

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

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

**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
«ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ-ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗ»**

Εργασία μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσης

***Μελέτη της χρωματινικής δομής του γενετικού τόπου
MHC τάξης II και ταυτοποίηση της γονιδιακής
σήμανσής του κατά τη μίτωση.***

Επιμέλεια: Αραμπατζή Παναγιώτα

Υπεύθυνος καθηγητής: Παπαματθαϊάκης Ιωσήφ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2006



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**



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

Οι εξεταστές της εργασίας:

- 1. Πάπαματθαϊάκης Ιωσήφ*
- 2. Κρετσόβαλη Ανδρονίκη*

Η εργασία αυτή είναι αφιερωμένη...

*...σε δύο καταπληκτικούς ανθρώπους που με στήριξαν
στη ζωή μου όσο κανένας άλλος, σε χαρές και λύπες,
ήταν πάντα κοντά μου όσο μακριά τους και αν
βρισκόμουνα, στη μητέρα μου και στον αδερφό μου!*

*...σε έναν άνθρωπο που έφυγε πολύ νωρίς από κοντά
μου και ποτέ δεν έμαθε ποια σχολή με «κέρδισε» τελικά,
αλλά που θα έχω πάντοτε φυλαγμένο στη καρδιά μου,
στον μόλις 6 χρόνια απόντα από τη ζωή πατέρα μου!*

Λίγα λόγια...

Συνήθως αυτή είναι μια σελίδα γεμάτη από τυπικές ευχαριστίες χωρίς ιδιαίτερο νόημα και ουσία, απλά για να ειπωθούν. Δεν ξέρω πώς να εκφράσω την αγάπη μου σ' αυτούς τους ανθρώπους που με στήριξαν τόσο πολύ κατά τη διάρκεια αυτού του μεταπτυχιακού χωρίς να γίνω τυπική και βαρετή. Αξιζουν όμως μια προσπάθεια...

Πρώτον από όλους νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω τον κύριο Παπαματθαϊάκη, το "boss" όπως τον αποκαλούμε συνήθως. Χωρίς αυτόν όχι μόνο αυτή η εργασία δεν θα υπήρχε αλλά και η αντίληψη μου για την επιστήμη της Βιολογίας θα ήταν εντελώς διαφορετική. Πίστεψε σε μένα όσο ελάχιστοι άνθρωποι και ελπίζω μόνο να μην του απογοήτευσα...

Σειρά έχει η Νίκη... ενδιαφέρθηκε για μένα από την πρώτη στιγμή και με ενθάρρυνε καθημερινά, όταν με απογοήτευαν τα δύσκολα πειράματα. Οι συμβουλές της ήταν πολύτιμες και καθοριστικές για τη δουλειά μου και την ευχαριστώ γι' αυτό...

Ότι και να πω για τον Τάκη θα είναι λίγο... είναι ο άνθρωπος για όλες τις δουλειές, με αστείρευτη υπομονή (...που πρώτη φορά βλέπω σε άνθρωπο) χωρίς αυτόν δεν ξέρω αν θα «επιβιώναμε» εκεί μέσα... Σ' ευχαριστώ Τακούλη μου για όλα...

Ο Μανόλης λοιπόν... στο εργαστήριο ο Μανόλης σήμαινε τα πάντα για μένα, δάσκαλος, βοηθός, παράδειγμα (...προς μίμηση φυσικά) και προ πάντων ένας καλός φίλος... Σ' ευχαριστώ για ότι μου έχεις προσφέρει έτσι απλόχερα...

Εφάκι...δεν σε ξέχασα βρε... ήσουνα μια καλή φίλη, πρόθυμη να με βοηθήσεις σε όλα και ελπίζω να παραμείνεις...

Η Φοίβη αποτελεί το πνεύμα αντιλογίας στο εργαστήριο... αλλά χωρίς τις εκπαιδευτικές τις ικανότητες θα είχα μαύρα μεσάνυχτα ακόμα...

Ο Γιώργος τώρα... αποτελεί το δεξί μας χέρι στα κύτταρα...χωρίς τις συμβουλές του επί του θέματος λίγα κύτταρα θα είχαν επιβιώσει στα χέρια μου...

Όσον αφορά τους μικρότερους δεν πρέπει να ξεχάσω τη Μαρίλια και τη Χριστίνα που ξεκινούν τώρα το master τους... Καλή τύχη κορίτσια...

Έχουν περάσει τόσοι πολλοί από το εργαστήριο τον ενάμιση χρόνο που είμαι εκεί και δεν θέλω να τους αναφέρω γιατί θα ξεχάσω πολλούς... Καλή τύχη παιδιά σε ότι κάνετε...

Τέλος, θα ήταν μεγάλη αδικία να μην αναφερθώ σε δύο ακόμα άτομα (...που δεν έχουν σχέση με το εργαστήριο) τον Γιάννη για την κατανόηση και την υπομονή του προς το πρόσωπο μου και τη Δήμητρα για τη φιλία της...

Χαίρομαι πολύ που αν και νιώθω την ανάγκη να γράψω αυτά τα λόγια δεν είμαι αναγκασμένη να σας αποχαιρετήσω... Είστε για μένα η δεύτερη μου οικογένεια και θα σας αγαπάω ότι και αν γίνει...

Σας ευχαριστώ παιδιά...

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	σελ. 7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	σελ. 8
1.1. Το Κύριο Σύμπλοκο Ιστοσυμβατότητας (ΚΣΙ)	σελ. 9
1.2. Το σύνδρομο των γυμνών λεμφοκυττάρων (<i>Bare Lymphocyte Syndrome, BLS</i>)	σελ. 11
1.3. Η ρύθμιση της μεταγραφής των τάξης II γονιδίων	σελ. 13
1.3.1. Τα ρυθμιστικά στοιχεία των τάξης II γονιδίων	σελ. 13
1.3.2. Οι μεταγραφικοί παράγοντες που προσδένονται στα ρυθμιστικά στοιχεία των τάξης II γονιδίων	σελ. 14
1.3.3. Ο κύριος ρυθμιστής των τάξης II, CIIA (<i>Class II Transactivator</i>)	σελ. 15
1.3.4. Η ενεργοποίηση της μεταγραφής από τον CIIA	σελ. 16
1.4. Σήμανση των γονιδίων κατά τη μίτωση	σελ. 18
1.5. Μηχανισμοί γονιδιακής σήμανσης κατά τη μίτωση	σελ. 19
1.5.1. Σήμανση του γονιδίου μέσω της τροποποίησης των ιστονών	σελ. 19
1.5.2. Σήμανση του γονιδίου με διαφορετικό τύπο ιστονών	σελ. 19
1.5.3. Σήμανση του γονιδίου από τη πρόσδεση ενός γενικού μεταγραφικού παράγοντα	σελ. 20
1.5.4. Σήμανση του γονιδίου από τη πρόσδεση ενός ειδικού μεταγραφικού παράγοντα	σελ. 20
Σκοπός της εργασίας	σελ. 22
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	σελ. 23
2.1. ΥΛΙΚΑ	σελ. 24
2.1.1. Αντιδραστήρια και υλικά	σελ. 24
2.1.2. Κυτταρικές σειρές	σελ. 24
2.1.3. Στελέχη βακτηρίων	σελ. 25
2.1.4. Θρεπτικά μέσα	σελ. 25
2.1.5. Αντισώματα	σελ. 25
2.1.6. Ολιγονουκλεοτίδια	σελ. 26
2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ	σελ. 27
2.2.1. Πέψη πλασμιδιακού DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	σελ. 27
2.2.2. Αντίδραση σύνδεσης γραμμικών μορίων	σελ. 27
2.2.3. Παρασκευή δεκτικών κυττάρων <i>Escherichia coli</i> για μετασχηματισμό με θερμικό σοκ (<i>Competent E.coli cells</i>)	σελ. 27
2.2.4. Μετασχηματισμός <i>E.coli</i> κυττάρων με θερμικό σοκ (<i>Transformation</i>)	σελ. 27
2.2.5. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες μετασχηματισμένων βακτηρίων	σελ. 28

2.2.6. Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός γραμμικών μορίων DNA	σελ.28
2.2.7. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR: <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)	σελ.29
2.2.8. Μελέτη πρόσβασης της χρωματίνης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες (Restriction endonuclease accessibility assay)	σελ.30
2.2.9. Παρασκευή νουκλεοσωμάτων με Μικροκοκκική νουκλεάση (MNase)	σελ.30
2.2.10. Υβριδοποίηση ολιγονουκλεοτιδίων	σελ.31
2.2.11. Αντίδραση Πολυνουκλεοτιδικής κινάσης T ₄	σελ.31
2.2.12. Αλληλούχηση DNA	σελ.32
2.2.13. Παρασκευή πηκτώματος αλληλούχησης	σελ.32
2.2.14. Συγχρονισμός κυτταρικής καλλιέργειας B λεμφοκυττάρων	σελ.32
2.2.15. Κυτταρομετρία ροής (FACS, <u>F</u> luorescence- <u>A</u> ctivated <u>C</u> ell <u>S</u> orting)	σελ.33
2.2.16. Παρασκευή χρωματίνης	σελ.33
2.2.17. Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation, CHIP)	σελ.33
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	σελ.35
3.1. Η υπερευαισθησία του HLA-DRA υποκινητή είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του ενζύμου στη κυτταρική σειρά Raji	σελ.36
3.2. Σύγκριση της υπερευαισθησίας του HLA-DRA υποκινητή στις κυτταρικές σειρές Raji και RJ2.2.5	σελ.37
3.3. Σύγκριση της υπερευαισθησίας του HLA-DRA υποκινητή στις κυτταρικές σειρές SJO και SJO R	σελ.38
3.4. Χαρτογράφηση του νουκλεοσώματος στην περιοχή του HLA-DRA υποκινητή στις κυτταρικές σειρές Raji και SJO	σελ.39
3.5. Σήμανση των τάξης II γονιδίων κατά τη μίτωση από τους βασικούς παράγοντες του ενισχυοσώματος RFX5 και NFYB	σελ.41
3.6. Σήμανση των τάξης II γονιδίων κατά τη μίτωση από τον παράγοντα CREB και τον κύριο ρυθμιστή τους τον CHTA	σελ.43
3.7. Διατήρηση των ενεργοποιητικών τροποποιήσεων των ιστονών των τάξης II γονιδίων κατά τη μίτωση	σελ.44
3.8. Μεταγραφική ενεργότητα των τάξης II γονιδίων κατά τη μίτωση	σελ.45
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	σελ.46
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	σελ.49

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο γενετικός τόπος των τάξης II γονιδίων είναι διεξοδικά μελετημένος όσον αφορά τη ρύθμιση της μεταγραφής του αλλά και τη λειτουργία του κυρίως στα κύτταρα των θηλαστικών. Λίγα όμως είναι γνωστά για τη χρωματινική δομή της περιοχής αυτής και γενικότερα για τη διαμόρφωση της χρωματίνης στον χώρο. Γενικά, η χρωματινική δομή των ενεργών μεταγραφικά γονιδίων έχει μια πιο ανοιχτή αρχιτεκτονική σε αντίθεση με τα γονίδια που δεν εκφράζονται. Η μελέτη της πρόσβασης της χρωματίνης στον υποκινητή του HLA-DRA γονιδίου με τη τεχνική της υπερευαισθησίας της χρωματίνης σε περιοριστικές ενδονουκλεάσες έδειξε διαφορετικό βαθμό πρόσβασης της περιοχής αυτής στις διαφορετικές B λεμφοκυτταρικές σειρές Raji, RJ2.2.5, SJO και SJO R. Παρ' όλα αυτά η χαρτογράφηση του νουκλεοσώματος στη περιοχή αυτή δεν έδειξε μετατόπιση του νουκλεοσώματος στις κυτταρικές σειρές Raji και SJO αν και η πρόσβαση της χρωματίνης διαφέρει. Ακόμη, μελετήθηκε η σήμανση των τάξης II γονιδίων κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και κυρίως κατά τη μίτωση. Παρατηρήθηκε η παρουσία του ενισχυοσώματος στον υποκινητή του γονιδίου καθώς και η διατήρηση των ενεργοποιητικών τροποποιήσεων των ιστονών. Τέλος, διαπιστώθηκε η παρουσία της βασικής μεταγραφικής μηχανής στη περιοχή αυτή που υποστηρίζει την θεωρία της ύπαρξης της μεταγραφής κατά τη μίτωση.

ABSTRACT

The class II cluster is a well studied locus in terms of its transcriptional regulation and function mainly in mammalian cells. Little is known about its chromatin structure and generally about the chromatin conformation in space. In general, the chromatin structure of transcriptionally active genes has an open architecture in contrast with genes that do not expressed. The study of chromatin accessibility in the promoter of HLA-DRA gene with the restriction endonuclease hypersensitivity assay shows differential access in this locus among the different lymphatic B cell lines Raji, RJ2.2.5, SJO and SJO R. Despite this data the nucleosome mapping in this region did not show any movement of the nucleosome neither in Raji cell line nor in SJO cell line in spite of the differential chromatin accessibility. In addition, we studied the bookmarking of class II genes during the cell cycle and mainly during mitosis. We observed the presence of the enhanceosome on the promoter of the gene and also the maintenance of the histone modifications that marks transcriptionally active genes. Finally, it is shown the presence of the general transcription machine in this region which supports the theory of the existence of transcription during mitosis.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

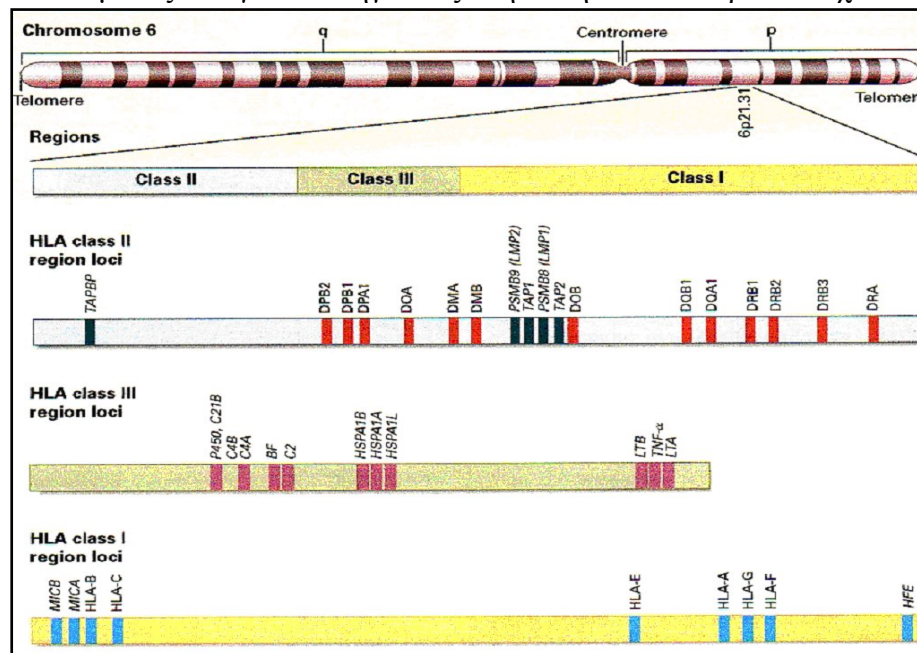
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΤΟ ΚΥΡΙΟ ΣΥΜΠΛΟΚΟ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ (ΚΣΙ)

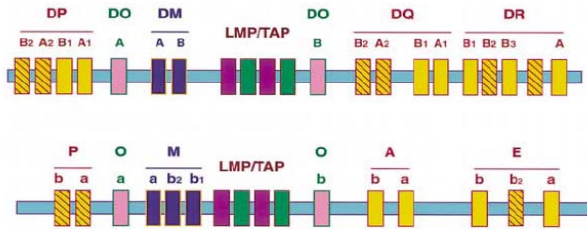
Το Κύριο Σύμπλοκο Ιστοσυμβατότητας, ΚΣΙ (ή Major Histocompatibility Complex, MHC) ανακαλύφθηκε μόλις τη δεκαετία του '30 (Gorer, 1936) και αποτελείται από μία πολυπληθέστατη οικογένεια γονιδίων που παίζει πρωτεύον ρόλο στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος των σπονδυλωτών. Στον ποντικό ονομάζεται γενετικός τόπος H2 (H2 locus) ενώ στον άνθρωπο HLA (Human Leukocyte Antigens), διότι πρωτοανακαλύφθηκε στα λευκά αιμοσφαίρια. Στον ανθρώπινο πληθυσμό υπάρχουν πολλά αλληλόμορφα αυτών των γονιδίων, γι' αυτό ο γενετικός τόπος ονομάζεται πολυμορφικός. Εκτείνεται σε μια μεγάλη περιοχή, 3,6 Mb, του χρωμοσώματος 6 στον άνθρωπο ενώ με την ανακάλυψη και άλλων ΚΣΙ-σχετιζόμενων γονιδίων η έκταση αυτή έφτασε τα 7,6Mb (Horton et al., 2004). Το ΚΣΙ χωρίζεται σε τρεις μεγάλες περιοχές γονιδίων με βάση τις ανοσολογικές τους ιδιότητες, οι οποίες ονομάζονται (από το τελομερές προς το κεντρομερές) τάξης I, τάξης III και τάξης II (εικόνα 1).

Η περιοχή των τάξης I γονιδίων περιέχει τα «κλασσικά» ή τάξης Ia γονίδια A, B και C και τα «μη κλασσικά» ή τάξης Ib γονίδια E, F, G, H, J κλπ. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν ετεροδιμερής πρωτεΐνες που διαμεσολαβούν στην παρουσίαση ιικών αντιγόνων. Ονομάζονται και αντιγόνα μεταμόσχευσης διότι ευθύνονται για την απόρριψη του ξένου ιστού, ο οποίος αναγνωρίζεται ως ξένος βάσει του συνδυασμού όλων των αντιγόνων τάξης I που φέρει. Η έκφραση τους είναι συστατική σε όλα τα εμπύρνα κύτταρα του οργανισμού και μπορεί να αυξηθεί με την επίδραση διαφόρων κυτοκινών, όπως η IFN- γ .

Η περιοχή των τάξης III περιέχει γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του συμπληρώματος (C2 και C4, factor B), καθώς και μέλη της οικογένειας hsp70, τον TNF και άλλα. Οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος στην χυμική ανοσία αλληλεπιδρούν με τα σύμπλοκα αντισώματος-αντιγόνου οδηγώντας στη λύση των κυττάρων-στόχων.



Εικόνα (1). Χάρτης της περιοχής HLA στο χρωμόσωμα 6p21 και των τριών υποπεριοχών στις οποίες χωρίζεται (Klein and Sato, 2000).



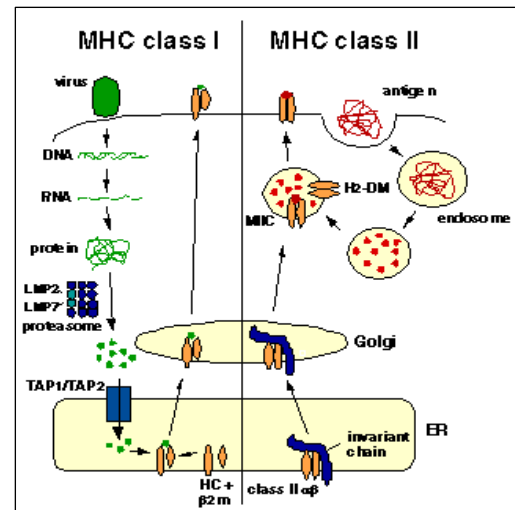
Εικόνα (2). Σχηματική απεικόνιση των περιοχών τάξης II στον άνθρωπο και το ποντίκι (Ting and Trowsdale, 2002).

Η περιοχή τάξης II περιέχει τα «κλασσικά» γονίδια DP, DQ και DR, τα «μη κλασσικά» γονίδια DM και DO που βοηθούν στην πρόσδεση των πεπτιδίων στα «κλασσικά» μόρια, καθώς επίσης και γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην επεξεργασία των αντιγόνων, όπως οι πρωτεΐνες LMP και TAP. Η οργάνωση της περιοχής των τάξης II στον άνθρωπο είναι όμοια με αυτή στον ποντικό (εικόνα 2). Τα

τάξης II γονίδια, σε αντίθεση με τα τάξης I εκφράζονται συστατικά μόνο σε εξειδικευμένα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα Β-λεμφοκύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα, τα μακροφάγα, τα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα, τα κύτταρα Langerhans του δέρματος, κύτταρα Kupfer του συκωτιού καθώς και τα ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα. Ακόμη είναι δυνατή η επαγωγή τους και σε άλλους κυτταρικούς τύπους με τη βοήθεια κυτοκινών, όπως της IFN- γ (Barrachina et al., 1999). Τα τάξης II γονίδια είναι υπεύθυνα για την παρουσίαση πεπτιδίων που προέρχονται από εξωγενή παθογόνα στους υποδοχείς των CD4⁺ Τ-λεμφοκυττάρων.

Όλα τα γονίδια του ΚΣΙ κωδικοποιούν ετεροδιμερές πρωτεΐνες που εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη με το μεγαλύτερο μέρος να εξέρχεται προς την εξωκυτταρική πλευρά. Τα αντιγόνα τάξης II αποτελούνται από δύο αλυσίδες, τις α και β , ο συνδυασμός των οποίων παράγει μια ολοκληρωμένη δομή με δύο εξωκυτταρικές επικράτειες. Ενώ όλα τα τάξης II αντιγόνα αποτελούνται από την ίδια αλυσίδα τάξης I και τη β 2-μικροσφαιρίνη.

