

**ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΕΡΕΥΝΑΣ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
«ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ & ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗ»**

**“ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ
ΠΟΥ ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΥΝ ΣΤΙΣ ΔΙΑΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ
ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΤΟΠΩΝ ΚΥΤΟΚΙΝΩΝ”**

**Τελική Αναφορά
Μεταπτυχιακής Ερευνητικής Εργασίας**

**ΠΕΤΡΟΣ ΤΖΕΡΠΟΣ
Μεταπτυχιακός φοιτητής
Διατμηματικού Προγράμματος
«Μοριακή Βιολογία-Βιοιατρική»**

ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2009

Ευχαριστίες

Θα ήταν μεγάλη παράλειψη αν δεν ευχαριστούσα όσους με βοήθησαν με τον ένα ή τον άλλο τρόπο στην ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας. Μεγάλο ευχαριστώ οφείλω κατ'αρχάς στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Χαράλαμπο Σπηλιανάκη για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω τη μεταπτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο του, καθώς και για την καθοδήγηση που μου παρείχε καθ'όλη τη διάρκεια του τελευταίου έτους.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Ι. Παπαματθαϊάκη ως Επιβλέποντα Καθηγητή αυτής της εργασίας και την Ερευνήτρια κ. Κ. Μαμαλάκη για τη συμμετοχή της στη τριμελή επιτροπή. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τη Εμμανουέλα Καφετάκη, τη Χρύσα Δεληγιάννη, την Καλλίνα Στρατήγη, τον Μιχάλη Σαρρή και τον Θωδωρή Σαββίδη που διαμόρφωσαν μια ευχάριστη ατμόσφαιρα συνεργασίας μες στο εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας & Βιοτεχνολογίας για τη παροχή υποτροφίας κατά τη μεγαλύτερη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος και την οικογένειά μου για την συμπαράσταση που μου παρείχε καθ'όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη	4
Εισαγωγή	5
A. Πυρηνική οργάνωση	6
I. Διαμερισματοποίηση του πυρήνα.	6
II. Διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις.	7
B. Διαφοροποίηση των Th1/Th2 κυττάρων	8
I. Μοριακοί μηχανισμοί της διαφοροποίησης των Th1/Th2 κυττάρων .	8 9
II. Ρυθμιστικά στοιχεία του γενετικού τόπου TH2.	10
III. Οι ρυθμιστικές περιοχές RHS6 και CNS1.	11
IV. Χρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις στα CD4+ T βοηθητικά κύτταρα.	11
Γ. Σκοπός της εργασίας	12
Υλικά –Μέθοδοι	13
Αποτελέσματα	20
A. Ανάλυση του TH2 γενετικού τόπου	21
B. Αποτυπώματα πρόσδεσης πρωτεϊνών στα ρυθμιστικά στοιχεία RHS6 & CNS1	22
Συζήτηση	28
Βιβλιογραφία	30

Περίληψη

Η πολυεπίπεδη οργάνωση του γονιδιώματος και ανώτερες δομές της χρωματίνης είναι καίρια χαρακτηριστικά του πυρήνα ανώτερων οργανισμών. Πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν ότι η υποπυρηνική τοποθέτηση γενετικών τόπων και χρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις (*cis* & *trans*) μες στον πυρήνα φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην γονιδιακή έκφραση. Αν και η ρύθμιση της μεταγραφής από *cis* ρυθμιστικά στοιχεία (υποκινητές, ενισχυτές, LCRs κά.) έχει αναλυθεί σε βάθος κατά το παρελθόν, μόλις πρόσφατα έχει διαφανεί πιθανός ρόλος στη μεταγραφική ρύθμιση των *trans* αλληλεπιδράσεων μεταξύ διαφορετικών χρωμοσωμάτων. Επειδή μηχανιστικές λεπτομέρειες πως δημιουργούνται οι διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις δεν είναι γνωστές, ο κύριος στόχος αυτής της μεταπτυχιακής μελέτης ήταν η συμβολή στη διαλεύκανση του μηχανισμού των διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων και ειδικότερα, ο χαρακτηρισμός πρωτεϊνικών συμπλόκων που επάγουν ή/και σταθεροποιούν διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις σε CD4+ κύτταρα ποντικού. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήσαμε τη τεχνική DNase I footprinting για τον χαρακτηρισμό πρωτεϊνικών συμπλόκων που προσδένονται σε ρυθμιστικά στοιχεία του γενετικού τόπου Th2 που συμμετέχουν σε διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις σε CD4+ κύτταρα ποντικού.

Abstract

Genome organization and high order chromatin structure are key features in the highly compartmentalized and dynamic environment of the eukaryotic nucleus. Recent studies have indicated that gene positioning and chromosomal interactions (*cis* & *trans*) in the nucleus may play an important role in gene expression. Although regulation of gene expression by *cis* regulatory elements (promoters, enhancers, silencers, locus control regions etc) is well established, it was not until recently shown that *trans* interactions between different chromosomes can play a role in transcriptional regulation. Because mechanistic details of how these interactions are formed are still lacking, the main aim of this thesis was to contribute to the elucidation of the molecular mechanisms of trans interactions and to establish a role for specific protein complexes in the generation and maintenance of interchromosomal interactions in mouse T cells. To this end, we applied DNase I footprinting assay to characterize the protein factors that bind to regulatory regions to the TH2 locus and potentially regulate interchromosomal interactions in CD4+ T helper cells.

Εισαγωγή

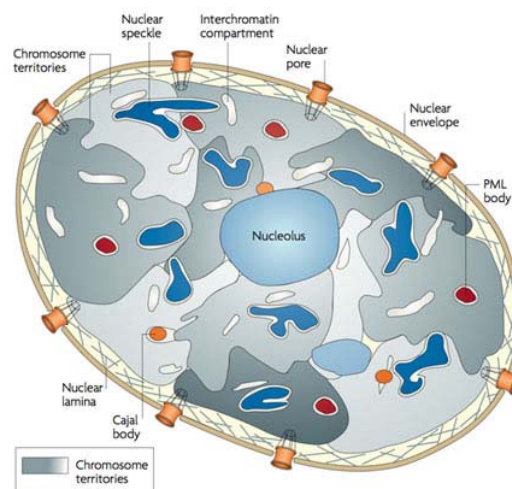
A. Πυρηνική οργάνωση

I. Διαμερισματοποίηση του πυρήνα

Ο μεσοφασικός πυρήνας των ανώτερων οργανισμών είναι ένα πολύ καλά οργανωμένο και διαμερισματοποιημένο οργανίδιο (Spector, 2001) (Εικόνα 1). Πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν την ύπαρξη υποπυρηνικών δομών και περιοχών όπου συγκεκριμένες κυτταρικές λειτουργίες (μεταγραφή, μάτισμα κτλ.) λαμβάνουν χώρα. Αυτές οι υποπυρηνικές δομές και περιοχές φαίνεται να είναι εξαιρετικά δυναμικές στη φύση τους με χαρακτηριστική την γρήγορη ανταλλαγή πρωτεϊνών που γίνεται μεταξύ αυτών και του πυρηνοπλάσματος (nucleoplasm).

Ο πυρήνας καθορίζεται από τον πυρηνικό φάκελο, μια δομή διπλής μεμβράνης. Η εξωτερική μεμβράνη συνδέεται με το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ συντήξεις της εξωτερικής και εσωτερικής μεμβράνης διαμορφώνουν τους πυρηνικούς πόρους, οι οποίοι χρησιμεύουν για τη μεταφορά υλικών μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα. Το περιφερικό πυρηνικό έλασμα (peripheral nuclear lamina) βρίσκεται εσωτερικά του πυρηνικού φακέλου και αποτελείται από τις πρωτεΐνες των λαμινών A/C και B και θεωρείται ότι παίζει ρόλο στη ρύθμιση της δομής του πυρηνικού φακέλου, καθώς και στην τοποθέτηση της χρωματίνης στην περιφέρεια του πυρήνα κατά τη μεσόφαση.

Μεσ στο πυρηνόπλασμα, όλα τα χρωμοσώματα διευθετούνται σε διακριτές περιοχές, τις χρωμοσωμικές περιοχές (chromosome territories). Ενεργά γονίδια βρίσκονται συνήθως στην περιφέρεια αυτών των περιοχών ενώ γενωμικές περιοχές που σχετίζονται με την ετεροχρωματίνη βρίσκονται συνήθως εντός των χρωμοσωμικών περιοχών. Επίσης, έχουν παρατηρηθεί αρκετά υποπυρηνικά σωματίδια (nuclear bodies) με διακριτές κατά τεκμήριο λειτουργίες. Για παράδειγμα, 25-50 σωματίδια με στικτό πρότυπο (nuclear speckles) παρατηρούνται μεσ στο πυρήνα και αποτελούνται από πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο μάτισμα πρώιμων mRNAs. Επίσης, διακριτά σωματίδια μεταγραφής (transcription factories) παρατηρούνται σε μεγάλο αριθμό (5.000-10.000 ανά πυρήνα) και θεωρείται ότι αποτελούν προσυγκροτημένα σημεία μεταγραφής όπου γενετικοί τόποι κινούνται προς αυτά για να μεταγραφούν. Επιπλέον, έχουν χαρακτηριστεί και άλλα υποπυρηνικά σωματίδια με διάφορες λειτουργίες όπως ο πυρηνίσκος (σύνθεση rRNA), τα σωματίδια Cajal (βιογένεση snRNPs), τα σωματίδια PML (μεταγραφική ρύθμιση, στόχος ιικής μόλυνσης) και άλλα.



Εικόνα 1 Πυρηνική οργάνωση και υποπυρηνικά σωματίδια.

II. Διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ DNA ρυθμιστικών περιοχών που βρίσκονται στο ίδιο χρωμόσωμα, πχ. μεταξύ υποκινητών και ενισχυτών ενός γονιδίου, έχουν περιγραφεί και χαρακτηριστεί σε μεγάλο βάθος κατά το παρελθόν. Τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις φαίνεται ότι συνεισφέρουν στη ρύθμιση της γονιδιακής ρύθμισης μέσω της διαμόρφωσης ανώτερων δομών χρωματίνης. Η χρησιμοποίηση νέων τεχνικών, όπως της 3C και της 4C τεχνικής, έχει βοηθήσει στο χαρακτηρισμό νέων ενδοχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων στην κλίμακα ολόκληρου του γονιδιώματος. Έτσι, φαίνεται ότι οι ενδοχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις σχηματίζονται σε μεγάλη συχνότητα και υπονοούν έναν γενικευμένο μηχανισμό διαμόρφωσης ανώτερων δομών χρωματίνης (Sexton et al, 2009). Ωστόσο, χρησιμοποιώντας αυτές τις τεχνικές έχουν χαρακτηριστεί και διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις. Παρακάτω αναφέρονται μερικά παραδείγματα από πρόσφατα περιγεγραμμένες διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις σε θηλαστικά.

Στην προσπάθεια να αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός της επιλογής και έκφρασης μόνο ενός οσφρητικού υποδοχέα ανά κύτταρο (στο ρηνικό επιθήλιο), χρησιμοποιώντας την 4C τεχνική, βρέθηκε ότι ο ενισχυτής H αλληλεπιδρά με πολλά γονίδια οσφρητικών υποδοχέων (Lomvardas et al, 2006). Με τη χρησιμοποίηση της τεχνικής DNA-FISH επιβεβαιώθηκε ότι ο ενισχυτής H αλληλεπιδρά με ένα αλληλομορφο ενός γονιδίου οσφρητικού υποδοχέα ανά κύτταρο. Με DNA/RNA-FISH, δείχτηκε ότι αλληλεπίδραση του ενισχυτή H συσχετίζεται άμεσα με την έκφραση του αλληλεπιδρώντος γονιδίου του οσφρητικού υποδοχέα. Έτσι, φαίνεται ότι μέσω διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων ενός ενισχυτή επιλέγεται και καθορίζεται το ένα γονίδιο οσφρητικού υποδοχέα που θα εκφραστεί σε ένα μόνο κύτταρο του ρινικού επιθηλίου.

