



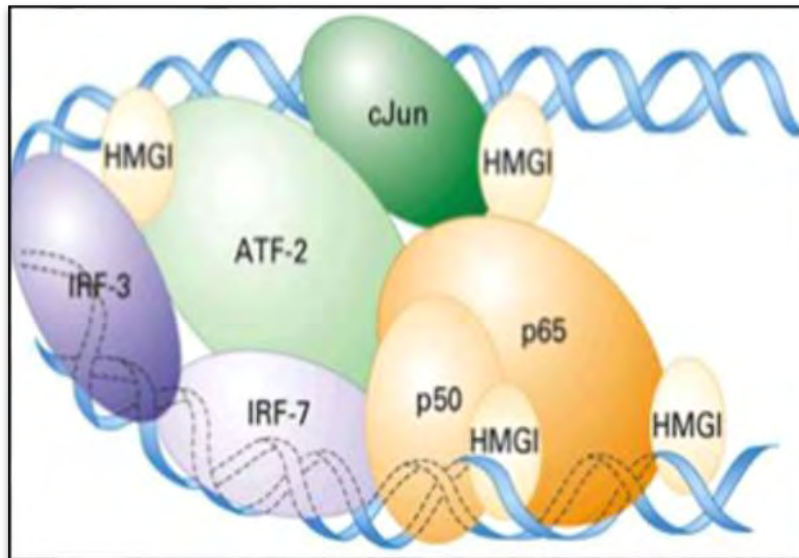
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΙΔΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ ΤΗΣ
ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ (ΙΒΕΑΑ)

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΣΤΟΧΑΣΤΙΚΩΝ
ΔΙΑΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΚΑΤΑ
ΤΟΝ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟ ΤΗΣ ΑΝΤΪΚΗΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ.



ΑΛΕΞΑΝΔΡΙΔΗ ΜΑΓΔΑΛΗΝΗ

Τριμελής επιτροπή:

1. Θάνος Δημήτρης, Ερευνητής Α΄, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών. Επιβλέπων.
2. Μαμούρης Ζήσης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Συνεπιβλέπων
3. Λιαδάκη Καλλιόπη, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Επιβλέπουσα στο εργαστήριο: Ψαρρά Ελένη PhD, Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια.

Εικόνα εξωφύλλου : Το μοντέλο του ενισχυοσώματος που σχηματίζεται στον ενισχυτή της IFN- β . Στα τέσσερα ρυθμιστικά στοιχεία του ενισχυτή βλέπουμε τους μεταγραφικούς παράγοντες και την αρχιτεκτονική πρωτεΐνη HMGI(Y) που συνδέεται με τη μικρή έλικα του DNA.

Πηγή: *Molecular Biology of the Cell, fourth edition, Alberts et al, εικόνα 10.5.*

Τίτλος της εργασίας στα αγγλικά:

Dissecting the role of the stochastic interchromosomal interactions orchestrating the antiviral response.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	4
Summary	6
Εισαγωγή	7
Εισαγωγικά στοιχεία	7
Δομές οργάνωσης της χρωματίνης: Το νουκλεόσωμα	7
Μεταγραφή	10
Ενισχυτές	11
Οι Ιντερφερόνες (IFNs)	12
Η Ιντερφερόνη β (IFNβ).....	13
Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ	14
Οι μεταγραφικοί παράγοντες IRFs.....	17
Ο IRF3.....	17
Ο IRF7.....	19
Οι μεταγραφικοί παράγοντες ATF2/cJun.....	21
Ο ενισχυτής και το ενισχόσωμα της IFNβ.....	22
Στοχαστική έκφραση γονιδίων.....	26
Μονοαλληλική έκφραση γονιδίων	28
Υλικά και μέθοδοι	31
Πρωτόκολλο για τον χειρισμό των κυττάρων HeLa	31
Προετοιμασία πυρηνικών εκχυλισμάτων για Western Blot	34
Ανοσοαποτύπωμα πρωτεϊνών (Western Blot)	36
Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	41
Απομόνωση RNA από κύτταρα HeLa.....	42
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	44
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR).....	46
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR).....	47
Αποτελέσματα	49
Βιβλιογραφία	57

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πρώτη γραμμή αντι-ικκής άμυνας βασίζεται στη παραγωγή και έκκριση ειδικών πρωτεϊνών που ονομάζονται ιντερφερόνες τύπου I, οι οποίες στη συνέχεια προσδένονται σε ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνεια τόσο υγείων όσο και μολυσμένων κυττάρων ενεργοποιώντας έναν μεγάλο αριθμό γονιδίων με αντιϊκή δράση. Τα προϊόντα των γονιδίων αυτών (μεταγραφικοί παράγοντες, κυτταροκίνες κ.α.) δρουν προλαμβάνοντας την εισβολή αλλά και τον πολλαπλασιασμό των ιών μέσα στα κύτταρα. Στον άνθρωπο η ιική μόλυνση προκαλεί την άμεση μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της ιντερφερόνης β (IFN-β). Αυτό επιτυγχάνεται με τη συντονισμένη ενεργοποίηση τριών μεταγραφικών παραγόντων (NF-κB, ATF-2/cJun, IRFs), οι οποίοι μαζί με την αρχιτεκτονική πρωτεΐνη HMG1(Y) προσδένονται στον ενισχυτή του γονιδίου της IFN-β και δημιουργούν ένα αρχιτεκτονικά πολύπλοκο σύμπλοκο που είναι γνωστό ως ενισχυόσωμα (enhanceosome). Το ενισχυόσωμα, αφού συγκροτηθεί στον ελεύθερο από νουκλεοσώματα ενισχυτή, καθοδηγεί τη στρατολόγηση μίας σειράς πρωτεϊνών που τροποποιούν τη χρωματίνη, συνενεργοποιώντας και βασικών μεταγραφικών παραγόντων στον υποκινητή. Το πρόγραμμα στρατολόγησης ολοκληρώνεται με την ολίσθηση του νουκλεοσώματος που κάλυπτε τον υποκινητή, επιτρέποντας έτσι, την πρόσδεση της RNA πολυμεράσης II και την έναρξη της μεταγραφής. Η συνεργατικότητα (cooperativity) με την οποία προσδένονται οι μεταγραφικοί παράγοντες στον ενισχυτή του γονιδίου, και η συνεργεία (synergy) που χαρακτηρίζει τον τρόπο στρατολόγησης των παραγόντων στο ενισχυόσωμα, υποδηλώνουν έναν εξαιρετικά πολύπλοκο και ακριβή μηχανισμό συνδυαστικού ελέγχου της μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου της IFN-β.

Ένα επιπρόσθετο ιδιαίτερο γνώρισμα της έκφρασης της IFN-β (Zawatzky et al., 1985), όπως και πολλών ακόμα κυτταροκινών, είναι ότι ακόμη και υπό ιδανικές συνθήκες μόνο ένα περιορισμένο ποσοστό κυττάρων (~22% για την IFN-β) σε έναν πληθυσμό εκφράζει το γονίδιο της κυτταροκίνης κάθε δεδομένη στιγμή. Αυτή η ετερογένεια χαρακτηρίζεται ως στοχαστικότητα ή πιθανοκρατία, και εμφανίζεται συνήθως σε βιολογικά συστήματα ή διεργασίες, που χαρακτηρίζονται από πολυπλοκότητα και χαμηλές συγκεντρώσεις των εμπλεκόμενων μορίων. Ένα ελκυστικό μοντέλο υποστηρίζει ότι η ίδια η μεταγραφική διαδικασία είναι υπεύθυνη για τη στοχαστική έκφραση κι αυτό, πιθανόν, να συνδέεται με την εγγενή πολυπλοκότητα της συγκρότησης του ενισχυοσώματος στον ενισχυτή/ υποκινητή της IFN-β.

Στόχος αυτής της πτυχιικής εργασίας είναι να ελεγχθεί η υπόθεση ότι το γονίδιο της ιντερφερόνης B, μετά την πρώτη ενεργοποίηση του από τα κατάλληλα σήματα, δεν επιστρέφει στην πρότερη αδρανή μεταγραφικά κατάσταση. Η υπόθεσή αυτή βασίζεται στο ότι οι τροποποιήσεις της χρωματίνης που λαμβάνουν χώρα, συγχρόνως με την αλληλεπίδραση του υποκινητή με άλλες χρωμοσωμικές περιοχές δίνουν την ικανότητα για ταχύτερη επανέκφραση των γονιδίων που επάγονται από ιική μόλυνση.

Υποθέσαμε ότι η μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της ιντερφερόνης B για επόμενη φορά μετά την περίοδο αδρανοποίησης θα απαιτεί λιγότερο χρόνο σε σχέση με τον αρχικό, λόγω κάποιας μεταγραφικής μνήμης αποθηκευμένης στον υποκινητή που θα σχετίζεται με τη δημιουργία μιας ελεύθερης νουκλεοσώματος περιοχής του υποκινητή μετά την αρχική έκφραση της IFNβ ή με τις διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις που πραγματοποιούνται. Από τα πειράματα που πραγματοποιήσαμε αποδείχθηκε η σιώπηση της έκφρασης του γονιδίου της IFNβ μετά από επαναλαμβανόμενες ικές μολύνσεις.

Αναρωτηθήκαμε μήπως αυτή η σιώπηση οφείλεται σε μη-είσοδο των μεταγραφικών παραγόντων στον πυρήνα και σχεδιάσαμε μια πειραματική προσέγγιση για να ελέγξουμε αυτή μας την υπόθεση. Από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν προέκυψε ότι η ποσότητα

τόσο του IRF-3 όσο και του NF-κB στον πυρήνα αυξάνεται δραματικά κατά τη δεύτερη ιική μόλυνση.

SUMMARY

The first line of antiviral response is laying in the production and secretion of the interferon type I proteins, which, subsequently bind to their specific receptors at the surface of healthy and infected cells in order to activate a large number of antiviral genes. The products of those genes (transcription factors, cytokines etc.) act by inhibiting the penetration or/and replication of the virus inside the cells. The infection of human cells with different types of viruses induces the transcription of the interferon beta (IFN- β) gene, through the coordinate activation of three distinct groups of transcription factors (NF- κ B, ATF-2/c-JUN, IRFs). The latter bind to the enhancer of the IFN- β gene in a cooperative manner and they create, in combination with the architectural protein HMGI(Y), a nucleoprotein complex, known as enhanceosome. The enhanceosome, after its formation at the nucleosome-free enhancer, instructs the ordered recruitment of several co-activators and basal transcription factors at the adjacent promoter. The recruitment program culminates with the sliding of the nucleosome masking the promoter, allowing the RNA polymerase II binding and the subsequent transcriptional initiation. Both the cooperativity in the binding of transcription factors to the enhancer of the gene and the synergy in the recruitment of the co-activators at the enhanceosome, imply an extremely complex and accurate mechanism of combinatorial control of the transcriptional activation of the IFN β gene.

Another striking feature of the IFN- β gene expression, as well as many other cytokine genes , is that even under optimal conditions , only a fraction of the cells in the population (~22% for the IFN- β) expresses the cytokine gene at any given moment . This heterogeneity is known as stochasticity and it is observed, usually, in biological system or procedures, characterized by high complexity and low concentrations of the implicated molecules. One attractive model proposes that the stochasticity is correlated with the transcription process itself and therefore is likely associated with the inherent complexity of enhanceosome assembly on the IFN- β enhancer /promoter.

The aim of this thesis project is to investigate the hypothesis that the interferon B gene, after its first activation by the appropriate signals, does not return to the previous inactive transcriptional state. This hypothesis is based on the fact that modifications of chromatin occurring simultaneously with the interaction of the promoter with other chromosomal regions provide the ability for faster re-expression of genes induced by viral infection.

We hypothesized that the transcriptional activation of the interferon B gene for the next time after the inactivation period would require less time than the original due to some transcription memory stored in the promoter that would be associated with the formation of a free nucleosome domain of the promoter after the initial expression of the IFN β or the interchromosomal interactions performed. We performed various experiments studying the expression of the IFN β gene after repetitive viral infections. The results demonstrated the almost total silence of the IFN β gene.

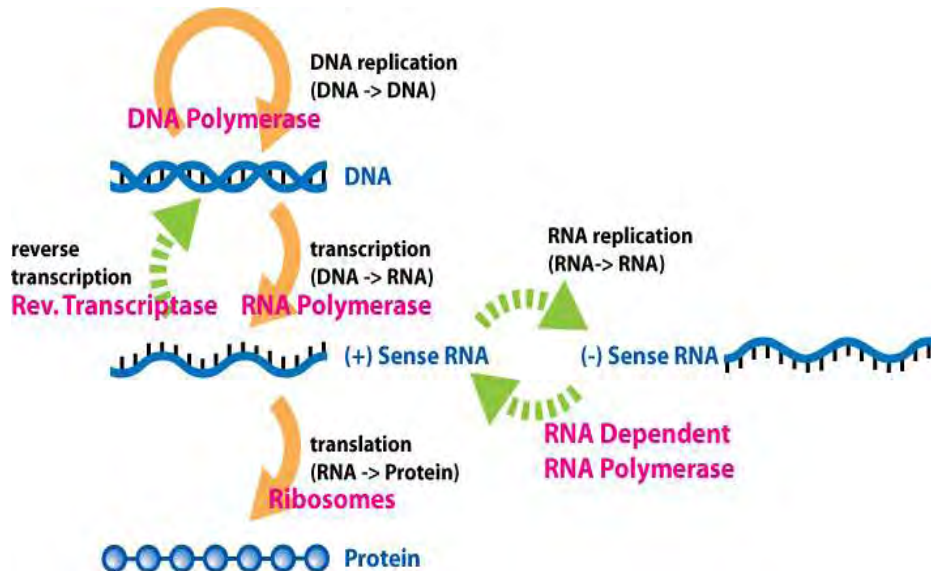
We wondered whether this silence was due to non-entry of transcription factors in the nucleus and we designed an experimental approach to control this hypothesis. From the experiments performed it was shown that the amount of both IRF-3 and NF- κ B in the nucleus increased dramatically during the second viral infection.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Εισαγωγικά στοιχεία

Όπως αναλύει ο Paul Nurse η επιστήμη της βιολογίας διαθέτει τέσσερις ευρέως αποδεκτές «σπουδαίες ιδέες» που είναι εγγενείς του διαλόγου «Τι είναι η ζωή;». Οι σύγχρονοι βιολόγοι λαμβάνουν ως δεδομένο ότι το κύτταρο είναι η βασική μονάδα των οργανισμών, το γονίδιο είναι η βάση της κληρονομικότητάς, η ζωή στηρίζεται σε χημικές αντιδράσεις, και ότι η εξέλιξη των ειδών γίνεται μέσω της φυσικής επιλογής⁽¹⁾. Αυτές οι τέσσερις ιδέες αποτελούν τον βασικό τρόπο σκέψης και προσέγγισης των βιολογικών προβλημάτων, οργάνωσης των πειραμάτων, παρουσίασης των αποτελεσμάτων στο κοινό, και σχεδιασμού προληπτικών και θεραπευτικών στρατηγικών από την σύγχρονη ιατρική. Κάθε μια από τις ιδέες αντιπροσωπεύει ένα διαφορετικό πρίσμα μέσω του οποίου μπορεί να γίνει κατανοητή η ζωή. Όμως για να διατυπωθούν αυτές οι ιδέες πέρασαν αρκετά χρόνια επιστημονικής έρευνας και μελετών που οδήγησαν στη σύγχρονη επιστημονική θεώρηση.

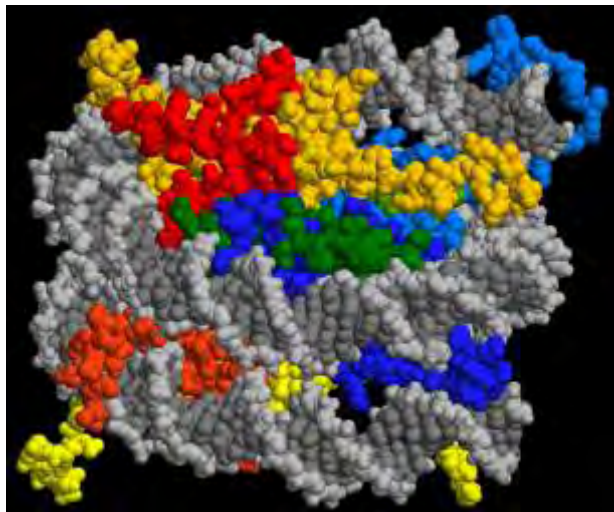
Βασιζόμενοι στα ερευνητικά αποτελέσματα της Rosalind Franklin, οι Francis Crick, James Watson και Maurice Wilkins το 1962 βραβεύτηκαν με το βραβείο Nobel in Physiology or Medicine για την περιγραφή της μοριακής δομής του DNA και την λειτουργία του ως φορέα των γενετικών πληροφοριών. Η ροή της γενετικής πληροφορίας από το DNA στο RNA και στις πρωτεΐνες περιγράφεται από το κεντρικό δόγμα της μοριακής βιολογίας όπως αυτό αρχικά διατυπώθηκε το 1970 από τον Francis Crick και όπου στη συνέχεια βελτιώθηκε με προσθήκες για να καλύπτει μεγαλύτερο φάσμα βιολογικών διεργασιών.



Δομές οργάνωσης της χρωματίνης : Το νουκλεόσωμα

Το νουκλεόσωμα είναι η βασική μονάδα οργάνωσης και συμπύκνωσης της χρωματίνης των ευκαρυωτικών κυττάρων⁽²⁾. Αποτελείται από ένα τμήμα DNA περιελγμένο γύρω από ένα οκταμερές ιστονών, έχει διάμετρο περίπου 11nm και μοριακό βάρος 262 KDalton. Τα νουκλεοσώματα αναδιπλώνονται οδηγώντας σε όλο και μεγαλύτερο βαθμό συσπείρωσης, σχηματίζοντας τελικά τα ινίδια χρωματίνης.

Το κύριο τμήμα του νουκλεοσώματος συγκροτείται από το οκταμερές των ιστονών δηλαδή από τις τέσσερις ιστόνες H2A, H2B, H3 και H4 (11-21 KD) με διπλή αντιπροσώπευση: 2(H2A-H2B-H3-H4). Εμφανίζει υδρόφοβο χαρακτήρα. Γύρω του τυλίγεται DNA μήκους 146 bp κατά 1.67 στροφές. Το μήκος του συνδετικού (linker) DNA έχει μέσο μήκος 60bp, ποικίλει όμως από 8-120bp ανάλογα με τον οργανισμό και τον ιστό⁽³⁾.



Οι ιστόνες του κύριου τμήματος είναι υψηλά συντηρημένες και διαθέτουν πανομοιότυπο δομικό πρότυπο. Δεσμεύονται στο όξινο (αρνητικά φορτισμένο) DNA με μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις. Αποτελούνται από τρεις άλφα έλικες ($\alpha 1-3$) ενωμένες με δύο βρόγχους (L1-2). Μεταξύ των μορίων H2A, H2B και H3, H4 σχηματίζονται ετεροδιμερή. Κάθε οκταμερές αποτελείται από το συνδυασμό δυο H2A-H2B και δυο H3-H4 ετεροδιμερών. Κατά το σχηματισμό της νουκλεοπρωτεϊνικής δομής τα δυο ετεροδιμερή των ιστονών H3-H4 αλληλεπιδρούν και σχηματίζουν έναν τετραμερές το οποίο έρχεται αρχικά σε επαφή με τη διπλή έλικα για να ακολουθήσει η συνένωση κάθε ετεροδιμερούς H2A-H2B. Παράλληλα εντοπίζεται και η συζευκτική ιστόνη H1 που συγκρατεί το τυλιγμένο DNA πάνω στο νουκλεόσωμα⁽³⁾.

Οι ιστόνες διαθέτουν ευέλικτα αμινοτελικά άκρα, είκοσι περίπου αμινοξέων, τα οποία προεκβάλλουν από το νουκλεόσωμα και υφίστανται χημικές μετά- μεταφραστικές τροποποιήσεις.



Benjamin Lewin, σελίδα 819,

εικόνα 20.25

Η σύνδεση των τροποποιήσεων με τους μηχανισμούς αξιοποίησης της γενετικής πληροφορίας αποτέλεσε κομβικό σημείο στη μελέτη του ρόλου της χρωματίνης στη γονιδιακή έκφραση. Οι αλλαγές της χρωματίνης σε ένα μεμονωμένο υποκινητή ελέγχουν

άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως η HMG(Y) που ακετυλιώνεται στην λυσίνη 71 για την διευκόλυνση της έναρξης της μεταγραφής⁽⁵⁾.

Μεταγραφή

Η μεταγραφή είναι το πρώτο βήμα της γονιδιακής έκφρασης όπου ένα συγκεκριμένο τμήμα DNA μεταγράφεται σε RNA (mRNA) από το ένζυμο RNA polymerase. Η μεταγραφή αρχίζει όταν η RNA polymerase προσδεθεί σε μία ειδική περιοχή, τον υποκινητή (promoter) στην αρχή του γονιδίου. Οι υποκινητές τυπικά βρίσκονται ανοδικά από το σημείο έναρξης της μεταγραφής και έχουν μήκος 100-1000 bp. Το άμεσο προϊόν της μεταγραφής ονομάζεται πρωτογενές μετάγραφο.

Στους ευκαρυώτες οι υποκινητές που σχετίζονται με την RNA polymerase II περιέχουν ένα πλαίσιο που ονομάζεται TATA που περιλαμβάνει μια πρότυπη αλληλουχία πρόσδεσης TATAAT και το οποίο αναγνωρίζεται από τον μεταγραφικό παράγοντα TBP. Η αλληλουχία αυτή επικεντρώνεται συνήθως στο -25 ανοδικό σημείο από το σημείο έναρξης της μεταγραφής.

Για να προσδεθεί η RNA polymerase II και να ξεκινήσει η μεταγραφή είναι απαραίτητη η δράση κάποιων πρωτεϊνών που ονομάζονται μεταγραφικοί παράγοντες TFIIIX. Το πρώτο βήμα είναι η πρόσδεση του παράγοντα TFIID σε μία περιοχή που εκτείνεται ανοδικά της αλληλουχίας TATA. Η αναγνώριση του πλαισίου TATA γίνεται από τον TBP ο οποίος προσδέεται στην μικρή αύλακα του DNA και των πρωτεϊνών TAF. Στη συνέχεια προσδέεται ο TFIIA ο οποίος ενεργοποιεί τον TBP. Ακολουθεί η πρόσδεση του TFIIIB καθοδικά του πλαισίου TATA σε μια αλληλουχία που ονομάζεται BRE (B recognition element). Έπειτα προσδέεται το ετεροτετραμερές σύμπλοκο TFIIIF το οποίο μπορεί να προσελκύσει την RNA polymerase II στο υπό συναρμολόγηση σύμπλοκο της μεταγραφής και να της παρέχει τον τρόπο πρόσδεσης. Το σύμπλοκο του TBP με τους TAF μπορεί να αλληλεπιδρά με την ουρά CTD της RNA polymerase II. Μετά την πρόσδεση του ενζύμου δρουν και άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες, όπως οι TFIIIE, TFIIH, TFIIJ, που εξασφαλίζουν την ομαλή διαφυγή του συμπλόκου από τον υποκινητή και την έναρξη της μεταγραφής. Η διαδικασία αυτή φαίνεται και στην εικόνα 6⁽⁶⁾.



*Benjamin
Lewin, σελίδα 858, εικόνα 21.14.*

Για να μπορέσει να προσδεθεί ο TFII D και ο TBP στο DNA πρέπει το πλαίσιο TATA να είναι ελεύθερο νουκλεοσωμάτων. Κάτι τέτοιο μπορεί να επιτευχθεί με την στρατολόγηση συμπλεγμάτων αναδόμησης της χρωματίνης, όπως το SWI/SNF.

Ενισχυτές

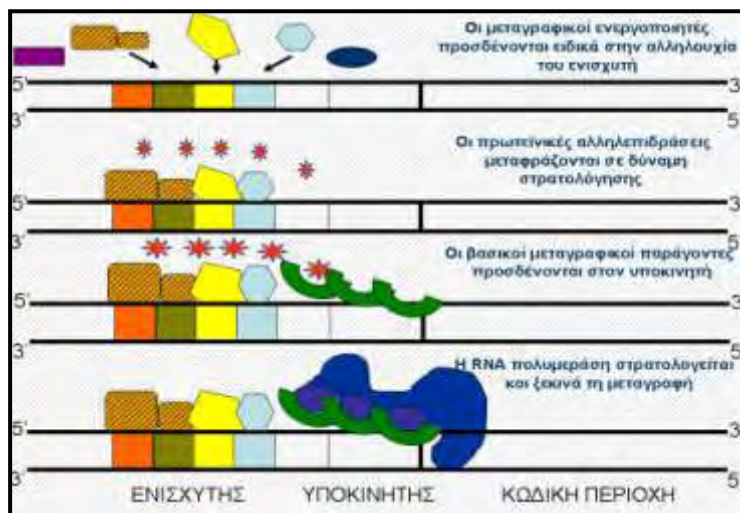
Οι υποκινητές των ευκαρυωτικών οργανισμών δεν λειτουργούν απαραίτητα μόνοι τους. Τουλάχιστον σε κάποιες περιπτώσεις η δράση ενός υποκινητή αυξάνεται κατά πολύ από την παρουσία ενός ενισχυτή (enhancer). Ο ενισχυτής είναι μία μικρή αλληλουχία DNA (50-1500 bp) ο οποίος αποτελείται από ένα άλλο σύνολο στοιχείων τοποθετημένων όμως σε μεταβλητή απόσταση από τα στοιχεία του υποκινητή. Σε αυτόν προσδένονται μεταγραφικοί παράγοντες για να διευκολύνουν την μεταγραφή.

Η θέση του ενισχυτή ως προς τον υποκινητή δε χρειάζεται να είναι σταθερή, αλλά μπορεί να ποικίλλει σημαντικά. Μπορεί να βρίσκεται είτε ανοδικά είτε καθοδικά του υποκινητή. Σε φυσικά γονιδιώματα, οι ενισχυτές μπορεί να βρίσκονται μέσα σ' ένα γονίδιο (δηλαδή καθοδικά από τον υποκινητή) ή και αρκετά απομακρυσμένοι, μέχρι και 1 Mbp (1,000,000 bp), προς οποιαδήποτε κατεύθυνση. Ενισχυτές μπορούν να βρεθούν και σε αλληλουχίες ιντρονίων. Αυτός είναι ένας από τους λόγους που πολυμορφισμοί σε αλληλουχίες ιντρονίων μπορούν να επηρεάσουν διάφορες κυτταρικές λειτουργίες παρόλο που δεν μεταγράφονται. Επιπλέον ενισχυτές μπορούν να βρεθούν και σε αλληλουχίες εξωνίων άλλων γονιδίων.

Επιπροσθέτως ένας ενισχυτής μπορεί να αποκοπεί και να εισαχθεί σε άλλο σημείο στο ίδιο χρωμόσωμα και να συνεχίσει να είναι λειτουργικός ή έχει τη δυνατότητα να επηρεάζει τη μεταγραφή σε γονίδια που βρίσκονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα⁽⁷⁾.

