

**Πανεπιστήμιο Κρήτης
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Ιατρικής
Τομέας Βασικών Επιστημών, Εργαστήριο Βιοχημείας
&
Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας & Βιοτεχνολογίας**

Διδακτορική Διατριβή

Θέμα

**Μονοπάτια σηματοδότησης που ρυθμίζουν την έκφραση των
γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών του ανθρώπου**

Νικολαΐδου-Νεοκοσμίδου Βαρβάρα

Επιβλέπων : Αναπληρωτής Καθηγητής Δημήτριος Καρδάσης

**Συν-επιβλέποντες : Καθηγητής Βασίλειος Ζαννής
Δρ. Ιωάννης Ταλιανίδης**

Ηράκλειο 2007

Πανεπιστήμιο Κρήτης
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Ιατρικής
Τομέας Βασικών Επιστημών, Εργαστήριο Βιοχημείας
&
Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας & Βιοτεχνολογίας

Διδακτορική Διατριβή

Θέμα

**Μονοπάτια σηματοδότησης που ρυθμίζουν την έκφραση των
γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών του ανθρώπου**

Νικολαΐδου-Νεοκοσμίδου Βαρβάρα

ΜΕΛΗ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Δ. ΚΑΡΔΑΣΗΣ
Β. ΖΑΝΝΗΣ
Χ. ΣΤΟΥΡΝΑΡΑΣ
Α. ΗΛΙΟΠΟΥΛΟΣ
Χ. ΤΣΑΤΣΑΝΗΣ
Δ. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑΚΗ
Α. ΓΡΑΒΑΝΗΣ

Ηράκλειο 2007

Ολοκληρώνοντας την παρούσα διδακτορική διατριβή θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κ. Δημήτρη Καρδάση, ο οποίος όχι μόνο μου προσέφερε την δυνατότητα να πραγματοποιήσω την εργασία αυτή, αλλά με βοήθησε με τις γνώσεις και την εμπειρία του σε κάθε βήμα της δουλειάς που πραγματοποιήθηκε. Η καθοδήγησή του ήταν, είναι και θα είναι σημαντική σε όλη τη διάρκεια της επιστημονικής μου πορείας και για τον λόγο αυτό τον ευχαριστώ ιδιαίτερα. Αισθάνομαι πολύ τυχερή που μου δόθηκε η δυνατότητα να συνεργαστώ, για περισσότερα από 5 ½ χρόνια, με ένα τόσο αξιόλογο επιστήμονα, αλλά κυρίως με ένα τόσο αξιόλογο άνθρωπο, που δε δίστασε να δώσει ακόμα και το αίμα του για να με βοηθήσει, σε δύσκολες στιγμές της οικογένειάς μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ζαννή Β. και τον κ. Ταλιανίδη Γ. οι οποίοι ως μέλη της τριμελούς επιτροπής μου παρακολούθησαν την πορεία της διατριβής μου και με τις επιστημονικές τους συμβουλές συνέβαλλαν αποφασιστικά στην ολοκλήρωση, καθώς και στη συγγραφή της. Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα 5 μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, την κα. Αλεξανδράκη Δ., τον κ. Γραβάνη Α., τον κ. Ηλιόπουλο Α., τον κ. Στουρνάρα Χ. και τον κ. Τσατσάνη Χ. οι οποίοι με τις συμβουλές τους συνέβαλλαν στην αρτιότερη συγγραφή της παρούσας διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους συναδέλφους μου Βέτα, Βίκυ, Christine και Γιώργο Κουτσοδόνη, που με βοήθησαν στα πρώτα «εργαστηριακά» μου βήματα. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τη Βέτα που με υπομονή και κατανόηση, με «μύησε» στις μεθόδους και τις τεχνικές του εργαστηρίου μας. Εκτός από αυτό όμως η Βέτα και η Βίκυ αποτελούν και σημαντικό κομμάτι της προσωπικής μου ζωής. Με έχουν στηρίξει σε κρίσιμες στιγμές της ζωής μου και γι' αυτό τις ευχαριστώ πολύ.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα παιδιά που πέρασαν από το εργαστήριο όλα αυτά τα χρόνια, το Γιώργο Κούκο, τον Κώστα Δροσάτο, την Αρσα, το Θωμά Βρεκούση, την Ελευθερία, την Έφη, τη Σόφη, το Μάνο, τη Γιάννα, τη Ναντίνα, το Γιώργο Μουντουφάρη και τον Κώστα Χαριτάκη για την άψογη συνεργασία μας, αλλά και την πολύ καλή παρέα τους εκτός εργαστηρίου. Η παρουσία όλων τους έκανε τις δύσκολες μέρες να φαντάζουν λιγότερο δύσκολες και τις καλές μέρες ακόμα καλύτερες.

Στη συνέχεια ευχαριστώ όλα τα παιδιά από το εργαστήριο του κ. Ανάγνου, το Θοδωρή, τη Σμάρω, το Μιχάλη, τη Μαρία και το Γιάννη, από το εργαστήριο του κ. Στουρνάρα, ειδικότερα τη Γαλάτσια, τη Ναταλία και την Έλσα και από το εργαστήριο του κ. Ηλιόπουλου, ειδικότερα τη Λίνα, τη Σοφία, τη Δήμητρα και τη Μαρία όχι μόνο για τη βοήθεια τους στην εκτέλεση πειραμάτων με την παροχή εξοπλισμού και αντιδραστηρίων, αλλά και για την καθημερινή τους παρέα εντός και εκτός εργαστηρίου. Επίσης, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου του κ. Ταλιανίδη που με φιλοξένησαν για λίγες μέρες στο εργαστήριό τους κατά τη διάρκεια της κατάληψης και συνέβαλαν καταλυτικά στην ολοκλήρωση μέρους της δουλειάς που δημοσιεύσαμε. Τέλος, ευχαριστώ όλα τα παιδιά των εργαστηρίων του τομέα για τη συνεργασία και τη βοήθεια τους όλα αυτά τα χρόνια.

Φυσικά και δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τις φίλες μου στη Θεσσαλονίκη, Μαρία Σμαραγδή, Χρύσα, Κατερίνα Πάικου και τη κουμπάρα μου Μαρία Μελέκου, για την ηθική υποστήριξη όλα αυτά τα χρόνια που είμαστε μακριά. Κάθε φορά που τις ακούω στο τηλέφωνο, παίρνω κουράγιο για να συνεχίσω να προσπαθώ για το καλύτερο.

Όσο για τις φίλες μου στη Κρήτη, Δάφνη, Κατερίνα Μπιλίτου, και Τερέζα...όσα ευχαριστώ και να πω θα είναι λίγα! Οι στιγμές που μου χάρισαν, η βοήθεια που μου προσέφεραν και η τεράστια ανοχή που έδειξαν (όσοι με γνωρίζουν

καλύτερα, καταλαβαίνουν τι θέλω να πω!), ήταν, είναι και θα είναι πολύτιμη, ακόμα και όταν θα σκορπίσουμε στα 4 σημεία του ορίζοντα. Ευχαριστώ κορίτσια μου...δεν ξέρω πώς θα τα κατάφερα χωρίς εσάς.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου την οικογένεια μου, τον πατέρα μου Αντώνη, την γιαγιά μου Μαριγίτσα, τον παππού μου Ιορδάνη και τον αδελφούλη μου Στράτο για όλα τα πράγματα, υλικά και πνευματικά, που μου έχουν προσφέρει όλα αυτά τα χρόνια. Τους ευχαριστώ περισσότερο από όλα γιατί στερήθηκαν πράγματα προκειμένου να μου δώσουν τη δυνατότητα να κάνω το όνειρό μου πραγματικότητα. Ελπίζω να έρθει κάποτε η στιγμή που θα μπορώ και εγώ με τη σειρά μου, να τους ανταποδώσω έστω ένα μικρό μέρος από όλα όσα μου προσέφεραν. Το τελευταίο ευχαριστώ είναι για τους ανθρώπους που δεν έχω πια δίπλα μου, τη μητέρα μου Νανά, τον παππού μου Στράτο και τη γιαγιά μου Βαρβάρα. Η ανάμνησή τους μένει πάντα ζωντανή μέσα μου. Με βοηθά να ξεπερνάω τα εμπόδια που βρίσκονται στο δρόμο μου και να κοιτάω πάντα μπροστά...Η αγάπη της οικογένειάς μου είναι το πολυτιμότερο δώρο και η κινητήριος δύναμη για όλα όσα έχω καταφέρει μέχρι τώρα και για όλα όσα θέλω να κατακτήσω στο μέλλον.

Στην οικογένειά μου

Περιεχόμενα

◆ Περίληψη.....	11
◆ Abstract.....	16
◆ Εισαγωγή.....	20
A. ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΑ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....	21
1. Παρουσίαση του βασικού υποκινητή και της αλληλουχίας των γεγονότων κατά την έναρξη της μεταγραφής των γονιδίων στα ευκαρυωτικά κύτταρα.....	21
2. Χρωματίνη, cis-ρυθμιστικά στοιχεία, πυρηνικός εντοπισμός και μεταγραφική ρύθμιση	23
3. Μεταγραφικοί παράγοντες, συν-ενεργοποιητές και συν-καταστολείς	30
B. ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ.....	35
1. Παρουσίαση των μεταγραφικών παραγόντων που ανήκουν στην υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών	35
2. Βασικές δομές και λειτουργίες των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών	38
3. Στοιχεία απόκρισης στις ορμόνες – HREs (Hormone Response Elements).....	43
4. Συν-ενεργοποιητές των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών	44
5. Ρύθμιση της μεταγραφικής ικανότητας των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών	44
6. Αλληλεπιδράσεις για τη μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων μεταξύ πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων και μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζονται από άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια	52
Γ. ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΟΥ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ HNF-4α.....	53
1. Ο ρόλος του HNF-4α στην ανάπτυξη και στις μεταβολικές λειτουργίες του οργανισμού	53
2. Ο ρόλος του HNF-4α σε διάφορες ασθένειες.....	55
3. Βασικές δομές και λειτουργίες του HNF-4α.....	56
4. Αλληλεπίδραση του HNF-4α με τους συν-ενεργοποιητές.....	59
5. Αλληλεπίδραση του HNF-4α με τους συν-καταστολείς.....	60
Δ. ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΟΥ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ RXRα.....	61
1. Ο ρόλος του RXRα στην φυσιολογία του οργανισμού.....	61
2. Βασικές δομές και λειτουργίες του RXRα.....	63
3. Συν-ρυθμιστές του RXRα.....	66
Ε. ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΟΥ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ TRβ.....	66
1. Ο ρόλος του TRβ στην φυσιολογία του οργανισμού.....	66

2.	Βασικές δομές και λειτουργίες του TRβ.....	67
3.	Μοριακός μηχανισμός δράσης του TRβ.....	69
ΣΤ. ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ.....		
1.	Μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών.....	72
2.	Παρουσίαση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών του ανθρώπου.....	74
Ζ. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΟΛΥΝΣΕΩΝ ΚΑΙ ΦΛΕΓΜΟΝΩΝ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ ΣΤΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΩΝ ΛΙΠΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....		
1.	Απόκριση σε οξεία φάση.....	82
2.	Αλλαγές στο μεταβολισμό των λιπών και των λιποπρωτεϊνών κατά τη μόλυνση και τη φλεγμονή	83
3.	Το μονοπάτι του TNFα.....	84
♦	Σκοπός και σημασία της διδακτορικής διατριβής.....	88
♦	Υλικά και Μέθοδοι.....	90
♦	Υλικά.....	90
♦	Μέθοδοι.....	93
♦	Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης (agarose gel).....	93
♦	Πένψεις DNA με τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών.....	93
♦	Απομόνωση τμημάτων DNA.....	94
♦	Αποφωσφορυλίωση DNA.....	94
♦	Αντίδραση σύνδεσης (ligation reaction).....	95
♦	Παρασκευή θρεπτικού μέσου LB για την ανάπτυξη στελεχών του βακτηρίου E.coli.....	95
♦	Βακτηριακός μετασχηματισμός (transformation).....	95
♦	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μικρής κλίμακας (miniprep procedure - micro screening).....	96
♦	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας (large scale preparation).....	96
♦	Πλασμιδιακές κατασκευές (plasmid constructions).....	97
♦	Κυτταροκαλλιέργειες.....	99
♦	Παροδικές επιμολύνσεις κυτταρικών σειρών (transient transfections).....	100
♦	Μέθοδος κανονικοποίησης β-gal.....	101
♦	Μέτρηση της αντίδρασης της λουσιφεράσης (Luciferase assay).....	101
♦	Πηκτή πολυακρυλαμίδης για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών.....	102
♦	Ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης (Western Blot).	102
♦	Παραγωγή και καθαρισμός πρωτεϊνών που είναι σε σύντηξη με τη πρωτεΐνη GST από βακτήρια.....	103
♦	<i>In vitro</i> αλληλεπίδραση πρωτεϊνών (pull-down).....	106
♦	Συν-ανοσοκατακρήμνιση & ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών (Co-Immunoprecipitation & Immunoprecipitation).....	107

◆ Έμμεσος ανοσοφθορισμός πρωτεϊνών σημασμένων με επίτοπο (Indirect Immunofluorescence).....	108
◆ Μέθοδος απομόνωσης mRNA.....	109
◆ RT-PCR (reverse transcriptase-PCR) και δημιουργία cDNA	110
◆ Απομόνωση πρωτεϊνών με τη χρήση του Trizol.....	111
◆ Μέθοδος ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP).....	111
◆ Κατακρήμνιση πρωτεϊνών μέσω αλληλεπίδρασης με DNA (DNAP, DNA affinity precipitation)	116
◆ Αποτελέσματα	119
I. Μηχανισμός μεταγραφικής καταστολής του υποκινητή της apoC-III και της μεταγραφικής δραστηριότητας του HNF-4a από σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούν τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB	120
1. Ανταγωνισμός μεταξύ αντι- και προ- φλεγμονωδών κυτταροκινών για τη ρύθμιση του υποκινητή της apoCIII στα ηπατικά κύτταρα.....	120
2. Η καταστολή του υποκινητή της apoCIII από TNF α πραγματοποιείται μέσω του NF-κB.....	123
3. Ο TNF α καταστέλλει τον υποκινητή του γονιδίου της apoCIII μέσω του HRE που εντοπίζεται στον κοντινό υποκινητή του γονιδίου.....	127
4. Ο TNF α καταστέλλει την επαγόμενη από HNF-4a ενεργοποίηση των υποκινητών των γονιδίων της apoCIII και της apoCII.....	129
5. Ο TNF α και ο LMP1 δεν επηρεάζουν τον υποκυτταρικό εντοπισμό ή την σταθερότητα του HNF-4a.....	132
6. Ο TNF α επηρεάζει την ικανότητα πρόσδεσης του HNF-4a στο DNA.....	133
7. Ο TNF α και το μονοπάτι του NF-κB καταστέλλουν τη μεταγραφική ικανότητα του HNF-4a με το να επηρεάζουν τη μεταγραφική ενεργότητα των περιοχών του AF-1 και AF-2.....	134
8. Διερεύνηση πιθανών μηχανισμών μεταγραφικής καταστολής του HNF-4a από τον NF-κB: <i>In vitro</i> αλληλεπίδραση μεταξύ HNF-4a και NF-κB και παρεμπόδιση στρατολόγησης των συν-ενεργοποιητών στον HNF-4a.....	137
II. Επίδραση της προ-φλεγμονώδους κυτταροκίνης TNFα στην έκφραση των γονιδίων σε κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος	142
1. Διερεύνηση της δράσης του TNF α στη μεταγραφική ενεργότητα γονιδίων απολιποπρωτεϊνών, συν-ρυθμιστών και πυρηνικών υποδοχέων σε ηπατικά κύτταρα ανθρώπου.....	142
2. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού της MEK1/2 από τον TNF α ρυθμίζει την έκφραση των SHP και PGC1 α	146
III. Ο ρόλος του καταστολέα SHP (Small Heterodimer Partner) στην ρύθμιση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών του ανθρώπου	148
1. Ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργότητας των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών από τον πυρηνικό υποδοχέα SHP	148
2. Η υπομονάδα p65 του NF-κB καταστέλλει τη μεταγραφική ενεργοποίηση του υποκινητή του SHP μεταξύ της περιοχής -1383/ -865	153
3. Ο HNF-4a και ο συν-ενεργοποιητής PGC1 α είναι υπεύθυνοι για τη σωστή έκφραση του γονιδίου του SHP.....	155

IV. Ο ρόλος της πρωτεΐνης Trp2/COT στην ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της apoC-III και της δραστηριότητας των πυρηνικών υποδοχέων HNF-4α, RXRα και T3Rβ.....	157
1. Ο ρόλος της κινάση Trp2/COT στη καταστολή της έκφρασης του γονιδίου της apoCIII μέσω του TNFα	157
2. Η κινάση Trp2/COT καταστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή της apoCIII μέσω του HNF-4α με τρόπο ανεξάρτητο των μονοπατιών της ERK και του NF-κB	159
3. Η κινάση Trp2/COT μεσολαβεί για την καταστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του HNF-4α επηρεάζοντας την ενεργότητα AF-1 και την DBD περιοχή του πυρηνικού υποδοχέα.....	162
4. Ο ρόλος της κινάσης COT στη μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών.....	165
5. Η κινάση COT δεν επηρεάζει την ικανότητα πρόσδεσης του HNF-4α στο DNA, αλλά την ικανότητα αλληλεπίδρασής του με τον συν-ενεργοποιητή PGC1α.....	168
6. Η επίδραση της κινάσης Trp2/COT στη μεταγραφική ενεργότητα των πυρηνικών υποδοχέων RXRα και TRβ.....	171
V. Φωσφορυλίωση των πυρηνικών υποδοχέων και ο ρόλος της πεπτιδύλο-πρόλυλο cis/trans ισομεράσης Pin1	174
1. Η φωσφορυλίωση του HNF-4α από το χημειοθεραπευτικό φάρμακο 5-Fluorouracil οδηγεί σε καταστολή της μεταγραφικής του ικανότητας, οδηγώντας στη καταστολή της έκφρασης του γονιδίου της apoCIII.....	174
2. Η πεπτιδύλο-πρόλυλο cis/trans ισομεράση Pin1 καταστέλλει τη μεταγραφική ικανότητα του HNF-4α.....	175
3. Η ισομεράση Pin1 καταστέλλει τη μεταγραφική ικανότητα του RXRα....	178
4. Επίδραση της ισομεράσης Pin1 στη μεταγραφική ενεργότητα υποκινητών των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών.....	180
♦ Συζήτηση.....	181
I. Ανταγωνισμός μεταξύ προ- και αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών κατά την απόκριση σε οξεία φάση (acute phase response).....	182
II. Ο ρόλος των πυρηνικών υποδοχέων στο μηχανισμό της καταστολής της έκφρασης του γονιδίου της apoCIII από τον TNFα	182
III. Πιθανοί μηχανισμοί καταστολής της μεταγραφικής δράσης του HNF4α από τον TNFα	183
IV. Επίδραση του TNFα στην έκφραση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών, μεταγραφικών παραγόντων και συν-ρυθμιστών σε κύτταρα HepG2.....	185
V. Ο ρόλος της κινάσης Trp2/COT στην ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργότητας πυρηνικών υποδοχέων από τον TNFα	188
VI. Φωσφορυλίωση πυρηνικών υποδοχέων και ο ρόλος της ισομεράσης Pin1.....	189
VII. Η βιολογική σημασία του προσδιορισμού των μοριακών μονοπατιών που επάγονται από τον TNFα και επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών του ανθρώπου.....	190
♦ Βιβλιογραφία.....	194
♦ Δημοσιεύσεις.....	215

Ευρετήριο Εικόνων και Πινάκων

♦ Εικόνα 1: Η σταδιακή συγκρότηση των υπομονάδων του συμπλόκου της βασικής μεταγραφικής μηχανής.....	22
♦ Εικόνα 2: Στρατολόγηση του ολοενζύμου της RNA πολυμεράσης II.	23
♦ Εικόνα 3: Η δομή των χρωμοσωμάτων	25
♦ Εικόνα 4: Ομοιοπολικές τροποποιήσεις των αμινοτελικών άκρων των ιστονών του πυρήνα των νουκλεοσωμάτων	26
♦ Εικόνα 5: Αλληλουχίες που απαντώνται στους υποκινητές των ευκαρυωτικών γονιδίων	28
♦ Εικόνα 6: Οι δομές των πιο καλά χαρακτηρισμένων DBD	35
♦ Εικόνα 7: Γενικοί μηχανισμοί δράσης των πυρηνικών υποδοχέων	36
♦ Εικόνα 8: Επίδραση στεροειδών και μη-στεροειδών συνδετών στους πυρηνικούς υποδοχείς.....	37
♦ Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση των περιοχών των πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων	39
♦ Εικόνα 10: Η περιοχή πρόσδεσης στο DNA των πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων.....	41
♦ Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση της περιοχής πρόσδεσης του συνδέτη LBD (Ligand Binding Domain).....	42
♦ Εικόνα 12: Πρόσδεση των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών στα HREs (Hormone Response Elements).....	44
♦ Εικόνα 13: Δομή και μηχανισμοί καταστολής του πυρηνικού υποδοχέα SHP (Short Heterodimer Partner).....	48
♦ Εικόνα 14: Ικανότητα ισομερίωσης φωσφορυλιωμένων καταλοίπων προλίνης από την ισομεράση Pin1 και πρωτεΐνες στόχοι της	51
♦ Εικόνα 15: Ομολογίες μεταξύ των HNF4 διαφόρων ειδών και ομολογία του HNF-4α με τον RXRα.	56
♦ Εικόνα 16: Παρουσίαση των διαφόρων δομικών και λειτουργικών περιοχών του HNF-4α	57
♦ Εικόνα 17: Οργάνωση του γονιδίου του HNF-4α και οι 7 ισομορφές του ...	58
♦ Εικόνα 18: Σχηματική αναπαράσταση των λειτουργικών περιοχών και των θέσεων φωσφορυλίωσης των πυρηνικών υποδοχέων ρετινοειδών.....	64
♦ Εικόνα 19: Σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούν κινάσες MAPK (ERKs, JNK, p38), PI3K, Akt, PKA και PKC συμμετέχουν στη ρύθμιση της μεταγραφής μέσω των ρετινοειδών	65
♦ Εικόνα 20: Σύγκριση της αμινοξικής ακολουθίας μεταξύ των TR ισοτύπων και των TRβ ισομορφών	68
♦ Εικόνα 21: Γενική οργάνωση των περιοχών των TRs	69
♦ Εικόνα 22: Παρουσίαση του εξανουκλεοτιδίου και της δομής των TREs ...	70
♦ Εικόνα 23: Μοντέλο ενεργοποίησης και καταστολής από τους υποδοχείς των θυρεοειδών ορμονών	71
♦ Εικόνα 24: Λιποπρωτεΐνη του πλάσματος	72
♦ Εικόνα 25: Μονοπάτι μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών	74
♦ Εικόνα 26: Απολιποπρωτεΐνη AII	75
♦ Εικόνα 27: Απολιποπρωτεΐνη B	76
♦ Εικόνα 28: Το σύμπλεγμα των απολιποπρωτεϊνών E, CI, CIV, CII	77
♦ Εικόνα 29: Το σύμπλεγμα των απολιποπρωτεϊνών A-I, CIII, A-IV	79

◆ Εικόνα 30: Ο υποκινητής της απολιποπρωτεΐνης A-I με τα ρυθμιστικά στοιχεία πάνω στα οποία προσδένονται πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών.....	80
◆ Εικόνα 31: Ρυθμιστικά στοιχεία του υποκινητή του γονιδίου της apoCIII ..	81
◆ Εικόνα 32: Ρυθμιστικά στοιχεία του υποκινητή του γονιδίου της apoAIV..	82
◆ Εικόνα 33: Το μονοπάτι του TNF α	85
◆ Εικόνα 34: Ανταγωνιστική επίδραση προ- και αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών στη μεταγραφική ενεργότητα του ανθρώπινου apoCIII υποκινητή στη κυτταρική σειρά HepG2.....	122
◆ Εικόνα 35: Η καταστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του υποκινητή του γονιδίου της apoCIII, από τον TNF α , πραγματοποιείται μέσω ενεργοποίησης του NF- κ B.....	126
◆ Εικόνα 36: Το κοντινό HRE του υποκινητή του γονιδίου της apoCIII είναι ικανό για να επάγει τη καταστολή του υποκινητή μέσω του TNF α	128
◆ Εικόνα 37: Ο TNF α καταστέλλει την επαγόμενη μέσω HNF-4 α ενεργοποίηση των υποκινητών των γονιδίων της apoCIII και της apoCII....	131
◆ Εικόνα 38: Ο TNF α δεν επηρεάζει τον πυρηνικό εντοπισμό ή τη σταθερότητα της πρωτεΐνης HNF-4 α , αλλά καταστέλλει μερικώς την ικανότητά της για αλληλεπίδραση με το DNA.....	133
◆ Εικόνα 39: Πρωτεΐνες-επαγωγείς του NF- κ B μονοπατιού μπορούν και καταστέλλουν την μεταγραφική ενεργότητα του HNF-4 α	135
◆ Εικόνα 40: Και οι δύο ενεργοποιητικές περιοχές του HNF-4 α (AF-1 και AF-2) καταστέλλονται από τον TNF α και το μονοπάτι του NF- κ B.....	136
◆ Εικόνα 41: Φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ HNF-4 α και NF- κ B, μέσω της περιοχής RHD του p65 και του p50.....	138
◆ Εικόνα 42: Παρεμπόδιση της στρατολόγησης των συν-ενεργοποιητών στις AF-1 και AF-2 περιοχές του HNF-4 α από το μονοπάτι του TNF α	141
◆ Εικόνα 43: Μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών από τον TNF α	144
◆ Εικόνα 44: Μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων μεταγραφικών παραγόντων και συν-ρυθμιστών των απολιποπρωτεϊνών από τον TNF α	146
◆ Εικόνα 45: Η ενεργοποίηση της MEK1/2 από τον TNF α ρυθμίζει την έκφραση των SHP και PGC1 α σε ηπατικά κύτταρα.....	148
◆ Εικόνα 46: Ο SHP καταστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή της apoCIII μέσω του HNF-4 α	150
◆ Εικόνα 47: Ο SHP καταστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα διαφόρων υποκινητών των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών.....	152
◆ Εικόνα 48: Ο NF- κ B καταστέλλει τη μεταγραφική ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου SHP μεταξύ της περιοχής -1383/ -865.....	154
◆ Εικόνα 49: Οι παράγοντες HNF-4 α και PGC1 α , είναι υπεύθυνοι για τη σωστή έκφραση του γονιδίου του SHP.....	156
◆ Εικόνα 50: Η κινάση COT εμπλέκεται στην μεταγραφική καταστολή του υποκινητή της apoCIII, μέσω του TNF α	158
◆ Εικόνα 51: Η κινάση Trp12 εμπλέκεται στην μεταγραφική καταστολή του υποκινητή της apoCIII.....	160
◆ Εικόνα 52: Η κινάση Trp12 εμπλέκεται στην μεταγραφική καταστολή του υποκινητή της apoCIII μέσω του HNF-4 α , με τρόπο ανεξάρτητο των μονοπατιών της Erk και του NF- κ B	162
◆ Εικόνα 53: Η κινάση Trp12/COT εμπλέκεται στην μεταγραφική καταστολή του HNF-4 α από τον TNF α	164

◆ Εικόνα 54: Η κινάση Trp2 στοχεύει το N-τελικό άκρο του HNF-4α όπου εντοπίζεται η περιοχή AF-1 και το DBD.....	165
◆ Εικόνα 55: Η κινάση COT καταστέλλει τη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων στόχων του HNF-4α.....	167
◆ Εικόνα 56: Ποσοτικοποίηση της καταστολής που προκαλεί η κινάση COT στη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων στόχων του HNF-4α	168
◆ Εικόνα 57: Η κινάση COT δεν επηρεάζει την ικανότητα πρόσδεσης του HNF-4α στο DNA, αλλά την ικανότητα αλληλεπίδρασή του με τον συν-ενεργοποιητή του PGC1α	170
◆ Εικόνα 58: Ο Trp2 μεσολαβεί για την καταστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του T3Rβ και του RXRα από τον TNFα	172
◆ Εικόνα 59: Η Trp2/COT καταστέλλει τη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της apoCII από το ρετινοϊκό οξύ, στοχεύοντας τα μεταγραφικά σύμπλοκα RXRα/RXRα και/ή RXRα/T3Rβ.....	173
◆ Εικόνα 60: Η 5-FU στη κυτταρική σειρά ηπατώματος του ανθρώπου HepG2, ενεργοποιεί το μονοπάτι της ERK, φωσφορυλιώνει τον HNF-4α σε μοτίβα Ser/Thr-Pro και καταστέλλει την έκφραση του γονιδίου της apoCIII.....	175
◆ Εικόνα 61: Η Pin1 καταστέλλει τη μεταγραφική ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου της apoCIII από τον HNF-4α	177
◆ Εικόνα 62: Η ισομεράση Pin1 καταστέλλει τη μεταγραφική ικανότητα του RXRα	179
◆ Εικόνα 63: Επίδραση της ισομεράσης Pin1 στη μεταγραφική ενεργότητα υποκινητών των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών.....	180
◆ Εικόνα 64: Συγκριτικά ιστογράμματα επίδρασης του TNFα στη μεταγραφή των γονιδίων apoCIII, apoAI, apoE και apoCII.....	186
◆ Εικόνα 65: Η έκφραση του γονιδίου της apoCIII στο ήπαρ Trp2 ^{-/-} ποντικού.	189
◆ Εικόνα 66: Μοριακά μονοπάτια που ρυθμίζουν τη μεταγραφική δραστηριότητα του HNF-4α και την έκφραση του γονιδίου της apoCIII κατά τη παρουσία του TNFα.	193
◆ Πίνακας 1: Ταξινόμηση των μεταγραφικών συν-ρυθμιστών.....	32
◆ Πίνακας 2: Υποοικογένειες των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών των θηλαστικών.	38
◆ Πίνακας 3: Τα ζευγάρια των εκκινητών που κατασκευάστηκαν για τις αντιδράσεις RT-PCR και την ανίχνευση της έκφρασης των διαφόρων γονιδίων	111
◆ Πίνακας 4: Τα ζευγάρια των εκκινητών που κατασκευάστηκαν για τις αντιδράσεις PCR που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση τμημάτων DNA που απομονώθηκε κατά τη πειραματική διαδικασία του ChIP	116

Συντμήσεις

AF , activation function	LDL , Low Density Lipoprotein
Amp , Ampicillin	LMP-1 , Latent Membrane Protein 1
AP-1 , Activating Protein 1	MAPK , Mitogen-activated Protein Kinase
ApoAI , apolipoprotein A-I	MEK-1 , MAPK/ERK kinase
ApoAIV , apolipoprotein A-IV	NF-κB , Nuclear Factor- κ B
ApoCII , apolipoprotein CII	NIK , NF- κ B-inducing kinase
ApoCIII , apolipoprotein CIII	NP40 , Nonylphenyl-Polyethylene Glycol
APS , Ammonium persulfate	ONPG , <i>O</i> -Nitrothienyl- β -D-galactopyranoside
ARP-1 , apoA-I Regulatory Protein-1	pERK , Phospho-ERK
BSA , Bovine Serum Albumin	PBS , Phosphate-buffered saline
CBP , CREB (cAMP-response-element binding protein) binding protein	PGC-1 , Peroxisome-proliferator-activated-receptor- γ co-activator-1
C/EBP , CCAAT Enhancer Binding Protein	PMSF , Phenylmethylsulfonyl Fluoride
DBD , DNA-binding domain	PPAR , Peroxisome Proliferator-Activating Receptor
DMEM , Dulbecco's modified Eagle's medium	RXRα , Retinoid X Receptor α
DMSO , Dimethyl Sulfoxide	SAPK , Stress-activated Protein Kinase
DTT , dithiothreitol	SDS , sodium dodecyl sulfate
EAR , erb-A related protein	SDS/PAGE , SDS polyacrylamide gel electrophoresis
EDTA , Ethylene diamine tetra-acetic acid	SMAD , similar to mother against decapentaplegic
EGTA , Ethylene glycol-bis(beta-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetra-acetic acid	SP1 , Specificity Protein 1
ERK , extracellular-signal-regulated kinase	SREBP , Sterol Regulatory Element Binding Protein
FBS , Fetal bovine serum	T3Rβ , Thyroid Hormone Receptor β
GRIP , glucocorticoid receptor interacting protein-1	TAE , Tris acetic EDTA
GST , Glutathion-S-transferase (26 kD)	TAFs , TATA box binding protein-Associated Factors
h , human	TBP , TATA box binding protein
HEK 293T , human embryonic kidney 293T	TE , Tris-HCl, EDTA
HDL , High Density Lipoprotein	TEMED , Tetramethylethylenediamine
HNF-4 , Hepatic Nuclear Factor-4	TES , Tris-HCl, EDTA, NaCl
HRE , Hormone Response Element	TFIIs , Transcription Factors II
HRP , horseradish peroxidase	TGF-β , Transforming Growth Factor- β
hyp , hybrid	TGS , Tris/Glycine/SDS
IDL , Intermediate Density Lipoproteins	TIF2 , Transcriptional intermediary factor 2
IκB-ND , Inhibitor of NF- κ B non-degradable	TNFα , Tumor necrosis factor-1
IKKβ , Inhibitor of NF- κ B kinase β	Tp12 , Tumor progression locus 2
IPDG , Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside	SHP , small heterodimer partner
JNK , Jun N-terminal kinase	SRC3 , Steroid receptor co-activator
LB , Luria Broth	USF , Upstream Stimulator Factor
LBD , ligand binding domain	VLDL , Very Low Density Lipoprotein

Περίληψη

Η παρούσα διδακτορική διατριβή στοχεύει στην διαλεύκανση του ρόλου των σηματοδοτικών μονοπατιών προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών και πυρηνικών υποδοχέων ορμονών στην ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών του ανθρώπου σε ηπατικά κύτταρα. Οι απολιποπρωτεΐνες, μαζί με ένζυμα του πλάσματος, τις πρωτεΐνες μεταφοράς λιπιδίων και τους υποδοχείς των λιποπρωτεϊνών συμμετέχουν στην βιογένεση και τον καταβολισμό των λιποπρωτεϊνών. Θεωρητικά, αλλαγές στη ρύθμιση της έκφρασης οποιασδήποτε απολιποπρωτεΐνης ή άλλης πρωτεΐνης του συστήματος των λιποπρωτεϊνών, μπορεί να επηρεάσει τη συγκέντρωση ή τη λειτουργία συγκεκριμένων ομάδων λιποπρωτεϊνών και σε μερικές περιπτώσεις να συνεισφέρει στη παθογένεση υπερλιπιδαιμίας ή ακόμα και στην ανάπτυξη αθηροσκλήρυνσης.

Στο πρώτο μέρος της εργασίας αυτής μελετήσαμε την επίδραση της προ-φλεγμονώδους κυτταροκίνης TNF α (Tumour Necrosis Factor α) στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της ανθρώπινης απολιποπρωτεΐνης CIII (apoCIII) σε ηπατικά κύτταρα. Αυτό που εντοπίσαμε ήταν η ύπαρξη μίας ανταγωνιστικής δράσης μεταξύ του TNF α και την αντί-φλεγμονώδους κυτταροκίνης TGF β (Transforming Growth Factor β) για τη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της apoCIII. Αποδείξαμε ότι ο TNF α είναι ένας ισχυρός καταστολέας της μεταγραφικής ενεργότητας διαφόρων υποκινητών των απολιποπρωτεϊνών, οι οποίοι φέρουν θέσεις πρόσδεσης για τον HNF-4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α) και ότι για τη καταστολή αυτή απαιτείται η παρουσία του HNF-4 α , ο οποίος είναι και ένας από τους βασικότερους ρυθμιστές της έκφρασης ηπατο-ειδικών γονιδίων στα θηλαστικά. Με τη χρήση συγκεκριμένων αναστολέων των μονοπατιών που επάγονται από τον TNF α , αποδείξαμε ότι η καταστολή του υποκινητή του γονιδίου της apoCIII από τον TNF α , προκαλείται μέσω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF- κ B (nuclear factor κ B). Με τη χρήση της πρωτεΐνης LMP1 (Latent Membrane Protein 1) του ιού Epstein-Barr, που έχει την ικανότητα να ενεργοποιεί τον NF- κ B καθώς και τη χρήση επαγωγέων του NF- κ B μονοπατιού, αποδείξαμε ότι ο NF- κ B είναι, εν μέρει, υπεύθυνος για την ισχυρή καταστολή τόσο της μεταγραφικής ενεργοποίησης του υποκινητή του γονιδίου της apoCIII, όσο και της μεταγραφικής ικανότητας του HNF-4 α . Ο TNF α δεν φαίνεται να έχει κάποια επίδραση στον ενδοκυτταρικό εντοπισμό ή τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HNF-4 α , φαίνεται όμως να επιδρά κατασταλτικά, ως ένα βαθμό, στην ικανότητά του HNF-4 α για πρόσδεση στο στοιχείο HRE (hormone response element) του κοντινού υποκινητή του γονιδίου της apoCIII. Με τη χρήση του συστήματος

μεταγραφικής ενεργοποίησης GAL4 του σακχαρομύκητα, αποδείξαμε ότι ο TNF α καταστέλλει τη μεταγραφική λειτουργία τόσο της AF-1 όσο και της AF-2 (activation functions 1 and 2) περιοχής του HNF-4 α και ότι η καταστολή αυτή μπορεί να ξεπεραστεί με την υπερέκφραση διαφόρων συν-ενεργοποιητών του HNF-4 α μεταξύ των οποίων ο PGC-1 α (peroxisome-proliferator-activated-receptor- γ co-activator 1 α), ο CBP [CREB (cAMP-response-element-binding protein) binding protein] και ο SRC3 (steroid receptor co-activator 3). Τέλος, με τη χρήση *in vitro* τεχνικών αποδείξαμε την ύπαρξη άμεσης φυσικής αλληλεπίδρασης μεταξύ του HNF-4 α και της υπομονάδας p65/Rel A του NF- κ B.

Στο δεύτερο μέρος της εργασίας αυτής μελετήσαμε την επίδραση του TNF α στην ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων απολιποπρωτεϊνών, πυρηνικών υποδοχέων ορμονών και συν-ρυθμιστών, σε ηπατικά κύτταρα ανθρώπου. Με τη χρήση της μεθόδου RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) είδαμε ότι τα πρότυπα έκφρασης πολλών γονιδίων παρουσιάζουν μία πρόιμη και μία όψιμη απόκριση στην παρουσία του TNF α . Αυτό θα μπορούσε να είναι το αποτέλεσμα διαφορετικών μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, που προκαλούνται από τα διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια του TNF α σε ρυθμιστικές πρωτεΐνες οι οποίες ελέγχουν θετικά ή αρνητικά την έκφραση των γονιδίων αυτών. Εξετάζοντας τα πρότυπα έκφρασης δύο πολύ σημαντικών συν-ρυθμιστών των πυρηνικών υποδοχέων, του αναστολέα των πυρηνικών υποδοχέων SHP (Small Heterodimer Partner) και του συν-ενεργοποιητή PGC-1 α , και χρησιμοποιώντας έναν ειδικό αναστολέα της MEK1/2 κινάσης, αποδείξαμε ότι ο TNF α ρυθμίζει την έκφραση των δύο αυτών γονιδίων μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού της MEK1/2 κινάσης.

Στο τρίτο μέρος εξετάσαμε με μεγαλύτερη λεπτομέρεια την επίδραση του TNF α στην ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου του SHP. Αυτό που είδαμε είναι ότι ο TNF α ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου του SHP όχι μόνο μέσω του μονοπατιού της MEK1/2 κινάσης, αλλά και μέσω της ενεργοποίησης του NF- κ B. Και τα δύο αυτά μονοπάτια φαίνεται να παίζουν κατασταλτικό ρόλο στην μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου του SHP. Επιπλέον, προσδιορίσαμε την περιοχή του υποκινητή του γονιδίου του SHP μέσω της οποίας δρα ο NF- κ B και η οποία εντοπίζεται μεταξύ των νουκλεοτιδίων -1383/-865. Τέλος, δείξαμε ότι ο HNF-4 α και ο συν-ενεργοποιητής PGC-1 α , αποτελούν ισχυρούς ενεργοποιητές της έκφρασης του γονιδίου του SHP στα ηπατικά κύτταρα.

Στο τέταρτο μέρος της εργασίας αυτής επικεντρωθήκαμε στον ρόλο της πρωτεΐνης Trp2/Cot, που ανήκει στην οικογένεια των MAP3K και ενεργοποιείται από την παρουσία προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως ο TNF α , στην ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών και στην μεταγραφική ικανότητα των πυρηνικών υποδοχέων, σε ηπατικές κυτταρικές σειρές. Δείξαμε ότι η Trp2 καταστέλλει ισχυρά τη συστατική ενεργότητα του HNF-4 α καθώς και την επαγόμενη από HNF-4 α μεταγραφική ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου της apoCIII στη κυτταρική σειρά ηπατώματος HepG2 του ανθρώπου. Με τη χρήση ειδικών αναστολέων και μεταλλαγμάτων με αρνητικώς επικρατούσα δράση, αποδείξαμε ότι για την καταστολή της ενεργότητας του HNF-4 α από την Trp2 δεν απαιτούνται τα μονοπάτια του NF- κ B ή της MEK1/2 κινάσης. Αποδείξαμε ότι η καταστολή της μεταγραφικής ικανότητας του HNF-4 α από την Trp2 δεν είναι αποτέλεσμα μειωμένης ικανότητας του HNF-4 α για πρόσδεση στο DNA, αλλά μειωμένης ικανότητας για αλληλεπίδραση με τον συν-ενεργοποιητή του, τον PGC-1 α . Η υπερέκφραση μίας αρνητικώς επικρατούσας μορφής της Trp2/Cot καθώς και η παρουσία ενός short-hairpin mRNA της Cot είχαν ως αποτέλεσμα την ισχυρή ενεργοποίηση όλων των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών που αναλύθηκαν στη κυτταρική σειρά HepG2, επιβεβαιώνοντας με τον τρόπο αυτό τη σπουδαιότητα της ενδογενούς Cot στη ρύθμιση διαφόρων γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών στα ηπατικά κύτταρα. Τέλος, δείξαμε ότι η Trp2/Cot είχε την ικανότητα να καταστείλει, την επαγόμενη από συνδέτη, ενεργοποίηση των πυρηνικών υποδοχέων RXR α και T3R β , χρησιμοποιώντας το GAL4-σύστημα, αλλά και μέσω της RXR α /T3R β -εξαρτώμενης μεταγραφικής ενεργοποίησης του υποκινητή της apoCII. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η Trp2/Cot πρέπει να παίζει έναν ευρύτερο ρόλο στην ρύθμιση της μεταγραφικής ικανότητας των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών στα ηπατικά κύτταρα.

Στο πέμπτο μέρος της εργασίας αυτής μελετήσαμε το ρόλο της φωσφορυλίωσης στην ενεργότητα των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών. Παρατηρήσαμε ότι η επώαση της κυτταρικής σειράς HepG2 με το χημειοθεραπευτικό φάρμακο 5-Φθοροουρακίλη (5-Fluorouracil, 5-FU) είχε ως αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση του HNF-4 α σε μοτίβα Ser/Thr-Pro. Η μετα-μεταφραστική αυτή τροποποίηση του HNF-4 α φαίνεται ότι καταστέλλει την μεταγραφική ικανότητα του HNF-4 α καθώς και την μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου της apoCIII. Διερευνήθηκε επίσης ο πιθανός ρόλος της πρόλυλο *cis/trans* ισομεράσης Pin1 στη ρύθμιση της μεταγραφικής ικανότητας των πυρηνικών υποδοχέων HNF-4 α

και RXR α . Και στις δύο περιπτώσεις η παρουσία της Pin1 άσκησε κατασταλτική δράση στην μεταγραφική ικανότητα των φωσφορυλιωμένων σε μοτίβα Ser/Thr-Pro πυρηνικών υποδοχέων. Τέλος, μελετήσαμε την πιθανή ανάμειξη της Pin1 στη ρύθμιση της έκφρασης διαφόρων υποκινητών γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών. Φαίνεται ότι η Pin1 ρυθμίζει με θετικό τρόπο την έκφραση του γονιδίου της apoE, ένα δεδομένο που απαιτεί περαιτέρω εξέταση.

Abstract

The focus of the present work is the elucidation of the role of signal transduction pathways involving pro-inflammatory cytokines and hormone nuclear receptors in the transcriptional regulation of the genes coding for apolipoproteins in human hepatocytes. Apolipoproteins, along with plasma enzymes, lipid transfer proteins and the lipoprotein receptors participate in the biogenesis and catabolism of lipoproteins. In principle, changes in the regulation of synthesis of any apolipoprotein or another protein of the lipoprotein system may affect the concentration or the function of a specific group of lipoproteins, and may in some instances contribute to the pathogenesis of hyperlipidemia or even atherosclerosis.

In the *first part*, we studied the effect of the pro-inflammatory cytokine TNF α (tumour necrosis factor α) on the regulation of apoCIII gene expression in human hepatocytes. We found that there is an antagonistic effect between TNF α and the anti-inflammatory cytokine TGF β (Transforming Growth Factor β) for the regulation of apoCIII gene expression. We showed that TNF α was a strong inhibitor of the activity of apolipoprotein promoters that harbour HNF-4 α (hepatocyte nuclear factor 4) binding sites and this inhibition required HNF-4 α , which is a key regulator of liver-specific gene expression in mammals. Using specific inhibitors of TNF α -induced signalling pathways, it was shown that inhibition of the apoCIII promoter by TNF α involved NF- κ B (nuclear factor κ B). By using LMP1 (Latent membrane protein 1) of the Epstein–Barr virus, which is an established potent activator of NF- κ B as well as wild-type forms of various NF- κ B signalling mediators, we proved that NF- κ B is responsible, at least in part, for the strong inhibition of both apoCIII promoter's activity and HNF-4 α 's transactivation function. We found that TNF α had no effect on the stability or the nuclear localization of HNF-4 α in HepG2 cells, but inhibited, at least in part, the binding properties of HNF-4 α to the proximal apoCIII HRE (hormone response element). By using the yeast-transactivator-GAL4 system, we showed that both AF-1 and AF-2 (activation functions 1 and 2) of HNF-4 α are inhibited by TNF α and that this inhibition was abolished by overexpression of different HNF-4 α co-activators, including PGC-1 α (peroxisome-proliferator-activated-receptor- γ co-activator 1 α), CBP [CREB (cAMP-response-element-binding protein) binding protein] and SRC3 (steroid receptor co-activator 3). By using *in vitro* experimental procedures such as GST-pull downs, we showed that the p65/Rel A subunit of NF- κ B interacts efficiently with HNF-4 α .

In the *second part*, we studied the effect of TNF α on the regulation of gene expression of apolipoproteins, of hormone nuclear receptors and of their co-regulators in human hepatocytes. By using RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) assays, we found that the expression patterns of some of these genes show an early and a late response to TNF α . This could be attributed to different post-translational modifications of regulatory proteins triggered by TNF α 's signaling pathways that could affect the expression of target genes in a positive or negative way. By examining the expression pattern of the nuclear receptor inhibitor SHP (Small Heterodimer Partner) and the co-activator PGC-1 α , which are very critical nuclear receptor co-regulators and by using specific inhibitors of the MEK1/2 kinase, we showed that TNF α regulates SHP and PGC-1 α gene expression through the MEK1/2 signalling pathway.

In the *third part*, we investigated more thoroughly the effect of TNF α on the regulation of SHP gene expression. We found that TNF α regulates SHP gene expression not only by the MEK1/2 pathway, but also by the activation of NF- κ B and that both of these pathways have an inhibitory effect on SHP promoter activity. We also determined a region of the SHP promoter, between nucleotides -1383/-865, that mediates the inhibitory effect of NF- κ B. We also showed that HNF-4 α and its co-activator PGC-1 α are strong activators of SHP gene expression in hepatocytes.

In the *fourth part*, we focused on the role of Tpl2/Cot, a protein that belongs to the MAP3K family and is activated by pro-inflammatory cytokines such as TNF α , in apolipoprotein gene regulation and nuclear receptor activity in hepatic cells. We showed that Tpl2 strongly inhibited the constitutive activity of the HNF-4 α and the HNF-4 α -mediated transactivation of the human apoCIII promoter in human hepatoma HepG2 cells. Using specific inhibitors and dominant negative mutants we showed that the NF- κ B and the MEK1/ERK pathways are not required for the inhibition of HNF-4 α activity by Tpl2. We showed that the inhibition of HNF-4 α activity by Tpl2/Cot is not due to HNF-4 α 's decreased DNA binding efficiency but because of the inability of HNF-4 α to interact with its co-activator PGC-1 α . The expression of a dominant negative mutant of Tpl2 or a short-hairpin mRNA of COT strongly activated all apolipoprotein genes tested in HepG2 cells confirming the important role of endogenous COT in apoC-III and possibly in other apolipoprotein gene regulation in hepatocytes. Finally, we showed that Tpl2/Cot inhibited the inducible activity of the RXR α and of the T3R β hormone nuclear receptors in GAL4-based transactivation

assays as well as the RXR α /T3R β -mediated induction of apoCII gene expression suggesting that Tpl2/Cot has a broader role in hormone nuclear receptor activity in hepatic cells.

In the *fifth part*, we studied the role of phosphorylation in nuclear hormone receptor activity. We found that treatment of HepG2 cells with the chemotherapeutic agent 5-Fluorouracil caused the proline-directed Ser/Thr phosphorylation of HNF-4 α and inhibited its activity as well as the activity of the apoCIII promoter. We also investigated the possible role of prolyl *cis/trans* isomerase Pin1 in the transcriptional activity of the hormone nuclear receptors HNF-4 α and RXR α . In both cases we found that the presence of Pin1 had an inhibitory effect on the transactivation efficiency of phosphorylated (pSer/Thr-Pro) nuclear receptors. Finally, we studied the involvement of Pin1 in the transcriptional regulation of various apolipoprotein promoters and we found that Pin1 seems to control, in a positive way, the expression of the apoE gene, an observation that needs to be investigated further.

Εισαγωγή

A. ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΑ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

1. Παρουσίαση του βασικού υποκινητή και της αλληλουχίας των γεγονότων κατά την έναρξη της μεταγραφής των γονιδίων στα ευκαρυωτικά κύτταρα

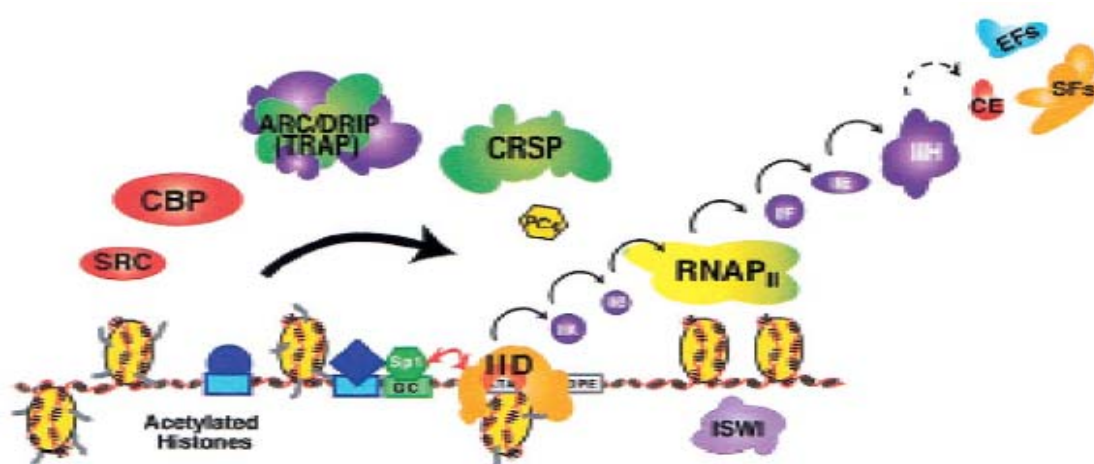
Η φαινοτυπική και λειτουργική ποικιλομορφία των ευκαρυωτικών κυττάρων καθώς και η απόκριση και η προσαρμογή τους στις εναλλασσόμενες συνθήκες του περιβάλλοντος, που απαιτείται για τη σωστή λειτουργία ενός οργανισμού, επιτυγχάνονται μέσω της αυστηρά ελεγχόμενης ρύθμισης της έκφρασης της γενετικής πληροφορίας που φέρουν. Με άλλα λόγια, αναφερόμαστε στη μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων των ευκαρυωτικών κυττάρων. Μπορούμε, λοιπόν, εύκολα να συμπεράνουμε την αναγκαιότητα για διερεύνηση των διαφόρων μηχανισμών, που στοχεύουν στη μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων. Έχοντας, δημιουργήσει αρχικά ένα, κάπως, στατικό μοντέλο έναρξης της μεταγραφής, γνωρίζουμε σήμερα ότι το κρίσιμο βήμα στην έναρξη της μεταγραφής αποτελεί η σύνδεση της RNA πολυμεράσης με τον υποκινητή του μεταγραφόμενου γονιδίου.

Η ανακάλυψη της ύπαρξης τριών RNA πολυμερασών στα ευκαρυωτικά κύτταρα (1) και της ειδίκευσής τους ως προς τη μεταγραφή διαφορετικών ομάδων γονιδίων, αποτέλεσαν σημαντικά γεγονότα που οδήγησαν στη ραγδαία πρόοδο ως προς τη κατανόηση των μηχανισμών της μεταγραφής. Συγκεκριμένα, βρέθηκε πως η RNA πολυμεράση I εμπλέκεται στη μεταγραφή των γονιδίων που κωδικοποιούν για το rRNA (ribosomal RNA), η RNA πολυμεράση II στη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες μέσω σύνθεσης mRNA και τέλος η RNA πολυμεράση III στη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν για 5S RNA και tRNA (transfer RNA) (2).

Παρά το γεγονός, όμως, πως οι RNA πολυμεράσες αποτελούν το αναγκαίο συστατικό της έναρξης της μεταγραφής των γονιδίων, δεν είναι ικανές από μόνες τους να οδηγήσουν *in vitro* την μεταγραφική ενεργοποίηση επιλεγμένων DNA αλληλουχιών (2). Με έρευνες που ακολούθησαν, οδηγηθήκαμε στην απομόνωση και των χαρακτηρισμό των βασικών μεταγραφικών παραγόντων (GTFs, general transcription factors) (3,4) οι οποίοι ήταν απαραίτητοι για την *in vitro* σωστή έναρξη της μεταγραφής, σε βασικά επίπεδα.

Το ερώτημα όμως που παρέμενε ήταν το, ποία είναι η σειρά αυτή των διαδοχικών βημάτων που καθορίζουν το σχηματισμό των προεναρκτήριων

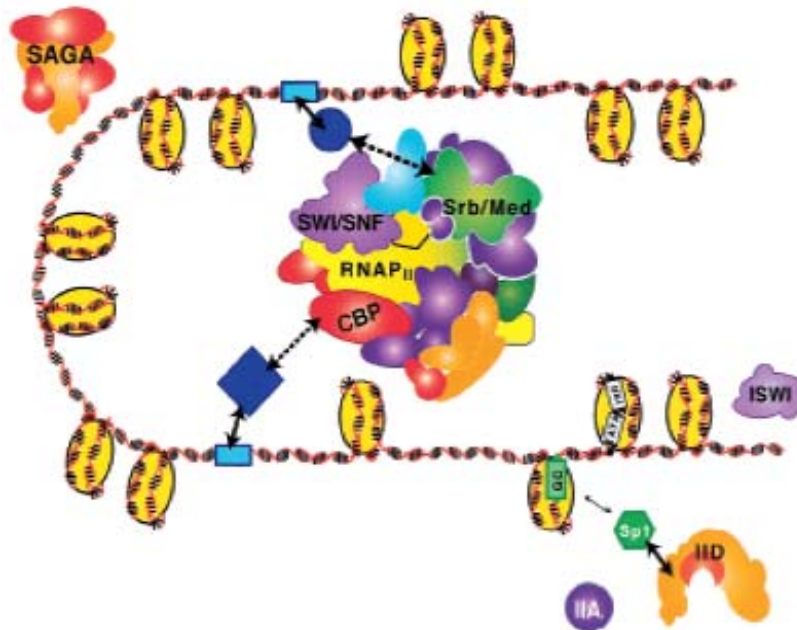
συμπλόκων, τα οποία οδηγούν στη μεταγραφή, από την RNA πολυμεράση II. Μετά από έρευνες πολλών ετών, διατυπώθηκαν δύο αντικρουόμενες θεωρίες, ως προς τον σχηματισμό του προεναρκτήριου συμπλόκου της μεταγραφής. Η μία θεωρία είναι αυτή της «σταδιακής συγκρότησης» των υπομονάδων του συμπλόκου της βασικής μεταγραφικής μηχανής (5). Σύμφωνα με αυτή οι βασικοί μεταγραφικοί παράγοντες TFII (Transcription Factor of RNAPol II) [TFIID/TBP (TATA-Binding Protein), TFIIIB, TFIIIF, TFIIIE, TFIIH], TAF_{II}s (TBP Associated Factors) και η ίδια η RNA πολυμεράση II (βασική μεταγραφική μηχανή) στρατολογούνται σταδιακά στον υποκινητή, βάσει μίας συγκεκριμένης ακολουθίας γεγονότων (Εικ. 1).



Εικόνα 1: Η σταδιακή συγκρότηση των υπομονάδων του συμπλόκου της βασικής μεταγραφικής μηχανής.

Βάσει *in vitro* βιοχημικών μελετών, η έναρξη της μεταγραφής απαιτεί τη σταδιακή στρατολόγηση των διαφόρων βασικών μεταγραφικών παραγόντων, με τη σειρά που παρουσιάζονται στην εικόνα, πάνω στον υποκινητή του μεταγραφόμενου γονιδίου [Lemon & Tjian (2000) *Genes Dev.* 14, 2551-2569].

Η άλλη θεωρία πραγματεύεται την παρουσία, στα ευκαρυωτικά κύτταρα, προκατασκευασμένων προεναρκτήριων συμπλόκων μεταγραφής, μεταξύ της RNA πολυμεράση II και των βασικών μεταγραφικών παραγόντων (ολοένζυμο της RNAPol II) (Εικ. 2). Η θεωρία αυτή προέκυψε από το γεγονός ότι, πολλές φορές, η απομόνωση της RNA πολυμεράση II από κυτταρικά εκχυλίσματα, οδηγούσε στην ταυτόχρονη απομόνωση και άλλων βασικών μεταγραφικών παραγόντων, καθώς και συν-ρυθμιστών, συμπλόκων αναδιοργάνωσης της χρωματίνης, ακόμα και πρωτεϊνών αντιγραφής και διόρθωσης του DNA (6-9).



Εικόνα 2: Στρατολόγηση του ολοενζύμου της RNA πολυμεράσης II.

Το ολοένζυμο της RNA πολυμεράσης II περιλαμβάνει την RNA πολυμεράση II, παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης (SWI/SNF), βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες (TFIs), συνενεργοποιητές (SRB, Med) και παράγοντες επεξεργασίας του RNA. Φαίνεται, όμως, πως το ολοένζυμο δεν συνοδεύουν ο TBP, ο TFIID ή/και TFIIA. Η σύνδεση της RNA πολυμεράσης II με τον TFIID ή τον TFIIA αποτελεί βασικό βήμα της έναρξης της μεταγραφής [Lemon & Tjian (2000) *Genes Dev.* 14, 2551-2569].

Παρόλα αυτά, πιο κοντά στην αλήθεια φαίνεται να είναι μία θεωρία που προκύπτει από τον συγκερασμό των δύο προηγούμενων (10). Με άλλα λόγια, *in vivo* μπορούμε να έχουμε είτε τη σταδιακή στρατολόγηση της βασικής μεταγραφικής μηχανής, είτε τη στρατολόγηση ενός προσχηματισμένου ολοενζύμου πάνω στους υποκινητές των διαφόρων γονιδίων. Ένας από τους βασικότερους λόγους που οδήγησαν σε αυτό το συμπέρασμα ήταν το γεγονός της παρουσίας, σε πολλές περιπτώσεις, ολοενζύμων RNA πολυμεράσης II τα οποία δεν έφεραν κάποιο από τους βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες, όπως π.χ. τον TFIID (11).

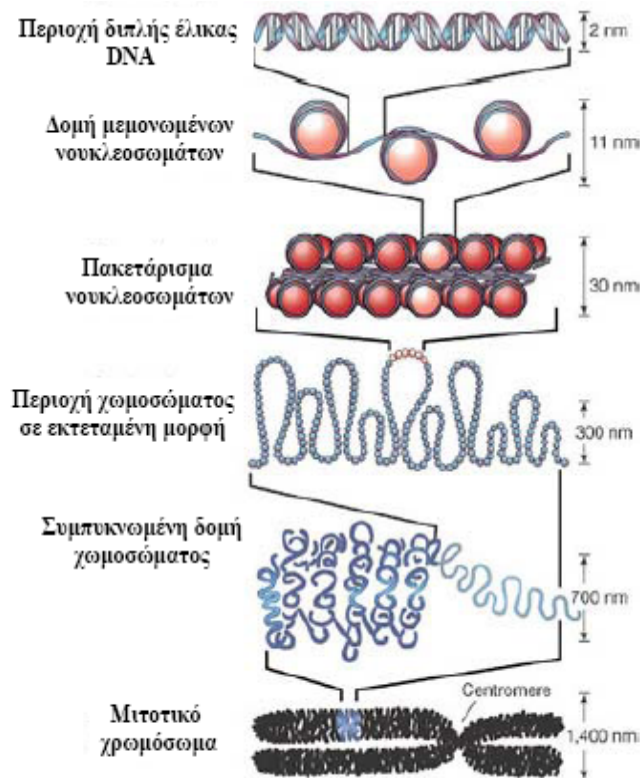
Γίνεται, λοιπόν, εύκολα αντιληπτό, ότι ακόμα και σε αυτό το βασικό επίπεδο μεταγραφικής ρύθμισης, υπάρχουν διάφορα κρίσιμα βήματα που μπορούν να ελέγξουν και να καθορίσουν την έναρξη της μεταγραφής.

2. Χρωματίνη, cis-ρυθμιστικά στοιχεία, πυρηνικός εντοπισμός και μεταγραφική ρύθμιση

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα περιέχουν ένα γενετικό υλικό τεραστίου μεγέθους, πράγμα που έρχεται σε αντίθεση με το γεγονός ότι, ένα πολύ μικρό τμήμα αυτού διατίθεται για τη κωδικοποίηση 6.000 με 100.000 πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες

για τη διαίωση της ζωής, από τη ζύμη ως και τον άνθρωπο. Αυτό συμβαίνει γιατί το γενετικό υλικό των ευκαρυωτικών κυττάρων περιλαμβάνει ένα πολύ μεγάλο αριθμό από *cis*-ρυθμιστικές περιοχές DNA οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη σωστή έκφραση των γονιδίων, στο χώρο και το χρόνο, ως απάντηση στις μεταβολικές απαιτήσεις, στα αναπτυξιακά προγράμματα και μιας πληθώρας άλλων εξωτερικών σημάτων που λαμβάνει το ευκαρυωτικό κύτταρο. Για να μπορέσει να διατηρήσει και να ελέγξει το τεράστιο αυτό γενετικό φορτίο, το ευκαρυωτικό κύτταρο έχει οργανώσει το ευθύγραμμο DNA του σε ευδιάκριτα χρωμοσώματα, καθένα από τα οποία είναι πακεταρισμένο σε μορφή χρωματίνης. Η βασική μονάδα της χρωματίνης ορίζεται ως το νουκλεόσωμα (12). Το νουκλεόσωμα αποτελείται από 146 ζευγάρια βάσεων (bp, base pairs) DNA τα οποία είναι τυλιγμένα γύρω από έναν οκταμερή πυρήνα πρωτεϊνών που ονομάζονται ιστόνες, και είναι η H2A, H2B, H3 και H4. Ο πυρήνας των ιστονών αποτελείται από ένα διμερές για κάθε μία από τις ιστόνες (13). Μεταξύ των νουκλεοσωμάτων υπάρχει ένα γυμνό κομμάτι DNA (linker DNA). Στο τμήμα αυτό απαντάται μία ακόμη ιστόνη, η H1 (Εικ. 3).

Η *in vivo* οργάνωση του DNA σε χρωματίνη, δημιουργεί ρυθμιστικούς περιορισμούς, οι οποίοι έχουν καθοριστικούς ρόλους σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες (14). Έτσι, λόγω χάρη, γνωρίζουμε πως οι αλληλουχίες του DNA, μέσα στη χρωματίνη, παρουσιάζουν ένα μεταβλητό βαθμό προσιτότητας κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, έτσι ώστε να εξυπηρετούν βασικές βιολογικές διαδικασίες, όπως αυτές της αντιγραφής του DNA, της έκφρασης των γονιδίων και της κυτταρικής διαίρεσης. Παρόλα αυτά, για μεγάλο χρονικό διάστημα, η άποψη που επικρατούσε για τη δομή της χρωματίνης, ήταν ότι επρόκειτο για ένα παθητικό πακετάρισμα του DNA το οποίο εξυπηρετούσε μόνο τη διατήρησή του και τη γενική καταστολή της μεταγραφής των διαφόρων γονιδίων (15). Η άποψη αυτή όμως στάθηκε ανίκανη να εξηγήσει το ρόλο της χρωματίνης στην έκφραση των γονιδίων. Από έρευνες που ακολούθησαν, φάνηκε πως η χρωματίνη είναι ένα δυναμικό και ενεργό μέλος της ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων των ευκαρυωτικών κυττάρων.

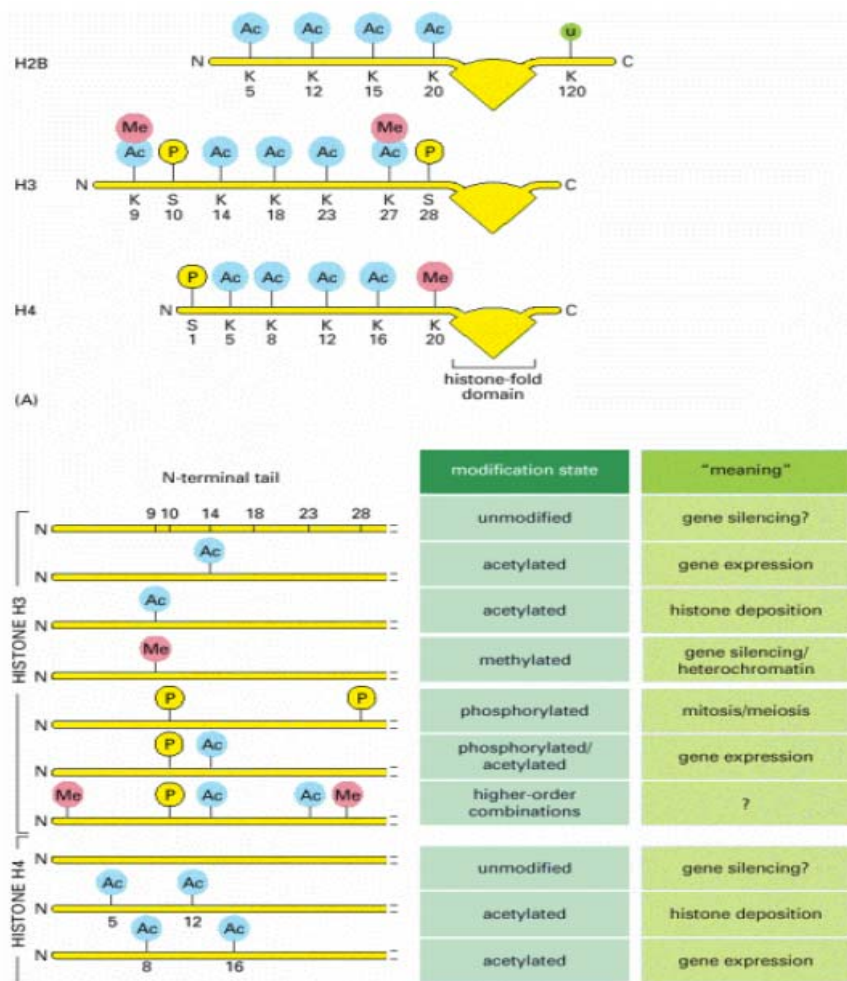


Εικόνα 3: Η δομή των χρωμοσωμάτων.

Στην εικόνα αυτή παρουσιάζονται τα διάφορα επίπεδα πακεταρίσματος του γενομικού υλικού των ευκαρυωτικών κυττάρων, από τη μορφή του χρωμοσώματος, ως τη μορφή των νουκλεοσωμάτων και της διπλής έλικας του DNA [Felsenfeld and Groudine (2003) *Nature*, 421, 448-53].

Η δομή της χρωματίνης, λοιπόν, επηρεάζει την μεταγραφή των γονιδίων σε δύο επίπεδα: οργανώνει τη γενετική πληροφορία στο χώρο, πράγμα που είναι αναγκαίο για τη σωστά συντονισμένη έκφραση των γονιδίων (16), ενώ παράλληλα περιορίζει τη πρόσβαση της μεταγραφικής μηχανής στις αλληλουχίες των υποκινητών (17). Ο δομικός αυτός περιορισμός που επιβάλλει η χρωματίνη στην έκφραση των γονιδίων, ξεπερνάται με τη δράση συμπλόκων πρωτεϊνών που φέρουν τρεις κύριες δράσεις. Πρώτον, την αντιστρεπτή μετα-μεταφραστική τροποποίηση (φωσφορυλίωση, ακετυλίωση, μεθυλίωση, ουμπικουιτυλίωση, σουμοϋλίωση) των αμινοτελικών «ουρών» των ιστονών στα αμινοξικά κατάλοιπα λυσίνης (K), αργινίνης (R), σερίνης (S) και θρεονίνης (T), με αποτέλεσμα τη τροποποίηση της χρωματινικής δομής. Τα ένζυμα που προκαλούν τις τροποποιήσεις αυτές (κινάσες, φωσφατάσες, ακετυλο-τρανσφεράσες ιστονών, απακετυλάσες ιστονών, μεθυλο-τρανσφεράσες ιστονών, λιγάσες ουμπικουιτίνης και σουμοϋλίωσης (SUMO, Small Ubiquitin-related Modifier) αλληλεπιδρούν με μεταγραφικούς παράγοντες που αναγνωρίζουν και προσδέονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες στο DNA (18, 19).

Συγκεκριμένα μοτίβα μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των ιστονών, φαίνεται να σχετίζονται με τα μεταγραφικά ενεργά γονίδια και συγκεκριμένα με τα μεταγραφικά ανενεργά. Το φαινόμενο αυτό ορίζει τον «κώδικα των ιστονών» (20) σύμφωνα με τον οποίο, συγκεκριμένες τροποποιήσεις των ιστονών, που γίνονται από ένα παράγοντα, προκαλούν τη στρατολόγηση των επόμενων μεταγραφικών παραγόντων (Εικ. 4).



Εικόνα 4: Ομοιοπολικές τροποποιήσεις των αμινοτελικών άκρων των ιστονών του πυρήνα των νουκλεοσωμάτων.

Οι πιο μελετημένες τροποποιήσεις των ιστονών του πυρήνα των νουκλεοσωμάτων: Me = μεθυλομάδα, Ac = ακετυλο-μάδα, P = φωσφόρος, U = ουμπικουτίνη. Κάποια αμινοξικά κατάλοιπα μπορούν να υποστούν περισσότερες από μία τροποποιήσεις. Όσον αφορά την θεωρία του «κώδικα των ιστονών», οι αμινοτελικές «ουρές» των ιστονών μπορούν να σημαδευτούν από διάφορους συνδυασμούς μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Οι συνδυασμοί αυτοί φαίνεται να έχουν συγκεκριμένες επιδράσεις στη δομή της χρωματίνης και κατά συνέπεια σε βασικές βιολογικές διαδικασίες, όπως αυτές της αντιγραφής του DNA, της έκφρασης των γονιδίων και της κυτταρικής διαίρεσης. (H=ιστόνες, K=Λυσίνη, S=Σερίνη) [Alberts *et al.*, (2002) *Molecular Biology of the Cell* 4th ed.]

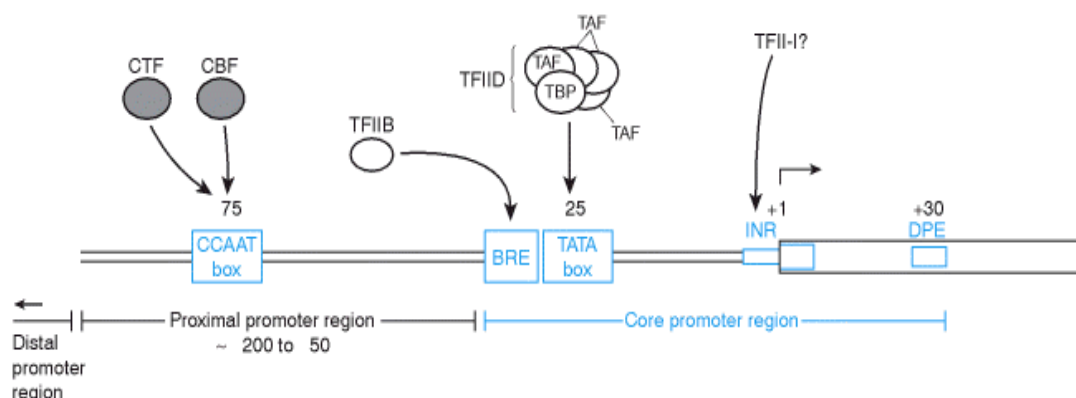
Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της πληροφορίας που φέρει η χρωματίνη, δίνοντας έτσι μία μεγαλύτερη διάσταση στη δυναμικότητα και τη συνδυαστική

ικανότητα που διέπει τη μεταγραφική ρύθμιση των ευκαρυωτικών γονιδίων. Δεύτερον, την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης με τη βοήθεια συμπλόκων αναδιαμόρφωσης, που εξαρτώνται από ATP (21). Τα σύμπλοκα αυτά προσδίδουν μία πλαστικότητα στη χρωματίνη, αφού έχουν την ικανότητα να αναδιευθετούν τα νουκλεοσώματα πάνω στη χρωματίνη. Και τρίτον, την μεθυλίωση του DNA στις περιοχές CpG από DNA μεθυλοτρανσφεράσες. Ο συνδυασμός της ενζυματικής αυτής δράσης με τη παρουσία μεθυλίωσης στις λυσίνες των ιστονών, οδηγεί σε μεταγραφική αποσιώπηση των γονιδίων και επίσης αποτελεί τυπικό χαρακτηριστικό της δομής της ετεροχρωματίνης (22). Τέλος, εκτός από τις ενζυμικές δράσεις που αναφέρθηκαν, σημαντικό ρόλο στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης φαίνεται να παίζουν οι δυναμικές και ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ιστόνης H1 και των άλλων ισομορφών της με πρωτεΐνες της χρωματίνης (23, 24).

Το επόμενο επίπεδο ρύθμισης της μεταγραφής των ευκαρυωτικών γονιδίων από τη RNA πολυμεράση II, όσον αφορά τη δομή του DNA, είναι η ύπαρξη αλληλουχιών που έχουν τη δυνατότητα να αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες. Οι αλληλουχίες αυτές είναι γνωστές ως *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία. Τα ρυθμιστικά αυτά στοιχεία διακρίνονται σε 5 μεγάλες κατηγορίες: τους *υποκινητές*, τους *ενισχυτές*, τους *αποσιωποποιητές*, τους *μονωτές* και τα *στοιχεία απόκρισης* (25).

Οι *υποκινητές* είναι συνδυασμοί μικρών αλληλουχιών που προηγούνται του γονιδίου, πολλές φορές και 200bp από την θέση έναρξης της μεταγραφής, και είναι υπεύθυνοι για την έναρξη της μεταγραφής (**Εικ. 5**). Οι υποκινητές υποδιαιρούνται σε 2 ομάδες στοιχείων: στα στοιχεία που συγκροτούν τον *βασικό υποκινητή*, τα οποία εντοπίζονται πολύ κοντά (-45 με +40) στην θέση έναρξης (+1) της μεταγραφής και στα στοιχεία έξω από το βασικό υποκινητή (-50 με -200). Ο βασικός υποκινητής περιέχει τα στοιχεία πάνω στα οποία προσδένεται η βασική μεταγραφική μηχανή και απουσία άλλων ρυθμιστικών στοιχείων, μπορεί να οδηγήσει σε μία συστατική, αλλά χαμηλού επιπέδου, μεταγραφική ενεργότητα (βασική μεταγραφική ενεργότητα). Οι αλληλουχίες που περιλαμβάνει είναι: 1) η αλληλουχία TATA, γνωστή και ως TATA box, στη θέση ~ -25, η οποία περιβάλλεται από μία περιοχή πλούσια σε GCs και αναγνωρίζεται από την πρωτεΐνη TBP, 2) η αλληλουχία BRE (TFIIB Recognition Element), η οποία βρίσκεται ακριβώς πριν το στοιχείο TATA και αναγνωρίζεται από τον TFIIB, 3) η αλληλουχία Inr (Initiator), η οποία εντοπίζεται στη θέση έναρξης της

μεταγραφής και τέλος 4) η αλληλουχία DPE (Downstream Promoter Element), η οποία εντοπίζεται στη θέση +30 (Εικ. 5) (26).



Εικόνα 5: Αλληλουχίες που απαντώνται στους υποκινητές των ευκαρυωτικών γονιδίων.

Στο διάγραμμα αυτό περιγράφονται οι πιο συντηρημένες αλληλουχίες που συναντώνται στους υποκινητές των ευκαρυωτικών γονιδίων που μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II. Παρόλα αυτά, δεν υπάρχουν πάντα όλα αυτά τα στοιχεία στους υποκινητές των διαφόρων γονιδίων. (BRE, TFIIB recognition element; DPE, downstream promoter element; CTF, CCAAT-binding transcription factor; CBF, CCAAT box-binding factor; TBP, TATA box-binding protein; TAF, TBP-associated factors) [Strachan, T., & Read, A. P. (1999) Human Molecular Genetics 2].

Τα στοιχεία που δεν περιέχονται στον βασικό υποκινητή των γονιδίων περιλαμβάνουν αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από συγκεκριμένους συστατικούς μεταγραφικούς παράγοντες και είναι: 1) τα GC boxes ή Sp1 boxes. Εντοπίζονται, συνήθως, μέσα στις 100bp από την θέση έναρξης της μεταγραφής και προσδένουν τον παράγοντα Sp1, και 2) τα CCATT boxes. Εντοπίζονται στη περιοχή -75 από την θέση έναρξης της μεταγραφής και αναγνωρίζονται από τους παράγοντες CTF (CCAAT-binding Transcription Factor) και CBF (CCAAT box-Binding Factor) οι οποίοι είναι γνωστοί και ως NF-I (Nuclear Factor I) και NF-Y (Nuclear Factor Y), αντίστοιχα.

Οι ενισχυτές είναι θετικά ρυθμιστικά στοιχεία τα οποία ενισχύουν τα επίπεδα της βασικής μεταγραφής των γονιδίων. Σε αντίθεση με τα στοιχεία των υποκινητών, η λειτουργία των στοιχείων των ενισχυτών φαίνεται να είναι ανεξάρτητη του προσανατολισμού τους και, ως ένα βαθμό, της απόστασής τους από το γονίδιο που ρυθμίζουν (27). Μέσα σε μόλις 200-300bp, οι ενισχυτές φέρουν στοιχεία που αναγνωρίζονται τόσο από συστατικούς όσο και από ιστο-ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες προσφέροντας έτσι ένα πρώτο επίπεδο ιστο-ειδικής έκφρασης των διαφόρων γονιδίων.

Οι *αποσιωποποιητές* (*silencers*) δρουν με τέτοιο τρόπο ώστε να μειώνουν τα επίπεδα της μεταγραφής και χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: στους *κλασικούς αποσιωποποιητές*, οι οποίοι δρουν ανεξάρτητα της θέσης τους και καταστέλλουν τη μεταγραφή με έναν ενεργητικό τρόπο και τα *αρνητικά ρυθμιστικά στοιχεία*, τα οποία δρουν με ένα παθητικό τρόπο, εξαρτημένο, όμως, της θέσης τους (28). Οι θέσεις στις οποίες εντοπίζονται οι διάφοροι αποσιωποποιητές ποικίλουν. Από μελέτες σε ανθρώπινα γονίδια, έχουν αναφερθεί αποσιωποποιητές τόσο κοντά στους υποκινητές, όσο και σε μακρινές περιοχές ακόμα και μέσα σε ιντρόνια.

Οι *μονωτές* (*insulators*), από την άλλη, είναι περιοχές του DNA μεγέθους 0,5 - 3kb που έχουν ως λειτουργία να μπλοκάρουν μία επίδραση, είτε θετική (από ενισχυτές), είτε αρνητική (από αποσιωποποιητές, ετεροχρωματίνη) από το να εξαπλωθεί σε μεγάλη έκταση και να επηρεάσει την έκφραση των περιβάλλοντων γονιδίων (29).

Τέλος, τα στοιχεία απόκρισης δρουν με τέτοιο τρόπο ώστε να ρυθμίζουν την μεταγραφή των γονιδίων σύμφωνα με συγκεκριμένα εξωτερικά ερεθίσματα που δέχεται το κύτταρο. Εντοπίζονται, συνήθως, σε περιοχές κοντά στον βασικό υποκινητή (μέσα σε ~1Kb από την θέση έναρξης). Έχει βρεθεί ένα πολύ μεγάλο πλήθος στοιχείων απόκρισης, τα οποία ρυθμίζουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων, ως απόκριση σε σήματα που λαμβάνονται από εξωτερικά (π.χ. ορμόνες), αλλά και εσωτερικά ερεθίσματα (π.χ. κυκλικό AMP).

Κλείνοντας την ενότητα αυτή, δεν θα μπορούσαμε να μην αναφέρουμε το σημαντικό ρόλο που έχει ο πυρήνας των ευκαρυωτικών κυττάρων στη μεταγραφική ρύθμιση. Από έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί γνωρίζουμε σήμερα ότι το πλήθος των μεταγραφικά ενεργών γονιδίων συγκεντρώνεται προς το κέντρο του πυρήνα, ενώ τα μεταγραφικά ανενεργά, προς την περιφέρεια (30, 31). Γνωρίζουμε, επίσης, ότι κάποιες αλληλουχίες της χρωματίνης (πλούσιες σε AT), που είναι γνωστές ως MARS (matrix attachment sites) ή SARs (scaffold attachment sites), έχουν τη δυνατότητα να αλληλεπιδρούν με δομές της μήτρας του πυρήνα (32-34). Οι αλληλουχίες αυτές βρίσκονται σε μεγάλη απόσταση μεταξύ τους και φαίνεται πως η λειτουργία τους είναι να απομονώνουν και να προστατεύουν τις μεταγραφικά ενεργές περιοχές της χρωματίνης από την ετεροχρωματίνη (35 - 38). Ο πυρηνίσκος, επίσης, αποτελεί τη δομή του πυρήνα στην οποία συγκεντρώνονται όλα εκείνα τα στοιχεία (γονίδια, RNA πολυμεράση I, μεταγραφικοί παράγοντες) που είναι απαραίτητα για την έκφραση των ριβοσωμικών RNAs (39, 40). Τέλος, έχει παρατηρηθεί, με πειράματα ανοσοφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας, ότι η μεταγραφική δραστηριότητα

από την RNA πολυμεράση II εντοπίζεται σε διακριτές περιοχές μέσα στον πυρήνα (41, 42)

3. Μεταγραφικοί παράγοντες, συν-ενεργοποιητές και συν-καταστολείς

Ένα κύριο χαρακτηριστικό, βάσει του οποίου διαχωρίζουμε τις διάφορες οικογένειες γονιδίων ή τα διάφορα γονίδια μεταξύ τους, είναι το γεγονός ότι σε κάθε περίπτωση τα γονίδια φέρουν μία ξεχωριστή σειρά από ειδικές αλληλουχίες (*cis*-ρυθμιστικά στοιχεία) τα οποία εντοπίζονται στους υποκινητές και τους ενισχυτές τους. Τα *cis*-ρυθμιστικά αυτά στοιχεία αποτελούν, ουσιαστικά, στοιχεία απόκρισης (RE, Response Elements) σε χρονικά (π.χ. αναπτυξιακά), χωρικά (π.χ. ιστοειδικά) ή περιβαλλοντικά (π.χ. μεταβολικά) ερεθίσματα και διαφέρουν από τα *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία του βασικού υποκινητή. Μερικά παραδείγματα είναι τα HSE (Heat-shock response Elements), τα SRE (Serum Response Elements) και τα HRE (Hormone Response Elements). Τα βασικά τους χαρακτηριστικά είναι ότι α) φέρουν μικρές κοινές αλληλουχίες, β) μπορούν να εντοπιστούν σε διάφορα γονίδια, δεν είναι όμως απαραίτητο οι αλληλουχίες τους να είναι πανομοιότυπες, γ) δεν έχουν συγκεκριμένες θέσεις μέσα στους υποκινητές / ενισχυτές και δ) μερικές φορές μπορούμε να συναντήσουμε πολλαπλά αντίγραφα από ένα ρυθμιστικό στοιχείο πάνω στο υποκινητή (43).

Οι ρυθμιστικές αυτές αλληλουχίες, αναγνωρίζονται από ένα σύνολο πρωτεϊνών που ονομάζονται *ρυθμιστικοί μεταγραφικοί παράγοντες* οι οποίοι, κατά κύριο λόγο, παρουσιάζουν ιστοειδική έκφραση (44, 45). Θεωρητικά, οι ρυθμιστικοί μεταγραφικοί παράγοντες, θα έπρεπε να είχαν την ικανότητα να καθοδηγούν άμεσα τη μεταγραφική μηχανή στον βασικό υποκινητή ενός γονιδίου και να επάγουν τη μεταγραφική του ενεργότητα. Στη πραγματικότητα, όμως, στα ευκαρυωτικά κύτταρα, η σωστά ρυθμισμένη, στο χώρο και στο χρόνο, μεταγραφή των γονιδίων τους, απαιτεί ένα μεγαλύτερο βαθμό ελευθερίας, ο οποίος επιτυγχάνεται με τη παρουσία δύο ομάδων πρωτεϊνών: των συν-ενεργοποιητών και των συν-καταστολέων, ή αλλιώς των συν-ρυθμιστών. Οι συν-ενεργοποιητές και οι συν-καταστολείς, στρατολογούνται στους υποκινητές των γονιδίων μέσω της αλληλεπίδρασης τους με τους ρυθμιστικούς μεταγραφικούς παράγοντες και όπως φανερώνει και η ονομασία τους, μπορούν να ρυθμίζουν θετικά ή αρνητικά τη μεταγραφή ενός συγκεκριμένου υποκινητή. Σήμερα, λοιπόν, γνωρίζουμε ότι ένας ρυθμιστικός μεταγραφικός παράγοντας μπορεί να

αλληλεπιδράσει και να συνεργαστεί με περισσότερους από έναν συν-ρυθμιστές και το αντίθετο (46 – 50).

Οι συν-ρυθμιστές, λοιπόν, διαιρούνται σε 5 κατηγορίες: Τη κατηγορία I αποτελούν οι μεταγραφικοί συν-παράγοντες που έρχονται σε επαφή, άμεσα ή έμμεσα, με τη βασική μεταγραφική μηχανή (π.χ. TAFs). Στη κατηγορία II ανήκουν οι συν-παράγοντες που αφού αλληλεπιδράσουν με τους ρυθμιστικούς μεταγραφικούς παράγοντες, στρατολογούν στους υποκινητές και άλλους θετικούς ή αρνητικούς συν-ρυθμιστές. Στη κατηγορία III ανήκει μία οικογένεια συν-ρυθμιστών που παρουσιάζει μία ιδιαίτερη πολυπλοκότητα. Τα μέλη της φέρουν πολλές υπομονάδες, με διάφορες ενζυμικές λειτουργίες. Κάποια από τα μέλη της οικογένειας φαίνεται να αλληλεπιδρούν με την RNA πολυμεράση II, ενώ κάποια με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες. Οι άλλες δύο κατηγορίες περιλαμβάνουν συν-ρυθμιστές που σχετίζονται με την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, με κάποιους από αυτούς να ανταγωνίζονται και κάποιους να ενισχύουν την κατασταλτική επίδραση που έχει η συμπυκνωμένη δομή της χρωματίνης. Στη κατηγορία IV ανήκουν οι συν-ρυθμιστές που προκαλούν ομοιοπολικές τροποποιήσεις στα νουκλεοσώματα, αλλά και στους μεταγραφικούς παράγοντες (βασικούς και ρυθμιστικούς). Μέλη της κατηγορίας αυτής είναι οι ακετυλο-τρανφεράσες και απακετυλάσες ιστονών. Τέλος, στη κατηγορία V ανήκουν οι συν-ρυθμιστές εκείνοι που σχετίζονται με την εξαρτώμενη από ATP αναδιαμόρφωση της χρωματίνης (10) (Πιν. 1).

Οι ρυθμιστικοί μεταγραφικοί παράγοντες, όπως αναφέραμε και στην αρχή της ενότητας αυτής, είναι υπεύθυνοι για την αναγνώριση των *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της συμπληρωματικότητας μεταξύ της επιφάνειας της πρωτεΐνης και των χαρακτηριστικών που παρουσιάζει η επιφάνεια της διπλής έλικας του DNA στην περιοχή πρόσδεσης. Παρά το ότι οι μεμονωμένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ αμινοξικών καταλοίπων και νουκλεοτιδίων είναι ασθενικής φύσεως (δεσμοί υδρογόνου, ιοντικοί δεσμοί και υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις), η παρουσία ~20 τέτοιων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ρυθμιστικών μεταγραφικών παραγόντων και των *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων τους, εγγυάται την ισχυρή και ειδική αλληλεπίδρασή τους. Οι ρυθμιστικοί μεταγραφικοί παράγοντες των ευκαρυωτικών κυττάρων, φέρουν 2 διαφορετικές λειτουργίες, οι οποίες εντοπίζονται σε διαφορετικές περιοχές (51-53): α) Η *ενεργοποιητική περιοχή* (AD, activation domain), η οποία έχει την ικανότητα να ενεργοποιεί την μεταγραφή των γονιδίων-στόχων τους, μετά τη πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων στο DNA. Αυτό πραγματοποιείται μέσω αλληλεπίδρασης

της AD περιοχής με τους βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες ή/και με άλλους συν-ρυθμιστές, οπότε και επιτυγχάνεται η συγκρότηση της βασικής μεταγραφικής μηχανής πάνω στον υποκινητή. Από τις μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί φαίνεται ότι οι περιοχές αυτές, άλλοτε είναι πλούσιες σε ασπαρτικά και γλουταμικά κατάλοιπα (acidic activation domains) και άλλοτε σε κατάλοιπα προλίνης ή γλουταμίνης (54) ή ακόμα και ισολευκίνης ή βασικών αμινοξέων (55-56). Παρόλα αυτά, δεν έχει βρεθεί κάποια συγκεκριμένη δομή που να αντιστοιχεί στην περιοχή AD των μεταγραφικών παραγόντων. Η υπόθεση, λοιπόν, που επικρατεί είναι πως οι περιοχές αυτές αποκτούν συγκεκριμένη δομή μόνο εφόσον έρθουν σε επαφή με τους στόχους τους (53).

Κατηγορίες	Γενικές ιδιότητες	Παραδείγματα
I	Πρωτεΐνες της βασικής μεταγραφικής μηχανής που αποτελούν στόχο ενεργοποιητών και καταστολέων, αναγνώριση του υποκινητή, ενζυματικές λειτουργίες	TAFs, TFIIA, NC2, PC4
II	Προσαρμογείς ενεργοποιητών και καταστολέων, ρυθμίζουν την πρόσδεση στο DNA, στοχεύουν άλλους συν-ρυθμιστές και την βασική μεταγραφική μηχανή	OCA-B/OBF-1, Groucho, Notch, CtBP, HCF, E1A, VP16
III	Συν-ρυθμιστές με πολλαπλές λειτουργίες που διαφέρουν μεταξύ τους, αλλά παρουσιάζουν πολλές δομικές ομοιότητες: αλληλεπιδρούν με την RNA πολυμεράση II και/ή με διάφορους ενεργοποιητές, φέρουν ενζυμικές ιδιότητες και ικανότητα επιλογής χρωματινικών δομών	Yeast Mediator, SRBs hCRSP, hPC2, hARC/DRIP/TRAP, hNAT, hSMCC, hSrb/Mediator
IV	Προσαρμογείς συν-ρυθμιστών που επιδρούν θετικά ή αρνητικά στη δομή της χρωματίνης, φέρουν ενεργότητες ακετυλοτρασφεράσης ή απακετυλοτρασφεράσης διαφόρων υποστρωμάτων: ιστονών, πρωτεϊνών που σχετίζονται με τις ιστονες, ενεργοποιητών, συν-ρυθμιστών και της βασικής μεταγραφικής μηχανής	CBP/p300, GCN5, P/CAF, p160s (SRC1, TIF2, p/CIP, κ.α.), HDAC-1 και HDAC-2 (rpd3), Sir2
V	Ενεργότητες αναδιαμόρφωσης της δομής των νουκλεοσωμάτων η οποία εξαρτάται από το ATP.	SNF2-ATPase (SWI/SNF, RSC) και ISWI-ATPase (NURF, ACF, ChrAC, RSF, κ.α.)

Πίνακας 1: Ταξινόμηση των μεταγραφικών συν-ρυθμιστών.

Στον πίνακα αυτό παρουσιάζονται μερικοί από τους πιο μελετημένους συν-ρυθμιστικούς παράγοντες, οι πέντε κατηγορίες στις οποίες ανήκουν και οι γενικές τους ιδιότητες [μετάφραση από Lemon & Tjian (2000) *Genes Dev.* 14, 2551-2569].

β) η περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DBD, DNA Binding Domain). Η περιοχή αυτή είναι απαραίτητη για την ειδική πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων τους. Σε αντίθεση με τη περιοχή AD, οι DBD

περιοχές των ρυθμιστικών μεταγραφικών παραγόντων είναι ιδιαίτερα μελετημένες. Ένας μεγάλος αριθμός μοτίβων DBD περιοχών έχει χαρακτηριστεί σε πολλούς διαφορετικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Τα μοτίβα αυτά φέρουν α -έλικες - σε μερικές περιπτώσεις β -πτυχωτά φύλλα - για την αλληλεπίδρασή τους με την μεγάλη αύλακα του DNA. Έτσι, ενώ τα DBD μοτίβα γενικά προσφέρουν τη βάση για την αλληλεπίδραση του μεταγραφικού παράγοντα με το DNA, η αμινοξική τους αλληλουχία είναι αυτή που καθορίζει την εξειδίκευσή τους ως προς την αναγνώριση συγκεκριμένων *cis*-ρυθμιστικών περιοχών. Το πλήθος των ρυθμιστικών μεταγραφικών παραγόντων προσδένονται στο DNA ως ομο- ή ετεροδιμερή με τη DBD περιοχή σε διαφορετική θέση από τη περιοχή που είναι υπεύθυνη για το διμερισμό. Τα πιο καλά χαρακτηρισμένα DBD μοτίβα είναι:

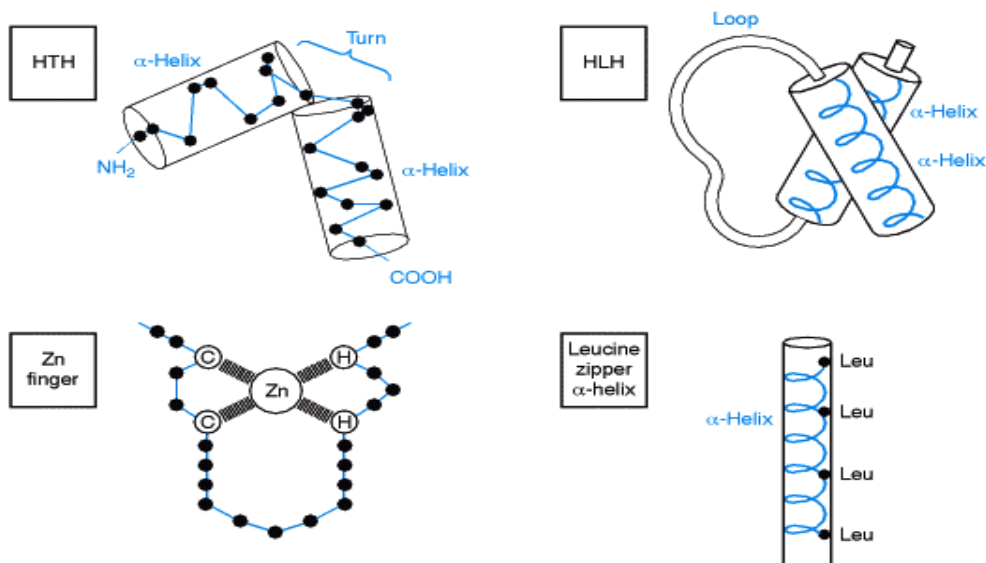
- *Μοτίβο helix-turn-helix (HTH)*: αποτελείται από ~20 αμινοξικά κατάλοιπα και χαρακτηρίζεται από 2 α -έλικες, που έρχονται σε στενή επαφή με το DNA και οι οποίες συνδέονται με μία μικρή στροφή. Η δεύτερη α -έλικα του HTH μοτίβου προσδένεται στη μεγάλη αύλακα του DNA με δεσμούς υδρογόνου και υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις, μέσω συγκεκριμένων πλευρικών αλυσίδων του DBD και εκτεθειμένων βάσεων του DNA (57), ενώ η πρώτη α -έλικα βοηθά στη σταθεροποίηση της δομής του μοτίβου (58). Το HTH μοτίβο χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά στον καταστολέα του λ φάγου (59) και ακολούθησαν και άλλες πρωτεΐνες που έχουν την ικανότητα να προσδένονται στο DNA (57). Ένα παρόμοιο μοτίβο πρόσδεσης σε DNA, είναι και το homeodomain που φέρουν διάφοροι μεταγραφικοί παράγοντες ασπόνδυλων και σπονδυλωτών (60) (**Εικ. 6**).

- *Μοτίβο helix-loop-helix (HLH)*: αποτελείται από 2 αμφιπαθείς α -έλικες οι οποίες παρουσιάζουν μία πλευρά με υδροφοβικά κατάλοιπα και μία πλευρά με θετικά φορτισμένα κατάλοιπα. Το μήκος της περιοχής μεταξύ των ελίκων κυμαίνεται από 12 - 28 αμινοξέα. Το μοτίβο αυτό προάγει τον διμερισμό των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας αριστερόστροφης κλειστής δέσμης 4 α -ελίκων με δύο διασταυρωμένες συνδέσεις. Η βασική περιοχή κοντά στο μοτίβο HLH (bHLH, basic HLH) είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση του διμερούς στο DNA (61) (**Εικ. 6**).

- *Μοτίβο φερμουάρ λευκίνης (Leucine zipper)*: αποτελείται από μία αλληλουχία αμινοξέων στην οποία κάθε επτά αμινοξέα είναι τοποθετημένη μία λευκίνη. Το μοτίβο αυτό δημιουργεί μία α -έλικα που αποτελείται από 8 στροφές. Οι πλευρικές ομάδες της λευκίνης που προεξέχουν από το φερμουάρ λευκίνης της μίας πρωτεΐνης,

αλληλεπιδρούν με τις πλευρικές ομάδες της λευκίνης από το φερμουάρ λευκίνης της άλλης πρωτεΐνης, με σκοπό τη δημιουργία διμερούς. Τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα που εντοπίζονται εκατέρωθεν του μοτίβου αυτού (bZIP, basic-Leucine Zipper) είναι υπεύθυνα για την αλληλεπίδραση του διμερούς με το DNA (62) (**Εικ. 6**).

- *Μοτίβο δάκτυλου ψευδαργύρου (zinc finger)*: αποτελείται από 25 – 30 αμινοξικά κατάλοιπα που συμπεριλαμβάνουν 2 συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης (Cys) και 2 συντηρημένα κατάλοιπα ιστοιδίνης (His), που δημιουργούν το μοτίβο C-2-C-12-H-3-H. Τα 12 αμινοξέα που χωρίζουν τη δεύτερη Cys από τη πρώτη His είναι κυρίως πολικά και βασικά, πράγμα που σημαίνει ότι αυτά είναι υπεύθυνα για την αλληλεπίδραση με το DNA. Το μοτίβο του δακτύλου ψευδαργύρου είναι ένα ασυνήθιστα μικρό μοτίβο, στο οποίο η παρουσία του ψευδάργυρου (Zn^{+2}) παίζει καθοριστικό ρόλο στη τριτοταγή δομή του. Οι 2 Cys και οι 2 His αλληλεπιδρούν με ένα άτομο Zn σε μία τετραεδρική μορφή, δημιουργώντας έτσι, μία δομή παρόμοια με αυτή ενός δάκτυλου (63). Το αμινοτελικό κομμάτι του δακτύλου σχηματίζει μία α -έλικα, ενώ το καρβοξυτελικό, ένα β -πτυχωτό φύλλο. Συνολικά οι α -έλικες αλληλεπιδρούν με περίπου 5 νουκλεοτίδια της μεγάλης αύλακας του DNA. Τέτοιες δομές έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν τόσο με μόρια DNA, όσο και με μόρια RNA, αλλά και με άλλες πρωτεΐνες. Οι διάφορες οικογένειες μοτίβων δακτύλων ψευδαργύρου χαρακτηρίζονται σύμφωνα με τον αριθμό και τη θέση των Cys και His καταλοίπων που αλληλεπιδρούν με τον Zn (64, 65) (**Εικ. 6**).



