

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

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

ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ Γ. ΣΠΗΛΙΑΝΑΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ
ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΜΗΣ ΤΑΞΗΣ II ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΠΟ ΤΟ
ΣΥΝΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΗ CITA**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΙΩΣΗΦ ΠΑΠΑΜΑΤΘΑΙΑΚΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, ΙΟΥΝΙΟΣ 2003

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ SUMMARY

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- Αντιγονοπαρουσίαση δια μέσω των τάξης II μορίων του Κυρίου Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας (MHC).
- Αντιγόνα του Κυρίου Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας
 - Χαρακτηριστικά
- Μεταγραφική ρύθμιση των MHC τάξης II γονιδίων.
- Κοινοί cis-δρώντες παράγοντες ρυθμίζουν μεταγραφικά τα γονίδια αντιγονικής επεξεργασίας.
- Το Σύνδρομο των Γυμνών Λεμφοκυττάρων.
- Σύνδρομο Γυμνών Λεμφοκυττάρων (BLS) Τύπου I.
- Σύνδρομο Γυμνών Λεμφοκυττάρων Τύπου II.
- Σύνδρομο Γυμνών Λεμφοκυττάρων Τύπου III.
- Ο Τάξης II Συννεργοποιητής (Class II Transactivator: CIITA)
 - Ανακάλυψη
 - Χαρακτηρισμός
 - Πρωτεϊνικές περιοχές με λειτουργική δράση.
 - Ρύθμιση του γονιδίου CIITA.
- Επιγενετικός έλεγχος των MHC τάξης II γονιδίων και του CIITA.

- Μηχανισμοί μεταγραφικής ρύθμισης γονιδίων.
- Ανακάλυψη και χαρακτηρισμός των ακετυλοτρανσφερασών ιστονών.
 - HAT-B
 - HAT-A
 - Μέλη της οικογένειας GNAT.
 - Μέλη της οικογένειας MYST.
 - p300/CBP
- Απακετυλάσες ιστονών.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΥΛΙΚΑ

- 1.1. Αντιδραστήρια.
- 1.2. Βακτηριακά στελέχη και πλασμιδιακοί φορείς.
- 1.3. Βακτηριακές καλλιέργειες.
- 1.4. Κυτταρικές σειρές.
- 1.5. Θρεπτικά διαλύματα και υλικά καλλιέργειών κυτταρικών σειρών.
- 1.6. Παρασκευή κυττάρων E.coli υψηλής δεκτικότητας.
- 1.7. Αντισώματα.
- 1.8. Ρητίνες κατακρήμνισης ανοσοσφαιρινών.

2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.

- 2.1. Απομόνωση της πρωτεΐνης CIITA από κύτταρα λεπιδοπτέρων.
- 2.2. Καθαρισμός ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης από βακτηριακά κύτταρα με αποδιατακτικές συνθήκες.
- 2.3. Απομόνωση αδιάλυτων χιμαϊρικών πρωτεϊνών σε σύντηξη με τη GST πρωτεΐνη
- 2.4. Παρασκευή πρωτεΐνης His-CRM1.

- 2.5. Αλληλεπιδράσεις χιμαιρικών πρωτεϊνών GST ή τμημάτων πρωτεϊνών με ραδιοσημασμένες πρωτεΐνες στόχους.
- 2.6. In vitro πείραμα αλληλεπίδρασης His-CRM1 με συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα.
- 2.7. Αντίδραση ακετυλίωσης πρωτεΐνης από GST-χιμαιρικό μόριο πρωτεΐνης με ιδιότητες ακετυλοτρανσφεράσης.
- 2.8. In vitro φωσφορύλιωση Πολυμεράσης II.
- 2.9. Παρασκευή πυρηνικών εκχυλισμάτων.
- 2.10. Σύγχρονη παρασκευή κυτταροπλασματικών και πυρηνικών εκχυλισμάτων από ευκαρυωτικά κύτταρα.
- 2.11. Ανοσοκατακρήμιση πρωτεϊνών από συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα.
- 2.12. Χρώση Νιτρικού αργύρου.

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗΣ ΚΑΙ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗΣ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.

- 3.1. Παροδική διαμόλυνση (transfection) κυτταρικών σειρών.
- 3.2. Επιμόλυνση κυττάρων Sf-9 με ανασυνδιασμένο βάκυλο-ιό.

4. ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ.

- 4.1. Κατασκευές στον φορέα έκφρασης pcDNA3 (Invitrogen).
- 4.2. Πλασμιδιακές κατασκευές στον φορέα έκφρασης pEGFP-C1.
- 4.3. Πλασμιδιακές κατασκευές στον προκαρυωτικό φορέα έκφρασης pGEX.
- 4.4. Πλασμιδιακές κατασκευές στο φορέα έκφρασης pBXG1.

5. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΟΥ DNA.

- 5.1. Αλυσιδωτή αντίδραση DNA πολυμεράσης (*Polymerase Chain Reaction PCR*).
- 5.2. Προσδιορισμός της πρωτοταγούς νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μορίων DNA (*DNA sequencing analysis*).
- 5.3. Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής.
- 5.4. In vitro μεταλλαξογέννεση.
- 5.5. Κλωνοποίηση των πρωτεϊνών του ενισχυοσώματος.

6. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ-DNA.

- 6.1. Έλεγχος ικανότητας πρόσδεσης απομονωμένης πρωτεΐνης, με αποδιατακτικές συνθήκες, σε σημασμένο δίκλωνο ολιγονουκλεοτίδιο.
- 6.2. In vitro αποτύπωμα με το ένζυμο DNase I.
- 6.3. In vitro στρατολόγηση πρωτεϊνών (ανασυνδιασμένων ή από πυρηνικά κυτταρικά εκχυλίσματα) σε τμήμα DNA.
- 6.4. Πείραμα ανοσοκατακρήμισης χρωματίνης.

ΕΙΔΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A. Ρύθμιση της έκφρασης των τάξης II αντιγόνων ιστοσυμβατότητας από συνενεργοποιητές που αλληλεπιδρούν με το CIIA.

- Το CBP ρυθμίζει θετικά την έκφραση των τάξης II αντιγόνων αλληλεπιδρώντας με το CIIA.
- Το CBP απαιτείται για την CIIA-εξαρτώμενη ενεργοποίηση των MHC τάξης II υποκινητών.
- Το CBP αλληλεπιδρά άμεσα με το CIIA.
- Η όξινη περιοχή ενεργοποίησης του CIIA προσδένεται στον pCAF τόσο in vitro όσο και in vivo.
- Ο pCAF δρα σαν συνενεργοποιητής για τη μεταγραφική ρύθμιση των τάξης II μορίων του Κυρίου Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας.
- Συζήτηση

Β. Η ακετυλίωση του C/PTA από τον pCAF αυξάνει τον πυρηνικό του εντοπισμό και τη μεταγραφική ενεργοποίηση των MHC τάξης II γονιδίων

- Ο pCAF και το CBP ακετυλιώνουν το C/PTA.
- Το C/PTA ακετυλιώνεται σε ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS: nuclear localization signal)
- Η ακετυλίωση αυξάνει την πυρηνική εντόπιση της πρωτεΐνης C/PTA.
- Συζήτηση
- Η ακετυλίωση του C/PTA σαν ρυθμιστικός μηχανισμός για την υποκυτταρική του κατανομή.

Γ. Η αλληλεπίδραση του C/PTA με τον εαυτό του συσχετίζεται με την υποκυτταρική του κατανομή και την ικανότητά του για μεταγραφική ενεργοποίηση.

- Πολλαπλές περιοχές καθορίζουν την πυρηνοκυτταροπλασματική κατανομή της πρωτεΐνης C/PTA.
- Το C/PTA αλληλεπιδρά με τον εαυτό του.
- Η αλληλεπίδραση του C/PTA με τον εαυτό του οδηγεί σε κυτταρική ανακατανομή και λειτουργική συμπλήρωση.
- Συζήτηση

Δ. Χαρακτηρισμός του ενισχυοσώματος και των βημάτων σχηματισμού του μεταγραφοσώματος ενός MHC τάξης II γονιδίου.

- In vitro σχηματισμός και χαρακτηρισμός του MHC τάξης II ενισχυοσώματος.
- Στρατολόγηση παραγόντων που απαιτούνται για τη μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή DRA in vivo.
- Το C/PTA ενισχύει τη φωσφορυλίωση της Ser5 της καρβοξυτελικής ουράς της RNA Πολυμεράσης II.
- Συζήτηση

ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Περίληψη

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής μελετήσαμε τους μηχανισμούς ρύθμισης των τάξης II αντιγόνων του Κυρίου Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας. Τα τάξης II αντιγόνα είναι διμερείς μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες με σκοπό την παρουσίαση αντιγόνων στα T-λεμφοκύτταρα. Η ρύθμιση της έκφρασής τους είναι αυστηρά ρυθμιζόμενη στο μεταγραφικό επίπεδο και η επαγωγή τους απαιτεί την ύπαρξη ενός ενισχυσώματος που δημιουργείται σε συντηρημένα στοιχεία (H,X,Y) του εγκύς υποκινητή καθώς και την έκφραση του παράγοντα C/PTA, που είναι και ο κύριος μεταγραφικός ενεργοποιητής των τάξης II γονιδίων.

Το C/PTA μπορεί να ρυθμίζει θετικά την έκφραση των MHC τάξης II γονιδίων αφού με την καρβοξυτελική του περιοχή στρατολογείται στο τάξης II ενισχυσώμα και με την αμινοτελική του περιοχή μπορεί να αλληλεπιδρά με άλλους μεταγραφικούς συνενεργοποιητές και να επάγει τη μεταγραφή. Δείξαμε ότι οι μεταγραφικοί συνενεργοποιητές CBP, pCAF και GCN5 αλληλεπιδρούν με την αμινοτελική περιοχή του C/PTA τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* και μπορούν να ρυθμίζουν θετικά την έκφραση των τάξης II αντιγόνων.

Το C/PTA όχι μόνο αλληλεπιδρά με τους παραπάνω συνενεργοποιητές αλλά ακετυλιώνεται απ' αυτούς σε διακριτά αμινοξικά κατάλοιπα λυσινών που εδράζονται σε ένα αμινοτελικό σήμα πυρηνικού εντοπισμού. Η ακετυλίωση του C/PTA έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της πυρηνικής του εντόπισης και την ενδυνάμωσή του για μεταγραφική ενεργοποίηση.

Η υποκυτταρική κατανομή του C/PTA καθορίζεται επίσης και από γεγονόςτα αλληλεπίδρασής του με τον εαυτό του. Η αλληλεπίδραση του C/PTA με τον εαυτό του οδηγεί σε κυτταρική ανακατανομή και λειτουργική συμπλήρωση.

Ο χαρακτηρισμός του τάξης II ενισχυσώματος έγινε για πρώτη φορά στα πλαίσια αυτής της εργασίας χρησιμοποιώντας ανασυνδιασμένες πρωτεΐνες και όχι πρωτεϊνικά εκχυλίσματα και δείχθηκε η συνεργατικότητα στην πρόσδεση των συμπλόκων στον εγκύς υποκινητή καθώς και η εξειδίκευση στην πρόσδεση. Δείξαμε ότι το *in vitro* ανασυστημένο τάξης II ενισχυσώμα μπορεί να στρατολογεί ειδικά στον υποκινητή τόσο το C/PTA όσο και άλλα μέρη της βασικής μεταγραφικής μηχανής. Χρησιμοποιώντας την τεχνική ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης δείξαμε την αλληλουχία στρατολόγησης των διαφόρων παραγόντων που απαιτούνται για την επαγωγή του τάξης II DRA γονιδίου μετά την επαγωγή των κυττάρων από IFN- γ . Πολλή σημαντικό αποτέλεσμα αποτελεί η απόδειξη ότι ένας συνενεργοποιητής όπως το C/PTA μπορεί να ρυθμίζει την έναρξη και επιμήκυνση της μεταγραφής ρυθμίζοντας τα επίπεδα φωσφορυλίωσης συγκεκριμένων καταλοίπων σερίνης της RNA Πολυμεράσης II.

Το σύστημα επαγωγής του γονιδίου DRA από IFN- γ είναι ένα επαγόμενο σύστημα μεταγραφής που ομοιάζει με την αλληλουχία των γεγονότων επαγωγής του γονιδίου της IFN- β μετά την προσθήκη ιού, στο ότι απαιτείται ένα ενισχυσώμα, που στην περίπτωση των τάξης II είναι προσχηματισμένο ενώ στην

περίπτωση της IFN-β είναι επαγόμενο. Πληροφορίες που αφορούν τη μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων γενικότερα μπορεί να αντλήσει κανείς συγκρίνοντας τα δύο συστήματα. Πιο σημαντικό γεγονός κρίνεται όμως η προσπάθεια κατανόησης της μεταγραφής των τάξης II γονιδίων και η προσπάθεια επαγωγής τους σε συμπαγείς όγκους όπου και η έκφραση ελλείπει.

SUMMARY

During my PhD studies I worked on the mechanisms regulating the expression of Major Histocompatibility Complex class II genes. MHC class II antigens are dimeric membrane glycoproteins that recognize and present antigenic peptides to T-lymphocytes. Their expression is highly regulated in transcriptional level and their stimulation needs the existence of an enhanceosome, which is composed on highly conserved sequences (HXY) of the proximal promoter, as well as the expression of CIITA, which is the major transcriptional regulator of the MHC class II genes.

CIITA can positively regulate the expression of MHC class II genes upon its recruitment through its carboxy-terminal domain onto the class II enhanceosome and with its amino-terminal domain interacting with various other transcriptional coactivators. We showed that transcriptional coactivators such as CBP, pCAF and GCN5 interact physically with CIITA in vitro and in vivo and positively regulate the expression of class II antigens.

CIITA not only interacts with these coactivators but it is being acetylated in discrete lysine residues that reside in an amino-terminal nuclear localization signal. Acetylation of CIITA results in increased nuclear accumulation of the protein and enhancement of transcriptional initiation.

The subcellular localization of CIITA is also affected from its self-association. Self association of CIITA results in subcellular redistribution of the protein and its functional complementation.

It's the first time, in the constraints of this study that the MHC class II enhanceosome was characterized using recombinant in vitro expressed proteins and not whole-cell extracts and it was shown the cooperative binding of all complexes onto the class II proximal promoter as well as the specificity in binding. We showed that the in vitro reconstituted enhanceosome can specifically recruit CIITA on the proximal promoter as well as other components of the basal transcription machinery. Using the technique of chromatin immunoprecipitation we showed the order of recruitment of all the factors needed for the induction of an MHC class II gene-DRA after the induction of cells with IFN- γ . It is an important result that a transcriptional transactivator such as CIITA can regulate the initiation and elongation of transcription regulating the levels of phosphorylation of specific serine residues of RNA polymerase II.

This induction of DRA from IFN- γ is an inducible system of transcription that resembles the order of recruitment and induction of IFN- β gene upon virus induction, in that they both need an enhanceosome, preassembled for class II or inducible in IFN- β . Someone can take information concerning transcriptional regulation of genes in general, from the comparison of the two systems. It is more important trying to understand the transcription of class II genes and induction of expression in solid tumors where they are not normally expressed.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Αντιγονοπαρουσίαση δια μέσω των τάξης II μορίων του Κυρίου Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας (MHC).

Κατά τη διάρκεια της αντιγονοπαρουσίασης, μια πρωτεΐνη δεσμεύεται και υφίσταται επεξεργασία από κύτταρα αντιγονοπαρουσιαστές (Antigen Presenting Cells: APCs), και μετά αναγνωρίζεται από τα T λεμφοκύτταρα. Τα βασικά πρότυπα αναγνώρισης πρωτεΐνης εμπλέκουν τόσο τα CD4 όσο και τα CD8 T λεμφοκύτταρα. Και οι δύο T κυτταρικοί τύποι δεν αναγνωρίζουν πρωτεϊνικά αντιγόνα στη φυσική τους μορφή αλλά μόνο μετά την επεξεργασία τους από τα APCs. Ο ρόλος του κυττάρου αντιγονοπαρουσιαστή είναι η επεξεργασία της πρωτεΐνης σε αποδιαταγμένα κομμάτια ή πεπτίδια που αλληλεπιδρούν με τάξης I ή τάξης II μόρια του κυρίου συμπλόκου ιστοσυμβατότητας (MHC). Το διαμοριακό σύμπλοκο πεπτιδίου-MHC αντιπροσωπεύει τον αντιγονικό καθοριστή που αναγνωρίζεται από τον αβ T υποδοχέα των CD4 ή CD8 κυττάρων. Παρόλα αυτά υπάρχουν αξιοσημείωτες διαφορές ανάμεσα στην αναγνώριση από τα CD4 ή τα CD8 T κύτταρα, στο ότι τα CD4 T κύτταρα αναγνωρίζουν τα πεπτίδια που είναι συνδεδεμένα με τάξης II MHC μόρια, ενώ τα CD8 T λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν πεπτίδια που είναι συνδεδεμένα με τα τάξης I μόρια. Τα CD4 ή CD8 μόρια αλληλεπιδρούν είτε με τα τάξης II ή τάξης I μόρια, αντίστοιχα, επιτρέποντας την αλληλεπίδραση του υποδοχέα του T λεμφοκυττάρου με το σύμπλοκο MHC-πεπτίδιο.

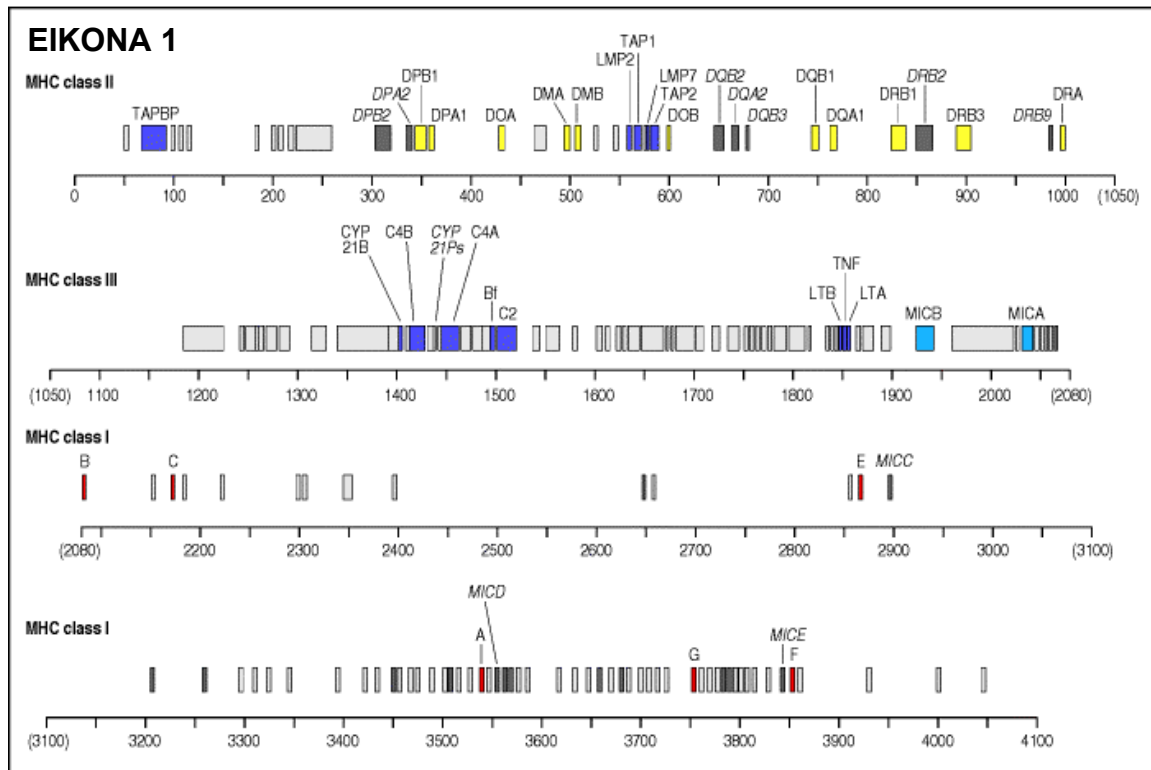
Αντιγόνα του Κυρίου Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας

Χαρακτηριστικά

Το Κύριο Σύμπλοκο Ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex: MHC), εδράζεται στον κοντό αρμό του χρωμοσώματος 6 (στον άνθρωπο), απαρτίζεται από 4 εκατομμύρια βάσεις DNA, και συμπεριλαμβάνει πολλά γονίδια που κωδικοποιούν τα MHC μόρια (Εικόνα 1). Τα MHC μόρια αναφέρονται και ως ανθρώπινα λευκοκυτταρικά αντιγόνα (Human Leukocyte Antigens: HLA), επειδή τα αντισώματα που τα αναγνωρίζουν αντιδρούν με τα λευκοκύτταρα, αλλά όχι με τα ερυθροκύτταρα. Αυτά τα μόρια είναι απαραίτητα για την αντιγονική παρουσίαση στα T λεμφοκύτταρα και χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες, τα μόρια τάξης I και II. Αυτά τα μόρια είναι υψηλά πολυμορφικά, και σαν τέτοια, είναι ο κύριος λόγος για την απόρριψη μοσχεύματος στις μεταμοσχεύσεις. Κάθε HLA μόριο αποτελείται από μια βαριά και μια ελαφριά αλυσίδα, που έρχονται μαζί για να σχηματίσουν την αύλακα πρόσδεσης των αντιγονικών πεπτιδίων. Ενώ η υπερέκφραση των MHC μορίων σχετίζεται με αυτοάνοσσα νοσήματα, η μειωμένη έκφραση αυτών οδηγεί σε ανοσοανεπάρκεια. Σε κάθε περίπτωση πάντως το αποτέλεσμα μπορεί να προκαλέσει το θάνατο του ασθενή.

Τα MHC τάξης I μόρια (HLA-A, B, C)(Εικόνα 2) προσδέονται σε ξένα αντιγονικά πεπτίδια στο κυτταρόπλασμα και τα παρουσιάζουν στα κυτταροτοξικά CD8⁺ T κύτταρα, τα οποία δρουν σκοτώνοντας το μολυσμένο κύτταρο. Εκφράζονται στα περισσότερα αιμοποιητικά πρόδρομα κύτταρα και τους απογόνους τους και μπορούν να επαχθούν στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους από την Ιντερφερόνη-γ (IFN-γ).

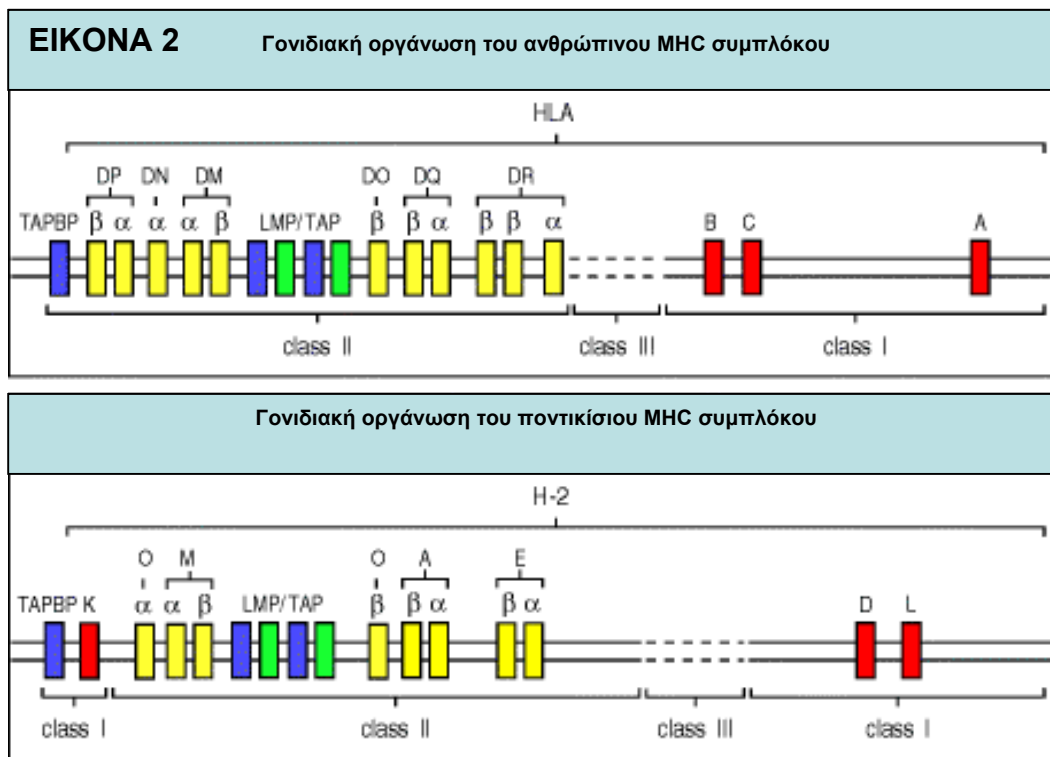
Η ελαφριά αλυσίδα του τάξης I μορίου αναφέρεται ως β2-μικροσφαιρίνη (β2-m), και αντίθετα με την τάξης I βαριά αλυσίδα και τις τάξης II βαριά και ελαφριά αλυσίδα, εδράζεται στο χρωμόσωμα 15. Η αύλακα πρόσδεσης του τάξης I μορίου είναι κλειστή, εννοώντας ότι είναι συνδεδεμένη και στα δύο άκρα, περιορίζοντας το μέγεθος του πεπτιδίου που θα προσδεθεί, στα 8-10 αμινοξέα. Ο ελάχιστος και μέγιστος αριθμός των τάξης I αλληλίων που μπορεί να εκφράσει ένα άτομο είναι 3(ομόζυγα) και 6, αντίστοιχα.



EIKONA 1: Αναλυτικός χάρτης του Κυρίου Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας στον άνθρωπο. Η οργάνωση των τάξης I, τάξης II και τάξης III περιοχών του ανθρώπινου MHC υποδεικνύονται, με σχετικές γενετικές αποστάσεις που δίνονται σε χιλιάδες ζεύγη βάσεων (Kb). Τα γονίδια που υποδεικνύονται στην τάξης I περιοχή (για παράδειγμα, E, F και G) είναι παρόμοια με τάξης I γονίδια, που κωδικοποιούν τα τάξης IB μόρια. Τα επιπλέον τάξης II γονίδια είναι ψευδογονίδια. Τα γονίδια που υποδεικνύονται στην τάξης II περιοχή κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες του συμπληρώματος C4 (δύο γονίδια, που υποδεικνύονται σαν C4A και C4B), C2 και τον παράγοντα B (υποδεικνύεται σαν Bf) καθώς και γονίδια που κωδικοποιούν τις κυτοκίνες TNF-α και λεμφοτοξίνη-α (LTA, LTB). Κοντά στα γονίδια C4 είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί την 21-υδροξυλάση (υποδεικνύεται σαν CYP 21B), ένα ένζυμο που ενέχεται στη σύνθεση των στεροειδών. Τα γονίδια που εμφανίζονται γκρι και με πλάγια γραφή είναι ψευδογονίδια. Τα γονίδια είναι χρωματιστά, με τα MHC τάξης I γονίδια να δείχνονται σαν κόκκινα, εκτός από τα MIC γονίδια, τα οποία δείχνονται μπλε. Αυτά είναι διαφορετικά από τα άλλα τάξης-I γονίδια και επιδέχονται διαφορετικό μεταγραφικό έλεγχο. Τα MHC τάξης II γονίδια υποδεικνύονται κίτρινα. Γονίδια στην περιοχή MHC που έχουν ανοσολογικές λειτουργίες αλλά δεν σχετίζονται με τα MHC τάξης I και τάξης II γονίδια υποδεικνύονται σαν μωβ.

Τα τάξης II μόρια (HLA-DP, -DQ, -DR)(Εικόνα 2) εντοπίζονται κυρίως στα κύτταρα αντιγονοπαρουσιαστές (APC), που είναι τα Β κύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα και τα μακροφάγα, και μπορούν να επαχθούν από IFN-γ σε πολλούς άλλους κυτταρικούς τύπους (Basta et al., 1987; Collins et al., 1984; Glimcher and Kara, 1992; Mach et al., 1996; Rohn et al., 1996; Ting and Baldwin, 1993). Αυτή η

τάξη μορίων δρα παρουσιάζοντας στα T λεμφοκύτταρα αντιγόνα που αποκωδομοούνται σε ενδοκυτταρικά κυστίδια. Το τάξης II μόριο, ενωμένο με το αντιγόνο, αναγνωρίζεται από τα CD4+ T κύτταρα βοηθούς. Ενώ η λειτουργία των CD8+ κυττάρων είναι να σκοτώνουν μολυσμένα κύτταρα, τα CD4+ κύτταρα λειτουργούν ενεργοποιώντας άλλα κύτταρα, όπως τα μακροφάγα (κυτταρική ανοσία) ή τα B κύτταρα (χυμική ανοσία). Η βαριά και ελαφριά αλυσίδες των τάξης II μορίων ονομάζονται α και β αλυσίδες, αντίστοιχα. Είναι ενδιαφέρον ότι η α αλυσίδα του HLA-DR είναι πολυμορφική. Η τάξης II αύλακα πρόσδεσης είναι ανοικτή, εννοώντας ότι δεν είναι προσδεμένα τα άκρα της, οπότε πεπτιδία 13-25 αμινοξέων μπορούν να προσδεθούν ικανοποιητικά. Ένα άτομο μπορεί να εκφράζει από 3 (ομόζυγο), ή το πολύ 8 διαφορετικά τάξης II αλληλία.



EIKONA 2: Η γενετική οργάνωση του Κυρίου συμπλόκου ιστοσυμβατότητας (MHC)

στον άνθρωπο και το ποντίκι. Η οργάνωση των κυρίων MHC γονιδίων υποδεικνύεται τόσο στους ανθρώπους (όπου το MHC ονομάζεται HLA και είναι στο χρωμόσωμα 6) και στα ποντίκια (όπου το MHC ονομάζεται H-2 και εδράζεται στο χρωμόσωμα 17). Η οργάνωση των MHC γονιδίων είναι όμοια και στα δύο είδη. Υπάρχουν ξεχωριστά σύμπλοκα από MHC τάξης I γονίδια (υποδεικνύονται κόκκινα) και MHC τάξης II γονίδια (δείχνονται κίτρινα), παρότι στο ποντίκι ένα MHC τάξης I γονίδιο (H-2K) φαίνεται να έχει μετατοπισθεί σχετικά με το ανθρώπινο MHC οπότε η τάξης I περιοχή στο ποντίκι είναι χωρισμένη στα δύο. Και στα δύο είδη υπάρχουν τρία κύρια τάξης I γονίδια, τα οποία ονομάζονται HLA-A, -B και -C στον άνθρωπο, και H2-K, -D και -L στο ποντίκι. Το γονίδιο για τη β2-μικροσφαιρίνη, παρότι κωδικοποιεί μέρος του MHC τάξης I μορίου, εδράζεται σε άλλο χρωμόσωμα, το χρωμόσωμα 15 στον άνθρωπο και το χρωμόσωμα 2 στο ποντίκι. Η τάξης II περιοχή περιλαμβάνει τα γονίδια για τις α και β αλυσίδες των αντιγονοπαρουσιαστικών MHC τάξης II μορίων HLA-DR, -DP, και -DQ (H-2A και -E στο ποντίκι). Επιπλέον, τα γονίδια για τους πεπτιδικούς μεταφορείς TAP1:TAP2, τα γονίδια LMP που κωδικοποιούν υπομονάδες του πρωτεασώματος, τα γονίδια που κωδικοποιούν τις αλυσίδες DMα και DMβ, τα γονίδια που κωδικοποιούν τις αλυσίδες α και β του μορίου DO (DNα και DNβ, αντίστοιχα), και το γονίδιο για την ταπασίνη (TAPBP) είναι επίσης στην MHC τάξης II περιοχή. Τα επονομαζόμενα τάξης III γονίδια κωδικοποιούν ποικίλες άλλες πρωτεΐνες με λειτουργίες στην ανοσία.

Επιπρόσθετα με τα κλασσικά MHC τάξης II γονίδια, τα HLA-DM και η Σταθερή αλυσίδα (Invariant chain) (Ii) παίζουν σημαντικούς ρόλους στην τάξης II απάντηση. Και οι δύο τάξεις MHC μορίων δομούνται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, παρόλα αυτά παρουσιάζονται στη μεμβράνη με διαφορετικούς τρόπους. Το τάξης I μόριο δεν μπορεί να φύγει από το ενδοπλασματικό δίκτυο μέχρι ένα πεπτιδίο να προσδεθεί. Απ'την άλλη μεριά, το τάξης II μόριο δεν φεύγει από το ενδοπλασματικό δίκτυο μέχρι η Ii καλύψει την αύλακα πρόσδεσης, αποτρέποντας στα τάξης II μόρια να προσδέσουν τον λάθος τύπο πεπτιδίου. Στο ενδοπλασματικό δίκτυο, η Ii προσδέεται στο MHC τάξης II μόριο και παραμένει προσδεμένη με αυτό μέχρι να γίνει το φόρτωμα πεπτιδίου στα ενδοσωμικά διαμερίσματα. Εδώ η πλειονότητα της Ii αποικοδομείται, αφήνοντας μόνο το πολυπεπτιδίο της Ii που είναι προσδεμένο με τάξης II μόριο (CLIP). Αφού το πεπτιδίο φορτωθεί, το CLIP απομακρύνεται από το HLA-DM (Bertolino and Rambourdin-Combe, 1996).

Η Σταθερή αλυσίδα Ii που εδράζεται στο χρωμόσωμα 5, επίσης γνωστή σαν CD74, ονομάζεται σταθερή αλυσίδα-invariant chain επειδή είναι μια μη-πολυμορφική αλυσίδα με πολύ μικρή ποικιλότητα ανάμεσα στα είδη. Παρόλα αυτά, υπάρχουν διαφορετικές ισομορφές της Ii τόσο στον άνθρωπο αλλά και το ποντίκι. Εναλλακτικό κόψιμο του mRNA στο έβδομο εξόνιο δημιουργεί μια κύρια 33KDa ισομορφή (31KDa στο ποντίκι) και μια μείζονα 41 KDa ισομορφή (Strubin et al., 1986).

Άλλο ένα μη-κλασσικό τάξης II μόριο, το HLA-DM, είναι απαραίτητο για τη σύνδεση του αντιγονικού πεπτιδίου πάνω στο τάξης II μόριο και για τη μετέπειτα απομάκρυνση του CLIP πεπτιδίου. Όταν το HLA-DM μόριο δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με το HLA-DR, το αποτέλεσμα είναι η συσσώρευση των HLA-DR/CLIP συμπλόκων στην κυτταρική επιφάνεια (Fling et al., 1994; Riberdy et al., 1992).

Απ'τη στιγμή που το σύμπλοκο πεπτιδίου και MHC μορίου φτάσει στην κυτταρική επιφάνεια και αναγνωριστεί από τον υποδοχέα του κατάλληλου T λεμφοκυττάρου, μια σειρά από αντιδράσεις ξεκινούν. Το πρώτο βήμα είναι η ενεργοποίηση του T κυττάρου, παρόλα αυτά εκτός από την αναγνώριση του συμπλόκου πεπτιδίου και MHC μορίου από τον υποδοχέα του T λεμφοκυττάρου, πρέπει να γίνει μια αλληλεπίδραση από συνενεργοποιητικά μόρια τόσο από το T κύτταρο αλλά και το κύτταρο αντιγονοπαρουσιαστή. Εάν δεν γίνει αυτό, αντί να ενεργοποιηθεί, το T κύτταρο θα πεθάνει (Medema and Borst, 1999). Τα B7-1 και B7-2 είναι δύο βοηθητικά μόρια παρόντα στο κύτταρο αντιγονοπαρουσιαστή που αλληλεπιδρούν με το CD28 στο T κύτταρο (Sperling and Bluestone, 1996; Van Gool et al., 1996). Αυτή η αλληλεπίδραση σηματοδοτεί ένα μονοπάτι που περιλαμβάνει την απελευθέρωση μιας σειράς κυτοκινών που είναι στοιχεία κλειδιά της ανοσολογικής απάντησης.

Μεταγραφική ρύθμιση των MHC τάξης II γονιδίων.

Τα γονίδια που κωδικοποιούν τα MHC τάξης II, τη Σταθερή αλυσίδα (Ii) και το HLA-DM ρυθμίζονται με σύγχρονο και συνδυασμένο τρόπο από μια συντηρημένη ομάδα μεταγραφικών παραγόντων. Η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός αυτών των μεταγραφικών παραγόντων κατά τα τελευταία χρόνια προσέδωσε πληροφορία για το πως αυτά τα σημαντικά γονίδια και η διαδικασία της αντιγονοπαρουσίασης ρυθμίζονται. Η ρύθμιση των γονιδίων αντιγονικής επεξεργασίας περιλαμβάνει μηχανισμούς που ενέχουν την επιγενετική τροποποίηση του DNA και της χρωματίνης, καθώς και την πυρηνική είσοδο μεταγραφικών παραγόντων.

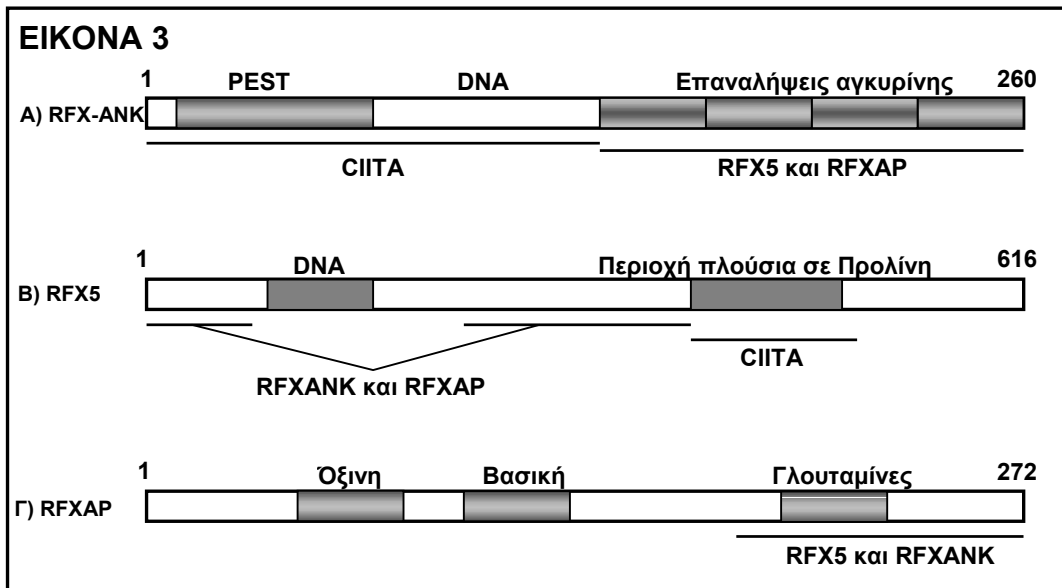
Το μονοπάτι αντιγονικής επεξεργασίας και παρουσίασης μέσω τάξης II μορίων παίζει ένα κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της ενεργοποίησης και εξειδίκευσης των απαντήσεων των CD4+ T κυττάρων, τα οποία με τη σειρά τους ρυθμίζουν πολλά στοιχεία της επίκτητης ανοσολογικής απόκρισης. Αυτό το μονοπάτι παρέχει ένα μηχανισμό για την κατηγοριοποίηση και παρουσίαση των πεπτιδίων που δημιουργούνται από πρωτεΐνες που στοχεύονται στα διαμερίσματα του ενδοσώματος των κυττάρων αντιγονοπαρουσιαστών (APCs). Τα γενικά χαρακτηριστικά αυτού του μονοπατιού είναι κοινά σε όλα τα κύτταρα αντιγονοπαρουσίασης, τα οποία περιλαμβάνουν δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα, Β λεμφοκύτταρα και κύτταρα του επιθηλίου του θύμου. Τα MHC τάξης II αβ ετεροδιμερή αρχικά σχηματίζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο με τη σταθερή αλυσίδα (Ii), η οποία δρα σαν σαπερόνη για να σταθεροποιήσει το ετεροδιμερές, αποκλείει το φόρτωμα μη ώριμων πεπτιδίων και οδηγεί τα τάξης II μόρια σε διαμερίσματα του ενδοσώματος. Η σταθερή αλυσίδα (Ii) ελευθερώνεται μερικώς δια μέσω μιας σειράς γεγονότων πρωτεολυτικής πέψης, αφήνοντας ένα πεπτίδιο (πεπτίδιο σταθερής αλυσίδας συνδεδεμένο με τάξης II-CLIP) που εδράζεται στην αύλακα πρόσδεσης πεπτιδίου του MHC μορίου. Η απελευθέρωση του CLIP και η αντικατάστασή του με αντιγονικά πεπτίδια καταλύεται από HLA-DM, το οποίο οδηγείται ανεξάρτητα στα όψιμα διαμερίσματα του ενδοσώματος. Το σύμπλοκο MHC τάξης II-πεπτιδίου μεταφέρεται μετά στην κυτταρική επιφάνεια το οποίο εξυπηρετεί αλληλεπιδράσεις με T λεμφοκύτταρα ειδικά για το αντιγόνο. Η έκφραση των MHC τάξης II, της σταθερής αλυσίδας (Ii) και των HLA-DM γονιδίων ρυθμίζεται συνδυασμένα στο επίπεδο της μεταγραφής από ένα συντηρημένο σύνολο παραγόντων και χαρακτηρισμένα cis-δρώντα στοιχεία.

Κοινοί cis-δρώντες παράγοντες ρυθμίζουν μεταγραφικά τα γονίδια αντιγονικής παρουσίασης.

Καθένα από τα γονίδια αντιγονικής επεξεργασίας και παρουσίασης (MHC τάξης II, σταθερή αλυσίδα Ii και HLA-DM) περιέχουν στον εγγύς υποκινητή τους μια κοινή ομάδα από cis-δρώντα στοιχεία τα οποία εδράζονται ~100-200bp 5' από το σημείο έναρξης της μεταγραφής. Αυτή η συντηρημένη περιοχή, η οποία αποτελείται από τα W/S, X1, X2 και Y κουτιά, είναι αναγκαία και ικανή για τη συστατική και επαγόμενη (από IFN- γ) μεταγραφική ρύθμιση όλων των γνωστών αναπτυξιακών και επαγόμενων

γεγονότων έκφρασης. Το Y κουτί είναι κοινό στο γένωμα και προσδένει τον ετεροτριμερή μεταγραφικό παράγοντα NF-Y, ο οποίος αποτελείται από τον NF-YA, τον NF-YB και τον NF-YC. Οι NF-YB και NF-YC περιέχουν δομές έλικας ιστόνης που θεωρείται ότι κάμπτουν το DNA σε υποκινητές, μια διαδικασία που μπορεί να υποβοηθεί τον αποτελεσματικό σχηματισμό πολλαπλών μεταγραφικών συμπλόκων και να παρέχει εύκολη πρόσβαση στην RNA πολυμεράση. Το X2 κουτί έχει βρεθεί ότι προσδένει τον παράγοντα CREB (Moreno et al., 1999). Ο CREB ενέχεται σε πολλά ρυθμιστικά μονοπάτια περιλαμβάνοντας την νευρολογική και ανοσολογική ανάπτυξη και ρύθμιση. Εκτός από τον εν δυνάμει σημαντικό ρόλο στη γονιδιακή ρύθμιση των MHC τάξης II, ο CREB είναι σημαντικός για τη σταθερότητα και συγκρότηση του συμπλόκου στο X1 κουτί, του ρυθμιστικού παράγοντα X (RFX), στους WXY υποκινητές.

Πληροφορίες για τους παράγοντες που αλληλεπιδρούν με το X1 στοιχείο προέκυψαν από την ανακάλυψη και την ανάλυση ασθενών που εμφανίζουν το σύνδρομο των γυμνών λεμφοκυττάρων (BLS), στους οποίους η έκφραση των MHC τάξης II είναι απύσχα (DeSandro et al., 1999). Το Σύνδρομο των Γυμνών Λεμφοκυττάρων προκαλείται από μεταλλάξεις σε συγκεκριμένους trans-δρώντες παράγοντες, για τους οποίους έχουν καθοριστεί τέσσερις ομάδες συμπληρωματικότητας (που ονομάζονται BLS ομάδες A, B, C και D). Οι ομάδες BLS B, C και D έχουν πρόβλημα στον παράγοντα πρόσδεσης στο DNA RFX, ο οποίος προσδένεται στο X1 κουτί. Ο RFX είναι ένα ετεροτριμερές, με μια διαφορετική υπομονάδα να επηρεάζεται σε καθεμιά από τις τρεις BLS ομάδες. Οι BLS ομάδες B, C και D είναι προβληματικές στον RFX-B (RFX-ANK), τον RFX5 και τον RFX-AP, αντίστοιχα (Durand et al., 1997; Masternak et al., 1998; Nagarajan et al., 1999; Steimle et al., 1995; Villard et al., 1997). Όπως υποδεικνύεται στην Εικόνα 3, οι τρεις υπομονάδες έχουν περιοχές απαραίτητες για την αλληλεπίδραση των υπομονάδων, για την οποία οι επαναλήψεις ανκυρίνης του RFX-ANK είναι απαραίτητες (DeSandro et al., 2000; Nekrep et al., 2000; Zhou et al., 2000). Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των ομάδων BLS με πρόβλημα στις RFX υπομονάδες είναι ότι οι υποκινητές των MHC τάξης II γονιδίων δεν είναι κατειλημμένοι σε κυτταρικές σειρές που προέρχονται από τέτοιους ασθενείς (Kara and Glimcher, 1991). Αυτό τονίζει τη σημασία του RFX και προτείνει ότι ο RFX είναι απαραίτητος για το σχηματισμό όλων των συμπλόκων στους WXY υποκινητές. In vitro αποδείξεις που δείχνουν ότι οι RFX, CREB και NF-Y σχηματίζουν ένα σταθερό συνεργατικό σύμπλοκο στο X-Y DNA υποστηρίζει την ιδέα ότι αυτοί οι παράγοντες σχηματίζουν μια επιφάνεια για τη στρατολόγηση επιπρόσθετων παραγόντων, όπως είναι ο τάξης II συνενεργοποιητής (CIITA) και η RNA πολυμεράση.



ΕΙΚΟΝΑ 3: Η δομή και οι λειτουργικές περιοχές των υπομονάδων RFX. (Α) Ο RFX-ANK περιέχει μια περιοχή πλούσια σε προλίνη, γλουταμικό οξύ, σερίνη, και θρεονίνη που ονομάζεται PEST, και είναι εν δυνάμει περιοχή υπεύθυνη για την πρόσδεση στο DNA καθώς περιέχει και τέσσερις επαναλήψεις αγκυρίνης. **(Β)** Ο RFX5 περιέχει μια καλά χαρακτηρισμένη περιοχή πρόσδεσης στο DNA που είναι όμοια με τα άλλα μέλη της οικογένειας, καθώς και μια περιοχή πλούσια σε προλίνες. **(Γ)** Ο RFXAP περιέχει περιοχές όξινης, βασικής καθώς και περιοχές πλούσιες σε γλουταμίνη. Υποδεικνύονται στο σχήμα οι περιοχές που είναι υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση με τις άλλες υπομονάδες του RFX συμπλόκου και με το CIITA.

Ασθενείς από την ομάδα συμπληρωματικότητας A του Συνδρόμου Γυμνών Λεμφοκυττάρων είναι ακέραιοι όσον αφορά τους παράγοντες RFX, CREB και NF- γ . Επιπλέον, αυτοί οι παράγοντες αλληλεπιδρούν στους MHC υποκινητές *in vivo*, παρόλα αυτά τα τάξης II γονίδια δεν εκφράζονται. Ο παράγοντας που είναι προβληματικός σ' αυτή την ομάδα συμπληρωματικότητας είναι υπεύθυνος για την ενεργοποίηση της μεταγραφής και ονομάζεται CIITA (Steimle et al., 1993). Το CIITA δεν προσδέεται απευθείας στο DNA, αλλά στρατολογείται στους WXY υποκινητές δια μέσω άμεσων αλληλεπιδράσεων με τα σύμπλοκα RFX-CREB-NFY (Beresford and Boss, 2001; Masternak et al., 2000). Όταν το CIITA προσδεθεί στον υποκινητή ενεργοποιεί τη μεταγραφή δια μέσω της όξινης περιοχής ενεργοποίησης που διαθέτει στην αμινοτελική του περιοχή. Δια μέσω αυτής της περιοχής και άλλων περιοχών που διαθέτει, το CIITA αλληλεπιδρά με στοιχεία της βασικής μεταγραφικής μηχανής.

Παρότι αυτή η ιστορία μοιάζει μάλλον ολοκληρωμένη, πολλές πτυχές της δράσης των RFX, CREB και CIITA μένει να διασαφηνισθούν. Καθεμιά από τις υπομονάδες του RFX συμπλόκου φωσφορυλιώνεται, παρόλα αυτά οι θέσεις και ο ρόλος αυτών των τροποποιήσεων είναι άγνωστα. Είναι πιθανό ότι τέτοιες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις ελέγχουν την πυρηνική είσοδο/έξοδο των RFX, την ικανότητά τους να προσδέονται στο CIITA, ή ακόμα και την ικανότητά τους να σχηματίζουν ένα μεταγραφικό σύμπλοκο *in vivo*. Η διασαφήνιση του ρόλου του cAMP στην τροποποίηση της έκφρασης των MHC τάξης II είναι ενδιαφέρουσα. Σε μερικά κυτταρικά συστήματα, παράγοντες όπως η προσταγλανδίνη E2 ή άλλες

βιολογικές συνθήκες που αυξάνουν τα επίπεδα του κυτταρικού cAMP οδηγούν στην αρνητική ρύθμιση των επαγόμενων από IFN- γ MHC τάξης II γονιδίων. Υπάρχει μια αναφορά που δείχνει ότι ενέχεται η πυρηνική εντόπιση του CIITA (Li et al., 2001). Άλλος ένας μηχανισμός που ενέχεται σ' αυτή την απάντηση θα μπορούσε να συμπεριλαμβάνει τον CREB, ο οποίος φωσφορυλιώνεται άμεσα στο μονοπάτι του cAMP, ένα συμβάν που οδηγεί στην πρόσδεση των συνενεργοποιητών CBP και p300. Δεν είναι γνωστό αν η φωσφορυλίωση του CREB αλλάζει την ικανότητα του CBP να αλληλεπιδρά επαρκώς στον τάξης II υποκινητή. Επιπλέον, μια εν δυνάμει σημαντική ομάδα συμπληρωματικότητας (E) με Σύνδρομο Γυμνών Λεμφοκυττάρων έχει περιγραφεί στην οποία τα MHC τάξης II γονίδια που μεταγράφονται προς την κεντρομερική κατεύθυνση δεν εκφράζονται (Douhan et al., 1996). Ο παράγοντας που είναι υπεύθυνος για αυτό το φαινότυπο είναι άγνωστος.

Το Σύνδρομο των Γυμνών Λεμφοκυττάρων.

Το σύνδρομο των γυμνών λεμφοκυττάρων (BLS: bare lymphocyte sndrome) χαρακτηρίζεται από μια σειρά σπάνιες αυτοσωμικές υπολειπόμενες ανωμαλίες στις οποίες οι ασθενείς εμφανίζουν ελλιπή ή χαμηλή έκφραση των HLA πρωτεϊνών του Κυρίου Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας. Τρεις τύποι BLS έχουν ταυτοποιηθεί, οι οποίοι διαφέρουν τόσο στη φαινοτυπική HLA έκφραση όσο και την έλλειψη της ανοσολογικής λειτουργίας. Στον BLS τύπο I, εμφανίζεται χαμηλή ή καθόλου έκφραση των HLA τάξης I μορίων στα περιφερικά κύτταρα του αίματος. Ο βαθμός της ανοσοανεπάρκειας ποικίλει περισσότερο στον BLS τύπο I, με μερικούς ασθενείς να εμφανίζουν κανονική ανοσία. Ο τύπος II BLS χαρακτηρίζεται από τη μείωση ή την παντελή έλλειψη της έκφρασης των HLA τάξης II πρωτεϊνών σε όλα τα κύτταρα. Στις ανωμαλίες BLS τύπου III, η έκφραση των αντιγόνων HLA τύπου I και II είναι ελαχιστοποιημένη και αυτοί οι ασθενείς εμφανίζουν σημαντική ανοσοανεπάρκεια. Οι μελέτες σε ασθενείς με BLS προσδίδουν πολλές πληροφορίες όσον αφορά τη δράση της επιλεκτικής καταστολής της δράσης των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας, καθώς επίσης προσφέροντας πληροφορίες για τη μεταγραφική και τη μεταμεταφραστική ρύθμιση των μορίων ιστοσυμβατότητας.

Σύνδρομο Γυμνών Λεμφοκυττάρων (BLS) Τύπου I.

Τα τάξης I αντιγόνα ιστοσυμβατότητας εκφράζονται συστατικά σε όλα τα φυσιολογικά εμπύρηννα κύτταρα, παρόλα αυτά η επιφανειακή έκφραση αυτών των πρωτεϊνών μπορεί να ρυθμιστεί αρνητικά από ιούς και σε μερικούς όγκους. Στα περιφερικά λεμφοκύτταρα του αίματος, η μειωμένη έκφραση των τάξης I αντιγόνων με φυσιολογικά επίπεδα τάξης II πρωτεϊνών είναι ένα συνηθισμένο χαρακτηριστικό του BLS Τύπου I. Τα επίπεδα της έκφρασης στην επιφάνεια του κυττάρου των τάξης I αντιγόνων ποικίλουν πολύ ανάμεσα στους τύπου I ασθενείς. Η ανοσοανεπάρκεια δεν σχετίζεται πάντα με τα επίπεδα της κυτταρικής έκφρασης των τάξης I, και ασθενείς με καθόλου ή χαμηλή έκφραση τάξης I αντιγόνων και κανένα σημάδι ανοσολογικής δυσλειτουργίας έχουν αναγνωρισθεί. Είναι αξιοσημείωτο, ότι ο μετασχηματισμός των B

κυττάρων με ιό Epstein-Barr από ασθενείς με το φαινότυπο που αναφέρθηκε στο τέλος οδηγεί σε μερική αποκατάσταση της έκφρασης των τάξης I. Σε άλλους ασθενείς συνολική ανοσοανεπάρκεια έχει συσχετιστεί με BLS τύπου I, περιλαμβάνοντας συνεχόμενες μολύνσεις από βακτήρια και μύκητες, χαμηλούς αριθμούς περιφερικών T λεμφοκυττάρων, και θάνατο μέσα σε ένα χρόνο μετά τη γέννηση. Στην πλειοψηφία αυτών των ασθενών, οι ειδικοί γενετικοί παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για την έλλειψη της έκφρασης των τάξης I παραμένουν άγνωστοι.

Μοριακές μελέτες για τον εντοπισμό του γενετικού προβλήματος στο BLS τύπου I πραγματοποιήθηκαν σε ασθενείς με πολύ χαμηλή έκφραση τάξης I (1-3% των φυσιολογικών επιπέδων). Σε όλες τις περιπτώσεις, αυτοί οι ασθενείς πάσχουν από χρόνιες βακτηριακές μολύνσεις και απαιτούν θεραπεία με αντιβιοτικά. Μελέτες με δύο συσχετιζόμενους τύπου I ασθενείς απεκάλυψε μια έλλειψη στην TAP2 (μεταφορέας που σχετίζεται με την αντιγονοπαρουσίαση), ένα μόριο που απαιτείται για τη σύνδεση με τα τάξης I και τη λειτουργία τους. Οι τάξης I βαριές αλυσίδες συντίθενται από αυτούς τους ασθενείς, παρόλα αυτά τα μόρια εγκλωβίζονται ενδοκυτταρικά και συνδέονται χαλαρά με τη β2-μικροσφαιρίνη. Σε φυσιολογικά άτομα, τόσο η επιφανειακή έκφραση των τάξης I πρωτεϊνών και η σταθερή σύνδεση των τάξης I βαρέων αλυσίδων με τη β2-μικροσφαιρίνη εξαρτάται από την πρόσδεση των αντιγονικών πεπτιδίων. Η μεταφορά των αντιγονικών πεπτιδίων στα τάξης I μόρια τυπικά συμβαίνει δια μέσω ενός ετεροδιμερούς μεταφορέα που αποτελείται από τις πρωτεΐνες TAP1 και TAP2 και εδράζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Ποντικίσιες και ανθρώπινες μεταλλαγμένες κυτταρικές σειρές καθώς και ποντίκια που τους ελλείπουν οι TAP πρωτεΐνες εμφανίζουν φαινότυπο σχεδόν πανομοιότυπο με ασθενείς με BLS τύπου I.

Σύνδρομο Γυμνών Λεμφοκυττάρων Τύπου II.

Τα τάξης II αντιγόνα του Κυρίου Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας εκφράζονται στα κύτταρα αντιγονοπαρουσιαστές όπως είναι τα B λεμφοκύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα και τα μακροφάγα. Η έκφραση των τάξης II πρωτεϊνών σε άλλους κυτταρικούς τύπους μπορεί να επαχθεί με τη χρήση κυτοκινών ενώ ένας μικρός αριθμός ιών μπορούν να ρυθμίσουν αρνητικά τα κυτταρικά επίπεδα των τάξης II αντιγόνων. Στον άνθρωπο, ετεροδιμερή από τάξης II α και β υπομονάδες συντίθενται από τους υψηλά πολυμορφικούς γενετικούς τόπους DR, DP και DQ που εδράζονται στο γονιδιακό σύμπλοκο του κυρίου συμπλόκου ιστοσυμβατότητας. Το BLS τύπου II κλασικά ορίζεται σαν η συνολική έλλειψη της έκφρασης τάξης II αντιγόνων. Παρόλα αυτά, αυτός ο ορισμός έχει διευρυνθεί ώστε να περιλάβει ασθενείς με έλλειψη συγκεκριμένων τάξης II υπομονάδων καθώς και περιορισμένη έκφραση τάξης II σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους. Ασθενείς που έχουν πολύ λίγες ή καθόλου τάξης II πρωτεΐνες στα περιφερικά κύτταρα του αίματος όλοι έχουν συνολική ανοσοανεπάρκεια και πάσχουν από χρόνιες ιϊκές, βακτηριακές, μυκητησιακές και πρωτοζωικές μολύνσεις του αναπνευστικού και πεπτικού συστήματος. Η κλινική

εμφάνιση των συμπτωμάτων της νόσου συμβαίνει κατά το πρώτο έτος ζωής και οι περισσότεροι ασθενείς δεν επιζούν μετά την ηλικία των τεσσάρων ετών χωρίς θεραπευτικές επεμβάσεις όπως η μεταμόσχευση νωτιαίου μυελού.

Ο συνολικός αριθμός των περιφερικών T λεμφοκυττάρων του αίματος είναι φυσιολογικός στους ασθενείς BLS τύπου II, με πολύ μικρούς αριθμούς κυκλοφορούντων CD4+ T λεμφοκυττάρων και ενισχυμένα επίπεδα CD8+ T λεμφοκυττάρων. Είναι ενδιαφέρον ότι μετά τη μεταμόσχευση μυελού των οστών σ' αυτούς τους ασθενείς, τα επίπεδα των CD4+ T κυττάρων παραμένουν χαμηλά, ενώ οι μηχανισμοί ανοσίας αποκαθίστανται. Ο αριθμός των περιφερικών B λεμφοκυττάρων του αίματος στους ασθενείς BLS τύπου II είναι φυσιολογικός, αλλά η παραγωγή αντισωμάτων είναι δραματικά μειωμένη σ' αυτά τα άτομα, πιθανά λόγω έλλειψης των CD4+ T κυττάρων βοηθών. Σε μερικούς ασθενείς, αυτοδραστικότητα που περιλαμβάνει πολυαρθρίτιδα, έκζεμα και ψωρίαση σχετίζεται επίσης με την έλλειψη της έκφρασης των τάξης II.

Η ανάλυση του BLS τύπου II στο μοριακό επίπεδο οδήγησε στην κατηγοριοποίηση των ασθενών σε πολλαπλές ομάδες συμπληρωματικότητας, όπου στην κάθε ομάδα λείπει ένα διακριτό γονίδιο που ρυθμίζει την έκφραση των τάξης II πρωτεϊνών. Σε όλες τις περιπτώσεις BLS τύπου II, τα τάξης II δομικά γονίδια είναι άθικτα, παρόλα αυτά το mRNA από αυτούς τους γενετικούς τόπους δεν ανιχνεύεται. Μελέτες οικογενειών υποδεικνύουν ότι τα γενετικά προβλήματα σε όλους τους ασθενείς εδράζονται έξω από το γονιδιακό σύμπλοκο του κυρίου συμπλόκου ιστοσυμβατότητας στο χρωμόσωμα 6. Η σύντηξη κυτταρικών σειρών από ασθενείς με κύτταρα από φυσιολογικά άτομα αποκαθιστά την έκφραση των τάξης II αλληλίων που προέρχονται από ασθενείς με BLS τύπου II. Αυτό το εύρημα ενισχύει το συμπέρασμα ότι το προβληματικό γονίδιο είναι ένας παράγοντας συνενεργοποιητής που ελέγχει τη μεταγραφή των τάξης II γονιδίων. Σύντηξη B κυτταρικών σειρών από διαφορετικούς τύπου II ασθενείς έχει οδηγήσει στον καθορισμό τριών γενετικών ομάδων συμπληρωματικότητας για αυτή την ανωμαλία (ομάδες A, B και C, που επίσης ονομάζονται και II, I και IV αντίστοιχα). Μια μεταλλαγμένη κυτταρική σειρά που επιλέχθηκε από την έλλειψη της για επιφανειακά τάξης II αντιγόνα δημιουργήθηκε στο εργαστήριο, και αυτή η κυτταρική σειρά αποτελεί μια τέταρτη ομάδα συμπληρωματικότητας (ομάδα D ή III). Επιπλέον ομάδες συμπληρωματικότητας μπορεί να υπάρχουν, περιλαμβάνοντας ασθενείς που εκφράζουν επιλεκτικά μόνο μια υποομάδα τάξης II υπομονάδων σε διακριτούς κυτταρικούς τύπους. Η πλειοψηφία των ασθενών που έχουν εντοπιστεί ανήκουν στις ομάδες συμπληρωματικότητας A και B.

Χρησιμοποιώντας κλωνοποίηση συμπληρωματικότητας βρέθηκε ο μεταγραφικός παράγοντας που έχει πρόβλημα στην ομάδα συμπληρωματικότητας A και είναι το CITA. Οι ασθενείς της ομάδας συμπληρωματικότητας C με BLS τύπου II έχουν μεταλλαγές στον μεταγραφικό παράγοντα RFX5.

Σύνδρομο Γυμνών Λεμφοκυττάρων Τύπου III.

Ασθενείς με BLS τύπου III δεν εκφράζουν τάξης II αντιγόνα καθώς και πολύ λίγα ή καθόλου τάξης I πρωτεΐνες. Ο φαινότυπος αυτών των ασθενών ποικίλει και πολλοί από αυτούς τους ασθενείς ταξινομούνται σαν BLS τύπου II λόγω της μερικής έκφρασης τάξης I αντιγόνων. Η ανοσοανεπάρκεια αυτών των ασθενών αντικατοπτρίζει αυτή των BLS τύπου II ασθενών περιλαμβάνοντας την ευπάθεια σε χρόνιες μολύνσεις και πρόωμο θάνατο. Τα περιφερικά επίπεδα CD4⁺ T λεμφοκυττάρων στο αίμα είναι χαμηλά και οι απαντήσεις στα αντισώματα δραματικά μειωμένες στους BLS τύπου III. Παρότι πολλοί ασθενείς με BLS τύπου III έχουν αναγνωριστεί, μικρή πρόοδος έχει επιτευχθεί για τον εντοπισμό των γενετικών ανωμαλιών σ'αυτούς τους ασθενείς. Η έκφραση τάξης I αντιγόνων σε μερικούς ασθενείς μπορεί να επαχθεί χρησιμοποιώντας IFN- γ αλλά αυτό δεν αποκαθιστά τα επίπεδα των τάξης II αντιγόνων. (Benichou and Strominger, 1991; Chang et al., 1996; Glimcher and Kara, 1992; Hauber et al., 1995; Klein et al., 1995; Peijnenburg et al., 1995)

Ο Τάξης II Συνενεργοποιητής (Class II Transactivator: CIITA)

Ανακάλυψη

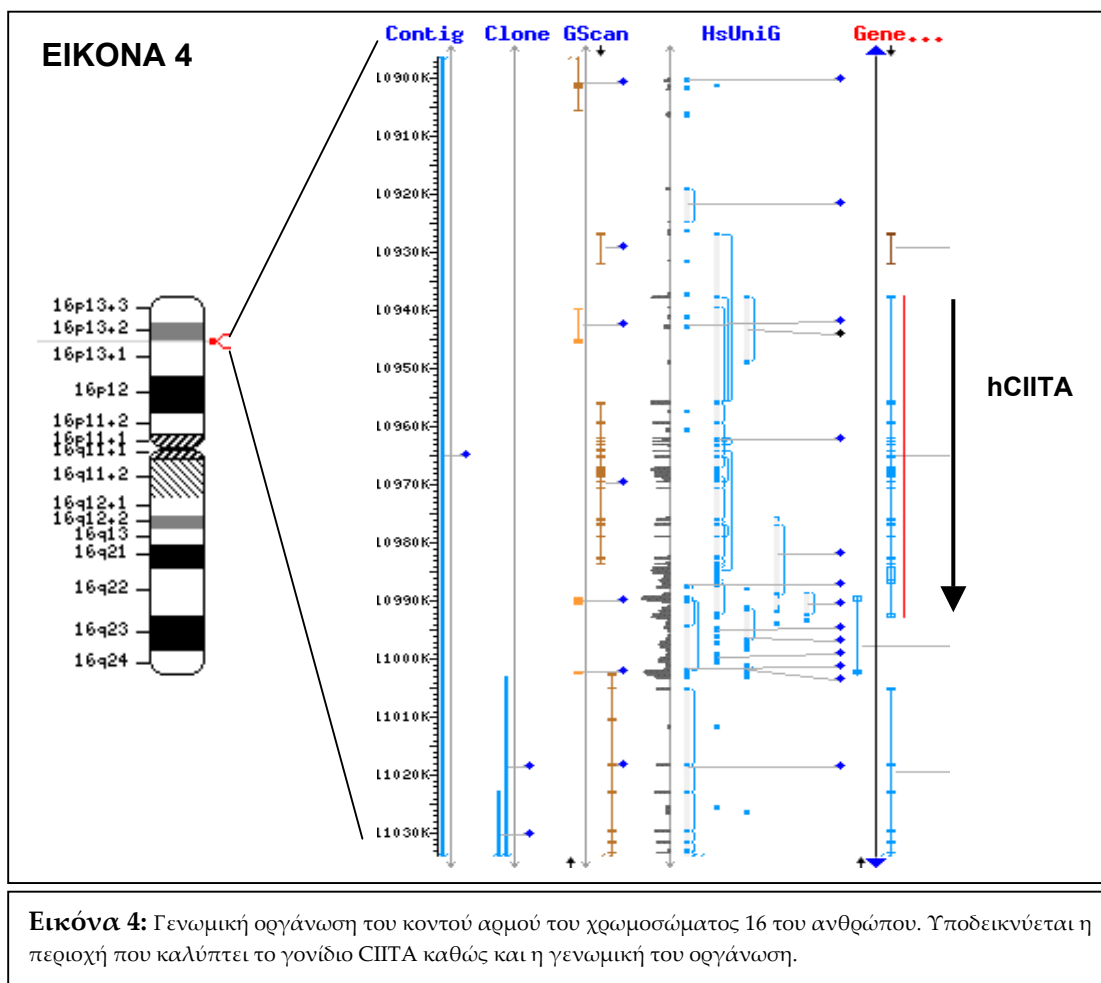
Ο τάξης II συνενεργοποιητής (Class II Transactivator: CIITA) είναι ο συνενεργοποιητής των τάξης II γονιδίων του κυρίου συμπλόκου ιστοσυμβατότητας (MHC). Συνήθως αναφέρεται σαν ο κύριος διακόπτης της έκφρασης των MHC τάξης II, επειδή είναι απολύτως απαραίτητος για τη μεταγραφή των τάξης II γονιδίων. Στην πραγματικότητα, η συσχέτιση ανάμεσα στα MHC τάξης II και την έκφραση του CIITA είναι τόσο ακριβής που κύτταρα που εκφράζουν συστατικά το ένα θα εκφράζουν επίσης συστατικά και το άλλο. Ποντίκια που δεν εκφράζουν το CIITA είναι επίσης αρνητικά για MHC τάξης II (Itoh-Lindstrom et al., 1999). Επιπρόσθετα, η έκφραση των MHC τάξης II σχετίζεται ποσοτικά με την έκφραση του CIITA (Otten et al., 1998). Είναι ενδιαφέρον, ότι παρότι η έκφραση της Ii είναι σημαντικά μειωμένη σ'αυτά τα ποντίκια, δεν ελλείπει πλήρως (Chang et al., 1996; Lee et al., 1997). Ο Steimle και οι συνεργάτες του το 1993 κλωνοποίησαν το CIITA με τεχνική κλωνοποίησης συμπληρωματικότητας χρησιμοποιώντας μια κυτταρική σειρά προερχόμενη από ασθενή με το σύνδρομο των γυμνών λεμφοκυττάρων. Κύτταρα από ασθενείς με σύνδρομο των γυμνών λεμφοκυττάρων (BLS) δεν εκφράζουν MHC τάξης I και II μόρια.