Επιπλέον ο ενισχυτής είναι λειτουργικός ανεξάρτητα από τον προσανατολισμό του (μπορεί δηλαδή να αντιστραφεί η κατεύθυνσή του χωρίς να επηρεαστεί η λειτουργικότητά του) ως προς τον υποκινητή.

Ο ενισχυτής διαθέτει πολλαπλές συνεχείς ή/και επικαλυπτόμενες αλληλουχίες οι οποίες ονομάζονται θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών ενεργοποιητών /αναστολέων (enhancer binding sites) ⁽⁸⁾.



Η αναγνώριση των θέσεων πρόσδεσης του ενισχυτή από τους απο παράγοντες εξασφαλίζει την ειδική ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων μετά την εμφάνιση του εξωκυτταρικού σήματος. Το μονοπάτι μεταγωγής του εξωκυτταρικού ερεθίσματος ενεργοποιεί ένα πλήθος μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι μετατοπίζονται στον πυρήνα και προσδένονται μεμονωμένα ή συνδυαστικά στις ειδικές θέσεις πρόσδεσής τους, που είναι παρούσες στους ενισχυτές/υποκινητές μόνο των ειδικών γονιδίων-στόχων. Μόνο όταν ο απαραίτητος συνδυασμός μεταγραφικών παραγόντων προσδεθεί στον υποκινητή/ενισχυτή ενός γονιδίου η RNA πολυμεράση προσδένεται στο DNA και ξεκινά τη μεταγραφή του.

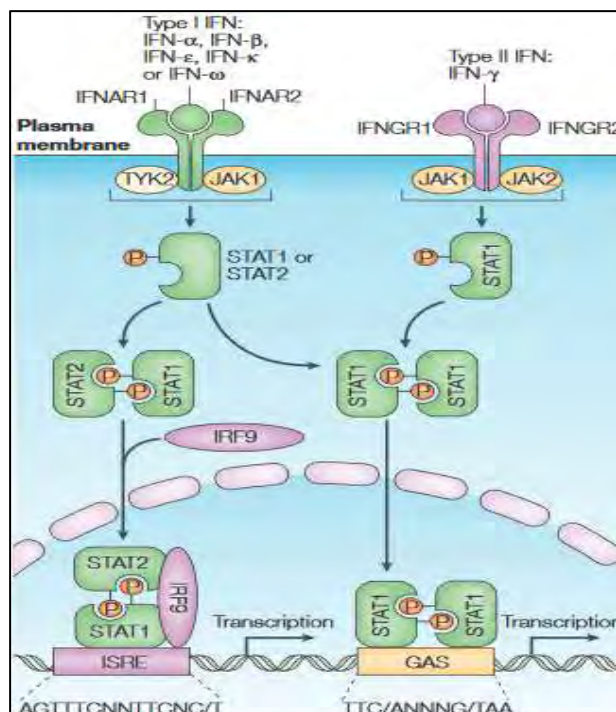
Οι ιντερφερόνες (IFNs)

Οι ιντερφερόνες αρχικά περιγράφηκαν το 1957 από τους Alick Isaacs και Jean Lindenmann στο National Institute for Medical Research στο Λονδίνο ως αποτέλεσμα μελετών της ιικής παρεμπόδισης ⁽⁹⁾.

Οι ιντερφερόνες (IFNs) είναι μία ομάδα σηματοδοτικών πρωτεϊνών που παράγονται και απελευθερώνονται από τα κύτταρα που έχουν ενεργοποιηθεί από διάφορα παθογόνα μόρια όπως ιοί, βακτήρια, παράσιτα αλλά και από καρκινικά κύτταρα. Τυπικά ένα κύτταρο απελευθερώνει ιντερφερόνες που δρουν σε γειτονικά κύτταρα ενεργοποιώντας την κυτταρική άμυνα. Οι ιντερφερόνες πήραν το όνομά τους εξαιτίας της ικανότητάς τους να εμπλέκονται και να παρεμποδίζουν (interfere) τον ιικό πολλαπλασιασμό και έτσι να δρουν κυτταροπροστατευτικά. Θα λέγαμε ότι η αντι-ιική απόκριση είναι μία οδός δύο σταδίων που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των IFNs και των γονιδίων που επάγονται από αυτές.

Οι IFNs ανήκουν σε μια μεγαλύτερη τάξη πρωτεϊνών που ονομάζονται κυτοκίνες, μόρια που χρησιμοποιούνται για την επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων για την ενεργοποίηση μονοπατιών που σχετίζονται με την άμυνα και το ανοσοποιητικό σύστημα. Οι IFNs επιπλέον έχουν και άλλες δράσεις, ενεργοποιούν τα κύτταρα της ανοσίας όπως τα φυσικά φονικά κύτταρα και τα μακροφάγα, αυξάνουν την αντιγονοπαρουσίαση μέσω της αύξησης της

έκφρασης του μείζον συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC I και II), επάγουν την ανάπτυξη/ διαφοροποίηση των Τ-κυτταροτοξικών (CD8+) λεμφοκυττάρων⁽¹⁰⁾ και αυξάνουν την έκφραση του άνοσο-πρωτεασώματος. Κάποια συμπτώματα μόλυνσης όπως ο πυρετός, ο μυϊκός πόνος και τα συμπτώματα γρίπης προκαλούνται επίσης από τις ιντερφερόνες και άλλες κυτοκίνες.



Περισσότερα από είκοσι διαφορετικά γονίδια που κωδικοποιούν IFNs έχουν ταυτοποιηθεί στα ζώα και στον άνθρωπο. Ανάλογα με τον τύπο του υποδοχέα που ενεργοποιούν οι IFNs του ανθρώπου ταξινομούνται σε τρεις τάξεις.

- I. Ιντερφερόνες τύπου I: Είναι οι IFN-α, IFN-β, IFN-ε, IFN-κ and IFN-ω. Αυτές προσδένονται στους υποδοχείς IFN-α/β (IFNAR) που αποτελείται από τις υπομονάδες IFNAR1 και IFNAR2 .
- II. Ιντερφερόνες τύπου II: Είναι η IFN-γ. Προσδέεται στον υποδοχέα IFNGR, ο οποίος αποτελείται από τις υπομονάδες IFNGR1 και IFNGR2⁽¹¹⁾.
- III. Ιντερφερόνες τύπου III: Είναι οι IFN-λ1, IFN-λ2 και IFN-λ3. Ενεργοποιούν τον υποδοχέα IL10R2 (ή αλλιώς CRF2-4) και τον IL28RA (ή αλλιώς IFNLR1, CRF2-12)⁽¹²⁾. Πρόσφατα εντοπίστηκε και μία ακόμα πρωτεΐνη η IFN-λ4 που συμμετέχει στο σηματοδοτικό μονοπάτι του IL28RA αλλά η δράση της ακόμα δεν έχει διαλευκανθεί⁽¹³⁾.

Με την πρόσδεσή τους στους υποδοχείς οι ιντερφερόνες ενεργοποιούν το σηματοδοτικό μονοπάτι JAK-STAT. Το κύτταρο παράγει μεγάλες ποσότητες της κινάσης PKR (protein kinase R). Αυτή φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη eIF-2 η οποία σχηματίζει ένα ανενεργό σύμπλοκο με την eIF2B, για να μειώσει την πρωτεϊνσύνθεση στο κύτταρο. Επίσης παράγεται και το ένζυμο RNase L το οποίο αποικοδομεί το RNA για να μειώσει περαιτέρω την πρωτεϊνσύνθεση ικών αλλά και κυτταρικών πρωτεϊνών⁽¹⁴⁾. Επιπλέον οι ιντερφερόνες επάγουν την έκφραση εκατοντάδων άλλων γονιδίων γνωστών ως ISGs (interferon-stimulated genes) που συμβάλλουν στην καταπολέμηση των ιών⁽¹⁵⁾. Παράλληλα αυξάνουν την έκφραση του p53 που προωθεί την απόπτωση των κυττάρων που έχουν μολυνθεί από ιούς όπως και σε καρκινικά κύτταρα⁽¹⁶⁾.

Η ιντερφερόνη β (IFNβ)

Η ιντερφερόνη β (IFNβ) είναι μια σηματοδοτική πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των κυτοκινών, και είναι Ιντερφερόνη τύπου Ι. Εκφράζεται από όλους σχεδόν τους κυτταρικούς τύπους σε μεγάλες ποσότητες από τους ινοβλάστες και η δράση της είναι παρακρινής. Κύτταρα που μολύνονται από κάποιο μόριο που μπορεί να επάγει την μονοπάτια παραγωγής ιντερφερόνης τελικά αποπύτουν. Η πρόσδεσή της, όμως, σε υποδοχείς γειτονικών κυττάρων τα καθιστά ανθεκτικά στην ιική μόλυνση. Η τελευταία είναι και το μοναδικό ερέθισμα που μπορεί να ενεργοποιήσει το γονίδιο της ιντερφερόνης β στον άνθρωπο ⁽¹⁷⁾. Η υπερέκφραση ιντερφερονών τύπου Ι συνδέεται με αυτοάνοσα νοσήματα.

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την IFNβ βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9p21. Δύο τύποι IFNβ έχουν ταυτοποιηθεί η IFN-β1 (IFNB1) και η IFN-β3 (IFNB3) ⁽¹⁸⁾.



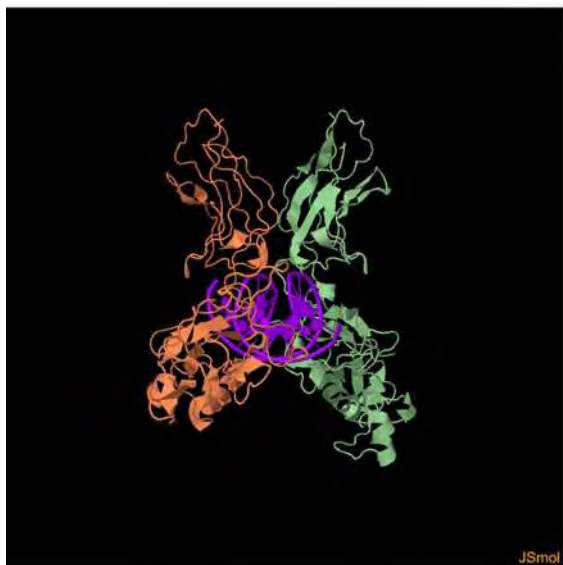
Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ

Οι Rel ή NF-kappaB (NF-κB) πρωτεΐνες περιλαμβάνουν μια οικογένεια δομικά παρόμοιων ευκαρυωτικών μεταγραφικών παραγόντων που συμμετέχουν στην μεταγραφή του DNA, στην παραγωγή κυτοκινών και στην κυτταρική επιβίωση. Ο NF-κB εντοπίζεται σε πολλούς κυτταρικούς τύπους και εμπλέκεται σε κυτταρικές αποκρίσεις που σχετίζονται με το στρες, τις κυτοκίνες, την υπερϊώδη ακτινοβολία, τις ελεύθερες ρίζες και τα αντιγόνα βακτηρίων και ιών ⁽¹⁹⁾. Ο NF-κB διαδραματίζει βασικό ρόλο στην ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης σε μολύνσεις (οι κ ελαφριές αλυσίδες είναι βασικά συστατικά των ανοσοσφαιρινών). Λανθασμένη ρύθμιση του NF-κB έχει συνδεθεί με καρκινογένεση, αυτοάνοσες ασθένειες, σηπτικό σοκ, ιικές μολύνσεις και λανθασμένη ανοσική απόκριση ⁽²⁰⁾.

Οι Rel/NF-κB πρωτεΐνες περιέχουν μια υψηλά συντηρημένη περιοχή 300 περίπου αμινοξέων που μπορεί να προσδεθεί στο DNA που ονομάζεται Rel homology (RH) domain (RHD). Η RHD αποτελείται από δύο immunoglobulin-like β barrel υπομονάδες που προσδέονται στην μεγάλη αύλακα του DNA ⁽²¹⁾. Οι υπομονάδες αυτές έχουν παρόμοια δομή με αυτή του προϊόντος που προκύπτει από το πρότογονογονίδιο cRel και έτσι οι Rel/NF-κB πρωτεΐνες πήραν το όνομά τους. Οι Rel/NF-κB πρωτεΐνες χωρίζονται σε δύο τάξεις ανάλογα με τις αλληλουχίες στο καρβοξυτελικό άκρο της επικράτειας RH. Η πρώτη τάξη περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες p105 και p100 που μετατρέπονται μέσω πρωτεόλυσης στις p50 και p52 αντίστοιχα ⁽²²⁾. Οι p105 και p100 διαθέτουν μακριά καρβοξυτελικά άκρα που περιέχουν επαναλήψεις αλληλουχιών αγκυρίνης οι οποίες καθιστούν τα μόρια ανενεργά. Μέσω της πρωτεόλυσης των περιοχών αυτών τα μόρια ενεργοποιούνται. Οι πρωτεΐνες αυτές γενικά δεν δρουν ως παράγοντες που ενεργοποιούν τη μεταγραφή εκτός και αν συνδεθούν με πρωτεΐνες της δεύτερης τάξης Rel/NF-κB. Η δεύτερη τάξη περιλαμβάνει την c-Rel (και το ρετροϊκό

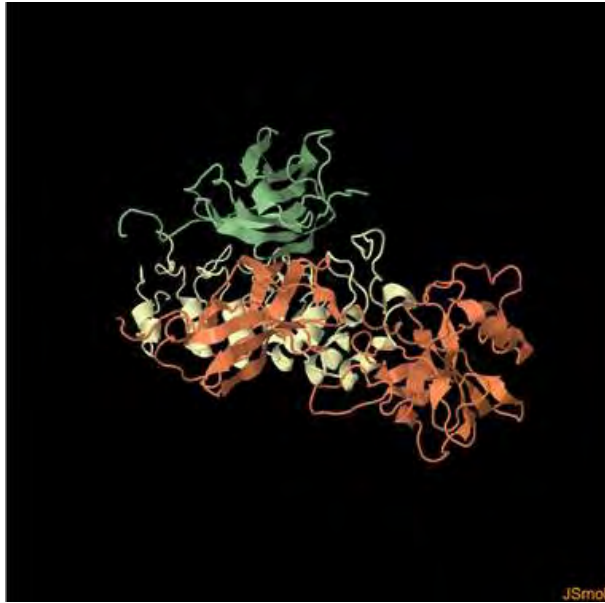
ομόλογο ν -Rel), την RelB, την RelA (p65), το ραχιαίο μορφογόνο της *Drosophila* και το ραχιαίο ανόσο-σχετικό παράγοντα Dif. Η δεύτερη τάξη πρωτεϊνών Rel/NF- κ B περιλαμβάνει αλληλουχίες ενεργοποίησης της μεταγραφής στο καρβοξυτελικό τους άκρο που δεν είναι απόλυτα συντηρημένες ανάμεσα στα είδη ⁽²³⁾.

Οι Rel/NF- κ B μεταγραφικοί παράγοντες προσδένονται στο DNA με τη μορφή διμερών, σε ειδικές αλληλουχίες μήκους 9-10 βάσεων που ονομάζονται kB sites. Όλες οι πρωτεΐνες Rel των σπονδυλωτών μπορούν να σχηματίσουν ομοδιμερή ή ετεροδιμερή εκτός από την RelB που σχηματίζει μόνο ετεροδιμερή. Ο όρος NF- κ B συνήθως αναφέρεται στο ετεροδιμερές p50-RelA(p65) διότι είναι το πιο διαδεδομένο διμερές που σχηματίζεται και συμμετέχει στις περισσότερες κυτταρικές διεργασίες ⁽²⁴⁾.



Σε μη διεγερμένα κύτταρα τα διμερή του NF- κ B βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα δεσμευμένα από μια οικογένεια αναστολέων που ονομάζονται πρωτεΐνες I κ Bs (Inhibitor of κ B). Αυτές περιέχουν πολλαπλές επαναλήψεις αλληλουχιών αγκυρίνης. Με την βοήθεια αυτών των αλληλουχιών οι I κ B δεσμεύουν τις περιοχές του NF- κ B που δέχονται τα σήματα για την μεταφορά του στον πυρήνα (nuclear localization signals NLS) και έτσι παραμένει ανενεργός στο κυτταρόπλασμα ⁽²⁵⁾.

Οι I κ Bs είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών που διαθέτουν ένα αμινοτελικό ρυθμιστικό άκρο που ακολουθείται από έξι ή περισσότερες επαναλήψεις αγκυρίνης και μία αλληλουχία PEST κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο. Οι I κ Bs αποτελούνται από τις I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , and Bcl-3 και η καλύτερα μελετημένη πρωτεΐνη αυτής της οικογένειας είναι η I κ B α .



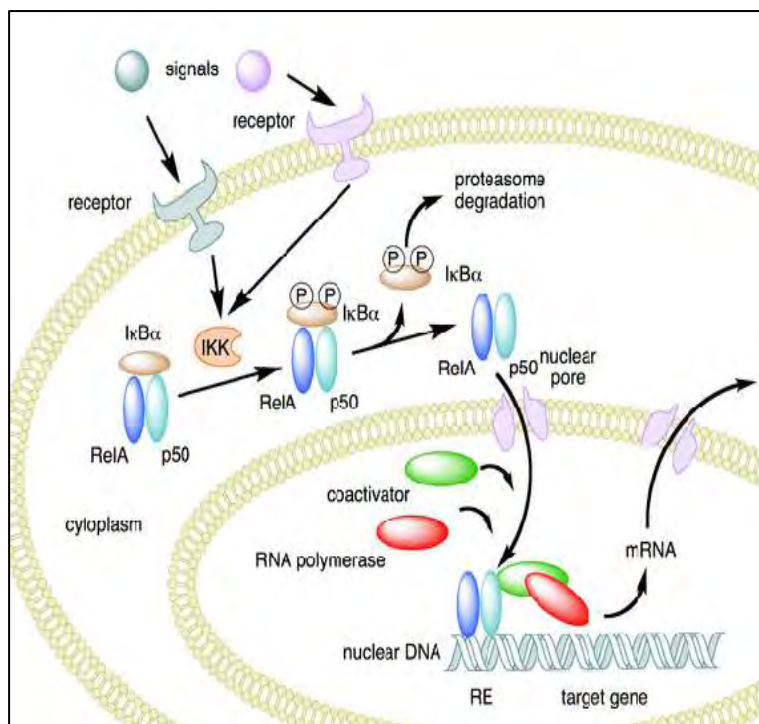
Ο NF-κB διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των κυτταρικών αποκρίσεων διότι ανήκει στην κατηγορία των μεταγραφικών παραγόντων που δρουν άμεσα μετά την ενεργοποίησή τους. Αυτό συμβαίνει διότι ο NF-κB βρίσκεται ήδη στο κύτταρο, σε ανενεργή μορφή και δεν απαιτείται πρωτεϊνοσύνθεση για να ενεργοποιηθεί. Αυτό επιτρέπει στον NF-κB να είναι από τα πρώτα μόρια που θα ανταποκριθούν σε κυτταρικά ερεθίσματα. Πολλά διαφορετικά μόρια μπορούν να ενεργοποιήσουν τον NF-κB μέσω διαφορετικών υποδοχέων. Η ταυτοποίηση των υποδοχέων TLR (Toll-like receptors) ως πρότυπα ειδικά μόρια αναγνώρισης σημάτων οδήγησε στην καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού ενεργοποίησης του NF-κB⁽²⁶⁾.

Η κλασική οδός ενεργοποίησης του NF-κB ξεκινά από τα σήματα που προκαλούν την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών IκB. Τα σήματα αυτά μπορεί να είναι ο TNFα, ελεύθερες ρίζες (ROS), βακτηριακοί λιποσακχαρίτες (LPS), γενετικό υλικό ιών και άλλα. Αυτά τα σήματα ενεργοποιούν ενδομεμβρανικούς ή και ενδοκυτταρικούς υποδοχείς (πχ: TLRs, TNFs) που με τη σειρά τους ενεργοποιούν άλλους παράγοντες όπως οι TRAFs και RIP. Αυτοί στην συνέχεια ενεργοποιούν την κινάση IKK (IκB kinase). Δεν είναι απολύτως ξεκάθαρο πως γίνεται η ενεργοποίηση της αλλά περιλαμβάνει την φωσφορυλίωση δύο καταλοίπων σερίνης (Ser 177 και 181 για την IKKβ, και Ser 176 και 180 για την IKKα) που βρίσκονται σε έναν βρόγχο ενεργοποίησης⁽²⁷⁾.

Η IKK αποτελείται από ένα ετεροδιμερές των καταλυτικών υπομονάδων IKKα και IKKβ και ένα βασικό ρυθμιστικό τμήμα που ονομάζεται NEMO (NF-κB essential modulator) ή αλλιώς IKKγ. Η IKK φωσφορυλιώνει δύο κατάλοιπα σερίνης στην ρυθμιστική περιοχή της IκB. Στην IκBa του ανθρώπου φωσφορυλιώνονται τα κατάλοιπα σερίνης 32 και 36. Η φωσφορυλίωση ενεργοποιεί την ουβικιτινίωση της IκBa (στην λυσίνη 48) την αποκόλληση της από το ετεροδιμερές p50/RelA(p65) και την αποικοδόμηση της στο πρωτεάσωμα.

Με την αποκόλληση της IκBa πλέον ο NF-κB μπορεί να μεταφερθεί στον πυρήνα όπου προσδένεται σε ειδικές αλληλουχίες του DNA που ονομάζονται RE (response elements). Τότε μπορεί να δράσει ως μεταγραφικός παράγοντας και να επάγει την μεταγραφή. Ο NF-κB επάγει την έκφραση της IκBa η οποία με τη σειρά της δεσμεύει πάλι τον NF-κB και τον καθιστά ανενεργό. Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται μια θηλιά ανατροφοδότησης που

εξασφαλίζει ότι ο NF- κ B θα βρίσκεται και θα δρα στον πυρήνα μόνο μετά από ειδικό σήμα ενεργοποίησης του⁽²⁸⁾.



Οι μεταγραφικοί παράγοντες IRFs.

Οι μεταγραφικοί παράγοντες IRF (Interferon regulatory factors) είναι πρωτεΐνες που ρυθμίζουν την μεταγραφή των ιντερφερονών. Η οικογένεια των IRF περιλαμβάνει εννέα μέλη: τον IRF1, τον IRF2, τον IRF3, τον IRF4 (γνωστός και ως LSIRF, PIP ή ICSAT), τον IRF5, τον IRF6, τον IRF7, τον IRF8 (γνωστός και ως ICSBP) και τον IRF9 (γνωστός και ως ISGF3 γ)⁽²⁹⁾. Ο IRF1 ήταν το πρώτο μέλος που φάνηκε να ενεργοποιεί υποκινητές των γονιδίων των IFN τύπου I το 1988⁽³⁰⁾.

Κάθε IRF αποτελείται από μία πολύ καλά συντηρημένη περιοχή σύνδεσης με το DNA περίπου 120 αμινοξέων που βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο περιέχει μια αλληλουχία από πέντε μόρια τρυπτοφάνης⁽³¹⁾ και σχηματίζει μια δομή έλικας-στροφής-έλικας. Αυτή η περιοχή αναγνωρίζει ειδικές αλληλουχίες στο DNA που είναι γνωστές ως ISRE (the IFN-stimulated response element) ή IRF-E⁽³²⁾ επειδή αρχικά ταυτοποιήθηκαν σε υποκινητές γονιδίων που ενεργοποιούνται από σήματα που προέρχονται από τις τύπου I IFNs⁽³³⁾. Οι ISRE βρίσκονται επίσης σε υποκινητές των γονιδίων των τύπου I IFNs όπως και σε υποκινητές άλλων γονιδίων που σχετίζονται με την ανοσοαπόκριση και την ογκογένεση.

Η λειτουργία των IRFs ως ρυθμιστές της ενεργοποίησης των γονιδίων που σχετίζονται με την ανοσία άρχισε να προκαλεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον με την ανακάλυψη υποδοχέων με συγκεκριμένα πρότυπα αναγνώρισης PRRs (pattern-recognition receptors). Οι PRRs αναγνωρίζουν μοριακά πρότυπα που προέρχονται από παθογόνα PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), όπως βακτηριακοί λιποσακχαρίτες (LPS) και ιικά νουκλεϊκά οξέα, όπου η αναγνώριση και δέσμευσή τους στους PRRs ενεργοποιεί συγκεκριμένα προγράμματα ανοσικής απόκρισης στον ξενιστή.

Δύο τάξεις PRRs έχουν αναγνωριστεί. Οι διαμεμβρανικοί PRRs που ονομάζονται TLRs (Toll-like receptors) και οι κυτταροπλασματικοί PRRs που περιλαμβάνουν τον RIG-I

(retinoic-acid-inducible gene I), τον MDA5 (melanoma-differentiation-associated gene 5), τον PKR και τις πρωτεΐνες NOD (nucleotide-binding oligomerization domain proteins)⁽³⁴⁾.

Ο IRF3

Ο IRF3 αρχικά ανακαλύφθηκε ως ένα ομόλογο των IRF1 και IRF2. Έπειτα από περαιτέρω μελέτες αποκαλύφθηκε η ακριβής δομή του. Διαθέτει πολλές ρυθμιστικές περιοχές με τις πιο καλά χαρακτηρισμένες να είναι το καρβοξυτελικό άκρο που είναι πλούσιο σε θέσεις φωσφορυλίωσης, μια περιοχή πρόσδεσης με το DNA και μια περιοχή που φέρει σήματα εξόδου από τον πυρήνα⁽³⁵⁾. Οι IRF3 και IRF7 παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία και έχουν μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό εξαιτίας του κομβικού ρόλου που διαδραματίζουν στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης κατά τον συντονισμό της αντι-ικτικής απόκρισης.