Εικ. 6: Οι δομές των πιο καλά χαρακτηρισμένων DBD

Στην εικόνα αυτή παρουσιάζονται σχηματικά οι περιοχές των ρυθμιστικών μεταγραφικών παραγόντων που δημιουργούν τις δομές οι οποίες είναι υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση των μεταγραφικών παραγόντων με το DNA και είναι οι: helix-turn-helix (HTH), helix-loop-helix (HLH), δάκτυλος ψευδαργύρου (zinc finger) και φερμουάρ λευκίνης (Leucine zipper) [Strachan, T., & Read, A. P. (1999) Human Molecular Genetics 2].

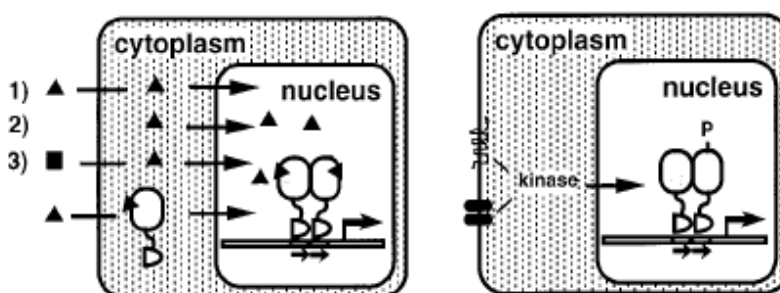
B. ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ

1. Παρουσίαση των μεταγραφικών παραγόντων που ανήκουν στην υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών

Μεταξύ των ρυθμιστικών μεταγραφικών παραγόντων που επάγουν την έκφραση των ευκαρυωτικών γονιδίων υπάρχει μία πάρα πολύ σημαντική υπεροικογένεια, η οποία είναι γνωστή ως πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών (NRs, Nuclear hormone Receptors). Οι πυρηνικοί υποδοχείς παίζουν καθοριστικό ρόλο σε ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών λειτουργιών των ευκαρυωτικών οργανισμών όπως η εμβρυϊκή ανάπτυξη, η κυτταρική διαφοροποίηση, ο μεταβολισμός και η ομοιόστασή τους (66, 67). Η λειτουργικότητα και η μεταγραφική ικανότητα του μεγαλύτερου ποσοστού των πυρηνικών υποδοχών ελέγχεται, κατά κύριο λόγο, μέσω της αλληλεπίδρασής τους με μικρά, λιπόφιλα μόρια, όπως οι στεροειδείς ορμόνες (γλυκοκορτικοειδή, οιστρογόνα, ανδρογόνα, προγεστερόνη) και η θυρεοειδής ορμόνη, η βιταμίνη D και τα ρετινοϊκά οξέα (ενεργές μορφές τη βιταμίνης A) ή ακόμα και με προϊόντα του μεταβολισμού (π.χ. λιπαρά οξέα, λευκοτριένια, προσταγλαδίνες, παράγωγα χοληστερόλης, χολικά οξέα, κ.α.). Σε μερικές

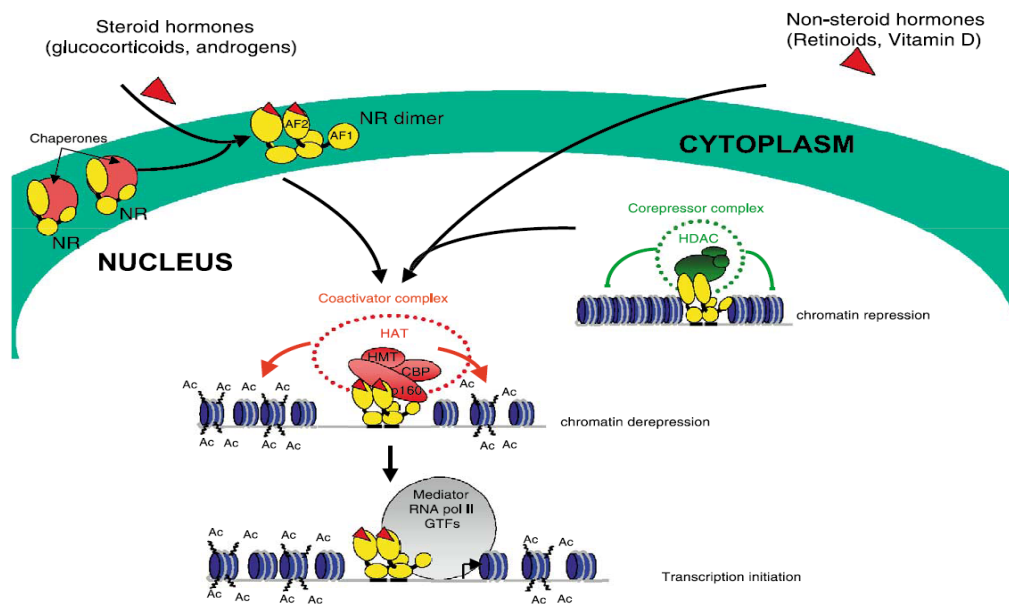
περιπτώσεις πυρηνικών υποδοχέων δεν έχει χαρακτηριστεί, ακόμα, κάποιος συνδέτης (ορφανοί πυρηνικοί υποδοχείς), ενώ σε άλλες φαίνεται πως οι πυρηνικοί υποδοχείς είναι συστατικά ενεργοποιημένοι ή ότι η μεταγραφική τους ικανότητα ελέγχεται αποκλειστικά από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (Εικ. 7) (68).

Η ένωση του συνδέτη στους πυρηνικούς υποδοχείς έχει ως αποτέλεσμα είτε την μετατόπιση του υποδοχέα στον πυρήνα και τη στρατολόγησή του, ως διμερές, στις ειδικές αλληλουχίες DNA –γνωστές και ως HREs (Hormone Response Elements)- του γονιδίου στόχου του, όπως συμβαίνει με τους υποδοχείς των στεροειδών ορμονών (69), είτε την αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης των υποδοχέων που εντοπίζονται στον πυρήνα, με αποτέλεσμα τη στρατολόγηση συν-ενεργοποιητών και των υπολοίπων παραγόντων της βασικής μεταγραφικής μηχανής στον υποκινητή του γονιδίου-στόχου (70-72). Άλλα μέλη της υπεροικογένειας, που έχουν την ικανότητα να προσδένονται στο DNA απουσία του συνδέτη τους [π.χ. ο υποδοχέας της θυρεοειδούς ορμόνης, TR (Thyroid Receptor) και του trans-ρετινοϊκού οξέος, RAR (Retinoic Acid Receptor)] φαίνεται να δρουν κατασταλτικά στην μεταγραφή, στρατολογώντας σύμπλοκα που φέρουν ενζυμικές δράσεις απακετυλίωσης ιστονών μέσω των συν-καταστολέων N-CoR (nuclear receptor corepressor) και SMRT (silencing mediator of retinoid and thyroid receptors), στους υποκινητές των γονιδίων στόχων τους (69, 73, 74) (Εικ. 8).



Εικόνα 7: Γενικοί μηχανισμοί δράσης των πυρηνικών υποδοχέων.

Αριστερά: Ο συνδέτης δημιουργείται με τρεις διαφορετικούς τρόπους: 1) ο συνδέτης/ορμόνη δημιουργείται από ένα ενδοκρινές όργανο και εισέρχεται στο κύτταρο-στόχο, 2) ο συνδέτης δημιουργείται από ένα πρόδρομο μόριο μέσα στο κύτταρο-στόχο και 3) ο συνδέτης μπορεί να είναι ένα μεταβολικό προϊόν που δημιουργείται εντός του κυττάρου-στόχου. Ο υποδοχέας που δεν έχει συνδεθεί με το λιπόφιλο μόριο μπορεί να εντοπίζεται, είτε στον πυρήνα (συνδεδεμένο ή όχι στον υποκινητή του γονιδίου-στόχου), είτε στο κυτταρόπλασμα. *Δεξιά:* Η μεταγραφική ικανότητα, σε κάποιες περιπτώσεις πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων, ρυθμίζεται από μονοπάτια που είναι ανεξάρτητα από την παρουσία συνδέτη. Μερικοί πυρηνικοί υποδοχείς είναι συστατικά ενεργοποιημένοι, ενώ η μεταγραφική ικανότητα άλλων ρυθμίζεται μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων όπως π.χ. φωσφορυλίωσης που επάγεται από σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από ορμόνες ή αυξητικούς παράγοντες [Aranda A. & Pascual A. (2001) *Physiological Rev.* 81, 1269-1304].



Εικόνα 8: Επίδραση στεροειδών και μη-στεροειδών συνδετών στους πυρηνικούς υποδοχείς.

Κατά την απουσία του συνδέτη τους, μερικοί υποδοχείς στεροειδών ορμονών εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα να αλληλεπιδρούν με ένα σύμπλοκο «μοριακών συνοδών» (chaperons) συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών της οικογένειας του θερμικού πλήγματος (HSP, Heat Shock Proteins), Hsp90 και Hsp56. Με τη σύνδεση της στεροειδούς ορμόνης, όμως, οι υποδοχείς αποδεσμεύονται από το σύμπλοκο, δημιουργούν διμερή, μετατοπίζονται στον πυρήνα και τελικά προσδένονται στο *cis*-ρυθμιστικό τους στοιχείο. Με τον τρόπο αυτό σηματοδοτείται ένα σύνολο αλληλεπιδράσεων που οδηγεί στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης στο σημείο έναρξης της μεταγραφής και στη στρατολόγηση της βασικής μεταγραφικής μηχανής στον υποκινητή του γονιδίου στόχου. Αντίθετα, οι πυρηνικοί υποδοχείς μη-ορμονικών συνδετών εντοπίζονται στον πυρήνα. Απουσία του συνδέτη, έχει ως αποτέλεσμα τη στρατολόγηση συμπλόκων που περιέχουν απακετυλάσες ιστονών μέσω της αλληλεπίδρασή των υποδοχέων με τους συν-καταστολείς. Η πρόσδεση του συνδέτη στον υποδοχέα έχει ως αποτέλεσμα την αποσύνδεση των συν-καταστολέων και τη σύνδεσή του με συν-ενεργοποιητές και σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης. Αυτό οδηγεί τελικά στη στρατολόγηση της βασικής μεταγραφικής μηχανής και την μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου στόχου [C. Rochette-Egly (2003) *Cellular Signalling* 15, 355–366]

Οι πυρηνικοί υποδοχείς συγκροτούν, όπως έχουμε ήδη αναφέρει, μία μεγάλη υπεροικογένεια μεταγραφικών παραγόντων και από τις ενδείξεις που υπάρχουν θεωρείται ότι έχουν προκύψει από έναν κοινό πρόγονο. Η εξελικτική ανάλυση (75) των πυρηνικών υποδοχέων, έχει οδηγήσει στην υποδιαίρεση τους σε επτά διαφορετικές υποοικογένειες (Πιν. 2). Η πιο πρόσφατα δημιουργημένη υποοικογένεια φαίνεται να είναι αυτή των στεροειδών υποδοχέων, μιας και είναι η μόνη για την οποία δεν έχουν βρεθεί κάποια ομόλογα γονίδια στα αρθρόποδα.

	Receptor	Subtype	Denomination	Ligand	Response Element	Monomer, Homodimer, or Heterodimer
Class I	TR	α, β	Thyroid hormone receptor	Thyroid hormone (T_3)	Pal, DR-4, IP	H
	RAR	α, β, γ	Retinoic acid receptor	Retinoic acid	DR-2, DR-5 Pal, IP	H
	VDR		Vitamin D receptor	1-25(OH) $_2$ vitamin D $_3$	DR-3, IP-9	H
	PPAR	α, β, γ	Peroxisome proliferator activated receptor	Benzotriene B4; Wy 14.643 Eicosanoids; thiazolidinediones (TZDs); 15-deoxy-12,41-prostaglandin J $_2$; polyunsaturated fatty acids	DR-1	H
	PXR		Pregnane X receptor	Pregnanes; C21 steroids	DR-3	H
	CAR/MB67	α, β	Constitutive androstane receptor	Androstanes; 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene	DR-5	H
	LXR	α, β	Liver X receptor	Oxysterols	DR-4	H
	FXR		Farnesoid X receptor	Bile acids	DR-4, IR-1	H
	RevErb	α, β	Reverse ErbA	Unknown	DR-2, Hemisite	M, D
	RZR/ROR	α, β, γ	Retinoid Z receptor/retinoic acid-related orphan receptor	Unknown	Hemisite	M
Class II	UR		Ubiquitous receptor	Unknown	DR-4	H
	RXR	α, β, γ	Retinoid X receptor	9- <i>Cis</i> -retinoic acid	Pal, DR-1	D
	COUP-TF	α, β, γ	Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor	Unknown	Pal, DR-5	D, H
	HNF-4	α, β, γ	Hepatocyte nuclear factor 4	Fatty acyl-CoA thioesters	DR-1, DR-2	D
Class III	TLX		Tailles-related receptor	Unknown	DR-1, Hemisite	M, D
	PNR		Photoreceptor-specific nuclear receptor	Unknown	DR-1, Hemisite	M, D
	TR2	α, β	Testis receptor	Unknown	DR-1 to DR5	D, H
Class IV	GR		Glucocorticoid receptor	Glucocorticoids	Pal	D
	AR		Androgen receptor	Androgens	Pal	D
	PR		Progesterone receptor	Progestins	Pal	D
	ER	α, β	Estrogen receptor	Estradiol	Pal	D
Class V	ERR	α, β, γ	Estrogen-related receptor	Unknown	Pal, Hemisite	M, D
	NGFLB	α, β, γ	NGF-induced clone B	Unknown	Pal, DR-5	M, D, H
Class VI	SF-1/FTZ-F1	α, β	Steroidogenic factor 1	Oxysterols	Hemisite	M
	Fushi Tarazu factor 1		Fushi Tarazu factor 1	Unknown		
Class 0	GCNF		Germ cell nuclear factor	Unknown	DR-0	D
	SHP		Small heterodimeric partner	Unknown		H
	DAX-1		Dosage-sensitive sex reversal	Unknown		

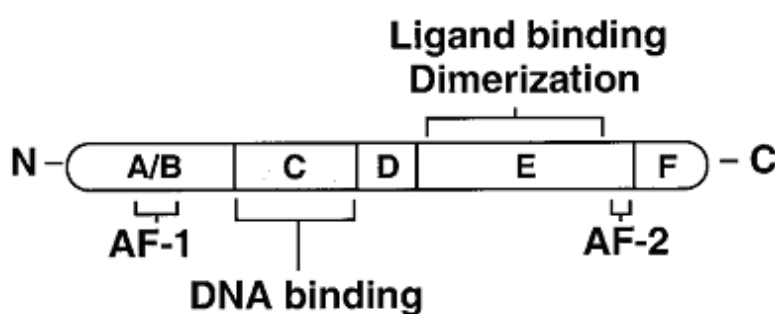
Πίνακας 2: Υποοικογένειες των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών των θηλαστικών

Στον πίνακα αυτό παρουσιάζονται οι 7 υποοικογένειες των πυρηνικών υποδοχέων, τα σημαντικότερα μέλη τους, οι συνδέτες τους, τα *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία τους και ο τρόπος με τον οποίο προσδένονται πάνω σε αυτά. (M=μονομερή, D=ομοδιμερή, H=εταυροδιμερή, DR=direct repeats (ευθείες επαναλήψεις), Pal=palindromes (παλίνδρομα), IP=Inverted palindromes (ανεστραμμένα παλίνδρομα) [Aranda A. & Pascual A. (2001) *Physiological Rev.* 81, 1269-1304].

2. Βασικές δομές και λειτουργίες των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών

Οι πυρηνικοί υποδοχείς παρουσιάζουν ένα χαρακτηριστικό δομικό πρότυπο, το οποίο αποτελείται από 6 δομικά και λειτουργικά διακριτές περιοχές (domains) (Εικ. 9). Όπως όλοι οι μεταγραφικοί παράγοντες, έτσι και οι πυρηνικοί υποδοχείς αποτελούνται από περιοχές με διακριτές και εξειδικευμένες λειτουργίες. Ένας τυπικός πυρηνικός υποδοχέας αποτελείται από μία μεταβλητή NH $_2$ -τελική περιοχή (A/B), μία συντηρημένη περιοχή αλληλεπίδρασης με το DNA (DBD) ή αλλιώς περιοχή C, μία περιοχή άρθρωσης D και μία συντηρημένη E περιοχή η οποία περιλαμβάνει την περιοχή πρόσδεσης των λιπόφιλων συνδετών (LBD, ligand binding domain). Κάποιοι υποδοχείς φέρουν μία επιπλέον COOH-τελική F περιοχή, της οποίας όμως η λειτουργία δεν είναι πολύ καλά χαρακτηρισμένη. Οι υποδοχείς φέρουν, επίσης, περιοχές οι οποίες είναι υπεύθυνες για την μεταγραφική ικανότητά τους. Η ιδιαίτερα μεταβλητή περιοχή A/B πολλών υποδοχέων περιέχει μία αυτόνομη ενεργοποιητική λειτουργία, η οποία είναι γνωστή ως AF-1 (Activation Function-1)

και συμβάλει στην συστατική και ανεξάρτητη από συνδέτη μεταγραφική ικανότητα των υποδοχέων. Μία δεύτερη ενεργοποιητική λειτουργία, που ορίζεται ως AF-2 (Activation Function-2) εντοπίζεται στο COOH-άκρο του LBD. Σε αντίθεση όμως με την AF-1, η AF-2 είναι μία ιδιαίτερα συντηρημένη περιοχή ανάμεσα στα μέλη των πυρηνικών υποδοχέων και η ενεργότητά της εξαρτάται άμεσα από την πρόσδεση του συνδέτη στον υποδοχέα.



Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση των περιοχών των πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων.

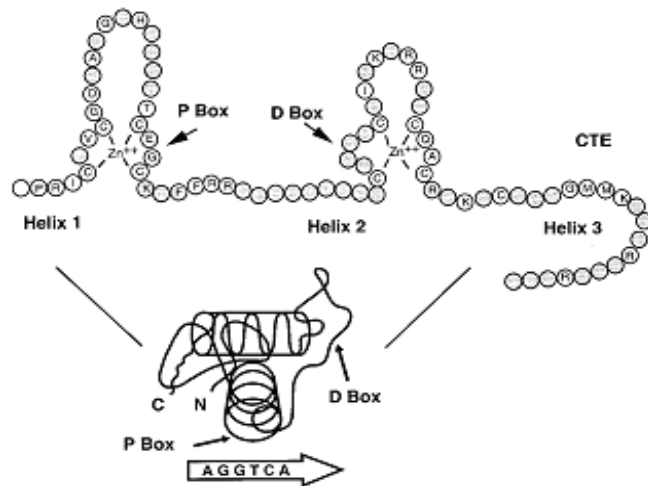
Ένας τυπικός πυρηνικός υποδοχέας αποτελείται από διάφορες λειτουργικές περιοχές. Η μεταβλητή NH₂-τελική περιοχή (A/B) περιλαμβάνει την ανεξάρτητη από συνδέτη ενεργοποιητική περιοχή AF-1. Η συντηρημένη περιοχή αλληλεπίδρασης με το DNA (DBD) ή αλλιώς περιοχή C, είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση των ειδικών *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων. Η μεταβλητή περιοχή άρθρωσης (hinge) D συνδέει την DBD περιοχή με την συντηρημένη E/F περιοχή, η οποία περιλαμβάνει την περιοχή πρόσδεσης των λιπόφιλων συνδετών (LBD, ligand binding domain) και τη επιφάνεια διμερισμού. Στο COOH-άκρο του LBD εντοπίζεται η εξαρτημένη από συνδέτη ενεργοποιητική περιοχή AF-2 των υποδοχέων [Aranda A. & Pascual A. (2001) *Physiological Rev.* 81, 1269-1304].

Πιο αναλυτικά, λοιπόν, έχουμε:

- **Περιοχή A/B:** Η NH₂-τελική περιοχή A/B είναι ιδιαίτερα μεταβλητή σε αλληλουχία και σε μήκος. Περιλαμβάνει, όπως έχουμε αναφέρει, την ενεργοποιητική λειτουργία AF-1 η οποία συμβάλει στη συστατική και ανεξάρτητη από συνδέτη μεταγραφική ικανότητα των υποδοχέων (76). Οι πολλαπλές ισομορφές που παρουσιάζουν διάφοροι πυρηνικοί υποδοχείς προέρχονται, κατά κύριο λόγο, από ένα γονίδιο και είναι αποτέλεσμα είτε εναλλακτικού ματίσματος, είτε χρήσης διαφορετικών υποκινητών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία διαφορετικών A/B περιοχών για κάθε ισομορφή. Οι ισομορφές των πυρηνικών υποδοχέων με τις διαφορετικές A/B περιοχές φαίνεται να έχουν συγκεκριμένες προτιμήσεις ως προς το ποιον υποκινητή θα ενεργοποιήσουν και σε ποιο κυτταρικό τύπο. Αυτό ενδεχομένως να είναι το αποτέλεσμα της ικανότητας των διαφόρων A/B περιοχών να αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένους, κυτταρο-ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες (68). Από την άλλη, γνωρίζουμε πως η A/B περιοχή των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών αποτελεί στόχο φωσφορυλίωσης πολλών διαφορετικών σηματοδοτικών

μονοπατιών (π.χ. μέσω κινασών εξαρτώμενων από κυκλίνες ή κινασών του στρες), με αποτέλεσμα την τροποποίηση της μεταγραφικής τους ικανότητας (77, 78).

- *Η περιοχή C - πρόσδεσης στο DNA (DBD):* Η DBD είναι η πιο συντηρημένη περιοχή μεταξύ των πυρηνικών υποδοχέων και είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση και τη πρόσδεση των υποδοχέων πάνω σε συγκεκριμένα *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία (**Εικ. 10**). Η DBD περιοχή φέρει 9 κυστεΐνες, αλλά και άλλα συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα, τα οποία απαιτούνται για την αλληλεπίδραση υψηλής συνάφειας με το DNA. Η περιοχή περιλαμβάνει 2 δακτύλους ψευδαργύρου, που εκτείνονται μεταξύ ~60-70 αμινοξέων και μία C-τελική προέκταση (CTE, COOH-terminal extension), που φέρει τις δομές T και A boxes. Σε κάθε δάκτυλο ψευδαργύρου, 4 από τα αμετάβλητα κατάλοιπα κυστεϊνών αλληλεπιδρούν, σε μία τετραεδρική δομή, με ένα ιόν ψευδαργύρου. Μελέτες πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και κρυσταλλογραφίας (79, 80) έχουν δείξει ότι οι 2 δάκτυλοι ψευδαργύρου αναδιπλώνονται για να δημιουργήσουν μία συμπαγή τεταρτοταγή δομή που αποτελεί τον πυρήνα της DBD περιοχής. Τα αμινοξέα που είναι υπεύθυνα για την αναγνώριση του σωστού *cis*-ρυθμιστικού στοιχείου εντοπίζονται σε μία δομή που ονομάζεται P box, ενώ τα αμινοξέα της δομής D box είναι υπεύθυνα για τη σωστή τεταρτοταγή δομή του πυρήνα της DBD περιοχής. Ο πυρήνας της DBD περιοχής αποτελείται από 2 α -έλικες. Η πρώτη προσδένεται στη μεγάλη αύλακα του DNA μέσω αλληλεπιδράσεων με συγκεκριμένες βάσεις νουκλεοτιδίων και η δεύτερη δημιουργεί ορθή γωνία με τη πρώτη έλικα. Στη περιοχή CTE φαίνεται πως έχουμε τη δημιουργία και μίας τρίτης α -έλικας (81).



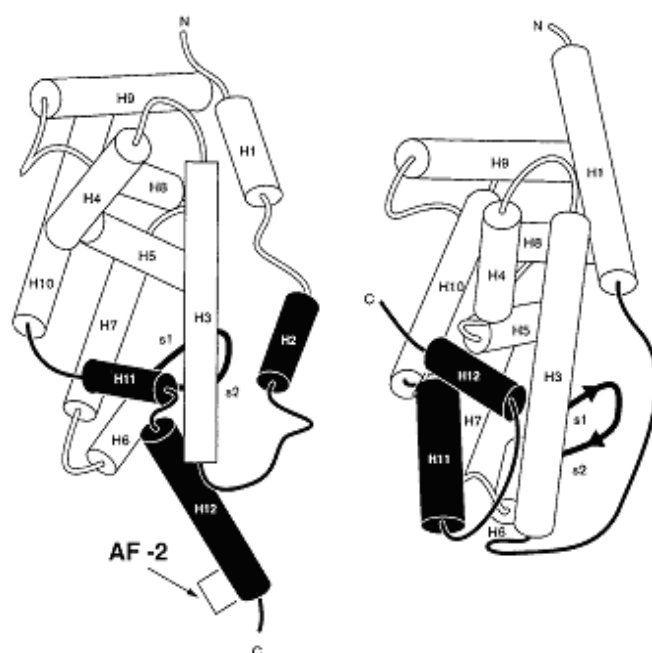
Εικόνα 10: Η περιοχή πρόσδεσης στο DNA των πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων.

Ένα διάγραμμα των 2 δακτύλων ψευδαργύρου και της C-τελικής ουράς του (CTE = COOH-terminal extension). Στους δακτύλους ψευδαργύρου 4 συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης συγκρατούν ένα ιόν ψευδαργύρου. Επίσης εμφανίζονται (με τα αντίστοιχα γράμματά τους) και άλλα συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα που εντοπίζονται στη περιοχή αυτή. Στην έλικα 1, τα αμινοξικά κατάλοιπα που εντοπίζονται στη δομή P box, είναι υπεύθυνα για την αναγνώριση του σωστού *cis*-ρυθμιστικού στοιχείου, ενώ τα αμινοξικά κατάλοιπα της δομής D box, του δεύτερου δάκτυλου ψευδαργύρου, είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία μιας επιφάνειας επαφής για τις 2 έλικες της δομής. Η CTE περιοχή περιέχει τις δομές T και A boxes, οι οποίες είναι πολύ σημαντικές για τη μονομερή πρόσδεση του υποδοχέα στο DNA. Η τεταρτοταγής δομή που συγκροτείται από αυτή την αλληλουχία αποτελεί τον πυρήνα της DBD περιοχής, ο οποίος αναγνωρίζει τη μισή αλληλουχία του *cis*-ρυθμιστικού στοιχείου [Aranda A. & Pascual A. (2001) *Physiological Rev.* 81, 1269-1304].

- *Περιοχή D – άρθρωσης (hinge region):* Η περιοχή D δεν είναι συντηρημένη ανάμεσα στους διάφορους υποδοχείς. Λειτουργεί σαν άρθρωση μεταξύ της DBD περιοχής και της περιοχής πρόσδεσης του συνδέτη, επιτρέποντας, έτσι, την περιστροφή της DBD περιοχής. Πολλές φορές στη περιοχή αυτή εντοπίζονται σήματα πυρηνικού εντοπισμού και αλληλουχίες που πιθανόν να χρησιμεύουν για την αλληλεπίδραση με συν-καταστολείς (73, 74, 82)

- *Περιοχή E – πρόσδεσης του συνδέτη (LBD, Ligand binding domain):* Η περιοχή E φέρει πολλαπλές λειτουργίες. Έκτος από την πρόσδεση του συνδέτη, εξυπηρετεί τον ομο- και ετερο-διμερισμό των πυρηνικών υποδοχέων, την αλληλεπίδρασή τους με τις πρωτεΐνες του θερμικού σοκ, την εξαρτημένη από συνδέτη μεταγραφική ικανότητα και, σε μερικές περιπτώσεις, την αντιστρεπτή από συνδέτη μεταγραφική καταστολή. Η περιοχή αυτή φέρει 2 καλά διατηρημένα μοτίβα: το «μοτίβο υπογραφής» ή αλλιώς T_i και στο C-άκρο, το μοτίβο της εξαρτημένης από το συνδέτη μεταγραφικής ενεργότητας AF-2 (83). Με τον χαρακτηρισμό των κρυσταλλικών δομών της περιοχής E διαφόρων πυρηνικών υποδοχέων, οδηγηθήκαμε στη διαπίστωση πως η συνολική διαμόρφωση της περιοχής αυτής είναι ιδιαίτερα όμοια μεταξύ τους και άρα ότι υπάρχει ένα κοινό πρότυπο δομής για την περιοχή

πρόσδεσης του συνδέτη, που ακολουθείται από όλους τους πυρηνικούς ορμονικούς υποδοχείς. (Εικ. 11) (71).



Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση της περιοχής πρόσδεσης του συνδέτη LBD (Ligand Binding Domain).

Αριστερά: Σχηματική αναπαράσταση της κρυσταλλικής δομής του LBD του RXR α πριν τη πρόσδεση του συνδέτη του 9-*cis* ρετινοϊκού οξέος.

Δεξιά: Σχηματική αναπαράσταση της κρυσταλλικής δομής του LBD του RXR α μετά τη πρόσδεση του συνδέτη του.

Οι κύλινδροι αναπαριστούν της α -έλικες, οι οποίοι είναι αριθμημένοι από το 1 ως το 12. Μία από τις κυριότερες διαφορές των δύο δομών είναι η αλλαγή θέσης της α -έλικας 12 μετά την πρόσδεση του συνδέτη. Η έλικα αυτή φέρει και τη λειτουργική περιοχή AF-2 [Wurtz et al. (1996) *Nat Struct Biol* 3, 87–94].

Η LBD περιοχή σχηματίζεται από 12 συντηρημένες α -έλικες (H1 ως H12). Μία συντηρημένη β -στροφή εντοπίζεται μεταξύ των H5 και H6. Η LBD περιοχή αναδιπλώνεται δημιουργώντας τρία στρώματα από αντιπαράλληλα τοποθετημένες α -έλικες. Το κεντρικό στρώμα, που αποτελείται από 3 έλικες, είναι πακεταρισμένο ανάμεσα σε άλλα δύο στρώματα, με αποτέλεσμα να δημιουργείται μία υδροφοβική κοιλότητα, η «τσέπη» πρόσδεσης του συνδέτη. Το μέγεθος της «τσέπης» διαφέρει μεταξύ των πυρηνικών υποδοχέων. Κρυσταλλογραφικές μελέτες των LBD περιοχών των υποδοχέων ρετινοειδών, έδειξαν ότι η περιοχή πρόσδεσης του συνδέτη υφίσταται δραματική αλλαγή στη διαμόρφωσή της κατά τη πρόσδεση του συνδέτη. Η αλλαγή της LBD περιοχής είναι τέτοια ώστε να εγκλωβίζει τον συνδέτη στην «τσέπη» πρόσδεσης. Το φαινόμενο αυτό χαρακτηρίστηκε ως «μοντέλο ποντικοπαγίδας» (83). Η έλικα που κλείνει την κοιλότητα της «τσέπης», είναι η έλικα 12. Έτσι παράλληλα

με τη παγίδευση του συνδέτη, εκτίθεται προς την εξωτερική επιφάνεια του υποδοχέα, το καλά συντηρημένο μοτίβο αμινοξέων $\phi\phi XE\phi\phi$ (όπου ϕ = υδρόφοβο αμινοξύ, X = οποιοδήποτε αμινοξύ, E = γλουταμικό οξύ) το οποίο εντοπίζεται στην έλικα 12 (70, 84). Το μοτίβο αυτό αποτελεί την επιφάνεια αλληλεπίδρασης με τους συν-ενεργοποιητές, η οποία είναι απαραίτητη για την ενίσχυση της μεταγραφικής ικανότητας των πυρηνικών υποδοχέων (85).

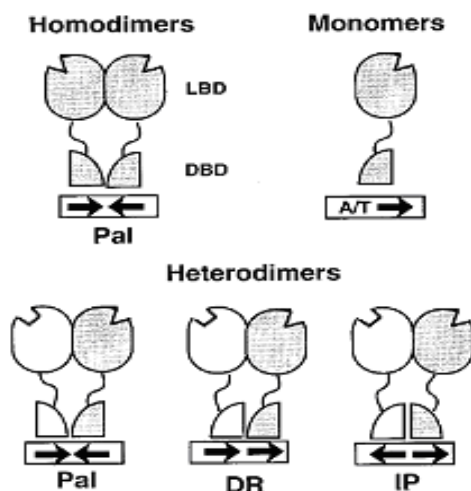
- *Περιοχή F*: Μερικά από τα μέλη των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών διαθέτουν και μία επιπλέον περιοχή στο C-άκρο τους, της οποίας η λειτουργία δεν είναι πλήρως χαρακτηρισμένη. Σε μερικές περιπτώσεις, ωστόσο φαίνεται να ασκεί κατασταλτική δράση στη μεταγραφική ικανότητα των υποδοχέων που τη φέρουν (86).

3. Στοιχεία απόκρισης στις ορμόνες – HREs (Hormone Response Elements)

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει, οι πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών ρυθμίζουν τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων τους με το να αναγνωρίζουν και να προσδένονται πάνω σε ειδικές αλληλουχίες DNA που φέρουν οι υποκινητές των γονιδίων αυτών, οι οποίες είναι γνωστές ως HREs (Hormone Response Elements). Πολύ συχνά θα συναντήσουμε HREs και στις περιοχές των ενισχυτών των γονιδίων-στόχων, πολλές χιλιάδες βάσεις μακριά από το σημείο έναρξης της μεταγραφής. Αναλύσεις φυσικών, αλλά και συνθετικών HREs, έδειξαν ότι μία αλληλουχία 6 βάσεων (εξανουκλεοτίδιο) συγκροτεί τον πυρήνα του μοτίβου που αναγνωρίζεται από την DBD περιοχή των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών. Δύο φαίνεται να είναι τα κύρια μοτίβα αναγνώρισης: η αλληλουχία AGAACA η οποία αναγνωρίζεται κυρίως από του υποδοχείς στεροειδών ορμονών (87) και η αλληλουχία AGG/TTCA η οποία αναγνωρίζεται από όλα τα υπόλοιπα μέλη της υπεροικογένειας (88, 89). Παρόλα αυτά, τα HREs που απαντώνται στη φύση μπορεί να παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές από τις αλληλουχίες που μόλις περιγράφηκαν.

Αν και μερικοί πυρηνικοί υποδοχείς δρουν ως μονομερή έχοντας την ικανότητα να προσδένονται πάνω σε ένα εξανουκλεοτίδιο, οι περισσότεροι υποδοχείς προσδένονται ως ομο- ή ετερο-διμερή πάνω σε HREs που αποτελούνται από 2 εξανουκλεοτίδια. Τα δύο εξανουκλεοτίδια μπορεί να είναι παλίνδρομα (Pal, Palindrome), ανεστραμμένα παλίνδρομα (IP, Inverted Palindromes) ή ευθείες επαναλήψεις (DR, Direct Repeats). Σε αντίθεση με τους υποδοχείς των στεροειδών ορμονών, οι οποίοι αναγνωρίζουν, σχεδόν εξολοκλήρου, παλίνδρομα HREs, οι

υπόλοιποι υποδοχείς μπορούν να προσδεθούν σε HREs διαφόρων διατάξεων (Εικ. 12).



Εικόνα 12: Πρόσδεση των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών στα HREs (Hormone Response Elements).

Οι πυρηνικοί υποδοχείς προσδέονται στο DNA ως μονομερή, ομο- ή ετερο-διμερή. Ο διμερισμός επιτυγχάνεται μέσω μίας επιφάνειας υδρόφοβων αμινοξέων που εντοπίζεται στην περιοχή E των υποδοχέων, ενώ η συνεργατική πρόσδεση των διμερών στο DNA γίνεται μέσω μίας κοινής επιφάνειας που σχηματίζεται μεταξύ των δύο DBD περιοχών. Οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών προσδέονται ως ομοδιμερή σε παλίνδρομα (Pal) HREs, που χωρίζονται από τρία νουκλεοτίδια. Η μονομερής πρόσδεση απαιτεί ένα εξανουκλεοτίδιο, το οποίο έπεται μίας αλληλουχίας πλούσιας σε A/T. Τα ετεροδιμερή μπορούν να αναγνωρίσουν HREs στα οποία τα εξανουκλεοτίδια είναι παλίνδρομα (Pal), ευθείες επαναλήψεις (DRs) ή ανεστραμμένες επαναλήψεις (IPs) [Aranda A. & Pascual A. (2001) *Physiological Rev.* 81, 1269-1304].

Σε αυτή τη περίπτωση η διάταξη αλλά και η απόσταση μεταξύ των εξανουκλεοτιδίων των HREs προσφέρουν μεγάλη ακρίβεια ως προς το είδος των ομο- ή ετερο-διμερών που πρόκειται να προσδέσουν και κατ' επέκταση μεγάλη ακρίβεια στη μεταγραφική ρύθμιση από τους πυρηνικούς υποδοχείς πάνω στα γονίδια-στόχους τους (80). Σε μερικές περιπτώσεις, επίσης, ένα HRE μπορεί να έχει την ικανότητα να ρυθμίσει τη μεταγραφή ενός γονιδίου ως απόκριση σε περισσότερες από μία ορμόνες (90).

Από αναλύσεις που έγιναν, βρέθηκε ότι τα πιο συνηθισμένα μοτίβα HREs για τους υποδοχείς μη-στεροειδών ορμονών είναι οι ευθείες επαναλήψεις (DRs) πάνω στις οποίες προσδέονται οι υποδοχείς ρετινοειδών, της θυρεοειδούς ορμόνης και της βιταμίνης D, κυρίως ως ετεροδιμερή με τον υποδοχέα του 9-cis-ρετινοϊκού οξέος RXR (Retinoid X Receptor). Μερικοί από τους υποδοχείς αυτούς έχουν την ικανότητα να προσδέονται και ως ομοδιμερή, όπως ο TR και ο RXR. Άλλοι υποδοχείς, όπως ο HNF-4 (Hepatic Nuclear Factor-4) προσδέονται σε DRs αποκλειστικά ως ομοδιμερή (91), ενώ άλλοι όπως ο NGFI-B (Nerve Growth Factor

Interacting protein-B), προσδένονται κυρίως ως μονομερή, αλλά έχουν τη δυνατότητα να προσδεθούν και με άλλους υποδοχείς και κυρίως με τον RXR (92, 93). Η απόσταση μεταξύ των DRs παίζει σημαντικό ρόλο στην εξειδίκευσή τους ως προς το είδος των υποδοχέων που είναι ικανά να προσδέσουν. Έτσι τα DRs που απέχουν 3, 4 και 5 νουκλεοτίδια (DR3, DR4 και DR5) διαμεσολαβούν στη μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων μέσω της βιταμίνης D, της θυρεοειδούς ορμόνης και των ρετινοϊκών οξέων αντίστοιχα (88, 94). Τα DR1 φαίνεται να προτιμούνται ιδιαίτερα από τους υποδοχείς RXR (Retinoid X Receptor) και PPAR (Peroxisome proliferator activated receptor), ενώ ο RAR ενεργοποιεί την μεταγραφή και μέσω του DR2 (89). Οι αλληλουχίες DR0, μπορούν επίσης να προσδέσουν ορμονικούς υποδοχείς, ενώ DRs με περισσότερα από 5 νουκλεοτίδια μεταξύ τους, φαίνεται να λειτουργούν ως «πρόχειρα» ρυθμιστικά στοιχεία για διάφορους υποδοχείς ορμονών (95). Τέλος, φαίνεται πως εκτός από τον αριθμό των νουκλεοτιδίων μεταξύ των DRs, σημαντικό ρόλο στην ικανότητα πρόσδεσης συγκεκριμένων υποδοχέων παίζουν τόσο οι μικρές διαφορές στα εξανουκλεοτίδια των HREs, όσο και των νουκλεοτιδίων εκατέρωθεν (96).

Εκτός όμως από τη μεταγραφική ενεργοποίηση που επιτυγχάνεται μέσω της πρόσδεσης των πυρηνικών υποδοχών στα ενεργοποιητικά HREs, υπάρχουν και περιπτώσεις μεταγραφικής καταστολής μέσω των HREs. Η καταστολή αυτή μπορεί να είναι παθητική, είτε μέσω ανταγωνισμού για τη θέση πρόσδεσης των υποδοχέων με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, είτε μέσω δημιουργίας μεταγραφικά ανενεργών ετεροδιμερών υποδοχών (68). Έχουν περιγραφεί παρόλα αυτά και περιπτώσεις κατασταλτικών HREs, πάνω στα οποία προσδένονται διμερή υποδοχέων συνδεδεμένων με τους συνδέτες τους. Τέτοια παραδείγματα είναι κατασταλτικά HREs γλυκοκορτικοειδών υποδοχέων και υποδοχέων θυρεοειδών ορμονών (97-101). Σε πολλές περιπτώσεις κατασταλτικών HREs η παρουσία του διμερούς των υποδοχέων που δεν έχει προσδέσει τον συνδέτη έχει ως αποτέλεσμα την μεταγραφική ενεργοποίηση, ενώ η πρόσδεση του συνδέτη επάγει τη μεταγραφική καταστολή. Αν και η δράση των κατασταλτικών HREs δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητή, η θέση τους φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο. Μερικά από αυτά τα HREs είναι πολύ κοντά στο σημείο έναρξης της μεταγραφής, ενώ κάποια εντοπίζονται αμέσως μετά το TATA box (102-104) ή ακόμα και στο 3'-μη μεταφραζόμενο άκρο (105). Η αρνητική τους επίδραση φαίνεται να σχετίζεται με τον έλεγχο του ρυθμού απελευθέρωσης της RNA πολυμεράσης II από τον υποκινητή. Τέλος, η αρνητική επίδραση που έχουν

μερικά HREs προκαλείται από το ότι κάποια διμερή υποδοχέων, παρουσία του συνδέτη τους, αλληλεπιδρούν με μεταγραφικούς συν-καταστολείς.

4. Συν-ενεργοποιητές των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών

Όπως, ήδη αναφέρθηκε, την πρόσδεση του συνδέτη στον πυρηνικό υποδοχέα ακολουθεί η μεταγραφική του ενεργοποίηση. Η μεταγραφική ικανότητα, όμως, που φέρουν οι πυρηνικοί υποδοχείς είναι ικανή μόνο για την έκφραση των γονιδίων-στόχων τους σε πολύ μικρά επίπεδα. Η σωστή έκφραση επιτυγχάνεται με τη στρατολόγηση και αλληλεπίδρασή τους με τους συν-ενεργοποιητές, μετά τη πρόσδεση του συνδέτη. Έχουν βρεθεί πέντε κύριες τάξεις συν-ενεργοποιητών που αλληλεπιδρούν με τους πυρηνικούς υποδοχείς ορμονών: 1) τα μέλη της υποοικογένειας p160 (SRC-1/N-CoA1, SRC-2/GRIP-2/TIF-2, και SRC-3/ACTR/AIB1/p/CIP/RAC3/TRAM-1) (106) τα οποία συμβάλουν στη στρατολόγηση άλλων συμπλόκων, 2) ακετυλοτρανφεράσες ιστονών (HATs) όπως οι CBP/p300 και p/CAF (107), 3) μεθυλοτρασφεράσες αργινίνης των ιστονών (HMTs, histone methyltransferases) όπως οι CARM1 και PRMT1 (108) 4) σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης των νουκλεοσωμάτων όπως οι SWI/SNF (19, 109) και 5) το σύμπλοκο πολλών υπομονάδων, που μεσολαβεί για την αλληλεπίδραση των πυρηνικών υποδοχέων με τη βασική μεταγραφική μηχανή (multisubunit mediator complex) (110, 111).

Παρόλα αυτά, υπάρχουν συν-ενεργοποιητές, που δεν είναι κοινοί για όλους τους υποδοχείς και οι οποίοι αλληλεπιδρούν και ρυθμίζουν τη μεταγραφική ενεργότητα συγκεκριμένων πυρηνικών υποδοχών. Επίσης, εκτός από την εξειδίκευση των συν-ενεργοποιητών για τους πυρηνικούς υποδοχείς, η έκφραση ορισμένων φαίνεται να είναι ιστοειδική ή/και να ρυθμίζεται από διάφορα εξωτερικά ερεθίσματα. Ένα τέτοιο παράδειγμα φαίνεται να είναι ο συν-ενεργοποιητής PGC1α.

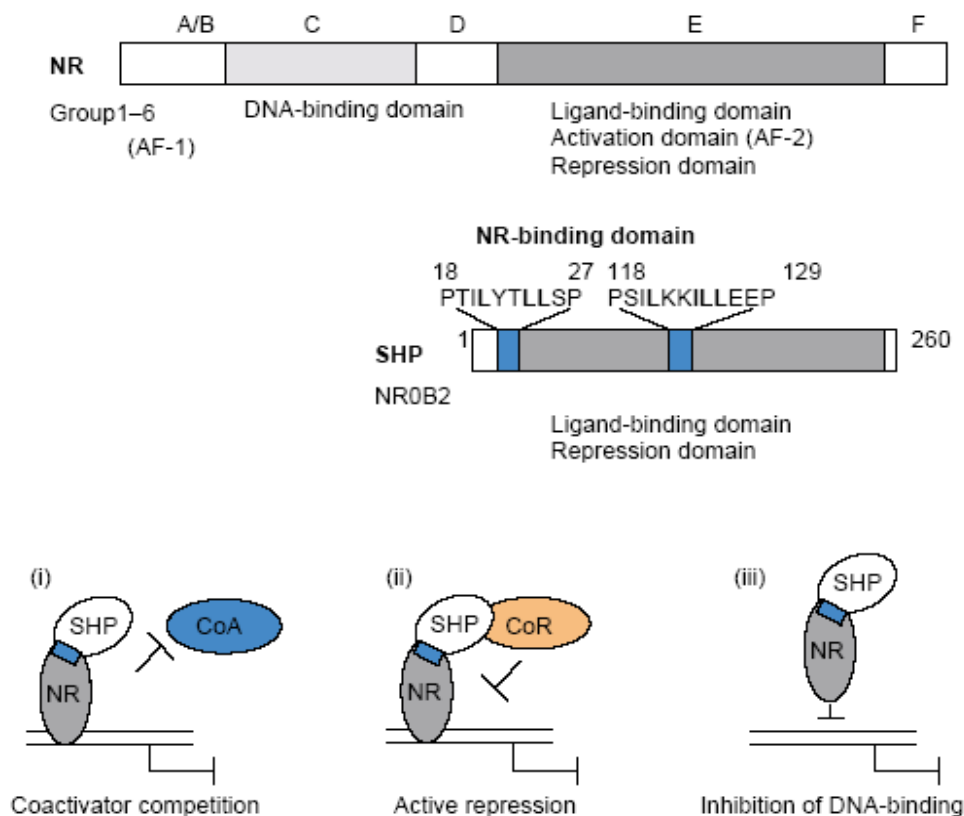
5. Ρύθμιση της μεταγραφικής ικανότητας των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών

Ένας τρόπος ρύθμιση της δράσης των πυρηνικών υποδοχέων, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, είναι μέσω των HREs. Ο προσανατολισμός και η απόσταση μεταξύ των 2 εξανουκλεοτιδίων που συνθέτουν τα HREs αποτελεί, ουσιαστικά, κριτήριο επιλογής του κατάλληλου διμερούς υποδοχέων. Παρόλα αυτά, όμως, πολλά HREs μπορούν να προσδέσουν, με μεγάλη συγγένεια, διάφορα

ετεροδιμερή. Για το λόγο αυτό, απαιτούνται διάφορα επίπεδα ρύθμισης της δράσης των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών, έτσι ώστε, με τη σειρά τους, να μπορούν να ρυθμίσουν σωστά την έκφραση των γονιδίων-στόχων τους.

Ένα επίπεδο ρύθμισης είναι αυτό του ανταγωνισμού μεταξύ ανενεργών και ενεργών, ετερο- και ομο- διμερών πυρηνικών μη-στεροειδών υποδοχέων (όπως RAR/RXR, VDR/RXR και RXR/RXR), για την ίδια θέση πρόσδεσης (112-114). Οι μελέτες έδειξαν πως τα διμερή αυτά δεν ανταγωνίζονται μόνο για την θέση πρόσδεσης, αλλά και για την αλληλεπίδραση με τους συν-ενεργοποιητές (115). Όσον αφορά, επίσης, των σχηματισμό ετεροδιμερών, πολύ σημαντικό ρόλο παίζει και η συγκέντρωση του πυρηνικού υποδοχέα RXR στο κύτταρο (116).

Ρυθμιστικό, επίσης, ρόλο στη μεταγραφική ικανότητα των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών φαίνεται να έχει και ένα, κάπως ασυνήθιστο, μέλος της υπεροικογένειας, ο SHP (Small Heterodimer Partner). Ο SHP δεν φέρει DBD περιοχή, έχει όμως την ικανότητα να δημιουργεί ετεροδιμερή με διάφορους πυρηνικούς υποδοχείς και να καταστέλλει την μεταγραφική τους ικανότητα (117, 118) (Εικ. 13).



Εικόνα 13: Δομή και μηχανισμοί καταστολής του πυρηνικού υποδοχέα SHP (Short Heterodimer Partner).

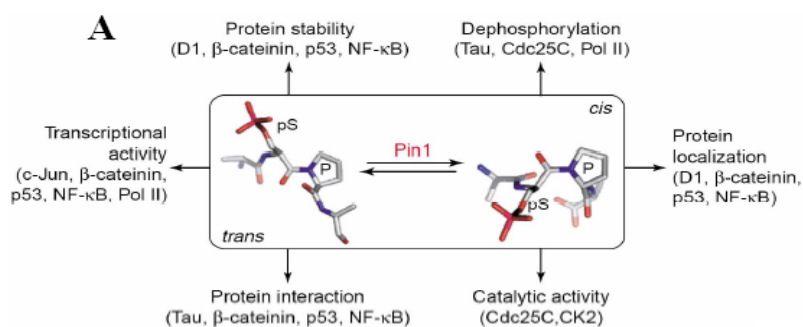
Η κωδική αλληλουχία του SHP εντοπίζεται σε όλα τα σπονδυλωτά και υπάρχει ~75% ομολογία του γονιδίου στον άνθρωπο, στο ποντίκι και στον αρουραίο. Η θέση των αμινοξέων του SHP, που παρουσιάζεται στην εικόνα, αντιστοιχεί στον SHP του αρουραίου. *Πάνω τμήμα:* Σύγκριση μεταξύ των δομών ενός τυπικού πυρηνικού ορμονικού υποδοχέα και του SHP. Ο SHP δεν φέρει DBD περιοχή, ενώ παράλληλα φέρει μία ιδιαίτερη LBD περιοχή. Η τρισιδιάστατη δομή της περιοχής LBD του SHP φέρει και τις 12 α -έλικες, περιέχει, όμως, ένα ένθεμα 13 αμινοξέων μεταξύ των ελίκων H5 και H7, του οποίου η λειτουργία δεν έχει ακόμα χαρακτηριστεί. Φέρει επίσης 2 λειτουργικά LXXLL-σχετικά μοτίβα, τα οποία εκτίθενται στην επιφάνεια της LBD περιοχής. Το πρώτο μοτίβο εντοπίζεται στη έλικα H1, ενώ το δεύτερο στην έλικα H5. *Κάτω τμήμα:* Παρουσίαση των 3 διαφορετικών μοντέλων του κατασταλτικού μηχανισμού του SHP πάνω στους πυρηνικούς υποδοχείς. (i) Ανταγωνισμός μεταξύ SHP και συν-ενεργοποιητών για την αλληλεπίδραση τους με τον, ήδη προσδεδεμένο στο DNA, πυρηνικό υποδοχέα. (ii) Ενεργή καταστολή μέσω στρατολόγησης των συν-καταστολέων, η οποία επάγεται από την αλληλεπίδραση του SHP με τον, προσδεδεμένο στο DNA, πυρηνικό υποδοχέα. (iii) Δημιουργία ετεροδιμερών SHP-πυρηνικού υποδοχέα τα οποία δεν έχουν την ικανότητα να προσδεθούν στο DNA. Και οι τρεις αυτοί μηχανισμοί μπορεί να συμβαίνουν ταυτόχρονα ή εναλλακτικά, πράγμα που εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο ή τον τύπο του υποκινητή του γονιδίου-στόχου [Ann Båvner, (2005) *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*, 16, 478-488].

Ο SHP έχει τρεις μηχανισμούς δράσης για να καταστέλλει τη μεταγραφική ικανότητα των πυρηνικών υποδοχέων. Στη πρώτη περίπτωση, ο SHP μπλοκάρει την ενεργοποίηση των διμερών πυρηνικών υποδοχέων οι οποίοι είναι προσδεδεμένοι στο DNA, με το να ανταγωνίζεται τους συν-ενεργοποιητές για την αλληλεπίδραση με τους υποδοχείς. Πιο αναλυτικά, έχει βρεθεί ότι ο SHP φέρει 2 λειτουργικά LXXLL-ανάλογα μοτίβα, τα οποία εκτίθενται στην επιφάνεια της LBD περιοχής του (119). Αντίστοιχα μοτίβα απαντώνται και στις αλληλουχίες των συν-ενεργοποιητών των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών, τα οποία είναι υπεύθυνα για την αλληλεπίδραση των συν-ενεργοποιητών με το AF-2 των πυρηνικών υποδοχέων. Έτσι, ο SHP μπλοκάρει την ενεργοποίηση των υποδοχέων με το να προσδέεται στην AF-2 περιοχή, όπου κανονικά προσδέονται οι συν-ενεργοποιητές. Αυτός φαίνεται να είναι και ο κατασταλτικός τρόπος δράσης του SHP για του υποδοχείς TR β (117, 118), RXR β (120) και HNF-4 α (121). Ειδικά για τον HNF-4 α , φαίνεται να υπάρχει ισχυρός ανταγωνισμός μεταξύ του συν-ενεργοποιητή του, PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) coactivator-1 α) και του SHP, για αλληλεπίδραση με τον HNF-4 α και άλλους πυρηνικούς υποδοχείς (122, 123). Στη δεύτερη περίπτωση, ο SHP αλληλεπιδρά με τους πυρηνικούς υποδοχείς, δημιουργώντας ετεροδιμερή τα οποία, όμως, δεν έχουν την ικανότητα να προσδέονται στο DNA (124). Τέλος, έχει βρεθεί και ένας μηχανισμός ενεργητικής καταστολής από τον SHP. Στις περιπτώσεις αυτές, η πρόσδεση του SHP στο διμερές των υποδοχέων όχι μόνο ανταγωνίζεται την αλληλεπίδραση των συν-ενεργοποιητών, αλλά συμβάλει και στη στρατολόγηση συν-καταστολέων μέσω της κατασταλτικής περιοχής που φέρει (125, 126).

Τέλος, δε θα πρέπει να παραλείψουμε να αναφέρουμε πως η μεταγραφική ικανότητα των πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων, δεν ρυθμίζεται μόνο από τη παρουσία ή όχι των λιπόφιλων συνδετών τους. Οι πυρηνικοί υποδοχείς, αλλά και οι συν-ρυθμιστές τους, αποτελούν στόχους διαφόρων μονοπατιών (όπως κινασών του στρες, αυξητικών παραγόντων, προ- και αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μετα-μεταφραστική τροποποίησή τους, η οποία ακολουθείται από την τροποποίηση διαφόρων λειτουργιών τους και κατ' επέκταση της μεταγραφικής τους ικανότητας. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που συναντάμε στους πυρηνικούς υποδοχείς ορμονών είναι κυρίως φωσφορυλιώσεις (77, 127, 128), σε όλες, σχεδόν, τις περιοχές των υποδοχέων οι οποίες επηρεάζουν θετικά ή αρνητικά την AF-1, την περιοχή πρόσδεσης του συνδέτη καθώς και την περιοχή πρόσδεσης στο DNA. Άλλες τροποποιήσεις των πυρηνικών υποδοχέων, λιγότερο μελετημένες, είναι οι ακετυλιώσεις (127, 128, 129), οι ουμπικουϊτυλιώσεις (128, 130) και οι σουμοϋλιώσεις (128, 131). Όσον αφορά τους συν-ενεργοποιητές των πυρηνικών υποδοχέων, οι κύριες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που επιδέχονται είναι ακετυλιώσεις (132) που εμποδίζουν την αλληλεπίδραση τους με του πυρηνικούς υποδοχείς, φωσφορυλιώσεις από κινάσες του στρες (133, 134), που άλλοτε καταστέλλουν και άλλοτε ενεργοποιούν τη δράση τους και ουμπικουτυλιώσεις (135), οι οποίες φαίνεται να ρυθμίζουν τη συγκέντρωσή τους στο κύτταρο μέσω πρωτεόλυσης.

Ειδικότερα, όσον αφορά τις επιδράσεις μέρους των φωσφορυλιώσεων που πραγματοποιούνται στους πυρηνικούς υποδοχείς και τους συν-ενεργοποιητές τους, έρχεται να συμπληρώσει ένας νέος μηχανισμός ρύθμισης της δράσης των πρωτεϊνών, μέσω αλλαγής της διαμόρφωσής τους. Ο μηχανισμός αυτός έχει να κάνει με την ισομερίωση συγκεκριμένων μοτίβων φωσφορυλίωσης, που πραγματοποιούνται σε κατάλοιπα σερίνης/θρεονίνης, τα οποία προηγούνται κατάλοιπων προλίνης (Ser/Thr-Pro) και ονομάζεται φωσφορυλίωση οδηγούμενη από προλίνη (Pro-directed phosphorylation, PDP) (136, 137). Η PDP είναι μία πολύ σημαντική διαδικασία σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες (π.χ. κυτταρικός πολλαπλασιασμός, διαφοροποίηση κ.α.). Τα μοτίβα Ser/Thr-Pro, φωσφορυλιώνονται από διάφορες κινάσες που ανήκουν στην οικογένεια Pro-directed protein kinases (137, 138). Η ισομερίωση αυτή πραγματοποιείται μέσω της πεπτιδίλο-προλινο *cis/trans* ισομεράσης (PPIase) Pin1 (18 KDa) (136, 139, 140) η οποία ισομεριώνει μόνο μοτίβα pSer/Thr-Pro. Τα μοτίβα αυτά απαντώνται είτε ως *cis*, είτε ως *trans* ισομερή και η αλλαγή της δομής τους

επιτυγχάνεται με τη βοήθεια *cis* και *trans* PPIases. (Εικ. 14 A). Η Pin1 είναι μία μικρή πρωτεΐνη και δεν φέρει κάποιο σινιάλο εισόδου ή εξόδου από τον πυρήνα. Αν και σε κυτταροκαλλιέργειες ανιχνεύτηκε αρχικά στον πυρήνα, σε αρκετούς κυτταρικούς τύπους, τόσο φυσιολογικούς, όσο και καρκινικούς, φαίνεται να εντοπίζεται και στο κυτταρόπλασμα. Φέρει 2 περιοχές, στις οποίες οφείλει και την ειδικότητά της ως προς το υπόστρωμα. Στο N-άκρο φέρει μία περιοχή WW η οποία περιλαμβάνει 2 συντηρημένα κατάλοιπα τρυπτοφάνης και στο C-άκρο φέρει μία περιοχή PPIase (136, 138-140). Η περιοχή WW είναι αυτή που έχει τη δυνατότητα πρόσδεσης σε συγκεκριμένα μοτίβα pSer/Thr-Pro (*trans* ισομορφή), στοχεύοντας μ' αυτόν τον τρόπο την Pin1 στο υπόστρωμά της, ενώ η περιοχή PPIase καταλύει τη ισομερίωση (*cis* ισομορφή) του ίδιου του μοτίβου ή άλλου μοτίβου στο ίδιο υπόστρωμα (141). Τέλος, η Pin1 ρυθμίζεται μέσω φωσφορυλίωσης, κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και της καρκινογένεσης. Η φωσφορυλίωση στη σερίνη 16 (WW domain) καταστέλλει την ικανότητα πρόσδεσης σε υπόστρωμα και ρυθμίζει τον υποκυτταρικό της εντοπισμό και την δράση της. Στα ήδη γνωστά υποστρώματα της ισομεράσης Pin1 (Εικ. 14 B), έρχονται τώρα να προστεθούν και οι πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών, αλλά και οι συν-ενεργοποιητές τους. Από πρόσφατες μελέτες γνωρίζουμε πως ο φωσφορυλιωμένος στη σερίνη 77 RARα αποτελεί στόχο της ισομεράσης Pin1, η δράση της οποίας επηρεάζει τη σταθερότητα του υποδοχέα (142). Η όλη διαδικασία είναι εξαρτώμενη της πρόσδεσης του συνδέτη στο πυρηνικό υποδοχέα. Επίσης, έχει δειχθεί πως και ο συν-ενεργοποιητής SRC-3 αποτελεί υπόστρωμα της ισομεράσης Pin1, η δράση της οποίας φαίνεται να ενισχύει την αλληλεπίδραση μεταξύ SRC-3 και CBP/p300, έτσι ώστε να αυξάνει την μεταγραφική ικανότητα των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών, αλλά ταυτόχρονα να μειώνει τον χρόνο ημιζωής του SRC-3 (143).



B

Pin1 substrates	Substrate function	Pin1 targeting sites
Mitotic proteins		
NIMA	Mitotic kinase	
Cdc25	Mitotic phosphatase	pThr48/67-Pro
Wee1	Mitotic kinase	
Plk1	Mitotic kinase	
Myt1	Mitotic kinase	
Cdc27	Anaphase-promoting complex	
CENP-F	Kinetochore protein	
Incenp	Inner centromere protein	
Rab4	G protein	
Bcl-2	Antiapoptotic protein	
NHERF-1	Na ⁺ /H ⁺ exchanger regulatory factor	
KRMP1	Kinesin-related protein	
CK2 α	Casein kinase II α	
TopII α	Topoisomerase II α	
Dab2	Endocytic adaptor molecule	
Cytoskeleton proteins		
tau	Microtubule-binding protein	pThr231-Pro
Transcription factors or proteins		
Pol II	RNA polymerase II	pSer5-Pro (in the repeat)
c-Jun	Transcriptional factor	pSer63/73-Pro
β -Catenin	Transcriptional factor	pSer246-Pro
P53	Transcriptional factor	pSer33/46-Pro, pSer33/315-Pro, pThr81-Pro
NF- κ B	Transcriptional factor	pThr254-Pro
Ct-2	Transcriptional factor	
NFAT	Transcriptional factor	
Sin3-Rpd3	Histone deacetylase complex	
hSpt5	Transcription elongation factor	G1-S proteins
Cyclin D1	G1/S cyclin	pThr286-Pro
Ki67	Proliferation-associated marker	pThr234-Pro
Apoptotic proteins		
Bcl-2	Antiapoptotic protein	
BimEL	Proapoptotic protein	Ser65-Pro

Εικόνα 14: Ικανότητα ισομερίωσης φωσφορυλιωμένων καταλοίπων προλίνης από την ισομεράση Pin1 και πρωτεΐνες στόχοι της.

A) Η φωσφορυλίωση πρωτεϊνών σε κατάλοιπα σερίνης (Ser) ή θρεονίνης (Thr) σε μοτίβα Ser/Thr-Pro, από ειδική κατηγορία κινασών (Prolyl-directed kinases), έχει ως αποτέλεσμα την αναγνώρισή τους από την ισομεράση Pin1 και την ισομερείωση της *trans* σε *cis* (και το αντίστροφο) μορφής του μοτίβου, ανάλογα με την θέση φωσφορυλίωσης. Το αποτέλεσμα είναι η αλλαγή της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης που ισομεριώνεται. B) Πρωτεΐνες στόχοι της προλυν-ισομεράσης Pin1 [Kun Ping Lu, (2004) *TRENDS in Biochemical Sciences*, 29, 200-209].

6. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων και μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζονται από άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια

Από μελέτες που έχουν γίνει, έχει προκύψει το συμπέρασμα πως οι πυρηνικοί υποδοχείς έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν την έκφραση διαφόρων γονιδίων, θετικά ή αρνητικά, ανεξάρτητα από την παρουσία HREs στον υποκινητή τους (144). Έτσι, π.χ. οι υποδοχείς οιστρογόνων (ERs, Estrogen Receptors) φαίνεται να ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων-στόχων, δημιουργώντας πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις με τα σύμπλοκα AP-1 (Activation Protein-1), πάνω σε AP-1 θέσεις πρόσδεσης (145). Τα AP-1 σύμπλοκα συγκροτούνται από ένα διμερές της Jun οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων (κυρίως Jun/Fos) και παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση των συμπλόκων αυτών, πραγματοποιείται μέσω της ενεργοποίησης της κίνησης JNK (Jun-NH₂-terminal kinase) από διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια.

Έχει βρεθεί, επίσης, πως άλλοι πυρηνικοί υποδοχείς όπως ο TR (Thyroid Receptor), ο RAR (Retinoic Acid Receptor) και ο GR (Glucocorticoid Receptor) έχουν τη δυνατότητα να καταστείλουν τη μεταγραφική ικανότητα των AP-1 συμπλόκων, μετά από πρόσδεση του συνδέτη τους, αλλά και το αντίθετο (146). Στο γεγονός αυτό αποδίδονται οι αντι-πολλαπλασιαστικές ιδιότητες που έχουν οι συνδέτες διαφόρων πυρηνικών υποδοχέων. Ανάλογα, μερικοί πυρηνικοί υποδοχείς, όπως ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (GR), φαίνεται να παρεμποδίζουν τη μεταγραφική ικανότητα του NF-κB, μεταγραφικού παράγοντα που ενεργοποιείται από πρό-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (π.χ. TNF α , Tumor Necrosis Factor α). Στο γεγονός αυτό αποδίδονται οι αντι-φλεγμονώδεις και ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες των γλυκοκορτικοειδών. Μέρος των αποτελεσμάτων της δουλειάς που παρουσιάζεται εδώ, αποδεικνύουν ότι και ο NF-κB με τη σειρά του έχει την ικανότητα να καταστέλλει τη μεταγραφική δράση των πυρηνικών υποδοχέων.

Τα διάφορα μοντέλα που έχουν προταθεί για τη κατασταλτική επίδραση των πυρηνικών υποδοχέων πάνω στο AP-1 και των NF-κB είναι: α) άμεση αλληλεπίδραση των υποδοχέων με την περιοχή φερμουάρ λευκίνης του c-Jun και την ομόλογη περιοχή *rel* της υπομονάδας p65 του NF-κB (147) η οποία δεν επιτρέπει την αλληλεπίδραση των παραγόντων με τις *cis*-ρυθμιστικές περιοχές τους, β) ανταγωνισμός για κοινούς συνενεργοποιητές (144) γ) μεταγραφική αύξηση του παράγοντα I κ -B α που συγκρατεί τον NF-κB στον πυρήνα (148) και δ) καταστολή της JNK κινάσης (149).

Γ. ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΟΥ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ HNF-4 α

1. Ο ρόλος του HNF-4 α στην ανάπτυξη και στις μεταβολικές λειτουργίες του οργανισμού

Η πρωτεΐνη HNF-4 α (Hepatocyte Nuclear Factor-4 α) ανήκει στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών. Από μελέτες προκύπτει ο καθοριστικός ρόλος του HNF-4 α τόσο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των θηλαστικών, από τα πρώτα κιάλας στάδια της εμβρυογένεσης (150), όσο και για τη πλήρη διαφοροποίηση της ηπατικής κυτταρικής σειράς τους (151). Επίσης, φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο και στη διατήρηση του ηπατικού φαινοτύπου, καθώς ελέγχει πλήθος λειτουργιών των ηπατικών κυττάρων (152, 153).

Η έκφραση του HNF-4 α ξεκινά από τα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης και εντοπίζεται στο εξωεμβρυϊκό ενδόδερμα, όπου φαίνεται να συμμετέχει στη σύνθεση

εκκρινόμενων ουσιών, απαραίτητων για τα έμβρυα (150). Η απουσία του, έχει ως αποτέλεσμα το θάνατο των εμβρύων στο στάδιο του μορίου, μίας και είναι αδύνατη η ολοκλήρωση της γαστριδιοποίησης. Από μελέτες σε ποντικούς, όπου πραγματοποιήθηκε στοχευόμενη απαλοιφή του γονιδίου του HNF-4α στο ήπαρ, έγινε κατανοητός ο ρόλος του στη φυσιολογική λειτουργία του ήπατος. Παρά, λοιπόν, τον σχηματισμό ηπατικού ιστού στα ζώα αυτά, παρατηρήθηκε καταστολή της έκφρασης διαφόρων γονιδίων που αποτελούν δείκτες της φυσιολογικής λειτουργίας αλλά και μιας πλήρως διαφοροποιημένης ηπατικής κυτταρικής σειράς (151, 153).

Στα ενήλικα άτομα ο HNF-4α εκφράζεται κυρίως στα ηπατικά κύτταρα, αλλά και στα κύτταρα των νεφρών, του εντέρου, του παγκρέατος και σε χαμηλά ποσά, στα κύτταρα του δέρματος και του στομάχου (154-156). Ο ρόλος του είναι να ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων, αλλά και δικτύων γονιδίων που είναι σημαντικά για τη διατήρηση της φυσιολογίας και της σωστής λειτουργίας των παραπάνω οργάνων (157). Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί 3 μέλη της οικογένειας HNF-4: HNF-4α, β και γ (158, 159) καθώς και 7 μετάγραφα εναλλακτικού ματίσματος του HNF-4α (160-165). Ο HNF-4α παίζει ζωτικό ρόλο στην ανάπτυξη του οργανισμού και αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή διαφόρων μεταβολικών μονοπατιών, συμπεριλαμβανομένων και αυτών της γλυκόζης, των αμινοξέων, των λιπαρών οξέων και της ομοιόστασης της χοληστερόλης. Επίσης ρυθμίζει τη μετάγραφή γονιδίων του ιού της ηπατίτιδας Β (166). Το πλήθος των γονιδίων που ρυθμίζει ο HNF-4α είναι ηπατοειδικά, όπως τα γονίδια των απολιποπρωτεϊνών που συμμετέχουν στη μεταφορά της χοληστερόλης και των λιπαρών οξέων (155, 167-174), της τρανσθυρετίνης που ελέγχει τη μεταφορά της θυροειδούς ορμόνης (T₄) (155), μεταβολικά ένζυμα του ήπατος όπως, η καρβοξυκινάση του φωσφοενολπυροσταφυλικού οξέος που συμμετέχει στη γλυκονεογένεση (175), η κινάση του L-πυροσταφυλικού οξέος (176) και η αλδολάση Β (177) που συμμετέχουν στη γλυκόλυση, η αμινοτρανσφεράση της τυροσίνης (178) και η τρανσκαρβαμυλάση της ορνιθίνης (179) που συμμετέχουν στη σύνθεση διαφόρων αμινοξέων και η α₁-αντιτρυψίνη (180) που αποτελεί διαλυτή πρωτεΐνη του ορού και εκκρίνεται από το ήπαρ. Άλλες λειτουργίες που ρυθμίζει ο HNF-4α στον οργανισμό είναι η σύνθεση ηηκτικών (παράγοντες VII, IX, X) και αντιπηκτικών παραγόντων του αίματος, η παραγωγή ερυθροποιητίνης που ελέγχει τη διαφοροποίηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, αλλά και η σύνθεση παραγόντων που συμμετέχουν στην άμυνα του οργανισμού (157). Τέλος, ο HNF-4α ελέγχει γονίδια

της οικογένειας του κυτοχρώματος P450 που συμμετέχουν στο μεταβολισμό λιπιδίων, στεροειδών και φαρμάκων, αλλά και στη σύνθεση χολικών οξέων (181,182).

Η στοχευόμενη απαλοιφή του γονιδίου του HNF-4α στο ήπαρ ποντικών είχε ως αποτέλεσμα τα ζώα αυτά να παρουσιάζουν απώλεια βάρους, διαταραχές στην έκκριση των λιποπρωτεϊνών πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL, Very low density Lipoprotein) και στην ομοιόσταση των χολικών οξέων, αύξηση της απορρόφησης χοληστερόλης από το ήπαρ και αυξημένη θνησιμότητα. Επίσης, τα ζώα αυτά παρουσιάζουν μία αθηροπροστατευτική σύνθεση λιποπρωτεϊνών στο αίμα τους, με μειωμένη την LDL (Low density Lipoprotein) και αυξημένη την HDL (High density Lipoprotein), που περιέχει την απολιποπρωτεΐνη AI (153). Μεταξύ των ηπατικών γονιδίων που φαίνεται να επηρεάζεται η έκφραση τους, απουσία του HNF-4α, είναι οι απολιποπρωτεΐνες apoCIII, apoAIV, apoB100 και apoCII.

Από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, προκύπτει το συμπέρασμα ότι ο HNF-4α συνεργάζεται και με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες για τη θετική ή την αρνητική ρύθμιση των γονιδίων-στόχων του. Μεταξύ των παραγόντων αυτών είναι ο COUP-TF II (Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor II) (167, 183, 184), ο SP-1 (Specificity Protein 1) (172, 185), ο HNF-1α (186), ο SREBP-1 (Sterol Response element Binding Protein-1) (187), ο HIF-1α (Hypoxia Inducible Factor-1α) (188), οι Smads (similar to mothers against decapentaplegic) μέσω του μονοπατιού της αντιφλεγμονώδους κυτταροκίνης TGFβ (Transforming Growth Factor β) (189, 190) και οι c-Jun, ATF-2 (Activating Transcription Factor-2) και C/EBPδ (CAAT/enhancer binding protein δ) μέσω των μονοπατιών των προ-φλεγμονοδών κυτταροκινών ιντερλευκίνης-1 και TNFα (Tumor Necrosis Factor α) (191, 192). Μέρος των αποτελεσμάτων της δουλειάς που παρουσιάζεται εδώ, αποδεικνύουν ότι και ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB συνεργάζεται με τον HNF-4α για τη ρύθμιση διαφόρων γονιδίων στόχων του.

2. Ο ρόλος του HNF-4α σε διάφορες ασθένειες

Από μελέτες που έχουν γίνει, έχει βρεθεί ότι ο HNF-4α εμπλέκεται στην εμφάνιση διαφόρων νόσων. Πιο συγκεκριμένα, έχουν βρεθεί περιπτώσεις αιμοφιλικών ατόμων στα οποία ανιχνεύτηκαν μεταλλαγές σε συγκεκριμένα HREs των υποκινητών γονιδίων όπως ο παράγοντας πήξης IX και VII του αίματος (193-195), πάνω στα οποία προσδένεται ο HNF-4α.

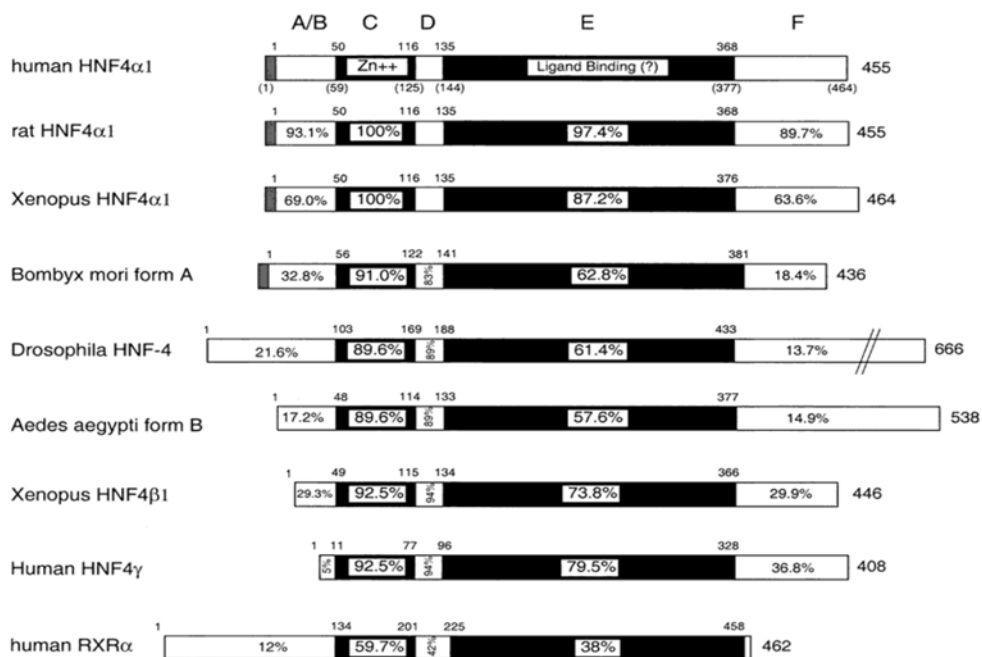
Υπάρχει επίσης η πιθανότητα, ο HNF-4 α να ευθύνεται και για διάφορες περιπτώσεις εμφάνισης αθηροσκλήρωσης, στεφανιαίας νόσου και καρδιαγγειακών παθήσεων. Αν και δεν υπάρχουν καταγεγραμμένα περιστατικά που να εμπλέκουν άμεσα κάποια μεταλλαγή στην αλληλουχία, την έκφραση ή στις θέσεις πρόσδεσης του HNF-4 α , γνωρίζουμε ότι τα κύρια γονίδια που εμπλέκονται στον μεταβολισμό της χοληστερόλης και των λιπαρών οξέων, δηλαδή οι απολιποπρωτεΐνες, αποτελούν βασικούς στόχους μεταγραφικής ρύθμισης του HNF-4 α .

Επιπλέον, το γεγονός ότι ο HNF-4 α αποτελεί κύριο μεταγραφικό παράγοντα έκφρασης των γονιδίων του ιού της ηπατίτιδας Β (196), αυτομάτως τον εμπλέκει στην ανάπτυξη καρκίνου του ήπατος, μέσω ιϊκής μόλυνσης.

Η πιο σημαντική όμως κατηγορία ασθενειών στην οποία εμπλέκεται ο HNF-4 α είναι αυτή της, μη εξαρτώμενης από ινσουλίνης, ανάπτυξης διαβήτη (NIDDM, Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus), γνωστή και ως τύπου II διαβήτη και συγκεκριμένα με την υποκατηγορία του νεανικού διαβήτη με αργοπορημένη έναρξη (MODY, Maturity Onset Diabetes of the Young). Η εμφάνιση του νεανικού διαβήτη τύπου MODY-1, σχετίζεται άμεσα με σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου του HNF-4 α (197, 198) αποτελώντας το 2-4% όλων των ασθενών με MODY (199). Ο τύπος MODY-1 σχετίζεται με ελλιπή έκκριση ινσουλίνης από τα β -παγκρεατικά κύτταρα, παρουσία υψηλής συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα και συνοδεύεται από μειωμένα επίπεδα apoCIII, apoAII και τριγλυκεριδίων (200).

3. Βασικές δομές και λειτουργίες του HNF-4 α

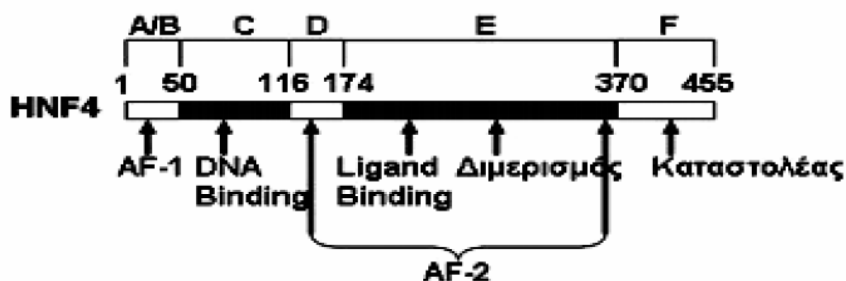
Ο HNF-4 α είναι ένα πολύ συντηρημένο μόριο ανάμεσα σε διάφορα είδη (**Εικ. 15**). Το mRNA του HNF-4 α έχει βρεθεί, εκτός από τα θηλαστικά (άνθρωπος, αρουραίος, ποντίκι) και στο βάτραχο, αλλά και σε διάφορα έντομα (155, 201-203). Ο HNF-4 α παρουσιάζει μία καλά συντηρημένη δομική και λειτουργική οργάνωση ως προς τα υπόλοιπα μέλη της υπερικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών. Από τους πυρηνικούς υποδοχείς, ο HNF-4 α παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ομολογία με τον RXR α .



Εικόνα 15: Ομολογίες μεταξύ των HNF4 διαφόρων ειδών και ομολογία του HNF-4 α με τον RXR α .

Διαγραμματική παρουσίαση και σύγκριση των διαφόρων περιοχών της ανθρώπινης πρωτεΐνης HNF-4 α με τις ομόλογες πρωτεΐνες άλλων ειδών αλλά και με την ανθρώπινη πρωτεΐνη RXR α [Sladek & Seidel, (2001) in Nuclear Receptors and Genetic Disease (Burris, T. P. and McCabe, E., eds.), pp. 309–361].

Όπως, ήδη, προείπαμε ο HNF-4 α φέρει τη χαρακτηριστική δομή των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών, με τις έξι δομικά και λειτουργικά διακριτές περιοχές A ως F (Εικ. 16). Η A/B περιοχή φέρει την ενεργοποιητική δομή AF-1, που εντοπίζεται στα πρώτα 24 αμινοξέα και ανήκει στη τάξη των όξινων ενεργοποιητών (86). Ο AF-1 λειτουργεί ως ιδιοσύστατος αυτόνομος ενεργοποιητής της μεταγραφής. Η περιοχή C αποτελεί το DBD μοτίβο του HNF-4 α . Η περιοχή αυτή έχει και τη μεγαλύτερη ομολογία τόσο μεταξύ των HNF-4 α πρωτεϊνών των διαφορετικών ειδών, αλλά και μεταξύ του HNF-4 α και των RXRs. Το DBD περιέχει 2 δακτυλίους ψευδαργύρου (Cys₂/Cys₂), με τη βοήθεια των οποίων προσδένεται στο DNA, πάνω σε HREs που περιλαμβάνουν τις επαναλήψεις G/AGGT/CCA_AGG/TT/CCA, οι οποίες χωρίζονται από ένα νουκλεοτίδιο (A ή σπανίως G) (HRE του τύπου DR1 (Direct Repeat 1)). Στην ίδια περιοχή εντοπίζεται και το σήμα του πυρηνικού εντοπισμού του HNF-4 α , το οποίο είναι υπεύθυνο για το σωστό υποκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης.

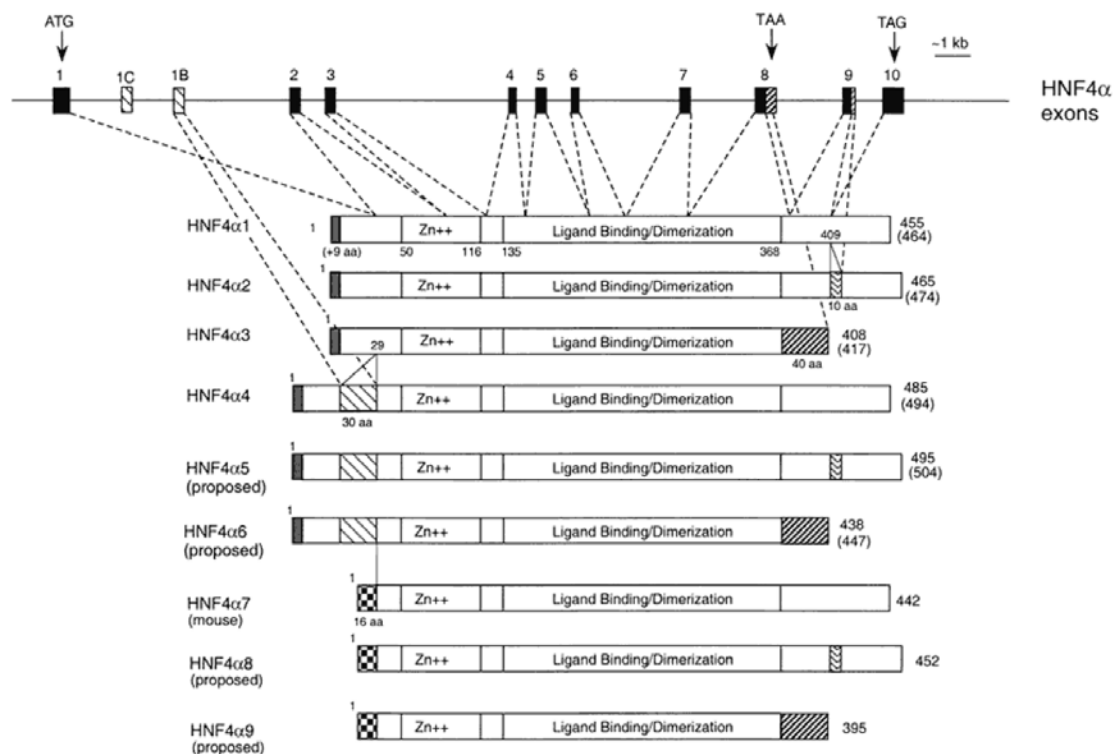


Εικόνα 16: Παρουσίαση των διαφόρων δομικών και λειτουργικών περιοχών του HNF-4α.

Διαγραμματική παρουσίαση των διαφόρων περιοχών του HNF-4α καθώς και των λειτουργιών που επιτελούν.

Η περιοχή D αποτελεί τον ευέλικτο σύνδεσμο μεταξύ της N-τελικής (DBD περιοχής) και C-τελικής (LBD και περιοχή διμερισμού) περιοχής του HNF-4α, η οποία του προσδίδει την απαραίτητη ελαστικότητα για την αλληλεπίδραση με το DNA και τη δημιουργία διμερών. Παρόλα αυτά, από μελέτες προκύπτει ότι η περιοχή D παίζει έναν πιο σημαντικό ρόλο, επηρεάζοντας τη δράση της εξαρτώμενης από συνδέτη μεταγραφικής ενεργότητας AF-2 (86). Η περιοχή E του HNF-4α φέρει την επιφάνεια πρόσδεσης με τον συνδέτη (LBD), για όσους πυρηνικούς υποδοχείς έχει χαρακτηριστεί κάποιος συνδέτης και την επιφάνεια ομοδιμερισμού. Ο HNF-4α προσδέεται στο DNA ως ομοδιμερές και ενώ αρχικά κατηγοριοποιήθηκε ως «ορφανός» πυρηνικός υποδοχέας (155), πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν τα λιπαρά οξέα ως ενδογενείς συνδέτες του HNF-4α (204-207). Στην περιοχή E εντοπίζεται και το συντηρημένο, μεταξύ των πυρηνικών υποδοχέων, μοτίβο *φφΧΕφφ* το οποίο είναι υπεύθυνο για τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις με του συν-ενεργοποιητές (86). Επίσης, στη περιοχή E εντοπίζεται και η εξαρτημένη από συνδέτη μεταγραφική ενεργότητα AF-2. Αντίθετα με τις AF-2 περιοχές άλλων πυρηνικών υποδοχέων (RXRα, RAR κ.α.), η AF-2 περιοχή του HNF-4α δεν εμφανίζει αυτόνομη λειτουργία και για τη δραστηκότητά της απαιτείται, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, και τμήμα της περιοχή D. Έχει βρεθεί πως η AF-1 και η AF-2, δρουν συνεργατικά στην ολική δραστηκότητα του HNF-4α (86). Τέλος, όσων αφορά τη περιοχή F, φαίνεται να παίζει κατασταλτικό ρόλο στη μεταγραφική δραστηκότητα του HNF-4α (86). Αν και αρχικά προτάθηκε ότι η περιοχή F δυσχεραίνει την αλληλεπίδραση των συν-ενεργοποιητών με το μοτίβο *φφΧΕφφ* (86), νεότερες μελέτες δείχνουν πως η περιοχή αυτή βοηθά στην αλληλεπίδραση του HNF-4α με τον συν-καταστολέα της μεταγραφής SMRT (Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid Receptors) (208).

Σχετικά με τις ισομορφές του HNF-4α στα θηλαστικά, φαίνεται να προκύπτουν είτε από εναλλακτικό μάτισμα του mRNA (156, 158), είτε από τη χρήση δύο διαφορετικών υποκινητών που φαίνεται να έχει το γονίδιο του HNF-4α (209) (Εικ. 17)



Εικόνα 17: Οργάνωση του γονιδίου του HNF-4α και οι 7 ισομορφές του.

Διαγραμματική παρουσίαση της οργάνωσης του HNF-4α γονιδίου, των 4 ισομορφών του που προέρχονται από εναλλακτικό μάτισμα του mRNA (α1-α4) και της ισομορφής α7 η οποία προέρχεται από εναλλακτική χρήση ενός δεύτερου υποκινητή του γονιδίου (P2). Η δομές των ισομορφών α5, α6, α8 και α9 είναι προτεινόμενες [Sladek & Seidel, (2001) in Nuclear Receptors and Genetic Disease (Burris, T. P. and McCabe, E., eds.), pp. 309–361].

Οι διάφορες ισομορφές του HNF-4α που έχουν καταγραφεί στα θηλαστικά φέρουν αλλαγές αποκλειστικά στις περιοχές A/B και F. Οι ισομορφές α1 και α2 είναι οι πρώτες που κλωνοποιήθηκαν (155, 163) και είναι οι πιο άφθονες στους ιστούς όπου και εκφράζεται ο HNF-4α, με την α2 να φέρει 10 επιπλέον αμινοξέα στην περιοχή F. Οι μεταγραφικές ιδιότητες των α1 και α2 ισομορφών έχουν μελετηθεί διεξοδικά (86, 210) και αυτό που παρατηρήθηκε ήταν μία μικρή διαφορά στη μεταγραφική τους ικανότητα, η οποία φαίνεται να επηρεάζεται από τον κυτταρικό τύπο. Η ισομορφή α3, από την άλλη, παρουσιάζει μία ατελώς σχηματισμένη F περιοχή (164), ενώ η α4 περιέχει ένα ένθεμα 30 αμινοξέων στην A/B περιοχή και στερείται φυσιολογικής σημασία (158). Η ισομορφή με το μεγαλύτερο ενδιαφέρον φαίνεται να είναι η α7, η οποία φέρει μία ατελώς σχηματισμένη A/B περιοχή (165) και αποτελεί το προϊόν του εναλλακτικού υποκινητή P2 του γονιδίου του HNF-4α (209). Μελέτες έχουν δείξει

πως η έκφραση της ισομορφής $\alpha 7$, προηγείται της έκφρασης της ισομορφής $\alpha 1$ κατά την ανάπτυξη του ήπατος (211), αλλά και ότι η μεταγραφική ενεργότητά της είναι πολύ μειωμένη σε σχέση μ' αυτή των $\alpha 1$ και $\alpha 2$ (212), λόγω του ότι στερείται της AF-1 περιοχής. Παρόλα αυτά, ο ιστοειδικός και αναπτυξιακός ρόλος των διαφόρων ισομορφών παραμένει άγνωστος.

Τέλος, ο HNF-4 α , όπως και άλλοι πυρηνικοί υποδοχείς, φωσφορυλιώνεται σε Ser/Thr (213), και η φωσφορυλίωση από συγκεκριμένες κινάσες όπως η PKA επηρεάζει την ικανότητα πρόσδεσής του στο DNA (214). Επίσης, ακετυλιώνεται από τον συν-ενεργοποιητή CBP και αυτή η τροποποίηση επάγει την πρόσδεση του HNF4 στο DNA, τον πυρηνικό εντοπισμό του, καθώς και την προσέλκυση άλλων συν-ενεργοποιητών (129).

4. Αλληλεπίδραση του HNF-4 α με τους συν-ενεργοποιητές

Αν και αρχικά είχε επικρατήσει η άποψη ότι η επανέκφραση και μόνο του HNF-4 α σε αποδιαφοροποιημένες κυτταρικές σειρές ηπατώματος, ήταν αρκετή για την επανάκτηση ενός φυσιολογικού ηπατικού φαινοτύπου (152), πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η έλλειψη των συν-ενεργοποιητών και όχι του HNF-4 α είναι υπεύθυνη για τα αρχικά, τουλάχιστον, στάδια αποδιαφοροποίησης των ηπατικών κυττάρων και την ανάπτυξη καρκίνου (215). Με άλλα λόγια, οι συν-ενεργοποιητές του HNF-4 α παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων-στόχων του HNF-4 α . Με πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια αυτής της εργασίας, επιβεβαιώσαμε το πόσο κρίσιμη είναι η παρουσία τόσο του HNF-4 α όσο και των συν-ενεργοποιητών του για την έκφραση γονιδίων-στόχων του, ακόμα και σε μη ηπατικές κυτταρικές σειρές.

Ο HNF-4 α , λοιπόν, φαίνεται να αλληλεπιδρά μέσω της AF-2 περιοχής του (μοτίβο *φφΧΕφφ*) με μέλη της p160 οικογένειας συν-ενεργοποιητών, όπως ο SRC-1 (Steroid Receptor co-activator-1), ο SRC-2/GRIP1/TIF2 (Glucocorticoid Receptor Intermediary Protein 1/Transcriptional Intermediary Factor 2) και ο SRC-3/RAC-3 (Receptor Associated Coactivator-3) (210, 216, 217). Επίσης αλληλεπιδρά με την ακετυλοτρανσφεράση των ιστονών p300/CBP (CREB Binding Protein) μέσω τόσο της AF-2 περιοχής, όσο και της AF-1 (218). Η AF-1 περιοχή του HNF-4 α φαίνεται να είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση και άλλων συν-ενεργοποιητών, αλλά και μεταγραφικών παραγόντων της βασικής μεταγραφικής μηχανής (219, 220).

Ο σημαντικότερος, όμως, συν-ενεργοποιητής του HNF-4α φαίνεται να είναι ο PGC-1α (PPAR-Gamma Coactivator-1). Αρχικά, χαρακτηρίστηκε η αλληλεπίδραση μεταξύ του HNF-4α και του PGC-1α (221, 222), ο οποίος παίζει σημαντικό ρόλο στις μεταβολικές λειτουργίες του ενήλικου οργανισμού (187, 223). Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την εμπλοκή του HNF-4α στην διαδικασία του μεταβολισμού των θρεπτικών ουσιών που προσλαμβάνει ο οργανισμός και συγκεκριμένα στην διαδικασία της γλυκονεογένεσης (224, 225). Παρόλα αυτά, δεδομένα από πρόσφατες μελέτες έρχονται να αποδώσουν νέες λειτουργίες στη δράση που προκύπτει από την αλληλεπίδραση μεταξύ HNF-4α και PGC-1α, οι οποίες σχετίζονται με την έκφραση γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών, της παραγωγής ουρίας, αλλά και της σύνθεσης χολικών οξέων (215). Όλες αυτές οι λειτουργίες αποτελούν κύριο μέρος των φυσιολογικών λειτουργιών του ήπατος και γι' αυτό το λόγο η σωστή έκφραση και αλληλεπίδραση των HNF-4α και PGC-1α, είναι καθοριστικής σημασίας για τη σωστή λειτουργία του οργάνου αυτού.

5. Αλληλεπίδραση του HNF-4α με τους συν-καταστολείς

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η περιοχή F του HNF-4α αρχικά θεωρήθηκε ότι επηρεάζει την μεταγραφική ικανότητα της πρωτεΐνης αποκλείοντας, εν μέρει, την AF-2 περιοχή του και συγκεκριμένα το μοτίβο *φφΧΕφφ*, το οποίο είναι υπεύθυνο για τις αλληλεπιδράσεις με τους συν-ενεργοποιητές. Παρόλα αυτά σήμερα γνωρίζουμε πως ο HNF-4α έχει τη δυνατότητα να αλληλεπιδρά με συν-καταστολείς, όπως ο SMART με αποτέλεσμα τη μείωση της μεταγραφικής ικανότητας του (208, 212). Παρά το γεγονός ότι η περιοχή F δεν φαίνεται να αλληλεπιδρά άμεσα με τον SMART, πρέπει να παίζει καθοριστικό ρόλο στην αλληλεπίδραση του υποδοχέα με τον συν-καταστολέα, αφού η απαλοιφή του οδηγεί σε σημαντική μείωση της καταστατικής δράσης του SMART.

Δ. ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΟΥ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ RXRα

1. Ο ρόλος του RXRα στην φυσιολογία του οργανισμού

Η βιταμίνη A και τα παράγωγά της, ρετινοϊκά οξέα (all *trans*-RA, 9-*cis* RA, 4οxo RA και 3,4dihydroRA) παίζουν ένα καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη, τη

διαφοροποίηση και την ομοίωση του οργανισμού, αλλά και σε πλήθος μεταβολικών διεργασιών του. Η ανακάλυψη των πυρηνικών υποδοχέων των ρετινοειδών, που αποτελούν μέλη των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών, βοήθησε σημαντικά στην κατανόηση των πλειοτροπικών αποτελεσμάτων που έχουν τα μικρά αυτά λιπόφιλα μόρια (226, 227).

Αρχικά ανακαλύφθηκε ο υποδοχέας του all *trans*-ρετινοϊκού οξέος (RA), ο RAR (Retinoid Acid Receptor) και στη συνέχεια εντοπίστηκε ένας νέος υποδοχέας ο RXR α (228) που αν και αρχικά χαρακτηρίστηκε ορφανός, γρήγορα έγινε κατανοητό ότι έχει την ικανότητα να προσδένει με μεγάλη συγγένεια τον 9-*cis* RA, από τον οποίο και επάγεται. Από 9-*cis* RA επάγονται και οι άλλοι δύο ισότυποι του RXR α υποδοχέα, RXR β και RXR γ , οι οποίοι κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια (ανασκόπηση 229). Και από τους τρεις ισότυπους προκύπτουν πλήθος ισομορφών (ανασκόπηση 230).

Παρά, όμως, το γεγονός ότι οι RARs και RXRs ενεργοποιούνται από ρετινοϊκά οξέα, φαίνεται να παρουσιάζουν τόσο δομικές, όσο και λειτουργικές διαφορές, γεγονός που τα κατατάσσει σε δύο διαφορετικές ομάδες των πυρηνικών υποδοχέων. Οι RXRs, απουσία του συνδέτη τους, σχηματίζουν τετραμερή, τα οποία αποσυνδέονται παρουσία το συνδέτη (230) για να σχηματίσουν διμερή και να προσδεθούν στο DNA. Ένα μοναδικό χαρακτηριστικό που παρουσιάζουν οι RXRs είναι ότι δημιουργούν ετεροδιμερή με διάφορα μέλη των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών (228). Η παρουσία των RXRs, στις περιπτώσεις αυτές, είναι απαραίτητη για την πρόσδεση των συνοδών - πυρηνικών υποδοχέων στο DNA. Στο γεγονός αυτό αποδίδεται και η πλειοτροπική δράση των ρετινοϊκών οξέων στον οργανισμό. Από *in vitro* μελέτες προκύπτει, επίσης, ότι οι RXRs, δημιουργούν και ομοδιμερή τα οποία έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με το DNA. Παραμένει, όμως, το ερώτημα αν υπάρχει κάποιο ξεχωριστό σηματοδοτικό μονοπάτι, που να εξαρτάται αποκλειστικά από τα ομοδιμερή των RXRs.

Το πρότυπο έκφρασης των ισότυπων των RXRs παρουσιάζει μεγάλη ανομοιογένεια. Έτσι, ενώ ο RXR α εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ, στο έντερο, στους νεφρούς, την επιδερμίδα και το δέρμα, ο RXR β εντοπίζεται σε όλους, σχεδόν, τους ιστούς, ενώ η έκφραση του RXR γ περιορίζεται στους μύες, σε συγκεκριμένα τμήματα του εγκεφάλου και στην υπόφυση (229). Η ικανότητά τους, λοιπόν, να δημιουργούν ετεροδιμερή, σε συνδυασμό με την κατανομή της έκφρασης των 3 ισότυπων,

φανερώνει τον ιδιαίτερο και σημαντικό ρόλο των RXRs στη σωστή λειτουργία του οργανισμού.

Για τη μελέτη της φυσιολογικής δράσης των RXRs πραγματοποιήθηκαν πειράματα στοχευόμενης καταστολής σε ποντίκια, για τα γονίδια και των τριών ισοτύπων. Όσον αφορά τον RXR α , η καταστολή του γονιδίου του είχε τις πιο δραματικές επιπτώσεις σε σχέση με τη καταστολή των άλλων δύο. Η απουσία του RXR α είχε ως αποτέλεσμα το θάνατο των εμβρύων (231, 232) την μέρα 14,5 εξαιτίας υποπλασίας του μυοκαρδίου. Τα έμβρυα αυτά έφεραν, επίσης, δυσμορφίες στους οφθαλμούς. Συμπερασματικά λοιπόν, ο RXR α είναι απαραίτητος για τη μετάδοση του σήματος των ρετινοειδών, που απαιτείται για την ανάπτυξη του μυοκαρδίου και των οφθαλμών. Για τη μελέτη του φυσιολογικού ρόλου του RXR α στον ενήλικο οργανισμό πραγματοποιήθηκε ιστοειδική καταστολή του γονιδίου του. Όσον αφορά την ιστοειδική καταστολή του RXR α στο ήπαρ (233), αυτή έδειξε ότι ο RXR α αποτελεί κρίσιμο λειτουργικό συνοδό πολλών πυρηνικών υποδοχέων όπως ο LXRA (Liver X receptor α), ο PXR (Pregnane X receptor), ο FXR (farnesoid X receptor), ο CAR β (constitutively activated receptor), και ο PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor). Απουσία του RXR α , είναι αδύνατη η ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων από τους πυρηνικούς αυτούς υποδοχείς. Αυτό, φυσικά, έχει ως αποτέλεσμα να επηρεάζεται ένα πλήθος μεταβολικών λειτουργιών του ήπατος.

