

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

**ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**Εργασία για τον Μεταπτυχιακό Τίτλο Ειδίκευσης**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ  
ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΗ ΤΩΝ ΤΑΞΗΣ II ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ  
ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ (CIIA)**

**Σπηλιανάκης Χαράλαμπος**

**Οκτώβριος 1998**

## Ευχαριστίες

Πρέπει να ευχαριστήσω θερμά όλο το προσωπικό του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας για το άψογο περιβάλλον και τη ατμόσφαιρα που δημιουργούσαν καθημερινά προκειμένου να μπορέσω απερίσπαστος να πραγματοποιήσω τα παρακάτω πειράματα.

Ευχαριστώ θερμά τον υπεύθυνο καθηγητή κ.Παπαματθαϊάκη για την καθοδήγηση και τις συμβουλές του καθ'όλο το διάστημα της πραγματοποίησης αυτής της εργασίας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Νίκη που υπήρξε ο πρώτος μου μέντορας στα πρώτα βήματά μου στον επιστημονικό χώρο.

Χωρίς τα παιδιά του εργαστηρίου Ελένη, Θοδώρα, Χριστιάνα, Κατερίνα και Τάκη, με όλα τα τσιμπούσια και τις καταχρήσεις που με ανάγκαζαν να υποπίπτω σίγουρα θα ήμουν πιο αδύνατος αλλά πιο δυστυχημένος. Νά είναι καλά ο Γιώργος και η μικρή Ελένη με τα γλυκάκια τους.

Η τελική μορφή αυτού του γραπτού καθώς και της δημόσιας παρουσίασής του επιτεύχθηκε κυρίως μετά τις διορθώσεις και υποδείξεις της Νίκης.

## Περίληψη

Ο παράγοντας CIITA (class II transactivator) είναι απαραίτητος μεταγραφικός ενεργοποιητής των γονιδίων ιστοσυμβατότητας τάξης II. Στη μελέτη αυτή περιγράφονται αποτελέσματα μιας αρχικής προσέγγισης μηχανισμών δράσης του σε δύο κατευθύνσεις: την παραγωγή αρνητικών μεταλλαγμάτων και τη διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων του με παράγοντες συνενεργοποίησης της μεταγραφής. Βρήκαμε ότι τμήματα του CIITA που στερούνται ενεργοποιητικών ικανοτήτων (απαλοιφή της περιοχής ενεργοποίησης, ΠΕ), έχουν επικρατή κατασταλτική δράση. Επιπλέον η ίδια η ΠΕ σε απομόνωση (aa1-114) είναι ικανή να καταστέλει τη δράση του CIITA όταν εκφρασθεί σαν σταθερό χμαιρικό μόριο με την πρωτεΐνη GFP. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με την κυτταρική εντόπιση υβριδικών μορίων με GFP. Η περιοχή του CIITA μεταξύ 114-408 αμινοξέα είναι σημαντική για την ικανότητα αρνητικής δράσης – ιδιότητα που συνδιάζεται με την αναγκαιότητά της για στρατολόγηση της πρωτεΐνης στον υποκινητή. Εργασίες στο εργαστήριό μας έχουν πρόσφατα δείξει ότι ο CIITA αλληλεπιδρά με πολλούς παράγοντες της ομάδας των συνενεργοποιητών. Τη μελέτη αυτή συμπληρώνουν τα ευρήματα αλληλεπίδρασης του CIITA με τον παράγοντα p/CAF (p300/CBP associated factor). Ο p/CAF αλληλεπιδρά με την περιοχή 1-114 και 114-408 του CIITA και τον ακετυλιώνει στην περιοχή μεταξύ 114-298 του μορίου. Τα πειράματα αυτά συζητούνται σε σχέση με τη σημασία της ακετυλίωσης ιστονών αλλά και μη ιστονικών- υποστρωμάτων στη μεταγραφική ενεργοποίηση.

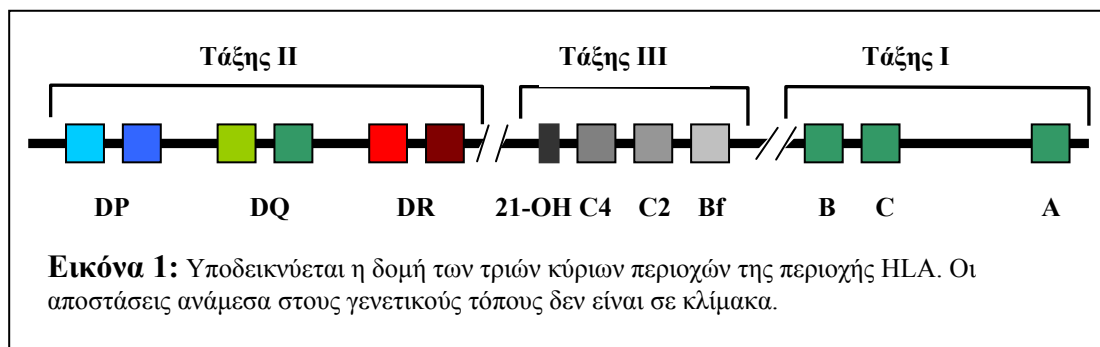
## Summary

The factor CIITA (class II transactivator) is an essential transcriptional activator of the MHC class II genes. Here, we present the results of a primary work involving the mechanisms of its action in two directions: the construction of negative mutants and the investigation of its interactions with transcriptional coactivators. We found that mutants of CIITA that lack transactivating properties (deletion of transactivation domain, TD) have a dominant negative action. In addition the transactivation domain itself (aa 1-114) is enough to suppress the action of CIITA when expressed as a stable GST chimeric protein. The results are in concordance with the subcellular expression of hybrid molecules with GFP. The part of CIITA between amino acids 114-408 is important for the potential negative action- an essential property for the recruitment of the protein to the promoter. Previous results from our lab show that CIITA interacts with many coactivators. These results are additive to the findings that CIITA interacts with the factor p/CAF (p300/CBP associated factor). p/CAF interacts with the region of CIITA that spans amino acids 1-114 and 114-408 and acetylates CIITA in the region between 115-298 of the molecule. These experiments are discussed in conjunction with the importance of histone acetylation and non-histone substrates in transcriptional activation.

## **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

## Οργάνωση και ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων της περιοχής HLA.

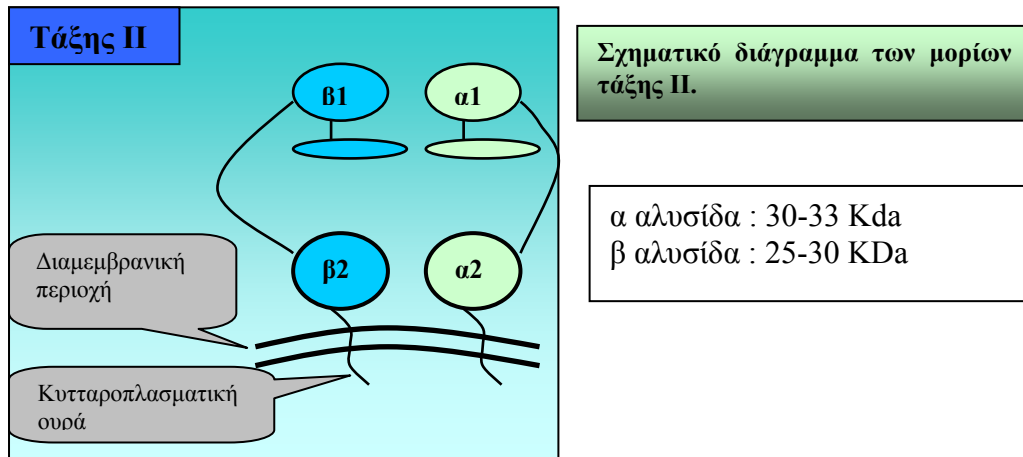
Τα μόρια HLA (Ανθρώπινο λευκοκυτταρικό αντιγόνο) κωδικοποιούνται από γονίδια του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας (MHC). Κυτταρογενετικές μελέτες χαρτογραφούν την περιοχή MHC στην ζώνη p21.3 του κοντού βραχίονα του χρωμοσώματος 6, που αριθμεί περίπου 4 εκατομμύρια βάσεις DNA. Αυτή η πολύπλοκη περιοχή περιέχει πολλαπλά εκφραζόμενα και μη εκφραζόμενα γονίδια που τοποθετούνται σε τρία κύρια γονιδιακά συμπλέγματα. Η περιοχή *Τάξης I* περιέχει γονίδια που κωδικοποιούν τα κλασικά αντιγόνα μεταμόσχευσης HLA-A,B και C. Η περιοχή *Τάξης II* περιέχει γονίδια που κωδικοποιούν τα μόρια HLA-D (HLA-DR, DQ, και DP). Η περιοχή *Τάξης III* περιέχει τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του Συμπληρώματος, τον παράγοντα B, C2 και C4, και το ένζυμο του κυτοχρώματος P-450 στεροειδής-21-υδροξυλάση. Επιπλέον γονίδια που πρόσφατα χαρτογραφήθηκαν σ'αυτή την περιοχή περιλαμβάνουν τον «παράγοντα νέκρωσης όγκου» (TNF  $\alpha$  και  $\beta$ ), τις «πρωτεΐνες θερμικού σοκ» (70KDa), μεταφορείς πεπτιδίων και γονίδια που κωδικοποιούν υπομονάδες του πρωτεασώματος. Αυτή η περιοχή είναι αξιοσημείωτη για τον ψηλό βαθμό πολυμορφισμού σε πολλούς απ'τους γενετικούς τόπους (**Εικόνα 1**). Τα αντιγόνα HLA αποτελούν το πιο πολυμορφικό αντιγονικό σύστημα στον άνθρωπο. (R.Lechler, 1994)



### Τα γονίδια τάξης II του Κυρίου Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας.

Τα μόρια που κωδικοποιούνται απ'την περιοχή HLA-D (ή τάξης II) είναι ετεροδιμερείς μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες που αποτελούνται από μια  $\alpha$  (ή βαριά) αλυσίδα 35KDa, και μια  $\beta$  (ελαφριά) αλυσίδα 28KDa. Οι δύο αλυσίδες είναι μη-ομοιοπολικά συνδεδεμένες. Η κάθε αλυσίδα έχει δύο εξωκυττάριας περιοχές περίπου 90 αμινοξέα, μια διαμεμβρανική περιοχή και μια κυταροπλασματική περιοχή περίπου 40 αμινοξέων. Η  $\beta$  αλυσίδα περιέχει δύο ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς, και η  $\alpha$  αλυσίδα ένα μονό ενδομοριακό δισουλφιδικό δεσμό. Κρυσταλλογραφικές μελέτες του μορίου HLA-DR1 έδειξαν ότι η δομή των τάξης II μορίων είναι γενικά όμοια μ'αυτή των τάξης I, όμως η θέση πρόσδεσης αντιγόνου έχει μια πιο ανοικτή διαμόρφωση. Η δομή των μορίων τάξης II φαίνεται σχηματικά στην εικόνα που ακολουθεί. Τρεις ξεχωριστοί ισότυποι των μορίων της περιοχής HLA-D εκφράζονται- και έχουν ονομαστεί HLA-DR, DQ και DP, αντίστοιχα. Τα τρία μόρια κωδικοποιούνται από γονίδια που βρίσκονται σε συγκεκριμένες υποπεριοχές της περιοχής HLA-D, και εμφανίζουν διαφορετικούς βαθμούς αλληλικού πολυμορφισμού. Κάθε υποπεριοχή περιέχει χαρακτηριστικά γονίδια για τις  $\alpha$  και  $\beta$

αλυσίδες, και τα προϊόντα τους συσχετίζονται για να σχηματίσουν το ετεροδιμερές τάξης II. (Lechler, 1994)



### Λειτουργία των μορίων MHC τάξης II.

Τα μόρια MHC-II είναι υπεύθυνα για την αντιγονοειδική ενεργοποίηση των CD4<sup>+</sup> T βοηθών λεμφοκυττάρων. Τα ετεροδιμερή MHC-II μεταφέρονται, μαζί με τη σταθερή αλυσίδα (invariant chain) Ii, σε ένα ειδικό ενδοκυτταρικό διαμέρισμα όπου η πολυμορφική θέση πρόσδεσης πεπτιδίου ενώνεται με πεπτίδια που προέρχονται από την επεξεργασία εξωγενών πρωτεϊνικών αντιγόνων. Τα προϊόντα των μη κλασικών γονιδίων τάξης II, HLA-DMA και -DMB είναι απαραίτητα για αυτό το στάδιο πρόσδεσης των πεπτιδίων. Το σύμπλοκο MHC-II /πεπτίδιο μεταφέρεται μετά στην επιφάνεια του κυττάρου όπου η αναγνώρισή του απ'τον υποδοχέα των T λεμφοκυττάρων CD4<sup>+</sup> οδηγεί σε αλληλο- και πεπτιδο-ειδική ενεργοποίηση T κυττάρων. Η ενεργοποίηση των T κυττάρων μπορεί επίσης να επιτευχθεί από την πρόσδεση υπεραντιγόνων στα μόρια MHC-II. Εκτός απ'την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων, τα μόρια MHC-II μεταφέρουν διαμεμβρανικά σήματα που ενεργοποιούν ποικίλες διαδικασίες ενεργοποίησης μέσα στο θετικό κύτταρο για MHC-II μόρια. (Mach review, 1996).

### Ρύθμιση των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξης II και έλεγχος της ανοσοαπόκρισης.

Η έκφραση των γονιδίων MHC-II ρυθμίζεται πολύ αυστηρά. Σε αντίθεση με τη συστατική έκφραση των αντιγόνων MHC τάξης-I (MHC-I), τα μόρια MHC-II εκφράζονται γενικά σε ένα πολύ μικρό αριθμό εξειδικευμένων κυττάρων. Δύο διακριτοί τρόποι έκφρασης παρουσιάζονται. Κάποια ειδικά κύτταρα εκφράζουν συστατικά, γονίδια MHC-II, ενώ σε MHC-II αρνητικούς κυτταρικούς τύπους, η έκφρασή τους μπορεί να επαχθεί. Η συστατική έκφραση αντιγόνων MHC-II περιορίζεται κυρίως σε κύτταρα αντιγονοπαρουσίασης (APC), περιλαμβάνοντας τα B λεμφοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα όπως τα κύτταρα του Langerhans, και άλλα κύτταρα της μονοκυτταρικής-μακροφαγικής γενεαλογίας (**Πίνακας I**).

Προβλήματα στη ρύθμιση της έκφρασης των MHC-II μπορεί να έχουν σημαντικές ανοσοπαθολογικές συνέπειες. Έλλειψη της έκφρασης των MHC-II είναι γνωστό ότι οδηγεί σε γενικευμένη ανοσοανεπάρκεια. Η έκτοπη ή παθολογική

υπερέκφραση των MHC-II έχει προταθεί ότι οδηγεί σε μη φυσιολογική ενεργοποίηση T λεμφοκυττάρων, που παρατηρείται σε συγκεκριμένες αυτοάνοσες ασθένειες.

**Πίνακας 1: Ιστο-ειδική έκφραση των αντιγόνων τάξης II**

**B λεμφοκύτταρα**  
**Μακροφάγα**  
**Δενδριτικά κύτταρα**  
**Ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα**  
**Θυμικό επιθήλιο**

**Τροποποίηση της έκφρασης των MHC τάξης II γονιδίων ιστοσυμβατότητας.**

Τα κύτταρα που εκφράζουν τάξης-II μπορούν να χωριστούν σε δύο κύριες κατηγορίες με βάση τη συστατική ή επαγόμενη έκφραση. Στην πρώτη ομάδα τα B λεμφοκύτταρα, είναι ο κύριος πληθυσμός κυττάρων που εκφράζουν μεγάλα επίπεδα τάξης II συστατικά. Για τα B κύτταρα η Ιντερλευκίνη-4 είναι το κύριο ερέθισμα ενεργοποίησης. Η δεύτερη ομάδα αποτελείται από μακροφάγα και κύτταρα μη-αιμοποιητικής προέλευσης. Η Ιντερφερόνη-γ είναι ο κύριος θετικός ρυθμιστής αυτής της ομάδας. Στον **Πίνακα 2** αναφέρονται τα ερεθίσματα που ρυθμίζουν θετικά ή αρνητικά τα γονίδια ιστοσυμβατότητας τάξης II, στα κύτταρα των δύο αυτών ομάδων. (Review Glimcher & Kara, 1992 )

**Πίνακας 2.**

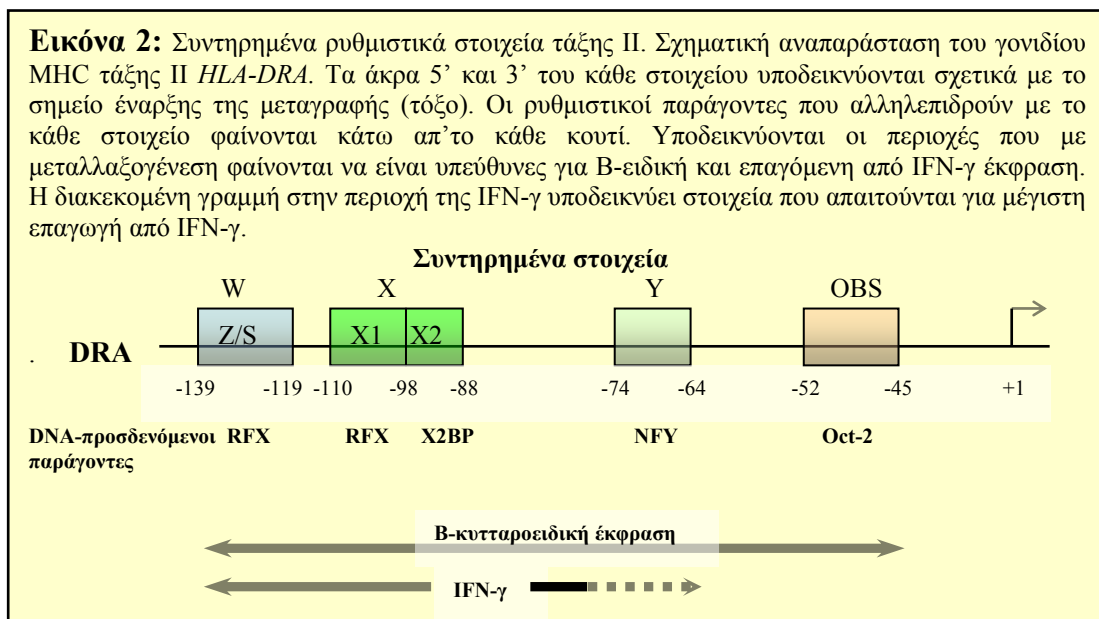
<b>B κύτταρα</b>	<b>Μακροφάγα και κύτταρα μη αιμοποιητικής σειράς</b>
<b><u>Θετική ρύθμιση</u></b>	<b><u>Θετική ρύθμιση</u></b>
Ιντερλευκίνη-4	IFN-γ (Μακροφάγα, αστροκύτταρα, γλιοβλάστωμα, ινοβλάστες, μελανοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα νεφρός, καρδιά, πνεύμονες, συκώτι, κ.α.)
Ιντερλευκίνη-13	GM-CSF
Ιντερλευκίνη-10	LPS (αστροκύτταρα)
Αντιγόνα διαφοροποίησης	Ισοπροτερενόλη (γλιοβλάστωμα)
aIgM	TNF-α
aIgD	Ιός ασθένειας Newcastle (αστροκύτταρα)
aLyb2	Ιός B ηπατίτιδας (ηπατώματα)
aB220	Μυκόπλασμα
H-ras ογκογονίδιο	
LPS	<b><u>Αρνητική Ρύθμιση</u></b>
PMA	PGE2
Τοξίνη χολέρας	LPS
IgE-αντιγονικά σύμπλοκα	IL-1 (ινοβλάστες)
<b><u>Αρνητική ρύθμιση.....</u></b>	Νορεπινεφρίνη (Αστροκύτταρα)
PGE2	α/β Ιντερφερόνες (Μακροφάγα, ενδοθηλιακά κύτταρα)
LPS	TNF-α
IFN-γ	CSF-1
Δεξαμεθαζόνη	TGF-β1 (μελανώματα)
	α2-μακροσφαιρίνη
	Δεξαμεθαζόνη
	α-φετοπροτεΐνη