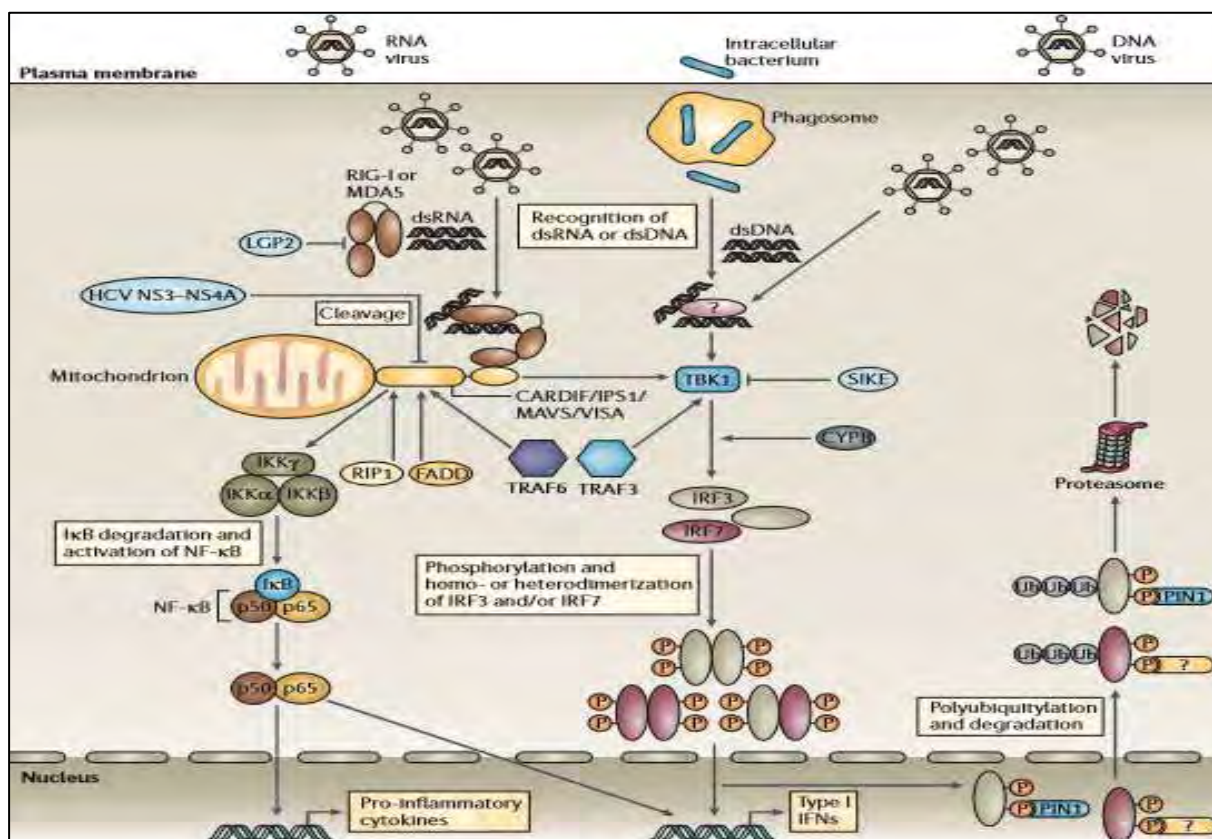
Ο IRF3 παράγεται συστηματικά μέσα στο κύτταρο. Βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα σε ανενεργή μορφή και σε περίπτωση ιικής μόλυνσης εισέρχεται στον πυρήνα. Το κλασσικό μοντέλο ενεργοποίησής του είναι αυτό που περιλαμβάνει τους κυτταροπλασματικούς υποδοχείς PRRs.

Το δίκλωνο RNA (double-stranded RNA, dsRNA) ή το δίκλωνο DNA double-stranded DNA (dsDNA) που εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα έπειτα από ιική ή βακτηριακή μόλυνση αλληλεπιδρά με την RNA-helicase περιοχή του υποδοχέα RIG-I ή του MDA5. Αυτό ενεργοποιεί την αλληλεπίδραση της CARD περιοχής (caspase-recruitment domain) του RIG-I ή του MDA5 με την CARD-like περιοχή που βρίσκεται στην μιτοχονδριακή μεμβράνη. Η περιοχή αυτή έχει τέσσερις εναλλακτικές ονομασίες: CARDIF (CARD adaptor inducing interferon- β), IPS1 (IFNB-promoter stimulator 1), MAVS (mitochondrial antiviral signaling protein) και VISA (virus-induced signaling adaptor). Η CARDIF/IPS1/MAVS/VISA ενεργοποιεί με τη σειρά της την κινάση TBK1 (TANK binding kinase 1) φωσφορυλιώνοντας την στην σερίνη 172⁽³⁶⁾, η οποία φωσφορυλιώνει τους IRF3 και IRF7 σε συγκεκριμένα κατάλοιπα σερίνης (όπως οι σερίνες 385 και 386 του IRF3). Παράλληλα ο RIG-I ενεργοποιεί τον STING⁽³⁷⁾ όπου και αυτός ενεργοποιεί την κινάση TBK1. Πολύ σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και η iRhom2 η οποία ενεργοποιεί την πρωτεΐνη TRAP β για να διευκολύνει την μετακίνηση του STING στο κυτταρόπλασμα και το ένζυμο EIF3S5 που απομακρύνει τα μόρια ουβικιτίνης που προσδένονται στην λυσίνη 48 του STING και έτσι εξασφαλίζεται η παρουσία του στο κυτταρόπλασμα⁽³⁸⁾. Επιπλέον θετική ρύθμιση της TBK1 προκαλούν οι CYPB (Cyclophilin B) και TRAF3 ενώ η SIKE (suppressor of I κ B (inhibitor of NF- κ B)-

kinase ε) λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής⁽³⁶⁾. Ως αρνητικός ρυθμιστής του RIG-I ή του MDA5 δρα και η LGP2 που δρα ανταγωνιστικά για την δέσμευση του ιικού RNA.

Μετά την φωσφορυλίωση των IRF3 και IRF7 ευνοείται ο όμο- και ο έτερο- διμερισμός τους. Τα διμερή μετακινούνται στον πυρήνα και ενεργοποιούν την μεταγραφή των γονιδίων των IFN τύπου I. Ο IRF3 αλληλεπιδρά με την IPO5/importin-β3 όπου συμμετέχει στην μεταφορά του στον πυρήνα. Η υπερέκφραση της FAF1 μειώνει αυτή την αλληλεπίδραση και δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της παραγωγής ιντερφερονών⁽³⁹⁾.

Μέσα στον πυρήνα η PIN1 (cis-trans peptidylprolyl isomerase, NIMA-interacting 1) αλληλεπιδρά με τα φωσφορυλιωμένα διμερή του IRF3, διευκολύνει την ουβικιτινιωσή τους και κατά συνέπεια την αποικοδόμησή τους στο πρωτεάσωμα. Σε αντίθεση με την PIN1 δρα η πρωτεΐνη ISG15 όπου σταθεροποιεί την παρουσία του IRF3 στον πυρήνα των μολυσμένων κυττάρων⁽⁴⁰⁾.



Ο IRF7

Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον IRF7 αρχικά μελετήθηκε το 1997, στο πλαίσιο των μελετών για την μόλυνση από τον ιό Epstein-Barr (EBV) όπου παρατηρήθηκε ότι ο IRF7 προσδένεται και ρυθμίζει τον υποκινητή EBNA1 Q⁽⁴¹⁾. Το γονίδιο στον άνθρωπο που κωδικοποιεί τον IRF7 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11p15.5 και κωδικοποιεί τέσσερις isoμορφές IRF7A, -B, -C και -D (-H)⁽⁴²⁾. Ο IRF7A στον άνθρωπο αποτελείται από 503 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 55kD.

Ο IRF3 είναι το κοντινότερο μέλος της οικογένειας των IRF με τον IRF7. Ενεργοποιούνται από το ίδιο μοριακό μονοπάτι και μαζί ρυθμίζουν την παραγωγή των ιντερφερονών τύπου I⁽⁴³⁾. Σε αντίθεση όμως με τον IRF3 που παράγεται συνέχεια στο κύτταρο σε μεγάλη ποσότητα και μένει ανενεργός στο κυτταρόπλασμα, ο IRF7 παραμένει σε πολύ χαμηλά επίπεδα στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους και έχει πολύ μικρή διάρκεια ημιζωής 0,5-1h σε μολυσμένα κύτταρα⁽⁴⁴⁾ και περίπου 5 h σε μη μολυσμένα κύτταρα. Η σταθερότητά του εξαρτάται από το σύστημα της ουβικιτίνης-πρωτεασώματος. Ο IRF7 αλλά όχι ο IRF3 περιέχει μια συντηρημένη αλληλουχία προλίνης-γλουταμινικού οξέος – σερίνης –θρεονίνης όπου είναι κομβική για την δράση των πρωτεολυτικών πρωτεϊνών⁽⁴⁵⁾.

Η αλληλουχία DNA (DBD) με την οποία προσδένεται ο IRF7 (GAAWNYGAAANY) δεν είναι τόσο περιορισμένη όσο αυτή του IRF3 (GAAANNGAAANN) και αυτό του δίνει τη δυνατότητα να ρυθμίζει ένα μεγαλύτερο εύρος γονιδίων που συμμετέχουν σε διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες⁽⁴⁶⁾.



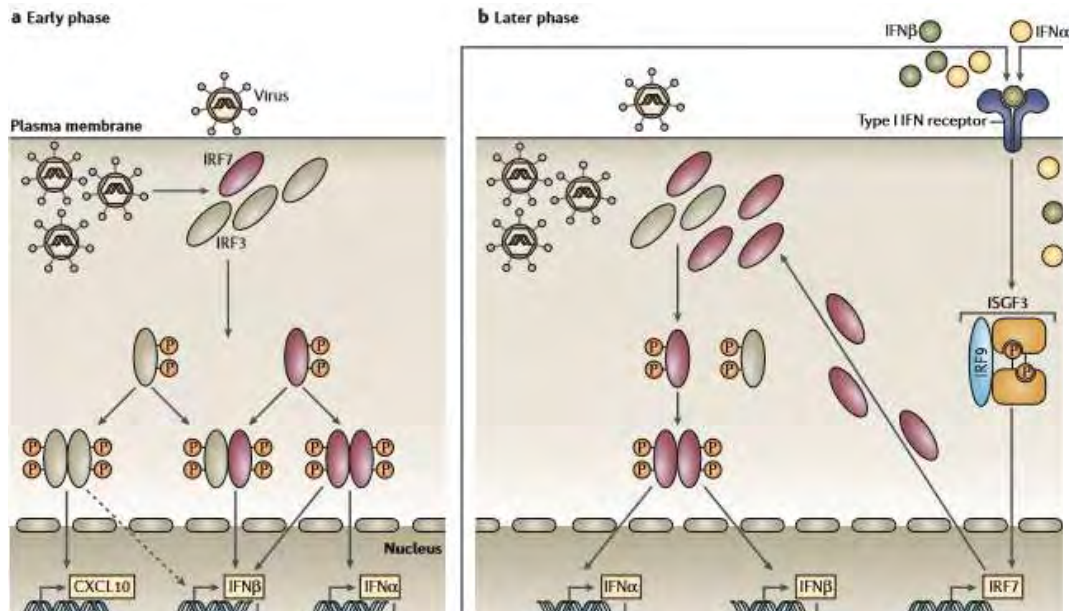
Η ενεργοποίηση του IRF-7 είναι απαραίτητη για την δράση του ως μεταγραφικός παράγοντας και γίνεται με παρόμοιο τρόπο με αυτή του IRF-3. Κομβικό ρόλο διαδραματίζει η κινάση TBK1 (TANK binding kinase 1) η οποία φωσφορυλιώνει τον IRF7 στα κατάλοιπα σερίνης 477 και 479. Παράλληλα ενεργοποίηση του IRF7 γίνεται μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού που ξεκινά από τους TLR7 και TLR9 όπου με τον IRF7 αλληλεπιδρά η MyD88 μέσω της φωσφορυλίωσής του από την κινάση σερίνης-θρεονίνης mTOR Ser/Thr (και όχι από την TBK1). Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τον σχηματισμό του συμπλόκου MyD88, IRAK-4, IRAK-1 και TRAF6⁽⁴⁷⁾.

Μελέτες γύρω από την κρυσταλλική δομή του IRF3 απέδειξαν τον τρόπο που η φωσφορυλίωση τον ενεργοποιεί. Παράλληλα το ίδιο μοντέλο ενεργοποίησης περιγράφηκε για τον IRF5 και θεωρείται ότι είναι ο γενικός μηχανισμός ενεργοποίησης των IRFs⁽⁴⁸⁾. Η περιοχή αλληλεπίδρασης με τους IRFs του IRF3 διαθέτει υδροφοβική επιφάνεια που καλύπτεται από μια αυτό-ανασταλτική περιοχή (autoinhibitory domain) στην ανενεργή μορφή του IRF3. Η φωσφορυλίωση αποκαλύπτει την υδροφοβική περιοχή και έτσι ο IRF3 μπορεί να διμεριστεί ή να αλληλεπιδράσει με άλλους συνενεργοποιητές⁽⁴⁹⁾.

Η μετακίνηση του IRF7 στον πυρήνα γίνεται μέσω της δράσης της κινάσης PI3K (phosphatidylinositol 3 kinase)⁽⁵⁰⁾.

Pathogens	PAMPs	PRRs	Adaptors	TRAFs	IRFs
Virus	dsDNA	DAI	?	TRAF3?	IRF3 IRF7/5?
Bacterium, virus	dsDNA (CpG)	TLR9	MyD88	TRAF6 TRAF3	IRF7/5/1 IRF8/4
Bacterium, virus	Poly AT-rich dsDNA	DHX9 DHX36 RNA Pol III dsRNA	MyD88	TRAF6?	IRF7
Virus	Non-AT-rich DNA	IFI16	STING	TRAF6 TRAF3	IRF3 IRF7/5?
Virus	ssRNA	Nod2	IPS-1	TRAF3	IRF3 IRF7/5?
Virus	dsRNA	TLR7/8	MyD88	TRAF6 TRAF3	IRF7/5/1 IRF4
Virus	dsRNA	RLRs	IPS-1	TRAF6 TRAF3	IRF3/7 IRF5
Vaccinia Virus	Poly(A)-rich DNA	Murine TLR8	MyD88	TRAF6?	IRF3 IRF7/5
Virus	?	TLR2	MyD88	TRAF6?	IRF3/7 IRF1
Bacterium	LPS	TLR4	TRIF TRAM	TRAF3	IRF3 IRF5
Bacterium	PGN	NLR β	?	TRAF6?	IRF3?

Τα ετεροδιμερή IRF3/IRF7 αφού μετακινούνται στον πυρήνα ενεργοποιούν την παραγωγή χημοκινών, συμπεριλαμβανομένου του προσδέτη χημοκινών CXCL10 (CXC-chemokine ligand 10) όπως και μικρές ποσότητες IFN β και IFN α . Οι IFNs που εκκρίνονται προσδένονται σε υποδοχείς των IFN τύπου I (IFNAR1 και IFNAR2) αυτοκρινώς ή παρακρινώς. Αυτή η πρόσδεση ενεργοποιεί το ετεροτριμερές ISGF3 (IFN-stimulated gene factor 3) που αποτελείται από τους STAT1, STAT2 και IRF9. Αυτό μετακινείται στον πυρήνα και επάγει την μεταγραφή του γονιδίου του IRF7. Ο IRF7 που παράγεται οδηγείται στο κυτταρόπλασμα και είναι έτοιμος να ενεργοποιηθεί έπειτα από κυτταρική μόλυνση και ενεργοποίηση των PRRs.



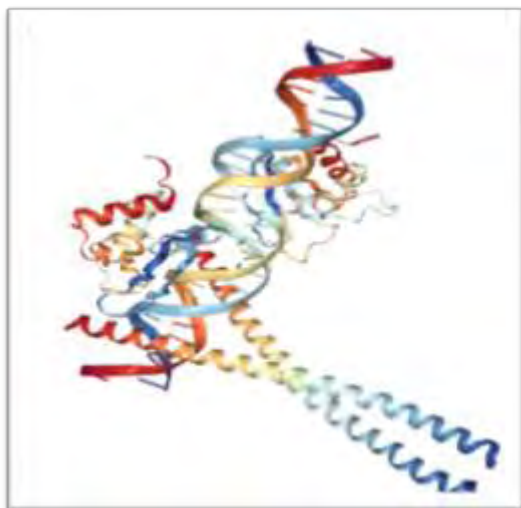
Οι μεταγραφικοί παράγοντες ATF2/cJun

Το γονίδιο ATF2 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2q32 και κωδικοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα ATF2 που αποτελείται από 505 αμινοξέα και είναι μέλος των πρωτεϊνών που διαθέτουν φερμουάρ λευκίνης.

Ο ATF2 φυσιολογικά επάγεται από τις κινάσες p38 (stress-activated protein kinases) και JNK και προσδένεται στο οκταμερές CRE (cAMP-responsive element). Δημιουργεί ένα ομοδιμερές ή ένα ετεροδιμερές με την πρωτεΐνη c-Jun και ενεργοποιεί τη μεταγραφή. Επιπλέον έχει τη δράση ακετυλοτρανσφεράσης ιστονών και ακετυλιώνει in vitro τις ιστόνες H2B και H4.

Ο c-Jun είναι μία πρωτεΐνη που στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο JUN το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1p32-p31. Σε συνδυασμό με τον c-Fos σχηματίζουν τον μεταγραφικό παράγοντα AP-1. Ανακαλύφθηκε αρχικά λοιπόν ως η προσδέτης του c-Fos και έπειτα ταυτοποιήθηκε ως το προϊόν του γονιδίου JUN. Ενεργοποιείται έπειτα από διπλή φωσφορυλίωση από το σηματοδοτικό μονοπάτι της κινάσης JNK στις σερίνες 63 και 73 και στις θρεονίνες 91 και 93. Βέβαια μπορεί να δράσει σε διαφορετικά μονοπάτια χωρίς να είναι απαραίτητη η φωσφορυλίωση του.

Οι ATF2 / c-Jun διμερίζονται και δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες, επάγοντας την παραγωγή της IFNβ.



Εικόνα 18: Η κρυσταλλική δομή των DBD περιοχών των IRF3 και ATF2/ c-Jun προσδεδεμένων στο DNA

Πηγή: Crystal structure of ATF-2/c-Jun and IRF-3 bound to the interferon-beta enhancer. Panne, D., Maniatis, T., Harrison, S.C. (2004) Embo J. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600453

Αντίθετα από τους NF-κB και IRF, το σύμπλοκο ATF-2/c-Jun βρίσκεται στον πυρήνα των μη διεγερμένων κυττάρων. Όμως δεν είναι ικανό να προσδεθεί στο DNA και να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή. Απαραίτητη είναι η φωσφορυλίωσή του από το MAPK σηματοδοτικό μονοπάτι. Επίσης ο ATF-2/c-Jun απαιτεί την συνεργιστική δράση με τους άλλους μεταγραφικούς παράγοντες για να προσδεθεί σταθερά στο DNA.

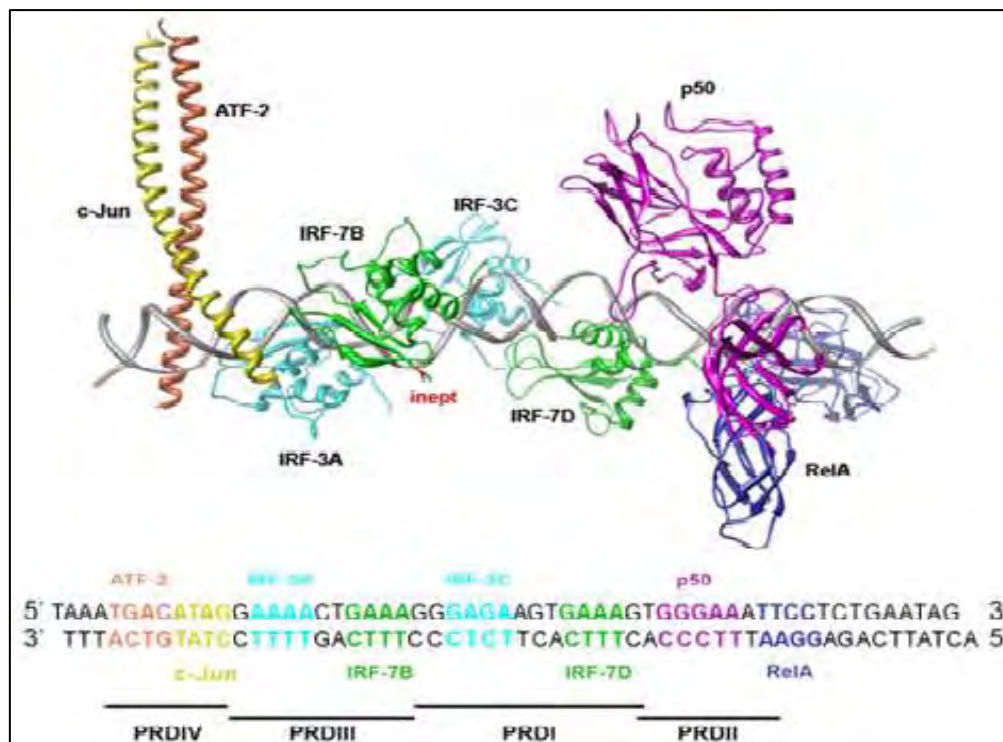
Ο Ενισχυτής και το Ενισχυόσωμα της IFNβ :

Ο ενισχυτής της ιντερφερόνης β (IFNβ enhancer) βρίσκεται ανοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής και καταλαμβάνει μαζί με τον υποκινητή μια περιοχή μήκους 110 ζευγών βάσεων. Ο ενισχυτής καταλαμβάνει 55 ζεύγη βάσεων και περιλαμβάνει συγκεκριμένες ρυθμιστικές αλληλουχίες. Τρεις από αυτές ονομάζονται Θετικά Ρυθμιστικά Στοιχεία (Positive Regulatory Domains) ή PRDs. Είναι οι PRDIV, PRDIII-I και PRDII, (σε κατεύθυνση 5' → 3')στις οποίες προσδένονται οι μεταγραφικοί παράγοντες. Στην αλληλουχία PRDIII-I προσδένονται διμερή της οικογένειας IRF (κυρίως το διμερές IRF3/IRF7) είναι

δηλαδή μια αλληλουχία ISRE (IFN-stimulated response element). Στην PRDIV προσδένεται το διμερές ATF2/cJun και στην PRDII ο NFκB (διμερές p65/p50).



Μετά το PRDIV, ακολουθεί ο κεντρικός υποκινητής με ένα στοιχείο TATA τοποθετημένο σε απόσταση 20 ζευγών βάσεων από το σημείο έναρξης της μεταγραφής.



Ο ικός επαγόμενος ενισχυτής του γονιδίου της IFN-β μας παρέχει ένα από τα καλύτερα παραδείγματα της συνεργιστικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των μεταγραφικών παραγόντων που μπορούν να οδηγήσουν σε ένα πολύ εξειδικευμένο μοντέλο γονιδιακής ενεργοποίησης. Το γονίδιο της IFN-β σε φυσιολογικές καταστάσεις δεν εκφράζεται αλλά έπειτα από ιική μόλυνση ενεργοποιείται η έκφρασή του σε πολύ μεγάλο βαθμό, κάτι που οφείλεται στην ύπαρξη του ενισχυτή.

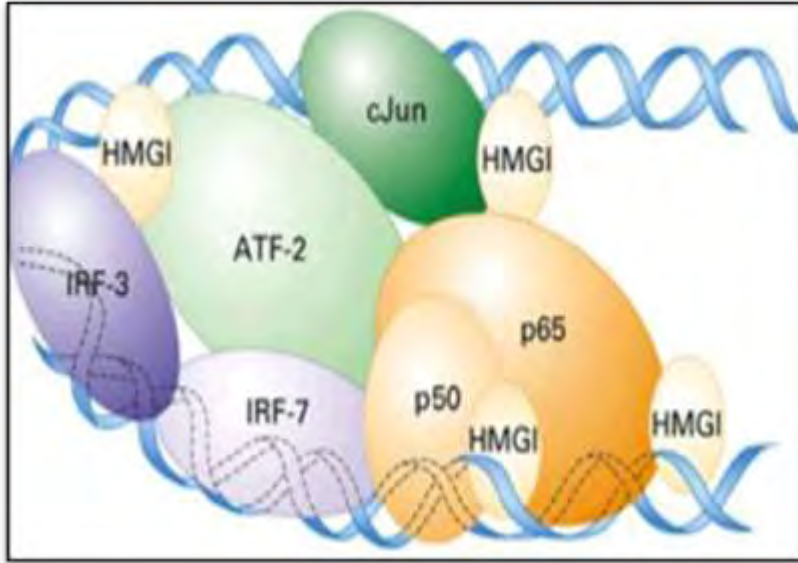
Όλες οι πρωτεΐνες που απαιτούνται για την συγκρότηση του ενισχυσώματος βρίσκονται στο κύτταρο πριν την ιική μόλυνση, όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως. Ο NFκB βρίσκεται

στο κυτταρόπλασμα ανενεργός, δεσμευμένος από ένα μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών IκB. Έπειτα από ιική μόλυνση η κινάση IKK φωσφορυλιώνει σε συγκεκριμένα κατάλοιπα σερίνης την IκB ευνοώντας την αποικοδόμηση της στο πρωτεάσωμα μέσω ουβικιτίνωσης. Έτσι ο NFκB μπορεί να εισέλθει στον πυρήνα. Ο IRF3 εκφράζεται και αυτός συνεχώς σε διάφορους κυτταρικούς τύπους και βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Ενεργοποιείται έπειτα από φωσφορυλίωση σε συγκεκριμένα κατάλοιπα σερίνης και ευνοείται ο διμερισμός του. Με την βοήθεια ειδικών πρωτεϊνών εισέρχεται στον πυρήνα. Επιπλέον σε μη μολυσμένα κύτταρα ο IRF3 είναι S- γλουτοθειομένος. Έπειτα από ιική μόλυνση η GRX-1 συμμετέχει στην από-γλουτοθειωσή του. Αντίθετα ο ATF-2/c-Jun βρίσκεται ήδη στον πυρήνα και είναι σε θέση να προσδεθεί στο DNA σε μη-διεγερμένα κύτταρα. Όμως δεν είναι ικανός να επάγει την μεταγραφή αν δεν φωσφορυλιωθεί η ενεργή περιοχή του από το σηματοδοτικό μονοπάτι των MAPK κινασών. Επίσης για την σταθερή πρόσδεση του ATF-2/c-Jun στο DNA απαιτείται η συνεργιστική δράση με τους άλλους μεταγραφικούς παράγοντες.

Η συγκρότηση του ενισχυοσώματος είναι απολύτως απαραίτητη προκειμένου να ενεργοποιηθεί το γονίδιο της IFNβ και το μοναδικό ερέθισμα που μπορεί ικανοποιήσει αυτή την απαίτηση είναι η ιική μόλυνση γιατί είναι ο μοναδικός τρόπος να ενεργοποιηθούν ταυτόχρονα όλοι οι παράγοντες που προσδένονται στην περιοχή του ενισχυτή. Υπάρχουν περισσότερα από ένα φυσιολογικά ερεθίσματα που μπορούν να ενεργοποιήσουν έναν μόνο ή ακόμα και δύο από αυτούς, αλλά αυτό δεν αρκεί για το σχηματισμό του ενισχυοσώματος και ως εκ τούτου για την έναρξη της μεταγραφής του γονιδίου της IFNβ.

Σημαντικότερο στοιχείο αποτέλεσε η ανακάλυψη του ότι η μεταγραφική ενεργοποίηση εξαρτάται από την δράση της πρωτεΐνης HMGI(Y) (high mobility group protein) η οποία δεν είναι όπως αυτή ενός τυπικού ενεργοποιητή. Το DNA στην περιοχή του ενισχυτή της ιντερφερόνης β παρουσιάζει μια ενδογενή καμπυλότητα και η πρόσδεση των παραγόντων ATF-2/c-Jun και NF-κB δεν ευνοείται. Το γεγονός αυτό αναστρέφεται από τη δράση του αρχιτεκτονικού πυρηνικού παράγοντα HMGI(Y). Η HMGI(Y) είναι μια μικρή χρωματινική πρωτεΐνη που προσδέεται σε περιοχές πλούσιες σε κατάλοιπα A-T από την πλευρά της μικρής αύλακας του DNA ⁽⁵¹⁾. Η πρόσδεσή της στα στοιχεία PRDIV και PRDII, αίρει την αρχική τους καμπυλότητα και καθιστά εφικτή των πρόσδεση των αντίστοιχων ενεργοποιητών. Το αλλοστερικό όμως αυτό φαινόμενο, δεν είναι η μοναδική συμβολή της HMGI(Y) στην ενεργοποίηση της IFNβ. Επιπλέον αλληλεπιδρά η ίδια με τους ενεργοποιητές που είναι προσδεμένοι στη μεγάλη αύλακα αλλά και προάγει τις διαπρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις των τελευταίων μεταξύ τους ⁽⁵²⁾. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η πρόσδεση όλων αυτών των παραγόντων στο DNA συνεργατικά (cooperativity) και ο σχηματισμός ενός νουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου στο οποίο δόθηκε η ονομασία *Ενισχυοσώμα* ⁽⁵³⁾ (enhanceosome). Η συγκρότηση του ενισχυοσώματος είναι απολύτως απαραίτητη προκειμένου να ενεργοποιηθεί το γονίδιο της IFNβ.