Από *in vitro* και *in vivo* μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, ο RXR α φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών, η έκφραση των οποίων αποτελεί σημαντικό κομμάτι της φυσιολογίας και της σωστής λειτουργίας του ήπατος. Στους υποκινητές όλων σχεδόν των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών έχουν εντοπιστεί HREs στα οποία μπορεί να προσδεθεί, είτε ως ομοδιμερές (RXR α /RXR α), είτε ως ετεροδιμερές με τα RAR, TR ή PPAR (RAR/RXR α , TR/RXR α , PPAR/RXR α) (234).

Με πειράματα, επίσης, ιστοειδικής καταστολής, οδηγηθήκαμε στο συμπέρασμα πως ο RXR α συμμετέχει ενεργά και στη δημιουργία του δέρματος, πιθανόν σε συνεργασία με τον VDR (vitamin D receptor) (229). Για όλες αυτές τις διαδικασίες φαίνεται να απαιτείται, όχι μόνο η δημιουργία ετεροδιμερών με τους υπόλοιπους πυρηνικούς υποδοχείς, αλλά και η μεταγραφική ενεργότητα AF-2 (και σε μικρότερο βαθμό η AF-1) του ίδιου του RXR α (229).

Τέλος, μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί έχουν αποδώσει στον RXR α τόσο αποπρωτικές ιδιότητες, όσο και επαγωγής της διαφοροποίησης (229). Για το λόγο αυτό ο RXR α έχει αποτελέσει στόχο για τη θεραπεία διαφόρων μορφών καρκίνου.

2. Βασικές δομές και λειτουργίες του RXR α

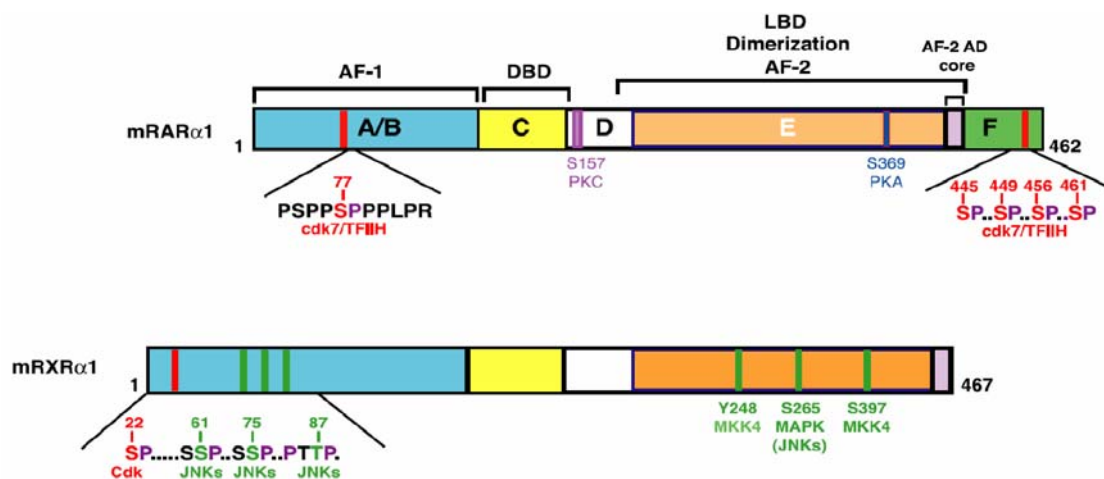
Για τους 3 ισότυπους των RXRs, οι οποίοι προέρχονται από διαφορετικά γονίδια, έχουν χαρακτηριστεί αρκετές ισομορφές οι οποίες προκύπτουν είτε από τη χρήση διαφορετικών υποκινητών ή/και από εναλλακτικό μάτισμα, με αποτέλεσμα να διαφέρουν στην N-τελική A/B περιοχή τους. Ωστόσο, για τον κάθε ισότυπο υπάρχουν δύο κυρίαρχες ισομορφές. Έτσι για τον RXR α , οι ισομορφές αυτές είναι οι $\alpha 1$ και $\alpha 2$ (229).

Οι RXRs και κατά συνέπεια και ο RXR α , είναι κοινοί παράγοντες ετεροδιμερισμού με τα μέλη της υποοικογένειας 1 των πυρηνικών υποδοχέων. Οι RXRs ετεροδιμερίζονται με τους υποδοχείς RARs, TRs, VDR, PPARs, LXRs, FXRs, PXR και CARs. Τα ετεροδιμερή αυτά λειτουργούν ως επαγόμενοι από συνδέτη ρυθμιστικοί μεταγραφικοί παράγοντες, που δρουν μέσω της πρόσδεσης τους στα αντίστοιχα HREs των υποκινητών των γονιδίων-στόχων τους. Η παρουσία του RXR αυξάνει τη συγγένεια του συνοδού υποδοχέα για το DNA. Κάθε ετεροδιμερές έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει και να προσδένεται σε διαφορετικά HREs με τη βασική δομή των ευθέων επαναλήψεων (DRs) PuG(G/T)TCA_Xn_PuG(G/T)TCA. Όπως περιγράφεται και από την αλληλουχία, ο αριθμός των βάσεων που παρεμβάλλεται μεταξύ των δύο εξανουκλεοτιδίων (Xn) των HREs διαφέρει για κάθε ετεροδιμερές. Έτσι, τα RXR-RAR προσδένονται σε DR-2 και DR-5, τα RXR-TR και RXR-LXR σε DR-4, τα RXR-VDR και RXR-PXR σε DR-3, ενώ τα RXR-PPAR σε DR-1 (ανασκόπηση 235). Παρόλα αυτά, η αλληλουχία του εξανουκλεοτιδίου αλλά και οι εκατέρωθεν αλληλουχίες παίζουν ρόλο στην αναγνώριση των HREs από τα διμερή που περιγράφηκαν. Τα ομοδιμερή του RXR έχουν την ικανότητα να προσδένονται σε DR-1. Με τον τρόπο αυτό προκύπτει ένας τεράστιος αριθμός διαφορετικών HREs τα οποία έχουν την ικανότητα να ρυθμίσουν την μεταγραφή μέσω των ρετινοϊδών.

Όπως και οι περισσότεροι πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών, έτσι και οι υποδοχείς των ρετινοειδών αποτελούνται από 6 διακριτές περιοχές (A-F) (Εικ. 18). Ο RXR α όμως φαίνεται να στερείται της περιοχής F. Η πιο συντηρημένη περιοχή είναι αυτή του DBD, ενώ μετά έρχεται αυτή του LBD. Στην περιοχή του LBD απαντώνται

και αρκετά συντηρημένα μοτίβα φωσφορυλίωσης. Στην A/B περιοχή εντοπίζεται και μία αλληλουχία η οποία έχει την δυνατότητα μεταγραφικής ενεργοποίησης ανεξάρτητης από την παρουσία συνδέτη, η AF-1.

Εικόνα 18: Σχηματική αναπαράσταση των λειτουργικών περιοχών και των θέσεων φωσφορυλίωσης των πυρηνικών υποδοχέων ρετινοειδών.

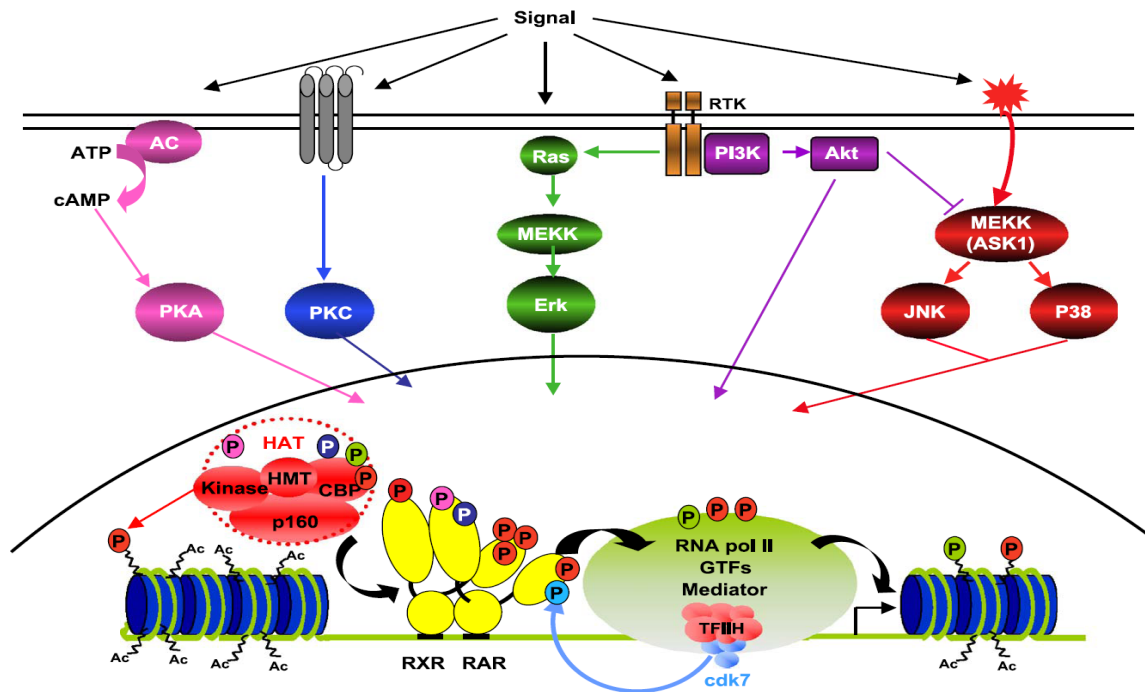


Στο σχήμα παρουσιάζονται η θέση πρόσδεσης στο DNA (DBD), η θέση πρόσδεσης του συνδέτη (LBD), η περιοχή διμερισμού και οι λειτουργικές περιοχές AF-1 και AF-2. Παρουσιάζονται επίσης οι αλληλουχίες που αποτελούν στόχους φωσφορυλίωσης διαφόρων κινάσων (MAPK= mitogen-activated protein kinase, MKK= MAPK kinase, JNK= Jun N-terminal kinase) [Bastien & Rochette-Egly, (2004) Gene 328, 1–16].

Η περιοχή AF-1, επίσης, παρουσιάζει αρκετά συντηρημένα μοτίβα φωσφορυλίωσης (78) για κινάσες εξαρτώμενες από προλίνες (CDKs, Cyclin-dependent kinases και MAP κινάσες) (236). Η περιοχή D φαίνεται να παίζει ρόλο συνδέτη μεταξύ DBD και LBD.

Μελέτες που έχουν γίνει τα τελευταία χρόνια μας δείχνουν πως οι φωσφορυλίώσεις των RXRs παίζουν πολύ σημαντικούς φυσιολογικούς ρόλους (**Εικ. 19**). Η φωσφορυλίωση του RXRα στη Ser22 (AF-1) δείχνει να είναι σημαντική για την ενεργοποίηση γονιδίων που είναι απαραίτητα για τη αντι-πολλαπλασιαστική δράση των ρετινοειδών (237). Επίσης, έχει δειχτεί πως η φωσφορυλίωση των Ser61, Ser75 και Thr87 (A/B domain) απαιτείται για μέγιστη μεταγραφική ενεργότητα τόσο των συμπλόκων RXR/RXR, όσο και RAR/RXR (238), ενώ η φωσφορυλίωση μέσω MAPK στην περιοχή E καταστέλλει τη μεταγραφική ικανότητα των RAR/RXR συμπλόκων (239). Μία υπόθεση είναι το ότι η φωσφορυλίωση αυτή προκαλεί κάποια αλλαγή της διαμόρφωσης μέσα στο LBD, με αποτέλεσμα την αδυναμία αλληλεπίδρασης με τους συν-ενεργοποιητές και μείωση της μεταγραφής. Τέλος,

φαίνεται πως η ίδια φωσφορυλίωση κάνει τον RXRα πιο ανθεκτικό στη αποικοδόμηση, με αποτέλεσμα την δημιουργία μίας επικρατούσας κατασταλτικής μορφής του RXRα.



Εικόνα 19: Σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούν κινάσες MAPK (ERKs, JNK, p38), PI3K, Akt, PKA και PKC συμμετέχουν στη ρύθμιση της μεταγραφής μέσω των ρετινοειδών.

Οι υποδοχείς των ρετινοειδών αποτελούν στόχους φωσφορυλίωσης πολλών διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών. Οι φωσφορυλίωσεις αυτές έχουν ως αποτέλεσμα τη ρύθμιση της ικανότητας των υποδοχέων να αλληλεπιδρούν με τους συν-ενεργοποιητές. Οι συν-ενεργοποιητές υπόκεινται επίσης σε φωσφορυλίωσεις με αποτέλεσμα να ρυθμίζεται η ενεργότητα τους ή/και η ικανότητά τους να στρατολογούν τροποποιητές των ιστονών (HAT, HMT) και σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης. Φωσφορυλίωσεις πραγματοποιούνται επίσης στις ιστόνες, στους γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες και στην RNA πολυμεράση II. (RTK, receptor tyrosine kinase; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; Erk, extracellular signal-regulated kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MEKK, MAPK kinase kinase; ASK1, apoptosis-stimulating kinase 1; AC, Adenylate cyclase; JNK, Jun amino-terminal kinase) [Bastien & Rochette-Egly, (2004) Gene 328, 1–16].

Τέλος, τα ετεροδιμερή που δημιουργούν οι RXRs, μπορούν να διακριθούν σε 2 κατηγορίες ανάλογα με το αν ο συνοδός-υποδοχέας επιτρέπει την ενεργοποίηση του διμερούς τόσο από τον δικό του συνδέτη, όσο και από τον συνδέτη του RXR (241). Οι πυρηνικοί υποδοχείς PPARs, LXRs, FXR, και PXR επιτρέπουν την ενεργοποίηση και από τους δύο συνδέτες, ενώ οι RARs, TRs, και VDR, επιτρέπουν την ενεργοποίηση του διμερούς μόνο παρουσία του δικού τους συνδέτη (242).

3. Συν-ρυθμιστές του RXRα

Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό αποτελεί και το γεγονός ότι οι RXRs δεν φαίνεται να αλληλεπιδρούν με τους συν-καταστολείς των πυρηνικών υποδοχέων NCoR (nuclear receptor corepressor) και SMART (silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors) εξαιτίας της τεταρτοταγούς δομής της έλικας 12 (240). Στο γεγονός αυτό οφείλεται η μικρή ικανότητα των ομοδιμερών RXR-RXR για καταστολή των γονιδίων στόχων του απουσία του συνδέτη τους.

Οι συν-ενεργοποιητές που αλληλεπιδρούν με τον RXRα είναι τα μέλη της οικογένειας p160 (NCOA1/SRC-1, NCOA2/SRC-2/TIF-2/GRIP-1, NCOA3/SRC-3/pCIP/ACTR/AIB1/TRAM1/RAC3) (243, 244), ο p300/CBP (245) και ο PGC-1α (246). Ο RXRα φαίνεται να αλληλεπιδρά και με πρωτεΐνες της βασικής μεταγραφικής μηχανής (ανασκόπηση 229).

E. ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΟΥ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ TRβ

1. Ο ρόλος του TRβ στην φυσιολογία του οργανισμού

Η θυρεοειδής ορμόνη T₃ (triiodothyronine), εκκρίνεται από τον θυρεοειδή αδένα και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη, την διαφοροποίηση και τις μεταβολικές λειτουργίες του οργανισμού (247). Η T₃ είναι απαραίτητη για τη σωστή λειτουργία όλων σχεδόν των ιστών του οργανισμού και στην ενήλικη ζωή σχετίζεται κυρίως με την απορρόφηση του οξυγόνου και τον μεταβολικό ρυθμό. Η δυσλειτουργία του θυρεοειδούς αδένα είναι μία από τις πιο κοινές παθολογικές καταστάσεις των ενδοκρινών αδένων. Ο υπερθυρεοειδισμός (αυξημένη έκκριση T₃) φαίνεται να σχετίζεται με δυσλειτουργίες της καρδιάς, με τη δημιουργία εξόφθαλμου και αυξημένο μεταβολικό ρυθμό, ενώ ο υποθυρεοειδισμός με μείωση του μεταβολικού ρυθμού, μείωση της ανάπτυξης και δημιουργία πνευματικών δυσλειτουργιών όταν παρουσιάζεται στα εμβρυϊκά στάδια (248).

Ο κύριος τρόπος δράσης της T₃ είναι η ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων-στόχων μέσω των πυρηνικών υποδοχέων των θυρεοειδών (TR, Thyroid Receptors) και των cis-ρυθμιστικών περιοχών τους (TREs, thyroid hormone response elements). Οι TRs παρουσιάζουν δύο ισότυπους, οι οποίοι κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια, τον TRα και τον TRβ. Από τις ισομορφές που προκύπτουν από το γονίδιο του TRα μόνο ο TRα1 φαίνεται να λειτουργεί ως ενεργοποιητής, ενώ οι υπόλοιπες, μάλλον, παίζουν κατασταλτικό ρόλο. Από την άλλη, οι ισομορφές για τον TRβ προκύπτουν από τη χρήση διαφορετικών υποκινητών. Οι κύριες ισομορφές του TRβ

είναι ο $\beta 1$ και $\beta 2$. Οι $TR\alpha 1$ και $TR\beta 1$ εκφράζονται σε όλους, σχεδόν, τους ιστούς. Παρόλα αυτά υπάρχει διαφορά στο πρότυπο έκφρασης τους, με τον $TR\alpha 1$ να εκφράζεται κυρίως στους σκελετικούς μυς και τα λιποκύτταρα και τον $TR\beta 1$ κυρίως στον εγκέφαλο, τα νεφρά και το ήπαρ (249).

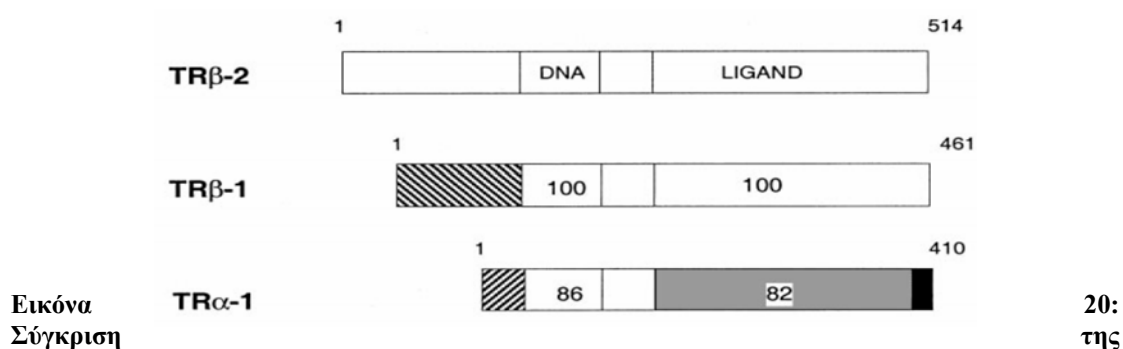
Όπως είναι λογικό, μεταλλάξεις που μεταβάλουν τη δομή των TRs ή των TREs, αλλά και αλλαγές στην έκκριση της T_3 , μπορούν να επηρεάσουν τη σωστή λειτουργία του οργανισμού και των συγκεκριμένων ιστών που αναφέραμε. Ειδικότερα, όσον αφορά το ήπαρ, ο $TR\beta$ φαίνεται να παίζει ρόλο στην ενεργοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα που συμμετέχουν στην λιπογένεση, τη λιπόλυση και τη διαδικασία της οξειδωσης των λιπαρών οξέων (ανασκόπηση 247). Παρόλα αυτά είναι γνωστό, εδώ και αρκετά χρόνια, ότι ο υποθυρεοειδισμός συνδέεται με την εμφάνιση υπερχοληστερολαιμίας και αυξημένων ποσών LDL (Low Density Lipoprotein) στον ορό του αίματος. Αν και αρχικά, η αδυναμία απομάκρυνσης και συσσώρευσης στο αίμα της LDL συνδέθηκε μόνο με την απορύθμιση των γονιδίων των υποδοχέων της LDL (247), σήμερα γνωρίζουμε πώς ο $TR\beta$ συμμετέχει στη μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών, που παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών. Από αναλύσεις μικροσυστοιχιών με cDNAs γονιδίων του ήπατος από ποντίκια $TR\beta^{-/-}$ φάνηκε καταστολή των γονιδίων apoCI και apoAIV (250).

2. Βασικές δομές και λειτουργίες του $TR\beta$

Οι $TR\beta$ είναι πολύ συντηρημένοι υποδοχείς μεταξύ των θηλαστικών και οι δύο κύριες ισομορφές που περιγράψαμε, $\beta 1$ και $\beta 2$, διαφέρουν μόνο ως προς την A/B περιοχή τους. Αν και η διαφορά των δύο A/B περιοχών είναι πολύ μεγάλη, οι δύο ισομορφές έχουν την ίδια ικανότητα να προσδένουν την T_3 και να ενεργοποιούν τα γονίδια στόχους τους, ενώ λίγα πράγματα είναι γνωστά σχετικά με την ειδικότητά τους ως προς την ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων (247).

Όπως και οι υπόλοιποι πυρηνικοί υποδοχείς, έτσι και οι TRs φέρουν την αντίστοιχη δομική οργάνωση. Αυτό που δε διαθέτουν, όπως και οι RXRs, είναι η F περιοχή. Η περιοχή A/B, όπως αναφέραμε, των TRs παρουσιάζει μεγάλες διαφορές τόσο μεταξύ των ισότυπων, όσο και μεταξύ των ισομορφών (**Εικ. 20**). Υπάρχει αρκετή βιβλιογραφία σχετικά με την ανομοιογενή δράση της περιοχής αυτής μεταξύ των ισομορφών $\beta 1$ και $\beta 2$ (ανασκόπηση 247). Το συμπέρασμα όμως είναι πως οι διαφορές αυτές που παρατηρούνται είναι αποτέλεσμα των διαφορετικών ειδών,

διαφορετικών κυτταρικών τύπων, των διαφορετικών TREs που χρησιμοποιούνται, αλλά και της διαφορετικής σύστασης των υποκινητών των γονιδίων-στόχων (251-253). Υπάρχουν, επίσης, μελέτες που αποκαλύπτουν ότι η N-τελική περιοχή των TRs μπορεί να επηρεάσει την στερεοδιαμόρφωση της DBD περιοχής και άρα τη ειδικότητα ως προς τα διάφορα TREs (254, 255). Εκτός, όμως από τις διαφορές που παρουσιάζουν οι N-τελικές περιοχές των TRs, όσον αφορά την εξαρτώμενη από συνδέτη ικανότητα ενεργοποίησης της μεταγραφής, φαίνεται να διαφέρουν και στην ικανότητά τους για ανεξάρτητη από συνδέτη καταστολή της μεταγραφής. Σε αντίθεση με τον TR α 1 και τον TR β 1, ο TR β 2 φαίνεται να μη μπορεί να καταστείλει τη μεταγραφή απουσία του συνδέτη έστω και αν έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με τους συν-καταστολείς εξ ίσου καλά (256).



Σχηματική αναπαράσταση των περιοχών των TR ισοτύπων και των TR β ισομορφών. Ενώ οι περιοχές DBD και LBD εμφανίζουν μεγάλη αμινοξική ομολογία, η N-τελική περιοχή είναι εντελώς διαφορετική μεταξύ των TRs [Yen P. M., (2001) *Physiol Rev.* 81,1097–1142].

Η DBD περιοχή, από την άλλη, είναι ιδιαίτερα συντηρημένη μεταξύ των TRs, αλλά και σε σχέση με τους άλλους πυρηνικούς υποδοχείς της ίδιας υποοικογένειας και παρουσιάζει το μοτίβο των δακτύλων ψευδαργύρου που έχει ήδη περιγραφεί. Όπως θα περιγράψουμε και παρακάτω, η ικανότητα των TRs να δημιουργούν ετεροδιμερή με τους RXRs είναι πολύ κρίσιμη για την πρόσδεση των TRs στα ασύμμετρα TREs, καθώς η αλληλεπίδραση αυτή σταθεροποιεί την πρόσδεση του διμερούς στο DNA και καθορίζει την απόσταση μεταξύ των εξανουκλεοτιδίων των TREs που επιλέγονται. Έχει, λοιπόν, χαρακτηριστεί και μία δεύτερη επιφάνεια ετεροδιμερισμού, μέσα στο DBD των TRs, η οποία φαίνεται να είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση TRs/RXRs πάνω στο DNA (257) (**Εικ. 21**).

Η περιοχή D, εκτός από το να συνδέει τις περιοχές DBD και LBD, φέρει και την αλληλουχία που είναι υπεύθυνη για τον πυρηνικό εντοπισμό των TRs (258).

Επιπλέον, η περιοχή αυτή φαίνεται να έχει ικανότητα αλληλεπίδρασης με τους συν-καταστολείς κατά τη πρόσδεση του διμερούς στο DNA και απουσία του συνδέτη (259) (Εικ. 21).

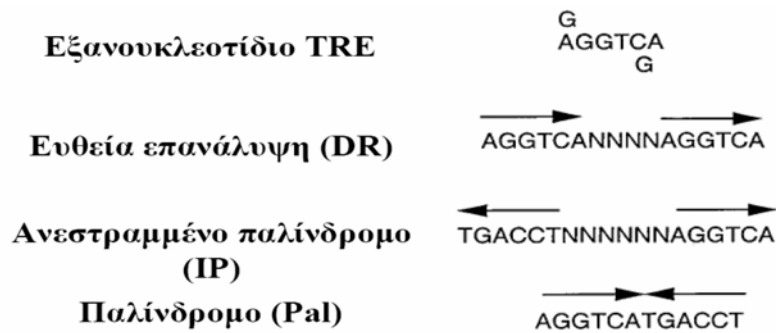


Εικόνα 21: Γενική οργάνωση των περιοχών των TRs.
Σχηματική αναπαράσταση των περιοχών των TRs και παρουσίαση των λειτουργιών τους [μετάφραση από Yen P. M., (2001) *Physiol Rev.* 81,1097–1142].

Η περιοχή E δεν φέρει μόνο το LBD, που είναι υπεύθυνο για την πρόσδεση της T_3 . Παίζει, επίσης, σημαντικό ρόλο στον διμερισμό, την μεταγραφική ενεργοποίηση, αφού περιέχει την εξαρτώμενη από συνδέτη μεταγραφική ενεργότητα AF-2, αλλά και στη βασική καταστολή απουσία της T_3 . Επιπλέον, φέρει διάφορες περιοχές αλληλεπίδρασης με συν-ενεργοποιητές, οι οποίες είναι διαφορετικές από την AF-2 περιοχή (ανασκόπηση 247) (Εικ. 21).

3. Μοριακός μηχανισμός δράσης του TRβ

Από *in vitro* μελέτες, έχει βρεθεί ότι οι TRs έχουν την ικανότητα να προσδένονται πάνω στα TREs ως μονομερή, ομοδιμερή, αλλά και ετεροδιμερή με τον RXR. Τα εξανουκλεοτίδια των TREs φέρουν τη συντηρημένη αλληλουχία (G/A)GGT(C/G)A (260), παρόλα αυτά υπάρχει μεγάλη πολυμορφία τόσο στη πρωτοταγή δομή των εξανουκλεοτιδίων, όσο και στον αριθμό τους, την απόσταση μεταξύ τους και τη φορά τους (260). Έτσι οι TRs μπορούν να προσδεθούν σε παλίνδρομες ευθείες αλλά και ανεστραμμένες επαναλήψεις, με τη βέλτιστη απόσταση μεταξύ των επαναλήψεων για κάθε ένα από τα TREs αυτά να είναι 0 (TRE_{pal}), 4 (DR4) και 6 (IP6) νουκλεοτίδια (Εικ. 22). Με τη χρήση *in vitro* τεχνικών έχουν ανακαλυφθεί πολλά TREs στοιχεία στους υποκινητές διαφόρων γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών (234). Μένει η πλήρης αξιολόγηση της λειτουργικότητάς τους ως προς τη μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών σε φυσιολογικές συνθήκες.



Εικόνα 22: Παρουσίαση του εξανουκλεοτιδίου και της δομής των TREs

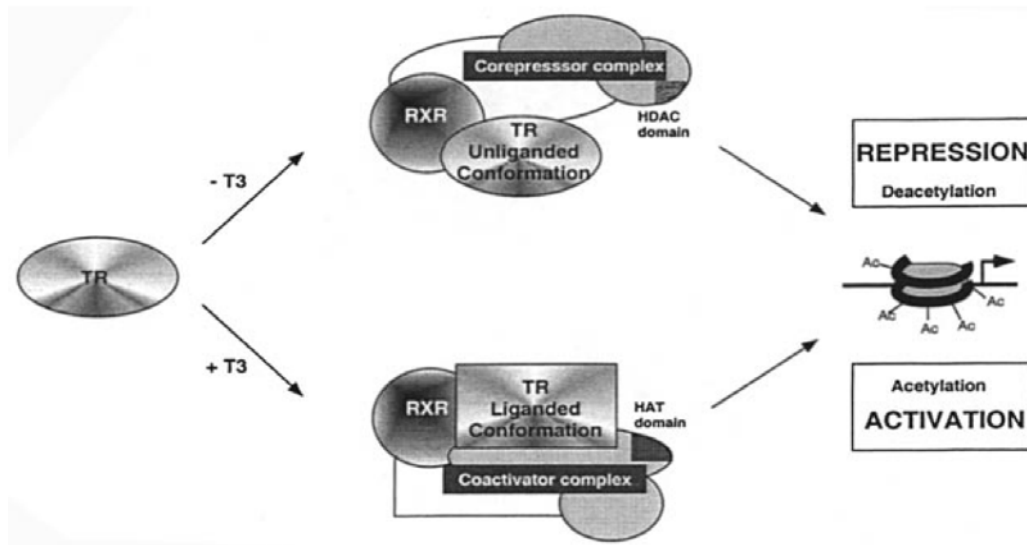
Σχηματική αναπαράσταση του εξανουκλεοτιδίου και της δομής των TREs. Το N συμβολίζει τον βέλτιστο αριθμό των νουκλεοτιδίων μεταξύ των δύο εξαμερών και τα βέλη τη φορά τους [μετάφραση από Yen P. M., (2001) *Physiol Rev.* 81,1097–1142].

Από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, γνωρίζουμε πως πολλές από τις δράσεις του TR β μπορούν να τροποποιηθούν εξαιτίας μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, όπως η φωσφορυλίωση. Αν και δεν γνωρίζουμε ακόμη ακριβώς ποια κατάλοιπα του TR β 1 φωσφορυλιώνονται, έχει βρεθεί ότι η τροποποίηση αυτή αυξάνει το σχηματισμό των ομοδιμερών, σε σχέση με τα ετεροδιμερή, αλλά φαίνεται να αυξάνει την αλληλεπίδραση με το DNA και για τα δύο είδη διμερών. Επίσης παρατηρήθηκε φωσφορυλίωση τόσο επαγόμενη από την πρόσδεση της T $_3$ (φωσφορυλίωση από MAP κινάσες), όσο και ανεξάρτητη από την παρουσία της. Γενικά, υπάρχει η πεποίθηση, από τα μέχρι στιγμής ευρήματα, ότι κάποιες από τις δράσεις που παρουσιάζουν οι TRs είναι ανεξάρτητες από την παρουσία της T $_3$ και εξαρτώνται από φωσφορυλιώσεις και από τη δράση ιστο-ειδικών κινασών και φωσφατασών (ανασκόπηση 247).

Σε αντίθεση, τώρα, με τους υποδοχείς των στεροειδών ορμονών, οι TRs έχουν την ικανότητα να προσδέονται στα TREs απουσία του συνδέτη τους. Με τον τρόπο αυτό ομο- και ετερο-διμερή των TRs έχουν την ικανότητα να επάγουν, μέσω θετικών TREs, την βασική μεταγραφική καταστολή γονιδίων-στόχων τους (261). Για τον σκοπό αυτό απαιτείται η αλληλεπίδραση των διμερών με τους συν-καταστολείς (**Εικ. 23**) των ορμονικών υποδοχέων NCoR και SMART.

Η πρόσδεση της ορμόνης T $_3$ στο διμερές TR/RXR έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση των συν-καταστολέων και τη στρατολόγηση των συν-ενεργοποιητών. Από πλήθος μελετών, γνωρίζουμε ότι οι TRs έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με τα μέλη της οικογένειας p160 (NCOA1/SRC-1, NCOA2/SRC-2/TIF-2/GRIP-1, NCOA3/SRC-3/pCIP/ACTR/AIB1/TRAM1/RAC3) καθώς και με τον p300/CBP (ανασκόπηση 229). Έχει βρεθεί επίσης ότι οι TRs, αλληλεπιδρούν με ένα ειδικό

σύμπλοκο συν-εργοποιητών που ονομάζεται TRAP (thyroid receptor-associated protein) (47) και το οποίο δεν φέρει ενεργότητα ακετυλοτρανσφεράσης ιστονών.



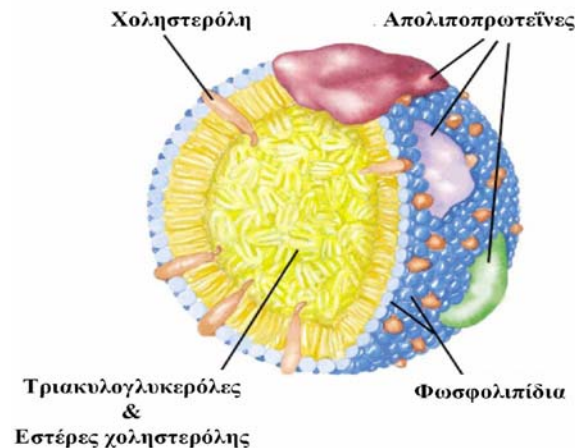
Εικόνα 23: Μοντέλο ενεργοποίησης και καταστολής από τους υποδοχείς των θυρεοειδών ορμονών.

Απουσία της ορμόνης T_3 , το διμερές TR/RXR στρατολογεί σύμπλοκα συν-καταστολέων με ενεργότητες απακετυλάσης ιστονών (HDAC), που έχουν ως αποτέλεσμα τη μεταγραφική καταστολή των γονιδίων-στόχων. Παρουσία της ορμόνης, το σύμπλοκο TR/ T_3 /RXR απελευθερώνει τους συν-καταστολείς και στρατολογεί συν-ενεργοποιητές με δράση ακετυλοτρανσφεράσης των ιστονών (HAT) με αποτέλεσμα τη μεταγραφική ενεργοποίηση [Zhang J. and Lazar M. A., (2000) *Annu. Rev. Physiol.* 62, 439–66]

ΣΤ. ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

1. Μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών

Οι απολιποπρωτεΐνες, μαζί με πρωτεΐνες μεταφοράς λιπιδίων, ένζυμα του πλάσματος και τους υποδοχείς των λιποπρωτεϊνών, συμμετέχουν στη βιογένεση, αλλά και στον καταβολισμό των λιποπρωτεϊνών (Εικ. 24)



Εικόνα 24: Λιποπρωτεΐνη του πλάσματος.

Σχηματική αναπαράσταση της γενικής δομής των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος

Η χοληστερόλη, οι τριακυλογλυκερόλες και άλλα λιπίδια που προκύπτουν από τον καταβολισμό των λιπών από τον οργανισμό, στο λεπτό έντερο, αλλά και από τον αναβολισμό τους σε ιστούς όπως το ήπαρ, μεταφέρονται στα υγρά του σώματος από τις λιποπρωτεΐνες. Οι λιποπρωτεΐνες ταξινομούνται κατά αυξανόμενη πυκνότητα ως εξής:

α) τα *χυλομικρά*, τα οποία παράγονται από το έντερο και περιέχουν μεγάλες ποσότητες τριακυλογλυκερολών. Μεταφέρουν τα λιπίδια που προσλαμβάνονται με την τροφή στον λιπώδη, αλλά και σε άλλους ιστούς. Περιέχουν μικρές ποσότητες απολιποπρωτεϊνών, όπως apoB-48, apoE, apoAI, apoAII, apoAIV, apoCII και apoCIII. Η υδρόλυση των χυλομικρών στον λιπώδη ιστό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία πλούσιων σε χοληστερόλη καταλοίπων, γνωστών ως *υπόλοιπα χυλομικρών*. Τα υπόλοιπα χυλομικρών, που φέρουν τις απολιποπρωτεΐνες apoB-48 και apoE, προσλαμβάνονται από το ήπαρ.

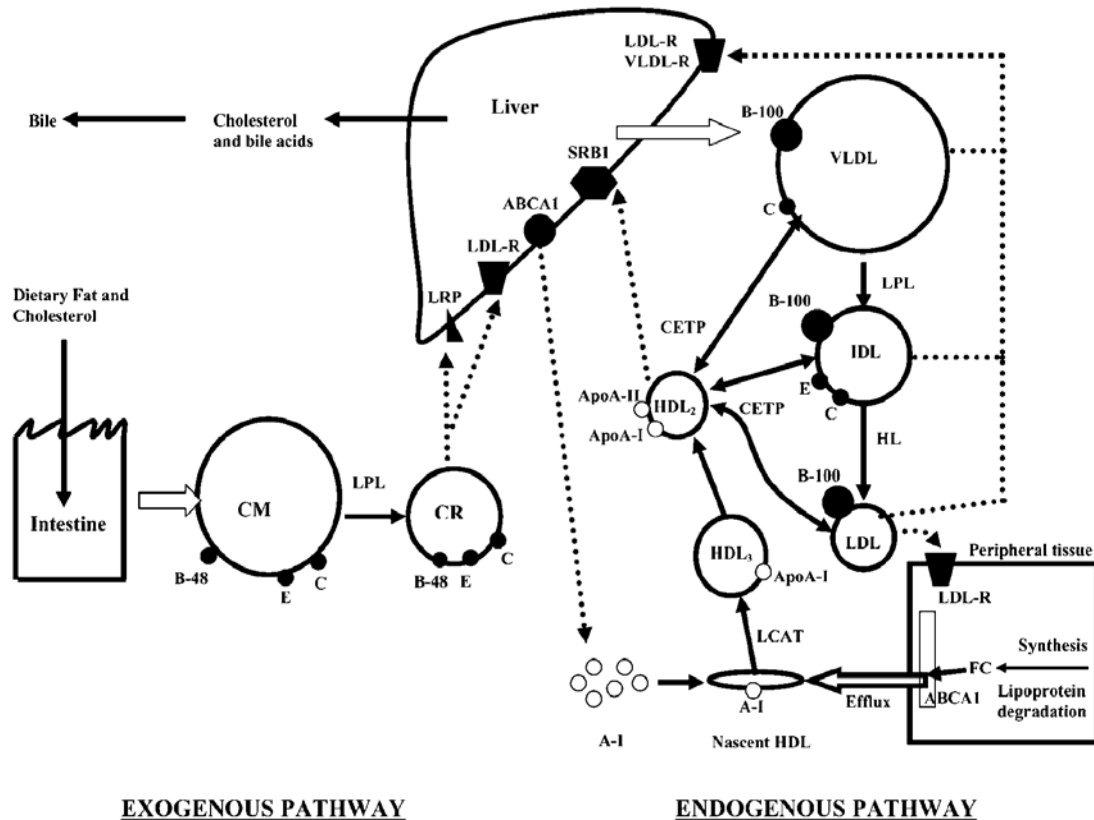
β) οι *λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας* (VLDL, very low density lipoproteins), οι οποίες παράγονται από το ήπαρ, περιέχουν μικρές ποσότητες από τις απολιποπρωτεΐνες apoB-100, apoE, apoC-II και apoC-III και μεταφέρουν τις

τριακυλογλυκερόλες που συνθέτονται στο ήπαρ, στον λιπώδη και σε άλλους ιστούς. Μετά την απελευθέρωση των τριακυλογλυκερολών από τις VLDL στον λιπώδη και τους άλλους ιστούς, δημιουργούνται υπόλοιπα, πλούσια σε εστέρες χοληστερόλης, γνωστά ως ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες.

γ) οι *λιποπρωτεΐνες ενδιάμεσης πυκνότητας* (IDL, intermediate density lipoproteins) περιέχουν τις απολιποπρωτεΐνες apoB-100 και apoE και είτε καταλήγουν στο ήπαρ, είτε μετασχηματίζονται σε λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας.

δ) οι *λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας* (LDL, low density lipoproteins) περιέχουν την απολιποπρωτεΐνη apoB-100 και αποτελούν τον κύριο φορέα χοληστερόλης στο αίμα. Ο ρόλος της LDL είναι να μεταφέρει χοληστερόλη στους περιφερικούς ιστούς για τον κυτταρικό διπλασιασμό, αλλά και τη βιοσύνθεση ορμονών. Και τέλος

ε) οι *λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας* (HDL, high density lipoproteins) περιέχουν τις απολιποπρωτεΐνες apoAI, apoAII, apoE, apoCII και apoCIII και εστέρες χοληστερόλης. Από όλες τις λιποπρωτεΐνες, είναι αυτή που περιέχει τα μεγαλύτερα ποσά απολιποπρωτεϊνών. Συντίθεται από ιστούς που περιέχουν υψηλά επίπεδα χοληστερόλης, όπως το ήπαρ και ο ρόλος της είναι να συλλέγει την ελεύθερη χοληστερόλη από το πλάσμα του αίματος και να την τοποθετεί στις VLDL ή LDL (262) (Εικ. 25).



Εικόνα 25: Μονοπάτι μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών .
 Σχηματική αναπαράσταση της μεταφοράς και μεταβολισμού των διαφόρων λιποπρωτεϊνών του οργανισμού (CM, chylomicron; CR, chylomicron remnant; FC, free cholesterol; HL, hepatic lipase; LDL-R, LDL receptor; VLDL-R, VLDL receptor). [Chan D. C., *et al* (2004) *Clinical Science* 107, 221–232]

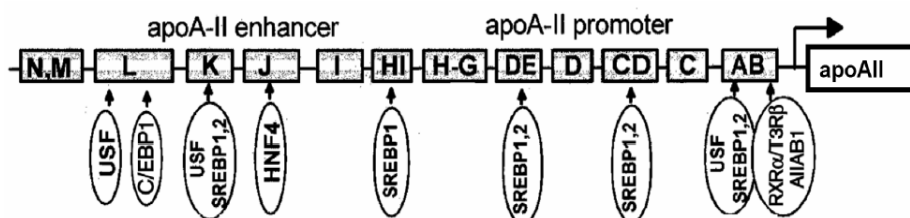
Περιμένει, λοιπόν, κανείς ότι αλλαγές στη δομή των απολιποπρωτεϊνών, ικανές να αλλάξουν τη λειτουργία τους, ή αλλαγές στη ρύθμιση της σύνθεσής τους, θα επηρεάσουν τα επίπεδα λιπιδίων-λιποπρωτεϊνών του πλάσματος και, σε ορισμένες περιπτώσεις, θα συμβάλουν στη παθογένεση της αθηροσκλήρυνσης (263). Αυτός είναι και ο κύριος λόγος για τον οποίο πραγματοποιούνται όλες οι μελέτες σχετικά με τη μεταγραφική ρύθμιση των απολιποπρωτεϊνών.

2. Παρουσίαση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών του ανθρώπου

Στις πιο καλά μελετημένες ανθρώπινες απολιποπρωτεΐνες, τόσο από άποψη φυσιολογίας, όσο και μεταγραφικής ρύθμισης των γονιδίων τους, ανήκουν οι:

➤ **Απολιποπρωτεΐνη A-II (apoA-II)**, το γονίδιο της οποίας εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1 (θέση 1q21-1q23). Η apoA-II, είναι μία από τις 2 βασικότερες πρωτεΐνες της HDL (264). Εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ και σε πολύ μικρότερο ποσοστό στο έντερο (265). Ο υποκινητής της apoA-II (-911/+29) περιέχει 8 κοντινές

ρυθμιστικές περιοχές (A-H) (κοντινός υποκινητής) και 6 μακρινές (I-N) (ενισχυτής) (266) (Εικ. 26). Οι περιοχές αυτές φέρουν *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία, τόσο για γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες (π.χ. USF, SREBP-1, SREBP-2 κ.α.), όσο και για τους ορμονικούς υποδοχείς HNF-4α και PPARα (στοιχείο J του ενισχυτή) και τα ετεροδιμερή των RXRα/TRβ (στοιχείο A/B του υποκινητή) (234, 267).



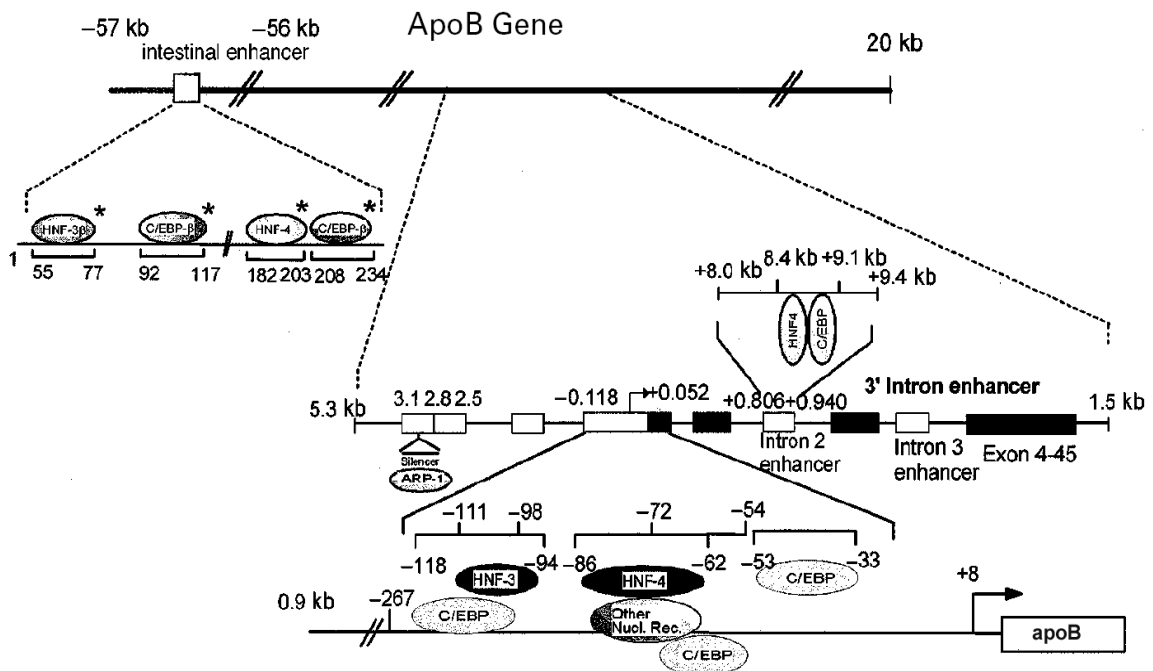
Εικόνα 26: Απολιποπρωτεΐνη ΑΙΙ.

Σχηματική αναπαράσταση των ρυθμιστικών περιοχών του γονιδίου της απολιποπρωτεΐνη ΑΙΙ. Στην εικόνα παρουσιάζονται οι θέσεις πρόσδεσης γενικών μεταγραφικών παραγόντων, αλλά και πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων [Zannis V. I., (2001) *Curr Opin Lipidol.* 12, 181-207].

Από *in vivo* μελέτες γνωρίζουμε ότι ο ενισχυτής είναι υπεύθυνος για την μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της apoAII στο ήπαρ (234), πιθανότατα μέσω του HNF-4α.

Μελέτες έχουν συνδέσει την αυξημένη παρουσία της apoAII στο αίμα με μία μορφή οικογενούς υπερλιπιδαιμίας (268), ενώ η μειωμένη παρουσία της σχετίζεται με την υπερχοληστερολαιμία (269).

➤ **Απολιποπρωτεΐνη Β (apoB)**, το γονίδιο της οποίας εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 2 (θέση 2p24) (Εικ. 27).



Εικόνα 27: Απολιποπρωτεΐνη Β.

Σχηματική αναπαράσταση των ρυθμιστικών περιοχών του γονιδίου της απολιποπρωτεΐνη Β. Στην εικόνα παρουσιάζονται οι θέσεις πρόσδεσης γενικών μεταγραφικών παραγόντων, αλλά και πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων [Zannis V. I., (2001) *Curr Opin Lipidol.* 12, 181-207].

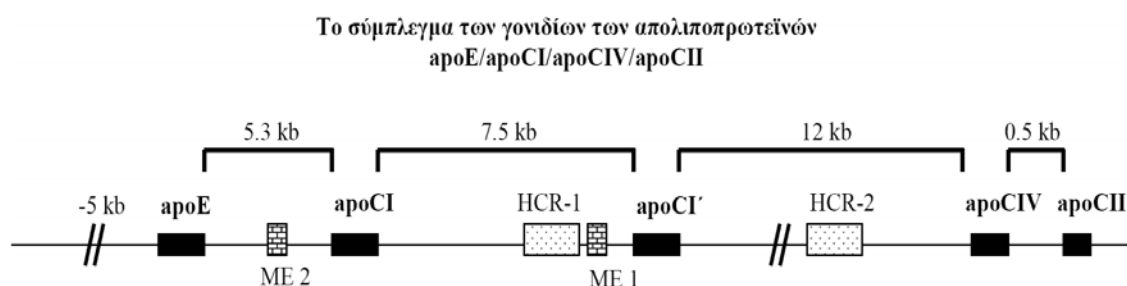
Η apoB συναντάται στο πλάσμα με 2 κυρίως ισομορφές, την apoB-48, η οποία και αποτελεί βασικό συστατικό των χυλομικρών και την apoB-100, που αποτελεί συστατικό των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητα (LDL). Εκφράζεται αποκλειστικά και μόνο στο έντερο (apoB-48) και στο ήπαρ (apoB-100) (270), με ελάχιστη έκφραση σε άλλου ιστούς (263). Η ηπατο-ειδική έκφραση ελέγχεται από ρυθμιστικές αλληλουχίες, οι οποίες εντοπίζονται 5kb ανοδικά και 1.5kb καθοδικά (μέσα στα ιντρόνια 2 και 3) του σημείου έναρξης της μεταγραφής της apoB, ενώ η έκφρασή της στο έντερο ελέγχεται από έναν ενισχυτή που εντοπίζεται 56kb ανοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής της apoB (234). Σημαντικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου της apoB είναι οι HNF-4α, HNF-3 και C/EBP για τους οποίους υπάρχουν θέσεις πρόσδεσης, τόσο στον υποκινητή, όσο και στους δύο ενισχυτές του γονιδίου. Στις θέσεις πρόσδεσης του HNF-4α μπορούν να προσδεθούν και άλλοι πυρηνικοί υποδοχείς, δεν γνωρίζουμε, όμως ακόμα τον φυσιολογικό τους ρόλο πάνω στην έκφραση της apoB.

Ασθένειες που σχετίζονται με την apoB είναι η υποβήτα-λιποπρωτεϊναιμία, κατά την οποία οι ασθενείς παρουσιάζουν μειωμένα ποσά LDL και αυξημένα ποσά HDL. Σε πολλές περιπτώσεις, η ασθένεια είναι αποτέλεσμα μεταλλαγής της apoB, η

οποία προκαλεί την έκφραση μίας πρωτεΐνης μικρότερης της apoB-100 (271). Σε πειράματα με ποντίκια που φέρουν μόνο ένα λειτουργικό αλληλόμορφο του apoB γονιδίου (αντίστοιχη κατάσταση), δείχθηκε ότι τα ποντίκια είναι ανθεκτικά στην υπερχοληστερολαιμία, ενώ η απουσία και των δύο αλληλομόρφων ήταν θανατηφόρα για τα έμβρυα (272). Από την άλλη, η υπερέκφραση της apoB συνδέεται με καρδιαγγειακές παθήσεις και σε διαγονιδιακά ποντίκια φάνηκε ότι αυξημένες ποσότητες apoB αυξάνουν τα επίπεδα της LDL και μειώνουν τα επίπεδα της HDL (273).

➤ **Απολιποπρωτεΐνες E, CI, CIV, CII (apoE/apoCI/apoCIV/apoCII)**, οι οποίες αποτελούν ένα σύμπλεγμα (cluster) γονιδίων που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 19 (θέση 19q13.2) (**Εικ. 28**).

Η apoE αποτελεί συστατικό των χυλομικρών και των λιποπρωτεϊνών πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL). Εκφράζεται στο ήπαρ και στους περισσότερους από τους περιφερικούς ιστούς και σε κύτταρα όπως στα μονοκύτταρα/μακροφάγα, στα αστροκύτταρα και τη μικρογλία (263, 274, 275).



Εικόνα 28: Το σύμπλεγμα των απολιποπρωτεϊνών E, CI, CIV, CII .

Σχηματική αναπαράσταση των ρυθμιστικών περιοχών των απολιποπρωτεϊνών E, CI, CIV, CII. Στην εικόνα παρουσιάζονται οι θέσεις των κοινών ρυθμιστικών στοιχείων HCR-1/2 (Hepatic Control Region-1/2) και ME-1/2 (Multienhancer-1/2).

Εκτός από τα στοιχεία του κοντινού υποκινητή, η έκφραση του γονιδίου της apoE ρυθμίζεται από τις ρυθμιστικές περιοχές multienhancer 1 και 2. Οι δύο αυτές περιοχές παρουσιάζουν ομολογία και εντοπίζονται 3,3 και 15,9 kb καθοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου, αντίστοιχα. Ο ρόλος τους είναι να ρυθμίζουν την έκφραση της apoE στα μακροφάγα και τα λιποκύτταρα (275). Σημαντικοί παράγοντες έκφρασης της apoE είναι ο SP1, ο HNF3, ο C/EBP και πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών, όπως ο LXR. Το γονίδιο της apoE παρουσιάζει πολυμορφικότητα στο σύνολο του πληθυσμού, με τα τρία πιο διαδεδομένα αλληλόμορφα να είναι το *ApoE2*, *ApoE3* και το *ApoE4*. Η apoE3 πρωτεΐνη θεωρείται

ως φυσιολογική, ενώ η apoE2 φαίνεται να σχετίζεται με τη παρουσία τύπου III υπερλιποπρωτεϊναιμίας, αλλά και με τον μειωμένο ή αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης αθηροσκλήρυνσης (276) και η apoE4, σχετίζεται με την ανάπτυξη αθηροσκλήρυνσης, αλλά και της νόσου του Alzheimer (AD, Alzheimer's Disease) (277).

Στο cluster αυτό εμφανίζονται 2 γονίδια *ApoCI*, ένα εκ των οποίων είναι ψευδογονίδιο. Η apoCI αποτελεί σε μεγάλο ποσοστό συστατικό των λιποπρωτεϊνών πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL), και σε πολύ μικρότερο ποσοστό των λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL). Εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ (263, 278), και σε μικρά ποσά στο δέρμα (279).

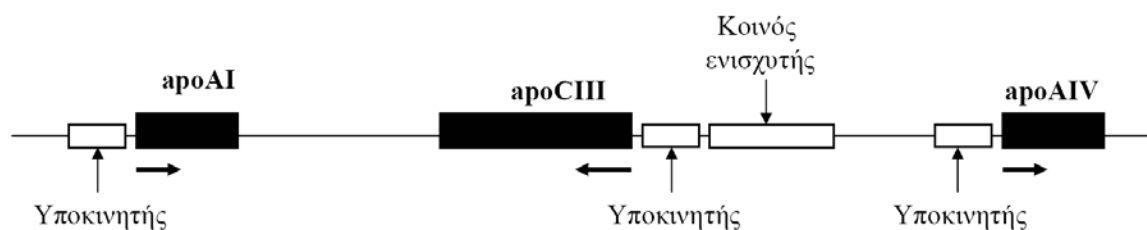
Η apoCII, όπως και η apoCI, αποτελεί σε μεγάλο ποσοστό, συστατικό των λιποπρωτεϊνών πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL), και σε πολύ μικρότερο ποσοστό των λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL). Εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ (263, 278) και στο έντερο (279). Σημαντικοί παράγοντες έκφρασης της apoCII είναι ο ARP-1, αλλά και οι πυρηνικοί υποδοχείς HNF-4α και RXRα/T3Rβ (234). Η υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου IB του ανθρώπου, έχει σχετιστεί με μεταλλάξεις που έχουν ανιχνευτεί στο γονίδιο της apoCII. Στις περιπτώσεις αυτές ανιχνεύονται αυξημένα ποσά τριγλυκεριδίων και χυλομικρών στο πλάσμα, ενώ η LDL και η HDL βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα (280).

Η apoCIV δεν είναι ιδιαίτερα μελετημένη απολιποπρωτεΐνη. Αυτό που γνωρίζουμε είναι ότι εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ (278).

Εκτός από τις κοντινούς υποκινητές που φέρουν και τα τέσσερα γονίδια του συμπλέγματος, έχουν εντοπισθεί και δύο επιπλέον ρυθμιστικά στοιχεία. Τα ρυθμιστικά αυτά στοιχεία είναι δύο ομόλογα HCR (Hepatic Control Regions), τα HCR-1 και HCR-2, τα οποία ρυθμίζουν την ηπατο-ειδική έκφραση των γονιδίων του συμπλέγματος (279). Αν και τα δύο στοιχεία είναι ικανά να επάγουν τη μεταγραφή όλων των γονιδίων του συμπλέγματος, φαίνεται ότι το HCR-1 είναι υπεύθυνο κυρίως για τη έκφραση της apoE και της apoCI, ενώ το HCR-2 για την έκφραση της apoCII και της apoCIV (234).

➤ **Απολιποπρωτεΐνες A-I, CIII, A-IV (apoA-I/apoCIII/apoA-IV)**, οι οποίες αποτελούν, επίσης, ένα σύμπλεγμα γονιδίων, που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 11 (θέση 11q23) (Εικ. 29).

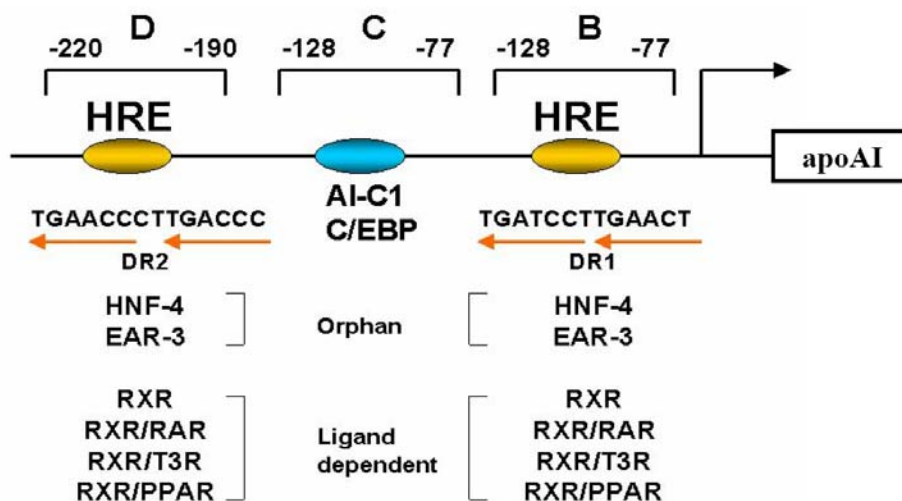
Το σύμπλεγμα των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών
apoAI/apoCIII/apoAIV



Εικόνα 29: Το σύμπλεγμα των απολιποπρωτεϊνών A-I, CIII, A-IV

Σχηματική αναπαράσταση των γονιδίων και των ρυθμιστικών περιοχών των απολιποπρωτεϊνών A-I, CIII και A-IV. Με τα οριζόντια βέλη χαρακτηρίζεται η φορά έκφρασης κάθε γονιδίου.

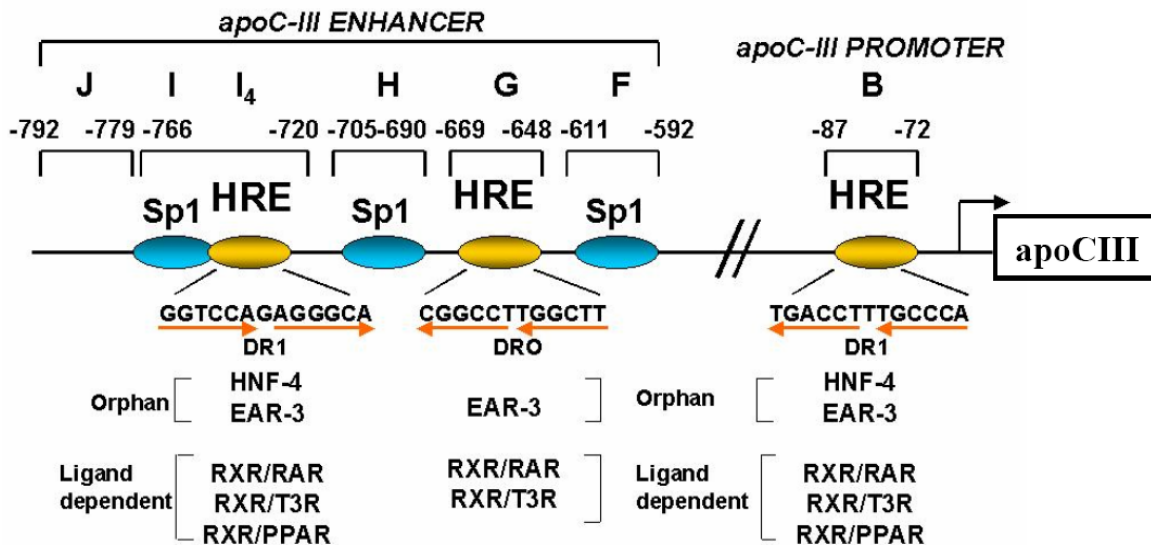
Η apoAI, αποτελεί το κύριο συστατικό της HDL και εκφράζεται σε μεγάλα ποσά στο ήπαρ και το έντερο, ενώ σε μικρότερα σε άλλους ιστούς (234). Απουσία της δεν σχηματίζεται HDL και γι' αυτό η μειωμένη έκφρασή της μπορεί να αποτελέσει παράγοντα παθογένεσης αθηροσκλήρυνσης και καρδιαγγειακών παθήσεων. Τα επίπεδα του mRNA της στους ιστούς ελέγχονται από ορμονικούς και διατροφικούς παράγοντες, ενώ ρυθμίζονται στα διάφορα στάδια της ανάπτυξης. Η apoA-I αποτελεί τον συνδέτη του υποδοχέα scavenger BI (SR-BI) και δραστικό συμπάρονο για την ενεργότητα του ενζύμου LCAT, υποκινώντας την έξοδο της χοληστερόλης από τα κύτταρα των περιφερικών ιστών (μονοπάτι της ανάστροφης μεταφοράς χοληστερόλης). Για τον λόγο αυτό, η apoA-I παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ποσότητας σε χοληστερόλη των περιφερικών ιστών. Πειραματικές αναλύσεις με ελλείμματα, αντικατάσταση νουκλεοτιδίων και DNase I footprinting του υποκινητή της apoA-I καθώς και αναλύσεις ενεργότητας CAT, έχουν δείξει ότι πάνω στον apoA-I υποκινητή, και μεταξύ των θέσεων -250 και -30, εντοπίζονται ρυθμιστικά στοιχεία τα οποία απαιτούνται για την ηπατοειδική μεταγραφή της apoA-I σε κυτταροκαλλιέργειες (234). Τρία είναι τα πιο σημαντικά ρυθμιστικά στοιχεία της περιοχής αυτής, τα B, C και D. Με αναλύσεις πρόσδεσης σε DNA (EMSA), συναγωνισμού και υπερανύψωσης ζώνης (supershift), δείχθηκε ότι τα ρυθμιστικά στοιχεία B και D προσδένουν ορφανούς και εξαρτώμενους από συνδέτες ορμονικούς υποδοχείς (234) (Εικ. 30).



Εικόνα 30: Ο υποκινητής της απολιποπρωτεΐνης A-I με τα ρυθμιστικά στοιχεία πάνω στα οποία προσδένονται πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών.

Σχηματική αναπαράσταση του γονιδίου της απολιποπρωτεΐνης A-I με τα ρυθμιστικά στοιχεία πάνω στα οποία προσδένονται πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών.

Η apoCIII, αποτελεί συστατικό των λιποπρωτεϊνών πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL), και σε πολύ μικρότερο ποσοστό των λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL) (262). Έχει δείχτει πως η apoCIII αναστέλλει την πρόσδεση των λιποπρωτεϊνών στους κυτταρικούς τους υποδοχείς, με αποτέλεσμα τη καταστολή του καταβολισμού των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών (281-283) και την εμφάνιση υπερτριγλυκεριδαιμίας. Αυτό συνεπάγεται ότι αυξημένα ποσά apoCIII οδηγούν σε συσσώρευση λιπιδίων πλούσιων σε τριγλυκερίδια στο πλάσμα (υπερτριγλυκεριδαιμία), πράγμα που αποτελεί ένα σοβαρό παράγοντα παθογένεσης της αθηροσκλήρυνσης. Η έκφραση της apoCIII είναι τόσο ιστοειδική, όσο και ρυθμιζόμενη κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του οργανισμού (284-285). Ειδικότερα, η apoCIII εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ και σε πολύ μικρότερο βαθμό, παρατηρείται και έκφρασή της στο έντερο (234). Ο υποκινητής της ανθρώπινης apoCIII, περιέχει 4 κοντινά (A-D) και 6 μακρινά (E-J) ρυθμιστικά στοιχεία μεταξύ των νουκλεοτιδίων -792 και -25 (286, 287). Τα μακρινά ρυθμιστικά στοιχεία F-J (μεταξύ των νουκλεοτιδίων -592 και -792) αποτελούν ένα κοινό ενισχυτή, ο οποίος αυξάνει τη μεταγραφική ικανότητα των υποκινητών όλων των γονιδίων του συμπλέγματος (172, 185, 287) (Εικ. 31).

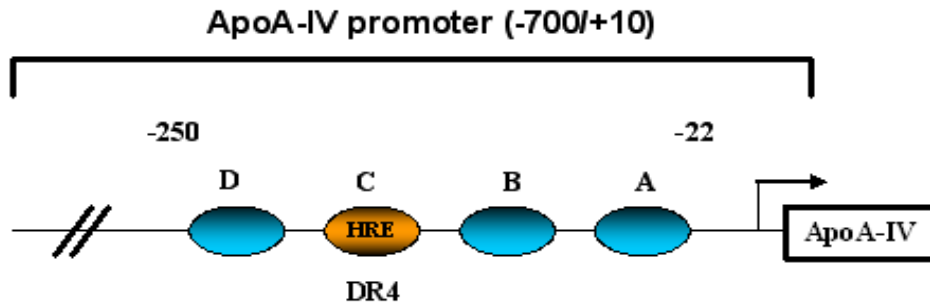


Εικόνα 31: Ρυθμιστικά στοιχεία του υποκινητή του γονιδίου της apoCIII.

Σχηματική αναπαράσταση των κοντινών (proximal) και μακρινών (distal) ρυθμιστικών στοιχείων του υποκινητή της apoCIII καθώς και των πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων που προσδένονται στα στοιχεία αυτά.

Ο κοντινός υποκινητή της apoCIII περιέχει ένα στοιχείο ορμονικής απόκρισης (Hormon Response Element, HRE), με απόσταση ενός νουκλεοτιδίου μεταξύ των επαναλήψεων (Direct Repeat 1, DR1), πάνω στο οποίο προσδένεται κυρίως ο πυρηνικός ορμονικός υποδοχέας HNF-4 α , αλλά και άλλοι ορμονικοί πυρηνικοί υποδοχείς, και το οποίο είναι υπεύθυνο για την *in vivo* ηπατοειδική έκφραση της apoCIII (172, 174, 185, 288). Ο μακρινός υποκινητής της apoCIII, περιέχει 3 θέσεις πρόσδεσης του γενικού παράγοντα SP1, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την *in vivo* έκφραση της apoCIII, αλλά και των apoAI και apoAIV, στο έντερο, αλλά και για την ενίσχυση της ηπατο-ειδικής τους μεταγραφής (185). Ο μακρινός υποκινητής, περιέχει, επίσης, μία θέση πρόσδεσης του παράγοντα ARP-1 και 2 HREs πάνω στα οποία προσδένονται ο HNF-4 α και άλλοι πυρηνικοί υποδοχείς, ορφανοί και μη, όπως ο RXR α ως ομοδιμερές ή ως ετεροδιμερές με τους TR β και PPAR α (185, 286) (Εικ. 31).

Η apoAIV είναι συστατικό των χυλομικρών και των λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL), ενώ εκφράζεται, κατά κύριο λόγο στο έντερο και σε μικρότερο ποσοστό στο ήπαρ (289). Ο υποκινητής της apoAIV φέρει 4 ρυθμιστικά στοιχεία (A-D) μεταξύ των νουκλεοτιδίων -22 και -250 (171). Το στοιχείο C περιέχει ένα DR4 HRE πάνω στο οποίο προσδένεται ο HNF-4 α και άλλοι πυρηνικοί ορμονικοί υποδοχείς (Εικ. 32).



Εικόνα 32: Ρυθμιστικά στοιχεία του υποκινητή του γονιδίου της apoAIV.
Σχηματική αναπαράσταση των ρυθμιστικών στοιχείων του υποκινητή της apoAIV.

Αν και η λειτουργία της δεν είναι ακόμα γνωστή, φαίνεται να συνδέεται με την απορρόφηση των λιπών που προέρχονται από την τροφή (290) και τον μεταβολισμό των HDL. Από έρευνες σε διαγονιδιακά ποντίκια φαίνεται ότι αυξημένη έκφραση της apoAIV έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της HDL και τη προστασία από τη δημιουργία αθηροματικής πλάκας και καταστροφής των αγγείων (291).

Z. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΟΛΥΝΣΕΩΝ ΚΑΙ ΦΛΕΓΜΟΝΩΝ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ ΣΤΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΩΝ ΛΙΠΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

1. Απόκριση σε οξεία φάση

Η απόκριση σε οξεία φάση (APR, acute-phase response) είναι μία ταχεία και πολύπλοκη αντίδραση του ξενιστή, η οποία προκαλείται από ερεθίσματα που δημιουργούνται από βλάβες οργάνων. Οι βλάβες αυτές προκαλούνται από μολύνσεις και φλεγμονές, στρες, τραυματισμό, εγκαύματα, ισχαιμική νέκρωση, αλλά και από τη ανάπτυξη όγκων (292).

Η APR συνοδεύεται από συγκεκριμένες αλλαγές στη συγκέντρωση των πρωτεϊνών του πλάσματος. Πρωτεΐνες των οποίων η συγκέντρωση αυξάνει κατά την APR, τουλάχιστον 25% [π.χ. CRP (C-reacting protein), SAA (serum amyloid A), φιβρονεκτίνη] αποτελούν τις θετικές-APR πρωτεΐνες, ενώ αυτές των οποίων η συγκέντρωση μειώνεται (αλβουμίνη, τρασφερίνη, α-φετοπρωτεΐνη), τις αρνητικές-APR πρωτεΐνες (292). Για τους μοριακούς μηχανισμούς που ελέγχουν τη μεταγραφική ρύθμιση των αρνητικών-APR πρωτεϊνών, γνωρίζουμε πολύ λιγότερα πράγματα, σε σχέση με τους μοριακούς μηχανισμούς που ελέγχουν τις θετικές-APR πρωτεΐνες. Η αλλαγή της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών αυτών κατά την APR οφείλεται κυρίως στην αλλαγή του ρυθμού έκφρασής τους στο ήπαρ, αλλά και σε άλλους ιστούς. Από μελέτες μικροσυστοιχιών από το ήπαρ ποντικών, στους οποίους

είχε χορηγηθεί ενδοτοξίνη, φάνηκε ότι ~7% των γονιδίων του ήπατος παρουσίασαν αλλαγές στην έκφραση τους, ως απόκριση στην τοξίνη (293). Θα πρέπει, ωστόσο, να έχουμε κατά νου ότι οι αλλαγές που παρατηρούνται στην έκφραση των πρωτεϊνών κατά την APR εξαρτώνται πολλές φορές από το είδος του οργανισμού που εξετάζουμε, σε συνδυασμό με το μέγεθος και το είδος της βλάβης.

Η APR που επάγεται κατά την μόλυνση / φλεγμονή, προστατεύει τον ξενιστή από περαιτέρω βλάβες. Σκοπός των αλλαγών που συντελούνται είναι: η εξουδετέρωση των μικροοργανισμών που εισβάλλουν στον ξενιστή, η μείωση κατά το δυνατό της καταστροφής του ιστού, η συμμετοχή στη τοπική ανοσολογική απόκριση και η αναγέννηση του ιστού. Εφόσον, όμως, η APR και οι αλλαγές αυτές παραταθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα, τότε μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές βλάβες στον ξενιστή (294).

Η αλλαγή στην έκφραση των πρωτεϊνών, που προκαλούνται κατά την APR, επάγονται από τις προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, οι οποίες παράγονται από διάφορους κυτταρικούς τύπους, όπως τα μακροφάγα, τα μονοκύτταρα, τα T λεμφοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα (292). Οι κύριες κυτταροκίνες που ευθύνονται για τον συντονισμό τόσο των ανοσολογικών αποκρίσεων, όσο και των αποκρίσεων σε φλεγμονές είναι οι TNF α και TNF β (Tumor Necrosis Factor), οι ιντερλευκίνες (ILs, Interleukins) και οι ιντερφερόνες (IFN- α , - β , και - γ).

Οι μολύνσεις και οι φλεγμονές, συνοδεύονται από παρόμοιες αλλαγές στον μεταβολισμό των λιπιδίων και των λιποπρωτεϊνών, οι οποίες επάγονται από τη παρουσία των κυτταροκινών. Θα πρέπει, επίσης, να επισημάνουμε ότι η έκκριση των φλεγμονωδών κυτταροκινών αυξάνει, παίζοντας παθογενετικό ρόλο, σε διάφορες κοινές διαταραχές του οργανισμού, όπως ο διαβήτης, η παχυσαρκία, το μεταβολικό σύνδρομο, η υπέρταση, η χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια, η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, αλλά και η αθηροσκλήρωση (295-301). Πολλές από τις διαταραχές αυτές προκαλούν αλλαγές στο μεταβολισμό των λιπιδίων, παρόμοιες με αυτές που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια μολύνσεων και φλεγμονών.

2. Αλλαγές στο μεταβολισμό των λιπών και των λιποπρωτεϊνών κατά τη μόλυνση και τη φλεγμονή

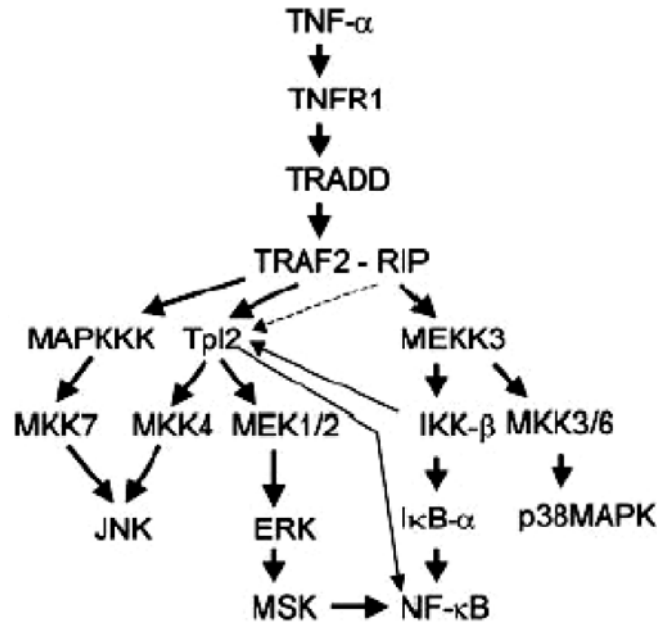
Μία από τις πρώιμες μεταβολικές αλλαγές που απαντώνται κατά τη μόλυνση / φλεγμονή του οργανισμού είναι η αύξηση των τριγλυκεριδίων (TG, triglyceride) στον ορό του αίματος (υπερτριγυκεριδαιμία), η οποία χαρακτηρίζεται από αυξημένα

επίπεδα VLDL (302). Οι επιπτώσεις των μολύνσεων / φλεγμονών στον μεταβολισμό των TG, φαίνεται να είναι όμοια σε όλα τα είδη, ενώ οι επιπτώσεις στο μεταβολισμό της χοληστερόλης διαφέρουν μεταξύ των τρωκτικών και των πρωτεύοντων. Έτσι, ενώ στα τρωκτικά παρουσιάζεται αύξηση στα επίπεδα χοληστερόλης του αίματος και αύξηση της σύνθεσής της από το ήπαρ, στα πρωτεύοντα είτε δεν παρατηρείται αλλαγή, είτε παρατηρείται μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης και της LDL στο αίμα (302). Ο μηχανισμός που προκαλεί αυτή τη διαφορετική αντίδραση μεταξύ των ειδών παραμένει άγνωστος. Παρόλα αυτά, κατά τη διάρκεια της APR, τα επίπεδα της HDL είναι μειωμένα τόσο στα τρωκτικά όσο και στα πρωτεύοντα. Η μείωση αυτή συνοδεύεται από αλλαγές στην έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με τον μεταβολισμό της HDL (303). Τέλος, οι μολύνσεις προκαλούν αλλαγές στη σύσταση και τη λειτουργικότητα των λιποπρωτεϊνών, μείωση του μονοπατιού της αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης και αύξηση της οξείδωσης των λιπιδίων.

Μέρος των αλλαγών που παρατηρούνται στον μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών κατά την APR φαίνεται να σχετίζεται με την μεταγραφική τροποποίηση που υπόκεινται τα γονίδια των απολιποπρωτεϊνών παρουσία των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών.

3. Το μονοπάτι του TNF α

Ο TNF α , όπως ήδη αναφέρθηκε, ανήκει στις προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Η πρόσδεσή του στον μεμβρανικό του υποδοχέα TNFR1 (TNF α Receptor 1) έχει ως αποτέλεσμα την στρατολόγηση των πρωτεϊνών RIP1 (Receptor interacting protein 1) και TRAF2 (TNF receptor associated factor 2) στο κυτταροπλασματικό C-άκρο του υποδοχέα. (304), με αποτέλεσμα τη μετάδοση σημάτων που ρυθμίζουν το μονοπάτι των MAPK κινασών και την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων όπως του NF- κ B (Εικ. 33), των AP-1, του c/EBP δ κ.α. (86, 192, 305-308).



Εικόνα 33: Το μονοπάτι του TNF α .

Σχηματική αναπαράσταση του μονοπατιού του TNF α που οδηγεί στην ενεργοποίηση των MAPK κινασών και του μεταγραφικού παράγοντα NF- κ B [Santasabuj Das, et. al. (2005) *J Biol Chem.*, 280, 23748-57].

Κομβικό σημείο στην επαγωγή του σήματος του TNF α αποτελεί η πρωτεΐνη Tpl2/COT (Tumor progression locus 2). Η *Tpl2* είναι ένα πρώτο-ογκογονίδιο το οποίο κωδικοποιεί για μία κυτταροπλασματική κινάση σερίνης / θρεονίνης, η οποία ανήκει στην οικογένεια των MAP3Κινασών (309). Η κινάση COT (MAP3K8), το ανθρώπινο ομόλογο της *Tpl2* κινάσης του ποντικού, ενεργοποιεί τις κινάσες ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase), μέσω ενεργοποίησης των MEK1/2 και την JNK (c-Jun N-terminal kinase), μέσω ενεργοποίησης της MKK4 (MAPK kinase 4). Με την υπερέκφρασή της ενεργοποιεί και άλλες MAPκινάσες, όπως η p38MAPK. Η *Tpl2/COT* συμμετέχει στην ενεργοποίηση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων όπως ο NF- κ B, ο NFAT και ο AP1. Αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο p105 του NF- κ B, το οποίο μετά τη πρωτεόλυσή του (από το σήμα του TNFR1), απελευθερώνεται και φωσφορυλιώνει την κινάση MEK. Η *Tpl2/COT* μεταφέρει σήματα προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών που συνδέονται με τους υποδοχείς TNF-RI, IL-1R (Interleukin-1 Receptor), CD40 και TLR4 (Toll like receptor 4), σε διάφορους κυτταρικούς τύπους όπως τα μακροφάγα, T- και B- κύτταρα. Η ίδια ενεργοποιείται με τη φωσφορυλίωσή της στη θρεονίνη 290 και οδηγείται σε αποικοδόμηση μετά την απελευθέρωσή της από στο σύμπλοκο του NF- κ B (308, 309).

Τέλος, ο κυριότερος στόχος ενεργοποίησης του μονοπατιού του TNF α είναι, όπως έχουμε αναφέρει, ο μεταγραφικός παράγοντας NF- κ B (Εικ. 33). Ο NF- κ B είναι μία διμερής πρωτεΐνη, η οποία έχει την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA. Οι υπομονάδες του NF- κ B προέρχονται από μία οικογένεια συγγενικών μεταγραφικών παραγόντων, που ονομάζεται Rel (ανασκόπηση 322). Το πιο συχνό διμερές του NF- κ B είναι το p65/p50. Η p65 αντιπροσωπεύει την πρωτεΐνη RelA, και αποτελεί την μεταγραφική υπομονάδα του NF- κ B, ενώ η p50 προκύπτει από πρωτεόλυση της NF- κ B1 (310). Η ενεργοποίηση του NF- κ B, επιτυγχάνεται μέσω φωσφορυλίωσης του αναστολέα I κ B (ανασκόπηση 322). Ο I κ B, είναι η πρωτεΐνη που κρατάει, μέσω φυσικής αλληλεπίδρασης, τον NF- κ B ανενεργό στο κυτταρόπλασμα. Φωσφορυλίωση του I κ B, προκαλεί την αποδέσμευση του από τον NF- κ B ο οποίος είναι σε θέση, πλέον, να μεταφερθεί στο κυτταρόπλασμα και να παίξει το ρυθμιστικό του ρόλο στα γονίδια-στόχους (ανασκόπηση 322).

Μία πρωτεΐνη που επίσης έχει την ικανότητα να ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα NF- κ B, είναι και ο LMP1 (Latent Membrane Protein 1, λανθάνουσα μεμβρανική πρωτεΐνη 1) του ιού Epstein-Barr (EBV). Ο ιός Epstein-Barr (EBV) ανήκει στην οικογένεια των γ ερποϊών και είναι εξαιρετικά διαδεδομένος στον άνθρωπο. Οι περισσότερες πρωταρχικές μολύνσεις συμβαίνουν τα πρώτα χρόνια της ζωής του ανθρώπου και είτε δεν εμφανίζουν συμπτώματα, είτε σχετίζονται με ήπιες πυρετώδεις ασθένειες. Όταν η μόλυνση συμβεί κατά την εφηβεία, ή σε ενηλίκους μπορεί να προκαλέσει μεταδοτική μονοπυρήνωση. Παρόλο που η πρωταρχική μόλυνση επιφέρει την ανοσοαπόκριση των T-λεμφοκυττάρων, ο EBV μπορεί να διατηρηθεί σε όλη τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου, προκαλώντας άδηλη μόλυνση των B-λεμφοκυττάρων μνήμης. Το αποτέλεσμα αυτής της λανθάνουσας μόλυνσης είναι η παραγωγή μη διαφοροποιημένων, συνεχώς πολλαπλασιαζόμενων λεμφοκυττάρων (λεμφοβλαστοειδείς κυτταρικές σειρές, LCLs), ιδιαίτερα σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Από γενετικές αναλύσεις με ανασυνδυασμένο EBV σήμερα γνωρίζουμε ότι για τον μετασχηματισμό και τη διατήρηση των LCLs είναι απαραίτητη, μεταξύ και άλλων πρωτεϊνών του ιού και η έκφραση της μεμβρανικής πρωτεΐνης LMP1 (323). Επίσης, είναι η μόνη πρωτεΐνη του EBV που επιφέρει μετασχηματισμό σε μη λεμφικά κύτταρα (324).

Η LMP1 είναι μια πρωτεΐνη 386 αμινοξέων, που αποτελείται από μια μικρή κυτταροπλασματική N-τερματική περιοχή, έξι διαμεμβρανικές περιοχές και μια μεγάλη κυτταροπλασματική περιοχή (C-terminal domain CTD). Πρόκειται για ένα

πρωτεϊνικό μόριο το οποίο μεταδίδει σήματα μετασχηματισμού από την πλασματική μεμβράνη, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB και την αλλαγή στον ρυθμό αύξησης των μολυσμένων με τον ιό κυττάρων (323). Έχει αποδειχθεί ότι η LMP1 ενεργοποιεί τον NF-κB, μέσω μονοπατιού σηματοδότησης παρόμοιου με εκείνου που επάγεται από τον TNF α , καθώς αρνητικώς επικρατούσες μορφές των NIK, IKK α και IKK β κινασών μπλοκάρουν την ενεργοποίηση του NF-κB χωρίς να επηρεάζουν την έκφραση του LMP1 (325, 326). Η διαφορά ανάμεσα σε TNFR και LMP1 είναι ότι ο δεύτερος επάγει σήματα αύξησης και ενεργοποίησης του NF-κB, συνεχώς, ακόμα και απουσία εξωκυττάριου ερεθίσματος.

Σκοπός και σημασία
της διδακτορικής
διατριβής

Ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η ανάδειξη των μηχανισμών που εμπλέκονται στην μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών του ανθρώπου από σηματοδοτικά μονοπάτια μέσω της ρύθμισης της μεταγραφική ικανότητας των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών.

Από τα εισαγωγικά στοιχεία συνειδητοποιούμε το σημαντικό ρόλο της σωστής έκφρασης των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών, για τη διατήρηση της ομοιόστασης των λιπιδίων και της χοληστερόλης στον ανθρώπινο οργανισμό. Απορύθμιση της έκφρασης των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση διαφόρων παθολογικών καταστάσεων που σχετίζονται με καρδιαγγειακές νόσους. Κύριοι ρυθμιστές της έκφρασης των περισσότερων γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών είναι μέλη της υπερικογένειας μεταγραφικών παραγόντων που ονομάζονται πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών μεταξύ των οποίων οι κυριότεροι είναι ο ορφανός πυρηνικός υποδοχέας HNF4α αλλά και οι RXRα και TRβ, πυρηνικοί υποδοχείς του 9-cis ρετινοϊκού οξέος και της θυρεοειδούς ορμόνης αντίστοιχα.

Σήμερα γνωρίζουμε ότι η μεταγραφική ενεργότητα των διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων, όπως και των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών, ρυθμίζεται από ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια ερεθίσματα τα οποία επάγουν διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια. Τα μονοπάτια αυτά όπως του TNFα, του TGFβ κ.α. είτε ελέγχουν τα πρωτεϊνικά επίπεδα των μεταγραφικών παραγόντων, μέσω γονιδιακής έκφρασης και αποικοδόμησης, είτε ελέγχουν τις λειτουργίες τους (ενδοκυτταρικός εντοπισμός, πρόσδεση στο DNA, αλληλεπίδραση με τους συν-ενεργοποιητές), μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων.

Από έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, σήμερα γνωρίζουμε πως η έκκριση των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως του TNFα αυξάνει, όχι μόνο κατά τη διάρκεια μολύνσεων και φλεγμονών, αλλά και σε διάφορες κοινές διαταραχές του οργανισμού, όπως ο διαβήτης, η παχυσαρκία, το μεταβολικό σύνδρομο, η υπέρταση, η χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια, η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, αλλά και αθηροσκλήρωση παίζοντας παθογενετικό ρόλο και προκαλώντας αλλαγές στο μεταβολισμό των λιπιδίων.

Ο προσδιορισμός των μοριακών αυτών μηχανισμών και η κατανόησή τους μπορεί να αποτελέσει στο μέλλον πολύτιμο εργαλείο για την αντιμετώπιση ασθενειών που σχετίζονται με τον μεταβολισμό των λιπιδίων και άλλων ασθενειών, όπως ο καρκίνος, στις οποίες εμπλέκονται οι πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών.

Υλικά και Μέθοδοι:

Υλικά:

Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- Πλασμίδια που φέρουν υποκινητές απολιποπρωτεϊνών (φορέας pGL3basic): apoCIII (-890/+24) Luc, apoCIII (-686/+24) Luc, apoCIII (-99/+24) Luc, apoCII (-550/+18) Luc, apoAIV (-700/+10) Luc, apoAI (-1500/-5) Luc, apoAII (-914/+29) Luc και apoB (-268/+8) Luc, apoE (-500/+77) Luc

- Πλασμίδια που φέρουν τον υποκινητή του SHP (φορέας pGL3basic): SHP -1383/+19 Luc, το οποίο μας παραχωρήθηκε από τον Δρ. Mark J. Evans (Wyeth Research, Cardiovascular and Metabolic Disease Research, Collegeville, Pennsylvania) και SHP -865/+10 Luc

- Πλασμίδια που φέρουν συνθετικούς υποκινητές: pG5B-Luc (φέρει 5 θέσεις πρόσδεσης για το DBD της πρωτεΐνης GAL4) και (NF-κB)x3-Luc (φέρει 3 θέσεις πρόσδεσης για τον παράγοντα NF-κB)

- Πλασμίδια συμπλήρωσης (Fill-up plasmids): ssDNA (salmon sperm DNA) της Gibco

- Πλασμίδια έκφρασης, σε ευκαρυωτικά κύτταρα, των πρωτεϊνών: LMP-1 (Latent Membrane Protein 1), NIK (NF-κB-inducing kinase), IKK β (Inhibitor of NF-κB kinase β), IκB-ND (Inhibitor of NF-κB non- degradable), p65, p50, p65/p50 hyb, Smad3, Smad4, hHNF4 α , hRXR α , hT3R β , Pin1, Pin1-W34A

Οι φορείς έκφρασης του αγρίου τύπου και των ελλειμματικών μορφών του HNF-4 α 1 του αρουραίου στον φορέα pCDNA1-amp ή σε σύντηξη με το DBD της πρωτεΐνης GAL4 μας προσφέρθηκαν από την Δρ. Μ. Χατζοπούλου-Κλαδαρά (Τμήμα Βιολογίας, ΑΠΘ). Ο φορέας έκφρασης για τον συν-ενεργοποιητή hPGC1 α (Peroxisome-proliferator-activated-receptor- γ co-activator-1) μας προσφέρθηκε από Δρ. Αν. Κράλλη (Dep. Of Cell biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, U.S.A.). Ο φορέας έκφρασης για τον συν-ενεργοποιητή hCBP και τον πυρηνικό υποδοχέα hSHP μας προσφέρθηκαν από τον Δρ. Ι. Ταλιανίδη (Ε.Κ.Β.Ε Αλ. Φλέμινγκ). Ο φορέας έκφρασης για τον hSRC3 καθώς και οι φορείς έκφρασης των χμιαρικών πρωτεϊνών GAL4-RXR α και GAL4-T3R β μας παραχωρήθηκαν από τον Δρ. Hinrich Gronemeyer (IGBMC, Illkirch, Strasbourg, France). Οι φορείς έκφρασης για τις πρωτεΐνες Trp2 αγρίου τύπου (wt, wild type), Trp2 Tr (Truncated) και Trp2 DN (dominant negative) μας παραχωρήθηκαν από τον Δρ. Χ. Τσατσάνη (Τμήμα

Ιατρικής, Ηράκλειο, Κρήτη). Τέλος, οι φορείς έκφρασης για τις πρωτεΐνες hCOT-wt, hCOT-DN (η κινάση COT είναι το ανθρώπινο ομόλογο της κινάσης Trp2) καθώς και shRNA (sort hairpin)-COT για την αποσιώπηση της έκφρασης της ενδογενούς COT, μας παραχωρήθηκαν από τον Δρ. Α. Ηλιόπουλο (Τμήμα Ιατρικής, Ηράκλειο, Κρήτη).

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη πραγματοποίηση των πειραματικών μεθόδων προέρχονται από τις εξής πηγές: Τα χημικά που χρησιμοποιούμε είναι από τη MERCK ή τη Sigma. Η αгарόζη αγοράστηκε από την εταιρεία EMS. Το θρεπτικό υλικό LB που χρησιμοποιήθηκε στις καλλιέργειες βακτηρίων περιείχε bacto-agar, bacto-tryptone yeast extract της εταιρείας Difco. Τα ένζυμα περιορισμού, το ένζυμο αποφωσφορυλίωσης του DNA CIAP (calf intestinal alkaline phosphates), η Taq πολυμεράση, η Co-Tag πολυμεράση, η T4 DNA λιγάση και τα ρυθμιστικά τους διαλύματα προέρχονται από τις εταιρίες Minotech, New England Biolabs, Gibco-BRL ή Promega. Τα δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) που χρησιμοποιήθηκαν στις αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (PCRs) αγοράστηκαν από την Pharmacia. Το αντιδραστήριο Trizol, που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του mRNA από ευκαρυωτικά κύτταρα, αγοράστηκε από την εταιρία Invitrogen. Η αντίστροφη μεταγραφάση (Superscript reverse transcriptase) και οι τυχαίοι εξαμερείς εκκινητές (random hexamer primers) που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) αγοράστηκαν από τη Pharmacia και την Invitrogen αντίστοιχα. Τα σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης (Glutathione Sepharose, GST beads), πρωτεΐνης A και πρωτεΐνης G, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για πειράματα GST-pull down, ανοσοκατακρήμνισης πρωτεΐνης και ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης, αγοράστηκαν από την εταιρεία Pharmacia Biotech. Η RnaseA και η λυσοζύμη αγοράστηκαν από τη Sigma. Για την απομόνωση τμημάτων DNA από πηκτική αгарόζη και την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μεγάλης κλίμακας βακτηριακή καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν τα QIAquick Gel Extraction Kit της QiaGen, CONCERTTM Rapid Gel extraction System και CONCERTTM High Purity Plasmid Midiprep System της Gibco-BRL. Ο δείκτης μοριακού βάρους λBstEII κατασκευάστηκε ύστερα από πέψη του DNA του λ βακτηριοφάγου που αγοράστηκε από το Ι.Τ.Ε. (Ιδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας, Ηράκλειο Κρήτης). Ο δείκτης μοριακού βάρους για τη πηκτική πολυακριλαμίδης είναι από την New England Biolabs. Οι αναστολείς πρωτεασών (PMSF, aprotinine, lupeptine) και οι αναστολείς φωσφατασών (EGTA, Sodium orthovanadate (Na₃VO₄), NaF) αγοράστηκαν από την Sigma. Στα πειράματα βιοτινυλίωσης χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια αгарόζης που

είναι επικαλυμμένα με στρεπταβιδίνη (Streptavidin beads) και στρεπταβιδίνη ομοιοπολικά συζευγμένη με HRP (horseradish peroxidase) που αγοράστηκαν από την Sigma. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης Protran αγοράστηκε από την εταιρεία Schleicher & Schuell. Τα αντισώματα α -HNF4a (C-19) polyclonal (goat), α -TR β monoclonal (mouse), α -NF- κ B p65(A) polyclonal (rabbit), α -Φώσφο-p53 (Ser 15) polyclonal (rabbit), α -myc (9E10) monoclonal (mouse), α -FLAG (M2) monoclonal (mouse), α - β -tubulin monoclonal (mouse), α -HA (mouse), α -φώσφο Ser/Thr-Pro είναι των εταιριών Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz Biotechnology, Inc., Sigma, Sigma, Eastman Kodak Co, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Millipore αντίστοιχα. Τα δεύτερα αντισώματα α -goat-FITC (συζευγμένο με fluorescein isothiocyanate), α -mouse-FITC, α -goat-HRP, α -mouse-HRP και α -rabbit-HRP είναι της εταιρίας Chemicon. Το δεύτερο αντίσωμα α -goat-rodamine μας παραχωρήθηκε από τον Δρ. Χ. Στουρνάρα. Το αντίσωμα α -HNF4a (rabbit) μας προσφέρθηκε από τον Δρ. Ι. Ταλιανίδη (Ε.Κ.Ε.Β Αλ. Θλέμινγκ). Τα αντισώματα α -ERK και α -pERK μας παραχωρήθηκαν από τον Δρ. Γ. Μαυροθαλασσίτη (IMBB-ITE, Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας-Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας). Τέλος, τα αντισώματα α -JNK / α -pJNK και α -p38MAPK / α -p p38MAPK μας παραχωρήθηκαν από τον Δρ. Χ. Τσατσάνη (Τμήμα Ιατρικής, Ηράκλειο, Κρήτη). Για την αυτοραδιογραφία χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Super Signal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate), ειδικό για την ανίχνευση του HRP, είναι της εταιρίας PIERCE και το υπερευαίσθητο σύστημα ανοσοαποτύπωσης (Kodak-Scientific Imaging Film) της εταιρείας Kodak. Ο αναστολέας της μη ειδικής πρόσδεσης πρωτεϊνών στο DNA, poly(dI/dC) και τα μαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης (Streptavidin Dyna-beats) που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα κατακρήμνισης μέσω αλληλεπίδρασης με DNA (DNAP, DNA affinity precipitation) αγοράστηκαν από τις εταιρίες Amersham Pharmasia και Dynal Biotech αντίστοιχα. Τα αντιδραστήρια για τις κυτταροκαλλιέργειες (DMEM {Dulbecco's modified Eagle's medium}, FBS {Fetal Bovine Serum}, Τρυψίνη-EDTA, PBS, Πενικιλίνη – Στρεπτομυκίνη) είναι της Gibco-BRL. Το ONPG (ο-νιτροφαινυλο-γαλακτοπυρανοζίτης) που χρησιμοποιήθηκε στη δοκιμασία β -γαλακτοσιδάσης, αγοράστηκε από τη Sigma. Το υπόστρωμα για την μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας της λουσιφεράσης αγοράστηκε από την εταιρεία Promega. Ο αναστολέας της κινάσης MEK-1, UO126, αγοράστηκε από την εταιρία Upstate

Biotechnology. Ο ανθρώπινος γενετικά ανασυνδυασμένος μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), που αποτελεί τον συνδέτη (ligand) των αντίστοιχων υποδοχέων TGF- β RI και TGF- β RII αγοράστηκε από την εταιρία R & D Systems, ενώ η ανθρώπινη γενετικά ανασυνδυασμένη κυτταροκίνη TNF α , που αποτελεί συνδέτη του TNF υποδοχέα 1 (TNF receptor 1, TNFR1), από τη Minotech και τη Roche. Όλα τα ολιγονουκλεοτίδια -και τα βιοτινυλιωμένα- που χρησιμοποιήθηκαν, συντέθηκαν στο εργαστήριο Μικροχημείας του Ι.Τ.Ε. Τέλος, τα υπόλοιπα χημικά που χρησιμοποιήθηκαν, προέρχονται από κοινές εμπορικές πηγές στην μεγαλύτερη δυνατή καθαρότητα.

Μέθοδοι:

Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης (agarose gel)

Για τις ηλεκτροφορήσεις χρησιμοποιήθηκαν πήκτωμα αγαρόζης 1% και 2% (παρασκευαστικό gel). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής :

Σε κωνική φιάλη των 200 ml φέρονται 150ml TAE 1x (50xTAE : 2M Tris HCl pH 7.5, 2mM EDTA, οξικό οξύ για ρύθμιση του pH) και 1,5 gr αγαρόζης. Το μείγμα βράζεται μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη, αφήνεται να κρυώσει, οπότε και προστίθενται 7,5 μl βρωμιούχου αιθιδίου (χρωστική για το DNA), και εκχύνεται σε ειδικό εκμαγείο. Αφού το πήκτωμα στερεοποιηθεί, φέρεται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει 1x TAE ως ρυθμιστικό διάλυμα - φορέα της ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 100 Volt, ενώ για την απομόνωση τμήματος DNA από παρασκευαστικό gel γίνεται στα 50 Volt. Ο δείκτης που χρησιμοποιούμε για να υπολογίσουμε τα μεγέθη των DNAs που ηλεκτροφορούμε, είναι το DNA του φάγου λ κομμένο με το περιοριστικό ένζυμο BstII. Τα μοριακά μεγέθη που παίρνουμε είναι (KD):8458, 7242, 6369, 5686, 4822/4327, 3675, 2322/1929, 1371/1264, 702/224/114. Τα DNAs φορτώνονται στη πηκτή μαζί με 1x loading buffer (6x= 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 30% glycerol in H₂O, 15% ficoll (type 400) in H₂O).

Πέψεις DNA με τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών

Σε πρώτο στάδιο, πραγματοποιούνται δοκιμαστικές πέψεις ως εξής: η ποσότητα DNA που κόβουμε είναι 1μg. Τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιούμε είναι 10-12 u/μl και η συγκέντρωση ενζύμου που απαιτείται για αποτελεσματικό

κόψιμο είναι 2x σε σχέση με τη ποσότητα του DNA. Τα ρυθμιστικά διαλύματα των ενζύμων είναι 10 φορές συγκεντρωμένα και η ποσότητα που χρησιμοποιούμε είναι ίση ή μεγαλύτερη με τα μl του ενζύμου. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 10 φορές τα μl του ρυθμιστικού διαλύματος και συμπληρώνεται με ddH₂O. Οι αντιδράσεις, για τα περισσότερα ένζυμα πραγματοποιούνται στους 37°C για 2h.

Για τις πέψεις μεγάλης κλίμακας, οι ποσότητες των DNAs που κόβουμε είναι 17μg του φορέα στον οποίο θέλουμε να ενθέσουμε ένα κομμάτι DNA, και 30μg από τα ενθέματα. Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται, στην απαιτούμενη θερμοκρασία, για 16 ώρες (over night). Οι ποσότητες του ενζύμου και του ρυθμιστικού διαλύματος, υπολογίζονται με τον τρόπο που έχει είδη περιγραφεί.

