

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ
Ε1Α ΚΑΙ C1ΤΑ ΣΤΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΤΩΝ
ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ ΤΑΞΗΣ
II.**

ΘΕΟΔΩΡΑ Δ. ΑΓΑΛΙΩΤΗ.

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 1998

*Στους Μάκη, Πηγειώ και
Αλέκο.*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε εξ ολοκλήρου στο εργαστήριο της ομάδας θηλαστικών του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, του ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας, υπό τη επίβλεψη του καθηγητή Ιωσήφ Παπαματθαϊάκη. Η συνεργασία μας υπήρξε άψογη καθ' όλη τη διάρκεια της, ενώ η επιστημονική σκέψη του, διαμόρφωσε καταλυτικά και τη δική μου. Τον ευχαριστώ διότι με τίμησε με την εμπιστοσύνη του και καθοδήγησε τα πρώτα βήματά μου στο πεδίο της βασικής έρευνας.

Οφείλω να ευχαριστήσω τους συνεργάτες μου της ομάδας Θηλαστικών, παρόντες αλλά και απόντες. Η συνεργασία μου μαζί τους υπήρξε εποικοδομητική, ενώ το περιβάλλον εργασίας μας ήταν πάντα εξαιρετικά ευχάριστο. Σε όλους τους συνεργάτες και τους φίλους μου, παρόντες σήμερα ή απόντες, ένα «Ευχαριστώ», πενιχρό αντίτιμο αυτού που υπήρξαν για μένα αυτά τα δέκα χρόνια.

Ειδική μνεία στις Στάσα και Νατάσσα, η φίλια μαζί τους, ήταν το σταθερό έρμα για να ισορροπήσω από τους κλυδωνισμούς των όποιων δυσκολιών. Τέλος ευγνωμοσύνη βαθύτατη, στην οικογένειά μου, σαν ελάχιστη αναγνώριση των θυσιών και των παραχωρήσεών τους στη διάρκεια μιας επίπονης αλλά εξαιρετικά διδακτικής προσπάθειας. Αυτό που τους χρωστάω είναι ανεκτίμητο.

Ηράκλειο 30.6.1998
Θεοδώρα Αγαλιώτη.

Συντμήσεις:

A	APCs: <i>Antigen Presenting Cells</i>
B	BLS: <i>Bare Lymphocyte Syndrome</i> bHLH: <i>basic Helix-loop-Helix proteins</i>
C	CAT: <i>Chloramphenicol Acetyl-Transferase</i> CBP: <i>CREBp Binding Protein</i> CIITA: <i>Class II TransActivator</i> CRE: <i>cAMP Response Element</i> CREBp: <i>cAMP Response Element Binding Protein</i>
E	E1A: <i>Early Region 1 A</i>
H	HLA: <i>Human Leukocyte Antigens</i> HIFα : <i>Hypoxia Inducible Factor α</i>
I	Ii: <i>Invariant Chain</i> ISGF3: <i>Interferon Stimulated Gene Factor 3</i>
J	JAKs: <i>Janus Kinases</i>
M	MHC: <i>Major Histo-Compatibility Antigens</i>
N	NF-Kb: <i>Nuclear Factor kappa B</i>
P	PCR: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
R	RFX: <i>Response Factor X</i> RFX-AP: <i>Response Factor X-Associated Protein</i>
S	STATs: <i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
T	TBP: <i>TATA Binding Protein</i> TGFβ: <i>Transforming Growth Factor β</i> TCR: <i>T Cell Receptor</i> TRE: <i>TPA Response Element.</i>
U	USF1: <i>Ubiquitous Factor 1</i>
Y	YY1: <i>Yin-Yang protein 1</i>

SUMMARY

The Major Histocompatibility Complex (MHC) Class II molecules are surface proteins of central importance for antigen presentation and the regulation of the immune response. MHC Class II molecules are encoded by members of a family of polymorphic genes that show complex cell type specific, developmental and cytokine mediated expression patterns. Class II genes have attracted a lot of scientific interest because of their immunological importance and complex expression. MHC Class II genes are coordinately regulated at the transcriptional level due to a unique combination of well-characterized conserved cis elements found at their proximal promoters called class II boxes (CB) or motifs. The presence and concerted action of all the CBs and their characterized cognate transcription factors (TFs) is necessary, but is not by itself sufficient for gene expression. At a higher regulatory level, the action of the above TFs is integrated by yet another protein factor called the Class II Transactivator protein (CIITA) that determines both the B cell specific and the interferon- γ (IFN γ) inducible transcriptional activity of Class II genes in cells of macrophage or epithelial origin.

The Adenoviral E1A gene has proven to be a valuable tool for the understanding of important aspects of cell cycle regulation. E1A is a dual transcriptional modulator. It acts as transcriptional activator or repressor in many cases of viral and cellular genes. Due to its ability to sequester molecules with properties of transcriptional “adaptors”, E1A is known to act as a powerful repressor of transcription.

Here we report that E1A represses B cell specific, interferon- γ induced and CIITA dependent transcription, of both mouse and human MHC class II promoters. This ability of E1A resides at both the extreme N-terminal part (aa 1-20) and the CR1 (aa) domain of the protein. These regions of E1A are known to interact with the “adaptor” molecule p300. Repression cannot be defined to target any single element. Thus, the combinatorial action of the E α gene promoter CBs is equally subject to activation in B cells or after IFN- γ and repression by E1A.

E1A does not interfere with the ability of CIITA access to Class II promoters. Rather, E1A specifically targets the function of CIITA’s transcription activation domain. E1A and CIITA do not physically contact each other. Since it has been demonstrated that E1A and CIITA bind to the CH₃ domain of the “adaptor” molecule CBP, we propose that E1A inhibits both B cell and IFN- γ mediated class II transcription by disrupting the CBP-CIITA interaction.

Furthermore, we show that E1A interferes with «early» events of the IFN- γ signal transduction pathway that depend on the integrity of the Jak-STAT system that in turn, is necessary for the transcriptional induction of CIITA. 293 cells that express E1A are defective in both early and late (Class II) IFN γ response. Inability of 293 cells for class II induction by IFN γ correlates with the absence of CIITA mRNA induction. The action of STAT1 α is inhibited in these cells in spite of its normal phosphorylation, transportation to the nucleus, and binding to the target DNA. We present evidence that E1A inhibits the action of STAT1 α by targeting its transcriptional activation domain.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.

Τα Τάξης II αντιγόνα που ανήκουν στο μείζον σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας, είναι μεμβρανικά ετεροδιμερή μόρια εξαιρετικής σημασίας για τις διαδικασίες του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως η παρουσίαση αντιγόνων και η ρύθμιση της ανοσοαπόκρισης. Τα τάξης II αντιγόνα κωδικοποιούνται από μέλη μίας οικογένειας πολυμορφικών γονιδίων, που επιδεικνύουν πολύπλοκα ιστοειδικά, αναπτυξιακά, και εξαρτώμενα από λεμφοκίνες πρότυπα έκφρασης. Τα τάξης II γονίδια παρουσιάζουν εξαιρετικό επιστημονικό ενδιαφέρον, λόγω της σπουδαιότητάς τους και της πολύπλοκης έκφρασής τους. Τα γονίδια τάξης II ρυθμίζονται ως ομάδα σε μεταγραφικό επίπεδο εξαιτίας ενός μοναδικού συνδυασμού καλά χαρακτηρισμένων και συντηρημένων cis στοιχείων που βρίσκονται στην εγγύτερη περιοχή των υποκινητών τους. Τα στοιχεία αυτά ονομάζονται «μοτίβα Τάξης II». Η παρουσία και η συντονισμένη δράση όλων αυτών των στοιχείων μαζί με τους χαρακτηρισμένους μεταγραφικούς παράγοντες που αλληλεπιδρούν με αυτά, είναι απαραίτητη αλλά όχι από μόνη της αρκετή για την έκφραση των γονιδίων αυτών. Σε ένα ανώτερο ρυθμιστικό επίπεδο η μεταγραφή των τάξης II γονιδίων Ιστοσυμβατότητας απαιτεί την ύπαρξη ενός άλλου μεταγραφικού παράγοντα που ονομάζεται CITA. (Class II Trans-Activator) ο οποίος καθορίζει αμφότερες την B λεμφοειδική και επαγόμενη από Ιντερφερόνη-γ (σε σειρές μακροφαγικής και επιθηλιακής γενεαλογίας) μεταγραφή των τάξης II γονιδίων.

Το αδενοϊκό γονίδιο E1A αποτελεί πολύτιμο βιοχημικό βοήθημα για την κατανόηση των μονοπατιών που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο. Το E1A είναι ένας διττός μεταγραφικός ρυθμιστής. Ενεργοποιεί ή καταστέλλει τη μεταγραφή σε πολλές περιπτώσεις ιικών ή κυτταρικών γονιδίων. Εξαιτίας της ικανότητας του να αλληλεπιδρά με μόρια με ιδιότητες μοριακών “αρμοστών” το E1A είναι ικανό να δρα ως ισχυρότατος μεταγραφικός καταστολέας.

Στην παρούσα μελέτη αναφέρεται ότι το E1A καταστέλλει τη B-λεμφοειδική, την επαγόμενη από την ιντερφερόνη-γ και την εξαρτώμενη από το CITA απόκριση των υποκινητών ανθρώπινων αλλά και ποντικίστων γονιδίων τάξης II. Αυτή η ιδιότητα του E1A αποδίδεται στην ύπαρξη αμφοτέρων του αμινοτελικού άκρου της πρωτεΐνης και της περιοχής CR1. Αυτές οι περιοχές του E1A είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρούν με το μόριο «αρμοστή» p300.

Το παρατηρούμενο κατασταλτικό αποτέλεσμα δεν μπορεί να συσχετισθεί με την ύπαρξη κανενός συγκεκριμένου cis στοιχείου του υποκινητή Eα. Ο υποκινητής Eα λειτουργεί ως εννιαίο σύνολο (στις περιπτώσεις συστατικής έκφρασης στα B λεμφοκύτταρα ή στις περιπτώσεις ενεργοποίησης από ιντερφερόνη-γ) και ως τέτοιος δέχεται την κατασταλτική επίδραση του E1A.

Το E1A δεν παρεμβαίνει στη διαδικασία κατά την οποία το CITA αποκτά πρόσβαση στους υποκινητές τάξης II μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Το E1A καταστέλλει ειδικά τη δράση του αμινοτελικού άκρου του μορίου CITA, δηλαδή την περιοχή του μορίου που ενεργοποιεί τη μεταγραφή. Το E1A και το CITA δεν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Δεδομένου του γεγονότος ότι το E1A και το CITA αλληλεπιδρούν και τα δύο με την περιοχή CH₃ του μορίου-αρμοστή CBP, προτείνεται ένα μηχανιστικό μοντέλο. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό το E1A καταστέλλει τη B λεμφοειδική και την επαγόμενη από Ιντερφερόνη-γ μεταγραφή των τάξης II, εμποδίζοντας την επαφή μεταξύ των μορίων CBP και CITA.

Το E1A παρεμβαίνει επίσης στο πρώιμο μονοπάτι σηματοδότησης της ιντερφερόνης-γ, η ακεραιότητα του οποίου είναι εξαιρετικής σημασίας για την

επαγωγή του μηνύματος CIPTA. Η κυτταρική σειρά 293 που εκφράζει τις πρωτεΐνες E1A μειονεκτεί στην «πρώιμη» και «όψιμη» απόκριση σε γεγονότα σηματοδότησης της ιντεφερόνης- γ . Το μειονέκτημα που διαπιστώνεται στην κυτταρική σειρά 293, ως προς την επαγωγή των τάξης II γονιδίων Ιστοσυμβατότητας συσχετίζεται με την απουσία επαγωγής μηνύματος CIPTA. Η δράση του STAT1a εμποδίζεται στην εν λόγω κυτταρική σειρά παρά το γεγονός ότι ο παράγοντας εμφανίζεται φωσφορυλιωμένος, μεταφέρεται στον κυτταρικό πυρήνα και προσδέεται στο DNA στόχο. Παρουσιάζονται στοιχεία που υποστηρίζουν ότι το E1A παρεμποδίζει τη δράση του STAT1a στοχεύοντας στη λειτουργία της περιοχής του μορίου που ενεργοποιεί τη μεταγραφή.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 ΠΡΟΛΟΓΟΣ.	2
1.2 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΑΠΟ ΥΠΟΚΙΝΗΤΕΣ ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΟΥΣ ΑΠΟ ΤΗΝ RNA ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ II.	5
1.3 ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ ΤΑΞΗΣ II.	9
1.3.1 Η πρωτεΐνη CIPTA, ως κύριος ρυθμιστής της συστατικής και επαγόμενης από την ιντερφερόνη-γ μεταγραφής των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξης II.	11
1.3.2 Δομή της πρωτεΐνης CIPTA.	13
1.4 ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ E1A.	14
1.4.1 Ο παράγοντας E1A και ο κυτταρικός κύκλος.	15
1.4.2 Ο παράγοντας E1A ως μεταγραφικός ρυθμιστής.	19
<i>α. μεταγραφική ενεργοποίηση.</i>	19
<i>β. μεταγραφική καταστολή.</i>	20
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	22
2.1 ΥΛΙΚΑ.	23
2.1.1 Αντιδραστήρια.	23
2.1.2 Στελέχη βακτηρίων και σακχαρομύκητα, ιικοί και πλασμιδιακοί φορείς και βιβλιοθήκες.	23
2.1.3 Καλλιέργειες βακτηρίων και σακχαρομύκητα.	23
2.1.4 Κυτταρικές σειρές.	23
2.1.5 Θρεπτικά διαλύματα και υλικά καλλιιεργειών κυτταρικών σειρών.	23
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ.	24
2.2.1 Μέθοδοι ανάλυσης νουκλεϊκών οξέων.	24
2.2.1^α Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	24
2.2.1^β Πέψη μορίων DNA με ένζυμα περιορισμού.	24
2.2.1^γ Απομόνωση τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης.	24
2.2.1^δ Ραδιοσήμανση μορίων DNA.	24
2.2.1^ε Διαδικασίες υποκλωνοποίησης μορίων DNA.	24
2.2.1^{στ} Μετασηματισμός βακτηριακών στελεχών.	25
2.2.1^ζ Ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων βακτηριακών κλώνων.	26

	Σελίδα
2.2.1 ^η Υβριδοποίηση νουκλεϊκών οξέων.	26
2.2.1 ^θ Προσδιορισμός της πρωτοταγούς νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μορίων DNA (DNA sequencing analysis).	26
2.2.1 ^ι Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).	26
2.2.1 ^{ια} Απομόνωση και αντίστροφη μεταγραφή κυταροπλασματικού RNA (Reverse transcription) από κύτταρα σε καλλιέργεια.	26
2.2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.	28
2.2.2 ^α Ανάλυση WESTERN.	28
2.2.2 ^β Παραγωγή ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από κύτταρα θηλαστικών.	28
2.2.2 ^γ Πειράματα μεταβολής της κινητικότητας ολιγονουκλεοτιδίων λόγω δέσμευσης με πρωτεΐνες (Electrophoretic Mobility Shift Assays, EMSAs).	29
2.2.2 ^δ Παρασκευή ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από κύτταρα <i>S. cerevisiae</i> .	29
2.2.2 ^ε Καθαρισμός της πρωτεΐνης EIA από στήλη συγγενείας Ni ⁺ NTA αραρόζης.	29
2.2.2 ^{στ} Καθαρισμός της πρωτεΐνης CIITA από στήλη συγγενείας Ni ⁺ NTA αραρόζης.	30
2.2.2 ^ζ Χρώση νιτρικού αργύρου.	30
2.2.2 ^η Βιοτινύλιωση πρωτεϊνών.	30
2.2.2 ^θ Αλληλεπιδράσεις χημικών πρωτεϊνών-GST ή τμημάτων πρωτεϊνών με ραδιοσημασμένες πρωτεΐνες στόχους.	30
2.2.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗΣ ΚΑΙ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗΣ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.	31
2.2.3 ^α Διαμόλυνση (transfection) κυτταρικών σειρών.	31
2.2.3 ^β . Επιμόλυνση κυττάρων Sf-9 με ανασυνδυασμένο μπακυλο-ιό.	31
2.2.3 ^γ Μετασχηματισμός κυττάρων <i>S. cerevisiae</i> .	31
2.3 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ ΚΑΙ ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ.	32
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	37
3.1 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΜΕ ΤΟΝ ΟΠΟΙΟ ΚΑΤΑΣΤΕΛΛΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ EIA Η ΣΥΣΤΑΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΜΕ ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΗ γ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΥΠΟΚΙΝΗΤΕΣ ΤΩΝ ΤΑΞΗΣ II ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ.	37
3.1^α Το γονίδιο EIA καταστέλλει τόσο τη συστατική μεταγραφική έκφραση των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξης II, όσο και την επαγόμενη από ιντερφερόνη-γ.	37

3.2^β <i>Χαρακτηρισμός των cis- στοιχείων των υποκινητών των γονιδίων ιστοσυμβατότητας μέσω των οποίων ο παράγοντας E1A ασκεί το κατασταλτικό του αποτέλεσμα.</i>	38
3.1^γ <i>Χαρτογράφηση των περιοχών της πρωτεΐνης E1A που είναι αναγκαίες για τη καταστολή της μεταγραφής των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξης II.</i>	40
3.1^δ <i>Μελέτη της επίδρασης του παράγοντα E1A στην ενεργοποίηση των γονιδίων ιστοσυμβατότητας που εξαρτάται από την ύπαρξη της CΙΤΑ.</i>	42
3.1^ε <i>Διερεύνηση του μηχανισμού με τον οποίο η πρωτεΐνη E1A καταστέλλει το μεταγραφικό δυναμικό της CΙΤΑ.</i>	43
3.1^{στ} <i>Μελέτη της επίδρασης των αρμοστών p300/CBP στη μεταγραφή των γονιδίων ιστοσυμβατότητας τάξης II.</i>	46
3.1^ς ΣΥΖΗΤΗΣΗ.	48
3.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΜΕ ΤΟΝ ΟΠΟΙΟ ΚΑΤΑΣΤΕΛΛΕΤΑΙ Η ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΠΡΩΙΜΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΑΡΞΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ E1A.	52
3.2^α <i>Μελέτη της επίδρασης του παράγοντα E1A στη δημιουργία συμπλεγμάτων στα οποία συμμετέχει ο STAT1α.</i>	53
3.2^β <i>Μελέτη της επίδρασης του παράγοντα E1A στην επαγωγή μηνύματος CΙΤΑ από την ιντερφερόνη γ στην κυτταρική σειρά 293.</i>	55
3.2^γ <i>Μελέτη των πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων που σχετίζονται με την επαγωγή μηνύματος CΙΤΑ στην κυτταρική σειρά 293.</i>	56
3.2^δ <i>Ο παράγοντας E1A έχει στόχο την περιοχή που ενεργοποιεί μεταγραφή του STAT1α.</i>	58
3.2 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.	60
3.3 ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ E1A ΚΑΙ CΙΤΑ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΠΟΥ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΟΥΝ ΜΕ ΤΙΣ E1A ΚΑΙ CΙΤΑ ΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ.	64
3.3^α <i>Καθαρισμός και βιοτινυλίωση της πρωτεΐνης E1A 243R</i>	64
3.3^β <i>Καθαρισμός της πρωτεΐνης CΙΤΑ.</i>	65
3.3^γ <i>Έκφραση των γονιδίων E1A και CΙΤΑ στο σακχαρομύκητα και μελέτη της δράσης τους ως μεταγραφικών ενεργοποιητών στο σύστημα των «Δύο υβριδίων».</i>	67
3.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.	69

	Σελίδα
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.	71
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ.	75

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. 1 ΠΡΟΛΟΓΟΣ.

Το ανοσοποιητικό σύστημα στα σπονδυλωτά είναι πεδίο έντονης επιστημονικής έρευνας, η οποία χρονολογείται ήδη από τα τέλη του περασμένου αιώνα. Αυτή η επιστημονική δραστηριότητα, έφερε στο φως σημαντικές ανακαλύψεις, που αφορούν στις σχέσεις των κυττάρων-συστατικών του πολύπλοκου αυτού αρχιτεκτονικά συστήματος, το οποίο είναι υπεύθυνο για την άμυνα του οργανισμού στην εισβολή εξωτερικών παθογόνων παραγόντων. Ο πρώτος διαχωρισμός που μπορεί να επιχειρήσει κάποιος αναζητώντας έναν ορισμό, είναι να διαχωρίσει το ανοσοποιητικό σύστημα σε δύο κύριους κυτταρικούς πληθυσμούς: Στα λεμφοκύτταρα Β, υπεύθυνα για την λεγόμενη «χυμική» ανοσία, και στα λεμφοκύτταρα Τ υπεύθυνα για την λεγόμενη «κυτταρομεσολαβητική» ανοσία.

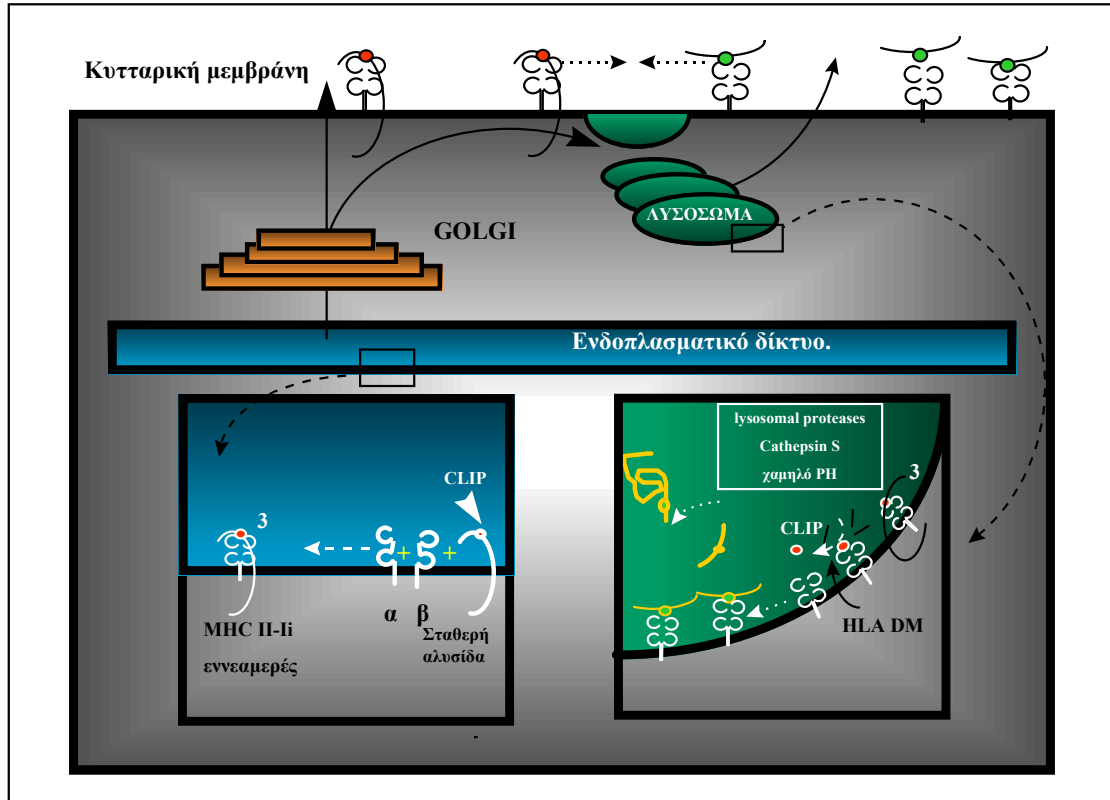
Οι σχέσεις των κυτταρικών συστατικών του ανοσοποιητικού συστήματος, βασίζονται κατά μεγάλο μέρος στην ύπαρξη και αναγνώριση μεμβρανικών μορίων που λειτουργούν ως σηματοδότες και καθορίζουν τόσο την κινητική όσο και την αναπτυξιακή συμπεριφορά ενός κυττάρου, σε δεδομένη χρονική στιγμή. Πλήθος τα μόρια στις μεμβράνες των δύο αυτών κυτταρικών πληθυσμών που καθορίζουν μάλιστα και τις λειτουργικές τους κατηγορίες. Μία τέτοια λειτουργική κατηγορία είναι τα κύτταρα που παρουσιάζουν τα εξωγενή αντιγόνα, κατάλληλα επεξεργασμένα, στους υποδοχείς των κυττάρων Τ (TCR) και λέγονται κύτταρα «παρουσιαστές αντιγόνων» (Antigen Presenting Cells ή APCs). Για την παρουσίαση αντιγόνων είναι πολύ σημαντική η ύπαρξη μίας οικογένειας μεμβρανικών μορίων που κωδικοποιούνται στο γενετικό τόπο του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex ή MHC). Η περιοχή αυτή του γενώματος στον άνθρωπο ονομάζεται HLA και εδράζεται στο χρωμόσωμα 6, ενώ στο ποντίκι ονομάζεται H-2 και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17. Ο γενετικός τόπος MHC περιλαμβάνει τρεις περιοχές που κωδικοποιούν τα αντιγόνα τάξης I, II και III. Ο διαχωρισμός των αντιγόνων αυτών σε τάξεις αντανακλά διαφορές τόσο στη δομή τους όσο και στο ρόλο τους. Τα αντιγόνα τάξης I και II είναι πολυμορφικά, όπως άλλωστε και η πλειοψηφία των πρωτεϊνικών μορίων που συναντώνται στο ανοσοποιητικό σύστημα, ενώ πολλά από τα αλληλόμορφα τους ξεπερνούν σε ηλικία ακόμα και αυτή την ίδια την ειδογένεση [1].

Τα αντιγόνα τάξης II είναι μικρά ετεροδιμερή συμπλέγματα διαμεμβρανικών γλυκο-πρωτεϊνών που εμφανίζονται στις μεμβράνες των «αντιγονοπαρουσιαστών». Συνίστανται από δύο πολυπεπίδια α και β, των οποίων η παρουσία στη μεμβράνη είναι το αποτέλεσμα πολύπλοκων διεργασιών σύνθεσης, μεταφοράς, αναγνώρισης και πρόσδεσης επεξεργασμένων πεπτιδίων. Τα πεπίδια αυτά προέρχονται από την αποικοδόμηση των πρωτεϊνικών συστατικών οποιουδήποτε σώματος, ο οργανισμός θεωρεί «ξένο» ως προς τον ίδιο [2]. Σημαντικό ρόλο σε αυτή τη διεργασία παίζει το γονίδιο της λεγόμενης «σταθερής αλυσίδας» (Invariant Chain gene) και τα γονίδια DM που χαρτογραφήθηκαν στην περιοχή των τάξης II σχετικά πρόσφατα [3]. Το προϊόν του γονιδίου της «σταθερής αλυσίδας» συνεκφράζεται με τα πολυπεπίδια α και β των αντιγόνων τάξης II, και δεσμευόμενο τα συνοδεύει, καθ' όλη τη διάρκεια των ενδοκυτταρικών μεταναστεύσεων τους στα υποκυτταρικά διαμερίσματα, μέχρι να «ανταλλαγεί» με τα αντιγονικά πεπίδια που πρόκειται να παρουσιαστούν. Τα προϊόντα των DM παίζουν βοηθητικό ρόλο σε αυτή τη διεργασία του φορτώματος

(Εικόνα 1). Τα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας εν γένει λειτουργούν παρουσιάζοντας πεπτίδια στον υποδοχέα των λεμφοκυττάρων T, πράγμα που σημαίνει ότι σχετίζονται άμεσα με μερικά από τα σημαντικότερα αναπτυξιακά μονοπάτια του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως με τις διαδικασίες της θετικής και αρνητικής επιλογής των λεμφοκυττάρων T, στο θύμο αδέν, και με την ανάπτυξη της γενεαλογίας των λεμφοκυττάρων B. Ποντίκια στα οποία έχουν δημιουργηθεί τεχνητά ελλείμματα στα δομικά τάξης II γονίδια (knock out mice), δε διαθέτουν κυκλοφορούντα περιφερειακά λεμφοκύτταρα T CD4⁺, δηλαδή βοηθούς T_H [4], αλλά είναι φυσιολογικά ζώα όταν αναπτύσσονται υπό άσηπτες συνθήκες.

Εκτός όμως από τον καθαρά αναπτυξιακό τους ρόλο, ρυθμίζουν σε μεγάλο βαθμό την ανοσοαπόκριση στα λεγόμενα εξωκυτταρικά παθογόνα (π.χ. βακτήρια), με την ενεργοποίηση του υποπληθυσμού των T_H. Η λειτουργία τους είναι εξαιρετικής σημασίας όπως αποδεικνύεται από την έλλειψη τους, υπεύθυνη στον άνθρωπο για το «σύνδρομο του γυμνού λεμφοκυττάρου» (Bare Lymphocyte Syndrome ή BLS), και από την εσφαλμένη ιστολογικά ή «εκτοπική» έκφρασή τους που προκαλεί καταστάσεις αυτοανοσίας. Το σύνδρομο του «γυμνού λεμφοκυττάρου» είναι μία βαριάς μορφής επίκτητη ανοσοανεπάρκεια, η οποία και προκαλεί θάνατο σε πρόωμη παιδική ηλικία στον φορέα, εξαιτίας εκτεταμένων βακτηριακών και μυκητιακών μολύνσεων του άνω αναπνευστικού συστήματος. Αντιμετωπίζεται μόνο με μεταμόσχευση μυελού των οστών.

Ένας σημαντικός ασφαλιστικός κόμβος για τη σωστή έκφραση των τάξης II γονιδίων ιστοσυμβατότητας είναι η μεταγραφή τους. Σκοπός την παρούσας διατριβής είναι η πρόταση ενός «μοντέλου», σύμφωνα με το οποίο συμβαίνουν τα γεγονότα επαγόμενης μεταγραφικής έναρξης στις περιοχές των υποκινητών των τάξης II γονιδίων ιστοσυμβατότητας. Το μοντέλο αυτό στοιχειοθετείται με την βοήθεια πληροφοριών που παρέχονται από τη χρήση ενός πολύτιμου «βιοχημικού εργαλείου»: του γονιδίου E1A του αδενοϊού 5. Πρόκειται για ένα ιϊκό γονίδιο, ορισμένα από τα πρωτεϊνικά προϊόντα του οποίου διαθέτουν ιδιότητες ρυθμιστών της μεταγραφικής διαδικασίας. Τα προϊόντα του γονιδίου αυτού έχουν χρησιμοποιηθεί, κατά το παρελθόν, στη διαλεύκανση βιοχημικών μονοπατιών που αφορούν στον κυτταρικό κύκλο. Η επαγωγή των γονιδίων ιστοσυμβατότητας τάξης II, από την ιντερφερόνη γ, είναι μία συνεχής σειρά διαδοχικών γεγονότων μεταγραφής. Έτσι, στην παρούσα μελέτη, η επίδραση της παρουσίας των πρωτεϊνικών προϊόντων E1A, σε μεταγραφικά φαινόμενα που οφείλονται στη ιντερφερόνη-γ, βοηθά στην κατανόηση των γεγονότων που λαμβάνουν χώρα από τα πρώιμα στάδια σηματοδότησης, έως και της στιγμής που η σηματοδότηση αυτή οδηγεί στη μεταγραφή των γονιδίων τάξης II. Στη συνέχεια της ενότητας της Εισαγωγής αναφέρονται τα ήδη γνωστά δεδομένα για τη μεταγραφή από υποκινητές εξαρτώμενους από την πολυμεράση II του RNA γενικά, για τη μεταγραφή των γονιδίων τάξης II ειδικότερα αλλά και για το γονίδιο E1A των αδενοϊών.



Εικόνα 1: Οι πολύπλοκες διαδικασίες μεταφοράς, στα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα των αντιγόνων τάξης II [5].

Τα ετεροδιμερή τάξης II μόρια συναρμολογούνται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (αριστερό εικονίδιο), με τη «σταθερή αλυσίδα» (Invariant chain) Ii, για να φτιάξουν εννεαμερή συμπλέγματα αβ-Ii (δείκτης 3). Από το σύστημα Trans Golgi, αυτά τα συμπλέγματα άγονται σε λυσοσωματικά υποκυτταρικά διαμερίσματα του μονοπατιού της ενδοκύτωσης, εξαιτίας σημάτων που βρίσκονται στην κυτταροπλασματική περιοχή της σταθερής αλυσίδας. Εκεί (δεξιό εικονίδιο), η σταθερή αλυσίδα αποικοδομείται μερικώς από καθεψίνες αφήνοντας το πεπτίδιο CLIP, στην κεντρική αύλακα αναγνώρισης του αντιγόνου των τάξης II. Στη συνέχεια, το CLIP ανταλλάσσεται με το αντιγονικό πεπτίδιο και αυτή η ανταλλαγή καταλύεται από τα μόρια HLA DM. Τόσο τα τάξης II που έχουν δεσμεύσει αντιγονικά πεπτίδια όσο και αυτά που είναι συνδεδεμένα με τη σταθερή αλυσίδα μεταφέρονται στην κυτταρική μεμβράνη.

1.2 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΑΠΟ ΥΠΟΚΙΝΗΤΕΣ ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΟΥΣ ΑΠΟ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ II ΤΟΥ RNA.

Η μεταγραφική διαδικασία είναι ένα φαινόμενο μεγάλης ακρίβειας και εξαιρετικής πολυπλοκότητας. Παρά το έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον στο πεδίο αυτό, πολλά από τα ερωτήματα που έχουν τεθεί παραμένουν άλυτα. Η διαδικασία αυτή μπορεί να αναλυθεί σε τέσσερα στάδια [6-9]:

1. Η απομάκρυνση και η τροποποίηση των ιστονών, ώστε να απελευθερωθεί το προς μεταγραφή τμήμα του DNA από τους τοπολογικούς περιορισμούς του νουκλεοσώματος.
2. Η «στρατολόγηση» του βασικού μεταγραφικού μηχανισμού είτε με τη μορφή διαλυτών συστατικών, είτε με τη μορφή της βιοχημικής οντότητας που ονομάζεται «ολοένζυμο της πολυμεράσης II».
3. Δύο (ή τρία) στάδια εξαρτώμενα από ATP, συμπεριλαμβανομένων
α) της «τήξης» της περιοχής του υποκινητή
β) της φωσφορυλίωσης της ίδιας της πολυμεράσης.
4. Η δημιουργία του πρώτου φωσφοδιεστερικού δεσμού του μεταγράφου και εν συνεχεία η επιμήκυνση και ο τερματισμός του.

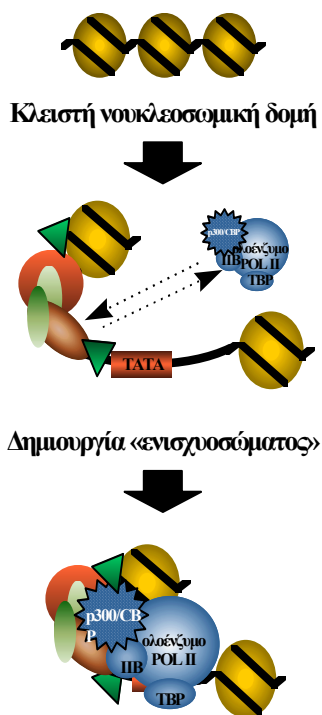
Τα δύο πρώτα στάδια αφορούν στη μεταγραφική έναρξη. Συγκεκριμένα η ενεργοποιούμενη μεταγραφή θεωρείται ότι αποτελεί «απόκριση» ενός βασικού μεταγραφικού μηχανισμού στην ύπαρξη μιας επιφάνειας, δημιουργημένης από την παράθεση ενός μοναδικού συνδυασμού μεταγραφικών παραγόντων, σε ένα περιορισμένο τμήμα DNA τον ενισχυτή (enhancer). Στο συμπέρασμα αυτό οδήγησε η μελέτη της μεταγραφής, στα πρότυπα συστήματα των υποκινητών της ιντερφερόνης-β και του TCR-a, δύο γονιδίων εξαρτώμενων για τη μεταγραφή τους από την πολυμεράση II του RNA.

Ο όρος «ενισχυόσωμα» (enhanceosome), εισάγεται για να δηλώσει ακριβώς το νουκλεο- πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που σχηματίζεται από μεταγραφικούς παράγοντες και πρωτεΐνες που «κάμπτουν» το DNA. Το ενισχυόσωμα είναι δομημένο έτσι ώστε το μεταγραφικό δυναμικό του να υπερβαίνει την άθροιση των μεταγραφικών δυναμικών των επι μέρους συστατικών του. Η χαρακτηριστική αυτή ιδιότητα του ενισχυοσώματος ονομάζεται «*συνέργεια*» (synergy) [9]. Υπάρχουν δύο επίπεδα στερεοειδικότητας του ενισχυοσώματος που αφορούν στη μεταγραφική ενεργοποίηση. Στο πρώτο οι αλληλεπιδράσεις των μεταγραφικών ενεργοποιητών πάνω στο γυμνό DNA υποκινούν την συνεργατική συναρμολόγηση του ενισχυοσώματος. Σε ένα δεύτερο επίπεδο η επιφάνεια αυτού του ίδιου του ενισχυοσώματος δεσμεύει κατά ένα συμπληρωματικό τρόπο μεγάλα πρωτεϊνικά μόρια συν-ενεργοποιητών ή αρμοστών (co-activators ή adaptors)[10] (Εικόνα 2).

Πριν ακόμα από την κλωνοποίηση μορίων με ιδιότητες αρμοστών, τα δεδομένα ήταν τέτοια που προέβλεπαν την ύπαρξη τέτοιων πρωτεϊνών. Η λειτουργία τους είναι, η ενοποίηση της βασικής μεταγραφικής μηχανής και του ενισχυοσώματος σε ένα υπερ-σύμπλεγμα, μεγέθους αντίστοιχου με αυτό ενός ριβοσώματος: του «μεταγραφικού σωματίου» (transcriptosome) [8].

Το βασικό χαρακτηριστικό των αρμοστών είναι ότι την πρόσβασή τους στους υποκινητές την αποκτούν χάρη στις αλληλεπιδράσεις τους με μεταγραφικούς

παράγοντες, που δεσμεύονται στο DNA και όχι αναγνωρίζοντας συγκεκριμένες αλληλουχίες στόχους (cis-elements) Μόρια με ιδιότητες αρμοστών, έχουν κλωνοποιηθεί στα θηλαστικά στην Δροσόφιλα στο *C. elegans* αλλά και στο σακχαρομύκητα [11,12].



Δημιουργία «μεταγραφικού σωματίου»

Εικόνα 2: Συνεργατικές λειτουργίες κατά την δημιουργία του ενισχυσώματος και τη συναρμολόγηση του προεναρκτήριου συμπλόκου.

Το τελικό μεταγραφικό σωματίο συναρμολογείται κατά τη διάρκεια μίας σταδιακής διαδικασίας, κάθε βήμα της οποίας χαρακτηρίζεται από συνέργεια. Αρχικά οι μεταγραφικοί ενεργοποιητές (ελλειπτικά σχήματα), μαζί με παράγοντες που λυγίζουν το DNA (τρίγωνα) δεσμεύονται στη χρωματίνη, ενώ στη συνέχεια υποχρεώνονται σε συνεργατικές πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις για να δημιουργήσουν το σταθερό «ενισχυσώμα». Η επιφάνεια του ενισχυσώματος, ως συμπληρωματική της επιφάνειας του προ-εναρκτήριου συμπλέγματος, το επιστρατεύει. Αυτό οδηγεί σε συνεργατική μεταγραφή. Τα διάστικτα βέλη δείχνουν τον αμοιβαίο χαρακτήρα της αλληλεπίδρασης. Παρόλο που η διαδικασία φαίνεται να περιλαμβάνει διακριτά στάδια, η αμοιβαιότητα των αλληλεπιδράσεων μπορεί να οδηγήσει σε ταυτόχρονη συναρμολόγηση του «μεταγραφικού σωματίου» [9].

Τα πιο γνωστά μόρια αυτής της κατηγορίας, είναι οι πρωτεΐνες p300 και CBP. Πρόκειται για μεγάλες πρωτεΐνες που αριθμούν περί τα 2.400 αμινοξικά κατάλοιπα η κάθε μία. Ανήκουν στην ίδια οικογένεια και εμφανίζουν μεγάλη ομολογία που πλησιάζει το 95% σε μία κεντρική περιοχή 800 αμινοξέων [13]. Η περιοχή αυτή της οποίας η κωδικοποιός αλληλουχία DNA δε διακόπτεται από ιντρόνια, περιλαμβάνει ένα μοτίβο, ίσως το μεγαλύτερο σε έκταση από τα μέχρι σήμερα χαρακτηρισμένα, που ονομάζεται «βρωμοπυρήνας» (bromodomain) [14].