Για την ομάδα A των BLS κυττάρων, η προσθήκη του αγρίου τύπου CIITA, με μια τεχνική συμπληρωματικότητας, φαίνεται ότι αποκαθιστά την έκφραση των MHC τάξης II γονιδίων. Μετά βρέθηκε ότι η προσθήκη του CIITA σε φυσιολογικά κύτταρα οδηγεί στην έκφραση των MHC τάξης II γονιδίων (Bradley et al., 1997; Chang et al., 1994; Chin et al., 1994; Steimle et al., 1994). Η ρύθμιση της έκφρασης των MHC τάξης II από το CIITA είναι απολύτως εξαρτημένη που ακόμα και μια μοναδική αμινοξική αλλαγή στο μόριο CIITA που μεταβάλλει τη δομή και κατ'επέκταση τη λειτουργία του μπορεί να οδηγήσει σε MHC

τάξης II ανεπάρκεια (Quan et al., 1999; Wiszniewsky et al., 2001). Απ'τη στιγμή που αυτός ο μεταγραφικός παράγοντας αναγνωρίστηκε σαν ένας σημαντικός ρυθμιστικός παράγοντας για την έκφραση των MHC τάξης II, πολλοί ερευνητές άρχισαν να εστιάζουν τις προσπάθειές τους για το χαρακτηρισμό του CIITA.

Χαρακτηρισμός

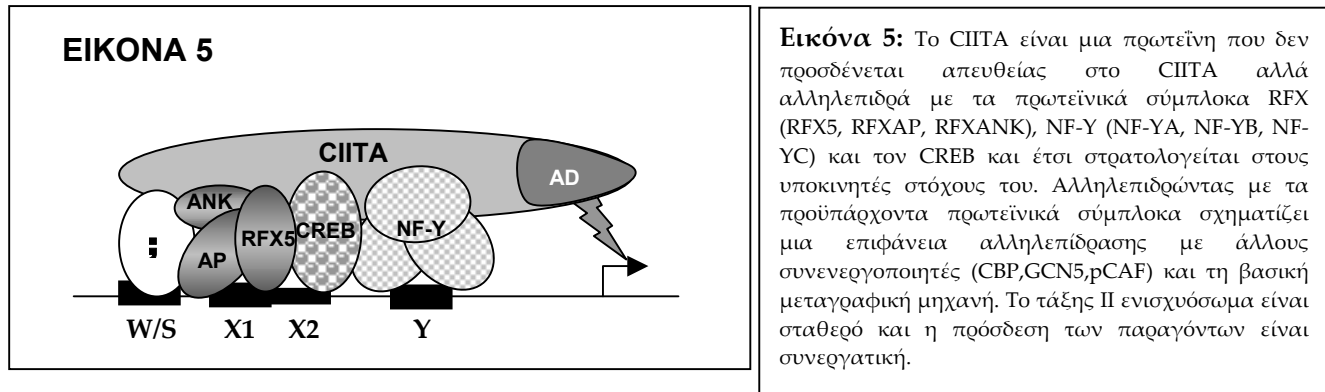
Το γονίδιο που κωδικοποιεί το CIITA εδράζεται στο χρωμόσωμα 16 (στον άνθρωπο και το ποντίκι)(Εικόνα 4), και παράγει ένα cDNA 4.5Kb, κωδικοποιώντας μια πρωτεΐνη 1130 αμινοξέων. Αποτελείται από 19 εξόνια καλύπτοντας 42 κιλοβάσεις γενωμικού DNA. Παρότι το προβλεπόμενο μοριακό βάρος της πρωτεΐνης είναι 123.5 KDa το πραγματικό μοριακό βάρος της πρωτεΐνης είναι 135KDa (Steimle et al., 1993), υποδεικνύοντας ότι μάλλον η πρωτεΐνη επιδέχεται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις.



Εικόνα 4: Γενωμική οργάνωση του κοντού αρμού του χρωμοσώματος 16 του ανθρώπου. Υποδεικνύεται η περιοχή που καλύπτει το γονίδιο CIITA καθώς και η γενωμική του οργάνωση.

Το CIITA είναι μια πρωτεΐνη που δεν προσδένεται άμεσα στον MHC υποκινητή, αλλά αλληλεπιδρά με τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα που προσδένονται στον υποκινητή, για να σχηματίσει μια μοριακή επιφάνεια που χαρακτηρίζεται σαν ενισχύσωμα (Εικόνα 5). Τα σύμπλοκα RFX και NFY είναι δύο τέτοια πρωτεϊνικά σύμπλοκα που προσδένονται σε ρυθμιστικές αλληλουχίες στον MHC τάξης II υποκινητή, σε κουτιά που

ονομάζονται σαν X και Y. Το X κουτί υποδιαιρείται στα X1 και X2 κουτιά. Στο κουτί X1 προσδένεται ο παράγοντας RFX5, μια υπομονάδα του συμπλόκου RFX. Ο RFX5 σχηματίζει σύμπλοκο με τους παράγοντες RFXAP και RFXANK. Στο κουτί X2 προσδένεται ο παράγοντας CREB (Moreno et al., 1999). Όμοια με το RFX, και το NFY είναι ένα τριμερές πρωτεϊνικό σύμπλοκο, που αποτελείται από τους παράγοντες NFY-A, -B, -C και προσδένεται στο κουτί Y.



Παραμένει ακόμα αναπάντητο το ερώτημα αν ο παράγοντας CIITA εκτός από τα σύμπλοκα που προσδένονται στα κουτιά X και Y αλληλεπιδρά και με παράγοντες που προσδένονται στο κουτί W. Το κουτί W είναι απαραίτητο για την επαγόμενη από IFN- γ έκφραση των τάξης II και είναι επίσης απαραίτητο για τη μέγιστη έκφραση στα B κύτταρα (Brown et al., 1998). Η αλληλεπίδραση του CIITA με αυτά τα στοιχεία απαιτεί αυστηρή κατανομή των ελίκων του DNA, έτσι η εισαγωγή μια μερικής έλικας DNA θα κατέστρεφε την ικανότητα του CIITA να αλληλεπιδρά με τα σύμπλοκα στον MHC τάξης II υποκινητή, οδηγώντας στη μη-έκφραση των MHC τάξης II μορίων (Zhu et al., 2000). Πιστεύεται ότι η σύσταση αυτών των παραγόντων στον τάξης II υποκινητή σηματοδοτεί τη στρατολόγηση του CIITA στο σύμπλοκο. Παρότι αυτοί οι παράγοντες μπορούν να αλληλεπιδράσουν κατά την απουσία του CIITA, μεταγραφική ενεργοποίηση δεν πραγματοποιείται και, επομένως, τα τάξης II γονίδια δεν μεταγράφονται (Steimle et al., 1993). Στην απουσία του συμπλόκου RFX, το σύμπλοκο που φτιάχνεται στον υποκινητή δεν μπορεί να σχηματισθεί (Kara and Glimcher, 1991; Kara and Glimcher, 1993). Μεταλλάξεις στις ποικίλες υπομονάδες του RFX συμπλόκου, το οποίο εκφράζεται συστατικά σε όλους τους ιστούς, έχει αναγνωριστεί σαν η αιτία για τους τύπους B, C και D του Συνδρόμου των Γυμνών Λεμφοκυττάρων (Durand et al., 1997; Masternak et al., 1998; Steimle et al., 1995). Σε ένα ασθενή με σύνδρομο γυμνών λεμφοκυττάρων της ομάδας συμπληρωματικότητας C, ένα πρώιμο κωδικόνιο σταματήματος στον RFX5 έχει βρεθεί ότι είναι η αιτία της έλλειψης έκφρασης MHC τάξης II, και της μειωμένης έκφρασης τάξης I. Βέβαια, παροδική διαμόλυνση των κυττάρων με εξωγενές CIITA είναι ικανή να παρακάμψει μερικώς αυτό το πρόβλημα, οδηγώντας στην έκφραση του HLA-DR, αλλά όχι των άλλων τάξης II μορίων, όπως τα HLA-DP και DQ (Peijnenburg et al., 1999). Παρόλα αυτά, τα διαμολυμένα κύτταρα παρέμειναν αρνητικά όσον αφορά τις λειτουργίες

αντιγονοπαρουσίασης, παρέχοντας έτσι άλλο ένα παράδειγμα αυστηρού ελέγχου και ακριβών παραμέτρων που απαιτούνται για τη σωστή ανοσολογική έκφραση.

Εκτός από τα τάξης II γονίδια, το CITA ενέχεται επίσης στη ρύθμιση των MHC τάξης I γονιδίων (Gobin et al., 1997; Martin et al., 1997) και την παραγωγή IL-4 (Gourley et al., 1999; Sisk et al., 2001), και το ίδιο ρυθμίζεται από IL-1β (Rohn et al., 1999). Η ρύθμιση των τάξης I γονιδίων από το CITA πραγματοποιείται από τη συνεργιστική αλληλεπίδραση των CITA και RelA (Girdlestone, 2000), ένα μεταγραφικό παράγοντα που προσδένεται στην περιοχή enh-A 5' από τα τάξης I γονίδια (Girdlestone et al., 1993). Παρόλα αυτά το CITA καταστέλλει τη μεταγραφή του γονιδίου της IL-4 (Gourley et al., 1999), μια κυτοκίνη που παράγεται από τα TH₂ κύτταρα και ενέχεται στη ρύθμιση της παραγωγής αντισωμάτων (Mosmann and Coffman, 1989; Paul, 1991). Όταν ποντίκια που δεν εκφράζουν CITA ενεργοποιήθηκαν με IL-12, τα TH₁ κύτταρα παρήγαγαν IL-4, υποδεικνύοντας ότι το CITA ρυθμίζει αρνητικά την παραγωγή IL-4 στα TH₁ κύτταρα. Αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στον NF-AT και το CBP/p300 ενισχύουν την ενεργότητα του υποκινητή IL-4 (Avots et al., 1999; Kubo et al., 1997). Ο μηχανισμός της μεταγραφικής καταστολής από το CITA βρέθηκε ότι είναι ο ανταγωνισμός με τον NF-AT για την πρόσδεση CBP/p300 (Sisk et al., 2000). Τέλος έχει δειχθεί ότι η IL-1β καταστέλλει την επαγόμενη από IFN-γ παραγωγή του CITA (Rohn et al., 1999). Παρόλα αυτά δεν είναι γνωστό πως λαμβάνει χώρα αυτή η διαδικασία αφού η πρόσδεση των STAT1 και IRF1 στις θέσεις πρόσδεσής τους δεν επηρεάζεται.

Πρωτεϊνικές περιοχές με λειτουργική δράση.

Ποικίλες περιοχές του CITA έχουν αναγνωρισθεί και είναι απαραίτητες για τη λειτουργία αυτού του μεταγραφικού παράγοντα (Bourne et al., 1991; Chin et al., 1997b; Steimle et al., 1994). Ξεκινώντας από το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης CITA, υπάρχει η περιοχή ενεργοποίησης που είναι πλούσια σε όξινα αμινοξέα. Στην αμινοτελική αυτή περιοχή που καλύπτει τα αμινοξέα 30-160 εμπεριέχονται τρεις α-έλικες που κρίνονται απαραίτητες για τη δράση της πρωτεΐνης σαν μεταγραφικού ενεργοποιητή. Η πρώτη α-έλικα καλύπτει τα αμινοξέα 51-71, η δεύτερη τα αμινοξέα 84-104 και η τρίτη τα αμινοξέα 124-138. Από λειτουργικά και *in vitro* πειράματα στο εργαστήριό μας έχουμε δείξει ότι καίριας σημασίας για τη δράση του μορίου είναι η συνεργασία της πρώτης και δεύτερης α-έλικας όσον αφορά την αλληλεπίδραση με συνενεργοποιητές όπως είναι το CBP και ο pCAF και GCN5.

Η περιοχή που ακολουθεί την περιοχή ενεργοποίησης είναι μια περιοχή πλούσια σε προλίνη-σερίνη και θρεονίνη. Ακολουθεί η περιοχή που είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση νουκλεοτιδίων, και η οποία εμπεριέχει τρία μοτίβα για την πρόσδεση GTP (αμινοξέα 420-427, 461-464, και 558-561). Στο καρβοξυτελικό άκρο του CITA υπάρχουν ποικίλες επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη (LRRs).

Η σημασία όλων των παραπάνω περιοχών γίνεται αντιληπτή από πειράματα μεταλλαξογένεσης. Πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες περιέχουν όξινες περιοχές, οι οποίες έχουν δειχθεί ότι είναι σημαντικές

για την ενεργοποίηση της μεταγραφής. Η όξινη περιοχή ενεργοποίησης του CIITA (αμινοξέα 30-160), ακολουθείται από περιοχές πλούσιες σε προλίνη (αμινοξέα 163-195), σε σερίνη (αμινοξέα (209-237) και θρεονίνη (αμινοξέα 260-322) (περιοχή PST). Όταν η όξινη περιοχή του CIITA αντικαταστάθηκε με την όξινη περιοχή ενός άλλου μεταγραφικού παράγοντα (HSV1), παρατηρήθηκε μείωση στην ενεργότητα της πρωτεΐνης CIITA (Chin et al., 1997a). Αφαίρεση της περιοχής PST από το CIITA οδήγησε σε πλήρη απώλεια της μεταγραφικής ενεργότητας της πρωτεΐνης. Παρόλα αυτά, όταν οι περιοχές πλούσιες σε προλίνη και σερίνη-θρεονίνη αφαιρέθηκαν κατά μόνος, δεν υπήρχε επίδραση στη λειτουργία της πρωτεΐνης. Αυτά τα πειράματα υποδεικνύουν ότι η όξινη περιοχή είναι απαραίτητη, αλλά όχι αρκετή από μόνη της για τη δράση μεταγραφικής ενεργοποίησης από το CIITA. Επιπλέον, οι περιοχές προλίνης και σερίνης-θρεονίνης μπορεί να προσφέρουν αλληλεπικαλυπτόμενες λειτουργίες στην ενεργοποίηση του CIITA.

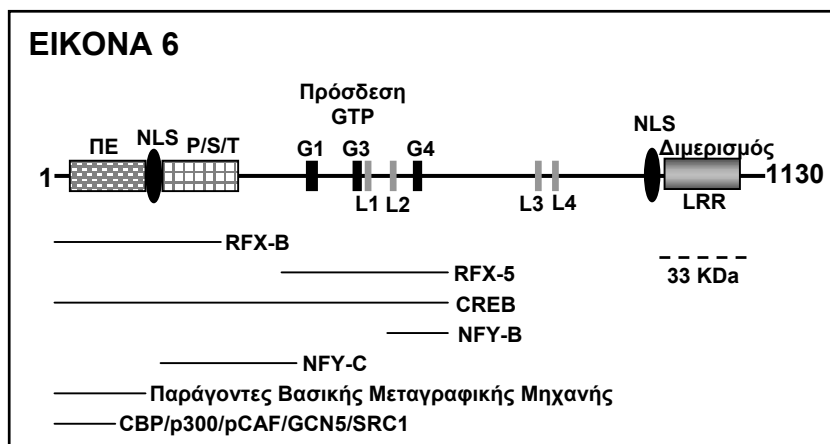
Έχει ήδη αναφερθεί ότι το CIITA δεν έχει ενεργότητα υδρόλυσης GTP, αλλά, παρόλα αυτά η περιοχή πρόσδεσης GTP είναι σημαντική για τη λειτουργία του μεταγραφικού παράγοντα. Μελέτες με Knockout ποντίκια που εξέφραζαν μια έλλειψη αυτής της περιοχής έδειξε ότι τα ποντίκια δεν είχαν ανιχνεύσιμα επίπεδα CIITA mRNA, και στην πραγματικότητα ομοιάζαν με ποντίκια που δεν έχουν το CIITA γονίδιο, παρά ένα γονίδιο με έλλειψη στη συγκεκριμένη περιοχή (Itoh-Lindstrom et al., 1999). Τα ποντίκια είχαν σχεδόν έλλειψη της έκφρασης των MHC τάξης II μορίων, με βάση ανάλυση με RT-PCR, και η έκφραση των MHC τάξης II από λιποπολυσακχαρίτη (LPS), IL-4 και IFN- γ δεν ήταν ανιχνεύσιμη. Επιπλέον η έκφραση της σταθερής αλυσίδας ήταν σημαντικά μειωμένη αλλά δεν εξέλειπε. Σε άλλη μελέτη, όπου το CIITA είχε μεταλλαχθεί για να επάγει την υδρόλυση GTP, το αποτέλεσμα ήταν μειωμένη μεταγραφική ενεργότητα (Harton et al., 1999). Άρα θεωρήθηκε ότι η πρόσδεση GTP στο CIITA απαιτείται για την πυρηνική είσοδο του συμπλόκου, κάτι που αποδεικνύεται και από το εύρημα ότι με ανοσοϊστοχημεία των κυττάρων που εκφράζουν τη μεταλλαγμένη μορφή CIITA φαίνεται ότι η πρωτεΐνη εδράζεται μόνο στο κυτταρόπλασμα και όχι τον πυρήνα των κυττάρων. Είναι προφανές ότι ο μεταγραφικός παράγοντας δεν μπορεί να δράσει εάν δεν μπορεί να μπει στον πυρήνα και να στρατολογηθεί στον MHC τάξης II υποκινητή.

Μελέτες όπου η περιοχή πλούσια σε λευκίνες του CIITA είχαν μεταλλαχθεί με αντικατάστασή τους από αλανίνη για ένα ή περισσότερα αμινοξικά κατάλοιπα απεκάλυψε ότι παρότι η μεταγραφική ενεργότητα του CIITA χάθηκε, η πρωτεΐνη μπορούσε ακόμα να αλληλεπιδρά με τους RFX και NFY. Παρόλα αυτά, δείχθηκε ότι in vivo η πρόσδεση του CIITA στον MHC τάξης II υποκινητή εξαρτάται από την LRR (Hake et al., 2000).

Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε ότι το CIITA περιέχει δύο διακριτές περιοχές που καθορίζουν την αυτοαλληλεπίδρασή του. Η τελευταία από τις δύο περιοχές περιλαμβάνει τα αμινοξέα 939-1130, και μεταλλαγές σ' αυτή την περιοχή οδηγούν σε αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του CIITA (Linhof et al., 2001). Από δουλειά του εργαστηρίου μας επίσης δείχθηκε ότι η κεντρική περιοχή του CIITA, που

περιλαμβάνει την περιοχή πρόσδεσης GTP, είναι αρκετή για αυτοαλληλεπίδραση και αυτή η περιοχή αλληλεπιδρά με την καρβοξυτελική περιοχή LRR και την αμινοτελική όξινη περιοχή (Kretsovali et al., 2001; Sisk et al., 2001). Άσχετα με την τοπολογία των απαραίτητων στοιχείων, ανάλυση μεταλλαγών υποδεικνύει ότι η αυτοαλληλεπίδραση είναι σημαντική για τη λειτουργία του CIITA.

Άρα δομικά το CIITA μπορεί να χωριστεί σε τέσσερις γενικές περιοχές (Εικόνα 6). Όπως έχει ήδη αναφερθεί η αμινοτελική περιοχή λειτουργεί σαν μεταγραφικός ενεργοποιητής. Αυτή η περιοχή έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά με πολλές άλλες πρωτεΐνες και έχει την ικανότητα να ακετυλιώνει ιστόνες (Raval et al., 2001). Αμέσως μετά την περιοχή ενεργοποίησης είναι μια περιοχή πλούσια σε προλίνη-σερίνη-θρεονίνη (P/S/T) με πιθανό ρυθμιστικό ρόλο. Παρακάτω είναι οι περιοχές που είναι υπεύθυνες για την πρόσδεση σε GTP (GTP-binding domain, GBD) που προσδένουν αλλά δεν υδρολύουν το GTP *in vitro* (Harton et al., 1999), υποδεικνύοντας ότι η πρόσδεση του GTP μπορεί να ρυθμίζει τη διαμόρφωση του CIITA. Πράγματι, μεταλλαγές αυτής της αλληλουχίας αναστέλλουν τη δράση του CIITA και οδηγούν στη συσσώρευση της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα. Κοντά στο καρβοξυτελικό του άκρο το CIITA έχει τουλάχιστον τέσσερις περιοχές πλούσιες σε λευκίνη (leucine-rich repeats, LRR)(Hake et al., 2000; Harton et al., 2002; Sisk et al., 2001). Οι περιοχές LRR, που αρχικά περιγράφηκαν στον αναστολέα της RNase, σχηματίζουν μια δομή σαν πέταλο που λειτουργεί σε αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (Kobe and Deisenhofer, 1995). Μεταλλαγή αυτών των αλληλουχιών αναστέλλει τη δράση του CIITA και οδηγεί στη συσσώρευση και πάλι του CIITA στο κυτταρόπλασμα (Harton et al., 2002). Οι περιοχές LRRs και GBD έχουν βρεθεί μαζί και σε πολλές άλλες πρωτεΐνες, όπως η περιοχή πρόσδεσης νουκλεοτιδίου και ολιγομερισμού (NOD) 1, αλλά η λειτουργική σημασία τέτοιων συνδιασμένων μοτίβων πρέπει να ερευνηθεί (Linhof et al., 2001).



0).

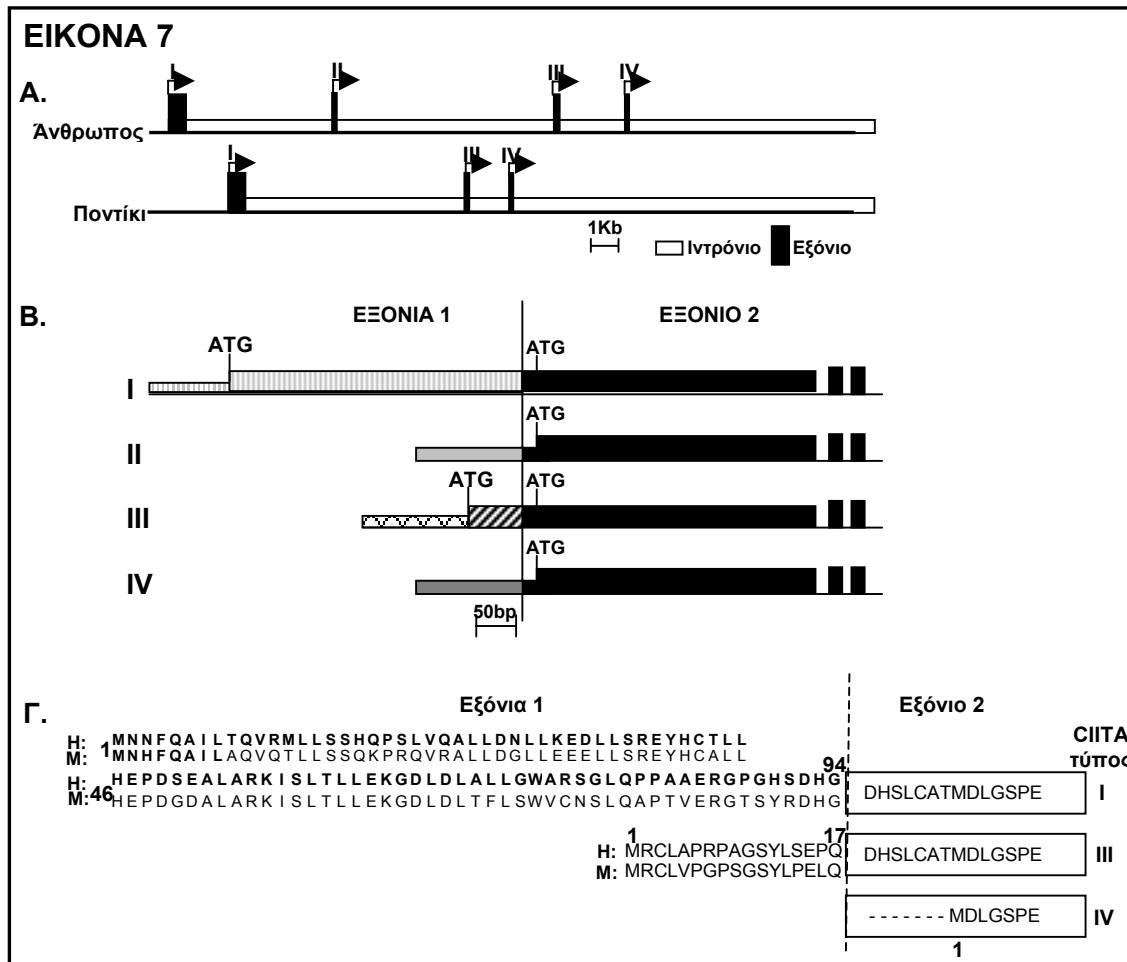
Οι περιοχές LRR και GDB του CITA ενέχονται επίσης στην ικανότητα του CITA να σχηματίζει ομομερή σύμπλοκα (Linhof et al., 2001; Sisk et al., 2001). Υπάρχουν αυξανόμενες μαρτυρίες ότι το αυτοαλληλεπιδρών CITA μπορεί να είναι η λειτουργική μορφή. Η ιστορία της αυτοαλληλεπίδρασης του CITA εγείρει δύο ερωτήματα. Το πρώτο ερώτημα είναι γιατί το CITA αλληλεπιδρά με τον εαυτό του; Η απάντηση μπορεί και να είχε δοθεί 13 χρόνια πριν, από το λειτουργικό χαρακτηρισμό ενός ανεστραμμένου WXY κουτιού 5' από τα τάξης II γονίδια στο ποντίκι (Van Ewijk et al., 1988). Σε ένα μοντέλο διαγονιδιακών ποντικών, η έλλειψη της 5' YXW περιοχής οδήγησε στην επιλεκτική σίγηση της έκφρασης των MHC τάξης II γονιδίων. Άρα, είναι πιθανό ότι και οι δύο WXY περιοχές λειτουργούν συνδυασμένα δια μέσω αλληλεπιδράσεων με ολιγομερισμένο CITA. Μια ανάλυση της MHC τάξης II περιοχής στον άνθρωπο οδηγεί στην αναγνώριση πολλαπλών περιοχών με XY κουτιά (U. Nagarajan, J. Gomez, JM Boss, αδημοσίευτες παρατηρήσεις) που θα μπορούσαν πιθανά να συμμετέχουν όπως έχει προταθεί. Το δεύτερο ερώτημα που αφορά την αλληλεπίδραση του CITA με τον εαυτό του είναι αν αυτό το φαινόμενο ρυθμίζεται. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το CITA έχει πολλαπλά κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης τα οποία μετά από φωσφορυλίωση θα μπορούσαν να ρυθμίζουν τη δομή του CITA και ιδανικά την ενεργότητά του.

Ρύθμιση του γονιδίου CITA.

Το 1997, χρησιμοποιώντας RACE-PCR, ο Muhlethaler-Mottet et al βρήκε ότι η μεταγραφή του CITA ρυθμίζεται από τέσσερις διακριτούς υποκινητές, που ονομάζονται P-I,II,III,IV. Καθένας από τους 4 υποκινητές μεταγράφει ένα διακριτό πρώτο εξόνιο, το οποίο ενώνεται με ένα κοινό δεύτερο εξόνιο. Τρεις από τους τέσσερις υποκινητές είναι ενεργοί σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους, και είναι υπεύθυνοι για την ενεργοποίηση και τον έλεγχο του μεταγραφικού παράγοντα. Δύο απ'αυτούς τους κυτταρικούς τύπους, τα δενδριτικά και τα Β κύτταρα, εκφράζουν το CITA συστατικά, ενώ άλλα είναι επαγόμενα από IFN- γ . Ο τύπου II υποκινητής δεν βρέθηκε ακόμα να είναι ενεργός σε κανένα συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο και έτσι πολύ λίγα είναι γνωστά για αυτό τον υποκινητή. Εξαιτίας του γεγονότος ότι το CITA αρχικά απομονώθηκε από Raji κύτταρα, μια Β λευχαιμική κυτταρική σειρά, η δημοσιευμένη αγρίου τύπου αλληλουχία είναι αυτή που καθοδηγείται από τον υποκινητή PIII. Οι υποκινητές I, III και IV βρέθηκαν και στο ποντίκι, και εμφανίζουν σημαντική ομολογία με τους υποκινητές στον άνθρωπο (Muhlethaler-Mottet et al., 1997).(Εικόνα 7)

Ο υποκινητής PIV επάγεται από κύτταρα που δεν προέρχονται από τον νωτιαίο μυελό σε απάντηση στην IFN- γ (Wadburger et al., 2001). Το πρώτο εξόνιο του PIV δεν κωδικοποιεί εναρκτήριο κωδικόνιο και έτσι το CITA ξεκινά με την πρώτη μεθειονίνη του εξονίου 2. Ο υποκινητής PIII επάγεται κυρίως από τα Β λεμφοκύτταρα και κωδικοποιεί ένα αμινοτελικό κομμάτι 17 αμινοξέων. Ο υποκινητής PI επάγεται στα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα και κωδικοποιεί μια αμινοξική αλληλουχία 94

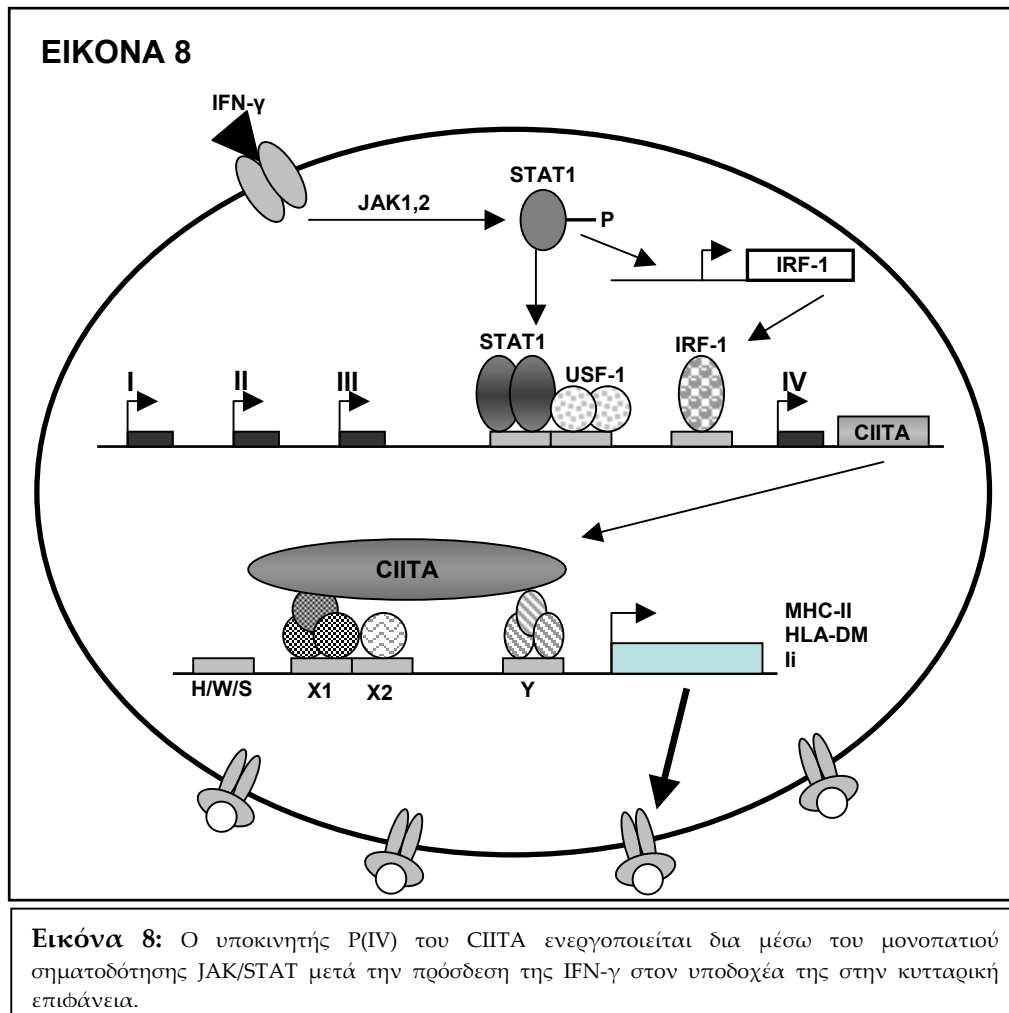
αμινοξέων που έχει ομολογία με την περιοχή στρατολόγησης κασπάσης (CARD) η οποία απαντάται σε πρωτεΐνες που ενέχονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια απόπτωσης (Nickerson et al., 2001). Παρότι ο ρόλος αυτής της περιοχής δεν είναι γνωστός, οι περιοχές CARD συχνά ενέχονται σε αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Η ισομορφή που κωδικοποιείται από τον υποκινητή PI βρέθηκε ότι έχει καλύτερη δυνατότητα μεταγραφικής ενεργοποίησης από τις άλλες μορφές του CIITA (Nickerson et al., 2001). Ίσως θα μπορούσε κανείς να υποθέσει ότι κάθε ισομορφή CIITA παρέχει μοναδικές ικανότητες στη ρύθμιση αντιγονοπαρουσίασης στους διαφορετικούς ιστούς.



ΕΙΚΟΝΑ 7: (Α) Γενωμική οργάνωση των 5' περιοχών του ανθρώπινου και ποντικίσου CIITA γονιδίων. Τα μαύρα κουτιά αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικά πρώτα εξόνια, τα λευκά κουτιά αντιστοιχούν στα ιντρόνια. Τα τόξα αντιπροσωπεύουν τα κύρια σημεία έναρξης της μεταγραφής του πρώτου εξονίου. (Β) Τα τέσσερα διαφορετικά 5' άκρα των ανθρώπινων CIITA mRNAs. Οι κωδικές περιοχές αντιπροσωπεύονται από τα κουτιά ευρύτερου πλάτους, οι 5' μη μεταφραζόμενες περιοχές από τα κουτιά μικρότερου πλάτους. Οι μη-ομόλογες περιοχές χρωματίζονται διαφορετικά. (Γ) Το CIITA μεταγράφεται από διαφορετικούς υποκινητές. Ένα σχηματικό διάγραμμα των τριών ανθρώπινων και ποντικίσου CIITA υποκινητών υποδεικνύονται. Κάθε υποκινητής μεταγράφει τη δική του αλληλουχία πρώτου εξονίου, η οποία κολλά στο κοινό εξόνιο 2. Τα προκύπτοντα αμινοτελικά άκρα των ειδικών CIITA ισοτύπων υποδεικνύονται με τον κώδικα του ενός γράμματος. Η αμινοξική αλληλουχία στο κοινά υποδεικνύει τα αμινοξέα που προσφέρονται από το εξόνιο 2. (H: άνθρωπος, M: ποντίκι)

Για τον υποκινητή PIV, τα απαραίτητα στοιχεία της αλληλουχίας του υποκινητή έχουν αναγνωρισθεί. Τρία cis-δρώντα στοιχεία σε μια περιοχή 154 bp του υποκινητή βρέθηκε ότι είναι σημαντικά για την επαγόμενη από IFN- γ έκφραση του PIV (Dong et al., 1999). Το πρώτο είναι το στοιχείο GAS (gamma activated sequence) που είναι δίπλα στο κουτί E, και ακολουθείται από ένα στοιχείο IRF. Αυτά τα στοιχεία προσδένονται από του μεταγωγούς σήματος και ενεργοποιητές της μεταγραφής (STAT-1: signal transducer and activator of transcription-1), τον παράγοντα ενεργοποίησης USF-1 (upstream stimulating factor-1) και τους παράγοντες IRF-1/IRF-2, αντίστοιχα (Muhlethaler-Mottet et al., 1998). Οι IRF1 και STAT1 είναι μεταγραφικοί παράγοντες επαγόμενοι από IFN- γ , ενώ η έκφραση του USF-1 είναι συστατική. Πιστεύεται ότι η πρόσδεση της IFN- γ στον υποδοχέα της στην κυτταρική επιφάνεια σηματοδοτεί μια σειρά από γεγονότα στα οποία ο STAT1 φωσφορυλιώνεται από τις κινάσες JAK1 και JAK2. Ο STAT1 μετά μετακινείται στον πυρήνα του κυττάρου όπου προσδένεται στο στοιχείο GAS (Darnell, 1997; Darnell et al., 1994; Schindler and Darnell, 1995). Παρόλα αυτά, ο STAT1 προσδένεται στο στοιχείο GAS μόνο με την παρουσία του USF-1 (Muhlethaler-Mottet et al., 1998).

Ο υποκινητής PIV εμφανίζει δύο διακριτά στάδια ενεργοποίησης (Morris et al., 2002). Μέσα σε 30 λεπτά μετά τη σηματοδότηση από IFN- γ , ο STAT1 προσδένεται και η τοπική δομή της χρωματίνης αποκτά σχετικά επίπεδα ακετυλίωσης στις ιστόνες. Παρόλα αυτά το CIPITA δεν μεταγράφεται έως ότου αρκετός IRF-1 συντεθεί και στρατολογηθεί στις θέσεις πρόσδεσής του στον υποκινητή PIV. Αυτή η διαδικασία απαιτεί 60 με 120 λεπτά για να ολοκληρωθεί. (Εικόνα 8)



Άρα, η πρόσδεση του USF-1 και του STAT1 στις θέσεις τους είναι συνεργατική και απαραίτητη για την επαγόμενη από IFN-γ έκφραση των MHC τάξης II. Τα μακροφάγα από ποντίκια που δεν εκφράζουν STAT1 δεν μπορούν να επαχθούν και να εκφράσουν CIITA mRNA. Ομοίως, σε ποντίκια που δεν εκφράζουν IRF1, υπάρχει σημαντική μείωση του επαγόμενου από IFN-γ CIITA mRNA που ανιχνεύεται στα νεφρά, υποδεικνύοντας ότι ο IRF-1 είναι ένας από τους καίριους παράγοντες για την επαγόμενη από IFN-γ έκφραση των MHC τάξης II (Hobart et al., 1997). Μεταγενέστερα πειράματα απέδειξαν ότι οι IRF-1 και IRF-2 καταλαμβάνουν τον υποκινητή μέσω του στοιχείου IRF, και συνεργατικά ενεργοποιούν τον PIV (Xi et al., 1999). Ο IRF-2 γενικά δρα σαν καταστολέας της μεταγραφής ανταγωνιζόμενος τον IRF-1 στην πρόσδεση του στοιχείου IRF (Harada et al., 1989; Harada et al., 1990; Tanaka et al., 1996; Taniguchi et al., 1995; Taniguchi et al., 1997). Παρόλα αυτά ποντίκια που δεν εκφράζουν IRF-2 έχουν μερική έκφραση του CIITA (Xi et al., 2001). Στα μακροφάγα, οι καταστολείς της σηματοδότησης από κυτοκίνες (SOCS-1: suppressors of cytokine signaling) εμποδίζουν την έκφραση και πρόσδεση του STAT1 και του IRF-1 στα στοιχεία πρόσδεσής τους, αναστέλλοντας έτσι την επαγόμενη από IFN-γ έκφραση του CIITA (O'Keefe et al., 2001).

Φαίνεται πως όχι μόνο υπάρχει διαφορετική χρήση των CIITA υποκινητών σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, αλλά επίσης και κάτω από διαφορετικές φυσιολογικές συνθήκες. Όταν η πειραματική αυτοάννοση εγκεφαλίτιδα (EAE), μια αυτοάννοση ασθένεια που προκαλείται από την παρουσίαση ποικίλων πρωτεϊνών μυελίνης (Wekerle et al., 1994), επάχθηκε στο κεντρικό νευρικό σύστημα ποντικών, οι CIITA τύποι I και IV βρέθηκαν στον εγκέφαλο και την νωτιαία χορδή. Καμιά μορφή CIITA δεν ανιχνεύθηκε στον εγκέφαλο ή τη νωτιαία χορδή των ποντικών ελέγχου (Suter et al., 2000). Επιπλέον, ο ενεργός υποκινητής μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια μιας συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς. Για παράδειγμα, τα πρώιμα προ-B κύτταρα έχουν επαγόμενη από IFN- γ έκφραση των MHC τάξης II, ενώ τα ώριμα B-κύτταρα παρουσιάζουν συστατική έκφραση. Εκτός από τη χρήση διαφορετικών υποκινητών, ποικίλοι μηχανισμοί σίγησης ή ενίσχυσης των CIITA υποκινητών έχουν περιγραφεί. Παρότι δεν είναι γνωστό πως επιλέγεται ο υποκινητής που θα χρησιμοποιηθεί, έχει προταθεί ότι η εναλλακτική συγκόλληση του mRNA παίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία (Muhlethaler-Mottet et al., 1997).

Ένας κυτταρικός τύπος όπου συμβαίνει σίγηση του υποκινητή είναι οι εμβρυϊκοί τροφοβλάστες. Οι εμβρυϊκοί τροφοβλάστες δεν έχουν συστατική και IFN- γ επαγόμενη έκφραση των MHC τάξης II μορίων. Επίσης βρέθηκε ότι επίσης δεν έχουν τόσο επαγόμενη όσο και συστατική έκφραση του CIITA. Υποτέθηκε ότι η αναστολή του CIITA, και έτσι των MHC τάξης II γονιδίων είναι σημαντική για την ανοχή μητέρας-εμβρύου. Δείχθηκε ότι σ' αυτά τα κύτταρα, οι ρυθμιστικοί παράγοντες του CIITA γονιδίου (STAT1 και IRF1) δεν ήταν δυνατό να στρατολογηθούν στον PIV. Επιπλέον δείχθηκε ότι αυτοί οι παράγοντες ήταν παρόντες, και μπορούσαν να ενεργοποιήσουν ένα γονίδιο αναφοράς σε πείραμα έκφρασης. Ο λόγος που δεν μπορούσαν να στρατολογηθούν στον υποκινητή ήταν η μεθυλίωση του PIV (Morris et al., 2000).

Άλλο ένα παράδειγμα σίγησης του CIITA υποκινητή περιλαμβάνει την τελική διαφοροποίηση των B κυττάρων σε πλασματοκύτταρα. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας συμβαίνει σίγηση της έκφρασης των MHC τάξης II που βρέθηκε ότι συσχετίζεται με τη σίγηση της έκφρασης του CIITA (Silacci et al., 1994). Στα ποντίκια η πρωτεΐνη BLIMP-1 (B lymphocyte induced maturation protein 1) είναι ένας μεταγραφικός καταστολέας που ενέχεται στη διαφοροποίηση των B κυττάρων σε πλασματοκύτταρα. Ο BLIMP-1 βρέθηκε ότι είναι καταστολέας του CIITA που δρα προσδεδεμένος στον CIITA PIII. Είναι ενδιαφέρον ότι ο παράγοντας διαφοροποίησης των B κυττάρων, ο Pax5 έχει ενεχθεί στην έκφραση του CIITA. Παρότι δεν είναι ακόμα γνωστό πως το Pax5 ρυθμίζει το CIITA, το Pax5 αναστέλλεται επίσης από την έκφραση του BLIMP1 (Shaffer et al., 2002). Άρα, διαφαίνεται ότι υπάρχει ένα ρυθμιστικό σύμπλεγμα που ενέχει θετικούς και αρνητικούς ρυθμιστές του CIITA κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των B κυττάρων. Επίσης βρέθηκε ότι η επαγωγή της έκφρασης του BLIMP-1 οδηγεί στην καταστολή της παραγωγής όχι μόνο του CIITA, HLA-DR, -DP και -DQ, αλλά επίσης και των μη-κλασικών MHC τάξης II γονιδίων, της σταθερής αλυσίδας (Ii) και του HLA-DM (Piskurich et al., 2000). Το ανθρώπινο ομόλογο του BLIMP-1 είναι ο

παράγοντας PRDI-BF1 (positive regulatory domain I binding factor 1), ο οποίος ενέχεται στη σίγηση της έκφρασης του CIITA σε όγκους πλασματοκυττάρων (Ghosh et al., 2001).

Σε μερικές περιπτώσεις μελανώματος, αντί για τη σίγηση των υποκινητών του CIITA, υπάρχει συστατική έκφραση, η οποία συνήθως περιορίζεται στα κύτταρα αντιγονοπαρουσιαστές (APCs). Η συστατική έκφραση των MHC τάξης II μορίων στα κύτταρα μελανώματος σχετίζεται με κακή πρόγνωση και συνήθως είναι μάρτυρας για την εξέλιξη της νόσου (Barnhill, 1993; Ostmeier et al., 1999). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι το ασυνήθιστο πρότυπο έκφρασης των τάξης II μορίων στα μυελοκύτταρα είναι το αποτέλεσμα της συστατικής έκφρασης CIITA, ειδικά, των CIITA τύπων III και IV (Deffrennes et al., 2001; Goodwin et al., 2001). Η μόνιμη έκφραση του PIII σχετίστηκε με παράγοντες που δρουν στον 5' ενισχυτή, και είναι γνωστός σαν «αλληλουχία απάντησης στην Ιντερφερόνη-γ». Η συστατική ενεργοποίηση του PIV φαίνεται να οφείλεται στον IRF-2, καθώς ο IRF-1 δεν εκφράζεται συστατικά στα μελανοκύτταρα.

Λίγα είναι γνωστά για το ρυθμιστικό έλεγχο του CIITA στα δενδριτικά κύτταρα. Τα MHC τάξης II εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στα δενδριτικά κύτταρα. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένα η ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων μετά την έκθεση σε φλεγμονώδη σήματα οδηγεί σε γρήγορη καταστολή της μεταγραφής του CIITA και της έκφρασης των MHC τάξης II. Αυτός ο μηχανισμός φαίνεται ότι καθορίζεται δια μέσω ενός συνολικού επιγενετικού μηχανισμού που ενέχει την απακετυλίωση των ιστονών (Landmann et al., 2001). Έχουν επίσης αναγνωρισθεί πολλαπλά μοτίβα αλληλουχιών που είναι ενεργά στα δενδριτικά κύτταρα στον υποκινητή PI. Οι παράγοντες που προσδένονται σ' αυτές τις θέσεις μένει να χαρακτηρισθούν.

Επιγενετικός έλεγχος των MHC τάξης II γονιδίων και του CIITA.

Εκτός από την άμεση πρόσδεση πρωτεϊνών στο DNA, τα MHC τάξης II γονίδια ρυθμίζονται από επιγενετικούς μηχανισμούς που χρησιμεύουν για τον περιορισμό της έκφρασης. Δύο κύρια παραδείγματα στα οποία τέτοιοι μηχανισμοί έχουν παρατηρηθεί ενέχουν την ανάπτυξη των εμβρυϊκών τροφοβλαστών και το σχηματισμό μερικών συμπαγών όγκων (Morris et al., 2000; van den Elsen et al., 2000; van der Stoep et al., 2002). Στην περίπτωση των εμβρυϊκών τροφοβλαστών, η ανικανότητά τους να επάγουν τα MHC τάξης II μόρια μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στη αποφυγή της έκφρασης των πατρικών αντιγόνων. Σε αντίθεση, η ανικανότητα των όγκων να εκφράσουν MHC τάξης II σε απάντηση στην IFN-γ είναι πιθανά ένας μηχανισμός διαφυγής του ανοσολογικού ελέγχου. Και στις δύο περιπτώσεις, η ικανότητα του CIITA να επαχθεί από την IFN-γ χάνεται και η επώαση των κυττάρων με τον αναστολέα μεθυλίωσης 5'δεοξαζακυτιδίνη οδηγεί στην επανέκφραση του CIITA και τη μεταγραφή των MHC τάξης II. Τέτοια πειράματα υποδεικνύουν ότι η μεθυλίωση της κυτοσίνης είναι υπεύθυνη για τη σίγηση της έκφρασης. Και στις δύο περιπτώσεις, η μεθυλίωση κυτοσίνης του υποκινητή PIV είναι ο στόχος. Χαρτογράφηση των καταλοίπων που μεθυλιώνονται υποδεικνύει μια συνολική μεθυλίωση της περιοχής σε κυτταρικές σειρές

που ομοιάζουν τους εμβρυϊκούς τροφοβλάστες (Morris et al., 2002). Η μεθυλίωση κυτοσίνης οδηγεί στην απακετυλίωση των τοπικών ιστονών και σε μη προσβάσιμη δομή χρωματίνης. Το αποτέλεσμα είναι ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες δεν έχουν πια πρόσβαση στην περιοχή. Παρότι πολλές DNA μεθυλοτρανσφεράσες έχουν χαρακτηριστεί, αυτές που είναι υπεύθυνες για τη μεθυλίωση του υποκινητή IV του CIIITA παραμένουν άγνωστες.

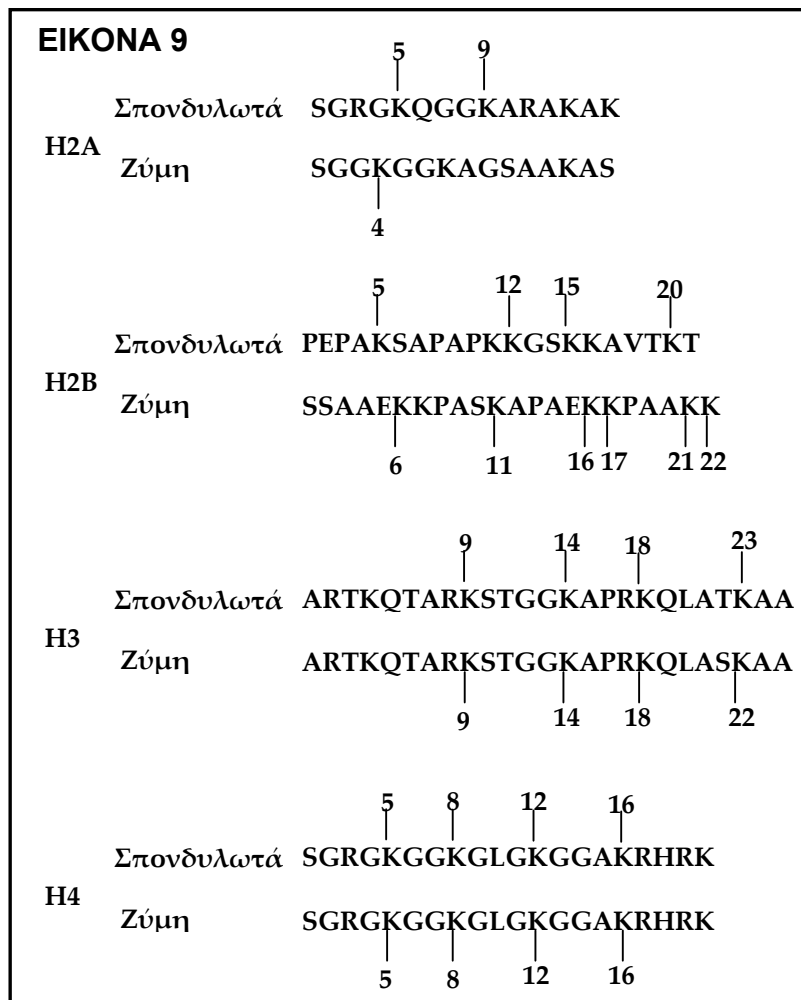
Μηχανισμοί μεταγραφικής ρύθμισης γονιδίων.

Η διαμερισματοποίηση του DNA μέσα στον πυρήνα των ευκαρυωτικών κυττάρων απαιτεί ιδιαίτερη συμπύκνωση αυτού του υψηλά πολωμένου πολυμερούς. Η συμπύκνωση επιτυγχάνεται με την αλληλεπίδραση του DNA με μια ομάδα ισχυρά βασικών πρωτεϊνών-ιστονών για να δημιουργήσουν μια δομή γνωστή ως χρωματίνη. Η σημαντική επαναλαμβανόμενη μονάδα στη χρωματίνη είναι το νουκλεόσωμα, το οποίο αποτελείται από ένα οκταμερές από τις τέσσερις κεντρικές ιστόνες, H2A, H2B, H3, και H4, και 147 βάσεις DNA τυλιγμένο σε δύο στροφές γύρω από το εξωτερικό του οκταμερούς. Τα νουκλεοσώματα με τη σειρά τους διπλώνονται σε δομές σταδιακά υψηλότερης δομής. Παρότι η δομή του νουκλεοσώματος είναι καλά χαρακτηρισμένη (Luger et al., 1997), λίγα είναι γνωστά για τη μοριακή φύση πιο υψηλά δομημένων μορφών. Το δίπλωμα της χρωματίνης είναι ιδιαίτερα δυναμικό, και ο βαθμός του διπλώματος επηρεάζει άμεσα την ενεργότητα του DNA στη μεταγραφή, την αντιγραφή και τον ανασυνδιασμό.

Οι περισσότερες σχετικές εργασίες που έχουν δημοσιευτεί τις προηγούμενες τρεις δεκαετίες προτείνουν ότι οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών επηρεάζουν το δίπλωμα της χρωματίνης και κατ'επέκταση τη γονιδιακή ενεργότητα. Πιο ειδικά, ο εμπλουτισμός ισομορφών ακετυλιωμένων ιστονών συχνά παρατηρείται σε μεταγραφόμενες αλληλουχίες DNA. Αυτό δείχθηκε άμεσα για πρώτη φορά από πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης χρησιμοποιώντας αντισώματα που αναγνωρίζουν επιλεκτικά υπερακετυλιωμένες ιστόνες. Αυτές οι μελέτες έδειξαν ότι οι ακετυλιωμένες ιστόνες εδράζονται γενικά σε περιοχές με ευαισθησία στην DNase I, και αυτό συσχετίζεται με μεταγραφική ενεργότητα (Hebbes et al., 1992; Hebbes et al., 1988). Η ακετυλίωση ιστονών και η γενική ευαισθησία στην πέψη με νουκλεάσες αναγνωρίζονται πλέον σαν χαρακτηριστικές ιδιότητες μεταγραφικά ενεργής χρωματίνης (Gross and Garrard, 1988; Grunstein, 1997; Struhl, 1998).

Η ακετυλίωση οδηγεί στην εξουδετέρωση του φορτίου συντηρημένων, συχνά σταθερών, καταλοίπων λυσίνης που εδράζονται σε αμινοτελικές περιοχές των ιστονών (Εικόνα 9). Αυτές οι περιοχές συχνά αναφέρονται σαν ουρές επειδή προεξέχουν έξω από το νουκλεόσωμα (Luger and Richmond, 1998; Wolffe and Hayes, 1999). Σαν τέτοιες, αυτές οι ουρές εκτίθενται στο περιβάλλον έξω από το πολυμερές χρωματίνης, παρέχοντας μια ιδιαίτερη σηματοδοτική επιφάνεια (Cheung et al., 2000) που μπορεί να αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες ή άλλα σύμπλοκα που λειτουργούν για την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης

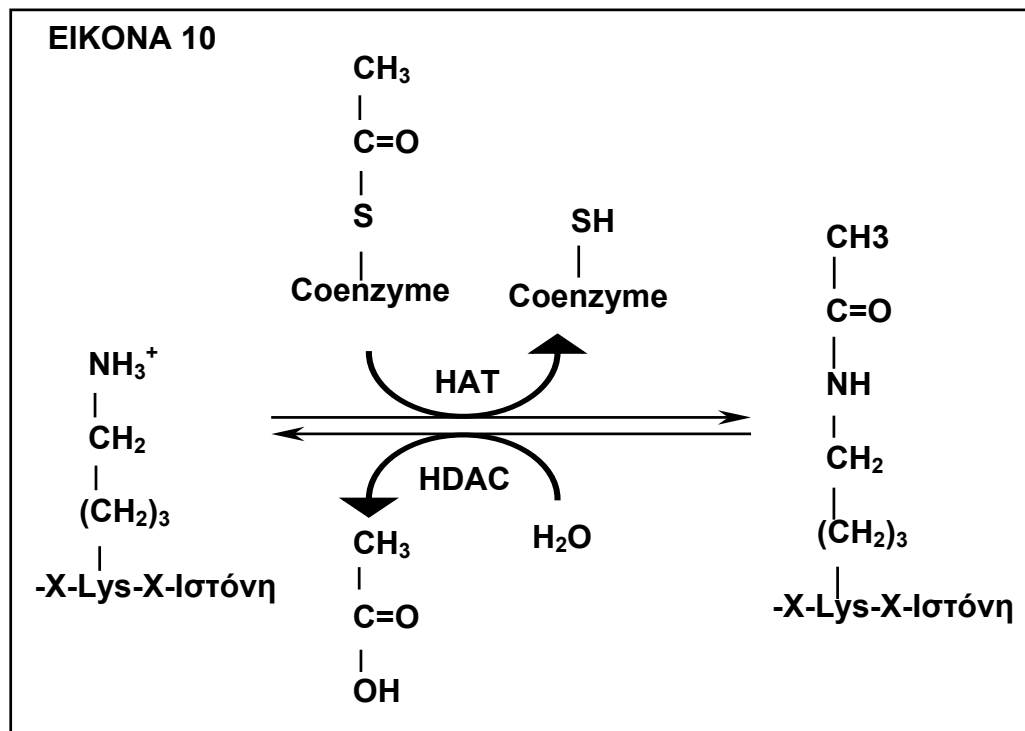
(Edmondson et al., 1996; Hecht et al., 1995; Logie et al., 1999). Αλλαγές στο φορτίο των ουρών των ιστονών εικάζεται ότι αποδυναμώνει τις επαφές ιστόνης:DNA. Η ακετυλίωση μπορεί επίσης να αλλάξει τις αλληλεπιδράσεις ιστόνης:ιστόνης ανάμεσα σε γειτονικά νουκλεοσώματα (Luger et al., 1997; Luger and Richmond, 1998; Tse et al., 1998; Wolffe and Hayes, 1999) καθώς και τις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις ιστόνες και ρυθμιστικές πρωτεΐνες (Edmondson et al., 1996; Hecht et al., 1995). Κάποιες ή όλες μαζί από αυτές τις αλλαγές μπορούν να επηρεάσουν τη δομή των νουκλεοσωμάτων καθώς και το υψηλής δομής δίπλωμά τους, οδηγώντας σε ένα πιο ανοικτό χρωματινικό περιβάλλον για μεταγραφή. Παρότι η συσχέτιση ανάμεσα στην ακετυλίωση ιστονών και τη γονιδιακή έκφραση είναι γνωστή για πολλά χρόνια, η διάκριση για το αν οι αλλαγές στην ακετυλίωση ιστονών ήταν το αίτιο ή το αποτέλεσμα της αυξημένης μεταγραφής ήταν προβληματική. Μηχανιστικές λύσεις στη ρύθμιση και τις λειτουργίες της ακετυλίωσης των ιστονών δόθηκαν με το χαρακτηρισμό των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για την προσθήκη και την αφαίρεση αυτής της σημαντικής αλλαγής της χρωματίνης.



Εικόνα 9: Γνωστές θέσεις ακετυλίωσης στις αμινοτελικές ουρές των ιστονών. Δείχνονται τα πρώτα αμινοξικά κατάλοιπα καθεμιάς από τις τέσσερις ιστόνες από σπονδυλωτά και από τη ζύμη, *Saccharomyces cerevisiae*. Οι θέσεις των καταλοίπων λυσίνης που είναι γνωστό ότι ακετυλιώνονται υποδεικνύονται.

Ανακάλυψη και χαρακτηρισμός των ακετυλοτρανσφερασών ιστονών.

Η ακετυλίωση ιστονών πραγματοποιείται μετα-μεταφραστικά στις ομάδες ε-NH³⁺ των συχνά υψηλά συντηρημένων καταλοίπων λυσίνης στις αμινοτελικές ουρές των ιστονών. Η ακετυλίωση ιστονών είναι αντιστρεπτή διαδικασία. Οι ακετυλοτρανσφεράσες ιστονών μεταφέρουν μια ακετυλομάδα από το ακετυλοσυνένζυμο A στις ομάδες ε-NH³⁺ των εσωτερικών καταλοίπων λυσίνης. Η προσθήκη ακετυλομάδας στις λυσίνες εξουδετερώνει το θετικό φορτίο και αυξάνει την υδροφοβικότητα. Στην αντίδραση απακετυλίωσης, οι απακετυλάσες ιστονών (HDACs) αφαιρούν ακετυλομάδες επαναφέροντας το θετικό φορτίο στις ιστόνες (Εικόνα 10). Τυπικά, κυτταρικά εκχυλίσματα ή μερικώς καθαρισμένα κλάσματα χρησιμοποιήθηκαν σε ενζυματικές προσεγγίσεις (Ait-Si-Ali et al., 1998; Kim et al., 2000). Η αναγνώριση των πολυπεπτιδίων που είναι υπεύθυνα για τις ενεργότητες ακετυλοτρανσφεράσης ιστονών (HAT) αποδείχθηκε ενδιαφέρουσα και διήρκεσε πολλά χρόνια. Οι HAT ενεργότητες ομαδοποιήθηκαν σε δύο γενικές κατηγορίες βάση την κυτταρική τους προέλευση και τις λειτουργίες τους. Οι κυτταροπλασματικές Β-τύπου HAT καταλύουν γεγονότα ακετυλίωσης που σχετίζονται με τη μεταφορά νεοσυντιθέμενων ιστονών από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και την πρόσδεσή τους στο νεοαντιγραφόμενο DNA (Allis et al., 1985; Ruiz-Carrillo et al., 1975). Οι πυρηνικές, Α-τύπου HAT καταλύουν γεγονότα που σχετίζονται με τη μεταγραφή (Brownell and Allis, 1996).



Εικόνα 10: Η ισορροπία στην ακετυλίωση ιστονών διατηρείται από αντίθετες ενεργότητες ακετυλοτρανσφερασών ιστονών και απακετυλασών. Το ακετυλοσυνένζυμο A είναι ο δότης ακετυλομάδας για την ακετυλίωση. Οι ακετυλοτρανσφεράσες ιστονών (HATs) μεταφέρουν μια ακετυλομάδα στην ομάδα ε-NH³⁺ των εσωτερικών καταλοίπων Λυσίνης των αμινοτελικών περιοχών των ιστονών. Η αντίστροφη αντίδραση καταλύεται από απακετυλάσες ιστονών (HDACs).

HAT-B

Η Hat1 αναγνωρίστηκε σαν η πρώτη καταλυτική υπομονάδα μιας B-τύπου HAT με ένα συνδυασμό γενετικής, ζύμης και βιοχημείας (Kleff et al., 1995; Parthun et al., 1996). Η ανασυνδιασμένη Hat1 ακετυλιώνει την ιστόνη H4 σε θέσεις που είναι γνωστό ότι μετατρέπονται σε νεοσυντιθέμενη H4 (π.χ. Lys5 και Lys12) (Εικόνα 9) (Chicoine et al., 1986; Sobel et al., 1995). Η Hat1 απαντάται σε ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο που περιέχει και την Hat2, ένα ορθόλογο των δύο στενά σχετιζόμενων πρωτεϊνών Rbp46/48 που απαντώνται σε ποικίλα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης (Parthun et al., 1996). Οι πρωτεΐνες Hat2 και Rbp46/48 μπορεί να αλληλεπιδρούν με σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης και ουρές ιστονών (π.χ. H4), οδηγώντας σε αύξηση της ειδικής ενεργότητας. Αυτή η παρατήρηση είναι σύμφωνη με το ότι η αναδιαμόρφωση των νουκλεοσωμάτων μπορεί να είναι απαραίτητη για την ακετυλίωση/απακετυλίωση ιστονών επειδή η φυσική περιέλιξη του DNA γύρω από το οκταμερές ιστονών καλύπτει την πρώτη έλικα της H4, η οποία είναι η θέση πρόσδεσης για την Rbp46/48 (Verreault et al., 1998). Άλλα συστατικά του Hat1/Hat2 συμπλόκου περιλαμβάνουν τις υπομονάδες CAF1, οι οποίες ενέχονται στο σχηματισμό της χρωματίνης (Imhof and Wolffe, 1999; Kaufman et al., 1995; Verreault et al., 1998).

HAT-A

Η πρώτη καταλυτική υπομονάδα μιας A-τύπου HAT, η p55, αναγνωρίστηκε σε μακροπυρηνικές παρασκευές από το πρωτόζωο *Tetrahymena* χρησιμοποιώντας μια προσέγγιση *in-gel* ενεργότητας (Brownell and Allis, 1995). Το ένζυμο αυτό ήταν αξιοσημείωτα όμοιο στην αλληλουχία με τον GCN5, μια πρωτεΐνη που είχε προηγουμένως χαρακτηριστεί σαν μεταγραφικός ρυθμιστής στη ζύμη (Berger et al., 1992; Brownell et al., 1996; Marcus et al., 1994; Silverman et al., 1994). Αυτή η ανακάλυψη παρείχε αρκετή μοριακή απόδειξη για μια άμεση σύνδεση ανάμεσα στην ακετυλίωση ιστονών και τη μεταγραφική ρύθμιση (Brownell et al., 1996). Ο Gcn5 στρατολογείται σε συγκεκριμένους υποκινητές δια μέσω σύνδεσης με τις πρωτεΐνες Ada, οι οποίες αλληλεπιδρούν με ενεργοποιητές που προσδένονται στο DNA. Το σύμπλοκο Gcn5-Ada επίσης αλληλεπιδρά με κομμάτια της βασικής μεταγραφικής μηχανής (Brown et al., 2000; Sterner and Berger, 2000). Η ικανότητα να συσχετίζει αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε ενεργοποιητές και βασικές πρωτεΐνες οδήγησε στον χαρακτηρισμό των Gcn5-Ada συμπλόκων σαν μεταγραφικούς διακόπτες ή συνενεργοποιητές.

Μετά την αναγνώριση ότι ο Gcn5 διαθέτει HAT ενεργότητα, οι πρώιμες μελέτες αμέσως παρείχαν ένα γενικό μοντέλο για τη στρατολόγηση HAT σε συγκεκριμένους υποκινητές από πρωτεΐνες ενεργοποίησης που προσδένονται στο DNA (Brownell and Allis, 1996; Wolffe and Pruss, 1996). Αυτή η υπόθεση έλαβε ραγδαία πειραματική υποστήριξη μετά την αναγνώριση διάφορων άλλων πρωτεϊνών διακοπών/συνενεργοποιητών με ενεργότητα HAT, συμπεριλαμβάνοντας το GCN5 των θηλαστικών (Wang et al., 1997; Xu et al., 2000; Yang et al., 1996) και το ορθόλογό του, pCAF (Yang et al., 1996), το CBP (Bannister and Kouzarides, 1996; Ogryzko et al., 1996), την p300 (Ogryzko et al., 1996), και τον TAFII250

(Dunphy et al., 2000; Mizzen et al., 1996). Επιπλέον πληροφορία για ένα γενικό μοντέλο ακετυλίωσης ιστονών παρέχεται από μελέτες με μεταγραφικούς ενεργοποιητές που οδηγούν στην πρόσδεση HAT συμπλόκων σε χρωματινικά υποστρώματα in vitro (Steger et al., 1998; Utley et al., 1998; Vignali et al., 2000; Wallberg et al., 1999). Σε τέτοια in vitro πειράματα, η ενεργοποίηση της μεταγραφής από HAT σύμπλοκα εξαρτάται από την παρουσία ακετυλοσυνένζυμου-A, υποστηρίζοντας επιπλέον τη σημασία της ακετυλίωσης για τη μεταγραφική ενεργοποίηση.

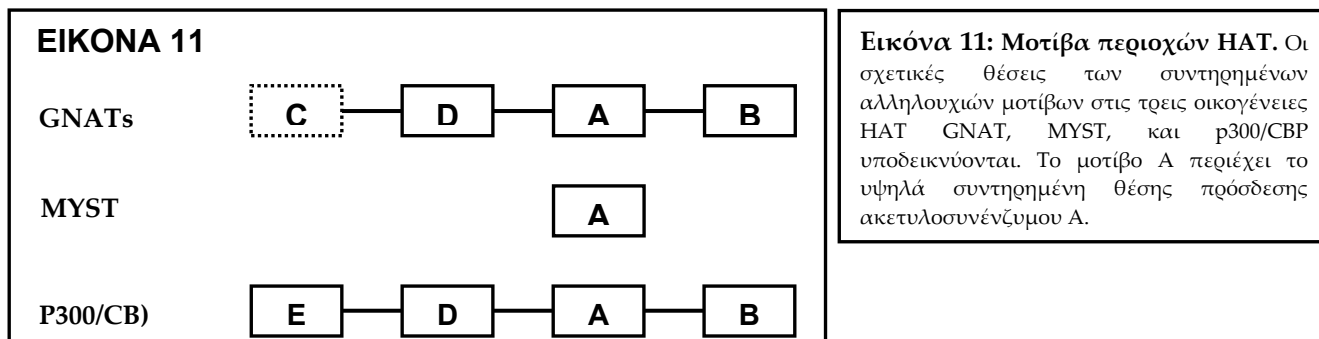
Παρά την ανακάλυψη πολυάριθμων HAT (Πίνακας 2) και την πιθανή στόχευση αυτών των ενεργοτήτων, το μεγάλο ζήτημα της συστατικής έναντι της στοχευόμενης ακετυλίωσης ιστονών μένει να γίνει αντιληπτό στο μοριακό επίπεδο.

