

Πανεπιστήμιο Κρήτης
Τμήμα Βιολογίας
Τμήμα Ιατρικής

Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας
Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και
Βιοτεχνολογίας

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ - ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗ

Μεταπτυχιακός Τίτλος Ειδίκευσης

**Μεθυλίωση του παράγοντα RFX5, συστατικού
του ενισχυοσώματος των γονιδίων τάξης II, από
τη μεθυλοτρανσφεράση αργινινών CARM1**

Φοίβη Σταυρίδη

Υπεύθυνος Καθηγητής: Ιωσήφ Παπαματθαϊάκης

Υπεύθυνη Εξετάστρια: Κλειώ Μαμαλάκη

Ηράκλειο, 2004

*Στη γιαγιά μου,
για τον καιρό που πέρασε
στο Ηράκλειο...*

Περιεχόμενα

Περίληψη 1

Abstract 1

1. Εισαγωγή

- 1.1 Σύμπλοκα Ιστοσυμβατότητας 2
- 1.2 Μεταγραφική Ρύθμιση των Συμπλόκων Τάξης II 5
 - 1.2.1 Παράγοντες NFY και CREB 6
 - 1.2.2 Παράγοντας CIITA 6
 - 1.2.3 Σύμπλοκο RFX και ο παράγοντας RFX5 7
- 1.3 Μεθυλοτρανσφεράσες αργινινών (PRMTs) 10

2. Υλικά και Μέθοδοι

- 2.1 Πλασμιδιακές Κατασκευές 11
- 2.2 Έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών 12
 - 2.2.1 Παρασκευή ανασυνδυασμένων GST-πρωτεϊνών 12
 - 2.2.2 Παρασκευή ανασυνδυασμένων His-πρωτεϊνών 13
- 2.3 In vitro μεθυλίωση πρωτεϊνών 14
- 2.4 GST-συγκατακρήμνιση πρωτεϊνών 15
- 2.5 Ανάλυση πρωτεϊνών με MALDI-MS 15

3. Αποτελέσματα - Συζήτηση 16

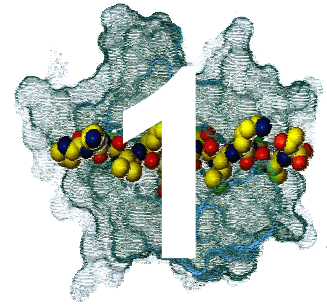
Βιβλιογραφία 22

Περίληψη

Είναι γνωστές αρκετές μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις παραγόντων που συμβάλλουν στη ρύθμιση των συμπλόκων ιστοσυμβατότητας τάξης II και οι περισσότερες αφορούν στον παράγοντα CIITA. Μοναδική εξαίρεση αποτελούν οι αναφορές για φωσφορυλίωση του συμπλόκου RFX, των οποίων η βιολογική σημασία δεν έχει διερευνηθεί. Στην εργασία αυτή αναφέρεται για πρώτη φορά η μεθυλίωση του παράγοντα RFX5 από τη μεθυλοτρανσφεράση αργινινών CARM1 (PRMT4). Προσδιορίστηκαν η περιοχή του RFX5 που αλληλεπιδρά με το ένζυμο *in vitro* και το κατάλοιπο-στόχος. Η αργινίνη που μεθυλιώνεται βρίσκεται στην περιοχή πλούσια σε προλίνες του RFX5, σε αλληλουχία παρουσιάζει ομοιότητες με μοτίβο αλληλεπίδρασης με περιοχές SH3, το οποίο αναφέρεται στη βιβλιογραφία ότι ρυθμίζεται από τη μεθυλίωση της αντίστοιχης αργινίνης. Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης το γεγονός ότι η αργινίνη-στόχος βρίσκεται δίπλα σε μία από τις σερίνες που φωσφορυλιώνονται από την PKA, δημιουργώντας υπόνοιες για συνδυαστική δράση των δύο τροποποιήσεων.

Abstract

A number of post-translational modifications with significance in the MHCII regulation has been reported to date. Most of them belong to the Class II Transactivator, CIITA, the only exception being reports of the RFX complex being phosphorylated, an event whose significance has not been investigated. Here the methylation of RFX5 by the arginine methyltransferase CARM1 (PRMT4) is reported. Both the RFX5 region that binds CARM1 *in vitro* and the arginine modified have been identified. The methylated arginine is located in the proline-rich region of RFX5 and exhibits sequence similarity with an arginine reported to regulate the interaction of a proline-rich with an SH3 domain. Even more intriguing is the fact that a serine next to the particular arginine is reported to be phosphorylated by PKA, raising the interesting possibility that the two modifications might act in concert.



Εισαγωγή

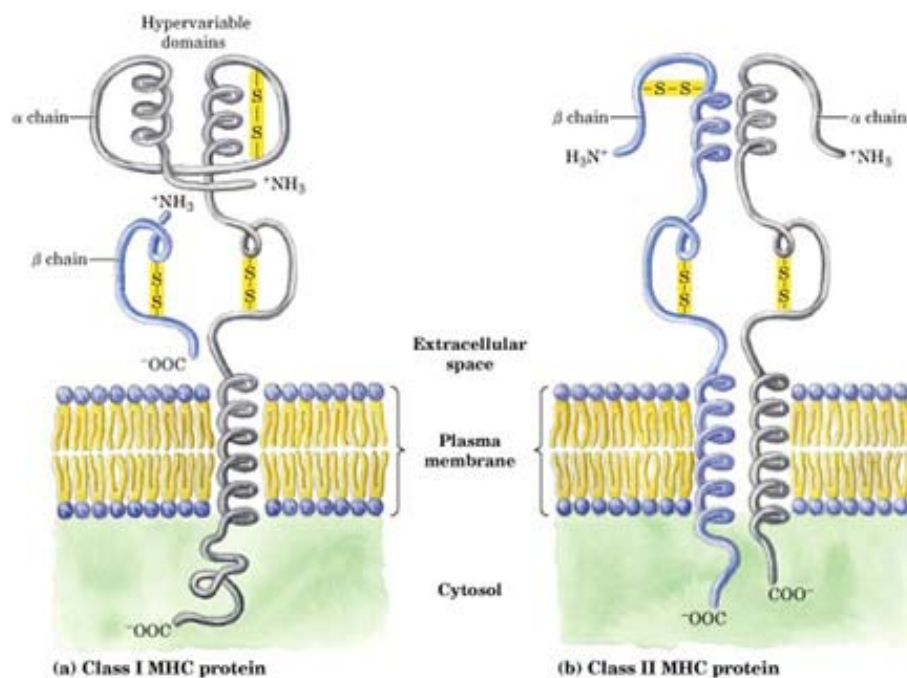
1.1 Σύμπλοκα Ιστοσυμβατότητας

Το ανοσοποιητικό σύστημα, προκειμένου να λειτουργήσει σωστά, πρέπει να μπορεί να διακρίνει ανάμεσα στα κύτταρα και τα μόρια του εαυτού του και σε αυτά που είναι ξένα και συνήθως επικίνδυνα. Λάθη στη διαδικασία αναγνώρισης μπορεί να οδηγήσουν σε σοβαρά προβλήματα, τα οποία μπορεί να προκληθούν από την επίθεση του ανοσοποιητικού στον ίδιο τον οργανισμό, ή αντίθετα, από την ανοχή ή την ανικανότητα αντιμετώπισης επιβλαβών στοιχείων όπως είναι οι μικροοργανισμοί ή τα καρκινικά κύτταρα. Στην πρώτη κατηγορία υπάγονται τα αυτοάνοσα νοσήματα, όπως είναι για παράδειγμα ο ζαχαρώδης διαβήτης τύπου I (νεανικός διαβήτης), όπου ο οργανισμός καταστρέφει τα κύτταρα που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ινσουλίνης. Στον αντίποδα, έχουμε περιπτώσεις όπου συγκεκριμένα κύτταρα ή μικροοργανισμοί αφήνονται να επιβιώσουν γιατί δεν αναγνωρίζονται ως επικίνδυνα, ή ευρύτερης κλίμακας καταστάσεις ανοσοανεπάρκειας όπου το ανοσοποιητικό σύστημα έχει χάσει σε σημαντικό βαθμό την ικανότητα να αντιδράσει στο περιβάλλον και που συνήθως οδηγούν στο θάνατο. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί και το σύνδρομο των γυμνών λεμφοκυττάρων, όπου τα κύτταρα του προσαρμόσιμου ανοσοποιητικού συστήματος δεν παρουσιάζουν στην επιφάνειά τους τα μόρια εκείνα που τους επιτρέπουν να εκτελέσουν αποτελεσματικά τις λειτουργίες τους, ένα σύνδρομο σπάνιο μεν, το οποίο όμως έχει προσφέρει πολλά στις γνώσεις μας γύρω από τη ρύθμιση της μεταγραφής των συμπλόκων ιστοσυμβατότητας τάξης II (βλ. παρακάτω).

Η αναγνώριση λοιπόν αποτελεί τον πυρήνα της ανοσολογικής απόκρισης ή ανοχής και η σημασία της δύσκολα μπορεί να υπερεκτιμηθεί. Σε μοριακό επίπεδο, αυτό που αναγνωρίζει το προσαρμόσιμο ανοσοποιητικό σύστημα είναι, ως επί το πλείστον, μικρά πεπτίδια

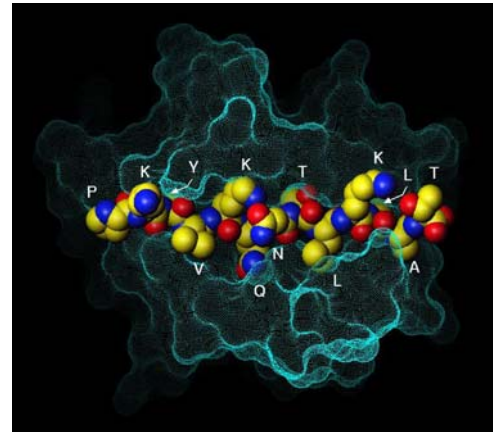
(αντιγόνα), τα οποία παρουσιάζονται από τα κύτταρα στην επιφάνειά τους, δεσμευμένα σε ειδικά μόρια, τα κύρια σύμπλοκα ιστοσυμβατότητας (**Major Histocompatibility Complexes, MHCs**). Τα κύρια σύμπλοκα ιστοσυμβατότητας οφείλουν την ονομασία τους στο γεγονός ότι καθορίζουν την ανοχή ή απόρριψη ενός μοσχεύματος, ανάλογα με το αν τα σύμπλοκα του δότη ομοιάζουν με του δέκτη - αν όχι, το ανοσοποιητικό σύστημα του δέκτη επιτίθεται στο μόσχευμα και το καταστρέφει. Υπάρχουν δύο τύποι MHCs, τα τάξης I και τα τάξης II. Τα **σύμπλοκα τάξης I** εκφράζονται σε όλα τα κύτταρα και είναι υπεύθυνα για την παρουσίαση των πρωτεϊνών που παράγονται μέσα στο κύτταρο στα T κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα. Έτσι, η παρουσία ξένου πεπτιδίου υποδηλώνει ότι το κύτταρο έχει μολυνθεί, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του T κυτταροτοξικού λεμφοκυττάρου και τη θανάτωση του μολυσμένου κυττάρου. Τα **σύμπλοκα τάξης II** εκφράζονται συστατικά μόνο σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, τα οποία έχουν την ικανότητα να λαμβάνουν πεπτίδια από το περιβάλλον, να τα επεξεργάζονται και να τα επιδεικνύουν προσδεσμένα στα τάξης II μόρια, προκειμένου να ενεργοποιήσουν τον υποπληθυσμό εκείνο των T βοηθών λεμφοκυττάρων που είναι ικανός να τα αναγνωρίσει - οι T βοηθοί συντονίζουν στη συνέχεια τις λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος με τρόπο ώστε να διατηρηθεί η ειδικότητα έναντι στο παθογόνο που προκάλεσε την αρχική ενεργοποίηση. Η έκφραση των συμπλόκων τάξης II μπορεί επίσης να επαχθεί σε αρκετούς τύπους κυττάρων από την ιντερφερόνη- γ (IFN- γ).