Το ενισχυοσώμα δεν αυξάνει μόνο την πιθανότητα σύνθεσης ενός σωστού μεταγράφου από μία αρχική μήτρα DNA, αλλά και την ταχύτητα σύνθεσης αυτού, φαινόμενο γνωστό ως συνέργεια (synergy). Με άλλα λόγια, στην ίδια μονάδα χρόνου, από τον ίδιο αριθμό εκμαγείων, η πρόσδεση των ενεργοποιητών και της HMGI(Y) στον ενισχυτή της IFNβ εξασφαλίζει ότι η στρατολόγηση της πολυμεράσης στον υποκινητή, η έναρξη της σύνθεσης του RNA και η επιμήκυνση του μεταγράφου, πραγματοποιείται με δραματικά μεγαλύτερη ταχύτητα σε σχέση με τη θεωρητική περίπτωση, όπου τα ίδια ακριβώς φαινόμενα εξελίσσονται απουσία του ενισχυοσώματος ⁽⁵⁴⁾.



Η συναρμολόγηση του ενισχυοσώματος απαιτεί μια σειρά από προϋποθέσεις. Μεταλλαγές των θέσεων πρόσδεσης, τοποθέτησή τους σε διαφορετική θέση επάνω στην έλικα του DNA ή σε μεγάλη απόσταση μεταξύ τους, αποτρέπει τις διαπρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις και ως εκ τούτου την απαιτούμενη υψηλή συνεργατικότητα στο επίπεδο της πρόσδεσης στο DNA.

Η ακριβής παράταξη των μεταγραφικών παραγόντων επάνω στον ενισχυτή, επιβάλλει μια αντίστοιχη διάταξη των περιοχών μεταγραφικής ενεργοποίησης στο χώρο. Με τον τρόπο αυτό αναδεικνύεται ένα δεύτερο επίπεδο συνεργατικότητας που ενυπάρχει στην κατασκευή του ενισχυοσώματος. Συγκεκριμένα για την περίπτωση του ενισχυοσώματος της IFN β , η πρωτεϊνική επιφάνεια που σχηματίζουν οι τρεις περιοχές μεταγραφικής ενεργοποίησης συν μια τέταρτη, ειδική περιοχή, που προσφέρεται από την υπομονάδα p65 του NF- κ B⁽⁵⁵⁾ με μια ειδική μορφή του ολοενζύμου, που είναι συνδεδεμένη με το μεταγραφικό συνενεργοποιητή CBP⁽⁵⁶⁾. Ο τελευταίος αποτελεί ένα μοριακό διαμεσολαβητή ο οποίος χρησιμοποιείται προκειμένου να στρατολογηθεί το ολοένζυμο της μεταγραφής με πολύ υψηλή αποτελεσματικότητα και να αρχίσει η μεταγραφή.

Ο ενισχυτής της IFN β περιβάλλεται από δύο νουκλεοσώματα. Το ένα από τα δύο χαρτογραφείται στη θέση που έχει συντεταγμένες -15/+132 σε σχέση με το σημείο έναρξης της μεταγραφής και ως εκ τούτου καλύπτει την ευρύτερη περιοχή γύρω από αυτό, ενώ το 5' άκρο του απέχει μόλις 5 ζεύγη βάσεων από το πολύ σημαντικό ρυθμιστικό στοιχείο TATA.

Η μεταγραφική επαγωγή του γονιδίου συνδέεται άρρηκτα με την αναδόμηση του νουκλεοσώματος αυτού και εξαρτάται από την παρατηρούμενη ακετυλίωση των ιστονών. Τα πειράματα έδειξαν ότι υπάρχει μια συγκεκριμένη χρονική σειρά, αρχής γενομένης από την πρόσδεση των ενεργοποιητών και της HMGI(Y) στον ενισχυτή. Η συγκρότηση του ενισχυοσώματος οδηγεί στη στρατολόγηση καταρχήν του συνενεργοποιητή GCN5⁽⁵⁷⁾. Αυτός ακετυλιώνει συγκεκριμένα κατάλοιπα λυσινών στις ιστόνες H3 και H4 του νουκλεοσώματος που καλύπτει τον υποκινητή. Επιπλέον, ακετυλιώνει την HMGI(Y) στη λυσίνη 71, γεγονός που σταθεροποιεί τη δομή του ενισχυοσώματος. Σε ό, τι αφορά τις ιστόνες, πρώτα τροποποιείται η λυσίνη K8 της H4 και η λυσίνη K9 της H3. Μία κινάση φωσφορυλιώνει την H3 στη σερίνη 10 για να ακολουθήσει η ακετυλίωση ενός ακόμα καταλοίπου λυσίνης, της ίδιας ιστόνης, στη θέση 14⁽⁵⁸⁾.

Με αυτό τον τρόπο, η σύσταση του ενισχυοσώματος αλλάζει, χωρίς, παρ' όλα αυτά, να διακυβεύεται η σταθερότητά του και η δράση του⁽⁵⁹⁾. Στη θέση PRDIII/I του ενισχυτή μπορούν να προσδένονται περισσότερα από ένα μέλη της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων IRF. Αρχικά προσδένεται ο IRF-1, αργότερα όμως αντικαθίσταται σταδιακά από άλλα μέλη της οικογένειας που γίνονται διαθέσιμα για πρόσδεση ή ενεργοποιούνται σε επόμενα στάδια της ιικής μόλυνσης (IRF-3 και IRF-7 αντιστοίχως). Οι αλλαγές αυτές

συμπίπτουν χρονικά με την αντικατάσταση του συνενεργοποιητή GCN5 από έναν άλλο που επίσης έχει δραστηριότητα ακετυλο-τρανσφεράσης, την πρωτεΐνη CBP⁽⁵⁷⁾.

Στα όψιμα στάδια της ιικής μόλυνσης το ενισχύσωμα αλλάζει σύσταση για μια ακόμα φορά. Ένα τέταρτο μέλος της οικογένειας IRF, ο IRF-2, διεισδύει στο ενισχύσωμα και πρακτικά αναστέλλει τη δράση του, καθώς απωθεί τη CBP με έναν ενεργητικό τρόπο⁽⁶⁰⁾.

Δρώντας αντίστροφα από το συνενεργοποιητή GCN5, η CBP αποσταθεροποιεί το ενισχύσωμα ακετυλιώνοντας τη λυσίνη K65 της HMGI(Y) και η μεταγραφή σταματά⁽⁶¹⁾. Αυτό όμως δε συμβαίνει ταυτόχρονα με την άφιξη της CBP και ο λόγος είναι ότι πρέπει προηγούμενα να αναιρεθεί, από κάποια απακετυλάση η αρχική ακετυλίωση της HMGI(Y) στη θέση K71.

Η σύνδεση του συμπλόκου CBP-ολοενζύμου με το ενισχύσωμα έχει δύο ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Πρώτον, προάγει τη στρατολόγηση του ολοενζύμου στον υποκινητή παρά το γεγονός ότι ο βασικός μεταγραφικός παράγοντας TFIID ακόμα δε μπορεί να προσδεθεί στο στοιχείο TATA, εξαιτίας της παρουσίας του νουκλεοσώματος. Δεύτερον, το σύμπλοκο SWI/SNF στρατολογείται από το ενισχύσωμα μέσω αλληλεπιδράσεών του με τη CBP⁽⁵⁷⁾. Αυτές όμως οι διαπρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις φαίνεται ότι δεν επαρκούν για σταθερή πρόσδεση, καθώς το SWI/SNF μέσω μιας επικράτειας bromo (bromodomain) στο εσωτερικό της καταλυτικής του υπομονάδας Brg1 προσδένεται στην H4 K8 που έχει ήδη ακετυλωθεί από το συνενεργοποιητή GCN5⁽⁶²⁾. Ακολουθεί η αναδόμηση του νουκλεοσώματος από το SWI/SNF.

Μέσω της αναδόμησης του νουκλεοσώματος το στοιχείο TATA καθίσταται προσβάσιμο από το σύμπλοκο TFIID και πιο συγκεκριμένα από την υπομονάδα του TBP⁽⁶³⁾. Για τη σταθεροποίηση της αλληλεπίδρασης, κατά τρόπο ανάλογο με την περίπτωση του SWI/SNF, αξιοποιούνται τα ακετυλιωμένα κατάλοιπα K9 και K14 της ιστόνης H3, τα οποία αναγνωρίζονται από μια δεύτερη υπομονάδα του συμπλόκου TFIID, που είναι η μεγαλύτερη όλων και ονομάζεται TAFII250. Οι δύο ακετυλιωμένες λυσίνες αναγνωρίζονται από ισάριθμες, διαδοχικές επικράτειες bromo που βρίσκονται στο εσωτερικό της TAFII250⁽⁶⁴⁾. Το αποτέλεσμα είναι η μεταγραφική ενεργοποίηση, που ακολουθεί ως άμεση συνέπεια των παραπάνω.

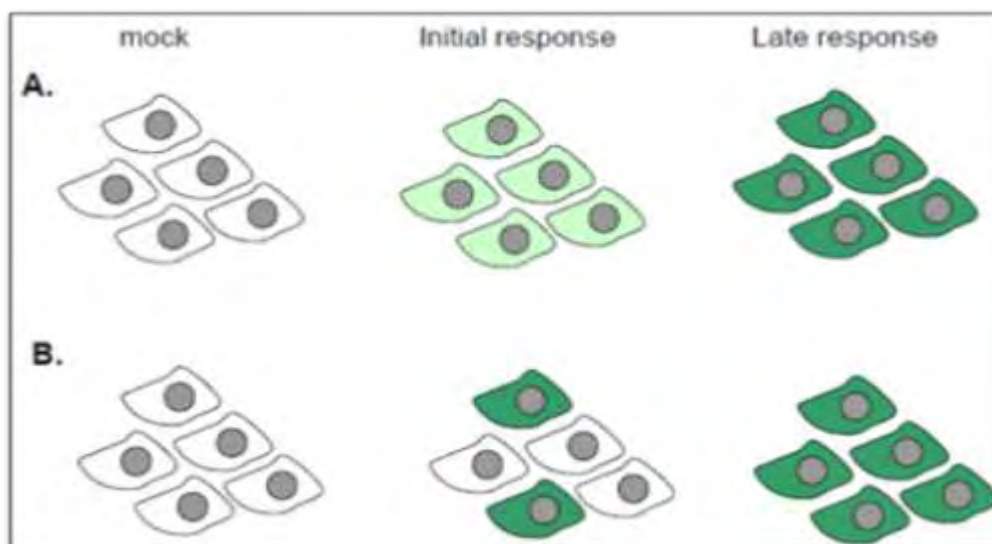
Η σταθερή πρόσδεση του TBP κάμπει το DNA και το νουκλεόσωμα εξωθείται σε μία ολίσθηση προς το εσωτερικό του γονιδίου, καθοδικά δηλαδή της αρχικής του θέσης, για μια απόσταση ίση με 36 ζεύγη βάσεων⁽⁶³⁾. Η περιοχή του υποκινητή είναι πλέον ελεύθερη, η συγκρότηση του προεναρκτήριου συμπλόκου ολοκληρώνεται και η μεταγραφή αρχίζει.

Στοχαστική έκφραση γονιδίων

Σημαντικό χαρακτηριστικό των κυττάρων είναι να έχουν την δυνατότητα να διαφοροποιούνται σε υποτύπους με συγκεκριμένη λειτουργικότητα. Ο τρόπος με τον οποίον διαλέγουν τα κύτταρα μια συγκεκριμένη μοίρα, θεωρείται συνήθως ντετερμινιστικός, στις περισσότερες δε των περιπτώσεων αυτή η υπόθεση αντικατοπτρίζει την πραγματικότητα. Αυτό μεταφράζεται με το ότι τα κύτταρα αποκτούν χαρακτηριστικά από την γενιά των κυττάρων από την οποία προέρχονται ή αλλάζουν χαρακτηριστικά βασιζόμενα στην εγγύτητά τους σε κάποιο ερέθισμα από κοντινά κύτταρα ή από το εξωκυττάριο περιβάλλον. Σε κάποιες όμως περιπτώσεις, σε οργανισμούς που ποικίλλουν από τα βακτήρια μέχρι και τον άνθρωπο, τα κύτταρα επιλέγουν ένα μονοπάτι διαφοροποίησης στοχαστικά, δηλαδή ανεξάρτητα από την προΐστορία ή το περιβάλλον τους. Πειραματικά δεδομένα απέδειξαν ότι πολλές από τις κυτταρικές λειτουργίες συμβαίνουν πιθανολογικά με μη-γραμμικό τρόπο, αποκαλύπτοντας την έντονη πλαστικότητα του κυττάρου και κατ' επέκταση κάθε βιολογικού συστήματος⁽⁶⁵⁾

⁽⁶⁶⁾ Τα δεδομένα αυτά έρχονται σε ρήξη με τις παραδοσιακές ιδέες ντετερμινισμού ή

αιτιοκρατίας κι υποδεικνύουν την αδυναμία της κλασσικής μηχανικής θεώρησης (σχέδιο-πρόθεση-καθορισμός) να ερμηνεύσει σε βάθος τα φαινόμενα της ζωής. Το κενό αυτό έρχεται να καλύψει η σύγχρονη θεωρία της στοχαστικότητας ή πιθανοκρατίας, που σταδιακά γίνεται ευρέως αποδεκτή. Η στοχαστικότητα, έχει κάποια μηχανιστικά προαπαιτούμενα. Αποτελεί όμως χαρακτηριστικό πλεονεκτικό ή ακόμη και απολύτως απαραίτητο σε διάφορες περιπτώσεις ρύθμισης.



Εικόνα 22: Διαφορετικά μοντέλα για την ερμηνεία της επαγόμενης γονιδιακής έκφρασης σε ένα πληθυσμό. A: Ντετερμινιστικό μοντέλο ή μοντέλο διαβάθμισης. Όλα τα κύτταρα αποκρίνονται στο σήμα, αλλά βαθμιαία αυξάνουν την παραγωγή του προϊόντος. B: Στοχαστικό μοντέλο ή απόκριση τύπου όλα ή τίποτα. Ένα ποσοστό των κυττάρων αποκρίνεται άμεσα στο ερέθισμα, αλλά στο μέγιστο βαθμό, ενώ σταδιακά αρχίζουν και τα υπόλοιπα.

Πηγή: In vivo study of transcriptional complexes , Apostolou E., Thanos D. 2009

Η στοχαστικότητα απαιτεί εξίσου τον τρόπο να δημιουργεί θόρυβο και τους μηχανισμούς για να σταθεροποιεί τις αποφάσεις στις οποίες το κύτταρο φτάνει μέσω της ίδιας. Ο θόρυβος μπορεί να προέρχεται από διάφορες πηγές, όπως η ποικιλομορφία στην ενεργότητα διάφορων γονιδίων, ή διαφορές στην μεταβολική δραστηριότητα από κύτταρο σε κύτταρο ή τα κυμαινόμενα επίπεδα ενός εξωκυττάρου σήματος⁽⁶⁷⁾.

Ο θόρυβος όμως, είναι ανίκανος από μόνος του να δημιουργήσει διακριτούς διακόπτες μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών καταστάσεων. Έτσι οι μεταβολές που παράγονται από τον θόρυβο είναι γενικά μικρές και παροδικές.

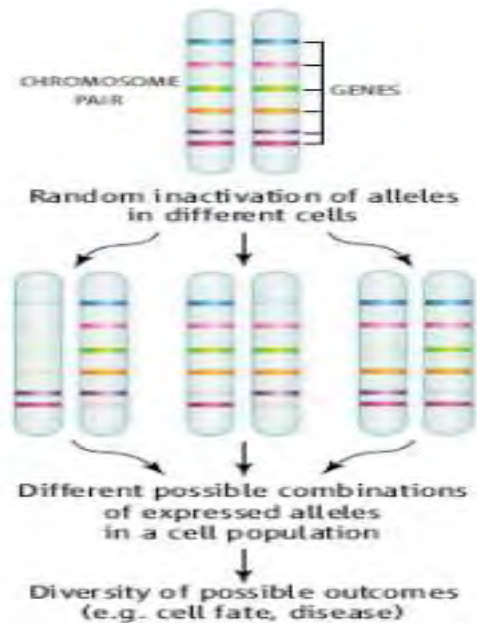
Πολλές έρευνες κατέληξαν ότι η μεταγραφή είναι ένα στοχαστικό γεγονός που συμβαίνει σε βραχείς παλμούς (pulses)⁽⁶⁸⁾. Ο αριθμός των ενεργών υποστρωμάτων σε ένα κυτταρικό πληθυσμό είναι αυτός που καθορίζει τη συνολική μεταγραφική δόση ανά χρονική στιγμή. Σύμφωνα με αυτήν την παρατήρηση, αυτό που έχει σημασία είναι η πιθανότητα κάθε μεμονωμένου υποστρώματος να είναι ενεργό για μεταγραφή, παρά ο ρυθμός της μεταγραφής από αυτό το υπόστρωμα⁽⁶⁹⁾. Δεδομένης της τυχαίας φύσης των γεγονότων που προηγούνται η μεταγραφή καταλήγει να συμβαίνει σε εκρήξεις ή κύματα (bursts) λόγω της πιθανολογικής μετάβασης ενός υποκινητή από την ενεργό στην ανενεργό κατάσταση κι αντίστροφα.

Υπάρχουν πολλές ανεξήγητες παρατηρήσεις, για το πως προκύπτει η γενετική ποικιλομορφία σε ισογενείς ή προερχόμενους από ένα κλώνο πληθυσμούς. Η προέλευση της τυχαιότητας δεν είναι καθόλου κατανοητή, οφείλεται όμως σε ένα μεγάλο ποσοστό στην στοχαστική φύση της γονιδιακής έκφρασης. Μια στρατηγική που χρησιμοποιούν τα κύτταρα για να αντιμετωπίσουν τέτοια φαινόμενα, είναι τα σημεία ελέγχου που περιοδικά επανασυγχρονίζουν τα γεγονότα του κυτταρικού κύκλου.

Μονοαλληλική έκφραση γονιδίων

Η διπλοειδία, έχει επιλεχθεί και έχει συντηρηθεί στους οργανισμούς ως κατάσταση. Είναι γενικά αποδεκτό πως ένας λόγος αποτελεί το ότι είναι πλεονέκτημα των οργανισμών να έχουν δύο λειτουργικά αντίγραφα του κάθε γονιδίου, ώστε να μπορούν να καλύπτουν τυχόν κληρονομήσιμες επιβλαβείς μεταλλάξεις. Όπως όμως είδαμε και παραπάνω, υπάρχουν περιπτώσεις που μέσω μεταγραφικών παραγόντων, επιλέγεται και ενεργοποιείται μόνο το ένα αλληλόμορφο ενός γονιδίου, καθιστώντας τα κύτταρα αυτά λειτουργικά ημίζυγα ως προς αυτό το γονίδιο. Τέτοιο παράδειγμα αποτελούν τα εντυπωμένα στο γένωμα γονίδια (imprinted genes) και η απενεργοποίηση του X χρωμοσώματος (X inactivation). Σύμφωνα όμως με τελευταίες μελέτες, υπάρχουν και αρκετά άλλα γονίδια που παρουσιάζουν μονοαλληλική έκφραση, με εξέχοντα παραδείγματα κάποια μέλη της οικογένειας των ιντερλευκινών (IFN β , Apostolou and Thanos, 2008, IL-2, Hollander et al, 1998, IL-4, Riviere et al, 1998, IL-5, Kelly and Locksey, 2000, IL-13, Guo et al, 2005, IL-10, Calado et al, 2006) και οι οσφρητικοί υποδοχείς. Γεγονός είναι ότι σε πολλές από αυτές τις περιπτώσεις, η επιλογή του αλληλίου προς έκφραση φαίνεται να είναι τυχαία. Η επιλογή του προς έκφραση γονιδίου, σε σχέση με άλλα ομόλογα γονίδια στο ίδιο χρωμόσωμα ή στο αλληλόμορφο του, μέσα στον κυτταρικό πληθυσμό, δεν συναντάται μόνο στην περίπτωση των κυτταροκινών, αλλά και σε άλλα βιολογικά συστήματα ⁽⁷⁰⁾. Είναι γνωστό ότι τα B- και T- λεμφοκύτταρα εκφράζουν στη επιφάνεια τους έναν μόνο εξειδικευμένο αντιγονικό υποδοχέα χάρη στην μονοαλληλική έκφραση των γονιδίων των ελαφριών και βαριών αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών (B-λεμφοκύτταρα), όσο και των γονιδίων των υποδοχέων των T-κυττάρων. Τα παραπάνω παραδείγματα αφορούν στην αλληλεπίδραση στοιχείων που βρίσκονται στο ίδιο χρωμόσωμα.

Παράδειγμα αποτελούν οι οσφρητικοί υποδοχείς, όπου κάθε νευρώνας εκφράζει μόνο έναν υποδοχέα, καθώς ο ενισχυτής H έρχεται κάθε φορά σε γειτνίαση με ένα από τα γονίδια των υποδοχέων ⁽⁷¹⁾. Θα πρέπει να σημειώσουμε ότι σε κάποια γονίδια παρατηρείται αλληλική ανισορροπία (allelic imbalance), μετά από πιθανή αποσιώπηση του ενός αλληλίου, κάτι που επίσης εμπίπτει στην περίπτωση της τυχαίας μονοαλληλικής έκφρασης. Μια πιθανή εξήγηση για το φαινόμενο της μονοαλληλικής έκφρασης είναι η τυχαία επιλογή τους ενός αλληλίου και η μετέπειτα αρνητική ανάδραση από το προϊόν του στα ανταγωνιστικά αλληλόμορφα, αυτό φαίνεται να ισχύει και στην περίπτωση των κυτοκινών και στους οσφρητικούς υποδοχείς ⁽⁷²⁾. Μια άλλη εξήγηση είναι ότι τα γονίδια που βρίσκονται στα δύο αλληλία, ανταγωνίζονται για ένα ρυθμιστικό στοιχείο (π.χ. ενισχυτής), που η παρουσία του ή η συγκέντρωση των μεταγραφικών παραγόντων που προσδένονται σε αυτό, είναι χαμηλή στο κύτταρο.



Τέτοια παραδείγματα, αποτελούν η περίπτωση του ενισχυτή LCR στα γονίδια των β-σφαιρινών όπως και τα Hox γονίδια που παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη ⁽⁷³⁾. Σε αυτές τις περιπτώσεις, παίζει καθοριστικό ρόλο το ποια είναι η θέση του κάθε γονιδίου ως προς το ρυθμιστικό στοιχείο ⁽⁷⁴⁾. Το πιο κοντινό στο ρυθμιστικό στοιχείο γονίδιο έχει συγκριτικό πλεονέκτημα έναντι των άλλων, αλλά αυτό χάνεται εάν οι αποστάσεις ως προς το ρυθμιστικό στοιχείο μικρύνουν. Για τις περιπτώσεις, όπου η μονοαλληλική έκφραση παρουσιάζει σταθερό χαρακτήρα, ως προς την επιλογή του αλληλίου, υπεύθυνοι φαίνονται να είναι μηχανισμοί, όπως οι τροποποιήσεις ιστονών, η μεθυλίωση του DNA και η μεταφορά αλληλομόρφων σε συγκεκριμένα πυρηνικά υποδιαμερίσματα, κυρίως προς αποσιώπηση. Πρόσφατα, έχει διαπιστωθεί ότι η επιλογή του αλληλομόρφου που θα εκφραστεί ή θα κατασταλεί μπορεί να επιτευχθεί και με πιο «πρωτότυπους» μηχανισμούς, στα πλαίσια ενός δυναμικά οργανωμένου πυρήνα. Έτσι, αποκαλύφθηκε, ότι τα ανενεργά αλληλόμορφα πολλών εντυπωμένων γονιδίων, εντοπίζονται σε κοινά υποπυρηνικά διαμερίσματα, μέσω ενός ευρέος δικτύου διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων ⁽⁷⁵⁾. Οι διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε απομακρυσμένα ρυθμιστικά στοιχεία και στα γονίδια στόχους, φαίνεται να συμβάλλουν και στην περίπτωση επιλογής του μοναδικού αλληλομόρφου που πρόκειται να εκφραστεί, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση των γονιδίων των οσφρητικών υποδοχέων ⁽⁷⁶⁾. Τέλος, στην περίπτωση των γονιδίων που εμφανίζουν αλληλομορφική ανισορροπία, η οποία δεν κληροδοτείται κλωνικά στα θυγατρικά κύτταρα, η μονοαλληλική έκφραση φαίνεται να δημιουργείται από τα ίδια αίτια, που προκαλούν και τη στοχαστική γονιδιακή έκφραση, δηλαδή μέσω μιας σειράς πιθανολογικών γεγονότων, που θα οδηγήσουν τυχαία στη μεταγραφή ενός από των δύο αλληλομόρφων. Ενδιαφέροντα στοιχεία σχετικά με την μονοαλληλική έκφραση αποτελούν τα παρακάτω. Μελέτη σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές LCLs, έδειξε ότι περισσότερα από 4000 αυτοσωμικά γονίδια υπόκεινται σε τυχαία μονοαλληλική έκφραση. Οι ερευνητές προς μεγάλη τους έκπληξη κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τουλάχιστον το 10% αυτών των γονιδίων, παρουσίαζαν μονοαλληλική έκφραση που όμως διατηρείται σταθερή στο ένα κυτταρικό πληθυσμό που έχει προέλθει από ένα κλώνο. Για την πλειοψηφία των γονιδίων αυτών, η μονοαλληλική έκφραση δεν ήταν μονόδρομος, καθώς άλλοι κλωνικοί πληθυσμοί παρουσίαζαν κανονικά έκφραση και από τα δύο αλληλία και κατηγοριοποιείται βάσει οντολογίας στην ομάδα των επιφανειακών

πρωτεϊνών και υποδοχέων⁽⁷⁷⁾. Ενδέχεται, λοιπόν, η μονοαλληλική έκφραση να διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο για τις αλληλεπιδράσεις και την επικοινωνία κάθε κυττάρου με τα γειτονικά του.