Πριν την κλωνοποίηση του γονιδίου της [15], η πρωτεΐνη p300 είχε χαρακτηριστεί πολύ νωρίτερα ως μία από τις πρωτεΐνες στόχους του ογκογονιδίου E1A του αδενοϊού 5 [16-18]. Η τοποθέτησή της είναι πυρηνική ενώ υφίσταται φωσφορυλιώσεις τα επίπεδα των οποίων ρυθμίζονται ανάλογα με τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου [19]. Ο παράγοντας CBP (CREB Binding Protein) αναγνωρίζεται αρχικά ως το μόριο που δεσμεύεται στην φωσφορυλιωμένη μορφή του μεταγραφικού παράγοντα CREB, το οποίο και προκαλεί ενίσχυση του μεταγραφικού δυναμικού του τελευταίου [20]. Οι δύο αρμοστές p300 και CBP, εκτός από την ομολογία που παρουσιάζουν, μπορούν να υποκαταστήσουν ο ένας τον άλλο, τουλάχιστο ως προς τις δύο αυτές ιδιότητες τους [21]. Μέχρι σήμερα οι περισσότεροι μεταγραφικοί παράγοντες (θετικοί ή αρνητικοί ρυθμιστές), φαίνεται να αλληλεπιδρούν με τα μόρια

p300 και CBP. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις αναφέρονται για τους πυρηνικούς υποδοχείς [27] όπως και για τους μεταγραφικούς παράγοντες p65 (NF-kB) [22], AP-1 [23], STAT-2 [24], STAT-1 [25, 34], bHLH [26], YY1 [28], p53 [29], C/EBP_{beta} [30], HIF1-alpha [31]. Από όλους τους μεταγραφικούς παράγοντες που αναφέρθηκαν μόνον ο CREBp είναι φωσφορυλιωμένος κατά την αλληλεπίδραση του με τον CBP, ενώ για τους υπόλοιπους η φωσφορυλίωση δε φαίνεται απαραίτητη.

Η αποτελεσματικότητα των αρμοστών έγκειται στο γεγονός ότι έλκουν την βασική μεταγραφική μηχανή, μέσω των επαφών τους με τον παράγοντα TFIIB. Εξαιτίας της φυσικής αλληλεπίδρασης αυτού του τελευταίου με τον TBP (TATA Binding Protein) έχει καθοριστεί ένα μοντέλο με βάση την αλυσίδα αυτών των φυσικών αλληλεπιδράσεων, που εξηγεί την αλληλουχία των γεγονότων από το αρχικό ερέθισμα έως τη μεταγραφική έναρξη. Με τη ανάπτυξη τεχνικών για την απομόνωση του ολοενζύμου της πολυμεράσης II από κύτταρα ανώτερων ευκαρυωτικών, φαίνεται επίσης ότι τα μόρια p300/CBP αποτελούν μέρος του ολοενζύμου αυτού [32].

Το περιοριστικό σημείο και ταυτόχρονα η ασφαλιστική δικλείδα της μεταγραφικής ρύθμισης, εμφανίζεται να είναι η συγκέντρωση των μορίων των αρμοστών. Σε ορισμένες περιπτώσεις μάλιστα, όπου παρατηρείται καταστολή ενός μεταγραφικού παράγοντα από την ύπαρξη κάποιου άλλου, αποδεικνύεται ο ανταγωνισμός των δύο αυτών παραγόντων για τις περιορισμένες ενδοκυττάρειες ποσότητες των μορίων αυτών [33-35].

Μία άλλη παράμετρος εισάγεται στα γεγονότα της μεταγραφικής έναρξης όταν αποκαλύπτεται ότι τα μόρια p300/CBP, αλληλεπιδρούν με ακετυλάσες όπως είναι η πρωτεΐνη pCAF, αλλά διαθέτουν και οι ίδιες δυνατότητα ακετυλίωσης ιστονών [36, 37]. Το γεγονός αυτό είναι σημαντικό αφού, η χρωματίνη, της οποίας η βασική μονάδα είναι το νουκλεόσωμα, υφίσταται συνεχείς χωροταξικούς επαναπροσδιορισμούς γνωστούς με τον όρο «remodeling». Οι χωροταξικές αυτές αλλαγές αποσκοπούν στο να διευκολύνουν ή να εμποδίσουν διαδικασίες όπως η μεταγραφή και η αντιγραφή. Οι αλληλεπιδράσεις DNA-ιστονών μέσα στο νουκλεόσωμα καθώς και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ νουκλεοσωμάτων είναι ηλεκτροστατικής φύσεως και η αλλαγή τους μπορεί να επηρεάσει ακόμα και την δομή μορφών υψηλότερης τάξης. Η ακετυλίωση των ιστονών αποτελεί διαδικασία κατά την οποία μεταφέρονται ακετύλια σε κατάλοιπα λυσίνης στα αμινοτελικά άκρα και των τεσσάρων ιστονών του «πυρήνα» (core) του νουκλεοσώματος. Σε πολλά συστήματα η κατάσταση ακετυλίωσης των ιστονών είναι συνδεδεμένη με αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα. Στην αντίθετη περίπτωση κατά την οποία ακετύλια αφαιρούνται από τις ιστόνες, συνδέεται με τη λεγόμενη «σιωπηλή χρωματίνη». Εναλλακτικά, διαφορεική ακετυλίωση μπορεί να επηρεάζει αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ιστονών και μη ιστονικών πρωτεϊνών που με την σειρά τους μπορεί να επηρεάζουν την δομή της χρωματίνης [38]. Για τις δύο πρωτεΐνες p300/CBP, οι ιστόνες αποτελούν υποστρώματα. Το τελευταίο αυτό γεγονός υποδηλώνει ότι οι αρμοστές p300 και CBP έχουν ενεργό ρόλο στην διαδικασία εκτόπισης των νουκλεοσωμάτων από το μεταγραφικό σωματίο. Στη φυσική μάλιστα προσέγγιση του DNA από τα μόρια των αρμοστών, πρέπει να έχει και φυσιολογική σημασία το γεγονός της δεδομένης συνάφειας της p300 για δίκλωνο DNA, χωρίς όμως αυτή η συνάφεια να συνεπάγεται και ειδικότητα αναγνώρισης συγκεκριμένης αλληλουχίας [39].

Ενώ στα ενεργά μεταγραφικά σωμάτια, μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, συμμετέχουν υποχρεωτικά περισσότερες από μία πρωτεΐνες με δράση ακετυλ-τρανσφεράσης, μόνο μία από αυτές επιτελεί την κρίσιμη λειτουργία της ακετυλίωσης, την απαραίτητη για την έναρξη της μεταγραφής. Αυτό, πιθανώς, είναι αποτέλεσμα της δομής που αποκτά το ενεργό μεταγραφικό σωμάτιο η οποία και είναι χαρακτηριστική για κάθε διαφορετικό υποκινητή [40, 41].

Από τα περισσότερο γνωστά μη ιστονικά υποστρώματα για τις p300/CBP, αποτελούν και οι πρωτεΐνες p53 [42] και TFII β [43]. Η p53 είναι μία πρωτεΐνη με μικρό χρόνο ημιζωής, η οποία φυσιολογικά διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα. Η έστω και μεταβατική υπερέκφρασή της προκαλεί απόπτωση. Η πρωτεΐνη p53 ασκεί αντι-πολλαπλασιαστική δράση, σαν αντίδραση σε ερεθίσματα stress. Η κύρια βιοχημική δράση της p53 είναι η απόκριση σε ζημιές στο DNA. Σημαντική για τη δράση αυτή είναι η ικανότητα της πρωτεΐνης να αλληλεπιδρά με ειδικές αλληλουχίες στόχους στο DNA και να δρα σα μεταγραφικός παράγοντας [44].

Η p53 αποτελεί στόχο ιικών ογκογονιδίων όπως είναι το αντιγόνο T του SV-40 και το E1A του αδενοϊού 5. Ανεξάρτητα από την ύπαρξη ογκογονιδίων, η p53 βρίσκεται σε σύμπλεγμα με τις p300/CBP, που ενισχύουν το μεταγραφικό δυναμικό της [45]. Η p53 ακετυλιώνεται στο καρβοξυτελικό της άκρο από τις p300/CBP, και το γεγονός αυτό οδηγεί σε αλλαγές στη στερεοδιάταξη του μορίου. Το επακόλουθο των αλλαγών αυτών φαίνεται να είναι η ενεργοποίηση της ικανότητας της πρωτεΐνης να αλληλεπιδρά με αλληλουχίες στόχους DNA και να ενεργοποιεί μεταγραφή [42].

Τα μόρια CBP/p300, φαίνεται ότι εμπλέκονται σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες, αφού εκτός από τις ιδιότητές τους που συζητήθηκαν εκτενώς μέχρι τώρα, είναι οι κοινοί παρονομαστές πολλών γνωστών βιοχημικών μονοπατιών και έχουν ενεργό ρόλο στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, ενώ βρίσκονται μεταλλαγμένα σε πολλούς καρκίνους [46]. Πρόσφατα κλωνοποιήθηκε από ανθρώπινα κύτταρα ένα ομόλογο των CBP/p300, με μοριακό βάρος 270 Kd [47], το οποίο δεν φαίνεται να διαθέτει ικανότητα ακετυλ-τρανσφεράσης. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι τα μόρια αυτά ανήκουν σε μία γονιδιακή οικογένεια, τα μέλη της οποίας πιθανώς έχουν διακριτούς ρόλους [48]. Αυτό είναι φανερό και από το ότι η ύπαρξη ενός μόνο λειτουργικού αλληλομόρφου του CBP οδηγεί στην εκδήλωση του συνδρόμου Rubinstein-Taybi [49]. Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι η ύπαρξη μόνο του ενός αλληλομόρφου τόσο της p300 όσο και του CBP στα ποντίκια, εκδηλώνεται ως εμβρυϊκός θνησιγόνος φαινότυπος (haploinsufficiency) [50].

1.3 ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ ΤΑΞΗΣ II.

Τα επίπεδα μεμβρανικής εμφάνισης των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξης II είναι ανάλογα των επιπέδων των ενδοκυττάρων μηνυμάτων τους, πράγμα που σημαίνει ότι η ρύθμισή τους εντοπίζεται κύρια σε μεταγραφικό και μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Έτσι ιστολογικά η έκφρασή των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξης II εντοπίζεται στα λεμφοκύτταρα B, ως συστατική, ενώ μπορούν να επαχθούν μεταγραφικά σε ένα πλήθος κυτταρικών σειρών επιθηλιακής ή μακροφαγικής γενεαλογίας, με την επίδραση μορίων που ονομάζονται κυτοκίνες. Από τους σημαντικότερους θετικούς ρυθμιστές της έκφρασης τους στις τελευταίες αυτές κυτταρικές σειρές είναι οι κυτοκίνες Ιντερφερόνη- γ και ο TNF- α (Tumor necrosis factor- α), ενώ ενισχυτικό ρόλο στη συστατική έκφρασή τους, στα λεμφοκύτταρα B, έχει η Ιντερλευκίνη-4 [51, 52]. Κατά την επαγωγή με ιντερφερόνη- γ , μακροφαγικών και επιθηλιακών κυτταρικών σειρών, τα μηνύματα mRNAs των τάξης II ανιχνεύονται στο κυτταρόπλασμα 6 με 8 ώρες μετά την προσθήκη ιντερφερόνης- γ . Επιφανειακά αντιγόνα εμφανίζονται στις 12 ώρες [53, 54]. Η επαγωγή των τάξης II, από την ιντερφερόνη γ , απαιτεί πρωτεϊνική σύνθεση, καθώς εμφανίζεται ευαίσθητη στο κυκλοεξιμίδιο [53]. Με βάση την ιδιότητα αυτή, η μεταγραφική επαγωγή των γονιδίων τάξης II, χαρακτηρίζεται ως «όψιμο» γεγονός απόκρισης σε ιντερφερόνη- γ , σε αντιδιαστολή με γεγονότα «πρώιμης» κυτταρικής απάντησης, που δεν απαιτούν πρωτεϊνική σύνθεση. Στους αρνητικούς ρυθμιστές της έκφρασης των αντιγόνων τάξης II, συγκαταλέγονται η ιντερφερόνη β και ο TGF- β (Transforming Growth Factor β).

Οι εγγύς ρυθμιστικές περιοχές των τάξης II έχουν μελετηθεί εκτενέστατα τα τελευταία χρόνια, τόσο στο ποντίκι όσο και στον άνθρωπο. Η σύγκριση των αλληλουχιών των περιοχών αυτών οδηγεί στην διαπίστωση ύπαρξης συντηρημένων περιοχών, των λεγόμενων «στοιχείων» ή «πλαισίων» (boxes) που οριοθετούνται μεταξύ των συντεταγμένων -30 έως -250 από το σημείο έναρξης της μεταγραφής [55, 56]. Οι συντηρημένες αυτές αλληλουχίες συναντώνται και στα γονίδια της «σταθερής αλυσίδας» καθώς και στα, μη τυπικά, τάξης II γονίδια DM. Πρόκειται για τρία μοτίβα που ονομάζονται στοιχεία Y, X και S/W/H. Στα συντηρημένα αυτά μοτίβα, έχουν ανιχνευθεί αλληλεπιδράσεις, με μεταγραφικούς παράγοντες, πολλοί από τους οποίους έχουν κλωνοποιηθεί. Εντούτοις, η λειτουργική σύνδεση της μεταγραφής των τάξης II γονιδίων με πρότυπα δέσμευσης στα στοιχεία αυτά, έχει δειχθεί μόνο σε ορισμένες περιπτώσεις [55, 56].

Το κουτί Y, είναι μία ανάποδη αλληλουχία CAAT. Η ύπαρξη του μοτίβου αυτού είναι απαραίτητη για την άριστη λεμφοειδική έκφραση των τάξης II γονιδίων. Στην αλληλουχία αυτή, αλληλεπιδρά ο τριμερής μεταγραφικός παράγοντας NF-Y. Υπάρχουν ενδείξεις που υποστηρίζουν ότι το κουτί αυτό αποτελεί στόχο της πρωτεΐνης YB-1, η οποία είναι αρνητικός ρυθμιστής των τάξης II γονιδίων ιστοσυμβατότητας [57].

Το στοιχείο X μπορεί να αναλυθεί σε δύο ημίσεια, και συγκεκριμένα στα πλαίσια X₁ και X₂. Το δεύτερο από αυτά μοιάζει ως προς την πρωτοταγή αλληλουχία του με cis στοιχεία που «αποκρίνονται» στη σηματοδότηση από εστερες φορβόλης και το κυκλικό AMP (TPA Response Element/ cAMP Response Element TRE/ CRE). Με τα στοιχεία TRE/ CRE είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρούν οι μεταγραφικοί παράγοντες των οικογενειών AP-1 και ATF. Το σύμπλεγμα που δεσμεύεται σε αυτό

το στοιχείο έχει απομονωθεί βιοχημικά από κυτταρική σειρά με χαρακτηριστικά λεμφοκυττάρων B (Raji), και ονομάζεται X₂BP (X₂ Binding Protein). Η πρωτεϊνική αυτή οντότητα έχει κοινά αντιγονικά χαρακτηριστικά με τον παράγοντα CREB, ένα πρωτεϊνικό μόριο που κινητοποιείται από το βιοχημικό μονοπάτι του κυκλικού AMP.

Με το μοτίβο X₁ αλληλεπιδρά το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα RFX, το οποίο φαίνεται να αποτελείται από τουλάχιστο τρεις υπομονάδες. Τα μοριακά τους βάρη είναι 75, 41 και 36 KDa. Η υπομονάδα p75 που αναφέρεται ως RFX-5, έχει κλωνοποιηθεί και είναι αυτή που δημιουργεί επαφές με την αλληλουχία στόχο [58]. Το δεύτερο μέχρι σήμερα κλωνοποιημένο πρωτεϊνικό μόριο του συμπλέγματος RFX ονομάστηκε RFX-AP (RFX-5 Associated Protein) και έχει μοριακό βάρος 41 KDa [59]. Η έλλειψη των διαφόρων υπομονάδων του RFX, έχει συσχετισθεί με τρεις διαφορετικές ομάδες συμπληρωματικότητας της ασθένειας του «γυμνού λεμφοκυττάρου» BLS. Η p75 (RFX-5), απουσιάζει από κυτταρικές σειρές που ανήκουν στην ομάδα συμπληρωματικότητας C, ενώ η p41 (RFX-AP) απουσιάζει από την ομάδα B. Τέλος φαίνεται ότι από μία τρίτη ομάδα συμπληρωματικότητας απουσιάζουν οι υπομονάδες p41 και p36 [55]. Οι περισσότεροι ασθενείς με σύνδρομο BLS, ανήκουν σε αυτές τις ομάδες συμπληρωματικότητας και *in vitro*, τα μοτίβα X στους υποκινητές των τάξης II γονιδίων εμφανίζονται «ακάλυπτα» [60].

Το στοιχείο S/H έχει ένα βοηθητικό ρόλο στην επαγωγή των αντιγόνων τάξης II από την ιντερφερόνη-γ, σε συνδυασμό με το μοτίβο X. Μέχρι σήμερα δεν έχει αποδειχτεί η λειτουργική σύνδεση κάποιου από τα πρωτεϊνικά συμπλέγματα που αλληλεπιδρούν με αυτό και της μεταγραφικής επαγωγής των γονιδίων τάξης II. Εντούτοις, υπάρχουν ενδείξεις για την ομοιότητα των πρωτεϊνικών συστατικών των συμπλεγμάτων που αλληλεπιδρούν με τα μοτίβα X και S, ενώ υπάρχουν και στοιχεία που υποστηρίζουν την (ασθενική) δέσμευση ενός δεύτερου μορίου RFX στο στοιχείο S [61].

Ο τρόπος με τον οποίο μελετώνται οι αλληλεπιδράσεις με τα συντηρημένα μοτίβα των υποκινητών των τάξης II γονιδίων, εκ πρώτης όψεως, δίνει την ψευδή εντύπωση, ότι το καθένα λειτουργεί χωριστά για τη μεταγραφή τους. Παρόλα αυτά υπάρχουν στοιχεία που συνηγορούν υπέρ της άποψης ότι τα μοτίβα αυτά λειτουργούν συνδυαστικά [62]. Ένα πρώτο στοιχείο δίνει το γεγονός ότι εκτός από την συντήρηση των αλληλουχιών, η σχετική τοποθέτηση των τριών κουτιών μεταξύ τους έχει σημασία για τη μεταγραφή των τάξης II γονιδίων. Σημαντικότατο ρόλο, τόσο στην επαγόμενη από ιντερφερόνη-γ, όσο και στη συστατική (στα B λεμφοκύτταρα) έκφραση, έχει το κουτί X, όπως υποδηλώνει και η κεντρική τοποθέτησή του, καθώς πλαισιώνεται από τα μοτίβα H και Y. Ισχυρές συνεργατικές αλληλεπιδράσεις (υπό την έννοια της ενίσχυσης στη δέσμευση του καθενός παράγοντα στην αλληλουχία στόχο), παρατηρούνται κατά την αλληλεπίδραση των συμπλεγμάτων RFX και X₂BP, στο μοτίβο X. Συγκεκριμένα η ύπαρξη του δεύτερου ενισχύει τη δέσμευση του πρώτου, ανεξάρτητα από τη συγγένεια που έχει ο κάθε παράγοντας χωριστά για τα διάφορα κουτιά X. Κατ' επέκταση μπορεί κανείς να θεωρήσει ότι οι αλληλεπιδράσεις των συγκεκριμένων αυτών μορίων με τον υποκινητή, αποτελούν τον πρώτο πυρήνα γύρω από τον οποίο συγκεντρώνονται και οι υπόλοιποι μεταγραφικοί παράγοντες. Ο ρόλος του μοτίβου Y, δεν είναι πρωταρχικός, κατ' αυτή την έννοια, αλλά ο ρόλος του είναι σημαντικός, όπως έχει δείχθει σε πλήθος πειραματικών προσεγγίσεων. Υπάρχουν μαρτυρίες για εξαιρετικά σταθερά πρωτεϊνικά συμπλέγματα X₁-X₂-Y *in vitro* [63] [64, 65]. Εκτός των άλλων έχει αποδειχτεί ότι ο NF-Y αλληλεπιδρά με τις HMG I (Y) [66] και pCAF [67]. Η αλληλεπίδραση με την HMG I (Y) ενισχύει την

πρόσδεσή του στην αλληλουχία του μοτίβου CAAT [66]. Η πρωτεΐνη pCAF είναι ακετυλ-τρανσφεράση, και πιθανώς η ιδιότητα της αυτή της προσδίδει ενεργό ρόλο στο χωροταξικό επαναπροσδιορισμό της μορφής της χρωματίνης [68]. Ο κεντρικός ρόλος των πρωτεϊνών HMG I(Y), στη διαδικασία δημιουργίας του ενισχυοσώματος έχει αποδειχτεί σε άλλα μεταγραφικά συστήματα [69]. Είναι κοινή πεποίθηση πλέον, ότι και στη περίπτωση των τάξης II, η δημιουργία ενός τέτοιου υπερ-συμπλέγματος ευθύνεται για τα γεγονότα μεταγραφικής έναρξης [55, 62], παρόλο που χρειάζονται επιπλέον πειραματικές μαρτυρίες για το ρόλο που μπορεί να έχουν οι δύο πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις που αναφέρθηκαν συγκεκριμένα για τη μεταγραφή των γονιδίων ιστοσυμβατότητας τάξης II. Με την κλωνοποίηση του γονιδίου και το χαρακτηρισμό της πρωτεΐνης CITA (Class II Trans-Activator) που έχει ιδιότητες μεταγραφικού «αρμοστή» εξηγείται το πως η «κατάληψη» των υποκινητών των τάξης II in vivo, δεν συσχετίζεται πάντα με την μεταγραφή τους [62].

1.3.1 Η πρωτεΐνη CITA ως ο κύριος ρυθμιστής της συστατικής και επαγόμενης από την ιντερφερόνη-γ μεταγραφής των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξης II.

Το γονίδιο CITA κλωνοποιήθηκε, με βάση την ικανότητά του να επαναφέρει το φαινότυπο έκφρασης αντιγόνων τάξης II στην επιφάνεια μίας τεχνητά μεταλλαγμένης κυτταρικής σειράς (της RJ2.2.5) που υστερεί σε αυτό το σημείο από την προγονική της σειρά (Raji) [70]. Έκτοτε βρέθηκε ότι το γονίδιο αυτό έχει την ικανότητα να συμπληρώνει κατά τον ίδιο τρόπο ανθρώπινες κυτταρικές σειρές προερχόμενες από ασθενείς, πάσχοντες από το «Σύνδρομο του γυμνού Λεμφοκυττάρου» BLS (Bare Lymphocyte Syndrome)[62, 70, 71]. Η έκφραση των τάξης II αντιγόνων συμπίπτει, στις περισσότερες περιπτώσεις, με την έκφραση της CITA. Με άλλα λόγια, η έκφραση της CITA είναι συστατική σε κυτταρικές σειρές που εκφράζουν τάξης II αντιγόνα ιστοσυμβατότητας ενώ σε άλλες μπορεί να επαχθεί με την χρήση ιντερφερόνης-γ [72], με κινητικές χρονικά προγενέστερες της επαγωγής που επιδεικνύουν τα τάξης II. Εντούτοις υπάρχουν και ενδείξεις ότι η μεταγραφή των τάξης II γονιδίων, μπορεί να τελεστεί χωρίς τη συνδρομή του CITA [73-75]. Οι μαρτυρίες αυτές αφορούν όμως συγκεκριμένους ιστοτύπους των αντιγόνων τάξης II, πράγμα που σημαίνει ότι, τίθεται υπό αμφισβήτηση η καθολικότητα αυτών των συμπερασμάτων. Δεν υπάρχει καμία αμφιβολία ότι η επαγωγή των τάξης II αντιγόνων ιστοσυμβατότητας, από την ιντερφερόνη-γ, χρησιμοποιεί σαν υποχρεωτικό ενδιάμεσο την πρωτεΐνη CITA [72, 76, 77].

Το πρώιμο μονοπάτι επαγωγής από την ιντερφερόνη-γ είναι καλά χαρακτηρισμένο ως προς τα συστατικά του μόρια. Η δέσμευση της ιντερφερόνης-γ στον υποδοχέα της, κινητοποιεί το μεταγωγό του σήματος και μεταγραφικό παράγοντα STAT1, μέσω μίας αλληλουχίας φωσφορυλιώσεων. Ο όρος «κινητοποίηση» περιλαμβάνει την φωσφορυλίωσή του από την κίνηση JAK₁, και την είσοδο του στο πυρηνόπλασμα, όπου συμβάλλει στη μεταγραφή γονιδίων στόχων. Τα γεγονότα αυτά ανήκουν στην πρώιμη απόκριση σε ιντερφερόνη-γ. Ένας αριθμός δημοσιεύσεων συνδέει το άμεσο μονοπάτι σηματοδότησης της ιντερφερόνης-γ με την επαγωγή CITA [71, 72, 79, 80]. Η σύνθεση του μηνύματος mRNA της CITA αρχίζει δύο ώρες μετά από την επίδραση της ιντερφερόνης-γ, περίοδος κατά την οποία ο άμεσα αποκρινόμενος στην ιντερφερόνη-γ μεταγραφικός ενεργοποιητής

STAT1α, δεν είναι πλέον φωσφορυλιωμένος και δεν αλληλεπιδρά με τις αλληλουχίες GAS in vitro [78].

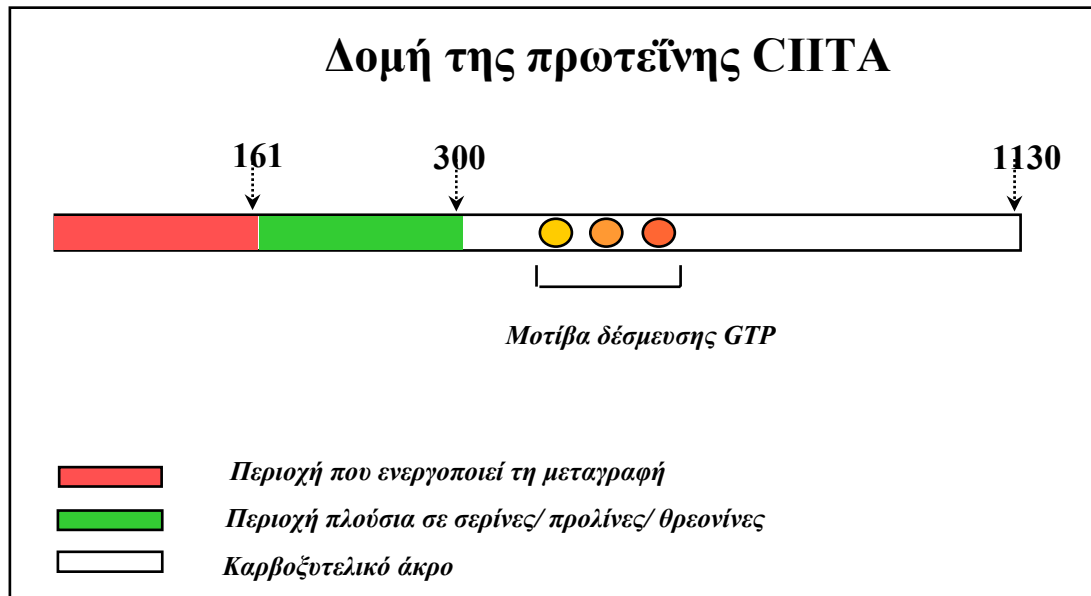
Δεδομένα που συνδέουν το άμεσο μονοπάτι σηματοδότησης της ιντερφερόνης-γ με την επαγωγή του CITA, είναι η ευαισθησία που επιδεικνύει η επαγωγή αυτή στη σταυροσπορίνη, για την οποία είναι γνωστό ότι αναστέλλει την φωσφορυλίωση που κινητοποιεί τη STAT1α [72]. Η κινάση η JAK₁, στην οποία αποδίδεται η φωσφορυλίωση αυτή, ως άμεσα αποκρινόμενη στην ιντερφερόνη γ, είναι επίσης απαραίτητη για την επαγωγή τόσο του μηνύματος του CITA όσο και για την επαγωγή των γονιδίων τάξης II. Συγκεκριμένα, σε μεταλλαγμένες κυτταρικές σειρές στις οποίες το γονίδιο της JAK₁ είναι ανενεργό, δεν επάγονται τόσο μηνύματα CITA όσο και αντιγόνων τάξης II. Η εισαγωγή του γονιδίου JAK₁, στα κύτταρα αυτά, επαναφέρει την επαγωγιμότητα των μηνυμάτων [71, 79]. Μία άλλη μαρτυρία προέρχεται από μελέτη με ειδικά συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια που εμποδίζουν τη μετάφραση του μηνύματος της STAT1α (antisense). Η χρήση των ολιγονουκλεοτιδίων αυτών καταργεί την επαγωγή του μηνύματος του CITA, καθώς και των αντιγόνων τάξης II [80]. Ένα τρίτο στοιχείο, συνιστά το γεγονός ότι σε κυτταρικές σειρές στις οποίες λείπει η STAT1α, δεν επάγονται τάξης II γονίδια από την ιντερφερόνη γ [81, 82]. Σε αυτές τις κυτταρικές σειρές επανέρχεται ο φαινότυπος επαγωγής των τάξης II με την προσθήκη STAT1α.

Οι απόψεις για τα όρια της ρυθμιστικής περιοχής του γονιδίου CITA που είναι υπεύθυνα για την επαγωγή του μηνυμάτός του από την ιντερφερόνη-γ διχοτομούνται. Η πρώτη άποψη υποστηρίζει ότι η περιοχή βρίσκεται πιθανώς σε κάποιο ιντρόνιο του γονιδίου [83]. Η άλλη άποψη υποστηρίζει ότι ο ενισχυτής βρίσκεται πίσω από την κωδική περιοχή του γονιδίου [84, 85]. Σύμφωνα με τη περισσότερο λεπτομερή τοποθέτηση, το γονίδιο διαθέτει τέσσερις περιοχές οι οποίες μπορούν να λειτουργήσουν σαν εναλλακτικοί υποκινητές. Οι υποκινητές αυτοί «αντιδρούν» σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους και σε διαφορετικά κυτταρικά ερεθίσματα. Από αυτούς τους εναλλακτικούς υποκινητές, οι οποίοι εντοπίζονται στην εγγύτερη περιοχή της 5' μη μεταφραζόμενης περιοχής του γονιδίου, ένας είναι εκείνος στον οποίο οφείλεται η μεταγραφική απόκριση σε ιντερφερόνη γ [84]. Στον υποκινητή αυτό υπάρχουν θέσεις δέσμευσης της STAT1α, η οποία σχηματίζει επαγόμενο σύμπλεγμα με τον «απανταχού» μεταγραφικό παράγοντα USF-1. Εκτός της STAT1α, στην άριστη μεταγραφική επαγωγή του γονιδίου CITA από την ιντερφερόνη γ, λαμβάνει μέρος και ο μεταγραφικός παράγοντας IRF-1 [86], όπως άλλωστε υποδεικνύει και η μερική ευαισθησία σε κυκλοεξιμίδιο της επαγωγής αυτής [72].

1.3.2 Δομή της πρωτεΐνης CITA.

Η πρωτεΐνη του CITA αποτελείται από 1130 αμινοξέα. Στο μόριο ξεχωρίζουν τρεις περιοχές. Το αμινοτελικό άκρο του μορίου, είναι υπεύθυνο για τη δράση του ως ενεργοποιητή της μεταγραφής [70, 87]. Πιθανολογείται ότι η λειτουργία αυτή οφείλεται στο αρνητικό φορτίο των όξινων αμινοξικών καταλοίπων της περιοχής αυτής (αμινοξικά κατάλοιπα 1-161, βλ Εικ.3). Μεταξύ άλλων πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής αυτού του τμήματος του μορίου υποδεικνύει τρεις α- έλικες. Από τις έλικες αυτές οι δύο πρώτες είναι σημαντικές για την λειτουργία της περιοχής αυτής. Σε αυτό το σημείο χαρτογραφείται και η περιοχή αλληλεπίδρασης της CITA με την TAF_{II}32 [88].

Το αμινοτελικό άκρο ακολουθεί μία περιοχή ενδιάμεση, πλούσια σε κατάλοιπα προλινών, σερινών και θρεονινών (αμινοξικά κατάλοιπα 161-300) ενώ στα τελευταία 410 καρβοξυ-τελικά αμινοξικά κατάλοιπα αναγνωρίζονται ορισμένα μοτίβα δέσμευσης GTP [89]. Στο ενδιάμεσο τμήμα της πρωτεΐνης (αμινοξικά κατάλοιπα 161-300), εντοπίζεται η ικανότητά της να δημιουργεί επαφές με τους μεταγραφικούς παράγοντες που δεσμεύονται στους υποκινητές των τάξης II γονιδίων. Είναι ενδιαφέρουσα η παρατήρηση ότι η απομάκρυνση των 120 περίπου πρώτων αμινοξικών καταλοίπων από την πρωτεΐνη οδηγεί σε «επικρατείς αρνητικές μεταλλαγές» πάνω στη δράση του ακέрайου μορίου [88, 89].



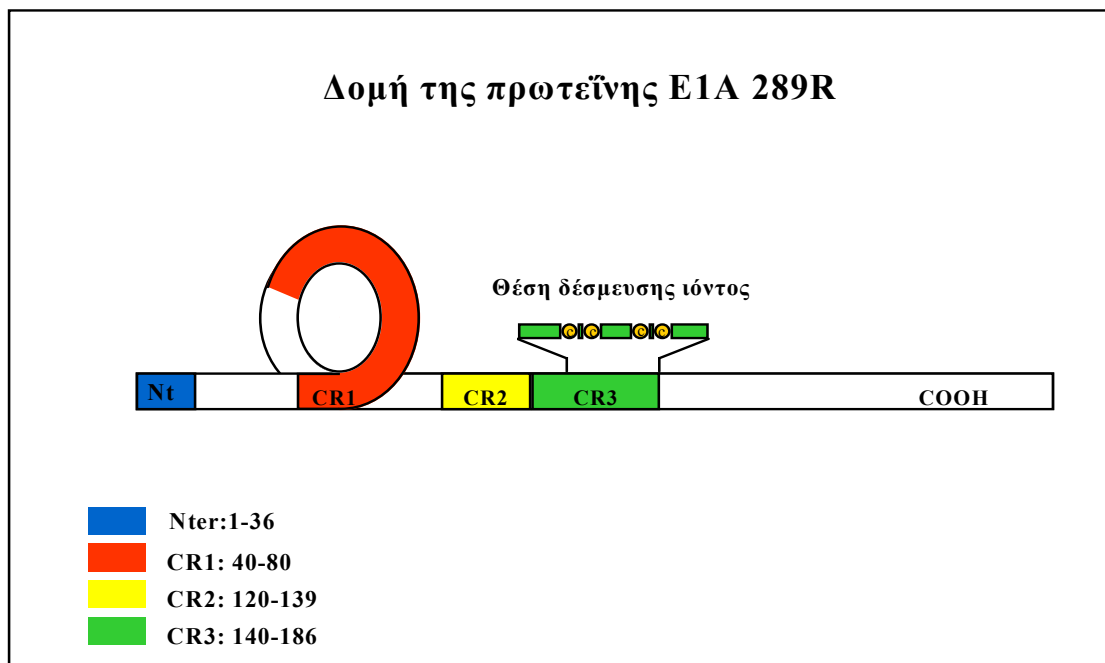
Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης CIITA.

Μία δεύτερη αλληλεπίδραση, που τοποθετείται στην περιοχή μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων 161-300, είναι και αυτή με τον μεταγραφικό παράγοντα RFX-5 [90]. Η πρωτεΐνη CIITA δε διαθέτει ικανότητα ειδικής δέσμευσης σε DNA και η δράση της ως ενεργοποιητή της μεταγραφής εξηγείται με την υπόθεση ότι δημιουργεί επαφές με μεταγραφικούς παράγοντες που αναγνωρίζουν τα συντηρημένα μοτίβα των υποκινητών των τάξης II γονιδίων ιστοσυμβατότητας [70, 87].

1.4 ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ E1A.

Στο φυσικό τους ξενιστή, οι ανθρώπινοι αδενοϊοί, προκαλούν λυτική μόλυνση. Σε κύτταρα όμως που δεν ευνοούν τέτοιο παραγωγικό πολλαπλασιασμό οι αδενοϊοί προκαλούν ογκογονικό μετασχηματισμό, που έχει ως αποτέλεσμα απεριόριστες κυτταρικές διαιρέσεις και έκρυθμη αύξηση. Υπεύθυνη για την ιδιότητα αυτή των αδενοϊών είναι η περιοχή του γονιδιώματος τους που αποκαλείται «Πρώιμη 1» (Early1) E1. Στην περιοχή E1 τοποθετούνται δύο μεταγραφικές μονάδες οι E1A και E1B.

Στη μεταγραφική μονάδα E1A αποδίδονται 5 μηνύματα, ως αποτέλεσμα «εναλλακτικής συρραφής», τα οποία και χαρακτηρίζονται από τον συντελεστή καθίζησης τους S. Από αυτά, τα μηνύματα 12 και 13S κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες E1A 243R και 289R αντίστοιχα. Αυτές είναι και οι μόνες από τα παραγόμενα πολυπεπίδια, τα αποδιδόμενα στην πρώιμη περιοχή, που έχουν σχέση με τον κυτταρικό μετασχηματισμό [91].



Εικόνα 4: Δομή της πρωτεΐνης E1A 289R. Η πρωτεΐνη 243R έχει την ίδια δομή εκτός του ότι δεν διαθέτει την περιοχή CR3. Η στρέβλωση της γραμμικής αναπαράστασης της πρωτεΐνης, στην περιοχή CR1, εισάγεται για να δηλώσει την εγγύτητα του αμινοτελικού άκρου του E1A με το καρβοξυτελικό ήμισυ της CR1 (λειτουργική θέση 1), και του αμινοτελικού ημίσεως της CR1 με τη CR2 (λειτουργική θέση 2).

Σύγκριση των αλληλουχιών E1A από διάφορους οροτύπους αδενοϊών αποκαλύπτει μεγάλη συντήρηση σε τρεις συγκεκριμένες περιοχές της πρωτεΐνης που χαρακτηρίζονται ακριβώς σαν συντηρημένες περιοχές (Conserved Regions) CR1, 2 και 3. Οι πρωτεΐνες 289R και 243R διαφέρουν στην εσωτερική περιοχή CR3, που αριθμεί 46 αμινοξέα και υπάρχει μόνο στην πρώτη πρωτεΐνη.

Οι πρωτεΐνες E1A είναι όξινες, με ένα μεγάλο ποσοστό προλινών στην σύνθεσή τους. Φωσφορυλιώνονται σε υπολείμματα σερινών (όπως στις S89 και S219), και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ανώμαλη κινητικότητα τους σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου-SDS [92, 93]. Είναι επίσης αξιoσημείωτες οι ιδιότητες τους να «αντέχουν» μεγάλα εσωτερικά ελλείμματα, αλλά και τα πεπτίδια που αντιστοιχούν στις τρεις συντηρημένες περιοχές να διατηρούν αυτόνομες τις λειτουργίες τους, έξω από την φυσική συνέχεια της πρωτεΐνης [108].

1.4.1 Ο παράγοντας E1A και ο κυτταρικός κύκλος.

Το γονίδιο E1A είναι το κύριο ρυθμιστικό μόριο του αναπαραγωγικού κύκλου των αδενοϊών αφού η κύρια λειτουργία του είναι να προσανατολίζει τον κυτταρικό μηχανισμό σε ολοκλήρωση του κυτταρικού κύκλου, επεμβαίνοντας ακριβώς στο ρυθμιστικό σημείο μεταξύ των φάσεων G_0/ G_1 και S. Η λειτουργία αυτή είναι απόλυτα αναγκαία για τους αδενοϊούς οι οποίοι προσβάλλουν κατά κύριο λόγο κύτταρα των επιθηλίων του άνω αναπνευστικού συστήματος, τα οποία είναι «εφησυχασμένα», βρίσκονται δηλαδή σε φάση G_0 . Για να πολλαπλασιαστούν οι αδενοϊοί πρέπει να κινητοποιήσουν τον κυτταρικό κύκλο. Στο σχήμα της εικόνας 5, αναγράφονται οι σχέσεις των μορίων που ρυθμίζουν το βιοχημικό μονοπάτι που με τη σειρά του ελέγχει τη μετάβαση του κυττάρου από την φάση G_1 στη φάση S. Το E1A εξαιτίας αυτής της δυνατότητας παρέμβασης στον κυτταρικό κύκλο, ευθύνεται για πολλά φαινόμενα, όπως είναι για παράδειγμα για την επαγωγή της σύνθεσης του DNA, για την επαγωγή απόπτωσης, για κυτταρική αθανατοποίηση και κυτταρικό μετασχηματισμό, για την καταστολή της κυτταρικής διαφοροποίησης και την παρεμπόδιση καρκινικών μεταστάσεων. Το εύρος των φαινομένων μπορεί να είναι πολύ μεγάλο αλλά πρόκειται για αντανάκλαση της συμπεριφοράς του E1A στους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους.

Ο χωρισμός του E1A σε συντηρημένες περιοχές αντανακλά και ένα λειτουργικό διαχωρισμό της πρωτεΐνης αφού όπως αποδείχτηκε κάθε μία από τις συντηρημένες περιοχές του μορίου απολαμβάνει ξεχωριστό ρόλο στο πολύπλοκο βιολογικό αποτέλεσμα της δράσης του E1A. Μετά από προσεκτικότερη ανάλυση των δεδομένων φαίνεται ότι ο συνδυασμός των συντηρημένων περιοχών μεταξύ τους και με το αμινοτελικό τμήμα του μορίου, δίνει δύο λειτουργικές «επικράτειες»: Τις ενεργές θέσεις 1 και 2. Η μεν πρώτη θέση αποτελείται από τον συνδυασμό του αμινοτελικού άκρου του E1A και του καρβοξυτελικού ημίσεως της CR1 (ενεργή θέση 1) και σχετίζεται με την αλληλεπίδραση με τις p300/CBP. Η δεύτερη ενεργή θέση (ενεργή θέση 2) αποτελεί συνδυασμό του αμινοτελικού ημίσεως της CR1 και της CR2, ενώ ευθύνεται για την αλληλεπίδραση με μόρια της οικογένειας του ρετινοβλαστώματος. Η ικανότητα του E1A να επάγει σύνθεση του κυτταρικού DNA, απαιτεί την ύπαρξη μίας τουλάχιστον από τις δύο λειτουργικές περιοχές που αναφέρθηκαν, αν και ο συνδυασμός τους είναι κατά κανόνα πολύ πιο αποτελεσματικός [94].