Η δομή των συμπλόκων τάξης I και τάξης II φαίνεται στο *Σχήμα 1.1*. Τα σύμπλοκα τάξης I αποτελούνται από μία πολυμορφική αλυσίδα, η οποία μπορεί να είναι τύπου HLA-A, -B ή -C και την αλυσίδα της β -μικροσφαιρίνης. Τα σύμπλοκα τάξης II αποτελούνται από δύο

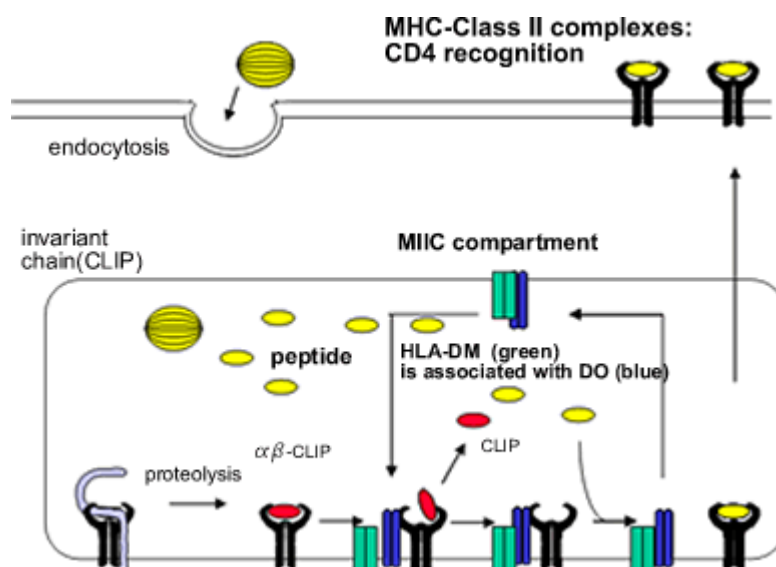


Σχήμα 1.1: Σχηματική παράσταση των κύριων συμπλόκων ιστοσυμβατότητας τάξης I και II

πολυμορφικές αλυσίδες, τις α και β και διακρίνονται σε τύπου HLA-DR, -DQ και -DP. Και στις δύο περιπτώσεις σχηματίζεται μία αύλακα μέσα στην οποία προσδένονται τα αντιγόνα - με τον τρόπο αυτό μπορούν να αναγνωριστούν ταυτόχρονα τόσο το αντιγόνο όσο και το κύριο σύμπλοκο ιστοσυμβατότητας. Σημειώνεται ότι τόσο τα τάξης I όσο και τα τάξης II σύμπλοκα δε μπορούν να σχηματιστούν απουσία του αντιγόνου - κατά συνέπεια κενά MHCs δεν υπάρχουν. Στο Σχήμα 1.2 απεικονίζεται ένα τάξης II σύμπλοκο και συγκεκριμένα ένα HLA-DR. Τα HLA-DR, -DQ και -DP αποτελούν τα “κλασσικά” MHC τάξης II. Εκτός από αυτά υπάρχουν και τα “μη κλασσικά” HLA-DO και HLA-DM, τα οποία δεν εκφράζονται στην κυτταρική μεμβράνη, βοηθούν όμως στη “φόρτωση” των κλασσικών τάξης II με αντιγόνα. Η διαδικασία αυτή είναι πιο εξειδικευμένη από ό,τι για τα τάξης I, αφού πρέπει να αποφευχθεί ο σχηματισμός συμπλόκου με αντιγόνα εαυτού στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Το πρόβλημα λύνεται με τη φόρτωση ενός προσωρινού, σταθερής αλληλουχίας πεπτιδίου (Ii, invariant chain), το οποίο στη συνέχεια αντικαθίσταται με το αντιγόνο. Στη διαδικασία αυτή είναι που συμμετέχουν τα μη κλασσικά τάξης II, σταθεροποιώντας το κενό, κλασσικό MHCII προκειμένου να γίνει η ανταλλαγή των πεπτιδίων. Η διαδικασία αυτή φαίνεται συνοπτικά στο Σχήμα 1.3.



Σχήμα 1.2: Σύμπλοκο του HLA-DR1 με πεπτίδιο του ιού της γρίπης

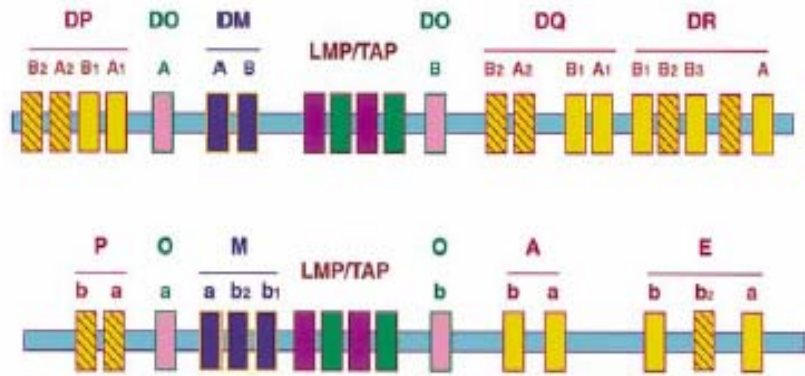


Σχήμα 1.3: Φόρτωση των MHCII με αντιγόνο

Το κλασσικό τάξης II φτάνει στο οργανίδιο φόρτωσης των τάξης II (MIIC) όπου η invariant chain υδρολύεται αφήνοντας ένα μικρό τμήμα (CLIP), το οποίο στη συνέχεια αντικαθίσταται από το αντιγόνο με τη βοήθεια του HLA-DM. Το HLA-DM σταθεροποιεί το μεταβατικό στάδιο της αντίδρασης, ενώ διμερίζεται με το HLA-DO του οποίου ο ακριβής ρόλος δεν είναι γνωστός.

Σχήμα 1.4 - Γονιδιακός τόπος των MHCII

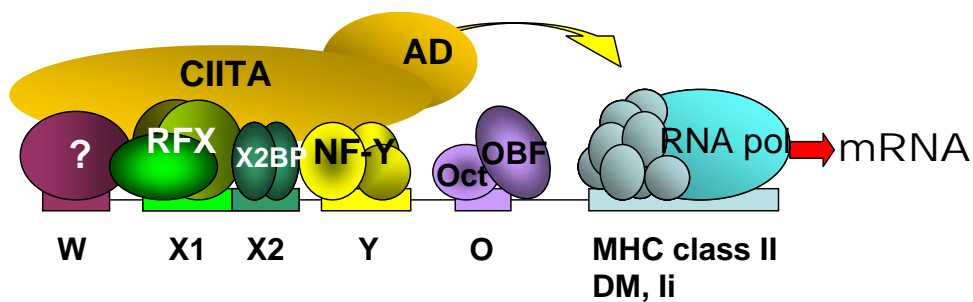
Στην πάνω σειρά απεικονίζονται τα ανθρώπινα γονίδια, στην κάτω του ποντικού. Με σκίαση υποδηλώνονται τα ψευδογονίδια. Οι πρωτεΐνες TAP συμμετέχουν στη φόρτωση των τάξης I.



1.2 Μεταγραφική ρύθμιση των συμπλόκων τάξης II

Τα γονίδια που κωδικοποιούν τα σύμπλοκα τάξης II, κλασσικά και μη, βρίσκονται στον ρ αρμό του χρωμοσώματος 6 στον άνθρωπο και στο χρωμόσωμα 17 στο ποντίκι (Σχήμα 1.4). Ο υποκινητής τους, όπως και της invariant chain, αποτελείται από τα στοιχεία S, X1, X2 και Y, στα οποία προσδένονται οι τριμερείς παράγοντες RFX και NFY, ο παράγοντας CREB και ο παράγοντας CIITA, ο οποίος δεν προσδένεται στο DNA αλλά πάνω στους υπόλοιπους παράγοντες (Σχήμα 1.5). Στο σύνολό τους, τα στοιχεία S, X και Y και οι οκτώ παράγοντες του ενισχυοσώματος είναι υπεύθυνοι τόσο για τη συστατική όσο και για την επαγόμενη έκφραση των τάξης II γονιδίων, ενώ εμπλέκονται και στην έκφραση των τάξης I, χωρίς όμως να έχουν καθοριστικό ρόλο^(3, 13, 36).

Ειδικό για το σύστημα είναι οι παράγοντες CIITA και ο τριμελής RFX, ο οποίος αποτελείται από τους RFX5, RFX-ANK (ή RFX-B) και RFX-AP. Ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά κατά τη μελέτη του συνδρόμου των γυμνών λεμφοκυττάρων, μια γενετική ασθένεια στην οποία τα σύμπλοκα τάξης II δεν εκφράζονται. Οι πρώτες μελέτες έδειξαν ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν τα σύμπλοκα τάξης II είναι άθικτα, ενώ παρατηρήθηκαν τέσσερις ομάδες συμπληρωματικότητας, οι οποίες ξέρουμε σήμερα ότι αντιστοιχούν σε μεταλλάξεις στους παράγοντες CIITA, RFX-ANK, RFX5 και RFX-AP (ομάδες A, B, C και D αντίστοιχα)⁽³⁰⁾.



Σχήμα 1.5

Σχηματική παράσταση του ενισχυοσώματος στα HLA-DR

1.2.1 Παράγοντες NFY και CREB

Οι παράγοντες NFY και CREB δεν είναι ειδικοί για τα γονίδια τάξης II, αφού εμπλέκονται στη ρύθμιση αρκετών γονιδίων. Ο παράγοντας NFY (Nuclear Factor Y) αποτελείται από τις υπομονάδες NFY-A, NFY-B και NFY-C και προσδένεται στο Y-box, προκαλώντας ταυτόχρονα μία κάμψη του DNA. Οι NFY-B και NFY-C παρουσιάζουν ομολογία με τις οικογένειες ιστονών H2B και H2A αντίστοιχα και σχηματίζουν ένα σταθερό διμερές πάνω στο οποίο προσδένεται ο NFY-A. Είναι γνωστές δύο μορφές του NFY-A, η μεγαλύτερη, η οποία είναι η κυρίαρχη μορφή στους ινοβλάστες και η μικρότερη, που είναι η κυρίαρχη μορφή στα λεμφοκύτταρα, ενώ οι υπόλοιποι τύποι κυττάρων έχουν ενδιάμεσες ποσότητες και των δύο μορφών. Περίπου το 30 % των ευκαρυωτικών υποκινητών περιέχουν την αλληλουχία που αναγνωρίζει ο NFY, ενώ ειδικά στα γονίδια τα οποία έχουν να κάνουν με τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου το στοιχείο Y είναι το πιο συχνά εμφανιζόμενο⁽²⁰⁾.