(Τα ένζυμα πρέπει να διατηρούνται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας στο πάγο)

Απομόνωση τμημάτων DNA

Οι πλασμιδιακοί φορείς (vectors) και τα ενθέματα (inserts), τα οποία προκύπτουν ύστερα από πέψεις με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού, ηλεκτροφορούνται σε παρασκευαστικό πήκτωμα αγαρόζης, όπως περιγράφεται παραπάνω, και οι ζώνες αφαιρούνται από το πήκτωμα με τη βοήθεια χειρουργικής λεπίδας. Ακολούθως, οι ζώνες τοποθετούνται σε κολώνες του QIAquick Gel Extraction Kit της Qiagen, οπότε ακολουθείται η προτεινόμενη από την κατασκευάστρια εταιρεία, πειραματική διαδικασία.

Αποφωσφορυλίωση DNA

Η αντίδραση που προετοιμάζουμε είναι η εξής :

20μl πλασμίδιο κομμένο με περιοριστικά ένζυμα (0,5-1 μg/μl)

3μl 10x CIAP buffer

3μl ένζυμο CIAP

2μl H₂O

Στη συνέχεια ακολουθείται η εξής διαδικασία: Επιάζουμε την αντίδραση στους 37°C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια προσθέτουμε 2μl ενζύμου CIAP και επιάζουμε την αντίδραση στους 37°C για 30 λεπτά. Προσθέτουμε 70μl H₂O. Ακολουθεί προσθήκη 50μl φαινόλης και 50μl χλωροφορμίου και ανάδευση. Φυγοκεντρούμε στις 12.000 στροφές για 5 λεπτά και κατόπιν μεταφέρουμε την υδατική φάση σε καθαρό σωλήνα 1,5ml. Προσθέτουμε ίσο όγκου χλωροφόρμιο, αναδεύουμε και φυγοκεντούμε όπως προηγουμένως (προαιρετικό). Στη συνέχεια προσθέτουμε 1/10 του όγκου 3M οξικού

νατρίου και 2,5 όγκων 100% αιθανόλης και τοποθετούμε για 5 λεπτά στους -80°C . Τέλος, φυγοκεντρούμε στις 12000 στροφές για 10 λεπτά και αφού ξεπλύνουμε 2 φορές την πελέττα με 70% αιθανόλη, τη στεγνώνομε και επαναδιαλύουμε σε ddH₂O.

Αντίδραση σύνδεσης (ligation reaction)

Οι αντιδράσεις σύνδεσης έγιναν σε τελικό όγκο 10μl ή 20μl. Το συνολικό DNA κυμαινόταν στα 200 ng. Για την αντίδραση απαιτείται το ένθεμα του DNA να είναι 3 με 4 φορές περισσότερο από το φορέα. Το μείγμα της αντίδρασης περιείχε το DNA του πλασμιδιακού φορέα και του ενθέματος, 1μl από ένζυμο T4 DNA ligase και 1x του αντίστοιχου ρυθμιστικού διαλύματος.

Παρασκευή θρεπτικού μέσου LB για την ανάπτυξη στελεγών του βακτηρίου E.coli

✓ LB για υγρή καλλιέργεια: 1% bactotryptone, 0.5% bacto yeast extract, 1%NaCl. Αναδεύουμε το διάλυμα και αποστειρώνουμε το LB μέσα σε κωνική φιάλη.

✓ LB για στερεή καλλιέργεια: μετά την ανάδευση προσθέτουμε 1.5% άγαρ και μετά αποστειρώνουμε. Πριν στερεοποιηθεί το LB, το προσθέτουμε σε πιάτα Petri.

Για την επιλογή βακτηριακών αποικιών που φέρουν πλασμίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε αμπικιλίνη, προσθέτουμε στο LB Amp 100μg/ml (τελική συγκέντρωση).

Βακτηριακός μετασχηματισμός (transformation)

Για το βακτηριακό μετασχηματισμό χρησιμοποιούμε τα στελέχη DH5α, DH10β και BL21 της *E.coli*, το (κύτταρα ικανά να μετασχηματιστούν, competent cells). Η διαδικασία έχει ως εξής: Τα competent στελέχη διατηρούνται στους -80°C . Ξεπαγώνουμε τα κύτταρα στον πάγο και σε 100μl κυττάρων προσθέτουμε ~1μg από το DNA που θέλουμε να μεγαλώσουμε ή 10-15μl της αντίδρασης σύνδεσης. Αφήνουμε στον πάγο για 30min. Πραγματοποιούμε heat shock στους 42°C για 45sec και τοποθετούμε ξανά στο πάγο για 2-3min. Προσθέτουμε, κοντά σε φλόγα, 900μl LB. Επωάζουμε στους 37°C για 1h. Το τρυβλίο Petri με θρεπτικό LB-άγαρ και αντιβιοτικό αμπικιλίνη, όπου θα αναπτυχθεί η καλλιέργεια, έχει ήδη τοποθετηθεί σε επωαστήρα 37°C για να αποκτήσει την κατάλληλη θερμοκρασία. Σε στείρες συνθήκες, απλώνουμε στα τρυβλία, με τη βοήθεια αποστειρωμένης γυάλινης ράβδου,

100μl από τα μετασηματισμένα κύτταρα. Η επώαση γίνεται στους 37⁰C για 16 - 18 ώρες (over night).

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μικρής κλίμακας (miniprep procedure - micro screening)

Κάθε αποικία λαμβάνεται από το τρυβλίο με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα και καλλιεργείται σε 2 ml LB-ampicillin, για 16 -18 ώρες, στους 37⁰ C υπό συνεχή ανάδευση. Από κάθε καλλιέργεια λαμβάνεται 1,5 ml, φυγοκεντρείται σε 14000 rpm για 2 min, σε θερμοκρασία δωματίου και αφού αναρροφηθεί το υπερκείμενο με πιπέττα Pasteur υπό κενό, το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε 600μl διαλύματος λύσης (lysis buffer : 8% sucrose, 5% Triton-100x, 50mMEDTA pH8.0, 50mM Tris-HCl pH 7.5). Κατόπιν στα κύτταρα προστίθενται 20 μl λυσοζύμης (10 mg/ml) και αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Ακολουθεί βρασμός για 90 δευτερόλεπτα και μεταφορά των δειγμάτων σε πάγο. Το αποτέλεσμα της προαναφερθείσας διαδικασίας είναι η παραμονή του πλασμιδιακού DNA εν διαλύσει, ενώ οι μεμβράνες, οι πρωτεΐνες και το χρωμοσωμικό DNA του βακτηριακού κυττάρου είναι δυνατό να κατακρημνιστούν. Για το σκοπό αυτό, τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 14000 rpm για 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημα (debris) απομακρύνεται με οδοντογλυφίδα, και το πλασμιδιακό DNA κατακρημνίζεται με 600 μl παγωμένης ισοπροπανόλης. Τα δείγματα αφήνονται στους -200⁰ C, για 30 λεπτά και ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 14000 rpm επί 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Το DNA κατακρημνίζεται ως ίζημα, εκπλένεται με 700 μl 75% αιθανόλης και φυγοκεντρείται στις 14000 rpm επί 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την αναρρόφηση της αλκοόλης, τα δείγματα ξηραίνονται υπό κενό και το DNA επαναδιαλύεται σε 30 μl αποστειρωμένου nanopure νερού που περιέχει RNase (10 mg/ml).

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας (large scale preparation)

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκαν κολώνες Qiagen (Qiagen- tip 500), βάσει των οδηγιών της κατασκευάστριας εταιρείας. Το πλασμιδιακό DNA επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο διαλύματος TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8). Η συγκέντρωσή του μετράται με φωτομέτρηση στα 260 nm, ενώ η ποιότητά του εκτιμάται μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Πλασμιδιακές κατασκευές (plasmid constructions)

Χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα πλασμίδια :

Πλασμίδια αναφοράς (Reporter plasmids): Ο ομοπολυμερικός υποκινητής p(3XkB-L) έχει περιγραφεί προηγουμένως (Mitchell et al., 1995). Ο συνθετικός υποκινητής pG₅-E1B-luc, που πριείχει 5 διαδοχικές θέσεις πρόσδεσης του GAL4 εκφράζεται από το πλασμίδιο pBXG1. Το πλασμίδιο αναφοράς (-99/+24) apoCIII-CAT έχει περιγραφεί προηγουμένως (189, 167).

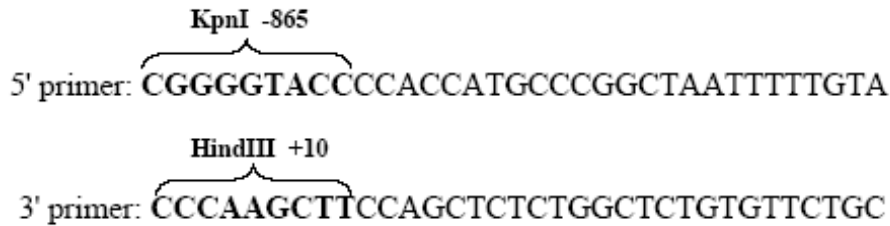
Πλασμίδιο συμπλήρωσης (Fill-up plasmids). ssDNA (salmon sperm DNA) της Gibco

Πλασμίδια έκφρασης (Expression vectors). Τα πλασμίδια pSG5LMP1-FLAG, pcDNA3LMP1-FLAG, pcDNA3LMP1(1-231)-FLAG, pCMVikBDN, pcDNA3NIK-FLAG, pcDNA3NIKDN, pcDNA3IKKβΔ9-FLAG (που εκφράζει την αγρίου τύπου IKKβ) pcDNA3IKKβΔ34-FLAG (που εκφράζει την αρνητικώς επικρατούσα μορφή του IKKβ) έχουν περιγραφεί προηγουμένως (328, 329). Ο φορέας έκφρασης pRC/CMV-p65 προσφέρθηκε από τον Δρ. Δ. Θάνο (Columbia University, New York, NY). Τα πλασμίδια pRC/CMVp65Δc και pRC/CMVp50 προσφέρθηκαν από το Δρ. Μαυροθαλασσίτη (Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο). Ο φορέας έκφρασης pCMX-Flag-hSHP μας προσφέρθηκε από τον Δρ. Ι. Ταλιανίδη (Ε.Κ.Ε.Β Αλ. Θλέμινγκ). Ο φορέας έκφρασης του pRC/CMVp50/p65, του pGEx2tp65ΔC και του pGEx2Tp50 έχουν περιγραφεί προηγουμένως (330). Το πλασμίδιο έκφρασης pMT2 HNF4 έχει αναφερθεί προηγουμένως (189, 167). Οι ελλειμματικές μορφές του HNF4 που εκφράζονται είτε από τον φορέα pcDNAIamp, είτε από τον φορέα pBX-G1 (σε σύζευξη με το GAL4) έχουν περιγραφεί προηγουμένως (86, 220).

Κατασκευή πλασμιδίων:

➤ SHP (-865/+10)-Luc

Για τη κατασκευή του πλασμιδίου αναφοράς που φέρει μέρος της περιοχή του υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου του SHP χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που φαίνονται παρακάτω



Με τη χρήση γενομικού DNA από κύτταρα HepG2, που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα, πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR και το προϊόν απομονώθηκε βάσει των πρωτοκόλλων που περιγράφηκαν προηγουμένως. Ακολούθησαν οι πέψεις του προϊόντος, αλλά και του φορέα pGL3-basic με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα (KpnI και HindIII). Πραγματοποιήθηκε αντίδραση σύνδεσης μεταξύ ενθέματος και φορέα. Οι θετικές κατασκευές επιλέχθηκαν βάσει μίας διαγνωστικής πέψης με KpnI και PvuII, η οποία δίνει ένα κομμάτι DNA μεγέθους ανάλογου με αυτό του ενθέματος

➤ **apoB (-268/+8) Luc**

Για τη κατασκευή του πλασμιδίου αναφοράς που φέρει μέρος της περιοχής του υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου της apoB χρησιμοποιήσαμε ένα παλαιότερο φορέα του apoB-CAT. Το ένθεμα απομονώθηκε μετά τη πέψη του φορέα apoB-CAT με τα περιοριστικά ένζυμα KpnI και SmaI. Με τα ίδια ένζυμα πραγματοποιήσαμε και τις διαδοχικές, αυτή τη φορά, πέψεις για τον φορέα pGL3-basic. Ακολούθησε αντίδραση ligation μεταξύ ενθέματος – φορέα και επιλογή των θετικών αποικιών βάσει του πρωτοκόλλου που είδη έχουμε περιγράψει.

➤ **apoAI (-1500/-5) Luc**

Για τη κατασκευή του πλασμιδίου αναφοράς που φέρει μέρος της περιοχής του υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου της apoA χρησιμοποιήσαμε ένα παλαιότερο φορέα του apoA Δ3-6-CAT. Στο πλασμίδιο αυτό πραγματοποιήθηκε πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα BamHI και HindIII, ακολούθησε απομόνωση από πηκτική αгарόζης και λείανση των άκρων του ενθέματος (blunting) με τη χρήση T4 πολυμεράσης. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 37⁰ C για 30min ως εξής:

Ένθεμα (5γ)	-> 10μl
T4pol	-> 1μl
NEB Buffer 2	-> 2μl
dNTPs (2mM)	-> 0.5μl
BSA 10x	-> 1μl
dH ₂ O	-> 5.5μl
Συνολο	= 20μl

Μετά την απενεργοποίηση του ενζύμου με 1μl EDTA, 75⁰ C για 20min, ακολούθησε καθαρισμός του ενθέματος με κολώνα.

Στον φορέα pGL3-basic πραγματοποιήσαμε τη πέψη με το περιοριστικό ένζυμο SmaI στους 25⁰ C. Το ένζυμο αυτό αφήνει μη κολλώδη άκρα. Ακολούθησε η απενεργοποίηση του ενζύμου στους 65⁰ C για 30min, η αποφωσφορυλίωση των άκρων του και ο καθαρισμός του όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως. Ακολούθησε αντίδραση σύνδεσης μεταξύ ενθέματος – φορέα και επιλογή των θετικών αποικιών βάση πέψης με τα περιοριστικά ένζυμα KpnI και SmaI που ελευθερώνουν κομμάτι DNA παρόμοιου μεγέθους με το ένθεμα.

Κυτταροκαλλιέργειες

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές COS-7, HEK 293T και HepG2 που προέρχονται από νεφρικά κύτταρα πιθήκου, νεφρικά κύτταρα εμβρύου ανθρώπου και κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος αντίστοιχα. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε φλάσκες 75 cm² και σε τρυβλία 6-well, p-60 και p-100 (διαμέτρου 6, 60 και 100 mm αντίστοιχα), σε επωαστήρα 37⁰C και σε συνθήκες 5% CO₂. Αποθέματα καλλιεργειών (stocks) φυλάσσονται σε θερμοκρασία -80⁰C σε θρεπτικό DMEM με 10% FBS και 10% DMSO. Τα κυτταρικά δείγματα εμβαπτίζονται σε υδατόλουτρο ώστε να ξεπαγώσουν και μεταφέρονται σε φλάσκες με πλήρες θρεπτικό υλικό, το οποίο ανανεώνεται την επόμενη μέρα προκειμένου να αποφευχθούν τυχούσες βλαβερές επιπτώσεις του DMSO. Το θρεπτικό υλικό στις φλάσκες ανανεώνεται κάθε 48 - 72 ώρες. Τα κύτταρα αραιώνονται (split) όταν σχηματίσουν μονοστιβάδα, με χρήση διαλύματος τρυψίνης (trypsin-EDTA), και στην κατάλληλη συγκέντρωση με προσθήκη πλήρους θρεπτικού υλικού (τελική αραιώση στις φλάσκες 1:10). Τα θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιούμε για τις κυτταρικές σειρές HEK293T και HepG2 είναι το High Glucose 10% FBS [50ml=44ml DMEM (4500

Glucose), 1ml Penicillin /Streptomycin, 5ml FBS], ενώ για τη κυτταρική σειρά COS7 το Low Glucose 10% FBS [50ml=44ml DMEM (1000 Glucose), 1ml Penicillin /Streptomycin, 5ml FBS].

Παροδικές επιμόλυνσεις κυτταρικών σειρών (transient transfections)

Οι παροδικές επιμόλυνσεις έγιναν με τη μέθοδο της συγκατακρήμνισης $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ με τα εκάστοτε κατάλληλα και επιθυμητά πλασμίδια. Τα COS-7 και τα HEK293T αραιώνονται σε 2.5×10^5 κύτταρα ανά well και σε 5×10^5 κύτταρα ανά τρυβλίο p60 και p100, ενώ τα HepG2 σε διπλάσιες ποσότητες αντίστοιχα, την προηγούμενη μέρα της επιμόλυνσης. Τα κύτταρα μετρώνται με αιμοκυττόμετρο Neubauer, της εταιρείας Hauser Scientific. Για την επιμόλυνση κυττάρων που καλλιεργούνται σε 6-well (χρησιμοποιούνται στο luciferase assay) παρασκευάζεται μείγμα που περιέχει συνήθως 2 μg πλασμιδίου αναφοράς, 6 μg πλασμιδίου έκφρασης ή/και πλασμιδίου συμπλήρωσης, 2 μg πλασμιδίου που φέρει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης, 31 μl CaCl_2 2M και 195 μl ddH₂O (H₂O for injections). Η ποσότητα του συνολικού DNA δεν υπερβαίνει τα 12 μg .

Για την επιμόλυνση κυττάρων που καλλιεργούνται σε τρυβλίο p-100 (χρησιμοποιούνται για έλεγχο της πρωτεϊνικής έκφρασης, Western blotting) το μείγμα περιέχει μέχρι 30 μg πλασμιδίου έκφρασης, 31 μl CaCl_2 2M και ποσότητα ddH₂O ώστε ο τελικός όγκος να είναι 250 μl .

Για την επιμόλυνση κυττάρων που καλλιεργούνται σε τρυβλίο p-60 (χρησιμοποιούνται για έλεγχο της πρωτεϊνικής έκφρασης και σε πειράματα ανοσοφθορισμού), το μείγμα περιέχει 2 μg κάθε πλασμιδίου έκφρασης και κατάλληλη ποσότητα πλασμιδίου συμπλήρωσης, ώστε η συνολική ποσότητα DNA να μην υπερβαίνει τα 17 μg , 31 μl CaCl_2 2M και ποσότητα ddH₂O ώστε ο τελικός όγκος να είναι 250 μl .

Σε κάθε περίπτωση, το μείγμα προστίθεται στάγδην και υπό συνεχή ανάδευση σε ίσο όγκο HEPES Buffered Saline (HBS) (2x HBS: 42 mM HEPES pH 7.1, 274 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 12 mM dextrose). Το διάλυμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά, για να προστεθεί ακολούθως στάγδην στο τρυβλίο με τα κύτταρα. Στην περίπτωση συγκατακρήμνισης σε 6-well, κάθε δείγμα μοιράζεται ισόποσα σε δύο wells. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 16 ώρες, αλλαγή θρεπτικού και επώαση για άλλες 24 ώρες. Στη συνέχεια τα κύτταρα εκκλένονται με PBS και συλλέγονται σε 300 μl διαλύματος λύσης (lysis buffer)-στην

περίπτωση των πειραμάτων σε 6-wells- είτε σε 1 ml PBS -στην περίπτωση των πειραμάτων σε τρυβλία p-100 ή p-60. Στην πρώτη περίπτωση, οι κυτταρικές μεμβράνες κατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη δεύτερη περίπτωση, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 5000 rpm για 5 min στους 4°C, και επαναδιάλυση σε μικρότερο όγκο PBS (100-200 µl). Σε κάθε περίπτωση, τα δείγματα μπορούν να διατηρηθούν σε θερμοκρασία -80°C.

Μέθοδος κανονικοποίησης β-gal

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την κανονικοποίηση της απόδοσης της επιμόλυνσης, καθώς και για την εξάλειψη του σφάλματος λόγω του διαφορετικού αριθμού κυτάρων κάθε τρυβλίου, σε πειράματα μέτρησης της αντίδρασης της λουσιφεράσης. Για τον σκοπό αυτό το μείγμα συγκατακρήμνισης (βλ. παραπάνω) περιέχει και πλασμίδιο-φορέα του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης υπό τον υποκινητή του Cytomegalovirus (πλασμίδιο pCMVβ-gal) ή του γονιδίου PGK (Phospho-Glycerate Kinase) (πλασμίδιο pGKβ-gal). Σε 20 µl κυτταρικού εκχυλίσματος προστίθενται 456 µl Sodium Phosphate buffer (0.1M pH 7.3), 132 µl ONPG (8 mg/ml σε 0.1 M Sodium Phosphate buffer), και 6 µl 100x salt (3M KCl, 1M MgCl₂, β-μερκαπτοαιθανόλη, ddH₂O, τελικός όγκος 1ml). Τα δείγματα επωάζονται σε υδατόλουτρο 37°C μέχρι να κιτρινίσουν. Η αντίδραση διακόπτεται με προσθήκη 200 µl διαλύματος Na₂CO₃ 1 M που προκαλεί μεταβολή του pH. Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) των δειγμάτων γίνεται σε φωτόμετρο στα 410 nm. Η μεγαλύτερη τιμή που λαμβάνεται ανά πείραμα διαιρείται με τις υπόλοιπες, οπότε προκύπτει για κάθε τρυβλίο ο παράγοντας κανονικοποίησης ο οποίος αντιστοιχεί στην ποσότητα δείγματος που θα χρησιμοποιηθεί στη μέτρηση της αντίδρασης της λουσιφεράσης.

Μέτρηση της αντίδρασης της λουσιφεράσης (Luciferase assay)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της μεταγραφικής ενεργοποίησης από τον υποκινητή του πλασμιδίου αναφοράς, ως αποτέλεσμα της επιμόλυνσης με πλασμίδια έκφρασης. Η εκτίμηση αυτή γίνεται με χρήση ενζυμικής αντίδρασης, όπου μετράται η δραστηριότητα του ενζύμου της λουσιφεράσης που προέρχεται από την πυγολαμπίδα (fire fly) και που, επίσης, εκφράζεται στα κύτταρα που επιμολύνθηκαν. Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιούνται 60µl από τα 100µl επαναδιαλυμένου σε Tris-HCl pH 7,9 250mM κυτταρικού εκχυλίσματος και 60µl

υποστρώματος λουσιφεράσης. Η τιμή της μεταγραφικής ενεργοποίησης κάθε δείγματος δίνεται από το λουμιόμετρο (Illuminometer) σε RLU/s.

Πηκτή πολυακρυλαμίδης για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Η πηκτή πολυακρυλαμίδης αποτελείται από δύο φάσεις:

- ✓ το stacking gel (6ml) => 3,6ml ddH₂O, 0,9ml 30% ακρυλαμίδη, 1,5ml stacking buffer, 60μl 10% APS, 6μl TEMED.
- ✓ το running gel (10ml) => 10,5% = 3,9ml ddH₂O, 3,5ml 30% ακρυλαμίδη, 2,5ml running buffer, 160μl 10% APS, 8μl TEMED

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε συσκευή Bio-Rad Protean electroblot στα 200V. Το ρυθμιστικό διάλυμα-φορέας μέσα στο οποίο τοποθετείται η Πηκτή για την ηλεκτροφόρηση είναι το 1xTGS [10x TGS (1L)= 30.3gr Tris, 144.2gr Glycine, 10gr SDS, pH 8.3]

Ο δείκτης που χρησιμοποιούμε για να υπολογίσουμε τα μεγέθη των πρωτεϊνών είναι ο Prestained Protein Marker (PPM). Τα μοριακά μεγέθη (KD) που παίρνουμε από τον δείκτη είναι: PPM=175, 83, 62, 47.5, 32.5, 25, 16.5, 6.5. Οι πρωτεΐνες φορτώνονται στη πηκτή μαζί με 2x SDS Loading Buffer (τελική συγκέντρωση 1x)

Διαλύματα

- 30% ακρυλαμίδη= σε 100ml ddH₂O προσθέτουμε 29gr acrylamide, 1gr bis-acrylamide και φιλτράρουμε (0,45 ή 0,22 μm).
- stacking buffer= 0,5M Tris, 0,4% w/v SDS, pH 6.8 φιλτράρουμε με φίλτρο 0,45 ή 0,22 μm.
- running buffer= 1,5M Tris, 0,4% w/v SDS, pH 8.8 φιλτράρουμε με φίλτρο 0,45 ή 0,22 μm.
- APS 10% (10ml)=1gr APS σε 1ml ddH₂O.
- Sample buffer 2x (10ml)= 0,625ml Tris 2M, 4ml SDS 10%, 0,4ml β-mercaptoethanol, 1ml Glycerol, 2mg Bromophenol Blue, 100mM DTT, pH 6.8

Ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης (Western Blot)

Ίσες ποσότητες πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί, υπόκεινται σε SDS/PAGE ηλεκτροφόρηση με την μέθοδο που έχει ήδη περιγραφεί. Σε κάθε δείγμα προστίθεται κατάλληλη ποσότητα από το 4X SDS

Loading Buffer [2.5 ml Tris-HCl, 1.6 ml β -mercaptoethanol, 8 ml 20% SDS, 4 ml glycerol, 8 mg bromophenol blue]. Χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα πολυακρυλαμίδης 8.5%, 10.5% ή 12.5%. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε 500 ml διαλύματος 1x TGS (1L 10x TGS : 30.3 gr Tris, 144.2 gr Glycine, 10 gr SDS, pH 8.3), στα 200 Volt και με χρήση της συσκευής Bio-Rad Protean electroblot. Η ίδια συσκευή χρησιμοποιήθηκε και για τη μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβάνες νιτροκυτταρίνης με 1000 ml Transfer Buffer [700 ml H₂O, 100 ml 10x TGS, 200 ml methanol].

Ακολουθεί χρώση των πρωτεϊνών με χρωστική Poinceau, έκπλυση με διάλυμα TBS-T [1x TBS, 0.05% Tween-20] [1 L 10x TBS: 90 gr NaCl, 250 ml Tris-HCl 2M pH 7.3] για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης των πρωτεϊνών μπλοκάρονται με εκπλύσεις με διάλυμα TBB [1x TBS, 5% ημιαποβουτηρωμένο γάλα, 0.05% Tween-20] 3 φορές, 10 λεπτά τη φορά, σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης επωάζονται για 16 ώρες (over night) στου 4⁰C με το αντίσωμα, που ανιχνεύει τον επιθυμητό επίτοπο ή την πρωτεΐνη, σε κατάλληλη αραιώση σε διάλυμα TBB. Ακολούθως, οι μεμβράνες εκπλένονται 3 φορές με διάλυμα TBS-T, 10 λεπτά τη φορά, σε θερμοκρασία δωματίου. Η επώαση των μεμβρανών σε κατάλληλο, αραιωμένο 1: 10000 σε TBS-T, δευτερεύον αντίσωμα HRP, γίνεται και πάλι για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν γίνονται 3 εκπλύσεις των 10 λεπτών η κάθε μία με TBS-T, και 1 έκπλυση των 5 λεπτών σε TBS, όλες σε θερμοκρασία δωματίου. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών γίνεται χρησιμοποιώντας το σύστημα ενισχυμένου χημειοφωσφορισμού (ECL Western blotting kit) και εκθέτοντας τις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης σε ECL-hyperfilm ή σε Fuji medical X-Ray film (Super RX) για διάφορα χρονικά διαστήματα.

Οι μεμβράνες μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν για εκ νέου ανίχνευση διαφορετικού επίτοπου, αφού υποβληθούν σε διαδικασία stripping, με χρήση κατάλληλου διαλύματος (Stripping buffer: 100 mM β -mercaptoethanol, 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.7) και επώαση στους 50⁰C για 30 λεπτά, με παροδική ανάδευση. Ακολουθούν εκπλύσεις και επώσεις των μεμβρανών, όπως περιγράφεται παραπάνω.

Παραγωγή και καθαρισμός πρωτεϊνών που είναι σε σύντηξη με τη πρωτεΐνη GST από βακτήρια

Οι πρωτεΐνες που θέλουμε να παράγουμε είναι κλωνοποιημένες σε pGex πλασμίδια (pGex-2TK) και στο N-άκρο τους είναι συντηγμένες με τη πρωτεΐνη GST

του *Shistosoma japonicum*. Τα pGex πλασμίδια περιέχουν τον υποκινητή *tac* ο οποίος βρίσκεται μπροστά από τη συντηγμένη πρωτεΐνη και της προσδίδει τη δυνατότητα επαγωγής κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (χορήγηση IPTG).

Παραγωγή των GST-πρωτεϊνών: Το πρώτο στάδιο της παραγωγής των GST-πρωτεϊνών είναι ο βακτηριακός μετασχηματισμός του DH5α στελέχους της *E.coli*, με τη διαδικασία που παρουσιάστηκε προηγουμένως. Στη συνέχεια, για να ελέγξουμε την παραγωγή ή όχι της πρωτεΐνης, αλλά και για να εντοπίσουμε τη θέση της (ελεύθερη στο κυτταρόπλασμα ή σε inclusion bodies), ώστε να μπορέσουμε να την απομονώσουμε, πραγματοποιούμε μία μικρής κλίμακας επαγωγή. Η αποικία που διαλέγουμε μεγαλώνει, αρχικά σε 2ml LB-Amp στους 37°C over night. Στη συνέχεια κρατάμε 0,5ml από τη καλλιέργεια σε erpendorf 1,5ml, φυγοκεντρούμε στα 13.000 rpm για 1min και αφαιρούμε το υπερκείμενο (δείγμα πριν την επαγωγή). Περνάμε την υπόλοιπη καλλιέργεια σε 20ml LB-Amp και επωάζουμε στους 37°C μέχρι τη στιγμή που η οπτική πυκνότητα (OD) φτάσει 0,6-0,8 (φωτομετρούμε 1ml της καλλιέργειας στα 600nm, visual). Στη φάση αυτή προσθέτουμε IPTG τελικής συγκέντρωσης 250μM και επωάζουμε στους 37°C για 3h. Μετά την επώαση κρατάμε και πάλι 0,5ml από τη καλλιέργεια σε erpendorf 1,5ml, φυγοκεντρούμε στα 13.000 rpm για 1min και αφαιρούμε το υπερκείμενο (δείγμα μετά την επαγωγή). Ρίχνουμε τα υπόλοιπα κύτταρα της καλλιέργειας με φυγοκέντρηση στα 3.500 rpm, για 20min στους 4°C. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε τις πελέτες σε 3-4ml PBS1x. Ακολουθεί σπάσιμο των κυττάρων με sonication στον πάγο (3-4 φορές από 30sec). Προσθέτουμε Triton X-100 σε τελική συγκέντρωση 1% και επωάζουμε στο rotator στους 4°C. Φυγοκεντρούμε στους 4°C στα 10.000rpm για 10min και μαζεύουμε το υπερκείμενο σε falcon (SN, supernatant). Στη συνέχεια προσθέτουμε στις πελέτες 400μl Solubilization Buffer (1mM EDTA, 25mM triethanolamine, 1,5% *N*-laurysarcosine) και επωάζουμε στον rotator στους 4°C. Προσθέτουμε Triton X-100 σε τελική συγκέντρωση 2% και CaCl₂ σε τελική συγκέντρωση 1mM. Φυγοκεντρούμε στους 4°C στα 10.000rpm για 10min και μαζεύουμε το υπερκείμενο σε falcon (Sol.SN, solubilized supernatant). Ηλεκτροφορούμε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 5μl από την πελέτα πριν την επαγωγή, 5μl από την πελέτα μετά την επαγωγή (οι πελέτες έχουν επαναδιαλυθεί σε 10 και 15μl PBS 1x αντίστοιχα), 15μl από το SN και 15μl από το Sol.SN σύμφωνα με το πρωτόκολλο που έχει περιγραφεί. Η πρωτεΐνες γίνονται ορατές με τη χρήση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue.

Εφόσον δούμε ότι υπάρχει επαγωγή και εντοπίσουμε την πρωτεΐνη, προχωράμε στη παραγωγή της πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακα. Αυτό που αλλάζει είναι ότι η αρχική καλλιέργεια είναι 50ml LB-Amp. Από τη καλλιέργεια αυτή περνάμε τα 30ml σε 200 ή 250ml LB-Amp.

(Σημ.: Όλη η διαδικασία απομόνωσης των πρωτεϊνών γίνεται στο πάγο και η φύλαξη των κυττάρων που έχουμε ρίξει με φυγοκεντρήσεις αλλά και των υπερκειμένων γίνεται στους -20°C .)

Εξισορρόπηση των Glutathione Sepharose beads (Equilibration): Τα σφαιρίδια γλουταθειόνης σεφαρόζης (Glutathione Sepharose, GS beads), παρέχονται από την εταιρία σε συγκέντρωση 75%. Η εξισορρόπηση 1ml διαλύματος που περιέχει 75% σφαιρίδια γλουταθειόνης σεφαρόζης, γίνεται ως εξής: Το 1ml του δ/τος φυγοκεντρείται στους 4°C , 10.000rpm για 5min. Αναρροφούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 7.5ml PBS 1x (10φορές ο όγκος των σφαιριδίων). Φυγοκεντρούμε στους 4°C , 10.000rpm για 5min και αναρροφούμε το υπερκείμενο. Προσθέτουμε 750μl PBS 1x (όγκος ίσος με τον όγκο των σφαιριδίων). Με τη μέθοδο αυτή έχουμε φτιάξει ένα εξισορροπημένο δ/μα 50% σφαιριδίων γλουταθειόνης σεφαρόζης σε PBS 1x.

Απομόνωση των GST χιμαιρικών πρωτεϊνών: Ανάλογα με το που έχουμε εντοπίσει την πρωτεΐνη μας, προσθέτουμε είτε στο υπερκείμενο, είτε στο υπερκείμενο μετά το Solubilization, την κατάλληλη ποσότητα σε μl από το δ/μα 50% σφαιριδίων γλουταθειόνης-σεφαρόζης εξισορροπημένων σε PBS (η ποσότητα αυτή καθορίζεται από τη ποσότητα της GST-πρωτεΐνης που έχει παραχθεί και κυμαίνεται από 250μl ως 300μl). Τα δείγματα αφήνονται σε περιστροφή, overnight στους 4°C . Το επόμενο πρωί φυγοκεντρούνται στις 2000 rpm για 5 λεπτά, στους 4°C . Στη συνέχεια, τα σφαιρίδια υφίστανται για 3 φορές την ακόλουθη διαδικασία : έκπλυση με παγωμένο PBS/1% Triton (1ml αν έχουμε τα beads σε eppendorf ή 3ml αν τα έχουμε σε falcon), περιστροφή για 5 λεπτά στους 4°C , και φυγοκέντρωση στις 2000 rpm για 5 λεπτά, στους 4°C . Μετά την τελευταία έκπλυση, στα σφαιρίδια προστίθεται PBS 1x (0,5ml αν έχουμε τα beads σε eppendorf ή 1ml αν τα έχουμε σε falcon), και ύστερα από στιγμιαία φυγοκέντρωση και απόρριψη του υπερκειμένου, στα σφαιρίδια προστίθεται PBS 1x ποσότητας ίση με τον όγκο των καθαρών beads. Τα δείγματα αποθηκεύονται στους 4°C . Σε 10-20μl δείγματος προστίθεται ίσος όγκος 2x SDS Loading Buffer, και μετά από βρασμό για 5 λεπτών, αναλύεται η έκφραση της GST-πρωτεΐνης σε 12,5% η

10,5% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Μετά την ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα βάφεται με χρωστική Commasie, που καθιστά ορατές τις πρωτεΐνες.

In vitro αλληλεπίδραση πρωτεϊνών (pull-down)

Η πειραματική αυτή διαδικασία απαιτεί τη χρήση δύο πρωτεϊνών οι οποίες θα αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους. Η μία πρωτεΐνη είναι αυτή που είναι σε σύντηξη με τη GST και παράγεται από βακτηριακά κύτταρα, ενώ η άλλη πρωτεΐνη παράγεται είτε από ευκαρυωτικά κύτταρα, και συγκεκριμένα από τη κυτταρική σειρά HEK293T.

In vitro αλληλεπίδραση GST-πρωτεΐνης με πρωτεΐνη που έχει απομονωθεί από HEK293T: Μετά την ολοκλήρωση της διεργασίας επιμόλυνσης HEK293T κυττάρων με πλασμίδιο έκφρασης έστω μιας πρωτεΐνης X και την αλλαγή του θρεπτικού (βλ. παρακάτω), εκπλένουμε με 5-10ml PBS 1x, αναρροφούμε και προσθέτουμε 1ml Versene 1x (υδατικό διάλυμα του Na₄EDTA). Αποκολλάμε με ξύστρο τα κύτταρα και φυγοκεντρούμε στις 5.000rpm, για 5min, στους 4⁰C. Αναρροφούμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε το ίζημα των κυττάρων με 700μl PBS 1x. Φυγοκεντρούμε στις 5.000rpm, για 5min, στους 4⁰C. Τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε WCE buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 400 mM KCl, 10% Glycerol, και 2 mM DTT και πρωτεϊνικοί αναστολείς (0,1% Leupeptin, 0,1%Pepstatine, 0,1% Benzamidine, 1% PMSF) που προστίθενται λίγο πριν τη χρήση). Η ποσότητα του WCE buffer πρέπει να είναι τέτοια ώστε να έχουμε 100μl από το κυτταρικό εκχύλισμα για κάθε αντίδραση αλληλεπίδρασης που θέλουμε να πραγματοποιήσουμε, καθώς και 20μl ως control για την παρουσία της πρωτεΐνης στο εκχύλισμα. Ακολουθεί διαδικασία παγώματος στους -80⁰C και ξεπαγώματος σε πάγο (freeze and thaw) για 3 φορές, έτσι ώστε να σπάσουν τα κύτταρα. Μετά την φυγοκέντρωση στις 5000 rpm για 5 λεπτά και την απομάκρυνση του ιζήματος, το υπερκείμενο φυλάσσεται στους - 80⁰C.

Στο μεταξύ, πραγματοποιείται η εξισορρόπηση των GST-πρωτεϊνών με 2x Interaction buffer [40 mM Hepes pH 7.9, 10 mM MgCl₂, 0.4% NP40, 0.4% BSA, 15% Glycerol, 4 mM PMSF και αναστολείς της πρωτεόλυσης (0,1% Leupeptin, 0,1% Pepstatine, 0,1% Benzamidine, 1% PMSF)] η οποία πραγματοποιείται ως εξής: απαλλάσσουμε, την απαιτούμενη για την αλληλεπίδραση, ποσότητα σφαιριδίων σεφαρόζης-γλουταθιόνης που έχουν προσδεδεδεμένες τις GST-πρωτεΐνες, από τη παρουσία του PBS με στιγμιαία φυγοκέντρωση. Προσθέτουμε 1ml 2x Interaction buffer, φυγοκεντρούμε στιγμιαία, και απομακρύνουμε το υπερκείμενο. Στο τέλος προσθέτουμε 200μl 2x Interaction buffer.

Σε 100 μl από το υπερκείμενο που έχουμε φυλάξει, προστίθενται τα 200μl από GST-πρωτεΐνη/2x Interaction buffer. Επίσης προστίθεται ddH₂O, ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να ανέρχεται στα 400μl. Ακολουθεί περιστροφή στους 4⁰C over night. Μετά από στιγμιαία φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του υπερκειμένου, πραγματοποιούνται 2 εκπλήσεις με 1ml αραιό Washing buffer [100mM KCl, 20mM Hepes pH 7.9, 5mM MgCl₂, 0.2% NP40, 4mM PMSF, και αναστολείς της πρωτεόλυσης (0,1% Leupeptin, 0,1% Pepstatine, 0,1% Benzamidine, 1% PMSF)] και 1 έκπληση με 1ml πυκνό Washing buffer (η μόνη διαφορά είναι ότι περιέχει 250mM KCl). Μεταξύ των εκπλήσεων πραγματοποιούνται επώσεις για 5min, με περιστροφή στους 4⁰C. Μετά από στιγμιαία φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του υπερκειμένου, στα σφαιρίδια προστίθενται 2x SDS Loading Buffer ποσότητας ίσης με τον όγκο των καθαρών beads που έχουν χρησιμοποιηθεί για το interaction. Ακολουθεί βρασμός για 10 λεπτά και ανίχνευση της πρωτεΐνης X (ή του επιτόπου της, εάν φέρει) με ηλεκτροφόρηση σε 10,5% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, και μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Western Blot, βλ. παραπάνω).

Συν-ανοσοκατακρήμνιση & ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών (Co-Immunoprecipitation & Immunoprecipitation)

Περίπου 32 ώρες μετά την επιμόλυνση κυττάρων HEK293T με πλασμιδιακό φορέα έκφρασης, έστω των πρωτεϊνών 1 και 2, ακολουθεί έκπλυση με παγωμένο PBS διάλυμα, αναρρόφηση και προσθήκη 0,3 – 0,5 ml διαλύματος λύσης (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,25% Sodium deoxycolate, 1mM EGTA, 1mM PMSF, 1μg/ml aprotinin/lupeptin, 1mM Na₃VO₄ και 1mM NaF). Τα τρυβλία αφήνονται σε ανακινούμενη πλατφόρμα, πάνω σε πάγο για 30 λεπτά, σε 4⁰C. Κατόπιν, τα κύτταρα αποκολλώνται με ξύστρο, συλλέγονται σε 1,5ml eppendorfs και φυγοκεντρούνται στις 13000rpm για 5min, στους 4⁰C. Το υπερκείμενο υπόκειται σε καθαρισμό (Pre-cleaning) με τη προσθήκη 40μl 50% σφαιριδίων πρωτεΐνης G (που έχουν προηγουμένως εξισορροπηθεί με διάλυμα PBS). Τα δείγματα αφήνονται να περιστρέφονται για 30 λεπτά, σε 4⁰C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 10 λεπτά, στους 4⁰C και η συλλογή του υπερκειμένου. Ακολουθεί η ποσοτικοποίηση των κυτταρικών εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Bradford-Lowry (DC Protein Assay, Bio-Rad) μετρώντας την απορρόφησή τους στα 750nm. Από το υπερκείμενο κρατείται ποσότητα 10-20μg που θα χρησιμοποιηθεί στην πρωτεϊνική ανάλυση ως δείγμα ελέγχου. Στη συνέχεια, σε τουλάχιστον 500μg πρωτεΐνης κάθε δείγματος

προστίθενται η κατάλληλη ποσότητα αντισώματος, ειδικού για την πρωτεΐνη που θέλουμε να κατακρημνίσουμε. Τα δείγματα αφήνονται να περιστρέφονται για 2 ώρες ως και 16 ώρες, στους 4⁰C. Κατόπιν, σε κάθε δείγμα προστίθενται 40μl 50% σφαιριδίων πρωτεΐνης G, που έχουν προηγουμένως εξισορροπηθεί με διάλυμα PBS. Στα σφαιρίδια αυτά προσκολλώνται τα αντισώματα και συνεπώς και η κατακρημνίζουσα πρωτεΐνη. Τα δείγματα αφήνονται να περιστρέφονται για 1½ ώρα, στους 4⁰C. Φυγοκεντρούμε στιγμιαία και αφαιρούμε το υπερκείμενο. Ακολουθούν 3 εκπλύσεις με 1 ml παγωμένου διαλύματος λύσης (προσθέτουμε το δ/μα λύσης και φυγοκεντρούμε στις 5000rpm για 1min). Μετά από στιγμιαία φυγοκέντρηση, προσθέτουμε 50μl 4x Sample Buffer. Μετά από βρασμό 5min, αναλύεται η ηλεκτροφορητική ικανότητα των δειγμάτων σε 10.5% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Ακολουθεί μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, και ανίχνευση της παρουσίας της πρωτεΐνης 2 (με Western Blot), με χρησιμοποίηση αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης 2 ή του επιτόπου της. Η ανίχνευση της πρωτεΐνης 2 υποδηλώνει την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών 1 και 2.

Αντίστοιχη διαδικασία ακολουθείται και στη περίπτωση που τα κύτταρά μας δεν έχουν επιμολυνθεί με κάποιο φορέα έκφρασης και θέλουμε να δούμε ενδογενείς πρωτεΐνες ή αν απλά θέλουμε να συγκεντρώσουμε τη πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει.

Έμμεσος ανοσοφθορισμός πρωτεϊνών σημασμένων με επίτοπο (Indirect Immunofluorescence)

Δεκαέξι ώρες μετά την επιμόλυνση κυττάρων COS-7 σε p60 τρυβλίο, τα κύτταρα αποκολλώνται με χρήση τρυψίνης και αραιώνονται σε 6-well τρυβλίο (αραίωση 1:3). Σε κάθε well έχει προηγουμένως τοποθετηθεί αποστειρωμένη καλυπτρίδα 22 x 22 mm καλυμμένη με 500 μl/well 0.1% gelatin. Τα κύτταρα επωάζονται για άλλες 24 ώρες για να ακολουθήσει στη συνέχεια η διαδικασία ανοσοφθορισμού.

Τα κύτταρα εκπλένονται 2 φορές, για 3 λεπτά τη φορά, σε θερμοκρασία δωματίου και αργά περιστρεφόμενη πλατφόρμα, με 1.5 ml/well PBS+/- (PBS, 0.9 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂). Ακολουθεί σταθεροποίηση των κυττάρων (fixing) με 1 ml/well διαλύματος 3% π-formaldehyde σε PBS+/-, για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς ανακίνηση. Επαναλαμβάνεται το στάδιο της έκπλυσης για 2 ακόμα φορές με τον ίδιο τρόπο. Οι μεμβράνες των κυττάρων γίνονται διαπερατές, ώστε τα αντισώματα να περνούν στο εσωτερικό τους, με χρήση διαλύματος 1 ml/well 0.5%

Triton-X-100 σε Buffer 1 (10x Buffer 1 : 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.1 mM Na₂HPO₄·2H₂O, 0.4 mM KH₂PO₄, 5.5 mM glucose, 4 mM NaHCO₃, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 20 mM MES, pH 6.0-6.5). Το στάδιο αυτό πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου και χωρίς ανακίνηση. Επαναλαμβάνονται 2 εκπλύσεις όπως περιγράφονται παραπάνω, καθώς και 2 ακόμα με τον ίδιο τρόπο, αλλά σε διάλυμα 1.5 ml/well PBS+/-/1.5% FBS (χρησιμοποιείται για μπλοκάρισμα μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης αντισωμάτων). Στη συνέχεια τα κύτταρα επωάζονται με 50 μl πρωταρχικού αντισώματος, το οποίο αραιώνεται 1:200 σε διάλυμα PBS+/-/1.5% FBS. Η επώαση γίνεται στους 4⁰ C, σε επίπεδη επιφάνεια για 30 λεπτά. Ακολουθούν 3 εκπλύσεις με τον τρόπο που έχει περιγραφεί και σε διάλυμα PBS+/-/1.5% FBS. Κατόπιν τα κύτταρα επωάζονται με 50 μl δευτερεύοντος αντισώματος IgG-FITC ή/και IgG-rodamin, το οποίο αραιώνεται 1:50 σε διάλυμα PBS+/-/1.5% FBS. Η επώαση γίνεται στο σκοτάδι (καθώς το IgG-FITC και το IgG-rodamin είναι φωτοευαίσθητο), στους 4⁰C, σε επίπεδη επιφάνεια και για 30 λεπτά. Η περαιτέρω διεργασία πραγματοποιείται στο σκοτάδι. Γίνονται 2 εκπλύσεις με διάλυμα PBS+/-/1.5% FBS, και 2 ακόμα με διάλυμα PBS+/-/. Στη συνέχεια οι καλυπτρίδες με τα κύτταρα αποκολλώνται και τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρους, στις οποίες έχουν προστεθεί 7 μl διαλύματος μονιμοποίησης (Glycerol/PBS 1:1). Τα όρια επαφής καλυπτρίδας-αντικειμενοφόρου στεγανοποιούνται με Manot. Τα δείγματα διατηρούνται στους 4⁰C και σε σκοτάδι, ενώ η παρατήρησή τους γίνεται σε μικροσκόπιο συνεστίασης Leica SP confocal fluorescent microscopy και η φωτογράφησή τους με 35 mm Olympus (C-35AD-4) camera.

Μέθοδος απομόνωσης mRNA

Κύτταρα HepG2 ή HEK293T απλώνονται σε πιάτα p-60s. Μετά το πέρας της πειραματικής διαδικασίας (επιμόλυνση ή επώαση με κάποιο παράγοντα), ακολουθεί έκπλυση με παγωμένο PBS διάλυμα, αναρρόφηση και προσθήκη 1ml Trizol. Μετά την ομογενοποίηση των κυττάρων, το εκχύλισμα συγκεντρώνεται σε εpp των 2ml. Στη συνέχεια προθέτουμε 200μl χλωροφόρμιο (CHCl₃) και αναδεύουμε ισχυρά (vortex) για 10sec. Το μείγμα αφήνεται για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.000rpm, για 15min, στους 4⁰C. Μετά τη φυγοκέντρηση σχηματίζονται δύο φάσεις, η ανόργανη (πάνω φάση) και η οργανική (κάτω φάση). Μεταφέρουμε την ανόργανη φάση (~500μl) σε ένα 1,5ml epp και προσθέτουμε 500μl ισοπροπανόλης. Αναδεύουμε ελαφρά και αφήνουμε για 10 λεπτά

σε RT. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.000rpm, για 15min, στους 4⁰C. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και ξεπλένουμε με 1ml 75% αιθανόλη (EtOH). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.000rpm, για 15min, στους 4⁰C. Αφαιρούμε την EtOH και στεγνώνουμε το ήζυμα του RNA. Επαναδιαλύουμε το RNA σε 50μl ddH₂O. Ακολουθεί ποσοτικοποίηση του RNA με τη φωτομέτρησή του στα 260nm. Κατα τη διαδικασία που περιγράφηκε θα πρέπει να τηρούνται στείρες συνθήκες.

RT-PCR (reverse transcriptase-PCR) και δημιουργία cDNA

Μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό του mRNA, ακολουθεί το η αντίδραση για το RT-PCR.

RNA (200μg/μl) -> 5μl

Random Primers (100ng/μl) -> 3μl

dNTPs (2μM) -> 5μl

ddH₂O -> 21μl

5 λεπτά στους 65⁰C. Άμεση τοποθέτηση στο πάγο. Στη συνέχεια προσθέτουμε:

5x First Strand Buffer -> 10μl

0,1M DTT -> 5μl

2 λεπτά στους 25⁰C. Στη συνέχεια προσθέτουμε το ένζυμο:

Super Script II RT -> 1μl
50μl

Το πρόγραμμα που ακολουθείτε στη συνέχεια είναι

10min στους 25⁰C

50min στους 42⁰C

15min στους 70⁰C

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση του mRNA των διαφόρων γονιδίων που εξετάσαμε παρουσιάζονται στον **πίνακα 3**

	Εκκινητές	μέγεθος
h apoCIII	5' εκκινητής: AGGAGTCCCAGGTGGCCCAGCAG. 3' εκκινητής: CACGGCTGAAGTTGGTCTGACCTCA.	148 bp
m apoCIII	5' εκκινητής: ACATGGAACAAGCCTCCAAG 3' εκκινητής: GGAGGGGTGAAGACATGAGA	314 bp
h apoAI	5' εκκινητής: AGTTTGAAGGCTCCGCCTTGGGAAA 3' εκκινητής: CACTTCTTCTGGAAGTCGTCCAGGTA.	229 bp
h apoAIV	5' εκκινητής: ATGTTCTGAAGGCCGTGGTCCT. 3' εκκινητής: GGGTGAGTTCAGATTTCTGGAGATGTT	166 bp
h apoE	5' εκκινητής: CCAGCGGAGGTGAAGGAC. 3' εκκινητής: CGCTTCTGCAGGTCATCG.	585 bp
h apoB	5' εκκινητής: ATGAGCTCAAGCTGGCCATTCCAGA. 3' εκκινητής: CTTTGATGAGAGCAAGTGGGCTGATG.	303 bp
h apoCII	5' εκκινητής: ATGAGCTCAAGCTGGCCATTCCAGA. 3' εκκινητής: CTTTGATGAGAGCAAGTGGGCTGATG.	303 bp
h SHP	5' εκκινητής: GGAGTCCTTCTGGAGCCTGGAGCTT 3' εκκινητής: AATGTGGGGTGTGGCTGAGTGAAGA	485 pb
h PGC1α	5' εκκινητής: AAGCAAAGGGAGAGGCAGAGGC 3' εκκινητής: GGTGGAAGCAGGGTCAAAGTCATC	341 pb
h HNF4α	5' εκκινητής: CGAGCAGATCCAGTTCATCA 3' εκκινητής: CCAGCGGCTTGCTAGATAAC	351 pb
h RXRα	5' εκκινητής: GTTGAACTCGCCTCTTTTGC 3' εκκινητής: GACACTTTCTCCCCACCAA	317 pb
h T3Rβ	5' εκκινητής: TGCAAGTTCACACATGAT 3' εκκινητής: TGGGCACTTGAGACACTCTG	328 pb

Πίνακας 3: Τα ζευγάρια των εκκινητών που κατασκευάστηκαν για τις αντιδράσεις RT-PCR και την ανίχνευση της έκφρασης των διαφόρων γονιδίων

Απομόνωση πρωτεϊνών με τη χρήση του Trizol

Κατά την απομόνωση mRNA και μετά την απομάκρυνση της ανόργανης φάσης, μπορούμε να κρατήσουμε την οργανική φάση για να απομονώσουμε πρωτεΐνες. Η διαδικασία πραγματοποιείται βάση του πρωτοκόλλου που προτείνει το εγχειρίδιο του αντιδραστηρίου του Trizol.

Μέθοδος ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP)

Ετοιμάστηκε 1 p-100 πιάτο με 5×10^6 κύτ./πιάτο και 24 ώρες αργότερα ξεκίνησε η διαδικασία ως εξής :

- Απομάκρυνση θρεπτικού και ξέπλυμα με 7ml θρεπτικό για HepG2
- Προσθήκη 9ml θρεπτικό και 1ml formaldehyde (10%) σταγόνα-σταγόνα (γρήγορα). Ανακάτεμα και επώαση 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθήκη 1ml Glycine (1,375M) σταγόνα-σταγόνα (γρήγορα) και ανακάτεμα

- Αφαίρεση υπερκειμένου και 3 πλυσίματα με 10 ml 1xPBS/0,5mM PMSF σε κάθε p-100.
- Προσθήκη 7 ml 1xPBS/0,5% NP-40/0,5mM PMSF και ξύσιμο των κυττάρων με scraper.
- Φυγοκέντρηση στις 1000 στροφές για 5min στους 4°C και επαναδιάλυση της πελέττας σε 5ml Swelling buffer. Επώαση στον πάγο για 10 λεπτά
- Σπάσιμο των κυττάρων με το μηχανήμα “Dounce”. 20 φορές για κάθε δείγμα
- Προσθήκη 5μl από το κάθε δείγμα σε 5μl Trypan Blue και έλεγχος με μικροσκόπιο για το αν έσπασαν τα κύτταρα και ελευθερώθηκαν οι πυρήνες
- Φυγοκέντρηση στις 2000 στροφές για 5 λεπτά στους 4°C και επαναδιάλυση πελέττας σε 2ml Sonication buffer
- 11 sonications των 30sec, με 5 λεπτά στον πάγο ανάμεσα σε κάθε sonication
- Φυγοκέντρηση στις 14000 στροφές για 15 λεπτά στους 4°C και μεταφορά υπερκειμένου σε καθαρό tube. Επανάληψη του προηγούμενου σταδίου.
- Μεταφορά 40μl σε καθαρό tube. (Αποθήκευση του υπόλοιπου στους -80°C).
- Προσθήκη 160μl H₂O και 20μl NaCl 4M. Επώαση 65°C o/n
- Καθάρισμα με φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική 25:24:1
- Καθάρισμα με χλωροφόρμιο:ισοαμυλική 24:1
- Κατακρήμνιση με αιθανόλη
- Επαναδιάλυση σε 20μl H₂O
- Έλεγχος σε πηκτή αγαρόζης 1,5%

Αν η χρωματίνη έχει σπάσει σε κομμάτια μικρότερα των 1000 βάσεων, μπορούμε να συνεχίσουμε την διαδικασία.

Ετοιμασία των beads

Για το δείγμα μας χρειάστηκαν 200μl καθαρά protein G beads (50μl για το +HNF4 και 100μl για το preclearing).

- Προσθήκη 1,5ml sonication buffer+inhibitors
- Περιστροφή για 10 λεπτά στους 4°C
- Φυγοκέντρηση στις 6000 στροφές για 3 λεπτά στους 4°C
- Αφαίρεση υπερκειμένου
- Επαναλαμβάνω 2 φορές τα 4 παραπάνω στάδια
- Προσθήκη 494μl dialysis buffer (+inhibitors) + 5μl BSA (100mg/ml) + 1μl λDNA (0,5μg/μl)

- Περιστροφή για 2 ώρες στους 4°C
- Μεταφορά από 180μl beads σε 2 καθαρά tubes και αποθήκευση στους 4°C
- Φυγοκέντρηση των υπόλοιπων beads (για preclearing) στις 6000 στροφές για 3 λεπτά στους 4°C
- Αφαίρεση υπερκειμένου

Η διαδικασία συνεχίζεται ως εξής:

- Ξεπάγωμα των δειγμάτων από τους -80°C
- Φωτομέτρηση κάθε δείγματος στα 260nm και 280nm
- Διαίρεση της κάθε OD₂₆₀ με τη μικρότερη OD₂₆₀ (λόγος)
- Προσθήκη στα preclearing beads 1500μl από το δείγμα με τη μικρότερη OD₂₆₀ και 1500/λόγος μl για τα υπόλοιπα. Προσθήκη sonication buffer μέχρι τα 1500μl
- Προσθήκη 16μl BSA (100mg/ml) και 3,2μl λ DNA (0,5μg/μl)
- Περιστροφή για 2 ώρες στους 4°C
- Φυγοκέντρηση στις 6000 στροφές για 3 λεπτά στους 4°C
- Μεταφορά υπερκειμένου σε νέα tubes
- Μέτρηση του όγκου του κάθε δείγματος
- Το δείγμα μας μοιράζεται εξίσου σε 2 νέα tubes, ενώ σε άλλο tube αποθηκεύεται στους -20°C το 1/10 του όγκου που μεταφέρθηκε σε κάθε tube (input)
- Στο πρώτο tube προστίθενται 5μl α-HNF4 (+HNF4) ενώ στο δεύτερο τίποτα (-ab)
- Περιστροφή για 2 ώρες στους 4°C
- Φυγοκέντρηση των beads από τους 4°C
- Αφαίρεση υπερκειμένου
- Προσθήκη των δειγμάτων (+ab, -ab) στα καθαρά beads
- Περιστροφή στους 4°C o/n
- 2 πλυσίματα με το Wash buffer A. Το κάθε πλύσιμο περιλαμβάνει 10 λεπτά περιστροφή στους 4°C και φυγοκέντρηση στις 6000 στροφές για 3 λεπτά στους 4°C
- 2 πλυσίματα με το Wash buffer B
- 2 πλυσίματα με το Wash buffer C

- 2 πλυσίματα με το TE buffer + inhibitors
- Προσθήκη 150μl Elution buffer. Vortex
- Επώαση στους 65°C για 10 λεπτά. Vortex
- Φυγοκέντρηση στις 14000 στροφές για 1 λεπτό
- Μεταφορά υπερκειμένου (150μl) σε καθαρό tube
- Προσθήκη 150μl Elution buffer. Vortex
- Επώαση στους 65°C για 10 λεπτά. Vortex
- Φυγοκέντρηση στις 14000 στροφές για 1 λεπτό
- Μεταφορά υπερκειμένου στο tube του προηγούμενου υπερκειμένου (300μl τελικά)
- Προσθήκη 100μl H₂O και 21μl NaCl 4M
- Για τα inputs προσθήκη μέχρι τα 300μl Elution buffer, 100μl H₂O και 21μl NaCl 4M
- Ανάδευση, flash spin και επώαση στους 65°C για 5 ώρες
- Προσθήκη 1μl RNase A (10mg/ml, DNase-free)
- Επώαση στους 37°C για 1 ώρα
- Προσθήκη 2μl EDTA (0,5M) και 2μl Proteinase K (10mg/ml)
- Επώαση στους 42°C για 2 ώρες
- Προσθήκη 200μl H₂O
- Προσθήκη 1/10 του όγκου CH₃COONa 3M
- Καθάρισμα με φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική 25:24:1
- Καθάρισμα με χλωροφόρμιο:ισοαμυλική 24:1
- Προσθήκη 1μl glycogen (20 mg/ml)
- Κατακρήμνιση με αιθανόλη o/n
- Επαναδιάλυση των inputs σε 100μl 10mM Tris (pH 7,5) και των δειγμάτων σε 50μl 10mM Tris (pH 7,5)

Swelling buffer

25mM Hepes pH 7,9
 1,5mM MgCl₂
 10mM KCl
 0,5% NP-40
 1mM DTT
 0,5mM PMSF
 2μg/ml aprotinin

Sonication buffer

50mM Hepes pH 7,9
 140mM NaCl
 1mM EDTA
 1% Triton X-100
 0,1% Na-deoxycholate
 0,1% SDS
 0,5mM PMSF
 10μg/ml aprotinin

TE

+ inhibitors

**Elution buffer
(prepare freshly)**

50mM Tris pH 8
 1mM EDTA
 1% SDS
 50mM NaHCO₃
 no inhibitors

Wash buffer A

50 mM Hepes pH 7,9
 140 mM NaCl
 1mM EDTA
 1% Triton X-100
 0,1% Na-deoxycholate
 0,1% SDS
 0,5 mM PMSF
 2μg/ml aprotinin

Wash buffer B

Όπως το Wash
 buffer A αλλά με
 500mM NaCl

Wash buffer C

20 mM Tris pH 8
 1 mM EDTA
 250 mM LiCl
 0,5% NP-40
 0,5% Na-deoxycholate
 0,5mM PMSF
 2μg/ml aprotinin

PCR για CHIP**Αντίδραση PCR**

Σε PCR tube αρχικά βάζω 10μl template (8μl η 6μl H₂O και 2μl ή 4μl από το δείγμα μου).

Στη συνέχεια ετοιμάζω την υπόλοιπη αντίδραση :

10μM sense primer	2μl
10μM antisense primer	2μl
10mM dNTPs	1μl
25mM MgCl ₂	3μl
10x Taq buffer	5μl
Taq polymerase	0,5μl
H ₂ O	26,5μl

Προγράμματα PCR που χρησιμοποιήθηκαν**Για PRO- apoC3-3S/A και apoAI-3S/A εκκινητές**

94°C για 3 λεπτά
 94°C για 1 λεπτό
 Annealing (68°C) για 1:30min **35**
 72°C για 2 λεπτά **κύκλοι**
 72°C για 5 λεπτά

Για apoC3-3S/A εκκινητές

94°C για 3 λεπτά
 94°C για 1 λεπτό
 Annealing (62°C) για 1:30min **35**
 72°C για 2 λεπτά **κύκλοι**
 72°C για 5 λεπτά

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των διαφόρων περιοχών του apoAI και apoCIII υποκινητή στο συγκεκριμένο πείραμα φαίνονται στον **πίνακα 4**

Πίνακας 4: ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των διαφόρων περιοχών του apoAI και apoCIII υποκινητών/ενισχυτή		
όνομα ολιγονουκλεοτιδίου	ακολουθία	θέση
apoC3-3A	5'- AGT TGC TCC CAC AGC CAG GGG GCA GT -3'	Ενισχυτής apoCIII (-906)
apoC3-3S	5'- TCT CAC AGC CCC TCC CAG CAC CTC CAT -3'	Ενισχυτής apoCIII (-543)
PRO apoC3-3A	5'- CAG GCC CAC CCC CAG TTC CTG AGC TCA -3'	Υποκινητής apoCIII (-256)
PRO apoC3-3S	5'- CCT GTT TTA TAT CAT CTC CAG GGC AGC AGG C -3'	Υποκινητής apoCIII (-45)
apoAI-3A	5'- AGA GTG ACC GGG GCA GGC AGC AGG AC -3'	Υποκινητής apoAI (+22)
apoAI-3S	5'- GGC AAC TGC CCA CAC ACT CCC ATG GAG G -3'	Υποκινητής apoAI (-315)

Πίνακας 4: Τα ζευγάρια των εκκινητών που κατασκευάστηκαν για τις αντιδράσεις PCR που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση τμημάτων DNA που απομονώθηκε κατά τη πειραματική διαδικασία του ChIP

Κατακρήμιση πρωτεϊνών μέσω αλληλεπίδρασης με DNA (DNAP, DNA affinity precipitation)

Προετοιμασία των κυτταρικών εκχυλισμάτων: Για τη πειραματική αυτή διαδικασία απαιτούνται είτε συνολικά εκχυλίσματα πρωτεΐνης, που προκύπτουν από τη χρήση του διαλύματος λύσης (περιγράφηκε κατά τη διαδικασία της ανοσοκατακρήμισης), είτε πυρηνικά εκχυλίσματα. Τα πυρηνικά εκχυλίσματα προκύπτουν ως εξής. Αφού πλύνουμε τα κύτταρα με παγωμένο PBS διάλυμα, τα μαζεύουμε σε 1ml PBS 1x και τα φυγοκεντρούμε στις 4.000rpm, για 5min, στους 4⁰C. Αφού υπολογίσουμε κατ' εκτίμηση τον όγκο της πελέτας, επαναδιαλύουμε με *Hypotonic Buffer* (+ αναστολείς πρωτεασών), πενταπλάσιου όγκου από αυτόν της πελέτας. Ακολουθεί φυγοκεντρηση στις 4.000rpm, για 5min, στους 4⁰C. Επαναδιαλύουμε την πελέτα με *Hypotonic Buffer* (+ αναστολείς πρωτεασών), τριπλάσιου όγκου από αυτόν της πελέτας και αφήνουμε στον πάγο για 10min. Ομογενοποιούμε τα κύτταρα με σύριγγα ινσουλίνης (27G) και κατακρημνίζουμε τους πυρήνες φυγοκεντρηση στις 6.000rpm, για 15min, στους 4⁰C. Αφού υπολογίσουμε κατ' εκτίμηση τον όγκο της πελέτας των πυρήνων, επαναδιαλύουμε με *Low Salt Buffer* (+ αναστολείς πρωτεασών) όγκου ½ του όγκου της πελέτας και αναδεύουμε ισχυρά (vortex). Στη συνέχεια προσθέτουμε *High Salt Buffer* (+ αναστολείς πρωτεασών) όγκου ½ του όγκου της πελέτας, στάγδην κατά τη διάρκεια του vortex.

Κατόπιν, αφήνουμε τα δείγματά μας να αναδεύονται για 30min, στους 4⁰C και τέλος φυγοκεντρούμε 13.000rpm, για 40min, στους 4⁰C. Η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με μέθοδο που περιγραφικέ προηγουμένως.

Προετοιμασία των μαγνητικών σφαιριδίων: Για κάθε δείγμα χρησιμοποιούνται 5μl Dynabeads M-280 Streptavidin (50μg). Τα σφαιρίδια τοποθετούνται σε μαγνητικό rack και πλένονται μία φορά με 500μl 1xB&W. Στη συνέχεια προσθέτουμε 7μl 2xB&W και 7μl από το βιοτινυλιωμένο-ολιγονουκλεοτίδιο (0,58μM) και επωάζουμε για 15min σε RT. Στα σφαιρίδια που χρησιμοποιούμε ως αρνητικό control προσθέτουμε μόνο 14μl 1xB&W. Στη συνέχεια ξεπλένουμε τα σφαιρίδια δύο φορές με 500μl 1xB&W και μία φορά με D Buffer.

Προετοιμασία των εκχυλισμάτων για την επώαση με τα σφαιρίδια: Στη συνέχεια επωάζουμε 30μg πυρηνικό εκχύλισμα ή 60-80μg συνολικό κυτταρικό εκχύλισμα με 1μl poly(dI/dC) (3μg/μl), 5μl 10xBinding buffer και συμπληρώνουμε την αντίδραση ως τα 50μl με D buffer. Επωάζουμε για 15min στον πάγο.

Τελικά προσθέτουμε το κυτταρικό εκχύλισμα στα μαγνητικά σφαιρίδια και επωάζουμε για 30min, στους 4⁰C. Στο τέλος ξεπλένουμε 3 φορές με 500μl D buffer, προσθέτουμε 20μl 4x Sample Buffer. Μετά από βρασμό 10min, αναλύεται η ηλεκτροφορητική ικανότητα των δειγμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Ακολουθεί μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, και ανίχνευση της παρουσίας της πρωτεΐνης (με Western Blot), με χρησιμοποίηση αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης ή του επιτόπου της.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

Hypotonic buffer

10mM Hepes pH 7.9
1,5mM MgCl₂
10mM KCl
0,2mM EDTA
(+PMSF, DTT..)

High salt buffer

20mM Hepes pH 7.9
25% glycerol
1,5mM MgCl₂
1,2M KCl (0,8 –
1,6M)
0,2mM EDTA
(+PMSF, DTT..)

Low salt buffer

20mM Hepes pH 7.9
25% glycerol
1,5mM MgCl₂
0,02M KCl
0,2mM EDTA
(+PMSF, DTT..)

2x B&W

10mM Tris-HCl
pH 7.5
1mM EDTA
2mM NaCl

10x Binding buffer

100mM Hepes pH 7.9
0.5 KCl
20mM MgCl₂
40mM Spermidine
1mg/ml BSA
0.2mM Zn acetate
0.5% NP40

D buffer

20mM Hepes pH
7.9
10% glycerol
40mM KCl
0.5mM DTT

Τα βιοτινυλιωμένα-ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν αντιστοιχούνε στις περιοχές -92/-67 του υποκινητή τους ανθρώπινου γονιδίου της apoCIII (286) και -86/-70 του υποκινητή τους ανθρώπινου γονιδίου της p21Cip1 (311).

Αποτελέσματα

I. Μηχανισμός μεταγραφικής καταστολής του υποκινητή της apoC-III και της μεταγραφικής δραστηριότητας του HNF-4 από σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούν τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB

1. Ανταγωνισμός μεταξύ αντι- και προ- φλεγμονωδών κυτταροκινών για τη ρύθμιση του υποκινητή της apoCIII στα ηπατικά κύτταρα

Από προηγούμενες μελέτες γνωρίζουμε ότι η έκφραση του γονιδίου της ανθρώπινης απολιποπρωτεΐνης CIII (apoCIII) καταστέλλεται κατά την απόκριση στην οξεία φάση (APR, acute-phase response), ως αποτέλεσμα της δράσης προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως ο TNF α (Tumor Necrosis Factor α) και η IL-1 (Interleukin-1) (191, 192). Οι μεταγραφικοί παράγοντες που εντοπίστηκαν να συμμετέχουν στη διαδικασία αυτή περιλαμβάνουν τις AP-1 (Activation protein 1) πρωτεΐνες c-Jun και ATF-2 (Activating Transcription Factor 2), όπως και τον C/EBP δ (CAAT/Enhancer binding Protein δ) (174, 192).

Η φυσική εξάλειψη της APR πραγματοποιείται, εν μέρει, με τη παραγωγή των αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως οι IL-10, IL-13 και ο TGF β (Transforming Growth Factor β) (312). Ο TGF β και οι μεταγωγείς του σήματός του, πρωτεΐνες Smads (Similar to Mothers Against Decapentaplegic) είναι ισχυρά αντι-φλεγμονώδη μόρια για τα θηλαστικά (313-316).

Έχει δειχθεί πρόσφατα, από το εργαστήριό μας, ότι ο TGF β και οι μεταγωγείς του σήματός του, πρωτεΐνες Smads, ενεργοποιούν την μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου της apoCIII. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω λειτουργικής και φυσικής αλληλεπίδρασης με τον πυρηνικό υποδοχέα HNF-4 α , ο οποίος προσδένεται στο κοντινό HRE του υποκινητή του γονιδίου της apoCIII (στοιχείο B) (189, 190). Με τις πειραματικές προσεγγίσεις που ακολουθούν, θα αποδείξουμε ότι η προ-φλεγμονώδης κυτταροκίνη TNF α ανταγωνίζεται τον TGF β για τη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της apoCIII σε ηπατικά κύτταρα.

Η ανταγωνιστική δράση (negative cross-talk) που ασκούν τα μονοπάτια σηματοδότησης του TNF α και του TGF β στην ενεργότητα του ανθρώπινου apoCIII υποκινητή, μελετήθηκε με δοκιμές μεταγραφικής ενεργοποίησης. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα παροδικών επιμολύνσεων της κυτταρικής σειράς ηπατώματος του ανθρώπου HepG2, με πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο αναφοράς της πυγολαμπίδας, λουσιφεράση, υπό τον έλεγχο του υποκινητή του ανθρώπινου apoCIII γονιδίου μεταξύ των νουκλεοτιδίων -890 και +24 (apoCIII -890/+24-Luc). Τα

κύτταρα αυτά επώασθησαν για 24 ώρες με αυξανόμενες συγκεντρώσεις, γενετικά ανασυνδυασμένου, ανθρώπινου TNF α (250, 500 και 1000 units). Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 34(A)**, η επώαση των επιμολυσμένων με τον υποκινητή της apoCIII κυττάρων HepG2, με TNF α είχε ως αποτέλεσμα την καταστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του υποκινητή της apoCIII, με τρόπο δοσο-εξαρτώμενο. Το εύρημα αυτό ήταν σε συμφωνία με προηγούμενες παρατηρήσεις που έδειξαν ότι ο TNF α καταστέλλει την μεταγραφική ενεργότητα του ανθρώπινου apoCIII γονιδίου στη κυτταρική σειρά HepG2 (191).

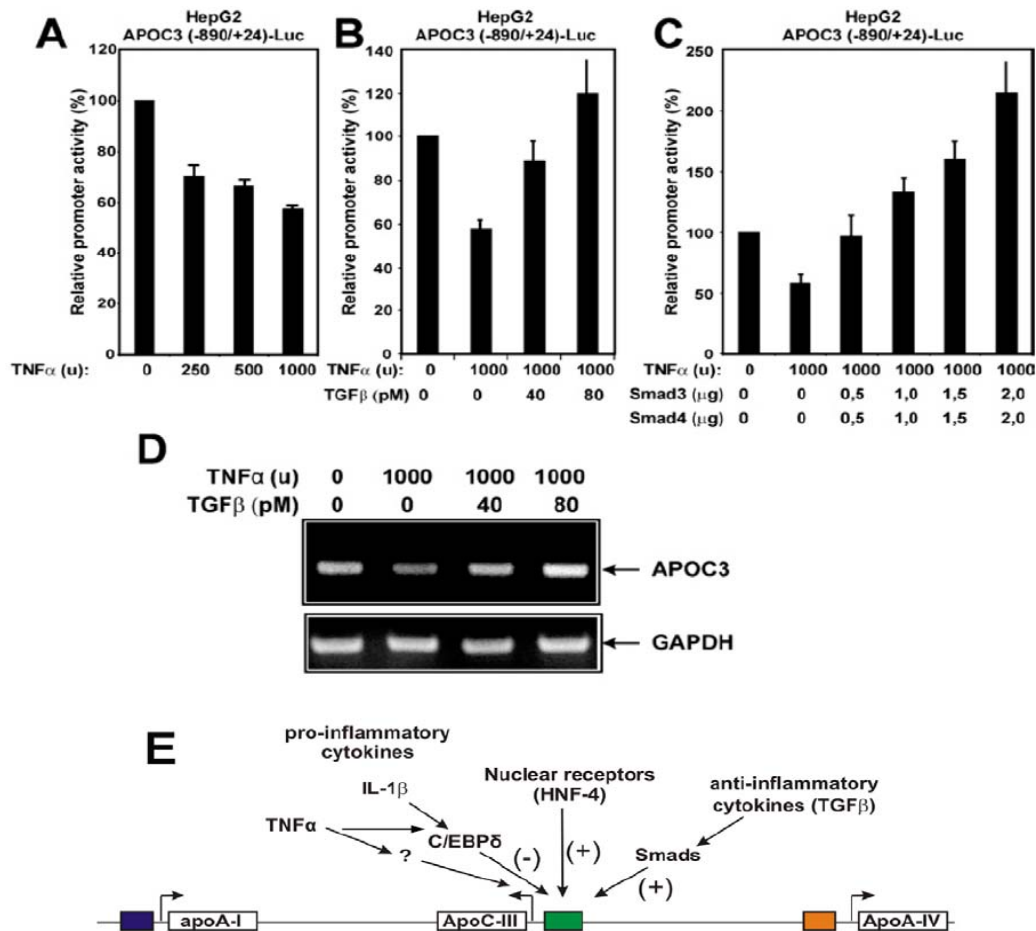
Στη συνέχεια, δείξαμε ότι η κατασταλτική επίδραση του TNF α στη μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή της apoCIII, μπορεί να ξεπεραστεί με την ταυτόχρονη επώαση, επιμολυσμένων με τον υποκινητή της apoCIII κυττάρων HepG2, με TNF α (1000 units) και με αυξανόμενες συγκεντρώσεις γενετικά ανασυνδυασμένου, ανθρώπινου TGF β (0, 40 και 80 pM) για 24 ώρες (**Εικ. 34B**). Το δεδομένο αυτό υποδεικνύει την ύπαρξη μίας ανταγωνιστικής δράσης μεταξύ των δύο μονοπατιών, που δρουν πάνω στον υποκινητή της apoCIII.

Η μεταγραφική καταστολή του υποκινητή της apoCIII από τον TNF α , ήταν δυνατόν να ξεπεραστεί και με την υπερέκφραση των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4, οι οποίες αποτελούν τους βασικούς επαγωγείς του σήματος του TGF β (**Εικ. 34C**). Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα παροδικών συν-επιμολύνσεων της κυτταρικής σειράς HepG2, με τον υποκινητή του γονιδίου της apoCIII και αυξανόμενων συγκεντρώσεων των φορέων έκφρασης των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4, παρουσία του TNF α (1000 units).

Σε συμφωνία με τα δεδομένα της **εικόνας 34B**, είναι και τα δεδομένα που προκύπτουν από πειράματα RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) σε κύτταρα HepG2. Η επώαση κυττάρων HepG2 με TNF α (1000 units) για 24 ώρες, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των βασικών επιπέδων mRNA του ανθρώπινου apoCIII γονιδίου. Η καταστολή αυτή μπορούσε να ξεπεραστεί με ταυτόχρονη επώαση των κυττάρων HepG2 με αυξανόμενες συγκεντρώσεις TGF β (0, 40 και 80pM) για 24 ώρες (**Εικ. 34D**).

Συμπερασματικά, λοιπόν, τα αποτελέσματα της **εικόνας 34** συνδυασμένα με προηγούμενα ευρήματα μας (167, 189, 190, 286) μας δείχνουν ότι η ενεργότητα του ανθρώπινου υποκινητή της apoCIII στη κυτταρική σειρά HepG2 μπορεί να ρυθμιστεί από θετικά ή αρνητικά σήματα, τα οποία παράγονται από αντι- και προ-

φλεγμονώδεις κυτταροκίνες αντίστοιχα. Η ανταγωνιστική αυτή δράση αναπαριστάται σχηματικά στην **εικόνα 34(E)**



Εικόνα 34: Ανταγωνιστική επίδραση προ- και αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών στη μεταγραφική ενεργότητα του ανθρώπινου apoCIII υποκινητή στη κυτταρική σειρά HepG2.

(A) Κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς apoCIII (-890/+24)-Luc (2 μ g) και επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις γενετικά ανασυνδυασμένου, ανθρώπινου TNF α (250, 500 και 1000 units) για 24 ώρες. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του υποκινητή της apoCIII. (B) Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς apoCIII (-890/+24)-Luc (2 μ g) και επωάστηκαν με TNF α (1000 units) απουσία ή παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων γενετικά ανασυνδυασμένου, ανθρώπινου TGF β 1 (0, 40 και 80 pM) για 24 ώρες. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του υποκινητή της apoCIII. (C) Κύτταρα HepG2 συν-επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς apoCIII (-890/+24)-Luc (2 μ g) και αυξανόμενες συγκεντρώσεις των φορέων έκφρασης των ανθρώπινων Smad3 και Smad4 (0, 0.5, 1.0, 1.5 και 2.0 μ g) παρουσία σταθερής δόσης TNF α (1000 units) για 24 ώρες. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του υποκινητή της apoCIII. (D) Κύτταρα HepG2 επωάστηκαν με TNF α (1000 units) παρουσία ή απουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων TGF β 1 (0, 40 και 80 pM) για 24 ώρες. Η έκφραση του γονιδίου της apoCIII αναλύθηκε με RT-PCR (Reverse Transcription-PCR). Τα επίπεδα έκφρασης του συστατικά εκφραζόμενου γονιδίου GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) χρησιμοποιήθηκαν για την κανονικοποίηση της συγκέντρωσης του RNA στα διάφορα δείγματα. (E) Σχηματική αναπαράσταση του ανθρώπινου γονιδιακού συμπλέγματος των απολιποπρωτεϊνών apoAI/apoCIII/apoAIV και των παραγόντων που ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου της apoCIII με

θετικό (+) ή αρνητικό (-) τρόπο. Τα βέλη υποδεικνύουν την κατεύθυνση της μεταγραφής κάθε γονιδίου και τα χρωματιστά κουτιά, τους υποκινητές για κάθε ένα από τα γονίδια.

2. Η καταστολή του υποκινητή της apoCIII από TNF α πραγματοποιείται μέσω του NF- κ B

Για να προσδιορίσουμε και να χαρακτηρίσουμε τα σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία είναι υπεύθυνα για την καταστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του υποκινητή της apoCIII στη κυτταρική σειρά HepG2 από τον TNF α , χρησιμοποιήσαμε 2 αναστολείς, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να μπλοκάρουν ειδικά 2 διαφορετικά και καλά χαρακτηρισμένα σηματοδοτικά μονοπάτια, που επάγονται από TNF α . Ο πρώτος αναστολέας είναι η αρνητικώς επικρατούσα (dominant negative) μορφή του αναστολέα I κ B, η οποία μπλοκάρει το μονοπάτι που οδηγεί στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF- κ B. Η αρνητικώς επικρατούσα μορφή του αναστολέα I κ B του NF- κ B, έχει χάσει την ικανότητά της να αποικοδομείται (I κ B-non-degradable, I κ B-ND) μετά από σηματοδότηση του TNF α , με αποτέλεσμα να συνεχίζει να κρατά μπλοκαρισμένο τον NF- κ B στο κυτταρόπλασμα και να μην επιτρέπει την είσοδό του στον πυρήνα. Ο δεύτερος αναστολέας, είναι ένα χημικό μόριο, ο UO126, οποίος μπλοκάροντας την κινάση MEK, μπλοκάρει το μονοπάτι του TNF α που οδηγεί στην ενεργοποίηση της κινάσης ERK.

Αρχικά, επιβεβαιώσαμε την ενεργοποίηση, από τον TNF α , των δύο σηματοδοτικών μονοπατιών στην κυτταρική σειρά ηπατώματος του ανθρώπου HepG2 με τη χρήση εδραιωμένων δοκιμών, όπως η επαγόμενη από TNF α μετατόπιση της υπομονάδας p65 του NF- κ B στον πυρήνα (**Εικ. 35A**) και η επαγόμενη από TNF α φωσφορυλίωση της κινάσης ERK (**Εικ. 35B**). Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοφθορισμού (Immunofluorescence, IF) και ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών (Western Blots, WB), στα οποία παρατηρήσαμε την επίδραση του TNF α στην ενεργοποίηση των δύο σηματοδοτικών μονοπατιών, του NF- κ B και της ERK, στη κυτταρική σειρά HepG2.

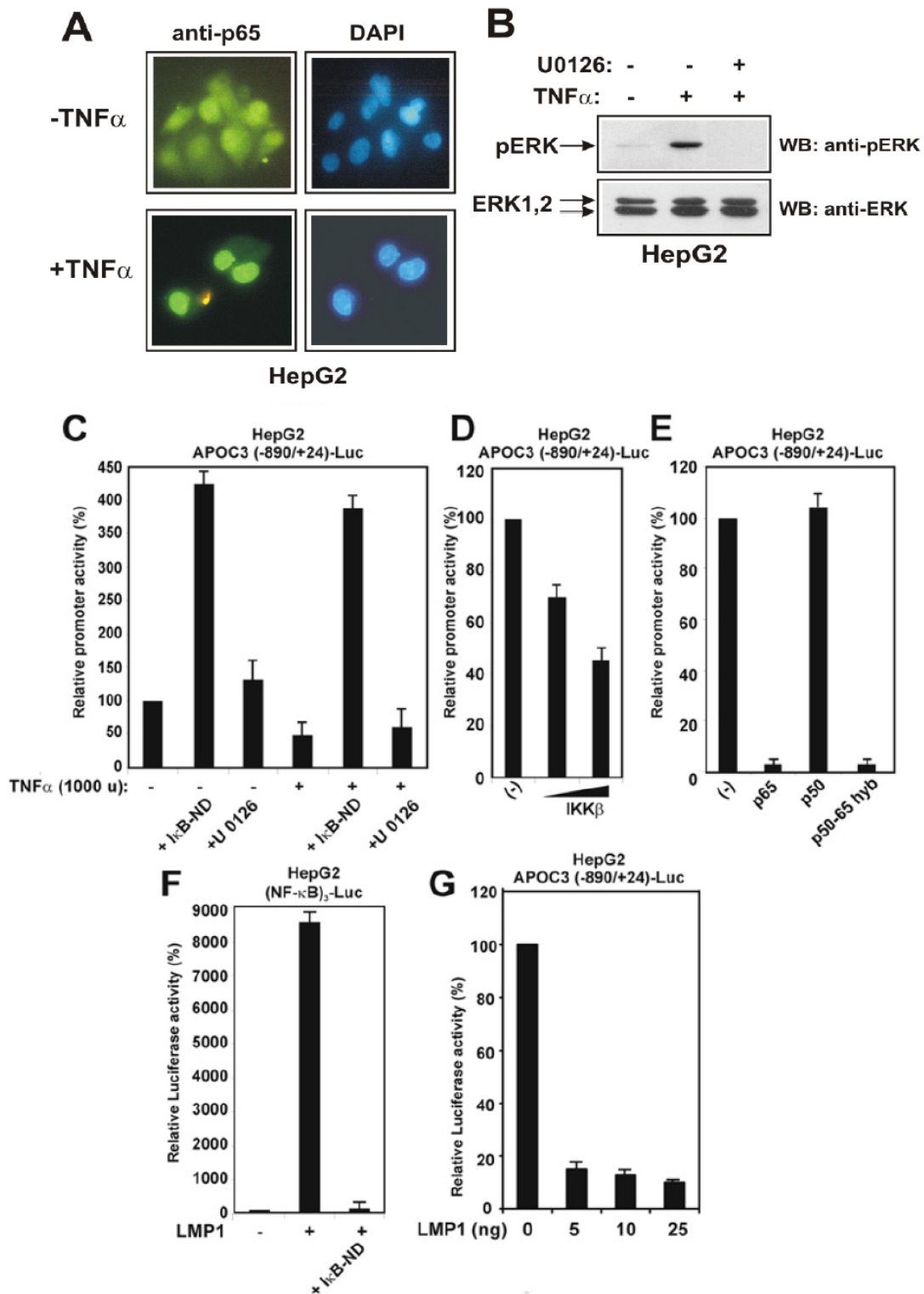
Στη συνέχεια, θελήσαμε να δούμε ποιο από τα δύο μονοπάτια είναι υπεύθυνο για την καταστολή που προκαλεί ο TNF α στον υποκινητή του γονιδίου της apoCIII. Αρχικά, με πειράματα παροδικής επιμόλυνσης κυττάρων HepG2 με τον υποκινητή της apoCIII, ελέγξαμε τη δράση των αναστολέων I κ B-ND και UO126, απουσία TNF α (βασικά επίπεδα έκφρασης), αλλά και παρουσία του. Όπως φαίνεται και από την **εικόνα 35(C)** η κατασταλτική δράση του TNF α πάνω στον υποκινητή του γονιδίου της apoCIII, εξουδετερώθηκε πλήρως με την συν-επιμόλυνση του

αναστολέα του NF- κ B μονοπατιού, I κ B-ND. Πιο συγκεκριμένα, η συν-επιμόλυνση του I κ B-ND στη κυτταρική σειρά HepG2, είχε ως αποτέλεσμα την ισχυρή ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου της apoCIII, ακόμα και απουσία του TNF α . Το εύρημα αυτό υποδεικνύει την ύπαρξη ενός ισχυρά κατασταλτικού, ενδογενούς μονοπατιού της κυτταρικής HepG2, το οποίο διατηρεί σε συνεχή καταστολή τη μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου της apoCIII, μέσω του NF- κ B μονοπατιού. Αντιθέτως, ο αναστολέας UO126 του μονοπατιού της ERK, φάνηκε να έχει μία ελάχιστη θετική επίδραση τόσο στα βασικά επίπεδα, όσο και στα κατεσταλμένα επίπεδα έκφρασης από TNF α , του υποκινητή του γονιδίου της apoCIII (**Εικ. 35C**). Συμπερασματικά, λοιπόν, η καταστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του υποκινητή του γονιδίου της apoCIII, από TNF α , στη κυτταρική σειρά HepG2, προκαλείται μέσω του μονοπατιού που οδηγεί στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF- κ B και όχι του μονοπατιού που οδηγεί στην ενεργοποίηση της κινάσης ERK.

Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε και με συμπληρωματικά πειράματα παροδικών συν-επιμολύνσεων κυττάρων HepG2 του υποκινητή του γονιδίου της apoCIII παρουσία διαφόρων επαγωγέων του μονοπατιού του NF- κ B, όπως η κινάση IKK β , η υπομονάδα p65 του NF- κ B, αλλά και ο LMP1. Στην **εικόνα 35(D)** φαίνεται ότι η υπερέκφραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων της κινάσης IKK β , σε κύτταρα HepG2 επιμολυσμένα με τον υποκινητή του γονιδίου της apoCIII, είχε ως αποτέλεσμα την καταστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του υποκινητή της apoCIII, με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Στην **εικόνα 35(E)** φαίνεται ότι η υπερέκφραση της υπομονάδας p65/RelA του NF- κ B έχει ως αποτέλεσμα την πλήρη καταστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του υποκινητή της apoCIII, κάτι που δεν επιτυγχάνεται με την υπερέκφραση της υπομονάδας p50 του NF- κ B. Τέλος, για να ελέγξουμε μέσω ποιας περιοχής της υπομονάδας p65 του NF- κ B, πραγματοποιείται η καταστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του υποκινητή της apoCIII, χρησιμοποιήσαμε, σε αντίστοιχα πειράματα υπερέκφρασης, μία υβριδική p65 πρωτεΐνη, η οποία έφερε την περιοχή RHD (Rel homology domain) (N-τελική περιοχή) της πρωτεΐνης p50 (p50-p65 hyb). Η πρωτεΐνη p50-p65 hyb ήταν εξίσου ικανή με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη p65, στο να καταστείλει τη μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή της apoCIII, οδηγώντας μας, έτσι στο συμπέρασμα ότι η καταστολή αυτή πραγματοποιείται μέσω της C-τελικής περιοχής του p65, η οποία φέρει και την ενεργοποιητική δράση του p65.

Ως επαλήθευση του κατασταλτικού ρόλου που παίζει ο NF-κB στη ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργότητας του υποκινητή της apoCIII, χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα μεταγραφικής ενεργότητας και η πρωτεΐνη LMP1 (Latent Membrane Protein 1, λανθάνουσα μεμβρανική πρωτεΐνη 1) του ιού Epstein–Barr. Ο LMP1 είναι ένα πρωτεϊνικό ομόλογο του υποδοχέα του TNF α , που έχει δείχθει ότι είναι ένας ισχυρός ενεργοποιητής του μονοπατιού που οδηγεί σε ενεργοποίηση του NF-κB σε διάφορους κυτταρικούς τύπου (323-326). Με πειράματα ελέγχου, δείχθηκε ότι η υπερέκφραση του LMP1, με παροδική επιμόλυνση κυττάρων HepG2, οδηγούσε σε ισχυρή ενεργοποίηση ενός συνθετικού υποκινητή που έφερε 3 θέσεις πρόσδεσης για NF-κB, ελέγχοντας την έκφραση του γονιδίου της λουσιφεράσης [(NF-κB)₃-Luc]. Η ενεργοποίηση αυτή, καταστέλλονταν πλήρως με την συν-έκφραση του αναστολέα IκB-ND (**Εικ. 35F**). Με πειράματα παροδικών επιμολύνσεων σε κύτταρα HepG2, που ακολούθησαν, φάνηκε ότι η υπερέκφραση, ακόμα και πολύ μικρών ποσών του LMP1, είχε ως αποτέλεσμα την δραματική καταστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του υποκινητή της apoCIII (**Εικ. 35G**).

Συμπερασματικά, λοιπόν, τα αποτελέσματα της **εικόνας 35** μας δείχνουν ότι η ενεργοποίηση του NF-κB μονοπατιού, στη κυτταρική σειρά HepG2, από τον TNF α προκαλεί ισχυρή καταστολή στη μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου της apoCIII. Ο σκοπός των πειραμάτων που θα περιγραφούν στη συνέχεια είναι ο χαρακτηρισμός των μοριακών μηχανισμών που επάγουν τη καταστολή αυτή.



Εικόνα 35: Η καταστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του υποκινητή του γονιδίου της apoCIII, από τον TNF α , πραγματοποιείται μέσω ενεργοποίησης του NF- κ B.

(A) Ενεργοποίηση του NF- κ B από TNF α , στη κυτταρική σειρά HepG2. Κύτταρα HepG2 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο χωρίς ορό για 16 ώρες και στη συνέχεια επωάσθηκαν με TNF α (1000 units) για 4 ώρες ή παρέμειναν χωρίς κάποια επεξεργασία. Η ενδοκυτταρική κατανομή της υπομονάδας p65 του NF- κ B εξετάστηκε με έμμεσο ανοσοφθορισμό, με τη χρήση α -p65 αντισώματος το οποίο ανιχνεύτηκε με τη χρήση δευτερεύοντος αντισώματος συζευγμένο με FITC. Οι πυρήνες βάφτηκαν με DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). (B) Ενεργοποίηση του μονοπατιού MEK1/ERK από TNF α , στη κυτταρική σειρά HepG2. Κύτταρα HepG2 προ-επωάσθηκαν με τον αναστολέα της κινάσης MEK1, U0126 (10 μ M) για 24 ώρες και ακολούθησε επώαση με TNF α (1000 units) για 15

λεπτά. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με Western blotting (WB) για τις πρωτεΐνες ERK και φωσφο-ERK, με τη χρήση των αντίστοιχων α -ERK και α -φωσφο-ERK αντισωμάτων και δευτερευόντων συζευγμένων με HRP αντισωμάτων. Τα βέλη υποδεικνύουν τη θέση των πρωτεϊνών φωσφο-ERK και ERK1/2. (C) Κύτταρα HepG2 συν-επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς apoCIII (-890/+24)-Luc (2 μ g) και τον φορέα έκφρασης για την μη αποικοδομήσιμη μορφή της I κ B α , I κ B-ND (2 μ g) ή επωάστηκαν με τον αναστολέα της MEK1, UO126 (10 μ M) για 24 ώρες, παρουσία ή απουσία του TNF α (1000 units). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του υποκινητή της apoCIII. (D) Κύτταρα HepG2 συν-επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς apoCIII (-890/+24)-Luc (2 μ g) και αυξανόμενων συγκεντρώσεων του φορέα έκφρασης του IKK β (0,1 και 2 μ g). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του υποκινητή της apoCIII. (E) Κύτταρα HepG2 συν-επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς apoCIII (-890/+24)-Luc (2 μ g) και με τους φορείς έκφρασης των πρωτεϊνών p65, p50 και p50/p65 hyb (2 μ g από τον κάθε φορέα). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του υποκινητή της apoCIII. (F) Κύτταρα HepG2 συν-επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς (NF- κ B) $_3$ -Luc (2 μ g) και τον φορέα έκφρασης του LMP1 (25ng) παρουσία και απουσία του φορέα έκφρασης του I κ B-ND (2 μ g). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του συνθετικού υποκινητή (NF- κ B) $_3$. (G) Κύτταρα HepG2 συν-επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς apoCIII (-890/+24)-Luc (2 μ g) και με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του φορέα έκφρασης του LMP1 (0, 5, 10 και 25ng). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του υποκινητή της apoCIII.

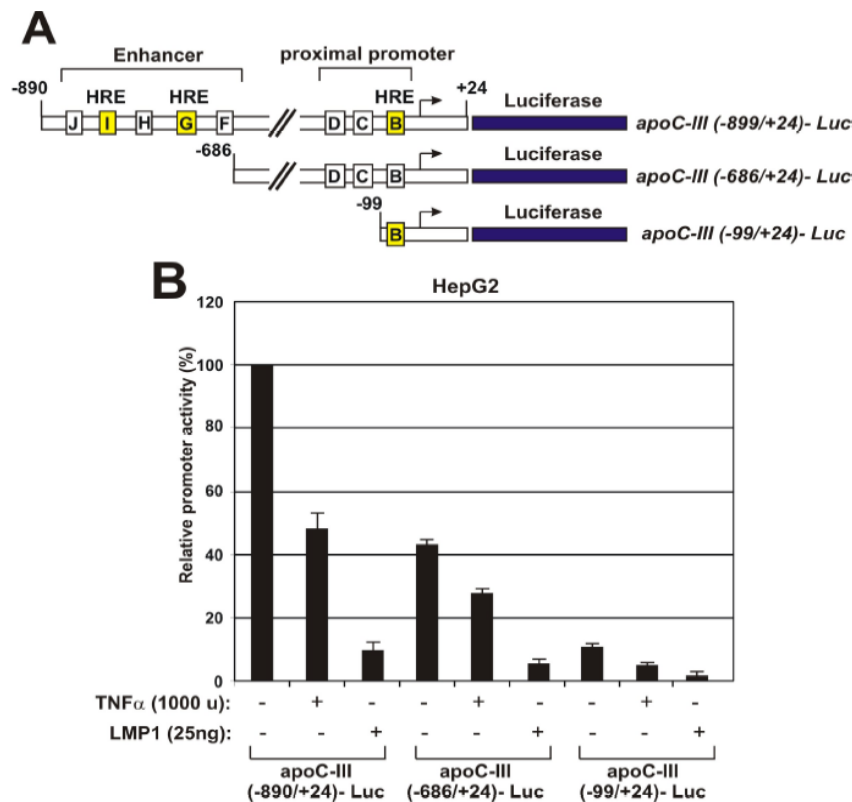
3. Ο TNF α καταστέλλει τον υποκινητή του γονιδίου της apoCIII μέσω του HRE που εντοπίζεται στον κοντινό υποκινητή του γονιδίου

Για να προσδιορίσουμε την περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της apoCIII η οποία αποκρίνεται στη κατασταλτική επίδραση του TNF α , χρησιμοποιήσαμε, σε πειράματα μεταγραφικής ενεργοποίησης, δύο ελλειμματικές μορφές του υποκινητή της apoCIII. Η μία ελλειμματική μορφή (apoCIII -686/+24) δεν περιέχει τα νουκλεοτίδια από το -890 ως το -687, τα οποία περιέχουν τα ρυθμιστικά στοιχεία του μακρινού υποκινητή (κοινός ενισχυτής) F-J (Εικ. 36A). Η δεύτερη ελλειμματική μορφή (apoCIII -99/+24) φέρει την περιοχή από το -99 ως το +24, η οποία περιλαμβάνει μόνο το ρυθμιστικό στοιχείο B του κοντινού υποκινητή (Εικ. 36A). Από προηγούμενες μελέτες, γνωρίζουμε ότι το στοιχείο B περιέχει ένα HRE, το οποίο έχει την ικανότητα να προσδένει συγκεκριμένους, ορφανούς ή εξαρτώμενους από συνδέτη, πυρηνικούς υποδοχείς, μεταξύ των οποίων και τον HNF-4a (167, 172, 286). Μεταλλαγές του ρυθμιστικού αυτού στοιχείου, δεν επιτρέπουν τη μεταγραφική ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου της apoCIII τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo* (167, 286).

Για το σκοπό αυτό, λοιπόν, πραγματοποιήθηκαν πειράματα παροδικών επιμολύνσεων κυττάρων HepG2, με τον υποκινητή του γονιδίου της apoCIII, αλλά και με τις δύο ελλειμματικές του μορφές, απουσία και παρουσία του TNF α ή του

LMP1. Όπως φαίνεται και στη **εικόνα 36 (B)**, και οι δύο ελλειμματικές μορφές του υποκινητή της apoCIII, καταστέλλονται τόσο από τον TNF α , όσο και από τον LMP1 σε βαθμό, παρόμοιο, με αυτόν της καταστολής που παρουσιάζει ο ολόκληρος υποκινητής του γονιδίου της apoCIII. Η ελάχιστη περιοχή του υποκινητή της apoCIII, που φαίνεται ότι απαιτείται για την εξαρτώμενη από TNF α ή LMP1 καταστολή του, εντοπίζεται στην περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων -99/+24, αφού περαιτέρω μείωση του apoCIII υποκινητή, ως τη θέση -55, έχει ως αποτέλεσμα να χάνονται ακόμα και τα βασικά επίπεδα έκφρασης του.