Επίσης, σε άλλη μελέτη, αποδείχτηκε ότι όλα τα γονίδια που εκφράζονται μονοαλληλικά μέχρι στιγμής, δείχνουν να αντιγράφονται ασύγχρονα. Ο χρόνος όμως της αντιγραφής δεν παρουσιάζει κάποια συσχέτιση με τον χρόνο έκφρασης. Τέτοια γονίδια μονοαλληλικής έκφρασης, αντιγράφονται ασύγχρονα ακόμη και σε ιστούς στους οποίους είτε εκφράζονται και από τα δύο αλληλία, είτε δεν εκφράζονται καθόλου. Επιπροσθέτως, ο χρόνος αντιγραφής αυτών των γονιδίων συμπίπτει σε όλο το μήκος ενός χρωμοσώματος, ενώ η κατάσταση έκφρασης επιλέγεται για κάθε γονίδιο ξεχωριστά⁽⁷⁸⁾. Η λειτουργική απλοειδία, δηλαδή η έκφραση μόνο ενός από τα δύο αλληλόμορφα ενδέχεται να έχει καταστροφικές συνέπειες, καθώς επιτρέπει την εκδήλωση υπολειπόμενων επιβλαβών χαρακτηριστικών. Η προβληματική που δημιουργείται εξαιτίας της μονοαλληλικής έκφρασης είναι δυνατόν να παρακαμφθεί, χάριν του γεγονότος ότι κάθε κυτταρικός πληθυσμός θα περιέχει κύτταρα που εκφράζουν τυχαία είτε το ένα είτε το άλλο αλληλόμορφο. Επομένως, τα κύτταρα που εκφράζουν το προβληματικό αλληλόμορφο θα αναπτύσσονται και θα πολλαπλασιάζονται σε χαμηλότερους ρυθμούς συγκριτικά με τα υγιή, τα οποία τελικά θα επικρατήσουν εξασφαλίζοντας την επιβίωση όλου του πληθυσμού. Προφανώς, η μονοαλληλική έκφραση, αφού σε κάποιες περιπτώσεις έχει επιλεγεί, θα προσδίδει κάποια πλεονεκτήματα. Ένα από αυτά, είναι η κάλυψη του αλληλομόρφου πατρικής ή μητρικής προέλευσης για λόγους που δίνουν στον οργανισμό προσαρμοστικότητα (fitness). Άλλου είδους πλεονέκτημα, όπως στην περίπτωση της απενεργοποίησης του X χρωμοσώματος, είναι η ισοστάθμιση της δόσης (dosage compensation). Η μονοαλληλική έκφραση θα μπορούσε επίσης να αυξάνει την ειδικότητα, όπως στην περίπτωση των οσφρητικών υποδοχέων ή των αντιγόνων των λεμφοκυττάρων, όπου τα κύτταρα εκφράζουν μόνο ένα είδος προκειμένου κάθε ένα από αυτά να μπορεί να αποκριθεί ειδικά σε ενός είδους ερέθισμα. Σε άλλες περιπτώσεις, η μονοαλληλική έκφραση παρέχει στο κύτταρο την δυνατότητα να κρατά χαμηλή την συγκέντρωση ενός mRNA, είτε μέχρι να ληφθεί μια σημαντικότερη ή πιο σταθερή απόφαση, είτε για λόγους λειτουργικότητας. Τέλος, με το να έχει το κύτταρο την πολυτέλεια να εκφράσει ένα, περισσότερα ή και καθόλου αλληλόμορφα, αντιλαμβανόμαστε ότι αυξάνει την ποικιλομορφία. Να υπογραμμίσουμε, ότι αυτή η ποικιλομορφία παρέχεται χωρίς να αλλάξουμε την ακολουθία του DNA και μπορεί επίσης να προσδώσει εξελικτικό πλεονέκτημα.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Πρωτόκολλα για τον χειρισμό των κυττάρων HeLa.

Υλικά, αντιδραστήρια και διαλύματα

		Εταιρία	Κωδικός	Περιγραφή
1	TC Dish 100, Cell+, standard dish	SARSTEDT	83.3902	100 x 20 mm
2	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	SIGMA ALDRICH	D6429	High glucose
3	Dulbecco's Phosphate buffered saline (DPBS)	SIGMA ALDRICH	D8537	Without CaCl ₂ and MgCl ₂
4	Pen Strep Antibiotic (Penicillin Streptomycin)	GIBCO	15140-122	Antibiotic
5	GlutaMax-I (L-alanine-L-glutamine dipeptide)	GIBCO	35050-038	
6	Trypsin-EDTA (0,5%)	GIBCO	15400-054	No phenol red
7	Filtropur S 0,2	SARSTEDT	831826001	Syringe filter for sterile filtration
8	Dimethyl sulfoxide (DMSO)	AppliChem	A36720250	cell culture grade

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη των HeLa αποτελείται από DMEM και 10% FBS.

Θρεπτικό μέσο:		
1	DMEM	500 ml
2	FBS	50 ml
3	GlutaMax-I	5.5 ml
4	Pen Strep Antibiotic	5.5 ml

Πριν προσθέσουμε στο θρεπτικό μέσο το FBS προτείνεται η θερμική απενεργοποίησή του (30 λεπτά στους 56°C) και το φιλτράρισμά του με Filtropur S 0,2. Η διαδικασία αυτή ακολουθείται για την απενεργοποίηση των πρωτεϊνών του συμπληρώματος και άλλων παραγόντων που αναστέλλουν την κυτταρική ανάπτυξη. Το φιλτράρισμα προτείνεται για την προστασία των καλλιέργειών από πιθανή παρουσία μυκοπλάσματος στον ορό.

Το GlutaMAX-I παρέχει στην κυτταροκαλλιέργεια την απαραίτητη ποσότητα L-αλανίνης και L-γλουταμίνης. Τα κύτταρα απελευθερώνουν σταδιακά αμινοπεπτιδάσες που υδρολύουν το διπεπτίδιο L-αλανίνης- L-γλουταμίνης. Με αυτό τον τρόπο παρέχονται στην καλλιέργεια με σταθερό ρυθμό τα απαραίτητα αμινοξέα⁽⁷⁹⁾.

Τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη χρησιμοποιούνται για την προστασία των κυτταροκαλλιεργειών από πιθανή μόλυνσή από gram-θετικά και gram-αρνητικά βακτήρια.

Η θρυψίνη αραιώνεται σε τελική συγκέντρωση 1X στο ρυθμιστικό διάλυμα DPBS. Αυτό δεν περιέχει κατιόντα ασβεστίου και μαγνησίου διότι αναστέλλουν τη δράση της.

1. Διατήρηση και ανάπτυξη

Οι χειρισμοί που αφορούν την καλλιέργεια των κυττάρων HeLa γίνονται σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο σε ειδική συσκευή καθέτου νηματικής ροής (hood) (Esco Class 2 Biohazard Safety Cabinet/ Class II Type A2 model: LA2-4A1-E. <http://www.esco-global.com/product/class-ii-type-a2-biological-safety-cabinets/class-ii-type-a2-biological-safety-cabinets-e-series/la2-e/>) όπου επικρατούν άσηπτες συνθήκες.

Τα κύτταρα φυλάσσονται κατά την καλλιέργειά τους σε ειδικό επωαστικό κλίβανο με σύστημα φίλτρων αέρα Hepa (ThermoForma Steri-Cycle CO₂ Incubator, model 381 <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/201370>) σε ελεγχόμενες συνθήκες 37°C και 5% CO₂.

Πριν ξεκινήσουμε τα παρακάτω πρωτόκολλα φροντίζουμε ώστε το θρεπτικό μέσο, το PBS και η θρυψίνη να είναι σε θερμοκρασία δωματίου (RT) και προετοιμάζουμε κατάλληλα την συσκευή καθέτου νηματικής ροής (hood) εξασφαλίζοντας ότι θα εργαστούμε σε άσηπτες συνθήκες.

2. Ανακαλλιέργεια κυττάρων (subculturing ή passaging)

Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων είναι απαραίτητη διότι με αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται η ανανέωση των θρεπτικών συστατικών, η απομάκρυνση τοξικών παραπροϊόντων των κυττάρων και η διατήρηση του αριθμού τους σε επιθυμητά επίπεδα.

Τα κύτταρα HeLa αναπτύσσονται προσκολλημένα δημιουργώντας μονοστοιβάδες (adherent cells). Τα κύτταρα αρχικά αφού επιστρωθούν σε τρυβλίο μπαίνουν στην εκθετική φάση ανάπτυξης και σε λίγες μέρες (περίπου 2 με 3) καλύπτουν την διαθέσιμη επιφάνεια. Το ακόλουθο πρωτόκολλο εφαρμόζεται σε κύτταρα που έχουν καλύψει τουλάχιστον το 80% του τρυβλίου στο οποίο αναπτύσσονται (80% confluent). Σε ένα τρυβλίο 10 cm θεωρούμε ότι ο αριθμός των HeLa κυττάρων όταν είναι πλήρες (confluent) είναι $8,8 \times 10^6$ ⁽⁸⁰⁾.

Στο παρακάτω πρωτόκολλο γίνεται η χρήση θρυψίνης, μιας πρωτεάσης της οικογένειας των πρωτεασών σερίνης όπου διασπά πεπτιδικούς δεσμούς δρώντας κυρίως στα καρβοξυτελικά άκρα των καταλοίπων λυσίνη και αργινίνη⁽⁸¹⁾ (εκτός αν αυτά ακολουθούνται από κατάλοιπο προλίνης⁽⁸²⁾). Το διάλυμα την θρυψίνης περιέχει EDTA. Το EDTA είναι ένας χηλικός πολυσχιδής υποκαταστάτης που σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με δισθενή κατιόντα ασβεστίου και μαγνησίου. Αυτά διευκολύνουν την κυτταρική προσκόλληση (απαραίτητα για την λειτουργία των ιντεγκρινών) και αναστέλλουν τη δράση της θρυψίνης.

Η θρυψίνη μετά την αποκόλληση των κυττάρων πρέπει να απενεργοποιηθεί διότι εκτεταμένη έκθεση των κυττάρων σε αυτή οδηγεί σε καταστροφή των πρωτεϊνών των κυτταρικών μεμβρανών και ενεργοποίηση μονοπατιών απόπτωσης⁽⁸³⁾. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση του θρεπτικού μέσου που περιέχει FBS. Το FBS περιέχει αναστολείς πρωτεασών, όπως οι α₁-antitrypsin και α₂-macroglobulin και περίσσεια δισθενών κατιόντων ασβεστίου και μαγνησίου που διακόπτουν τη δράση της.

Το πρωτόκολλο που ακολουθούμε αναλύεται παρακάτω αλλά παρατίθεται και στον παρακάτω διαδικτυακό τόπο: <http://www.thermofisher.com/gr/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/subculturing-adherent-cells.html> .

Αναλυτικά:

- i. Αναρροφούμε το θρεπτικό υλικό από το τρυβλίο και το αποχύνουμε σε ειδικό δοχείο αποβλήτων.
- ii. Ξεπλένουμε τα κύτταρα (που είναι προσκολλημένα στον πάτο του τρυβλίου) με 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων PBS. Αναρροφούμε το PBS από το τρυβλίο και το αποχύνουμε σε ειδικό δοχείο αποβλήτων.
- iii. Προσθέτουμε 2 ml Θρυψίνη και επωάζουμε τα κύτταρα για περίπου δύο λεπτά.
- iv. Όταν τα κύτταρα έχουν αποκολληθεί στο σύνολό τους από το τρυβλίο προσθέτουμε 4 ml θρεπτικό υλικό. Το FBS απενεργοποιεί τη θρυψίνη. Η αποκόλληση υποβοηθάται με ελαφρύ χτύπημα του τρυβλίου.
- v. Το αιώρημα συλλέγεται σε falcon και φυγοκεντρείται για 5min στα 1200rpm.
- vi. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και επαναδιαλυτοποιούμε το ίζημα των κυττάρων σε κατάλληλο όγκο θρεπτικού υλικού.
- vii. Μεταφέρουμε τον επιθυμητό όγκο του επαναιωρήματος σε νέο τρυβλίο και συμπληρώνουμε με θρεπτικό υλικό μέχρι την πλήρωση των 10 ml.

Αρκετά σημαντικό είναι να καταγράφεται πόσες φορές έχουν διαιρεθεί και ανακαλλιεργηθεί τα κύτταρα (passage) διότι έπειτα από πολλές κυτταρικές διαιρέσεις παρατηρούνται μεταλλάξεις στο γενετικό υλικό και αλλαγή στην μορφολογία των κυττάρων.

3. Κρυοσυντήρηση των κυττάρων για μακροπρόθεσμη φύλαξη.

Το πρωτόκολλο που ακολουθούμε αναλύεται παρακάτω αλλά παρατίθεται και στον παρακάτω διαδικτυακό τόπο: <https://www.thermofisher.com/gr/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/freezing-cells.html>

Το πρωτόκολλο της κρυοσυντήρησης περιλαμβάνει τα αρχικά στάδια της ανακαλλιέργειας των κυττάρων. Έπειτα το στάδιο v (Το αιώρημα συλλέγεται σε falcon και φυγοκεντρείται για 5min στα 1200rpm.) ακολουθούμε τα εξής βήματα :

- vi. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και επαναδιαλυτοποιούμε το ίζημα των κυττάρων σε κατάλληλο όγκο διαλύματος 30% FBS , 10% DMSO σε θρεπτικό υλικό DMEM. Υπολογίζουμε ότι τα κύτταρα ενός τρυβλίου 10cm θα επαναδιαλυτοποιηθούν σε 3 ml διαλύματος.
- vii. Μεταφέρουμε 1ml σε κάθε φιαλίδιο κρυοσυντήρησης (cryovial) . Κάθε φιαλίδιο περιέχει περίπου 3×10^6 κύτταρα. Για να διασφαλίσουμε ότι ίσος αριθμός κυττάρων μοιράζεται στα φιαλίδια κάθε φορά ανακατεύουμε ελαφρώς για να διατηρηθεί ομογενές το εναιώρημα.
- viii. Αποθηκεύουμε τα φιαλίδια σε καταψύκτη θερμοκρασίας -80°C .

Το διμεθυλοσουλφοξειδίο (DMSO) είναι πολικός, απρωτικός διαλύτης και δρα ως κρυοπροστατευτικός παράγοντας. Τα υδατικά διαλύματα κρυοπροστατευτικών παραγόντων κάνουν το νερό να σκληρύνει κατά τη ψύξη σαν γυαλί, χωρίς τον σχηματισμό κρυστάλλων πάγου οι οποίοι καταστρέφουν τα κύτταρα. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται υαλοποίηση (vitrification). Κατά την ψύξη ενός υγρού με αργό ρυθμό σχηματίζονται κρύσταλλοι. Αντίθετα, κατά την ψύξη με ταχύτατο ρυθμό το υγρό υπόκειται σε υαλοποίηση. Το ζητούμενο σε μια διαδικασία κατάψυξης ενός ζωικού ιστού ή μια καλλιέργειας κυττάρων είναι η υαλοποίηση του υγρού περιβάλλοντός τους⁽⁸⁴⁾.

Το παραπάνω πρωτόκολλο πρέπει να εκτελείται με ταχύ ρυθμό διότι το DMSO σε θερμοκρασία δωματίου (RT) μπορεί να δράσει τοξικά για τα κύτταρα⁽⁸⁵⁾.

4. Ξεπάγωμα κυττάρων.

Το πρωτόκολλο που ακολουθούμε αναλύεται παρακάτω αλλά παρατίθεται και στον παρακάτω διαδικτυακό τόπο: <https://www.thermofisher.com/gr/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/thawing-cells.html>.

- i. Βάζουμε το φιαλίδιο (cryovial) σε υδατόλουτρο 37°C και το αφήνουμε να ξεπαγώσει για περίπου 1 min.
- ii. Το μεταφέρουμε μέσα στην συσκευή καθέτου νηματικής ροής και προσθέτουμε το περιεχόμενό του με ίση ποσότητα (1 ml) θρεπτικού μέσου σε ένα falcon χωρητικότητας 15ml.
- iii. Φυγοκεντρούμε για 5min στα 1200rpm.
- iv. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και επαναδιαλυτοποιούμε το ίζημα των κυττάρων σε θρεπτικό υλικό.
- v. Μεταφέρουμε το επαναιώρημα σε τρυβλίο και συμπληρώνουμε με θρεπτικό υλικό μέχρι την πλήρωση των 10 ml.

Το παραπάνω πρωτόκολλο πρέπει να εκτελείται με ταχύ ρυθμό διότι το DMSO σε θερμοκρασία δωματίου (RT) μπορεί να δράσει τοξικά για τα κύτταρα.

Προετοιμασία πυρηνικών εκχυλισμάτων για Western Blot

		Εταιρία	Κωδικός
1	Hepes	SIGMA	H3375-500G
2	Potassium Chloride (KCl)	SIGMA	P-3911
3	Sodium Chloride (NaCl)	AppliChem	A2942.1000
4	Magnesium Chloride (MgCl ₂)	AppliChem	A44250250
5	Protease Inhibitors (PIC)		
6	Glycerol	FISHER Chemical	G/0650/15
7	NP-40		
8	Bromophenol Blue		
9	DTT		
10	SDS	AppliChem	A2263.0100

Ακολουθούμε το παρακάτω πρωτόκολλο για την απομόνωση πυρηνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα HeLa που θα χρησιμοποιηθούν για την ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blotting).

Αρχικά παρασκευάζουμε τα παρακάτω διαλύματα που θα χρειαστούν για το πρωτόκολλο. Κάθε φορά παρασκευάζουμε καινούρια διαλύματα και δεν φτιάχνουμε stock.

Buffer A			
		Stock	$V_{\text{τελ.}}=10\text{ml}$
1	10 mM Hepes pH=7,5	1M	100μl
2	10 mM KCl	2,5M	40μl
3	1,5 mM MgCl ₂	1M	15μl
4	PIC	50X	200μl

5	10 % Glycerol	50%	2ml
6	$\gamma\text{H}_2\text{O}$	-	7,645ml

Buffer B			
		Stock	$V_{\text{τελ.}}=10\text{ml}$
1	20 mM Hepes pH=7,5	1M	200 μl
2	420 mM NaCl	5M	840 μl
3	1,5 mM MgCl_2	1M	15 μl
4	PIC	50X	200 μl
5	Glycerol	50%	5ml
6	$\gamma\text{H}_2\text{O}$	-	3,745ml

Ξεκινάμε από ένα τρυβλίο 10cm πληρότητας τουλάχιστον 80% (περίπου 8×10^6 κύτταρα).

Ξεκινάμε την διαδικασία για την συλλογή των κυττάρων.

Αναρροφούμε το θρεπτικό υλικό, ξεπλένουμε τα κύτταρα με PBS και προσθέτουμε 2 ml θρυψίνης. Φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά σε 1200 rpm. Αποχύνουμε το υπερκείμενο και ακολουθούμε τα εξής βήματα:

- i. Επαναδιαλυτοποιούμε τα κύτταρα σε 1 ml ice cold Buffer A, αφού έχουμε προσθέσει 1/20 Vf (δηλαδή 50 μl) 10% NP-40. Επαναδιαλυτοποιούμε τα κύτταρα με την βοήθεια της πιπέτας ή του vortex.
- ii. Διατηρούμε τα κύτταρα στον πάγο για 20 min.
- iii. Κάνουμε vortex και φυγοκεντρούμε σε max speed για 1min (κατά προτίμηση στους 4°C). Στο υπερκείμενο βρίσκεται το κυτταρόπλασμα των κυττάρων ενώ στην πελλέτα βρίσκονται οι πυρήνες.
- iv. Ξεπλένουμε την πελλέτα με 1ml ice cold Buffer A (χωρίς NP-40 !). Επαδιαλυτοποιούμε με vortex, όσο καλύτερα μπορούμε. Φυγοκεντρούμε σε max speed για 1min (κατά προτίμηση στους 4°C). Αποχύνουμε το υπερκείμενο.
- v. Επαναλαμβάνουμε το προηγούμενο βήμα.
- vi. Προσθέτουμε 50 μl Buffer B, ενώ έχουμε τα δείγματα στον πάγο. Για τα επόμενα 20 min πρέπει να κάνουμε vortex τα δείγματά μας κάθε 2-3 min ενώ είμαστε στο cold room (4°C).
- vii. Φυγοκεντρούμε σε max speed για 15-20 min στους 4°C).
- viii. Κρατάμε το υπερκείμενο κάθε δείγματος στο οποίο βρίσκεται το πυρηνικό εκχύλισμα.
- ix. Διατηρούμε τα πυρηνικά εκχυλίσματα στους -20°C, και αν θέλουμε τα δείγματα από το κυτταρόπλασμα (βήμα iii) στους -80°C.

Για να χρησιμοποιήσουμε τα δείγματα στο Western Blot πρέπει να τους προσθέσουμε και χρωστική – loading dye. Αυτή περιέχει :

	Αντιδραστήρια:	Τελικές Συγκεντρώσεις:
1	Tris HCl pH 6,8	0,25M
2	SDS	8%
3	Glycerol	30%
4	Bromophenol Blue	0,02%
5	DTT	0,3M

Για τα 50 ul δείγματος πυρηνικών εκχυλισμάτων που θα έχω από κάθε δείγμα προσθέτω 10 ul χρωστικής – loading dye. Πριν χρησιμοποιήσω τα δείγματα στο Western Blot συνίσταται η θέρμανσή τους στους 100°C για τουλάχιστον 10 min.

Ανοσοαποτύπωμα Πρωτεϊνών (Western Blotting)

Η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης είναι μια αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών σε σύνθετα δείγματα όπως ομογενοποιημένα κυττάρων. Η μέθοδος περιλαμβάνει το διαχωρισμό των πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου με βάση το μοριακό τους μέγεθος, τη μεταφορά των πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί σε μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή πολυβινυλιδενικού φθοριδίου (PVDF) και τέλος την ανίχνευσή τους με τη βοήθεια ειδικών αντισωμάτων.

1. Παρασκευή πηκτής SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

		Εταιρία	Κωδικός	Περιγραφή
1	Tris ultrapure	AppliChem	A1086.1000	
2	Glycine	AppliChem	A1067.1000	
3	SDS			
4	Methanol	Fisher Chemical	M/4000/PC25	Analytical reagent grade
5	Acrylamide/bis-acrylamide 29:1	SIGMA	A3574	
6	Ammonium persulfate (APS)	AppliChem	A2941.0100	
7	TEMED	AppliChem	A1148.0100	

Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου σχηματίζονται από τον πολυμερισμό της ακρυλαμιδίου με την bis-ακρυλαμιδή. Η ακρυλαμιδή σχηματίζει γραμμικά πολυμερή ενώ η bis-ακρυλαμιδή συμβάλλει στην διασύνδεσή τους μέσω ομάδων μεθυλενίου. Ο πολυμερισμός ξεκινά με την προσθήκη APS και TEMED. Οι πηκτές είναι τριών διαστάσεων, με ουδέτερο ηλεκτρικό φορτίο και υδρόφιλες. Ο διαχωρισμός των μορίων μέσα στην πηκτή εξαρτάται από το μέγεθος των σχηματιζόμενων πόρων. Αυτό καθορίζεται από το ποσοστό της ακρυλαμιδίου και της bis-ακρυλαμιδίου στην πηκτή⁽⁸⁶⁾.

Ανάλογα με το μέγεθος της πρωτεΐνης που θέλουμε να εντοπίσουμε παρασκευάζουμε ανάλογης συγκέντρωσης πηκτή. Ακολουθεί ένας πίνακας που μας βοηθά, κατά προσέγγιση, να υπολογίσουμε τη συγκέντρωση της πηκτής που χρειαζόμαστε.

	Μοριακό βάρος πρωτεΐνης	Ποσοστό πηκτώματος ακρυλαμιδίου
1	4–40 kDa	20%
2	12–45 kDa	15%
3	10–70 kDa	12.5%
4	15–100 kDa	10%
5	25–200 kDa	8%

Η πηκτή ακρυλαμίδης/ bis-ακρυλαμίδης χωρίζεται σε δύο φάσεις. Την ανώτερη φάση ,όπου όλες οι πρωτεΐνες ευθυγραμμίζονται σε ένα ενιαίο μέτωπο (stacking phase)και την φάση του διαχωρισμού των πρωτεϊνών (separating phase).

Μια τυπική συνταγή παρασκευής πηκτής ακρυλαμίδης περιλαμβάνει τα εξής :

		Separating phase		Stacking phase
		10% $V_{\text{τελ.}} = 10 \text{ ml}$	14% $V_{\text{τελ.}} = 10 \text{ ml}$	5% $V_{\text{τελ.}} = 4 \text{ ml}$
1	Ακρυλαμίδη 30%	3,33 ml	4,66 ml	625,5 μl
2	$\gamma\text{H}_2\text{O}$	4,13 ml	2,8 ml	2,62ml
3	Tris (1,5M)	2,47 ml (pH 8.8)	2,47ml (pH8.8)	468 μl (1M, pH 6.8)
4	SDS 20%	50 μl	50 μl	18,75 μl
5	APS 10%	40 μl	40 μl	37,5 μl
6	TEMED	20 μl	20 μl	15 μl

Η ακρυλαμίδη είναι ισχυρή νευροτοξίνη, κατά την χρήση της απαιτείται μεγάλη προσοχή.

Το δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS), μετουσιώνει τις πρωτεΐνες και τους προσδίδει αρνητικό φορτίο ισοδύναμο με το μήκος του πολυπεπτιδίου⁽⁸⁷⁾. Χωρίς το SDS διαφορετικές πρωτεΐνες με παρόμοιο μοριακό βάρος θα ηλεκτροφορούσαν διαφορετικά εξαιτίας της διαφοράς του ισοηλεκτρικού τους σημείου.

Το APS είναι μία ανόργανη ένωση και χρησιμοποιείται ως πηγή ελευθέρων ριζών για την εκκίνηση του πολυμερισμού της πηκτής.

Το TEMED (N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine) σταθεροποιεί τις ελεύθερες ρίζες και βελτιώνει τον πολυμερισμό των πηκτών.

2. Ηλεκτροφόρηση

		Εταιρία	Κωδικός	Περιγραφή
1	Page Ruler Prestained Protein ladder	Thermo Scientific	26616	

Ηλεκτροφορούμε τα δείγματα σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα 1X σε ένταση πεδίου 50mA στα 120V για περίπου 1 ώρα και 30 λεπτά (ανάλογα με την συγκέντρωση της πηκτής).

		10X Buffer	1X Buffer
1	Tris	121.1 g	100 ml 10X buffer
2	Glycine	576g	
3	SDS 20%	-	5ml
4	$\gamma\text{H}_2\text{O}$	4L	895ml

Χρησιμοποιούμε ως μάρτυρα τον Page Ruler Prestained protein Ladder για να μπορέσουμε να προσδιορίσουμε το μέγεθος των πρωτεϊνών. Ο μάρτυρας περιέχει μια κόκκινη μπάντα αναφοράς 70kDa και μία πράσινη 10kDa.

3. Αποτύπωμα σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Transfer)

		Εταιρία	Κωδικός	Περιγραφή
<u>1</u>	Whatmann	GE Healthcare	3030917	
<u>2</u>	Nitrocellulose Blotting membrane	GE Healthcare	10600002	0.45μm 300x4m

Η διαδικασία μεταφοράς (transfer) των πρωτεϊνών από την πηκτή σε μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης PVDF) ονομάζεται αποτύπωμα ή στύπωμα. Αυτή μπορεί να επιτευχθεί με απλή ροή του διαλύτη, εξαιτίας τριχοειδών φαινομένων, ή συνήθως ηλεκτροφορητικά διότι με αυτή τη μέθοδο καθίσταται πιο γρήγορη και ευαίσθητη η μεταφορά. Σημαντικό πλεονέκτημα του στυπώματος είναι ότι οι πρωτεΐνες είναι πιο εύκολα προσβάσιμες στην επιφάνεια της μεμβράνης σε σχέση με το εσωτερικό της πηκτής. Οι μεμβράνες αποθηκεύονται εύκολα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για περισσότερες από μία ανοσοανιχνεύσεις.