Ο παράγοντας CREB (CRE binding protein), ο οποίος πριν ταυτοποιηθεί στο σύστημα⁽²⁴⁾ αναφερόταν ως X2BP (X2 binding protein), προσδένεται ως ομοδιμερές στο παλινδρομικό στοιχείο CRE (cAMP Response Element). Το γενικό σχήμα ενεργοποίησής του από το cAMP περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της PKA (Protein Kinase A), η οποία φωσφορυλιώνει τον CREB στη σερίνη 133, καθιστώντας τον έτσι ικανό να αλληλεπιδράσει με το συνενεργοποιητή CBP (ή τον p300) και να προκαλέσει μεταγραφή. Εκτός από την παλινδρομική αλληλουχία, το στοιχείο CRE αποτελείται, εξίσου συχνά, από τα πέντε τελευταία νουκλεοτίδια (CGTCA αντί για TGACGTCA), με τα οποία ο CREB αλληλεπιδρά λιγότερο ισχυρά, αν και αυτό δεν αναμένεται να επηρεάζει τη ρύθμιση των γονιδίων in vivo λόγω της μεγάλης ποσότητας CREB στα κύτταρα⁽²³⁾. Το στοιχείο X2 ομοιάζει στην αλληλουχία με το ημι-στοιχείο CRE (TGCGTCA)⁽⁴¹⁾.

1.2.2 Παράγοντας CIITA

Ο καλύτερα μελετημένος παράγοντας στο σύστημα είναι ο CIITA (Class II TransActivator), ο οποίος θεωρείται ο κύριος ρυθμιστής του συστήματος, αφού η έκφραση του είναι από μόνη της ικανή να προκαλέσει την έκφραση των τάξης II γονιδίων σε κύτταρα που φυσιολογικά δεν τα εκφράζουν, ενώ σε κύτταρα όπου η έκφρασή τους είναι συστατική τα επίπεδα έκφρασης είναι ανάλογα των επιπέδων έκφρασης του CIITA. Αντίθετα, οι υπόλοιποι παράγοντες του ενισχυοσώματος εκφράζονται καθολικά. Ο παράγοντας CIITA απαντάται σε τέσσερις μορφές, οι οποίες διαφέρουν κατά το άμινο-τελικό άκρο. Η μεταγραφή του ελέγχεται από τέσσερις διαφορετικούς υποκινητές, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τη

μεταγραφή διαφορετικού πρώτου εξονίου, και κυρίως, είναι υπεύθυνοι για τη μεταγραφή σε διαφορετικές περιπτώσεις. Έτσι, ο υποκινητής I (pI) είναι υπεύθυνος για τη συστατική έκφραση των συμπλόκων τάξης II στα δενδριτικά κύτταρα, ο pIII για τη συστατική έκφραση στα B λεμφοκύτταρα, ενώ η ενεργοποίηση της μεταγραφής από την ιντερφερόνη-γ στα επιθηλιακά κύτταρα, τα μακροφάγα και τους ινοβλάστες μεσολαβείται από τον υποκινητή IV. Σημειώνεται εδώ ότι αυτός είναι και ο τρόπος επαγωγής των τάξης II από την ιντερφερόνη-γ, αφού τα ίδια τα γονίδια των συμπλόκων τάξης II δε διαθέτουν ρυθμιστικά στοιχεία που να αποκρίνονται στην ιντερφερόνη-γ^(22, 27).

Εκτός από τον έλεγχο της μεταγραφής του, η δράση του CIITA και κατά συνέπεια η έκφραση των τάξης II γονιδίων, ρυθμίζεται και από άλλους παράγοντες, όπως η τοπολογία του στο κύτταρο. Προκειμένου λοιπόν να εισέλθει ο CIITA στον πυρήνα, είναι απαραίτητη η πρόσδεση GTP⁽¹²⁾ και ο διμερισμός του⁽¹⁷⁾, ενώ η έξοδός του ρυθμίζεται αρνητικά από την ακετυλίωσή του⁽³³⁾. Άλλες μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις που επηρεάζουν τη λειτουργία του είναι η φωσφορυλίωσή του, η οποία μπορεί να προκαλέσει τόσο αρνητική⁽¹⁸⁾ όσο και θετική ρύθμιση^(32,37), ανάλογα με την περιοχή που φωσφορυλιώνεται, ενώ τέλος η ουβικυτινιλίωσή του φαίνεται να προκαλεί ενεργοποίηση, αν και ο μηχανισμός με τον οποίο συμβαίνει αυτό παραμένει άγνωστος⁽¹¹⁾.

Όπως υποδηλώνει η ονομασία του, ο CIITA διαθέτει την περιοχική ενεργοποίησης του ενισχυοσώματος. Δεν περιέχει κάποια γνωστή περιοχική πρόσδεσης DNA και στρατολογείται στο ενισχυόσωμα μέσω πολλαπλών πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων: αλληλεπιδρά με τους τρεις παράγοντες RFX, τον παράγοντα CREB και τους NFY-B και NFY-C^(21, 44). Οι παράγοντες αυτοί σχηματίζουν μια βάση (scaffold) πάνω στην οποία προσδένεται ο CIITA. Αφού στρατολογηθεί στο ενισχυόσωμα, στρατολογεί με τη σειρά του ακετυλοτρανσφεράσες όπως ο CBP^(9, 16), ενώ αλληλεπιδρά και με στοιχεία της βασικής μεταγραφικής μηχανής όπως οι παράγοντες TBP⁽¹⁹⁾, TFIIB και TAFIIs⁽¹³⁾. Με τον τρόπο αυτό φαίνεται ότι δρα με τη σειρά του σαν μία βάση όπου συγκροτείται η βασική μεταγραφική μηχανή.

1.2.3 Σύμπλοκο RFX και ο παράγοντας RFX5

Η κυριότερη υπομονάδα του RFX είναι ο RFX5, ο οποίος αποτελεί το πέμπτο μέλος μίας σχετικά νέας οικογένειας πρωτεϊνών προσδενόμενων στο DNA, της οικογένειας RFX (Regulatory Factor X)⁽⁸⁾. Οι μικρότεροι παράγοντες RFX-AP και RFX-ANK δεν παρουσιάζουν ομοιότητες με την οικογένεια RFX, αλλά πήραν την ονομασία τους από το γεγονός ότι σχηματίζουν σύμπλοκο με τον RFX5 (RFX Associated Protein και RFX ANKyrin αντίστοιχα).

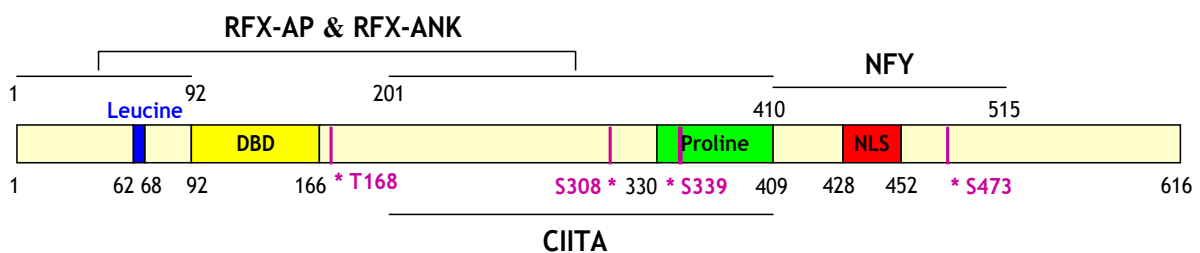
Το σύμπλοκο RFX προσδένεται στο X1-box, ενώ έχει φανεί να αλληλεπιδρά ασθενώς και με το S box, για το οποίο όμως δεν είναι γνωστό από ποια πρωτεΐνη καταλαμβάνεται *in vivo*. Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι η πιθανότητα να καταλαμβάνεται από δεύτερο σύμπλοκο RFX είναι μικρότερη από όσο ήταν κοινώς αποδεκτό, αφού η αλληλουχία που αλληλεπιδρά με τον RFX δεν είναι συντηρημένη⁽²⁶⁾. Όσον αφορά την πρόσδεσή του στο X1 box, τόσο ο RFX5 όσο και ο RFX-ANK περιέχουν περιοχές πρόσδεσης DNA, προκειμένου όμως να προσδεθούν στο DNA, πρέπει να σχηματίσουν το τριμερές των RFX5, -AP και -ANK, το οποίο εικάζεται ότι σχηματίζεται πριν την πρόσδεση του DNA. Ακόμα και τότε, η αλληλεπίδραση με το DNA είναι πολύ ασθενής. Κατάληψη του υποκινητή παρατηρείται μόνο όταν υπάρχει ταυτόχρονη αλληλεπίδραση και με τον NFY, ο οποίος αντίστοιχα χρειάζεται τον παράγοντα RFX προκειμένου να μπορέσει να προσδεθεί στο DNA⁽⁴⁰⁾. Ο παράγοντας CREB, ο οποίος προσδένεται στο DNA κάπως ισχυρότερα, είναι επίσης απαραίτητος^(33, 40).

Η σημασία των αλληλεπιδράσεων αυτών φαίνεται και από το γεγονός ότι διατάραξη της σχετικής θέσης των διαφορετικών στοιχείων X και Y αλλά και του S, έχουν σαν αποτέλεσμα την απώλεια της λειτουργικότητας του υποκινητή. Συγκεκριμένα, για τα X και Y σημασία δεν έχει τόσο η απόσταση μεταξύ τους, όσο το αν η περιοχή στην οποία προσδένονται οι αντίστοιχες πρωτεΐνες διατηρεί τον ίδιο προσανατολισμό, αφού παρεμβολή αλληλουχίας DNA που αντιστοιχεί σε μία ή δύο στροφές της έλικας δεν προκαλεί απώλεια της λειτουργικότητας, ενώ παρεμβολή αλληλουχιών που αντιστοιχούν σε μισές στροφές έλικας προκαλούν πλήρη απώλεια^(38,39). Το στοιχείο S έχει ακόμα πιο αυστηρές ανάγκες προκειμένου να συμβάλει στην ενεργοποίηση, αφού παρεμβολή ακόμα και μίας ή δύο βάσεων προκαλεί διαφορά στην ενεργοποίηση⁽²⁶⁾. Το σημερινό μοντέλο ενεργοποίησης είναι ότι οι επτά παράγοντες καταλαμβάνουν τον υποκινητή από κοινού, δημιουργώντας έτσι μια επιφάνεια με την οποία μπορεί να αλληλεπιδράσει ο C/ITA, ο οποίος διαθέτει την περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης. Εκτός από το C/ITA, μια ασθενέστερη περιοχή ενεργοποίησης φαίνεται να διαθέτει και ο RFX5, αν και η σημασία της και ο τρόπος με τον οποίο δρα παραμένουν άγνωστα.

Οι RFX5, -AP και -ANK τροποποιούνται επίσης μετα-μεταφραστικά, αν και λίγα πράγματα είναι γνωστά για τις τροποποιήσεις αυτές. Κατά την πρώτη ανίχνευσή των RFX-AP και -ANK και μετά από ραδιοσήμανση, οι τρεις πρωτεΐνες βρέθηκαν φωσφορυλιωμένες *in vivo*, κάτι το οποίο για μεγάλο διάστημα δεν είχε μελετηθεί περισσότερο⁽²⁵⁾. Είναι επίσης γνωστό ότι η ουβικυτινιλίωση του RFX5 προκαλεί απενεργοποίηση των γονιδίων μέσω της κλασσικής οδού, προκαλώντας δηλαδή την αποικοδόμησή του⁽⁴³⁾. Πρόσφατα, στα πλαίσια σύγκρισης προβλεπόμενων και πραγματικών καταλοίπων-στόχων της κινάσης PKA μελετήθηκε και η

φωσφορυλίωση του RFX5 με τη χρήση φασματοσκοπίας μαζών. Κατά τη μελέτη αυτή, βρέθηκαν να φωσφορυλιώνονται τα κατάλοιπα T168, S308, S339 και S473⁽¹⁴⁾.

