



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

**ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΚΑΙ *IN SITU* ΟΡΓΑΝΩΣΗ
ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΟΥ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ
ΦΑΚΕΛΟΥ: Η ΣΥΝΔΕΣΗ HP1-LBR**

**ΜΑΚΑΤΣΩΡΗ ΔΗΜΗΤΡΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

Δ Ι Δ Α Κ Τ Ο Ρ Ι Κ Η Δ Ι Α Τ Ρ Ι Β Η

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2006



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».



Ένταξη για εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής στο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών σπουδών «Βιοτεχνολογία» της κ. Μακατσώρη Δήμητρας: 19-12-2001

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής επιτροπής: 19-12-2001 σύμφωνα με απόφαση της Ειδικής Διατμηματικής Επιτροπής του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Βιοτεχνολογία», έγγραφο του Επιστημονικού Υπευθύνου κ. Ιωάννη Λαζαρίδη Αναπληρωτή Καθηγητή Γενικής Βιολογίας.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Γεωργάτος Σπυρίδων Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, επιβλέπων

Λαζαρίδης Ιωάννης Αναπληρωτής Καθηγητής Γενικής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος

Παπαμαρκάκη Θωμαΐς Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος

Ορισμός Θέματος: 19-12-2001

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Γεωργάτος Σπυρίδων	Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καναβάρος Παναγιώτης	Καθηγητής Ανατομίας που καλύπτει και την ιστολογία -εμβρυολογία Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Σεφεριάδης Κωνσταντίνος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Φώτης Θεόδωρος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Λαζαρίδης Ιωάννης	Αναπληρωτής Καθηγητής Γενικής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Παπαμαρκάκη Θωμαΐς	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Πολίτου Αναστασία	Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

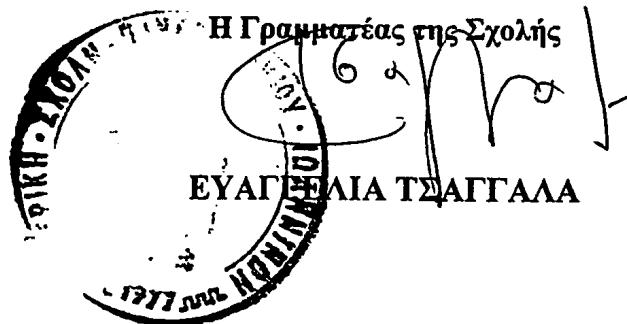


Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 12-12-2006

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Επαμεινώνδας Τσιάνος

Καθηγητής Παθολογίας



Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων με επιβλέποντα καθηγητή τον Καθηγητή Βιολογίας Σπυρίδωνα Δ. Γεωργάτο. Πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Επιχειρησιακού Προγράμματος Έρευνας και Τεχνολογίας με κωδικό 01ΕΔ56 και ενταγμένο στην πράξη ΠΕΝΕΔ του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανταγωνιστικότητα» (ΕΠΑΝ) με τίτλο: «ΝΕΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ - Η ΕΤΕΡΟΧΡΩΜΑΤΙΝΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ 1 ΚΑΙ Η Β-ΤΟΥΜΠΟΥΛΙΝΗ ΩΣ ΔΕΙΚΤΕΣ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΚΑΙ ΑΠΑΝΤΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗΝ ΑΓΩΓΗ ΜΕ ΤΑΞΟΛΗ» και Επιστημονικό Υπεύθυνο τον Σπυρίδωνα Δ. Γεωργάτο .



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Κοιτάζοντας πίσω είμαι σίγουρη ότι το απόλαυσα. Σε πολλά και διαφορετικά επίπεδα. Στη δουλειά μέσα στο εργαστήριο, στις ανθρώπινες σχέσεις που δημιουργήθηκαν και καταστράφηκαν. Όλα αυτά αποτέλεσαν μία καινούργια ανάγνωση για τον εαυτό μου και τους ανθρώπους. Έκανα πάρα πολλά λάθη και ήμουν πολύ αυστηρή και απαιτητική με τους άλλους.

Θέλω να ξεχωρίσω μερικούς ανθρώπους. Καταρχήν το αφεντικό μου Σπύρο Γεωργάτο. Παρόλο που πιστεύω ότι ίδια είναι τα αφεντικά δεξιά και αριστερά, για μένα ήταν κάτι περισσότερο από αυτό. Τον ευχαριστώ απεριόριστα για τη στήριξη, τις συμβουλές, και κυρίως την έμπνευση. Ήταν μοναδική η εμπειρία να δουλεύω μαζί του και νομίζω ότι όχι μόνο δεν θα το ξεχάσω αλλά και δεν θα το ξαναβρώ.

Δεν θα μπορούσα να μην αναφέρω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γιάννη Λαζαρίδη που η γλυκύτητά του και το ενδιαφέρον του ήταν συγκινητικό. Επίσης, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Παναγιώτη Κούκλη που με βοήθησε εξαιρετικά στην εμπλοκή που χρειάστηκε να έχω με τα ποντίκια εξ Αμερικής και επίσης για τις ενδιαφέρουσες κουβέντες για μουσικές και ταινίες.

Από τα παιδιά στο εργαστήριο θα ήθελα να ξεκινήσω από τον Γιάννη (Ioannis) Γιαννιό που ήταν μεγάλη μου χαρά να συνεργαστώ μαζί του. Τον ευχαριστώ πολύ για τη βοήθειά του. Μου θύμιζε παλιές καλές εποχές και ότι υπάρχει ακόμα ελπίδα. Τη Νάνσυ Σαλμά που ήταν σημαντικό στήριγμα και ένας άνθρωπος απλόχερος με πολύ μεγάλη καρδιά. Τι να πω για τον Γιώργο Διαλυνά! Πρέπει να μιλάω για μέρες και πάλι δεν θα μου φτάνει. Σπουδαίο συντροφάκι, χωρίς αυτόν δεν μπορώ να φανταστώ πως θα τα είχα καταφέρει. Έχουμε περάσει πάρα πολλά μαζί, του χρωστάω αμέτρητα πράγματα, μου έδινε ηρεμία και κουράγιο και του ζητάω συγγνώμη για όλα αυτά που χρειάστηκε να αντέξει. Τώρα που θα φύγω μου φαίνεται σχεδόν απίστευτο ότι δεν θα τον βλέπω κάθε μέρα, να γελάμε και να στεναχωριόμαστε μαζί, να γίνονται τα πράγματα με όρεξη, κέφι και συναδελφικότητα με την πραγματική έννοια της λέξης.

Στήριγμα μεγάλο η Νίκη Κουρμούλη, η πρώτη μου δασκάλα και ίσως ο πιο δικός μου άνθρωπος. Με έμαθε πολλά γράμματα και με το παράδειγμά της μου δίδαξε το μεράκι, τον ενθουσιασμό για τη δουλειά, την ευχαρίστηση που μπορείς να πάρεις και τον «διαφορετικό» τρόπο σε αυτές τις δύσκολες εποχές για πρίγκιπες. Θέλει αρετή και τόλμη η ελευθερία!

Επίσης, οι άνθρωποι έξω από το εργαστήριο που χωρίς αυτούς θα ήταν πολύ δύσκολο να συνεχίσω και να χαμογελώ. Πρώτα απ' όλα το Παπίκ, ο σύντροφός μου, που έχει στηρίξει τις επιλογές μου με τον δικό του τρόπο, με καταλαβαίνει όπως κανείς άλλος και τον ευχαριστώ που ποτέ δεν ξέχασε να μου δείχνει την αγάπη του. Η Βίκη, η Αννούλα και ο Αντώνης, μοναδική πάστα ανθρώπων που τους αγάπησα πολύ και θα μου λείψουν απίστευτα.

Και φυσικά η Κίκα, ο σκύλος μου, που θέλω να της ζητήσω συγγνώμη που θα την εγκαταλείψω τώρα που φεύγω για τα ξένα.

Πολλά ευχαριστώ στους γονείς μου και τον αδερφό μου για την στήριξη όλα αυτά τα χρόνια. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επταμελή μου επιτροπή για την κριτική της στάση και το ενδιαφέρον της για τη συγκεκριμένη εργασία.

«Και εις την σκοτιάν βαθειάν, εις το απέραντον διάστημα, τα φώτα σιγαλέα, κινώνται των αστέρων, λελυπημένα.»

Ο Ωκεανός- Ωδαι, Ανδρέας Κάλβος



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελίδα

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
1.1	Οργάνωση της χρωματίνης	5
1.2	Χρωματίνη και Ιστονικός Κώδικας	9
1.3	Δυναμική νουκλεοσωμάτων (Nucleosome dynamics)	14
1.3A	Εγγενής δυναμική νουκλεοσωμάτων (Intrinsic nucleosome dynamics)	15
1.3B	Αποδιάταξη των νουκλεοσωμάτων που διαμεσολαβείται από πρωτεΐνες (Protein-mediated nucleosome dissociation)	15
1.3Γ	Ανταλλαγή ιστονών (Core Histone exchange)	16
1.3Δ	Αντικατάσταση ισομορφών ιστονών (Histone variant exchange)	17
1.4	Οι πρωτεΐνες HP1	19
1.4.1	Δομή και λειτουργικός ρόλος της HP1	19
1.4.2	Σχέσεις δομής και λειτουργίας των πρωτεϊνών HP1	20
1.4.3	HP1 και συγκρότηση της χρωματίνης (Chromatin assembly)	25
1.4.4	Αλληλεπιδράσεις HP1-πυρηνικού φακέλου	27
1.4.5	Ο ρόλος των πρωτεϊνών HP1 στη λειτουργία κεντρομερών και τελομερών	29
1.4.6	Η HP1 και η συσχέτισή της με το μεταστατικό δυναμικό	30
1.5	Μορφολογία, δομική οργάνωση και λειτουργία του κυτταρικού πυρήνα	31
1.6	Οργάνωση και λειτουργία του πυρηνικού φακέλου	32
1.7	Πυρηνικός φάκελος και ασθένειες	38
1.8	Στόχοι της παρούσας μελέτης	44
2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	45
2.1	Αντισώματα και πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν στη διάρκεια της μελέτης	45
2.2	Μέθοδοι καλλιέργειας κυττάρων	46
2.2.1	Συγχρονισμός κυττάρων	47



2.2.2	Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών	47
2.2.2A	Μικροενέσεις-Αυτοματοποιημένο σύστημα μικροενέσεων (AIS2)	47
2.2.2B	Ηλεκτροδιαπίδυση (Electroporation)	48
2.2.2Γ	Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών με τη μέθοδο του φωσφορικού ασβεστίου	48
2.3	Παρασκευαστικές Μέθοδοι	48
2.3.1	Παραγωγή ανασυνδυασμένων χμαιοικικών GST πρωτεϊνών	48
2.3.2	Παραγωγή ανασυνδυασμένων χμαιοικικών His πρωτεϊνών	49
2.3.3A	Παραγωγή ανασυνδυασμένης ιστόνης H3 και H4	49
2.3.3B	Εξισορρόπηση σφαιριδίων SP-sepharose	50
2.3.4	Απομόνωση πυρήνων από ερυθροκύτταρα γαλοπούλας	50
2.3.5	Παρασκευή πυρηνικών φακέλων από πυρήνες ερυθροκυττάρων γαλοπούλας	51
2.3.5A	Με χρήση του ενζύμου DNase I	51
2.3.5B	Με χρήση του ενζύμου μικροκοκκικής νουκλεάσης MNase	51
2.3.6	Παρασκευή κυτταρικών και πυρηνικών εκχυλισμάτων	52
2.3.7	Παρασκευή εκχυλισμάτων από κύτταρα HeLa που βρίσκονται στο όριο G1/S φάσης	52
2.4	Βιοχημικές μέθοδοι	52
2.4.1	Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών	52
2.4.2	Ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (Native gel electrophoresis)	53
2.4.3	Χρώση πηκτών πολυακρυλαμιδίου	53
2.4.4	Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά western (western blotting)	53
2.4.5	Συγκατακρήμνιση πρωτεϊνών με σφαιρίδια γλουταθειόνης-αγαρόζης (pull-down)	54
2.4.6	Καθαρισμός ενδογενούς LBR και χρωματογραφία συγγένειας σε Affi-Gel υποστρώματα (matrices)	55
2.4.7	Δοκιμασίες χημικής διασύνδεσης (Cross-linking)	55
2.4.8	Πειράματα πέψης με τη χρήση του ενζύμου τρυψίνη	55
2.4.9	Πλεύση πυρηνικών φακέλων σε βαθμίδωση σακχαρόζης	56
2.4.10	Ανάλυση εκχυλισμάτων με βαθμίδωση σακχαρόζης	56



2.5	Μοριακές μέθοδοι	56
2.5.1	Απομόνωση RNA και RT-PCR	56
2.5.2	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	57
2.5.3	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης	57
2.5.4	Απομόνωση DNA από καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας	57
2.5.5	Μετασηματισμός βακτηρίων με τη μέθοδο του θερμικού «σοκ»	58
2.6	Μορφολογικές μέθοδοι	58
2.6.1	Έμμεσος ανοσοφθορισμός	58
2.6.2	Ανίχνευση κυττάρων που βρίσκονται στην S φάση	59
2.6.3	Συνεστιακή μικροσκοπία	59
2.6.4	Ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία	59
2.7	Παρασκευή πολυκλωνικών αντισωμάτων	60
2.8	Φασματοσκοπία μάζας	60
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	61
3.1	Ανίχνευση γενωμικών περιοχών της HP1α και HP1β σε καρκινικά και μετασηματισμένα κύτταρα	61
3.2	Αλληλεπιδράσεις της HP1 με απομονωμένες ιστόνες και ιστονικά πεπτίδια	64
3.3	Αλληλεπιδράσεις της HP1 με τμήματα χρωματίνης	66
3.4	Αλληλεπιδράσεις της HP1 με ακέραια νουκλεοσώματα (particles) και υποσωματίδια (sub-particles) ετεροχρωματινικής προέλευσης	69
3.5	Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της ιστόνης H3 που αλληλεπιδρά με την HP1	74
3.6	Ενσωμάτωση της HP1 στη χρωματίνη υπό <i>in vivo</i> συνθήκες	76
3.7	Ο LBR αλληλεπιδρά με την περιφερική ετεροχρωματίνη	81
3.8	Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της χρωματίνης που αλληλεπιδρά με τον LBR	82
3.9	Ο LBR ολιγομερίζεται υπό <i>in vitro</i> συνθήκες	87
3.10	Ο LBR εντοπίζεται σε διακριτές νησίδες του πυρηνικού φακέλου υπό <i>in vivo</i> συνθήκες	90



3.11	Ετερόζυγες μεταλλάξεις επηρεάζουν την οργάνωση του LBR και την καθόλου δομή του πυρήνα	90
4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	95
4.1	Καρκινικός φαινότυπος και πρότυπα έκφρασης της HP1	95
4.2	Η μεθυλίωση της λυσίνης 9 στην ιστόνη H3 ως καθοριστικός παράγοντας αλληλεπίδρασης με την HP1β	95
4.3	Η ενσωμάτωση της HP1 στη χρωματίνη συμβαίνει μέσω πολλαπλών οδών	96
4.4	LBR και επιγενετικά χαρακτηριστικά της χρωματίνης	97
4.5	Αλληλεπιδράσεις LBR-LBR και σχηματισμός νησίδων στον πυρηνικό φάκελο	98
5	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	101
6	ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ	103
7	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	107



1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Οργάνωση της χρωματίνης

Στα κύτταρα των ευκαρυωτικών οργανισμών, το επίμηκες μόριο του DNA «συμπυκνώνεται» μέσα σε ένα μικρό κυτταρικό διαμέρισμα όπως είναι ο πυρήνας. Κατά τη διάρκεια της μεσόφασης, το γενετικό υλικό απαντάται ως ένα νουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο το οποίο ονομάζεται χρωματίνη. Η χρωματίνη, ανάλογα με το βαθμό συμπύκνωσής της και το πόσο ενεργή είναι μεταγραφικά, διακρίνεται σε ετεροχρωματίνη (ανενεργή και πιο συμπυκνωμένη) και ευχρωματίνη (ενεργή και λιγότερο συμπυκνωμένη). Οι όροι ετεροχρωματίνη και ευχρωματίνη ορίσθηκαν για πρώτη φορά από τον E. Heitz ως δύο περιοχές του μεσοφασικού πυρήνα που έχουν διακριτή και χαρακτηριστική μορφολογία. Η ετεροχρωματίνη αντιγράφεται προς το τέλος της S φάσης, περιέχει υπο-ακετυλιωμένες ιστόνες και υψηλό ποσοστό μεθυλιωμένου DNA. Η ετεροχρωματίνη διαχωρίζεται περαιτέρω σε περικεντρομεριδιακή ή συστατική (constitutive) και σε περιστασιακή (facultative). Η συστατική ετεροχρωματίνη συγκεντρώνεται γύρω από τα κεντρομερή, περιέχει μεγάλης έκτασης περιοχές με α-δορυφορικές επαναλήψεις και διακρίνεται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο από την ηλεκτροσκοιρότητά της (electron dense). Η περιστασιακή ετεροχρωματίνη είναι αποσιωπημένη κατά μη αναστρέψιμο τρόπο και παραμένει ανενεργή και συμπυκνωμένη κατά τη διάρκεια της μεσόφασης σε όλους τους κυτταρικούς τύπους. Η συστατική ετεροχρωματίνη έχει τη δυνατότητα να επανέλθει σε μία μεταγραφικά ενεργή κατάσταση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το αδρανοποιημένο χρωμόσωμα X. Επίσης υπάρχει και η περιφερική ετεροχρωματίνη που επενδύει την εσωτερική πυρηνική μεμβράνη (Εικ. 1).

Από εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου προκύπτει ότι στο πρώτο επίπεδο συμπύκνωσης η χρωματίνη οργανώνεται σε δομές που περιγράφονται από τον όρο «χάντρες κομπολογιού» (beads-on-a-string) που αποτελούν την ίνα των 10 nm (Σχήμα 1). Η ίνα των 10 nm συσπειρώνεται περαιτέρω στην ίνα των 30 nm. Δεν είναι ακόμη σαφές πώς διατάσσονται τα νουκλεοσώματα στην ίνα αυτή. Η ίνα των 30 nm οργανώνεται περαιτέρω σε βρόχους (loops) που προεξέχουν από ένα κεντρικό άξονα. Τελικά, αυτή η αλυσίδα των βρόχων υπόκειται σε επαλέον «συμπύκνωση» για να σχηματίσει το μιτωτικό χρωμόσωμα.



Η βασική υπομονάδα της χρωματίνης είναι τα νουκλεοσώματα τα οποία ακολουθούν ένα κοινό δομικό πρότυπο σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Τα νουκλεοσώματα συνδέονται μεταξύ τους με συνδετικό DNA (linker DNA) που το μήκος του ποικίλλει από 8 bp έως και 114 bp ανά νουκλεόσωμα. Το συνδετικό DNA φιλοξενεί ένα μόριο ιστόνης H1 που βρίσκεται στο σημείο εισόδου και εξόδου του DNA στο νουκλεόσωμα. Κρυσταλλογραφικές μελέτες κατέληξαν σε ένα θεμελιώδες δομικό μοντέλο, όπου κάθε νουκλεόσωμα προσομοιάζεται ως ένα «κοντό βαρέλι» διαστάσεων 100x50 Å, το οποίο περιβάλλεται από 1.65 στροφές υπερ-ελικωμένου DNA. Το σύνολο της δομής χωρίζεται σαφώς σε τρεις διακριτές υπομονάδες. Το κέντρο καταλαμβάνει ένα τετραμερές ιστονών (H3-H4)₂, ενώ στις δύο άκρες εντοπίζονται δύο διμερή των ιστονών H2A-H2B (Εικ. 2).



Εικόνα 1. Ηλεκτρονική φωτογραφία μεσοφασικού πυρήνα. (1) Ευχρωματίνη (ηλεκτροδιαγωγείς περιοχές), (2) Ετεροχρωματίνη (ηλεκτροσκοπιές περιοχές), (3) Περιφερική ετεροχρωματίνη, (4) Πυρηνίσκος, (5) Ετεροχρωματίνη της περιφέρειας του πυρηνίσκου, (6) Πυρηνικοί πόροι, (7) Πυρηνικός φάκελος. (J.A.G., Rhodin, Histology, 1974, Oxf. Univ. Press.)

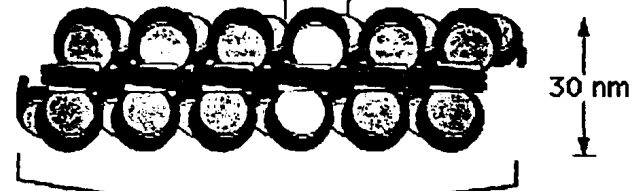
μα μικρή περιοχή της διπλής έλικας του DNA



χρωματίνη στη μορφή «χάντρες κομπολογιού»



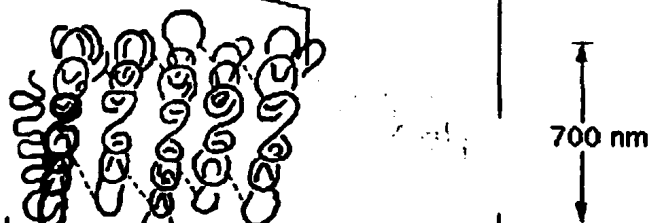
ένα χρωματίνης διαμέτρου 30 nm από συσκευασμένα νουκλεοσωμάτια



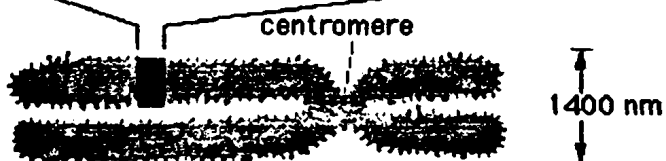
διατομή ενός χρωμοσώματος σε εκτεταμένη μορφή



διατομή ενός συμπυκνωμένου χρωμοσώματος

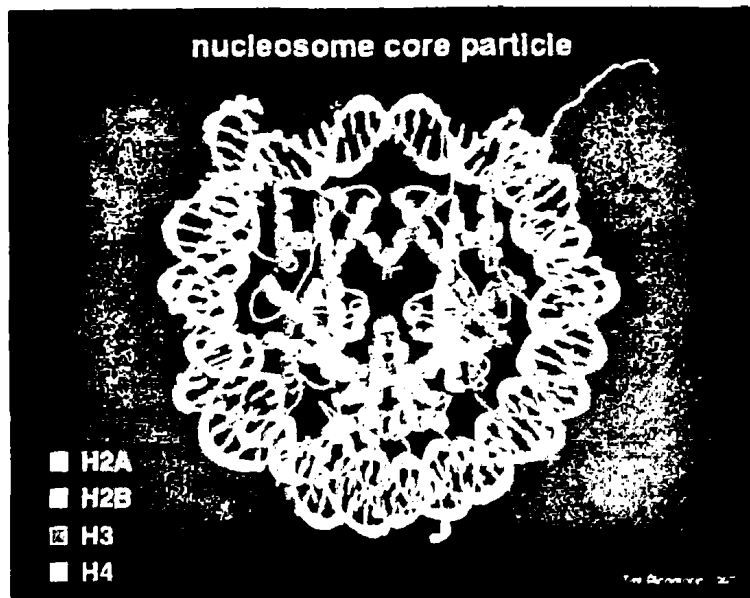


ένα ολόκληρο μιτωτικό χρωμόσωμα



Σχήμα 1. Σχηματική αναπαράσταση των διαφορετικών επιπέδων ιεραρχικής οργάνωσης και «συσκευασίας» της χρωματίνης ενός μεταφασικού χρωμοσώματος (Molecular Biology of the Cell, 4th Edition, Alberts et al, Garland Press).





Εικόνα 2. Μοντέλο της δομής του νουκλεοσώματος, το οποίο περιλαμβάνει τις πυρηνικές (core) ιστόνες και το περιελιγμένο DNA. (Tim Richmond, 1997)

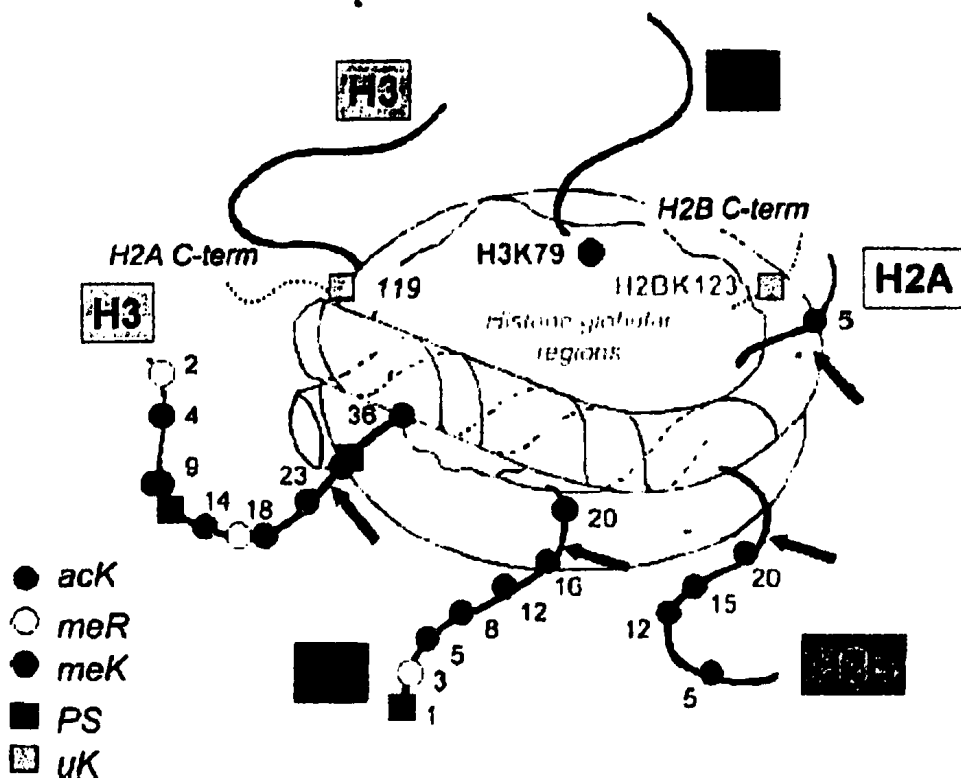
Οι ιστόνες H3 και H4 είναι πολύ συντηρημένες εξελικτικά και επιτελούν την ίδια λειτουργία σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Οι H2A και H2B εμφανίζουν ειδο-ειδική ποικιλομορφία ως προς την αμινοξική τους αλληλουχία. Η ιστόνη H1 περιλαμβάνει ένα σύνολο συγγενικών πρωτεϊνών που εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ διαφορετικών ιστών και ειδών. Οι πυρηνικές ιστόνες είναι πλούσιες σε θετικά φορτισμένα αμινοξέα, όπως η λυσίνη και η αργινίνη. Τη δομή των ιστονών χαρακτηρίζουν τρία δομικά μοτίβα : (α) το κεντρικό τμήμα τριών α ελίκων (histone fold) στην κεντρική θέση του μορίου, (β) τα εκτός ελίκων τμήματα (extra-fold structured elements) που ποικίλουν σε κάθε ιστόνη, και (γ) οι εύκαμπτες αμινοτελικές «ουρές» που επίσης ποικίλουν σε μήκος από 13 έως 42 αμινοξέα. Τα histone folds των ιστονών οργανώνονται σε διατάξεις “handshake” από τις οποίες προκύπτουν τα ετεροδιμερή H2A-H2B και H3-H4 (1).

1.2 Χρωματίνη και Ιστονικός Κώδικας

Η χρωματίνη, το φυσιολογικό υπόστρωμα μέσα στο οποίο αποθηκεύεται η γενετική πληροφορία, υπόκειται σε μία πολύ μεγάλη ποικιλία μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων κυρίως στα αμινοξικά κατάλοιπα των «ουρών» των ιστονών. Οι τροποποιήσεις αυτές δεν αποτελούν μόνο ένα μηχανισμό αναδιοργάνωσης του νουκλεοσώματος, αλλά και μία πιθανή πηγή πληροφορίας. Έχει προταθεί ότι συγκεκριμένες τροποποιήσεις ή συνδυασμοί τους, συγκροτούν ένα επιγενετικό σύστημα σημάτων που ονομάζεται «ιστονικός κώδικας». Ο κώδικας αυτός προσδιορίζει ή αντιστοιχεί σε διαφορετικές χρωματινικές καταστάσεις, μεταγραφικά ενεργές ή ανενεργές. Οι διαφορετικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις κατατάσσονται σε ευχρωματινικού τύπου που αντιστοιχούν σε μεταγραφικά ενεργή κατάσταση (on) και σε ετεροχρωματινικού τύπου που προσιδιάζουν σε μεταγραφικά ανενεργή (off) κατάσταση. Οι βασικές τροποποιήσεις είναι η μεθυλίωση, η ακετυλίωση, η φωσφορυλίωση, η ουβικουιτινιλίωση, η σουμοϋλίωση, η κιτρουλινίωση και η ADP-ριβοσυλίωση (Σχήμα 2). Τα τελευταία χρόνια έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί πολλά ένζυμα που καταλύουν ανάλογες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως την ακετυλίωση (Histone Acetyl Transferases, HATs), τη μεθυλίωση (Histone Methyl Transferases, HMTs) και τη φωσφορυλίωση (ATP-εξαρτώμενες κινάσες). Η εικόνα που έχουμε για τις αντίστοιχες πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για την ουβικουιτινιλίωση, τη σουμοϋλίωση και την κιτρουλινίωση δεν είναι σαφής.

Οι πιθανές διαστάσεις του συνδυαστικού ρεπερτορίου μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων του ιστονικού κώδικα είναι τεράστιες. Για παράδειγμα, η μεθυλίωση των 5 αμινοξικών καταλοίπων λυσίνης στην αμινοτελική ουρά της ιστόνης H3 μπορεί να δώσει 15×10^3 διαφορετικούς συνδυασμούς, ενώ όλες οι δυνατές τροποποιήσεις στις λυσίνες, αργινίνες, σερίνες και θρεονίνες που βρίσκονται στην ίδια περιοχή δίνει τον αστρονομικό αριθμό των 256×10^6 συνδυασμών. Συνεπώς, ακόμα και εάν μόνο το 1% των προβλέψιμων συνδυασμών υφίστανται *in vivo*, η «ανάγνωση» και η «μετάφραση» των τροποποιήσεων αυτών θα ήταν αδύνατη χωρίς τη βοήθεια ειδικών «αποκωδικοποιητών». Πρόσφατες μελέτες έχουν αποκαλύψει έναν αριθμό πρωτεϊνών που συνδέονται με χρωματίνη και αλληλεπιδρούν με ειδικά τροποποιημένες ιστόνες αποκωδικοποιώντας έτσι τις πληροφορίες του ιστονικού κώδικα. Τα μόρια αυτά που ονομάζονται από κοινού “effector molecules”, συχνά αποτελούν μέρη μεγάλων ενζυματικών συμπλόκων και περιέχουν ειδικά μοτίβα που είναι γνωστά ως bromo-, tudor-, chromo- και PHD domains.





Σχήμα 2. Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που απαντώνται στις ιστόνες (Turner, 2002).

Τα bromodomains συγκροτούν μία δομική οικογένεια και απαντώνται σε πολλές ακετυλ-τρανσφεράσες των ιστονών (HATs), σε παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης (π.χ Swi2, Gcn5 και Taf1), ή σε μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο TAF_{II}250. Οι περιοχές αυτές προσδέονται σε ακετυλιωμένες λυσίνες. Η δομή τους περιγράφεται από ένα αριστερόστροφο δεμάτιο τεσσάρων ελίκων (four-helix bundle) που δημιουργεί μία υδροφοβική σχισμή (rocket) η οποία φιλοξενεί την ακετυλιωμένη λυσίνη. Η στρατολόγηση και η σταθεροποίηση των συμπλόκων που περιέχουν bromodomains στη χρωματίνη στη θέση του εκκινητή (promoter chromatin) είναι πολύ σημαντική για την αποτελεσματική ενεργοποίηση της μεταγραφής πολλών γονιδίων (2-4). *In vitro* μελέτες έδειξαν ότι η πρόσδεση της ακετυλιωμένης λυσίνης στο bromodomain είναι πολύ ασθενική, αλλά ενισχύεται σημαντικά από την παρουσία bromodomains που είναι διαταγμένα εν σειρά και αλληλεπιδρούν ταυτόχρονα με πολλαπλές ακετυλιωμένες θέσεις. Για παράδειγμα, το πολυπρωτεϊνικό

σύμπλοκο TAF_{II}250 που συμμετέχει στη συγκρότηση της μεταγραφικής μηχανής διαθέτει δύο bromodomains εν σειρά. Υπάρχουν όμως και άλλα παραδείγματα διαδοχικών ακετυλίωσεων σε λυσίνες των ιστονών H3 και H4 από σύμπλοκα που περιέχουν bromodomains, με πιο χαρακτηριστικό την ακετυλίωση σε λυσίνες στον υποκινητή IFN-β από την GCN5 HAT στις θέσεις K8 της H4, K9 της H3 και K14 της H3 (2). Η ακετυλίωση αναστρέφεται από ειδικές απο-ακετυλάσες HDACs (Histone Deacetylases). Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η Sir2 που αναστρέφει την ακετυλίωση της K16 στην ιστόνη H4.