Από τις πιο καλά μελετημένες σχέσεις του E1A είναι αυτή με το προϊόν του γονιδίου του ρετινοβλαστώματος pRB. Είναι ενδιαφέρουσα ως περίπτωση το πως ένα ογκογονίδιο αδρανοποιεί ένα αντι-ογκογονίδιο [95]. Το ρετινοβλάστωμα είναι από τα πρώτα γονίδια που έχουν χαρακτηριστεί ως «ογκοκατασταλτικά» (tumor suppressor genes) και βρίσκεται σε μεταλλαγμένη και ανενεργή μορφή σε έναν αριθμό

ανθρώπινων καρκίνων διαφορετικής ιστολογικής προέλευσης. Το ρετινοβλάστωμα ανήκει σε μία οικογένεια ομόλογων μορίων με παρόμοιους αλλά διακριτούς ρόλους στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Τα μόρια αυτά αναφέρονται υπό την γενική ονομασία «Pocket proteins» και είναι εκτός του pRB τα p107 και p130.

Η κύρια δράση των μορίων της οικογένειας του ρετινοβλαστώματος, είναι η ρύθμιση της δράσης της μεταγραφικής οντότητας E2F. Ο E2F ανακαλύπτεται το 1986, στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά HeLa, κατά την ανάλυση του αδενοϊκού υποκινητή E2 [96]. Ο ανθρώπινος παράγοντας E2F₁ [97-99] είναι ο πρώτος από μία οικογένεια ομόλογων μορίων που αριθμεί πολλά επιπλέον μέλη. Οι ανθρώπινοι E2F₁, E2F₂ και E2F₃, οι ποντικίσιοι DP-1,-2,-3, ετερο-διμερίζονται και βάσει της ικανότητας τους να αλληλεπιδρούν μόνο με το ρετινοβλάστωμα pRB, πιστεύεται ότι είναι τελικά υπεύθυνοι για τη μετάβαση του κυτταρικού κύκλου από τη G₁ στην S [100-102]. Στοιχεία με τα οποία αλληλεπιδρούν παράγοντες E2F βρίσκονται σε αδενοϊκούς υποκινητές αλλά και στους υποκινητές των γονιδίων DHFR, c-myc, cdc-2, n-myc καθώς και της κυκλίνης E [103].

Τα συμπλέγματα του ρετινοβλαστώματος με τα ετεροδιμερή της οικογένειας των παραγόντων E2F, ενώ διατηρούν την ικανότητα να δεσμεύονται σε αλληλουχίες στόχους υποκινητών, εν τούτοις δεν ενεργοποιούν μεταγραφή. Η παρατήρηση ότι το ρετινοβλάστωμα αλληλεπιδρά με απακετυλάσες των ιστονών, δίνει απάντηση, στο για αρκετό χρονικό διάστημα δυσεπίλυτο ερώτημα [103], του τρόπου με τον οποίο το μόριο αυτό καταστέλλει την μεταγραφική ενεργοποίηση από τον E2F [104, 105]. Η ικανότητα του pRB να δρα ως μεταγραφικός καταστολέας, ανάγεται τελικά στο επίπεδο διατήρησης μιας «κλειστής» χρωματινικής δομής, σε αντίθεση με όσα αναφέρθηκαν πιο πάνω για τους μεταγραφικούς αρμοστές [106].

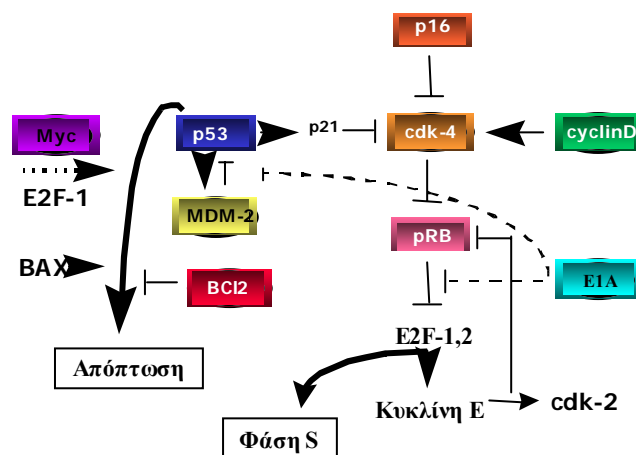
Τα επίπεδα και η σύσταση των ρυθμιστικών συμπλεγμάτων του E2F με τα μόρια της οικογένειας του ρετινοβλαστώματος αλλάζουν κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Οι αλλαγές στα συμπλέγματα αυτά οφείλονται σε γεγονότα φωσφορυλίωσης. Συγκεκριμένα υποφωσφορυλιωμένες μορφές pRB, και των ομόλογων του μορίων, συνδέονται με E2F, ενώ οι υπερφωσφορυλιωμένες μορφές τον απελευθερώνουν. Το E1A επεμβαίνει σε αυτό ακριβώς το σημείο: χάρη στις περιοχές CR1 και CR2 (δηλαδή στην ενεργή θέση 2), αποδεσμεύει in vitro και in vivo το E2F από το RB και τα συναφή μόρια [107], παρακάμπτοντας την ανάγκη φωσφορυλίωσης. Η ενέργεια είναι αρκετή για να κινητοποιήσει τον κυτταρικό κύκλο [103, 108].

Όπως αναφέρθηκε και οι δύο λειτουργικές θέσεις του E1A είναι απόλυτα ικανές από μόνες τους να ενεργοποιήσουν τον κυτταρικό κύκλο. Η παρατήρηση αυτή σε συνδυασμό με την δεδομένη αλληλεπίδραση της ενεργής θέσης 1 με τις p300/CBP, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου φαίνεται άμεσα εξαρτώμενη από τους συνενεργοποιητές. Τα σημεία που οι αρμοστές παρεμβαίνουν στο βιοχημικό μονοπάτι της εικόνας 5, είναι μέχρι σήμερα δύο: Υπάρχουν μαρτυρίες κατά τις οποίες ο παράγοντας E2F αλληλεπιδρά με τις p300/CBP [109, 110], καθώς και το γεγονός ότι η μεταγραφική δράση της p53, ρυθμίζεται άμεσα, και σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν στην προηγούμενη ενότητα, από γεγονότα ακετυλίωσης, οφειλόμενα στις p300/CBP [29, 42, 45, 111]. Περισσότερα για το θέμα αυτό δεν είναι γνωστά. Η εικόνα όμως αναμένεται να είναι εξαιρετικά πολύπλοκη εφόσον το θέμα της επιλεκτικής γονιδιακής ενεργοποίησης

φαίνεται να εναπόκειται στον ανταγωνισμό για τις περιορισμένες ποσότητες των μορίων αρμοστών.

Μία άλλη ιδιότητα του E1A, αυτή της επαγωγής απόπτωσης σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους, σχετίζεται και πάλι με την παρεμβολή του μορίου στο μονοπάτι της εικόνας 5.

Το μονοπάτι p53-pRB



Εικόνα 5: Το μονοπάτι ρύθμισης της μετάβασης του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G₁ στη φάση S, στο οποίο και παρεμβαίνει το E1A, αντισταθμίζοντας την αρνητική ρύθμιση που ασκεί το ρετινοβλάστωμα Rb πάνω στη μεταγραφική οντότητα E2F, και αυξάνοντας τα επίπεδα της πρωτεΐνης p53. Η παρέμβαση του E1A προκαλεί ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, είτε μετάβαση στη φάση S είτε απόπτωση [112].

Είναι φανερό ότι η επαγωγή απόπτωσης, ως ιδιότητα, δεν είναι πλεονεκτική για τις ανάγκες πολλαπλασιασμού των αδενοϊών. Εντούτοις, προστατευτικό ρόλο, αποτρέποντας τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο που ακολουθεί την έκφραση του E1A, παίζει το δεύτερο γονίδιο της πρώιμης αδενοϊκής περιοχής 1, E1B [113].

Υπάρχουν δύο απόψεις για τον τρόπο με τον οποίο το E1A προκαλεί απόπτωση. Η πρώτη άποψη συνηγορεί υπέρ της υπόθεσης ότι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος από το E1A, είναι ένα φαινόμενο έμμεσο, και συμβαίνει στις περιπτώσεις εκείνες που το εσωτερικό σήμα για προώθηση του κυτταρικού κύκλου, έρχεται σε αντίφαση με σήματα από το εξωκυτταρικό περιβάλλον, όπως σήματα αναστολής του πολλαπλασιασμού μέσω κυτταρικών επαφών ή έλλειψης αυξητικών παραγόντων [91, 114].

Η δεύτερη άποψη στηρίζεται στην παρατήρηση ότι το E1A σταθεροποιεί τα ενδοκυττάρια επίπεδα της πρωτεΐνης p53. Όπως φαίνεται και στο σχήμα της εικόνας 5 το μονοπάτι που ελέγχει τη μετάβαση από τη φάση G₁ στην S, έχει δύο σκέλη. Εάν το ρετινοβλάστωμα δίνει ένα σήμα του τύπου «ναι-όχι» στην πρόοδο του κυτταρικού

κύκλου, το μόριο της p53 πρέπει να θεωρηθεί ως ο μοριακός «θυροφύλακας», καθώς το αν το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου θα είναι βιώσιμο ή αν το κύτταρο τελικώς θα οδηγηθεί σε απόπτωση, εναπόκειται στο μόριο αυτό. Ο μηχανισμός με τον οποίο συμβαίνει αυτό δεν είναι γνωστός, αλλά σχετίζεται με την αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της p53 [112]. Η σταθεροποίηση του προϊόντος της p53, από το E1A, έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης και αυτό πιστεύεται ότι είναι η αιτία που οδηγεί τα κύτταρα σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο [113, 115, 116]. Η ιδιότητα της σταθεροποίησης της p53, συσχετίζεται άμεσα με την ικανότητα του E1A να αλληλεπιδρά τόσο με το ρετινοβλάστωμα όσο και με τις p300/CBP [116]. Η απελευθέρωση ενεργού E2F που προκύπτει από την απομάκρυνση του pRB, προκαλεί τη σταθεροποίηση του προϊόντος p14^{ARF} (ομόλογο του p16). Αυτή η τελευταία πρωτεΐνη αποτρέπει την αποικοδόμηση της p53 που εξαρτάται από την MDM2 [168].

Μία τρίτη ιδιότητα του E1A, στην οποία οφείλει και τη φήμη του ως ογκογονίδιο, είναι αυτή της αθανатоποίησης πρωτογενών κυττάρων, ενώ σε συνδυασμό με το E1B ή με ογκογονίδια όπως το ras ή το Jun, είναι ικανό να επάγει πλήρη μετασχηματισμό. Ο τρόπος με τον οποίο το E1A προκαλεί μετασχηματισμό δεν είναι απόλυτα κατανοητός. Ο μετασχηματισμός σαν διαδικασία μπορεί να αναλυθεί σε δύο συντεταγμένες. Η συντεταγμένη A είναι μία πρώτη διαδικασία αθανатоποίησης, που συσχετίζεται με την ικανότητα του E1A να δεσμεύει και τις πρωτεΐνες της οικογένειας του RB αλλά και τους συνενεργοποιητές. Στη διαδικασία της αθανатоποίησης φαίνεται ότι παίζει ρόλο το E1B παρεμποδίζοντας την E1A επαγόμενη απόπτωση κατά τα προαναφερθέντα. Η δεύτερη συντεταγμένη είναι τα όψιμα γεγονότα που οδηγούν σε ένα μετασχηματισμένο φαινότυπο, ο οποίος απαιτεί αποκλειστικά και μόνο τη CR1. Στο φαινόμενο του πλήρους μετασχηματισμού, από τα γονίδια στόχους του E1A η απορρύθμιση της κυκλίνης D φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο [117]. Εκτός από την περιοχή CR1 που είναι απαραίτητη και στις δύο αυτές διαδικασίες υπάρχουν άλλες τέσσερις περιοχές του E1A που φαίνονται απαραίτητες για την συνεργασία του με τα ογκογονίδια ras και Jun, και ίσως έχουν ένα ρόλο στα όψιμα στάδια της αθανатоποίησης. Από αυτές τις υπόλοιπες περιοχές ξεχωρίζει μία που τοποθετείται στο καρβοξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης, διότι η ύπαρξη της έχει ένα κατασταλτικό φαινότυπο στην διαδικασία συνεργασίας μετασχηματισμού από ενεργοποιημένο ras. Στην περιοχή αυτή, χαρτογραφείται η αλληλεπίδραση μίας πρωτεΐνης. Ονομάζεται CtBP (Carboxy terminus Binding protein) [118]. Η λειτουργία της παραμένει άγνωστη, εντούτοις θεωρείται ότι διαδραματίζει ένα ρυθμιστικό ρόλο στα φαινόμενα που αποδίδονται στην περιοχή CR1 [118, 119]. Περισσότερο φως στο θέμα αυτό αναμένεται να ρίξει η κλωνοποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί την ομόλογη της πρωτεΐνης αυτής στη Δροσόφιλα [120]. Πρόσφατα χαρακτηρίστηκε και ένα δεύτερο ανθρώπινο ομόλογο του CtBP αλλά η σχέση του με το E1A δεν έχει αποδειχθεί [121].

Η απάντηση στα ερωτήματα αν η ιδιότητα του E1A, να αθανатоποιεί πρωτογενή κύτταρα και να μετασχηματίζει ήδη αθανатоποιημένα, οφείλεται στην ικανότητα του να δεσμεύει κάποια από τις προαναφερθείσες πρωτεΐνες δεν είναι ξεκάθαρη. Μέχρι σήμερα δεν είναι γνωστό αν όλο το εύρος των γεγονότων που αποδίδονται στο E1A μπορεί να εξηγηθεί με βάση τις αλληλεπιδράσεις με τα κυτταρικά πολυπεπτίδια που αναφέρθηκαν. Υπάρχουν κάποιες πρόσφατες μαρτυρίες που υποστηρίζουν ότι η ιδιότητα επαγωγής των όψιμων σταδίων του

μετασχηματισμού από E1A πρέπει να αναζητηθεί στην αλληλεπίδραση του με κυτταρικά πολυπεπίδια που ακόμα δεν έχουν χαρακτηρισθεί [117, 122].

1.4.2 Ο παράγοντας E1A ως μεταγραφικός ρυθμιστής.

α. Μεταγραφική ενεργοποίηση.

Η ευρύτητα των φαινοτύπων που αποδίδονται στο E1A, είναι αντανάκλαση της δράσης του ως μεταγραφικού ρυθμιστή, που ενεργοποιεί ή καταστέλλει ιικά και κυτταρικά γονίδια. Το ίδιο το E1A δε δεσμεύεται ειδικά σε κάποια DNA αλληλουχία-στόχο [123], ενώ σε υποκινητές που επιδεικνύουν κοινή συμπεριφορά ως προς την ενεργοποίηση ή την καταστολή τους από αυτό, δεν είναι δυνατό να ανιχνευθεί κάποιο στοιχείο «αποκρινόμενο» σε E1A. Παρόλα αυτά, η μεταγραφική ενεργοποίηση είναι ιδιότητα που αποδίδεται μόνο στην πρωτεΐνη 289R εξαιτίας της ύπαρξης της περιοχής CR3 [124]. Η περιοχή αυτή είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση ικών γονιδίων, και διαθέτει μία πολύπλοκη δομή που μοιάζει με δάκτυλο ψευδαργύρου (Εικόνα 4) [125, 126]. Η επικρατέστερη υπόθεση του πώς επιτυγχάνεται η μεταγραφική ενεργοποίηση μέσω της CR3 του E1A εμπλέκει την ικανότητα του μορίου να αλληλεπιδρά μέσω αυτής της συγκεκριμένης περιοχής με:

α) τον κυτταρικό μεταγραφικό παράγοντα ATF2 (της οικογένειας των παραγόντων που «αποκρίνονται» στο κυκλικό AMP),

β) και με την πρωτεΐνη TBP που αλληλεπιδρά με το στοιχείο TATA.

Στους υποκινητές των αδενοϊκών γονιδίων συναντώνται, πολύ συχνά, στοιχεία που αναγνωρίζονται επιλεκτικά από το μεταγραφικό παράγοντα ATF2. Ο μεταγραφικός αυτός παράγοντας διαθέτει στο αμινοτελικό του άκρο την υπεύθυνη για την μεταγραφική ενεργοποίηση περιοχή του, η οποία στο ολόκληρο μόριο είναι «κρυμμένη» και ενεργοποιείται μετά από φωσφορυλίωση [127]. Η αλληλεπίδραση της 289R με τον ATF2 γίνεται μέσω του αμινοτελικού τμήματος της CR3 και προκαλεί αλλαγή στη στερεοδιάταξη του δεύτερου, με αποτέλεσμα να παρακάμπτεται η ανάγκη φωσφορυλίωσης, και να ενεργοποιείται η μεταγραφή [128-130].

Το καρβοξυτελικό άκρο της CR3 (που μεταξύ άλλων περιέχει και τη δομή που μοιάζει με δάκτυλο ψευδαργύρου) αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη TBP [131, 132]. Με αυτή την αλληλεπίδραση συσχετίζεται η αυξημένη ικανότητα μεταγραφικής ενεργοποίησης που παρουσιάζει η πρωτεΐνη 289R [133]. Το μοντέλο για τη μεταγραφική ενεργοποίηση, προβλέπει ότι το E1A λειτουργεί σε στενή γειτνίαση με τον υποκινητή, παίζοντας το ρόλο γέφυρας μεταξύ του ATF2 και του TBP [125, 131]. Είναι αξιοσημείωτο ότι σε αυτή τη περίπτωση θεωρείται ότι το E1A παίζει το ρόλο ενός μορίου αρμοστή. Συνδυάζοντας τα γεγονότα μεταγραφικής ενεργοποίησης με τα υπάρχοντα στοιχεία για τις περιπτώσεις μεταγραφικής καταστολής που αποδίδονται στο ίδιο μόριο (παραθέτονται στην επόμενη ενότητα), οδηγείται κανείς σε ένα συμπέρασμα. Η δράση του E1A σαν θετικού μεταγραφικού ρυθμιστή εξαρτάται άμεσα από την πρόσβασή του στην εγγύτερη περιοχή των υποκινητών. Στις περιπτώσεις που η φυσική αυτή προσέγγιση δεν εξασφαλίζεται, οι ιδιότητες του μορίου να αλληλεπιδρά με σημαντικά για τη μεταγραφή μόρια (p300/CBP, TBP), οδηγούν σε γεγονότα μεταγραφικής καταστολής. Σε ένα τέτοιο μοντέλο οδηγεί και η παρατήρηση ότι αν το αμινοτελικό άκρο του E1A (αμινοξέα 1-80) οδηγηθεί τεχνητά σε υποκινητές (μέσω χμαιοικικών μορίων Gal4 ή LexA-E1A) λειτουργεί σαν θετικός μεταγραφικός ρυθμιστής. Πρέπει εδώ να σημειωθεί ότι εκτός της 289R και η E1A 243R αλληλεπιδρά (ασθενέστερα) με τον TBP μέσω των αμινοξέων 1-80 [131]. Η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση της CR1 με τον TBP, θεωρείται ότι έχει θετικά

αποτελέσματα, αφού αποτρέπει την προσκόλληση του αρνητικού ρυθμιστή Dr1 στον TBP [134].

Τέλος εκτός από την αλληλεπίδραση της CR3 με τον TBP παρατηρείται και άλλη μία με τον ανθρώπινο παράγοντα TAF_{II}135. Πρόκειται για ένα μόριο που ανήκει στο σύμπλεγμα TFIID [135].

β. Μεταγραφική καταστολή.

Μέχρι πρόσφατα ο τρόπος με τον οποίο το E1A δρα σαν αρνητικός μεταγραφικός ρυθμιστής δεν ήταν κατανοητός. Μαρτυρίες καταστολής προέρχονται από μελέτες, στον ενισχυτή του SV-40, υποκινητές που απαντούν σε εστέρες φορβόλης, υποκινητές που ενεργοποιούνται με πυρηνικούς υποδοχείς, υποκινητές που απαντούν σε κυτοκίνες, και άλλους. Από τις πιο καλά χαρακτηρισμένες είναι η περίπτωση καταστολής της μεταγραφικής ενεργότητας AP-1. Η κυτταρική αυτή ενεργότητα είναι το αποτέλεσμα ετερο-διμερισμού πρωτεϊνικών μορίων που ανήκουν στις οικογένειες των πρωτο-ογκογονιδίων jun και fos, αλλά και μορίων που ανήκουν στην οικογένεια CREB/ATF. Το ιδιαίτερα ενδιαφέρον σε αυτή την περίπτωση είναι ότι το E1A, καταστέλλει επιλεκτικά συγκεκριμένους συνδυασμούς ετεροδιμερών AP-1, ενώ άλλους τους ενεργοποιεί [136]. Για παράδειγμα, ο υποκινητής της ανθρώπινης κολλαγενάσης, μιας μεταλλο-πρωτεάσης, καταστέλλεται από το E1A [137]. Υπεύθυνο για την καταστολή αυτή είναι ένα στοιχείο του υποκινητή που απαντά σε TPA (12-O-tetradecanoylphorbol 13 acetate και δεσμεύει ετεροδιμερή jun/fos. Αντίθετα το στοιχείο TRE, στον υποκινητή του c-jun, ρυθμίζεται θετικά από το E1A αλλά είναι βέβαιο ότι σε αυτό δεσμεύονται ετεροδιμερή jun/ATF. Υπάρχουν ήδη συσσωρευμένες μαρτυρίες που υποστηρίζουν ότι το E1A εμποδίζει την προσχώρηση των p300/CBP στα ενεργά μεταγραφικά συμπλέγματα, στις περιπτώσεις καταστολής της κυτταρικής ενεργότητας AP-1 (για μία κατατοπιστική ανασκόπηση βλ. και [138]).

Ο υποκινητής του SV-40 αποτελείται από σαφώς καθορισμένα cis στοιχεία, τα οποία είτε χωριστά είτε σε συνδυασμό καταστέλλονται από το E1A [139, 140]. Η παρουσία της p300, σε περίσσεια, είναι απόλυτα ικανή να επαναφέρει κατά ένα ποσοστό 40% την ικανότητα ενεργοποίησης της μεταγραφής από τον ενισχυτή, παρουσία του E1A. Αυτό σημαίνει ότι αποτελεί στόχο για το E1A, αλλά ίσως στο μηχανισμό καταστολής συμβαίνουν και άλλα, μέχρι στιγμής αδιευκρίνιστα γεγονότα [15]. Μία τρίτη περίπτωση μεταγραφικής καταστολής από το E1A σχετίζεται άμεσα με την παρεμπόδιση της διαφοροποίησης των μυοβλαστών.

Σε μία πληθώρα περιπτώσεων το E1A καταστέλλει τη μεταγραφική ενεργοποίηση από λεμφοκίνες όπως είναι η ιντερφερόνη-γ και η ιντερλευκίνη-6. Τα βιοχημικά μονοπάτια που κινητοποιούνται από τα δύο αυτά μόρια έχουν αρκετές ομοιότητες. Οι ιντερφερόνες δρουν όπως έχει αναφερθεί και αλλού στην πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού έναντι σε ιούς, κινητοποιώντας μία κυτταρική διαδικασία που είναι γνωστή ως «αντιϊκή κατάσταση» (antiviral state), και στις λεπτομέρειές της συνίσταται στο να μην επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό των ιών μέσα στο κύτταρο. Είναι γνωστό, ότι οι αδενοϊοί δεν υφίστανται τις συνέπειες της αντιϊκής δράσης μορίων όπως οι ιντερφερόνες. Δύο είναι οι στρατηγικές των αδενοϊών, για να αποφεύγουν το λεγόμενο «αντί-ϊκό» στάδιο, που ακολουθεί την ιϊκή μόλυνση. Κατά ένα τρόπο αυτό οφείλεται στα «συνοδευτικά» mRNAs των αδενοϊών, αλλά και στο γεγονός ότι το γονίδιο E1A καταστέλλει τη μεταγραφή των επαγόμενων από τις

ιντερφερόνες, γονιδίων. Το κατασταλτικό γεγονός επιτελείται κατά κύριο λόγο από την E1A 243R και εστιάζεται στο επίπεδο της μεταγραφής, χωρίς όμως να αποκλείεται και η παρεμβολή του σε μετά-μεταγραφικές διαδικασίες [141]. Από την άλλη μεριά η ιντερλευκίνη-6 ρυθμίζει την αύξηση και τη διαφοροποίηση κυτταρικών τύπων του ανοσοποιητικού. Επίσης έχειδειχτεί ότι και στην περίπτωση της ιντερλευκίνης-6 το E1A αναπτύσσει παρόμοια δράση [142]. Στα πρώιμα γεγονότα σηματοδότησης από την ιντερφερόνη-γ, κινητοποιείται το μόριο STAT1α, ο οποίος μετά την φωσφορυλίωσή του εισάγεται στον πυρήνα του κυττάρου. Κατά ένα αντίστοιχο τρόπο η ιντερλευκίνη-6 κινητοποιεί το παράγοντα STAT3 [143], και η ιντερφερόνη-α το σύμπλεγμα του τετραμερούς μεταγραφικού παράγοντα ISGF3. Στο σύμπλεγμα αυτό συμμετέχει και ο παράγοντας STAT1α, μία ισομορφή του ο STAT1β, καθώς και ένα ομόλογο μόριο ο STAT2. Τα μεταγραφικά γεγονότα που ακολουθούν την ενεργοποίηση και από τις τρεις λεμφοκίνες, καταστέλλονται από το E1A. Ο τρόπος με τον οποίο το E1A επιτυγχάνει αυτό το αποτέλεσμα δεν είναι ξεκάθαρος σε καμία από τις τρεις περιπτώσεις. Υπάρχουν αναφορές που υποστηρίζουν ότι η ύπαρξη του E1A επηρεάζει τα ενδοκυττάρια επίπεδα των STATs, μειώνοντας τις ποσότητές τους [142, 144], ότι επεμβαίνει στη μεταφορά των ενεργοποιημένων STATs στον πυρήνα του κυττάρου [145] και ότι εντούτοις, *in vitro*, δεν εμποδίζει την δέσμευση των ενεργοποιημένων STATs στις αλληλουχίες στόχους τους [142, 144, 145]. Μετά από την παρατήρηση ότι η πρωτεΐνες STAT1α και STAT2 αλληλεπιδρούν με τους συνενεργοποιητές p300/CBP [24, 25], είναι πιθανό ότι οι περιπτώσεις αυτές της μεταγραφικής καταστολής οφείλονται, όπως και στην περίπτωση του AP-1, σε παρεμπόδιση των συνενεργοποιητών από το να συμμετέχουν στα ενεργά μεταγραφικά σύμπλοκα.

Ένας επιπλέον βαθμός πολυπλοκότητας στην υπόθεση της μεταγραφικής καταστολής από το E1A προέρχεται από μελέτες στο σακχαρομύκητα. Στον οργανισμό αυτό το E1A έχειδειχτεί ότι αλληλεπιδρά με ένα πολύ-παραγοντικό σύμπλεγμα πρωτεϊνών που καλείται SWI/SNF, του οποίου η κύρια λειτουργία είναι η ακετυλίωση ιστονών, (σε περιπτώσεις επαγομένης μεταγραφής) ούτως ώστε οι μεταγραφικοί παράγοντες να αποκτούν πρόσβαση στους υποκινητές [146]. Είναι σήμερα παραδεκτό ότι τέτοια συμπλέγματα εκτός από τον οργανισμό που αναφέρθηκε υπάρχουν και στο ποντίκι και στον άνθρωπο και μάλιστα περισσότερα από ένα, γεγονός που αντανάκλα ένα σχετικό βαθμό ειδικότητας ως προς τους υποκινητές με τους οποίους σχετίζονται. Σύνδεση της παραπάνω παρατήρησης με τους συνενεργοποιητές προέρχεται από το γεγονός ότι με έναν ειδικό για την p300 αντιορό κατακρημνίζεται επίσης σε πυρηνικά εκχυλίσματα το προϊόν του γονιδίου hBRG1. Πρόκειται για το ανθρώπινο ομόλογο της υπομονάδας SNF2 του SWI/SNF [147].

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.

2.1 ΥΛΙΚΑ.

2.1.1. ANTIΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής προήλθαν από τις εταιρείες BOEINGER MANHEIM, PHARMACIA, PROMEGA, SIGMA CHEMICALS, United States Biochemicals. Τα περιοριστικά και τροποποιητικά ένζυμα των νουκλεϊκών οξέων είναι από τις εταιρείες MINOTECH, New England Biolabs, PROMEGA, United States Biochemicals (USB) και Dyna-ZYME. Τα αντισώματα είναι από τις εταιρείες Santa Cruz και BOEINGER MANHEIM. Τα θρεπτικά υλικά καλλιέργειας των βακτηριακών στελεχών και στελεχών σακχαρομύκητα είναι από την DIFCO και εκείνα της καλλιέργειας κυτταρικών σειρών είναι από την GIPCO-BRL. Τα ραδιοσημασμένα νουκλεοτίδια είναι από την εταιρεία AMERSHAM όπως και η ραδιενεργή χλωραμφαινικόλη. Οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης είναι από τις εταιρείες SCHLEICHER & SHUELL και GELMAN. Ενώ τα φιλμ αυτοραδιογραφίας είναι από την KODAK. Τα ολιγονουκλεοτίδια συντέθηκαν στο εργαστήριο Μικροχημείας του ΙΤΕ.

2.1.2 ΣΤΕΛΕΧΗ, ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ, ΠΙΚΟΙ ΚΑΙ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ ΚΑΙ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΕΣ.

Για την κατασκευή των πλασμιδιακών κατασκευών χρησιμοποιήθηκαν οι φορείς: pBLUESCRIPT KSII (STRATAGENE), pBLUE Bac HIS ,pRC-CMV pRC-RSV (INVITROGEN), pEG202, pBXG1, pAS-2.1 και pACT-2, pMVNI-III (CLONTECH).

Το σύστημα των δύο υβριδίων που βασίζεται σε πρωτεϊνικά υβρίδια της πρωτεΐνης Gal4 προέρχεται από την εταιρεία CLONTECH, ενώ εκείνο που βασίζεται σε πρωτεϊνικά υβρίδια με τις πρωτεΐνες LexA και VP-16 είναι προσφορά του Δρ R. Brent. Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν είναι *E.coli* DH5α και JM101, οι γονότυποι των οποίων ευρίσκονται στο σχετικό εργαστηριακό εγχειρίδιο [148]. Τα στελέχη σακχαρομύκητα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα EGY48 και EGY188, Y190 και Y187. Οι βιβλιοθήκες που χρησιμοποιήθηκαν είναι lgt11 HeLa και pACT B-cell library (CLONTECH).

2.1.3 Καλλιέργειες βακτηρίων και σακχαρομύκητα.

Για την καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών χρησιμοποιήθηκε το μέσο Luria-Bertani σε υγρή και στερεά μορφή. Η ανάπτυξη των βακτηριοφάγων έγινε σε στερεό θρεπτικό NZCYM. Τα διαλύματα των αντιβιοτικών παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με το εργαστηριακό εγχειρίδιο [148]. Οι καλλιέργειες των στελεχών σακχαρομύκητα έγιναν στα θρεπτικά μέσα YEPD και SD όπως περιγράφονται στο εγχειρίδιο «The Matchmaker system» (CLONTECH).

2.1.4 Κυτταρικές σειρές.

Στα πειράματα παροδικής διαμόλυνσης χρησιμοποιήθηκαν οι ανθρώπινες κυτταρικές σειρές *HeLa* και *Raji*. Τα κύτταρα *HeLa* είναι επιθηλιακά κύτταρα που προέρχονται από αδενοκαρκίνωμα τραχήλου μήτρας. Τα κύτταρα *Raji* είναι σειρές που προέρχονται από το λέμφωμα *Burkitt* και έχουν χαρακτηριστικά διαφοροποιημένων Β-κυττάρων. Περισσότερες πληροφορίες για τις παραπάνω σειρές καθώς και οι σχετικές αναφορές περιέχονται στον κατάλογο της εταιρείας ATCC η οποία υπήρξε ο προμηθευτής.

Η κυτταρική σειρά *Sf-9* ATCC#CRL1711 προέρχεται από κύτταρα λεπιδοπτερών και αγοράστηκε από την εταιρεία INVITROGEN.

2.1.5 Θρεπτικά διαλύματα και υλικά καλλιεργείων κυτταρικών σειρών.

Για την σειρά *Raji* χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο RPMI1640 από την GIBCO συμπληρωμένο με 50 μM β-μερκαπτοαιθανόλη. Τα κύτταρα *HeLa* καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο MEM τροποποιημένο σύμφωνα με τον Dulbecco. Τα δύο αυτά θρεπτικά μέσα συμπληρώθηκαν με 10% ορό εμβρύου βοδιού και 50 μg/ml γενταμυκίνη. Τα κύτταρα *Sf-9* καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο TC-100 (GIBCO) συμπληρωμένο με 10% ορό εμβρύου βοδιού.

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ.

2.2.1 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

2.2.1α. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.

Για την παρασκευή υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι:

- α. Η μέθοδος βρασμού της βακτηριακής καλλιέργειας [149] και
- β. Η αλκαλική λύση [148].

2.2.1β Πέψη μορίων DNA με ένζυμα περιορισμού.

Οι περιοριστικές πέψεις πραγματοποιήθηκαν με βάση τις άριστες συνθήκες στις οποίες λειτουργεί ένα ένζυμο (θερμοκρασία, pH, μοριακότητα ρυθμιστικού διαλύματος σε άλατα) σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας και τα πρωτόκολλα που περιγράφονται στο σχετικό εργαστηριακό εγχειρίδιο [150].

2.2.1γ Απομόνωση τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης.

Για την απομόνωση τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ηλεκτροέκλυσης όπως περιγράφεται στο εργαστηριακό εγχειρίδιο [150].

2.2.1δ Ραδιοσήμανση μορίων DNA.

Για την ραδιοσήμανση των μορίων του DNA χρησιμοποιήθηκαν διάφορες τεχνικές. Η επιλογή γινόταν κάθε φορά με βάση το είδος του μορίου που επρόκειτο να σημειωθεί (μονόκλωνο ή δίκλωνο ολιγονουκλεοτίδιο ή τμήμα DNA κ.λπ.). Αναλυτικότερα οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

α. *Nick translation*. Η μέθοδος αυτή δίνει την δυνατότητα παραγωγής μορίων ανιχνευτών με ειδική ενεργότητα 1×10^8 cpm/μg. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε βρίσκεται στο σχετικό εργαστηριακό εγχειρίδιο [148].

β. *Σήμανση με την βοήθεια τυχαίων εκκινήτων (Random oligo labeling)*. Η μέθοδος αυτή ακολουθήθηκε σε περιπτώσεις όπου υπήρχε ανάγκη ραδιοσημασμένων ανιχνευτών υψηλής ειδικής ενεργότητας δηλαδή μεγαλύτερης από 5×10^8 cpm/μg. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιγράφεται αλλού [148].

γ. *Σήμανση συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων με την πολυνουκλεοτιδική κινάση του βακτηριοφάγου T4*. Η διαδικασία αυτή παράγει ανιχνευτές με ειδική ενεργότητα μεγαλύτερη του 10^9 cpm/μg. Ακολουθήσαμε την διαδικασία όπως περιγράφεται από τους Sambrook et al.

δ. *Σήμανση δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων με το μεγάλο ενζυμικό κλάσμα Klenow*. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα μεταβολής της κινητικότητας του DNA λόγω δέσμευσης με πρωτεΐνη, εναλλακτικά της μεθόδου χρήσης της πολυνουκλεοτιδικής κινάσης T4. Αυτό συνέβη διότι με την παρούσα μέθοδο σημαίνονται μόνον τα δίκλιωνα μόρια, ενώ με την προηγούμενη η σήμανση περιλαμβάνει όλα τα μόρια ακόμα και εκείνα που βρίσκονται σε μονόκλιωνα κατάσταση. Το ενζυμικό κλάσμα Klenow της πολυμεράσης I του DNA της *E. coli* συμπληρώνει 3' υπολειπόμενα άκρα τα οποία προέρχονται από τα συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια. Η ειδική ενεργότητα δεν ξεπερνά τα 2×10^8 cpm/μg. Σε κάθε περίπτωση και όπου αναφέρεται η ειδική ενεργότητα (Specific activity) υπολογίζεται μετά από κατακρήμνιση του 1% της αντίδρασης παρουσία 10% TCA και υπολογισμό της ενσωμάτωσης μετά από μέτρηση σε μετρητή σπινθηρισμού.

2.2.1ε Διαδικασίες υποκλωνοποίησης μορίων DNA.

Οι συνήθεις διαδικασίες υποκλωνοποίησης σε πλασμιδιακούς φορείς περιλαμβάνουν την συνένωση δύο τμημάτων DNA. Η συνένωση περιλαμβάνει τμήματα με συμβατά ή με τυφλά άκρα. Τα τυφλά άκρα δημιουργούνται με δύο τρόπους :

α. *Με χρήση του μεγάλου ενζυμικού κλάσματος Klenow της πολυμεράσης I του DNA της E. coli*. Το ένζυμο είναι ικανό παρουσία δεσόξυ-νουκλεοτιδίων να «γεμίζει» 5' υπολειπόμενα άκρα που αφήνουν οι περιοριστικές πέψεις των περισσότερων ενζύμων. Η συνήθης αντίδραση περιλαμβάνει ένα ρυθμιστικό διάλυμα με pH: 8.0 και περιεκτικότητα σε $MgCl_2$ 10 mM, 5 μg/ml DNA, 0.1 mM, δεσόξυ-νουκλεοτίδια (dNTPs), και 150 u/ml ενζύμου. Η αντίδραση επώαζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Ακολουθεί θερμική απενεργοποίηση του ενζύμου με επώαση στους 70°C. Το ίδιο ένζυμο είναι ικανό να περιορίζει τα 3' προεξέχοντα άκρα που προκύπτουν από πέψεις περιοριστικών ενζύμων αρκεί στην παραπάνω τυπική αντίδραση να παραλειφθεί η προσθήκη δεσόξυ-νουκλεοτιδίων.

β. Με χρήση της νουκλεάσης S1. Το ένζυμο αυτό έχει την ιδιότητα να περιορίζει τα μονόκλιωνα τμήματα του DNA και δεν εμφανίζει ειδικότητα στο αν τα μονόκλιωνα άκρα είναι 3' είτε 5' προεξέχοντα. Το ένζυμο χρησιμοποιήθηκε στις περιπτώσεις εκείνες όπου ήταν αναγκαία η αφαίρεση συγκεκριμένου αριθμού νουκλεοτιδίων από 5' υπολειπόμενο άκρο για λόγους διατήρησης, στις προκύπτουσες κατασκευές, του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου που μας ενδιέφερε. Η αντίδραση στην περίπτωση αυτή περιλαμβάνει 1 mg/ml DNA, 150 u/ml ενζύμου S1, ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου pH:4.5. Η αντίδραση επωάζεται στους 30°C για 30 λεπτά και στην συνέχεια με προσθήκη κατάλληλου διαλύματος το pH της αντίδρασης αυξάνει και το ένζυμο σταματά να δρα. Ακολουθεί και σε αυτή την περίπτωση θερμική απενεργοποίηση του ενζύμου.

γ. Αντίδραση σύνδεσης δύο μορίων DNA. Στις αντιδράσεις σύνδεσης (ligation) δύο μορίων DNA χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο λιγάση του βακτηριοφάγου T4. Στην περίπτωση όπου τα άκρα των δύο μορίων ήταν συμβατά, η συγκέντρωση του συνολικού DNA δεν ξεπερνά τα 5μg/ml για πλασμίδια μέσου μεγέθους, ενώ η ποσότητα της λιγάσης είναι 10 Weiss units/ml. Η αντίδραση περιλαμβάνει 1 mM ATP. Για τα ενθέματα DNA στις αντιδράσεις σύνδεσης ο υπολογισμός της ποσότητας τους βασιζόταν στο να επιτευχθεί μοριακή αναλογία 1/5 ή 1/3 (φορέας /ένθεμα) ανάλογα με το μέγεθος τους. Ο χρόνος επώασης της αντίδρασης είναι 90 λεπτά στους 16°C. Στην περίπτωση που τα άκρα είναι τυφλά διατηρούνται οι παραπάνω μοριακές αναλογίες αλλά η ποσότητα της λιγάσης αυξάνεται κατά μία τάξη μεγέθους ενώ η θερμοκρασία επώασης της αντίδρασης είναι 25°C και η διάρκεια της διπλασιάζεται.

2.2.1.στ Μετασχηματισμός βακτηριακών στελεχών.

Για τον μετασχηματισμό βακτηριακών στελεχών ακολουθήσαμε δύο μεθόδους. Την μέθοδο CaCl₂-RbCl₂ όπως έχει περιγραφεί [150], και αυτή της εισαγωγής DNA στα κύτταρα με την χρήση ηλεκτρικού παλμού. Η πρώτη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε κατ' αποκλειστικότητα για βακτηριακούς μετασχηματισμούς ρουτίνας, ενώ η δεύτερη στην περίπτωση όπου ήταν αναγκαία η επίτευξη υψηλής αποτελεσματικότητας μετασχηματισμού, όπως στην περίπτωση του πολλαπλασιασμού των κλώνων μιας πλασμιδιακής βιβλιοθήκης.