## Ο υποκινητής των τάξης II γονιδίων του κυρίου συμπλόκου ιστοσυμβατότητας.

### Cis-ρυθμιστικά στοιχεία.

Η έκφραση των γονιδίων MHC-II ρυθμίζεται κυρίως στο επίπεδο της μεταγραφής. Παρότι έχουν περιγραφεί και άλλα μακρινά ρυθμιστικά στοιχεία, η εγγύτερη περιοχή του υποκινητή που καλύπτει 150bp πριν το σημείο έναρξης της μεταγραφής είναι αρκετή για να επιφέρει συστατική και επαγόμενη έκφραση σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης κυττάρων. Αυτή η περιοχή του υποκινητή περιέχει μοτίβα αλληλουχιών που ονομάζονται S, X, X2, και Y (**Εικόνα 2**). Οι αλληλουχίες τους, ο προσανατολισμός τους, οι σχετικές θέσεις τους, και οι αποστάσεις τους είναι διατηρημένα σ' όλα τα γονίδια α και β αλυσίδων σ' όλα τα είδη που έχουν εξεταστεί. Η ίδια δομή υποκινητή είναι επίσης διατηρημένη σε γονίδια που είναι γνωστό ότι ρυθμίζονται ανάλογα με τα MHC-II, όπως τα γονίδια HLA-DM και το γονίδιο σταθερής αλυσίδας (Ii).

Το κουτί S (7bp) (ονομάζεται επίσης H, W ή Z) τοποθετείται σε μια περιοχή περίπου 140 bp πριν το σημείο έναρξης της μεταγραφής. Το κουτί Y περιέχει μια ανάποδη CCAAT αλληλουχία. Ανάλογα με το γονίδιο, το κουτί X2 αποτελεί είτε ένα απαντητικό στοιχείο σε cAMP (CRE) ή ένα απαντητικό στοιχείο σε TPA (TRE). Το δεύτερο μισό της συντηρημένης περιοχής του κουτιού X βρίσκεται σε μια περιοχή πλούσια σε πυριμιδίνες, που βρίσκεται ακριβώς δίπλα απ' το 5' άκρο του κουτιού X. (**Εικόνα 2**). (Review Boss, 1997).





**Πίνακας 3: Πυρηνικά σύμπλοκα και κλωνοποιημένες πρωτεΐνες που προσδένονται στον υποκινητή MHC τάξης II.**

κουτί	X	Υποκινητές	Χαρακτηριστικά	Λειτουργία
RFX		DRA,DPA,DRB1 DRB3,DQA,Ea	Πυρηνικό σύμπλοκο, συστατικό, λείπει σε MHC-II ρυθμιστικά μεταλλάγματα. Δύο υπομονάδες η p75 ή RFX5, προσδένεται συνεργατικά με τον NF-Y και την X2BP σε όλους τους MHC-II υποκινητές, απαραίτητος ενεργοποιητής των MHC-II, DM και Ii.	ENEP, BLS
RFX5		DRA	Κλωνοποιημένος, το 5 <sup>ο</sup> μέλος της οικογένειας RFX, είναι η p75 υπομονάδα του RFX συμπλόκου, συστατικός, μεταλλαγμένος σε όλους τους BLS ασθενείς της ομάδας C, απαραίτητος ενεργοποιητής των MHC-II, DM και Ii.	ENEP, BLS
NF-X		Ea,Eβ,Αa,Αβ,DRA	Πυρηνικό σύμπλοκο, συστατική έκφρ. Πιθανά αντιπροσωπεύει τις κλωνοποιημένες RFX1-3 πρωτεΐνες.	ENEP,BSM
RFX1-4		DRA,DPA,DQA Ea	Κλωνοποιημένοι, οικογένεια πρωτεϊνών με χαρ/κές μονάδες πρόσδεσης σε DNA και διμερισμού, προσδένονται σαν ομο- ή ετεροδιμερή σε ανάστροφες επαναλήψεις γνωστές σαν EF-C ή MDBP θέσεις.	ENE, BSM για RFX1
TRAX1		DRA	Πυρηνικό σύμπλοκο, διακριτό από RFX και NFX	ENEP,
NF-X1		DQB,DPB,DRA DPA,DRB,DQA	Κλωνοποιημένος, πλούσια σε κυστεΐνη πρωτεΐνη προσδενόμενη σε DNA, ενισχύεται από IFN-γ	KAT
<b>κουτί Y</b>				
NF-Y(YEBP,CBF)		Όλοι	Συστατικός, παράγοντας προσδενόμενος σε CCAAT, προσδένεται συνεργατικά με RFX, ενεργοποιητής για πολλά γονίδια, τρεις υπομονάδες κλωνοποιημένες.	ENEP, BSM
YB-1		DRA,DQB,DRB,Ii	Κλωνοποιημένος, μέλος πολυγονιδιακής οικογένειας, χαμηλή εξειδίκευση πρόσδεσης.	KAT
<b>κουτί X2</b>				
X2BP (X2bp) DRB3		DRA, DPB,DRB1, DRB3	Πυρηνικό σύμπλοκο, συστατική έκφρ., προσδένεται συνεργατικά με RFX σ'όλους τους υποκινητές που έχουν εξεταστεί και είναι διακριτός από CREB-1,CREB-2,CREM-1,ATF-2,ATF-3,c-Fos, c-Jun,hXB1.	ENEP
NF-X2		DRA	Πυρηνικό σύμπλοκο, πιθανά αντιστοιχεί στον AP-1 (c-Jun/c-Fos)	KAT, BSM
IFNEX		DRA,RT1Ba	Πυρηνικό σύμπλοκο, επαγόμενο από IFN-γ μόνο σε πρώιμα αστροκύτταρα και μικρογλιακά κύτταρα.	ENEP
TIC-X		DRA,RT1Ba	Πυρηνικό σύμπλοκο, επαγόμενο από IFN-γ και TNF-α μόνο σε πρώιμα αστροκύτταρα	ENEP
hXBP1		Aa, DRA, DPB	Κλωνοποιημένος, b-Zip πρωτεΐνη, προτίμηση για TRE θέσεις, μπορεί να ετεροδιμερίζεται με c-Fos.	ENEP
HB16		Aa	Κλωνοποιημένος, b-Zip πρωτεΐνη, προτίμηση για CRE θέσεις, μπορεί να ετεροδιμερίζεται με c-Jun	ENEP
mXBP		Aa	Κλωνοποιημένος, b-Zip πρωτεΐνη, προτίμηση για CRE θέσεις, μπορεί να ετεροδιμερίζεται με c-Jun	ENEP
<b>κουτί S</b>				
W-B1/W-B2, NF-Zc/NF-Z2, NF-J		DRA DPA, DQB	Πυρηνικά σύμπλοκα, μπορούν επίσης να αλληλεπιδρούν με το X κουτί του DRA	ENEP
Κλώνος18		DPA	Πυρηνικό σύμπλοκο, προσδένεται σε S και J αλληλουχίες	ENEP, BSM
			Κλωνοποιημένος, Πρωτεΐνη δακτύλου ψευδαργύρου, προσδένεται σε S και J αλληλουχίες	ENEP

**ENEP,KAT,:** λειτουργική ένδειξη για ρόλο στην ενεργοποίηση των MHC-II (Ενεργοποίηση, Καταστολή  
**BLS:** ανενεργό ή μεταλλαγμένο σε BSL ασθενείς  
**BSM:** επίδραση μεταλλαγών της θέσης πρόσδεσης στην ενεργότητα του υποκινητή

## Παράγοντες που προσδένονται σε DNA .

Έχουν χαρακτηριστεί πολλοί παράγοντες που προσδένονται σε χαρακτηριστικά cis-στοιχεία του υποκινητή τάξης II .(Πίνακας 3).

## Ανοσοανεπάρκεια MHC τάξης II ή το Σύνδρομο των γυμνών λεμφοκυττάρων (BLS).

Οι ασθένειες που σχετίζονται με εκτεταμένη ανοσοανεπάρκεια αποτελούν μια ετερογενή ομάδα κληρονομούμενων ανωμαλιών του ανοσοποιητικού συστήματος. Ένα τέτοιο σύνδρομο είναι η ανοσοανεπάρκεια MHC τάξης II, η οποία είναι μια αυτοσωμική υπολειπόμενη ασθένεια που χαρακτηρίζεται απ'την έλλειψη MHC τάξης II γονιδιακής έκφρασης. Η έλλειψη MHC τάξης II έκφρασης οδηγεί σε μια γενικευμένη ανοσοανεπάρκεια που προκαλείται από την απουσία τόσο κυτταρικών όσο και χυμικών ανοσολογικών αποκρίσεων σε εξωγενή αντιγόνα. Υπάρχει μια εξαιρετική ευαισθησία σε ιϊκές, βακτηριακές, μυκητιακές και πρωτοζωικές μολύνσεις. Οι ασθενείς χαρακτηρίζονται από την απουσία αντιγονοειδικών T κυττάρων. Αυτός ο τύπος πρώιμης ανεπάρκειας ονομάστηκε 'ανεπάρκεια MHC τάξης II', ή αλλιώς 'Σύνδρομο των Γυμνών Λεμφοκυττάρων', (BLS: Bare Lymphocyte Syndrome).

Πειράματα κυτταρικής σύντηξης χρησιμοποιώντας κυτταρικές σειρές προερχόμενες από ασθενείς με BLS και ένας αριθμός πειραματικά δημιουργημένων ρυθμιστικών μεταλλαγμάτων MHC-II οδήγησε στο χαρακτηρισμό διαφόρων διακριτών ομάδων συμπληρωματικότητας. (Πίνακας 4).

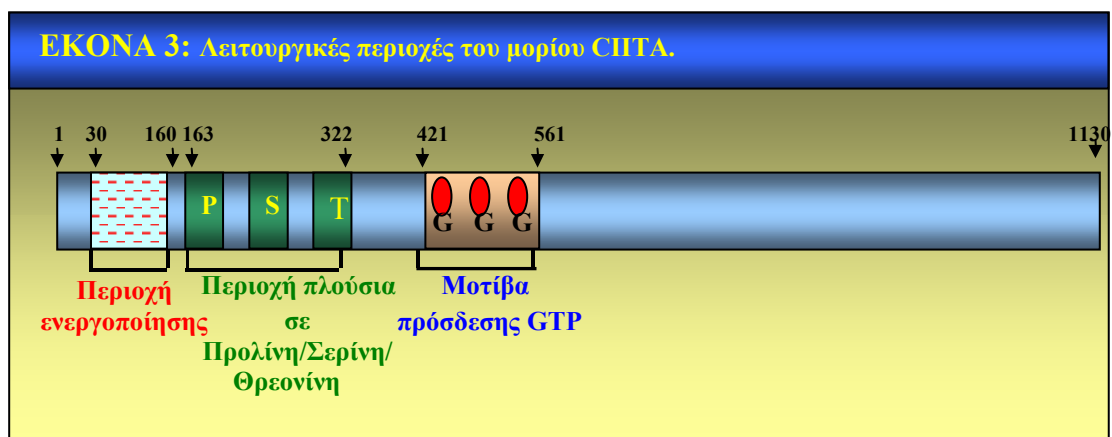
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Φαινοτυπικές, βιοχημικές και μοριακές ανωμαλίες των MHC τάξης II ρυθμιστικών μεταλλαγμάτων από BLS ομάδες συμπληρωματικότητας A-E.</b>							
		<b>BLS ομάδες συμπληρωματικότητας</b>					
		<b>Φυσικού τύπου</b>	<b>A(II)</b>	<b>B(I)</b>	<b>C(IV)</b>	<b>D(III)</b>	<b>E</b>
<b>Πρωτοτυπική BLS-κυτταρική σειρά</b>			<b>BLS-2</b>	<b>BLS-1</b>	<b>SJO</b>	<b>καμία</b>	<b>ABI</b>
<b>Αριθμός μη σχετιζόμενων οικογενειών</b>			<b>5</b>	<b>13</b>	<b>3</b>	<b>καμία</b>	<b>1</b>
<b>Πρωτοτυπικό in vitro μετάλλαγμα</b>			<b>RJ2.2.5</b>	<b>κανένα</b>	<b>κανένα</b>	<b>6.1.6</b>	<b>κανένα</b>
<b>MHC τάξης II έκφραση</b>	+	-	-	-	-	-	-
<b>MHC τάξης II ενεργότητα υποκινητή</b>	+	-	-	-	-	-	#
<b>Πρόσδεση RFX</b>	+	+	-	-	-	-	#
<b>DNase I θέσεις υπερευαισθησίας</b>	+	+	-	-	-	#	#
<b>In vivo πρόσδεση υποκινητή</b>	+	+	-	-	-	-	#
<b>Γενετική ανωμαλία</b>			<b>CHTA</b>	<b>?</b>	<b>RFX5</b>	<b>RFXAP</b>	<b>?</b>
							<b># : άγνωστο</b>

## Τρόπος λειτουργίας του παράγοντα CITA.

Ο CITA είναι ο παράγοντας που λείπει από την ομάδα συμπληρωματικότητας A (Steimle 1993). Δρα σαν συνενεργοποιητικός παράγοντας, μη προσδεδεμένος στο DNA. Δεν έχουν βρεθεί ομολογίες της πρωτεΐνης CITA με άλλους γνωστούς παράγοντες. Το μόνο γνωστό πρωτεϊνικό μοτίβο που βρέθηκε στο CITA είναι μια περιοχή πρόσδεσης GTP. Η αμινοτελική περιοχή του CITA είναι πλούσια σε όξινα αμινοξέα και είναι υπεύθυνη για τη δράση του CITA σαν ενεργοποιητή της μεταγραφής των τάξης II γονιδίων. Αμέσως μετά την όξινη περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης διαθέτει μια περιοχή πλούσια σε Προλίνες/Σερίνες/Θρεονίνες. Η εξειδίκευση του CITA για τους τάξης II υποκινητές προσδίδεται από το καρβοξυτελικό κομμάτι της πρωτεΐνης (**Εικόνα 3**) (Chin b 1997, Riley 1995, Zhou 1995)

Υπάρχει θετικός ποσοτικός συσχετισμός ανάμεσα στο επίπεδο έκφρασης του CITA και αυτού των MHC-II γονιδίων. Υπερέκφραση ανασυνδιασμένου CITA σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης συνοδεύεται από αύξηση στην ενεργότητα του τάξης II υποκινητή. Άρα το επίπεδο CITA καθορίζει την ενεργότητα του MHC-II υποκινητή. Το CITA εκφράζεται συστατικά σε MHC-II θετικές κυτταρικές σειρές και ιστούς (Review Mach 1996). Η έκφραση του CITA επάγεται από IFN- $\gamma$  και αυτή η επαγωγή προηγείται της επαγωγής των τάξης II γονιδίων. Σε ινοβλάστες από ασθενείς με BLS, όπου έχει πρόβλημα το CITA, δεν μπορεί να επαχθεί η έκφραση τάξης II μορίων από IFN- $\gamma$ . Η συστατική έκφραση CITA μετατρέπει σε θετικές MHC-II αρνητικές και κατά την απουσία IFN- $\gamma$ . Το CITA δεν μπορεί να επαχθεί σε Jak-1 προβληματικές σειρές. Η επιλεκτική καταστολή των τάξης II σε τελικά διαφοροποιημένα πλασματοκύτταρα οφείλεται και πάλι στη μη έκφραση του CITA (Silacci 1994, Lantron 1988).

Το CITA είναι ένας συνενεργοποιητής που δεν προσδέεται στο DNA, και άρα επιστρατεύεται στον υποκινητή των MHC II γονιδίων μέσω αλληλεπιδράσεων με μεταγραφικούς παράγοντες που προσδένονται στο DNA. Είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρά άμεσα με τον RFX5 που προσδέεται στο στοιχείο X του υποκινητή. Επίσης έχουν αναφερθεί αλληλεπιδράσεις του CITA με παράγοντες της βασικής μεταγραφικής μηχανής (TAFII250, TAFII32, κ.α.).