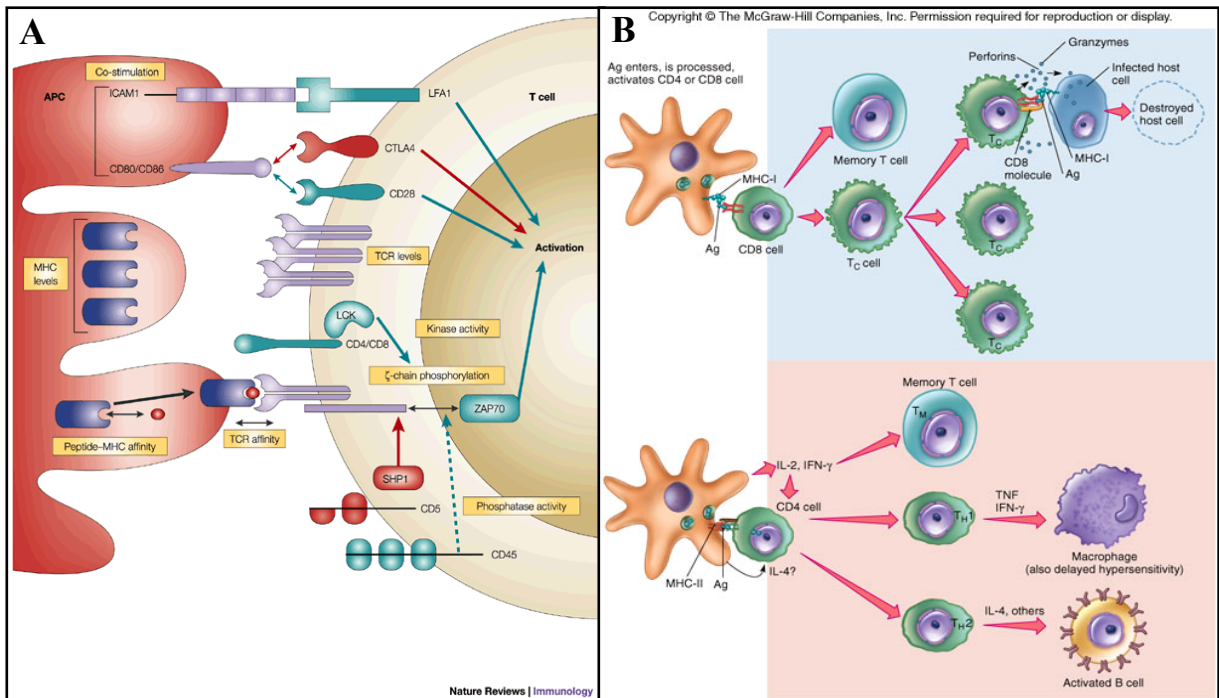
Ο φυσιολογικός ρόλος του ΚΣΙ είναι να δεσμεύει πρωτεϊνικά τμήματα των διαφόρων αντιγόνων και να τα εκθέτει στα Τ-λεμφοκύτταρα. Τα τμήματα των αντιγόνων προκύπτουν μετά από ενδοκυτταρική πέψη, με διαφορετικό τρόπο στις δύο τάξεις. Στα τάξης I αντιγόνα, τα τμήματα προκύπτουν από ιούς ή άλλα ενδοκυτταρικά παράσιτα, καθώς και τις πρωτεΐνες του ίδιου του κυττάρου, οι οποίες πέπτονται, εισέρχονται στο ER, συνδέονται με τα τάξης I μόρια και μεταφέρονται στην επιφάνεια του κυττάρου. Στα τάξης II αντιγόνα τα τμήματα προκύπτουν από ενδοκυττάρωση στα λευκοκύτταρα των ξένων πρωτεϊνών. Γίνεται πρωτεόλυση τους στα λυσοσώματα, κατόπιν συντήκονται με τα μεταφορικά κυστίδια, που περιέχουν τα τάξης II μόρια και μεταφέρονται στην επιφάνεια (εικόνα 3).



Εικόνα (3) Σύγκριση των μονοπατιών αντιγονοπαρουσίασης των τάξης I και τάξης II αντιγόνων.

Μετά την μεταφορά των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας στη κυτταροπλασματική μεμβράνη των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων είναι έτοιμα για την αλληλεπίδραση

των μορίων αυτών με τον υποδοχέα των T λεμφοκυττάρων. Η αλληλεπίδραση των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων με τα T λεμφοκύτταρα δεν είναι και τόσο απλή διότι εμπλέκονται πολλοί συνυποδοχείς και μόρια που υποβοηθούν τη σύνδεση αυτή (εικόνα 4A). Τα τάξης I αντιγόνα ενεργοποιούν τα CD8⁺ T λεμφοκύτταρα τα οποία γίνονται είτε κυτταροτοξικά είτε T κύτταρα μνήμης. Τα τάξης II αντιγόνα ενεργοποιούν τον υποδοχέα των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων και αυτά με τη σειρά τους εκκρίνοντας τις κατάλληλες κυτοκίνες ενεργοποιούν τα B λεμφοκύτταρα, τα μακροφάγα ή γίνονται T κύτταρα μνήμης (εικόνα 4B). Τέλος, αυτά τα T λεμφοκύτταρα πριν βγουν από τον θύμο στην κυκλοφορία υφίστανται εκτεταμένο έλεγχο και επιλέγονται μόνο αυτά με τους λειτουργικούς υποδοχείς. Και σ' αυτή τη επιλογή των T λεμφοκυττάρων παίζουν σημαντικό ρόλο τα γονίδια ιστοσυμβατότητας.



Εικόνα (4). Α) Πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων με τα T λεμφοκύτταρα. Β) Τα μονοπάτια που ακολουθούν την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων από τα τάξης I (μπλέ) και από τα τάξης II (ροζ).

1.2. ΤΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΤΩΝ ΓΥΜΝΩΝ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ (BARE LYMPHOCYTE SYNDROME, BLS)

Το σύνδρομο των γυμνών λεμφοκυττάρων (BLS) είναι μια σπάνια κληρονομική ανοσολογική ανεπάρκεια, με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο κληρονόμησης. Οφείλεται στην έλλειψη της έκφρασης των MHC τάξης II γονιδίων τα οποία κατέχουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την ενεργοποίηση των CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων. Η έλλειψη των τάξης II γονιδίων έχει ως αποτέλεσμα σοβαρή ανεπάρκεια της κυτταρικής και της χυμικής ανοσίας και οι ασθενείς είναι επιρρεπείς σε ιικές και βακτηριακές λοιμώξεις αλλά και σε λοιμώξεις από μύκητες και πρωτόζωα (Elhasid and Etzioni, 1996). Τα κλινικά χαρακτηριστικά της ασθένειας περιλαμβάνουν κυρίως λοιμώξεις της

γαστρεντερικής οδού, πνευμονία, βρογχίτιδα, σε προχωρημένα στάδια σηψαιμία αλλά και θάνατο σε πολύ μικρή ηλικία. Η ασθένεια αυτή αποτελεί ένα μοναδικό μοντέλο μελέτης της γονιδιακής ρύθμισης των τάξης II γονιδίων διότι προκαλείται από μεταλλάξεις των βασικών ρυθμιστών της έκφρασής τους.

Στην BLS, η συστατική αλλά και η επαγόμενη έκφραση των τάξης II αντιγόνων καταργείται με αποτέλεσμα την έλλειψη των επιφανειακών τάξης II μορίων από όλα τα ειδικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα αλλά και από κύτταρα που δεν προέρχονται από τον μυελό των οστών, όπως τα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Το ίδιο συμβαίνει και μετά από επαγωγή με κυτοκίνες όπως IFN- γ (Elhasid and Etzioni, 1996).

Ο συνολικός αριθμός των T και B λεμφοκυττάρων που κυκλοφορούν στο αίμα είναι φυσιολογικός αλλά ο αριθμός των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων είναι σημαντικά μειωμένος. Η μείωση αυτή ποικίλει από ασθενή σε ασθενή. Τα ελάχιστα CD4⁺ T λεμφοκύτταρα δεν φαίνεται να έχουν ιδιαίτερες ανωμαλίες στο ρεπερτόριο του TCR υποδοχέα τους και δρουν φυσιολογικά. Η παρουσία αυτών των T λεμφοκυττάρων σε ασθενείς που δεν μπορούν να εκφράσουν τάξης II γονίδια παραμένει ένα παράδοξο εφόσον δεν έχουν ακόμα ταυτοποιηθεί εναλλακτικοί τρόποι θετικής επιλογής των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων ή κάποια υποτυπώδη έκφραση των τάξης II γονιδίων στον θύμο (Reith and Mach, 2001).

Χαρτογράφηση του γενετικού τόπου που προκαλεί το σύνδρομο των γυμνών λεμφοκυττάρων δεν δίνει την περιοχή 6q21 όπου βρίσκονται τα τάξης II γονίδια αλλά περιοχές σε τέσσερα διαφορετικά χρωμοσώματα, το 1, 13, 16 και 19. Έτσι, διαπιστώθηκε ότι οι μεταλλάξεις που προκαλούν τη νόσο δεν γίνονται στο γενετικό τόπο των τάξης II γονιδίων αλλά σε τέσσερις διαφορετικούς γενετικούς τόπους που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες απαραίτητους για την έκφραση των τάξης II γονιδίων. Η γενετική αυτή ετερογένεια της νόσου κατατάσσει τους ασθενείς σε τέσσερις ομάδες συμπληρωματικότητας A-D (πίνακας 1). Ακόμη πολλές κυτταρικές σειρές με έλλειψη έκφρασης των τάξης II γονιδίων προέκυψαν από τις ομάδες αυτές και αποτελούν σήμερα χρήσιμα εργαλεία για την πειραματική μελέτη των γονιδίων αυτών.

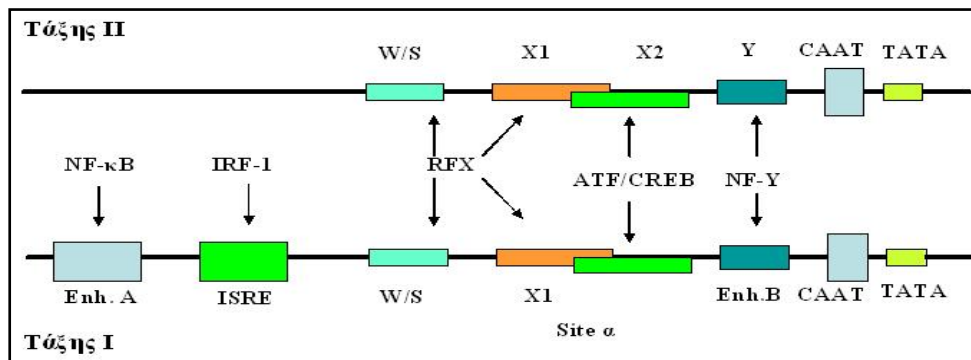
Ομάδα συμπληρωματικότητας BLS	A	B	C	D
Πρωτότυπη κυτταρική σειρά από ασθενείς	BLS-2, BCH	BLS-1, Ra	SJO, Ro	DA, ABI
Πρωτότυπο in vitro μετάλλαγμα	RJ2.2.5	Κανένα	G1B	6.1.6
Έκφραση MHC τάξης II	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
Ενεργότητα υποκινητή των MHC τάξης II	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
Πρόσδεση του RFX συμπλόκου	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι
Κάλυψη υποκινητή in vivo	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι
Υπεύθυνο γονίδιο για τη νόσο	<i>MHC2TA</i>	<i>RFXANK</i>	<i>RFX5</i>	<i>RFXAP</i>
Χρωμοσωμική θέση	16p13	19p12	1q21.1-21.3	13q14
Πρωτεΐνη	CIITA	RFXANK	RFX5	RFXAP
Μήκος πρωτεϊνών (σε αμινοξέα)	1130	269	616	272
Μοριακό βάρος πρωτεϊνών	130 kD	33 kD	75 kD	36 kD
Αριθμός μεταλλαγών στην BLS	5	7	5	3

Πίνακας 1. Γενετική, βιοχημική και μοριακή ετερογένεια στην BLS.

1.3. Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ ΤΩΝ ΤΑΞΗΣ II ΓΟΝΙΔΙΩΝ

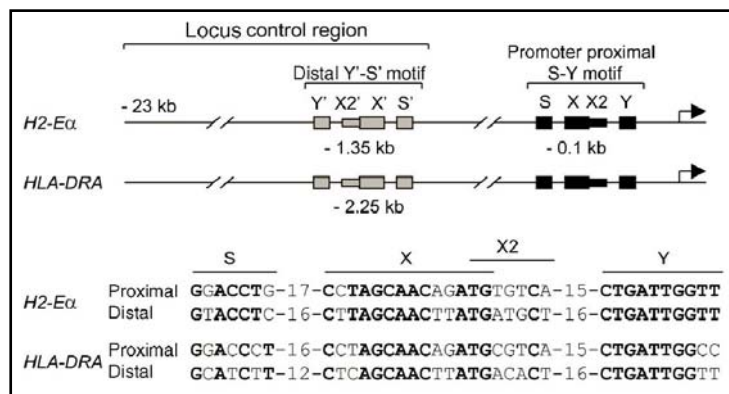
1.3.1. Τα ρυθμιστικά στοιχεία των τάξης II γονιδίων

Η έκφραση των γονιδίων της περιοχής τάξης II ρυθμίζεται μεταγραφικά μέσω μιας συντηρημένης ρυθμιστικής περιοχής που είναι τοποθετημένη μέσα στις 150-300 bp πάνω από τη θέση έναρξης της μεταγραφής κάθε τάξης II γονιδίου. Η περιοχή αυτή του υποκινητή περιέχει τέσσερα ρυθμιστικά κουτιά, το W/S, το X, το X2 και το Y κουτί. Τα κουτιά αυτά είναι πολύ καλά συντηρημένα όσον αφορά την κατεύθυνση αλλά και τα διαστήματα τους ώστε να λειτουργούν σαν μια ρυθμιστική μονάδα. Τα τάξης I γονίδια έχουν αρκετά όμοια ρυθμιστικά στοιχεία με τα τάξης II, έχοντας επιπλέον και ISRE (interferon regulatory response element) και θέσεις πρόσδεσης του NF-κB που τους παρέχει τη συστατική τους έκφραση (van den Elsen et al., 1998), (εικόνα 5).



Εικόνα (5). Συγκριτική απεικόνιση των ρυθμιστικών στοιχείων στους υποκινητές των τάξης II και των τάξης I γονιδίων.

Πρόσφατα ανακαλύφθηκαν και άλλα λειτουργικά στοιχεία στους υποκινητές των τάξης II γονιδίων που βρίσκονται περίπου 2.3 Kb από τη θέση έναρξης της μεταγραφής (Masternak et al., 2003). Τα στοιχεία αυτά είναι πανομοιότυπα με αυτά του υποκινητή αλλά είναι ανεστραμμένα (συμβολίζονται ως S', X', X2' και Y'). Η περιοχή αυτή λειτουργεί ως LCR (Locus Control Region) και υπάρχει επίσης και στον ποντικό με μεγάλη ομολογία (εικόνα 6). Σχηματίζεται και σε αυτή τη περιοχή ενισχύσωμα προκαλώντας υπερακετυλίωση της περιοχής, στρατολόγηση της μεταγραφικής μηχανής και παραγωγή έκτοπων μεταγράφων προκειμένου να εξασφαλιστεί μια ανοιχτή κατάσταση χρωματίνης.



Εικόνα (6). Συγκριτική απεικόνιση του LCR στον άνθρωπο και στον ποντικό (Masternak et al., 2003).

1.3.2. Οι μεταγραφικοί παράγοντες που προσδένονται στα ρυθμιστικά στοιχεία των τάξης II γονιδίων

Τα ρυθμιστικά στοιχεία των υποκινητών των τάξης II καλύπτονται διαρκώς από τους μεταγραφικούς παράγοντες που τα αναγνωρίζουν σε όλους τους κυτταρικούς τύπους. Τρεις από τις τέσσερις πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν από το σύνδρομο των γυμνών λεμφοκυττάρων και αποτελούν τις ομάδες συμπληρωματικότητας B, C και D συνιστούν το RFX σύμπλοκο (RFXANK, RFX5 και RFXAP). Είναι ένα τριμερές σύμπλοκο που συνδέεται στο X1 κουτί, που αποτελεί τμήμα του X κουτιού στους υποκινητές των τάξης II γονιδίων. Είναι μέλη της ίδιας οικογένειας με κοινό χαρακτηριστικό την RFX περιοχή πρόσδεσης στο DNA (Emery et al., 1996). Το RFX σύμπλοκο φαίνεται να αλληλεπιδρά με το NFY σύμπλοκο μέσω του RFX5 (Reith and Mach, 2001), αλλά και με τον CIITA μέσω επαναλήψεων αγκυρίνης που υπάρχουν στον RFXANK.

Ένα άλλο σύμπλοκο, το X2BP-CREB σύμπλοκο συνδέεται στο X2 κουτί που αποτελεί το δεύτερο τμήμα του X κουτιού. Η πρωτεΐνη CREB συνδέεται σε αλληλουχίες απόκρισης σε cAMP (cAMP responsive elements, CRE). Επίσης, η CREB αλληλεπιδρά με τον CIITA και το RFX σύμπλοκο. Ακόμη στο X2 κουτί συνδέεται και η πρωτεΐνη X2BP (X2 binding protein) η οποία ανήκει επίσης στην οικογένεια ATF/CREB. Το RFX σύμπλοκο και το X2BP-CREB σύμπλοκο συνδέονται στο X κουτί συνεργατικά (Reith et al., 1994a).

Στη συνέχεια στο Y κουτί συνδέεται ένα τρίτο σύμπλοκο, το τριμερές NF-Y σύμπλοκο (NF-YA, NF-YB και NF-YC). Το Y κουτί είναι ένα ανεστραμμένο CCAAT κουτί χαρακτηριστικό για τη πρόσδεση του NFY, μορίου που είναι συντηρημένο από τον σακχαρομύκητα ως τον άνθρωπο (Mantovani, 1999). Η πρόσδεση του NFY συμπλόκου γίνεται συνεργατικά με το RFX σύμπλοκο μέσω του RFX5 μορίου (Reith et al., 1994b).

Τέλος, υπάρχει και το S κουτί που βρίσκεται μόλις 16bp από το X κουτί. Δεν είναι ακόμα γνωστό αν συνδέεται κάποιος παράγοντας στο κουτί αυτό, αν και προτάθηκε από μια ομάδα επιστημών ότι προσδένεται και εκεί το σύμπλοκο RFX. Δεν είναι ξεκάθαρη ακόμα η λειτουργία του αλλά φαίνεται να είναι απαραίτητη η συγκεκριμένη θέση του από το X κουτί ενώ μετατόπιση του 1-2 bp είναι καταστροφική για την στρατολόγηση του CIITA και την ενεργότητα του υποκινητή (Muhlethaler-Mottet et al., 2004).

Όλοι οι παραπάνω μεταγραφικοί παράγοντες δρουν συνεργατικά για την δημιουργία μια ανώτερης δομής ενός νουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου που σχηματίζεται στους υποκινητές των τάξης II γονιδίων και πρόσφατα χαρακτηρίστηκε ως ενισχυόσωμα των τάξης II γονιδίων (Masternak et al., 2000). Πυρήνας αυτού του νουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου φαίνεται να είναι το RFX σύμπλοκο και είναι απαραίτητο για τη σταθεροποίηση του ενισχυοσώματος (Reith and Mach, 2001).

Οι παράγοντες του ενισχυοσώματος εκφράζονται συστατικά σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και καταλαμβάνουν τους υποκινητές των τάξης II γονιδίων σχηματίζοντας το ενισχυόσωμα. Ο σχηματισμός αυτός είναι απαραίτητος για τη μεταγραφή, αλλά δεν είναι ικανός να την επάγει από μόνος του αφού ο βασικός ρυθμιστής των τάξης II γονιδίων είναι ο CIITA (Class II Transactivator).

1.3.3. Ο κύριος ρυθμιστής των τάξης II, CIITA (Class II Transactivator)

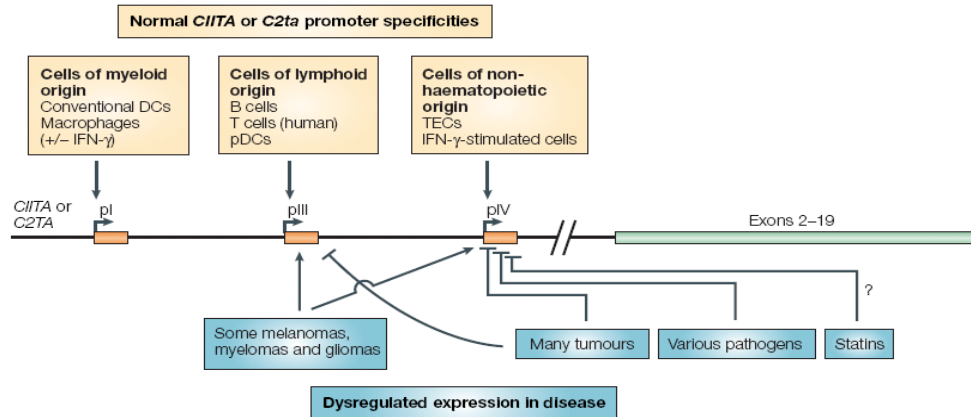
Ο CIITA είναι μία πρωτεΐνη 1130 kD που ταυτοποιήθηκε για πρώτη μέσω της ομάδας συμπληρωματικότητας A του συνδρόμου των γυμνών λεμφοκυττάρων (BLS) και είναι η πρωτεΐνη που λείπει από την κυτταρική σειρά RJ2.2.5 (Steimle et al., 1993). Λειτουργεί ως συνενεργοποιητής χωρίς να προσδένεται στο DNA και προκαλεί μια σειρά γεγονότων που σηματοδοτούν την έναρξη της μεταγραφής.

Η πρωτοταγής δομή του μορίου περιλαμβάνει μια (N)-αμινοτελική περιοχή πλούσια σε όξινα αμινοξέα, τρεις περιοχές πλούσιες σε προλίνη, σερίνη και θρεονίνη, μια κεντρική περιοχή πρόσδεσης GTP και μια (C)-καρβοξυτελική περιοχή που περιέχει επαναλήψεις λευκινών (LRRs). Ο συνδυασμός μιας κεντρικής περιοχής σύνδεσης νουκλεοτιδίου με μία καρβοξυτελική LRR είναι χαρακτηριστικό της NOD οικογένειας πρωτεϊνών (nucleotide oligomerization domain) γνωστή ως CATERPILLER οικογένεια πρωτεϊνών (Ting and Davis, 2005). Το αμινοτελικό άκρο περιέχει περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής μέσω αλληλεπιδράσεων άλλων πρωτεϊνών όπως παράγοντες της γενικής μεταγραφικής μηχανής, ένζυμα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης και άλλους συνενεργοποιητές. Η καρβοξυτελική περιοχή είναι υπεύθυνη για τον σχηματισμό του μορίου, για την εισαγωγή του στον πυρήνα και τη στρατολόγηση του ενισχυοσώματος (Boss and Jensen, 2003). Ο πυρηνικός εντοπισμός ελέγχεται από τρία σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS, Nuclear Localization Signal) για την είσοδο στον πυρήνα και τρία σήματα εξόδου (NES, Nuclear Export Signal) για την έξοδο από τον πυρήνα (Kretsovali et al., 2001).

Η λειτουργία του CIITA ρυθμίζεται μέσω μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Φωσφορυλίωση των συγκεκριμένων καταλοίπων αυξάνει τον ολιγομερισμό του, την αλληλεπίδραση του με άλλους παράγοντες και την ικανότητα του να ενεργοποιεί τους υποκινητές των τάξης II γονιδίων (Tosi et al., 2002). Ενώ φωσφορυλίωση άλλων καταλοίπων μειώνει την λειτουργικότητα του. Επίσης, ακετυλίωση του ρυθμίζει την είσοδο και την έξοδο του από τον πυρήνα (Spilianakis et al., 2000) ενώ ουβικουτινιλίωση του αυξάνει την ικανότητα ενεργοποίησης των τάξης II γονιδίων (Greer et al., 2003).

Σε αντίθεση με τα συστατικά του ενισχυοσώματος που εκφράζονται συστατικά σε όλους στους κυτταρικούς τύπους ανεξάρτητα από την έκφραση ή μη των τάξης II γονιδίων, η έκφραση του CIITA ελέγχεται αυστηρά. Το γονίδιο που εκφράζει τον CIITA, ονομάζεται *MHCIIA* στον άνθρωπο και βρίσκεται στην περιοχή AIR1 (activator of immune-response gene Ir1 locus) που καθορίζει απόλυτα το που, ποτέ και σε τι επίπεδα θα εκφραστούν τα τάξης II γονίδια (Reith and Mach, 2001). Το γονίδιο του CIITA ρυθμίζεται από μία περιοχή που περιέχει τέσσερις υποκινητές (pI-pIV), (Muhlethaler-Mottet et al., 1997). Τρεις από τους υποκινητές αυτούς (η λειτουργία του pII δεν είναι γνωστή) επάγουν τον σχηματισμό τριών διαφορετικών μεταγράφων, που διαφέρουν στο 5' άκρο τους λόγω διαφορετικής έναρξης της μεταγραφής. Αν οι διαφορετικές ισομορφές του CIITA έχουν διαφορετικές λειτουργίες δεν είναι ακόμα γνωστό. Ο υποκινητής pI είναι ειδικός για τη μυελική σειρά και επάγει την έκφραση του CIITA στα δένδριτικά και στα επαγόμενα από IFN-γ μακροφάγα. Η λειτουργία του pII δεν έχει ταυτοποιηθεί ακόμα. Ο pIII είναι ειδικός για την λεμφική σειρά κυττάρων και επάγει τον CIITA στα B λεμφοκύτταρα και στα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα. Ο

υποκινητής pIV επάγει την έκφραση στα επιθηλιακά κύτταρα του θύμου και σε κύτταρα που δεν έχουν αιμοποιητική προέλευση και επάγονται από IFN- γ (εικόνα 7).