Πίνακας 2 Χαρακτηριστικά των HAT οικογενειών				
Οικογένεια HAT	HAT (και σύμπλοκα που σχετίζονται αυτή)	Ιστονές που ακετυλιώνονται από ανασυνδιασμένες HAT	Ιστονές που ακετυλιώνονται από σύμπλοκο HAT	Αλληλεπιδράσεις με άλλες HATs
GNAT	Gcn5(SAGA,ADA,A2)	H3>>H4	H3, H2B	p300, CBP
	pCAF(pCAF)	H3>>H4	H3, H4	p300, CBP
	Hat1(HatB)	H4>>H2A	H4, H2A	
	Elp3 (επιμηκυντής)	H2A, H2B, H3, H4		
	Hpa2	H3>H4		
MYST	Esa1 (NuA4)	H4>>H3, H2A	H2A, H4	
	MOF (MSL)	H4>>H3, H2A	H4	
	Sas2	Άγνωστο	.	
	Sas3 (NuA3)	Άγνωστο	.	
	MORF	H4>H3	.	
	Tip60	H4>>H3, H2A	.	
	Hbo1 (ORC)		.H3, H4	
p300/CBP	p300	H2A, H2B, H3, H4		pCAF, GCN5
	CBP	H2A, H2B, H3, H4		pCAF, GCN5
Παράγοντες της βασικής μεταγραφικής μηχανής	TAFII250 (TFIID)	H3>>H2A		
	TFIIC		H3, H4>H2A	
	Nut1		H3>>H4	
Συμπαράγοντες πυρηνικών υποδοχέων	ACTR	H3>H4		p300, CBP, pCAF
	SRC1	H3>H4		p300, CBP, pCAF

Μέλη της οικογένειας GNAT.

Τόσο η Hat1 B-τύπου HAT (Kleff et al., 1995; Parthun et al., 1996; Verreault et al., 1998) και ο Gcn5 A-τύπου HATs (από ένα αριθμό ειδών) παρουσιάζουν διάφορα συντηρημένα δομικά μοτίβα που σχετίζονται με την ακετυλίωση. Η αναγνώριση αυτών των ομοιοτήτων οδήγησε στην περιγραφή της υπεροικογένειας GNAT (N-ακετυλοτρανσφεράσες σχετιζόμενες με τον GCN5, Gcn5-related N-acetyltransferase) (Neuwald

and Landsman, 1997) (Πίνακας 2). Προκαρνωτικά και ευκαρνωτικά μέλη της υπερικογένειας GNAT παρουσιάζουν, σε διαφορετικό βαθμό, έως και τέσσερα συντηρημένα μοτίβα, που ονομάζονται A-D (Εικόνα 11). Το μοτίβο A είναι το πιο καλά συντηρημένο μοτίβο και περιέχει μια αλληλουχία Arg/Gln-X-X-Gly-X-Gly/Ala που είναι σημαντική για την αναγνώριση του ακετυλοσυνένζυμου-A και τη πρόσδεσή του (Dutnall et al., 1998; Wolf et al., 1998).



Εικόνα 11: Μοτίβα περιοχών HAT. Οι σχετικές θέσεις των συντηρημένων αλληλουχιών μοτίβων στις τρεις οικογένειες HAT GNAT, MYST, και p300/CBP υποδεικνύονται. Το μοτίβο A περιέχει το υψηλά συντηρημένη θέση πρόσδεσης ακετυλοσυνένζυμου A.

Μέχρι τώρα, ο Gcn5 της ζύμης (γ Gcn5) είναι μια από τις πιο καλά χαρακτηρισμένες HATs, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. Λειτουργικές περιοχές της πρωτεΐνης της ζύμης έχει προσδιοριστεί ότι περιέχουν, σε σειρά από το αμινοτελικό προς το καρβοξυτελικό άκρο (Εικόνα 12A): πρώτα μια αμινοτελική περιοχή, που ποικίλει σε μήκος και είναι σημαντικά μακρύτερη στα μετάζωα, πιστεύεται ότι εξασφαλίζει την αναγνώριση νουκλεοσωμικών υποστρωμάτων (Smith et al., 1998; Xu et al., 1998), δεύτερο μια καλά συντηρημένη καταλυτική περιοχή HAT που περιέχει τις περισσότερες από τις υποπεριοχές που είναι παρούσες στα μέλη της οικογένειας GNAT και περιγράφονται στην Εικόνα 11 (εκτός από το μοτίβο C) (Candau et al., 1997), τρίτο μια περιοχή αλληλεπίδρασης με την Ada2p (Candau et al., 1996) και τέταρτο, μια καρβοξυτελική βρομοπεριοχή.

Μέλη της οικογένειας MYST.

Το μοτίβο A της οικογένειας GNAT που περιγράφεται παραπάνω απαντάται επίσης στην οικογένεια MYST (ονομάζεται έτσι από τα πρώτα μέλη της MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, και Tip60), άλλη μια ομάδα σχετιζόμενων πρωτεϊνών που είναι είτε HATs είτε ATs (Εικόνα 11 και Πίνακας 2). Αυτή η ομοιότητα υποδεικνύει ότι αυτό το δομικό μοτίβο μπορεί να χρησιμοποιείται ευρέως για την πρόσδεση του ακετυλοσυνένζυμου A. Η ενεργότητα HAT έχει βρεθεί για πολλά από τα μέλη της οικογένειας MYST που υποδεικνύονται στην Εικόνα 12B. Η Tip60 (για την Tat-αλληλεπιδρώσα πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 60KDa (Kamine et al., 1996) ήταν το πρώτο ανθρώπινο μέλος της οικογένειας MYST με ενεργότητα HAT (Kimura and Horikoshi, 1998; Yamamoto and Horikoshi, 1997). Η Sas3 είναι το ομόλογο από τη ζύμη για το ανθρώπινο ογκογονίδιο MOZ (monocytic leukemia zinc finger protein) (Borrow et al., 1996; Reifsnnyder et al., 1996). Μια χρωμοσωμική μετατόπιση ανάμεσα στο CBP και το MOZ δημιουργεί μια νέα πρωτεΐνη που σχετίζεται με ογκογονικό μετασχηματισμό οδηγώντας σε μια ανθρώπινη ασθένεια. Η Sas3 είναι η

καταλυτική υπομονάδα ενός HAT συμπλόκου της ζύμης που παρουσιάζει εξειδίκευση για νουκλεοσωμική H3. Η HAT ενεργότητα του MOZ δεν έχει ακόμα δειχθεί, αλλά ομοιότητες στην αλληλουχία ανάμεσα στην Sas3 και την MOZ υποδεικνύουν ότι η MOZ είναι μια HAT (John et al., 2000; Takechi and Nakayama, 1999). Η πρωτεΐνη της ζύμης Esa1 (για essential Sas family acetyltransferase 1) ήταν η πρώτη απαραίτητη HAT που βρέθηκε στη ζύμη (Clarke et al., 1999; Smith et al., 1998), και η Esa1 είναι τώρα γνωστό ότι αποτελεί την καταλυτική υπομονάδα του HAT συμπλόκου NuA4 (για nucleosomal acetyltransferase for H4) (Allard et al., 1999; Grant et al., 1997).

p300/CBP

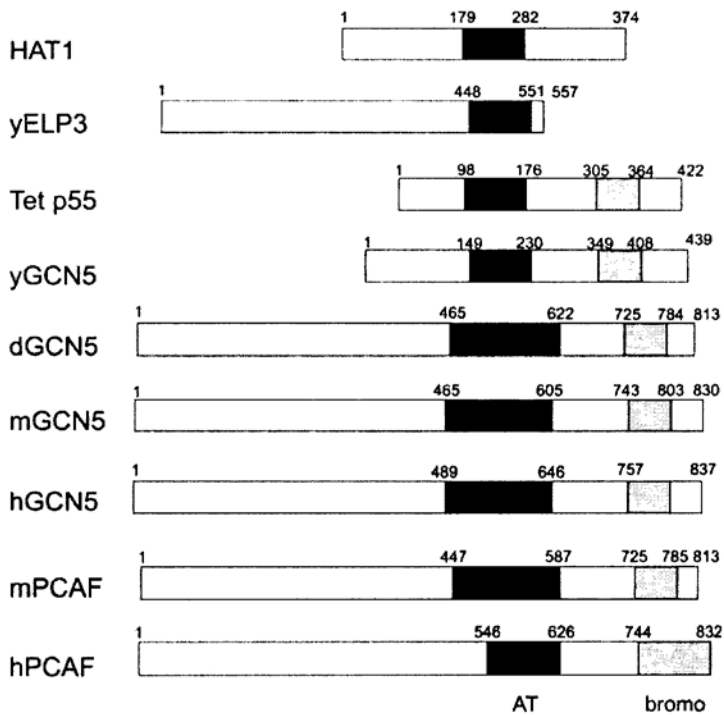
Δύο από τις πιο ευρέως μελετημένες HATs στη μεταγραφική ρύθμιση είναι οι p300 και το CBP (Shikama et al., 1997). Αυτές οι πρωτεΐνες απομονώθηκαν ανεξάρτητα σαν παράγοντες που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη του αδενοϊού E1A (p300) (Eckner et al., 1994) ή τη φωσφορυλιωμένη μορφή του μεταγραφικού παράγοντα CREB (CBP) (Chrivia et al., 1993). Ο υψηλός βαθμός ομοιότητας ανάμεσα σ' αυτές τις πρωτεΐνες σύντομα αναγνωρίστηκε (Arany et al., 1994), και μετέπειτα μελέτες υπέδειξαν ότι είναι συμπληρωματικές στη δράση, τουλάχιστον σε κύτταρα σε καλλιέργεια (Arany et al., 1995; Eckner et al., 1994; Lundblad et al., 1995; Shikama et al., 1997). Οι p300/CBP περιέχουν διάφορες διακριτές περιοχές (Εικόνα 13), περιλαμβάνοντας τρεις περιοχές με δάκτυλο ψευδαργύρου (αναφέρονται σαν cys, ZZ, και TAZ περιοχές), μια βρομοπεριοχή, μια περιοχή HAT, και τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες περιοχές που αλληλεπιδρούν με πολλούς μεταγραφικούς παράγοντες (Janknecht and Hunter, 1996a; Shikama et al., 1997). Όπως η Gcn5p, οι p300/CBP έχουν δράση συνενεργοποιητών στη μεταγραφή (Janknecht and Hunter, 1996a; Kwok et al., 1994). Δεν προσδένονται άμεσα στο DNA αλλά στρατολογούνται σε υποκινητές δια μέσω αλληλεπιδράσεων με μεταγραφικούς παράγοντες που προσδένονται στο DNA όπως είναι η E1A και ο φωσφορυλιωμένος CREB. Πολλοί παράγοντες αλληλεπιδρούν με τις p300/CBP, συμπεριλαμβανομένων των c-Jun (Bannister and Kouzarides, 1995a), c-Myb (Dai et al., 1996; Oelgeschlager et al., 1996), c-Fos (Janknecht et al., 1995), TFIID (Ferrerri et al., 1994), MyoD (Sartorelli et al., 1997; Yuan et al., 1996), τους πυρηνικούς υποδοχείς ορμονών (Janknecht and Hunter, 1996a; Kamei et al., 1996), και E2F1 (Martinez-Balbas et al., 2000) ανάμεσα σ' άλλες. Επειδή περιορισμένες ποσότητες p300/CBP είναι παρούσες μέσα στο κύτταρο, η αλλαγή της κατανομής των p300/CBP ανάμεσα σ' αυτές τις διαφορετικές πρωτεΐνες μπορεί να παρέχει ένα μηχανισμό για τη ρύθμιση διαφορετικών σηματοδοτικών και μεταγραφικών μονοπατιών (Kamei et al., 1996).

Οι HAT ενεργότητες των p300/CBP απαιτούνται για τις λειτουργίες αυτών των πρωτεϊνών στη μεταγραφική ενεργοποίηση. Μεταλλαγές στο ενεργό κέντρο HAT καταργούν τις δράσεις συνενεργοποίησης (Bannister and Kouzarides, 1996; Martinez-Balbas et al., 2000; Ogryzko et al., 1996). Στην αρχή, αυτές οι HATs θεωρήθηκε ότι είναι πολύ διαφορετικές από την οικογένεια GNAT. Συγκρίσεις αλληλουχιών με το CBP, για παράδειγμα, δεν υπέδειξαν ομολογία με άλλες ακετυλοτρανσφεράσες.

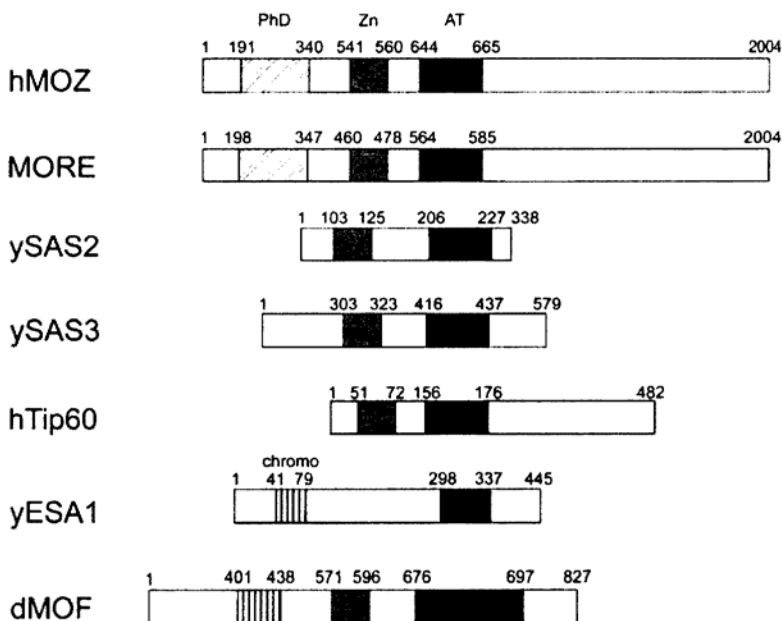
Παρόλα αυτά, προσεκτική σύγκριση υπέδειξε ότι οι περιοχές HAT των p300/CBP περιέχουν μοτίβα που σχετίζονται με τα μοτίβα A, B, και D των GNATs (Εικόνα 11). Επιπρόσθετα, οι p300/CBP περιέχουν ένα πρωτότυπο μοτίβο E που είναι ομόλογο με αλληλουχίες στις HAT περιοχές των GCN5 και pCAF αλλά δεν απαντώνται σε άλλες ακετυλοτρανσφεράσες (Martinez-Balbas et al., 2000).

ΕΙΚΟΝΑ 12

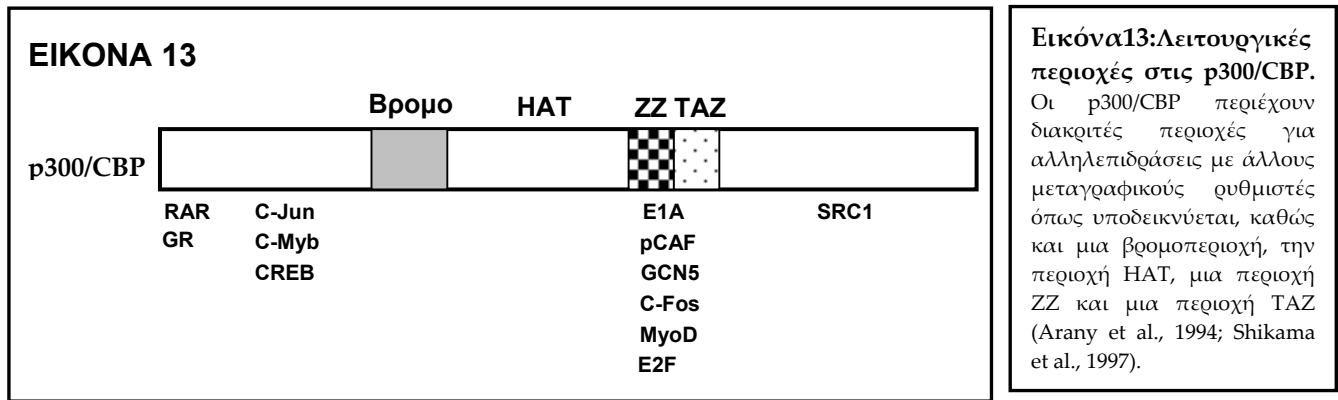
A. GNAT family.



B. MYST family.



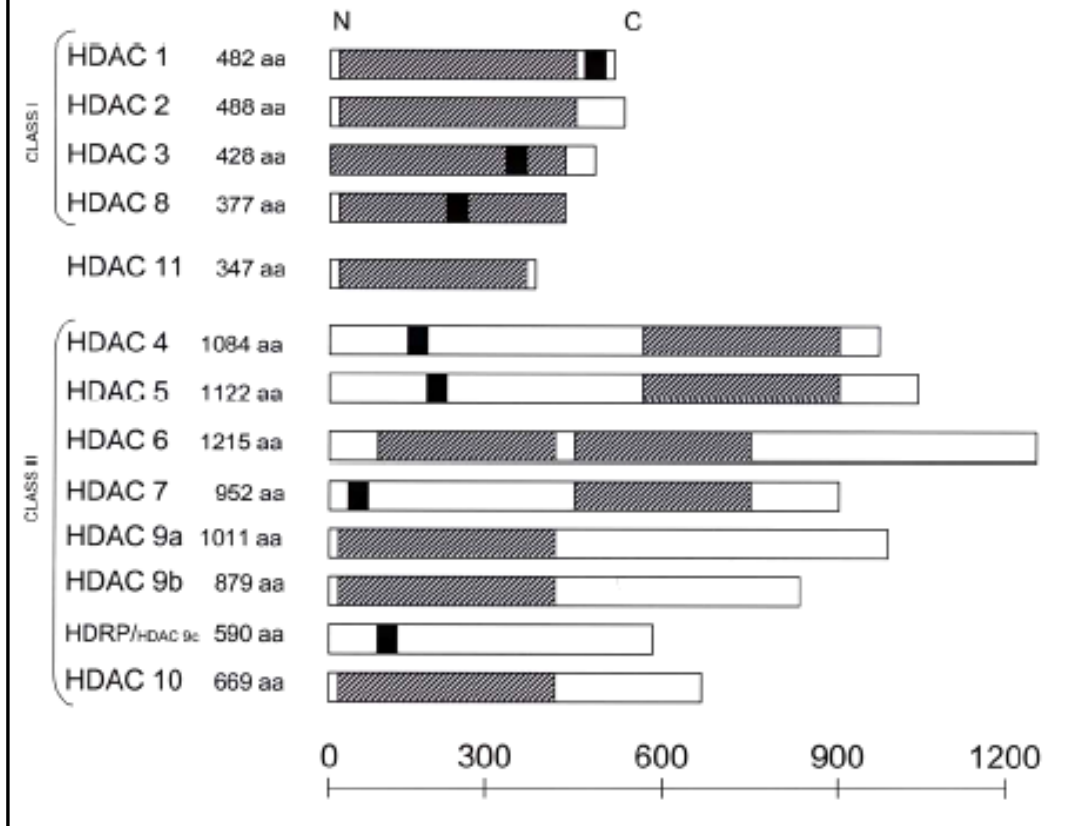
Εικόνα 12: Τα σχετικά μεγέθη και η τοπολογία των συντηρημένων μοτίβων για τις οικογένειες GNAT και MYST των HATs υποδεικνύονται. AT: περιοχή ακετυλοτρανσφεράσης, Bromo: βρομοπεριοχές, PhD: ομοπεριοχές φυτών, Zn: περιοχές δακτύλων ψευδαργύρου, chromo: χρωμοπεριοχές.



Απακετυλάσεις ιστονών.

Τον ίδιο χρόνο που αναγνωρίστηκαν οι πρώτες πυρηνικές HATs, αναγνωρίστηκε επίσης η πρώτη απακετυλάση ιστονών (HDAC) (Taunton et al., 1996). Αυτή η απακετυλάση από θηλαστικά ήταν ομόλογη με τον συγκαταστολέα από τη ζύμη Rpd3p (Εικόνα14). Τα επόμενα χρόνια, περισσότεροι συγκαταστολείς αναγνωρίστηκε ότι ήταν HDACs, όπως και περισσότεροι συνενεργοποιητές αναγνωρίστηκαν σαν HATs, παρέχοντας υποστήριξη στη ιδέα ότι υπερακετυλιωμένη χρωματίνη είναι μεταγραφικά ενεργή ενώ υποακετυλιωμένη χρωματίνη είναι κατασταλαμένη. Πράγματι, τουλάχιστον μερικά ρυθμιζόμενα γεγονότα ενεργοποίησης είναι γνωστό ότι ενέχουν την ανταλλαγή συμπλόκων με δράση HDACs με άλλα με ενεργότητες HAT. Συγκεκριμένοι πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών (όπως ο υποδοχέας της θυρεοειδούς ορμόνης) αλληλεπιδρούν με HDACs για να καταστείλουν τη μεταγραφή στο στάδιο μη πρόσδεσης του δεσμευτή, αλλά αλληλεπιδρούν με HATs στην παρουσία δεσμευτή για να ενεργοποιήσουν τα γονίδια στόχους τους (Collingwood et al., 1999; Freedman, 1999; Glass and Rosenfeld, 2000). Παρόλα αυτά είναι σημαντικό να θυμόμαστε ότι η ισορροπία ακετυλίωσης ιστονών φαίνεται να έχει διαφορετικές επιδράσεις σε διαφορετικά γονίδια σε διαφορετικές ρυθμίσεις. Για παράδειγμα, η ακετυλίωση της K12 στην ιστόνη H4 μπορεί να είναι απαραίτητη για τη μεταγραφική σίγηση στη ζύμη και τη *Drosophila* (Braunstein et al., 1996; Turner et al., 1992).

ΕΙΚΟΝΑ 14



Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση των διαφορετικών ισομορφών HDAC. Οι μπάρες υποδεικνύουν το μήκος της πρωτεΐνης. Οι γραμμωτές περιοχές αναπαριστούν την καταλυτική περιοχή. Η HDRP δεν έχει ενεργότητα απακετυλάσης. Το μαύρο υποδεικνύει ένα σήμα πυρηνικής εισόδου (NLS). N=αμινοτελική περιοχή και C=καρβοξυτελική περιοχή.

Ειδικοί στόχοι της παρούσας εργασίας.

- A. Μελέτη της ρύθμισης της έκφρασης των τάξης II αντιγόνων ιστοσυμβατότητας από συνενεργοποιητές που αλληλεπιδρούν με το CIITA.
- B. Μελέτη της δράσης της ακετυλίωσης του CIITA, από τον pCAF και το CBP, στον υποκυτταρικό του εντοπισμό και τη μεταγραφική ενεργοποίηση των MHC τάξης II γονιδίων.
- Γ. Μελέτη της αλληλεπίδρασης του CIITA με τον εαυτό του και πως αυτό συσχετίζεται με την υποκυτταρική του κατανομή και την ικανότητά του για μεταγραφική ενεργοποίηση των MHC τάξης II γονιδίων.
- Δ. Χαρακτηρισμός του ενισχυσώματος τάξης II και ο μηχανισμός μεταγραφικής ενεργοποίησης από CIITA.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΥΛΙΚΑ

1.1. Αντιδραστήρια Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας προέρχονταν απ'τις εταιρείες Bohringer Mannheim, Pharmacia, Promega, Sigma Chemicals, United States Biochemicals. Τα περιοριστικά και τροποποιητικά ένζυμα των νουκλεϊκών οξέων προέρχονταν απ'τις εταιρείες Minotech, New England Biolabs, Promega, και United States Biochemicals (USB). Τα θρεπτικά υλικά καλλιέργειας των βακτηριακών στελεχών προέρχονταν από την Gibco-BRL. Τα ραδιοσημασμένα νουκλεοτίδια και η ραδιενεργή χλωραμφαινικόλη προέρχονταν απ'την εταιρεία Amersham. Οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης προέρχονταν απ'τις εταιρείες Schleicher & Schuell και Gelman. Οι μεμβράνες αυτοραδιογραφίας προέρχονταν απ'την Kodak. Τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια προέρχονταν απ'το εργαστήριο Μικροχημείας του ΙΤΕ.

1.2. Βακτηριακά στελέχη και πλασμιδιακοί φορείς. Για την κατασκευή των πλασμιδιακών κατασκευών χρησιμοποιήθηκαν οι φορείς: pBluescript KSII (Stratagene), pRC-RSV, pRC-CMV, pCDNA3 (Invitrogen), pBXGI.

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν είναι E.coli DH5α, HB101, ο γονότυπος των οποίων περιγράφεται στους Sambrook et al. Για τα πειράματα μεταλλαξογένεσης χρησιμοποιήθηκαν άλλα δύο βακτηριακά στελέχη, από όπου δεκτικά κύτταρα παρασκευάστηκαν στο εργαστήριό μας:

- Βακτηριακό στέλεχος BMH 71-18 *mutS*: #Q6321, Promega.
- Βακτηριακό στέλεχος JM109: #P9751, Promega.

1.3. Βακτηριακές καλλιέργειες. Για την καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο Luria-Bertani σε υγρή και στερεά μορφή. Τα διαλύματα των αντιβιοτικών παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τους Sambrook et al.

1.4. Κυτταρικές σειρές. Στα πειράματα παροδικής διαμόλυνσης χρησιμοποιήθηκαν οι ανθράπινες κυτταρικές σειρές *Hela* και *Raji*. Τα κύτταρα *Hela* είναι επιθηλιακά κύτταρα που προέρχονται από αδενοκαρκίνωμα τραχήλου της μήτρας. Τα κύτταρα *Raji* είναι σειρές που προέρχονται από το λέμφωμα *Burkitt* και έχουν χαρακτηριστικά διαφοροποιημένων Β κυττάρων. Περισσότερες πληροφορίες για τις παραπάνω σειρές καθώς και οι σχετικές αναφορές περιέχονται στον κατάλογο της εταιρείας ATCC απ'όπου και προμηθεύτηκαν τα κύτταρα. Η κυτταρική σειρά Sf9 ATCC#CRL1711 προέρχεται από κύτταρα λεπιδόπτερον και αγοράστηκε από την εταιρεία Invitrogen.

1.5. Θρεπτικά διαλύματα και υλικά καλλιέργειών κυτταρικών σειρών. Για την κυτταρική σειρά *Raji* χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο RPMI1640 από την Gibco συμπληρωμένο με 50μM β-μερκαπτοαιθανόλη. Τα κύτταρα *Hela* καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο MEM τροποποιημένο σύμφωνα με τον Dulbecco. Τα δύο αυτά θρεπτικά συμπληρώθηκαν με 10% ορό εμβρύου βοδιού και 50μg/ml γενταμυκίνη.

1.6. Παρασκευή κυττάρων E.coli υψηλής δεκτικότητας. Επιμολύνουμε με 1mL από κορεσμένη καλλιέργεια 100mL Psi θρεπτικό (1lt: 5gr Bacto Yeast extract, 20gr Bacto tryptone, 5gr MgSO₄, pH: 7.6 χρησιμοποιώντας KOH). Επιδιώκουμε στους 37°C έως ότου η απορρόφηση σε μήκος κύματος 550nm γίνει αυστηρά 0.48. Παγώνουμε τη φλάσκα με τα κύτταρα σε πάγο για 15 λεπτά και μετά φυγοκεντρούμε στις 4000στροφές, για 10 λεπτά στους 4°C. Επαναδιαλύουμε την πελέτα των κυττάρων σε 0.4 όγκους (σε σχέση με τον αρχικό όγκο της καλλιέργειας) διάλυμα Tfb1 (30mM οξικό κάλιο, 100mM χλωριούχο ρουβίδιο, 10mM χλωριούχο ασβέστιο, 50mM χλωριούχο μαγκάνιο, 15%(v/v) γλυκερόλη. Το pH ρυθμίζεται με αραιό οξικό οξύ στο 5.8) και επιδιώκουμε στον πάγο για 15 λεπτά. Πελετάρουμε όπως και πριν και επαναδιαλύουμε την πελέτα σε 0.04 όγκους TfbII (10mM MOPS, 75mM χλωριούχο ασβέστιο, 10mM χλωριούχο ρουβίδιο, 15%(v/v) γλυκερόλη. Το pH ρυθμίζεται με καυστικό νάτριο στο 6.5). Επιδιώκουμε στον πάγο για 15 λεπτά και μετά παγώνουμε στους -70°C.

1.7. Αντισώματα. Τα στοιχεία των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη παρατίθενται παρακάτω.

Anti-acetyl-Histone H3: #06-599 (Upstate Biotechnology)
Anti-acetyl Histone H4: #06-866 (Upstate Biotechnology)
Anti-Brg N15: #sc-8749 (Santa Cruz Biotechnology)
Anti-Brm1 N19: #sc-6450 (Santa Cruz Biotechnology)
Anti-CBP A22: #sc-369 (Santa Cruz Biotechnology)
Anti-Cdk7 C19: #sc-529 (Santa Cruz Biotechnology)
Anti-Cdk9 C20: #sc-484 (Santa Cruz Biotechnology)
Anti-CIITA rabbit polyclonal antibody: AB3008 (Chemicon International)
Anti-CREB C21: #186 (Santa Cruz Biotechnology)
Anti-Flag M2 monoclonal antibody: F3165 (Sigma)
Anti-GCN5 N18: #sc-6303 (Santa Cruz Biotechnology)
Anti-His probe H15: #sc-803 (Santa Cruz Biotechnology)
Anti-Myc-HRP Antibody: #46-0709 (Invitrogen)
Anti-NFY (B subunit specific): #4557 (Rockland)
Anti-NFY (A subunit specific): # 5896 (Rockland)
Anti-Pol II (N-20): sc-899 (Santa Cruz Biotechnology)
Anti-RFX5 N-terminal: #100-401-193 (Rockland)
Anti-TFIID (TBP) (SI-1): sc-273 (Santa Cruz Biotechnology)
Anti-TFII E C17: #sc-237 (Santa Cruz Biotechnology)
Anti-TFII H p89 (S-19): sc-293 (Santa Cruz Biotechnology)
GFP monoclonal antibody: #8362-1 (Clontech)
Monoclonal antibody for RNA Polymerase II: MMS-134R clone H14 (Covance, Babco)
Monoclonal antibody for RNA Polymerase II: MMS-129R clone H5 (Covance, Babco)

1.8. Ρητίνες κατακρήμνισης ανοσοσφαιρινών.

Protein-G: #17-0404-03 (Amersham Pharmacia biotech)
Protein-A sepharose CL-4B (Amersham Pharmacia biotech)
Anti-Flag M2 Affinity gel: #A1205, Sigma
Glutathione Sepharose4B: #17-0757-01, Pharmacia Biotech

2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.

2.1. Απομόνωση της πρωτεΐνης CIITA από κύτταρα λεπιδοπτερών. Ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη CIITA παράχθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και χρησιμοποιώντας το σύστημα "Bac-to-Bac Baculovirus expression system" (Life Technologies/Gibco BRL) με τις παρακάτω αλλαγές. Τα κύτταρα μετά την επιμόλυνσή τους συλλέγονται και επαναδιαλύονται σε μικρό όγκο Διαλύματος-X (20mM HEPES pH 7.9, 100mM KCl, 0.2mM EDTA, 20% γλυκερόλη, 1mM DTT, 1mM PMSF) και γίνονται τρεις επαναλήψεις παγώματος-ξεπαγώματος σε ξηρό πάγο και πάγο αντίστοιχα. Τα σπασμένα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στις 14.000 στροφές στους 4°C, για 15 λεπτά. Συλλέγουμε το υπερκείμενο και πραγματοποιούμε διαπίδυση για 2 ώρες με 100-200 φορές τον όγκο του δείγματος, με διάλυμα διαπίδυσης (10mM Tris pH 7.5, 30% γλυκερόλη, 0.1% NP40, 2mM μερκαπτοαιθανόλη, 1M NaCl, 2mM PMSF). Πλένουμε με το τελευταίο διάλυμα κολώνα Ni-NTA και επωάζουμε με την πρωτεΐνη στο ψυγείο για 2-3 ώρες. Φυγοκεντρούμε σε χαμηλές στροφές, αφαιρούμε το υπερκείμενο και πλένουμε την κολώνα τρεις φορές με το ίδιο διάλυμα. Εκλούουμε την πρωτεΐνη σε τέσσερα στάδια με διάλυμα διαπίδυσης που περιέχει 100mM, 250mM, 1M Ιμιδαζόλιο και

τέλος 10mM EDTA. Τρέχουμε μικρό μέρος κάθε εκλούσματος, της κολώνας και του υπερκείμενου του κυτταρικού διαλύματος που αλληλεπίδρασε με την κολώνα, και πραγματοποιείται ανάλυση κατά Western. Τα εκλούσματα που περιέχουν την πρωτεΐνη ενοποιούνται και μετά πραγματοποιείται διαπίδυση προς το εξής διάλυμα: 20mM Tris pH 8.0, 10% γλυκερόλη, 100mM NaCl, 1mM DTT, 0.1% NP-40. Η πρωτεΐνη παγώνεται σε υγρό άζωτο και φυλάσσεται στους -80°C.

2.2. Καθαρισμός ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης από βακτηριακά κύτταρα με αποδιατακτικές συνθήκες. Εμβολιάσαμε με μοναδιαία αποικία της επιθυμητής πρωτεΐνης 10ml με θρεπτικό Lenox LB και μετά από O/N ανάπτυξη εμβολιάσαμε 4lt από θρεπτικό Lenox LB. Η ανάπτυξη των βακτηρίων έγινε στους 37°C μέχρι (απορρόφηση στα 550nm) OD=0.5. Επάγουμε τη σύνθεση της πρωτεΐνης με 1ml IPTG (0.141gr/ml IPTG=592.4mM) για κάθε λίτρο καλλιέργειας. Επάγουμε την ανάπτυξη για 3 ώρες, και μετά φυγοκεντρούμε την καλλιέργεια για 10 λεπτά στις 4000rpm. Επαναδιαλύουμε την πελέτα σε 30ml (για κάθε λίτρο καλλιέργειας) ενός διαλύματος που περιέχει 8M Urea, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 100mM Na₂PO₄ pH 7.0, 10mM Ιμιδαζόλιο και 10mM Μερκαπτοαιθανόλη. Το pH του διαλύματος αυτού πριν τη χρήση του ρυθμίζεται στο 8.0 με προσθήκη HCl. Επιδρούμε στο ομογενοποιημένο διάλυμα με υπερήχους (15Watts) για 1.5 λεπτά χωρίς να επιτρέψουμε στο δείγμα να θερμανθεί. Μετά φυγοκεντρούμε στις 8.000rpm, στους 4°C για 20 λεπτά. Πλένουμε τρεις φορές με ίσο όγκο απ'το παραπάνω διάλυμα ρητίνη Ni-NTA αραρόζης. Αναμιγνύουμε το υπερκείμενο του βακτηριακού διαλύματος μετά την φυγοκέντρωση με τη ρητίνη και προσθέτουμε 1.8ml 12%NP-40 (1% τελική συγκέντρωση). Αναδεύουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες. Κατόπιν φυγοκεντρούμε και πλένουμε τη ρητίνη 3-4φορές με 10ml απ'το αρχικό διάλυμα. Εκλούουμε την ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη από τη ρητίνη με ίσο όγκο αρχικού διαλύματος που περιέχει 100mM, 250mM, 1M Ιμιδαζόλιο και ένα τελικό με 10mMEDTA. Τρέχουμε σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης μια μικρή ποσότητα από κάθε έκλουση για να ελέγξουμε την ποσότητα και ποιότητα της κάθε πρωτεΐνης. Πριν τη χρήση κάθε εκλουσμένης πρωτεΐνης πραγματοποιούμε Dialysis (διαπίδυση) με μειούμενες ποσότητες Ουρίας (8M-4M-2M-1M-0.5M-0.0 M) σε ένα διάλυμα που περιέχει 20mM Tris-HCl pH 8.0, 10% γλυκερόλη, 300mM NaCl, 1mM DTT, και 0.1% NP40.

2.3. Απομόνωση αδιάλυτων χιμαιρικών πρωτεϊνών σε σύντηξη με τη GST πρωτεΐνη: Εμβολιάζουμε μεγάλη φλάσκα με θρεπτικό LB (πρωτόκολλο για 100ml καλλιέργεια) με κορεσμένη καλλιέργεια της υπό μελέτη πρωτεΐνης, σε αραιώση 1/50-1/100. Επωάζουμε στους 37°C έως η απορρόφηση στα 550nm να γίνει 0.6. Επάγουμε 0.1-1mM IPTG για 4 ώρες στους 37°C. Πελετάρουμε τα κύτταρα και επαναδιαλύουμε σε 6ml διάλυμα STE (10mM Tris pH 8.0, 150mM NaCl, 1mM EDTA) με 100μg/ml λυσοζύμη, και επωάζουμε για 15 λεπτά στον πάγο. Προσθέτουμε DTT σε τελική συγκέντρωση 5mM. Λύνουμε τα κύτταρα προσθέτοντας sarcosyl σε τελική συγκέντρωση 1.5%. Αναδεύουμε έντονα (Vortex) για 5 δευτερόλεπτα. Ασκούμε υπερήχους για 1 λεπτό με το δείγμα στον πάγο. Καθαρίζουμε το δείγμα φυγοκεντρώντας στα 10.000g, για 5 λεπτά στους 4°C. Στο υπερκείμενο προσθέτουμε Triton X-100 σε τελική συγκέντρωση 2-4% (από απόθεμα 10% σε STE). Αναδεύουμε έντονα για 5 δευτερόλεπτα και μετά επωάζουμε το κυτταρικό εκχύλισμα για 1-2 ώρες με 50% v/v κολώνα Γλουταθιόνης στους 4°C. Μετά την επώαση πλένουμε την κολώνα 3-5 φορές με κρύο PBS. Εκλούουμε την πρωτεΐνη με μισό όγκο (σε σχέση με την κολώνα) διαλύματος έκλουσης (75mM Hepes pH 7.4, 150mM NaCl, 10mM ανηγμένη γλουταθιόνη, 5mM DTT, 0.1% Triton X-100). Αναδεύουμε έντονα την κολώνα και συλλέγουμε το υπερκείμενο. Επαναλαμβάνουμε για τρεις φορές. Για να αποθηκεύσουμε προσθέτουμε γλυκερόλη σε συγκέντρωση 10% και φυλάσσουμε στους -80°C.

2.4. Παρασκευή πρωτεΐνης His-CRM1. Επάγουμε με 1mM IPTG για 3 ώρες στους 30°C την έκφραση της πρωτεΐνης όταν η απορρόφηση της καλλιέργειας προς επαγωγή στα 550nm είναι 0.6-0.7. Φυγοκεντρούμε την καλλιέργεια και επαναδιαλύουμε την πελέτα σε 5ml (για 500ml καλλιέργεια) Διάλυμα A (50mM Tris pH 8.0, 100mM NaCl, 1mM MgCl₂) και επωάζουμε για 1ώρα στον πάγο με 0.1% λυσοζύμη και αναστολείς πρωτεασών. Μετά προσθέτουμε TritonX-100 σε τελική συγκέντρωση 1% και επωάζουμε για 30 λεπτά στον πάγο. Προσθέτουμε DNaseI σε συγκέντρωση 80μg/ml για 15 λεπτά. Φυγοκεντρούμε σε υψηλές στροφές για 30 λεπτά στους 4°C. Η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης γίνεται με κολώνα Ni-NTA η οποία μετά την

αλληλεπίδραση πλένεται με Διάλυμα Α που περιέχει επίσης 60mM Ιμιδαζόλιο, 0.5% TritonX-100 και 5% γλυκερόλη.

2.5. Αλληλεπιδράσεις χιμαιρικών πρωτεϊνών GST ή τμημάτων πρωτεϊνών με ραδιοσημασμένες πρωτεΐνες στόχους. Η μεθοδολογία αυτή χρησιμοποιήθηκε για την *in vitro* ανίχνευση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων και στις λεπτομέρειές της συνίσταται στη χρήση:

α. χιμαιρικών πρωτεϊνών μεταξύ του γονιδίου της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης και κατάλληλων τμημάτων cDNAs. Η χρήση των χιμαιρικών μορίων είναι χρήσιμη διότι αυτά, εξαιτίας της πρωτεΐνης της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης, αλληλεπιδρούν με μόρια γλουταθειόνης ακινητοποιημένα σε συσσωματώματα σεφαρόζης. Κατά αυτό τον τρόπο κατακρομμίζονται επιλεκτικά με φυγοκέντρηση από το συνολικό διάλυμα των βακτηριακών πρωτεϊνών. Για την παραγωγή αυτών των χιμαιρικών πρωτεϊνών μετά τις τυπικές διαδικασίες υποκλωνοποίησης ακολουθήθηκε συνοπτικά η εξής διαδικασία:

Μια βακτηριακή αποικία κυττάρων E.coli DH5α που φέρει το χιμαιρικό μόριο σε κατάλληλο προκαρυωτικό φορέα έκφρασης (pGEX), μολύνει 500ml θρεπτικού υλικού(LB). Η ανάπτυξη της καλλιέργειας στους 37 ή 30°C ελέγχεται σε τακτικά χρονικά διαστήματα με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας. Όταν η τιμή της φτάσει στο 0.7-0.8 σε μήκος κύματος 550nm, προστίθεται IPTG σε τελική συγκέντρωση 1mM. Η καλλιέργεια επωάζεται για δύο επιπλέον ώρες στις ίδιες συνθήκες. Στη συνέχεια η καλλιέργεια φυγοκεντρείται και τα βακτήρια συλλέγονται και επαναιωρούνται σε 2ml διαλύματος 1X PBS, 0.5%BSA, 1mM PMSF. Ακολουθεί λύση των κυττάρων με υπερήχους για ένα λεπτό. Στο λύμα προστίθεται στη συνέχεια Triton-X100 σε τελική συγκέντρωση 1%, και γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 10%. Αναμιγνύουμε και φυγοκεντρούμε στις 14.000rpm, στους 4°C για 15λεπτά. Από το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης απομονώνονται 200μl, και προστίθενται σε 30μl αιωρήματος γλουταθειόνης ακινητοποιημένης σε σωματίδια σεφαρόζης (1mg/ml w/v). Το μίγμα επωάζεται στους 4°C, για μία ώρα με συνεχή ανάδευση. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 2500rpm, 4°C, 2λεπτά και πλύσεις του ιζήματος των σωματιδίων σεφαρόζης τρεις φορές με 500μl του παραπάνω διαλύματος. Ακολουθεί ανάλυση του δείγματος σε πήκτωμα ακρυλαμίδης-SDS με τη μέθοδο Laemli, για την ποσοτικοποίηση της παραγόμενης χιμαιρικής πρωτεΐνης που κατακρομμίζεται με αυτή τη διαδικασία από το διάλυμα των βακτηριακών πρωτεϊνών.

β. ραδιοσημασμένων πρωτεϊνικών μορίων, με το *in vitro* σύστημα QuickTNT(Promega). Σε 200μl διάλυμα (150mM KCl, 20mM Hepes pH 7.9, 0.1% NP40, 5mM MgCl₂, 0.2% BSA, 1mM PMSF) αναμιγνύονται κατάλληλη ποσότητα σωματιδίων σεφαρόζης, με βάση την ποσότητα της χιμαιρικής πρωτεΐνης που έχει δεσμευτεί, και το ραδιενεργά σημασμένο έτερο πρωτεϊνικό μόριο. Η αντίδραση αλληλεπίδρασης πραγματοποιείται στους 4°C με συνεχή ανάδευση για 5-6 ώρες. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 3000rpm, 4°C, 2λεπτά και πλύσεις του ιζήματος τρεις φορές με 1ml του διαλύματος (150mM KCl, 20mM Hepes pH 7.9, 0.1% NP-40, 5mM MgCl₂, 10% γλυκερόλη, 1mM PMSF). Ακολουθεί ανάλυση κατά Laemli, ξήρανση του πηκτώματος σε αντλία κενού και αυτοραδιογραφία. Σε περίπτωση αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών η ραδιενεργά σημασμένη πρωτεΐνη θα έχει κατακρατηθεί από τα σωματίδια σεφαρόζης και θα ανιχνευθεί στο αντίστοιχο δείγμα.

2.6. In vitro πείραμα αλληλεπίδρασης His-CRM1 με συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα. Πλένουμε κολώνα Ni-NTA τρεις φορές με Διάλυμα-A (50mM Tris pH 8.0, 100mM NaCl, 1mM MgCl₂, 60mM Ιμιδαζόλιο, 0.5% Triton X-100, 5% γλυκερόλη, αναστολείς πρωτεασών). Προσθέτουμε το βακτηριακό πρωτεϊνικό εκχύλισμα His-CRM1 για αλληλεπίδραση για 1 ώρα στο ψυγείο. Φυγοκεντρούμε και πλένουμε για τρεις φορές με Διάλυμα-A και μια φορά με EBC διάλυμα (50mM Tris pH 8.0, 170mM NaCl, 0.5% NP-40, 50mM NaF, αναστολείς πρωτεασών). Κατόπιν η His-CRM1 πρωτεΐνη στην κολώνα νικελίου μπλοκάρεται με 5mg/ml BSA σε διάλυμα EBC για 45 λεπτά στο ψυγείο. Η κολώνα πλένεται 2 φορές με διάλυμα EBC. Συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από Cos-1 κύτταρα παροδικά διαμολυμένα με διαφορετικές κατασκευές με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) αλληλεπιδρούν με κολώνα Ni-NTA και το υπερκείμενο συλλέγεται και αφήνεται να αλληλεπιδράσει στο ψυγείο για 4-5 ώρες με την His-CRM1/Ni-NTA. Η κολώνα φυγοκεντρείται και πλένεται τρεις φορές με 1ml διάλυμα NETN (10mM Tris pH 8.0, 250mM

NaCl, 0.5% NP-40). Μετά η κολώνα τρέχεται σε 10% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και ακολουθεί ανάλυση κατά Western με anti-GFP αντίσωμα (Clontech).

2.7. Αντίδραση ακετυλίωσης πρωτεΐνης από GST-χμαιοικό μόριο πρωτεΐνης με ιδιότητες ακετυλοτρανσφεράσης. Η αντίδραση στηρίζεται στην ιδιότητα συγκεκριμένων πρωτεϊνών να ακετυλιώνουν κατάλοιπα Λυσίνης όπου τα εντοπίζουν σε πρωτεΐνες στόχους. Στην περίπτωση μας τόσο η πρωτεΐνη με τη ενζυμική δραστηριότητα όσο και η πρωτεΐνη στόχος βρίσκονται σε ανοικτό πλαίσιο διαβάσματος με την τρανσφεράση της γλουταθειόνης, προκειμένου να μπορούμε εύκολα να απομονώσουμε τις εν λόγω πρωτεΐνες. Το πρωτόκολλο που ακολουθείται είναι των Brownell & Allis με μόνη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκαν ίσες με 1μg ποσότητες πρωτεϊνών ενζύμου και υποστρώματος.

2.8. In vitro φωσφορυλίωση Πολυμεράσης II. Οι αντιδράσεις φωσφορυλίωσης της Πολυμεράσης II από ανασυνδιασμένη CΙΤΑ πρωτεΐνη πραγματοποιήθηκαν σε όγκο 30μl, στους 30°C για μια ώρα πριν φορτωθούν σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Το διάλυμα φωσφορυλίωσης περιελάμβανε τα εξής: 5mM Hepes pH 7.8, 20mM Tris-HCl pH 7.9, 7mM MgCl₂, 60mM KCl, 12% (v/v) γλυκερόλη, 2% (w/v) πολυαιθυλενική γλυκόλη 8000, 2mM 2-μερκαπτοαιθανόλη, 0.1mM EDTA, 6μg BSA, 15μM ATP, 3μCi [γ-³²P] ATP.

2.9. Παρασκευή πυρηνικών εκχυλισμάτων. Το πρωτόκολλο που ακολουθεί αναφέρεται στην Παρασκευή πυρηνικών εκχυλισμάτων από 3l HeLa κύτταρα σε πυκνότητα 0.57x10⁶/ml. Παρασκευάζουμε το διάλυμα A που περιέχει 10mM Hepes pH 7.9, 1.5mM MgCl₂, 10mM KCl και 0.5mM DTT καθώς και το διάλυμα C που περιέχει 20mM Hepes pH 7.9, 25% γλυκερόλη, 0.42M NaCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM EDTA, 0.5mM PMSF, 0.5mM DTT. Απομονώνουμε τα κύτταρα και τα πλένουμε με ένα όγκο διάλυμα A για να διώξουμε το PBS, πιπετάροντας πάνω κάτω ήπια ώστε να επαναδιαλύσουμε τα κύτταρα. Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στις 1000rpm, πετάμε το υπερκείμενο και μετράμε τον όγκο της πελέτας (=PCV). Προσθέτουμε 5 όγκους (5xPCV) διάλυμα A στην πελέτα, και επωάζουμε για 10 λεπτά στον πάγο. Φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά στις 2000rpm, και πετάμε το υπερκείμενο. Προσθέτουμε στην πελέτα ίσο όγκο διάλυμα A και μεταφέρουμε τα κύτταρα σε ομογενοποιητή Dounce, όπου και ομογενοποιούμε τα κύτταρα με 10 χτυπήματα. Πελετάρουμε τους πυρήνες στις 6000rpm για 20 λεπτά και πετάμε το υπερκείμενο. Προσθέτουμε στην πελέτα 3ml διάλυμα C για 10⁹ κύτταρα και επωάζουμε στον πάγο για 45 λεπτά. Μεταφέρουμε τους πυρήνες σε σακούλα διαπίδυσης με πόρους έως 12-14000(MWCO) και επιδρούμε με διάλυμα που περιέχει 20mM Hepes pH 7.9, 20% γλυκερόλη, 0.1M KCl, 0.2mM EDTA, 0.5mM PMSF, 0.5mM DTT, για 3-5 ώρες στο ψυγείο. Έπειτα φυγοκεντρούμε σε ψυχόμενη φυγόκεντρο για την απομάκρυνση αδιάλυτων σωματιδίων και παίρνουμε το υπερκείμενο σε καθαρά δοχεία τα οποία παγώνουμε σε υγρό άζωτο.

2.10. Σύγχρονη παρασκευή κυτταροπλασματικών και πυρηνικών εκχυλισμάτων από ευκαρυωτικά κύτταρα. Όλα τα διαλύματα πρέπει να είναι κρύα και να κρατώνται στον πάγο. Πλένουμε μία φορά την κυτταρική πελέτα με κρύο PBS (χωρίς τη χρήση EDTA). Ξύνουμε τα κύτταρα και τα συλλέγουμε κατάλληλο δοχείο το οποίο φυγοκεντρείται και αφαιρείται το υπερκείμενο. Επαναδιαλύουμε την κυτταρική πελέτα σε 400 μl (αναφερόμαστε σε 6xWell plate) Διάλυμα A (10mM Hepes pH 7.9, 1.5mM MgCl₂, 10mM KCl, 1mM DTT, 1mM PMSF) με σύγχρονη ανάδευση του δοχείου. Επωάζουμε στον πάγο για 10 λεπτά. Αναδεύουμε έντονα (Vortex) για 10 δευτερόλεπτα. Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα για 10 δευτερόλεπτα και μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέα δοχεία το οποίο αποτελεί το κυτταροπλασματικό κλάσμα της παρασκευής των εκχυλισμάτων. [Το κυτταροπλασματικό κλάσμα φυγοκεντρείται επιπλέον για 10 λεπτά στις 14.000rpm και στο υπερκείμενο προστίθενται 70μl 50% γλυκερόλη και τα εκχυλίσματα φυλάσσονται στους -70°C.]. Η πελέτα επαναδιαλύεται σε 90μl κρύο Διάλυμα C (25% γλυκερόλη, 20mM Hepes pH 7.9, 450mM NaCl, 1.5mM MgCl₂, 0.5mM DTT, 0.2mM PMSF) με σύγχρονη ανάδευση του δοχείου. Τα δείγματα επωάζονται στον πάγο ή περιστρέφονται στο ψυγείο για 20 λεπτά. Φυγοκεντρούμε τα δείγματα για 2 λεπτά στους 4°C στις 14.000 στροφές. Συλλέγουμε το υπερκείμενο το οποίο αποτελεί το

πυρηνικό κλάσμα των εκχυλισμάτων και φυλάσσεται στους -70°C . Τρέχουμε σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 24μlτ κυτταροπλασματικού κλάσματος και 6μlτ πυρηνικού κλάσματος και ακολουθεί ανάλυση κατά Western.

2.11. Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών από συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα. Για τις *in vivo* αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, COS-1 κύτταρα σε 100mm δοχεία διαμολύνθηκαν παροδικά με 5μg από κάθε πλασμιδιακό φορέα χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο με κατακρήμνιση χλωριούχου ασβεστίου. Συνολικά εκχυλίσματα παρασκευάστηκαν σε διάλυμα λύσης (10mM Tris-HCl pH8, 170mM NaCl, 5mM EDTA, 0.5% NP-40, 1mM DTT, αναστολείς πρωτεασών). Εκχυλίσματα που αντιστοιχούν σε 5×10^6 κύτταρα επώαστηκαν για 16 ώρες στους 4°C με το κατάλληλο αντίσωμα. Μετά ακολούθησε επώαση με κολώνα Protein-A ή Protein-G για μονοκλωνικά και πολυκλωνικά αντισώματα αντίστοιχα, για τρεις ώρες στους 4°C . Τα δείγματα μετά την ανοσοκατακρήμνιση πλύθηκαν τρεις φορές με διάλυμα λύσης αλλά με 250mM NaCl. Τα δείγματα μετά τρέχουν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και ακολουθείται ανάλυση κατά Western.

2.12. Χρώση Νιτρικού αργύρου για ανίχνευση μικροποσοτήτων πρωτεΐνης. Τρέχουμε τις υπό μελέτη πρωτεΐνες σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης κατάλληλης συγκέντρωσης. Σταθεροποιούμε τις πρωτεΐνες στο πήκτωμα επιδρώντας για 30 λεπτά με διάλυμα που περιέχει 50% Μεθανόλη και 12% Οξικό οξύ. Επιδρούμε για άλλες δύο φορές των 15 λεπτών έκαστη με διάλυμα 10% Μεθανόλης και 5% Οξικού οξέος. Ακολουθεί επώαση με διάλυμα οξειδωσης για 10 λεπτά (σ' αυτή τη φάση το πήκτωμα αποκτά κίτρινη όψη). Πλένουμε τρεις φορές με νερό 5 λεπτά έκαστη (έως ότου το πήκτωμα ξαναγίνει άχρωμο). Επώαζουμε για 20 λεπτά με διάλυμα Νιτρικού αργύρου (μετά από αυτή την επώαση αλλάζουμε δοχείο). Πλένουμε για ένα λεπτό με νερό. Κατόπιν και με έντονη ανάδευση επιδρούμε με διάλυμα Ανάπτυξης (0.28M Καρβονικό Νάτριο, 0.5ml Φορμαλδεΐδη (από 37%) για ένα λίτρο διάλυμα) για δύο φορές των 30 δευτερολέπτων έκαστη. Ακολουθεί επώαση με 3% Οξικό οξύ και τέλος πλύσιμο με νερό για δύο εικοσάλεπτα.

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗΣ ΚΑΙ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗΣ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.

3.1. Παροδική διαμόλυνση (transfection) κυτταρικών σειρών. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της επίδρασης του παράγοντα C/PTA, και κατάλληλων ελλείψεών του, στην λεμφοειδική έκφραση ή επαγωγή από Ιντερφερόνη- γ των τάξης II γονιδίων ιστοσυμβατότητας. Σαν γονίδια αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν κατασκευές CAT των οποίων η έκφραση ήταν υπό τον έλεγχο ρυθμιστικών περιοχών των γονιδίων E α και E β . Για τη διαμόλυνση ακολουθήθηκαν δύο μέθοδοι ανάλογα με την κυτταρική σειρά.

α. Της συγκατακρήμνισης DNA με Ca_3PO_4 για τις περισσότερες κυτταρικές σειρές.

β. Της επιμόλυνσης με τη χρήση δεξτράνης για τις λεμφοκυτταρικές σειρές.

Τόσο για τη διαμόλυνση όσο και για τον μετέπειτα προσδιορισμό της ενεργότητας CAT ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται από τους Graham και Van der Eb. Η αποτελεσματικότητα της επιμόλυνσης προσδιορίστηκε σε όλα τα πειράματα με τη χρήση της κατασκευής pCMV β LacZ. Η κατασκευή αυτή με την εισαγωγή της στα κύτταρα οδηγεί στην παραγωγή β -γαλακτοσιδάσης της οποίας η ενεργότητα υπολογίζεται εύκολα.

3.2. Επιμόλυνση κυττάρων Sf-9 με ανασυνδιασμένο βάκυλο-ιό. Για την απόκτηση ανασυνδιασμένου βάκυλο-ιού ακολουθήθηκε με λεπτομέρεια το πρωτόκολλο που προτείνει στο σχετικό εγχειρίδιό της η GibcoBRL (Bac-to-Bac Baculovirus Expression System). Ανασυνδιασμένοι ιοί κατασκευάστηκαν για τις πρωτεΐνες C/PTA, mC/PTA.F961S, CBP και pCAF. Από το σημείο που αποκτάται ο ιός και μετά η διαδικασία επιμόλυνσης είναι τέτοια ώστε να μεγιστοποιείται η παραγωγή της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης. Αυτό επιτυγχάνεται με την τιτλοδότηση του ιικού αποθέματος και τον έλεγχο με ανάλυση κατά Western της ποσότητας του ιικού αποθέματος που αποδίδει τη μέγιστη παραγωγή ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης. Σε 6xWell plate απλώνονται 2ml Sf9 κύτταρα σε κάθε well, σε συγκέντρωση 500.000 κύτταρα/ml και επιμολύνονται με αυξανόμενες ποσότητες ιικού αποθέματος (τουτέστιν 10^{-3} μlτ, 10^{-2} μlτ, 10^{-1} μlτ, 1μlτ, 2μlτ, 5μlτ

έως και 50μl). Τα κύτταρα συλλέγονται 60-72 ώρες μετά την επιμόλυνση, σπάνε σε Διάλυμα-Χ (20mM HEPES pH 7.9, 100mM KCl, 0.2mM EDTA, 20% γλυκερόλη, 1mM DTT, 1mM PMSF) και τρία παγώματα-ξεπαγώματα σε ξηρό πάγο και πάγο αντίστοιχα, και τρέχουν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης για να αναλυθούν κατά Western.

4. ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ.

4.1. Κατασκευές στον φορέα έκφρασης pcDNA3 (Invitrogen).

- CIITA/pcDNA3:** Το cDNA του γονιδίου CIITA σαν EcoRI-XbaI κομμάτι από pcDNA1 κλωνοποιείται στον pcDNA3 σε EcoRV θέση (Klenow).
- Flag.CIITA/pcDNA3:** Το Flag ολιγονουκλεοτίδιο κλωνοποιείται στην EcoRI θέση του φορέα CIITA/pcDNA3. Το Flag ολιγονουκλεοτίδιο δημιουργείται από την αλληλεπίδραση των παρακάτω εκκινητών: Flag1: 5'-AATTCACCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGATCG-3' και Flag2: 5'-AATTCGATCTTATCGTCGTCATCCTTGTAAATCCATGGTG-3'.
- CIITAantisense/pcDNA3:** Το cDNA του CIITA προϊόντος κλωνοποιημένο σε ανάποδη κατεύθυνση στην EcoRV θέση του pcDNA3.
- CIITA.IVS/pcDNA3:** Η SV40 θέση πολυαδενυλίωσης (IVS) κλωνοποιημένο στις θέσεις XhoI-XbaI του φορέα CIITA/pcDNA3.
- CIITA.1-114/pcDNA3:** Τα πρώτα 114 αμινοξέα του CIITA σαν EcoRI-XbaI κομμάτι από το φορέα έκφρασης pBXGI κλωνοποιούνται στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα pcDNA3.
- CIITA.1-408/pcDNA3:** Από το συνολικό CIITA στον φορέα pcDNA3 αφαιρείται το καρβοξυτελικό κομμάτι με NotI πέψη και ξανακλείνουμε για να πάρουμε τη νέα κατασκευή.
- NLS2.Flu.Δ102/pcDNA3:** Το καρβοξυτελικό NotI κομμάτι του CIITA/pcDNA3 κλωνοποιείται σε NotI θέση του pcDNA3. Στις EcoRI-NotI θέσεις κλωνοποιείται το PCR πολλαπλασιασμένο κομμάτι του CIITA (bp 421-1340) με τη βοήθεια των εκκινητών, και κομμένο με τα αντίστοιχα ένζυμα:
CIITA.N(1164): 5'> CAC GAA TTC CCA GTA TGT CTT CCA GG <3'
CIITA.C(1165): 5'> GCA CAG CAA TCA CTC GTG TCT C <3'
Στην EcoRI θέση κλωνοποιείται σαν EcoRI κομμάτι το NLS2.Flu κομμάτι (περιέχει σήμα πυρηνικού εντοπισμού, εναρκτήριο κωδικόνιο για τη μετάφραση της πρωτεΐνης, και τον επίτοπο της αιμαγλουτινίνης Flu).
- CIITA.175-408/pcDNA3:** Το αντίστοιχο κομμάτι του CIITA με άκρα EcoRI-NotI κλωνοποιείται στις αντίστοιχες θέσεις του pcDNA3. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: CIITA.638.5': 5'-GCCGAATTCAGTGAGCGACTGCTCC-3' και CIITA.C: 5'-GCACAGCAATCACTCGTGTCTC-3'.
- CIITA.302-408/pcDNA3:** Το αντίστοιχο κομμάτι CIITA με άκρα EcoRI-NotI κλωνοποιείται στις αντίστοιχες θέσεις του pcDNA3. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής: CIITA.1019.5': 5'-GCCGAATTCGAACCTGCCCTGACCTCC-3' και CIITA.C: 5'-GCACAGCAATCACTCGTGTCTC-3'.
- CIITA.Δ174/pcDNA3:** Στον φορέα CIITA.175-408/pcDNA3 και στις θέσεις NotI-XhoI κλωνοποιήθηκε το CIITA.Δ408 κομμένο με τα ίδια ένζυμα.
- CIITA.Δ301/pcDNA3:** Στο φορέα CIITA.302-408/pcDNA3 και στις θέσεις NotI-XhoI κλωνοποιήθηκε το CIITA.Δ408 κομμένο με τα ίδια ένζυμα.
- NLS2.Flu.Δ408/pcDNA3:** Κλωνοποιούμε το NotI καρβοξυτελικό κομμάτι του CIITA από CIITA/pcDNA3 σε NotI θέση του pcDNA3. Το NLS2.Flu κλωνοποιείται στην NotI θέση σαν HindIII κομμάτι από NLS2.Flu/pbluescriptKS.
- CBP/pcDNA3:** Το cDNA του CBP κλωνοποιείται σαν BamHI κομμάτι σε BamHI θέση του pcDNA3.
- pCAF/pcDNA3:** Το cDNA του γονιδίου pCAF απομονώνεται σαν EcoRI(Klenow filled)-KpnI (Klenow 3'→5' φαγωμένο) από το φορέα pCX (Nakatani) και κλωνοποιείται στην BamHI θέση του pcDNA3.
- pCAF.1-654/pcDNA3:** Ο φορέας pCAF/pcDNA3 πέπτεται με BamHI και ξανακλείνει.

16. **pCAF.353-832/pcDNA3:** Η αντίστοιχη αλληλουχία του pCAF με EcoRI-XhoI άκρα κλωνοποιείται στις αντίστοιχες θέσεις του pcDNA3. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: pCAF.353.5': 5'-GCCGAATTCCTAGAAGAAGAAGTATATAG-3' και pCAF.3': 5'-GCCCTCGAGTCACTTGTCAATTAATCC-3'.
17. **Flag.pCAF.353-832/pcDNA3:** Στον φορέα pCAF.353-832/pcDNA3 και στη θέση EcoRI κλωνοποιείται στη σωστή κατεύθυνση το Flag ολιγονουκλεοτίδιο με EcoRI άκρα.

4.2. Πλασμιδιακές κατασκευές στον φορέα έκφρασης pEGFP-C1.

1. **CIITA/pEGFP-C1:** Το EcoRI-XbaI κομμάτι του CIITA από CIITA/pcDNA3 κλωνοποιείται στην XmaI θέση του pEGFP-C1.
2. **CIITA.Δ102/pEGFP-C1:** Το EcoRI κομμάτι του CIITA απ'το πλασμίδιο Δ102.IVS/pcDNA3 κλωνοποιείται στην EcoRI θέση του pEGFP-C1.
3. **CIITA.Δ74/pEGFP-C1:** Στον φορέα CIITA.Δ408/pEGFP.CI και στις θέσεις EcoRI-NotI κλωνοποιείται το κομμάτι DNA CIITA.75-408 που κόβεται με τα ένζυμα EcoRI-NotI αφού πολλαπλασιαστεί με τους εκκινητές CIITA.75.5'new: 5'-GCCGAATTCCTGCGACCAGTTCAGCAGG-3' και CIITA.C: 5'-GCACAGCAATCACTCGTGTCTC-3'.
4. **NLS2.Flu.Δ408/pEGFP-C1:** Το EcoRI-XbaI κομμάτι από το NLS2.Flu.Δ408/pcDNA3 κλωνοποιείται στην XmaI θέση του pEGFP-CI (Klenow).
5. **CIITA.Δ408/pEGFP-C1:** Το NotI κομμάτι του Δ408/pcDNA3 κλωνοποιείται στην EcoRI θέση του pEGFP-CI (Klenow).
6. **CIITA.1-50/pEGFP-C1:** Σε υπόστρωμα CIITA/pEGFP-CI σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιούνται οι εκκινητές GFP-CI και CIITA.50.3': 5'-GCCCTCGAGGAAGTGGTAGAGGCACAG-3'.
7. **CIITA.1-80/pEGFP-C1:** Το αντίστοιχο κομμάτι με άκρα EcoRI-XhoI γεμισμένα με το ένζυμο Klenow κλωνοποιούνται στο φορέα στην XmaI θέση αφού γεμίσει με το ένζυμο Klenow. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται για τον πολλαπλασιασμό του κομματιού ήταν οι T7 και CIITA.80.3': 5'-GCCCTCGAGCCTGCTGAACTGGTCGCA-3'.
8. **CIITA.60-114/pEGFP-C1:** Η κατασκευή CIITA.Δ60/pEGFP-CI πέπτεται με EcoNI-BamHI γεμίζεται με το ένζυμο Klenow και επανασυγκοιείται.
9. **CIITA.75-114/pEGFP-C1:** Ο φορέας CIITA.Δ74/pEGFP-CI πέπτεται με τα ένζυμα EcoNI-BamHI γεμίζει με το ένζυμο Klenow και μετά επανασυγκοιείται.
10. **CIITA.1-114/pEGFP-C1:** Το EcoRI-EcoNI κομμάτι από CIITA/pcDNA3 κλωνοποιείται στην XmaI θέση του pEGFP-CI (Klenow).
11. **CIITA.1-129/pEGFP-C1:** Τα πρώτα 129 αμινοξέα του CIITA σαν EcoRI κομμάτι κλωνοποιείται στην XmaI (γεμισμένη με Klenow) θέση του φορέα.
12. **CIITA.129-174/pEGFP-C1:** Η καθορισμένη αμινοξική αλληλουχία σαν EcoRI κομμάτι από τον φορέα pGEX-4T1 κλωνοποιείται στην XmaI (γεμισμένη με Klenow) θέση του φορέα.
13. **CIITA.102-408/pEGFP-C1:** Από τον φορέα CIITA.Δ102/pEGFP-CI αφαιρούμε το κομμάτι NotI-EcoRV κάνουμε γέμισμα με ένζυμο Klenow και ξανακλείνουμε τον φορέα.
14. **CIITA.175-408/pEGFP-C1:** Το κομμάτι 175-408 του CIITA με άκρα EcoRI-NotI κλωνοποιείται στο φορέα CIITA.1-408/pEGFP-CI που του έχει αφαιρεθεί το κομμάτι CIITA.1-408 (EcoRI-NotI). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: CIITA.638.5': 5'-GCCGAATTCAGTGAGCGACTGCTCC-3' και CIITA.C: 5'-GCACAGCAATCACTCGTGTCTC-3'.
15. **CIITA.1-549/pEGFP-C1:** Ο φορέας CIITA/pEGFP-CI πέπτεται με τα ένζυμα SmaI και BamHI γίνεται γέμισμα με το ένζυμο Klenow και μετά επανασυγκόληση.
16. **CIITA.1-524/pEGFP-C1:** Σε υπόστρωμα CIITA/pEGFP-CI χρησιμοποιούμε σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης τους εκκινητές GFP.CI: 5'-ACTCTCGGCATGGAC-3' και CIITA.524.3': 5'-GCCGGATCCGGAGCAGGGCTCCGCCGG-3'. Το κομμάτι αυτό πέπτεται με τα ένζυμα XhoI-BamHI και κλωνοποιείται στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα GFP-CI.