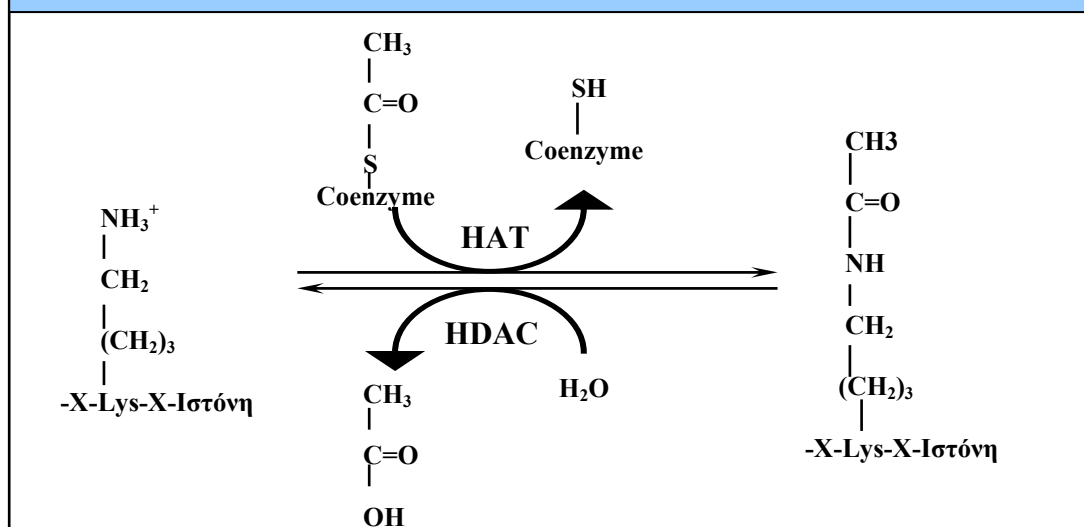


## Συνενεργοποιητές της μεταγραφής με ενεργότητα ακετυλάσης.

Η ακετυλίωση εσωτερικών καταλοίπων λυσίνης των αμινοτελικών περιοχών των ιστονών έχει βρεθεί ότι συσχετίζεται θετικά με τη μεταγραφική ενεργοποίηση στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Grunstein 1997, Brownell 1996). Πρόσφατες ανακαλύψεις που δείχνουν ότι μεταγραφικοί συνενεργοποιητές έχουν ενεργότητες ακετυλοτρανσφεράσης (HAT) υποδεικνύουν ότι η ακετυλίωση και απακετυλίωση ιστονών παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής. (Kuo 1998)

Η ακετυλίωση ιστονών πραγματοποιείται μετα-μεταφραστικά στις ομάδες  $\epsilon\text{-NH}_3^+$  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 Α στις ομάδες  $\epsilon\text{-NH}_3^+$  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 4)

**ΕΙΚΟΝΑ 4:** Η ισορροπία στην ακετυλίωση ιστονών διατηρείται από αντίθετες ενεργότητες ακετυλοτρανσφεράσων ιστονών και απακετυλασών. Το ακετυλοσυνένζυμο Α είναι ο δότης ακετυλομάδας για την ακετυλίωση. Οι ακετυλοτρανσφεράσες ιστονών (HATs) μεταφέρουν μια ακετυλομάδα στην ομάδα  $\epsilon\text{-NH}_3^+$  των εσωτερικών καταλοίπων λυσίνης των αμινοτελικών περιοχών των ιστονών. Η αντίστροφη αντίδραση καταλύεται από απακετυλάσες ιστονών (HDACs)



Οι ουρές των ιστονών παίζουν σημαντικό ρόλο σε διανουκλεοσωμικές αλληλεπιδράσεις, και επομένως η ακετυλίωση τους αποσταθεροποιεί τη χρωματινική δομή, διευκολύνοντας την πρόσβαση των μεταγραφικών παραγόντων στο DNA. (Luger 1997)

Πλήθος συνενεργοποιητών έχουν εντοπιστεί με ενεργότητα ακετυλάσης ιστονών. Ενεργότητα ακετυλάσης ιστονών βρέθηκε σε πολλούς συνενεργοποιητές που παίζουν ρόλο στην επαγόμενη μεταγραφή, περιλαμβάνοντας τον GCN5 σε άνθρωπο και ζύμη (Yang 1996), τον p/CAF (Bannister 1996), την p300/CBP (Ogryzko 1996), τον ACTR (Chen 1997), τον SRC1 (Glass 1997) και την υπομονάδα TAFII250 του TFIID (Mizzen 1996). (Πίνακας 5)(Kuo 1998)

<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 5.</b>			
<b>Πρωτεΐνη</b>	<b>Υποστρώματα</b>	<b>Οργανισμός</b>	<b>Δράση</b>
Gcn5p	H3, H4, H2B	Ζύμη	Συνενεργοποιητής
Gcn5p/Ada	H3, H2B	Ζύμη	
SAGA	H3, H2B	Ζύμη	
Gcn5p/Ada3/?	H4, Sin1p	Ζύμη	
p55	H3, H4, H2B	Ζύμη	
hTAFII250	H3, H4, TFIIEβ	Άνθρωπος	Υπομονάδα TFIID
dTAFII230	H3, H4	Δροσόφιλα	
yTAFII130		Ζύμη	Ρύθμιση κυτταρικού κύκλου
p300/CBP	όλες τις νουκλεοσωμικές ιστόνες, TFIIEβ, TFIIF, p53	Άνθρωπος	Συνενεργοποιητές
pCAF	H3, p53, CIP1A	Άνθρωπος, Δροσόφιλα	
ACTR	H3, H4	Άνθρωπος	Συνενεργοποιητής
SRC-1	H3, H4	Άνθρωπος	Συνενεργοποιητής
Esa1p	Ελεύθερη H4, H2A, H3	Ζύμη	
Tip60	H4, H2A, H3	Άνθρωπος	
Hat1p	ελεύθερη H4	Ζύμη	
<b>Απακετυλάσες</b>			
Rpd3p	όλες τις ιστόνες που ακετυλιώνονται	Ζύμη	Ρυθμιστής της μεταγραφής
mRpd3		Άνθρωπος	Συγκαταστολέας
Hda1p	όλες τις ιστόνες που ακετυλιώνονται	Ζύμη	
HDAC1		Άνθρωπος	

Οι συνενεργοποιητές CBP/p300 αλληλεπιδρούν με ένα μεγάλο αριθμό ενεργοποιητών και κάνουν δυνατή την ενεργότητά τους δια μέσου της προσέγγισης της βασικής μεταγραφικής μηχανής και της ακετυλίωσης ιστονών. Απ' τη στιγμή που ενεργοποιητές εξαρτώμενοι από CBP/p300 ενέχονται σε ποικίλα, διαφορετικά μονοπάτια σηματοδότησης, ο ανταγωνισμός για τις περιορισμένες ποσότητες CBP/p300 από διάφορους ενεργοποιητές μπορεί να παίζει ρόλο στις εξειδικευμένες κυτταρικές αποκρίσεις σε εξωκυτταρικά σήματα. (Shikama 1997)

Ο p/CAF κλωνοποιήθηκε με βάση την ομολογία που παρουσιάζει με τον παράγοντα GCN5 του σακχαρομύκητα και βρέθηκε να αλληλεπιδρά άμεσα με τους συνενεργοποιητές CBP/p300 (Yang 1996). Ο CBP αλληλεπιδρά με τον p/CAF στην περιοχή CH3 όπου αλληλεπιδρά και η ογκοπρωτεΐνη E1A του αδενοϊού, στην αμινοξική περιοχή 1801-1851, και στην αμινοτελική του περιοχή (αμινοξέα 1-460)(Korzus 1998). Ο p/CAF ακετυλιώνει κυρίως την ιστόνη H3 και λιγότερο την ιστόνη H4. Είναι ενδιαφέρον ότι ο p/CAF αλληλεπιδρά και με άλλες ακετυλάσες ιστονών, εκτός από p300/CBP, όπως ACTR/SRC1, σχηματίζοντας ένα υπερσύμπλοκο ακετυλασών σε στοιχεία υποκινητών. Ο p/CAF βρίσκεται σ' ένα σύμπλοκο με πάνω από 20 σχετιζόμενα πολυπεπτίδια που περιέχουν ομόλογα απ' τη ζύμη όπως ADA2, ADA3 και SPT3. Το υπερσύμπλοκο του p/CAF είναι σχεδόν όμοιο με το αντίστοιχο υπερσύμπλοκο SAGA της ζύμης (Grant, 1998). Μερικά πολυπεπτίδια που

σχετίζονται με τον p/CAF είναι πανομοιότυπα με TBP συνδεδεμένους μεταγραφικούς παράγοντες (TAFs) που περιέχουν πεπτίδια με δομή ιστόνης. (Ogryzko 1998).

Οι ακετυλοτρανσφεράσες έχουν και άλλους στόχους εκτός από ιστόνες. Πρόσφατα δείχθηκε ότι η πρωτεΐνη p53 ακετυλιώνεται από CBP και αυτό ενδυναμώνει την πρόσδεση της πρωτεΐνης στο DNA (Gu 1997). Η p53 επίσης ακετυλιώνεται στο σήμα πυρηνικού εντοπισμού της από τον p/CAF. Επιπρόσθετα οι CBP, p/CAF και TAFII250 όλοι μπορούν να ακετυλιώσουν τον βασικό μεταγραφικό παράγοντα TFIIIE-β και τις RAP30/74 υπομονάδες του TFIIIF.

Μια σύγκριση N-ακετυλοτρανσφερασών που προέρχονται από διάφορους οργανισμούς υπέδειξε τέσσερα συντηρημένα μοτίβα (A-D). Τα μοτίβα A και B έχει προηγουμένως αναφερθεί ότι είναι θέσεις πρόσδεση ακετυλ-CoA. Οι CBP και p/CAF περιέχουν τα μοτίβα A, B, και D αλλά όχι το C. Όμως οι CBP και p/CAF έχουν ένα επιπρόσθετο μοτίβο (E) που δεν απαντάται σε άλλες N-ακετυλοτρανσφεράσες και ίσως αντιπροσωπεύει μια υπομονάδα απαραίτητη για μια υποομάδα ακετυλοτρανσφερασών. Η ομοιότητα στη δομή των μονάδων ακετυλοτρανσφεράσης των CBP και p/CAF υποδεικνύει ότι ανήκουν στην ίδια οικογένεια. (Balbas 1998).

## **Σκοπός αυτής της εργασίας.**

Προκειμένου να διερευνήσουμε το μηχανισμό δράσης του μεταγραφικού ενεργοποιητή των τάξης II γονιδίων ιστοσυμβατότητας αρχικά δημιουργήσαμε μια σειρά μεταλλαγές του μορίου και θελήσαμε να διερευνήσουμε τη λειτουργία τους και τον τρόπο δράση τους στη μεταγραφική ενεργοποίηση. Σε συνδυασμό με αυτά τα δεδομένα δημιουργήθηκαν μια σειρά κατασκευές των παραπάνω μεταλλαγών σε σύντηξη με την πρωτεΐνη GFP προκειμένου να παρατηρήσουμε τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό της κάθε μεταλλαγής καθώς και του ακέρατου μορίου.

Στα πλαίσια μιας ευρύτερης εργασίας στο εργαστήριό μας που περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση συνενεργοποιητών της μεταγραφής με τον μεταγραφικό ενεργοποιητή C/PTA, βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά με τον συνενεργοποιητή CBP. Ήταν γνωστή η αλληλεπίδραση του CBP με τον συνενεργοποιητή με ιδιότητες ακετυλάσης p/CAF και περαιτέρω σκεφτήκαμε να ελέγξουμε την αλληλεπίδραση του C/PTA με τον p/CAF. Αφού δείχθηκε ότι οι δύο συνενεργοποιητές αλληλεπιδρούν ελέγξαμε αν ο C/PTA ακετυλιώνεται από p/CAF αφού ως γνωστό ο p/CAF εκτός από ιστόνες έχει και σαν υπόστρωμα ακετυλίωσης μεταγραφικούς παράγοντες. Και η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε.

## **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

# 1 ΥΛΙΚΑ

## 1.1. Αντιδραστήρια

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας προέρχονταν απ'τις εταιρείες Boehringer 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, ο γονότυπος του οποίου περιγράφεται στους Sambrook et al.

## 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 ανθρώπινες κυτταρικές σειρές *Hela* και *Raji*. Τα κύτταρα *Hela* είναι επιθηλιακά κύτταρα που προέρχονται από αδenoκαρκίνωμα 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.

## 1.5 Θρεπτικά διαλύματα και υλικά καλλιιεργειών κυτταρικών σειρών.

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



## 2 ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ.

#### 2.1α Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.

Για την Παρασκευή υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι:

- α. Η μέθοδος βρασμού της βακτηριακής καλλιέργειας και
- β. Η αλκαλική λύση

Η πρώτη χρησιμοποιήθηκε αποκλειστικά για την ταυτοποίηση ανασυνδιασμένων κλώνων και περιγράφεται από τους Holmes & Quingley (1981). Η δεύτερη περιγράφεται από τους Sambrook et al.

#### 2.1β Πέψη μορίων DNA με ένζυμα περιορισμού.

Οι περιοριστικές πέψεις πραγματοποιήθηκαν με βάση τις άριστες συνθήκες στις οποίες λειτουργεί ένα ένζυμο (θερμοκρασία, pH, μοριακότητα ρυθμιστικού διαλύματος σε άλατα) σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας και τα πρωτόκολλα που περιγράφονται στους Maniatis et al.

#### 2.1γ Απομόνωση τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης.

Για την απομόνωση τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ηλεκτροέκλυσης όπως περιγράφεται από τους Maniatis et al. καθώς και το Qiaquick nucleotide purification Kit (Qiagen) σύμφωνα με το πρωτόκολλο που υποδεικνύει η εταιρεία.

#### 2.1δ Ραδιοσήμανση μορίων DNA.

Για τη ραδιοσήμανση των μορίων DNA χρησιμοποιήθηκαν διάφορες τεχνικές. Η επιλογή γινόταν κάθε φορά με βάση το είδος του μορίου που επρόκειτο να σημανθεί (μονόκλωνο ή δίκλωνο ολιγονουκλεοτίδιο ή τμήμα DNA κλπ. Αναλυτικότερα οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

α. *Nick translation*. Η μέθοδος αυτή δίνει τη δυνατότητα παραγωγής μορίων ανιχνευτών με ειδική ενεργότητα  $1 \times 10^8$  cpm/μg. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιγράφεται από τους Sambrook et al.

β. *Σήμανση με την βοήθεια τυχαίων εκκινητών (Random oligo labeling)*. Η μέθοδος αυτή ακολουθήθηκε σε περιπτώσεις όπου υπήρχε ανάγκη ραδιοσημασμένων ανιχνευτών υψηλής ειδικής ενεργότητας μεγαλύτερης από  $5 \times 10^8$  cpm/μg. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιγράφεται από τους Sambrook et al.

γ. *Σήμανση δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων με τη μεγάλη ενζυμική υπομονάδα Klenow*. Με την παρούσα μέθοδο σημαίνονται μόνο τα δίκλιωνα μόρια DNA και ενδείκνυται για μικρά ~50bp μόρια δίκλωνου DNA. Η μεγάλη ενζυμική υπομονάδα Klenow της πολυμεράσης I του DNA της E.coli συμπληρώνει 3' υπολειπόμενα άκρα τα οποία προέρχονται από τα συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια. Η ειδική ενεργότητα δεν ξεπερνά τα  $2 \times 10^8$  cpm/μg. Σε κάθε περίπτωση και όπου αναφέρεται η ειδική ενεργότητα (Specific activity) υπολογίζεται μετά από κατακρήμνιση του 1% της αντίδρασης παρουσία 10% TCA και υπολογισμό της ενσωμάτωσης μετά από μέτρηση σε μετρητή σπινθηρισμού (Beta Counter).

#### 2.1ε Διαδικασίες υποκλωνοποίησης μορίων DNA

Οι συνήθεις διαδικασίες υποκλωνοποίησης σε πλασμιδιακούς φορείς περιλαμβάνουν τη συνένωση δύο τμημάτων DNA. Η συνένωση περιλαμβάνει

τμήματα με προεξέχοντα ή με τυφλά άκρα. Τα τυφλά άκρα δημιουργούνται με δύο τρόπους:

**α. Με χρήση της μεγάλης υπομονάδας Klenow της πολυμεράσης I του DNA της *E.coli*.** Το ένζυμο είναι ικανό παρουσία δεοξυ-νουκλεοτιδίων να «γεμίζει» 5' υπολειπόμενα άκρα που αφήνουν οι περιοριστικές πέψεις των περισσότερων ενζύμων. Επίσης εκμεταλλευόμενοι την 3'→5' εξωνουκλεολυτική δράση του ίδιου ενζύμου μπορούμε να «φάμε» 3' υπολειπόμενα άκρα, παραλείποντας τη χρήση δεοξυνουκλεοτιδίων απ'την αντίδραση. Η συνήθης αντίδραση περιλαμβάνει ένα ρυθμιστικό διάλυμα με pH 8.0 και περιεκτικότητα σε MgCl<sub>2</sub> 10mM, 5μg/ml DNA, 0.1mM δεόξυ-νουκλεοτίδια (dNTPs), και 150u/ml ενζύμου. Η αντίδραση επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Ακολουθεί θερμική απενεργοποίηση του ενζύμου με επώαση στους 70°C.

**β. Με χρήση της νουκλεάσης S1.** Το ένζυμο αυτό έχει την ιδιότητα να περιορίζει τα μονόκλωνα τμήματα του DNA και δεν εμφανίζει ειδικότητα στο αν τα μονόκλωνα άκρα είναι 3' είτε 5' προεξέχοντα. Το ένζυμο χρησιμοποιήθηκε στις περιπτώσεις εκείνες όπου ήταν αναγκαία η αφαίρεση συγκεκριμένου αριθμού νουκλεοτιδίων από 5' υπολειπόμενα άκρα για λόγους διατήρησης στις προκύπτουσες κατασκευές, του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου που μας ενδιέφερε. Η αντίδραση στην περίπτωση αυτή περιλαμβάνει 1mg/ml DNA, 150u/ml ενζύμου S1, ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου pH 4.5. Η αντίδραση επωάζεται στους 30°C για 30 λεπτά και στη συνέχεια με προσθήκη κατάλληλου διαλύματος το pH της αντίδρασης αυξάνει και το ένζυμο σταματά να δρα. Ακολουθεί και σε αυτή την περίπτωση θερμική απενεργοποίηση του ενζύμου.

**γ. Αντίδραση συγκόλλησης δύο μορίων DNA.** Στις αντιδράσεις συγκόλλησης (ligation) δύο μορίων DNA χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο λιγάση του βακτηριοφάγου T4. Στην περίπτωση όπου τα άκρα των δύο μορίων ήταν συμβατά η συγκέντρωση του συνολικού DNA δεν ξεπερνά τα 5μg/ml για πλασμίδια μέσου μεγέθους ενώ η ποσότητα της λιγάσης είναι 10 Weiss units/ml. Η αντίδραση περιλαμβάνει 1mM ATP. Για τα ενθέματα DNA στις αντιδράσεις συγκόλλησης ο υπολογισμός της ποσότητας τους βασιζόταν στο να επιτευχθεί μοριακή αναλογία 1/5 ή 1/10 (φορέας/ένθεμα) ανάλογα με το μέγεθός τους. Ο χρόνος επώασης της αντίδρασης είναι 1.5 έως 4 ώρες στους 16°C. Στην περίπτωση που τα άκρα είναι τυφλά διατηρούνται οι παραπάνω μοριακές αναλογίες ενώ η θερμοκρασία επώασης της αντίδρασης είναι 25°C και η διάρκεια αυξάνεται κατά το δυνατό.