Τα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα φαίνονται στο Σχήμα 1.6, όπου παριστάνεται ο RFX5 με τις γνωστές υπο-περιοχές του. Ο RFX5 αποτελείται από 616 αμινοξέα και μέχρι σήμερα έχουν εντοπιστεί περιοχές αλληλεπίδρασης με τους RFX-AP και RFX-ANK⁽⁷⁾, περιοχή διμερισμού⁽¹⁵⁾, περιοχή πρόσδεσης DNA, μία περιοχή πλούσια σε προλίνες, δύο σήματα πυρηνικού εντοπισμού⁽²⁸⁾, από τα οποία το πρώτο φαίνεται να είναι το κυριότερο και περιοχή αλληλεπίδρασης με τον NFY⁽⁴⁰⁾.



Σχήμα 1.6: Γνωστές περιοχές του RFX5

Με μπλε παριστάνεται η περιοχή πλούσια σε λευκίνες (περιοχή διμερισμού), με κίτρινο η περιοχή πρόσδεσης DNA, με πράσινο η περιοχή πλούσια σε προλίνες και με κόκκινο το σήμα πυρηνικού εντοπισμού. Το τελευταίο αποτελείται από δύο μέρη, συγκεκριμένα τα αμινοξέα 428-432 και 449-452. Στο σχήμα σημειώνονται επίσης οι περιοχές αλληλεπίδρασης με τους υπόλοιπους παράγοντες του ενισχυοσώματος, όπως αυτές προκύπτουν από συνδυασμό των αποτελεσμάτων διαφορετικών εργασιών. Με αστερίσκο σημειώνονται τα κατάλοιπα που φωσφορυλιώνονται.

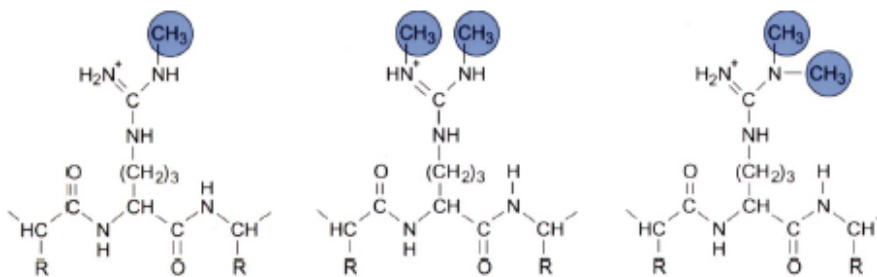
Οι περιοχές που είναι υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση με τους RFX-AP και RFX-ANK δεν έχουν διερευνηθεί ξεχωριστά, λόγω της φύσης του συμπλόκου: ισχυρή αλληλεπίδραση παρατηρείται μόνο όταν συνυπάρχουν οι τρεις παράγοντες. Όσον αφορά το διμερισμό του RFX5, τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας RFX προσδέονται στο DNA ως ομοδιμερή, ο RFX5 όμως δεν περιέχει τη συντηρημένη στην οικογένεια περιοχή διμερισμού, ούτε και κάποια άλλη γνωστή περιοχή διμερισμού⁽⁸⁾. Η σημασία μιας περιοχής πλούσιας σε λευκίνες (aa 62-68, στο σχήμα με μπλε) προέκυψε από πειράματα μεταλαξογένεσης⁽⁴⁾, ενώ στη συνέχεια δείχθηκε ότι η περιοχή είναι απαραίτητη για το διμερισμό του RFX5⁽¹⁵⁾. Ο RFX-ANK έχει επίσης ικανότητα διμερισμού, αλλά η σημασία των αλληλεπιδράσεων αυτών για την ακριβή δομή του συμπλόκου RFX in vivo δεν έχει μελετηθεί.

Αν και η σημασία της περιοχής πλούσιας σε προλίνες έχει δειχθεί in vivo, ο ακριβής της ρόλος δεν είναι γνωστός. Από τα πειράματα των DeSandro και συνεργατών προκύπτει ότι

θα μπορούσε να είναι η περιοχή αλληλεπίδρασης με τον CIITA (ευρύτερη περιοχή 201-409)⁽⁷⁾, κάτι που έρχεται σε σύγκρουση με τα αποτελέσματα των Zhu και συνεργατών, οι οποίοι προσδιορίζουν ως περιοχή αλληλεπίδρασης τα αμινοξέα 121 ως 200⁽⁴⁴⁾. Η πρώτη προσπάθεια προσδιορισμού των περιοχών αλληλεπίδρασης ανάμεσα στους RFX5 και CIITA έδειξε αλληλεπίδραση ανάμεσα στις περιοχές 299-1129 του CIITA και 195-615 του RFX5⁽³¹⁾, βρίσκεται δηλαδή σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των DeSandro και συνεργατών. Μία άλλη πιθανότητα είναι να είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση των RFX-ANK ή RFX-AP⁽⁷⁾.

1.3 Μεθυλοτρανσφεράσες αργινινών (PRMTs)

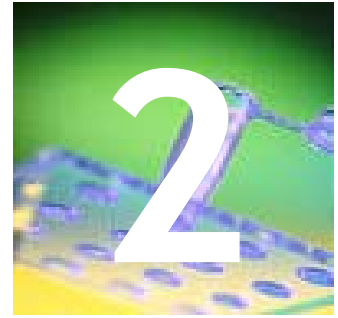
Εκτός από τη φωσφορυλίωση, στο εργαστήριό μας παρατηρήθηκε μεθυλίωση του RFX5 από τη μεθυλοτρανσφεράση CARM1 (Co-activator Associated arginine Methyltransferase 1). Η CARM1 ανήκει στην οικογένεια των μεθυλοτρανσφερασών αργινινών PRMTs (Protein arginine Methyl Transferases) και αναφέρεται και ως PRMT4. Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί επτά μεθυλοτρανσφεράσες στα θηλαστικά. Οι πιο καλά χαρακτηρισμένες είναι οι PRMT1 και CARM1, οι οποίες χαρακτηρίζονται ως τύπου I. Οι μεθυλοτρανσφεράσες αργινινών τύπου I μπορούν να προκαλέσουν μονομεθυλίωση ή ασύμμετρη διμεθυλίωση (βλ. Σχήμα 1.7), σε αντίθεση με τις τύπου II που προκαλούν μονομεθυλίωση ή συμμετρική διμεθυλίωση^(10, 13).



Σχήμα 1.7

Μόνο-, συμμετρική και ασύμμετρη διμεθυλίωση αργινινών.

Όπως υποδηλώνει και η ονομασία της, η CARM1 στρατολογείται από συνενεργοποιητές, όπως ο p160 και συμβάλλει στην ενεργοποίηση γονιδίων που ελέγχονται από πυρηνικούς υποδοχείς, όπως για παράδειγμα ο υποδοχέας οιστρογόνου. Η συγκεκριμένη δράση οφείλεται στη μεθυλίωση της ιστόνης 3⁽⁵⁾. Η CARM1 όμως μεθυλιώνει και μη ιστονικές πρωτεΐνες, όπως ο CBP (Creb Binding Protein), ο οποίος υπήρξε το πρώτο παράδειγμα μεθυλίωσης μεταγραφικού παράγοντα. Η μεθυλίωση του CBP από την CARM έχει σαν αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασής του με τον παράγοντα CREB, με αποτέλεσμα τη μείωση τη μεταγραφής⁽⁴²⁾.



Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Πλασμιδιακές Κατασκευές

His-RFX5-1-195: Οι βάσεις 1-587 του ανθρώπινου παράγοντα RFX5 απομονώθηκαν από κατασκευή σε pEGFP-C1 και κλωνοποιήθηκαν στον pRSET-C κομμένο με XhoI.

His-RFX5-1-119: Αφαιρέθηκαν οι βάσεις 359-587 του His-RFX5-1-195 μετά από πέψη με Scal (θέση 359) και PvuII (θέση στον polylinker).

His-RFX5-94-195: Αφαιρέθηκαν οι βάσεις 1-284 από τον His-RFX5-1-195 μετά από πέψη με BamHI.

His-RFX5-197-479: Οι βάσεις 588-1437 απομονώθηκαν από κατασκευή σε pCDNA3 και κλωνοποιήθηκαν στις θέσεις XhoI και EcoRI του pRSET-C.

His-RFX5-197-319: Αφαιρέθηκαν οι βάσεις 660-1437 μετά από πέψη με PstI και EcoRI και κατεργασία με Klenow, από τον His-RFX5-197-479.

His-RFX5-214-334: Το τμήμα 588-1041 (aa 197-348) πολλαπλασιάστηκε με PCR και στη συνέχεια απομονώθηκε το τμήμα 214-334 με πέψη με BamHI και SmaI και κλωνοποιήθηκε στις θέσεις BamHI και PvuII του pRSET-C.

His-RFX5-322-479: Απομονώθηκαν οι βάσεις 665-1437 από τον His-RFX5-197-479 μετά από πέψη με PstI και EcoRI και κλωνοποιήθηκαν στις αντίστοιχες θέσεις του pRET-C.

His-RFX5-322-376: Αφαιρέθηκαν οι βάσεις 1130-1437 (aa 377-479) από τον His-RFX5-322-479 μετά από πέψη με PvuII και EcoRI.

His-RFX5-322-347: Το τμήμα 964-1041 πολλαπλασιάστηκε με PCR και κλωνοποιήθηκε στον pRSET-C στις θέσεις BamHI και EcoRI.

His-RFX5-348-376: Πολλαπλασιάστηκαν οι βάσεις 1043-1128 με PCR και κλωνοποιήθηκαν στον pRSET-C στις θέσεις BamHI και EcoRI.

His-RFX5-348-479: Πολλαπλασιάστηκαν οι βάσεις 1043-1437 με PCR και κλωνοποιήθηκαν στον pRSET-C στις θέσεις BamHI και EcoRI.

His-RFX5-377-433: Απομονώθηκαν οι βάσεις 1129-1300 (aa377-433) μετά από πέψη του His-RFX5-322-479 με PvuII και κλωνοποιήθηκαν σε pRSET-B, κομμένο επίσης με PvuII.

His-RFX5-434-479: Απομονώθηκαν οι βάσεις 1301-1437 μετά από πέψη του His-RFX5-322-479 με PvuII και EcoRI και κλωνοποιήθηκαν στις αντίστοιχες θέσεις του pRSET-C.

His-RFX5-480-616(end): Οι βάσεις 1438-1851 απομονώθηκαν από κατασκευή σε pCDNA3 και κλωνοποιήθηκαν σε pRSET-C κομμένο με EcoRI.