17. **CIITA.1-535/pEGFP-CI:** Με υπόστρωμα CIITA/pEGFP-CI χρησιμοποιούμε σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης τους εκκινητές GFP.CI: 5'-ACTCTCGGCATGGAC-3' και CIITA.535.3': 5'-GGCGGATCCCTTCTGGAAAAGGCCGGC-3'. Το τμήμα DNA πέπτεται με τα περιοριστικά ένζυμα XhoI-BamHI και κλωνοποιείται στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα pEGFP-CI.
18. **CIITA.524-535/pEGFP-CI:** Το ολιγονουκλεοτίδιο που κλωνοποιήθηκε στον φορέα pEGFP-CI απορτίζεται από τους εξής δύο εκκινητές: και CIITA.535.3': 5'-CTTGTGCGAAAAGGCCGGCCAGCAGCCCCGGAGGGAATTCGGC-3'.
19. **CIITA.536-549/pEGFP-CI:** Στην HindIII θέση του φορέα κλωνοποιείται το ολιγονουκλεοτίδιο που απορτίζεται από τους εξής εκκινητές: CIITA.536.5': 5'-AAGCTGCTCCGAGTTGCACCCCTCCTCCTCACAGCCCCGGCCCGGATCCGCC-3' και CIITA.549.3': 5'-GGCGGATCCGGGCCGGCTGTGAGGAGGAGGGTGAACCTCGGAGCAGCTT-3'.
20. **CIITA.524-549/pEGFP-CI:** Κλωνοποιήθηκε στις θέσεις EcoRI-BamHI το κομμάτι που πολλαπλασιάζεται από τους εκκινητές CIITA.524.5': 5'-GCCGAATTCCTCCGGGGGCTGCTGGCCGGCCTTTCCAGAAG-3' και CIITA.549.3': 5'-GGCGGATCCGGGCCGGCTGTGAGGAGGAGGGTGAACCTCGGAGCAGCTT-3'.
21. **CIITA.549-850/pEGFP-CI:** Στις θέσεις EcoRI-SalI του φορέα κλωνοποιείται το κομμένο με EcoRI-XhoI κομμάτι που πολλαπλασιάζεται με τους εκκινητές CIITA.549.5': 5'-GCCGAATTCCTCCGGGGCCGCCTGGTC-3' και CIITA.850-3': 5'-GCCCTCGAGCTTGCCAGTACATGTGC-3'.
22. **CIITA.Δ174/pEGFP-CI:** Το κομμάτι Δ174.CIITA με άκρα EcoRI-XhoI κλωνοποιείται στις θέσεις EcoRI-SalI του φορέα.
23. **NLS.Δ174/pEGFP-CI:** Το δίκλωνο ολιγονουκλεοτίδιο με το SV40-NLS και με άκρα EcoRI κλωνοποιείται στην EcoRI θέση του φορέα CIITA.Δ174/pEGFP-CI. Μετά η νέα κατασκευή πέπτεται με BglIII, γίνεται γέμισμα με Klenow και επανασυγκόληση. Η αλληλουχία των ολιγονουκλεοτιδίων NLS είναι η εξής: NLS1: 5'-AATTCTATGCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTCCATG-3', NLS2: 5'-AATTCATGGACCTTCCGCTTCTTCTTGGGCATAG-3'.
24. **CIITA.302-408/pEGFP-CI:** Το αντίστοιχο κομμάτι του CIITA με άκρα EcoRI-NotI κλωνοποιημένο στον ίδιο φορέα όπως πριν. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: CIITA.1019.5': 5'-GCCGAATTCGAACCTGCCCTGACCTCC-3' και CIITA.C: 5'-GCACAGCAATCACTCGTGTCTC-3'.
25. **CIITA.1-408/pEGFP-CI:** Από το πλασμίδιο CIITA/pEGFP-CI αφαιρείται το NotI κομμάτι και το υπόλοιπο επανασυγκολεείται.
26. **CIITA.1-790/pEGFP-CI:** Στην KpnI θέση του φορέα κλωνοποιείται το KpnI κομμάτι που απομονώνεται από την αντίστοιχη πέψη του φορέα CIITA/pEGFP-CI.
27. **CIITA.1-979/pEGFP-CI:** Ο φορέας CIITA/pEGFP-CI πέπτεται με το ένζυμο BamHI και ξανακλείνει.
28. **CIITA.980-1130/pEGFP-CI:** Ο φορέας CIITA/pEGFP-CI πέπτεται με BglIII και μερικώς με BamHI γίνεται γέμισμα με το ένζυμο Klenow και επανασυγκόληση.
29. **pCAF/pEGFP-CI:** Ο φορέας pCAF/pCX πέπτεται με EcoRI και KpnI (φαγωμένη και γεμισμένη με Klenow) και το κομμάτι του pCAF κλωνοποιείται στις θέσεις EcoRI-SmaI του νέου φορέα.

4.3. Πλασμιδιακές κατασκευές στον προκαρυωτικό φορέα έκφρασης pGEX (Pharmacia Biotech).

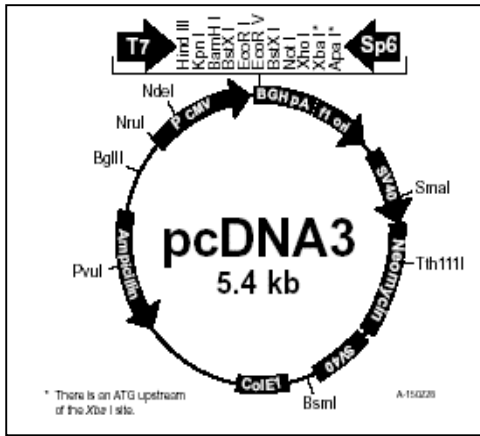
1. **CIITA/pGEX-4T1:** Το συνολικό CIITA σαν EcoRI-XhoI κομμάτι κλωνοποιείται στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα.
2. **CIITA.1-408/pGEX-4T1:** Το EcoRI-NotI κομμάτι του CIITA/pCDNA3 κλωνοποιείται σε αντίστοιχες θέσεις του pGEX-4T1.
3. **CIITA1-114/pGEX-4T1:** Τα πρώτα 114 αμινοξέα του CIITA σαν EcoRI-BamHI (γεμισμένη) κομμάτι από το φορέα CIITA1-114/pBXGI κλωνοποιείται στις θέσεις EcoRI-SmaI του φορέα.

4. **CIITA.1-129/pGEX-4T1:** Τα πρώτα 129 αμινοξέα του CIITA σαν EcoRI κομμάτι κομμένο μετά από πολλαπλασιασμό με τους εκκινητές: T7 και CIITA516.3': 5'-GCCGAATTCCATCTCCATACTCTCACCG-3' με υπόστρωμα CIITA/pcDNA3, κλωνοποιείται στην EcoRI θέση του φορέα.
5. **CIITA.1-80/pGEX-4T1:** Τα πρώτα 80 αμινοξέα του CIITA με άκρα EcoRI-XhoI κλωνοποιημένα στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σε υπόστρωμα CIITA/pcDNA3 ήταν οι T7 και CIITA.80.3': 5'-GCCCTCGAGCCTGCTGAACTGGTCGCA-3'.
6. **CIITA.75-114/pGEX-4T1:** Το αντίστοιχο κομμάτι και με άκρα EcoRI-XhoI κλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι CIITA.75.5': 5'-GCCGAATTCTGCGACCAGTTCAGCAGG-3' και CIITA.114.3': 5'-GCCCTCGAGCAGGCCCTCCAGCAGGA-3'.
7. **CIITA.115-151/pGEX-4T1:** Το αντίστοιχο κομμάτι με άκρα EcoRI-XhoI κλωνοποιημένα στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι CIITA.115.5': 5'-GCCGAATTCAGCAAGGACATTTTCAAG-3', και CIITA.569.3': 5'-GCCCTCGAGGAAGCTCCTCTGGGAAGGG-3'.
8. **CIITA.75-151/pGEX-4T1:** Το αντίστοιχο κομμάτι με άκρα EcoRI-XhoI κλωνοποιημένο στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι CIITA.75.5': 5'-GCCGAATTCTGCGACCAGTTCAGCAGG-3' και CIITA.569.3': 5'-GCCCTCGAGGAAGCTCCTCTGGGAAGGG-3'.
9. **CIITA.75-307/pGEX-4T1:** Το αντίστοιχο κομμάτι με άκρα EcoRI-XhoI κλωνοποιημένο στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι CIITA.75.5': 5'-GCCGAATTCTGCGACCAGTTCAGCAGG-3' και CIITA.1036.3': 5'-GCCCTCGAGGGAGGTCAGGGCAGGTTC-3'.
10. **CIITA.75-408/pGEX-4T1:** Το αντίστοιχο κομμάτι με άκρα EcoRI-XhoI κλωνοποιημένο στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι CIITA.75.5': 5'-GCCGAATTCTGCGACCAGTTCAGCAGG-3' και CIITA.C: 5'-GCACAGCAATCACTCGTGTCTC-3'.
11. **CIITA.129-174/pGEX-4T1:** EcoRI κομμάτι μετά από πολλαπλασιασμό με τους εξής εκκινητές: CIITA.499.5': 5'-GCCGAATTCGGTGAGAGTATGGAGATGC-3' και CIITA.637.3': 5'-GCCGAATTCTCCACTAGGAGACTGCC-3', κλωνοποιείται στην EcoRI θέση του φορέα.
12. **CIITA.1-174/pGEX-4T1:** Τα πρώτα 174 αμινοξέα του CIITA σαν EcoRI κομμάτι κλωνοποιούνται στην αντίστοιχη θέση του φορέα pGEX-4T1. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για το κομμάτι είναι: T7 και CIITA.637.3': 5'-GCCGAATTCTCCACTAGGAGACTGCC-3'.
13. **CIITA.175-307/pGEX-4T1:** Το αντίστοιχο κομμάτι του CIITA με άκρα EcoRI-XhoI κλωνοποιείται στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι: CIITA.638.5': 5'-GCCGAATTCAGTGAGCGACTGCTCC-3', CIITA.1036.3': 5'-GCCCTCGAGGGAGGTCAGGGCAGGTTC-3'.
14. **CIITA.1-298/pGEX-4T1:** Από την κατασκευή CIITA1-408/pGEX-4T1 αφαιρείται το SphI-NotI κομμάτι του CIITA και μετά επανασυγκολύμε (Klenow 3'-5' εξωνουκλεόλυση και μετά γέμισμα).
15. **CIITA.115-307/pGEX-4T1:** Το αντίστοιχο κομμάτι με άκρα EcoRI-XhoI κλωνοποιημένο στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι CIITA.115.5': 5'-GCCGAATTCAGCAAGGACATTTTCAAG-3' και CIITA.1036.3': 5'-GCCCTCGAGGGAGGTCAGGGCAGGTTC-3'.
16. **CIITA.115-408/pGEX-4T1:** Το αντίστοιχο κομμάτι με άκρα EcoRI-NotI κλωνοποιημένο στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι CIITA.115.5': 5'-GCCGAATTCAGCAAGGACATTTTCAAG-3' και CIITA.C: 5'-GCACAGCAATCACTCGTGTCTC-3'.
17. **CIITA.175-408/pGEX-4T1:** Το αντίστοιχο κομμάτι του CIITA με άκρα EcoRI-NotI κλωνοποιείται στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: CIITA.638.5': 5'-GCCGAATTCAGTGAGCGACTGCTCC-3', και CIITA.C: 5'-GCACAGCAATCACTCGTGTCTC-3'.
18. **CIITA.298-408/pGEX-3X:** Το SphI-NotI κομμάτι του CIITA (φάγωμα και γέμισμα με Klenow) κλωνοποιείται στην SmaI θέση του pGEX-3X.
19. **CIITA408-978/pGEX-4T1:** Απομονώνουμε το BamHI κομμάτι από το πλασμίδιο Δ408/pGEX-4T1 και το κλωνοποιούμε στην BamHI θέση του pGEX-4T1.

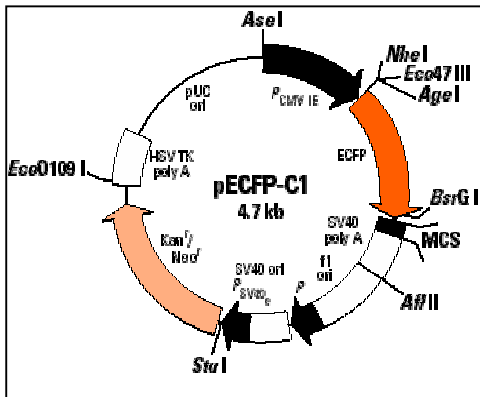
20. **CIITA790-978/pGEX-3X:** Από CIITA.IVS/pcDNA3 απομονώνουμε το KpnI-BamHI κομμάτι (φάγωμα, γέμισμα με Klenow) και κλωνοποιούμε στην SmaI θέση του pGEX-3X.
21. **CIITA.800-1130/pGEX-4T1:** Στις θέσεις EcoRI-XhoI του φορέα κλωνοποιείται το κομμάτι που πολλαπλασιάζεται με τους εκκινητές: CIITA.800.5': 5'-GCCGAATTCACACTGCGGGCGCGGCAG-3' και CIITA.stop: 5'-GCCGGATCCTCGAGCTCAGGCTGATCCGTGA-3'.
22. **pCAF/pGEX-3X:** Το EcoRI-KpnI(klenow 3'-5' εξωνουκλεολυμένο) κομμάτι του Flag.pCAF/pCX (Nakatani) κλωνοποιείται στην SmaI θέση του pGEX-3X.
23. **pCAF1-370/pGEX-3X:** Το EcoRI-DdeI κομμάτι του pCAF/pCX κλωνοποιείται στην SmaI θέση του pGEX-3X (Klenow).
24. **pCAF370-783/pGEX-3X:** Το DdeI κομμάτι του pCAF/pCX κλωνοποιείται στην SmaI θέση του pGEX-3X (Klenow).
25. **pCAF.1-525/pGEX-3X:** Το κομμάτι EcoRI-PvuII του pCAF γεμισμένο με Klenow κλωνοποιείται στη SmaI θέση του φορέα.
26. **pCAF.1-654/pGEX-3X:** Από το φορέα pCAF/pGEX-3X απομονώνουμε το κομμάτι με BamHI άκρα και το κλωνοποιούμε στην BamHI θέση του pGEX-3X.
27. **pCAF.653-736/pGEX-4T1:** Το αντίστοιχο κομμάτι με άκρα EcoRI-XhoI κλωνοποιείται στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι pCAF.653.5': 5'-GCCGAATTCGCGATCCCGTACACAG-3' και pCAF.736.3': 5'-GCCCTCGAGGAGGATGCTCTTGAGCG-3'.
28. **pCAF.737-832/pGEX-4T1:** Το αντίστοιχο κομμάτι με άκρα EcoRI-XhoI κλωνοποιημένο στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι pCAF.737.5': 5'-GCCGAATTCAGCAGGTGAAGAGCCATC-3' και pCAF.3': 5'-GCCCTCGAGTCACTTGTCAATTAATC C-3'.
29. **pCAF.768-832/pGEX-4T1:** Το αντίστοιχο κομμάτι με άκρα EcoRI-XhoI κλωνοποιημένο στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι pCAF.768.5': 5'-GCCGAATTCATGGATCTCAAAACCATG-3' και pCAF.3': 5'-GCCCTCGAGTCACTTGTCAATTAATCC-3'.
30. **hGCN5/pGEX-4T1:** Το cDNA του ανθρώπινου GCN5 με EcoRI άκρα κλωνοποιείται στην αντίστοιχη θέση του φορέα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι hGCN5.5': 5'-GGAATTCTACAATCATGGACTAC-3' και hGCN5.3': 5'-GGAATTCCTACTTGTCAATG AGGC C-3' και σαν υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε ο φορέας hGCN5/pCX (από Y.Nakatani).

4.4. Πλασμιδιακές κατασκευές στο φορέα έκφρασης pBXG1. Φορέας για την έκφραση σε ευκαρυωτικά κύτταρα, πρωτεϊνών σε σύντηξη με την περιοχή πρόσδεσης της πρωτεΐνης GAL4.

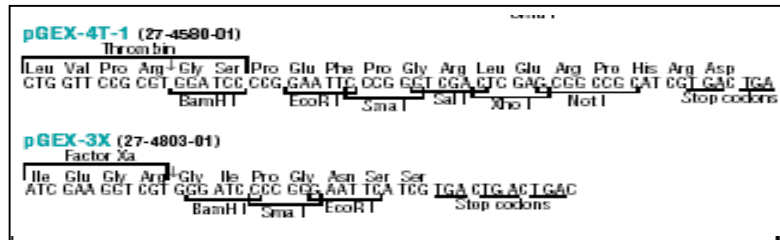
1. **CIITA/pBXGI:** Το CIITA cDNA σαν EcoRI-XbaI κομμάτι κλωνοποιημένο στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα.
2. **CIITA.Δ102/pBXGI:** Η έλλειψη του CIITA χωρίς τα πρώτα 102 αμινοξέα σαν κομμάτι με άκρα EcoRI-XhoI γεμισμένα με Klenow-I κλωνοποιείται στη θέση SmaI του φορέα.
3. **CIITA.Δ408/pBXGI:** Το έλλειμμα του CIITA σαν EcoRI-XbaI κομμάτι κλωνοποιείται στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα.
4. **CIITA1-408/pBXG1:** Τα πρώτα 408 αμινοξέα του CIITA σαν EcoRI-NotI (γεμισμένη με Klenow) κομμάτι κλωνοποιημένο στις θέσεις EcoRI-SmaI του φορέα.
5. **CIITA1-114/pBXG1:** Τα πρώτα 114 αμινοξέα του CIITA σαν EcoRI-EcoNI (γεμισμένη με Klenow) κομμάτι κλωνοποιημένο στις θέσεις EcoRI-SmaI του φορέα.



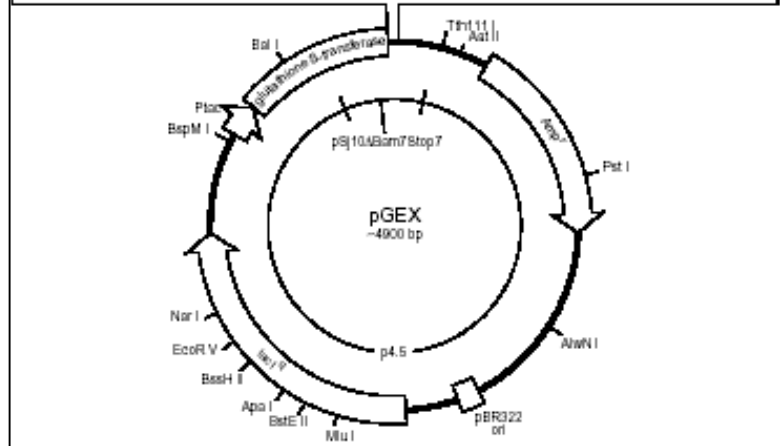
Φορέας έκφρασης σε ευκαρυωτικά κύτταρα **pcDNA3**
 (www.invitrogen.com/contents/vectors/pcDNA3)



Φορέας έκφρασης σε ευκαρυωτικά κύτταρα **pEGFP-C1** φέρον την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη, για καρβοξυτελικές συντήξεις πρωτεϊνών.
 (www.clontech.com)



Φορέας έκφρασης **pGEX**- σε προκαρυωτικά κύτταρα, πρωτεϊνών σε σύντηξη με την πρωτεΐνη GST.
 (www.Amershambiosciences.com)



5. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΟΥ DNA.

5.1. Αλυσιδωτή αντίδραση DNA πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction PCR). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο γεγονός πολλαπλασιασμού οποιασδήποτε αλληλουχίας DNA *in vitro*, με τη χρήση μιας ελάχιστης ποσότητας DNA-μήτρας και δύο ολιγονουκλεοτιδίων εναρκτών που υβριδοποιούν εκατέρωθεν της αλληλουχίας DNA που ενδιαφέρει, στις δύο συμπληρωματικές αλυσίδες. Επίσης η μέθοδος αξιοποιεί την ικανότητα DNA πολυμερασών από θερμοφίλους οργανισμούς να «αντέχουν» σε υψηλές θερμοκρασίες και έτσι να παρίστανται σε όλα τα στάδια της αντίδρασης, χωρίς να χάνουν την αποτελεσματικότητά τους να πολυμερίζουν DNA.

Μια τυπική αντίδραση περιλαμβάνει 5ng DNA μήτρας, 1X ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (50mM KCl, 10mM Tris-Cl pH 8.4), 1-1.5mM MgCl₂, 0.2 mM δεοξυ-νουκλεοτιδίων dNTPs, 0.5u θερμοσταθερής πολυμεράσης Taq και 20 pmole από κάθε ένα ολιγονουκλεοτίδιο- εκκινήτη (primer). Τα συστατικά θερμαίνονται για 5 λεπτά στους 100°C (αποδιάταξη), και στη συνέχεια υποβάλλονται σε 25-30 κύκλους που περιλαμβάνουν διαδοχικά στάδια αποδιάταξης, υβριδοποίησης των εκκινήτων στις αλληλουχίες στόχους της μήτρας σε κατάλληλη θερμοκρασία, και επιμήκυνσης των νέων αλυσίδων στους 72°C. Σε ένα τρίτο στάδιο ακολουθεί η ολοκλήρωση των ήδη υπαρχόντων αλυσίδων στους 72°C για 10 λεπτά. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινήτων στις αλληλουχίες στόχους της μήτρας υπολογίζεται σύμφωνα με τον μαθηματικό τύπο

$$T_d = T_m - 13 \text{ και}$$

$$T_m = 81.5 - 16.6 (\log [Na^+]) + 41.5 (\%G-C) - 600/N \text{ όπου } N \text{ είναι ο αριθμός των βάσεων του εκκινήτη.}$$

5.2. Προσδιορισμός της πρωτοταγούς νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μορίων DNA (DNA sequencing analysis). Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του τετρατισμού της επιμήκυνσης του DNA, μέσω της ενσωμάτωσης τριφωσφορικών δι-δεοξυ νουκλεοτιδίων (dideoxy chain termination method) των Sanger et al. Σαν μήτρα χρησιμοποιήθηκε υπερελικωμένο πλασμιδιακό DNA και η σήμανση των μορίων έγινε με [³⁵S]-dATP. Στις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο Sequenase version 2.0 από την USB, η οποία είναι τροποποιημένη πολυμεράση T7. Για την διαδικασία ακολουθήθηκαν οι οδηγίες της προμηθεύτριας εταιρείας που περιέχονται στο σχετικό εγχειρίδιο.

5.3. Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής. Κύτταρα HeLa, Raji, RJ2.2.5 ή κάθε άλλος κυτταρικός τύπος συλλέγονται και πελετάρωνται, οπότε μπορούν να αποθηκευτούν στους -80°C για μεγάλο χρονικό διάστημα. Τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 0.5-1ml Trizol (Gibco-BRL) και παρασκευάζεται RNA σύμφωνα με τις υποδείξεις της εταιρείας. Αναφέρω ότι αυτή η μέθοδος παρασκευής RNA είναι σύντομη (30 λεπτά) και πολύ αξιόπιστη για όσες φορές χρησιμοποιήθηκε. 27.5μl από 2μg RNA με 200ng εξαμερών εκκινήτων τυχαίας αλληλουχίας ζεσταίνονται για 7 λεπτά στους 65°C. Ακολουθεί επώαση στον πάγο και φυγοκέντρηση. Προστίθενται 12.5μl από ένα μίγμα που περιέχει [8μl διαλύματος αντίστροφης μεταγραφής(5x), 2μl dNTPs (10mM), 0.5μl RNAsin(20U/μl)]. Το μίγμα επωάζεται για 2 ώρες στους 37°C. Για ανάλυση, σε 2.5μl αυτού του διαλύματος πραγματοποιείται αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με τους κατάλληλους εκκινήτες. Αναφέρω ότι όλοι οι εκκινήτες που κατασκευάστηκαν για ανάλυση δειγμάτων με αντίστροφη μεταγραφή έχουν αντίδραση αλληλεπίδρασης με το υπόστρωμα (T-annealing) 64°C. Καταγράφω αναλυτικά τις θέσεις πρόσδεσης των ειδικών εκκινήτων για την αναγνώριση των διαφορετικών τύπων του CIITA που εκφράζονται στους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους. Αλληλουχία των διαφορετικών εκκινήτων:

CIITA.CodI5': 5'-GCCATCAGCCCAGCCTGGTGC-3'

CIITA.CodIII5': 5'-ATGCGTTGCCTGGCTCCACGCC-3'

CIITA.CodIV5': 5'-CCAGAGCTGGCGGGAGGGAG-3'

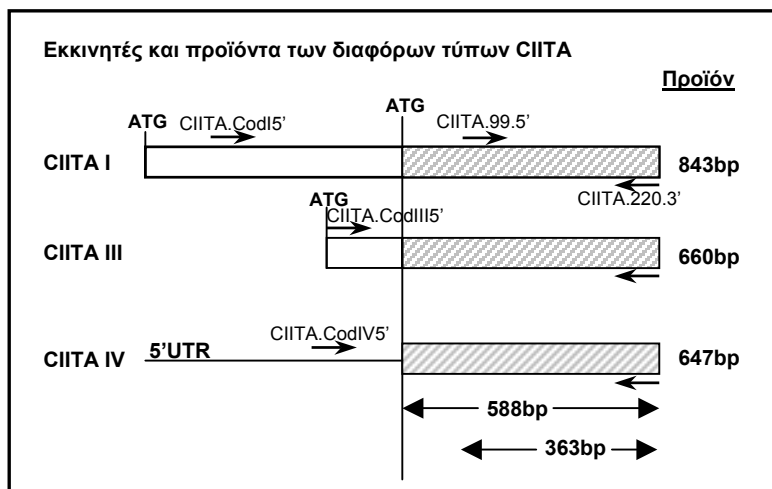
CIITA99.5': 5'-GCCGGAAGTGGACCAGTATGTCTTCC-3'

CIITA220.3': 5'-CAGGCAGCTCAACGAGGAAGTGGAG-3'

Για τη συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων οι συνθήκες για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι οι παρακάτω:

- 94°C, 5'
 - 94°C, 30"
 - 64°C, 1'
 - 72°C, 40"
 - 72°C, 5'
- } x 24 κύκλοι

Τα προϊόντα των αντιδράσεων τρέχουν σε 2% πήκτωμα αγαρόζης.



Ακόμη στα πειράματα ανίχνευσης έκφρασης διαφόρων γονιδίων με την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής RNA και αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκαν και τα παρακάτω ζεύγη εκκινητών:

Εκκινητές για την ανίχνευση του μηνύματος του γονιδίου DRA:

DRAexon4.5': 5'-GAGTTTGATGCTCCAAGCCCTCTCCCA-3'

DRAexon4.3': 5'-CAGAGGCCCCCTGCGTTCTGCTGCATT-3'

DRAexon1.5': 5'-GAACATGTGATCATCCAGGCCGAGTTC-3'

DRAexon2.3': 5'-GGGCTCTCTCAGTCCACAGGGCTG-3'

Εκκινητές για την ανίχνευση του μηνύματος του γονιδίου pCAF, σχεδιασμένοι στο καρβοξυτελικό άκρο του:

pCAF.RTC5': 5'-AGGTTCCCCATGGATCTGAAAACCATG-3'

pCAF.RTC3': 5'-CAGCTTCCTTAATTTTACTGAAGAAGAA-3'

Εκκινητές για την ανίχνευση του mRNA μηνύματος από το γονίδιο GCN5L1 (κοντή μορφή) και GCN5L2 (μακρά μορφή):

GCN5L2.RT5': 5'-ATGGCGGAACCTTCCCAGGCCCC-3'

GCN5L2.RT3': 5'-GCCATTACACTTACAGGTTCCATTGGCC-3'

GCN5L1.cod5': 5'-ATGGCCCCGGGAGCCGAGGTGAGCG-3'

GCN5L1.cod3': 5'-CTAGGAAGGGGCAGACTGCAGCTG-3'

Εκκινητές για την ανίχνευση του μηνύματος mRNA από τα γονίδια IRF1 και STAT1:

IRF1.RT.5': 5'-ATGCCCATCACTCGGATGCGC-3'

IRF1.RT.3': 5'-GGCACAGCGAAAGTTGGCCTTCCACG-3'

STAT1.RT.5': 5'-ATGTCTCAGTGGTACGAACCTCAGCAGC-3'

STAT1.RT.3': 5'-CCAGTTTCTTGGCCCGCGGAGC-3'

STAT1.RT.3': 5'-GACATCTGGATTGGGTCTTCTG-3'

5.4. In vitro μεταλλαξογέννεση Σημειακές μεταλλαγές στο cDNA του γονιδίου CITA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο και τα υλικά από την εταιρεία Promega. Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το “GeneEditor in vitro site-directed mutagenesis system”. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία των σημειακών μεταλλαγών ήταν οι παρακάτω:

ML1: 5'-CAGCGATGCTGACCCCGCGTGCCTACCACTTCTATGA-3'

ML2: 5'-CCCTGCTCCGCCCGGGGGCGGCGGCCCGCCTTTTCC-3'

ML3: 5'-CTGCTCCGAGGTTGCACCGCCGCCACAGCCCGGCCCGGGGC-3'

F961S:5'- AAGAACTGGAGTCTGCGCTGGGCCCT-3'

mGTP2: 5'- GAGCAGATCCTGCAGCCCCGGACGGTTCAAG-3'

mNLS1:5'- GGAGCTCCCTGCTGTTGGGGCCCCATCGATACTGGAGTTTGCCTGG-3'

K141.144A: 5'-GTTGGGCAGGCAAGTCAGGCAAGACCCTTC-3'

K156.159A: 5'-GCAGACCTGGCGCACTGGGCGCCAGCTGAG-3'

KK141.144RR: 5'-GTTGGGCAGAGAAGTCAGAGAAGACCCTTCCC-3'

KK156.159RR: 5'-GGCAGACCTGAGGCACTGGAGGCCAGCTGAGC-3'

K141R: 5'-GTTGGGCAGAGAAGTCAGAAAAG-3'

K144A: 5'-AAAAGTCAGGCAAGACCCTTCCC-3'

K144Q: 5'-AAAAGTCAGCAAAGACCCTTCCC-3'

K144R: 5'-AAAAGTCAGAGAAGACCCTTCCC-3'

FDA50: 5'-CTCTACCACGCCTATGCCCAGATGGACC-3'

Όλες οι κατασκευές επιβεβαιώθηκαν με αλληλούχιση της πρωτοταγούς δομής του DNA. Η έκφραση των αντίστοιχων πρωτεϊνών επιβεβαιώθηκε με Western Blot και ανοσοφθορισμό.

5.5. Κλωνοποίηση των πρωτεϊνών του ενισχυσώματος. Οι πρωτεΐνες NFYA, NFYB, NFYC, κλωνοποιήθηκαν από cDNA βιβλιοθήκη με τη μέθοδο του PCR χρησιμοποιώντας τα αντίστοιχα ζεύγη εκκινητών:

NFYA5': 5'-ATGGAGCAGTATACAGCAAACAGCAA-3'

NFYA3': 5'-TTAGGACACTCGGATGATCTGTGTCAT-3'

NFYB5': 5'-ATGACAATGGACGGCGACAGCTC-3'

NFYB3': 5'-TCATGAAAACCTGAATTTGCTGGACACC-3'

NFYC5': 5'-ATGTCCACAGAAGGAGGGTTTGG-3'

NFYC3': 5'-TCAGTCTCCAGTCACCTGGGG-3'

Ο φορέας έκφρασης για την πρωτεΐνη RFX5 ήταν προσφορά από τον Dr. Santa Ono, ο φορέας για την έκφραση της πρωτεΐνης RFXAP ήταν προσφορά από τον Dr. Jeremy Boss, ο φορέας έκφρασης για την πρωτεΐνη RFXANK ήταν προσφορά από τον Dr. Phillip Tschlis, και ο φορέας έκφρασης για την πρωτεΐνη CREB ήταν προσφορά του Δρ. Δημήτρη Θάνου.

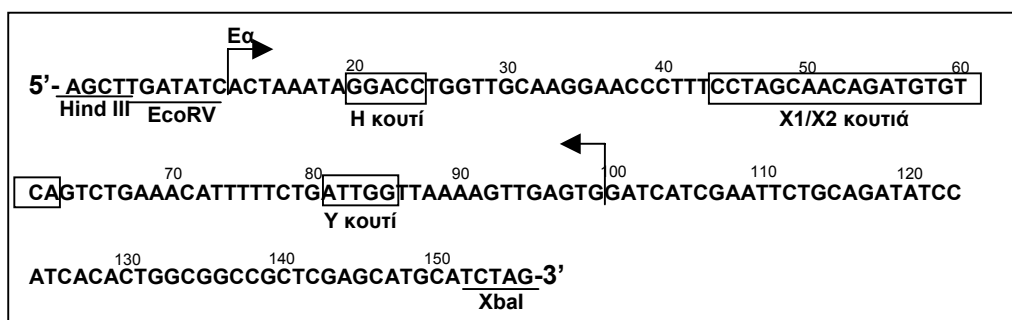
6. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ-DNA.

6.1. Έλεγχος ικανότητας πρόσδεσης απομονωμένης πρωτεΐνης, με αποδιατακτικές συνθήκες, σε σημασμένο δίκλωνο ολιγονουκλεοτίδιο. Η υπό μελέτη πρωτεΐνη, αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου, για 20 λεπτά να προσδεθεί στο κατάλληλο σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο σε ένα διάλυμα που περιέχει 2μlτ διάλυμα πρόσδεσης (50% γλυκερόλη, 100mM Tris-HCl pH 7.4, 500mM NaCl, 10mMEDTA) 2μlτ BSA (10mg/ml stock), 2μlτ DTT (20mM stock), 2μlτ NP40 (0.1%stock), 50-100ng poly-dI/dC σε τελικό όγκο 20 μlτ. Τρέχουμε τα δείγματα σε 4-6% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (29:1) με 0.5X TBE , και 300Volts το μέγιστο. Η πρωτεΐνη αραιώνεται πριν αλληλεπιδράσει με το ολιγονουκλεοτίδιο με ένα διάλυμα που περιέχει 100mM KCl, 10% γλυκερόλη, 0.1mM EDTA, 0.1% NP40, 0.5mM PMSF, 1mM DTT και 25mM Hepes pH 7.9. Στην περίπτωση που χρησιμοποιήσαμε τις τάξης II πρωτεΐνες του ενισχυσώματος δεν χρησιμοποιούμε poly-

dI/dC γιατί κατέστρεφε τα σύμπλοκα των πρωτεϊνών.

6.2. In vitro αποτύπωμα με το ένζυμο DNase I. Η κατάλληλη πρωτεΐνη ή το σύμπλοκο πρωτεϊνών υπό μελέτη αφήνονται να αλληλεπιδράσουν με το κατάλληλα ραδιοσημασμένο τμήμα δίκλωνου DNA για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε ένα διάλυμα που περιέχει 2μl BSA (10mg/ml stock), 100ng dG:dC, 2μl 10xFootprinting Buffer (100mM Tris-HCl pH 8.0, 150mM Hepes pH 7.9, 500mM NaCl, 50mM MgCl₂, 10mM DTT, 50% γλυκερόλη), και νερό μέχρι τελικό όγκο 20μl. Μετά το πέρας του χρόνου αλληλεπίδρασης προσθέτουμε 2μl αραιωμένη DNaseI (αραίωση σε διάλυμα 50mM CaCl₂, 20mM Hepes pH 7.9) και επωάζουμε στον πάγο ακριβώς 5 λεπτά. Προσθέτουμε 200μl διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης (200μl 2.5M NH₄OAc, 2.5μg ssDNA για κάθε αντίδραση) και 600μl αιθανόλη, αναδεύουμε και επωάζουμε στους -70°C για 15 λεπτά. Κατακρημνίζουμε το DNA και το επαναδιαλύουμε σε DNA loading buffer, το ζεσταίνουμε στους 60°C για 20 λεπτά για να επαναδιαλυθεί και το βράζουμε για 2 λεπτά πριν το φορτώσουμε σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης με Ουρία.

Στα in vitro αποτυπώματα με το ένζυμο DNaseI που υποδεικνύονται στο κείμενο το ραδιοσημασμένο τμήμα DNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο ενισχυτής του τάξης II γονιδίου Ea του ποντικού το οποίο ήταν ραδιοσημασμένο είτε στο 5' άκρο του όπου διαθέτει μια HindIII θέση, είτε στο 3' άκρο του όπου διαθέτει μια XbaI θέση. Η αλληλουχία του τμήματος DNA που αναφέραμε παρατίθεται:



6.3. In vitro στρατολόγηση πρωτεϊνών (ανασυνδιασμένων ή από πυρηνικά κυτταρικά εκχυλίσματα) σε τμήμα DNA. Δίκλωνο DNA που φέρει στο 5' άκρο του κατάλοιπο βιοτίνης προσδέθηκε σε μαγνητικά σφαιρίδια που έφεραν στρεπταβιδίνη αφού πρώτα πλύθηκαν τρεις φορές με το παρακάτω διάλυμα (5mM Tris-HCl pH 7.6, 0.5mM EDTA, και 1M NaCl. Μετά από αλληλεπίδραση για 30 λεπτά έγινε ένα πλύσιμο με νερό και τα σφαιρίδια με το DNA επαναδιαλύθηκαν σε BC100 [833μl KCl (3M stock), 500μl Hepes pH 7.9 (1M stock), 5ml γλυκερόλη (100% stock), 10μl EDTA (0.5M stock), 12.5 μl DTT (1M stock), 125μl PMSF (100mM stock)]. Στα μαγνητικά σφαιρίδια με το προσδεμένο DNA έγινε η προσθήκη ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών ή κυτταρικών εκχυλισμάτων και προστέθηκαν 300μl διαλύματος BC-100 που περιείχε 0.01% Triton-X100, και 100mg/ml BSA. Ακολούθησε ανάδευση για 2 ώρες στο ψυγείο. Έγινε φυγοκέντρηση και πλύσιμο τρεις φορές με διάλυμα BC-100 που περιείχε 0.001% Triton. Ακολούθως τα δείγματα φορτώνονται για ανάλυση σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

Τα υποστρώματα δίκλωνου DNA που χρησιμοποιήθηκαν σ' αυτού του είδους τα πειράματα ήταν τα Βιοτίνη-DRA-ενισχυτής (ή Bio-DRA) και Βιοτίνη-DRA-κεντρικός υποκινητής (Bio-DRA-core). Το πρώτο κομμάτι DNA παρασκευάστηκε με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα ένα πλασμιδιακό φορέα που έφερε κλωνοποιημένο τον υποκινητή του DRA (DRA-CAT φορέας) και εκκινητές τον 5' [DRA-5' TCTTGTGTCCTGGACCCTTTCGCAAGAACCC 3'] και 3' [BioCAT-5' Bio.GAACGGTGGTATATCCAGTG 3']. Το δεύτερο κομμάτι DNA παρασκευάστηκε και αυτό χρησιμοποιώντας την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, σαν υπόστρωμα ένα πλασμιδιακό φορέα Sp73/CAT που φέρει κλωνοποιημένο τον κεντρικό (core) υποκινητή του DRA [αυτός δημιουργείται με την αλληλεπίδραση δύο ολιγονουκλεοτιδίων:

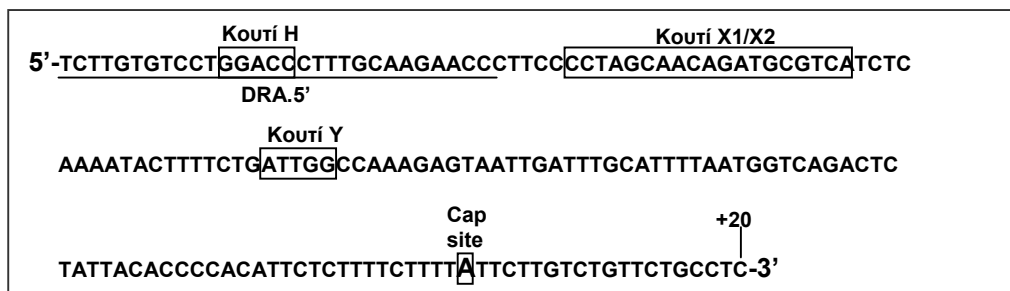
DRA.FW 5'GATCCATGGTCAGACTCTATTACACCCACATTCTCTTTTCTTTTATTCTTGTCTGTTCTGCCTC AT-3' και

DRA.REV 5'CGATGAGGCAGAACAGACAAGAATAAAAAGAAAAGAGAATGTGGGGTGTAAATAGAGTCTG

ACCATG-3']

στις θέσεις BamHI και ClaI, και τους εκκινητές T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' και BioCAT.

Η αλληλουχία του DNA κομματιού με τον DRA ενισχυτή είναι η εξής:



6.4. Πείραμα ανοσοκατακρήμνισης χρωματινής. Για κάθε υπό μελέτη περίπτωση απλώνουμε σε 1-3 (20cm) πιάτα, 2.5x10⁶ κύτταρα σε 25ml DMEM με 10%FBS και μεγαλώνουμε έως ότου τα κύτταρα καλύψουν το 60% της επιφάνειας κάθε πιάτου. Μονιμοποιούμε τα κύτταρα προσθέτοντας 1/10 του όγκου διάλυμα φορμαλδεΐδης 10% [φτιάχνεται διαλύοντας φορμαλδεΐδη 37% (σε τελική συγκέντρωση 10%) σε διάλυμα 0.1M NaCl, 1mM EDTA, 0.5mM EGTA, 50mM HEPES pH 8.0] απευθείας στο θρεπτικό υλικό. Κουνάμε τα πιάτα για να γίνει το διάλυμα ομογενές και επωάζουμε για 10-15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Σταματάμε την αντίδραση προσθέτοντας γλυκίνη σε τελική συγκέντρωση 0.125M. Ανακατεύουμε καλά και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Σ' αυτό το βήμα το θρεπτικό αλλάζει χρώμα προς το κίτρινο λόγω της μεταβολής του pH του διαλύματος. Πλένουμε τα κύτταρα τρεις φορές με κρύο PBS και μετά τα ξύνουμε και τα φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά. Επαναδιαλύουμε την πελέτα σε 5-10 ml διάλυμα λύσης (0.25% Triton X-100, 0.5% NP-40, 10mM EDTA, 0.5mM EGTA, 10mM Tris pH 8.0, 1mM PMSF) και επωάζουμε στον πάγο για 10 λεπτά ανακατεύοντας το διάλυμα κατά διαστήματα. Πελετάρουμε τους πυρήνες και τους επαναδιαλύουμε σε 5-10ml 0.2M NaCl, 1mM EDTA, 0.5mM EGTA, 10mM Tris pH 8.0, 1mM PMSF. Επωάζουμε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και πελετάρουμε τους πυρήνες. Επαναδιαλύουμε σε 2-4ml 1mM EDTA, 0.5mM EGTA, 10mM Tris pH 8.0, 1mM PMSF. Δρούμε με υπερήχους στο διάλυμα με επαναλήψεις συνολικής διάρκειας 250-300 δευτερόλεπτα. Στα ενδιάμεσα διαστήματα παγώνουμε καλά τα δείγματα. Ελέγχουμε τα δείγματα τρέχοντας 20μl από κάθε δείγμα σε 1.3 % πήκτωμα αγαρόζης. Η καλώς σπασμένη χρωματινή οφείλει να δώσει ένα εκτεταμένο smear από DNA. Το μέσο μέγεθος χρωματινής οφείλει να είναι 400-600bp. Απομακρύνουμε τις κυτταρικές μεμβράνες φυγοκεντρώντας σε υψηλές στροφές για 10 λεπτά. Προσθέτουμε στα δείγματα sarcosyl σε τελική συγκέντρωση 0.5% και επωάζουμε αναδεύοντας σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Προσθέτουμε CsCl ~0.568gr/ml και το επαναδιαλύουμε ζεσταίνοντας στους 37°C. Τοποθετούμε σε ανοικτό SW55 ρότορα, πλαστικά δοχεία (Beckman 1.2" x 2", #326819) και φυγοκεντρούμε στις 40.000 στροφές για 36-48 ώρες. Μετά την υπερφυγοκέντρωση στο δοχείο παρατηρείται ένα λευκό δαχτυλίδι από μεμβράνες. Τα συμπλέγματα DNA-πρωτεΐνης πρέπει να τοποθετούνται κάτω από το δαχτυλίδι. Αφαιρούμε σταδιακά μικρά τμήματα της υδατικής φάσης και τα κρατάμε χωριστά. Επιβεβαιώνουμε την ύπαρξη συμπλόκων DNA-πρωτεΐνης σε κάθε μέρος που αφαιρέθηκε τρέχοντας 30μl σε 1% πήκτωμα αγαρόζης. Ελέγχουμε για φθορισμό λόγω της ύπαρξης DNA. Ενώνουμε τα μέρη του διαλύματος που φέρουν τα σύμπλοκα και επιδρούμε με διαπίδυση για 16 ώρες εναντίον διαλύματος 10mM Tris pH 8.0, 1mM EDTA, 0.5mM EGTA, 5% γλυκερόλη. Χρησιμοποιούμε 1Lt διαλύματος διαπίδυσης με μία ενδιάμεση αλλαγή. Μετά τη διαπίδυση φωτομετρούμε τα δείγματα στα 260nm και σε 2M NaCl. Πραγματοποιούμε ανοσοκατακρήμνιση στα 500μl χρησιμοποιώντας 20μg χρωματινής σε διάλυμα RIPA (1% Triton X-100, 0.1% DOC, 140mM NaCl, 1mM PMSF) και 10μg από το αντίσωμα που μας ενδιαφέρει. Επωάζουμε για 16 ώρες στο ψυγείο αναδεύοντας. Κατά τη διάρκεια του προηγούμενου βήματος επωάζουμε κολώνα Protein A ή G για 16 ώρες στο ψυγείο με 100μg/ml DNA από σπέρμα σολομού, και σε διάλυμα RIPA. Μετά ενώνουμε την κολώνα Protein A/G με την ανοσοκατακρημνισμένη χρωματινή (χρωματινή + αντίσωμα /RIPA) και επωάζουμε με ανάδευση στο ψυγείο για 3 ώρες. Πλένουμε 7 φορές την κολώνα με την ανοσοκατακρημνισμένη χρωματινή με διάλυμα RIPA που περιέχει 500mM NaCl αντί για 140mM και 100μg/ml tRNA από ζύμη. Μετά τα πλυσίματα

επαναδιαλύουμε την κολώνα σε 100μl διάλυμα TE (10mM Tris pH 8.0, 1mM EDTA) με 0.5% SDS και proteinase K 200μg/ml τελική συγκέντρωση. Επιδράζουμε στους 55°C για τρεις ώρες και 16 ώρες στους 65°C. Καθαρίζουμε τα δείγματα με φαινόλη και χλωροφόρμιο και κατακρημνίζουμε με αιθανόλη και 20μg γλυκογόνο για κάθε δείγμα. Επαναδιαλύουμε τις πελέτες σε 50μl διάλυμα TE pH 7.5. Για ανάλυση χρησιμοποιούμε 5μl από κάθε ανοσοκατακρημνισμένη χρωματίνη ενώ χρησιμοποιούμε και αντίστοιχη ποσότητα από DNA χρωματίνης που δεν έχει υποστεί ανοσοκατακρήμνιση για σύγκριση. Ακολουθεί ανάλυση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης είτε χρησιμοποιώντας ραδιενεργά νουκλεοτίδια και τρέξιμο σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης των προϊόντων, είτε χρησιμοποιώντας ανάλυση κατά Real-Time PCR.

Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές για τον υποκινητή του γονιδίου DRA, για την κωδική περιοχή και την 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου DRA. Επίσης για σύγκριση χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές για τον υποκινητή των γονιδίων της Ιντερφερόνης-β και του γονιδίου GAPDH. Υποδεικνύονται και οι υποκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για πειράματα στον υποκινητή P(IV) του CIITA.

DRA.prom5': 5'-TCTTGTGTCCTGGACCCTTTGCAAGAACCC-3'

DRA.prom3': 5'-CCCAATTACTCTTTGGCCAATCAGAAAAATATTTTG-3'

DRAexon3.5': 5'-GAGTTTGATGCTCCAAGCCCTCTCCCA-3'

DRAexon3.3': 5'-CAGAGGCCCCCTGCGTTCTGCTGCATT-3'

DRA.3'UTR.5': 5'-GGCACATGGAGGTGATGGTGTTCCTT-3'

DRA.3'UTR.3': 5'-ATAACCACTCTTGGGGTGGCTATAGG-3'

IFNb.prom5': 5'-GCTTTCCTTTGCTTTCCTCCCAAGTC-3'

IFNb.prom3': 5'-CCTTTCCTCCATGGGTATGGCC-3'

CIITA-IVchip_for.: 5'-CCACTGTGAGGAACCGAC-3'

CIITA-IVchip_rev: 5'-AGCAACCAAGCACCTACTG-3'

Οι συνθήκες για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιώντας ραδιενεργά νουκλεοτίδια είναι οι παρακάτω:

Ο συνολικός όγκος αντίδρασης ήταν 50μl και εμπεριέχοντο τα εξής (1/10 από 10xδιάλυμα πολυμεράσης, 2.5mM MgCl₂, 0.2μl Taq πολυμεράση, 0.025mM dNTPs, 400ng από κάθε εκκινητή, 0.25μl ³²P-dATP, 0.25μl ³²P-dCTP). Οι συνθήκες πολυμερισμού περιλαμβάνουν τα παρακάτω στάδια: 5λεπτά στους 94°C, και 24 επαναλήψεις από 30 δευτερόλεπτα στους 94°C, 30 δευτερόλεπτα στους 64°C, και 30 δευτερόλεπτα στους 72°C, και τέλος ακολουθεί ένα τελικό βήμα με 2 λεπτά στους 72°C. Στην αντίδραση μετά την ολοκλήρωσή της προστέθηκαν 10μl 6x διάλυμα φορτώματος (orange-G) και 20μl από τα 60μl έτρεξαν σε 5% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Η ένταση κάθε ειδικού σήματος ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση Phosphor Imager, οι ποσότητες εξομοιώθηκαν με βάση την ένταση δειγμάτων που δεν έχουν υποστεί ανοσοκατακρήμνιση και οι ανάλογες ποσότητες για κάθε δείγμα ξανατρέχτηκαν από την αρχή για να έχουμε τις τελικές εικόνες. Το κάθε πείραμα ανοσοκατακρήμνισης επαναλήφθηκε τουλάχιστον τρεις φορές για να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ρύθμιση της έκφρασης των τάξης II αντιγόνων ιστοσυμβατότητας από συνενεργοποιητές που αλληλεπιδρούν με το CIITA.

Αποτελέσματα

Το CBP ρυθμίζει θετικά την έκφραση των τάξης II αντιγόνων αλληλεπιδρώντας με το CIITA.

Η ρυθμιστική περιοχή του υποκινητή που είναι υπεύθυνη για την έκφραση των MHC τάξης II έχει όπως είδαμε αναγνωριστεί. Αυτή η περιοχή είναι αξιοσημείωτα πολύπλοκη και αποτελείται από μια σειρά λειτουργικών στοιχείων (H/W/S/Z, X, και Y) που είναι συντηρημένα τόσο στην αλληλουχία και την τοπολογία (σχετικές αποστάσεις μεταξύ τους) ανάμεσα στα διαφορετικά γονίδια του ανθρώπου και του ποντικού (Glimcher and Kara, 1992). Παρότι πολλοί από τους μεταγραφικούς παράγοντες που προσδένονται σ' αυτά τα στοιχεία έχουν χαρακτηρισθεί (Mach et al., 1996; Steimle et al., 1996), η παρουσία τους δεν είναι αρκετή για τη ρυθμιζόμενη έκφραση αυτών των γονιδίων.

Η εξειδίκευση στην έκφραση επιτυγχάνεται με τη στρατολόγηση στον υποκινητή του τάξης II συνενεργοποιητή (CIITA), ο οποίος δρα σαν ιστοειδικός συνενεργοποιητής και το πρότυπο έκφρασης του μοιάζει ακριβώς με το πρότυπο γονιδιακής έκφρασης των τάξης II γονιδίων. Δηλαδή η έκφραση του CIITA είναι συστατική στα B λεμφοκύτταρα και άλλους κυτταρικούς τύπους αντιγονοπαρουσίασης και είναι επαγόμενη από την IFN- γ σε ποικίλους κυτταρικούς τύπους (Mach et al., 1996; Steimle et al., 1996; Steimle et al., 1994). Η ενεργοποίηση του MHC τάξης II υποκινητή από το CIITA απαιτεί κυρίως την X1-X2 περιοχή και παράλληλα τα Y και H/W κουτιά (Riley et al., 1995; Zhou and Glimcher, 1995). Το CIITA δεν προσδένεται στο DNA από μόνο του αλλά στρατολογείται στον υποκινητή μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλα πρωτεϊνικά σύμπλοκα που περιλαμβάνουν τα RFX, NFY σύμπλοκα και τον CREB (Scholl et al., 1997). Η λειτουργική κατάτμηση του CIITA απεκάλυψε την ύπαρξη μιας αμινοτελικής όξινης περιοχής που δρα σαν αυτόνομη περιοχή ενεργοποίησης και μια καρβοξυτελική περιοχή που απαιτείται για τη στρατολόγηση του CIITA στους MHC τάξης II υποκινητές (Reith et al., 1994; Riley et al., 1995).

Παρότι υπάρχει μεγάλο ποσό πληροφορίας όσον αφορά τη θετική ρύθμιση των MHC τάξης II γονιδίων είτε στα B κύτταρα είτε σε άλλους κυτταρικούς τύπους που είναι επαγόμενοι από IFN- γ , ο μηχανισμός δράσης αρνητικά δρώντων παραγόντων δεν είναι απόλυτα κατανοητός. Πολλές ουσίες που αναστέλλουν την έκφραση των MHC τάξης II γονιδίων είναι γνωστές (Glimcher and Kara, 1992). Τα γλυκοκορτικοειδή και οι προσταγλανδίνες δρουν αρνητικά στην έκφραση των MHC τάξης II γονιδίων στα B κύτταρα (Celada et al., 1993; Glimcher and Kara, 1992; Ivashkiv et al., 1994; Schwiebert et al., 1995). Στα μακροφάγα, τα γλυκοκορτικοειδή, οι προσταγλανδίνες και οι IFN- α/β ανταγωνίζονται τη δράση της IFN- γ , η οποία μαζί με την Ιντερλευκίνη-4 είναι ο κύριος θετικός ρυθμιστής των MHC τάξης II γονιδίων (Fertsch-Ruggio et al., 1988; Glimcher and Kara, 1992). Η ογκοπρωτεΐνη E1A του αδενοϊού έχει ένα ισχυρό

ανασταλτικό αποτέλεσμα στην επαγόμενη από IFN- γ γονιδιακή ενεργότητα σε πολλά συστήματα, περιλαμβάνοντας και τα MHC τάξης II γονίδια (Gutch and Reich, 1991; Kalvakolanu et al., 1991).

Η ογκοπρωτεΐνη του αδενοϊού E1A είναι ένα μόριο με πλειοτροπική δράση ικανό να επηρεάσει την έκφραση πολλών γονιδίων του κυττάρου. Μερικά από τα αποτελέσματα του E1A έχουν αποδοθεί στις αλληλεπιδράσεις του με τους συνενεργοποιητές CBP και p300 (Janknecht and Hunter, 1996b; Shikama et al., 1997). Η αμινοτελική περιοχή και η συντηρημένη περιοχή 1 (CR1) του E1A έχει δειχθεί ότι ενέχονται στις αλληλεπιδράσεις με τις CH3 περιοχές των συνενεργοποιητών CBP και p300, οδηγώντας στην αναστολή της μεταγραφής από πολλούς κυτταρικούς ενισχυτές και υποκινητές που απαιτούν τους CBP-p300 (Arany et al., 1995; Eckner et al., 1994; Lundblad et al., 1995). Οι συνενεργοποιητές CBP-p300 αλληλεπιδρούν με ένα μεγάλο αριθμό ενεργοποιητών και ενδυναμώνουν την ενεργότητά τους στρατολογώντας τη βασική μεταγραφική μηχανή και ακετυλιώνοντας ιστόνες (Bannister and Kouzarides, 1996; Janknecht and Hunter, 1996b; Ogryzko et al., 1996; Shikama et al., 1997; Yang et al., 1996). Απ'τη στιγμή που μεταγραφικοί ενεργοποιητές που εμπλέκονται σε διαφορετικά μονοπάτια σηματοδότησης εξαρτώνται από το CBP-p300 για να εκφέρουν τη δράση τους, ο ανταγωνισμός για τις περιορισμένες ποσότητες CBP-p300 μπορεί να επηρεάσει την εξειδίκευση των κυτταρικών αποκρίσεων σε εξωκυτταρικά σήματα (Horvai et al., 1997; Kamei et al., 1996). Σε μια προσπάθεια να αναλύσουμε το μηχανισμό δράσης θετικά ή αρνητικά δρώντων παραγόντων, εξετάσαμε τη συμμετοχή του συνενεργοποιητή CBP στη ρύθμιση της έκφρασης των MHC τάξης II.

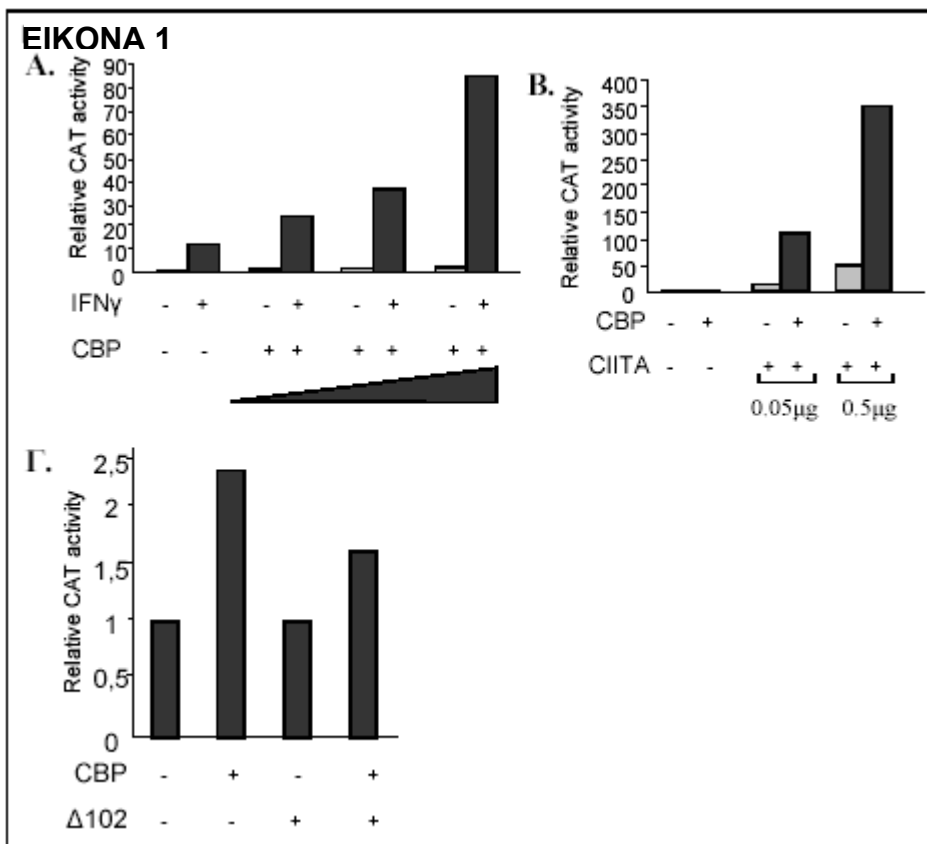
Στο κομμάτι που ακολουθεί δείχνουμε ότι το CBP απαιτείται τόσο για την επαγόμενη από IFN- γ όσο και τη συστατική στα B κύτταρα έκφραση των MHC τάξης II υποκινητών και ότι το E1A αναστέλλει και τα δύο μονοπάτια έκφρασης. Δείχνουμε ότι το CBP στρατολογείται στους MHC τάξης II υποκινητές αλληλεπιδρώντας με την αμινοτελική περιοχή ενεργοποίησης του CITA.

Το CBP απαιτείται για την CITA-εξαρτώμενη ενεργοποίηση των MHC τάξης II υποκινητών.

Έχουμε δείξει ότι τόσο η CR1 όσο και η αμινοτελική περιοχή του E1A απαιτούνται για την καταστολή της γονιδιακής έκφρασης των τάξης II. Είναι ενδιαφέρον ότι οι ίδιες περιοχές του E1A απαιτούνται για το πλειοτροπικό αποτέλεσμα του E1A σε πολλούς μη-σχετιζόμενους ενεργοποιητές. Αυτό το αποτέλεσμα οφείλεται στην αλληλεπίδραση του E1A με τους συνενεργοποιητές CBP/p300 (Arany et al., 1995; Eckner et al., 1994; Lundblad et al., 1995). Άρα, αρχικά μελετήσαμε εάν ο CBP ενέχεται στη ρύθμιση της έκφρασης των τάξης II γονιδίων. HeLa κύτταρα διαμολύνθηκαν παροδικά με την κατασκευή αναφοράς του τάξης II E α υποκινητή (-353 έως +14) σε σύντηξη με το CAT γονίδιο, μαζί με αυξανόμενες ποσότητες μιας κατασκευής που εξέφραζε CBP. Η ενεργότητα του CAT γονιδίου αναφοράς υπολογίστηκε σε εκχυλίσματα από κύτταρα που είχαν υποστεί ή δεν είχαν υποστεί την επίδραση της IFN- γ . Τα δεδομένα στην Εικόνα 1A δείχνουν ότι διαμόλυνση αυξανόμενων ποσοτήτων της κατασκευής CBP οδηγούν σε

ενίσχυση, με τρόπο εξαρτώμενο από την ποσότητα του πλασμιδίου, (πάνω από επτά φορές) της επαγόμενης από IFN- γ μεταγραφής και δεν είχε αξιοσημείωτη επίδραση (έως 2.2 φορές) στα επίπεδα έκφρασης. Άρα, ο συνενεργοποιητής CBP απαιτείται για τα μέγιστα επίπεδα της επαγόμενης από IFN- γ μεταγραφής των τάξης II.

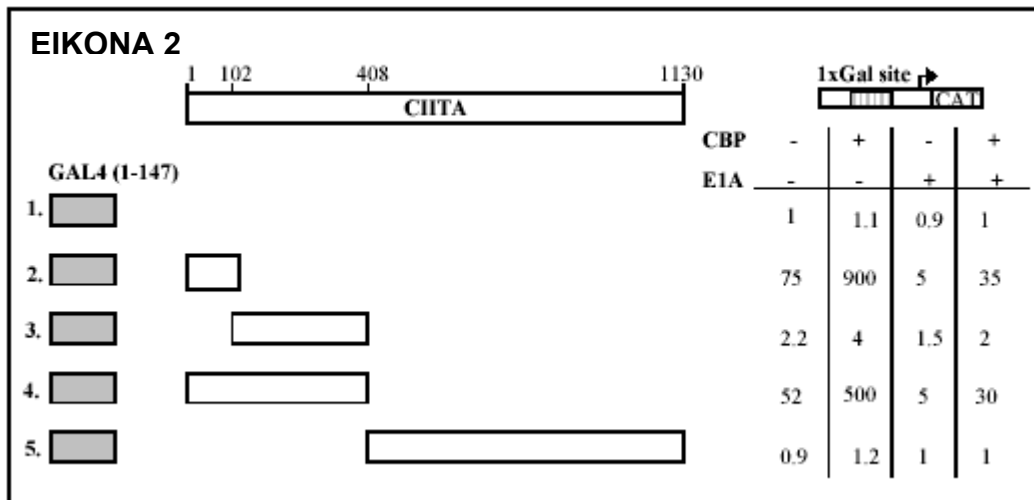
Το επόμενο που μελετήσαμε ήταν αν οι δύο συνενεργοποιητές, το CBP και ο C/PTA συνεργάζονται στο πλαίσιο του τάξης II υποκινητή. Τα αποτελέσματα στην Εικόνα 1B δείχνουν ότι διαμόλυνση είτε μικρών (50ng) είτε μεγάλων (500ng) ποσοτήτων μιας κατασκευής που εκφράζει C/PTA οδηγεί σε 11- και 51- φορές ενεργοποίηση, αντίστοιχα, του υποκινητή E α σε κύτταρα HeLa. Παρόλα αυτά η συνέκφραση του CBP με το C/PTA ενεργοποιούν τον E α υποκινητή 111- και 350-φορές, αντίστοιχα, οδηγώντας έτσι σε 7 με 10 φορές συνέργεια. Το γεγονός ότι το CBP μόνο του ελάχιστα επηρεάζει τον E α υποκινητή υποδεικνύει ότι η στρατολόγηση του CBP στον υποκινητή απαιτεί την παρουσία του C/PTA. Το C/PTA στρατολογείται στον υποκινητή είτε ακολουθώντας εκτοπική έκφραση ή με επαγωγή της σύνθεσής του από την IFN- γ . Έχει ήδη δειχθεί ότι αμινοτελικές ελλείψεις του C/PTA αποτυγχάνουν να ενεργοποιήσουν τους τάξης II υποκινητές και παρουσιάζουν μια αρνητική επικρατή δράση (Bontron et al., 1997; Zhou et al., 1997). Μια τέτοια έλλειψη του C/PTA που δεν διαθέτει τα 102 αμινοτελικά αμινοξέα (Δ 102), και δεν έχει μεταγραφική ενεργότητα, δεν μπορεί να συνεργαστεί με το CBP (Εικόνα 1Γ). Άρα, η ενδυνάμωση της δράσης του C/PTA στους τάξης II υποκινητές από το CBP, εξαρτάται από την παρουσία της αμινοτελικής περιοχής ενεργοποίησης του C/PTA.



Εικόνα 1: Το CBP ενισχύει τη δράση της IFN- γ και του C/PTA στους τάξης II υποκινητές. (A) Μετρήθηκε η CAT ενεργότητα από μη-επαγμένα και επαγμένα από IFN- γ HeLa κύτταρα διαμολυμένα με το φορέα E α CAT και την παρουσία ή την απουσία 1, 2 και 3 μ g μιας κατασκευής που εξέφραζε CBP. (B) CAT ενεργότητα του E α CAT υποκινητή σε HeLa κύτταρα μετά την διαμόλυνση C/PTA (0.05 ή 0.5 μ g), CBP (4 μ g), ή και τους δύο φορείς έκφρασης. (Γ) Ενίσχυση της δράσης του C/PTA από το CBP απαιτεί την αμινοτελική περιοχή ενεργοποίησης του C/PTA. CAT ενεργότητα του E α CAT υποκινητή σε HeLa κύτταρα μετά τη διαμόλυνση της έλλειψης του C/PTA Δ 102 (0.5 μ g), CBP (4 μ g), ή και των δύο φορέων έκφρασης.

Το CBP αλληλεπιδρά άμεσα με το CΙΠΤΑ.

Για να εξετάσουμε αν η συνέργεια ανάμεσα στο CΙΠΤΑ και το CBP στη μεταγραφική ενεργοποίηση των τάξης II υποκινητών οφείλεται στην απευθείας αλληλεπίδρασή τους, χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο προσέγγισης των δύο υβριδίων στα θηλαστικά. Διαφορετικά κομμάτια του CΙΠΤΑ συντήχθηκαν με την GAL4 περιοχή πρόσδεσης στο DNA, της ζύμης, και οι μεταγραφικές ενεργότητες αυτών των κατασκευών υπολογίστηκαν παρουσία ή απουσία συνδιαμολυνόμενου CBP με μια κατασκευή αναφοράς που περιείχε μία μόνο θέση πρόσδεσης για GAL4 πριν το CAT γονίδιο. Χιμαιρικές πρωτεΐνες που περιλαμβάνουν τις αμινοτελικές αμινοξικές αλληλουχίες 1-114 ή 1-408 του CΙΠΤΑ αυξάνουν τη γονιδιακή έκφραση της κατασκευής αναφοράς 75 και 52 φορές σε συμφωνία με άλλες αναφορές (Riley et al., 1995; Zhou and Glimcher, 1995), και αυτές οι ενεργότητες επιπλέον ενισχύθηκαν από το CBP πάνω από 900 και 500 φορές πάνω από τα βασικά επίπεδα έκφρασης, αντίστοιχα (Εικόνα 2, σειρές 3 και 4). Επιπλέον, το E1A καταστέλλει ισχυρά τη λειτουργία ενεργοποίησης των αμινοτελικών κομματιών του CΙΠΤΑ, τα οποία μερικώς αποκαθιστώνται από τη συνέκφραση του CBP (Εικόνα 2, σειρές 2 και 4). Τα τμήματα του CΙΠΤΑ που περιέχουν την περιοχή που καλύπτει τα αμινοξέα 102 έως 408 ή 408 έως 1130 δεν ενεργοποιούν τη μεταγραφή ούτε συνεργάζονται με το CBP (Εικόνα 2, σειρές 3 και 5). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα 102 αμινοτελικά αμινοξέα του CΙΠΤΑ ενέχονται στην αλληλεπίδραση με το CBP.



