1.). Τα X, Y και H (μαύρα κουτιά) προσδιορίζουν τις *cis*-ρυθμιστικές αλληλουχίες των τάξης II υποκινητών, ενώ τα μαύρα βέλη το σημείο (+1) έναρξης της CAT-μεταγραφής.

1.3. Συζήτηση

Η μελέτη της *in vivo* μεταγραφικής συμπεριφοράς των 5΄ σειριακών και των 3΄ διαδοχικών ελλείψεων του Eα υποκινητή αποκάλυψε την συνδυαστική φύση των επιμέρους X, Y και H συστατικών λειτουργικών του στοιχείων και ταυτοποίησε την ύπαρξη τριών νέων ρυθμιστικών περιοχών με σημαντικότερη, τόσο για την B-ιστοειδική όσο και για την IFN-γ επαγόμενη απόκριση του υποκινητή την ISR_{α}, η οποία εμφανίζει δομική επικάλυψη με την επταμερή συντηρημένη (H) αλληλουχία.

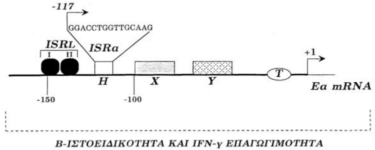
Η υψηλή δομική ομολογία των ρυθμιστικών στοιχείων του ανθρώπινου DRα γονιδίου με τον Eα υποκινητή[22,25,38] και κατ' επέκταση η συντήρηση των αντίστοιχων μεταγραφικών μηχανισμών, επέτρεψε την ανάλυση της συμπεριφοράς όλων των κατασκευών μας στις Raji (B) και HeLa, IFN-γ ανθρώπινες κυτταρικές σειρές και την συγκριτική τους μελέτη με την A_{20} σειρά, που αποτελεί και τον μοναδικό καλά μελετημένο πληθυσμό του ποντικού, που εκφράζει υψηλά συστατικά επίπεδα τάξης II αντιγόνων. Παρόμοια συμπεράσματα της συνδυαστικής (combinatorial) οργάνωσης υποκινητών έχουν εξαχθεί και από ανεξάρτητες μελέτες για όλα σχεδόν τα ενεργά γονίδια της τάξης II οικογένειας[1,5], όπως για το DRα[22,23,25,28,29], DPα[21], Eβ[79], Aα[8] και την 'Invariant chain'[50] (η οποία βοηθά στην τρι-τεταρτοταγή συγκρότηση των διαμοριακών συμπλεγμάτων τάξης ΙΙ και επεξεργασμένων αντιγόνων στο ενδοπλασματικό δίκτυο).

Ανάλυση 5΄ ελλείψεων του υποκινητή του Aα γονιδίου του ποντικού σε A_{20} και WEHI, IFN-γ (μακροφάγα) κυτταρικές σειρές αποκάλυψε τον σημαντικό ρόλο της Η περιοχής και καθοδήγησε στον προσδιορισμό ενός ISR_a-ομόλογου στοιχείου τοπολογούμενου μεταξύ των -105 και -89 αλληλουχιών του Aα υποκινητή[8], ενισχύοντας έτσι την άποψη της συντονισμένης μεταγραφικής ρύθμισης και επακόλουθης μεμβρανικής έκφρασης όλων των MHC-II αντιγόνων (coordinated gene expression)[5].

Κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση θέσης (site directed mutagenesis) των X, H *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων του Eα υποκινητή σε B και μακροφάγες κυτταρικές σειρές επιβεβαίωσε την σημασία της παρουσίας τόσο των X όσο και των H-ISR_a αλληλουχιών, για την *in vitro* υψηλή και αξιόπιστη μεταγραφική ενεργότητα του Eα υποκινητή[39]. η μεταλλαγή μάλιστα στην Η-περιοχή (μεταλλαγή 10, εικόνα 2)[39] φαίνεται να περιλαμβάνει το νεοχαρακτηρισμένο ISR_a *cis*-στοιχείο. Μεταλλαγές υποκατάστασης της TATA συντηρημένης αλληλουχίας δεν φάνηκαν να επηρεάζουν την δράση του υποκινητή, επιβεβαιώνοντας έτσι τα αποτελέσματα της -343, -43 CAT 3΄ έλλειψης, η οποία εμφανίζει υψηλή B-ιστοειδική δραστικότητα χωρίς να εμπεριέχει το αυθεντικό της TATA στοιχείο (η λειτουργική αντικατάσταση αυτού από το TATA της α-σφαιρίνης δεν αποκλείεται).

Η έλλειψη πέντε βάσεων (-107, -102) στην 5΄ περιοχή του X-στοιχείου του DPα ανθρώπινου υποκινητή οδηγεί σε μια κατακόρυφη πτώση της μεταγραφικής ενεργότητας, υποδηλώνοντας έτσι ότι το αντίστοιχο λειτουργικό ISRα-ανάλογο του DPα γονιδίου ταυτοποιείται στην περιοχή -107, -102 (αποκαλούμενο J-στοιχείο). Τα δομικά όρια του ISRα στοιχείου προσδιορίσθηκαν από: α) τις 5΄ σειριακές ελλείψεις, β) την ομολογία με τις DRα ρυθμιστικές αλληλουχίες και γ) πειράματα διαμοριακών αλληλεπιδράσεων *in vitro* DNA-πρωτεΐνης (βλ. κεφάλαιο 2).

Είναι λοιπόν εμφανές ότι τα 'ISRα-αντίστοιχα' *cis*-στοιχεία του κάθε υποκινητή της γονιδιακής τάξης ΙΙ οικογένειας συνεργάζονται *in trans* με τις X-συντηρημένες περιοχές[22] για να προσφέρουν ιστοειδικότητα και IFN-γ επαγόμενη μεταγραφική δραστηριότητα, ενώ η Y-αλληλουχία συμμετέχει τόσο ποσοτικά όπως και ποιοτικά[1,5,45] στην επίτευξη των προαναφερόμενων φαινοτύπων. Η συνεργατική μάλιστα σταθεροποιητική αλληλεπίδραση των NF-Y και X1,2-συνδεόμενων πρωτεϊνών[72] (RFX, XBP: βλ. Εισαγωγή, εικόνα 5) και η επακόλουθη, στερεοδιατακτικά καθορισμένη από την ίδια την δομική οργάνωση του υποκινητή (DRα)[35,36], ισχυρή σύνδεση αυτών στις αναγνωριστικές αλληλουχίες σύνδεσης, συνιστά τον βασικότερο μηχανισμό συνδυαστικής οργάνωσης του υποκινητή και αθροιστικής συνεργατικής λειτουργίας των X και Y (τουλάχιστον) *cis*-λειτουργικών στοιχείων. Η ταυτοποίηση και η σχετική τοπολογία των νέων *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων του Eα υποκινητή φαίνεται στην εικόνα 15.



Εικόνα 15: Απεικόνιση των τριών νέων *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων του Ea υποκινητή (ISRa, $ISRL_I$ και $ISRL_{II}$). Διακρίνεται η ISRa νουκλεοτιδική αλληλουχία (βλ. κεφάλαιο 2), ενώ το μαύρο βέλος -117 προσδιορίζει την ελάχιστη περιοχή (Y-X-ISRa) του εγγύς τμήματος του υποκινητή που προσφέρει τόσο Β-ιστοειδική όσο και IFN-γ επαγόμενη υψηλή μεταγραφική ενεργότητα.

Το $ISRL_{II}$ *cis*-λειτουργικό στοιχείο εμφανίζει μια σαφή ενισχυτική δραστηριότητα της μεταγραφικής επαγωγής τόσο στις Β-κυτταρικές σειρές (Raji, A_{20}) όσο και στις IFN-γ αποκρινόμενες HeLa σειρές, αφού έλλειψη αυτού οδηγεί σε μεγάλη πτώση της ενεργότητας του Ea υποκινητή. Το θετικό μεταγραφικό αποτέλεσμα (positive effect) της λειτουργίας του $ISRL_{II}$ στοιχείου αποδίδεται στην σύνδεση μεταγραφικών παραγόντων (transcription factors) της IRF-οικογένειας[152,155] (βλ. Εισαγωγή, κεφάλαιο 2.6.), υπόθεση που ενδεικνύεται τόσο α) από την δομική ομολογία του $ISRL_{II}$ στοιχείου με την DNA αναγνωριστική θέση σύνδεσης του IRF-1 μεταγραφικού ενεργοποιητή[158], όσο και β) από την μεταγραφική ενεργοποίηση των Ea κατασκευών αναφοράς CAT (-1700, -140) μέσω της παροδικής υπερέκφρασης της IRF-1 πρωτεΐνης σε κυτταρικές σειρές HeLa παρουσία IFN-γ (βλ. κεφάλαιο 7).

Η επακόλουθη *trans*-ανάλυση και λειτουργική μελέτη των πυρηνικών πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων (nuclear bindings) με τα $ISRL_I$ και $ISRL_{II}$ στοιχεία αντίστοιχα πραγματοποιήθηκε απο την Δρ. Μ. Γρηγορίου κατά την εκπόνηση της Διδακτορικής της Διατριβής[207].

Ο λειτουργικός καθορισμός του $ISRL_I$ *cis*-στοιχείου ως μιας νέας ρυθμιστικής μεταγραφικής μονάδας βασίσθηκε στον αρνητικό φαινότυπο που εμφάνισε στα A_{20} κύτταρα του ποντικού, καθώς και στην ομολογία με την $ISRL_{II}$ περιοχή. Η γραμμική επανάληψη των βάσεων GAAAPy συνιστά το μονομερές τμήμα της IRF-1,2 DNA αναγνωριστικής θέσης, ενώ ο αρνητικός Β-ιστοειδικός χαρακτήρας του $ISRL_I$ *cis*-στοιχείου θα μπορούσε να αποδοθεί στην εκλεκτική σύνδεση του λεμφοειδικού IRF-2 μεταγραφικού καταστολέα[152,155]. Η χαμηλή πιθανώς συγγένεια σύνδεσης (binding affinity) του IRF-2 με το $ISRL_I$ *cis*-στοιχείο - λόγω μη διμερισμού της DNA θέσης σύνδεσης - επεξηγεί και την ελαφρά κατασταλτική συμπεριφορά (repression) της $ISRL_I$ περιοχής στην μεταγραφική ενεργότητα του Εα υποκινητή.

Οπως εκτεταμένα αναλύθηκε στην εισαγωγή (κεφάλαιο 1.3.1.) ένας από τους σημαντικότερους ενεργοποιητές - εκτός βέβαια της IFN-γ - της έκφρασης των τάξης II αντιγόνων είναι ο παράγοντας νέκρωσης όγκου TNF-α (Tumour Necrosis Factor-α)[5,34,37], ο οποίος συνεργατικά με την δράση της IFN-γ μπορεί να υπερεπάγει την μεταγραφική δραστηριότητα των DRα και Αα υποκινητών σε αστροκυτταρικές και μακροφάγες κυτταρικές σειρές αντίστοιχα[5,34,51].

Στην παρούσα μελέτη (κεφάλαιο 1.2.3., εικόνα 14), η μεταγραφική υψηλή ενεργότητα του Εα υποκινητή σε HeLa κυτταρικές σειρές φάνηκε να εξαρτάται από την παρουσία τόσο της IFN-γ όσο και του TNF-α. Το γεγονός ότι όλες οι ανασυνδυασμένες Εα-κατασκευές αποκρίνονται συγκρίσιμα στην δράση των δύο επαγωγέων υποδεικνύει ότι τα ίδια-ομόλογα *cis*-στοιχεία καθορίζουν την δράση του υποκινητή στην IFN-γ και στον TNF-α. Η ικανότητα της TNF-α μεταγραφικής απόκρισης του -1700 Εα CAT φορέα αποδεικνύει την απουσία της συμμετοχής του NFκB (B-)[46] στοιχείου στο μονοπάτι μετάδοσης του σήματος του TNF-α από την μεμβράνη στον Εα υποκινητή.

Αν και έχει δειχθεί από πλήθος ανεξάρτητων ερευνών ότι ο NFκB μεταγραφικός παράγοντας - αποτελούμενος από δύο p50/p65 συστατικές υπομονάδες - ενεργοποιείται μέτα-μεταφραστικά από την δράση του TNF-α μέσω εκλεκτικής απενεργοποίησης του κυτταροπλασματικού αναστολέα του IκB[80] (όπως αποκαλύφθηκε για τον υποκινητή της βαριάς αλυσίδας των τάξης I γονιδίων)[200], η TNF-α επαγόμενη μεταγραφική δραστηριότητα του DRα γονιδίου σε αστροκυτταρικές σειρές φαίνεται να ελέγχεται από πυρηνικά μεταγραφικά υπερσύμπλοκα, τα οποία ενεργοποιούνται τόσο από TNF-α όσο και από IFN-γ και που εμφανίζουν υψηλή συγγένεια σύνδεσης με την X *cis*-ρυθμιστική περιοχή (Εισαγωγή, κεφάλαιο 1.3.3.1.), η οποία ως γνωστόν δεν παρουσιάζει ούτε δομική ούτε λειτουργική ομολογία με το NFκB *cis*-στοιχείο.

Η ενεργότητα λοιπόν της κατασκευής -1700 Εα CAT στην TNF-α δράση θα μπορούσε να αποδοθεί (μεμονωμένα ή συνδυαστικά), α) σε TNF-α επαγόμενα σύμπλοκα των X, H-ISRα περιοχών, β) σε TNF-α ενεργοποιημένα μεταγραφικά συμπλέγματα των W, X΄ περιοχών και γ) στην *in trans* επαγωγή της T-ομόλογης περιοχής (-42, -28) του Εα, η οποία, όσον αφορά τουλάχιστον το Αα γονίδιο, έχει δειχθεί ότι ελέγχει μεταγραφικά την συμπεριφορά του Αα υποκινητή στην δράση του TNF-α [51].

Η μερική μάλιστα απόκριση της κατασκευής -1700, -1300: 2x στην επίδραση του TNF-α επιβεβαιώνει την ισχύ του προαναφερόμενου μοντέλου, αφού τα Y΄-X΄ στοιχεία σε διμερή μορφή υποκαθιστούν (μερικώς) την συνολική δραστηριότητα του υποκινητή, εμφανίζοντας μάλιστα και υψηλή B-ιστοειδική ενεργότητα, γεγονός που έχει επιβεβαιωθεί *in vivo* και από ανεξάρτητες μελέτες τρανσγενωμικών μεταλλαγμένων ποντικών που έχουν ενσωματώσει 5΄ ακρωτηριασμένους Εα υποκινητές[1,5].

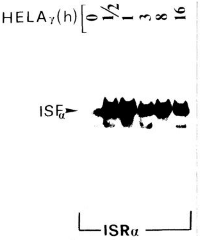
2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ *trans*-ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΟΥ ΣΥΝΔΕΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ISRα ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ Εα ΓΟΝΙΔΙΟΥ

Η μελέτη που ακολουθεί αφορά την μοριακή ταυτοποίηση και την λειτουργική ανάλυση των μεταγραφικών συμπλεγμάτων που ανιχνεύονται στην ISRα *cis*-ρυθμιστική περιοχή, η οποία συνιστά και το ανώτερο 5΄ άκρο του Εα υποκινητή, το οποίον εμφανίζει ιστοειδική και επαγόμενη μεταγραφική ενεργότητα. Η προσπάθεια βιοχημικού χαρακτηρισμού των επαγόμενων από IFN πυρηνικών πρωτεϊνικών μεταγραφικών συμπλόκων συνιστά το κυριότερο αντικείμενο του παρόντος κεφαλαίου, ενώ η ανάλυση τόσο των X-, όσο και των ISRL- πυρηνικών αλληλεπιδράσεων ολοκληρώθηκε από την Δρ. Μ. Γρηγορίου κατά την εκπόνηση της Διδακτορικής της Διατριβής[207].

2.1. Ταυτοποίηση ενός νέου μεταγραφικού συμπλόκου (ISFα), το οποίον αναγνωρίζει την ISRα περιοχή και επάγεται γρήγορα από IFN-γ

Για την *in vitro* ανίχνευση επαγόμενων από IFN-γ μεταγραφικών συμπλεγμάτων πραγματοποιήθηκαν πειράματα μεταβολής της κινητικότητας DNA λόγω αλληλεπίδρασης (E.M.S.A.: βλ. Υλικά και Μέθοδοι, κεφάλαιο 2.3.3.) του ISRα *cis*-στοιχείου με πυρηνικά εκχυλίσματα HeLa κυτταρικών σειρών επωασμένων για διαφορετικούς χρόνους με IFN-γ. Ο δομικός σχεδιασμός της ISRα περιοχής βασίσθηκε τόσο στις 5΄ σειριακές ελλείψεις (βλ. κεφάλαιο 1.2.1.) όσο και στην ομολογία των αντίστοιχων ρυθμιστικών περιοχών των Εα και DRα υποκινητών. Η ISRα περιοχή επικαλύπτει συνολικά το H *cis*-στοιχείο, ενώ εκτείνεται αρκετές βάσεις 3΄ αυτού συμπεριλαμβάνοντας την 'TGCA' συντηρημένη αλληλουχία. Ο δίκλωνος μοριακός ανιχνευτής (ds-oligonucleotide) που κατασκευάσθηκε εμπεριέχει τις βάσεις -125 έως -103 του Εα υποκινητή και για λόγους ευκολίας θα αποκαλείται ISRα όπως και η *cis*-ρυθμιστική αλληλουχία (εικόνα 15).

Η επώαση του ακραία ραδιοσημασμένου ανιχνευτή ISRα με μια σειρά πυρηνικών εκχυλισμάτων (nuclear extracts) HeLa κυττάρων επεξεργασμένων με IFN-γ για διαφορετικούς χρόνους από 30΄ έως 16h αποκάλυψε την ύπαρξη ενός γρήγορα επαγόμενου (<30΄) πυρηνικού συμπλέγματος, το οποίον εμφανίζει υψηλή συγγένεια σύνδεσης με την ISRα περιοχή και το οποίον αποκαλείται ISFα: Interferon Stimulated Factor-α (εικόνα 16).



Εικόνα 16: Πειράματα μεταβολής της κινητικότητας λόγω αλληλεπίδρασης της ISRα περιοχής με πλήθος πυρηνικών εκχυλισμάτων HeLa κυττάρων επωασμένων με IFN-γ από 30΄ έως 16h. Η γρήγορη επαγωγή του ISFα μεταγραφικού συμπλόκου είναι εμφανής.

2.2. Συσχέτιση των ISFα συμπλεγμάτων με τους μεταγραφικούς παράγοντες που αλληλεπιδρούν με τα ISRE/GAS στοιχεία. Λειτουργική ομοιότητα των ISFα-GAF2 συμπλεγμάτων

Παρασκευές ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων[213] (whole cell extracts, βλ. Υλικά και Μέθοδοι, κεφάλαιο 2.3.2.) A_{20} και HeLa, IFN-γ 3h κυτταρικών σειρών επωάσθηκαν *in vitro* παρουσία δίκλωνων ακραία ραδιοσημασμένων ιχνηθετών ISRα αντίστοιχα. Το ISFα μεταγραφικό σύμπλοκο των HeLa, IFN-γ 3h επιθηλιακών σειρών ανθρώπου παρουσίασε συγκρίσιμη μοριακή κινητικότητα μ' αυτή που ταυτοποιήθηκε στο σύμπλεγμα των A_{20} κυττάρων του ποντικού. Η υψηλή συστατική (constitutive) Β-ιστοειδική ενεργότητα σύνδεσης φαίνεται να ταυτίζεται (όσον αφορά τουλάχιστον την κινητική συμπεριφορά των δύο συμπλεγμάτων) με την HeLa, IFN-γ επαγόμενη δραστηριότητα του ISFα συμπλόκου, γεγονός που μας επιτρέπει να αναφερόμαστε στα ISFα συμπλέγματα χωρίς να διακρίνουμε την προέλευση της κυτταρικής σειράς που εμφανίζονται (εικόνα 17).

Πειράματα 'κρύου' ανταγωνισμού (competition, βλ. Υλικά και Μέθοδοι, κεφάλαιο 2.3.3.) μέσω προσθήκης 50 ngr (50x) μη ραδιοσημασμένου δίκλωνου ISRα ανιχνευτή κατέδειξαν την ειδικότητα (specificity) της ISFα ενεργότητας σύνδεσης, ενώ συνεπώαση της ISRα ραδιοσημασμένης περιοχής με 200 ngr (200x) του X *cis*-στοιχείου του Eα υποκινητή (βλ. Παράρτημα, κεφάλαιο 3.2.1.) δεν εμφάνισε κανένα ανταγωνισμό, αποκαλύπτοντας την υψηλή συγγένεια σύνδεσης του ISFα μεταγραφικού συμπλόκου εκλεκτικά στην ISRα περιοχή του Eα υποκινητή.

Παρόμοιες δοκιμές 'κρύου' ανταγωνισμού κατέδειξαν την ικανότητα του ISFα συμπλόκου να αναγνωρίζει τα ISR1 και ISR2 *cis*-στοιχεία του E6 υποκινητή[79] (Interferon Stimulated Region, βλ. κεφάλαιο 8) με υψηλή συγγένεια, ενώ φαίνεται να συνδέεται περισσότερο 'χαλαρά' στην ISR3 περιοχή αυτού[79] (βλ. Διδακτορική Διατριβή Δρ. Μ. Γρηγορίου, 1993)[207]. Συγκρίσιμη συγγένεια σύνδεσης εμφανίσθηκε και για τα ISRL1 ($ISRL_I$) και ISRL2 ($ISRL_{II}$) *cis*-στοιχεία του Eα υποκινητή, ενώ η ικανότητα εκλεκτικής αναγνώρισης των GAS (GASL) και ISRE *cis*-στοιχείων (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, κεφάλαιο 3.2.3.) υπήρξε το εντυπωσιακότερο εύρημα των πειραμάτων 'κρύου' ανταγωνισμού, αφού κατατάσσει τους ISFα παράγοντες στην μεγάλη οικογένεια των επαγόμενων STAT μεταγραφικών πρωτεϊνών (βλ. Εισαγωγή, κεφάλαιο 2.5.).

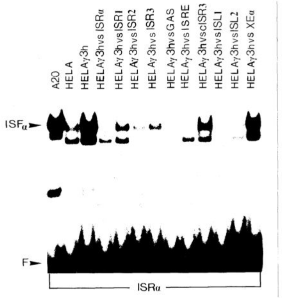
Σημειώνεται ότι σε όλες τις δοκιμές ομόλογου (εαυτού) ή ετερόλογου (ξένου ανιχνευτή) ανταγωνισμού ο ραδιοσημασμένος ιχνηθέτης αντιπροσωπεύονταν σε μοριακή συγκέντρωση 1 ngr/μl το οποίον ισοδυναμούσε με 10^5 cpm/μl, ενώ ο προς μελέτη 'κρύος' ανιχνευτής (εκτός του X-στοιχείου) παρευρισκόταν σε μοριακή περίσσεια της τάξης των 50x-φορών (50 ngr). Ολες οι δοκιμές 'κρύου' ανταγωνισμού φαίνονται ενοποιημένες στο ίδιο ουδέτερο πήκτωμα μη αποδιατακτικής (native) ακρυλαμίδης στην εικόνα 17.

Ακολουθώντας 'αντίστροφους' πειραματικούς σχεδιασμούς πραγματοποιήθηκαν δοκιμές μεταβολής κινητικότητας λόγω αλληλεπίδρασης (EMSA) της GAS περιοχής του GBP υποκινητή (βλ. Εισαγωγή, κεφάλαιο 2.2.), μέσω της *in vitro* επώασης Raji και HeLa, IFN-γ 3h ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων αντίστοιχα (εικόνα 18).

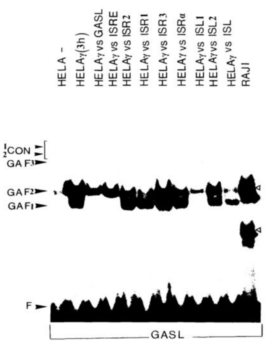
Ο GASL (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, κεφάλαιο 3.2.3.) ραδιοσημασμένος ανιχνευτής περιλαμβάνοντας τόσο το GAS όσο και το ISRE *cis*-ρυθμιστικό στοιχείο, επιτρέπει την ταυτοποίηση τριών επαγόμενων με IFN-γ μεταγραφικών συμπλεγμάτων GAF1, GAF2 και GAF3 (Gamma Activation Factor, βλ. Γλωσσάριο), καθώς και δύο συστατικών (constitutive) συμπλόκων χαλαρής ενεργότητας σύνδεσης ($\frac{1}{2}$ CON).

Η προσθήκη 'κρύων' ανταγωνιστών σε μοριακή περίσσεια συγκέντρωσης 50x (50 ngr) των GASL και ISRE δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων κατέδειξε την ειδικότητα της αλληλεπίδρασης, ενώ η ικανότητα ισχυρού εκλεκτικού συναγωνισμού της ενεργότητας σύνδεσης του GAF2 συμπλόκου από τα ISRα, ISR1, ISR2 και ISRL(1) *cis*-στοιχεία αποκάλυψε την λειτουργική συγγένεια-ταυτότητα των ISFα (-ομόλογων) μεταγραφικών παραγόντων με το GAF2[119], επαγόμενο από IFN-γ πυρηνικό σύμπλοκο.

Σαν θετικός μάρτυρας της αποδοτικότητας των *in vitro* διαμοριακών αλληλεπιδράσεων DNA-πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκαν Raji ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα, τα οποία εμφάνισαν δύο Β-ιστοειδικά συμπλέγματα (άσπρα μικρά βέλη της εικόνας 18), ένα εκ των οποίων παρουσίασε την ίδια μοριακή κινητικότητα με το GAF2 επαγόμενο από IFN-γ σύμπλοκο. Τα αποτελέσματα των προπεριγραφέντων δοκιμών φαίνονται συνολικά στην εικόνα 18.

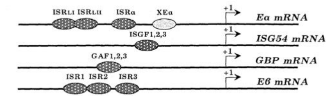


Εικονα 17: Πειράματα 'κρύου' ανταγωνισμού σε HeLa, IFN-γ 3h ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα του ISFα μεταγραφικού συμπλόκου, με την χρήση πλήθους δίκλωνων ανιχνευτών (ετερόλογων ολιγονουκλεοτιδίων) των υποκινητών των Εα (ISRL1, ISRL2, XEα, καθώς και του ISRα εαυτού), Εβ (ISR1, ISR2 και ISR3), GBP (GAS) και ISG54 (ISRE). Η παρόμοια μοριακή κινητικότητα των A_{20} και HeLa, IFN-γ 3h ISFα συμπλόκων είναι προφανής.



Εικόνα 18: Πειράματα 'κρύου' ανταγωνισμού σε HeLa, IFN-γ 3h ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα της GASL (-138, -104) περιοχής του GBP υποκινητή, μέσω της χρήσης πλήθους δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων των Εα [ISRa, ISRL (1,2)], Εβ (ISR1, ISR2 και ISR3) και ISG54 (ISRE) υποκινητών. Τα μαύρα βέλη προσδιορίζουν τους τρείς GAF1, GAF2 και GAF3[119] επαγόμενους παράγοντες, ενώ τα μικρά άσπρα βέλη τα δύο Β-ιστοειδικά σύμπλοκα που ανιχνεύονται στα Raji ανθρώπινα εκχυλίσματα.

Με βάση όλα τα αναλυμένα πρότυπα 'κρύου' ανταγωνισμού των GAS/ISRE *cis*-στοιχείων στις ενεργότητες σύνδεσης των ISFα (-ομόλογων στον Εβ υποκινητή) πυρηνικών συμπλεγμάτων και της εκλεκτικής αναγνώρισης από το GAF2 επαγόμενο σύμπλοκο των ISR (α, 1,2,3,L) περιοχών των Εα και Εβ υποκινητών (βλ. κεφάλαιο 8), φαίνεται να διαμορφώνεται ένα συντονισμένο διαγονιδιακό μεταγραφικό δίκτυο, το οποίον στηρίζεται σε κοινούς επαγόμενους από IFN πυρηνικούς παράγοντες, οι οποίοι μπορούν να ελέγχουν ένα μεγάλο φάσμα διαφορετικών υποκινητών όπως του Εα, GBP, ISG54, Εβ αντίστοιχα (εικόνα 19).



Εικόνα 19: Συνοπτική παρουσίαση της μοριακής τοπολογίας των επαγόμενων μεταγραφικών συμπλόκων ISFa και GAF2 στους αντίστοιχους Ea και GBP υποκινητές. Με τα σκιαγραμμένα σύμβολα προσδιορίζουμε τα λειτουργικά ομόλογα (σε σχέση με τις αντίστοιχες ενεργότητες σύνδεσης), πυρηνικά μεταγραφικά σύμπλοκα των τεσσάρων Ea, ISG54, GBP και Eβ επαγόμενων από IFN-γ υποκινητών, ενώ το ανοικτόχρωμα συμβολισμένο X *cis*-στοιχείο δεν φαίνεται να συμμετέχει στην επαγόμενη δραστηριότητα του Ea υποκινητή.

2.3. Πειράματα παρεμβολής σύνδεσης λόγω μεθυλίωσης του ISFa συμπλόκου εμφανίζουν ένα επικαλυπτόμενο πρότυπο προστασίας του ISRa στοιχείου με την συντηρημένη H περιοχή

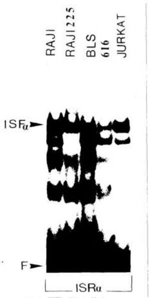
Η παρεμβολή σύνδεσης του ISFa επαγόμενου συμπλόκου μετά από την εκλεκτική μεθυλίωση του ISRa μονόκλωνα ραδιοσημασμένου ανιχνευτή, αποκάλυψε το ακριβές πρότυπο μοριακής προστασίας βάσεων γουανίνης (G), τόσο στην κωδική (sense) όσο και στην αντικωδική (antisense) αλυσίδα[210] του Ea υποκινητή (θλ. Υλικά και Μέθοδοι, κεφάλαιο 2.3.4.). Οι βάσεις γουανίνης που επέδειξαν την ισχυρότερη αλληλεπίδραση (προστασία) ήταν οι: -117G, -116G, -111G, -110G και -107G από τον κωδικό DNA κλώνο και -106G, -113G και -114G από τον αντικωδικό κλώνο με πιο εμφανή την γουανίνη της αντικωδικής αλυσίδας στην θέση -106.

Η περιοχή αναγνωριστικής σύνδεσης του ISFa επαγόμενου (IFN-γ: 3h) μεταγραφικού συμπλόκου φαίνεται να περιλαμβάνει τόσο την συντηρημένη επταμερή (H) αλληλουχία (-117, -111) όσο και το 3′ επακόλουθο 'TGCA' στοιχείο της εγγύς περιοχής του Ea υποκινητή, γεγονός που συνιστά και το βασικό κριτήριο για τον δομικό προσδιορισμό των 5′ και 3′ ορίων του ISRa *cis*-λειτουργικού στοιχείου (θλ. κεφάλαιο 1.2.4.). Το μοριακό πρότυπο προστασίας (παρεμπόδιση σύνδεσης λόγω μεθυλίωσης) βάσεων γουανίνης του ISFa συμπλόκου παρουσιάζεται στην εικόνα 20.

Εικόνα 20: Πειράματα παρεμβολής σύνδεσης λόγω μεθυλίωσης του IFN-γ (3h) επαγόμενου ISFα συμπλόκου. Με Fs και Fα συμβολίζουμε τα αδέσμευτα (free) μόρια του ISRα μεθυλιωμένου ανιχνευτή, ενώ με Bs και Bα τους συνδεδεμένους (bound) με τα ISFα σύμπλοκα και επιλεγμένους πληθυσμούς του ISRα ραδιοσημασμένου ιχνηθέτη (-125, -104 bp). Το σύμβολο 's' προσδιορίζει την κωδική (sense) αλυσίδα, ενώ το 'α' την αντικωδική (antisense). Στο κάτω μέρος της εικόνας παρουσιάζεται η ISRα *cis*-περιοχή με το επικαλυπτόμενο H συντηρημένο στοιχείο, ενώ οι μαύρες 'τελείες' καθορίζουν το πρότυπο μοριακής προστασίας βάσεων γουανίνης του ISFα συμπλόκου και από τις δύο αλυσίδες.

2.4. Ιστοειδικό πρότυπο σύνδεσης του ISFα συμπλόκου

Πειράματα μεταβολής της κινητικότητας λόγω αλληλεπίδρασης του ραδιοσημασμένου δίκλωνου ISRα ιχνηθέτη με πυρηνικά εκχυλίσματα πλήθους κυτταρικών σειρών, αποκάλυψαν την ύπαρξη του ISFα μεταγραφικού συμπλόκου σε όλους τους φαινότυπους που αναλύθηκαν, υποστηρίζοντας και ενισχύοντας την άποψη, ότι τόσο η Jurkat κυτταρική σειρά - η οποία δεν εκφράζει μεμβρανικά τάξης II αντιγόνα -, όσο και οι τρεις ανοσοανεπαρκείς πληθυσμοί RJ225, BLS και 6.1.6., οι οποίοι στερούνται τάξης II+ φαινοτύπου (βλ. Εισαγωγή, κεφάλαιο 1.3.2.) θα πρέπει να παρουσιάζουν μια δομική ή λειτουργική μοριακή ανεπάρκεια (molecular defect) στους μηχανισμούς μεταγραφικής ενεργοποίησης των τάξης II υποκινητών, διαφορετική από κάποια πιθανή ίσως δομική αλλοίωση (truncation) ή ιστοειδική λειτουργική καταστολή σύνδεσης του ISFα συμπλόκου στην αναγνωριστική του ISRα αλληλουχία (εικόνα 21). Η πιθανότητα ύπαρξης διακριτών μοριακών ισομορφών του ISFα συμπλόκου, με ιστοειδικά τροποποιημένες ικανότητες μεταγραφικής ενεργοποίησης (transcriptional activation), συνιστά έναν εναλλακτικό μηχανισμό που δεν μπορεί να αποκλεισθεί τουλάχιστον όσον αφορά τις κυτταρικές σειρές Jurkat.



Εικόνα 21: Πειράματα μεταβολής κινητικότητας πλήθους πυρηνικών εκχυλισμάτων με δίκλωνο ανιχνευτή το ISRα *cis*-στοιχείο. Τα Raji συνιστούν Β-κύτταρα ανθρώπου II+, τα Jurkat Τ-κύτταρα αρνητικού τάξης II φαινότυπου, ενώ τα RJ225, BLS και 6.1.6. ανοσοανεπαρκείς σειρές που αδυνατούν να εκφράσουν MHC τάξης II αντιγόνα στην μεμβράνη (βλ. Εισαγωγή, κεφάλαιο 1.3.2.). Η ύπαρξη του ISFα συμπλόκου (μαύρο βέλος) είναι εμφανής σ' όλους τους κυτταρικούς φαινότυπους.

2.5. Μοριακή σύσταση του ISFα επαγόμενου συμπλόκου
Μια νέα τεχνική

Με σκοπό την διατήρηση του αναλυτικού προτύπου των ISFα-ISRα *in vitro* διαμοριακών αλληλεπιδράσεων - όπως ανιχνεύονται σε παρασκευαστικά EMSA πηκτώματα - και την αποφυγή χρήσης μοριακά ασταθών και οικονομικά δαπανηρών βρωμοϋποκατεστημένων ολιγονουκλεοτιδίων (δίκλωνων περιοχών σύνδεσης: binding sites), αναπτύξαμε μια νέα τεχνική συνδυασμένης φωτοχημικής ομοιοπολικής σύνδεσης DNA-Πρωτεΐνης, η οποία επιτρέπει την ταυτοποίηση τόσο του αριθμού των πρωτεϊνικών παραγόντων που εμπεριέχονται σ' ένα υπερμοριακό σύμπλοκο (ISFα) όσο και του μοριακού βάρους (MW) κάθε ευρισκόμενου μέλους εξ αυτών[40,210]. Τα πλεονεκτήματα της καινούργιας μεθόδου αποτιμώνται: α) στο χαμηλό κόστος αυτής, αφού όλα τα αντιδραστήρια (^{32}γ-dATP, κινάση, αλυσίδες θέσης σύνδεσης, κλπ.) περιλαμβάνονται στον συμβατικό εξοπλισμό ενός EMSA πειράματος και β) στην ικανότητά της να διατηρεί αναλλοίωτο το διακριτικό αναλυτικό πρότυπο (pattern) των *in vitro* αλληλεπιδράσεων DNA-Πρωτεΐνης (ISFα-ISRα).

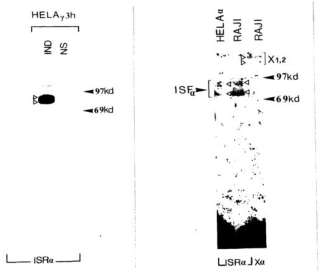
Τα διαδοχικά βήματα της μεθόδου παρουσιάζονται συνοπτικά ως ακολούθως (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, κεφάλαιο 2.3.5.):

1. Ακραία σήμανση της δίκλωνης θέσης σύνδεσης με T_4 κινάση (^{32}γ-dATP).
2. Παρασκευαστικό EMSA μη αποδιατακτικό πήκτωμα 4%.
3. Τοποθέτηση αυτού 15΄-20΄ πάνω σε λαμπτήρα UV (312 mm).
4. Αποκοπή της ραδιενεργού ζώνης.
5. Τοποθέτηση σε διάλυμα σύνδεσης (crosslinking buffer) το οποίον περιέχει:
   1x TBE
   3% φορμαλδεΰδη
6. Σύνδεση για 1,5h στους 4°C.
7. Είσοδος της ραδιενεργού ακρυλαμίδης σε μεμβράνη διαπίδυσης.
8. Ηλεκτροέκλουση για 1,5h στα 200 V.
9. Αναστροφή πολικότητας για 10΄.
10. Προσθήκη 10-20 μgr BSA και πενταπλάσιου όγκου (5x) κρύας ακετόνης.
11. Παραμονή στους -80°C για 12h.
12. Κατακρήμνιση για 30΄ στις 10.000 rpm.
13. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 1x διάλυμα φόρτωσης[58] + 100 mM DTT.
14. Αναλυτικός διαχωρισμός σε 8-10% SDS-PAGE πήκτωμα.
15. Στερέωση, ξήρανση, αυτοραδιογραφία.

Η μοριακή σύσταση του ISFα συμπλόκου, που ταυτοποιήθηκε σε πυρηνικά εκχυλίσματα προερχόμενα από HeLa κύτταρα επωασμένα με IFN-γ για 3h, κατέδειξε την ύπαρξη δύο πρωτεϊνικών παραγόντων μοριακής κινητικότητας ανάμεσα στα 60/80 kd - υπολογίζεται ένα μέσο μοριακό μέγεθος της τάξης των 75 kd - και σχετικής διαφοράς μεταξύ τους μικρότερη από 5 kd. Η κανονικοποίηση του μοριακού βάρους γίνεται μετά από αφαίρεση της 'μάζας' του δίκλωνου ανιχνευτή, ο οποίος υπολογίζεται γύρω στα 10-15 kd[28,40,94]. Η ειδικότητα της διαμοριακής σύνδεσης (crosslinking) προσδιορίσθηκε από την μη ειδική αλληλεπίδραση (NS) ενός συμπλόκου χαμηλής μοριακής κινητικότητας στις EMSA παρασκευαστικές δοκιμές, το οποίον δεν εμφάνισε κανένα 'crosslinking' πρότυπο (εικόνα 22).

Η ανάλυση της μοριακής σύστασης των Raji και HeLa, IFN-α 3h πυρηνικών εκχυλισμάτων κατέδειξε ένα εντυπωσιακά συγκρίσιμο πρότυπο διαμοριακής σύνδεσης μ' αυτό των HeLa, IFN-γ 3h παρασκευών (δύο πρωτεϊνικά μόρια κινητικότητας μεταξύ 60-80 kd), ενώ η υψηλή κινητικότητα (110-130 kd) των X-συνδεόμενων πρωτεϊνών[60] συνιστά ένα ακόμα θετικό στοιχείο της ειδικότητας και της αξιοπιστίας της νέας μεθόδου.

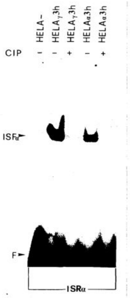
Η παράθεση των πειραμάτων μοριακής σύστασης του ISFα συμπλόκου φαίνεται στην εικόνα 22.



Εικόνα 22: Πειράματα φωτοχημικής ομοιοπολικής σύνδεσης των ISFα συμπλόκων με τις ISRα ραδιοσημασμένες *cis*-περιοχές σύνδεσης, τόσο σε HeLa, IFN-γ 3h πυρηνικά εκχυλίσματα (δύο άσπρα βέλη στο αριστερό τμήμα της εικόνας), όσο και σε Raji και HeLa, IFN-α 3h παρασκευές (δύο ζεύγη άσπρων βελών στο δεξί τμήμα της εικόνας). Η Xα περιοχή του Eα υποκινητή χρησιμοποιήθηκε σαν μάρτυρας ειδικότητας της διαμοριακής αλληλεπίδρασης (δύο άσπρα βέλη: $X_{1,2}$ υψηλής μοριακής κινητικότητας). Με τον όρο "IND" επισημαίνουμε το επαγόμενο σύμπλοκο, ενώ με τον 'NS' την μη ειδική αλληλεπίδραση (βλ. Γλωσσάριο).

2.6. *In vitro* αποφωσφορυλίωση του ISFα συμπλόκου. Επαγωγή και μετά την δράση της IFN-α

In vitro προεπώαση πυρηνικών εκχυλισμάτων HeLa κυττάρων καλλιεργημένων παρουσία IFN-γ ή IFN-α για 3h, με χαμηλές συγκεντρώσεις (1,7 u/μl) CIP φωσφατάσης (Calf Intestine Phosphatase: Bo.M.) για χρόνο 30΄ στους 30°C[154,166], κατήργησε πλήρως την ικανότητα των ISFα μεταγραφικών συμπλόκων να αλληλεπιδρούν με την ακραία ραδιοσημασμένη ISRα *cis*-ρυθμιστική περιοχή (εικόνα 23).