Τα δεδομένα, λοιπόν, που προκύπτουν από την **εικόνα 36**, μας υποδεικνύουν ότι η καταστολή του υποκινητή του γονιδίου της apoCIII από τον TNF α , πρέπει να πραγματοποιείται, τουλάχιστον εν μέρει, λόγω επίδρασης του TNF α στους πυρηνικούς υποδοχείς που προσδένονται στο HRE του κοντινού υποκινητή.



Εικόνα 36: Το κοντινό HRE του υποκινητή του γονιδίου της apoCIII είναι ικανό για να επάγει τη καταστολή του υποκινητή μέσω του TNF α .

(A) Σχηματική αναπαράσταση των πλασμιδίων αναφοράς του υποκινητή του γονιδίου της apoCIII που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα μεταγραφικής ενεργοποίησης που περιγράφονται στο (B). Τα ρυθμιστικά στοιχεία του κοντινού υποκινητή όσο και του ενισχυτή παρουσιάζονται σχηματικά με κουτιά που φέρουν τα γράμματα B-J. (B) Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με τα πλασμίδια αναφοράς apoCIII (-890/+24)-Luc, apoCIII (-686/+24)-Luc και apoCIII (-99/+24)-Luc (2 μ g από το καθένα) παρουσία ή απουσία TNF α (1000 units) για 24 ώρες ή συν- επιμολύνθηκαν με τον φορέα έκφρασης του LMP1 (25ng). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του υποκινητή της apoCIII, καθώς και των ελλειμματικών μορφών του.

4. Ο TNF α καταστέλλει την επαγόμενη από HNF-4a ενεργοποίηση των υποκινητών των γονιδίων της αρCIII και της αρCII

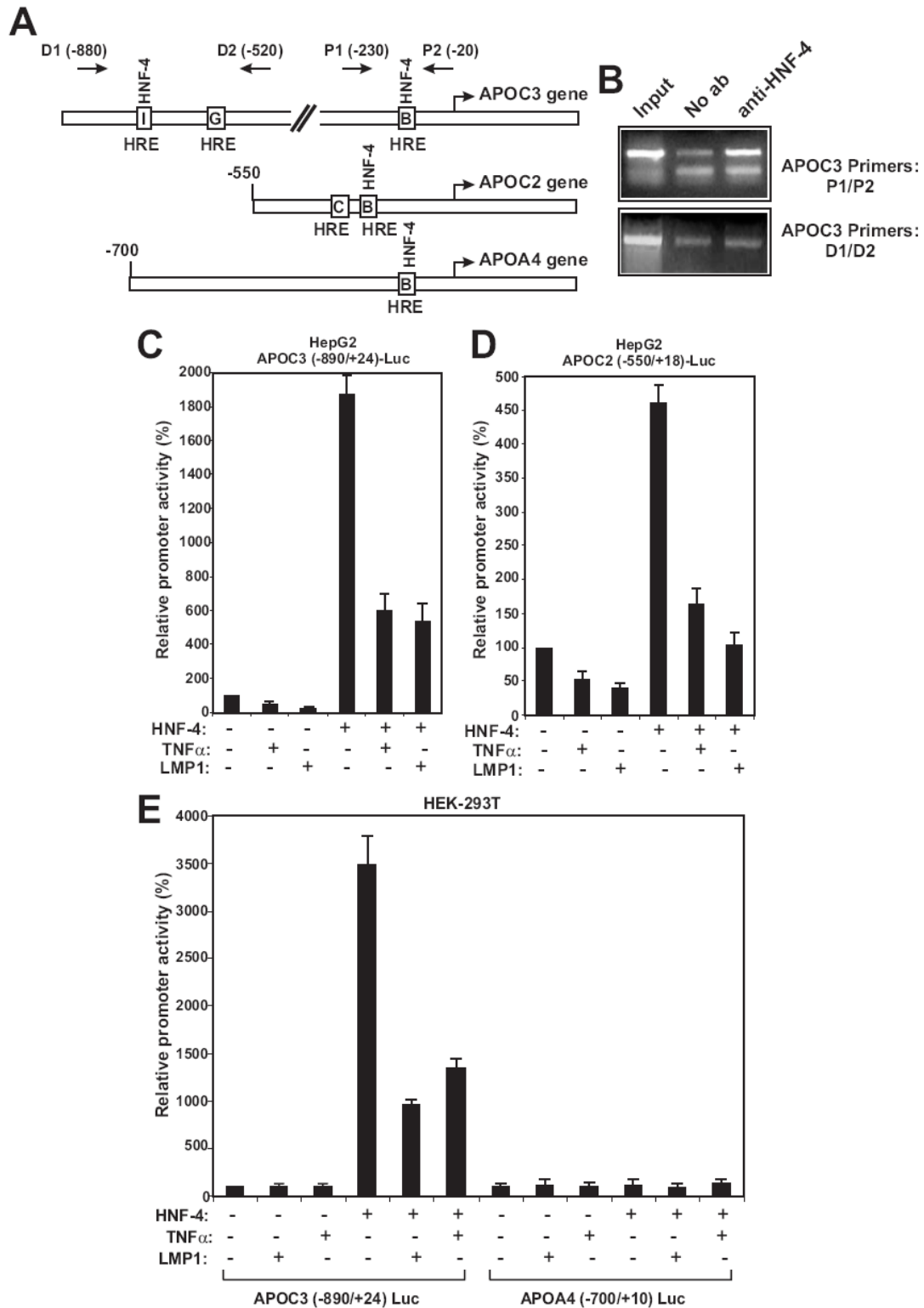
Από προηγούμενες *in vivo* μελέτες, έχει εδραιωθεί το γεγονός ότι ο HNF-4a αποτελεί τον κυριότερο ρυθμιστικό μεταγραφικό παράγοντα της έκφρασης του γονιδίου της αρCIII, καθώς και άλλων γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών, στα ηπατικά κύτταρα (153). Έχει επίσης δειχθεί ότι ο HNF-4a μπορεί και προσδένεται, *in vitro*, με μεγάλη συγγένεια στο κοντινό HRE (ρυθμιστικό στοιχείο B) του υποκινητή της αρCIII (286). Η επιβεβαίωση της στρατολόγησης του HNF-4a στον υποκινητή του γονιδίου της αρCIII *in vivo* πραγματοποιήθηκε με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP, Chromatin Immunoprecipitation), από κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος HepG2. Όπως φαίνεται και στην **εικόνα 37(B)** ο HNF-4a είχε την ικανότητα να στρατολογείται στην περιοχή του κοντινού υποκινητή της αρCIII, μεταξύ των θέσεων -230/-20, που περιέχει το HRE του στοιχείου B. Παρόλα αυτά, δεν παρατηρήσαμε τη στρατολόγηση του HNF-4a στη μακρινή περιοχή του υποκινητή, μεταξύ των θέσεων -880/-520 η οποία περιέχει τα HREs των στοιχείων G και I.

Με τη χρήση πειραμάτων μεταγραφικής ενεργοποίησης, θελήσαμε να προσδιορίσουμε τον ρόλο του HNF-4a στην μεταγραφική καταστολή του υποκινητή της αρCIII μέσω της δράσης του TNF α . Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα παροδικής επιμόλυνσης κυττάρων HepG2 με τον υποκινητή της αρCIII (-890/+24) και συν-επιμόλυνσης του HNF-4a, παρουσία και απουσία του TNF α ή του LMP1. Παρατηρήσαμε, λοιπόν, ότι ο HNF-4a έχει την ικανότητα να ενεργοποιεί ισχυρά τον υποκινητή της αρCIII (-890/+24) στα κύτταρα HepG2. Η μεταγραφική αυτή ενεργοποίηση καταστέλλονταν τόσο παρουσία του TNF α , όσο και από την συν-έκφραση του LMP1 (**Εικ. 37C**). Με παρόμοια πειράματα παροδικών επιμολύνσεων της κυτταρικής σειράς HepG2, παρατηρήσαμε ότι τόσο ο TNF α όσο και ο LMP1 επιδρούν κατασταλτικά στη μεταγραφική ενεργοποίηση, που πραγματοποιείται μέσω του HNF-4a, του υποκινητή του γονιδίου της αρCII (-550/+18) (**Εικ. 37D**) ο οποίος, επίσης, περιέχει θέση πρόσδεσης για τον HNF-4a (HRE του ρυθμιστικού στοιχείου B, **Εικ. 37A**).

Για να επιβεβαιώσουμε την απαίτηση της παρουσία του HNF-4a, για την επαγόμενη, μέσω TNF α και LMP1, καταστολής του υποκινητή του γονιδίου της αρCIII, πραγματοποιήθηκαν πειράματα μεταγραφικής ενεργοποίησης στη κυτταρική σειρά HEK-293T, τα οποία δεν εκφράζουν HNF-4a. Έτσι, με πειράματα παροδικής

επιμόλυνσης κυττάρων HEK-293T με τον υποκινητή της apoCIII, παρουσία ή απουσία συν-έκφρασης του HNF-4a, παρατηρήσαμε ότι τόσο η παρουσία του TNF α , όσο και η παρουσία του LMP1, δεν είχε κανένα κατασταλτικό αποτέλεσμα στην ενεργότητα του υποκινητή της apoCIII, εφόσον ο HNF-4a απουσίαζε, ενώ προκαλούσαν ισχυρή καταστολή στη επαγόμενη από HNF-4a μεταγραφική ενεργοποίηση του υποκινητή της apoCIII (**Εικ. 37E**). Για να επαληθεύσουμε τα ευρήματά μας, χρησιμοποιήσαμε, σε αντίστοιχα πειράματα μεταγραφικής ενεργοποίησης στη κυτταρική σειρά HEK-293T, τον υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου της apoAIV (-700/+10). Ο υποκινητής αυτός, αν και φέρει θέσεις πρόσδεσης για τον HNF-4a (HRE του ρυθμιστικού στοιχείου C), (**Εικ. 37A**), δεν έχει την ικανότητα να ενεργοποιείται παρουσία μόνο του HNF-4a (171). Στην **εικόνας 37(E)**, παρατηρούμε πως ούτε ο TNF α , αλλά ούτε και ο LMP1 έχουν την ικανότητα να επιδράσουν στη μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή της apoAIV (-700/+10), τόσο απουσία, όσο και παρουσία του HNF-4a.

Συμπερασματικά, λοιπόν, τα δεδομένα της **εικόνας 37** υποδεικνύουν ότι ο TNF α , αλλά και άλλοι παράγοντες που ενεργοποιούν τον NF- κ B, μπορούν να καταστείλουν την ενεργότητα συγκεκριμένων υποκινητών, που φέρουν θέσεις πρόσδεσης για τον HNF-4a, και ότι για τη καταστολή αυτή είναι απαραίτητη η φυσική και λειτουργική παρουσία του HNF-4a στις θέσεις αυτές.



Εικόνα 37: Ο TNF α καταστέλλει την επαγόμενη μέσω HNF-4a ενεργοποίηση των υποκινητών των γονιδίων της apoCIII και της apoCII.

(A) Σχηματική αναπαράσταση των υποκινητών των ανθρώπινων γονιδίων της apoCIII, της apoCII και της apoAIV, όπου εμφανίζονται τα HREs πάνω στα οποία προσδέεται ο HNF-4a. Οι περιοχές πάνω στον υποκινητή της apoCIII, στις οποίες αντιστοιχούν τα δύο ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα ChIP (B), υποδεικνύονται με τα βέλη D1 - D2 (distal primers, μακρινοί εκκινητές) και P1 - P2 (proximal primers, κοντινοί εκκινητές). (B) *In vivo* στρατολόγηση του HNF-4a στον

κοντινό υποκινητή της *apoCIII*. Τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP) πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση χρωματίνης από κύτταρα HepG2, που συλλέχτηκε με τη μέθοδο που έχει περιγραφεί στο κεφάλαιο «Υλικά και μέθοδοι». Για την ανίχνευση των συγκεκριμένων περιοχών πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR με τη χρήση εκκινητών που αντιστοιχούν στην μακρινή (D1 - D2), αλλά και στη κοντινή (P1 - P2) περιοχή του υποκινητή της *apoCIII*, σε δείγματα των οποίων η χρωματίνη είχε κατακρημνιστεί απουσία (δεύτερη στήλη) ή παρουσία *α-HNF-4a* αντισώματος (τρίτη στήλη). Για τον θετικό έλεγχο των εκκινητών, χρησιμοποιήσαμε μη κατακρημνισμένη χρωματίνη (πρώτη στήλη “input”). (C και D) Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς *apoCIII* (-890/+24)-Luc (2 μg) (C) ή με το πλασμίδιο αναφοράς *apoCII* (-550/+18)-Luc (2 μg) (D), απουσία ή παρουσία του φορέα έκφρασης του *HNF-4a* (2 μg) και επώασθηκαν με TNF α (1000 units) για 24 ώρες ή συν- επιμολύνθηκαν με τον φορέα έκφρασης του LMP1 (25ng). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του υποκινητή της *apoCIII* και της *apoCII*. (E) Κύτταρα HEK-293T επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς *apoCIII* (-890/+24)-Luc (2 μg) ή με το πλασμίδιο αναφοράς *apoAIV* (-700/+10)-Luc (2 μg), απουσία ή παρουσία του φορέα έκφρασης του *HNF-4a* (2 μg) και επώασθηκαν με TNF α (1000 units) για 24 ώρες ή συν- επιμολύνθηκαν με τον φορέα έκφρασης του LMP1 (25ng). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του υποκινητή της *apoCIII* και της *apoAIV*.

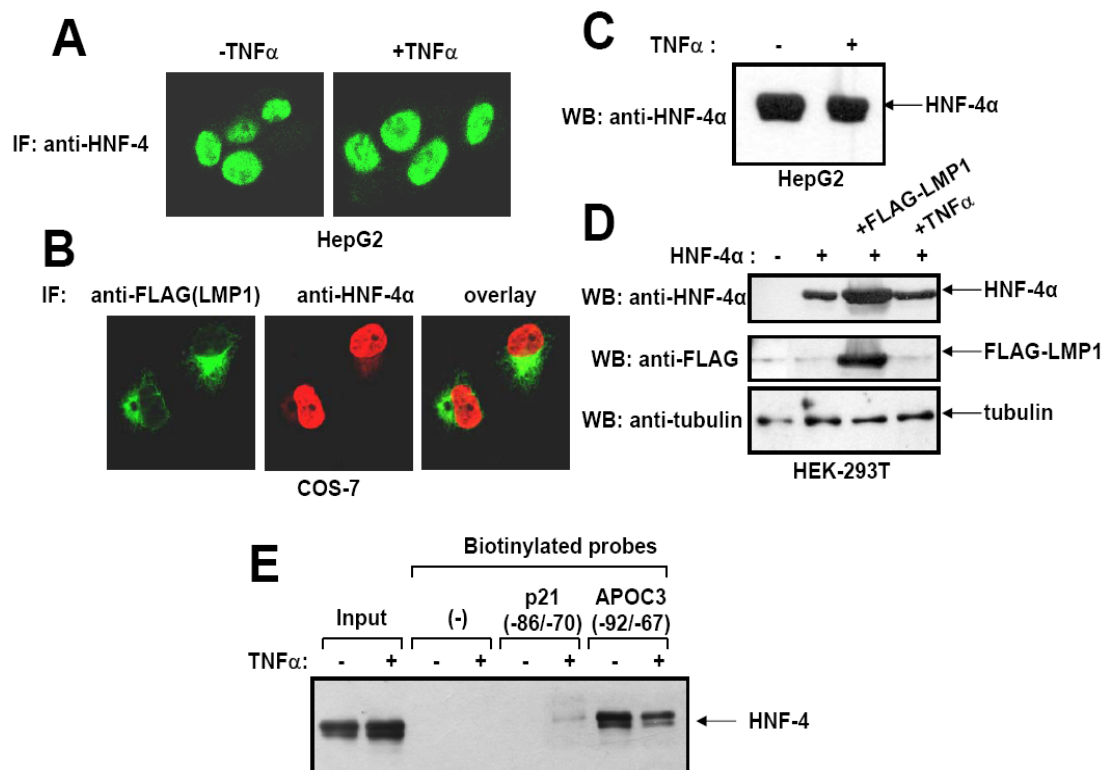
5. Ο TNF α και ο LMP1 δεν επηρεάζουν τον υποκυτταρικό εντοπισμό ή την σταθερότητα του HNF-4 α

Για να ερευνήσουμε περαιτέρω το μηχανισμό καταστολής από τον TNF α στην μεταγραφική ενεργότητα που επάγεται από τον HNF-4 α , εξετάστηκε η επίδραση του TNF α και του LMP1 στον υποκυτταρικό εντοπισμό και την σταθερότητα της πρωτεΐνης HNF-4 α . Με τη χρήση αναλύσεων ανοσοφθορισμού, παρατηρήθηκε ότι η συνεχής συσσώρευση του ενδογενούς HNF-4 α στους πυρήνες των κυττάρων HepG2 δεν επηρεάστηκε από την επώαση των κυττάρων με TNF α για 24 ώρες (Εικ. 38A). Με πειράματα διπλού-ανοσοφθορισμού δείξαμε ότι, αντίστοιχα με τον TNF α , ούτε η παρουσία του LMP1, επέφερε κάποια αλλαγή στον πυρηνικό εντοπισμό του HNF-4 α στη κυτταρική σειρά COS-7, στην οποία είχε πραγματοποιηθεί παροδική συν-επιμόλυνση με τους φορείς έκφρασης των δύο πρωτεϊνών (Εικ. 38B).

Για να εξετάσουμε την επίδραση του TNF α και του LMP1 στην σταθερότητα της πρωτεΐνης HNF-4 α , πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοαποτύπωσης (WBs). Τα πειράματα αυτά έδειξαν καθαρά πως ούτε ο TNF α , αλλά ούτε και ο LMP1, είχαν κάποια επίδραση στη σταθερότητα του ενδογενούς HNF-4 α των HepG2 κυττάρων (Εικ. 38C) ή του εξωγενούς HNF-4 α των HEK-293T κυττάρων, το οποίο εισάγαμε στα κύτταρα με τη παροδική επιμόλυνσή τους (Εικ. 38D).

6. Ο TNF α επηρεάζει την ικανότητα πρόσδεσης του HNF-4 α στο DNA

Στη συνέχεια εξετάστηκε η επίδραση του TNF α στην ικανότητα πρόσδεσης του HNF-4 α στο DNA. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα κατακρήμνιση πρωτεΐνης, μέσω αλληλεπίδρασης της με DNA (DNAP, DNA affinity precipitation), χρησιμοποιώντας πυρηνικά εκχυλίσματα από κύτταρα HepG2 και ένα βιοτινυλιωμένο δίκλωνο ολιγονουκλεοτίδιο που αντιστοιχεί στη περιοχή -92/-67 του υποκινητή του γονιδίου της apoCIII και περιλαμβάνει το κοντινό HRE πάνω στο οποίο έχει την ικανότητα να προσδένεται ο HNF-4 α *in vivo* και *in vitro*. Όπως φαίνεται και στην **εικόνα 38(E)**, ο HNF-4 α αλληλεπιδρά με το ολιγονουκλεοτίδιο apoCIII (-92/-67), όμως μέρος της ικανότητάς του αυτής αναστέλλεται από την επώαση των κυττάρων HepG2 με TNF α για 24 ώρες. Σε πειράματα ελέγχου που πραγματοποιήθηκαν, είδαμε ότι ο HNF-4 α δεν παρουσιάζει μη ειδική αλληλεπίδραση με τα μαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης (Dynabeads) ή με άλλα ολιγονουκλεοτίδια, όπως αυτό που αντιστοιχεί στη περιοχή -86/-70 του υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου p21^{Cip1} (311).



Εικόνα 38: Ο TNF α δεν επηρεάζει τον πυρηνικό εντοπισμό ή τη σταθερότητα της πρωτεΐνης HNF-4 α , αλλά καταστέλλει μερικώς την ικανότητά της για αλληλεπίδραση με το DNA.

(A) Κύτταρα HepG2 τοποθετήθηκαν πάνω σε καλυπτρίδες απουσία ή παρουσία TNF α (1000 units) για 24 ώρες. Ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός του HNF-4 α παρατηρήθηκε με έμμεσο ανοσοφθορισμό (IF, Immunofluorescence) με τη χρήση ενός α -HNF-4 α πολυκλωνικού αντισώματος και ενός δευτερεύοντος FITC-συνδεδεμένου αντισώματος. Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν με τη χρήση του

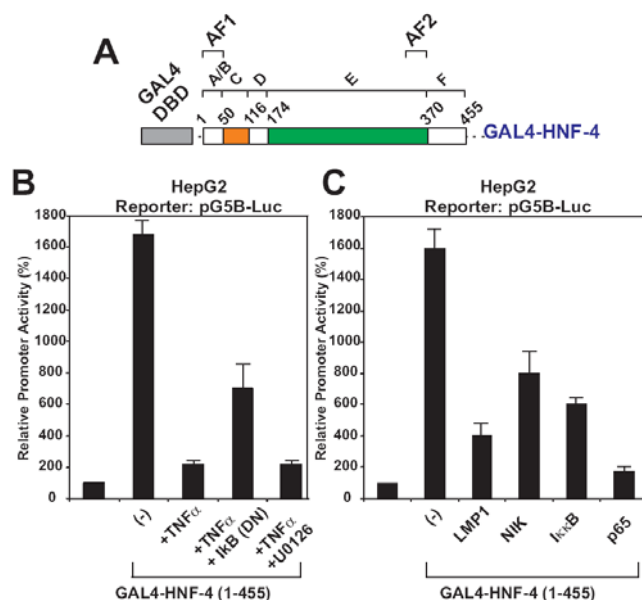
συνεστιακού μικροσκοπίου φθορισμού Leica PS. **(B)** Κύτταρα HEK-293T συν-επιμολύνθηκαν παροδικά με τους φορείς έκφρασης των πρωτεϊνών HNF-4a και LMP1-FLAG και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν πάνω σε καλυπτρίδες. Ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνών HNF-4a και LMP1-FLAG πραγματοποιήθηκε με έμμεσο ανοσοφθορισμό και τη χρήση του α -HNF-4a πολυκλωνικού αντισώματος και α -FLAG μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού και των δευτερευόντων α -rodamin και α -FITC συνδεδεμένων αντισωμάτων αντίστοιχα. Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν με τη χρήση του συνεστιακού μικροσκοπίου φθορισμού Leica PS. **(C)** Κύτταρα HepG2 επώασθησαν με TNF α (1000 units) για 24 ώρες ή παρέμειναν χωρίς TNF α . Τα επίπεδα έκφρασης της ενδογενούς HNF-4a πρωτεΐνης προσδιορίστηκαν με ανάλυση κατά Western, για την οποία χρησιμοποιήθηκε ένα α -HNF-4a πολυκλωνικό αντίσωμα και ένα δευτερεύον HRP συνδεδεμένο αντίσωμα. Η ποσοτικοποίηση των κυτταρικών εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Bradford-Lowry (DC Protein Assay, Bio-Rad). **(D)** Κύτταρα HEK-293T επιμολύνθηκαν παροδικά με τον φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης HNF-4a και είτε συν-επιμολύνθηκαν με τον φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης LMP1-FLAG ή επώασθησαν με TNF α (1000 units) για 24 ώρες. Τα επίπεδα έκφρασης των εξωγενών πρωτεϊνών HNF-4a και LMP1-FLAG, καθώς και της ενδογενούς τουμπουλίνης (control) στα επιμολυσμένα κύτταρα, προσδιορίστηκαν με ανάλυση κατά Western, για την οποία χρησιμοποιήθηκαν ένα α -HNF-4a πολυκλωνικό αντίσωμα, ένα α -FLAG μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού και ένα α - β -tubulin μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού αντίστοιχα και τα αντίστοιχα δευτερεύοντα HRP-συνδεδεμένα αντισώματα. Η ποσοτικοποίηση των κυτταρικών εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Bradford-Lowry (DC Protein Assay, Bio-Rad). **(E)** Με τη χρήση πυρηνικών εκχυλισμάτων κυττάρων HepG2, τα οποία είχαν επωασθεί με TNF α (1000 units) για 24 ώρες ή όχι, πραγματοποιήθηκε πείραμα κατακρήμνισης πρωτεΐνης, μέσω αλληλεπίδρασής της με DNA (DNAP, DNA affinity precipitation). Τα πυρηνικά εκχυλίσματα επώασθησαν είτε μόνο με τα μαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης (Dynabeads) (αρνητικό control), είτε με τα βιοτινυλιωμένα ολιγονουκλεοτίδια που αντιστοιχούν στις περιοχές -86/-70 του υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου p21^{Cip1} (αρνητικό control) ή της περιοχής -92/-67 του υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου της apoCIII. Η πρόσδεση του HNF-4a στα ολιγονουκλεοτίδια ανιχνεύτηκε με SDS/PAGE και ανοσοαποτύπωση με τη χρήση α -HNF-4a πολυκλωνικού αντισώματος και του δευτερεύοντος HRP-συνδεδεμένου αντισώματος.

7. Ο TNF α και το μονοπάτι του NF- κ B καταστέλλουν τη μεταγραφική ικανότητα του HNF-4a με το να επηρεάζουν τη μεταγραφική ενεργότητα των περιοχών του AF-1 και AF-2

Στα πειράματα που ακολουθούν, προσπαθήσαμε να ερευνήσουμε την επίδραση του μονοπατιού του NF- κ B στις λειτουργίες του πυρηνικού υποδοχέα HNF-4a με τη χρήση του καλά χαρακτηρισμένου GAL4 συστήματος. Για το σκοπό αυτό δημιουργήθηκε μία χιμαιρική πρωτεΐνη, με τη σύντηξη του DBD του μεταγραφικού παράγοντα της ζύμης GAL4 (1-147aa) στην N-τελική περιοχή του αγρίου τύπου HNF-4a1 (1-455) του αρουραίου. Η χιμαιρική αυτή πρωτεΐνη που ονομάστηκε GAL4-HNF-4a (1-455) (**Εικ. 39A**) εκφράστηκε παροδικά σε κύτταρα HepG2 παρουσία του πλασμιδίου αναφοράς που φέρει το γονίδιο της λουσιφεράσης, υπό τον έλεγχο του συνθετικού υποκινητή που φέρει 5 θέσεις πρόσδεσης για την DBD περιοχή του GAL4 (pG5B-Luc). Η ικανότητα του GAL4-HNF-4a (1-455) να ενεργοποιεί τον υποκινητή G5B, απουσία ή παρουσία διαφόρων ενεργοποιητών του NF- κ B εκτιμήθηκε βάσει των μετρήσεων της ενεργότητας της λουσιφεράσης. Όπως φαίνεται και στην **εικόνα 39(B)**, ο TNF α ασκεί έντονη κατασταλτική επίδραση στη μεταγραφική ενεργότητα του GAL4-HNF-4a (1-455) στη κυτταρική σειρά HepG2. Η

μεταγραφική αυτή καταστολή μπόρεσε να ξεπεραστεί, μερικώς, παρουσία του αναστολέα του NF-κB μονοπατιού, IκB-ND, κάτι όμως που ήταν αδύνατο παρουσία του MEK1 αναστολέα, UO126. Τα ευρήματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τα δεδομένα που προέκυψαν από την **εικόνα 35(C)**. Η μεταγραφική ενεργότητα, όμως, του GAL4-HNF-4α (1-455) καταστέλλεται και από άλλους ενεργοποιητές του NF-κB μονοπατιού, όπως είναι ο συστατικά ενεργοποιημένος υποδοχέας LMP1 και οι κινάσες NIK και IKKβ, αλλά και η ίδια η υπομονάδα του NF-κB, p65/RelA (**Εικ. 39C**).

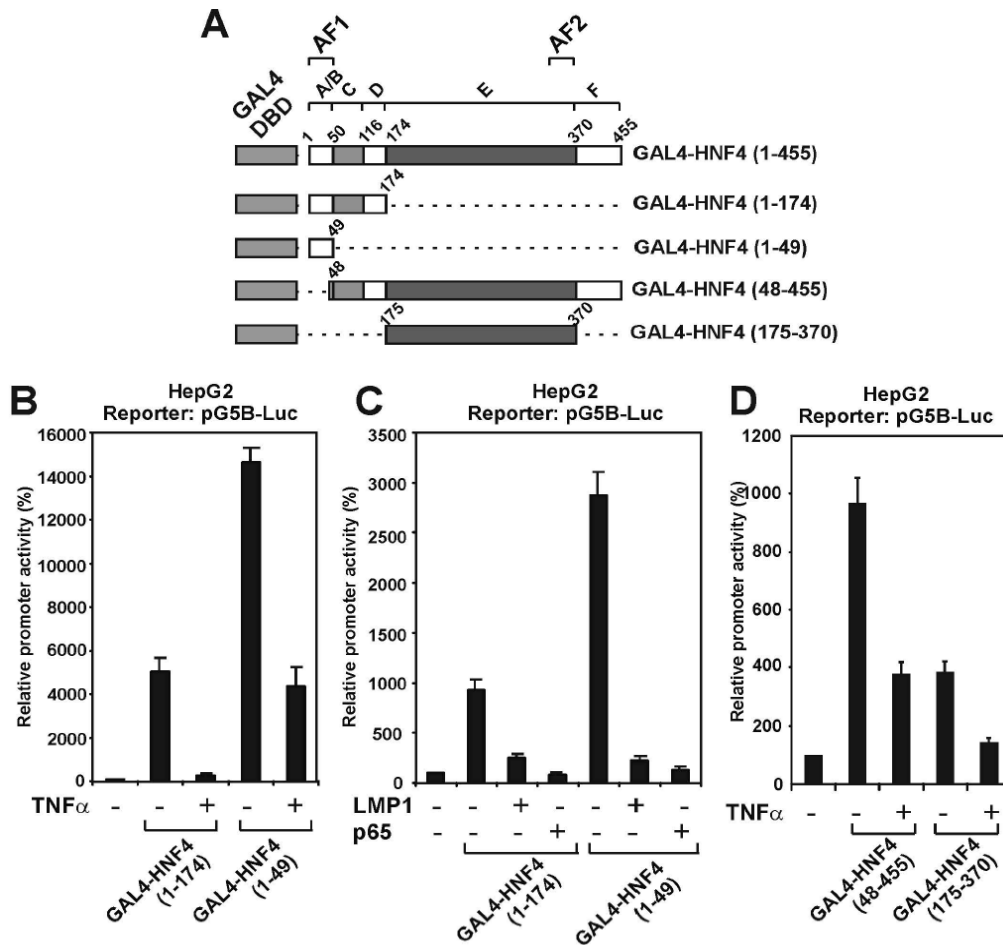
Με τη χρήση διάφορων ελλειμματικών μορφών του HNF-4α σε σύντηξη με το DBD του GAL4 (**Εικ. 40A**), δείξαμε ότι και οι δύο ενεργοποιητικές περιοχές του HNF-4α (AF-1 και AF-2) επηρεάζονται από τη κατασταλτική επίδραση του TNFα. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα μεταγραφικής ενεργοποίησης με παροδικές επιμολύνσεις HepG2 κυττάρων. Όπως φαίνεται και από τις **εικόνες 40(B)** και **40(C)**, ο TNFα, ο LMP1 και ο p65, προκαλούν έντονη καταστολή στην μεταγραφική ενεργότητα των ελλειμματικών μορφών του HNF-4α 1-174 και 1-49, τα οποία περιέχουν μόνο την AF-1 ενεργοποιητική περιοχή. Και ο TNFα, όμως παρουσίασε παρόμοια κατασταλτική δράση, πάνω στις ελλειμματικές μορφές του HNF-4α 48-455 και 175-370, τα οποία περιέχουν μόνο την ενεργότητα AF-2 (**Εικ. 40A**).



Εικόνα 39: Πρωτεΐνες-επαγωγείς του NF-κB μονοπατιού μπορούν και καταστέλλουν την μεταγραφική ενεργότητα του HNF-4α.

(A) Σχηματική αναπαράσταση της υβριδικής πρωτεΐνης GAL4-HNF-4α (1-455), που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα των εικόνων (B)-(C). Οι λειτουργικές περιοχές του HNF-4α παρουσιάζονται με τα γράμματα A-F. (B) Κύτταρα HepG2 συν-επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG5B-

Luc (2 μ g) και τον φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης GAL4-HNF-4 α (1-455) (100 ng) και επώασθησαν με TNF α (1000 units) για 24 ώρες, απουσία ή παρουσία του φορέα έκφρασης του αναστολέα του NF- κ B μονοπατιού, I κ B-ND (2 μ g) ή παρουσία του αναστολέα της MEK1, UO126 για 24 ώρες (πραγματοποιήθηκε προ-επώαση 15 λεπτών για τον UO126, πριν την χορήγηση του TNF α). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του συνθετικού υποκινητή G5B. (C) Κύτταρα HepG2 συνεπιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG5B-Luc (2 μ g) και τον φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης GAL4-HNF-4 α (1-455) (100 ng) απουσία και παρουσία των φορέων έκφρασης των πρωτεϊνών LMP1 (25 ng), NIK (2 μ g), IKK β (2 μ g) και p65 (2 μ g). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του συνθετικού υποκινητή G5B.



Εικόνα 40: Και οι δύο ενεργοποιητικές περιοχές του HNF-4 α (AF-1 και AF-2) καταστέλλονται από τον TNF α και το μονοπάτι του NF- κ B.

(A) Σχηματική αναπαράσταση των διαφόρων ελλειμματικών μορφών της υβριδικής πρωτεΐνης GAL4-HNF-4 α που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα των εικόνων (B)-(D). (B) Κύτταρα HepG2 συνεπιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG5B-Luc (2 μ g) και τους φορείς έκφρασης των πρωτεϊνών GAL4-HNF-4 α (1-174) (100 ng) και GAL4-HNF-4 α (1-49) (100 ng) απουσία ή παρουσία TNF α (1000 units) για 24 ώρες. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του συνθετικού υποκινητή G5B. (C) Κύτταρα HepG2 συνεπιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG5B-Luc (2 μ g) και τους φορείς έκφρασης των πρωτεϊνών GAL4-HNF-4 α (1-174) (100 ng) και GAL4-HNF-4 α (1-49) (100 ng) απουσία ή παρουσία των φορέων έκφρασης LMP1 (25 ng) και p65 (2 μ g). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του συνθετικού υποκινητή G5B. (D) Κύτταρα HepG2 συνεπιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG5B-Luc (2 μ g) και τους φορείς έκφρασης των πρωτεϊνών GAL4-HNF-4 α (48-455) (100 ng) και GAL4-HNF-4 α (175-370) (100 ng) απουσία ή παρουσία TNF α (1000 units) για 24 ώρες. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για

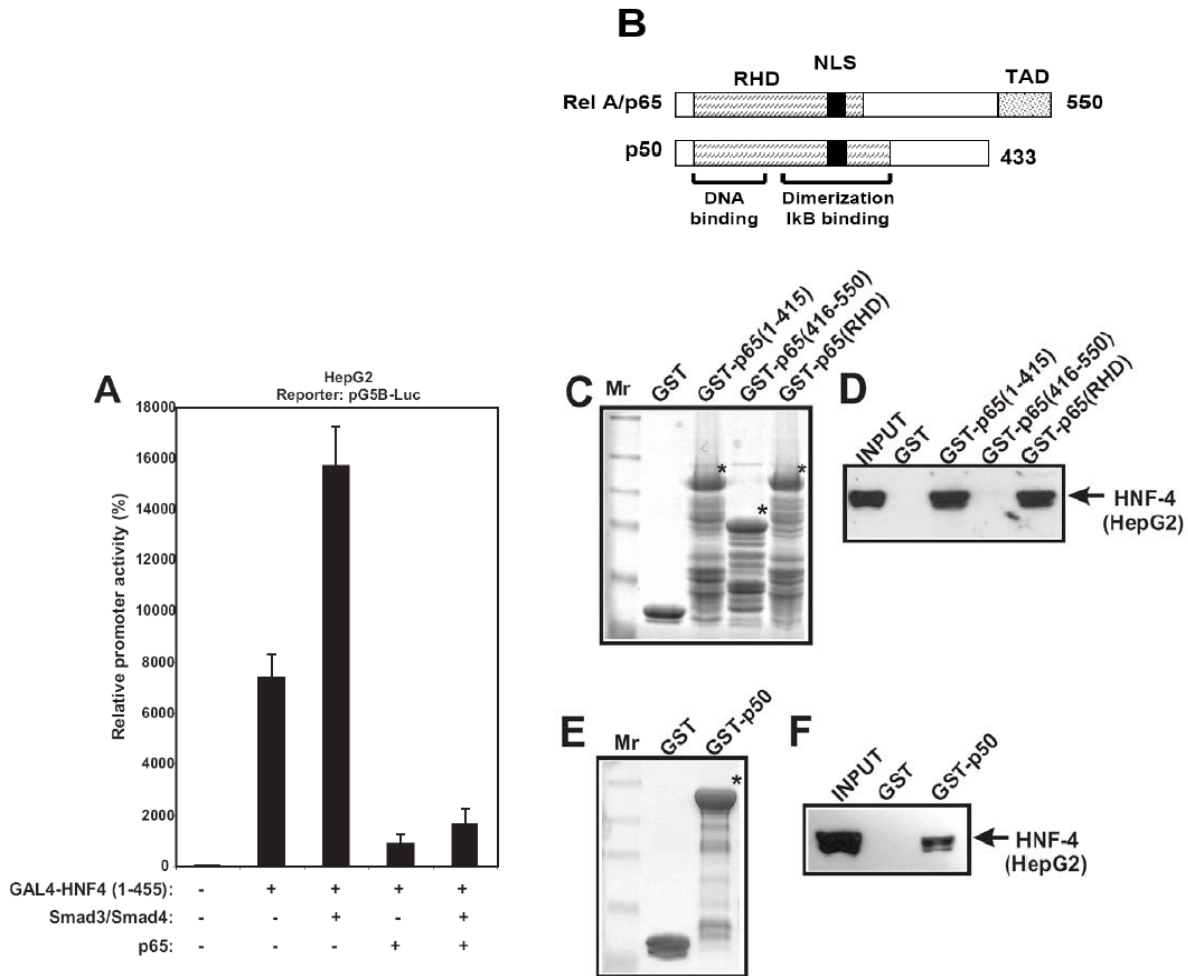
ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του συνθετικού υποκινητή G5B.

8. Διερεύνηση πιθανών μηχανισμών μεταγραφικής καταστολής του HNF-4α από τον NF-κB: *In vitro* αλληλεπίδραση μεταξύ HNF-4α και NF-κB και παρεμπόδιση στρατολόγησης των συν-ενεργοποιητών στον HNF-4α

Από τα πειράματα που πραγματοποιήσαμε, αρχικά παρατηρήσαμε ότι η παρουσία του TNFα είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της ικανότητας του HNF-4α για αλληλεπίδραση με το DNA (**Εικ. 38E**). Η μείωση της ικανότητας του HNF-4α για πρόσδεση στο DNA θα μπορούσε να αποτελέσει μέρος του μηχανισμού της κατασταλτικής δράσης του TNFα πάνω στον HNF-4α. Παρόλα αυτά, ο HNF-4α συνεχίζει να παρουσιάζει μία ικανοποιητική ικανότητα πρόσδεσης στο DNA παρουσία του TNFα. Επιπλέον, από τα πειράματα με τη χρήση του συστήματος GAL4 που ακολούθησαν (**Εικ. 39 & 40**), παρατηρήσαμε ότι ο TNFα συνεχίζει να καταστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του HNF-4α, παρά το γεγονός ότι αυτός δεν προσδένεται πλέον μέσω της δικής του DBD περιοχή στο DNA, αλλά μέσω του DBD του GAL4. Άρα θα πρέπει να υπάρχουν επιπλέον μηχανισμοί που να επάγουν την καταστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του HNF-4α μέσω του TNFα και του μονοπατιού του NF-κB.

Με πειράματα μεταγραφικής ενεργοποίησης, λοιπόν, δείξαμε ότι ο p65 μπορούσε να καταστείλει, όχι μόνο τα βασικά επίπεδα μεταγραφικής ενεργότητας του GAL4-HNF-4α (1-455), πάνω στον υποκινητή G5B, αλλά και της εξαρτώμενης από Smads αύξησης της μεταγραφικής του ενεργότητας (**Εικ. 41A**). Τα τελευταία, αυτά δεδομένα υποδεικνύουν ότι η ανταγωνιστή δράση μεταξύ TGFβ και TNFα, που παρατηρήθηκε πάνω στον υποκινητή της apoCIII (**Εικ. 34A**), θα μπορούσε να είναι το αποτέλεσμα της ανταγωνιστικής αλληλεπίδρασης των επαγωγέων τους (Smads και NF-κB αντίστοιχα) με τον HNF-4α, ο οποίος προσδένεται στον υποκινητή της apoCIII. Γνωρίζοντας, λοιπόν, από προηγούμενες μελέτες μας (189, 190) ότι ο HNF-4α μπορεί να αλληλεπιδρά άμεσα, με τις πρωτεΐνες Smads, θελήσαμε να διερευνήσουμε το αν κάποια από τις υπομονάδες του NF-κB (p65, p50) (**Εικ. 41B**) έχει αυτή τη δυνατότητα, μπλοκάροντας, έτσι τη μεταγραφική ενεργότητα του HNF-4α. Αυτό ελέγχθηκε με πειράματα *in vitro* αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήσαμε ελλειμματικές μορφές της πρωτεΐνης p65 [GST-p65(1-415), GST-p65(416-550), GST-p65(RHD)] (**Εικ. 41C**), αλλά και τη πρωτεΐνη p50 (GST-p50) (**Εικ. 41E**), που φέρουν στο N-τελικό τους άκρο τη πρωτεΐνη GST, η οποία έχει

την ικανότητα να προσδένει γλουταθειόνη. Από την επώαση των απομονωμένων από βακτήρια, υβριδικών υπομονάδων του NF-κB με κυτταρικά εκχυλίσματα HepG2 κυττάρων και στη συνέχεια ανάλυση των δειγμάτων με SDS/PAGE και ανοσοαποτύπωση, προέκυψε ότι οι υπομονάδες του NF-κB, p65 και p50, έχουν την δυνατότητα να αλληλεπιδρούν με τον HNF-4α, πιθανότατα μέσω της περιοχής RHD, η οποία είναι ομόλογη και για τις δύο υπομονάδες και εντοπίζεται στο N-τελικό άκρο τους (Εικ. 41D, τρίτη και πέμπτη στήλη & 41F, τρίτη στήλη).



Εικόνα 41: Φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ HNF-4 και NF-κB, μέσω της περιοχής RHD του p65 και του p50

(A) Κύτταρα HepG2 συν-επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG5B-Luc (2 μg) και τον φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης GAL4-HNF-4α (1-455) (100 ng), απουσία και παρουσία των φορέων έκφρασης των πρωτεϊνών Smad3, Smad4 και p65 (2 μg για κάθε πλασμίδιο). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του συνθετικού υποκινητή G5B. (B) Σχηματική αναπαράσταση των πρωτεϊνικών υπομονάδων του NF-κB, p65 και p50 που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα (C)-(F). Στο σχήμα φαίνονται το RHD των δύο πρωτεϊνών, που είναι υπεύθυνο για την πρόσδεσή τους στο DNA καθώς και για τις πρωτεϊνικές τους αλληλεπιδράσεις, το σήμα εισόδου τους στον πυρήνα (NLS, nuclear localization signal) και η ενεργοποιητική περιοχή του p65 (TAD, transactivation domain). (C & E) Βακτηριακά στελέχη DH5α (*E. coli*) μετασηματίστηκαν με τους φορείς έκφρασης της πρωτεΐνης GST αλλά και των υβριδικών πρωτεϊνών GST-p65(1-415), GST-p65(416-550), GST-p65(RHD) (C) και GST-p50 (E) αντίστοιχα. Η επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με την

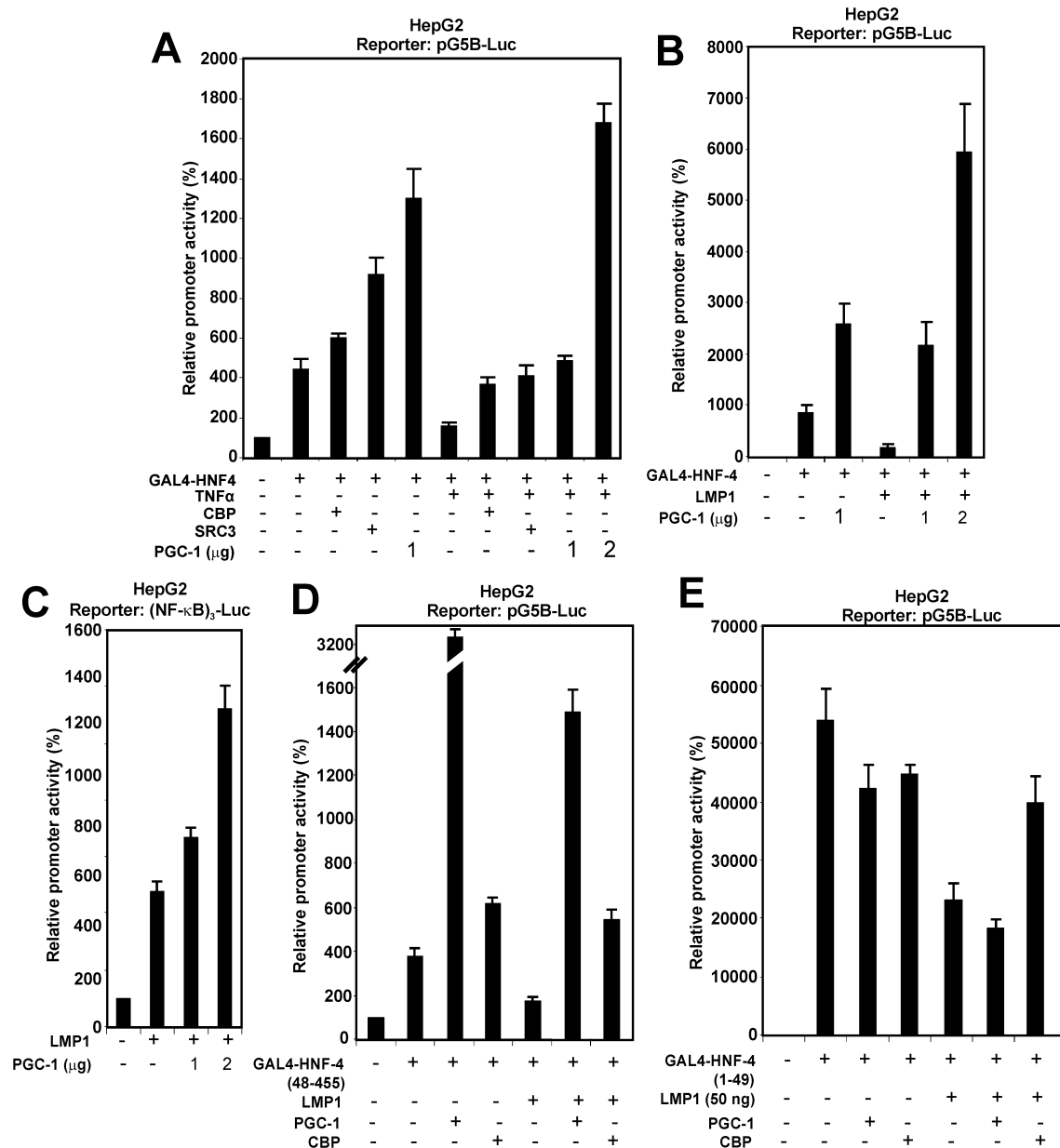
επώαση των καλλιιεργειών με IPTG (250 μ M) στους 37⁰C για 3h. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα επώασθηκαν με σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης, πάνω στα οποία προσδένεται πρωτεΐνη GST, στους 4⁰C, για 16-18 ώρες. Η ποσοτικοποίηση του GST και των GST-υβριδικών πρωτεϊνών έγινε με την ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και χρώση με Commassie Brilliant Blue. (Mr, πρωτεϊνικός marker) (**D & F**) Κυτταρικά εκχυλίσματα HepG2 κυτάρων επώασθηκαν με τις απομονωμένες από βακτήρια πρωτεΐνες GST (αρνητικό control) και GST-p65(1-415), GST-p65(416-550), GST-p65(RHD) (D), αλλά και GST-p50 (F) στους 4⁰C, για 16-18 ώρες. Μετά τις εκλύσεις για απομάκρυνση των μη ειδικών πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, τα δείγματα αναλύθηκαν με SDS/PAGE. Η ανίχνευση του HNF-4 α πραγματοποιήθηκε με ανοσοαποτύπωση και τη χρήση α -HNF-4 α πολυκλωνικού αντισώματος και του δευτερεύοντος HRP-συνδεδεμένου αντισώματος.

Τα δεδομένα που προέκυψαν, τα οποία παρουσιάζονται στην **εικόνα 40**, υποδεικνύουν ότι ο TNF α , μέσω του NF- κ B μονοπατιού, μειώνει τη μεταγραφική ικανότητα του HNF-4 α , επιδρώντας στις ενεργοποιητικές του περιοχές AF-1 και AF-2. Έχει δειχθεί στο παρελθόν ότι διάφοροι συν-ενεργοποιητές των πυρηνικών υποδοχέων έχουν την ικανότητα να αυξάνουν τη μεταγραφική ικανότητα του HNF-4 α μέσω των AF-1 και AF-2. Ανάμεσά τους υπάρχουν συν-ενεργοποιητές όπως ο PGC1 α , που δείχνουν προτίμηση για την AF-2 περιοχή, ενώ άλλοι, όπως ο CBP/p300 και ο SRC3, που δρουν μέσω και των δύο περιοχών (129, 210, 216-218, 224). Για το λόγο αυτό εξετάστηκε η εμπλοκή των συν-ενεργοποιητών στον μηχανισμό της καταστολής του HNF-4 α από τον TNF α και το μονοπάτι του NF- κ B, με τη χρήση πειραμάτων μεταγραφικής ενεργοποίηση σε κύτταρα HepG2. Στην **εικόνα 42(A)** φαίνεται ότι η κατασταλτική επίδραση του TNF α , πάνω στην πρωτεΐνη GAL4-HNF-4 α (1-455), μπορεί να ξεπεραστεί εντελώς με την υπερέκφραση των συν-ενεργοποιητών του HNF-4 α , CBP, SRC3 και PGC1 α . Πιο συγκεκριμένα, ο PGC1 α , όχι μόνο μπόρεσε να εξουδετερώσει την αρνητική επίδραση του TNF α , αλλά προκάλεσε και μία ισχυρή συν-ενεργοποίηση του GAL4-HNF-4 α (1-455) (4 φορές μεγαλύτερη από τα βασικά επίπεδα ενεργότητας του GAL4-HNF-4 α) (**εικ. 42A**, τελευταία στήλη). Η υπερέκφραση του PGC1 α είχε την ίδια επίδραση και στην περίπτωση της καταστολής του GAL4-HNF-4 α (1-455), από τον LMP1 (**εικ. 42B**, τρίτη και τέταρτη στήλη).

Για να διερευνήσουμε τον πιθανό ανταγωνισμό μεταξύ HNF-4 α και NF- κ B για τη χρήση κοινών συν-ενεργοποιητών, ερευνήσαμε την ικανότητα του PGC1 α να δρα ως συν-ενεργοποιητής του NF- κ B, μέσω της σηματοδότησης από LMP1. Όπως φαίνεται και από την **εικόνα 42(C)** η υπερέκφραση του PGC1 α , ενίσχυσε σημαντικά την μεταγραφική ενεργοποίηση του συνθετικού υποκινητή (NF- κ B)₃, που επάγεται από την ενεργοποίηση του NF- κ B, μέσω LMP1 σηματοδότησης. Αυτό σημαίνει ότι ο PGC1 α έχει την δυνατότητα να αλληλεπιδρά και να δρα ως συν-ενεργοποιητής του

NF- κ B, μετά την ενεργοποίηση (π.χ. μέσω LMP1 σηματοδότησης) και την είσοδό του NF- κ B στον πυρήνα. Ο ανταγωνισμός μεταξύ του HNF-4 α και των επαγωγέων του σήματος του LMP1, για τον PGC1 α , αφορά αποκλειστικά την περιοχή της μεταγραφικής ενεργοποίησης AF-2 του HNF-4 α [σύγκριση της μεταγραφικής ενεργότητας μεταξύ GAL4-HNF-4 α (48-455), που φέρει μόνο την AF-2 περιοχή (**εικ. 42D**) και του GAL4-HNF-4 α (1-49), που φέρει μόνο την AF-1 περιοχή (**εικ. 42E**). Αντιθέτως, ο CBP παρουσίασε την ίδια ενεργότητα και μέσω της AF-1 και μέσω της AF-2 περιοχής (**εικ. 42D & 42E**).

Συνοπτικά, τα δεδομένα τις **εικόνας 42** υποδεικνύουν ότι η επαγόμενη από TNF α και LMP1 καταστολή της μεταγραφικής ικανότητας του HNF-4 α σχετίζεται, τουλάχιστον εν μέρει, με την ικανότητα στρατολόγησης των συν-ενεργοποιητών και αλληλεπίδρασής τόσο με την AF-1, όσο και με την AF-2 περιοχή.



Εικόνα 42: Παρεμπόδιση της στρατολόγησης των συν-ενεργοποιητών στις AF-1 και AF-2 περιοχές του HNF-4 α από το μονοπάτι του TNF α

(A) Κύτταρα HepG2 συν-επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG5B-Luc (2 μ g) και τον φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης GAL4-HNF-4 α (1-455) (100 ng), καθώς και τους φορείς έκφρασης των συν-ενεργοποιητών CBP, SRC3 (2 μ g) και δύο συγκεντρώσεων του φορέα έκφρασης του συν-ενεργοποιητή PGC1 α (1 και 2 μ g), απουσία και παρουσία TNF α (1000 units) για 24 ώρες. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του συνθετικού υποκινητή G5B. (B) Κύτταρα HepG2 συν-επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG5B-Luc (2 μ g) και τον φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης GAL4-HNF-4 α (1-455) (100 ng), καθώς και δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων του φορέα έκφρασης του συν-ενεργοποιητή PGC1 α (1 και 2 μ g), απουσία και παρουσία του φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης LMP1 (25 ng). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του συνθετικού υποκινητή G5B. (C) Κύτταρα HepG2 συν-επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς (NF- κ B)₃-Luc (2 μ g) και τον φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης LMP1 (50 ng), απουσία και παρουσία δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων του φορέα έκφρασης του συν-ενεργοποιητή PGC1 α (1 και 2 μ g). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του συνθετικού υποκινητή (NF- κ B)₃. (D) Κύτταρα HepG2 συν-

επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG5B-Luc (2 µg) και τον φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης GAL4-HNF-4α (48-455) (100 ng), καθώς και τους φορείς έκφρασης των συν-ενεργοποιητών CBP (2 µg) και PGC1α (2 µg), απουσία και παρουσία του φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης LMP1 (50 ng). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του συνθετικού υποκινητή G5B. (E) Κύτταρα HepG2 συν-επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG5B-Luc (2 µg) και τον φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης GAL4-HNF-4α (1-49) (100 ng), καθώς και τους φορείς έκφρασης των συν-ενεργοποιητών CBP (2 µg) και PGC1α (2 µg), απουσία και παρουσία του φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης LMP1 (50 ng). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του συνθετικού υποκινητή G5B.

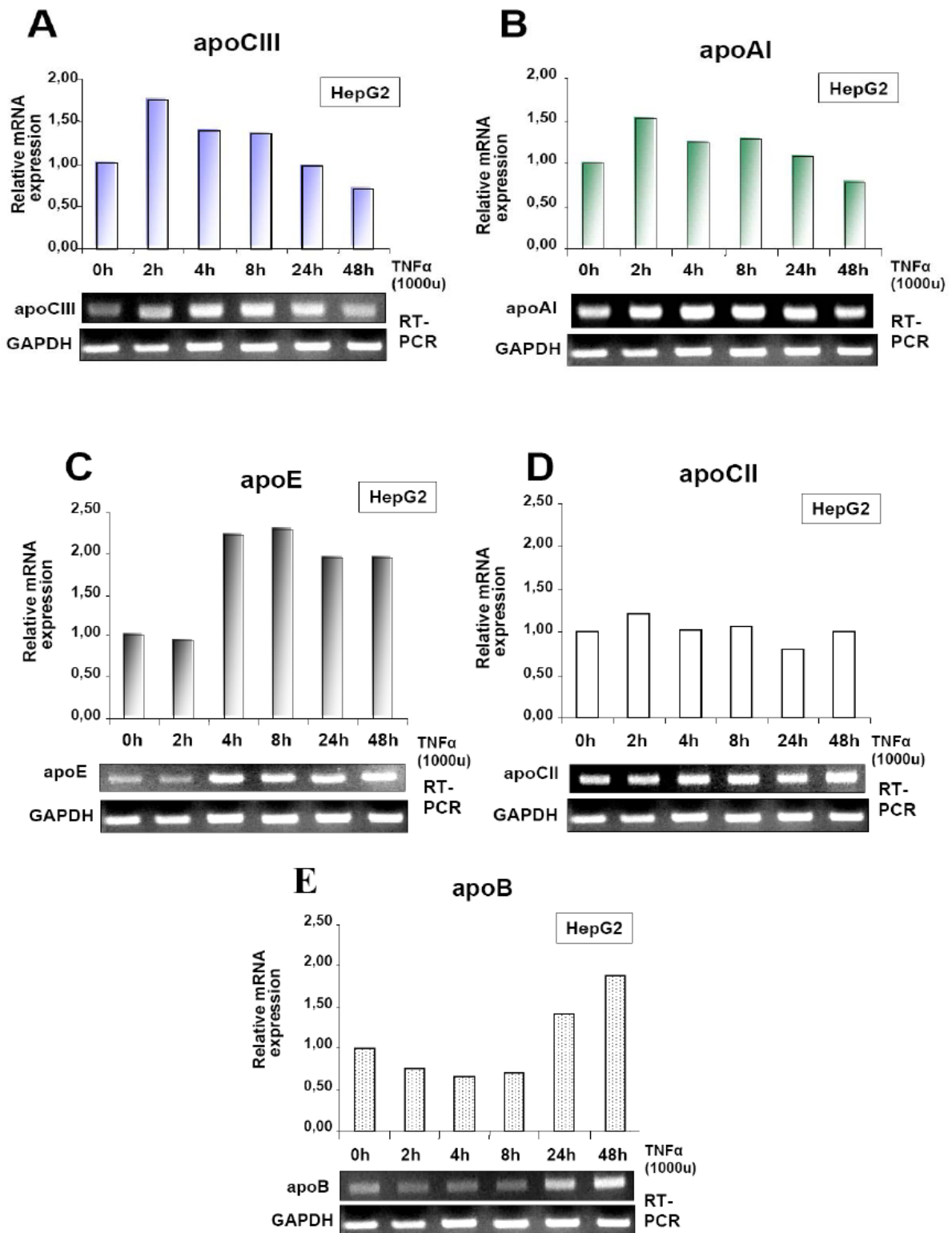
II. Επίδραση της προ-φλεγμονώδους κυτταροκίνης TNFα στην έκφραση των γονιδίων σε κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος

1. Διερεύνηση της δράσης του TNFα στη μεταγραφική ενεργότητα γονιδίων απολιποπρωτεϊνών, συν-ρυθμιστών και πυρηνικών υποδοχέων σε ηπατικά κύτταρα ανθρώπου

Γνωρίζουμε ότι κατά την απόκριση στην οξεία φάση (APR, acute-phase response) η έκκριση των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως του TNFα, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση ή τη μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας πολύ μεγάλου αριθμού γονιδίων του ήπατος. Από τα γονίδια του ήπατος ποντικού, το ~7% φαίνεται να αποκρίνονται στην APR και τη παρουσία προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών (293). Επίσης, κατά την APR παρατηρούνται και αλλαγές στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση των τριγλυκεριδίων στον ορό του αίματος (υπερτριγλυκεριδαμία), που χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα VLDL (302), αλλά και από μειωμένα επίπεδα HDL (303). Η παρατεταμένη παρουσία, λοιπόν, φλεγμονωδών κυτταροκινών αυξάνει τις πιθανότητες εμφάνισης διαφόρων διαταραχών του οργανισμού, μεταξύ των οποίων η παχυσαρκία, το μεταβολικό σύνδρομο, η χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια, αλλά και αθηροσκλήρωση (295-301).

Για τους παραπάνω λόγους, λοιπόν, θελήσαμε να ελέγξουμε την επίδραση του TNFα στη μεταγραφική ενεργότητα γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών, άλλα και μεταγραφικών τους παραγόντων, όπως συν-ρυθμιστών και πυρηνικών υποδοχέων, της κυτταρικής σειράς ηπατώματος του ανθρώπου HepG2. Αρχικά, αναλύσαμε το πρότυπο έκφρασης πέντε διαφορετικών γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών: της apoCIII (εικ. 43A) και της apoAI (εικ. 43B) που βρίσκονται στο ίδιο σύμπλεγμα γονιδίων, της apoE (εικ. 43C) και της apoCII (εικ. 43D), που επίσης εντοπίζονται στο ίδιο

σύμπλεγμα γονιδίων και της *apoB* (**εικ. 43E**). Τα επίπεδα έκφρασης των διαφόρων γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών αναλύθηκαν με πειράματα RT-PCR για τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος HepG2, που επώασθηκαν με TNF α (1000u) για 0, 2, 4, 8, 24 και 48 ώρες. Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την **εικόνα 43**, είναι ότι όντως ο TNF α παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών, αφού από τα 5 γονίδια που ελέγξαμε, μόνο η *apoCII* (**εικ. 43D**) φαίνεται να μην αποκρίνεται στην παρουσία του, ενώ επίσης φαίνεται πως η ρύθμιση, που επάγεται από TNF α δεν έχει το ίδιο αποτέλεσμα για όλα τα γονίδια των απολιποπρωτεϊνών. Ο TNF α φαίνεται να ασκεί κατασταλτική δράση στις *apoCIII* (**εικ. 43A**) και *apoAI* (**εικ. 43B**) κατά τη διάρκεια του 24ώρου, ενώ φαίνεται να ενεργοποιεί την έκφραση των *apoE* (**εικ. 43C**) και *apoB* (**εικ. 43E**). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το εύρημα ότι ο TNF α φαίνεται να έχει διπλή δράση στην έκφραση των γονιδίων *apoAI* και *apoCIII*. Συγκεκριμένα, ο TNF α προκαλεί αύξηση των επιπέδων mRNA μέσα στις πρώτες 2 ώρες και στην συνέχεια σταδιακή μείωση των επιπέδων μέχρι τις 24 ώρες

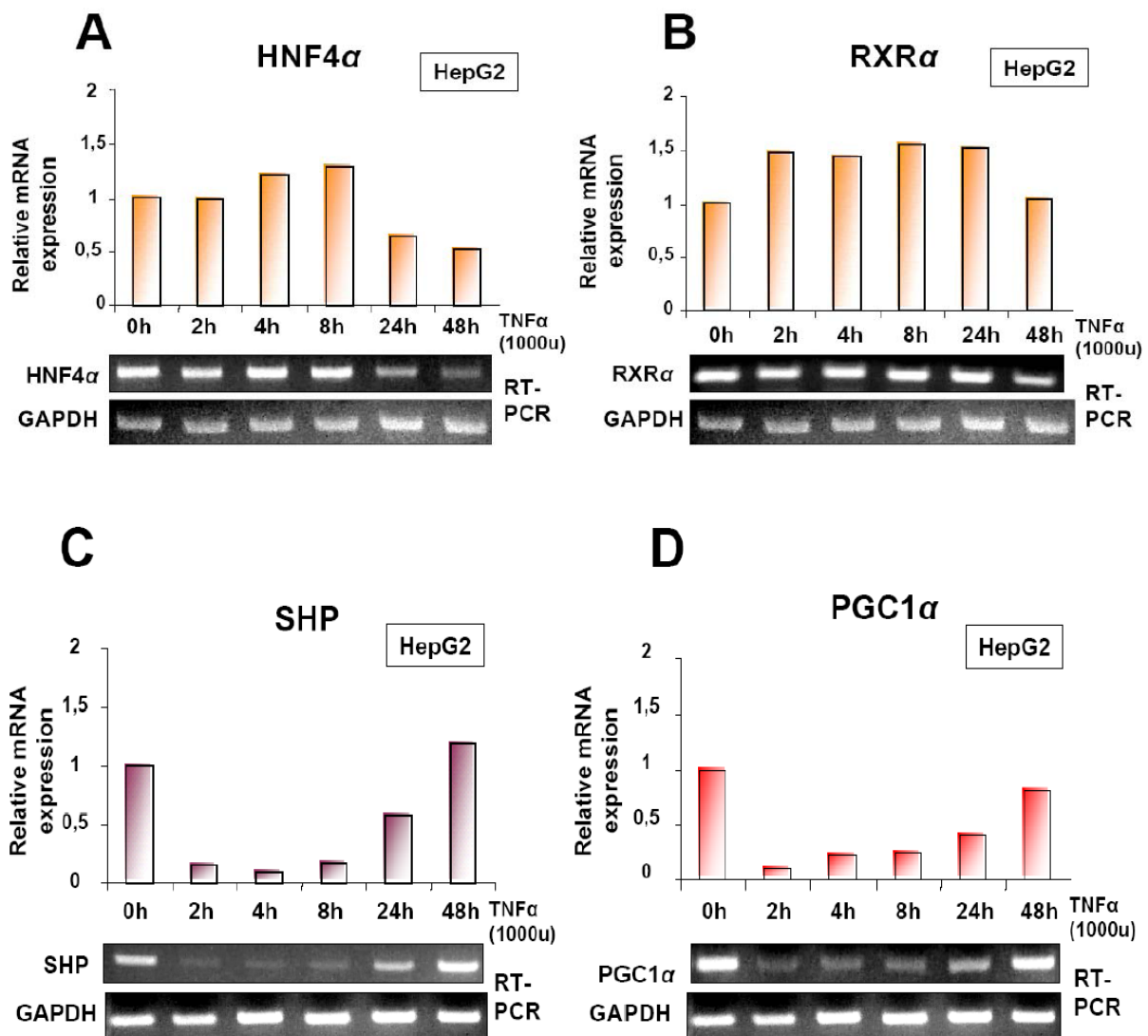


Εικόνα. 43: Μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών από τον TNFα.

Κύτταρα HepG2 επωάσθησαν με TNFα (1000 units) για 0, 2, 4, 8, 24 και 48 ώρες. Η έκφραση των γονιδίων της apoCIII (A), της apoAI (B), της apoE (C), της apoCII (D) και της apoB (E) αναλύθηκε με RT-PCR (Reverse Transcription-PCR). Τα επίπεδα έκφρασης του συστατικά εκφραζόμενου γονιδίου GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) χρησιμοποιήθηκαν για την κανονικοποίηση της συγκέντρωσης του RNA στα διάφορα δείγματα. Στα ιστογράμματα παρουσιάζεται η σχετική έκφραση

του mRNA κάθε γονιδίου, το οποίο ποσοτικοποιήθηκε με την ηλεκτροφόρησή του σε πηκτή αγαρόζης και τη χρήση του προγράμματος Tina 2.07d.

Με ανάλογα πειράματα διερευνήσαμε και την επίδραση του TNF α στην μεταγραφική ενεργότητα των γονιδίων δύο πολύ σημαντικών μεταγραφικών παραγόντων των υποκινητών των απολιποπρωτεϊνών, των πυρηνικών υποδοχέων HNF-4 α (**Εικ. 44A**) και RXR α (**Εικ. 44B**), καθώς και δύο βασικών συν-ρυθμιστών τους, ενός συν-καταστολέα, του SHP (**Εικ. 44C**) και ενός συν-ενεργοποιητή, του PGC1 α (**Εικ. 44D**). Στην περίπτωση των δύο πυρηνικών υποδοχέων παρατηρούμε ότι ο TNF α ασκεί διαφορετική επίδραση με το να αυξάνει τα επίπεδα mRNA, ως και την 24η ώρα, του RXR α (**Εικ. 44B**) και να μειώνει τα επίπεδα mRNA του HNF-4 α (**Εικ. 44A**), από την 24η ώρα και έπειτα. Παρόλα αυτά, όσον αφορά τον HNF-4 α , η κατασταλτική επίδραση του TNF α στην έκφραση του γονιδίου του δεν φαίνεται να έχει και την αντίστοιχη επίδραση στα πρωτεϊνικά του επίπεδα στα κύτταρα HepG2, τα οποία συνεχίζουν και μένουν αμετάβλητα ως και τις 24 ώρες (**Εικ. 38C**). Το ιδιαίτερα εντυπωσιακό εύρημα της πειραματικής αυτής διαδικασίας είναι η έντονη κατασταλτική δράση που φαίνεται ότι ασκεί ο TNF α στην έκφραση του SHP (**Εικ. 44C**) και του PGC1 α (**Εικ. 44D**), κατά τις πρώτες 8 ώρες μετά την προσθήκη του TNF α , ενώ αξιοσημείωτη είναι η ομοιότητα στο προφίλ των επιπέδων mRNA των δύο αυτών γονιδίων (SHP και PGC1 α) παρουσία του TNF α .



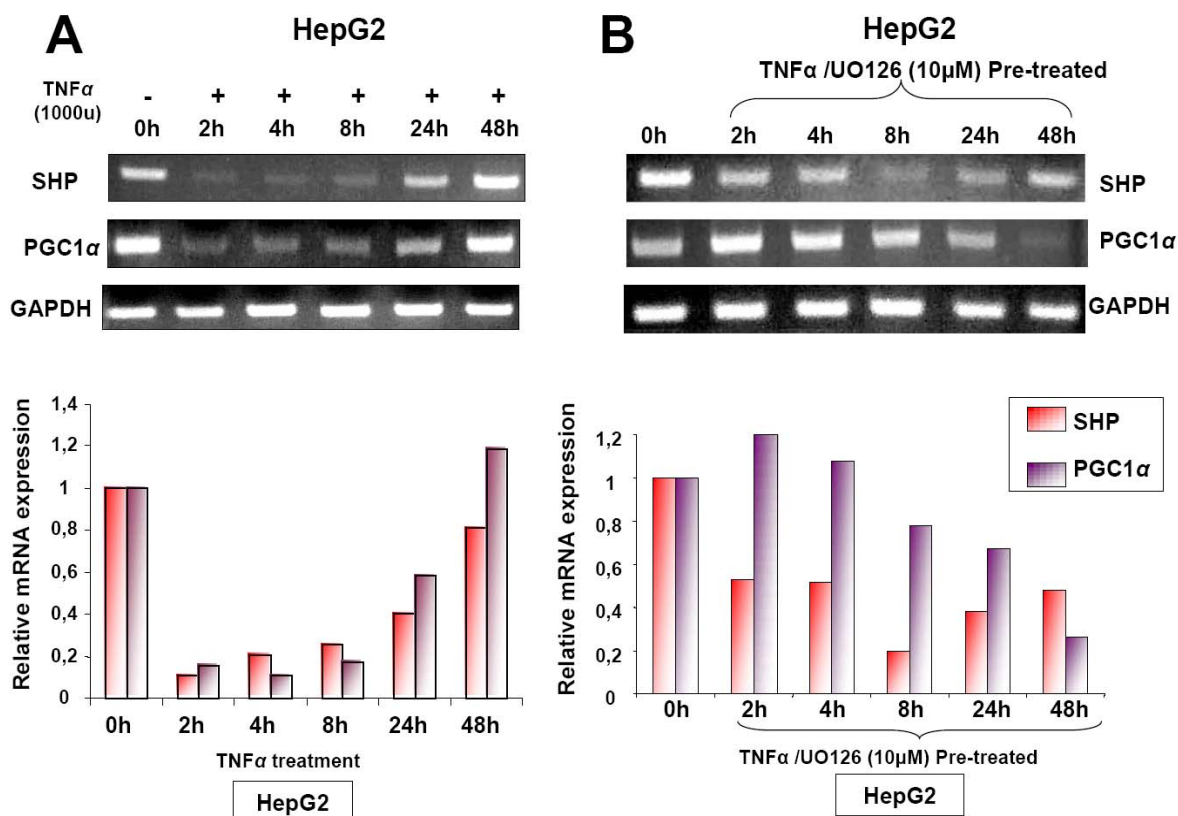
Εικόνα. 44: Μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων μεταγραφικών παραγόντων και συν-ρυθμιστών των απολιποπρωτεϊνών από τον TNFα.

Κύτταρα HepG2 επώασθησαν με TNFα (1000 units) για 0, 2, 4, 8, 24 και 48 ώρες. Η έκφραση των γονιδίων του HNF-4α (A), του RXRα (B), του SHP (C) και του PGC1α (D) αναλύθηκε με RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR). Τα επίπεδα έκφρασης του συστατικά εκφραζόμενου γονιδίου GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) χρησιμοποιήθηκαν για την κανονικοποίηση της συγκέντρωσης του RNA στα διάφορα δείγματα. Στα ιστογράμματα παρουσιάζεται η σχετική έκφραση του mRNA κάθε γονιδίου, το οποίο ποσοτικοποιήθηκε με την ηλεκτροφόρησή του σε πηκτή αгарόζης και τη χρήση του προγράμματος Tina 2.07d

2. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού της MEK1/2 από τον TNFα ρυθμίζει την έκφραση των SHP και PGC1α

Συγκρίνοντας, λοιπόν, την δράση του TNFα στην έκφραση του SHP και του PGC1α (Εικ. 45A), βλέπουμε ότι το μοτίβο της μεταγραφικής καταστολής που τους ασκεί ο TNFα είναι παρόμοιο. Γνωρίζοντας το πόσο σημαντικό ρόλο στη μεταγραφική ρύθμιση των απολιποπρωτεϊνών, αλλά και άλλων γονιδίων που

εκφράζονται στο ήπαρ, παίζουν οι συν-ρυθμιστές (215) και αφού έχουμε ήδη δείξει ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα, τουλάχιστον του HNF-4α (**Εικ. 38C**), δεν επηρεάζονται από την παρουσία του TNFα, θελήσαμε να μελετήσουμε το μονοπάτι εκείνο του TNFα που επάγει αυτή τη δραματική καταστολή, των δύο συν-ρυθμιστών, στη οποία ενδεχομένως να οφείλεται και μέρος του μηχανισμού δράσης του TNFα στη μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών. Στην **εικόνα 45(B)** βλέπουμε, λοιπόν, ότι η προ-επάση των κυττάρων HepG2, με τον χημικό αναστολέα του μονοπατιού της MEK1/2, UO126 πριν την επάσή τους με TNFα, για τα χρονικά διαστήματα των 0, 2, 4, 8, 24 και 48 ωρών, είχε ως αποτέλεσμα, για τον PGC1α, τη πλήρη εξουδετέρωση της κατασταλτικής επίδρασης του TNFα, στα πρώιμα στάδια της δράσης του (**Εικ. 45B**). Αυτό σημαίνει ότι η καταστολή αυτή προέρχεται αποκλειστικά από την ενεργοποίηση του μονοπατιού της MEK1/2. Δεν συμβαίνει όμως το ίδιο και με τον SHP. Παρά το γεγονός ότι η παρουσία του αναστολέα της MEK επαναφέρει μεγάλο μέρος της μεταγραφικής του ενεργοποίησης (**Εικ. 45B**), φαίνεται ότι υπάρχει και κάποιο άλλο μονοπάτι, που επάγεται από τον TNFα και το οποίο συνεχίζει να το καταστέλλει. Παρόλα αυτά, είναι εμφανές πως μονοπάτια που επάγονται από τον TNFα, εκτός της ενεργοποίησης της MEK, ασκούν επίσης κατασταλτική δράση στην έκφραση και των δύο γονιδίων.



Εικόνα 45: Η ενεργοποίηση της MEK1/2 από τον TNFα ρυθμίζει την έκφραση των SHP και PGC1α σε ηπατικά κύτταρα.

(A) Κύτταρα HepG2 επωάστηκαν με TNFα (1000 units) για 0, 2, 4, 8, 24 και 48 ώρες. Η έκφραση των γονιδίων του SHP και του PGC1α αναλύθηκε με RT-PCR. Τα επίπεδα έκφραση του συστατικά εκφραζόμενου γονιδίου GAPDH χρησιμοποιήθηκαν για την κανονικοποίηση της συγκέντρωσης του RNA στα διάφορα δείγματα. Στα ιστογράμματα παρουσιάζεται η σχετική έκφραση του mRNA κάθε γονιδίου, το οποίο ποσοτικοποιήθηκε με την ηλεκτροφόρησή του σε πηκτική αгарόζης και τη χρήση του προγράμματος Tina 2.07d. (B) Κύτταρα HepG2 επωάστηκαν με TNFα (1000 units) για 0, 2, 4, 8, 24 και 48 ώρες, αφού πρώτα προ-επωάστηκαν για 15 λεπτά, με τον αναστολέα της κινάσης MEK, UO126 (10μM). Η έκφραση των γονιδίων του SHP και του PGC1α αναλύθηκε με RT-PCR. Τα επίπεδα έκφραση του συστατικά εκφραζόμενου γονιδίου GAPDH χρησιμοποιήθηκαν για την κανονικοποίηση της συγκέντρωσης του RNA στα διάφορα δείγματα. Στα ιστογράμματα παρουσιάζεται η σχετική έκφραση του mRNA κάθε γονιδίου, το οποίο ποσοτικοποιήθηκε με την ηλεκτροφόρησή του σε πηκτική αгарόζης και τη χρήση του προγράμματος Tina 2.07d.

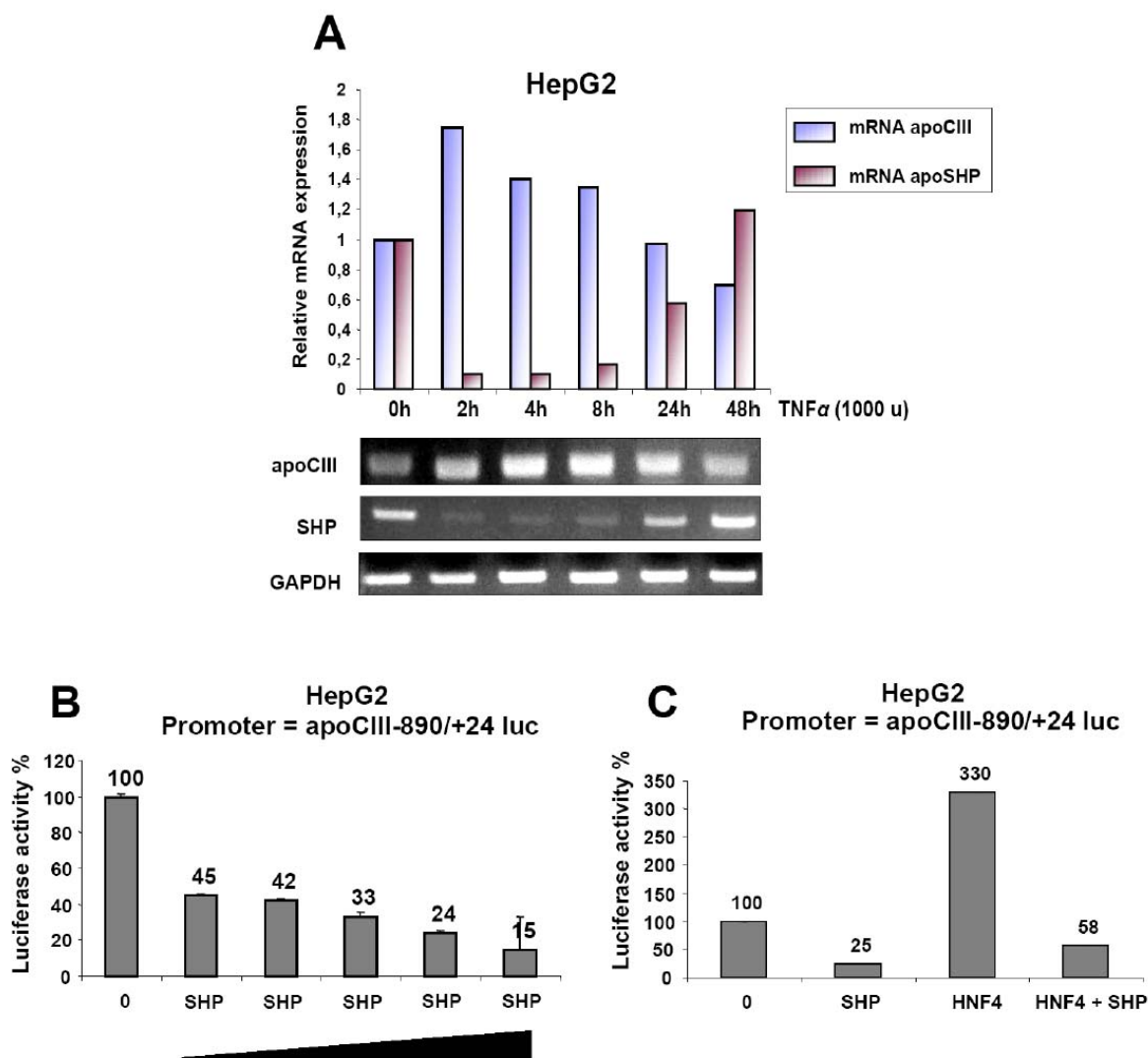
III. Ο ρόλος του καταστολέα SHP (Small Heterodimer Partner) στην ρύθμιση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών του ανθρώπου

1. Ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργότητας των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών από τον πυρηνικό υποδοχέα SHP

Γνωρίζουμε, από προηγούμενες μελέτες, ότι ο πυρηνικός υποδοχέας SHP έχει την ικανότητα να ρυθμίζει την έκφραση διαφόρων γονιδίων, αλληλεπιδρώντας και καταστέλλοντας τη μεταγραφική ενεργότητα πυρηνικών υποδοχέων όπως ο TRβ (117, 118), RXRβ (120) και HNF-4α (121). Ένα δεδομένο από την ανάλυση της

έκφρασης των ηπατικών γονιδίων, από κύτταρα HepG2, παρουσία του TNF α για τα χρονικά διαστήματα 0, 2, 4, 8, 24 και 48 ωρών, προέκυψε από τη σύγκριση της επίδρασης του TNF α στη μεταγραφική ενεργότητα των γονιδίων της apoCIII και του SHP (**Εικ. 46A**). Φαίνεται, λοιπόν, ότι η καταστολή της μεταγραφής του γονιδίου του SHP, κατά τη πρώιμη δράση του TNF α , έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του γονιδίου της apoCIII, ενώ η σταδιακή αύξηση της έκφρασης του SHP κατά την 24η και 48η ώρα, έχει ως αποτέλεσμα τη μεταγραφική καταστολή της apoCIII. Ανάλογη είναι και η παρατήρηση όσον αφορά τη μεταγραφική ενεργοποίηση και καταστολή του γονιδίου της apoAI. Συμπερασματικά, λοιπόν, θα μπορούσαμε να πούμε ότι η μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου του SHP από τον TNF α σε χρονικό διάστημα 24 ωρών, ενδεχομένως να αποτελεί ακόμη ένα μηχανισμό, ανεξάρτητο του μονοπατιού του NF- κ B, που οδηγεί στην καταστολή του υποκινητή του γονιδίου της apoCIII.

Για να διερευνήσουμε την πιθανότητα αυτή, πραγματοποιήσαμε πειράματα μεταγραφικής ενεργότητας, στα οποία κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με τον υποκινητή του γονιδίου της apoCIII του ανθρώπου, παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων του φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης SHP. Τα πειράματα αυτά μας έδειξαν ότι η παρουσία του SHP ασκεί δόσο-εξαρτώμενη κατασταλτική δράση στην ενεργότητα του υποκινητή της apoCIII (**Εικ. 46B**). Με αντίστοιχα πειράματα, παροδικής επιμόλυνσης HepG2 κυττάρων, καταλήξαμε στο ότι η μεταγραφική αυτή καταστολή προκαλείται μέσω του HNF-4 α (**Εικ. 46C**).

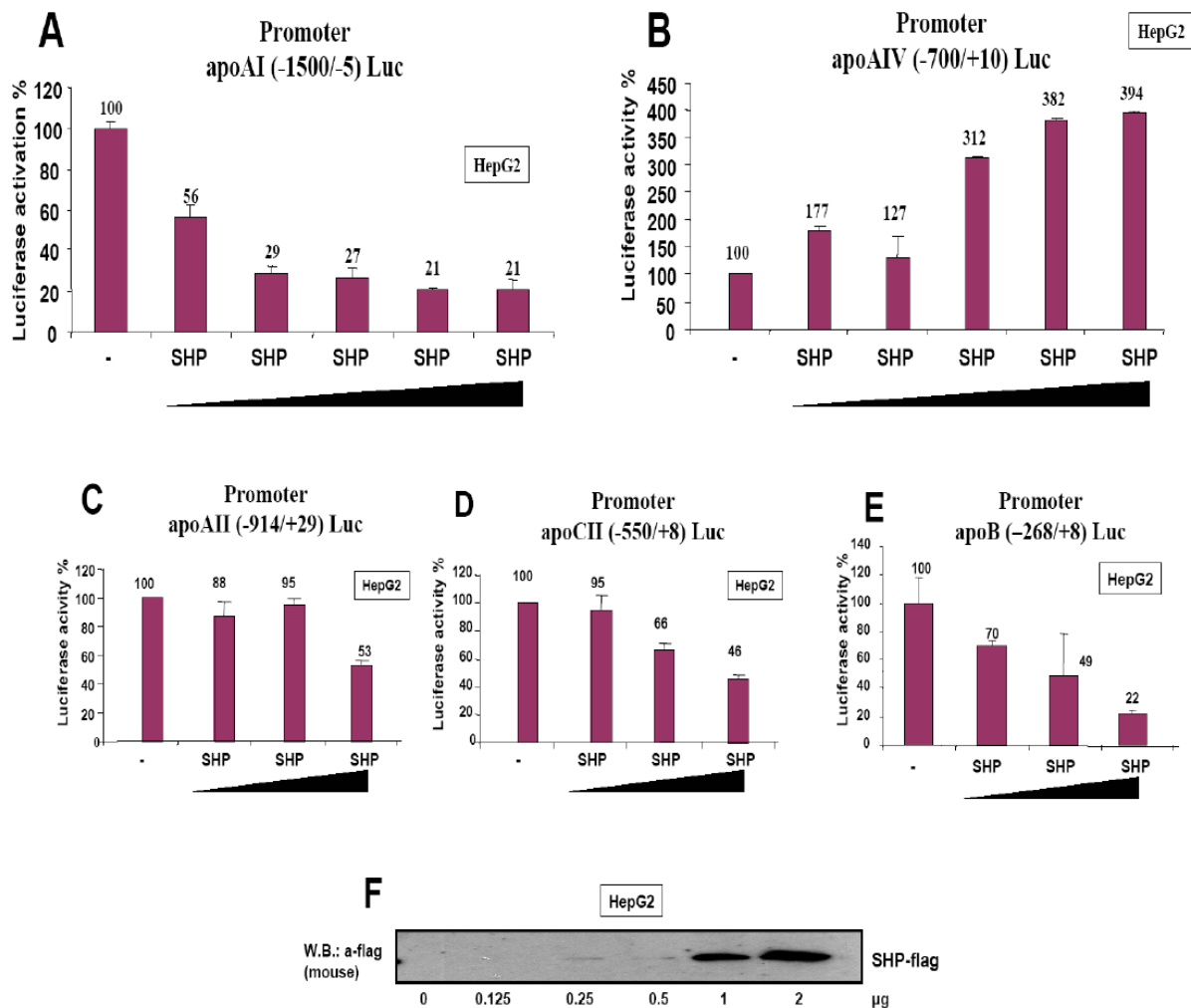


Εικόνα 46: Ο SHP καταστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή της apoCIII μέσω του HNF-4α

(A) Κύτταρα HepG2 επωάστηκαν με TNFα (1000 units) για 0, 2, 4, 8, 24 και 48 ώρες. Η έκφραση των γονιδίων της apoCIII και του SHP αναλύθηκε με RT-PCR. Τα επίπεδα έκφρασης του συστατικά εκφραζόμενου γονιδίου GAPDH χρησιμοποιήθηκαν για την κανονικοποίηση της συγκέντρωσης του RNA στα διάφορα δείγματα. Στα ιστογράμματα παρουσιάζεται η σχετική έκφραση του mRNA κάθε γονιδίου, το οποίο ποσοτικοποιήθηκε με την ηλεκτροφόρησή του σε πηκτική αгарόζης και τη χρήση του προγράμματος Tina 2.07d. (B) Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς apoCIII (-890/+24)-Luc (2 μg), απουσία και παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων από τον φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης SHP (0.125, 0.25, 0.5, 1 και 2 μg). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του υποκινητή της apoCIII. (C) Κύτταρα HepG2 συν-επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς apoCIII (-890/+24)-Luc (2 μg) παρουσία του φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης SHP (1 μg) ή του φορέα έκφρασης του HNF-4α (1 μg) ή και με τους δύο φορείς ταυτόχρονα. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του υποκινητή της apoCIII.

Στη συνέχεια, θελήσαμε να ελέγξουμε αν η παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης SHP (Εικ. 47F), θα είχε την ίδια κατασταλτική για τη μεταγραφική ενεργότητα, επίδραση και στους υποκινητές των γονιδίων άλλων απολιποπρωτεϊνών. Χρησιμοποιώντας, λοιπόν, σε πειράματα παροδικών

επιμολύνσεων HepG2 κυττάρων, τους υποκινητές των γονιδίων apoAI [(-1500/-5) Luc] (**Εικ. 47A**) και apoAIV [(-700/+10) Luc] (**Εικ. 47B**), τα οποία εντοπίζονται στο ίδιο σύμπλεγμα γονιδίων, παρατηρήσαμε ότι παρά το γεγονός ότι και οι δύο απολιποπρωτεΐνες ρυθμίζονται από τον HNF-4 α , στη περίπτωση του υποκινητή της apoAIV, ο SHP, φαίνεται να παίζει ενεργοποιητικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασής του γονιδίου της. Στη περίπτωση των υποκινητών των γονιδίων της apoAII [(-914/+29) Luc] (**Εικ. 47C**), και της apoCII [(-550/+8) Luc] (**Εικ. 47D**), που επίσης φέρουν HRE πάνω στα οποία ο HNF-4 α καθώς και το ετεροδιμερές RXR α /TR β , έχουν την ικανότητα να προσδένονται, η επίδραση του SHP στη μεταγραφική τους καταστολή δε φαίνεται να είναι ιδιαίτερα ισχυρή. Τέλος, χρησιμοποιήσαμε τον υποκινητή του γονιδίου της apoB [(-700/+10) Luc] (**Εικ. 47E**), του οποίου η μεταγραφική ρύθμιση επίσης ελέγχεται από τον HNF-4 α , αλλά και από άλλους πυρηνικούς υποδοχείς και είδαμε ότι η παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων της SHP πρωτεΐνης, είχε ως αποτέλεσμα την έντονη καταστολή του υποκινητή της.



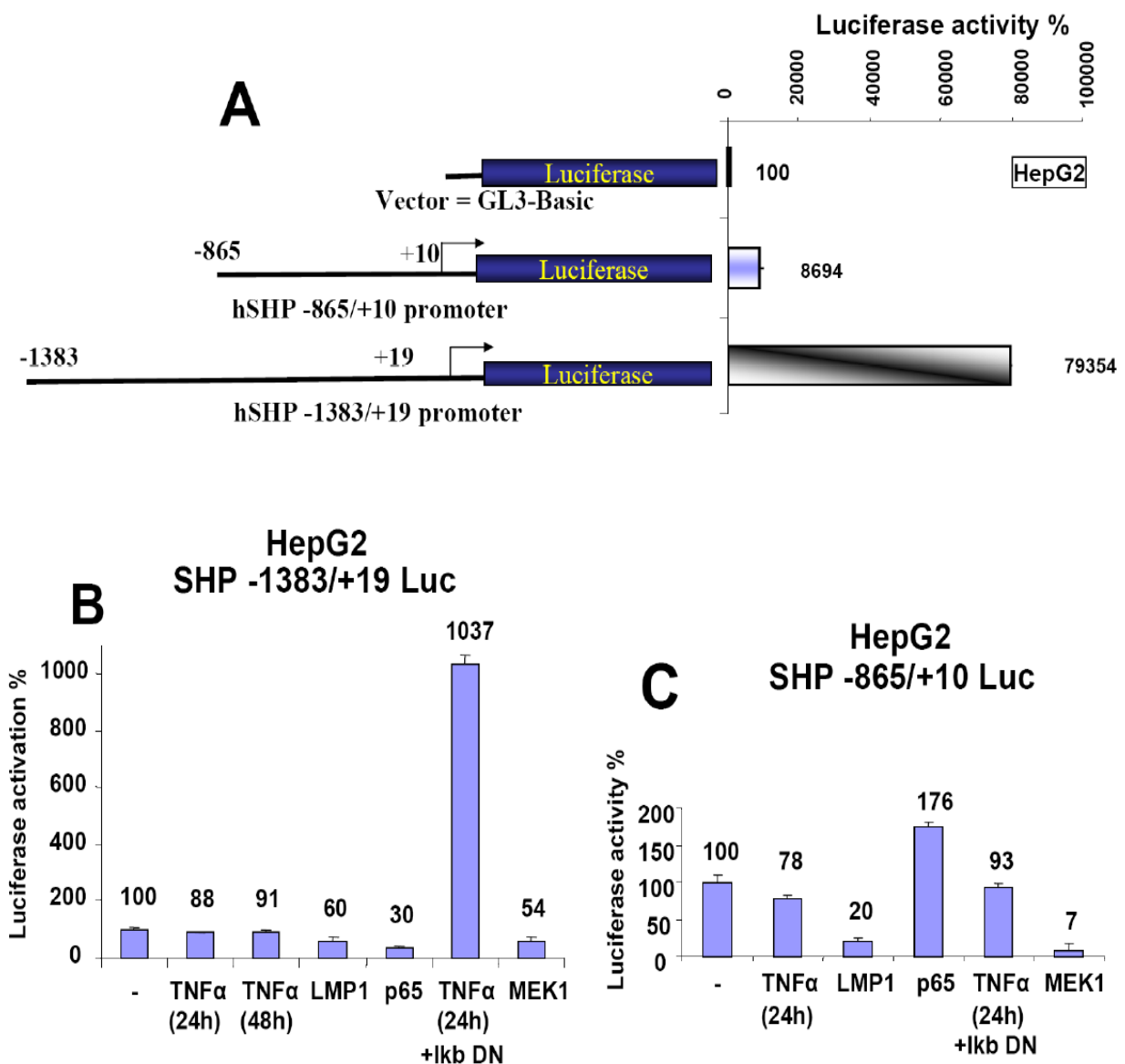
Εικόνα 47: Ο SHP καταστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα διαφόρων υποκινητών των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών.

(A & B) Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με τα πλασμίδια αναφοράς apoAI (-1500/-5) Luc (2 μg) (A) ή apoAIV (-700/+10) Luc (2 μg) (B), απουσία και παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων από τον φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης SHP (0.125, 0.25, 0.5, 1 και 2 μg). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στα ιστογράμματα παρουσιάζονται οι κανονικοποιημένες σχετικές ενεργότητες των υποκινητών της apoAI και της apoAIV. (C-E) Κύτταρα HepG2 συνεπιμολύνθηκαν παροδικά με τα πλασμίδια αναφοράς apoAII (-914/+29) Luc (2 μg) (C) ή apoCII (-550/+8) Luc (2 μg) (D) ή apoB (-700/+10) Luc (2 μg) (E) απουσία και παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων από τον φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης SHP (0.125, 0.5 και 2 μg). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στα ιστογράμματα παρουσιάζονται οι κανονικοποιημένες σχετικές ενεργότητες των υποκινητών της apoAII, της apoCII και της apoB. (F) Κυτταρικά εκχυλίσματα HepG2 κυττάρων, που προήλθαν από τις πειραματικές διαδικασίες (A-E) χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των αυξανόμενων επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης SHP-FLAG, που προήλθε από την επιμόλυνση των κυττάρων με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης (0.125, 0.25, 0.5, 1 και 2 μg). Η ποσοτικοποίηση των κυτταρικών εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Bradford-Lowry (DC Protein Assay, Bio-Rad) και ίσες ποσότητες συνολικής πρωτεΐνης αναλύθηκαν με SDS/PAGE. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση και ανίχνευση του SHP-FLAG με τη χρήση του α-FLAG μονοκλωνικό αντισώματος ποντικού και του αντίστοιχου δευτερεύοντος HRP-συνδεδεμένου αντισώματος. Τα μg που αναγράφονται κάτω από την εικόνα αντιστοιχούν στις ποσότητες των επιμολυσμένων φορέων έκφρασης του SHP-FLAG.

2. Η υπομονάδα p65 του NF-κB καταστέλλει τη μεταγραφική ενεργοποίηση του υποκινητή του SHP μέσω της περιοχής -1383/-865

Επειδή ο ορμονικός υποδοχέας SHP φαίνεται να συμμετέχει στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών μέσω σηματοδότησης από τον TNFα (Εικ. 46), ενώ ταυτόχρονα ο TNFα ελέγχει και τη δική του έκφραση (Εικ. 44C), θελήσαμε να μελετήσουμε τον υποκινητή του SHP και να δούμε ποια είναι εκείνα τα μονοπάτια του TNFα που ευθύνονται για τη μεταγραφική του ρύθμιση. Από πειραματικές προσεγγίσεις που παρουσιάστηκαν, γνωρίζουμε ήδη ότι ένα μέρος της μεταγραφικής καταστολής που υφίσταται το γονίδιο του SHP, κατά τη πρόιμη δράση του TNFα, οφείλεται στην ενεργοποίηση της κινάσης MEK1/2 (Εικ. 45B).

Για τη διερεύνηση της δράσης των μονοπατιών του TNFα πάνω στην έκφραση του γονιδίου του SHP, χρησιμοποιήσαμε τον υποκινητή του γονιδίου του SHP (-1383/+19) Luc καθώς και μία ελλειμματική του μορφή, τον SHP (-865/+10) Luc (Εικ. 48A). Και οι δύο αυτοί υποκινητές παρουσιάζουν πολύ μεγάλη μεταγραφική ενεργότητα κατά την παροδική τους επιμόλυνση σε κύτταρα HepG2 (Εικ. 48A). Στα πειράματα μεταγραφικής ενεργότητας που πραγματοποιήθηκαν με παροδικές επιμολύνσεις κυττάρων HepG2 με τον υποκινητή SHP (-1383/+19) Luc, παρατηρήσαμε ότι παρά το ότι ο TNFα δεν φαινόταν να ρυθμίζει με κάποιο τρόπο τον υποκινητή του SHP, τόσο ο LMP1, όσο και ο NF-κB φαίνεται να ασκούν έντονη κατασταλτική δράση στη μεταγραφική ικανότητα του υποκινητή (Εικ. 48B). Η χρήση επίσης του αναστολέα IκB-ND, του NF-κB μονοπατιού, παρουσία του TNFα, είχε ως αποτέλεσμα την μεταγραφική αύξηση του υποκινητή SHP (-1383/+19) Luc, πολύ πάνω από τα βασικά του επίπεδα. Επιβεβαιώθηκε επίσης το γεγονός ότι η κινάση MEK1 ασκεί έντονη κατασταλτική επίδραση στον υποκινητή του SHP (Εικ. 48B). Ενώ, όμως ο LMP1 και η κινάση MEK1 συνεχίζουν να ασκούν έντονη κατασταλτική επίδραση στην μεταγραφική ικανότητα της ελλειμματικής μορφής του υποκινητή του SHP [(-865/+10) Luc], ο p65 και ο αναστολέας του, IκB-ND, δεν μπορούν πλέον να δράσουν (Εικ. 48C). Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ενώ το μονοπάτι της MEK1 καταστέλλει τον υποκινητή του SHP μέσω μία περιοχής μεταξύ των νουκλεοτιδίων -865/+10, ο NF-κB δρα μέσω άλλης περιοχής που εντοπίζεται μεταξύ των νουκλεοτιδίων -1383 και -865.