## **2.1στ Μετασηματισμός βακτηριακών στελεχών.**

Για το μετασηματισμό βακτηριακών στελεχών ακολουθήθηκε η μέθοδος CaCl<sub>2</sub>-RbCl<sub>2</sub> όπως περιγράφεται από τους Maniatis et al.

## **2.1ζ Ταυτοποίηση ανασυνδιασμένων βακτηριακών κλώνων.**

Η ταυτοποίηση των ανασυνδιασμένων βακτηριακών κλώνων έγινε με *in situ* υβριδοποίηση των βακτηριακών αποικιών μετά από την μεταφορά τους σε μεμβράνη υβριδοποίησης σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Grunstein και Hogness (1975), ή με τη χρήση κατάλληλων διαγνωστικών περιοριστικών πέψεων.

## **2.1η Υβριδοποίηση νουκλεϊκών οξέων.**

Όλες οι υβριδοποιήσεις των μεμβρανών έγιναν σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Church και Gilbert. Συνοπτικά οι μεμβράνες εισάγονται σε διάλυμα που περιέχει 7% SDS, 0.5M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.0, 1% BSA. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης εξαρτάται από τη σύσταση, το μέγεθος και την ομολογία των προς υβριδοποίηση

αλληλουχιών. Ο ραδιοσημασμένος ανιχνευτής αποδιατάσσεται για 5 λεπτά στους 100°C. Ακολουθεί υβριδοποίηση στις ίδιες συνθήκες για 12-18 ώρες. Χρησιμοποιήθηκε συνήθως 10<sup>6</sup> cpm/ml διαλύματος υβριδοποίησης. Στο τέλος της υβριδοποίησης οι μεμβράνες ξεπλένονται με διάλυμα που περιέχει 5% SDS, 40mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.0, 1mM EDTA, που έχει προθερμανθεί στη θερμοκρασία υβριδοποίησης.

## **2.10 Προσδιορισμός της πρωτοταγούς νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μορίων DNA (DNA sequencing analysis).**

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του τερματισμού της επιμήκυνσης του DNA, μέσω της ενσωμάτωσης τριφωσφορικών δι-δέοξυ νουκλεοτιδίων (dideoxy chain termination method) των Sanger et al. Σαν μήτρα χρησιμοποιήθηκε υπερελικωμένο πλασμιδιακό DNA και η σήμανση των μορίων έγινε με [<sup>35</sup>S]-dATP. Στις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο Sequenase version 2.0 από την USBC, η οποία είναι τροποποιημένη πολυμεράση T7. Για την διαδικασία ακολουθήθηκαν οι οδηγίες της προμηθεύτριας εταιρίας που περιέχονται στο σχετικό εγχειρίδιο.

## **2.1i 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 MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM δεοξυ-νουκλεοτιδίων dNTPs, 0.5u θερμοσταθερής πολυμεράσης Taq και 20 pmole από κάθε ένα ολιγονουκλεοτίδιο- εκκινητή (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 εκκινητών 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 υπάρχοντων αλυσίδων στους 72°C για 10 λεπτά. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών στις αλληλουχίες στόχους της μήτρας υπολογίζεται σύμφωνα με τον μαθηματικό τύπο

$$T_d = T_m - 13 \text{ και}$$

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

## **2.2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.**

### **2.2a Αλληλεπιδράσεις χημικών 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. Κατ'αυτό τον τρόπο κατακρημνίζονται 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 κατακρημνίζεται 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 MgCl<sub>2</sub>, 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 MgCl<sub>2</sub>, 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.

## **2.2β Αντίδραση ακετυλίωσης πρωτεΐνης από GST-χιμαιρικό μόριο πρωτεΐνης με ιδιότητες ακετυλοτρανσφεράσης.**

Η αντίδραση στηρίζεται στην ιδιότητα συγκεκριμένων πρωτεϊνών να ακετυλιώνουν κατάλοιπα Λυσίνης όπου τα εντοπίζουν σε πρωτεΐνες στόχους. Στην περίπτωσή 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 απομονώνουμε 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.

### 2.3 Διαμόλυνση (transfection) κυτταρικών σειρών.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της επίδρασης του παράγοντα CITA, 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 Ea και Eb. Για τη διαμόλυνση ακολουθήθηκαν δύο μέθοδοι ανάλογα με την κυτταρική σειρά.

**α.** Της συγκατακρήμνισης DNA με Ca<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 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 pCMVβLacZ. Η κατασκευή αυτή με την εισαγωγή της στα κύτταρα οδηγεί στην παραγωγή β-γαλακτοσιδάσης της οποίας η ενεργότητα υπολογίζεται εύκολα (Hall et al).

### 2.3 ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ.

#### A. Κατασκευές στον φορέα έκφρασης pcDNA3 (Invitrogen).

1. **CITA/pcDNA3:** Το cDNA του γονιδίου CITA σαν EcoRI-XbaI κομμάτι από pcDNA1 κλωνοποιείται στον pcDNA3 σε EcoRV θέση (Klenow).
2. **NLS2.Flu.Δ102/pcDNA3:** Το καρβοξυτελικό NotI κομμάτι του CITA/pcDNA3 κλωνοποιείται σε NotI θέση του pcDNA3. Στις EcoRI-NotI θέσεις κλωνοποιείται το PCR πολλαπλασιασμένο κομμάτι του CITA (bp 421-1340) με τη βοήθεια των εκκινητών, και κομμένο με τα αντίστοιχα ένζυμα:  
*CITA.N(1164):* 5'> CAC **GAA TTC** CCA GTA TGT CTT CCA GG <3'  
*CITA.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).
3. **NLS2.Flu.Δ408/pcDNA3:** Κλωνοποιούμε το NotI καρβοξυτελικό κομμάτι του CITA από CITA/pcDNA3 σε NotI θέση του pcDNA3. Το NLS2.Flu κλωνοποιείται στην NotI θέση σαν HindIII κομμάτι από NLS2.Flu/pbluescriptKS.
4. **CBP/pcDNA3:** Το cDNA του CBP κλωνοποιείται σαν BamHI κομμάτι σε BamHI θέση του pcDNA3.
5. **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.

#### B. Πλασμιδιακές κατασκευές στον φορέα έκφρασης pEGFP-C1 (Clontech U55763).

- 1) **CITA/pEGFP-C1:** Το EcoRI-XbaI κομμάτι του CITA από CITA/pcDNA3 κλωνοποιείται στην XmaI θέση του pEGFP-C1.

- 2) **CIITA.Δ102/pEGFP-CI:** Το EcoRI κομμάτι του CIITA απ'το πλασμίδιο Δ102.IVS/pcDNA3 κλωνοποιείται στην EcoRI θέση του pEGFP-CI.
- 3) **NLS2.Flu.Δ408/pEGFP-CI:** Το EcoRI-XbaI κομμάτι από το NLS2.Flu.Δ408/pcDNA3 κλωνοποιείται στην XmaI θέση του pEGFP-CI (Klenow).
- 4) **CIITA.Δ408/pEGFP-CI:** Το NotI κομμάτι του Δ408/pcDNA3 κλωνοποιείται στην EcoRI θέση του pEGFP-CI (Klenow).
- 5) **CIITA.1-114/pEGFP-CI:** Το EcoRI-EcoNI κομμάτι από CIITA/pcDNA3 κλωνοποιείται στην XmaI θέση του pEGFP-CI (Klenow).
- 6) **CIITA.1-408/pEGFP-CI:** Από το πλασμίδιο CIITA/pEGFP-CI αφαιρείται το NotI κομμάτι και το υπόλοιπο επανασυγκολλάται.

#### **Γ. Πλασμιδιακές κατασκευές στον προκαρυωτικό φορέα έκφρασης pGEX (Pharmacia Biotech).**

- 1) **pCAF/pGEX-3X:** Το EcoRI-KpnI(klenow 3'-5' εξωνουκλεολυμένο) κομμάτι του Flag.pCAF/pCX (Nakatani) κλωνοποιείται στην SmaI θέση του pGEX-3X.
- 2) **CIITA.1-408/pGEX-4T1:** Το EcoRI-NotI κομμάτι του CIITA/pcDNA3 κλωνοποιείται σε αντίστοιχες θέσεις του pGEX-4T1.
- 3) **CIITA.1-298/pGEX-4T1:** Από την κατασκευή CIITA1-408/pGEX-4T1 αφαιρείται το SphI-NotI κομμάτι του CIITA και μετά επανασυγκολλούμε (Klenow 3'-5' εξωνουκλεόλυση και μετά γέμισμα).
- 4) **CIITA.298-408/pGEX-3X:** Το SphI-NotI κομμάτι του CIITA (φάγωμα και γέμισμα με Klenow) κλωνοποιείται στην SmaI θέση του pGEX-3X.
- 5) **CIITA408-978/pGEX-4T1:** Απομονώνουμε το BamHI κομμάτι από το πλασμίδιο Δ408/pGEX-4T1 και το κλωνοποιούμε στην BamHI θέση του pGEX-4T1.
- 6) **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.
- 7) **pCAF1-370/pGEX-3x:** Το EcoRI-DdeI κομμάτι του pCAF/pCX κλωνοποιείται στην SmaI θέση του pGEX-3X (Klenow).
- 8) **pCAF370-783/pGEX-3X:** Το DdeI κομμάτι του pCAF/pCX κλωνοποιείται στην SmaI θέση του pGEX-3X (Klenow).

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### **A. Μεταλλαγές της πρωτεΐνης CΠΤΑ, που λειτουργούν ως καταστολείς της έκφρασης των τάξης II αντιγόνων ιστοσυμβατότητας.**

Έχει προηγουμένα δειχθεί, τόσο απ' το εργαστήριό μας καθώς κι από άλλους (Zhou 1997, Chin a 1997, Riley 1995, Chin b 1997, Zhou 1995) ότι το CΠΤΑ διαθέτει μια περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης, που είναι πλούσια σε όξινα αμινοξέα (αμινοξέα 26-137, Zhou 1997). Έχει επίσης δειχθεί ότι για την εξειδίκευση του CΠΤΑ ως προς τα MHC τάξης II γονίδια DR, DP, και DQ απαιτείται η εναπομένουσα καρβοξυτελική περιοχή (αμινοξέα 317-1130) (Zhou 1995). Παρόλα αυτά το πεπτίδιο CΠΤΑ.Δ408, που του έχει αφαιρεθεί η όξινη περιοχή καθώς και η περιοχή πλούσια σε Προλίνη/Σερίνη/Θρεονίνη δεν λειτουργεί σαν καταστολέας της έκφρασης των MHC τάξης II γονιδίων. Η περιοχή πλούσια σε Προλίνη/Σερίνη/Θρεονίνη (PST) καλύπτει μια περιοχή αμινοξέων από 133 έως 292 (περιοχή πλούσια σε Προλίνη, αμινοξέα 133-165, περιοχή πλούσια σε Σερίνη, αμινοξέα 179-207, και περιοχή πλούσια σε Θρεονίνη, αμινοξέα 231-292) και βρέθηκε ότι είναι απαραίτητη για μέγιστη ενεργοποίηση από το CΠΤΑ. Θεωρήσαμε λοιπόν ότι αυτή η περιοχή ίσως ήταν σημαντική για την σταθεροποίηση της αλληλεπίδρασης του CΠΤΑ με σημαντικούς μεταγραφικούς παράγοντες που προσδένονται στον υποκινητή τάξης II. Έτσι δημιουργήθηκε η κατασκευή NLS2.Flu.Δ102/pcDNA3 (Δ102), απ' την οποία έχει αφαιρεθεί η όξινη περιοχή ενεργοποίησης, αλλά διατηρείται η PST περιοχή. Αυτή η κατασκευή ελέγχθηκε για την κατασταλτική της δράση.

Επίσης, παράλληλα με την παραπάνω μεταλλαγή χρησιμοποιήθηκαν για την πιθανή κατασταλτική τους δράση οι κατασκευές CΠΤΑ.N1-114/pcDNA3 (N114), και NLS2.Flu.Δ408/pcDNA3 (Δ408). Η πρώτη κατασκευή περιλαμβάνει τα αμινοτελικά πρώτα 114 αμινοξέα, που περιέχουν την όξινη περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης του CΠΤΑ, ενώ η δεύτερη κατασκευή περιέχει την καρβοξυτελική περιοχή του CΠΤΑ από το αμινοξύ 408 έως 1130, απ' όπου έχουν αφαιρεθεί τόσο η όξινη περιοχή ενεργοποίησης καθώς και η περιοχή (PST) (**ΕΙΚΟΝΑ 5Α**).

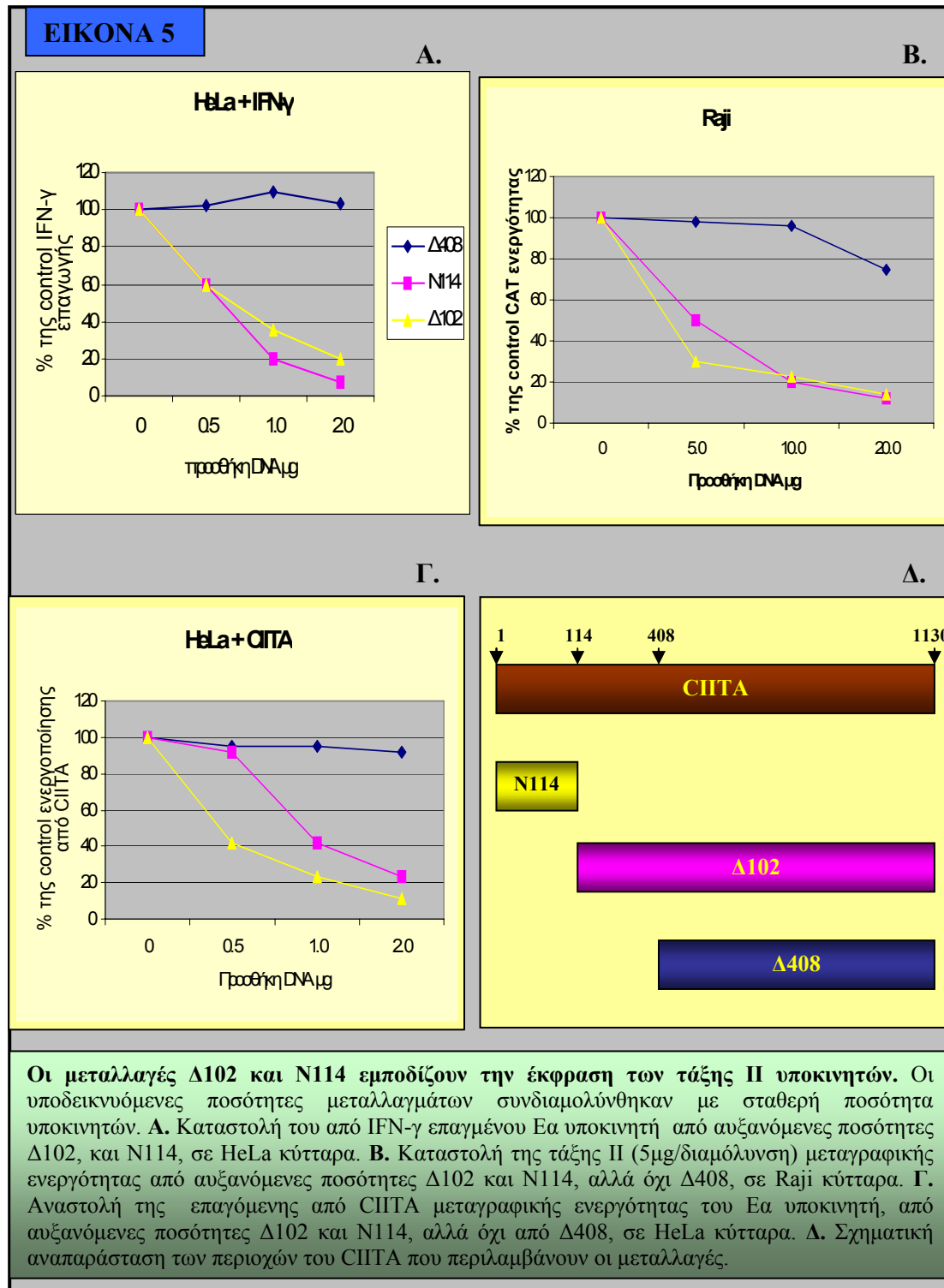
Η δράση του ακέραιου ή των μεταλλαγμένων μορφών CΠΤΑ στον υποκινητή τάξης II Ea μελετήθηκε σε τάξης II θετικό ή αρνητικό γενετικό υπόβαθρο. Η παροδική διαμόλυνση κυττάρων με CΠΤΑ επάγει την ενεργότητα του υποκινητή τάξης II Ea σε HeLa κύτταρα τα οποία δεν εκφράζουν γονίδια τάξης II, αλλά όχι στα κύτταρα Raji τα οποία εκφράζουν γονίδια τάξης II σε υψηλά επίπεδα (Kretsovali et al, in preparation).

Η μεταλλαγή Δ102 του CΠΤΑ που της λείπουν τα 102 πρώτα αμινοξέα όχι μόνο δεν ενεργοποιεί τη μεταγραφή αλλά επίσης μειώνει τη συστατική έκφραση του Ea υποκινητή στα Raji κύτταρα που εκφράζουν CΠΤΑ (**Εικόνα 5B**). Αν χρησιμοποιήσουμε μόνο την όξινη περιοχή ενεργοποίησης του CΠΤΑ N114 σε σύντηξη με την GFP (η GFP χρησιμοποιείται για να σταθεροποιήσει το μόριο N114), παρατηρούμε μια παρόμοια κατασταλτική δράση. Εάν αφαιρεθούν και οι αλληλουχίες που εκτείνονται έως και το αμινοξύ 408 (Δ408) που περιλαμβάνουν την (PST) περιοχή, τότε η κατασταλτική δράση του μορίου παύει να υφίσταται.