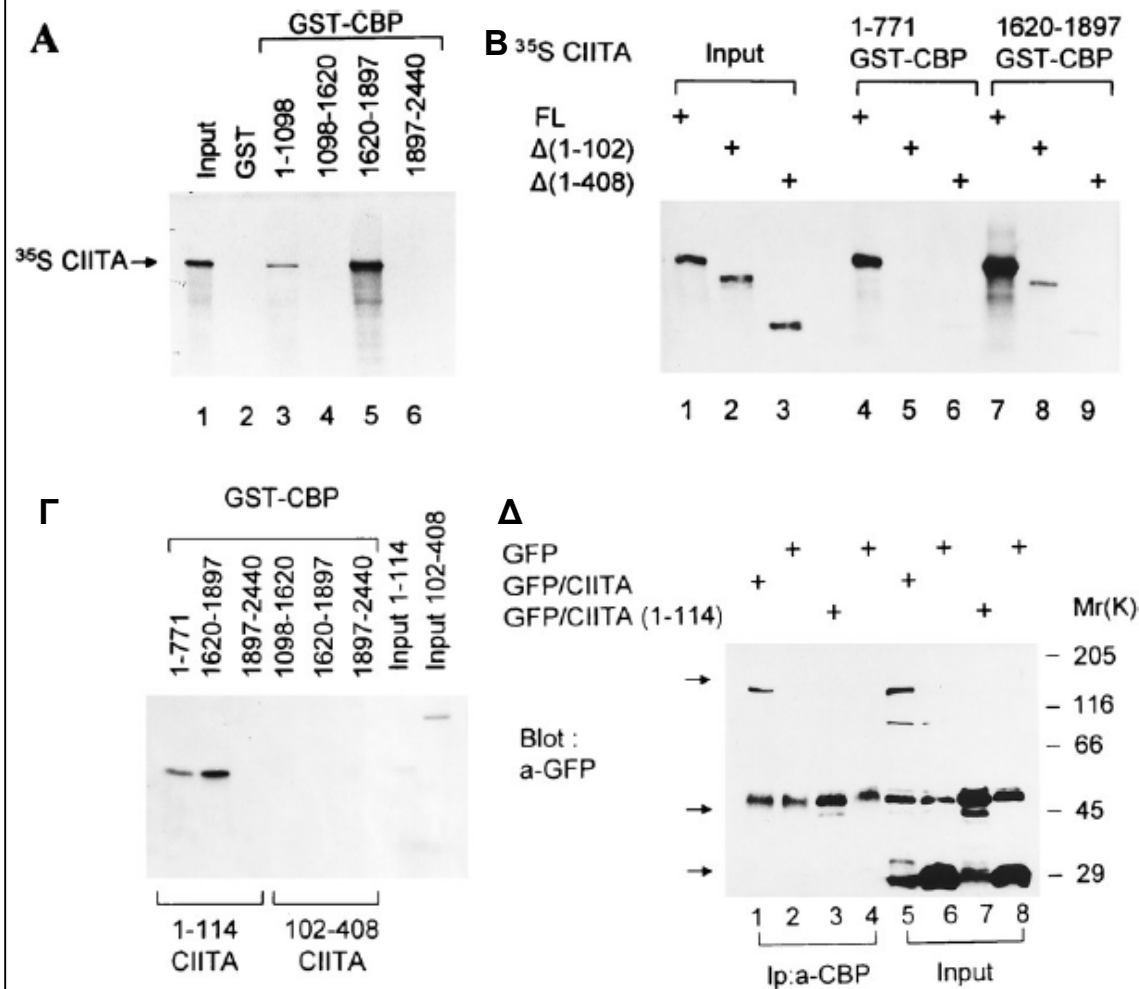
Εικόνα 2: Το CBP αλληλεπιδρά με την αμινοτελική περιοχή του CΙΠΤΑ. HeLa κύτταρα διαμολύνθηκαν παροδικά με 1μg φορέων που εξέφραζαν υβρίδια της GAL4 περιοχής πρόσδεσης στο DNA σε σύντηξη με τα υποδεικνυόμενα τμήματα του CΙΠΤΑ και 1.5μg μιας κατασκευής με γονίδιο αναφοράς το CAT που φέρει μια μόνο θέση πρόσδεσης GAL4 και υποδεικνύεται διαγραμματικά στην κορυφή της εικόνας. Τα αποτελέσματα είναι μέσοι όροι από πειράματα που έγιναν τουλάχιστον τρεις φορές σε HeLa κύτταρα στην παρουσία ή απουσία 6μg CBP και/ή φορέων έκφρασης για το E1A.

Πραγματοποιώντας πειράματα κατακρήμνισης με την πρωτεΐνη GST δείξαμε ότι υπάρχει φυσική αλληλεπίδραση του CΙΠΤΑ με το CBP. In vitro μεταφρασμένο και σημασμένο με ³⁵S-μεθειονίνη CΙΠΤΑ ελέγχθηκε για την ικανότητά του να αλληλεπιδρά ειδικά με διάφορα τμήματα του CBP συντηγμένα με

GST και προσδεμένα σε σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης. Βρήκαμε ότι το CITA αλληλεπιδρά με δυο διαφορετικές περιοχές του CBP. Η πρώτη, η οποία καλύπτει τα αμινοξέα 1620 έως 1897 (Εικόνα 3Α, λωρίδα 5), περιέχει την περιοχή πρόσδεσης του E1A στο CBP, ενώ η δεύτερη εντοπίζεται μέσα στα πρώτα 1098 αμινοξέα του CBP (Εικόνα 3Α, λωρίδα 3). Η εξειδίκευση στην πρόσδεση του CITA για αυτές τις αλληλεπιδράσεις ελέγχθηκε απ' την ανικανότητα του CITA να κατακρατείται από την πρωτεΐνη GST μόνη της (Εικόνα 3Α, λωρίδα 2) ή με άλλες περιοχές του CBP (Εικόνα 3Α, λωρίδες 4 και 6). Η αμινοτελική περιοχή του CBP που ήταν ικανή να αλληλεπιδρά με το CITA περιορίστηκε επιπλέον στα πρώτα 771 αμινοξέα του CBP. Τα αποτελέσματα στην Εικόνα 4B δείχνουν ότι η έλλειψη των αμινοτελικών 102 αμινοξέων του CITA μειώνουν δραματικά την ικανότητά του να αλληλεπιδρά και με τις δύο περιοχές του CBP (συγκρίνουμε τις λωρίδες 4 με 5 και 7 με 8). Επιπλέον, τα 102 αμινοτελικά αμινοξέα του CITA είναι ικανά για αλληλεπίδραση και με τις δύο περιοχές του CBP (Εικόνα 3Γ). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η αμινοτελική περιοχή του CITA, η οποία αποτελεί την περιοχή ενεργοποίησης του μορίου, αλληλεπιδρά απευθείας με το CBP σε δύο διαφορετικές περιοχές. Η μια από αυτές τις περιοχές συμπίπτει με την περιοχή αλληλεπίδρασης του E1A στο CBP, ενώ η δεύτερη περιοχή περιλαμβάνει τα αμινοξέα 1 έως 771 του CBP. Η αλληλεπίδραση του E1A με το CBP/p300 απαιτεί τόσο αμινοτελικές αλληλουχίες όσο και την περιοχή CR1 (Arany et al., 1995; Eckner et al., 1994; Lundblad et al., 1995). Η ανικανότητα των E1A μεταλλαγών, που δεν διαθέτουν κάποια από αυτές τις περιοχές (Nt ή την CR1), να επηρεάσουν τη δράση της IFN-γ ή του CITA συσχετίζεται με την ανικανότητά τους να προσδέσουν το CBP. Άρα, η δράση του E1A μπορεί να οφείλεται στον ανταγωνισμό με το CITA για πρόσδεση CBP ή στο σχηματισμό ενός συμπλόκου που είναι μεταγραφικά ανενεργό.

Προκειμένου να ανιχνεύσουμε την αλληλεπίδραση του CITA με το CBP *in vivo*, χρησιμοποιήσαμε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης και Western blotting (Εικόνα 3D). Η πλήρης CITA πρωτεΐνη ή μόνο τα 114 αμινοτελικά αμινοξέα παρήχθησαν σε Cos κύτταρα σαν συντήγματα με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP). Εκχυλίσματα από διαμολυμμένα Cos κύτταρα αναλύθηκαν κατά Western με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για τη GFP με (Εικόνα 3Δ, λωρίδες 1 έως 4) ή χωρίς (λωρίδες 5 έως 8) ανοσοκατακρήμνιση με αντι-CBP αντισώματα. Η αποτελεσματικότητα της ανοσοκατακρήμνισης ελέγχθηκε με ανάλυση κατά Western με αντι-CBP αντισώματα. Τόσο το ακέραιο CITA (Εικόνα 3Δ, λωρίδα 1) και ένα μικρό CITA μόριο που περιείχε τα πρώτα 114 αμινοξέα (λωρίδα 3) ανοσοκατακρήμνισθηκαν με αντι-CBP αντισώματα (λωρίδες 2 και 4). Άρα, σε συμφωνία με το *in vivo* πείραμα, δείξαμε ότι το CITA αλληλεπιδρά επίσης με το CBP σε κύτταρα και ότι τα πρώτα 114 αμινοτελικά αμινοξέα του CITA είναι αρκετά για αυτή την αλληλεπίδραση.

ΕΙΚΟΝΑ 3



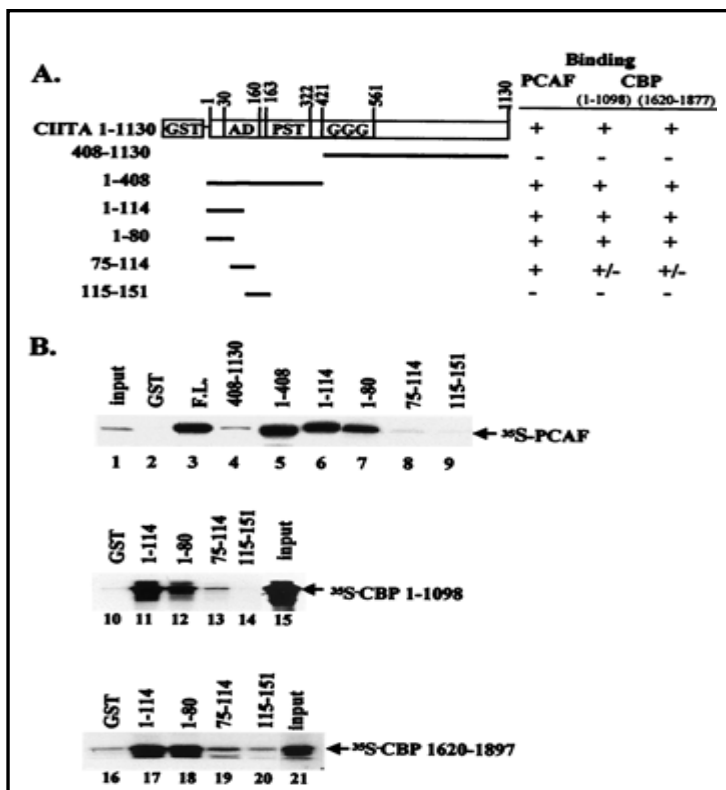
Εικόνα 3: Το CIITA αλληλεπιδρά με το CBP. (A) In vitro μεταφρασμένο και ραδιοσημασμένο με ³⁵S-μεθειονίνη πλήρες CIITA χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα κατακρήμνισης με GST με ίσες ποσότητες GST μόνη της ή σε σύντηξη με τα υποδεικνυόμενα κομμάτια του CBP (λωρίδες 3 έως 6). Η λωρίδα 1 περιέχει 10% της αρχικής ποσότητας του CIITA πριν την αλληλεπίδραση. (B) Πειράματα κατακρήμνισης με GST χρησιμοποιώντας τις περιοχές του CBP που καλύπτουν τα αμινοξέα 1 έως 771 (λωρίδες 4 έως 6) και 1620 έως 1897 (λωρίδες 7 έως 9) και in-vitro μεταφρασμένα και ραδιοσημασμένα πλήρη ή σε έλλειψη CIITA μόρια. (C) In-vitro μεταφρασμένες και ραδιοσημασμένες περιοχές του CIITA που καλύπτουν τα αμινοξέα 1 έως 114 και 102 έως 408 επωάστηκαν με συντηξίες της GST με τις αμινοξικές περιοχές του CBP 1-771, 1620-1897, και 1897-2440. (D) Το CBP και το CIITA σχηματίζουν ένα σύμπλοκο in vivo. Συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από Cos1 κύτταρα διαμολυμένα με τις υποδεικνυόμενες κατασκευές ανοσοκατακρήμνιστηκαν με αντι-CBP (a-CBP) αντισώματα, και ακολούθησε ανάλυση κατά Western με αντι-GFP αντισώματα. Οι λωρίδες 1 έως 4, ανοσοκατακρήμνιστηκαν (Ip) με αντι-CBP (λωρίδες 5 έως 8 εκχύλισμα χωρίς ανοσοκατακρήμνιση). Οι κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν για τις διαμολύνσεις ήταν η GFP μόνη της (λωρίδες 2, 4, 6, και 8), GFP σε σύντηξη με το πλήρες CIITA, GFP-CIITA (λωρίδες 1 και 5), και τα 114 αμινοτελικά αμινοξέα [(GFP/CIITA(1-114))] (λωρίδες 3 και 7). Τα τόξα υποδεικνύουν τις πρωτεΐνες που αναφέραμε.

Η όξινη περιοχή ενεργοποίησης του CIITA προσδένεται στον pCAF τόσο in vitro όσο και in vivo.

Ο pCAF είναι μια πρωτεΐνη με δράση ακετυλοτρανσφεράσης που ομοιάζει δομικά και λειτουργικά με την πρωτεΐνη GCN5, και συμμετέχει στο σχηματισμό ενός πρωτεϊνικού υπερσμπλόκου (Ogrysko et al.,

1998). Επειδή ο pCAF συνδέεται *in vitro* και *in vivo* με την πρωτεΐνη CBP θελήσαμε να μελετήσουμε τη δράση του στη μεταγραφική ρύθμιση των MHC τάξης II γονιδίων.

Για να προσδιορίσουμε την περιοχή του C/ITA που ενέχεται στην πρόσδεση pCAF, χρησιμοποιήσαμε διαφορετικά τμήματα της C/ITA πρωτεΐνης συντηγμένα με την πρωτεΐνη GST (Εικόνα 4A). Τμήματα του C/ITA που περιείχαν την αμινοτελική περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης του C/ITA (τμήματα 1-408αα και 1-114αα [λωρίδες 5 και 6, Εικόνα 4B]) αλληλεπιδρούν με τον pCAF. Είναι ενδιαφέρον ότι η ίδια αμινοτελική περιοχή (αμινοξέα 1-114) είναι επίσης υπεύθυνη για την πρόσδεση CBP (Kretsovali et al., 1998). Σε μια προσπάθεια να χαρτογραφήσουμε περισσότερο τις περιοχές αλληλεπίδρασης με CBP και pCAF μέσα στην αμινοτελική περιοχή του C/ITA, η περιοχή που εκτείνεται ανάμεσα στα αμινοξέα 1 έως 151 χωρίστηκε σε τρία μικρότερα κομμάτια. Να αναφερθεί ότι η επιλογή αυτή έγινε γιατί σ' αυτή την περιοχή το C/ITA περιέχει τρεις α -έλικες και κάθε επιμέρους κομμάτι που χρησιμοποιήθηκε περιείχε και μια α -έλικα. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1B, τόσο ο pCAF όσο και ο CBP προσδένονται κυρίως στα πρώτα 80 αμινοξέα του C/ITA (Εικόνα 4B, λωρίδες 7, 12, και 18), που περιέχουν μια α -έλικα απαραίτητη για την μεταγραφική ενεργότητα που επιτυγχάνεται μέσω C/ITA (Fontes et al., 1999).

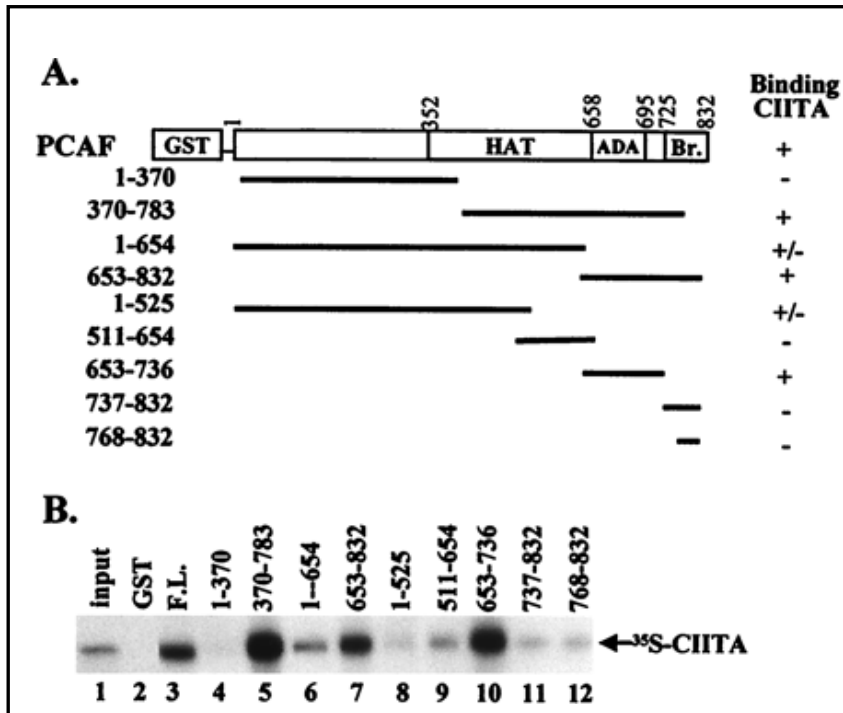


Εικόνα 4: Η περιοχή ενεργοποίησης του C/ITA προσδένεται στο CBP και pCAF. (A)

GST συντήξεις διαφορετικών κομματιών της C/ITA πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκαν για την αλληλεπίδραση με τους pCAF και CBP δείχνονται διαγραμματικά. (B) *In vitro* μεταφρασμένος και σημασμένος με 35 S-μεθειονίνη pCAF ή δύο περιοχές του CBP (CBP 1-1098 και CBP 1620-1877) χρησιμοποιήθηκαν σε πείραμα GST κατακρήμνισης με ίσες ποσότητες (1μg) της GST μόνη της (λωρίδες 2,10 και 16) ή συντήγματα αυτής με τα υποδεικνύομενα τμήματα του C/ITA. Οι ποσότητες input ήταν 5% στη λωρίδα 1, 30% στη λωρίδα 15 και 20% στη λωρίδα 21.

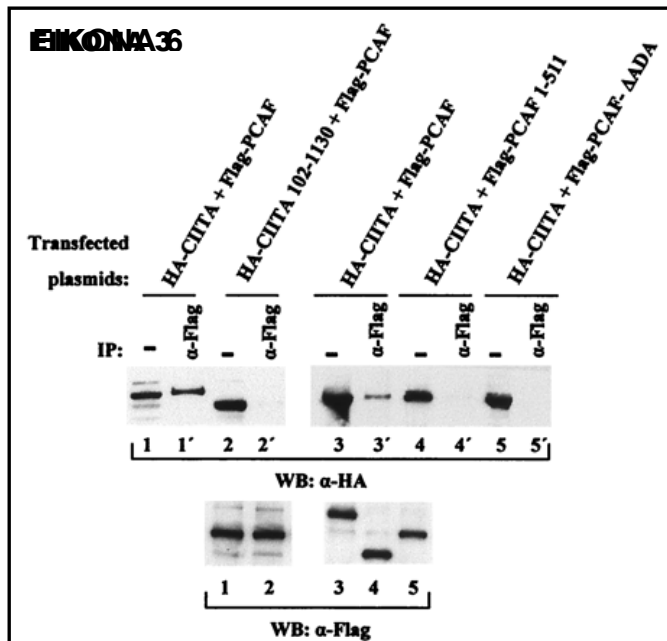
Για να χαρτογραφήσουμε την περιοχή του pCAF που προσδένει C/ITA, χρησιμοποιήσαμε κατασκευές ελλείψεων, που υποδεικνύονται στην Εικόνα 5A. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 5B, η καρβοξυτελική περιοχή (αμινοξέα 370-783) του pCAF είναι απαραίτητη για την πρόσδεση του C/ITA (λωρίδα 5) ενώ η αμινοτελική περιοχή (αμινοξέα 1-370) δεν είναι (λωρίδα 4). Περαιτέρω ανάλυση έδειξε ότι

η περιοχή με την ενεργότητα ακετυλοτρανσφεράσης (που εμπεριέχεται στα τμήματα 1-654 και 511-654 στις λωρίδες 6 και 9) αλληλεπιδρά λίγο με το CIITA ενώ η περιοχή που περιλαμβάνει την περιοχή πρόσδεσης για ADA (τμήμα 653-736) αλληλεπιδρά ισχυρά με το CIITA. Η «Βρόμο-περιοχή» δεν αλληλεπιδρά με το CIITA (λωρίδες 11 και 12). Λαμβάνοντας υπόψη μας αυτά τα αποτελέσματα, η περιοχή του pCAF που αλληλεπιδρά με το CIITA είναι διαφορετική από την περιοχή που απαιτείται για πρόσδεση CBP και των πυρηνικών υποδοχέων και συνενεργοποιητών.



Εικόνα 5: Περιοχές του pCAF που αλληλεπιδρούν με το CIITA. (A) Διάγραμμα των GST-pCAF πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκαν για αλληλεπίδραση με το CIITA, Br., Βρόμο-περιοχή. **(B)** In vitro ³⁵S-σημασμένη CIITA πρωτεΐνη χρησιμοποιήθηκε σε πείραμα GST συγκατακρήμνισης με ίσες ποσότητες είτε GST πρωτεΐνης μόνη της ή GST συντήγματος των υποδεικνυόμενων περιοχών του pCAF (λωρίδες 3 έως 12).

Για να εξετάσουμε αν ο pCAF και το CIITA συνδέονται in vivo, συνδιαμολύναμε COS-1 κύτταρα με φορείς έκφρασης που κωδικοποιούσαν pCAF με επίτοπο Flag και CIITA με επίτοπο HA (αιμαγλουτινίνης) και πραγματοποιήσαμε πειράματα συγκατακρήμνισης. Η Εικόνα 6 δείχνει ότι η άθικτη CIITA πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με pCAF (λωρίδα 1) ενώ μια έλλειψη των πρώτων 102 αμινοξέων (που απαιτούνται για πρόσδεση στον pCAF in vitro) δεν αλληλεπιδρά (λωρίδα 2). Επίσης προσδιορίσαμε ποιες περιοχές του pCAF είναι σημαντικές για την αλληλεπίδραση με το CIITA in vivo. Μια pCAF έλλειψη που περιέχει μόνο τα πρώτα 511 αμινοξέα (pCAF 1-511) και ένα έλλειμμα που του λείπει η περιοχή αλληλεπίδρασης με ADA (αμινοξέα 653-736) (pCAF ΔADA) δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με το CIITA (λωρίδες 4 και 5, αντίστοιχα), σε αντίθεση με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη (λωρίδα 3). Άρα η ανάλυση για τις in vivo αλληλεπιδράσεις συσχετίζονται απόλυτα με τα in vitro δεδομένα που παρουσιάστηκαν αμέσως πριν.



Εικόνα 6: In vivo αλληλεπίδραση ανάμεσα στο CIITA και τον pCAF. Ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από COS-1 κύτταρα διαμολυμένα με τους υποδεικνυόμενους φορείς (5μg απ' τον καθένα) ελέγχθηκαν με Western Blot με anti-Ha αντίσωμα πριν (λωρίδες 1 έως 5) ή μετά (λωρίδες 1' έως 5') από ανοσοκατακρήμνιση (IP) με anti-Flag M2 αγαρόζη. Στις λωρίδες 1 έως 5 τα inputs είναι 10% από το πρωτεϊνικό εκχύλισμα που χρησιμοποιήθηκε για ανοσοκατακρήμνιση. Ίσες ποσότητες από τα inputs ελέγχθηκαν επίσης για την έκφραση των pCAF συντήξεων χρησιμοποιώντας αντίσωμα anti-Flag.

Ο pCAF δρα σαν συνενεργοποιητής για τη μεταγραφική ρύθμιση των τάξης II μορίων του Κυρίου Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας.

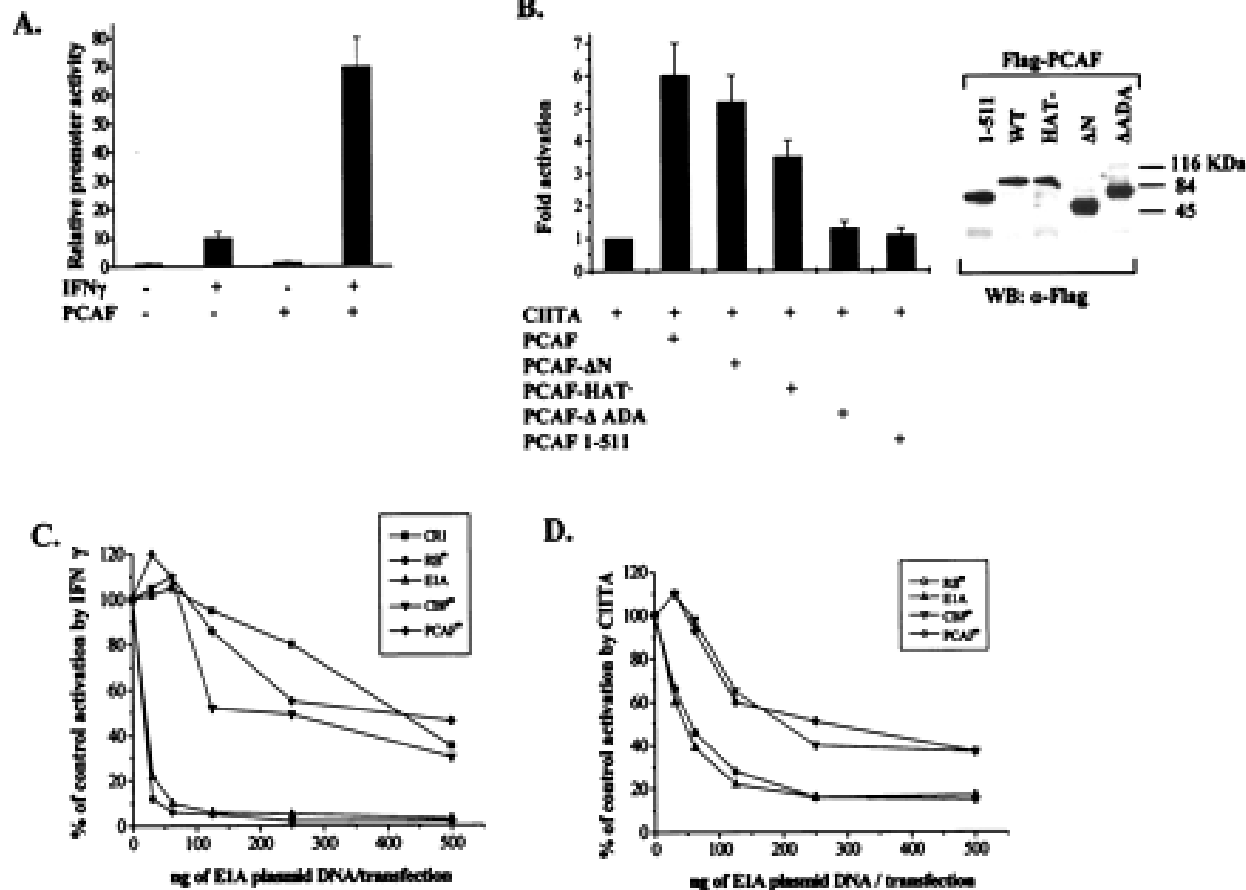
Το επόμενο ερώτημα, μετά τη διαπίστωση της αλληλεπίδρασης pCAF και CIITA, ήταν εάν ο pCAF δρα σαν συνενεργοποιητής στη μεταγραφική ρύθμιση των Τάξης II αντιγόνων Ιστοσυμβατότητας. HeLa κύτταρα διαμολύνθηκαν παροδικά με την κατασκευή του Εα MHC τάξης II υποκινητή μαζί με κατασκευές που εξέφραζαν pCAF. Η ενεργότητα του υποκινητή υπολογίστηκε από κύτταρα πριν ή μετά την επώαση με IFN- γ για 20 ώρες, η οποία είναι γνωστό ότι επάγει την έκφραση του CIITA, το οποίο με τη σειρά του επάγει τη μεταγραφή των τάξης II γονιδίων του Κυρίου Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας. Παρότι η παρουσία του pCAF δεν επηρέασε σημαντικά τα βασικά επίπεδα έκφρασης του υποκινητή, ενίσχυσε σημαντικά (έως και επτά φορές) την επαγόμενη από IFN- γ έκφραση (Εικόνα 7A). Αφού το αποτέλεσμα της IFN- γ στην έκφραση των τάξης II αντιγόνων Ιστοσυμβατότητας ρυθμίζεται μέσω CIITA, εξετάσαμε την ικανότητα του pCAF να συνεργάζεται με εξωγενώς παρεχόμενο CIITA. Διαμόλυνση με φορέα έκφρασης CIITA οδήγησε στην ενεργοποίηση του Εα τάξης II υποκινητή σε HeLa κύτταρα, ενώ ο pCAF από μόνος του δεν είχε καμιά επίδραση. Συνέκφραση του pCAF αύξησε την ενεργοποίηση που επιτυγχάνεται μόνο από CIITA (Εικόνα 7B).

Άρα ο pCAF και το CIITA συνεργατικά ενεργοποιούν τη μεταγραφή ενός τάξης II υποκινητή. Αφαίρεση της περιοχής αλληλεπίδρασης με CBP από τον pCAF (αμινοξέα 1-372) δεν ανέστειλε την ικανότητα του pCAF να ενεργοποιεί την CIITA-εξαρτώμενη τάξης II μεταγραφή (pCAF- Δ N, Εικόνα 7B). Άρα η ικανότητα του pCAF να υποβοηθά την ενεργοποίηση από CIITA είναι κυρίως ανεξάρτητη από το CBP. Μια pCAF πρωτεΐνη που φέρει μεταλλαγές στην περιοχή με ενεργότητα ακετυλοτρανσφεράσης

(Korzus et al., 1998) (pCAF HAT⁻) έχει μειωμένη ικανότητα συνενεργοποίησης με το CIITA συγκρινόμενη με αυτή της αγρίου τύπου πρωτεΐνης. Αυτό υποδηλώνει ότι η ακετυλίωση ιστονών ή πρωτεϊνών συμβάλει στη συνέργεια που παρατηρείται ανάμεσα στον pCAF και το CIITA. Δύο ελλείμματα του pCAF που δεν αλληλεπιδρούν με το CIITA (pCAF 1-511 και pCAF ΔADA (Εικόνα 7B) δεν είναι ικανά να δράσουν συνεργατικά με το CIITA. Αυτό το αποτέλεσμα τονίζει τη σημασία της ισχυρής αλληλεπίδρασης pCAF και CIITA για την συνενεργοποίηση των τάξης II γονιδίων ιστοσυμβατότητας.

Για να εκτιμήσουμε τη σχετική σημασία του CBP και του pCAF στη ρύθμιση των MHC τάξης II γονιδίων, χρησιμοποιήσαμε διάφορες μεταλλάξεις του E1A (Εικόνα 7C και D) που επιλεκτικά καταργούν την πρόσδεση είτε του pCAF είτε του CBP. Η μεταλλαγή E55 (pCAF^m) εμφανίζει μειωμένη πρόσδεση με pCAF (Reid et al., 1998), και η μεταλλαγή TK460 (CBP^m), στην οποία τα αμινοξέα 64 έως 68 έχουν αφαιρεθεί, δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με CBP (Bannister and Kouzarides, 1995b). Και οι δύο τύποι μεταλλαγών μειώνουν σημαντικά την ικανότητα του E1A να καταστέλλει την επαγωγή από IFN- γ καθώς επίσης και την απευθείας ενεργοποίηση από το CIITA ενός τάξης II υποκινητή (Εικόνα 7C και D). Συνδιαμόλυνση του 13S E1A ή μια μεταλλαγής που δεν αλληλεπιδρά με pRb (Rb^m, μεταλλαγή TK496 στην οποία τα αμινοξέα 38 έως 44 είναι μεταλλαγμένα σε αλανίνη (Bannister and Kouzarides, 1995b), εμφάνισαν σημαντική καταστολή, σε αντίθεση με μια CR1 έλλειψη, η οποία ήταν ένας ασθενής καταστολέας (Εικόνα 7C και D). Άρα αφαίρεση του ενός συνενεργοποιητή δεν είναι αρκετή για να μειώσει την ενεργοποίηση του υποκινητή. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν τη συμπληρωματικότητα του pCAF και CBP, οι οποίοι μπορούν ανεξάρτητα να ενδυναμώσουν τη δράση του CIITA.

ΕΙΚΟΝΑ 7



Εικόνα 7: Ο pCAF δρα σαν συνενεργοποιητής για την έκφραση των MHC τάξης II γονιδίων. (A) Φορείς που κωδικοποιούν τον pCAF ή ο φορέας μόνος του (0.5 έως 1 μ g) συνδιαμολύνθηκαν με 1 μ g με ένα MHC τάξης II υποκινητή-με CAT γονίδιο αναφοράς σε HeLa κύτταρα. Μη επαγμένα και επαγμένα με IFN- γ (50U/ml) κύτταρα μετρήθηκαν για CAT ενεργότητα 24 ώρες μετά την προσθήκη IFN- γ . Η CAT ενεργότητα των διαμολυμένων με άδειο φορέα και χωρίς επαγωγή ορίστηκε σαν 1. **(B)** HeLa κύτταρα συνδιαμολύνθηκαν με ένα τάξης II υποκινητή με λουσιφεράση σαν γονίδιο αναφοράς (1 μ g) με ένα φορέα που εξέφραζε CIITA (20ng), και 0.5 έως 1 μ g από φορείς που εξέφραζαν αγρίου τύπου pCAF, μια έλλειψη που της λείπουν τα πρώτα 352 αμινοξέα (pCAF- Δ N), μια μεταλλαγή που δεν έχει ενεργότητα ακετυλοτρανσφεράσης (pCAF HAT⁻) μια μεταλλαγή που περιέχει μόνο τα 511 πρώτα αμινοξέα (pCAF I-511), και μια μεταλλαγή που της λείπουν τα αμινοξέα 653 έως 736 (pCAF- Δ ADA). Η ενεργότητα λουσιφεράσης μετρήθηκε 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση. Η ενεργότητα του τάξης II-Luc γονιδίου αναφοράς στην παρουσία CIITA πρωτεΐνης ορίστηκε σαν 1 και αντιπροσωπεύει ένα εύρος επαγωγής από 7 έως 15 φορές. Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης pCAF αναλύθηκαν με Western Blot χρησιμοποιώντας ένα anti-Flag αντίσωμα. **(C)** HeLa κύτταρα διαμολύνθηκαν με 1 μ g ενός τάξης II-CAT φορέα μαζί με άδειο φορέα ή αυξανόμενες ποσότητες φορέων που εκφράζουν τα υποδεικνυόμενα EIA προϊόντα. Η επαγωγή με IFN- γ ποίκιλε από 15 έως 45 φορές. **(D)** HeLa κύτταρα συνδιαμολύνθηκαν με 1 μ g τάξης II-CAT και 100ng ενός φορέα που εκφράζει CIITA και άδειο φορέα ή αυξανόμενες ποσότητες φορέων που εξέφραζαν τα υποδεικνυόμενα EIA προϊόντα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν ποσοστό της ενεργοποίησης με CIITA και είναι οι μέσοι όροι από τρία πειράματα. Η ενεργοποίηση με CIITA ποίκιλε από 75 έως 120 φορές.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σ' αυτό το μέρος της εργασίας μελετήσαμε το μηχανισμό με τον οποίο η πρωτεΐνη CIITA λειτουργεί για να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή των τάξης II γονιδίων του Κυρίου Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας. Δείξαμε ότι το CIITA λειτουργεί στρατολογώντας δύο συνενεργοποιητές με ιδιότητες ακετυλοτρανσφεράσης, τους CBP και pCAF. Η ογκοπρωτεΐνη E1A καταστέλλει τη μεταγραφή των MHC τάξης II γονιδίων συνδεδεμένη με το CBP και τον pCAF, αποτρέποντας έτσι την αλληλεπίδραση του CIITA με το CBP και τον pCAF. Τα 102 αμινοτελικά αμινοξέα του CIITA, τα οποία δρουν σαν αυτόνομη περιοχή ενεργοποίησης, απαιτούνται για τη στρατολόγηση των συνενεργοποιητών CBP και pCAF.

Το CIITA είναι ένας γονίδιο-ειδικός ενεργοποιητής που απαιτείται τόσο για την ειδική έκφραση στα Β λεμφοκύτταρα όσο και για την επαγόμενη από IFN- γ έκφραση των MHC τάξης II γονιδίων. Προηγούμενες μελέτες είχαν δείξει ότι, παρότι η ενεργότητα του CIITA εξαρτάται από την παρουσία των καλά χαρακτηρισμένων και συντηρημένων ρυθμιστικών στοιχείων στα MHC τάξης II γονίδια, το CIITA από μόνο του δεν προσδένεται στο DNA. Αυτό οδήγησε στην υπόθεση ότι το CIITA λειτουργεί σαν γονίδιο-ειδικός ενεργοποιητής για την αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας των MHC τάξης II γονιδίων (Mach et al., 1996; Steimle et al., 1996). Το CIITA στρατολογείται στον MHC υποκινητή δια μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης με τους ενεργοποιητές που προσδένονται στον υποκινητή (Scholl et al., 1997). Όμοια με τις επιδράσεις που έχουν περιγραφεί σε άλλα συστήματα επαγόμενα από IFN- γ (Gutch and Reich, 1991; Kalvakolanu et al., 1991), η E1A πρωτεΐνη, όπως δείχνουμε εδώ, μπορεί να καταστείλει τη μεταγραφή που επάγεται από IFN- γ στον Εα MHC τάξης II υποκινητή. Επίσης, το E1A καταστέλλει ισχυρά την ενεργότητα του ίδιου υποκινητή σε Β λεμφοκυτταρικές σειρές. Το E1A επίσης καταστέλλει αποτελεσματικά τη μεταγραφική ενεργοποίηση από εξωγενές CIITA, υποδεικνύοντας ότι το CIITA είναι ο άμεσος στόχος του E1A. Αφού δεν μπορέσαμε να ανιχνεύσουμε αλληλεπίδραση ανάμεσα στο CIITA και το E1A, η καταστολή από το E1A μπορεί να εξηγηθεί από την ικανότητά του να προσδένεται και να καταστέλλει τη δράση του CBP, της p300 και του pCAF, κατ' αναλογία με προηγούμενες περιπτώσεις (Arany et al., 1995; Eckner et al., 1994; Lundblad et al., 1995).

Σ' αυτή τη μελέτη δείξαμε ότι η δράση του CIITA ενδυναμώνεται από το CBP και τον pCAF και οδηγεί στην αυξημένη έκφραση των MHC τάξης II υποκινητών τόσο στη συστατική έκφραση στα Β λεμφοκύτταρα και μετά την επαγωγή από IFN- γ σε μη-λεμφοκυτταρικές σειρές. Τόσο το CBP όσο και ο pCAF είναι απαραίτητοι για τη μεταγραφική ενεργοποίηση των τάξης II γονιδίων. Δείξαμε ότι το CBP και ο pCAF προσδένονται στο CIITA και συνεργάζονται μαζί του για να επάγουν τη μεταγραφή των τάξης II γονιδίων. Αυτή η λειτουργία προϋποθέτει την ισχυρή αλληλεπίδραση ανάμεσα στις δύο πρωτεΐνες αλλά και την ενεργότητα ακετυλοτρανσφεράσης των CBP και pCAF. Η συνολική δράση των CBP και pCAF σε ένα τάξης II υποκινητή επιτυγχάνεται από τη συνδυασμένη δράση τους για τη στρατολόγηση της μεταγραφικής μηχανής και την ακετυλίωση της χρωματίνης αλλά και του CIITA. Παρατηρήσαμε ότι οι

CBP και pCAF δεν μπορούν να αλληλεπιδράσουν συγχρόνως με το CIITA *in vitro* (προσωπικές παρατηρήσεις). Αυτό δεν είναι μη αναμενόμενο λαμβάνοντας υπόψη μας τη μικρή περιοχή του CIITA (τα αμινοτελικά πρώτα 80 αμινοξέα) με την οποία και οι δύο αλληλεπιδρούν. Επίσης δείξαμε ότι η ογκοπρωτεΐνη E1A, η οποία αναστέλλει τη συνεργασία του CIITA με το CBP, επίσης επηρεάζει την αλληλεπίδραση ανάμεσα στο CIITA και τον pCAF (Kretsovali et al., 1998). Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να προκύπτει από την αναστολή της αλληλεπίδρασης του CIITA στον pCAF αφού το E1A (Reid et al., 1998) και το CIITA προσδένονται στην ίδια περιοχή του pCAF. Μεταλλαγές του E1A που δεν μπορούν να προσδεθούν στο CBP ή τον pCAF (Bannister and Kouzarides, 1995b; Reid et al., 1998) έχουν εξίσου μειωμένη ικανότητα να αναστείλουν την ενεργότητα του CIITA σε ένα τάξης II υποκινητή.

Με την προσέγγιση των δύο-υβριδίων σε θηλαστικά καθώς και με κατακρήμνιση με GST και πειράματα ανοσοκατακρήμνισης, ανιχνεύσαμε άμεση αλληλεπίδραση ανάμεσα στα CBP-CIITA και pCAF-CIITA που οδηγεί στη συνεργατική μεταγραφική ενεργοποίηση. Δείξαμε ότι το CIITA μπορεί να αλληλεπιδρά με την C/H3 περιοχή (αμινοξέα 1620 έως 1897) και τα 771 αμινοτελικά αμινοξέα του CBP. Χαρτογράφηση του CIITA μορίου έδειξε ότι η αμινοτελική του περιοχή (αμινοξέα 1 έως 102) αλληλεπιδρά και με τις δύο περιοχές του CBP. Άρα ο γενικός συνενεργοποιητής CBP επιτυγχάνει γονιδιο-ειδική εξειδίκευση αλληλεπιδρώντας με τον γονιδιο-ειδικό συνενεργοποιητή CIITA.

Προηγούμενες μελέτες έχουν περιγράψει αλληλεπιδράσεις του CIITA με μέλη της βασικής μεταγραφικής μηχανής όπως οι TAFII32 (Fontes et al., 1997), TAFII250 (Mahanta et al., 1997), και TFIIB (Mahanta et al., 1997). Η αλληλεπίδραση του CIITA με το CBP που περιγράφεται εδώ παρέχει άμεση συσχέτιση του υποκινητή με την RNA πολυμεράση II με την οποία το CBP είναι σε σύμπλοκο (Kee et al., 1996; Nakajima et al., 1997). Άρα το CIITA μπορεί να ενεργοποιεί τη μεταγραφή δια μέσω της στρατολόγησης του TFIID-TFIIB συμπλόκου και του CBP-RNA Pol II με τρόπο εξαρτώμενο από τον CREB (Nakajima et al., 1997). Σύγκριση της αμινοτελικής περιοχής ενεργοποίησης του CIITA με την περιοχή ενεργοποίησης του VP16 έδειξε ότι έχουν την ίδια δυνατότητα για ενεργοποίηση όταν συντηχθούν με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA της GAL4. Παρόλα αυτά, το CIITA, αλλά όχι η VP16 περιοχή ενεργοποίησης, υποβοηθείται από το CBP. Η αντικατάσταση της περιοχής ενεργοποίησης του CIITA με αυτή της VP16, η οποία είναι επίσης γνωστό ότι επαφίεται άμεσα στη βασική μεταγραφική μηχανή, δημιουργεί ένα μόριο με έξι φορές μειωμένη δράση στη μεταγραφική ενεργοποίηση των MHC τάξης II και χωρίς να συνεργάζεται με το CBP. Άρα, η περιοχή ενεργοποίησης του CIITA δεν μπορεί να ανταλλαχθεί με την αντίστοιχη της VP16 στο πλαίσιο του τάξης II υποκινητή επειδή του CIITA αλλά όχι της VP16, στρατολογεί CBP.

Ανάλυση των στοιχείων του υποκινητή και των παραγόντων που προσδένονται στο DNA υποδεικνύει ότι η μεταγραφή των τάξης II γονιδίων εξαρτάται από τη συνεργατική πρόσδεση των παραγόντων που αλληλεπιδρούν με τα στοιχεία W/S/H, X και Y (Louis-Pence et al., 1997; Moreno et al., 1995; Reith et al., 1994). Η σύσταση ενός υψηλής συνάφειας πολυπρωτεϊνικού-DNA συμπλόκου είναι απαραίτητη

για τη στρατολόγηση του CIIITA στον υποκινητή (Mach et al., 1996; Steimle et al., 1996). Το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο στον τάξης II υποκινητή μπορεί να δημιουργήσει σημαντικές επιφάνειες πρόσδεσης για τη διευκόλυνση της πρόσδεσης όχι μόνο του CIIITA αλλά επίσης και του CBP και pCAF με τρόπο όμοιο με το καλά χαρακτηρισμένο γονίδιο της IFN-β (Merika et al., 1998). Η στρατολόγηση του CBP, με την ενεργότητα ακετυλοτρανσφεράσης που διαθέτει (Bannister and Kouzarides, 1996; Ogryzko et al., 1996; Yang et al., 1996), θα μπορούσε να αλλάζει τη δομή της χρωματίνης για να ενδυναμώσει το σχηματισμό ενός στερεοειδικού συμπλόκου (Carey, 1998; Kim and Maniatis, 1997).

Η έκφραση του CIIITA μετά τη σηματοδότηση με IFN-γ εξαρτάται από το JAK-STAT μονοπάτι. Η σύνθεση του CIIITA δεν μπορεί να επαχθεί σε κύτταρα που ελλείπει η JAK1 (Chang et al., 1994) ή σε κύτταρα από Stat1-/- ποντίκια (Meraz et al., 1996). Ο STAT1 προσδένεται στον επαγόμενο από IFN-γ υποκινητή του CIIITA σε συνεργασία με τον USF-1 (Muhlethaler-Mottet et al., 1998). Η γονιδιακή ενεργοποίηση από τον STAT1 και τον STAT2 απαιτεί τους συνενεργοποιητές CBP και p300 (Bhattacharya et al., 1996; Horvai et al., 1997; Zhang et al., 1996). Αφού η επίδραση του CBP στη δράση του διαμολυμένου CIIITA επίσης παρατηρείται στη μεταλλαγμένη κυτταρική σειρά RJ2.2.5, που της ελλείπει το ενδογενές CIIITA, η συνεργατικότητα δεν ενέχει την εξαρτώμενη από CBP παραγωγή του ενδογενούς CIIITA. Άρα, ο συνενεργοποιητής CBP ενέχεται τουλάχιστον σε δύο στάδια που οδηγούν στη γονιδιακή ενεργοποίηση των MHC τάξης II γονιδίων πρώτα, στην έκφραση του CIIITA που καθορίζεται από το STAT1 (Horvai et al., 1997; Zhang et al., 1996), και δεύτερο, στη δράση του CIIITA για να ενεργοποιήσει μεταγραφικά τα τάξης II γονίδια, όπως υποδεικνύουμε εδώ.

Τα CBP/p300 και pCAF λειτουργούν σαν μεσολαβητές ποικίλων σηματοδοτικών μονοπατιών που ελέγχουν μια ομάδα γονιδίων. Η συμμετοχή των CBP και pCAF στη γονιδιακή έκφραση των MHC τάξης II μπορεί έτσι να εξηγήσει τη δράση συγκεκριμένων ερεθισμάτων που τα ελέγχουν αρνητικά, όπως είναι τα γλυκοκορτικοειδή, οι προσταγλανδίνες (οι οποίες αυξάνουν τα ενδοκυτταρικά επίπεδα κυκλικού AMP), και οι IFN-α/β (Celada et al., 1993; Fertsch-Ruggio et al., 1988; Glimcher and Kara, 1992; Ivashkin and Glimcher, 1991; Schwiebert et al., 1995). Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών (Kamei et al., 1996), ο ενεργοποιητής CREB (Montminy, 1997), και ο STAT2 (Bhattacharya et al., 1996) μπορεί να ανταγωνίζονται με τον STAT1 και το CIIITA για το CBP και έτσι περιορίζουν την έκφραση των τάξης II γονιδίων.

Η λειτουργική αλληλεπίδραση ανάμεσα σε δύο ρυθμιστικές πρωτεΐνες που δεν προσδένονται στο DNA και περιγράφεται σ' αυτή τη δουλειά παρέχει πληροφορίες στον πολύπλοκο μηχανισμό που ενέχεται στην ενεργοποίηση της έκφρασης των MHC τάξης II γονιδίων καθώς και την τροποποίησή του σε ποικίλα σηματοδοτικά μονοπάτια.

Η ακετυλίωση του CΙΤΑ από τον pCAF αυξάνει τον πυρηνικό του εντοπισμό και τη μεταγραφική ενεργοποίηση των ΜΗC τάξης II γονιδίων.

Αποτελέσματα

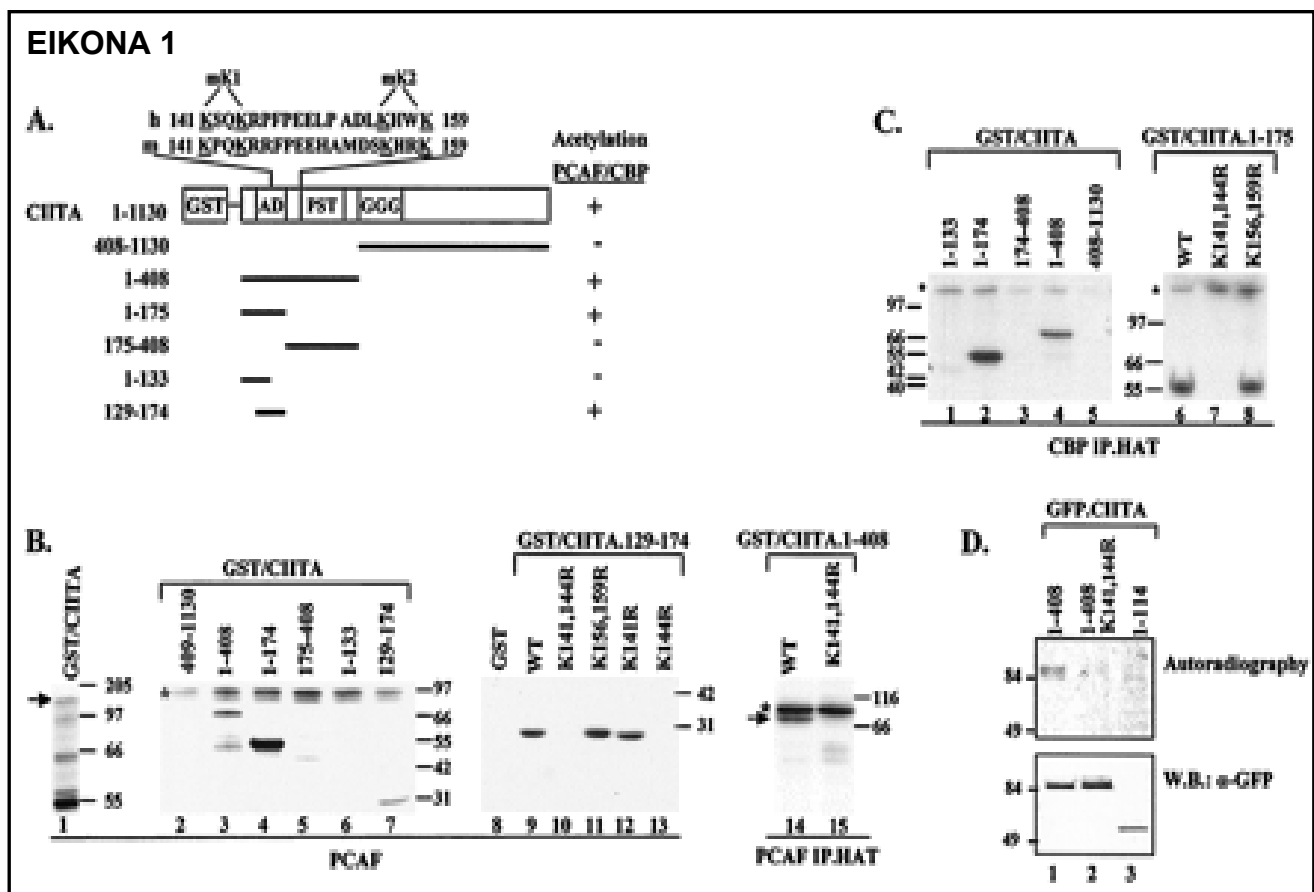
Ο pCAF και το CBP ακετυλιώνουν το CΙΤΑ.

Ο pCAF και το CBP είναι ακετυλοτρανσφεράσες που έχουν σαν υποστρώματα όχι μόνο ιστόνες αλλά και άλλες πρωτεΐνες (Berger, 1999; Kouzarides, 1999). Γι'αυτό το λόγο ελέγξαμε εάν το CΙΤΑ μπορούσε να ακετυλωθεί από pCAF και CBP. Στην Εικόνα 1B δείχνεται ότι ο pCAF μπορεί να ακετυλιώσει το CΙΤΑ *in vitro* (λωρίδα 1). Ανάλυση με τη χρήση ελλείψεων υπέδειξε ότι η ακετυλίωση του CΙΤΑ περιορίζεται στα αμινοξέα 129 έως 174 (λωρίδα 7). Αυτή η περιοχή περιέχει δύο ζεύγη κοντινών λυσινών, που είναι καλά συντηρημένες ανάμεσα στο ανθρώπινο και το ποντικίσιο CΙΤΑ (Εικόνα 1A). Η μετάλλαξη του πρώτου ζεύγους, K141,144 (που ονομάζεται mK1), καταργεί την ακετυλίωση (λωρίδα 10), ενώ η μεταλλαγή του δεύτερου ζεύγους, K156,159 (ονομάζεται mK2), δεν είχε καμία επίδραση (λωρίδα 11). Άρα, ο pCAF ακετυλιώνει το πρώτο ζεύγος λυσινών, K141,144. Επιπλέον μεταλλαξογέννεση υπέδειξε ότι η λυσίνη 144 είναι ο στόχος ακετυλίωσης από pCAF (λωρίδα 13). Το ίδιο αποτέλεσμα προκύπτει όταν η ακετυλίωση πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας ανοσοκατακρημνισμένο pCAF από διαμολυμένα COS-1 κύτταρα (λωρίδες 14 και 15).

Μετά εξετάσαμε την ικανότητα του CBP να ακετυλιώνει CΙΤΑ. Επειδή η CBP.HAT περιοχή που έχει παραχθεί βακτηριακά, ήταν ανίκανη να ακετυλιώσει το CΙΤΑ, χρησιμοποιήσαμε ανοσοκατακρημνισμένο CBP από διαμολυμένα COS-1 κύτταρα. Όπως υποδεικνύεται στην Εικόνα 1C, το CBP μπορεί ακετυλιώσει το CΙΤΑ. Ανάλυση με ελλείψεις περιορίσε την περιοχή που ακετυλιώνεται στα πρώτα 174 αμινοξέα (λωρίδα 2). Χρησιμοποιώντας μεταλλαγμένες εκδοχές της περιοχής των πρώτων 174 αμινοξέων, προσδιορίσαμε ότι το CBP ακετυλιώνει το ζεύγος λυσινών K141,144 του CΙΤΑ (λωρίδα 7) αλλά δεν ακετυλιώνει το ζεύγος λυσινών K156,159 (λωρίδα 8). Δεν είναι πιθανό η ακετυλίωση του CΙΤΑ να οφείλεται σε κάποια άλλη ακετυλάση που συγκατακρημνίζεται με το CBP, αφού το CΙΤΑ δεν ακετυλιώνεται όταν παρασκευάσουμε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κύτταρα διαμολυμένα με φορέα έκφρασης CBP.HAT και ανοσοκατακρημνίσαμε το CBP (προσωπικές παρατηρήσεις).

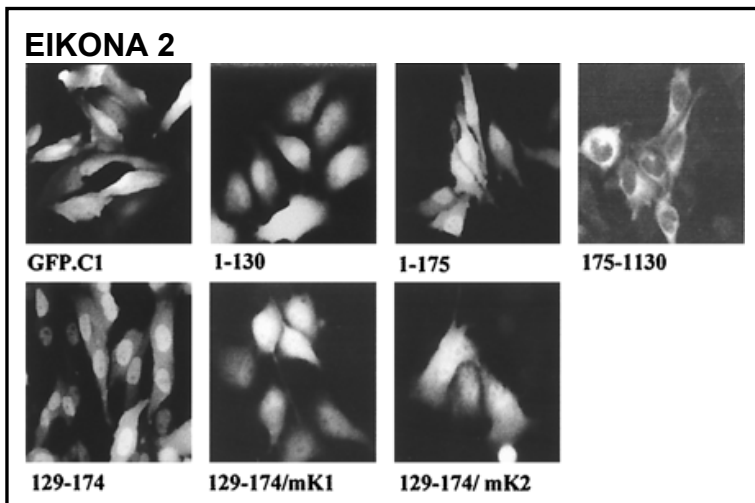
Για να εξετάσουμε αν οι στόχοι ακετυλίωσης που ανιχνεύουμε *in vitro* είναι επίσης στόχοι για ακετυλίωση *in vivo*, πραγματοποιήθηκε μεταβολική σήμανση κύτταρων που εξέφραζαν CΙΤΑ πρωτεΐνες σε σύντηξη με την πρωτεΐνη GFP. Η Εικόνα 1D δείχνει ότι ένα έλλειμμα που περιλαμβάνει τα πρώτα 114 αμινοξέα του CΙΤΑ και δεν περιέχει κανένα κατάλοιπο λυσίνης, δεν σημαίνεται *in vivo* (λωρίδα 3). Η

αργίου τύπου 1-408 CΙΤΑ πρωτεΐνη σημάνθηκε *in vivo* (λωρίδα 1), ενώ οι μεταλλάξεις K141,144R εμφάνισαν μειωμένη ακετυλίωση (λωρίδα 2). Η ακέραια CΙΤΑ πρωτεΐνη επίσης ακετυλιώνεται *in vivo*, παρότι η επίδραση των μεταλλαγμένων λυσινών 141 και 144 ήταν λιγότερο καθαρό, πιθανά επειδή επιπλέον κατάλοιπα λυσινών-στόχοι ακετυλίωσης μπορεί να υπάρχουν στην πρωτεΐνη. Το συμπέρασμα για την ανάλυση ακετυλίωσης που πραγματοποιήθηκε είναι ότι το ζεύγος λυσινών K141,144 του CΙΤΑ ακετυλιώνεται τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Στο εξής οι μεταλλάξεις K141,144R και K156,159R θα ονομάζονται mK1 και mK2, αντίστοιχα. Επίσης πρέπει να αναφέρουμε ότι όλα τα *in vitro* πειράματα ακετυλίωσης του CΙΤΑ πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν ανασυνδιασμένο ανθρώπινο GCN5, σαν ακετυλοτρανσφεράση, και πάλι τα αποτελέσματα είναι ακριβώς τα ίδια όπως στην περίπτωση του pCAF, το μοναδικό κατάλοιπο που ακετυλιώνεται στο CΙΤΑ είναι η λυσίνη 144.



Εικόνα 1: Το CΙΤΑ ακετυλιώνεται *in vitro* και *in vivo*. (A) Χημειρικά μόρια CΙΤΑ σε σύντηξη με την πρωτεΐνη GST ελέγχθηκαν για *in vitro* ακετυλίωση. Υποδεικνύεται η αμινοξική αλληλουχία του ανθρώπινου και ποντικίσου CΙΤΑ στην περιοχή που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 141 έως 159, και τα κρίσιμα κατάλοιπα λυσινών υπογραμμίζονται. Τα mK1 και mK2 υποδεικνύουν τις μεταλλάξεις των ζευγών λυσινών K141,144 και K156,159, αντίστοιχα. (B) Πειράματα ακετυλίωσης με pCAF. Τμήματα (1-2μg) των υποδεικνυόμενων τμημάτων CΙΤΑ χρησιμοποιήθηκαν για *in vitro* ακετυλίωση χρησιμοποιώντας 500ng από GST-pCAF (λωρίδες 1 έως 13) ή pCAF ανοσοκατακρημνισμένο με anti-Flag M2 αγαρόζη από COS-1 κύτταρα (λωρίδες 14 και 15). *: αυτοακετυλίωση pCAF. WT: αργίου τύπου. (C) Πείραμα ακετυλίωσης με ανοσοκατακρημνισμένο CBP. Το CBP ανοσοκατακρημνίστηκε (IP) από COS-1 κυτταρικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα με anti-CBP αντισώματα και χρησιμοποιήθηκαν για ακετυλίωση των υποδεικνυόμενων τμημάτων CΙΤΑ. *: αυτοακετυλίωση CBP. (D) *In vivo* ακετυλίωση. COS-1 κύτταρα διαμολυμένα με τους υποδεικνυόμενους φορείς σημάνθηκαν με $[^3\text{H}]$ οξικό οξύ για 1 ώρα. Παρασκευάστηκαν συνολικά κυτταρικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα και ανοσοκατακρημνίστηκαν με anti-GFP μονοκλωνικό αντισώμα, έτρεξαν σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης συγκέντρωσης 10% και έγιναν αυτοραδιογραφία. Πανομοιότυπα μη ραδιοσημασμένα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν σε Western Blot (WB) με anti-GFP αντισώμα.

Η περιοχή του CIPTA που περιέχει τα κατάλοιπα λυσινών που ακετυλιώνονται (Εικόνα 1A) είναι υψηλά συντηρημένη ανάμεσα στο ανθρώπινο και το ποντικίσιο CIPTA (Sims et al., 1997) και έχει ομοιότητα με ένα διμερές NLS (bipartite NLS). Προκειμένου να εξετάσουμε την ικανότητα αυτής της περιοχής να προάγει την είσοδο του CIPTA στον πυρήνα, χρησιμοποιήσαμε συντήξεις του CIPTA με τη GFP. Η σύντηξη της GFP με τα πρώτα 130 αμινοξέα του CIPTA(1-130) παράγει μια πρωτεΐνη που είναι διάχυτα κατανεμημένη, όπως η GFP πρωτεΐνη από μόνη της, ενώ μια σύντηξη των πρώτων 175 αμινοξέων (1-175) του CIPTA με τη GFP είχε πυρηνική εντόπιση (Εικόνα 2), υποδεικνύοντας ότι ένα NLS μπορεί να υπάρχει σ'αυτή την περιοχή. Επίσης, μια αμινοτελική έλλειψη των πρώτων 174 αμινοξέων (175-1130) είχε κυτταροπλασματική εντόπιση. Το NLS περαιτέρω περιορίστηκε ανάμεσα στα αμινοξέα 129 έως 174, όπως υποδεικνύεται από την αντίστοιχη GFP σύντηξη, η οποία εμφανίζει σαφή πυρηνική εντόπιση (Εικόνα 2). Επιπλέον, αντικατάσταση των λυσινών 141 και 144 (mK1) ή των 156 και 159 (mK2) με αργινίνες στο πλαίσιο της κατασκευής GFP-CIPTA/129-174 έδωσε πρωτεΐνες που ήταν ομογενώς κατανεμημένες τόσο στον πυρήνα όσο και το κυτταρόπλασμα. Άρα, η περιοχή που εκτείνεται από τις λυσίνες 141 έως 159 είναι ένα διμερές NLS που απαιτεί και τα δύο μοτίβα για να είναι λειτουργικό.

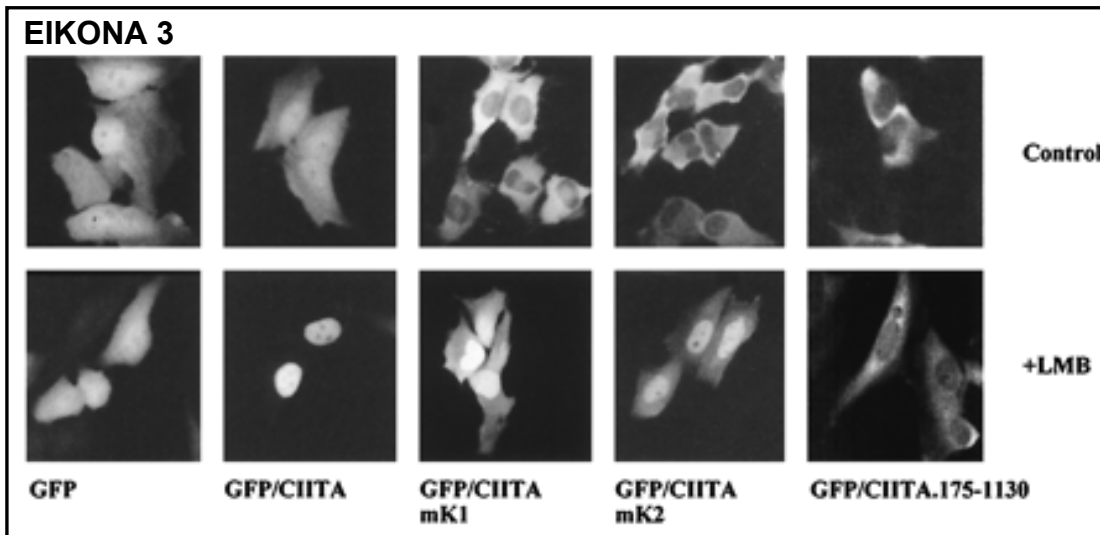


Εικόνα 2: Ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού εμπεριέχεται ανάμεσα στα αμινοξέα 141 και 159 του CIPTA. GFP συντήξεις των υποδεικνυόμενων περιοχών του CIPTA διαμόλυναν HeLa κύτταρα. Ο πράσινος φθορισμός παρατηρήθηκε 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση.

Η ακετυλίωση αυξάνει την πυρηνική εντόπιση της πρωτεΐνης CIPTA.

Από τη στιγμή που η ακετυλίωση στοχεύει κατάλοιπα λυσινών που εδράζονται σε ένα NLS, εξετάσαμε εάν η ακετυλίωση μπορεί να επηρεάζει την πυρηνική εντόπιση της πρωτεΐνης. Για να κάνουμε αυτό χρησιμοποιήσαμε συντήξεις με τη GFP για να μελετήσουμε τον υποκυτταρικό εντοπισμό των μεταλλαγών ακετυλίωσης mK1 σε σχέση με την mK2 και την αγρίου τύπου πρωτεΐνη. Η πρωτεΐνη της σύντηξης της GFP με το CIPTA κατανέμεται τόσο στον πυρήνα όσο και το κυτταρόπλασμα, ενώ οι μεταλλαγές mK1 και mK2 εδράζονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 3, επάνω μέρος). Πιο ειδικά, όπως δείχνεται στον Πίνακα 1, η αγρίου τύπου CIPTA πρωτεΐνη έχει περισσότερο πυρηνική παρά κυτταροπλασματική κατανομή (N>C) στο 33% των κυττάρων, σε αντίθεση με το 0.5% των κυττάρων που

εκφράζουν τις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες mK1 ή mK2. Επιπλέον, η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη mK2 κατανέμεται ομογενώς (N=C) στο 14.4% των κυττάρων, συγκρινόμενο με μόνο 3.5% της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης mK1. Είναι ενδιαφέρον ότι χρήση της Λεπτομυκίνης Β (LMB)(Wolff et al., 1997), ένα καλά χαρακτηρισμένο αναστολέα της πυρηνικής εξόδου που εξαρτάται από CRM1 (Fornierod et al., 1997; Fukuda et al., 1997), οδήγησε στην έντονη πυρηνική εντόπιση του CIITA (Εικόνα 3,LMB). Οι μεταλλαγές mK1 και mK2 επίσης απαντούν στη Λεπτομυκίνη-Β (Εικόνα 3, LMB) σε μικρότερο όμως βαθμό, υποδεικνύοντας ότι διατηρούν την ικανότητα εισόδου και μπορούν να συσσωρευτούν στον πυρήνα όταν αναστέλλεται η έξοδος. Σαν στοιχείο ελέγχου, δείχνουμε ότι μια πρωτεΐνη με αμινοτελική έλλειψη που δεν έχει το NLS και περιέχει τα αμινοξέα 175 έως 1130 έχει επίσης κυτταροπλασματική εντόπιση αλλά δεν επηρεάζεται από τη χρήση LMB (Εικόνα 3). Άρα, ο παρατηρούμενος υποκυτταρικός εντοπισμός του CIITA καθορίζεται τόσο από την πυρηνική είσοδο όσο και από την εξαρτώμενη από τη CRM1 έξοδο.



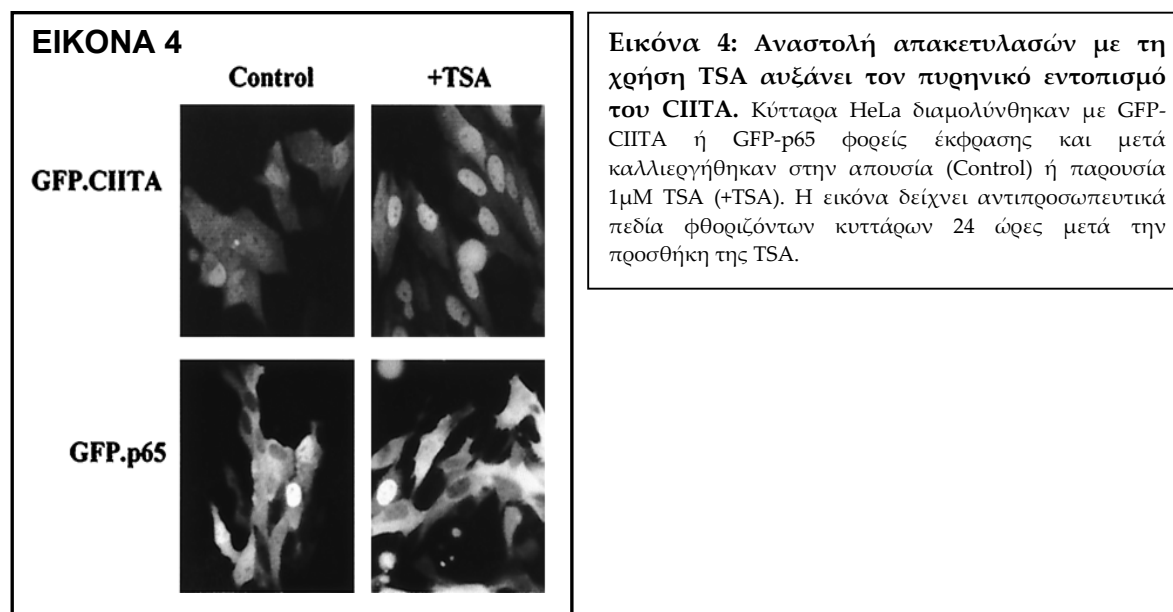
Εικόνα 3: Το CIITA εξέρχεται από τον πυρήνα μέσω της πρωτεΐνης CRM1. Η πυρηνοκυτταροπλασματική κατανομή της αγρίου τύπου και των μεταλλαγών GFP-CIITA συντήξεων δείχνονται σε HeLa κύτταρα. Το LMB υποδηλώνει τη χρήση 20nM LMB για 2 ώρες.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Υποκυτταρική κατανομή των GFP συντήξεων μετά τη χρήση TSA.