Μετασχηματισμός βακτηριακών στελεχών με πλασμιδιακή βιβλιοθήκη έκφρασης από κύτταρα Raji. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την ειδική περίπτωση μετασχηματισμού βακτηρίων είναι προσαρμοσμένο για την περίπτωση που το αρχικό πλασμιδιακό υλικό της βιβλιοθήκης είναι περιορισμένο. Χρησιμοποιήθηκαν 10 μg πλασμιδιακής βιβλιοθήκης ευγενώς προσφερόμενης από τον Δρ. Δημήτρη Θάνο.

Εν συντομία η διαδικασία που ακολουθήθηκε έχει ως εξής:

Μία και μοναδική βακτηριακή αποικία διαμέτρου 1-2mm μολύνει 100ml υγρού θρεπτικού LB. Η καλλιέργεια επωάζεται 16-18 ώρες στους 25°C, ώστε η οπτική της πυκνότητα να είναι 0.5 στα 600 nm. Τα βακτήρια συλλέγονται και φυγοκεντρώνονται στις 3000 rpm στους 4°C και επαναδιαλύονται σε ίσο με τον αρχικό όγκο αποστειρωμένου νερού. Ακολουθεί φυγοκέντρωση όπως προηγούμενα και επαναδιάλυση στο μισό του αρχικού όγκου σε αποστειρωμένο νερό. Φυγοκέντρωση όπως προηγούμενα και επαναδιάλυση σε 1 ml αποστειρωμένου και παγωμένου στους 4°C διαλύματος 10% γλυκερόλης. Τα βακτήρια μεταφέρονται σε σωλήνες μικρο-φυγοκέντρου και κρατούνται στον πάγο. Φυγοκεντρώνονται 5 λεπτά στις 6000 rpm στους 4°C. Απομακρύνεται όλο το υπερκείμενο και στην συνέχεια τα βακτήρια επαναδιαλύονται σε συνολικό όγκο 100 μl. Τα διαμοιράζουμε σε σωλήνες μικρο-φυγοκέντρου ανά 40 μl. Προσθέτουμε το DNA με το οποίο θα γίνει ο μετασχηματισμός και του οποίου ο όγκος δεν θα πρέπει να ξεπερνά τα 5 μl. Ο ηλεκτρικός παλμός καθορίζεται από την τάση που εφαρμόζουμε στα άκρα της κυψελίδας, την αντίσταση του πυκνωτή και την χωρητικότητα του. Σε αυτή την περίπτωση οι άριστες συνθήκες είναι οι εξής. 1.5 KV, 200 Ω, 25 μF, για κυψελίδα πάχους 0.1cm. Ο χρόνος του παλμού είναι άριστος μεταξύ των τιμών 4.3-4.6 msec. Η αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού είναι 10⁸/1 μg DNA. Τα βακτήρια που έχουν υποστεί τον παλμό επωάζονται με ήπια ανάδευση σε υγρό θρεπτικό SOC (0.5 yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucose) για μία ώρα στους 37°C. Στο τέλος φυγοκεντρώνονται και απλώνονται σε τρυβλία επιλογής.

Σ' αυτή την διαδικασία είναι σημαντικό να διατηρείται η θερμοκρασία των βακτηρίων από την στιγμή που θα φυγοκεντρηθούν για πρώτη φορά και μετά στους 4°C. Επίσης το νερό στο οποίο επαναδιαλύονται τα κύτταρα θα πρέπει να έχει όσο το δυνατό χαμηλότερη αγωγιμότητα (18 MΩ) και το DNA πρέπει να έχει περάσει από στήλη μοριακής διήθησης για να αφαιραθεί. Όλα τα παραπάνω είναι αναγκαία για να αυξηθεί όσο το δυνατό ο χρόνος του παλμού και να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού.

2.2.1ζ Ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων βακτηριακών κλώνων.

Η ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων βακτηριακών κλώνων έγινε με *in situ* υβριδοποίηση των βακτηριακών αποικιών μετά από την μεταφορά τους σε μεμβράνη υβριδοποίησης και έχει περιγραφεί αλλού [151].

2.2.1η Υβριδοποίηση νουκλεϊκών οξέων.

Όλες οι υβριδοποιήσεις των μεμβρανών έγιναν σύμφωνα με το κάτωθι πρωτόκολλο: Συνοπτικά οι μεμβράνες εισάγονται σε διάλυμα που περιέχει 7% SDS, 0.5 M Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄ pH: 7.2, 1% BSA. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης εξαρτάται από την σύνθεση, το μέγεθος και την ομολογία των προς υβριδοποίηση αλληλουχιών. Ο ραδιοσημασμένος ανιχνευτής αποδιατάσσεται για 5 λεπτά στους 100°C. Ακολουθεί υβριδοποίηση στις ίδιες συνθήκες για 12-18 ώρες. Χρησιμοποιούσαμε συνήθως 10⁶ cpm/ml διαλύματος υβριδοποίησης. Στο τέλος της υβριδοποίησης οι μεμβράνες ξεπλένονται με διάλυμα που περιέχει 5% SDS, 0.5 M Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄ pH: 7.2, 1 mM EDTA, που έχει προθερμανθεί στη θερμοκρασία υβριδοποίησης.

2.2.1θ Προσδιορισμός της πρωτοταγούς νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μορίων DNA (DNA sequencing analysis).

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του τερματισμού της επιμήκυνσης του DNA, μέσω της ενσωμάτωσης τριφωσφορικών δι-δεόξυ νουκλεοτιδίων (dideoxy chain termination method). Σαν μήτρα χρησιμοποιήθηκε υπερελικωμένο πλασμιδιακό DNA και η σήμανση των μορίων έγινε με α [³⁵S]-dATP. Στις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο Sequenase version 2.0 από την USB, η οποία είναι τροποποιημένη πολυμεράση T7. Για την διαδικασία ακολουθήθηκαν οι οδηγίες της προμηθεύτριας εταιρείας που περιέχονται στο σχετικό εγχειρίδιο.

2.2.1ι Αλυσιδωτή αντίδραση DNA πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction PCR).

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο γεγονός πολλαπλασιασμού οποιασδήποτε αλληλουχίας DNA *in vitro*, με την χρήση μιας ελάχιστης ποσότητας DNA-μήτρας και δύο ολιγονουκλεοτιδίων-εναρκτών που υβριδοποιούν εκατέρωθεν της αλληλουχίας DNA που ενδιαφέρει, στις δύο συμπληρωματικές αλυσίδες. Επίσης η μέθοδος αξιοποιεί την ικανότητα DNA πολυμερασών από θερμόφιλους οργανισμούς να «αντέχουν» υψηλές θερμοκρασίες και έτσι να παρίστανται σε όλα τα στάδια της αντίδρασης, χωρίς να χάνουν την αποτελεσματικότητά τους να πολυμερίζουν το DNA.

Μία τυπική αντίδραση περιλαμβάνει 5 ng DNA μήτρας, 1X ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl pH:8.4), 1-1,5 mM MgCl₂, 0.2 mM δεοξυ- νουκλεοτιδίων dNTPs, 0.5 u Θερμο-σταθερής πολυμεράσης Taq και 20 picomole από κάθε ένα ολιγονουκλεοτίδιο- εκκινητή (primer). Τα συστατικά θερμαίνονται για 5 λεπτά στους 100°C, (αποδιάταξη) και στην συνέχεια υποβάλλονται σε 25-30 κύκλους που περιλαμβάνουν διαδοχικά στάδια αποδιάταξης, υβριδοποίησης των εκκινητών στις αλληλουχίες στόχους της μήτρας σε κατάλληλη θερμοκρασία, και επιμήκυνσης των νέων αλυσίδων στους 72°C. Σε ένα τρίτο στάδιο ακολουθεί η ολοκλήρωση των ήδη υπάρχοντων αλυσίδων στους 72°C για 10 λεπτά. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών στις αλληλουχίες στόχους της μήτρας υπολογίζεται σύμφωνα με τον μαθηματικό τύπο

$$T_d = T_m - 13 \text{ και}$$

$T_m = 81.5 - 16.6(\log [Na^+]) + 41.5(\%G-C) - 600/N$ όπου N είναι ο αριθμός των βάσεων του εκκινητή.

2.2.1ια Απομόνωση και αντίστροφη μεταγραφή κυτταροπλασματικού RNA (Reverse Transcription) από κύτταρα σε καλλιέργεια.

10⁶ κύτταρα σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης συλλέγονται και πλένονται δύο φορές με PBS, με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις (1700 rpm 25°C 5 min) και επαναδιαλύσεις. Το κυτταρικό ίζημα τοποθετείται στη συνέχεια στον πάγο, αφού απομακρυνθεί το υπερκείμενο. Στο ίζημα προστίθενται 5 ml μείγματος ίσου όγκου όξινης φαινόλης pH: 4.5 και διαλύματος NETS (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH: 7.5, 1% SDS). Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση (vortex). Το μείγμα φυγοκεντρείται (1700 rpm 25°C 5 min), και το υπερκείμενο υφίσταται τρεις διαδοχικές εκχυλίσεις με μείγμα φαινόλης pH: 8/χλωροφορμίου 1/1. Εν συνεχεία στο υπερκείμενο προστίθενται 100% Ethanol, ίση με 2 όγκους διαλύματος, και 3M CH₃COONa ίσο με το 1/10 του όγκου του διαλύματος. Το δείγμα φυγοκεντρείται (14000 rpm 4°C 15 min), επαναδιαλύεται σε 200 μl αποστειρωμένου και αποιονισμένου νερού και ακολουθεί εκτίμηση της ποσότητας και της ποιότητας του κυτταροπλασματικού RNA, με ανάλυση 20 μl δείγματος σε πήκτωμα αγαρόζης.

Σε 2 μg κυτταροπλασματικού RNA προστίθενται 2 μl τυχαίων εξαμερών εκκινητών συγκέντρωσης 100 pmol/ml και αποστειρωμένο και απιονισμένο νερό έως όγκου 27.5 μl. Το δείγμα θερμαίνεται στους 65°C για 5 λεπτά και τοποθετείται στον πάγο. Σε αυτό προστίθενται το καταλληλο ρυθμιστικό διάλυμα άριστης απόδοσης της «αντίστροφης μεταγραφάσης» (Reverse Transcriptase) που έχει επιλεγεί 0,5 mM dNTPs, 1u Rnasin, 5u Reverse Transcriptase, σε τελικό όγκο αντίδρασης 40 μl. Η αντίδραση επωάζεται στους 37°C για 2 ώρες. Το 1/5 του δείγματος στη συνέχεια αποτελεί «μήτρα» για αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

2.2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.

2.2.2.α Ανάλυση WESTERN.

Η ανάλυση Western στηρίζεται στην δυνατότητα της μεταφοράς πρωτεϊνών από πηκτώματα ακρυλαμιδίου, και την ακινητοποίησή τους σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης. Χρησιμοποιήθηκε στις περιπτώσεις ταυτοποίησης των χιμαιρικών πρωτεϊνών, των υβριδίων LexA και GAL4., καθώς και στην περίπτωση καθαρισμών των πρωτεϊνών E1A και C1TA.

Κατά την διαδικασία αυτή 5-10 μg ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος πρωτεϊνών αναλύεται σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου κατά το σύστημα Laemmli. Στην συνέχεια ακολουθεί μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε ημι-ξηρό σύστημα ηλεκτροφόρησης. Κατά την διαδικασία αυτή τοποθετείται το πήκτωμα ακρυλαμιδίου και η μεμβράνη εν τω μέσω δύο ηλεκτροδίων γραφίτη εμποτισμένων με διάλυμα 48 mM Tris base, 39 mM γλυκίνη, 0.037% SDS, 20% μεθανόλη. Εφαρμόζεται τάση στα ηλεκτρόδια σύμφωνα με τον αριθμητικό τύπο $0.8 \text{ mA} \times \text{cm}^2$ για 90 λεπτά, και στην συνέχεια η μεμβράνη ξηραίνεται στον αέρα και εμβαπτίζεται σε διάλυμα 0.1% οξικού οξέος 1% Ponceau S, για να διαπιστωθεί η πλήρης μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στην νιτροκυτταρίνη. Την χρώση ακολουθούν τρεις πλύσεις με αραιό διάλυμα οξικού οξέος, και η μεμβράνη μπορεί σε αυτό το στάδιο να φωτογραφηθεί. Η χρωστική Ponceau απομακρύνεται στην συνέχεια με διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα TBS: 100 mM Tris-Cl pH:7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20. Ακολουθεί προ-επώαση της μεμβράνης στο παραπάνω διάλυμα συμπληρωμένο με 3% BSA ή 5% σκόνη γάλακτος, για 30-60 λεπτά, ενώ στην συνέχεια προστίθεται το κατάλληλο κάθε φορά αντίσωμα στην κατάλληλη συγκέντρωση σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας. Η επώαση με το αντίσωμα γίνεται σε ένα χρονικό διάστημα 8-12 ωρών στους 4°C. Ακολουθούν τρεις πλύσεις των 10 λεπτών με περίσσεια διαλύματος TBS, και στην συνέχεια στο ίδιο διάλυμα προστίθεται το δεύτερο αντίσωμα για ένα διάστημα 60 λεπτών. Μετά το τέλος της διαδικασίας αυτής ακολουθούν πλύσεις με TBS για δύο εικοσάλεπτα. Ακολουθεί η διαδικασία εμφάνισης ανάλογα με το ένζυμο που είναι προσδεμένο στο δεύτερο αντίσωμα.

1. Αντίδραση αλκαλικής φωσφατάσης. Το υπόστρωμα σε αυτή την περίπτωση είναι το αντιδραστήριο nitro-tetrazolium-blue NBT, το οποίο προστίθεται σε συγκέντρωση 0.015 % σε διάλυμα 10 mM Tris-Cl pH: 9.5 μαζί με το αντιδραστήριο X-phosphate. Η αντίδραση ολοκληρώνεται συνήθως σε 16 ώρες.

2. Αντίδραση υπεροξειδάσης. Σαν υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια χλωροναφθόλη, Diamino-benzidine DAB, και λουμινόλη. Η χλωροναφθόλη διαλυμένη σε μεθανόλη προστίθεται σε συγκέντρωση 0.6 gr/lit σε διάλυμα τριαιθανολαμίνης (7.5 gr/lit NaCl, 2.8 ml/lit Triethanolamine, pH:7.5). Στην συνέχεια προστίθεται 0.03% H₂O₂ και η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 5 ώρες. Εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί το αντιδραστήριο DAB σε συγκέντρωση 0.6 gr/ lit σε διάλυμα 10 mM Tris-Cl pH: 7.4, 150 mM NaCl, παρουσία 0.03% H₂O₂. Μία τρίτη μέθοδος που εκμεταλλεύεται την συνδεμένη στο δεύτερο αντίσωμα υπεροξειδάση, είναι η μέθοδος της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced Chemiluminesence ECL-AMERSAM) η οποία χρησιμοποιεί σαν μέθοδο ανίχνευσης το φως που προκαλείται από την αντίδραση οξειδωσης της λουμινόλης από την υπεροξειδάση παρουσία φαινολών. Αυτή η αντίδραση δίνει 100 φορές πιο ενισχυμένο σήμα από τις συμβατικές μεθόδους χρώσης. Η ανίχνευση του σήματος γίνεται με αυτοραδιογραφία. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι σύμφωνο με τις οδηγίες της προμηθεύτριας εταιρείας σε (AMERSHAM).

2.2.2.β Παραγωγή ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από κύτταρα θηλαστικών.

Το ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα, λαμβάνεται από 10⁹ κύτταρα τα οποία ξεπλένονται δις με PBS από το υγρό της καλλιέργειας τους και στη συνέχεια επαναδιαλύονται σε κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει 20 mM HEPES-KOH PH:7.9, 0.2 mM EDTA, 20% glycerol, 100 mM KCl., 1% PMSF, 1 mM Antipain, 0.5 mM Leupeptin, 1 mM Aprotinin, 1 mM Pepstatin. Το εναιώρημα των κυττάρων παγώνει σε ξηρό πάγο για 5 λεπτά και ξεπαγώνει στους 37°C για άλλα 5 λεπτά, τρεις φορές (Freeze Thaw). Με αυτό τον τρόπο τα κύτταρα λύνονται και οι πρωτεΐνες απελευθερώνονται στο διάλυμα. Στην συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρώνται στους 4°C, στις 14.000 rpm και μετρείται η συγκέντρωση των πρωτεϊνών του υπερκειμένου είτε με την μέθοδο BRADFORD είτε με την μέθοδο LOWRY.

2.2.2.γ Πειράματα μεταβολής της κινητικότητας ολιγονουκλεοτιδίων λόγω δέσμευσης με πρωτεΐνες (Electrophoretic Mobility Shift Assays, EMSAs).

Η μέθοδος αυτή παρέχει ένα γρήγορο αλλά εξαιρετικά ευαίσθητο τρόπο ανίχνευσης πυρηνικών πρωτεϊνικών παραγόντων ικανών να αλληλεπιδρούν με ρυθμιστικές αλληλουχίες στόχους. Τα βασικά βήματα περιλαμβάνουν

α. την σήμανση του δίκλωνου ολιγονουκλεοτιδίου όπως αναφέρεται παραπάνω.

β. επώαση του σημασμένου ανιχνευτή με το πρωτεϊνικό εκχύλισμα. Μια τυπική αντίδραση περιλαμβάνει:

1. 2×10^4 - 10^5 cpm DNA
2. 0.2-2 μg φορέα (carrier) DNA (poly dIdC) για την τιτλοδότηση των μη ειδικών αλληλεπιδράσεων.
3. 2-20 μg πρωτεΐνης ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος
4. Διάλυμα σύνδεσης (12 mM HEPES-KOH pH:7.9, 4 mM Tris-Cl pH:7.9, 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 12% v/v glycerol) ή (20 mM Tris-HCl mM pH: 7.9, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5% glycerol, 0.5 μg *E. Coli* DNA) μέχρι τελικού όγκου 30 μl.

Η αντίδραση παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.

γ. ακολουθεί η ηλεκτροφορητική ανάλυση των συμπλόκων. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμιδίου 4%. Το ρυθμιστικό διάλυμα στο οποίο πραγματοποιείται, είναι διάλυμα υψηλής ιοντικής ισχύος 0.4 - 0.25 X Tris-Borate. Ακολουθεί στέγνωμα του πηκτώματος σε αντλία κενού και αυτοραδιογραφία.

Στην περίπτωση εκείνη που πρέπει να διαπιστωθεί εάν κάποιες από τις πρωτεΐνες του συμπλόκου αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένους αντιορούς, τότε ο αντιορός προ-επωάζεται με το υλικό του εκχυλίσματος για 30-60 λεπτά πριν από την αντίδραση σύνδεσης. Η ίδια ποσότητα αντιορού τοποθετείται και στις αντιδράσεις μάρτυρες, για το ίδιο χρονικό διάστημα.

2.2.2.δ Παρασκευή ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από κύτταρα *S. Cerevisiae*.

Για την παραγωγή ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από κύτταρα σακχαρομύκητα, μία καλλιέργεια επωάζεται σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο μέχρι η οπτική της πυκνότητα στα 600 nm να φτάσει να είναι μεγαλύτερη του 1. Στη συνέχεια τα κύτταρα και φυγοκεντρώνονται στις 3000 rpm στους 25°C για 5 λεπτά. Τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 500-1000 μl διάλυμα λύσης 20 mM Tris-Cl pH:8, 400 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 10% glycerol, 7 mM β-Merkaptoethanol, 1 mM Antipain, 0.5 mM Leupeptin, 1 mM Aprotinin, 1 mM Pepstatin. και τους προσθέτονται 500-1000 μl υάλινα μικροσφαιρίδια. Ακολουθεί έντονο ανακάτεμα για δύο τουλάχιστον λεπτά. Το υλικό φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στους 4°C, και στο υπερκείμενο προστίθεται κατάλληλος όγκος από κορεσμένο διάλυμα $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3.9 M) ώστε η τελική συγκέντρωση του άλατος στο δείγμα να είναι 40%. Τα δείγματα επωάζονται στον πάγο για 30 λεπτά, και στην συνέχεια φυγοκεντρώνονται στις 10⁴ rpm. Τα πρωτεϊνικά ιζήματα τα επαναδιαλύουμε σε 100-200 μl διαλύματος με σύσταση 10 mM HEPES-KOH pH:7.9, 5 mM EDTA, 7 mM β-Merkaptoethanol, 1 mM Antipain, 0.5 mM Leupeptin, 1 mM Aprotinin, 1 mM Pepstatin. Ακολουθεί ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών στο διάλυμα.

2.2.2.ε Καθαρισμός της πρωτεΐνης E1A από στήλη συγγενείας Ni^{2+} NTA αγαρόζης.

Τρία με πέντε mg ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από κύτταρα Sf-9, μολυσμένα με τον κατάλληλο ανασυνδυασμένο Μπακυλο-ιό, υφίστανται εκτεταμένη διαπίδηση σε διάλυμα A, το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί και για την εξισορρόπηση 2 ml στήλης Ni^{2+} NTA αγαρόζης, μήκους 10 εκατοστών και διατομής 3 mm, συνεχούς ροής 3-5 ml/min. Στην συνέχεια το συνολικό εκχύλισμα εφαρμόζεται στην στήλη και συλλέγονται κλάσματα του 1ml. Στην συνέχεια εφαρμόζονται στην στήλη 20 ml διαλύματος A (50 mM NaPO_4 pH:8, 100 mM KCl, 0.1% Tween-20, 10 mM β-Merkaptoethanol, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA) ενώ η συλλογή κλασμάτων συνεχίζεται. Για την έκλυση της πρωτεΐνης εφαρμόζεται στην στήλη γραμμικό κλινές 0-250 mM Ιμιδαζολίου σε διάλυμα A. Η συλλογή κλασμάτων συνεχίζεται αλλά το μέγεθος των κλασμάτων μειώνεται στο 0.5 ml. Στην συνέχεια η στήλη ξεπλένεται και πάλι με 20 ml διαλύματος A, ενώ τα κλάσματα αναλύονται σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου κατά το σύστημα Laemmli. Ακολουθεί χρώση νιτρικού αργύρου και τα κλάσματα στα οποία εμφανίζεται η πρωτεΐνη ενοποιούνται και υφίστανται εκτεταμένη διαπίδηση κατά διαλύματος B (5 mM HEPES-KOH pH:7.9, 32% glycerol, 20 mM EDTA, 125 mM DTT, 2.7 mM KCl, 1 mM Antipain, 0.5 mM Leupeptin, 1 mM Aprotinin, 1 mM Pepstatin.) Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο 1 mg/ml. Η πρωτεΐνη φυλάσσεται στους -80°C.

2.2.2.στ Καθαρισμός της πρωτεΐνης CΙΤΑ από στήλη συγγενείας Ni⁺ NTA αραρόζης.

Για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης CΙΤΑ, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως και για την πρωτεΐνη E1A, εκτός του ότι ο καθαρισμός έγινε υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Το διάλυμα A εδώ έχει την εξής σύσταση 6 M Gn-HCl, 100 mM NaH₂PO₄, 100 mM Tris-Cl pH: 8. Η έκλυση της πρωτεΐνης γίνεται με κλινές pH διαλύματος 8 M ουρίας, 100 mM NaH₂PO₄, 100 mM Tris-Cl pH: 8-4.5.

2.2.2.ζ Χρώση νιτρικού αργύρου.

Η μέθοδος αυτή ακολουθήθηκε για την χρώση των πηκτωμάτων ανάλυσης των κλασμάτων από την στήλη καθαρισμού των πρωτεϊνών E1A και CΙΤΑ. Η ικανότητα ανίχνευσης πρωτεϊνών είναι μεγαλύτερη από την μέθοδο χρώσης Coomassie, και πλησιάζει το όριο ανίχνευσης της ανάλυσης Western που είναι το 1ng πρωτεΐνης. Το πήκτωμα επωάζεται με ήπια ανάδευση για 2 ώρες σε διάλυμα 10% οξικού οξέος, 50% μεθανόλης. Ακολουθεί επώαση με ήπια ανάδευση για 10 λεπτά σε διάλυμα οξειδωσης A, ενώ στην συνέχεια για τρία δεκάλεπτα ξεπλένεται με απιονισμένο νερό. Ακολουθώντας το πήκτωμα επωάζεται σε διάλυμα 2gr/lit AgNO₃, για 20-30 λεπτά. Ακολουθούν σύντομες πλύσεις με απιονισμένο νερό και προσθήκη του διαλύματος «εμφάνισης» 28 gr/lit Na₂CO₃, 0.018% φορμυλδεϋδης. Η προσθήκη του διαλύματος αυτού γίνεται με έντονη ανάδευση και ανανεώνεται κάθε μισό λεπτό. Το πήκτωμα μετά την χρώση επωάζεται σε διάλυμα 2% γλυκερόλης και 5% οξικού οξέος για 30 λεπτά και ξηραίνεται σε αντλία κενού. Οι χρόνοι επώασης είναι ανάλογοι του πάχους του πηκτώματος. Εδώ όπου αναφέρονται αφορούν πηκτώματα πάχους 1.5 mm.

2.2.2.η Βιοτινυλίωση πρωτεϊνών

Για την βιοτινυλίωση της καθαρής πρωτεΐνης E1A χρησιμοποιήθηκαν διάφορα πρωτόκολλα το παρακάτω όμως αποδείχθηκε αποτελεσματικότερο όλων ως προς τον αριθμό των υποκαταστάσεων . Συνοπτικά η πρωτεΐνη συμπυκνώνεται σε συγκέντρωση 1-20 mg/ml και στη συνέχεια υφίσταται διαπίδυση έναντι διαλύματος ανθρακικού νατρίου (17.3 gr/lit NaHCO₃, 8.6 gr/litNa₂CO₃ pH:9.3). Ακολουθεί προσθήκη ισομερούς μίγματος (σοκινναμιδικός εστέρας βιοτίνης διαλυμένος σε DMSO και σε συγκέντρωση 1%κ.β.) και επώαση για 2-4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή ολονύκτια επώαση στους 4°C. Το ισομερές μείγμα προστίθεται σε αναλογία 150 μg-1.5 mg εστέρα /mg πρωτεΐνης, ανάλογα με τον επιθυμητό αριθμό υποκαταστάσεων.

Ακολουθεί διαπίδυση του προϊόντος της αντίδρασης έναντι περίσσειας διαλύματος PBS, 1mM PMSF.

2.2.2.θ Αλληλεπιδράσεις χιμαιρικών πρωτεϊνών/GST ή τμημάτων πρωτεϊνών με ραδιοσημασμένες πρωτεΐνες στόχους.

Η μεθοδολογία αυτή χρησιμοποιήθηκε για την in vitro ανίχνευση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων και στις λεπτομέρειές της συνίσταται στη χρήση:

α. χιμαιρικών πρωτεϊνών μεταξύ του γονιδίου της τρσφεράσης της γλουταθειόνης και κατάλληλων τμημάτων cDNAs. Η χρήση των χιμαιρικών μορίων είναι χρήσιμη διότι αυτά, εξαιτίας του επιτόπου της τρσφεράσης της γλουταθειόνης, αλληλεπιδρούν με μόρια γλουταθειόνης ακινητοποιημένα σε σωματίδια σεφαρόζης. Κατ' αυτό τον τρόπο κατακρημνίζονται επιλεκτικά με φυγοκέντρωση από το συνολικό διάλυμα των βακτηριακών πρωτεϊνών. Για τη διαδικασία παραγωγής αυτών των χιμαιρικών πρωτεϊνών μετά τις τυπικές διαδικασίες υποκλωνοποίησης ακολουθήθηκε συνοπτικά η εξής διαδικασία:

Μία βακτηριακή αποικία κυττάρων *E. coli DH5a* που φέρει το χιμαιρικό γονίδιο σε κατάλληλο προκαρυωτικό φορέα έκφρασης (pGEX), μόλυνει 200 ml θρεπτικού υλικού. Η ανάπτυξη της καλλιέργειας στους 37° C ελέγχεται σε τακτά χρονικά διαστήματα με μέτρηση της οπτικής της πυκνότητας. Όταν αυτή φτάσει σε τιμή 0.8, προστίθεται IPTG σε τελική συγκέντρωση 1 mM. Η καλλιέργεια επωάζεται για δύο επιπλέον ώρες στις ίδιες συνθήκες. Στη συνέχεια η καλλιέργεια φυγοκεντρείται και τα βακτήρια συλλέγονται και επαναιωρούνται σε 2 ml διαλύματος A, PBS, 0.5% BSA, 1 mM PMSF. Ακολουθεί διάσπαση των κυττάρων με υπερήχους για ένα λεπτό. Στο υλικό προστίθεται στη συνέχεια TRITON-X100 σε τελική συγκέντρωση 1%, και γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 10%. Ανάμιξη και φυγοκέντρωση στις 14000 rpm, στους 4°C, 15 λεπτά. Από το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης απομακρύνονται 200 μl, στα οποία προστίθενται 30 μl αιωρήματος γλουταθειόνης ακινητοποιημένης σε σωματίδια σεφαρόζης (1 mg/ml). Το μείγμα επωάζεται στους 4°C, για μία ώρα με συνεχή ανακίνηση. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 2500 rpm, 4° C, 5 λεπτά, και πλύσεις του ιζήματος των σωματιδίων σεφαρόζης τρις με 500 μl διαλύματος A. Ακολουθεί ανάλυση του δείγματος σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου-SDS με τη μέθοδο Laemmli, για την ποσοτικοποίηση της

παραγόμενης χιμαιρικής πρωτεΐνης που κατακρημνίζεται με αυτή τη διαδικασία από το διάλυμα των βακτηριακών πρωτεϊνών.

β. Ραδιοσημασμένων πρωτεϊνικών μορίων, με το *in vitro* σύστημα QuickTNT (PROMEGA). Σε 500 μl διάλυμα B (150 mM KCl, 20 mM HEPES pH:7.9, 0.1% NP-40, 5 mM MgCl₂, 0.2% BSA, 1mM PMSF) αναμειγνύονται κατάλληλη ποσότητα σωματιδίων σεφαρόζης, με βάση την ποσότητα της χιμαιρικής πρωτεΐνης που έχουν δεσμεύσει, και το ραδιενεργά σημασμένο έτερο πρωτεϊνικό μόριο. Η αντίδραση αλληλεπίδρασης εκτελείται στους 4°C με συνεχή ανάδευση για 5-12 ώρες. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 2500 rpm, 4°C, 5 λεπτά και πλύσεις του ιζήματος τρεις με 500 μl διαλύματος B (150 mM KCl, 20 mM HEPES pH:7.9, 0.1% NP-40, 5 mM MgCl₂, 10% γλυκερόλη, 1 mM PMSF). Ακολουθεί ανάλυση κατά Laemmli, ξήρανση του πηκτώματος σε αντλία κενού και αυτοραδιογραφία. Σε περίπτωση αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών, η ραδιενεργά σημασμένη θα έχει κατακρατηθεί από τα σωματίδια σεφαρόζης, και θα ανιχνεύεται στο αντίστοιχο δείγμα.

2.2.3 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗΣ ΚΑΙ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗΣ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.

2.2.3.α Διαμόλυνση (transfection) κυτταρικών σειρών.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη της επίδρασης της ογκοπρωτεΐνης E1A και κατάλληλων ελλείψεων της, στην λεμφοειδική έκφραση ή επαγωγή από γ-ιντερφερόνη των τάξης II γονιδίων ιστοσυμβατότητας. Σαν γονίδια αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν κατασκευές CAT των οποίων η έκφραση ήταν υπό τον έλεγχο ρυθμιστικών περιοχών των υποκινητών των γονιδίων Eα και Eβ. Για την διαμόλυνση ακολουθήθηκαν δύο μέθοδοι ανάλογα με την κυτταρική σειρά.

A. Της συγκατακρήμνισης DNA με Ca₃PO₄ για τις περισσότερες κυτταρικές σειρές.

B. Της επιμόλυνσης με την χρήση δεξτράνης για τις λεμφοκυτταρικές σειρές.

Τόσο για την διαμόλυνση όσο και για τον μετέπειτα προσδιορισμό της ενεργότητας CAT ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται στο εργαστηριακό εγχειρίδιο [148]. Η αποτελεσματικότητα της επιμόλυνσης προσδιορίστηκε σε όλα τα πειράματα με την χρήση της κατασκευής pCMVβLacZ. Η κατασκευή αυτή με την εισαγωγή της στα κύτταρα οδηγεί στην παραγωγή β-γαλακτοσιδάσης της οποίας η ενεργότητα υπολογίζεται εύκολα [148].

2.2.3.β Επιμόλυνση κυττάρων Sf-9 με ανασυνδυασμένο μπακυλο-ιό.

Για την απόκτηση ανασυνδυασμένου μπακυλο-ιού ακολουθήθηκε στις λεπτομέρειές του το πρωτόκολλο που προτείνει στο σχετικό εγχειρίδιο της η INVITROGEN. Από το σημείο που αποκτάται ο ιός και μετά η διαδικασία επιμόλυνσης θα πρέπει να είναι τέτοια ώστε να μεγιστοποιείται η παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Στην περίπτωση του ανασυνδυασμένου με E1A μπακυλο-ιού, η πλασμιδιακή κατασκευή έκφρασης ήταν ευγενική παραχώρηση του Δρ Alex Van der Eb. Αφού υπολογίστηκε ο τίτλος του ιού επιμολύνθηκαν 1.8×10^7 κύτταρα με πολλαπλότητα επιμόλυνσης (multiplicity of infection MOI= αριθμός ιοσωματίων /κύτταρο) 10 και επώαστηκαν για μία ώρα στους 27°C σε θρεπτικό που δεν περιέχει ορό. Στην συνέχεια απομακρύνεται το θρεπτικό που περιέχει τον ιό και τοποθετείται πλήρες θρεπτικό. Τα κύτταρα συλλέγονται 40 ώρες μετά την μόλυνση όπως είναι η άριστη συνθήκη για την μέγιστη παραγωγή της πρωτεΐνης, και αφού πλυθούν δύο φορές με PBS επαναδιαλύονται σε διάλυμα X, για την παραγωγή ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος (βλ παραπάνω). Τέλος πριν το εκχύλισμα εφαρμοστεί στην στήλη χρωματογραφίας Ni⁺ NTA αγαρόζης υφίσταται εκτεταμένη διαπίδηση έναντι διαλύματος εξισορρόπησης στήλης A.

2.2.3.γ Μετασχηματισμός κυττάρων *S. cerevisiae*.

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε ομοίως για μικρής και μεγάλης κλίμακας μετασχηματισμούς. Στους μετασχηματισμούς μεγάλης κλίμακας αυξήθηκε η ποσότητα του πλασμιδιακού DNA και ο αριθμός των επιμέρους αντιδράσεων. Με την διαδικασία αυτή επιτεύχθηκε μέγιστη αποτελεσματικότητα μετασχηματισμού (efficiency of transformation) 2×10^4 /mg DNA, στα στελέχη Y190 και Y187. Αφού με τα προτεινόμενα από την κατασκευάστρια εταιρεία (Clontech) πρωτόκολλα η αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού ήταν πολύ μικρότερη (5×10^3), αυτή ήταν η διαδικασία που προτιμήθηκε. Συνοπτικά μία αποικία ενοφθαλμίζει 50 ml θρεπτικού διαλύματος YEP ή κατάλληλου διαλύματος SD συμπληρωμένου με τα κατάλληλα αμινοξέα και επώαζεται μέχρι τίτλου κυττάρων 2×10^7 /ml. Τα κύτταρα αραιώνονται σε καλλιέργειες των 50 ml και σε τίτλο 2×10^6 /ml. Η επώαση συνεχίζεται για 4-5 ώρες ακόμη στους 30°C με έντονη ανάδευση, μέχρι ο αριθμός των κυττάρων να φτάσει τα 2×10^7 . Στο σημείο αυτό τα κύτταρα συλλέγονται και φυγοκεντρώνονται 5 λεπτά στις 3000 rpm και ξεπλένονται μία φορά με απιονισμένο και αποστειρωμένο νερό. Στην συνέχεια τα

κύτταρα επαναδιαλύονται σε κατάλληλο όγκο διαλύματος 0.1 M LiOAc, ώστε ο τίτλος των κυττάρων να είναι 2×10^9 /ml. Τα κύτταρα μοιράζονται ανά 50 μ l, φυγοκεντρώνται και απομακρύνεται το υπερκείμενο. Στο ίζημα των κυττάρων προστίθενται με την σειρά τα εξής:

240 μ l 50% PEG 3.350
36 μ l 1 M LioAc
50 μ l 2 mg/ml Salmon Sperm DNA
10 μ g DNA σε συνολικό όγκο 50 μ l.

Ακολουθεί έντονη ανάδευση (vortex) μέχρι ομοιογενούς ανάμιξης και επώαση στους 30°C, για 30 λεπτά. Στην συνέχεια τα κύτταρα υφίστανται θερμικό shock στους 42°C για 25 λεπτά. Τέλος τα κύτταρα φυγοκεντρώνται, επαναδιαλύονται σε 150 μ l αποστειρωμένου νερού και απλώνονται σε κατάλληλα τρυβλία επιλογής. Η επώαση διαρκεί 3 ημέρες για να εμφανισθούν τα κύτταρα που έχουν υποστεί μετασχηματισμό.

2.3. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ ΚΑΙ ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ.

Τα ελλείμματα του E1A Δ 13, και Δ 20, κατασκευάστηκαν με την κλωνοποίηση των τμημάτων BstXI(partial)-HincII (S1), και PvuII-HincII, αντίστοιχα, σε φορέα Bluescript NcoI (Klenow), με σκοπό να τους παρασχεθεί ένα εναρκτήριο κωδικό ATG. Από τις προκύπτουσες κατασκευές τα τμήματα NcoI-HincII, κλωνοποιήθηκαν στο φορέα pRC/RSV μεταξύ των θέσεων HindIII-XbaI (Klenow).

Τα χμαιρικά μόρια VP16-CITTA (και τα ελλείμματα του) και VP16-STAT1 α , κατασκευάστηκαν με την ένθεση τμημάτων EcoRI- XbaI, απομονωμένων από τις κατασκευές CITTA-pCDNA3, Δ 102-pCDNA3, Δ 408-pCDNA3 στον κατάλληλο φορέα pMVN. Τα CITTA και Δ 408 εντέθηκαν σε pMVNI, περιορισμένο με τα ίδια μόρια, ενώ το Δ 102 εντέθηκε σε pMVNII. Το STAT1 α απομονώθηκε ως τμήμα NcoI-EcoRV από τον φορέα Bluescript και τοποθετήθηκε στο φορέα pMVNII, στη θέση EcoRI (Klenow).

Τα χμαιρικά μόρια LexA-E1A δημιουργήθηκαν με την ένθεση στη θέση EcoRI (Klenow) του φορέα pEG202 τμήματα BamHI-RsaI (CR1) και BamHI-HincII (E1A) από κατασκευές της E1A12S σε φορέα pBluescript που έχουν περιγραφεί αλλού [169].

Τα χμαιρικά μόρια Gal4-CITTA και τα ελλείματά του κατασκευάστηκαν ενθέτοντας τα τμήματα

α) EcoRI- XbaI από τα Δ 102-pCDNA3 και Δ 408-pCDNA3 στο φορέα pAS-2 περιορισμένο με EcoRI (Klenow).

β) EcoRI- BamHI και EcoRI-NotI από το Δ 102-pCDNA3 στο φορέα pAS-2 περιορισμένο με EcoRI (Klenow).

Η κατασκευή έκφρασης του CITTA για την παραγωγή του με το σύστημα των μπακυλοϊών έγινε με την ένθεση τμήματος EcoRI-XhoI από την κατασκευή CITTA-pCDNA3 σε φορέα pBlueBacHis C, περιορισμένου με τα ένζυμα EcoRI-SalI. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την έλλειψη Δ 102, αλλά η παραγωγή της πρωτεΐνης δεν ολοκληρώθηκε.

Τα χμαιρικά μόρια Gal4-STAT1 α και το έλλειμμα του AD κατασκευάστηκαν ενθέτοντας τα τμήματα NcoI-EcoRV και SmaI- EcoRV στον φορέα pBXG1 περιορισμένο στη μεν πρώτη περίπτωση με PstI (Klenow) στην δεύτερη με BamHI (Klenow). Από το φορέα αυτό τα τμήματα εξάγονται ως BglII-XbaI (partial digest) και ενθέτονται σε φορέα pRC/RSV Hind III-XbaI.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

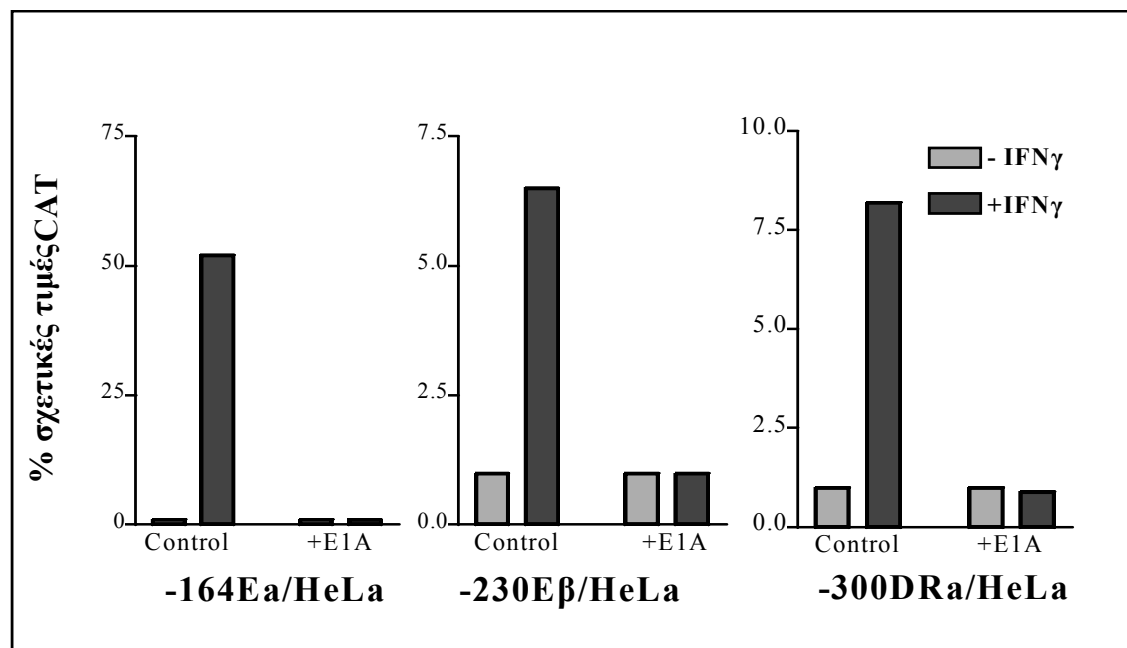
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.