Τα chromodomains έχουν ειδικότητα για μεθυλιωμένες λυσίνες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα πρωτεϊνών που περιέχουν chromodomains είναι η Heterochromatin Protein 1 (HP1) και η Polycomb (Pc) (5). Και οι δύο αυτές πρωτεΐνες εμπλέκονται σε διαδικασίες γονιδιακής αποσιώπησης. Συγκεκριμένα, το chromodomain της πρωτεΐνης HP1 αλληλεπιδρά με την τριμεθυλιωμένη λυσίνη 9 της ιστόνης H3. Η μεθυλίωση της λυσίνης 9 καταλύεται από έναν αριθμό διαφορετικών ενζύμων όπως η Suv39h, η G9a, η ESET, και η GLP/Eu-HMTase1. Τα ένζυμα αυτά περιέχουν ένα τμήμα SET που είχε αρχικά αναγνωριστεί ως μία κοινή ακολουθία αμινοξέων σε πρωτεΐνες της *Drosophila* όπως η Su(Var)3-9, η E(z) και η Trithorax και θεωρείται απαραίτητο για την ειδική μεθυλίωση της λυσίνης. Το τμήμα SET αποτελείται από 130 αμινοξέα που σχηματίζουν τρία διακριτά β φύλλα και πλαισιώνονται εκατέρωθεν από α-έλικες.

Η πρωτεΐνη Polycomb αλληλεπιδρά με την τριμεθυλιωμένη λυσίνη 27 της ιστόνης H3 και εμπλέκεται στην αποσιώπηση ομοιοτικών (homeobox) γονιδίων που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εμβρυϊκή ανάπτυξη. Η πρωτεΐνη Polycomb αποτελεί μέρος του συμπλόκου PRC1 που σταθεροποιεί τη δομή της χρωματίνης και την καθιστά επιδεκτική στην αναδιαμόρφωση (remodeling) από την ATPάση SWI/SNF. Επίσης, το συμπλόκο PRC1 επάγει τη συμπύκνωση νουκλεοσωματικών συστοιχιών, αναστέλλοντας τη μεταγραφή. *In vitro* μελέτες έδειξαν άμεση αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης Pc και της μεθυλιωμένης λυσίνης 27 στην ιστόνη H3. Συγκεκριμένα, το chromodomain της Pc προσδένεται 5 φορές ισχυρότερα με την τριμεθυλιωμένη «ουρά» της H3 από ότι με τη δι- ή μονομεθυλιωμένη. Μελέτες σε πολυταινικά χρωμοσώματα της *Drosophila* αποκάλυψαν ότι οι θέσεις πρόσδεσης της πρωτεΐνης Pc συμπίπτουν γενικώς με τις θέσεις στις οποίες εντοπίζεται η τριμεθυλιωμένη K9-H3 και η K27-H3, αν και ο συνεντοπισμός αυτός δεν είναι απόλυτος. Τα δεδομένα αυτά υπαινίσσονται ότι η αποσιώπηση μέσω της Pc μπορεί να απαιτεί και άλλους παράγοντες εκτός από την τριμεθυλιωμένη ιστόνη H3.



Άλλο ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα τροποποίησης που συνδέεται με συγκεκριμένο "effector molecule" αποτελεί η μεθυλίωση στη λυσίνη 4 της ιστόνης H3 και η αλληλεπίδραση της με την πρωτεΐνη CHD1. Η CHD1 (Chromo-ATPase/Helicase-DNA binding domain) συνδέεται με τα σύμπλοκα SAGA και SLIK HAT. Μέσω του chromodomain αναγνωρίζει την K4 και συμβάλλει στην ενεργοποίηση της μεταγραφής. Τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη μεθυλίωση στη λυσίνη 4 είναι η Set7/9 και η MLL (Mixed Lineage Leukemia) στον άνθρωπο και η Set1 στο σακχαρομύκητα. Η μεθυλίωση αυτή είναι συντηρημένη από τον μύκητα έως τον άνθρωπο. Η H3-K4 μεθυλίωση αναστέλλει τη μεθυλίωση της K9 στην H3 και πιθανώς την επακόλουθη πρόσδεση της HP1, αλλά υποβοηθεί την ακετυλίωση της H3 από την p300, μία ακετυλ-τρανσφεράση (HAT) που σχετίζεται με τη γονιδιακή ενεργοποίηση. Ο ενεργοποιητικός ρόλος της μεθυλίωσης στη λυσίνη 4 ενισχύεται και από το εύρημα ότι η τροποποίηση αυτή εμποδίζει την πρόσδεση του (ανασταλτικού) συμπλόκου NuRD (Nucleosome Remodeling & Deacetylase) και του παράγοντα αποσιώπησης Sir3 στις αμινοτελικές ουρές των ιστονών.

Η μεθυλίωση στη λυσίνη 79 της ιστόνης H3 είναι μία τροποποίηση που περιορίζεται σε ευχρωματινικές περιοχές του γονιδιώματος. Το ένζυμο που καταλύει την μονο-, δι- και τριμεθυλίωση της συγκεκριμένης λυσίνης (η οποία βρίσκεται στο globular domain) είναι η DOT1L (Disruptor of telomeric silencing-1), η μόνη γνωστή μεθυλάση λυσίνης που δεν διαθέτει τμήμα SET. Η K79 είναι υπομεθυλιωμένη σε αποσιωπημένες περιοχές και η υπερέκφραση ή απαλοιφή της DOT1L στον ζυμομύκητα παρεμποδίζει την αποσιώπηση τελομεριδιακών τόπων (6). Μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι το τμήμα tudor μίας πρωτεΐνης απόκρισης σε βλάβες DNA (DNA damage response protein) που ονομάζεται 53BP1, αναγνωρίζει τη διμεθυλιωμένη H3-K79 (7). Η 53BP1 είναι μία p53-binding protein που συγκεντρώνεται σε σημεία θραύσης δίκλωνου DNA (DNA double strand breaks, DSBs) και εικάζεται ότι χαλαρώνει τοπικά τη δομή της χρωματίνης. Τα tudor- και chromo-domains είναι παρόμοια σε αλληλουχία και φαίνεται ότι προέρχονται από έναν κοινό πρόγονο που διαθέτει ικανότητα πρόσδεσης σε μεθυλιωμένα υποστρώματα. Αποτελούνται από πέντε αντιπαράλληλους β-κλώνους (β1-β5) που σχηματίζουν ένα «β-βαρέλυ». Μία καλά μελετημένη τροποποίηση που σχετίζεται με αποσιωπημένη χρωματίνη (chromatin condensation-reduced transcription) είναι η μεθυλίωση στη λυσίνη 20 της ιστόνης H4. Η μονομεθυλίωση της K20 καταλύεται από το ένζυμο PR-Set7/Set8 και εξαρτάται από τον κυτταρικό κύκλο. Ένα άλλο ένζυμο, η Suv4-20h καταλύει την τριμεθυλίωση της H4-K20 και αλληλεπιδρά με την ετεροχρωματίνη (8). Έχει δείχθει ότι η τροποποίηση αυτή προαπαιτεί την



τριμεθυλίωση της K9 στην H3 από τις μεθυλάσες Suv39h *in vivo* (9). Η αλληλεπίδραση των ενζύμων Suv4-20h με την HP1 υποστηρίζει έναν διαδοχικό (sequential) μηχανισμό απαραίτητο για την εγκατάσταση της H3-K9 και H4-K20 τριμεθυλίωσης στην περικεντρική ετεροχρωματίνη (8).

Η ακετυλίωση στην K16 της ιστόνης H4 αποτελεί μία ενεργοποιητική τροποποίηση που αποκλείει τη μεθυλίωση στην K20. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι η μεθυλίωση στην K20 της H4 διατηρεί την αποσιωπημένη κατάσταση αποκλείοντας την ακετυλίωση της γειτονικής της λυσίνης. Άλλες γνωστές τροποποιήσεις αποτελούν η μεθυλίωση της λυσίνης 36 στην ιστόνη H3, που καταλύεται από το ένζυμο Set2 στο μύκητα και συσχετίζεται με τη φάση της επιμήκυνσης στη μεταγραφή (transcription elongation) (10).

Τα PHD domains είναι κοινά δομικά μοτίβα σε πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς και αποτελούν θέσεις σύνδεσης ιόντων Zn^{2+} . Ένας μεγάλος αριθμός πυρηνικών πρωτεϊνών που συνδέεται με χρωματικά υποστρώματα διαθέτει PHD domains (11). Έχει αναφερθεί ότι η συνεργασία PHD domain με bromo domain ενισχύει τη σύνδεση με υπερακετυλιωμένα νουκλεοσώματα. Επίσης, έχει δείχθει ότι τα PHD domains του ACF1, μίας υπομονάδας του παράγοντα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης ISWI, προσδένονται στις τέσσερις πυρηνικές ιστόνες και ενισχύουν την ολίσθηση των νουκλεοσωμάτων μέσω ACF1 (12).

Τα τελευταία χρόνια μεγαλώνει συνεχώς ο αριθμός των τροποποιήσεων που απαντώνται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στην αμινοτελική ουρά των ιστονών. Θεωρείται μάλλον απίθανο αυτές οι πολλαπλές ομοιοπολικού τύπου τροποποιήσεις να έχουν εξελιχθεί ανεξάρτητα. Η εξαιρετικά μεγάλη πυκνότητα και ποικιλότητα που παρατηρείται φαίνεται ότι εξυπηρετεί σημαντικά βιολογικά φαινόμενα, ειδικά αν σκεφτούμε ότι οι περισσότερες θέσεις τροποποίησης είναι εξαιρετικά συντηρημένες. Η υπόθεση των τοπικών δυαδικών διακοπών (local binary switches) έρχεται να εξηγήσει με ποιο συνδυαστικό τρόπο μπορεί να «διαβάζονται» οι τροποποιήσεις αυτές (13). Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, η φωσφορυλίωση μίας θέσης που γειτονεύει με μία μεθυλιωμένη λυσίνη μπορεί να οδηγήσει σε αποσύνδεση του “effector” που συνδέεται εκεί. Ένας τέτοιος χαρακτηριστικός «διακόπτης» είναι ο “methyl/phos switch” στις θέσεις K9/S10 της ιστόνης H3. Η φωσφορυλίωση στην S10 αναστέλλει τη μεθυλίωση της K9 και η μεθυλίωση της K9 ανταγωνίζεται την φωσφορυλίωση στην S10. *In vitro* δοκιμασίες έδειξαν ότι τα chromodomains παρουσιάζουν απώλεια της σύνδεσης σε διπλά τροποποιημένα πεπτίδια που περιέχουν me-K9 και phospho-S10. Επίσης, η πρωτεΐνη HP1 «απελευθερώνεται» από την me-K9 όταν τα κύτταρα εισέρχονται στη μίτωση, ένα στάδιο του κυτταρικού κύκλου που χαρακτηρίζεται από γρήγορη και παροδική



αύξηση της φωσφορυλίωσης της S10 (14, 15). Ένα επιπλέον δεδομένο που υποστηρίζει το πρότυπο αυτό αποτελεί η δράση της πρωτεΐνης PP1 (Protein Phosphatase 1) η οποία αποφωσφορυλιώνει την S10 στο τέλος της μίτωσης και επιτρέπει την πρόσδεση της HP1 στη μεθυλιωμένη K9 (16).

Ένα παράδειγμα «σταυρωτής ρύθμισης» (trans-regulation) αποτελεί η ουβικουτινίωση της H2B στη λυσίνη 123 από το ένζυμο Rad6 η οποία προαπαιτείται για τη διμεθυλίωση της K4 στην H3 από το ένζυμο Set1p, ή της K79 της H3 από την Dot1p. Επίσης, η μεθυλίωση της R3 της H4 από την PRMT1 (Protein arginine Methyltransferase 1) φαίνεται ότι ενεργοποιεί την ακετυλίωση της K5, K8, K12 και K16 από το CBP-p300, που με τη σειρά της προάγει τη μεθυλίωση της R2, R17 και R26 της H3 από την CARM1, ένα άλλο μέλος της οικογένειας PRMT.

Εκτός από τους μηχανισμούς του “binary switching” μεταξύ δύο γειτονικών θέσεων, συγκεντρωμένες τροποποιημένες θέσεις μπορούν να λειτουργήσουν επίσης ως διακριτές μονάδες πληροφορίας που διαμεσολαβούν συγκεκριμένα σήματα. Αυτές οι μονάδες πληροφορίας ονομάζονται “modification cassettes” και επηρεάζουν την αναγνώριση και την πρόσδεση πιθανών “effector molecules”. Παραδείγματα μικρών «κασσετών» υπάρχουν στις ουρές της H3 και H4. Στην ιστόνη H3 η αλληλουχία μεταξύ της K9 και T11 έχει 4 διαφορετικές τροποποιήσεις. Στην ιστόνη H4 αντίστοιχες περιοχές αποτελούν η S1, η R3 και η K5 που αντίστοιχα φωσφορυλιώνονται, μεθυλιώνονται και ακετυλιώνονται.

1.3 Δυναμική νουκλεοσωμάτων (Nucleosome dynamics)

Τα νουκλεοσώματα και οι ίνες χρωματίνης συνιστούν τις θεμελιώδεις υπομονάδες των ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων. Πρόκειται για εξαιρετικά δυναμικές δομές που προσλαμβάνουν πολλές διαφορετικές διαμορφώσεις. Μία ίνα χρωματίνης αποτελείται από συστοιχίες νουκλεοσωμάτων (nucleosomal arrays), συνδετικές ιστόνες (linker histones) και άλλες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τα νουκλεοσώματα. Οι ίνες χρωματίνης μπορούν να «συμπυκνωθούν» σε υψηλότερης τάξης δομές, γνωστές ως δευτεροταγείς και τριτοταγείς δομές χρωματίνης.

Ο δυναμικός χαρακτήρας των νουκλεοσωμάτων υπογραμμίζεται από την παρουσία παραγόντων «αναδιαμόρφωσης» που εξαρτώνται από το ATP (ATP-dependent chromatin remodeling factors) και είναι ικανοί να μετακινήσουν το οκταμερές των ιστονών κατά μήκος



του DNA. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται «νουκλεοσωματική ολίσθηση» (nucleosome sliding).

Τα δεδομένα που υποστηρίζουν τον δυναμικό χαρακτήρα των νουκλεοσωμάτων είναι επιγραμματικά τα εξής: α) η εγγενής δυναμική των νουκλεοσωμάτων (Intrinsic nucleosome dynamics), β) η διαμεσολαβούμενη αποδιάταξη των νουκλεοσωμάτων (Protein-mediated nucleosome dissociation), γ) η αντικατάσταση ιστονών (core histone exchange) και δ) η ανταλλαγή ισομορφών ιστονών (histone variant exchange).

1.3A Εγγενής δυναμική νουκλεοσωμάτων (Intrinsic nucleosome dynamics)

Η χρωματίνη φαίνεται να έχει μια εγγενή δυναμική, που εξασφαλίζεται χωρίς την επικουρία άλλων παραγόντων. Πειράματα FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) έδειξαν ότι οι άκρες του νουκλεοσωματικού DNA ξετυλίγονται και ξανατυλίγονται ταχύτατα (μέσα σε 50-250 ms) γύρω από τον νουκλεοσωματικό «πυρήνα» (17). Ο χρόνος αυτός είναι αρκετός για να επιτραπεί σε έναν μεταγραφικό παράγοντα να προσδεθεί στο νουκλεοσωματικό DNA κατά τη διάρκεια που είναι ξετυλιγμένο και να επιτρέψει την πρόσβαση της μεταγραφικής μηχανής.

Έχει προταθεί ότι υπό *in vivo* συνθήκες τα μονονουκλεοσώματα μοιάζουν στο γνωστό κρυσταλλογραφικό μοντέλο τους μόνο για ελάχιστα στιγμότυπα. Φαίνεται δε, ότι το οκταμερές των ιστονών εξελίχθηκε με τέτοιο τρόπο ώστε να επιτρέπει το νουκλεόσωμα να «αναπνέει» (nucleosome breathing) (18, 19).

1.3B Αποδιάταξη των νουκλεοσωμάτων που διαμεσολαβείται από πρωτεΐνες (Protein-mediated nucleosome dissociation)

Ένας μηχανισμός αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης είναι η αποδιάταξη των νουκλεοσωμάτων μέσω πρωτεϊνών. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται σε νουκλεοσώματα που απαντώνται σε περιοχές υποκινητών. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο υποκινητής Pho5 στον οποίο οι πυρηνικές ιστόνες (core histones) που συγκροτούν τα νουκλεοσώματα υπερακετυλιώνονται και στη συνέχεια απομακρύνονται (20, 21). Η απομάκρυνση αυτή δεν γίνεται μέσω ολίσθησης (sliding), αλλά μέσω παροδικής αποδιάταξης (dissociation) των ιστονών (22, 23). Υπεύθυνη για την αποδιάταξη των ιστονών H3/H4 είναι η πρωτεΐνη συνοδός Asf1 (anti-silencing factor 1), η οποία διαμεσολαβεί την απομάκρυνση των ιστονών



από τον υποκινητή. Επίσης, η Asf1 συνεργάζεται με τον CAF1 (Chromatin Assembly Factor 1) και ρυθμίζει την έκφραση πολλών γονιδίων στον σακχαρομύκητα (24). Δύο πρόσφατες μελέτες σε όλο το γονιδίωμα (genome-wide) προτείνουν ότι η «απομάκρυνση» (clearance) νουκλεοσωμάτων από τις περιοχές των υποκινητών αποτελεί ένα γενικευμένο φαινόμενο (25, 26).

1.3Γ Ανταλλαγή ιστονών (core histone exchange)

Ένας άλλος βασικός μηχανισμός αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης είναι η ανταλλαγή ιστονών. Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της μεσόφασης, τα διμερή H2A-H2B ανταλλάσσονται συνεχώς μεταξύ διαφορετικών νουκλεοσωμάτων σε όλο το γονιδίωμα, ενώ το τετραμερές (H3-H4)₂ είναι πιο σταθερό. Χαρακτηριστικός πρωτεϊνικός παράγοντας που απομακρύνει διμερή H2A-H2B από ακέραια νουκλεοσώματα είναι ο FACT (Facilitates Chromatin Transactions) (27, 28). Επιπλέον, ο FACT θεωρείται υπεύθυνος για την εξαιρετικά γρήγορη ανασυγκρότηση (reassembly) των νουκλεοσωμάτων σε περιοχές που έχει προηγηθεί μεταγραφή, μαζί με τον H3-H4 συνοδό (chaperone) Spt6 (29). Ο SWI-SNF είναι ένας άλλος ATP-εξαρτώμενος παράγοντας αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης (ATP-dependent chromatin remodeling factor), που εκτός από την ολίσθηση (sliding) των νουκλεοσωμάτων, επιτελεί και άλλες λειτουργίες όπως η απομάκρυνση και η ανταλλαγή του διμερούς H2A-H2B. Οι λειτουργίες αυτές δεν φαίνεται να είναι προαπαιτούμενες για την ATP-εξαρτώμενη ολίσθηση, αλλά συνέπεια του φαινομένου. Σε φυσιολογικές συνθήκες, η σύνδεση διμερών H2A-H2B στο τετραμερές (H3-H4)₂ δεν είναι αρκετά σταθερή χωρίς την παρουσία DNA. Επειδή το διμερές H2A-H2B οργανώνει τις τελευταίες 40 βάσεις του νουκλεοσωματικού DNA, ακόμα και το μερικό ξεδίπλωμα του DNA έχει ως αποτέλεσμα τον αποσύνδεση του διμερούς (30). Είναι επίσης γνωστό ότι οι συνοδοί ιστονών (histone chaperones), μόνοι τους ή σε συνεργασία με τους ATP-εξαρτώμενους αναδιαμορφωτές (ATP-dependent remodelers), προωθούν την μη-εξαρτώμενη από την αντιγραφή ανταλλαγή διμερών H2A-H2B (replication-independent H2A-H2B dimer exchange). Για παράδειγμα, η yNAP-1 (yeast Nucleosome Assembly Protein 1) είναι ικανή να αφαιρεί και να αντικαθιστά ένα ή και τα δύο διμερή H2A-H2B από ένα ακέραιο νουκλεόσωμα *in vitro* (31, 32).



1.3A Αντικατάσταση ισομορφών ιστονών (Histone variant exchange)

Ένας βασικός μηχανισμός αλλαγής της σύστασης των νουκλεοσωμάτων είναι η αντικατάσταση των κανονικών ιστονών από ισομορφές τους (variants). Τα είδη των ισομορφών περιγράφονται στον πίνακα 1. Η ιστόνη H2A έχει τον μεγαλύτερο αριθμό ισομορφών και περιλαμβάνει την H2A.Z, την MacroH2A, την H2A^{Bbd}, και την H2A.X. Οι ισομορφές της H2A έχουν διαφορά από τις κανονικές ιστόνες στο μήκος και στην αλληλουχία των καρβοξυτελικών άκρων, καθώς επίσης και στην κατανομή τους. Η H2A.Z εναποτίθεται στη χρωματίνη κατά τη διάρκεια και εκτός S φάσης και έχει αναγνωριστεί σε δύο σύμπλοκα : Το ένα περιέχει τον ιστονικό συνοδό NAP1 και το άλλο περιέχει την ΑΤΡάση Swt1. Η ενσωμάτωση της H2A.Z στη χρωματίνη σταθεροποιεί το οκταμερές και συμπυκνώνει την χρωματινική ίνα, αλλά αποτρέπει την περαιτέρω συσπείρωσή της σε ανώτερης τάξης δομές (30, 33).

Στο καρβοξυτελικό της άκρο η H2A.X διαθέτει μία μοναδική αμινοξική αλληλουχία που περιέχει ένα συντηρημένο κατάλοιπο σερίνης. Η σερίνη αυτή φωσφορυλιώνεται σε νουκλεοσώματα που βρίσκονται εκατέρωθεν σημείων θραύσης δίκλωνου DNA (DNA double strand breaks). Η H2A.X ενσωματώνεται τυχαία σε χρωμοσώματα και στη φωσφορυλιωμένη της μορφή αποτελεί δείκτη βλαβών στο DNA (DNA damage). (34). Για την ενσωμάτωση αυτή απαιτείται το σύμπλοκο Tip60 και συγκεκριμένα η ΑΤΡάση και η ακετυλ-τρανσφεράση. Ενδιαφέρον είναι ότι η αντίδραση αυτή είναι μονόδρομη, δηλαδή το σύμπλοκο καταλύει μόνο την αντικατάσταση των φωσφορυλιωμένων διμερών H2A.X-H2B με μη-φωσφορυλιωμένα και όχι το αντίστροφο. Είναι πολύ πιθανό ότι η ανταλλαγή διμερών H2A-H2B είναι το αρχικό βήμα που οδηγεί στην πλήρη αποδιάταξη του νουκλεοσώματος.

Η ισομορφή H2A^{Bbd} (Bar1-body-deficient) συγκεντρώνεται σε θέσεις μεταγραφής και αποκλείεται από το αδρανοποιημένο χρωμόσωμα X (Bar1 body) των θηλυκών ατόμων. Σε αντίθεση, το Bar1 body είναι εμπλουτισμένο στην ισομορφή macroH2A. Η macroH2A διαθέτει ένα αμινοτελικό τμήμα παρόμοιο με αυτό της H2A, και ένα μεγάλο καρβοξυτελικό τμήμα της τάξεως των 20 kDa που δεν έχει καμία ομοιότητα με τις υπόλοιπες ιστόνες. Το τμήμα αυτό περιέχει ένα δομικό μοτίβο leucine-Zipper που ενέχεται σε διμερισμό πρωτεϊνών. Πιθανότατα, η τάση διμερισμού που έχουν νουκλεοσώματα τα οποία περιέχουν macro-H2A συντελεί στη συμπύκνωση μεγάλων χρωματινικών τμημάτων. Παρόλο που η ισομορφή αυτή είναι ένας χαρακτηριστικός δείκτης της αδρανοποίησης του X χρωμοσώματος, η παρουσία της δεν είναι απαραίτητη για την διατήρηση της αδρανοποιημένης κατάστασης. Η



ενσωμάτωσή της συμβαίνει μετά τη σύνδεση του ειδικού μεταγραφήματος *Xist* στο αδρανοποιημένο X (Xi). Απουσία του *Xist*, η macroH2A δεν εντοπίζεται στο Xi.

Τρεις είναι οι βασικές ισομορφές της ιστόνης H3: Η H3.1, η H3.3 και η κεντρομεριδιακή CENP-A (CenH3). Επίσης, υπάρχει μία ισομορφή που εκφράζεται ιστοειδικά στους όρχεις, η H3.4. Η H3.3 και η H3.4 διαφέρουν μόνο κατά 4 αμινοξέα από την H3. Σε αντίθεση με την H3 που παράγεται στη διάρκεια της S φάσης, η H3.3 εκφράζεται σε όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, εντοπίζεται σε μεταγραφικά ενεργές περιοχές και αποτρέπει την επέκταση της ετεροχρωματινοποίησης. Τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα που είναι υπεύθυνα για την εναπόθεση των ιστονών H3.1 και H3.3 περιλαμβάνουν κοινές υπομονάδες, αλλά και ειδικούς ιστονικούς συνοδούς (histone chaperones). Η H3.1 εναποτίθεται με τη βοήθεια του CAF1, ενώ η H3.3 με τον ιστονικό συνοδό HIRA (Histone Regulatory homolog A). Η εναπόθεση της H3.1 στη διάρκεια της αντιγραφής πιθανότατα μεσολαβείται από τον CAF1 μέσω της αλληλεπίδρασης του με πρωτεΐνες που απαντώνται στις εστίες αντιγραφής, όπως η PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), ενώ η HIRA μεσολαβεί την εναπόθεση της H3.3 σε περιοχές που μεταγράφονται.

Η ισομορφή CENP-A εντοπίζεται στα κεντρομερίδια αλλά δεν είναι γνωστό πώς ενσωματώνεται σε αυτά. Η λειτουργία της είναι πολύ σημαντική καθώς η πλήρης απαλοιφή του γονιδίου είναι θνησιγόνος. Οι παράγοντες που ενέχονται στην ενσωμάτωση της CENP-A στη χρωματίνη δεν είναι γνωστοί. Έχει βρεθεί ότι η εντόπιση της Cse4 (κεντρομεριδιακή CENP-A στο μύκητα) επηρεάζεται από την απουσία των παραγόντων CAF1 και HIRA. Συγκεκριμένα, η Cse4 μετατοπίζεται από τα κεντρομερίδια και ανιχνεύεται και σε μη κεντρομεριδιακές περιοχές.

Table 2. Histone variants and their functions

Variant	Species	Chromatin effect	Function
H1 ^a	Mouse	Chromatin condensation	Transcription repression
H5	Chicken	Chromatin condensation	Transcription repression
SpH1	Sea urchin	Chromatin condensation	Chromatin packaging
H1t	Mouse	Open chromatin	Histone exchange, recombination ^b
MacroH2A	Vertebrate	Condensed chromatin	X-chromosome inactivation
H2ABbd	Vertebrate	Open chromatin	Transcription activation
H2A.X	Ubiquitous	Condensed chromatin	DNA repair/recombination/transcription repression
H2A.Z	Ubiquitous	Open/closed chromatin	Transcription activation/repression, chromosome segregation
SpH2B	Sea urchin	Chromatin condensation	Chromatin packaging
CenH3	Ubiquitous		Kinetochores formation/function
H3.3	Ubiquitous	Open chromatin	Transcription

The species distribution and likely functions of major histone variants are shown.

Πίνακας 1. Ισομορφές των ιστονών και οι αντίστοιχες λειτουργίες τους (Kamakaka & Biggins, 2005).



1.4 Οι πρωτεΐνες HP1

1.4.1 Δομή και λειτουργικός ρόλος της HP1

Η HP1 αρχικά χαρακτηρίστηκε ως ένα οργανικό στοιχείο της ετεροχρωματινής διότι μεταλλάξεις της λειτουργούν ως dominant suppressors στο φαινόμενο επίδρασης θέσης (Position Effect Variegation-PEV) (35, 36). Το φαινόμενο PEV περιγράφεται από την αποσιώπηση ενός μεταγραφικά ενεργού γονιδίου, λόγω μετακίνησής του από την ευχρωματινή σε μία ετεροχρωματινική περιοχή. Έχει μελετηθεί συστηματικά στη *D. melanogaster*, τον *S. pombe* και το ποντίκι. Χαρακτηριστικό παράδειγμα του φαινομένου στη *D. melanogaster* είναι η μεταφορά του γονιδίου *white*. Το 1930, ο Hermann Müller περιέγραψε μεταλλαγμένα στελέχη στη *Drosophila* που είχαν προκύψει από ακτινοβολία με ακτίνες X που παρουσίαζαν μωσαϊκή έκφραση του γονιδίου *white* στα μάτια. Η αποσιώπηση του γονιδίου *white*, του οποίου η έκφραση σε κάθε ομματίδιο οδηγεί στην ομοιόμορφη κόκκινη χρώση στις φυσιολογικές μύγες, βρέθηκε ότι συνδέεται με την μετατόπιση του γονιδίου *white* από τη φυσιολογική του ευχρωματινική θέση στην περιοχή του κεντρομεριδίου. Οι λευκές περιοχές αντιστοιχούσαν σε κύτταρα στα οποία το γονίδιο είχε απενεργοποιηθεί λόγω «ετεροχρωματινοποίησης». Παρατηρήθηκε ότι το PEV μπορεί να ενισχυθεί (αύξηση των λευκών περιοχών), ή να κατασταλεί (επανεμφάνιση του φυσιολογικού κόκκινου χρώματος) από άλλες μεταλλάξεις. Έτσι, επειδή η υπερέκφραση της HP1 είχε ως αποτέλεσμα την ενίσχυση του φαινομένου PEV, δημιουργήθηκε η βάσιμη υποψία ότι η πρωτεΐνη αυτή διαδραματίζει έναν αποσιωπητικό ρόλο (35). Πράγματι, ανάλυση της αμινοξικής ακολουθίας της HP1 αποκάλυψε μία περιοχή με αξιοσημείωτη ομολογία με την πρωτεΐνη Polycomb (Pc) στη *Drosophila* που ελέγχει την αποσιώπηση ομοιοτικών γονιδίων (37). Οι δύο αυτές πρωτεΐνες μοιράζονται μία δομική περιοχή που ονομάζεται Chromodomain (Chromatin Organization Modifier). Η περιοχή chromodomain (CD) είναι πολύ συντηρημένη στους ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς (38).

Η CD αποτελεί ένα κοινό χαρακτηριστικό γνώρισμα των λεγομένων χρωμοπρωτεϊνών. Η οικογένεια αυτή υποδιαιρείται σε αρκετές υποοικογένειες, που περιλαμβάνουν πρωτεΐνες του χρωματινικού περιβάλλοντος (HP1, Pc, CHD, SUV39, RBP1) (39). Η περαιτέρω κατηγοριοποίηση των χρωμοπρωτεϊνών γίνεται σύμφωνα με την παρουσία άλλων συντηρημένων περιοχών που τους προσδίδουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Για



παράδειγμα, τέτοιες περιοχές προσδίδουν ενζυμικές ιδιότητες (π.χ. μεθυλ-τρανσφεράσης), ιδιότητες ελικάσης/ΑΤΡάσης, ενώ άλλες έχουν την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA ή αλληλεπίδρασης με πυρηνικές πρωτεΐνες.

1.4.2 Σχέσεις δομής και λειτουργίας των πρωτεϊνών HP1

Η οικογένεια των πρωτεϊνών HP1 είναι πολύ συντηρημένη από τον μύκητα έως τον άνθρωπο (40) (Πίνακας 2). Αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά στην *Drosophila* και συναντάται σε τρεις ισομορφές HP1a, HP1b και HP1c. Η ομόλογη μορφή στον σακχαρομύκητα (*S. pombe*) είναι η Swi6, στον βάτραχο οι Xhp1a και Xhp1γ, στο κοτόπουλο οι CHCB1, CHCB2 και CHCB3, στον ποντικό οι HP1α, HP1β και HP1γ και στον άνθρωπο οι HP1^{Hs}α, HP1^{Hs}β και HP1^{Hs}γ.