Επιπλέον ελέγχθηκε η δραστηριότητα των προαναφερθέντων μεταλλαγών σε κύτταρα που δεν εκφράζουν CΠΤΑ (HeLa). Στα κύτταρα HeLa παρατηρούμε ενεργότητα του τάξης II υποκινητή παρουσία CΠΤΑ, είτε εξωγενούς (μέσω παροδικής διαμόλυνσης) είτε του ενδογενούς (κατόπιν επεξεργασίας με IFN-γ). Και στις δύο περιπτώσεις (**Εικόνα 5A, Γ**) οι μεταλλαγές Δ102 και N114 είναι δραστικές ως καταστολείς της μεταγραφής, ενώ η μεταλλαγή Δ408 είναι αδρανής. Αυξανόμενες ποσότητες των μεταλλαγών Δ102, και N114 αποτελεσματικά



καταστέλλουν τη μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή Ea στα Raji κύτταρα, σε αντίθεση με τη μεταλλαγή Δ408.



**Συζήτηση:** Κατασκευάστηκαν τρεις μεταλλαγές της πρωτεΐνης CIITA. Απ' την πρώτη, Δ102, έχει αφαιρεθεί η όξινη περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης του μορίου, ενώ διατηρείται η περιοχή που περιέχει Προλίνη/Σερίνη/Θρεονίνη. Είναι φανερό ότι η μεταλλαγή αυτή είναι ικανή να επιφέρει καταστολή τόσο της συστατικής, όσο και της επαγόμενης από IFN- $\gamma$  τάξης II μεταγραφικής

ενεργοποίησης. Τις ίδιες παρατηρήσεις έχουμε να κάνουμε και για τη μεταλλαγή που αποτελείται μόνο από την όξινη περιοχή ενεργοποίησης του μορίου N114. Η μεταλλαγή αυτή αν και διατηρεί την περιοχή ενεργοποίησης του μορίου από μόνη της δεν προσδίδει μεταγραφική ενεργότητα στους τάξης II υποκινητές γιατί δεν διατηρεί αλληλουχίες (πχ. PST) απαραίτητες για αλληλεπίδραση με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, καθώς και αλληλουχίες απ' το καρβοξυτελικό μέρος της πρωτεΐνης CΠΤΑ που απαιτούνται για εξειδικευμένη στόχευση των τάξης II υποκινητών (**Εικόνα 6Α**).

Περιοχές πλούσιες σε Προλίνη/Σερίνη/Θρεονίνη βρέθηκαν σε πολλούς μεταγραφικούς παράγοντες ( Mermod 1989) και προτάθηκε ότι είναι σημαντικές για την αυξανόμενη μεταγραφική ενεργότητα (CTF/NF-1, Bcl-3), πιθανά προάγοντας πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις με παράγοντες της βασικής μεταγραφικής μηχανής που προσδένονται σε κουτιά TATA. Οι PST περιοχές ίσως δρουν συνεργατικά με τις όξινες περιοχές ενεργοποίησης για την αύξηση του ρυθμού της μεταγραφής. Παρόλα αυτά, στα πειράματα που προαναφέραμε, η προσθήκη της περιοχής PST στην καρβοξυτελική περιοχή του μορίου, που του προσδίδει γονιδιακή εξειδίκευση, φαίνεται ότι απαιτείται για την αξιοσημείωτη ανασταλτική δράση του μεταλλάγματος Δ102. Το μετάλλαγμα αυτό πιθανά τοποθετείται στους τάξης II υποκινητές, λόγω αλληλεπίδρασης με ειδικούς για τάξης II παράγοντες, και επειδή στερείται της όξινης περιοχής ενεργοποίησης του μορίου δεν έχει μεταγραφική ενεργότητα. Με την τοποθέτησή του όμως στους υποκινητές δρα απαγορευτικά για την αλληλεπίδραση του ολόκληρου άθικτου μορίου CΠΤΑ το οποίο εκφράζεται συστατικά στο κύτταρο, ή επάγεται απ' την IFN-γ (**Εικόνα 6Β**).

Το μετάλλαγμα δε, που αποτελείται μόνο απ' την όξινη περιοχή ενεργοποίησης της πρωτεΐνης CΠΤΑ ούτε αυτό έχει τη δυνατότητα ενεργοποίησης τάξης II υποκινητών από μόνο του αλλά και επιπλέον δρα κατασταλτικά στη δράση της άθικτης πρωτεΐνης CΠΤΑ. Αυτό το μετάλλαγμα επειδή δεν διαθέτει τις ειδικές αλληλουχίες είναι διαλυτό και δεν τοποθετείται στους υποκινητές. Η κατασταλτική δράση του οφείλεται στην κατακράτηση παραγόντων (πχ. συνενεργοποιητών ή παραγόντων της βασικής μεταγραφικής μηχανής) που είναι απαραίτητοι για τη δραστηριότητα της ακέραιας πρωτεΐνης CΠΤΑ (**Εικόνα 6Γ**).

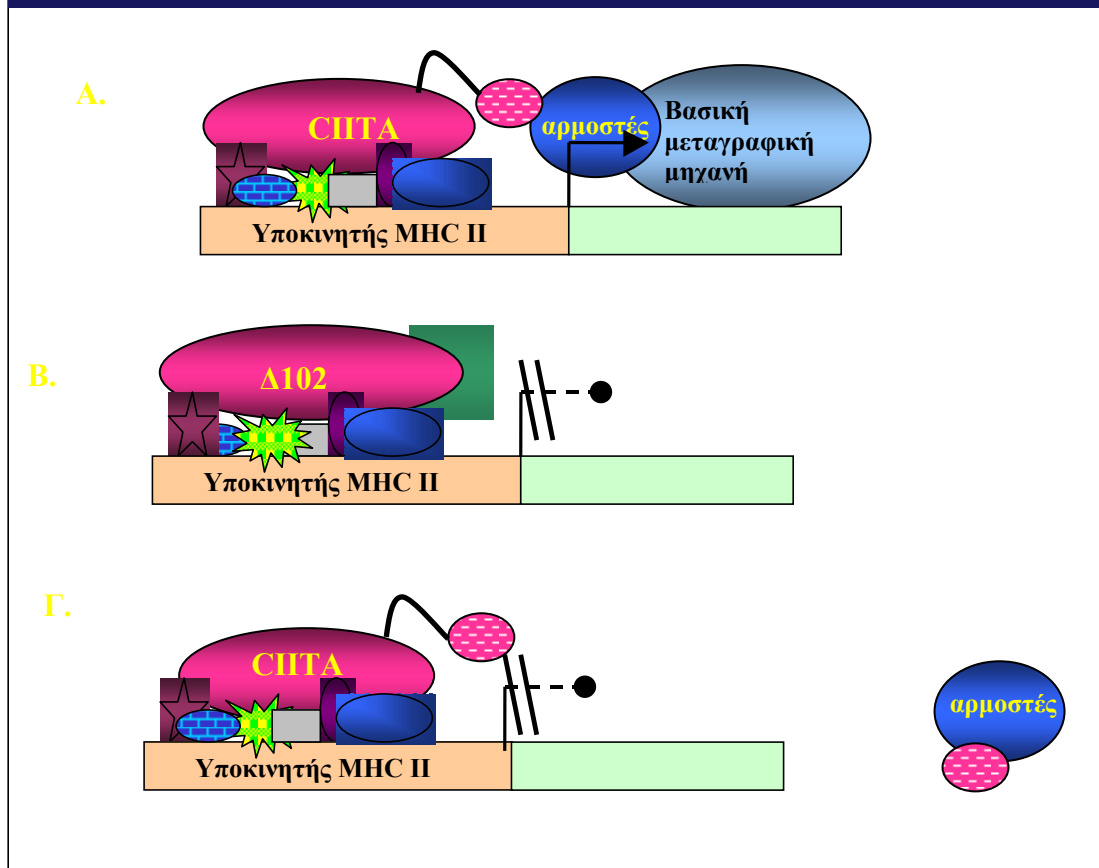
Σε σχέση με εξωγενώς προστιθέμενο CΠΤΑ σε κύτταρα HeLa παρατηρούμε ότι η καταστολή που επιφέρει η μεταλλαγή Δ102 είναι πιο δραστική από την αντίστοιχη της μεταλλαγής N114. Αυτό ίσως εξηγείται απ' το γεγονός ότι οι δύο πρωτεΐνες δεν παράγονται σε ίσες ποσότητες, δεν έχουν τον ίδιο ενδοκυτταρικό εντοπισμό (σαν GST χιμαιρικές πρωτεΐνες η N114 έχει διάχυτη κατανομή, ενώ η Δ102 είναι πυρηνική), αλλά και δεν έχουν τον ίδιο τρόπο δράσης. Η μεταλλαγή Δ102 δρα ειδικά στον υποκινητή των τάξης II εμποδίζοντας τη δράση της ακέραιας πρωτεΐνης CΠΤΑ, ενώ η μεταλλαγή N114 δρα με πιο γενικό τρόπο και τιτλοδοτεί παράγοντες που απαιτούνται, όχι μόνο για τη δράση της ακέραιας πρωτεΐνης στην ενεργοποίηση των τάξης II, αλλά και για την παραγωγή της ίδιας της πρωτεΐνης CΠΤΑ. Σε όλες της περιπτώσεις βέβαια παρατηρούμε ότι η μεταλλαγή Δ408 δεν παρουσιάζει αξιοσημείωτη κατασταλτική δράση, αφού πιθανά δεν τοποθετείται στον υποκινητή.

### ΕΙΚΟΝΑ 6.

Α. Η πρωτεΐνη CIITA με την όξινη μεταγραφική περιοχή του ενεργοποιεί τη μεταγραφή των γονιδίων MHC τάξης II αλληλεπιδρώντας με ειδικούς για τάξης II μεταγραφικούς παράγοντες.

Β. Η μεταλλαγμένη CIITA πρωτεΐνη ( $\Delta 102$ ) αλληλεπιδρά με τον υποκινητή εμποδίζοντας την ακέραια πρωτεΐνη CIITA να τοποθετηθεί και να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή μέσω της όξινης περιοχής.

Γ. Η μεταλλαγή N114 αλληλεπιδρά με παράγοντες απαραίτητους για τη μεταγραφική ενεργοποίηση εμποδίζοντάς τους να αλληλεπιδράσουν με το ακέραιο μόριο CIITA.

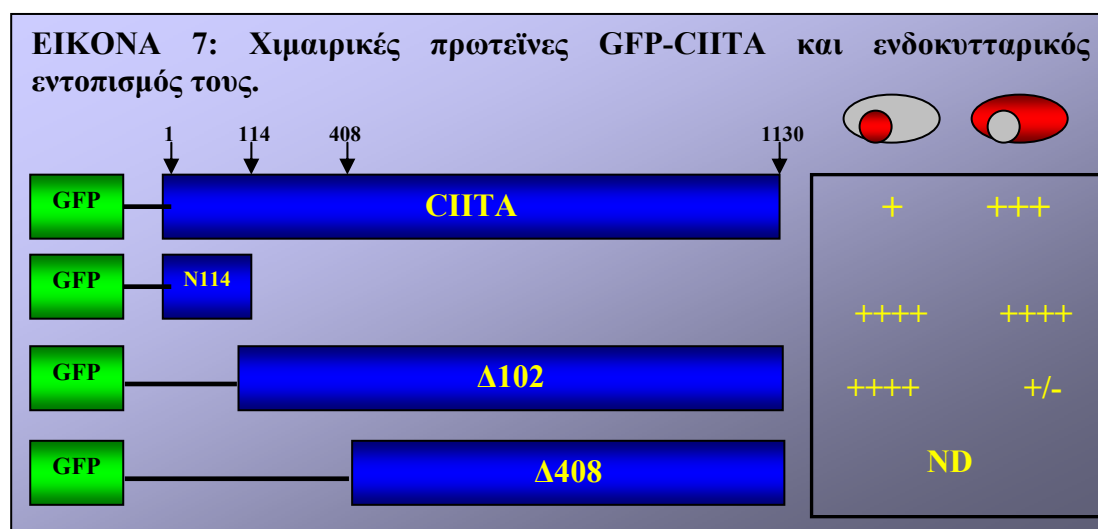


Η αναγνώριση των παραπάνω μεταλλαγμάτων έχει μεγάλη πρακτική σημασία. Αυτά τα μεταλλάγματα, και περισσότερο η  $\Delta 102$  μεταλλαγή που δρα πιο ειδικά, ίσως είναι ικανά να καταστέλλουν την MHC τάξης II έκφραση σε ένα *in vivo* σύστημα. Τα MHC τάξης II μόρια παίζουν σημαντικό ρόλο στην απόρριψη μοσχεύματος, τις αυτοάνοσες ασθένειες, φλεγμονώδεις ασθένειες, και νευροπαθολογικές ασθένειες. Η έκφραση των MHC τάξης II μορίων ή το σύμπλεγμα αυτοαντιγόνου-τάξης II μορίου που σε φυσιολογικά αρνητικά για τάξης II κύτταρα δεν εκφράζονται, πιστεύεται ότι οδηγούν στην επιβάρυνση της ασθένειας. Άρα η χρήση των κατασταλτικών μεταλλαγμάτων που προκύπτουν απ' αυτή τη μελέτη θα είναι πολύ αποτελεσματικά στην αλλαγή ολόκληρου του μονοπατιού αντιγονοπαρουσίασης από MHC τάξης II.

## B. Μελέτη της ενδοκυττάριας τοποθέτησης των διαφόρων μεταλλαγών της πρωτεΐνης CIITA.

Όπως δείξαμε πριν, και για τους λόγους που εξηγήσαμε οι μεταλλαγές Δ102 και N114 έχουν κατασταλτική δράση, θεωρώντας φυσικά ότι τοποθετούνται στον πυρήνα του κυττάρου. Έτσι θελήσαμε να μελετήσουμε την ενδοκυττάρια τοποθέτηση αυτών των μεταλλαγμάτων και της ακέραιας πρωτεΐνης CIITA. Για το σκοπό αυτό κατασκευάσαμε χμιαρικά μόρια του ακέραιου μορίου του CIITA καθώς και των μεταλλαγών του σε σύντηξη με την πρωτεΐνη GFP (Green Fluorescent Protein) και έτσι σε μικροσκοπική παρατήρηση εντοπίζουμε την έκφραση του κάθε χμιαρικού μορίου.

Στην **Εικόνα 7** φαίνονται οι εν λόγω κατασκευές.



Οι παραπάνω κατασκευές χρησιμοποιήθηκαν για παροδική διαμόλυνση κυτταρικών σειρών HeLa (δεν εκφράζουν CIITA ενδογενώς) και Cos (κύτταρα πιθήκου, που δεν είναι γνωστό ότι εκφράζουν κάποιο γονίδιο ανάλογο του ανθρώπινου ή ποντικίσου CIITA).

Με την κατασκευή GFP-CIITA διαμολύνθηκαν κύτταρα Cos. Μετά από μικροσκοπική παρατήρηση φαίνεται ότι η μεγάλη μάζα της ακέραιας πρωτεΐνης CIITA εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, ενώ ελάχιστη ποσότητα ανιχνεύεται στον πυρήνα (**Εικόνα 8A**). Με την κατασκευή GFP-Δ102 διαμολύνθηκαν κύτταρα Cos. Παρατηρούμε ότι το μετάλλαγμα εκφράζεται αποκλειστικά στον πυρήνα (**Εικόνα 8B**). Με την κατασκευή GFP-N114 διαμολύνουμε κύτταρα Cos και μετά από παρατήρηση βλέπουμε ότι το μόριο κατανέμεται αδιάκριτα τόσο στον πυρήνα όσο και το κυτταρόπλασμα (**Εικόνα 8Γ**). Με δεδομένο ότι στην περιοχή της πρωτεΐνης CIITA από 144-161 (Sims 1997) υπάρχει ένα εν δυνάμει σήμα πυρηνικής τοποθέτησης της πρωτεΐνης CIITA (NLS) η κατανομή της ακέραιας πρωτεΐνης CIITA μας ωθεί στην υπόθεση της ύπαρξης στην αμινοξική περιοχή 1-102 ενός στοιχείου που προάγει την κυτταροπλασματική τοποθέτηση του μορίου. Επίσης απ'τη διαμόλυνση Cos κυττάρων με το φορέα έκφρασης της GFP, η εικόνα που παίρνουμε είναι η ίδια με την **Εικόνα 8A** όταν διαμολύνουμε τα κύτταρα με GFP-CIITA. Στην **Εικόνα 9** φαίνεται η ανάλυση κατά Western των χμιαρικών πρωτεϊνών που υποδεικνύονται στην **Εικόνα 7**.

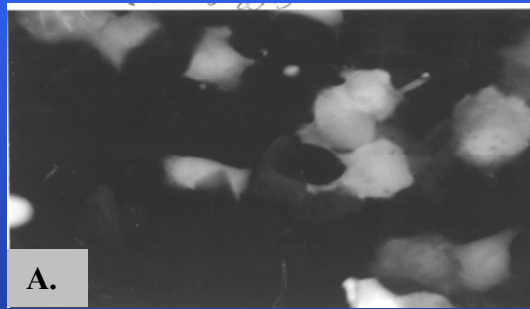
**Εικόνα 8:** Ενδοκυτταρική τοποθέτηση της πρωτεΐνης CITA καθώς και των μεταλλαγμάτων του, με τη βοήθεια χμαιρικών μορίων με GFP.

**A.** Ενδοκυτταρικός εντοπισμός της χμαιρικής πρωτεΐνης GFP-CITA

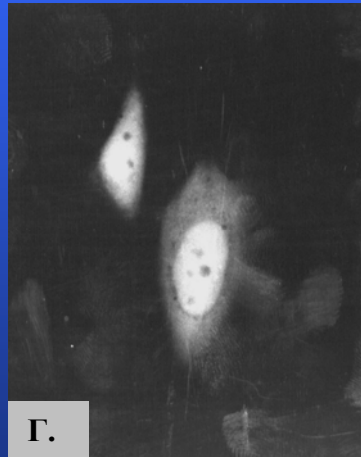
**B.** Ενδοκυτταρικός εντοπισμός της χμαιρικής πρωτεΐνης GFP-Δ102 .