TSA	WT CIITA		mK1		mK2		p65	
	-	+	-	+	-	+	-	+
N>C	33±3	77±8.5	0.5±0.2	0.6±0.2	0.4±0.2	2.2±0.7	13.3±3.1	14.2±4
N=C	54.4±4.2	19.5±3	3.5±1	5.5±2	14.4±2.7	60.4±8.1	14.7±4	13.1±3.5
C>N	12.6±2	3.5±0.8	96±1.2	93.4±3	85.2±2.8	37.4±7.2	72±6.7	72.7±6.5

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Το ποσοστό των κυττάρων με σαφώς εμφανή πυρηνικό σε σχέση με τον κυτταροπλασματικό φθορισμό (N>C), φθορισμό ομογενώς κατανεμημένο τόσο στον πυρήνα όσο και το κυτταρόπλασμα (N=C), ή κυρίως κυτταροπλασματικό φθορισμό (C>N) υποδεικνύεται 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση χωρίς (-) ή παρουσία (+) 1μM TSA. Τα αποτελέσματα είναι οι μέσοι όροι των επί τοις εκατό ποσοστών με τη σταθερή του απόκλιση, από πέντε ανεξάρτητα πειράματα. Για κάθε πείραμα μετρήθηκαν πάνω από 1000 κύτταρα.

Για να συσχετίσουμε την υποκυτταρική κατανομή του CIITA με το επίπεδο ακετυλίωσής του, χρησιμοποιήσαμε τον αναστολέα απακετυλασών Τριχοστατίνη-A (TSA) (Yoshida et al., 1990). Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με συντήξεις της GFP με την αγρίου τύπου ή μεταλλαγμένη CIITA πρωτεΐνη καθώς και με την GFP-p65, και ο πυρηνοκυτταροπλασματικός εντοπισμός αυτών των πρωτεϊνών ανιχνεύθηκε με μικροσκοπία φθορισμού. Στην Εικόνα 4 δείχνεται ότι η προσθήκη TSA ενισχύει σημαντικά την πυρηνική εντόπιση του GFP-CIITA αλλά δεν επηρέασε σημαντικά τον υποκυτταρικό εντοπισμό της GFP-p65, η οποία δεν ακετυλιώνεται από CBP ή pCAF (Munshi et al., 1998) και μετακινείται ανάμεσα στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα με ρυθμιζόμενο τρόπο (Baldwin, 1996; Harhaj and Sun, 1999). Ο Πίνακας 1 ποσοτικοποιεί την πυρηνική και κυτταροπλασματική κατανομή της αγρίου τύπου, της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης CIITA, και της p65 πριν και μετά την επίδραση της TSA. Επίδραση της TSA για 24 ώρες οδήγησε σε ισχυρή ανακατανομή της πρωτεΐνης GFP-CIITA προς τον πυρήνα (N>C τα κύτταρα αυξήθηκαν από 33 σε 77%) με σαφή μείωση της ομογενούς (N=C κύτταρα μειώθηκαν από 54 σε 19%) και κυτταροπλασματικής (C>N) εκφραζόμενης πρωτεΐνης. Είναι ενδιαφέρον ότι η χρήση TSA επηρέασε σημαντικά την κατανομή της μεταλλαγμένης mK2, αυξάνοντας την ομογενή κατανομή στο 60%, αλλά δεν επηρέασε την κατανομή της μεταλλαγμένης ακετυλίωσης mK1. Επίσης δείχθηκε ότι η TSA δεν επηρεάζει την υποκυτταρική κατανομή της p65.



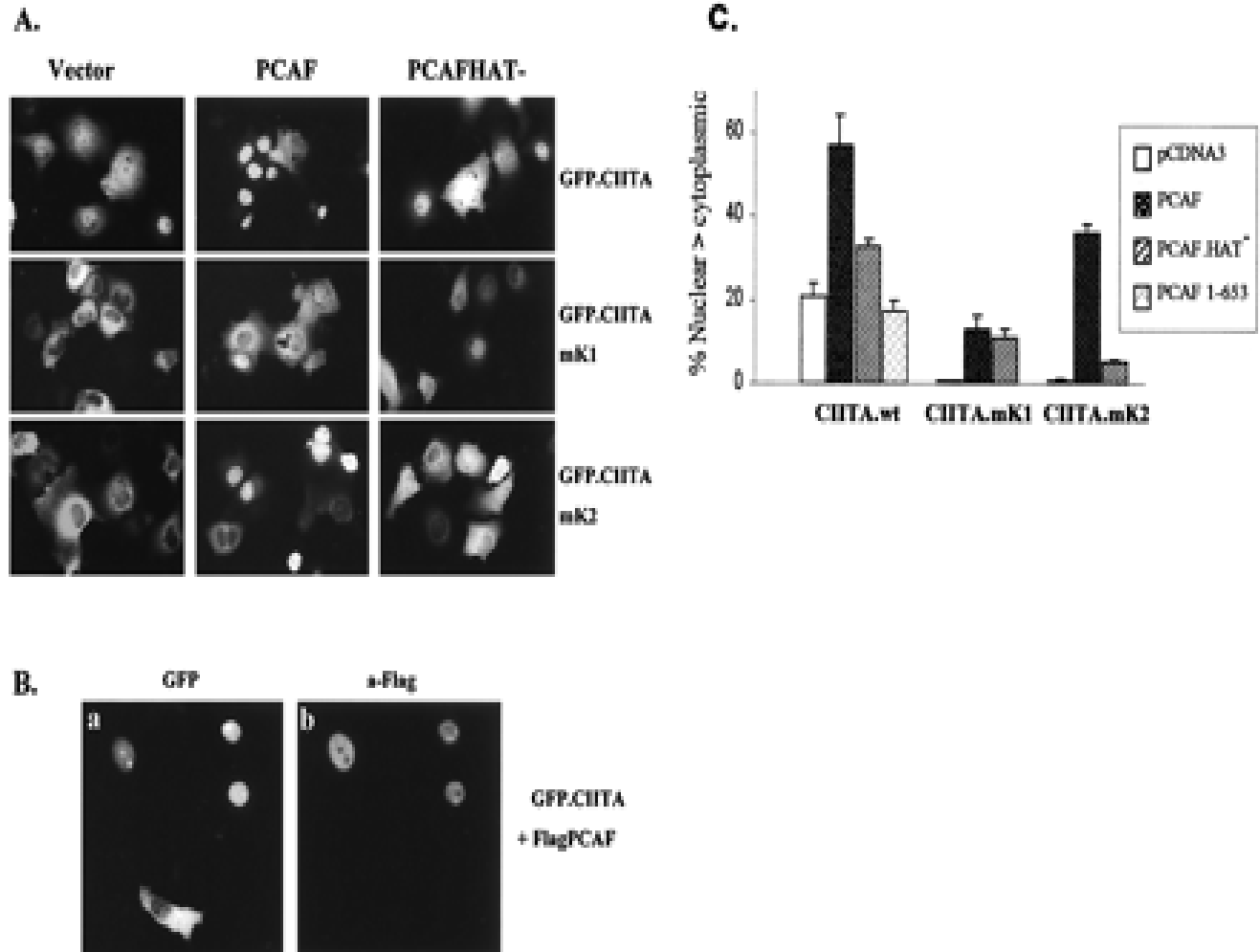
Άρα η αναστολή της απακετυλίωσης μετατοπίζει το ισοζύγιο της CIITA πρωτεΐνης από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα με τρόπο εξαρτώμενο από την παρουσία του ζεύγους λυσινών K141,144.

Για να έχουμε ευθεία απόδειξη ότι η ακετυλίωση του CIITA από τον pCAF επηρεάζει την πυρηνική και κυτταροπλασματική κατανομή του, συνδιαμολύναμε GFP-CIITA και pCAF κατασκευές έκφρασης σε COS-1 κύτταρα. Ο εξωγενώς εκφραζόμενος pCAF έχει τη δυνατότητα να αυξήσει τα πυρηνικά επίπεδα του

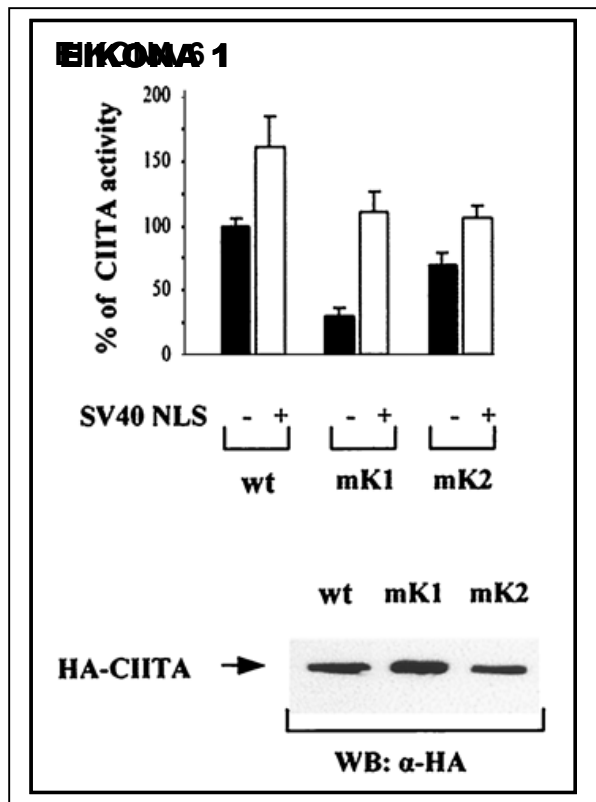
CIITA. Όπως υποδεικνύεται στην Εικόνα 5A και C, η συνέκφραση του pCAF ενισχύει τον πυρηνικό εντοπισμό του GFP-CIITA ενώ η πρωτεΐνη pCAF.HAT είναι πολύ λιγότερο αποτελεσματική. Τα κύτταρα που εκφράζουν υψηλά επίπεδα pCAF παρουσιάζουν υψηλό πυρηνικό εντοπισμό του CIITA. Στην Εικόνα 5B υποδεικνύεται το ίδιο δείχνοντας ότι ο πυρηνικός εντοπισμός του GFP-CIITA συσχετίζεται με την έκφραση του pCAF. Ο υποκυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης GFP δεν επηρεάζεται από τη συνέκφραση του pCAF. Η μεταλλαγή mK2 επίσης απαντά ισχυρά στη συνέκφραση του pCAF (το επί τοις εκατό ποσοστό των κυττάρων που εμφανίζουν πυρηνικό φθορισμό αυξάνεται από 0.7 σε 33%), και αυτό το αποτέλεσμα είναι εξαρτώμενο από την ενεργότητα ακετυλοτρανσφεράσης (Εικόνα 5C). Παρόλα αυτά, η απάντηση της μεταλλαγής mK1 ήταν σαφώς χαμηλότερη και δεν εξαρτάται από την παρουσία μιας άθικτης περιοχής με ιδιότητα ακετυλοτρανσφεράσης (Εικόνα 5C). Ελλείψεις του pCAF που δεν αλληλεπιδρούν ισχυρά με το CIITA, όπως η έλλειψη pCAF.1-653 (Εικόνα 5C) ή η έλλειψη pCAF.ΔADA, δεν έχουν την ικανότητα να αυξήσουν τον πυρηνικό εντοπισμό του CIITA. Άρα, η επίδραση του pCAF στην κατανομή του CIITA εξαρτάται από την ικανότητά του να αλληλεπιδρά και να ακετυλιώνει το CIITA. Όλα τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι η ακετυλίωση από τον pCAF ή η αναστολή της απακετυλίωσης οδηγεί σε αυξημένα πυρηνικά επίπεδα του CIITA στοχεύοντας τις λυσίνες 141 και 144.

Το επόμενο που εξετάσαμε ήταν οι συνέπειες της ακετυλίωσης του CIITA στην γονιδιακή έκφραση των MHC τάξης II. Για αυτό το λόγο, εξετάσαμε την ικανότητα της αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων CIITA πρωτεϊνών να ενεργοποιούν ένα τάξης II υποκινητή. Η Εικόνα 6 υποδεικνύει ότι η μεταλλαγή mK1 έχει μια σαφώς μειωμένη ικανότητα να επάγει ένα τάξης II υποκινητή (25% σε σχέση με τα επίπεδα επαγωγής της αγρίου τύπου πρωτεΐνης). Σε αντίθεση, η μεταλλαγή mK2 διατηρεί το 70% της ενεργότητας της αγρίου τύπου πρωτεΐνης (Εικόνα 6). Η διαφορικότητα στην επαγωγή από τις δύο μεταλλαγμένες πρωτεΐνες συσχετίζεται με τον διαφορικό υποκυτταρικό εντοπισμό του CIITA (Πίνακας 1). Για να διαπιστώσουμε εάν μπορούμε να επηρεάσουμε την ενεργότητα της αγρίου τύπου καθώς και των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών CIITA αυξάνοντας τον πυρηνικό τους εντοπισμό, δημιουργήσαμε συντήξεις που φέρουν στο αμινοτελικό τους άκρο το σήμα πυρηνικού εντοπισμού του *simian* ιού 40 (SV40). Η προσθήκη αυτού του σήματος πυρηνικού εντοπισμού καθιστά όλες τις πρωτεΐνες πυρηνικές, οδηγώντας σε αύξηση της ενεργότητάς τους (Εικόνα 6). Πιο ειδικά, η ενεργότητα της μεταλλαγής mK1 αποκαθίσταται και φτάνει σε επίπεδα που συγκρίνονται με αυτά της μεταλλαγής mK2. Άρα, αυξημένα επίπεδα πυρηνικού εντοπισμού του CIITA οδηγούν σε αυξημένη μεταγραφική ενεργοποίηση των τάξης II γονιδίων.

EIKONA 5



Εικόνα 5: Ο pCAF ενισχύει τον πυρηνικό εντοπισμό του CΙΤΑ. (Α) Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με 1μg φορέα έκφρασης GFP-CΙΤΑ και 3μg Flag-pCAF ή Flag-pCAF.HAT- ή άδειο φορέα. Τα κύτταρα αναλύθηκαν 20 με 24 ώρες αργότερα. **(Β)** Συνέκφραση του pCAF οδηγεί σε υψηλά επίπεδα πυρηνικού CΙΤΑ. Κύτταρα διαμολυμένα με GFP-CΙΤΑ και Flag-pCAF βάφτηκαν με anti-Flag αντίσωμα και με δεύτερο αντίσωμα προσδεμένο με ροδαμίνη και αναλύθηκαν είτε για φθορισμό GFP (a) είτε για χρώση ροδαμίνης (b). **(C)** Ποσοτική ανάλυση των προηγούμενων αποτελεσμάτων. Υποδεικνύεται το ποσοστό των κυττάρων που εξέφραζαν σε μεγάλο ποσοστό ή απολύτως πυρηνικό CΙΤΑ (N>C) στην παρουσία των υποδεικνυόμενων φορέων έκφρασης pCAF. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται προέκυψαν από την ανάλυση πάνω από 300 κυττάρων, 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση και είναι μέσοι όροι από 4 ανεξάρτητα πειράματα.



Εικόνα 6: Μεταγραφική ενεργοποίηση από τις μεταλλάξεις για ακετυλίωση του CIITA. COS-1 κύτταρα διαμολύνθηκαν με 1μg του Ea τάξης II-Luc φορέα αναφοράς και 25 ng φορέων έκφρασης των υποδεικνυόμενων αγρίου τύπου (wt) ή μεταλλαγών του CIITA. Η ενεργότητα λουσιφεράσης μετρήθηκε 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σαν το ποσοστό της ενεργοποίησης του υποκινητή που επιτυγχάνεται από το αγρίου τύπου CIITA, το οποίο ορίζεται σαν 100%, και οι τιμές είναι οι μέσοι όροι τεσσάρων πειραμάτων. Οι μαύρες και άσπρες στήλες υποδεικνύουν τις ενεργότητες των συντήξεων CIITA στην απουσία ή παρουσία του σήματος πυρηνικού εντοπισμού του SV40, αντίστοιχα. Το πρότυπο έκφρασης των πρωτεϊνών CIITA αναλύθηκε με Western Blot χρησιμοποιώντας anti-HA αντίσωμα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σ' αυτό το κομμάτι της μελέτης μας εξετάσαμε το ρόλο της αλληλεπίδρασης του pCAF και του CBP στη μεταγραφική ενεργοποίηση των τάξης II γονιδίων ιστοσυμβατότητας του Κυρίου Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας. Η πρόσδεση του pCAF ή του CBP οδηγεί στην ακετυλίωση του CIITA σε κατάλοιπα λυσινών που εδράζονται σε ένα σήμα του πυρηνικού εντοπισμού. Επιπλέον δείχθηκε ότι το CIITA εξέρχεται από τον πυρήνα με ένα μονοπάτι που εξαρτάται από την πρωτεΐνη CRM1. Βασιζόμενοι στο αποτέλεσμα του αναστολέα απακετυλίωσης TSA καθώς και στη δράση του pCAF να αυξάνει τα πυρηνικά επίπεδα του CIITA δια μέσω της ακετυλίωσης αυτών των καταλοίπων λυσινών, προτείνουμε ότι μια σημαντική λειτουργία της ακετυλίωσης είναι να ρυθμίζει την ενεργότητα ενός συνενεργοποιητή αυξάνοντας τον πυρηνικό του υποκυτταρικό εντοπισμό.

Το CBP και ο pCAF είναι ακετυλοτρανσφεράσες ιστονών και άλλων παραγόντων που συμμετέχουν στο σχηματισμό διαφορετικών πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων. Το CBP είναι μέρος του ολοενζύμου της Πολυμεράσης II (Nakajima et al., 1997), ενώ ο pCAF ανιχνεύεται σε ανθρώπινα κύτταρα σε ένα σύμπλοκο που είναι αντίστοιχο του SAGA στη ζύμη και περιλαμβάνει ανθρώπινα ομόλογα των yADA2, yADA3, ySpt3 και TAFs με δομές ιστόνης (Ogrysko et al., 1998). Άρα η ικανότητα του CIITA να στρατολογεί τις ακετυλοτρανσφεράσες CBP και pCAF ανεξάρτητα, του παρέχει τη δυνατότητα να αλλάζει τη δομή της χρωματίνης με εναλλακτικές αλληλεπιδράσεις με ποικίλα σύμπλοκα. Το CIITA είναι απαραίτητο για την απόκτηση ενός κατελιμμένου από παράγοντες τάξης II υποκινητή σε επαγμένους από IFN-γ ινοβλάστες

αλλά όχι στα Β λεμφοκύτταρα (Villard et al., 1999; Wright et al., 1998). Αυτή η διαφορά ίσως οφείλεται σε κυτταροειδικά σύμπλοκα αλλαγής της χρωματίνης που αλληλεπιδρούν με το C/EBP. Δεν υπάρχει εκτεταμένη πληροφορία όσον αφορά τη ρύθμιση της ενεργότητας του C/EBP και του pCAF σε διαφορετικά κύτταρα και σε απάντηση σε διαφορετικά σήματα (Masumi et al., 1999). Άρα, συμπεραίνουμε ότι οι συνθήκες που ρυθμίζουν την επάρκεια και τη στοιχειομετρία καθενός από τους δύο συνενεργοποιητές μπορούν να επηρεάζουν επίσης τη λειτουργία του C/EBP.

Η ακετυλίωση του C/EBP σαν ρυθμιστικός μηχανισμός για την υποκυτταρική του κατανομή.

Δείξαμε ότι η ακετυλίωση μπορεί να ρυθμίζει τον υποκυτταρικό εντοπισμό του C/EBP, το οποίο μετακινείται ανάμεσα στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα. Η μετακίνηση του C/EBP επιτυγχάνεται από τη συνδυασμένη δράση της πυρηνικής εισόδου και της πυρηνικής εξόδου που εξαρτάται από την CRM1. Ο τελευταίος μηχανισμός περιλαμβάνει αλληλουχίες πυρηνικής εξόδου (Kretsovali et al., 2001). Χαρακτηρίσαμε ήδη ένα διμερές σήμα πυρηνικής εισόδου στην αμινοτελική περιοχή του C/EBP. Άλλο ένα σήμα πυρηνικής εισόδου, το οποίο ελλείπει σε ένα ασθενή με «σύνδρομο γυμνών λεμφοκυττάρων», χαρακτηρίστηκε πρόσφατα στο καρβοξυτελικό άκρο του C/EBP (αμινοξέα 955 έως 960) (Cressman et al., 1999). Διαφαίνεται ότι και τα δύο σήματα πυρηνικής εισόδου είναι απαραίτητα για την πυρηνική είσοδο και λειτουργία του C/EBP. Το πρώτο μισό του αμινοτελικού εντοπιζόμενου NLS περιέχει τις λυσίνες 141 και 144, οι οποίες είναι στόχοι ακετυλίωσης από το C/EBP και pCAF. Δείξαμε ότι συνθήκες που ευνοούν τη ακετυλίωση, όπως η συνέκφραση του pCAF ή η αναστολή απακετυλασών, οδηγούν στην αύξηση των πυρηνικών επιπέδων του C/EBP. Αυτό το αποτέλεσμα απαιτεί (i) την άμεση φυσική αλληλεπίδραση ανάμεσα στον pCAF και το C/EBP και (ii) το ζεύγος λυσινών K141,144. Όταν η πυρηνική είσοδος του C/EBP αναστέλλεται από τη μεταλλαγή mK2 στο σήμα πυρηνικής εισόδου (NLS), η δράση της ακετυλίωσης στο να ελέγχει τα πυρηνικά επίπεδα γίνεται πιο εμφανής. Η μεταλλαγή ακετυλίωσης και NLS, mK1, δεν επηρεάζεται από τη δράση της ακετυλάσης του pCAF, παρότι μετατοπίζεται σε μικρό βαθμό προς τον πυρήνα μέσω του pCAF αλλά με τρόπο που δεν εξαρτάται από τη δράση ακετυλοτρανσφεράσης. Αυτή η δράση τονίζει την ικανότητα της απλής αλληλεπίδρασης με τον pCAF για τη μετακίνηση προς τον πυρήνα των μεταλλαγμάτων mK1, mK2 και της αγρίου τύπου πρωτεΐνης. Ο αναστολέας απακετυλασών TSA μιμείται, παρότι σε μικρότερο βαθμό, τη δράση του pCAF στη μεταλλαγή mK2. Μια πιθανή εξήγηση γι'αυτό θα μπορούσε να είναι ότι η TSA δρα έμμεσα και άρα με πιο αργή κινητική απ'ότι ο pCAF. Αυξημένα πυρηνικά επίπεδα του C/EBP μπορεί να οφείλονται σε αυξημένη είσοδο ή μειωμένη έξοδο. Αφού οι ακετυλάσες όπως ο pCAF είναι πυρηνικές πρωτεΐνες, τείνουμε προς τη δεύτερη υπόθεση, παρότι η πρώτη δεν μπορεί να αποκλειστεί.

Ο βαθμός ακετυλίωσης του C/EBP είναι σημαντικός για την ενεργότητά του. Η ικανότητα ενός μορίου pCAF χωρίς δράση ακετυλοτρανσφεράσης, να δρα σαν συνενεργοποιητής για το C/EBP είναι

μειωμένη σε σύγκριση με το αγρίου τύπου μόριο αλλά δεν χάνεται τελείως. Η έλλειψη πλήρους αναστολής μπορεί να οφείλεται στην ικανότητα ενός HAT- pCAF να στρατολογεί την ακετυλάση CBP. Η σημασία της ακετυλίωσης του C/EBP β στη μεταγραφική ενεργοποίηση ενός τάξης II υποκινητή διαφαίνεται από τη μειωμένη ικανότητα συνενεργοποίησης του μεταλλάγματος ακετυλίωσης mK1 συγκρινόμενο με το αγρίου τύπου μόριο η το μετάλλαγμα mK2 (που είναι μεταλλαγή στο σήμα πυρηνικής εισόδου). Αφού και οι δύο μεταλλαγές διατηρούν μια εγγενή ικανότητα για πυρηνική είσοδο, όπως υποδεικνύεται από τη δράση της LMB (Εικόνα 3), η διαφορικότητα στη μεταγραφική ενεργοποίηση από τα mK1 και mK2 υπογραμμίζει τη σημασία της ακετυλίωσης στη δράση του C/EBP β .

Πιστεύεται ότι η ακετυλίωση επάγει δομικές αλλαγές που θα μπορούσαν να επηρεάζουν αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-DNA ή πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Για το C/EBP β , η ακετυλίωση ίσως επάγει μια διαμορφωτική αλλαγή, η οποία αλλάζει τον τρόπο με τον οποίο το C/EBP β αλληλεπιδρά με το μηχανισμό πυρηνικής εξόδου. Εναλλακτικά, είναι πιθανό ότι το ακετυλιωμένο C/EBP β κατακρατείται στον πυρήνα λόγω αλληλεπίδρασης με μια αρχιτεκτονική πυρηνική δομή (τον πυρηνοσκελετό) (Cook, 1999; Hozak, 1996; Iborra et al., 1996; Jackson et al., 1993), πιθανά δια μέσω ενδιάμεσων μορίων όπως ο pCAF. Η ακετυλίωση μπορεί επίσης να υποβοηθά ή να σταθεροποιεί τη στρατολόγηση του C/EBP β στους MHC τάξης II υποκινητές. Από την άλλη πλευρά η απακετυλίωση μπορεί να μειώνει τα πυρηνικά επίπεδα και την αλληλεπίδραση στον υποκινητή, περιορίζοντας έτσι την ικανότητα του C/EBP β για μεταγραφική ενεργοποίηση.

Έχει επίσης δημοσιευθεί ότι η πρόσδεση GTP απαιτείται για την πυρηνική κατανομή και την ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων του C/EBP β (Harton et al., 1999). Η πιθανότητα μιας λειτουργικής σύνδεσης αυτών των δύο μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων- της ακετυλίωσης και της πρόσδεσης GTP- για τη ρύθμιση της υποκυτταρικής κατανομής και ενεργότητας του C/EBP β θα αναφερθεί παρακάτω.

Ο έλεγχος της ενδοκυτταρικής μετακίνησης πρωτεϊνών είναι ένας νέος μηχανισμός δια μέσω του οποίου η ακετυλίωση μπορεί να ρυθμίζει τη δράση ενός μεταγραφικού ενεργοποιητή ή συνενεργοποιητή όπως είναι και το C/EBP β . Είναι αξιοσημείωτο, ότι και σε άλλες δύο περιπτώσεις, τα κατάλοιπα που ακετυλιώνονται βρίσκονται μέσα σε σήματα πυρηνικού εντοπισμού. Οι θέσεις ακετυλίωσης της p53 από το CBP και τον pCAF, βρίσκονται μέσα στο σήμα πυρηνικής εισόδου (Sakaguchi et al., 1998), ενώ οι ακετυλιωμένες λυσίνες στον παράγοντα EKLF επίσης εδράζονται σε ένα NLS (Zhang and Bieker, 1998). Θα ήταν ενδιαφέρον να διερευνηθεί εάν σ'αυτές τις περιπτώσεις το επίπεδο ακετυλίωσης των πρωτεϊνών επηρεάζει την υποκυτταρική τους κατανομή.

Συμπερασματικά αναφέρουμε ότι τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι ο pCAF ενεργοποιεί τη μεταγραφή των MHC τάξης II γονιδίων δια μέσω μηχανισμούς που εξαρτώνται από την ακετυλίωση και όχι μόνο. Δείξαμε ότι μια σημαντική δράση της ακετυλίωσης είναι η μετατόπιση της πυρηνοκυτταροπλασματικής ισορροπίας ενός ενεργοποιητή προς τον πυρήνα.

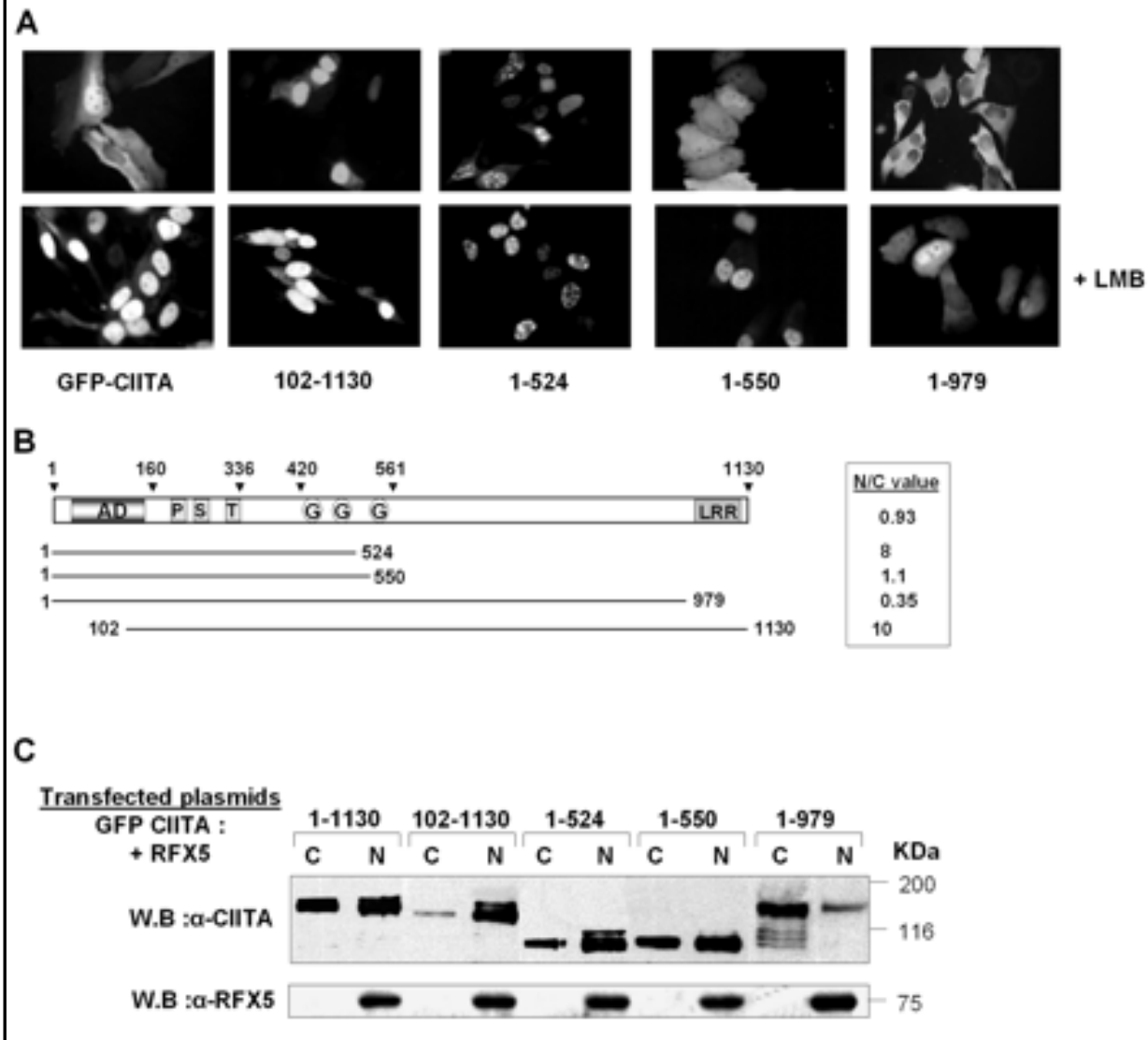
Η αλληλεπίδραση του CIPTA με τον εαυτό του συσχετίζεται με την υποκυτταρική του κατανομή και την ικανότητά του για μεταγραφική ενεργοποίηση.

Αποτελέσματα

Πολλαπλές περιοχές καθορίζουν την πυρηνοκυτταροπλασματική κατανομή της πρωτεΐνης CIPTA.

Έχουμε ήδη δείξει με προηγούμενα πειράματα ότι το CIPTA είναι ο πρώτος συνενεργοποιητής που εξέρχεται ενεργά από τον πυρήνα (Spilianakis et al., 2000). Σε συμφωνία με αυτή και άλλες παρατηρήσεις βρήκαμε ότι το CIPTA κατανέμεται ισομερώς ανάμεσα στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα με λόγο πυρηνικής προς κυτταροπλασματική κατανομή (N/C) ίσο με 0.93. Για να αναγνωρίσουμε περιοχές που ενέχονται στην έξοδο της πρωτεΐνης, δημιουργήσαμε αμινοτελικές και καρβοξυτελικές ελλείψεις του CIPTA σε σύντηξη με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) (Εικόνα 1B). Η έλλειψη των πρώτων 102 αμινοξέων (Εικόνα 1A, 102-1130) καθιστά την πρωτεΐνη πυρηνική (N/C=10), υποδεικνύοντας ότι αυτή η περιοχή ρυθμίζει την πυρηνική έξοδο. Άρα, αλληλουχίες μέσα στην περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης της πρωτεΐνης καθορίζουν την πυρηνική της έξοδο. Όλες οι καρβοξυτελικές ελλείψεις του CIPTA που διατηρούν το αμινοτελικό NLS2 (Spilianakis et al., 2000) και εκτείνονται μέχρι το αμινοξύ 524, είναι κυρίως πυρηνικές. Όπως δείχνεται στην Εικόνα 1A το CIPTA.1-524 εμφανίζει υψηλά επίπεδα πυρηνικής εντόπισης (N/C=8). Σε αντίθεση, ένα μόριο CIPTA που εκτείνεται ως το αμινοξύ 550 εμφανίζει ίση κατανομή και στα δύο κυτταρικά διαμερίσματα (N/C=1.1) και κατακρατείται στον πυρήνα όταν προστίθεται στα κύτταρα LMB (αναστολέας της καθοριζόμενης από CRM1 πυρηνικής εξόδου). Αυτά τα πρότυπα κατανομής είναι συμβατά με την παρουσία επιπρόσθετων αλληλουχιών ανάμεσα στα αμινοξέα 525 και 550 που ενέχονται στην πυρηνική έξοδο. Χαρακτηρίζουμε τις περιοχές 1-102 και 525-550 σαν περιοχές πυρηνικής εξόδου (Nuclear Export Regions: NERs) 1 και 2, αντίστοιχα. Μια έλλειψη του CIPTA που εκτείνεται μέχρι το αμινοξύ 979 (Εικόνα 1A, 1-979) και περιέχει και τα δύο NLSs (Cressman et al., 1999) εμφανίζει κυτταροπλασματική κατανομή (N/C=0.35) και απαντά μερικώς στην προσθήκη LMB. Και σε συμφωνία με μια άλλη δημοσίευση (Hake et al., 2000), τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι επιπλέον πληροφορία για πυρηνικό εντοπισμό εδράζεται στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης που είναι πλούσια σε λευκίνη. Πειράματα παρασκευής πυρηνικών και κυτταροπλασματικών κλασμάτων HeLa κυττάρων συνδιαμολυμένων με την ίδια ομάδα κατασκευών που δείχνονται στην Εικόνα 1B καθώς και με μια κατασκευή που κωδικοποιεί τον RFX5 έδειξαν ότι η κατανομή των πρωτεϊνών στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα (Εικόνα 1C) είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της οπτικής ανάλυσης. Ο RFX5 που είναι αποκλειστικά πυρηνικός παρατίθεται σαν σημείο ελέγχου της μεθόδου κλασμάτωσης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων.

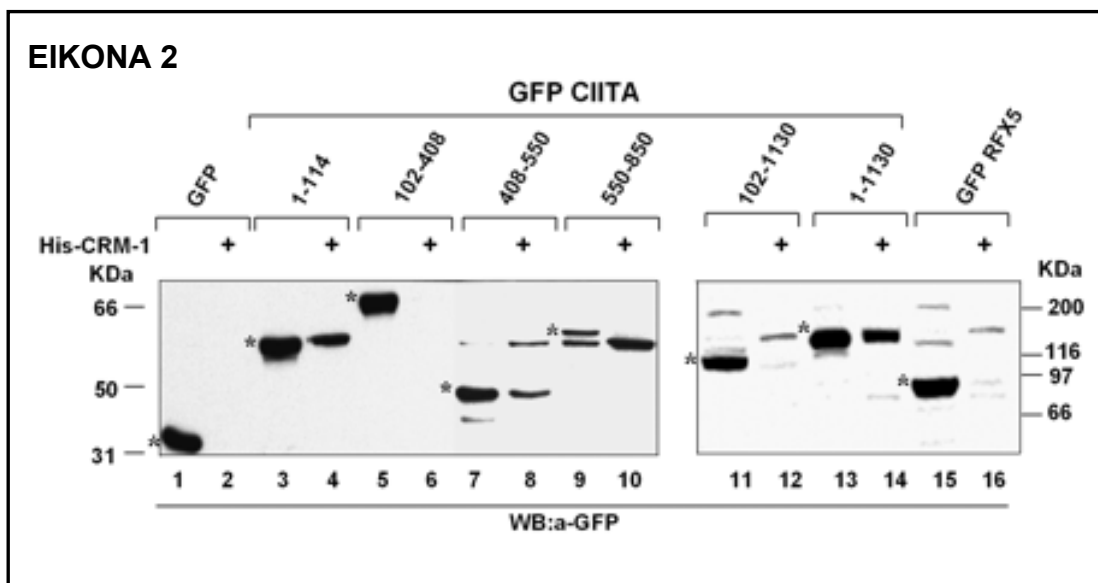
EΙΚΟΝΑ 1



Εικόνα 1: Διαφορετικές επιδράσεις των ελλειμμάτων της πρωτεΐνης CIITA στην πυρηνική είσοδο και την καθοριζόμενη από LMB πυρηνική κατακράτηση. (A) GFP συντήξεις των υποδεικνυόμενων περιοχών του CIITA διαμόλυναν HeLa κύτταρα. GFP-CIITA είναι η αγρίου τύπου πρωτεΐνη (αμινοξέα 1-1130). Ο πράσινος φθορισμός παρατηρήθηκε 24h αργότερα είτε χωρίς προσθήκη ή μετά την προσθήκη για 2h 20nM λεπτομυκίνης B (+LMB). **(B)** σχηματική αναπαράσταση του CIITA και των άκρων των ελλείψεων αυτού. Η περιοχή ενεργοποίησης (AD), οι θέσεις πρόσδεσης GTP (GTP), τα σήματα πυρηνικής εισόδου (NLS), και η περιοχή πλούσια σε λευκίνες (LRR) υποδεικνύονται. Στα αριστερά δείχνονται οι αναλογίες πυρηνικού προς κυτταροπλασματικό φθορισμό όπως μετρήθηκαν με το πρόγραμμα Scion Beta 4, και οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους από τουλάχιστον 50 κύτταρα. **(C)** κυτταροπλασματικά (C) και πυρηνικά (N) κλάσματα παρασκευάστηκαν από HeLa κύτταρα διαμολυμένα με 5μg των υποδεικνυόμενων GFP-CIITA συντήξεων και 1.5μg μιας κατασκευής που εξέφραζε RFX5. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση κατά Western χρησιμοποιώντας είτε α-CIITA ή α-RFX5 αντισώματα.

Για να διερευνήσουμε το ρόλο των διάφορων περιοχών του CIITA στον έλεγχο της πυρηνικής εξόδου, πραγματοποιήσαμε πειράματα για την αξιολόγηση της πρόσδεσης διάφορων κομματιών του CIITA στον υποδοχέα εξόδου CRM1 (Fornerod et al., 1997; Ossareh-Nazari et al., 1997). Συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από COS-1 κύτταρα που εξέφραζαν διάφορα παράγωγα του CIITA σε σύντηξη με την GFP

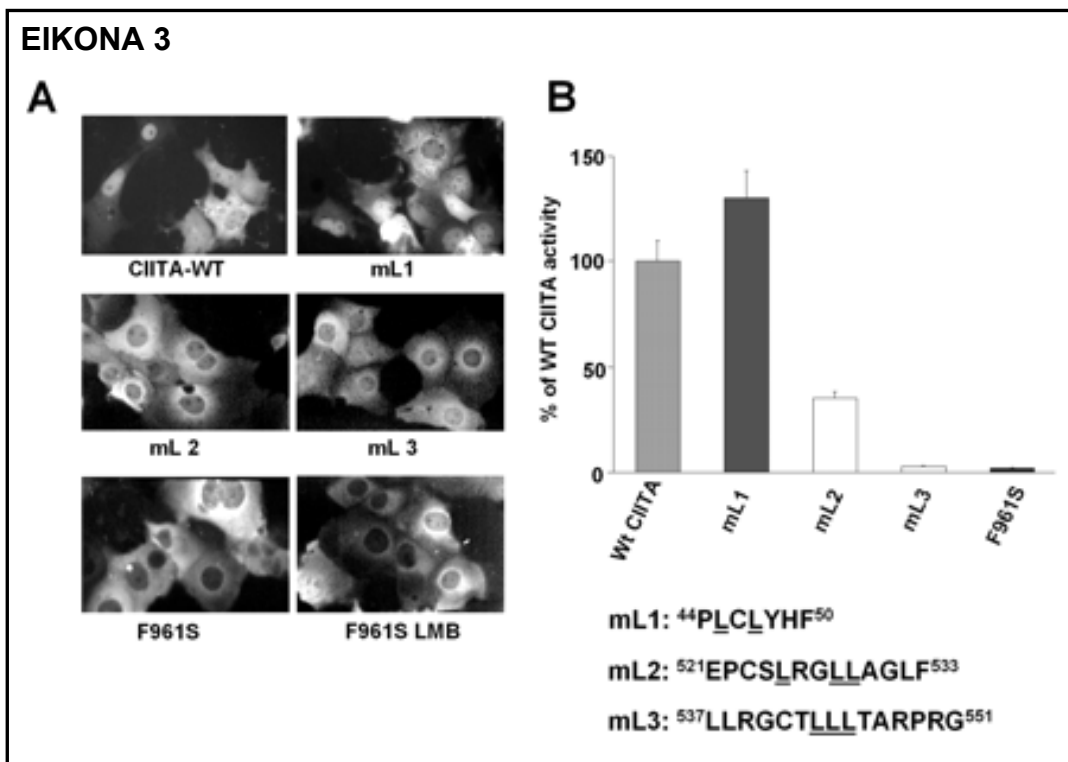
πέρασαν από μια κολώνα αλληλεπίδρασης που περιείχε την CRM1. Η ειδική κατακράτηση πρωτεϊνών στην κολώνα CRM1 ανιχνεύτηκε με ανοσοεντοπισμό. Η Εικόνα 2 δείχνει ότι το πλήρες CIITA κατακρατείται ειδικά στην κολώνα (Εικόνα 2, λωρίδα 14), ενώ ο RFX5 μια πυρηνική πρωτεΐνη δεν κατακρατείται (λωρίδα 16). Τα κομμάτια του CIITA 1-114 και 408-550 που περιέχουν τα στοιχεία NER1 και NER2, που περιγράφηκαν νωρίτερα προσδένονται στην CRM1 (λωρίδες 4 και 8, αντίστοιχα), ενώ κομμάτια που καλύπτουν τις περιοχές 102-408 και 550-850 δεν κατακρατούνται (λωρίδες 6 και 10). Μια έλλειψη που αφαιρεί τα πρώτα 102 αμινοξέα της πρωτεΐνης (CIITA.102-1130) η οποία είναι αποκλειστικά πυρηνική δεν προσδένεται στην CRM1 (λωρίδα 12), υποδεικνύοντας ότι παρότι περιέχει αλληλουχίες που προάγουν την πυρηνική έξοδο, αυτές οι αλληλουχίες δεν είναι προσβάσιμες στην μηχανή εξόδου, με αυτό τον τρόπο που πραγματοποιείται το πείραμα.



Εικόνα 2: Συγκεκριμένες περιοχές του CIITA αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα πυρηνικής εξόδου CRM1. Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από COS-1 κύτταρα διαμολυμένα με συντήξεις της GFP με τα υποδεικνυόμενα CIITA κομμάτια ή το control εξειδίκευσης RFX5 πέρασαν από μια κολώνα Ni-NTA όπου είχε ακινητοποιηθεί η CRM1 με His επίτοπο. Οι κατακρατημένες πρωτεΐνες (λωρίδες με ζυγά νούμερα) σε σύγκριση με το 10% της αρχικής ποσότητας που προστέθηκε (λωρίδες με μονά νούμερα) ανιχνεύτηκαν με ανοσοεντοπισμό με ένα μονοκλωνικό anti-GFP αντίσωμα. Οι ειδικές μπάντες των υπό μελέτη πρωτεϊνών υποδεικνύονται με αστερίσκους.

Και τα δύο NERs περιέχουν ομάδες κοντινών λευκινών, παρότι δεν ομοιάζουν απόλυτα με τα πρότυπα σήματα πυρηνικής εξόδου (Mattaj and Englmeier, 1998). Για να διερευνήσουμε εάν αυτές οι λευκίνες μπορεί να απαιτούνταν για την έξοδο του CIITA, δημιουργήσαμε τις μεταλλαγές που δείχνονται στην Εικόνα 3 και μελετήσαμε τις υποκυτταρικές κατανομές και ενεργότητες των GFP-χιμαιρικών πρωτεϊνών. Η κατανομή της μεταλλαγής ml1 ήταν όμοια με το διάχυτο πρότυπο της αγρίου τύπου πρωτεΐνης, ενώ οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες ml2 και ml3 ήταν κυρίως κυτταροπλασματικές στην πλειοψηφία των κυττάρων (Εικόνα 3Α). Άρα οι μεταλλαγμένες λευκίνες στα ml2 και ml3 ενέχονται στον πυρηνικό εντοπισμό του CIITA. Επίσης κατασκευάσαμε μια μεταλλαγμένη πρωτεΐνη που έχει εντοπισθεί

σε ασθενείς με σύνδρομο γυμνών λεμφοκυττάρων, και αντικαθιστά τη Φαινυλαλανίνη 961 με Σερίνη (F961S) (Quan et al., 1999). Αυτή η σημειακή μεταλλαγή επίσης καθιστά την πρωτεΐνη κυτταροπλασματική (Εικόνα 3A). Η χρήση LMB δεν επηρέασε την κατανομή των ml2, ml3, ή του F961S (Εικόνα 3A), υποδεικνύοντας ότι αυτές οι μεταλλαγές είναι προβληματικές στην πυρηνική είσοδο. Πειράματα παροδικής διαμόλυνσης (Εικόνα 3B), χρησιμοποιώντας ως φορέα αναφοράς τον MHC τάξης II υποκινητή σε σύντηξη με τη Λουσιφεράση έδειξαν επιπλέον ότι το ml1 είχε ενεργότητα ελαφρώς υψηλότερη από το αγρίου τύπου μόριο. Το μετάλλαγμα ml2 διατηρεί περίπου το 30% της ενεργότητας, σε συμφωνία με μια άλλη δημοσίευση (Brown et al., 1998) και το ml3 ή το F961S είναι πρακτικά ανενεργά (Εικόνα 3B). Συνολικά αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν ότι μεταλλαγές που δεν καταστρέφουν άμεσα τα αυτόνομα σήματα πυρηνικής εισόδου παρόλα αυτά καταστέλλουν την πυρηνική είσοδο και ενεργότητα του CIITA.

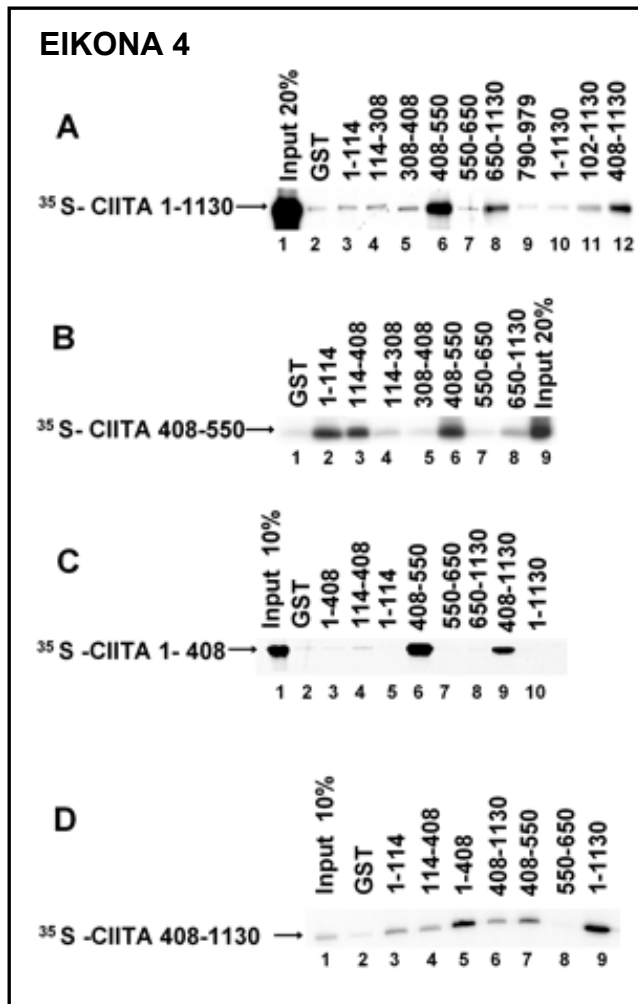


Εικόνα 3: Προβληματική πυρηνική είσοδος και ενεργότητα σημειακών μεταλλαγών του CIITA. (A) η υποκυτταρική κατανομή των υποδεικνυόμενων αγρίου τύπου (WT) και των μεταλλαγμένων CIITA μορίων συντηγμένων με την GFP πρωτεΐνη, αναλύθηκε μετά την έκφρασή τους σε COS-7 κύτταρα. (B) μεταγραφική ενεργοποίηση ενός τάξης II-λουσιφεράσης φορέα αναφοράς (1μg) από τα υποδεικνυόμενα αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων μορφών CIITA (100ng) εκτιμήθηκε μετά τη διαμόλυνση 1.5x10⁵ HeLa κυττάρων. Τα αποτελέσματα χρησιμοποιώντας είτε FLAG- ή GFP-CIITA φορείς ήταν συγκρίσιμα και είναι οι μέσες τιμές από έξι πειράματα που παρουσιάζονται σαν επί τοις εκατό ποσοστά σε σχέση με την ενεργότητα λουσιφεράσης που παράγεται από το αγρίου τύπου CIITA (WT CIITA), του οποίου η ενεργότητα καθορίζεται σαν 100. Οι μεταλλαγές των καταλοίπων λευκίνης σε αλανίνες στα ml1, ml2 και ml3 είναι υπογραμμισμένες.

Το CIIΤΑ αλληλεπιδρά με τον εαυτό του.

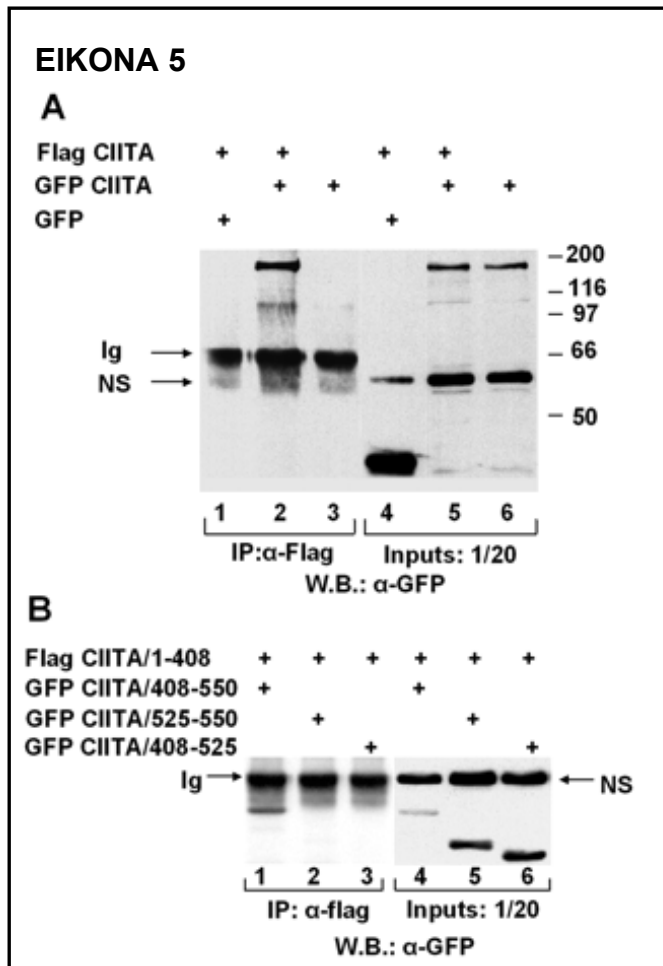
Η προβληματική πυρηνική είσοδος των μεταλλαγών του CIIΤΑ που δεν επηρεάζουν άμεσα τα σήματα πυρηνικής εισόδου εγείρουν την πιθανότητα ότι η είσοδος μπορεί να απαιτεί μια συγκεκριμένη δομή πρωτεΐνης που καταστρέφεται στις μεταλλαγές που αναφέρουμε. Μια τέτοια διαμόρφωση μπορεί να επιτευχθεί με αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης πρωτεΐνης. Η ομολογία του CIIΤΑ με τον ενεργοποιητή κασπασών Nod1 που έχει τη δυνατότητα να ολιγομερίζεται (Inohara et al., 2000) μας οδήγησε στη διερεύνηση της υπόθεσης της αυτοαλληλεπίδρασης του CIIΤΑ.

Η Εικόνα 4Α δείχνει ότι, *in vitro* μεταφρασμένη και σημασμένη με ³⁵S-μεθειονίνη, αγρίου τύπου CIIΤΑ, αλληλεπιδρά ισχυρά με την περιοχή που εκτείνεται από τα αμινοξέα 408 έως 550 (λωρίδα 6) και με την καρβοξυτελική περιοχή (αμινοξέα 650-1130 και 408-1130, λωρίδες 8 και 12, αντίστοιχα). Ο ίδιος ραδιενεργός ανιχνευτής μπορεί να αλληλεπιδρά σε μικρότερο βαθμό με την αμινοτελική έλλειψη των αμινοξέων 102-1130 (λωρίδα 11). Ένας ανιχνευτής των αμινοξέων 408-550 (Εικόνα 4B) μπορεί να αλληλεπιδρά με τον εαυτό του (λωρίδα 6), με τα αμινοτελικά αμινοξέα 1-114 (λωρίδα 2) και 114-408 (λωρίδα 3) και λιγότερο καλά με τα καρβοξυτελικά αμινοξέα 650-1130 (λωρίδα 8). Σε συμφωνία με αυτό, ένα τμήμα που καλύπτει τα πρώτα 408 αμινοξέα κατακρατείται επαρκώς από το GST-CIIΤΑ/408-550 (Εικόνα 4C, λωρίδα 6) αλλά δεν έχει την ικανότητα ομοτυπικής αλληλεπίδρασης (Εικόνα 4C, λωρίδες 3-5). Τα καρβοξυτελικά αμινοξέα 408-1130 μπορεί να προσδένεται στα αμινοτελικά αμινοξέα 1-408 (Εικόνα 4D, λωρίδα 5) και λιγότερο ικανοποιητικά στον εαυτό του (Εικόνα 4D, λωρίδα 6). Είναι αξιοσημείωτο ότι ένα άθικτο CIIΤΑ μόριο δεν έχει τη δυνατότητα να προσδένεται στον εαυτό του (Εικόνα 4A, λωρίδα 10) ή στα αμινοτελικά 408 αμινοξέα (Εικόνα 4A, λωρίδες 3-5 και C, λωρίδα 10), ενώ μπορεί να προσδένεται στα καρβοξυτελικά αμινοξέα 408-1130 (Εικόνα 4A, λωρίδα 12 και D, λωρίδα 9). Άρα η αμινοτελική περιοχή πρέπει να ενέχεται με την αυτοαλληλεπίδραση του CIIΤΑ *in vitro*.



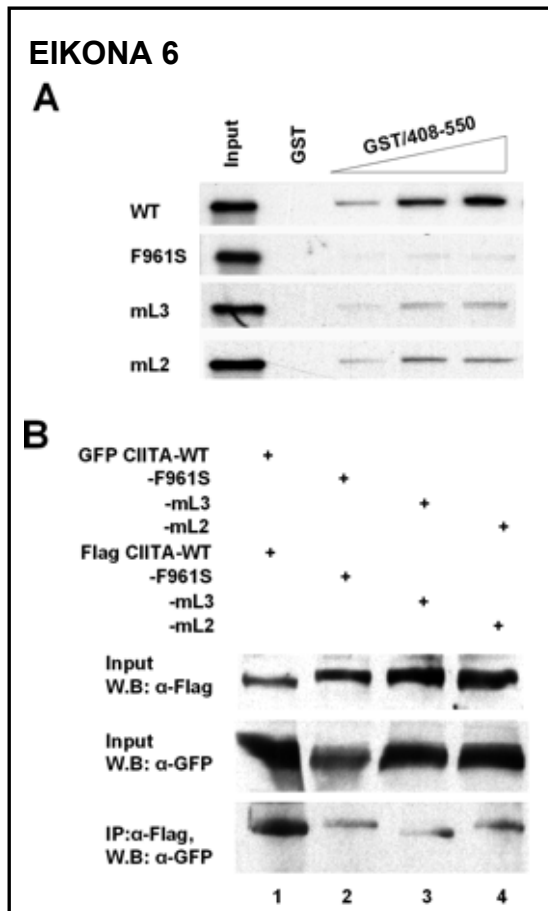
Εικόνα 4: Ομοτυπικές και ετεροτυπικές αυτοαλληλεπιδράσεις από συγκεκριμένες περιοχές του CIITA *in vitro*. Πειράματα κατακρήμνισης με GST πραγματοποιήθηκαν με ίσα ποσά (1μg) των GST συντήξεων με τα υποδεικνυόμενα κομμάτια CIITA, και *in vitro* μεταφρασμένα και σημασμένα με ^{35}S -μεθειονίνη κατασκευές CIITA, της αγρίου τύπου (A), του 408-550 (B), του 1-408 (C), και 408-1130 (D).

Για να επιβεβαιώσουμε ότι τέτοιου είδους αυτοαλληλεπιδράσεις επίσης λαμβάνουν χώρα και *in vitro* χρησιμοποιήσαμε την τεχνική της συνανοσοκατακρήμνισης των CIITA πρωτεϊνών που διέθεταν είτε FLAG επίτοπο είτε ήταν σε σύντηξη με την GFP. Η Εικόνα 5A δείχνει ότι το FLAG-CIITA συνανοσοκατακρήμνιζει επαρκώς το GFP-CIITA (λωρίδα 2) αλλά όχι την GFP (λωρίδα 1). Το GFP-CIITA από μόνο του δεν προσδένεται στην anti-FLAG κολώνα (λωρίδα 3). Άρα άθικτα CIITA μόρια είναι ικανά να αυτο-ολιγομερίζονται *in vivo* αλλά όχι *in vitro*, υποδεικνύοντας τη συμμετοχή επιπλέον παραγόντων ή πρωτεϊνικών τροποποιήσεων. Όμοια πειράματα συνανοσοκατακρήμνισης επιβεβαίωσαν ότι η αλληλεπίδραση των αμινοτελικών αμινοξέων 1-408 στην περιοχή 408-550 του CIITA επίσης πραγματοποιείται *in vivo* (Εικόνα 5B, λωρίδα 1) και απαιτεί άθικτη την κεντρική περιοχή επειδή κομμάτια μετά αυτής δεν αλληλεπιδρούν (Εικόνα 5B, λωρίδες 2 και 3). Αυτά τα πειράματα δείχνουν ότι το CIITA πραγματοποιεί πολλαπλές ομοτυπικές και ετεροτυπικές αλληλεπιδράσεις που μπορεί να οδηγήσουν σε ενδομοριακές και/ή διμοριακές αυτοαλληλεπιδράσεις.



Εικόνα 5: Το CIITA αλληλεπιδρά με τον εαυτό του in vivo. Συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από COS-1 κύτταρα διαμολυμένα με τα υποδεικνυόμενα (+) GFP- ή FLAG-συντηγμένα μόρια ανοσοκατακρημνήστικαν με anti-FLAG αντίσωμα, τρέχτηκαν σε SDS-αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης και μετά ανοσοανιχνεύτηκαν με anti-GFP αντίσωμα. Οι υποδεικνυόμενες GFP πρωτεΐνες ανιχνεύτηκαν είτε πριν (λωρίδες 4-6) ή μετά την ανοσοκατακρήμνιση (IP) με anti-FLAG αντίσωμα (λωρίδες 1-3). Οι πρωτεΐνες με επίτοπο FLAG ήταν το FLAG-CIITA (A) και το FLAG.CIITA/1-408 (B). Οι ποντικίσιες ανοσοσφαιρίνες και μη ειδικά ανιχνεύμενες πρωτεΐνες υποδεικνύονται επίσης.

Μετά εξετάσαμε την ικανότητα των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών ml2, ml3, και F961S να αλληλεπιδρούν με τον εαυτό τους in vitro και in vivo. Η Εικόνα 6A δείχνει ότι οι μεταλλαγές ml2 και ml3 έχουν μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης στην περιοχή 408-550 του GST-CIITA, ενώ η μεταλλαγή F961S πρακτικά δεν αλληλεπιδρά. In vivo πειράματα συνανοσοκατακρήμνισης δείχνουν ότι και οι τρεις μεταλλαγές έχουν μειωμένη ικανότητα για αυτοαλληλεπίδραση (Εικόνα 6B, λωρίδες 2-4), συγκρινόμενες με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη (Εικόνα 6B, λωρίδα 1). Συνολικά αυτά τα αποτελέσματα στηρίζουν την πιθανότητα ότι αυτές οι σημειακές μεταλλαγές οδηγούν σε διαφορεική τοπολογία και προβληματική λειτουργία επηρεάζοντας την ικανότητα για αυτοαλληλεπίδραση.

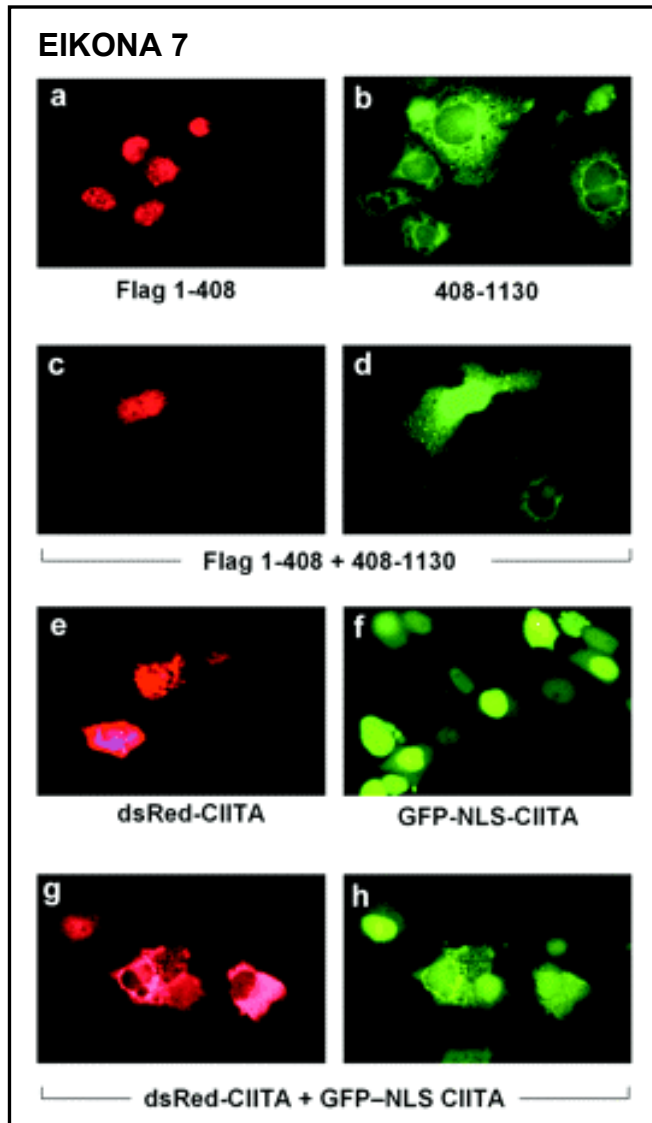


Εικόνα 6: Οι κυτταροπλασματικές CIITA μεταλλαγές έχουν μειωμένη ικανότητα για αυτοαλληλεπίδραση. (Α) Κατακράτηση αυξανόμενων ποσοτήτων (0.25, 1, ή 2μg) του αγρίου τύπου και των υποδεικνυόμενων CIITA μεταλλαγών από το GST-CIITA/408-550. **(Β)** Συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα COS-1 κυττάρων συνδιαμολυμένων με τα υποδεικνυόμενα (+) ζευγάρια FLAG- και GFP-wt ή μεταλλαγμένων CIITA μορίων, χρησιμοποιήθηκαν για συναυσοκατακρήμιση χρησιμοποιώντας anti-FLAG αντίσωμα που ακολουθήθηκε από ανοσοεντοπισμό χρησιμοποιώντας anti-GFP αντίσωμα. W.B.: Western Blot.

Η αλληλεπίδραση του CIITA με τον εαυτό του οδηγεί σε κυτταρική ανακατανομή και λειτουργική συμπλήρωση.

Για να παρακολουθήσουμε την αλληλεπίδραση μεταξύ τμημάτων του CIITA χρησιμοποιήσαμε συντήξεις με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) και προβλέψαμε ότι η αλληλεπίδραση θα επηρέαζε τον υποκυτταρικό εντοπισμό των πρωτεϊνών. Η Εικόνα 7 δείχνει ότι το FLAG.CIITA/1-408 είναι κυρίως πυρηνικό ($N/C > 10$) (κομμάτι α) και η έλλειψη 408-1130 που δεν έχει το NLS2 είναι κυτταροπλασματική ($N/C = 0.33$) (κομμάτι β). Παρόλα αυτά, μετά από συνδιαμόλυνση, το μόριο 408-1130 δείχνει αυξημένα πυρηνικά επίπεδα (συγκρίνουμε τα κομμάτια β και δ) σε κύτταρα που εκφράζουν επίσης το CIITA/1-408 (συγκρίνουμε τα κομμάτια γ και δ). Σε τέτοιου είδους πειράματα ο μέσος όρος του λόγου N/C του 408-1130 που υπολογίζεται από κύτταρα που συνεκφράζουν τα δύο μόρια αυξάνει από 0.33 σε 0.83, πλησιάζοντας έτσι τα επίπεδα του αγρίου τύπου CIITA. Η ίδια προσέγγιση εφαρμόστηκε για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης ανάμεσα σε δύο διαφορετικά άθικτα CIITA μόρια μέσα στα κύτταρα. Για αυτό το λόγο μελετήθηκε η επίδραση ενός κόκκινα φθορίζοντος CIITA (dsred-CIITA) (Εικόνα 7ε) στην τοπολογία ενός GFP-CIITA που από μόνο του ήταν πυρηνικό (Εικόνα 7f) λόγω της δράσης ενός εξωγενώς προστιθέμενου SV40 NLS (GFP-NLS.CIITA). Το dsred-CIITA οδήγησε σε αυξημένη πυρηνική κατανομή του συνεκφραζόμενου GFP-NLS.CIITA (συγκρίνουμε τα κομμάτια h-f), υποδεικνύοντας ότι σ' αυτό το πλαίσιο,

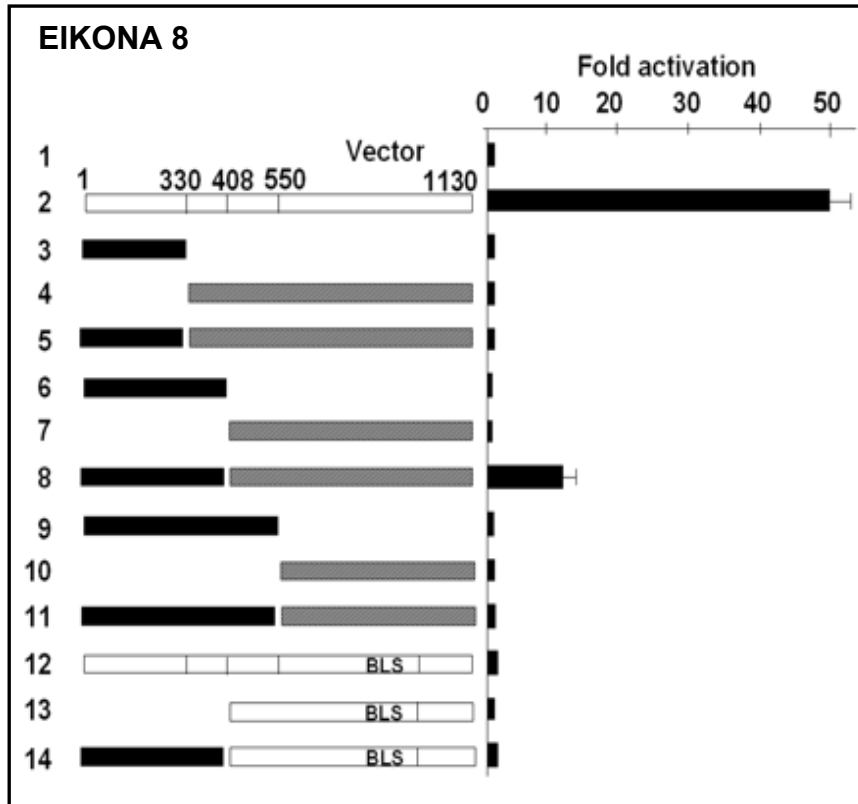
ένα μοναδικό SV40 NLS που είναι παρόν στα διμερή που σχηματίζεται με το CIITA δεν είναι αρκετό να παρακάμψει τη δράση των σημάτων εξόδου. Συνολικά η διμοριακή αλληλεπίδραση είτε των άθικτων μορίων CIITA ή κομματιών αυτού επηρεάζει την υποκυτταρική του κατανομή με τρόπο που μιμείται αυτή του άθικτου CIITA.