Κατά τη διαφοροποίηση των εμβρυακών βλαστικών κυττάρων, λαμβάνει χώρα η απενεργοποίηση του X-χρωμοσώματος στα θηλυκά κύτταρα. Αμέσως πριν την τυχαία επιλογή του X-χρωμοσώματος που θα απενεργοποιηθεί, παρατηρείται η διαχρωμοσωμική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο X-χρωμοσωμάτων (Xu et al, 2006; Bacher et al, 2006). Οι γενωμικές περιοχές που αλληλεπιδρούν είναι οι περιοχές που ελέγχουν και την έναρξη της απενεργοποίησης του X-χρωμοσώματος. Αυτή η αλληλεπίδραση θεωρείται ότι παίζει ρόλο στην έναρξη απενεργοποίησης του X-χρωμοσώματος και στην «καταμέτρηση» των X-χρωμοσωμάτων από το κύτταρο. Η αλληλεπίδραση αυτή εξαρτάται από τις πρωτεΐνες CTCF (Xu et al, 2007) και OCT4 (Donohoe et al, 2009) ενώ και η ενεργή μεταγραφή είναι απαραίτητη για αυτή την αλληλεπίδραση (Xu et al, 2007).

Ένα άλλο παράδειγμα διαχρωμοσωμικής αλληλεπίδρασης είναι αυτή μεταξύ του γενετικού τόπου (Igf2)/H19 και του γενετικού τόπου Wsb1/Nf1 (Ling et al, 2006). Η αλληλεπίδραση αυτή λαμβάνει χώρα μόνο στο ένα αλληλόμορφο υποδηλώνοντας ότι οι διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις ρυθμίζουν το γενετικό εντύπωμα των γονιδίων. Αυτή η αλληλεπίδραση εξαρτάται από την πρωτεΐνη CTCF που έχει προταθεί ότι ίσως φέρνει κοντά τα αλληλεπιδρώντα αλληλόμορφα.

Πρόσφατα δείχτηκε ότι διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις συμμετέχουν και στη ρύθμιση της έκφρασης της IFN-β σε HeLa κύτταρα μετά από ιική μόλυνση (Apostolou & Thanos, 2008). Ο υποκινητής της IFN-β αλληλεπιδρά με τρεις γενετικούς τόπους που έχουν θέση πρόσδεσης για τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κβ. Αυτοί οι γενετικοί τόποι περιέχουν επίσης επαναλαμβανόμενο DNA τύπου Alu. Αυτές οι διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις φαίνεται ότι επηρεάζουν την κινητική

σχηματισμού του ενισχυοσώματος και την έκφραση της της IFN-β από ένα αλληλόμορφο κατά τα πρώτα στάδια μετά από ιική μόλυνση.

Τέλος, γονίδια που επάγονται από οιστρογόνο αλληλεπιδρούν μεταξύ τους καθώς μεταγράφονται. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές εξαρτούνται από μεταγραφικούς παράγοντες καθώς και από τη δράση της πυρηνικής ακτίνης και μυοσίνης, δείχνοντας ότι συμμετέχουν στην ενεργή μεταφορά γενωμικών περιοχών. Επίσης, οι αλληλεπιδράσεις αυτές λαμβάνουν χώρα σε υποπυρηνικά σωματίδια που υπάρχουν παράγοντες ματίσματος (nuclear speckles).

B. Διαφοροποίηση των Th1/Th2 κυττάρων

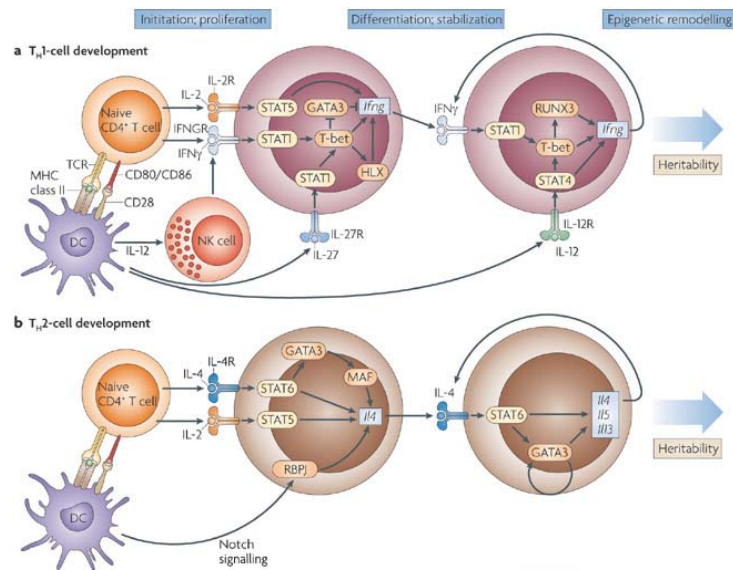
I. Μοριακοί μηχανισμοί της διαφοροποίησης των Th1/Th2 κυττάρων

Η ανοσολογική απόκριση σε διάφορα είδη μικροοργανισμών ενορχηστρώνεται σε μεγάλο βαθμό από τη δράση των διάφορων υποομάδων των T βοηθητικών κυττάρων. Τα CD4⁺ T βοηθητικά κύτταρα (Th) αρχικά περιγράφηκαν όταν παρατηρήθηκε ότι διαφορετικοί κλώνοι T κυττάρων μπορούσαν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με την αμοιβαία αποκλειστική παραγωγή κυτοκινών. Έτσι, Th1 κύτταρα ονομάστηκαν αυτά που παράγουν IFN-γ και Th2 τα κύτταρα που παράγουν IL-4, IL-5 και IL-13. Η δράση των Th1 κυττάρων είναι εξαιρετικά σημαντική για την άμυνα του ξενιστή σε ενδοκυτταρικά παθογόνα, ενώ τα Th2 κύτταρα για την άμυνα έναντι μολύνσεων σε έλμινθες. Πρόσφατα, έχουν χαρακτηριστεί και άλλες υποομάδες CD4⁺ T βοηθητικών κυττάρων, όπως τα Th17 κύτταρα που παράγουν IL-17 και τα Th9 που παράγουν IL-9 (Amsen et al, 2009).

Η διαφοροποίηση των πρώιμων (naive) CD4⁺ T βοηθητικών κυττάρων (Εικόνα 2) επιτυγχάνεται μετά από σηματοδότηση από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και ενεργοποίησή των πρώιμων CD4⁺ T βοηθητικών κυττάρων μέσω του υποδοχέα TCR και άλλων συνεργοποιητικών μορίων. Αρχικά, επιτυγχάνεται επαγωγή της IL-2 και ενεργοποίηση της πρωτεΐνης STAT5 καθώς και έναρξη του κυτταρικού κύκλου. Η διαφοροποίηση στις διάφορες υποομάδες καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τις συγκεντρώσεις κυτοκινών στο άμεσο μικροπεριβάλλον των κυττάρων, καθώς και στην ενεργοποίηση δικτύων μεταγραφικών παραγόντων που δρουν μετά την ενεργοποίησή μέσω του υποδοχέα TCR (Wilson et al, 2009).

Η ανάπτυξη των Th1 κυττάρων αρχίζει με την ενεργοποίηση της STAT1 από την IFN-γ και την IL-27 που παράγονται από τα NK κύτταρα και αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, αντίστοιχα. Η STAT1, μαζί με επαγόμενους μεταγραφικούς παράγοντες από την ενεργοποίηση του TCR, επάγει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα T-bet, ο οποίος είναι καθοριστικός παράγοντας για την διαφοροποίηση των Th1 κυττάρων. Ο T-bet με τη σειρά του θα επάγει την έκφραση της IFN-γ, του υποδοχέα IL-12Rβ2 και των μεταγραφικών παραγόντων HLX και RUNX3, ενώ δρα ανταγωνιστικά στη δράση του GATA3. Μετά την επαγωγή της έκφρασής του, ο υποδοχέας IL-12Rβ2 ετεροδιμερίζεται με τον υποδοχέα IL-12Rβ1 και σχηματίζει τον λειτουργικό υποδοχέα IL-12R, ο οποίος επιτρέπει την παραγόμενη από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα IL-12 να ενεργοποιήσει τη STAT4. Η STAT4, ο T-bet, ο HLX και ο RUNX3 προσδένονται στο γενετικό τόπο της IFN-γ και ενεργοποιούν την έκφρασή της, η οποία με τη σειρά της θα ενδυναμώνει την διαφοροποίηση σε Th1 κύτταρα μέσω της ενεργοποίησης της STAT1 μέσω ενός κύκλου θετικής ανάδρασης (positive feedback loop). Παράλληλα, ο T-bet και ο RUNX3 προσδένονται στο γενετικό τόπο της IL-4 και καταστέλλουν την έκφρασή

της, παρεμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο τη διαφοροποίηση σε Th2 κύτταρα (Wilson et al, 2009).



Εικόνα 2 Η διαφοροποίηση των Th1 και Th2 κυττάρων

Η ανάπτυξη των Th2 κυττάρων αρχίζει με την ενεργοποίηση της STAT6 από την IL-4 και μαζί με επαγόμενους μεταγραφικούς παράγοντες από την ενεργοποίηση του TCR, επάγει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα GATA3, ο οποίος είναι καθοριστικός παράγοντας για την διαφοροποίηση των Th2 κυττάρων. Εναλλακτικά, η σηματοδότηση μέσω Notch μπορεί να ενεργοποιήσει τον GATA3 με έναν τρόπο μη εξαρτώμενο από STAT6. Ο GATA3 επάγει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα MAF που συνεργεί στην ενεργοποίηση της IL-4, ενώ μαζί την STAT6, ο GATA3 ενεργοποιεί την έκφραση των κυτοκινών IL-4, IL-5 και IL-13. Η διαφοροποίηση σε Th2 κύτταρα σταθεροποιείται από την αυτοενεργοποίηση του GATA3, την αυτοκρινή και παρακρινή ενεργοποίηση της IL-4 από την STAT6 και την ανταγωνιστική δράση της STAT6 και του GATA3 στην έκφραση της IFN-γ και στη διαφοροποίηση σε Th1 κύτταρα (Wilson et al, 2009).

II. Ρυθμιστικά στοιχεία του γενετικού τύπου TH2

Τα γονίδια IL-4, IL-5 και IL-13 του ποντικού βρίσκονται μαζί σε μια γενωμική περιοχή (“γενετικός τόπος TH2”) του χρωμοσώματος 11 συνολικού μήκους 120 κιλοβάσεων. Ανάμεσα στα γονίδια IL-5 και IL-13 βρίσκεται το γονίδιο Rad50, το οποίο εκφράζεται συστατικά και η ρύθμιση της έκφρασής του είναι ανεξάρτητη από αυτή των γονιδίων των IL-4, IL-5 και IL-13. Η ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων IL-4, IL-5 και IL-13 εξαρτάται, εκτός από τους υποκινητές τους, και από πολλά ρυθμιστικά στοιχεία DNA που έχουν χαρακτηριστεί στο γενετικό τόπο TH2. Αυτά τα ρυθμιστικά στοιχεία έχουν καθοριστεί πειραματικά με την ανακάλυψη περιοχών που δείχνουν υπερευαισθησία σε DNase I, με τη μελέτη επιγενετικών τροποποιήσεων ιστονών και DNA μεθυλίωσης σε περιοχές του γενετικού τόπου TH2, με τη χρήση διαγονιδιακών ποντικών καθώς και με τη πρόβλεψη συντηρημένων περιοχών ανάμεσα στα είδη με τη χρήση υπολογιστικών μεθόδων.