Εικόνα 23: Πειράματα *in vitro* αποφωσφορυλίωσης των ISFα επαγόμενων συμπλεγμάτων τόσο από IFN-α, όσο και από IFN-γ, μέσω προεπώασης των αντίστοιχων πυρηνικών εκχυλισμάτων με χαμηλές συγκεντρώσεις CIP φωσφατάσης. Η ταυτόσημη μοριακή κινητικότητα των δύο ISFα συμπλεγμάτων (IFN-α και IFN-γ) είναι εμφανής.

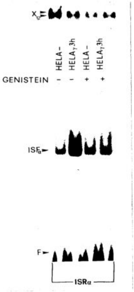
Η εντυπωσιακή *in vitro* κατάργηση (μέσω της CIP) της ενεργότητας σύνδεσης του ISFα επαγόμενου (τόσο από IFN-α, όσο και από IFN-γ) συμπλόκου στην ISRα *cis*-περιοχή, αποκαλύπτει την λειτουργική εξάρτηση της ειδικότητας και της συγγένειας σύνδεσης των ISFα μεταγραφικών παραγόντων από τον βαθμό φωσφορυλίωσης αυτών· η διαφορική φωσφορυλίωση του ISFα συμπλόκου απαιτείται για την υψηλή ενεργότητα σύνδεσης αυτού στην ISRα αναγνωριστική θέση σύνδεσης.

Σαν μάρτυρες ελέγχου (controls) της ειδικότητας του βαθμού αποφωσφορυλίωσης παραγόντων μέσω της CIP ενεργότητας, χρησιμοποιήθηκαν πυρηνικά εκχυλίσματα υψηλής ενεργότητας σύνδεσης στο NFκB σύμπλοκο[1,46,80] (HL60 λευχαιμικές σειρές επωασμένες για 48h με TNF-α[227]), τα οποία επωάσθηκαν για 1h με διαφορετικές συγκεντρώσεις CIP φωσφατάσης (1,7 u/μl μέχρι 51 u/μl). Καμμία από αυτές τις παρασκευές δεν παρουσίασε πτώση της ενεργότητας σύνδεσης, αφού ως γνωστόν τα p50-p65 (NFκB) μεταγραφικά σύμπλοκα δεν απαιτούν φωσφορυλίωση για την αλληλεπίδρασή τους με τις *cis*-αναγνωριστικές τους αλληλουχίες[80] (μη εμφανιζόμενα δεδομένα).

2.7. *In vitro* αναστολή της ενεργότητας σύνδεσης των ISFα μεταγραφικών παραγόντων με την χρήση ενός αναστολέα κινασών τυροσίνης, της Genistein

Παρασκευές πυρηνικών εκχυλισμάτων από HeLa κυτταρικές σειρές επωασμένες με IFN-γ για 3h, παρουσία χαμηλών - μη τοξικών συγκεντρώσεων (30 μgr/ml) ενός αναστολέα κινασών τυροσίνης (Genistein)[33,116,119,166] και επακόλουθη προσθήκη ακραία ραδιοσημασμένου δίκλωνου ανιχνευτή ISRα, οδήγησε σε πλήρη καταστολή της επαγόμενης ενεργότητας σύνδεσης των ISFα συμπλόκων, μέσω της λειτουργικής αναστολής (inhibition) της ενζυμικής δραστικότητας των ενδογενών κινασών τυροσίνης. Η ειδικότητα της *in vivo* κατάργησης της ενεργότητας σύνδεσης του ISFα (IFN-γ 3h) επαγόμενου συμπλόκου ελέγχθηκε με EMSA πειράματα του X *cis*-συντηρημένου στοιχείου του Eα υποκινητή (XEα), το οποίον παρουσίασε ένα απαράλλακτο πρότυπο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων ($X_{1,2}$) σε όλες τις παρασκευές πυρηνικών εκχυλισμάτων που αναλύθηκαν (εικόνα 24).

Η εξαφάνιση του ισχυρά επαγόμενου ISFα συμπλόκου από την *in vivo* δράση της Genistein (βλ. Γλωσσάριο), υποδηλώνει - συνεργατικά και με τα συμπεράσματα του κεφαλαίου 2.6. - ότι η ISFα ενεργότητα σύνδεσης εξαρτάται (ά-έμμεσα) από την επαγόμενη ενζυμική δραστηριότητα ενδοκυτταρικών κινασών τυροσίνης, εκ των οποίων μερικά πιθανά μοριακά υποστρώματα είναι και οι 'διμερείς' (βλ. κεφάλαιο 2.5.) ISFα μεταγραφικοί παράγοντες (βλ. Συμπεράσματα κεφαλαίου 2.8.).



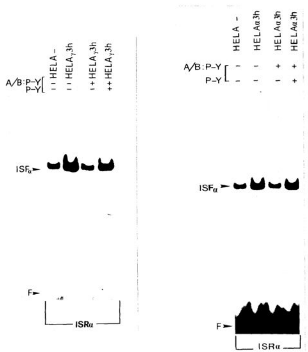
Εικόνα 24: Πειράματα αναστολής της ενεργότητας σύνδεσης του ISFα επαγόμενου από IFN-γ 3h (100 u/ml) συμπλόκου μέσω της δράσης ενός αναστολέα κινασών τυροσίνης (Genistein: 30 μgr/ml). Οι $X_{1,2}$ πυρηνικές πρωτεΐνες του ΧΕα *cis*-στοιχείου (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, κεφάλαιο 3.2.1.), φαίνονται αναλλοίωτες από την δράση τόσο της IFN-γ όσο και της Genstein.

2.8. Κατάργηση της ενεργότητας σύνδεσης του ISFα επαγόμενου συμπλόκου με την χρήση πολυκλωνικού αντισώματος φωσφοτυροσίνης

Με σκοπό την ταυτοποίηση της παρουσίας αμινοξικών καταλοίπων φωσφοτυροσίνης (P-Y: βλ. Γλωσσάριο) στα ISFα επαγόμενα μεταγραφικά σύμπλοκα, πυρηνικά εκχυλίσματα HeLa κυττάρων επεξεργασμένων με IFN-γ ή IFN-α για 3h, προεπωάσθηκαν με 1 μgr πολυκλωνικού αντισώματος φωσφοτυροσίνης (A/B: P-Y, UBI) για 60΄ στους 30°C[119,149], ενώ μετά την συνπροσθήκη του ISRα ραδιοσημασμένου ανιχνευτή η επώαση συνεχίσθηκε για 30΄ στους 4°C.

Η πλήρης κατάργηση της επαγόμενης ενεργότητας σύνδεσης του ISFα συμπλόκου τόσο στην περίπτωση της IFN-γ όσο και σε αυτή της IFN-α καταδεικνύει την ύπαρξη φωσφορυλιωμένων καταλοίπων τυροσίνης - χωρίς να αποκλείεται η παρουσία καταλοίπων φωσφοσερίνης ή φωσφοθρεονίνης - επιβεβαιώνοντας τα συμπεράσματα των EMSA πειραμάτων αναστολής σύνδεσης με την χρήση της Genistein (βλ. κεφάλαιο 2.7.). Η ειδικότητα της αναστολής ελέγχθηκε με την ταυτόχρονη προσθήκη 'κρύας' φωσφοτυροσίνης (μοριακά ασταθής σε χαμηλές οξύτητες) συγκεντρώσεων 0,5-1 mM, η οποία ανέστρεψε τον αδρανοποιημένο από το αντίσωμα ISFα επαγόμενο φαινότυπο, τιτλοδοτώντας τον πολυκλωνικό IgG (1 μgr/μl) αντιορό.

Η *in vitro* καταστολή της ενεργότητας σύνδεσης του ISFα επαγόμενου (IFN-γ και IFN-α) πυρηνικού συμπλόκου από την δράση του πολυκλωνικού αντισώματος φωσφοτυροσίνης φαίνεται στην εικόνα 25.



Εικόνα 25: Πειράματα *in vitro* αναστολής της ISFα επαγόμενης (IFN-α: δεξιό τμήμα και IFN-γ: αριστερό τμήμα) ενεργότητας σύνδεσης με την χρήση πολυκλωνικού αντισώματος φωσφοτυροσίνης (A/B: P-Y). Εμφανής είναι η επαναφορά του ISFα επαγόμενου φαινότυπου μετά την συνπροσθήκη 1 mM 'κρύας' φωσφοτυροσίνης (P-Y).

2.9. Συζήτηση

Η ανάλυση των μοριακών μηχανισμών μετάδοσης του σήματος της IFN-γ από τον διαμεμβρανικό υποδοχέα στον κυτταρικό πυρήνα (Signal transduction pathway) κατέδειξε την ύπαρξη ενός ομοδιμερούς μεταγραφικού συμπλόκου STAT1 (p91/84: Signal Transducer and Activator of Transcription)[81,141,171], το οποίον στην φωσφορυλιωμένη του μορφή εμφανίζει υψηλή συγγένεια σύνδεσης με τις GAS-ομόλογες αλληλουχίες των IFN-γ επαγόμενων γονιδιακών υποκινητών[132,141] (βλ. Εισαγωγή, κεφάλαια 2.2. και 2.5.).

Η ανάλυση της πρωτοδιάταξης του Εα υποκινητη δεν αποκάλυψε κανένα GAS *cis*-ρυθμιστικό στοιχείο[41], ενώ οι 5΄ σειριακές ελλείψεις (βλ. κεφάλαιο 1) απέδειξαν την συνεργατική φύση όλων των συστατικών περιοχών (X, Y και ISRα) αυτού, αφού καμμία εξ' αυτών δεν μπορεί να προσφέρει, ως ικανή και αναγκαία ρυθμιστική αλληλουχία, ετερόλογη υψηλή μεταγραφική ενεργοποίηση.

Αντίθετα, τα GAS και ISRE *cis*-λειτουργικά στοιχεία θεωρούνται τόσο ικανά όσο και αναγκαία για την ειδική (IFN-γ και IFN-α) αλλά και ισχυρή μεταγραφική ενεργότητα που προσφέρουν στον αντίστοιχο γονιδιακό υποκινητή[100,111,114,162], γεγονός που συνιστά και την βασικότερη λειτουργική διαφορά των ISRα και GAS *cis*-ρυθμιστικών περιοχών.

Η διαφορική μεταγραφική συμπεριφορά των ISRα και GAS *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων βασίζεται στην τροποποιημένη δομική σύσταση της ISRα περιοχής και μάλιστα στην αλλοίωση της χαλαρής ακραίας ανάστροφης επανάληψης TT-X_5-AA, μέσω της αντικατάστασης του 'πρώτου' A από την κυτοσίνη -111 (-111 C) της αντικωδικής αλυσίδας της ISRα *cis*-περιοχής:

(cons)	GAS	:	5΄-TTNCNNNAA-3΄
(Eα)	ISRα	:	5΄-TTNCNNNCA-3΄ (αντικωδική αλυσίδα)
			*

Η νουκλεοτιδική σύνθεση του ISRα στοιχείου και η λειτουργική-δομική του διάκριση από την GAS περιοχή καθορίζει και την φύση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων των ISFα πυρηνικών παραγόντων, οι οποίοι φαίνεται να συνιστούν μία διακριτή υπο-οικογένεια μεταγραφικών μορίων από αυτή της STAT1. Οι κυριότερες διαφορές των ISFα και STAT1 συμπλόκων φαίνονται ως ακολούθως:

	ISFα	STAT1
α) Αλληλουχία αναγνώρισης:	TTNCNNNCA	TTNCNNNAA[204]
β) Μοριακό βάρος:	~75 kd	91 kd[81,132,137,138]
γ) Κινητική επαγωγής:	Διατηρείται και μετά από 24h	Μειώνεται σημαντικά μετά την πάροδο 3h[116,185]

Η γρήγορη πτώση της ενεργότητας σύνδεσης και εκλεκτικής φωσφορυλίωσης της STAT1 πρωτεΐνης είναι εμφανής στην GAS-ομόλογη αλληλουχία του FcγR υποκινητή[116,132] (βλ. Εισαγωγή, κεφάλαιο 2.2.), ενώ το αυθεντικό GAS *cis*-στοιχείο του GBP υποκινητή εμφανίζει διαφορετικό πρότυπο κινητικής της επαγωγής των GAF παραγόντων ανάλογα με τον φαινότυπο του κυτταρικού τύπου (ινοβλάστες ή HeLa) που χρησιμοποιείται, πιθανώς λόγω εναλλακτικής χρήσης όλων των GAF 1,2,3 μοριακών ισομορφών[109,119].

Προσπάθειες *in vitro* κατάργησης (ή δημιουργίας υπερσυμπλόκων: supershift) του ISFα επαγόμενου συμπλέγματος με την χρήση πολυκλωνικού αντισώματος STAT1 (SANTA CRUZ) κατέστησαν άκαρπες, επιβεβαιώνοντας τα συμπεράσματα της παρούσας μελέτης, ότι τα ISFα και STAT1 μεταγραφικά σύμπλοκα συνιστούν δύο διαφορετικές υπο-οικογένειες παραγόντων τόσο στην δομική τους οργάνωση όσο και στην λειτουργική τους συμπεριφορά.

Παρ' όλες τις προαναφερόμενες διαφορές, θεωρούμε ότι οι ISF παράγοντες ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των STAT πρωτεϊνών (βλ. Εισαγωγή, κεφάλαιο 2.5.), αφού εμφανίζουν τις ακόλουθες ιδιότητες-ομοιότητες με τους STAT1 α,β[81,141,171,204] επαγόμενους μοριακούς μεταγραφικούς διαμεσολαβητές:

ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ ISF ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ

ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΠΑΓΩΓΗΣ	ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ	ΑΝΑΣΤΟΛΗ	ΜΟΡΙΑΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ	P-Y: ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ
Γρήγορη, μικρότερη από 30΄	IFN-α/β, IFN-γ	Αναστολέας Κινασών Τυροσίνης Genistein	'Διμερές'	Θετική

Ο ισχυρός και εκλεκτικός 'κρύος' ανταγωνισμός της ISRα αλληλουχίας (όπως και των ISR1,2) στην ενεργότητα σύνδεσης του GAF2 πυρηνικού συμπλόκου της GASL περιοχής του GBP υποκινητή ενισχύει την λειτουργική συσχέτιση των ISFα-GAF2 παραγόντων, χωρίς όμως να τους αποδίδει πρόσθετες μοριακές ιδιότητες αφού η ταύτιση των GAF/STAT δεν έχει ακόμα διαλευκανθεί.

Προσθετικά, ο ανάστροφος υψηλός ανταγωνισμός των ISFa ενεργοτήτων σύνδεσης από τις GASL/ISRE αλληλουχίες (βλ. κεφάλαιο 2.2.) συνιστά ίσως το ουσιαστικότερο λειτουργικό κριτήριο για την μοριακή κατάταξη των ISFa πρωτεϊνών στην μεγάλη υπεροικογένεια των STAT παραγόντων[143,171,220].

Πειράματα *in vivo* υπερέκφρασης της STAT1a (p91) πρωτεΐνης παρουσία της Ea (-140, +14) CAT ανασυνδυασμένης κατασκευής αναφοράς, απέτυχαν να επιδείξουν μεταγραφική ενεργοποίηση, επιβεβαιώνοντας έτσι την προθεωρούμενη διαφορική ταξινόμηση των ISF και STAT παραγόντων και ενισχύοντας την άποψη της έμμεσης συμμετοχής του STAT1 παράγοντα στην επαγόμενη από IFN-γ μεταγραφική δραστηριότητα τόσο του Ea υποκινητή όσο και του ανθρώπινου ομόλογου DRa[77].

Αντίθετα, η ανασυνδυασμένη κατασκευή μάρτυρας GASL-CAT παρουσία του ευκαρυωτικού φορέα έκφρασης pRC/CMV-p91 (Not I/Apa I) κατέδειξε σε πειράματα παροδικής συνδιαμόλυνσης HeLa κυττάρων μια αύξηση της CAT ενεργότητας ~4x φορές (μη εμφανιζόμενα αποτελέσματα).

Η κατάργηση του επαγόμενου από IFN-γ ISFa πυρηνικού συμπλόκου από την δράση του αναστολέα της Genistein, σε συνδυασμό με τον μοριακό φαινότυπο της γ1 μεταλλαγμένης κυτταρικής σειράς[107,171,173] (βλ. Εισαγωγή, κεφάλαιο 2.3.), όπου η επαγόμενη από IFN-γ μεταγραφική ενεργοποίηση του DRa γονιδίου εμφανίζεται ανεπαρκής λόγω του μοριακού δομικού ακρωτηριασμού της JAK2 πρωτεϊνικής κινάσης τυροσίνης[141,173], μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι μία από τις υπεύθυνες κινάσες τυροσίνης για την ενεργοποίηση των ISFa συμπλεγμάτων ανήκει στην νέα JAK οικογένεια και πιθανώς ταυτίζεται με την JAK2 (βλ. Συζήτηση κεφαλαίου 6), όπως ακριβώς έχει αναλυθεί και για την μετάδοση του μοριακού μηνύματος της IFN μέσω των STAT παραγόντων[141,170,171].

Η ύπαρξη ενός εναλλακτικού μοριακού μονοπατιού μετάδοσης του σήματος της IFN-γ, όπως αυτού που αναλύθηκε στην περίπτωση των RJ225 ανοσοανεπαρκών κυτταρικών σειρών (βλ. Εισαγωγή, κεφάλαιο 1.3.2.)[76,77,84], δεν συνιστά ένα ανταγωνιστικό μοντέλο ρύθμισης με αυτό των ISFa επαγόμενων συμπλόκων, αλλά πιθανότατα μια ισχυρή ασφαλιστική λειτουργική δικλείδα πολλαπλού ελέγχου του Ea υποκινητή, η οποία διαμορφώνει ένα πολύπλοκο οργανωμένο δίκτυο πολλαπλών θημάτων επαγόμενης ρύθμισης[16], όπως αυτό της σύγχρονης ή διαδοχικής ενεργοποίησης τόσο των ISFa όσο και των CIITA[76,77,84] παραγόντων.

Η εντυπωσιακή εμφάνιση IFN-γ επαγόμενων μεταγραφικών συμπλόκων στους τάξης II υποκινητές και η συσχέτιση των λειτουργικών τους ιδιοτήτων με τους STAT παράγοντες αποτελεί την πρώτη προσέγγιση για την λεπτομερή μοριακή ανάλυση των μηχανισμών ιστοειδικής και επαγόμενης έκφρασης των τάξης II γονιδίων.

Επαγόμενα σύμπλοκα παρόμοιας συμπεριφοράς έχουν ανιχνευθεί και στην ενδιάμεση περιοχή των W και X *cis*-στοιχείων του υποκινητή του Iγ γονιδίου[53], καθώς και στην περιοχή των X-Y *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων του Eβ υποκινητή[42,79,207].

Η δομική μάλιστα ομολογία του νέου στοιχείου, της ενδιάμεσης W-X περιοχής, του Iγ υποκινητή με την ευρύτερη ISRα περιοχή, καθώς και η ενεργοποίηση του επαγόμενου συμπλόκου αυτού από προϋπάρχοντες μεταγραφικούς παράγοντες, χωρίς την απαίτηση *de novo* μεταγραφής, πιθανολογεί την συμμετοχή ISF-ομόλογων πρωτεϊνών στο μονοπάτι μεταγραφικής επαγωγής του Iγ υποκινητή. Η ύπαρξη του X-Y επαγόμενου συμπλόκου σε κυτταρικές σειρές μακροφάγων ποντικού[42] δεν φαίνεται να ασκεί καθοριστικό ρόλο στην μεταγραφική συμπεριφορά του Eβ υποκινητή, αφού η minimum X-Y περιοχή δεν αρκεί για την B-ιστοειδική και IFN-γ ρυθμιζόμενη μεταγραφική δραστηριότητα αυτού[79].

Η ύπαρξη IL-4 επαγόμενων συμπλεγμάτων στις BRE απόμακρες ρυθμιστικές περιοχές του Aα υποκινητή[56,59], καθώς και η ταυτοποίηση παρόμοιων B-αναπτυξιακά ελεγχόμενων μεταγραφικών συμπλόκων στην εγγύς περιοχή του Eβ υποκινητή[43], σε συνδυασμό και με την δομική ομολογία αυτών των *cis*-αναγνωριστικών θέσεων σύνδεσης με την ISRα περιοχή, ενισχύει το μοντέλο ότι τόσο οι ISF όσο και οι IL-4 επαγόμενοι παράγοντες ανήκουν στην ευρύτερη υπεροικογένεια των STAT πρωτεϊνών, γεγονός που επιβεβαιώθηκε πολύ πρόσφατα από την μοριακή κλωνοποίηση της IL-4 STAT (STAT6)[220].

Η ανάλυση της πρωτεϊνικής σύστασης του W *cis*-στοιχείου της απόμακρης ρυθμιστικής περιοχής του Eα υποκινητή (-1322, -1180 bp)[1] αποκάλυψε την ύπαρξη B-ιστοειδικών 'διμερών' συμπλόκων των οποίων η κινητικότητα κυμαινόνταν ανάμεσα στα 65-80 kd και των οποίων η αναγνωριστική αλληλουχία σύνδεσης περιείχε και 'προστάτευε' το TGCA μοτίβο και μάλιστα την γουανίνη της αντικωδικής αλυσίδας[5,40]. Με βάση αυτή την ανάλυση προτείνουμε ότι οι ISF παράγοντες μπορούν να ελέγχουν και την B-ιστοειδική συμπεριφορά του Eα απόμακρου (distal) υποκινητή[1,47], γεγονός που συμφωνεί και με την υψηλή ενεργότητα σύνδεσης των ISFα σε Raji και A_{20} πυρηνικά εκχυλίσματα (με βάση την μέχρι τώρα *cis*-και *trans*-ανάλυση η B-ιστοειδικότητα δεν μπορεί να διακριθεί μηχανιστικά από την IFN-γ επαγωγιμότητα).

Σε σχέση με ότι αφορά την μοριακή σύσταση του ISFα επαγόμενου συμπλόκου και την ταυτοποίησή του ως 'διμερές', επισημαίνεται ότι η διάκριση της περίπτωσης ύπαρξης δύο πρωτεϊνικών μορίων που συνδέονται στην ίδια ρυθμιστική *cis*-αλληλουχία από αυτή της παρουσίας δύο υποπληθυσμών δίκλωνων ISRα ανιχνευτών που αλληλεπιδρούν με διαφορετικούς όμως μεταγραφικούς παράγοντες είναι δύσκολο να προσδιορισθεί.

Η ικανότητα των ISFα συμπλόκων να αναγνωρίζουν τις ISRL αλληλουχίες του Eα υποκινητή, οι οποίες συνιστούν μονομερείς ISRE-ομόλογες επαναλήψεις, αποδίδεται στην πλούσια σε πουρίνες (Pu) 5΄ περιοχή της ISRα δίκλωνης συνθετικής αλληλουχίας (-122 έως -115 bp), η οποία έχει πλήρως μελετηθεί και αναλυθεί από την Δρ. Μ. Γρηγορίου κατά την εκπόνηση της Διδακτορικής της Διατριβής[207].

Το συνολικό μηχανιστικό μοντέλο B-ιστοειδικής και IFN-επαγόμενης ρύθμισης του Eα υποκινητή διαμορφώνεται στην συνεργατική διαμοριακή φυσική αλληλεπίδραση των mXBP-mRFX πρωτεϊνών με τους NF-Y μεταγραφικούς παράγοντες[72], καθώς και στην πιθανή λειτουργική συνεργασία (α-έμμεση) των ISFα με τις X-, Y- συνδεόμενες πρωτεΐνες[22,31,47], μέσω ενός στερεοειδικού μοριακού λυγίσματος (bending)[36] της εγγύς περιοχής του Eα υποκινητή, όπως έχει εντυπωσιακά δειχθεί και για τον υποκινητή του γονιδίου της IFN-β[80].

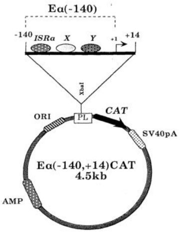
3. ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗΣ ΑΠΟ IFN-γ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ Eα ΚΑΙ GBP ΥΠΟΚΙΝΗΤΩΝ

Η συγκριτική ανάλυση της λειτουργικής μεταγραφικής συμπεριφοράς των ISRα και GAS *cis*-στοιχείων επιτεύχθηκε δια μέσου κινητικών μελετών της επαγόμενης από IFN-γ CAT ενεργότητας των αντίστοιχων Eα (-140, +14) CAT και GBP (GASL, -40IFNβ) CAT ανασυνδυασμένων κατασκευών. Η περιγραφή της δομικής οργάνωσης των δύο φορέων, καθώς και τα αποτελέσματα των πειραμάτων παροδικής διαμόλυνσης HeLa κυττάρων δίδονται ως ακολούθως:

3.1. Πλασμιδιακές κατασκευές

3.1.1. *Ο ανασυνδυασμένος φορέας Eα (-140, +14) CAT*

Χρησιμοποιήθηκε η 5΄ έλλειψη -140 CAT του Eα υποκινητή, η οποία εμφανίζεται τόσο αναγκαία όσο και ικανή για την Β-ιστοειδική και IFN-γ επαγόμενη μεταγραφική του ενεργότητα (βλ. κεφάλαια 1.1.1. και 1.2.1.). Περιληπτικά αναφέρουμε ότι το Rsa I-Pvu I (-353, +14) τμήμα περιοριστικής υδρόλυσης του Eα υποκινητή κλωνοποιείται στην Xba I θέση του πολυσυνδέτη (PL) της pLSVoCAT κατασκευής[41] (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, κεφάλαιο 3.1.1.), ενώ οι 5΄ ελλείψεις αυτού με την βοήθεια χρήσης χαμηλών συγκεντρώσεων Exo III νουκλεάσης καταλήγουν στην δημιουργία του ανασυνδυασμένου φορέα Eα (-140, +14) CAT, ο οποίος φέρει μπροστά από το γονίδιο αναφοράς CAT τις 'minimum' λειτουργικές ρυθμιστικές αλληλουχίες (ISRα, X και Y) της εγγύς περιοχής του Eα υποκινητή (εικόνα 26).

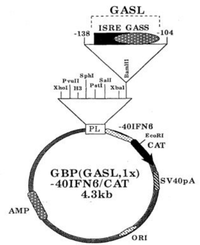


Εικόνα 26: Περιγραφή της μοριακής οργάνωσης της Eα (-140, +14) CAT ανασυνδυασμένης κατασκευής. Οι ISRα, X και Y *cis*-ρυθμιστικές αλληλουχίες ελέγχουν την μεταγραφική ενεργότητα του CAT γονιδίου αναφοράς (μαύρο βέλος).

3.1.2. *Ο ανασυνδυασμένος φορέας GBP (GASL, -40IFNθ) CAT*

Για την δημιουργία της ανασυνδυασμένης κατασκευής GBP (GASL, -40IFNθ) CAT χρησιμοποιήθηκε ο φορέας (-40IFNθ)CAT - ή αλλιώς ονομαζόμενος (872)CAT -, ο οποίος, προερχόμενος από την πατρική κατασκευή (parental vector) pSP73 (PROMEGA), φέρει τον χωρίς μεταγραφική ενεργότητα (promoterless) υποκινητή του γονιδίου της IFN-θ (-40:IFNθ) - ο οποίος περιέχει ουσιαστικά μόνο την 'TATA' *cis*-συντηρημένη αλληλουχία[82] - μπροστά από το CAT γονίδιο αναφοράς.

Η ελάχιστη μεταγραφική δραστηριότητα του (-40IFNθ)CAT φορέα μπορεί να αυξηθεί δραματικά (βλ. κεφάλαιο 3.2.) από την κλωνοποίηση στην Bam HI περιοριστική θέση του πολυσυνδέτη (PL) αυτού του GASL (-138, -104) *cis*-ρυθμιστικού στοιχείου του GBP υποκινητή (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, κεφάλαιο 3.2.3.). Η δομική οργάνωση της GBP (GASL, -40IFNθ) CAT κατασκευής φαίνεται στην εικόνα 27.



Εικόνα 27: Μοριακή περιγραφή της οργάνωσης της GBP (GASL, -40IFNβ) CAT κατασκευής. Οι ISRE και GASS συμβολισμοί προσδιορίζουν τα επιμέρους λειτουργικά συστατικά στοιχεία της GASL περιοχής, ενώ με τον όρο PL αναφερόμαστε στον πολυσυνδέτη (polylinker) κλωνοποίησης. Διακρίνονται τα τμήματα του 'minimum' υποκινητή της IFN-β (-40IFNβ) καθώς και το CAT γονίδιο αναφοράς (μαύρο βέλος προσανατολισμένης φοράς). Οι περιοριστικές πέψεις διάγνωσης των GASL-ανασυνδυασμένων κατασκευών πραγματοποιήθηκαν με διπλές υδρολύσεις EcoR I-Hind III και EcoR I-Xba I, ενώ η ταυτοποίηση των μονομερών αντιγράφων (single copy) επιτεύχθηκε και μέσω υδρόλυσης με BamH I.

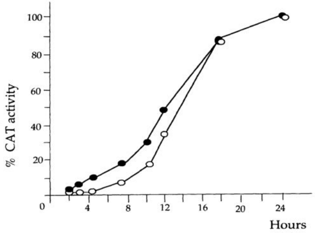
3.2. Πειράματα παροδικής διαμόλυνσης

Ολη η σειρά των πειραμάτων παροδικής διαμόλυνσης πραγματοποιήθηκε σε HeLa (ATCC) κυτταρικές σειρές με την μέθοδο της συγκατακρήμνισης υπερελικωμένων πλασμιδιακών κατασκευών παρουσία αλάτων Ca_3PO_4 (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, κεφάλαιο 2.4.).

Η αποδοτικότητα της διαμόλυνσης κάθε φορά ελέγχονταν με την συνπροσθήκη της pCMV$_β$-lacZ κατασκευής, ενώ η κανονικοποίηση των τελικών τιμών CAT-ενεργότητας προσδιορίζονταν από την εσωτερική διόρθωση με τις αντίστοιχες μετρήσεις της β-gal (γαλακτοσιδάσης) δραστηριότητας.

Η τελική τιμή της κάθε μέτρησης προέρχεται από τον μέσο όρο τουλάχιστον τριών πειραματικών επαναλήψεων, ενώ το σχετικό σφάλμα δεν ξεπερνά το 10%, γι' αυτό και δεν αναγράφεται σε καμμία από τις καμπύλες ή διαγράμματα της παρούσας μελέτης.

Η συγκριτική κινητική ανάλυση των Εα και GBP υποκινητών επιτεύχθηκε μέσω της διαμόλυνσης των αντίστοιχων Εα (-140, +14) CAT και GBP (GASL, -40IFNβ) CAT ανασυνδυασμένων κατασκευών, σε HeLa επιθηλιακές σειρές με διαδοχική προσθήκη IFN-γ [σε ανεξάρτητα κυτταρικά σύνολα (pools)] κάθε 2h και τελικό προσδιορισμό της CAT-ενεργότητας μετά την πάροδο 24h (εικόνα 28).



Εικόνα 28: CAT ενεργότητες των <u>Εα (-140, +14) CAT</u> [άσπροι κύκλοι] και <u>GBP (GASL, -40IFNβ) CAT</u> [μαύροι κύκλοι] ανασυνδυασμένων κατασκευών, μετρούμενες κάθε 2h από την στιγμή προσθήκης της IFN-γ, μέχρι την πάροδο 24h. Με τον όρο '% CAT activity' επισημαίνουμε την επί τοις εκατό ενζυμική CAT-ενεργότητα, ενώ με τον όρο 'hours' τις ώρες της παρουσίας της IFN-γ στην παροδικά διαμολυσμένη καλλιέργεια (βλ. Γλωσσάριο). Η τελική συγκέντρωση της IFN-γ στην καλλιέργεια ήταν 100 u/ml (GENZYME).

3.3. Συζήτηση

Τα πειράματα παροδικής διαμόλυνσης των Εα (-140, +14) CAT και GBP (GASL, -40IFNβ) CAT ανασυνδυσμένων κατασκευών σε HeLa κυτταρικές σειρές, αποκάλυψαν την <u>ομόλογη</u> μεταγραφική συμπεριφορά στο <u>χρονικό</u> πρότυπο επαγωγής από IFN-γ των αντίστοιχων -140 Εα και GASL (GBP) *cis*-ρυθμιστικών περιοχών.

Η -140 Εα 5΄ έλλειψη του Εα υποκινητή περιλαμβάνει τα ISRα, X και Y *cis*-λειτουργικά στοιχεία, τα οποία θεωρούνται τόσο αναγκαία όσο και ικανά (μόνο αν συνυπάρχουν και δρουν συνεργατικά) για την Β-ιστοειδική και IFN-γ επαγόμενη μεταγραφική ενεργοποίηση. Αφού η X *cis*-αλληλουχία δεν προσφέρει καμμία δραστηριότητα στον Εα υποκινητή, είναι εμφανές ότι το περιοριστικό - λειτουργικό μοριακό βήμα για την εκλεκτική ενεργοποίηση αυτού είναι η δραστηριοποίηση της ISRα *cis*-περιοχής, μέσω της υψηλής ενεργότητας σύνδεσης των αντίστοιχων ISFα πυρηνικών συμπλόκων (βλ. κεφάλαιο 2)[78].

Η παρούσα λοιπόν συγκριτική μελέτη αναλύει την σχετική λειτουργική συμπεριφορά - σε σχέση με τους μηχανισμούς επαγόμενης (IFN-γ) μεταγραφικής ενεργοποίησης - των ISRα και GASL *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων αντίστοιχα.

Η GBP (GASL, -40IFNβ) CAT ανασυνδυασμένη κατασκευή μιμείται λειτουργικά τον GBP υποκινητή - τουλάχιστον σε ότι αφορά την μεταγραφική του συμπεριφορά σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης -, αφού η παρουσία του GASL *cis*-λειτουργικού στοιχείου εμφανίζεται τόσο αναγκαία όσο και ικανή για την ρυθμιζόμενη μεταγραφική ενεργότητα του GBP υποκινητή[102,111,112,162].

Η υψηλή ευαισθησία των παροδικών CAT-δοκιμών επέτρεψε την αναταξινόμηση του Εα γονιδίου στην οικογένεια των γονιδίων 'ενδιάμεσης' (intermediate) μεταγραφικής απόκρισης, αφού τα πρώϊμα μοριακά γεγονότα επαγόμενης μεταγραφικής έναρξης ταυτοποιούνται μεταξύ 4h και 8h ύπαρξης IFN-γ στην κυτταρική καλλιέργεια.

Η διαφορά στον χρόνο ανίχνευσης του πρώτου μηνύματος mRNA του DRα γονιδίου, το οποίον ταυτοποιήθηκε από την ερευνητική ομάδα του R. Flavell[5,29] να εντοπίζεται μετά τις 8h δράσης της IFN-γ, αποδίδεται πιθανώς είτε στην διαφορική ευαισθησία των τεχνικών παροδικής διαμόλυνσης (η παρούσα μελέτη)[78] και προστασίας από RNAάση (RNAase protection)[29], είτε στην διαφορετική μεταγραφική συμπεριφορά των γονιδίων Εα και DRα στην δράση της IFN-γ.

Η υψηλή δομική σταθερότητα του μηνύματος της ακετυλοτρανσφεράσης της χλωραμφαινικόλης (CAT-mRNA stability) στις HeLa κυτταρικές σειρές επιτρέπει την γραμμική αντιστοιχία των επιπέδων συσσώρευσης των CAT-mRNAs με την συχνότητα έναρξης των γεγονότων μεταγραφικής ενεργοποίησης μετά από την επίδραση της IFN-γ.

Η ταχύτερη ενεργοποίηση (σε σχέση με τον Εα υποκινητή) του GBP-ομόλογου υποκινητή, που ορίζεται από την λειτουργική δραστηριότητα του GASL *cis*-ρυθμιστικού στοιχείου από 1h έως 12h (εικόνα 28), θα μπορούσε να αποδοθεί εναλλακτικά ή συνεργατικά στα ακόλουθα μοριακά γεγονότα: α) πιθανή συμμετοχή των GAF1 και GAF3 πυρηνικών συμπλεγμάτων[119] στην επαγόμενη μεταγραφική δραστηριότητα της GASL-CAT ανασυνδυασμένης κατασκευής. Η λειτουργική ισοδυναμία των Εα και GBP υποκινητών αποδίδεται στους ISFα και GAF2 παράγοντες αντίστοιχα, ενώ οι μικρές κινητικές διαφορές επαγωγής στην λειτουργία των GAF1 και GAF3 επαγόμενων συμπλόκων[119] (βλ. κεφάλαιο 2.2.). β) Η συνεργατική φύση του Εα υποκινητή απαιτεί πιθανή διαμοριακή αλληλεπίδραση των ISFα, X- και Y- συνδεόμενων πρωτεϊνών[72], η οποία σταθεροποιείται μέσω της παρουσίας ενός *de novo* συντιθέμενου μορίου[85] - όπως ίσως της CIITA πρωτεΐνης[76,77,84]. Η απαίτηση εκ νέου μεταγραφής, καθώς και η ύπαρξη τουλάχιστον δύο θημάτων DNA σύνδεσης - των ISFα και X - πυρηνικών πρωτεϊνών στις αντίστοιχες *cis*-αλληλουχίες αιτιολογεί την μικρή χρονική καθυστέρηση μεταγραφικής επαγωγής του Eα γονιδίου σε σχέση με το GBP.

Το μοντέλο πιθανής ύπαρξης ενός ενδιάμεσου μεσολαβητικού μηχανισμού στην μεταγραφική έναρξη του Eα υποκινητή ενισχύεται από την καταστολή της μεταγραφικής ενεργοποίησης του ομόλογου DRα γονιδίου από την παρουσία της κυκλοεξειμίδης (CHX: θλ. Εισαγωγή, κεφάλαιο 1.3.3.) σε HeLa κυτταρικές καλλιέργειες[5,16,29], φαινόμενο που καθορίζεται τόσο από την φυσιολογία της χρησιμοποιούμενης κυτταρικής σειράς όσο και από τον σχετικό χρόνο προσθήκης CHX και IFN-γ σε αυτήν[5,16]. Πιθανολογείται μάλιστα ότι η CHX δεν καταργεί τα πρώϊμα γεγονότα μεταγραφικής έναρξης αλλά τα όψιμα στάδια επιμήκυνσης της σύνθεσης των RNA αλυσίδων[16].

Η ομόλογη συμπεριφορά των Eα και GBP υποκινητών (εικόνα 28) επιθεβαιώνεται και από τα κινητικά χαρακτηριστικά επαγωγής των αντίστοιχων ενδογενών γονιδίων τα οποία εμφανίζουν τις ακόλουθες ομοιότητες: α) συνεχής αύξηση της επαγόμενης από IFN-γ συσσώρευσης των αντίστοιχων mRNAs (Eα και GBP), από χρόνο 30′ έως 24h σε HeLa S_3 κυτταρικές σειρές[9,29,109,112]. Η κινητική μεταγραφική συμπεριφορά του GBP γονιδίου σε FS2 ινοθλάστες εμφανίζεται διαφορετική[109]. θ) Καταστολή της μεταγραφικής ενεργότητας και των δύο υποκινητών από την παρουσία CHX σε HeLa, IFN-γ κυτταρικές σειρές[16,29,112], αντίθετα σε FS2 ινοθλάστες η δραστηριότητα του GBP υποκινητή εμφανίζεται ανεξάρτητη από την δράση της CHX[16,102,112]. γ) Εξάρτηση της IFN-γ επαγόμενης μεταγραφικής ενεργοποίησης - τόσο του Eα όσο και του GBP υποκινητή - από την δράση του αναστολέα της 2-αμινοπουρίνης (AP: aminopurin, θλ. Γλωσσάριο)[78,112] (η παρούσα μελέτη: μη εμφανιζόμενα αποτελέσματα). Η πιθανή δράση της αμινοπουρίνης στα υποθετικά ενδιάμεσα μόρια προσαρμογής (mediators ή adaptors) μεταγραφικής ενεργοποίησης παραμένει ακόμη αδιευκρίνιστη.

4. *IN VIVO* ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ Eα ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ. ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΤΟΥΣ GBP ΚΑΙ ISG54 ΥΠΟΚΙΝΗΤΕΣ

Η *in vivo* συγκριτική μελέτη της καταστολής της επαγόμενης από IFN-γ μεταγραφικής ενεργοποίησης των Eα, GBP και ISG54 υποκινητών, επιτεύχθηκε μέσω της εκλεκτικής προσθήκης διαφορετικών φαρμάκων (drugs) - αναστολέων (inhibitors) σε HeLa παροδικά διαμολυσμένες κυτταρικές καλλιέργειες με τις ανασυνδυασμένες κατασκευές Eα (-140, +14) CAT, GBP (GASL, -40IFNθ) CAT, ISG54 (ISRE, -40IFNθ) CAT και GBP (GASS, -40IFNθ) CAT αντίστοιχα, παρουσία IFN-γ για 24-48h στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης[78]. Η δομική οργάνωση των τεσσάρων φορέων, καθώς και τα αποτελέσματα των πειραμάτων παροδικής διαμόλυνσης HeLa κυττάρων φαίνονται ως ακολούθως:

4.1. Πλασμιδιακές κατασκευές

4.1.1. *Ο ανασυνδυασμένος φορέας Εα (-140, +14) CAT*

Τόσο ο τρόπος κατασκευής, όσο και η μοριακή περιγραφή του Εα (-140, +14) CAT φορέα του Εα γονιδιακού υποκινητή παρατίθεται στο κεφάλαιο 3.1.1. στην εικόνα 26.