Εικόνα (7). Η ρύθμιση του *MHCIIA* γονιδίου από τρεις διαφορετικούς υποκινητές (Reith et al., 2005).

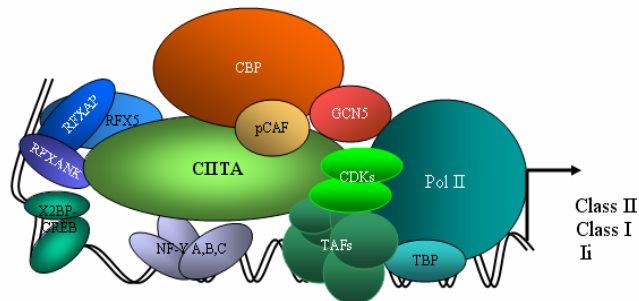
Η επαγωγή του CIITA από IFN- γ είναι το βασικότερο μονοπάτι έκφρασης του βασικού ρυθμιστή των τάξης II. Συνοπτικά, πρόσδεση της IFN- γ στον υποδοχέα της προκαλεί την ενεργοποίηση των JAK1 (Janus kinase 1) και JAK2 που οδηγεί στην φωσφορύλιωση, στον διμερισμό και την εισαγωγή του STAT1 (Signal transducer and activator of transcription 1) στον πυρήνα. Ο STAT1 προσδένεται σε συγκεκριμένες θέσεις πάνω στο γονιδίωμα στις θέσεις GAS (Gamma activating sequence). Ένα τέτοιο στοιχείο υπάρχει και στον υποκινητή pIV του CIITA και μετά από πρόσδεση του STAT1 και του IRF1 επάγεται η έκφραση του (Reith et al., 2005).

Τα κλασσικά και μη-κλασσικά τάξης II γονίδια καθώς και το γονίδιο Ii είναι στόχοι του CIITA. Έχουν προταθεί και άλλοι υποθετικοί στόχοι αλλά η ειδικότητα του μορίου για την ρύθμιση των τάξης II γονιδίων το καθιστά τον κύριο ρυθμιστή τους.

1.3.4. Η ενεργοποίηση της μεταγραφής από τον CIITA

Παρ' όλο που δεν συνδέεται άμεσα στο DNA αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή των γονιδίων αυτών συντονίζοντας πολλαπλά γεγονότα που είναι απαραίτητα για τη μεταγραφή τους. Έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί που προωθούν την μεταγραφή μέσω του CIITA και συνοπτικά περιγράφονται παρακάτω.

Αρχικά, ο σχηματισμός του ενισχυσώματος προκαλεί τη στρατολόγηση και τη πρόσδεση του CIITA στους υποκινητές των τάξης II γονιδίων (εικόνα 8). Αλληλεπιδρά με διάφορους παράγοντες του ενισχυσώματος και σταθεροποιεί περαιτέρω το νουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο. Ακόμη, ο CIITA στρατολογεί μεταγραφικούς παράγοντες που αποτελούν μέρος



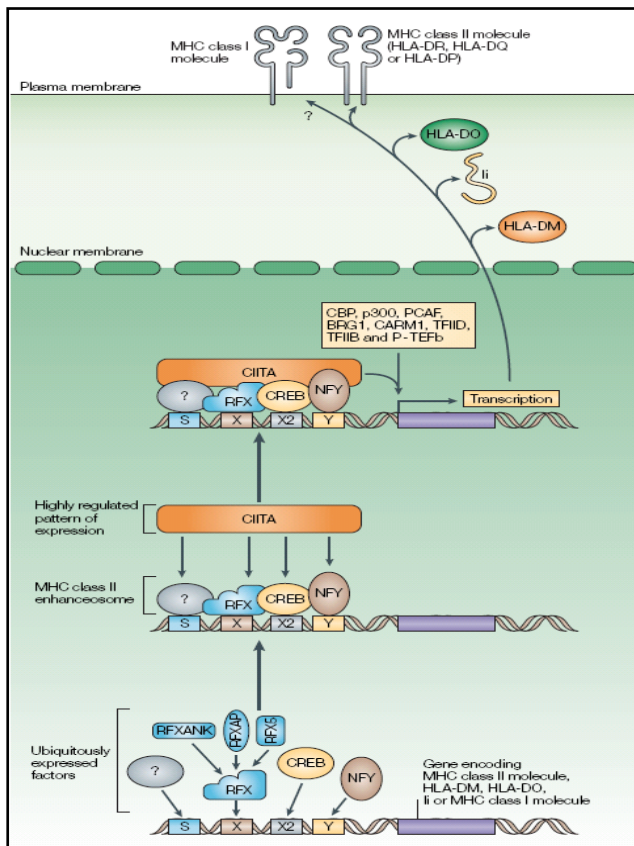
Εικόνα (8). Το ενισχύσωμα των τάξης II με όλους τους συνενεργοποιητές της μεταγραφής.

της βασικής μεταγραφικής μηχανής, όπως TBP, TAF_{II}32, TAF_{II}70, TIIH και P-TEFb (Fontes et al., 1997; Kanazawa et al., 2000; Mahanta et al., 1997). Αυτοί βοηθούν στο σχηματισμό του προ-εναρκτήριου συμπλόκου της μεταγραφής (εικόνα 9).

Επίσης, συνδέεται και με μέλη της οικογένειας των ακετυλοτρανσφερασών των ιστονών (HAT) που επιτρέπουν τον σχηματισμό μιας πιο ανοιχτής δομής στη χρωματίνη και διευκολύνουν τη μεταγραφή. Τέτοιοι παράγοντες είναι ο CBP/p300 (Fontes et al., 1999; Kretsovali et al., 1998), ο PCAF (P300/CBP-associated factor) (Spilianakis et al., 2000) και ο GCN5. Έχει καταγραφεί και η ενδογενής ικανότητα του C/PTA ως ακετυλάσης των ιστονών. Τέλος, αλληλεπιδρά με παράγοντες όπως ο SRC-1 (steroid receptor coactivator-1), ATP-εξαρτώμενοι παράγοντες όπως ο BRG1 αλλά και με απακετυλάσες ιστονών (HDAC1) που προωθούν τη μείωση της έκφρασης (Zika et al., 2003). Στρατολογεί και μεθυλοτρανσφεράσες (HMT) στους υποκινητές των τάξης II γονιδίων όπως τη CARM1 (co-activator – associated arginine-methyltransferase 1) οδηγώντας στη μεθυλίωση της αργινίνης 17 στην ιστόνη H3.

Τέλος, μελέτες έδειξαν την αλληλεπίδραση του C/PTA με σύμπλοκα κινασών-κυκλινών, όπως CDK7 και CDK9 τα οποία φωσφορυλιώνουν τη καρβοξυτελική περιοχή της RNA πολυμεράσης II στη σερίνη 5 (Spilianakis et al., 2003) που σηματοδοτεί την απομάκρυνση της πολυμεράσης από τον υποκινητή και τη έναρξη της παραγωγής RNA.

Όπως είναι ήδη εμφανές η πολυπλοκότητα της ρύθμισης των τάξης II γονιδίων είναι πολύ μεγάλη και γίνεται ακόμη μεγαλύτερη όταν μελετάται και στην τρίτη διάσταση της στον χώρο. Η τρισδιάστατη δομή της χρωματίνης επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων και το αντίστροφο αφού είναι πλέον γνωστό ότι απομακρυσμένες περιοχές του ίδιου χρωμοσώματος ή και διαφορετικών χρωμοσωμάτων μπορεί να έρχονται πολύ κοντά μεταξύ τους στο χώρο και να αλληλεπιδρούν (Spilianakis and Flavell, 2004; Spilianakis et al., 2005). Ακόμη είναι γνωστό ότι η χρωματίνη σε μεσοφασικούς πυρήνες των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών είναι οργανωμένη σε επικράτειες (Cremer and Cremer, 2001).

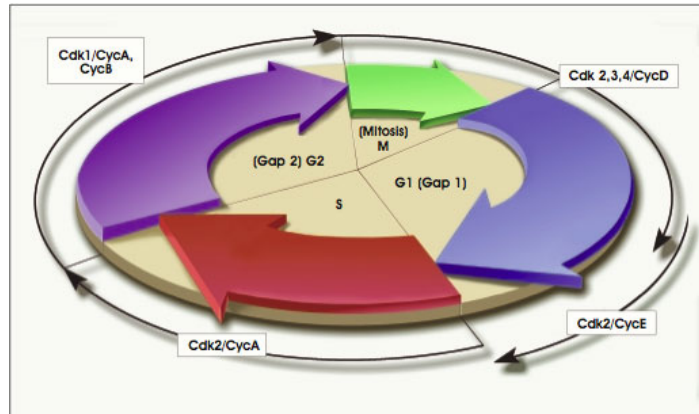


Εικόνα (9). Επαγωγή της έκφρασης των τάξης II γονιδίων.

1.4. ΣΗΜΑΝΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗ ΜΙΤΩΣΗ

Ακόμα λιγότερες είναι η αναφορές για την ρύθμιση των γονιδίων όταν εμπλέκεται και η τέταρτη διάσταση, αυτή του χρόνου. Η διάσταση του χρόνου σε κυτταρικό επίπεδο μπορεί να εννοηθεί βραχυπρόθεσμα, κατά τη διάρκεια ενός κυτταρικού κύκλου ή μακροπρόθεσμα κατά την ανάπτυξη και διαφοροποίηση του κυττάρου. Ελάχιστα είναι γνωστά σήμερα για την ρύθμιση των γονιδίων κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και συγκεκριμένα κατά τη μίτωση (εικόνα 10).

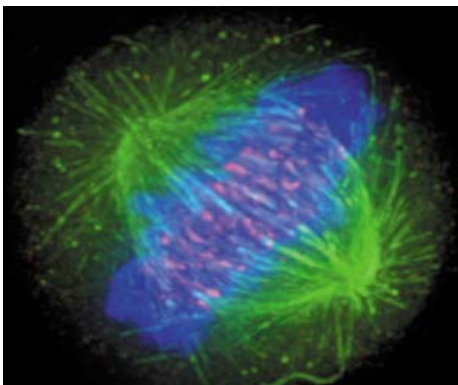
Κατά τη διάρκεια της μίτωσης, η χρωματίνη συμπυκνώνεται σε ανώτερες δομές μέχρι την τελική σύσταση των χρωμοσωμάτων. Ένα ένζυμο, η condensin, παίζει καθοριστικό ρόλο στη συμπύκνωση της χρωματίνης. Αποτελείται από πέντε υπομονάδες και ενεργοποιείται κατά την έναρξη της μίτωσης μέσω φωσφορυλίωσης των υπομονάδων της, CAP-G, CAP-H και CAP-D2 από την κινάση Cdc2-cyclinB που είναι και ο



Εικόνα (10). Ο κύτταρικός κύκλος και τα σημαντικότερα σύμπλοκα κινάσων- κυκλινών.

βασικός ρυθμιστής της συγκεκριμένης φάσης του κυτταρικού κύκλου (Hirano, 2004; Strunnikov, 2003). Πολλές ακόμα τροποποιήσεις συμβαίνουν μέσα στο κύτταρο, καταρρέει ο πυρηνικός φάκελος και σχηματίζεται η μιτωτική άτρακτος προκειμένου να τοποθετηθούν σωστά τα χρωμοσώματα στον ισημερινό του κυττάρου και με τη κυτοκίνηση να χωριστούν στα δύο νέα κύτταρα (εικόνα 11).

Η παρατήρηση ότι η μεταγραφή αναστέλλεται κατά τη διάρκεια της μίτωσης έγινε πριν τρεις περίπου δεκαετίες με αυτοραδιογραφικές μελέτες (Johnson and Holland, 1965; Littau et al., 1964; Prescott and Bender, 1962; Taylor, 1960). Έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί αναστολής της μεταγραφής κατά τη μίτωση όπως: (1) η συμπύκνωση της χρωματίνης περιορίζει την πρόσβαση των μεταγραφικών παραγόντων στο DNA (Johnson and Holland, 1965), (2) η ενεργοποίηση πρωτεϊνών που προκαλούν την αναστολή της μεταγραφής με τη δράση τους, όπως η condensin (Chuang et al., 1994), (3) η απενεργοποίηση ή η απομάκρυνση από τη μιτωτική χρωματίνη των μεταγραφικών παραγόντων (Martinez-Balbas et al., 1995) και (4) ο πρόωρος τερματισμός της μεταγραφής κυρίως στις περιπτώσεις μεγάλων γονιδίων (Shermoen and O'Farrell, 1991).



Εικόνα (11). Κύτταρο κατά τη μίτωση.

Παρ' όλα αυτά για να διατηρηθεί ο φαινότυπος του κάθε διαφοροποιημένου κυττάρου, θα πρέπει να υπάρχει ένα μηχανισμός ώστε το κύτταρο να γνωρίζει ποια γονίδια ήταν ενεργοποιημένα πριν τη κυτταρική διαίρεση και να διατηρήσει το πρότυπο έκφρασης τους και στα θυγατρικά κύτταρα που θα προκύψουν. Οι πρώτες παρατηρήσεις έδειξαν ότι συγκεκριμένες θέσεις στη χρωματίνη διατηρούν την υπερευαισθησία τους σε νουκλεάσες και χημικούς μάρτυρες κατά τη συμπύκνωση της χρωματίνης, καθώς και σε όλη τη διάρκεια της μίτωσης (Groudine and Weintraub, 1982; Struhl, 1981; Weintraub, 1985). Έτσι, προτάθηκε ο μηχανισμός της σήμανσης των ενεργών γονιδίων (gene bookmarking) ως το μέσο για να διατηρήσει το κύτταρο την ταυτότητα του (John and Workman, 1998). Οπότε, ως γονιδιακή σήμανση (gene bookmarking) ορίζουμε τη σήμανση με οποιονδήποτε τρόπο των ενεργοποιημένων γονιδίων πριν την έναρξη της μίτωσης, προκειμένου να ενεργοποιηθούν μετά τη κυτταρική διαίρεση, ώστε να διατηρηθεί το πρότυπο έκφρασης τους στα θυγατρικά κύτταρα. Τα τελευταία χρόνια έγιναν αρκετές μελέτες για το μηχανισμό αυτό αλλά ακόμα παραμένει άγνωστος. Έτσι, προτάθηκαν διάφοροι μηχανισμοί με τους οποίους γίνεται η σήμανση των γονιδίων κατά τη μίτωση.

1.5. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΣΗΜΑΝΣΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΜΙΤΩΣΗ

1.5.1. Σήμανση του γονιδίου μέσω της τροποποίησης των ιστονών

Ο πρώτος μηχανισμός προτείνει τη σήμανση των γονιδίων μέσω της τροποποίησης των ιστονών. Αδιαμφισβήτητο είναι το γεγονός ότι οι τροποποιήσεις των ιστονών είναι βασικοί ρυθμιστές της δομής της χρωματίνης. Έτσι, προτάθηκε ότι τροποποιήσεις τους σε περιοχές που αντιστοιχούν σε ενεργοποιημένα γονίδια μπορούν να λειτουργήσουν σαν μνήμη για το κύτταρο (Jeppesen, 1997). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι περιοχές των ενεργοποιημένων γονιδίων συνδέονται με συγκεκριμένες τροποποιήσεις ιστονών, όπως υπερακετυλίωση της H3 και H4, τρι- και διμεθυλίωση της λυσίνης 4 της H3 και διμεθυλίωση της λυσίνης 79 της H3 (Kouskouti and Talianidis, 2005). Οι τροποποιήσεις αυτές πραγματοποιούνται από τα ειδικά ένζυμα τροποποίησης ιστονών που στρατολογούνται είτε από μεταγραφικούς παράγοντες που ήταν συνδεδεμένοι στις θέσεις αυτές είτε από το σύμπλοκο της RNA πολυμεράσης II.

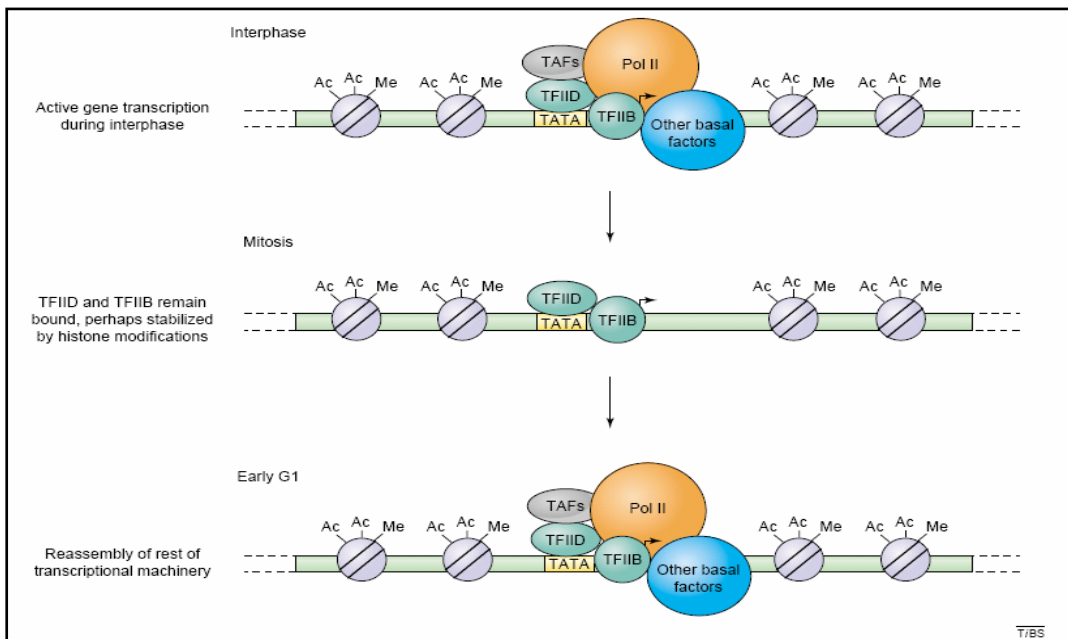
1.5.2. Σήμανση του γονιδίου με διαφορετικό τύπο ιστονών

Αποτελέσματα από μια άλλη μελέτη προτείνουν ένα δεύτερο μηχανισμό σήμανσης κατά τον οποίο οι περιοχές των ενεργοποιημένων γονιδίων φαίνεται να βρίσκονται σε νουκλεοσώματα που περιέχουν μια παραλλαγή της H3, την H3.3, σε συνδυασμό με ακετυλίωση και μεθυλίωση της H3 και διατηρούνται κατά τη μίτωση (Chow et al., 2005). Τροποποίηση της χρωματίνης που σχετίζεται με έναρξη της μεταγραφής φαίνεται να ευθύνεται για τη τοποθέτηση της H3.3 στο νουκλεόσωμα. Το φαινόμενο αυτό δεν έχει αναλυθεί ακόμα αρκετά για να συσχετιστεί απόλυτα με τη γονιδιακή σήμανση.

1.5.3. Σήμανση του γονιδίου από τη πρόσδεση ενός γενικού μεταγραφικού παράγοντα

Ένας τρίτος μηχανισμός γονιδιακής σήμανσης είναι η σήμανση του γονιδίου από τη πρόσδεση ενός γενικού μεταγραφικού παράγοντα, όπως του TFIID. Ο μεταγραφικός παράγοντας TFIID ανήκει στη βασική μεταγραφική μηχανή των ευκαρυωτικών κυττάρων και αλληλεπιδρά με το TATA κουτί στους υποκινητές των γονιδίων μέσω της TBP υπομονάδας του. Βιοχημικές και ανοσοϊστολογικές μελέτες έδειξαν ότι ένα μέρος του TFIID παραμένει στενά συνδεδεμένο με τα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα κατά τη μίτωση (Segil et al., 1996). Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα με μικροσκοπία φθορισμού του υποκυτταρικού εντοπισμού του TBP-GFP (Chen et al., 2002). Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης έδειξαν ότι ο TFIID, σε συνδυασμό με τον TFIIB, βρίσκονται κατά τη μίτωση μόνο στους υποκινητές των γονιδίων που ήταν ενεργοποιημένα και όχι σε όσα δεν εκφράζονταν (Christova and Oelgeschlager, 2002).

Ο TFIID φαίνεται να είναι ένα καλός υπονήπιος παράγοντας για τη σήμανση των γονιδίων για δυο βασικούς λόγους: (1) είναι ένας γενικός μεταγραφικός παράγοντας που συνδέεται σε πολλά ενεργοποιημένα γονίδια και (2) εξηγείται η γρήγορη στρατολόγηση της μεταγραφικής μηχανής μετά το τέλος της μίτωσης αφού αποτελεί μέρος της (εικόνα 12).



Εικόνα (12). Μηχανισμός γονιδιακής σήμανσης από τον TFIID (Sarge and Park-Sarge, 2005).

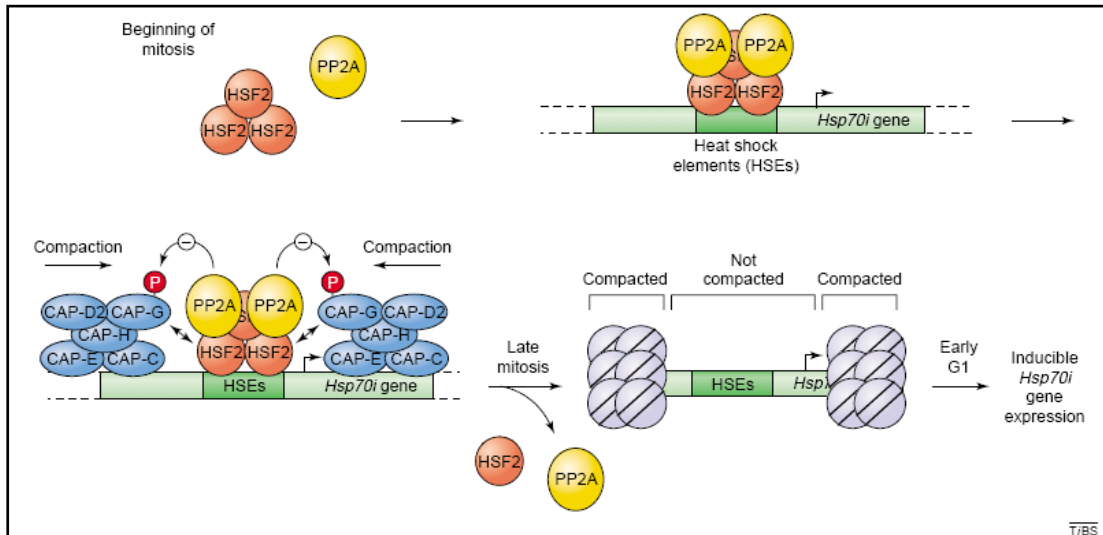
1.5.4. Σήμανση του γονιδίου από τη πρόσδεση ενός ειδικού μεταγραφικού παράγοντα

Ο τέταρτος και τελευταίος μηχανισμός γονιδιακής σήμανσης που έχει προταθεί είναι η πρόσδεση ενός ειδικού για το γονίδιο μεταγραφικού παράγοντα με πιο καλά μελετημένη περίπτωση αυτή του γονιδίου *hsp70* από τον μεταγραφικό παράγοντα HSP2. Μέλη της οικογένειας των HSP (Heat shock protein) βρίσκονται στην περιοχή των τάξης III γονιδίων του ΚΣΙ. Το γονίδιο *hsp70* επάγεται σε καταστάσεις στρες του κυττάρου, κυρίως λόγω αυξημένης θερμοκρασίας με τη βοήθεια του μεταγραφικού παράγοντα

HSP1 που προσδένεται τις θέσεις HREs στον υποκινητή του γονιδίου (Morano and Thiele, 1999). Οι θέσεις αυτές παρουσίαζαν υπερευαισθησία σε DNase στα μιτωτικά κύτταρα και θεωρήθηκαν ως σημασμένες (Martinez-Balbas et al., 1995).

Πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι ο μεταγραφικός παράγοντας HSP2 αλληλεπιδρά με την υπομονάδα CAP-G της condensin κατά τη μίτωση, μετά από σουμυλίωση του HSP2 και προτάθηκε ο ρόλος του στην σήμανση του γονιδίου. Στην ίδια δουλειά αποδείχτηκε η πρόσδεση του HSP2 στον υποκινητή του γονιδίου στην αρχή της μίτωσης και η στρατολόγηση της φωσφατάσης PP2A στην περιοχή. Η αλληλεπίδραση του HSP2 με την CAP-G διευκολύνει την PP2A να αποφωσφορυλιώσει το σύμπλοκο της condensin με αποτέλεσμα να αποτρέψει τη συμπύκνωση της χρωματίνης στην περιοχή αυτή (εικόνα 13). Επίσης, πειράματα RNAi για τον HSP2 και επαγωγή θερμικού σοκ στα κύτταρα στην επόμενη G1 έδειξαν ότι μειώθηκε η ικανότητα των κυττάρων να επάγουν το γονίδιο *hsp70* ενώ αυξήθηκε ο κυτταρικός θάνατος (Xing et al., 2005).

Είναι πλέον αποδεδειγμένη η ύπαρξη μηχανισμού γονιδιακής σήμανσης κατά τη μίτωση, αλλά ο τρόπος με τον οποίο γίνεται η σήμανση αυτή δεν είναι ακόμη ξεκάθαρος. Πιθανότατα λαμβάνουν μέρος περισσότεροι από έναν μηχανισμοί από αυτούς που αναλύθηκαν παραπάνω ή η ύπαρξη νέων είναι πολύ πιθανή.



Εικόνα (13). Μηχανισμός γονιδιακής σήμανσης του *hsp70* από τον μεταγραφικό παράγοντα HSP2 (Sarge and Park-Sarge, 2005).

Όπως προαναφέρθηκε τα γονίδια τάξης II εκφράζονται συστατικά σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους, όπως τα Β-λεμφοκύτταρα ενώ σε άλλους μόνο μετά από επαγωγή με κυτοκίνες. Επίσης, ο ρόλος τους στην αντιγονοπαρουσίαση είναι καθοριστικός για το ανοσοποιητικό σύστημα καθώς επίσης και ο λόγος ύπαρξης των συγκεκριμένων κυττάρων, που τα εκφράζουν συστατικά, στον οργανισμό. Η ύπαρξη μηχανισμού σήμανσης των γονιδίων αυτών κατά τη μίτωση φαίνεται να είναι μείζονος σημασίας για τα κύτταρα αυτά προκειμένου να διατηρήσουν το ίδιο πρότυπο έκφρασης και στα θυγατρικά κύτταρα, ενεργοποιώντας τα γονίδια αυτά στην επόμενη φάση του κυτταρικού κύκλου.

Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη ενός γενετικού τόπου ιδιαίτερης σημασίας για τα σπονδυλωτά, των τάξης II γονιδίων ιστοσυμβατότητας. Ο γενετικός αυτός τόπος είναι διεξοδικά μελετημένος όσον αφορά τη ρύθμιση της μεταγραφής του αλλά και τη λειτουργία του κυρίως στα κύτταρα των θηλαστικών. Λίγα όμως είναι γνωστά για τη χρωματινική δομή της περιοχής αυτής και γενικότερα για την διαμόρφωση της χρωματίνης στον χώρο. Οι περισσότερες εργασίες μελετούν τα γονίδια αυτά σε δύο διαστάσεις (2D) ενώ όπως αναφέρεται και στην εισαγωγή πολύ σημαντικό ρόλο στην μεταγραφική ενεργότητα των γονιδίων παίζει η διαμόρφωση τους στον χώρο (3D) και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ περιοχών του ίδιου χρωμοσώματος ή διαφορετικών χρωμοσωμάτων (Spilianakis and Flavell, 2004; Spilianakis et al., 2005). Η εργασία αυτή προσπαθεί να προσεγγίσει τη διαμόρφωση των τάξης II γονιδίων στο χώρο μελετώντας τη πρόσβαση της χρωματίνης αλλά και τη χαρτογράφηση του νουκλεοσώματος στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου HLA-DRA.

Επίσης, ακόμα λιγότερες είναι η αναφορές για την μελέτη των διαφόρων γονιδίων όταν εμπλέκεται και η ρύθμιση τους στην τέταρτη διάσταση, αυτή του χρόνου (4D). Όπως προαναφέρθηκε η διάσταση αυτή μπορεί να εννοηθεί μακροπρόθεσμα, κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης του κυττάρου και βραχυπρόθεσμα κατά τη διάρκεια ενός κυτταρικού κύκλου. Η παρούσα εργασία προσπαθεί να ρίξει φως στην ρύθμιση των τάξης II γονιδίων κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και συγκεκριμένα κατά τη διάρκεια της μίτωσης. Μελετάται η ύπαρξη μηχανισμού σήμανσης των γονιδίων αυτών κατά τη μίτωση η οποία φαίνεται να είναι μείζονος σημασίας για τα κύτταρα που εκφράζουν συστατικά τα γονίδια αυτά προκειμένου να διατηρήσουν το ίδιο πρότυπο έκφρασης και στα θυγατρικά κύτταρα, ενεργοποιώντας τα γονίδια αυτά στην επόμενη φάση του κυτταρικού κύκλου. Τελικός σκοπός της εργασίας είναι η ταυτοποίηση του μηχανισμού αυτού και η μελέτη ύπαρξης μεταγραφικής ενεργότητας κατά τη μίτωση εφόσον φαίνεται να τηρούνται όλες η προϋποθέσεις. Μια τέτοια θεωρία θα γκρέμιζε το δόγμα της αναστολής της μεταγραφής κατά τη μίτωση και θα διεύρυνε τους ορίζοντες της γονιδιακής ρύθμισης και του τρόπου που την αντιλαμβανόμαστε σήμερα.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΥΛΙΚΑ

2.1.1. Αντιδραστήρια και υλικά

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των εργαστηριακών πειραμάτων προήλθαν από τις εξής εταιρίες: SIGMA ALDRICH CHEMIE GmbH, BIORAD LABORATORIES, PROMEGA, QIAGEN, INVITROGEN.

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες καθώς και τα ένζυμα τροποποίησης νουκλεϊκών οξέων προήλθαν από τις εταιρίες: MINOTECH και NEW ENGLAND BIOLABS (NEB).

Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία ανασυνδιασμένων πλασμιδίων ήταν ο pBLUESCRIPT KS II της STRATAGENE.

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν κολώνες NOUCLEOBOND ενώ για τον καθαρισμό των τμημάτων DNA από το πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκαν κολώνες NOUCLEOSPIN της εταιρείας MACHEREY-NAGEL.

Για τον καθαρισμό του σημασμένου εκκινητή από τα ελεύθερα νουκλεοτίδια χρησιμοποιήθηκαν κολώνες μοριακής διήθησης G-50 sepharose της AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH. Η ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της protein G agarose fast-flow (Cat # 16-266) της UPSTATE.

Για τον συγχρονισμό των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε Θυμιδίνη που παραγγέλθηκε από τη SIGMA ALDRICH CHEMIE GmbH.

Οι αλληλουχίες των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων καθώς και τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Μικροχημείας του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Ι.Τ.Ε.

2.1.2. Κυτταρικές σειρές

Για τα πειράματα της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές Raji, RJ2.2.5, SJO και SJO R.

Τα Raji είναι Β λεμφοκύτταρα (εκφράζουν συστατικά τάξης II γονίδια) που έχουν απομονωθεί από λέμφωμα Burkitt και υπερεκφράζουν το ογκογονίδιο c-myc λόγω της μετατόπισης του από το χρωμόσωμα 8 στο χρωμόσωμα 14 όπου τίθεται υπό τον έλεγχο ενός ενισχυτή των ανοσοσφαιρινών με αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη έκφραση του (Rabbitts et al., 1983).

Τα RJ2.2.5 είναι επίσης Β λεμφοκύτταρα που προέρχονται από τα Raji έπειτα από μεταλλαξογέννεση με γ ακτινοβολία. Βασικό τους χαρακτηριστικό είναι ότι δεν εκφράζουν τάξης II γονίδια ιστοσυμβατότητας λόγω μη λειτουργικού CIITA μετά από μια σειρά μεταλλαγών και στα δυο αλληλόμορφα του γονιδίου *MHCIIA*.

Τα SJO είναι και αυτά μια Β λεμφοκυτταρική σειρά από την οποία λείπει το γονίδιο του RFX5, με αποτέλεσμα να μην εκφράζουν τάξης II γονίδια αλλά και ο σχηματισμός του ενισχυοσώματος να μην είναι εφικτός στους υποκινητές των γονιδίων αυτών (κάτι που δεν συμβαίνει στα RJ2.2.5). Τα SJO R είναι η ίδια κυτταρική σειρά με τη μόνη διαφορά ότι έχει εντεθεί στο γονιδίωμα τους το γονίδιο του RFX5 και ο φαινότυπος έχει διασωθεί (rescue).

2.1.3. Στελέχη βακτηρίων

Το βακτηριακό στέλεχος *E.coli* που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πλασμιδίων ήταν σε όλες τις περιπτώσεις το DH5α [*SupE44 ΔlacU169 (φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*]. Το στέλεχος αυτό είναι ανίκανο ανασυνδυασμού και χρησιμοποιείται για επίστρωση σε τριβλία Petri και ανάπτυξη πλασμιδίων και κοσμιδίων. Το φ80 *lacZΔM15* επιτρέπει α-συμπληρωματικότητα με το αμινοτελικό άκρο της β-γαλακτοσιδάσης των pUC φορέων. (Hanahan, 1983).

2.1.4. Θρεπτικά μέσα

Καλλιέργειες βακτηρίων

Η καλλιέργεια των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε στο θρεπτικό μέσο LB (Luria-Bertany) το οποίο περιέχει 1% τρυπτόνη (bacto tryptone), 0.5% εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) και 1% NaCl, ενώ για τις στερεές καλλιέργειες προστίθεται επιπλέον 1.5% άγαρ. Και στις δυο περιπτώσεις το pH ρυθμίζεται στο 7.0 με NaOH.

Ένα δεύτερο θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία επιδεκτικών βακτηρίων DH5α ήταν το Psi broth το οποίο περιέχει 0.5% εκχύλισμα ζύμης (yeast extract), 2% bacto tryptone και 0.5% MgSO₄. το pH αυτού του διαλύματος ρυθμίζεται στο 7.6 με KOH.

Καλλιέργειες ευκαρυωτικών κυττάρων

Για τις καλλιέργειες των ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών Raji, RJ2.2.5, SJO και SJO R χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο RPMI από τη εταιρία Gibco που περιείχε 10% FBS.

2.1.5. Αντισώματα

Anti-acetyl histone H4: Upstate biotechnology, Rabbit antiserum, 1μg/μg, Cat# 06-866, Lot# 29532, 2μl/ανοσοκατακρήμιση

Anti-dimethyl histone H3 lysine 4 (K4): Upstate biotechnology, Rabbit antiserum, 1μg/μg, Cat# 07-030, Lot# 26335, 1.5μl/ανοσοκατακρήμιση

Anti-pol II (N-20): Santa Cruz biotechnology, 200μg/ml, Cat# sc-899, Lot# B2106, 2μl/ανοσοκατακρήμιση

Anti-RFX5: Rockland, Anti-RFX5 (N-terminal) Rabbit polyclonal IgG, Code# 100-401-193, Lot# 14634, 1μl/ανοσοκατακρήμιση

Anti-NFY-B (FL-207): Santa Cruz biotechnology, 200μg/ml, Cat# sc-13045, Lot# J2903, Rabbit polyclonal IgG, 5μl/ανοσοκατακρήμιση

Anti-CREB-1 (C-21): Santa Cruz biotechnology, 200μg/ml, Cat # sc-189, Lot# J0804, Rabbit polyclonal IgG, 30μl/ανοσοκατακρήμιση

Anti-CIITA: Για την ανοσοκατακρήμνιση του CIITA χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο το οποίο είχε κατασκευαστεί από τα πρώτα 330 αμινοξέα της πρωτεΐνης και χρησιμοποιήθηκε σε αραιώση 1:125 δηλαδή 2μl/ανοσοκατακρήμνιση.

2.1.6. Ολιγονουκλεοτίδια

Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την real time PCR στα πειράματα υπερευαισθησίας της χρωματίνης σε περιοριστικές ενδονουκλεάσες ήταν:

HLA-DRA promoter: 5' εκκινήτης: 5'-GTT GTC CTG TTT GTT TAA GAA-3'
3' εκκινήτης: 5'-TCT TTT GGG AGT CAG TAG AGC-3'

HLA-DRA -1800: 5' εκκινήτης: 5'-AAG CCC TTT GAT GCG ATC AG-3'
3' εκκινήτης: 5'-TTC CAT ACT GTT GTG CTG GG-3'

RNA pol II (peptide D): 5' εκκινήτης: 5'-TGC CTC TGC GAA GTG TGA GAT-3'
3' εκκινήτης: 5'-CAA ACT AAC AGC GGT TTA AT-3'

Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα της χαρτογράφησης του νουκλεοσώματος στην περιοχή του υποκινητή του HLA-DRA γονιδίου ήταν:

HLA-DRA promoter (1): 5'-CCA ATG AAC GGA GTA TCT TGT-3'

HLA-DRA promoter (2): 5'-CTT GTG TCC TGG ACC CTT TGC AAG AAC CC-3'

LINK (25): 5'-GCG GTG ACC CGG GAG ATC TGA ATT C-3'

LINK (11): 5'-GAA TTC AGA TC-3'

Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την real time PCR στα πειράματα της γονιδιακής σήμανσης κατά τη μίτωση ήταν:

HLA-DRA promoter: 5' εκκινήτης: 5'-GTT GTC CTG TTT GTT TAA GAA-3'
3' εκκινήτης: 5'-TCT TTT GGG AGT CAG TAG AGC-3'

GAPDH promoter: 5' εκκινήτης: 5'-TGA GCA GAC CGG TGT CAC TA-3'
3' εκκινήτης: 5'-AGG ACT TTG GGA ACG ACT GA-3'

CyclinB1 promoter: 5' εκκινήτης: 5'-GGA GCA GTG CGG GGT TTA-3'
3' εκκινήτης: 5'-CGA CCA GCC AAG GAC CTA CA-3'

HLA-DRA exon 5: 5' εκκινήτης: 5'-GAA AGC AGT CAT CTT CAG CGT T-3'
3' εκκινήτης: 5'-AGA GGC ATT GCA TGG TGA TAA T-3'

2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1. Πέψη πλασμιδιακού DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Προκειμένου να γίνει δυνατή η κλωνοποίηση ενός τμήματος DNA είναι απαραίτητη η πέψη τόσο του τμήματος που θέλουμε να κλωνοποιηθεί όσο και του πλασμιδιακού φορέα με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στα κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα με την παρουσία της πρωτεΐνης BSA, στις ιδανικές συνθήκες (μοριακότητα και σύσταση αλάτων στο ρυθμιστικό διάλυμα, συγκέντρωση ενζύμου, θερμοκρασία, pH, συγκέντρωση υποστρώματος) σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της εκάστοτε εταιρείας.

2.2.2. Αντίδραση σύνδεσης γραμμικών μορίων

Η αντίδραση πραγματοποιείται με τη δράση της λιγάσης του DNA βακτηριοφάγου T₄ (T₄ DNA ligase), η οποία καταλύει το σχηματισμό φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ της φωσφορικής ομάδας του 5' άκρου και της υδροξυλικής ομάδας του 3' άκρου δίκλωνων μορίων DNA. Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιούνται οι αντιδράσεις σύνδεσης ποικίλουν ανάλογα με τα άκρα των γραμμικών μορίων που επρόκειτο να ενωθούν (συμπληρωματικά ή τυφλά), το μέγεθος τους και το επιθυμητό προϊόν της αντίδρασης, όπως επανακυκλοποίηση του πλασμιδίου ή κατασκευή ανασυνδυασμένου πλασμιδίου. Το ένθεμα στην αντίδραση έχει 10πλάσια μοριακότητα σε σχέση με τον φορέα.

2.2.3. Παρασκευή δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli* για μετασχηματισμό με θερμικό σοκ (*Competent E.coli cells*)

Μολύνθηκαν 3ml υγρού θρεπτικού μέσου LB με το επιθυμητό βακτηριακό στέλεχος (DH5α), και επωάζεται στους 37° C O/N. 200ml Psi broth μολύνονται με την ολονύκτια καλλιέργεια και επωάζονται στους 30° C με έντονη ανακίνηση έως ότου η απορρόφηση στα 550nm να φτάσει στα 0.48. Αμέσως μετά η καλλιέργεια φυγοκεντρείται για 10min στις 2.000 rpm στους 4° C, η πελλέτα επαναδιαλύεται ήπια σε διάλυμα Tfb I (30mM CH₃COOK, 50mM MnCl₂, 100mM KCl, 10mM CaCl₂, 15% Glycerol). Στη συνέχεια η καλλιέργεια φυγοκεντρείται για 10min στις 3.000 rpm στους 4° C και τα κύτταρα επαναδιαλύονται ήπια σε διάλυμα Tfb II (10mM MOPS pH 7, 75mM CaCl₂, 10mM KCl, 15% γλυκερόλη). Τέλος, μοιράζονται σε aliquots των 100 μl και αποθηκεύονται στους -80° C για 4-8 εβδομάδες.

2.2.4. Μετασχηματισμός *E.coli* κυττάρων με θερμικό σοκ (*Transformation*)

Ο μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων είναι απαραίτητος τόσο για τον πολλαπλασιασμό και την απομόνωση πλασμιδιακού DNA όσο και για την ανίχνευση ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών κατασκευών που προέρχονται από αντίδραση σύνδεσης (ligation). Οι πλασμιδιακοί φορείς έχουν την ικανότητα αναδιπλασιασμού μέσα στο βακτηριακό κύτταρο λόγω της θέσης έναρξης της αντιγραφής που διαθέτουν. Ακόμη φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας σε διάφορα αντιβιοτικά και μας δίνουν τη

δυνατότητα επιλογής των ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών κατασκευών μας γιατί μόνο αυτά που περιέχουν το επιθυμητό πλασμίδιο επιζούν σε θρεπτικό μέσο με τα κατάλληλα αντιβιοτικά.

Σε 100μl δεκτικών κυττάρων *E.coli* (DH5α) προστίθεται το μίγμα της αντίδρασης της λιγάσης ή κάποιο πλασμίδιο και το μίγμα ανακινείται ήπια. Επωάζεται για 30min στον πάγο και έπειτα προκαλείται θερμικό σοκ στους 42° C για 90sec. Τα κύτταρα επανατοποθετούνται στον πάγο για 2-4min και προστίθεται 1ml LB χωρίς αντιβιοτικά. Γίνεται επώαση στους 37° C για 1h έτσι ώστε τα κύτταρα να συνέλθουν από το σοκ, να αναπτυχθούν και να παράγουν τις πρωτεΐνες που τους προσδίδουν αντίσταση στα αντιβιοτικά. Στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται για 1min στις 14.000 rpm σε RT, απομακρύνεται το LB και μια μικρή ποσότητα που απομένει απλώνεται σε πιάτα LB με τα κατάλληλα αντιβιοτικά για επιλογή. Επωάζονται στους 37° C O/N.

2.2.5. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες μετασηματισμένων βακτηρίων

Μολύνονται 3ml υγρού θρεπτικού μέσου LB (1% τρυπτόνη, 0.5% εκχύλισμα ζύμης, 1% NaCl) με την επιθυμητή βακτηριακή αποικία, προσθέτοντας τα κατάλληλα αντιβιοτικά και επωάζεται στους 37° C ολονύκτια (O/N). Την επόμενη μέρα οι πελλέτες επαναδιαλύεται σε 1 όγκο κρύου διαλύματος I (50mM γλυκόζη, 25mM Tris-HCl pH 8, 10mM EDTA pH 8) που περιέχει RNase A. Στη συνέχεια προστίθενται 2 όγκοι διαλύματος II (0.2N NaOH, 0.1% SDS) για την λύση των κυττάρων και 1.5 όγκοι διαλύματος III (3M οξικό κάλιο, 5M οξικό οξύ) που είναι το διάλυμα εξουδετέρωσης.

Στην συνέχεια αν το πλασμίδιο προορίζονταν για διαγνωστικές πέψεις γινόταν κατακρήμνιση με 2 όγκους αιθανόλη ενώ αν το πλασμίδιο επρόκειτο να χρησιμοποιηθεί για διαμόλυνση σε ευκαρυωτικά κύτταρα γινόταν καθαρισμός με κολώνα σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Nucleobond και έπειτα κατακρήμνιση με 0.8 όγκους ισοπροπανόλης.

2.2.6. Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός γραμμικών μορίων DNA

Υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, τα γραμμικά μόρια του DNA μεταναστεύουν σε πήκτωμα αгарόζης ή πολυακρυλαμίδης με ταχύτητες ανάλογες του μεγέθους τους. Η πυκνότητα του πηκτώματος και η εφαρμοζόμενη διαφορά δυναμικού καθορίζονται ανάλογα με τα μεγέθη των μορίων που θα διαχωριστούν. Τα μεγέθη καθώς και οι ποσότητες του DNA που ηλεκτροφορούνται καθορίζονται μετά από σύγκριση των ζωνών που δίνουν με μεγέθη γνωστών τμημάτων DNA που ηλεκτροφορούνται ταυτόχρονα με ακτινοβόληση του πηκτώματος με UV ακτινοβολία. Ο μάρτυρας ποσότητας και μεγέθους που χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα ήταν το DNA του λ φάγου τεμαχισμένο με το περιοριστικό ένζυμο PstI. Το διάλυμα που προστέθηκε σε όλα τα διαλύματα πριν την ηλεκτροφόρηση ήταν το διάλυμα 6x της χρωστικής orange G (0.25% orange G, 15% φικόλλη σε TE). Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0.5x TBE.

- **Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης:** ανάλογα με την επιθυμητή πυκνότητα του πηκτώματος διαλύεται με βρασμό μια ποσότητα σκόνης αγαρόζης σε 0.5x TBE (π.χ. για πήκτωμα 1%, 1gr σκόνης αγαρόζης διαλύεται σε 100ml 0.5x TBE).