Εικόνα 7: Συνέκφραση διαφορετικών CIITA μορίων οδηγεί στην υποκυτταρική ανακατανομή στα κύτταρα. Τα FLAG-, GFP-, ή dsred-CIITA παράγωγα διαμολύνθηκαν μόνα τους ή σε συνδυασμό σε COS-7 κύτταρα, και η υποκυτταρική τους κατανομή παρατηρήθηκε 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση με άμεσο φθορισμό και/ή χρώση χρησιμοποιώντας ένα FLAG αντίσωμα προσδεμένο σε ισοθειοκυανική τετραροδαμίνη.

Τέλος, για να ελέγξουμε τις λειτουργικές επιπτώσεις της αυτοαλληλεπίδρασης του CIITA, φτιάξαμε συμπληρωματικά κομμάτια CIITA που ομοιάζουν στο αγρίου τύπου μόριο, και τα συνδιαμολύναμε σε HeLa κύτταρα. Αυτόνομα εκφραζόμενες αμινο- ή καρβοξυ-τελικές ελλείψεις του CIITA δεν είχαν επίδραση σε ένα φορέα αναφοράς MHC τάξης II (Εικόνα 8, γραμμές 3, 4, 6, 7, 9, και 10). Είναι ενδιαφέρον ότι συνέκφραση αμινοτελικών και καρβοξυτελικών άκρων του CIITA που χωρίζονται στο αμινοξύ 408 (1-408 και 408-1130) δείχνουν αξιοσημείωτη συμπληρωματική ενεργότητα (Εικόνα 8, γραμμή 8). Χωρίζοντας το μόριο στο αμινοξύ 330 ή 550 δεν αποκαθιστά τη CIITA ενεργότητα (Εικόνα 8, γραμμές 5 και 11). Άρα, ένα λειτουργικό CIITA μπορεί να ανασυσταθεί από το συνδυασμό δύο χωριστών πρωτεϊνικών τμημάτων που προέρχονται από διάτμηση στη θέση 408. Αντίθετα, τα καρβοξυτελικά κομμάτια (408-1130

αμινοξέα), η μεταλλαγή F961S (γραμμή 14) ή τα ml2 και ml3, τα οποία δεν έχουν την ικανότητα αυτοαλληλεπίδρασης, είναι ανίκανα να αποκαταστήσουν τη μεταγραφική ενεργότητα με τέτοιου είδους μεθόδους.



Εικόνα 8: Δια-συμπλήρωση της ενεργότητας του C/EBPβ από τα αυτόνομα αμινο- και καρβοξυτελικά άκρα του C/EBPβ. HeLa κύτταρα συνδιαμολύνθηκαν με ίσα ποσά αμινοτελικών ή καρβοξυτελικών και/ή DNA φορέα για συμπλήρωμα (0.3μg) στους συνδυασμούς που υποδεικνύονται, και η επίδρασή τους στον φορέα αναφοράς τάξης Πλουσιφεράση μελετήθηκε συγκριτικά με φορείς που εξέφραζαν το συνολικό αγγίου τύπου C/EBPβ. Το BLS υποδεικνύει τη μεταλλαγή F961S. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σαν φορές ενεργοποίησης ως προς τα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με άδειο φορέα (και η ενεργοποίησή τους ορίστηκε στην τιμή 1) και είναι οι μέσοι όροι τεσσάρων πειραμάτων.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σ'αυτή τη σειρά πειραμάτων μελετήσαμε μηχανισμούς που ελέγχουν την πυρηνοκυτταροπλασματική μετακίνηση του C/EBPβ. Καθορίσαμε δύο χωριστές περιοχές, την NER1 και τη NER2, που επιτυγχάνουν την εξαρτώμενη από τη CRM1 πυρηνική έξοδο του C/EBPβ. Επιπλέον, παρέχουμε αποδείξεις ότι τα πυρηνικά επίπεδα του C/EBPβ σχετίζονται με την ικανότητά του να αλληλεπιδρά με τον εαυτό του. Δείχνουμε ότι το C/EBPβ μπορεί να αλληλεπιδρά με τον εαυτό του δια μέσω ομο- και ετεροτυπικών αλληλεπιδράσεων. Βασιζόμενοι στην ανάλυση των μεταλλαγών που καταστρέφουν την πυρηνική είσοδο, προτείνουμε ότι δομικά στοιχεία που αποκαλύπτονται με την αυτοαλληλεπίδραση επηρεάζουν την αναγνώριση του C/EBPβ από το μηχανισμό εισόδου.

Η ρυθμιζόμενη πυρηνική μεταφορά είναι ένας μηχανισμός που ταχέως μεταβάλλει έναν κυτταρικό παράγοντα από μια ανενεργό σε μια ενεργό μορφή και το αντίθετο κατά τη διάρκεια κυτταρικής σηματοδότησης, της προαγωγής του κυτταρικού κύκλου, και μονοπατιών διαφοροποίησης. Η επιλογή για μεταφορά δια μέσου της πυρηνικής μεμβράνης επιτυγχάνεται από διαφορετικούς μηχανισμούς. Σε μερικές περιπτώσεις ο διμερισμός των παραγόντων μετά από σηματοεξαρτώμενη φωσφορυλίωση (STATs) προηγείται της πυρηνικής εισόδου, παρότι δεν είναι καθορισμένο εάν είναι προαπαιτούμενο γι'αυτήν. Η

αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες είναι επίσης ένας καλά μελετημένος μηχανισμός για τη ρυθμιζόμενη πυρηνοκυτταροπλασματική μεταφορά. Η πρόσδεση του IκB στην p65 εμποδίζει την πυρηνική είσοδο της καλύπτοντας το NLS της (Beg et al., 1992; Zabel et al., 1993). Αντίθετα, η πρόσδεση της καλσινευρίνης αναστέλλει την πυρηνική έξοδο του NFAT καλύπτοντας τα σήματα πυρηνικής εξόδου (Zhu and McKeon, 1999). Επιπρόσθετα, η αυτοαλληλεπίδραση μπορεί να επηρεάζει την πυρηνοκυτταροπλασματική μεταφορά, όπως υποδεικνύεται από τον τετραμερισμό της p53 που εμποδίζει την πυρηνική της έξοδο.

Παρότι η ενδοκυτταρική μετακίνηση κυρίως χαρακτηρίζει μεταγραφικούς παράγοντες που ενεργοποιούνται από μεταμεταφραστικούς μηχανισμούς, το C/PTA, που ρυθμίζεται στο μεταγραφικό επίπεδο, επίσης μετακινείται ανάμεσα στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα (Cressman et al., 1999; Spilianakis et al., 2000). Αυτή η συμπεριφορά του C/PTA δεν είναι τυπική για ένα συνενεργοποιητή, επειδή υπάρχει ένα μόνο άλλο παράδειγμα συνενεργοποιητή που έχει δειχθεί ότι κινείται ανάμεσα στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα σε απάντηση σε διαφορετικά ερεθίσματα. Τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης της ενδογενούς πρωτεΐνης δεν έχει επιτρέψει μέχρι τώρα τη διασαφήνιση του ρόλου της πυρηνοκυτταροπλασματικής μετακίνησης του C/PTA σε διάφορες φυσιολογικές και αναπτυξιακές καταστάσεις. Είναι πιθανό ότι το ποσό και/ή ο χρόνος που το C/PTA κατακρατείται στον πυρήνα πρέπει να είναι αυστηρά καθορισμένα. Χαμηλά επίπεδα πυρηνικού C/PTA ίσως είναι απαραίτητα για τη αποφυγή δευτερογενών επιδράσεων όπως είναι η αναστολή της ενεργότητας άλλων παραγόντων όπως έχει δειχθεί για τον NFAT (Sisk et al., 2000) και τον δεσμευτή Fas (Gourley and Chang, 2001). Επιπλέον, η πιθανότητα το C/PTA να έχει άγνωστες λειτουργίες στο κυτταρόπλασμα δεν μπορεί να αποκλεισθεί. Σχετικά με αυτό, η αμινοξική ομολογία του C/PTA με τον ενεργοποιητή κασπασών Nod-1 (Inohara et al., 1999) είναι πολύ ενδιαφέρουσα και απαιτεί επιπλέον μελέτη για να καθορισθεί ο ρόλος του σε αποπτωτικά μονοπάτια.

Το Nod-1 είναι γνωστό ότι ολιγομερίζεται δια μέσω της περιοχής που είναι υπεύθυνη για πρόσδεση νουκλεοτιδίου (Inohara et al., 2000). Δείχνουμε με βιοχημικές, τοπολογικές και λειτουργικές μεθοδολογίες ότι το C/PTA είναι επίσης ικανό να ολιγομερίζεται δια μέσω αλληλουχιών ομόλογων με του Nod-1. Το C/PTA έχει την ικανότητα για πολλαπλές (ομοτυπικές και ετεροτυπικές) αλληλεπιδράσεις, που όλες ενέχουν την κεντρική περιοχή του μορίου που φέρει τις θέσεις πρόσδεσης GTP και την περιοχή NER2. Ενδομοριακές και διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μπορούν να οδηγήσουν σε μια ανώτερη δομή του μονομερούς ή του διμερούς με τρόπο που το ένα δεν αποκλείει το άλλο. Κανείς τύπος αλληλεπίδρασης δεν αποκλείεται από την παρούσα ανάλυση.

Η ετεροτυπική, ενδομοριακή αλληλεπίδραση των αμινοτελικών αλληλουχιών που περιλαμβάνουν το NER1 με την κεντρική περιοχή του NER2 περιορίζει την NER2-NER2 ομοτυπική αλληλεπίδραση και μειώνει τα πυρηνικά επίπεδα του C/PTA. Σε συμφωνία με αυτό, η αφαίρεση του NER1 μετατοπίζει την ισορροπία προς τις ομοτυπικές NER2-καθοριζόμενες αλληλεπιδράσεις που οδηγούν σε μια αποκλειστικά πυρηνική κατανομή που παρατηρείται στην μορφή 102-1130/GFP του C/PTA. Επίσης, σημειακές μεταλλάξεις

στο NER2, που καταργούν τον ομοτυπικό διμερισμό που καθορίζεται από το NER2, οδηγούν στην ανικανότητα πυρηνικής εισόδου. Αυτή η διαδικασία είναι διαφορετική από αυτή της IRF3 πρωτεΐνης, που είναι συστατικά κυτταροπλασματική λόγω της ενδομοριακής αλληλεπίδρασης, που καλύπτει το NLS, ενώ μετά τη σηματοδότηση από I δ και την φωσφορυλίωσή της IRF3, διμερίζεται και εισέρχεται στον πυρήνα (Lin et al., 1999). Η ισορροπία των σημάτων εισόδου και εξόδου στον καθορισμό της υποκυτταρικής κατανομής του C/PTA υποδεικνύεται από τα αποτελέσματα ανακατανομής που προκαλούνται από τη ζευγαρωτή έκφραση αμινοτελικών με καρβοξυτελικά κομμάτια του C/PTA ή των άθικτων C/PTA μορίων, το ένα από τα οποία συνεκφράζεται με ένα SV40 NLS. Και στις δύο περιπτώσεις η συνέκφραση οιοδήποτε ζεύγους μορίων αλλάζει δραματικά την πυρηνική ή κυτταροπλασματική κατανομή της πρωτεΐνης και σχεδόν αποκαθιστά το πρότυπο κατανομής και την ενεργότητα του αγρίου τύπου C/PTA.

Η αλληλεπίδραση του C/PTA με τη CRM1 εξαρτάται από την παρουσία τόσο του NER1 όσο και του NER2. Επειδή δεν παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη αλληλεπίδραση της CRM-1 με βακτηριακά εκφραζόμενο C/PTA και *in vitro* μεταφρασμένη και σημασμένη CRM-1 στην παρουσία ή απουσία Ran-GTP, η πιθανότητα ότι ένας ενδιάμεσος παράγοντας απαιτείται για αυτή την αλληλεπίδραση παραμένει ανοικτή για περαιτέρω διερεύνηση. Παράγωγα του C/PTA που τους λείπει η αμινοτελική περιοχή που φέρει το NER1 δείχνουν ένα ισχυρό επικρατή αρνητικό φαινότυπο (Bontron et al., 1997; Yun et al., 1997; Zhou et al., 1997). Άρα, το αρνητικό αποτέλεσμα αυτών των πρωτεϊνών προκύπτει από τον έντονο πυρηνικό εντοπισμό τους σε σχέση με τη αυξημένη ικανότητά τους να στρατολογούνται στον υποκινητή (Masternak et al., 2000). Η τοπολογία του NER1 μέσα στην περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης υποδεικνύει ότι ο CBP και ο pCAF μπορεί να ανταγωνίζονται με τη CRM1 για την πρόσδεση στο C/PTA με τρόπο όμοιο με την καλσινευρίνη για τον NFAT (Zhu and McKeon, 1999). Δείξαμε ότι ο pCAF αυξάνει τα πυρηνικά επίπεδα του C/PTA με ένα μηχανισμό που περιλαμβάνει την ακετυλίωση και την άμεση αλληλεπίδραση (Spilianakis et al., 2000). Είναι πιθανό ότι ο δεύτερος μηχανισμός ενέχει την κάλυψη της επιφάνειας πρόσδεσης του C/PTA με τη CRM-1. Άρα, τα C/PTA μόρια που δεν ενέχονται σε μηχανισμούς μεταγραφικής μπορεί να έχουν γρήγορη πυρηνοκυτταροπλασματική ανακατανομή. Η πυρηνική κατακράτηση δια μέσω αλληλεπίδρασης με συνενεργοποιητές έχει επίσης αναφερθεί για τον IRF3 (Kumar et al., 2000), τον HNF-4 (Soutoglou et al., 2000), και τον ASC-1 (Kim et al., 1999).

Είναι ενδιαφέρον ότι διαφορετικές μεταλλαγές στο C/PTA όπως η αντικατάσταση λευκινών και η μεταλλαγή στο καρβοξυτελικό NLS ή οι μεταλλαγές που πραγματοποιούνται στις θέσεις πρόσδεσης GTP (Harton et al., 1999) ή την περιοχή πλούσια σε λευκίνες (Hake et al., 2000) οδηγούν σε προβληματική πυρηνική είσοδο. Ένα μοντέλο σύμφωνο με αυτά τα αποτελέσματα θα μπορούσε να ενέχει αλλαγές της πρωτεϊνικής διαμόρφωσης που επηρεάζουν την αναγνώριση του C/PTA από το μηχανισμό εισόδου. Όμοιοι μηχανισμοί ίσως μεταβάλλουν τις πυρηνοκυτταροπλασματικές ιδιότητες και άλλων πρωτεϊνών επίσης.

Χαρακτηρισμός του ενισχυοσώματος και των βημάτων σχηματισμού του μεταγραφοσώματος ενός MHC τάξης II γονιδίου.

Αποτελέσματα

In vitro σχηματισμός και χαρακτηρισμός του MHC τάξης II ενισχυοσώματος.

Προηγούμενες μελέτες είχαν προτείνει ότι το C/ITA στρατολογείται στο τάξης II ενισχυοσώμα αλληλεπιδρώντας με πολλαπλές πρωτεΐνες του ενισχυοσώματος όπως είναι ο CREB και τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα RFX και NFY. Παρόλα αυτά οι προηγούμενες μελέτες είχαν πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας συνολικά εκχυλίσματα πρωτεϊνών σαν πηγή για τους μεταγραφικούς παράγοντες και άρα δεν απέκλειαν την πιθανότητα ότι άλλες άγνωστες μέχρι τώρα πρωτεΐνες θα μπορούσαν να καθορίζουν αυτές τις αλληλεπιδράσεις. Θελήσαμε να ανασυστήσουμε *in vitro* το ενισχυοσώμα τάξης II χρησιμοποιώντας ανασυνδιασμένα σύμπλοκα RFX, NFY και CREB. Οι τρεις RFX υπομονάδες (RFX5, RFXAP και RFXANK), μαζί με τις τρεις NFY υπομονάδες (NFYA, NFYB και NFYC) και ο CREB εκφράστηκαν και καθαρίστηκαν από κύτταρα *E.coli* (Εικόνα 1A).

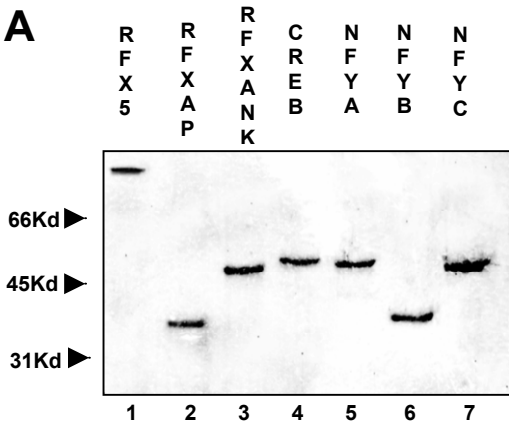
Η Εικόνα 1B δείχνει ότι ο MHC τάξης II υποκινητής (που τρέχει μόνος στη λωρίδα 1) σχηματίζει διαφορετικά σύμπλοκα με τα σύμπλοκα RFX, NFY και CREB (λωρίδες 2-4). Συνδυασμοί ανά δύο των παραγόντων αποκάλυψε το σχηματισμό συμπλόκων του τάξης II υποκινητή που περιείχαν και τους δύο παράγοντες καθώς επίσης και τις κατά μόνος προσδεδεμένες πρωτεΐνες στο DNA (λωρίδες 5-7). Είναι αξιοσημείωτο ότι όταν όλοι οι παράγοντες αλληλεπέδρασαν με τον DRA υποκινητή ένα καινούριο σύμπλοκο σχηματίστηκε που περιείχε και τις επτά πρωτεΐνες (Εικόνα 1B, λωρίδα 8). Στην Εικόνα 1Γ υποδεικνύεται η πρόσδεση των προσχηματισμένων συμπλόκων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Η συνεργατική φύση του σχηματισμού του τάξης II ενισχυοσώματος αποκαλύφθηκε με ποσοτικά πειράματα αποτύπωσης με DNase I. Οι αυτόνομες Εικόνες 1'Β και 1'Γ δείχνει ότι αυξανόμενες ποσότητες ανασυνδιασμένων RFX ή NFY προστατεύουν λίγο τον DRA υποκινητή από την πέψη με DNaseI (Εικόνα 1'Γ, τμήματα 2 και 3). Σε αντίθεση ο CREB αλληλεπιδρά ισχυρά με την X2 υποπεριοχή του DRA υποκινητή (τμήμα 4). Αξιοσημείωτα, όταν οι ίδιες ποσότητες των RFX, NFY και CREB αλληλεπέδρασαν με τον υποκινητή συγχρόνως, ένα εκτεταμένο αποτύπωμα που περιελάμβανε τα κουτιά X, Y και την περιοχή ανάμεσα στα X και S κουτιά παρατηρήθηκε, ενδεικτικό του σχηματισμού ενισχυοσώματος (Εικόνα 1C, τμήμα 5). Είναι σημαντικό, ότι ο σχηματισμός ενισχυοσώματος είναι ισχυρά συνεργατικός αφού ο σχηματισμός του συμβαίνει σε συγκεντρώσεις των μεταγραφικών παραγόντων στις οποίες αυτοί οι ενεργοποιητές δεν μπορούν να προσδεθούν στο DNA όταν εξετάζονται από μόνοι τους (Εικόνα 1'Γ, συγκρίνουμε το τμήμα 5 με τα τμήματα 2, 3 και 4). Η Εικόνα 1Δ δείχνει ότι η συνεργατική και υψηλής συνάφειας πρόσδεση στο DNA οφείλεται στην σταθερή του αλληλεπίδραση με το DNA όπως

αποκαλύπτεται με τα off rate πειράματα ανταγωνισμού (Εικόνα 1Δ, τμήμα 1) αν συγκριθούν με τα ανεξάρτητα CREB, RFX ή NFY υποσύνπλοκα (Εικόνα 1Δ, τμήματα 2, 3, 4 αντίστοιχα).

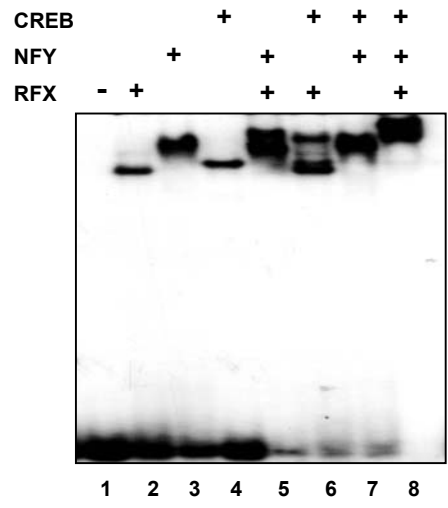
Για να εξετάσουμε την ικανότητα του ενισχυοσώματος να στρατολογεί απευθείας CIITA πραγματοποιήσαμε in vitro πειράματα κατακράτησης πάνω σε ακινητοποιημένο υπόστρωμα DNA. Ένα βιοτινυλιωμένο τμήμα DNA που εκτείνεται από τις -120 βάσεις DNA έως τις +13 βάσεις (+1 είναι το σημείο έναρξης της μεταγραφής όπως ορίζεται πάνω στον υποκινητή) του DRα υποκινητή (Εικόνα 1Ε, δεξί) προσδέθηκε σε μαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης (Dyna1) και στη συνέχεια προσδέθηκαν τα σύνπλοκα RFX, NFY και CREB είτε κατά μόνας είτε όλα μαζί. Κατόπιν τα μαγνητικά σφαιρίδια αλληλεπέδρασαν με καθαρή πρωτεΐνη CIITA. Η πρόσδεση των παραγόντων RFX, NFY, CREB και CIITA ανιχνεύτηκε με ανοσοεντοπισμό. Η Εικόνα 1Ε δείχνει ότι ο RFX, ο NFY ή ο CREB δεν μπορούν να στρατολογήσουν CIITA όταν είναι προσδεμένοι από μόνοι τους στον DRα υποκινητή (λωρίδες 1-3). Παρόλα αυτά, το τάξης II ενισχυόσωμα που αποτελείται και από τα τρία πρωτεϊνικά σύνπλοκα (RFX, NFY και CREB) στρατολογούν το CIITA επαρκώς (λωρίδα 4). Άρα το CIITA στρατολογείται στον DRα υποκινητή δια μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με το ενισχυόσωμα για το σχηματισμό του οποίου αναγκαία και ικανή είναι η παρουσία RFX, NFY και CREB. Αυτή ήταν η πρώτη φορά που χαρακτηρίστηκε από καθαρισμένες πρωτεΐνες το ενισχυόσωμα για ένα MHC τάξης II υποκινητή.

EIKONA 1

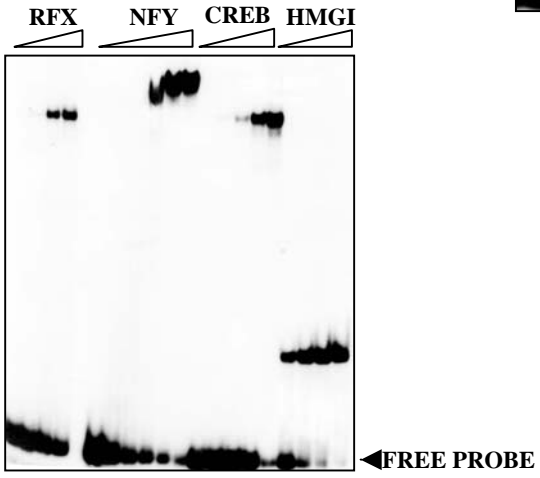
A



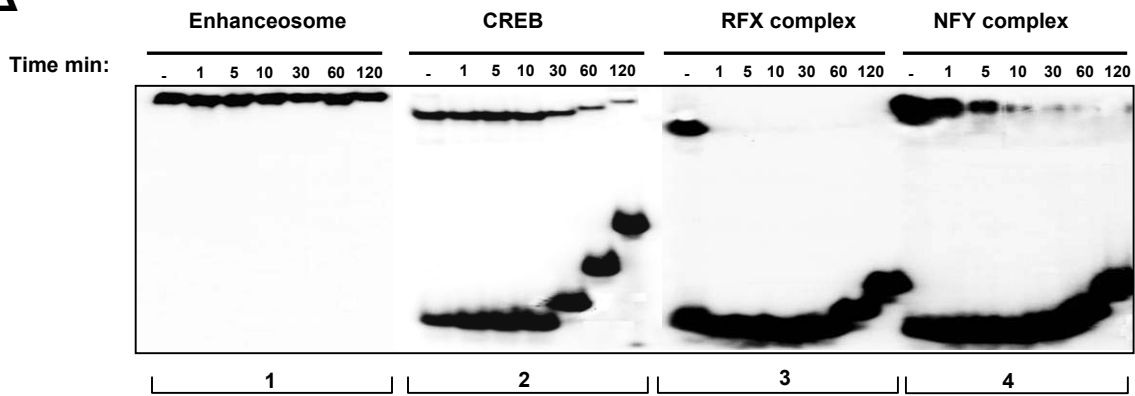
B



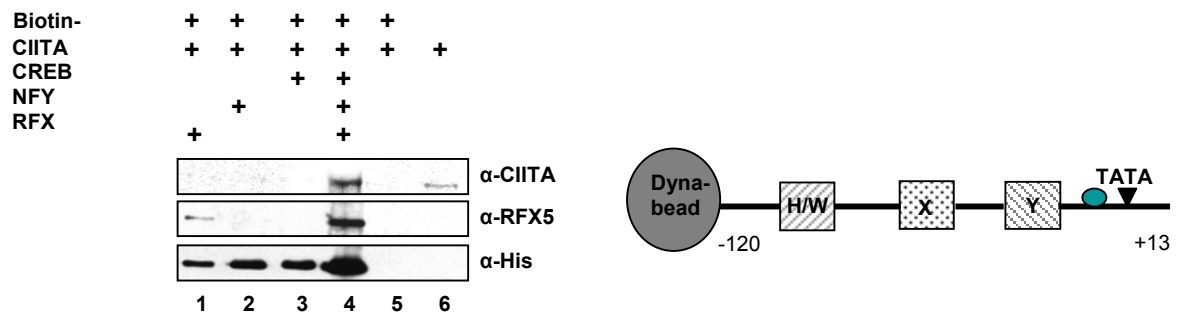
Γ

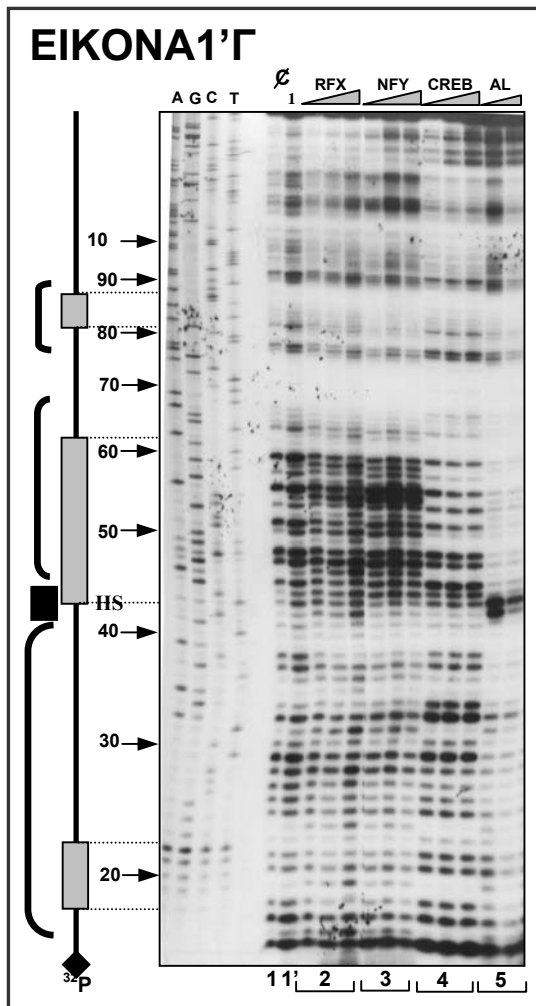


Δ



E





Εικόνα 1: *In vitro* σχηματισμός του τάξης II ενισχυοσώματος. **(Α)** Ανάλυση σε SDS-PAGE των βακτηριακά παραγμένων και καθαρισμένων με κολώνα Ni-NTA, ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών. Οι υπομονάδες του RFX και NFY συμπλόκων καθώς και ο CREB έχουν τρέξει σε 10% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. **(Β)** Πειράματα EMSA πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τις κατάλληλες ποσότητες για τις επτά ανασυνδιασμένες πρωτεΐνες μετά από πολλαπλές τιτλοδοτήσεις στο ραδιοσημασμένο με ³²P DRα-XY ολιγονουκλεοτίδιο. Οι αντιδράσεις έχουν αναλυθεί σε 5% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. **(Γ)** Το ίδιο όπως πριν. Υποδεικνύεται η πρόδεση αυξανόμενων συγκεντρώσεων προσχηματισμένων συμπλόκων. **(Δ)** Πειράματα off-rate χρησιμοποιώντας χρησιμοποιώντας σύμπλοκα του ραδιενεργού DRα ολιγονουκλεοτιδίου και των υποδεικνυόμενων παραγόντων. Στις αντιδράσεις όπου υποδεικνύεται έχει προστεθεί μη σημασμένος με ραδιενέργεια DNA ανιχνευτής σε 100 φορές περίσσεια και έχουν φορτωθεί σειριακά μετά το πέρας του χρόνου που υποδεικνύεται σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 5%. **(Ε)** Το κομμάτι DNA του DRα υποκινητή από -120 έως +13 βιοτινυλιώθηκε και προσδέθηκε σε μαγνητικά σφαιρίδια Dynal. Οι υποδεικνυόμενοι παράγοντες του ενισχυοσώματος προστέθηκαν είτε κατά μόνας ή σε συνδυασμό με ανασυνδιασμένη CΙΡΤΑ πρωτεΐνη παραγμένη με το σύστημα των βακυλοϊών σε Sf9 κύτταρα λεπιδοπτερών. Η παρουσία των κατακρατημένων πρωτεϊνών ανιχνεύθηκε με την τεχνική του Western Blot με τα υποδεικνυόμενα στα δεξιά αντισώματα. **(Εικόνα 1'Β)** Πείραμα *in vitro* αποτυπώματος με DNaseI πριν (ϕ) και μετά την πρόδεση αυξανόμενων ποσοτήτων των υποδεικνυόμενων παραγόντων, που έχουν σχηματισθεί όπως παραπάνω (στα EMSA) αλλά σε μεγαλύτερες ποσότητες, σε ένα κομμάτι DNA από τον DRα υποκινητή που εκτείνεται από το -120 έως το +13 νουκλεοτίδιο σε σχέση με το σημείο έναρξης της μεταγραφής (+1). Οι αντιδράσεις έχουν αναλυθεί σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 6% με ουρία. Οι προστατευμένες περιοχές (αγκύλες) και μια θέση υπερευαίσθησίας στη DNaseI (HS) υποδεικνύονται. **(Εικόνα 1'Γ)** Το ίδιο πείραμα όπως πριν. Παρατίθεται για να υποδειχθεί καλύτερα η προστασία που παρατηρείται στο κουτί (S) του υποκινητή.

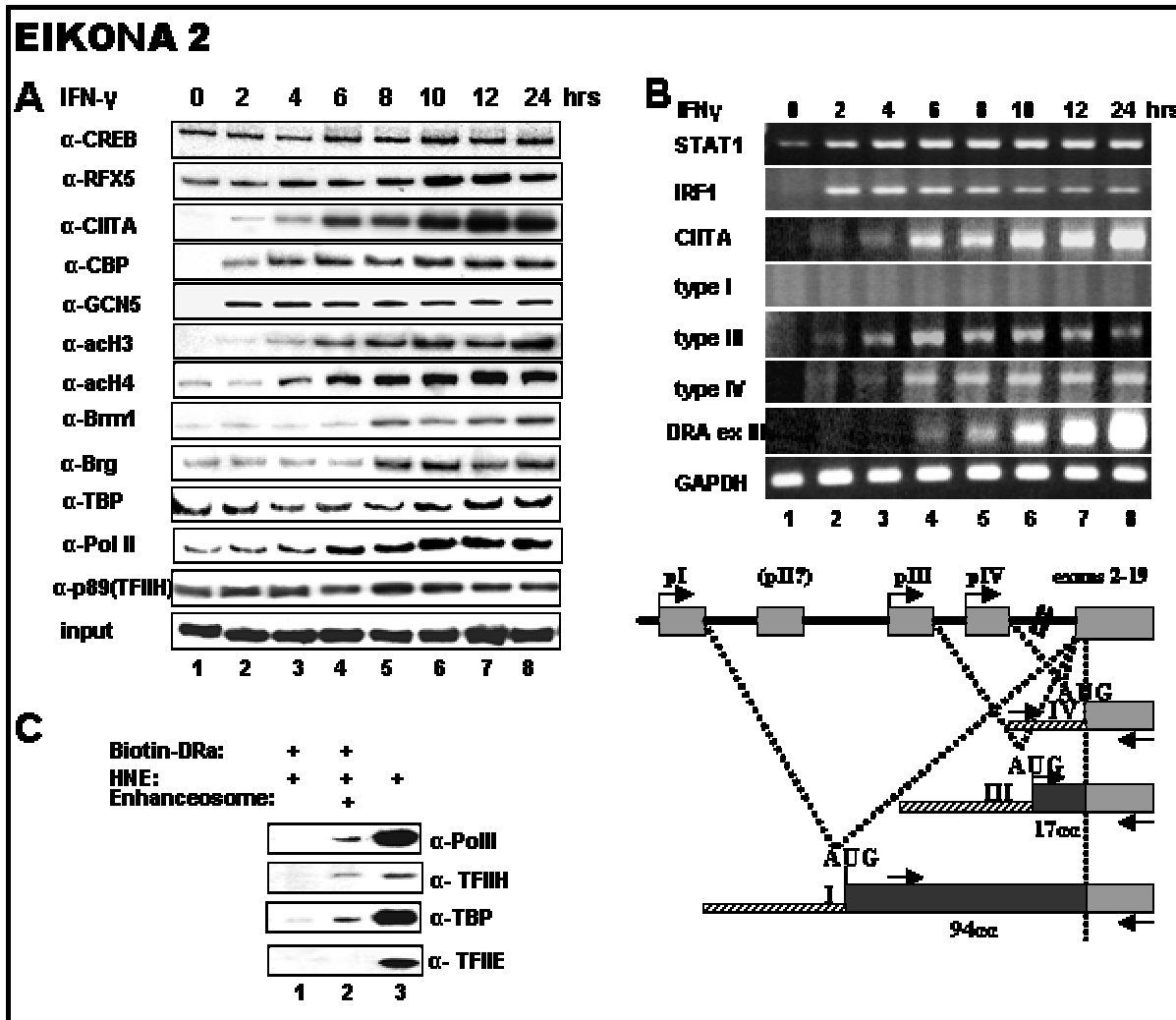
Στρατολόγηση παραγόντων που απαιτούνται για τη μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή DRα *in vivo*.

Για να διερευνήσουμε τη στρατολόγηση της πρωτεΐνης CIITA στον ενδογενή τάξης II DRα υποκινητή πραγματοποιήσαμε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης χρησιμοποιώντας χρωματίνη παρασκευασμένη από HeLa κύτταρα κατεργασμένα με IFN-γ για διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Η Εικόνα 2A (λωρίδες 1,2) δείχνει ότι στα μη κατεργασμένα κύτταρα ο DRα υποκινητής είναι κατειλημμένος από τους παράγοντες που απαρτίζουν το τάξης II ενισχύσωμα (σ' αυτό το πείραμα υποδεικνύεται ανοσοκατακρήμνιση με αντισώματα για CREB και RFX5, αλλά αντίστοιχα πειράματα με τα ίδια αποτελέσματα πραγματοποιήθηκαν με αντισώματα για τις πρωτεΐνες RFXANK και NFYA), παρότι το DRα γονίδιο δεν εκφράζεται ακόμα (Εικόνα 2B, λωρίδα 1). Αυτό το αποτέλεσμα είναι σε συμφωνία με προηγούμενα δεδομένα από *in vivo* αποτύπωση με DNaseI που υποδεικνύουν προστασία των τάξης II υποκινητών σε μη επαγμένα HeLa κύτταρα (Kara and Glimcher, 1993). Επίσης είναι αξιοσημείωτο ότι μέρος της βασικής μεταγραφικής μηχανής όπως το TBP, η RNA PolIII και ο TFIIF είναι επίσης προσδεμένα στον DRα υποκινητή προ επαγωγής (Εικόνα 2A). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι το τάξης II ενισχύσωμα μπορεί να στρατολογήει παράγοντες της βασικής μεταγραφικής μηχανής με τρόπο συστατικό και ανεξάρτητο της παρουσίας CIITA.

Για να διερευνήσουμε αυτή την πιθανότητα πραγματοποιήσαμε πειράματα *in vitro* στρατολόγησης παραγόντων χρησιμοποιώντας ακινητοποιημένο DNA του DRα υποκινητή. Η Εικόνα 2C δείχνει ότι απουσία του τάξης II ενισχυοσώματος κανείς από αυτούς τους βασικούς παράγοντες δεν προσδέεται στον DRα υποκινητή (λωρίδα 1). Παρόλα αυτά, το τάξης II ενισχύσωμα μπορεί να στρατολογήσει TBP, RNA PolIII και TFIIF(p89) αλλά όχι τον TFIIE στον υποκινητή (λωρίδα 2). Έτσι, το τάξης II ενισχύσωμα μπορεί να στρατολογήσει σημαντικούς παράγοντες της βασικής μεταγραφικής μηχανής στον υποκινητή απουσία CIITA. Αυτό το αποτέλεσμα είναι σε συμφωνία με τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης που περιγράφονται προηγούμενα.

Δύο ώρες μετά την επαγωγή των κυττάρων με IFN-γ το ενισχύσωμα στρατολογεί το νεοσυντιθέμενο CIITA, του οποίου η έκφραση μετά την επαγωγή από IFN-γ πραγματοποιείται από τους υποκινητές pIII και pIV του γονιδίου CIITA (Εικόνα 2B, λωρίδα 2). Κατά το ίδιο χρονικό διάστημα (στις 2 ώρες) το τάξης II ενισχύσωμα στρατολογεί τους συνενεργοποιητές και ακετυλοτρανσφεράσες CBP και GCN5 στον υποκινητή. Υποθέτουμε ότι η στρατολόγηση αυτών των πρωτεϊνών στον DRα υποκινητή πραγματοποιείται μέσω της αλληλεπίδρασής τους με το CIITA (Fontes et al., 1999; Kretsovali et al., 1998). Η ποσότητα του CIITA που προσδέεται στον υποκινητή είναι αναλογική της ποσότητας του CIITA που συντίθεται κατόπιν δράσης της IFN-γ (Εικόνα 2A και 2B). Η στρατολόγηση των CBP, GCN5 και CIITA στον υποκινητή ακολουθείται από την ακετυλίωση των ιστονών H3 και H4 (Εικόνα 2A, λωρίδες 3-8). Είναι σημαντικό ότι η ακετυλίωση των ιστονών στον υποκινητή προηγείται της στρατολόγησης των συμπλόκων

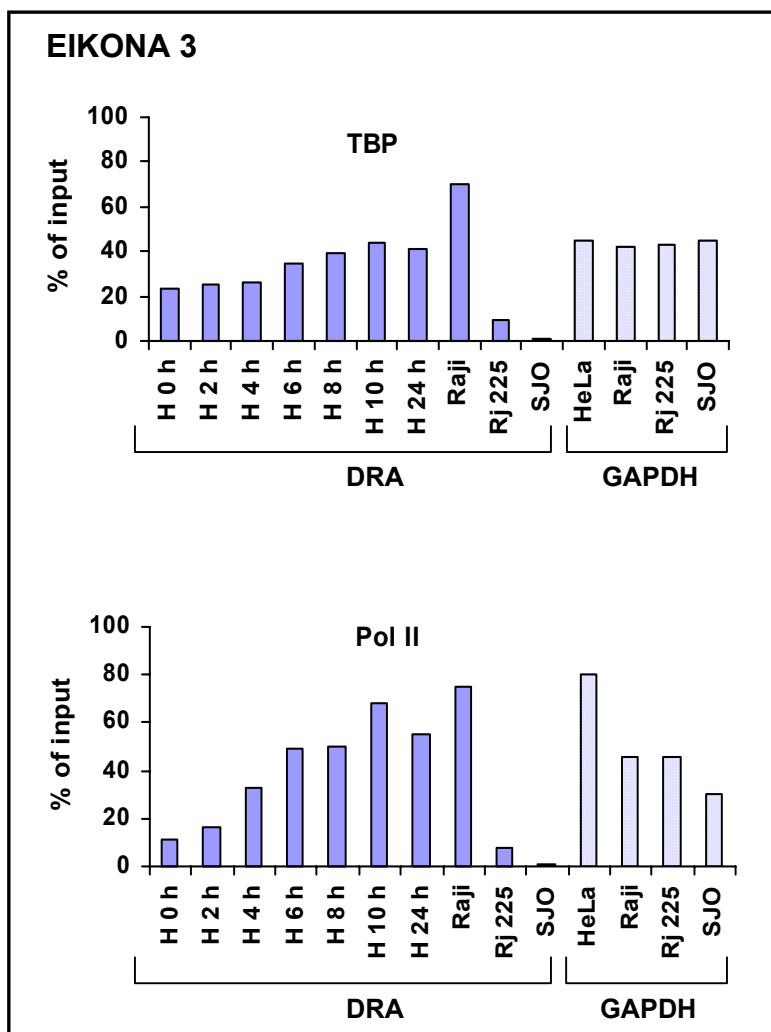
αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης SWI/SNF, που στα πειράματα που παρουσιάζονται εκπροσωπούνται από τους παράγοντες Brg-1 ή Brm-1. Η Εικόνα 2B υποδεικνύει ότι τα πρώτα μετάγραφα του μηνύματος DRα εμφανίζονται στις έξι ώρες μετά την επαγωγή από IFN-γ όταν η στρατολόγηση των CIITA, GCN5, CBP, και RNA PolIII καθώς και η ακετυλίωση των ιστονών έχουν φτάσει σχεδόν στις μέγιστες τιμές τους (λωρίδα 4). Τα μηνύματα του DRα συνεχίζουν να συσσωρεύονται καθόλη τη διάρκεια του πέρατος του χρόνου (Εικόνα 2B) και αυτή η αύξηση συσχετίζεται με την αυξανόμενη σταθερότητα του ενισχυσώματος, και τη στρατολόγηση των CIITA και SWI/SNF (Εικόνα 2A).



Εικόνα 2: Στρατολόγηση συμπαράγοντων *in vitro* και *in vivo* στον DRα υποκινητή κατά τη διάρκεια επαγωγής από IFN-γ. (A) Η σειρά της στρατολόγησης παραγόντων στον DRα υποκινητή μετά την προσθήκη IFN-γ σε HeLa κύτταρα. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης πραγματοποιήθηκαν, χρησιμοποιώντας αντισώματα εναντίον των υποδεικνυόμενων πρωτεϊνών ή εναντίον ακετυλιωμένης ιστόνης 3 (α-H3) και ιστόνης 4 (αH4) και μετά πραγματοποιήθηκαν ημιποσοτικές αντιδράσεις PCR στο ανοσοκατακρημνισμένο ή στο 1% του αρχικού υλικού χρησιμοποιώντας εκκινητές ειδικούς για τον εγγύς υποκινητή του DRα τάξης II γονιδίου. (B) Ενεργοποίηση του τάξης II DRα γονιδίου κατά τη διάρκεια επαγωγής από IFN-γ. HeLa κύτταρα επάχθησαν με IFN-γ για τα υποδεικνυόμενα χρονικά διαστήματα. Τα επίπεδα mRNA ανιχνεύτηκαν ακολουθώντας αντιδράσεις ημιποσοτικής RT-PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές που καλύπτουν την κωδική περιοχή του CIITA στα αμινοξέα 960-1110 (CIITA), το mRNA που εκφράζεται από τους υποκινητές I, III και IV του CIITA, το εξόνιο III του γονιδίου DRα και την κωδική περιοχή του γονιδίου GAPDH, του IRF1 και του STAT1 όπως υποδεικνύεται στα αριστερά. (C) *In vitro* στρατολόγηση των γενικών μεταγραφικών παραγόντων από το σχηματισμένο ενισχυσώμα. Πυρηνικά κυτταρικά εκχυλίσματα (HNE) από HeLa κύτταρα προστέθηκαν στο βιοτινυλωμένο DRα κομμάτι DNA στην παρουσία (+) ή την απουσία των παραγόντων του ενισχυσώματος (RFX, CREB και NFY). Οι υποδεικνυόμενοι παράγοντες ανιχνεύτηκαν με Western Blot χρησιμοποιώντας τα αντισώματα που υποδεικνύονται στα αριστερά.

Η παρατήρησή μας ότι ένα σημαντικό ποσό TBP και RNA PolIII είναι προσδεμένα στον υποκινητή πριν την επαγωγή από IFN- γ ήταν αξιοσημείωτη και μη αναμενόμενη και γι' αυτό μετρήσαμε τα ποσά των πρωτεϊνών αυτών στον υποκινητή πραγματοποιώντας πειράματα ανοσοκατακρήμνισης που ακολουθούνται από ποσοτική Real-time PCR ανάλυση. Για σύγκριση υπολογίστηκαν τα επίπεδα TBP και RNA Pol II σε Β-λεμφοκύτταρα που εκφράζουν (Raji) ή όχι (RJ2.2.5, SJO) MHC τάξης II. Επίσης χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς το γονίδιο της GAPDH. Επιπλέον, αυτά τα ποσά συγκρίθηκαν επίσης με τα ποσά του υποκινητή DR α DNA που ανοσοκατακρήμνίστηκαν με TBP και RNA PolIII από κύτταρα που είτε εκφράζουν συστατικά τα τάξης II γονίδια (όπως η Raji Β λεμφοκυτταρική σειρά), η ισογενής μεταλλαγμένη σειρά RJ2.2.5 που δεν εκφράζει λειτουργική CIITA πρωτεΐνη ή τα SJO κύτταρα που δεν εκφράζουν την υπομονάδα RFX5 του συμπλόκου RFX του ενισχυοσώματος και επομένως δεν εκφράζουν και τα τάξης II γονίδια. Το πάνω μέρος της Εικόνας 3 δείχνει ότι το ποσό του TBP που είναι προσδεμένο στον μη επαγμένο DR α υποκινητή είναι το 51% αυτού που είναι προσδεμένο στον υποκινητή του ισχυρά εκφραζόμενου GAPDH γονιδίου, και αυτό το ποσοστό αυξάνει στο 99% αυτού μετά την επαγωγή με IFN- γ . Η Εικόνα 3 δείχνει ότι όπως ήταν αναμενόμενο, ο υποκινητής του DR α γονιδίου που εκφράζεται συστατικά στα Raji Β κύτταρα είναι κατελιημμένος από υψηλά επίπεδα TBP, παρόλα αυτά, το ποσό του TBP που είναι προσδεμένο στον DR α υποκινητή σε κύτταρα που δεν εκφράζουν CIITA ή RFX5 είναι 17% και λιγότερο από 1% των επιπέδων στον GAPDH υποκινητή, αντίστοιχα. Άρα, το TBP δεν μπορεί να στρατολογηθεί στον DR α υποκινητή σε κύτταρα που δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη RFX5 του ενισχυοσώματος. Αυτό το αποτέλεσμα συμφωνεί με τα προηγούμενα όπου ένα προσχηματισμένο ενισχυόσωμα μπορεί να στρατολογήσει TBP στην απουσία CIITA. Παρόμοια αποτελέσματα παίρνουμε όταν υπολογίσουμε τα σχετικά επίπεδα της RNA PolIII που στρατολογούνται στους υποκινητές DR α και GAPDH. Όπως φαίνεται στο κάτω μέρος της Εικόνας 3, ένα σημαντικό ποσό της RNA PolIII καταλαμβάνει τον υποκινητή ακόμα και πριν την επαγωγή από IFN- γ , και αυτό το ποσό αυξάνει με το πέρασμα του χρόνου της επαγωγής στα HeLa κύτταρα. Υπολογίσαμε ότι η στρατολόγηση της RNA PolIII αυξάνει 6 φορές μετά την επαγωγή από IFN- γ σε επίπεδα όμοια με αυτά στους υποκινητές GAPDH ή DR α που και οι δύο εκφράζονται συστατικά στα Raji κύτταρα. Είναι σημαντικό ότι το ποσό της RNA PolIII που είναι στον DR α υποκινητή στα μη επαγμένα HeLa κύτταρα είναι συγκρίσιμο με αυτό κυττάρων που δεν εκφράζουν CIITA αλλά και πάλι είναι 10 φορές περισσότερο από αυτό που βρίσκεται σε κύτταρα που δεν εκφράζουν RFX5. Άρα, το TBP και η RNA PolIII και οι δύο στρατολογούνται με τρόπο που εξαρτάται από το ενισχυόσωμα στο μεταγραφικά σιωπηλό DR α γονίδιο στα HeLa κύτταρα.

Ο υποκινητής του μη εκφραζόμενου γονιδίου της Ιντερφερόνης- β (IFN- β) χρησιμοποιήθηκε σαν γενικό αρνητικό control σε όλα τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης. Σε όλες τις περιπτώσεις που εξετάσαμε τα σήματα της IFN β ήταν σταθερά κοντά στα επίπεδα του θορύβου.

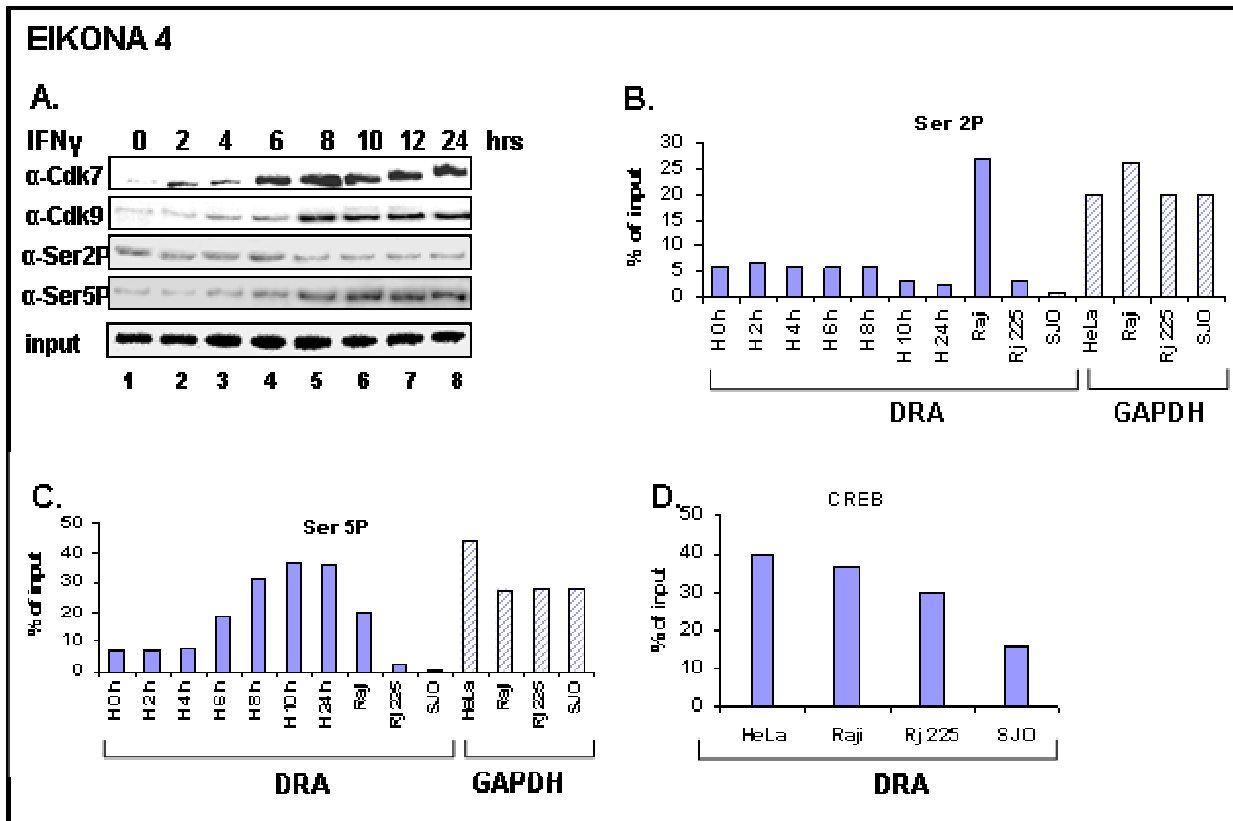


Εικόνα 3: Ανάλυση Real time PCR μετά από ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης με αντισώματα για TBP (πάνω) και RNA PolII (κάτω). Ανοσοκατακρήμνισμένη χρωματίνη από μη επαγμένα (0h) ή επαγμένα για τους υποδεικνυόμενους χρόνους HeLa (H), κύτταρα Raji που εκφράζουν τάξης II (Raji), κύτταρα Rj2.25 που δεν εκφράζουν CIITA. Και SJO που δεν εκφράζουν RFX5, πολλαπλασιάστηκε με εκκινητές ειδικούς για τους υποκινητές DRα ή GAPDH και μετά αναλύθηκε ποσοτικά. Οι τιμές του GAPDH κατά τη διάρκεια της επαγωγής από IFN-γ στα HeLa κύτταρα εμφανίζουν μικρή τυχαία διακύμανση. Τα αποτελέσματα είναι το % ποσοστό της ανοσοκατακρήμνισμένης σε σχέση με την αρχική χρωματίνη που χρησιμοποιήθηκε και εκπροσωπεί μέσους όρους από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα πειράματα με σφάλμα λιγότερο του 25% της μέσης τιμής.

Το CIITA ενισχύει τη φωσφορυλίωση της Ser5 της καρβοξυτελικής ουράς της RNA Πολυμεράσης II.

Τα πειράματα που παρουσιάστηκαν μέχρι τώρα συγκλίνουν στο παρακάτω μοντέλο: Στα μη επαγμένα κύτταρα το ενισχύσωμα σχηματίζεται από προϋπάρχοντες μεταγραφικούς παράγοντες που στρατολογούν μια υποομάδα βασικών παραγόντων της μεταγραφικής μηχανής (TBP, RNAPolIII και TFIIB-p89) στον DRα υποκινητή. Μετά την επαγωγή από IFN-γ το νεοσυντιθέμενο CIITA στρατολογείται στο ενισχύσωμα δια μέσω ισχυρών αλληλεπιδράσεων οδηγώντας μετέπειτα στη στρατολόγηση των CBP και GCN5 και αυτό ακολουθείται από την ακετυλίωση των ιστονών H3 και H4 και τη συνακόλουθη στρατολόγηση της μηχανής αλλαγής της δομής της χρωματίνης SWI/SNF. Η παρουσία της RNA PolIII στον DRα υποκινητή στα μη επαγμένα κύτταρα μας ώθησε να εξετάσουμε τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της καρβοξυτελικής ουράς της. Η φωσφορυλίωση της RNA Pol II απαιτείται για τη μετακίνησή της από το προεναρκτήριο σύμπλοκο και επιμήκυνση της μεταγραφής. Οι κινάσες CDK7 και CDK9 φωσφορυλιώνουν την καρβοξυτελική περιοχή της RNA Pol II. Στην Εικόνα 4A λωρίδα 2 υποδεικνύεται ότι η CDK7, μια υπομονάδα του ολο-TFIIB συμπλόκου στρατολογείται στον ενδογενή DRα υποκινητή και αυτή η

στρατολόγηση σχετίζεται επακριβώς με την κινητική της στρατολόγησης του CIITA (Εικόνα 2A, λωρίδα 2). Έτσι, τα δύο υποσύμπλοκα που συνδυάζονται για να σχηματίσουν το ολο-TFIIH, το κεντρικό TFIIH που περιλαμβάνει την p89 υπομονάδα και το CAK σύμπλοκο που περιέχει την CDK7 κινάση, στρατολογούνται και τα δύο στον DRα υποκινητή με σαφείς κινητικές και μηχανισμούς. Επιπλέον, η CDK9, μια υπομονάδα του pTEF-b συμπλόκου, στρατολογείται επίσης στον τάξης II υποκινητή με μια ελαφρώς καθυστερημένη κινητική σε σχέση με τη CDK7. Είναι καλά μελετημένο ότι η φωσφορυλίωση της RNA PolIII CTD από τις κινάσες CDK7 και CDK9 σηματοδοτεί τη μετάβαση από τη μεταγραφική έναρξη στη μεταγραφική επιμήκυνση. Χρησιμοποιώντας αντισώματα που αναγνωρίζουν ειδικά τις φωσφορυλιωμένες μορφές της RNA PolIII CTD (Εικόνα 4A) δείξαμε ότι το χρονικό σημείο έναρξης της μεταγραφής του DRα (6 ώρες)(Εικόνα 2B) συσχετίζεται απόλυτα με την αύξηση της φωσφορυλίωσης της Ser5 της RNA PolIII CTD. Από την άλλη μεριά, η φωσφορυλίωση της Ser2 της RNA PolIII CTD δεν συμβαδίζει με τη μεταγραφή του DRα (Εικόνα 4A). Αυτά τα αποτελέσματα υποστηρίχθηκαν επιπλέον με ποσοτική Real time PCR ανάλυση (Εικόνα 4B και 4C). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4C τα ποσά της φωσφορυλιωμένης Ser5 RNA PolIII στο μέγιστο της DRα μεταγραφής είναι παρόμοια με τα ποσά που ανιχνεύονται στον υποκινητή του GAPDH γονιδίου. Βρέθηκε επίσης ότι υπάρχει απόλυτη συσχέτιση της Ser5 φωσφορυλίωσης στον DRα υποκινητή ανάμεσα στα επαγμένα από IFN-γ HeLa κύτταρα και τα συστατικά ενεργά Raji κύτταρα. Σε αντιδιαστολή, τα επίπεδα της Ser2 φωσφορυλίωσης δεν συνδυάζονται με τη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου DRα. Σε κύτταρα που δεν εκφράζουν CIITA ή RFX5 δεν ανιχνεύεται φωσφορυλιωμένη RNA Pol II (Εικόνα 4B και 4C). Σαν στοιχείο ποιοτικού ελέγχου δείχνουμε ότι η ποσότητα του CREB που είναι προσδεμένη στον DRα υποκινητή σε όλους τους κυτταρικούς τύπους ήταν όμοια. Σαν σημείωση αναφέρουμε ότι τα ποσά της CREB πρωτεΐνης που είναι προσδεμένη στον DRα υποκινητή στα SJO κύτταρα (που δεν εκφράζουν RFX5) ήταν μειωμένα, ένα αποτέλεσμα σύμφωνο με τη συνεργατική φύση σχηματισμού του ενισχυοσώματος.



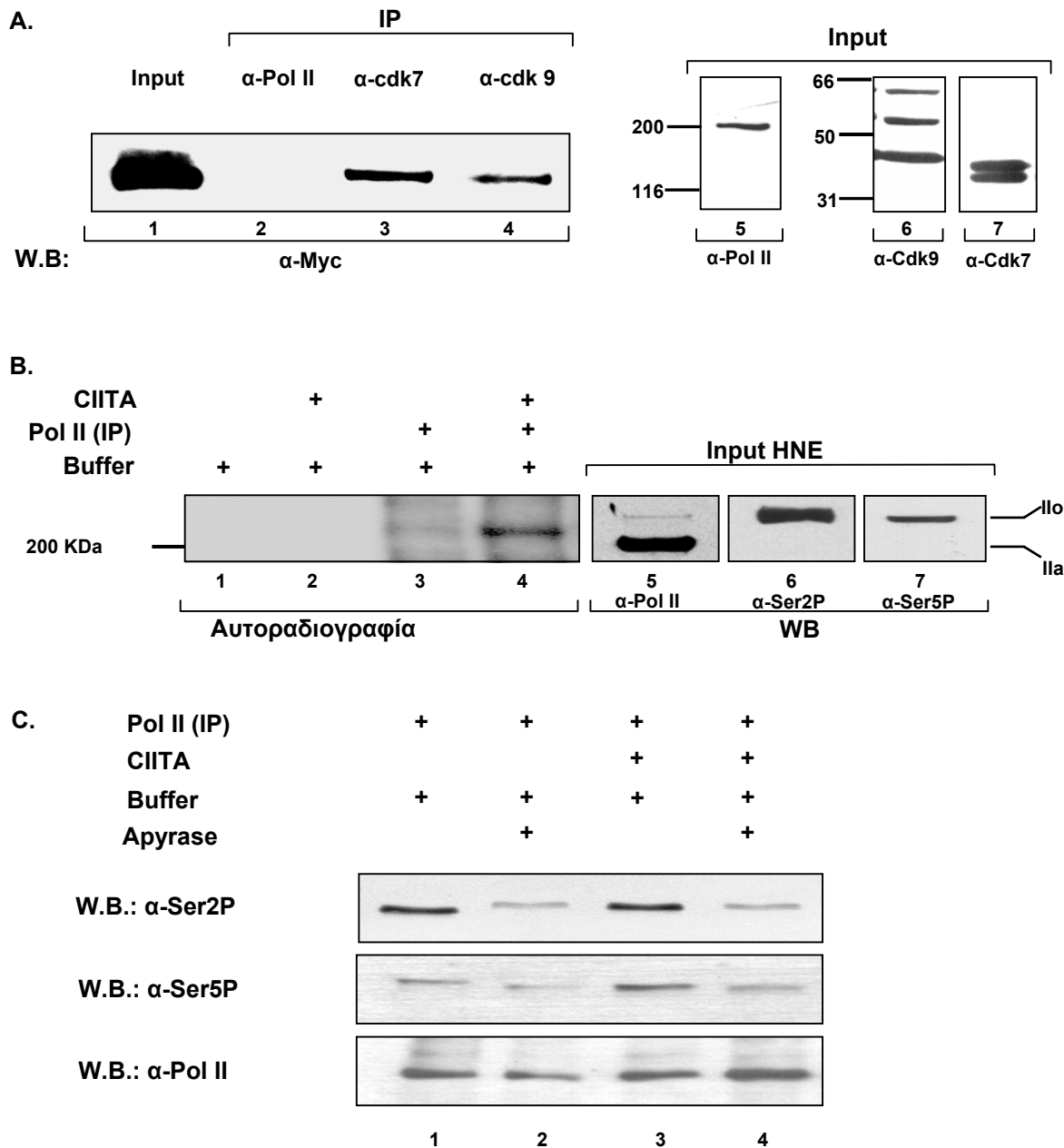
Εικόνα 4: Δυναμική στρατολόγηση των κινασών της RNA PolIII και φωσφορυλίωση των σερινών της CTD στη μεταγραφή επαγμένη από IFN- γ . (A) Ανάλυση ανοσοκατακρήμνισης χρωματινής της CDK7, CDK9 και των φωσφορυλιωμένων μορφών της RNA PolIII στις σερίνες 2 και 5, κατά τη διάρκεια επαγωγής από IFN- γ σε HeLa κύτταρα. (B,C) Ανάλυση Real time PCR των φωσφορυλιωμένων μορφών της RNA PolIII στις σερίνες 2 και 5 στον τάξης II DRa υποκινητή σε επαγμένα από IFN- γ HeLa κύτταρα και B λεμφοκύτταρα (Raji, Rj2.25 και SJO). Πειράματα ελέγχου πραγματοποιήθηκαν και στον υποκινητή του GAPDH γονιδίου. (D) Ανάλυση Real time PCR του προσδεμένου στον DRa υποκινητή παράγοντα CREB σε HeLa κύτταρα ή στους υποδεικνυόμενους B λεμφοκυτταρικούς τύπους.

Αφού η στρατολόγηση των CTD κινασών, CDK7 και CDK9 συμβαίνει μετά τη στρατολόγηση του CIITA στον υποκινητή εξετάσαμε την πιθανότητα αλληλεπίδρασής τους με το CIITA. Η Εικόνα 5A δείχνει ότι αντισώματα για τις ενδογενείς CDK7 και CDK9 πρωτεΐνες μπορούν να κατακρημνίσουν το CIITA (λωρίδες 3, 4) που έχει εκφραστεί σε COS κύτταρα μετά από διαμόλυνση με τον κατάλληλο φορέα. Σε αντίθεση αντισώματα για την RNA PolIII δεν κατακρημνίζουν το CIITA (λωρίδα 2). Τα Western Blot της Εικόνας 5 (λωρίδες 5,6 και 7) υποδεικνύουν την ειδικότητα των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοκατακρήμνιση. Άρα, το CIITA μπορεί να στρατολογήσει και τις δύο κινάσες στον υποκινητή δια μέσω άμεσων ή έμμεσων αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης.

Τα πειράματα που περιγράφηκαν μέχρι τώρα υποδεικνύουν ότι το CIITA μπορεί να επηρεάζει το επίπεδο φωσφορυλίωσης της RNA PolIII στρατολογώντας τις κινάσες CDK7 και CDK9. Για να διερευνήσουμε αυτή την πιθανότητα εξετάσαμε την ικανότητα του CIITA να ενισχύει τη φωσφορυλίωση της RNA PolIII in vitro. Το σύμπλοκο του ολοενζύμου της RNA PolIII ανοσοκατακρημνίστηκε χρησιμοποιώντας αντίσωμα ειδικό για την RNA PolIII και το επίπεδο της φωσφορυλίωσης της RNA PolIII

προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας ^{32}P -ATP και ανασυνδιασμένο CΙΤΑ στην αντίδραση. Η Εικόνα 5B δείχνει ότι η προσθήκη του CΙΤΑ παραγμένου σε κύτταρα βακυλοϊών αυξάνει την *in vitro* φωσφορυλίωση της RNA PolIII (συγκρίνουμε τις λωρίδες 2 και 3). Το Western Blot υποδεικνύει ότι στις λωρίδες 5, 6 και 7 τις μορφές της φωσφορυλιωμένης RNA PolIII που επάγεται από CΙΤΑ και χαρακτηρίζονται σαν μορφές RNA PolIII A και IIo. Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν επίσης από το πείραμα που δείχνεται στη Εικόνα 5C. Εδώ, ανοσοκατακρημνισμένη RNA PolIII αφέθηκε να φωσφορυλιωθεί από τις αλληλεπιδρώσες σ' αυτήν CDK πρωτεΐνες χρησιμοποιώντας μη ραδιενεργό ATP στην παρουσία ή απουσία ανασυνδιασμένου CΙΤΑ που ακολουθείται από western blot ανάλυση χρησιμοποιώντας αντισώματα για τις φωσφορυλιωμένες μορφές της RNA PolIII CTD στις Ser2 ή Ser5. Η Εικόνα 5C δείχνει ότι το CΙΤΑ ειδικά αυξάνει τη φωσφορυλίωση της Ser5 αλλά όχι της Ser2 σε δείγμα όπου τα πυρηνικά εκχυλίσματα δεν έχουν επιδεχθεί την επίδραση απυράσης (καταστρέφει το ATP) (λωρίδα 3) ή έχει χρησιμοποιηθεί απυράση (λωρίδα 4). Άρα, μια απ' τις δράσεις του CΙΤΑ είναι να αυξάνει τη φωσφορυλίωση της Ser5 στην καρβοξυτελική άκρη (CTD) της RNA PolIII.