Πολλά από αυτά τα ρυθμιστικά στοιχεία βρίσκονται γειτονικά των γονιδίων IL-4 και IL-13 και ελέγχουν την έκφραση διαγονιδιακών κατασκευών-μαρτύρων (reporter transgenes) στα Th2 κύτταρα. Ανάμεσα σε αυτά είναι το ρυθμιστικό

στοιχείο HS5 το οποίο είναι εξαρτώμενο από σηματοδότηση Notch. Επίσης, αρκετά ρυθμιστικά στοιχεία βρίσκονται πιο μακριά από τις κωδικές περιοχές των γονιδίων. Επίσης, τέσσερα ρυθμιστικά στοιχεία (RHS4-7) αποτελούν τον Th2 LCR (Locus Control Region) στο 3' άκρο του γονιδίου *Rad50*. Η λειτουργία των ρυθμιστικών στοιχείων ως LCR αποδείχτηκε με την δημιουργία διαγονιδιακού ποντικού με την περιοχή αυτή που μπορούσε να επάγει την έκφραση γειτονικών γονιδίων ανεξάρτητα από την περιοχή ένθεσής της στο γονιδίωμα (Lee et al, 2009).

DNase I HS site(s)	Alternative name	HS pattern ^a	Effect of deletion ^b
<i>Rad50</i> 3' introns			
LCR O	RHS 5	Th2, Th1, MC	
LCR A	RHS 6	Th2, Th1, MC	
LCR B	RHS 6	Th2, Stimulated Th1, MC	
LCR C	RHS 7	Stimulated Th2, MC	↓IL-4/IL-13/IL-5 in Th2 cells ↓LCR/promoter interactions
<i>Il13</i>			
HS I	CGRE	Th2, MC	
HS II	<i>Il13</i> promoter	Th2, MC	
HS III		Th2, MC	
MCHS		MC only	
<i>Il13/Il4</i> intergenic			
HSS3		Th2, Th1, naive T, MC	
HSS2 and HSS1	CNS1	Th2	↓IL-4/IL-13 in Th2 cells
HS 0		Th2, MC	
<i>Il4</i>			
HS I	<i>Il4</i> promoter	Th2, MC	
—	CIRE	None	
HS II	<i>Il4</i> intronic enhancer	Th2, MC	
HS III			
<i>Il4/Klf3a</i> intergenic			
HS IV	<i>Il4</i> silencer	Th2, Th1, naive T, MC	↑IL-4 in naive T, Th1, Th2 cells, MC
HS V _A	<i>Il4</i> 3' enhancer	Stimulated Th2, MC	↓IL-4/IL-13 in Th2, MC ^c
HS V	CNS2	Th2, MC	

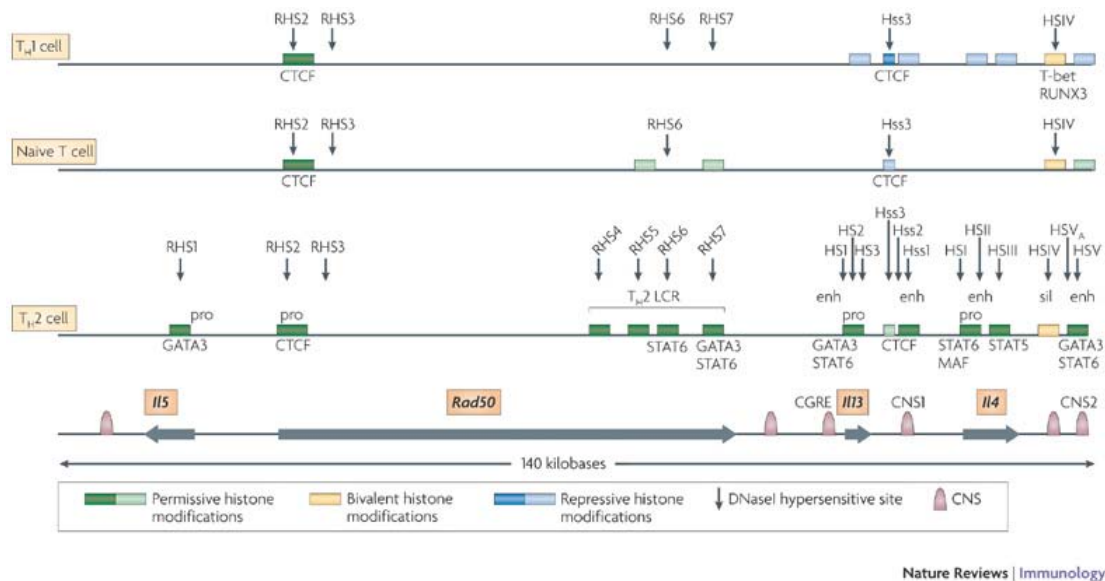
Εικόνα 3 Τα ρυθμιστικά στοιχεία του Th2 γενετικού τόπου

III. Οι ρυθμιστικές περιοχές RHS6 και CNS1

Από τις περιοχές του TH2 LCR, οι RHS4, RHS5 και RHS7 δείχνουν υπερευαισθησία σε DNase I μόνο στα Th2 κύτταρα, ενώ η περιοχή RHS6 είναι υπερευαίσθητη σε DNase I τόσο στα πρώιμα κύτταρα, όσο και στα Th2 και Th1 κύτταρα (Εικόνα 4). Αυτό το γεγονός καταδεικνύει τη σημασία της RHS6 κατά την αρχική ενεργοποίηση του Th2 γενετικού τόπου, καθώς φαίνεται να είναι η μόνη προσβάσιμη περιοχή του TH2 LCR σε μεταγραφικούς παράγοντες. Επίσης, η RHS6 είναι η μόνη περιοχή του TH2 LCR που συμμετέχει σε διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις (βλέπε παρακάτω). Ωστόσο, η σημασία αυτής της περιοχής μένει να αποδειχτεί με γενετική αφαίρεση της (knock out) (Lee et al, 2009).

Η πιο συντηρημένη περιοχή του Th2 γενετικού τόπου είναι η CNS1. Βρίσκεται ανάμεσα στα γονίδια *IL-4* και *IL-13* και περιέχει δύο υπερευαίσθητες σε DNase I περιοχές (HSS1 και HSS2) στα Th2 κύτταρα. Ακετυλίωση της ιστόνης H3 στην CNS1 συσχετίζεται με αυξημένη δυνατότητα έκφρασης της *IL-4*. Η σημασία της περιοχής αυτής στην ρύθμιση της έκφρασης των *IL-4* και *IL-13* διαφάνηκε όταν αφαίρεση της (CNS1 knock out) μείωσε τη δυνατότητα έκφρασης της *IL-4* και *IL-13* ενώ και η *in vivo* ανοσολογική απόκριση των Th2 κυττάρων μειώθηκε. Επίσης, η

περιοχή αυτή συμμετέχει σε ενδοχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις με αρκετά ρυθμιστικά στοιχεία του Th2 γενετικού τόπου, ενώ προσδένονται σε αυτή πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην διαμόρφωση ανώτερης δομής της χρωματίνης, όπως η SATB1 και η RAD21 (cohesin) (Ansel et al, 2006).



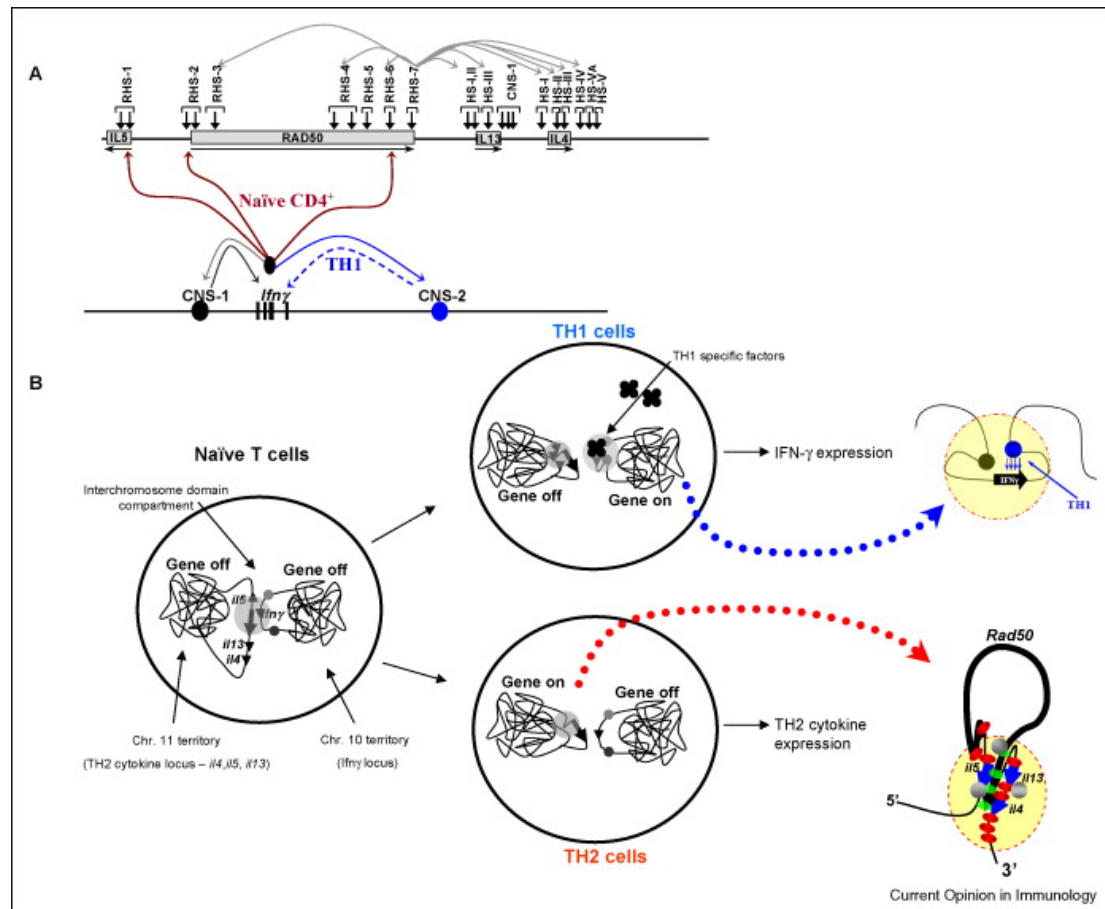
Εικόνα 4 Ο γενετικός τόπος Th2

IV. Χρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις στα CD4+ T βοηθητικά κύτταρα

Πολλά από τα ρυθμιστικά στοιχεία του Th2 γενετικού τόπου, βρίσκονται μακριά από τις κωδικές περιοχές των γονιδίων των IL-4, IL-5 και IL-13. Η δράση τους σ' αυτές φαίνεται να εξαρτάται από την τρισδιάστατη δομή της χρωματίνης. Με τη χρησιμοποίηση της τεχνικής 3C, δείχτηκε ότι πολλά από αυτά τα ρυθμιστικά στοιχεία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους σχηματίζοντας ένα βρόγχο χρωματίνης (chromatin loop). Βρέθηκε ότι υποκινητές και ενισχυτές των γονιδίων αλληλεπιδρούν με τον Th2 LCR, δημιουργώντας μια δομή που επιτρέπει προφανώς την συντονισμένη έκφραση τους (Spilianakis & Flavell, 2004). Σε ποντίκι με γενετική αφαίρεση της RHS7, τόσο οι αλληλεπιδράσεις των ρυθμιστικών στοιχείων όσο και τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων IL-4, IL-5 και IL-13 ήταν μειωμένα (Lee et al, 2005).