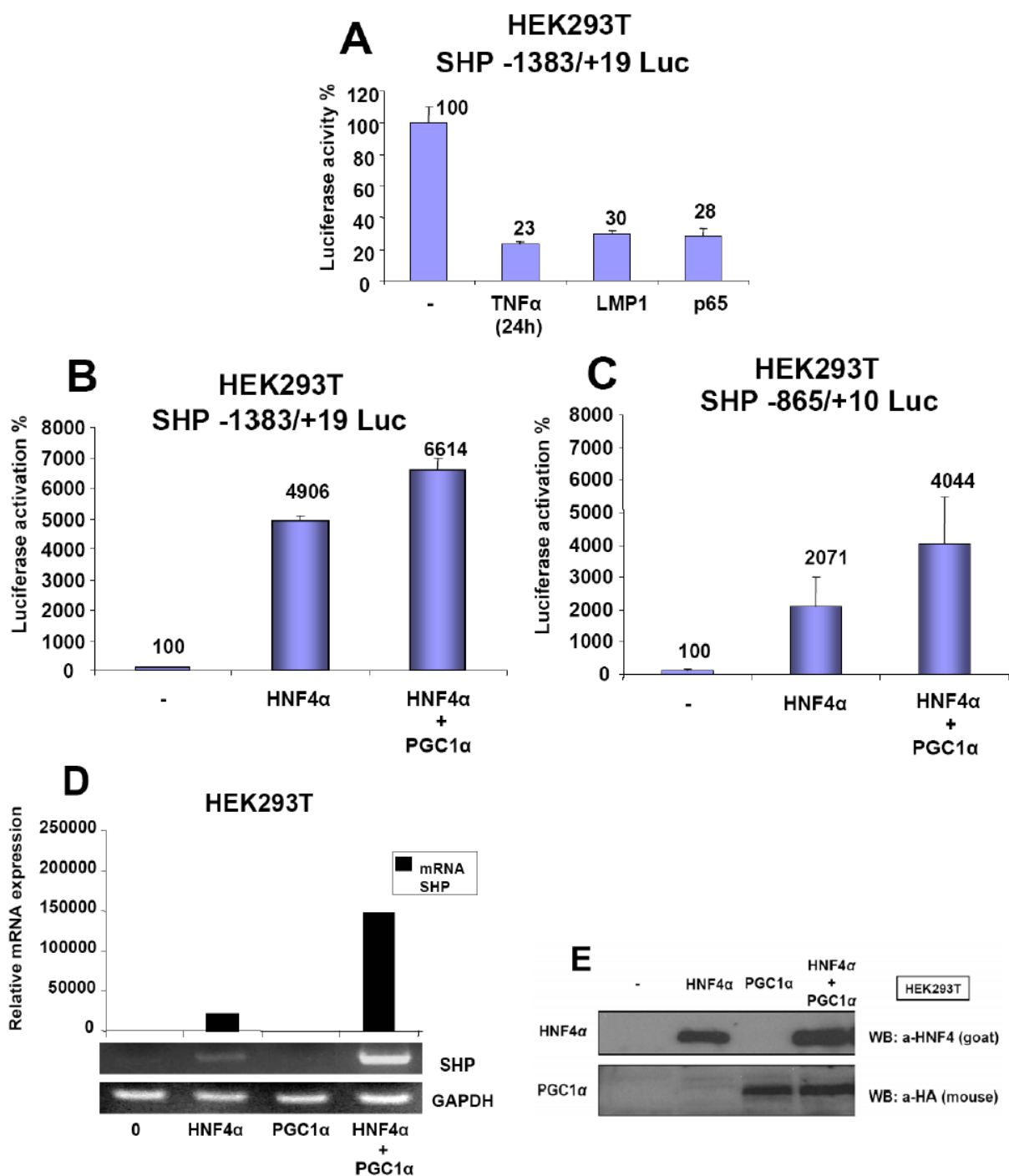
Εικόνα 48: Ο NF-κB καταστέλλει τη μεταγραφική ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου SHP μεταξύ της περιοχής -1383/ -865.

(A) *Αριστερά:* Σχηματική αναπαράσταση των δύο υποκινητών του γονιδίου SHP που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα που παρουσιάζονται στην εικόνα αυτή. *Δεξιά:* Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με τα πλασμίδια αναφοράς SHP (-1383/+19) (2 μg) ή SHP (-865/+10) Luc (2 μg). Ως control χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pGL3-basic που φέρει μόνο το γονίδιο της λουσιφεράσης (2 μg). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα των υποκινητών του SHP (-1383/+19) και (-865/+10). (B) Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με τα πλασμίδια αναφοράς SHP (-1383/+19) (2 μg), παρουσία ή απουσία TNFα (1000 units) για 24 και 48 ώρες και των πλασμιδίων έκφρασης των πρωτεϊνών LMP1 (50ng), p65 (2 μg), IκB-ND (2 μg) και MEK1 (2 μg). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του υποκινητή SHP (-1383/+19). (C) Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με τα πλασμίδια αναφοράς SHP (-865/+10) (2 μg), παρουσία ή απουσία TNFα (1000 units) για 24 ώρες και των πλασμιδίων έκφρασης των πρωτεϊνών LMP1 (50ng), p65 (2 μg), IκB-ND (2 μg) και MEK1 (2 μg). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του υποκινητή SHP (-1383/+19).

3. Ο HNF-4α και ο συν-ενεργοποιητής PGC1α είναι υπεύθυνοι για τη σωστή έκφραση του γονιδίου του SHP

Αν και στα κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος HepG2, η παρουσία του TNFα για 24 ή 48 ώρες δεν φάνηκε να επηρεάζει τη μεταγραφική ικανότητα των δύο υποκινητών του SHP, δεν συνέβη το ίδιο όταν επαναλάβουμε το αντίστοιχο πείραμα στη κυτταρική σειρά HEK293T (**Εικ. 49A**). Στη περίπτωση αυτή βρέθηκε ότι τόσο ο LMP1 και ο p65, αλλά όσο και ο TNFα, ασκούν έντονη κατασταλτική επίδραση στη μεταγραφική ικανότητα του υποκινητή SHP (-1383/+19). Επειδή ο SHP δεν εκφράζεται φυσιολογικά στη κυτταρική σειρά HEK293T, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι ούτε και ο HNF-4α εκφράζεται στα κύτταρα αυτά, μας οδήγησε στη σκέψη ότι ο HNF-4α, μπορεί να ευθύνεται τόσο για τη σωστή έκφραση του γονιδίου του SHP, όσο και για μέρος της επανάκαμψης της έκφρασης του SHP, που ουσιαστικά παρατηρούμε κατά την 24η και 48η ώρα επώασης με TNFα στη κυτταρική σειρά HepG2 (**Εικ. 44C & 48B**).

Για να επιβεβαιώσουμε τη σκέψη αυτή πραγματοποιήσαμε πειράματα μεταγραφικής ενεργότητας, στα οποία κύτταρα HEK293T επιμολύνθηκαν παροδικά με τους υποκινητές του γονιδίου του SHP (-1383/+19) (**Εικ. 49B**) και (-865/+10) (**Εικ. 49C**) του ανθρώπου. Η εξωγενής έκφραση του HNF-4α, αλλά και συνδυασμός της έκφρασής του με την έκφραση του συν-ενεργοποιητή του, PGC1α στα HEK293T, είχε ως αποτέλεσμα την μεταγραφική ενεργοποίηση και των δύο υποκινητών του SHP, σε επίπεδα παρόμοια με αυτά που παρατηρήσαμε αρχικά για τους δύο υποκινητές στη κυτταρική σειρά HepG2 (**Εικ. 48A**). Η επιβεβαίωση της ικανότητας, αλλά και της αναγκαιότητας της παρουσίας του HNF-4α, σε συνδυασμό με τον PGC1α, για τη σωστή έκφραση του SHP, ήρθε όταν μπορέσαμε, με τη χρήση πειραμάτων παροδικής επιμόλυνσης, (**Εικ. 49E**), να υπερεκφράσουμε σε κύτταρα HEK293T τον παράγοντα HNF-4α και τον συν-ενεργοποιητή PGC1α και να ενεργοποιήσουμε το ενδογενές γονίδιο του SHP, των HEK293T κυττάρων (**Εικ. 49D**).



Εικόνα 49: Οι παράγοντες HNF-4 α και PGC1 α , είναι υπεύθυνοι για τη σωστή έκφραση του γονιδίου του SHP.

(A) Κύτταρα HEK293T επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς SHP (-1383/+19) (2 μ g) παρουσία ή απουσία TNF α (1000 units) για 24h ή παρουσία των πλασμιδίων έκφρασης των πρωτεϊνών LMP1 (50ng) και p65 (2 μ g). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του υποκινητή του SHP (-1383/+19). (B & C) Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με τα πλασμίδια αναφοράς SHP (-1383/+19) (2 μ g) ή SHP (-865/+10) Luc (2 μ g) (C) και το φορέα έκφρασης του HNF-4 α (2 μ g) παρουσία ή απουσία του φορέα έκφρασης του συν-ενεργοποιητή PGC1 α (1 μ g). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στα ιστογράμματα παρουσιάζονται οι κανονικοποιημένες σχετικές ενεργότητες των υποκινητών SHP (-1383/+19) (B) και SHP (-865/+10) (C). (D) Κύτταρα HEK293T επιμολύνθηκαν παροδικά με του φορείς έκφρασης του HNF-4 α (4 μ g) και

του PGC1 α -HA (2 μ g). Μετά από 48 ώρες τα κύτταρα συλλέχθηκαν και ακολούθησε απομόνωση συνολικού RNA με τη μέθοδο Trizol[®]. Η έκφραση του γονιδίου του SHP αναλύθηκε με RT-PCR. Τα επίπεδα έκφρασης του συστατικά εκφραζόμενου γονιδίου GAPDH χρησιμοποιήθηκαν για την κανονικοποίηση της συγκέντρωσης του RNA στα διάφορα δείγματα. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η σχετική έκφραση του mRNA του γονιδίου του SHP, το οποίο ποσοτικοποιήθηκε με την ηλεκτροφόρησή του σε πηκτή αγαρόζης και τη χρήση του προγράμματος Tina 2.07d. (E) Τα κύτταρα HEK293T της πειραματικής διαδικασίας που εμφανίζεται στην εικόνα (D) χρησιμοποιήθηκαν για απομόνωση συνολικής πρωτεΐνης βάσει του πρωτοκόλλου του Trizol[®]. Η ανίχνευση των εξωγενών εκφραζόμενων πρωτεϊνών έγινε με ανάλυση κατά Western. Ο HNF-4a ανιχνεύτηκε με ένα α -HNF-4a πολυκλωνικό αντίσωμα, ενώ ο PGC1 α -HA με τη χρήση του α -HA μονοκλωνικού αντισώματος ποντικού και των αντίστοιχων δευτερευόντων HRP-συνδεδεμένων αντισωμάτων.

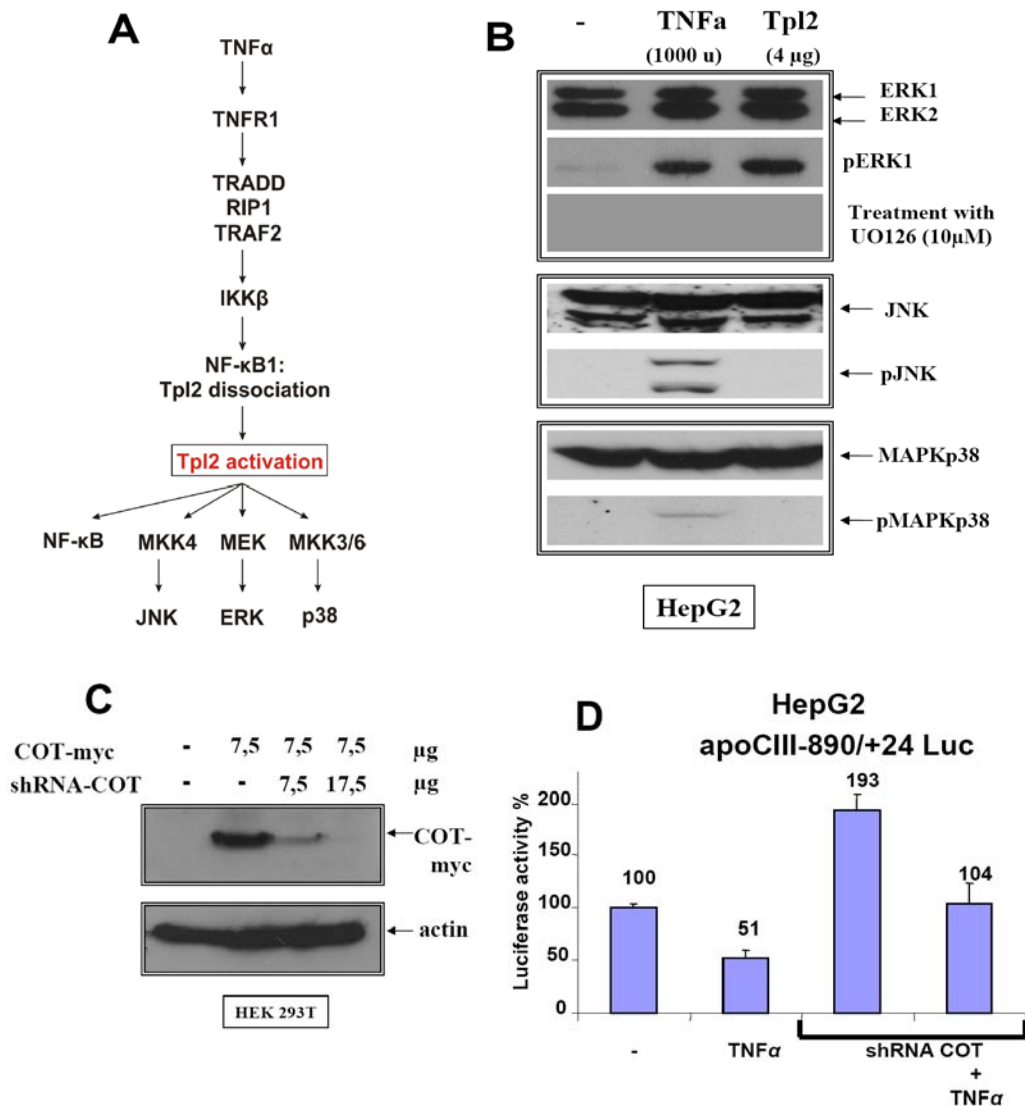
IV. Ο ρόλος της πρωτεΐνης Trp2/COT στην ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της apoC-III και της δραστηριότητας των πυρηνικών υποδοχέων HNF-4a, RXRa και T3R β

1. Ο ρόλος της κινάση Trp2/COT στη καταστολή της έκφρασης του γονιδίου της apoCIII μέσω του TNF α

Επειδή το μονοπάτι του TNF α φαίνεται να παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών, θελήσαμε να ελέγξουμε τον ρόλο που παίζει ένα πολύ βασικό συστατικό του μονοπατιού του, της κινάσης Trp2 και του ανθρώπινου ομολόγου της COT. Όπως φαίνεται και στην **εικόνα 50 (A)**, ο TNF α επάγει την ενεργοποίηση της Trp2/COT, μέσω του ορθόδοξου (canonical) μονοπατιού του, η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί τόσο τον NF- κ B, όσο και τις κινάσες JNK, ERK αλλά και p38MAPK (308, 309). Η ενεργοποίηση των διαφόρων μονοπατιών που έπονται της Trp2, εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο. Για το λόγο αυτό θελήσαμε να δούμε ποια από τα μονοπάτια των κινασών αυτών ενεργοποιούνται παρουσία εξωγενούς Trp2, στη κυτταρική σειρά HepG2. Αυτό που παρατηρήσαμε ήταν ότι, ενώ η παρουσία της κυτταροκίνης TNF α είχε ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση και των τριών μονοπατιών, η Trp2 φάνηκε να ενεργοποιεί μόνο την κινάση ERK (**Εικ. 50B**), η ενεργοποίηση της οποίας αναστέλλονταν παρουσία του αναστολέα της MEK, UO126. Επειδή, όμως η ποσότητα των ενεργοποιημένων από TNF α , φωσφο-JNK και φωσφο-p38MAPK που ανιχνεύουμε είναι πολύ μικρή και η ικανότητα επιμόλυνσης των HepG2 κυττάρων είναι επίσης μικρή, η Trp2 θα μπορούσε να ενεργοποιεί και τα άλλα δύο μονοπάτια, αλλά εμείς να μην είμαστε σε θέση να παρατηρήσουμε την ενεργοποίηση αυτή με ανοσοαποτύπωση.

Το αρχικό ερώτημα που τέθηκε ήταν αν η κινάση Trp2/COT συμμετέχει στη καταστολή του υποκινητή του γονιδίου της apoCIII, μέσω του TNF α . Για το σκοπό

αυτό χρησιμοποιήσαμε την τεχνική των shRNA (small hairpin RNA) για την αποσιώπηση του ενδογενούς γονιδίου της COT, των κυττάρων HepG2. Ο φορέας έκφρασης του shRNA-COT, ελέγχθηκε για την ικανότητά του να αποσιωπά την παραγωγή του mRNA της υπερεκφρασμένης, σε κύτταρα HEK293T, COT (Εικ. 50C) και στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα παροδικών επιμολύνσεων κυττάρων HepG2, με τον υποκινητή της apoCIII, απουσία και παρουσία του TNFα (Εικ. 50D). Αυτό που παρατηρήθηκε ήταν ότι η αποσιώπηση της έκφρασης της κινάσης της ενδογενούς COT μπλόκαρε τελείως τη μεταγραφική καταστολή του υποκινητή του γονιδίου της apoCIII, από τον TNFα. Παρατηρήθηκε επιπλέον και μία μικρή αύξηση των βασικών επιπέδων μεταγραφής του υποκινητή της apoCIII.



Εικόνα 50: Η κινάση COT εμπλέκεται στην μεταγραφική καταστολή του υποκινητή της apoCIII, μέσω του TNFα.

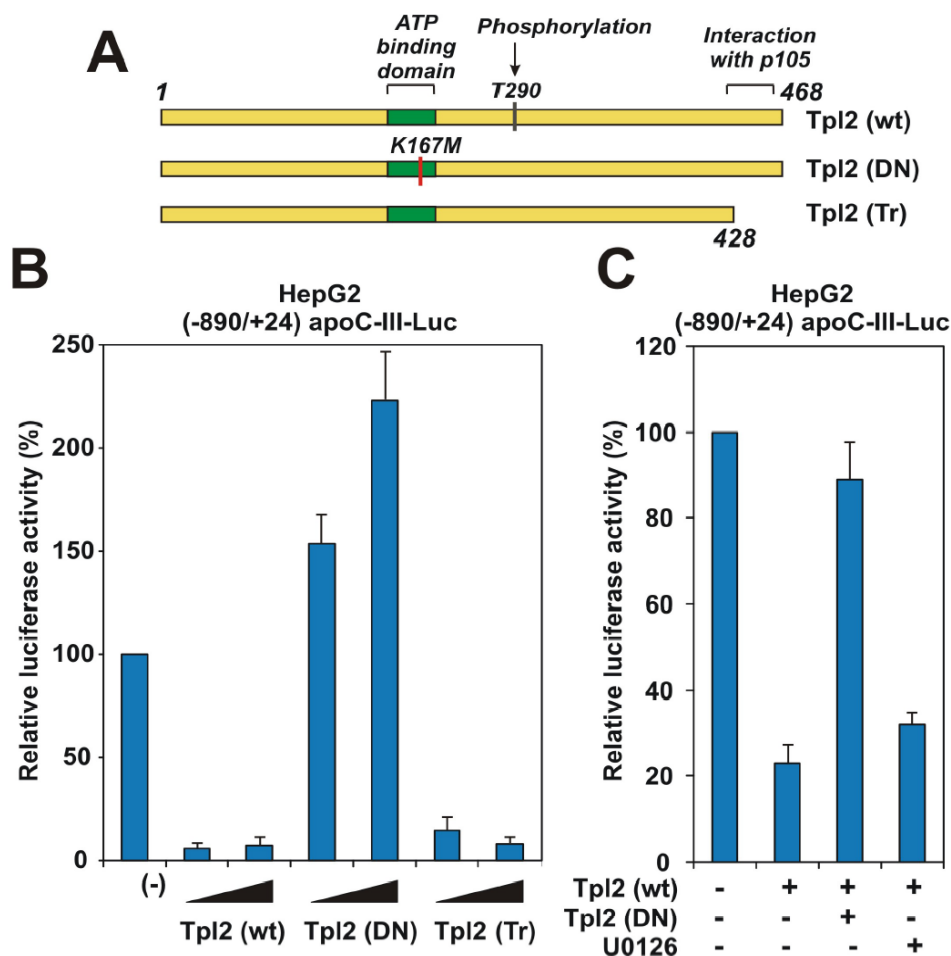
(A) Σχηματική αναπαράσταση του ορθόδοξου μονοπατιού του TNFα που οδηγεί στην ενεργοποίηση της κινάσης Tpl2, καθώς και μονοπάτια που η ίδια ενεργοποιεί στις διάφορες κυτταρικές σειρές. (B) Κύτταρα HepG2 επώασθησαν με TNFα (1000 units) για 24h ή επιμολύνθηκαν παροδικά με τον φορέα

έκφρασης της Trp2 (2 μg) απουσία ή παρουσία προ-επώασης με τον χημικό αναστολέα της MEK, UO126 (10 μM) για 24 ώρες. Ως δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικά εκχυλίσματα HepG2, τα οποία δεν είχαν υποστεί κάποια επεξεργασία. Η ποσοτικοποίηση των κυτταρικών εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Bradford-Lowry (DC Protein Assay, Bio-Rad) και ίσες ποσότητες συνολικής πρωτεΐνης αναλύθηκαν με SDS/PAGE. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση και ανίχνευση των πρωτεϊνών ERK, φωσφο-ERK, JNK, φωσφο-JNK, p38MAPK και φωσφο-p38MAPK με τη χρήση των α-ERK πολυκλωνικού, α-φωσφο-ERK μονοκλωνικού, α-JNK πολυκλωνικού, α-φωσφο-JNK πολυκλωνικού, α-p38MAPK πολυκλωνικού και α-φωσφο-p38MAPK πολυκλωνικού αντισώματος αντίστοιχα και τη χρήση του αντίστοιχου δευτερεύοντος HRP-συνδεδεμένου αντισώματος. (C) Κύτταρα HEK293T επιμολύνθηκαν παροδικά με τον φορέα έκφρασης του COT-myc (7,5 μg), απουσία και παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων του φορέα έκφρασης του shRNA-COT (7,5 και 17,5 μg). Η ποσοτικοποίηση των κυτταρικών εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Bradford-Lowry (DC Protein Assay, Bio-Rad) και ίσες ποσότητες συνολικής πρωτεΐνης (350 μg συνολικής πρωτεΐνης) αναλύθηκαν με SDS/PAGE. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση και ανίχνευση των πρωτεϊνών COT-myc και ακτίνης με τη χρήση α-COT πολυκλωνικού και α-actin πολυκλωνικού αντισώματος και τη χρήση του αντίστοιχου δευτερεύοντος HRP-συνδεδεμένου αντισώματος. (D) Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς apoCIII (-890/+24)-Luc (2 μg), παρουσία ή απουσία TNFα (1000 units) για 24 και του φορέα έκφρασης του shRNA-COT (8 μg). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του υποκινητή της apoCIII.

2. Η κινάση Trp2/COT καταστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή της apoCIII μέσω του HNF-4α με τρόπο ανεξάρτητο των μονοπατιών της ERK και του NF-κB

Για να ελέγξουμε τη δράση της κινάσης Trp2 στη μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου της apoCIII, πραγματοποιήσαμε πειράματα παροδικών επιμολύνσεων HepG2 κυττάρων με τον υποκινητή της apoCIII, παρουσία τριών διαφορετικών μορφών της Trp2 (Εικ. 51A): της Trp2 αγρίου τύπου (Trp2-wt), μιας ελλειμματικής μορφή, που αποτελεί και την ογκογονική, Trp2 (Trp2-Tr) και μίας αρνητικώς επικρατούσας μορφής της (Trp2-DN). Η Trp2-Tr, είναι μία συστατικά ενεργοποιημένη κινάση, αφού λείπει η περιοχή αλληλεπίδρασης με τον p105, η οποία ουσιαστικά είναι υπεύθυνη για τη καταστολή της ενεργότητας κινάσης. Η Trp2-DN, από την άλλη, φέρει μία σημειακή μεταλλαγή στη περιοχή πρόσδεσης με το ATP, μπλοκάροντας έτσι την ενεργότητα κινάσης, καθιστώντας την πρωτεΐνη ανενεργή. Η ιδιότητά της να δρα ως αρνητικώς επικρατούσα μορφή, πηγάζει από το γεγονός ότι η κινάση Trp2/COT δρα ως διμερές. Από τα πειράματα μεταγραφικής ενεργοποίησης του υποκινητή της apoCIII, σε κύτταρα HepG2, παρατηρήσαμε ότι η Trp2-wt και η Trp2-Tr ασκούν έντονη καταστατική επίδραση στον υποκινητή της apoCIII, ενώ η παρουσία της μορφής Trp2-DN, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των βασικών επιπέδων μεταγραφής του υποκινητή της apoCIII (Εικ. 51B), κατάσταση ανάλογη με αυτή που παρατηρήσαμε κατά τη χρήση του shRNA-COT (Εικ. 50D). Με άλλα λόγια, η Trp2-DN και το shRNA-COT, είναι ικανά να μπλοκάρουν, με διαφορετικούς τρόπους, την δράση της κινάσης Trp2/COT. Θέλοντας να διερευνήσουμε το μονοπάτι

της Trp2 που είναι υπεύθυνο για τη μεταγραφική καταστολή του υποκινητή της apoCIII, χρησιμοποιήσαμε, παρουσία της Trp2, τον χημικό αναστολέα της MEK, UO126. Δεν παρατηρήσαμε όμως κάποια αλλαγή στην κατασταλτική επίδραση που ασκεί η Trp2 στην έκφραση της apoCIII (Εικ. 51C). Αυτό σημαίνει ότι το μονοπάτι της ERK, που ενεργοποιείται από τη εξωγενή έκφραση της Trp2 στα HepG2 κύτταρα, δεν είναι υπεύθυνο για τη μεταγραφική καταστολή του υποκινητή της apoCIII που παρατηρούμε.

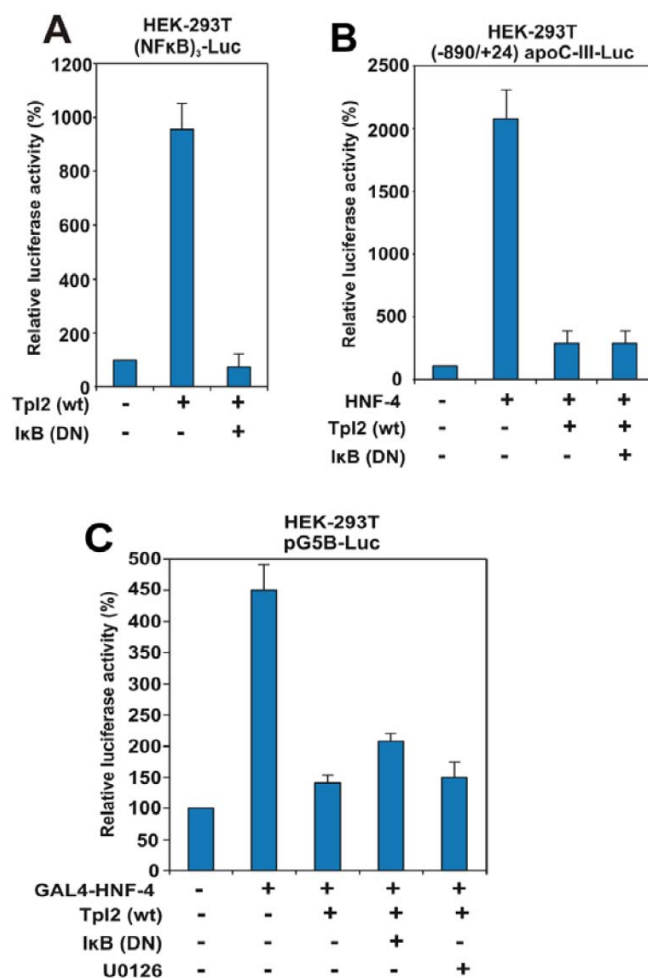


Εικόνα 51: Η κινάση Trp2 εμπλέκεται στην μεταγραφική καταστολή του υποκινητή της apoCIII.

(A) Σχηματική αναπαράσταση των τριών διαφορετικών μορφών της Trp2 που χρησιμοποιήθηκαν στις εικόνες B και C. Οι βασικές λειτουργικές περιοχές της Trp2 αγρίου τύπου (Trp2-wt) είναι η θέση πρόσδεσης του ATP, η θέση φωσφορύλιωσής της, που προκαλεί την ενεργοποίηση της κινάσης και η θέση αλληλεπίδρασης με τον NF- κ B p105 (B) Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς apoCIII (-890/+24)-Luc (2 μ g), παρουσία δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων του φορέα έκφρασης της Trp2 (wt) (1 και 2 μ g) ή της Trp2 (DN) (1 και 2 μ g) ή της Trp2 (tr) (1 και 2 μ g). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του υποκινητή της apoCIII. (C) Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς apoCIII (-890/+24)-Luc (2 μ g) και τους φορείς έκφρασης της Trp2 (wt) (0,125 μ g) ή της Trp2 (DN) (0,125 μ g) απουσία ή παρουσία επώασης με τον χημικό αναστολέα της MEK, UO126 (10 μ M) για 24 ώρες. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του υποκινητή της apoCIII.

Άλλο ένα βασικό μονοπάτι που ενεργοποιεί η Trp2 είναι αυτό του NF-κB. Η δράση αυτή της Trp2-wt επιβεβαιώθηκε με πειράματα μεταγραφικής ενεργοποίησης, σε κύτταρα HEK293T, του συνθετικού υποκινητή (NF-κB)₃. Η παρουσία του IκB-ND, είχε ως αποτέλεσμα τη πλήρη καταστολή της ενεργοποιητικής δράσης της Trp2 πάνω στον υποκινητή (NF-κB)₃ (**Εικ. 52A**). Με αντίστοιχα πειράματα, θελήσαμε να ελέγξουμε, αν ο NF-κB εμπλέκεται στην καταστολή του υποκινητή της apoCIII, από την Trp2-wt. Από τα ως τώρα δεδομένα, προκύπτει ότι η μεταγραφική καταστολή που προκαλεί το μονοπάτι του NF-κB στον υποκινητή της apoCIII, προκαλείται μέσω του HNF-4α. Με το σκεπτικό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα μεταγραφικής ενεργοποίησης, σε κύτταρα HEK293T, του υποκινητή της apoCIII παρουσία του HNF-4α. Η εξωγενής έκφραση της Trp2-wt, είχε ως αποτέλεσμα την καταστολή της επαγόμενης από HNF-4α μεταγραφικής ενεργοποίησης του υποκινητή της apoCIII, η παρουσία όμως του αναστολέα IκB-ND, δεν μπόρεσε να επαναφέρει την ενεργότητα αυτή στα αρχικά της επίπεδα (**Εικ. 52B**). Αυτό σημαίνει πως ούτε και το μονοπάτι του NF-κB εμπλέκεται στη μεταγραφική καταστολή του υποκινητή της apoCIII από την Trp2.

Χρησιμοποιώντας το σύστημα του GAL4, θελήσαμε να ελέγξουμε την κατασταλτική επίδραση που φάνηκε να έχει η Trp2-wt στη μεταγραφική ενεργότητα του HNF-4α, καθώς και το μονοπάτι που είναι υπεύθυνο για τη καταστολή αυτή. Με πειράματα παροδικών επιμολύνσεων HEK293T κυττάρων, επιβεβαιώσαμε τη κατασταλτική επίδραση της Trp2 πάνω στη μεταγραφική ενεργότητα του GAL4-HNF-4α, ενώ με τη χρήση των αναστολέων IκB-ND και UO126, καταλήξαμε στο ότι ούτε ο NF-κB, αλλά ούτε και το μονοπάτι της MEK, είναι υπεύθυνα για την καταστολή που παρατηρούμε (**Εικ. 52C**).



Εικόνα 52: Η κινάση Trp12 εμπλέκεται στην μεταγραφική καταστολή του υποκινητή της apoCIII μέσω του HNF-4α, με τρόπο ανεξάρτητο των μονοπατιών της Erk και του NF-κB.

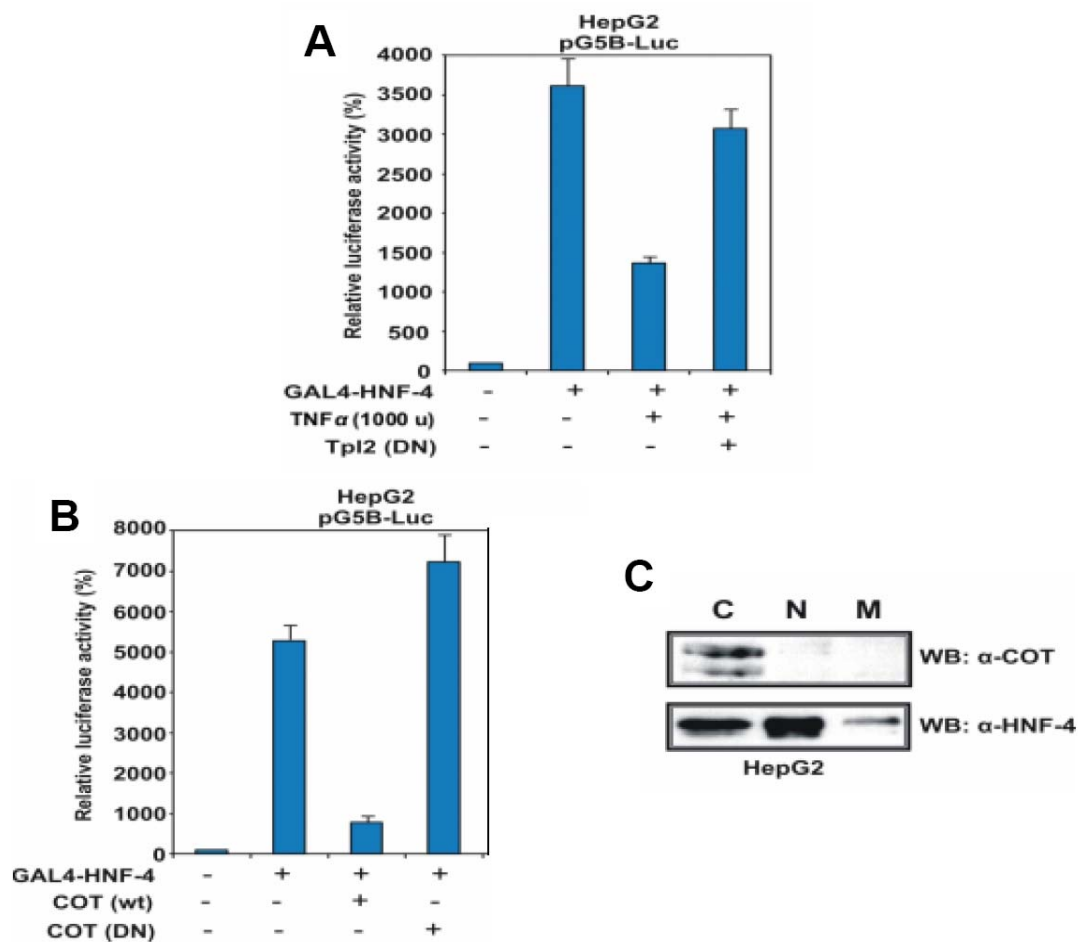
(A) Κύτταρα HEK293T συν-επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς (NF-κB)₃-Luc (2 μg) και τον φορέα έκφρασης του Trp12 (wt) (2 μg) παρουσία και απουσία του φορέα έκφρασης του IκB-ND (2 μg). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του συνθετικού υποκινητή (NF-κB)₃. (B) Κύτταρα HEK293T συν-επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς apoCIII (-890/+24)-Luc (2 μg) και τον φορέα έκφρασης του HNF-4α (2 μg), απουσία και παρουσία τον φορέα έκφρασης του Trp12 (wt) (2 μg) και του φορέα έκφρασης του IκB-ND (2 μg). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του υποκινητή της apoCIII. (C) Κύτταρα HEK293T συν-επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG5B-Luc (2 μg) και τον φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης GAL4-HNF-4α (100 ng) απουσία ή παρουσία τον φορέα έκφρασης του Trp12 (wt) (2 μg) ή του φορέα έκφρασης του IκB-ND (2 μg) ή του χημικού αναστολέα της MEK, UO126 (10 μM) για 24 ώρες. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του συνθετικού υποκινητή G5B.

3. Η κινάση Trp12/COT μεσολαβεί για την καταστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του HNF-4α επηρεάζοντας την ενεργότητα AF-1 και την DBD περιοχή του πυρηνικού υποδοχέα

Έχοντας ήδη διαπιστώσει ότι η κινάση Trp12 μεσολαβεί για τη μεταγραφική καταστολή του υποκινητή του γονιδίου της apoCIII από τον TNFα, θελήσαμε να ελέγξουμε αν συμβαίνει το ίδιο και κατά τη καταστολή του HNF-4α από τον TNFα.

Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα μεταγραφικής ενεργότητας, στα οποία HepG2 κύτταρα επιμολύνθηκαν παροδικά με την υβριδική πρωτεΐνη GAL4-HNF-4 α . Η συν-επιμόλυνση των κυττάρων με τον φορέα έκφρασης του Trp12-DN, παρουσία του TNF α , είχε ως αποτέλεσμα την επαναφορά, του μεγαλύτερου μέρους, της μεταγραφικής ενεργότητας του GAL4-HNF-4 α (**Εικ. 53A**).

Με αντίστοιχα πειράματα δείξαμε ότι και η κινάση COT, που είναι η ομόλογη πρωτεΐνη της Trp12 στον άνθρωπο, έχει την ικανότητα να καταστέλλει ισχυρά τη μεταγραφική ενεργότητα του GAL4-HNF-4 α , ενώ παράλληλα η μεταλλαγμένη, αρνητικώς επικρατούσα μορφή της, COT-DN, αυξάνει τη μεταγραφική του ενεργότητα, στα HepG2 κύτταρα, πέρα από τα βασικά του επίπεδα (**Εικ. 53B**). Επειδή η έντονη κατασταλτική επίδραση της κινάσης Trp12/COT, τόσο στον υποκινητή της apoCIII, όσο και στον HNF-4 α , δεν μπόρεσε να αιτιολογηθεί βάσει της ενεργοποίησης των μονοπατιών της ERK ή του NF- κ B, θελήσαμε να ελέγξουμε την πιθανότητα του υποκυτταρικού συνεντοπισμού, της COT και του HNF-4 α , που θα μπορούσε να αποτελέσει την ένδειξη μίας φυσικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο πρωτεϊνών. Στην **εικόνα 53 (C)** φαίνεται ότι στα εκχυλίσματα HepG2 κυττάρων, η COT εντοπίζεται αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα (C, cytoplasm), ενώ ο HNF-4 α κατά κύριο λόγο στον πυρήνα (N, nucleolus). Οι ποσότητες του HNF-4 α που ανιχνεύονται στο κυτταρόπλασμα και στις μεμβράνες (M, membranes), οφείλονται πιθανότατα στην ανάμειξη των δύο αυτών κλασμάτων με πυρηνικά εκχυλίσματα.

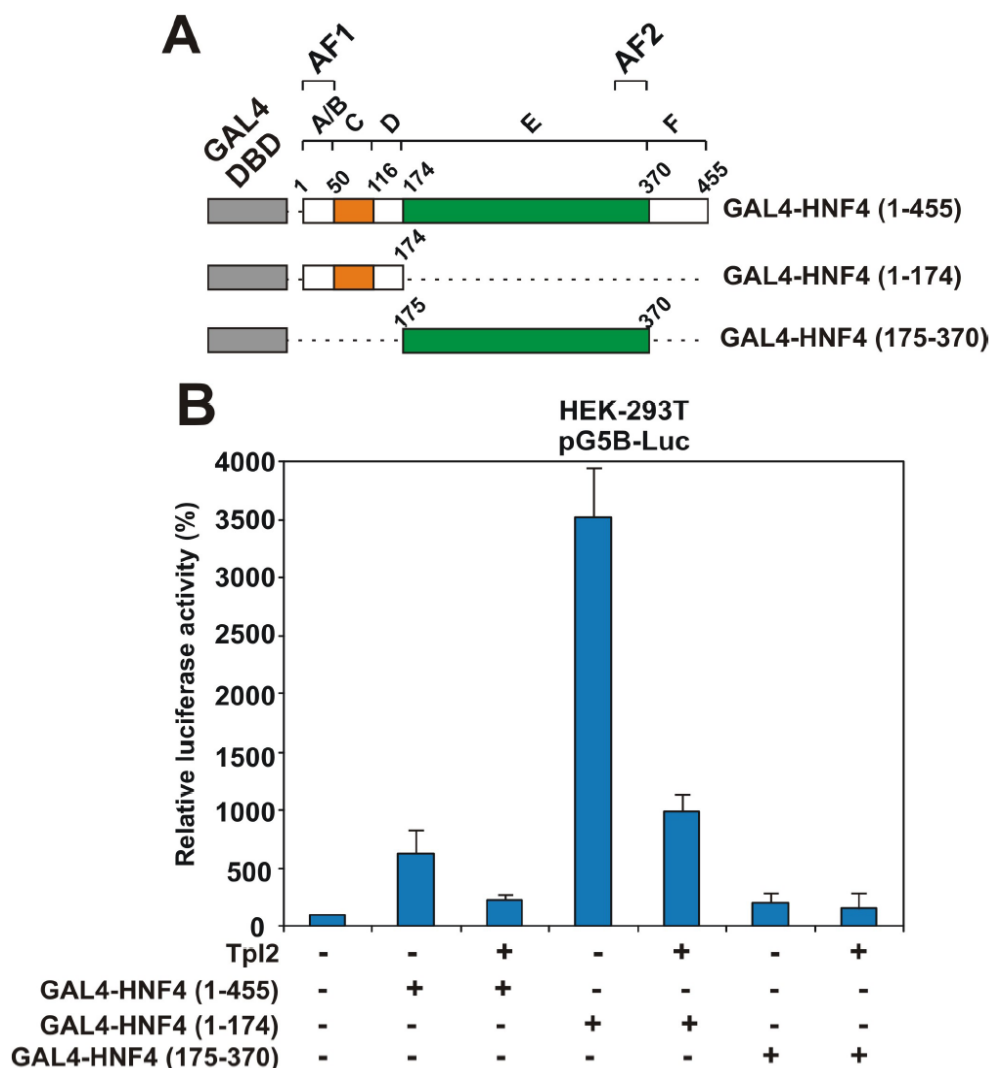


Εικόνα 53: Η κινάση Trp12/COT εμπλέκεται στην μεταγραφική καταστολή του HNF-4 α από τον TNF α .

(A) Κύτταρα HepG2 συν-επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG5B-Luc (2 μ g) και τον φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης GAL4-HNF-4 α (100 ng) παρουσία ή απουσία TNF α (1000 units) για 24 και του φορέα έκφρασης της Trp12 (DN) (2 μ g). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του συνθετικού υποκινητή G5B. (B) Κύτταρα HepG2 συν-επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG5B-Luc (2 μ g) και τον φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης GAL4-HNF-4 α (100 ng) παρουσία ή απουσία των φορέων έκφρασης COT (wt) ή COT (DN) (2 μ g για κάθε φορέα). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του συνθετικού υποκινητή G5B. (C) Κλασματοποιημένα εκχυλίσματα κυττάρων HepG2, αναλύθηκαν με SDS/PAGE και ανοσοαποτύπωση. Η ανίχνευση των ενδογενών πρωτεϊνών COT και HNF-4 α , πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των α -COT και α -HNF-4 α πολυκλωνικών αντισωμάτων και των αντίστοιχων δευτερευόντων HRP-συνδεδεμένων αντισωμάτων.

Τέλος, για να εντοπίσουμε τις περιοχές εκείνες του HNF-4 α που εμπλέκονται στη καταστολή μέσω της Trp12/COT, χρησιμοποιήσαμε τις δύο ελλειμματικές μορφές του, GAL4-HNF-4 α (1-174), η οποία φέρει την ενεργότητα AF-1 και τη περιοχή πρόσδεσης του υποδοχέα στο DNA (DBD) και GAL4-HNF-4 α (175-370), που φέρει την ενεργότητα AF-2, την LBD περιοχή καθώς και τη περιοχή διμερισμού του υποδοχέα (Εικ. 54A). Με πειράματα μεταγραφικής ενεργότητας σε κύτταρα HEK293T, παρατηρήσαμε ότι η Trp12 καταστέλλει ισχυρά τον GAL4-HNF-4 α (1-

174), όπου και εντοπίζεται η AF-1 και η DBD περιοχή (Εικ. 54B), ενώ δεν φαίνεται να έχει κατασταλτική δράση στον GAL4-HNF-4α (175-370).



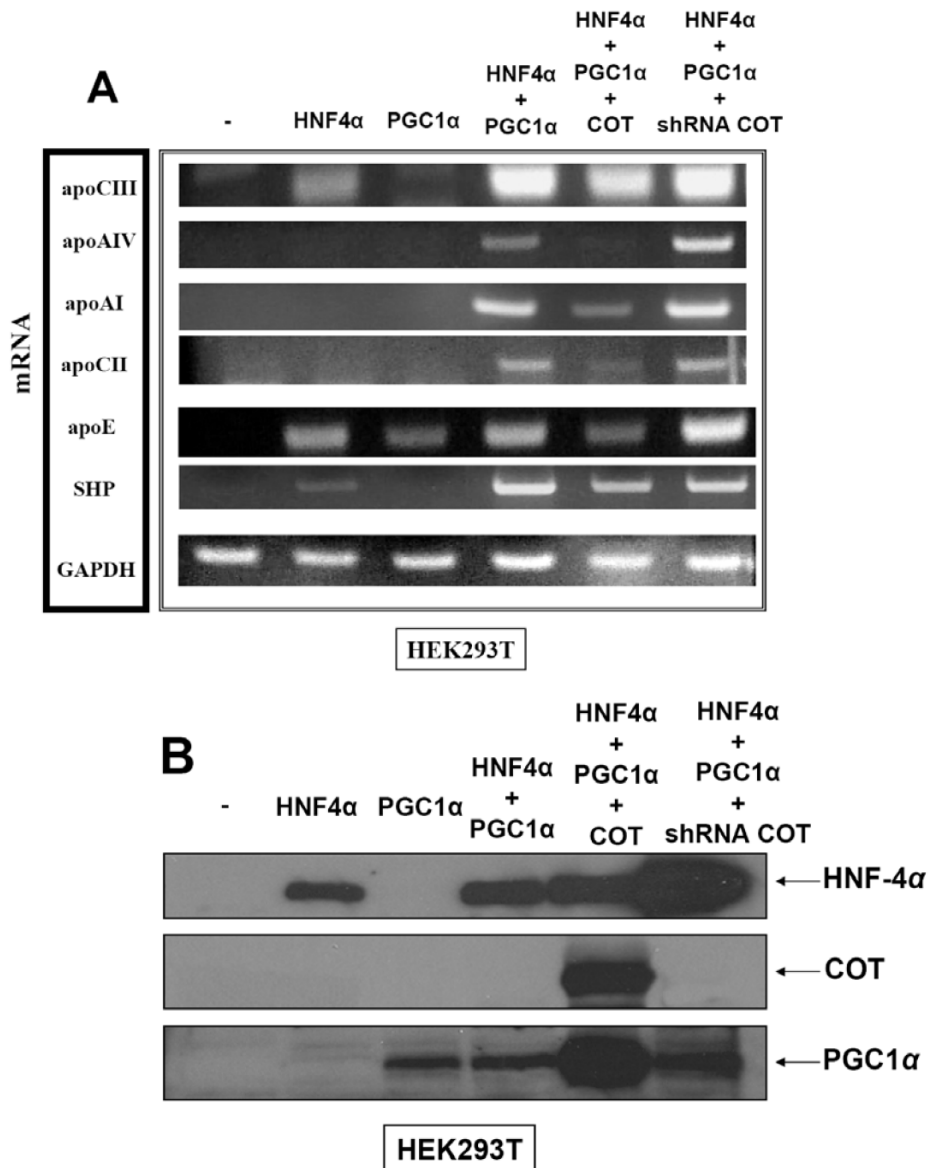
Εικόνα 54: Η κινάση Trp12 στοχεύει το N-τελικό άκρο του HNF-4α όπου εντοπίζεται η περιοχή AF-1 και το DBD.

(A) Σχηματική αναπαράσταση της υβριδικής πρωτεΐνης GAL4-HNF-4α και των δύο ελλειμματικών της μορφών που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα την εικόνας (B). (B) Κύτταρα HepG2 συνεπιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG5B-Luc (2 μg) και τους φορείς έκφρασης των πρωτεϊνών GAL4-HNF-4α (1-455) (100 ng), GAL4-HNF-4α (1-174) (100 ng) και GAL4-HNF-4α (175-370) (100 ng) απουσία ή παρουσία του φορέα έκφρασης της Trp12 (DN) (2 μg). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του συνθετικού υποκινητή G5B.

4. Ο ρόλος της κινάσης COT στη μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών

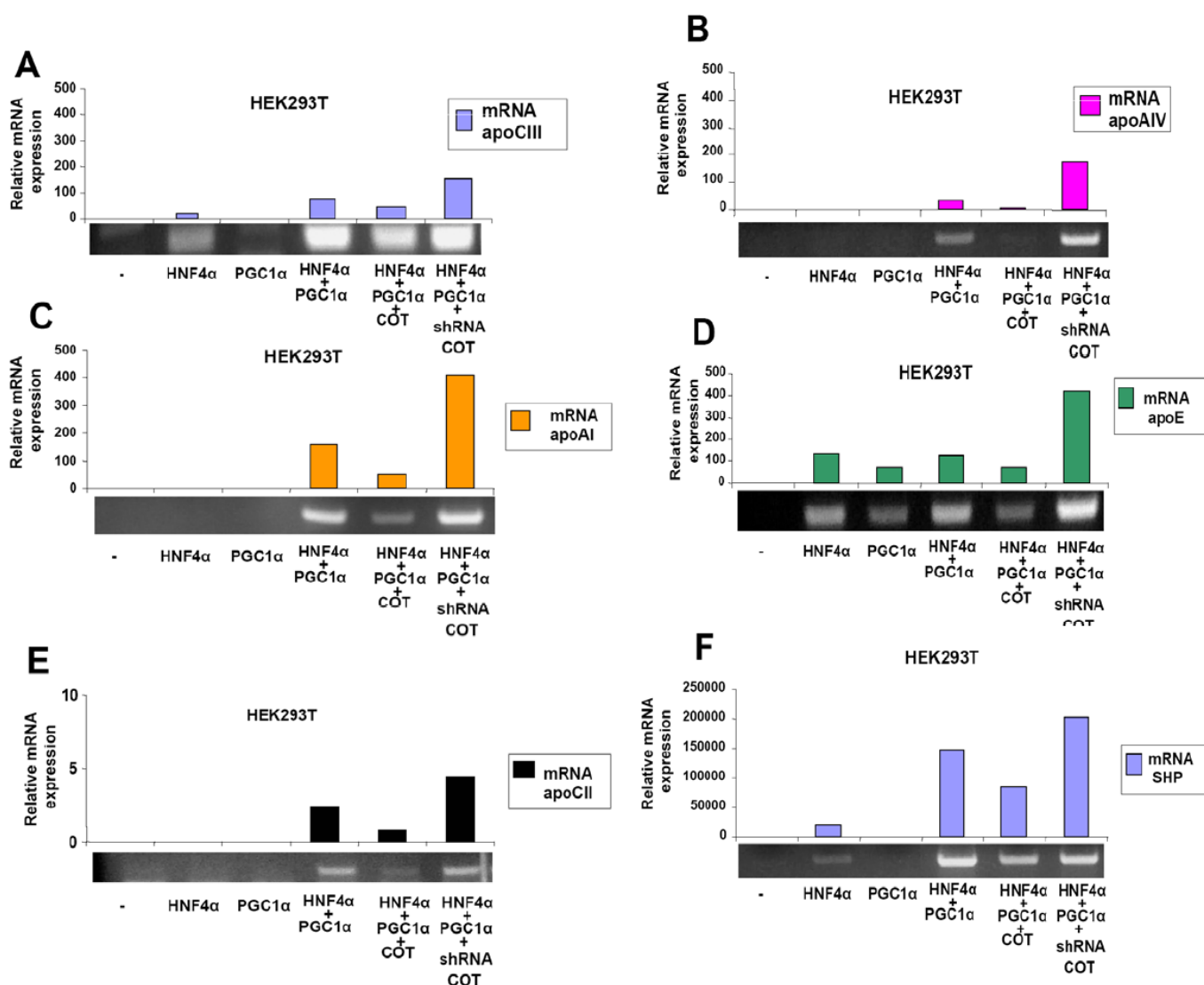
Παρακολουθώντας, από τα δεδομένα μας, το πόσο ισχυρή ήταν η κατασταλτική επίδραση της κινάσης COT τόσο στη μεταγραφική ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου της apoCIII, όσο και στην μεταγραφική ικανότητα του ρυθμιστή της, HNF-4α, θελήσαμε να δούμε ποια θα ήταν η επίδρασή της και στη

μεταγραφική ρύθμιση άλλων γονιδίων απολιποπρωτεϊνών. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήσαμε πειράματα παροδικών επιμολύνσεων HEK293T κυττάρων με τον πυρηνικό υποδοχέα HNF-4 α , απουσία και παρουσία του βασικού συν-ενεργοποιητή του PGC1 α . Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την εκτοπική έκφραση διαφόρων γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών, όπως της apoCIII, apoAIV, apoAI, apoCII και apoE την οποία και παρακολουθήσαμε με την ανίχνευση του mRNA τους (**Εικ. 55A & 56**). Το δεδομένο που προέκυψε ήταν ότι η υπερέκφραση της κινάσης COT είχε, σε κάθε περίπτωση, κατασταλτική επίδραση στην επαγόμενη μέσω HNF-4 α /PGC1 α , μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών (**Εικ. 55A**). Ακόμα και στη περίπτωση της επαγόμενης μέσω HNF-4 α /PGC1 α μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου του SHP, η κινάση COT φαίνεται να δρα κατασταλτικά. Από την άλλη μεριά, η αποσιώπηση του ενδογενούς γονιδίου της COT, με τη χρήση του shRNA-COT, είχε ως αποτέλεσμα την περαιτέρω ενεργοποίηση τόσο των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών, όσο και του SHP. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι ο SHP δεν μπορεί να ευθύνεται για την επαγόμενη, μέσω COT, καταστολή. Στην **εικόνα 55(B)** παρουσιάζονται οι ποσότητες των υπερεκφρασμένων πρωτεϊνών HNF-4 α , PGC1 α και COT από τη παροδική επιμόλυνση των HEK293T κυττάρων. Από τα δεδομένα της εικόνας μπορούμε να αποκλείσουμε και τη περίπτωση της μειωμένης έκφρασης του συν-ενεργοποιητή PGC1 α , που θα οδηγούσε σε μεταγραφική καταστολή των γονιδίων-στόχων, αφού στο δείγμα όπου έχει υπερεκφραστεί η COT, η έκφραση του PGC1 α είναι παρά πολύ καλή.



Εικόνα 55: Η κινάση COT καταστέλλει τη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων στόχων του HNF-4α.

(A) Κύτταρα HEK293T επιμολύνθηκαν παροδικά με του φορείς έκφρασης του HNF-4α (2 μg) και του PGC1α-HA (2 μg) απουσία και παρουσία των φορέων έκφρασης της κινάσης COT (wt) (1 μg) ή του φορέα μεταγραφής του shRNA-COT (4 μg). Μετά από 48 ώρες, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και ακολούθησε απομόνωση συνολικού RNA με τη μέθοδο Trizol[®]. Η έκφραση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών apoCIII, apoAIV, apoAI, apoCII και apoE αλλά και του SHP αναλύθηκαν με RT-PCR. Τα επίπεδα έκφρασης του συστατικά εκφραζόμενου γονιδίου GAPDH χρησιμοποιήθηκαν για την κανονικοποίηση της συγκέντρωσης του RNA στα διάφορα δείγματα. (B) Τα κύτταρα HEK293T της πειραματικής διαδικασίας που εμφανίζεται στην εικόνα (A) χρησιμοποιήθηκαν για απομόνωση συνολικής πρωτεΐνης βάση του πρωτοκόλλου του Trizol[®]. Η ανίχνευση των εξωγενώς εκφραζόμενων πρωτεϊνών έγινε με ανάλυση κατά Western. Ο HNF-4α ανιχνεύτηκε με ένα α-HNF-4α πολυκλωνικό αντίσωμα, ο PGC1α-HA με τη χρήση του α-HA μονοκλωνικού αντισώματος ποντικού, ενώ η COT με τη χρήση του α-COT πολυκλωνικού αντισώματος και των αντίστοιχων δευτερευόντων HRP-συνδεδεμένων αντισωμάτων.



Εικόνα 56: Ποσοτικοποίηση της καταστολής που προκαλεί η κινάση COT στη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων στόχων του HNF-4α.

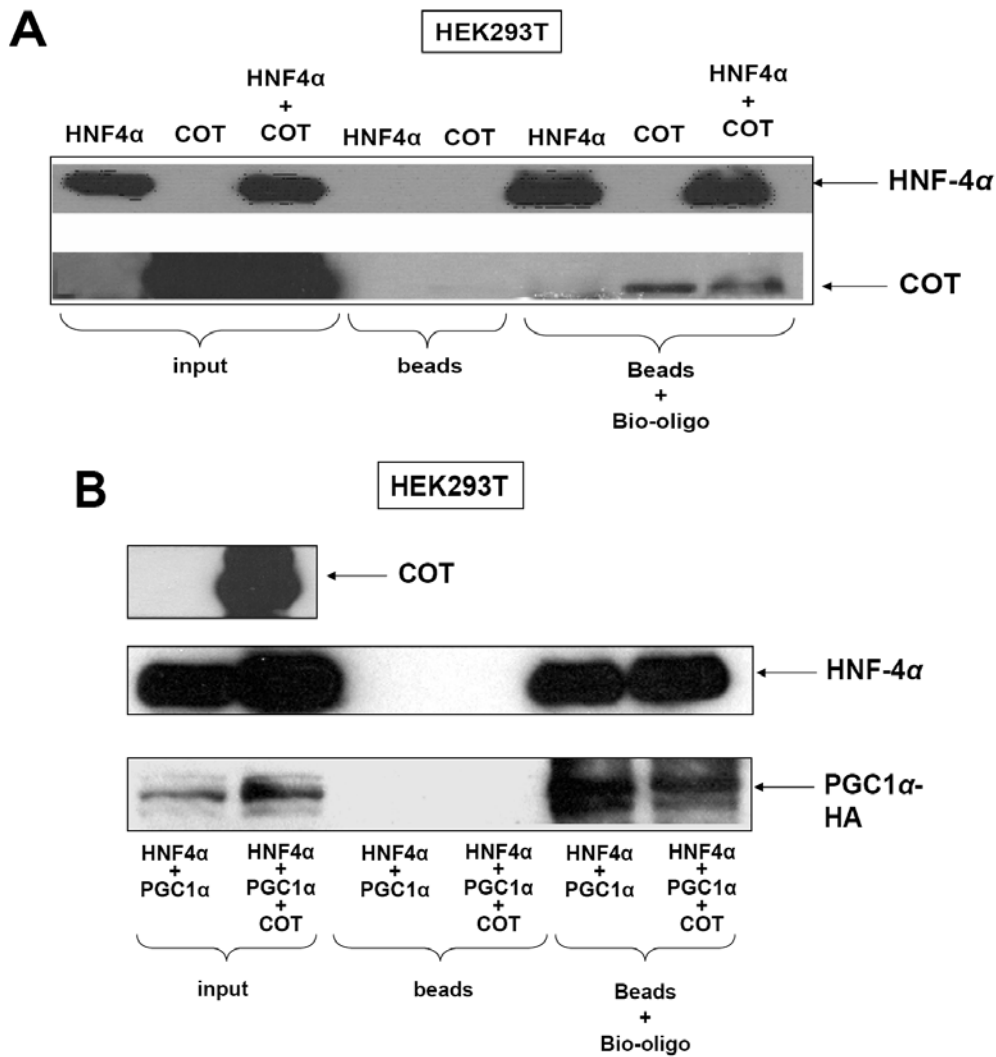
(A-F) Στα ιστογράμματα παρουσιάζεται η σχετική έκφραση των mRNA των γονιδίων apoCIII (A), apoAIV (B), apoAI (C), apoE (D) και apoCII (E) αλλά και του SHP (F) τα οποία ποσοτικοποιήθηκαν με την ηλεκτροφόρησή τους σε πηκτή αгарόζης και τη χρήση του προγράμματος Tina 2.07d

5. Η κινάση COT δεν επηρεάζει την ικανότητα πρόσδεσης του HNF-4α στο DNA, αλλά την ικανότητα αλληλεπίδρασής του με τον συν-ενεργοποιητή PGC1α

Στη προσπάθειά μας να ανακαλύψουμε τον μηχανισμό της έντονης κατασταλτικής επίδρασης της κινάσης COT στη μεταγραφική ενεργότητα του HNF-4α, ελέγξαμε αρχικά αν η υπερέκφρασή της αλλοιώνει την ικανότητα του HNF-4α να προσδένεται στο DNA. Αυτό έγινε γιατί είχαμε μία αρχική ένδειξη ότι η COT επιδρά κατασταλτικά στη περιοχή της υβριδική πρωτεΐνης GAL4-HNF-4α (1-174), η οποία φέρει την ενεργότητα AF-1 και τη περιοχή πρόσδεσης του υποδοχέα στο DNA (DBD) (Εικ. 54B). Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα παροδικής

επιμόλυνσης HEK293T κυττάρων με τους φορείς έκφρασης του HNF-4 α , της COT αλλά και συν-επιμόλυνσης των δύο φορέων. Στη συνέχεια, τα κυτταρικά αυτά εκχυλίσματα, χρησιμοποιήθηκαν για πειράματα κατακρήμνιση πρωτεΐνης, μέσω αλληλεπίδρασής της με DNA (DNAP, DNA affinity precipitation), χρησιμοποιώντας ένα βιοτινυλιωμένο δίκλωνο ολιγονουκλεοτίδιο, που αντιστοιχεί στη περιοχή -92/-67 του υποκινητή του γονιδίου της apoCIII και περιλαμβάνει το κοντινό HRE πάνω στο οποίο έχει την ικανότητα να προσδένεται ο HNF-4 α *in vivo* και *in vitro*. Αυτό που παρατηρήσαμε ήταν ότι η ικανότητα πρόσδεσης του HNF-4 α πάνω στο DNA, δεν επηρεάστηκε καθόλου από τη παρουσία της υπερ-εκφρασμένης κινάσης COT (**Εικ. 57A**).

Βασικό στοιχείο της μεταγραφικής ενεργότητας του HNF-4 α είναι η αλληλεπίδρασή του με τους συν-ενεργοποιητές του και ιδίως η αλληλεπίδρασή του με τον PGC1 α . Αυτό γίνεται αντιληπτό και από το γεγονός ότι στις περισσότερες περιπτώσεις εκτοπικής έκφρασης των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών, στη κυτταρική σειρά HEK293T, η παρουσία μόνο του HNF-4 α δεν ήταν αρκετή για την ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων του (**Εικ. 55A & 56**). Γι' αυτόν ακριβώς τον λόγο θελήσαμε να ερευνήσουμε την περίπτωση η κινάση COT να επιδρά αρνητικά στην ικανότητα του HNF-4 α για αλληλεπίδραση με τον PGC1 α πάνω στο DNA. Και σε αυτή τη περίπτωση, πραγματοποιήσαμε αντίστοιχα πειράματα DNAP, με κυτταρικά εκχυλίσματα HEK293T κυττάρων, στα οποία είχαν υπερ-εκφραστεί ο HNF-4 α και ο PGC1 α , απουσία και παρουσία της COT. Στη περίπτωση συν-έκφρασης και των τριών πρωτεϊνών, παρατηρήσαμε σαφή μείωση της ποσότητας του PGC1 α που κατακρημνίζεται μαζί με τον προσδεμένο στο DNA, HNF-4 α (**Εικ. 57B**).



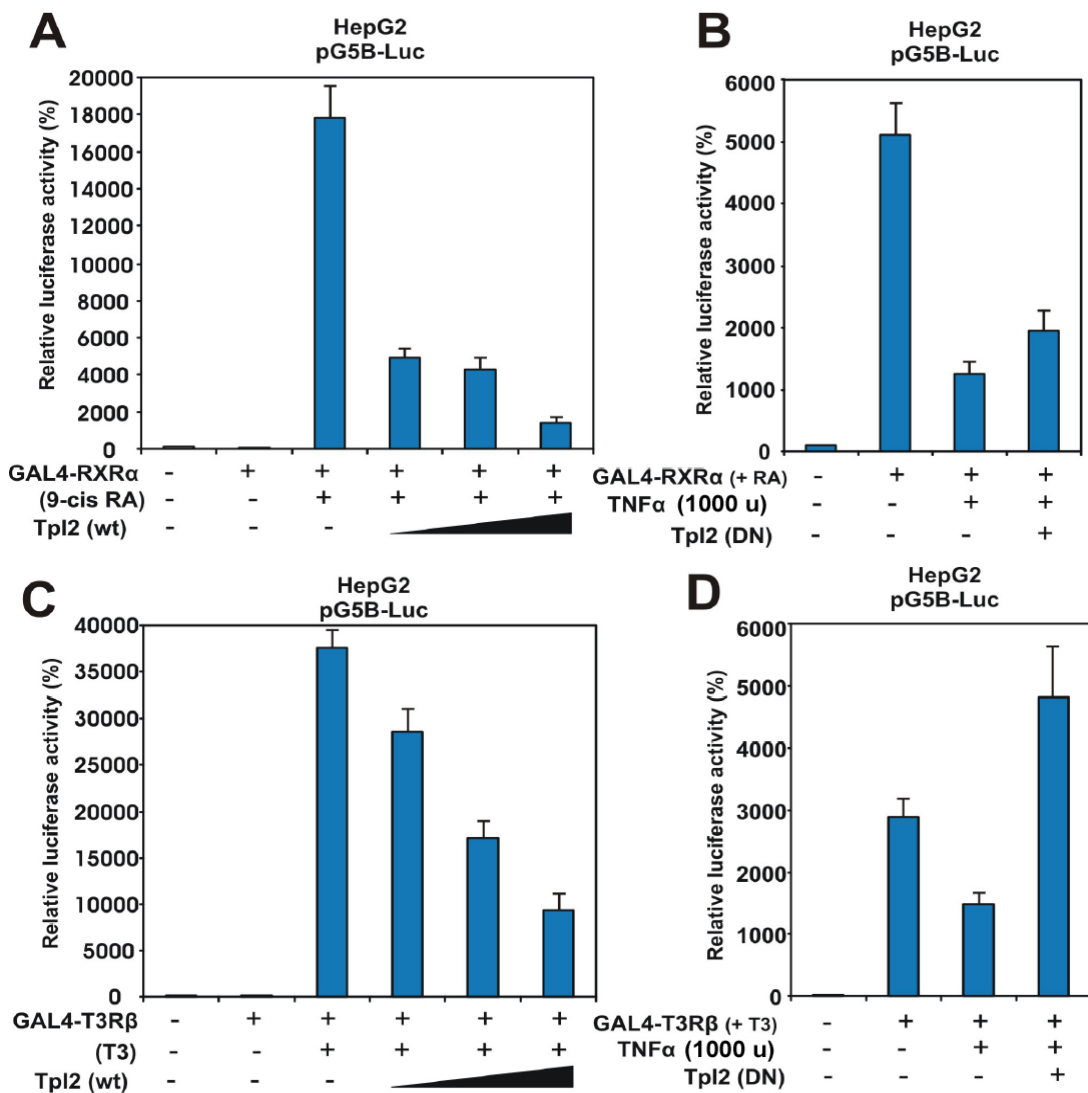
Εικόνα 57: Η κινάση COT δεν επηρεάζει την ικανότητα πρόσδεσης του HNF-4α στο DNA, αλλά την ικανότητα αλληλεπίδρασής του με τον συν-ενεργοποιητή του PGC1α.

(A) Με τη χρήση κυτταρικών εκχυλισμάτων κυττάρων HEK293T, τα οποία είχαν επιμολυνθεί παροδικά με τους φορείς έκφρασης του HNF-4α (2 μg) και της κινάσης COT (wt) (1 μg), αλλά και συν-επιμολυνθεί με τους δύο φορείς έκφρασης, πραγματοποιήθηκε πείραμα κατακρήμνισης πρωτεΐνης, μέσω αλληλεπίδρασής της με DNA (DNAP, DNA affinity precipitation). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα επωάσθησαν είτε μόνο με τα μαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης (Dynabeads) (αρνητικό control), είτε με το βιοτινυλιωμένο ολιγονουκλεοτίδιο που αντιστοιχεί στη περιοχή -92/-67 του υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου της apoCIII. Η πρόσδεση του HNF-4α στα ολιγονουκλεοτίδια ανιχνεύτηκε με SDS/PAGE και ανοσοαποτύπωση με τη χρήση α-HNF-4α πολυκλωνικού αντισώματος και του δευτερεύοντος HRP-συνδεδεμένου αντισώματος. Στο ίδιο blot ανιχνεύτηκε μετά από stripping η υπερ-έκφραση της COT με τη χρήση του α-COT πολυκλωνικού αντισώματος και του δευτερεύοντος HRP-συνδεδεμένου αντισώματος. (B) Με τη χρήση κυτταρικών εκχυλισμάτων κυττάρων HEK293T, τα οποία είχαν συν-επιμολυνθεί παροδικά με τους φορείς έκφρασης του HNF-4α (2 μg) και του PGC1α-HA (2 μg), απουσία και παρουσία της κινάσης COT (wt) (1 μg), πραγματοποιήθηκε πείραμα κατακρήμνισης πρωτεΐνης, μέσω αλληλεπίδρασής της με DNA (DNAP, DNA affinity precipitation). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα επωάσθησαν είτε μόνο με τα μαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης (Dynabeads) (αρνητικό control), είτε με το βιοτινυλιωμένα ολιγονουκλεοτίδιο που αντιστοιχεί στη περιοχή -92/-67 του υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου της apoCIII. Η πρόσδεση του HNF-4α στα ολιγονουκλεοτίδια ανιχνεύτηκε με SDS/PAGE και ανοσοαποτύπωση με τη χρήση α-HNF-4α πολυκλωνικού αντισώματος και του δευτερεύοντος HRP-συνδεδεμένου αντισώματος. Στο ίδιο blot ανιχνεύτηκε, μετά από stripping, ο υπερ-εκφρασμένος και συγκατακρημνισμένος με τον HNF-4α, PGC1α-HA με τη χρήση του α-HA μονοκλωνικού αντισώματος ποντικού και αντιστοίχως ανιχνεύτηκε η υπερ-έκφραση της COT με τη χρήση του α-COT πολυκλωνικού αντισώματος και των δευτερεύοντων HRP-συνδεδεμένων αντισωμάτων.

6. Η επίδραση της κινάσης Trp2/COT στη μεταγραφική ενεργότητα των πυρηνικών υποδοχέων RXR α και TR β

Τέλος, θελήσαμε να μελετήσουμε την επίδραση της Trp2/COT σε δύο ακόμα πυρηνικούς υποδοχείς, που παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών, τον RXR α και τον TR β . Χρησιμοποιώντας το σύστημα του GAL4, ελέγξαμε την επίδραση της κινάση Trp2 στις υβριδικές πρωτεΐνες GAL4-RXR α και GAL4-TR β . Με πειράματα μεταγραφικής ενεργοποίησης σε HepG2 κύτταρα, παρατηρήσαμε ότι αυξανόμενες συγκεντρώσεις της Trp2, οδηγούσαν σε σταδιακή μεταγραφική καταστολή τόσο τον GAL4-RXR α (**Εικ. 58A**), όσο και τον GAL4-TR β (**Εικ. 58C**), παρουσία των συνδετών τους 9-cis RA και T₃ αντίστοιχα. Με παρόμοια πειράματα, παρατηρήσαμε επίσης ότι ο TNF α μπορούσε να καταστείλει, εκτός του HNF-4 α , και της μεταγραφικές ενεργότητες των πυρηνικών υποδοχέων RXR α και TR β (**Εικ. 58B & 58D**).

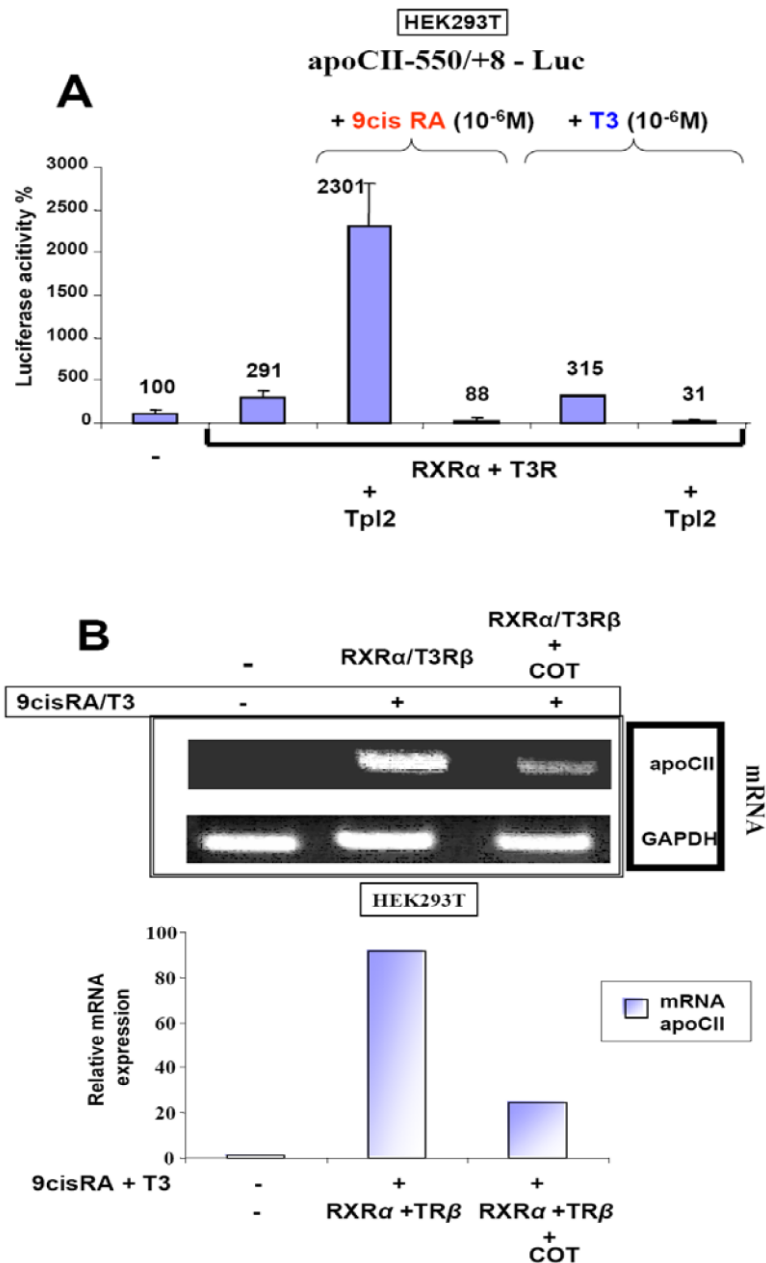
Και στην περίπτωση όμως επαγωγής της μεταγραφικής ενεργοποίησης φυσικών υποκινητών, μέσω των ομο- ή ετερο-διμερών των RXR α και TR β , η υπερέκφραση της Trp2 μπορεί να προκαλέσει τη μεταγραφική καταστολή τους. Στην **εικόνα 59 (A)** βλέπουμε ένα τέτοιο παράδειγμα. Η εξωγενής συν-έκφραση των RXR α και TR β , σε HEK293T κύτταρα, είχε ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου της apoCII, ο οποίος είχε επίσης επιμολυνθεί στα κύτταρα, παρουσία του συνδέτη του RXR α , 9-cis RA. Αυτό πιθανότατα σημαίνει ότι ο υποκινητής της apoCII ενεργοποιείται, τουλάχιστον στη κυτταρική σειρά HEK293T, μόνο από τα ομοδιμερή RXR α /RXR α . Σε κάθε όμως περίπτωση, είτε στα επαγόμενα είτε στα βασικά επίπεδα μεταγραφικής ενεργοποίησης, η υπερέκφραση της Trp2 είχε ως αποτέλεσμα τη καταστολή του γονιδίου της apoCII, μέσω των RXR α και TR β . Αντίστοιχη ήταν και η καταστολή από την κινάση COT, στην εκτοπική έκφραση του γονιδίου της apoCII στα κύτταρα HEK293T, μέσω υπερέκφρασης των RXR α και TR β παρουσία των συνδετών τους (**Εικ. 59B**).



Εικόνα 58: Ο Trp12 μεσολαβεί για την καταστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του T3Rβ και του RXRα από τον TNFα.

(A) Κύτταρα HepG2 συν-επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG5B-Luc (2 µg) και τον φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης GAL4-RXRα (2 µg) και επωάστηκαν με τον συνδέτη 9-cis RA (10^{-6} M) για 24 ώρες, απουσία ή παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων του φορέα έκφρασης της Trp12 (wt) (0.5, 1 και 2 µg). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του συνθετικού υποκινητή G5B.

(B) Κύτταρα HepG2 συν-επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG5B-Luc (2 µg) και τον φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης GAL4-RXRα (2 µg) και επωάστηκαν με τον συνδέτη 9-cis RA (10^{-6} M) για 24 ώρες, απουσία ή παρουσία TNFα (1000 units) και του φορέα έκφρασης της Trp12 (DN) (2 µg). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του συνθετικού υποκινητή G5B. (C) Κύτταρα HepG2 συν-επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG5B-Luc (2 µg) και τον φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης GAL4-T3Rβ (2 µg) και επωάστηκαν με τον συνδέτη T₃ (10^{-6} M) για 24 ώρες, απουσία ή παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων του φορέα έκφρασης της Trp12 (wt) (0.5, 1 και 2 µg). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του συνθετικού υποκινητή G5B. (D) Κύτταρα HepG2 συν-επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG5B-Luc (2 µg) και τον φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης GAL4-T3Rβ (2 µg) και επωάστηκαν με τον συνδέτη T₃ (10^{-6} M) για 24 ώρες, απουσία ή παρουσία TNFα (1000 units) και του φορέα έκφρασης της Trp12 (DN) (2 µg). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του συνθετικού υποκινητή G5B.



Εικόνα 59: Η Trp2/COT καταστέλλει τη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της apoCII από το ρετινοϊκό οξύ, στοχεύοντας τα μεταγραφικά σύμπλοκα RXRα/RXRα και/ή RXRα/TRβ

(A) Κύτταρα HEK293T επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς apoCII (-550/+18)-Luc (2 μg), και τους φορείς έκφρασης των RXRα (2 μg) και T3Rβ (2 μg) απουσία ή παρουσία των συνδεδετών τους 9-cis RA (10⁻⁶M) και T₃ (10⁻⁶M) για 24 ώρες, αλλά και του φορέα έκφρασης της Trp2 (wt) (1 μg). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του υποκινητή της apoCII. (B) Κύτταρα HEK293T επιμολύνθηκαν παροδικά με τους φορείς έκφρασης του RXRα (4 μg) και του T3Rβ (4 μg) απουσία ή παρουσία φορέα έκφρασης της COT (wt) (1 μg). Μετά από 48 ώρες τα κύτταρα συλλέχθηκαν και ακολούθησε απομόνωση συνολικού RNA με τη μέθοδο Trizol[®]. Η έκφραση του γονιδίου της apoCII αναλύθηκε με RT-PCR. Τα επίπεδα έκφρασης του συστατικά εκφραζόμενου γονιδίου GAPDH χρησιμοποιήθηκαν για την κανονικοποίηση της συγκέντρωσης του RNA στα διάφορα δείγματα. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η σχετική έκφραση του mRNA του γονιδίου της apoCII, το οποίο ποσοτικοποιήθηκε με την ηλεκτροφόρησή του σε πηκτική αгарόζης και τη χρήση του προγράμματος Tina 2.07d.

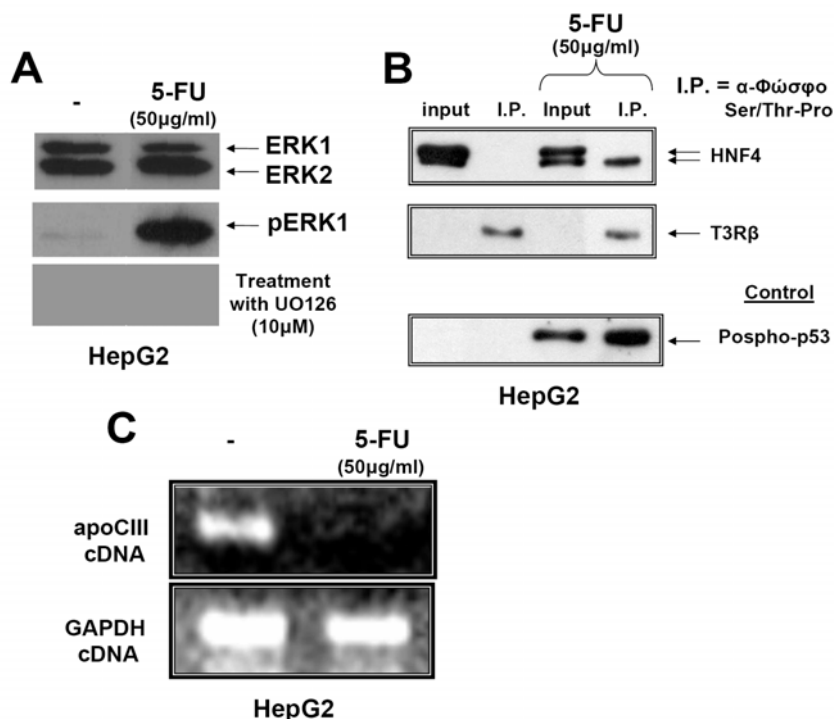
V. Φωσφορυλίωση των πυρηνικών υποδοχέων και ο ρόλος της πεπτιδύλο-πρόλυτο cis/trans ισομεράσης Pin1

1. Η φωσφορυλίωση του HNF-4α από το χημειοθεραπευτικό φάρμακο 5-Fluorouracil οδηγεί σε καταστολή της μεταγραφικής του ικανότητας και ως συνέπεια σε καταστολή της έκφρασης του γονιδίου της apoCIII

Η φωσφορυλίωση των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών είναι μία πάρα πολύ βασική φυσιολογική διαδικασία, που σκοπό έχει τη ρύθμιση της μεταγραφικής τους ενεργότητας, ως απόκριση σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια. Για το λόγο αυτό θελήσαμε να ελέγξουμε την επίδραση της φωσφορυλίωσης στη μεταγραφική ενεργότητα του HNF-4α. Για την επαγωγή της φωσφορυλίωσης του HNF-4α, χρησιμοποιήσαμε το χημειοθεραπευτικό φάρμακο 5-Fluorouracil (5-FU). Η 5-FU (5-φθορο-ουρακίλη), είναι ένα φθοριωμένο παράγωγο ουρακίλης, το οποίο προκαλεί βλάβες στο DNA. Η παρουσία του έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση διαφόρων κινασών που σχετίζονται με το στρες (327). Αρχικά, θελήσαμε να ελέγξουμε ποιες από τις κινάσες του στρες, ενεργοποιούνται στη κυτταρική σειρά HepG2, παρουσία της 5-FU. Από τις κινάσες που ελέγξαμε, μόνο η ERK φάνηκε να φωσφορυλιώνεται και να ενεργοποιείται παρουσία της 5-FU, ενώ η ενεργοποίηση αυτή καταστέλλονταν παρουσία του χημικού αναστολέα της MEK, UO126 (**Εικ. 60A**). Η παρουσία της 5-FU στη κυτταρική σειρά HepG2 είχε επίσης ως αποτέλεσμα και τη φωσφορυλίωση του HNF-4α και μάλιστα σε μοτίβα σερίνη/θρεονίνης ακολουθούμενα από προλίνη (Ser/Thr-Pro) (**Εικ. 60B**). Το δεδομένο αυτό προέκυψε από την συνολική κατακρήμνιση πρωτεϊνών, φωσφορυλιωμένων σε μοτίβα Ser/Thr-Pro, HepG2 κυττάρων, απουσία και παρουσία της 5-FU, με τη χρήση ενός ειδικού α-φωσφο-Ser/Thr-Pro αντισώματος. Η παρουσία της 5-FU, δεν είχε αντίστοιχο αποτέλεσμα μετα-μεταγραφικής τροποποίησης στον TRβ, ο οποίος φαίνεται να είναι συνεχώς φωσφορυλιωμένος σε τέτοια μοτίβα (**Εικ. 60B**). Για λόγους σύγκρισης, ανιχνεύσαμε την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης p53 στη Ser(15)-Pro, η οποία γνωρίζουμε ότι επάγεται παρουσία της 5-FU (311). Ένα ακόμα δεδομένο που προέκυψε από την επώαση των κυττάρων HepG2 με την 5-FU, ήταν ότι τα μπορούσε να καταστείλει πλήρως τη μεταγραφή του γονιδίου της apoCIII (**Εικ. 60C**).

Συγκεντρωτικά, μπορούμε να πούμε, από τα δεδομένα της **εικόνας 60** ότι η φωσφορυλίωση του HNF-4α, από τη δράση της 5-FU, σε μοτίβα Ser/Thr-Pro έχει,

πιθανότητα ως αποτέλεσμα τη καταστολή της μεταγραφικής του ικανότητας και την αποσιώπησης της έκφρασης του γονιδίου της apoCIII.



Εικόνα 60: Η 5-FU στη κυτταρική σειρά ηπατώματος του ανθρώπου HepG2, ενεργοποιεί το μονοπάτι της ERK, φωσφορυλιώνει τον HNF-4α σε μοτίβα Ser/Thr-Pro και καταστέλλει την έκφραση του γονιδίου της apoCIII.

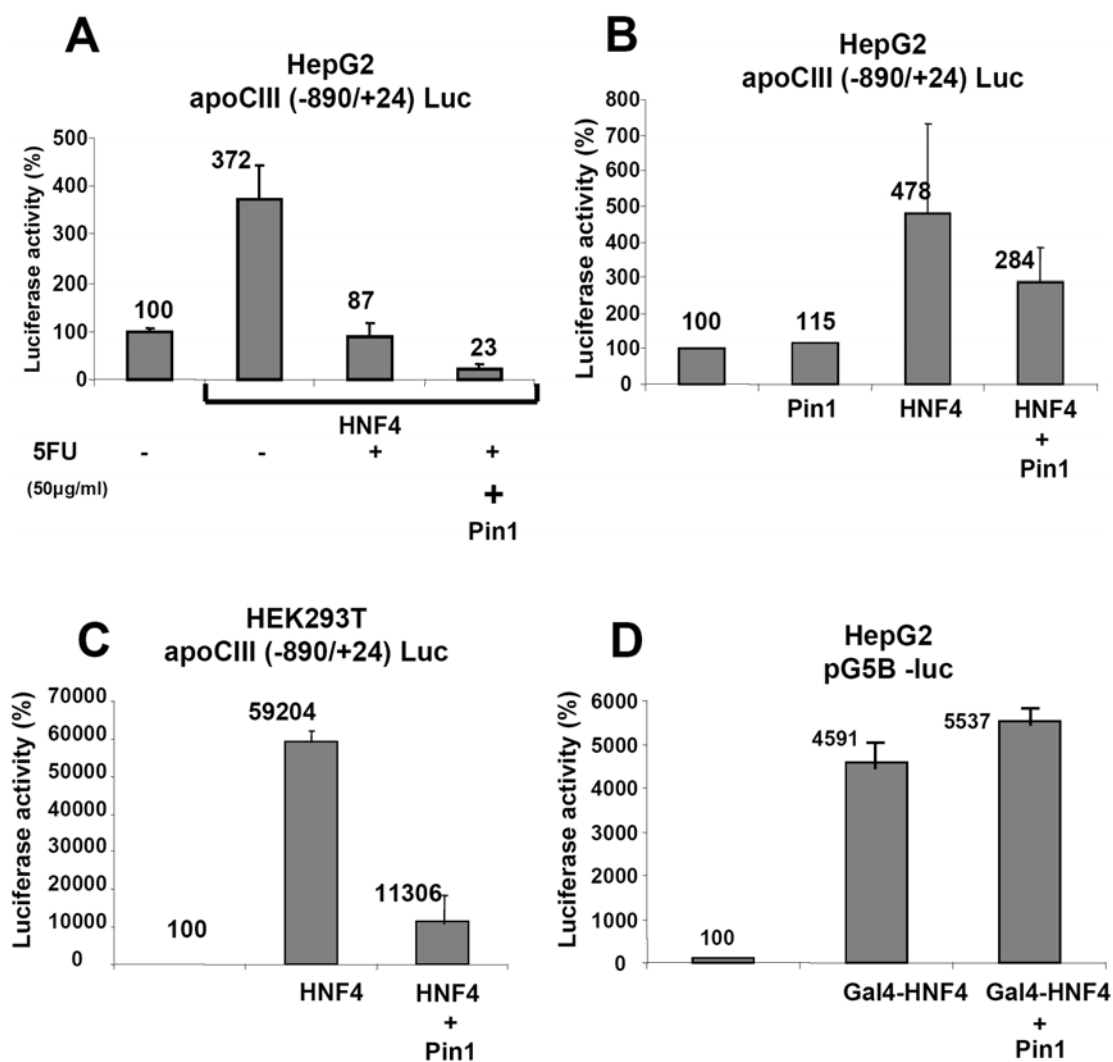
(A) Κύτταρα HepG2 επώασθησαν με 5-FU (50 μg/ml) για 24 ώρες, παρουσία ή απουσία του χημικού αναστολέα της MEK, UO126 (10 μM). Ως δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικά εκχυλίσματα HepG2, τα οποία δεν είχαν υποστεί κάποια επεξεργασία. Η ποσοτικοποίηση των κυτταρικών εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Bradford-Lowry (DC Protein Assay, Bio-Rad) και ίσες ποσότητες συνολικής πρωτεΐνης αναλύθηκαν με SDS/PAGE. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση και ανίχνευση των πρωτεϊνών ERK και φωσφο-ERK με τη χρήση των α-ERK πολυκλωνικού και α-φωσφο-ERK μονοκλωνικού αντισώματος αντίστοιχα και τη χρήση του αντίστοιχου δευτερεύοντος HRP-συνδεδεμένου αντισώματος. (B) Κύτταρα HepG2 επώασθησαν με 5-FU (50 μg/ml) για 24 ώρες. Ως δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικά εκχυλίσματα HepG2, τα οποία δεν είχαν υποστεί κάποια επεξεργασία. Η ποσοτικοποίηση των κυτταρικών εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Bradford-Lowry (DC Protein Assay, Bio-Rad) και ίσες ποσότητες συνολικής πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκαν για κατακρήμνιση με τη χρήση του αντισώματος α-φωσφο-Ser/Thr-Pro (MPM2). Τα δείγματα αναλύθηκαν με SDS/PAGE. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση και ανίχνευση των πρωτεϊνών HNF-4α, TRβ και φώσφο-Ser(15)-p53 με τη χρήση των α-HNF-4α πολυκλωνικού, α-TRβ μονοκλωνικού και α- p53 (p-Ser 15) πολυκλωνικού αντισώματος και τη χρήση των αντίστοιχων δευτερευόντων HRP-συνδεδεμένων αντισωμάτων. (C) Κύτταρα HepG2 επώασθησαν με 5-FU (50 μg/ml) για 24 ώρες. Η έκφραση του γονιδίου της apoCIII αναλύθηκε με RT-PCR. Τα επίπεδα έκφρασης του συστατικά εκφραζόμενου γονιδίου GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) χρησιμοποιήθηκαν για την κανονικοποίηση της συγκέντρωσης του RNA στα διάφορα δείγματα.

2. Η πεπτιδύλο-πρόλυλο *cis/trans* ισομεράση Pin1 καταστέλλει τη μεταγραφική ικανότητα του HNF-4α

Για να διαπιστώσουμε αν, όντως, η καταστολή του γονιδίου της apoCIII από την 5-FU πραγματοποιείται μέσω του HNF-4α και της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης που υπόκειται, πραγματοποιήσαμε πειράματα μεταγραφικής

ενεργοποίησης του υποκινητής της apoCIII σε κύτταρα HepG2. Η επώαση των κυττάρων με 5-FU, είχε ως αποτέλεσμα τη καταστολή της επαγόμενης από HNF-4 α , ενεργοποίησης του υποκινητή της apoCIII (**Εικ. 61A**). Το ότι η καταστολή που παρατηρούμε είναι αποτέλεσμα της μετα- μεταφραστικής τροποποίησης του HNF-4 α , και συγκεκριμένα της φωσφορυλίσης σε μοτίβα Ser/Thr-Pro, που προκαλεί ο 5-FU, έρχεται να επιβεβαιώσει και το γεγονός ότι η υπερ-έκφραση της πεπτιδύλο-πρόλυλο *cis/trans* ισομεράσης Pin1 προκαλεί την ακόμα ισχυρότερη καταστολή της επαγόμενης από HNF-4 α , ενεργοποίησης του υποκινητή της apoCIII (**Εικ. 61A**).

Η ισομεράση Pin1, ισομεριώνει μόνο φωσφορυλιωμένα μοτίβα Ser/Thr-Pro ελέγχοντας, μ' αυτόν τον τρόπο, τον μηχανισμό της φωσφορυλίωσης και την επίδρασή της στις φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες. Θέλοντας να μελετήσουμε την επίδραση της υπερέκφρασης της ισομεράσης Pin1 στα κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος HepG2, πραγματοποιήσαμε πειράματα παροδικών επιμολύνσεων της Pin1 παρουσία του υποκινητή της apoCIII. Η υπρέκφραση της Pin1 δεν επέφερε καμία αλλαγή στα βασικά επίπεδα έκφρασης του υποκινητή της apoCIII, ωστόσο εξακολουθούσε να καταστέλλει την επαγόμενη από HNF-4 α , μεταγραφική του ενεργοποίηση (**Εικ. 61B**). Αυτό ενδεχομένως, να οφείλεται σε φωσφορυλίωση του εξωγενούς HNF-4 α , που υφίσταται από το στρεσάρισμα των κυττάρων κατά τη διαδικασία της επιμόλυνσης. Άλλωστε, παρατηρούμε ότι η καταστολή του Pin1 στη μεταγραφική ενεργότητα του HNF-4 α , σε κύτταρα HepG2, δεν είναι ανάλογη με αυτή που παρατηρήθηκε στο αντίστοιχο πείραμα παρουσία του 5-FU. Η υπερέκφραση της ισομεράσης Pin1, είχε επίσης κατασταλτική επίδραση στην επαγόμενη από HNF-4 α , μεταγραφική ενεργοποίηση του υποκινητή της apoCIII στην κυτταρική σειρά HEK293T (**Εικ. 61C**). Στη προσπάθειά μας όμως να μελετήσουμε την επίδραση της Pin1 στη μεταγραφική ικανότητα του HNF-4 α , χρησιμοποιώντας το σύστημα του GAL4, δεν μπορέσαμε να ανιχνεύσουμε την κατασταλτική δράση που είχαμε εντοπίσει με τις προηγούμενες πειραματικές διαδικασίες (**Εικ. 61D**). Παρόλα αυτά, το αποτέλεσμα αυτό μας οδήγησε στη σκέψη ότι η φωσφορυλίωση του HNF-4 α μέσω 5-FU και η καταστολή του από την Pin1, να σχετίζονται με την ικανότητα του HNF-4 α να προσδένεται στο DNA. Πιθανότατα, λοιπόν, η φωσφορυλίωση του HNF-4 α και η ισομερίωσή του, να εντοπίζονται στη DBD περιοχή του υποδοχέα.

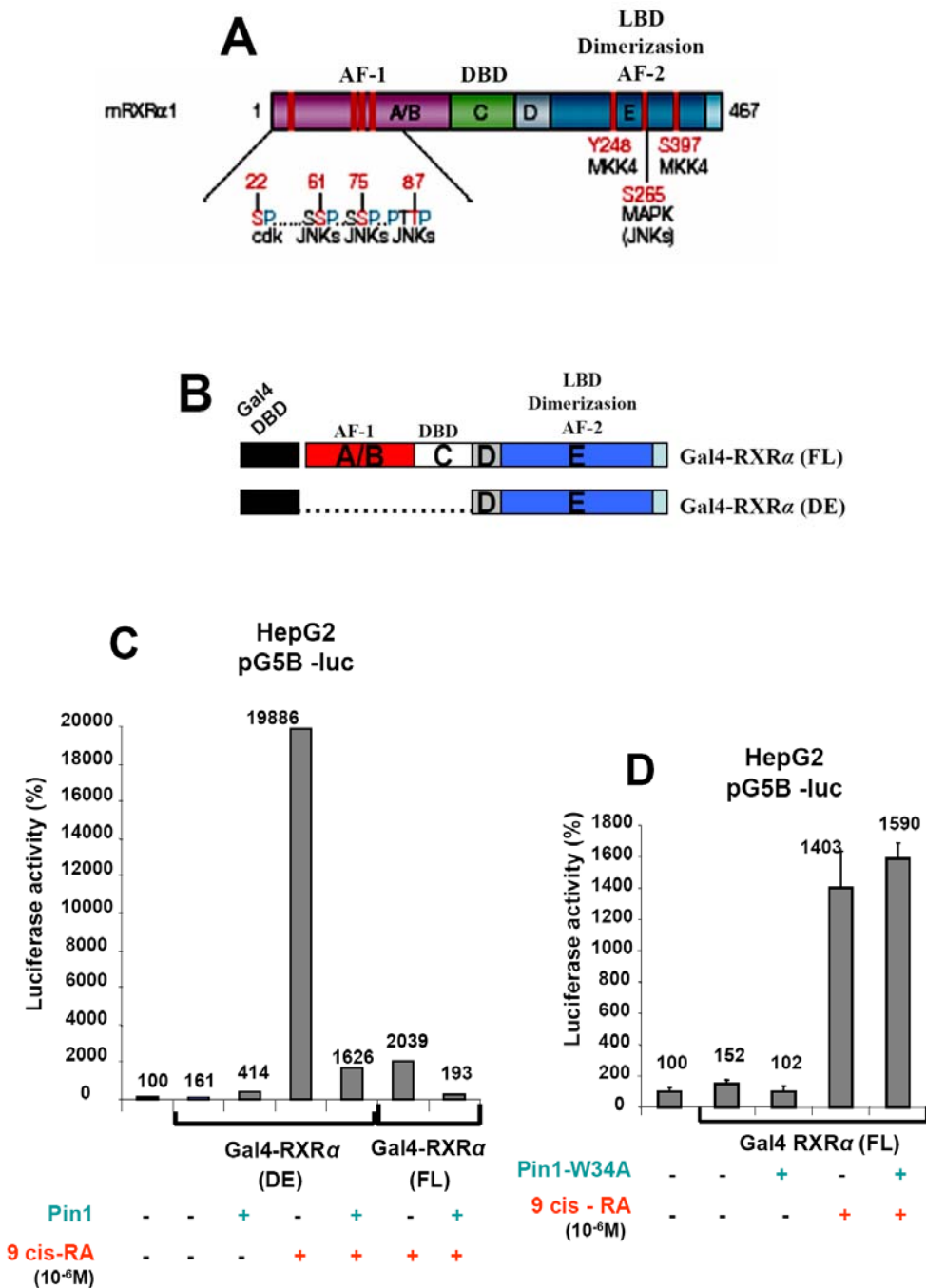


Εικόνα 61: Η Pin1 καταστέλλει τη μεταγραφική ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου της apoCIII από τον HNF-4α.

(A) Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς apoCIII (-890/+24)-Luc (2 µg), παρουσία ή απουσία 5-FU (50µg/ml) για 24 ώρες και των φορέων έκφρασης του HNF-4α (2 µg) και της Pin1 (1 µg). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του υποκινητή της apoCIII. (B) Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς apoCIII (-890/+24)-Luc (2 µg), και τους φορείς έκφρασης του HNF-4α (2 µg) και της Pin1 (1 µg) ή συν-επιμολύνσης των δύο φορέων έκφρασης. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του υποκινητή της apoCIII. (C) Κύτταρα HEK293T συν-επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς apoCIII (-890/+24)-Luc (2 µg) και τον φορέα έκφρασης του HNF-4α (2 µg), απουσία και παρουσία του φορέα έκφρασης της Pin1 (1 µg). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του υποκινητή της apoCIII. (D) Κύτταρα HepG2 συν-επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG5B-Luc (2 µg) και τον φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης GAL4-HNF-4α (100 ng), απουσία και παρουσία του φορέα έκφρασης της Pin1 (1 µg). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του συνθετικού υποκινητή G5B.

3. Η ισομεράση Pin1 καταστέλλει τη μεταγραφική ικανότητα του RXR α

Η φωσφορυλίωση του πυρηνικού υποδοχέα RXR α , αποτελεί σημαντικό μηχανισμό της ρύθμισης της μεταγραφικής του ικανότητας. Από τις ως τώρα μελέτες γνωρίζουμε ότι υπάρχουν πολλά μοτίβα Ser/Thr-Pro που φωσφορυλιώνονται από κινάσες του στρες, ως απόκριση σε διάφορα ερεθίσματα (**Εικ. 62A**), όπως και κατά τη διαδικασία της υπερέκφρασης του RXR α (78). Με τη χρήση του συστήματος GAL4 θελήσαμε να ελέγξουμε την επίδραση της ισομεράσης Pin1 στις φωσφορυλιώσεις των μοτίβων Ser/Thr-Pro σε ολόκληρη την αλληλουχία του υποδοχέα [GAL4-RXR α (FL)], αλλά και σε ένα συγκεκριμένο μοτίβο Ser-Pro που εντοπίζεται στην περιοχή E του πυρηνικού υποδοχέα (Ser265-P) [GAL4-RXR α (DE)] (**Εικ. 62B**). Από τα πειράματα παροδικών επιμολύνσεων HepG2 κυττάρων με τις δύο υβριδικές μορφές του RXR α , είδαμε ότι η επαγόμενη από τον συνδέτη, 9-cis RA, μεταγραφική ενεργοποίηση τόσο του RXR α (FL), όσο και του RXR α (DE), καταστέλλονταν πλήρως παρουσία της ισομεράσης Pin1 (**Εικ. 62C**). Μόνο στη περίπτωση του RXR α (DE) και απουσία του συνδέτη, η Pin1 φαίνεται να αυξάνει τη μεταγραφική ενεργότητα του μορίου. Ενδεχομένως, λοιπόν, η στερεοδιαμόρφωση της περιοχής DE, πριν τη σύνδεση με τον 9-cis RA, να είναι τέτοια που η ισομερίωση της φωσφο-Ser265-P από την Pin1, να αποκαλύπτει μέρος της AF-2 ενεργότητας και να αυξάνει τη μεταγραφική δράση του μορίου. Στη περίπτωση όμως, που ο 9-cis RA είναι ήδη προσδεδεμένος, η ισομερίωση μπορεί να έχει ακριβώς το αντίθετο αποτέλεσμα και έτσι να παρατηρούμε τη δραστική αυτή μείωση, τόσο στη μεταγραφική ικανότητα της περιοχής DE, όσο και ολόκληρου του RXR α . Τέλος, ως αρνητικό control, χρησιμοποιήσαμε και μία μεταλλαγμένη μορφή της Pin1, την Pin1-W34A, η οποία έχει χάσει την ικανότητά της να αναγνωρίζει και να αλληλεπιδρά με τα μοτίβα φωσφο-Ser/Thr-Pro των πρωτεϊνών στόχων της. Σε αντίστοιχα πειράματα παροδικών επιμολύνσεων HepG2 κυττάρων, παρατηρήσαμε ότι η μεταλλαγμένη Pin1-W34A δεν είχε καμία επίδραση στη μεταγραφική ενεργότητα του GAL4-RXR α (FL), ούτε απουσία, αλλά ούτε και παρουσία του συνδέτη του (**Εικ. 62D**).