2.2 Έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

2.2.1 Παρασκευή ανασυνδυασμένων GST-πρωτεϊνών

Έκφραση των πρωτεϊνών: Οι GST πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κλωνοποιημένες σε πλασμιδιακούς φορείς pGEX. Οι πλασμιδιακοί φορείς pGEX περιέχουν την πρωτεΐνη GST (Glutathione S-transferase) στο άμινο- τελικό άκρο της κλωνοποιημένης πρωτεΐνης, η δε επαγωγή της χιμαιρικής πρωτεΐνης γίνεται με προσθήκη IPTG. Για την έκφραση των GST-πρωτεϊνών μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορα βακτηριακά στελέχη. Στα πειράματα που θα περιγραφούν χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος DH5a. Σε καλλιέργεια σε εκθετική φάση ανάπτυξης προστίθεται IPTG σε τελική συγκέντρωση 1 mM και στη συνέχεια η καλλιέργεια επωάζεται στους 30 °C για 2-3 ώρες. Τα βακτήρια συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 6000 rpm για 10 λεπτά, επαναιωρούνται σε διάλυμα TBS-Triton-PMSF (20 mM Tris pH 7.5, 90 mM NaCl, 1% Triton, 1mM PMSF) και λύονται με υπέρηχους. Το σύνολο των πρωτεϊνών περιέχεται στο υπερκείμενο που απομονώνεται μετά από φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 10 λεπτά (4 °C).

Απομόνωση της GST-πρωτεΐνης: 20 μl γλουταθειόνης ακινητοποιημένης σε κολώνα σεφαρόζης πλένονται 3 φορές με TBS-Triton-PMSF και στη συνέχεια προστίθεται το πρωτεϊνικό κλάσμα από το προηγούμενο στάδιο. Το μίγμα αναδεύεται ήπια για μία ώρα στους 4 °C. Στη συνέχεια η κολώνα διαχωρίζεται με φυγοκέντρηση στις 3500 rpm για 1-2 λεπτά και πλένεται 3 φορές με TBS-Triton-PMSF. Η GST-πρωτεΐνη μπορεί να εκλουθεί ή να χρησιμοποιηθεί δεσμευμένη πάνω στην κολώνα. Στην περίπτωση της GST-CARM προστίθεται ίσος όγκος TBS-γλυκερόλης (20 mM Tris pH 7.5, 90 mM NaCl, 20% γλυκερόλη) και το εναιώρημα φυλάσσεται στους -20 °C. Υπό τις συνθήκες αυτές, η GST-CARM διατηρεί πλήρως την ενζυματική της δραστικότητα για 2-3 μήνες.

2.2.2 Παρασκευή ανασυνδυασμένων His- πρωτεϊνών

Έκφραση των πρωτεϊνών: Η έκφραση των His- πρωτεϊνών από το φορέα pRSET βρίσκεται υπό τον έλεγχο ενός φαγικής προέλευσης υποκινητή (T7 promoter), ο οποίος αναγνωρίζεται από την T7 RNA πολυμεράση. Το γονίδιο για την T7 RNA πολυμεράση βρίσκεται κλωνοποιημένο σε ξεχωριστό πλασμιδιακό φορέα, ο οποίος προσδίδει επίσης αντίσταση στη χλωραμφενικόλη, σε ειδικά στελέχη E.coli - το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε ήταν το BL21(DE3)pLysS. Η έκφραση της T7 RNA πολυμεράσης και κατ' επέκταση της πρωτεΐνης που βρίσκεται κλωνοποιημένη στο φορέα pRSET, επάγεται από το ισοπρόπυλο-β-D-θειογαλακτοσίδιο (IPTG), το οποίο προστίθεται σε συγκέντρωση 1 mM, σε καλλιέργεια σε εκθετική φάση. Η καλλιέργεια στη συνέχεια μεταφέρεται στους 30 °C, όπου παραμένει για 2-4 ώρες. Τα βακτήρια συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 6000 rpm για 20 λεπτά (4 °C), επαναιωρούνται σε διάλυμα His (8 M ουρία, 10 mM Tris pH 8, 100 mM Na_xPO₄ pH 7, 10 mM ιμιδαζόλιο, 10 mM μερκαπτοαιθανόλη, pH 8) και λύονται με υπέρηχους. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 20 λεπτά (4 °C) και συλλέγεται το υπερκείμενο, στο οποίο περιέχεται το σύνολο των πρωτεϊνών των βακτηρίων.

Απομόνωση της His- πρωτεΐνης: Κατάλληλος όγκος (300 μl/lit καλλιέργειας) κολώνας νικελίου (Ni-NTA της QIAGEN) πλένεται 3 φορές με ίσο όγκο διαλύματος His, αναμιγνύεται με το πρωτεϊνικό εκκλύσιμα και προστίθεται NP40 σε τελική συγκέντρωση 1%. Το μίγμα αναδεύεται ήπια για 2-3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια η κολώνα συλλέγεται με φυγοκέντρηση στις 2500 rpm και πλένεται 3-4 φορές με 10 ml διαλύματος His. Όλες οι πλύσεις γίνονται με προσθήκη του διαλύματος, ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 2500 rpm.

Έκλουση: Η μέθοδος έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο ανταγωνισμός με ιμιδαζόλιο για τη δέσμευση της κολώνας. Στην κολώνα προστίθενται διαλύματα έκλουσης με σταδιακά αυξανόμενη συγκέντρωση σε ιμιδαζόλιο. Τα διαλύματα έκλουσης έχουν την ίδια σύσταση με το διάλυμα His, με τις ακόλουθες τροποποιήσεις: 1^ο διάλυμα 100 mM ιμιδαζόλιο, 2^ο διάλυμα 250 mM ιμιδαζόλιο, 3^ο διάλυμα 1M ιμιδαζόλιο, 4^ο διάλυμα 1M ιμιδαζόλιο και 10 mM EDTA. 10 μl από κάθε κλάσμα και από την κολώνα μετά την έκλουση ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και βαφή με coomassie blue.

Επαναδιάταξη της His- πρωτεΐνης: Επειδή ο επίτοπος his- είναι μικρός σε μέγεθος, η δέσμευση στην κολώνα νικελίου γίνεται υπό αποδιατακτικές συνθήκες ώστε να αποφεύγεται

τυχόν απόκρυψή του στο εσωτερικό της πρωτεΐνης. Μετά την έκλουση η ουρία απομακρύνεται, κλείνοντας το διάλυμα της πρωτεΐνης (τα κλάσματα εκείνα τα οποία είχαν σημαντική ποσότητα πρωτεΐνης) σε ημιπερατή μεμβράνη (dialysis tubing) η οποία επιτρέπει τη διέλευση των μικρών μορίων του διαλύτη αλλά όχι των πρωτεϊνών που είναι πολύ μεγαλύτερες σε μέγεθος. Οι μεμβράνες αφήνονται 2-3 ώρες σε διαλύματα που περιέχουν σταδιακά λιγότερη ουρία (4M, 2M, 1M, 0.5M και 0M, ενώ όλα έχουν περιεκτικότητα 20 mM Tris pH 8, 10% glycerol, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 % NP40). Κατάλοιπα της κολώνας και τυχόν κατακρημνισμένη ποσότητα της πρωτεΐνης απομακρύνονται με φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 5 λεπτά.

2.3 *In vitro* μεθυλίωση πρωτεϊνών

Για τη μεθυλίωση χρησιμοποιήθηκε η GST-CARM, με συνένζυμο ραδιενεργά σημασμένη S-αδενοσινο-μεθειονίνη (SAM). Στα πρώτα πειράματα χρησιμοποιήθηκε ³H-SAM, ενώ στη συνέχεια προτιμήθηκε η χρήση ¹⁴C-SAM, λόγω της δυνατότητας χρήσης phosphorimager (Storm Imager της Amersham Biosciences). Η GST-CARM χρησιμοποιήθηκε υπό μορφή εναιωρήματος όπως περιγράφηκε, ενώ η αντίδραση γίνεται σε περιβάλλον 50 mM Tris (pH 8.5) 20 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM 2-μερκαπτοαιθανόλης και 250 mM σουκρόζης. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται για μία ώρα στους 30 °C. Ακολούθως οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης με SDS, το οποίο στη συνέχεια ξηραίνεται πάνω σε διηθητικό χαρτί με την εφαρμογή θέρμανσης και κενού, αφού προηγουμένως ελεγχθεί η παρουσία των πρωτεϊνών με βαφή με coomassie blue.

Η ανίχνευση της ραδιενέργειας γίνεται με έκθεση φωτογραφικού φιλμ για μερικές μέρες, προκειμένου για ³H-SAM. Στην περίπτωση αυτή, πριν τη ξήρανση του, το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης κατεργάζεται με αντιδραστήριο που εκκλύει φως υπό την επίδραση της ραδιενεργούς ακτινοβολίας (Amplify, Amersham Biosciences) προκειμένου να αυξηθεί η ένταση του σήματος. Στην περίπτωση της ¹⁴C-SAM, η ραδιενέργεια ανιχνεύεται εκτίθοντας την ειδική κασέτα για 2 ως 12 ώρες.

2.4 GST- συγκατακρήμνιση πρωτεϊνών

Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιούνται 20 μl σεφαρόζης γλουταθειόνης. Η κολώνα πλένεται 3 φορές με το διαλύτη της GST πρωτεΐνης που θα απομονωθεί στη συνέχεια, προκειμένου να απομακρυνθεί η αιθανόλη που χρησιμοποιείται σαν συντηρητικό της κολώνας. Στη συνέχεια προστίθεται το πρωτεϊνικό εκχύλισμα που περιέχει την GST- πρωτεΐνη και αφήνεται υπό ήπια ανάδευση στους 4 °C για μία ώρα. Η κολώνα απομονώνεται με φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 3500 rpm και πλένεται τρεις φορές με διάλυμα GST-wash (150 mM KCl, 20 mM Hepes pH 7.9, 0.3% NP40, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM PMSF). Στη συνέχεια προστίθενται 200 μl διαλύματος GST-interaction (150 mM KCl, 20 mM Hepes pH 7.9, 0.1% NP40, 5 mM MgCl₂, 0.2% BSA) και η his-πρωτεΐνη. Οι πρωτεΐνες αφήνονται να αλληλεπιδράσουν για 3 ώρες στους 4 °C υπό ανάδευση (rotation). Στη συνέχεια η κολώνα συλλέγεται με φυγοκέντρηση και πλένεται τρεις φορές με GST-wash. Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS), μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Western blot) και στη συνέχεια η μεμβράνη εξετάζεται για την ύπαρξη His-πρωτεΐνης με αντίσωμα κατά του his- επίτοπου.

2.5 Ανάλυση πρωτεϊνών με MALDI-MS

Οι πρωτεΐνες που αναλύθηκαν με MALDI-MS μεθυλιώθηκαν με κρύα S-αδενοσινο-μεθειονίνη, ενώ ταυτόχρονα έγιναν και οι αντίστοιχες ραδιενεργές αντιδράσεις, προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία της αντίδρασης μεθυλίωσης. Στη συνέχεια τα μίγματα των κρύων αντιδράσεων διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, οι ζώνες των RFX5 πρωτεϊνών επιλέχθηκαν με βάση το μέγεθός τους μετά από βαφή με άργυρο και αποκόπηκαν. Τα τμήματα που αναλύθηκαν από το φασματόμετρο προέκυψαν μετά από in gel πέψη με τρυψίνη.