Παράλληλα με τις ενδοχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις, παρατηρήθηκε ότι 3 ρυθμιστικά στοιχεία του Th2 γενετικού τόπου (RHS2, RHS3 και RHS6) που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11 αλληλεπιδρούν στα πρώιμα CD4+ T βοηθητικά κύτταρα με τον υποκινητή της IFN- γ που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 10. Αυτές οι διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις μειώνονται κατά τη διαφοροποίηση τόσο σε TH1 όσο και σε TH2 κύτταρα. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές επιβεβαιώθηκαν και με DNA-FISH που έδειξε σε ανάλυση ανά κύτταρο ότι οι αλληλεπιδράσεις αυτές λαμβάνουν χώρα σε 36,3 % των κυττάρων και αφορούν μόνο ένα αλληλόμορφο των γενετικών τόπων. Σε ποντίκι με γενετική αφαίρεση της RHS7, τόσο οι αλληλεπιδράσεις των δύο γενετικών τόπων όσο και τα επίπεδα έκφρασης της IFN- γ ήταν μειωμένα. Επειδή τα πρώιμα CD4+ T βοηθητικά κύτταρα δεν εκφράζουν ούτε IFN- γ αλλά ούτε και IL-4, IL-5 και IL-13, προτάθηκε ότι αυτές οι διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις

διατηρούν τους δύο γενετικούς τύπους σε μια διαμόρφωση έτοιμη για άμεση ενεργοποίηση (poised conformation) (Spilianakis et al , 2005).



Εικόνα 5 Ενδο- και δια-χρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις στα CD4+ T βοηθητικά κύτταρα

Γ. Σκοπός της εργασίας

Η ανακάλυψη των διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων στα CD4+ T βοηθητικά κύτταρα κατέδειξε για πρώτη φορά ότι η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μπορεί να εξαρτάται και από την υποπυρηνική τοποθέτηση των γενετικών τόπων. Η διαλεύκανση του μηχανισμού των διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων είναι μεγάλης σημασίας, καθώς οι αλληλεπιδράσεις τέτοιου είδους δεν περιορίζονται μόνο στα CD4+ T βοηθητικά κύτταρα, αλλά παρατηρούνται και σε πολλούς άλλους κυτταρικούς τύπους και φαίνεται ότι πρόκειται για πολύ γενικό φαινόμενο.

Για τη μελέτη του μηχανισμού των διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων είναι απαραίτητη η χαρακτηρισμός των πρωτεϊνικών συμπλόκων που συμμετέχουν είτε στη δημιουργία είτε στη σταθεροποίηση αυτών των αλληλεπιδράσεων. Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν ο χαρακτηρισμός των πρωτεϊνικών συμπλόκων που προσδένονται στις ρυθμιστικές περιοχές του Th2 γενετικού τύπου που συμμετέχουν στις διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις με τον υποκινητή της IFN-γ.

Υλικά & Μέθοδοι

Υλικά- Μέθοδοι

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

1. 1,5 ml βακτηριακής καλλιέργειας φυγοκεντρείται στις 13000rpm για 1 λεπτό.
2. Επαναδιαλύουμε τα κύτταρα σε 100 µl διαλύματος I (15 mM Tris-HCl, pH=8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A).
3. Προσθέτουμε 200 µl από το διάλυμα II (0.2 M NaOH, 1% SDS) για τη λύση των κυττάρων και επωάζουμε για 5 λεπτά.
4. Προσθέτουμε 150 µl από το διάλυμα III (2.5 M CH₃COOK, pH=5.2)
5. Φυγοκέντρωση 14000 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο σωληνάκι και προσθέτουμε 0,7 όγκους ισοπροπανόλη.
7. Φυγοκέντρωση 14000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C.
8. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 100 µl 70% EtOH.
9. Φυγοκέντρωση 14000 rpm για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Επαναδιαλύουμε σε νερό.

Πέψη DNA με περιοριστικά ένζυμα

Σε eppendorf προσθέτουμε τα παρακάτω :

1. Επιθυμητή ποσότητα δείγματος DNA.
2. Κατάλληλο ανά περίπτωση ενζύμου ρυθμιστικό διάλυμα (10x) σε τελική συγκέντρωση 1x.
3. Κατάλληλη ποσότητα ενζύμου ενδονουκλεάσης περιορισμού(έως 10% του συνολικού όγκου της αντίδρασης).

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 37 °C για 1-2 ώρες.

Ενοποίηση DNA τμημάτων

Σε eppendorf προσθέτουμε τα παρακάτω:

1. Κατάλληλη ποσότητα πλασμιδιακού DNA και τμήματος ένθεσης.
2. Ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης 10X.
3. Το ένζυμο της T4 DNA λιγάσης (1-3 U).
4. ddH₂O έως τον τελικό όγκο (10-20 µl)

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Τα συστατικά της αντίδρασης PCR ήταν :

Μήτρα DNA	100ng (BAC) 1ng (πλασμίδιο)
Ρυθμιστικό διάλυμα 10x	2µl
MgCl ₂ 25mM	2µl
dNTPs 10mM	0.5µl
Εκκινητής Forward (5ng/µl)	2µl
Εκκινητής Reverse (5ng/µl)	2µl

Ταq DNA πολυμεράση	0,3μl
ddH ₂ O	Έως 20μl

Το πρόγραμμα PCR (touchdown) που χρησιμοποιήθηκε ήταν το παρακάτω :

1. 94°C για 5 λεπτά.
2. 94 °C για 30 δευτερόλεπτα.
3. 65 °C για 30 δευτερόλεπτα.
4. 72°C για 30 δευτερόλεπτα.
5. Τα στάδια 2-4 για άλλες 31 φορές. Σε κάθε επόμενο κύκλο η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών μειωνόταν κατά 0,3 °C .
6. 72°C για 5 λεπτά.
7. 16°C επ'άοριστον.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

IL-13 conserved region

CNS1 #1

DF3-FOR : 5' gccgaattcgaatcagccaggaatcacagg 3'

DF4-REV : 5' gcctctagacatctcgagtggaaagtgatc 3'

DF5-FOR : 5' gccgaattcctctcgcgaggggatcacttcc 3'

DF6-REV : 5' gcctctagatcacgagcctcattatcttc 3'

CNS1 #2

DF7-FOR : 5' gccgaattccataggcctagtctctgcac 3'

DF8-REV : 5' gccctcgagctcaggtgagaaatgagattc 3'

CNS1 #3

DF9-FOR : 5' gccgaattcccctctcgccttcagtgaac 3'

DF10-REV : 5' gccctcgaggaagccaactgggcactttctc 3'

CNS1 #4

DF11-FOR : 5' gccgaattcctattgagaaccacaggttcc 3'

DF12-REV : 5' gccctcgagcattccaagtctcaccactag 3'

RHS6 region

DF13-FOR : 5' gccgaattctgaattttaccaacccgaagg 3'

DF14-REV : 5' gccctcgagagtctgtctctgagagctg 3'

DF15-FOR : 5' gccgaattcggagacaggactaaciaaagtc 3'

DF16-REV : 5' gccctcgaggcttactgtttcagcagcctg 3'

DF17-FOR : 5' gccgaattcgaacagtaagcctggagaag 3'

DF18-REV : 5' gccctcgagtaacattttaaaaggccattt 3'

DF19-FOR : 5' gccgaattccctctggttgtaactaacat 3'

DF20-REV : 5' gccctcgagactgcagtcaccttggtcattc 3'

DF21-FOR: 5' gccgaattcgtgactgcagtaggcateta 3'

DF22-REV: 5' gccctcgaggaaggtagacatgcttgaag 3'

DF23-FOR: 5' gccgaattcgtctaccttctgggtatacaa 3'

DF24-REV: 5' gccctcgagaggaaaggctggctccacagg 3'

Σήμανση ραδιενεργού ανιχνευτή

Τα συστατικά της αντίδρασης ήταν τα εξής:

1. 80 pmol DNA ολιγονουκλεοτιδίου ή 200ng PCR προϊόν (~250 bp)
2. 2μl PNK buffer (10x)
3. 2μl PNK (T4 πολυνουκλεοτιδική κινάση)
4. 5μl γ-ATP
5. ddH₂O έως 20μl

Η αντίδραση επωάζεται για 30-45 λεπτά στους 37 °C. Ο σημασμένος ανιχνευτής καθαρίζεται σε G-50 κολώνα.

Απομόνωση CD4⁺ κυττάρων από ποντίκια

1. Θυσιάζουμε ποντίκια C57BL/6 4-6 εβδομάδων και απομονώνουμε δευτερογενή λεμφικά όργανα (σπλήνας και λεμφαδένες).
2. Ομογενοποιούμε με σύνθλιψη τα όργανα σε διάλυμα 1xPBS.
3. Περνούμε τα κύτταρα από φίλτρο mesh.
4. Φυγοκέντρηση 1200-1400 rpm για 5 λεπτά.
5. Επαναδιαλύουμε τα κύτταρα σε 10 ml MACS buffer (1xPBS, 2mM EDTA, pH:8 , 0,5%w/v BSA) και περνούμε ξανά τα κύτταρα από φίλτρο mesh.
6. Φυγοκέντρηση 1200-1400 rpm για 5 λεπτά.
7. Επαναδιαλύουμε τα κύτταρα σε MACS buffer (1 ml ανά 2-3 ποντίκια).
8. Προσθέτουμε 35 μl CD4 microbeads (Miltenyi Biotec) και επωάζουμε για 20 λεπτά στους 4°C.
9. Προσθέτουμε 9 ml MACS buffer.
10. Φυγοκέντρηση 1200-1400 rpm για 5 λεπτά.
11. Επαναδιαλύουμε τα κύτταρα σε 4 ml MACS buffer.
12. Εξισορροπούμε την κολώνα LS με 4 ml MACS buffer.
13. Προσθέτουμε τα κύτταρα στην κολώνα LS μέσα από φίλτρο mesh.
14. Ξεπλένουμε την κολώνα 2 φορές με 4 ml MACS buffer.
15. Για την έκλουση των CD4⁺ κυττάρων χρησιμοποιούμε έμβολο αφού προσθέσουμε διαδοχικά 4 και 3 ml MACS buffer.

Απομόνωση πρωτεϊνικών εκγυλισμάτων

1. Επαναδιαλύουμε τα κύτταρα σε 1 ml Cell Rinse Buffer (40mM Tris, pH:4, 1mM EDTA, 0,15M NaCl).
2. Φυγοκέντρηση 14000 rpm για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Επαναδιαλύουμε τα κύτταρα σε 300-500μl Resuspension Buffer (40mM HEPES-KOH pH:7.9 , 0,4 M NaCl, 1mM DTT, 10% v/v γλυκερόλη, 0,1mM PMSF).
4. 3 κύκλοι παγώματος- ξεπαγώματος σε υγρό άζωτο και 37 °C αντίστοιχα.
5. Φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 15 λεπτά στους 4°C.
6. Παίρνουμε το υπερκείμενο και το φυλάσσουμε στους -80 °C.