Members of the HP1 family.					
Name	Organism	Size (amino acid residues)	Reported cytology	Silencing activity demonstrated	Refs
Swi6p	<i>S. pombe</i>	328	Centromeres, telomeres, oldest mating type cassettes	+	[66]
Hhp1p	<i>T. thermophila</i>	184	Absent in micronuclei; enriched in condensed chromatin of macronuclei	-	[43]
pchet1	<i>P. citri</i>	173	Male specific nuclear protein; not heterochromatin-specific	ND	[40]
pchet2	<i>P. citri</i>	184	ND	ND	[40]
HP1	<i>D. melanogaster</i>	206	Pericentric heterochromatin, telomeres, several non-pericentric sites	+	[7]
DnHP1	<i>D. virilis</i>	213	ND	ND	[67]
enb(CAB07241)	<i>C. elegans</i>	175	ND	ND	(a)
g[3702834]	<i>C. elegans</i>	184	ND	ND	(a)
Xhp1a	<i>X. laevis</i>	141	ND	ND	[37]
Xhp1γ	<i>X. laevis</i>	171	ND	ND	[37]
CHCB1	<i>G. gallus</i>	185	ND	ND	[58]
CHCB2	<i>G. gallus</i>	174	ND	ND	[58]
mHP1α	<i>M. musculus</i>	181	ND	+	[28]
M31, MoMOD1	<i>M. musculus</i>	185	Pericentric heterochromatin	-	[59]
M32, MoMOD2	<i>M. musculus</i>	173	Euchromatic; excluded from heterochromatin	-	[59]
HP1 ^{Hs}	<i>H. sapiens</i>	191	Pericentric heterochromatin	+	[60]
HP1 ^{Hs}	<i>H. sapiens</i>	185	Pericentric heterochromatin	-	[58]
HP1 ^{Hs}	<i>H. sapiens</i>	173	Euchromatic; excluded from heterochromatin	+	[22]

(a) GenBank database. ND, not determined.

Πίνακας 2. Τα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών HP1 (Eissenberg & Elgin, 2000).

Οι ισομορφές των πρωτεϊνών HP1 έχουν κοινή μοριακή αρχιτεκτονική, δηλαδή αποτελούνται από τρεις διακριτές περιοχές: τον χρωμοτομέα (chromodomain, CD) που είναι συντηρημένος και βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο, τον καρβοξυτελικό «σκιώδη χρωμοτομέα» (chromoshadow domain, CSD) και την ενδιάμεση περιοχή hinge (Σχήμα 3). Οι περιοχές CD και CSD παρουσιάζουν αξιοσημείωτη ομοιότητα και φαίνεται ότι προήλθαν από διπλασιασμό ενός προδρόμου γονιδίου. Η επίλυση της τριτοταγούς δομής του CD και του CSD έγινε με τη χρήση φασματοσκοπίας μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού (NMR) και κρυσταλλογραφίας ακτίνων X (41-43). Και οι δύο περιοχές έχουν σφαιροειδή (globular) μορφή με μέση

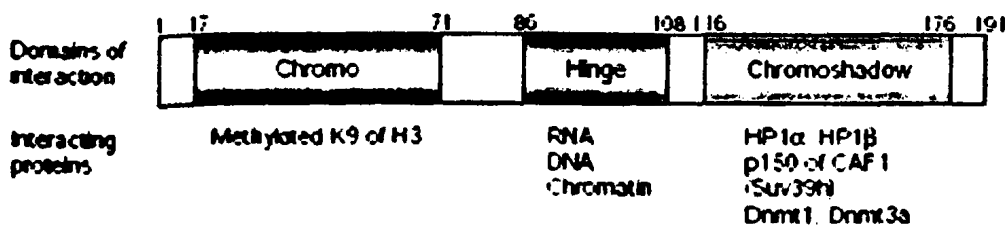


διάμετρο περίπου 30 Å. Διαμορφώνονται από μία (στην περίπτωση του CD) ή δύο (στο CSD) καρβοξυτελικές α-έλικες που αναδιπλώνονται επάνω σε μία β-πτυχωτή επιφάνεια, η οποία αποτελείται από τρεις αντιπαράλληλες β-αλυσίδες (Εικόνα 3). Παρόλο που η CD και η CSD έχουν πολύ παρόμοιες δομές, υπηρετούν διαφορετικές λειτουργίες. Η πρώτη έχει θεωρηθεί υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση του μορίου με τη χρωματίνη, ενώ η δεύτερη φαίνεται να ευθύνεται για τον διμερισμό της HP1 και να αντιπροσωπεύει μία πλατφόρμα αλληλεπιδράσεων με πυρηνικούς συνοδούς, παράγοντες αναδιαμόρφωσης χρωματίνης (remodeling factors) και ενζύμων που τροποποιούν τις ιστόνες (42, 43).

A

HP1α	MGKQIKRYT-ADSSSSE	IKGTVVEKVLDERNVKQVVEILLKQKQFSREKNTVWRPEKRLDC	59
HP1β	MGKQIKNEKVLSEVLEEE	IKGTVVEKVLAKRVVWIKQVVEILLKQKQFSREKNTVWRPEKRLDC	60
HP1γ	MGKQIKQK-EGKVEEAL	IKGTVVEKVLDERNVKQVVEILLKQKQFSREKNTVWRPEKRLDC	59
HP1α
HP1α	PKLISRFKQKYLINKEEENKQFRKSGSRRKSS-SFSMS-ADDTKSKQGRBSSNDIARGF		117
HP1β	PKLISRFKQKYLINKEEENKQFRKSGSRRKSS-SFSMS-ADDTKSKQGRBSSNDIARGF		113
HP1γ	PKLISRFKQKYLINKEEENKQFRKSGSRRKSS-SFSMS-ADDTKSKQGRBSSNDIARGF		107
HP1α
HP1α	IKGCLRFKQIKGATDSSCCBQNFLEMDQDVTDEADLVLAKEANVKCPQIVIAFYERKLTREY		177
HP1β	IKGCLRFKQIKGATDSSCCBQNFLEMDQDVTDEADLVLAKEANVKCPQIVIAFYERKLTREY		173
HP1γ	IKGCLRFKQIKGATDSSCCBQNFLEMDQDVTDEADLVLAKEANVKCPQIVIAFYERKLTREY		167
HP1α
HP1α	PEEAEMKESAKS		191
HP1β	PEEODDEKQDN--		185
HP1γ	P-EEEAQ-----		173

B



Σχήμα 3. (Α) Η αμινοξική αλληλουχία των ισομορφών της HP1 στον ποντικό. (Β) Τα τμήματα της πρωτεΐνης HP1. CD (κόκκινο), CSD (μωλε), Hinge (πράσινο) και οι αντίστοιχοι παράγοντες με τους οποίους αλληλεπιδρούν (interaction partners) (Maison & Almouzni, 2004).





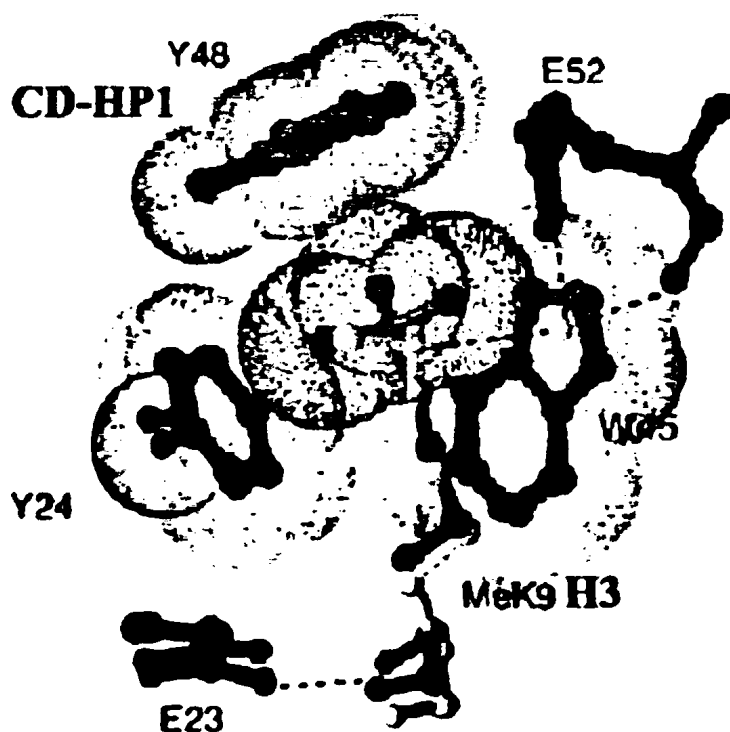
Εικόνα 3. Δομή του χρωμοτομέα (chromodomain, CD) και του χρωμοσκιάδη τομέα (chromoshadow, CSD) της πρωτεΐνης HP1β. N- και C- είναι τα αμινο- και καρβοξυ-τελικά άκρα των δύο περιοχών. Οι έλικες αναπαρίστανται ως σπείρες ($\alpha 1/\alpha 2$) και οι β -δομές ως ταινίες (Singh & Georgatos, 2002).

Έχει δειχθεί ότι η απουσία της περιοχής CD, ή η μετάλλαξή της, οδηγεί σε αποσύνδεση της HP1 από την κεντρομεριδιακή ετεροχρωματίνη (44). Η άποψη που ισχύει ως τώρα είναι ότι η HP1 εντοπίζεται κυρίως σε μεταγραφικά ανενεργή, συστατική (constitutive) ετεροχρωματίνη συνδεόμενη ειδικά με την ιστόνη H3 που είναι μετα-μεταφραστικά τροποποιημένη (τριμεθυλιωμένη) στη λυσίνη 9 (me_3K9-H3). Η άποψη αυτή στηρίζεται σε μία σειρά παρατηρήσεων. Η HP1 α /HP1 β σε πολύ μεγάλο βαθμό συνεντοπίζονται με την me_3K9-H3 (45, 46) και φαίνεται να συγκεντρώνονται σε περιοχές αποσιωπημένων γονιδίων (47). Επίσης, οι HP1 α /HP1 β απομακρύνονται από τις συνήθεις τους θέσεις όταν τα ένζυμα (SUV39H1/H2) που ευθύνονται για την μετα-μεταφραστική τροποποίηση της H3 απαλειφθούν (45, 46). *In vitro* πειράματα έδειξαν ότι πεπτίδια τριμεθυλιωμένα στη λυσίνη 9 της ιστόνης H3, καθώς και η ενδογενής ιστόνη H3, συνδέονται με την HP1, ενώ μη τροποποιημένα πεπτίδια και ανασυνδυασμένη ιστόνη H3 δεν έχουν αυτή την ιδιότητα (48-51). Ανάλυση με NMR και κρυσταλλογραφία ακτίνων X έδειξαν ότι η τροποποίηση αυτή δημιουργεί ένα σημείο σύνδεσης (creates a binding site...) για την HP1, παρόλο που η αλληλεπίδραση είναι αρκετά ασθενική (K_d της τάξεως των $10^{-6}M$). Η διεπιφάνεια HP1-H3 σχηματίζεται από τα τρία υδρόφοβα αμινοξέα της περιοχής CD δημιουργώντας ένα «κλωβό» στον οποίο φιλοξενείται το τριμεθυλιωμένο τμήμα της ιστόνης H3 (Εικόνα 4).

Παρά την απλότητα και την κομψότητα του παραπάνω προτύπου, μελέτες σε διάφορους οργανισμούς, κυτταρικούς τύπους και χρωμοσωμικά παρασκευάσματα, έδειξαν ότι η εικόνα



είναι πιο σύνθετη. Κατ' αρχήν, η HP1 και η me_3K9-H3 δεν συνεντοπίζονται απόλυτα (52, 53), ενώ χαρτογράφηση αυτών των περιοχών στη *Drosophila* απεκάλυψε διακριτές θέσεις πρόσδεσης (54-56). Επίσης, η HP1 αποσυνδέεται από την ετεροχρωματίνη όχι μόνο όταν απουσιάζουν στοιχεία όπως η μεθυλ-τρανσφεράση SUV39H1/H2, αλλά και απουσία άλλων παραγόντων όπως η ORC2 (Origin Recognition Complex 2) ή RNA (57-61). Μία ακόμα σημαντική παρατήρηση είναι ότι η HP1 αλληλεπιδρά σε σημαντικό βαθμό με μη μεθυλιωμένη ιστόνη H3 και «γυμνό DNA», τουλάχιστον *in vitro*. (62-64). Επίσης, η περιοχή CD έχει δειχθεί ότι συνδέεται στην «core» περιοχή της ιστόνης H3 που φιλοξενεί το «histone fold» (63, 65). Η τροποποίηση (me_3K9-H3) δεν είναι αρκετή για να οδηγήσει την HP1 στην ετεροχρωματίνη και απαιτεί ένα υποακετυλιωμένο περιβάλλον και τη συμβολή κάποιου είδους RNA που δεν έχει χαρακτηριστεί ακόμα (58). Τέλος, οι πρωτεΐνες HP1 δεν συγκεντρώνονται στην περιστασιακή (facultative) ετεροχρωματίνη, όπως το αδρανικοποιημένο χρωμόσωμα X (X_i), παρόλο που η περιοχή αυτή περιέχει μεθυλιωμένη ιστόνη H3 (45, 52).



Εικόνα 4. Σχηματικό στερεοδιάγραμμα που απεικονίζει τη διμεθυλιωμένη λυσίνη 9 της ιστόνης H3 (κίτρινο) και την τριμεθυλιωμένη λυσίνη 9 (κόκκινο) στο σύμπλοκο με τον χρομοτομέα (CD) της HP1 (μυλε και πράσινο, αντίστοιχα) (Jacobs & Khorasanizadeh, 2002)

Έχουν διατυπωθεί αρκετά υποθέσεις σε ό,τι αφορά τον ρόλο της HP1 στη συγκρότηση και διατήρηση της ετεροχρωματινικής κατάστασης. Το δεδομένο ότι η HP1 αλληλεπιδρά με το ένζυμο Su(var)3-9 που είναι υπεύθυνο για την τριμεθυλίωση της K9 της H3 και ταυτόχρονα ότι η συγκεκριμένη τροποποίηση αποτελεί σημείο πρόσδεσης (binding site) για την HP1, υποστηρίζει την ύπαρξη ενός μηχανισμού θετικής ανάδρασης.

Η περιοχή CSD είναι υπεύθυνη για τον διμερισμό της HP1. Δύο μόρια HP1 μπορούν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους και να σχηματιστούν ομο- ή ετεροδιμερή. Επίσης, η περιοχή CSD συμμετέχει στις αλληλεπιδράσεις της HP1 με διάφορες πυρηνικές πρωτεΐνες. Έχει βρεθεί ότι η CSD προσδένεται ισχυρά σε περιοχές που περιέχουν την αλληλουχία P_xV_xL (Proline, Valine, Leucine, x=οποιοδήποτε αμινοξύ). Το τμήμα αυτό προσδένεται ως μονομέρες σε μία υδροφοβική «φωλιά» που σχηματίζεται από δύο υπομονάδες ενός διμερούς CSD (66). Υπάρχει ένας αριθμός πρωτεϊνών που περιέχουν μοτίβα P_xV_xL, όπως η μεγάλη υπομονάδα p150 του CAF1 (Chromatin Assembly Factor 1), ο TAF_{II}130 (TATA binding protein (TBP)-associated factor) και απαιτούν το διμερισμό της CSD (42, 67, 68). Επίσης, πρωτεΐνες όπως η ATRX, ο LBR, η Sp100a περιέχουν τέτοια μοτίβα και προσδένονται στην HP1 *in vitro* (69). Υπάρχουν όμως και πρωτεΐνες που αν και δεν περιέχουν τα μοτίβα αυτά, μπορούν να αλληλεπιδράσουν με την HP1. Επίσης, υπάρχουν δεδομένα ότι μερικές πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με την HP1 μέσω της περιοχής CD ή hinge (70). Για παράδειγμα, η HP1 στη *Drosophila* αλληλεπιδρά με την DmORC1 και DmORC2 μέσω των περιοχών CD και CSD, αντίστοιχα (71). Από τα στοιχεία αυτά φαίνεται ότι η περιοχή CSD δεν είναι η μόνη περιοχή του μορίου που διαμεσολαβεί αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες.

Όπως αναφέρθηκε, η CD και η CSD χωρίζονται από ένα μη δομημένο τμήμα (hinge) που θεωρείται εύκαμπτο και είναι εκτεθειμένο στην επιφάνεια του μορίου. Η συνδετική αυτή περιοχή δεν έχει μεγάλου βαθμού ομολογία ανάμεσα στις διάφορες πρωτεΐνες HP1, σε αντίθεση με τη CD και τη CSD που η ομολογία τους είναι της τάξης του 50-70%. Η μόνη συντηρημένη αλληλουχία που απαντάται στην περιοχή αυτή είναι ένα τμήμα βασικών αμινοξέων, το οποίο συνιστά ένα σήμα εισόδου στον πυρήνα (Nuclear Localization Signal, NLS). Μία άλλη περιοχή με σημαντικό ρόλο είναι η ακολουθία όξινων αμινοξέων που βρίσκονται ακριβώς πριν το αμινοτελικό άκρο της CD. Μεταλλάξεις των αμινοξέων αυτών οδηγούν σε απώλεια της λειτουργικότητας του μορίου (72). Σε αντίθεση με τη CD και τη CSD, δεν έχουν βρεθεί πολλές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την HP1 μέσω του hinge. Μία πρωτεΐνη που φαίνεται ότι συνδέεται σε αυτό το τμήμα είναι η INCENP (Inner



Centromere Protein) που αλληλεπιδρά ειδικά με την ανθρώπινη HP1α (73). Επίσης, έχει προταθεί αλληλεπίδραση της περιοχής hinge με RNA (59).

Ένα άλλο ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της περιοχής hinge είναι ότι περιέχει αλληλουχίες θέσεων φωσφορυλίωσης από πολλές κινάσες (74). Μεταλλάξεις που μιμούνται μία υπερφωσφορυλιωμένη κατάσταση της HP1 στη *Drosophila* ενισχύουν τον ομοδιμερισμό του μορίου και την αλληλεπίδραση με την me₃K9-H3 και καταργούν την ικανότητα της HP1 να αλληλεπιδρά με την ORC1 (Origin Recognition Complex 1) και την HOAP (HP1/ORC-associated protein) (75). Επιπλέον, μεταλλάξεις που καθιστούν αδύνατη την φωσφορυλίωση του hinge διαταράσσουν την αλληλεπίδραση της HP1 με ένα άλλο μέλος των πρωτεϊνών ORC, την ORC2. Οι παρατηρήσεις αυτές ενισχύουν την πιθανότητα η φωσφορυλίωση της HP1 στην περιοχή hinge να παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της δραστηριότητας της CD και της CSD. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι δομές των CD και CSD έχουν προσδιοριστεί ξεχωριστά, χρησιμοποιώντας μη τροποποιημένα πολυπεπίδια. Επομένως, δεν είναι βέβαιο εάν η τριτοταγής δομή του ενιαίου και φυσιολογικά τροποποιημένου μορίου προκύπτει από το άθροισμα των ιδιοτήτων CD και CSD. Λόγου χάρη, είναι πιθανό το hinge να μην αποτελεί απλώς ένα συνδετικό τμήμα, αλλά μία ρυθμιστική περιοχή που διαμορφώνει το μόριο τροποποιώντας τη χωρική σχέση των CD και CSD. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από το γεγονός ότι το hinge περιέχει αρκετές αλληλουχίες αναγνωρίσιμες από διάφορες κινάσες ή ακετυλ-τρανσφεράσες.

1.4.3 HP1 και συγκρότηση της χρωματίνης (Chromatin Assembly)

Είναι γνωστό ότι οι πρωτεΐνες HP1 αλληλεπιδρούν με παράγοντες που συμμετέχουν στη συγκρότηση της χρωματίνης κατά τη διάρκεια της αντιγραφής και της επιδιόρθωσης του DNA. Πειράματα *in vitro* έδειξαν ότι η υπομονάδα p150 του CAF1 (Chromatin Assembly Factor 1) αλληλεπιδρά με την HP1α και HP1β στον ποντικό και την HP1α στον άνθρωπο (42, 67, 68). Ο CAF1 είναι ένα σύμπλοκο τριών πρωτεϊνών που διαμεσολαβεί την εναπόθεση ιστονών H3/H4 στα νεοσχηματιζόμενα νουκλεοσώματα κατά τη φάση επιμήκυνσης της αντιγραφής. Η υπομονάδα p150 περιέχει το μοτίβο PxVxL που αλληλεπιδρά *in vitro* με τη CSD της HP1. Η φυσιολογική σημασία της αλληλεπίδρασης CAF1-HP1 δεν είναι σαφής, καθώς μεταλλάξεις στο CSD εμποδίζουν την σύνδεση χωρίς να επηρεάζουν την στρατολόγηση του CAF p150 στις εστίες αντιγραφής (replication foci) κατά τη διάρκεια της S φάσης (68). Μία πρόσφατη μελέτη αποκάλυψε την ύπαρξη ενός υπο-πληθυσμού της HP1α



που φαίνεται να αλληλεπιδρά με τον CAF1 μέσω της p150 κατά την αντιγραφή. Το σύμπλοκο αυτό δεν περιέχει ιστόνες και εντοπίζεται στην περιφέρεια των περικεντρομεριδιακών περιοχών ανεξάρτητα από το εάν η H3 είναι μεθυλιωμένη ή όχι (61). Η εντόπιση αυτού του υπο-πληθυσμού HP1α εξαρτάται από την p150. Καταστολή της έκφρασης της p150 με si-RNA (small interfering RNA) προκαλεί απομάκρυνση της HP1α από τις περικεντρομεριδιακές θέσεις.

Στη *Drosophila*, η HP1 αλληλεπιδρά με υπομονάδες του συμπλόκου ORC (Origin Recognition Complex) (71, 76, 77). Το σύμπλοκο ORC είναι συντηρημένο, αποτελείται από 6 υπομονάδες και απαιτείται για την έναρξη της αντιγραφής του χρωμοσωμικού DNA (78). Η υπομονάδα ORC2 συνδέεται ισχυρά με την ετεροχρωματίνη και την HP1α/HP1β στην φάση G1 και στην αρχή της S, αλλά στο τέλος της S, G2 και M περιορίζεται στα κεντρομερή (60). Απομάκρυνση της ORC2 αλλάζει την εντόπιση της HP1, αλλά δεν επηρεάζει την κατανομή της me₃K9-H3. Η υπομονάδα ORC1 συνδέεται επίσης με την HP1α, αλληλεπίδραση για την οποία είναι απαραίτητες τόσο η περιοχή CD όσο και η CSD. Μεταλλάξεις στην υπομονάδα ORC2 έχουν ως αποτέλεσμα την εκτόπιση της HP1 από τις φυσιολογικές ετεροχρωματινικές θέσεις και την καταστολή του PEV (57, 71). Στον μύκητα *S. cerevisiae* που δεν διαθέτει HP1, η ORC προσδένεται σε ειδικές αλληλουχίες DNA που βρίσκονται εκατέρωθεν αποσιωπημένων γονιδίων αναπαραγωγής (silent-mate loci) και αποτελούν εστίες από τις οποίες ξεκινά η ετεροχρωματινοποίηση (79-83). Η ORC προσελκύει την πρωτεΐνη SIR1 και αυτή με τη σειρά της μία ολόκληρη σειρά πρωτεϊνών που συνδέονται με DNA. Η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη συγκρότηση μίας πολυπρωτεϊνικής πλατφόρμας που αποτελείται από SIRs, καταστέλλοντας έτσι οποιαδήποτε μεταγραφική δραστηριότητα (84).

Είναι πιθανό ότι στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς η αλληλεπίδραση της HP1 με την ORC αποτελεί τον αντίστοιχο μηχανισμό «εγκαθίδρυσης» ετεροχρωματινικής δομής όπως στον μύκητα *S. cerevisiae*. Την παραπάνω υπόθεση υποστηρίζει η παρουσία της πρωτεΐνης HOAP που συνδέεται με τον ORC και την HP1, λειτουργώντας ως υποκατάστατο των SIRs (που δεν υπάρχουν στα ανώτερα ζώα). Η HOAP έχει ετεροχρωματινική εντόπιση, διαθέτει ικανότητα πρόσδεσης σε ειδικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA και είναι γνωστό ότι λειτουργεί ως τροποποιητής του PEV (77). Μία άλλη ερμηνεία της αλληλεπίδρασης HP1-ORC είναι ότι συμμετέχει στην επιγενετική μεταβίβαση και κληρονόμηση της ετεροχρωματινικής κατάστασης από το ένα κύτταρο στους απογόνους του, μέσω της διαδικασίας της αντιγραφής (39). Μελέτες στη μύγα (*Drosophila*) και στον βάτραχο



(*Xenopus*) έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση HP1-ORC συμβαίνει σε θέσεις πρόσδεσης του ORC (57, 71).

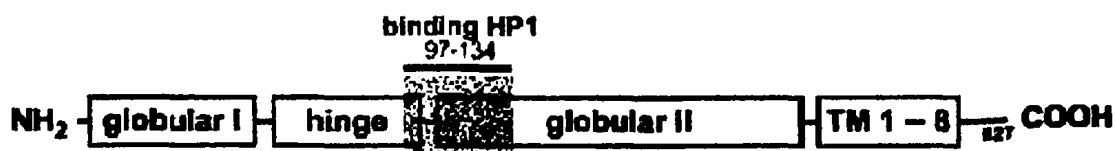
Κατ' αναλογία, στη *Drosophila* μεταλλάξεις στην ORC διαταράσσουν την ετεροχρωματική εντόπιση της HP1 (57). Επίσης, ένα πεπτιδίο που παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση HOAP-HP1 μπορεί να εκτοπίσει την HP1 από τα πολυταινικά χρωμοσώματα της *Drosophila* (76). Όπως και οι πρωτεΐνες SIR, η HP1 δεν αναγνωρίζει μία συγκεκριμένη αλληλουχία DNA. Η σύνδεση των ORC/HOAP-HP1 μπορεί να απαιτείται για τη ρυθμιζόμενη στρατολόγηση της HP1 σε συγκεκριμένες θέσεις στο γονιδίωμα και την αφετηρία της ετεροχρωματινοποίησης.

1.4.4 Αλληλεπιδράσεις HP1-πυρηνικού φακέλου

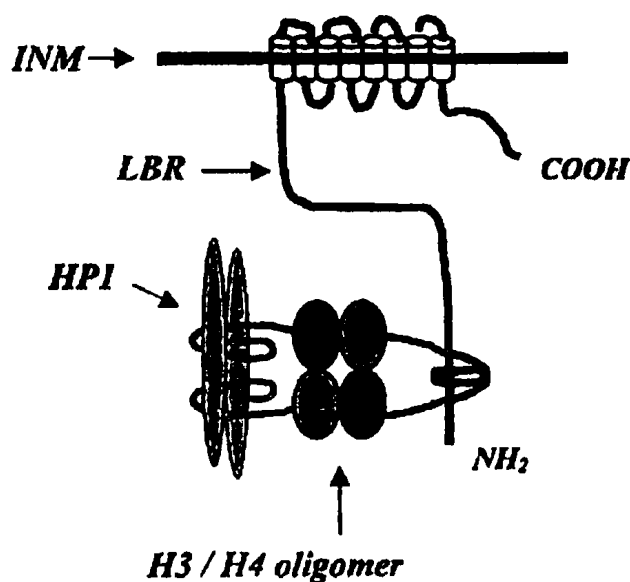
Ένα άλλο σημαντικό θέμα είναι η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης HP1 με στοιχεία του πυρηνικού φακέλου (85). Σε πολλούς τύπους κυττάρων από τον άνθρωπο έως το ποντίκι, η κεντρομεριδιακή ετεροχρωματίνη συχνά εντοπίζεται στην περιφέρεια του πυρήνα (9, 86). Επίσης, έχει δείχθει ότι γονίδια που αποσιωπούνται/καταστέλλονται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης στρατολογούνται στην περιφέρεια (87). Μελέτες έμμεσου ανοσοφθορισμού δεν συνηγορούν υπέρ μιας άμεσης σύνδεσης HP1-πυρηνικού φακέλου. (15, 36, 85). Ωστόσο, όταν παρακολουθηθεί η πορεία της HP1 που έχει εισαχθεί στο κύτταρο με μικροένεση (85), ή μετά από διαμόλυνση, (88) η HP1 εντοπίζεται (τουλάχιστον πρόσκαιρα) στον φάκελο. Επίσης, υπάρχουν αποτελέσματα που υποστηρίζουν την αλληλεπίδραση της HP1 με στοιχεία του πυρηνικού φακέλου όπως ο LBR (89, 90). Συγκεκριμένα, προτείνονται δύο διαφορετικοί τρόποι αλληλεπιδράσεων. Οι Ye και συνεργάτες (1997) έχουν δείξει μία άμεση αλληλεπίδραση του CSD τμήματος της HP1 με την περιοχή ανάμεσα στα αμινοξέα 97-134 που αντιστοιχεί στην περιοχή του RS και του δεύτερου συμπαγούς (globular) τμήματος του LBR (Σχήμα 4) (90). Οι Polioudaki και συνεργάτες (2001) έχουν υποστηρίξει μία έμμεση αλληλεπίδραση της HP1 και του LBR μέσω των ιστονών H3 και H4 (Σχήμα 5) (89). Αυτή η έμμεση αλληλεπίδραση ανάμεσα στον LBR και την HP1 επηρεάζεται αρνητικά από την υπερακετυλίωση των ιστονών από την CREB-binding protein. Το προτεινόμενο πρότυπο υποστηρίζει ότι το σύμπλοκο HP1:H3/H4:LBR λειτουργεί σαν άγκυρα (anchor) που συγκεντρώνει και δημιουργεί πολλαπλές στοιβάδες διασυνδεδεμένων νουκλεοσωμάτων. Πιο συγκεκριμένα, το αμινοτελικό τμήμα του LBR που βρίσκεται στο πυρηνόπλασμα αλληλεπιδρά με τις ιστόνες H3/H4 που είναι αποακετυλιωμένες και μεθυλιωμένες στη λυσίνη 9 της ιστόνης H3. Η περιοχή CD της HP1 αλληλεπιδρά με την ιστόνη H3 μέσω του histone



fold, ή μέσω της τριμεθυλιωμένης λυσίνης 9 και διμερίζεται μέσω της περιοχής CSD. Σε αυτή τη «δισθενή» μορφή, μπορεί επομένως να λειτουργεί ως «συνδετήρας», διαμεσολαβώντας την διασύνδεση μεταξύ διαφορετικών νουκλεοσωμάτων και τον σχηματισμό υψηλότερης τάξης δομών χρωματίνης (π.χ. πολλαπλές «στοιβάδες» πολυνουκλεοσωμάτων κάτω από την εσωτερική πυρηνική μεμβράνη). Ο σχηματισμός των πολλαπλών στοιβάδων γίνεται μέσω διαδοχικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της HP1 και των αποακετυλιωμένων/μεθυλιωμένων στη λυσίνη 9 μορίων H3/H4. Ο μηχανισμός με τον οποίο σταματάει ο σχηματισμός περαιτέρω στοιβάδων περιλαμβάνει την ακετυλίωση των ιστονών.



Σχήμα 4. Σχεδιάγραμμα που απεικονίζει την πρωτεΐνη LBR και την προτεινόμενη θέση πρόσδεσης (μπλε γραμμοσκίαση) με την πρωτεΐνη HP1 (Ye et al., 1997).



Σχήμα 5. Υποθετικό μοντέλο του συμπλέγματος LBR-ιστονών-HP1 σύμφωνα με το οποίο ο LBR και η HP1 συνδέονται μέσω ενός ολιγομερούς H3/H4 (τετραμερές) (Polioudaki et al., 2001).