Αποτελέσματα - Συζήτηση

3.1 Ο RFX5 αλληλεπιδρά με τη μεθυλοτρανσφεράση CARM1 μέσω του αμινο- τελικού άκρου του

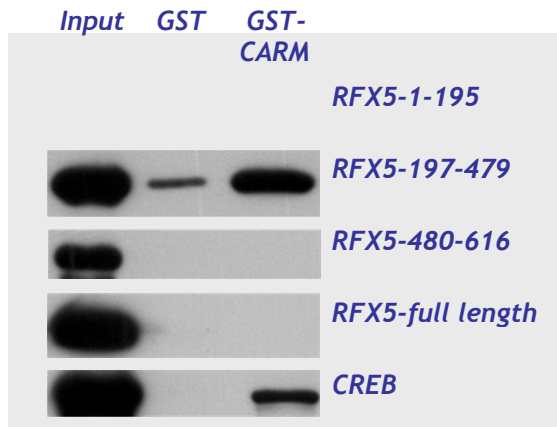
Εξετάστηκε η ικανότητα του RFX5 να συγκρατηθεί από την GST-CARM1, ακινητοποιημένη σε κολώνα γλουταθειόνης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι His-RFX5-1-195, His-RFX5-197-479 και His-RFX5-480-616. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης δύο πρότυπες αντιδράσεις για κάθε πρωτεΐνη. Μία αρνητική, χρησιμοποιώντας την GST πρωτεΐνη αντί της GST-CARM1 προκειμένου να αποκλειστούν οι μη ειδικές αλληλεπιδράσεις και μία θετική, χρησιμοποιώντας το ένα δέκατο της ποσότητας His-RFX5 που χρησιμοποιήθηκε στην αλληλεπίδραση ως input, προκειμένου να ελεγχθεί η Western. Όπως φαίνεται από τις φωτογραφίες στο Σχήμα 3.1, ο RFX5 αλληλεπιδρά με την CARM1 μέσω του αμινο- τελικού άκρου του και συγκεκριμένα την περιοχή 1-195. Η περιοχή αυτή περιέχει δύο περιοχές με γνωστή βιολογική δράση: την περιοχή 92-166 η οποία αποτελεί την περιοχή πρόσδεσης του DNA (DBD) και την περιοχή 62-68, η οποία αποτελεί την περιοχή διμερισμού του RFX5 (βλ. Σχήμα 1.6). Πιθανότερο είναι λοιπόν η αλληλεπίδραση με την CARM1 να μεσολαβείται από την περιοχή 1-91, παρά από την ίδια περιοχή που είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση στο DNA. Πραγματικά, προκαταρκτικά πειράματα χρησιμοποιώντας τις His-RFX5-1-119 και His-RFX5-94-195 έδειξαν ότι η τελευταία δεν αλληλεπιδρά με τη GST-CARM1.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι παρά το ότι η περιοχή πρόσδεσης της CARM1 έχει αφαιρεθεί στα πειράματα της in vitro μεθυλίωσης, η αντίδραση προχωρεί απρόσκοπτα.

3.2 Ο RFX5 μεθυλιώνεται στην περιοχή πλούσια σε προλίνες

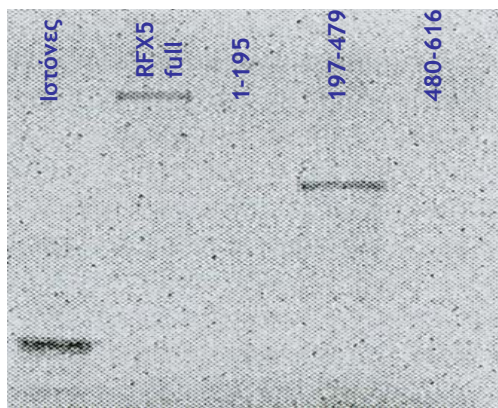
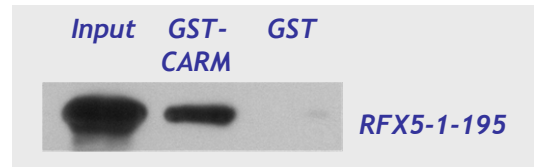
Σε πρώτο στάδιο δοκιμάστηκε η μεθυλίωση του πλήρους RFX5 σημασμένου με GST- και σημασμένου με His- επίτοπο, από τη μεθυλοτρανσφεράση CARM1, σημασμένη με τον GST επίτοπο. Παρατηρήθηκε ότι ενώ ο His-RFX5 μεθυλιώνεται, η μεθυλίωση του GST-RFX5 από την GST-CARM παρεμποδίζεται. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι ο επίτοπος GST, ως ογκοδέστερος του επίτοπου His, παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση της CARM με τον RFX5. Μία άλλη πιθανή εξήγηση είναι ότι οι GST- πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους ή με τα σφαιρίδια γλουταθειόνης και αποκτούν τέτοιο προσανατολισμό που έχει σαν αποτέλεσμα επίσης την παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης CARM1 και RFX5.

Ανεξάρτητα από το λόγο που προκαλεί την παρεμπόδιση, επιλέχθηκε ο His επίτοπος για την παρασκευή ανασυδασμένων υποπεριοχών του RFX5. Σε πρώτο στάδιο εξετάστηκαν το τμήμα 1-195, το οποίο περιέχει την περιοχή πρόσδεσης DNA, το τμήμα 197-479, το οποίο περιέχει μία περιοχή πλούσια σε προλίνες και σήματα πυρηνικού εντοπισμού και το τμήμα 480-616, το οποίο περιέχει την περιοχή αλληλεπίδρασης με τον NFY. Οι περιοχές αυτές φαίνονται στα *Σχήματα 1.6* και *3.6*. Στη συνέχεια και αφού διαπιστώθηκε ότι μεθυλιώνεται το μεσαίο τμήμα (*Σχήμα 3.2*), εξετάστηκαν οι περιοχές 197-319 και 322-479, η δεύτερη από τις οποίες περιέχει την περιοχή πλούσια σε προλίνες. Η περιοχή 322-479 βρέθηκε να μεθυλιώνεται (*Σχήμα 3.3*) και στάληκε για ανάλυση με MALDI-MS, μαζί με την αμέσως μεγαλύτερη περιοχή, 197-479. Αν και δεν έγινε δυνατό να “διαβαστούν” τα πεπτίδια που περιείχαν το κατάλοιπο που φάνηκε να μεθυλιώνεται στα πειράματα ραδιοσήμανσης, βεβαιώθηκε για αρκετά από τα υπόλοιπα κατάλοιπα ότι δε μεθυλιώνονται (*Σχήμα 3.6*). Η περιοχή 322-479 περιορίστηκε περαιτέρω στις περιοχές 322-376 (περιοχή πλούσια σε προλίνες), 377-433 (σήμα πυρηνικού εντοπισμού 1) και 434-479 (σήμα πυρηνικού εντοπισμού 2 και υποθετικό σήμα πυρηνικού εντοπισμού). Όπως φαίνεται στο *Σχήμα 3.4*, μεθυλιώνεται η περιοχή 322-376, η οποία περιέχει 5 αργινίνες, τις R328, R335, R338, R354 και R370. Από αυτές, οι R335 και R354 έχει φανεί ότι δε μεθυλιώνονται από τα φάσματα MALDI-MS. Στο τελικό πείραμα μεθυλίωσης δοκιμάστηκαν οι περιοχές 322-347 (περιέχει τις R328, R335 και R338), 214-334 (R328 μόνο) και 348-376 (R354 και R370). Η μόνη περιοχή που δίνει σήμα μεθυλίωσης είναι η 322-347 (*Σχήμα 3.5*) και εφόσον οι αργινίνες 328 και 335 αποκλείονται βάσει της μη μεθυλίωσης της πρωτεΐνης 214-334 και της φασματοσκοπίας MALDI αντίστοιχα, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι μεθυλιώνεται η αργινίνη 338. Στο *Σχήμα 3.6* φαίνεται συνοπτικά η διαδικασία εντοπισμού της αργινίνης 338 ως το υπόστρωμα της μεθυλίωσης.



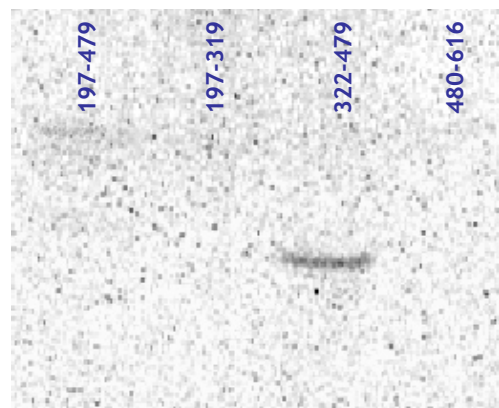
Σχήμα 3.1: GST-αλληλεπιδράσεις μεταξύ της GST-CARM και τμημάτων του RFX5

Ως input χρησιμοποιήθηκε ποσότητα πρωτεΐνης ίση με το $1/10$ της ποσότητας που χρησιμοποιήθηκε για την αλληλεπίδραση. Αριστερά, πλύσεις με 0.2% NP40. Κάτω, επανάληψη με 0.3% NP40.

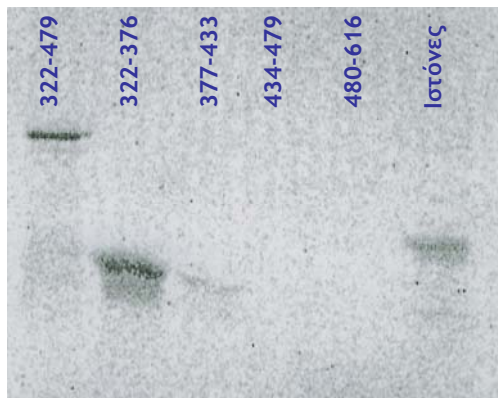


Σχήμα 3.2: Μεθυλίωση των RFX5-1-195, 197-479 και 480-616.

Στο πείραμα περιλήφθηκε μίγμα ιστονών ως θετικό πρότυπο.

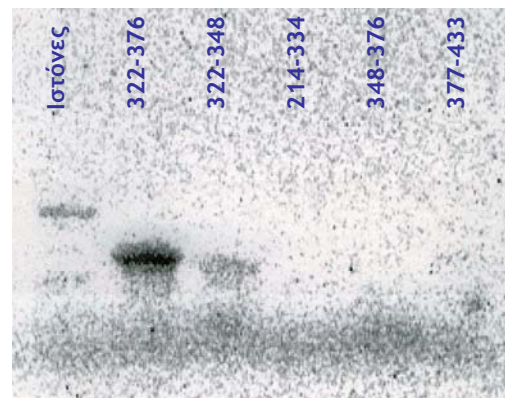


Σχήμα 3.3: Μεθυλίωση των RFX5-197-319 και 322-479.



Σχήμα 3.4: Μεθυλίωση των RFX5-322-376, 377-433 και 434-479.

Στο πείραμα περιλήφθηκε μίγμα ιστονών ως θετικό πρότυπο.



Σχήμα 3.5: Μεθυλίωση των RFX5-322-347, 348-376, 214-336 και 348-479.

Στο πείραμα περιλήφθηκαν ιστόνες ως θετικό πρότυπο. Η διαφορά έντασης ανάμεσα στα 322-376 και 322-347 οφείλεται στη διαφορά ποσότητας πρωτεΐνης.