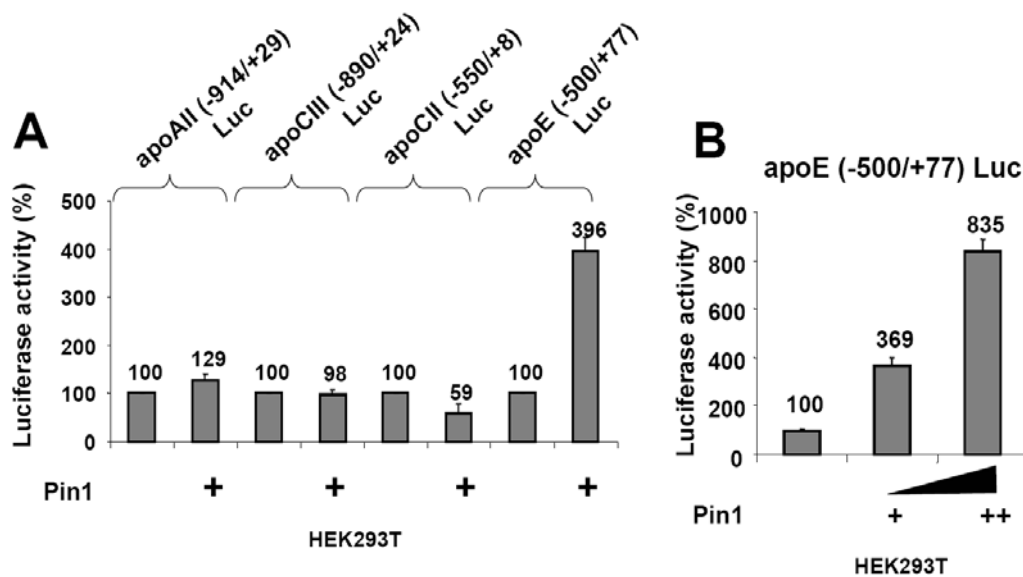


Εικόνα 62: Η ισομεράση Pin1 καταστέλλει τη μεταγραφική ικανότητα του RXRα.

(A) Σχηματική αναπαράσταση του πυρηνικού υποδοχέα του RXRα του ποντικού. Στην εικόνα παρουσιάζονται οι δομικές και λειτουργικές περιοχές, καθώς και οι θέσεις φωσφορυλίωσης του RXRα. (B) Σχηματική αναπαράσταση των GAL4-RXRα (FL) και GAL4-RXRα (DE) που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα που ακολουθούν. (C) Κύτταρα HepG2 συν-επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG5B-Luc (2 μg) και τον φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης GAL4-RXRα (DE) (2 μg) και GAL4-RXRα (FL) (2 μg) απουσία ή παρουσία του συνδέτη τους 9 cis-RA (10⁻⁶M) για 24 ώρες και του φορέα έκφρασης της Pin1 (1 μg). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του συνθετικού υποκινητή G5B. (D) Κύτταρα HepG2 συν-επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG5B-Luc (2 μg) και τον φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης GAL4-RXRα (FL) (2 μg) απουσία ή παρουσία του συνδέτη τους 9 cis-RA (10⁻⁶M) για 24 ώρες και του φορέα έκφρασης της μεταλλαγμένης Pin1-W34A (1 μg). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του συνθετικού υποκινητή G5B.

4. Επίδραση της ισομεράσης Pin1 στη μεταγραφική ενεργότητα υποκινητών των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών

Κλείνοντας το κεφάλαιο της ισομεράσης Pin1, θελήσαμε να ελέγξουμε την επίδρασή της στους υποκινητές διαφόρων γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα παροδικής επιμόλυνσης HepG2 κυττάρων με τους υποκινητές των γονιδίων apoAII, apoCIII, apoCII και apoE απουσία και παρουσία της ισομεράσης Pin1 (Εικ. 63A). Όπως είχαμε, ήδη, διαπιστώσει η παρουσία της ισομεράσης Pin1 δεν είχε κανένα αποτέλεσμα στη μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή της apoCIII. Δεν φάνηκε, επίσης, να επηρεάζει τη μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή της apoAII. Αυτό που παρατηρήσαμε ήταν η καταστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του υποκινητή της apoCII, καθώς και η αρκετά μεγάλη αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας του υποκινητή της apoE, η οποία μάλιστα φαίνεται να είναι ανάλογη της υπερέκφρασης της Pin1 (Εικ. 63B). Το εύρημα αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό, αν σκεφτούμε ότι και οι δύο πρωτεΐνες εμπλέκονται στην νόσο Alzheimer's (141, 277).



Εικόνα 63: Επίδραση της ισομεράσης Pin1 στη μεταγραφική ενεργότητα υποκινητών των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών.

(A) Κύτταρα HEK293T επιμολύνθηκαν παροδικά με τα πλασμίδια αναφοράς apoAII (-914/+29) Luc, apoCIII (-890/+24)-Luc, apoCII (-550/+8)-Luc και apoE (-500/+77)-Luc (2 µg για κάθε φορέα) απουσία και παρουσία του φορέα έκφρασης της Pin1 (1 µg). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζονται οι κανονικοποιημένες σχετικές ενεργότητες των υποκινητών apoAII, apoCIII, apoCII και apoE. (B) Κύτταρα HEK293T επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς apoE (-500/+77)-Luc (2 µg) απουσία και παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων του φορέα έκφρασης της Pin1 (1 και 2 µg). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για ενεργότητα λουσιφεράσης. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη σχετική ενεργότητα του υποκινητή της apoE.

Συζήτηση

I. Ανταγωνισμός μεταξύ προ- και αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών κατά την απόκριση σε οξεία φάση (acute phase response)

Τα δεδομένα που παρουσιάζονται στην παρούσα διατριβή, αποδεικνύουν ότι οι προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως ο TNF α , που ενεργοποιούν πολλαπλά σηματοδοτικά μονοπάτια, συμπεριλαμβανομένου και του NF- κ B, μπορούν να καταστείλουν την έκφραση ηπατο-ειδικών γονιδίων, με ένα νέο μηχανισμό που περιλαμβάνει την τροποποίηση της ικανότητας πρόσδεσης στο DNA, αλλά και της μεταγραφικής ικανότητας των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών, όπως ο HNF-4 α . Ο μηχανισμός αυτός φαίνεται να είναι βασικός για την ανταγωνιστική δράση μεταξύ της προ-φλεγμονώδους κυτταροκίνης TNF α και της αντι-φλεγμονώδους κυτταροκίνης TGF β για την έκφραση του γονιδίου της apoCIII (**Εικ. 34**) κατά την διαδικασία της απόκρισης σε οξεία φάση κατά την οποία ο οργανισμός απαντά σε διάφορες καταστάσεις, όπως μολύνσεις και φλεγμονές, στρες, τραυματισμό, εγκαύματα, ισχαιμική νέκρωση, αλλά και κατά τη ανάπτυξη όγκων (292). Δεν πρόκειται για το πρώτο παράδειγμα ανταγωνιστικής δράσης μεταξύ δύο κυτταροκινών. Ο ανταγωνισμός μεταξύ TGF β και TNF α ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων του κολλαγόνου και είναι πολύ σημαντικός για τη ρύθμιση της ομοιόστασης και επιδιόρθωσης των ιστών (318). Παρόλα αυτά, στη περίπτωση των γονιδίων του κολλαγόνου, φαίνεται ότι στην ανταγωνιστική αυτή επίδραση, συμμετέχει το μονοπάτι των MAPK και όχι οι πυρηνικοί υποδοχείς (319).

II. Ο ρόλος των πυρηνικών υποδοχέων στο μηχανισμό της καταστολής της έκφρασης του γονιδίου της apoCIII από τον TNF α

Η συμμετοχή των πυρηνικών υποδοχέων στο μηχανισμό της καταστολής της έκφρασης του γονιδίου της apoCIII από τον TNF α , υπονοήθηκε από τα δεδομένα που προέκυψαν από πειράματα μεταγραφικής ενεργότητας στα οποία χρησιμοποιήθηκαν ελλειμματικές μορφές του υποκινητή της apoCIII. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι η περιοχή του υποκινητή, που περιελάμβανε μόνο το κοντινό HRE (στοιχείο B), ήταν ικανή για να επάγει την καταστολή μέσω του TNF α (**Εικ. 36**). Από προηγούμενες *in vitro* μελέτες γνωρίζουμε, ότι το κοντινό HRE του υποκινητή της apoCIII είναι του τύπου DR1 (Direct Repeat με απόσταση 1 νουκλεοτιδίου) και προσδένει ισχυρά τον HNF-4 α , αλλά και τους ARP-1 (apolipoprotein AI regulatory protein 1), EAR-2 (erbA-regulated protein 2), EAR-3 και τα ετεροδιμερή του RXR α με τον RAR α . Λιγότερο ισχυρά προσδένονται τα ομοδιμερή του RAR α , αλλά και τα ετεροδιμερή

του RXR α με τον TR β και τον PPAR α (167, 286). Μεταξύ των πυρηνικών υποδοχέων που προσδένονται πάνω σ' αυτό το HRE, ο πιο βασικός φαίνεται να είναι ο HNF-4 α , αφού η στοχευμένη καταστολή του στο ήπαρ έχει ως αποτέλεσμα την πλήρη καταστολή της έκφρασης του γονιδίου της apoCIII (153).

Παρόλα αυτά δεν υπήρχαν, ως τώρα *in vivo* στοιχεία που να αποδεικνύουν τη στρατολόγηση του HNF-4 α σ' αυτό το HRE, αλλά ούτε και στο HRE του μακρινού υποκινητή του γονιδίου της apoCIII. Με την πραγματοποίηση δοκιμής ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης, μπορέσαμε για πρώτη φορά, να αποδείξουμε την συστατική στρατολόγηση του HNF-4 α στο HRE του κοντινού υποκινητή της apoCIII στη κυτταρική σειρά HepG2 (**Εικ. 37B**). Προς έκπληξή μας, ο HNF-4 α δεν φαίνεται να προσδένεται στο HRE του μακρινού υποκινητή της apoCIII, η *in vitro* πρόσδεση του οποίου, είχε δειχτεί από προηγούμενα πειράματα να είναι ιδιαίτερα σημαντική για την έκφραση των apoCIII και apoAI γονιδίων στο ήπαρ (167, 286, 320). Το δεδομένο αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι άλλοι πυρηνικοί υποδοχείς, εκτός του HNF-4 α , είναι οι κύριοι ρυθμιστές του apoCIII γονιδίου, μέσω του HRE του μακρινού υποκινητή, κάτι όμως που θα πρέπει να επιβεβαιωθεί με συμπληρωματικά πειράματα *in vivo* αλληλεπίδρασης με το DNA. Ανάλογα αναγκαία είναι και η μελέτη των πυρηνικών υποδοχέων, εκτός του HNF-4 α , που στρατολογούνται στο κοντινό HRE του υποκινητή του γονιδίου της apoCIII.

Με τη χρήση της υβριδικής GAL4-HNF-4 α πρωτεΐνης, αλλά και ελλειμματικών της μορφών, καθώς και διαφόρων επαγωγέων του NF- κ B μονοπατιού, όπως του TNF α και του LMP1, μπορέσαμε να έχουμε ισχυρά δεδομένα που αποδεικνύουν την εμπλοκή του NF- κ B μονοπατιού στις λειτουργίες του HNF-4 α (**Εικ. 39**).

III. Πιθανοί μηχανισμοί καταστολής της μεταγραφικής δράσης του HNF4 α από τον TNF α

Η αρνητική επίδραση του TNF α και του μονοπατιού του NF- κ B πάνω στον HNF-4 α μπορεί να εξηγηθεί βάσει διάφορων μηχανισμών, οι οποίοι δεν είναι απαραίτητα να αναιρούν ο ένας τον άλλο: 1) Ο TNF α , λοιπόν, φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά την ικανότητα του HNF-4 α για πρόσδεση στο DNA. Στην **εικόνα 38(E)** βλέπουμε ότι ο HNF-4 α , που προέρχεται από πυρηνικά εκχυλίσματα HepG2 κυττάρων, τα οποία έχουν επωασθεί με TNF α , παρουσιάζει μικρότερη ικανότητα πρόσδεσης για το HRE του κοντινού υποκινητή της apoCIII, από ότι ο HNF-4 α , που

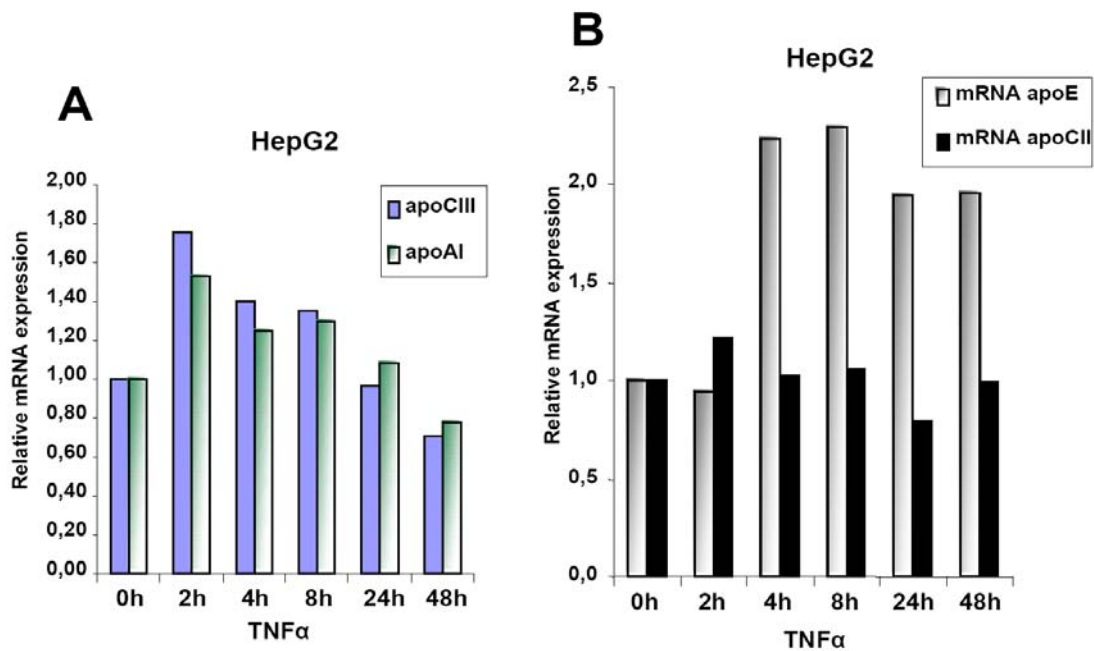
προέρχεται από κύτταρα HepG2 που δεν έχουν υποστεί κάποια αγωγή. Αυτό, ίσως να είναι αποτέλεσμα μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που εντοπίζονται στην DBD περιοχή, οι οποίες θα μπορούσαν να επηρεάσουν την συγγένεια πρόσδεσης του υποδοχέα για τα HREs του. Την υπόθεση αυτή ενισχύουν δεδομένα που έχουν προκύψει από προηγούμενες μελέτες και τα οποία δείχνουν ότι η ικανότητα του HNF-4 α για αλληλεπίδραση με το DNA, μπορούν να ρυθμιστούν θετικά ή αρνητικά από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως η ακετυλίωση (129) και η φωσφορυλίωση που επάγεται από διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν οι κινάσες MAPK και JAKs (Janus kinases) (181, 321). 2) Ο TNF α και το μονοπάτι του NF- κ B, φαίνεται να ασκούν αρνητική επίδραση στη μεταγραφική ικανότητα HNF-4 α . Από *in vitro* πειράματα αλληλεπίδρασης, έχουμε ενδείξεις ότι ο HNF-4 α μπορεί και αλληλεπιδρά με το RHD των υπομονάδων p65 και p50 του NF- κ B (**Εικ. 41D & 41F**). Από παλιότερες μελέτες γνωρίζουμε ότι πυρηνικοί υποδοχείς, όπως αυτοί των γλυκοκορτικοειδών είναι σε θέση να αλληλεπιδράσουν με τη περιοχή αυτή, των υπομονάδων του NF- κ B (147) αποτρέποντας την πρόσδεση του NF- κ B στο DNA. Στη δική μας περίπτωση, η ανάγκη της C-τελικής περιοχής του p65, που φέρει την ενεργοποιητική του λειτουργία TAD (Transactivation Domain) (**Εικ. 35E**) μας οδηγεί στην σκέψη ότι πιθανόν, η στρατολόγησή του στο DNA μέσω του HNF-4 α , να επάγει τέτοιες αλλαγές στη στερεοδιαμόρφωση του p65, ώστε να μετατρέπει την περιοχή αυτή από ενεργοποιητική σε κατασταλτική, μέσω στρατολόγησης συν-καταστολέων. Παρόλα αυτά, απαιτούνται περισσότερα δεδομένα για να στηρίξουν την υπόθεση αυτή. 3) Η καταστολή του HNF-4 α , μέσω του NF- κ B θα μπορούσε, επίσης, να είναι το αποτέλεσμα ανταγωνισμού μεταξύ HNF-4 α και NF- κ B για διάφορους συν-ενεργοποιητές του πρώτου. Αντίστοιχο παράδειγμα αποτελεί η μεταγραφική καταστολή του NF- κ B από τους υποδοχείς στεροειδών ορμονών (144). Γνωρίζουμε ότι ο HNF-4 α αλληλεπιδρά με συν-ενεργοποιητές της οικογένειας p160, μεταξύ των οποίων και ο SRC3, με την ακετυλοτρανσφεράση ιστονών CBP/p300, αλλά και τον PGC1 α , που αποτελεί βασικό του συν-ενεργοποιητή στην διαδικασία της ηπατικής γλυκονεογένεσης (224, 225), αλλά και της έκφρασης γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών, της παραγωγής ουρίας και της σύνθεσης χολικών οξέων (215). Προς την υπόθεση αυτή συνηγορούν τα δεδομένα που παρουσιάζονται στην **Εικόνα 42** στην οποία μπορούμε να δούμε ότι η καταστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του HNF-4 α τόσο από τον TNF α , όσο και από τον LMP1, μπορούσε να ξεπεραστεί με την υπερέκφραση διαφόρων συν-ενεργοποιητών του HNF-4 α (SRC3, CBP και

PGC1a) οι οποίοι αλληλεπιδρούν με τις ενεργοποιητικές του περιοχές AF-1 και AF-2. Επιπλέον, δείξαμε ότι τουλάχιστον ένας από τους συν-ενεργοποιητές αυτού, ο PGC1a, μπορεί να δράσει και ως συν-ενεργοποιητής του NF-κB (Εικ. 42C).

IV. Επίδραση του TNFα στην έκφραση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών, μεταγραφικών παραγόντων και συν-ρυθμιστών σε κύτταρα HepG2

Μία πιο προσεκτική ματιά στην επίδραση του TNFα στη κυτταρική σειρά ηπατώματος του ανθρώπου HepG2, μας έδειξε ότι η παρουσία του επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων διαφόρων απολιποπρωτεϊνών, μεταγραφικών τους παραγόντων, αλλά και συν-ρυθμιστών τους (Εικ. 43 & 44). Η επίδρασή του TNFα, σε μερικές περιπτώσεις, φαίνεται να έχει μία πρόιμη και μία όψιμη επίδραση (early / late response) στην έκφραση των απολιποπρωτεϊνών αλλά και των μεταγραφικών τους παραγόντων. Στην περίπτωση των γονιδίων apoAI, apoCIII και HNF4a, παρατηρείται μία αύξηση των επιπέδων mRNA κατά τις πρώτες 2 – 8 ώρες από τη χορήγηση του TNFα η οποία σταδιακά μειώνεται μέχρι τις 48 ώρες. Ακριβώς το αντίθετο προφίλ παρατηρήθηκε στην περίπτωση των γονιδίων SHP και PGC1a (ταχεία καταστολή που ακολουθείται από σταδιακή αύξηση). Τέλος, στην περίπτωση των γονιδίων apoE και apoB παρατηρείται απλά μία καθυστερημένη αύξηση στα επίπεδα mRNA η οποία διατηρείται για 48 ώρες (Εικ. 43 & 44). Οι διαφορές που παρατηρούμε, πιθανότατα, να οφείλονται τόσο στα διαφορετικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται παρουσία του TNFα, κατά την πρόιμη και την όψιμη επίδρασή του, αλλά και στις αλλαγές της έκφρασης διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων, θετικών ή αρνητικών, που σταδιακά εγκαθιδρύονται εξαιτίας της παρατεταμένης παρουσίας της κυτταροκίνης.

Όσον αφορά τις απολιποπρωτεΐνες, η παρατεταμένη παρουσία του TNFα, στα κύτταρα HepG2, έχει ως αποτέλεσμα τη σύγχρονη καταστολή της έκφρασης των γονιδίων της apoCIII και της apoAI, που εντοπίζονται στο ίδιο σύμπλεγμα γονιδίων, κάτι που θα μπορούσε να επιτυγχάνεται μέσω του κοινού τους ενισχυτή, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την ηπατική έκφραση των δύο γονιδίων (234) (Εικ. 64A). Ο TNFα, όμως, δεν ρυθμίζει με κοινό τρόπο και την έκφραση των γονιδίων της apoE και της apoCII (Εικ. 64B), που επίσης εντοπίζονται σε κοινό σύμπλεγμα γονιδίων. Αυτό μας οδηγεί στη σκέψη πως η ρύθμιση αυτή δεν επιτυγχάνεται μέσω των HCR-1 και HCR-2 (Hepatic Contro Regions), τα οποία ρυθμίζουν την ηπατο-ειδική έκφραση των γονιδίων του συμπλέγματος apoE/apoCI/apoCIV/apoCII (234).



Εικόνα 64: Συγκριτικά ιστογράμματα επίδρασης του TNF α στη μεταγραφή των γονιδίων apoCIII, apoAI, apoE και apoCII.

(A & B) Στα ιστογράμματα παρουσιάζεται η σχετική έκφραση του mRNA των γονιδίων apoCIII, apoAI, apoE και apoCII, η οποία ποσοτικοποιήθηκε με την ηλεκτροφόρησή του σε πηκτή αγαρόζης και τη χρήση του προγράμματος Tina 2.07d. Οι μετρήσεις προέκυψαν από το πείραμα που παρουσιάζεται στην **εικόνα 43**

Τα δεδομένα που προέκυψαν από τα πειράματα που παρουσιάζονται στην **Εικόνα 43**, είναι πολύ σημαντικά, γιατί σχετίζονται άμεσα με τις επιδράσεις της παρατεταμένης παρουσίας του TNF α , στον ανθρώπινο οργανισμό, δηλαδή στην αύξηση των τριγλυκεριδίων στο αίμα (302) και τη μείωση της HDL (303). Η μείωση της έκφρασης της apoAI, εξαιτίας της παρατεταμένης παρουσίας του TNF α , θα μπορούσε, λοιπόν, να οδηγήσει σε δραματική μείωση των επιπέδων της HDL, αφού αποτελεί το κύριο συστατικό της (234). Η αύξηση των επιπέδων της apoE, θα μπορούσε να προκαλέσει αύξηση των επιπέδων της VLDL και ανάπτυξη αθηροσκλήρυνσης, εφόσον αναφερόμαστε στο αλληλόμορφο apoE2 (262), αλλά και να προκαλέσει την εμφάνιση της νόσου του Alzheimer, εφόσον αναφερόμαστε στο αλληλόμορφο apoE4 (277). Τέλος, η αύξηση της apoB, γνωρίζουμε από προηγούμενες μελέτες, ότι οδηγεί στη μείωση της HDL και στην αύξηση της LDL (273) κατάσταση που συνδέεται άμεσα με καρδιαγγειακές παθήσεις. Για τους παραπάνω λόγους, η μελέτη της μεταγραφικής ρύθμισης των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών από τον TNF α , είναι ιδιαίτερα σημαντική.

Όσον αφορά τους μεταγραφικούς παράγοντες HNF-4 α και RXR α , (**Εικ. 44A & 44B**), φαίνεται να επηρεάζονται και αυτοί σε μεταγραφικό επίπεδο, από την παρουσία του TNF α . Όσον αφορά όμως τουλάχιστον τον HNF-4 α , φαίνεται ότι η αλλαγή στην έκφρασή του δεν επηρεάζει τα πρωτεϊνικά του επίπεδα (**Εικ. 38C**) στη διάρκεια του 24ώρου, όπου και πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα που παρουσιάζουμε. Από την άλλη μεριά, η μεταγραφική αύξηση του γονιδίου του RXR α , θα μπορούσε να ήταν σημαντική, εφόσον ανιχνευτεί αντίστοιχη αύξηση των πρωτεϊνικών του επιπέδων.

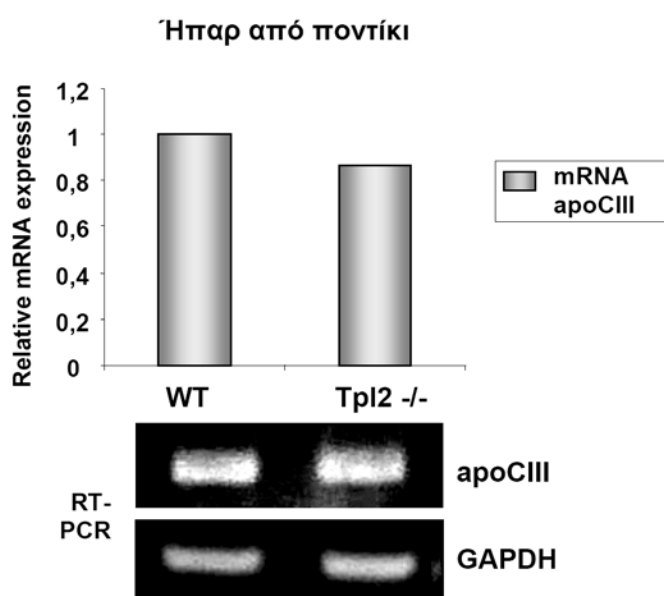
Ιδιαίτερη εντύπωση μας προκάλεσε επίσης και η δραματική επίδραση που έχει ο TNF α , στη μεταγραφική ενεργότητα των γονιδίων των συν-ρυθμιστών SHP (αρνητικός) και PGC1 α (θετικός) (**Εικ. 45A**). Κατά τη πρόιμη επίδρασή του, ο TNF α , φαίνεται να επιδρά αρνητικά στη μεταγραφική ενεργότητα του PGC1 α , μέσω του μονοπατιού της ERK (**Εικ. 45B**), ενώ απαιτείται τόσο το μονοπάτι της ERK, όσο και του NF- κ B για τη πλήρη καταστολή της έκφρασης του SHP (**Εικ. 45B & 48**). Η μεταγραφική αύξηση, ωστόσο, του SHP κατά τη παρατεταμένη παρουσία του TNF α , στα HepG2 κύτταρα, φαίνεται να οδηγεί σε καταστολή της μεταγραφικής έκφρασης του γονιδίου της apoCIII (**Εικ. 46A**) μέσω του HNF-4 α (**Εικ. 46C**). Αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει ένα τέταρτο μηχανισμό ρύθμισης της μεταγραφικής ικανότητας του HNF-4 α από τον TNF α .

Με πειράματα εκτοπικής έκφρασης γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών, αλλά και μεταγραφικών συν-ρυθμιστών της έκφρασής τους, στη κυτταρική σειρά HEK293T αποδείξαμε την αναγκαιότητα της ύπαρξης τόσο του HNF-4 α , όσο και του συν-ενεργοποιητή του, PGC1 α , για τη σωστή έκφραση διαφόρων γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών, αλλά και του συν-καταστολέα SHP (**Εικ. 55A**). Ακόμα και στη περίπτωση της apoAIV, την οποία δεν μπορούμε να ανιχνεύσουμε στα HepG2 κύτταρα, εξαιτίας των μειωμένων επιπέδων έκφρασης του PGC1 α (215), η μέθοδος της παροδική επιμόλυνσης HEK293T κυττάρων με τους φορείς έκφρασης του HNF-4 α και του PGC1 α οδήγησε, τελικά, στην έκφρασή της. Μελλοντικά, η στρατηγική αυτή θα μπορούσε να αποτελέσει τη βάση της γονιδιακής θεραπείας των καρκινικών ηπατικών κυττάρων, επαναφέροντας την μεταγραφική ενεργότητα των ηπατικών γονιδίων και κατ' επέκταση των ηπατικών λειτουργιών.

V. Ο ρόλος της κινάσης Trp2/COT στην ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργότητας πυρηνικών υποδοχέων από τον TNF α

Άλλος ένα ρυθμιστής της μεταγραφική ικανότητας των πυρηνικών υποδοχέων φαίνεται να είναι και η κινάση COT, που αποτελεί κομβικό σημείο των μονοπατιών που επάγονται από τον TNF α . Η κινάση COT φαίνεται να καταστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του HNF-4 α (Εικ. 53B), του RXR α (Εικ. 58A), και του TR β (Εικ. 58C). Ειδικά για τον HNF-4 α και τον TR β , η COT φαίνεται να μεσολαβεί για τη μεταγραφική του καταστολή μέσω του TNF α (Εικ. 53A & 58D αντίστοιχα). Η υπερέκφραση της COT, έχει ως αποτέλεσμα τη μεταγραφική καταστολή, όλων των επαγόμενων από HNF-4 α , γονιδίων που ελέγξαμε (Εικ. 55A). Αν και το μονοπάτι το οποίο οδηγεί στη καταστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του HNF-4 α , από την COT, δεν είναι ακόμη γνωστό, φαίνεται πως η παρουσία της έχει ως αποτέλεσμα, όχι τη μείωση της ικανότητας του HNF-4 α για αλληλεπίδραση με το DNA (Εικ. 57A), αλλά τη μείωση της ικανότητας αλληλεπίδρασής του, με τους συν-ενεργοποιητές του. Αυτό τουλάχιστον φαίνεται να συμβαίνει στη περίπτωση του συν-ενεργοποιητή PGC1 α (Εικ. 57B). Το γεγονός ότι δεν είδαμε να επηρεάζεται η μεταγραφική ικανότητα της υβριδικής πρωτεΐνης GAL4-HNF-4 α , που φέρει μόνο την περιοχή AF-2, από την υπερέκφραση της Trp2 (η ομόλογη πρωτεΐνη στο ποντίκι) στα κύτταρα HEK293T, προφανώς οφείλεται στην απουσία της έκφρασης του συν-ενεργοποιητή PGC1 α στη κυτταρική αυτή σειρά (215) (Εικ. 54B). Άλλωστε μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι η ελλειμματική αυτή μορφή του GAL4-HNF-4 α δεν έχει καμία ενεργότητα στα HEK293T κύτταρα. Αντίθετα, η ελλειμματική μορφή του GAL4-HNF-4 α που φέρει την περιοχή AF-1 είναι ενεργή στη κυτταρική σειρά HEK293T, πιθανώς εξαιτίας της καλής έκφρασης των συν-ενεργοποιητών της οικογένειας p160, και καταστέλλεται από την παρουσία της Trp2, πιθανότατα μέσω αντίστοιχου μηχανισμού. Αντίστοιχος, ενδεχομένως να είναι και ο μηχανισμός δράσης του COT στη καταστολή της επαγωγής του γονιδίου της apoCII, που επάγεται από το ετεροδιμερές RXR α / TR β (Εικ. 59A).

Αν και η αποσιώπηση του ενδογενούς γονιδίου της COT στη κυτταρική σειρά HEK293T είχε ως αποτέλεσμα την περαιτέρω μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων που επάγονται από HNF-4α και PGC1α (Εικ. 55A), δεν μπορέσαμε να αποδείξουμε το ίδιο και για την έκφραση του ενδογενούς apoCIII γονιδίου στο ήπαρ *Trp2*^{-/-} ποντικού (Εικ. 65). Ενδεχομένως να απαιτείται επίδραση του TNFα στο ήπαρ των ζώων αυτών, για να μπορέσουμε να ανιχνεύσουμε κάποια αλλαγή στην έκφραση της apoCIII, αλλά και άλλων γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών.



Εικόνα 65: Η έκφραση του γονιδίου της apoCIII στο ήπαρ *Trp2*^{-/-} ποντικού.

Συνολικό mRNA απομονώθηκε από το ήπαρ φυσιολογικού και *Trp2*^{-/-} ποντικού σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Trizol[®]. Η έκφραση του γονιδίου της απολιποπρωτεΐνης apoCIII αναλύθηκε με RT-PCR. Τα επίπεδα έκφρασης του συστατικά εκφραζόμενου γονιδίου GAPDH χρησιμοποιήθηκαν για την κανονικοποίηση της συγκέντρωσης του RNA στα δείγματά μας. Στο ιστόγραμμα παρουσιάζεται η σχετική έκφραση του mRNA του γονιδίου της apoCIII, το οποίο ποσοτικοποιήθηκε με την ηλεκτροφόρησή του σε πηκτή αгарόζης και τη χρήση του προγράμματος Tina 2.07d.

VI. Φωσφορυλίωση πυρηνικών υποδοχέων και ο ρόλος της ισομεράσης Pin1

Τέλος, θελήσαμε να μελετήσουμε την επίδραση της φωσφορυλίωσης των πυρηνικών υποδοχέων HNF-4α και RXRα και του μηχανισμού ισομερείωσής τους από την πρωτεΐνη Pin1. Η φωσφορυλίωση του HNF-4α από το χημειοθεραπευτικό φάρμακο 5-Fluorouracil (5-FU) είχε ως αποτέλεσμα την καταστολή της μεταγραφικής του ικανότητας σε HepG2 κύτταρα, ενώ η υπερέκφραση της ισομεράσης Pin1, οδήγησε σε πλήρη καταστολή της επαγόμενης από HNF-4α, ενεργοποίησης του υποκινητή της apoCIII (Εικ. 61A). Επειδή η Pin1 στοχεύει μόνο μοτίβα φώσφο-Ser/Thr-Pro, συμπεραίνουμε ότι η φωσφορυλίωση του HNF-4α από 5-

FU, πραγματοποιείται στα μοτίβα αυτά. Επειδή όμως η Pin1 συνεχίζει να δρα κατασταλτικά πάνω στον HNF-4 α και απουσία της επαγόμενης από 5-FU φωσφορυλίωσης του, πιστεύουμε ότι η διαδικασία της παροδικής επιμόλυνσης ενεργοποιεί μονοπάτια κινασών του στρες, που επίσης φωσφορυλιώνουν τον HNF-4 α (Εικ. 61B & 61C). Πιθανολογούμε ότι αυτές οι φωσφορυλίώσεις και η ισομερείωση από την Pin1 πραγματοποιούνται στην DBD περιοχή του HNF-4 α αφού η δράση της Pin1 πάνω στον HNF-4 α παύει να υφίσταται όταν αυτός προσδένεται στο DNA μέσω της DBD περιοχής του GAL4, αλλά αυτό απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση. Δείξαμε τέλος ότι η ισομεράση Pin1 καταστέλλει την μεταγραφική ενεργότητα του RXR α παρουσία του συνδέτη του 9-cis RA. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι: α) η δράση της ισομεράσης Pin1 δεν περιορίζεται μόνο στον HNF-4 α αλλά φαίνεται να περιλαμβάνει και άλλους πυρηνικούς υποδοχείς, β) ο υποδοχέας RXR α είναι συστατικά φωσφορυλιωμένος, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (239) και γ) η ισομερείωση του RXR α από την Pin1 επηρεάζει την δομή του LBD και κατ' επέκταση την δράση του συνδέτη 9-cis RA σε αυτήν. Είναι πιθανόν ότι η ισομερείωση «κλειδώνει» την LBD σε μία διαμόρφωση η οποία δεν μπορεί να τροποποιηθεί από τον συνδέτη και ως αποτέλεσμα δεν ευνοεί την πρόσδεση των συν-ενεργοποιητών. Η κατανόηση του μηχανισμού δράσης της Pin1 στους πυρηνικούς υποδοχείς αναμένεται να έχει μεγάλη βιοϊατρική σημασία καθώς οι πυρηνικοί υποδοχείς επηρεάζουν μία πληθώρα βιολογικών διεργασιών από την ανάπτυξη του εμβρύου μέχρι το ενήλικο στάδιο του οργανισμού. Πιθανώς να έχει επίσης επίπτωση στην θεραπεία νοσημάτων που βασίζεται σε πυρηνικούς υποδοχείς όπως ο καρκίνος.

VII. Η βιολογική σημασία του προσδιορισμού των μοριακών μονοπατιών που επάγονται από τον TNF α και επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών του ανθρώπου

Από έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, σήμερα γνωρίζουμε πως η έκκριση των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως του TNF α αυξάνει, όχι μόνο κατά τη διάρκεια μολύνσεων και φλεγμονών, αλλά και σε διάφορες κοινές διαταραχές του οργανισμού, όπως ο διαβήτης, η παχυσαρκία, το μεταβολικό σύνδρομο, η υπέρταση, η χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια, η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, αλλά και η αθηροσκλήρωση (295-301). Η υπερέκκριση του TNF α φαίνεται να παίζει παθογενετικό ρόλο κατά τη διάρκεια των διαταραχών αυτών, προκαλώντας παράλληλα αλλαγές στο μεταβολισμό των λιπιδίων. Οι αλλαγές αυτές έχουν ως

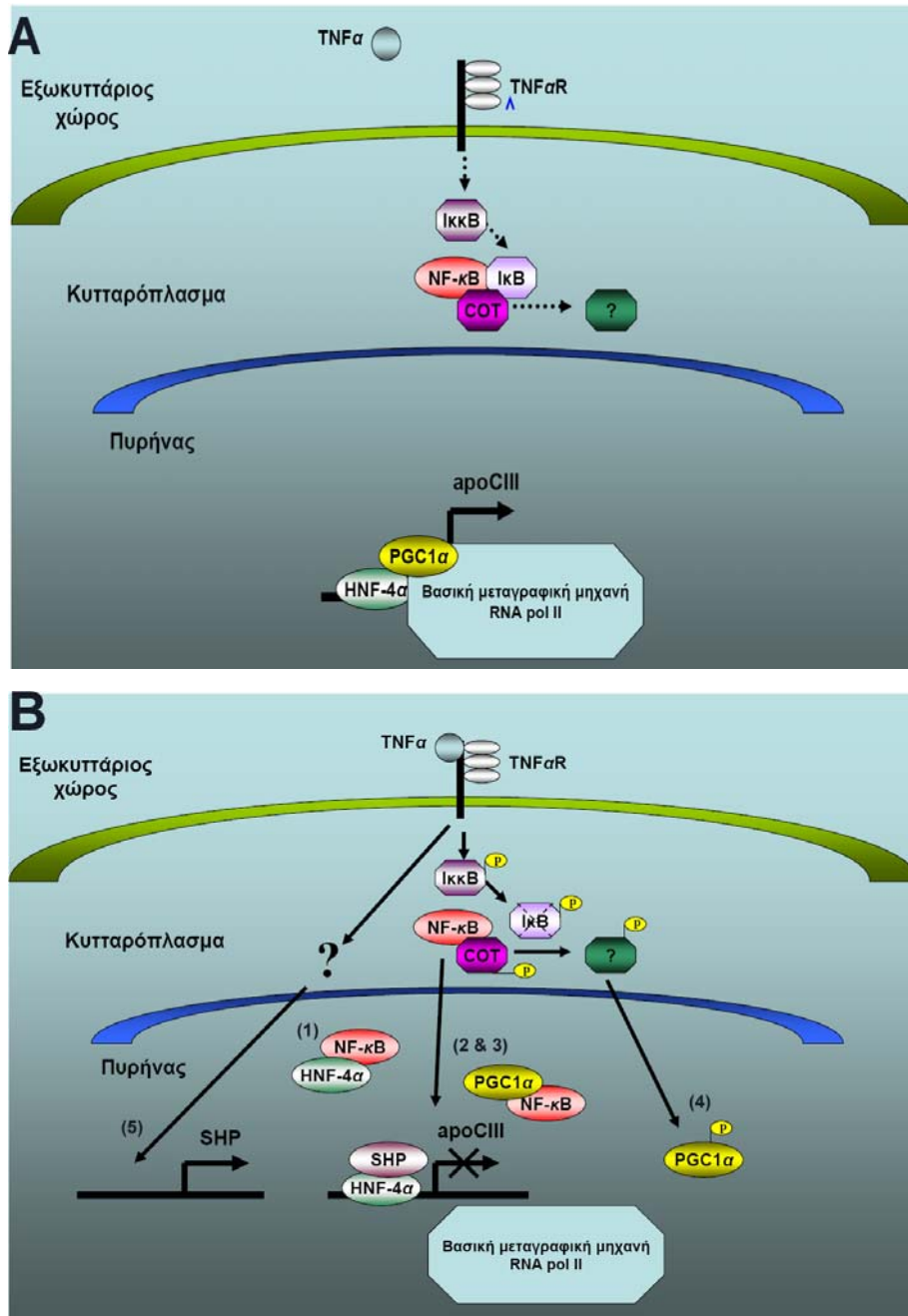
αποτέλεσμα την αύξηση των τριγλυκεριδίων και της VLDL, την αύξηση της οξείδωσης των λιπιδίων, την μείωση της HDL και την μείωση της αντίστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης.

Με πειράματα ανίχνευσης της μεταγραφικής έκφρασης διαφόρων γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών στη κυτταρική σειρά ηπατώματος HepG2 (**Εικ. 43**) μπορέσαμε να παρατηρήσουμε ότι η παρατεταμένη παρουσία του TNF α είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης απολιποπρωτεϊνών όπως της apoE και της apoB που συμμετέχουν στο σχηματισμό των VLDL σωματιδίων. Στο γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται και μέρος της συσσώρευσης των VLDL στον ορό που παρατηρείται κατά τη διάρκεια των κοινών διαταραχών που προαναφέραμε. Επίσης, παρατηρήσαμε την μείωση της έκφραση του γονιδίου της apoAI, κύριου συστατικού για την δημιουργία της HDL. Αυτός μπορεί να είναι και ο κύριος λόγος της μείωσης των HDL σωματιδίων στις αντίστοιχες παθολογικές καταστάσεις. Με αυτό τον τρόπο μπορέσαμε να συνδέσουμε τον TNF α με δύο κύριες αλλαγές στο μεταβολισμό των λιπιδίων που παρατηρούνται κατά την υπερέκκριση της κυτταροκίνης.

Επίσης θελήσαμε να μελετήσουμε πιο διεξοδικά την επίδραση του TNF α στη μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της apoCIII. Έχει δειχτεί πως η apoCIII αναστέλλει την πρόσδεση των λιποπρωτεϊνών στους κυτταρικούς τους υποδοχείς, με αποτέλεσμα τη καταστολή του καταβολισμού των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών (281-283) και την εμφάνιση υπερτριγλυκεριδαιμίας. Αυτό συνεπάγεται ότι αυξημένα ποσά apoCIII οδηγούν σε συσσώρευση λιπιδίων πλούσιων σε τριγλυκερίδια στο πλάσμα (υπερτριγλυκεριδαιμία), γεγονός που αποτελεί ένα σοβαρό παράγοντα παθογένεσης της αθηροσκλήρυνσης. Από τα πειραματικά μας δεδομένα προκύπτει πως ο TNF α ασκεί έντονη κατασταλτική επίδραση στην έκφραση του γονιδίου της apoCIII, ρυθμίζοντας διάφορες ιδιότητες του κύριου θετικού ρυθμιστικού της παράγοντα, του πυρηνικού υποδοχέα HNF-4 α (**Εικ. 66**). Στο μοριακό μηχανισμό καταστολής της μεταγραφικής δραστηριότητας του HNF-4 α από τον TNF α εμπλέκεται ο μεταγραφικός παράγοντας NF- κ B, ο οποίος φαίνεται να μειώνει την ικανότητα του HNF-4 α για πρόσδεση στο DNA ή/και να ανταγωνίζεται του συν-ενεργοποιητές για αλληλεπίδραση με τον HNF-4 α ή/και να στρατολογεί τους συν-ενεργοποιητές του HNF-4 α για την μεταγραφική ενεργοποίηση δικών του γονιδίων-στόχων. Άλλη μία πρωτεΐνη που επάγεται από TNF α , η κινάση Trp12/COT φαίνεται επίσης να παίζει σημαντικό ρόλο στη μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας του HNF-4 α παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδραση του HNF-4 α με

τους συν-ενεργοποιητές τους, πιθανότατα μέσω κάποιου μονοπατιού φωσφορυλίωσης των τελευταίων. Τέλος, η παρατήρηση ότι η παρατεταμένη παρουσία του TNF α σε ηπατικά κύτταρα επάγει την έκφραση συν-καταστολέων του HNF-4 α , όπως του SHP, σημαίνει ότι υπάρχουν και έμμεσοι μηχανισμοί καταστολής της μεταγραφικής δραστηριότητας του HNF-4 α .

Ο προσδιορισμός των μοριακών μηχανισμών που περιγράψαμε και η κατανόησή τους μπορεί να αποτελέσει στο μέλλον πολύτιμο εργαλείο για την αντιμετώπιση ασθενειών που σχετίζονται με τον μεταβολισμό των λιπιδίων και άλλων ασθενειών, όπως ο καρκίνος, στις οποίες εμπλέκονται οι πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών.



Εικόνα 66: Μοριακά μονοπάτια που ρυθμίζουν τη μεταγραφική δραστηριότητα του HNF-4 α και την έκφραση του γονιδίου της apoCIII κατά τη παρουσία του TNF α .

(A) Η φυσιολογική έκφραση του γονιδίου της apoCIII στα ηπατικά κύτταρα απουσία σηματοδότησης από τον TNF α . (B) Η ενεργοποίηση του NF- κ B μονοπατιού μετά τη πρόσδεση του TNF α στον υποδοχέα του έχει ως αποτέλεσμα τη καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του HNF-4 α μέσω: (1) μείωσης της ικανότητας του HNF-4 α για πρόσδεση στο DNA, (2) συναγωνισμού μεταξύ NF- κ B και συν-ενεργοποιητών για αλληλεπίδραση με τον HNF-4 α και (3) στρατολόγηση των συν-ενεργοποιητών του HNF-4 α από τον NF- κ B για την ενεργοποίηση δικών του γονιδίων στόχων (μηχανισμός *squelching*). Η κινάση COT φαίνεται να μειώνει την ικανότητα του HNF-4 α να αλληλεπιδρά με τους συν-ενεργοποιητές (4), ενώ έμμεσα μονοπάτια μεταγραφικής ρύθμισης που επάγονται από TNF α και ελέγχουν θετικά την έκφραση συν-καταστολέων του HNF-4 α (π.χ. του SHP) (5) φαίνεται να συμμετέχουν στην καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του HNF-4 α .

Βιβλιογραφία:

1. **Roeder, R. G. & Rutter, W.J. (1969)** Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic organism. *Nature* **244**, 234-237
2. **Roeder, R. G. (2003)** The eukaryotic transcriptional machinery: complexities and mechanisms unforeseen. *Nature Med.* **9**, 1239-1244
3. **Matsui, T., J. Segall, P. A. Weil, and R. G. Roeder. (1980).** Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* **255**, 11992–11996
4. **Samuels M., Fire A., Sharp P. A. (1982)** Separation and characterization of factors mediating accurate transcription by RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* **257**, 14419–14427
5. **Buratowski, S., Hahn, S., Guarente, L., and Sharp, P.A. (1989)** Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell* **56**, 549–561
6. **Koleske, A.J. and Young, R.A. (1994)** An RNA Polymerase II holoenzyme responsive to activators. *Nature* **368**, 466–469
7. **Chao, D.M., Gadbois, E.L., Murray, P.J., Anderson, S.F., Sonu, M.S., Parvin, J.D. and Young, R.A. (1996)** A mammalian SRB protein associated with an RNA polymerase II holoenzyme. *Nature* **380**, 82–85.
8. **Maldonado, E., Shiekhatar, R., Sheldon, M., Cho, H., Drapkin, R., Rickert, P., Lees, E., Anderson, C.W., Linn, S., and Reinberg, D. (1996)** A human RNA Polymerase II complex associated with SRB and DNA-repair proteins. *Nature* **381**, 86–89.
9. **Parvin, J.D. and Young, R.A. (1998)** Regulatory targets in the RNA polymerase II holoenzyme. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 565–570.
10. **Lemon, B & Tjian, R. (2000)** Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev.* **14**, 2551-2569
11. **Alberts B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2002)** *Molecular Biology of the Cell* (4th edition) Garland Publishing, New York
12. **Kornberg, R. (1974)** Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* **184**, 868–871.
13. **Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997)** Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251–260
14. **Khorasanizadeh S (2004)** The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* **116**, 259–272
15. **Lorch, Y., Lapointe, J.W., and Kornberg, R.D. (1987)** Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones. *Cell* **49**, 203–210.
16. **Perkins TJ, Hallett M, Glass L (2004)** Inferring models of gene expression dynamics. *J Theor Biol* **230**, 289–299
17. **Dillon N, Festenstein R (2002)** Unravelling heterochromatin: competition between positive and negative factors regulates accessibility. *Trends Genet* **18**, 252–258
18. **Gill G (2004)** SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev* **18**, 2046–2059
19. **Narlikar GJ, Fan HY, Kingston RE (2002)** Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* **108**, 475–487

20. **Jenuwein T, Allis CD (2001)** Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-1080
21. **Sif S (2004)** ATP-dependent nucleosome remodelling complexes: enzymes tailored to deal with chromatin. *J Cell Biochem* **91**, 1087-1098
22. **Hermann A, Gowher H, Jeltsch A (2004)** Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell Mol Life Sci* **61**, 2571-2587
23. **Catez F, Yang H, Tracey KJ, Reeves R, Misteli T, Bustin M (2004)** Network of dynamic interactions between histone H1 and high-mobility-group proteins in chromatin. *Mol Cell Biol* **24**, 4321-4328
24. **Bustin M, Catez F, Lim JH (2005)** The dynamics of histone H1 function in chromatin. *Mol Cell* **17**, 617-620
25. **Strachan, T. and Read, A. P. (1999)** Human Molecular Genetics 2 (2nd edition) Garland Science, New York and London
26. **Burke TW. and Kadonaga JT. (1997)** The downstream core promoter element, DPE, is conserved from Drosophila to humans and is recognized by TAFII60 of *Drosophila* *Genes Dev.* **11**, 3020-3031
27. **Blackwood EM. and Kadonaga JT. (1998)** Going the distance: a current view of enhancer action *Science* **281**, 60-63
28. **Ogbourne S. and Antalis TM. (1998)** Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes *Biochem J.* **331**, 1-14
29. **Geyer PK. (1997)** The role of insulator elements in defining domains of gene expression *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**, 242
30. **Andrulis, E.D., Neiman, A.M., Zappulla, D.C., and Sternglanz, R. (1998)** Perinuclear localization of chromatin facilitates transcriptional silencing. *Nature* **394**, 592-595.
31. **Verschure, P.J., van Der Kraan, I., Manders, E.M., and van Driel, R. (1999)** Spatial relationship between transcription sites and chromosome territories. *J. Cell Biol.* **147**, 13-24.
32. **Cockerill, P.N. and Garrard, W.T. (1986)** Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites. *Cell* **44**, 273-282.
33. **Gasser, S.M. and Laemmli, U.K. (1986)** Cohabitation of scaffold binding regions with upstream/enhancer elements of three developmentally regulated genes of *D. melanogaster*. *Cell* **46**, 521-530.
34. **Forrester, W.C., van Genderen, C., Jenuwein, T., and Grosschedl, R. (1994)** Dependence of enhancer-mediated transcription of the immunoglobulin mu gene on nuclear matrix attachment regions. *Science* **265**, 1221-1225.
35. **Kirillov, A., Kistler, B., Mostoslavsky, R., Cedar, H., Wirth, T., and Bergman, Y. (1996)** A role for nuclear NF- κ B in B-cell specific demethylation of the Ig μ locus. *Nat. Genet.* **13**, 435-441.
36. **Jenuwein, T., Forrester, W.C., Fernandez-Herrero, L.A., Laible, G., Dull, M., and Grosschedl, R. (1997)** Extension of chromatin accessibility by nuclear matrix attachment regions. *Nature* **385**, 269-272.
37. **Girard, F., Bello, B., Laemmli, U.K., and Gehring, W.J. (1998)** In vivo analysis of scaffold-associated regions in Drosophila: A synthetic high-affinity SAR binding protein suppresses position effect variegation. *EMBO J.* **17**, 2079-2085
38. **Namciu, S.J., Blochlinger, K.B., and Fournier, R.E. (1998)** Human matrix attachment regions insulate transgene expression from chromosomal position effects in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 2382-2391.

39. **Fakan, S. and Hernandez-Verdun, D. (1986)** The nucleolus and the nucleolar organizer regions. *Biol. Cell* **56**, 189–205.
40. **Scheer, U. and Hock, R. (1999)** Structure and function of the nucleolus. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **11**, 385–390.
41. **Zeng, C., Kim, E., Warren, S.L., and Berget, S.M. (1997)** Dynamic relocation of transcription and splicing factors dependent upon transcriptional activity. *EMBO J.* **16**: 1401–1412.
42. **Wei, X., Somanathan, S., Samarabandu, J., and Berezney, R. (1999)** Three-dimensional visualization of transcription sites and their association with splicing factor-rich nuclear speckles. *J. Cell Biol.* **146**: 543–558.
43. **Lewin, B., (2000)** Genes VII. Oxford University Press and Cell Press, NY, U.S.A
44. **Lenardo, M.J. and Baltimore, D. (1989)** NF-kappa B: A pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell* **58**: 227–229
45. **Lai, E. and Darnell, J.E., Jr. (1991)** Transcriptional control in hepatocytes: A window on development. *Trends Biochem. Sci.* **16**: 427–430.
46. **Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.-J., and O'Malley, B.W. (1995)** Sequence and characterization of a co-activator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* **270**, 1354–1357.
47. **Fondell, J.D., Ge, H., and Roeder, R.G. (1996)** Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 8329–8333.
48. **Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S.-C., Heyman, R.A., Rose, D.W., Glass, C.K., et al. (1996)** A CBP-integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* **85**, 403–414.
49. **Mengus, G., May, M., Carre', L., Chambon, P., and Davidson, I. (1997).** Human TAF(II)135 potentiates transcriptional activation by the AF-2s of the retinoic acid, vitamin D3, and thyroid hormone receptors in mammalian cells. *Genes & Dev.* **11**, 1381–1395.
50. **Nagy, L., Kao, H.Y., Chakravarti, D., Lin, R.J., Hassig, C.A., Ayer, D.E., Schreiber, S.L., and Evans, R.M. (1997)** Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* **89**: 373–380.
51. **Hope, I. A. and Struhl, K. (1986)** Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. *Cell*, **48**, 885–894.
52. **Keegan, L., Gill, G. and Ptashne, M. (1986)** Separation of DNA binding from the transcription activation function of a eukaryotic regulatory protein. *Science*, **231**, 699–704
53. **Triebenberg, S. J. (1995)** Structure and function of transcriptional activation domains. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **5**, 190–196.
54. **Johnson P. F., Sterneck E., Williams S. C. (1993)** Activation domains of transcriptional regulatory proteins. *J Nutr Biochem*, **4**, 386-398.
55. **Attardi L.D., Tjian R. (1993)** Drosophila tissue-specific transcription factor NTF-1 contains a novel isoleucine-rich activation motif. *Genes Dev*, **7**, 1341-1353.
56. **Estruch J. J., Crossland L., Golf S. A. (1994)** Plant activating sequences: positively charged peptides are functional as transcriptional activation domains. *Nucleic Acids Res*, **22**, 3983-3989.

57. Brennan R. G., Matthews B. W. (1989) The helix-turn-helix DNA binding motif. *J Biol Chem.* **264**, 1903-6.
58. Sauer R. T., Yocum R. R., Doolittle R. F., Lewis M., Pabo C. O. (1982) Homology among DNA-binding proteins suggests use of a conserved supersecondary structure. *Nature.* **298**, 447-51.
59. Pabo C. O., Sauer R. T. (1984) Protein-DNA recognition. *Annu Rev Biochem.* **53**, 293-321.
60. Mannervik M. (1999) Target genes of homeodomain proteins. *Bioessays.* **21**, 267-70.
61. Littlewood T. D., Evan G. I. (1995) Transcription factors 2: helix-loop-helix. *Protein Profile.* **2**, 621-702.
62. O'Shea E. K., Rutkowski R., Kim P. S. (1989) Evidence that the leucine zipper is a coiled coil. *Science.* **243**, 538-42.
63. Miller J, McLachlan AD, Klug A. (1985) Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* **4**, 1609–1614.
64. Evans R. M., Hollenberg S. M. (1988) Zinc fingers: guilt by association. *Cell.* **52**, 1-3.
65. Klug A, Rhodes D. (1987) Zinc fingers: a novel protein fold for nucleic acid recognition. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **52**, 473-82.
66. Gronemeyer, H., and Laudet, V. (1995) Nuclear receptors. *Protein Profile* **2**, 1173–1308
67. Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., and Evans, R.M. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**, 835–839.
68. Aranda A. & Pascual A. (2001) Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiological Rev.* **81**, 1269-1304
69. Tsai, J. M. & O' Malley, B. W. (1994) Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 451-486
70. Renaud J. P., Rochel N., Ruff M., Vivat V., Chambon P., Gronemeyer H., Moras D. (1995) Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-*trans* retinoic acid. *Nature* **378**, 681–689
71. Moras D. & Gronemeyer H. (1998) The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 384–391
72. Gronemeyer H. & Miturski R. (2001) Molecular mechanisms of retinoid action. *Cell. & Mol. Biol. Lett.* **6**. 3-52
73. Horlein A. J., Naar A. M., Heinzl T., Torchia J., Gloss B., Kurokawa R., Ryan A., Kamei Y., Soderstorm M., Glass C. K., & Rossenfeld M. G. (1995) Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* **377**, 397–404.
74. Chen J. D. & Evans R. M. (1995) A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* **377**, 454–457
75. Laudet V. (1997) Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol* **19**, 207–226
76. Nagpal S, Friant S, Nakshatri H, Chambon P. (1993) RARs and RXRs: evidence for two autonomous transactivation functions (AF-1 and AF-2) and heterodimerization *in vivo*. *EMBO J.* **12**, 2349– 60.
77. Shao D. & Lazar M. A. (1999) Modulating nuclear receptor function: may the phos be with you. *J Clin Invest* **103**, 1617–1618

78. Rochette-Egly C. (2003) Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation *Cellular Signalling* **15**, 355–366
79. Luisi B. F., Xu W. X., Otwinowski Z., Freedman L. P., Yamamoto K. R., Sigler P. B. (1991) Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* **352**, 497–505
80. Schwabe J. W., Chapman L., Finch J. T., Rhodes D. (1993) The crystalstructure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound toDNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell* **75**, 567–578
81. Lee M. S., Kliewer S. A., Provencal J., Wright P. E., Evans R. M. (1993) Structure of the retinoid X receptor alpha DNA binding domain: a helix required for homodimeric DNA binding. *Science* **260**, 1117–1121
82. Haelens A., Tanner T., Denayer S., Callewaert L. and Claessens F. (2007) The Hinge Region Regulates DNA Binding, Nuclear Translocation, and Transactivation of the Androgen Receptor *Cancer Res.* **67**, 4514-4523.
83. Wurtz J. M., Bourguet W., Renaud J. P., Vivat V., Chambon P., Moras D., Gronemeyer H. (1996) A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat Struct Biol* **3**, 87–94
84. Feng W., Ribeiro R. C. J., Wagner R. L., Nguyen H., Apriletti J. W., Fletterick R. J., Baxter J. D., Kushner P. I., West B. L., (1998) Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors. *Science* **280**, 1747-1749
85. Danielian P. S., White R., Lees J. A., Parker M. G., (1992) Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors *EMBO J.* **11**, 1025-1033
86. Hadzopoulou-Cladaras, M., Kistanova, E., Evagelopoulou, C., Zeng, S., Cladaras, C. Ladias, J. (1997) Functional domains of the nuclear receptor Hepatocyte nuclear factor 4. *J. Biol. Chem.* **272**, 539–550
87. Beato M., Herrlich P., Schutz G. (1995) Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* **83**, 851–857
88. Umesono K., Murakami K. K., Thompson C. C., Evans R. M. (1991) Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* **65**, 1255–1266
89. Mangelsdorf D. J. & Evans R. M. (1995) The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* **83**, 841–850
90. Umesono K., Giguere V., Glass C. K., Rosenfeld M. G., Evans R. M. (1988) Retinoic acid and thyroid hormone induce gene expression through a common responsive element. *Nature* **336**, 262–265
91. Jinag G., Nepomuceno L., Hopkins K., Sladek, F. M. (1995) Exclusive homodimerization of the orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4 defines a new subclass of nuclear receptors. *Mol. Cell. Bio.* **15**, 5131-5143
92. Wilson T. E., Fahrner T. J., Milbrandt J., (1993) The orphan receptors NGFI-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction. *Mol. Cell. Bio.* **13**, 5794-5804
93. Perlmann T. & Jansson L. (1995) A novel pathway for vitamin A signalling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes Dev.* **9**, 769-782
94. Naar A. M., Boutin J. M., Lipkin S. M., Yu V. C., Holloway J. M., Glass C. K., Rosenfeld M. G. (1991) The orientation and spacing of core DNA binding motifs dictate selective transcriptional responses to three nuclear receptors. *Cell* **65**, 1267–1279

95. Kato S., Sasaki H., Suzawa M., Masushige S., Tora L., Chambon P., Gronemeyer H. (1995) Widely spaced, directly repeated PuGGTCA elements act as promiscuous enhancers for different classes of nuclear receptors. *Mol Cell Biol* **15**, 5858–5867
96. Mader S., Leroy P., Chen J. Y., Chambon P. (1993) Multiple parameters control the selectivity of nuclear receptors for their response elements. Selectivity and promiscuity in response element recognition by retinoic acid receptors and retinoid X receptors. *J Biol Chem* **268**, 591–600
97. Bodenner D. L., Mroczynski M. A., Weintraub B. D., Radovick S., Wondisford F. E. (1991) A detailed functional and structural analysis of a major thyroid hormone inhibitory element in the human thyrotropin beta-subunit gene. *J Biol Chem* **266**, 21666–21673
98. Carr F. E. & Wong N. C. (1994) Characteristics of a negative thyroid hormone response element. *J Biol Chem* **269**, 4175–4179,
99. Drouin J., Trifiro M. A., Plante R. K., Nemer M., Eriksson P., Wrangé O. (1989) Glucocorticoid receptor binding to a specific DNA sequence is required for hormone-dependent repression of proopiomelanocortin gene transcription. *Mol Cell Biol* **9**, 5305–5314
100. Drouin J., Sun Y. L., Chamblerland M., Gauthier Y., De Lean A., Nemer M., Schmidt T. J. (1993) Novel glucocorticoid receptor complex with DNA element of the hormone-repressed POMC gene. *EMBO J* **12**, 145–156
101. Hollenberg A. N., Monden T., Flynn T. R., Boers M. E., Cohen O., Wondisford F. E. (1995) The human thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone through two distinct classes of negative thyroid hormone response elements. *Mol Endocrinol* **9**, 540–550
102. Belandia B., Latasa M. J., Villa A., Pascual A. (1998) Thyroid hormone negatively regulates the transcriptional activity of the beta-amyloid precursor protein gene. *J Biol Chem* **273**, 30366–30371
103. Perez-Juste G., Garcia-Silva S., Aaranda A. (2000) An element in the region responsible for premature termination of transcription mediates repression of *c-myc* gene expression by thyroid hormone in neuroblastoma cells. *J Biol Chem* **275**, 1307–1314
104. Saatcioglu F., Deng T., Karin M. (1993) A novel *cis* element mediating ligand-independent activation by c-ErbA: implications for hormonal regulation. *Cell* **75**, 1095–1105
105. Bigler J. & Eisenman R. N. (1995) Novel location and function of a thyroid hormone response element. *EMBO J* **14**, 5710–5723
106. Xu, J., and Li, Q. (2003) Review of the in vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family. *Mol. Endocrinol.* **17**, 1681–1692
107. Lee, J. W., Lee, Y. C., Na, S. Y., Jung, D. J., and Lee, S. K. (2001) Transcriptional coregulators of the nuclear receptor superfamily: coactivators and corepressors. *Cell Mol. Life Sci.* **58**, 289–297
108. Lee, D. Y., Teyssier, C., Strahl, B. D., and Stallcup, M. R. (2005) Role of protein methylation in regulation of transcription. *Endocr. Rev.* **26**, 147–170
109. Belandia, B., and Parker, M. G. (2003) Nuclear receptors: a rendezvous for chromatin remodeling factors. *Cell* **114**, 277–280
110. Lewis, B. A., and Reinberg, D. (2003) The mediator coactivator complex: functional and physical roles in transcriptional regulation. *J. Cell Sci.* **116**, 3667–3675

111. Taatjes, D. J., Marr, M. T., and Tjian, R. (2004) Regulatory diversity among metazoan co-activator complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **5**, 403–410
112. Kurokawa R., Drenth J., Boehm M., Sugarman J., Gloss B., Rosenfeld M. G., Heyman R. A., Glass C. K. (1994) Regulation of retinoid signalling by receptor polarity and allosteric control of ligand binding. *Nature* **371**, 528–531
113. Garcia-Villalba P., Jimenez-Lara A. M., Aranda A. (1996) Vitamin D interferes with transactivation of the growth hormone gene by thyroid hormone and retinoic acid. *Mol Cell Biol* **16**, 318–327
114. Jimenez-Lara A. M. & Aranda A. (1999) The vitamin D receptor binds in a transcriptionally inactive form and without a defined polarity on a retinoic acid response element. *FASEB J* **13**, 1073–10
115. Jimenez-Lara A. M. & Aranda A. (1999) Vitamin D represses retinoic acid dependent transactivation of the retinoic acid receptor-beta2 promoter: the AF-2 domain of the vitamin D receptor is required for transrepression. *Endocrinology* **140**, 2898–2907
116. Barettono D., Bugge T. H., Bartunek P., Vivanco Ruiz M. D., Sonntagbuck V., Beug H., Zenke M., Stunnenberg H. G. (1993) Unliganded T3R, but not its oncogenic variant, v-*erbA*, suppresses RAR-dependent transactivation by titrating out RXR. *EMBO J* **12**, 1343–1354
117. Seol W., Choi H. S., Moore D. D. (1996) An orphan nuclear hormone receptor that lacks a DNA binding domain and heterodimerizes with other receptors. *Science* **272**, 1336–1339
118. Seol W., Chung M., Moore D. D. (1997) Novel receptor interaction and repression domains in the orphan receptor SHP. *Mol Cell Biol* **17**, 7126–7131
119. Johansson, L. Bavner A., Thomsen J. S., Farnegardh M., Gustafsson J. A., Treuter E. (2000) The orphan nuclear receptor SHP utilizes conserved LXXLL-related motifs for interactions with ligand-activated estrogen receptors. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1124–1133
120. Johansson L., Thomsen J. S., Dandimopoulos A. E., Spyrou G., Gustafsson J. A., Treuter E. (1999) The orphan nuclear receptor SHP inhibits agonist-dependent transcriptional activity of estrogen receptors ERalpha and ERbeta. *J Biol Chem* **274**, 345–353
121. Lee, Y. K., Dell H., Dowhan D. H., Hadzopoulou-Cladaras M., Moore D. D. (2000) The orphan nuclear receptor SHP inhibits hepatocyte nuclear factor 4 and retinoid X receptor transactivation: two mechanisms for repression. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 187–195
122. Ortlund, E. A., Lee Y., Solomon I. H., Hager J. M., Safi R., Choi Y., Guan Z., Tripathy A., Raetz C. R., McDonnell D. P., Moore D. D., Redinbo M. R. (2005) Modulation of human nuclear receptor LRH-1 activity by phospholipids and SHP. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 357–363
123. Borgius, L. J., Steffensen K. R., Gustafsson J. A., Treuter E. (2002) Glucocorticoid signaling is perturbed by the atypical orphan receptor and corepressor SHP. *J. Biol. Chem.* **277**, 49761–49766
124. Lee, Y. K. & Moore, D. D. (2002) Dual mechanisms for repression of the monomeric orphan receptor liver receptor homologous protein-1 by the orphan small heterodimer partner. *J. Biol. Chem.* **277**, 2463–2467
125. Bae, Y., Kemper J. K., Kemper B. (2004) Repression of CAR-mediated transactivation of CYP2B genes by the orphan nuclear receptor, short Heterodimer partner (SHP). *DNA Cell Biol.* **23**, 81–91

126. **Kemper, J., Kim H., Miao J., Bhalla S., Bae Y. (2004)** Role of an mSin3A-Swi/Snf chromatin remodeling complex in the feedback repression of bile acid biosynthesis by SHP. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 7707–7719
127. **Gronemeyer H., Gustafsson J. A. & Laudet V. (2004)** Principles for modulation of nuclear receptor superfamily *Nat. Review* **3**, 950-964
128. **Faus H. & Haendler B. (2006)** Post-translational modifications of steroid receptors. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **60**, 520–528
129. **Soutoglou E., Katrakili N., Talianidis I. (2000)** Acetylation regulates transcription factor activity at multiple levels. *Mol. Cell.* **5**, 745–751
130. **Verma S, Ismail A, Gao X, Fu G, Li X, O'Malley BW, Nawaz Z. (2004)** The ubiquitin-conjugating enzyme UBC7 acts as a coactivator for steroid hormone receptors. *Mol Cell Biol* **24**, 8716–26.
131. **Poukka H., Karvonen U., Jänne O. A., Palvimo J. J. (2000)** Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1). *Proc Natl Acad Sci* **97**,14145–50
132. **Chen H., Lin R. J., Xie W., Wilpitz D., Evans R. M. (1999)** Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. *Cell* **98**, 675–686
133. **Knutti D., Kressler D., Kralli A. (2001)** Regulation of the transcriptional coactivator PGC-1 via MAPK-sensitive interaction with a repressor. *Proc Natl Acad Sci* **98**,9713–9718
134. **Font de Mora J., Brown M. (2000)** AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor *Mol Cell Biol* **20**,5041–5047
135. **Lonard, D. M., Nawaz, Z., Smith, C. L. and O'Malley, B.W. (2000)** The 26S proteasome is required for estrogen receptor- α and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor- α transactivation *Mol Cell* **5**, 939-48.
136. **Yaffe M. B., Schutkowski M., Shen M., Zhou X. Z., Stukenberg P. T., Rahfeld J. U., Xu J., Kuang J., Kirschner M. W., Fischer G., Cantley L. C., Lu K. P. (1997)** Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism. *Science* **278**, 1957–1960
137. **Lu, K.P. (2003)** Prolyl isomerase Pin1 as a molecular target for cancer diagnostics and therapeutics. *Cancer Cell* **4**, 175–180
138. **Lu K. P., Liou Y. C., Zhou X. Z. (2002)** Pinning down the proline-directed phosphorylation signaling. *Trends Cell Biol.* **12**, 164–172
139. **Lu K. P., Hanes S. D., Hunter T. (1996)** A human peptidyl–prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. *Nature* **380**, 544–547
140. **Ranganathan R., Lu K. P., Hunter T., Noel J. P. (1997)** Structural and functional analysis of the mitotic peptidyl–prolyl isomerase Pin1 suggests that substrate recognition is phosphorylation dependent. *Cell* **89**, 875–886
141. **Lu, K.P. (2004)** Pinning down cell signaling, cancer and Alzheimer's disease. *TRENDS in Biochemical Sciences* **29**, 200-209
142. **Brondani V., Schefer Q., Hamy F., Klimkait T. (2005)** The peptidyl–prolyl isomerase Pin1 regulates phospho-Ser⁷⁷ retinoic acid receptor α stability *Bioch. and Bioph. Res. Commun.* **328**, 6–13
143. **Yi P., Wu R. C., Sandquist J., Wong J., Tsai S. Y., Tsai M. J., A. R. Means, Bert W. O'Malley (2007)** Peptidyl-Prolyl Isomerase 1 (Pin1) Serves as a Coactivator of Steroid Receptor by Regulating the Activity of Phosphorylated Steroid Receptor Coactivator 3 (SRC-3/AIB1) *Mol. and Cell. Biology***25**, 9687–9699

144. **Gottlicher M., Heck S., Herrlich P. (1998)** Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J Mol Med* **76**, 480–489,
145. **Gaub M. P., Bellard M., Scheuer I., Chambon P., Sassone-Corsi P. (1990)** Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the *fos-jun* complex. *Cell* **63**, 1267–1276
146. **Pfahl M. (1993)** Nuclear receptor / AP-1 interaction. *Endocr Rev* **14**, 651–658
147. **Wissink S., Van Heerde E. C., Schmitz M. L., Kalkhoven E., Van Der Burg B., Baeuerle P. A., Van Der Saag P. T. (1997)** Distinct domains of the RelA NF-kappaB subunit are required for negative cross-talk and direct interaction with the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* **272**, 22278–22284,
148. **Auphan N, Didinato J. A., Rosette C., Helmbert A., Karin M. (1995)** Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* **270**, 286–290
149. **Caelles C., Gonzalez-Sancho J. M., Munoz A. (1997)** Nuclear hormone receptor antagonism with AP-1 by inhibition of the JNK pathway. *Genes Dev* **11**, 3351–3364
150. **Chen, W. S., Manova, K., Weinstein, D. C., Duncan, S. A., Plump, A. S., Prezioso, V. R., Bachvarova, R. F., and Darnell, J. E., Jr. (1994)** Distribution of the HNF-4 gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos *Genes Dev.* **8**, 2466-2477
151. **Li J., Ning G., Duncan S. A. (2000)** Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4 α . *Genes Dev* **14**, 464-474.
152. **Spath G., Weiss M. C. (1997)** Hepatocyte nuclear factor 4 expression overcomes repression of the hepatic phenotype in dedifferentiated hepatoma cells. *Mol Cell Biol* **17**, 1913-1922.
153. **Hayhurst G. P., Lee Y. H., Lambert G., Ward J. M., Gonzalez F. J. (2001)** Hepatocyte nuclear factor 4 α (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol Cell Biol* **21**, 1393-1403.
154. **Miquerol, L., Lopez, S., Cartier, N., Tulliez, M., Raymondjean, M., and Kahn, A. (1992)** Expression of the L-type pyruvate kinase gene and the hepatocyte nuclear factor 4 transcription factor in exocrine and endocrine pancreas. *J. Biol. Chem.* **269**, 8944–8951
155. **Sladek, F. M., Zhong, W. M., Lai, E., and Darnell, J. E., Jr. (1990)** Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily *Genes Dev.* **4**, 353–2365
156. **Taraviras, S., Monaghan, A. P., Schutz, G., and Kelsey, G. (1994)** Characterization of the mouse HNF-4 gene and its expression during mouse embryogenesis *Mech. Dev.* **48**, 67–79
157. **Sladek, F. M. and Seidel, S. D. (2001)** in Nuclear Receptors and Genetic Disease (Burris, T. P. and McCabe, E., eds.), pp. 309–361, *Academic Press, San Francisco*
158. **Drewes, T., Senkel, S., Holewa, B., and Ryffel, G. U. (1996)** Human Hepatocyte Nuclear Factor 4 isoforms are encoded by distinct and differentially expressed genes *Mol. Cell. Biol.* **16**, 925–931
159. **Holewa, B., Zapp, D., Drewes, T., Senkel, S., and Ryffel, G. U. (1997)** HNF4 β , a new gene of the HNF4 family with distinct activation and expression profiles in oogenesis and embryogenesis of *Xenopus laevis*. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 687–694

160. Chartier, F. L., Bossu, J. P., Laudet, V., Fruchart, J. C., and Laine, B. (1994) Cloning and sequencing of cDNAs encoding the human hepatocyte nuclear factor 4 indicate the presence of two isoforms in human liver. *Gene* **147**, 269–272
161. Furuta, H., Iwasaki, N., Oda, N., Hinokio, Y., Horikawa, Y., Yamagata, K., Yano, N., Sugahiro, J., Ogata, M., Ohgawara, H., Omori, Y., Iwamoto, Y., and Bell, G. I. (1997) Organization and partial sequence of the hepatocyte nuclear factor-4 alpha/MODY1 gene and identification of a missense mutation, R127W, in a Japanese family with MODY. *Diabetes* **46**, 1652–165
162. Hata, S., Inoue, T., Kosuga, K., Nakashima, T., Tsukamoto, T., and Osumi, T. (1995) Identification of two splice isoforms of mRNA for mouse hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4). *Biochim. Biophys. Acta* **1260**, 55–61
163. Hata, S., Tsukamoto, T., and Osumi, T. (1992) A novel isoform of rat Hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4). *Biochim. Biophys. Acta* **1131**, 211–213
164. Kritis, A. A., Argyrokastritis, A., Moschonas, N. K., Power, S., Katrakili, N., Zannis, V. I., Cereghini, S., and Talianidis, I. (1996) Isolation and characterization of a third isoform of human hepatocyte nuclear factor 4. *Gene* **173**, 275–280
165. Nakhei, H., Lingott, A., Lemm, I., and Ryffel, G. U. (1998) An alternative splice variant of the tissue specific transcription factor HNFalpha predominates in undifferentiated murine cell types. *Nucleic Acids Res.* **26**, 497–504
166. Sladek, F.M. (1994) "Hepatocyte Nuclear factor 4 (HNF-4)" chapter in *Liver Gene Expression*, (ed.s F. Tronche, M. Yaniv, R.G. Landes Co., Austin, TX).
167. Ladias, J. A., Hadzopoulou-Cladaras, M., Kardassis, D., Cardot, P., Cheng, J., Zannis, V., and Cladaras, C. (1992) Transcriptional regulation of human apolipoprotein genes apoB, apoCII and apoAII by members of the steroid hormone receptor superfamily HNF-4, ARP-1, EAR-2 and EAR-3. *J. Biol. Chem.* **267**, 15849–15860
168. Mietus-Snyder, M., Sladek, F. M., Ginsburg, G. S., Kuo, C. F., Ladias, J. A., Darnell, J. E., Jr., and Karathanasis, S. K. (1992) Antagonism between apolipoprotein regulatory protein 1, Ear3/Coup-TF and Hepatocyte nuclear factor 4 modulate apolipoprotein CIII gene expression in liver and intestinal cells. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 1708–1718
169. Cardot P., Chambaz J., Kardassis D., Cladaras C., Zannis V. (1993) Factors participating in the liver-specific expression of the human apolipoprotein A-II gene and their significance for transcription. *Biochemistry* **32**, 9080-9093
170. Metzger, S., Halaas, J. L., Breslow, J. L., and Sladek, F. M. (1993) Orphan receptor HNF-4 and bZip protein C/EBP α bind to overlapping regions of the apolipoprotein B gene promoter and synergistically activate transcription. *J. Biol. Chem.* **268**, 16831–16838
171. Ktistaki E., Lacort J., Katrakili N., Zannis V., Talianidis I. (1994) Transcriptional regulation of the apolipoprotein A-IV gene involves synergism between a proximal orphan receptor response element and a distant enhancer located in the upstream promoter region of apolipoprotein C-III gene *Nucleic Acids Re.* **22**, 4689-4696
172. Kardassis, D., Tzamelis, I., Hadzopoulou-Cladaras, M., Talianidis, I., and Zannis, V. (1997) Distal apolipoprotein C-III regulatory elements F to J act as a general modular enhancer of proximal promoters that contain hormone response elements. Synergism between Hepatocyte Nuclear Factor-4 molecules bound to the proximal promoter and distal enhancer sites. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**, 222–232

173. **Kardassis, D., Sacharidou, E., and Zannis, V. I. (1998)** Transactivation of the humal apolipoprotein CII promoter by orphan and ligand-dependent nuclear receptors. The regulatory element CIIC is a thyroid hormone response element *J. Biol. Chem.* **273**, 17810–17816
174. **Hadzopoulou-Cladaras, M., Lavrentiadou, S. N., Zannis, V. I., and Kardassis, D. (1998)** Transactivation of the ApoCIII promoter by ATF-2 and repression by members of the Jun family. *Biochemistry* **37**, 14078–14087
175. **Hall R. K., Sladek F. M., Granner D. K. (1995)** The orphan receptors COUP-TF and HNF-4 serve as accessory factors required for induction of phosphoenolpyruvate kinase gene transcription by glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 412-416
176. **Diaz-Guerra M., Bergot M. O., Martinez A., Cuif M. H., Kahn A., Raymondjean M. (1993)** Functional characterization of the L-type pyruvate kinase gene glucose response element. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7725-7735
177. **Gregori C., Porteu A., Lopez S., Kahn A., Pichard A. L. (1998)** Characterization of the aldolase B intonic enhancer. *Jour. Biol. Chem* **273**, 25237-25243
178. **Nitsch D., Boshart M., Schutz G., (1993)** Activation of the tyrosine aminotransferase gene is dependent on synergy between liver-specific and hormone-responsive elements *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5479-5483
179. **Nishiyori A., Tashiro H., Kimura A., Akagi K., Yamamura K. M. M., Takiguchi M. (1994)** Determination of tissue specificity of the enhancer by combinatorial operation of tissue-enriched transcription factors: both HNF-4 and C/EBP are required for liver-specific activity of the ornithine transcarbamylase enhancer *Jour. Biol. Chem* **269**, 1323-1331
180. **Hardon E. M., Frain M., Paonessa G., Cortese R. (1988)** Two distinct factors interact with the promoter regions of several liver-specific genes *EMBO J.* **7**, 1711-1719
181. **De Fabiani E., Mitro N., Anzulovich A. C., Pinelli A., Galli G., Crestani M. (2001)** The negative effects of bile acids and Tumor Necrosis Factor- α on the transcription of cholesterol 7 α -hydroxylase gene (*CYP7A1*) converge to Hepatic Nuclear Factor-4. A novel mechanism of feedback regulation of bile acid synthesis mediated by nuclear receptors. *Jour. Biol. Chem.* **176**, 30708-30716
182. **Tirona R. G., Lee W., Leake B. F., Lan L. B., Cline C. B., Lamba V., Parviz F., Duncan S. A., Inoue Y., Gonzalez F. J., Schuetz E. G., Kim R. B. (2003)** The orphan nuclear receptor HNF4 α determines PXR- and CAR-mediated xenobiotic induction of CYP3A4. *Nat Med.* **9**, 220-4.
183. **Hatzis P., Talianidis I. (2001)** Regulatory mechanisms controlling human hepatocyte nuclear factor 4 α gene expression. *Mol Cell Biol.* **21**, 7320-30.
184. **Crestani M., Sadeghpour A., Stroup D., Galli G., Chiang J. Y. (1998)** Transcriptional activation of the cholesterol 7 α -hydroxylase gene (*CYP7A*) by nuclear hormone receptors. *J Lipid Res.* **39**, 2192-200
185. **Talianidis I., Tambakaki A., Toursounova J., Zannis V. I. (1995)** Complex interactions between SP1 bound to multiple distal regulatory sites and HNF-4 bound to the proximal promoter lead to transcriptional activation of liver-specific human APOCIII gene. *Biochemistry.* **34**, 10298-309.
186. **Ktistaki E., Talianidis I. (1997)** Modulation of hepatic gene expression by hepatocyte nuclear factor 1. *Science.* **277**, 109-12.
187. **Yamamoto T., Shimano H., Nakagawa Y., Ide T., Yahagi N., Matsuzaka T., Nakakuki M., Takahashi A., Suzuki H., Sone H., Toyoshima H., Sato R.,**

- Yamada N. (2004)** SREBP-1 interacts with hepatocyte nuclear factor-4 alpha and interferes with PGC-1 recruitment to suppress hepatic gluconeogenic genes. *J Biol Chem.* **279**, 12027-35
- 188. Tsuchiya T., Kominato Y., Ueda M. (2002)** Human hypoxic signal transduction through a signature motif in hepatocyte nuclear factor 4. *J Biochem* **132**, 37-44.
- 189. Kardassis D., Pardali K., Zannis V. I. (2000)** SMAD Proteins Transactivate the Human ApoCIII Promoter by Interacting Physically and Functionally with Hepatocyte Nuclear Factor 4 *JBC.* **275**, 41405–41414
- 190. Chou W. C., Prokova V., Shiraishi K., Valcourt U., Moustakas A., Hadzopoulou-Cladaras M., Zannis V. I., Kardassis D. (2003)** Mechanism of a Transcriptional Cross Talk between Transforming Growth Factor- β -regulated Smad3 and Smad4 Proteins and Orphan Nuclear Receptor Hepatocyte Nuclear Factor-4 *Mol. Biol. of the Cell* **14**, 1279–1294
- 191. Lacorte, J. M., Ktistaki, E, Beigneux, A., Zannis, V. I., Chambaz, J. and Talianidis, I. (1997)** Activation of CAAT enhancer-binding protein delta (C/EBPdelta) by interleukin-1 negatively influences apolipoprotein C-III expression. *J. Biol. Chem.* **272**, 23578–23584
- 192. Lacorte, J. M., Beigneux, A., Parant, M. and Chambaz, J. (1997)** Repression of apoC-III gene expression by TNF α involves C/EBP δ /NF-IL6 β via an IL-1 independent pathway. *FEBS Lett.* **415**, 217–220
- 193. Reijnen M. J., Sladek F. M., Bertina R. M., Reitsma P. H. (1992)** Disruption of a binding site for hepatocyte nuclear factor 4 results in hemophilia B Leyden. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**, 6300-3
- 194. Naka H., Brownlee G. G. (1996)** Transcriptional regulation of the human factor IX promoter by the orphan receptor superfamily factor, HNF4, ARP1 and COUP/Ear3. *Br J Haematol.* **92**, 231-40
- 195. Arbin A. A., Pollak E. S., Bayleran J. K., High K. A., Bauer K. A. (1997)** Severe factor VII deficiency due to a mutation disrupting a hepatocyte nuclear factor 4 binding site in the factor VII promoter. *Blood.* **89**, 176-82.
- 196. Garcia A. D., Ostapchuk P., Hearing P. (1993)** Functional interaction of nuclear factors EF-C, HNF-4, and RXR alpha with hepatitis B virus enhancer I. *J Virol.* **67**, 3940-50.
- 197. Yamagata K., Furuta H., Oda N., Kaisaki P. J., Menzel S., Cox N. J., Fajans S. S., Signorini S., Stoffel M., Bell G. I. (1996)** Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1) *Nature.* **384**, 458-60
- 198. Ryffel G. U. (2001)** Mutations in the human genes encoding the transcription factors of the hepatocyte nuclear factor (HNF)1 and HNF4 families: functional and pathological consequences. *J Mol Endocrinol.* **27**, 11-29.
- 199. Malecki M. T., Yang Y., Antonellis A., Curtis S., Warram J. H., Krolewski A. S. (1999)** Identification of new mutations in the hepatocyte nuclear factor 4alpha gene among families with early onset Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* **16**, 193-200
- 200. Shih D. Q., Dansky H. M., Fleisher M., Assmann G., Fajans S. S., Stoffel M. (2000)** Genotype/phenotype relationships in HNF-4alpha/MODY1: haploinsufficiency is associated with reduced apolipoprotein (AII), apolipoprotein (CIII), lipoprotein(a), and triglyceride levels. *Diabetes.* **49**, 832-7
- 201. Zhong W., Mirkovitch J., Darnell J. E. (1994)** Tissue-specific regulation of mouse hepatocyte nuclear factor 4 expression. *Mol Cell Biol.* **14**, 7276-84

202. Swevers L., Iatrou K. (1998) The orphan receptor BmHNF-4 of the silkworm *Bombyx mori*: ovarian and zygotic expression of two mRNA isoforms encoding polypeptides with different activating domains. *Mech Dev.* **72**, 3-13.
203. Kapitskaya M. Z., Dittmer N. T., Deitsch K. W., Cho W. L., Taylor D. G., Leff T., Raikhel A. S. (1998) Three isoforms of a hepatocyte nuclear factor-4 transcription factor with tissue- and stage-specific expression in the adult mosquito. *J Biol Chem.* **273**, 29801-10.
204. Hertz, R., Magenheimer, I., Berman, I., Bar-Tana, J., (1998) Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4 α . *Nature.* **392**, 512-516
205. Duda, K., Chi, Y. I. and Shoelson, S. E. (2004) Structural basis for HNF-4 α activation by ligand and co-activator binding. *J. Biol. Chem.* **279**, 23311-23316
206. Dhe-Paganon, S., Duda, K., Iwamoto, M., Chi, Y.-I. and Shoelson, S. E. (2002) Crystal structure of the HNF-4 α ligand binding domain in complex with endogenous fatty acid ligand. *J. Biol. Chem.* **277**, 37973-37976
207. Wisely, B. G., Miller, A. B., Davis, R. G., Thornquest, A. D., Johnson, R., Spitzer, T., Sefler, A., Shearer, B., Moore, J. T., Miller, A. B. et al. (2002) Hepatocyte nuclear factor 4 is a transcription factor that constitutively binds fatty acids. *Structure* **10**, 1225-1234
208. Ruse, Jr, M. D., Privalsky, M. L. and Sladek, F. M. (2002) Competitive cofactor recruitment by orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4 α 1: modulation by the F domain. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 1626-1638
209. Thomas H., Jaschowitz K., Bulman M., Frayling T. M., Mitchell S. M., Roosen S., Lingott-Frieg A., Tack C. J., Ellard S., Ryffel G. U., Hattersley A. T. (2001) A distant upstream promoter of the HNF-4 α gene connects the transcription factors involved in maturity-onset diabetes of the young. *Hum Mol Genet.* **10**, 2089-97.
210. Sladek F. M., Ruse M. D. Jr, Nepomuceno L., Huang S. M., Stallcup M. R. (1999) Modulation of transcriptional activation and coactivator interaction by a splicing variation in the F domain of nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4 α . *Mol Cell Biol.* **19**, 6509-22.
211. Torres-Padilla M. E., Fougere-Deschatrette C., Weiss M. C. (2001) Expression of HNF4 α isoforms in mouse liver development is regulated by sequential promoter usage and constitutive 3' end splicing. *Mech Dev.* **109**, 183-93
212. Torres-Padilla M. E., Sladek F. M., Weiss M. C. (2002) Developmentally regulated N-terminal variants of the nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4 α mediate multiple interactions through coactivator and corepressor-histone deacetylase complexes. *J Biol Chem.* **277**, 44677-87
213. Jiang G., Nepomuceno L., Yang Q., Sladek F. M. (1997) Serine/threonine phosphorylation of orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4. *Arch Biochem Biophys* **340**, 1-9.
214. Viollet B., Kahn A., Raymondjean M. (1997) Protein Kinase A-Dependent Phosphorylation Modulates DNA-Binding Activity of Hepatocyte Nuclear Factor-4. *Molecular and Cellular Biology* **17**, 4208-4219
215. Martinez-Jimenez C. P., Gomez-Lechon M. J., Castell J. V., Jover R. (2006) Underexpressed Coactivators PGC1 α AND SRC1 Impair Hepatocyte Nuclear Factor 4 α Function and Promote Dedifferentiation in Human Hepatoma Cells *J Biol Chem* **281**, 29840-29849
216. Wang, J. C., Stafford, M. J. and Granner, D. K. (1998) SRC-1 and GRIP1 coactivate transcription with hepatocyte nuclear factor 4. *J. Biol. Chem.* **273**, 30847-30850

217. Iordanidou, P., Aggelidou, E., Demetriades, C. and Hadzopoulou-Cladaras, M. (2005) Distinct amino acid residues may be involved in co-activator and ligand interactions in hepatocyte nuclear factor-4 α . *J. Biol. Chem.* **280**, 21810–21819
218. Dell, H. and Hadzopoulou-Cladaras, M. (1999) CREB-binding protein is a transcriptional co-activator for hepatocyte nuclear factor-4 and enhances apolipoprotein gene expression. *J. Biol. Chem.* **274**, 9013–9021
219. Green V. J., Kokkotou E., Ladias J. A. (1998) Critical structural elements and multitarget protein interactions of the transcriptional activator AF-1 of hepatocyte nuclear factor 4. *J Biol Chem.* **273**, 29950-7
220. Kistanova E., Dell H., Tsantili P., Falvey E., Cladaras C., Hadzopoulou-Cladaras M. (2001) The activation function-1 of hepatocyte nuclear factor-4 is an acidic activator that mediates interactions through bulky hydrophobic residues. *Biochem J.* **356**, 635-42.
221. Puigserver, P., Wu, Z., Park, C. W., Graves, R., Wright, M., and Spiegelman, B. M. (1998) A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**, 829–839
222. Knutti, D., and Kralli, A. (2001) PGC-1, a versatile coactivator. *Trends Endocrinol. Metab.* **12**, 360–365
223. Bhalla, S., Ozalp, C., Fang, S., Xiang, L., and Kemper, J. K. (2004) Ligand-activated pregnane X receptor interferes with HNF-4 signaling by targeting a common coactivator PGC-1 α . Functional implications in hepatic cholesterol and glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* **279**, 45139–45147
224. Yoon, J. C., Puigserver, P., Chen, G., Donovan, J., Wu, Z., Rhee, J., Adelmant, G., Stafford, J., Kahn, C. R., Granner, D. K., Newgard, C. B., and Spiegelman, B. M. (2001) Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* **413**, 131–138
225. Rhee, J., Inoue, Y., Yoon, J. C., Puigserver, P., Fan, M., Gonzalez, F. J., and Spiegelman, B. M. (2003) Regulation of hepatic fasting response by PPAR γ coactivator-1 α (PGC-1): requirement for hepatocyte nuclear factor 4 α in gluconeogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 4012–4017
226. Petkovich M., Brand N. J., Krust A. and Chambon P. (1987) A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* **330**: 444–450
227. Giguere V., Ong E. S., Segui P. and Evans R. M. (1987) Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* **330**: 624–629
228. Mangelsdorf D. J., Ong E. S., Dyck J. A., and Evans R. M. (1990) Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* **345**, 224–229.
229. Germain P., Chambon P., Eichele G., Evans R. M., Lazar M. A., Leid M., De Lera A. R., Lotan R., Mangelsdorf D. J., Gronemeyer H. (2006) International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X Receptors *Pharmacol Rev* **58**, 760–772
230. Szanto A., Narkar V., Shen Q., Uray I. P., Davies P. J. A. and Nagy L. (2004) Retinoid X receptors: X-ploring their (patho)physiological functions *Cell Death and Differentiation* **11**, S126–S143
231. Kastner P., Grondona J. M., Mark M., Gansmuller A., LeMeur M., Decimo D., Vonesch J. L., Dolle P., and Chambon P. (1994) Genetic analysis of RXR α developmental function: convergence of RXR and RAR signaling pathways in heart and eye morphogenesis. *Cell* **78**, 987–1003.