1.4.5 Ο ρόλος των πρωτεϊνών HP1 στη λειτουργία κεντρομερών και τελομερών

Οι πρωτεΐνες HP1 εντοπίζονται στα κεντρομερή και συμμετέχουν στην «επέκταση» του ετεροχρωματινικού περιβάλλοντος. Εκτός από αυτή τη λειτουργία οι πρωτεΐνες HP1 συμμετέχουν επίσης στη συμπύκνωση και τον διαχωρισμό των χρωματίδων κατά την κυτταρική διαίρεση. Συγκεκριμένα, η Swi6 απαιτείται για την ομαλή σύζευξη (cohesion) των αδελφών χρωματίδων στον *S. pombe* (91). Επιπροσθέτως, όταν η Swi6 είναι μεταλλαγμένη ή δεν εκφράζεται καθόλου παρουσιάζονται ανωμαλίες στη μετακίνηση των χρωματίδων κατά το στάδιο της ανάφασης (92). Μεγάλος αριθμός κεντρομεριδίων καθυστερούν να μετακινηθούν προς τους πόλους της ατράκτου και επίσης παρατηρείται μεγάλος βαθμός απώλειας χρωμοσωμάτων. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα, η HP1α είναι απαραίτητη για τον πιστό διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων στη *Drosophila*. Μύγες ομόζυγες για μεταλλάξεις στην HP1 πεθαίνουν στα τελευταία στάδια της προνύμφης λόγω σοβαρών ανωμαλιών στη διαδικασία διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων κατά το στάδιο της ανάφασης (14). Επίσης, σε ποντίκια *Sun39h-null* η μείωση ή και η απουσία της τριμεθυλίωσης της λυσίνης 9 της ιστόνης H3 (me_3K9-H3) οδηγεί σε αυξημένη αστάθεια των χρωμοσωμάτων λόγω της υψηλής συχνότητας μη-ομόλογου ανασυνδυασμού στη μείωση (45). Η σχέση ανάμεσα στην HP1 και τον χρωμοσωμικό διαχωρισμό παρουσιάζεται σε μία μελέτη που έγινε στον *S. pombe* και αποκαλύπτει τη φυσική αλληλεπίδραση ανάμεσα στην Swi6 και το σύμπλοκο των πρωτεϊνών cohesins (93). Συγκεκριμένα, μία υπομονάδα του συμπλόκου αυτού, η Psc3, αλληλεπιδρά με την Swi6 και την HP1α στο ποντίκι.

Η HP1 φαίνεται να συμμετέχει επίσης στην ομαλή λειτουργία των τελομερών εμποδίζοντας την «παρά φύση» σύνδεση/συγκόλληση τους. Πρόσφατες μελέτες στη *Drosophila* έδειξαν ότι ενώ η απαλοιφή της μεθυλτρανσφεράσης *Su(var)3-9* υπεύθυνης για την me_3K9-H3 δεν επηρεάζει τη σωστή λειτουργία των τελομερών, η παρουσία της HP1 είναι απαραίτητη (64). Φαίνεται λοιπόν ότι η HP1 συνδέεται απευθείας στο τελομεριδιακό DNA με τρόπο που δεν εξαρτάται από την μεθυλίωση ή την αλληλουχία του DNA. Προτείνεται ότι η HP1 που είναι προσδεσμένη στο DNA προωθεί την ετεροχρωματινοποίηση της τελομεριδιακής περιοχής στρατολογώντας (μετά) μία μεθυλ-τρανσφεράση. Δεν είναι γνωστό εάν ο ρόλος αυτός της HP1 είναι συντηρημένος σε άλλους οργανισμούς εκτός της *Drosophila*. Τα τελομερή στη *Drosophila* αποτελούν μία ιδιόζουσα κατάσταση αφού δεν έχουν τις επαναλήψεις DNA που εισάγει η τελομεράση στους άλλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και ουσιαστικά αποτρέπουν



την ελάττωση του μήκους των τελομεριδιακών περιοχών μέσω μετάθεσης αλληλουχών DNA (prevents telomere attrition via DNA transposition).

1.4.6 Η HP1 και η συσχέτισή της με το μεταστατικό δυναμικό

Διάφορες μορφολογικές και βιοχημικές παράμετροι που σχετίζονται με τη δομή και τη λειτουργία των ευκαρυωτικών κυττάρων έχουν κατά καιρούς χρησιμοποιηθεί ως δείκτες πρόγνωσης του καρκίνου και ως μέτρο του μεταστατικού δυναμικού. Στον κατάλογο αυτών των δεικτών περιλαμβάνονται χρωμοσωμικές ανωμαλίες (94) και αλλαγές στη μορφολογία του πυρήνα (95, 96). Οι αλλαγές στο σχήμα και το μέγεθος του πυρήνα, όπως και οι αλλοιώσεις της χρωματινικής σύστασης έχουν συσχετισθεί με πιο επιθετικούς καρκίνους του μαστού και με επανεμφάνιση της νόσου μετά από περιόδους ύφεσης. Σε μία μελέτη στην οποία έγινε συσχέτιση του μεγέθους του πυρήνα σε συνδυασμό με την μικροσκοπική του υφή (nuclear texture) αποδείχτηκε ότι οι παράμετροι αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες πρόγνωσης στο 92% των ασθενών με καρκίνο του μαστού (95). Οι μελέτες αυτές προτείνουν ότι τα πρότυπα συμπύκνωσης της χρωματινής αλλάζουν κατά την εξέλιξη της μεταστατικής νόσου. Το αδρό (coarse) χρωματινικό δίκτυο, η ύπαρξη συσσωματωμάτων (clumping) και η αύξηση του μεγέθους του πυρήνα φαίνεται λοιπόν ότι αποτελούν χαρακτηριστικά των επιθετικών μορφών καρκίνων.

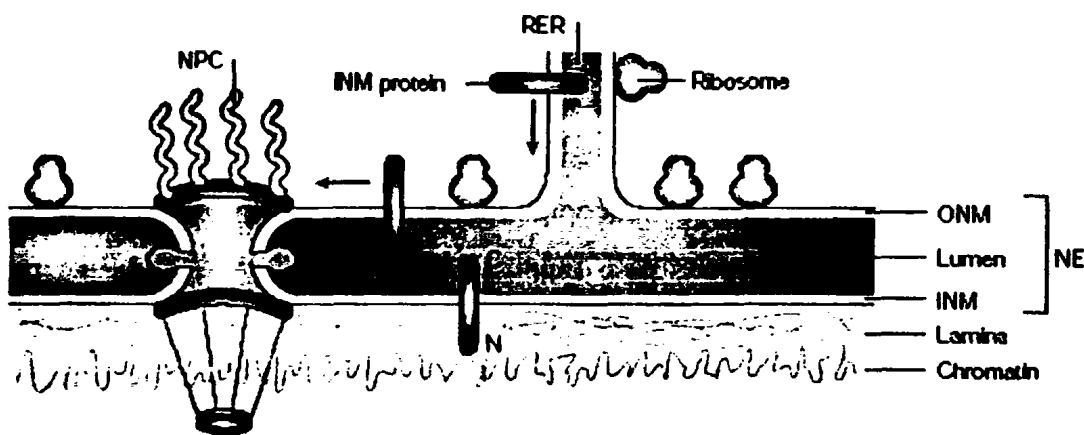
Είναι γνωστό ότι η έκφραση της μίας εκ των τριών ισομορφών της HP1, της HP1α, επηρεάζεται ιδιαίτερα σε καρκίνους του μαστού που είναι διηθητικοί και έχουν υψηλό μεταστατικό δυναμικό. Αυτό δεν είναι παράδοξο, διότι η HP1 είναι μία από τις βασικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην οργάνωση της χρωματινής και στη γονιδιακή ρύθμιση. Η ύπαρξη τριών ισομορφών HP1, που έχουν σχεδόν την ίδια δομή και παρόμοιες βιοχημικές ιδιότητες αλλά εντοπίζονται σε διαφορετικούς πυρηνικούς «τόπους», αποτελεί ένα αίνιγμα στη διεθνή βιβλιογραφία. Δεδομένου ότι το πρότυπο έκφρασης των τριών ισομορφών δεν έχει μελετηθεί μέχρι τώρα *in vivo*, δεν είναι σαφές εάν η πολυμορφία της HP1 αποτελεί μια «εξελικτική σπατάλη» χωρίς ιδιαίτερη φυσιολογική σημασία, ή μία ένδειξη λειτουργικά σημαντικής κυτταρο- ή ιστο-ειδικότητας. Αποτελέσματα που δημοσιεύθηκαν πρόσφατα υποστηρίζουν εμμέσως το δεύτερο ενδεχόμενο και δημιουργούν τη βάσιμη υποψία ότι η HP1 επηρεάζει τη βιολογική συμπεριφορά (μεταστατικό δυναμικό) επιθετικών νεοπλασιών (97, 98). Οι παρατηρήσεις αυτές υποστηρίζουν ότι στην κυτταρική σειρά MDA-MB-231 που προέρχεται από καρκίνο του μαστού και θεωρείται πολύ διηθητική σε σύγκριση με την



κυτταρική σειρά MCF-7, μειώνεται η έκφραση της μία εκ των τριών ισομορφών της HP1, της HP1α. Υποβοηθούμενη έκφραση (forced expression) της HP1α σε καρκινικά κύτταρα μειώνει κατά πολύ τη διηθητική τους ικανότητα, αποκαλύπτοντας έτσι έναν νέο μηχανισμό ρύθμισης του μεταστατικού δυναμικού. Αυτό έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, διότι ο προσδιορισμός της σχετικής αναλογίας των HP1α, β και γ σε διάφορους τύπους και στάδια καρκίνου θα μπορούσε να έχει μεγάλη προβλεπτική ή διαγνωστική σημασία.

1.5 Μορφολογία, δομική οργάνωση και λειτουργία του κυτταρικού πυρήνα

Μία βασική διαφορά ανάμεσα στους προκαρυωτικούς και τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι η οργάνωση του γενετικού υλικού σε ένα διακριτό διαμέρισμα που ονομάζεται πυρήνας. Ο πυρήνας οριοθετείται από τον πυρηνικό φάκελο, ένα μεμβρανικό περίβλημα που αποτελείται από πεπλατυσμένες δεξαμενές και περιλαμβάνει τρεις διακριτές περιοχές: την εξωτερική πυρηνική μεμβράνη προς την πλευρά του κυτταροπλάσματος, την εσωτερική πυρηνική μεμβράνη προς το πυρηνόπλασμα και τη μεμβράνη των συμπλεγμάτων των πυρηνικών πόρων. Οι πυρηνικοί πόροι αποτελούν το σημείο στο οποίο συντήκονται η εσωτερική με την εξωτερική πυρηνική μεμβράνη και επιτρέπουν την εκλεκτική μεταφορά μακρομορίων και μεταβολιτών ανάμεσα στο πυρηνόπλασμα και το κυτταρόπλασμα. (Σχήμα 6)



Σχήμα 6. Σχηματική αναπαράσταση του πυρηνικού φακέλου και των στοιχείων που τον συγκροτούν. NPC (σύμπλοκο των πυρηνικών πόρων), INM PROTEIN (πρωτεΐνη της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης), RER (αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο), Ribosome (ριβόσωμα), ONM (εξωτερική πυρηνική μεμβράνη), Lumen (αυλός), INM (εσωτερική πυρηνική μεμβράνη), Lamina (λάμινα), Chromatin (χρωματίνη), NE (πυρηνικός φάκελος) (Mataj, 2004).

Τα συμπλέγματα των πυρηνικών πόρων είναι εξειδικευμένες «μοριακές μηχανές» μοριακού βάρους περίπου 125 MDa, οι οποίες αποτελούνται από περισσότερες από 50 (στη ζύμη) έως και 100 (στα σπονδυλωτά) διαφορετικές πρωτεΐνες, τις νουκλεοπορίνες. Σχηματίζουν έναν διάυλο που συγκροτείται από οκτώ ακτινωτούς σχηματισμούς και διαμορφώνει έναν πόρο. Τα στόμια του διαύλου καταλήγουν σε δύο δακτυλίους, έναν κυτταροπλασματικό και έναν πυρηνοπλασματικό. Από τον τελευταίο εκφύονται ινίδια τα οποία συνδέονται στα άπω άκρα τους δημιουργώντας μία κωνοειδή προσεκβολή προς την μεριά του πυρηνοπλασματικού δακτυλίου.

Η εξωτερική και η εσωτερική πυρηνική μεμβράνη έχουν παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες και φωσφολιπιδική σύνθεση, αλλά διαφέρουν στην πρωτεϊνική τους σύσταση. Η εξωτερική πυρηνική μεμβράνη αποτελεί συνέχεια του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου, ενώ η εσωτερική περιέχει ειδικά στοιχεία που δεν συναντώνται σε άλλες μεμβράνες και αλληλεπιδρά με την πυρηνική λάμινα και την χρωματίνη. Η πυρηνική λάμινα αποτελείται από ένα εκτεταμένο δίκτυο ενδιάμεσων ινιδίων και προκύπτει από πολυμερισμό ενός ή και περισσότερων ειδών λαμινών τύπου A και τύπου B.

1.6 Οργάνωση και λειτουργία του πυρηνικού φακέλου

Τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί κατά πολύ ο αριθμός των αναγνωρισμένων πρωτεϊνών της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης. Ανάμεσα σε αυτές οι πιο καλά χαρακτηρισμένες είναι ο LBR (Lamin B Receptor), η LAP1 (Lamina Associated-Polypeptide 1), η LAP2, η Emerin και η MAN1 (Πίνακας 3, Σχήμα 7).

Ο LBR εκφράζεται σε όλα τα μετázωα και αρχικά απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε στα ερυθροκύτταρα των πτηνών. Ονομάζεται επίσης και p58 γιατί, αν και έχει πραγματικό μοριακό βάρος 74 kDa, κατά την ηλεκτροφόρηση μεταναστεύει στην περιοχή των 58 kDa. Αποτελείται από ένα υδρόφιλο αμινοτελικό τμήμα και ένα υδρόφοβο καρβοξυτελικό τμήμα το οποίο περιέχει 7 ή 8 (προβλεπόμενα) διαμεμβρανικά τμήματα (99, 100). Το αμινοτελικό τμήμα προβάλλει προς το πυρηνόπλασμα, είναι εξαιρετικά φορτισμένο και περιέχει πολλαπλά μοτίβα σερίνης/αργινίνης (SR motifs). Τα μοτίβα αυτά παρέχουν μία πλατφόρμα για πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις και αποτελούν στόχους φωσφορυλίωσης.

Ο υδρόφοβος πυρήνας του LBR παρουσιάζει μία σημαντική ομοιότητα στο επίπεδο της αλληλουχίας με τις αναγωγάσες της στερόλης στα σπονδυλωτά, στους μύκητες και στα φυτά, αναδεικνύοντας μία εξελικτική συγγένεια με τα ένζυμα αυτά (101). Στον άνθρωπο το γονίδιο



του LBR βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1q42.1 και περιέχει 13 εξόνια. Τα πρώτα τέσσερα κωδικοποιούν την αμινοτελική περιοχή και τα υπόλοιπα την καρβοξυτελική. Επίσης, υπάρχει ένα μεγάλο εσόνιο που διαχωρίζει τα εξόνια 4 και 5, και είναι πολύ πιθανό το σημερινό γονίδιο του LBR να έχει προκύψει από ανασυνδυασμό δύο αρχέγονων γονιδίων, εκ των οποίων το ένα κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη «τύπου ιστόνης» και το άλλο ένα ένζυμο του ενδοπλασματικού δικτύου (102).

Ο LBR αποτελεί μέρος ενός μεγάλου πρωτεϊνικού συμπλόκου (103, 104). Το σύμπλοκο αυτό περιλαμβάνει τις λαμίνες Α- και Β-τύπου, μία ειδική κινάση (LBR κινάση), μία άλλη διαμεμβρανική πρωτεΐνη την p18 και έναν χαμηλού μοριακού βάρους παράγοντα που ονομάζεται p32/p34. Η LBR κινάση είναι όμοια με την κινάση SRPK1, ένα ένζυμο που τροποποιεί μοτίβα σερίνης/αργινίνης (105, 106). Αυτή η ειδική φωσφορυλίωση για τα μοτίβα σερίνης/αργινίνης αποδεσμεύει τον p32/p34 από το σύμπλοκο του LBR, αλλά δεν επηρεάζει την σύνδεση των λαμινών (105). Η p18 έχει δομική ομοιότητα με τους περιφερικούς υποδοχείς των βενζοδιαζεπινών, εκφράζεται σε έναν περιορισμένο αριθμό τελικώς διαφοροποιημένων κυττάρων και συνδέεται με τον LBR και τις λαμίνες Β-τύπου *in vitro* (107).

Ένα σημαντικό θέμα προς διερεύνηση είναι κατά πόσο το σύμπλοκο του LBR διασπάται κατά τη μίτωση. Ο LBR και η λαμίνη τύπου Β συνεντοπίζονται και συγκαθιζάνουν σε μιτωτικά εκχυλίσματα ηπατώματος κοτόπουλου (108), χωρίς όμως να παρατηρείται κάτι αντίστοιχο σε άλλα συστήματα (109, 110). Πειράματα που έγιναν σε κύτταρα Cos-7, στα οποία υπερεκφράστηκε τμήμα του LBR έδειξαν ότι ο LBR «απορροφάται» από το ενδοπλασματικό δίκτυο (111). Ωστόσο, η παρατήρηση αυτή πρέπει να ερμηνευθεί με μεγάλη προσοχή, καθώς απέχει κατά πολύ από την φυσιολογική κατάσταση. Είναι πιθανό η «οπισθοδρόμηση» του LBR στο ενδοπλασματικό δίκτυο να οφείλεται στα πολύ υψηλά επίπεδα έκφρασης με συνέπεια τη δημιουργία «υπερτροφικού» πυρηνικού φακέλου που μπορεί να φιλοξενήσει επιπλέον μόρια.

Η LAP1 είναι μία μεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II και αποτελείται από ένα πυρηνοπλασματικό αμινοτελικό τμήμα, μία διαμεμβρανική περιοχή και ένα καρβοξυτελικό τμήμα που προβάλλει στον περιπυρηνικό χώρο. Η πρωτεΐνη εκφράζεται σε διαφορετικές ισομορφές (LAP1A, B και C) που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα του μεταγραφήματος του γονιδίου της LAP1. Η LAP1C αποτελεί την μικρότερη ισομορφή και εκφράζεται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, ενώ η LAP1A και LAP1B διαθέτουν μεγαλύτερα πυρηνοπλασματικά τμήματα και



εκφράζονται μόνο σε καλά διαφοροποιημένα κύτταρα όπως και οι λαμίνες τύπου A (112, 113). Δεν είναι σαφές εάν η LAP1 εκφράζεται σε όλα τα μετάζωα.

Όπως ο LBR, και η LAP1 φαίνεται να αποτελεί μέρος ενός μεγάλου πρωτεϊνικού συμπλόκου. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης έδειξαν ότι η LAP1 είναι στενά συνδεδεμένη με τις λαμίνες τύπου B και μία ασβεστοεξαρτώμενη κινάση (114). Επίσης, ανάλυση στο επίπεδο της αλληλουχίας έδειξε ότι η LAP1A και LAP1B διαθέτουν ένα μοτίβο ελικοειδούς έλικας (coiled-coil) 27 αμινοξέων το οποίο μπορεί να είναι λειτουργικό σε αλληλεπιδράσεις LAP1-LAP1 (113). Στο επίπεδο του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου η LAP1 σχηματίζει ευμεγέθη σύμπλοκα που κατανέμονται περιοδικά στον πυρηνικό φάκελο (114). Η αλληλεπίδραση της LAP1 με τις πυρηνικές λαμίνες διαταράσσεται από την μιτωτική φωσφορυλίωση και η τροποποιημένη πρωτεΐνη απελευθερώνεται από το σύμπλοκο και διαχωρίζεται από τις μιτωτικές μεμβράνες (112). Δεν είναι γνωστό κατά πόσο οι μεμβράνες αυτές αποτελούν μέρος του ενδοπλασματικού δικτύου ή αντιπροσωπεύουν διακριτά κυστίδια (114-116).

Η LAP2 είναι μία άλλη οικογένεια εναλλακτικά ματισμένων πρωτεϊνών που αποτελείται από τρεις ισομορφές στον άνθρωπο (α , β , γ) και επτά στον ποντικό (α , β , β' , γ , δ , ϵ , ζ). Οι ισομορφές β , γ , δ και ϵ ανήκουν στις μεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου II και αποτελούνται από ένα πυρηνοπλασματικό αμινοτελικό τμήμα, μία διαμεμβρανική περιοχή και ένα μικρό καρβοξυτελικό τομέα που προβάλλει στον περιπυρηνικό χώρο. Η LAP2 α και η LAP2 ζ δεν διαθέτουν διαμεμβρανικό τμήμα και συνεπώς είναι πυρηνοπλασματικές. Η LAP2 β διαθέτει τη μεγαλύτερη αμινοτελική περιοχή (~400 αμινοξέα), ενώ τα αντίστοιχα τμήματα στις LAP2 γ , δ , ϵ είναι μικρότερα. Η LAP2 α είναι δομικά και λειτουργικά διαφορετική από τις άλλες ισομορφές. Μοιράζεται ένα κοινό τμήμα 187 αμινοξέων στην αμινοτελική περιοχή με όλες τις άλλες ισομορφές και περιέχει ένα ξεχωριστό καρβοξυτελικό τμήμα (506 αμινοξέα), χωρίς να διαθέτει διαμεμβρανική περιοχή (116).

Η LAP2 β φαίνεται να συμμετέχει στον σχηματισμό πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης και χρήση χημικών διασυνδετών (cross-linking) έδειξαν την ύπαρξη ενός συμπλόκου τουλάχιστον τεσσάρων πυρηνικών πρωτεϊνών. Όπως η LAP1, η LAP2 β αλληλεπιδρά με τις λαμίνες τύπου B και η αποδέσμευσή της επιτυγχάνεται με μιτωτική φωσφορυλίωση (112, 114). Η υπερφωσφορυλιωμένη LAP2 β εντοπίζεται σε μιτωτικά κυστίδια, διαφορετικά από εκείνα που περιέχουν LAP1.

Η LAP2 β διαθέτει ένα πυρηνοπλασματικό, αμινοτελικό τμήμα πλούσιο σε κατάλοιπα σερίνης, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και μία πολύ μικρή καρβοξυτελική «ουρά» που προβάλλει στον περιπυρηνικό χώρο. Η πρωτεΐνη αυτή είναι το προϊόν του ανθρώπινου γονιδίου STA και



υπάρχει επίσης στα τρωκτικά. Το ανθρώπινο γονίδιο *STA* βρίσκεται στο χρωμόσωμα X (Xq28) και όταν μεταλλαχθεί προκύπτει μία μορφή μυϊκής δυστροφίας που ονομάζεται Emery-Dreifuss (117, 118). Ανοσοϊστοχημικές μελέτες αποκάλυψαν ειδική εντόπιση στον πυρηνικό φάκελο, εκτός από τα καρδιακά μυοκύτταρα όπου υλικό εντοπίζεται επίσης και στους ενδιάμεσους δίσκους. Η πρωτεΐνη είναι επίσης παρούσα στα αιμοπετάλια τα οποία είναι απύρνηνα και δεν διαθέτουν εξειδικευμένες μεμβράνες (119).

Η *emerin*, ο LBR, η LAP2β και οι λαμίνες τύπου Β αποτελούν μέρη ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου. Επίσης, έχει δειχθεί άμεση αλληλεπίδραση της *emerin* με την λαμίνη τύπου Α (120). Μεταλλάξεις στο γονίδιο της λαμίνης Α προκαλούν επίσης μυϊκή δυστροφία τύπου Emery-Dreifuss (121), το οποίο ουσιαστικά προτείνει την ύπαρξη ενός ενιαίου τρόπου λειτουργίας μεταξύ των λαμινών και των πρωτεϊνών της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης με τις οποίες αλληλεπιδρούν και υποστηρίζουν ίσως μια κοινή και ξεχωριστή λειτουργία στο μυ. Η *MAN1*, που αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά σε έναν αυτοάνοσο ορρό, αποτελείται από δύο διαμεμβρανικά τμήματα, ένα μεγάλο αμινοτελικό και ένα σχετικά μικρό καρβοξυτελικό τμήμα που προβάλλει στο πυρηνόπλασμα (122). Το γονίδιο *MAN1* στον άνθρωπο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 12q14 και αποτελείται από 10 εξόνια, από τα οποία τα επτά κωδικοποιούν την πρωτεΐνη. Έχει αναγνωριστεί ένα μόνο mRNA και η πρωτεΐνη φαίνεται να είναι παρούσα σε όλους τους ιστούς που έχουν μελετηθεί. Ανάλυση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας έδειξε ότι η *MAN1* μοιράζεται ένα κοινό δομικό μοτίβο 40 αμινοξέων με την *emerin* και την LAP2β, το λεγόμενο μοτίβο LEM (LEM module). Το LEM module αποτελείται από δύο μεγάλες παράλληλες α-έλικες που συνδέονται με μία αγκύλη 12 αμινοξέων. Πρόσφατα βρέθηκε ότι μεταλλάξεις στη *MAN1* προκαλούν διάφορες ασθένειες όπως οστεοποικίλωση, το σύνδρομο Buschke-Ollendorff, και μελορεόστωση. Επίσης, το καρβοξυτελικό τμήμα της *MAN1* αλληλεπιδρά με την Smad2 και την Smad3 και ανταγωνίζεται τη σηματοδότηση από τον αυξητικό παράγοντα TGF-β μέσω των Smad2 και Smad3 (123).

Έλεγχος GFP-fusion βιβλιοθηκών καθώς και πρωτεομική ανάλυση αποκάλυψε την ύπαρξη νέων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, όπως η *Nurim* (Nuclear-rim) με πέντε διαμεμβρανικά τμήματα και λίγα υδρόφιλα, η *Unc-84* και η *LUMA* με τρία έως τέσσερα διαμεμβρανικά τμήματα.

Μία νέα ομάδα πρωτεϊνών που αρχικά ονομάστηκε *Synes* και στη συνέχεια *Nesprins* αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά σε μία ανάλυση με χρήση του συστήματος των δύο υβριδίων (two-hybrid) για μία κινάση στη μετασυναπτική μεμβράνη του μυ. Με την χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων, η *Syne-1* βρέθηκε να εντοπίζεται στον πυρηνικό φάκελο. Η



οικογένεια αυτή χαρακτηρίζεται από ποικίλο αριθμό επαναλήψεων σπεκτρίνης (spectrin repeats) και ένα συντηρημένο τμήμα που αναφέρεται ως τμήμα KASH (KASH domain, Klarsicht, Anc-1, Syne-1 Homology). Η οικογένεια πρωτεϊνών Syne/Nesprin του πυρηνικού φακέλου επεκτάθηκε με την εύρεση ενός ξεχωριστού γονιδίου (Syne/Nesprin-2) στον άνθρωπο το οποίο είχε σημαντική ομοιότητα στο επίπεδο της αλληλουχίας με την Syne/Nesprin-1. Η Nesprin-2 συνεντοπίζεται και αλληλεπιδρά με την λαμίνη A και την emerin. Σε κύτταρα στα οποία λείπει η λαμίνη A/C, η Nesprin-2 και η emerin απεντοπίζονται και σχηματίζουν συσσωματώματα στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Επίσης, δύο άλλες πρωτεΐνες στα θηλαστικά, η Upc84A (αναφέρεται επίσης ως Sun1) και η SUN2 (Sad-1 και UNC τμήμα) βρέθηκαν να είναι ομόλογες με την Upc84, μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη του πυρηνικού φακέλου που αναγνωρίστηκε αρχικά στον *C. elegans*. Μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας έδειξαν ότι η SUN2 εντοπίζεται σε μικρές νησίδες στον πυρηνικό φάκελο.

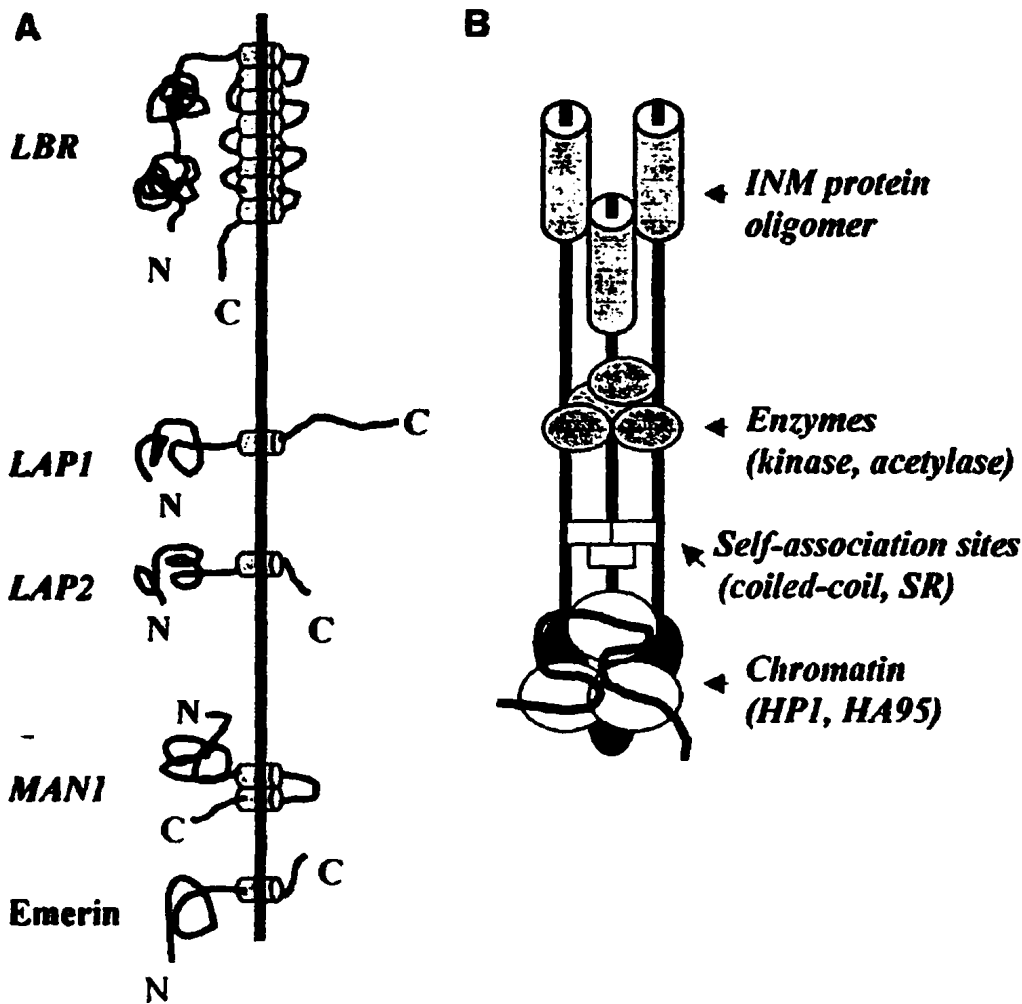
Table 1 | Properties of inner nuclear membrane proteins

Name	Size	Lamin binding	Chromatin interactions	Other properties
LAP1A	75 kDa	A/B-type lamins		REF. 56
LAP1B	68 kDa	A/B-type lamins		Splice variant of LAP1A (REF. 65).
LAP1C	57 kDa	A/B-type lamins?		Type-2 membrane protein. 173-residue luminal domain. 311-residue nucleoplasmic domain. Splice variant of LAP1A (REF. 65, 67)
LAP2B	50 kDa	B-type lamins	BAF, HAF5	Type-2 membrane protein. Large, 410-residue nucleoplasmic domain. LEM domain ^{14, 20} .
LAP2α, β, γ	38–46 kDa	Most probably B-type lamins	Probable chromatin binding through BAF	Type-2 membrane proteins. Splice variants of LAP2β. Two other splice variants, LAP2α and LAP2γ, are soluble proteins ^{12, 20} .
LER	70 kDa	B-type lamins	HP1, HAF5	Multi-spanning protein. Sterol C-14 reductase activity ^{20, 61} .
Emerin	20 kDa	A-type lamins	BAF	Defect in emerin linked to Emery-Dreifuss muscular dystrophy. LEM domain ¹⁴ .
Nurim	29 kDa			Multi-spanning membrane protein ¹⁹ .
MAN1	32 kDa	Unknown	Probable chromatin binding through BAF	LEM domain ¹⁴ .
LUMA	45 kDa			Multi-spanning ¹⁹ .
RFPB	126 kDa		SMN/SNF-related transcription factors containing a FING finger	Multi-spanning type-IV P-type ATPase ¹⁰⁰ .
UNC-63	118 kDa			Type-2 membrane protein. Interacts with UNC-64 (REF. 39).
UNC-64	126 kDa	<i>C. elegans</i> lamin		Central transmembrane domain. Role in nuclear migration ³⁹ .
Syne1 (Myne1, Nesprin1)	112–380 kDa	A-type lamins		Type-2 membrane protein. Multiple spectrin repeats. Klarsicht homology at carboxyl terminus. Several splice variants ^{40–42} .
Syne2 (Nesprin2)	61–377 kDa	Unknown		Type-2 membrane protein. Several splice variants ^{40–42} .
NUANCE	706 kDa ⁴²	Unknown		Proximal type-2 membrane protein. Klarsicht homology at carboxyl terminus. Syne1 splice variant. Possible INM protein (first Genbank submission, accession number AF435011).
KIAA0610	100 kDa			Multi-spanning. C2H2 zinc finger. Partial homology to JNC-64 (REF. 102).