Για να πραγματοποιηθεί η μεταφορά πρέπει να διαταχθεί η μεμβράνη με την πηκτή με τρόπο τέτοιο ώστε να έρχονται σφικτά σε επαφή χωρίς την παρουσία αέρα. Παρακάτω παρατίθεται μια κλασική διάταξη μεταφοράς.



Εικόνα 24: Κλασική διάταξη μεταφοράς.

Πηγή: <http://www.abcam.com>, Western blot protocol.

Στην κάθοδο (αρνητικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο) τοποθετείται ένα ειδικό σφουγγάρι και δύο χαρτιά Whatmann σε κατάλληλο μέγεθος, λίγο μεγαλύτερα από την πηκτή. Η πηκτή αφαιρείται από το ειδικά τζάμια που την περιβάλλουν και τοποθετείται πάνω από το απορροφητικό χαρτί. Πάνω από την πηκτή τοποθετείται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και άλλα δύο χαρτιά Whatmann. Τέλος προσθέτουμε ένα ακόμα σφουγγάρι και κλείνουμε την συσκευή που ονομάζεται σάντουιτς. Προσέχουμε κατά την συναρμολόγηση της διάταξης αυτής κάθε στρώμα που προσθέτουμε να είναι καλά εμποτισμένο με το ειδικό διάλυμα

ηλεκτροφόρησης (transfer buffer). Επίσης προσέχουμε να μην υπάρχουν φυσαλίδες αέρα και όσες υπάρχουν τις αφαιρούμε ασκώντας πίεση πάνω από κάθε στρώμα.

Παρακάτω ακολουθεί η σύσταση του διαλύματος που χρησιμοποιούμε για την μεταφορά:

		10X Buffer	1X Buffer
1	Tris	121.1 g	100 ml 10X buffer
2	Glycine	576g	
3	SDS 20%	-	2,5ml
4	Methanol	-	200 ml
5	γH ₂ O	4L	697,5ml
pH ≈ 8.3			

Το SDS αυξάνει την ικανότητα μεταφοράς των πρωτεϊνών αλλά μειώνει την ικανότητα πρόσδεσής τους στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

Η μεθανόλη ελαχιστοποιεί το φούσκωμα της πηκτής και αυξάνει την ικανότητα πρόσδεσης των πρωτεϊνών στην μεμβράνη. Όμως δυσκολεύει την διαδικασία της μεταφοράς τους.

Το pH του διαλύματος καθορίζει το σωστό προσανατολισμό των ηλεκτροδίων για την επαφή πηκτής/νιτροκυτταρίνης. Το pH του διαλύματος είναι ελαφρά αλκαλικό και τα πολυπεπίδια συμπεριφέρονται ως ανιόντα. Έτσι στην διάταξη η νιτροκυτταρίνη βρίσκεται ανοδικά της πηκτής (προς την άνοδο, το θετικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο).

Ο τρόπος πρόσδεσης των πρωτεϊνών στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης δεν είναι απολύτως γνωστός αλλά είναι σίγουρα μη-ομοιοπολικός και περιλαμβάνει υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Η νιτροκυτταρίνη δίνει αρκετά καλά αποτελέσματα στην μεταφορά περίπου 80-100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Το κύριο πρόβλημα που δημιουργείται κατά τη μεταφορά είναι ότι οι μεγαλομοριακές πρωτεΐνες εκλύονται από το πήκτωμα πιο αργά σε σχέση με αυτές μικρότερου μοριακού βάρους.

Ηλεκτροφορούμε σε ένταση πεδίου 300mA στα 90V για περίπου 50 λεπτά.

4. Κάλυψη μη-ειδικών θέσεων πρόσδεσης (Blocking)

		Εταιρία	Κωδικός	Περιγραφή
1	Dulbecco's Phosphate buffered saline (DPBS)	SIGMA ALDRICH	D8537	Without CaCl_2 and MgCl_2
2	Dried Milk Powder	AppliChem	A0830.0500	Nonfat
3	Tween20	AppliChem	A1389.0500	

PBST		
1	10X PBS	50 ml
2	20% Tween 20	5 ml
3	$\gamma\text{H}_2\text{O}$	345 ml

Μετά το πέρας της μεταφοράς των πρωτεϊνών, η μεμβράνη επωάζεται σε διάλυμα άπαχου γάλακτος 5% (blocking buffer) για περίπου 50 λεπτά για την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης. Η σκόνη του γάλακτος είναι διαλυμένη σε PBST.

Για επιβεβαίωση της πλήρους μεταφοράς των πρωτεϊνών στην μεμβράνη μπορεί να γίνει χρώση της πηκτής με χρωστική Coomassie ή/και της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με την χρωστική Ponceau.

5. Επώαση με πρώτο και δεύτερο αντίσωμα .

Για την παρούσα πτυχιακή εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντισώματα :

	Αντίσωμα	Εταιρεία	Κωδικός	
Πρώτο Αντίσωμα				
1	A-p65	Abcam	7970	A-Rabbit
2	A-GAPDH	Ambion		A-Mouse
3	A-H3	Upstate	05499	A-Mouse
4	A-H3	Abcam	1791	A-Rabbit
5	A-TFIIID	Santa Cruz	58C9	A-Mouse
6	A-IRF3	Abcam	76369	A-Rabbit
7	A-IRF7	Santa Cruz	H-246	A-Rabbit

Δεύτερο Αντίσωμα						
1	HRP	Goat	Anti-Rabbit	Invitrogen	656120	
2	HRP	Goat	Anti-Mouse	Invitrogen	626520	

- i. Παρασκευάζεται διάλυμα 1% γάλακτος στο οποίο προστίθεται σε κατάλληλη αραιώση το πρώτο αντίσωμα.
- ii. Αφαιρούμε το blocking buffer και ξεπλένουμε την μεμβράνη με 10 ml PBST.
- iii. Προσθέτουμε το πρώτο αντίσωμα στην μεμβράνη και επωάζουμε για 16-18 ώρες (overnight O/N) στους 4°C.
- iv. Ξεπλένουμε τη μεμβράνη με 10 ml PBST για 10 λεπτά.
- v. Ξεπλένουμε τη μεμβράνη με 10 ml PBST για 5 λεπτά τρεις φορές.
- vi. Παρασκευάζεται διάλυμα 1% γάλακτος στο οποίο προστίθεται σε κατάλληλη αραιώση το δεύτερο αντίσωμα.
- vii. Προσθέτουμε το δεύτερο αντίσωμα στην μεμβράνη και επωάζουμε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (25°C RT).
- viii. Ξεπλένουμε τη μεμβράνη με 10 ml PBST για 10 λεπτά.
- ix. Ξεπλένουμε τη μεμβράνη με 10 ml PBST για 5 λεπτά δύο φορές.
- x. Ξεπλένουμε τη μεμβράνη με 10 ml PBS για 5 λεπτά.

Το πρώτο αντίσωμα στοχεύει την πρωτεΐνη στόχο. Η αραιώσή του είναι τέτοια ώστε να μην προσδένεται σε άλλες πρωτεΐνες στην μεμβράνη. Ο χρόνος επώασης εξαρτάται από την συγγένεια πρόσδεσης της πρωτεΐνης με το αντίσωμα και την ποσότητα της πρωτεΐνης στην μεμβράνη. Η μεμβράνη στη συνέχεια ξεπλένεται για να απομακρυνθεί η περίσσεια του πρώτου αντισώματος και για να διασπαστούν οι πιθανές μη-ειδικές, ασθενείς αλληλεπιδράσεις του με άλλες πρωτεΐνες πάνω στη μεμβράνη. Το δεύτερο αντίσωμα αναγνωρίζει την Fc σταθερή περιοχή του πρώτου αντισώματος, η οποία είναι χαρακτηριστική και ειδική του ζώου που παρασκευάστηκε το πρώτο αντίσωμα. Το δεύτερο αντίσωμα που χρησιμοποιούμε είναι ομοιοπολικά συζευγμένο με το ένζυμο Horseradish peroxidase (HRP).

6. Εμφάνιση σήματος.

		Εταιρία	Κωδικός	Περιγραφή
1	Chemiluminescent HRP Substrate	Millipore	WBKL50100	
2	Film	FUJIFILM	4741019289	Medical x-ray film

Η ανίχνευση του σήματος βασίζεται στην χημειοφωταύγεια και γίνεται με το σύστημα ECL (Enhanced Chemiluminescence). Κατά την αντίδραση η luminol (diacylhydrazide) αντιδρά παρουσία H₂O₂/χημικών ενισχυτών(φαινολών) σε αλκαλικές συνθήκες και παράγεται φως (428nm). Το φως αυτό μπορεί να αποτυπωθεί σε ειδικό φιλμ. Κατά την εμφάνιση του φιλμ το φως αποτυπώνεται ως μαύρες γραμμές όπου αντιστοιχούν στο σημείο όπου το αντίσωμα αντέδρασε με την πρωτεΐνη.

Έκδυση της μεμβράνης (Stripping)

Έκδυση είναι ο όρος που χρησιμοποιείται για την αφαίρεση του πρώτου και του δεύτερου αντισώματος από την μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η διαδικασία αυτή είναι ιδιαίτερα χρήσιμη

διότι δίνει τη δυνατότητα χρήσης της μεμβράνης για πολλαπλούς στόχους. Επιπλέον γίνεται οικονομία αντιδραστηρίων, δειγμάτων και χρόνου.

Υπάρχει περίπτωση, εάν το stripping είναι πολύ ισχυρό να απομακρυνθούν και πρωτεΐνες των δειγμάτων μαζί με τα αντισώματα. Συνεπώς δεν προτείνεται η χρήση της μεθόδου αυτής για μελέτες ποσοτικής έκφρασης πρωτεϊνών.

Αρχικά παρασκευάζεται το παρακάτω ρυθμιστικό διάλυμα:

Stripping buffer		
1	SDS	2 gr
2	Tris 1M pH =6,7	6,25 ml
3	Συμπληρώνουμε μέχρι τα 100 ml νερό και ρυθμίζουμε το pH=6,7 με την προσθήκη HCl	
4	Beta Mercaptoethanol 14,3M	780 μl

- i. Ξεπλένουμε τη μεμβράνη με 10 ml PBST για 10 λεπτά τρεις φορές.
- ii. Επωάζουμε την μεμβράνη σε 25 ml προθερμασμένο Stripping buffer στους 50°C για 30 λεπτά. Κάθε 10 λεπτά αναδεύουμε το διάλυμα.
- iii. Ξεπλένουμε την μεμβράνη με 10 ml PBST για 10 λεπτά τρεις φορές

Στη συνέχεια γίνεται Blocking της μεμβράνης και επώαση με νέα αντισώματα.

Όλη η διαδικασία πρέπει να γίνει σε ειδικό απαγωγό (fume hood) διότι η Beta Mercaptoethanol είναι ιδιαίτερα τοξική.

Το Stripping buffer μπορεί να χρησιμοποιηθεί πάνω από μία φορές. Αποθηκεύεται στους 4°C.

Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (Agarose gel electrophoresis)

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης είναι η πρότυπη μέθοδος για τον διαχωρισμό μορίων DNA διαφορετικού μήκους. Βασίζεται στην κίνηση φορτισμένων μορίων σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, στο οποίο τα αρνητικά φορτισμένα μόρια μεταναστεύουν προς το θετικό ηλεκτρόδιο ενώ τα θετικά μόρια μεταναστεύουν προς το αρνητικό ηλεκτρόδιο.

Η αγαρόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης, ο οποίος σχηματίζει πηκτή με πόρους, των οποίων η διάμετρος κυμαίνεται από 100nm έως 300nm. Το μέγεθος των πόρων εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης στην πηκτή και κατά συνέπεια η παράμετρος αυτή καθορίζει το εύρος των κλασμάτων DNA που μπορούν να διαχωριστούν. Η συγκέντρωση των πηκτωμάτων ποικίλει από 0,2% μέχρι 3%. Όσο μικρότερη η συγκέντρωση τόσο πιο γρήγορα μετακινούνται τα τμήματα DNA. Γενικά εάν ο σκοπός είναι ο διαχωρισμός μεγάλων τμημάτων DNA επιλέγεται μία μικρότερη συγκέντρωση αγαρόζης, ενώ εάν επιθυμείτε ο διαχωρισμός μικρότερων τμημάτων επιλέγεται μία μεγαλύτερη συγκέντρωση.

Μία πηκτή αγαρόζης παρασκευάζεται με ανάμειξη της κατάλληλης ποσότητας σκόνης αγαρόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X TBE και τη θερμαίνουμε μέχρι αυτή να λιώσει. Στο διάλυμα τοποθετούμε και 5% βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) το οποίο εισβάλλει στη διπλή έλικα έτσι ώστε σε UV φως να είναι ορατό το DNA. Το EtBr απαιτεί πολύ προσεκτικό χειρισμό καθώς είναι πιθανό μεταλλαξιγόνο και ιδιαίτερα τοξικό.

Παρασκευή 5X stock διαλύματος TBE (4 L):

Αντιδραστήρια:		
1)	Tris base	216g
2)	Boric Acid	110g
3)	EDTA	14.9g

4) dH ₂ O	Μέχρι την πλήρωση του όγκου
Ρυθμίζουμε το pH στο 8,3 με την προσθήκη HCL	

Ρίχνουμε το διάλυμα σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης και τοποθετούμε ειδικά χτενάκια έτσι ώστε να σχηματιστούν πηγάδια (wells), στα οποία θα φορτώσουμε τα δείγματα DNA. Αφού σχηματιστεί η πηκτή, εμβαπτίζεται σε 0,5-1X TBE που επιτρέπει τη διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος διαμέσου αυτής όταν ασκηθεί διαφορά ηλεκτρικού δυναμικού στα άκρα της. Αποφεύγεται η χρήση υψηλότερης συγκέντρωσης διαλύματος εξαιτίας της μεγάλης θερμοκρασίας που αναπτύσσεται κατά την ηλεκτροφόρηση.

Για τη φόρτωση του δείγματος DNA χρησιμοποιούμε διάλυμα ρυθμιστικό με γλυκερόλη ή ενίοτε σουκρόζη (έτσι ώστε το δείγμα να αποκτά μεγαλύτερη πυκνότητα και να κατακάθεται) και κάποια χρωστική για την οπτικοποίηση των δειγμάτων. Στη συνέχεια τα δείγματα DNA τοποθετούνται στα πηγάδια, κοντά στον αρνητικό πόλο ώστε μετά την εφαρμογή τάσης (όσο μεγαλύτερη είναι η τάση σε Volt τόσο πιο γρήγορα μετακινείται το DNA μέσα από τους πόρους της πηκτής και το αντίστροφο) να κινηθούν προς τον θετικό πόλο εξαιτίας του αρνητικού τους φορτίου. Για την εκτίμηση του μεγέθους των τμημάτων DNA καθώς και για την διάγνωση προβλημάτων κατά την ηλεκτροφόρησης τρέχουμε παράλληλα και έναν DNA δείκτη μοριακού βάρους (ladder), ο οποίος αποτελείται από τμήματα DNA καθορισμένου μεγέθους. Τέλος φωτογραφίζουμε το πήκτωμα με χρήση λάμπας υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Η ουσία που καθιστά ορατό το DNA είναι το βρωμιούχο αιθίδιο το οποίο ενσωματώνεται στην έλικα του DNA και απορροφά τη χρωστική.

Απομόνωση RNA από κύτταρα HeLa.

Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας τα δείγματα ομογενοποιούνται με τη βοήθεια του TRI Reagent, ενός αντιδραστηρίου που περιέχει φαινόλη. Έπειτα φυγοκεντρώνονται και έτσι διαχωρίζονται σε τρεις φάσεις. Μία κατώτερη οργανική φάση, μία μέση που περιέχει DNA και μία τρίτη ανώτερη υδατική φάση που περιέχει RNA. Το RNA ανακτάται με αλκοολική καταβύθιση και επανενυδάτωση.

Προετοιμασία των δειγμάτων :

- 1) Αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό από τα τρυβλία. Δεν ξεπλένουμε τα κύτταρα διότι κάτι τέτοιο μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή των mRNAs.
- 2) Ομογενοποιούμε τα κύτταρα με τη βοήθεια του TRI Reagent. Προσθέτουμε 1 ml Reagent κατευθείαν σε ένα πιάτο 10 cm², πληρότητας 90%. Η ποσότητα του Reagent που θα χρησιμοποιήσουμε εξαρτάται από το εμβαδόν του τρυβλίου και όχι από τον αριθμό των κυττάρων. Γενικός κανόνας είναι να ομογενοποιούμε τα δείγματα σε 10 με 20 φορές μεγαλύτερο όγκο. Η λύση γίνεται κατευθείαν στο πιάτο καλλιέργειας. Μετά την προσθήκη του Reagent περνάμε το κυτταρικό διάλυμα πολλές φορές από μία πιπέτα για να διευκολύνουμε την ομογενοποίηση.

Το TRI Reagent περιέχει φαινόλη και guanidine thiocyanate τα οποία συμβάλλουν στον άμεση απενεργοποίηση των RNAs.

Η φαινόλη είναι ισχυρό δηλητήριο και το guanidine thiocyanate έχει ερεθιστική δράση. Επαφή με το TRI Reagent προκαλεί ερεθισμό και μπορεί να είναι θανατηφόρα. Συνεπώς συνίσταται η χρήση γαντιών και λοιπού προστατευτικού εξοπλισμού όπως και καθόλη τη διάρκεια χρήσης του TRI Reagent να χρησιμοποιείται ειδική συσκευή καθέτου νηματικής ροής-απαγωγός.

Μετά την ομογενοποίηση των κυττάρων τα δείγματα μπορούν να αποθηκευτούν στους -80°C για ένα μήνα.

- 3) Φάση διαχωρισμού: Για τον αποτελεσματικότερο διαχωρισμό των νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλεγμάτων αφήνουμε τα δείγματά μας για 5 min σε RT χωρίς να τα ανακινούμε.
- 4) Προσθέτουμε στα δείγματα 0,2 ml Chloroform (CHCl_3) για κάθε 1 ml Reagent που χρησιμοποιήσαμε. Ανακινούμε έντονα για 15 sec και τα αφήνουμε ακίνητα για 2-15 min σε RT.
Το χλωροφόρμιο που θα χρησιμοποιηθεί πρέπει να μην περιέχει ισοαμλική αλκοόλη ή άλλα πρόσθετα. Αντί για χλωροφόρμιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί BCP: 1-Bromo-3-chloropropane, το οποίο είναι λιγότερο τοξικό και η χρήση του μειώνει την πιθανότητα μόλυνσης του RNA με DNA.
- 5) Φυγοκεντρούμε σε 12.000g για 15 min σε $2-8^{\circ}\text{C}$.

Η φυγοκέντρηση διαχωρίζει το μείγμα σε τρεις φάσεις. Μία κόκκινη οργανική φάση στο κάτω μέρος που περιέχει τις πρωτεΐνες, μία μέση φάση που περιέχει το DNA και μία άχρωμη υδατική φάση που περιέχει το RNA. Φυγοκέντρηση σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 8°C οδηγεί σε συμμετοχή του DNA στην υδατική φάση.

- 6) Μεταφέρουμε την υδατική φάση σε ένα καινούριο tube.
- 7) Επαναλαμβάνουμε την ίδια διαδικασία άλλες δύο φορές.
- 8) Προσθέτουμε 0,5 ml Isopropanol/ml TRI Reagent που είχε χρησιμοποιηθεί αρχικά. Ανακινούμε έντονα και τα αφήνουμε ακίνητα για 5-10 min σε RT.
- 9) Φυγοκεντρούμε σε 12.000g για 20 min σε $2-8^{\circ}\text{C}$. Το RNA θα σχηματίσει μια υπόλευκη πελλέτα στον πάτο και στα πλάγια τοιχώματα του tube.
- 10) Αφαιρούμε όλο το υπερκείμενο και προσθέτουμε 1 ml 70% Ethanol/ ml TRI Reagent που είχε χρησιμοποιηθεί αρχικά.
- 11) Ανακατεύουμε έντονα (vortex) και φυγοκεντρούμε σε 7,500g για 20 min σε $2-8^{\circ}\text{C}$.
- 12) Αφαιρούμε το υπερκείμενο και στεγνώνουμε την πελλέτα. Αποφεύγουμε την χρήση του speed-vac.
- 13) Επαναδιαλυτοποιούμε το RNA σε buffer της επιλογής μας ($\gamma \text{H}_2\text{O}$).
- 14) Μετράμε την ποσότητα του RNA που απομονώσαμε στο Nanodrop 1000A (στα 260nm) χρησιμοποιώντας ως τυφλό το buffer επαναδιαλυτοποίησης ($\gamma \text{H}_2\text{O}$).
- 15) Σε αυτό το στάδιο διατηρούμε τα δείγματά μας στους 4°C ή τα αποθηκεύουμε στους -80°C .

Επώαση με DNase (DNase treatment)

Για να διασφαλίσουμε ότι τα δείγματά μας περιέχουν μόνο RNA και καθόλου DNA κάνουμε επώαση με DNase.

Η DNase I, (RNase-free) είναι μία ενδονουκλεάση που πέπτει μη-ειδικά το DNA απελευθερώνοντας δι- τρι- και όλιγο νουκλεοτίδια με 5'φωσφορυλιωμένα και 3'υδροξυλιωμένα άκρα. Η DNase I δρα σε μονόκλιωνα και δίκλιωνα DNA, στη χρωματίνη και σε υβρίδια RNA:DNA. Παράλληλα χρησιμοποιείται και το ένζυμο HaeIII που δρα επικουρικά στη δράση της DNase I. Το ένζυμο HaeIII πέπτει το δίκλινο DNA στην αλληλουχία GGCC μεταξύ του G και του C.

Υπολογίζουμε ότι σε κάθε αντίδραση θέλουμε να έχουμε 4γ (4μg) από το RNA οπότε ανάλογα με τις μετρήσεις του Nanodrop 1000A σχεδιάζουμε και τις αντίστοιχες αντιδράσεις.

	Αντιδραστήρια	Συγκεντρώσεις
1	RNA sample	4 μg

2	Dnase	4u
3	10X buffer	1X
4	HaeIII	1u
5	ddH ₂ O	Μέχρι την πλήρωση του όγκου
	Vf	(Συνήθως 60 μl)

Αφήνουμε την αντίδραση της DNase I στους 37°C για 1h.

Επειδή συνήθως η αντίδραση της DNase γίνεται σε όγκο 60 μl μετά το πέρας της 1h προσθέτουμε επιπλέον ddH₂O (340μl) για να είναι ευκολότεροι οι επόμενοι χειρισμοί.

Για να απομονώσουμε το RNA από το διάλυμα ακολουθούμε την ακόλουθη διαδικασία:

- 1) Προσθέτουμε ίσο όγκο διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου 1:1 και ανακατεύουμε έντονα. Αφήνουμε για 6 min σε RT.
- 2) Φυγοκεντρούμε στα 12.000g για 15 min στους 4°C.
- 3) Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε ένα νέο tube και προσθέτουμε ίσο όγκο με το υπερκείμενο χλωροφόρμιο (CHCl₃). Ανακατεύουμε έντονα.
- 4) Φυγοκεντρούμε στα 12.000g για 15 min στους 4°C.
- 5) Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 3 και 4
- 6) Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε ένα νέο tube και προσθέτουμε διπλάσιο όγκο 100% ice cold Ethanol και 1/10 του όγκου sodium acetate (CH₃COONa). Αφήνουμε για τουλάχιστον 2h στους -80°C.
- 7) Φυγοκεντρούμε στα 12.000g για 45 min στους 4°C.
- 8) Αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε έναν όγκο (περίπου 400μl) 70% ice cold Ethanol.
- 9) Φυγοκεντρούμε στα 12.000g για 20 min στους 4°C.
- 10) Αφαιρούμε το υπερκείμενο και στεγνώνουμε την πελλέτα. Αποφεύγουμε την χρήση του speed-vac.
- 11) Επαναδιαλυτοποιούμε το RNA σε buffer της επιλογής μας (γ H₂O).
- 12) Μετράμε την ποσότητα του RNA που απομονώσαμε στο Nanodrop 1000A (στα 260nm) χρησιμοποιώντας ως τυφλό το buffer επαναδιαλυτοποίησης (γ H₂O).

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται για να ενισχυθεί ένα ή περισσότερα τμήματα DNA ανάμεσα από ένα πλήθος αλληλουχιών. Με αυτό τον τρόπο παράγονται χιλιάδες ή εκατομμύρια αντίγραφα μια συγκεκριμένης αλληλουχίας. Είναι μια εύκολη, σχετικά οικονομική τεχνική και πολύ αξιόπιστη.

Η χρήση υψηλής ποιότητας αρχικού δείγματος DNA διασφαλίζει σε μεγάλο βαθμό την επιτυχία της αντίδρασης. Προτεινόμενη ποσότητα γενωμικού δείγματος σε μία αντίδραση όγκου 50μl είναι 1ng-1mg

Η Taq DNA πολυμεράση είναι το πιο γνωστό ένζυμο που χρησιμοποιείται για την PCR . Η Taq DNA πολυμεράση είναι ένα θερμοσταθερό ένζυμο με χρόνο ημιζωής 40 min στους 95°C. Ενσωματώνει νουκλεοτίδια με ρυθμό περίπου 60 bases/sec στους 70°C και μπορεί να ενισχύσει τμήματα μέγιστου μήκους 5 kb, κάνοντας την ιδανική για την PCR. Γενικά προτείνεται η χρήση της Taq DNA πολυμεράσης σε συγκέντρωση 25 units/ml (1.25 units/50 μl reaction).

Η αντίδραση PCR ενέχει την σχεδίαση δύο μορίων εκκινητών (primers), τα οποία περιστοιχίζουν την αλληλουχία DNA που επιλέγουμε να ενισχύσουμε. Έχουν μέγεθος

περίπου 20-30 νουκλεοτίδια και ιδανικά περιέχουν GC content 40–60%. Το ένα μόριο εκκινητή είναι συμπληρωματικό με τον έναν κλώνο του δίκλωνου DNA και το άλλο μόριο εκκινητή με τον συμπληρωματικό του από την άλλη κατεύθυνση. Οι εκκινητές θα πρέπει να σχεδιαστούν με προσοχή ώστε να μην είναι συμπληρωματικοί μεταξύ τους και να έχουν T_m μεταξύ 55-70°C με διαφορά μεταξύ τους 5°C. Υπολογιστικά προγράμματα όπως το Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>), μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον σχεδιασμό ή την ανάλυση των εκκινητών. Η συνηθής τελική συγκέντρωση του κάθε εκκινητή στην αντίδραση είναι 0,1-0,5μM.

Η PCR πραγματοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο παρέχει το κατάλληλο χημικό περιβάλλον για τη δράση της πολυμεράσης. Το pH του διαλύματος είναι συνήθως μεταξύ 8,0 και 9,5 και σταθεροποιείται στις περισσότερες περιπτώσεις από Tris-HCl.