4.1.2. *Ο ανασυνδυασμένος φορέας GBP (GASL, -40IFNβ) CAT*

Η περιγραφή της δομικής οργάνωσης καθώς και η πορεία κατασκευής του GBP (GASL, -40IFNβ) CAT φορέα του GBP υποκινητή, παρουσιάζεται στο κεφάλαιο 3.1.2. στην εικόνα 27. Για λόγους συγκριτικής μελέτης όλων των κατασκευών ο φορέας GBP (GASL, -40IFNβ) CAT εμφανίζεται ξανά μαζί με τους ISG54 (ISRE, -40IFNβ) CAT και GBP (GASS, -40IFNβ) CAT ανασυνδυασμένους φορείς στην εικόνα 29Γ[78].

4.1.3. *Ο ανασυνδυασμένος φορέας ISG54 (ISRE, -40IFNβ) CAT*

Για την δημιουργία της ανασυνδυασμένης κατασκευής ISG54 (ISRE, -40IFNβ) CAT χρησιμοποιήθηκε ο φορέας 872: -40IFNβCAT (βλ. κεφάλαιο 3.1.2.), στην BamH I περιοριστική θέση του πολυσυνδέτη (PL) του οποίου κλωνοποιήθηκε η ISRE (-109, -80) *cis*-ρυθμιστική αλληλουχία του ISG54 υποκινητή (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, κεφάλαιο 3.2.3.), μέσω αντίδρασης σύνδεσης συμβατών προεξέχοντων BamH I άκρων. Η τελική επιβεβαίωση των ανασυνδυασμένων κλώνων πραγματοποιήθηκε με BamH I ή EcoR I-Hind III αναλυτικές περιοριστικές πέψεις, ενώ η προς διαμόλυνση ISG54 (ISRE, -40IFNβ) CAT κατασκευή ελέγχθηκε ως προς την ορθότητά της με ανάλυση πρωτοδιάταξης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας κατά Sanger. Η δομική οργάνωση της ανασυνδυασμένης κατασκευής φαίνεται στην εικόνα 29Α.

4.1.4. *Ο ανασυνδυασμένος φορέας GBP (GASS, -40IFNβ) CAT*

Η ανασυνδυασμένη κατασκευή GBP (GASS, -40IFNβ) CAT προήλθε από την κλωνοποίηση του GASS (GAS Small: -126, -106) *cis*-ρυθμιστικού στοιχείου του GBP υποκινητή (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, κεφάλαιο 3.2.3.) στην BamH I περιοριστική θέση του πολυσυνδέτη (PL) του 872: (-40IFNβ)CAT φορέα μέσω αντίδρασης σύνδεσης τυφλών μη συμβατών άκρων (blunt ends). Η συνεπώαση της

GASS δίκλωνης αλληλουχίας σύνδεσης, σε συνθήκες μοριακής περίσσειας αυτής (500 ngr), με χαμηλές συγκεντρώσεις φορέα (50 ngr) είχε ως αποτέλεσμα την δημιουργία ενός μεγάλου αριθμού ανασυνδυασμένων κατασκευών, οι οποίοι έφεραν την GASS *cis*-περιοχή σε ποικίλου αριθμού πολλαπλά αντίγραφα (copies) μπροστά από το CAT γονίδιο αναφοράς και την 'minimum' περιοχή μεταγραφικής ενεργότητας (-40) του υποκινητή της IFN-β (εικόνα 29B). Για τις δοκιμές παροδικής διαμόλυνσης επιλέχθηκαν οι θετικές GBP (GASS, -40IFNβ) CAT ανασυνδυασμένες κατασκευές που έφεραν το GASS *cis*-στοιχείο μία (1x) και τέσσερεις (4x) φορές στην BamH I θέση του (-40IFNβ)CAT φορέα.

Η αρχική ταυτοποίηση των κλώνων έγινε με την τεχνική της *in situ* υβριδοποίησης των βακτηριακών αποικιών[165] (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, κεφάλαιο 2.2.9.), ενώ η τελική επιβεβαίωση του αριθμού των GASS μοριακών αντιγράφων ανά φορέα πραγματοποιήθηκε με αναλυτικές διπλές περιοριστικές πέψεις EcoR I-Hind III ή EcoR I-Xba I.

Η μοριακή οργάνωση της GBP (GASS 4x, -40IFNβ) CAT ανασυνδυασμένης κατασκευής περιγράφεται στην εικόνα 29B, ενώ η συγκριτική δομή και των τριών φορέων στην εικόνα 29.

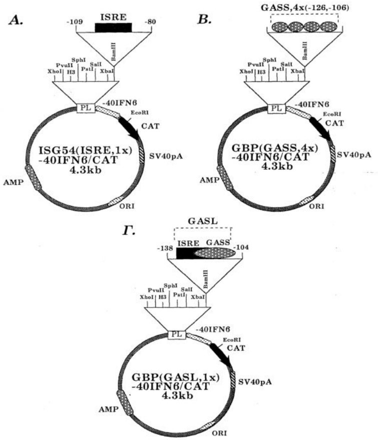
4.2. Πειράματα παροδικής διαμόλυνσης

Η βασική πειραματική πορεία διαμόλυνσης που ακολουθήθηκε περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.2. (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, κεφάλαιο 2.4.). Η καταστολή της επαγόμενης από IFN-γ CAT ενεργότητας της κάθε ανασυνδυασμένης κατασκευής Eα, GASL, GASS και ISRE επιτεύχθηκε με την προσθήκη στην HeLa κυτταρική καλλιέργεια τριών διαφορετικών φαρμάκων-αναστολέων των οποίων η ενδοκυτταρική δράση περιγράφεται ως ακολούθως (βλ. Γλωσσάριο):

α) <u>Σταυροσπορίνη (Staurosporin: S).</u> Αναστολέας (inhibitor) ευρέος φάσματος, μεγάλου αριθμού κινασών[122,154,166]. Σε συγκεντρώσεις 10 nM χρησιμοποιείται ως εκλεκτικός καταστολέας της δράσης της πρωτεϊνικής κινάσης-C (Protein Kinase-C)[166]. Στην παρούσα μελέτη δοκιμάσθηκαν δύο συγκεντρώσεις 50 nM και 100 nM, εκ των οποίων μόνο η δεύτερη εμφάνισε ισχυρό φαινότυπο μεταγραφικής καταστολής.

β) <u>Γενιστεΐνη (Genistein: G).</u> Εκλεκτικός αναστολέας ενδοκυτταρικών κινασών τυροσίνης. Δεν παρουσιάζει κυτταρική τοξικότητα και χρησιμοποιείται σε συγκεντρώσεις 30-100 μgr/ml[33,119,166]. Οι πειραματικές δοκιμές καταστολής στις Eα, GASL, GASS και ISRE ανασυνδυασμένες κατασκευές πραγματοποιήθηκαν παρουσία Genistein συγκέντρωσης 30 μgr/ml.

γ) <u>Βαναδικό οξύ (Vanadate: V).</u> Ειδικός αναστολέας φωσφατασών τυροσίνης. Χρησιμοποιείται σε μοριακές συγκεντρώσεις 0,5 mM - 1 mM και δεν εμφανίζει συμπτώματα κυτταροτοξικότητας[119,166,167]. Δοκιμάσθηκε σε παρόμοιες συγκεντρώσεις της τάξης του 1 mM.

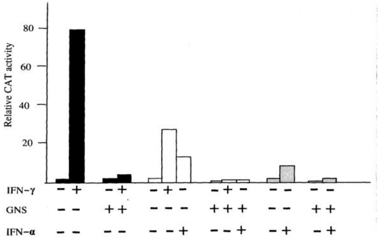


Εικόνα 29: Περιγραφή της δομικής οργάνωσης των ISG54 (ISRE, -40IFNβ) CAT [A], GBP (GASS, -40IFNβ) CAT [B] και GBP (GASL, -40IFNβ) CAT [Γ]. Το μαύρο βέλος προσδιορίζει την κατεύθυνση μεταγραφής του CAT γονιδίου αναφοράς, ενώ το -40IFNβ τον 'minimum' υποκινητή του γονιδίου της IFN-β. Με τους ISRE, GASS και GASL σκιαγραμμένους σχηματισμούς παριστάνονται τα συστατικά *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία που εμπεριέχονται στις ανασυνδυασμένες κατασκευές.

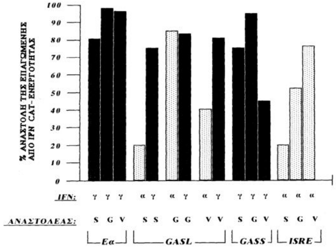
Ολοι οι ενζυμικοί αναστολείς κινασών και φωσφατασών (S, G και V) προσθέτονταν 1-3h προ της προσθήκης της IFN-γ (100 u/ml) στην HeLa κυτταρική καλλιέργεια, ενώ μετά την παροδική διαμόλυνση με τις υπερελικωμένες πλασμιδιακές κατασκευές η επώαση συνεχιζόταν για 24-48h παρουσία τόσο IFN-γ όσο και του αντίστοιχου φαρμάκου.

Η κανονικοποίηση του βαθμού ενσωμάτωσης των ανασυνδυασμένων κατασκευών γινόταν με βάση την συγκατακρήμνιση της $pCMV_6$-lacZ κατασκευής, ενώ η μέση απόκλιση όλων των τελικών τιμών της CAT-ενεργότητας δεν ξεπερνούσε το 10%, γι' αυτό και δεν προσδιορίζεται σε κανένα από τα ακόλουθα διαγράμματα.

Στην εικόνα 30A περιγράφεται η σχετική CAT-ενεργότητα (Relative CAT activity: βλ. Γλωσσάριο) των Εα (-140, +14) CAT, ISG54 (ISRE, -40IFNβ) CAT και GBP (GASL, -40IFNβ) CAT κατασκευών τόσο μετά από τη δράση της IFN-γ (υψηλή) όσο και μετά από την κατασταλτική επί της IFN-γ επίδραση της Genistein (χαμηλή).



Εικόνα 30A: Κατασταλτική δράση της Genistein (30 μgr/ml) στην επαγόμενη από IFN, CAT-μεταγραφική ενεργότητα (Relative CAT activity: βλ. Γλωσσάριο) των ακόλουθων ανασυνδυασμένων κατασκευών: α) Εα (-140, +14) CAT [μαύρα διαγράμματα]· επάγεται μόνο από IFN-γ. β) GBP (GASL, -40IFNβ) CAT [άσπρα διαγράμματα]· επάγεται τόσο από IFN-γ όσο και από IFN-α. γ) ISG54 (ISRE, -40IFNβ) CAT [γκρί διαγράμματα]· επάγεται μεταγραφικά μόνο από IFN-α. Τα σύμβολα [+] και [-] υποδηλώνουν παρουσία και απουσία της λεμφοκίνης/αναστολέα αντίστοιχα. Ο υψηλός βαθμός μεταγραφικής αναστολής από την δράση της Genistein είναι προφανής και για τις τρεις ανασυνδυασμένες κατασκευές.



Εικόνα 30B: Αναστολή (%) της επαγόμενης από IFN CAT-ενεργότητας των Eα, GASL, GASS και ISRE ανασυνδυασμένων κατασκευών μετά την προσθήκη χαμηλών μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων S (Σταυροσπορίνης), G (Γενιστεΐνης) και V (Βαναδικού οξέος) στις διαμολυσμένες καλλιέργειες. Ο συμβολισμός Eα προσδιορίζει τον Eα (-140, +14) CAT φορέα, ο οποίος ανταποκρίνεται μεταγραφικά μόνο σε IFN-γ· ο GASL τον φορέα GBP (GASL, -40IFNθ) CAT, ο οποίος 'απαντά' τόσο σε IFN-γ όσο και σε IFN-α· ο GASS τον φορέα GBP (GASS 4x -40IFNθ) CAT, ο οποίος φέρει τέσσερα (4x) μοριακά αντίγραφα της GASS *cis*-ρυθμιστικής περιοχής (βλ. κεφάλαιο 4.1.4.) και ο οποίος 'απαντά' μόνο σε IFN-γ· και ο ISRE τον φορέα ISG54 (ISRE, -40IFNθ) CAT, ο οποίος αποκρίνεται μεταγραφικά μόνο σε IFN-α. Με τις 'μαύρες' στήλες προσδιορίζεται η IFN-γ(γ), ενώ με τις 'λευκές' η IFN-α(α).

Αντίθετα από την εικόνα 30Α, τα διαγράμματα της εικόνας 30Β περιγράφουν την επί τοις εκατό (%) αναστολή της επαγόμενης από IFN CAT-μεταγραφικής ενεργότητας των τεσσάρων ανασυνδυασμένων κατασκευών Eα, GASL, GASS και ISRE, παρουσία του κάθε φαρμάκου-αναστολέα S, G και V (βλ. Γλωσσάριο) αντίστοιχα. Οσο υψηλότερη είναι η στήλη, τόσο ισχυρότερη προσδιορίζεται και η μεταγραφική αναστολή (transcriptional inhibition).

Η κατασκευή GBP (GASS 1x -40IFNθ) CAT, η οποία φέρει το GASS *cis*-στοιχείο μία μόνο φορά μπροστά από το CAT γονίδιο αναφοράς, δεν παρουσίασε επαγόμενο φαινότυπο γι' αυτό και δεν αναφέρεται στα διαγράμματα της εικόνας 30B.

4.3. Συζήτηση

Τα *in vivo* πειράματα παροδικής διαμόλυνσης των Εα, GASL, GASS και ISRE ανασυνδυασμένων κατασκευών σε HeLa κυτταρικές σειρές αποκάλυψαν την ύπαρξη κοινών μοριακών γεγονότων σύγχρονης φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης, τα οποία συναπαιτούνται για την μετάδοση της πληροφορίας της IFN-(γ και α) από τον διαμεμβρανικό υποδοχέα (IFN-R) στον αντίστοιχο Εα, GBP και ISG54 γονιδιακό υποκινητή. Η εκλεκτική επαγωγή των Εα (-140, +14) CAT, ISG54 (ISRE, -40IFN6) CAT και GBP (GASL, -40IFN6) CAT πλασμιδιακών φορέων από τις IFN-γ, IFN-α και IFN-γ,α αντίστοιχα, συμφωνεί απόλυτα με την μεταγραφική συμπεριφορά των αντίστοιχων Εα, ISG54 και GBP γονιδίων (βλ. Εισαγωγή, κεφάλαια 2.1. και 2.2.), γεγονός που συνιστά και το πιο ισχυρό κριτήριο ελέγχου της αξιοπιστίας και της ειδικότητας των πειραμάτων παροδικής διαμόλυνσης.

Η κατάργηση της επαγόμενης από IFN-γ μεταγραφικής ενεργότητας του Εα υποκινητή από χαμηλές μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις του αναστολέα της Genistein αποδεικνύει την εξάρτηση της επαγωγής του Εα γονιδίου από την καταλυτική δραστικότητα των ενδοκυτταρικών κινασών τυροσίνης (tyrosine kinases). Η Genistein, μπλοκάροντας τα ενεργά κέντρα των κινασών τυροσίνης[33,119,166], καταργεί τις καταλυτικές ενεργότητες αυτών, εμποδίζοντας έτσι την μεταβίβαση του μοριακού σήματος της IFN-γ από τον διαμεμβρανικό υποδοχέα της στον Εα υποκινητή, γεγονός που οδηγεί σε ισχυρή μεταγραφική ησύχανση (silencing) και επακόλουθη καταστολή της γονιδιακής έκφρασης.

Η *'in vivo* μοριακή ευαισθησία' (sensitivity) των ISFα επαγόμενων συμπλόκων από την δράση της Genistein (βλ. κεφάλαιο 2.7.) επιβεβαιώνει την απαίτηση ύπαρξης ενεργών καταλυτικών μορίων κινασών τυροσίνης στον μηχανισμό IFN-γ μεταγραφικής ενεργοποίησης του Εα υποκινητή και ενισχύει ακόμη περισσότερο τον καθοριστικό-λειτουργικό ρόλο των ISFα/ISRα αλληλεπιδράσεων στην επαγόμενη συμπεριφορά του Εα γονιδίου.

Με βάση την ανθεκτικότητα (resistance) των Χ-συνδεομένων πρωτεϊνών στην επίδραση της Genistein (βλ. κεφάλαιο 2.7.) συμπεραίνουμε ότι η κυριότερη - αλλά όχι ίσως και η μόνη - μοριακή αιτία της καταστολής της μεταγραφικής δραστηριότητας του Εα υποκινητή (-140, +14) εντοπίζεται στην κατάργηση της ενεργότητας σύνδεσης των επαγόμενων ISFα πυρηνικών συμπλόκων λόγω αναστολής της ενζυμικής δραστικότητας της οικογένειας των κινασών τυροσίνης που τα φωσφορυλιώνουν και τα ενεργοποιούν.

Η πιο πιθανή υποψήφια κινάση για την φωσφορυλίωση των ISFα συμπλόκων και την μεταγραφική ενεργοποίηση του Εα υποκινητή είναι η JAK2 κινάση (βλ. κεφάλαιο 6.3.), η οποία φαίνεται να εμφανίζει μεγάλη ευαισθησία, τόσο σε χαμηλές συγκεντρώσεις Genistein (30 μgr/ml) όσο και σε υψηλές συγκεντρώσεις Staurosporin (100 nM), γεγονός που την διακρίνει φαρμακοκινητικά από την πρωτεϊνική κινάση-C (Protein kinase-C).

Το γεγονός ότι η μεταγραφική ενεργότητα των ISG54 και GBP επαγόμενων από IFN υποκινητών καταστέλεται παρουσία Genistein, όπως αναλύεται σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης, η οποία καταργεί την καταλυτική δραστηριότητα της JAK-οικογένειας κινασών, επιβεβαιώνει την υπόθεση της άμεσης συμμετοχής των JAKs (JAK2) στην επαγόμενη φωσφορυλίωση των ISFα μεταγραφικών παραγόντων (βλ. Εισαγωγή, κεφάλαιο 2.4.). Ο συγκρίσιμος μάλιστα βαθμός μεταγραφικής αναστολής των Εα και GASS ανασυνδυασμένων κατασκευών από την Genistein, υποδηλώνει ότι τα μονοπάτια μετάδοσης της μοριακής πληροφορίας από τον διαμεμβρανικό υποδοχέα της IFN-γ στους Εα και GBP υποκινητές αντίστοιχα, μοιράζονται πολλά από τα ενδιάμεσα μεσολαβητικά στοιχεία (κινάσες) μεταφοράς του σήματος, επικοινωνώντας λειτουργικά (cross-talk) μεταξύ τους, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από την ισχυρή αναστολή του GASL φορέα, τόσο από την δράση της Genistein όσο και απ' αυτή της Staurosporin.

Η ασθενής (weak) κατάργηση της μεταγραφικής ενεργότητας της ISRE ανασυνδυασμένης κατασκευής - η οποία ανταποκρίνεται μόνο σε IFN-α - από την Staurosporin (20%), σε αντίθεση με την ισχυρή αναστολή της από την Genistein (80%), διαφοροποιεί φαρμακοκινητικά τα δύο μονοπάτια της IFN-γ και IFN-α, γεγονός που έχει ήδη ταυτοποιηθεί από την διακριτή συμμετοχή διαφορετικών συμπλόκων κινασών τυροσίνης - JAK1, JAK2 και JAK1, TYK2 - στους αντίστοιχους μηχανισμούς μετάδοσης της μοριακής πληροφορίας[141,171].

Η μεταγραφική συμπεριφορά του GASL *cis*-ρυθμιστικού στοιχείου εμφανίζεται απόλυτα συγκρίσιμη με του GASS υποστοιχείου, όσον αφορά την αναστολή της IFN-γ επαγωγής του από Genistein και Staurosporin, καθώς και πολύ ομόλογη με του ISRE υποστοιχείου, όσον αφορά την καταστολή της IFN-α επαγόμενης ενεργότητας αυτού από Genistein και Staurosporin. Πιθανολογείται λοιπόν ότι τα GASS και ISRE υποστοιχεία της GASL περιοχής λειτουργούν ανεξάρτητα, σε σχέση με την διαφορική τους απόκριση σε IFN-γ και IFN-α αντίστοιχα, ενώ η συνεργατική συμμετοχή του μονοπατιού της IFN-γ στο μονοπάτι της IFN-α, δηλαδή του GASS υποστοιχείου στο ISRE, ενδεικνύεται από την διαφορική απόκριση των GASL και ISRE κατασκευών στην IFN-α παρουσία Genistein. Η υπερεπαγωγή IFN-α αποκρινόμενων γονιδίων (ISG54, GBP) μέσω προεπώασης με IFN-γ[102,112] επιβεβαιώνει το προτεινόμενο μοντέλο συνεργατικής δράσης, χωρίς βέβαια να αποκλείει και την πιθανότητα συμμετοχής άλλων μηχανισμών όπως: α) αναστολή της δράσης φωσφατασών τυροσίνης, β) αναστολή μεταγραφικής σύνθεσης ενός καταστολέα[102,112] κλπ.

Η δομική σύσταση των GAF και ISGF-3 μεταγραφικών συμπλόκων, τα οποία συγκροτούνται από τα STAT1α[154] ομοδιμερή και από τα p48, STAT1α-STAT1β, STAT2[135] ετεροδιμερή πρωτεϊνικά μόρια αντίστοιχα, ενισχύει την άποψη της συνεργατικής φύσης της IFN-γ στον μηχανισμό ταχείας αλλά και καθυστερημένης απόκρισης (late response) της IFN-α, γεγονός όμως που δεν παρουσιάζει αντίστροφη λειτουργική δράση.

Ενώ τα GASL και ISRE *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία εμφανίζονται ικανά και αναγκαία για την μεταγραφική επαγόμενη ενεργοποίηση των GBP και ISG54 αντίστοιχων υποκινητών τους[100,114,162] (βλ. κεφάλαιο 3), το GASS *cis*-στοιχείο σ' ένα μοριακό αντίγραφο (1 copy) εμφανίζεται λειτουργικά ανενεργό, ενώ σε τέσσερα (4 copies) παρουσιάζει υψηλή λειτουργική - επαγόμενη από IFN-γ - δραστηριότητα, φαινόμενο που αποδίδεται είτε στο χαμηλό μεταγραφικό δυναμικό του στοιχείου, είτε στην προαπαίτηση συνεργατικής αλληλεπίδρασης με γειτονικές *cis*-αλληλουχίες στα δομικά πλαίσια του πατρικού υποκινητή[109,119].

Η ταυτόσημη ισχυρή αναστολή της επαγόμενης από IFN-γ μεταγραφικής δραστηριότητας των Εα και GASL ανασυνδυασμένων κατασκευών από την δράση του Vanadate υποδηλώνει την απαίτηση τουλάχιστον ενός μοριακού γεγονότος αποφωσφορυλίωσης στους μηχανισμούς μετάδοσης του σήματος της IFN-γ από τον διαμεμβρανικό υποδοχέα της στους Εα και GBP υποκινητές. Η σημαντική κατάργηση (>50%) της IFN-επαγόμενης ενεργότητας όλων των Εα, GASL, GASS και ISRE ανασυνδυασμένων φορέων από την επίδραση του Vanadate, το οποίον συνιστά έναν γενικό αναστολέα φωσφατασών τυροσίνης[119], αποδεικνύει ότι και τα δύο μονοπάτια της IFN (γ και α) λειτουργούν συνεργατικά μέσω κοινών μηχανισμών σύγχρονης φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης, οι οποίες μπορούν να λαμβάνουν χώρα τόσο σε κοινά, όσο και σε διακριτά μοριακά υποστρώματα.

Η ισχυρή αναστολή της επαγόμενης από IFN-γ μεταγραφικής ενεργότητας του Εα υποκινητή από χαμηλές μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις (1 mM) Vanadate αποκαλύπτει την ανάγκη αποφωσφορυλίωσης και επακόλουθης ενεργοποίησης κάποιων άγνωστων πρωτεϊνικών υποστρωμάτων[223], τα οποία συνεργατικά με τις φωσφορυλιωμένες μορφές των ISFα πυρηνικών συμπλόκων ενεργοποιούν μεταγραφικά τον Εα υποκινητή.

Η μεταγραφική ενεργοποίηση μέσω εκλεκτικής αποφωσφορυλίωσης έχει εντυπωσιακά αποδειχθεί για την περίπτωση της c-jun ογκοπρωτεΐνης[81], μηχανισμός που θα μπορούσε πειστικότατα να υϊοθετηθεί και για τον Εα υποκινητή αφού στο X_2 *cis*-ρυθμιστικό του στοιχείο συνδέεται με υψηλή συγγένεια ο jun-ομόλογος mXBP μεταγραφικός παράγοντας (βλ. Εισαγωγή, κεφάλαιο 1.3.3.2.). Το πιθανό λοιπόν προτεινόμενο μοριακό μοντέλο, όσον αφορά τον Εα υποκινητή, συνύπαρξης γεγονότων σύγχρονης αποφωσφορυλίωσης και φωσφορυλίωσης θα μπορούσε να σκιαγραφηθεί ως ακολούθως: α) φωσφορυλίωση των ISFα πυρηνικών συμπλόκων και επακόλουθη ενεργοποίηση αυτών, β) αποφωσφορυλίωση των ήδη φωσφορυλιωμένων jun-ομολόγων (mXBP) πρωτεϊνών του X_2 *cis*-στοιχείου και επακόλουθη λειτουργική τους ενεργοποίηση και γ) άμεση συγκρότηση ενός υπερμοριακού συμπλέγματος όλων των *trans*-μεταγραφικών παραγόντων (ISFα, RFX, XBP, NF-Y) του Εα υποκινητή, μέσω λυγίσματος (bending) και μερικής κυκλοποίησης (looping) αυτού, με τελικό σκοπό την υψηλή μεταγραφική του ενεργοποίηση.

Εναλλακτικά, η λειτουργική αναγκαιότητα αποφωσφορυλίωσης θα μπορούσε να αναχθεί στα πιο πρώϊμα μοριακά γεγονότα μετάδοσης του σήματος, όπως αυτό της ενεργοποίησης του κυτταροπλασματικού τμήματος του λεμφοκινικού υποδοχέα, ή ακόμα και της καταλυτικής δραστηριοποίησης ενός διαφορετικού συστήματος κινασών απ' αυτό των JAKs[13].

5. ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΟΥ ΕΝΔΟΓΕΝΟΥΣ DRα mRNA ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΚΙΝΑΣΩΝ ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ

Επακολούθως των πειραμάτων παροδικής διαμόλυνσης της Εα (-140, +14) CAT ανασυνδυασμένης κατασκευής σε HeLa IFN-γ κυτταρικές σειρές παρουσία πλήθους φαρμακολογικών αναστολέων πραγματοποιήθηκαν δοκιμές κατά Northern συνολικού RNA (total RNA) HeLa κυττάρων, τα οποία καλλιεργήθηκαν για 48h παρουσία 100 u/ml IFN-γ και διαφορετικών μη τοξικών συγκεντρώσεων ενός μεγάλου αριθμού αναστολέων γνωστής φυσιολογικής δράσης. Ο μοριακός ιχνηθέτης (PROBE) που χρησιμοποιήθηκε ήταν ένα τμήμα του cDNA του τάξης II DRα ανθρώπινου γονιδίου[5,9,224].

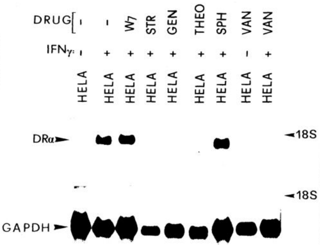
5.1. Η μεταγραφική δραστηριότητα του DRα γονιδίου ελέγχεται από την ενζυμική ενεργότητα ενδογενών κινασών τυροσίνης

Για την παρασκευή όλων των RNA δειγμάτων ακολουθήθηκαν οι μέθοδοι της θερμής όξινης φαινόλης[58], καθώς και αυτή της Li/Urea[58,86] (θλ. Γλωσσάριο), η οποία υπέστη τις ακόλουθες τροποποιήσεις[78], εμπλουτίζοντας έτσι το σχετικό κλάσμα των poly[A+] μηνυμάτων που απομονώνονται στην τελική RNA παρασκευή μας (H. Jäckle, προσωπική επικοινωνία). Τα βήματα της νέας μεθόδου δίνονται ως ακολούθως:

1. Επαναδιάλυση του κυτταρικού (HeLa) ιζήματος (pellet) σε 5 ml (10 ml/100 mgr) διαλύματος-H το οποίον περιέχει:
   6 M UREA
   3 M Licl
   20 mM NaAc, pH: 5,2
   300 μgr/ml Ηπαρίνης (Heparin: 50 mgr/ml)
   0,5% SDS
2. Ομογενοποίηση σε υάλινο ομογενοποιητή (Porter-Emergen) με 15-20 ωθήσεις (strokes).
3. Τοποθέτηση στους 4°C για 12h.
4. Φυγοκέντρηση 10.000 rpm για 30΄ στους 4°C.
5. Ξέπλυμα 2x με διάλυμα-W (4 ml) το οποίον περιέχει:
   8 M UREA
   4 M Licl
6. Επαναδιάλυση σε 3 ml διάλυμα-S το οποίον περιέχει
   2% SDS
   60 mM NaAc, pH: 5,2
7. Τοποθέτηση για 12h στους 30°C σε περιστροφικό ρότορα.
8. Εκχύλιση με όξινη φαινόλη 3x και τελική κατακρήμνιση παρουσία 30 mM NaAc, pH: 5,2 και 2 όγκων προψυγμένης αιθανόλης.

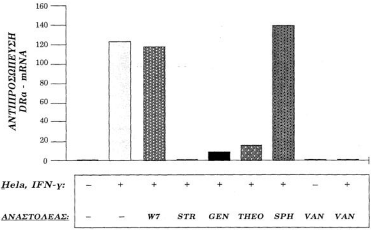
Ο μοριακός ιχνηθέτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Pst I/Pst I τμήμα περιοριστικής υδρόλυσης 700 bp του DRα cDNA ($pDRH_2$)[224], ενώ τόσο ο τρόπος ραδιοσήμανσης αυτού (με την βοήθεια τυχαίων εναρκτών) όσο και η τεχνική διαδικασία της ανάλυσης κατά Northern, καθώς και της τελικής υβριδοποίησης των ακινητοποιημένων mRNAs στην μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης περιγράφονται στα Υλικά και Μέθοδοι στα αντίστοιχα κεφάλαια 2.2.1., 2.2.3. και 2.2.2.

Με σκοπό την αξιολόγηση των ποσοτικών διαφορών στις RNA παρασκευές μας, η ίδια μεμβράνη αναϋβριδοποιήθηκε με το cDNA ενός βασικού μεταβολικού ενζύμου σαν ιχνηθέτη (GAPDH: βλ. Γλωσσάριο), το οποίον ραδιοσημάνθηκε με την χρήση της DNA πολυμεράσης-I μέσω Nick Translation (βλ. Γλωσσάριο). Η σχετική διόρθωση των διαφορετικών επιπέδων των DRα mRNAs από την ανασταλτική επίδραση του κάθε φαρμάκου, πραγματοποιήθηκε από την σύγκριση των εντάσεων των DRα και GAPDH ραδιενεργών ζωνών στην κάθε RNA παρασκευή αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων κατά Northern παρουσιάζονται στην εικόνα 31.



Εικόνα 31: Ανάλυση κατά Northern, RNA- HeLa κυτταρικών σειρών συνεπωασμένων με IFN-γ και πλήθος φαρμακοκινητικών αναστολέων (DRUGS) όπως: W7, STR (Σταυροσπορίνης), GEN (Γενιστεΐνης), THEO (Θεοφιλίνης), SPH (Σφιγγοσίνης), VAN (Ο-Βαναδικού οξέος). Η ίδια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης υβριδοποιήθηκε διαδοχικά με τον DRα μοριακό ανιχνευτή καθώς και με τον GAPDH ανιχνευτή για εκτίμηση ποσοτικών διαφορών στις RNA παρασκευές μας (μαύρα βέλη στο αριστερό τμήμα της εικόνας). Ο συμβολισμός 18S (δύο μαύρα βέλη στο δεξιό τμήμα της εικόνας) προσδιορίζει την θέση του 18S-RNA (2.0 kbp), όπως αυτό ταυτοποιείται με χρώση EthBr του αποδιατακτικού πηκτώματος διαχωρισμού των RNAs. Η πλήρης ονοματολογία όλων των αναστολέων παρατίθεται στο Γλωσσάριο.

Με σκοπό την ακριβέστερη αξιολόγηση των ποσοτικών διαφορών της αντιπροσώπευσης του DRα μηνύματος στις RNA παρασκευές μας, η φωτογραφία της εικόνας 31 σαρώθηκε (scanning analysis) οπτικά και οι εντάσεις των DRα και GAPDH ζωνών μετασχηματίσθηκαν σε ηλεκτρονικό παλμό, ο οποίος διαδοχικά αναλύθηκε και εκτιμήθηκε με βάση τον θόρυβο (background) τυχαίων σημείων πάνω στην μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης, διαδικασία που ευγενικά εκτελέσθηκε από την Δρ. Μ. Παπαδοπούλου. Το διάγραμμα των κανονικοποιημένων τιμών φαίνεται ως ακολούθως στην εικόνα 32.



Εικόνα 32: Ανάλυση οπτικής σάρωσης και κανονικοποίησης των ποσοτικών διαφορών των RNA-δειγμάτων της Northern ανάλυσης της εικόνας 31. Η διαφορική αντιπροσώπευση του DRα-mRNA, ανάλογα με το είδος και την μοριακή φυσιολογία του αντίστοιχου φαρμάκου-αναστολέα[1] που χρησιμοποιείται, είναι εμφανής. Η ηλεκτρονική διάταξη της οπτικής ανάλυσης ήταν τύπου Macintosh-IIci (Apple), ενώ ο 'Scanner' τύπου Colour OneScanner (Apple). Το πρόγραμμα (Software) της οπτικής σάρωσης ήταν το O-Photo 2.0.

Για τις RNA παρασκευές μας όλοι οι HeLa κυτταρικοί πληθυσμοί επωάσθηκαν παρουσία IFN-γ 100 u/ml για 24-48h με τους αντίστοιχους αναστολείς (inhibitors)[1], των οποίων οι ενεργές μοριακές συγκεντρώσεις δίνονται ως ακολούθως[78,222]:

[1] Η προμηθεύτρια εταιρεία των W7, THEO, SPH και VAN ήταν η SIGMA Co., ενώ των STR και GEN η UBI Co.

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ					
W7	**STR**	**GEN**	**THEO**	**SPH**	**VAN**
15 μM	100 nM	30 μgr/ml	150 μgr/ml	50 nM	1mM

5.2. Συζήτηση

Εκτός από την γενετική ανάλυση μεταλλαγών (βλ. Εισαγωγή, κεφάλαιο 2.3.), ένας από τους πιο δημοφιλείς τρόπους μοριακής μελέτης της μετάδοσης του σήματος από τον διαμεμβρανικό υποδοχέα στον κυτταρικό πυρήνα, είναι η προσθήκη ειδικών φαρμάκων-αναστολέων, οι οποίοι καταργούν εκλεκτικά διαφορετικά στάδια-βήματα στο μονοπάτι μεταβίβασης της μοριακής πληροφορίας.

Η υψηλή επαγωγή του DRα-mRNA (-1,5 kbp) μετά από την δράση της IFN-γ συμφωνεί απόλυτα με τον επαγόμενο μεταγραφικό φαινότυπο των πειραμάτων παροδικής διαμόλυνσης της Εα (-140, +14) CAT ανασυνδυασμένης κατασκευής (βλ. κεφάλαιο 4.2.). Η ισχυρή καταστολή της επαγωγής, μετά από την επίδραση των φαρμάκων της Σταυροσπορίνης (πλήρης: 100%) και της Γενιστεΐνης (94%), αποδεικνύει την συμμετοχή μορίων κινασών τυροσίνης στο μοριακό μονοπάτι του σήματος της IFN-γ από τον μεμβρανικό υποδοχέα της στον DRα γονιδιακό υποκινητή, ενώ η δραματική αναστολή μετά την δράση του βαναδικού οξέος (100%) ενδεικνύει την συναπαίτηση γεγονότων σύγχρονης αποφωσφορυλίωσης, διαφορετικών, πιθανώς, μοριακών υποστρωμάτων, γεγονός που έχει εντυπωσιακά δειχθεί και με τα πειράματα παροδικής διαμόλυνσης του Εα (-140, +14) CAT ανασυνδυασμένου φορέα (βλ. κεφάλαια 4.2. και 4.3.). Ο τρόπος δράσης και λειτουργικής αναστολής του κάθε φαρμάκου περιγράφεται ως ακολούθως[171,222] (για την επεξήγηση των ξενόγλωσσων όρων βλ. Συντμήσεις-Γλωσσάριο):

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ					
W7	**STR**	**GEN**	**THEO**	**SPH**	**VAN**
Ca/CaM CaM-ανταγ.	PTK JAK PKC	PTK JAK	cAMP Ca/CaM αδενυλ.κυκλάση	PKC	PTP

Η ισχυρή αναστολή της μεταγραφικής επαγωγής του DRα γονιδίου από την δράση της Σταυροσπορίνης και της Γενιστεΐνης, αλλά όχι της Σφιγγοσίνης, αποκλείει την άμμεσο ενεργό λειτουργική συμμετοχή της PKC (πρωτεϊνικής κινάσης-C) στο μονοπάτι μετάδοσης της πληροφορίας της IFN-γ στον DRα υποκινητή, ενισχύοντας και υποστηρίζοντας τον μηχανισμό μεταβίβασης του σήματος μέσω της διαφορικής ενεργοποίησης των κινασών τυροσίνης της JAK-οικογένειας[13,33,78,181,222].

Ο μεταγραφικός χαμηλός φαινότυπος της επίδρασης της Θεοφιλίνης (ισχυρή αναστολή: 87%) ενδεικνύει την ύπαρξη ενός μοριακού μονοπατιού εξαρτώμενου από την καταλυτική δραστικότητα της αδενυλικής κυκλάσης του cAMP, με πιθανότερο μοριακό υπόστρωμα τις X_2-συνδεόμενες πρωτεΐνες, όπως τις hXBP ή τους c-jun ομόλογους μεταγραφικούς παράγοντες[5,69,71] (θλ. Εισαγωγή, κεφάλαιο 1.3.3.2.) του DRα υποκινητή.

Η ειδικότητα των δοκιμών καταστολής του Ca^{2+}/CaM (ασβεστίου/καλμοντουλίνης) μονοπατιού μεταφοράς της πληροφορίας αποδείχθηκε από την συμπεριφορά του W7 φαρμάκου-αναστολέα, η οποία εμφανίσθηκε αρνητική. Τόσο στα πειράματα παροδικής διαμόλυνσης (μη εμφανιζόμενα δεδομένα) της Eα (-140, +14) CAT ανασυνδυασμένης κατασκευής όσο και σε αναλύσεις κατά Northern του ενδογενούς DRα-mRNA, ο W7 αναστολέας δεν μπόρεσε να καταργήσει την επαγόμενη από IFN-γ μεταγραφική ενεργότητα των δύο Eα και DRα υποκινητών αντίστοιχα, αποκλείοντας έτσι την άμμεση ενεργό συμμετοχή του Ca^{2+}/CaM στο μονοπάτι διαβίβασης του σήματος της IFN-γ σε HeLa κυτταρικούς πληθυσμούς. Η διαφορετική - αντίστροφη - πάντως συμπεριφορά αναστολής των φαρμάκων της Θεοφιλίνης και του W7 θα μπορούσε να αποδοθεί και στην χρήση διαφορικής μοριακής συγκέντρωσης του W7 (15 μM), το οποίον ως γνωστόν εμφανίζει λειτουργική δράση μόνο αν προστεθεί σε συγκεκριμένες ποσότητες στην προς μελέτη κυτταρική καλλιέργεια[222].

Η υψηλή δομική ομολογία των κωδικών και ρυθμιστικών περιοχών (promoters) των Eα (ποντίκι) και DRα (άνθρωπος) γονιδίων αντίστοιχα[5,9,215], σε συνδυασμό με την υψηλή λειτουργική συντήρηση των μηχανισμών της ιστοειδικής και επαγόμενης μεταγραφικής ενεργοποίησης αυτών, επιτρέπει την εξαγωγή αξιόπιστων και ακριβών συμπερασμάτων της συμπεριφοράς του Eα υποκινητή από αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν με το DRα ομόλογο γονίδιο. Η ανάλυση της μεταγραφικής αναστολής του DRα-mRNA από την δράση πλήθους φαρμάκων-αναστολέων καθορίζει πιστά την αντίστοιχη συμπεριφορά του Eα γονιδίου, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από την σύμπτωση (συμφωνία) των αποτελεσμάτων των πειραμάτων παροδικής διαμόλυνσης του Eα υποκινητή, με τις αναλύσεις κατά Northern του DRα γονιδίου.

Συμπερασματικά λοιπόν, αποδεικνύεται ότι η μεταγραφική επαγωγή των Eα και DRα γονιδίων ρυθμίζεται από μοριακά γεγονότα ταυτόχρονης φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης ετερογενών υποστρωμάτων, μέσω διαφορικής συμμετοχής πρωτεϊνικών μορίων κινάσης τυροσίνης (PTK) και φωσφατάσης τυροσίνης (PTP) αντίστοιχα. Η ύπαρξη ενός cAMP-εξαρτώμενου μηχανισμού πιθανολογείται, ενώ η διαφορά απόκρισης του DRa-γονιδίου στην δράση του W7 και της Θεοφιλίνης θα μπορούσε να αποδοθεί ακόμα και στην διαφορική ευαισθησία των JAK-κινασών σ' αυτούς τους αναστολείς, γεγονός που ακόμα παραμένει αδιευκρίνιστο.

6. ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΗΣ JAK2 ΚΙΝΑΣΗΣ ΣΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ IFN-γ ΣΤΟΝ Ea ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ

Με σκοπό την ταυτοποίηση της συμμετοχής της JAK2 κινάσης στους μηχανισμούς μεταγραφικής ενεργοποίησης του Ea γονιδίου, πραγματοποιήθηκαν πειράματα παροδικής συνδιαμόλυνσης των Ea (-140, +14) CAT και pRC/CMV-JAK2 ή pRC/CMV-JAK2/dl:B/X ανασυνδυασμένων κατασκευών αντίστοιχα, σε HeLa κυτταρικές σειρές παρουσία IFN-γ για 24-48h[78].