BAF: barrier to autointegration factor; *C. elegans*: *Caenorhabditis elegans*; INM: inner nuclear membrane; LAP: lamina-associated polypeptide; LER: lamin B receptor; F-FING: FING finger-binding protein.

Πίνακας 3. Πρωτεΐνες της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης και χαρακτηριστικές ιδιότητές τους (Burke & Stewart, 2002).





Σχήμα 7. Τοπολογία και οργάνωση των πρωτεϊνών της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης. (A) Σχηματικό διάγραμμα που αναπαριστά τα δομικά χαρακτηριστικά μερικών από τις γνωστές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Τα υδρόφιλα άκρα (ακανόνιστες γραμμές) προβάλλουν στο πυρηνόπλασμα (αριστερά) και την περικυρηνική δεξαμενή (δεξιά), ενώ οι υδρόφοβες περιοχές (κύλινδροι) διασχίζουν την εσωτερική πυρηνική μεμβράνη (ευθεία γραμμή). (B) Υποθετικό μοντέλο πρωτεϊνικών συγκροτημάτων της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης. Τα συμπλέγματα αυτά πιθανότατα αποτελούνται από ολιγομερή μεμβρανικών πρωτεϊνών (που συγκροτούνται τοπικά μέσω αλληλεπιδράσεων coiled-coil και SR-SR) ρυθμιστικά ένζυμα και στοιχεία συνδεδεμένα με τη χρωματίνη (Georgatos, 2001).

1.7 Πυρηνικός φάκελος και ασθένειες

Πρόσφατες κλινικές και εργαστηριακές μελέτες αποκαλύπτουν ότι βλάβες του πυρηνικού φακέλου και της πυρηνικής λάμινας συσχετίζονται με ποικίλες ασθένειες στον άνθρωπο και τα ζώα. Ο όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει τα σύνδρομα αυτά, που περιλαμβάνουν καρδιακές και σκελετικές μυοπάθειες, λιποδυστροφίες και περιφερικές νευροπάθειες, είναι “nuclear envelopathies” (Πίνακας 4).

Table 1. Diseases related to mutation of lamins or lamin-associated proteins

	Major phenotypes	Mutated gene	Representation of mutations
Autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy	Early contractures of tendons, slowly progressing muscle weakness and wasting, conduction defects in heart	LMNA (gene encoding lamins A and C). Chromosome location 1q21.3	Throughout coding sequence, includes amino acid substitutions, frameshift and premature stop codons
Autosomal recessive Emery-Dreifuss muscular dystrophy	Early contractures of tendons, slowly progressing muscle weakness and wasting, conduction defects in heart	LMNA (gene encoding lamins A and C). Chromosome location 1q21.3	Single homozygous mutation at C644T giving rise to amino acid substitution P222Y
X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy	Early contractures of tendons, slowly progressing muscle weakness and wasting, conduction defects in heart	STA (gene encoding emerin). Chromosome location Xq28	Throughout coding sequence, includes frameshift and missense mutations and premature stop codons
Limb girdle muscular dystrophy type II	Progressive muscle weakness of hip girdle and proximal arm and leg muscles	LMNA (gene encoding lamins A and C). Chromosome location 1q21.3	Amino acid substitution, codon deletion, and splice donor mutations reported
Dilated cardiomyopathy with conduction system defect	Impaired systolic function and dilation of the left or both ventricles. Variable skeletal muscle involvement	LMNA (gene encoding lamins A and C). Chromosome location 1q21.3	Throughout coding sequence, includes amino acid substitutions, frameshift and premature stop codons
Charcot-Marie-Tooth disorder	Motor and sensory neuropathies characterized by muscle weakness and wasting, foot deformities, and axonal degeneration	LMNA (gene encoding lamins A and C). Chromosome location 1q21.3	Single mutation in Algerian families giving rise to R250C substitution
Dunnigan-type familial partial lipodystrophy	Loss of subcutaneous adipocyte tissue from extremities and trunk with excessive fat deposition in neck. Profound insulin resistance and diabetes	LMNA (gene encoding lamins A and C). Chromosome location 1q21.3	Missense mutations clustered in exons 9 and 11
Mandibular acid dysplasia	Hypoplastic mandibles, dental crowding, stiff joints, partial lipodystrophy, insulin resistance	LMNA (gene encoding lamins A and C). Chromosome location 1q21.3	Homozygous mutation R527H
Holtzblatt-Gilford progeria	Short stature, alopecia, absence of subcutaneous fat, osteoporosis, musculoskeletal abnormalities, diabetes type II, premature atherosclerosis	LMNA (gene encoding lamins A and C). Chromosome location 1q21.3	C-to-T transition in codon 608 in exon 11 (C608Q) activating a cryptic splice donor site
Atypical Werner's syndrome	Sclerodermis-like skin changes, especially in the extremities, cataract, subcutaneous calcification, premature arteriosclerosis, diabetes mellitus, and a widened and prematurely aged face	LMNA (gene encoding lamins A and C). Chromosome location 1q21.3	A57P, R133L, and L140R

Πίνακας 4. Ασθένειες που σχετίζονται με μεταλλάξεις στις λαμίνες ή και σε πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τις λαμίνες (Burke & Stewart, 2006).

Δύο είναι οι καλά μελετημένες ασθένειες που αφορούν το γονίδιο του LBR: Η ανωμαλία Pelger-Hüet (PHA) και η δυσπλασία Greenberg. Η συχνότητα της PHA υπολογίζεται στο 0.01-0.1%, αλλά είναι πολύ μεγαλύτερη σε μία περιοχή της βόρειας Σουηδίας (0.6%) και της νοτιοανατολικής Γερμανίας (1.01%). Η στοιχειώδης γενετική βλάβη που προκαλεί το σύνδρομο αυτό κληρονομείται ως αυτοσωματικός, επικρατής χαρακτήρας. Στα προσβεβλημένα άτομα, τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα παρουσιάζουν μειωμένη λόβωση στους πυρήνες τους και μεγάλα συσσωματώματα χρωματίνης. Οι ομόζυγοι ασθενείς παρουσιάζουν σκελετικές ανωμαλίες, δεν αναπτύσσονται κανονικά και πολλές φορές εκδηλώνουν επιληπτικές κρίσεις. Ορισμένες φορές, οι μεταλλάξεις του LBR που είναι



υπεύθυνες για τη ΡΗΑ εντοπίζονται σε θέσεις ματίσματος (splice sites) του πρωτογενούς μεταγραφικού προϊόντος. Ωστόσο, σε άλλες περιπτώσεις, έχουμε αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης (frameshift mutations), ή πρόωρη λήξη της μετάφρασης του αντίστοιχου mRNA (nonsense mutations). Τα λεμφοβλαστοειδή κύτταρα ετεροζύγων ατόμων περιέχουν χαμηλά επίπεδα LBR, ενώ κύτταρα από ομόζυγα άτομα περιέχουν μόνο ίχνη του. Λόγω του ότι ο LBR λειτουργεί ως αναγωγή της χοληστερόλης, μείωση ή απουσία του μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές του μεταβολισμού της χοληστερόλης και να προκαλέσει αναπτυξιακές ανωμαλίες, όπως έχει δειχθεί για το σύνδρομο Smith-Lemli-Opitz στο οποίο είναι μεταλλαγμένη η ομόλογη αναγωγή της στερόλης DHCR7. Σε δύο ανεξάρτητα στελέχη ποντικών με αιματολογικό φαινότυπο παρόμοιο με αυτόν που συναντάται στην Pelger-Huet (124) βρέθηκε 1 frameshift και 1 nonsense μετάλλαξη στο γονίδιο του LBR. Τα ποντίκια αυτά έχουν «ιχθυωσικό» (ic) φαινότυπο και παρουσιάζουν ανωμαλίες στην οργάνωση της χρωματίνης παρόμοιες με αυτές που περιγράφηκαν παραπάνω. Οι Shultz και συνεργάτες (2003) παρατήρησαν ότι τα ομόζυγα ic ποντίκια αναπτύσσουν επίσης και άλλες φαινοτυπικές ανωμαλίες, όπως αλωπεκία, συνδακτυλία και υδροκεφαλία (125). Ο γενετικός τόπος ic στο ποντίκι εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1 και βρίσκεται πολύ κοντά στη χρωμοσωμική θέση του LBR. Από τρεις ανεξάρτητες μεταλλάξεις (ic, icJ, ic4J) στον ic locus, μία προκαλεί πρόωρη λήξη της μετάφρασης και δύο αλλαγή πλαισίου ανάγνωσης του mRNA. Οι μεταλλάξεις αυτές οδηγούν σε περικεκομμένες ή και βεβλαμμένες πρωτεΐνες.

Η σκελετική δυσπλασία Greenberg ή HEM (Hydrops-Ectopic calcification-Moth-eaten) μεταδίδεται ως αυτοσωματικός υπολειπόμενος χαρακτήρας. Πρόκειται για μία θανατηφόρο χονδροδυστροφία που χαρακτηρίζεται από πλήθος σκελετικών και σπλαχνικών ανωμαλιών (μεγάλο κρανίο με ελαττωματική οστεοποίηση, αποπιτανώσεις στα πλευρά, το στέρνο και την πύελο, πλατυσπονδυλία και ριζομυελικές διαταραχές, πολυδακτυλία, «σκοροφαγωμένη» εικόνα των επιμήκων οστών, ηπατομεγαλία και μεγάλο πλακούντα με ύδρωπα). Ο LBR που παράγεται σε αυτή την περίπτωση είναι περικεκομμένος και η αμινοξική αλληλουχία του σταματά στο βρόχο μεταξύ της 7ης και 8ης διαμεμβρανικής περιοχής. Οι (126) ανίχνευσαν αυξημένα επίπεδα του προδρόμου της χοληστερόλης cholesta-8,14-dien-3-beta-ol σε ινοβλάστες δέρματος από ένα νεογνό ηλικίας 18 εβδομάδων με HEM, ένα εύρημα συμβατό με την έλλειψη του βιοσυνθετικού ενζύμου της χοληστερόλης 3-beta-hydroxysterol delta(14)-reductase. Η υγιής μητέρα του προσβεβλημένου νεογνού παρουσίαζε υπολόβωση των πολυμορφοπύρηνων, όμοια με αυτή της ΡΗΑ. Αυτό δημιουργεί τη βάσιμη υποψία ότι η αυτοσωμική, επικρατής ΡΗΑ μπορεί να είναι η ετερόζυγη (ελαφρά) μορφή της HEM. Το



γεγονός ότι έχουν αναφερθεί πολύ λίγες περιπτώσεις ομοζυγωτίας για την ΡΗΑ οφείλεται ίσως στο ότι η ομόζυγη κατάσταση είναι θανατηφόρος.

Πέραν των δύο αυτών συνδρόμων που αναφέραμε παραπάνω, υπάρχει επίσης ένας μεγάλος αριθμός ασθενειών που οφείλονται σε μεταλλάξεις άλλων στοιχείων του πυρηνικού φακέλου. Μεταλλάξεις στο φυλοσύνδετο (X-linked) γονίδιο EMD, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης emerin, είναι υπεύθυνες για την μυϊκή δυστροφία Emery-Dreifuss (X-EDMD), την τρίτη πιο συχνή μορφή φυλοσύνδετης μυϊκής δυστροφίας στον άνθρωπο (127). Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο EMD έχουν ως αποτέλεσμα την πλήρη έλλειψη της πρωτεΐνης emerin στους άνδρες και την σποραδική έλλειψη στις γυναίκες, εξαρτώμενου από την έκταση της αδρανοποίησης του X χρωμοσώματος το οποίο φέρει το μη μεταλλαγμένο αλληλόμορφο. Η EDMD χαρακτηρίζεται από συσπάσεις του Αχιλλείου τένοντα, του αγκώνα, και των εκτείνων αυχενικών μυών (neck extensors) και σταδιακή απώλεια μυϊκής μάζας, ειδικότερα των δικέφαλων και τρικέφαλων μυών. Χαρακτηριστικό είναι ότι οι ασθενείς αναπτύσσουν προβλήματα στην αγωγιμότητα του ηλεκτρικού ερεθίσματος στην καρδιά, με αποτέλεσμα θανατηφόρες αρρυθμίες.

Η αυτοσωματική επικρατής μορφή της EDMD (AD-EDMD) παρουσιάζει παρόμοια κλινική εικόνα και οφείλεται σε μετάλλαξη στο γονίδιο της λαμίνης A που προκαλεί έκτοπη κατανομή της emerin (από τον πυρηνικό φάκελο στο ενδοπλασματικό δίκτυο).

Μία άλλη ομάδα ασθενειών οφείλονται σε μεταλλάξεις αντικατάστασης βάσης (missense) που οδηγούν σε απώλεια της λειτουργικότητας της MAN1. Τέτοιες είναι η οστεοποικίλωση, το σύνδρομο Buschke-Ollendorf και η μελορεόστωση (melorheostosis) που συλλογικά αναφέρονται ως σύνδρομο των "spotted bones". Σε ανθρώπινους ινοβλάστες έχει βρεθεί ότι η MAN1 ανταγωνίζεται τη σηματοδότηση μέσω BMP και TGF- β η οποία διαμεσολαβείται από τους μεταγραφικούς παράγοντες Smad1 και Smad 2. Η μετάλλαξη της καταργεί αυτή την ανασταλτική δράση και έχει, προφανώς, παθογενετική σημασία.

Η μελορεόστωση χαρακτηρίζεται από «κυλιόμενη» υπερόστωση του φλοιού των αυλοειδών οστών. Συχνά συνοδεύεται από ανωμαλίες των γειτονικών μαλακών μορίων, όπως συσπάσεις των αρθρώσεων, σκληροδερματικές αλλοιώσεις, μυϊκή ατροφία, αιμαγγειώματα, και λεμφοίδημα. Παρόλα ταύτα, οι ανωμαλίες αυτές δεν συσχετίζονται με κάποια συγκεκριμένη ιστοπαθολογική αλλοίωση.

Οι ασθένειες που σχετίζονται με μεταλλάξεις στις λαμίνες τύπου A χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: Τις πρωτογενείς και τις δευτερογενείς λαμινοπάθειες. Οι πρωτογενείς λαμινοπάθειες προκύπτουν από μεταλλάξεις στο γονίδιο LMNA. Οι δευτερογενείς



λαμινοπάθειες προκαλούνται από μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί την ενδοπρωτεάση *FACE-1* (*ZMPSTE-24*, που απαιτείται για την μετα-μεταφραστική «ωρίμανση» των λαμινών τύπου A. Οι πρωτογενείς λαμινοπάθειες χωρίζονται σε πέντε υποκατηγορίες. Η ομάδα με τη μεγαλύτερη συχνότητα είναι αυτή που περιλαμβάνει τις ασθένειες του σκελετικού και καρδιακού μυ με πιο χαρακτηριστικές την AD-EDMD και την LGMD1B (Limb Girdle Muscular Dystrophy). Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει ασθένειες του λευκού λιπώδους ιστού και/ή του σκελετού με πιο χαρακτηριστικές την FPLD (Dunnigan-type Familial Partial Lipodystrophy) και την MAD (Mandibuloacral dysplasia). Η τρίτη ομάδα αφορά μία υπολειπόμενη μετάλλαξη που οδηγεί σε περιφερικές νευροπάθειες που σχετίζονται με απομυελινοποίηση των κινητικών νευρώνων (Charcot-Marie-Tooth syndrome type 2b, CMT2B1) και η τέταρτη ομάδα περιλαμβάνει τις ασθένειες πρόωρης γήρανσης όπως η Hutchinson Gilford Progeria syndrome (HGPS) και μερικές περιπτώσεις άτυπου συνδρόμου Werner. Τέλος, η πέμπτη ομάδα περιλαμβάνει ετερογενείς διαταραχές με αλληλοεπικαλυπτόμενες ιστοπαθολογικές βλάβες που συναντώνται και στις τέσσερις πρώτες ομάδες, υποδεικνύοντας έτσι έναν κοινό παθογεντικό μηχανισμό (128) (Σχήμα 8).

Μέχρι τώρα, δεν έχουν αναφερθεί μεταλλάξεις στο γονίδιο της λαμίνης B που ευθύνονται για ανθρώπινες ασθένειες. Ποντίκια ομόζυγα για μία μετάλλαξη στη λαμίνη B εκδηλώνουν ποικίλες ανωμαλίες στους πνεύμονες και στο σκελετικό σύστημα και πεθαίνουν κατά τον τοκετό. Τα κύτταρα που προέρχονται από τα ομόζυγα έμβρυα παρουσιάζουν ανώμαλη μορφολογία του πυρήνα και μη φυσιολογικό πολλαπλασιασμό, πράγμα που σημαίνει ότι η λαμίνη B είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική εμβρυογένεση (129).

Υπάρχει ένας αριθμός μεταλλάξεων που εντοπίζονται στην καρβοξυτελική ουρά της λαμίνης A και C και αφορούν ένα τμήμα που προσομοιάζει με ανοσοσφαιρίνη (Ig-like) και πιθανότατα συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις με νουκλεϊνικά οξέα. Όλες οι μεταλλάξεις που εντοπίζονται στην περιοχή αυτή επηρεάζουν συντηρημένα υδρόφοβα κατάλοιπα ή «κρυμμένα» (buried) πολικά κατάλοιπα που αποσταθεροποιούν συνολικά το Ig-like τμήμα και προκαλούν ασθένειες που σχετίζονται με τους γραμμωτούς μύες (EDMD, LGMD). Αντίθετα, μεταλλάξεις που σχετίζονται με ασθένειες τύπου FPLD αντιστοιχούν σε τρεις θέσεις που γειτονεύουν και είναι εκτεθειμένες στο υδατικό περιβάλλον. Οι μεταλλάξεις στις θέσεις αυτές μειώνουν το θετικό φορτίο της πρωτεΐνης και ενδεχομένως εμποδίζουν την πρόσδεση ενός ειδικού μεταγραφικού παράγοντα, ή κάποιου άλλου χρωματινικού ρυθμιστή απαραίτητου για την ιστοειδική έκφραση στα λιποκύτταρα.



Ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός που θα μπορούσε να εξηγήσει πώς μεταλλάξεις στις πρωτεΐνες αυτές προκαλούν τόσο διαφορετικές ασθένειες παραμένει άγνωστος. Έχουν προταθεί διάφορες θεωρίες, οι οποίες όμως δεν αλληλοαποκλείονται.

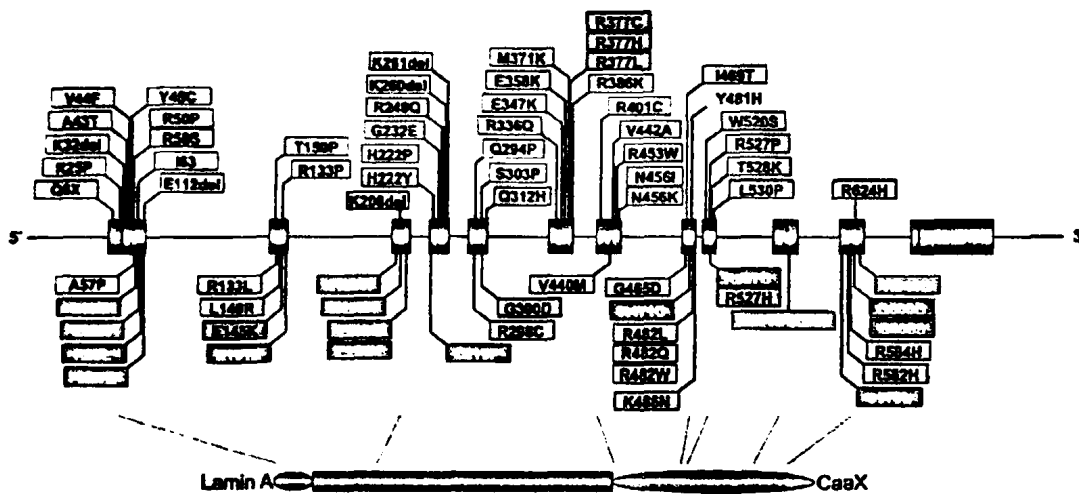
Η θεωρία του μηχανικού στρες προτείνει ότι οι τυχόν ανωμαλίες στην αρχιτεκτονική του πυρήνα καθιστούν το οργανίδιο αυτό ευάλωτο σε βλάβες λόγω μηχανικής «διάτασης». Πράγματι, οι πυρήνες από ηπατοκύτταρα ποντικών *Lmna*^{-/-} είναι πιο εύθραυστοι σε σχέση με τους πυρήνες από αγρίου τύπου ποντίκια και παρουσιάζουν την τάση να σχηματίζουν κυστίδια. Η ιδέα της αυξημένης ευθραυστότητας είναι ιδιαίτερος ελκυστική και εξηγεί ικανοποιητικά τις παθολογικές αλλοιώσεις του καρδιακού και σκελετικού μυ, καθώς οι δυνάμεις που αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια της μυϊκής σύσπασης μπορεί -δυνητικά- να οδηγήσουν στην επιλεκτική θραύση των πυρήνων. Το μηχανικό στρες ως παράγοντας στην εξέλιξη της λιποδυστροφίας (FLPD) δεν θεωρείται πιθανή ερμηνεία, καθώς οι πυρήνες των λιποκυττάρων δεν υφίστανται αναλόγου μεγέθους «διατμητικές» δυνάμεις. Συνεπώς, η μηχανική καταπόνηση δεν μπορεί να αποτελεί τον μόνο παθογενετικό μηχανισμό των λαμινοπαθειών.

Ένα στοιχείο που περιπλέκει τα πράγματα είναι το γεγονός ότι ένα ποσοστό 10-25% των ινοβλαστών από ασθενείς FPLD παρουσιάζουν δομικές αλλαγές στον πυρήνα με μεγάλη ομοιότητα με αυτές που παρατηρούνται στα ποντίκια *Lmna*^{-/-}. Αν αποδειχθεί ότι αυτό αποτελεί ένα γενικό χαρακτηριστικό της FPLD, θα πρέπει να υποθέσουμε ότι οι δομικές αλλοιώσεις της πυρηνικής λάμινας δεν μπορούν να αποτελούν το γενεσιουργό αίτιο της μυϊκής δυστροφίας, καθώς οι ασθενείς FPLD δεν παρουσιάζουν καμία μυοσκελετική βλάβη.

Η δεύτερη άποψη που έχει αναπτυχθεί είναι η λεγόμενη «υπόθεση της γονιδιακής έκφρασης» (gene expression hypothesis). Η θεωρία αυτή προτείνει ότι ο πυρηνικός φάκελος μπορεί να συμμετέχει στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και ότι μεταλλάξεις στις λαμίνες και τις αλληλεπιδρώσες με αυτές πρωτεΐνες αλλάζει την ιστοειδική γονιδιακή έκφραση. Για παράδειγμα, οι λαμίνες μπορεί να επηρεάζουν την οργάνωση της ετεροχρωματίνης στον πυρήνα. Αλλαγές στην οργάνωση της χρωματίνης, όπως έχει καταγραφεί σε ποντίκια *Lmna*^{-/-} και σε ασθενείς με μυϊκή δυστροφία Emery -Dreifuss, μπορεί να οδηγούν με τη σειρά τους σε αλλαγές των προτύπων γονιδιακής έκφρασης με δυνητικώς βλαβερά αποτελέσματα (deleterious effects). Μία ακόμη συσχέτιση προκύπτει από το εύρημα ότι οι λαμίνες τύπου A αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη SREBP1 (Sterol Response Element Binding Protein 1), έναν μεταγραφικό παράγοντα που ενέχεται στη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων. Είναι πιθανό η αλληλεπίδραση αυτή να έχει σχέση με την παθογένεση της FPLD, καθώς, σε ασθενείς με



FPLD, η μεταλλαγμένη λαμίνη παρουσιάζει χαμηλότερη συγγένεια για την SREBP1. Το ίδιο παρατηρείται και για την αυτοσωμικού τύπου μυϊκή δυστροφία Emery-Dreifuss με την μετάλλαξη L530P, που δεν σχετίζεται με την FPLD.



Protein Key:

- Globular domain
- Rod-like domain
- Globular domain specific to Lamin A
- Globular domain specific to Lamin C
- 3' Untranslated

LMNA Mutations:

- AD-Emery Dreifuss Muscular Dystrophy (EDMD)
- AD-Limb Girdle Muscular Dystrophy (LGMD1B)
- AD-Dilated Cardiomyopathy (DCM)
- Mandibuloacral Dysplasia Familial Lipodystrophy
- AD-Dunnigan type Familial Lipodystrophy
- Charcot-Marie-Tooth Disorder Type 2 (CMT2)
- Hutchinson-Gilford Progeria (HGPS)
- Atypical Werner Syndrome

Σχήμα 8. Απεικόνιση του γονιδίου της λαμίνης A και ομαδοποίηση των μεταλλάξεων που προκαλούν ασθένειες. Παρατηρούμε ότι οι μεταλλάξεις που προκαλούν μυοπάθειες είναι μάλλον διάσπαρτες. Αντίθετα, η πλειοψηφία των μεταλλάξεων που ευθύνονται για την ασθένεια Mandibuloacral, Dunnigan-type familial partial dystrophy, και Hutchinson Gilford Progeria syndrome συγκεντρώνονται στο καρβοξυτελικό τμήμα (globular domain) του μορίου (Burke & Stewart, 2006).



1.8 Στόχοι της παρούσας μελέτης:

Αρχικός μας στόχος σε αυτή τη μελέτη ήταν η συσχέτιση των προτύπων έκφρασης της ετεροχρωματινικής πρωτεΐνης HP1 με τον καρκινικό φαινότυπο. Ωστόσο, επειδή τα αρχικά αποτελέσματά μας και μια σειρά παράλληλων πειραμάτων που έγιναν από άλλα μέλη του εργαστηρίου έδειξαν ότι όλες οι ισομορφές της HP1 εκφράζονται σταθερά στους περισσότερους φυσιολογικούς και νεοπλασματικούς ιστούς, επικεντρώσαμε το ενδιαφέρον μας στη υποπυρηνική κατανομή της πρωτεΐνης, η οποία όντως διαφέρει ανάλογα με το βαθμό διαφοροποίησης και την κυτταρική αύξηση. Για να διερευνηθεί σε βάθος αυτό το πρόβλημα αποφασίσαμε να μελετήσουμε τις αλληλεπιδράσεις της HP1 με διαφορετικά χρωματινικά υποστρώματα κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Η μελέτη αυτή επεκτάθηκε κατόπιν στην ανάλυση των αλληλεπιδράσεων HP1-πυρηνικού φακέλου, μέσω της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης LBR, σε φυσιολογικά και μεταλλαγμένα κύτταρα.



2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Αντισώματα και πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν στη διάρκεια της μελέτης

Στη διάρκεια της μελέτης αυτής χρησιμοποιήθηκαν πολυκλωνικά αντισώματα έναντι του LBR στο κοτόπουλο ο χαρακτηρισμός των οποίων έχει περιγραφεί προηγουμένως (108, 130). Τα αντισώματα έναντι του LBR στα θηλαστικά κατασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας ως αντιγόνο το αμινοτελικό τμήμα του χμαιρικού His₆-LBR στον άνθρωπο. Και τα δύο αυτά αντισώματα απομονώθηκαν με χρωματογραφία συγγένειας (Affi-Gel matrices) στην οποία είχαν προσδεθεί τα αμινοτελικά τμήματα του LBR στο κοτόπουλο και στον άνθρωπο αντίστοιχα. Τα πολυκλωνικά αντισώματα έναντι της διμεθυλιωμένης λυσίνης 4 της ιστόνης H3 και της ακετυλιωμένης λυσίνης 14 της ιστόνης H3 αγοράστηκαν από την *Upstate Biotechnology, Inc. (Lake Placid, NY)*. Ο χαρακτηρισμός του αντισώματος έναντι της τριμεθυλιωμένης λυσίνης 9 της ιστόνης H3 έχει περιγραφεί (52).

<u>Πρωτογενή</u> <u>Αντισώματα</u>	<u>Ξενιστής</u>	<u>Πολυκλωνικό/</u> <u>Μονοκλωνικό</u>
Chicken LBR	Κουνέλι	Π
Human LBR	Κουνέλι	Π
Mouse LBR	Κουνέλι	Π
Lamin B	Κουνέλι	Π
Lamin A	Κουνέλι	Π
GST	Κουνέλι	Π
2meK4-H3	Κουνέλι	Π
3meK9-H3	Κουνέλι	Π
acK14-H3	Κουνέλι	Π
3meK20-H4	Κουνέλι	Π
CREST	Ανθρώπινος αυτοάνοσος ορός	Π



Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν :

- goat a-rabbit IgG 488 με απορρόφηση (Abs) στα 495 nm και εκπομπή (Em) στα 519 nm
- goat a-rabbit IgG 568 με απορρόφηση (Abs) στα 578 nm και εκπομπή (Em) στα 603 nm
- donkey a-rat IgG 488 με απορρόφηση (Abs) στα 495 nm και εκπομπή (Em) στα 519 nm από την *Alexa Fluor, Molecular Probes (Eugene, OR)*.

Πλασμιδιακοί φορείς

<u>Όνομα</u> <u>κατασκευής</u>	<u>Φορέας</u>	<u>Ένθεμα</u>
mHP1β-GST	pGEX1	Mouse HP1β (residues 1-185)
hnHP1β-GFP	pBCHGN	Human HP1β (residues 1-185)
CD-GFP	pEGFP-C1	Human HP1β (residues 1-70)
ΔCD-GFP	pEGFP-C1	Human HP1β (residues 69-185)
chNtLBR-GST	PGEX-2T	Chicken N-terminal LBR (residues 1-205)
hnNtLBR-His	pET-16b	Human N-terminal LBR (residues 1-201)
mNtLBR-GST	pGEX-6P1	Mouse N-terminal LBR (residues 1-212)
GST	pGAT2	
H3	pET-3a	Xenopus H3
H4	pET-3a	Xenopus H4
CD39mutant-GFP	pCDNA3	Human CD39mutant (αντικατάσταση του extracellular domain CD39 με GFP, κατασκευή Σ. Χριστοφορίδης)
Rab7-GFP	pEGFP-C1	Dog Rab7

2.2 Μέθοδοι καλλιέργειας κυττάρων

Για την καλλιέργεια των κυττάρων HeLa, MCF7 χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό DMEM που περιείχε 2 mM L-γλουταμίνη, 2 mM πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη και 10% FCS.

Οι ινοβλάστες από ποντικό καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό RPMI που περιείχε 2 mM L-γλουταμίνη, 2 mM πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη, 10% βόειο εμβρυϊκό ορό (FCS) και 50 μM



2-μερκαπτοαθανόλη. Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε σε θερμοκρασία 37 °C και ατμόσφαιρα 5% CO₂

2.2.1 Συγχρονισμός κυττάρων

Για τον συγχρονισμό των κυττάρων στο όριο G1/S φάσης χρησιμοποιήθηκαν 5 mM υδροξουρία για 24 ώρες. Εναλλακτικά, χρησιμοποιήθηκαν 3 μg/ml aphidicolin για 24 ώρες, 0.5 mM μιμοσίνης για 24 ώρες, ή διπλό block με θυμιδίνη (19 ώρες σε 2 mM θυμιδίνης, 9 ώρες απουσία φαρμάκου (release), 16 ώρες σε 2 mM θυμιδίνης).

2.2.2 Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών

2.2.2A Μικροενέσεις-Αυτοματοποιημένο σύστημα μικροενέσεων (AIS2)

Με την τεχνική των μικροενέσεων εισαγάγαμε εξωγενώς μακρομόρια (νουκλειικά οξέα, πρωτεΐνες) ή φάρμακα στο εσωτερικό (στον πυρήνα ή το κυτταρόπλασμα) ενός κυττάρου. Χρησιμοποιήσαμε το σύστημα AIS2 (Automated Injection System 2) το οποίο αποτελείται από τα εξής μέρη: α) Πρόγραμμα ελέγχου AIS2 μέσω του οποίου ορίζουμε τον όγκο της ουσίας που εισάγουμε στο κύτταρο (ρυθμίζοντας την πίεση και την χρονική διάρκεια της μικροένεσης) καθώς και την κίνηση της μικροπιπέτας και της βάσης του μικροσκοπίου (Cell Biology Trading), β) Προσωπικός υπολογιστής μέσω του οποίου εκτελείται το πρόγραμμα ελέγχου AIS2, γ) Σύστημα μικροχειρισμού (Luigs & Neumann) με το οποίο ορίζουμε την ακριβή θέση της μικροπιπέτας στο χώρο, δ) Ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss, Axiovert 200), ε) Σύστημα αντλίας (AIS2 FemptoJet) με το οποίο ελέγχουμε την πίεση της μικροένεσης. Κατασκευάσαμε τις μικροπιπέτες χρησιμοποιώντας την συσκευή P-97 Flaming/Brown micropipette puller (Shutter Instrument Co). Χρησιμοποιήσαμε γυάλινα τριχοειδή (borosilicate glass capillaries, Harvard apparatus) σωληνάρια με εξωτερική διάμετρο 1.2 mm και εσωτερική διάμετρο 0.94 mm. Η συγκέντρωση που χρησιμοποιήσαμε για τα νουκλειικά οξέα είναι 50-200 ng/ml, ενώ για τις πρωτεΐνες 1-5 mg/ml, αφού μετά την φυγοκέντριση των δειγμάτων στις 13.000 rpm (14500g) για 15 λεπτά στους 4 °C και διατηρήσαμε το υπερκείμενο.