Τα ιόντα μαγνησίου (Mg^{2+}) δρουν ως συμπαράγοντες για τη δράση της πολυμεράσης καθώς βοηθούν στην ενσωμάτωση των dNTPs κατά τον πολυμερισμό. Τα ιόντα μαγνησίου στο ενεργό κέντρο του ενζύμου καταλύουν τον σχηματισμό φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ του 3'-OH του εκκινητή και της φωσφορικής ομάδας ενός dNTP. Επιπροσθέτως τα ιόντα μαγνησίου διευκολύνουν την πρόσδεση των εκκινητών και των συμπληρωματικών τμημάτων DNA σταθεροποιώντας τα αρνητικά φορτία των φωσφορικών ομάδων. Η συνηθής τελική συγκέντρωση των Mg^{2+} κυμαίνεται στα 1-3 mM. Η τελική συγκέντρωση στο 1X Standard Taq Reaction Buffer είναι 1,5 mM. Η συγκέντρωσή του μπορεί να προσαρμοστεί με τη χρήση $MgCl_2$ ή $MgSO_4$. Χαμηλές συγκεντρώσεις ιόντων μαγνησίου οδηγούν στη μη πραγματοποίηση της αντίδρασης εξαιτίας της μειωμένης λειτουργίας της πολυμεράσης. Υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων μαγνησίου από την άλλη πλευρά οδηγούν στην ενίσχυση μη-ειδικών τμημάτων.

Άλλα ενισχυτικά της αντίδρασης σε περίπτωση δυσκολότερων συνθηκών πραγματοποίησής της είναι το DMSO (τελικής συγκέντρωσης 1–10%) και το φορμαμίδιο (τελικής συγκέντρωσης 1,25–10%).

Τα δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) είναι τα dATP, dCTP, dGTP, και dTTP και προστίθενται στην αντίδραση σε ίσες ποσότητες. Η προτεινόμενη τελική συγκέντρωση για το κάθε ένα είναι 200 μM. Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ενδέχεται να παρεμποδίσουν τη δράση της πολυμεράσης.

Η αντίδραση περιλαμβάνει τρία στάδια που επαναλαμβάνονται για περίπου 20-30 φορές το κάθε ένα και τα οποία γίνονται σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

Το πρώτο στάδιο είναι η αποδιάταξη (denaturation) του δίκλωνου DNA το οποίο γίνεται συνήθως στους 95°C για 30 sec μέχρι ακόμα και 3 min. Το δεύτερο στάδιο είναι η πρόσδεση των εκκινητών (annealing) και βασίζεται στο T_m των εκκινητών. Οι θερμοκρασίες κυμαίνονται μεταξύ 45-68°C. Το τρίτο στάδιο είναι η επιμήκυνση των εκκινητών (extension), με συνέπεια την σύνθεση συμπληρωματικών κλώνων. Στο στάδιο αυτό δρα η πολυμεράση. Η θερμοκρασία στην οποία θα γίνει η αντιγραφή του DNA σε αυτό το στάδιο είναι 68-72°C. Η υψηλή αυτή διαδικασία αποδιατάσσει τους εκκινητές διότι είναι προσδεμένοι στο DNA με μεγάλη ειδικότητα.

Συνήθως ετοιμάζεται ένα μείγμα αντιδράσεων που περιέχει όλα τα συστατικά εκτός του DNA υπολογισμένα για $n+1$ αντιδράσεις (όπου n ο πραγματικός αριθμός αντιδράσεων). Έπειτα το μείγμα διαμοιράζεται σε n eppendorfs και σε αυτά προστίθεται το DNA. Παράλληλα πραγματοποιείται και μία αντίδραση ελέγχου η οποία περιέχει όλα τα συστατικά της αντίδρασης με ίσο όγκο αποστειρωμένου ddH_2O αντί του DNA (αρνητικός μάρτυρας). Πριν την χρήση όλα τα συστατικά της αντίδρασης αναδεύονται και φυγοκεντρώνονται σύντομα.

Η ενδεικτική αντίδραση που θα ετοιμάσουμε θα περιέχει τα εξής συστατικά :

	Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση διαλυμάτων stock	Τελική ποσότητα
1	DNA template	-	2 μ l
2	Forward primer	100 ng/ μ l	0,5 μ l
3	Reverse Primer	100 ng/ μ l	0,5 μ l
4	dNTPs	10 mM	2 μ l
5	Taq Buffer	10 X	2 μ l
6	MgSO ₄	50 mM	0,6 μ l
7	ddH ₂ O	-	12,2 μ l
8	Taq DNA polymerase	5 U/ μ l	0,2 μ l
	V _{final}		20 μ l

Προτεινόμενο πρόγραμμα για την PCR είναι το εξής :

1)	Στους 94°C για 3 min
2)	Στους 94°C για 30 sec
3)	(Ta) Στους 66°C για 30 sec
4)	Στους 72°C για 1 min (για τα βήματα 2-4 40 κύκλοι)
5)	Στους 72°C για 5 min.

Οι stock συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων διαφέρουν κάθε φορά (κυρίως αυτές των εκκινητών) συνεπώς η παραπάνω αντίδραση είναι ενδεικτική και διαφέρει ανάλογα την περίπτωση. Παράλληλα το παραπάνω προτεινόμενο πρόγραμμα της PCR εξαρτάται από το T_m των εκκινητών, την πολυμεράση που θα επιλεγθεί, το μήκος του τμήματος που θέλουμε να ενισχύσουμε σε κάθε περίπτωση κλπ.

Για τα πειράματά μας χρησιμοποιήσαμε τους παρακάτω εκκινητές:

A) GAPDH			
Forward primer	5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT CA -3'	T _m = 56,4°C	T _a =62°C, 1min, 1749bp
Reverse primer	5'-TTG AGG TCA ATG AAG GGG TC-3'	T _m = 54,5°C	
B) IFNβ1			
Forward primer	5'-ATG ACC AAC AAG TGT CTC CTC C-3'	T _m = 56,7°C	T _a =60°C, 30sec, 2250bp
Reverse primer	5'GAT AGA CAT TAG CCA GGA GGT TC-3'	T _m = 54,6°C	

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real time PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR), γνωστή και ως ποσοτική PCR (Quantitative PCR, qPCR), είναι μία εργαστηριακή τεχνική της μοριακής βιολογίας που βασίζεται στην αντίδραση PCR. Η PCR πραγματικού χρόνου αποτελεί τη καλύτερη στρατηγική για την γρήγορη και ακριβή ποσοτικοποίηση RNA και DNA, καθώς επιτρέπει τη μέτρηση της ποσότητας των προϊόντων, και κατ' επέκταση την παρακολούθηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού ενός μορίου-στόχου, σε όλη τη διάρκεια της αντίδρασης της PCR. Ύστερα από μία αρχική φάση κατά την οποία δεν είναι ανιχνεύσιμο το προϊόν της PCR λόγω του ότι βρίσκεται σε πολύ χαμηλή ποσότητα, ακολουθεί μια εκθετική φάση κατά την οποία η ποσότητα σχεδόν διπλασιάζεται σε κάθε βήμα. Αν υπάρχουν περισσότερα μόρια στην αρχή, θα χρειαστούν λιγότεροι κύκλοι για να αρχίσει η εκθετική φάση. Συγκρίνοντας τον αριθμό των κύκλων που απαιτούνται για την έλευση της εκθετικής φάσης σε διαφορετικές αντιδράσεις, μπορούμε να προσδιορίσουμε την αρχική ποσότητα των μορίων

που χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα στις αντιδράσεις. Τα προϊόντα της PCR ανιχνεύονται με τη βοήθεια της χρωστικής SYBR Green, μίας χρωστικής η οποία προσδένεται στο DNA χωρίς προτίμηση για συγκεκριμένες αλληλουχίες και εκπέμπει φθορισμό μόνο όταν παρεμβάλλεται στην διπλή έλικα.

Για κάθε γονίδιο του οποίου την έκφραση θέλουμε να εξετάσουμε παρασκευάζουμε ένα μείγμα το οποίο περιέχει τα εξής:

	Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση διαλυμάτων stock	Τελική ποσότητα
1	DNA template	-	6 μ L (<20 ng/20 μ l rxn)
2	Forward primer	Διαφορετική συγκέντρωση για το κάθε set primers	Εξαρτάται από την αρχική συγκέντρωση.(Περίπου 200 nM)
3	Reverse Primer		
4	KAPA mix	2X	10 μ L
5	ddH ₂ O	-	μέχρι τα 20 μ L

Το KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) είναι ένα έτοιμο προς χρήση μείγμα που περιέχει όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια για την Real-Time PCR εκτός από τους εκκινητές και το δείγμα DNA. Το mix φυλάσσεται και διατηρείται στους -20°C. Πρέπει να αποφεύγεται η απευθείας έκθεση του στο φως καθώς επηρεάζεται η ένταση του φθορισμού του.

Η τελική συγκέντρωση του MgCl₂ στο 1X μείγμα είναι 2,5 mM.

Προτεινόμενο πρόγραμμα για την qPCR είναι το εξής :

1)	Στους 95°C για 20sec-3 min, για να ενεργοποιηθεί η ειδική πολυμεράση.
2)	Στους 95°C για 1-3 sec
3)	Στους 60°C για 20sec (T _a)
4)	Στους 72°C (ανάλογα με τον αριθμό bp του DNA στόχου)
5)	Στους 4°C για διατήρηση.

Κάθε φορά πραγματοποιούμε και μία αντίδραση με εκκινητές ειδικούς για ένα housekeeping γονίδιο όπως είναι ο GAPDH , έτσι ώστε να έχουμε μια ένδειξη εάν η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σωστά καθώς επίσης να μπορούμε να κάνουμε την κανονικοποίηση μεταξύ των δειγμάτων. Μόνο με αυτόν τον τρόπο τα αποτελέσματα μας θα μπορούν να είναι συγκρίσιμα.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT- PCR).

Ο συνδυασμός της αντίστροφης μεταγραφής με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επιτρέπει την σύνθεση αντιγράφων cDNA. Το πρώτο βήμα είναι η ενζυμική μετατροπή του RNA (που έχει απομονωθεί παραδείγματος χάριν μετά από την διαδικασία απομόνωσης RNA) σε cDNA με την αντίστροφη μεταγραφή, ενώ ακολουθεί ενίσχυση του DNA με Taq πολυμεράση με τον ίδιο τρόπο όπως σε μία κανονική PCR. Με αυτό τον τρόπο έχουμε τη δυνατότητα ενίσχυσης του ενδογενούς mRNA το οποίο μέσω της αντίστροφης αντιγραφής θα το έχουμε με τη μορφή cDNA.

Στο εργαστήριο χρησιμοποιούμε το kit της Invitrogen : SuperScript First-Strand Synthesis System for RT- PCR. Cat.No:11904-018

Για την πραγματοποίηση της RT-PCR θα χρειαστεί να παρασκευάσουμε δύο μείγματα τα οποία θα περιέχουν τα εξής:

	Μείγμα 1 ανά αντίδραση			Μείγμα 2 ανά αντίδραση	
1	OligodT 0.5 µg/µl (ή GSP)	1 µl	1	RT Buffer 10X	2 µl (1X)
2	dNTPs 10 mM	1 µl	2	DDT 0.1M	2 µl
3	υπόστρωμα από το RNA	1 µg	3	Enzyme	1 µl (200 units)
4	dd H ₂ O	to 10 µl	4	dd H ₂ O	to 20 µl

Αρχικά προσθέτουμε το υπόστρωμα σε κάθε PCR tube. Στη συνέχεια προσθέτουμε το μείγμα 1 σε κάθε αντίδραση και τοποθετούμε στη συσκευή για την PCR. Ρυθμίζουμε την PCR :

1)	Στους 65°C για 5 min
2)	Στους 4°C για 5 min

Όσο παραμένουν τα δείγματά μας στους 4°C προσθέτουμε το μίγμα 2 στις αντιδράσεις που βρίσκονται ήδη στη συσκευή. Έπειτα συνεχίζουμε το πρόγραμμα της PCR:

3)	Στους 42°C για 52 min
4)	Στους 70°C για 15 min
5)	Στους 4°C για ∞

Το cDNA που συντέθηκε κατά την αντίδραση μπορεί να ενισχυθεί σε επόμενο βήμα κατευθείαν με την χρήση της απλής PCR. Προτείνεται η χρήση του 10% του όγκου της αρχικής αντίδρασης (2µl) .

Για να ελέγξουμε τα αποτελέσματα της RT-PCR χρησιμοποιούμε για εσωτερικό θετικό έλεγχο ένα housekeeping γονίδιο (δηλαδή ένα γονίδιο που εκφράζεται συνεχώς στα κύτταρα που χρησιμοποιούμε). Εάν δεν ενισχυθεί το cDNA από αυτό το γονίδιο τότε η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής δεν έχει πραγματοποιηθεί σωστά. Στα δικά μας πειράματα χρησιμοποιήσαμε το γονίδιο της GAPDH .

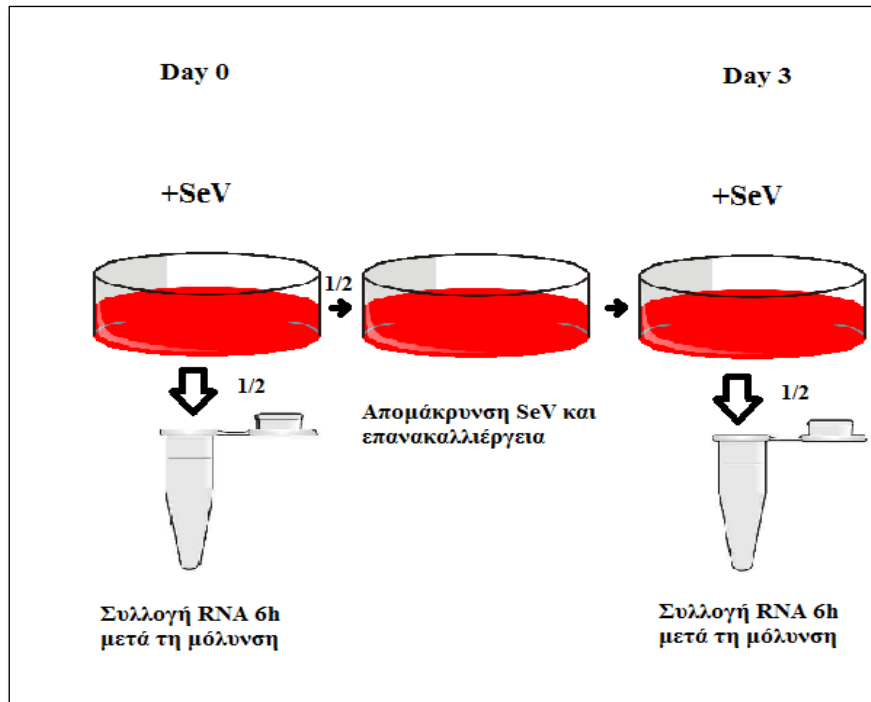
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στόχος αυτής της πτυχιακής εργασίας είναι να ελεγχθεί η υπόθεση ότι το γονίδιο της ιντερφερόνης Β, μετά την πρώτη ενεργοποίηση του από τα κατάλληλα σήματα, δεν επιστρέφει στην πρότερη αδρανή μεταγραφικά κατάσταση. Η υπόθεσή αυτή βασίζεται στο ότι οι τροποποιήσεις της χρωματίνης που λαμβάνουν χώρα, συγχρόνως με την αλληλεπίδραση του υποκινητή με άλλες χρωμοσωμικές περιοχές δίνουν την ικανότητα για ταχύτερη επανέκφραση των γονιδίων που επάγονται από ιική μόλυνση.

Για αυτό το λόγο, χρησιμοποιήσαμε το καλά χαρακτηρισμένο μοντέλο της ενεργοποίησης του γονιδίου της ιντερφερόνης Β σε ανθρώπινα κύτταρα μετά από μόλυνση από τον ιό Sendai, ώστε να μελετήσουμε την ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου μετά τη λήξη του προγράμματος έκφρασης.

Υποθέσαμε ότι η μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της ιντερφερόνης Β για επόμενη φορά μετά την περίοδο αδρανοποίησης θα απαιτεί λιγότερο χρόνο σε σχέση με τον αρχικό, λόγω κάποιας μεταγραφικής μνήμης αποθηκευμένης στον υποκινητή που θα σχετίζεται με τη δημιουργία μιας ελεύθερης νουκλεοσώματος περιοχής του υποκινητή μετά την αρχική έκφραση της IFNβ ή με τις διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις που πραγματοποιούνται.

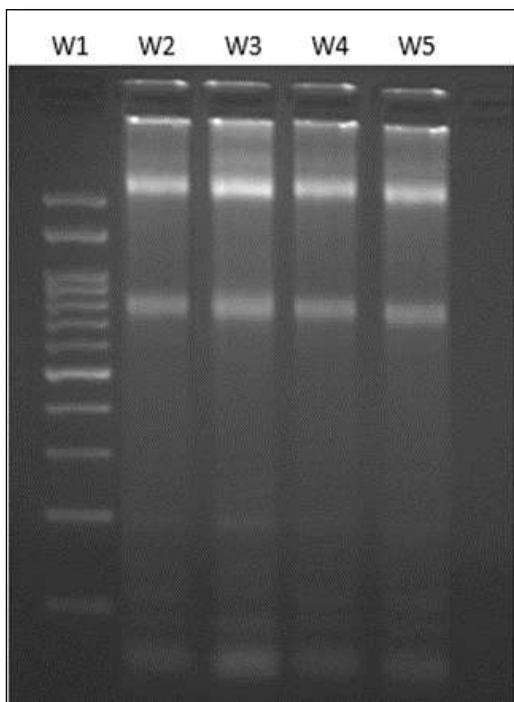
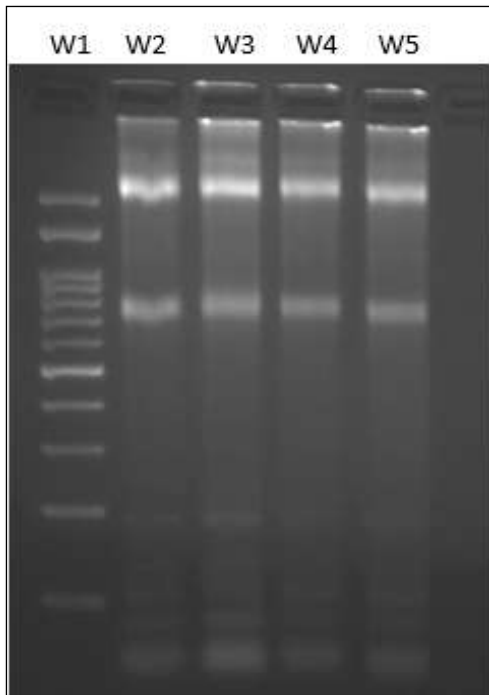
Για το λόγο αυτό σχεδιάσαμε το εξής πείραμα. Μολύναμε κύτταρα HeLa αλλά και κύτταρα Namalwa (στο 90% του κορεσμού τους) με ιό Sendai και μετά από 6 ώρες ικής μόλυνσης, αφού πλύναμε πολύ καλά τα κύτταρα για να απομακρυνθεί ο ιός, μαζέψαμε το μισό πληθυσμό των κυττάρων ενώ τα υπόλοιπα τα τοποθετήσαμε πάλι πίσω σε καλλιέργεια, τα διατηρήσαμε για 72 ώρες και επαναλάβαμε ξανά την ική μόλυνση. Αυτό το σχήμα επαναλήφθηκε ώστε να καταλήξουμε να έχουμε 2 γεγονότα ικής μόλυνσης με χρονικό διάστημα μεταξύ δυο διαδοχικών ικών μολύνσεων 72 ώρες. Αρχικά παρατηρήσαμε μακροσκοπικά ότι τα κύτταρα έπειτα από κάθε μόλυνση εξαλλάσσονταν μορφολογικά ενώ ταυτόχρονα αυξήθηκε ο κυτταρικός θάνατος.



Από τα κύτταρα απομονώσαμε το ολικό RNA (protocol: Απομόνωση RNA από κύτταρα). Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας τα δείγματα ομογενοποιούνται με τη βοήθεια του TRI Reagent, ενός αντιδραστήριου που περιέχει φαινόλη. Έπειτα φυγοκεντρώνονται και έτσι διαχωρίζονται σε τρεις φάσεις. Μία κατώτερη οργανική φάση, μία μέση που περιέχει DNA και μία τρίτη ανώτερη υδατική φάση που περιέχει RNA. Το RNA ανακτάται με αλκοολική καταβύθιση και επανενυδάτωση. Μετράμε την ποσότητα του RNA με τη βοήθεια του Nanodrop 1000A στα 260nm. Για να διασφαλίσουμε ότι τα δείγματά μας περιέχουν μόνο RNA και καθόλου DNA κάνουμε επώαση με DNase, και επανακτάμε το RNA με τη διαδικασία που έχει ήδη περιγραφεί στο πρωτόκολλο.

Στη συνέχεια για να επιβεβαιώσουμε ότι η απομόνωση του RNA έχει γίνει σωστά ηλεκτροφορούμε τα δείγματά σε 1.8% agarose gel στα 80 Volt μέχρι να διαχωριστούν οι μπάντες. Το ολικό RNA όταν ηλεκτροφορείται σε απόδιατακτικό πήκτωμα αγαρόζης θα εμφανίζει δύο πολύ χαρακτηριστικές μπάντες την 28S και την 18S rRNA (στα ευκαριωτικά δείγματα). Η 28S rRNA μπάνα (που είναι μεγαλύτερου μοριακού μεγέθους και συνεπώς είναι αυτή που βρίσκεται στο πάνω μέρος του πηκτώματος) πρέπει να είναι σχεδόν διπλάσιας έντασης από τη 18S rRNA μπάνα. Αυτός είναι ένας καλός δείκτης ότι το ολικό RNA που έχει απομονωθεί δεν έχει αλλοιωθεί.

Παρακάτω φαίνονται οι ηλεκτροφορήσεις των ολικών RNA που απομονώθηκαν:



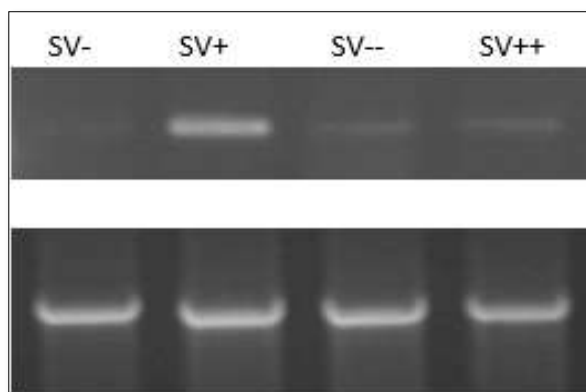
Αφού το RNA φαίνεται να είναι σε άριστη κατάσταση συνεχίζουμε τη πειραματική διαδικασία με RT-PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής)

Ο συνδυασμός της αντίστροφης μεταγραφής με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επιτρέπει την σύνθεση αντιγράφων cDNA. Το πρώτο βήμα είναι η ενζυμική μετατροπή του RNA σε cDNA με την αντίστροφη μεταγραφάση, ενώ ακολουθεί ενίσχυση του DNA με Taq πολυμεράση με τον ίδιο τρόπο όπως σε μία κανονική PCR. Με αυτό τον τρόπο έχουμε τη δυνατότητα ενίσχυσης του ενδογενούς mRNA το οποίο μέσω της αντίστροφης αντιγραφής θα το έχουμε με τη μορφή cDNA.

Στο εργαστήριο χρησιμοποιούμε το kit της Invitrogen: SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR. Cat.No:11904-018.

Τα cDNA τα οποία κατασκευάστηκαν χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα για τους ειδικούς για την IFNB εκκινητές καθώς και εκκινητές για το housekeeping γονίδιο GAPDH, το οποίο χρησιμεύει για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Με αυτόν τον τρόπο επιτεύχθηκε η ενίσχυση των αρχικών υποστρωμάτων και ο ποσοτικός προσδιορισμός τους.

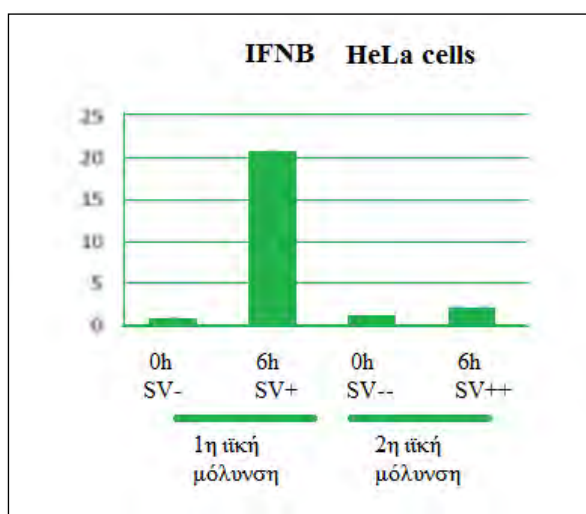
Ηλεκτροφορήσαμε τα αποτελέσματα της PCR σε 2% agarose gel στα 80 Volt.

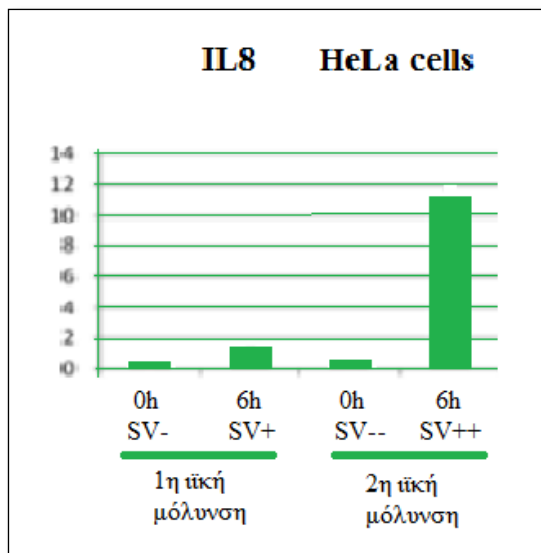
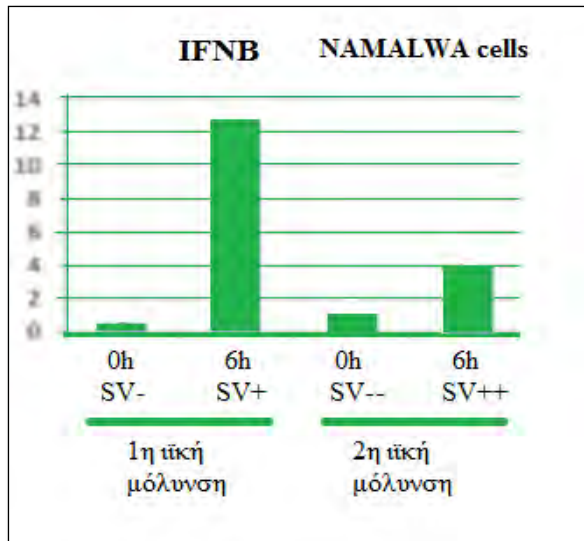


Στη συνέχεια κάναμε Real Time –PCR χρησιμοποιώντας τα αντίστοιχα cDNA ως υπόστρωμα και για τους ειδικούς εκκινητές για την IFN-β και την IL8 .