EIKONA 5



Εικόνα 5: Το CIITA ενισχύει τη φωσφορυλίωση της RNA PolII. (A) Το CIITA αλληλεπιδρά in vivo με τις κινάσες CDK7 και CDK9. Συνολικά κυτταρικά εκχυλίσματα από COS-1 κύτταρα διαμολυμένα με CIITA με myc επίτοπο αναλύθηκαν σε 8% αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης και ανοσοανιχνεύθηκαν με anti-myc αντίσωμα είτε πριν (input) είτε μετά από ανοσοκατακρήμνιση (IP) με αντισώματα κατά της RNA PolII, της CDK7 και της CDK9. Κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν σε 6% και 10% πηκτώματα και ανοσοανιχνεύτηκαν με αντισώματα για RNA PolII, CDK7 και CDK9 αντίστοιχα. **(B)** Η RNA PolII ανοσοκατακρήμνιστηκε από πυρηνικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα HeLa κυττάρων και ίσες ποσότητες φωσφορυλιώθηκαν in vitro με γ - 32 P-ATP στην παρουσία ή απουσία CIITA. Οι αντιδράσεις αναλύθηκαν σε 6% αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης μαζί με input HeLa πυρηνικά εκχυλίσματα. Το ραδιενεργό κομμάτι του πηκτώματος στέγνωσε και υπέστη αυτοραδιογραφία. Το μη ραδιενεργό κομμάτι μεταφέρθηκε σε νιτροκυτταρίνη και αναλύθηκε με τα υποδεικνυόμενα αντισώματα. Οι μορφές I α και I β αντιστοιχούν στις φωσφορυλιωμένες και μη φωσφορυλιωμένες μορφές της RNA PolII. **(C)** Αντιδράσεις in vitro φωσφορυλίωσης της RNA PolII πραγματοποιήθηκαν παρουσία CIITA σε πυρηνικά εκχυλίσματα που έχουν επιδεχθεί ή όχι τη δράση απυράσης όπως υποδεικνύεται. Οι φωσφορυλιωμένες μορφές της RNA PolII ανιχνεύονται με ανοσοανίχνευση χρησιμοποιώντας αντισώματα ειδικά για τις φωσφορυλιωμένες μορφές της RNA PolII CTD στις Ser2 και Ser5.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η μεταγραφή γονιδίων ως απάντηση σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα επιτυγχάνεται με διακριτούς μηχανισμούς. Γενικά, οι μεταγραφικοί ενεργοποιητές προσδένονται σειριακά στα ρυθμιστικά τους στοιχεία και αυτό οδηγεί σε μια καθορισμένη σειρά στρατολόγησης τόσο των παραγόντων που αλλάζουν τη δομή της χρωματίνης καθώς και των γενικών μεταγραφικών παραγόντων (Cosma, 2002). Αυτές οι διαφορές σχετίζονται με διαφορετικές βιολογικές ανάγκες για κάθε γονιδιακό προϊόν. Σ' αυτό το κομμάτι της εργασίας περιγράψουμε τη σειρά των γεγονότων που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της επαγωγής του MHC τάξης II DRα γονιδίου κατόπιν επαγωγής από την IFN-γ. Βρήκαμε ότι, σε αντίθεση με προηγούμενες περιπτώσεις της ρυθμιζόμενης από ερεθίσματα γονιδιακής μεταγραφής όπως ιός (Agalioti et al., 2000), οιστρογόνα (Shang et al., 2000), η έλλειψη φωσφορικών (Gregory et al., 1999) ή από σήματα διαφοροποίησης (Soutoglou and Talianidis, 2002), οι ενεργοποιητές που είναι υπεύθυνοι για την έκφραση του DRα γονιδίου είναι προσδεδεμένοι από πριν στον ενισχυτή σχηματίζοντας το τάξης II ενισχυόσωμα. Το ενισχυόσωμα που λειτουργεί σαν μια επιφάνεια πρόσδεσης για τη στρατολόγηση μια σειράς παραγόντων της βασικής μεταγραφικής μηχανής που παραμένουν προσδεδεμένοι στον εγγύς υποκινητή ακόμα και κάτω από συνθήκες όπου το γονίδιο είναι μεταγραφικά ανενεργό. Με άλλα λόγια τα τάξης II γονίδια είναι «προετοιμασμένα» για έκφραση. Η μεταγραφική ενεργοποίηση σε απάντηση στην IFN-γ απαιτεί τη σύνθεση του CITA, το οποίο στρατολογείται ταχέως στον υποκινητή όλων των τάξης II γονιδίων. Δείξαμε ότι αυτή η στρατολόγηση σχετίζεται με την περαιτέρω στρατολόγηση συμπλόκων με ιδιότητες αλλαγής της δομής της χρωματίνης όπως ακετυλοτρανσφεράσες ιστονών και μηχανές αλλαγής της δομής που εξαρτώνται από ATP. Είναι σημαντικό, ότι το CITA επίσης στρατολογεί CDK7 και CDK9 οδηγώντας έτσι στη φωσφορυλίωση της καρβοξυτελικής ουράς της RNA PolIII και την επιμήκυνση της μεταγραφής. Έτσι, μια από τις σημαντικές λειτουργίες του CITA είναι να επάγει την έναρξη και συνέχιση της μεταγραφής. Συνολικά, τα αποτελέσματά μας περιγράφουν μια νέα στρατηγική με την οποία ένας ειδικός μεταγραφικός συνενεργοποιητής ρυθμίζει το πρόγραμμα της MHC τάξης II γονιδιακής έκφρασης.

Το τάξης II ενισχυόσωμα σχηματίζεται δια μέσω πολλαπλών συνεργατικών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στις πρωτεΐνες που το αποτελούν και το DNA (Masternak et al., 2000). Κάναμε ανασύσταση του ενισχυοσώματος *in vitro* χρησιμοποιώντας τις επτά υπομονάδες που το αποτελούν (RFX: RFX5,RFXANK,RFXAP, NFY: NFYA,NFYB,NFYC, CREB) και βρήκαμε ότι η μοριακή βάση για τη συνεργατικότητα είναι ο πολύ αργός ρυθμός αποσύνθεσης του RFX και NFY. Ο CREB παίζει ένα σημαντικό ρόλο σ' αυτή τη διαδικασία αλληλεπιδρώντας με τα σύμπλοκα RFX και NFY και σταθεροποιώντας την αλληλεπίδρασή τους με το DNA-ενισχυτή. Αυτή η υπόθεση είναι συμβατή με προηγούμενες παρατηρήσεις που δείχνουν ότι η προσθήκη μισής αλλά όχι ολόκληρης έλικας DNA ανάμεσα στις θέσεις πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων πάνω στον ενισχυτή μειώνει δραματικά την ενεργότητά του (Ting and

Trowsdale, 2002). Τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης έδειξαν ότι η σύσταση του ενισχυοσώματος *in vivo* δεν είναι αρκετή για μεταγραφική ενεργοποίηση παρά το γεγονός ότι ποικίλες μονάδες της βασικής μεταγραφικής μηχανής συμπεριλαμβάνοντας τους TBP και RNA PolIII έχουν ήδη φτάσει στον υποκινητή. Παρόλα αυτά, αυτά τα σύμπλοκα είναι εν δυνάμει ενεργά. Δείξαμε ότι σύμπλοκο ενισχυοσώματος-βασικής μεταγραφικής μηχανής ενεργοποιείται στρατολογώντας το νεοσυντιθέμενο CIITA μετά τη χρήση IFN- γ . Η στρατολόγηση CIITA οδηγεί σε περαιτέρω σταθεροποίηση του μεταγραφικού συμπλόκου αλληλεπιδρώντας και συντονίζοντας μια νέα σειρά πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων τόσο με το ενισχυόσωμα αλλά και τη μερικώς σχηματισμένη μεταγραφική μηχανή. Άρα ο σχηματισμός ενός λειτουργικού ενισχυοσώματος συμβαίνει σε διακριτά βιοχημικά βήματα. Ομοίως και το προεναρκτήριο μεταγραφικό σύμπλοκο επηρεάζεται επίσης από το CIITA. Δείξαμε ότι η στρατολόγηση των TBP και RNA PolIII αυξάνεται μετά τη στρατολόγηση του CIITA και ότι το CIITA οδηγεί στη στρατολόγηση των CDK7 και CDK9 κινασών της CTD της RNA PolIII. Αυξημένη σταθερότητα ενισχυοσώματος και προεναρκτηρίου μεταγραφικού συμπλόκου μετά την επαγωγή από IFN- γ μπορεί να εξηγήσει άλλες παρατηρήσεις όπου χρησιμοποιώντας *in vivo* αποτύπωση μετά από DNaseI έδειξαν αυξημένη προστασία στα κουτιά ΧΥ του τάξης II ενισχυτή από IFN- γ ή CIITA σε κύτταρα ινοσαρκώματος (Wright et al., 1998). Ποσοτική ανάλυση έδειξε ότι μη επαγμένα HeLa κύτταρα ομοιάζουν με B λεμφοκυτταρικές σειρές που δεν εκφράζουν CIITA όσον αφορά την χαμηλή στρατολόγηση RNA PolIII αλλά διαφέρουν σ'ότι αφορά τα TBP επίπεδα (Masternak and Reith, 2002). Άρα ο DR α υποκινητής στα επιθηλιακά HeLa κύτταρα ομοιάζουν περισσότερο με τον υποκινητή του τάξης II γονιδίου DMB σε B λεμφοκύτταρα που δεν εκφράζουν CIITA όπου φαίνεται ότι η πρόσδεση TBP καθορίζεται κυρίως από το ενισχυόσωμα μόνο (Masternak and Reith, 2002). Συνολικά, αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο σχηματισμός του προεναρκτηρίου μεταγραφικού συμπλόκου στους MHC τάξης II υποκινητές μπορεί να ελέγχεται από μηχανισμούς ειδικούς για τον υποκινητή, το κύτταρο ή κάποιο σήμα. Πιο ειδικά σε ινοβλαστικά κύτταρα που απαντούν αναστρέψιμα στην IFN- γ , ο DR α υποκινητής διαθέτει ένα μερικώς προσχηματισμένο μεταγραφικό σύμπλοκο, που του ελλείπει επαρκής RNA PolIII αλλά διατηρεί TBP και άλλα κομμάτια του TFIID για να εξασφαλίσει τη γρήγορη επανενεργοποίηση του (Christova and Oelgeschlager, 2002).

Η Ιντερφερόνη- γ σηματοδοτεί τη σύνθεση του CIITA που ρυθμίζει τη στρατολόγηση των ακετυλοτρανσφερασών ιστονών CBP και GCN5 που σχετίζονται με τη ακετυλίωση της χρωματίνης που προηγείται της έναρξης της μεταγραφής. Άρα, η συνεργασία ανάμεσα στο CIITA και το CBP και/ή τους pCAF/GCN5 που δείχθηκε σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης κυττάρων (Fontes et al., 1999; Kretsovali et al., 1998; Spilianakis et al., 2000) αντικατοπτρίζει ένα φυσιολογικό ρόλο των συνενεργοποιητών τύπου ακετυλοτρανσφεράσης ιστονών στη μεταγραφή των MHC τάξης II γονιδίων. Συνενεργοποιητές με ενεργότητα ακετυλοτρανσφεράσης ιστονών ή το CIITA το ίδιο που έχει ενεργότητα ακετυλοτρανσφεράσης (Raval et al., 2001) μπορεί να συμβάλουν στην υπερακετυλίωση ιστονών. Τα πειράματά μας επίσης έδειξαν

οτι μηχανές αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης που περιέχουν τόσο Brg-1 όσο και Brm-1 στρατολογούνται στον DRα υποκινητή, ακολουθώντας το κύμα ακετυλίωσης και η παρουσία τους σχετίζεται χρονικά με το ρόλο του για συνέχιση της μεταγραφής. Άρα η ανάγκη για αναδιαμόρφωση που εξαρτάται από SWI/SNF δεν περιορίζεται στην έκφραση του CIITA του ίδιου (Mudhasani and Fontes, 2002) αλλά απαιτείται άμεσα για τη μεταγραφή των MHC τάξης II γονιδίων.

Η φωσφορυλίωση της RNA PolIII στην καρβοξυτελική της ουρά (CTD) είναι ένα σημαντικό γεγονός που σχετίζεται με την επιμήκυνση της μεταγραφής. Το γεγονός που στενά σχετίζεται με τη μεταγραφή του γονιδίου DRα είναι η φωσφορυλίωση της CTD στη Ser5 που εντοπίζεται για πρώτη φορά 6 ώρες μετά την επαγωγή, που σημαίνει την ώρα που ξεκινά η μεταγραφή. Το CIITA φαίνεται να συντονίζει τη στρατολόγηση των δύο κινασών της CTD δηλαδή τις CDK7 και CDK9 δια μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Στον σακχαρομύκητα η Ser5 της CTD φωσφορυλιώνεται κυρίως από την κινάση TFIIF KIN28 (CDK7 ομόλογο) (Hengartner et al., 1998), ενώ στην περίπτωση του HIV, η CDK7 και η CDK9 φωσφορυλιώνουν τις σερίνες 5 και 2 αντίστοιχα στην απουσία Tat. Παρόλα αυτά στην παρουσία Tat, η CDK9 επίσης φωσφορυλιώνει τη Ser5 (Zhu et al., 2000). Κινητικά, η φωσφορυλιωμένη στη Ser5 RNA PolIII στον υποκινητή DRα σχετίζεται καλύτερα με τη στρατολόγηση της CDK7 απ'ότι της CDK9, παρότι ένας ρόλος της τελευταίας δεν μπορεί να αποκλειστεί. Σε αντίθεση με τη Ser5 η φωσφορυλίωση της Ser2 δεν ρυθμίζεται θετικά στον DRα υποκινητή μετά από επαγωγή, κάτι που συμφωνεί με αποτελέσματα σε συστατικά εκφραζόμενα γονίδια στη ζύμη (Komarnitsky et al., 2000). Σε αντίθεση με την επαγόμενη από IFN-γ μεταγραφή στα HeLa κύτταρα, η φωσφορυλίωση της Ser2 είναι υψηλή στα Raji B κύτταρα που μεταγράφουν συστατικά το DRα γονίδιο. Σε ένα άλλο σύστημα μεταγραφής επαγόμενης από σήμα, το IL-8 γονίδιο, η επαγωγή από TNF οδηγεί σε φωσφορυλίωση των Ser5 και Ser2 της προσδεμένης στον υποκινητή RNA PolIII (Barboric M et al., 2001; Nissen and Yamamoto, 2000). Άρα η εξειδίκευση των κινασών για διακριτές σερίνες της CTD είναι αντικείμενο γονιδιο-, κυτταρο-, και ρυθμιστικού τύπου ειδικούς κανόνες.

Το CIITA ενισχύει τη φωσφορυλίωση της Ser5 της RNA PolIII CTD in vitro. Ένα τέτοιο αποτέλεσμα μπορεί να οφείλεται στη ικανότητά του να αυξάνει την ενζυμική δραστικότητα ή να σταθεροποιεί την αλληλεπίδραση ενζύμου-υποστρώματος. Άρα, το CIITA στοχεύει και τις δύο κινάσες της προσδεμένης στον υποκινητή RNA PolIII και επηρεάζει ειδικά την ικανότητά τους να φωσφορυλιώνουν τη Ser5. Άρα το CIITA είναι ένας συννεργοποιητής που επηρεάζει όχι μόνο το σχηματισμό του προεναρκτήριου μεταγραφικού συμπλόκου αλλά και τη φωσφορυλίωση της RNA PolIII και την έναρξη και συνέχιση της μεταγραφής. Επομένως τα αποτελέσματά μας περιγράφουν ένα σημαντικό μηχανισμό ελέγχου της γονιδιακής μεταγραφής όπου ένα γονίδιο θηλαστικών είναι έτοιμο για μεταγραφή. Αυτό είναι αρκετά ασυνήθιστο για τα ανώτερα ευκαρυωτικά γονίδια όπου γενικά σήματα οδηγούν στο συνδυασμένο σχηματισμό μεταγραφικών παραγόντων, συμπαραγόντων και στοιχείων της βασικής μεταγραφικής μηχανής σε έναν κατά τα άλλα «άδειο» υποκινητή. Σε αντίθεση, εδώ δείξαμε οτι ένας μεγάλος αριθμός των παραπάνω

συστατικών που αναφέραμε είναι ήδη προσδεδεμένοι στον υποκινητή και περιμένουν να ενεργοποιηθούν από τον επερχόμενο ειδικό για τα MHC τάξης II συνενεργοποιητή (CITA). Ο τελευταίος διαθέτει ποικίλες βιοχημικές ενεργότητες όπως η ενεργότητα ακετυλίωσης ιστονών, η παροχή επιφανειών αλληλεπίδρασης με παράγοντες της βασικής μεταγραφικής μηχανής και του ενισχυσώματος καθώς και με την ικανότητα επαγωγής κινασών όπως οι CDK7 και CDK9 που φωσφορυλιώνουν το καρβοξυτελικό άκρο της RNA PolII, επιτρέποντας έτσι την έναρξη και συνέχιση της μεταγραφής και την έναρξη της σύνθεσης του RNA.

ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κατά την πραγματοποίηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής και με κύριο αντικείμενο τη μεταγραφική ρύθμιση της έκφρασης των MHC τάξης II γονιδίων πραγματοποιήθηκε έρευνα που οδήγησε στα παρακάτω συμπεράσματα.

Το CITA αποτελεί θετικό ρυθμιστή της έκφρασης των τάξης II αντιγόνων ιστοσυμβατότητας κι αυτό το επιτυγχάνει αλληλεπιδρώντας στην αμινοτελική του περιοχή (αμινοξέα 1-114, πρώτη και δεύτερη α -έλικα) με άλλους συνενεργοποιητές της μεταγραφής με ενεργότητα ακετυλοτρανσφεράσης, όπως είναι οι CBP, pCAF και GCN5. Η αλληλεπίδραση δείχθηκε ότι συμβαίνει *in vitro* και *in vivo*.

Το CITA διαθέτει ένα διμερές σήμα πυρηνικού εντοπισμού στο αμινοτελικό του άκρο το οποίο και χαρακτηρίστηκε στα πλαίσια αυτής της εργασίας.

Οι ακετυλοτρανσφεράσες pCAF και GCN5 ακετυλιώνουν τη λυσίνη 144 η οποία και εδράζεται στο σήμα πυρηνικού εντοπισμού του CITA. Το CBP ακετυλιώνει το παραπάνω κατάλοιπο λυσίνης καθώς και το κατάλοιπο 141 του σήματος πυρηνικού εντοπισμού αλλά και άλλα κατάλοιπα που εκτείνονται πιο καρβοξυτελικά του παραπάνω σήματος.

Δείχθηκε ότι η ακετυλίωση στο σήμα πυρηνικής εισόδου του CITA επηρεάζει τον υποκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης και μάλιστα αυξάνει η συγκέντρωση στον πυρήνα όταν ανασταλεί η απακετυλίωση με συγκεκριμένα φάρμακα.

Δείχθηκε ότι η πρωτεΐνη CITA μπορεί να αλληλεπιδρά με τον εαυτό της και αυτό επηρεάζει την υποκυτταρική κατανομή της πρωτεΐνης αλλά οδηγεί και σε λειτουργική συμπλήρωση της δράσης της.

Για πρώτη φορά χρησιμοποιώντας ανασυνδιασμένες πρωτεΐνες παραγμένες *in vitro* μπορέσαμε να δείξουμε τη συνεργατικότητα και εξειδίκευση στην πρόσδεση του MHC τάξης II ενισχυοσώματος σε συντηρημένες αλληλουχίες του εγκύς DRA υποκινητή.

Δείχθηκε ότι το τάξης II ενισχυοσώμα μπορεί εξειδικευμένα να στρατολογεί *in vitro* την πρωτεΐνη CITA καθώς και άλλα κομμάτια της βασικής μεταγραφικής μηχανής.

Χρησιμοποιώντας πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης δείξαμε τη διαδοχή των γεγονότων όσον αφορά τη στρατολόγηση των παραγόντων και μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις στον υποκινητή DRA μετά την επαγωγή από IFN- γ . Δείξαμε ότι μέρη της βασικής μεταγραφικής μηχανής είναι ήδη στρατολογημένα στον εγκύς υποκινητή πριν την επαγωγή από IFN- γ καθώς και τα μέλη του τάξης II ενισχυοσώματος είναι προσδεμένα στις θέσεις του. Επαγόμενη είναι η πρόσδεση του CITA στον υποκινητή και ακολουθεί η στρατολόγηση άλλων συνενεργοποιητών (CBP, GCN5) που επάγουν την ακετυλίωση των ιστονών στα νουκλεοσώματα του εγκύς υποκινητή.

Πιο σημαντικό κρίνεται, και δείχνεται για πρώτη φορά για ένα συνενεργοποιητή, ότι το CITA ρυθμίζει θετικά τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της καρβοξυτελικής ουράς της RNA Πολυμεράσης II.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agalioti, T., Lomvardas, S., Parekh, B., Yie, J., Maniatis, T., and Thanos, D. (2000). Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN- β promoter. *Cell* 103, 667-678.
- Ait-Si-Ali, S., Ramirez, S., Robin, P., Trouche, D., and Harel-Bellan, A. (1998). *Nucleic Acids Res* 26, 3869-3870.
- Allard, S., Utley, R. T., Savard, J., Clarke, A. S., and Grant, P. A. (1999). *EMBO J* 18, 5108-5119.
- Allis, C. D., Chicoine, L. G., Richman, R., and Schulman, I. G. (1985). *Proc Natl Acad Sci* 82, 8048-8052.
- Arany, Z., Newsome, D., Oldread, E., Livingston, D. M., and Eckner, R. (1995). A family of transcriptional adaptor proteins targeted by the E1A oncoprotein. *Nature* 374, 81-84.
- Arany, Z., Sellers, W. R., Livingston, D. M., and Eckner, R. (1994). *Cell* 77, 799-800.
- Avots, A., Buttman, M., Chuvpilo, S., Escher, C., Smola, U., Bannister, A. J., Rapp, U., Kouzarides, T., and Serfling, E. (1999). CBP/p300 integrates Raf-Rac signaling pathways in the transcriptional induction of NF-ATc during T cell activation. *Immunity* 10, 515-524.
- Baldwin, A. S. J. (1996). The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14, 649-683.
- Bannister, A., and Kouzarides, T. (1995a). CBP-induced stimulation of c-Fos activity is abrogated by E1A. *EMBO J* 14, 4758-4762.
- Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (1995b). CBP-induced stimulation of c-Fos activity is abrogated by E1A. *EMBO J* 14, 4758-4762.
- Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384, 641-643.
- Barboric M, Nissen RM, Kanazawa S, Jabrane-Ferrat N, and BM., P. (2001). NF-kappaB binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell* 8, 327-337.
- Barnhill, R. L. (1993). Pathology and prognostic factors. *Curr Opin Oncol* 5, 364-376.
- Basta, P. V., Sherman, P. A., and Ting, J. P. (1987). Identification of an interferon-gamma response region 5' of the human histocompatibility leukocyte antigen DR alpha chain gene which is active in human glioblastoma multiforme lines. *J Immunol* 138, 1275-1280.
- Beg, A. A., Ruben, S. M., Scheinman, R. I., Haskill, S., Rosen, C. A., and Baldwin, A. S. J. (1992). I kappa B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF-kappa B: a mechanism for cytoplasmic retention. *Genes Dev* 6, 1899-1913.
- Benichou, B., and Strominger, J. L. (1991). Class-II negative patient and mutant B-cell lines represent at least three, and probably four, distinct genetic defects defined by complementation analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 4285-4288.
- Beresford, G. W., and Boss, J. M. (2001). CIITA coordinates multiple histone acetylation modifications at the HLA-DRA promoter. *Nature Immunol* 2, 652-657.
- Berger, S. L. (1999). Gene activation by histone and factor acetyltransferases. *Current Opinion in Cell Biology* 11, 336-341.
- Berger, S. L., Pina, B., Silverman, N., Marcus, G. A., and Agapite, J. (1992). *Cell* 70, 251-265.
- Bertolino, P., and Rambourdin-Combe, C. (1996). The MHC class II-associated invariant chain: a molecule with multiple roles in MHC class II biosynthesis and antigen presentation to CD4+ T cells. *Crit Rev Immunol* 16, 359-379.
- Bhattacharya, S., Eckner, R., Grossman, S., Oldread, E., Arany, Z., D'Andrea, A., and Livinstone, D. (1996). Cooperation of Stat2 and p300/CBP in signaling induced by interferon- α . *Nature* 383, 344-347.
- Bontron, S., Ucla, C., Mach, B., and Steimle, V. (1997). Efficient repression of endogenous major histocompatibility complex class II expression through dominant negative CIITA mutants isolated by a functional selection strategy. *MolCellBiol* 17, 4249-4258.
- Borrow, J., Stanton, V. P., Andresen, J. M., Becher, R., and Behm, F. G. (1996). *Nat Genet* 14, 33-41.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A., and McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 347, 117-127.
- Bradley, M. B., Fernandez, J. M., Ungers, G., Diaz-Barrientos, T., Steimle, V., Mach, B., O'Reilly, R., and Lee, J. S. (1997). Correction of defective expression in MHC class II deficiency (bare lymphocyte syndrome) cells by retroviral transduction of CIITA. *J Immunol* 159, 1086-1095.
- Braunstein, M., Sobel, R. E., Allis, C. D., Turner, B. M., and Broach, J. R. (1996). *Mol Cell Biol* 16, 4349-4356.
- Brown, C. E., Lechner, T., Howe, L., and Workman, J. L. (2000). *Trends Biochem Sci* 25, 15-19.
- Brown, J. A., Rogers, E. M., and Boss, J. M. (1998). The MHC class II transactivator (CIITA) requires conserved leucine charged domains or interactions with the conserved W box promoter element. *Nucleic Acids Res* 26, 4128-4136.
- Brownell, J., and Allis, C. (1996). Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Current Opinion in Genetics & Development* 6, 176-184.
- Brownell, J., and Allis, C. D. (1995). *Proc Natl Acad Sci* 92, 4364-6368.
- Brownell, J., Zhou, J. X., Ranalli, T., Kobayashi, S., and Edmondson, D. G. (1996). *Cell* 84, 843-851.

- Candau, R., Moore, P. A., Wang, L., Barlev, N., and Ying, C. Y. (1996). *Mol Cell Biol* 16, 593-602.
- Candau, R., Zhou, J. X., Allis, C. D., and Berger, M. (1997). *EMBO J* 16, 555-565.
- Carey, M. (1998). *The enhanceosome and transcriptional synergy*. *Cell* 92, 5-8.
- Celada, A., McKercher, S., and Maki, R. (1993). Repression of major histocompatibility complex IA expression by glucocorticoids: the glucocorticoid receptor inhibits the DNA binding of the X box DNA binding protein. *J Exp Med* 177, 691-698.
- Chang, C. H., Fontes, J. D., Peterlin, M., and Flavell, R. A. (1994). Class II transactivator (CIITA) is sufficient for the inducible expression of major histocompatibility complex class II genes. *J Exp Med* 180, 1367-1374.
- Chang, C. H., Guerder, S., Hong, S., Van Ewijk, W., and Flavell, R. (1996). Mice lacking the MHC class II transactivator (CIITA) show tissue-specific impairment of MHC class II expression. *Immunity* 4, 167-178.
- Cheung, P., Allis, C. D., and Sassone-Corsi, P. (2000). *Cell* 103, 263-271.
- Chicoine, L. G., Schulman, I. G., Richman, R., Cook, R. G., and Allis, C. D. (1986). *J Biol Chem* 261, 1071-1076.
- Chin, K., Li, G., and Ting, J. (1997a). Activation and transdominant suppression of MHC class II and HLA-DMB promoters by a series of C-terminal class II transactivator deletion mutants. *J Immunology* 159, 2789-2794.
- Chin, K. C., Li, G. G. X., and Ting, J. P. Y. (1997b). Importance of acidic, proline/serine/threonine-rich, and GTP-binding regions in the major histocompatibility complex class II transactivator: Generation of transdominant-negative mutants. *PNAS USA* 94, 2501-2506.
- Chin, K.-C., Mao, C., Skinner, C., Riley, J. L., Wright, K. L., Moreno, C. S., Stark, G. R., Boss, J. M., and Ting, J. P. (1994). Molecular analysis of G1B and G3A IFN gamma mutants reveals that defects in CIITA or RFX result in defective class II MHC and Ii gene induction. *Immunity* 1, 687-697.
- Christova, R., and Oelgeschlager, T. (2002). Association of human TFIID-promoter complexes with silenced mitotic chromatin in vivo. *Nat Cell Biol* 4, 79-82.
- Chrivia, J. C., Kwok, R. P. S., Lamb, N., Hagiwara, M., Montminy, M., and Goodman, R. H. (1993). *Nature* 365, 855-859.
- Clarke, A. S., Lowell, J. E., Jacobson, S. J., and Pillus, L. (1999). *Mol Cell Biol* 19, 2515-2526.
- Collingwood, T. N., Urnov, F. D., and Wolffe, A. P. (1999). *J Mol Endocrinol* 23, 255-275.
- Collins, T., Korman, A., Wake, C. T., Boss, J. M., Kappes, D. J., Fiers, W., Ault, K. A., Gimbrone, M. A., Strominger, J. L., and Pober, J. S. (1984). Immune interferon activates multiple class II major histocompatibility genes and the associated invariant chain gene in human endothelial cells and dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 4917-4921.
- Cook, P. R. (1999). The organization of replication and transcription. *Science* 284, 1790-1795.
- Cosma, M. P. (2002). Ordered recruitment: gene-specific mechanism of transcription activation. *Mol Cell* 10, 227-236.
- Cressman, D. E., Chin, K. C., Taxman, D. J., and Ting, J. P. Y. (1999). A defect in the nuclear translocation of CIITA causes a form of type II Bare Lymphocyte Syndrome. *Immunity* 10, 163-171.
- Dai, P., Akimaru, H., Tanaka, Y., Hou, D. X., and Yasukawa, T. (1996). *Genes & Development* 10, 528-540.
- Darnell, J. E. J. (1997). STATs and gene regulation. *Science* 277, 1630-1635.
- Darnell, J. E. J., Kerr, I. M., and Stark, G. R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264, 1415-1421.
- Deffrennes, V., Vedrenne, J., Stolzenberg, M. C., Piskurich, J. F., Barbieri, G., Ting, J. P., Charron, D., and Alcaide-Loridan, C. (2001). Constitutive expression of MHC class II genes in melanoma cell lines results from the transcription of class II transactivator abnormally initiated from its B-cell specific promoter. *J Immunol* 167, 98-106.
- DeSandro, A. M., Nagarajan, U. M., and Boss, J. M. (1999). The bare lymphocyte syndrome: molecular clues to the transcriptional regulation of major histocompatibility complex class II genes. *Am J Hum Genet* 65, 279-286.
- DeSandro, A. M., Nagarajan, U. M., and Boss, J. M. (2000). Associations and interactions between bare lymphocyte syndrome factors. *Mol Cell Biol* 20, 6587-6599.
- Dong, Y., Rohn, W. M., and Benveniste, E. N. (1999). IFN-gamma regulation of the type IV class II transactivator promoter in astrocytes. *J Immunol* 162, 4731-4739.
- Douhan, J. I., Hauber, I., Eibl, M., and Glimcher, L. H. (1996). Genetic evidence for a new type of major histocompatibility complex class II combined immunodeficiency characterized by a dyscoordinate regulation of HLA-D alpha and beta chains. *J Exp Med* 183, 1063-1069.
- Dunphy, E. L., Johnson, T., Auerbach, S. S., and Wang, E. H. (2000). *Mol Cell Biol* 20, 1134-1139.
- Durand, B., Sperisen, P., Emery, P., Barras, E., Zufferey, M., Mach, B., and Reith, W. (1997). RFXAP, a novel subunit of the RFX DNA binding complex, is mutated in MHC class II deficiency. *EMBO J* 16, 1045-1055.
- Dutnall, R. N., Tafrov, S. T., Sternglanz, R., and Ramakrishnan, V. (1998). *Cell* 94, 427-438.
- Eckner, R., Ewen, M., Newsome, D., Gerdes, J., DeCaprio, J., Lawrence, J., and Livinstone, D. (1994). Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A associated 300-Kd (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor. *Genes Dev* 8, 869-884.
- Edmondson, D. G., Smith, M. M., and Roth, S. Y. (1996). *Genes & Development* 10, 1247-1259.

- Ferreri, K., Gill, G., and Montminy, M. (1994). *Proc Natl Acad Sci* 91, 1210-1213.
- Fertsch-Ruggio, D., Schoenberg, D. R., and Vogel, S. N. (1988). Induction of macrophage Ia antigen expression by rIFN-gamma and down-regulation by IFN-alpha/beta and dexamethasone are regulated transcriptionally. *J Immunol* 141, 1582-1589.
- Fling, S. P., Arp, B., and Pious, D. (1994). HLA-DMA and -DMB genes are both required for MHC class II/peptide complex formation in antigen-presenting cells. *Nature* 368, 554-558.
- 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.
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., and Mattaj, I. W. (1997). CRM1 is an export receptor for Leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 90, 1051-1060.
- Freedman, L. P. (1999). *Cell* 97, 5-8.
- Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M., and Nishida, E. (1997). CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* 390, 308-311.
- Ghosh, N., Gyory, I., Wright, G., Wood, J., and Wright, K. L. (2001). Positive regulatory domain I binding factor 1 silences class II transactivator expression in multiple myeloma cells. *J Biol Chem* 276, 15264-15268.
- Girdlestone, J. (2000). Synergistic induction of HLA class I expression by RelA and CIITA. *Blood* 95, 3804-3808.
- Girdlestone, J., Isamat, M., Gewert, D., and Milstein, C. (1993). Transcriptional regulation of HLA-A and -B: differential binding of members of the Rel and IRF families of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 11568-11572.
- Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (2000). *Genes & Development* 14, 121-141.
- Glimcher, L. H., and Kara, C. J. (1992). Sequences and factors: a guide to MHC class-II transcription. *Annual Review in Immunology* 10, 13-49.
- Gobin, S. J., Peijnenburg, A., Keijsers, V., and van den Elsen, P. J. (1997). Site alpha is crucial for two routes of IFN gamma-induced MHC class I transactivation: the ISRE-mediated route and a novel pathway involving CIITA. *Immunity* 6, 601-611.
- Goodwin, B. L., Xi, H., Tejiram, R., Eason, D. D., Ghosh, N., Wright, K. L., Nagarajan, U. M., Boss, J. M., and Blanck, G. (2001). Varying functions of specific major histocompatibility class II transactivator promoter III and IV elements in melanoma cell lines. *Cell Growth Differ* 12, 327-335.
- Gourley, T., Roys, S., Lukacs, N. W., Kunkel, S. L., Flavell, R. A., and Chang, C. H. (1999). A novel role for the major histocompatibility complex class II transactivator CIITA in the repression of IL-4 production. *Immunity* 10, 377-386.
- Gourley, T. S., and Chang, C. H. (2001). The Class II transactivator prevents activation-induced cell death by inhibiting Fas ligand gene expression. *J Immunol* 166, 2917-2921.
- Grant, P. A., Duggan, L., Cote, J., Roberts, S. M., and Brownell, J. E. (1997). *Genes & Development* 11, 1640-1650.
- Gregory, P. D., Schmid, A., Zavari, M., Munsterkotter, M., and Horz, W. (1999). Chromatin remodelling at the PHO8 promoter requires SWI-SNF and SAGA at a step subsequent to activator binding. *EMBO J* 18, 6407-6414.
- Gross, D. S., and Garrard, W. T. (1988). *Annu Rev Biochem* 57, 159-197.
- Grunstein, M. (1997). *Nature* 389, 349-352.
- Gutch, M. J., and Reich, N. C. (1991). Repression of the interferon signal transduction pathway by the adenovirus E1A oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 7913-7917.
- Hake, S., Masternak, K., Kammerbauer, C., Jansen, C., Reith, W., and Steimle, V. (2000). CIITA leucine-rich repeats control nuclear localization in vivo recruitment to the Major Histocompatibility Complex (MHC) class II enhanceosome, and MHC class II gene transcription. *Mol Cell Biol* 20, 7716-7725.
- Harada, H., Fujita, T., Miyamoto, M., Kimura, Y., Maruyama, M., Furia, A., Miyata, T., and Taniguchi, T. (1989). Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes. *Cell* 58, 729-739.
- Harada, H., Willison, K., Sakakibara, J., Miyamoto, M., Fujita, T., and Taniguchi, T. (1990). Absence of the type I IFN system in EC cells: transcriptional activator (IRF-1) and repressor (IRF-2) genes are developmentally regulated. *Cell* 63, 303-312.
- Harhaj, E. W., and Sun, S. C. (1999). Regulation of RelA subcellular localization by a putative nuclear export signal and p50. *Mol Cell Biol* 19, 7088-7095.
- Harton, J. A., Cressman, D. E., Chin, K.-C., Der, C. J., and Ting, J. P. (1999). GTP binding by class II transactivator: role in nuclear import. *Science* 285, 1402-1405.
- Harton, J. A., O'Connor, W., Conti, B., Linhof, M. W., and Ting, J. P. (2002). Leucine-rich repeats of the class II transactivator control its rate of nuclear accumulation. *Hum Immunol* 63, 588-601.
- Hauber, I., Gulle, H., Wolf, H., Maris, M., Eggenbauer, H., and Eibl, M. (1995). Molecular characterization of major histocompatibility complex class II gene expression and demonstration of antigen-specific T cell response indicate a new phenotype in class-II deficient patients. *J Exp Med* 181, 1411-1423.

- Hebbes, T. R., Thorne, A. W., Clayton, A. L., and Crane-Robinson, C. (1992). *Nucleic Acids Res* 20, 1017-1022.
- 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.
- Hecht, A., Laroche, T., Strahl-Bolsinger, S., Gasser, S. M., and Grunstein, M. (1995). *Cell* 80, 583-592.
- Hengartner, C., Myer, V., Liao, S., Wilson, C., Koh, S., and Young, R. (1998). Temporal regulation of RNA polymerase II by Srb10 and Kin28 cyclin-dependent kinases. *Mol Cell* 2, 43-53.
- Hobart, M., Ramassar, V., Goes, N., Urmson, J., and Halloran, P. F. (1997). IFN regulatory factor-1 plays a central role in the regulation of the expression of class I and II MHC genes *in vivo*. *J Immunol* 158, 4260-4269.
- Horvai, A. E., Xu, L., Korzus, E., Brard, G., Kalafus, D., Mullen, T.-M., Rose, D. W., Rosenfeld, M. G., and Glass, C. K. (1997). Nuclear integration of JAK/STAT and Ras/AP-1 signaling by CBP and p300. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 1074-1079.
- Hozak, P. (1996). The nucleoskeleton and attached activities. *Exp Cell Res* 229, 267-271.
- Iborra, F. J., Pombo, A., Jackson, D. A., and Cook, P. R. (1996). Active RNA polymerases are localized within discrete transcription "factories" in human nuclei. *J Cell Sci* 109, 1427-1436.
- Imhof, A., and Wolffe, A. P. (1999). *Biochemistry* 38, 13085-13093.
- Inohara, N. T., Koseki, T., del Peso, L., Hu, Y., Yee, C., Chen, S., Carrio, r., Merino, J., Liu, D., Ni, J., and Nunez, G. (1999). Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem* 274, 14560-14567.
- Inohara, N. T., Koseki, T., Lin, J., del Peso, L., Lucas, P. C., Chen, F. F., Ogura, Y., and Nunez, G. (2000). An induced proximity model for NF-kB activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways. *J Biol Chem* 275, 27823-27831.
- Itoh-Lindstrom, Y., Piskurich, J., Felix, N. J., Wang, Y. N., Brickey, W. J., Platt, J. L., Koller, B. H., and Ting, J. P. (1999). Reduced IL-4, lipopolysaccharide-, and IFN-g induced MHC class II expression in mice lacking class II transactivator due to targeted deletion of the GTP-binding domain. *J Immunol* 163, 2425-2431.
- Ivashkiv, L. B., Ayres, A., and Glimcher, L. H. (1994). Inhibition of IFN-gamma induction of class II MHC genes by cAMP and prostaglandins. *Immunopharmacology* 27, 67-77.
- Ivashkiv, L. B., and Glimcher, L. H. (1991). Repression of class II major histocompatibility complex genes by cyclic AMP is mediated by conserved promoter elements. *J Exp Med* 174, 1583-1592.
- Jackson, D. A., Hassan, A. B., Errington, R. J., and Cook, P. R. (1993). Visualization of focal sites of transcription within human nuclei. *EMBO J* 12, 1059-1065.
- Janknecht, R., Cahill, M. A., and Nordheim, A. (1995). *Carcinogenesis* 16, 443-450.
- Janknecht, R., and Hunter, T. (1996a). *Nature* 383, 22-23.
- Janknecht, R., and Hunter, T. (1996b). Transcriptional control: versatile molecular glue. *Curr Biol* 6, 951-954.
- John, S., Howe, L., Tafrov, S. T., Grant, P. A., Sternglanz, R., and Workman, J. L. (2000). *Genes & Development* 14, 1196-1208.
- Kalvakolanu, D. V. R., Bandyopadhyay, S. K., Harter, M. L., and Sen, G. C. (1991). Inhibition of interferon-inducible gene expression by the adenovirus E1A proteins: block in transcriptional complex formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 7459-7463.
- Kamei, Y., Xu, L., Heinzel, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S. C., Heyman, R. A., Rose, D. W., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* 85, 403-414.
- Kamine, J., Elangovan, B., Subremanian, T., Coleman, D., and Chinnadurai, G. (1996). *Virology* 216, 357-366.
- Kara, C., and Glimcher, L. H. (1991). *In vivo* footprinting of MHC class II genes: bare promoters in the bare lymphocyte syndrome. *Science* 252, 709-712.
- Kara, C., and Glimcher, L. H. (1993). Developmental and cytokine-mediated regulation of MHC class II gene promoter occupancy *in vivo*. *J Immunol* 150, 4934-4942.
- Kaufman, P. D., Kobayashi, S., Kessler, N., and Stillman, B. (1995). *Cell* 81, 1105-1114.
- Kee, B. L., Arias, J., and Montminy, M. (1996). Adaptor-mediated recruitment of RNA polymerase II to a signal-dependent activator. *J Biol Chem* 271, 2373-2375.
- Kim, H.-J., Yi, J.-Y., Sung, H.-S., Moore, D., Jhun, B., Lee, Y. C., and Lee, J. W. (1999). Activating signal cointegrator 1, a novel transcription activator of nuclear receptors, and its cytosolic localization under conditions of serum deprivation. *Mol Cell Biol* 19, 6323-6332.
- Kim, T. K., and Maniatis, T. (1997). The mechanism of transcriptional synergy of an *in vitro* assembled interferon-β enhanceosome. *Mol Cell* 1, 119-129.
- Kim, Y., Tanner, K. G., and Denu, J. M. (2000). *Anal Biochem* 280, 308-314.
- Kimura, A., and Horikoshi, M. (1998). *Genes Cells*. *Genes Cells* 3, 789-800.
- Kleff, S., Andrulis, E. D., Anderson, C. W., and Sternglanz, R. (1995). *J Biol Chem* 270, 24674-24677.
- Klein, C., Cavazzana-Calvo, M., and Le Deist, F. (1995). Bone marrow transplantation in major histocompatibility complex class II deficiency: a single-center study of 19 patients. *Blood* 85, 580-587.

- Kobe, B., and Deisenhofer, J. (1995). A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature* 374, 183-186.
- Komarnitsky, P., Cho, E., and Buratowski, S. (2000). Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev* 14, 2452-2460.
- Korzus, E., Torchia, J., Rose, D. W., Xu, L., Kurokawa, R., McInerney, E. M., Mullen, T.-M., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1998). Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science* 279, 703-707.
- Kouzarides, T. (1999). Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Current Opinion in Genetics & Development* 9, 40-48.
- 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. *MolCellBiol* 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.
- Kubo, M., Ransom, J., Webb, D., Hashimoto, Y., Tada, T., and Nakayama, T. (1997). T-cell subset specific expression of the IL-4 gene is regulated by a silencer element and STAT-6. *EMBO J* 16, 4007-4020.
- Kumar, K. P., McBride, K. M., Weaver, B. K., Dingwall, C., and Reich, N. C. (2000). Regulated nuclear-cytoplasmic localization of Interferon Regulatory Factor 3, a subunit of Double-Stranded RNA-Activated Factor 1. *MolCellBiol* 20, 4159-4168.
- Kwok, R. P. S., Lundblad, J. R., Chrovia, J. C., Richards, J. P., and Bachinger, H. P. (1994). *Nature* 370, 223-226.
- Landmann, S., Muhlethaler-Mottet, A., Bernasconi, L., Suter, T., Waldburger, J. M., Masternak, K., Arrighi, J., Hauser, C., Fontana, A., and Reith, W. (2001). Maturation of dendritic cells is accompanied by rapid transcriptional silencing of class II transactivator (CIITA) expression. *J Exp Med* 194, 379-391.
- Lee, Y. J., Han, Y., Lu, H. T., Nguyen, V., Qin, H., Howe, P. H., Hocevar, B. A., Boss, J. M., Ransohoff, R. M., and Benveniste, E. N. (1997). TGF-beta suppresses the IFN-gamma induction of MHC class II gene expression by inhibiting class II transactivator messenger RNA expression. *J Immunol* 158, 2065-2075.
- Li, G., Harton, J. A., Zhu, X., and Ting, J. P. (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, 4626-4635.
- Lin, J., Mamane, Y., and Hiscott, J. (1999). Structural and functional analysis of interferon regulatory factor 3: localization of the transactivation and autoinhibitory domains. *Mol Cell Biol* 19, 2465-2474.
- Linhof, M. W., Harton, J., Cressman, D., Martin, B., and Ting, J. P. (2001). Two distinct domains within CIITA mediate self-association: involvement of the GTP-Binding and Leucine-Rich domains. *MolCellBiol* 21, 3001-3011.
- Logie, C., Tse, C., Hansen, J. C., and Peterson, C. L. (1999). *Biochemistry* 38, 2514-2522.
- Louis-Plence, P., Moreno, C. S., and Boss, J. M. (1997). Formation of a regulatory factor X1/X2 box-binding protein/nuclear factor-Y multiprotein complex on the conserved regulatory regions of HLA Class II genes. *J Immunol* 159, 3899-3909.
- Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., and Richmond, T. J. (1997). *Nature* 389, 251-260.
- Luger, K., and Richmond, R. K. (1998). *Curr Opin Genet Dev* 8, 140-146.
- Lundblad, J. R., Kwok, R. P. S., Lurance, M. E., Harter, M. L., and Goodman, R. H. (1995). Adenoviral E1A-associated protein p300 as a functional homologue of the transcriptional co-activator CBP. *Nature* 374, 85-88.
- Mach, B., Steimle, V., Martinez-Soria, E., and Reith, W. (1996). Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu Rev Immunol* 14, 301-331.
- 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 USA* 94, 6324-6329.
- Marcus, G. A., Silverman, N., Berger, M., Horiuchi, J., and Guarente, L. (1994). *EMBO J* 13, 4807-4815.
- Martin, B. K., Chin, K. C., Olsen, J. C., Skinner, C. A., Dey, A., Ozato, K., and Ting, J. P. (1997). Induction of MHC class II expression by the MHC class II transactivator CIITA. *Immunity* 6, 591-600.
- Martinez-Balbas, M., Bauer, U. M., Nielsen, S., Brehm, A., and Kouzarides, T. (2000). Regulation of E2F1 activity by acetylation. *EMBO J* 19, 662-671.
- Masternak, K., Barras, E., Zufferey, M., Conrad, B., Corthals, G., Abersold, R., Sanchez, J.-C., Hochstrasser, D., Mach, B., and Reith, W. (1998). A gene encoding a novel RFX-associated transactivator is mutated in the majority of MHC class II deficiency patients. *Nat Genet* 20, 273-277.
- Masternak, K., Muhlethaler-Mottet, A., Villard, J., Zufferey, M., Steimle, V., and Reith, W. (2000). CIITA is a transcriptional coactivator that is recruited to the MHC class II promoters by multiple synergistic interactions with an enhanceosome complex. *Genes Dev* 14, 1156-1166.

- Masternak, K., and Reith, W. (2002). Promoter-specific functions of CIITA and the MHC class II enhanceosome in transcriptional activation. *Embo J* 21, 1379-1288.
- Masumi, A., Wang, I. M., Lefebvre, B., Yang, X. J., Nakatani, Y., and Ozato, K. (1999). The histone acetylase PCAF is a phorbol-ester-inducible coactivator of the IRF family that confers enhanced interferon responsiveness. *Molecular and Cellular Biology* 19, 1810-1820.
- Mattaj, I. W., and Englmeier, L. (1998). Nucleocytoplasmic transport: The soluble phase. *Annu Rev Biochem* 67, 265-306.
- Medema, J. P., and Borst, J. (1999). T cell signaling: a decision of life and death. *Hum Immunol* 60, 403-411.
- Meraz, M. A., White, J. M., Sheehan, K. C., Bach, E. A., Rodig, S. J., Dighe, A. S., Kaplan, D. H., Riley, J. K., Greenlund, A. C., and Cambell, D. (1996). Targeted disruption of the STAT1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* 84, 431-442.
- Merika, M., Williams, A., Chen, G., Collins, T., and Thanos, D. (1998). Recruitment of CBP/p300 by the IFN β enhanceosome is required for synergistic activation of transcription. *Mol Cell* 1, 1-20.
- Mizzen, C. A., Yang, X. J., Kokubo, T., Brownell, J., and Bannister, A. J. (1996). *Cell* 87, 1261-1270.
- Montminy, M. (1997). Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu Rev Biochem* 66, 807-822.
- Moreno, C. S., Berensford, G. W., Louis-Pence, P., Morris, A. C., and Boss, J. M. (1999). CREB regulates MHC class II expression in a CIITA-dependent manner. *Immunity* 10, 143-151.
- Moreno, C. S., Emery, P., West, J. E., Durand, B., Reith, W., Mach, B., and Boss, J. M. (1995). Purified X2 binding protein (X2BP) cooperatively binds the class II MHC X box region in the presence of purified RFX, the X box factor deficient in the bare lymphocyte syndrome. *J Immunol* 155, 4313-4321.
- Morris, A. C., Berensford, G. W., Mooney, M., and Boss, J. M. (2002). Kinetics of an interferon- γ response: transcription and assembly of CIITA promoter IV and inhibition by methylation. *Mol Cell Biol* 22, 4781-4791.
- Morris, A. C., Spangler, W., and Boss, J. M. (2000). Methylation of class II transactivator promoter IV: a novel mechanism of MHC class II gene control. *J Immunol* 164, 4143-4149.
- Mosmann, T. R., and Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7, 145-173.
- Mudhasani, R., and Fontes, J. D. (2002). The class II transactivator requires brahma-related gene 1 to activate transcription of major histocompatibility complex class II genes. *Mol Cell Biol* 22, 5019-5026.
- Muhlethaler-Mottet, A., Di Berardino, W., Otten, L., and Mach, B. (1998). Activation of the MHC class II transactivator CIITA by interferon gamma requires cooperative interaction between Stat1 and USF-1. *Immunity* 8, 157-166.
- 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.
- Munshi, N., Merika, M., Yie, J., Senger, K., Chen, G., and Thanos, D. (1998). Acetylation of HMG I(Y) by CBP turns off IFN β expression by disrupting the enhanceosome. *Molecular Cell* 2, 457-467.
- Nagarajan, U. M., Louis-Pence, P., DeSandro, A. M., Nilsen, R., Bushey, A., and Boss, J. M. (1999). RFX-B is the gene responsible for the most common cause of the bare lymphocyte syndrome, a MHC class II immunodeficiency. *Immunity* 10, 153-162.
- Nakajima, T., Ushida, C., Anderson, S., Parvin, J., and Montminy, M. (1997). Analysis of a cAMP-responsive activator reveals a two-component mechanism for transcriptional induction via signal-dependent factors. *Genes Dev* 11, 738-747.
- Nekrep, N., Jabrane-Ferrat, N., and Peterlin, B. M. (2000). Mutations in the bare lymphocyte syndrome define critical steps in the assembly of the regulatory factor X complex. *Mol Cell Biol* 20, 4455-4461.
- Neuwald, A. F., and Landsman, D. (1997). *Trends Biochem Sci* 22, 154-155.
- Nickerson, K., Sisk, T. J., Inohara, N. T., Yee, C., Kennell, J., Cho, M., Yannie, P. I., Nunez, G., and Chang, C. H. (2001). Dendritic cell-specific MHC class II transactivator contains a caspase recruitment domain that confers potent transactivation activity. *J Biol Chem* 276, 19089-19093.
- Nissen, R., and Yamamoto, K. (2000). The glucocorticoid receptor inhibits NF κ B by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* 14, 2314-2329.
- Oelgeschlager, T., Janknecht, R., Krieg, V., Schreek, S., and Luscher, B. (1996). *EMBO J* 15, 2771-2780.
- Ogrysko, V., Kotani, T., Zhang, X., Schiltz, L., Howard, T., Yang, X. J., Howard, B., Qin, J., and Nakatani, Y. (1998). Histone-like TAFs within the pCAF histone acetylase complex. *Cell* 94, 35-44.
- Ogryzko, V. V., Schiltz, R. L., Russanova, V., Howard, B. H., and Nakatani, Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87, 953-959.
- O'Keefe, G. M., Nguyen, V., Ping Tang, L. L., and Benveniste, E. N. (2001). IFN-gamma regulation of class II transactivator promoter IV in macrophages and microglia: involvement of the suppressors of cytokine signaling-1 protein. *J Immunol* 166, 2260-2269.

- Ossareh-Nazari, B., Bachelerie, F., and Dargemont, C. (1997). Evidence for a role of CRM1 in signal-mediated nuclear protein export. *Science* 278, 141-144.
- Ostmeier, H., Fuchs, B., Otto, F., Mawick, R., Lippold, A., Krieg, V., and Suter, L. (1999). Can immunohistochemical markers and mitotic rate improve prognostic precision in patients with primary melanoma? *Cancer* 85, 2391-2399.
- Otten, L., Steimle, V., Bontron, S., and Mach, B. (1998). Quantitative control of MHC class II expression by the transactivator CIITA. *Eur J Immunol* 28, 473-478.
- Parthun, M. R., Widom, J., and Gottschling, D. E. (1996). *Cell* 87, 85-94.
- Paul, W. E. (1991). Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* 77, 1859-1870.
- Peijnenburg, A., Godthelp, B., van Boxel-Dezaire, A., and van den Elsen, P. (1995). Definition of a novel complementation group in MHC class II deficiency. *Immunogenetics* 41, 287-294.
- Peijnenburg, A., Van Eggermond, M. J., Gobin, S., Van den Berg, R., Godthelp, B., Vossen, J. M., and van den Elsen, P. (1999). Discoordinate expression of invariant chain and MHHC class II genes in class II transactivator-transfected fibroblasts defective for RFX5. *J Immunol* 163, 794-801.
- Piskurich, J., Lin, K.-I., Lin, Y., Wang, Y. N., Ting, J., and Calame, K. (2000). BLIMP-1 mediates extinction of major histocompatibility class II transactivator expression in plasma cells. *Nat Immunol* 1, 526-532.
- Quan, V., Towey, M., Sacks, S., and Kelly, A. P. (1999). Absence of MHC class II gene expression in a patient with a single amino acid s.
- Raval, A., Howcroft, T. K., Weissman, J. D., Kirshner, S., Zhu, X.-S., Yokoyama, K., Ting, J. P., and Singer, D. S. (2001). Transcriptional coactivator, CIITA, is an acetyltransferase that bypasses a promoter requirement for TAFII250. *Mol Cell* 7, 105-115.
- Reid, J. L., Bannister, A. J., Zegerman, P., Martinez-Balbas, M. A., and Kouzarides, T. (1998). E1A directly binds and regulates the P/CAF acetyltransferase. *EMBO J* 17, 4469-4477.
- Reifsnnyder, C., Lowell, J. E., Clarke, A. S., and Pillus, L. (1996). *Nat Genet* 14, 42-49.
- Reith, W., Kobr, M., Emery, P., Durand, B., Siegrist, C. A., and Mach, B. (1994). Cooperative binding between factors RFX and X2bp to the X and X2 boxes of MHC class II promoters. *J Biol Chem* 269, 20020-20025.
- Riberdy, J. M., Newcomb, J. R., Surman, M. J., Barbosa, J. A., and Cresswell, P. (1992). HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides. *Nature* 360, 474-477.
- Riley, J. L., Westerheide, S. D., Price, J. A., Brown, J. A., and Boss, J. M. (1995). Activation of class II MHC genes requires both the X box region and the class II transactivator (CIITA). *Immunity* 2, 533-543.
- Rohn, W. M., Lee, Y. J., and Benveniste, E. N. (1996). regulation of class II MHC gene expression. *Crit Rev Immunol* 16, 311-330.
- Rohn, W. M., Tang, L. P., Dong, Y., and Benveniste, E. N. (1999). IL-1beta inhibits IFN-gamma-induced class II MHC expression by suppressing transcription of the class II transactivator gene. *J Immunol* 162, 886-896.
- Ruiz-Carrillo, A., Wangh, L. J., and Allfrey, V. G. (1975). *Science* 190, 117-128.
- Sakaguchi, K., Herrera, J., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C., and Appella, E. (1998). DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes & Development* 12, 2831-2841.
- Sartorelli, V., Huang, J., Hamamori, Y., and Keddes, L. (1997). *Mol Cell Biol* 17, 1010-1026.
- Schindler, C., and Darnell, J. J. (1995). Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem* 64, 621-651.
- Scholl, T., Mahanta, S. K., and Strominger, J. L. (1997). Specific complex formation between the type II bare lymphocyte syndrome-associated transactivators CIITA and RFX5. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 6330-6334.
- Schwiebert, L. M., Schleimer, R. P., Radka, S. F., and Ono, S. J. (1995). Modulation of MHC class II expression in human cells by dexamethasone. *Cell Immunol* 165, 12-19.
- Shaffer, A., Lin, K., Kuo, T., Yu, X., Hurt, E., Rosenwald, A., Giltzate, J., Yang, L., Zhao, H., and Calame, K. (2002). Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* 17, 51-62.
- Shang, Y., Hu, X., DiRenzo, J., Lazar, M. A., and Brown, M. (2000). Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* 103, 843-852.
- Shikama, N., Lyon, J., and Thangue, N. B. (1997). The p300/CBP family: integrating signals with transcription factors and chromatin. *Trends in Cell Biology* 7, 230-236.
- Silacci, P., Mottet, A., Steimle, V., Reith, W., and Mach, B. (1994). Developmental extinction of major histocompatibility complex class II gene expression in plasmocytes is mediated by silencing of the transactivator gene CIITA. *J Exp Med* 180, 1329-1336.
- Silverman, N., Agapite, J., and Guarente, L. (1994). *Proc Natl Acad Sci* 91, 11665-11668.
- Sims, T., Elliot, J., Ramassar, V., Denney, D., and Halloran, P. (1997). Mouse class II transactivator: cDNA sequence and amino acid comparison with the human class II transactivator. *Immunogenetics* 45, 220-222.

- Sisk, T. J., Gourley, T., Roys, S., and Chang, C. H. (2000). MHC class II transactivator inhibits IL-4 gene transcription by competing with NF-AT to bind the coactivator CREB binding protein(CBP)/p300. *J Immunol* 165, 2511-2517.
- Sisk, T. J., Roys, S., and Chang, C. H. (2001). Self-association of CIITA and its transactivation potential. *Mol Cell Biol* 21, 4919-4928.
- Smith, E. R., Belote, J. M., Schiltz, R. L., Yang, X. J., and Moore, P. A. (1998). *Nucleic Acids Res* 26, 2948-2954.
- Sobel, R. E., Cook, R. G., Perry, C. A., Amunziato, A. T., and Allis, C. D. (1995). *Proc Natl Acad Sci* 92, 1237-1241.
- Soutoglou, E., Katrakili, N., and Talianidis, I. (2000). Acetylation regulates transcription factor activity at multiple levels. *Mol Cell* 5, 745-751.
- Soutoglou, E., and Talianidis, I. (2002). Coordination of PIC assembly and chromatin remodeling during differentiation-induced gene activation. *Science* 295, 1901-1904.
- Sperling, A. I., and Bluestone, J. A. (1996). The complexities of T-cell co-stimulation:CD28 and beyond. *Immunol Rev* 153, 155-182.
- Spilianakis, C., Papamatheakis, J., and Kretsovali, A. (2000). Acetylation by PCAF enhances CIITA nuclear accumulation and transactivation of Major Histocompatibility Complex Class II genes. *MolCellBiol* 20, 8489-8498.
- Steger, D. J., Utley, R. T., Grant, P. A., John, S., and Eberharter, A. (1998). *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 63, 483-491.
- Steimle, V., Durand, B., Emmanuele, B., Zufferey, M., Hadam, M., Mach, B., and Reith, W. (1995). A novel DNA-binding regulatory factor is mutated in primary MHC class II deficiency (bare lymphocyte syndrome). *Genes Dev* 9, 1021-1032.
- 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.
- Steimle, V., Reith, W., and Mach, B. (1996). Major histocompatibility complex class II deficiency: a disease of gene regulation. *Advances in Immunology* 61, 327-340.
- Steimle, V., Siegrist, C. A., Mottet, A., Lisowska-Grosppierre, B., and Mach, B. (1994). Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 265, 106-109.
- Sterner, D. E., and Berger, S. L. (2000). *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 435-459.
- Strubin, M., Long, E. O., and Mach, B. (1986). Two forms of the Ia antigen-associated invariant chain result from alternative initiation at two in-phase AUGs. *Cell* 47, 619-625.
- Struhl, K. (1998). Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev* 12, 599-606.
- Suter, T., Malipiero, U., Otten, L., Ludewig, B., Muhlethaler-Mottet, A., Mach, B., Reith, W., and Fontana, A. (2000). Dendritic cells and differential usage of the MHC class II transactivator promoters in the central nervous system in experimental autoimmune encephalitis. *Eur J Immunol* 30, 794-802.
- Takechi, S., and Nakayama, T. (1999). *Biochem Biophys Res Commun* 266, 405-410.
- Tanaka, N., Ishihara, M., Lamphier, M., Nozawa, H., Matsuyama, T., Mak, T. W., Aizawa, S., Tokino, T., Oren, M., and Taniguchi, T. (1996). Cooperation of the tumor suppressor IRF-1 and p53 in response to DNA damage. *Nature* 382, 816-818.
- Taniguchi, T., Harada, H., and Lamphier, M. (1995). regulation of the interferon system and cell growth by the IRF transcription factors. *J Cancer Res Clin Oncol* 121, 516-520.
- Taniguchi, T., Lamphier, M., and Tanaka, N. (1997). IRF-1: the transcription factor linking the interferon response and oncogenesis. *BiochimBiophysActa* 1333, M9-17.
- Taunton, J., Hassig, C. A., and Schreiber, S. L. (1996). *Science* 272, 408-411.
- Ting, J. P., and Baldwin, A. S. (1993). Regulation of MHC gene expression. *Curr Opin Immunol* 5, 8-16.
- Ting, J. P., and Trowsdale, J. (2002). Genetic control of MHC class II expression. *Cell* 109 suppl, S21-33.
- Tse, C., Sera, T., Wolffe, A. P., and Hansen, J. C. (1998). *Mol Cell Biol* 18, 4629-4638.
- Turner, B. M., Birley, A. J., and Lavender, J. (1992). *Cell* 69, 375-384.
- Utley, R. T., Ikeda, K., Grant, P. A., Cote, J., and Steger, D. J. (1998). *Nature* 394, 498-502.
- van den Elsen, P., van der Stoep, N., Vietor, H., Wilson, L., van Zutphen, M., and Gobin, S. (2000). Lack of CIITA expression is central to the absence of antigen presentation functions of trophoblast cells and is caused by methylation of the IFN-gamma inducible promoter(IV) of CIITA. *Hum Immunol* 61, 850-862.
- van der Stoep, N., Biesta, P., Quinten, E., and van den Elsen, P. (2002). Lack of IFN-gamma mediated induction of the class II transactivator (CIITA) through promoter methylation is predominantly found in developmental tumor cell lines. *Int J Cancer* 97, 501-507.
- Van Ewijk, W., Ron, Y., Monaco, J., Kappler, J., Marrack, P., Le Meur, M., Gerlinger, P., Durand, B., Benoist, C., and Mathis, D. (1988). Compartmentalization of MHC class II gene expression in transgenic mice. *Cell* 53, 357-370.
- Van Gool, S. W., NVandenbergh, P., De Boer, M., and Ceuppens, J. L. (1996). CD80, CD86 and CD40 provide accessory signals in a multistep T-cell activation model. *Immunol Rev* 153, 47-83.
- Verreault, A., Kaufman, P. D., Kobayashi, S., and Stillman, B. (1998). *Curr Biol* 8, 96-108.
- Vignali, M., Steger, D. J., Neely, K. E., and Workman, J. L. (2000). *EMBO J* 19, 2629-2640.

- Villard, J., Lisowska-Grospierre, B., van den Elsen, P., Fischer, A., Reith, W., and Mach, B. (1997). Mutation of RFXAP, a regulator of MHC class II genes, in primary MHC class II deficiency. *N Engl J Med* 337, 748-753.
- Villard, J., Muhlethaler-Mottet, A., Bontron, S., Mach, B., and Reith, W. (1999). CIITA-induced occupation of MHC class II promoters is independent of the cooperative stabilization of the promoter-bound multi-protein complexes. *Int Immunol* 11, 461-469.
- Wadburger, J., Suter, T., Fontana, A., Acha-Orbea, H., and Reith, W. (2001). Selective abrogation of major histocompatibility complex class II expression on extrahematopoietic cells in mice lacking promoter IV of the class II transactivator gene. *J Exp Med* 19, 393-406.
- Wallberg, A. E., Neely, K. E., Gustafsson, J. A., Workman, J. L., Wright, A. P., and Grant, P. A. (1999). *Mol Cell Biol* 19, 5952-5959.
- Wang, L., Mizzen, C. A., Ying, C., Candau, R., and Barlev, N. (1997). *Mol Cell Biol* 17, 519-527.
- Wekerle, H., Kojima, K., Lannes-Vieira, J., Lassmann, H., and Linington, C. (1994). Animal models. *AnnNeurol* 36, S47-53.
- Wiszniewsky, W., Fondaneche, M. C., Le Deist, F., Kanariou, M., Selz, F., Brousse, N., Steinle, V., Barbieri, G., Alcaide-Loridan, C., and Charron, D. (2001). Mutation in the class II transactivator leading to a mild immunodeficiency. *J Immunol* 167, 1787-1794.
- Wolf, E., Vassilev, A., Makino, Y., Sali, A., Nakatani, Y., and Burley, S. K. (1998). *Cell* 94, 439-449.
- Wolff, B., Sanglier, J. J., and Wang, Y. (1997). Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleo-cytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA. *ChemBiol* 4, 139-147.
- Wolffe, A. P., and Hayes, J. J. (1999). *Nucleic Acids Res* 27, 711-720.
- Wolffe, A. P., and Pruss, D. (1996). *Cell* 84, 817-819.
- Wright, K., Chin, K., Linhoff, M., Skinner, C., Brown, J., Boss, J., Stark, G., and Ting, J. (1998). CIITA stimulation of transcription factor binding to major histocompatibility complex class II and associated promoters in vivo. *ProcNatlAcadSci USA* 95, 6267-6272.
- Xi, H., Eason, D. D., Ghosh, D., Dovey, S., Wright, K. L., and Blanck, G. (1999). Cooccupancy of the interferon regulatory element of the class II transactivator (CIITA) type IV promoter by interferon regulatory factors 1 and 2. *Oncogene* 18, 5889-5903.
- Xi, H., Goodwin, B., Shepherd, A. T., and Blanck, G. (2001). Impaired class II transactivator expression in mice lacking interferon regulatory factor-2. *Oncogene* 20, 4219.
- Xu, W., Edmondson, D. G., Evrard, Y., Wakamiya, M., Behringer, R. R., and Roth, S. Y. (2000). *Nat Genet* 26, 229-232.
- Xu, W., Edmondson, D. G., and Roth, S. Y. (1998). *Mol Cell Biol* 18, 5659-5669.
- Yamamoto, T., and Horikoshi, M. (1997). *J Biol Chem* 272, 30595-30598.
- Yang, X. J., Ogryzko, V., Nishikawa, J., Howard, B., and Nakatani, Y. (1996). A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* 382, 319-324.
- Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M., and Beppu, T. (1990). Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *AJBiolChem* 265, 17174-17179.
- Yuan, W., Condorelli, G., Caruso, M., Felsani, A., and Giordano, A. (1996). *J Biol Chem* 271, 9009-9013.
- Yun, S., Gustafsson, K., and Fabre, J. (1997). Suppression of MHC class II expression by human class II transactivator constructs lacking the N-terminal domain. *IntImmunol* 9, 1545-1553.
- Zabel, U., Henkel, T., Silva, M. S., and Baeuerle, P. A. (1993). Nuclear uptake control of NF-Kappa B by MAD-3, an I kappa B protein present in the nucleus. *Embo J* 12, 201-211.
- Zhang, J. J., Vinkemeier, U., Gu, W., Chakravarti, D., Horvath, C. M., and Darnell, J. E. J. (1996). Two contact regions between Stat1 and CBP/p300 in interferon γ signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 15092-15096.
- Zhang, W., and Bieker, J. (1998). Acetylation and modulation of erythroid Kruppel-like factor (EKLF) activity by interaction with histone acetyltransferases. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 9855-9860.
- Zhou, H., and Glimcher, L. H. (1995). Human MHC class II gene transcription directed by the carboxyl terminus of CIITA, one of the defective genes in type II MHC combined immune deficiency. *Immunity* 2, 545-553.
- Zhou, H., Su, H. S., Zhang, X., Douhan, J. r., and Glimcher, L. H. (1997). CIITA-dependent and -independent class II MHC expression revealed by a dominant negative mutant. *J Immunol* 158, 4741-4749.
- Zhou, M., Halanski, M., Radonovich, M., Kashanchi, F., Peng, J., Price, D., and Brady, J. (2000). Tat modifies the activity of CDK9 to phosphorylate serine 5 of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain during human immunodeficiency virus type 1 transcription. *Mol Cell Biol* 20, 5077-5086.
- Zhu, J., and McKeon, F. (1999). NF-AT activation requires suppression of Crm1 dependent export by calcineurin. *Nature* 398, 256-260.

- *Zhu, X.-S., Linhof, M. W., Li, G., Chin, K.-C., Maity, S. N., and Ting, J. P. (2000). Transcriptional Scaffold: CIITA Interacts with NF-Y, RFX and CREB to cause stereospecific regulation of the class II major histocompatibility complex promoter. Mol Cell Biol 20, 6051-6061.*