2.2.2B Ηλεκτροδιαπίδυση (Electroporation)

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος ώστε να διαταραχθεί προσωρινά η φωσφολιπιδιακή διπλοστοιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης με αποτέλεσμα πολικά μόρια όπως τα νουκλεϊκά οξέα να εισέλθουν στο κύτταρο. Χρησιμοποιήσαμε την συσκευή ECM630 (BTX Inc.) και τις ειδικές κυψελίδες (cuvettes-BTX 640). Αραιώσαμε 1.2×10^6 κύτταρα και 5-20 μg πλασμιδίου σε DMEM σε τελικό όγκο 400 μl . Χρησιμοποιήσαμε τις παραμέτρους 260 V (ισχύς ρεύματος), 850 μF (χωρητικότητα), 725 Ω (αντίσταση).

2.2.2Γ Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών με τη μέθοδο του φωσφορικού ασβεστίου

Όλες οι κυτταρικές σειρές διαμολύνθηκαν με τη μέθοδο του φωσφορικού ασβεστίου. Τα κύτταρα HeLa τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 6-well με πυκνότητα 5×10^5 κύτταρα ανά θέση. Τα μείγματα του DNA αναμείχθηκαν με διάλυμα CaCl_2 0.25 M και στη συνέχεια προστέθηκε ίσος όγκος διαλύματος 2x HBS.

Σύνθεση διαλύματος 2x HBS : 274 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 12 mM dextrose, 42 mM HEPES. Το pH ρυθμίστηκε στο 7.1 ± 0.1 .

2.3 Παρασκευαστικές Μέθοδοι

2.3.1 Παραγωγή ανασυνδυασμένων χιμαιρικών GST πρωτεϊνών

Η παραγωγή και απομόνωση χιμαιρικών GST πρωτεϊνών έγινε σύμφωνα με την μέθοδο των Smith & Johnson (1998) (131). Βακτηριακή καλλιέργεια BL21(DE3) αραιώθηκε σε O.D~0.1 και αφέθηκε να αναπτυχθεί έως O.D~0.6 στους 37 °C. Η επαγωγή της πρωτεΐνης έγινε παρουσία 0.2 mM IPTG, στους 37 °C για την HP1 β -GST και στους 25 °C για τον NiLBR-GST για 3 ώρες. Η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε για 15 λεπτά, στα 5000 rpm στους 4 °C σε φυγόκεντρο Sorvall και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε διάλυμα PBS στο οποίο είχε προστεθεί 10 mM μερκαπτοαιθανόλη και 1.3 mM PMSF. Ακολούθησε σύντομη έκθεση σε υπερήχους, προσθήκη Triton X-100 σε τελική συγκέντρωση 1% και φυγοκέντρωση στα 26000 rpm για 45 λεπτά, 4 °C στην κεφαλή SW27, Beckman. Στη συνέχεια, συλλέχθηκε η υγρή φάση και επωάστηκε με 500 μl σφαιρίδια γλουταθειόνης-αγαρόζης, εξισορροπημένα με το παραπάνω διάλυμα, για 1 ώρα στους 4 °C υπό συνεχή ανάδευση. Μετά την επώαση τα



σφαιρίδια πλύθηκαν με το ίδιο διάλυμα, στη συνέχεια με διάλυμα PBS/1 mM PMSF και ακολούθησε έκλουση της πρωτεΐνης με διάλυμα έκλουσης (10 mM ανηγμένης-reduced γλουταθειόνης, 50 mM Tris-HCl pH 8). Όλες οι πρωτεΐνες φυγοκεντρήθηκαν στα 12000g στους 4 °C, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν συσσωματώματα. Επίσης έγινε διαπίδυση των πρωτεϊνών στο κατάλληλο διάλυμα ανάλογα με την εκάστοτε διαδικασία.

2.3.2 Παραγωγή ανασυνδυασμένων χμαιοικικών His πρωτεϊνών

Βακτηριακή καλλιέργεια BL21(DE3) αραιώθηκε σε O.D~0.1 και αφέθηκε να αναπτυχθεί έως O.D~0.6 στους 37 °C. Η επαγωγή της πρωτεΐνης έγινε παρουσία 0.2 mM IPTG, στους 25 °C για τον NiLBR-His για 3 ώρες. Η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε για 15 λεπτά, στα 5000 rpm στους 4 °C σε φυγόκεντρο Sorvall και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε διάλυμα λύσης (50mM Tris-HCl pH 7.3, 0.1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 10 mM μερκαπτοαιθανόλη, 2 μg/ml αναστολείς πρωτεασών, 1.25 mg/ml λυσοζύμη) και επώαστηκε σε κινούμενη πλατφόρμα για 1 ώρα στους 4 °C. Ακολούθησε διάσπαση των βακτηριακών τοιχωμάτων με υπέρηχους, προσθήκη 1 mM Triton X-100, 2 mM MgCl₂ και 20 μg/ml DNase I και επώαση σε κινούμενη πλατφόρμα για 15 λεπτά στους 4 °C. Το υλικό φυγοκεντρήθηκε για 15 λεπτά στις 10000 rpm και συλλέχθηκε η υγρή φάση η οποία αραιώθηκε 1:1 με διάλυμα λύσης που όμως δεν περιείχε μερκαπτοαιθανόλη, λυσοζύμη και EGTA. Στη συνέχεια προστέθηκε 5 mM ιμιδαζόλη και το υλικό επώαστηκε σε περιστρεφόμενη πλατφόρμα επί μία ώρα μαζί με 600μl σφαιριδίων Ni (νικελίου) που είχαν προηγουμένως πλυθεί με νερό και εξισορροπηθεί με διάλυμα λύσης στο οποίο είχε προστεθεί 5 mM ιμιδαζόλης. Μετά την επώαση, τα σφαιρίδια Ni ξεπλύθηκαν με τουλάχιστον 300ml διαλύματος λύσης στο οποίο είχε προστεθεί 20 mM ιμιδαζόλη και ακολούθησε έκλουση της πρωτεΐνης με διάλυμα λύσης στο οποίο είχαν προστεθεί 500 mM ιμιδαζόλης.

2.3.3A Παραγωγή ανασυνδυασμένης ιστόνης H3 και H4

Βακτηριακή καλλιέργεια BL21(DE3) αραιώθηκε σε O.D~0.1 και αφέθηκε να αναπτυχθεί έως O.D~0.6 στους 37 °C. Η επαγωγή της πρωτεΐνης έγινε παρουσία 0.2 mM IPTG, στους 37 °C για 3 ώρες. Φυγοκεντρήσαμε την καλλιέργεια για 15 λεπτά, στις 5000 rpm, στους 4 °C, σε φυγόκεντρο τύπου Sorvall, επαναδιαλύσαμε το βακτηριακό ίζημα σε διάλυμα λύσης (7 M Guanidinium-HCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM DTT, 1 mM PMSF) και επώασαμε υπό



ανάδευση για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Χρησιμοποιήσαμε υπέρηχους για να διαλυτοποιήσουμε τυχόν συσσωματώματα και κατόπιν φυγοκεντρήσαμε στις 26000 rpm για 40 λεπτά, στους 20 °C στην κεφαλή SW27, Beckman. Συλλέξαμε την υγρή φάση, προσθέσαμε 10 όγκους διαλύματος SAU-0 (7 M ουρία, 20 mM οξικό νάτριο pH 5.2, 5 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF) και επώασαμε με 5 ml σφαιρίδια SP-sepharose (που εξισορροπήσαμε την προηγούμενη μέρα) για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν μεταφέραμε τα σφαιρίδια σε χρωματογραφική στήλη και πλύναμε με 100 ml διαλύματος SAU-0. Εκλούσαμε την πρωτεΐνη με 15 ml διαλύματος SAU-0, 400 mM NaCl, συλλέξαμε κλάσματα του 1 ml τα οποία αναλύσαμε με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE.

2.3.3B Εξισορρόπηση σφαιριδίων SP-sepharose

Εξισορροπήσαμε τα σφαιρίδια SP-sepharose πλένοντας δύο φορές με 100 ml διαλύματος 1 M οξικό νάτριο pH 5.2, μία φορά με 100 ml διαλύματος 100 mM οξικό νάτριο pH 5.2, δύο φορές με 100 ml διαλύματος 20 mM οξικό νάτριο pH 5.2 και στη συνέχεια επώασαμε ο/n με 100 ml διαλύματος 7 M ουρία, 1 mM EDTA, 20 mM οξικό νάτριο pH 5.2.

2.3.4 Απομόνωση πυρήνων από ερυθροκύτταρα γαλοπούλας

Η παρασκευή πυρηνικών φακέλων από ερυθροκύτταρα γαλοπούλας έγινε σύμφωνα με το τροποποιημένο πρωτόκολλο των Georgatos & Blobel (1987) (132). Πηγή των πυρηνικών φακέλων ήταν 80 ml αίματος γαλοπούλας. Το αίμα αραιώθηκε 1:3 με PBS/2 mM EDTA ώστε να παρεμποδιστεί η πήξη. Το αίμα φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στα 1000 g στους 4 °C σε επιτραπέζια φυγόκεντρο και το υπερκείμενο υγρό που αντιστοιχεί στο πλάσμα αναρροφήθηκε. Τα ερυθροκύτταρα ξηλώθηκαν 3 φορές με πολύ κρύο PBS και επαναλήφθηκαν οι φυγοκεντρήσεις. Μετά την τελευταία φυγοκέντρωση, το υπερκείμενο αναρροφήθηκε, τα ερυθροκύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 10 όγκους ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (5 mM NaPO₄ pH 7.4, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1.3 mM PMSF) και επώαστηκαν για 10 λεπτά στον πάγο με συνεχή ανάδευση. Τα λυμένα ερυθροκύτταρα φυγοκεντρήθηκαν για 1.5 λεπτό, στους 4 °C, στις 10000 rpm σε κεφαλή SS-34, φυγόκεντρο Sorvall. Το ίζημα της φυγοκέντρωσης που αντιπροσωπεύει τις μεμβρανοσκελετικές δομές των ερυθροκυττάρων επαναδιαλύθηκε σε διάλυμα λύσης και ακολούθησε χρήση υπέρηχων ώστε να επιτευχθεί περαιτέρω τεμαχισμός και απομάκρυνση των πλασματικών μεμβρανών. Εκ νέου



φυγοκέντρωση των ερυθροκυττάρων για 10 λεπτά στα 1000 g είχε ως αποτέλεσμα την καθίζηση των πυρήνων και το διαχωρισμό τους από τις πλασματικές μεμβράνες που παρέμεναν στο υπερκείμενο υγρό. Οι πυρήνες επαναδιαλύθηκαν στο διάλυμα λύσης σε αναλογία 1:5 και στη συνέχεια αναγκάστηκαν υπό πίεση να περάσουν 2 φορές από μία κεκαμένη βελόνα (22 gauge). Αφού προστέθηκε ίσος όγκος διαλύματος λύσης ακολούθησε φυγοκέντρωση στην κεφαλή SS-34, φυγόκεντρο Sorvall, στα 1000 g για 10 λεπτά. Το ίζημα αντιπροσωπεύει τεμαχισμένους πυρήνες ερυθροκυττάρων γαλοπούλας. Το ίζημα αυτό πάγωνε σε υγρό άζωτο και διατηρούνταν στους -80°C μέχρι τη χρήση.

2.3.5 Παρασκευή πυρηνικών φακέλων από πυρήνες ερυθροκυττάρων γαλοπούλας

A. Με χρήση του ενζύμου DNase I

Οι πυρήνες των ερυθροκυττάρων επαναδιαλύθηκαν σε 10 ml διαλύματος DNase I (10 mM NaPO_4 , pH 7.4, 2 mM MgCl_2 , 10% σακχαρόζη, 1 mM DTT, 1.3 mM PMSF, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ αναστολείς πρωτεασών και 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNase I) και επώαστηκαν σε κινούμενη πλατφόρμα για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε δεκάλεπτη φυγοκέντρωση στα 10000 g και επανάληψη της παραπάνω διαδικασίας δύο ακόμη φορές. Το μεμβρανικό ίζημα (οι πυρηνικοί φάκελοι) ξεπλύθηκαν με παγωμένο νερό για την απομάκρυνση των συνδετικών (linker) ιστονών και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 30 λεπτά σε φυγόκεντρο Eppendorf στα 12000g στους 4°C .

B. Με χρήση του ενζύμου μικροκοκκικής νουκλεάσης MNase

Οι πυρήνες των ερυθροκυττάρων επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα που περιέχει 20 mM HEPES-KOH pH 7.4, 5 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 0.025% Triton X-100, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, αναστολείς πρωτεασών και 1101 units MNase/30 ml αίμα γαλοπούλας. Επώαστηκαν για 10 λεπτά στους 37°C και η αντίδραση σταματούσε με προσθήκη 2 mM EDTA και επώαση στον πάγο για 10 λεπτά. Ακολούθησε δεκάλεπτη φυγοκέντρωση στα 13000 g, 4°C . Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και το μεμβρανικό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε παγωμένο διάλυμα 2 mM EDTA pH 7.5 και επαναφυγοκεντρήθηκε. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και το μεμβρανικό ίζημα εκχυλίστηκε όπως περιγράφεται παρακάτω.



2.3.6 Παρασκευή κυτταρικών και πυρηνικών εκχυλισμάτων

Τα εκχυλίσματα από τους πυρηνικούς φακέλους γαλοπούλας παρασκευάστηκαν με προσεκτική επαναδιάλυση των φακέλων σε διάλυμα που περιείχε 300/600 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, 250 mM σακχαρόζη, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, αναστολείς πρωτεασών, παρουσία/απουσία 1% Triton X-100 κατά περίπτωση. Ακολούθησε υπερφυγοκέντρωση στα 200-350000 g για 30 λεπτά στους 4 °C, και τα διαλυτά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν αμέσως ή κλασματοποιήθηκαν περαιτέρω σε 5-20% βαθμίδωση σακχαρόζης με φυγοκέντρωση στα 100000 g, ο/η στους 4 °C.

2.3.7 Παρασκευή εκχυλισμάτων από κύτταρα HeLa που βρίσκονται στο όριο G1/ S φάσης

Κύτταρα HeLa συγχρονισμένα στο όριο G1/S φάσης, συλλέχθηκαν παρουσία θρυψίνης, πλύθηκαν 3 φορές με ισοτονικό διάλυμα που περιείχε 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 2 mM MgCl₂, 1 mM PMSF και επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 2 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 250 mM σακχαρόζη, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 2 μg/ml αναστολείς πρωτεασών, 0.25% Triton X-100 παρουσία MNase.

2.4 Βιοχημικές μέθοδοι

2.4.1 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες αναλύονταν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου υπό αναγωγικές συνθήκες (Laemmli, 1970). Χρησιμοποιήθηκαν πηκτές πολυακρυλαμιδίου με συγκέντρωση ακρυλαμιδίου 10, 13.5 ή 15%. Τα stock διαλύματα ή χημικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των πηκτών ήταν : διάλυμα 30% ακρυλαμίδης/bis-ακρυλαμίδης, (διάλυμα πηκτής διαχωρισμού separating gel buffer : 1.5 M Tris base, 0.4% SDS pH 8.8), (stacking gel buffer : 0.5 M Tris base, 0.4% SDS, pH 6.8), 10% APS (Ammonium PerSulfate), και TEMED (n, n', n'-TetraMethylethyleneDiamine). Οι πρωτεΐνες πριν ηλεκτροφορηθούν διαλύθηκαν σε διάλυμα Laemmli, το οποίο ήταν 4 φορές συγκεντρωμένο. Το διάλυμα Laemmli έχει την εξής σύσταση: 250mM Tris-HCl (pH 7), 9.2% SDS, 40% γλυκερόλη, 0.2% (βάρος κατ' όγκο) μπλε της βρωμοφαινόλης και 100 mM DTT. Οι πρωτεΐνες θερμάνθηκαν για 5 λεπτά στους 95



°C προκειμένου να αναχθούν. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε διάλυμα 192 mM γλυκίνη, 25 mM Tris base, 0.1% SDS και η διάρκειά της ήταν 3-4 ώρες στα 45 mA (και σε σταθερή μέγιστη τάση-voltage). Δείκτες μοριακού βάρους (BIORAD) περιείχαν τις εξής πρωτεΐνες: Μυοσίνη (250 KDa), β-γαλακτοσιδάση (115 KDa), Φωσφορυλάση Β (97 KDa), αλβουμίνη ορού βοός (69 KDa), ωαλβουμίνη (46 KDa), Καρβονική Ανυδράση (30 KDa) και Λυσοζύμη (14.3 KDa).

2.4.2 Ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (Native gel electrophoresis)

Το ποσοστό της bis-ακρυλαμίδης στο συνολικό διάλυμα της ακρυλαμίδης ήταν 4%. Συγκεκριμένα 30 gr ακρυλαμίδης και 0.8 gr bis-acrylamide διαλύθηκαν σε τελικό όγκο 100 ml. Χρησιμοποιήθηκαν πηκτές πολυακρυλαμιδίου με συγκέντρωση ακρυλαμιδίου 10%. Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε στην παρασκευή της πηκτής ακρυλαμιδίου και στην ηλεκτροφόρηση περιείχε 40 mM Tris, 20 mM CH₃COONa, 2 mM EDTA, pH 7.4. Η ηλεκτροφόρηση έγινε στους 4 °C στα 30 mAmp με συχνές αλλαγές διαλύματος ηλεκτροφόρησης για να αποφευχθεί η μεταβολή του pH.

2.4.3 Χρώση πηκτών πολυακρυλαμιδίου

Η χρώση των πηκτών πολυακρυλαμιδίου έγινε με τη χρωστική Coomassie Blue G250. Για την χρώση με Coomassie Blue G250 οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου αμέσως μετά την ηλεκτροφόρηση βάφτηκαν και μονιμοποιήθηκαν σε 50% μεθανόλη, 12% οξικό οξύ και 0.1% w/v Coomassie Blue. Για την απομάκρυνση της περίσσειας της χρωστικής οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου τοποθετήθηκαν σε διάλυμα 50% μεθανόλης και 10% οξικού οξέος ή 10% μεθανόλης και 10% οξικού οξέος.

2.4.4 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά western (western blotting)

Η διαδικασία του western blotting έγινε σύμφωνα με καθιερωμένα πρωτόκολλα (108, 114, 133). Οι πρωτεΐνες που έπρεπε να ανιχνευτούν με την τεχνική του western blotting διαχωρίστηκαν αρχικά με ηλεκτροφόρηση σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου και μεταφέρθηκαν σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης (Protran, 0.45mm) με τάση 35 V για 3 ώρες. Το ρυθμιστικό διάλυμα μέσα στο οποίο έγινε η μεταφορά περιείχε 192 mM γλυκίνη, 25 mM Tris-base, 0.1%



SDS και 20% μεθανόλη. Η νιτροκυτταρίνη μετά την μεταφορά πλύθηκε 1 φορά για 10 λεπτά με το διάλυμα πλύσης που περιείχε 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 155 mM NaCl και 0.1% Tween 20. Στη συνέχεια για να δεσμευθούν οι μη ειδικές θέσεις δέσμευσης πρωτεϊνών επώασθη με το διάλυμα πλύσης παρουσία 1% (FSG) ζελατίνη από δέρμα ψαριού (blocking buffer) ο/η σε θερμοκρασία δωματίου, σε περιστρεφόμενη πλατφόρμα. Ακολούθησε επώαση της νιτροκυτταρίνης με το πρωτογενές αντίσωμα αραιωμένο στο blocking buffer για τουλάχιστον 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια η νιτροκυτταρίνη ξεπλύθηκε 4 φορές από 10 λεπτά με συνεχή ανακίνηση σε blocking buffer, ώστε να αφαιρεθεί όλο το επιπλέον πρωτογενές αντίσωμα που δεν είχε προσδεθεί πάνω στις μεμβράνες. Η επώαση με το κατάλληλο δευτερογενές αντίσωμα έγινε μέσα σε blocking buffer για 1 ώρα στις ίδιες συνθήκες όπως και το πρωτογενές. Οι μεμβράνες ξεπλύθηκαν στη συνέχεια 3 φορές με το blocking buffer από 5 λεπτά και 3 φορές με το ίδιο διάλυμα απουσία ζελατίνης για να απομακρυνθεί όλο το μη δεσμευμένο αντίσωμα. Ακολούθησε εμφάνιση του western blot με το ECL KIT.

2.4.5 Συγκατακρήμιση πρωτεϊνών με σφαιρίδια γλουταθειόνης-αγαρόζης (pull-down)

Η πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει (5-30 μg περίπου) επώασθη για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε περιστρεφόμενη πλατφόρμα παρουσία 1% FSG με τα σφαιρίδια γλουταθειόνης-αγαρόζης που έχουν από πριν εξισορροπηθεί στο assay buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, 10% σακχαρόζη, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF). Στη συνέχεια, τα σφαιρίδια πλύθηκαν 3 φορές με το assay buffer και 1 φορά με assay buffer της κατάλληλης αλατότητας (300/600/750 mM), με ενδιάμεσες φυγοκεντρήσεις (short spin) σε φυγόκεντρο Eppendorf. Ακολουθούσε επώαση με το κατάλληλο εκχύλισμα ή πρωτεΐνη για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου σε περιστρεφόμενη πλατφόρμα. Τα σφαιρίδια πλύθηκαν για 6 φορές με το κατάλληλης αλατότητας assay buffer (300/600/750 mM), και 1 φορά με ισοτονικό assay buffer απουσία Triton X-100. Τέλος, προστέθηκαν 40 μl Laemmli buffer και τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 95 °C για 5 λεπτά και το υπερκείμενο υγρό αναλύθηκε σε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE.



2.4.6 Καθαρισμός ενδογενούς LBR και χρωματογραφία συγγένειας σε Affi-Gel υποστρώματα (matrices)

Ο ενδογενής LBR απομονώθηκε με παρασκευαστική ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και έκλουση από ταινία πηκτής πολυακρυλαμιδίου, όπως περιγράφεται (130). Η εκλούμενη πρωτεΐνη απαναδιαλύθηκε σε διάλυμα 100 mM HEPES-NaOH pH 7.4, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, 2 % Triton X-100, 0.2 mM PMSF, 0.05 mM DTT και ακολούθησε διαπίδυση σε διάλυμα 100 mM HEPES-NaOH pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.2 mM PMSF για 5 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Η σύζευξη (coupling) σε Affi-Gel 10/15 έγινε σύμφωνα με τον κατασκευαστή (*Bio-Rad*). Τα διάφορα εκχυλίσματα επώασθηκαν στην κολώνα Affi-Gel-LBR για 90 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ύστερα από πλύσεις με 15 όγκους κολώνας διαλύματος assay buffer, το προσδεμένο υλικό εκλούστηκε είτε με Laemmli SDS sample buffer, ή με 1 M NaCl, 5 M ουρία, 40 mM Tris-HCl pH 8, 0.1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 1 mM DTT και 1 mM PMSF.

2.4.7 Δοκιμασίες χημικής διασύνδεσης (Cross-linking)

Η ικανότητα του LBR να σχηματίζει πολυμερή ελέγχθηκε με τη χρήση του χημικού διασυνδέτη γλουταραλδεύδη (chemical cross-linking). Στον LBR-His₆ προστέθηκε 0.03% γλουταραλδεύδη και τα δείγματα επώασθηκαν για τα χρονικά διαστήματα των 3 και 10 λεπτών. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ισομοριακές ποσότητες του κυτοχρώματος c το οποίο δεν έχει ικανότητα πολυμερισμού. Η αντίδραση σταμάτησε με την προσθήκη 100 μM Tris-HCl pH 8 και διαλύματος Laemmli και το υλικό αναλύθηκε με SDS-PAGE και χρώση Coomassie Blue.

2.4.8 Πειράματα πέψης με την χρήση του ενζύμου θρυψίνη

Χρησιμοποιήσαμε 40 μl σφαιριδίων αгарόζης διασυνδεδεμένων με το ένζυμο θρυψίνη (19.5 units/ml, Sigma). Πλύναμε τα σφαιρίδια τρεις φορές με παγωμένο PBS 1x με σύντομες ενδιάμεσες φυγοκεντρήσεις σε φυγόκεντρο τύπου Eppendorf. Στη συνέχεια, επώασαμε 50 μg πρωτεΐνης σε διάλυμα 10 mM Tris-HCl pH 7.4 με τα σφαιρίδια για 0, 2 και 10 λεπτά στους 4 °C σε κινούμενη πλατφόρμα. Τερματίσαμε την πέψη με προσθήκη αναστολέων των πρωτεασών (100 μg/ml απροτινίνη, λευπεπτίνη, πεπστατίνη, αντιπαΐνη, 200 μg/ml



αναστολέα της θρυψίνης). Φυγοκεντρήσαμε για 15 λεπτά στα 10000g στους 4 °C. Κατόπιν, το υλικό υπερφυγοκεντρήθηκε στα 200-350000 g για 30 λεπτά στους 4 °C. Συλλέξαμε το υπερκείμενο και το χρησιμοποιήσαμε άμεσα σε πειράματα “pull-down”.

2.4.9 Πλεύση πυρηνικών φακέλων σε βαθμίδωση σακχαρόζης

Οι πυρηνικοί φάκελοι επαναδιαλύθηκαν σε assay buffer αλατότητας 300 mM NaCl, ακολούθησε χρήση υπερήχων (sonication) και ρυθμίστηκε η τελική συγκέντρωση σακχαρόζης στο 60%. Το επαναδιαλυμένο υλικό εναποτέθηκε στον πυθμένα φυγοκεντρικού σωληναρίου. Ακολούθησε διαδοχική εναπόθεση τεσσάρων στρωμάτων βαθμίδωσης σακχαρόζης (50, 30, 20, 10%) σε assay buffer αλατότητας 300 mM NaCl. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση στα 100000 g με την κεφαλή SW41.Ti για 18 ώρες στους 4 °C και συλλέχθηκαν κλάσματα στην περιοχή 50-30%.

2.4.10 Ανάλυση εκχυλισμάτων με βαθμίδωση σακχαρόζης

Τα πυρηνικά εκχυλίσματα υποβλήθηκαν σε ανάλυση με βαθμίδωση σακχαρόζης 10-30%. Στον πυθμένα φυγοκεντρικού σωληναρίου τοποθετήσαμε ένα στρώμα (cushion) διαλύματος ίδιας σύστασης με αυτό που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των πυρηνικών εκχυλισμάτων (assay buffer) με περιεκτικότητα σακχαρόζης 30%. Με χρήση βαθμιδοποιητή (gradient maker) και κατάλληλης διάταξης εναποθέσαμε διάλυμα (assay buffer) του οποίου η συγκέντρωση σε σακχαρόζη ελαττώνονταν προοδευτικά από 30 σε 10 %. Στη βαθμίδωση αυτή εναποθέταμε το πυρηνικό εκχύλισμα. Ακολούθησε φυγοκέντρωση για 18 ώρες στους 4 °C χρησιμοποιώντας την κεφαλή SW41.Ti. Συλλέξαμε κλάσματα των 500 μl με κλασματοσυλλέκτη, τα οποία στη συνέχεια αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE.

2.5 Μοριακές μέθοδοι

2.5.1 Απομόνωση RNA και RT-PCR

RNA απομονώθηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου Trizol (Invitrogen). Ακολούθησε σύνθεση του αντίστοιχου cDNA και ενίσχυση (amplification) με RT (Reverse Transcription) PCR με τη μέθοδο των random hexamers και χρήση του kit Superscript First strand synthesis (Invitrogen).



2.5.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Τα πριμοδοτικά ολιγονουκλεοτίδια (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για το γονίδιο της ανθρώπινης HP1α έχουν την εξής αλληλουχία :

5' primer : CTCAAACAGTGCCGATGACA

3' primer : TCCGCATCCTCAGGATATGC

και ενισχύουν ένα κομμάτι 264-bp που αντιστοιχεί στα νουκλεοτίδια 416-679 που βρίσκονται μετά τον χρωμοτομέα (CD) της HP1α.

Αντίστοιχα, για την HP1β οι primers ήταν :

5' primer : GAAAGCTGGCGGGCACTAT

3' primer : GAGCGTTAGTTCTTGTCATC

και ενισχύουν ένα κομμάτι 580-bp που αντιστοιχεί στα νουκλεοτίδια 558-779 που βρίσκεται μετά τον χρωμοτομέα (CD) της HP1β.

Οι συνθήκες της PCR αντίδρασης ήταν :

1.5 mM MgCl₂ , 200 mM dNTPs, 200 pmol 5' primer, 200 pmol 3' primer, 0.1 U/μl Taq polymerase, εκμαγείο DNA (DNA template) 400-500 ng.

Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν κάτω από τις ακόλουθες συνθήκες :

Μετουσίωση για 3 min στους 94 °C ακολουθούμενη από 35 κύκλους με το εξής πρόγραμμα :

Μετουσίωση για 30 sec στους 94 °C

Αναδιάταξη για 2 min στους 51 °C

Επιμήκυνση για 2 min στους 72 °C

2.5.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης

Τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR αναλύθηκαν σε πήκτωμα αгарόζης συγκέντρωσης 1.2%.

Η σκόνη αгарόζης διαλύθηκε σε διάλυμα 1x TAE, το οποίο χρησιμοποιήθηκε και στην ηλεκτροφόρηση. Το stock διάλυμα (50x TAE) περιείχε 0.04 M Tris-acetate και 0.001 M EDTA pH 8.0. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε μέγιστη τάση 5 Volt/cm.

2.5.4 Απομόνωση DNA από καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας

Η απομόνωση DNA από καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας έγινε με τη χρήση στηλών QIAGEN, σύμφωνα με το εγχειρίδιο της εταιρείας.



2.5.5 Μετασχηματισμός βακτηρίων με τη μέθοδο του θερμικού «σοκ»

- Τοποθετούμε 100λ βακτηρίων σε σωλήνα των 15ml
 - Προσθήκη 0.5 καθαρού πλασμιδίου ή 10λ αντίδραση συγκόλλησης
 - Τοποθέτηση στον πάγο για 30 λεπτά
 - Θέρμανση στους 42 °C για 45 δευτερόλεπτα
 - Τοποθέτηση για 2 λεπτά σε πάγο
 - Προσθήκη 900λ LB
 - Επώαση για 1 ώρα στους 37 °C στις 225 στροφές
- Άπλωμα σε πιάτο LB+Ampr και επώαση στους 37 °C ο/η.

2.6 Μορφολογικές μέθοδοι

2.6.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός έγινε σύμφωνα με δημοσιευμένα πρωτόκολλα (108, 133). Κύτταρα πάνω σε καλυπτρίδες μονιμοποιήθηκαν με 1-4% φορμαλδεΐδη για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ή μεθανόλη στους -20 °C. Τα δείγματα ξεπλύθηκαν 3 φορές με PBS και το μονιμοποιητικό απενεργοποιήθηκε με επώαση για 10 λεπτά με γλυκίνη σε PBS. Στη συνέχεια τα δείγματα ξεπλύθηκαν με PBS και επώασθηκαν για 15 λεπτά με blocking buffer που περιείχε 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7.4, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, 0.2% Triton X-100, 0.5% ζελατίνη από δέρμα ψαριού (FSG). Το αντίσωμα αραιώθηκε μέσα στο blocking buffer και προστέθηκε στα δείγματα για 1 ώρα. Μετά από πλύση με blocking buffer, προστέθηκε το δευτερογενές αντίσωμα για 45 λεπτά. Ακολούθησε πλύση με PBS και τελική μονιμοποίηση με 4% φορμαλδεΐδη. Τα δείγματα βάφτηκαν για 5 λεπτά με 10 μg/ml DAPI (4'-6-Diamidino-2-Phenylindole) σε PBS, ή έγινε επώαση με RNase 0.2u/μl για 30 λεπτά και ακολούθησε χρώση με ιωδιούχο προπίδιο (Propidium Iodide) σε αραιώση 1 mg/ml για 7 λεπτά. Τέλος, τα πλακίδια ξεπλύθηκαν 3 φορές με PBS, στεγνώθηκαν ελαφρά, τοποθετήθηκαν σε Vectashield και ακινητοποιήθηκαν πάνω σε αντικειμενοφόρους με βερνίκι νυχιών.