DNase I footprinting

Για κάθε πείραμα DNase I footprinting χρησιμοποιούμε 5 αντιδράσεις για κάθε PCR προϊόν ως εξής:

- 1) ανέπαφο δείγμα (control)
- 2) DNA + DNase I (0,0005U)
- 3) DNA +5μg πρωτεϊνικά εκχυλίσματα CD4⁺κυττάρων + DNase I (0,005U)
- 4) DNA +10μg πρωτεϊνικά εκχυλίσματα CD4⁺κυττάρων + DNase I (0,005U)
- 5) DNA +15μg πρωτεϊνικά εκχυλίσματα CD4⁺κυττάρων + DNase I (0,005U)

Πρόσδεση των DNA τμημάτων σε Dynabeads M-280 Streptavidin

Κατάλληλη ποσότητα από τα προϊόντα PCR που σημάνθηκαν με ραδιενεργό γ-ATP (2ng και ~ 25000 CPM) χρησιμοποιούνται για την πρόσδεση σε μαγνητικά σφαιρίδια *Dynabeads M-280 Streptavidin*. Η πρόσδεση γίνεται ως εξής :

- 1) Προσθέτουμε 10 μl beads (binding capacity 10ng/μl) σε 1xB/W buffer (5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 mM EDTA , 1 M NaCl).
- 2) Με τη βοήθεια μαγνήτη ξεπλένουμε 3 φορές τα beads σε 1xB/W buffer.
- 3) 10ng DNA (2ng για κάθε δείγμα) προστίθενται σε 10 μl beads σε 1xB/W buffer και ανακατεύουμε τακτικά για 15 λεπτά.
- 4) Με τη βοήθεια μαγνήτη ξεπλένουμε 2 φορές τα beads σε 1xB/W buffer.
- 5) Επαναδιαλύουμε τα beads σε 50 μl Footprinting buffer (10mM Hepes. pH:7,5, 60mM KCl, 10% γλυκερόλη, 0,1mM EDTA, 0,5mM DTT) και μοιράζουμε 10μl ανά δείγμα.
- 6) Με τη βοήθεια μαγνήτη αφαιρούμε το διάλυμα.

DNase I footprinting

- 1) Προσθέτουμε στα beads 50μl Footprinting buffer που περιέχει ανάλογα με την αντίδραση 0, 5, 10 ή 15 μg πρωτεϊνικά εκχυλίσματα CD4⁺κυττάρων (τα οποία έχουν προεπωαστεί με 0,5μg dI:dC για 10 λεπτά στους 4°C.). Το πέμπτο erpendroff προορίζεται ως control (ανέπαφο δείγμα).
- 2) Επωάζουμε τις αντιδράσεις για 30 λεπτά στον πάγο.
- 3) Προσθέτουμε στις αντιδράσεις 50μl Co-factor buffer (10mM MgCl₂, 5mM CaCl₂) και επωάζουμε τις αντιδράσεις για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- 4) Προσθέτουμε στις αντιδράσεις 5 μl κατάλληλης συγκέντρωσης DNase I για 2 λεπτά. Στην αντίδραση χωρίς πρωτεϊνικά εκχυλίσματα η ποσότητα της DNase I ήταν 0,0005U, ενώ στις αντιδράσεις με πρωτεϊνικά εκχυλίσματα η ποσότητα της DNase I ήταν 0,005U.
- 5) Προσθέτουμε 100 μl STOP buffer (1% SDS, 200mM NaCl, 20mM EDTA, pH:8).
- 6) Ξεπλένουμε τα beads με 100μl Wash1 Buffer (2M NaCl, 20mM EDTA).
- 7) Ξεπλένουμε τα beads με 100μl Wash2 Buffer (10 mM Tris HCl, pH:7.5, 1 mM EDTA).
- 8) Προσθέτουμε 4μl Sample buffer (8 M urea, 0,5xTBE, 0.05% bromophenol blue και 0.05% xylene cyanol).
- 9) Επωάζουμε τα δείγματα στους 95 °C για 3 λεπτά.
- 10) Αναλύονται οι αντιδράσεις σε αποδιατακτικό 6% gel ακρυλαμίδης (8M Urea, 0,5%TBE).

Παρακάτω παρατίθενται οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν για το DNase I footprinting

RHS6.1

AGTCCTGTCTCCTGAGAGCTGAGGTAGCTAGGGCAGGCATGGTGTTCAGG
TTAACAGGAAGCTTTGGCTTTCACAAGCATTTCTTCTTTCAGTGTCTAGA
GACTACTGCTTTAAAAGAGAATTGAAGTAAGGGTAGGCCTGTGGAGGTTA
GTGCACACTGGTACTAGCCCTGGTGA CTGATGAGAGAGTCAGGCTTCTAA
GTCAAGGCCTCCTTTTGAGCCACAGATGCCTTCGGGTGGTAAAATTCA

RHS6.2

GCTTACTGTTTCAGCAGCCTGCATCTGATACTTAGACGTATTTATGTTGAG
TCATTTCTTCTCTTTGGCTGGTGACCAGAAGATCACGGAATGATTGTACA
GAGGCAGCGGCATTACGTTTAGTTTTTTTTGTATATATCAGATAAGAG
GCCAGCAAATGGAAGGGAGTCCGCGCACATCCTTTGCATGGTGATAGCTG
TGAAACTTGCCTTCCTACCACTGGAGTGA CTTTGTTAGTCTGTCTCC

RHS6.3

TAACATTTTAAAAGGCCATTTATAAAAATTAGGATCCTAGCATATAAAGCTT
TGAAAAGTAATCTTCACATATGATTGGTTCTCGAAACATTCTGTGAAATA
CTTTTTGTTACCATTTTCCCTTTTTAAGAAAATAATAGCTGGTTTGTCTACA
CTTTATGAAAGAAGCATAAAGTATCAGGCAGAGATGAGCGTGGGTTAGAA
AATGGAGACCTGGTGAAGCAGAGAGGCTTCTCCAGGCTTACTGTTTC

RHS6.4

ACTGCAGTCACCTTGGTCATCCCCAGTGGTTACGCACTGTGCTGCTAACTC
CCAGAGAGACCCAACTTCAGCTGCCCGGCCAGCCGACCGACCAACTGTAG
CAGTCGTCATTTCTGTGACACCCTGAGCCTTTCTGTACGAGGCTCCCTCTG
CTCTGACTCTCTACCCTACTTGGTGTGTGTTCTCCATTCACAAGCTTATTTA
TGTTAGTTACCAACCAGAGG

RHS6.5

GAAGGTAGACATGCTTGGAAAGATTTGACAATACTCTTGTCTGTTCACTCCC
TTAAAAACAGACAACAACAAACTACCATAATCAAAGCTGCTAGTTTCTT
AGCCACTTTCTGTATCTCAGGCAAATTTTATAGGATCTGTTTTCGTAGTAA
TTGGAGATTGGAGAGATGTTATGTGACTTGGAGCACAGCTTGTCTTTCAGA
AGGTGAAGCTACGTCAGTGGCTGCTTCTTTAGATGGCCTACTGCAGTCAC

RHS6.6

AGGAAAGGCTGGCTCCACAGGCACGTGTTCTATTCAGTGCCCTTATGACT
AAACGCATTTAGGATACCTCTCTCATCACAGGAAAAACAAGCCCAAAGT
GTTTGCTGTTTTAGTTTTCTCCTGCTTTCTACTGCTTTGTATACCCAGAAGG
TAGAC

CNS1-1.1

GAATCAGCCAGGAATCACAGGtgggccataacctggctgccccatgagggctgctgcccgcacaagggctg
caggaagagcaatgcagccccacacactggctccactgtgatgctcagagcggagatgacgaggtttgc
tatatttaattttggctgctgctgacctctgaccacacagcagcccagacagagcagggctgggggag
tttcttaggcctctgcgagggGATCACTTTCCTACTCGAGATG

CNS1-1.2

CTCTGCGAGGGGATCACTTTCCactcgagatggcactgtggagggggaggaagagagagcaacagaaag
tgaggtcgtaagtagaaaattgcttctgggatttcgagtggttcgtcatggggccctccctggctgcc
gagaaatcagttgatctgggaaagtgcgttgcaagccatgcgctctgtcgcttttgggtggagccgaga
aatgaatGAAGATAATGAGGCCTCGTGA

CNS1-2

CTCAGGTGAGAAATGAGATTCAATTTCCGTTGAACTCCACAGCAAACAAA
CACTTCTGCTACTCAGGCAAGGTGTTGAAAACACAGTCACTTCAGGGGTT
TCTCTGCTCAGTATGCAGAGGAGCTGTGCAGAGGACTAGGCCTATG

CNS1-3

GAAGCCACTGGGCACTTTCTCTAATATGCAAAGAAACTCTCAGCAAGGC
CAGAGACAGGGGAGCTGAAGAGAGCTGAGAGCCTGTGGTGAGTGGGAGA
CAGAGCTGGTCAGAGCGTAGGGCGAGCTGCCCTCAGCACCCAGGCTCA
GGAGGTTTCACTGAAGGCGAGAGGG

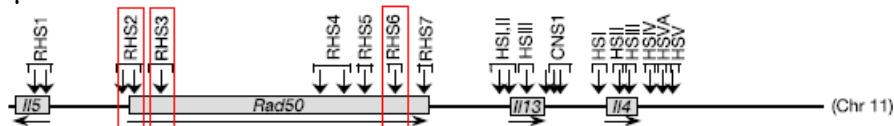
CNS1-4

CATTCCAAGTCTCACCACTAGGGGTCCACAGCTAGTCATATCCTCATCCTG
TCCACAGCTCCAATTCTTCACTTCTACTGTGCCTCAGACAGAGGGGG
AACCTGTGGTTCTCAATAG

Αποτελέσματα

A. Ανάλυση του TH2 γενετικού τύπου

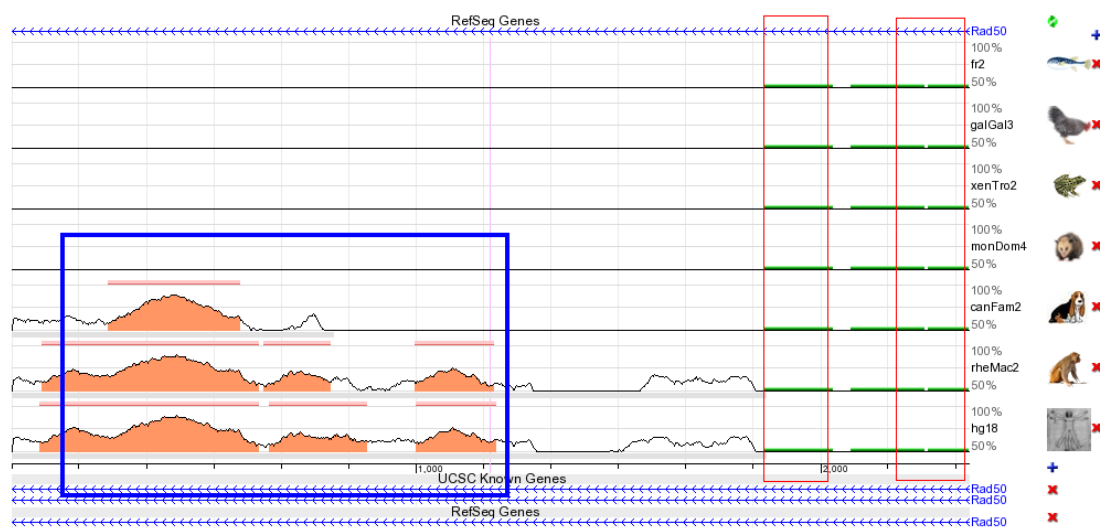
Κατά την αρχική περιγραφή των διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των γενετικών τύπων TH2 και IFN- γ στα πρώιμα CD4+ T βοηθητικά κύτταρα, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική 3C. Με αυτό τον τρόπο προσδιορίστηκαν οι γενωμικές περιοχές που συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις. Παρατηρήθηκε ότι 3 ρυθμιστικά στοιχεία του Th2 γενετικού τύπου (RHS2, RHS3 και RHS6) που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11 αλληλεπιδρούν με τον υποκινητή της IFN- γ που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 10.