Τα αποτελέσματα χωρίζονται σε τρεις ενότητες, στο τέλος κάθε μίας παρατίθεται η συζήτηση των αποτελεσμάτων.

3.1 Διερεύνηση του μηχανισμού με τον οποίο καταστέλλεται από τον παράγοντα E1A η συστατική και επαγόμενη με ιντερφερόνη-γ μεταγραφή από τους υποκινητές των τάξης II αντιγόνων ιστοσυμβατότητας.

3.1α Το γονίδιο E1A καταστέλλει τόσο τη συστατική μεταγραφική έκφραση των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξης II, όσο και την επαγόμενη από ιντερφερόνη-γ.

Με βάση το γεγονός ότι το E1A καταστέλλει ένα πλήθος ικών και κυτταρικών γονιδίων, ελέγξαμε τη επίδραση του σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης στην μεταγραφή κατάλληλων κατασκευών που φέρουν τα cis-ρυθμιστικά στοιχεία των γονιδίων ιστοσυμβατότητας τάξης II, Eα και Eβ του ποντικού, και του ανθρώπινου γονιδίου DRα. Πρόκειται για τις κατασκευές -164Eα/CAT, -230Eβ/CAT και -300DRα/CAT. Ως φορέας του γονιδίου του αδενοϊού 5 289RE1A, χρησιμοποιήθηκε η κατασκευή pRSV5E1A, ευγενώς προσφερόμενη από τον Dr Alex van der Eb.



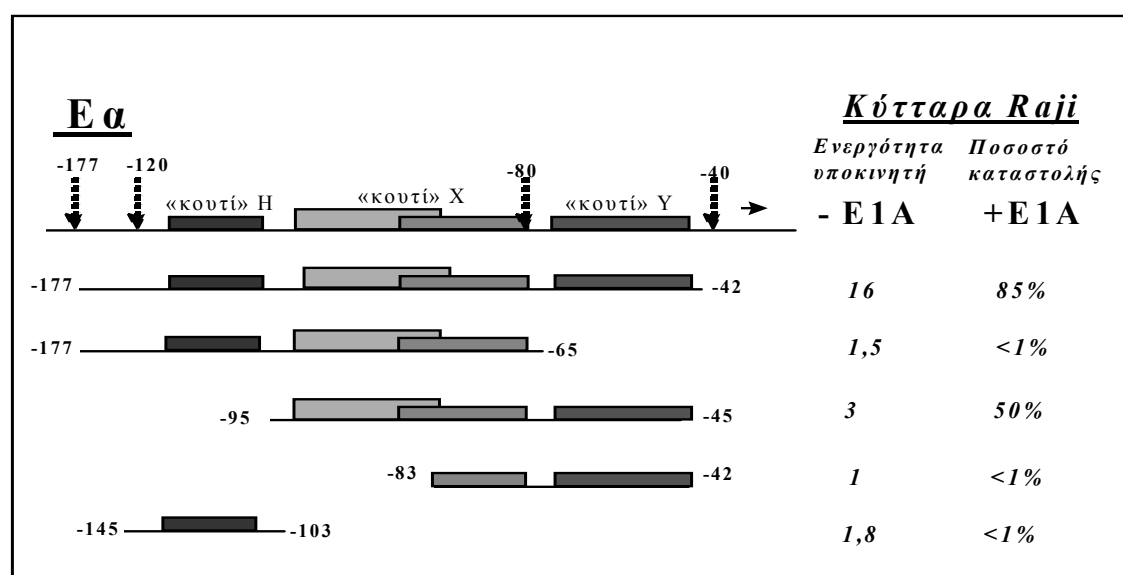
Εικόνα 6: Επίδραση του E1A στην επαγόμενη από ιντερφερόνη γ, μεταγραφή κατασκευών CAT, που φέρουν ρυθμιστικά στοιχεία από τρία γονίδια τάξης II. Το E1A καταστέλλει την επαγόμενη μεταγραφή, χωρίς να επηρεάζει τα βασικά επίπεδα μεταγραφής και στις τρεις περιπτώσεις.

Η παρουσία της κατασκευής που φέρει το E1A καταστέλλει την συστατική μεταγραφή από τους τρεις υποκινητές στην κυτταρική σειρά με χαρακτηριστικά λεμφοκυττάρων B, Raji, κατά ένα ποσοστό 90% (τα δεδομένα αυτά δεν παρουσιάζονται). Στην εικόνα 6 παραθέτονται τα ιστογράμματα της συμπεριφοράς των τριών κατασκευών αναφοράς που προαναφέρθηκαν σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης κυττάρων HeLa. Και οι τρεις κατασκευές αποκρίνονται μεταγραφικά

(σε διαφορετικό βαθμό η κάθε μία) στην επίδραση με ιντερφερόνη γ. Η ύπαρξη της E1A (σε ποσότητες από 50 ng/πείραμα) καταστέλλει ισχυρά το επαγωγικό αποτέλεσμα της ιντερφερόνης στις κατασκευές αυτές. Είναι αξιοσημείωτο ότι και στις τρεις περιπτώσεις η E1A δεν επηρεάζει τα βασικά επίπεδα της μεταγραφής. Η παρατήρηση αυτή υποδεικνύει ότι η επίδραση της E1A που παρατηρούμε δεν οφείλεται στην «τιτλοδότηση» κάποιου συστατικού της «βασικής μεταγραφικής μηχανής». Το ίδιο κατασταλτικό αποτέλεσμα παρατηρείται και όταν χρησιμοποιηθεί κατασκευή έκφρασης της πρωτεΐνης E1A 243R.

3.1β Χαρακτηρισμός των cis στοιχείων των υποκινητών των γονιδίων ιστοσυμβατότητας μέσω των οποίων ο παράγοντας E1A ασκεί το κατασταλτικό του αποτέλεσμα.

Στην προσπάθεια να βρεθεί η μικρότερη περιοχή, η αποκρινόμενη στο E1A, πάνω στους υποκινητές των τάξης II, χρησιμοποιήθηκαν συγκεκριμένες ελλειμματικές κατασκευές των υποκινητών αυτών χαρακτηρισμένες αλλού [152, 153]. Πρόκειται για μία σειρά από τμήματα του υποκινητή του γονιδίου Ea τα οποία έχουν εντεθεί πίσω από το βασικό υποκινητή (το στοιχείο TATA) του γονιδίου της α2-σφαιρίνης.



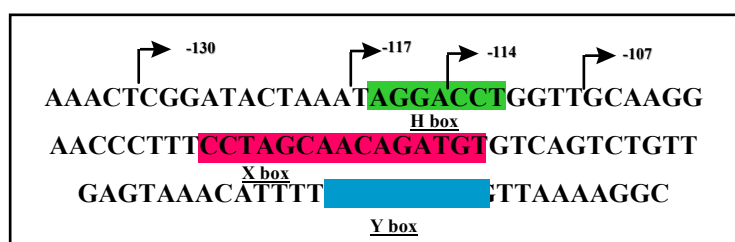
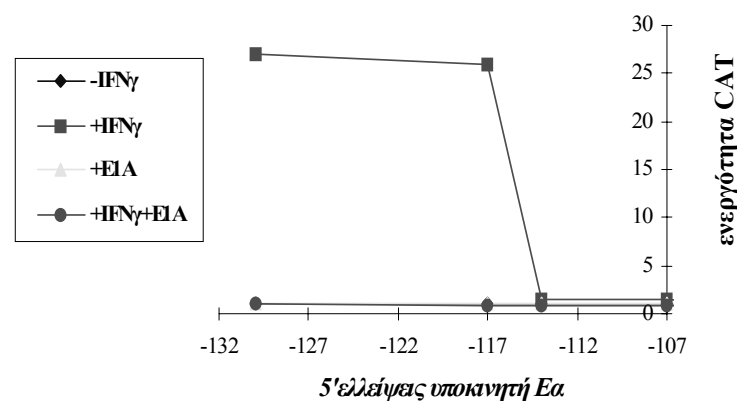
Εικόνα 7: Επίδραση της E1A σε κατασκευές CAT που φέρουν ρυθμιστικά στοιχεία του υποκινητή Ea τοποθετημένα σε συνδυασμό με τον υποκινητή της α-σφαιρίνης.

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 7 το τμήμα από το νουκλεοτίδιο -177 έως του -65 του Ea, το οποίο δρα ως B ιστοειδικός υποκινητής και περιλαμβάνει τα στοιχεία X και H, καταστέλλεται κατά ένα ποσοστό 85% από την παρουσία της 289R5E1A ή της 243R. Η κατασκευή από το -95 έως του -45, η οποία επιδεικνύει πολύ χαμηλότερη B ιστοειδική έκφραση και περιλαμβάνει τα στοιχεία X και Y, καταστέλλεται κατά ένα ποσοστό 50% από το E1A. Οι άλλες δύο κατασκευές που εξετάστηκαν, δεν υποκινούν B ιστοειδική έκφραση (σε αυτές το στοιχείο X είτε δεν υπάρχει, είτε είναι ελλειμματικό), και τα επίπεδα έκφρασής τους δεν επηρεάζονται από την παρουσία της E1A. Θα πρέπει να αναφερθεί στο σημείο αυτό ότι ο υποκινητής της α-σφαιρίνης αφενός δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική

μεταγραφική δραστηριότητα στα κύτταρα Raji, αφετέρου δεν επηρεάζεται από την ύπαρξη της E1A.

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι δεν υπάρχει συσχέτιση της αρνητικής επίδρασης της E1A με την ύπαρξη κάποιου συγκεκριμένου στοιχείου ή τμήματος του υποκινητή. Η B λεμφοειδική έκφραση που υποκινεί το σύνολο των στοιχείων του υποκινητή, καταστέλλεται ισχυρά από την E1A όπως και το μικρότερο τμήμα αυτού που διατηρεί κάποια ιστοειδικότητα. Ο υποκινητής δεν φαίνεται να διαθέτει κάποιο συγκεκριμένο στοιχείο που να αποκρίνεται στο κατασταλατικό αποτέλεσμα της E1A. Εξάλλου, η E1A φαίνεται ότι έχει σαν στόχο το σύνολο του υποκινητή. Με άλλα λόγια, η ικανότητα του υποκινητή να προκαλεί ιστοειδική μεταγραφή, και να καταστέλλεται από την ύπαρξη της E1A είναι δύο λειτουργίες αδιαχώριστες.

Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγουμε και σε ότι αφορά στην επίδραση της E1A στην απόκριση σε ιντερφερόνη-γ των υποκινητών των γονιδίων τάξης II. Μια σειρά 5' διαδοχικών ελλείψεων του γονιδίου Ea χρησιμοποιήθηκε για να καθοριστεί η περιοχή μέσω της οποίας το E1A ασκεί το κατασταλατικό του αποτέλεσμα στην επαγωγή από την ιντερφερόνη-γ.



Εικόνα 8: Επίδραση της E1A στην επαγωγή από την ιντερφερόνη γ, κατασκευών CAT που φέρουν διαδοχικές 5' ελλείψεις του υποκινητή Ea. Η δράση της E1A περιορίζεται στις κατασκευές που επιδεικνύουν επαγωγή. Τα βασικά επίπεδα έκφρασης και εδώ σε κάθε περίπτωση παραμένουν ανεπηρέαστα.

Το αποτέλεσμα των πειραμάτων παροδικής διαμόλυνσης, με αυτές στα κύτταρα HeLa, παριστάνεται γραφικά στο σχήμα της Εικόνας 8. Τα 5' όρια των κατασκευών (αναγράφονται στον άξονα των X) σε σχέση με τα κύρια ρυθμιστικά στοιχεία του υποκινητή Ea σημειώνονται με βέλη στις αντίστοιχες νουκλεοτιδικές συντεταγμένες.

Η επαγωγιμότητα των ελλειμματικών αυτών κατασκευών όπως έχει αποδειχτεί οφείλεται στην ύπαρξη των στοιχείων H και X. Όπως και στην περίπτωση της B λεμφοειδικής έκφρασης για την απόκριση του υποκινητή στο κατασταλτικό αποτέλεσμα της E1A, δεν ευθύνεται κάποιο συγκεκριμένο στοιχείο. Ο υποκινητής λειτουργεί σαν σύνολο αποκρινόμενος στην ιντερφερόνη- γ , και σαν σύνολο καταστέλλεται από την E1A. Σε καμία από τις περιπτώσεις η E1A δεν φαίνεται να επηρεάζει τα βασικά επίπεδα έκφρασης. Τις ίδιες πληροφορίες δίνουν και παρόμοια πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικές ελλείψεις 3' του υποκινητή του Eα (τα δεδομένα αυτά δεν παρουσιάζονται).

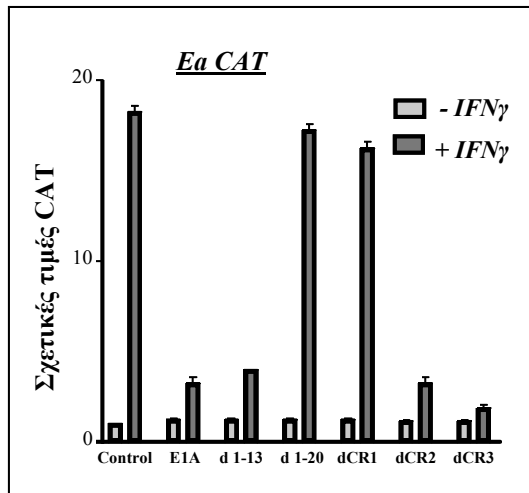
3.1γ Χαρτογράφηση των περιοχών της πρωτεΐνης E1A που είναι αναγκαίες για την καταστολή της μεταγραφής των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξης II.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το γονίδιο E1A χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη συντηρημένων περιοχών, στις οποίες και αποδίδονται συγκεκριμένες λειτουργίες. Στην προσπάθεια να συσχετισθούν συγκεκριμένες περιοχές της πρωτεΐνης E1A με το φαινότυπο καταστολής στη μεταγραφή των αντιγόνων τάξης II που περιγράφηκε, χρησιμοποιήθηκαν κατασκευές που εκφράζουν εσωτερικά ελλείμματα του μορίου (προσφορά του Dr Alex van der Eb). Πρόκειται για τις Δ 38-65 (έλλειψη της CR1), Δ 125-133 (έλλειψη της CR2) και Δ 140-189 (έλλειψη της CR3). Επίσης, αν και το αμινοτελικό άκρο της E1A δεν εμφανίζεται συντηρημένο στους διάφορους οροτύπους αδενοϊών, εντούτοις, είναι σημαντικό για τα γεγονότα μεταγραφικής καταστολής [91]. Κατασκευάστηκαν στον φορέα pRC/RSV δύο αμινοτελικά ελλείμματα που αφαιρούν από το E1A τα αμινοξικά κατάλοιπα 2-13 και 2-20. Στην εικόνα 9 Γ παραθέτονται σε σχηματική αναπαράσταση οι κατασκευές που αναφέρθηκαν. Όλες οι κατασκευές εξετάστηκαν, σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης σε κύτταρα COS, ως προς την ικανότητά τους να παράγουν τις ελλειμματικές πρωτεΐνες E1A (ανάλυση Western). Ανιχνευτικό μόριο σε τέτοιου είδους πειράματα είναι ο μονοκλωνικός αντιορός α -E1A M73 [18]. Επίσης έγιναν για τον ίδιο λόγο πειράματα ανοσοφθορισμού σε κύτταρα HeLa με το ίδιο αντίσωμα. Σε κάθε περίπτωση η παραγωγή των πρωτεϊνών από τις αντίστοιχες κατασκευές κρίθηκε ικανοποιητική. Οι ελλείψεις παράγονται και σε συγκρίσιμες ποσότητες (τα δεδομένα αυτά δεν παρουσιάζονται).

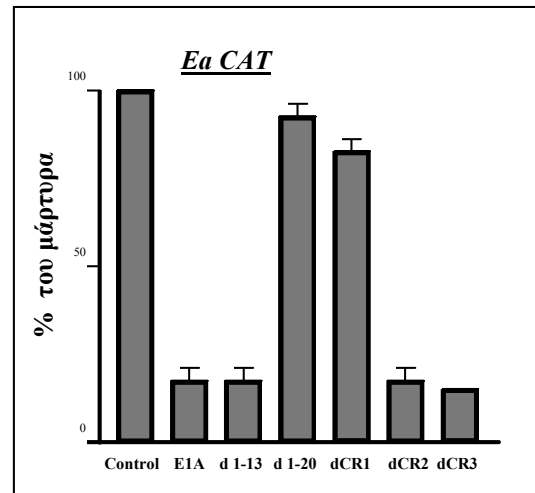
Όπως φαίνεται από τα ιστογράμματα της ίδιας εικόνας, τα εσωτερικά ελλείμματα των περιοχών CR2, CR3 και Δ 2-13 δεν επηρεάζουν τον κατασταλτικό φαινότυπο της E1A, όσον αφορά στην έκφραση της κατασκευής Eα, τόσο στην κυτταρική σειρά Raji (εικόνα 7 B) όσο και στην επαγωγή της στα κύτταρα HeLa (εικόνα 7 A) από την ιντερφερόνη γ . Αντίθετα τα ελλείμματα της περιοχής CR1 και των αμινοξέων 2-20, καταργούν την κατασταλτική επίδραση της E1A πάνω στη B-λεμφοειδική και επαγόμενη από την ιντερφερόνη γ έκφραση της κατασκευής Eα/CAT.

Από τα παραπάνω εξάγεται το συμπέρασμα ότι ο φαινότυπος καταστολής της E1A οφείλεται στην παρουσία των αμινοξικών καταλοίπων 2-20 και 38-65. Από τα βιβλιογραφικά δεδομένα [15-18], συνάγεται ότι η καταστολή από το E1A συμπίπτει με την λειτουργική θέση 1, δηλαδή το λειτουργικό εκείνο τμήμα του E1A που απαρτίζεται από το αμινοτελικό άκρο του μορίου και από την περιοχή CR1 [108].

A. Κύτταρα HeLa



B. Κύτταρα Raji



Γ. Ελλείψεις του E1A

CR1	CR2	CR3		Αλληλεπίδραση με CBP	
				CBP-Nter	CBP-CH ₃
			E1A289R	+	+
			E1A289R Δ 2-13	+	+
			E1A289R Δ 2-20	-	-
			E1A289R Δ CR1	nd	nd
			E1A289R Δ CR2	nd	nd
			E1A289R Δ CR3	+	+

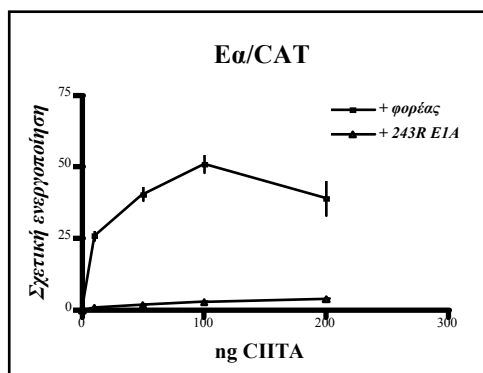
Εικόνα 9: Επίδραση των διαφορετικών ελλειμμάτων του E1A στην επαγόμενη από ιντερφερόνη γ (A) και συστατική σε λεμφοκύτταρα B (B) έκφραση της κατασκευής Ea CAT. Η ιδιότητα του E1A να δρα σαν αρνητικός ρυθμιστής και στις δύο περιπτώσεις συμπίπτει με την ύπαρξη της «Ενεργής θέσης 1».

Στο λειτουργικό αυτό τμήμα του μορίου, όπως έχει αναφερθεί και προηγούμενα, χαρτογραφείται η αλληλεπίδραση με τα μόρια αρμοστές p300/CBP [15, 18, 21, 40]. Ωστόσο οι αμινοξικές συντεταγμένες πάνω στο μόριο της E1A, εντός των οποίων τοποθετείται η αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη p300 δεν συμπίπτουν απόλυτα με το φαινότυπο καταστολής των μεταλλαγών. Η διαφορά εντοπίζεται στη μεταλλαγή που αφαιρεί τα κατάλοιπα 2-13, η οποία και διατηρεί την ιδιότητα αρνητικής επίδρασης πάνω στη μεταγραφή των γονιδίων τάξης II, είτε αυτή είναι συστατική (κύτταρα Raji) είτε είναι επαγόμενη από ιντερφερόνη γ (κύτταρα HeLa). Η μεταλλαγή αυτή, δεν αναμένεται να αλληλεπιδρά *in vivo* με την p300, διότι όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία [18], μία μικρότερη αμινοτελική έλλειψη του E1A που αφαιρεί τα 12 πρώτα αμινοξέα της E1A (Δ 12), δεν φαίνεται να αλληλεπιδρά με τα μόρια αρμοστές σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης.

Για να ερευνηθεί το ενδεχόμενο η έλλειψη Δ13 να αλληλεπιδρά με τις p300/CBP [18], εξετάστηκαν σε πειράματα αλληλεπίδρασης με GST-χιμαιρικά τμήματα των πρωτεϊνών αυτών, οι *in vitro* συνθεμένες πρωτεΐνες E1A: το ακέραιο μόριο, η Δ13 και η Δ20. Η Δ13 αλληλεπιδρά ισχυρά, όπως και το ακέραιο μόριο E1A με την τρίτη περιοχή, την πλούσια σε κυστεΐνες και ιστιδίνες, τόσο της p300, όσο και της CBP. Επίσης και η Δ13 και το ακέραιο μόριο αλληλεπιδρούν εξίσου καλά (συγκρίνοντάς τα μεταξύ τους) αλλά ασθενέστερα (από ότι με τη CH₃) με το αμινοτελικό άκρο της CBP. Αντίθετα η Δ20 δεν διαθέτει ικανότητα αλληλεπίδρασης με κανένα από τα δύο τμήματα των πρωτεϊνών p300/CBP (τα παραπάνω δεδομένα δεν παρουσιάζονται εδώ, διότι αποτελούν τμήμα της πτυχιακής εργασίας του Γ. Κουτρούμπα.). Το συμπέρασμα από τις παραπάνω πληροφορίες είναι ότι ο φαινότυπος καταστολής του E1A συμπίπτει απόλυτα με την ύπαρξη της λειτουργικής περιοχής 1.

3.1δ Μελέτη της επίδρασης του παράγοντα E1A στην ενεργοποίηση της μεταγραφής των τάξης II γονιδίων ιστοσυμβατότητας από την ύπαρξη της C/ITA.

Είναι γνωστό ότι η πρωτεΐνη C/ITA, σε μη σταθερές κυτταρικές διαμολύνσεις, επάγει την μεταγραφή των γονιδίων ιστοσυμβατότητας [70]. Επιπρόσθετα, η υπερέκφραση του γονιδίου C/ITA, υπό ετερόλογο υποκινητή σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης, στην κυτταρική σειρά HeLa είναι ικανή να επάγει μεταγραφή των γονιδίων τάξης II, παρακάμπτοντας την ανάγκη σηματοδότησης με ιντερφερόνη-γ [70, 76, 154].



Εικόνα 10: Απόκριση της κατασκευής Eα CAT σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις κατασκευής έκφρασης της C/ITA παρουσία [▲] ή απουσία[□] της E1A σε ποσότητα 250 ng.

Για να μελετηθεί η επίδραση της E1A πάνω στο φαινόμενο αυτό επιχειρήθηκε διαμόλυνση κατασκευών που εκφράζουν τα δύο γονίδια υπό την επίδραση διαφορετικών υποκινητών σε διαφορετικές στοιχειομετρίες. Όπως φαίνεται και στο γράφημα της εικόνας 10, η κατασκευή -164 Eα CAT, αποκρίνεται μεταγραφικά στην παρουσία CΠΤΑ, κατά ένα τρόπο ανάλογο της δόσης του μορίου.

Η συν- διαμόλυνση της κατασκευής RSVdelCR3 (243R 5E1A), σε ποσότητα 250ng, έχει ένα ισχυρό κατασταλτικό αποτέλεσμα στη δράση αυτή, σε όλες τις συγκεντρώσεις του CΠΤΑ που εξετάστηκαν. Τα εξαγόμενα αποτελέσματα είναι τα ίδια με δύο κατασκευές έκφρασης του CΠΤΑ. Οι κατασκευές αυτές διαφέρουν ως προς τον υποκινητή στον οποίο οφείλεται και η μεταγραφή του γονιδίου. Είτε η παραγωγή της CΠΤΑ οφείλεται στον υποκινητή του ανθρώπινου μεγαλο-κυτταρο-ϊού CMV, είτε στον υποκινητή του ιού του σαρκώματος του Rous RSV, παρατηρείται το ίδιο φαινόμενο καταστολής. Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι η μεταγραφική δραστηριότητα των δύο υποκινητών δεν επηρεάζεται από την παρουσία του E1A: |το E1A δεν επηρεάζει τα επίπεδα παραγωγής της CΠΤΑ αλλά τη λειτουργία της. Όπως και στην περίπτωση της επαγόμενης από την ιντερφερόνη-γ και της συστατικής B λεμφοειδικής έκφρασης της κατασκευής Eα CAT, έτσι και στην περίπτωση της απόκρισης της στην παρουσία του CΠΤΑ, το E1A δρα αρνητικά. Το δεδομένο αυτό είναι σημαντικό αφού υποδεικνύει το μόριο CΠΤΑ σαν έναν άμεσο ή έμμεσο στόχο της δράσης της E1A.

Όπως παρουσιάζεται στο γράφημα της εικόνας 10 η απόκριση του υποκινητή στις αυξανόμενες δόσεις του CΠΤΑ φτάνει στην υψηλότερη τιμή της σε συγκέντρωση 100 ng, αλλά στην περαιτέρω αύξηση αντί να διατηρείται σταθερή, μειώνεται ελαφρά. Το γεγονός αυτό είναι ενδεικτικό της ύπαρξης ενός παράγοντα, από τον οποίο εξαρτάται άμεσα το μεταγραφικό δυναμικό της CΠΤΑ, και του οποίου η ποσότητα είναι περιορισμένη. Η μείωση του μεταγραφικού δυναμικού μεταφράζεται σε τιτλοδότηση αυτού του περιοριστικού παράγοντα από την περίσσεια CΠΤΑ. Έτσι ο στόχος της E1A μπορεί να είναι, σύμφωνα με τα προαναφερθέντα, είτε το ίδιο το CΠΤΑ είτε ο περιοριστικός παράγοντας στον οποίο το CΠΤΑ οφείλει το μεταγραφικό δυναμικό του.

3.1ε Διερεύνηση του μηχανισμού με τον οποίο η πρωτεΐνη E1A καταστέλλει το μεταγραφικό δυναμικό της CΠΤΑ.

Εφόσον τα δεδομένα υποδεικνύουν ως πιθανό στόχο της κατασταλτικής επίδρασης του E1A το μόριο CΠΤΑ, ελέγξαμε την πιθανότητα άμεσης αλληλεπίδρασης των δύο μορίων. Πλασμιδιακές κατασκευές χιμαιρικών GST-τμημάτων, αλλά και ολόκληρης της πρωτεΐνης CΠΤΑ ελέγχθηκαν για την in vitro αλληλεπίδρασή τους με την E1A289R. Όπως φαίνεται στην εικόνα 11, δεν παρατηρείται άμεση αλληλεπίδραση της E1A289R με κανένα από τα παραγόμενα χιμαιρικά μόρια που βασίζονται σε ελλείμματα της CΠΤΑ (δείγματα 2-5). Αντίθετα, κάτω από αυτές τις συνθήκες παρατηρείται ισχυρή αλληλεπίδραση της E1A289R με την περιοχή CH₃ του CBP (δείγμα 6), η οποία και χρησιμοποιείται στην περίπτωση αυτή ως θετικός μάρτυρας [40]. Έχοντας αποκλείσει την φυσική αλληλεπίδραση των δύο μορίων, αποκλείεται ταυτόχρονα και η «άμεση μοριακή τιτλοδότηση» (η φράση

υιοθετείται για να αποδώσει τον αγγλικό όρο «squelching») ως τον πιθανό μηχανισμό βάσει του οποίου παρατηρείται η αρνητική επίδραση της μίας πρωτεΐνης (E1A) έναντι της άλλης (CΠΤΑ).

Όπως έχει αναφερθεί το CΠΤΑ είναι ένα μόριο που διαθέτει ιδιότητες αρμοστή. Αυτό σημαίνει ότι δεν έχει άμεση πρόσβαση στους υποκινητές των γονιδίων τάξης II αναγνωρίζοντας κάποια αλληλουχία στόχο. Αντίθετα την ενεργοποιητική δράση του την οφείλει στην αλληλεπίδρασή του με το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που αναγνωρίζει το στοιχείο X. Έχει άλλωστε αναφερθεί η άμεση αλληλεπίδραση του με τον παράγοντα RFX-5 [90]. Το E1A μπορεί να παρεμβαίνει διακόπτοντας είτε αυτή την αλληλεπίδραση είτε την αλληλεπίδραση της περιοχής του CΠΤΑ που ευθύνεται για τη μεταγραφική ενεργοποίηση με κάποιο τρίτο μόριο.

Το να οφείλεται το κατασταλτικό αποτέλεσμα που παρατηρούμε, στην επίδραση του E1A στο δυναμικό κάποιου τρίτου παράγοντα εκτός του CΠΤΑ δεν θεωρείται πιθανό, για λόγους που αναφέρονται στη συνέχεια.





Εικόνα 11: Πείραμα συγκατακρήμνισης E1A και χμαιοικών τμημάτων του CΠΤΑ με GST. Δεν ανιχνεύεται ειδική αλληλεπίδραση με κανένα από τα τμήματα του CΠΤΑ που εξετάζονται αλλά ούτε και με το χμαιοικό μόριο που περιλαμβάνει όλη την κωδική περιοχή του CΠΤΑ. Στο δείγμα 5 ως θετικός μάρτυρας αλληλεπίδρασης το χμαιοικό μόριο που περιλαμβάνει την περιοχή CH₃ της CBP.

Σε διακριτές περιοχές της πρωτεΐνης CΠΤΑ αποδίδονται διαφορετικές λειτουργίες. Για παράδειγμα το δυναμικό ενεργοποίησης της μεταγραφής της CΠΤΑ εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης [70, 87, 155]. Απόρροια αυτού του γεγονότος είναι ένα ακόμα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό του μορίου: την ιδιότητα συγκεκριμένων ελλειμμάτων ή και μεταλλαγών της πρωτεΐνης να δρουν ως

«επικρατείς αρνητικές μεταλλαγές» (Dominant negative mutants) στην δράση του ακέραιου μορίου ως θετικού μεταγραφικού ρυθμιστή των τάξης II γονιδίων [75, 88, 89]. Την ιδιότητα της «επικρατούς αρνητικής μεταλλαγής» διαθέτει η έλλειψη Δ102, από την οποία έχουν αφαιρεθεί τα 102 πρώτα αμινοξέα της πρωτεΐνης. Στο έλλειμμα αυτό εξακολουθεί να υπάρχει η περιοχή μέσω της οποίας το μόριο αποκτά πρόσβαση στους υποκινητές των γονιδίων ιστοσυμβατότητας τάξης II [90]. Η ιδιότητα του μορίου αυτού φάνηκε εξαιρετικά χρήσιμη στο σχεδιασμό μίας πειραματικής προσέγγισης για να διαπιστωθεί ο τρόπος με τον οποίο επιδρά κατασταλτικά το E1A πάνω στο μεταγραφικό δυναμικό της C/PTA.

Η πειραματική στρατηγική συνίσταται στο να αντικατασταθεί το τμήμα της C/PTA εκείνο στο οποίο οφείλεται το μεταγραφικό δυναμικό της, με μία ετερόλογη περιοχή, ικανή για μεταγραφική ενεργοποίηση, η οποία αποδεδειγμένα δεν υφίσταται την κατασταλτική επίδραση της E1A. Το χαρακτηριστικό αυτό, το διαθέτει κατάλληλο τμήμα μίας άλλης ιϊκής πρωτεΐνης της VP16. Έτσι δημιουργήθηκαν τρεις χμιαϊκές κατασκευές. Σε κοινό πλαίσιο ανάγνωσης με τα κατάλληλα αμινοξέα της VP16 (VP16 Activation Domain, VP16AD) τοποθετήθηκαν:

α) ολόκληρη η κωδική περιοχή του ανθρώπινου γονιδίου του C/PTA και
 β) δύο ελλείμματα του ίδιου γονιδίου, η έλλειψη των αμινοξέων 1-102 (Δ102) και η έλλειψη των αμινοξέων 1-408 (Δ408). Οι κατασκευές αυτές χρησιμοποιήθηκαν για την παροδική διαμόλυνση κυττάρων HeLa, χωρίς και μαζί με την κατασκευή έκφρασης της πρωτεΐνης 243R E1A. Η κατασκευή αναφοράς στα πειράματα αυτά είναι το τμήμα από το νουκλεοτίδιο -1714 του υποκινητή του γονιδίου Eα, το οποίο οδηγεί τη μεταγραφή του γονιδίου CAT (κατασκευή F1/CAT) (εικόνα 12).

		<i>Σχετική ενεργοποίηση της κατασκευής F1/CAT</i>		
		<i>- CBP</i>	<i>+ CBP</i>	<i>+ E1A</i>
	VP16-C/PTA	190	1150	123.5
	VP16-Δ102	33	55	31.2
	VP16-Δ408	1.3	1.8	1.1
	VP16	1.0	1.1	0.9

Εικόνα 12: Οι χμιαϊκές κατασκευές που δημιουργήθηκαν από την ένθεση τμημάτων της C/PTA σε κοινό ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης με την περιοχή που ευθύνεται για το μεταγραφικό δυναμικό της ιϊκής πρωτεΐνης VP16. Στον πίνακα παραθέτονται στοιχεία για τη συμπεριφορά των κατασκευών αυτών στην ενεργοποίηση της μεταγραφής της κατασκευής F1 CAT (πειράματα παροδικής διαμόλυνσης κυττάρων HeLa) καθώς και η συμπεριφορά τους σε συνδυασμό με την ύπαρξη CBP. Στην τρίτη στήλη του πίνακα παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της ύπαρξης του E1A στο δυναμικό μεταγραφικής ενεργοποίησης του κάθε χμιαϊκού μορίου πάνω στην κατασκευή αναφοράς F1 CAT.

Η πρώτη παρατήρηση μας είναι ότι η παραχώρηση της ετερόλογης περιοχής της VP16, στο έλλειμμα Δ102, το μετατρέπει σε μεταγραφικό ενεργοποιητή, παρόλο που, όπως φαίνεται και στον πίνακα της εικόνας 12 δεν συγκρίνεται το δυναμικό του με αυτό του ακέραιου μορίου. Η διαπίστωση ότι η προσθήκη της VP-16 AD στο μόριο Δ102 το καθιστά θετικό μεταγραφικό ρυθμιστή, ενισχύει την πεποίθηση ότι το

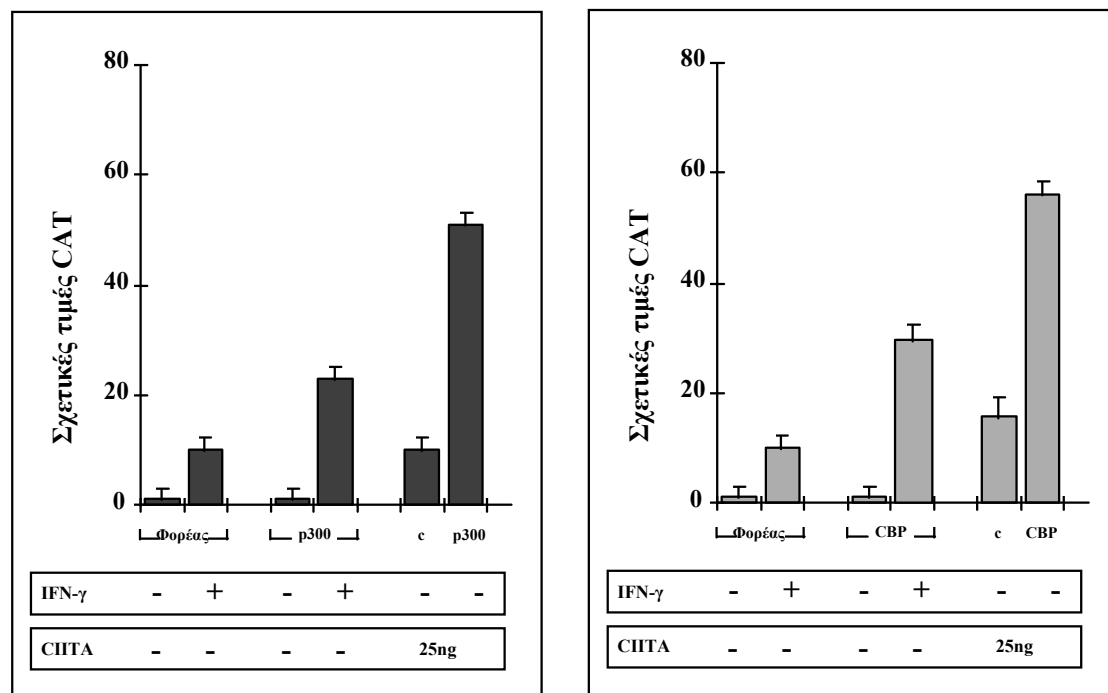
έλλειμμα Δ102 έχει εξασφαλίσει την φυσική πρόσβασή του στους υποκινητές των τάξης II, βάσει τη αποδεδειγμένης φυσικής αλληλεπίδρασής του με τον RFX-5 [90]. Αντίθετα το μόριο Δ408 κατά τον ίδιο τρόπο δεν ενεργοποιεί τη μεταγραφή ακόμα και μετά την προσθήκη της VP16AD. Το χμιαρικό αυτό μόριο δεν επιδεικνύει κυρίαρχο αρνητικό φαινότυπο στη δράση του ακέραιου μορίου. Πιθανή εξήγηση για τη συμπεριφορά του μορίου αυτού, είναι ότι δεν έχει πρόσβαση στον υποκινητή. Η προσθήκη της VP16AD σε ολόκληρο το μόριο CΠΤΑ ελάχιστα συνεισφέρει στη δράση του ως θετικού μεταγραφικού παράγοντα. Το CΠΤΑ είναι από μόνο του ένας πολύ ισχυρός μεταγραφικός ρυθμιστής. Η ύπαρξη της E1A δεν αναιρεί το μεταγραφικό δυναμικό των χμιαρικών μορίων VP16-CΠΤΑ, και VP16-Δ408. Από τα δεδομένα αυτά φαίνεται ότι η προσθήκη της VP16AD, σε αυτά τα μόρια, τα καθιστά «άνοσα» ή μερικώς «άνοσα» στην κατασταλτική επίδραση του E1A. Παράλληλα είναι φανερό ότι ο στόχος της E1A είναι αποκλειστικά κάποια λειτουργία της περιοχής του CΠΤΑ που ενεργοποιεί τη μεταγραφή. Στο συμπέρασμα αυτό οδηγεί η σκέψη ότι αν το E1A εμπόδιζε την πρόσβαση του μορίου στους υποκινητές θα έπρεπε να καταστέλλει τη δράση του VP16-Δ408, πράγμα που δεν παρατηρείται. (Το γεγονός ότι στόχο του E1A αποτελεί η AD της CΠΤΑ υποστηρίζεται και από δεδομένα τα οποία και δεν παρουσιάζονται εδώ καθώς αποτελούν μέρος της εργασίας του μεταπτυχιακού φοιτητή Χ. Σπηλιανάκη. Συγκεκριμένα πρόκειται για τη μελέτη της κατασταλτικής επίδρασης της E1A σε ένα μεταγραφικό σύστημα όπου η κατασκευή αναφοράς είναι υπό την επίρεια τεσσάρων θέσεων αναγνώρισης του μεταγραφικού παράγοντα του σακχαρομύκητα Gal4. Στο σύστημα αυτό εξετάζεται το μεταγραφικό δυναμικό χμιαρικών μορίων Gal4-CΠΤΑ και κατάλληλων ελλείψεων του. Η παρουσία της E1A και στην περίπτωση αυτή καταστέλλει το μεταγραφικό δυναμικό της κατασκευής Gal4-CΠΤΑ στο συγκεκριμένο σύστημα. Έτσι αποκλείεται το ενδεχόμενο να οφείλεται ο κατασταλτικός φαινότυπος που παρατηρούμε στην επίδραση του E1A σε κάποιον από τους υπόλοιπους μεταγραφικούς παράγοντες (RFX-5, NF-Y κτλ) που λαμβάνουν μέρος στις διαδικασίες μεταγραφής των τάξης II γονιδίων).