Τα δείγματα εξετάστηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal microscope) *Leica SP*.



2.6.2 Ανίχνευση κυττάρων που βρίσκονται στην S φάση

1) Με ενσωμάτωση βρωμοδεοξουριδίνης (*BrdU*) : Τα κύτταρα που βρίσκονται στην S φάση ενσωματώνουν βρωμοδεοξουριδίνη κατά τον διπλασιασμό του DNA και μπορούμε να τα ανιχνεύσουμε με το 5 -Bromo-2 -deoxy-uridine Labeling & Detection Kit I της εταιρίας Roche ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2) Με ενσωμάτωση τριφωσφορικής δεοξουριδίνης συζευγμένης με το χρωμοφόρο Cy3 (*Cy3-dUTP*) : Τα κύτταρα που βρίσκονται στην S φάση ενσωματώνουν *Cy3-dUTP* κατά τον διπλασιασμό του DNA. Η εισαγωγή του νουκλεοτιδίου *Cy3-dUTP* (σε συγκέντρωση 20 mM) στα κύτταρα επαυγχάνεται με μικροένεση (σε διάλυμα PBS 1x) ή με υποτονικό σοκ σε διάλυμα KHB (10 mM HEPES pH 7.4, 30 mM KCl, 5 mM MgCl₂) για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

2.6.3 Συνεστιακή μικροσκοπία

Χρησιμοποιήθηκε μικροσκοπία TCS NT από την εταιρία Leica Optics, Germany. Η πηγή laser ήταν ακτίνα Ar/Kr (αργού/κρυπτού) που επιτρέπει την λήψη οπτικών τομών πάχους της τάξης του δεκάτου των μικρομέτρων. Οι οπτικές τομές ήταν πάχους 0.3-0.4 μm.

2.6.4 Ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία

Για χρώση των δειγμάτων με αντισώματα πριν την έγκλιση τους σε ρητίνες, το ίζημα των ερυθροκυττάρων μονιμοποιήθηκε με 4% φορμαλδεύδη. Στη συνέχεια, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε χρώση με αντισώματα όπως στον έμμεσο ανοσοφθορισμό. Η μόνη διαφορά ήταν ότι για την αναστολή της μη ειδικής χρώσης χρησιμοποιήθηκε 0.5 % ζελατίνη σε PBS. Στη θέση του δευτερογενούς αντισώματος χρησιμοποιήθηκε πρωτεΐνη A-χρυσός μεγέθους 10 nm. Τα δείγματα μονιμοποιήθηκαν περαιτέρω σε 2 % γλουταραλδεύδη-PBS για 10 λεπτά και ξεπλύθηκαν για 4-5 φορές με PBS, Κατόπιν έγινε επώαση σε 1% OsO₄ σε PBS για 1 ώρα. Τα δείγματα ξεπλύθηκαν καλά με νερό και αφυδατώθηκαν σταδιακά σε 70%, 90% και απόλυτη αιθανόλη (15 λεπτά κάθε φορά). Στη συνέχεια επώασθηκαν για 30 λεπτά σε 1/1 μείγμα ρητινών (Epon) και απόλυτης αιθανόλης και 1 ώρα σε καθαρό μείγμα ρητινών. Καινούργιες ρητίνες τοποθετήθηκαν κατόπιν και αφήθηκαν να πολυμεριστούν για τουλάχιστον 14 ώρες στους 56 °C. Τα δείγματα κόπηκαν σε υπερμικροτόμο Reichert με λάμα από διαμάντι και οι



τομές (πάχους 60-90 nm) τοποθετήθηκαν σε δισκία Cu, 100 mesh. Βάφτηκαν αρχικά με 10% οξικό ουρανύλιο αραιωμένο 1/1 με απόλυτη αιθανόλη για 10 λεπτά στο σκοτάδι και αφού ξεπλύθηκαν με νερό, ξαναβάφτηκαν με κιτρικό μόλυβδο για 30 λεπτά. Τα δείγματα ξεπλύθηκαν με νερό, αφέθηκαν να στεγνώσουν και παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο Philips 400 που λειτουργούσε στα 80 KeV.

2.7 Παρασκευή πολυκλωνικών αντισωμάτων

Παρασκευάστηκαν πολυκλωνικά αντισώματα έναντι του αμινοτελικού τμήματος του LBR για την αλληλουχία που αντιστοιχεί στον άνθρωπο και στο ποντίκι. Για ανοσοποίηση χρησιμοποιήθηκαν οι αντίστοιχες πρωτεΐνες hNt-LBR-His και mNt-LBR-GST. Οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν αρχικά με ηλεκτροφόρηση σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου σε χαμηλά mAmp. Η χρώση των πηκτών πολυακρυλαμιδίου έγινε με τη χρωστική Coomassie Blue G250 παρουσία 2-προπανόλης αντί μεθανόλης. Στη συνέχεια, για την απομάκρυνση της περίσσειας της χρωστικής οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου τοποθετήθηκαν σε διάλυμα 40% 2-προπανόλης και 10% οξικού οξέος. Οι πηκτές πλύθηκαν πολλές φορές με διάλυμα PBS και οι επιλεγείσες ταινίες αποκόπηκαν από την πηκτική και ομογενοποιήθηκαν. Στο ομογενοποίημα προστέθηκε ίσος όγκος complete adjuvant και έγινε υποδόρια ένεση στο κουνέλι. Ακολούθησαν αναμνηστικές δόσεις με incomplete adjuvant.

2.8 Φασματοσκοπία μάζας

Η φασματοσκοπία μάζας MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of Flight) έγινε στο *Functional Genomics Unit of Moredun Research Institute, Edinburgh, UK*. Η πέψη των πρωτεϊνών που αποκόπηκαν από το πολυακρυλαμίδιο έγινε με μία πρωτεάση ειδική για αργινίνες. Το ΔΜ (η διαφορά μεταξύ της μετρούμενης και της υπολογισμένης μάζας) ήταν της τάξης 1/10,000.



3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η κυρίαρχη άποψη στη βιβλιογραφία είναι ότι η HP1 συνδέεται ειδικά με την ιστόνη H3 που είναι μετα-μεταφραστικά τροποποιημένη (τριμεθυλιωμένη) στη λυσίνη 9 (me₃K9-H3). Ωστόσο, υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις για το εάν και κατά πόσον αυτή η σύνδεση αποτελεί την εξαίρεση ή τον κανόνα και εάν η HP1 εντοπίζεται μόνο σε περιοχές που είναι εμπλουτισμένες σε αυτή την τροποποίηση (κυρίως περικεντρομεριδιακή ετεροχρωματίνη). Ένας αρχικός έλεγχος που διεξήγαγε το εργαστήριό μας χρησιμοποιώντας ειδικούς ανιχνευτές για την HP1α και HP1β έδειξε ότι η έκφραση των πρωτεϊνών αυτών δεν επηρεάζεται σημαντικά κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης ορισμένων κυττάρων (π.χ. λεμφοκύτταρα), αλλά μειώνεται σημαντικά σε άλλες περιπτώσεις (π.χ. ερυθροποίηση). Εν τούτοις, μελέτη φυσιολογικών ιστών του ανθρώπου και του ποντικού αποκάλυψε σύνθετα πρότυπα υποπυρηνικής κατανομής που δεν θα μπορούσαν εύκολα να αποδοθούν σε αυξομειώσεις της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης των HP1α/β, αλλά θα ήταν πιο συμβατά με έναν μηχανισμό ρύθμισης που εξαρτάται από αυξητικούς παράγοντες και μιτογόνα.

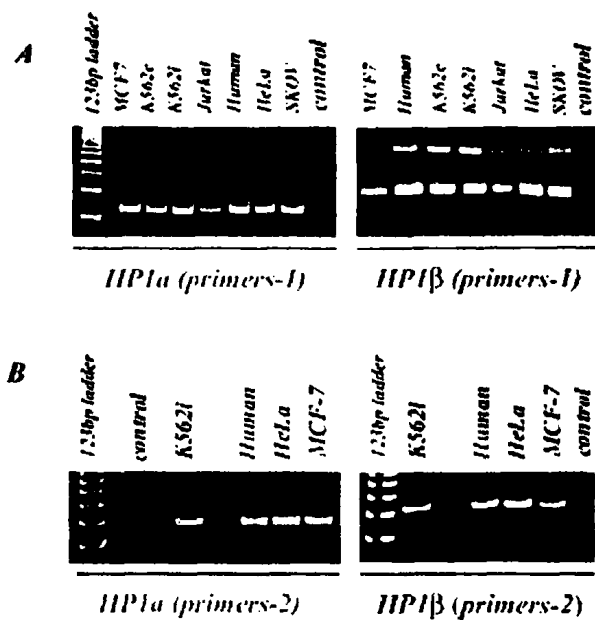
3.1 Ανίχνευση γενωμικών περιοχών της HP1α και HP1β σε καρκινικά και μετασχηματισμένα κύτταρα

Το γεγονός ότι νεοπλασίες του ίδιου ιστολογικού τύπου διαφέρουν ορισμένες φορές ως προς το ποσοστό των HP1-θετικών κυττάρων (Ρήτου 2006, αδημοσίευτα αποτελέσματα) σημαίνει ότι η εξέλιξη της νεοπλασίας ενδεχομένως συνοδεύεται από σωματικές μεταλλάξεις (somatic cell mutations) στα αντίστοιχα γονίδια. Οι μεταλλάξεις αυτές μπορεί να θίγουν την κωδικοποιούσα περιοχή ή την περιοχή των υποκινητών.

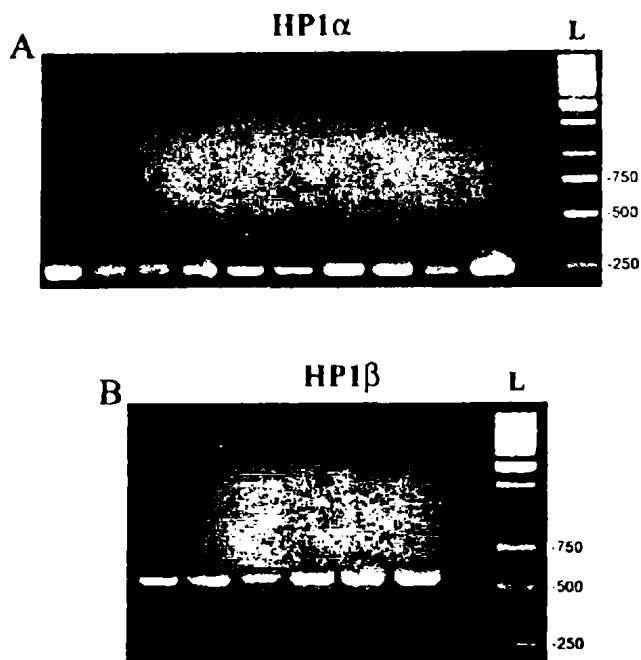
Διερευνώντας την πρώτη πιθανότητα παρασκευάσαμε με PCR δύο διαφορετικές γενωμικές περιοχές των HP1α και HP1β από σειρές μετασχηματισμένων κυττάρων (MCF-7-καρκίνος μαστού, SKOV3-καρκίνος ωοθηκών, Jurkat-T-λεμφοκύτταρα (λευχαιμία), K562-φυσικά φονικά NK-natural killer cells (λέμφωμα non-Hodgkin) control, K562-induced (ερυθρολευχαιμικά κύτταρα διαφοροποιημένα *in vitro* υπό την επίδραση χημικών επαγωγέων (I) που «ωριμάζουν» προς νορμοβλάστες και παράγουν αιμοσφαιρίνη), και HeLa (Εικ. 5). Τα δύο mRNAs ανιχνεύθηκαν σε όλα τα δείγματα, δηλαδή τόσο σε μη-διαφοροποιημένα όσο και σε διαφοροποιημένα κύτταρα. Επίσης, εξετάσαμε κατά τον ίδιο τρόπο υλικό από ανθρώπινα



νεοπλάσματα και συγκεκριμένα από διάχυτο Β-λέμφωμα όπου δεν παρατηρήθηκαν διαφορές (Εικ. 6).



Εικόνα 5. PCR από γενωμικό DNA στα κύτταρα που περιγράφονται. (Α) Η περιοχή που έχει «πολλαπλασιαστεί» αντιστοιχεί στον χρωμοτομέα (chromodomain), ενώ στο (Β) σε ολόκληρο περίπου το μόριο της HP1α και HP1β.



Εικόνα 6. RT-PCR σε υλικό από λεμφώματα ασθενών.

(A) Η περιοχή που έχει «πολλαπλασιαστεί» αντιστοιχεί στα νουκλεοτίδια 416-679, που βρίσκονται μετά τον χρωμοτομέα (CD) της HP1α.

(B) Η περιοχή που έχει «πολλαπλασιαστεί» αντιστοιχεί στα νουκλεοτίδια 558-779, που βρίσκονται μετά τον χρωμοτομέα (CD) της HP1β. Το (L) αντιστοιχεί στο δείκτη bp.

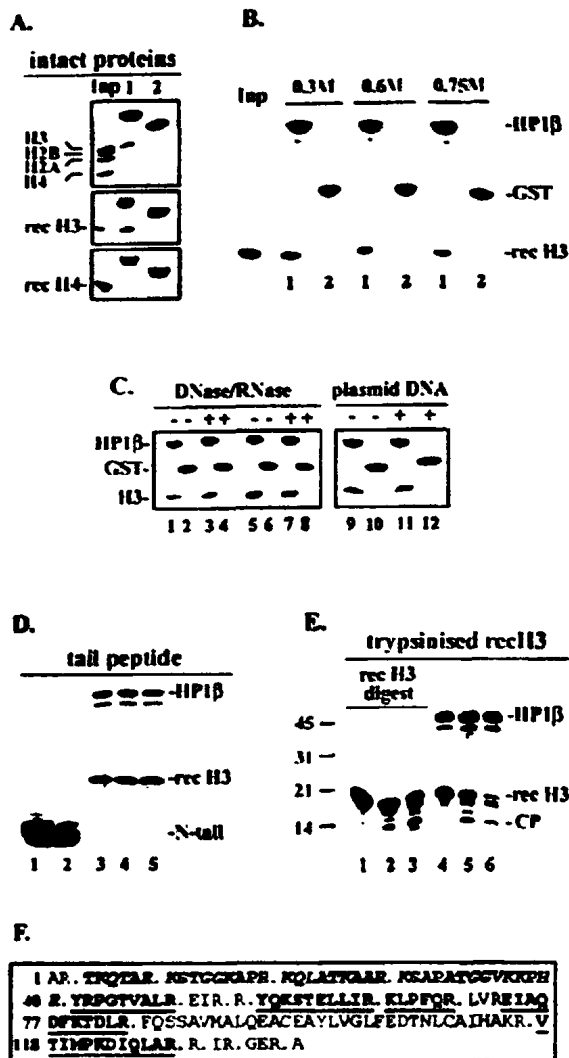
Διαπιστώσαμε επίσης με έμμεσο ανοσοφθορισμό ότι η HP1α/β είναι παρούσα σε όλες τις κυτταρικές σειρές καθώς και στα δείγματα από διαφορετικούς ασθενείς με λέμφωμα. Επί τη βάσει αυτών των ευρημάτων, θελήσαμε λοιπόν να διερευνήσουμε σε μεγαλύτερη λεπτομέρεια τις αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης HP1 με διάφορα χρωματινικά υποστρώματα και να μελετήσουμε εάν τα πρότυπα κατανομής της επηρεάζονται από τον κυτταρικό κύκλο. Το στοιχείο αυτό έχει μεγάλη σημασία όταν επιχειρείται η σύγκριση φυσιολογικών και εξαλλαγμένων κυττάρων, διότι, όπως είναι ευρέως γνωστό, ο κυτταρικός κύκλος δεν ελέγχεται κανονικά στη δεύτερη περίπτωση.

3.2 Αλληλεπιδράσεις της HP1 με απομονωμένες ιστόνες και ιστονικά πεπτίδια

Για να μελετήσουμε την ειδικότητα των αλληλεπιδράσεων HP1-χρωματίνης εξετάσαμε τη σύνδεση της HP1β με ολικές ιστόνες που προέρχονται από ένα πυρηνικό εκχύλισμα με 0.1 M θεικού οξέος. Όπως παρουσιάζεται στην Εικ. 7Α, η HP1β-GST συγκατακρημνίσθηκε σχεδόν αποκλειστικά με την ιστόνη H3. Σε συμφωνία με την παρατήρηση αυτή, η HP1β συνδέθηκε σχεδόν στοιχειομετρικά στην ανασυνδυασμένη ιστόνη H3 (rH3), αλλά όχι στην ανασυνδυασμένη ιστόνη H4 (rH4). Η αλληλεπίδραση της HP1β με την rH3 ήταν ισχυρή και παρατηρήθηκε ακόμα και σε υψηλή ιονική ισχύ (0.75M NaCl) (Εικ. 7Β). Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην αλληλεπίδραση αυτή όταν η HP1β ή η rH3 επωάσθηκαν με DNaseI/RNaseA, ή όταν προστέθηκαν στοιχειομετρικές ποσότητες πλασμιδιακού DNA. Συνεπώς, έμμεσες αλληλεπιδράσεις που διαμεσολαμβάνονται από νουκλεϊνικά οξέα θα πρέπει να αποκλειστούν.

Η Εικ. 7D, δείχνει πειράματα “pull-down” με την HP1β και την rH3, παρουσία αμινοτελικών πεπτιδίων της ιστόνης H3 που ήταν τριμεθυλιωμένα στη λυσίνη 9 (me₃K9-H3), ή εντελώς μητροποποιημένα. Παρατηρούμε ότι τα πεπτίδια συνδέθηκαν πολύ λίγο στην HP1 και κανένα τους δεν ανταγωνίστηκε τη σύνδεση με την ακέραια πρωτεΐνη (H3), ακόμα και όταν χρησιμοποιήθηκε περίσσεια (200x). Στη συνέχεια, έγινε περιορισμένη πέψη της rH3 με το ένζυμο θρυψίνη για να ελεγχθεί η δυνατότητα σύνδεσης διαφόρων τμημάτων της πρωτεΐνης αυτής. Όταν χρησιμοποιήθηκε η πρωτεολυμένη πρωτεΐνη, παρατηρήθηκε ότι η HP1β συγκατακρημνίζεται με ένα πεπτίδιο μοριακής μάζας 12 kDa που αντιστοιχεί σύμφωνα και με άλλες μελέτες στο κεντρικό τμήμα (histone fold) της H3 (Εικ. 7E) (134-136). Αποκόψαμε από την πηκτή πολυακρυλαμίδιου το πεπτίδιο αυτό και το αναλύσαμε με φασματοσκοπία μάζας. Έτσι διαπιστώσαμε ότι πράγματι αντιστοιχεί στην ακολουθία αμινοξέων 40-129, δηλαδή στο histone fold. Συνεπώς, από το σύνολο των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι υπό *in vitro* συνθήκες η HP1β συνδέεται με την H3 ανεξάρτητα από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, αλληλεπιδρώντας κυρίως με το κεντρικό τμήμα του μορίου.





ΕΙΚΟΝΑ 7. Πρόδεση της HP1 σε απομονωμένες ιστόνες και ιστονικά πεπτιδια.

(A) Υλικό που συγκατακρημνίζεται με την HP1β (γραμμή 1), ή την GST (γραμμή 2), μετά από εκθάση με ένα μείγμα ερυθροκυτταρικών ιστονών, με recH3, ή με recH4. Το (Ipr) αντιστοιχεί στο 50% της ποσότητας που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα. (B) H3 που συγκατακρημνίζεται με την HP1β (γραμμή 1), ή την GST (γραμμή 2), σε 0.3, 0.6, και 0.75 M NaCl. Το (Ipr) είναι όπως στο (A). (C) Η ιστόνη H3 που συγκατακρημνίζεται με την HP1β (μονοί αριθμοί) ή την GST (ζυγοί αριθμοί) παρουσία DNase I/RNase A ή πλασμιδιακού DNA. Οι γραμμές 1-4 και 9-10 αντιστοιχούν σε ανασυνδυασμένες ιστόνες και οι 5-8 και 11-12 σε φυσιολογικές. (D) Πρόδεση της H3 στην HP1β παρουσία περισσειας μη τροποποιημένου αμινοτελικού πεπτιδίου (γραμμή 3), τροποποιημένου αμινοτελικού πεπτιδίου (me₃K9) (γραμμή 4) ή ρυθμιστικού διαλύματος (γραμμή 5). Οι γραμμές 1 και 2 δείχνουν ηλεκτροφορετικά προφίλ του μη τροποποιημένου και τροποποιημένου πεπτιδίου της H3, αντίστοιχα. (E) Πέψη της H3 με θρυψίνη για 0 λεπτά (γραμμή 1), 2 λεπτά (γραμμή 2), και 10 λεπτά (γραμμή 3). Οι γραμμές 4-6 αντιστοιχούν στο υλικό που συγκατακρημνίζεται με την HP1β σε κάθε ένα από τα παρασκευάσματα. Επισημαίνονται το πεπτιδιο που αντιστοιχεί στο "histone fold" τμήμα της ιστόνης H3 (CP) και η ακέραια πρωτεΐνη. Η γραμμή στα αριστερά αντιστοιχεί στους δείκτες μοριακών μαζών (σε kDa). (F) Η αλληλουχία του πεπτιδίου CP, όπως ανιχνεύεται από την ανάλυση φασματοσκοπίας μάζας. Οι αλληλουχίες που δίνουν διακριτές κορυφές είναι με κεφαλαία και υπογραμμισμένα γράμματα, ενώ τα προϊόντα που είναι είτε πολύ μικρά ή πολύ μεγάλα για ανάλυση με τη μέθοδο MALDI-TOF είναι με κεφαλαία. Η πρωτεΐνη επώαστηκε με πρωτεάση ειδική για αργινίνες και η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα Mascot Search.



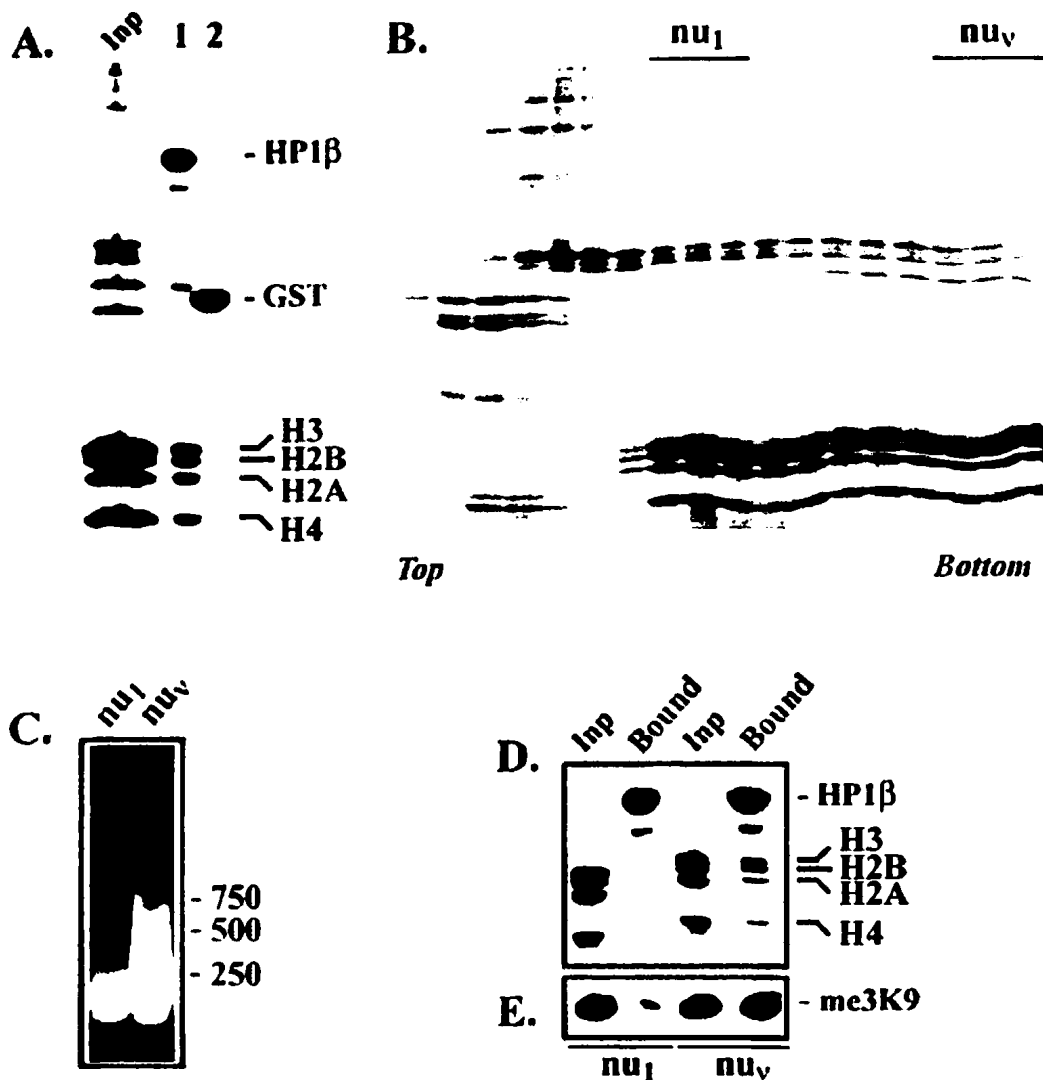
3.3 Αλληλεπιδράσεις της HP1 με τμήματα χρωματίνης

Για να μελετήσουμε τις αλληλεπιδράσεις της HP1 με την ολική χρωματίνη, χρησιμοποιήσαμε σαν υπόστρωμα υλικό που απελευθερώνεται από πυρήνες G0 κυττάρων (εμπύρηνα ερυθροκύτταρα γαλοπούλας) μετά από πέψη με MNase. Όπως φαίνεται στην Εικ. 8A, σε πειράματα “pull-down” η HP1β συγκατακρημνίζεται με στοιχειομετρικές ποσότητες ιστονών. Υποβάλαμε τη χρωματίνη σε κλασμάτωση (βαθμίδωση σακχαρόζης) και εξετάσαμε ξεχωριστά το κάθε κλάσμα για την ικανότητα σύνδεσης με την HP1β (Εικ. 8B, C). Παρατηρήσαμε ότι η HP1β συνδέεται σχεδόν αποκλειστικά με ολιγονουκλεοσωματικές συστοιχίες (nu_n) και δεν αλληλεπιδρά με μονονουκλεοσώματα (nu_1) (Εικ. 8D). Η προτίμηση της HP1β για τα ολιγονουκλεοσώματα δεν οφείλεται σε εμπλουτισμό της $\text{me}_3\text{K9-H3}$, όπως φαίνεται από το western blot (Εικ. 8E). Επίσης, δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά όταν το πείραμα έγινε σε υψηλότερη ιονική ισχύ (0.6 M NaCl).

Συνεχίζοντας τη μελέτη, εξετάσαμε χρωματίνη που απομονώνεται από κύτταρα συγχρονισμένα στην S φάση. Η χρωματίνη αυτή περιέχει μία ποικιλία νουκλεοσωμάτων (assembly/disassembly intermediates) (137, 138). HeLa κύτταρα συγχρονίστηκαν στο όριο G1/S με θυμιδίνη και στη συνέχεια «απελευθερώθηκαν» για 7 ώρες, ώστε να βρίσκονται στο μέσον της S φάσης (Εικ. 9A, inset). Μετά από λύση με Triton X-100 και πέψη με το ένζυμο MNase, συλλέξαμε ένα διαλυτό χρωματινικό κλάσμα (F1). (Η πέψη με MNase κρίθηκε απαραίτητη για να απελευθερωθούν σωματίδια που ήταν παγιδευμένα σε ίνες χρωματίνης). Μεγαλύτερα τμήματα ευχρωματίνης (F2) και ετεροχρωματίνης (F3) εκχυλίστηκαν από το αδιάλυτο ίζημα με τη χρήση διαλύματος 2 mM EDTA και 0.3 M NaCl, αντίστοιχα (βλ. Διάγραμμα στην Εικ. 9A).

Όταν χρησιμοποιήσαμε το κλάσμα F1 ως υπόστρωμα και το πείραμα έγινε σε 0.3 M NaCl, η HP1β συγκατακρημνίστηκε με οκταμερή ιστονών (Εικ. 9B, F1, γραμμή 1). Όμως, όταν το ίδιο πείραμα έγινε σε υψηλότερη ιονική ισχύ (0.6 M NaCl), το ίζημα της HP1β περιείχε κυρίως τετραμερή H3/H4 (Εικ. 9B, F1, γραμμή 2). Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι τα σωματίδια που είναι διαλυτά στο απορρυπαντικό είναι ασταθή και πιθανώς αντιπροσωπεύουν νεοσχηματισμένα ή αποσταθεροποιημένα νουκλεοσώματα (139). Σε υποστήριξη αυτής της ερμηνείας, πειράματα “pull down” με τα κλάσματα F2 και F3 έδειξαν ότι η HP1β συγκατακρημνίζεται με οκταμερή ιστονών παρουσία υψηλού άλατος (Εικ. 9B, F2 και F3, σύγκριση γραμμής 1 & 2). Το υλικό αυτό είναι γνωστό ότι περιέχει σταθερά τεμάχια χρωματίνης που είναι αδιάλυτα στο απορρυπαντικό, δηλαδή πολυνουκλεοσώματα.



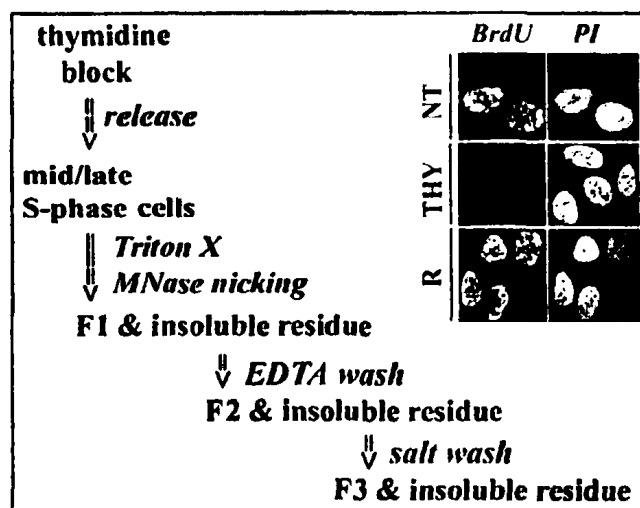


ΕΙΚΟΝΑ 8. Πρόσδεση της HP1β σε μονονουκλεοσώματα και ολιγονουκλεοσώματα.

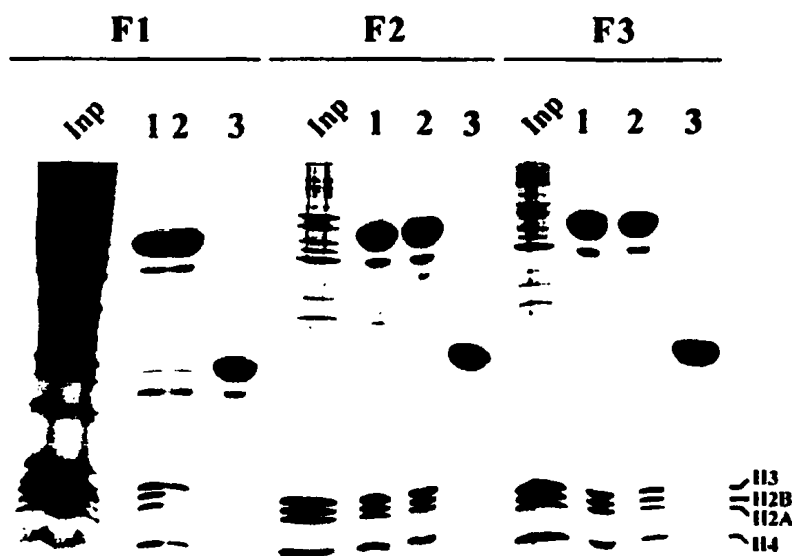
(A) Πρόσδεση της HP1β σε ολική (bulk) χρωματίνη, που απελευθερώνεται από πυρήνες μετά από πέψη με MNase. (γραμμή 1, το υλικό που συγκατακρημνίζεται με την HP1β σε συνθήκες 0.3 M NaCl), (γραμμή 2, ο αντίστοιχος GST μάρτυρας). Το (Inp) αποτελεί το 20% της ποσότητας που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα. (B) Κλασμάτωση του υλικού μετά από πέψη με MNase σε βαθμίδωση σακχαρόζης (10-30%). Τα κλάσματα που αντιστοιχούν στα μονονουκλεοσώματα και στα ολιγονουκλεοσώματα υποσημειώνονται ως (ν_1) και (ν_v), αντίστοιχα. (C) DNA των κλασμάτων (ν_1) και (ν_v). Τα μεγέθη (σε bp) φαίνονται στα δεξιά. (D) "Pull down" με επιλεγμένα κλάσματα. Σε κάθε περίπτωση, το (Inp) αποτελεί το 20% της ποσότητας που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα. Το (Bound) αντιστοιχεί στο υλικό που συγκατακρημνίζεται με την HP1β. (E) Ανοσοαποτύπωση κατά western με αντισώματα για την me₃K9 στα δείγματα που αντιστοιχούν στο D.