**Γ.** Ενδοκυτταρικός εντοπισμός της χμαιρικής πρωτεΐνης GFP-N114.

(Σ' όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα Cos)



**A.**

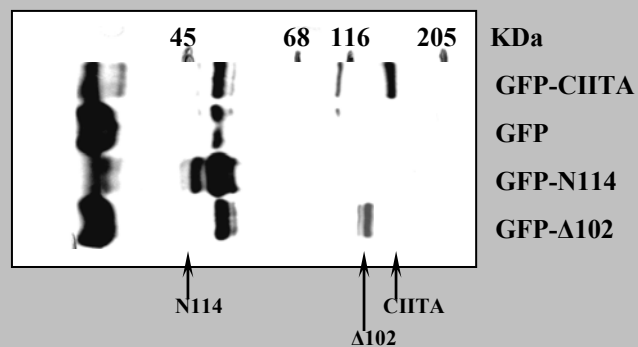


**Γ.**



**B.**

**ΕΙΚΟΝΑ 9:** Ανάλυση των χμαιρικών πρωτεϊνών GFP-CITA, GFP-Δ102, GFP-N114, κατά Western για έλεγχο της έκφρασής τους.



**Συζήτηση:** Η διαμερισματοποίηση του ευκαρυωτικού κυττάρου σε πυρήνα και κυτταρόπλασμα κάνει απαραίτητη τη μεταφορά μια μεγάλης ποικιλίας μορίων RNA και πρωτεϊνών ανάμεσα στις θέσεις της σύνθεσης, ωρίμανσης και λειτουργίας τους. Επίσης επιτρέπει τη ρύθμιση κυτταρικών διαδικασιών με τον έλεγχο της πυρηνοκυτταροπλασματικής εντόπισης πρωτεϊνών και RNA.

Ο πυρηνικός φάκελος διαθέτει μεγάλες πρωτεϊνικές κατασκευές που ονομάζονται πυρηνικοί πόροι και επιτρέπουν σε πρωτεΐνες και RNA να εισέλθουν στον πυρήνα. Κάθε πυρηνικός φάκελος επιτρέπει την παθητική διάχυση ιόντων μικρών μορίων και των περισσότερων μακρομορίων με μοριακό βάρος μικρότερο από ~60KDa, ενώ μεγαλύτερα μόρια μεταφέρονται με υποβοηθούμενη εξαρτώμενη από ενέργεια μεταφορά.

Πολλές πυρηνικές πρωτεΐνες εισέρχονται στον πυρήνα με τη βοήθεια ενός σήματος πυρηνικής εντόπισης (**NLS: Nuclear Localization Signal**) που είναι πλούσιο σε βασικά αμινοξέα (Dingwall 1991). Ένα ετεροδιμερές σύμπλοκο από *ιμπορτίνη α* και *ιμπορτίνη β* (ή *πυρηνοφερίνη α* και *β*) αναγνωρίζει και προσδένει βασικά NLSs μέσω μιας θέσης πρόσδεσης NLS της *α* υπομονάδας, και η *ιμπορτίνη β* φέρει σε πέρας την μεταφορά του συμπλόκου *ιμπορτίνης* και προς μεταφορά φορτίου από τον πυρηνικό πόρο, με θερμοεξαρτώμενο τρόπο. Η μεταφορά στο πυρηνόπλασμα πραγματοποιείται από τον κύκλο της Ran GTPase, και απαιτεί ενέργεια από την *υδρόλυση GTP*. (Nakienly 1997).

Σε αναλογία με αλληλουχίες-σήματα υπεύθυνα για τον πυρηνικό εντοπισμό πρωτεϊνών υπάρχουν σήματα εξόδου από τον πυρήνα (NESs: Nuclear Export Sequences) που ενδυναμώνουν την έξοδο ετερόλογων πρωτεϊνών που διαφορετικά θα παρέμεναν αποκλειστικά στον πυρήνα. (Wen, 1995).

Πρώιμες μελέτες σύγκρισης της αλληλουχίας του CITA με άλλα γνωστά πρωτεϊνικά μοτίβα υπέδειξαν ένα εν δυνάμει σήμα πυρηνικής εντόπισης στο CITA του ποντικού (Sims 1997). Στη συγκεκριμένη περιοχή το ποντικίσιο με το ανθρώπινο γονίδιο σε αμινοξικό επίπεδο εμφανίζουν ομολογία της τάξης του 72%. Αν λοιπόν θεωρήσουμε ότι η συγκεκριμένη περιοχή μπορεί να λειτουργήσει σαν NLS μπορούμε να εξηγήσουμε την κατ'αποκλειστικότητα πυρηνική εντόπιση της μεταλλαγής Δ102. Είναι φανερό ότι ενώ το ακέραιο μόριο εμφανίζεται κυτταρόπλασμα, η μεταλλαγή Δ102 εντοπίζεται αποκλειστικά στον πυρήνα. Είναι πιθανό λοιπόν ότι αφαιρώντας την όξινη περιοχή ενεργοποίησης του μορίου απομακρύνουμε απ'το μόριο ένα πιθανό σήμα εξόδου απ'τον πυρήνα, ή κατακράτησης στο κυτταρόπλασμα, που περιέχεται σ'αυτή την περιοχή.

Με δεδομένη την αναγκαιότητα πυρηνικής τοποθέτησης του CITA για την επίτευξη της μεταγραφικής ενεργότητας η παρατήρηση της συσσώρευσης, της διαμολυμένης πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα φαίνεται εκ πρώτης όψεως ανεξήγητη. Πιθανά η μικρή ποσότητα CITA που βρίσκεται στον πυρήνα είναι η μεταγραφικά ενεργή πρωτεΐνη, ενώ η υπόλοιπη εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, για λόγους που δεν μπορούμε προς το παρόν να ερμηνεύσουμε. Για να εξάγουμε πιο αξιόπιστα αποτελέσματα πρέπει να εξετάσουμε την κυτταρική κατανομή της ενδογενούς πρωτεΐνης.

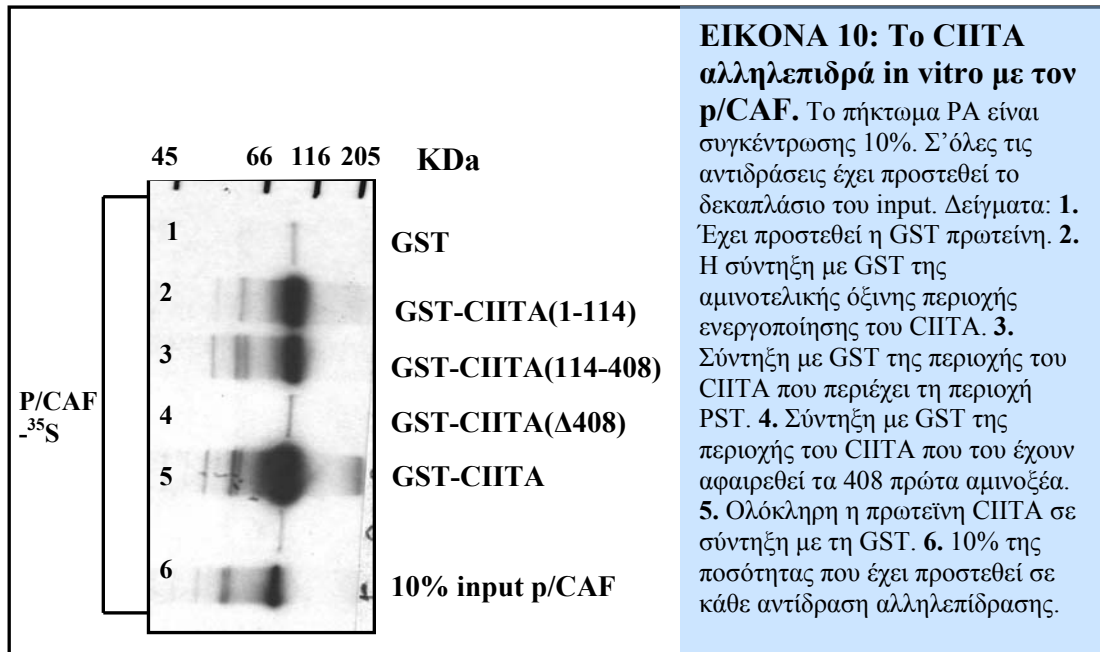
**Γ. Ο μεταγραφικός trans-ενεργοποιητής των τάξης II γονιδίων ιστοσυμβατότητας, CIITA, αλληλεπιδρά, με το μεταγραφικό συνενεργοποιητή, με ιδιότητες ακέτυλο-τρανσφεράσης, p/CAF.**

Η πρωτεΐνη CIITA δεν προσδέεται στο DNA. Η στρατολόγησή της στον υποκινητή των γονιδίων τάξης II γίνεται με αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης με τους παράγοντες που είναι προσδεμένοι στο DNA. Έχει δειχθεί η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης CIITA με τον μεταγραφικό παράγοντα RFX5 ( Scholl 1997) που αναγνωρίζει το στοιχείο X1 του υποκινητή των τάξης II. Επίσης έχει δειχθεί η αλληλεπίδραση του CIITA με παράγοντες της βασικής μεταγραφικής μηχανής, όπως TFIIB, TAFII250, TAFII32, TAFII70, p62 του TFIIF, κ.α. Στο εργαστήριό μας δείχθηκε πρόσφατα ότι ο παράγοντας CIITA επιστρατεύει το συνενεργοποιητή CBP προς επίτευξη μέγιστης ενεργοποίησης των γονιδίων τάξης II (Kretsovali 1998).

Επειδή ο CBP συνδέεται στενά με τον συνενεργοποιητή p/CAF, που έχει ιδιότητες ακετυλοτρανσφεράσης, θελήσαμε να μελετήσουμε την πιθανή αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης CIITA με τον p/CAF.

Ελέγχθηκε in vitro η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης p/CAF που ήταν ραδιοσημασμένη με [<sup>35</sup>S]-μεθειονίνη με μια σειρά κατασκευές του CIITA που παράχθηκαν σαν χμαιοϊκικές πρωτεΐνες με GST. Τα κομμάτια του CIITA που χρησιμοποιήθηκαν γι' αυτό το σκοπό καλύπτουν τις αμινοξικές περιοχές (1-114), (114-408), (408-1130= Δ408), και (1-1130= ολόκληρη η πρωτεΐνη). Σε κάθε αντίδραση αλληλεπίδρασης προστέθηκε δεκαπλάσια ποσότητα σημασμένης p/CAF πρωτεΐνης σε σχέση με αυτή που τρέχουμε σαν control σε αποδιατακτικό (SDS) πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (συγκέντρωσης 10%).

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 10** το CIITA αλληλεπιδρά με p/CAF (**δείγμα 5**). Οι υποπεριοχές του CIITA που ευθύνονται για αλληλεπίδραση με p/CAF είναι η αα1-114 (**δείγμα 2**) και η αα114-408 (**δείγμα 3**). Μετά από μέτρηση σε Phosphoimager, του σήματος κάθε ζώνης p/CAF πρωτεΐνης που κατακρατείται από κάθε κατασκευή GST-CIITA, έχουμε να παρατηρήσουμε τα εξής. Το control δείγμα με GST κατακρατεί το 1.6% της σημασμένης πρωτεΐνης p/CAF. Το ποσοστό αυτό αν και μικρό εξηγείται απ' τα μη καλά πλυσίματα της κολώνας με GST μετά την αντίδραση αλληλεπίδρασης. Η κατασκευή GST-CIITA(1-114) κατακρατεί το 19.28% της προστιθέμενης σημασμένης p/CAF πρωτεΐνης. Η κατασκευή GST-CIITA(114-408) κατακρατεί το 16.85% της προστιθέμενης ποσότητας p/CAF. Είναι φανερό, και λαμβάνοντας υπόψη το πειραματικό σφάλμα, ότι οι περιοχές του CIITA (1-114) και (114-408) αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη p/CAF περίπου στον ίδιο βαθμό. Αντίθετα το υπόλοιπο μόριο, που περιλαμβάνει τα καρβοξυτελικά 722 αμινοξέα [κατασκευή GST-CIITA(Δ408)], δεν φαίνεται να αλληλεπιδρά καθόλου με την πρωτεΐνη p/CAF αφού συγκρατεί μόνο το 1.27% της προστιθέμενης ποσότητας p/CAF. Η κατασκευή που περιέχει ολόκληρο το μόριο CIITA αλληλεπιδρά φυσικά με τη πρωτεΐνη p/CAF και μάλιστα συγκρατεί το 42.3% της προστιθέμενης ποσότητας p/CAF, ποσοστό περίπου όσο το άθροισμα της αλληλεπίδρασης με τις περιοχές (1-114) και (114-408) χωριστά. Τα παραπάνω φαίνονται στην **Εικόνα 10**.

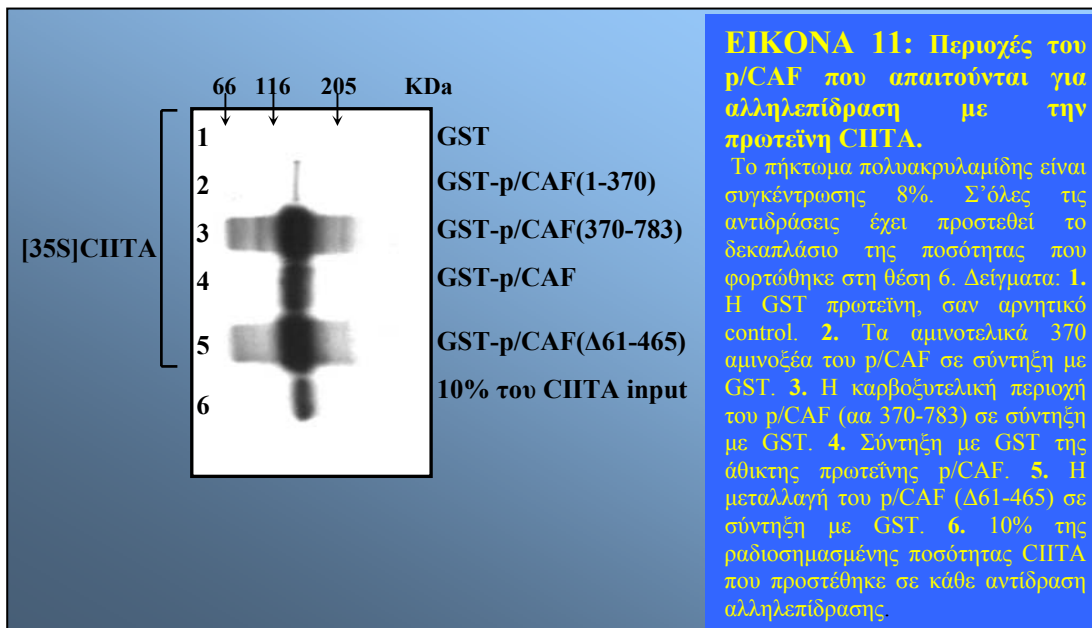


**ΕΙΚΟΝΑ 10: Το CИTTA αλληλεπιδρά in vitro με τον p/CAF.** Το πήκτωμα PA είναι συγκέντρωσης 10%. Σ' όλες τις αντιδράσεις έχει προστεθεί το δεκαπλάσιο του input. Δείγματα: 1. Έχει προστεθεί η GST πρωτεΐνη. 2. Η σύντηξη με GST της αμινοτελικής όξινης περιοχής ενεργοποίησης του CИTTA. 3. Σύντηξη με GST της περιοχής του CИTTA που περιέχει τη περιοχή PST. 4. Σύντηξη με GST της περιοχής του CИTTA που του έχουν αφαιρεθεί τα 408 πρώτα αμινοξέα. 5. Ολόκληρη η πρωτεΐνη CИTTA σε σύντηξη με τη GST. 6. 10% της ποσότητας που έχει προστεθεί σε κάθε αντίδραση αλληλεπίδρασης.

Όταν σημάζουμε με [<sup>35</sup>S] την πρωτεΐνη CИTTA και χρησιμοποιήσουμε για αλληλεπίδραση την πρωτεΐνη p/CAF σε σύντηξη με την GST, η αλληλεπίδραση ανάμεσα στις δύο πρωτεΐνες διατηρείται.

Για να προσδιορίσουμε την περιοχή του p/CAF που αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη CИTTA δημιουργήθηκαν κατασκευές που περιλαμβάνουν διακριτές λειτουργικές περιοχές του p/CAF σε σύντηξη με την πρωτεΐνη GST. Η πρώτη κατασκευή περιλαμβάνει την αμινοτελική περιοχή του p/CAF(αμινοξέα 1-370) η οποία δεν φαίνεται να αλληλεπιδρά με το CИTTA παρά μόνο ελάχιστα, αφού συγκρατεί μόνο το 2.8% της προστιθέμενης ραδιοσημασμένης ποσότητας της πρωτεΐνης CИTTA. Η δεύτερη κατασκευή περιλαμβάνει την καρβοξυτελική περιοχή του p/CAF (αμινοξέα 370-783). Σ' αυτή την περιοχή παρατηρούμε αξιοσημείωτη αλληλεπίδραση, αφού συγκρατεί το 64.8% της προστιθέμενης ποσότητας CИTTA. Η κατασκευή που περιλαμβάνει την ακέραιη πρωτεΐνη p/CAF συγκρατεί το 29.2% της προστιθέμενης ποσότητας CИTTA. Τέλος η κατασκευή που περιλαμβάνει ένα μετάλλαγμα p/CAF που του έχει αφαιρεθεί η περιοχή από το αμινοξύ 61 έως το 465 φαίνεται να αλληλεπιδρά καλύτερα από όλες τις άλλες κατασκευές, αφού κατακρατεί το 80.88% της προστιθέμενης ποσότητας ραδιοσημασμένης πρωτεΐνης CИTTA (**Εικόνα 11**). Τα αναφερόμενα ποσοστά % δεν υποδηλώνουν άμεση ποσοτικοποίηση της αλληλεπίδρασης των δύο μορίων, αλλά υποδεικνύουν ποιοτικές διαφορές.