Εικόνα 6 Τα τρία ρυθμιστικά στοιχεία του Th2 γενετικού τύπου (RHS2, RHS3 και RHS6) που συμμετέχουν στις διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις.

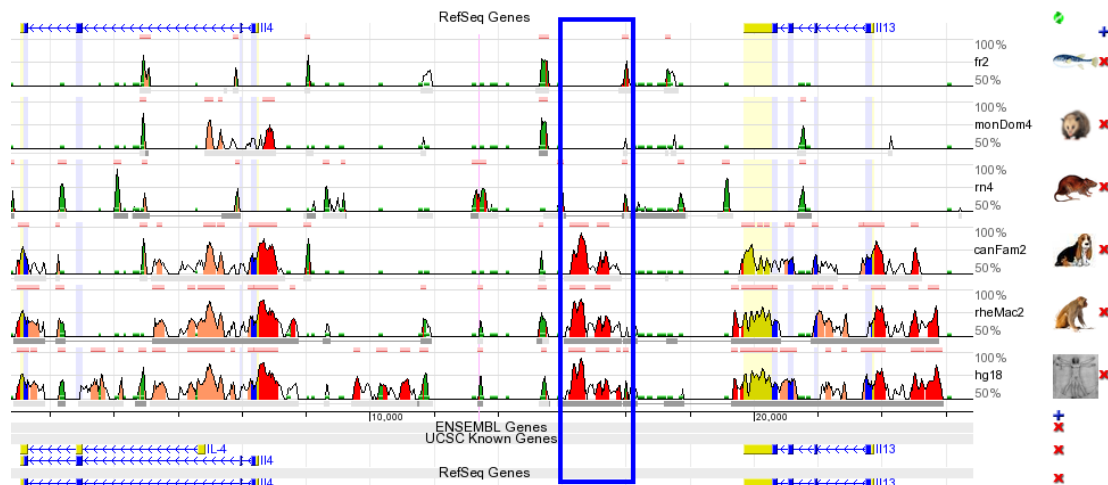
Αρχικός στόχος αυτής της εργασίας ήταν η ανάλυση, με βάση τα πειράματα 3C, των αλληλουχιών DNA που συμμετέχουν στις διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις. Επικεντρωθήκαμε στον γενετικό τύπο Th2, καθώς η γενεωμική περιοχή της IFN- γ που συμμετέχει στις διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνει τόσο τον υποκινητή όσο και ολόκληρη την κωδική περιοχή, καθιστώντας την ανάλυσή τους πολύ πολύπλοκη.

Τα τρία ρυθμιστικά στοιχεία του Th2 γενετικού τύπου (RHS2, RHS3 και RHS6) που συμμετέχουν στις διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις αφορούν συντηρημένες ανάμεσα στα είδη DNA αλληλουχίες ενώ και οι τρεις περιοχές είναι υπερευαίσθητες σε DNase I στα πρώιμα CD4+ T βοηθητικά κύτταρα. Αρχικά προσπαθήσαμε να βρούμε DNA αλληλουχίες οι οποίες να είναι κοινές και στις τρεις περιοχές αλλά η σύγκριση μεταξύ τους έδωσε μόνο επαναλαμβανόμενα τμήματα DNA (Εικόνα 7). Για περαιτέρω λεπτομερέστερη ανάλυση επιλέξαμε την RHS6 καθώς είναι μέρος του Th2 LCR, ενώ συμμετέχει και σε άλλες διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις (αδημοσίευτα αποτελέσματα). Επίσης, σε ποντίκια με γενετική έλλειψη περιοχών των Th2 LCR οι διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις μειώνονται.



Εικόνα 7 Σύγκριση μεταξύ των ειδών της περιοχής RHS6 που συμμετέχει στις διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις (τα κόκκινα πλαίσια επισημαίνουν επαναλαμβανόμενα τμήματα DNA ενώ με μπλε επισημαίνεται η περιοχή που επιλέχθηκε για ανάλυση με DNase I footprinting).

Επίσης, επιλέξαμε για περαιτέρω ανάλυση και την περιοχή CNS1, αν και η ανάλυση με 3C δεν έδειξε να συμμετέχει στις διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις. Την επιλέξαμε διότι αποτελεί μια πολύ συντηρημένη περιοχή του Th2 γενετικού τόπου είναι η CNS1 και περιέχει δύο υπερευαίσθητες σε DNase I περιοχές (HSS1 και HSS2) στα Th2 κύτταρα. Επίσης, η περιοχή αυτή συμμετέχει σε ενδοχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις με αρκετά ρυθμιστικά στοιχεία του Th2 γενετικού τόπου, ενώ πολύ ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι προσδένονται σε αυτή πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην διαμόρφωση ανώτερης δομής της χρωματίνης, όπως η SATB1 και η RAD21 (cohesin) (Ansel et al, 2006).



Εικόνα 8 Σύγκριση μεταξύ των ειδών της περιοχής CNS1 (στο μπλε πλαίσιο επισημαίνεται η περιοχή που επιλέχθηκε για ανάλυση με DNase I footprinting).

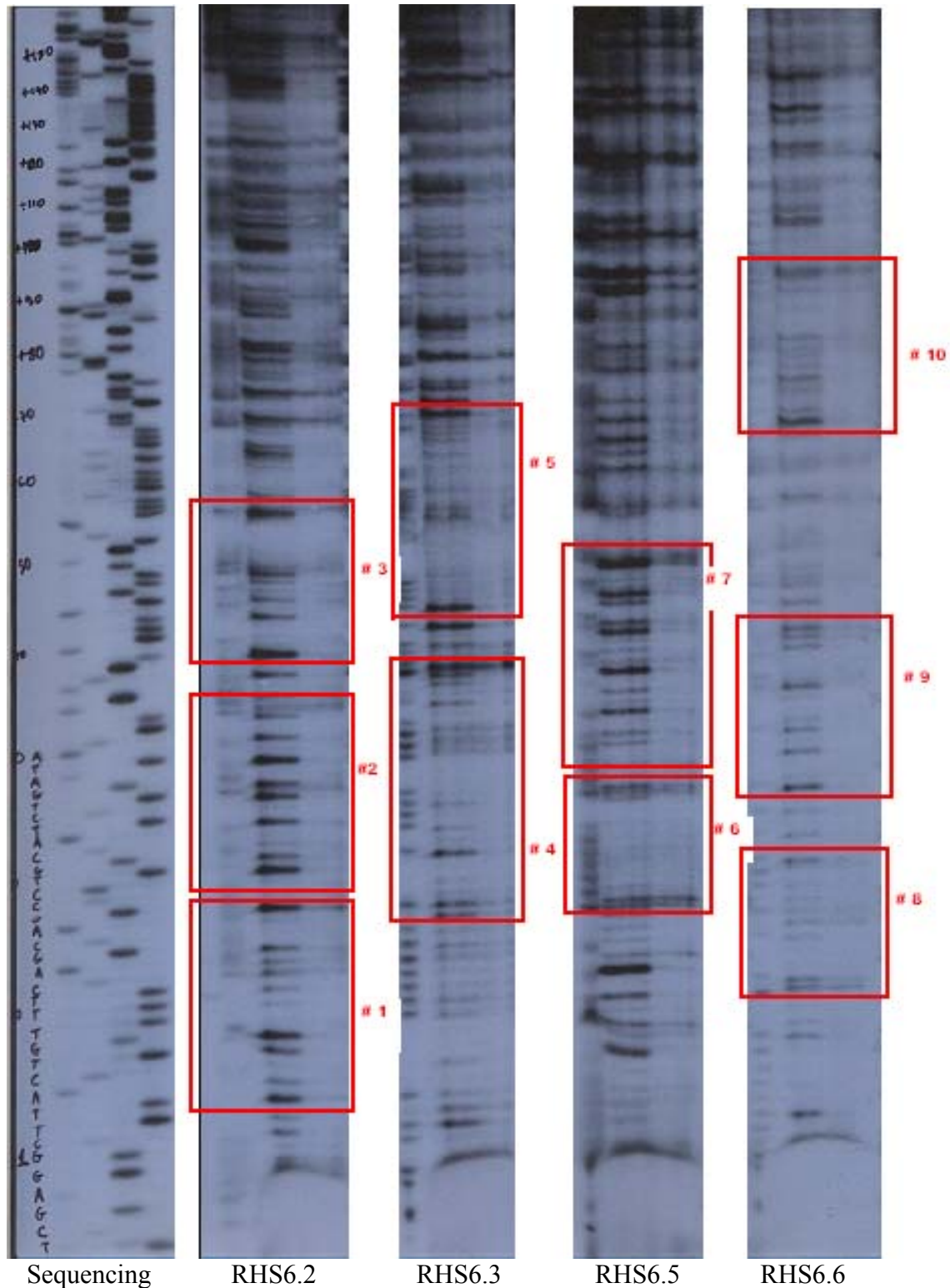
B. Αποτυπώματα πρόσδεσης πρωτεϊνών στα ρυθμιστικά στοιχεία RHS6 & CNS1.

Απώτερος σκοπός αυτής της εργασίας ήταν ο προσδιορισμός πρωτεϊνικών συμπλόκων που συμμετέχουν στις διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις. Για αυτό τον σκοπό, επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε την τεχνική DNase I footprinting στις περιοχές RHS6 και CNS1 για να επισημάνουμε τις θέσεις πρόσδεσης πρωτεϊνών σ' αυτές τις περιοχές. Περαιτέρω ανάλυση αυτών των θέσεων πρόσδεσης πρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει στην πειραματική απομόνωση των πρωτεϊνών (yeast one hybrid, DNA affinity chromatography) ή και στην πρόβλεψη τους μέσω υπολογιστικών προγραμμάτων.