3.1στ Μελέτη της επίδρασης των αρμοστών p300/CBP στη μεταγραφή των γονιδίων ιστοσυμβατότητας τάξης II.

Ο συνδυασμός των δεδομένων που παρατέθηκαν οδηγεί σε μία ενδιαφέρουσα υπόθεση. Συγκεκριμένα η χαρτογράφηση της περιοχής του E1A που ευθύνεται για τον κατασταλτικό φαινότυπο που επιδεικνύει στη μεταγραφή των τάξης II γονιδίων είχε ως αποτέλεσμα να αποδοθεί η δράση αυτή στην «ενεργή θέση 1» του μορίου. Η περιοχή αυτή ευθύνεται και για την αλληλεπίδραση με τα μόρια αρμοστές p300 και CBP. Από την άλλη μεριά τα μόρια αυτά αποτελούν στόχο των περιοχών που ευθύνονται για μεταγραφική ενεργοποίηση των περισσότερων από τους γνωστούς μεταγραφικούς παράγοντες. Επίσης η ένδειξη ότι στόχο για το E1A αποτελεί η αντίστοιχη περιοχή του CΠΤΑ επιβάλλει την εξέταση της πιθανής επίδρασης των μορίων p300/CBP στη μεταγραφή των γονιδίων τάξης II. Για το λόγο αυτό εξετάστηκε σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης το αποτέλεσμα της παρουσίας κατασκευών έκφρασης για τις p300/CBP στη μεταγραφή που υποκινεί η κατασκευή αναφοράς F1. Κατασκευές έκφρασης της p300 (προσφορά του Δρ D. Livingstone [15] και της CBP (προσφορά του Δρ Δ. Θάνου) (υπό τον ιικό υποκινητή CMV αμφότερα τα γονίδια), διαμολύνουν κύτταρα HeLa, χωρίς ή με την προσθήκη

ιντερφερόνης- γ , καθώς και σε συνδυασμό με κατασκευές που φέρουν ακέραια την κωδική περιοχή του CITA.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών φαίνονται στην εικόνα 13. Η ύπαρξη των εξωγενώς προστιθέμενων p300 και CBP ενισχύει την απόκριση του υποκινητή E α στην ιντερφερόνη γ , κατά ένα τρόπο ανάλογο των δόσεών τους. Επίσης η ύπαρξη τους ενισχύει την απόκριση του ίδιου υποκινητή στη δράση του μορίου CITA. Όπως είναι φανερό η ενίσχυση που παρατηρείται στη μεταγραφή των γονιδίων τάξης II, από την ύπαρξη των μορίων p300/ CBP, φανερώνει ότι αυτά έχουν ενεργό ρόλο σε αυτές τις μεταγραφικές διαδικασίες. Η σχέση του CBP με το CITA μεταξύ άλλων έχει αποδειχτεί ότι βασίζεται στην απευθείας αλληλεπίδραση των δύο μορίων, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Η περιοχές αλληλεπίδρασης έχουν χαρτογραφηθεί και στα δύο μόρια [156]. Είναι μάλιστα αξιοσημείωτο το γεγονός ότι χαρτογραφούνται δύο περιοχές αλληλεπίδρασης με το CITA πάνω στο μόριο CBP. Αυτές οι περιοχές αλληλεπίδρασης τοποθετούνται στο αμινοτελικό άκρο του μορίου (αμινοξέα 1-770) και στην περιοχή CH₃ (αμινοξέα 1620-1897). Πρέπει να επισημανθεί η σύμπτωση των περιοχών αλληλεπίδρασης του E1A και του CITA πάνω στο μόριο CBP. Η ιδιότητα αυτή των δύο μορίων είναι πιθανό ότι καθιστά αδύνατη τη ταυτόχρονη αλληλεπίδρασή τους με το CBP.



Εικόνα 13: Επίδραση των μορίων με ιδιότητες αρμοστών σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης κυττάρων HeLa πάνω στην κατασκευή F1 CAT. Η ύπαρξη της p300 (αριστερό εικονίδιο) και του CBP (δεξί εικονίδιο) ενισχύει τόσο την επαγωγή της κατασκευής από την ιντερφερόνη γ , όσο και την απόκρισή της στη ύπαρξη του CITA.

Στο CITA, η περιοχή αλληλεπίδρασης χαρτογραφείται στο αμινοτελικό άκρο του μορίου δηλαδή ακριβώς στην περιοχή στην οποία οφείλεται η δράση του, ως θετικού μεταγραφικού ρυθμιστή. Η απόδειξη της λειτουργικής σχέσης της αλληλεπίδρασης της περιοχής που ενεργοποιεί μεταγραφή του CITA με το CBP προσεγγίζεται πειραματικά κατά τη συνδιαμόλυνση σε κύτταρα HeLa των χιμαιρικών κατασκευών VP16-CITA που περιγράφηκαν στην προηγούμενη ενότητα με την

κατασκευή έκφρασης του CBP. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών παραθέτονται στη μεσαία στήλη του πίνακα της εικόνας 12. Παρατηρείται ενίσχυση του μεταγραφικού δυναμικού του VP16-CITTA από την παρουσία κατασκευής έκφρασης της CBP κατάμια τάξη μεγέθους, πράγμα που είναι κατανοητό διότι στο χμιαϊκό μόριο υπάρχει η περιοχή αλληλεπίδρασης με τον CBP. Αντίθετα το CBP δεν έχει καμία επίδραση στη μεταγραφική ενεργοποίηση που οφείλεται στα μόρια VP16-Δ102 και VP16-Δ408. Από αυτά λείπει η περιοχή αλληλεπίδρασης με το CBP.

Ο συνδυασμός όλων των παραπάνω δεδομένων οδηγεί στη διατύπωση ενός μοντέλου σύμφωνα με το οποίο η ύπαρξη της CITTA διασφαλίζει τη μεταγραφική ενεργοποίηση από τους υποκινητές των τάξης II γονιδίων ιστοσυμβατότητας, ενώ η παρουσία του E1A επιδρά αρνητικά σε αυτή τη διαδικασία, όπως αναφέρεται στη «Συζήτηση» των αποτελεσμάτων.

3.1ζ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.

Το E1A είναι ένας δυναμικός μεταγραφικός ρυθμιστής. Ο λειτουργικός του ρόλος, έγκειται στον επαναπρογραμματισμό του κυτταρικού μεταγραφικού προτύπου, ώστε να εξυπηρετούνται οι ανάγκες των αδενοϊών. Η μεταγραφική καταστολή των τάξης II αντιγόνων ιστοσυμβατότητας εξυπηρετεί τους αδενοϊούς διότι πιθανώς με τον τρόπο αυτό ξεφεύγουν της ανοσο-επιτήρησης του οργανισμού. Είναι γνωστό ότι οι ιικές μολύνσεις αντιμετωπίζονται από τον οργανισμό, κύρια, μέσω των λεμφοκυττάρων T CD8⁺, τα οποία αναγνωρίζουν αντιγονικά πεπτίδια παρουσιασμένα δια μέσου των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξης I. Τα αντιγόνα τάξης II, παρουσιάζουν πεπτίδια σε λεμφοκύτταρα T CD4⁺, και η παρουσίαση αυτή σχετίζεται με την αντιμετώπιση ενδοκυττάρων παθογόνων. Εν τούτοις αυτό δεν είναι απόλυτο. Σε αρκετές περιπτώσεις ιοί στοχεύουν στην καταστολή αυτού του δεύτερου μονοπατιού κυτταρικής ανοσίας, και μάλιστα επεμβαίνουν και σε διακριτά στάδια ρύθμισης. Χαρακτηριστικότερο, και ίσως γνωστότερο, παράδειγμα ο ιός HIV, ουσιαστικό στόχο του οποίου αποτελεί η κατηγορία των λεμφοκυττάρων T CD4⁺[157]. Ο ανθρώπινος μεγαλο-κυτταροϊός HCMV, της κατηγορίας των ερπητοϊών, καταστέλλει επίσης την επαγόμενη έκφραση των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξης II, από την ιντερφερόνη-γ, με απώτερο στόχο την απορύθμιση των T CD4⁺ [158].

Η καταστολή της μεταγραφής των αντιγόνων τάξης από το αδενοϊκό E1A έχει αναφερθεί και από άλλους [141,144], στα πλαίσια της διερεύνησης των μηχανισμών με τους οποίους οι αδενοϊοί ξεφεύγουν της ανοσο-επιτήρησης του οργανισμού. Στην παρούσα μελέτη δείξαμε ότι τόσο η B συστατική, όσο και η επαγόμενη από ιντερφερόνη-γ, αλλά και η εξαρτώμενη από την ύπαρξη CIPTA, μεταγραφή των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξης II, καταστέλλεται από την ύπαρξη και των δύο πρωτεϊνικών ισομόρφων του E1A, της 243 και της 289R. Όπως και σε περιπτώσεις που το E1A δρα σαν αρνητικός μεταγραφικός ρυθμιστής σε άλλα συστήματα, και εδώ διαπιστώσαμε ότι δεν υπάρχει κάποιο συγκεκριμένο cis στοιχείο στους υποκινητές που να αποκρίνεται άμεσα στη κατασταλτική επίδραση της παρουσίας του E1A. Είναι κοινό χαρακτηριστικό των υποκινητών των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξης II, το ότι παρόλο που αποτελούνται από διακριτά cis στοιχεία, η λειτουργικότητά τους στις περιπτώσεις μεταγραφικής ενεργοποίησης οφείλεται σε γεγονότα συνεργατικών αλληλεπιδράσεων. Με άλλα λόγια οι υποκινητές αυτοί λειτουργούν σαν σύνολα, με συγκεκριμένους τοπολογικούς περιορισμούς, και ακριβείς συσχετισμούς των συστατικών τους. Ο στόχος του E1A φαίνεται ότι είναι ακριβώς αυτή η λειτουργική ενότητα των υποκινητών. Για το λόγο αυτό δεν διαπιστώνουμε την ύπαρξη συγκεκριμένων διακριτών μοτίβων, που να δρουν αποκρινόμενα στο E1A, στις εγγύς ρυθμιστικές περιοχές των τάξης II αντιγόνων ιστοσυμβατότητας.

Υπεύθυνη για τον κατασταλτικό φαινότυπο που ασκεί το μόριο είναι η ύπαρξη της ενεργής θέσης 1, η οποία πολλές φορές έχει ενοχοποιηθεί για τις κατασταλτικές ιδιότητες του μορίου και σε άλλα μεταγραφικά συστήματα [137,138, 139,140,144]. Μία από τις ιδιότητες αυτής της λειτουργικής ενότητας της πρωτεΐνης είναι η αλληλεπίδραση με τα μόρια αρμοστές p300/CBP. Αυτή ήταν και η παρατήρηση που οδήγησε στο να εξετασθεί το ενδεχόμενο τα μόρια- αρμοστές να έχουν ενεργό ρόλο στη διαδικασία της μεταγραφικής επαγωγής, από την

ιντερφερόνη- γ των υποκινητών των τάξης II γονιδίων. Τα αποτελέσματα των πειραματικών προσεγγίσεων που παρουσιάστηκαν οδηγούν στη διατύπωση ενός μηχανιστικού μοντέλου, το οποίο αφενός ολοκληρώνει την εικόνα που έχουμε για τα γεγονότα μεταγραφικής έναρξης πάνω στους υποκινητές των γονιδίων τάξης II και αφετέρου εξηγεί και τον τρόπο δράσης του E1A.

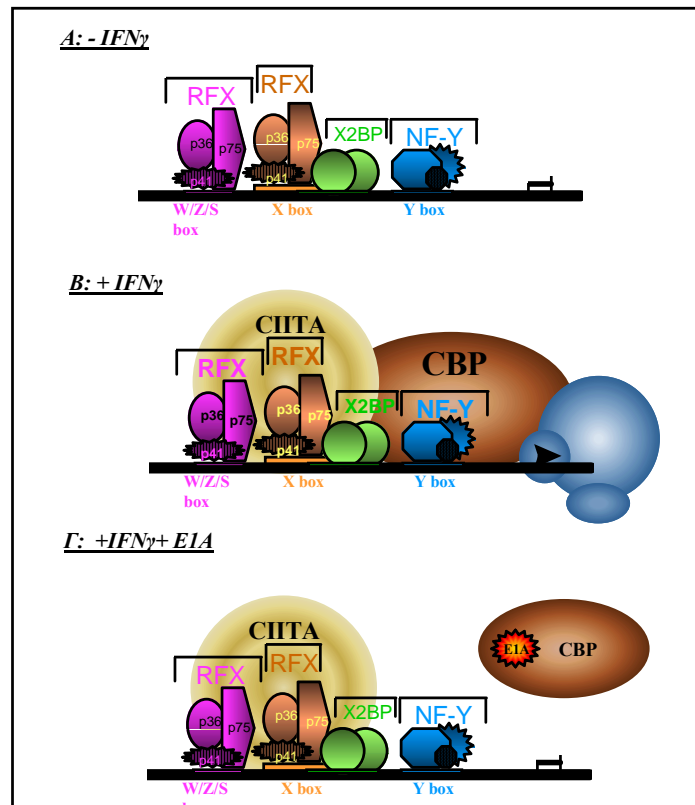
Η συναρμολόγηση των μεταγραφικών παραγόντων πάνω σε ένα συγκεκριμένο υποκινητή χαρακτηρίζεται από κάποια ιεραρχία. Η C/ITA, όπως άλλωστε έχει αναφερθεί, είναι το μόριο κλειδί για τη μεταγραφή των τάξης II γονιδίων ιστοσυμβατότητας [72, 76, 77]. Όταν η παρουσία των υπολοίπων παραγόντων, που συνεπικουρούν στην μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων αυτών, είναι φυσιολογική, η ύπαρξη του C/ITA είναι απαραίτητη για την κατάληψη των υποκινητών *in vivo* [62]. Το C/ITA με άλλα λόγια έχει και ένα συντονιστικό ρόλο στη διαδικασία αυτή. Το C/ITA χρησιμοποιεί το στοιχείο X, και τους μεταγραφικούς παράγοντες που αλληλεπιδρούν με αυτό για να έχει πρόσβαση στους υποκινητές [70, 87, 90]. Οι μεταγραφικοί παράγοντες που αλληλεπιδρούν με τα *cis* στοιχεία των υποκινητών δεν στερούνται πρωτεϊνικών περιοχών που ενεργοποιούν τη μεταγραφή. Εντούτοις, χωρίς την ύπαρξη του C/ITA, δεν συμβαίνει μεταγραφή από τους υποκινητές τάξης II. Δεν αποκλείεται το C/ITA να διαθέτει και κάποια ενζυμική λειτουργία (εξαιτίας της ύπαρξης των μοτίβων δέσμευσης GTP [89]), στην τροποποίηση κάποιου από αυτούς τους παράγοντες. Πάντως, είναι απόλυτα βέβαιο ότι η πρωτεϊνική περιοχή που ευθύνεται για τη μεταγραφική ενεργοποίηση των τάξης II γονιδίων ιστοσυμβατότητας ανήκει στο C/ITA (C/ITA A.D. Activation Domain) [70, 87].

Με βάση το δεδομένο αυτό, αξιολογείται το εύρημα της αλληλεπίδρασης του C/ITA με το CBP, ένα μόριο με ικανότητα ακετυλ-τρανσφεράσης [36, 37]. Η στρατολόγηση ενός τέτοιου μορίου, δεν είναι απίθανο να υποθέσει κανείς, ότι έχει ενεργό ρόλο στη διαδικασία κατά την οποία η «σιωπηλή» χρωματινική δομή των υποκινητών μετατρέπεται σε μία ενεργή μεταγραφικά μορφή. Αυτή είναι πιθανά και η λειτουργία που επιτελεί η C/ITA A.D.: Να έλκει τα μόρια-αρμοστές. Δεν είναι όμως απίθανο τελικά το C/ITA να αποτελεί ένα πυρήνα πάνω στον οποίο δημιουργούνται υπέρ-συμπλέγματα στα οποία λαμβάνουν μέρος περισσότερες από μία πρωτεΐνες με δράση ακετυλ-τρανσφεράσης. Υπάρχουν βιβλιογραφικές μαρτυρίες που υποστηρίζουν τη συμμετοχή του TAF_{II}250 στη μεταγραφική ενεργοποίηση από C/ITA [159]. Αυτή η πρωτεΐνη έχει επίσης δράση ακετυλ-τρανσφεράσης. Λεπτομερέστερες πειραματικές προσεγγίσεις είναι απαραίτητες για να διαπιστωθεί, σε ποια από όλες οφείλεται η κρίσιμη ενζυμική διαδικασία για τη μεταγραφική έναρξη.

Σημαντικό ρόλο στην έναρξη της μεταγραφής, είναι πιθανό ότι διαδραματίζουν και οι αναφερόμενες αλληλεπιδράσεις του C/ITA με συστατικούς παράγοντες της βασικής μεταγραφικής μηχανής. Συγκεκριμένα έχουν αναφερθεί αλληλεπιδράσεις με τους TAF_{II}32 και TFIIB [88, 159]. Η τοποθέτηση όλων αυτών των μορίων σε ένα κοινό μηχανιστικό μοντέλο απαιτεί πειραματικές διαδικασίες που θα επιχειρήσουν να αποδώσουν ένα λειτουργικό ρόλο σε αυτές τις παρατηρούμενες αλληλεπιδράσεις.

Η σύμπτωση των θέσεων αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών CBP και E1A, όπως χαρτογραφούνται πάνω στο μόριο C/ITA, είναι ένα γεγονός που αποκλείει την

ταυτόχρονη πρόσδεση των δύο πρωτεϊνών στο μόριο αυτό, παρόλο που κάτι τέτοιο δεν έχει αποδειχτεί άμεσα. Η υπόθεση ότι το E1A εμποδίζει κατά την παρουσία του τη στρατολόγηση των CBP/p300, στηρίζεται από την παρατήρηση ότι η παραχώρηση της περιοχής που ενεργοποιεί μεταγραφή της πρωτεΐνης VP16, η οποία αποδεδειγμένα δεν επιστρατεύει τους συνενεργοποιητές CBP/p300 [160], καθιστά το CITA άνοσο στην κατασταλτική επίδραση του E1A. Αν το αδενοϊκό μόριο εμποδίζει την πρόσβαση του CITA στους υποκινητές διακόπτοντας κάποια άλλη αλληλεπίδραση θα περίμενε κανείς να καταστέλλει το μεταγραφικό δυναμικό του μορίου VP16-Δ102 πράγμα που δεν συμβαίνει.



Εικόνα 15: Σχηματική αναπαράσταση της επίδρασης του E1A στην επαγόμενη από την ιντερφερόνη γ μεταγραφή των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξης II.

Η παρατήρηση ότι η παραχώρηση της VP-16 AD στο ελλειμματικό μόριο Δ102 δεν το καθιστά «άριστο» ως προς την ενεργοποίηση της μεταγραφής της εξαρτώμενης από τους τάξης II υποκινητές, χρήζει (βλ εικόνα 12) επίσης σχολιασμού. Οι λόγοι για τους οποίους συμβαίνει το παρατηρούμενο φαινόμενο παραμένουν αδιευκρίνιστοι. Παρόλα αυτά όμως μία αποδεκτή πιθανότητα είναι η εξής: Η παρουσία ακριβώς της VP-16 AD αν και θετική ως προς τη μεταγραφική ενεργοποίηση, δε φτάνει στα επίπεδα της φυσιολογικής ενεργοποίησης που παρατηρούμε εξαιτίας της AD του CITA. Αυτό είναι απόρροια των γεγονότων συνέργειας που αποδίδονται στην περιοχή αυτή.

Ένα άλλο ενδεχόμενο που πρέπει να αναφερθεί εδώ είναι ότι το CITA μπορεί να αποτελεί υπόστρωμα για κάποια από τις πρωτεΐνες με δράση ακετυλ-τρανσφεράσης (βλ «Συζήτηση» τρίτου μέρους). Το E1A διακόπτοντας την

αλληλεπίδραση μεταξύ των CITA και CBP είναι δυνατό να αποτρέπει μια ακετυλίωση με θετικό ρυθμιστικό ρόλο. Όλα τα παραπάνω παρουσιάζονται σχηματικά στην εικόνα 15.

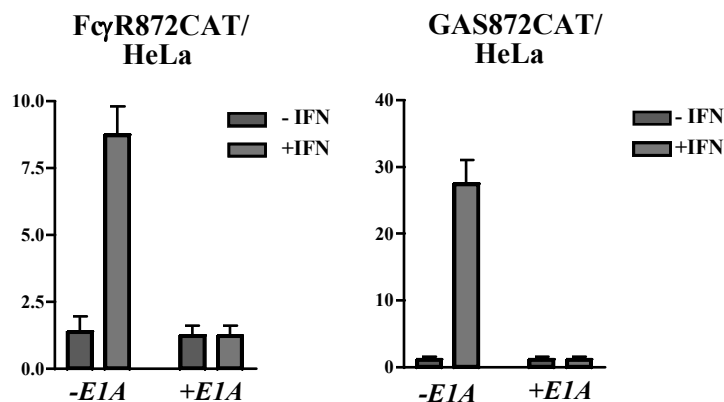
3.2 Μελέτη του μηχανισμού με τον οποίο καταστέλλεται η επαγωγή του πρώιμου μονοπατιού σηματοδότησης της ιντερφερόνης-γ, από την ύπαρξη των πρωτεϊνών E1A.

Η επαγωγή των αντιγόνων τάξης II από την ιντερφερόνη γ είναι ένα όψιμο χρονικά γεγονός, (μηνύματα και επιφανειακά τάξης II αντιγόνα εμφανίζονται στις 8 και 10 ώρες αντίστοιχα), αλλά κυρίως διότι η επαγωγή αυτή απαιτεί πρωτεϊνική σύνθεση. Πρόσφατα επιτεύχθηκε η σύνδεση του μονοπατιού πρώιμης σηματοδότησης από την ιντερφερόνη-γ (που περιλαμβάνει τη δραστηριοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα STAT1α κατά τα ήδη αναφερθέντα) με την επαγωγή των αντιγόνων τάξης II [71, 72, 79, 80, 86]. Ο μεταγραφικός παράγοντας STAT1α κινητοποιείται και επάγει μεταγραφικά το CΠΤΑ, το οποίο με τη σειρά του επάγει μεταγραφικά τα αντιγόνα Τάξης II [86]. Η ύπαρξη του E1A είναι δυνατό να παρεμβαίνει σε αυτά τα πολύ πρώιμα στάδια σηματοδότησης από την ιντερφερόνη-γ, και η επαγωγή των τάξης II να σταματά σε ένα προγενέστερο στάδιο από εκείνο της «αναμέτρησης» του E1A με το μεταγραφικό δυναμικό του παράγοντα CΠΤΑ.

Με σκοπό να διερευνηθεί η συμπεριφορά του E1A έναντι στο πρώιμο μονοπάτι σηματοδότησης από την ιντερφερόνη-γ, έγιναν πειράματα παροδικής διαμόλυνσης με κατάλληλες πλασμιδιακές κατασκευές, που «αποκρίνονται» μόνο στην κινητοποίηση του παράγοντα STAT1α, σε κύτταρα HeLa παρουσία ή απουσία κατασκευής έκφρασης του E1A. Οι πλασμιδιακές κατασκευές αναφοράς διαθέτουν το γονίδιο CAT υπό την επήρεια του ελάχιστου υποκινητή του γονιδίου της ιντερφερόνης-β (στοιχείο TATA) πριν από το οποίο έχουν εντεθεί εις διπλούν

α) το στοιχείο GAS (Gamma Activated Sequence) του γονιδίου GBP ή

β) το στοιχείο FcγR από τον υποκινητή του γονιδίου του υποδοχέα του σταθερού τμήματος των αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών [161]. Και τα δύο στοιχεία δεσμεύουν ισχυρά τον παράγοντα STAT1α, όπως φαίνεται από πειράματα EMSAs.



Εικόνα 16: Επίδραση του αδενοϊκού E1A στην επαγωγή κατασκευών αναφοράς που αποκρίνονται στην ενεργοποίηση του STAT1α από την ιντερφερόνη-γ. Όπως και στη περίπτωση των υποκινητών των γονιδίων τάξης II τα βασικά επίπεδα έκφρασης δεν επηρεάζονται.

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 16, η παρουσία του E1A, καταστέλλει σε σχεδόν βασικά επίπεδα την επαγωγική επίδραση της ιντερφερόνης- γ στις δύο αυτές κατασκευές αναφοράς. Τα βασικά επίπεδα παραμένουν ανεπηρέαστα, πράγμα που όπως και στη περίπτωση των υποκινητών των τάξης II σημαίνει ότι ο φαινότυπος που παρατηρούμε δεν οφείλεται σε «μοριακή τιτλοδότηση» κάποιου περιοριστικού παράγοντα της βασικής μεταγραφικής μηχανής. Οι δύο κατασκευές αποκρίνονται επαγωγικά, όπως αναφέρθηκε, μόνο στη ύπαρξη ενεργοποιημένου STAT1 α . Είναι φανερό από το φαινόμενο καταστολής που παρατηρούμε ότι ο παράγοντας STAT1 α αποτελεί στόχο της κατασταλτικής επίδρασης του E1A.

3.2α Μελέτη της επίδρασης του παράγοντα E1A στη δημιουργία συμπλεγμάτων στα οποία συμμετέχει ο STAT1 α .

Εικόνα17: Συγκριτική παράθεση EMSAs, με σημασμένα ολιγονουκλεοτίδια GAS, επωασμένα με κυτταρικά εκχυλίσματα από κύτταρα HeLa (δείγματα 1,2,5,6) και 293 (δείγματα 3,4,7,8). Ο παράγοντας STAT1 α κινητοποιείται κανονικά και εισάγεται στον πυρήνα και στις δύο κυτταρικές σειρές (δείγματα 6 και 8).

Όπως έχει αναφερθεί αλλού για την περίπτωση του κινητοποιούμενου από την ιντερφερόνη- α , ISGF3, η παρουσία του E1A σε σταθερούς κυτταρικούς κλώνους μειώνει αισθητά, χωρίς να καταργεί εντελώς την δέσμευση του μεταγραφικού αυτού παράγοντα στις αλληλουχίες στόχους [144]. Για να διερευνηθεί το ενδεχόμενο το E1A να εμποδίζει:

- α) τη φωσφορυλίωση
- β) την είσοδο στο πυρήνα, και
- γ) να αποτρέπει τη δέσμευση του παράγοντα STAT1 α στις αλληλουχίες στόχους του, έγιναν πειράματα EMSAs, με τη χρήση σημασμένων ολιγονουκλεοτιδίων GAS [162]. Χρησιμοποιήθηκαν ολικά και πυρηνικά εκχυλίσματα από τις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές HeLa και 293.

Εικόνα 18: Πείραμα EMSA με την χρήση ολιγονουκλεοτιδίου GAS (A), και ανάλυση κατά Western (B) με πολυκλωνικό αντιγόνο α -STAT1 α , πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από την κυτταρική σειρά 293. Η κινητικότητα του πολυπεπτιδίου που αντιστοιχεί στο STAT1 α , έχει μειωθεί, στο δείγμα που έχει υλοστεί επώαση με ιντερφερόνη γ , γεγονός ενδεικτικό μετα-μεταφραστικών φωσφορυλιώσεων.

Στη πρώτη (HeLa) ο παράγοντας STAT1α κινητοποιείται κανονικά. Η δεύτερη (293) έχει δημιουργηθεί με αθανатоποίηση, μετά από την ένθεση περιοχής του αδενοϊκού γονιδιώματος που περιλαμβάνει τα γονίδια E1A και E1B. Η κυτταρική αυτή σειρά εκφράζει τα πολυπεπτίδια 243 και 289R του E1A, σταθερά. Όπως φαίνεται στην εικόνα 17 και στις δύο κυτταρικές σειρές ο παράγοντας STAT1α, κινητοποιείται κανονικά και εισάγεται στον πυρήνα, ενώ δεσμεύεται και στις αλληλουχίες στόχους του (εικόνα 17, δείγματα με άρτια αρίθμηση).

Το γεγονός ότι πρόκειται για τον παράγοντα STAT1α στα επαγόμενα συμπλέγματα που παρατηρούμε αποδεικνύεται με τη χρήση πολυκλωνικού αντιορού α-STAT1α (SC#36), στις αντιδράσεις EMSAs. Η ένταση της ζώνης που αντιστοιχεί στα επαγόμενα συμπλέγματα μειώνεται εξαιτίας της παρουσίας του αντισώματος (τα δεδομένα αυτά δεν παρουσιάζονται). Η φωσφορυλίωσή του επίσης δεν επηρεάζεται αφού χωρίς αυτή τη μετα-μεταφραστική τροποποίηση ο παράγοντας δεν δεσμεύεται στις αλληλουχίες στόχους του [163]. Όπως άλλωστε φαίνεται και στην ανάλυση Western της εικόνας 18 B, η κινητικότητα του πολυπεπτιδίου που αντιπροσωπεύει τον STAT1α, μειώνεται μετά από την επίδραση με ιντερφερόνη-γ, γεγονός ενδεικτικό μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων όπως είναι η φωσφορυλίωση. Από τα παραπάνω δεδομένα είναι φανερό ότι η ύπαρξη της E1A στην κυτταρική σειρά 293 δεν επηρεάζει την κινητοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα STAT1α, με οποιονδήποτε τρόπο. Είναι όμως ανοιχτό το ενδεχόμενο το E1A να επηρεάζει το μεταγραφικό δυναμικό του μορίου αυτού.

3.2β Μελέτη της επίδρασης του παράγοντα E1A στην επαγωγή μηνύματος CIITA από την ιντερφερόνη-γ στην κυτταρική σειρά 293.

Η επαγωγή του μηνύματος του CIITA, όπως έχει αναφερθεί, εξαρτάται κατά κύριο λόγο από την ενεργοποίηση του παράγοντα STAT1α, αφού για την επαγωγή αυτή δεν είναι απαραίτητη πρωτεϊνική σύνθεση [72], ενώ η ύπαρξη, του επίσης κινητοποιούμενου από την ιντερφερόνη-γ μεταγραφικού παράγοντα IRF1, δεν είναι απολύτως απαραίτητη [72, 164]. Όπως αναφέρθηκε στη προηγούμενη ενότητα, το μονοπάτι σηματοδότησης από την ιντερφερόνη-γ που οδηγεί στη κινητοποίηση του STAT1α, είναι ακέραιο στα κύτταρα 293. Για να διαπιστωθεί αν επάγεται μήνυμα CIITA στα κύτταρα αυτά, απομονώθηκε ολικό RNA, από κύτταρα 293 που έχουν υποστεί ή όχι, επώαση με ιντερφερόνη-γ για 24 ώρες. Η ύπαρξη του μηνύματος CIITA ελέγχθηκε με πειράματα ανάλυσης Northern, και αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε μήτρες μεταγραμμένου ολικού RNA (Reverse Transcription PCR, RT PCR). Η ανάλυση Northern αποκαλύπτει τρία διαφορετικά mRNAs, στο δείγμα του θετικού μάρτυρα που στη περίπτωση αυτή είναι ολικό RNA από κύτταρα Raji [87], ενώ κανένα από τα μηνύματα αυτά δεν ανιχνεύεται στο δείγμα ολικού RNA από κύτταρα 293, επωασμένα με ιντερφερόνη-γ (τα στοιχεία αυτά δεν παρουσιάζονται). Επιστρατεύτηκε επίσης, η τεχνική RT PCR εξαιτίας της μεγαλύτερης ευαισθησίας της στην ανίχνευση σπάνιων μηνυμάτων. Όπως φαίνεται στην εικόνα 19 με το συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε, η χαρακτηριστική ζώνη του CIITA, μεγέθους 450bp, εμφανίζεται μόνο στο δείγμα του θετικού μάρτυρα (Raji RNA δείγμα 9) και όχι στο δείγμα RNA από τα κύτταρα 293 (+IFN γ)(δείγμα 7). Η ακεραιότητα των RNAs και στα τρία δείγματα ελέγχεται με τη χρήση ζεύγους εκκινητών ειδικών για το γονίδιο της GAPDH, η ύπαρξη του οποίου είναι συστατική σε όλες τις κυτταρικές σειρές (δείγματα 4-6). Από την παραπάνω πειραματική

προσέγγιση φαίνεται ότι παρά την ακεραιότητα του μονοπατιού σηματοδότησης από την ιντερφερόνη γ στα κύτταρα 293, δεν παράγεται μήνυμα RNA του CHTA.

Εικόνα 19: Συνδυασμός αντίστροφης μεταγραφής ολικού RNA και αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης από κύτταρα Raji και 293. Στις αντιδράσεις που περιλαμβάνονται ειδικοί εκκινητές για το γονίδιο CHTA ανιχνεύεται προϊόν μόνο στο εκχύλισμα από κύτταρα Raji. Ως θετικοί μάρτυρες για την ακεραιότητα όλων των δειγμάτων χρησιμοποιούνται εκκινητές για το γονίδιο GAPDH. Το ειδικό προϊόν που παράγεται από αυτούς ανιχνεύεται σε όλα τα δείγματα.

Για να διαπιστωθεί η ακεραιότητα του γονιδίου του CHTA στην κυτταρική σειρά 293, με ανάλυση κατά Southern, συγκρίθηκε το περιοριστικό πρότυπο της γενωμικής οργάνωσης του γονιδίου του CHTA από κύτταρα HeLa (που όπως είναι γνωστό επάγουν τόσο τάξης II αντιγόνα ιστοσυμβατότητας, αλλά και CHTA) με αυτό των κυττάρων 293. Αυτή η πειραματική προσέγγιση επιλέχθηκε για να διαπιστωθεί κάποιο δευτερογενές συμβάν καταστροφής του γονιδίου CHTA, αφού για την κυτταρική σειρά 293, (πρόκειται για αθανатоποιημένα πρωτογενή ανθρώπινα κύτταρα) δεν υπάρχει ιστορικό οποιασδήποτε ανοσοανεπάρκειας. Το πρότυπο της γενωμικής οργάνωσης του CHTA, όπως αποκαλύπτεται με τη χρήση μοριακού ανιχνευτή που αντιστοιχεί στο cDNA του γονιδίου, είναι το ίδιο και για τις δύο κυτταρικές σειρές (τα δεδομένα αυτά δεν παρουσιάζονται). Δεν υπάρχει δηλαδή ένδειξη κάποιου ελλείμματος ή ένθεσης στην κωδική περιοχή του γονιδίου.

3.2γ Μελέτη των πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων που σχετίζονται με την επαγωγή του μηνύματος CHTA στην κυτταρική σειρά 293.

Όπως έχει δειχθεί αλλού, η επαγωγή του μηνύματος του CHTA από την ιντερφερόνη- γ , σχετίζεται με την *in vitro* ανίχνευση ενός πρωτεϊνικού συμπλέγματος σε συγκεκριμένη αλληλουχία του υποκινητή του CHTA [86]. Στο σύμπλεγμα αυτό συμμετέχει εκτός του STAT1 α , ο μεταγραφικός παράγοντας USF $_1$, ο οποίος δεν δείχνει κάποια ιστοειδικότητα. Η συνεργατική αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών πάνω στον υποκινητή του CHTA θεωρείται ότι είναι ένα από τα πρώτα και

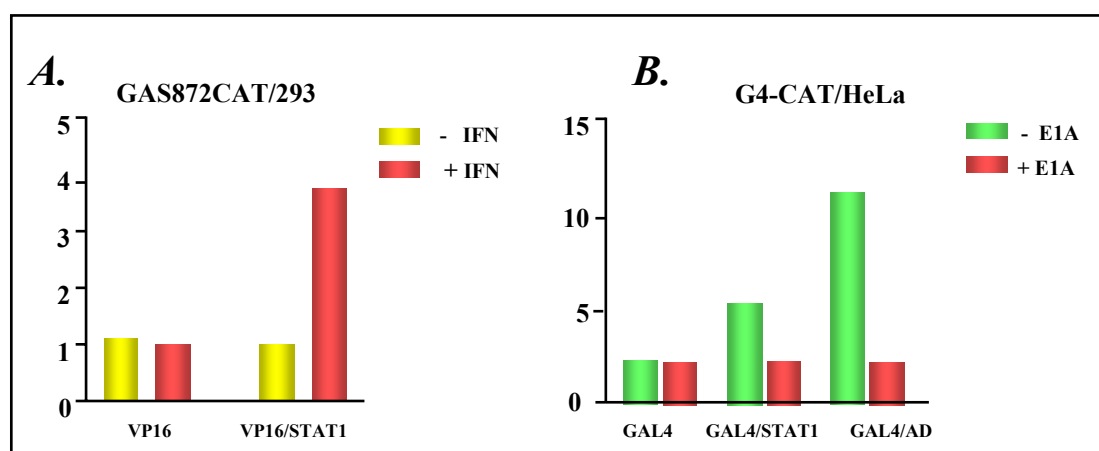
ουσιαστικά γεγονότα στη μεταγραφή του γονιδίου. Με σκοπό να δούμε εάν το E1A παρεμβαίνει ή διακόπτει αυτή τη συνεργατική αλληλεπίδραση πάνω στο συγκεκριμένο στοιχείο του υποκινητή του C17A, έγιναν πειράματα EMSAs με πυρηνικά εκχυλίσματα από κύτταρα 293, και ανιχνευτικό μόριο το ολιγονουκλεοτίδιο NGE του υποκινητή PIV του C17A [86]. Σαν θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν πυρηνικά εκχυλίσματα από την κυτταρική σειρά HeLa.

Εικόνα 20: Πείραμα EMSA, με σημασμένα ολιγονουκλεοτίδια NGE, επωασμένα με κυτταρικά εκχυλίσματα από κύτταρα HeLa και 293. Και στις δύο κυτταρικές σειρές παρατηρείται το υπερ-σύμπλεγμα που έχει αναφερθεί ότι οφείλεται στη συνεργατική αλληλεπίδραση του «απανταχού» μεταγραφικού παράγοντα USF₁ και του STAT1α.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 20, μετά από επαγωγή με ιντερφερόνη- γ (δείγματα 2 και 4), τα συμπλέγματα πρωτεϊνών/ DNA που σχηματίζονται και στις δύο κυτταρικές σειρές δεν διαφέρουν μεταξύ τους. Επιπλέον το σύμπλεγμα με τη μικρότερη κινητικότητα, που αντιστοιχεί σε αυτό που προκύπτει από τη συνεργατική αλληλεπίδραση των STAT1 και USF1, σύμφωνα με το ήδη γνωστό πρότυπο, δημιουργείται και στις δύο κυτταρικές σειρές. Στην εικόνα 20 φαίνονται άλλωστε οι χαρακτηριστικές ζώνες που αντιστοιχούν στη συνεργατική αλληλεπίδραση των παραγόντων USF₁ και STAT1 α , είναι και ποσοτικά συγκρίσιμες στις δύο κυτταρικές σειρές. Έτσι, παρά το γεγονός ότι μήνυμα CIPTA δεν ανιχνεύεται μετά από σηματοδότηση με ιντερφερόνη- γ , στην κυτταρική σειρά 293, το σύμπλεγμα το οποίο ευθύνεται [86] για την επαγωγή του, δημιουργείται *in vitro* σε πυρηνικά εκχυλίσματα της κυτταρικής σειράς 293. Τελικά, η παρουσία του E1A δεν έχει καμία επίδραση ούτε και στη διαδικασία συνεργατικής δέσμευσης των δύο παραγόντων πάνω στο ολιγονουκλεοτίδιο στόχο.

3.2δ Ο παράγοντας E1A έχει σαν στόχο την περιοχή που ενεργοποιεί μεταγραφή του STAT1 α .

Από τα αποτελέσματα που παρατέθηκαν μέχρι τώρα είναι φανερό ότι η παρουσία του E1A δεν αποτρέπει τη δημιουργία συμπλεγμάτων πάνω σε στοιχεία του DNA. Έτσι η περιοχή αλληλεπίδρασης του STAT1 α με το DNA δεν φαίνεται να αποτελεί στόχο για το E1A.



Εικόνα 21: **A.** Σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης η επαγωγιμότητα των κατασκευών αναφοράς που αποκρίνονται στο πρώιμο μονοπάτι της ιντερφερόνης γ επανέρχεται στα κύτταρα 293, παρουσία της κατασκευής έκφρασης του χιμαιρικού μορίου VP16-STAT1 α μετά από επίδραση με ιντερφερόνη γ . **B.** Η επαγωγή της μεταγραφής από την κατασκευή αναφοράς G4-CAT σε κύτταρα HeLa, που προκαλείται από την παρουσία των χιμαιρικών κατασκευών GAL4-STAT1 και GAL4-AD, καταστέλλεται από την παρουσία της ογκοπρωτεΐνης E1A.

Υπάρχει όμως ανοικτό το ενδεχόμενο, ο στόχος του E1A να είναι η περιοχή του μορίου που είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση της μεταγραφής. Η περιοχή αυτή τοποθετείται στο καρβοξυτελικό άκρο του μορίου κατά μήκος των 34 τελευταίων αμινοξέων της πρωτεΐνης. Η περιοχή αυτή υπάρχει μόνο στη μορφή STAT1 α , ενώ λείπει από τη STAT1 β , λόγω «εναλλακτικής σύνδεσης» (alternative splicing) στο

επίπεδο μηνυμάτων. Για να ερευνηθεί το ενδεχόμενο αυτό, δημιουργήθηκε ένα χμιαρικό μόριο που συνδυάζει σε ένα κοινό ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης τα πολυπεπίδια του STAT1 και την περιοχή την υπεύθυνη για την ενεργοποίηση της μεταγραφής της ικής πρωτεΐνης VP16 (STAT1-VP16). Όπως φαίνεται και στην εικόνα 21 Α, η πλασμιδιακή κατασκευή GAS-CAT δεν παρουσιάζει καμία επαγωγιμότητα σε παροδική διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς 293, ενώ σε συνδιαμόλυνσή της μαζί με την κατασκευή (STAT1-VP16), και επίδραση με ιντερφερόνη- γ , παρουσιάζει επίπεδα CAT αυξημένα 2-3 φορές σε σχέση με τα επίπεδα μεταγραφής χωρίς ιντερφερόνη γ .