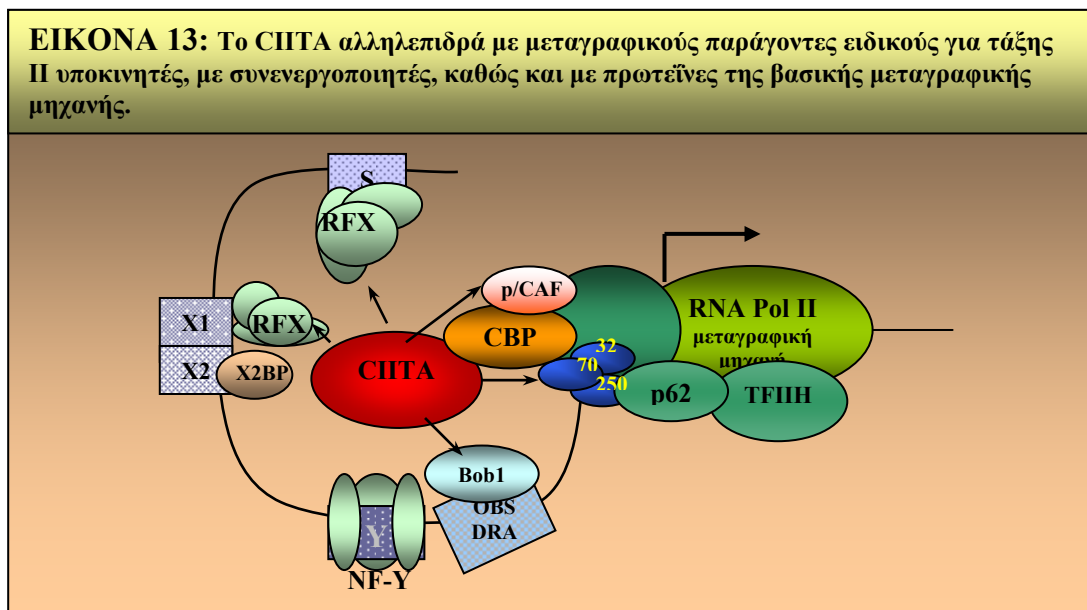
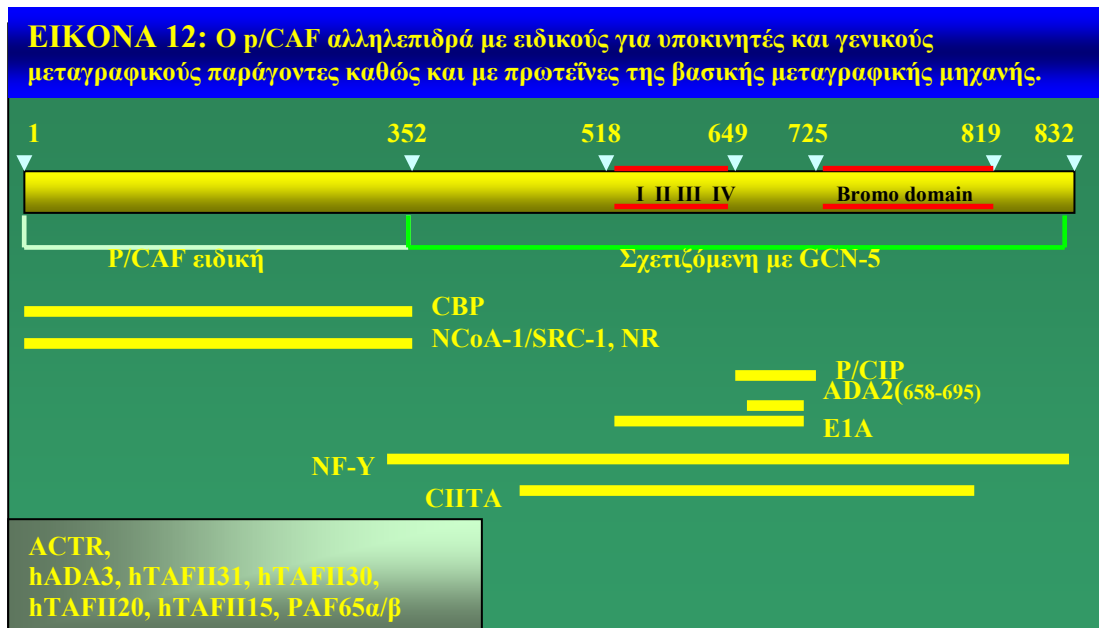


**Συζήτηση:** Η αμινοτελική όξινη περιοχή ενεργοποίησης του CИTA αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες μέλη της βασικής μεταγραφικής μηχανής. Η περιοχή του CИTA(αμινοξέα 17-148) αλληλεπιδρά με την TFIIIB (που συνδέεται με TBP, Fontes 1997) και με τον hTAFII70 καθώς και με την υπομονάδα του TFIIH την p62 (όπου μέσω της ενεργότητας κινάσης του TFIIH μπορεί να φωσφορυλιώνει την καρβοξυτελική μονάδα της μεγάλης υπομονάδας της Pol II και έτσι να επιτυγχάνει την επιμήκυνση της μεταγραφής, πράγμα που μπορεί να κάνει το CИTA) καθώς και με τον TAFII250 (που μπορεί να συνδέεται με TBP). (Mahanta 1997).

Επίσης η ίδια περιοχή της πρωτεΐνης CИTA είναι απαραίτητη για αλληλεπίδραση με τον συνενεργοποιητή CBP (Kretsovali 1998). Όμως ο CИTA δεν ακετυλιώνεται από CBP (παρατηρήσεις του εργαστηρίου). Οπότε αφού η CBP αλληλεπιδρά με CИTA, και η CBP αλληλεπιδρά με μια άλλη ακετυλοτρανσφεράση, τον p/CAF, ελέγξαμε την αλληλεπίδραση του CИTA με p/CAF. Σε ότι αφορά την αλληλεπίδραση του CИTA με τον p/CAF, εκτός απ'την αμινοτελική όξινη περιοχή του CИTA απαιτείται και η περιοχή που είναι πλούσια σε Προλίνη/Σερίνη/Θρεονίνη. Άλλωστε, είναι γνωστή η σπουδαιότητα της τελευταίας περιοχής σε ότι αφορά, τόσο τη μέγιστη μεταγραφική ενεργότητα, όσο και σε ότι αφορά τη στρατολόγηση του CИTA στον υποκινητή των γονιδίων τάξης II. Είναι γνωστό ότι η περιοχή αυτή απαιτείται για αλληλεπίδραση με το μεταγραφικό παράγοντα RFX5, ενώ αν την αφαιρέσουμε τελείως τα μεταλλαγμένα μόρια CИTA που προκύπτουν δεν έχουν την ιδιότητα ενεργής κατασταλτικής δράσης στην μεταγραφική ενεργοποίηση των τάξης II.

Θα ήταν ενδιαφέρον να βρούμε πια είναι η λειτουργική σημασία μιας τέτοιας αλληλεπίδρασης αφού δεν έχει αναφερθεί έως τώρα κάποια λειτουργική δραστηριότητα αυτής της περιοχής του CИTA. Επίσης είναι ενδιαφέρον να διερευνηθεί εάν η αλληλεπίδραση με p/CAF γίνεται πριν ή μετά τη στρατολόγηση του CИTA στον υποκινητή τάξης II.

Στην **Εικόνα 12** φαίνονται σχηματικά οι περιοχές αλληλεπίδρασης του p/CAF με άλλους πρωτεϊνικούς παράγοντες.



Η περιοχή του p/CAF που είναι υπεύθυνη για αλληλεπίδραση με CBP (Yang 1996) και τους πυρηνικούς υποδοχείς και χαρακτηρίζεται σαν p/CAF-ειδική δεν αλληλεπιδρά με το C/ITA. Αντίθετα η περιοχή του p/CAF που είναι σχετιζόμενη (ομολογία στην αλληλουχία) με GCN5 και περιλαμβάνει περιοχή με ενεργότητα ακετυλοτρανσφεράσης (αμινοξέα 518-649), και αλληλεπιδράσης με p/CIP (αμινοξέα 941-1084) (Kozus 1998) καθώς και μια bromo-περιοχή, αλληλεπιδρά ισχυρά με C/ITA. Άρα η περιοχή που είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση με το C/ITA περιλαμβάνει την αμινοξική περιοχή 465-832.

**Δ. Ο μεταγραφικός ενεργοποιητής των τάξης II αντιγόνων ιστοσυμβατότητας CΙΠΤΑ, ακετυλιώνεται από τον μεταγραφικό παράγοντα με ιδιότητες ακετυλοτρανσφεράσης p/CAF.**

Με βάση την παρατηρηθείσα αλληλεπίδραση ανάμεσα σε CΙΠΤΑ και p/CAF θελήσαμε να εξετάσουμε την πιθανότητα ακετυλίωσης του CΙΠΤΑ από τον p/CAF. Χρησιμοποιήθηκε ολόκληρο το μόριο και επιμέρους τμήματα του p/CAF σε σύντηξη με την πρωτεΐνη GST. Το CΙΠΤΑ παράχθηκε κι αυτό σαν χιμαιρικό μόριο με GST σε προκαρυωτικό σύστημα έκφρασης. Η κατασκευή p/CAF που διαθέταμε έχει την ιδιότητα ακετυλοτρανσφεράσης καθώς και την ιδιότητα να αυτοακετυλιώνεται όπως έχει και προηγούμενα αναφερθεί (Herrera 1997). Ο p/CAF φάνηκε να ακετυλιώνει το CΙΠΤΑ (**Εικόνα 14Α, δείγμα 1**). Ο p/CAF δεν ακετυλιώνει GST (**Εικόνα 14Α, δείγμα 3**) αλλά ακετυλιώνει ιστόνες (**Εικόνα 14Α στο δείγμα 2** η ακετυλιωμένη ιστόνη H3). Στο δείγμα 1 ανιχνεύεται η ακετυλιωμένη πρωτεΐνη CΙΠΤΑ εκτός από μια ζώνη που ανιχνεύεται στο ύψος των 116KDa και είναι η αυτοακετυλιωμένη μορφή του p/CAF.

Είναι γνωστό ότι οι πρωτεΐνες με ιδιότητα ακετυλοτρανσφεράσης ακετυλιώνουν κατάλοιπα λυσίνης και το CΙΠΤΑ περιέχει 42 τέτοια κατάλοιπα στην αλληλουχία του. Αφού δείξαμε ότι ο p/CAF ακετυλιώνει το CΙΠΤΑ προχωρήσαμε στον προσδιορισμό της περιοχής του CΙΠΤΑ που ακετυλιώνεται. Χρησιμοποιήσαμε και πάλι χιμαιρικά μόρια CΙΠΤΑ σε σύντηξη με την πρωτεΐνη GST που περιλαμβάνουν τα εξής. Το συνολικό μόριο CΙΠΤΑ (GST-CΙΠΤΑ), τα πρώτα 408 αμινοξέα του CΙΠΤΑ (GST-CΙΠΤΑ1-408), τη μεταλλαγή που της λείπουν τα πρώτα 408 αμινοξέα (GST-CΙΠΤΑ.Δ408), την περιοχή από το αμινοξύ 408 έως το αμινοξύ 790 (GST-CΙΠΤΑ408-790), την περιοχή από το αμινοξύ 790 έως το αμινοξύ 978 (GST-CΙΠΤΑ790-978). Είναι φανερό απ' την **Εικόνα 14Β** ότι η ακετυλίωση του CΙΠΤΑ υφίσταται στα πρώτα 408 αμινοξέα (**δείγμα 4**) ενώ η μεταλλαγή του CΙΠΤΑ που της λείπουν τα πρώτα 408 αμινοξέα καθώς και τα επιμέρους κομμάτια της δεν ακετυλιώνονται (**δείγματα 5-7**). Στην ίδια εικόνα φαίνεται το θετικό (**δείγμα 2**) και αρνητικό (**δείγμα 3**) control της αντίδρασης.

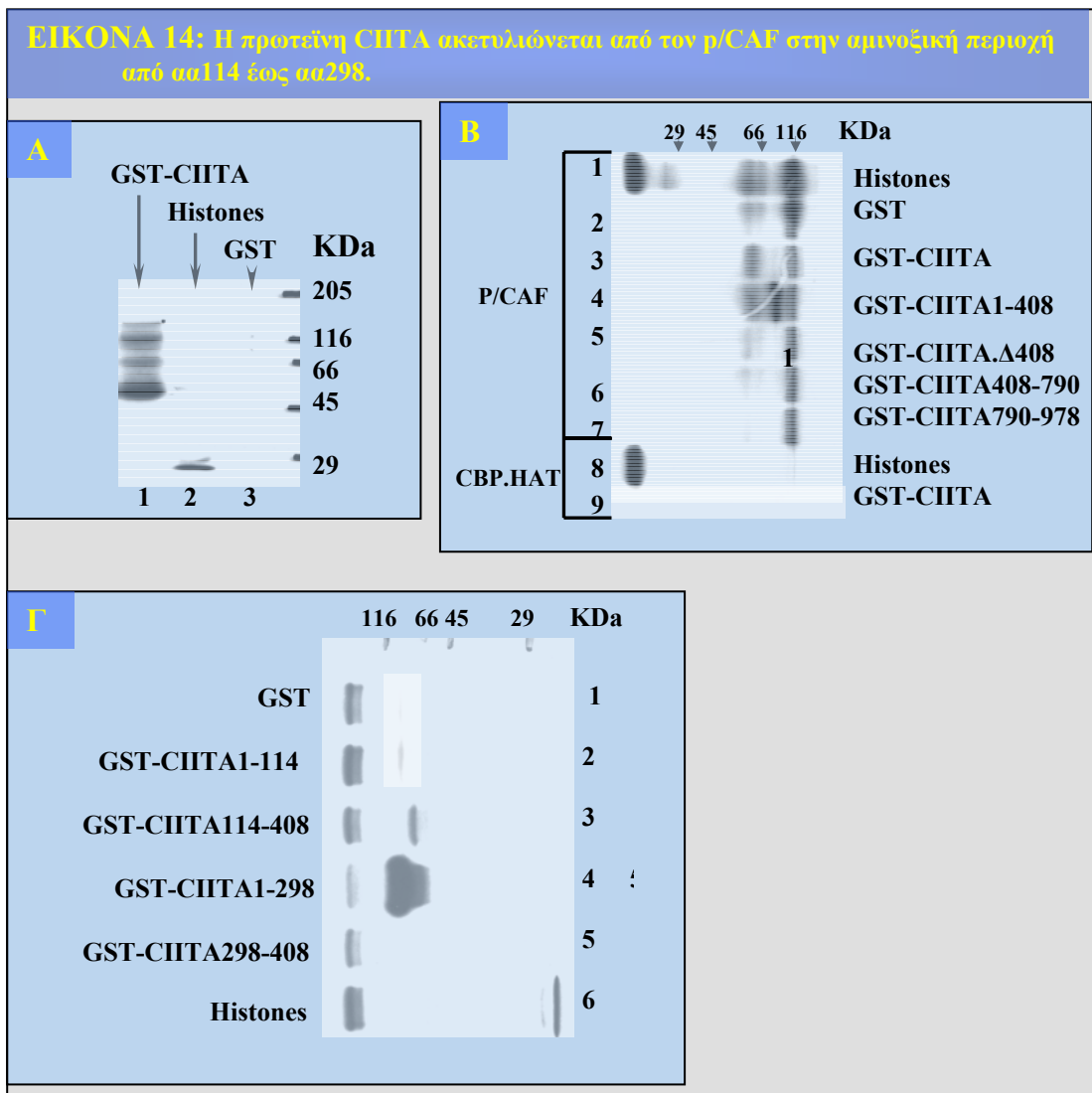
Προκειμένου να προσδιορίσουμε περαιτέρω την περιοχή του CΙΠΤΑ που ακετυλιώνεται έγιναν δύο κατασκευές που χωρίζουν την περιοχή (1-408) σε δύο υποπεριοχές, την περιοχή που περιλαμβάνει τα πρώτα 298 αμινοξέα (GST-CΙΠΤΑ1-298), και τη περιοχή από το αμινοξύ 298 έως το αμινοξύ 408 (GST-CΙΠΤΑ298-408). Η αμινοξική περιοχή που περιλαμβάνει την αμινοτελική όξινη περιοχή ενεργοποίησης του CΙΠΤΑ (αμινοξέα 1-114) δεν περιέχει κανένα κατάλοιπο λυσίνης αλλά παρόλα αυτά χρησιμοποιείται σαν control σε αντίδραση ακετυλίωσης, και πράγματι δεν ακετυλιώνεται. Στην **Εικόνα 14Γ** φαίνεται ότι μόνο οι περιοχές του CΙΠΤΑ που περιλαμβάνουν τα αμινοξέα από 114 έως 408 (**δείγμα 3**) και 1 έως 298 (**δείγμα 4**) ακετυλιώνονται. Άρα δεδομένου ότι η περιοχή του CΙΠΤΑ (1-114) δεν ακετυλιώνεται (**δείγμα 2**) συμπεραίνουμε ότι η ακετυλίωση του μορίου υφίσταται στην περιοχή από το αμινοξύ 115 έως το αμινοξύ 298.

**Συζήτηση:** Ο p/CAF ακετυλιώνει ιστόνες τόσο ελεύθερες (κυρίως την H3 και λιγότερο την H4) καθώς και σε νουκλεοσώματα. Ο p/CAF αυτοακετυλιώνεται επίσης στην αμινοτελική του περιοχή πάνω στο σήμα εισόδου στον πυρήνα που διαθέτει (αμινοξέα 352-377) (Kouzarides unpublished). Το γεγονός ότι μεταγραφικοί παράγοντες όπως η p53 (Gu 1997) και βασικοί μεταγραφικοί παράγοντες όπως ο

TFIIIE ακετυλιώνονται από CBP και p/CAF, υποδεικνύει ότι η ακετυλίωση είναι ένας σημαντικός μηχανισμός ρύθμισης της ενεργότητας μεταγραφικών παραγόντων.

Ένα επιπλέον παράδειγμα τέτοιας ρύθμισης, και συγκεκριμένα της έκφρασης των MHC II γονιδίων ιστοσυμβατότητας, ίσως αποδειχθεί η ρύθμιση της δράσης του CIITA μέσω ακετυλίωσης.

Το CIITA ακετυλιώνεται από τον p/CAF σε μια περιοχή που καλύπτει τα αμινοξέα από 115-298. Αυτή η περιοχή του CIITA περιλαμβάνει μια περιοχή πλούσια σε Προλίνες/Σερίνες/Θρεονίνες (PST), για την οποία δεν έχει αναφερθεί μέχρι τώρα κάποια λειτουργική δραστηριότητα. Παρ'όλα αυτά αυτή η περιοχή είναι σημαντική γιατί φαίνεται να επικουρεί τη όξινη περιοχή ενεργοποίησης και επιπλέον είναι απαραίτητη για τη δημιουργία επικρατών κατασταλακτικών μεταλλαγών της πρωτεΐνης CIITA. Ίσως η αποκάλυψη της λειτουργικότητας του μορίου σε σχέση με την ακετυλίωση να οδηγήσει στη αναγνώριση της δραστηριότητας αυτής της περιοχής.