2.2.7. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR: Polymerase Chain Reaction)

Με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επιτυγχάνεται πολλαπλασιασμός επιθυμητών περιοχών του DNA με τη βοήθεια δυο μικρών συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιούνται ως εκκινητές της αντίδρασης και είναι συμπληρωματικοί των άκρων της αλληλουχίας που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε.

Η αντίδραση πραγματοποιείται με μια σειρά επαναλαμβανόμενων κύκλων που περιλαμβάνουν: καταστροφή των κυτταρικών δομών και αποδιάταξη των νουκλεϊκών οξέων στους 94° C, υβριδοποίηση των εκκινητών στις κατάλληλες θέσεις σε θερμοκρασία συγκεκριμένη για το καθένα ζεύγος εκκινητών και τέλος, ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων για την επιμήκυνση των δύο αλυσίδων στους 72° C με τη δράση της θερμοανθεκτικής DNA εξαρτώμενης DNA πολυμεράσης Taq (πολυμεράση που έχει απομονωθεί από τον θερμόφιλο οργανισμό *Thermus aquaticus*). Οι παραπάνω αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε αυτόματους θερμικούς κυκλοποιητές.

Στις περιπτώσεις που ήταν απαραίτητη η ποσοτικοποίηση των προϊόντων όπως στις ανοσοκατακρημνίσεις της χρωματίνης χρησιμοποιήθηκε real time PCR. Στην αντίδραση γινόταν προσθήκη επιπλέον της φθορίζουσας χρωστικής SYBER Green I (1μl από διάλυμα με οπτική πυκνότητα 0.4) που έχει την ικανότητα σύνδεσης σε δίκλιωνα τμήματα DNA και η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος Opticon Monitor.

Το πρόγραμμα του εφαρμόστηκε στην προκειμένη περίπτωση είναι:

- 5 min στους 94° C
 - 30 sec στους 94° C
 - 30 sec στους 60° C
 - 30 sec στους 72° C
 - 2 min στους 72° C
 - Καμπύλη τήξης με μέτρηση ανά 0.5° C από τους 72° C μέχρι τους 94° C
- 
 38 κύκλοι (επιμήκυνση)

Ενώ η αντίδραση είχε ως έξης:

- 2.5mM MgCl₂
- 1/10 του όγκου της αντίδρασης ρυθμιστικό διάλυμα της Taq
- 0.2mM dNTPs
- 2μM εκκινητής 3' άκρου
- 2μM εκκινητής 5' άκρου
- 0.5 units Taq polymerase
- 1μl Syber Green I
- H₂O σε τελικό όγκο 20μl

2.2.8. Τεχνική υπεραισθησίας της χρωματίνης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες (*Restriction endonuclease hypersensitivity assay*)

Η μελέτη του βαθμού πρόσβασης της χρωματίνης σε μεταγραφικούς παράγοντες γίνεται με τη βοήθεια περιοριστικών ενδονουκλεασών (*Restriction endonuclease accessibility assay*) που κόβουν στην υπό μελέτη περιοχή και διαπιστώνεται η πρόσβαση του ενζύμου σ' αυτή, εφόσον βέβαια υπάρχουν οι κατάλληλες περιοριστικές θέσεις. Αρχικά μια καλλιέργεια κυττάρων αφού πλυθεί τρεις φορές με PBS η πελλέτα επαναδιαλύεται σε ένα διάλυμα λύσης των κυττάρων (**Lysis buffer:** 10mM Tris-HCl pH 7.4, 60mM KCl, 15mM NaCl, 5mM MgCl₂, 0.1mM EGTA, 0.1% NP-40 και 300mM sucrose). Στο διάλυμα αυτό σπάει η κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων και ελευθερώνεται ο πυρήνας, αυτό ταυτοποιείται με χρώση με Trypan blue το οποίο εισέρχεται στον πυρήνα μόνο εφόσον έχει διαλυθεί η κυτταροπλασματική μεμβράνη.

Έπειτα, πραγματοποιείται μερική πέψη των πυρήνων με το κατάλληλο ένζυμο (στην προκειμένη περίπτωση SspI) αφού τα κύτταρα επαναδιαλυθούν στο κατάλληλο διάλυμα που προτείνει η εταιρία για το συγκεκριμένο ένζυμο. Η πέψη γίνεται στους 37°C για 30 min σε διάφορες συγκεντρώσεις του ενζύμου. Μ' αυτόν τον τρόπο βλέπουμε στις περιοχές που καλύπτονται από πρωτεΐνες μειωμένη πρόσβαση του ενζύμου. Στην συνέχεια οι πυρήνες τοποθετούνται σε ένα διάλυμα λύσης των πυρήνων με τη βοήθεια της πρωτεΐνης K (**Nuclear lysis buffer:** 300mM C H₃COONa, 5mM EDTA, 0.5% SDS και 0.1mg/ml πρωτεΐνη K). Παραμένουν O/N στους 55°C.

Την επόμενη μέρα γίνεται καθαρισμός 2 φορές με φαινόλη, μετά χλωροφόρμιο και τέλος κατακρήμνιση με 100% αιθανόλη με 1/10 του όγκου οξικό νάτριο. Οι πελλέτες επαναδιαλύονται σε νερό και γίνεται φωτομέτρηση του DNA για να διαπιστωθεί η συγκέντρωση του ενώ ηλεκτροφορείται μια μικρή ποσότητα για τον ποιοτικό έλεγχο του δείγματος. Έπειτα, με real time PCR διαπιστώνεται η πρόσβαση της υπό μελέτη περιοχής και συγκρίνεται με άκοπο DNA που προέρχεται από τους ίδιους πυρήνες αλλά και με περιοχές που δεν διαθέτουν τη περιοριστική αυτή θέση.

2.2.9. Παρασκευή μονονουκλεοσωμάτων με Μικροκοκκική νουκλεάση (*MNase*)

Για την παρασκευή μονονουκλεοσωμάτων από μια καλλιέργεια B λεμφοκυττάρων με πυκνότητα 1×10^6 κύτταρα στο ml γίνεται μονιμοποίηση με διάλυμα φορμαλδεΐδης 1.1% (**HCHO solution:** 50mM Hepes pH 7.9, 100mM NaCl, 1mM EDTA pH 8, 0.5mM EGTA pH 8 και 11% HCHO) για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου ενώ η αντίδραση σταματά με τη προσθήκη γλυκίνης σε τελική συγκέντρωση 0.125M. Φυγοκεντρούμε στις 2700 rpm για 7min στους 4°C και έπειτα γίνονται τρία πλυσίματα με κρύο PBS.

Η πελλέτα επαναδιαλύεται σε διάλυμα σουκρόζης (**Sucrose buffer:** 0.3M sucrose, 2mM MgAc, 3mM CaCl₂, 1% Triton-X 100, 10mM Hepes pH 7.9) και επωάζεται στον πάγο για 10 min. Με το διάλυμα αυτό σπάει η κυτταροπλασματική μεμβράνη ενώ στην συνέχεια με τον ομοιογεννοποιητή Dounce και με 150 επαναλήψεις απομακρύνεται το κυτταρόπλασμα. Γίνεται χρώση με Trypan blue για την ταυτοποίηση των πυρήνων και με το ίδιο διάλυμα σουκρόζης πραγματοποιούνται 2 πλυσίματα για την απομάκρυνση των κυτταρικών υπολειμμάτων. Έπειτα, δημιουργείται μια διαβάθμιση συγκέντρωσης τοποθετώντας ένα διάλυμα γλυκερόλης (**Glycerol buffer:** 25% glycerol,

5mM MgAc, 0.1mM EDTA pH 8 και 10mM HEPES pH 7.9) κάτω από το διάλυμα σουκρόζης που περιέχει τους πυρήνες και γίνεται φυγοκέντρηση στις 3000rpm για 5 min στους 4⁰ C. Αυτό επαναλαμβάνεται άλλη μια φορά και μετά οι πυρήνες τοποθετούνται στο διάλυμα γλυκερόλης και φυλάσσονται στους 4⁰ C ολονύκτια ενώ το 1/10 του δείγματος τοποθετείται σε ένα διάλυμα πρωτεΐνάσης K 0.25μg/μl και 0.5 % SDS. Πραγματοποιείται επώαση του δείγματος στους 55°C για 3 ώρες για την αντίστροφη μονιμοποίηση του και στη συνέχεια O/N στους 65⁰C.

Την επόμενη μέρα το μικρό αυτό τμήμα της χρωματίνης καθαρίζεται με 2 φορές φαινόλη, μετά χλωροφόρμιο και τέλος κατακρήμιση με 100% αιθανόλη με 1/10 του όγκου οξικό νάτριο. Πραγματοποιείται επώαση με RNase A στο δείγμα και έπειτα φωτομέτρηση για να διαπιστωθεί η ποσότητα του DNA που διαθέτουμε. Αφού υπολογίσουμε την συγκέντρωση του DNA που έχουμε, επαναδιαλύουμε τους πυρήνες σε διάλυμα 2x της μικροκοκκικής νουκλεάσης (**2x MNase buffer**: 50mM KCl, 8mM MgCl₂, 2mM CaCl₂ και 100mM Tris-HCl pH 7.6) και προσθέτω το ένζυμο με 0.2units/μl (μετά από εύρεση της συγκέντρωσης του ενζύμου με πείραμα διαφορετικών συγκεντρώσεων που πραγματοποιήθηκε). Γίνεται επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 4 min ακριβώς και η αντίδραση σταματά με το ειδικό διάλυμα (**2x stop buffer**: 0.2mM NaCl, 10mM EDTA pH 8, 10mM EGTA pH 8, 50mM Tris-HCl pH 8 και 2% SDS).

Την επόμενη μέρα η χρωματίνη καθαρίζεται με 2 φορές φαινόλη, μετά χλωροφόρμιο και τέλος κατακρήμιση με 100% αιθανόλη με 1/10 του όγκου οξικό νάτριο. Πραγματοποιείται επώαση με RNase A και έπειτα ξανά κατακρήμιση με 100% αιθανόλη και επαναδιάλυση σε νερό. Όλη η ποσότητα ηλεκτροφορείται και απομονώνεται από το πήκτωμα το τμήμα του DNA που αντιστοιχεί σε μονονουκλεοσώματα.

2.2.10. Υβριδοποίηση ολιγονουκλεοτιδίων

Οι δυο αλυσίδες των συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων διατηρούνται ξεχωριστά αραιωμένες με νερό σε συγκέντρωση 100 μM. Για τη διαδικασία της κλωνοποίησης υβριδοποιούνται ισομοριακές ποσότητες μετά από βρασμό για 5 min και αργή ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου.

2.2.11. Αντίδραση Πολυνουκλεοτιδικής κινάσης T₄

Το ένζυμο T₄ πολυνουκλεοτιδική κινάση (T₄ PNK) έχει την ιδιότητα να μεταφέρει τη γ-φωσφορική ομάδα του ATP στο 5' άκρο μονοφωσφορικών μονονουκλεοτιδίων, μονόκλωνων και δίκλωνων DNA και RNA μορίων. Στην προκειμένη περίπτωση επιθυμούμε να προστεθούν σημασμένες φωσφορικές ομάδες στα 5' προεξέχοντα άκρα ενός εκκινητή προκειμένου να ταυτοποιηθεί το προϊόν της PCR που θα προκύψει. Μετά την υβριδοποίηση των αλυσίδων προστίθεται κατάλληλη ποσότητα κινάσης και [α-³²P] dATP για την διεξαγωγή της αντίδρασης. Εν προκειμένω, η αντίδραση για κάθε ολιγονουκλεοτίδιο πραγματοποιήθηκε στους 37⁰ C για 45 λεπτά. Έπειτα γίνεται κατακρήμιση του σημασμένου εκκινητή με αιθανόλη και NH₄OAc και yeast t-RNA.

2.2.12. Αλληλούχηση DNA

Για την χαρτογράφηση του νουκλεοσώματος απαραίτητη είναι η αλληλούχηση μιας γνωστής περιοχής ενός πλασμιδίου προκειμένου να είναι εφικτό να μετρηθούν οι βάσεις. Αρχικά γίνεται αποδιάταξη 5μg του πλασμιδίου που θα αλληλουχηθεί με 200mM NaOH για 5 min σε RT, γίνεται κατακρήμνιση του με αιθανόλη και οξικό νάτριο και επαναδιαλύεται σε 7μl νερό. Προστίθεται 20ng εκκινήτη, 2μl 5x διάλυμα της Sequenase (sequenase buffer) και τοποθετείται στους 65⁰ C για 5 min και μετά απευθείας στους 37⁰ C για 30 min. Έπειτα, προστίθεται 5.5μl διάλυμα σήμανσης (**Labeling mix**: 1μl DTT, 2μl labeling mix (1/10 αραιώση), 1μl [α -³²P] dATP και 2μl Sequenase (αραιώση 1/4)).

Τέλος, τοποθετούνται σε microtiter 2.5μl ddNTPs για να σταματούν την αντίδραση σε διάφορες θέσεις και 3.5μl από την αντίδραση. Συνήθως η σειρά που τοποθετούνται τα ddNTPs είναι AGCT. Επωάζονται για 5 min στους 37⁰ C και η αντίδραση σταματά με stop buffer που περιέχει φορμαμίδιο (διάλυμα που τοποθετείται σε όλες τις αντιδράσεις που θα ηλεκτροφορηθούν σε αποδιατακτικό πήκτωμα). Αποθηκεύονται στους -20⁰ C.

2.2.13. Παρασκευή πηκτώματος αλληλούχησης

Το πήκτωμα αλληλούχησης είναι αποδιατακτικό 6% σε ουρία και περιέχει 72g ουρία, 22.5ml ακρυλαμίδα (38:2), 15ml TBE και πολυμεριστικά 150μl APS και 150μl TEMED. Επίσης, θα πρέπει να διατηρείται σε θερμοκρασία 40-45⁰ C κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης. Στην συνέχεια στεγνώνετε καλά σε στεγνωτήρα και εκτίθεται σε κασέτα με ειδική επιφάνεια όπου συσσωρεύονται οι κρούσεις των σημασμένων προϊόντων και την επόμενη μέρα γίνεται σάρωση του στον Phosphorimager και αναλύεται σε ειδικό λογισμικό στην προτιμητέα ανάλυση.

2.2.14. Συγχρονισμός κυτταρικής καλλιέργειας B λεμφοκυττάρων

Ο συγχρονισμός της κυτταρικής καλλιέργειας Raji πραγματοποιήθηκε με διπλό μπλοκ θυμιδίνης προκειμένου να απομονωθούν πληθυσμοί κυττάρων που να βρίσκονται στην ίδια φάση του κυτταρικού κύκλου. Λόγω της περίσσειας του θρεπτικού σε θυμιδίνη τα κύτταρα αδυνατούν να βιοσυνθέσουν σωστά νουκλεοτίδια και ο κυτταρικός κύκλος μπλοκάρεται στην αρχή της S, γιατί δεν μπορεί να γίνει αντιγραφή του DNA.

Έτσι, σε μια καλλιέργεια B λεμφοκυττάρων προστίθεται 2mM θυμιδίνη και επωάζονται μ' αυτή για 18 ώρες. Στην συνέχεια αφαιρείται με πλύσιμο των κυττάρων με PBS και προσθήκη φρέσκου θρεπτικού έτσι ώστε τα κύτταρα να απελευθερωθούν από το μπλοκ. Η απελευθέρωση γίνεται για 8 ώρες και έπειτα ακολουθεί το δεύτερο μπλοκ θυμιδίνης όπου προστίθεται και πάλι στο θρεπτικό σε συγκέντρωση 2mM για 18 ώρες. Το δεύτερο μπλοκ είναι απαραίτητο για να γίνει πιο αποδοτικός ο συγχρονισμός των κυττάρων. Μετά από την επώαση τα κύτταρα απελευθερώνονται και προχωρούν συγχρονισμένα στις επόμενες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Μετά την απελευθέρωση αρχίζει και η συλλογή δειγμάτων ανά 2 ώρες μέχρις ότου να πραγματοποιήσουν έναν ολόκληρο κυτταρικό κύκλο.

2.2.15. Κυτταρομετρία ροής (FACS, *Fluorescence-Activated Cell Sorting*)

Για την ταυτοποίηση της φάσης του κυτταρικού κύκλου των πληθυσμών των κυττάρων που συλλέχθηκαν μετά την απελευθέρωση από το διπλό μπλοκ θυμιδίνης πραγματοποιείται με κυτταρομετρία ροής. Πελλέτα 1×10^6 κύτταρων μονιμοποιούνται με 100% αιθανόλη για 10 min και έπειτα γίνεται πλύσιμο με 70% αιθανόλη στην οποία μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα. Στη συνέχεια επωάζονται για 1 ώρα σε διάλυμα PBS που περιέχει 100μg/ml RNase A για την καταστροφή του RNA και γίνεται απευθείας χρώση με 15μl ιωδιούχου προπιδίου για λίγα λεπτά. Το ιωδιούχο προπίδιο συνδέεται στο DNA και μας επιτρέπει ανάλογα με την ένταση του φθορισμού του να διακρίνουμε σε ποια φάση του κυτταρικού κύκλου βρίσκονται τα κύτταρα της καλλιέργειας. Τα κύτταρα εισέρχονται σε κυτταρομετρητή ροής της BIORAD και η κατανομή του αναλύεται σε κατάλληλο υπολογιστικό πρόγραμμα.

2.2.16. Παρασκευή χρωματίνης

Σε καλλιέργεια B λεμφοκυττάρων με πυκνότητα 1×10^6 κύτταρα στο ml που έχουν υποστεί την εκάστοτε επεξεργασία γίνεται μονιμοποίηση της χρωματίνης με 1.1% φορμαλδεΰδη (1/10 του όγκου της καλλιέργειας από φορμαλδεΰδη 11%) για 12 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση της μονιμοποίησης σταματά με τη προσθήκη γλυκίνης σε τελική συγκέντρωση 0.125M (1/20 του όγκου της καλλιέργειας από διάλυμα γλυκίνης 25M). Έπειτα γίνονται τρία διαδοχικά πλυσίματα των κυττάρων με PBS που περιέχει αναστολείς πρωτεασών (1mM PMSF) και φυγοκεντρήσεις για 5 min στις 2000 rpm στους 4°C. Μετά την τρίτη φυγοκέντρωση η πελλέτα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε διάλυμα λύσης των κυττάρων (**Lysis buffer**: 1% SDS, 10mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH 8). Για κάθε 10×10^6 κύτταρα βάζουμε 1ml του διαλύματος αυτού και τοποθετούνται στον πάγο για 10 min ώστε να λυθούν οι κυτταρικές μεμβράνες. Έπειτα, η χρωματίνη σπάει σε μικρότερα τμήματα των 250bp-500bp με τη βοήθεια υπερήχων με 7 εφαρμογές διάρκειας 60 sec ενώ η ένταση των υπερήχων ρυθμίζεται αναλόγως του όγκου κάθε δείγματος. Στη συνέχεια φυγοκεντρώνται για 15 min στις 14.000 rpm στους 4°C για την απομάκρυνση κυτταρικών υπολειμμάτων και γίνεται ηλεκτροφόρηση μιας μικρής ποσότητας, μετά από θέρμανση στους 65°C για 5 min προκειμένου να αποδιαταχθούν οι πρωτεΐνες, για την ταυτοποίηση του μεγέθους των τμημάτων στα οποία έσπασε η χρωματίνη. Η χρωματίνη διατηρείται στους -80°C για λίγες εβδομάδες.

2.2.17. Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (*Chromatin Immunoprecipitation, CHIP*)

Για την ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης χρησιμοποιούνται σφαιρίδια αгарόζης πρωτεΐνης G τα οποία αφού πλυθούν με το διάλυμα ανοσοκατακρήμνισης (**IP buffer**: 0.01% SDS, 1.1% TritonX-100, 1.2mM EDTA, 16.7mM Tris-HCl pH 8, 167mM NaCl και αναστολείς πρωτεασών) μπλοκάρονται με BSA 1mg/ml, Salmon sperm DNA 100μg/ml και IP buffer.

Η ανοσοκατακρήμνιση πραγματοποιείται με ποσότητα χρωματίνης που αντιστοιχεί σε 1×10^6 κύτταρα. Αραιώνεται αρχικά σε IP buffer 4 φορές και επωάζεται με το κάθε αντίσωμα (2-10μg) O/N στους 4°C με ανακίνηση. Ξεχωριστά ανακινούνται O/N και τα σφαιρίδια της πρωτεΐνης A με το διάλυμα μπλοκαρίσματος.

Την επόμενη μέρα μοιράζονται τα σφαιρίδια ισόποσα στα δείγματα και επωάζονται 3 ώρες στους 4°C σε ανακίνηση προκειμένου να πιάσει η πρωτεΐνη A την Fc ουρά του αντισώματος το οποίο μετά την επώαση του με τη χρωματίνη θα έχει συνδεθεί με την πρωτεΐνη που αναγνωρίζει. Έπειτα, πραγματοποιούνται 5 πλυσίματα, για να καθαριστούν τα σύμπλοκα χρωματίνης-αντισώματος-σφαιριδίων, με 1ml από τα παρακάτω διαλύματα με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις για 1 min στις 6000 rpm στους 4°C: 2 πλυσίματα με χαμηλής αλατότητας διάλυμα (0.1% SDS, 1% TritonX-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH 8, 150mM NaCl και αναστολείς πρωτεασών), 2 πλυσίματα με υψηλής αλατότητας διάλυμα (0.1% SDS, 1% TritonX-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH 8, 150mM NaCl και αναστολείς πρωτεασών) και 1 πλύσιμο με T.E, pH 8. Μετά το τελευταίο πλύσιμο γίνεται αντίστροφη μονιμοποίηση των αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών-πρωτεϊνών και πρωτεϊνών-DNA με τη προσθήκη πρωτεϊνάσης K 200μg/ml, SDS 0.5% και TE μέχρι τον τελικό όγκο των 200μl. Πραγματοποιείται επώαση των δειγμάτων στους 55°C για 3 ώρες και στη συνέχεια O/N στους 65°C.

Την επόμενη μέρα γίνεται καθαρισμός των δειγμάτων 2 φορές με ίσο όγκο μίγματος φαινόλης, χλωροφορμίου και ισοαμυλικής αλκοόλης και μετά με ίσο όγκο χλωροφορμίου. Έπειτα, κατακρήμνιση του DNA με 2 όγκους αιθανόλης, 1/10 του όγκου οξικό νάτριο και 20μg γλυκογόνου. Η πελλέτα επαναδιαλύεται σε 70μl H₂O. Η ποσότητα του DNA που κατακρημνίστηκε ταυτοποιείται ποσοτικά με real time PCR χρησιμοποιώντας σαν συνολική ποσότητα που χρησιμοποιήθηκε το 1/10 του συνολικού όγκου του δείγματος.