Το γεγονός ότι η E1A έχει στόχο τη δράση της περιοχής που ενεργοποιεί τη μεταγραφή του παράγοντα STAT1 α , αποδεικνύεται και με μία δεύτερη πειραματική στρατηγική: Τη δημιουργία χμιαρικών μορίων από την τοποθέτηση σε κοινό πλαίσιο ανάγνωσης α) της περιοχής που αλληλεπιδρά με το DNA του μεταγραφικού παράγοντα του σακχαρομύκητα GAL4 και β) ολόκληρη την κωδική περιοχή του γονιδίου STAT1 α (GAL4-STAT1 α), ή μόνο την περιοχή που ενεργοποιεί μεταγραφή του ίδιου μορίου (GAL4-Activation Domain). Όπως φαίνεται στην εικόνα 21 Β, σε κατασκευή αναφοράς που φέρει τέσσερις θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα GAL4 (G4-CAT) σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης σε κύτταρα HeLa, η επίδραση των δύο χμιαρικών μορίων είναι σαφώς επαγωγική. Η παρουσία της κατασκευής GAL4-Activation Domain έχει καλύτερο επαγωγικό αποτέλεσμα από ότι η παρουσία της GAL4-STAT1 α . Και στις δύο περιπτώσεις όμως η συνδιαμόλυνση με κατακευές έκφρασης του E1A έχουν ως αποτέλεσμα την κατάργηση του οποιουδήποτε επαγωγικού αποτελέσματος. Αυτό το πείραμα δίνει μία άμεση απόδειξη του γεγονότος ότι ο φαινότυπος που παρατηρούμε οφείλεται στην καταργήση από το E1A της λειτουργίας της περιοχής που ενεργοποιεί τη μεταγραφή του STAT1 α , σε ένα καθαρά τεχνητό σύστημα όπου έχει απομονωθεί και ανιχνεύεται η δράση αυτής ακριβώς της συγκεκριμένης περιοχής.

Αφού λοιπόν αποκλείσαμε τα ενδεχόμενα μη λειτουργικού μονοπατιού σηματοδότησης από την ιντερφερόνη γ , την παρεμβολή του E1A σε κάποιο από τα πρώιμα στάδια της ενεργοποίησης του STAT1 α , έως της αλληλεπίδρασής του με τις αλληλουχίες DNA, διαπιστώνεται ότι (όπως και στην περίπτωση της CIP1A) ο στόχος του E1A είναι η περιοχή του μορίου που ενεργοποιεί τη μεταγραφή. Αυτό σημαίνει ότι το E1A είναι δυνατό να παρεμβαίνει σε ένα πολύ πρώιμο στάδιο σηματοδότησης εξαρτώμενης από ιντερφερόνη γ , εμποδίζοντας ειδικά το STAT1 α , να επάγει μεταγραφή.

3.2ε ΣΥΖΗΤΗΣΗ.

Το πρώιμο μονοπάτι επαγωγής της ιντερφερόνης- γ αποτελεί στόχο πολλών ιών εξαιτίας του λεγόμενου αντικου σταδίου. Κατά την διάρκεια επαγωγής αυτής της διαδικασίας η αντιγραφή πολλών ιών αναστέλλεται. Οι αδενοϊοί δεν ανήκουν στη κατηγορία αυτή καθώς δεν υφίστανται τις συνέπειες της επαγωγής του αντιϊκού σταδίου. Είναι μάλιστα ικανοί, να «προστατέψουν» άλλα είδη ιών από τις συνέπειες της δράσης των ιντερφερονών, σε καταστάσεις επιμόλυνσης [144, 165]. Το αντιϊκό στάδιο έχει μεγάλη διάρκεια (έως και δύο ημέρες) και περιλαμβάνει την μεταγραφική ενεργοποίηση αρκετών γονιδίων, η λειτουργία των οποίων μέχρι σήμερα παραμένει άγνωστη. Υπεύθυνα για την αποφυγή των συνεπειών του αντικου σταδίου, σε ότι αφορά στους αδενοϊούς, είναι αποκλειστικά τα προϊόντα της περιοχής E1A [141, 144].

Η μελέτη του βιοχημικού μονοπατιού που ακολουθεί την αλληλεπίδραση των ιντερφερονών με τον υποδοχέα τους, έχει αποκαλύψει σημαντικές πτυχές του τρόπου δράσης των μορίων αυτών. Παράλληλα, οι κόμβοι του μονοπατιού στους οποίους θα μπορούσε να παρεμβαίνει το E1A, εμποδίζοντας τη συνέχειά του, είναι εξίσου πολλοί. Υπάρχουν όμως και ορισμένες παράμετροι που αν ληφθούν υπ' όψιν, περιορίζουν σημαντικά τις υποθέσεις που μπορούν να γίνουν. Μία τέτοια παράμετρος είναι η πυρηνική τοποθέτηση του E1A. Και οι δύο μορφές της πρωτεΐνης E1A έχουν πυρηνική τοποθέτηση, χάρη στην ύπαρξη ενός πεπτιδικού σήματος εισόδου στον κυτταρικό πυρήνα (NLS= Nuclear Localization Signal), το οποίο και βρίσκεται στο καρβοξυτελικό τους άκρο [166]. Από την άλλη μεριά, πολλά στάδια του βιοχημικού μονοπατιού των ιντερφερονών λαμβάνουν χώρα στο κυτταρόπλασμα, όπως η ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων STAT1α και ISGF3, μέσω φωσφορυλιώσεων. Είναι λοιπόν δύσκολο να φανταστεί κανείς, πως είναι δυνατό, μία πρωτεΐνη με πυρηνική τοποθέτηση να επεμβαίνει σε κυτταροπλασματικά γεγονότα. Είναι όμως πιθανό το ενδεχόμενο, το E1A, να είναι σε θέση, να εμποδίσει τη μετάβαση του ενεργού μεταγραφικού συμπλέγματος STAT1α από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, επάγοντας την έκφραση κάποιας υποθετικής πρωτεΐνης που να αποτρέπει αυτή τη διαδικασία. Τα πειράματα που παρουσιάστηκαν εδώ, απορρίπτουν αυτή την πιθανότητα.

Υπάρχουν βιβλιογραφικές μαρτυρίες που αναφέρουν ότι κυτταρικοί κλώνοι που εκφράζουν E1A μετά από επαγωγή με επίδραση μετάλλων (το E1A βρίσκεται υπό την επίδραση του υποκινητή της μεταλλοθειονίνης), δεν επιδεικνύουν σε πειράματα EMSAs τη δημιουργία των συμπλεγμάτων ISGF3 και STAT1α, πάνω στα κατάλληλα ολιγονουκλεοτίδια- στόχους, μετά από επίδραση με ιντερφερόνες [144, 145]. Τα αποτελέσματα αυτά, αντανακλούν μειωμένα επίπεδα των πολυπεπτιδίων που συμμετέχουν στα συμπλέγματα αυτά, όπως άλλωστε έχει αποδειχτεί στη μία από τις δύο περιπτώσεις [145]. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην ενότητα αυτή, αποδεικνύουν ότι η ενεργοποίηση, η είσοδος στον κυτταρικό πυρήνα και η αλληλεπίδραση με τις αλληλουχίες στόχους του παράγοντα STAT1α δεν επηρεάζονται από την παρουσία του E1A. Αυτό το συμπέρασμα δεν έρχεται κατ' ανάγκη σε αντίθεση με τις υπάρχουσες βιβλιογραφικές πληροφορίες. Στις ανωτέρω περιπτώσεις, το E1A επάγεται στην κυτταρική σειρά, μετά από επίδραση CdCl₂, αφού βρίσκεται υπό την επήρεια του υποκινητή της μεταλλοθειονίνης. Τα συστήματα μελέτης είναι δηλαδή διαφορετικά στις δύο περιπτώσεις, ενώ δεν είναι απίθανο η επίδραση μετάλλων στο κύτταρο να επηρεάζει τα παρατηρούμενα αποτελέσματα.

Κατά δεύτερο λόγο η επίδραση της ύπαρξης του E1A στην κινητική των επαγόμενων συμπλεγμάτων εξετάζεται μετά από 22 ώρες, χρονικό διάστημα απαραίτητο για τη συσσώρευση της πρωτεΐνης E1A. Κατά τρίτο λόγο η κυτταρική σειρά στην οποία εντέθηκε το E1A είναι η HeLa, για την οποία είναι γνωστό ότι εκφράζονται τα γονίδια E6 και E7 του ιού του θηλώματος (papilloma virus). Τα γονίδια αυτά μοιράζονται αρκετές από τις ιδιότητες του E1A, και η ύπαρξή τους θα μπορούσε να έχει κάποια συμμετοχή στους φαινοτύπους που παρατηρούνται.

Η κυτταρική σειρά 293 έχει αθανатоποιηθεί με την πρώιμη περιοχή του γενώματος των αδενοϊών, και εκφράζει συστατικά, χωρίς την ανάγκη επαγωγής, τα γονίδια E1A και E1B, τα οποία και δεν μοιράζονται κοινές λειτουργικές ικανότητες. Έτσι οι διαπιστώσεις που μπορούν να γίνουν από τις πειραματικές προσεγγίσεις σε αυτή την κυτταρική σειρά, προσομοιάζουν περισσότερο τις καταστάσεις μόλυνσης με τον αδενοϊό 5. Το μειονέκτημα χρήσης της κυτταρικής αυτής σειράς, έχει σχέση με το γεγονός ότι προέρχεται από πρωτογενή ανθρώπινα κύτταρα, αθανатоποιημένα *in vitro*, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει μία «πατρική» κυτταρική σειρά που θα επέτρεπε ποσοτικούς συσχετισμούς. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιείται η κυτταρική σειρά HeLa. Ένα άλλο πλεονέκτημα της χρήσης της κυτταρικής σειράς 293 είναι ότι η έκφραση του E1A δεν είναι μεταβατική, αλλά συστατική, έχει φτάσει δηλαδή σε μία κατάσταση ισορροπίας συμβατή με τη βιωσιμότητα του κυττάρου (θα πρέπει εδώ να αναφερθεί μία δεδομένη τοξικότητα της πρωτεΐνης 289R άσχετης με γεγονότα επαγωγής απόπτωσης [114]). Πρόκειται για μία ιδιότητα του E1A, η οποία δεν μας επέτρεψε τη δημιουργία και χρήση κυτταρικών κλώνων που να εκφράζουν συστατικά το E1A. Η δημιουργία σταθερών κυτταρικών κλώνων επιχειρήθηκε με σκοπό να χρησιμοποιηθεί στις πειραματικές προσεγγίσεις που περιγράφονται σε αυτή την ενότητα.). Στα πειράματα παροδικής συν-διαμόλυνσης κατασκευών έκφρασης E1A και κατασκευών αναφοράς CAT που αποκρίνονται στον STAT1α, δεν είναι δυνατό να ερευνηθεί το κατά πόσο η παρουσία του E1A επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης του παράγοντα αυτού, εξαιτίας του μικρού ποσοστού των κυττάρων που ουσιαστικά διαμολύνονται. Το πλεονέκτημα χρήσης της κυτταρικής σειράς 293 είναι ότι τα φαινόμενα της μη-επαγωγιμότητας των κατασκευών αναφοράς μπορούν να συσχετισθούν με την επίδραση της παρουσίας του E1A πάνω στην πρωτεϊνική οντότητα του STAT1α.

Για τους λόγους αυτούς, η κυτταρική σειρά 293, αποτελεί ένα ικανοποιητικό κυτταρικό σύστημα για να μελετηθεί η επίδραση της παρουσίας των πρωτεϊνών E1A πάνω στο STAT1α. Επίσης θα πρέπει να σημειωθεί ότι όπως φαίνεται τα κύτταρα 293, έχουν ακέραιο το μηχανισμό σηματοδότησης της ιντερφερόνης γ , πράγμα που μεταφράζεται στην ύπαρξη ενός λειτουργικού υποδοχέα και στην ύπαρξη του μηχανισμού ενεργοποίησης μέσω φωσφορυλίωσης του STAT1α. Το E1A δεν φαίνεται να εμπλέκεται στις διαδικασίες αυτές. Ο στόχος του E1A είναι, αυτή καθεαυτή, η λειτουργία του STAT1α ως μεταγραφικού παράγοντα και όχι η κινητοποίησή του. Από τις λειτουργικές περιοχές της πρωτεΐνης ξεχωρίζουν δύο:

α) Η περιοχή που είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με το DNA

β) Η περιοχή που είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση της μεταγραφής.

Όπως αποδεικνύεται με τα πειράματα που παρατέθηκαν η αλληλεπίδραση του STAT1α με τις αλληλουχίες GAS δεν επηρεάζεται από το E1A. Το αποτέλεσμα αυτό ενισχύεται από την παρατήρησή μας, ότι η εξωγενής προσθήκη καθαρής πρωτεΐνης E1A, ακόμα και σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις, πριν από την αλληλεπίδραση των

κυτταρικών εκχυλισμάτων με τα σημασμένα ολιγονουκλεοτίδια GAS, δεν επηρεάζει την εμφάνιση των συμπλεγμάτων του STAT1α (τα δεδομένα αυτά δεν παρουσιάζονται). Έτσι ο πιθανότερος στόχος του E1A πάνω στο STAT1α είναι η υπεύθυνη περιοχή για την ενεργοποίηση της μεταγραφής. Πραγματικά, η προσθήκη της αντίστοιχης περιοχής του ιϊκού μεταγραφικού ρυθμιστή VP16, που αποδεδειγμένα δεν καταστέλλεται από το E1A, καθιστά ενεργό το μόριο STAT1α μετά από επίδραση με ιντερφερόνη γ στα κύτταρα 293 και τις κατασκευές αναφοράς που απαντούν σε αυτόν επαγωγίμως. Η δημοσίευση του γεγονότος της φυσικής αλληλεπίδρασης του αρμοστή p300 με το STAT1α, ενισχύει την προτεινόμενη υπόθεσή μας [25, 34].

Η προσθήκη της ετερόλογης περιοχής της VP16 στο STAT1α, ενώ είναι ικανή να επαναφέρει την επαγωγιμότητα στις κατασκευές που αποκρίνονται σε αυτό το μόριο, δεν είναι σε θέση να επαναφέρει ενεργοποίηση σε κατασκευές αναφοράς που φέρουν στοιχεία ρυθμιστικού ελέγχου των υποκινητών τάξης II. Μία εξήγηση για το φαινόμενο αυτό μπορεί να είναι το ότι στο επίπεδο του υποκινητή του C/PTA, *in vivo*, η ύπαρξη της περιοχής που ενεργοποιεί τη μεταγραφή της VP16, δεν λειτουργεί τόσο αποτελεσματικά όσο η αντίστοιχη περιοχή του STAT1α, που καταστέλλεται από το E1A. Μία δεύτερη εξήγηση εξίσου πιθανή είναι ότι η επαγόμενη από την ιντερφερόνη γ , μεταγραφή του C/PTA δεν εναπόκειται μόνο στην ύπαρξη λειτουργικού STAT1α, αλλά χρειάζεται τη συνδρομή και άλλων μεταγραφικών παραγόντων επηρεαζόμενων από το E1A, όπως για παράδειγμα ο IRF-1. Μία τρίτη πιθανή εξήγηση είναι ότι η κυτταρική σειρά 293 μειονεκτεί στην μεταγραφική επαγωγή των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξης II, λόγω έλλειψης κάποιου από τους υπόλοιπους μεταγραφικούς παράγοντες που συμβάλλουν σε αυτή. Κάτι τέτοιο όμως δεν θεωρείται πιθανό. Όπως έγινε αντιληπτό η γενωμική οργάνωση του γονιδίου C/PTA δεν παρουσιάζει αποκλίνοντα χαρακτηριστικά από το πρότυπο της κυτταρικής σειράς HeLa, τουλάχιστο ως προς τα εξόνια της κωδικής περιοχής. Βέβαια δεν γνωρίζουμε τίποτα για σημειακές μεταλλάξεις που θα αλλοίωναν ίσως τη διαδικασία της εναλλακτικής σύνδεσης του mRNA. Από την άλλη μεριά όμως δεν αναφέρεται κατάσταση οποιασδήποτε ανοσοανεπάρκειας, στον άνθρωπο από τον οποίο προέρχονται τα 293. Μία τέταρτη εξήγηση για το φαινόμενο που παρατηρούμε είναι ότι το χμιαϊκό μόριο STAT1α-VP16 προωθεί την παραγωγή μηνύματος C/PTA, καθώς και πρωτεΐνης αλλά η ύπαρξη του E1A, κατά τα προαναφερθέντα στην προηγούμενη ενότητα, επιδρά κατασταλτικά στην επαγωγική δράση του μορίου στη μεταγραφή των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξης II.

Επίσης θα πρέπει να αναφερθεί ότι κατά τα φαινόμενα και οι υπόλοιποι μεταγραφικοί παράγοντες φαίνεται να υπάρχουν καθώς η επαγωγιμότητα από τον τάξης II υποκινητή Eα επανέρχεται μετά από υπερέκφραση του γονιδίου του C/PTA-VP16 στα 293. Ο παράγοντας διαθέτει την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής της VP16 (κατά τα αναφερόμενα στη προηγούμενη ενότητα) που δεν υφίσταται καταστολή από το E1A. Η εισαγωγή του στα κύτταρα 293 επάγει μεταγραφικά κατασκευές αναφοράς που φέρουν ρυθμιστικά στοιχεία του υποκινητή Eα (αδημοσίευτες πληροφορίες).

Τα αποτελέσματα αυτής της ενότητας δεν έρχονται σε αντίθεση με αυτά που αναφέρονται στην προηγούμενη. Πρέπει να γίνει κατανοητό ότι πρόκειται για δύο διαφορετικές κυτταρικές σειρές, ανθρώπινες και οι δύο, αλλά από διαφορετικούς ιστούς. Χρειάζονται περισσότερα πειράματα για την συνθεση ενός μοντέλου για το

οποίο, εκτός των άλλων η σχέση του πρώιμου μονοπατιού επαγωγής της ιντερφερόνης γ με την επαγωγή του CITA mRNA να έχει καθοριστεί στις λεπτομέρειές της.

3.3 Βιοχημικός καθαρισμός των πρωτεϊνών E1A και C1TA. Πειράματα επιλογής πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τις E1A και C1TA στο σύστημα του σακχαρομούκητα.

3.3a Καθαρισμός και βιοτινυλίωση της πρωτεΐνης E1A 243R.

Η παραγωγή της E1A έγινε με το σύστημα των μπακυλο-ιών, στην κυτταρική σειρά Sf9. Ο ανασυνδυασμένος μπακυλο-ιός που φέρει το γονίδιο E1A προσφέρθηκε από τον Dr Alex Van der Eb. Ο καθαρισμός της E1A έγινε κάνοντας χρήση μίας αμινοτελικής ένθεσης έξι, γραμμικά, τοποθετημένων ιστιδινών, και της δεδομένης συνάφειάς τους για τα δισθενή ιόντα μετάλλων, όπως του Νικελίου (Ni^{++}). Στη συγκεκριμένη περίπτωση τα ιόντα νικελίου είναι «προσδεμένα» μη ομοιοπολικά σε νιτριλοξικό οξύ (Nitrilacetic Acid, NTA), το οποίο με τη σειρά του είναι ακινητοποιημένο σε σωματίδια αгарόζης. Ο καθαρισμός της πρωτεΐνης έγινε κατά τα αναφερόμενα στο σχετικό χωρίο των «Υλικών και Μεθόδων», υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες. Η πρωτεΐνη εκλύεται κατά το μεγαλύτερο ποσοστό της στο τρίτο κλάσμα του κλινούς συγκέντρωσης ιμιδαζολίου (0-250 mM), όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 22.

Εικόνα 22: Καθαρισμός και βιοτινυλίωση της E1A. Η πρωτεΐνη παράχθηκε με το σύστημα των μπακυλο-ιών και καθαρίστηκε με χρωματογραφία συγγένειας αгарόζης-NTA- Ni^{2+} . Στην πρώτη εικόνα τα κλάσματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμίδιου 10% και ακολούθησε χρώση νιτρικού αργύρου. Η ζώνη που χαρακτηρίζεται ως E1A στα δείγματα 2, 3, 4 αναγνωρίζεται από το μονοκλωνικό αντιγόνο M73. Στη δεύτερη εικόνα βιοτινυλιωμένες E1A (δείγμα 1, BSA δείγμα 3 και μοριακοί δείκτες (δείγμα 2) ανιχνεύονται με τη χρήση στρεπταβιδίνης-υπεροξυδάσης.

Στη συνέχεια η παραγόμενη πρωτεΐνη (0.5 mg καθαρής πρωτεΐνης εξαγόμενης από 10^8 κύτταρα Sf-9) βιοτινυλώθηκε (εικόνα 22 κάτω εικονίδιο, δείγμα 1), με σκοπό να αποτελέσει ανιχνευτικό μόριο σε πείραμα επιλογής κλώνων, από βιβλιοθήκη έκφρασης. Πρέπει να σημειωθεί ότι η βιοτινυλωμένη πρωτεΐνη E1A, χρησιμοποιήθηκε σε πείραμα Far Western, έναντι αναλυμένων πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων HeLa, σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου-SDS. Η χρήση της E1A σε αυτή την πειραματική προσέγγιση, αποκαλύπτει ένα πρότυπο ίδιο με εκείνο μιας ανοσοκατακρήμνισης με αντιορό έναντι της E1A (τα δεδομένα αυτά δεν παρουσιάζονται). Από αυτό το γεγονός εξάγεται το συμπέρασμα ότι η E1A είναι λειτουργική, και ότι δυνητικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το πείραμα επιλογής. Η εκτέλεση του πειράματος της *in vitro* επιλογής από τη βιβλιοθήκη έκφρασης, δεν είχε θετικό αποτέλεσμα.

3.3β Καθαρισμός της πρωτεΐνης CIPTA.

Η κατασκευή έκφρασης της CIPTA δημιουργήθηκε με την τοποθέτηση σε κοινό ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης της κωδικής περιοχής του cDNA της με μια γραμμική παράθεση έξι ιστιδινών (His), στον πλασμιδιακό φορέα pBLUE BacHis C, κατά τα αναφερόμενα στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι». Για την μόλυνση των κυττάρων Sf-9, ακολουθήθηκε στις λεπτομέρειές του το πρωτόκολλο της Invitrogen (Version D). Για την ανίχνευση του ανασυνδυσμένου μπακυλο-ιού, ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κύτταρα Sf-9, μολυσμένα με απομονωμένες ικές πλάκες, υπέστησαν ανάλυση Western. Η ανίχνευση της ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης έγινε με μονοκλωνικό αντιορό έναντι των τεσσάρων πρώτων αμινοξέων της χιμαιρικής της μορφής (α-MRG, Qiagen).

Στην εικόνα 23 A, φαίνεται ότι ανασυνδυσμένη πρωτεΐνη υπάρχει μόνο στο δείγμα 6. Στην διαδικασία δημιουργίας ιικού διαλύματος υψηλού τίτλου, διαπιστώθηκε ότι το δείγμα του ανασυνδυσμένου μπακυλο-ιού δεν ήταν ομοιογενές. Συγκεκριμένα υπήρχαν ενδείξεις για πρόσμιξη με μπακυλο-ιό αγρίου τύπου, αφού ορισμένα από τα μολυσμένα κύτταρα των καλλιιεργειών, εμφάνιζαν «πυρηνικά κοκκία» αποδεικτικά της ύπαρξής του. Πριν από την παραγωγή ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης επιχειρήθηκε η απομόνωση αμιγών ανασυνδυσμένων ικών πλακών, αφού το δεδομένο πλεονέκτημα του μπακυλο-ιού αγρίου τύπου, να αναπαράγεται γρηγορότερα, υπονομεύει την απόδοση της μεθόδου (Εικόνα 22 B).

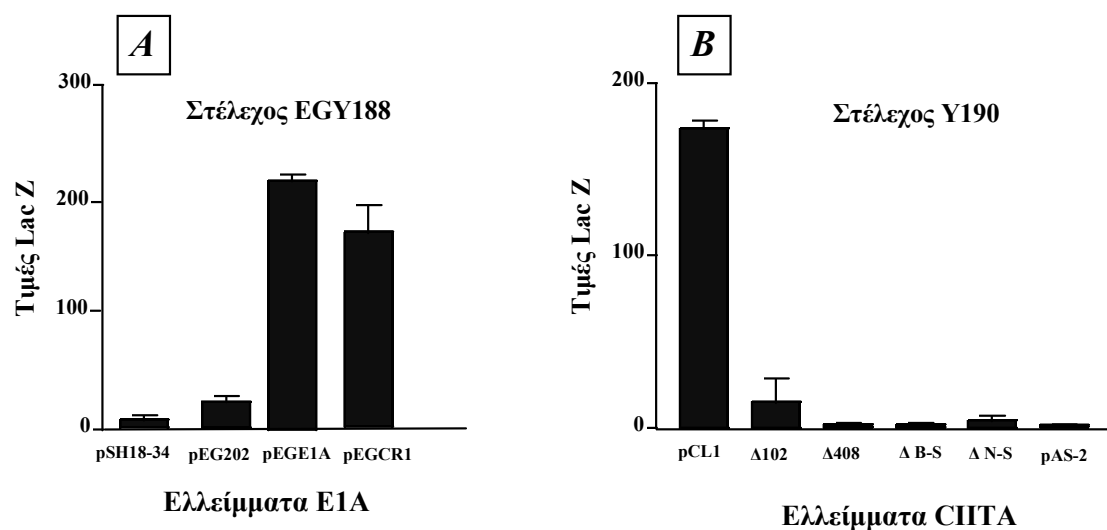
Ο καθαρισμός της CIPTA όπως αναφέρεται στο σχετικό χωρίο του κεφαλαίου «Υλικά και Μέθοδοι», έγινε υπό αποδιατακτικές συνθήκες (οι συνθήκες αποδιάταξης επιλέχθηκαν εξαιτίας του γεγονότος ότι κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες η πρωτεΐνη δεν κατακρατείται ικανοποιητικά από τη στήλη χρωματογραφίας. Πιθανή εξήγηση για το παρατηρούμενο φαινόμενο είναι ότι η πρωτεΐνη λόγω δομής «αποκρύπτει» τη γραμμική παράθεση ιστιδινών από τη στήλη). Για την έκλουση της πρωτεΐνης από τη «στήλη συγγένειας» αγαρόζης NTA Ni⁺, χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλα διαλύματα ουρίας με διαφορετικό pH. Στην εικόνα 22 Γ φαίνεται πως η μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης εκλύεται στα κλάσματα 10-15, όπου χρησιμοποιείται διάλυμα με pH:5,9. Στη συνέχεια τα ενοποιημένα κλάσματα υφίστανται διαδικασία επαναδιάταξης. Από την ανάλυση των ενοποιημένων κλασμάτων σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου και χρώση νιτρικού αργύρου, έγινε φανερό ότι ακόμα και κάτω από τις αποδιατακτικές συνθήκες του πειράματος καθαρισμού, η πρωτεΐνη έχει προσμίξεις, ή πρωτεολύεται από το καρβοξυτελικό της άκρο. Έτσι η διαδικασία κατέληξε περισσότερο σε έναν «εμπλουτισμό» παρά σε καθαρισμό της

CIITA. Η λειτουργικότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης υποδηλώνεται, έμμεσα, από το γεγονός ότι μετά από όλη αυτή τη διαδικασία, διατηρεί την ικανότητα της να αλληλεπιδρά με τη χιμαιρική GST-CBP (τα δεδομένα αυτά δεν παρουσιάζονται). Η πρωτεΐνη που παράχθηκε κατά τον τρόπο αυτό εξετάστηκε για το αν διαθέτει ικανότητα ακετυλάσης ιστονών, όπως τα περισσότερα μόρια με δράση αρμοστών. Τα αποτελέσματα τέτοιων πειραμάτων είναι αρνητικά. Η CIITA δεν έχει τέτοια δράση.

Εικόνα 23: Καθαρισμός της CIITA. Η πρωτεΐνη παράχθηκε με το σύστημα των μπακυλο-ιών και καθαρίστηκε με χρωματογραφία συγγένειας αραρόζης-NTA-Ni²⁺. Η ανίχνευση γίνεται με μονοκλωνικό αντιγόνο α-MRG (Qiagen) έναντι αμινοτελικά ενθωμένου τριπεπτιδίου σε κοινό ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης με την πρωτεΐνη CIITA. **A:** Ανίχνευση της ιϊκής πλάκας που φέρει τον ανασυνδυασμένο μπακυλο-ιό (δείγμα 6). **B:** Καθαρισμός της ιϊκής πλάκας από προσμίξεις με μπακυλοϊούς αγρίου τύπου. Πλάκα που δημιουργείται από τον καθαρό ανασυνδυασμένο μπακυλο-ιό είναι αυτή από την οποία προέρχεται το δείγμα 8. **Γ:** Κλάσματα που συλλέχθηκαν από τον καθαρισμό της πρωτεΐνης CIITA Κατά τα αναφερόμενα στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι». Κλάσματα 1, 2: αρχικό δείγμα, δείγμα μετά από διαπίδυση σε διάλυμα A. Δείγματα 3-8 : έκλουση με διάλυμα ουρίας pH:8.0, δείγματα 9-12: έκλουση με διάλυμα ουρίας pH:6.5, δείγματα 13-16: έκλουση με διάλυμα ουρίας pH:5.9, δείγματα 17-20: έκλουση με διάλυμα ουρίας pH:4.5

3.3γ Έκφραση των γονιδίων E1A και C1TA στο σακχαρομύκητα και μελέτη της δράσης τους ως μεταγραφικών ενεργοποιητών στο σύστημα των δύο υβριδίων.

Στην προσπάθεια να χρησιμοποιηθούν τα μόρια E1A και C1TA σε ένα πείραμα γενετικής επιλογής, ελλείμματα των δύο γονιδίων εντέθηκαν σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης του σακχαρομύκητα. Το γονίδιο E1A και ένα τμήμα του που περιλαμβάνει την περιοχή CR1 (αμινοξέα 1-80), τοποθετήθηκαν σε κοινό ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης με την περιοχή που είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με τοDNA, της βακτηριακής πρωτεΐνης LexA. Η δράση των χμαιρικών αυτών μορίων ως ενεργοποιητών της μεταγραφής, ελέγχθηκε στα στελέχη EGY48 και EGY188, ενώ μετρήθηκε η επίδρασή τους σε μονάδες LacZ, πάνω στις κατάλληλες κατασκευές αναφοράς. (Η παραγωγή των χμαιρικών αυτών μορίων ελέγχθηκε με ανάλυση Western με πολυκλωνικό αντιγόνο έναντι της πρωτεΐνης LexA). Από τα πειράματα αυτά είναι φανερό (Εικόνα 23 Α) ότι τα δύο χμαιρικά μόρια που εξετάστηκαν είναι ικανά να ενεργοποιούν τη μεταγραφή στο σύστημα αυτό και συνεπώς είναι ακατάλληλα για χρήση στο γενετικό σύστημα επιλογής των δύο υβριδίων. Τα ελλείμματα του γονιδίου C1TA που εξετάστηκαν, τοποθετήθηκαν σε κοινό ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης με την περιοχή δέσμευσης στο DNA της πρωτεΐνης Gal4 του σακχαρομύκητα. Η δράση τους ως ενεργοποιητών της μεταγραφής μελετήθηκε στο στέλεχος Y190. Η έκφραση των χμαιρικών πρωτεϊνών ελέγχθηκε με τη χρήση πολυκλωνικού αντιγόνου α-Gal4, σε ανάλυση Western.



Εικόνα 23: Έλεγχος του μεταγραφικού δυναμικού των χμαιρικών κατασκευών LexA/E1A (A) και Gal4/C1TA (B), καθώς και των ελλειμμάτων τους, σε κατάλληλα στελέχη σακχαρομύκητα.

Οι χμαιρικές πρωτεΐνες Gal4-Δ102 και Gal4-Δ408, εκφράζονται σταθερά σε όλες τις αποικίες σακχαρομύκητα που εξετάστηκαν. Αντίθετα οι Gal4-ΔN-S και Gal4-ΔB-S, δεν ανιχνεύθηκαν ποτέ σε αυτή την πειραματική προσέγγιση και τα προϊόντα τους θεωρήθηκαν ασταθή (τα δεδομένα αυτά δεν παρουσιάζονται). Το μόριο Gal4-Δ102 ενεργοποιεί σημαντικά τη μεταγραφή, όπως φαίνεται και στην εικόνα 17β, πράγμα που υποδηλώνει την ακαταλληλότητα χρήσης του στο σύστημα των δύο υβριδίων. Αντίθετα το μόριο Gal4-Δ408, δεν ενεργοποιεί τη μεταγραφή

(εικόνα 17β) και σε συνδυασμό με τη σταθερότητα του προϊόντος του επιλέχθηκε για αυτό το πείραμα.

Το πείραμα γενετικής επιλογής στο σακχαρομύκητα έγινε με την χρήση μίας βιβλιοθήκης έκφρασης, από λεμφοκύτταρα B κατά τα αναφερόμενα στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι». Από το πείραμα επιλογής απομονώθηκαν 70 κλώνοι, από τους οποίους, στα επόμενα στάδια, κανένας δεν έδειξε εξάρτηση για τη μεταγραφική ενεργοποίηση που επιδεικνύουν από το μόριο Gal4-Δ408. Έτσι χαρακτηρίστηκαν ως «ψευδώς θετικοί» και δεν αναλύθηκαν περισσότερο.

3.3δ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην προσπάθεια να απομονωθούν κλώνοι που εκφράζουν πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με το E1A και έχοντας αποκλείσει τη χρήση του συστήματος των δύο υβριδίων, επιλέχθηκε μία *in vitro* πειραματική προσέγγιση. Η πρωτεΐνη E1A 243R καθαρίστηκε με χρωματογραφία συγγένειας και σημάνθηκε *in vitro* με την προσθήκη ομάδων βιοτίνης (βιοτινυλίωση). Χρησιμοποιήθηκε δε, ως ανιχνευτικό μόριο έναντι βιβλιοθήκης έκφρασης από κύτταρα HeLa. Το γεγονός ότι σε ανάλυση FarWestern, το μόριο αναγνωρίζει πολυπεπτίδια από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων HeLa υποδεικνύει ότι η πρωτεΐνη E1A που παράγεται με τον τρόπο αυτό είναι λειτουργική. Παρόλα αυτά, το πείραμα επιλογής δεν απέδωσε. Επειδή η κάθε πρωτεΐνη διαθέτει διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες η ίδια η πειραματική προσέγγιση στην περίπτωση αυτή θέτει κάποιους περιορισμούς. Άλλωστε και οι αλληλεπιδράσεις των διαφόρων πρωτεϊνικών μορίων χαρακτηρίζονται από διαφορετικές σταθερές. Για τους δύο αυτούς λόγους η τεχνική Far Western δεν μπορεί να γενικευθεί, όπως η τεχνική ανάλυσης Western (όπου τα ανιχνευτικά μόρια είναι αντισώματα και αλληλεπιδρούν κατά τον ίδιο τρόπο με τα μόρια έναντι στα οποία έχουν κατασκευασθεί). Πιθανή, επίσης εξήγηση για το αρνητικό αποτέλεσμα είναι η χαμηλή ευαισθησία της μεθόδου. Συγκεκριμένα η διαδικασία αποδιάταξης-επαναδιάταξης των πρωτεϊνών πάνω στην ικκή πλάκα, μειώνει την τοπική συγκέντρωση της λειτουργικής πρωτεΐνης [167]. Ένας συνδυασμός όλων αυτών των δεδομένων θα πρέπει να λειτούργησε αρνητικά και στην παραπάνω περίπτωση. Εντούτοις, η πρωτεΐνη E1A που παράγεται σύμφωνα με τις διαδικασίες που παραθέτονται στην ενότητα αυτή, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε βιοχημικά πειράματα, στα οποία είναι απαραίτητη η ύπαρξη απομονωμένων συστατικών.

Με το ίδιο σκεπτικό επιχειρήθηκε και η παραγωγή και απομόνωση της πρωτεΐνης του C1TA. Η πρωτεΐνη μπορεί να χρησιμεύσει στην παραγωγή αντισώματος. Το γεγονός επίσης ότι η ίδια δεν διαθέτει ικανότητα ακετυλίωσης ιστονών (κάτι που επιβεβαιώνεται και από μία χιμαιρική με GST μορφή της), δεν αποκλείει να αποτελεί η ίδια υπόστρωμα για ακετυλίωση, από τα μόρια-αρμοστές, η από ακετυλάσες που αλληλεπιδρούν με αυτά όπως ο pCAF. Η υπάρχουσα πρωτεΐνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να απαντηθούν τέτοιου είδους ερωτήματα.

Όσον αφορά στην εκτέλεση των γενετικών πειραμάτων επιλογής στο σύστημα του σακχαρομύκητα, η περίπτωση του E1A υπήρξε απαγορευτική. Το γεγονός ότι ακόμα και η περιοχή μεταξύ των αμινοξέων 1-80 μπορεί να δρα σαν θετικός μεταγραφικός παράγοντας όταν κατευθύνεται μέσω μίας ετερόλογης περιοχής στο να αλληλεπιδράσει με στοιχεία του υποκινητή, δεν είναι κάτι αναμενόμενο. Η περιοχή CR1 εμπλέκεται σε καταστάσεις μεταγραφικής καταστολής παρά σε περιπτώσεις μεταγραφικής ενεργοποίησης. Η ιδιότητα του αμινοτελικού άκρου και της CR1 να ενεργοποιούν μεταγραφή σε τέτοια τεχνητά συστήματα του E1A αποδίδεται στην ικανότητα αυτής ακριβώς της περιοχής να αλληλεπιδρά με τον παράγοντα της βασικής μεταγραφικής μηχανής TBP [131].

Στην περίπτωση του C1TA, το γεγονός ότι δεν βρέθηκαν κλώνοι εκφράζοντες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με αυτό ίσως πρέπει να αποδοθεί στο ότι από την έλλειψη που χρησιμοποιήθηκε στην εκτέλεση του πειράματος, έλλειπαν οι περιοχές αλληλεπίδρασης με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες. Από την έλλειψη Δ408 λείπει η περιοχή που είναι πλούσια σε προλίνες/θρεονίνες/σερίνες, η οποία, όπως εξάγεται από τη συμπεριφορά των ελλειμμάτων του ευθύνεται για την πρόσβασή του στους

υποκινητές των γονιδίων ιστοσυμβατότητας τάξης II. Εντούτοις υπέρ της χρησιμοποίησης του μορίου Δ408 στο πείραμα γενετικής επιλογής αποτελεί το γεγονός ότι στο έλλειμμα αυτό υπάρχουν τα μοτίβα δέσμευσης GTP αλλά και μία σημαντική καρβοξυτελική περιοχή 40 περίπου αμινοξέων. Και οι δύο αυτές περιοχές της πρωτεΐνης είναι σαφώς απαραίτητες για τη λειτουργικότητά της, καθώς μεταλλαγή του δεύτερου μοτίβου δέσμευσης GTP οδηγεί σε μόριο με κυρίαρχες αρνητικές ιδιότητες πάνω στη δράση του ακέραιου μορίου. Επίσης έλλειψη της περιοχής μεταξύ των αμινοξέων 939-964, ανιχνεύεται σε ένα μόριο που απαντάται σε ασθενείς που πάσχουν από το σύνδρομο του γυμνού λεμφοκυττάρου [87].

Παρόλα αυτά όμως δεν πρέπει να παραβλέπουμε το γεγονός ότι το μόριο Δ408 όχι μόνο δεν επιδεικνύει κυρίαρχο αρνητικό φαινότυπο έναντι της δράσης του ακέραιου μορίου αλλά δεν είναι καν λειτουργικό ως μεταγραφικός παράγοντας. Είναι επίσης πιθανό ότι το μόριο Δ408, ακριβώς εξαιτίας της αμινοτελικής έλλειψης του, να αποκτά λανθασμένη στερεοδιάταξη. Ίσως αυτός να είναι ο λόγος που το πείραμα γενετικής επιλογής δεν απέδωσε.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στα πλαίσια της εργασίας αυτής, ερευνήθηκε η επίδραση του ογκογονιδίου E1A του αδενοϊού 5 σε γεγονότα μεταγραφικής ρύθμισης που οφείλονται στη δράση της ιντερφερόνης- γ . Ο αρχικός στόχος ήταν να μελετηθεί η επίδραση της E1A στη μεταγραφή των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξης II, με σκοπό να εξαχθούν συμπεράσματα που αφορούν στη διαλεύκανση των μηχανισμών μεταγραφικής έναρξης στο γονιδιακό αυτό σύστημα. Η έκφραση των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξης II (είτε επαγόμενη, είτε συστατική), ρυθμίζεται σε μεταγραφικό επίπεδο χάρη στη παράθεση ενός μοναδικού συνδυασμού cis στοιχείων στους υποκινητές τους. Η πρωτεΐνη C/PTA αποτελεί μόριο κλειδί στη διαδικασία μεταγραφικής ενεργοποίησης του συστήματος [72, 76, 77]. Το μόριο αυτό αποτελεί ένα είδος μεταγραφικού αρμοστή, εξαιτίας του γεγονότος ότι την πρόσβασή του στους υποκινητές, την αποκτά μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με τους παράγοντες που αλληλεπιδρούν με το στοιχείο X [87, 90].