6.1. Πλασμιδιακές κατασκευές

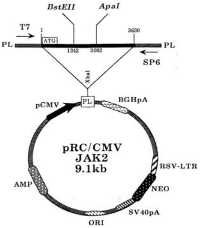
6.1.1. *Ο ανασυνδυασμένος φορέας Ea (-140, +14) CAT*

Τόσο ο τρόπος κατασκευής όσο και η μοριακή περιγραφή του Ea (-140, +14) CAT ανασυνδυασμένου φορέα του Ea γονιδιακού υποκινητή παρατίθεται στο κεφάλαιο 3.1.1. στην εικόνα 26.

6.1.2. *Ο ανασυνδυασμένος φορέας pRC/CMV-JAK2*

Για την δημιουργία της ανασυνδυασμένης κατασκευής pRC/CMV-JAK2 χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pRC/CMV (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, κεφάλαιο 3.1.3.), στην Xba I περιοριστική θέση του πολυσυνδέτη (PL) του οποίου κλωνοποιήθηκε το cDNA της JAK2 κινάσης του ποντικού (mJAK2)[175], μέσω αντίδρασης σύνδεσης τυφλών μη συμβατών και μη προεξέχοντων άκρων. Τόσο η θέση κλωνοποίησης (junction), όσο και οι 5΄, 3΄ περιβάλλουσες αλληλουχίες της ATG κωδικής τριπλέτας έναρξης της μετάφρασης, ελέγχθηκαν με συμβατικές τεχνικές ανάλυσης πρωτοδιάταξης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας κατά Sanger[58].

Η μοριακή οργάνωση του ανασυνδυασμένου φορέα φαίνεται στην εικόνα 33.



Εικόνα 33: Δομική οργάνωση του pRC/CMV-JAK2 φορέα μοριακού μεγέθους 9.1 kbp. Με το μαύρο θέλος pCMV αναπαρίσταται ο ισχυρός υποκινητής συστατικής έκφρασης CMV του κυτταρομεγαλοϊού (βλ. Γλωσσάριο), ενώ οι υπόλοιποι κυλινδρικοί σχηματισμοί (AMP, ORI, NEO, BGHpA) προσδιορίζουν τα απαραίτητα γονίδια της χαρακτηριστικής μοριακής φυσιολογίας του pRC/CMV (INVITROGEN) φορέα (βλ. Γλωσσάριο). Το γονιδιακό ένθεμα του cDNA της JAK2 κινάσης ορίζεται από τους αριθμούς 1 και 3630 (bp), ενώ οι BstE II και Apa I θέσεις περιοριστικής υδρόλυσης καθορίζουν τα δομικά όρια των 3΄ ελλείψεων του JAK2-cDNA που περιγράφονται στο κεφάλαιο 6.1.3.

Η pRC/CMV-JAK2 ανασυνδυασμένη κατασκευή προσφέρει υψηλή συνεχή ευκαρυωτική γονιδιακή έκφραση του cDNA της JAK2 κινάσης, λόγω του ισχυρού pCMV ϊικού υποκινητή και των σημάτων (signals) πολυαδενυλίωσης του γονιδίου της αυξητικής ορμόνης βοός (BGHpA). Η τελική κατασκευή του υπερελικωμένου φορέα pRC/CMV-JAK2 μετασχηματίσθηκε σε DH5a θακτηριακά στελέχη[58] και επιλέγχθηκε μέσω του γονιδίου ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (amp^R). Ενα από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του ανασυνδυασμένου φορέα ήταν η υψηλή μοριακή του αστάθεια - υψηλή συχνότητα δομικών ελλείψεων (deletions) - σε όλα τα θακτηριακά στελέχη που δοκιμάσθηκαν (JM101, HB101, XL-1, JM103), εκτός από το προαναφερόμενο του τύπου DH5a. Για την αριστοποίηση (optimization) των μεταβολικών συνθηκών θακτηριακής ανάπτυξης η συγκέντρωση της αμπικιλίνης (AMP) ελλατώθηκε στα 30 μgr/ml.

6.1.3. *Ο ανασυνδυασμένος φορέας pRC/CMV-JAK2/dl:B/X*

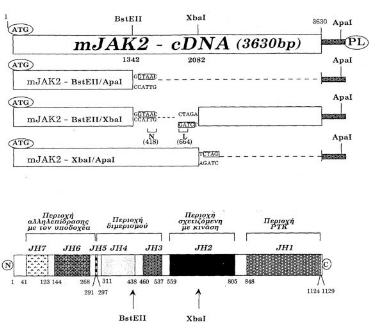
Με σκοπό την <u>αρνητική λειτουργική τιτλοδότηση</u> (negative functional titration) του μονοπατιού μετάδοσης του σήματος της IFN-γ στον Ea υποκινητή, δημιουργήθηκαν τρεις μεταλλαγμένες θυγατρικές κατασκευές από τον πατρικό φορέα pRC/CMV-JAK2, οι οποίες ονομάσθηκαν dl:B/A, dl:B/X και dl:X/A αντίστοιχα.

Η κατασκευή pRC/CMV-JAK2/<u>dl:B/A (6,8 kbp)</u> προήλθε από διπλή περιοριστική πέψη του pRC/CMV-JAK2 (9.1 kbp) πατρικού φορέα στις BstE II και Apa I θέσεις αναγνώρισης του mJAK2-cDNA και του πολυσυνδέτη (PL) κλωνοποίησης αντίστοιχα. Το γονιδιακό θραύσμα (fragment) που αφαιρείται είναι της τάξης των 2,3 kbp, ενώ το απομένον τμήμα - διατηρώντας άθικτη την ATG τριπλέτα έναρξης της μετάφρασης - δύναται να κωδικοποιεί μια 3΄ μοριακά ακρωτηριασμένη (truncated) πρωτεΐνη μεγέθους 445αα.

Η δεύτερη κατασκευή, pRC/CMV-JAK2/<u>dl:B/X (8,4 kbp)</u>, δημιουργήθηκε από τις διπλές περιοριστικές πέψεις του πατρικού φορέα στις BstE II και Xba I αναγνωριστικές θέσεις του mJAK2-cDNA, αφαιρώντας ένα μικρό ενδιάμεσο γονιδιακό θραύσμα (internal fragment) μήκους 740 bp. Η μονομοριακή αντίδραση σύνδεσης μετά από τους απαραίτητους τροποποιητικούς χειρισμούς στα BstE II και Xba I προεξέχοντα άκρα οδήγησε στην κατασκευή ενός μεταλλαγμένου mJAK2-cDNA μορίου, το οποίον δύναται να κωδικοποιεί την σύνθεση ενός ενδιάμεσα ακρωτηριασμένου πρωτεϊνικού προϊόντος μεγέθους 963 αα, του οποίου λείπουν 246 αα, από την θέση N(418) έως την θέση L(664). Ολα τα υπόλοιπα λειτουργικά στοιχεία του μεταλλαγμένου-ανασυνδυασμένου φορέα έκφρασης (pCMV, ATG-τριπλέτα έναρξης της μετάφρασης, BGHpA) διατηρούνται δομικά αναλλοίωτα.

Η τρίτη και τελευταία κατασκευή pRC/CMV-JAK2/<u>dl:X/A (7,6 kbp)</u> δημιουργήθηκε από διπλή περιοριστική πέψη του pRC/CMV-JAK2 (βλ. κεφάλαιο 6.1.2.) πατρικού φορέα, στις Xba I και Apa I αναγνωριστικές θέσεις του mJAK2-cDNA και του πολυσυνδέτη (PL) κλωνοποίησης αντίστοιχα. Το τμήμα του γονιδίου που αφαιρείται είναι της τάξης των 1,55 kbp, ενώ η απομένουσα γονιδιακή περιοχή των 2,08 kbp δύναται να κωδικοποιεί την σύνθεση μιας 3΄ ακρωτηριασμένης JAK2 πρωτεΐνης μοριακού μεγέθους 692 αα, διατηρώντας πάντα άθικτη την ATG-κωδική τριπλέτα έναρξης της μετάφρασης.

Η δομική οργάνωση όλων των (dl) μεταλλαγμένων mJAK2-cDNA μορίων εμφανίζεται στην εικόνα 34, όπου και περιγράφεται παραστατικά η μοριακή ανατομία των μελών των κινασών της JAK-οικογένειας, όπως αυτή έχει προβλεφθεί τόσο από ομολογίες στην πρωτοταγή τους δομή όσο και από προκαταρκτική λειτουργική ανάλυση αυτών[168,170,171].



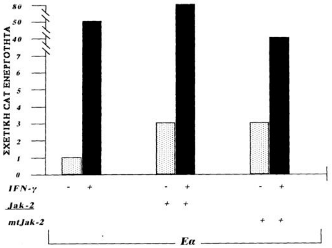
Εικόνα 34: Μοριακή περιγραφή των <u>dl:B/A</u>, <u>dl:B/X</u> και <u>dl:X/A</u> δομικών ελλείψεων του cDNA της mJAK2 κινάσης (επάνω τμήμα της εικόνας, βλ. κείμενο κεφαλαίου 6.1.3.). Στο κάτω τμήμα της εικόνας παριστάνονται οι συντηρημένοι λειτουργικοί πυρήνες (functional domains) JH των μελών της JAK-οικογένειας, οι οποίοι έχουν τοποθετηθεί σε απόλυτη ευθυγράμμιση με τα δομικά όρια των κωδικών περιοχών των μεταλλαγμένων JAK-πρωτεϊνών, προσδιορίζοντας έτσι το λειτουργικό τμήμα του μορίου το οποίον αφαιρείται.

Από τις μεταλλαγές που περιγράφησαν μόνο η dl:B/X δομική εσωτερική έλλειψη εμφάνισε επαναλήψιμο και αξιόπιστο φαινότυπο (βλ. κεφάλαιο 6.2.), γι' αυτό και ο τίτλος του παρόντος υποκεφαλαίου αναφέρεται αποκλειστικά στην <u>pRC/CMV-JAK2/dl:B/X</u> ανασυνδυασμένη κατασκευή.

6.2. Πειράματα παροδικής διαμόλυνσης

Η βασική πειραματική διαδικασία παροδικής διαμόλυνσης HeLa (ATCC) κυτταρικών σειρών περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.2. (βλ. επίσης Υλικά και Μέθοδοι, κεφάλαιο 2.4.). Περιληπτικά αναφέρουμε ότι HeLa κυτταρικοί πληθυσμοί συνδιαμολύνονται -με την μέθοδο συγκατακρήμνισης με άλατα Ca_3PO_4- με τις Εα

(-140, +14) CAT και pRC/CMV-JAK2 ή Εα (-140, +14) CAT και pRC/CMV-JAK2/dl:B/X (mtJAK2) ανασυνδυασμένες πλασμιδιακές κατασκευές αντίστοιχα, παρουσία IFN-γ 100 u/ml, για χρόνο 24-48h. Η κανονικοποίηση των CAT-πειραματικών τιμών γίνεται με βάση την ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, κεφάλαιο 2.4.), ενώ η εξισορρόπηση των ποσοτικών διαφορών των ανασυνδυασμένων κατασκευών επιτυγχάνεται με την προσθήκη DNA του πατρικού φορέα pRC/CMV (stuffer-DNA). Στα δείγματα τα οποία διαμολύνονται μόνο με την Εα (-140, +14) CAT ανασυνδυασμένη κατασκευή προστίθεται DNA του pRC/CMV πατρικού φορέα, σε συγκρίσιμες μοριακές συγκεντρώσεις με αυτές των κατασκευών που εκφράζουν τόσο την φυσικού τύπου (wild type) όσο και την μεταλλαγμένου τύπου (mutant type) JAK2-πρωτεΐνη αντίστοιχα. Τα πειράματα παροδικής συνδιαμόλυνσης του Εα (-140, +14) CAT φορέα με τις δύο ανασυνδυασμένες κατασκευές έκφρασης της JAK2-πρωτεϊνικής κινάσης περιγράφονται στην εικόνα 35.



Εικόνα 35: Διάγραμμα σχετικής CAT-ενεργότητας της εγγύς ρυθμιστικής περιοχής του Εα υποκινητή [Εα(-140, +14) CAT], απουσία (λευκές ράβδοι) ή παρουσία (μαύροι ράβδοι) IFN-γ, μετά από προσθήκη-συνδιαμόλυνση ίσων ποσοτήτων DNA των pRC/CMV-JAK2 (JAK2: εκφράζει πρωτεΐνη φυσικού τύπου) και pRC/CMV-JAK2/dl:B/X (mtJAK2: εκφράζει μεταλλαγμένου τύπου πρωτεΐνη και ειδικότερα αυτή με την dl:B/X εσωτερική δομική έλλειψη) ανασυνδυασμένων φορέων έκφρασης αντίστοιχα.

Το μέσο σχετικό σφάλμα (απόκλιση) όλων των πειραματικών τελικών τιμών της CAT-ενεργότητας υπολογίσθηκε μικρότερο του 10%, γι' αυτό και δεν περιγράφεται σε κανένα από τα προαναφερόμενα διαγράμματα (εικόνα 35). Τα πειράματα παροδικής συνδιαμόλυνσης επαναλήφθηκαν τρεις (3x) φορές, τόσο για τον pRC/CMV-JAK2 φορέα όσο και για τις dl:B/X, dl:B/A και dl:X/A μεταλλαγμένες ανασυνδυασμένες κατασκευές. Αντίθετα από τον φορέα pRC/CMV-JAK2/dl:B/X, οι κατασκευές pRC/CMV-JAK2/dl:B/A και pRC/CMV-JAK2/dl:X/A δεν εμφάνισαν κανένα καταστaλτικό φαινότυπο μεταγραφικής επαγωγής από IFN-γ του Ea υποκινητή, γι' αυτό και δεν αναλύονται σε κανένα κεφάλαιο της παρούσας μελέτης.

Η παροδική υπερέκφραση της JAK2-πρωτεϊνικής κινάσης αυξάνει επαναλήψιμα τα βασικά (basic levels) μεταγραφικά επίπεδα του Ea (-140, +14) υποκινητή κατά τρεις φορές (3x), ενισχύοντας συγχρόνως και τα επαγόμενα (inducible levels) από IFN-γ επίπεδα κατά 1,6x φορές.

Αντίθετα, η υπερέκφραση της ενδιάμεσα (dl:B/X) μεταλλαγμένης JAK2-πρωτεΐνης καταστέλει τον επαγόμενο από IFN-γ μεταγραφικό φαινότυπο κατά 20%, αν συγκριθεί με τα μη-διαμολυσμένα με τον φορέα pRC/CMV-JAK2 δείγματα, ή κατά 50% αν συγκριθεί με τις παρασκευές όπου έχουν διαμολυνθεί με την pRC/CMV-JAK2 ανασυνδυασμένη κατασκευή, διατηρώντας πάντα αναλλοίωτα τα βασικά μεταγραφικά επίπεδα του Ea (-140, +14) γονιδιακού υποκινητή.

6.3. Συζήτηση

Τα πειράματα παροδικής υπερέκφρασης της JAK2-πρωτεϊνικής κινάσης του ποντικού (mJAK2) αποκάλυψαν την ενεργό συμμετοχή αυτής στο μονοπάτι μετάδοσης του μοριακού σήματος της IFN-γ από τον διαμεμβρανικό της υποδοχέα στον Ea υποκινητή. Η αύξηση τόσο των βασικών μεταγραφικών (basic transcription) επιπέδων κατά 3x φορές όσο και των επαγόμενων (inducible) κατά 1,6x φορές αποδεικνύει ότι η καταλυτική ενεργότητα της JAK2-κινάσης απαιτείται - χωρίς να αποτελεί την μοναδική μοριακή προϋπόθεση - για την μεταγραφική ενεργοποίηση του Ea υποκινητή, μηχανισμός που επιβεβαιώνεται και από τα ακόλουθα γεγονότα:

α) Υψηλή καταστολή της επαγόμενης μεταγραφικής ενεργότητας του Ea υποκινητή σε δοκιμές παροδικής διαμόλυνσης, από την επίδραση των φαρμάκων Genistein ή Staurosporin, τα οποία εκλεκτικά αναστέλουν (λειτουργικά) την οικογένεια των JAK-κινασών, καθώς και κάποιες μη ταυτοποιημένες ακόμα κινάσες τυροσίνης (PTK: βλ. Γλωσσάριο) (βλ. κεφάλαιο 4).

β) Ισχυρή αναστολή της μεταγραφικής επαγωγής του ομόλογου DRa γονιδίου σε HeLa κυτταρικές σειρές μετά την προσθήκη Genistein ή Staurosporin (βλ. κεφάλαιο 5).

γ) Κατάργηση της επαγόμενης από IFN-γ μεμβρανικής αντιπροσώπευσης των ανθρώπινων (HLA-DRa) τάξης II αντιγόνων στην μεμβράνη των γ1A μεταλλαγμένων κυτταρικών σειρών, οι οποίες στερούνται της JAK2 καταλυτικής ενεργότητας κινάσης[169-173] (βλ. Εισαγωγή, κεφάλαιο 2.3.).

Η επαγωγή της μεταγραφικής ενεργότητας του Ea υποκινητή κατά 3x φορές μετά την υπερέκφραση της JAK2-κινάσης απουσία IFN-γ, συμφωνεί απόλυτα με τον βαθμό επαγωγής (3,5x) της GASL *cis*-ρυθμιστικής περιοχής του GBP υποκινητή (βλ. Εισαγωγή, κεφάλαιο 2.2.) μετά την υπερέκφραση της JAK2-πρωτεΐνης σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης COS κυτταρικών σειρών[169], γεγονός που επιβεβαιώνει και την ομόλογη λειτουργική συμπεριφορά των Ea και GBP (GASL) υποκινητών (βλ. κεφάλαια 3, 4).

Ο χαμηλό βαθμός JAK2-επαγόμενης μεταγραφικής ενεργοποίησης αποδίδεται, για τα μεν βασικά επίπεδα (3x) στην χαμηλή καταλυτική δραστικότητα της JAK2-κινάσης λόγω απουσίας IFN-γ (μια και η JAK2 φωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται από την σύνδεση της IFN-γ στον αντίστοιχο υποδοχέα της)[141,168-173,204], για δε τα επαγόμενα επίπεδα (1,6x) στον μοριακό λειτουργικό κορεσμό του συστήματος (saturation), αφού η IFN-γ έχει ήδη κινητοποιήσει τα ενδογενή μονοπάτια μετάδοσης σήματος στον Ea υποκινητή, επιτρέποντας μικρές μόνο βελτιώσεις στην ποσοτική αποδοτικότητα του μεταγραφικού αυτού συστήματος.

Η τελική επιβεβαίωση της ενεργού συμμετοχής της JAK2-πρωτεϊνικής κινάσης στο μονοπάτι μετάδοσης της μοριακής πληροφορίας της IFN-γ στον Ea υποκινητή, πραγματοποιήθηκε με την κατασκευή τριών δομικών ελλείψεων του cDNA της JAK2 (dl:B/A, dl:B/X και dl:X/A), των οποίων ο τελικός σκοπός ήταν η λειτουργική αρνητική τιτλοδότηση (titration) του μονοπατιού της IFN-γ σε διακριτά μοριακά βήματα από τον υποδοχέα έως το υπόστρωμα φωσφορυλίωσης.

Οπως περιγράφεται και στην εικόνα 34, η πιθανή λειτουργική συμπεριφορά των τριών μεταλλαγμένων κατασκευών σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης θα ήταν η ακόλουθη[141,168,170,171]:

α) dl:B/A: αδυναμία φωσφορυλίωσης υποστρώματος, ανικανότητα ετεροδιμερισμού, αλλά δυνατότητα αλληλεπίδρασης και τιτλοδότησης των θέσεων σύνδεσης με τον διαμεμβρανικό υποδοχέα της IFN-γ,

β) dl:B/X: αδυναμία ετεροδιμερισμού ή ομοδιμερισμού, αλλά διατήρηση της ικανότητας αλληλεπίδρασης με τον υποδοχέα, καθώς και του λειτουργικού δυναμικού φωσφορυλίωσης υποστρώματος και

γ) dl:X/A: ικανότητα τόσο διμερισμού όσο και σύνδεσης με το κυτταροπλασματικό τμήμα του υποδοχέα, αλλά αδυναμία φωσφορυλίωσης υποστρώματος.

Η αδυναμία αρνητικής τιτλοδότησης του Ea επαγόμενου μεταγραφικού φαινότυπου, μέσω της υπερέκφρασης των dl:B/A και dl:X/A ακρωτηριασμένων JAK2-πρωτεϊνών (μη εμφανιζόμενα αποτελέσματα), αποδίδεται στην δημιουργία μη-λειτουργικών μεταλλαγμένων JAK2 μορίων χωρίς καμμία καταλυτική δραστικότητα κινάσης. Η μοριακή αφαίρεση των JH1 και JH2 (JAK Homology: βλ. Γλωσσάριο) λειτουργικών πυρήνων πιθανώς προάγει την δομική κατάρευση των JAK2 μεταλλαγμένων κινασών, οδηγώντας έτσι στην επακόλουθη λειτουργική τους αδράνεια και αδυναμία να τιτλοδοτήσουν τόσο τον μεμβρανικό υποδοχέα όσο και τον αντίστοιχο διμερή τους μοριακό συνεταίρο.

Αντίθετα, η υπερέκφραση της dl:B/X εσωτερικά (246 αα) μεταλλαγμένης JAK2-πρωτεΐνης, οδήγησε σε 50% καταστολή (συγκρινόμενη με την φυσικού τύπου JAK2) της επαγόμενης από IFN-γ μεταγραφικής ενεργότητας του Εα υποκινητή, διατηρώντας αναλλοίωτα τα βασικά (3x) επίπεδα. Η ικανότητα της dl:B/X-JAK2-κινάσης να φωσφορυλιώνει τα μοριακά της υποστρώματα (substrates) απουσία IFN-γ και να ενεργοποιεί τον αντίστοιχο υποκινητή στόχο (Εα), συνιστά πιθανώς το ισχυρότερο μοριακό μοντέλο αιτιολόγησης της - κατά 3x φορές - επαγωγής των βασικών μεταγραφικών επιπέδων του Εα υποκινητή. Η υπερέκφραση της JAK2-κινάσης σε δοκιμές παροδικής διαμόλυνσης γ1Α και COS κυτταρικών σειρών, εμφάνισε το μοριακό χαρακτηριστικό απεξάρτησης της καταλυτικής δραστικότητάς της, τόσο από την προσθήκη IFN-γ (φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση) όσο και από την απαίτηση ομο- ή ετεροδιμερισμού[169,173] (βλ. Εισαγωγή, κεφάλαια 2.1., 2.2. και 2.4.), γεγονός που επιβεβαιώνει και τον επαγόμενο φαινότυπο των βασικών επιπέδων μετά από την υπερέκφραση της dl:B/X πρωτεΐνης. Μέσω της υπερέκφρασης λοιπόν ξεπερνάται κάθε μοριακή απαίτηση ρυθμιζόμενης δράσης, όπως αλληλεπίδρασης με τον διαμεμβρανικό υποδοχέα, αυτο-ετεροφωσφορυλίωσης και ομο- ή ετεροδιμερισμού.

Αντίθετα, παρουσία IFN-γ (επαγόμενη και αυστηρά ρυθμιζόμενη κατάσταση) η dl:B/X -JAK2- ακρωτηριασμένη πρωτεΐνη συνδέεται με τον διαμεμβρανικό υποδοχέα και φωσφορυλιώνει τα υποστρώματά της, χωρίς όμως να μπορεί να δημιουργήσει ετεροδιμερή σύμπλοκα με την JAK1-κινάση, διατηρώντας έτσι ένα χαμηλό ενζυμικό δυναμικό φωσφορυλίωσης και αποκλείοντας συγχρόνως τα ενδογενή ενεργοποιημένα JAK2 μόρια φυσικού τύπου να αλληλεπιδρούν τόσο με τον IFN-γ υποδοχέα όσο και με τα μοριακά τους υποστρώματα. Η υπερέκφραση λοιπόν της dl:B/X μεταλλαγμένης κινάσης φαίνεται να τιτλοδοτεί αρνητικά το μονοπάτι μετάδοσης του σήματος της IFN-γ στον Εα υποκινητή, επιβεβαιώνοντας την καταλυτική συμμετοχή της JAK2-κινάσης στον μηχανισμό επαγόμενης μεταγραφικής ενεργοποίησης του Εα γονιδίου.

Παρόμοια πειράματα υπερέκφρασης ενός μεταλλαγμένου μοριακού παραγώγου της JAK2-πρωτεΐνης σε ερυθρολευχαιμικές κυτταρικές σειρές, κατέδειξαν πλήρη αναστολή της λειτουργικής δραστηριότητας του μονοπατιού μετάδοσης του μοριακού σήματος της ερυθροποιητίνης (Epo)[225], επιβεβαιώνοντας έτσι την ενεργό συμμετοχή της JAK2-κινάσης στους Epo- ρυθμιστικούς φυσιολογικούς μηχανισμούς κυτταρικής διαφοροποίησης[168,171,175].

Με βάση λοιπόν την λειτουργική ομολογία τόσο των ISFa και GAF/STAT μεταγραφικών παραγόντων μεταξύ τους, όσο και των Εα και GBP αντίστοιχων γονιδιακών υποκινητών, προτείνουμε ότι τα ISFa επαγόμενα σύμπλοκα συνιστούν αναγκαία μοριακά υποστρώματα-προϊόντα φωσφορυλίωσης της καταλυτικής δράσης της JAK2-κινάσης, τα οποία μεταβιβάζουν την πληροφορία από τον μεμβρανικό υποδοχέα της IFN-γ στον Εα υποκινητή στόχο (βλ. κεφάλαια 2, 4, 5).

7. ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ Eα ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΜΕΣΩ ΠΑΡΟΔΙΚΗΣ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ IRF-1 ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ. ΑΔΥΝΑΜΙΑ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΤΟΛΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ICSBP

Με σκοπό την προκαταρκτική μελέτη της λειτουργικής συμπεριφοράς των ISRL *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων του Eα υποκινητή (βλ. κεφάλαιο 1), πραγματοποιήθηκαν *in vivo* δοκιμές παροδικής συνδιαμόλυνσης HeLa κυτταρικών σειρών με ευκαρυωτικές κατασκευές έκφρασης των IRF-1 και ICSBP μεταγραφικών παραγόντων, παρουσία του ανασυνδυασμένου φορέα στόχου Eα (-140, +14) CAT.

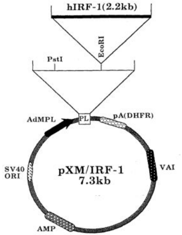
7.1. Πλασμιδιακές κατασκευές

7.1.1. *Ο ανασυνδυασμένος φορέας Eα (-140, +14) CAT*

Τόσο ο τρόπος κατασκευής όσο και η μοριακή περιγραφή του Eα (-140, +14) CAT ανασυνδυασμένου φορέα του Eα γονιδιακού υποκινητή παρατίθεται στο κεφάλαιο 3.1.1. και ειδικότερα στην εικόνα 26.

7.1.2. *Ο ανασυνδυασμένος φορέας pXM/IRF-1*

Για την δημιουργία της ανασυνδυασμένης κατασκευής pXM/IRF-1 (7,3 kb), χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pXM (5,1 kb) στην EcoR I περιοριστική θέση του οποίου, κλωνοποιήθηκε το ανθρώπινο cDNA του IRF-1 (hIRF-1: 2,2 kb) μεταγραφικού παράγοντα (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, κεφάλαιο 3.1.4.). Η υψηλή συστατική (constitutive) έκφραση του IRF-1 γονιδίου ελέγχεται από τον ισχυρό κυρίαρχο υποκινητή του όψιμου γονιδίου του αδενοϊού τύπου-5 (Ad5), AdMPL (Adenovirus Major Late Promoter), ενώ το συντιθέμενο mRNA σταθεροποιείται από την ύπαρξη ενός μηχανισμού πολυαδενυλίωσης (pA) προερχόμενου από το γονίδιο της ρεδουκτάσης του διϋδροφυλλικού οξέος DHFR. Η δομική οργάνωση του pXM/IRF-1 ανασυνδυασμένου φορέα φαίνεται στην εικόνα 36.



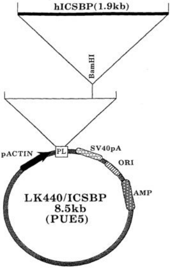
Εικόνα 36: Μοριακή περιγραφή της οργάνωσης της pXM/IRF-1 ανασυνδυασμένης κατασκευής (7,3 kb). Διακρίνεται η θέση κλωνοποίησης EcoR I του πολυσυνδέτη (PL), καθώς και ο ισχυρός AdMPL συστατικός υποκινητής έκφρασης (μαύρο βέλος) του cDNA του IRF-1 μεταγραφικού παράγοντα (2,2 kb).

7.1.3. *Ο ανασυνδυασμένος φορέας LK440/ICSBP (PUE:5)*

Για την δημιουργία της ανασυνδυασμένης κατασκευής LK440/ICSBP (PUE:5), (8,5 kb), χρησιμοποιήθηκε ο φορέας LK440 (6,6 kb), στην BamH I περιοριστική θέση του πολυσυνδέτη του οποίου (PL) κλωνοποιήθηκε - μέσω διαμοριακής αντίδρασης σύνδεσης τυφλών άκρων - το cDNA του ανθρώπινου ICSBP (1,9 kb) μεταγραφικού καταστολέα[162] (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, κεφάλαιο 3.1.5.).

Η υψηλή συνεχής έκφραση του ICSBP (βλ. Γλωσσάριο) μεταγραφικού παράγοντα ρυθμίζεται από την συστατική δραστηριότητα του ισχυρού υποκινητή του γονιδίου της ακτίνης (pActin), ενώ το αντίστοιχο συντιθέμενο mRNA σταθεροποιείται από σήματα πολυαδενυλίωσης του SV40 ιού (SV40pA)[162].

Η δομική οργάνωση του LK440/ICSBP (PUE:5) ανασυνδυασμένου φορέα περιγράφεται στην εικόνα 37. Οι συμβολισμοί ORI και AMP υποδηλώνουν τα υπεύθυνα γονίδια για τον αυτόνομο πλασμιδιακό διπλασιασμό και για τον φαινότυπο της αντιβιοτικής ανθεκτικότητας αντίστοιχα (βλ. επίσης κεφάλαιο 7.1.2.).



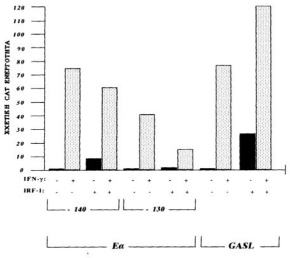
Εικόνα 37: Μοριακή περιγραφή της δομής του LK440/ICSBP (8,5 kb) ανασυνδυασμένου φορέα. Διακρίνεται η BamH I θέση κλωνοποίησης, καθώς και ο ισχυρός συστατικός υποκινητής έκφρασης pACTIN (υποκινητής γονιδίου ακτίνης: μαύρο βέλος) του cDNA του ICSBP μεταγραφικού καταστολέα (1,9 kb).

7.2. Πειράματα παροδικής διαμόλυνσης

Η βασική πειραματική διαδικασία παροδικής διαμόλυνσης που ακολουθήθηκε περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.2., καθώς επίσης και στα Υλικά και Μέθοδοι, κεφάλαιο 2.4. Περιληπτικά αναφέρουμε ότι HeLa (ATCC) κυτταρικές σειρές συνδιαμολύνονται - μέσω συγκατακρήμνισης αλάτων Ca_3PO_4 - με τις Εα (-140, +14) CAT και pXM/IRF-1 ή/και LK440/ICSBP ανασυνδυασμένες κατασκευές αντίστοιχα, απουσία ή παρουσία IFN-γ, για 24-48h. Εναλλακτικά χρησιμοποιείται ο Εα (-130, +14) CAT φορέας αναφοράς (βλ. κεφάλαια 1.1.1. και 1.2.1.), ενώ ως κατασκευές μάρτυρες (positive controls) χρησιμοποιούνται οι GBP (GASL, -40IFNθ) CAT και ISG54 (ISRE, -40IFNθ) CAT ανασυνδυασμένοι φορείς, οι οποίοι ανταποκρίνονται εκλεκτικά σε IFN-γ και IFN-α αντίστοιχα (βλ. κεφάλαιο 4).

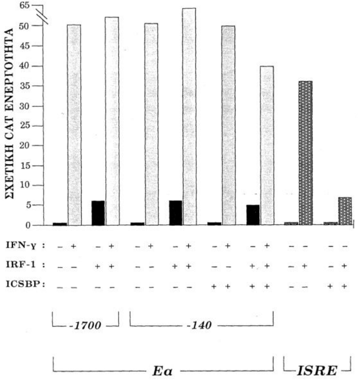
Οι τελικές τιμές όλων των πειραματικών δοκιμών παροδικής διαμόλυνσης προέρχονται από τον μέσο όρο τουλάχιστον τεσσάρων επαναλήψεων, ενώ το αντίστοιχο σχετικό σφάλμα-απόκλιση δεν ξεπερνά το 10%, γι' αυτό και δεν αναγράφεται σε κανένα από τα διαγράμματα των ακόλουθων εικόνων 38, 39. Οπως έχει προαναφερθεί (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, κεφάλαιο 2.4.), η κανονικοποίηση και η εσωτερική διόρθωση των μετρήσεων της CAT-ενεργότητας γίνεται με βάση τις τιμές της καταλυτικής δραστικότητας του ενζύμου της β-γαλακτοσιδάσης (β-gal).

Η ενισχυτική λειτουργική επίδραση της υπερέκφρασης του IRF-1 ενεργοποιητικού παράγοντα (activator) στην μεταγραφική δραστηριότητα του Εα υποκινητή αποκαλύφθηκε με πειράματα παροδικής συνδιαμόλυνσης HeLa κυτταρικών σειρών των Εα (-140, +14) CAT και pXM/IRF-1 ανασυνδυασμένων κατασκευών (εικόνα 38). Η ειδικότητα (specificity) του μηχανισμού ενεργοποίησης ελέγχθηκε με την χρήση τόσο του Εα (-130, +14) CAT φορέα αναφοράς όσο και της GBP (GASL, -40IFNβ) CAT κατασκευής μάρτυρα (εικόνα 38).



Εικόνα 38: Δοκιμές παροδικής υπερέκφρασης του IRF-1 μεταγραφικού παράγοντα (pXM/IRF-1) μετά από την προσθήκη των ακόλουθων ανασυνδυασμένων κατασκευών αναφοράς (CAT), απουσία (μαύρη ράβδος) ή παρουσία (άσπρη ράβδος) IFN-γ: Εα (-140, +14) CAT, Εα (-130, +14) CAT και GBP (GASL, -40IFNβ) CAT. Η μεταγραφική <u>επαγωγή των βασικών επιπέδων</u> της CAT-ενεργότητας των Εα (-140, +14) CAT και GBP (GASL, -40IFNβ) CAT φορέων στόχων από την δράση του IRF-1 ενεργοποιητή είναι εμφανής (βλ. κεφάλαιο 7.3.).

Η διαφορική κατασταλτική επίδραση της υπερέκφρασης του ICSBP παράγοντα στην μεταγραφική ενεργότητα των Εα και ISG54 υποκινητών αντίστοιχα αποκαλύφθηκε με πειράματα παροδικής συνδιαμόλυνσης HeLa κυτταρικών σειρών των Εα (-140, +14) CAT και LK440/ICSBP ή ISG54 (ISRE, -40IFNβ) CAT και LK440/ICSBP ανασυνδυασμένων κατασκευών παρουσία του pXM/IRF-1 ευκαρυωτικού φορέα έκφρασης. Εναλλακτικά χρησιμοποιήθηκε η Εα (-1700, +14) CAT κατασκευή (βλ. κεφάλαια 1.1.1. και 1.2.1.), η οποία εμφάνισε απόλυτα συγκρίσιμο μεταγραφικό φαινότυπο με αυτόν του Εα (-140, +14) φορέα (εικόνα 39). Όλοι οι συνδυασμοί παροδικών συνδιαμολύνσεων, καθώς και το τελικό αποτέλεσμα της μεταγραφικής ενεργότητας του CAT-γονιδίου αναφοράς, περιγράφονται ως ακολούθως: α) Εα (-1700, +14) CAT: υψηλή ενεργότητα παρουσία IFN-γ (100 u/ml), β) Εα (-140, +14) CAT: υψηλή ενεργότητα επαγόμενη από IFN-γ (100 u/ml), γ) Εα (-1700, +14) CAT και pXM/IRF-1: επαγόμενη μεταγραφική δραστικότητα συγκρίσιμη με αυτή των κατασκευών: δ) Εα (-140, +14) CAT και pXM/IRF-1: σημαντικά επαγόμενη μεταγραφική δραστικότητα των βασικών επιπέδων έκφρασης, ε) Εα (-140, +14) CAT και LK440/ICSBP: υψηλή ενεργότητα παρουσία IFN-γ, χωρίς ίχνη μεταγραφικής καταστολής (repression), ζ) Εα (-140, +14) CAT, LK440/ICSBP και pXM/IRF-1: υψηλή CAT- ενεργότητα παρουσία (ή και απουσία) IFN-γ, χωρίς ίχνη αξιόλογης μεταγραφικής καταστολής, η) ISG54 (ISRE, -40IFNβ) CAT και pXM/IRF-1: ισχυρή μεταγραφική ενεργοποίηση απουσία IFN-γ [λειτουργεί σαν θετικός μάρτυρας ελέγχου του βαθμού παροδικής υπερέκφρασης του IRF-1 ανασυνδυασμένου μεταγραφικού ενεργοποιητή (activator)], θ) ISG54 (ISRE, -40IFNβ) CAT και LK440/ICSBP: αδυναμία μεταγραφικής ενεργοποίησης και ι) ISG54 (ISRE, -40IFNβ) CAT, LK440/ICSBP και pXM/IRF-1: ισχυρή καταστολή της επαγόμενης από την υπερέκφραση του IRF-1, CAT-μεταγραφικής ενεργότητας (εικόνα 39).



Εικόνα 39: Μετρήσεις της σχετικής CAT-ενεργότητας των πειραμάτων παροδικής διαμόλυνσης HeLa κυτταρικών σειρών των Ea (-1700, +14) CAT, Ea (-140, +14) CAT (μαύροι ράβδοι: απουσία IFN-γ και άσπροι ράβδοι: παρουσία IFN-γ) και ISG54 (ISRE, -40IFNβ) CAT (γκρί ράβδοι) ανασυνδυασμένων κατασκευών αναφοράς, παρουσία πλήθους διαφορετικών συνδυασμών των pXM/IRF-1 και LK440/ICSBP ευκαρυωτικών φορέων έκφρασης (βλ. κείμενο).

7.3. Συζήτηση

Η μεταγραφική επαγωγή (7x φορές) των βασικών επιπέδων CAT-ενεργότητας της Eα (-140, +14) CAT ανασυνδυασμένης κατασκευής - αλλά όχι του Eα (-130, +14) CAT φορέα - αποδεικνύει την ενεργό συμμετοχή του IRF-1 μεταγραφικού παράγοντα στο μονοπάτι μετάδοσης του μοριακού σήματος της IFN-γ στην εγγύς ρυθμιστική περιοχή του Eα υποκινητή. Ο συγκρίσιμος-ομόλογος (7x) βαθμός IRF-1 επαγόμενης μεταγραφικής ενεργοποίησης των Eα (-1700) και Eα (-140) αντίστοιχων ανασυνδυασμένων κατασκευών επιβεβαιώνει την άποψη της λειτουργικής παρουσίας IRF-1 αποκρινόμενων *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων στην εγγύς (proximal: -140) αλλά όχι στην απόμακρη (distal: -1700) περιοχή του Eα υποκινητή.

Η διαφορική συμπεριφορά των Eα (-140) (επαγόμενη) και Eα (-130) (μη επαγόμενη) αντίστοιχων ανασυνδυασμένων κατασκευών στην παροδική υπερέκφραση του IRF-1 μεταγραφικού παράγοντα ταυτοποίησε το IRF-1 αποκρινόμενο *cis*-στοιχείο στην ISRL περιοχή και μάλιστα στο $ISRL_{II}$ υποστοιχείο (-140, -130) της 5΄ εγγύς ρυθμιστικής περιοχής του Eα υποκινητή (βλ. κεφάλαιο 1, εικόνα 10 και 12).