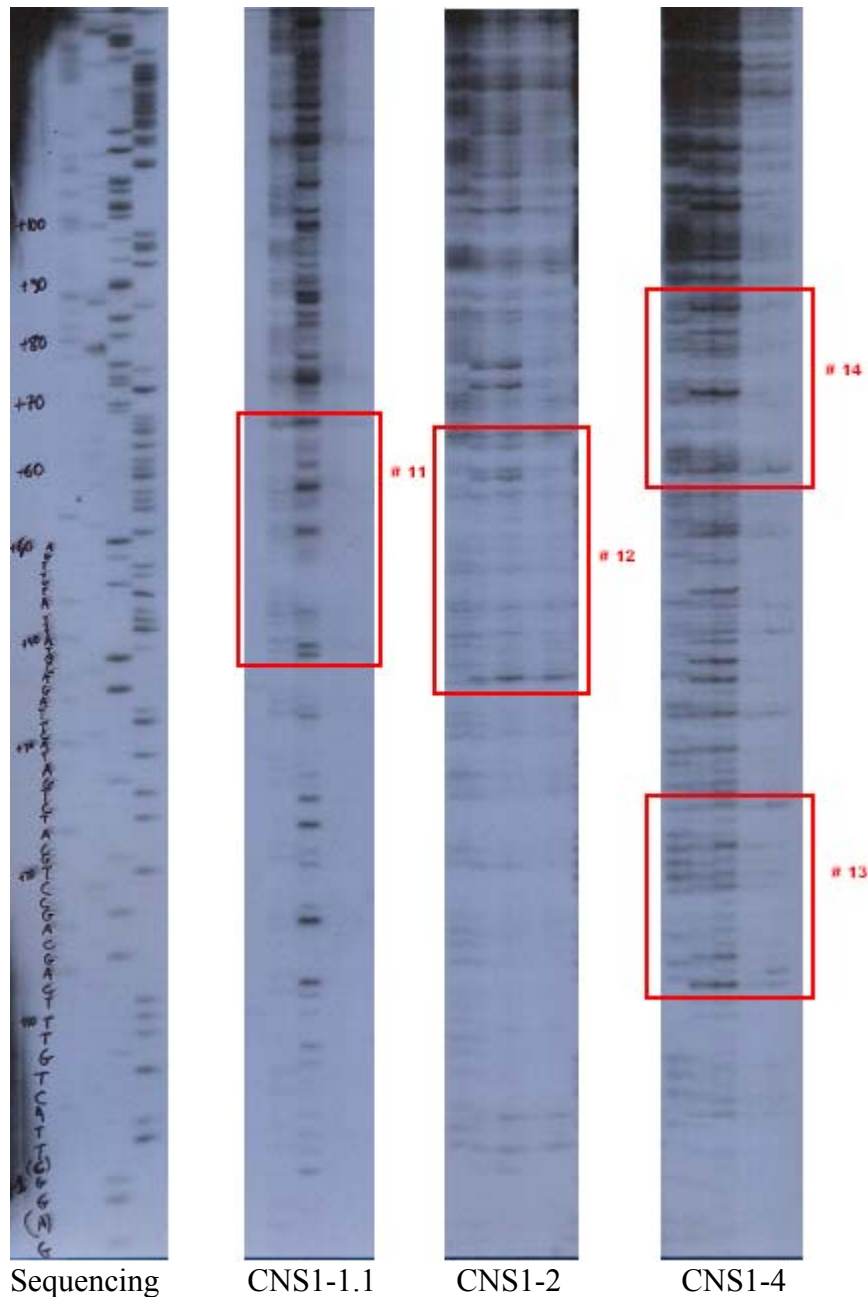
Για το DNase I footprinting αρχικά κλωνοποιήσαμε 6 τμήματα μεγέθους ~250bp από την RHS6 με μικρή αλληλοεπικάλυψη (~30 bp) μεταξύ τους. Η κλωνοποίηση έγινε στον πλασμιδιακό φορέα pbluescript II SK με τα ένζυμα EcoRI/XhoI. Αντίστοιχα, κλωνοποιήσαμε 5 τμήματα από την περιοχή CNS1 διαφορετικών μεγεθών στον πλασμιδιακό φορέα pbluescript II SK με τα ένζυμα EcoRI/XhoI για τα τμήματα CNS1-2, CNS1-3, CNS1-4 ενώ για τα τμήματα CNS1-1.1 και CNS1-1.2 η κλωνοποίηση έγινε με τα ένζυμα EcoRI/XbaI. Η αλληλουχίες των τμημάτων επιβεβαιώθηκαν με DNA αλληλούχηση και αναφέρονται στο Παράρτημα των Υλικών-Μεθόδων.

Μετά από πολλές δοκιμές για τον προσδιορισμό της κατάλληλης ποσότητας DNase I, της κατάλληλης ποσότητας DNA ανιχνευτή και της κατάλληλης ποσότητας πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων, στις Εικόνες 9 και 10 φαίνονται τα αποτυπώματα των

προσδεμένων πρωτεϊνών σε όσες περιοχές καταφέραμε να πάρουμε πιο καθαρή εικόνα. Για κάθε πείραμα DNase I footprinting είχαμε 5 αντιδράσεις για κάθε PCR προϊόν ως εξής: 1) ανέπαφο δείγμα (control), 2) DNA + DNase I (0,0005U), 3) DNA + 5μg πρωτεϊνικά εκχυλίσματα CD4⁺κυττάρων + DNase I (0,005U), 4) DNA + 10μg πρωτεϊνικά εκχυλίσματα CD4⁺κυττάρων + DNase I (0,005U), 5) DNA + 15μg πρωτεϊνικά εκχυλίσματα CD4⁺κυττάρων + DNase I (0,005U).



Εικόνα 9 Αποτυπώματα πρόσδεσης πρωτεϊνών σε περιοχές της RHS6



Εικόνα 10 Αποτυπώματα πρόσδεσης πρωτεϊνών σε περιοχές της CNS1,

Προσδιορίζοντας τα πιθανά αποτυπώματα πρόσδεσης πρωτεϊνών στα ρυθμιστικά στοιχεία RHS6 & CNS1, χρησιμοποιήσαμε αυτές τις αλληλουχίες στο online πρόγραμμα rVISTA tool που προβλέπει τη πρόσδεση πρωτεϊνών σε DNA αλληλουχίες. Παρακάτω φαίνονται όλες οι πιθανές πρωτεΐνες που μπορούν να προσδεθούν στα περιγραφέντα αποτυπώματα πρόσδεσης πρωτεϊνών

Περιοχή RHS6.2 (Αποτυπώματα # 1,2,3)

V\$AREB6_04	6 (+)	ctGTTTcag
V\$AP4_01	15 (-)	caGCCTGCATCTGatact
V\$FREAC7_01	35 (-)	gacgTATTTATgttga
V\$ATATA_B	38 (+)	gTATTTATGt
V\$TCF11MAFG_01	39 (-)	tatttaTGTTGAGTCatttctt
V\$CDXA_01	40 (+)	aTTtatg

V\$XFD3_01	41 (-)	tttaTGTTGAGtca
V\$BACH1_01	44 (+)	atgTTGAGTCATttc
V\$NRF2_Q4	44 (+)	aTGTTGAGTCAtt
V\$AP1_01	45 (+)	tgtTGAGTCAtt
V\$MAF_Q6_01	45 (+)	tgttGAGTCAT
V\$NFE2_01	45 (+)	tGTTGAGTCAT
V\$AP1_01	45 (-)	tgtTGAGTCAtt
V\$BACH2_01	46 (+)	gtTGAGTCAtt
V\$AP1_Q4	46 (-)	gttgAGTCAtt
V\$AP1_Q6	46 (-)	gttgAGTCAtt
V\$AP1_C	47 (+)	tTGAGTCAT
V\$AP1_C	47 (-)	tTGAGTCAT
V\$AP1_Q6_01	47 (-)	tTGAGTCAT
V\$AP1_Q4_01	48 (+)	TGAGTCAT
V\$IPF1_Q4_01	48 (+)	tgagtCATTTctttc
V\$STAT5A_Q4	53 (+)	catTTCtt

Περιοχή RHS6.3 (Αποτυπώματα # 4,5)

V\$APOLYA_B	10 (-)	aAAAGGCCATTTATA
V\$YY1_01	11 (+)	aaaggCCATTTataaaa
V\$RSRFC4_Q2	12 (-)	aaggCCATTTATAAAaat
V\$NFMUE1_Q6	13 (+)	AGGCCATTT
V\$RSRFC4_01	13 (+)	aggCCATTTATAAAaat
V\$MEF2_Q6_01	14 (+)	gGCCATTTATAa
V\$MEF2_Q2	15 (+)	gccatttATAAAAATTAGgatcc
V\$CDXA_Q2	18 (+)	atTtata
V\$HOXA4_Q2	24 (+)	aaAATTAG
V\$HOXA3_Q1	24 (-)	aaaattAgg
V\$BARBIE_Q1	41 (+)	atatAAAGCTTTGGA
V\$CEBP_Q1	48 (+)	gcttTGAAAagt
V\$OTX_Q1	57 (-)	AAGTAATC
V\$PAX2_Q1	61 (+)	aatcTTCACatatgattgg
V\$PAX6_Q1	61 (+)	aatcTTCACATATGATTggtt
V\$NFY_Q1	69 (-)	catatgATTGGttctc

Περιοχή RHS6.5 (Αποτυπώματα # 6,7)

V\$EV11_01	31 ()	TACTCTTGTCTGTTCa
V\$P53_DECAMER_Q2	32 ()	actCTTGtct
V\$PR_Q2	40 ()	cTGTTCactc
V\$P300_Q1	41 ()	tgTTCACTCCCtta

Περιοχή RHS6.6 (Αποτυπώματα # 8,9,10)

V\$AP2_Q6_01	11 (+)	ggctCCACAGGCa
V\$ARNT_Q2	15 (+)	ccacaggCACGTGttctatt
V\$MYCMAX_Q3	15 (+)	ccacaggCACGTGttctatt
V\$ARNT_Q2	15 (-)	ccacaggCACGTGttctatt
V\$MYCMAX_Q3	15 (-)	ccacaggCACGTGttctatt
V\$ARNT_Q1	17 (+)	acaggCACGTGttcta
V\$XBP1_Q1	17 (+)	acagGCACGTGttctat
V\$ARNT_Q1	17 (-)	acaggCACGTGttcta
V\$HIF1_Q3	17 (-)	acagGCACGTgttc

V\$MAX_01	18 (+)	caggCACGTGttct
V\$MYCMAX_01	18 (+)	caGGCACGTGTTct
V\$STRA13_01	18 (+)	cagGCACGTGttct
V\$USF_01	18 (+)	caggCACGTGttct
V\$USF_02	18 (+)	caggCACGTGttct
V\$HIF1_Q5	18 (-)	caggCACGTgtt
V\$MAX_01	18 (-)	caggCACGTGttct
V\$MYCMAX_01	18 (-)	caGGCACGTGTTct
V\$USF_01	18 (-)	caggCACGTGttct
V\$USF_02	18 (-)	caggCACGTGttct
V\$AREB6_03	19 (+)	aggCACGTGttc
V\$NMYC_01	19 (+)	aggCACGTGttc
V\$AHRHIF_Q6	19 (-)	aggCACGtg
V\$EBOX_Q6_01	19 (-)	aggCACGTGt
V\$MYCMAX_02	19 (-)	aggCACGTGTTc
V\$NMYC_01	19 (-)	aggCACGTGttc
V\$USF_Q6_01	19 (-)	aggCACGTGttc
V\$SREBP1_01	20 (-)	gGCACGTGTTc
V\$EBOX_Q6_01	21 (+)	gCACGTGttc
V\$USF_C	21 (+)	gCACGTGt
V\$CLOCKBMAL_Q6	21 (-)	gCACGTGt
V\$MYC_Q2	21 (-)	gCACGTG
V\$USF_C	21 (-)	gCACGTGt
V\$MYC_Q2	22 (+)	CACGTGt
V\$USF2_Q6	22 (+)	CACGTG
V\$USF2_Q6	22 (-)	CACGTG
V\$PR_Q2	25 (-)	gTGTTctatt
V\$AP1_01	43 (-)	ttaTGACTAAacg
V\$AP1_Q6_01	45 (+)	aTGACTAAa
V\$AP1_Q4_01	45 (-)	aTGACTAA
V\$POU3F2_01	45 (-)	ATGACTAAACGCAT
V\$BRN2_01	53 (-)	acgcATTTAGGATAcc
V\$NFAT_Q6	77 (+)	cacaGGAAAaac
V\$FOXO4_01	83 (+)	aaAAACAagcc
V\$PPARA_01	83 (+)	AAAAACAAGCCCAAAAGTGT
V\$P53_DECAMER_Q2	85 (+)	aaaCAAGccc
V\$P53_02	85 (-)	aaaCAAGCCc

Περιοχή CNS1-1.1 (Αποτυπώματα # 11)