Όπως αποδεικνύεται μέσα στα πλαίσια της διατριβής αυτής, το ογκογονίδιο E1A του αδενοϊού 5 έχει μία ισχυρά κατασταλτική επίδραση στη μεταγραφή που οφείλεται στους υποκινητές των γονιδίων ιστοσυμβατότητας τάξης II. Η καταστολή αφορά τόσο στην επαγόμενη από την ιντερφερόνη γ , όσο και στη B συστατική μεταγραφή, που αποτελούν κατά μία έννοια «φυσιολογικές διαδικασίες». Εκτός αυτού το E1A καταστέλλει κατ' ανάλογο τρόπο και την απόκριση των υποκινητών στην «εκτοπική» ύπαρξη του C/PTA στην κυτταρική σειρά HeLa. Αποδεικνύεται ότι το E1A δεν ασκεί το κατασταλτικό του αποτέλεσμα μέσω κάποιου συγκεκριμένου cis στοιχείου του υποκινητή Ea. Ο υποκινητής λειτουργεί σαν σύνολο και σαν σύνολο αποκρίνεται και στην κατασταλτική επίδραση του E1A. Παρόλο που δεν έχει αποδειχτεί άμεσα, εικάζεται ότι και για τους υποκινητές τάξης II ισχύει το μοντέλο που έχει περιγραφεί σε άλλα συστήματα: εκείνο που προβλέπει την ύπαρξη ενός «ενισχυσώματος» με βάση τις ισχυρές συνεργατικές αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται μεταξύ των διαφόρων παραγόντων του υποκινητή [62].

Το γεγονός ότι το E1A καταστέλλει το σύνολο των λειτουργικών στοιχείων του υποκινητή, συνηγορεί υπέρ αυτής της υπόθεσης. Οι περιοχές του μορίου που είναι υπεύθυνες για το κατασταλτικό αποτέλεσμα είναι το αμινοτελικό άκρο και η CR1, με τις οποίες το E1A αλληλεπιδρά με τους αρμοστές p300 και CBP. Με βάση το δεδομένο αυτό ελέγχθηκε η επίδραση των δύο μορίων στη επαγόμενη από την ιντερφερόνη γ και το C/PTA μεταγραφή των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξης II: η παρουσία των δύο μορίων έχει σαφώς ενεργοποιητική επίδραση πάνω στο φαινόμενο. Τα μόρια αρμοστές λαμβάνουν μέρος σε φαινόμενα μεταγραφής υποκινούμενα από το σύνολο των ρυθμιστικών cis στοιχείων των γονιδίων τάξης II.

Το E1A δεν αλληλεπιδρά με το C/PTA, τουλάχιστο σε συνθήκες όπου ανιχνεύεται αλληλεπίδραση με κατάλληλο πρωτεϊνικό τμήμα της p300. Έχοντας αποκλείσει έτσι την πιθανότητα μίας «άμεσης μοριακής τιτλοδότησης» (squenching) του E1A πάνω στο C/PTA στη συνέχεια εντοπίστηκε ποιά λειτουργία του μορίου C/PTA εμποδίζεται από την παρουσία του E1A. Με κατάλληλη πειραματική προσέγγιση αποδεικνύεται ότι το E1A έχει στόχο την δράση της περιοχής που ενεργοποιεί τη μεταγραφή στο μόριο του C/PTA. Η λειτουργία αυτής της περιοχής

κατά τα φαινόμενα, είναι να δημιουργεί επαφές με το μόριο αρμοστή CBP, και μάλιστα οι θέσεις αλληλεπίδρασής της με τον αρμοστή συμπίπτουν με τις θέσεις αλληλεπίδρασης του E1A με το ίδιο μόριο. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα συντίθεται ένα μηχανιστικό μοντέλο των γεγονότων που πιθανά συμβαίνουν στους υποκινητές των γονιδίων τάξης II κατά την έναρξη της μεταγραφικής διαδικασίας, παρουσία ή απουσία του ογκογονιδίου E1A. Το μοντέλο αυτό δεν θεωρείται πλήρες διότι οι λεπτομέρειες του δεν είναι γνωστές. Ο ρόλος που καλείται να διαδραματίσει το C/PTA στο επίπεδο του υποκινητή δεν θα πρέπει να είναι μόνο ο παθητικός ρόλος του μορίου -γέφυρας. Η απομονωμένη πρωτεΐνη C/PTA δεν φαίνεται να έχει δράση ακετυλ-τρανσφεράσης, παρόλο που δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο να αποτελεί η ίδια υπόστρωμα ακετυλίωσης. Τέτοιου είδους γεγονότα (όπως άλλωστε και η χρονική τους αλληλουχία) πρέπει να διερευνηθούν στο μέλλον με κατάλληλες πειραματικές προσεγγίσεις. Προς το παρόν, εικάζεται μία πιθανή ενεργή συμμετοχή της C/PTA στη μεταγραφή των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξης II. Εκτός από το γεγονός της ύπαρξης των μοτίβων που δεσμεύουν GTP στο καρβοξυτελικό της άκρο, η ακεραιότητα των οποίων φαίνεται να είναι σημαντική για την δράση του μορίου, δεν υπάρχουν άλλες ενδείξεις για ενζυμική δραστηριότητα της πρωτεΐνης, ούτε ασφαλώς και για πιθανά υποστρώματα της. Με τη χρήση της καθαρής πρωτεΐνης που περιγράφεται στη εργασία αυτή μπορούν να διερευνηθούν πλήθος ενδεχόμενα, σε βιοχημικό επίπεδο.

Για την υποστήριξη του μοντέλου που αναφέρεται εδώ, θα ήταν ίσως ενδιαφέρον να πραγματοποιηθεί ένα πείραμα «άμεσης τιτλοδότησης» του CBP από την E1A παρουσία του μορίου C/PTA *in vitro*. Η υπόθεσή μας υποδηλώνει ότι ασφαλώς οι πρωτεΐνες E1A και C/PTA αλληλεπιδρούν με το CBP στις ίδιες θέσεις αλλά για να εκτοπίζει η μία την άλλη θα πρέπει οι αλληλεπιδράσεις τους να χαρακτηρίζονται από διαφορετικές σταθερές. Έτσι, οι αυξανόμενες συγκεντρώσεις της μίας (E1A) θα πρέπει να είναι ικανές να αποσταθεροποιούν την πρόσδεση της άλλης (C/PTA). Το αποτέλεσμα ενός τέτοιου *in vitro* πειράματος θα αποδείκνυε την ισχύ του προτεινόμενου μοντέλου, ενώ για την πραγματοποίησή του, η απαίτηση για απομονωμένες πρωτεΐνες E1A και C/PTA καλύπτεται από τα αναφερόμενα στην παρούσα εργασία.

Από μία άλλη οπτική γωνία, η «αναμέτρηση» του E1A με το μονοπάτι της ιντερφερόνης- γ είναι δυνατό να συμβαίνει νωρίτερα καθώς όπως αποδεικνύεται εδώ και το πρώιμο μονοπάτι σηματοδότησης της ιντερφερόνης- γ υφίσταται κατασταλτική επίδραση από την ύπαρξη των πρωτεϊνών E1A. Αν και οι πρωτεΐνες E1A δεν εμπλέκονται στις διαδικασίες φωσφορύλιωσης, εισόδου στον κυτταρικό πυρήνα, και αλληλεπίδρασης του παράγοντα STAT1a με τις αλληλουχίες στόχους του, εντούτοις, στη κυτταρική σειρά 293, η επίδραση με ιντερφερόνη- γ δεν οδηγεί σε μεταγραφική ενεργοποίηση κατάλληλων κατασκευών αναφοράς, που απαντούν ειδικά στην ύπαρξη ενεργοποιημένου STAT1a. Στόχος του παράγοντα E1A είναι σαφώς η περιοχή που ενεργοποιεί τη μεταγραφή του STAT1a, χωρίς όμως να έχει γίνει λεπτομερέστερη μελέτη στο θέμα, ούτως ώστε να μπορεί να αποφανθεί κανείς για το αν το E1A διακόπτει (κατά ένα τρόπο αντίστοιχο με τα συμπεράσματα που εξάγονται από το πρώτο μέρος της εργασίας) κάποια αλληλεπίδραση της περιοχής αυτής με έναν από τους μέχρι σήμερα γνωστούς αρμοστές. Οι πιθανές υποθέσεις που προτείνονται δημιουργούνται από συνδυασμό των φαινομένων που παρατηρούνται εδώ και των πληροφοριών που παρέχει η υπάρχουσα βιβλιογραφία. Εξαιτίας της

αναφερόμενης αλληλεπίδρασης της περιοχής που ενεργοποιεί μεταγραφή της πρωτεΐνης STAT1α και των p300 και CBP [25, 34], εικάζεται ότι το E1A και στην περίπτωση αυτή αποτρέπει την αλληλεπίδραση των αρμοστών με το μεταγραφικό παράγοντα STAT1α. Το αποτέλεσμα μιας τέτοιας δράσης θα ήταν ο φαινότυπος που παρατηρούμε της κατάργησης του ενεργοποιητικού δυναμικού του STAT1α ως μεταγραφικού παράγοντα στην κυτταρική σειρά 293.

Τα αποτελέσματα του δεύτερου κεφαλαίου της εργασίας αυτής δεν έρχονται σε αντίθεση με τα προτεινόμενα στο πρώτο κεφάλαιο. Η κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή συμπερασμάτων στις δύο ενότητες είναι διαφορετικές. Πρόκειται ασφαλώς για ανθρώπινες κυτταρικές σειρές αλλά προέρχονται από διαφορετικούς ιστούς. Ο καλύτερος τρόπος για να διαπιστωθεί τι ακριβώς συμβαίνει με το μονοπάτι σηματοδότησης της ιντερφερόνης- γ και το E1A στην κυτταρική σειρά HeLa, θα ήταν θυγατρικοί κλώνοι της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς που να εκφράζουν σταθερά τις πρωτεΐνες E1A. Τέτοιοι κλώνοι όμως δεν υπάρχουν. Από μία άλλη οπτική γωνία, τα περιγραφόμενα στη δεύτερη ενότητα της διατριβής δεν συνιστούν ένα μοντέλο έναντι του προτεινόμενου στην πρώτη ενότητα. Και αυτό διότι ο ρόλος του STAT1α στη μεταγραφή των τάξης II γονιδίων ιστοσυμβατότητας έχει ακόμη σκοτεινά σημεία τα οποία πρέπει να διαλευκανθούν πριν γίνει συνολική εκτίμηση του αποτελέσματος που έχει η επίδραση του E1A στη δράση του στο φαινόμενο της μεταγραφής των γονιδίων τάξης II. Στη δεύτερη ενότητα απλά διαπιστώνεται η κατασταλτική επίδραση του ογκογονιδίου E1A στο ενεργοποιητικό δυναμικό του STAT1α.

Επίσης, η «αναμέτρηση» του E1A με το CITA είναι βέβαιο ότι συμβαίνει σε κυτταρικούς τύπους όπως στα κύτταρα Raji, αλλά και στα κύτταρα HeLa στα πειράματα παροδικής διαμόλυνσης με κατασκευές έκφρασης της πρωτεΐνης CITA. Υπάρχουν ακόμα πολλά σημεία που χρήζουν διερεύνησης στο πολύπλοκο φαινόμενο της μεταγραφής των γονιδίων ιστοσυμβατότητας τάξης II. Πρόκειται για ένα μεταγραφικό σύστημα του οποίου τα συστατικά δεν έχουν ανακαλυφθεί ακόμα στο συνολό τους. Η ανακάλυψη νέων στοιχείων θα οδηγήσει πιθανώς σε καινούρια συμπεράσματα ή επανεκτιμήσεις των παρατηρούμενων φαινομένων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

4 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. **Klein Jan, Gutknecht Jutta, and F. Norbert.**, *The Major Histocompatibility Complex and Human evolution*. Trends in Genetics., 1990. **6**: 7-11.
2. **Pieters Jean**, *MHC classII restricted antigen presentation*. Current Opinion in Immunology., 1977. **9**: 89-96.
3. **Kelly A. P., Monaco J. J., Co S. J., Trowsdale J.**, *A new human HLA class II related locus DM.*, Nature, 1991. **353**: 571.
4. **Grusby M. and Glimcher L. H.**, *"Immune Responses in MHC class II- deficient Mice"*. Ann.Rev.Immunol, 1995. **13**: 417-435.
5. **Ploeg L. Hidde**, *Viral strategies of Immune evasion*. Science, 1998. **280**: p. 248-253.
6. **Nikolov D. B. and Burley S. K.**, *RNA polymerase II transcription initiation: a structural view*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997. **94**: 15-22.
7. **Greenblatt Jack**, *RNA polymerase II and transcriptional regulation*. Current Opinion in Cell Biology, 1997. **9**: 310-319.
8. **Orphanides George, Lagrange Thierry, and Reinberg Danny**, *The general transcription factors of RNA polymerase II*. Genes & Development, 1996. **10**: 2657-2683.
9. **Herschlag D. and Johnson B. F.**, *Synergism in transcriptional activation: a kinetic view*. Genes & Development, 1993. **7**: 173-179.
10. **Carey Michael**, *The enhanceosome and transcriptional synergy*. Cell, 1998. **92**: 5-8.
11. **Eckner R.**, *p300 and CBP as transcriptional regulators and targets of oncogenic events*. Biol Chem., 1996. **377**(11): 685-688.
12. **Marcus G. A., et al.**, *Functional similarity and physical association between GCN5 and ADA2: putative transcriptional adaptors*. EMBO journal, 1994. **13**(20): 4807-4815.
13. **Arany Z., et al.**, *E1A associated p300 and CREB associated CBP belong to a conserved family of coactivators*. Cell, 1994. **77**(June 17): 799-800.
14. **Haynes S. R., et al.**, *The bromodomain: a conserved sequence found in human Drosophila and yeast proteins*. Nucl. Acid. Res., 1992. **20**: 2603.
15. **Eckner R., et al.**, *Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus associated 300-kD protein reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor*. Genes & Development., 1994. **8**: 869-884.
16. **Avantaggiati M. L., et al.**, *The SV-40 large T antigen and adenovirus E1A oncoproteins interact with distinct isoforms of the transcriptional coactivator, p300*. EMBO J., 1996. **15**: 2236-2248.
17. **Stein R. W., et al.**, *Analysis of E1A mediated growth regulation functions: binding of the 300 Kd cellular product correlates with E1A enhancer repression function and DNA synthesis-inducing activity*. Journal of Virology, 1990. **64**: 4421-4427.
18. **Whyte P., Williamson N. M., and Harlow Ed**, *Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A proteins*. Cell, 1989. **56**: 67-75.
19. **Yiaciuk P. and Moran E.**, *Analysis with specific polyclonal antiserum indicates that the E1A associated 300-kD protein is a stable nuclear phosphoprotein that undergoes cell cycle phase specific modification*. Molecular and Cellular Biology, 1991. **11**: 5389-5397.
20. **Chrivia J. C., et al.**, *Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP*. Nature, 1993. **365**: 855-859.
21. **Lundblad J. R., et al.**, *Adenoviral associated protein p300 as a functional homologue of the transcriptional coactivator CBP*. Nature, 1995. **374**: 85-88.
22. **Gerritsen M. E., et al.**, *CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65*. Proc.Natl.Acad. Sci. USA, 1997. **94**: 2927-2932.
23. **Lee J.-S., et al.**, *Adenovirus E1A downregulates cjun and jun B-mediated transcription by targeting their coactivator p300*. Molecular and Cellular Biology., 1996. **16**: 4312-4326.
24. **Bhattacharya S., et al.**, *Cooperation of Stat2 and p300/CBP in signalling induced by inyterferon-á*. Nature, 1996. **383**: 344-346.
25. **Zhang Jue J., et al.**, *Two contact regions between STAT1 and CBP/p300 in Interferon -γ signaling*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996. **93**: 15092-15096.

26. **Eckner R., et al.,** *Interaction and functional collaboration of p300/CBP and bHLH proteins in muscle and B-cell differentiation.* Genes & Development, 1996. **10**: 2478-2490.
27. **Heery D. M., et al.,** *A signature motif in transcriptional coactivators mediates binding to nuclear receptors.* Nature, 1997. **387**: 733-736.
28. **Lee J.-S., et al.,** *Relief of YY1 transcriptional repression by adenovirus E1A is mediated by E1A-associated protein p300.* Genes & Development, 1995. **9**: 1188-1198.
29. **Avantaggiati M. L., et al.,** *Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways.* Cell, 1997. **89**: 1175-1184.
30. **Minc S., Haenig B., and Klempnauer K. H.,** *Interaction and functional collaboration of p300 and C/EBPbeta.* Molecular and Cellular Biology., 1997. **17**: 6609-6617.
31. **Arany Z., et al.,** *An essential role of p300/CBP in the cellular response to hypoxia.* Proc. Natl Acad Sci. USA, 1996. **93**: 12969-12973.
32. **Neish A., et al.,** *Factors associated with the mammalian RNA polymerase II holoenzyme.* Nucleic Acids Research, 1998. **26**: 847-853.
33. **Kamei Y., et al.,** *A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors.* Cell, 1996. **85**: 403-414.
34. **Horvai A. E., et al.,** *Nuclear integration of JAK/STAT and Ras/AP-1 signaling by CBP and p300.* Proc. Natl. Acad Sci. USA, 1997. **94**: 1074-1079.
35. **Nakajima T., et al.,** *The signal dependent coactivator CBP is a nuclear target for pp90 RSK.* Cell, 1996. **86**: 465-474.
36. **Banister A. J. and Kouzarides T.,** *The CBP coactivator is a histone acetyltransferase.* Nature, 1996. **384**: 641-643.
37. **Ogryzko V., et al.,** *The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases.* Cell, 1996. **87**: 953-959.
38. **Roth S.Y. and Allis C. D.,** *The subunit exchange model of histone acetylation.* Trends in Cell Biology, 1996. **6**: 371-375.
39. **Rikitake Y. and Moran E.,** *DNA binding properties of the E1A-associated 300-kilodalton protein.* Molecular and Cellular Biology., 1992. **12**: 2826-2836.
40. **Kurokawa R., et al.,** *Differential use of CREB binding protein-coactivator complexes.* Science, 1998. **279**: 700-703.
41. **Korzus E., et al.,** *Transcription factor-specific requirements for coactivator and their acetyltransferase functions.* Science, 1998. **279**: 703-706.
42. **Gu W. and Roeder R. G.,** *Activation of p53 sequence specific DNA binding by acetylation of p53 c-terminal domain.* Cell, 1997. **90**: 595-606.
43. **Imhof A., et al.,** *Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferase.* Current Biology, 1997. **7**: 659-692.
44. **Ko L. J. and Prives C.,** *p53: puzzle and paradigm.* Genes & Development, 1996. **10**: 1054-1072.
45. **Gu W., Shi X.-L., and Roeder R. G.,** *Synergistic activation of transcription by CBP and p53.* Nature, 1997. **387**: 819-822.
46. **Giles R., Peters D. J. M., and Breuning M. H.,** *Conjunction Dysfunction: CBP/p300 in human disease.* Trends in Genetics, 1998. **14**: 18-183.
47. **Dallas P., et al.,** *p300/CBP related protein p270 is a component of mammalian SWI/SNF complexes.* MCB, 1998. **18**: 3596-3603.
48. **Kawasaki H., et al.,** *Distinct roles of the coactivators p300/CBP in retinoic acid induced differentiation.* Nature, 1998. **393**: 284-289.
49. **Petrij F., et al.,** *Rubinstein Taybi syndrome caused by mutation in the transcriptional co activator CBP.* Nature, 1995. **376**: 348-351.
50. **Yao Tso-Pang, et al.,** *Gene Dosage dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300.* Cell, 1998. **93**: 361-372.
51. **Rousset F. R., et al.,** *Regulation of the Fc receptor for the IgE and Class II MHC antigen expression on Burkitt's lymphoma cell lines by Human IL-4 and interferon-γ.* J. Immunology, 1988. **140**: 2625-2632.
52. **McKearn J. P. and Rosenberg N.,** *Interleukin induced increase in Ia expression by normal mouse cells.* J. Exp. Med., 1984. **160**: 679-683.

53. **Amaldi I., et al.,** "Induction of HLA Class II Genes by Interferon- γ is transcriptional and requires a trans acting protein". *J.Immunology.*, 1989. **142**: 999-1004.
54. **Rosa F. and F. M.,** *Regulation of HLA-DRA gene by interferon- γ : transcriptional and post transcriptional control.* *J.Immunology*, 1988. **140**: 1660-1664.
55. **Boss J. M.,** "Regulation of transcription of MHC class II genes". *Curr.Op.Cell Biol*, 1997. **9**: 107-113.
56. **Glimcher L. H. and Kara C. J.,** *Sequences and factors: A guide to MHC gene transcription.* *Annu. Rev. Imm.*, 1992. **10**: 13-50.
57. **Ting J., et al.,** *YB-1 DNA binding protein represses interferon γ activation of class II major histocompatibility complex genes.* *The journal of Experimental Medicine*, 1994. **179**: 1605-1611.
58. **Steimle V., et al.,** *A novel DNA binding regulatory factor is mutated in primary MHC class II deficiency (bare lymphocyte syndrome).* *Genes & Development*, 1995. **9**: 1021-1032.
59. **Durand B., et al.,** "RFX-AP, a novel subunit of the RFX DNA binding complex is mutated in MHC Class II deficiency". *EMBO J.*, 1997. **16**: 1045-1055.
60. **Reith W., et al.,** *Congenital immunodeficiency with a regulatory defect in MHC class II gene expression lacks a specific HLA DRA promoter binding protein RFX.* *Cell*, 1988. **53**: 897-906.
61. **Jabrane-Ferrat N., et al.,** *Complex Architecture of Major Histocompatibility Class II Promoters.* *MCB*, 1996. **16**: 4683-4690.
62. **Mach B., et al.,** "Regulation of MHC ClassII genes: Lessons from a disease". *Annu. Rev. Imm.*, 1996. **14**: 301-331.
63. **Reith W., et al.,** *Function of major histocompatibility complex Class II promotersrequires cooperative binding between factors RFX and NF-Y.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994. **91**: 554-558.
64. **Reith W., et al.,** *Cooperative Binding between factors RFX and X2BP to the X and X2 boxes of MHC Class II promoters.* *J. Biol. Chem.*, 1994. **269**: 20020-20025.
65. **Moreno C. S., et al.,** *Purified X2 box binding protein X₂BPcooperatively binds the Class II MHC box in the presence of purified RFX, the X box factor deficient in Bare lymphocyte syndrome.* *J. Immunology.*, 1995.
66. **Currie Alexander R.,** *Functional interaction between the DNA binnding subunit Trimerization domain of NF-Y and the High mobility group protein HMG I-Y.* *The J. Biol. Chem.*, 1997. **272**: 30880-30888.
67. **Currie Alexander R.,** *NF-Y is associated with the Histone acetyltransferases GCN5 and pCAF.* *J. Biol. Chem.*, 1998. **373**: 1430-1434.
68. **Yang Xiang-Jiao, et al.,** *A p300/CBP associated factor that competes with adenoviral oncoprotein E1A.* *Nature*, 1996. **382**: 319-324.
69. **Thanos D. and Maniatis T.,** *Virus induction of Human Interferon beta gene expression requires the assembly of an enhanceosome.* *Cell*, 1995. **83**: 1091-1100.
70. **Steimle V., et al.,** *Complementation Cloning of an MHC Class II Transactivator mutated in Hereditary MHC Class II Deficiency (or Bare Lymphocyte Syndrome).* *Cell*, 1993. **175**: 135-146.
71. **Chang C. and Flavell R. A.,** *Class II Transactivator Regulates the expression of Multiple genes involved in antigen presentation.* *J. Exp. Med.*, 1995. **181**: 765-767.
72. **Steimle V., et al.,** *Regulation of MHC Class II Expression by Interferon- γ Mediated by The Transactivator Gene CIITA.* *Science*, 1994. **265**: 106-109.
73. **Chang C., et al.,** *Mice lacking the MHC class II transactivator show tissue specific impairment of MHC class II expression.* *Immunity*, 1996. **4**: 267-178.
74. **Douhan J. III, et al.,** *An Isotype specific activator in Major Histocompatibility Complex (MHC) class II genes that is independent of class II transactivator.* *J. Exp. Med.* 1997. **185**: 1885-1895.
75. **Zhou H., et al.,** *CIITA-dependent and independent Class II expression revealed by a dominant negative mutant.* *The journal of Immunology.*, 1997. **158**: 4741-4749.
76. **Chang C., et al.,** *Class II transactivator (CIITA) is sufficient for the inducible expression of major histocompatibility complexclass II genes.* *J. Exp. Med.*, 1994. **180**: 1367-.

77. **Ramassar V., et al.,** *Evidence for the in vivo role of Class II transactivator in Basal and Interferon- γ induced class II expression in mouse tissue.* Transplantation, 1996. **62**: 1901-1907.
78. **Shuai K., et al.,** *Activation of transcription by interferon- γ : Tyrosine phosphorylation of a 91 Kd DNA binding protein.* Science, 1992. **258**: 1808-1812.
79. **Muller M., et al.,** *The protein tyrosine kinase Jak1 complements defects in interferon α/β and γ signal transduction.* Nature, 1993. **366**: 129.
80. **Lee Y., and Benveniste E. N.,** *Stat-1 α expression is involved in Interferon- γ induction of the Class II Transactivator and Class II MHC genes.* J. Immunology, 1996. **157**: 1559-1568.
81. **Meraz M. A., et al.,** *Targeted disruption of the STAT1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the Jak-STAT signaling pathway.* Cell, 1996. **84**: 431-442.
82. **Muller M., et al.,** *Complementation of a mutant cell line: central role of the 91 kD polypeptide of ISGF3 of the interferon α and γ signal transduction pathway.* EMBO J., 1993. **12**: 4221-4228.
83. **Lennon A. M., et al.,** *Isolation of a B cell specific promoter for the human Class II transactivator.* Immunogenetics, 1997. **45**: 266-273.
84. **Muhlethaler-Mottet Annick, et al.,** *Expression of MHC Class II molecules in different cellular and functional compartments is controlled by differential usage of multiple promoters of the transactivator CIITA.* EMBO J., 1997. **16**: 2851-2860.
85. **Piscurich Janet F., et al.,** *Identification of distinct regions of 5' flanking DNA that mediate constitutive, interferon - γ , STAT1 and TGF β regulated expression of the Class II transactivator gene.* J. Immunology, 1998. **160**: 233-240.
86. **Muhlethaler-Mottet A., et al.,** *Activation of the MHC class II transactivator CIITA by interferon- γ requires cooperative interaction between STAT1 and USF1.* Immunity, 1998. **8**: 157-166.
87. **Riley J. L., et al.,** *Activation of MHC Class II Genes Requires Both the X box Region and the Class II Transactivator.* Immunity, 1995: 533-543.
88. **Fontes J. D., Jiang B., and Matija Peterlin B.,** *The Class II trans-activator CIITA interacts with the TBP-associated factor TAF $_{II}$ 32.* Nucleic Acids Research., 1997. **25**: 2522-2528.
89. **Chin K. C., Li G. G-X., and T.J. P-Y.,** *Importance of acidic, proline/ serine/ threonine rich, and GTP- binding regions in the major histocompatibility complex class II transactivator: generation of transdominant negative mutants.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997. **94**: 2501-2506.
90. **Scholl T., Mahanta S., and Strominger J. L.,** *Specific complex formation between the type II bare lymphocyte syndrome-associated transactivators CIITA and RFX.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997. **94**: 6330-6334.
91. **Bayley S. T. and Mymryk J. S.,** *Adenovirus E1A proteins and transformation.* Int. J. Onc., 1994. **5**: 425-444.
92. **Richter J. D., et al.,** *Heterogeneity of adenovirus type 5 E1A proteins: multiple serine phosphorylations induce slow migrating electrophoretic variants but do not affect E1A induced transcriptional activation.* J. Virol., 1988. **62**: 1948-1955.
93. **Smith C. L., et al.,** *Phosphorylation of serine residue 89 of human adenovirus E1A proteins is responsible for their characteristic electrophoretic mobility shifts, and its mutation affects biological function.* J. Virol, 1989. **63**: 1569-1577.
94. **Howe J. A., et al.,** *Retinoblastoma growth suppressor and a 300 Kd protein appear to regulate cellular DNA synthesis.* Proc Natl Acad Sci. USA, 1990. **87**: 5883-5887.
95. **Whyte P., et al.,** *Association between an oncogene and an ant-ioncogene: The adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma Gene product.* Nature, 1988. **334**: 124-129.
96. **Kovesdi I., Reichel R., and Nevins J. R.,** *Identification of a cellular transcription factor involved in E1A transactivation.* Cell, 1986. **445**: 219-228.
97. **Helin K., et al.,** *A cDNA encoding a pRB- binding protein with properties of the transcription factor E2F.* Cell, 1992. **70**: 337-350.
98. **Kaelin W. G., et al.,** *Expression cloning of a cDNA encoding a Retinoblastoma - binding protein with E2F like properties.* Cell, 1992. **70**: 351-364.

99. **Shan B., et al.**, *Molecular cloning of cellular genes encoding retinoblastoma associated proteins: Identification of a gene with properties of the transcription factor E2F*. MCB, 1992. **12**: 5620-5631.
100. **Helin K., Harlow E., and Fattaey A.**, *Inhibition of E2F1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein*. MCB, 1993. **13**: 6501-6508.
101. **Flemington E. K., Speck S. H., and Kaelin W. J. Jr.**, *E2F mediated transactivation is inhibited by complex formation with the retinoblastoma susceptibility gene product*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993. **90**: 6914-6918.
102. **Lees J. A., et al.**, *The retinoblastoma protein binds to a family of E2F transcription factors*. Molecular and Cellular Biology, 1993. **13**: 7813-7825.
103. **Nevins J. R.**, *E2F: a link between tumor suppressor protein and viral oncoproteins*. Science, 1992. **258**: 424-429.
104. **Brehm A., et al.**, *Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription*. Nature, 1998. **391**: 597-601.
105. **Magnani-J. L., et al.**, *Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase*. Nature, 1998. **391**: 601-604.
106. **de Pinho R.**, *The cancer-chromatin connection*. Nature, 1998. **391**: 533-536.
107. **Fattaey A. R., Harlow E., and Helin K.**, *Independent regions of adenovirus E1A are required for binding to and dissociation of E2F protein complexes*. MCB, 1993. **13**: 7267-7277.
108. **Moran E.**, *DNA tumor virus transforming proteins and the cell cycle*. Curr. Op. Genet. Dev., 1993. **3**: 63-70.
109. **Trouche D., Cook A., and Kouzarides T.**, *The CBP coactivator stimulates E2F/DP1 activity*. Nucl. Acid Res., 1996. **24**: 4139-4145.
110. **Trouche D. and Kouzarides T.**, *E2F1 and E1A 12S have a homologous activation domain regulated by RB and CBP*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996. **93**: 1493-1442.
111. **Lill N. L., et al.**, *Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators*. Nature, 1997. **387**: 823-826.
112. **Levine A. J.**, *p53 The cellular gatekeeper for growth and division*. Cell, 1997. **88**: 323-331.
113. **Debbas M. and White E.**, *Wild type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B*. Genes & Development., 1993. **7**: 546-554.
114. **Mymryk J. S.**, *Tumour suppressive properties of the adenovirus E1A oncogene*. Oncogene, 1996. **13**: 1581-1589.
115. **Lowe S. W. and Ruley E. H.**, *Stabilization of the p53 tumor suppressor gene is induced by adenovirus E1A and accompanies apoptosis*. Genes & Development., 1993. **7**: 535-545.
116. **Querido E., Teodoro J. G., and Branton P.**, *Accumulation of p53 induced by the Adenovirus E1A protein requires regions involved in the stimulation of DNA synthesis*. Journal of Virology, 1997. **71**: 3526-3533.
117. **Dorsman J. C., et al.**, *The N-terminal region of the adenovirus type 5 E1A proteins can repress expression of cellular genes via two distinct but overlapping domains*. J. Virol., 1995. **69**: 2962-2967.
118. **Boyd J. M., et al.**, *A region in the c-terminus of adenovirus 2-5 E1A protein is required for association with a cellular phosphoprotein and important for the negative modulation of the T24-ras mediated transformation, tumorigenesis and metastasis*. The EMBO J., 1993. **12**: 469-478.
119. **Sollerbrant K., Chinnadurai G., and Svensson C.**, *The CtBP binding domain in the adenovirus E1A protein controls CRI dependent transactivation*. Nucl. Acid. Res, 1996. **24**: 2578-2584.
120. **Poortinga G., Watanabe M., and P. S.**, *Drosophila CtBP: a Hairy-interacting protein required for embryonic segmentation and Hairy mediated transcriptional repression*. The EMBO J., 1998. **17**: 2067-2078.
121. **Katsanis N. and Fischer E. M.**, *A novel c-terminal binding protein CtBP2 is closely related to CtBP1, an adenovirus E1A binding protein and maps to human chromosome 21q21.3*. Genomics, 1998. **47**: 294-299.

122. **Sang N. and Giordano A.,** *Extreme N-terminus of E1A Oncoprotein specifically associates with a new set of cellular proteins.* Journal of Cellular Physiology., 1997. **170**: 182-191.
123. **Chatterjee P. K., et al.,** *DNA binding properties of an adenovirus 289R E1A protein.* The EMBO journal, 1988. **7**: 835-841.
124. **Lillie J. W. and Green M. R.,** *Transcription activation by the adenovirus E1A protein.* Nature, 1989. **338**: 39-44.
125. **Webster L. C. and Ricciardi R. P.,** *Trans dominant mutants of E1A provide genetic evidence that the zinc finger of the trans activating domain binds a transcription factor.* MCB, 1991. **11**: 4287-4296.
126. **Martin K. J., Lillie J. W., and Green M. R.,** *Evidence for interaction of different eukaryotic transcriptional activators with distinct cellular targets.* Nature, 1990. **346**: 147-152.
127. **Livingstone C., Gunvanti P., and Jones N.,** *ATF-2 contains a phosphorylation dependent transcriptional activation domain.* The EMBO J., 1995. **14**: 1785-1797.
128. **Liu F. and Green M. R.,** *Promoter targeting by adenovirus E1A through interaction with different cellular DNA- binding domains.* Nature, 1994. **368**: 520-525.
129. **Chatton B., et al.,** *Transcriptional activation by the adenovirus larger E1A product is mediated by members of the cellular transcription factor ATF family which can directly associate with E1A.* MCB, 1993. **13**: 561-570.
130. **Li X. and Green M. R.,** *Intramolecular inhibition of activating transcription factor-2 function by its DNA binding domain.* Genes & Development., 1996. **10**: 517-527.
131. **Lee Wes S., et al.,** *Adenovirus E1A activation domain binds the Basic repeat in the TATA box transcription factor.* Cell, 1991. **67**: 365-376.
132. **Boyer T. G. and Berk A. J.,** *Functional interaction of Adenovirus E1A with Holo-TFIID.* Genes&Development, 1993. **7**: 1810-1823.
133. **Leong K., Brunet L., and Berk A. J.,** *Factors responsible for the higher transcriptional activity of extracts of adenovirus infected cells fractionate with the TATA box transcription factor.* MCB, 1988. **8**: 1765-1774.
134. **Byers-Kraus V., et al.,** *Interaction of the Dr1 inhibitory factor with the TATA binding protein is disrupted by Adenovirus E1A.* Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 1994. **91**(July).
135. **Mazzarelli J.M., et al.,** *The transactivation domain of adenovirus E1A interacts with the C-terminus of the human TAF_{II}135.* J. Virol., 1997. **71**:7978-7983.
136. **van Dam Hans, et al.,** *Differential effects of the adenovirus E1A oncogene on members of the AP-1 Transcription factor family.* MCB, 1990. **10**: 5857-5864.
137. **Offringa Rienk, et al.,** *A novel function of the transforming domain of E1A: Repression of AP-1 activity.* Cell, 1990. **62**:527-538.
138. **Hagmeyer B., Angel P., and van Dam H.,** *Modulation of AP-1/ATF transcription factor activity by the adenovirus E1A oncogene products.* BioEssays, 1995. **17**: 621-629.
139. **Borelli E., Hen R., and Chambon P.,** *Adenovirus 2 E1A products repress enhancer induced stimulation of transcription.* Nature, 1984. **312**: 608-612.
140. **Rochette-Egly C., Fromental C., and Chambon P.,** *General repression of enhancer activity by the Adenovirus-2 E1A proteins.* Genes and Development, 1990. **4**: 137-150.
141. **Reich N., et al.,** *Transcription of interferon-stimulated genes induced by Adenoviral particles but is suppressed by E1A gene products.* J. Virol., 1988. **62**: 114-119.
142. **Takeda T., et al.,** *E1A repression of IL-6 induced gene activation by blocking the assembly of IL-6 response element binding complexes.* J. Immunology, 1994. **153**: 4573-4582.
143. **Zhong Zhong, W. Zilong, and Darnell J. Jr.,** *Stat3: A STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6.* Science, 1994. **264**: 95-98.
144. **Kalvakolanu D. V. R., et al.,** *Inhibition of interferon inducible gene expression by Adenovirus E1A proteins.* Proc Natl. Acad Sci USA, 1991. **88**: 7459-7463.
145. **Leonard G. T. and Sen G. C.,** *Effects of Adenovirus E1A protein on interferon signaling.* Virology, 1996. **224**: p. 25-33.
146. **Miller M. E., et al.,** *Adenovirus E1A specifically blocks SWI/SNF- dependent transcriptional activation.* MCB, 1996. **16**: 5737-5743.

147. **Mymryk J. S. and Smith M. M.,** *Influence of the adenovirus 5E1A oncogene on chromatin remodelling.* Biochem. Cell Biol., 1997. **75**: 95-102.
148. **Sambrook J., Fischer E. F., Maniatis T.,** *Molecular cloning: a laboratory manual.*, ed. C.S.H. 1989, New York.
149. **Holmes D. S., Qingley M.,** *A rapid boiling method for preparation of bacterial plasmids.* Anal. Biochem., 1981. **119**: 93-95.
150. **Maniatis T., Fischer E. F., Sambrook J.,** *Molecular cloning: a laboratory manual.*, ed. C.S. H. 1982, New York.
151. **Grunstein M., Hogness D.,** *Colony Hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene.* 1975. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **72**: 3961-3964.
152. **Thanos D., Mavrothalassitis G., and Papamathaiakis J.,** *Multiple regulatory regions on the 5' side of the mouse E alpha gene.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988. **85**.
153. **Thanos D., et al.,** *The MHC class II E beta promoter: a complex arrangement of positive and negative elements determines B cell and interferon-gamma regulated expression.* Nucleic Acids Research, 1993. **21**: 6010-6019.
154. **Chang C., et al.,** *CIITA activates expression of MHC class II genes in mouse T cells.* Int. Immunology, 1995. **7**: 1515-1518.
155. **Zhou H. and Glimcher L. H.,** *Human MHC Class II gene transcription directed by the carboxyl terminus of CIITA, one of the defective genes in type II MHC combined Immunodeficiency.* Immunity, 1995. **2**: 545-553.
156. **Kretsovali A., et al.,** *Functional interaction between the ClassII Transactivator CIITA and the coactivator CBP.* MCB, 1998 in press.
157. **Copeland K. F. T. and Heeney J. L.,** *T helper cell activation and Human Retroviral pathogenesis.* Microbiological Reviews., 1996. **60**: 722-742.
158. **Miller D. M., et al.,** *Human Cytomegalovirus inhibits Major Histocompatibility complex Class II expression by disruption of the Jak/ STAT pathway.* J. Exp. Med., 1998. **187**: 675-683.
159. **Mahanta S., et al.,** *Transactivation by CIITA, the type II Bare Lymphocyte Syndrome associated factor, requires participation of multiple regions of the TATA box binding protein.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997. **94**: 6324-6329.
160. **Merika M., et al.,** *Recruitment of p300/CBP by the IFN- γ enhanceosome is required for synergistic activation of transcription.* Mol. Cell, 1998.
161. **Kretsovali A. and Papamathaiakis J.,** *A novel IL-4 responsive element of the E alpha MHC class II promoter tht binds to an inducible factor.* Nucl. Acid. Res., 1995. **23**: 2919-2928.
162. **Pine R., Canova A., and S. C.,** *Tyrosine Phosphorylated p91 binds to a single element in the ISGF2/IRF promoter to mediate induction by interferon- γ and interferon- γ , and is likely to autoregulate the p91 gene.* The EMBO J., 1994. **13**: 158.
163. **O'Shea J. J.,** *Jaks, STATs, cytokine Signal Transduction, and Immunoregulation: Are we there yet?* Immunity, 1997. **7**: 1-11.
164. **Kimura T., et al.,** *Involvement of the IRF1 transcription factor in antiviral response to interferons.* Science, 1994. **264**: 1921-1924.
165. **Anderson K. P. and Fennie E. H.,** *Adenovirus Early Region 1A modulation of interferon antiviral activity.* J. Virol., 1987. **61**: 787-795.
166. **Lyons R. H., Ferguson B. Q., and Rosenberg M.,** *Pentapeptide nuclear localization signal in adenovirus E1A.* MCB, 1987. **7**: 2451-2456.
167. **Ausubel F. R., B.R., Kingston R., Moore D., Seidman J., Smith J., Struhl K.,** *Current protocols in molecular biology.* 1989.
168. **K.Vousden** «9th p53 Workshop» May 1998, Crete Greece
169. **Agalioti Th.,** Ms.C Thesis, 1993, Biology Dept., University of Crete.