In vitro ανάλυση επιλογής των δυνατών-άριστων αναγνωριστικών θέσεων σύνδεσης (optimum binding sites) του IRF-1 (Interferon Regulatory Factor-1: βλ. Γλωσσάριο) μεταγραφικού παράγοντα προσδιόρισε την 'consensus' αλληλουχία σύνδεσης αυτού, η οποία συνίσταται από δύο γραμμικές επαναλήψεις τύπου 'GAAA' και της οποίας η συνολική δομική σύσταση είναι η ακόλουθη:

```
G (A) A A A (G / C) (T / C) G A A A (G / C) (T / C)
```

Δομική συγκριτική ανάλυση του $ISRL_{II}$ υποστοιχείου με την IRF-1 'consensus' συνδεόμενη περιοχή ταυτοποίησε την ύπαρξη της 'GAAA' κοινής αλληλουχίας σε μονομερή μορφή, η οποία επίσης συναντάται και στο ομόλογο αλλά λειτουργικά άγνωστο $ISRL_{I}$ υποστοιχείο. Η τριπλή στοίχιση των $ISRL_{I}$, $ISRL_{II}$ και IRF-1 θέσεων σύνδεσης φαίνεται ως ακολούθως (αναφορά 158 και κεφάλαιο 1, εικόνα 12B):

```
IRF-1     :   G(A)AAA(G/C)(T/C)GAAA(G/C)(T/C)
ISRL_I    :   G   AAA   T   G TTAA
ISRL_II   :       AA G   T G GAAA   C  T
```

Η υψηλή δομική ομολογία του $ISRL_{II}$ υποστοιχείου με την IRF-1 'consensus' περιοχή σύνδεσης επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα της παροδικής συνδιαμόλυνσης των Eα (-140, +14) CAT και pXM/IRF-1 κατασκευών και αποκαλύπτει ότι τα πρώϊμα μεταγραφικά μοριακά γεγονότα της IRF-1 επαγόμενης ενεργότητας του Εα υποκινητή συνίστανται στην διαφορική σύνδεση του IRF-1 μεταγραφικού ενεργοποιητή στην $ISRL_{II}$ *cis*-ρυθμιστική αλληλουχία. Προκαταρκτικά πειράματα βακτηριακής παρασκευής ανασυνδυασμένης IRF-1 πρωτεΐνης (rIRF-1) και επακόλουθες δοκιμές *in vitro* αλληλεπίδρασης με ραδιοσημασμένους DNA ανιχνευτές σύνδεσης (SouthWestern analysis) απέτυχαν να εμφανίσουν εκλεκτική διαμοριακή αλληλεπίδραση IRF-1/$ISRL_{II}$, ενώ αντίθετα οι θετικοί μάρτυρες σύνδεσης ISRE-GASL φάνηκαν να συνδέουν ισχυρά την rIRF-1 πρωτεΐνη (μη εμφανιζόμενα αποτελέσματα). Οι λόγοι που επεξηγούν την διαφορική μοριακή συμπεριφορά σύνδεσης του IRF-1 μεταγραφικού παράγοντα στην $ISRL_{II}$ *cis*-περιοχή δίνονται ως ακολούθως: α) χαμηλή συγγένεια σύνδεσης (binding affinity) λόγω λεπτών δομικών διαφορών των $ISRL_{II}$ και IRF-1 *cis*-περιοχών, β) απαίτηση φωσφορυλίωσης[151] για την διαφορική διάκριση σύνδεσης στα $ISRL_{II}$ και IRF-1 αποκρινόμενα στοιχεία (ISRE: βλ. Εισαγωγή, κεφάλαιο 2.6.) και γ) απαίτηση ενός μοριακού συνεταίρου ετεροδιμερισμού, ο οποίος θα σταθεροποιεί-τροποποιεί την IRF-1/$ISRL_{II}$ διαμοριακή αλληλεπίδραση, προσφέροντας έτσι την ζητούμενη *in vivo* εκλεκτικότητα του IRF-1 συμπλόκου έναντι των $ISRL_{II}$ και IRF-1 συνδεόμενων περιοχών (ISRE, GASL).

Η υπόθεση της χαμηλής συγγένειας σύνδεσης του IRF-1 στην $ISRL_{II}$ *cis*-λειτουργική περιοχή του Εα υποκινητή επιβεβαιώνεται και από την διαφορετική απόκριση του Εα (-140, +14) CAT φορέα έναντι των GBP (GASL, -40IFNβ) CAT, ISG54 (ISRE, -40IFNβ) CAT ανασυνδυασμένων κατασκευών στην παροδική υπερέκφραση του IRF-1 (pXM/IRF-1) μεταγραφικού ενεργοποιητή. Η πολύ ισχυρή μεταγραφική επαγωγή του 'GASL'-στοιχείου (27x φορές), καθώς και του 'ISRE'-*cis*-στοιχείου (36x φορές) αποδίδεται στην υψηλή συγγένεια σύνδεσης της IRF-1 παραγώμενης πρωτεΐνης στην ISRE *cis*-αλληλουχία[158,162,163] των αντίστοιχων κατασκευών, αντίθετα με την 7x-φορών χαμηλή επαγωγή του Εα (-140, +14) CAT ανασυνδυασμένου φορέα, που αιτιολογείται από την χαμηλή *in vivo* μοριακή σταθερότητα (χρόνο ζωής - συγγένεια σύνδεσης) του IRF-1/$ISRL_{II}$ διαμοριακού συμπλόκου.

Εναλλακτικά, η λειτουργική αλληλεπίδραση-ετεροδιμερισμός της IRF-1 πρωτεΐνης με το ISFL επαγόμενο από IFN μεταγραφικό σύμπλοκο[207] της ISRL *cis*-περιοχής θα μπορούσε να αποτελέσει ένα πιθανό μηχανιστικό μοντέλο, το οποίον δικαιολογεί τόσο την ύπαρξη μοριακού εταίρου όσο και τις χαμηλές μεταγραφικές επαγωγές του Εα υποκινητή από την IRF-1 παροδική υπερέκφραση.

Η διαφορετική λειτουργική απόκριση των Εα (-140, +14) CAT και ISG54 (ISRE, -40IFNβ) CAT ανασυνδυασμένων κατασκευών στην δράση του ICSBP (Interferon Consensus Sequence Binding Protein: βλ. Γλωσσάριο) μεταγραφικού καταστολέα[161-163] συνιστά ένα ακόμα ενισχυτικό στοιχείο της διακριτής-εκλεκτικής συμμετοχής του IRF-1 ενεργοποιητή στην μεταγραφική συμπεριφορά των Εα και ISG54-GBP υποκινητών.

Ο ICSBP παράγοντας δημιουργώντας ισχυρά ετεροδιμερή διαμοριακά σύμπλοκα αρνητικού μεταγραφικού δυναμικού με τις IRF-1, 2 πρωτεΐνες και εκτοπίζοντας, με άγνωστο ακόμα μηχανισμό την ISGF-3γ (p48) υπομονάδα από την ISRE αναγνωριστική της αλληλουχία σύνδεσης[162,163] (βλ. Εισαγωγή, κεφάλαιο 2.6.) καταστέλει μεταγραφικά όλα τα αποκρινόμενα σε IFN γονίδια, αδρανοποιώντας λειτουργικά το μοριακό μονοπάτι της 'ISRE'-διαμεσολαβητικής γονιδιακής επαγωγής[162].

Οπως παρουσιάζεται στην εικόνα 39, η υπερέκφραση του ICSBP παράγοντα έχει σαν αποτέλεσμα την καταστολή της IRF-1 επαγόμενης μεταγραφικής ενεργότητας (36x) του 'ISRE' *cis*-στοιχείου [ISG54 (ISRE, -40IFNθ) CAT] κατά 80%, γεγονός που αποδίδεται στην αρνητική τιτλοδότηση (δομική και λειτουργική) του IRF-1 ενεργοποιητή από τον ICSBP μεταγραφικό κατασταλέα[163]. Σε ταυτόσημα συμπεράσματα κατέληξε και η ερευνητική ομάδα της Δρ. Κ. Ozato, χρησιμοποιώντας όμως το ISRE *cis*-στοιχείο του ISG15 υποκινητή (βλ. Εισαγωγή, κεφ. 2.1.) και πραγματοποιώντας όλα τα πειράματα παροδικής συνδιαμόλυνσης σε N-tera2 εμβρυϊκές ανθρώπινες καρκινικές σειρές[162]. Αντίθετα, η επίδραση της υπερπαραγωγής της ICSBP πρωτεΐνης στην μεταγραφική ενεργότητα του Εα υποκινητή [Εα (-140, +14) CAT] εμφανίζεται χαμηλή, αφού η παρατηρούμενη καταστολή στα μεν IFN-γ επαγόμενα επίπεδα δεν ξεπερνά το 30%, ενώ στα δε IRF-1 'επαγόμενα-βασικά' επίπεδα υπολογίζεται σε ποσοστό μικρότερο του 28%.

Η βιολογική σημασία της λειτουργικής μεταγραφικής ανθεκτικότητας του Εα υποκινητή στην κατασταλτική δράση της ICSBP πρωτεΐνης αναλύεται στην υψηλή μεμβρανική αντιπροσώπευση των τάξης ΙΙ αντιγόνων, τόσο σε Β-κύτταρα όσο και σε επαγόμενες από IFN-γ επιθηλιακές ή μακροφάγες κυτταρικές σειρές (βλ. Εισαγωγή, κεφάλαιο 1.3.1.). Η *de novo* μεταγραφική επαγωγή και σύνθεση του ICSBP παράγοντα από την δράση της IFN-γ (βλ. Εισαγωγή, κεφάλαιο 2.6.), καταστέλει την όψιμη έκφραση των γονιδίων των τάξης Ι αντιγόνων[161,162] (μέσω λειτουργικής αναστολής των IRF-1 και ISGF-3γ (p48) μεταγραφικών ενεργοποιητών), διατηρώντας όμως αναλλοίωτα τα επίπεδα μεταγραφικής λειτουργίας - βασικής και επαγόμενης - των τάξης ΙΙ γονιδιακών υποκινητών.

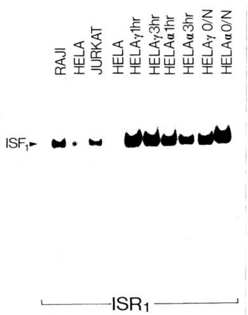
Η αδυναμία μεταγραφικής καταστολής από την δράση του ICSBP παράγοντα της Εα (-140, +14) CAT ανασυνδυασμένης κατασκευής, παρουσία IRF-1 πρωτεΐνης ή/και IFN-γ αποδίδεται στην τροποποιημένη δομική σύσταση του IRF-1 συμπλόκου, που συνδέεται και ενεργοποιεί λειτουργικά την ISRL *cis*-περιοχή του Εα υποκινητή. Η πιθανή ύπαρξη ενός ετεροδιμερούς συμπλέγματος IRF-1/TXα (Transcription factor X του Eα γονιδίου), το οποίον δεν επιτρέπει την δημιουργία του IRF-1/ICSBP[163] ανενεργού συμπλόκου - εκδηλώνοντας έτσι την μοριακή ανθεκτικότητα του Εα υποκινητή στην δράση του ICSBP παράγοντα - και το οποίον εμφανίζει ένα χαμηλό μεταγραφικό δυναμικό σύνδεσης και ενεργοποίησης της ISRL *cis*-περιοχής (7x), συνιστά ίσως τον κυριότερο μηχανισμό λειτουργικής συμμετοχής του ISRL *cis*-στοιχείου στην συνολική μεταγραφική δραστικότητα του Εα υποκινητή. Τα πειράματα αμοιβαίου κρύου ανταγωνισμού των EMSA δοκιμών των ISRα και ISRL ανιχνευτών σύνδεσης αντίστοιχα (βλ. κεφάλαιο 2.2.

καθώς και αναφορά 207), θα μπορούσαν εναλλακτικά να υποστηρίξουν την πιθανότητα της μοριακής ταυτότητας των ISFα και TXα μεταγραφικών συμπλόκων.

8. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ *trans*-ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΟΥ ΣΥΝΔΕΟΝΤΑΙ ΣΤΙΣ ISR1 ΚΑΙ ISR2 (5΄ ΤΟΥ Χ ΣΤΟΙΧΕΙΟΥ) ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΟΥ Ε6 ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ

8.1. Ταυτοποίηση ενός νέου μεταγραφικού συμπλόκου (ISF1), το οποίον αναγνωρίζει την ISR1 ρυθμιστική περιοχή και επάγεται τόσο από IFN-γ όσο και από IFN-α

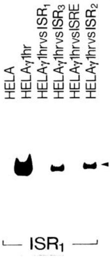
Με σκοπό την *in vitro* ταυτοποίηση επαγόμενων από IFN-γ πυρηνικών συμπλεγμάτων πραγματοποιήθηκαν EMSA δοκιμές των ISR1 και ISR2 (Interferon Stimulated Region: βλ. Γλωσσάριο) *cis*-στοιχείων του Ε6 υποκινητή με πυρηνικά εκχυλίσματα HeLa κυτταρικών σειρών επωασμένων με IFN-γ ή IFN-α για διαφορετικούς χρόνους από 1h έως και 16h (O/N). Ο δομικός σχεδιασμός των ISR1 και ISR2 *cis*-περιοχών βασίσθηκε στην CAT λειτουργική ανάλυση των 5΄ ελλείψεων του Ε6 υποκινητή[79,207], καθώς και στην ομολογία της πρωτοταγούς νουκλεοτιδικής δομής των ISR1, ISR2 και ISRα αλληλουχιών. Η ISR1 (-170, -156) περιοχή εντοπίζεται 5΄ του Η-συντηρημένου στοιχείου του Ε6 υποκινητή και περιλαμβάνει το 'TGCA' χαρακτηριστικό μοτίβο (motif) των ISR *cis*-στοιχείων. Επώαση *in vitro* ακραία ραδιοσημασμένων δίκλωνων ανιχνευτών ISR1 με πυρηνικά εκχυλίσματα HeLa κυττάρων επεξεργασμένων με IFN-γ για 1h, 3h και 16h, αποκάλυψε την ύπαρξη ενός γρήγορα επαγόμενου (<1h) συμπλόκου ISF1 (Interferon Stimulated Factor-1), το οποίον εμφανίζει υψηλή συγγένεια σύνδεσης με το ISR1 *cis*-στοιχείο[79] (εικόνα 40).



Εικόνα 40: EMSA δοκιμές της ISR1 ραδιοσημασμένης περιοχής, με πλήθος πυρηνικών εκχυλισμάτων (B) Raji, (T) Jurkat και HeLa, IFN-γ κυτταρικών σειρών (1-16h: O/N). Η γρήγορη επαγωγή του ISF1 μεταγραφικού συμπλόκου είναι προφανής. Η λεμφοειδική συστατική αντιπροσώπευση (B- και T-κυττάρων) των ISF1 συμπλεγμάτων φαίνεται να ταυτίζεται - όσον αφορά την μοριακή τους κινητικότητα - με την IFN-γ επαγόμενη αφθονία αυτών (ISF1) σε HeLa πυρηνικά εκχυλίσματα.

8.2. Συσχέτιση των ISF1 επαγόμενων συμπλεγμάτων με τους μεταγραφικούς παράγοντες που αλληλεπιδρούν με το ISRE στοιχείο

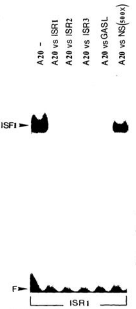
Πειράματα 'κρύου ανταγωνισμού' (βλ. κεφάλαιο 2.2. και Υλικά και Μέθοδοι, κεφάλαιο 2.3.3.), διαμέσου προσθήκης 50 ngr (50x) μη ραδιοσημασμένης ISR1 δίκλωνης *cis*-αλληλουχίας, κατέδειξαν την ειδικότητα (specificity) της ISF1 ενεργότητας σύνδεσης, ενώ συνεπώαση *in vitro* των ISR1/ISF1 συμπλόκων με 50 ngr (50x) του ISRE *cis*-στοιχείου του ISG54 υποκινητή (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, κεφάλαιο 3.2.3.) αποκάλυψε την υψηλή συγγένεια σύνδεσης του ISF1 συμπλόκου για την ISRE αλληλουχία και μάλιστα σε συγκρίσιμο βαθμό με αυτή για το ISR1 *cis*-στοιχείο[79] (εικόνα 41Α). Η ειδικότητα του ανταγωνισμού επιβεβαιώθηκε με την χρήση των ISR2 και ISR3 περιοχών του Ε6 υποκινητή (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, κεφάλαιο 3.2.2.), οι οποίες σε συνθήκες μοριακής περίσσειας 50x-φορών, αν και φαίνεται να αναγνωρίζουν επαρκώς το ISF1 επαγόμενο σύμπλοκο, παρουσιάζουν μικρότερη συγγένεια σύνδεσης (affinity) από αυτή των ISR1/ISRE *cis*-ρυθμιστικών περιοχών[79] (εικόνα 41Α).



Εικόνα 41Α: Πειράματα 'κρύου ανταγωνισμού' του <u>ISF1 επαγόμενου συμπλόκου</u> με την χρήση των ακόλουθων μη ραδιοσημασμένων δίκλωνων ανιχνευτών: ISR1, ISR2, ISR3 και ISRE (βλ. κείμενο). Ο ισχυρός ανταγωνισμός του ISRE στοιχείου στον μοριακό σχηματισμό του ISF1-επαγόμενου συμπλόκου είναι προφανής.

Παρόμοιες δοκιμές 'κρύου ανταγωνισμού' πραγματοποιήθηκαν και σε πυρηνικά εκχυλίσματα A_{20} Β-κυττάρων ποντικού, παρουσία μη ιχνηθετημένων δίκλωνων περιοχών σύνδεσης όπως: ISR1, ISR2, ISR3, GASL και ΧΕ6 (NS: Non Specific) (βλ. Παράρτημα, κεφάλαιο 3.2.).

Η μοριακή περίσσεια των ISR1, ISR2, ISR3 και GASL ειδικών ανταγωνιστών (competitors) προσδιορίσθηκε στα 50 ngr (50x), ενώ του ΧΕ6 μη-ειδικού ανταγωνιστή (NS) στα 500 ngr (500x). Η περιγραφή των πειραμάτων κρύου ανταγωνισμού του Β-ιστοειδικού ISF1 συμπλόκου εμφανίζεται στην εικόνα 41Β.



Εικόνα 41Β: Πειράματα EMSA 'κρύου ανταγωνισμού' του B-ιστοειδικού (A_{20}) ISF1 συμπλόκου από την προσθήκη πλήθους διαφορετικών περιοχών σύνδεσης. Η έλλειψη ανταγωνισμού από την NS δίκλωνη αλληλουχία (XEθ: 500x) αποδεικνύει την ειδικότητα της αλληλεπίδρασης, ενώ ο ισχυρός ειδικός ανταγωνισμός από τις ISR1, ISR2, ISR3 και GASL *cis*-περιοχές (50x) είναι εμφανής. Ο όρος F συμβολίζει τον αδέσμευτο ανιχνευτή (Free: βλ. Γλωσσάριο).

Συμπερασματικά λοιπόν, το ISF1 πυρηνικό σύμπλοκο εμφανίζει υψηλή αναγνωριστική συγγένεια σύνδεσης με τις ISRE και GASL *cis*-ρυθμιστικές περιοχές των ISG54 και GBP υποκινητών αντίστοιχα[79] (βλ. Εισαγωγή, κεφάλαιο 2.1. και 2.2.), ενώ δεν παρουσιάζει καμμία ειδικότητα αλληλεπίδρασης με την X-συντηρημένη περιοχή του Eθ υποκινητή (XEθ). Τόσο η επαγόμενη από IFN-γ όσο και η B-ιστοειδική (A_{20}) μοριακή μορφή του ISF1 μεταγραφικού συμπλόκου φαίνεται να αναγνωρίζει με υψηλή συγγένεια σύνδεσης τις ISR2 και ISR3 *cis*-περιοχές του Eθ υποκινητή[79,207] (βλ. Συζήτηση, κεφάλαιο 8.10.).

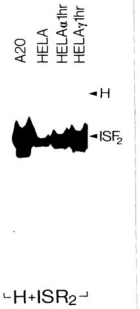
8.3. Πειράματα παρεμβολής σύνδεσης λόγω μεθυλίωσης του ISF1 συμπλόκου

Με στόχο: α) την καλύτερη δυνατή παρουσίαση του πρότυπου μοριακής προστασίας των βάσεων γουανίνης (G) του ISF1 επαγόμενου συμπλόκου επί της μονόκλωνα ραδιοσημασμένης ISR1 *cis*-περιοχής (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, κεφάλαιο

2.3.4.) και θ) την συγκριτική παράθεση των μοριακών αλληλεπιδράσεων των ISF1, ISF2 και ISF3 επαγόμενων συμπλεγμάτων στην 5΄ εγγύς ρυθμιστική περιοχή του Ε6 (-170) υποκινητή, τα αποτελέσματα της παρεμβολής σύνδεσης λόγω μεθυλίωσης του ISF1 πυρηνικού συμπλόκου παρουσιάζονται στην εικόνα 45 του κεφαλαίου 8.6., όπου και πραγματοποιείται και ο ανάλογος σχολιασμός.

8.4. Ταυτοποίηση ενός νέου επαγόμενου συμπλέγματος (ISF2), το οποίον ενεργοποιείται τόσο με IFN-γ όσο και με IFN-α

Ακραία ραδιοσημασμένοι ISR2 δίκλωνοι ιχνηθέτες επωάσθηκαν *in vitro* με πυρηνικά εκχυλίσματα A_{20} (Β-κυττάρων) και HeLa κυτταρικών σειρών επεξεργασμένων με IFN-γ ή IFN-α για 1h, αποκαλύπτοντας την ύπαρξη ενός γρήγορα επαγόμενου (<1h) πυρηνικού συμπλέγματος ISF2 (Interferon Stimulated Factor-2), καθώς και ενός συστατικού Η (Heptamer) συμπλόκου υψηλής μοριακής κινητικότητας[79] (εικόνα 42Α).



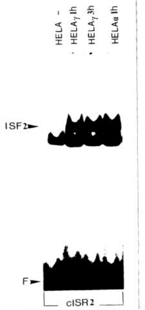
Εικόνα 42Α: Γρήγορη ενεργοποίηση της ικανότητας σύνδεσης του ISF2 επαγόμενου συμπλόκου μετά την δράση της IFN-γ (γ1h) ή IFN-α (α1h). Η υψηλή συστατική αντιπροσώπευση των ISF2 Β-ιστοειδικών συμπλόκων σε A_{20} πυρηνικά εκχυλίσματα είναι προφανής.

Για λόγους ευκολίας και ομοιογένειας της ονοματολογίας ο ιχνηθέτης H+ISR2 (-162, -143) θα αποκαλείται ISR2 ενώ ο ISR2 θα συμβολίζεται ως cISR2 (-152, -139) (core ISR2).

Οπως παρουσιάζεται στην εικόνα 42Α, η μοριακή κινητικότητα του ISF2 επαγόμενου συμπλόκου (IFN-γ, α) εμφανίζεται συγκρίσιμη με αυτή της Β-ιστοειδικής συστατικής μορφής (A_{20}) του ISF2, ενώ η παρουσία του Η-συμπλόκου συνεχούς έκφρασης λειτουργεί σαν εσωτερικός μάρτυρας εκτίμησης των ποσοτικών διαφορών των πυρηνικών πρωτεϊνικών παρασκευών μας.

Η ειδικότητα της αλληλεπίδρασης του Η-συμπλόκου υψηλής μοριακής κινητικότητας, καθώς και ο λεπτομερής προσδιορισμός της αλληλουχίας του ISR2 *cis*-στοιχείου με την οποία συνδέεται, αποκαλύφθηκε τόσο από πειράματα παρεμβολής σύνδεσης λόγω μεθυλίωσης (βλ. κεφάλαιο 8.6.) όσο και από EMSA δοκιμές συνεπώασης ακραία ραδιοσημασμένης cISR2 δίκλωνης συνδετικής περιοχής με πυρηνικά εκχυλίσματα HeLa κυτταρικών πληθυσμών επεξεργασμένων με IFN-γ ή IFN-α για 1h και 3h· η απουσία της Η-ενεργότητας σύνδεσης στον cISR2 ιχνηθέτη, αποδεικνύει την ικανότητα αλληλεπίδρασης του Η συστατικού συμπλόκου, τόσο με την Η-συντηρημένη περιοχή όσο και με τις 5΄ αλληλουχίες αυτής (εικόνα 42Β). Αντίθετα, η ισχυρά επαγόμενη μορφή του ISF2 μεταγραφικού συμπλόκου είναι εμφανής σε όλα τα πυρηνικά εκχυλίσματα HeLa κυττάρων επεξεργασμένων με IFN (γ ή α), γεγονός που προσδιορίζει την cISR2 *cis*-συνδετική περιοχή ως την ελάχιστη δυνατή αλληλουχία (-152, -143) αναγνώρισης και αλληλεπίδρασης του ISF2 πυρηνικού συμπλέγματος (εικόνα 42Β).

Ο δομικός σχεδιασμός της ISR2 περιοχής πραγματοποιήθηκε με τρόπο ώστε να περιλαμβάνει τόσο το Η-συντηρημένο στοιχείο - καθώς και τις 5΄ αλληλουχίες αυτής - όσο και το 'TGCA' χαρακτηριστικό μοτίβο, γεγονός που επιτρέπει την σύγχρονη ταυτοποίηση του ISF2 επαγόμενου συμπλόκου και του Η-συστατικού συμπλέγματος υψηλής μοριακής κινητικότητας (βλ. κεφάλαιο 8.1.).



Εικόνα 42Β: Ταχύτατη ενεργοποίηση του ISF2 - επαγόμενου από IFN - συμπλέγματος, το οποίον εμφανίζει υψηλή συγγένεια σύνδεσης με την cISR2 περιοχή του Ε6 υποκινητή (μαύρο βέλος ISF2 στο αριστερό τμήμα της εικόνας). Ο όρος F συμβολίζει τον αδέσμευτο ραδιοσημασμένο ανιχνευτή (Free: βλ. Γλωσσάριο).

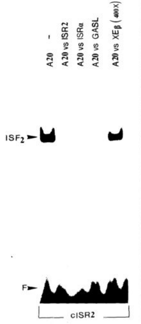
8.5. Λειτουργική συσχέτιση των ISFs (ISF1, ISF2 και ISFα) με τους μεταγραφικούς παράγοντες που αλληλεπιδρούν με το ISRE στοιχείο

Δοκιμές 'κρύου ανταγωνισμού' του cISR2 ακραία ραδιοσημασμένου ιχνηθέτη (βλ. κεφάλαια 2.2. και 8.2., καθώς και Υλικά και Μέθοδοι, κεφάλαιο 2.3.3.) διαμέσου προσθήκης 50 ngr (50x) μη ραδιοσημασμένης cISR2 *cis*-δίκλωνης αλληλουχίας σύνδεσης κατέδειξαν την ειδικότητα (specificity) της ISF2 ενεργότητας σύνδεσης, ενώ *in vitro* συνεπώαση των cISR2/ISF2 (HeLa, IFN-γ 3h) διαμοριακών συμπλόκων παρουσία 50 ngr (50x) των ISR1, ISR3, ISRα και ISRE μη-ιχνηθετημένων δίκλωνων *cis*-περιοχών αποκάλυψαν την υψηλή συγγένεια και ικανότητα σύνδεσης των ISF2 επαγόμενων (IFN-γ 3h) συμπλόκων στις ISR1, ISRα και ISRE αλληλουχίες, γεγονός αναμενόμενο από την μοριακή συμπεριφορά των ISF1 και ISFα επαγόμενων συμπλόκων (βλ. κεφάλαια 2.2. και 8.2.)· αντίθετα η ικανότητα αναγνώρισης της ISR3 περιοχής εμφανίσθηκε χαμηλή, γεγονός που αποδόθηκε στην περιορισμένη δομική ομολογία των ISR2/α και ISR3 στοιχείων αντίστοιχα. Η περιγραφή των πειραμάτων 'κρύου ανταγωνισμού' της cISR2 *cis*-περιοχής παρουσιάζεται στην εικόνα 43A.

Εικόνα 43A: Δοκιμές 'κρύου ανταγωνισμού' του ISF2 επαγόμενου συμπλόκου με την προσθήκη πλήθους διαφορετικών περιοχών σύνδεσης. Η υψηλή ενεργότητα ειδικής αλληλεπίδρασης του ISF2 στα ISR1, ISRα και ISRE *cis*-στοιχεία είναι εμφανής. Ο όρος F (Free) συμβολίζει τον αδέσμευτο ανιχνευτή, ενώ ο όρος comp (competitor) τον 'κρύο' ανταγωνιστή (βλ. Γλωσσάριο)· με το σύμβολο 'h' αναπαριστούμε τις ώρες (hours) παραμονής της IFN-γ στην HeLa κυτταρική καλλιέργεια· το ISF2 επαγόμενο σύμπλοκο συμβολίζεται με το μαύρο βέλος στο αριστερό-κεντρικό τμήμα της εικόνας.

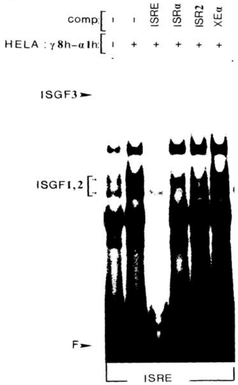
Το ειδικό πρωτεϊνικό σύμπλεγμα χαμηλής μοριακής κινητικότητας που παρατηρείται στον cISR2 ανιχνευτή - ακριβώς κάτω από το ISF2 επαγόμενο σύμπλοκο - λειτουργεί σαν εσωτερικός μάρτυρας ποσοτικού ελέγχου των πυρηνικών παρασκευών μας, εμφανίζοντας υψηλή ενεργότητα σύνδεσης συστατικής έκφρασης· η συσχέτιση της μοριακής σύστασης αυτού και του ISF2 συμπλέγματος παραμένει ακόμα αδιευκρίνιστη.

Παρόμοιες δοκιμές 'κρύου ανταγωνισμού' της cISR2 περιοχής σύνδεσης A_{20} πυρηνικών εκχυλισμάτων με την χρήση των ISR2, ISRα, GASL και XEθ μη ραδιοσημασμένων ανιχνευτών αποκάλυψαν τα ακόλουθα: α) υψηλή Β-ιστοειδική συστατική (constitutive) έκφραση του ISF2 συμπλόκου, β) μεγάλη συγγένεια σύνδεσης (affinity) του ISF2 συμπλέγματος με την cISR2 (-152, -143) *cis*-περιοχή, γ) υψηλή ικανότητα αναγνώρισης των ISRα και GASL *cis*-στοιχείων από την Β-ιστοειδική μορφή του ISF2 συμπλόκου και δ) αδυναμία αλληλεπίδρασης, ακόμα και σε συνθήκες υψηλής μοριακής περίσσειας (400x), του ISF2 πυρηνικού συμπλόκου με την XEθ περιοχή του Eθ υποκινητή (εικόνα 43Β).



Εικόνα 43Β: Πειράματα 'κρύου ανταγωνισμού' του cISR2 *cis*-στοιχείου με την χρήση πλήθους μη ραδιοσημασμένων ανιχνευτών. Η Β-ιστοειδική μοριακή μορφή του ISF2 συμπλόκου καταργείται ισχυρά από τον ανταγωνισμό των ISRα και GASL (50x) *cis*-περιοχών, ενώ η ειδικότητα της αλληλεπίδρασης ελέγχεται με την απουσία ανταγωνισμού από το XEθ (400x) συντηρημένο στοιχείο (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, κεφάλαια 3.2.2. και 3.2.3.)· με τον όρο F (Free) συμβολίζουμε τον αδέσμευτο ραδιενεργό ανιχνευτή (βλ. Γλωσσάριο).

Ακολουθώντας 'αντίστροφες' πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν EMSA δοκιμές, όπου σαν ραδιενεργός ανιχνευτής χρησιμοποιήθηκε η ISRE *cis*-περιοχή του ISG54 υποκινητή (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, κεφάλαιο 3.2.3.), ενώ σαν μη ραδιοσημασμένοι ανταγωνιστές οι ISRα, ISR2 και XEα δίκλωνες περιοχές σύνδεσης (εικόνα 44).



Εικόνα 44: Δοκιμές 'κρύου ανταγωνισμού' σε πυρηνικά εκχυλίσματα HeLa, IFN-γ 8h και IFN-α 1h κυτταρικών σειρών της ISRE (-109, -80) περιοχής του ISG54 υποκινητή, διαμέσου της προσθήκης των ISR2, ISRα, XEα και ISRE δίκλωνων ανιχνευτών. Η εκλεκτική ανταγωνιστική δράση των ISRα και ISR2 *cis*-στοιχείων στην ενεργότητα σύνδεσης των ISGF1,2 (μικρά μαύρα βέλη) επαγόμενων συμπλόκων στον ISRE ανιχνευτή είναι προφανής· με τον όρο comp (competitor) υποδηλώνουμε τον ανταγωνιστή, ενώ με το σύμβολο F (Free) τον αδέσμευτο ανιχνευτή (βλ. Γλωσσάριο).

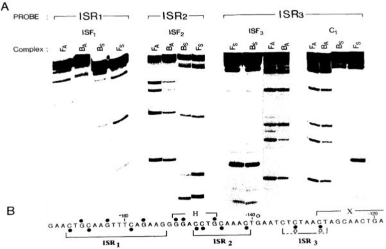
Η *in vitro* επώαση πυρηνικών εκχυλισμάτων HeLa κυτταρικών σειρών συνεπεξεργασμένων με IFN-γ για 8h και IFN-α για 1h, μαζί με το ακραία ραδιοσημασμένο ISRE *cis*-στοιχείο, αποκάλυψε την ύπαρξη τριών επαγόμενων μεταγραφικών συμπλόκων ISGF1, ISGF2 και ISGF3[110,122] (Interferon Stimulated Gene Factor: βλ. Γλωσσάριο).

Η ειδικότητα των αλληλεπιδράσεων ελέγχθηκε τόσο με πειράματα αυτοανταγωνισμού (ISRE: 50x) όσο και ανταγωνισμού με την ΧΕα (100x) *cis*-περιοχή, η οποία δεν παρουσίασε κανένα ανιχνεύσιμο φαινότυπο μείωσης της ενεργότητας σύνδεσης των ISGF-επαγόμενων συμπλόκων.

Η προσθήκη 'κρύων ανταγωνιστών' σε μοριακή περίσσεια συγκέντρωσης 50x (50 ngr) των ISRα και ISR2 δίκλωνων περιοχών κατέδειξε τον εκλεκτικό συναγωνισμό της ενεργότητας σύνδεσης των ISGF1 και ISGF2 επαγόμενων συμπλόκων (το ISGF-3 επαγόμενο υπερσύμπλοκο διατηρείται αναλλοίωτο), αποκαλύπτοντας έτσι την λειτουργική ομολογία - σε σχέση με την ικανότητα αναγνώρισης DNA συνδετικών αλληλουχιών - των ISFα/ISF2 με τους ISGF1,2[122] μεταγραφικούς παράγοντες (εικόνα 44).

8.6. Πειράματα παρεμβολής σύνδεσης λόγω μεθυλίωσης του ISF2 επαγόμενου μεταγραφικού συμπλόκου. Ισχυρή επικάλυψη με το σύμπλεγμα που αναγνωρίζει την Η περιοχή

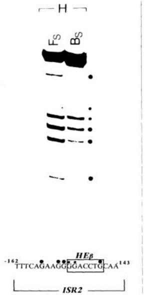
Η παρεμβολή σύνδεσης λόγω μεθυλίωσης των ISF1 (βλ. κεφάλαιο 8.3.) και ISF2 επαγόμενων πυρηνικών συμπλόκων μετά από την εκλεκτική μεθυλίωση των ISR1 (-170, -156) και cISR2 (-152, -139) μονόκλωνων ραδιοσημασμένων ανιχνευτών αντίστοιχα αποκάλυψε το ακριβές πρότυπο μοριακής προστασίας βάσεων γουανίνης (G), τόσο στην κωδική (sense) όσο και στην αντικωδική (antisense) αλυσίδα του Εθ υποκινητή[79,210] (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, κεφάλαιο 2.3.4.) (εικόνα 45Α). Οι βάσεις γουανίνης που επέδειξαν την ισχυρότερη αλληλεπίδραση (προστασία) για μεν το ISF1 επαγόμενο σύμπλοκο ήταν οι: -167G, -163G, -157G στην κωδική αλυσίδα και -169G, -166G, -159G στην αντικωδική αλυσίδα, ενώ για δε το ISF2 επαγόμενο σύμπλεγμα ήταν οι: -149G, -148G, -145G, -141G στην μη κωδική αλυσίδα και -152G, -151G, -146G στην κωδική άλυσίδα[79]. Το μοριακό πρότυπο προστασίας των βάσεων γουανίνης των ISF1 και ISF2 επαγόμενων (από IFN-γ 3h) μεταγραφικών συμπλόκων παρουσιάζεται στην εικόνα 45Α.



Εικόνα 45Α: (Α): Πειράματα <u>παρεμβολής σύνδεσης λόγω μεθυλίωσης</u> των <u>ISF1</u> και <u>ISF2</u> επαγόμενων συμπλεγμάτων. Με Fs (Free sense) και Fa (Free antisense) συμβολίζουμε τα αδέσμευτα μόρια των ISR1 και ISR2 (cISR2) μεθυλιωμένων ανιχνευτών, ενώ με Bs και Ba τους συνδεδεμένους (bound) με τα ISF σύπλοκα και επιλεγμένους πληθυσμούς των ISR ραδιοσημασμένων ιχνηθετών.
(Β): Απεικόνιση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της εγγύς ρυθμιστικής περιοχής του Εθ υποκινητή (-170, -80). Οι μαύρες τελείες συμβολίζουν τις βάσεις γουανίνης που προστατεύονται, ενώ οι αγκύλες ISR1, ISR2 και Η προσδιορίζουν τα *cis*-λειτουργικά στοιχεία που χρησιμοποιήθηκαν για τις δοκιμές μεθυλίωσης και σύνδεσης. Ο όρος 'PROBE' αναφέρεται στον ραδιοσημασμένο μεθυλιωμένο ISR ανιχνευτή, ενώ ο όρος 'COMPLEX' υποδηλώνει το συνδεόμενο ISF επαγόμενο πυρηνικό σύμπλοκο (βλ. Γλωσσάριο).

Η ανάλυση της ISR3 *cis*-λειτουργικής περιοχής, καθώς και η ταυτοποίηση του μοριακού προτύπου προστασίας βάσεων, τόσο του επαγόμενου ISF3 όσο και του συστατικού C1 συμπλόκου της εικόνας 45Α, πραγματοποιήθηκε από την Δρ. Μ. Γρηγορίου[207] κατά την εκπόνηση της Διδακτορικής της Διατριβής. Η παράθεσή τους όμως διευκολύνει την συνολική εκτίμηση του βαθμού προστασίας του Εθ υποκινητή από τα τρία επαγόμενα ISF1, ISF2 και ISF3 σύμπλοκα[79], ενώ συγχρόνως βελτιώνει την τοπολογική αντίληψη της θέσης σύνδεσης των ISF1 και ISF2 μεταγραφικών συμπλόκων στην εγγύς ρυθμιστική περιοχή αυτού (Εθ).

Η περιοχή αλληλεπίδρασης του ISF2 πυρηνικού συμπλόκου επικαλύπτεται δομικά με το Η-συντηρημένο στοιχείο, το οποίον συνδέεται εκλεκτικά τόσο με το επαγόμενο ISF2 όσο και με το συστατικό σύμπλεγμα Η (εικόνα 42Α), το οποίον αναγνωρίζει (προστατεύει) τις βάσεις γουανίνης: -157G, -154G, -153G, -152G, -151G και -146G της κωδικής αλυσίδας του ISR2 (Η+ISR2) *cis*-στοιχείου. Το πρότυπο μοριακής προστασίας του υψηλής κινητικότητας Η συμπλόκου παρουσιάζεται στην εικόνα 45Β.



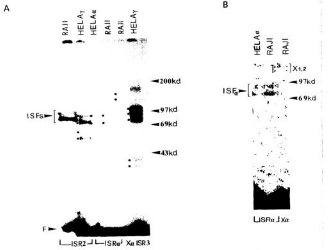
Εικόνα 45Β: Πρότυπο μοριακής προστασίας του Η συστατικού συμπλόκου της ISR2 (-162, -143) *cis*-ρυθμιστικής περιοχής. Οι -157G, -154G, -151G και -146G βάσεις γουανίνης παρουσιάζουν την ισχυρότερη αλληλεπίδραση (μεγάλες μαύρες βούλες). Οι όροι Fs και Bs συμβολίζουν τον αδέσμευτο και δεσμευμένο ραδιενεργό ανιχνευτή της κωδικής (sense) αλυσίδας αντίστοιχα.

Συμπερασματικά λοιπόν φαίνεται ότι το ISF2 επαγόμενο σύμπλοκο αναγνωρίζει την Η-συντηρημένη αλληλουχία καθώς και το 3΄ 'TGCA' χαρακτηριστικό μοτίβο των ISR *cis*-στοιχείων, ενώ το συστατικό σύμπλοκο Η εμφανίζει ένα ισχυρά επικαλυπτόμενο πρότυπο προστασίας, το οποίον εκτείνεται και λίγες βάσεις 5΄ του Η *cis*-στοιχείου (βλ. κεφάλαιο 8.10.).

8.7. Ανάλυση της μοριακής σύστασης του ISF2 επαγόμενου συμπλέγματος

Με σκοπό την ανάλυση της μοριακής σύστασης (αριθμού μελών συμπλόκου και αντίστοιχων μοριακών θαρών) των ISF2 επαγόμενων και Β-ιστοειδικών συμπλόκων πραγματοποιήθηκαν πειραματικές δοκιμές συνδυασμένης φωτοχημικής (UV/ Chemical) ομοιοπολικής σύνδεσης (βλ. κεφάλαιο 2.5. και Υλικά και Μέθοδοι, κεφάλαιο 2.3.5.), η οποία συνιστά μια καινούργια τεχνική που αναπτύξαμε *in vitro* και της οποίας τα βασικά πλεονεκτήματα αποτιμώνται τόσο στην αξιοπιστία του αναλυτικού προτύπου των EMSA αλληλεπιδράσεων, όσο και στο χαμηλό κόστος των συμβατικών αντιδραστηρίων που απαιτούνται για την εκτέλεσή της. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε, καθώς και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων που απαιτήθηκε, περιγράφεται λεπτομερώς στο κεφάλαιο 2.5., γι' αυτό και δεν αναφέρεται για την παρούσα δομική ανάλυση της μοριακής σύστασης του ISF2 συμπλόκου.

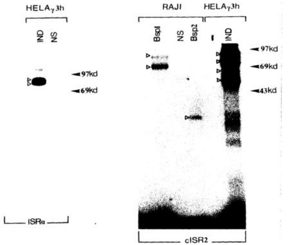
Για λόγους συγκριτικής μελέτης, το πρότυπο διαμοριακής σύνδεσης των ISF2 παραγόντων παρατίθεται μαζί με αυτό των ISRα (βλ. κεφάλαιο 2.5.) και των ISR3 επαγόμενων και Β-ιστοειδικών πυρηνικών συμπλόκων (εικόνα 46Α).