Η έκφραση της IL-8 διαμεσολαβείται από τον μεταγραφικό παράγοντα NF-kB, όπως και της ιντερφερόνης αλλά αντίθετα με την ιντερφερόνη, είναι ανεξάρτητη των διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων (Apostolou and Thanos, 2008). Στα NAMALWA κύτταρα η IL-8 δεν εκφράζεται, όπως έχει δειχθεί από το εργαστήριο μας (Agelopoulos and Thanos, 2006) λόγω της ύπαρξης της ιστόνης macroH₂A στο νουκλεόσωμα που καλύπτει τον υποκινητή του γονιδίου της IL-8 στο συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο.

Τα αποτελέσματα φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα:





Από αυτά τα πειράματα που πραγματοποιήσαμε αποδείχθηκε η σιώπηση της έκφρασης του γονιδίου της IFN β μετά από επαναλαμβανόμενες ιικές μολύνσεις.

Κατά την 1^η ιική μόλυνση για την παραγωγή της IFN β απαιτείται η συγκρότηση του ενισχυσώματος στον ενισχυτή του γονιδίου της ιντερφερόνης. Όπως αναλύθηκε στην Εισαγωγή, όλες οι πρωτεΐνες που απαιτούνται για την συγκρότηση του ενισχυσώματος βρίσκονται στο κύτταρο πριν την ιική μόλυνση.

Ο NF κ B βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα ανενεργός, δεσμευμένος από ένα μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών I κ B. Έπειτα από ιική μόλυνση η κινάση IKK φωσφορυλιώνει σε συγκεκριμένα κατάλοιπα σερίνης την I κ B ευνοώντας την αποικοδόμηση της στο πρωτεάσωμα μέσω ουβικιτίνωσης. Έτσι ο NF κ B μπορεί να εισέλθει στον πυρήνα. Ο IRF3 εκφράζεται και αυτός συνεχώς σε διάφορους κυτταρικούς τύπους και βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Ενεργοποιείται έπειτα από φωσφορυλίωση σε συγκεκριμένα κατάλοιπα σερίνης και ευνοείται ο διμερισμός του. Με την βοήθεια ειδικών πρωτεϊνών εισέρχεται στον

πυρήνα. Επιπλέον σε μη μολυσμένα κύτταρα ο IRF3 είναι S- γλουτοθειωμένος. Έπειτα από ιική μόλυνση η GRX-1 συμμετέχει στην από- γλουτοθειωσή του. Αντίθετα ο ATF-2/c-Jun βρίσκεται ήδη στον πυρήνα και είναι σε θέση να προσδεθεί στο DNA σε μη-διεγερμένα κύτταρα. Όμως δεν είναι ικανός να επάγει την μεταγραφή αν δεν φωσφορυλιωθεί η ενεργή περιοχή του από το σηματοδοτικό μονοπάτι των MAPK κινασών. Επίσης για την σταθερή πρόσδεση του ATF-2/c-Jun στο DNA απαιτείται η συνεργιστική δράση με τους άλλους μεταγραφικούς παράγοντες.

Έτσι σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν για την μη-απόκριση (non response) του γονιδίου της ιντερφερόνης έπειτα από επόμενες ιικές μολύνσεις αναρωτηθήκαμε μήπως αυτό οφείλεται σε μη-είσοδο των μεταγραφικών παραγόντων στον πυρήνα .

Έτσι επαναλάβαμε το παραπάνω σχήμα και μολύναμε κύτταρα HeLa (στο 90% του κορεσμού τους) με ιό Sendai και μετά από 6 ώρες ικής μόλυνσης, αφού πλύναμε πολύ καλά τα κύτταρα για να απομακρυνθεί ο ιός, μαζέψαμε το μισό πληθυσμό των κυττάρων ενώ τα υπόλοιπα τα τοποθετήσαμε πάλι πίσω σε καλλιέργεια, τα διατηρήσαμε για 72 ώρες και επαναλάβαμε ξανά την ική μόλυνση. Επαναλάβαμε ώστε να καταλήξουμε να έχουμε 2 γεγονότα ικής μόλυνσης με χρονικό διάστημα μεταξύ δυο διαδοχικών ικών μολύνσεων 72 ώρες.

Από τα κύτταρα απομονώσαμε το πυρηνικό DNA (protocol: Προετοιμασία πυρηνικών εκχυλισμάτων για Western Blot) και πραγματοποιήσαμε Western Blot, που είναι μια μέθοδος ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών μέσω ανοσοαποτύπωσης, για να ελέγξουμε την ποσότητα των μεταγραφικών παραγόντων IRF3 και NF-κB που απαιτούνται για την συγκρότηση του ενισχυσώματος στον πυρήνα των κυττάρων.

Ηλεκτροφορούμε τα δείγματα σε πηκτή πολυακρυλαμίδης, για να μπορέσουν οι πρωτεΐνες να διαχωριστούν τόσο με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο όσο και με βάση το μοριακό τους βάρος, με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται ο βέλτιστος διαχωρισμός τους. Για να πραγματοποιηθεί η ανοσοαποτύπωση πρέπει οι πρωτεΐνες που έχουν διαχωριστεί να μεταφερθούν σε μία μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Μετά τη μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη, πραγματοποιείται το μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων για την πιο ειδική πρόσδεση του πρώτου αντισώματος που είναι ειδικό στη μία μεμβράνη για τον IRF3 και στη δεύτερη για τον p65 (τμήμα του NF-κB) ενώ ακολουθεί και επώαση με το δεύτερο αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει τη βαριά αλυσίδα του πρώτου αντισώματος και είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του σήματος. Παράλληλα χρησιμοποιούμε και αντίσωμα για την ιστόνη H3 , που παρουσιάζει σταθερή έκφραση στον πυρήνα των κυττάρων, όπου με τη βοήθεια της θα μπορέσουμε να πραγματοποιήσουμε την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων μας.

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται συνοπτικά τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για κάθε μεταγραφικό παράγοντα ξεχωριστά:

A) Για τον IRF-3

Well	Samples	Ποσότητα δείγματος	1 st Ab	2 nd Ab
W1	Marker	5 ul		
W2	Hela SV-	5ul	Anti-IRF-3 A- Rabbit Abcam 76367 1:500, 1% milk	HRP Goat Anti Rabbit, Invitrogen 656120 ,1:10.000 1% milk
W3	Hela SV+	3ul		
W4	Hela SV- -	1,5 ul		
W5	Hela SV++	3ul		
10% gel, 50 min transfer, 60 min blocking 5% milk.				

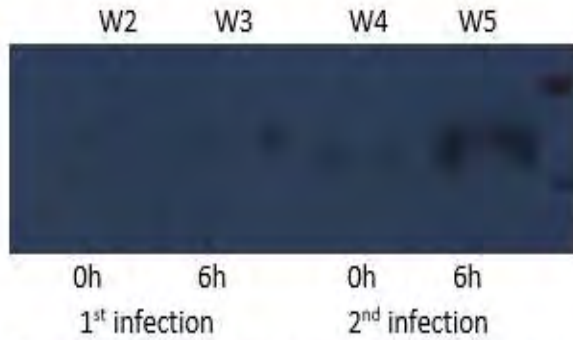


Figure 1: Ανοσοαποτύπωση σε φιλμ με αντίσωμα για τον IRF3

Well	Samples	Ποσότητα δείγματος	1 st Ab	2 nd Ab
W1	Marker	5ul	Anti-H3 A-Rabbit Abcam 1791 1:1.000 1% milk	HRP Goat Anti Rabbit, Invitrogen 656120, 1:10.000 1% milk
W2	Hela SV-	5 ul		
W3	Hela SV+	3ul		
W4	Hela SV- -	1,5ul		
W5	Hela SV++	3 ul		

14% gel, 50 min transfer, 60 min blocking 5% milk.

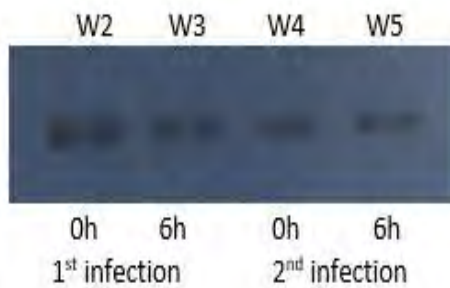


Figure 2: Ανοσοαποτύπωση σε φιλμ με αντίσωμα για την H3

B) Για τον NF-κB

Well	Samples	Ποσότητα δείγματος	1 st Ab	2 nd Ab
W1	Marker	5 ul	Anti-p65 A- Rabbit Abcam 7970 1:1.000, 1% milk	HRP Goat Anti Rabbit, Invitrogen 656120 ,1:10.000 1% milk
W2	Hela SV-	5ul		
W3	Hela SV+	5ul		
W4	Hela SV- -	5 ul		
W5	Hela SV++	4ul		

10% gel, 50 min transfer, 50 min blocking 5% milk.

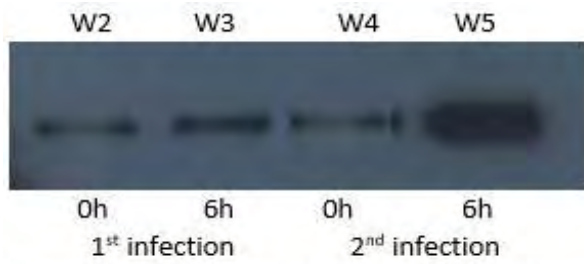


Figure 3: Ανοσοαποτύπωση σε φιλμ με αντίσωμα για τον p65

Well	Samples	Ποσότητα δείγματος	1 st Ab	2 nd Ab
W1	Marker	5ul	Anti-H3 A-Rabbit Abcam 1791 1:1.000 1% milk	HRP Goat Anti Rabbit, Invitrogen 656120, 1:10.000 1% milk
W2	Hela SV-	5 ul		
W3	Hela SV+	5ul		
W4	Hela SV- -	5ul		
W5	Hela SV++	4 ul		
14% gel, 50 min transfer, 50 min blocking 5% milk.				

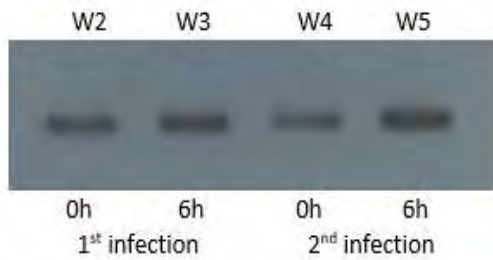


Figure 4: Ανοσοαποτύπωση σε φιλμ με αντίσωμα για την H3

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η ποσότητα τόσο του IRF-3 όσο και του NF-κB στον πυρήνα αυξάνεται δραματικά κατά τη δεύτερη ιική μόλυνση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Nurse, Sir Paul.** *The great ideas of biology.* 2003, Clinical Med JRCPL, p. 560-568.
2. **M. Noll.** *Subunit structure of chromatin.* s.l. : Nature, 20 September 1974. PMID: 4422492.
3. **Γαβρύλης, Ηλίας.** Νουκλεόσωμα: Η βασική δομική μονάδα οργάνωσης της χρωματίνης. <http://blogs.sch.gr>. [Ηλεκτρονικό] 16 Νοεμβρίου 2010.
4. **Lewin, Benjamin.** *Genes VIII.* s.l. : PEARSON EDUCATION, 2004, page 931. ISBN: 9789609989596.
5. **Neuwald A.F., Landsman D.** *GCN5-related histone N-acetyltransferases belong to a diverse superfamily that includes the yeast SPT10 protein.* , s.l. : Trends Biochem., 1997, pages 154-155.
6. **Lewis, Benjamin.** *Genes VIII.* s.l. : PEARSON EDUCATION, 2004, pages 858-859. ISBN: 9789609989596.
7. **Spilianakis, Charalampos G., et al,** *Interchromosomal associations between alternatively expressed loci.* 435, s.l. : Nature, 2005, pages 637-645. PMID: 15880101.
8. **Ευτυχία, Αποστόλου.** *Μελέτη της δυναμικής μεταγραφικών συμπλόκων in vivo.* Αθήνα : s.n., 2009.
9. **Isaacs, A Lindenmann, J.** *"Virus interference. I. The interferon".* s.l. : Biol.Sci , September 1957, pages 258-67, Τόμ. 147.
10. **Stark M et al.** *Phosphatidate phosphatase--a key enzyme in glycerolipid biosynthesis. Studies on the yeast enzyme.* J Protein Chem, 1998, pages 1-7.
11. **De Andrea, M, et al.** *The interferon system: an overview.* s.l. : Eur J Paediatr Neurol , 2002, pages: 41-58.
12. **J, Vilcek.** *Novel Interferons.* s.l. : Nat. Immunol, January 2003, pages 8-9.
13. **Lu, YF, et al.** *"Interferon-λ4 is a cell-autonomous type III interferon associated with pre-treatment hepatitis C virus burden."* s.l. : Virology, February 2015, pages 334-40, Τόμ. 476.

14. **Fensterl V, Sen GC.** "*Interferons and viral infections*". s.l. : BioFactors., 2009, pages: 14-20, Τόμ. 35.
15. **De Veer MJ, Holko M, Frevel M, Walker E, Der S, Paranjape JM, Silverman RH, Williams BR .** "*Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays*". s.l. : Journal of leukocyte biology., 2001, pages 912-920, Τόμ. 69.
16. **Takaoka A, Hayakawa S, Yanai H, Stoiber D, Negishi H, Kikuchi H, Sasaki S, Imai K, Shibue T, Honda K, Taniguchi T.** "*Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence*". s.l. : Nature, 2003, pages:516-23, Τόμ. 424.
17. **Maniatis T, Weintraub H.** *Gene expression and differentiation.* s.l. : Curr Opin Genet Dev, 2 Apr 1992, pages: 197-198, Τόμ. 2.
18. **Todd S, Naylor SL .**"*New chromosomal mapping assignments for argininosuccinate synthetase pseudogene 1, interferon-beta 3 gene, and the diazepam binding inhibitor gene*". s.l. : Somat. Cell Mol. Genet. , 1992, pages: 381-5.
19. **Gilmore TD.** "*Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives*", s.l. : Oncogene., Oct 2006. PMID 17072321..
20. **Albensi BC, Mattson MP.** "*Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity*". s.l. : Synapse, February 2000, pages: 151-9. PMID 10611641..
21. **Müller CW, Rey FA, Sodeoka M, Verdine GL, Harrison SC.** "*Structure of the NF-kappa B p50 homodimer bound to DNA*". 373, s.l. : Nature., (January 1995, pages: 311-7. PMID 7830764..
22. **Ghosh S, Gifford AM, Riviere LR, Tempst P, Nolan GP, Baltimore D.** *Cloning of the p50 subunit of NFkB: homology to Rel and dorsal.* s.l. : Cell, 1990, pages: 1019-29, Τόμ. 62.
23. **Gilmore TD.** "*Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives*". s.l. : Oncogene, Oct 2006, pages 6680-4. PMID 17072321..
24. **Gilmore TD.** *NF-kB.* s.l. : Oncogene , 1999, pages 6841-6964, Τόμ. 18.
25. **Jacobs MD, Harrison SC.** "*Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex*" . s.l. : Cell, Dec 1998, pages: 749–58. . PMID 9865693..
26. **AR, Brasier.** "*The NF-kappaB regulatory network*", s.l. : Cardiovascular Toxicology., 2006, pages: 111-30. PMID 17303919..
27. **Israel, Alain.***The IKK Complex, a Central Regulator of NF-kB Activation.* s.l. : Cold Spring Harb Perspect Biol. , 2010 Mar; . doi: 10.1101/cshperspect.a000158.
8. **ND.Perkins.**"*Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function*". s.l. : Nature Reviews Molecular Cell Biology., Jan 2007, pages: 49–62.
29. **Lohoff, M. & Mak, T. W.** *Roles of interferon-regulatory factors in T-helper-cell differentiation.* , s.l. : Nature Rev. Immunol., 2005, pages:125–135.
30. **Miyamoto, M. et al.***Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-β gene regulatory elements* , s.l. : Cell, 1988, pages: 903–913 . This paper reports the discovery of the first IRF-family member, IRF1.

31. **Chen W, Royer W.** *Structural insights into interferon regulatory factor activation.* s.l. : Cell Signal, 2010, pages: 883-887.
32. **Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A. & Tanaka, N.** *IRF family of transcription factors as regulators of host defense,* s.l. : Annu. Rev. Immunol. , 2001, pages: 623-655.
33. **Taniguchi, T. & Takaoka, A.** *A weak signal for strong responses: interferon- α/β revisited.* s.l. : Nature Rev. Mol. Cell Biol, 2001, pages: 378-386.
34. **Janeway, C. A. Jr. & Medzhitov, R.** *Innate immune recognition,* s.l. : Annu. Rev. Immunol. , 2002, pages: 197-216.
35. **Lin R, Heylbroeck C, Genin P, Pitha PM, Hiscott J.** *"Essential Role of Interferon Regulatory Factor 3 in Direct Activation of RANTES Chemokine Transcription".* s.l. : Mol Cell Biol. , Feb 1999. PMID 9891032..
36. **Asli Muvaffak.** *Evaluating TBK1 as a Therapeutic Target in Cancers with Activated IRF3.* s.l. : Mol Cancer Res, 12 Jul 2014. doi:10.1158/1541-7786.
37. **Liu Y, Goulet ML, Sze A, Bel Hadj S, Belgnaoui SM, Lababidi RR, Zheng C, Fritz JH, Olgarnier D, Lin R.** *RIG-I Mediated STING Up-Regulation Restricts HSV-1 Infection.* s.l. : J Virol., 2016 Aug 10. PMID: 27512060.
38. **Luo WW, Li S, Li C, Lian H, Yang Q, Zhong B, Shu HB.** *iRhom2 is essential for innate immunity to DNA viruses by mediating trafficking and stability of the adaptor STING.* s.l. : Nat Immunol., 2016 Sep. doi: 10.1038/ni.3510..
39. **Song S, Lee JJ, Kim HJ, Lee JY, Chang J, Lee KJ.** *Fas-Associated Factor 1 Negatively Regulates the Antiviral Immune Response by Inhibiting Translocation of Interferon Regulatory Factor 3 to the Nucleus.* s.l. : Mol Cell Biol., 2016 Jan 25. doi:10.1128/MCB.00744-15.
40. **Lu G, Reinert JT, Pitha-Rowe I, Okumura A, Kellum M, Knobeloch KP, Hassel B, Pitha PM.** *ISG15 enhances the innate antiviral response by inhibition of IRF-3 degradation.* .s.l. : Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) , 2006.
41. **Zhang L, Pagano JS.** *IRF7, a new interferon regulatory factor associated with Epstein-Barr virus latency.* s.l. : Mol Cell Biol , 1997.
42. **Zhang L, Pagano JS.** *Structure and function of IRF7.* s.l. : Interferon Cytokine Res, 2002.
43. **Honda K, Taniguchi T.** *IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors.* s.l. : Nat Rev Immunol , 2006.
44. **S Ning, J S Pagano, G N Barber.** *IRF7: activation, regulation, modification and function.* s.l. : Genes and Immunity, 14 April 2011. doi:10.1038/gene.2011.21.
45. **Prakash A, Levy DE.** *Regulation of IRF7 through cell type-specific protein stability.* s.l. : Biochem Biophys Res Commun, 2006.
46. **Lin R, Genin P, Mamane Y, Hiscott J.** *Selective DNA binding and association with the CREB binding protein coactivator contribute to differential activation of α/β interferon genes by interferon regulatory factors 3 and 7.* s.l. : Mol Cell Biol , 2000, Tόμ. 20.
47. **Uematsu S, Sato S, Yamamoto M, Hirotani T, Kato H, Takeshita F, Matsuda M, Coban C, Ishii KJ, Kawai T, Takeuchi O, Akira S.** *Interleukin-1 receptor-associated*

kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon- α induction. s.l. : J Exp Med, 2005.

48. **Chen W, Lam SS, Srinath H, Jiang Z, Correia JJ, Schiffer CA et al.** *Insights into interferon regulatory factor activation from the crystal structure of dimeric IRF5.* s.l. : Nat Struct Mol Biol , 2008.

49. **Qin BY, Liu C, Lam SS, Srinath H, Delston R, Correia JJ et al.** *Crystal structure of IRF3 reveals mechanism of autoinhibition and virus-induced phosphoactivation .* s.l. : Nat Struct Mol Biol, 2003.

50. **Guiducci C, Ghirelli C, Marloie-Provost MA, Matray T, Coffman RL, Liu YJ et al.** *PI3K is critical for the nuclear translocation of IRF7 and type I IFN production by human plasmacytoid dendritic cells in response to TLR activation.* s.l. : J Exp Med, 2008.

51. **Thanos D, Maniatis T.** *The high mobility group protein HMG I(Y) is required for NF-kappa B-dependent virus induction of the human IFN-beta gene.* s.l. : Cell. , 1992 Nov 27.

52. **Yie J, Merika M, Munshi N, Chen G, Thanos D.** *The role of HMG I(Y) in the assembly and function of the IFN-beta enhanceosome.* s.l. : EMBO J. , 1999 Jun 1.

53. **Thanos D, Maniatis T.** *Virus induction of human IFN beta gene expression requires the assembly of an enhanceosome.* s.l. : Cell, 1995 Dec 29 .

54. **Yie J, Senger K, Thanos D.** *Mechanism by which the IFN-beta enhanceosome activates transcription .* 96, s.l. : Proc Natl Acad Sci U S A., 1999 Nov 9.

55. **Merika M, Williams AJ, Chen G, Collins T, Thanos D.** *Recruitment of CBP/p300 by the IFN beta enhanceosome is required for synergistic activation of transcription. .* s.l. : Mol Cell. , 1998 Jan.

56. **Cho H, Orphanides G, Sun X, Yang XJ, Ogryzko V, Lees E, Nakatani Y, Reinberg D.** *A human RNA polymerase II complex containing factors that modify chromatin structure.* s.l. : Mol Cell Biol. , 1998 Sep.

57. **Agalioti T, Lomvardas S, Parekh B, Yie J, Maniatis T, Thanos D.** *Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter.* s.l. : Cell., 2000 Nov 10.

58. **Agalioti T, Chen G, Thanos D.** *Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene.* s.l. : Cell., 2002 Nov 1.

59. **Munshi N, Agalioti T, Lomvardas S, Merika M, Chen G, Thanos D.** *Coordination of a transcriptional switch by HMG I(Y) acetylation.* s.l. : Science, 2001 Aug 10.

60. **Senger K, Merika M, Agalioti T, Yie J, Escalante CR, Chen G, Aggarwal AK, Thanos D.** *Gene repression by coactivator repulsion.* s.l. : Mol Cell., 2000 Oct 6.

61. **Munshi N1, Merika M, Yie J, Senger K, Chen G, Thanos D.** *Acetylation of HMG I(Y) by CBP turns off IFN beta expression by disrupting the enhanceosome.* s.l. : Mol Cell, 2 Oct 1998.

62. **Agalioti T, Chen G, Thanos D.** *Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene.* s.l. : Cell., 2002 Nov 1.

63. **Lomvardas, Thanos D.** *Nucleosome sliding via TBP DNA binding in vivo.* s.l. : Cell, 2001 Sep 21.

64. **Jacobson Ladurner et al.** *Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module.* s.l. : Science., 2000 May 26.
65. **A. Kurakin.** *Stochastic cell .* s.l. : IUBMB Life., 2005 Feb.
66. **Shahrezaei V, Swain PS.** *The stochastic nature of biochemical networks.* s.l. : Curr Opin Biotechnol., 2008 Aug 19.
67. **Raser JM, O'Shea EK.** *Noise in gene expression: origins, consequences, and control.* s.l. : Science, 2005 Sep 23.
68. **Pedraza JM, Paulsson J.** *Effects of molecular memory and bursting on fluctuations in gene expression.* s.l. : Science. , 2008 Jan 18.
69. **DA. Hume.** *Probability in transcriptional regulation and its implications for leukocyte differentiation and inducible gene expression.* s.l. : Blood. , 2000 Oct 1.
70. **de Laat W, Grosveld F.** *Inter-chromosomal gene regulation in the mammalian cell nucleus.* s.l. : Curr Opin Genet Dev. , 2007 Oct.
71. **Serizawa S, Miyamichi K, Nakatani H, Suzuki M, Saito M, Yoshihara Y, Sakano H.** *Negative feedback regulation ensures the one receptor-one olfactory neuron rule in mouse.* s.l. : Science. , 2003 Dec 19;.
72. **Fuxa M, Skok JA.** *Transcriptional regulation in early B cell development.* s.l. : Curr Opin Immunol., 2007 Apr.
73. **Kmita M, Fraudeau N, Héroult Y, Duboule D.** *Serial deletions and duplications suggest a mechanism for the collinearity of Hoxd genes in limbs.* s.l. : Nature., 2002 Nov 14.
74. **Dillon N, Trimborn T, Strouboulis J, Fraser P, Grosveld F.** *The effect of distance on long-range chromatin interactions.* s.l. : Mol Cell. , 1997 Dec.
75. **Zhao et al.** *Circular chromosome conformation capture (4C) uncovers extensive networks of epigenetically regulated intra- and interchromosomal interactions.* s.l. : Nat Genet., 2006 Nov.
76. **Lomvardas S, Barnea G, Pisapia DJ, Mendelsohn M, Kirkland J, Axel R.** *Interchromosomal interactions and olfactory receptor choice.* s.l. : Cell. , 2006 Jul 28.
77. **Gimelbrant A, Hutchinson JN, Thompson BR, Chess A.** *Widespread. Monoallelic expression on human autosomes.* s.l. : Science. , 2007 Nov 16.
78. **Yang PK, Kuroda MI.** *Noncoding RNAs and intranuclear positioning in monoallelic gene expression.* s.l. : Cell. , 2007 Feb 23.
79. **ThermoFisher.** Glutamax vs Glutamine. www.thermofisher.com.
80. **ThermoFisher.** Useful Numbers for Cell Culture, www.thermofisher.com.
81. **Rodriguez J, Gupta N, Smith RD, Pevzner PA .** *"Does trypsin cut before proline?"* J. Proteome Res., 2008. PMID 18067249.
82. *"Sequencing Grade Modified Trypsin"*. www.promega.com. 2009-02-08.
83. **Huang, H. L., et al.** *"Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells.* s.l. : Journal of Biomedical Science , 2010, Tόμ. 17. PMID: 20459778.

84. Θανάσης Βαλαβανίδης, Καθηγητής - Κωνσταντίνος Ευσταθίου, Καθηγητής. Η χημική ένωση του μήνα. Διμεθλοσουλφοξείδιο (DMSO). Φεβρουάριος 2011. http://195.134.76.37/chemicals/chem_DMSO.htm.

85. Theodore I. Malinin, Vernon P. Perry. *Toxicity of dimethyl sulfoxide on HeLa cells* . Maryland USA , 7 October 2006. doi: 10.1016/S0011-2240(67)80216-5.

86. *Electrophoresis for western blot*, Abcam. <http://www.abcam.com>.

87. *How SDS-PAGE works*. Bitesizebio. <http://bitesizebio.com>.