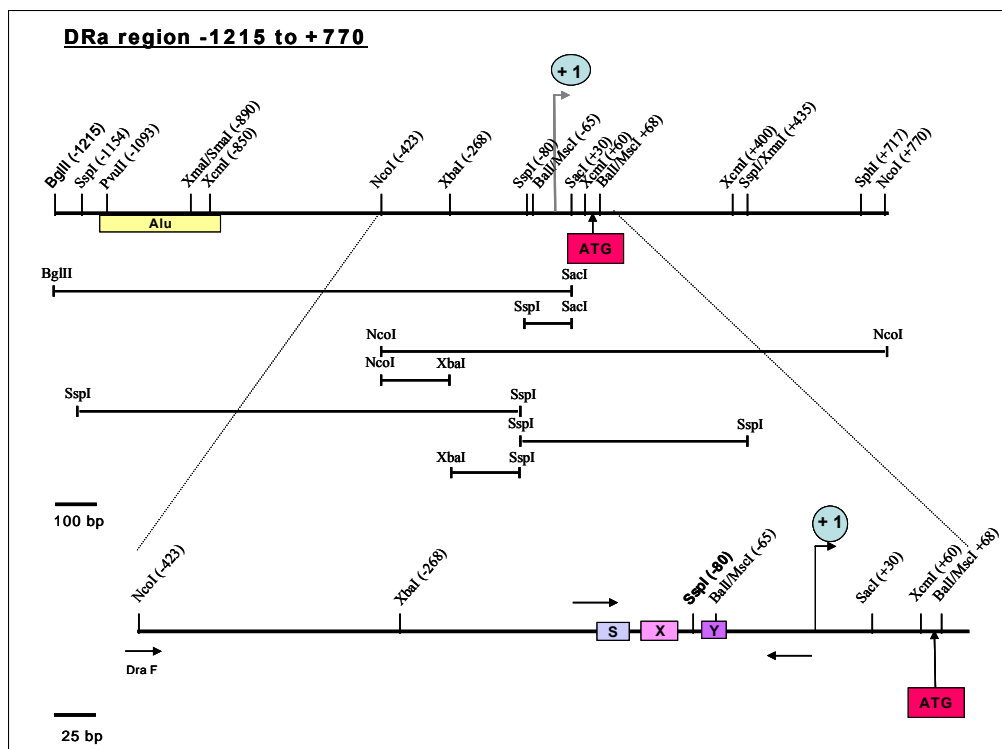
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Η ΥΠΕΡΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΟΥ HLA-DRA ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΕΙΝΑΙ ΑΝΑΛΟΓΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΣΤΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ Raji

Γενικά, η χρωματινική δομή των ενεργών μεταγραφικά γονιδίων έχει μια πιο ανοιχτή αρχιτεκτονική σε αντίθεση με γονίδια που δεν εκφράζονται (Hebbes et al., 1988). Η τεχνική της υπερευαισθησίας της χρωματινής σε περιοριστικές ενδονουκλεάσες μας δίνει τη δυνατότητα να μελετήσουμε σε ποιο βαθμό είναι προσβάσιμη η υπό μελέτη περιοχή σε πρωτεΐνες, όπως σε μεταγραφικούς παράγοντες.

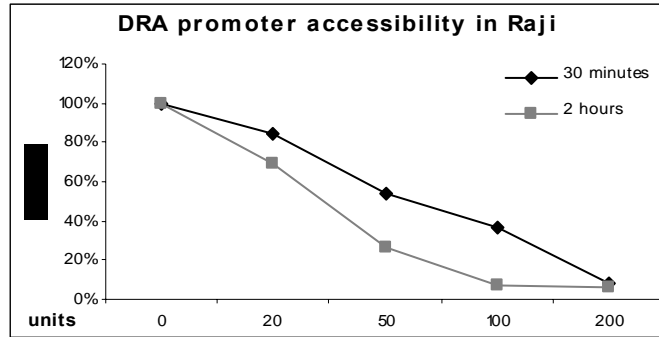
Στην προκειμένη περίπτωση η περιοχή αυτή είναι ένα χαρακτηριστικός υποκινητής των τάξης II γονιδίων και συγκεκριμένα του HLA-DRA γονιδίου. Ο υποκινητής αυτός όπως φαίνεται από τον περιοριστικό του χάρτη διαθέτει μια περιοριστική θέση μεταξύ του X και του Y κουτιού του, η οποία χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα υπερευαισθησίας της χρωματινής (εικόνα 14). Η θέση αυτή είναι καθοριστική για την πρόσβαση της χρωματινικής δομής διότι βρίσκεται στη ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου αυτού, στη θέση δηλαδή δημιουργίας του ενισχυσώματος.



Εικόνα (14). Περιοριστικός χάρτης του υποκινητή του HLA-DRA γονιδίου με τα χαρακτηριστικά ρυθμιστικά κουτιά της έκφρασης του.

Σε πυρήνες που απομονώθηκαν από Β λεμφοκύτταρα της κυτταρικής σειράς Raji που εκφράζουν συστατικά τα τάξης II γονίδια πραγματοποιήθηκε πέψη των πυρήνων αυτών (5×10^6 ανά αντίδραση) με τη περιοριστική ενδονουκλεάση SspI σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0, 20, 50, 100 και 200 units) και σε δύο διαφορετικά χρονικά διαστήματα (30min και 2hrs). Σε real time PCR με εκκινιτές εκατέρωθεν της

περιοριστικής θέσης και παρουσίαση των αποτελεσμάτων σε σχέση με το άκοπο DNA (χωρίς ένζυμο) δείχνουν ότι: ο υποκινητής HLA-DRA διαθέτει μια ανοιχτή χρωματινική δομή με αποτέλεσμα να είναι προσβάσιμη στο περιοριστικό ένζυμο αλλά και στους μεταγραφικούς παράγοντες που ρυθμίζουν το γονίδιο λόγω της συστατικής του έκφρασης. Ακόμη επώαση του ενζύμου για 30 min δίνει μια σχεδόν γραμμική σχέση της συγκέντρωσης του ενζύμου με τον βαθμό υπερευαισθησίας, ενώ στις 2 ώρες αν και διατηρείται η γραμμικότητα της σχέσης αυτής το ένζυμο έχει 4πλάσιο χρόνο στη διάθεση του με αποτέλεσμα να αυξάνεται το ποσοστό υπερευαισθησίας και οι 100 units να είναι αρκετές για πέσουν όλο το DNA. Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα ολική πέψη του υλικού δεν είναι εφικτή διότι πραγματοποιείται σε πυρήνες και πιθανότατα να υπάρχουν δομές π.χ. αποπτωτικά κύτταρα που να μην το επιτρέπουν.

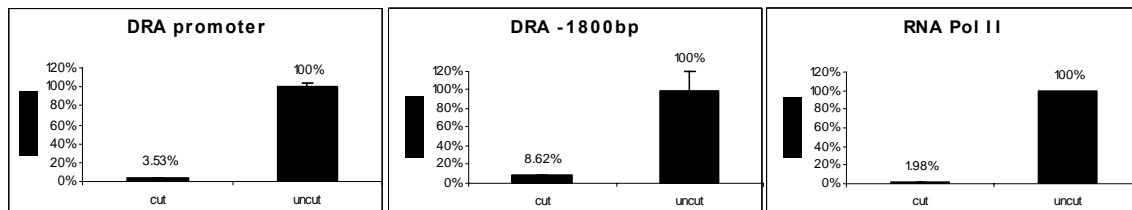


Εικόνα (15). Η πρόσβαση της χρωματινής αυξάνεται ανάλογα με την συγκέντρωση του ενζύμου.

Σε όλα τα παρακάτω πειράματα υπερευαισθησίας της χρωματινής θα χρησιμοποιηθεί το χρονικό διάστημα των 30 min και ορισμένες από τις συγκεντρώσεις του ενζύμου της SspI.

3.2. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΟΥ HLA-DRA ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΣΤΙΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ Raji ΚΑΙ RJ2.2.5

Όπως προαναφέρθηκε η κυτταρική σειρά Raji εκφράζει συστατικά τα τάξης II γονίδια ιστοσυμβατότητας σε αντίθεση με ένα μετάλλαγμα της σειράς αυτής, τα RJ2.2.5 το οποίο δεν εκφράζει τα τάξης II λόγω απώλειας του CITA. Στην κυτταρική σειρά RJ2.2.5 η ρυθμιστική περιοχή καλύπτεται από το ενισχυόσωμα αλλά δεν είναι σε θέση να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή αφού λείπει ο βασικός ρυθμιστής τους. Για τη σύγκριση των δύο αυτών σειρών αλλά και για τα επόμενα πειράματα υπερευαισθησίας της χρωματινής επιλέχθηκαν άλλοι δύο γενετικοί τόποι οι οποίοι περιλαμβάνουν μια περιοριστική θέση ανάμεσα στους δύο εκκινιτές. Επιλέχθηκε μία θέση πολύ πιο απομακρυσμένη από τη θέση έναρξης της μεταγραφής στο -1800bp αλλά στο ίδιο γονίδιο του HLA-DRA και άλλη μια στην κωδική περιοχή του γονιδίου της RNA πολυμεράσης II, του πολυπεπτιδίου D. Και οι δυο αυτές περιοχές δεν αποτελούν γνωστές θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων και άρα δεν θα αναμέναμε να είναι προσβάσιμες. Για να βεβαιωθούμε ότι η περιοριστική θέση υπάρχει στα κύτταρα μας και δεν έχει υποστεί κάποια μεταλλαγή γίνεται πέψη σε γενωμικό DNA και έπειτα ανίχνευση



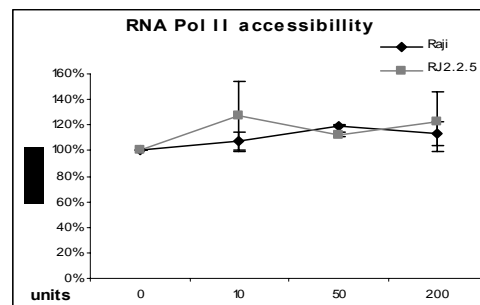
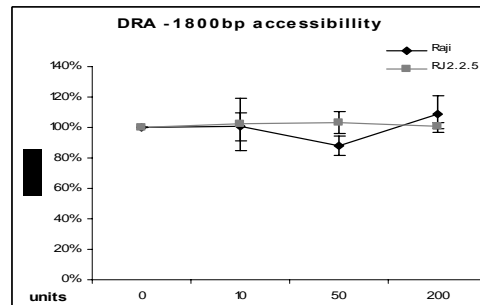
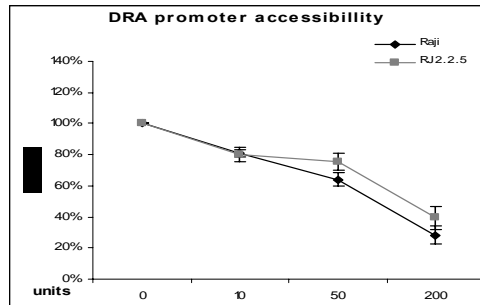
Εικόνα (16). Δοκιμαστική πέψη γενωμικού DNA για την διαβεβαίωση ύπαρξης της περιοριστικής θέσης στις συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές.

με real time PCR (εικόνα 16).

Από τη σύγκριση λοιπόν των δύο B λεμφοκυτταρικών σειρών σε συγκεντρώσεις του ενζύμου SspI (0, 10, 20 και 200units) στο χρονικό διάστημα των 30 min παρατηρείται ότι: στον υποκινητή του γονιδίου HLA-DRA υπάρχει σχεδόν ο ίδιος βαθμός πρόσβασης του ενζύμου παρόλο που στα RJ2.2.5 δεν γίνεται μεταγραφή. Πιθανότατα λοιπόν το ενισχυσώμα είναι αυτό που διατηρεί την χρωματινική δομή ανοιχτή σε ένα γονίδιο που όφειλε να μεταγράφεται συστατικά αλλά αυτό δεν συμβαίνει λόγω της έλλειψης του CITA.

Τα RJ2.2.5 κύτταρα σε μεγάλες συγκεντρώσεις ενζύμου φαίνεται να είναι να μην έχουν εντελώς την ίδια πρόσβαση με τα Raji αλλά η διαφορά είναι της τάξεως του 10% (εικόνα 17). Μια πιθανή εξήγηση για το φαινόμενο αυτό μπορεί να είναι η απουσία του CITA και συνεπώς η απουσία των ακετυλιώσεων που αυτός προκαλεί στις ιστόνες για να διατηρούν τη δομή σε μια πιο ανοιχτή κατάσταση είτε λόγω της ενδογενής ικανότητας του για ακετυλίωση είτε στρατολογώντας ακετυλοτρανσφεράσες (Kretsovali et al., 1998).

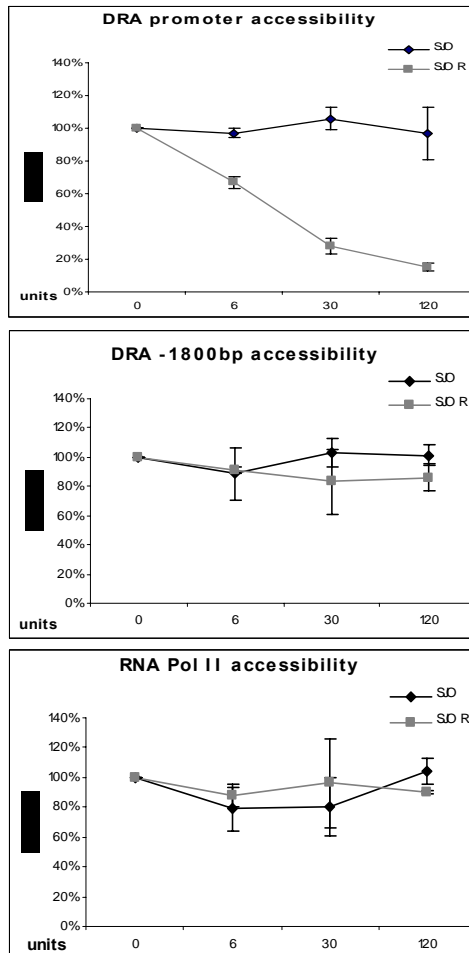
Όσον αφορά τις δύο άλλες περιοχές που επιλέχθηκαν για τη σύγκριση με τον υποκινητή δεν εμφανίζουν καμία πρόσβαση στο ένζυμο και στις δύο κυτταρικές σειρές, είτε εντός του γενετικού τόπου του DRA είτε εκτός. Τέλος, οι δύο αυτές περιοχές αποτελούν και μάρτυρες για την κατάσταση στην οποία βρίσκεται η χρωματίνη λόγω των χειρισμών που απαιτεί το πείραμα.



Εικόνα (17). Σύγκριση της πρόσβασης της χρωματίνης στις κυτταρικές σειρές Raji και RJ2.2.5.

3.3. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΟΥ HLA-DRA ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΣΤΙΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ SJO ΚΑΙ SJO R

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε σύγκριση της υπερευαισθησίας της χρωματίνης δυο άλλων κυτταρικών σειρών, των SJO και SJO R. Είναι επίσης B λεμφοκυτταρικές σειρές όπου τα SJO κύτταρα έχουν έλλειψη του RFX5 που είναι ένα από τα βασικά συστατικά του ενισχυσώματος. Πυρήνας του ενισχυσώματος φαίνεται να είναι το RFX σύμπλοκο και είναι απαραίτητο για τη σταθεροποίηση του συμπλόκου (Reith and Mach, 2001). Έτσι, όχι μόνο δεν έχουμε έκφραση των τάξης II γονιδίων αλλά όλοι οι υποκινητές είναι «γυμνοί», δεν καλύπτονται από το ενισχυσώμα όπως θα όφειλαν. Στην άλλη κυτταρική σειρά, SJO R, έχει επανεισαχθεί ο RFX5 με αποτέλεσμα να σωθεί ο φαινότυπος και να έχουμε και πάλι έκφραση των τάξης II γονιδίων. Για να μελετηθεί η πρόσβαση της χρωματίνης στις δύο αυτές κυτταρικές σειρές και να συγκριθούν μεταξύ



Εικόνα (18). Σύγκριση της πρόσβασης της χρωματίνης στις κυτταρικές σειρές SJO και SJO R.

τους πραγματοποιήθηκε η γνωστή τεχνική με μόνη διαφορά τη προσαρμογή των συγκεντρώσεων του ενζύμου στον αριθμό των κυττάρων, γι' αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις (0, 6, 30 και 120 units) για το χρονικό διάστημα των 30 min.

Συγκρίνοντας λοιπόν τη πρόσβαση της χρωματίνης στον υποκινητή του DRA γονιδίου παρατηρούμε ότι στα SJO δεν υπάρχει καθόλου πρόσβαση της χρωματίνης αφού το ποσοστό παραμένει στο 100% περίπου. Σε αντίθεση μ' αυτό βλέπουμε ότι στην κυτταρική σειρά SJO R όπου έχει επανεισαχθεί ο RFX5 η προσβασιμότητα της χρωματίνης επανέρχεται και συναγωνίζεται τα επίπεδα των Raji και RJ2.2.5 κυττάρων. Είναι λοιπόν εμφανές πως η πρόσβαση επανακτάται με τον σχηματισμό του ενισχυοσώματος στο οποίο πρωτεύον ρόλο παίζει το RFX σύμπλοκο και ο RFX5 σ' αυτό. Ενώ απουσία του η χρωματινική δομή παραμένει «κλειστή» ακόμη και σε ένα γονίδιο που θα όφειλε να εκφραστεί σε B λεμφοκύτταρα όπως αυτά.

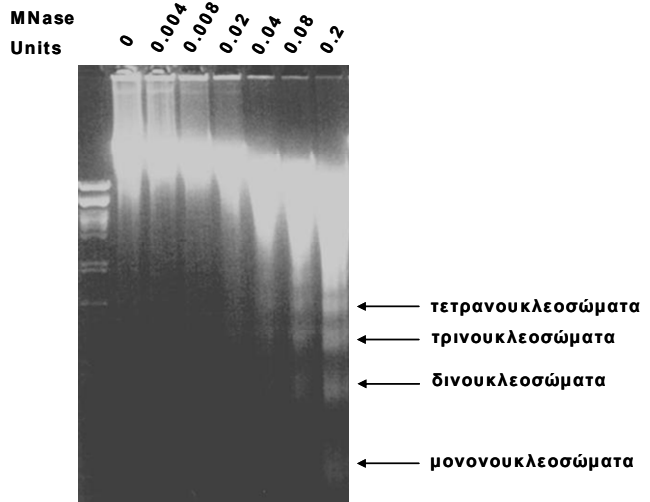
Η δύο άλλες περιοχές στο -1800bp από το σημείο έναρξης της μεταγραφής στο DRA γονίδιο αλλά και η περιοχή της RNA πολυμεράσης II παραμένουν αμετάβλητες, χωρίς καμία υπερευαισθησία στο ένζυμο και στις δύο κυτταρικές σειρές.

3.4. ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΟΥ ΝΟΥΚΛΕΟΣΩΜΑΤΟΣ ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ HLA-DRA ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΣΤΙΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ Raji ΚΑΙ SJO

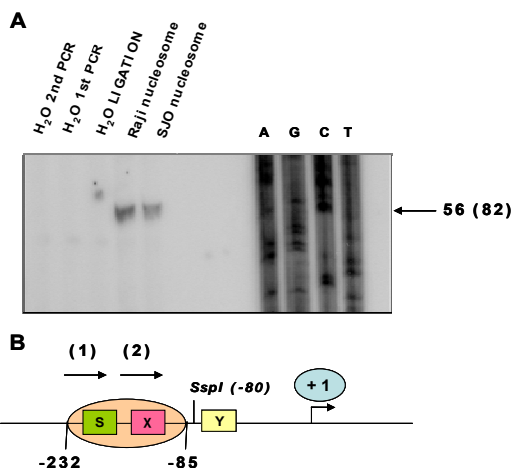
Μετά τα πειράματα υπερευαισθησίας της χρωματίνης στον υποκινητή του HLA-DRA γονιδίου και οι παρατηρήσεις ότι η πρόσβαση της χρωματίνης μεταβάλλεται στις διάφορες κυτταρικές σειρές ανάλογα με την ύπαρξη ή μη του ενισχυοσώματος προέκυψε το εύλογο ερώτημα αν υπάρχει κάποια μετατόπιση του νουκλεοσώματος στην περιοχή αυτή. Τα νουκλεοσώματα παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των γονιδίων και ανάλογα με τις τροποποιήσεις που δέχονται οι ουρές των ιστονών που τα αποτελούν σχηματίζουν προσβάσιμες ή μη περιοχές. Ακόμη παλιότερες μελέτες σε άλλα γονίδια, όπως στη IFN-β έδειξαν ότι για τη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου απαιτείται μετατόπιση του νουκλεοσώματος από τη θέση έναρξης της μεταγραφής (Lomvardas and Thanos, 2002). Στο συγκεκριμένο πείραμα έγινε απομόνωση μονονουκλεοσωμάτων από δύο κυτταρικές σειρές, από Raji τα οποία έχουν συστατική έκφραση των τάξης II

γονιδίων και προσβάσιμη χρωματινική δομή και τα SJO που δεν εκφράζουν τάξης II γονίδια, δεν σχηματίζεται το ενισχυόσωμα ούτε έχουν προσβάσιμη χρωματίνη.

Συνοπτικά, η χαρτογράφηση γίνεται ως εξής: αρχικά, απομονώνονται μονονουκλεοσώματα μετά από επώαση με μικροκοκκική νουκλεάση, γίνεται σύνδεση τους με δύο ολιγονουκλεοτίδια που είναι συμπληρωματικά μεταξύ τους και έχουν υβριδοποιηθεί προκειμένου να συνδεθούν στα άκρα των νουκλεοσωμάτων. Για να διαπιστώσουμε τη συγκέντρωση μικροκοκκικής νουκλεάσης που θα χρησιμοποιήσουμε έγινε ένα προ-πείραμα με διάφορες συγκεντρώσεις του ενζύμου για να βρεθεί η κατάλληλη συγκέντρωση (εικόνα 19). Επιλέχθηκε η συγκέντρωση εκείνη που θα δίνει μερική πέψη προκειμένου να αποφευχθεί η καταστροφή των άκρων των νουκλεοσωμάτων, η οποία είναι 0.08 units. Έπειτα, πραγματοποιείται μια αντίδραση PCR με εκκινιτές έναν ειδικό για το γονίδιο (1) και έναν από τα δύο ολιγονουκλεοτίδια (LINK 25), ενώ ακολουθεί μια δεύτερη re-PCR με μήτρα την πρώτη PCR με έναν εκκινιτή (2) πιο εσωτερικό από τον πρώτο ειδικό για το γονίδιο και σημασμένο στα άκρα με ραδιενεργό φώσφορο και πάλι το ολιγονουκλεοτίδιο LINK25. Με τη πρώτη PCR (κύκλοι 20) εμπλουτίζεται το προϊόν που θέλουμε να σημάνουμε με τη δεύτερη PCR (κύκλοι 5). Παράλληλα γίνεται αλληλούχηση ενός γνωστού τμήματος ενός πλασμιδίου με γνωστό εκκινιτή προκειμένου να είναι εφικτό να μετρήσουμε με ακρίβεια νουκλεοτιδίου την άκρη του νουκλεοσωματος. Σε κάθε βήμα τοποθετούμε και το κατάλληλο control για να είμαστε σίγουροι πως δεν έχουμε μολύνσεις (εικόνα 20).



Εικόνα (19). Διαβάθμιση συγκέντρωσης MNase για την ταυτοποίηση της ιδανικής για μερική πέψη της χρωματίνης.



Εικόνα (20). Α) Χαρτογράφηση των νουκλεοσωμάτων σε Raji και SJO κύτταρα. Ο αριθμός στην παρένθεση υποδηλώνει το μέγεθος της μάντας και το ολιγονουκλεοτίδιο με το A που προσθέτει επιπλέον η Taq πολυμεράση. Β) Γραφική αναπαράσταση του νουκλεοσωματος στον υποκινητή του DRA γονιδίου σε σχέση με τα κουτιά και την SspI.