Εικόνα 46Α: Συγκριτική παρουσίαση του προτύπου διαμοριακής σύνδεσης (crosslinking) των ISFs (μαύρο βέλος και αγκύλη) συμπλόκων, προερχόμενων από την ειδική αλληλεπίδραση των υψηλά ραδιοσημασμένων ISR2, ISRα και ISR3 δίκλωνων περιοχών σύνδεσης με πυρηνικά εκχυλίσματα από Β-κύτταρα Raji ή από επαγόμενα με IFN-γ ή IFN-α για 3h HeLa κυτταρικές σειρές (αριστερό πήκτωμα). Το δεξί πήκτωμα αποτελεί μεγαλύτερη έκθεση του κεντρικού τμήματος του αριστερού και περιγράφεται αναλυτικά στην εικόνα 22. Το διαφορικό πρότυπο υψηλής κινητικότητας των Χα-συνδεόμενων πρωτεϊνών αποδεικνύει την αξιοπιστία της νέας τεχνικής· οι μαύρες τελείες καθορίζουν τις θέσεις μοριακής κινητικότητας του κάθε συστατικού παράγοντα του συμπλόκου, ενώ τα βέλη στο δεξί τμήμα του κάθε πηκτώματος τους μάρτυρες αναφοράς της σχετικής κινητικότητας.

Οπως προσδιορίσθηκε και για τα ISFα πυρηνικά συμπλέγματα, η κανονικοποίηση του μοριακού βάρους (MW) των ISF2 παραγόντων κατέδειξε την ύπαρξη δύο κοινών πρωτεϊνικών μορίων κινητικότητας ανάμεσα στα 60-80 kd, με μέσο μοριακό μέγεθος 75 kd και σχετική διαφορά μεταξύ τους περίπου 5 kd. Αν και το κάθε ομοιοπολικό σύμπλοκο εμφάνισε ιδιαίτερο πρότυπο διαμοριακής σύνδεσης (ποικίλο αριθμό πρωτεϊνικών παραγόντων), τόσο η Β-ιστοειδική όσο και η IFN-επαγόμενη μοριακή μορφή του ISF2 συμπλόκου, καθώς και οι αντίστοιχες των ISFα και ISF3, μοιράζονται την παρουσία δύο κοινών πρωτεϊνικών μορίων κινητικότητας μεταξύ 60-80 kd, γεγονός που ενισχύει την άποψη της δομικής και λειτουργικής ταυτοσημίας των ISF2, ISFα και ISF3 (αλλά και ISF1) μεταγραφικών παραγόντων μεταξύ τους.

Παρόμοιες μελέτες συνδυασμένης φωτοχημικής σύνδεσης της cISR2 *cis*-περιοχής με Raji και HeLa, IFN-γ 3h πυρηνικά εκχυλίσματα αποκάλυψαν την ύπαρξη κοινών 'διμερών' (ISF2) συμπλόκων των οποίων η μοριακή κινητικότητα κυμαινόταν μεταξύ 60-80 kd (εικόνα 46Β). Για λόγους συγκριτικής ανάλυσης παραθέτουμε παράλληλα το πρότυπο διαμοριακής σύνδεσης τόσο των ISRα/ISFα (εικόνα 22) όσο και των ISR2/ISF2 πυρηνικών συμπλόκων (εικόνα 46Β).



Εικόνα 46Β: Συγκριτική παρουσίαση του πρότυπου διαμοριακής (crosslinking) σύνδεσης των ISF2 και ISFα (μικρά άσπρα βέλη) συμπλόκων που αναγνωρίζουν τις cISR2 και ISRα *cis*-περιοχές σύνδεσης αντίστοιχα. Οι όροι IND και NS προσδιορίζουν τα επαγόμενα (INDUCIBLE) και τα μη ειδικά (Non Specific) συμπλέγματα (βλ. Γλωσσάριο), ενώ οι συμβολισμοί Bsp1,2 τις Β-ιστοειδικές (B-specific) μοριακές μορφές του ISF2 συμπλόκου. Το μικρό κάθετο μαύρο βέλος καθορίζει μια μη ειδική αλληλεπίδραση που παρατηρείται μόνο στις παρασκευαστικές EMSA δοκιμές, ενώ τα οριζόντια μεγάλα μαύρα βέλη τους μάρτυρες αναφοράς της σχετικής μοριακής κινητικότητας.

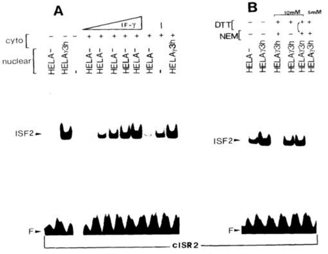
Η δομή και λειτουργική ταυτοσημία-ομολογία των ISFa και ISF2 συμπλόκων προσδιορίζεται από την ύπαρξη δύο κοινών πρωτεϊνικών παραγόντων συγκρίσιμης μοριακής κινητικότητας (μέσου μεγέθους 75 kd), οι οποίοι φαίνεται να συναντώνται τόσο στις B-ιστοειδικές όσο και τις IFN-επαγόμενες μοριακές μορφές των ISFs συμπλεγμάτων.

8.8. Διττή ενδοκυτταρική εντόπιση των ISF2 μεταγραφικών παραγόντων τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα

Παρασκευές κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, κεφάλαιο 2.3.1.) και επακόλουθες EMSA δοκιμές αλληλεπίδρασης αποκάλυψαν την ύπαρξη των ISF2 επαγόμενων συμπλόκων στο κυτταρόπλασμα, επιβεβαιώνοντας την άποψη της γρήγορης μετά-μεταφραστικής τροποποίησης (φωσφορυλίωσης) των ISF συμπλόκων στο κυτταρόπλασμα και της επακόλουθης μετακίνησής τους στον πυρήνα, όπου και συνδέονται εκλεκτικά στις ISR *cis*-αναγνωριστικές τους αλληλουχίες. Η διττή κυτταροπλασματική και πυρηνική εντόπιση των ISF2 επαγόμενων συμπλεγμάτων φαίνεται στην εικόνα 47Α.

Πρωταρχικά βιοχημικά πειράματα κατάργησης *in vitro* της ISF2 επαγόμενης ενεργότητας σύνδεσης από την δράση του αναγωγικού αλκυλιωτικού αναστολέα NEM (βλ. Γλωσσάριο) κατέδειξαν την απαίτηση ελεύθερων μη-οξειδωμένων -SH-σουλφυδριλικών ομάδων των κυστεϊνών, γεγονός που έχει παρατηρηθεί και σε άλλους μεταγραφικούς παράγοντες της IRF-οικογένειας, όπως η ISGF-3γ (p48) υπομονάδα[101]. Η υψηλή ευαισθησία του ISF2 κυτταροπλασματικού και πυρηνικού συμπλόκου στην δράση του NEM (5 mM) παράγοντα τον διαφοροποιεί λειτουργικά (ISF2) από την STAT1α (p91) μεταγραφική πρωτεΐνη, η οποία ως γνωστόν εμφανίζει υψηλή NEM-ανθεκτικότητα.

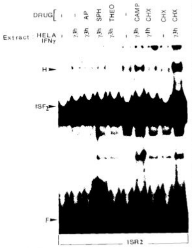
Η ευαισθησία της ISF2 ενεργότητας σύνδεσης σε χαμηλές (5-10 mM) συγκεντρώσεις του NEM αναστολέα περιγράφεται στην εικόνα 47Β.



Εικόνα 47: (A): Διττή ενδοκυτταρική εντόπιση σε κυτταρόπλασμα και πυρήνα των ISF2 επαγόμενων συμπλόκων (IFN-γ, 3h). Οι διάφοροι συνδυασμοί *in vitro* συνπροσθήκης κυτταροπλασματικών (cyto) και πυρηνικών (nuclear) εκχυλισμάτων αποδεικνύουν τόσο την υψηλή αντιπροσώπευση των ISF2 επαγόμενων συμπλόκων στο κυτταρόπλασμα όσο και την απουσία ενός ειδικού αναστολέα (inhibitor) στην μη επαγόμενη κατάσταση[80]. (B): Δοκιμές *in vitro* αναστολής της ISF2 ενεργότητας σύνδεσης από την δράση του NEM αναστολέα. Η διαδοχική προσθήκη NEM και DTT (10 mM) (βλ. Γλωσσάριο) εμφανίζεται κατασταλτική, ενώ η προσθήκη DTT και NEM δεν παρουσιάζει κανένα τιτλοδοτήσιμο φαινότυπο (μαύρο κυρτό βέλος). Με τον όρο F (Free) επισημαίνουμε τον αδέσμευτο ανιχνευτή (βλ. Γλωσσάριο).

8.9. Φαρμακοκινητικές μελέτες των ISF2 παραγόντων

Πειράματα EMSA αλληλεπίδρασης της ακραίας ραδιοσημασμένης ISR2 (H+ISR2) *cis*-περιοχής με πυρηνικά εκχυλίσματα (extracts) HeLa κυτταρικών σειρών επωασμένων με IFN-γ για 3h, παρουσία ενός μεγάλου αριθμού φαρμακοκινητικών αναστολέων, κατέδειξαν την ανθεκτικότητα του ISF2 επαγόμενου συμπλόκου σε όλους εξ αυτών, εμφανίζοντας συγχρόνως το εντυπωσιακό φαινόμενο της υπερεπαγωγής (superinduction) μετά την επίδραση της κυκλοεξειμίδης (CHX) στην επεξεργασμένη με IFN-γ για 3h HeLa κυτταρική καλλιέργεια (εικόνα 48).



Εικόνα 48: Φαρμακοκινητική (DRUG) ανάλυση της ISF2 επαγόμενης ενεργότητας σύνδεσης από την δράση των ακόλουθων αναστολέων: AP (2-αμινοπουρίνη: 50 μΜ), SPH (σφιγγοσίνη: 50 mM), THEO (θεοφιλίνη: 150 μgr/ml), CAMP (καμπτοθεκίνη: 50 μΜ) και CHX (κυκλοεξειμίδη: 50 μgr/ml) (βλ. Γλωσσάριο). Με τον συμβολισμό F (Free) επισημαίνουμε τον αδέσμευτο ανιχνευτή, ενώ με τον όρο 'EXTRACT' το πυρηνικό εκχύλισμα (βλ. Γλωσσάριο).

Η συστατική έκφραση του υψηλής κινητικότητας Η-συμπλόκου (Η) λειτουργεί σαν εσωτερικός μάρτυρας ελέγχου των ποσοτικών διαφορών των πυρηνικών παρασκευών μας, ενώ η φαρμακολογική μοριακή αντίσταση του ISF2 επαγόμενου συμπλόκου είναι εμφανής. Τόσο η ανθεκτικότητα του ISF2 συμπλέγματος όσο και η υπερεπαγωγή αυτού στην δράση της κυκλοεξιμίδης (CHX) αποδεικνύει ότι ο μηχανισμός IFN-επαγόμενης ενεργοποίησης σύνδεσης του ISF2 συμπλόκου είναι ανεξάρτητος από *de novo* πρωτεϊνοσύνθεση, ενώ συγχρόνως ενδεικνύει την ύπαρξη ενός ISR-συνδεόμενου καταστολέα, του οποίου η ενεργοποίηση φαίνεται να ρυθμίζεται στο μεταγραφικό επίπεδο (φαινόμενο υπερεπαγωγής μόνο στις 3h επώασης με IFN-γ).

8.10. Συζήτηση

Οι 5΄ σειριακές ελλείψεις καθώς και οι μεταλλαγές υποκατάστασης του Εβ υποκινητή αποκάλυψαν την ύπαρξη τριών νέων *cis*-λειτουργικών στοιχείων ονομαζόμενων ISR1, ISR2 και ISR3[79]. Επακόλουθη ανάλυση των -*trans*-μεταγραφικών παραγόντων, που αλληλεπιδρούν με τις ISR (Interferon Stimulated Region) περιοχές, ταυτοποίησε την παρουσία ισχυρά επαγόμενων πυρηνικών συμπλόκων αποκαλούμενων ISFs (Interferon Stimulated Factors). Τα ISF1 και ISF2 συμπλέγματα αναγνωρίζουν εκλεκτικά τα ISR1 και ISR2 *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία αντίστοιχα, τόσο με την Β-ιστοειδική τους (Raji, A_{20}) όσο και με την επαγόμενη μοριακή μορφή τους. Τα ISF1 και ISF2 επαγόμενα σύμπλοκα ενεργοποιούνται ταχύτατα από την δράση της IFN (γ ή α) και παραμένουν δραστικά και μετά από πολύωρη επώαση με αυτήν, γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι ο μηχανισμός ενεργοποίησης των ISF1,2 συμπλόκων βασίζεται σε μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις των συστατικών τους παραγόντων και όχι σε *de novo* πρωτεϊνική σύνθεση· η μοριακή ανθεκτικότητα του ISF2 επαγόμενου συμπλέγματος στην κατασταλτική δράση της κυκλοεξειμίδης επιβεβαιώνει τον προαναφερόμενο μηχανισμό.

Οι Β-ιστοειδικές (λεμφοειδικές) μορφές υψηλής συστατικής έκφρασης, καθώς και οι ισχυρά επαγόμενες από IFN μοριακές μορφές των ISF (1,2,3 και α)[2] μεταγραφικών συμπλόκων εμφανίζουν συγκρίσιμη συμπεριφορά όσον αφορά την μοριακή τους κινητικότητα, την αναγνώριση ομόλογων (ISR) και ετερόλογων *cis*-αλληλουχιών (ISRE/GASL), το πρότυπο μοριακής προστασίας βάσεων καθώς και το μοριακό προφίλ διαμοριακής σύνδεσης, γεγονός που μας επιτρέπει να ταξινομήσουμε τα ISF1, ISF2, ISF3 και ISFα πυρηνικά σύμπλοκα στην νέα οικογένεια των ISF μεταγραφικών παραγόντων[78,79]. Οι μοριακές ιδιότητες των ISF1 και ISF2 περιγράφονται ως ακολούθως:

ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΠΑΓΩΓΗΣ	ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ	ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ		ΜΟΡΙΑΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ	-*cis*-ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ
Γρήγορη, μικρότερη από 60΄	IFN-α/β IFN-γ (CHX)	Αμινοπουρίνη: Σφιγγοσίνη: Θεοφιλίνη: Καμπτοθεκίνη: Κυκλοεξειμίδη: NEM:	- - - - - +	‘Διμερές’	ISR ISRE GASL

Η ικανότητα των ISF1 επαγόμενων και Β-ιστοειδικών συμπλόκων να αναγνωρίζουν τις ISR1, ISR2, ISR3 και ISRα (βλ. κεφάλαιο 2) *cis*-περιοχές με εντυπωσιακά υψηλή συγγένεια σύνδεσης, καθώς και η δυνατότητα εκλεκτικής

[2] ISF3: αναλυτικά μελετούμενο σύμπλοκο από την Δρ. Μ. Γρηγορίου κατά την εκπόνηση της Διδακτορικής της Διατριβής[207].

αλληλεπίδρασης των ISF2 (B- και IFN-γ μοριακών μορφών) πυρηνικών συμπλεγμάτων με τα ISR2, ISR1 και ISRa *cis*-στοιχεία (βλ. κεφάλαιο 2), αποδίδεται στην υψηλή δομική ομολογία των ISR1, ISR2 και ISRa περιοχών, οι οποίες εμφανίζουν το χαρακτηριστικό ISR-μοτίβο του 'TGCA' τετρανουκλεοτιδικού πυρήνα (core). Η κατακόρυφη ευθυγράμμιση των ISR-αλληλουχιών εμφανίζεται ως ακολούθως:

ISR1:	A- CTGCAAGTTTCAGA
ISR2:	TTTCAGAAGGGGACCTGCAAg
cISR2:	GGACCTGCAAACTG
ISRa:	ACTAAATAGGACCTGGTTGCAAG
ISR- consensus:	5'-PyTGCAAPu-3'

Συγκριτική ανάλυση του προτύπου μοριακής προστασίας βάσεων των τριών ISF1, ISF2 και ISFa επαγόμενων από IFN-γ πυρηνικών συμπλόκων (βλ. κεφάλαιο 2.3. και 8.6.) αποκάλυψε την υψηλή δομική συντήρηση αυτού και στα τρία συμπλέγματα, εμφανίζοντας έναν ομόλογο κεντρικό 'TGCA' δομικό πυρήνα προστασίας, επιβεβαιώνοντας έτσι την άποψη ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες της ISF οικογένειας αναγνωρίζουν με υψηλή συγγένεια όλες τις δομικές παραλλαγές (versions) της ISR-'consensus' αλληλουχίας σύνδεσης, η οποία διαμορφώνεται με βάση ένα συντηρημένο 'TGCA' τετρανουκλεοτιδικό *cis*-στοιχείο.

Η ισχυρή αλληλεπίδραση των ISF1 και ISF2 πυρηνικών συμπλόκων με τις ISRE και GASL *cis*-περιοχές τα ταξινομεί στην μεγάλη οικογένεια των ISGF/GAF παραγόντων (βλ. Εισαγωγή, κεφάλαια 2.1., 2.2., 2.5. και 2.6.), ενώ η δυνατότητα εκλεκτικής αναγνώρισης υψηλής συγγένειας σύνδεσης των ISRa και ISR2 *cis*-περιοχών από τους επαγόμενους μεταγραφικούς παράγοντες ISGF1,2 (βλ. Εισαγωγή, κεφάλαιο 2.6.) αποκαλύπτει την υψηλή λειτουργική ομολογία (ενεργότητα σύνδεσης) των ISF και ISGF συμπλόκων. Με βάση τόσο την μοριακή συσχέτιση των ISFa και GAF2 επαγόμενων συμπλεγμάτων (βλ. κεφάλαιο 2.2.) όσο και την ικανότητα εκλεκτικής επαγόμενης (IFN-α) σύνδεσης των ISGF-3γ (p48) και STAT1α (p91) υπομονάδων στην ISRE *cis*-ρυθμιστική αλληλουχία[141,204], προτείνουμε ότι οι ISF1,2 μεταγραφικοί παράγοντες ανήκουν στην μεγάλη υπεροικογένεια των STAT-πρωτεϊνών, μερικά μέλη της οποίας (ISFs) εμφανίζουν υψηλή δυνατότητα αλληλεπίδρασης τόσο με τις ISR, όσο και με τις GASL/ISRE *cis*-αλληλουχίες.

Η έλλειψη σύνδεσης (ανταγωνισμού) του ISGF3 συμπλόκου στις ISRa και ISR2 περιοχές διαφοροποιεί τους ISF2 και ISGF-3γ παράγοντες, ενώ η NEM-ευαισθησία διακρίνει την STAT1α πρωτεΐνη από το ISF2 επαγόμενο σύμπλοκο[101]. Η μοριακή σύσταση των ISF2 συμπλεγμάτων (60-80 kd) τα ξεχωρίζει αδιαμφισβήτητα από τα μέχρι τώρα γνωστά μοριακά πρωτεϊνικά μέλη της IRF-οικογένειας, τα οποία εμφανίζουν χαμηλά μοριακά βάρη της τάξεως 35-50 kd[138-140,152,158,161-163].

Στηριζόμενοι στην δομική ομολογία των ISR *cis*-περιοχών, καθώς και στην υψηλή λειτουργική ομοιότητα των ISF1,2 και ISFα επαγόμενων συμπλόκων εισηγούμαστε τον ακόλουθο μηχανισμό μετάδοσης της μοριακής πληροφορίας του σήματος της IFN-γ από τον υποδοχέα της στον Εβ υποκινητή: α) σύνδεση της IFN-γ στον διαμεμβρανικό της υποδοχέα, β) ενεργοποίηση της JAK2 κινάσης της τυροσίνης, γ) επακόλουθη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση των κυτταροπλασματικά εντοπιζόμενων ISF1, ISF2 και ISF3 συμπλόκων, δ) μετακίνησή τους στον πυρήνα και διαδοχική σύνδεσή τους στις ISR αντίστοιχες αναγνωριστικές αλληλουχίες και ε) συνεργατική αλληλεπίδραση αυτών με τους υπόλοιπους *trans*-μεταγραφικούς παράγοντες του Εβ υποκινητή, όπως RFX, mXBP, CIITA, NF-Y, με τελικό μοριακό αποτέλεσμα την μεταγραφική ενεργοποίηση αυτού[5,60,61,63,77,84].

Η ύπαρξη τριών επαγόμενων ISF (1,2 και 3) πυρηνικών συμπλόκων στον Εβ υποκινητή (εικόνα 19) προσφέρει υψηλή λειτουργική ασφάλεια μεταγραφικής έναρξης (transcriptional safety), εκφράζοντας συγχρόνως την συνδυαστική φύση του υποκινητή, ο οποίος απαιτεί τουλάχιστον δύο διαφορετικά αλλά συνεργαζόμενα γεγονότα για την ενεργοποίησή του: α) την μέτα-μεταφραστική τροποποίηση των ISF1,2 και 3 μεταγραφικών παραγόντων και β) την *de novo* επαγόμενη από IFN-γ σύνθεση του CIITA μεταγραφικού ενεργοποιητή[76,77,84].

Η δυνατότητα συντονισμένης έκφρασης των Εα και Εβ τάξης ΙΙ αντιγόνων στην μεμβράνη, φαίνεται να ρυθμίζεται από την παρουσία ομόλογων ISR *cis*-στοιχείων στους αντίστοιχους υποκινητές, τα οποία αλληλεπιδρούν εκλεκτικά με τους ομόλογους ISF μεταγραφικούς τους παράγοντες, των οποίων η συντονισμένη ενεργοποίηση (Β-ιστοειδική ή IFN-γ επαγόμενη) διαμορφώνει - σε συνεργασία πιθανώς με την CIITA πρωτεΐνη[84] - την απαιτούμενη μοριακή βάση της ανοσολογικής απάντησης έναντι εξωγενών αντιγόνων.

Ο εκτενής σχολιασμός των ISF παραγόντων (1,2,3 και α) παρατίθεται στην συζήτηση του κεφαλαίου 2 (2.9.), όπου και αναλύεται τόσο η σχέση ISF-STAT, όσο και η λειτουργική συμμετοχή των ISF συμπλόκων στην Β-ιστοειδική και επαγόμενη από IFN-γ μεταγραφική ενεργοποίηση των τάξης ΙΙ υποκινητών.

9. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΝΕΩΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΩΝ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΩΝ ΣΤΙΣ ISR2 ΚΑΙ ISR3 ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΟΥ Ε6 ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΡΕΤΙΝΟΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (R.A.) ΣΕ ΕΜΒΡΥΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

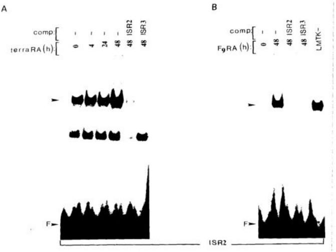
Με στόχο την *in vitro* ανίχνευση επαγόμενων από ρετινοϊκό οξύ (Retinoic Acid: R.A.) πυρηνικών συμπλόκων στην εγγύς ρυθμιστική περιοχή του Ε6 υποκινητή, πραγματοποιήθηκαν EMSA δοκιμές των ISR2 και ISR3 *cis*-στοιχείων με την χρήση πυρηνικών εκχυλισμάτων N-tera2 και F_9 εμβρυϊκών κυτταρικών σειρών (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, κεφάλαιο 1.4.).

9.1. Κινητική μελέτη της εμφάνισης των επαγόμενων από ρετινοϊκό οξύ (R.A.) μεταγραφικών συμπλόκων

9.1.1. *Η ISR2 περιοχή*

Η συνεπώαση της ακραίας ραδιοσημασμένης ISR2 *cis*-περιοχής με πλήθος πυρηνικών εκχυλισμάτων N-tera2 εμβρυϊκών κυτταρικών σειρών, επεξεργασμένων με R.A. από 4-48h αποκάλυψε την ύπαρξη ενός επαγόμενου συμπλόκου, το οποίον εμφάνιζε υψηλή συγγένεια σύνδεσης για το ISR2 *cis*-στοιχείο. Η ειδικότητα της διαμοριακής αλληλεπίδρασης αποδείχθηκε με πειράματα κρύου ανταγωνισμού 50x της ISR2 περιοχής, ενώ η λειτουργική ομολογία των ISR2 και ISR3 στοιχείων με την ταυτόχρονη προσθήκη 50 ngr (50x) της ISR3 μη ραδιοσημασμένης περιοχής (εικόνα 49Α). Η μοριακή συγκέντρωση του R.A. ήταν $5x10^{-7}$ σε διαμόρφωση 'all-trans' (SIGMA). Παρόμοιες δοκιμές EMSA πραγματοποιήθηκαν και με την χρήση πυρηνικών εκχυλισμάτων F_9 κυτταρικών σειρών επωασμένων με R.A. για 48h (εικόνα 49Β).

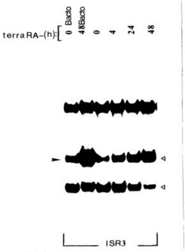
Το ισχυρό επαγόμενο σύμπλοκο που παρατηρείται σε πυρηνικά εκχυλίσματα F_9 εμβρυϊκών σειρών επωασμένων με R.A. για 48h εμφανίζει υψηλή συγγένεια σύνδεσης για τις ISR2 και ISR3 περιοχές, ενώ η μοριακή του κινητικότητα παρουσιάζεται ταυτόσημη με αυτή του N-tera2 επαγόμενου συμπλέγματος. Σαν θετικοί μάρτυρες της αλληλεπίδρασης χρησιμοποιήθηκαν πυρηνικά εκχυλίσματα $LMTK^-$ ινοβλαστικών σειρών, τα οποία κατέδειξαν υψηλή συστατική ενεργότητα σύνδεσης με την ISR2 περιοχή.



Εικόνα 49: EMSA δοκιμές της ISR2 *cis*-περιοχής με την χρήση πυρηνικών εκχυλισμάτων N-tera2 (A) και F_9 (B) κυτταρικών σειρών επωασμένων με ρετινοϊκό οξύ (R.A.) για διαφορετικούς χρόνους 4-48h. Ο όρος F (Free) υποδηλώνει τον αδέσμευτο ανιχνευτή, ενώ ο όρος comp (competitor) τον κρύο ανταγωνιστή. Το μαύρο μικρό βέλος προσδιορίζει την θέση μοριακής κινητικότητας του επαγόμενου συμπλέγματος.

9.1.2. *Η ISR3 περιοχή*

Συνεπώαση πυρηνικών εκχυλισμάτων N-tera2 εμβρυϊκών κυτταρικών σειρών, οι οποίες αναπτύχθηκαν σε στερεό τροποποιημένο βακτηριακό μέσο (Bacto) παρουσία R.A. για χρόνο 48h, με την ραδιοσημασμένη ISR3 *cis*-περιοχή, κατέδειξαν την ύπαρξη ενός ισχυρά επαγόμενου πυρηνικού συμπλόκου (μαύρο βέλος εικόνας 50) υψηλής συγγένειας σύνδεσης για το ISR3 *cis*-στοιχείο. Η συστατική έκφραση των υπόλοιπων πυρηνικών συμπλεγμάτων αποτελεί τον ποσοτικό μάρτυρα ελέγχου των διαφορών των πυρηνικών μας παρασκευών (εικόνα 50). Επακόλουθη παρασκευή πυρηνικών εκχυλισμάτων N-tera2 εμβρυϊκών σειρών επωασμένων με R.A. για χρόνους 4-48h, αποκάλυψε την ύπαρξη ενός ομόλογου ισχυρά επαγόμενου συμπλόκου με υψηλή συγγένεια σύνδεσης για την ISR3 *cis*-περιοχή (εικόνα 50).



Εικόνα 50: EMSA δοκιμές της ISR3 *cis*-περιοχής με την χρήση πυρηνικών εκχυλισμάτων N-tera2 εμβρυϊκών κυττάρων επωασμένων με ρετινοϊκό οξύ (R.A.) για διαφορετικούς χρόνους (βλ. κείμενο). Το επαγόμενο σύμπλοκο (μαύρο βέλος) είναι προφανές και στα δύο είδη πυρηνικών εκχυλισμάτων. Τα δύο άσπρα βέλη προσδιορίζουν τα αλληλοσυσχετιζόμενα λειτουργικά πυρηνικά σύμπλοκα, ενώ το 'επάνω' άσπρο βέλος καταδεικνύει το επαγόμενο από R.A. σύμπλεγμα.

Το σύμπλοκο υψηλής συστατικής έκφασης (constitutive complex) και μοριακής κινητικότητας λειτουργεί σαν εσωτερικός μάρτυρας ποσοτικού ελέγχου των διαφορών των πυρηνικών μας παρασκευών, ενώ η αντίστροφη σχέση της ενεργότητας σύνδεσης των συμπλόκων που προσδιορίζονται από τα δύο άσπρα βέλη της εικόνας 50, επιβεβαιώνει την υπόθεση της λειτουργικής τους ομολογίας, υποστηρίζοντας τον μηχανισμό του επαγόμενου από R.A. ετεροδιμερισμού του 'επάνω' συμπλόκου μέσω της τιτλοδότησης σύνδεσης των συστατικών παραγόντων του 'κάτω' πυρηνικού συμπλέγματος.

9.2. Αντιγονική ομοιότητα του CF-1 μεταγραφικού παράγοντα με το επαγόμενο απο R.A. πυρηνικό σύμπλεγμα της ISR2 περιοχής

In vitro προεπώαση των πυρηνικών εκχυλισμάτων, N-tera2 κυτταρικών σειρών επεξεργασμένων με R.A. για 48h, με 1 μl και 3 μl αντίστοιχα πολυκλωνικού αντιορού (1 μgr/μl) του CF-1 χοριονικού μεταγραφικού παράγοντα[219] για 30΄ στους 4°C και επακόλουθη προσθήκη του ISR2 ραδιενεργού ανιχνευτή αποκάλυψε την αντιγονική ομολογία της CF-1 πρωτεΐνης και του επαγόμενου από R.A. συμπλόκου της ISR2 περιοχής (τουλάχιστον του παράγοντα σύνδεσης), αφού οδήγησε στην πλήρη εξαφάνιση αυτού (εικόνα 51).

Εικόνα 51: Κατασταλτική δράση του αντισώματος του CF-1 μεταγραφικού παράγοντα (A/B: CF-1: βλ. Γλωσσάριο) στον μοριακό σχηματισμό του επαγόμενου από ρετινοϊκό οξύ (R.A.) συμπλόκου της ISR2 *cis*-περιοχής. Με τον όρο F (Free) συμβολίζεται ο αδέσμευτος ραδιενεργός ανιχνευτής, ενώ με τον όρο comp (competitor) ο κρύος ανταγωνιστής. Ως 'pr' (preimmune: βλ. Γλωσσάριο) επισημαίνουμε τον πολυκλωνικό αντιορό προ της ανοσοποίησης· το μαύρο μικρό βέλος προσδιορίζει το επαγόμενο σύμπλεγμα από R.A.

Η ισχυρή καταστολή της ενεργότητας σύνδεσης του επαγόμενου από R.A. πυρηνικού συμπλόκου της ISR2 *cis*-περιοχής από την δράση του CF-1 πολυκλωνικού αντιορού είναι εμφανής και στις δύο μοριακές συγκεντρώσεις του αντισώματος, ενώ η ειδικότητα της αναστολής αποδεικνύεται με την χρήση μη ανοσοποιημένου αντιορού, ο οποίος δεν εμφανίζει κανένα τιτλοδοτημένο φαινότυπο. Η υψηλή συγγένεια της επαγόμενης αλληλεπίδρασης σύνδεσης ελέγχεται με δοκιμές 'κρύου ανταγωνισμού' 50 ngr (50x) της μη ραδιοσημασμένης ISR2 περιοχής.

9.3. Συζήτηση

Η μεταγραφική ενεργοποίηση των τάξης I γονιδίων σε N-tera2 εμβρυϊκές τερατοκαρκινικές σειρές, μετά την συνεχή επεξεργασία αυτών με ρετινοϊκό οξύ, αποδίδεται τόσο στην *de novo* μεταγραφική σύνθεση των p50/p65 συστατικών υπομονάδων του NFκB παράγοντα, όσο και στον επαγόμενο μοριακό σχηματισμό του ετεροδιμερούς συμπλόκου RARθ/RXRθ[198,199] (Retinoic Acid Receptor: υποδοχέας ρετινοϊκού οξέος).

Ο μεταγραφικός παράγοντας RXRθ (H-2RIIBP) εκφράζεται συνεχώς τόσο σε αδιαφοροποίητα όσο και σε διαφοροποιημένα (παρουσία R.A.) εμβρυϊκά κύτταρα και αλληλεπιδρά ειδικά με την GG(T/A)CA *cis*-ρυθμιστική αλληλουχία της εγγύς περιοχής των τάξης I υποκινητών, χωρίς όμως να ενεργοποιεί μεταγραφικά το αντίστοιχο γονίδιο στόχο[198]. Η επαγόμενη από R.A. *de novo* μεταγραφική ενεργοποίηση του RARθ γονιδίου[201] οδηγεί στην σύνθεση ετεροδιμερών πρωτεϊνικών συμπλόκων RARθ/RXRθ, τα οποία εμφανίζουν ένα υψηλό δυναμικό μεταγραφικής ενεργοποίησης του τάξης I υποκινητή[198,199,221].

Με βάση λοιπόν την ομολογία της επαγόμενης από IFN-γ γονιδιακής συμπεριφοράς των τάξης I και II υποκινητών, προτείνουμε την ύπαρξη παρόμοιων ρυθμιστικών μηχανισμών ελέγχου της επαγόμενης από R.A. μεταγραφικής ενεργοποίησης των τάξης I και II γονιδίων.

Υποστηρίζουμε λοιπόν την άποψη ότι το επαγόμενο από R.A. πυρηνικό σύμπλοκο, που αναγνωρίζει με υψηλή συγγένεια σύνδεσης τα ISR2 και ISR3 *cis*-στοιχεία, διαμορφώνεται από τον μοριακό ετεροδιμερισμό της RXRθ (H-2RIIBP) πρωτεΐνης με κάποιο άλλο (RARθ) μέλος της οικογένειας των υποδοχέων του ρετινοϊκού οξέος (RAR)[201,202].

Η αντιγονική αναγνώριση του επαγόμενου από R.A. συμπλέγματος από αντίσωμα έναντι του Δροσοφιλικού ομόλογου (CF-1) του H-2RIIBP υποδοχέα[219], επιβεβαιώνει την άποψη της ενεργούς λειτουργικής συμμετοχής της RXRθ πρωτεΐνης στον μοριακό σχηματισμό των επαγόμενων από R.A. πυρηνικών συμπλόκων του Eθ υποκινητή.

Ο σύγχρονος υψηλός βαθμός επαγόμενης από R.A. δραστικότητας σύνδεσης των N-tera2 και F_9 πυρηνικών συμπλόκων στις ISR *cis*-περιοχές του Eθ υποκινητή ενισχύει τον μηχανισμό της εκλεκτικής μεταγραφικής σύνθεσης και μεμβρανικής 'έκκρισης' των τάξης I και II αντιγόνων, μετά την κυτταροδιαφοροποιητική δράση του R.A. σε εμβρυϊκές τερατοκαρκινικές σειρές. Ο υψηλός μάλιστα βαθμός επαγωγής του πυρηνικού συμπλόκου, που αναγνωρίζει την ISR3 *cis*-περιοχή, μετά από επίδραση R.A. σε N-tera2 'θακτηριακά' μεγαλωμένες καλλιέργειες - όπου προκαλείται υψηλός βαθμός συσσωμάτωσης και κυτταρικής διαφοροποίησης -, επιβεβαιώνει την υπόθεση ότι η επαγόμενη από R.A. μεταγραφική ενεργοποίηση των τάξης II υποκινητών συνιστά ένα σημαντικό λειτουργικό μοριακό δείκτη ρυθμιστικού ελέγχου του βαθμού κυτταρικής διαφοροποίησης εμβρυϊκών τερατοκαρκινικών σειρών, μετά την συνεχή δράση του ρετινοϊκού οξέος (R.A.). Η αντίστροφη ποσοτική συσχέτιση της ενεργότητας σύνδεσης του 'χαμηλής' κινητικότητας και συστατικής έκφρασης και του επαγόμενου από R.A. 'υψηλής' κινητικότητας πυρηνικού συμπλόκου της ISR3 *cis*-περιοχής (εικόνα 50) επιβεβαιώνει το μοριακό μοντέλο του επαγόμενου ετεροδιμερούς, το οποίον εμπεριέχει σαν βασική συστατική υπομονάδα του τον H-2RIIBP μεταγραφικό παράγοντα[198].

Η δομική ομολογία των ISR2 και ISR3 *cis*-στοιχείων με την περιοχή αλληλεπίδρασης του RXRβ πρωτεϊνικού παράγοντα συνιστά ένα ακόμη συνοδευτικό ενδεικτικό στοιχείο της ενεργούς λειτουργικής συμμετοχής της H-2RIIBP (RXRβ) υπομονάδας στους μοριακούς μηχανισμούς μεταγραφικής ενεργοποίησης των τάξης II γονιδίων από την διαφοροποιό δράση του ρετινοϊκού οξέος (εικόνα 52).

H-2RIIBP	:	aGG(A/T)CA
ISR2	:	gGG A CC
ISR3	:	tGA A TC
Consensus	:	5΄-NGPuAPy N-3΄

Εικόνα 52: Κάθετη στοίχιση των ISR2, ISR3 και των *cis*-αλληλουχιών σύνδεσης του H-2RIIBP (RXRβ) μεταγραφικού παράγοντα. Η κοινή-ομόλογη αλληλουχία (consensus) - NGPuAPyN - είναι προφανής.

Το τελικό μηχανιστικό μοντέλο που προτείνουμε δίδεται ως ακολούθως: α) κυτταρική διαφοροποίηση των εμβρυϊκών κυτταρικών σειρών μετά από συνεχή επώαση με ρετινοϊκό οξύ, η οποία συνοδεύεται από την β) *de novo* μεταγραφική ενεργοποίηση ενός μέλους της οικογένειας των υποδοχέων του ρετινοϊκού οξέος (RARβ), το οποίον γ) δημιουργεί ενεργά ετεροδιμερή μεταγραφικά σύμπλοκα με την RXRβ υπομονάδα συστατικής έκφρασης και το οποίον τελικά, δ) εμφανίζοντας τροποποιημένες συγγένειες σύνδεσης, αναγνωρίζει τις ISR2 και ISR3 *cis*-περιοχές και ενεργοποιεί μεταγραφικά τον Εβ υποκινητή (η επαγόμενη από R.A. μεταγραφική σύνθεση των τάξης II mRNAs δεν έχει ακόμα αποδειχθεί για κανένα από τα μέλη της οικογένειας).

10. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ Ε1Α ΟΓΚΟΑΝΤΙΓΟΝΟΥ ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ Εα ΓΟΝΙΔΙΟΥ

Με στόχο την λειτουργική μελέτη της συνέπειας της υπερέκφρασης του Ε1Α ογκοαντιγόνου στην επαγόμενη από IFN-γ μεταγραφική ενεργότητα του Εα υποκινητή πραγματοποιήθηκαν πειράματα παροδικής συνδιαμόλυνσης καθώς και EMSA *in vitro* δοκιμές σύνδεσης τα οποία αναλύονται ως ακολούθως:

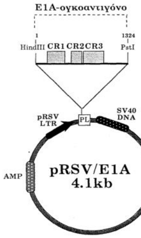
10.1. Πλασμιδιακές κατασκευές

10.1.1. *Ο ανασυνδυασμένος φορέας Ea (-140, +14) CAT*

Τόσο ο τρόπος κλωνοποίησης όσο και η μοριακή οργάνωση της Ea (-140, +14) CAT ανασυνδυασμένης κατασκευής περιγράφονται αναλυτικά στο κεφάλαιο 3.1.1.

10.1.2. *Οι ανασυνδυασμένοι φορείς RSV(LTR)-E1A και RSV(LTR)E1A:dlCR1*

Με σκοπό την υπερέκφραση του E1A ογκοαντιγόνου σε δοκιμές παροδικής διαμόλυνσης χρησιμοποιήθηκε ο φορέας RSV(LTR)-E1A, ο οποίος κωδικοποιεί για την υψηλή σύνθεση του ιϊκού αντιγόνου E1A του αδενοϊού τύπου-5 (Ad5). Το τμήμα του γενώματος του Ad5 ιού το οποίον ευθύνεται για την παραγωγή της E1A ογκοπρωτεΐνης κλωνοποιήθηκε μετά τον υποκινητή-ενισχυτή του RSV ρετροϊού, (pRSV-LTR: βλ. Γλωσσάριο) στις Hind III και Pst I περιοριστικές αναγνωριστικές θέσεις. Η ικανότητα της RSV-LTR ρυθμιστικής περιοχής να προσφέρει υψηλή μεταγραφική δραστηριότητα στο ετερόλογο γονίδιο αναφοράς της είχε ως αποτέλεσμα την υπερέκφραση του E1A ογκοαντιγόνου και επακόλουθα την αρνητική τιτλοδότηση των ενδοκυτταρικών φυσιολογικών μηχανισμών στόχων. Η μοριακή περιγραφή της RSV(LTR)-E1A ανασυνδυασμένης κατασκευής φαίνεται στην εικόνα 53.



Εικόνα 53: Μοριακή οργάνωση της δομής του pRSV/E1A (4,1 kb) ανασυνδυασμένου φορέα. Τα CR1, CR2 και CR3 συμβολίζουν τις διακριτές λειτουργικές περιοχές του E1A ογκοαντιγόνου.

Ο φορέας RSV(LTR)-E1A:dlCR1, προέρχεται από τον πατρικό φορέα RSV(LTR)-E1A, έχοντας όμως απομακρύνει την CR1 (22-118αα) ρυθμιστική περιοχή. Η περαιτέρω μελέτη της συμπεριφοράς διαφόρων κατασκευών του E1A ογκοαντιγόνου αποτελεί την βασική ερευνητική θεματολογία της υποψήφιας Διδάκτορος Θ. Αγαλιώτη, γι' αυτό και δεν αναλύεται παραπάνω στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή.