Απ' τις 42 λυσίνες που περιέχει το CIPTA και είναι πιθανά υποστρώματα ακετυλίωσης απ' τον p/CAF έχουμε περιορίσει τη περιοχή στις 7 λυσίνες. Έγινε σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας (πρόγραμμα Lipman-Pearson Protein Alignment) ολόκληρου του μορίου CIPTA με την αλληλουχία της p53 που ακετυλιώνεται από p/CAF και αυτής που ακετυλιώνεται από CBP. Καμία ομολογία δεν βρέθηκε με την περιοχή aa1-408 του CIPTA. Κατόπιν έγινε σύγκριση της αμινοξικής περιοχής (1-408) του CIPTA και των αμινοξικών αλληλουχιών διαφόρων ιστονών που ακετυλιώνονται, (ιστόνες H4 και H4b της Tetrahymena, και ιστόνες H3 και H4 της ζύμης). Στο πεπτίδιο CIPTA1-408 αναγνωρίστηκε μια αλληλουχία (αμινοξέα 136-145) που εμφανίζει ομολογία με την ιστόνη H4b της Tetrahymena, τόσο στο αμινοτελικό άκρο της (αμινοξέα 136-141) όσο και στο καρβοξυτελικό άκρο της (αμινοξέα 141-145). Είναι γνωστό ότι στην ίδια περιοχή εντοπίζεται και το εν δυνάμει σήμα πυρηνικής εντόπισης του CIPTA. Άρα είναι πιθανό η ακετυλίωση να ρυθμίζει τη δραστηριότητα του NLS και επομένως να ευθύνεται για τον κυτταρικό εντοπισμό του CIPTA (**Εικόνα 15**).

**ΕΙΚΟΝΑ 15: Σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας 115-298 της πρωτεΐνης CHTA του ανθρώπου και του ποντικού. Υποδεικνύεται το υποθετικό NLS του ποντικίσου CHTA. Γίνεται σύγκριση της ίδιας αλληλουχίας με γνωστές περιοχές πρωτεϊνών που ακετυλιώνονται.**

		Ιστόνη H4b της Tetrahymena		
				KVGKR
A.: 115-	SKDIFK	-HIGPDEV IG	ESMEMPAEVG	QKSQKRPFPE
Π.: 115-	SKDLFI	EHIGAEEGFG EN I E I	PVEAG	QKPKRRFPE
	μοτίβο I			μοτίβο II
A.:151	EL PADLKH WK	PAEPPTVVTG	SLLVGPVSDC	
Π.:151	EHAMDSKH RK	LV-PTS RTS L	NYLDLPTGHI	
	mNLS?	μοτίβο III		
A.:190	STLPCLPLPA	LFNQEPASGQ	MRLEKTDQI P	
Π.:180	QIFTTLPQGL	WQI SGAGTGL	SSV LI YHGEM	
A.:221	MPF- - -SSS	SLSCLNLPEG	PI QFVPTI ST	
Π.:210	PQVNQVLPSS	SLSI PS LPES	PDRPGSTSPF	
A.:246	LPHGLWQISE	AGTGVSSI F I	YHGEVPQASQ	
Π.:240	TPS AA DLPSM	PE PALTSRVN	ETEDTS P SPC	
A.:276	VP PPSGFTVH	GLPTSPDRPG	ST	
Π.:270	QEGPES - - - -	- - - - - - - - - -	- -	

<span style="display:inline-block; width:15px; height:15px; background-color:lightgreen; border:1px solid black;"></span>	υποθετικό NLS στο ποντικίσιο CHTA
<span style="display:inline-block; width:15px; height:15px; background-color:lightcoral; border:1px solid black;"></span>	όμοια αμινοξέα ανάμεσα στο ποντικίσιο και το ανθρώπινο CHTA
<span style="display:inline-block; width:15px; height:15px; background-color:lightblue; border:1px solid black;"></span>	Λυσίνες
<span style="display:inline-block; width:15px; height:15px; background-color:lightorange; border:1px solid black;"></span>	συντηρημένο μοτίβο ανάμεσα σε CHTA ποντικού/ανθρώπου και περιοχής ακετυλίωσης της H4b της Tetrahymena.

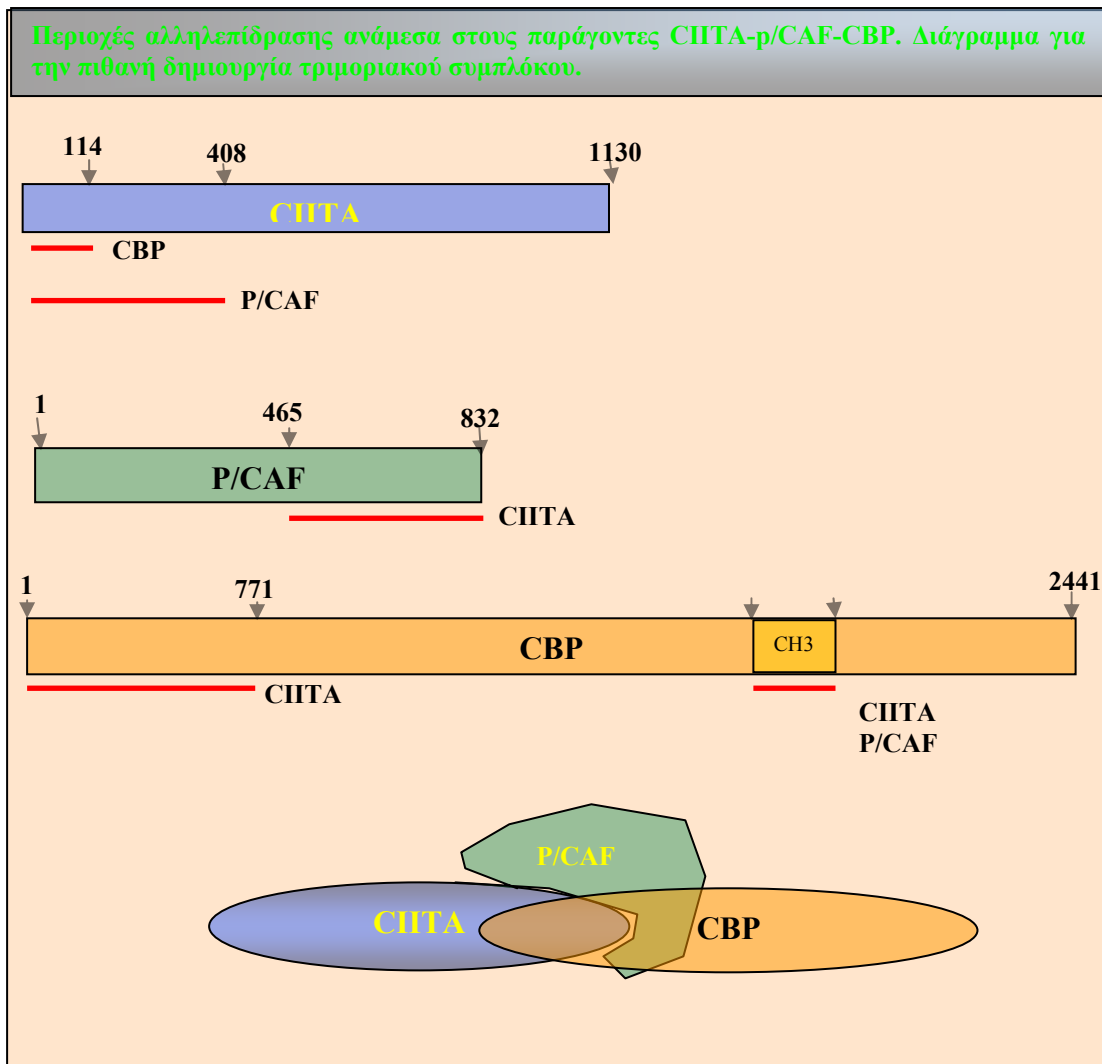
Μια σειρά πειραμάτων πρέπει να γίνουν προκειμένου να απαντηθούν καίρια ερωτήματα που αφορούν τη ρύθμιση της έκφρασης των τάξης II αντιγόνων ιστοσυμβατότητας και της ρύθμιση της δράσης της πρωτεΐνης CHTA από την ακετυλοτρανσφεράση p/CAF. Πρέπει να προσδιοριστούν με ακρίβεια τα κατάλοιπα Λυσίνης στο μόριο του CHTA που ακετυλιώνονται από p/CAF, προκειμένου να αποτιμηθεί ο ρόλος της ακετυλίωσης στη δραστηριότητα του μορίου.

Επίσης πραγματοποιούνται πειράματα παροδικής διαμόλυνσης με φορείς έκφρασης που περιέχουν τους p/CAF και CHTA προκειμένου να εξεταστεί ο ρόλος του p/CAF στην ενεργοποίηση/καταστολή της έκφρασης των τάξης II γονιδίων ιστοσυμβατότητας.

Πρέπει να πραγματοποιηθούν πειράματα χαρακτηρισμού τόσο σήματος πυρηνικής εντόπισης όσο και σήματος εξόδου απ'τον πυρήνα στο μόριο του CHTA. Μπορούν να πραγματοποιηθούν τέτοια πειράματα με την κατασκευή χιμαιρικών μορίων με GFP.

Τέλος πρέπει να αναφερθεί ότι πραγματοποιείται η δημιουργία κατασκευής για τη δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών στο εργαστήριό μας, που θα ενισχύσει την ιστοειδική υπερέκφραση της μεταλλαγής Δ102 σε Β κύτταρα, που όπως είναι γνωστό εκφράζουν συστατικά CHTA, και η μεταλλαγή Δ102 λειτουργεί σαν επικρατές κατασταλτικό μετάλλαγμα (dominant negative mutant).

Στο παρακάτω σχήμα υποδεικνύονται οι περιοχές αλληλεπίδρασης ανάμεσα στους πρωτεϊνικούς παράγοντες CHTA, p/CAF και CBP, καθώς και ένα υποθετικό σχήμα για τη δημιουργία ενός τριμοριακού συμπλόκου.



## Συμπεράσματα

- Οι μεταλλαγές του CIPTA N114(περιλαμβάνει τα πρώτα 114 όξινα αμινοξέα-περιοχή ενεργοποίησης του CIPTA) καθώς και η μεταλλαγή Δ102(ελλείπουν τα πρώτα 102 αμινοξέα) δρουν σαν ενεργά κατασταλτικά μόρια της συστατικής ή επαγόμενης μεταγραφής των τάξης II γονιδίων ιστοσυμβατότητας.
- Ο υποκυτταρικός εντοπισμός του ακέραιου μορίου CIPTA σε σύντηξη με GFP είναι κυτταροπλασματικός, της μεταλλαγής N114 είναι διάχυτος κυτταροπλασματικός και πυρηνικός, ενώ της μεταλλαγής Δ102 είναι πυρηνικός. Πιθανά στην αμινοξική περιοχή 1-102 υπάρχει ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού. Τα πειράματα αυτά συνεχίζονται.
- Ο CIPTA αλληλεπιδρά με τον p/CAF με την αμινοξική περιοχή που περιλαμβάνει τα πρώτα 408 αμινοξέα της πρωτεΐνης.
- Ο p/CAF αλληλεπιδρά με το CIPTA μέσω της καρβοξυτελικής περιοχής (αμινοξέα 370-832) της πρωτεΐνης.
- Η πρωτεΐνη CIPTA ακετυλιώνεται από τον p/CAF στην αμινοξική περιοχή 115-298, που περιλαμβάνει 7 κατάλοιπα λυσίνης που πιθανά ακετυλιώνονται.



## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Balbas, M., Bannister, A., Martin, K., Haus-Seuffert, P., Meisterernst, M., and Kouzarides, T. (1998). The acetyltransferase activity of CBP stimulates transcription. *EMBO Journal* *17*, 2886-2893.
- Bannister, A., and Kouzarides, T. (1996). The CBP-coactivator is a histone acetyltransferase. *Nature* *384*, 641-643.
- Blanco, J., Minucci, S., Lu, J., Yang, X., Walker, K., Chen, H., Evans, R., Nakatani, Y., and Ozato, K. (1998). The histone acetylase p/CAF is a nuclear receptor coactivator. *Genes & Development* *12*, 1638-1651.
- Boss, J. (1997). Regulation of transcription of MHC class II genes. *Current Opin.Immunol.* *9*, 107-113.
- Brownell, J., Zhou, J., Ranelli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D., Roth, S., and Allis, C. (1996). Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5 linking histone acetylation to gene activation. *Cell* *84*, 843-851.
- Chen, H., Lin, R., Schiltz, R., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M., Nakatani, Y., and Evans, R. (1997). Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with p/CAF and CBP/p300. *Cell* *90*, 569-580.
- Chin, K., Li, G., and Ting, J. (1997). Activation and transdominant suppression of MHC class II and HLA-DMB promoters by a series of C-terminal class II transactivator deletion mutants. *J.Immunol.* *159*, 2789-2794.
- Chin, K. C., Li, G. G., and Ting, J. P. (1997). Importance of acidic, proline/serine/threonine-rich, and GTP-binding regions in the major histocompatibility complex class II transactivator: generation of transdominant-negative mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *94*.
- Dingwall, C., and Laskey, R. (1991). Nuclear targeting sequences- a consensus? *TIBS* *16*, 478-481.
- Fisher, U., Huber, J., Boelens, W., Mattaj, I., and Luhrmann, R. (1995). The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* *82*, 475-483.
- Fontes, J., Jiang, B., and Peterlin, B. (1997). The class II trans-activator CIITA interacts with the TBP- associated factor TAFII32. *Nucleic.Acid.Res.* *25*, 2522-2528.
- Fukuda, M., Gotoh, I., Gotoh, Y., and Nishida, E. (1996). Cytoplasmic localization of Mitogen-activated protein kinase directed by its NH<sub>2</sub>-terminal, Leucine-rich short amino acid sequence, which acts as a nuclear export signal. *J.Biol.Chem.* *271*, 20024-20028.

- Glass, C., Rose, D., and Rosenfeld, M. (1997). Nuclear receptors coactivators. *Current Opinion in Cell Biology* 9, 222-232.
- Glimcher, L. H., and Kara, C. J. (1992). Sequences and factors: a guide to MHC class-II transcription. *Annu. Rev. Immunol.* 10, 13-49.
- Grant, P., Schieltz, D. Pray-Grant, M., Steger, D., Reese, J., Yates, J., Workman, J. A subset of TAFIIs are integral components of the SAGA complex required for nucleosome acetylation and transcriptional stimulation. *Cell* 94, 45-53.
- Grunstein, M. (1975). Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *PNAS* 72, 3961-3964.
- Grunstein, M.(1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 389, 349-352.
- Gu, W., and Roeder, R. (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*.
- Herrera, J., Bergel, M., Yang, X., and Nakatani, Y. (1997). The histone acetyltransferase activity of human GCN5 and pCAF is stabilized by coenzymes. *J.Biol.Chem.* 272, 27253-27258.
- Holmes, D. (1981). A rapid boiling method for preparation of bacterial plasmids. *Anal.Biochem.* 119, 93-95.
- Korzus, E., Torchia, J., Rose, D., Xu, L., Kurokawa, R., McInerney, E., Mullen, T., Glass, C., and Rosenfeld, M. (1998). Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science* 279, 703-707.
- Kretsovali, A., Agalioti, T., Spilianakis, C., Tzortzakaki, E., Merika, M., and Papamatheakis, J. (1998). Involvement of CREB binding protein (CBP) in the expression of the Major Histocompatibility Class II genes via interaction with the class II transactivator (CIITA). *Mol.Cel.Biol.* *in press*.
- Kuo, M., Allis, C. (1998) Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* 20, 615-626.
- Kurokawa, R., Kalafus, D., Ogliastro, M., Kioussi, C., Xu, L., Torchia, J., Rosenfeld, M., and Glass, C. (1998). Differential use of CREB binding protein-coactivator complexes. *Science* 279, 700-703.
- Latron, F., Jotterand, B., Maffei, A., Scarpellino, A., Bernard, M., Strominger, J., and Accolla, R. (1988). Active suppression of MHC class II gene expression during differentiation from B cells to plasma cells. *PNAS* 85, 2229-2233.
- Lechler, R. (1994). HLA and disease. Academic press.

- Luger, K., Mader, A., Richmond, R., Sargent, D., Richmond, T. (1997) Crystallization of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-260.
- Mach, B., Steimle, V., Martinez-Soria, E., and Reith, W. (1986). Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 301-331.
- Mahanta, S., Scholl, T., Yang, F., and Strominger, J. (1997). Transactivation by CIITA, the type II bare lymphocyte syndrome-associated factor, requires participation of multiple regions of the TATA box binding protein. *PNAS* 94, 6324-6329.
- Maniatis, T., and Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. ed. C.S. Harbor, New York.
- Mermoud, N., O'Neill, T., Kelly, T., and Tijian, R. (1989). The proline rich transcriptional activator of CTF/NF-1 is distinct from the replication and DNA binding domain. *Cell* 58, 741-745.
- Mizzen, C., and al, e. (1996). The TAFII250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* 87, 1261-1270.
- Nakienly, S., and Dreyfuss, G. (1997). Nuclear export of proteins and RNAs. *Current Opin. Cel. Biol.* 9, 420-429.
- Ogryzko, V., Kotani, T., Zhang, X., Schiltz, R., Yang, X., Howard, B., Qin, J., and Nakatani, Y. (1998). Histone-like TAFs within the p/CAF histone acetylase complex. *Cell* 94, 35-44.
- Ogryzko, V., Schiltz, R., Russanova, V., Howard, B., and Nakatani, Y. (1996). The transcription coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87, 953-959.
- Reid, J., Bannister, A., Zegerman, P., Martinez-Balbas, M., and Kouzarides, T. (1998). E1A directly binds and regulates the p/CAF acetyltransferase. *EMBO Journal* 17, 4469-4477.
- Reith, W., Kober, 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.
- 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.
- Sambrook, J., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. ed. C.S. Harbor, New York.

- Scholl, T., Mahanta, S., and Strominger, J. (1997). Specific complex formation between the type II bare lymphocyte syndrome-associated transactivators CIITA and RFX5. *PNAS* 94, 6330-6334.
- Shikama, N., Lyon, J., and Thangue, B. (1997). The p300/CBP family: integrating signals with transcription factors and chromatin. *Trends Cel.Biol.* 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.
- Sims, T., Elliott, 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.
- 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., Siegrist, C. A., Mottet, A., Lisowska-Grospierre, B., and Mach, B. (1994). Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 265, 106-109.
- Wade, P., Pruss, D., and Wolffe, A. (1997). Histone acetylation: chromatin in action. *TIBS* 22, 128-132.
- Wen, W., Meinkoth, J., Tsien, R., and Taylor, S. (1995). Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* 82, 463-473.
- Yang, X., 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.
- 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.