εκκινιτή προκειμένου να είναι εφικτό να μετρήσουμε με ακρίβεια νουκλεοτιδίου την άκρη του νουκλεοσωματος. Σε κάθε βήμα τοποθετούμε και το κατάλληλο control για να είμαστε σίγουροι πως δεν έχουμε μολύνσεις (εικόνα 20).

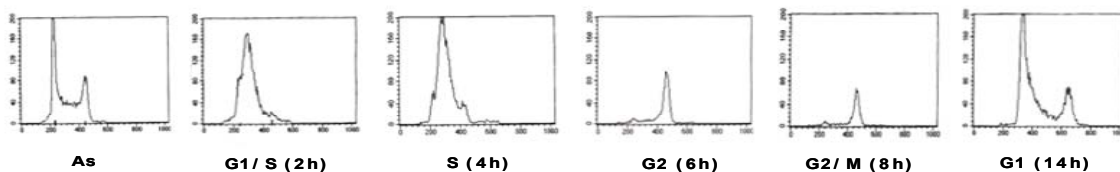
Στη προκειμένη περίπτωση μας ενδιέφερε να χαρτογραφήσουμε το άκρο του νουκλεοσωματος που βρίσκεται από τη πλευρά όπου υπάρχει η περιοριστική θέση SspI για να δούμε αν επηρεάζει τη πρόσβαση της χρωματίνης ή όχι στις δύο κυτταρικούς τύπους. Έτσι, διαπιστώθηκε ότι και στους δύο κυτταρικούς τύπους το νουκλεόσωμα εντοπίζεται μεταξύ των θέσεων -85 και -232 καλύπτοντας τα δύο κουτιά S και X αφήνοντας απ' έξω το Y κουτί αλλά και τη θέση SspI.

Φαίνεται λοιπόν ότι το συγκεκριμένο νουκλεόσωμα δεν είναι ο καθοριστικός παράγοντας για τη πρόσβαση της χρωματίνης στον υποκινητή των τάξης II γονιδίων. Πιθανότατα το ενισχυόσωμα να είναι σε θέση να συνδέεται στα γονίδια αυτά χωρίς να υπάρχει μετατόπιση του νουκλεοσώματος ή το επόμενο νουκλεόσωμα να ρυθμίζει τη μεταγραφή των γονιδίων και να είναι αυτό που μετακινείται. Το γεγονός ότι παρατηρούμε διαφορετική πρόσβαση στη περίπτωση των Raji κυττάρων και των SJO πιθανόν να οφείλεται σε άλλου τύπου διαμορφώσεις της χρωματίνης στη δεύτερη κυτταρική σειρά όπως τη αναδίπλωση και συνάμα συμύκνωση της περιοχής ή ακόμα και τη μεταφορά της σε ετεροχρωματινικές περιοχές εφόσον δεν διαθέτει τον βασικό συντελεστή για τον σχηματισμό του ενισχυοσώματος. Μια τέτοια εξήγηση θα δικαιολογούσε και τη συστατική παρουσία του ενισχυοσώματος σε όλους τους τύπους κυττάρων ακόμα και σε κύτταρα που δεν θα τα εκφράσουν ποτέ. Πιθανά λόγω της σπουδαιότητας των γονιδίων αυτών ο οργανισμός έχει προνοήσει να βρίσκονται μονίμως σε μη συμυκνωμένη μορφή ώστε να είναι ταχύτατη η ενεργοποίησή τους όταν χρειαστεί και κατά συνέπεια και η απάντηση του σε ξένα αντιγόνα. Η θεωρία αυτή υποστηρίζεται και με τα παρακάτω πειράματα όπου παρατηρείται γονιδιακή σήμανση του γενετικού αυτού τύπου ακόμα και κατά τη μίτωση.

3.5. ΣΗΜΑΝΣΗ ΤΩΝ ΤΑΞΗΣ II ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗ ΜΙΤΩΣΗ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΒΑΣΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΟΥ ΕΝΙΣΧΥΟΣΩΜΑΤΟΣ RFX5 ΚΑΙ NFYB

Στα πειράματα του κυτταρικού κύκλου απαραίτητη προϋπόθεση είναι ο συγχρονισμός των κυττάρων, στην προκειμένη περίπτωση των Raji κυττάρων που εκφράζουν συστατικά τα τάξης II γονίδια. Ο συγχρονισμός της καλλιέργειας απαιτείται προκειμένου να μπορούμε κατόπιν της απελευθέρωσης των κυττάρων να απομονώσουμε πληθυσμούς κυττάρων που να βρίσκονται στην ίδια φάση του κυτταρικού κύκλου. Είναι πολύ σημαντικό ο πληθυσμός να είναι όσο το δυνατόν πιο ομοιογενής ώστε τα αποτελέσματα να ανταποκρίνονται στην εκάστοτε φάση του κυτταρικού κύκλου. Κατά τη συλλογή δειγμάτων για παρασκευή χρωματίνης, συλλέγετε και ένα μικρό δείγμα του πληθυσμού για χρώση με ιωδιούχο προπίδιο και κυτταρομετρία ροής.

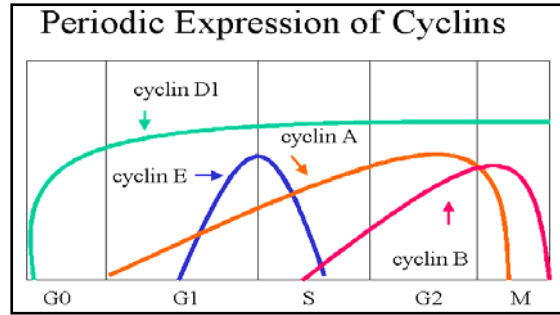
Έτσι, συλλέχθηκαν δείγματα κάθε 2 ώρες μετά από την απελευθέρωση, όπου στις 2 ώρες τα κύτταρα βρισκόταν στην G1/S, μετά από 4 ώρες στην S, μετά από 6 ώρες στην G2, μετά από 8 ώρες στην G2/M και τέλος μετά από 14 ώρες ξαναμπαίνουν στην G1 του επόμενου κυτταρικού κύκλου (εικόνα 21). Όλοι οι πληθυσμοί συγκρίνονται με τα ασύγχρονα κύτταρα. Επομένως, παρασκευάζονται χρωματίνες από τα διάφορα χρονικά διαστήματα που αντιστοιχούν σε φάσεις του κυτταρικού κύκλου και πραγματοποιείται ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης με διάφορα αντισώματα για να διαπιστωθεί η παρουσία των παραγόντων ή των τροποποιήσεων αυτών κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και ιδιαίτερα κατά τη μίτωση.



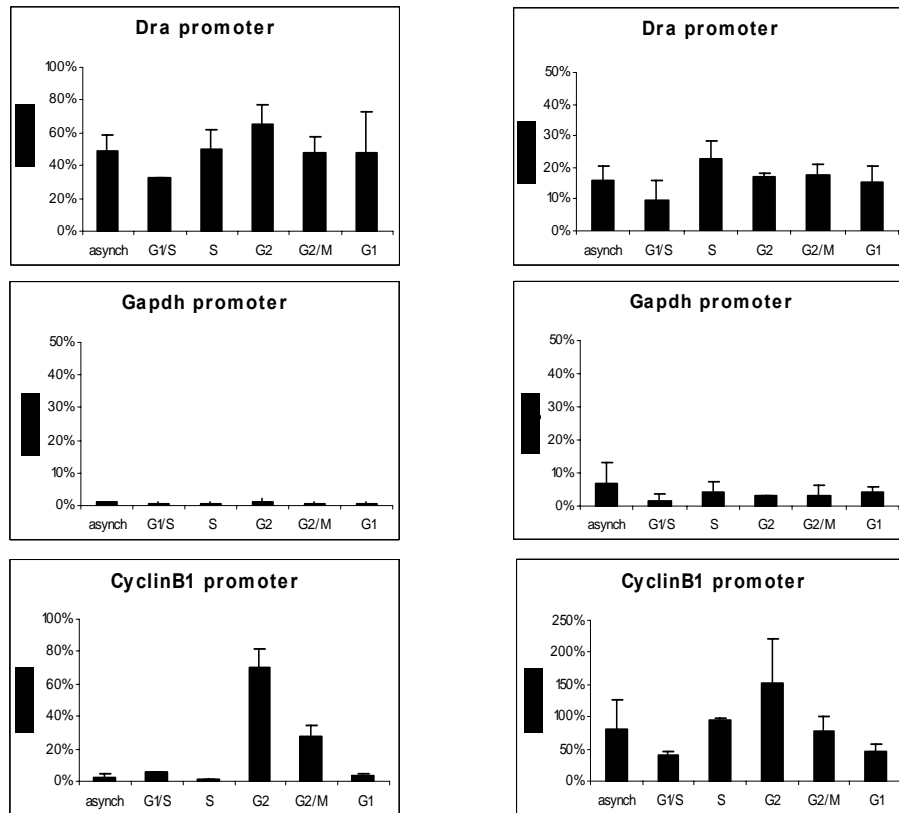
Εικόνα (21) . Ανάλυση δειγμάτων των κυτταρικών πληθυσμών με κυτταρομετρία ροής και χρώση με ιωδιούχο προπίδιο για την εύρεση της φάσης του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκονται.

Ακόμη στα πειράματα κυτταρικού κύκλου κατάλληλα γονίδια που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν control είναι τα γονίδια των κυκλινών λόγω της περιοδικής έκφρασης (εικόνα 22).

Οι πρώτες ανοσοκατακρημνίσεις χρωματίνης που πραγματοποιήθηκαν αφορούσαν δύο μέλη του ενισχυσώματος, τον RFX5 που βρίσκεται στο RFX σύμπλοκο και τον NFYB που βρίσκεται στο NFY σύμπλοκο. Η Real time PCR έδειξε την παρουσία και των δύο παραγόντων καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου αλλά και κατά τη μίτωση. Η κινητική και των δύο παραγόντων δείχνει ότι παραμένουν στον υποκινητή του DRA γονιδίου σημαίνοντας το γονίδιο κατά τη μίτωση. Όσον αφορά τον υποκινητή του γονιδίου GAPDH δεν παρατηρείται RFX5 όπως άλλωστε και θα όφειλε αφού δεν ρυθμίζεται απ' αυτόν ενώ εντοπίζεται σε ελάχιστη ποσότητα ο NFYB ο οποίος φαίνεται να τον ρυθμίζει λόγω των πολλαπλών CCAAT κουτιών που έχει. Τέλος, στον υποκινητή της CyclinB1 παρατηρείται NFYB ο οποίος τη ρυθμίζει (Manni et al., 2001) και μάλιστα αυξάνεται κατά τη G2 όπου και η CyclinB1 εκφράζεται ενώ φαίνεται να υπάρχει και RFX5 κατά τη G2 και G2/M που αποτελεί μια εντελώς νέα λειτουργία του παράγοντα αυτού που εξαρτάται από τη μίτωση (εικόνα 23). Σίγουρα η τελευταία παρατήρηση χρειάζεται περαιτέρω πειραματική ανάλυση.



Εικόνα (22). Διαφορική έκφραση κυκλινών κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.



IP: a-RFX-5

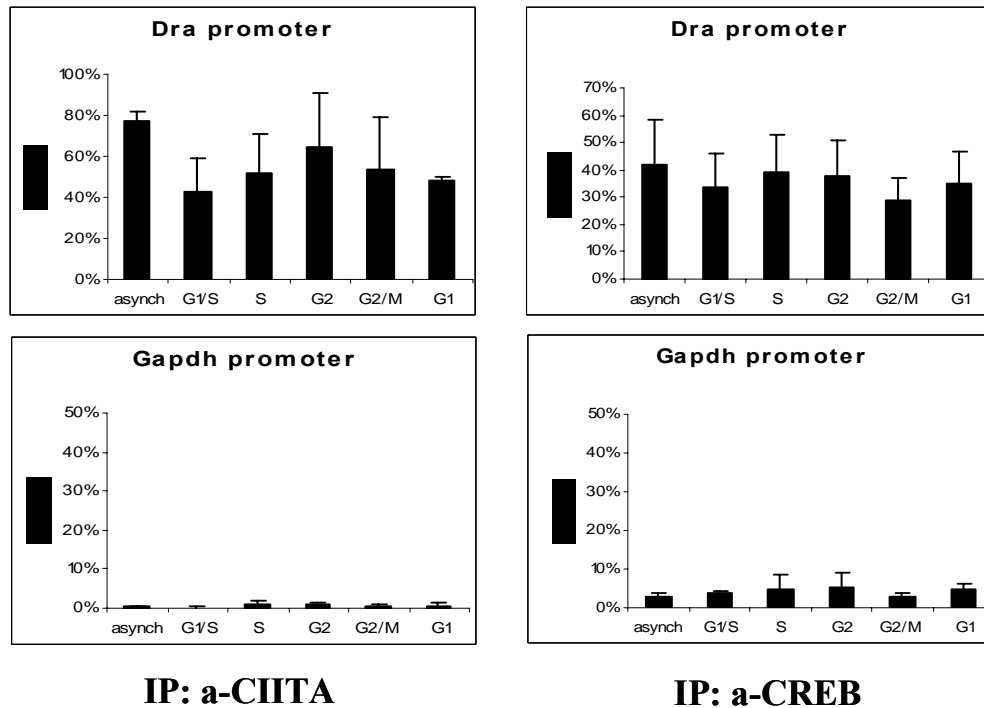
IP: a-NFY-B

Εικόνα (23). Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης για τους μεταγραφικούς παράγοντες RFX5 και NFYB του ενισχυσώματος κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.

3.6. ΣΗΜΑΝΣΗ ΤΩΝ ΤΑΞΗΣ II ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗ ΜΙΤΩΣΗ ΑΠΟ ΤΟΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ CREB ΚΑΙ ΤΟΝ ΚΥΡΙΟ ΡΥΘΜΙΣΤΗ ΤΟΥΣ ΤΟΝ C/ITA

Τα επόμενα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης που πραγματοποιήθηκαν αφορούσαν τον μεταγραφικό παράγοντα και μέλος του ενισχυσώματος CREB αλλά και τον βασικό ρυθμιστή των τάξης II γονιδίων, τον C/ITA. Όπως φαίνεται και στα διαγράμματα ο CREB αλλά και ο C/ITA παραμένει στον υποκινητή των τάξης II γονιδίων κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και κυρίως κατά τη μίτωση. Κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει στο γονίδιο του GAPDH όσον αφορά τον C/ITA ενώ στην περίπτωση του CREB υπάρχει μια μικρή πρόσδεση, κάτι που πιθανολογείται και σε άλλες εργασίες (Damodaran et al., 2002). Η πρόσδεση των δύο παραγόντων στον DRA υποκινητή φαίνεται να παραμένει σταθερή χωρίς ιδιαίτερες διακυμάνσεις στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου (εικόνα 24).

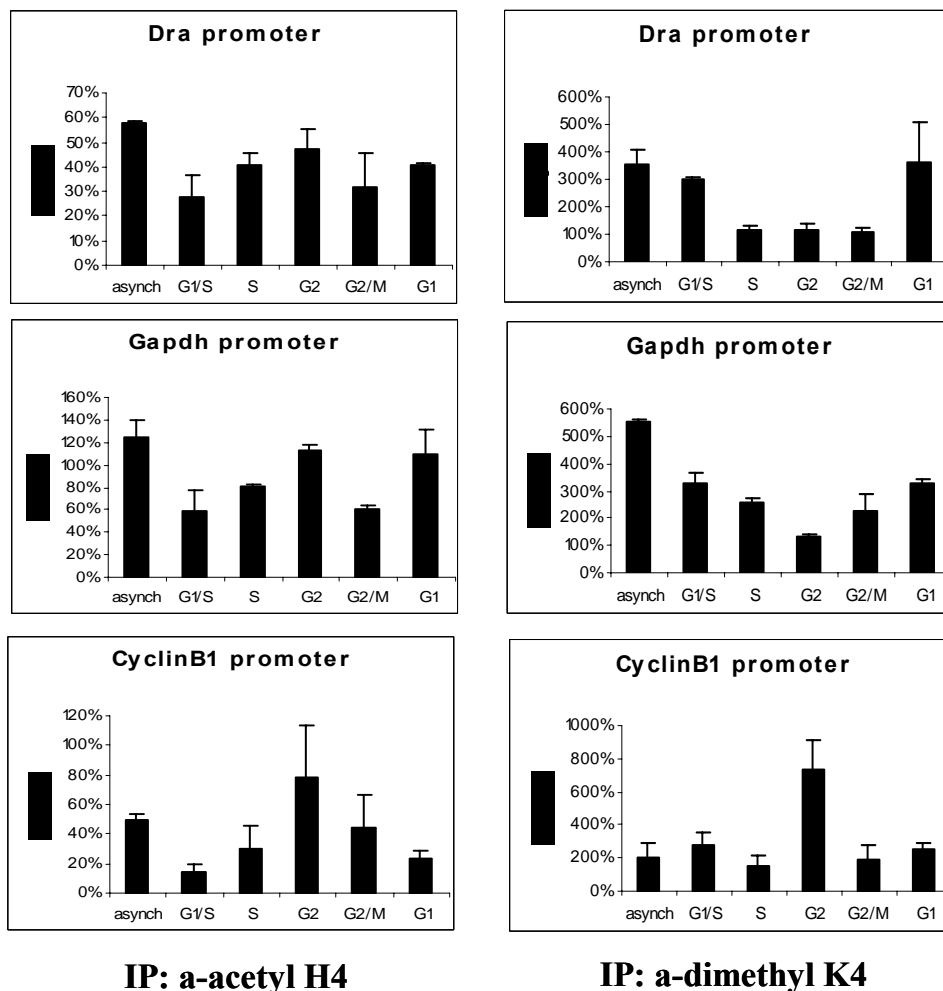
Είναι λοιπόν προφανές ότι τρεις βασικοί παράγοντες του ενισχυσώματος που συνιστούν και τα αντίστοιχα σύμπλοκα παραμένουν καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και κατά τη μίτωση στον υποκινητή του DRA γονιδίου, υποδηλώνοντας σήμανση του γενετικού τόπου των τάξης II γονιδίων κατά τη μίτωση. Επίσης, ο βασικός ρυθμιστής των γονιδίων αυτών, ο C/ITA εμφανίζεται και αυτός να παραμένει στην θέση του, προσδεδεμένος στο ενισχυσώμα του γονιδίου. Έτσι, γεννιέται το εύλογο ερώτημα αν οι ενεργοποιητικές τροποποιήσεις των ιστονών όπως η ακετυλίωση της ιστόνης H4 και η διμεθυλίωση της λυσίνης 4 στην ιστόνη H3 διατηρούνται στη μίτωση, όπως μελετάται παρακάτω.



Εικόνα (24). Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης για τον μεταγραφικό παράγοντα CREB του ενισχυσώματος και του βασικού ρυθμιστή των τάξης II γονιδίων, C/ITA, κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.

3.7. ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΤΩΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΩΝ ΤΩΝ ΙΣΤΟΝΩΝ ΤΩΝ ΤΑΞΗΣ II ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗ ΜΙΤΩΣΗ

Εφόσον ταυτοποιήθηκε η σήμανση των γονιδίων τάξης II κατά τη μίτωση είναι απαραίτητο να δειχθεί τι συμβαίνει με τις ενεργοποιητικές τροποποιήσεις των ιστονών. Δύο χαρακτηριστικές τροποποιήσεις που συνδέονται με μεταγραφικά ενεργή χρωματίνη είναι η ακετυλίωση της ιστόνης H4 και η διμεθυλίωση της λυσίνης 4 στην ιστόνη H3 (εικόνα 25). Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης για τις δύο αυτές τροποποιήσεις έδειξε ότι η ακετυλίωση της H4 παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου ενώ η διμεθυλίωση μειώνεται 3 φορές περίπου από την S μέχρι την M για να τριπλασιαστεί πάλι στην επόμενη G1. Στον υποκινητή του GAPDH ακολουθείται περίπου η ίδια κινητική της ακετυλίωσης ενώ η διμεθυλίωση πέφτει μόνο κατά τη G2 και επανέρχεται στη μίτωση. Ακόμη στον υποκινητή της CyclinB1 παρατηρείται αύξηση της ακετυλίωσης και της διμεθυλίωσης κατά τη G2 όπου συμβαίνει και η μέγιστη επαγωγή της.



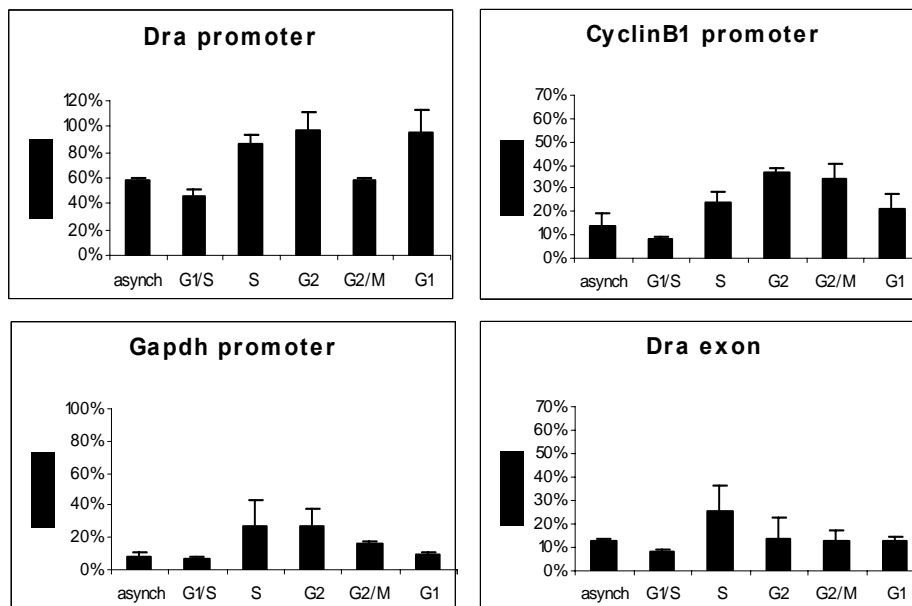
Εικόνα (25). Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης για δύο ενεργοποιητικές τροποποιήσεις των ιστονών κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.

3.8. ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΤΑΞΗΣ II ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗ ΜΙΤΩΣΗ

Η σήμανση των τάξης II γονιδίων κατά τη μίτωση με τη διατήρηση του ενισχυοσώματος, η ύπαρξη ενεργοποιητικών τροποποιήσεων των ιστονών αλλά κυρίως η παρουσία του βασικού ρυθμιστή των τάξης II γονιδίων, του CPTA γεννά το εύλογο ερώτημα μήπως υπάρχει μεταγραφική ενεργότητα των γονιδίων αυτών και κατά τη μίτωση. Μια πρώτη προσέγγιση αυτού του ερωτήματος που πραγματοποιήθηκε ήταν η ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης με αντίσωμα για την RNA πολυμεράση II (εικόνα 26). Έτσι, αρχικά θα παρατηρήσουμε αν υπάρχει στον υποκινητή του γονιδίου η βασική μεταγραφική μηχανή και έπειτα χρησιμοποιώντας εκκινιτές για ένα απομακρυσμένο από τον υποκινητή εξώνιο θα διαπιστώσουμε αν μπορούμε να ανιχνεύσουμε πολυμεράση σε φάση επιμήκυνσης.