232. **Sucov H. M., Dyson E., Gumeringer C. L., Price J., Chien K. R., and Evans R. M. (1994)** RXR α mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis. *Genes Dev* **8**, 1007–1018.
233. **Wan Y. J., An D., Cai Y., Repa J. J., Hung-Po Chen T., Flores M., Postic C., Magnuson M. A., Chen J., Chien K. R., et al. (2000)** Hepatocyte-specific mutation establishes retinoid X receptor α as a heterodimeric integrator of multiple physiological processes in the liver. *Mol Cell Biol* **20**, 4436–4444.
234. **Zannis V. I., Kan H. Y., Kritis A., Zanni E. E., Kardassis D. (2001)** Transcriptional regulatory mechanisms of the human apolipoprotein genes in vitro and in vivo. *Curr Opin Lipidol.* **12**, 181-207.
235. **Glass C. K. (1994)** Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev* **15**, 391–407.
236. **Adam-Stitah, S., Penna, L., Chambon, P., Rochette-Egly, C (1999)** Hyperphosphorylation of the retinoid X receptor alpha (RXR α) by activated c-Jun N terminal kinases (JNKs). *J. Biol. Chem.* **274**, 18932– 18941
237. **Bastien, J., Adam-Stitah, S., Plassat, J.L., Chambon, P., Rochette-Egly, C. (2002)** The phosphorylation site located in the A region of RXR α is required for the anti proliferative effect of retinoic acid and the activation of RA-target genes in F9 cells. *J. Biol. Chem.* **24**, 24.
238. **Gianni, M., Tarrade, A., Nigro, E.A., Garattini, E., Rochette-Egly, C (2003)** The AF-1 and AF-2 domains of RAR gamma 2 and RXR alpha cooperate for triggering the transactivation and the degradation of RAR gamma 2/RXR alpha heterodimers. *J. Biol. Chem.* **278**, 34458–34466
239. **Matsushima-Nishiwaki, R., Okuno, M., Adachi, S., Sano, T., Akita, K., Moriwaki, H., Friedman, S.L., Kojima, S. (2001)** Phosphorylation of retinoid X receptor alpha at serine 260 impairs its metabolism and function in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* **61**, 7675– 7682
240. **Zhang J., Hu X., and Lazar M. A. (1999)** A novel role for helix 12 of retinoid X receptor in regulating repression. *Mol Cell Biol* **19**, 6448–6457.
241. **Leblanc B. P. and Stunnenberg H. G. (1995)** 9-*cis* retinoic acid signaling: changing partners causes some excitement. *Genes Dev* **9**,1811–1816.
242. **Westin S., Kurokawa R., Nolte R. T., Wisely G. B., McInerney E. M., Rose D. W., Milburn M. V., Rosenfeld M. G., and Glass C. K. (1998)** Interactions controlling the assembly of nuclear-receptor heterodimers and co-activators. *Nature* **395**, 199–202.
243. **Chen, J.D. (2000)** Steroid/nuclear receptor coactivators. *Vitam. Horm.* **58**, 391–448
244. **McKenna, N.J., O'Malley, B.W., (2002)** Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* **108**, 465– 474.
245. **Vo, N., Goodman, R.H., (2001)** CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* **276**, 13505– 13508.
246. **Delerville P., Wu Y., Burris T. P., Chin W. W., and Suen C. S. (2002)** PGC-1 functions as a transcriptional coactivator for the retinoid X receptors. *J Biol Chem* **277**, 3913–3917.
247. **Yen P. M. (2001)** Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev.* **81**,1097–1142.
248. **Zhang J. and Lazar M. A. (2000)** The mechanism of action of thyroid hormones *Annu. Rev. Physiol.* **62**, 439–66
249. **Viguerie N. and Langin D. (2003)** Effect of thyroid hormone on gene expression. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **6**, 377–381

250. Flores-Morales A, Gullberg H, Fernandez L, et al. (2002) Patterns of liver gene expression governed by TRbeta. *Mol Endocrinol* **16**, 1257–1268.
251. Farsseti A., Desvergne B., Hallbeck P., Rpbbins J., Nikodem V. M. (1992) Characterization of myelin basic protein thyroid hormone response element and its function in the context of native and heterologous promoter. *J Biol Chem* **267**, 15784–15788
252. Suen S. & Chin W. W. (1993) Ligand-dependent, Pit-1/GH-1-independent, transcriptional stimulation of rat growth hormone gene expression by thyroid hormone receptors in vitro. *Mol Cell Biol* **13**, 1719–1727,
253. Ye Z. S., Forman B. M., Aranda A., Pascual A., Park H. Y., Casanova J., Samuels H. H. (1988) Rat growth hormone gene expression. Both cell-specific and thyroid hormone response elements are required for thyroid hormone regulation. *J Biol Chem* **263**, 7821–7829
254. Hadzic E., Habeos I., Raaka B. M., Samuels H. H. (1998) A novel multifunctional motif in the amino-terminal A/B domain of T3Ralpha modulates DNA binding and receptor dimerization. *J Biol Chem* **273**, 10270–10278
255. Judelson C. & Privalsky M. L. (1996) DNA recognition by normal and oncogenic thyroid hormone receptors. Unexpected diversity in half-site specificity controlled by non-zinc finger determinants. *J Biol Chem* **271**, 10800–10805
256. Hollenberg A. N., Monden T., Madura J. P., Lee K., Wondisford F. E. (1996) Function of nuclear co-repressor protein on thyroid hormone response elements is regulated by the receptor A/B domain. *J. Biol. Chem.* **271**, 28516–20
257. Forman B. M., Yang C. R., Au M., Casanova J., Ghysdael J., et al. (1989). A domain containing leucine-zipper-like motifs mediates novel in vivo interactions between the thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Mol. Endocrinol.* **3**, 1610–26
258. Evans R. M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* **240**, 889–895
259. Rose D. W., Lambert M. H., Milburn M. V., Glass C. K., Rosenfeld M. G. (1999) Molecular determinants of nuclear receptor-corepressor interaction. *Genes Dev* **13**, 3198–3208
260. Williams G. R. AND Brend G. A. (1995) Thyroid hormone response elements. In: *Molecular Endocrinology: Basic Concepts and Clinical Correlations*, edited by Weintraub B. New York: Raven p217–239.
261. Yen P. M., Wilcox E. C., Hayashi Y., Refetoff S., Chin W. W. (1995) Studies on the repression of basal transcription (silencing) by artificial and natural thyroid hormone receptor-b mutants. *Endocrinology* **136**, 2845–2851
262. Zannis, V., Kypreos, K., Chroni, A., Kardassis, D., Zanni E. E., (2005) Lipoproteins and Atherogenesis. In: *Molecular Mechanism of Atherosclerosis*. Loscalzo, J. Edit p111-174
263. Zannis V. I., Kardassis D., Zanni E. E. (1993) Genetic mutations affecting human lipoproteins, their receptors, and their enzymes. *Adv Hum Genet* **21**, 145-319
264. Warden, C. H., Daluiski, A., Bu, X., Purcell-Huynh, D. A., De Meester, C., Shieh, B.-H., Puppione, D. L., Gray, R. M., Reaven, G. M., Chen, Y.-D. I., Rotter, J. I., Lusis, A. J. (1993) Evidence for linkage of the apolipoprotein A-II locus to plasma apolipoprotein A-II and free fatty acid levels in mice and humans. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **90**, 10886-10890

265. **Hussain M. M., Zannis V. I. (1990)** Intracellular modification of human apolipoprotein AII (apoAII) and sites of apoAII mRNA synthesis: comparison of apoAII with apoCII and apoCIII isoproteins. *Biochemistry*. **29**, 209-17
266. **Chambaz J., Cardot P., Pastier D., et al. (1991)** Promoter elements and factors required for hepatic transcription of the human apoA-II gene. *J Biol Chem* **266**, 11676-11685
267. **Ribeiro A., Pastier D., Kardassis D., Chambaz J., Cardot P. (1999)** Cooperative binding of upstream stimulatory factor and hepatic nuclear factor 4 drives the transcription of the human apolipoprotein A-II gene. *J Biol Chem*. **274**, 1216-25.
268. **Allayee, H., Castellani, L. W., Cantor, R. M., de Bruin, T. W. A., Lysis, A. J. (2003)** Biochemical and genetic association of plasma apolipoprotein A-II levels with familial combined hyperlipidemia. *Circ. Res.* **92**, 1262-1267
269. **Takada, D., Emi, M., Ezura, Y., Nobe, Y., Kawamura, K., Iino, Y., Katayama, Y., Xin, Y., Wu, L. L., Larringa-Shum, S., Stephenson, S. H., Hunt, S. C., Hopkins, P. N. (2002)** Interaction between the LDL-receptor gene bearing a novel mutation and a variant in the apolipoprotein A-II promoter: molecular study in a 1135-member familial hypercholesterolemia kindred. *J. Hum. Genet.* **47**, 656-664
270. **Cladaras C., Hadzopoulou-Cladaras M., Nolte R. T., Atkinson D., Zannis V. I. (1986)** The complete sequence and structural analysis of human apolipoprotein B-100: relationship between apoB-100 and apoB-48 forms. *EMBO J.* **5**, 3495-507
271. **Young, S. G.; Bertics, S. J.; Curtiss, L. K.; Dubois, B. W.; Witztum, J. L. (1987)** Genetic analysis of a kindred with familial hypobetalipoproteinemia: evidence for two separate gene defects: one associated with an abnormal apolipoprotein B species, apolipoprotein B-37; and a second associated with low plasma concentrations of apolipoprotein B-100. *J. Clin. Invest.* **79**: 1842-1851
272. **Farese R. V., Ruland S. L., Flynn L. M., Stokowski R. P., Young S. G. (1995)** Knockout of the mouse apolipoprotein B gene results in embryonic lethality in homozygotes and protection against diet-induced hypercholesterolemia in heterozygotes. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92**, 1774-8
273. **McCormick SP, Ng JK, Véniant M, Borén J, Pierotti V, Flynn LM, Grass DS, Connolly A, Young SG. (1996)** Transgenic mice that overexpress mouse apolipoprotein B. Evidence that the DNA sequences controlling intestinal expression of the apolipoprotein B gene are distant from the structural gene. *J Biol Chem.* **271**, 11963-70
274. **Ignatius M. J., Gebicke-Harter P. J., Skene J. H., Schilling J. W., Weisgraber K. H., Mahley R. W., Shooter E. M. (1986)** Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA.* **83**, 1125-9
275. **Shih SJ, Allan C, Grehan S, Tse E, Moran C, Taylor JM. (2000)** Duplicated downstream enhancers control expression of the human apolipoprotein E gene in macrophages and adipose tissue. *J Biol Chem.* **275**, 31567-72
276. **Zannis V. I., Breslow J. L., Utermann G., Mahley R. W., Weisgraber K. H., Havel R. J., Goldstein J. L., Brown M. S., Schonfeld G., Hazzard W. R., Blum C. (1982)** Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes. *J. Lipid. Res.* **23**, 911-4
277. **Corder E. H., Saunders A. M., Strittmatter W. J., Schmechel D. E., Gaskell P. C., Small G. W., Roses A. D., Haines J. L., Pericak-Vance M. A.**

- (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* **261**, 921-923
278. **Allan C. M., Walker D., Segrest J. P., Taylor J. M. (1995)** Identification and characterization of a new human gene (APOC4) in the apolipoprotein E, C-I, and C-II gene locus. *Genomics*. **28**, 291-300
279. **Simonet W. S., Bucay N., Lauer S. J., Taylor J. M. (1993)** A far-downstream hepatocyte-specific control region directs expression of the linked human apolipoprotein E and C-I genes in transgenic mice. *J Biol Chem*. **268**, 8221-9
280. **Baggio G., Manzato E., Gabelli C., Fellin R., Martini S., Enzi G. B., Verlatto F., Baiocchi M. R., Sprecher D. L., Kashyap M. L., Brewer H. B. Jr., Crepaldi G. (1986)** Apolipoprotein C-II deficiency syndrome: clinical features, lipoprotein characterization, lipase activity, and correction of hypertriglyceridemia after apolipoprotein C II administration in two affected patients. *J. Clin. Invest.* **77**, 520-527
281. **Brown W. V., Baginsky M. L. (1972)** Inhibition of lipoprotein lipase by an apoprotein of human very low density lipoprotein. *Biochem Biophys Res Commun*. **46**, 375-82
282. **Shelburne F., Hanks J., Meyers W., Quarfordt S. (1980)** Effect of apoproteins on hepatic uptake of triglyceride emulsions in the rat. *J Clin Invest.* **65**, 652-8
283. **Windler E, Chao Y, Havel RJ. (1980)** Regulation of the hepatic uptake of triglyceride-rich lipoproteins in the rat. Opposing effects of homologous apolipoprotein E and individual C apoproteins. *J Biol Chem*. **255**, 8303-7
284. **Zannis V. I., Cole F. S., Jackson C. L., Kurnit D. M., Karathanasis S. K. (1985)** Distribution of apolipoprotein A-I, C-II, C-III, and E mRNA in fetal human tissues. Time-dependent induction of apolipoprotein E mRNA by cultures of human monocyte-macrophages. *Biochemistry*. **24**, 4450-5
285. **Haddad I. A., Ordovas J. M., Fitzpatrick T., Karathanasis S. K. (1986)** Linkage, evolution, and expression of the rat apolipoprotein A-I, C-III, and A-IV genes. *J Biol Chem*. **261**, 13268-77
286. **Lavrentiadou SN, Hadzopoulou-Cladaras M, Kardassis D, Zannis VI. (1999)** Binding specificity and modulation of the human ApoCIII promoter activity by heterodimers of ligand-dependent nuclear receptors. *Biochemistry*. **38**, 964-75
287. **Ogami K., Hadzopoulou-Cladaras M., Cladaras C., Zannis V. I. (1990)** Promoter elements and factors required for hepatic and intestinal transcription of the human ApoCIII gene. *J Biol Chem*. **265**, 9808-15
288. **Ginsburg G. S., Ozer J., Karathanasis S. K. (1995)** Intestinal apolipoprotein AI gene transcription is regulated by multiple distinct DNA elements and is synergistically activated by the orphan nuclear receptor, hepatocyte nuclear factor 4. *J Clin Invest.* **96**, 528-38
289. **Karathanasis S. K., Yunis I., Zannis V. I. (1986)** Structure, evolution and tissue-specific synthesis of human apolipoprotein A-IV. *Biochemistry*; **25**, 3962-3970.
290. **Weinberg, R. B., and Scanu. A. M. (1983).** Isolation and characterization of human apolipoprotein A-IV from lipoprotein-depleted serum. *J. Lipid Res.* **24**: 52-59
291. **Cohen R. D., Castellani L. W., Qiao J.-H., Van Lenten B. J., Lusis A. J., Reue K. (1997)** Reduced aortic lesions and elevated high density lipoprotein

- levels in transgenic mice overexpressing mouse apolipoprotein A-IV. *J. Clin. Invest.* **99**, 1906-1916
292. **Gabay, C., and Kushner. I. (1999)** Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N. Engl. J. Med.* **340**, 448–454
 293. **Yoo, J. Y., and Desiderio. S. (2003)** Innate and acquired immunity intersect in a global view of the acute-phase response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 1157–1162
 294. **Khovidhunkit W., Kim M. S., Memon R. A., Shigenaga J. K., Moser A. H., Feingold K. R., et al. (2004)** Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J Lipid Res* **45**, 1169- 96
 295. **Pickup, J. C., and Crook. M. A. (1998)** Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia.* **41**, 1241–1248
 296. **Pradhan, A. D., and Ridker. P. M. (2002).** Do atherosclerosis and type 2 diabetes share a common inflammatory basis? *Eur. Heart J.* **23**, 831–834
 297. **Huerta, M. G., and Nadler. J. L. (2002)** Role of inflammatory pathways in the development and cardiovascular complications of type 2 diabetes. *Curr. Diab. Rep.* **2**, 396–402
 298. **Grimble, R. F. (2002).** Inflammatory status and insulin resistance. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* **5**, 551–559
 299. **Yudkin, J. S., Kumari M., Humphries S. E., and Mohamed-Ali V. (2000).** Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis.* **148**, 209–214
 300. **Sharma, R., Al-Nasser F. O., and Anker S. D. (2001)** The importance of tumor necrosis factor and lipoproteins in the pathogenesis of chronic heart failure. *Heart Fail. Monit.* **2**, 42–47
 301. **Young, J. L., Libby P., and Schonbeck. U. (2002).** Cytokines in the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb. Haemost.* **88**, 554–567
 302. **Hardardóttir, I., Grunfeld C., and Feingold. K. R. (1995)** Effects of endotoxin on lipid metabolism. *Biochem. Soc. Trans.* **23**, 1013–1018
 303. **Khovidhunkit, W., Memon R. A., Feingold K. R., and Grunfeld. C. (2000)** Infection and inflammation-induced proatherogenic changes of lipoproteins. *J. Infect. Dis.* **181**, 462–472.
 304. **Hsu, H., Huang, J., Shu, H.-B., Baichwal, V., and Goeddel, D. V. (1996)** TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* **4**, 387–396
 305. **Kelliher, M. A., Grimm, S., Ishida, Y., Kuo, F., Stanger, B. Z., and Leder, P. (1998)** The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity* **8**, 297–303
 306. **Devin, A., Cook, A., Lin, Y., Rodriguez, Y., Kelliher, M., and Liu, Z. (2000)** The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity* **12**, 419–429
 307. **Devin, A., Lin, Y., and Liu, Z. G. (2003)** The role of the death-domain kinase RIP in tumour-necrosis-factor-induced activation of mitogen-activated protein kinases. *EMBO Rep.* **4**, 623–627
 308. **Beinke, S. and Ley, S.C. (2004)** Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem J.* **382**,393-409
 309. **Tsatsanis C. (2006)** Tpl2 kinase. *AfCS-Nature Molecule Pages.* doi:10.1038/mp.a000092.01

310. **Palombella V. J., Rando O. J., Goldberg A. L., Maniatis T. (1994)** The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- κ B precursor protein and the activation of NF- κ B. *Cell* **78**, 773–785
311. **Koutsodontis, G., Moustakas, A. and Kardassis, D. (2002)** The role of Sp1 family members, the proximal GC-rich motifs and the upstream enhancer region in the regulation of the human cell cycle inhibitor p21WAF-1/Cip1 gene promoter. *Biochemistry* **41**, 12771–12784
312. **Koj, A. (1998)** Termination of acute-phase response: role of some cytokines and anti-inflammatory drugs. *Gen. Pharmacol.* **31**, 9–18
313. **Shull, M. M., Ormsby, I., Kier, A. B., Pawlowski, S., Diebold, R. J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., Calvin, D. et al. (1992)** Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* **359**, 693–699
314. **Moustakas, A., Souchelnytskyi, S. and Heldin, C. H. (2001)** Smad regulation in TGF- β signal transduction. *J. Cell Sci.* **114**, 4359–4369
315. **Massague, J. (1998)** TGF- β signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 753–791
316. **ten Dijke, P. and Hill, C. S. (2004)** New insights into TGF- β –Smad signalling. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 265–273
317. **Hatzivassiliou, E. and Mosialos, G. (2002)** Cellular signalling pathways engaged by the Epstein–Barr virus transforming protein LMP1. *Front. Biosci.* **7**, 319–329
318. **Schiller, M., Javelaud, D. and Mauviel, A. (2004)** TGF- β -induced SMAD signalling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *J. Dermatol. Sci.* **35**, 83–92
319. **Verrecchia, F., Wagner, E. F. and Mauviel, A. (2002)** Distinct involvement of the Jun-N-terminal kinase and NF- κ B pathways in the repression of the human COL1A2 gene by TNF- α . *EMBO Rep.* **3**, 1069–1074
320. **Kan, H-Y., Georgopoulos, S. and Zannis, V. I. (2000)** A hormone response element in the human apolipoprotein CIII (ApoCIII) enhancer is essential for intestinal expression of the ApoA-I and ApoCIII genes and contributes to the hepatic expression of the two linked genes in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **275**, 30423–30431
321. **Li, X., Salisbury-Rowswell, J., Murdock, A. D., Forse, R. A. and Burke, P. A. (2002)** Hepatocyte nuclear factor 4 response to injury involves a rapid decrease in DNA binding and transactivation via a JAK2 signal transduction pathway. *Biochem. J.* **368**, 203–211
322. **Chen F., Castranova V., Shi X. (2001)** New Insights into the Role of Nuclear Factor- κ B in Cell Growth Regulation *American Journal of Pathology.* **159** 387-397
323. **McFarland E. D. C., Izumi K. M., Mosialos G., (1999)** Epstein-barr virus transformation: involvement of latent membrane protein 1-mediated activation of NF- κ B *Oncogene*, **18**, 6959-6964
324. **Mosialos G., Birkenbach M, Yalamanchili R, VanArsdale T, Ware C, Kieff E. (1995)** The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family *Cell*, **80**, 389-399
325. **Mosialos G., (1997)** The role of Rel/NF- κ B proteins in viral oncogenesis and the regulation of viral transcription. *Semin. in Cancer Biol.*, **8**, 121-129.
326. **Sheppard K. A., Rose D. W., Haque Z. K., Kurokawa R., McInerney E., Westin S., Thanos D., Rosenfeld M. G., Glass C.K., Collins T. (1999)**

- Transcriptional activation by NF-kappaB requires multiple coactivators. *Molecular and Cellular Biology*, **19**, 6367-6378
- 327. Longley D. B., Harkin D. P., Johnston P. G. (2003)** 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*. **3**, 330-8.
- 328. Devergne O., Hatzivassiliou E., Izumi K. M., Kaye K. M., Kleijnen M. F., Kieff E., Mosialos G. (1996)** Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol*. **16**:7098-108.
- 329. Sylla B. S., Hung S. C., Davidson D. M., Hatzivassiliou E., Malinin N. L., Wallach D., Gilmore T. D., Kieff E., Mosialos G. (1998)** Epstein-Barr virus-transforming protein latent infection membrane protein 1 activates transcription factor NF-kappaB through a pathway that includes the NF-kappaB-inducing kinase and the IkappaB kinases IKKalpha and IKKbeta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**:10106-11.
- 330. Mitchell T., Sugden B. (1995)** Stimulation of NF-kappa B-mediated transcription by mutant derivatives of the latent membrane protein of Epstein-Barr virus. *J Virol*. **69**:2968-76.

Δημοσιεύσεις

Inhibition of hepatocyte nuclear factor 4 transcriptional activity by the nuclear factor κ B pathway

Varvara NIKOLAIDOU-NEOKOSMIDOU, Vassilis I. ZANNIS and Dimitris KARDASSIS¹

Department of Basic Sciences, University of Crete Medical School and Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation of Research and Technology Hellas (IMBB-FORTH), Heraklion 71003, Crete, Greece

HNF-4 (hepatocyte nuclear factor 4) is a key regulator of liver-specific gene expression in mammals. We have shown previously that the activity of the human APOC3 (apolipoprotein C-III) promoter is positively regulated by the anti-inflammatory cytokine TGF β (transforming growth factor β) and its effectors Smad3 (similar to mothers against decapentaplegic 3) and Smad4 proteins via physical and functional interactions between Smads and HNF-4. We now show that the pro-inflammatory cytokine TNF α (tumour necrosis factor α) antagonizes TGF β for the regulation of APOC3 gene expression in hepatocytes. TNF α was a strong inhibitor of the activity of apolipoprotein promoters that harbour HNF-4 binding sites and this inhibition required HNF-4. Using specific inhibitors of TNF α -induced signalling pathways, it was shown that inhibition of the APOC3 promoter by TNF α involved NF- κ B (nuclear factor κ B). Latent membrane protein 1 of the Epstein–Barr virus, which is an established potent activator of NF- κ B as well as wild-type forms of various NF- κ B signalling mediators, also inhibited strongly the APOC3 promoter and the transactivation function of HNF-4. TNF α had no effect on the stability or the nuclear localization of HNF-4 in HepG2 cells,

but inhibited the binding of HNF-4 to the proximal APOC3 HRE (hormone response element). Using the yeast-transactivator-GAL4 system, we showed that both AF-1 and AF-2 (activation functions 1 and 2) of HNF-4 are inhibited by TNF α and that this inhibition was abolished by overexpression of different HNF-4 co-activators, including PGC-1 (peroxisome-proliferator-activated-receptor- γ co-activator 1), CBP [CREB (cAMP-response-element-binding protein) binding protein] and SRC3 (steroid receptor co-activator 3). In summary, our findings indicate that TNF α , or other factors that trigger an NF- κ B response in hepatic cells, inhibit the transcriptional activity of the APOC3 and other HNF-4-dependent promoters and that this inhibition could be accounted for by a decrease in DNA binding and the down-regulation of the transactivation potential of the AF-1 and AF-2 domains of HNF-4.

Key words: apolipoprotein C-III (APOC3), co-activators hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4), nuclear factor κ B (NF- κ B), transcriptional inhibition, tumour necrosis factor α (TNF α).

INTRODUCTION

HNF-4 (hepatocyte nuclear factor 4) belongs to the hormone nuclear receptor gene superfamily of transcription factors on the basis of its domain architecture, which is characterized by the presence of an N-terminal AF-1 (activation function 1), a DBD (DNA-binding domain) of the zinc-finger type and a multifunctional LBD (ligand-binding domain) which harbours AF-2 and is connected with the DBD by a hinge region [1–4]. Although HNF-4 belongs to a subclass of nuclear receptors termed ‘orphan receptors’, it was recently shown that fatty acids may constitute endogenous ligands of HNF-4 [5–7]. HNF-4 also harbours an inhibitory C-terminal domain which modulates the binding of co-activators to the adjacent AF-2 [4,8]. The AF-1 and AF-2 domains of HNF-4 have been shown to interact with different members of the p160 family of co-activators, including SRC1 (steroid receptor co-activator 1) and GRIP1 (glucocorticoid receptor interacting protein-1)/TIF2 (transcriptional intermediary factor 2) [9–11], as well as with the histone acetyltransferase CBP [CREB (cAMP-response-element-binding protein) binding protein] [12]. CBP

acetylates HNF-4, and this modification has been shown to regulate several functions of HNF-4, including DNA binding, nuclear accumulation and interaction with co-activators [13]. In addition, HNF-4 interacts with PGC-1 (peroxisome-proliferator activated-receptor- γ co-activator 1), a protein that plays important roles in hepatic gluconeogenesis [11,14].

HNF-4 is predominantly expressed in the liver, intestine, pancreas and kidney and regulates the expression of genes and gene networks with important physiological roles in the above organs [2]. Conditional inactivation of HNF-4 in the liver of mice caused weight loss, increased rate of mortality and lipid abnormalities due to impaired expression of HNF-4-regulated genes involved in lipid and bile acid metabolism and transport [15]. Among the genes that were transcriptionally silenced by the inactivation of HNF-4 in the liver was the APOC3 (apolipoprotein C-III) gene [15].

APOC3 has been implicated in the modulation of binding of apolipoprotein E-containing lipoproteins to cell receptors and their subsequent catabolism [16–20]. The importance of APOC3 in triacylglycerol homeostasis is supported by studies in

Abbreviations used: AF, activation function; APOA1, apolipoprotein A-I; APOA4, apolipoprotein A-IV; APOC3, apolipoprotein C-III; CBP, CREB (cAMP-response-element-binding protein) binding protein; DBD, DNA-binding domain; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; EAR, erbA-related protein; ERK, extracellular-signal-regulated kinase; FBS, fetal bovine serum; GRIP1, glucocorticoid receptor interacting protein-1; HEK 293T, human embryonic kidney 293T; hyb, hybrid; HNF-4, hepatocyte nuclear factor 4; HRE, hormone response element; I κ B-ND, inhibitor of NF- κ B non-degradable; IKK β , inhibitor of NF- κ B kinase β ; IMBB-FORTH, Institute of Molecular Biology and Biotechnology–Foundation of Research and Technology Hellas; LBD, ligand binding domain; LMP1, latent membrane protein 1; MEK-1, MAPK (mitogen-activated protein kinase)/ERK kinase; NF- κ B, nuclear factor κ B; NIK, NF- κ B-inducing kinase; ONPG, *o*-nitrophenyl galactopyranoside; pERK, phospho-ERK; PGC-1, peroxisome-proliferator-activated-receptor- γ co-activator 1; RXR α , retinoid X receptor α ; Smad, similar to mothers against decapentaplegic; TGF β , transforming growth factor β ; TNF α , tumour necrosis factor α ; SRC3, steroid receptor co-activator 3; TIF2, transcriptional intermediary factor 2.

¹ To whom correspondence should be addressed (email kardassis@imbb.forth.gr).

transgenic mice, in which overexpression of the APOC3 gene was found to be associated with severe hypertriglyceridaemia ('hypertriglyceridaemia') due to the defective clearance of triacylglycerol-rich lipoprotein remnants [21,22].

The human APOC3 gene is closely linked to the human APOA1 and APOA4 (apolipoproteins A-I and A-IV) genes on the long arm of chromosome 11 [23]. *In vitro* mutagenesis established that three HREs (hormone-response elements), located in the proximal promoter and enhancer, as well as three Sp1 (stimulating protein-1)-binding sites located in the APOC3 enhancer, are important for the APOC3 gene expression in hepatic cells [24–28]. Two of the above HREs (elements B and I) bind HNF-4 and other orphan and ligand-dependent nuclear receptors [25–28].

Previous studies have demonstrated that the APOC3 gene is down-regulated during the acute-phase response, owing to the action of pro-inflammatory cytokines such as TNF α (tumour-necrosis factor- α) and interleukin-1 [29,30]. Transcription factors found previously to mediate this process include the AP-1 (activation protein-1) proteins c-Jun and ATF-2 (activating transcription factor 2), as well as C/EBP δ (CAAT/enhancer binding protein δ) [30,31]. Natural extinguishing of the acute-phase response occurs in part because of the production of anti-inflammatory cytokines such as interleukin-10, interleukin-13 and TGF β (transforming growth factor β) [32]. TGF β and its signalling mediators, the Smad (similar to mothers against decapentaplegic) proteins, are potent anti-inflammatory molecules in mammals [33–36].

We have shown recently that TGF β and its signal transducers, the Smad proteins, transactivate the APOC3 gene promoter by interacting physically and functionally with HNF-4, which binds to the proximal APOC3 HRE (element B) [37,38]. We now show that the pro-inflammatory cytokine TNF α antagonizes TGF β for the regulation of APOC3 gene expression in hepatocytes. Inhibition of the APOC3 promoter by TNF α requires the participation of the NF- κ B (nuclear factor κ B) pathway, which affects the DNA binding and transactivation potential of HNF-4.

MATERIALS AND METHODS

Materials

All reagents for cell culture, including DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), FBS (fetal bovine serum), trypsin/EDTA and PBS were purchased from Life Technologies. ONPG (*o*-nitrophenyl galactopyranoside), PMSF, the anti-FLAG (M2) mouse monoclonal antibody and the anti- β -tubulin mouse monoclonal antibody were purchased from Sigma. The anti-HNF-4 (C-19) goat polyclonal antibody and anti-NF- κ B p65(A) rabbit polyclonal antibody were purchased from Santa Cruz Biotechnology. The anti-ERK [anti-(extracellular-signal-regulated kinase)] and anti-pERK [anti-phospho-ERK] antibodies were gifts from Dr G. Mavrothalassitis [IMBB-FORTH (Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation of Research and Technology Hellas), Heraklion, Crete, Greece]. The rabbit anti-HNF-4 antibody was kindly provided by Dr Iannis Talianidis (IMBB-FORTH). The dNTPs, poly(dI/dC) and the G-Sepharose beads were purchased from Amersham Pharmacia. The luciferase assay kit and random hexamers were purchased from Promega. The MEK [MAPK (mitogen-activated protein kinase)/ERK kinase]-1 inhibitor U0126 was purchased from Upstate Biotechnology. Human recombinant TNF α was purchased from Roche and Minotech. Human recombinant TGF β was purchased from R&D Systems. The Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate was purchased from Pierce. Streptavidin Dynabeads were purchased from Dynal Biotech. Superscript reverse

transcriptase was purchased from Invitrogen. Oligonucleotides were synthesized at the Microchemistry Laboratory of FORTH.

Cell culture, transient transfections and reporter assays

Human hepatoma HepG2 cells, HEK (human embryonic kidney) 293T cells and COS-7 fibroblasts were cultured in DMEM, supplemented with 10% (v/v) FBS and penicillin/streptomycin, in a 37°C, 5% CO₂ incubator. Human recombinant TNF α (0, 250, 500 or 1000 units), TGF β (0, 40, 80 pM) or the MEK1 inhibitor U0126 (10 μ M) were added to the cell-culture medium for different time periods. Transient transfections were performed by the Ca₃(PO₄)₂ co-precipitation method using 6 μ g of DNA/well when the transfections were performed in six-well plates or 35 μ g/plate when transfections were performed in P-100 plates. Luciferase assays were performed using the Luciferase assay kit from Promega Corp. according to the manufacturer's instructions. Normalization for transfection efficiency was performed using β -galactosidase assays.

Plasmids

The apolipoprotein promoter plasmids APOC3 (–890/+24)-Luc, APOC3 (–686/+24)-Luc, APOC3 (–99/+24)-Luc, APOC2 (–550/+18)-Luc, APOA4 (–700/+24)-Luc, the NF- κ B responsive vector (NF- κ B)₃-Luc and expression vectors for LMP1 (latent membrane protein 1), NIK (NF- κ B-inducing kinase), IKK β (inhibitor of NF- κ B kinase β), I κ B-ND (inhibitor of NF- κ B non-degradable), p65, p50, p50/p65 hyb (hybrid) Smad proteins (Smad3 and Smad4) have been described previously [24,38–41]. Expression vectors for wild-type or truncated forms of rat HNF-4a1 in expression vector pCDNA1-amp or fused with the DBD of GAL4 were kindly provided by Dr Margarita Hadzopoulou-Cladaras (Department of Genetics, Development and Molecular Biology, Laboratory of Developmental Biology, School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece). The expression vector for the human PGC-1 co-activator was kindly given by Dr Anastasia Kralli (Department of Cell Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, U.S.A.). The expression vector for the human CBP co-activator was kindly given by Dr Ioannis Talianidis (IMBB-FORTH). The expression vector for the human SRC3 was kindly given by Dr Hinrich Gronemeyer [IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire), Illkirch, Strasbourg, France].

Reverse-transcription PCR

HepG2 cells were treated with 1,000 units of TNF α in the absence or in the presence of TGF β (40 and 80 pM) for 24 h or left untreated. Total RNAs were prepared and equal concentrations of RNAs were used for cDNA synthesis. The synthesis of cDNAs was performed using Superscript reverse transcriptase and random hexamers as primers. The cDNAs were used for PCR amplifications with primers corresponding to the human APOC3 cDNA. The sequences of the primers were as follows: APOC3 forward primer, 5' AGGAGTCCCAGGTGGCCAGCAG 3'; APOC3 reverse primer, 5' CACGGCTGAAGTTGGTCTGACCTCA 3'.

Indirect immunofluorescence

HepG2 cells or transfected COS-7 cells were seeded on glass coverslips coated with 0.1% gelatin. Cells were washed three times on a slow rotating platform with PBS+/+ (PBS plus 0.9 mM CaCl₂ and 0.5 mM MgCl₂) and fixed with 3% p-formaldehyde in

PBS+/+ for 5 min at room temperature. Cells were washed three times with PBS+/+ and permeabilized with 0.5% Triton X-100 in buffer 1 (10 \times buffer 1 is 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM Na₂HPO₄, 0.4 mM KH₂PO₄, 5.5 mM glucose, 4 mM NaHCO₃, 2 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA and 20 mM Mes, pH 6.0–6.5) for 5 min at room temperature. Cells were washed three times with PBS+/+, blocked with PBS +/+1.5% FBS and incubated with the primary antibody (1:200 dilution, in PBS+/+1.5% FBS) for 30 min at 4°C. Cells were washed three times with PBS+/+1.5% FBS and incubated with the secondary antibody (1:50 dilution in PBS +/+1.5% FBS) for 30 min at 4°C in the dark. Cells were washed three times with PBS+/+ in the dark and mounted on glass slides using mounting solution (glycerol/PBS, 1:1, v/v). Cells were observed using a Leica SP confocal fluorescent microscope.

Western blotting

For Western-blotting analysis of endogenous (HepG2) or transfected (HEK-293T) proteins, cells were trypsinized, pelleted by centrifugation at 2000 rev./min (350 g) for 5 min, washed once with ice-cold PBS, re-centrifuged as described above and resuspended in lysis buffer [50 mM Tris/HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.25% sodium deoxycholate and 1 mM EGTA] supplemented with protease inhibitors (1 mM PMSF, 1 μ g/ml pepstatin and 1 μ g/ml leupeptin). Extracts were allowed to rotate at 4°C for 30 min and centrifuged at 13 000 rev./min (15 800 g) for 5 min at 4°C. Protein concentration was measured using the Bio-Rad DC Protein Assay kit, and equal amounts were loaded on SDS/10.5%-(w/v)-polyacrylamide gels, followed by electrotransfer to Protran 0.45- μ m-pore-size nitrocellulose transfer membrane (Schleicher & Schuell BioScience). Immunoblotting was performed using appropriate monoclonal or polyclonal antibodies, followed by incubation with horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibodies. Proteins were visualized by enhanced chemiluminescence.

Chromatin immunoprecipitations

The chromatin immunoprecipitation assay was performed as described previously [42], using chromatin from HepG2 cells and a rabbit polyclonal antibody towards human HNF-4. Immunoprecipitated chromatin was analysed by PCR using primers corresponding to the proximal (–233/–21) and distal (–882/–518) regions of the human APOC3 promoter. The proximal APOC3 promoter primers were: P1: 5' CAG GCC CAC CCC CAG TTC CTG AGC TCA 3'; P2: 5' CCT GTT TTA TAT CAT CTC CAG GGC AGC AGG C 3'. The distal APOC3 promoter primers were: D1: 5' AGT TGC TCC CAC AGC CAG GGG GCA GT 3'; D2: 5' TCT CAC AGC CCC TCC CAG CAC CTC CAT 3'. The products of the PCR amplifications (35 cycles) were analysed by agarose-gel electrophoresis and ethidium bromide staining.

DNA affinity precipitation

For DNA affinity precipitation, nuclear extracts from HepG2 cells that had been treated with TNF α (1000 units) for 24 h or from untreated HepG2 cells were used. Dynabeads were washed once with 1 \times B&W buffer [5 mM Tris/HCl (pH 7.5), 0.5 mM EDTA and 1 mM NaCl], mixed with 0.58 μ M of biotinylated oligonucleotide and incubated at room temperature (25°C) for 15 min. The oligonucleotide-coupled beads were washed twice with 1 \times B&W buffer and once with 1 \times BBRC buffer (10% glycerol, 10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂ and 0.2 mM EDTA).

The protein–DNA binding reactions were allowed to proceed for 30 min on ice in a buffer containing 10% (v/v) glycerol, 20 mM Hepes (pH 7.9), 40 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 4 mM spermidine, 100 μ g/ml BSA, 0.02 mM zinc acetate, 0.05% Nonidet P40 and 0.5 mM dithiothreitol. Each reaction mixture included 30 μ g of nuclear extracts, 3 μ g of competitor poly(dI/dC) and the biotinylated oligonucleotide-coupled Dynabeads, which were prepared as described above in a total reaction volume of 50 μ l. Biotinylated oligonucleotides corresponding to the –92/–67 region of the human APOC3 promoter [28] and the –86/–70 region of the human p21^{Cip1} promoter [43] were utilized. HNF-4 bound to the oligonucleotides was detected by SDS/PAGE and immunoblotting using a polyclonal anti-HNF-4 antibody.

RESULTS

Antagonistic effects between TGF β and TNF α on the activity of the human APOC3 promoter in HepG2 cells

Negative cross-talk between the TGF β and TNF α signalling pathways on the activity of the human APOC3 promoter was investigated by transactivation assays in human hepatoma-derived HepG2 cells. For this purpose, HepG2 cells were transfected with a plasmid bearing the firefly luciferase reporter gene under the control of the promoter of the human APOC3 gene between nucleotides –890 and +24 (APOC3 –890/+24-Luc) and were treated with increasing amounts of recombinant human TNF α (250, 500 and 1000 units) for 24 h. As shown in Figure 1(A), TNF α treatment inhibited the activity of the APOC3 promoter in a dose-dependent manner. This finding was in agreement with previous observations showing that TNF α inhibited the transcription of the human APOC3 gene in HepG2 cells [29].

It was next shown that the inhibitory effect of TNF α on the APOC3 promoter could be overcome by the simultaneous treatment of HepG2 cells with increasing doses of human recombinant TGF β (Figure 1B), suggesting a negative cross-talk between the two pathways operating on the APOC3 promoter. Inhibition of APOC3 promoter activity by TNF α could also be abrogated by overexpression of Smad3 and Smad4 proteins, which are the key effectors of the TGF β pathway (Figure 1C). In agreement with the data of Figure 1(B), treatment of HepG2 cells with TNF α (1000 units) for 24 h caused a reduction in the steady-state mRNA levels of the human APOC3 gene and this inhibition could be overcome by the simultaneous treatment of HepG2 cells with increasing doses (40 and 80 pM) of TGF β (Figure 1D).

In conclusion, the results shown in Figure 1 combined with our previous findings [27,28,37,38] indicate that the activity of the human APOC3 promoter in HepG2 cells can be modulated by positive and negative signals which are produced by anti-inflammatory and pro-inflammatory cytokines respectively. This is shown schematically in Figure 1(E).

Inhibition of APOC3 promoter activity by TNF α is mediated by NF- κ B

To identify and characterize the signalling pathway(s) that is (are) responsible for the TNF α -induced inhibition of APOC3 promoter activity in HepG2 cells, two inhibitors that specifically block well-characterized and distinct TNF α -induced signalling cascades were utilized: a mutant that blocks the cascade leading to NF- κ B activation (a dominant negative, non-degradable form of the I κ B inhibitor that keeps NF- κ B in the cytoplasm, I κ B-ND) and a chemical inhibitor (the MEK1 inhibitor U0126) that blocks the cascade leading from TNF α to ERK. First, the activation of the above signalling cascades by TNF α in HepG2 cells was shown

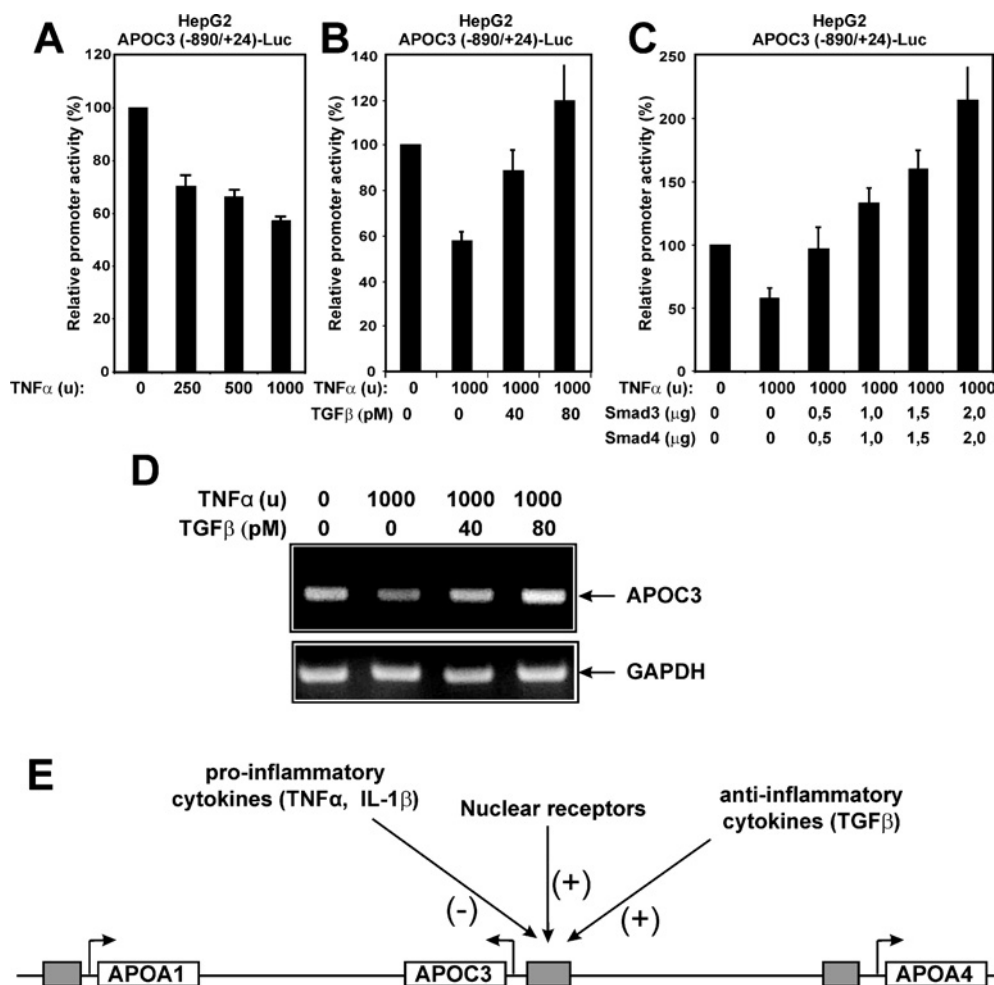


Figure 1 Antagonistic effects of pro- and anti-inflammatory cytokines on the activity of the human APOC3 promoter in HepG2 cells

(A) Human hepatoma HepG2 cells were transiently transfected with the APOC3 (–890/+24)-Luc reporter plasmid (2 μ g) and treated with different doses of human recombinant TNF α (0, 250, 500 and 1000 units) for 24 h. Cell extracts were analysed for luciferase activity. Normalized relative APOC3 promoter activity is shown as a histogram. (B) HepG2 cells were transiently transfected with the APOC3 (–890/+24)-Luc reporter plasmid (2 μ g) and treated with TNF α (1000 units) in the absence or in the presence of increasing doses of human recombinant TGF β 1 (0, 40 and 80 pM) for 24 h. Cell extracts were analysed for luciferase activity. Normalized relative APOC3 promoter activity is shown as a histogram. (C) HepG2 cells were transiently transfected with the APOC3 (–890/+24)-Luc reporter plasmid (2 μ g) along with increasing concentrations of expression vectors for human Smad3 and Smad4 (0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 μ g) and treated with a constant dose of TNF α (1000 units) for 24 h. Cell extracts were analysed for luciferase activity. Normalized relative APOC3 promoter activity is shown as a histogram. (D) HepG2 cells were treated with TNF α (1000 units) in the absence or in the presence of increasing doses of human recombinant TGF β 1 (0, 40 and 80 pM) for 24 h. The expression of the APOC3 gene was analysed by reverse transcription PCR. The expression levels of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were used for normalization of RNA concentration in the various samples. (E) Schematic representation of the human APOA1–APOC3–APOA4 gene cluster and factors that regulate the expression of the APOC3 gene in a positive (+) or a negative (–) manner. The arrows show the direction of transcription of each gene and the grey boxes represent the promoter regions of the three genes of the cluster. Abbreviation: IL-1 β , interleukin 1 β .

by well-established assays such as TNF α -induced p65 nuclear translocation (Figure 2A) and the TNF α -induced phosphorylation of ERK (Figure 2B). Then the effect of the two inhibitors on the constitutive as well as on the TNF α -inducible activity of the APOC3 promoter was evaluated. As shown in Figure 2(C), inhibition of the APOC3 promoter by TNF α was totally abolished in the presence of the I κ B-ND inhibitor. In fact, a strong activation of the APOC3 promoter was observed by the NF- κ B inhibitor, even in the absence of TNF α , a finding indicative of the existence of strong endogenous negative signals in HepG2 cells that constitutively inhibit APOC3 promoter activity via the NF- κ B pathway. By contrast, the U0126 inhibitor of the MEK1/ERK pathway had only a minor positive effect on both the basal and the TNF α -inhibited APOC3 promoter activity (Figure 2C).

Next, the effect of selected NF- κ B signalling effectors on APOC3 promoter activity in HepG2 cells was investigated by transactivation assays. Figure 2(D) shows that overexpression

of IKK β kinase inhibited APOC3 promoter activity in a dose-dependent manner, and Figure 2(E) shows that overexpression of the p65/RelA subunit of NF- κ B totally abolished APOC3 promoter activity, whereas the p50 subunit had no effect. Finally, a p65 hyb protein in which the RHD (Rel homology domain) of p65 was exchanged for the corresponding domain of p50 (p50/p65 hyb) was as effective as full-length p65 in inhibiting the APOC3 promoter, suggesting that the inhibition is mediated by the C-terminal transactivation domain of p65.

As an additional confirmation of the inhibitory role played by NF- κ B in APOC3 promoter regulation, the LMP1 of Epstein–Barr virus was utilized in transactivation assays. LMP1 is a protein homologous with the TNF α receptor that has been shown previously to be a potent activator of the NF- κ B pathway in various cell types [44]. In a control experiment, it was established that LMP1 strongly activated a NF- κ B-responsive promoter [(NF- κ B) $_3$] in HepG2 cells and this activation was inhibited

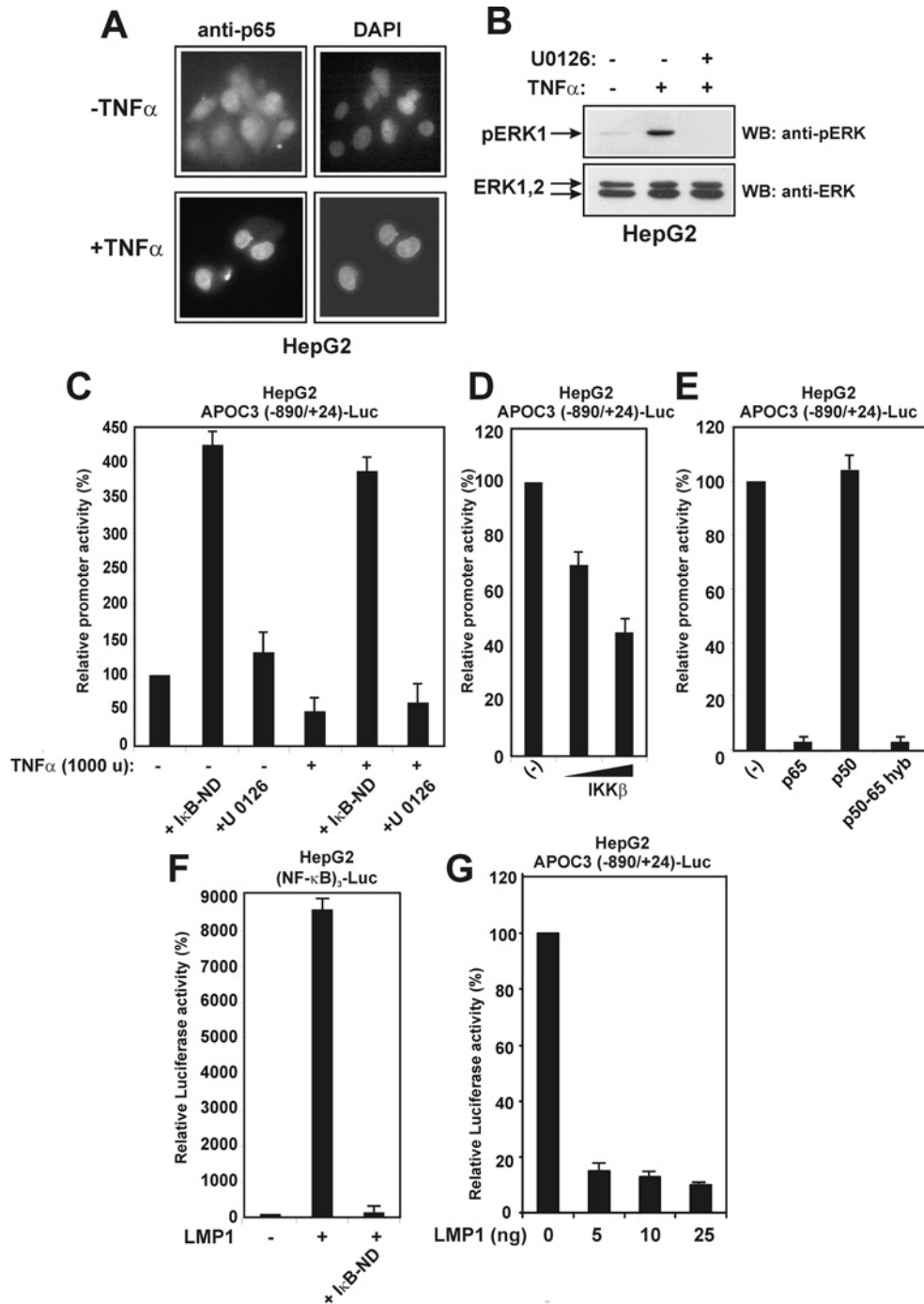


Figure 2 Inhibition of APOC3 promoter activity by TNF α is mediated by NF- κ B

(A) TNF α activates NF- κ B in HepG2 cells. HepG2 cells were serum-starved for 16 h and treated with TNF α (1000 units) for 4 h or left untreated. The intracellular distribution of the p65 subunit of NF- κ B was examined by indirect immunofluorescence using an anti-p65 antibody followed by a secondary FITC-conjugated antibody. Nuclei were stained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). (B) TNF α activates the MEK1/ERK pathway in HepG2 cells. HepG2 cells were pretreated with the MEK1 inhibitor U0126 (10 μ M) for 24 h, followed by a short treatment with TNF α (1000 units) for 15 min. Cell extracts were analysed by Western blotting for pERK or total ERK using the corresponding anti-ERK antibodies followed by secondary horseradish-peroxidase-conjugated antibodies. Arrows show the position of pERK and ERK1/2 proteins. (C) HepG2 cells were transiently transfected with the APOC3 (-890/+24)-Luc reporter plasmid (2 μ g) and treated with TNF α (1000 units) in the presence or in the absence of an expression vector for the non-degradable form of I κ B α , I κ B-ND (2.0 μ g), or the MEK1 inhibitor U0126 (10 μ M) for 24 h. Cell extracts were analysed for luciferase activity. Normalized relative APOC3 promoter activity is shown as a histogram. (D) HepG2 cells were transiently transfected with the APOC3 (-890/+24)-Luc reporter plasmid (2 μ g), along with increasing concentrations of an expression vector for IKK β (0, 1.0 and 2.0 μ g). Cell extracts were analysed for luciferase activity. Normalized relative APOC3 promoter activity is shown as a histogram. (E) HepG2 cells were transiently transfected with the APOC3 (-890/+24)-Luc reporter plasmid (2 μ g), along with expression vectors for p65, p50 or a p50/p65 hyb protein (2.0 μ g each). Cell extracts were analysed for luciferase activity. Normalized relative APOC3 promoter activity is shown as a histogram. (F) HepG2 cells were transiently transfected with the (NF- κ B)₃-Luc reporter plasmid (2 μ g), along with an expression vector for LMP1 (25 ng) in the presence or in the absence of an expression vector for I κ B-ND (2.0 μ g). Cell extracts were analysed for luciferase activity. Normalized relative APOC3 promoter activity is shown as a histogram. (G) HepG2 cells were transiently transfected with the APOC3 (-890/+24)-Luc reporter plasmid (2 μ g), along with increasing concentrations of an expression vector for LMP1 (0, 5, 10 and 25 ng). Cell extracts were analysed for luciferase activity. Normalized relative APOC3 promoter activity is shown as a histogram.

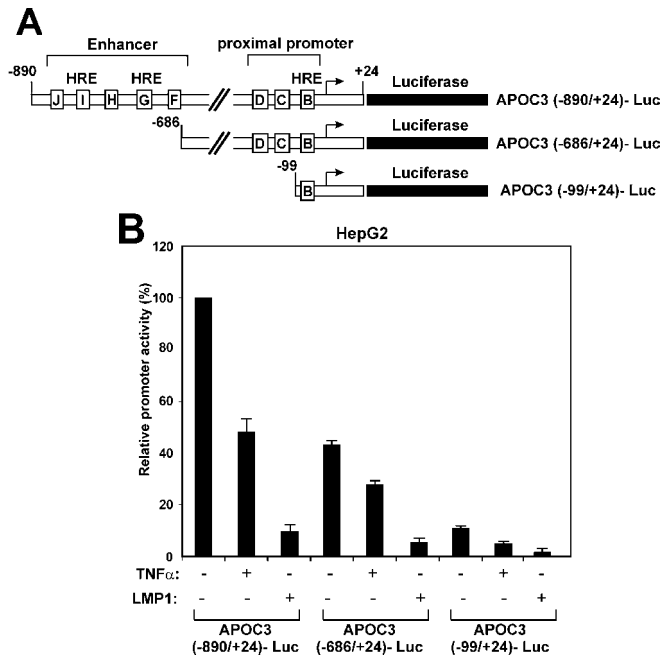


Figure 3 The proximal HRE of the APOC3 promoter is sufficient to mediate inhibition by TNF α

(A) Schematic representation of the APOC3 promoter-luciferase constructs used in the transactivation experiments of (B). Regulatory elements in the APOC3 proximal promoter and the enhancer are shown by boxes labelled B–J. (B) HepG2 cells were transiently transfected with the various APOC3-Luc reporter plasmid (2 μ g) shown at the bottom of the graph and were treated with TNF α (1000 units) for 24 h or co-transfected with an expression vector for LMP1 (25 ng). Cell extracts were analysed for luciferase activity. Normalized relative APOC3 promoter activity is shown by a histogram.

by the dominant-negative I κ B-ND mutant (Figure 2F). More importantly, it was shown that a small amount of LMP1 was sufficient to fully block APOC3 promoter activity in HepG2 cells (Figure 2G).

In summary, the findings of Figure 2 indicate that activation of the NF- κ B pathway in HepG2 cells by TNF α causes a strong inhibition of the APOC3 promoter activity. The molecular mechanism of this inhibition was the subject of the subsequent experiments presented below.

The proximal HRE of the APOC3 promoter is sufficient to mediate inhibition by TNF α

To identify the region of the APOC3 promoter that responds to TNF α , two truncated APOC3 promoter fragments were utilized in transactivation experiments in HepG2 cells. One mutant (APOC3 -686/+24) lacks the region between nucleotides -890 and -687, which includes the distal enhancer elements F–J (Figure 3A). The second mutant (APOC3 -99/+24) contains the region between nucleotides -99 and +24, which includes only the proximal element B (Figure 3A). Element B was shown previously to harbour an HRE that binds a selection of orphan and ligand-dependent nuclear receptors, including HNF-4 [27,28]. Mutagenesis of this element abolished APOC3 promoter activity both *in vitro* and *in vivo* [27,28].

As shown in Figure 3(B), both APOC3 promoter mutants were inhibited by TNF α and LMP1 to approximately the same extent as was the full-length APOC3 promoter. The minimal region of the APOC3 promoter required for TNF α or LMP1-induced inhibition

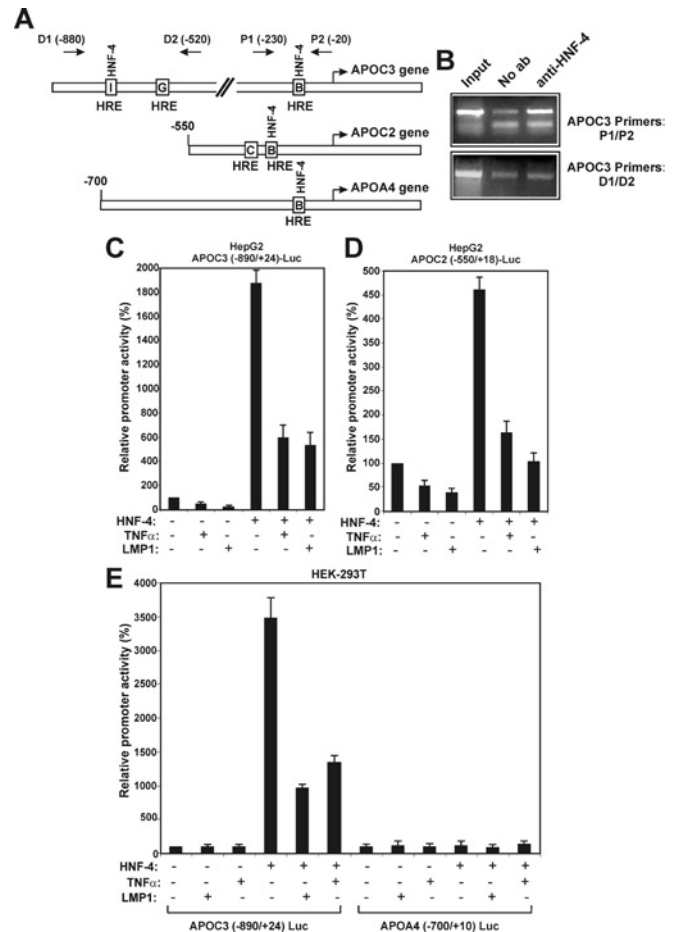


Figure 4 TNF α inhibits the HNF-4-mediated transactivation of the APOC3 and APOC2 promoters

(A) Schematic representation of the human APOC3, APOC2 and APOA4 promoter regions, showing the locations of the HREs that bind HNF-4 in each promoter. The location of the oligonucleotide primer sets on the APOC3 promoter that were utilized in the chromatin-immunoprecipitation assays of (B) are shown by arrows labelled D1 and D2 (distal primers) and P1 and P2 (proximal primers). (B) Recruitment of HNF-4 to the proximal APOC3 promoter *in vivo*. The chromatin-immunoprecipitation assay was performed using chromatin from HepG2 cells as described in the Materials and methods section, using primers corresponding to the proximal (P1 and P2) or the distal (D1 and D2) regions of the APOC3 promoter in the absence (second lane) or in the presence (third lane) of an anti-HNF-4 antibody. Non-immunoprecipitated chromatin was included as a positive control (first lane labelled 'Input'). (C and D) HepG2 cells were transiently transfected with the APOC3 (-890/+24)-Luc reporter plasmid (2 μ g) (C) or with the APOC2 (-550/+18)-Luc plasmid (2 μ g) (D) and were treated with TNF α (1000 units) for 24 h or were co-transfected with an expression vector for LMP1 (25 ng). The same experiment was repeated in the presence of an expression vector for HNF-4 (2 μ g). Cell extracts were analysed for luciferase activity. Normalized relative promoter activity is shown as a histogram. (E) HEK-293T cells were transiently transfected with the APOC3 (-890/+24)-Luc reporter plasmid or with the APOA4 (-700/+24)-Luc plasmid (2 μ g) and were treated with TNF α (1000 units) for 24 h or co-transfected with an expression vector for LMP1 (25 ng). The same experiment was repeated in the presence of an expression vector for HNF-4 (2 μ g). Cell extracts were analysed for luciferase activity. Normalized relative promoter activity is shown as a histogram.

is the -99/+24, since further deletion of the APOC3 promoter to nucleotide -55 abolished both the constitutive and the TNF α -inhibited APOC3 promoter activity (results not shown).

The results shown in Figure 3 indicate that inhibition of the APOC3 promoter activity by TNF α could be mediated, at least in part, by interfering with the activity of nuclear receptors that bind to the proximal APOC3 HRE.

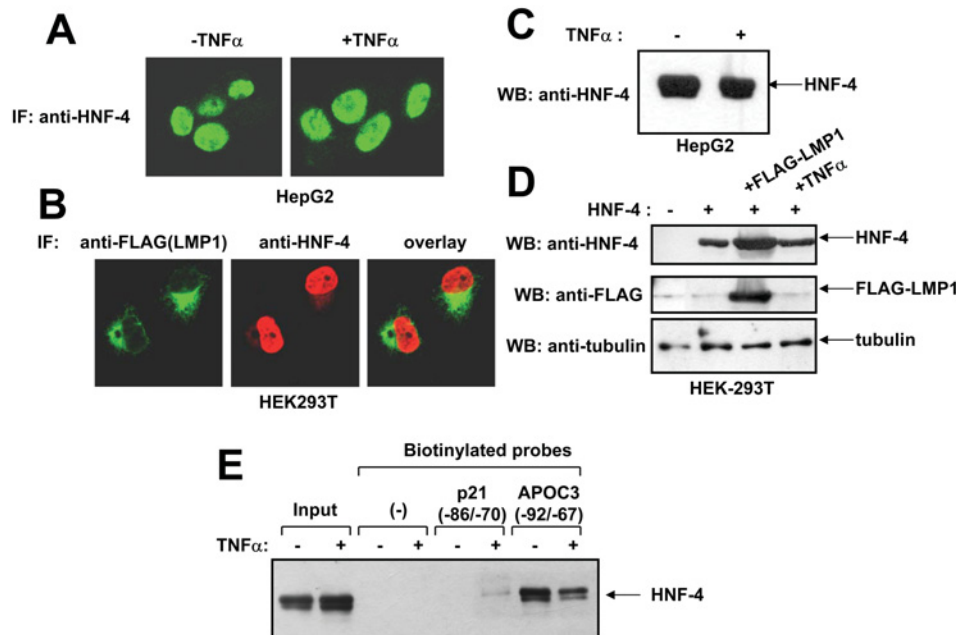


Figure 5 TNF α does not affect the nuclear localization or the stability, but inhibits the DNA-binding activity of HNF-4

(A) HepG2 cells were plated in coverslips and treated with TNF α (1000 units) for 24 h or left untreated. The intracellular localization of HNF-4 was observed by indirect immunofluorescence (IF) using an anti-HNF-4 polyclonal antibody followed by a secondary FITC-conjugated antibody. (B) HEK-293T cells were transiently co-transfected with expression vectors for HNF-4 and FLAG-LMP1 and placed on coverslips. The intracellular localization of HNF-4 and FLAG-LMP1 proteins was observed by indirect immunofluorescence using an anti-HNF-4 polyclonal antibody and an anti-FLAG mouse monoclonal antibody followed by the appropriate secondary FITC- or Rhodamine-conjugated antibodies. In (A) and (B), cells were observed using a Leica SP confocal fluorescence microscope. (C) HepG2 cells were treated with TNF α (1000 units) for 24 h or left untreated. The levels of expression of endogenous HNF-4 protein were determined by Western blotting (WB) using an anti-HNF-4 goat polyclonal antibody followed by a secondary horseradish-peroxidase-conjugated antibody. (D) HEK-293T cells were transiently transfected with an expression vector for HNF-4 and were treated with TNF α (1000 units) for 24 h or co-transfected with an expression vector for FLAG-LMP1. The levels of expression of exogenous HNF-4, FLAG-LMP1 and tubulin (control) in the transfected cells was determined by Western blotting using an anti-HNF-4 goat polyclonal antibody, an anti-FLAG mouse monoclonal antibody and a mouse monoclonal anti- β -tubulin antibody respectively, followed by the appropriate secondary horseradish-peroxidase-conjugated antibodies. (E) DNA-affinity precipitation experiment using nuclear extracts from HepG2 cells that had been treated with TNF α (1000 units) for 24 h or from untreated HepG2 cells and biotinylated oligonucleotides corresponding to the -92/-67 region of the human APOC3 promoter or the -86/-70 region of the human p21^{Cip1} promoter. HNF-4 bound to the oligonucleotides was detected by SDS/PAGE and immunoblotting using a polyclonal anti-HNF-4 antibody.

TNF α inhibits the HNF-4-mediated transactivation of the APOC3 and APOC2 promoters

Previous *in vivo* studies have established that HNF-4 is the single most important regulator of the expression of the APOC3 gene, as well as of other apolipoprotein genes in hepatocytes [15]. It was shown previously that HNF-4 binds with high affinity to the proximal HRE B of the APOC3 promoter *in vitro* [28]. The recruitment of HNF-4 to the APOC3 promoter *in vivo* was established here by a chromatin-immunoprecipitation experiment. As shown in Figure 4(B), HNF-4 was recruited to the proximal APOC3 promoter region -230/-20 that includes HRE B, but, surprisingly, it failed to bind to the distal region -880/-520 that harbours the distal HREs G and I.

It was then shown that HNF-4 strongly transactivated the APOC3 (-890/+24) promoter in HepG2 cells and that this transactivation was inhibited by TNF α or LMP1 expression (Figure 4C). A similarly negative effect of TNF α and LMP1 on HNF-4-mediated transactivation was observed using the APOC2 promoter (Figure 4D), which also contains a binding site for HNF-4 (HRE B; Figure 4A). To confirm the requirement of HNF-4 for the TNF α and LMP1-induced inhibition of the APOC3 promoter, transactivation experiments were performed in HEK-293T cells, which lack endogenous HNF-4. As shown in Figure 4(E), TNF α or LMP1 had no effect on the activity of the APOC3 promoter in HEK-293T cells, whereas they

strongly inhibited the HNF-4-mediated transactivation of the same promoter. As a negative control, the human APOA4 promoter (-700/+10) was utilized. This promoter cannot be transactivated by HNF-4, despite the presence of a HNF-4 binding site in the proximal region (Figures 4A and 4E) [40].

In summary, the results shown in Figure 4 indicate that TNF α and other NF- κ B activating factors can inhibit the activity of a certain set of promoters harbouring HNF-4 binding sites and that HNF-4 is required for this inhibition.

TNF α does not affect the nuclear localization or the stability of HNF-4

To investigate further the mechanism of inhibition of HNF-4-mediated transactivation by TNF α , the effect of TNF α and LMP1 on HNF-4 nuclear localization and stability was examined. Using immunofluorescence analysis, it was shown that the constitutive nuclear accumulation of HNF-4 in HepG2 cells was not affected following treatment with TNF α for 24 h (Figure 5A). In a double-immunofluorescence experiment, it was shown that, similar to TNF α , LMP1 had no effect on HNF-4 nuclear localization in HEK293T cells which had been co-transfected with both factors (Figure 5B). Immunoblotting analysis clearly showed that neither TNF α nor LMP1 affected the stability of endogenous HNF-4 in HepG2 cells (Figure 5C) or exogenous HNF-4 in HEK-293T cells (Figure 5D).

TNF α modifies the DNA-binding properties of HNF-4

It was next examined whether TNF α affected the DNA-binding properties of HNF-4. For this purpose a DNA-affinity precipitation experiment was performed using endogenous HNF-4 in HepG2 cells and a biotinylated double-stranded oligonucleotide corresponding to the $-92/-67$ region of the APOC3 promoter that includes the proximal HRE. As shown in Figure 5(E), HNF-4 bound efficiently to the proximal APOC3 ($-92/-67$) oligonucleotide, and this binding was inhibited by TNF α . In control experiments it was shown that HNF-4 did not bind to the streptavidin Dynabeads or to a double-stranded synthetic oligonucleotide corresponding to the $-86/-70$ region of the human p21^{Cip1} promoter [43].

TNF α and NF- κ B inhibit the transcriptional activation function of HNF-4 by modulating the activity of AF-1 and AF-2 domains

In the next series of experiments, the effects of the NF- κ B pathway on nuclear HNF-4 functions was investigated using the well-characterized GAL4 system. For this purpose, a fusion protein consisting of full-length rat HNF-4a1 (amino acids 1–455) fused with the DBD of the yeast transactivator GAL4 (amino acids 1–147) (Figure 6A) was transiently expressed in HepG2 cells and its ability to transactivate the GAL4-responsive artificial promoter G5B (consisting of five tandem GAL4-binding sites) in the presence or in the absence of different NF- κ B pathway activators and effectors was evaluated by luciferase assays. As shown in Figure 6(B), TNF α strongly inhibited the transcriptional activity of GAL4-HNF-4 in HepG2 cells. This repression could be partially reversed by the dominant-negative I κ B-ND mutant, but not by the MEK1 inhibitor U0126, in agreement with the results shown in Figure 2(C). The transcriptional activity of GAL4-HNF-4 was also inhibited by LMP1, as well as by different effectors of the TNF α and LMP1 pathways, including the NIK, the IKK β kinase and the p65/RelA subunit of NF- κ B (Figure 6C). Finally, it was shown that p65 inhibited not only the constitutive, but also the Smad-inducible, transcriptional activity of HNF-4 (Figure 6D). The latter findings suggested that the antagonistic effects between TGF β and TNF α on the APOC3 promoter shown in Figure 1(B) could be accounted for by antagonistic interactions between their signalling effectors (NF- κ B and Smad proteins) with HNF-4, which binds to the APOC3 promoter.

Using various truncated forms of HNF-4 fused with the DBD of GAL4 (Figure 7A), it was shown that both transactivation domains of HNF-4 (AF-1 and AF-2) respond to the inhibitory effects of TNF α . As shown in Figures 7(B) and 7(C), TNF α , LMP1 and p65 strongly inhibited the transcriptional activity of HNF-4 mutants 1–174 and 1–49 which contain only the transactivation domain AF-1. TNF α had a similar inhibitory effect on two HNF-4 mutants lacking the AF-1 domain, but retaining the AF-2 domain (mutants 48–455 and 175–370).

Different co-activators have been shown previously to activate the transactivation function of the AF-1 and AF-2 domains of HNF-4. Among them are co-activators which show preference for the AF-2, domain such as PGC-1 and co-activators that act via both domains such as CBP/p300 and SRC3 [9–14]. The findings of the present study, shown in Figures 6 and 7, suggested that TNF α , via the NF- κ B pathway, interferes with the nuclear functions of HNF-4 and specifically with the transactivation functions of AF-1 and AF-2. The involvement of co-activators in the mechanism of repression of HNF-4 by TNF α was investigated by transactivation assays in HepG2 cells. Figure 8(A) shows that the inhibitory effect of TNF α on GAL4-HNF-4 could be totally abolished by over-expression of the HNF-4 co-activators CBP, SRC3 and PGC-1.

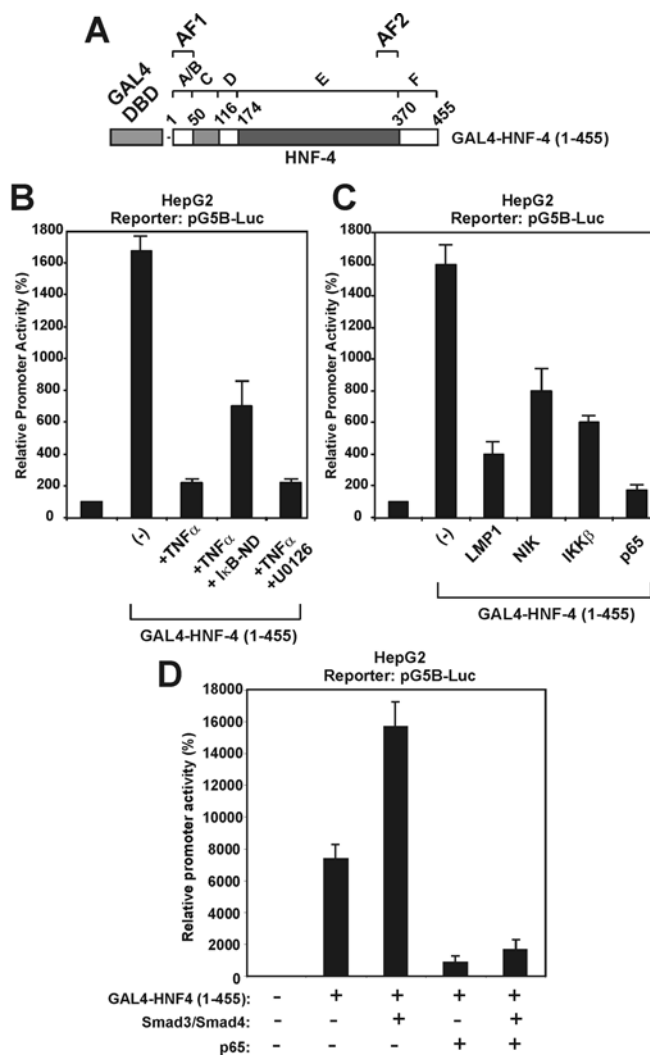


Figure 6 Different effectors of the NF- κ B pathway inhibit the transcriptional activation function of HNF-4 in a GAL4-based transactivation system

(A) Schematic representation of GAL4-HNF-4 (1–455) protein that was utilized in the transactivation experiments of (B)–(D). Functional domains in HNF-4 are shown by the letters A–F. (B) HepG2 cells were transiently transfected with the pG5B-Luc reporter plasmid (2 μ g), along with an expression vector for GAL4-HNF-4 (1–455) (100 ng) and were treated with TNF α (1000 units) or the MEK1 inhibitor U0126 for 24 h as shown at the bottom of the graph. The dominant-negative form of I κ B (I κ B-ND) (2 μ g) was also utilized in one of the assays, along with TNF α . Cell extracts were analysed for luciferase activity. Normalized relative promoter activity is shown by a histogram. (C) HepG2 cells were transiently transfected with the pG5B-Luc reporter plasmid (2 μ g), along with an expression vector for GAL4-HNF-4 (1–455) (100 ng) in the absence or in the presence of expression vectors for LMP1 (25 ng), NIK (2 μ g), IKK β (2 μ g) and p65 (2 μ g), as shown at the bottom of the graph. Cell extracts were analysed for luciferase activity. Normalized relative promoter activity is shown by a histogram. (D) HepG2 cells were transiently transfected with the pG5B-Luc reporter plasmid (2 μ g), along with an expression vector for GAL4-HNF-4 (1–455) (100 ng) in the absence or in the presence of expression vectors for Smad3, Smad4 and p65 (2 μ g) as indicated at the bottom of the graph. Cell extracts were analysed for luciferase activity. Normalized relative promoter activity is shown by a histogram.

PGC-1, in particular, not only abolished inhibition by TNF α , but induced a strong co-activation of GAL4-HNF-4 (4-fold above basal uninduced levels) (Figure 8A, last bar). PGC-1 had a similar positive effect under conditions of GAL4-HNF-4 inhibition by LMP1 (Figure 8B, third and fourth bars).

To investigate potential competition between HNF-4 and NF- κ B for common co-activators, the ability of PGC-1 to function as a co-activator of LMP1 signalling to NF- κ B was examined.

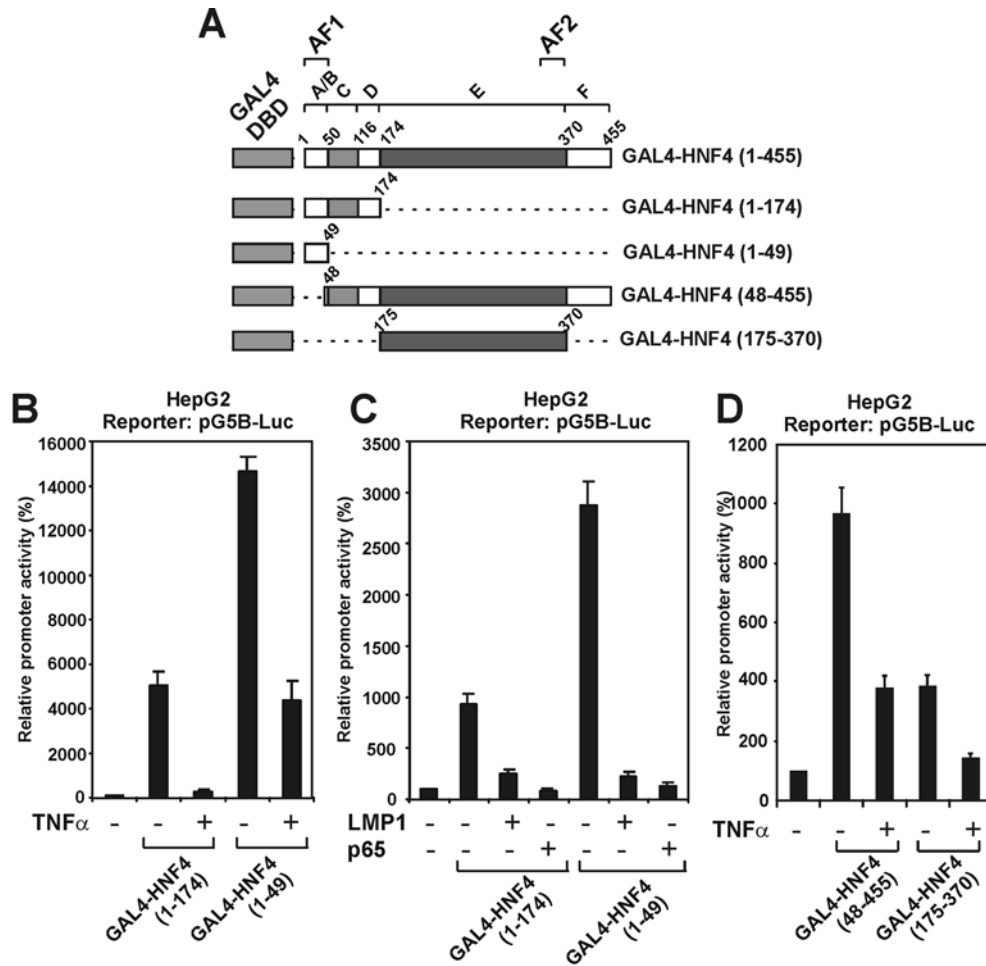


Figure 7 Both transactivation domains of HNF-4 (AF1 and AF2) are inhibited by TNF α and the NF- κ B pathway

(A) Schematic representation of the various truncated GAL4-HNF-4 proteins that were utilized in the transactivation experiments of (B)–(D). (B) HepG2 cells were transiently transfected with the pG5B-Luc reporter plasmid (2 μ g), along with expression vectors for GAL4-HNF-4 (1–174) or GAL4-HNF-4 (1–49) (100 ng) and were treated with TNF α (1000 units) for 24 h or left untreated as shown at the bottom of the graph. Cell extracts were analysed for luciferase activity. Normalized relative promoter activity is shown by a histogram. (C) HepG2 cells were transiently transfected with the pG5B-Luc reporter plasmid (2 μ g), along with expression vectors for GAL4-HNF-4 (1–174) or GAL4-HNF-4 (1–49) (100 ng) in the absence or in the presence of expression vectors for LMP1 (25 ng) or p65 (2 μ g) as shown at the bottom of the graph. Cell extracts were analysed for luciferase activity. Normalized relative promoter activity is shown by a histogram. (D) HepG2 cells were transiently transfected with the pG5B-Luc reporter plasmid (2 μ g) along with expression vectors for GAL4-HNF-4 (48–455) or GAL4-HNF-4 (175–370) (100 ng) and were treated with TNF α (1000 units) for 24 h or left untreated as shown at the bottom of the graph. Cell extracts were analysed for luciferase activity. Normalized relative promoter activity is shown by a histogram.

As shown in Figure 8(C), PGC-1 strongly co-activated LMP1 in a transactivation assay in which the artificial promoter (NF- κ B)₃ was used, suggesting that PGC-1 may act as a co-activator of LMP1 signalling to NF- κ B. Competition between HNF-4 and LMP1 effectors for PGC-1 was specific for the AF-2 domain of HNF-4 [compare GAL4-HNF-4 (48–455) lacking AF-1 in Figure 8D with GAL4-HNF-4 (1–49), which contains only AF-1, in Figure 8E]. By contrast, CBP was equally active on both AF-1 and AF-2 domains (Figures 8D and 8E).

The findings shown in Figure 8 suggested that TNF α and LMP1-induced inhibition of HNF-4 transcriptional activity could be accounted for, at least in part, by interference with the recruitment of co-activators that interact with both the AF-1 and AF-2 domains of HNF-4.

DISCUSSION

The present findings indicate that pro-inflammatory cytokines, such as TNF α , that activate multiple signalling pathways, includ-

ing NF- κ B, can inhibit the expression of liver-specific genes by a novel mechanism that involves the modification of the DNA-binding and transactivation properties of a hormone nuclear receptor such as HNF-4. This mechanism seems to be important for the negative cross-talk between the TNF α and the anti-inflammatory cytokine TGF β on the expression of the APOC3 gene during the acute-phase response, a process by which organisms respond to various conditions such as infections, ischaemic necrosis and trauma [32]. This is not the first example of a negative cross-talk between the two cytokines. TGF β /TNF α antagonism regulates the expression of the collagen genes and is very important for the control of tissue homeostasis and repair [45]. However, in the case of the collagen genes, the JNK-MAPK pathway, rather than nuclear receptors, is involved in this antagonism [46].

The participation of nuclear receptors in the mechanism of transcriptional inhibition of the APOC3 gene by TNF α was suggested by the results of transactivation experiments in which deletion mutants of the APOC3 promoter were utilized. These

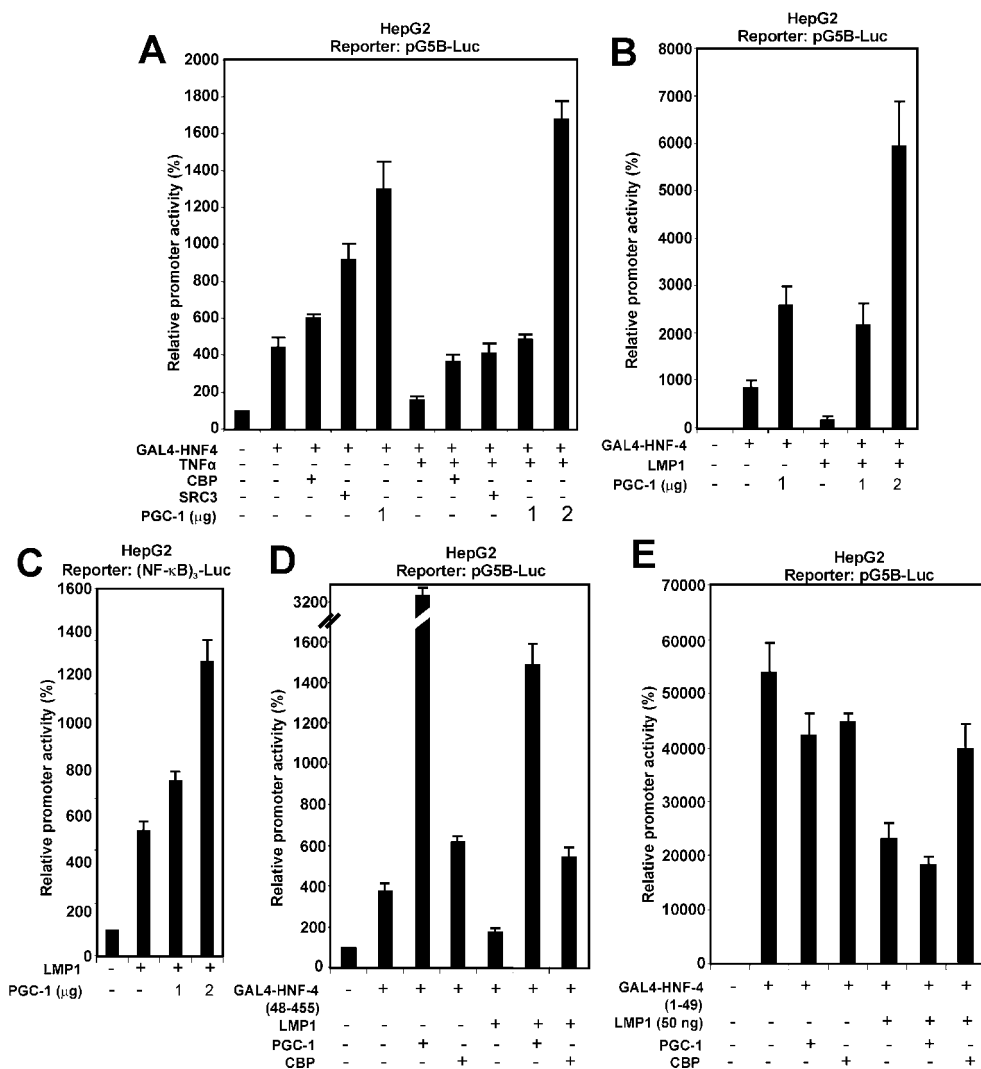


Figure 8 Inhibition of HNF-4 activity by TNF α may be accounted for by interference with the recruitment or the functions of AF-1 and AF-2 HNF-4 co-activators

(A) HepG2 cells were transiently transfected with the pG5B-Luc reporter plasmid (2 μ g), along with an expression vector for GAL4-HNF-4 (100 ng) and were treated with TNF α (1000 units) for 24 h in the absence or in the presence of expression vectors for the co-activators CBP, SRC3 (2 μ g each) and two different concentrations of the PGC-1 co-activator (1 and 2 μ g) as indicated at the bottom of the graph. Cell extracts were analysed for luciferase activity. Normalized relative promoter activity is shown as a histogram. (B) HepG2 cells were transiently transfected with the pG5B-Luc reporter plasmid (2 μ g), along with expression vectors for GAL4-HNF-4 (100 ng), LMP1 (25 ng) and two different concentrations of an expression vector for PGC-1 (1 and 2 μ g). Cell extracts were analysed for luciferase activity. Normalized relative promoter activity is shown as a histogram. (C) HepG2 cells were transiently transfected with the (NF- κ B)₃-Luc reporter plasmid (2 μ g), along with an expression vector for LMP1 (50 ng) and two different concentrations of an expression vector for PGC-1 (1 and 2 μ g). Cell extracts were analysed for luciferase activity. Normalized relative promoter activity is shown by a histogram. (D) HepG2 cells were transiently transfected with the pG5B-Luc reporter plasmid (2 μ g), along with expression vectors for GAL4-HNF-4 (48–455) (100 ng), LMP1 (50 ng), PGC-1 (2 μ g) and CBP (2 μ g), as indicated at the bottom of the graph. Cell extracts were analysed for luciferase activity. Normalized relative promoter activity is shown as a histogram. (E) HepG2 cells were transiently transfected with the pG5B-Luc reporter plasmid (2 μ g), along with expression vectors for GAL4-HNF-4 (1–49) (100 ng), LMP1 (50 ng), PGC-1 (2 μ g) and CBP (2 μ g) as indicated at the bottom of the graph. Cell extracts were analysed for luciferase activity. Normalized relative promoter activity is shown as a histogram.

experiments showed that the proximal HRE (element B) was sufficient to mediate repression by TNF α (Figure 3). Previous *in vitro* studies had established that this proximal HRE of the APOC3 promoter is of the DR1 type (direct repeat with one nucleotide spacing) and strongly binds HNF-4 as well as ARP-1 (apolipoprotein A-I regulatory protein 1), EAR-2 (erba-related protein 2), EAR-3 and heterodimers of RXR α (retinoid X receptor α) with RAR α (retinoic acid receptor α) and less efficiently binds homodimers of RAR α and heterodimers of RXR α with T3R β (thyroid hormone receptor β) or PPAR α (peroxisome-proliferator-activated receptor α) [27,28]. Among the nuclear receptors that bind to this HRE, HNF-4 seems to play the prominent role, as conditional inactivation of HNF-4 in the liver abolished the expression of the APOC3 gene [15]. However, *in vivo* evidence

for the recruitment of HNF-4 to this HRE as well as the HRE of the APOC3 enhancer in hepatic cells was missing. By performing a chromatin-immunoprecipitation assay we were able to demonstrate for the first time here the constitutive recruitment of HNF-4 to the proximal HRE of the APOC3 promoter in HepG2 cells (Figure 4B). Surprisingly, HNF-4 was not found on the distal HRE of the APOC3 enhancer, which was shown previously to bind HNF-4 *in vitro* and to be crucial for the expression of the APOC3 and APOA1 genes *in vitro* and *in vivo* (Figure 4B) [27,28,47]. This finding could suggest that nuclear receptors other than HNF-4 are the predominant regulators of the APOC3 gene via the distal HRE, but this has to be confirmed by additional *in vivo* DNA binding experiments. The recruitment of nuclear receptors other than HNF-4 to the proximal HRE and their involvement in

transcriptional responses to extracellular signal also need to be thoroughly investigated.

Using GAL4-HNF-4 fusion proteins and different NF- κ B-inducing agents, such as TNF α and the LMP1 transforming protein of the Epstein–Barr virus, we provide strong evidence for the involvement of the NF- κ B pathway in the nuclear functions of HNF-4. (Figure 6). This could be explained by different, not necessarily mutually exclusive, mechanisms, as follows. (i) An indirect mechanism, such as the transcriptional activation of an HNF-4 inhibitor by NF- κ B. Such an inhibitor could be the SHP (small heterodimer partner), which was shown to physically interact with HNF-4 and inhibit its transcriptional activity [48]. This hypothesis is supported by the findings of Figure 2(E), which showed that inhibition of HNF-4 requires the transactivation domain of the p65/Rel subunit of NF- κ B. (ii) Inhibition could be accomplished by interference of NF- κ B with the recruitment or functions of different HNF-4 co-activators. HNF-4 has been shown to interact with members of the p160 family of co-activators, including SRC-1 and GRIP1/TIF2, as well as with the histone acetyltransferase CBP and with PGC-1, a co-activator that plays important roles in hepatic gluconeogenesis [8–14]. In agreement with this hypothesis are the results presented in Figure 8, which showed that inhibition of HNF-4 by TNF α or LMP1 was overcome by overexpression of different HNF-4 co-activators, including CBP, SRC3 and PGC1, which interact with distinct transactivation domains of HNF-4 (AF-1 and AF-2) and that at least one of these proteins (PGC-1) may function as co-activator of NF- κ B signalling (Figure 8C).

In addition to the negative effect of the TNF α /NF- κ B pathway on the transactivation properties of HNF-4, TNF α appears to modify the DNA binding properties of this transcription factor as well. As shown in Figure 5(E), HNF-4 present in nuclear extracts from HepG2 cells that had been pre-treated with TNF α has a lower affinity for the proximal APOC3 HRE than HNF-4 present in untreated cells. This may be due to a modification, such as phosphorylation of HNF-4 in the DBD, which could affect its affinity for DNA. In support of this hypothesis are the results of previous studies showing that the DNA-binding properties of HNF-4 can be modulated in a positive or a negative manner by modifications such as acetylation [13] and phosphorylation which is induced by different signal transduction pathways involving MAPK and JAKs (Janus kinases) [49,50].

In summary, the present as well as previous studies from our group showed that the orphan nuclear receptor HNF-4 may have an important role in hepatic gene regulation, not only as a constitutive transcriptional activator but also as a 'molecular switch' utilized by pro-inflammatory (TNF α , interleukin 1) or anti-inflammatory (TGF β) cytokines in order to induce or inhibit the expression of a selection of HNF-4 target genes during conditions of inflammation. The mechanism of inhibition of HNF-4 transcriptional activity by NF- κ B described here may also apply to other hormone nuclear receptors that are homologous with HNF-4 and which bind to the same regulatory elements as HNF-4, but this hypothesis requires additional experimentation. If true, such a mechanism may have wide implications for nuclear receptor physiology.

We thank Dr C. Stournaras, Dr G. Mavrothalassitis, Dr A. Eliopoulos and Dr C. Tsatsanis (The Medical School, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece), Dr I. Talianidis, Dr A. Gafencu (Institute of Cellular Biology and Pathology Nicolae Simionescu, Bucharest, Romania) and Dr M. Hadzopoulou-Cladaras for reagents, protocols and discussions. We thank Dr G. Koutsodontis (The Medical School, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece) for assistance in the chromatin immunoprecipitation experiment. This research was supported by a grant from the Greek Ministry of Development (PENED-2001) and internal funds from the IMBB of Crete.

REFERENCES

- Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. and Evans, R. M. (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**, 835–839
- Sladek, F. M. and Seidel, S. D. (2001) in *Nuclear Receptors and Genetic Disease* (Burriss, T. P. and McCabe, E., eds.), pp. 309–361, Academic Press, San Francisco
- Giguere, V. (1999) Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocrinol. Rev.* **20**, 689–725
- Hadzopoulou-Cladaras, M., Kistanova, E., Evagelopoulou, C., Zeng, S., Cladaras, C. and Ladias, J. (1997) Functional domains of the nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4. *J. Biol. Chem.* **272**, 539–550
- Duda, K., Chi, Y. I. and Shoelson, S. E. (2004) Structural basis for HNF-4 α activation by ligand and co-activator binding. *J. Biol. Chem.* **279**, 23311–23316
- Dhe-Paganon, S., Duda, K., Iwamoto, M., Chi, Y.-I. and Shoelson, S. E. (2002) Crystal structure of the HNF-4 α ligand binding domain in complex with endogenous fatty acid ligand. *J. Biol. Chem.* **277**, 37973–37976
- Wisely, B. G., Miller, A. B., Davis, R. G., Thornquest, A. D., Johnson, R., Spitzer, T., Seffler, A., Shearer, B., Moore, J. T., Miller, A. B. et al. (2002) Hepatocyte nuclear factor 4 is a transcription factor that constitutively binds fatty acids. *Structure* **10**, 1225–1234
- Ruse, Jr, M. D., Privalsky, M. L. and Sladek, F. M. (2002) Competitive cofactor recruitment by orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4 α 1: modulation by the F domain. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 1626–1638
- Sladek, F. M., Ruse, M. D., Nepomuceno, L., Huang, S. M. and Stallcup, M. R. (1999) Modulation of transcriptional activation and co-activator interaction by a splicing variation in the F domain of nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4 α 1. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6509–6522
- Wang, J. C., Stafford, M. J. and Granner, D. K. (1998) SRC-1 and GRIP1 coactivate transcription with hepatocyte nuclear factor 4. *J. Biol. Chem.* **273**, 30847–30850
- Iordanidou, P., Aggelidou, E., Demetriades, C. and Hadzopoulou-Cladaras, M. (2005) Distinct amino acid residues may be involved in co-activator and ligand interactions in hepatocyte nuclear factor-4 α . *J. Biol. Chem.* **280**, 21810–21819
- Dell, H. and Hadzopoulou-Cladaras, M. (1999) CREB-binding protein is a transcriptional co-activator for hepatocyte nuclear factor-4 and enhances apolipoprotein gene expression. *J. Biol. Chem.* **274**, 9013–9021
- Soutoglou, E., Katrakili, N. and Talianidis, I. (2000) Acetylation regulates transcription factor activity at multiple levels. *Mol. Cell* **5**, 745–751
- Yoon, J. C., Puigserver, P., Chen, G., Donovan, J., Wu, Z., Rhee, J., Adelman, G., Stafford, J., Kahn, C. R., Granner, D. K. et al. (2001) Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional co-activator PGC-1. *Nature (London)* **413**, 131–138
- Hayhurst, G. P., Lee, Y. H., Lambert, G., Ward, J. M. and Gonzalez, F. J. (2001) Hepatocyte nuclear factor 4 α (nuclear receptor 2 α 1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 1393–1403
- Herbert, P. N., Assmann, G., Gotto, Jr, A. M. and Fredrickson, D. S. (1982) in *The Metabolic Basis of Inherited Diseases* (Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B., Fredrickson, D. S., Goldstein, J. L. and Brown, M. S., eds.), pp. 589–651, McGraw-Hill, New York
- Brown, W. V. and Baginsky, M. L. (1972) Inhibition of lipoprotein lipase by an apoprotein of human very low density lipoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**, 375–382
- Shelburne, F., Hanks, J., Meyers, W. and Quarfordt, S. (1980) Effect of apoproteins on hepatic uptake of triglyceride emulsions in the rat. *J. Clin. Invest.* **65**, 652–658
- Windler, E., Chao, X. and Havel, R. J. (1980) Regulation of the hepatic uptake of triglyceride-rich lipoproteins in the rat. Opposing effects of homologous apolipoprotein E and individual C apoproteins. *J. Biol. Chem.* **255**, 8303–8307
- Krauss, R. M., Herbert, P. M., Levy, R. I. and Fredrickson, D. S. (1973) Further observations on the activation and inhibition of lipoprotein lipase by apolipoproteins. *Circ. Res.* **33**, 403–411
- Ito, Y., Azrolan, N., O'Connell, A., Walsh, A. and Breslow, J. L. (1990) Hypertriglyceridemia as a result of human apo CIII gene expression in transgenic mice. *Science* **249**, 790–793
- de Silva, H. V., Lauer, S. J., Wang, J., Simonet, W. S., Weisgraber, K. H., Mahley, R. W. and Taylor, J. M. (1994) Overexpression of human apolipoprotein C-III in transgenic mice results in an accumulation of apolipoprotein B48 remnants that is corrected by excess apolipoprotein E. *J. Biol. Chem.* **269**, 2324–2335
- Karathanasis, S. K. (1985) Apolipoprotein multigene family: tandem organization of human apolipoprotein AI, CIII and AIV genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 6374–6378
- Ogami, K., Hadzopoulou-Cladaras, M., Cladaras, C. and Zannis, V. I. (1990) Promoter elements and factors required for hepatic and intestinal transcription of the human ApoCIII gene. *J. Biol. Chem.* **265**, 9808–9815
- Talianidis, I., Tambakaki, A., Tourounova, J. and Zannis, V. I. (1995) Complex interactions between SP1 bound to multiple distal regulatory sites and HNF-4 bound to the proximal promoter lead to transcriptional activation of liver-specific human APOCIII gene. *Biochemistry* **34**, 10298–10309

- 26 Kardassis, D., Tzamelis, I., Hadzopoulou-Cladaras, M., Talianidis, I. and Zannis, V. I. (1997) Distal apolipoprotein C-III regulatory elements F to J act as a general modular enhancer for proximal promoters that contain hormone response elements. Synergism between hepatic nuclear factor-4 molecules bound to the proximal promoter and distal enhancer sites. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**, 222–232
- 27 Ladias, J. A. A., Hadzopoulou-Cladaras, M., Kardassis, D., Cardot, P., Cheng, J., Zannis, V. I. and Cladaras, C. (1992) Transcriptional regulation of human apolipoprotein genes ApoB, ApoCIII and ApoAII by members of the steroid hormone receptor superfamily HNF-4, ARP-1, EAR-2 and EAR-3. *J. Biol. Chem.* **267**, 15849–15860
- 28 Lavrentiadou, S. N., Hadzopoulou-Cladaras, M., Kardassis, D. and Zannis, V. I. (1999) Binding specificity and modulation of the human ApoCIII promoter activity by heterodimers of ligand-dependent nuclear receptors *Biochemistry* **38**, 964–975
- 29 Lacorte, J. M., Ktistaki, E., Beigneux, A., Zannis, V. I., Chambaz, J. and Talianidis, I. (1997) Activation of CAAT enhancer-binding protein delta (C/EBPdelta) by interleukin-1 negatively influences apolipoprotein C-III expression. *J. Biol. Chem.* **272**, 23578–23584
- 30 Lacorte, J. M., Beigneux, A., Parant, M. and Chambaz, J. (1997) Repression of apoC-III gene expression by TNF α involves C/EBP δ /NF-IL6 β via an IL-1 independent pathway. *FEBS Lett.* **415**, 217–220
- 31 Hadzopoulou-Cladaras, M., Lavrentiadou, S. N., Zannis, V. I. and Kardassis, D. (1998) Transactivation of the ApoCIII promoter by ATF-2 and repression by members of the Jun family. *Biochemistry* **37**, 14078–14087
- 32 Koj, A. (1998) Termination of acute-phase response: role of some cytokines and anti-inflammatory drugs. *Gen. Pharmacol.* **31**, 9–18
- 33 Shull, M. M., Ormsby, I., Kier, A. B., Pawlowski, S., Diebold, R. J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., Calvin, D. et al. (1992) Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature (London)* **359**, 693–699
- 34 Moustakas, A., Souchelnytskyi, S. and Heldin, C. H. (2001) Smad regulation in TGF- β signal transduction. *J. Cell Sci.* **114**, 4359–4369
- 35 Massague, J. (1998) TGF- β signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 753–791
- 36 ten Dijke, P. and Hill, C. S. (2004) New insights into TGF- β –Smad signalling. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 265–273
- 37 Kardassis, D., Pardali, K. and Zannis, V. I. (2000) SMAD proteins transactivate the human ApoCIII promoter by interacting physically and functionally with hepatocyte nuclear factor 4. *J. Biol. Chem.* **275**, 41405–41414
- 38 Chou, W. C., Pocola, V., Shiraishi, K., Valcourt, U., Moustakas, A., Hadzopoulou-Cladaras, M., Zannis, V. I. and Kardassis, D. (2003) Mechanism of a transcriptional cross talk between transforming growth factor- β -regulated Smad3 and Smad4 proteins and orphan nuclear receptor hepatocyte nuclear factor-4. *Mol. Biol. Cell* **14**, 1279–1294
- 39 Prokova, V., Mosialos, G. and Kardassis, D. (2002) Inhibition of transforming growth factor β signalling and Smad-dependent activation of transcription by the latent membrane protein 1 of Epstein–Barr virus. *J. Biol. Chem.* **277**, 9342–9350
- 40 Ktistaki, E., Lacorte, J. M., Katrakili, N., Zannis, V. I. and Talianidis, I. (1994) Transcriptional regulation of the apolipoprotein A-IV gene involves synergism between a proximal orphan receptor response element and a distant enhancer located in the upstream promoter region of the apolipoprotein C-III gene. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4689–4696
- 41 Vorgia, P., Zannis, V. I. and Kardassis, D. (1998) A short proximal promoter and the distal hepatic control region-1 (HCR-1) contribute to the liver specificity of the human apolipoprotein C-II gene. Hepatic enhancement by HCR-1 requires two proximal hormone response elements which have different binding specificities for orphan receptors HNF-4, ARP-1 and EAR-2. *J. Biol. Chem.* **273**, 4188–4196
- 42 Koutsodontis, G. and Kardassis, D. (2004) Inhibition of p53-mediated transcriptional responses by mithramycin A. *Oncogene* **23**, 9190–9200
- 43 Koutsodontis, G., Moustakas, A. and Kardassis, D. (2002) The role of Sp1 family members, the proximal GC-rich motifs and the upstream enhancer region in the regulation of the human cell cycle inhibitor p21WAF-1/Cip1 gene promoter. *Biochemistry* **41**, 12771–12784
- 44 Hatzivassiliou, E. and Mosialos, G. (2002) Cellular signalling pathways engaged by the Epstein–Barr virus transforming protein LMP1. *Front. Biosci.* **7**, d319–d329
- 45 Schiller, M., Javelaud, D. and Mauviel, A. (2004) TGF- β -induced SMAD signalling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *J. Dermatol. Sci.* **35**, 83–92
- 46 Verrecchia, F., Wagner, E. F. and Mauviel, A. (2002) Distinct involvement of the Jun-N-terminal kinase and NF- κ B pathways in the repression of the human COL1A2 gene by TNF- α . *EMBO Rep.* **3**, 1069–1074
- 47 Kan, H.-Y., Georgopoulos, S. and Zannis, V. I. (2000) A hormone response element in the human apolipoprotein CIII (ApoCIII) enhancer is essential for intestinal expression of the ApoA-I and ApoCIII genes and contributes to the hepatic expression of the two linked genes in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **275**, 30423–30431
- 48 Lee, Y. K., Dell, H., Dowhan, D. H., Hadzopoulou-Cladaras, M. and Moore, D. D. (2000) The orphan nuclear receptor SHP inhibits hepatocyte nuclear factor 4 and retinoid X receptor transactivation: two mechanisms for repression. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 187–195
- 49 De Fabiani, E., Mitro, N., Anzulovich, A. C., Pinelli, A., Galli, G. and Crestani, M. (2001) The negative effects of bile acids and tumor necrosis factor- α on the transcription of cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A1) converge to hepatocyte nuclear factor-4: a novel mechanism of feedback regulation of bile acid synthesis mediated by nuclear receptors. *J. Biol. Chem.* **276**, 30708–30716
- 50 Li, X., Salisbury-Rowswell, J., Murdock, A. D., Forse, R. A. and Burke, P. A. (2002) Hepatocyte nuclear factor 4 response to injury involves a rapid decrease in DNA binding and transactivation via a JAK2 signal transduction pathway. *Biochem. J.* **368**, 203–211

Received 30 January 2006/1 June 2006; accepted 13 June 2006

Published as BJ Immediate Publication 13 June 2006, doi:10.1042/BJ20060169