10.2. Πειράματα παροδικής διαμόλυνσης

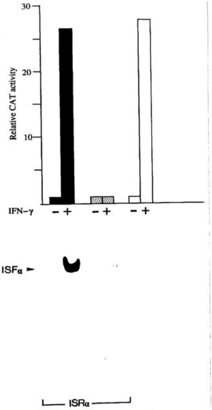
Ολα τα πειράματα παροδικής συνδιαμόλυνσης των Εα (-140, +14) CAT και RSV(LTR)-E1A ανασυνδυασμένων κατασκευών σε HeLa κυτταρικές σειρές παρουσία IFN-γ (100 u/ml) (βλ. κεφάλαιο 3.2.) κατέδειξαν την ισχυρή κατασταλτική δραστικότητα της υπερέκφρασης του E1A ογκοαντιγόνου στην επαγόμενη από IFN-γ μεταγραφική ενεργότητα της εγγύς ρυθμιστικής περιοχής του Εα υποκινητή (-140, +14). Η ειδικότητα της μεταγραφικής αναστολής (transcriptional inhibition) αποδείχθηκε με την χρήση της RSV(LTR)E1A:dlCR1 κατασκευής, όπου η υπερέκφραση της μεταλλαγμένης μοριακής μορφής του E1A ογκοαντιγόνου αδυνατούσε να τιτλοδοτήσει αρνητικά τους ενδοκυτταρικούς μηχανισμούς μεταγραφικής επαγωγής του Εα υποκινητή, αποδεικνύοντας έτσι την αναγκαιότητα της ύπαρξης της δομικά άθικτης CR1 περιοχής για την παρεμπόδιση της μετάδοσης του μοριακού σήματος της IFN-γ από τον διαμεμβρανικό υποδοχέα της στον γονιδιακό υποκινητή στόχο (εικόνα 54).

Ολες οι δοκιμές παροδικής συνδιαμόλυνσης πραγματοποιήθηκαν όπως ακριβώς περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.2., ενώ σαν μάρτυρας του βαθμού διαμόλυνσης χρησιμοποιήθηκε η κατασκευή pCMV$_{\beta}$-lacZ. Η μέση απόκλιση των τελικών τιμών των πειραμάτων παροδικής διαμόλυνσης δεν ξεπερνούσε το 10%, γι' αυτό και δεν αναγράφεται στο διάγραμμα της εικόνας 54.

10.3. Καταστολή της ενεργότητας σύνδεσης του ISFα επαγόμενου συμπλόκου στην ISRα περιοχή από την υπερέκφραση του E1A ογκοαντιγόνου

In vitro EMSA δοκιμές σύνδεσης της ISRα ακραία ραδιοσημασμένης *cis*-περιοχής του Εα υποκινητή με συνολικά κυτταρικά εκχυλίσματα[108,213] HeLa κυτταρικών σειρών, παροδικά προδιαμολυσμένων με την RSV(LTR)-E1A ανασυνδυασμένη κατασκευή υπερέκφρασης του E1A ογκοαντιγόνου παρουσία IFN-γ, αποκάλυψαν την εξάρτηση της ενεργότητας σύνδεσης του ISFα επαγόμενου συμπλόκου από την παρουσία της E1A ογκοπρωτεΐνης.

Το υψηλά επαγόμενο από IFN-γ ISFα μεταγραφικό σύμπλοκο καταστέλεται ισχυρά από την υπερέκφραση του E1A ιϊκού αντιγόνου, φαινόμενο που σχετίζεται με την βασική μηχανιστική μοριακή αντίληψη της κατάργησης της επαγόμενης μεταγραφικής ενεργότητας του Εα υποκινητή από την δράση της E1A ογκοπρωτεΐνης (εικόνα 54).



Εικόνα 54: Επάνω τμήμα: Διαγραμματική απεικόνιση της σχετικής CAT-μεταγραφικής ενεργότητας της Εα (-140, +14) CAT ανασυνδυασμένης κατασκευής: α) παρουσία IFN-γ (μαύρη στήλη), β) παρουσία IFN-γ καθώς και του RSV(LTR)-E1A ανασυνδυασμένου φορέα υπερέκφρασης E1A ογκοαντιγόνου (μαύρη στικτή στήλη) και γ) παρουσία IFN-γ και της RSV(LTR)-E1A:dlCR1 μεταλλαγμένης κατασκευής (λευκή στήλη). Με τον όρο 'Relative CAT activity' υποδηλώνουμε την CAT-σχετική ενεργότητα.
Κάτω τμήμα: EMSA δοκιμές σύνδεσης της ISRα ραδιοσημασμένης περιοχής με συνολικά κυτταρικά εκχυλίσματα HeLa σειρών επωασμένων με IFN-γ (δεύτερο και τέταρτο δείγμα απο αριστερά), απουσία (δεύτερο δείγμα) ή παρουσία (τρίτο και τέταρτο δείγμα) της ανασυνδυασμένης κατασκευής RSV(LTR)-E1A. Με τον όρο F (Free) υποδηλώνουμε τον αδέσμευτο ραδιενεργό ανιχνευτή.

10.4. Συζήτηση

Η υψηλή ογκογενετική δραστηριότητα του E1A αντιγόνου του Ad5 ιού αποδίδεται στην ικανότητά του να απορρυθμίζει τους μοριακούς μηχανισμούς ελέγχου των κυτταρικών μιτωτικών διαιρέσεων και να καταστέλει την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή στην παρουσία εξωγενών ιϊκών αντιγόνων (βλ. Εισαγωγή, κεφάλαιο 3)[191,193,194].

Η κατάργηση της ικανότητας σύνδεσης της p48 (ISGF-3γ) συστατικής υπομονάδας του ISGF-3 υπερσυμπλόκου στην ISRE *cis*-αλληλουχία μετά την υπερέκφραση του E1A ογκοαντιγόνου αποτελεί τον κυριότερο μοριακό μηχανισμό αναστολής της επαγόμενης από IFN μεταγραφικής ενεργοποίησης των τάξης I γονιδίων μετά από ιϊκή μόλυνση με αδενοϊό HeLa κυτταρικών σειρών[187,188]. Η υπερέκφραση της E1A ογκοπρωτεΐνης φάνηκε να επεμβαίνει κατασταλτικά και στο μονοπάτι μετάδοσης του σήματος της IL-6 από τον διαμεμβρανικό υποδοχέα της στον υποκινητή στόχο, μέσω αναστολής τόσο της πρωτεϊνικής αντιπροσώπευσης όσο και του βαθμού αυτοσυγκρότησης των STAT1α, STAT1β, STAT2 και STAT3 μεταγραφικών παραγόντων[226]. Η υπεύθυνη λειτουργική περιοχή της E1A ογκοπρωτεΐνης που απαιτείται για την μοριακή περεμπόδιση (interference) της μεταβίβασης της πληροφορίας των λεμφοκινών IFN-γ/α και IL-6 αποκαλύφθηκε να είναι ο CR1 (22-188αα) δομικός πυρήνας[188,226].

Η παρούσα ερευνητική μελέτη περιγράφει έναν ακόμα μηχανισμό καταστολής της ανοσολογικής άμυνας του κυττάρου ξενιστή από την μολυσματική δράση παθογόνων αδενοϊών. Η υπερέκφραση του E1A ογκοαντιγόνου αναστέλει την ενεργότητα σύνδεσης των ISFα επαγόμενων συμπλόκων στις ISRα αναγνωριστικές τους αλληλουχίες με τελικό αποτέλεσμα την ισχυρή καταστολή της μεταγραφικής απόκρισης του Eα υποκινητή στην IFN-γ παρουσία της E1A ογκοπρωτεΐνης. Η χρήση της RSV(LTR)-E1A:dlCR1 ανασυνδυασμένης μεταλλαγμένης κατασκευής επιβεβαίωσε την άποψη της ενεργού συμμετοχής της CR1 περιοχής στον μηχανισμό καταστολής της ανοσολογικής κυτταρικής απόκρισης. Η αδυναμία μεμβρανικής 'έκκρισης' τάξης II αντιγόνων διαμορφώνει έναν ανοσοανεπαρκή φαινότυπο, ο οποίος καθοδηγεί την μοριακή διαφυγή του Ad5 ιού από τους μηχανισμούς ανοσολογικής άμυνας του ξενιστή και την επακόλουθη παραγωγή μεγάλου αριθμού ιϊκών σωματιδίων.

Η ισχυρή καταστολή της ενεργότητας σύνδεσης του ISFα επαγόμενου συμπλόκου αποδίδεται στις παρακάτω διακριτές μοριακές αιτίες (οι οποίες μπορούν και να συνυπάρχουν): α) E1A-επαγόμενη καταστολή της *de novo* μεταγραφικής ενεργοποίησης των ISFα γονιδίων, β) E1A-εξαρτώμενη κατάργηση του μηχανισμού φωσφορυλίωσης και επακόλουθης ενεργοποίησης των ISFα συμπλόκων και γ) έμμεση ή άμεση E1A-κατευθυνόμενη ενεργοποίηση ενός κυτταρικού παράγοντα (host cell factor), ο οποίος αποσταθεροποιεί το διαμοριακό σύμπλοκο ISFα/ISRα, εκδιώχνοντας τους ISFα παράγοντες από την ISRα *cis*-αναγνωριστική τους αλληλουχία σύνδεσης.

Ενας, μάλιστα, προτεινόμενος μηχανισμός για την καταστολή της IFN-επαγόμενης μεταγραφικής ενεργότητας των ISGs γονιδίων σε νεοπλαστικές σειρές επιθηλίου τραχήλου μήτρας είναι η ενεργοποίηση ενός πρωτεϊνικού μορίου ΤΚΟ (Transcriptional Knockout) 19 kd, το οποίον δημιουργεί ανενεργά ετεροδιμερή σύμπλοκα με τους IRF-1 και p48 (ISGF-3γ) μεταγραφικούς παράγοντες, αποκλείοντας έτσι την σύνδεση αυτών στην ISRE *cis*-ρυθμιστική τους αλληλουχία. Η αιτιακή μοριακή συσχέτιση της υπερέκφρασης του H_7 ογκοαντιγόνου, το οποίον προκαλεί το νεοπλαστικό φαινότυπο, με τον μηχανισμό ενεργοποίησης του ΤΚΟ μεταγραφικού παράγοντα παραμένει ακόμη άγνωστη και διερευνάται[124].

Ο τελικός μοριακός μηχανισμός που προτείνεται για την καταστολή της ανοσοαπόκρισης των κυττάρων του ξενιστή στην ογκογόνο δράση του Ad5 αδενοϊού βασίζεται στην έμμεση ή άμεση λειτουργική αρνητική τιτλοδότηση των ISF μεταγραφικών παραγόντων μετά την υπερέκφραση της E1A ογκοπρωτεΐνης, με τελικό αποτέλεσμα την καταστολή της επαγόμενης από IFN-γ μεταγραφικής ενεργότητας των τάξης II γονιδιακών υποκινητών.

Γενικεύοντας το μοριακό μοντέλο, προτείνουμε την E1A εξαρτώμενη λειτουργική αναστολή σύνδεσης ή μεταγραφικής ενεργοποίησης μερικών μελών της STAT-οικογένειας (STAT1, STAT3)[226], που σαν αποτέλεσμα έχει την συνολική αποδιοργάνωση των ρυθμιστικών μηχανισμών ελέγχου του ανοσολογικού συστήματος.

Η αρνητική τιτλοδότηση των ISF, STAT μεταγραφικών συμπλόκων από την λειτουργική δράση του CR1 δομικού πυρήνα του E1A ογκοαντιγόνου θα μπορούσε να αποδοθεί είτε α) σε μια άμεση διαμοριακή αλληλεπίδραση (E1A-ISF/STAT) τύπου E1A-ATF2[216] είτε β) σε έμμεσους κατασταλτικούς μηχανισμούς με πιθανή συμμετοχή του κυτταρικού παράγοντα p300[218] (βλ. Εισαγωγή, κεφάλαιο 3).

11. ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΜΟΡΙΑΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη (βλ. Αποτελέσματα-Συζήτηση, κεφάλαια 1-7) αποκαλύπτουμε τον μοριακό μηχανισμό μετάδοσης του σήματος της IFN-γ από τον διαμεμβρανικό της υποδοχέα στον υποκινητή του Eα γονιδίου.

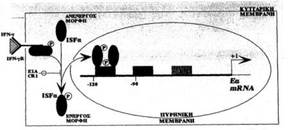
Η σύνδεση της IFN-γ στον αντίστοιχο υποδοχέα της προκαλεί την στερεοδιατακτική ενεργοποίηση λόγω φωσφορυλίωσης της JAK2 κινάσης της τυροσίνης (καθώς και άλλων μελών της JAK-οικογένειας, όπως της JAK1)[141,168,171,204], η οποία φαίνεται να φωσφορυλιώνει τα ISFα 'διμερή' σύμπλοκα και να τα ενεργοποιεί.

Η φωσφορυλιωμένη μορφή των ISFα επαγόμενων συμπλεγμάτων μετακινείται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και αναγνωρίζει με υψηλή συγγένεια σύνδεσης την ISRα *cis*-αλληλουχία του Eα υποκινητή (εικόνα 55).

Το τελικό μηχανιστικό μοντέλο μεταγραφικής ενεργοποίησης του Eα γονιδίου[78] διαμορφώνεται από την πιθανή διαμοριακή αλληλεπίδραση της φωσφορυλιωμένης μορφής των ISFα συμπλόκων με την CIITA ρυθμιστική πρωτεΐνη[76,77,84], καθώς και με τους X- και Y- συνδεόμενους μεταγραφικούς παράγοντες[5,60-63,215].

Η ανοσοκατασταλτική δραστηριότητα του αδενοϊού τύπου-5 (βλ. Αποτελέσματα-Συζήτηση, κεφάλαιο 10) εντοπίζεται στην αναστολή της ενεργότητας σύνδεσης των ISFα μεταγραφικών παραγόντων από την α-έμμεση δράση του E1A-ογκοαντιγόνου (εικόνα 55).

Το προτεινόμενο μοριακό μοντέλο του μηχανισμού μεταγραφικής ενεργοποίησης του Eα υποκινητή περιγράφεται στην εικόνα 55.



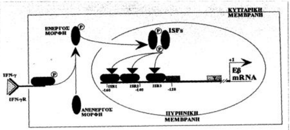
Εικόνα 55: Μοριακός μηχανισμός της επαγόμενης μεταγραφικής ενεργοποίησης του Eα γονιδίου, μετά την δράση της IFN-γ.

Η συνεργατική μεταγραφική ρύθμιση των Eα και Eβ γονιδίων επιτυγχάνεται διαμέσου της ενεργοποίησης των κοινών τους ISR *cis*-ομόλογων αλληλουχιών των αντίστοιχων υποκινητών τους.

Ο ανάλογος μοριακός μηχανισμός που προτείνεται για την επαγόμενη ενεργοποίηση του Eβ υποκινητή αναλύεται ως ακολούθως: α) σύνδεση της IFN-γ στον διαμεμβρανικό της υποδοχέα και επακόλουθη ενεργοποίηση λόγω φωσφορυλίωσης της JAK2 κινάσης της τυροσίνης (καθώς και άλλων μελών της JAK-οικογένειας, όπως της JAK1)[141,168,171,204]. β) Η φωσφορυλιωμένη ενεργός μορφή της JAK2 κινάσης φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τους ISF1, ISF2 και ISF3 μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι μετακινούνται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και αναγνωρίζουν με υψηλή συγγένεια σύνδεσης τις αντίστοιχες ISR1, ISR2 και ISR3 *cis*-ρυθμιστικές περιοχές του Eβ υποκινητή (εικόνα 56).

Το ολοκληρωμένο μηχανιστικό μοντέλο μεταγραφικής ενεργοποίησης του Eβ γονιδίου[79,207] (βλ. Αποτελέσματα-Συζήτηση, κεφάλαιο 8) διαμορφώνεται από την πιθανή διαμοριακή αλληλεπίδραση των ISF1, ISF2 και ISF3 επαγόμενων από IFN-γ μεταγραφικών συμπλόκων μεταξύ τους, καθώς και από την συνεργατική συμμετοχή των X- και Y- συνδεόμενων πυρηνικών παραγόντων[5,60-63,215] και της CIITA ρυθμιστικής πρωτεΐνης[76,77,84].

Το προτεινόμενο μοριακό μοντέλο του μηχανισμού μεταγραφικής ενεργοποίησης του Εβ υποκινητή περιγράφεται στην εικόνα 56.



Εικόνα 56: Μοριακός μηχανισμός της επαγόμενης μεταγραφικής ενεργοποίησης του Εβ γονιδίου, μετά την δράση της IFN-γ.

Η αποκάλυψη της ύπαρξης του νέου ISRa *cis*-ρυθμιστικού στοιχείου του Εα υποκινητή και η λειτουργική ομολογία των αντίστοιχων ISFs μεταγραφικών παραγόντων με τις STAT πρωτεΐνες, ανοίγει καινούργιους δρόμους, τόσο στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών γονιδιακής ρύθμισης των τάξης II γονιδίων ιστοσυμβατότητας, όσο και στην γενετική αντιμετώπιση περιπτώσεων οξείας ανοσοανεπάρκειας, αυτοάνοσης ιστικής καταστροφής, ή ακόμα και κακοήθους νεοπλαστικής εξαλλαγής.

Η άμεση μοριακή συσχέτιση των B-συστατικών και των επαγόμενων από IFN-γ μορφών των ISF πυρηνικών συμπλόκων φαίνεται να ενισχύει την αξιοπιστία ενός προτεινόμενου B-ιστοειδικού μηχανισμού, όπου το προενεργοποιημένο JAK/ISF μονοπάτι εμφανίζει υψηλή συστατική λειτουργική ενεργότητα, γεγονός που επιτρέπει και την συνεχή (ιστοειδική, αλλά μη ρυθμιζόμενη) έκφραση των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξης II, Εα και Εβ.

ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη αποκαλύψαμε την παρουσία νέων cis-λειτουργικών στοιχείων ISR του Εα γονιδιακού υποκινητή και ταυτοποιήσαμε την ύπαρξη μιας νέας οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων ISF, η οποία παρουσίασε υψηλή ομολογία λειτουργικής συμπεριφοράς με τους παράγοντες της STAT οικογένειας.

Για την ολοκλήρωση της αντίληψης των μοριακών μηχανισμών μεταγραφικής ενεργοποίησης των γονιδίων ιστοσυμβατότητας τάξης II στον ποντικό, απαιτείται η απομόνωση και ο βιοχημικός καθαρισμός των συστατικών πρωτεϊνών των ISF B-ιστοειδικών ή επαγόμενων πυρηνικών συμπλεγμάτων και η επακόλουθη μοριακή κλωνοποίηση των αντίστοιχων γονιδίων. Η συγκριτική δομική και λειτουργική ανάλυση των ISF πρωτεϊνών με τους ήδη γνωστούς STAT παράγοντες θα αποδείξει την προτεινόμενη σχέση ομοιότητας-ομολογίας των ISF και STAT μορίων μεταξύ τους.

EMSA δοκιμές σύνδεσης, των ISR ραδιοσημασμένων ανιχνευτών με πυρηνικά εκχυλίσματα των U1-U5 μεταλλαγμένων κυτταρικών σειρών επωασμένων με IFN-γ, θα αποκαλύψει την άμεση λειτουργική συσχέτιση των JAK κινασών με τους ISF παράγοντες, καθώς και των STAT και ISF πρωτεϊνών μεταξύ τους. Παρόμοια πειράματα σύνδεσης, παρουσία διαφορετικών πολυκλωνικών αντιορών όλων των μέχρι τώρα κλωνοποιημένων STAT παραγόντων, θα προσδιορίσουν την πιθανή αντιγονική ομολογία μιας ή περισσοτέρων εξ αυτών με τα ISF πυρηνικά σύμπλοκα.

In vitro δοκιμές διαμοριακής πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης (παρουσία ή απουσία των αντίστοιχων cis-περιοχών σύνδεσης) των ISF πυρηνικών συμπλόκων με τις ανασυνδυασμένες RFX ή XBP πρωτεΐνες θα επιβεβαιώσει την συνεργατική φύση των τάξης II υποκινητών και θα αποκαλύψει νέους μηχανισμούς μοριακής ρύθμισης, καθώς και καινούργια μονοπάτια μετάδοσης της πληροφορίας της IFN-γ από τον μεμβρανικό της υποδοχέα στον υποκινητή στόχο.

Παρόμοιες δοκιμές in vitro ανίχνευσης πιθανών αλληλεπιδράσεων των ISF πυρηνικών συμπλεγμάτων με τον ανασυνδυασμένο CIITA μεταγραφικό παράγοντα θα ολοκληρώσουν την μοριακή μας αντίληψη για τον ρυθμιστικό μηχανισμό μεταγραφικού ελέγχου των γονιδίων ιστοσυμβατότητας τάξης II στον ποντικό.

Η λεπτομερής ανάλυση των μηχανισμών μοριακής παρεμπόδισης της διαφορικής έκφρασης των τάξης II γονιδίων -και επακόλουθα της διαμόρφωσης ενός ανοσοανεπαρκούς κυτταρικού φαινότυπου- από την υπερέκφραση του E1A ογκοαντιγόνου μετά από ιϊκή μόλυνση με τον Ad5, θα αποκαλυφθεί με in vitro δοκιμές αλληλεπίδρασης των ISF πυρηνικών συμπλόκων με την ανασυνδυασμένη E1A ογκοπρωτεΐνη ή τον CR1 δομικό-λειτουργικό πυρήνα αυτής.

Αναφερόμενοι τέλος, στους μηχανισμούς μεταγραφικής ενεργοποίησης των τάξης II γονιδίων από ρετινοϊκό οξύ, είναι εμφανής η απαίτηση τόσο πειραματικών δοκιμών κατά Northern - των οποίων τα συμπεράσματα θα επιβεβαιώσουν την λειτουργική παρουσία των επαγόμενων συμπλόκων - όσο και in vitro EMSA δοκιμών σύνδεσης με την χρήση ανασυνδυασμένων RAR ή/και RXR πρωτεϊνών, που θα αποδείξουν την αδιαμφισβήτητη αλληλεπίδραση του RXRβ υποδοχέα με τα ISR cis-ρυθμιστικά στοιχεία των Εα και Εβ γονιδιακών υποκινητών αντίστοιχα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη αποκαλύπτουμε την ύπαρξη ενός νέου *cis*-ρυθμιστικού στοιχείου ISRα του υποκινητή Eα, το οποίον παρουσιάζει μεγάλη δομική επικάλυψη με την H *cis*-συντηρημένη αλληλουχία. Η ISRα περιοχή εμφανίζεται αναγκαία τόσο για την B-ιστοειδική όσο και για την IFN-γ επαγόμενη μεταγραφική δραστηριότητα του Eα υποκινητή.

In vitro δοκιμές μεταβολής της κινητικότητας λόγω αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες (EMSA) του ISRα *cis*-στοιχείου ταυτοποίησαν την παρουσία ενός ταχύτατα επαγόμενου πυρηνικού συμπλόκου ISFα, το οποίον εμφανίζει υψηλή συγγένεια σύνδεσης για τις ρυθμιστικές περιοχές GAS και ISRE των GBP και ISG54 υποκινητών αντίστοιχα. Ανάλυση της μοριακής σύστασης του ISFα συμπλόκου αποκάλυψε την ύπαρξη δύο πρωτεϊνών μοριακού μεγέθους 70-80kd. Μερικός βιοχημικός χαρακτηρισμός αυτών απέδειξε, ότι η φωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης των ISFα παραγόντων συνιστά τον ικανό και αναγκαίο μοριακό μηχανισμό για την επαγόμενη ενεργότητα σύνδεσης στην ISRα *cis*-περιοχή.

Συγκριτική ανάλυση των Eα και GBP υποκινητών αποκάλυψε την ομόλογη μεταγραφική τους συμπεριφορά τόσο ως προς την κινητική τους απόκριση στην δράση της IFN-γ όσο και ως προς την υψηλή τους ευαισθησία στους φαρμακολογικούς αναστολείς κινασών τυροσίνης όπως η σταυροσπορίνη και η γενιστεΐνη.

Ο μοριακός μηχανισμός επαγόμενης (IFN-γ) μεταγραφικής ενεργοποίησης των Eα, GBP και ISG54 υποκινητών ταυτοποιείται σε γεγονότα σύγχρονης φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης, τα οποία λαμβάνουν χώρα είτε σε διακριτά είτε στα ίδια μοριακά υποστρώματα (ISFα).

Η πιθανότερη υποψήφια κινάση που ευθύνεται για την εκλεκτική φωσφορυλίωση των ISFα συμπλόκων και για την διαφορική ενεργοποίηση του Eα υποκινητή φαίνεται να είναι η JAK2 κινάση, η οποία, όταν υπερεκφράζεται, αυξάνει τόσο τα βασικά όσο και τα επαγόμενα μεταγραφικά επίπεδα.

Η μεταγραφική συμπεριφορά των ISRL στοιχείων (Eα) τόσο *in cis*-όσο και *in-trans*- αποδίδεται στην ενεργότητα σύνδεσης του IRF1 παράγοντα, ο οποίος φαίνεται να συμμετέχει σε πυρηνικά σύμπλοκα τα οποία εμφανίζουν υψηλή ανθεκτικότητα στην δράση του ICSBP μεταγραφικού καταστολέα.

Trans ανάλυση των πυρηνικών μεταγραφικών συμπλεγμάτων του Eβ υποκινητή αποκάλυψε την ύπαρξη τριών αλληλοσυσχετιζόμενων επαγόμενων από IFN-γ συμπλόκων ISF1,ISF2 και ISF3, τα οποία εμφανίζουν υψηλή συγγένεια σύνδεσης για τις ISR, ISRE και GAS περιοχές. Η δομική και λειτουργική ομολογία των ISFα, ISF1, ISF2 και ISF3 συμπλόκων μεταξύ τους μας επιτρέπει την μοριακή ταξινόμησή τους σε μια νέα οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων ISFs.

Μοριακή ανάλυση του μηχανισμού δράσης του ρετινοϊκού οξέος στον Εβ υποκινητή αποκάλυψε την ύπαρξη επαγόμενων συμπλόκων εμβρυϊκών κυττάρων, τα οποία εμφανίζουν υψηλή συγγένεια σύνδεσης για τις ISR2 και ISR3 *cis*-ρυθμιστικές αλληλουχίες. Το επαγόμενο από ρετινοϊκό οξύ πυρηνικό σύμπλοκο φαίνεται να αποτελείται από μεταγραφικούς ετεροδιμερείς παράγοντες, εκ των οποίων ο ένας τουλάχιστον μοριακός εταίρος πιθανολογείται να είναι ο H-2RIIBP (RXRβ) ρετινοϊκός υποδοχέας ή άλλος αντιγονικά ομόλογος αυτού.

Η ισχυρή καταστολή της επαγόμενης από IFN-γ μεταγραφικής ενεργότητας του Εα υποκινητή μετά την υπερέκφραση του E1A ογκοαντιγόνου του Ad5 αδενοϊού αιτιολογείται από την σύγχρονη κατάργηση σύνδεσης του ISFα επαγόμενου συμπλόκου, χωρίς να αποκλείεται η συμμετοχή άλλων μηχανισμών.

SUMMARY

In this study we are describing a novel *cis*-regulatory element ISRα of the Eα promoter, which overlaps with the H *cis*-conserved sequence. The ISRα region appears to be necessary both for the B-specific and the IFN-γ inducible transcriptional activity of the Eα promoter.

In vitro EMSA experiments of the ISRα *cis*-element identified the presence of a very quickly inducible nuclear complex ISFα, with high binding affinity for the GAS and ISRE regulatory regions of the GBP and ISG54 promoters respectively. Analysis of the molecular composition of the ISFα complex revealed the presence of two closely migrating proteins with approximate molecular weight 70-80kd. Further biochemical analysis showed that tyrosine phosphorylation of ISFα is required for binding to its DNA target-site, ISRα.

Comparative functional analysis of the Eα and GBP promoters disclosed the similarities in their transcriptional as behaviour as judged by their time-course response to the IFN-γ action and their strong sensitivity to the action of two tyrosine kinase inhibitors, staurosporin and genistein.

The molecular mechanism of the IFN-γ inducible transcriptional activation of the Eα, GBP and ISG54 promoters involves coupled events of phosphorylation and dephosphorylation, which could take place either on the same or distinct molecular substrates (ISFα).

The most probable candidate kinase that selectively phosphorylates the ISFα complexes and consequently activates the Eα promoter seems to be the JAK2 kinase, whose overexpression increases either the basic or the inducible transcriptional levels.

The transcriptional behaviour of the ISRL elements within the Eα promoter either in *cis*- or in *trans*- is attributed to the binding activity of the IRF1 transcription factor, which seems to participate in nuclear complexes that appear to be highly resistant to the repressing function of the ICSBP protein.

Trans- analysis of the nuclear transcription complexes of the E6 promoter revealed the existence of three IFN-γ inducible complexes ISF1, ISF2 and ISF3, with very strong binding affinity for the ISR, ISRE and GAS elements. The structural and functional homology of the ISFα, ISF1, ISF2 and ISF3 complexes allows their molecular classification in a novel family of transcription factors called ISFs.

Molecular studies on the mechanism of the retinoic acid function on the E6 promoter uncovered the existence of inducible complexes from embryonic cell lines, with high binding activity for the ISR2 and ISR3 *cis*-regulatory sequences. The retinoic acid inducible nuclear complex seems to be composed of transcriptional heterodimeric factors, of which at least one molecular partner is the H-2RIIBP (RXRб) retinoic receptor or an immunologically related factor.

The strong repression of the IFN-γ inducible transcriptional activity of the Eα promoter after the overexpression of the E1A oncoantigen of the Ad5 adenovirus correlates with the concordant inhibition of binding of the ISFα inducible complex, although the involvement of additional (alternative) mechanisms cannot be excluded.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Fehling, H.-J., Viville, S., VanEwijk, W., Benoist, C. and Mathis, D. (1989). Fine-tuning of MHC class II gene expression in defined microenvironments. *TIG,* **5,** 342-347.
2. Trowsdale, J. (1993). Genomic structure and function in the MHC. *TIG,* **9,** 117-122.
3. Steinmetz, M. and Haas, W. (1993). Recent expreriments with MHC knock-out mice: More questions than answers. *BioEssays,* **15,** 613-615.
4. Milner, C.M. and Campbell, R.D. (1992). Genes, genes and more genes in the human major histocompatibility complex. *BioEssays,* **14,** 565-571.
5. Glimcher, L.H. and Kara, C.J. (1992). Sequences and factors: a guide to MHC class II transcription (review). *Annual Reviews of Immunology,* **18,** 13-41.
6. Doyle, C., Ford, P.J., Ponath, P., Spies, T. and Strominger, J.L. (1990). Regulation of the invariant chain gene in normal and mutant B-lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **87,** 4590-4594.
7. Dorn, A., Durant, B., Marfing, C., LeMeur, M., Benoist, C. and Mathis, D. (1987). The conserved MHC class II boxes -X and -Y are transcriptional control elements and specifically bind nuclear proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **84,** 6249-6253.
8. Dedrick, R.L. and Jones, P.P. (1990). Sequence elements required for activity of a murine MHC class II promoter bind common and cell-type specific nuclear factors. *Mol. Cell. Biol.,* **10,** 593-604.
9. Benoist, C. and Mathis, D. (1990). Regulation of major histocompatibility complex class II genes: X, Y and other letters of the alphabet (review). *Annual Reviews of Immunology,* **8,** 681-715.
10. Kourilsky, P. and Claveries, J.-M. (1989). MHC restriction, alloreactivity, and thymic education: a common link? *Cell,* **56,** 327-329.
11. Kaufman, J.F., Auffray, C., Korman, A.J., Shackelford, D.A. and Strominger, J. (1984). The class II molecules of the human and murine major histocompatibility complex. *Cell,* **36,** 1-13.
12. Engelhard, V.H. (1994). How cells process antigens. *Scientific American,* August, 54-61.
13. Williams, B.R.G. (1991). Transcriptional regulation of interferon-stimulated genes. *Eur. J. Biochem.,* **200,** 1-11.
14. Revel, M. and Chebath, J. (1986). Interferon-activated genes. *TIBS,* **11,** 166-170.
15. Kerr, I.M. and Stark, G.R. (1991). The control of interferon-inducible gene expression. *FEBS,* **285,** 194-198.
16. Gupta, S.L. (1990). Regulation of cellular gene expression by interferon-gamma: Involvement of multiple pathways. *Intl. J. Cell. Clon.,* **8,** 92-102.
17. Pestka, S., Langer, J.A., Zoon, K.C. and Samuel, C.E. (1987). Interferons and their actions (review). *Ann. Rev. Biochem.,* **56,** 727-777.

18. VonBoehmer, H. and Kisielow, P. (1991). How the immune system learns about self. *Scientific American,* October, 50-59.
19. Saluz, H.P., Wiebauer, K. and Wallace, A. (1991). Studying DNA modifications and DNA-protein interactions *in vivo*. *TIG,* **7,** 207-211.
20. Wright, K.L. and Ting, J.P.-Y. (1992). *In vivo* footprint analysis of the *HLA-DRA* gene promoter: Cell-specific interaction at the octamer site and up-regulation of X box binding by interferon-γ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **89,** 7601-7605.
21. Yang, Z., Sugawara, M., Ponath, P.D., Wessendorf, L., Banerji, J., Li, Y. and Strominger, J.L. (1990). Interferon-γ response region in the promoter of the human *DPA* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **87,** 9226-9230.
22. Tsang, S.Y., Nakanishi, M. and Peterlin, B.M. (1990). Mutational analysis of the *DRA* promoter: *cis*-acting sequences and *trans*-acting factors. *Mol. Cell. Biol.,* **10,** 711-719.
23. Tsang, S.Y., Nakanishi, M. and Peterlin, B.M. (1988). B-cell specific and interferon-γ inducible regulation of the *HLA-DRα* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **85,** 8598-8602.
24. Voliva, C.F., Aronheim, A., Walker, M.D. and Peterlin, B.M. (1992). B-cell factor 1 is required for optimal expression of the *DRA* promoter in B cells. *Mol. Cell. Biol.,* **12,** 2383-2390.
25. Sugawara, M., Ponath, P.D., Shin, J., Yang, Z. and Stromiger, J.L. (1991). Delineation of a previously unrecognized cis-acting element required for *HLA* class II gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **88,** 10347-10351.
26. Sakurai, M. and Strominger, J.L. (1988). B-cell specific enhancer activity of conserved upstream elements of the class II major histocompatibility complex *DQB* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **85,** 6909-6913.
27. Latron, F., Jotterand-Bellomo, M., Maffei, A., Scarpellino, L., Bernard, M., Strominger, J.L. and Accolla, R.S. (1988). Active suppression of major histocompatibility complex class II gene expression during differentiation from B cells to plasma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **85,** 2229-2233.
28. Sherman, P.A., Basta, P.V., Moore, T.L., Brown, A.M., Ting, J.P.-Y. (1989). Class II box consensus sequences in the *HLA-DRα* gene: transcriptional function and interaction with nuclear proteins. *Mol. Cell. Biol.,* **9,** 50-56.
29. Blanar, M.A., Boettger, E.C. and Flavell, R.A. (1988). Transcriptional activation of *HLA-DRα* by interferon-γ requires a trans-acting protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **85,** 4672-4676.
30. Kobr, M., Reith, W., Herrero-Sanchez, C. and Mach, B. (1990). Two DNA-binding proteins discriminate between the promoters of different members of the major histocompatibility complex class II multigene family. *Mol. Cell. Biol.,* **10,** 965-971.

31. Cogswell, J.P., Basta, P.V. and Ting, J.P.-Y. (1990). X-box binding proteins positively and negatively regulate transcription of the *HLA-DRA* gene through interaction with discrete upstream W and V elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 7703-7707.
32. Haseqawa, S.L. and Boss, J.M. (1991). Two B cell factos bind the *HLA-DRA* box region and recognize different subsets of *HLA* class II promoters. *Nucl. Acids Res.*, **19**, 6269-6276.
33. Ryu, K., Koide, Y., Yamashita, Y. and Yoshida, T.O. (1993). Inhibition of tyrosine phosphorylation prevents IFN-γ-induced *HLA-DR* molecule expression. *J. Immunol.*, **150**, 1253-1262.
34. Panek, R.B., Moses, H., Ting, J.P.-Y. and Benveniste, E.N. (1992). Tumor necrosis factor-α response elements in the *HLA-DRA* promoter: identification of a tumor necrosis factor-α-induced DNA-protein complex in astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 11518-11522.
35. Vilen, B.J., Penta, J.F. and Ting, J.P.-Y. (1992). Structural constraints within a trimeric transcriptional regulatory region. *J. Biol. Chem.*, **267**, 23728-23734.
36. Vilen, B.J., Cogswell, J.P. and Ting, J.P.-Y. (1991). Stereospecific alignment of the X and Y elements is required for major histocompatibility complex class II *DRA* promoter function. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 2406-2415.
37. Arenzana-Seisdedos, F., Mogensen, S.C., Vuillier, F., Fiers, W. and Virelizier, J.-L. (1988). Autocrine secretion of tumor necrosis factor under the influence of inteferon-γ amplifies *HLA-DRA* gene induction in human monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 6087-6091.
38. Mathis, D.J., Benoist, C.O., Williams II, V.E., Kanter, M.R. and McDevitt, H.O. (1983). The murine E_a immune response gene. *Cell*, **32**, 745-754.
39. Viville, S., Jongeneel, V., Koch, W., Mantovani, R., Benoist, C. and Mathis, D. (1991). The E_a promoter: a linker-scanning analysis. *J. Immunol.*, **146**, 3211-3217.
40. Dorn, A., Benoist, C. and Mathis, D. (1989). New B-lymphocyte specific enhancer-binding protein. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 312-320.
41. Thanos, D., Mavrothalassitis, G. and Papamatheakis, J. (1988). Mutliple regulatory regions on the 5′ side of the mouse E_a gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 3075-3079.
42. Finn, P.W., Kara, C.J., Douhan III, J., Van T.T., Folsom, V. and Glimcher, L.H. (1990). Interferon-γ regulates binding of two nuclear protein complexes in a macrophage cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 914-918.
43. Finn, P.W., Kara, C.J., Van, T.T., Douhan III, J., Boothby, M.R., Glimcher, L.H. (1990). The presence of a DNA binding complex correlates with *E6* class II MHC gene expression. *EMBO J.*, **9**, 1543-1549.

44. Kara, C.J. and Glimcher, L.H. (1993). Developmental and cytokine-mediated regulation of MHC class II gene promoter occupancy *in vivo*. *J. Immunol.*, **150**, 4934-4942.
45. Brown, A., Barr, C. and Ting, J. (1991). Sequences homologous to class II MHC W, X and Y elements mediated constitutive and IFN-γ induced expression of human class II-associated invariant chain gene. *J. Immunol.*, **146**, 3183-3189.
46. Blanar, M.A., Burkly, L.C. and Flavell, R.A. (1989). NFκB binds within a region required for B-cell-specific expression of the major histocompatibility complex class II gene E_a^d. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 844-846.
47. Cogswell, J., Austin, J. and Ting, J. (1991). The W element is a positive regulator of *HLA-DRA* transcription in various *DR+* cell types. *J. Immunol.*, **146**, 1361-1367.
48. Kara, C.J. and Glimcher, L.H. (1991). *In vivo* footprinting of MHC class II genes: bare promoters in the bare lymphocyte syndrome. *Science*, **252**, 709-712.
49. Liou, H.-C., Polla, B.S., Aragnol, D., Leserman, L.D., Griffith, I.J. and Glimcher, L.H. (1988). A tissue-specific DNase I-hypersensitive site in a class II A_a gene is under trans-regulatory control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 2738-2742.
50. Zhu, L. and Jones, P.P. (1990). Transcriptional control of the invariant chain gene involves promoter and enhancer elements common to and distinct from major histocompatibility complex class II genes. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 3906-3916.
51. Freund, Y.R., Dedrick, R.L. and Jones, P.P. (1990). *Cis*-acting sequences required for class II gene regulation by interferon-γ and tumor necrosis factor-α in a murine macrophage cell line. *J. Exp. Med.*, **171**, 1283-1299.
52. Lonergan, M., Dey, A., Becker, K.G., Drew, P.D. and Ozato, K. (1993). A regulatory element in the β2-microglobulin promoter identified by *in vivo* footprinting. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 6629-6639.
53. Eades, A.-M., Litfin, M. and Rahmasdorf, H.J. (1990). The IFN-γ response of the murine invariant chain gene is mediated by a complex enhancer that includes several MHC class II consensus elements. *J. Immunol.*, **144**, 4399-4409.
54. Athanassakis-Vassiliadis, I., Thanos, D. and Papamatheakis, J. (1989). Induction of class II major histocompatibility complex antigens in murine placenta by 5-azacytidine and interferon-γ involves different cell populations. *Eur. J. Immunol.*, **19**, 2341-2348.
55. Gravallese, E.M., Boothby, M.R., Smas, C.M. and Glimcher, L.H. (1989). A lipopolysaccharide-induced DNA-binding protein for a class II gene in B cells is distinct from NFκB. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 3184-3192.

56. Boothby, M., Gravallese, E., Liou, H.-C. and Glimcher, L.H. (1988). A DNA binding protein regulated by IL-4 and by differentiation in B cells. *Science,* **242,** 1599-1562.

57. Smith, E.L., Freeman, G., Vogt, M. and Dulbecco, R. (1960). The nucleic acid of polyoma virus. *Virology,* **12,** 185-191.

58. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor.

59. Rothman, P., Li, S.C., Gorham, B., Glimcher, L., Alt, F. and Boothby, M. (1991). Identification of a conserved lipopolysaccharide-plus-interleukin-4-responsive element located at the promoter of germ line ε transcripts. *Mol. Cell. Biol.,* **11,** 5551-5561.

60. Reith, W., Herrero-Sanchez, C., Kobr, M., Silacci, P., Berte, C., Barras, E., Fey, S. and Mach, B. (1990). MHC class II regulatory factor RFX has a novel DNA-binding domain and a functionally independent dimerization domain. *Genes and Development,* **4,** 1528-1540.