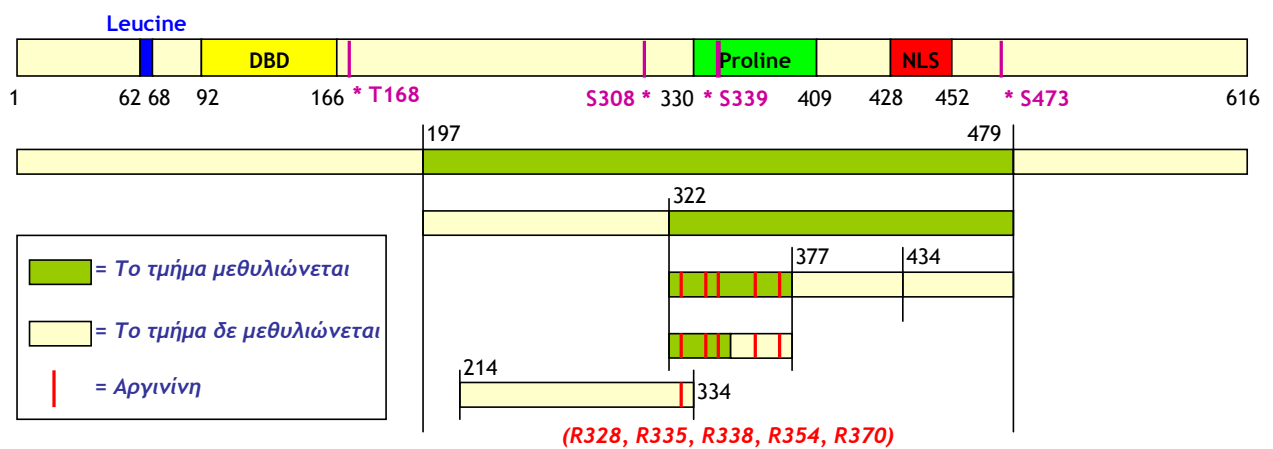
Αλληλουχία RFX5:

```

1      MAEDEPDAKS PKTGGRAPPG GAEAGEPTTL LQRLRGTISK AVQNKVEGIL QDVQKFSNDND
61     KLYLYLQLPS GPTTGDKSSE PSTLSNEEYM YAYRWIRNHL EEHTDTCLPK QSVYDAYRKY
121    CESLACCRPL STANFGKIIR EIFPDIKARR LGGRGQSKYC YSGIRRKTLV SMPPLPGLDL
181    KGSESPEMGP EVTPAPRDEL VEAACALTCD WAERILKRSF SSIVEVARFL LQQHLISARS
241    AHAHVLKAMG LAEEDHAPR ERSSKPKNGL ENPEGGAHKK PERLAQPPKD LEARTGAGPL
301    ARGERRKKSIVV ESSAPGANNL QVNALVARLP LLLPRAPRSL IPPIPVSPPI LAPRLSSGAL
361    KVATLPLSSR AGAPPAAVPI INMILPTVPA LPGPGPGPGR APPGGLTQPR GTENREVGIG
421    GDQGPDKGV KRRTAEVPVSE ASGQAPPAKA AKQDIEDTAS DAKRKRGRPR KKS GGSGGERN
481    STPLKSAAM ESAQSSRLPW ETWGS GEGN SAGGAERP GP MGEAEKGAVL AQQQGDGTVS
541    KGGRGPQSQH TKEAEDKIPL VPSKVSIVIG SRSQKEAFPL AKGEVDTAPQ GNKDLKEHVL
601    QSSLSQEHKD PKATPP*

```

Μεθυλίωσεις τμημάτων του RFX5:



MALDI-MS:

```

1      MAEDEPDAKS PKTGGRAPPG GAEAGEPTTL LQRLRGTISK AVQNKVEGIL QDVQKFSNDND
61     KLYLYLQLPS GPTTGDKSSE PSTLSNEEYM YAYRWIRNHL EEHTDTCLPK QSVYDAYRKY
121    CESLACCRPL STANFGKIIR EIFPDIKARR LGGRGQSKYC YSGIRRKTLV SMPPLPGLDL
181    KGSESPEMGP EVTPAPRDEL VEAACALTCD WAERILKRSF SSIVEVARFL LQQHLISARS
241    AHAHVLKAMG LAEEDHAPR ERSSKPKNGL ENPEGGAHKK PERLAQPPKD LEARTGAGPL
301    ARGERRKKSIVV ESSAPGANNL QVNALVARLP LLLPRAPRSL IPPIPVSPPI LAPRLSSGAL
361    KVATLPLSSR AGAPPAAVPI INMILPTVPA LPGPGPGPGR APPGGLTQPR GTENREVGIG
421    GDQGPDKGV KRRTAEVPVSE ASGQAPPAKA AKQDIEDTAS DAKRKRGRPR KKS GGSGGERN
481    STPLKSAAM ESAQSSRLPW ETWGS GEGN SAGGAERP GP MGEAEKGAVL AQQQGDGTVS
541    KGGRGPQSQH TKEAEDKIPL VPSKVSIVIG SRSQKEAFPL AKGEVDTAPQ GNKDLKEHVL
601    QSSLSQEHKD PKATPP*

```

Σχήμα 3.6 - Μεθυλίωσεις τμημάτων του RFX5

Πάνω: Η αλληλουχία του RFX5. Σημειώνονται οι αργινίνες, η περιοχή πλούσια σε λευκίνες (■), η περιοχή πρόσδεσης του DNA (■), η περιοχή πλούσια σε προλίνες (■) και τα δύο σήματα πυρηνικού εντοπισμού (■).

Μέση: Σχηματική παράσταση των τμημάτων του RFX5. Στα μικρότερα τμήματα σημειώνονται οι αργινίνες 328, 335, 338, 354 και 370.

Κάτω: Έλεγχος τμημάτων του RFX5 με φασματοσκοπία μαζών MALDI. Σημειώνονται οι αργινίνες των τμημάτων που ελέγχθηκαν με κόκκινο. Με μπλε παριστάνονται τα τμήματα για τα οποία αποκλείστηκε η μεθυλίωση. Οι γκρι περιοχές δεν ελέγχθηκαν.

Η μεθυλίωση της αργινίνης 338 παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον, γιατί βρίσκεται δίπλα σε μία σερίνη (S339), η οποία έχει βρεθεί να φωσφορυλιώνεται (βλ. Σχήμα 3.7), έχουμε δηλαδή μεθυλίωση και φωσφορυλίωση σε γειτονικά αμινοξέα. Επίσης βρίσκεται δίπλα στην αλληλουχία PxxP, προς το καρβόξυ- τελικό της άκρο. Ο συνδυασμός των χαρακτηριστικών αυτών έχει παρατηρηθεί προηγουμένως σε πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με περιοχές τύπου SH3 (Src Homology 3 domains). Συγκεκριμένα, σημαντικός αριθμός περιοχών SH3 αλληλεπιδρούν με περιοχές πλούσιες σε προλίνες που περιέχουν το μοτίβο PxxP και μία αργινίνη 2 ή 3 θέσεις πριν το άμινο- τελικό άκρο (ligands τύπου I), ή περιοχές όπως η περιοχή που μελετήσαμε, όπου το μοτίβο PxxP ακολουθείται από μία αργινίνη 1 ή 2 θέσεις μετά το καρβόξυ- τελικό άκρο (ligands τύπου II). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η αναφορά από τους Bedford και συνεργάτες ότι μεθυλίωση της αργινίνης στο μοτίβο PxxPR της πρωτεΐνης Sam68 (μια adapter πρωτεΐνη για τις Src κινάσες) έχει αναφερθεί να παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση της περιοχής πλούσιας σε προλίνες με την περιοχή SH3, χωρίς να παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση με περιοχές τύπου WW, οι οποίες αναγνωρίζουν τις ίδιες περιοχές με τις SH3. Οι συγγραφείς προτείνουν ότι η μεθυλίωση της αργινίνης αυτής μπορεί να χρησιμεύει προκειμένου να ευνοήσει την πρόσδεση ενός τύπου παραγόντων έναντι άλλων, μεταβάλλοντας έτσι τη λειτουργία του Sam68, από κυτοπλασματικού παράγοντα σε πυρηνικό. Ρυθμιστικό ρόλο της αλληλεπίδρασης με περιοχές SH3 φαίνεται να έχει και η φωσφορυλίωση καταλοίπων μέσα ή δίπλα στο μοτίβο PxxP. Έτσι, φωσφορυλίωση τυροσινών δίπλα σε περιοχές πλούσιες σε προλίνες της πρωτεΐνης Enabled της δροσόφιλας, από την Abl, μια κινάση τυροσίνης (phosphotyrosine kinase, PTK), παρεμποδίζει την αλληλεπίδρασή τους με περιοχές SH3. Τα κατάλοιπα τυροσίνης της δροσόφιλας δεν είναι συντηρημένα στις συγγενικές πρωτεΐνες mEha και VASP (στο ποντίκι και τον άνθρωπος αντίστοιχα), ούτε και η δράση της Abl, αφού αντίθετα από τη δροσόφιλα όπου παραμένει στο κυτταρόπλασμα και φαίνεται να έχει κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη του ΚΝΣ, στα θηλαστικά μετακινείται ανάμεσα το κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα, ενώ εμπλέκεται στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία και την οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία. Παρόλα αυτά, η σημασία των μετα- μεταγραφικών τροποποιήσεων στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των περιοχών πλούσιων σε προλίνες είναι προφανής.

V N A L V A R L P L L L P R A P R S L I P P I P V S P P I L A P R L S S G A
322

L K V A T L P L S S R A G A P P A
376

Σχήμα 3.7: Αλληλουχία της περιοχής 322-376.

Σημειώνονται οι αργινίνες με γκρίζο, το μοτίβο προλινών με πράσινο, η αργινίνη 338 με κόκκινο και η σερίνη 339 με γαλάζιο.

Όσον αφορά την περιοχή πλούσια σε προλίνες του RFX5, η βιολογική της σημασία είναι αποδεδειγμένη από πειράματα ελλείψεων, χωρίς όμως να είναι γνωστή η λειτουργία της. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται συχνά ως η περιοχή αλληλεπίδρασης με το CIITA, παρόλα αυτά δε μπορεί να αποκλειστούν οι αλληλεπιδράσεις με τους RFX-AP και RFX-ANK (βλ. και Σχήμα 1.6 και τη σχετική περιγραφή στην Εισαγωγή). Επίσης, αν και οι περιοχές πλούσιες σε προλίνες είναι συχνά περιοχές που μεσολαβούν την αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών, δε μπορεί να αποκλειστεί και το ενδεχόμενο διαφορετικής λειτουργίας. Οι ομοιότητες ανάμεσα στην περιοχή μεθυλίωσης του RFX5 και σε περιοχές αλληλεπίδρασης που ρυθμίζονται από τέτοια μεθυλίωση είναι εξαιρετικά ενδιαφέρουσες, θα πρέπει όμως να ελεγχθεί η μεθυλίωση και *in vivo*. Τα παραπάνω ισχύουν και για τη φωσφορυλίωση της σερίνης 339.