Όπως διαφαίνεται από τα διαγράμματα υπάρχει πολυμεράση στον υποκινητή του DRA γονιδίου, και διατηρείται σταθερή με μικρές διακυμάνσεις κατά τη G1/S και τη G2 όπου μειώνεται. Στον υποκινητή του γονιδίου GAPDH υπάρχει σε μικρό ποσοστό πράγμα αρκετά πιθανό λόγω της συστατικής έκφρασης του γονιδίου σε όλους τους κυτταρικούς τύπους (housekeeping gene). Στον υποκινητή της CyclinB1 η πολυμεράση αυξάνεται κατά τη G2/M λόγω της έκφρασης της στις συγκεκριμένες φάσεις του κυτταρικού κύκλου.

Χρησιμοποιώντας εκκινιτές για ένα απομακρυσμένο από τον υποκινητή του DRA εξώνιο, συγκεκριμένα το εξώνιο 5 παρατηρούμε ότι ανιχνεύεται πολυμεράση που βρίσκεται σε φάση επιμήκυνσης περίπου 10-20% σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Ένα τέτοιο δεδομένο υποστηρίζει την πιθανότητα να υπάρχει μεταγραφή και κατά τη μίτωση σε χαμηλά επίπεδα, για να ταυτοποιηθεί όμως κάτι τέτοιο είναι απαραίτητα πειράματα που θα αποδεικνύουν την ύπαρξη νεοσυντιθέμενου RNA κατά τη μίτωση.



IP: a-polII

Εικόνα (26). Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης για την RNA πολυμεράση II και η μεταγραφική ενεργότητα των γονιδίων κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Λίγα είναι γνωστά για τη χρωματινική δομή των τάξης II γονιδίων και γενικότερα για τη διαμόρφωση της χρωματίνης στον χώρο. Με τη τεχνική της υπερειαισθησίας της χρωματίνης σε περιοριστικές ενδονουκλεάσες μελετήσαμε σε ποιο βαθμό είναι προσβάσιμη η περιοχή του υποκινητή του HLA-DRA γονιδίου σε διάφορες Β λεμφοκυτταρικές σειρές. Η πρόσβαση ή μη του ενζύμου μας δείχνει τη γενική κατάσταση της χρωματίνης, αν είναι δηλαδή προσβάσιμη σε μεταγραφικούς παράγοντες. Η πρόσβαση αυτή μπορεί να οφείλεται σε διάφορους λόγους ανάλογα με το υπό μελέτη γονίδιο κάθε φορά, όπως σε μετακίνηση νουκλεοσωμάτων, πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων, τροποποιήσεις ιστονών ή ακόμα και μεταγραφή.

Έτσι, τα πειράματα υπερειαισθησίας της χρωματίνης έδειξαν ότι υπάρχει διαφορετική προσβασιμότητα στη συγκεκριμένη περιοχή ανάμεσα στις διαφορετικές κυτταρικές σειρές. Στα Raji και στα RJ2.2.5 κύτταρα παρατηρήθηκε σημαντική υπερειαισθησία της χρωματίνης σχεδόν ανάλογη με τη συγκέντρωση του ενζύμου. Ως προς τη πρώτη κυτταρική σειρά, τα Raji, τα οποία εκφράζουν τα τάξης II συστατικά, φαίνεται η πρόσβαση να είναι αναμενόμενη λόγω της μεταγραφής των γονιδίων αυτών. Η παρόμοια πρόσβαση όμως στα RJ2.2.5, που δεν διαθέτουν CIIITA οπότε δεν πραγματοποιείται μεταγραφή, δείχνει ότι η παρουσία και μόνο του ενισχυοσώματος είναι αρκετή για να διατηρεί ανοιχτή τη χρωματίνη. Έπειτα, συγκρίνοντας τα SJO κύτταρα, τα οποία δεν διαθέτουν RFX5 και συνεπώς δεν μπορεί να συσταθεί το ενισχυόσωμα με τα SJO R, στα οποία έχει επανεισαχθεί ο RFX5 και έχει αποκατασταθεί ο φαινότυπος διαπιστώσαμε ότι στα πρώτα δεν υπήρχε καμία πρόσβαση ενώ στα δεύτερα είχε αποκατασταθεί και αυτή. Η παρατήρηση αυτή μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το ενισχυόσωμα είναι αυτό που διατηρεί τη διαμόρφωση της χρωματίνης σε ανοιχτή δομή είτε υπάρχει μεταγραφή είτε όχι.

Προχωρώντας ένα βήμα μπροστά, μελετήσαμε αν μεσολαβεί κάποια μετακίνηση του νουκλεοσώματος στην περιοχή αυτή χαρτογραφώντας το σε δύο κυτταρικές σειρές σε Raji και SJO οι οποίες επιλέχθηκαν λόγω της διαφορετικής πρόσβασης που εμφάνιζε η χρωματίνη στην περιοχή του υποκινητή του HLA-DRA. Έτσι, παρατηρήθηκε ότι δεν έχει μετακινηθεί το νουκλεόσωμα σε κάποιο από τους δύο κυτταρικούς τύπους. Το γεγονός ότι βλέπουμε διαφορετική πρόσβαση πιθανότατα να οφείλεται σε άλλου τύπου διαμορφώσεις της χρωματίνης στα SJO κύτταρα όπως τη αναδίπλωση και συνάμα συμπύκνωση της περιοχής ή ακόμα και τη μεταφορά της σε ετεροχρωματινικές περιοχές εφόσον δεν διαθέτει τον βασικό συντελεστή για τον σχηματισμό του ενισχυοσώματος, τον RFX5. Μια τέτοια εξήγηση θα δικαιολογούσε και τη συστατική παρουσία του ενισχυοσώματος σε όλους τους τύπους κυττάρων ακόμα και σε κύτταρα που δεν θα τα εκφράσουν ποτέ. Πιθανά λόγω της σπουδαιότητας των γονιδίων αυτών ο οργανισμός έχει προνοήσει να βρίσκονται μονίμως σε μη συμπυκνωμένη μορφή ώστε να είναι ταχύτερη η ενεργοποίησή τους όταν χρειαστεί και κατά συνέπεια και η απάντησή τους σε ξένα αντιγόνα.

Παρόμοια συμπεράσματα προέκυψαν και από στα πειράματα μελέτης του κυτταρικού κύκλου στα οποία υποδηλώνεται η σήμανση των τάξης II γονιδίων σε όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και ιδιαίτερα κατά τη μίτωση. Αυτό μαρτυρεί η πρόσδεση των παραγόντων αυτών στον υποκινητή του γονιδίου καθώς επίσης και οι ενεργοποιητικές τροποποιήσεις που φαίνεται να παραμένουν προκειμένου να

διατηρήσουν ανοιχτή τη χρωματίνη σ' αυτή τη περιοχή. Η συγκεκριμένη γονιδιακή σήμανση δεν εντάσσεται σε κάποιο από τα παραπάνω μοντέλα αλλά φαίνεται να είναι ένας καινούργιος μηχανισμός. Δεν έχουμε απλά την πρόσδεση ενός ειδικού για την περιοχή παράγοντα αλλά την παρουσία όλου του ενισχυοσώματος των τάξης II γονιδίων προσδεμένο στον υποκινητή καθώς επίσης και τις ενεργοποιητικές τροποποιήσεις των ιστονών. Όπως προαναφέρθηκε ο CITA είναι ο κύριος ρυθμιστής των τάξης II γονιδίων ο οποίος στρατολογείται εφόσον συσταθεί το υπόλοιπο ενισχυόσωμα και με τη σειρά του στρατολογεί ακετυλοτρανσφεράσες και κινάσες επάγει τη μεταγραφή των τάξης II γονιδίων φέρνοντας τη βασική μεταγραφική μηχανή. Στην προκειμένη περίπτωση της γονιδιακής σήμανσης υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να συμβαίνει κάτι τέτοιο, εφόσον πληρούνται όλες οι προϋποθέσεις για μεταγραφή: (1) η παρουσία ενισχυοσώματος, (2) η παρουσία του CITA και (3) η ανοιχτή δομή της χρωματίνης μέσω τροποποιήσεων των ιστονών. Πιθανότατα η μεταγραφή να είναι το βασικό στοιχείο αυτού του μοντέλου και να είναι απαραίτητη για να μη συμπυκνωθεί η περιοχή. Μπορεί όμως να είναι απλά το αποτέλεσμα της ανοιχτής δομής της χρωματίνης και να μην έχει λειτουργικό ρόλο. Για να απαντηθούν αυτά τα ερωτήματα πρέπει να μελετηθεί διεξοδικά το φαινόμενο.

Ένα τέτοιο μοντέλο όπου η μεταγραφή διατηρεί τη χρωματίνη σε ανοιχτή κατάσταση έχει διαπιστωθεί και σε άλλες περιπτώσεις, που δεν σχετίζονται άμεσα με τη μίτωση. Μια τέτοια περίπτωση, όπως προαναφέρθηκε, είναι ο LCR των τάξης II γονιδίων όπου σχηματίζεται ενισχυόσωμα προκαλώντας υπερακετυλίωση της περιοχής, στρατολόγηση της μεταγραφικής μηχανής και παραγωγή έκτοπων μεταγράφων προκειμένου να εξασφαλιστεί μια ανοιχτή κατάσταση χρωματίνης (Masternak et al., 2003). Άλλο ένα παράδειγμα ενδογονιδιακής μεταγραφής αυτή τη φορά διαπιστώθηκε στον V(D)J ανασυνδυασμό σε πρώιμα B-λεμφοκύτταρα όπου παρατηρήθηκε ότι κατά τον ανασυνδυασμό του V στο DJ για το σχηματισμό V(D)J παράγονταν μετάγραφα αντίστροφης κατεύθυνσης στην περιοχή του V σε συνδυασμό με την ακετυλίωση των H3 και H4 ιστονών (Bolland et al., 2004). Οι συγγραφείς προτείνουν δυο πιθανούς λόγους αυτού του φαινομένου: (1) ότι η ενδογονιδιακή μεταγραφή του V πραγματοποιείται για να εμποδίσει τον πρόωρο ανασυνδυασμό της περιοχής, πριν γίνει δηλαδή ο DJ ανασυνδυασμός και (2) ότι βοηθά να εξασφαλιστεί μια ανοιχτή δομή στη χρωματίνη για να διευκολυνθεί ο ανασυνδυασμός.

Για να διαπιστωθεί αν στα γονίδια τάξης II ισχύει ένα παρόμοιο μοντέλο μεταγραφής είναι απαραίτητο να δειχθεί ότι υπάρχει νεοσυντιθέμενο RNA κατά τη μίτωση. Αν κάτι τέτοιο ισχύει επόμενος στόχος θα είναι να μελετηθεί αν έχει κάποιο σαφή βιολογικό ρόλο ή είναι αποτέλεσμα της ανοιχτής δομής της χρωματίνης στην περιοχή αυτή.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Barrachina, M., Gonalons, E. and Celada, A. (1999) LPS upregulates MHC class II I-A expression in B lymphocytes at transcriptional and at translational levels. *Tissue Antigens*, **54**, 461-470.
- Bolland, D.J., Wood, A.L., Johnston, C.M., Bunting, S.F., Morgan, G., Chakalova, L., Fraser, P.J. and Corcoran, A.E. (2004) Antisense intergenic transcription in V(D)J recombination. *Nature immunology*, **5**, 630-636.
- Boss, J.M. and Jensen, P.E. (2003) Transcriptional regulation of the MHC class II antigen presentation pathway. *Curr Opin Immunol*, **15**, 105-111.
- Chen, D., Hinkley, C.S., Henry, R.W. and Huang, S. (2002) TBP dynamics in living human cells: constitutive association of TBP with mitotic chromosomes. *Mol Biol Cell*, **13**, 276-284.
- Chow, C.M., Georgiou, A., Szutorisz, H., Maia e Silva, A., Pombo, A., Barahona, I., Dargelos, E., Canzonetta, C. and Dillon, N. (2005) Variant histone H3.3 marks promoters of transcriptionally active genes during mammalian cell division. *EMBO Rep*, **6**, 354-360.
- Christova, R. and Oelgeschlager, T. (2002) Association of human TFIID-promoter complexes with silenced mitotic chromatin in vivo. *Nat Cell Biol*, **4**, 79-82.
- Chuang, P.T., Albertson, D.G. and Meyer, B.J. (1994) DPY-27: a chromosome condensation protein homolog that regulates *C. elegans* dosage compensation through association with the X chromosome. *Cell*, **79**, 459-474.
- Cremer, T. and Cremer, C. (2001) Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet*, **2**, 292-301.
- Damodaran, T.V., Abdel-Rahman, A., El-Sourady, M.H. and Abou-Donia, M.B. (2002) Differential alteration of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA in the central nervous system of hens treated with diisopropylphosphorofluoridate (DFP). *Neurochem Int*, **40**, 371-379.
- Elhasid, R. and Etzioni, A. (1996) Major histocompatibility complex class II deficiency: a clinical review. *Blood Rev*, **10**, 242-248.
- Emery, P., Durand, B., Mach, B. and Reith, W. (1996) RFX proteins, a novel family of DNA binding proteins conserved in the eukaryotic kingdom. *Nucleic Acids Res*, **24**, 803-807.
- Fontes, J.D., Jiang, B. and Peterlin, B.M. (1997) The class II trans-activator CIITA interacts with the TBP-associated factor TAFII32. *Nucleic Acids Res*, **25**, 2522-2528.
- Fontes, J.D., Kanazawa, S., Jean, D. and Peterlin, B.M. (1999) Interactions between the class II transactivator and CREB binding protein increase transcription of major histocompatibility complex class II genes. *Mol Cell Biol*, **19**, 941-947.
- Gorer, P.A. (1936) The detection of a hereditary antigenic difference in the blood of mice by means of human group A serum. *J. Genet*, **32**, 17-31.
- Greer, S.F., Zika, E., Conti, B., Zhu, X.S. and Ting, J.P. (2003) Enhancement of CIITA transcriptional function by ubiquitin. *Nat Immunol*, **4**, 1074-1082.
- Groudine, M. and Weintraub, H. (1982) Propagation of globin DNAase I-hypersensitive sites in absence of factors required for induction: a possible mechanism for determination. *Cell*, **30**, 131-139.

- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Hebbes, T.R., Thorne, A.W. and Crane-Robinson, C. (1988) A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *Embo J*, **7**, 1395-1402.
- Hirano, T. (2004) Chromosome shaping by two condensins. *Cell Cycle*, **3**, 26-28.
- Horton, R., Wilming, L., Rand, V., Lovering, R.C., Bruford, E.A., Khodiyar, V.K., Lush, M.J., Povey, S., Talbot, C.C., Jr., Wright, M.W., Wain, H.M., Trowsdale, J., Ziegler, A. and Beck, S. (2004) Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet*, **5**, 889-899.
- Jeppesen, P. (1997) Histone acetylation: a possible mechanism for the inheritance of cell memory at mitosis. *Bioessays*, **19**, 67-74.
- John, S. and Workman, J.L. (1998) Bookmarking genes for activation in condensed mitotic chromosomes. *Bioessays*, **20**, 275-279.
- Johnson, T.C. and Holland, J.J. (1965) Ribonucleic acid and protein synthesis in mitotic HeLa cells. *J Cell Biol*, **27**, 565-574.
- Kanazawa, S., Okamoto, T. and Peterlin, B.M. (2000) Tat competes with CIITA for the binding to P-TEFb and blocks the expression of MHC class II genes in HIV infection. *Immunity*, **12**, 61-70.
- Klein, J. and Sato, A. (2000) The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med*, **343**, 702-709.
- Kouskouti, A. and Talianidis, I. (2005) Histone modifications defining active genes persist after transcriptional and mitotic inactivation. *Embo J*, **24**, 347-357.
- Kretsovali, A., Agalioti, T., Spilianakis, C., Tzortzakaki, E., Merika, M. and Papamatheakis, J. (1998) Involvement of CREB binding protein in expression of major histocompatibility complex class II genes via interaction with the class II transactivator. *Mol Cell Biol*, **18**, 6777-6783.
- Kretsovali, A., Spilianakis, C., Dimakopoulos, A., Makatounakis, T. and Papamatheakis, J. (2001) Self-association of class II transactivator correlates with its intracellular localization and transactivation. *J Biol Chem*, **276**, 32191-32197.
- Littau, V.C., Allfrey, V.G., Frenster, J.H. and Mirsky, A.E. (1964) Active and Inactive Regions of Nuclear Chromatin as Revealed by Electron Microscope Autoradiography. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **52**, 93-100.
- Lomvardas, S. and Thanos, D. (2002) Modifying Gene Expression Programs by Altering Core Promoter Chromatin Architecture. *Cell*, **110**, 261-271.
- Mahanta, S.K., Scholl, T., Yang, F.C. and Strominger, J.L. (1997) Transactivation by CIITA, the type II bare lymphocyte syndrome-associated factor, requires participation of multiple regions of the TATA box binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 6324-6329.
- Manni, I., Mazzaro, G., Gurtner, A., Mantovani, R., Haugwitz, U., Krause, K., England, K., Sacchi, A., Soddu, S. and Piaggio, G. (2001) NF-Y mediates the transcriptional inhibition of the cyclin B1, cyclin B2, and cdc25C promoters upon induced G2 arrest. *J Biol Chem*, **276**, 5570-5576.
- Mantovani, R. (1999) The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene*, **239**, 15-27.

- Martinez-Balbas, M.A., Dey, A., Rabindran, S.K., Ozato, K. and Wu, C. (1995) Displacement of sequence-specific transcription factors from mitotic chromatin. *Cell*, **83**, 29-38.
- Masternak, K., Muhlethaler-Mottet, A., Villard, J., Zufferey, M., Steimle, V. and Reith, W. (2000) CIITA is a transcriptional coactivator that is recruited to MHC class II promoters by multiple synergistic interactions with an enhanceosome complex. *Genes Dev*, **14**, 1156-1166.
- Masternak, K., Peyraud, N., Krawczyk, M., Barras, E. and Reith, W. (2003) Chromatin remodeling and extragenic transcription at the MHC class II locus control region. *Nat Immunol*, **4**, 132-137.
- Morano, K.A. and Thiele, D.J. (1999) Heat shock factor function and regulation in response to cellular stress, growth, and differentiation signals. *Gene Expr*, **7**, 271-282.
- Muhlethaler-Mottet, A., Krawczyk, M., Masternak, K., Spilianakis, C., Kretsovali, A., Papamatheakis, J. and Reith, W. (2004) The S box of major histocompatibility complex class II promoters is a key determinant for recruitment of the transcriptional co-activator CIITA. *J Biol Chem*, **279**, 40529-40535.
- Muhlethaler-Mottet, A., Otten, L.A., Steimle, V. and Mach, B. (1997) Expression of MHC class II molecules in different cellular and functional compartments is controlled by differential usage of multiple promoters of the transactivator CIITA. *Embo J*, **16**, 2851-2860.
- Prescott, D.M. and Bender, M.A. (1962) Synthesis of RNA and protein during mitosis in mammalian tissue culture cells. *Exp Cell Res*, **26**, 260-268.
- Rabbitts, T.H., Hamlyn, P.H. and Baer, R. (1983) Altered nucleotide sequences of a translocated c-myc gene in Burkitt lymphoma. *Nature*, **306**, 760-765.
- Reith, W., Kobr, M., Emery, P., Durand, B., Siegrist, C.A. and Mach, B. (1994a) Cooperative binding between factors RFX and X2bp to the X and X2 boxes of MHC class II promoters. *J Biol Chem*, **269**, 20020-20025.
- Reith, W., LeibundGut-Landmann, S. and Waldburger, J.M. (2005) Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. *Nat Rev Immunol*, **5**, 793-806.
- Reith, W. and Mach, B. (2001) The bare lymphocyte syndrome and the regulation of MHC expression. *Annu Rev Immunol*, **19**, 331-373.
- Reith, W., Siegrist, C.A., Durand, B., Barras, E. and Mach, B. (1994b) Function of major histocompatibility complex class II promoters requires cooperative binding between factors RFX and NF-Y. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 554-558.
- Sarge, K.D. and Park-Sarge, O.K. (2005) Gene bookmarking: keeping the pages open. *Trends Biochem Sci*, **30**, 605-610.
- Segil, N., Guermah, M., Hoffmann, A., Roeder, R.G. and Heintz, N. (1996) Mitotic regulation of TFIID: inhibition of activator-dependent transcription and changes in subcellular localization. *Genes Dev*, **10**, 2389-2400.
- Shermoen, A.W. and O'Farrell, P.H. (1991) Progression of the cell cycle through mitosis leads to abortion of nascent transcripts. *Cell*, **67**, 303-310.
- Spilianakis, C., Kretsovali, A., Agalioti, T., Makatounakis, T., Thanos, D. and Papamatheakis, J. (2003) CIITA regulates transcription onset via Ser5-phosphorylation of RNA Pol II. *Embo J*, **22**, 5125-5136.

- Spilianakis, C., Papamatheakis, J. and Kretsovali, A. (2000) Acetylation by PCAF enhances CIITA nuclear accumulation and transactivation of major histocompatibility complex class II genes. *Mol Cell Biol*, **20**, 8489-8498.
- Spilianakis, C.G. and Flavell, R.A. (2004) Long-range intrachromosomal interactions in the T helper type 2 cytokine locus. *Nat Immunol*, **5**, 1017-1027.
- Spilianakis, C.G., Lalioti, M.D., Town, T., Lee, G.R. and Flavell, R.A. (2005) Interchromosomal associations between alternatively expressed loci. *Nature*, **435**, 637-645.
- Steimle, V., Otten, L.A., Zufferey, M. and Mach, B. (1993) Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome). *Cell*, **75**, 135-146.
- Struhl, G. (1981) A gene product required for correct initiation of segmental determination in *Drosophila*. *Nature*, **293**, 36-41.
- Strunnikov, A.V. (2003) Condensin and biological role of chromosome condensation. *Prog Cell Cycle Res*, **5**, 361-367.
- Taylor, J.H. (1960) Nucleic acid synthesis in relation to the cell division cycle. *Ann N Y Acad Sci*, **90**, 409-421.
- Ting, J.P. and Davis, B.K. (2005) CATERPILLER: a novel gene family important in immunity, cell death, and diseases. *Annu Rev Immunol*, **23**, 387-414.
- Tosi, G., Jabrane-Ferrat, N. and Peterlin, B.M. (2002) Phosphorylation of CIITA directs its oligomerization, accumulation and increased activity on MHCII promoters. *Embo J*, **21**, 5467-5476.
- van den Elsen, P.J., Gobin, S.J., van Eggermond, M.C. and Peijnenburg, A. (1998) Regulation of MHC class I and II gene transcription: differences and similarities. *Immunogenetics*, **48**, 208-221.
- Weintraub, H. (1985) High-resolution mapping of S1- and DNase I-hypersensitive sites in chromatin. *Mol Cell Biol*, **5**, 1538-1539.
- Xing, H., Wilkerson, D.C., Mayhew, C.N., Lubert, E.J., Skaggs, H.S., Goodson, M.L., Hong, Y., Park-Sarge, O.K. and Sarge, K.D. (2005) Mechanism of hsp70i gene bookmarking. *Science*, **307**, 421-423.
- Zika, E., Greer, S.F., Zhu, X.S. and Ting, J.P. (2003) Histone deacetylase 1/mSin3A disrupts gamma interferon-induced CIITA function and major histocompatibility complex class II enhanceosome formation. *Mol Cell Biol*, **23**, 3091-3102.