61. Liou, H.-C., Boothby, M.R., Finn, P.W., Davidon, R., Nabav, N., Zeleznik-Le, N.J., Ting, J.P.-Y. and Glimcher, L.H. (1990). A new member of the leucine zipper class of proteins that binds to the *HLA-DRα* promoter. *Science,* **247,** 1581-1584.

62. Didier, D.K., Schiffenbauer, J., Woulfe, S.L., Zacheis, M. and Schwartz, B.D. (1988). Characterization of the cDNA encoding a protein binding to the major histocompatibility complex class II Y box. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **85,** 7322-7326.

63. VanHuijsduijner, R.H., Li, X.Y., Black, D., Matthes, H., Benoist, C. and Mathis, D. (1990). Co-evolution from yeast to mouse: cDNA cloning of the two NF-Y (CP-1/CBF) subunits. *EMBO J.,* **9,** 3119-3127.

64. Maity, S.N., Vuorio, T. and De Crombrugghe, B. (1990). The B subunit of a rat heteromeric CCAAT-binding transcription factor shows a striking sequence identity with the yeast Hap2 transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **87,** 5378-5382.

65. Li, X.-Y., Mantovani, R., VanHuijsduijnen, H., Andre, I., Benoist, C. and Mathis, D. (1991). Evolutionary variation of the CCAAT-binding transcription factor NF-Y. *Nucl. Acids Res.,* **20,** 1087-1091.

66. Kern, M.J. and Woodward, J.G. (1991). The same CCAAT box-binding factor binds to the promoter of two coordinately regulated major histocompatibility complex class II genes. *Mol. Cell. Biol.,* **11,** 578-581.

67. Zeleznik-Le, N.J., Azizkhan, J.C. and Ting, J.P.-Y. (1991). Affinity-purified CCAAT-box-binding protein (YEBP) functionally regulates expression of a human class II major histocompatibility complex gene and the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **88,** 1873-1877.

68. Mantovani, R., Pessara, U., Tronche, F., Li, X.-Y., Knapp, A.-M., Pasquali, J.-L., Benoist, C. and Mathis, D. (1992). Monoclonal antibodies to NF-Y define its function in MHC class II and albumin gene transcription. *EMBO J.,* **11,** 3315-3322.
69. Kara, C.J., Liou, H.-C., Ivashkiv, L.B., Glimcher, L.H. (1990). A cDNA for a human cyclic AMP response element-binding protein which is distinct from CREB and expressed preferentially in brain. *Mol. Cell. Biol.,* **10,** 1347-1357.
70. Ivashkiv, L.B., Liou, H.-C., Kara, C.J., Lamph, W.W., Verma, I.M. and Glimcher, L.H. (1990). mXBP/CRE-BP2 and c-Jun form a complex which binds to the cyclic AMP, but not to the 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, response element. *Mol. Cell. Biol.,* **10,** 1609-1621.
71. Ono, S.J., Bazil, V., Levi, B.-Z., Ozato, K. and Strominger, J.L. (1991). Transcription of a subset of human class II major histocompatibility complex genes is regulated by a nucleoprotein complex that contains c-fos or an antigenically related protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **88,** 4304-4308.
72. Wright, K.L., Vilen, B.J., Itoh-Lindstrom, Y., Moore, T.L., Li, Guoxuan, Criscitiello, M., Cogswell, P., Clarke, J.B. and Ting, J.P.-Y. (1994). CCAAT box binding protein NF-Y facilitates *in vivo* recruitment of upstream DNA binding transcription factors. *EMBO J.,* **13,** 4042-4053.
73. Siegrist, C.A., Durant, B., Emery, P., David, E., Hearing, P., Mach, B. and Reith, W. (1993). RFX1 is identical to enhancer factor C and functions as a transactivator of the hepatitis B virus enhancer. *Mol. Cell. Biol.,* **13,** 6375-6384.
74. Zhang, X.-Y., Jabrane-Ferrat, N., Asiedu, C.K., Samac, S., Peterlin, B.M. and Ehrlich, M. (1993). The major histocompatibility complex class II promoter-binding protein RFX (NF-X) is a methylated DNA-binding protein. *Mol. Cell. Biol.,* **13,** 6810-6818.
75. Reith, W., Satola, S., Sanchez, H.C., Amaldi, I., Lisowska-Grospierre, B., Griscelli, C., Hadam, M.R. and Mach, B. (1988). Congenital immunodeficiency with a regulatory defect in MHC class II gene expression lacks a specific *HLA-DR* promoter binding protein, RF-X. *Cell,* **53,** 897-906.
76. Steimle, V., Otten, L.A., Zufferey, M. and Mach, B. (1993). Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome). *Cell,* **75,** 135-146.
77. Steimle, V., Siegrist, C.-A., Mottet, A., Lisowska-Grospierre, B. and Mach, B. (1994). Regulation of MHC class II expression by interferon-γ mediated by the transactivator gene CIITA. *Science,* **265,** 106-109.

78. Stravopodis, D., Gregoriou, M., Thanos, D. and Papamatheakis, J. (1995). The activation of a tyrosine phosphorylated factor that binds to the H box is correlated with interferon-γ (IFN-γ) expression of the Eα promoter. **(In preparation).**

79. Thanos, D., Gregoriou, M., Stravopodis, D., Liapaki, K., Makatounakis, T. and Papamatheakis, J. (1993). The MHC class II *E6* promoter: a complex arrangement of positive and negative elements determines B cell and interferon-γ (IFN-γ) regulated expression. *Nucl. Acids Res.,* **21,** 6010-6019.

80. Tjian, R. and Maniatis, T. (1994). Transcriptional activation: A complex puzzle with few easy pieces (review). *Cell,* **77,** 5-8.

81. Karin, M. (1994). Signal transduction from the cell surface to the nucleus through the phosphorylation of transcription factors (review). *Curr. Biol.,* **6,** 415-424.

82. Buratowski, S. (1994). The basics of basal transcription by RNA polymerase II. *Cell,* **77,** 1-3.

83. Silver, P.A. (1991). How proteins enter the nucleus. *Cell,* **64,** 489-497.

84. Mach, B., Steimle, V. and Reith, W. (1994). MHC class II-deficient combined immunodeficiency: a disease of gene regulation (review). *Immunol. Rev.,* **138,** 207-221.

85. Kara, C.J. and Glimcher, L.H. (1993). Promoter accessibility within the environment of the MHC is affected in class II-deficient combined immunodeficiency. *EMBO J.,* **12,** 187-193.

86. Rubin Lab. (1990). Methods Book, 2nd Edition.

87. Bénichou, B. and Strominger, J.L. (1991). Class II-antigen-negative patient and mutant B-cell lines represent at least three, and probably four, distinct genetic defects defined by complementation analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **88,** 4285-4288.

88. Ombra, M.N., Perfetto, C., Autiero, M., Anzisi, A.M., Pasquinelli, R., Maffei, A., Del Pozzo, G. and Guardiola, J. (1993). Reversion of a transcriptionally defective MHC class II-negative human B-cell mutant. *Nucl. Acids Res.,* **21,** 381-386.

89. Yang, Z., Accolla, R.S., Pious, D., Zegers, B.J.M. and Strominger, J. (1988). Two distinct genetic loci regulating class II gene expression are defective in human mutant and patient cell lines. *EMBO J.,* **7,** 1965-1972.

90. Doyle, C., Ford, P.J., Ponath, P.D., Spies, T. and Strominger, J.L. (1990). Regulation of the clas II-associated invariant chain gene in normal and mutant B-lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **87,** 4590-4594.

91. Mao, C., Davies, D., Kerr, I.M. and Stark, G.R. (1993). Mutant human cells defective in induction of major histocompatibility complex class II gene by interferon-γ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **90,** 2880-2884.

92. Sloan, J.H. and Boss, J.M. (1988). Conserved upstream sequences of human class II genes in wild-type but not mutant B-cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **85,** 8186-8190.
93. Cönczy, P., Reith, W., Barras, E., Lisowska-Grospierre, B., Griscelli, C., Hadam, M.R. and Mach, B. (1989). Inherited immunodeficiency with a defect in a major histocompatibility complex class II promoter-binding protein differs in the chromatin structure of the *HLA-DRA* gene. *Mol. Cell. Biol.,* **9,** 296-302.
94. Stimac, E., Urieli-Shoval, S., Kempin, S. and Pious, D. (1991). Defective *HLA-DRA* X box binding in the class II transactive transcription factor mutant 6.1.6 and in cell lines from class II immunodeficient patients. *J. Immunol.,* **146,** 4398-4405.
95. Reith, W., Barras, E., Satola, S., Kobr, M., Reinhart, D., Herrero-Sanchez, C. and Mach, B. (1989). Cloning of the major histocompatibility complex class II promoter binding protein affected in a hereditary defect in class II gene regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **86,** 4200-4204.
96. Pellegrini, S., John, J., Shearer, M., Kerr, I.M. and Stark, G.R. (1989). Use of a selectable marker regulated by alpha interferon to obtain mutations in the signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.,* **9,** 4605-4612.
97. McKendry, R., John, J., Flavell, D., Müller, M., Kerr, I.M. and Stark, G.R. (1991). High-frequency mutagenesis of human cells and characterization of a mutant unresponsive to both α- and γ-interferons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **88,** 11455-11459.
98. John, J., McKendry, R., Pellegrini, S., Flavell, D., Kerr, I.M. and Stark, G.R. (1991). Isolation and characterization of a new mutant human cell line unresponsive to alpha and beta interferons. *Mol. Cell. Biol.,* **11,** 4189-4195.
99. Hunter, T. (1993). Cytokine connections. *Nature,* **366,** 114-115.
100. Reid, L.E., Brasnett, A.H., Gilbert, C.S., Andrew, G., Porter, C.G., Gewert, D.R., Stark, G.R. and Kerr, I.M. (1989). A single DNA response element can confer inducibility by both α- and γ-interferons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **86,** 840-844.
101. Levy, D.E., Kessler, D.S., Pine, R., Reich, N. and Darnell Jr., J.E. (1988). Interferon-induced nuclear factors that bind a shared promoter element correlate with positive and negative transcriptional control. *Genes and Development,* **2,** 383-393.
102. Decker, T., Lew, D.J., Cheng, Y.-S.E., Levy, D.E. and Darnell Jr., J.E. (1989). Interactions of α- and γ-interferon in the transcriptional regulation of the gene encoding a guanylate-binding protein. *EMBO J.,* **8,** 2009-2014.
103. Strehlow, I. and Decker, T. (1992). Transcriptional induction of IFN-γ responsive genes is modulated by DNA surrounding the interferon stimulation response element. *Nucl. Acids Res.,* **20,** 3865-3872.

104. Blanar, M.A., Baldwin Jr., A.S., Flavell, R.A. and Sharp, P.A. (1989). A gamma-interferon-induced factor that binds the interferon response sequence of the MHC class I gene, H-2K^b. *EMBO J.,* **8,** 1139-1144.
105. Marx, J. (1992). Taking a direct path to the genes. *Science,* **257,** 744-745.
106. Parrington, J., Rogers, N.C., Gewert, D.R., Pine, R., Veals, S.A., Levy, D.E., Stark, G.R. and Kerr, I.M. (1993). The interferon-stimulated response elements of two human genes detect overlapping sets of transcription factors. *Eur. J. Biochem.,* **214,** 617-626.
107. Pellegrini, S. and Schindler, C. (1993). Early events in signalling by interferons (review). *TIBS,* **18,** 338-342.
108. Levy, D.E., Kessler, D.S., Pine, R. and Darnell, Jr. J.E. (1989). Cytoplasmic activation of ISGF3, the positive regulator of interferon-α-stimulated transcription, reconstituted *in vitro. Genes and Development,* **3,** 1362-1371.
109. Decker, T., Lew, D.J., Mirkovitch, J. and Darnell, Jr., J.E. (1991). Cytoplasmic activation of GAF an IFN-γ-regulated DNA-binding factor. *EMBO J.,* **10,** 927-932.
110. Kessler, D.S., Veals, S.A., Fu, X.-Y. and Levy, D.E. (1990). Interferon-α regulates nuclear translocation and DNA-binding affinity of ISGF3, a mutlimeric transcriptional activator. *Genes and Development,* **4,** 1753-1765.
111. Lew, D.J., Decker, T., Strehlow, I. and Darnell, J.E. (1991). Overlapping elements in the guanylate-binding protein gene promoter mediate transcriptional induction by alpha and gamma interferons. *Mol. Cell. Biol.,* **11,** 182-191.
112. Lew, D.J., Decker, T. and Darnell, Jr., J.E. (1989). Alpha interferon and gamma interferon stimulate transcription of a single gene through different signal transduction pathways. *Mol. Cell. Biol.,* **9,** 5404-5411.
113. Loh, J.E., Chang, C.-H., Fodor, W.L. and Flavell, R.A. (1992). Dissection of the interferon-γ-MHC class II signal transduction pathway reveals that type I and type II interferon systems share common signalling component(s). *EMBO J.,* **11,** 1351-1363.
114. Näf, D., Hardin, S.E. and Weissmann, C. (1991). Multimerization of AAGTGA and GAAAGT generates sequences that mediate virus inducibility by mimicking an interferon promoter element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **88,** 1369-1373.
115. Eilers, A., Baccarini, M., Horn, F., Hipskind, R.A., Schindler, C. and Decker, T. (1994). A factor induced by differentiation signals in cells of the macrophage lineage binds to the gamma interferon activation site. *Mol. Cell. Biol.,* **14,** 1364-1373.

116. Wilson, K.C. and Finbloom, D.S. (1992). Interferon-γ rapidly induces in human monocytes a DNA-binding factor that recognizes the γ response region within the promoter of the gene for the high-affinity Fcγ receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **89,** 11964-11968.

117. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **74,** 5463-5467.

118. Yuan, J., Wegenka, U.M., Lütticken, C., Buschmann, J., Decker, T., Schindler, C., Heinrich, P.C. and Horn, F. (1994). The signalling pathways of interleukin-6 and gamma interferon converge by the activation of different transcription factors which bind to common responsive DNA elements. *Mol. Cell. Biol.,* **14,** 1657-1668.

119. Igarashi, K., David, M., Finbloom, D.S. and Larner, A.C. (1993). *In vitro* activation of the transcription factor gamma interferon activation factor by gamma interferon: evidence for a tyrosine phosphatase/kinase signaling cascade. *Mol. Cell. Biol.,* **13,** 1634-1640.

120. Dignam, J., Lebovitz, M. and Roeder, R. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated nuclei. *Nucl. Acids Res.,* **11,** 1475-1489.

121. Perez, C., Wietzerbin, J. and Benech, P.D. (1993). Two *cis*-DNA elements involved in myeloid-cell-specific expression and gamma interferon (IFN-γ) activation of the human high-affinity Fcγ receptor gene: a novel IFN regulatory mechanism. *Mol. Cell. Biol.,* **13,** 2182-2192.

122. Reich, N.C. and Darnell, Jr., J.E. (1989). Differential binding of interferon-induced factors to an oligonucleotide that mediates transcriptional activation. *Nucl. Acids Res.,* **17,** 3415-3424.

123. Fu, X.-Y., Kessler, D.S., Veals, S.A., Levy, D.E. and Darnell, Jr. J.E. (1990). ISGF3, the transcriptional activator induced by interferon α, consists of multiple interacting polypeptide chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **87,** 8555-8559.

124. Petricoin III, E., David, M., Fang, H., Grimley, P., Larner, A.C. and Vande Pol, S. (1994). Human cancer cell lines express a negative transcriptional regulator of the interferon regulatory factor family of DNA binding proteins. *Mol. Cell. Biol.,* **14,** 1477-1486.

125. Haque, S.J. and Williams, B.R.G. (1994). Identification and characterization of an interferon (IFN)-stimulated response element-IFN-stimulated gene factor 3-independent signaling pathway for IFN-α. *J. Biol. Chem.,* **269,** 19523-19529.

126. Driggers, P.H., Elenbaas, B.A., An, J.-B., Lee, I.J. and Ozato, K. (1992). Two upstream elements activate transcription of a major histocompatibility complex class I gene *in vitro*. *Nucl. Acids Res.,* **20,** 2533-2540.

127. Mirkovitch, J., Decker, T. and Darnell, Jr., J.E. (1992). Interferon induction of gene transcription analyzed by *in vivo* footprinting. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 1-9.
128. Levy, D. and Darnell, Jr., J.E. (1990). Interferon-dependent transcriptional activation: signal transduction without second messenger involvement? (review). *New Biol.*, **2**, 923-928.
129. Improta, T., Schindler, C., Horvath, C.M., Kerr, I.M., Stark, G.R. and Darnell, Jr., J.E. (1994). Transcription factor ISGF-3 formation requires phosphorylated Stat91 protein, but Stat113 protein is phosphorylated independently of Stat91 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 4776-4780.
130. Loh, J.E., Schindler, C., Ziemiecki, A., Harpur, A.G., Wilks, A.F. and Flavell, R.A. (1994). Mutant cell lines unresponsive to alpha/beta and gamma interferon are defective in tyrosine phosphorylation of ISGF-3α components. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 2170-2179.
131. Greenlund, A.C., Farrar, M.A., Viviano, B.L. and Schreiber, R.D. (1994). Ligand-induced IFNγ receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91). *EMBO J.*, **13**, 1591-1600.
132. Pearse, R.N., Feinman, R., Shuai, K., Darnell, Jr., J.E. and Ravetch, J.V. (1993). Interferon-γ-induced transcription of the high-affinity Fc receptor for IgG requires assembly of a complex that includes the 91-kDa subunit of transcription factor ISGF3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 4314-4318.
133. Learner, A.C., David, M., Feldman, G.M., Igarashi, K.-I., Hackett, R.H., Webb, S.A., Sweitzer, S.M., Petricoin III, E.F. and Finbloom, D.S. (1993). Tyrosine phosphorylation of DNA binding proteins by multiple cytokines. *Science*, **261**, 1730-1746 (a-d) (see all the following references in the same issue).
134. Müller, M., Laxton, C., Briscoe, J., Schindler, C., Improta, T., Darnell, Jr., J.E., Stark, G.R. and Kerr, I.M. (1993). Complementation of a mutant cell line: central role of the 91 kDa polypeptide of ISGF3 in the interferon-α and -γ signal transduction pathways. *EMBO J.*, **12**, 4221-4228.
135. Schindler, C., Shuai, K., Prezioso, V.R. and Darnell, Jr., J.E. (1992). Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor. *Science*, **257**, 809-813.
136. Pine, R., Canova, A. and Schindler, C. (1994). Tyrosine phosphorylated p91 binds to a single element in the ISGF2/IRF-1 promoter to mediate induction by IFNα and IFNγ, and is likely to autoregulate the p91 gene. *EMBO J.*, **13**, 158-167.
137. Fu, X.-Y., Schindler, C., Improta, T., Aebersold, R. and Darnell, Jr., J.E. (1992). The proteins of ISGF-3, the interferon α-induced transcriptional activator, define a gene family involved in signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 7840-7843.

138. Schindler, C., Fu, X.-Y., Improta, T., Aebersold, R. and Darnell, Jr., J.E. (1992). Proteins of transcription factor ISGF-3: one gene encodes the 91-and 84-kDa ISGF-3 proteins that are activated by interferon-α. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **89,** 7836-7839.
139. Veals, S.A., Schindler, C., Leonard, D., Fu, X.-Y., Aebersold, R., Darnell, Jr., J.E. and Levy, D.E. (1992). Subunit of an alpha-interferon-responsive transcription factor is related to interferon regulatory factor and Myb families of DNA-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.,* **12,** 3315-3324.
140. Veals, S.A., Santa Maria, T. and Levy, D.E. (1993). Two domains of ISGF3γ that mediate protein-DNA and protein-protein interactions during transcription factor assembly contribute to DNA-binding specificity. *Mol. Cell. Biol.,* **13,** 196-206.
141. Darnell, Jr., J.E., Kerr, I.M. and Stark, G.R. (1994). Jak-STAT pathway and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins (review). *Science,* **264,** 1415-1421.
142. Akira, S., Kishio, Y., Inoue, M., Wang, X.-J., Wei, S., Matsusaka, T., Yoshida, K., Sudo, T., Naruto, M. and Kishimoto, T. (1994). Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell,* **77,** 63-71.
143. Zhong, Z., Wen, Z. and Darnell, Jr., J.E. (1994). Stat3 and Stat4: members of the family of signal transducers and activators of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **91,** 4806-4810.
144. Fu, X.-Y. (1992). A transcription factor with SH2 and SH3 domains is directly activated by an interferon α-induced cytoplasmic protein tyrosine kinase(s). *Cell,* **70,** 323-335.
145. Shuai, K., Horvath, C.M., Huang, L.H.T., Qureshi, S.A., Cowburn, D. and Darnell, Jr., J.E. (1994). Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell,* **76,** 821-828.
146. Wegenka, U.M., Lütticken, C., Buschmann, J., Yuan, J., Lottspeich, F., Müller-Esterl, W., Schindler, C., Roeb, E., Heinrich, P.C. and Horn, F. (1994). The interleukin-6-activated acute-phase response factor is antigenically and functionally related to members of the signal transducer and activator of transcription (STAT) family. *Mol. Cell. Biol.,* **14,** 3186-3196.
147. Zhong, Z., Wen, Z. and Darnell, Jr., J.E. (1994). Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science,* **264,** 95-98.

148. Lütticken, C., Wegenka, U.M., Yuan, J., Buschmann, J., Schindler, C., Ziemiecki, A., Harpur, A.G., Wilks, A.F., Yasukawa, K., Taga, T., Kishimoto, T., Barbieri, G., Pellegrini, S., Sendtner, M., Heinrich, P.C. and Horn, F. (1994). Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science,* **263,** 89-92.
149. Sadowski, H.B. and Gilman, M.Z. (1993). Cell-free activation of a DNA-binding protein by epidermal growth factor. *Nature,* **362,** 79-83.
150. David, M. and Larner, A.C. (1992). Activation of transcription factors by interferon-alpha in a cell-free system. *Science,* **257,** 813-815.
151. Watanabe, N., Sakakibara, J., Hovanessian, A.G., Taniguchi, T. and Fujita, T. (1991). Activation of IFN-β element by IRF-1 requires a post-translational event in addition to IRF-1 synthesis. *Nucl. Acids Res.,* **19,** 4421-4428.
152. Harada, H., Fujita, T., Miyamoto, M., Kimura, Y., Maruyama, M., Furia, A., Miyata, T. and Taniguchi, T. (1989). Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes. *Cell,* **58,** 729-739.
153. Yamamoto, K., Quelle, F.W., Thierfelder, W.E., Kreider, B.L., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Silvennoinen, O. and Ihle, J.N. (1994). Stat4, a novel gamma interferon activation site-binding protein expressed in early myeloid differentiation. *Mol. Cell. Biol.,* **14,** 4342-4349.
154. Shuai, K., Schindler, C., Prezioso, V.R. and Darnell, Jr., J.E. (1992). Activation of transcription by IFN-γ: tyrosine phosphorylation of a 91-kD DNA binding protein. *Science,* **258,** 1808-1812.
155. Harada, H., Takahashi, E.-I., Itoh, S., Harada, K., Hori, T.-A. and Taniguchi, T. (1994). Structure and regulation of the human interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2 genes: implications for a gene network in the interferon system. *Mol. Cell. Biol.,* **14,** 1500-1509.
156. Kanno, Y., Kozak, C.A., Schindler, C., Driggers, P.H., Ennist, D.L., Gleason, S.L., Darnell, Jr., J.E. and Ozato, K. (1993). The genomic structure of the murine ICSBP gene reveals the presence of the gamma interferon-responsive element, to which an ISGF3α subunit (or similar) molecule binds. *Mol. Cell. Biol.,* **13,** 3951-3963.
157. Rein, T., Müller, M. and Żorbas, H. (1994). *In vivo* footprinting of the IRF-1 promoter: inducible occupation of a GAS element next to a persistent structural alteration of the DNA. *Nucl. Acids Res.,* **22,** 3033-3037.
158. Tanaka, N., Kawakami, T. and Taniguchi, T. (1993). Recognition DNA sequences of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2, regulators of cell growth and the interferon system. *Mol. Cell. Biol.,* **13,** 4531-4538.

159. Matsuyama, T., Kimura, T., Kitagawa, M., Pfeffer, K., Kawakami, T., Watanabe, N., Kündig, T.M., Amakawa, R., Kishihara, K., Wakeham, A., Potter, J., Furlonger, C.L., Narendran, A., Suzuki, H., Ohashi, P.S., Paige, C.J., Taniguchi, T. and Mak, T.W. (1993). Targeted disruption of IRF-1 or IRF-2 results in abnormal type I IFN gene induction and aberrant lymphocyte development. *Cell,* **75,** 83-97.
160. Harada, H., Kitagawa, M., Tanaka, N., Yamamoto, H., Harada, K., Ishihara, M. and Taniguchi, T. (1993). Anti-oncogenic and oncogenic potentials of interferon regulatory factors-1 and -2. *Science,* **259,** 971-974.
161. Driggers, P.H., Ennist, D.L., Gleason, S.L., Mak, W.-H., Marks, M.S., Levi, B.-Z., Flanagan, J.R., Appella, E. and Ozato, K. (1990). An interferon-γ-regulated protein that binds the interferon-inducible enhancer element of major histocompatibility complex class I genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **87,** 3743-3747.
162. Nelson, N., Marks, M.S., Driggers, P.H. and Ozato, K. (1993). Interferon consensus sequence-binding protein, a member of the interferon regulatory factor family, suppresses interferon-induced gene transcription. *Mol. Cell. Biol.,* **13,** 588-599.
163. Bovolenta, C., Driggers, P.H., Marks, M.S., Medin, J.A., Politis, A.D., Vogel, S.N., Levy, D.E., Sakaguchi, K., Appella, E., Coligan, J.E. and Ozato, K. (1994). Molecular interactions between interferon consensus sequence binding protein and members of the interferon regulatory factor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **91,** 5046-5050.
164. Harroch, S., Revel, M. and Chebath, J. (1994). Induction by interleukin-6 of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) gene expression through the palindromic interferon response element pIRE and cell type-dependent control of IRF-1 binding to DNA. *EMBO J.,* **13,** 1942-1949.
165. Grunstein, M. and Hogness, D. (1975). Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **72,** 3961-3964.
166. Igarashi, K.-I., David, M., Larner, A.C. and Finbloom, D.S. (1993). *In vitro* activation of a transcription factor by gamma interferon requires a membrane-associated tyrosine kinase and is mimicked by vanadate. *Mol. Cell. Biol.,* **13,** 3984-3989.
167. David, M., Grimley, P.M., Finbloom, D.S. and Larner, A.C. (1993). A nuclear tyrosine phosphatase downregulates interferon-induced gene expression. *Mol. Cell. Biol.,* **13,** 7515-7521.
168. Wilks, A.F. and Harpur, A.G. (1994). Cytokine signal transduction and the JAK family of protein tyrosine kinases (review). *BioEssays,* **16,** 313-320.

169. Silvennoinen, O., Ihle, J.N., Schlessinger, J. and Levy, D.E. (1993). Interferon-induced nuclear signalling by Jak protein tyrosine kinases. *Nature,* **366,** 583-585.

170. Ziemiecki, A., Harpur, A.G. and Wilks, A.F. (1994). JAK protein tyrosine kinases. Their role in cytokine signalling (review). *Trends Cell Biol.,* **4,** 207-212.

171. Ihle, J.N., Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Yamamoto, K., Thierfelder, W.E., Kreider, B. and Silvennoinen, O. (1994). Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs (review). *TIBS,* **19,** 222-227.

172. Müller, M., Briscoe, J., Laxton, C., Guschin, D., Ziemiecki, A., Silvennoinen, O., Harpur, A.G., Barbieri, G., Witthuhn, B.A., Schindler, C., Pellegrini, S., Wilks, A.F., Ihle, J.N., Stark, G.R. and Kerr, I.M. (1993). The protein tyrosine kinase JAK1 complements defects in interferon-α/β and -γ signal transduction. *Nature,* **366,** 129-135.

173. Watling, D., Guschin, D., Müller, M., Silvennoinen, O., Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Rogers, N.C., Schindler, C., Stark, G.R., Ihle, J.N. and Kerr, I.M. (1993). Complementation by the protein tyrosine kinase JAK2 of a mutant cell line defective in the interferon-γ signal transduction pathway. *Nature,* **366,** 166-170.

174. Silvennoinen, O., Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Cleveland, J.L., Yi, T. and Ihle, J.N. (1993). Structure of the murine Jak2 protein-tyrosine kinase and its role in interleukin 3 signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **90,** 8429-8433.

175. Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Silvennoinen, O., Yi, T., Tang, B., Miura, O. and Ihle, J.N. (1993). JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell,* **74,** 227-236.

176. Argetsinger, L.S., Campbell, G.S., Yang, X., Withuhn, B.A., Silvennoinen, O., Ihle, J.N. and Carter-Su, C. (1993). Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell,* **74,** 234-244.

177. Valazquez, L., Fellous, M., Stark, G. and Pellegrini, S. (1992). A protein tyrosine kinase in the interferon α/β signaling pathway. *Cell,* **70,** 313-322.

178. Kawamura, M., McVicar, D.W., Johnston, J.A., Blake, T.B., Chen, Y.-Q., Lal, B.K., Lloyd, A.R., Kelvin, D.J., Staples, J.e., Ortaldo, J.R. and O'Shea, J.J. (1994). Molecular cloning of L-JAK, a Janus family protein-tyrosine kinase expressed in natural killer cells and activated leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **91,** 6374-6378.

179a. Johnston, J.A., Kawamura, M., Kirken, R.A., Chen, Y.-Q., Blake, T.B., Shibuya, K., Ortaldo, J.R., McVicar, D. and O'Shea, J.J. (1994). Phosphorylation and activation of the Jak-3 Janus kinase in response to interleukin-2. *Nature,* **370,** 151-157.

179b. Witthuhn, A.G., Silvennoinen, O., Miura, O., Lai, S.K., Cwik, C., Liu, T.E. and Ihle, N.J. (1994). Involvement of the JAK-3 Janus Kinase in signalling by interleukins 2 and 4 in lymphoid and myeloid cells. *Nature,* **370,** 153-157.
180. Campbell, G.S., Argetsinger, L.S., Ihle, J.N., Kelly, P.A., Rillema J.A. and Carter-Su, C. (1994). Activation of JAK2 tyrosine kinase by prolactin receptors in Nb_2 cells and mouse mammary gland explants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **91,** 5232-5236.
181. Igarashi, K.-I., Garotta, G., Ozmen, L., Ziemiecki, A., Wilks, A.F., Harpur, A.G., Larner, A.C. and Finbloom, D.S. (1994). Interferon-γ induces tyrosine phosphorylation of interferon-γ receptor and regulated association of protein tyrosine kinases, Jakl and Jak2, with its receptor. *J. Biol. Chem.,* **269,** 14333-14336.
182. Narazaki, M., Witthuhn, B.A., Yoshida, K., Silvennoinen, O., Yasukawa, K., Ihle, J.N., Kishimoto, T. and Taga, T. (1994). Activation of Jak2 kinase mediated by the interleukin-6 signal transducer gp130. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **91,** 2285-2289.
183. Nicholson, S.E., Oates, A.C., Harpur, A.G., Ziemiecki, A., Wilks, A.F. and Layton, J.E. (1994). Tyrosine kinase JAK1 is associated with the granulocyte-colony-stimulating factor receptor and both become tyrosine-phosphorylated after receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **91,** 2985-2988.
184. Dusanter-Fourt, I., Müller, O., Ziemiecki, A., Mayeux, P., Drucker, B., Djiane, J., Wilks, A., Harpur, A.G., Fischer, S. and Gisselbrecht, S. (1994). Identification of JAK protein tyrosine kinases as signaling molecules for prolactin. Functional analysis of prolactin receptor and prolactin-erythropoietin receptor chimera expressed in lymphoid cells. *EMBO J.,* **13,** 2583-2591.
185. Caldenhoven, E., Coffer, P., Yuan, J., VanDe Stolpe, A., Horn, F., Kruijer, W. and VanDer Saag, P.T. (1994). Stimulation of the human intercellular adhesion molecule-1 promoter by interleukin-6 and interferon-γ involves binding of distinct factors to a palindromic response element. *J. Biol. Chem.,* **269,** 21146-21154.
186. Petricoin III, E.F., Hackett, R.H., Akai, H., Igarashi, K., Finbloom, D.S. and Larner, A.C. (1992). Modulation of interferon signaling in human fibroblasts by phorbol esters. *Mol. Cell. Biol.,* **12,** 4486-4495.

187. Nielsch, U., Zimmer, S.G. and Babiss, L.E. (1991). Changes in NF-κB and ISGF3 DNA binding activities are responsible for differences in MHC and β-IFN gene expression in Ad5- versus Ad12- transformed cells. *EMBO J.*, **10**, 4169-4175.

188. Kalvakolanu, D.V.R., Bandyopadhyay, S.K., Harter, M.L. and Sen, G.C. (1991). Inhibition of interferon-inducible gene expression by adenovirus E1A proteins: block in transcriptional complex formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 7459-7463.

189. Offringa, R., Gebel, S., Van Dam, H., Timmers, M., Smits, A., Zwart, R., Stein, B., Bos, J.L., Van Der Eb, A. and Herrlich, P. (1990). A novel function of the transforming domain of E1A: repression of AP-1 activity. *Cell*, **62**, 527-538.

190. Van Dam, H., Offringa, R., Meijer, I., Stein, B., Smits, A.M., Herrlich, P., Bos, J.L. and Van Der Eb, A. (1990). Differential effects of the adenovirus E1A oncogene on members of the AP-1 transcription factor family. *Mol. Cel. Biol.*, **10**, 5857-5864.

191. Boulanger, P.A. and Blair, G.E. (1991). Expression and interactions of human adenovirus oncoproteins. *J. Biochem.*, **275**, 281-299.

192. Kitabayashi, I., Kawakami, Z., Chiu, R., Ozawa, K., Matsuoka, T., Toyoshima, S., Umesono, K., Evans, R.M., Gachelin, G. and Yokoyama, K. (1991). Transcriptional regulation of the *c-jun* gene by retinoic acid and E1A during differentiation of F9 cells. *EMBO J.*, **11**, 167-175.

193. Nevins, J.R. (1991). Transcriptional activation by viral regulatory proteins (review). *TIBS*, **16**, 435-439.

194. Moran, E. (1993). DNA tumor virus transforming proteins and the cell cycle (review). *Cur. Opin. Genet. Devel.*, **3**, 63-70.

195. Driscoll, J. and Finley, D. (1992). A controlled breakdown: antigen processing and the turnover of viral proteins. *Cell*, **68**, 823-825.

196. Chellappan, S.P., Hiebert, S., Mudryj, M., Horowitz, J.M. and Nevins, J.R. (1991). The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell*, **65**, 1053-1061.

197. Debbas, M. and White, E. (1993). Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. *Genes and Development*, **7**, 546-554.

198. Nagata, T., Segars, J.H., Levi, B.-Z. and Ozato, K. (1992). Retinoic acid-dependent transactivation of major histocompatibility complex class I promoters by the nuclear hormone receptor H-2RIIBP in undifferentiated embryonal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 937-941.

199. Segars, J.H., Nagata, T., Bours, V., Medin, J.A., Franzoso, G., Blanco, J.C.G., Drew, P.D., Becker, K.G., An, J., Tang, T., Stephany, D.A., Neel, B., Siebenlist, U. and Ozato, K. (1993). Retinoic acid induction of major histocompatibility complex class I genes in N-Terra2 embryonal carcinoma cells involves induction of NF-κB (p50-p65) and retinoic acid receptor β-retinoid X receptor β heterodimers. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 6157-6169.
200. Johnson, D.R. and Pober, J.S. (1994). *HLA* class I heavy-chain gene promoter elements mediating synergy between tumour necrosis factor and interferons. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 1322-1332.
201. Zelent, A., Mendelsohn, C., Kastner, P., Krust, A., Garnier, J.-M., Ruffenach, F., Leroy, P. and Chambon, P. (1991). Differentially expressed isoforms of the mouse retinoic acid receptor β are generated by usage of two promoters and alternative splicing. *EMBO J.*, **10**, 71-81.
202. Leroy, P., Krust, A., Zelent, A., Mendelsohn, C., Garnier, J.-M., Kastner, P., Dierich, A. and Chambon, P. (1991). Multiple isoforms of the mouse retinoic acid receptor α are generated by alternative splicing and differential induction by retinoic acid. *EMBO J.*, **10**, 59-69.
203. Shivji, M.K. and La Thangue, N.B. (1991). Multicomponent differentiation-regulated transcription factors in F9 embryonal carcinoma stem cells. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 1686-1695.
204. Shuai, K. (1994). Interferon-activated signal transduction to the nucleus (review). *Cur. Opin. Cell Biol.*, **6**, 253-259.
205. Kisselev, L., Frolova, L. and Haenni, A.-L. (1993). Interferon inducibility of mammalian tryptophanyl-tRNA synthetase: new perpectives. *TIBS*, **18**, 263-267.
206. Fu, X.-Y. and Zhang, J.-J. (1993). Transcription factor p91 interacts with the epidermal growth factor receptor and mediates activation of the *c-fos* gene promoter. *Cell*, **74**, 1135-1145.
207. Γρηγορίου, Μ. (1993). Μελέτη της μεταγραφικής ρύθμισης του γονιδίου ιστοσυμβατότητας τάξης II *Εβ* του ποντικού. *Διδακτορική Διατριβή*.
208. Roitt, J., Brostoff, J. and Male, D. (1986). *Immunology* (Textbook). Gower Medical Publishing. London, New York.
209. Graham, F. and Van Der Eb, A. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human-5 DNA. *Virology*, **57**, 456-467.
210. Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J. and Struhl, K. (1989). Current protocols in Molecular Biology.
211. McGregor, G. and Caskey, D. (1989). Construction of plasmids that express *E. coli* β-galactosidase in mammalian cells. *Nucl. Acids Res.*, **17**, 23-65.

212. Durand, B., Kobr, M., Reith, W. and Mach, B. (1994). Functional complementation of Major Histocompatibility Complex Class II regulation mutant by the purified X-box-binding protein RFX. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 6839-6847.

213. Ktistaki, E., Lacorte, J.M., Katrakili, N., Zannis, V. and Talianidis, I. (1994). Transcriptional regulation of the ApoAIV gene involves synergism between a proximal orphan receptor response element and a distant enhancer located in the upstream promoter region of the ApoCIII gene. *Nucl. Acids Res.*, **22**, 4689-4696.

214. Pearse, R., Feinman, R. and Ravetch, J. (1991). Characterization of the promoter of the human gene encoding the high-affinity IgG receptor: Transcriptional induction by γ-interferon is mediated through common DNA response elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 11305-11309.

215. Pan, J., Ting, Y. and Baldwin, A. (1993). Regulation of MHC gene expression (review). *Curr. Opin. Immunol.*, **5**, 8-16.

216. Liu, F. and Green, R.M. (1994). Promoter targeting by adenovirus E1A through interaction with different cellular DNA-binding domains. *Nature*, **368**, 520-525.

217. Gutch, J.M. and Reich, C.N. (1991). Repression of the Interferon Signal transduction pathway by the adenovirus E1A oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 7913-7917.

218. Bayley, T.S. and Mymryk, S.J. (1994). Adenovirus E1A proteins and transformation (review). *Intl. J. of Oncology*, **5**, 425-444.

219. Shea, M., King, D., Conboy, M., Mariani, B. and Kafatos, F. (1990). Proteins that bind to *Drosophila* chorion cis-regulatory elements: A new C_2H_2 zinc finger protein and a C_2C_2 steroid receptor-like component. *Genes and Development*, **4**, 1128-1140.

220. Hou, J., Schindler, U., Henzel, W., Chun, H.T., Brasseur, M. and McKnight, S. (1994). An Interleukin-4 induced transcription factor: IL-4 STAT. *Science*, **265**, 1701-1706.

221. Parker, M. (1993). Steroid and related receptors (review). *Curr. Opin. Cell Biology*, **5**, 499-504.

222. Vassiliadis, S., Kyrpides, N., Stravopodis, D., Gregoriou, M. and Papamatheakis, J. (1993). Investigation of intracellular signals generated by γ-interferon and IL-4 leading to the induction of class II antigen expression. *Mediators of Inflammation*, **2**, 343-348.

223. Feng, S.G. and Pawson, T. (1994). Phosphotyrosine phosphatases with SH2 domains: regulators of signal transduction *TIBS*, **10**, 54-58.

224. Lee, S.J., Trowsdale, J. and Bodmer, F.W. (1982). cDNA clones coding for the heavy chain of human *HLA-DR* antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 545-549.

225. Zhuang, H., Patel, V.S., He, T., Sonsteby, K.S., Niu, Z. and Wejchowski, M.D. (1994). Inhibition of erythropoietin-induced mitogenesis by a kinase deficient form of JAK2. Communication. *J. Biol. Chem.*, **269,** 21411-21414.
226. Takeda, T., Nakajima, K., Kojima, H. and Hirano, T. (1994). E1A repression of IL-6-induced gene activation by blocking the assembly of IL-6 response element binding complexes. *J. Immunol.,* **153,** 4573-4582.
227. Vassiliadis, S., Stravopodis, D., Kyrpides, N., Gregoriou, M. and Papamatheakis, J. (1993). One and two- level regulation patterns affecting NFκB mRNA and nuclear NFκB activity after treatment with TNF-α, IFN-γ and IL-4. *European Cytokine Network,* **4,** 25-30.
228. Karlsson, L., Surh, C., Sprent, J. and Peterson, P. (1992). An unusual class II molecule. *Immunology Today,* **13,** 469-470.

Δακτυλογράφηση, Δημιουργία Γραφικών, Ηλεκτρονική Επεξεργασία κειμένου: Γ. Χουλάκη, Μονής Αρετίου 4Β, Ηράκλειο, Κρήτη. Τηλ. 324.508.