Σε μελλοντική φάση θα πρέπει να διευκρινιστεί ο ρόλος της περιοχής πλούσιας σε προλίνες. Σημαντικό είναι να δοκιμαστεί η αλληλεπίδραση της αυστηρά καθορισμένης περιοχής πλούσιας σε προλίνες με τους υπόλοιπους παράγοντες του ενισχυοσώματος, προκειμένου να αντιμετωπιστούν οι ασάφειες προηγούμενων αποτελεσμάτων, στα οποία δοκιμάστηκαν μεγαλύτερες περιοχές. Προτείνεται επίσης η ταυτόχρονη διερεύνηση των δύο τροποποιήσεων, με την αξιολόγηση της δράσης σημειακά μεταλλαγμένων πρωτεϊνών. Αν η βιολογική δραστηριότητα των δύο σημειακά μεταλλαγμένων πρωτεϊνών βρεθεί να διαφέρει από της αγρίου τύπου, ποια μπορεί να είναι η δράση μιας διπλά μεταλλαγμένης πρωτεΐνης; Αν η περίπτωση του RFX5 είναι ανάλογη της περίπτωσης των περιοχών αλληλεπίδρασης με περιοχές SH3, οι δύο τροποποιήσεις μπορεί να έχουν συνεργική δράση. Σε κάθε περίπτωση, η ύπαρξη δύο τροποποιήσεων σε γειτονικά αμινοξέα μπορεί να αποτελέσει ένα ιδιαίτερα ευαίσθητο σύστημα ρύθμισης. Θα είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον να διευκρινιστεί ο βιολογικός ρόλος μιας τέτοιας ρύθμισης.



Βιβλιογραφία

1. **Aletta, J.M., T.R. Cimato and M.J. Ettinger.** (1998). Protein methylation: a signal event in post-translational modification. *Trends Biochem. Sci.*, **23**: 89-91.
2. **Bedford, M.T., A. Frankel, M.B. Yaffe, S. Clarke, P. Leder and S. Richard.** (2000). Arginine Methylation Inhibits the Binding of Proline-rich Ligands to Src Homology 3, but not WW, Domains. *J. Biol. Chem.* **275(21)**: 16030-36.
3. **Boss, J. and P.E. Jensen.** (2003). Transcriptional regulation of the MHC class II antigen presentation pathway. *Curr. Op. Imm.* **15**: 105-111.
4. **Brickey W.J., K.L. Wright, X.S. Zhu and J.P. Ting.** (1999). Analysis of the defect in IFN-gamma induction of MHC class II genes in G1B cells: identification of a novel and functionally critical leucine-rich motif (62-LYLYLQL-68) in the regulatory factor X 5 transcription factor. *J. Immunol.*, **163(12)**: 6622-30.
5. **Chen, D., H. Ma, H. Hong, S.S. Koh, S.-M. Huang, B.T. Schurter, D.W. Aswad and M.R. Stallcup.** (1999). Regulation of Transcription by a Protein Methyltransferase. *Science*, **284**: 2174-7.
6. **Comer, A.R., S.M. Ahern-Djamali, J.-L. Juang, P.D.Jackson and F.M. Hoffmann.** (1998). Phosphorylation of Enabled by the *Drosophila* Abelson Tyrosine Kinase Regulates the In Vivo Function and Protein-Protein Interactions of Enabled. *Mol. Cell. Biol.*, **18(1)**: 152-160.
7. **DeSandro, A.M., U.M. Nagarajan and J.M. Boss.** (2000). Associations and Interactions Between Bare Lymphocyte Syndrome Factors. *Mol. Cell. Biol.* **20(17)**: 6587-6599.
8. **Emery, P., B. Durand, B. Mach and W. Reith.** (1996). RFX proteins, a novel family of DNA binding proteins conserved in the eukaryotic kingdom. *Nucleic Acids Res.* **24(5)**: 803-807.
9. **Fontes, J.D., S. Kanazawa, D. Jean, and B.M. Peterlin.** (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.

10. Frankel, A. and S. Clarke. (2000). PRMT3 is a Distinct Member of the Protein Arginine *N*-Methyltransferase Family. *J. Biol. Chem.* **275**(42): 32974-82.
11. Greer, S.F., E. Zika, B. Conti, X.-S. Zhu and J.P-Y Ting. (2003). Enhancement of CIITA transcriptional function by ubiquitin. *Nat. Immunol.* **4**(11): 1074-1082.
12. Harton, J. A., D. E. Cressman, K. C. Chin, C. J. Der, and J. P. Ting. (1999). GTP binding by class II transactivator: role in nuclear import. *Science* **285**: 1402-1405.
13. Harton, J.A., and J.P. Ting. (2000). Class II transactivator: Mastering the art of major histocompatibility complex expression. *Mol. Cell. Biol.* **20**(17): 6185-6194.
14. Hjerrild, M., A. Stensballe, T.E. Rasmussen, C.B. Kofoed, N. Blom, T. Sicheritz-Ponten, M.R. Larsen, S. Brunak, O.S. Jensen and S. Gammeltoft. (2004). Identification of Phosphorylation Sites in Protein Kinase A Substrates Using Artificial Neural Networks and Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.*, **3**: 426-433.
15. Jabrane-Ferrat, N., N. Nekrep, G. Tosi, L.J. Esserman and B.M. Peterlin. (2002). Major histocompatibility complex class II transcriptional platform: assembly of nuclear factor Y and MHCII enhanceosome regulatory factor X (RFX) on DNA requires RFX5 dimers. *Mol. Cell. Biol.* **22**:5616.
16. Kretsovali, A., T. Agalioti, C. Spilianakis, E. Tzortzakaki, M. Merika, and J. Papamatheakis. (1998). Involvement of CREB binding protein in expression of major histocompatibility complex class II genes via interaction with class II transactivator. *Mol. Cell. Biol.* **18**(11): 6777-6783.
17. Kretsovali, A., C. Spilianakis, A. Dimakopoulos, T. Makatounakis and J. Papamatheakis. (2001). Self-association of class II transactivator correlates with its intracellular localization and transactivation. *J. Biol. Chem.* **276**: 32191-32197.
18. Li, G., J.A. Harton, X. Zhu, and J.P. Ting. (2001). Downregulation of CIITA function by protein kinase A (PKA)-mediated phosphorylation: Mechanism of prostaglandin E, cyclic AMP, and PKA inhibition of class II major histocompatibility complex expression in monocytic lines. *Mol. Cell. Biol.* **21**(14): 4626-4635.
19. Mahanta, S.K., T. Scholl, F.C. Yang, J.L. Strominger. (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.* **94**: 6324-6329.
20. Mantovani, R. (1999). The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene* **239**: 15-27.
21. Masternak, K., A. Muhlethaler-Mottet, J. Villard, M. Zufferey, V. Steimle and W. Reith. (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.
22. Masternak, K. and W. Reith. (2002). Promoter-specific functions of CIITA and the MHC class II enhanceosome in transcriptional activation. *EMBO J.* **21**(6): 1379-1388.
23. Mayr, B. and M. Montminy. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Mol. Cell Biol.* **2**: 599-609.

24. **Moreno, C.S., G.W. Beresford, P. Louis-Pence, A.C. Morris, and J.M. Boss.** (1999). CREB regulates MHC class II expression in a CIITA-dependent manner. *Immunity* **10**: 143-151.
25. **Moreno, C.S., E.M. Rogers, J.A. Brown, and J.M. Boss.** (1997). Regulatory factor X, a bare lymphocyte syndrome transcription factor, is a multimeric phosphoprotein complex. *J. Immunol.* **158(12)**: 5841-5848.
26. **Muhlethaler-Mottet, A., M. Krawczyk, K. Masternak, C. Spilianakis, A. Kretsovali, J. Papamatheakis and W. Reith.** (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(39)**: 40529-35.
27. **Muhlethaler-Mottet, A., L.A. Otten, V. Steimle, and B. Mach.** (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(10)**: 2851-2860.
28. **Nagarajan, U.M., A.B. Long, M.T. Harreman, A.H. Corbett and J.M. Boss.** (2004). A Hierarchy of Nuclear Localization Signals Governs the Import of the Regulatory Factor X Complex Subunits and MHC Class II Expression. *J. Immunol.*, **173(1)**: 410-9.
29. **Nekrep, N., N. Jabrane-Ferrat, H.M. Wolf, M.M. Eibl, M.Geyer and B.M. Peterlin.** (2002). Mutation in a winged-helix DNA-binding motif causes atypical bare lymphocyte syndrome. *Nat. Immunol.* **3(11)**: 1075-1081.
30. **Reith, W. and B. Mach.** (2001). The Bare Lymphocyte Syndrome and the Regulation of MHC Expression. *Annu. Rev. Immunol.* **19**: 331-373.
31. **Scholl, T., S.K. Mahanta and J.L. Strominger.** (1997). Specific complex formation between the type II bare lymphocyte syndrome associated transactivators CIITA and RFX5. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 6330-6334.
32. **Sisk, T.J., K. Nickerson, R.P.S. Kwok, and C-H Chang.** (2003). Phosphorylation of class II transactivator regulates its interaction ability and transactivation function. *Int. Immunol.* **15(10)**: 1195-1205.
33. **Spilianakis, C., J. Papamatheakis and A. Kretsovali.** (2000). Acetylation by PCAF enhances CIITA nuclear accumulation and transactivation of major histocompatibility complex class II genes. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 8489-8498.
34. **Steimle, V., B. Durand, B. Emmanuele, M. Zufferey, M.R. Hadam, B. Mach and W. Reith.** (1995). A novel DNA-binding regulatory factor is mutated in primary MHC class II deficiency (bare lymphocyte syndrome). *Genes Dev.* **9**: 1021.
35. **Steimle, V., L.A. Otten, M. Zufferey and B. Mach.** (1993). Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome). *Cell* **75**: 135-146.
36. **Ting, J.P-Y and J. Trowsdale.** (2002). Genetic Control of MHC Class II Expression. *Cell*, **109**: S21-S33.

37. Tosi, G., N. Jabrane-Ferrat, and B.M. Peterlin. (2002). Phosphorylation of CIITA directs its oligomerization, accumulation and increased activity on MHCII promoters. *EMBO J.* **21(20)**: 5467-5476.
38. Vilen, B. J., J. P. Cogswell, and J. P. Ting. (1991). Stereospecific alignment of the X and Y elements is required for major histocompatibility complex class II DRA promoter function. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 2406-2415.
39. Vilen, B. J., J. F. Penta, and J. P.-Y. Ting. (1992). Structural constraints within a trimeric transcriptional regulatory region: constitutive and interferon-gamma inducible expression of the HLA-DRA gene. *J. Biol. Chem.* **267(33)**: 23728-23734.
40. Villard, J., M. Peretti, K. Masternak, E. Barras, G. Caretti, R. Mantovani, and W. Reith. (2000). A functionally essential domain of RFX5 mediates activation of major histocompatibility complex class II promoters by promoting cooperative binding between RFX and NF-Y. *Mol. Cell. Biol.* **20(10)**: 3364-3376.
41. Westerheide, S.D. and J.M. Boss. (1999). Orientation and positional mapping of the subunits of the multicomponent transcription factors RFX and X2BP to the major histocompatibility complex class II transcriptional enhancer. *Nucleic Acids Res.* **27(7)**: 1635-1641.
42. Xu, W., H. Chen, K. Du, H. Asahara, M. Tini, B.M. Emerson, M. Montminy, R. M. Evans. (2001). A Transcriptional Switch Mediated by Cofactor Methylation. *Science* **294**: 2507-11.
43. Zhong, G., L. Liu, T. Fan, P. Fan, and H. Ji. (2000). Degradation of Transcription Factor RFX5 during the Inhibition of both Constitutive and Interferon γ -inducible Major Histocompatibility Complex Class II Expression in Chlamydia-infected Cells. *J. Exp. Med.* **191(9)**: 1525-1534.
44. Zhu, X.-S., M. W. Linhoff, G. Li, K.-C. Chin, S. N. Maity, and J. P.-Y. Ting. (2000). Transcriptional scaffold: CIITA interacts with NF-Y, RFX, and CREB to cause stereospecific regulation of class II major Histocompatibility promoter. *Mol. Cell. Biol.* **20(16)**: 6051-6061.