V\$HES1_Q2	54 (-)	tgccgCACAAGggct
V\$GABP_B	69 (+)	gCAGGAAGAGca
V\$NRF2_01	69 (+)	GCAGGAAGag

Περιοχή CNS1-2 (Αποτυπώματα # 12)

V\$HNF3_Q6_01	36 (-)	tccacagcAAACAaacac
V\$FREAC3_01	37 (+)	ccacaGCAAAACAa
V\$XFD3_01	39 (+)	acaGCAAAACAa
V\$FOX_Q2	39 (-)	aCAGCAAAACAa
V\$FOXJ2_01	40 (+)	cagcaaACAAACActtct
V\$DBP_Q6	41 (+)	AGCAaac
V\$HFH3_01	43 (-)	cAAACAAACActt
V\$HFH4_01	43 (-)	CAAAACAACActt
V\$HFH8_01	43 (-)	caaACAACActt
V\$SRY_01	44 (+)	AAACaaa

V\$AHR_Q5	61 (-)	actCAGGCaag
V\$AREB6_01	61 (-)	actCAGGCaaggt

Περιοχή CNS1-4 (Αποτυπώματα # 13,14)

V\$E2_01	12 (-)	tcACCACTAGGGGTcc
V\$E2_Q6	12 (-)	tcACCACTAGGGGTcc
V\$E2_Q6_01	13 (-)	cACCACTAGGGGTcca
V\$LRF_Q2	21 (-)	GGGGtccac
V\$SEF1_C	24 (-)	gTCCACAGCTAGTCATATC
V\$PAX3_01	66 (+)	TCTTCACACttct
V\$TBX5B_01	69 (-)	tcACACTt
V\$ZTA_Q2	79 (+)	acactgTGCTCA

Συζήτηση

Συζήτηση

Η ανακάλυψη των διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων στα CD4+ T βοηθητικά κύτταρα κατέδειξε για πρώτη φορά ότι η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης κατά τη διαφοροποίηση μπορεί να εξαρτάται και από τις αλληλεπιδράσεις γενετικών τόπων. Η διαλεύκανση του μηχανισμού των διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων είναι μεγάλης σημασίας, καθώς οι αλληλεπιδράσεις τέτοιου είδους δεν περιορίζονται μόνο στα CD4+ T βοηθητικά κύτταρα, αλλά παρατηρούνται και σε πολλούς άλλους κυτταρικούς τύπους και φαίνεται ότι πρόκειται για πολύ γενικό φαινόμενο.

Για τη μελέτη του μηχανισμού των διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων είναι απαραίτητος ο χαρακτηρισμός των πρωτεϊνικών συμπλόκων που συμμετέχουν είτε στη δημιουργία είτε στη σταθεροποίηση αυτών των αλληλεπιδράσεων. Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν ο προσδιορισμός και ο χαρακτηρισμός των πρωτεϊνικών συμπλόκων που προσδένονται στις ρυθμιστικές περιοχές του Th2 γενετικού τύπου που συμμετέχουν στις διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις με τον υποκινητή της IFN- γ . Για αυτό τον σκοπό, επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε την τεχνική DNase I footprinting στις περιοχές RHS6 και CNS1 για να επισημάνουμε τις θέσεις πρόσδεσης πρωτεϊνών σ' αυτές τις περιοχές. Περαιτέρω ανάλυση αυτών των θέσεων πρόσδεσης πρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει στην πειραματική απομόνωση των πρωτεϊνών (yeast one hybrid, DNA affinity chromatography) ή και στην πρόβλεψη τους μέσω υπολογιστικών προγραμμάτων.

Η ανάλυση με DNase I footprinting αποδείχτηκε ιδιαίτερα δύσκολη, καθώς έπρεπε να προσδιοριστούν μετά από πολλές δοκιμές η κατάλληλη ποσότητα DNase I, η κατάλληλη ποσότητα DNA ανιχνευτή και η κατάλληλη ποσότητα πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων. Επίσης, πολλές φορές παρατηρήθηκε αποδόμηση του DNA ανιχνευτή ακόμα και στις control αντιδράσεις, καθιστώντας την ανάλυση των αποτυπωμάτων των πρωτεϊνών επισφαλής. Ωστόσο, προχωρήσαμε στην υπολογιστική πρόβλεψη των πιθανών πρωτεϊνών που προσδένονται στις περιοχές RHS6 και CNS1.

Μεταξύ των πιθανών πρωτεϊνών που προσδένονται στις περιοχές RHS6 και CNS1 μετά από την υπολογιστική πρόβλεψη, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν μερικές από αυτές που είτε ο ρόλος τους στη διαφοροποίηση των Th1/Th2 κυττάρων είναι γνωστός είτε έχουν γενικότερο ρόλο στην δομή της χρωματίνης. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι η AP1, η STAT5A, η NFAT, η YY1, η GABP και η p53.

Ωστόσο, μετά από βιβλιογραφική αναζήτηση, η πρωτεΐνη BACH1 που πιθανώς προσδένεται στην περιοχή RHS6.2 (αποτύπωμα #3), έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Λειτουργεί ως καταστολέας των γονιδίων της β -σφαιρίνης και έχει δείχθει ότι προσδένεται κατά την αδιαφοροποιήσιμη φάση των ερυθροκυττάρων σε ρυθμιστικά στοιχεία του LCR της β -σφαιρίνης. Ακόμα μεγαλύτερο ενδιαφέρον, παρουσιάζει το γεγονός ότι BACH1 μπορεί να φέρει κοντά απομακρυσμένες ρυθμιστικές περιοχές του LCR της β -σφαιρίνης μέσω ομοδιμεροποίησης και ετεροδιμεροποίησης με την πρωτεΐνη MafK. Αυτή η δράση της εξαρτάται από τον περιοχή BTB/POZ που περιέχει στη δομή της. Επίσης, πειράματα μικροσυστοιχιών έδειξαν ότι BACH1 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα CD4+ T βοηθητικά κύτταρα και εικάζουμε ότι μπορεί να έχει παρόμοια δράση σ' αυτά τα κύτταρα.

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι παρά τη τεχνική δυσκολία του DNase I footprinting, πιστεύουμε ότι περαιτέρω ανάλυση των αποτυπωμάτων και των θέσεων πρόσδεσης πρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει στο χαρακτηρισμό πρωτεϊνών που μέχρι τώρα δεν είχαν μελετηθεί στα CD4+ T βοηθητικά κύτταρα.

Βιβλιογραφία

Amsen D, Spilianakis CG, Flavell RA. How are T(H)1 and T(H)2 effector cells made? *Curr Opin Immunol.* 2009 Apr;21(2):153-60.

Ansel KM, Djuretic I, Tanasa B, Rao A. Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:607-56.

Apostolou E, Thanos D. Virus Infection Induces NF-kappaB-dependent interchromosomal associations mediating monoallelic IFN-beta gene expression. *Cell.* 2008 Jul 11;134(1):85-96.

Bacher CP, Guggiari M, Brors B, Augui S, Clerc P, Avner P, Eils R, Heard E. Transient colocalization of X-inactivation centres accompanies the initiation of X inactivation. *Nat Cell Biol.* 2006 Mar;8(3):293-9.

Bartkuhn M, Renkawitz R. Long range chromatin interactions involved in gene regulation. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Nov;1783(11):2161-6.

de Laat W, Grosveld F. Inter-chromosomal gene regulation in the mammalian cell nucleus. *Curr Opin Genet Dev.* 2007 Oct;17(5):456-64.

Dekker J. Gene regulation in the third dimension. *Science.* 2008 Mar 28;319(5871):1793-4.

Dillon N. The impact of gene location in the nucleus on transcriptional regulation. *Dev Cell.* 2008 Aug;15(2):182-6.

Donohoe ME, Silva SS, Pinter SF, Xu N, Lee JT. The pluripotency factor Oct4 interacts with Ctfc and also controls X-chromosome pairing and counting. *Nature.* 2009 Jul 2;460(7251):128-32.

Fraser P, Bickmore W. Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation. *Nature.* 2007 May 24;447(7143):413-7.

Göndör A, Ohlsson R. Chromosome crosstalk in three dimensions. *Nature.* 2009 Sep 10;461(7261):212-7.

Hu Q, Kwon YS, Nunez E, Cardamone MD, Hutt KR, Ohgi KA, Garcia-Bassets I, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG, Fu XD. Enhancing nuclear receptor-induced transcription requires nuclear motor and LSD1-dependent gene networking in interchromatin granules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Dec 9;105(49):19199-204.

Kumaran RI, Thakar R, Spector DL. Chromatin dynamics and gene positioning. *Cell.* 2008 Mar 21;132(6):929-34.

Lawrence JB, Clemson CM. Gene associations: true romance or chance meeting in a nuclear neighborhood? *J Cell Biol.* 2008 Sep 22;182(6):1035-8.

- Lee GR, Kim ST, Spilianakis CG, Fields PE, Flavell RA. T helper cell differentiation: regulation by cis elements and epigenetics. *Immunity*. 2006 Apr;24(4):369-79.
- Lee GR, Spilianakis CG, Flavell RA. Hypersensitive site 7 of the TH2 locus control region is essential for expressing TH2 cytokine genes and for long-range intrachromosomal interactions. *Nat Immunol*. 2005 Jan;6(1):42-8.
- Ling JQ, Li T, Hu JF, Vu TH, Chen HL, Qiu XW, Cherry AM, Hoffman AR. CTCF mediates interchromosomal colocalization between *Igf2/H19* and *Wsb1/Nf1*. *Science*. 2006 Apr 14;312(5771):269-72.
- Lomvardas S, Barnea G, Pisapia DJ, Mendelsohn M, Kirkland J, Axel R. Interchromosomal interactions and olfactory receptor choice. *Cell*. 2006 Jul 28;126(2):403-13.
- Nunez E, Fu XD, Rosenfeld MG. Nuclear organization in the 3D space of the nucleus - cause or consequence? *Curr Opin Genet Dev*. 2009 Oct;19(5):424-36.
- Sexton T, Bantignies F, Cavalli G. Genomic interactions: chromatin loops and gene meeting points in transcriptional regulation. *Semin Cell Dev Biol*. 2009 Sep;20(7):849-55.
- Spector DL. Nuclear domains. *J Cell Sci*. 2001 Aug;114(Pt 16):2891-3.
- Spilianakis CG, Flavell RA. Long-range intrachromosomal interactions in the T helper type 2 cytokine locus. *Nat Immunol*. 2004 Oct;5(10):1017-27.
- Spilianakis CG, Lalioti MD, Town T, Lee GR, Flavell RA. Interchromosomal associations between alternatively expressed loci. *Nature*. 2005 Jun 2;435(7042):637-45.
- Takizawa T, Meaburn KJ, Misteli T. The meaning of gene positioning. *Cell*. 2008 Oct 3;135(1):9-13.
- Wilson CB, Rowell E, Sekimata M. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol*. 2009 Feb;9(2):91-105.
- Xu N, Donohoe ME, Silva SS, Lee JT. Evidence that homologous X-chromosome pairing requires transcription and Ctf protein. *Nat Genet*. 2007 Nov;39(11):1390-6.
- Xu N, Tsai CL, Lee JT. Transient homologous chromosome pairing marks the onset of X inactivation. *Science*. 2006 Feb 24;311(5764):1149-52.
- Zhao R, Bodnar MS, Spector DL. Nuclear neighborhoods and gene expression. *Curr Opin Genet Dev*. 2009 Apr;19(2):172-9.
- Zhou L, Chong MM, Littman DR. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity*. 2009 May;30(5):646-55.