A.



B.



ΕΙΚΟΝΑ 9. Πρόσδεση της HP1 σε κλάσματα χρωματίνης από κύτταρα που βρίσκονται στην S φάση.

(A) Σχηματική αναπαράσταση της κλασμάτωσης. Το ένθετο δείχνει κύτταρα HeLa με χρώση για BrdU (BrdU) και ιωδιούχο προπίδιο (PI) πριν τον συγχρονισμό (NT), μετά από την αναστολή με θυμιδίνη (THY), και μετά από «απελευθέρωση» (release) για 7 ώρες (R). (B) Πρόσδεση της HP1β σε νουκλεοσωματικά σωματίδια (particles) που έχουν εκχυλιστεί από κύτταρα που βρίσκονται στην S φάση. (γραμμές 1 και 2, υλικό που συνδέεται στην HP1β σε 0.3 M και 0.6 M NaCl, αντίστοιχα), (γραμμή 3, δείγμα-μάρτυρας GST, σε 0.3 M NaCl). Το (Imp) αποτελεί το 20% της ποσότητας που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα. Τα F1, F2 και F3 αντιστοιχούν στη χρωματίνη που διαλυτοποιήθηκε διαδοχικά παρουσία Triton X-100, EDTA και 0.3 M NaCl.



3.4 Αλληλεπιδράσεις της HP1 με ακέραια νουκλεοσώματα (particles) και υποσωματίδια (sub-particles) ετεροχρωματινικής προέλευσης

Τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν στις Εικ. 8 & 9 δείχνουν ότι η HP1β δεν αλληλεπιδρά με ακέραια μονονουκλεοσώματα που απελευθερώνονται από χρωματίνη G0, αλλά συνδέεται σε ολιγονουκλεοσώματα που είναι ασταθή υπό συνθήκες υψηλής ιοντικής ισχύος (salt-labile) και απομονώνονται από κύτταρα τα οποία βρίσκονται στην S φάση. Επειδή αυτές οι χρωματινικές παρασκευές αντιπροσωπεύουν ολική (bulk) χρωματίνη, αναρωτηθήκαμε τι θα συνέβαινε εάν χρησιμοποιούσαμε χρωματίνη που είναι εμπλουτισμένη σε μεθυλιωμένη ιστόνη H3 (me₃K9). Για να απαντήσουμε στην ερώτηση αυτή, χρησιμοποιήσαμε κλάσματα που προέρχονται από περιφερική ετεροχρωματίνη. Σε άλλη μελέτη δείξαμε ότι μπορούμε να απομονώσουμε μονονουκλεοσώματα εμπλουτισμένα σε τριμεθυλιωμένη λυσίνη 9 (me₃K9) και μη τροποποιημένα στη λυσίνη 4 με εκχύλιση πυρηνικών «φαντασμάτων» (nuclear ghosts) με 0.3 M NaCl. Το εκχύλισμα αυτό προέρχεται από πυρήνες G0 που έχουν υποστεί εξαντλητική πέψη με DNaseI και θραύση με υπέρηχους, για να απελευθερωθούν τμήματα ετεροχρωματινής που είναι σταθερά συνδεδεμένα με τον πυρηνικό φάκελο (140). Όταν συνεινώσαμε τέτοια εκχυλίσματα (DNase-NGEs) με την HP1β σε διαφορετικές συνθήκες ιοντικής ισχύος, παρατηρήσαμε ένα πολύ ενδιαφέρον και επαναλήψιμο φαινόμενο. Σε 0.3 M NaCl, η HP1β συγκατακρημνίζεται με τις τέσσερις πυρηνικές ιστόνες και τμήματα DNA μήκους 100-250 bp (Εικ. 10A, B, γραμμή 1). Μετά από πιο προσεκτική επισκόπηση του δείγματος, παρατηρήσαμε όμως ότι η στοιχειομετρία των ιστονών ήταν μετατοπισμένη υπέρ των ιστονών H3/H4. Αυτό έγινε πιο προφανές όταν το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε 0.6 M NaCl, όπου η HP1β αλληλεπιδρά αποκλειστικά με H3/H4 υποσωματίδια (sub-particles H3/H4), τα οποία δεν περιέχουν DNA (Εικ. 10A, B, γραμμή 3).

Αυτή η χαρακτηριστική «προτίμηση» της HP1β δεν παρατηρήθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε υλικό το οποίο περιείχε μεγαλύτερου μεγέθους σωματίδια. Εκμεταλλευόμενοι το γεγονός ότι η MNase είναι λιγότερο «επιθετική» από την DNaseI, παρασκευάσαμε εκχυλίσματα περιφερικής ετεροχρωματινής που περιείχαν ολιγονουκλεοσώματα αντί μονονουκλεοσωμάτων μετά από πέψη πυρήνων με MNase αντί της DNaseI. Όταν ελέγξαμε τέτοια εκχυλίσματα (MNase-NGEs) υπό διαφορετικές συνθήκες ιοντικής ισχύος, παρατηρήσαμε ότι η HP1β συνδέεται με στοιχειομετρικές ποσότητες των τεσσάρων πυρηνικών ιστονών και τμήματα DNA που αποτελούνται από 150 bp-mers, ακόμα και στα 0.6 M NaCl. Το πείραμα αυτό αποδεικνύει ότι τα οκταμερή των ιστονών δεν



αποδιοργανώνονται (disassemble) όταν η ιονική ισχύς αυξάνεται από τα 0.3 M στα 0.6 M NaCl, αλλά αυτό συμβαίνει όταν παράλληλα το νουκλεοσωματικό DNA έχει κοπέι εξαντλητικά. Η παρατήρηση αυτή βρίσκεται σε συμφωνία με την πρόσφατη βιβλιογραφία. Η ιονική ισχύς στην οποία το DNA αποσυνδέεται από το οκταμερές και τα διμερή H2A/H2B διαχωρίζονται από το τετραμερές H3/H4 είναι μεταξύ του 0.5 M και 1 M NaCl. Ο βαθμός αποσύνδεσης εξαρτάται όμως σημαντικά και από τη συγκέντρωση Mg^{2+} (30, 48, 141-143). Παρατηρήσαμε επίσης ότι η ιστόνη H3 που κατακρημνίζεται από εκχυλίσματα (DNase-NGEs) σε 0.3 M και 0.6 M NaCl δεν διαφέρει ως προς την τριμεθυλίωση της λυσίνης 9 (me_3K9-H3) (Εικ. 10C). Συμψηφιζόμενες, οι παρατηρήσεις που παρουσιάζονται στην Εικ. 10A μας οδηγούν επομένως στο συμπέρασμα ότι υπό πιο «απαιτητικές» συνθήκες, η HP1β παρουσιάζει επιλεκτική πρόσδεση στα υποσωματίδια H3/H4.

Όπως αναφέρθηκε, τα διασπασμένα (disrupted) νουκλεοσώματα προϋπάρχουν στο υλικό που χρησιμοποιούμε ως πηγή (input) και δεν προέρχονται από αποσύνδεση που προκύπτει με την απλή αύξηση της ιονικής ισχύος. Αυτό επιβεβαιώθηκε υποβάλλοντας τα εκχυλίσματα (DNase-NGEs) σε κλασμάτωση (Εικ. 10D-F) και ελέγχοντας τα διαφορετικά κλάσματα σε πειράματα “pull-down” υπό δύο διαφορετικές συνθήκες (0.3 M και 0.6 M NaCl). Όπως παρουσιάζεται στην Εικ. 10G (γραμμές 3 & 4), όταν χρησιμοποιήσαμε αρχικά κλάσματα (π.χ κλάσμα 7), η HP1β επέλεξε αποκλειστικά τις ιστόνες H3/H4 και στις δύο συνθήκες. Αντίθετα, όταν χρησιμοποιήθηκαν μεσαία και τελικά κλάσματα (π.χ κλάσματα 12-19), παρατηρήσαμε ότι η σύνδεση της HP1β επηρεάζονταν από την ιονική ισχύ, όπως στα προηγούμενα πειράματα (σύγκριση Εικ. 10G, γραμμές 5-8 με Εικ. 9A, γραμμές 1-4). Επίσης, η HP1β δεν συγκατακρημνίστηκε με τις συνδετικές (linker) ιστόνες (Εικ. 10G, γραμμές 1 & 2) που βρίσκονται σε μεγάλα ποσά στα πρώτα κλάσματα (Εικ. 10D).

Η εξήγηση που δίνουμε για τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζεται στην Εικ. 10H. Πιστεύουμε ότι τα κορυφαία (χαμηλής πυκνότητας) κλάσματα που φαίνονται στην Εικ. 10D αποτελούνται κυρίως από διασπασμένα σωματίδια (disrupted particles, nu_D). Αυτά τα σωματίδια προέρχονται πιθανώς από νουκλεοσώματα των οποίων το DNA έχει κοπέι εξαντλητικά κατά τη διάρκεια της χρωματινικής παρασκευής. Η απομάκρυνση του DNA είναι γνωστό ότι εξασθενίζει τις αλληλεπιδράσεις των H2A/H2B : H3/H4 και συντελεί στην αποδιάταξη του οκταμερούς (144). Τα μεσαία και τελικά (υψηλής πυκνότητας) κλάσματα από τη βαθμίδωση σακχαρόζης είναι εμπλουτισμένα σε αέραια μονονουκλεοσώματα (nu_1) και σε σωματίδια στα οποία λείπουν ποικίλα τμήματα νουκλεοσωματικού DNA και είναι, συνεπώς, μερικώς «ανοιχτά» (nu_0). Σε αντίθεση με τα nu_1 , τα nu_0 και τα nu_D μπορούν να



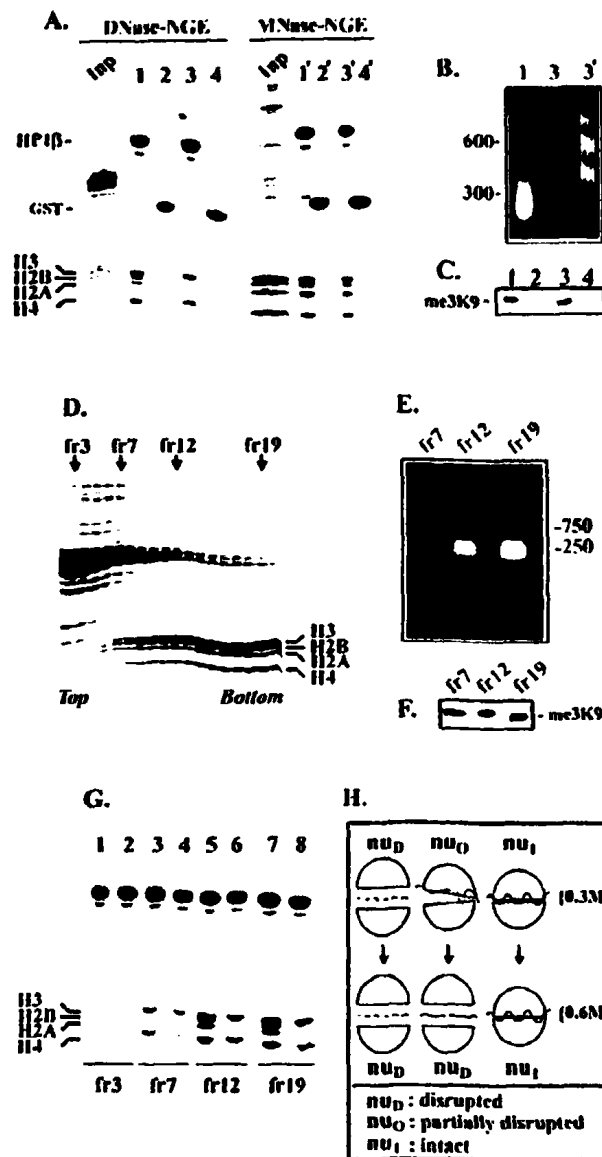
συνδεθούν με την HP1β σε επιτρεπτικές συνθήκες. Σε 0.3 M NaCl υπάρχει μία έμφαση στο τετραμερές H3/H4 (Εικ. 10A, G), γιατί η HP1β αλληλεπιδρά με ακέραια οκταμερή (ν_0) και ταυτόχρονα με υποσωματίδια (half-particles) που αποτελούνται από H3/H4. Αυτό γίνεται ακόμα πιο προφανές όταν αυξήσουμε την ιονική ισχύ, καθώς τα ασταθή ν_0 διαχωρίζονται εντελώς και μετατρέπονται σε ν_D . Επειδή τα ν_1 περιέχουν ακέραιο νουκλεοσωματικό DNA και δεν αποδιατάσσονται σε συνθήκες υψηλής ιονικής ισχύος (0.6 M NaCl), μόνο δύο είδη σωματιδίων απομένουν στη συνθήκη αυτή: Τα εντελώς διασπασμένα σωματίδια (ν_D) που συνδέονται με την HP1β και τα ακέραια μονονουκλεοσώματα (ν_1) που δεν αλληλεπιδρούν με αυτή.

Για να εξετάσουμε πιο άμεσα εάν η HP1β έχει πράγματι «προτίμηση» για τα διασπασμένα σωματίδια (disrupted particles) συγκρίναμε την HP1 με τον LBR. Ο LBR είναι μία πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τη χρωματίνη αλλά δομικά δεν σχετίζεται με την HP1 και μπορεί να συνδεθεί μόνο με ακέραια νουκλεοσώματα. Πραγματοποιήσαμε πειράματα “pull-down” με τον rNtLBR-GST και την rHP1-GST χρησιμοποιώντας ως πηγή νουκλεοσωμάτων μία χρωματινική παρασκευή που περιείχε ακέραια και διασπασμένα (disrupted) νουκλεοσώματα (145). Τα αποτελέσματα της Εικ. 11A δείχνουν ότι κάτω από τις ίδιες συνθήκες, ο LBR «συλλέγει» οκταμερή ιστονών, ενώ η HP1β επιλέγει κυρίως τετραμερή H3/H4.

Για να επιβεβαιώσουμε περαιτέρω τα αποτελέσματα αυτά, πραγματοποιήσαμε παρόμοια πειράματα υπό περιοριστικές (limiting) συνθήκες. Όπως παρουσιάζεται στην Εικ. 11B, σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις HP1β συγκατακρημνίζονται αποκλειστικά τετραμερή H3/H4, δηλαδή διασπασμένα σωματίδια (ν_D). Το ίδιο παρατηρήθηκε επίσης σε πειράματα διαδοχικών (successive) “pull-down” υπό συνθήκες υψηλής ιονικής ισχύος (0.6 M NaCl). Στην περίπτωση αυτή, η HP1β επώαστηκε με μία σταθερή ποσότητα εκχυλίσματος DNase-NGEs, όπως παρουσιάζεται στην Εικ. 10A. Στη συνέχεια, αφού συλλέχθηκε το πρώτο ίζημα, μία καινούργια ποσότητα πρωτεΐνης προστέθηκε στο υπερκείμενο που αποτελεί το μη προσδεμένο υλικό (non-bound, NB). Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε 9 ακόμη φορές. Όπως παρουσιάζεται στην Εικ. 11C, η HP1β συνδέθηκε μόνο με τα τετραμερή H3/H4, ενώ εξακολουθούσε να υπάρχει στο υπερκείμενο (NB) σημαντικό ποσό πυρηνικών ιστονών σε μορφή ακέραιων μονονουκλεοσωμάτων (ν_1) (σύγκριση γραμμής Inp και NB).

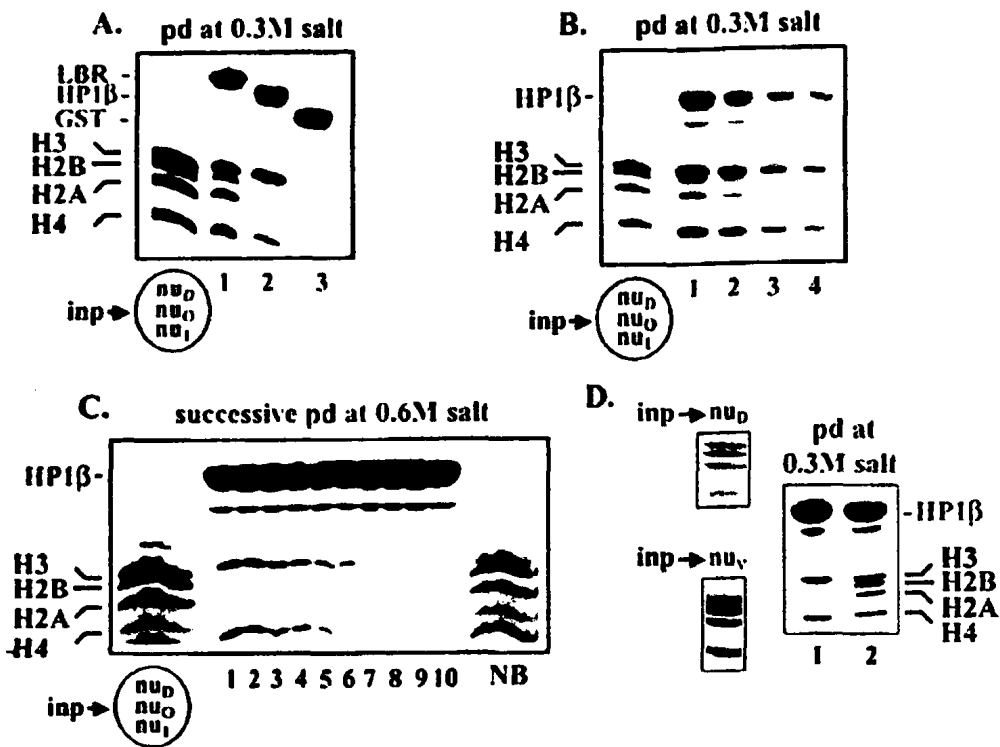
Για να αποκλείσουμε παράγοντες που έχουν σχέση με την τεχνική της κάθε παρασκευής εξετάσαμε συγκριτικά την αλληλεπίδραση της HP1β με τετραμερή H3/H4 (ν_D , Εικ. 10D) και με τα ολιγονουκλεοσώματα (ν_n , Εικ. 8B). Όπως φαίνεται στην Εικ. 11D, και τα δύο είδη σωματιδίων (ν_D & ν_n) αλληλεπιδρούν σχεδόν στοιχειομετρικά με την HP1β.





ΕΙΚΟΝΑ 10. Αλληλεπίδραση της HP1β με διασπασμένα (disrupted) νουκλεοσώματα.
 (A) Αλληλεπίδραση της HP1β με τμήματα περιφερικής ετεροχρωματινής μετά από εκχύλιση πυρηνικών «φαντασμάτων» (NG). (γραμμές 1 και 1' και 3 και 3', υλικό που κατακρημνίζεται από την HP1β σε 0.3 M και 0.6 M NaCl, αντίστοιχα. (γραμμές 2 και 2' και 4 και 4', δείγμα-μάρτυρας με την πρωτεΐνη GST). Το (Inp) αποτελεί το 20% της ποσότητας που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα. Τα DNase-NGE αντιστοιχούν σε εκχύλιση παρουσία DNase I, ενώ τα MNase-NGE παρουσία MNase (βλέπε κείμενο). (B) Το απομονωμένο DNA των δειγμάτων 1, 3 και 3' που αντιστοιχούν στο (A). Οι δείκτες (σε bp) υποδεικνύονται στα αριστερά. (C) Ανοσοαποτύπωση κατά western με αντισώματα για την me₃K9-H3. Οι γραμμές είναι ακριβώς όπως υποδεικνύονται στο (A). (D) Κλασμάτωση του εκχυλίσματος DNase-NGE σε βαθμίδωση σακχαρόζης 10-30%. Τα κλάσματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα που ακολουθούν επισημαίνονται με βέλη. (E, F) DNA και ανοσοαποτύπωση κατά western των κλασμάτων που υποδεικνύονται στην (D). Οι δείκτες (σε bp) υποδεικνύονται στα δεξιά. (G) Πειράματα "pull down" με τα κλάσματα που επισημαίνονται παραπάνω. Οι συνθήκες ιονικής ισχύος είναι 0.3 M (μονοί αριθμοί) ή 0.6 M (ζυγοί αριθμοί). (H) Σχηματική αναπαράσταση των τύπων σωματιδίων (particles) που παρατηρούνται στα εκχυλίσματα των NG. Το νουκλεοσωματικό DNA αναπαρίσταται με διακεκομμένες ή κυματοειδείς γραμμές. Τα H2A-H2B και H3-H4 υποσύμπλοκα παρουσιάζονται ως ημικύκλια. Για περισσότερες λεπτομέρειες (βλέπε κείμενο).





ΕΙΚΟΝΑ 11. Εκλεκτική αλληλεπίδραση της HP1 με υποσωματίδια H3/H4.

(A) Σωματίδια που «εκπλέγουν» ο LBR (γραμμή 1), η HP1β (γραμμή 2), και η GST (γραμμή 3) από ένα μείγμα πλήρως και μερικώς συγκροτημένων (assembled) νουκλεοσωμάτων σε 0.3 M NaCl. Το (Inp) αποτελεί το 20% της ποσότητας που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα. (B) "Pull down" με διαφορετικές ποσότητες HP1β (μειούμενες σε ποσότητα από την γραμμή 1 στη γραμμή 4) σε 0.3 M NaCl. Το (Inp) αποτελεί το 20% της ποσότητας που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα και περιέχει nu_1 , nu_0 , and nu_D . (C) Ιστόνες που συγκατακρημνίζονται με την gHP1β σε 10 διαδοχικά "pull down" σε 0.6 M NaCl (γραμμές 1-10). Περιλαμβάνονται τα δείγματα του εκχυλίσματος από τα πυρηνικά «φαντάσματα» (Inp; 20%) και του μη προσδεμένου υλικού (NB; 20% του συνολικού). (D) Ιστόνες που συγκατακρημνίζονται με την HP1β όταν το υλικό (Inp, 20%) περιέχει διασπασμένα (disrupted) σωματίδια (γραμμή 1, nu_D), ή ολιγονουκλεοσώματα (γραμμή 2, nu_1).



3.5 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της ιστόνης H3 που αλληλεπιδρά με την HP1

Για να προσδιορίσουμε τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των σωματιδίων τα οποία συνδέονται στην HP1, απομονώσαμε την ιστόνη H3 που συγκαθιζάνει με την HP1β σε συνθήκες ιονικής ισχύος 0.3 M NaCl και 0.6 M NaCl και υποβάλαμε το δείγμα σε ανάλυση με φασματοσκοπία μάζας (MALDI-TOF).

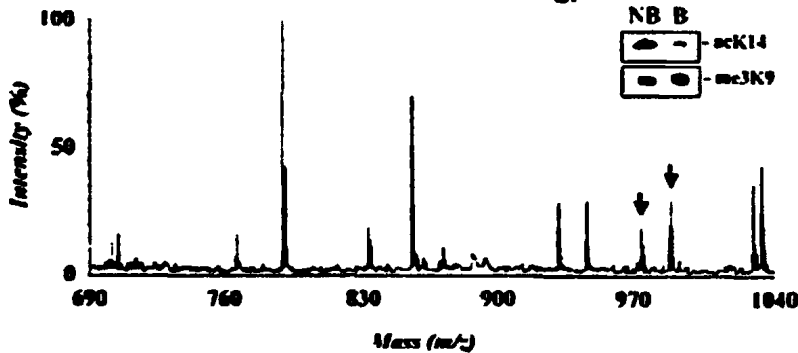
Σε συμφωνία με τις προηγούμενες βιοχημικές παρατηρήσεις (Εικ. 7-10), οι τροποποιήσεις που ανιχνεύθηκαν με MALDI-TOF ήταν ίδιες σε όλα τα δείγματα H3 ανεξάρτητα από τις συνθήκες στις οποίες πραγματοποιούνταν το “pull down”. Όπως παρατηρείται στην Εικ. 12A, μεθυλίωση στη λυσίνη 4 και διπλή ακετυλίωση στη λυσίνη 18/λυσίνη 23 (K18/K23) δεν διαπιστώθηκαν. Όμως, η ιστόνη H3 είχε άλλες ενδιαφέρουσες τροποποιήσεις, π.χ. τριμεθυλίωση στη λυσίνη 79 (K79) και (μονο)ακετυλίωση στην K18/K23, που έχουν χαρακτηριστεί ως «ευχρωματινικές». Επίσης, αναγνωρίστηκε η τριμεθυλίωση της λυσίνης 27 (K27) και η μεθυλίωση της λυσίνης 36 (K36). Η τριμεθυλίωση της K27 έχει συσχετιστεί με την αποσιώπηση μέσω της πρωτεΐνης Polycomb, ενώ η μεθυλίωση της K36 αποτελεί ένα σήμα “transcription ON” (5). Το τμήμα της «ουράς» της ιστόνης H3 που αντιστοιχεί στα αμινοξέα 9-17 και περιέχει τη λυσίνη 9 (K9) και τη λυσίνη 14 (K14) ήταν πολλαπλά τροποποιημένο. Επειδή όμως η διαφορά μάζας που αντιστοιχεί στην τριμεθυλίωση της λυσίνης είναι ίδια με αυτή της ακετυλίωσης της λυσίνης, μία κορυφή που ανιχνεύσαμε στα 971.5 Da μπορεί να αντιστοιχεί είτε σε διμεθυλιωμένο και ακετυλιωμένο, είτε σε διμεθυλιωμένο και τριμεθυλιωμένο πεπτίδιο. Με την ίδια λογική, μία κορυφή στα 985.5 Da μπορεί να αντιστοιχεί είτε σε ένα διπλά τριμεθυλιωμένο, είτε σε ένα τριμεθυλιωμένο και ακετυλιωμένο πεπτίδιο (Εικ. 12B). Επειδή μέχρι τώρα δεν έχει περιγραφεί καμία μεθυλ-τρανσφεράση ειδική για την K14, και ταυτοχρόνως η me_3K9-H3 και η $acK14-H3$ μπορούσε να ανιχνευθεί με western (Εικ. 12C), πιστεύουμε ότι ο δεύτερος συνδυασμός (τριμεθυλιωμένο και ακετυλιωμένο πεπτίδιο) είναι πιθανότερος. Σε κάθε περίπτωση, οι τροποποιήσεις που παρατηρήθηκαν δεν ήταν «διαγνωστικές» και δεν υπακούουν στον γενικό κανόνα «τριμεθυλίωση στην K9 / απουσία ακετυλίωσης στην K14 / μονομεθυλίωση στην K27» που θεωρείται ικανή και αναγκαία συνθήκη για τη σύνδεση με την HP1 (30, 48, 141-143).



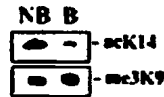
A.

Peak (Da)	Peptide (res. no)	Potential modifications	Presence in HPI precipitates	Modifiable tyrosines
704.4	3-8	none	+	K4
718.4	3-8	me	-	K4
732.4	3-8	2Xme	-	K4
746.4	3-8	3Xme/ac	-	K4
901.5	9-17	none	-	K9, K14
915.5	9-17	me	-	K9, K14
929.5	9-17	2Xme	+	K9, K14
943.5	9-17	3Xme/ac	+	K9, K14
971.5	9-17	5Xme/ac+2Xme	+	K9, K14
985.5	9-17	6Xme/ac+3Xme	+	K9, K14
986.6	18-26	none	-	K18, K23
1028.6	18-26	ac	+	K18, K23
1070.6	18-26	2Xac	-	K18, K23
1433.8	27-40	none	-	K27, K36
1447.8	27-40	me	-	K27, K36
1461.8	27-40	2Xme	+	K27, K36
1475.8	27-40	3Xme	+	K27, K36
1489.8	27-40	4Xme	+	K27, K36
1832.6	41-49	none	+	K27, K36
1250.7	54-63	none	+	K56
788.8	64-69	none	+	K64
1335.6	78-83	none	+	K79
1363.6	73-83	3Xme	+	K79
1584.8	117-128	none	+	K122

B.



C.



ΕΙΚΟΝΑ 12. Τροποποιήσεις της ιστόνης H3 που αλληλεπιδρά με την HPI.

(A) Κατάλογος των κορυφών που ανιχνεύθηκαν από την ανάλυση με φασματοσκοπία μάζας στα δείγματα της ιστόνης H3 που συγκατακρημνίζεται με τις HPIα, HPIβ, και HPIγ. (nm), μη τροποποιημένα κατάλοιπα; (me), μεθυλιωμένα κατάλοιπα; (ac), ακετυλιωμένα κατάλοιπα. (B) Ένα τμήμα του φάσματος μάζας που περιέχει τις πιο ενδιαφέρουσες κορυφές (αυτές που αντιστοιχούν στα 971.5 και 985.5 Da επισημαίνονται με βέλη). (C) Ανοσοαποτύπωση κατά western με αντισώματα για την me₂K9 και την acK14 της ιστόνης H3. Οι γραμμές αντιστοιχούν στο προσδεμένο (B) και μη προσδεμένο (NB) κλάσμα (έχει αναλυθεί το 100% του υλικού). Το πείραμα έγινε σε ιονική ισχύ 0.6 M NaCl.



3.6 Ενσωμάτωση της HP1 στη χρωματίνη υπό *in vivo* συνθήκες

Οι μέχρι τώρα παρατηρήσεις μας συνηγορούν στο συμπέρασμα ότι η HP1 αλληλεπιδρά με τη χρωματίνη ανάλογα με τη φυσική της κατάσταση. Επειδή η χρωματίνη είναι μία δυναμική δομή και υπόκειται σε πολλαπλές αλλαγές κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (144), θεωρήσαμε ότι οι *in vitro* παρατηρήσεις μας είναι πιθανόν να αντιστοιχούν σε μία συγκεκριμένη *in vivo* συνθήκη. Για να προσεγγίσουμε την ιδέα αυτή χρησιμοποιήσαμε ένα σύστημα παροδικής διαμόλυνσης (transient transfection). Δύο διαφορετικές ανθρώπινες κυτταρικές σειρές (HeLa, MCF-7) διαμολύνθηκαν με πολλές διαφορετικές μεθόδους (μικροένεση, με τη μέθοδο του φωσφορικού ασβεστίου, ή με ηλεκτροδιαπίδυση-electroporation) με το πλασμίδιο της HP1β-gfp. Ανεξαρτήτως μεθόδου, στα διαμολυσμένα κύτταρα παρατηρήθηκαν δύο διακριτοί φαινότυποι. Ένας εστιακός φαινότυπος (Speckled phenotype, SP) που περιγράφει κύτταρα στα οποία η HP1β-gfp συγκεντρώνεται σε ετεροχρωματινικές θέσεις γύρω από τον πυρήνισκο και την περιφερική ετεροχρωματίνη και ένας διάχυτος φαινότυπος (diffuse phenotype, D), όπου η πρωτεΐνη HP1β-gfp κατανέμεται διάχυτα σε ολόκληρο το νουκλεόπλασμα, σχηματίζοντας μικρά κοκκία (Εικ. 13Α). Επειδή τα κύτταρα "SP" είχαν ελαφρώς μεγαλύτερους πυρήνες από τα κύτταρα "D" πράγμα που συμβαίνει μετά την G1 φάση μας δημιουργήθηκε η υποψία ότι οι διαφορές αυτές μπορεί να εξαρτώνται από τον κυτταρικό κύκλο.

Για να μελετήσουμε την συσχέτιση αυτή, μικροενέσαμε σε κύτταρα HeLa (ταυτοχρόνως) το πλασμίδιο της HP1β-gfp και το ανάλογο βάσης Cy3-dUTP και εξετάσαμε τα κύτταρα 6 ώρες αργότερα. Όπως φαίνεται στην Εικ. 14Α, τα κύτταρα που παρουσιάζουν πρότυπο κατανομής "D" είναι στις περισσότερες περιπτώσεις αρνητικά για το Cy3-dUTP, δεν βρίσκονται δηλαδή στην S φάση. Στο μικρό ποσοστό των κυττάρων όπου το πρότυπο "D" συνυπάρχει με θετικό σήμα για το Cy3-dUTP, το πρότυπο του τελευταίου είναι τυπικό ενός κυττάρου που βρίσκεται στην πρώιμη S-φάση (ευχρωματινική κατανομή). Τέλος, στις περιπτώσεις που παρατηρείται πρότυπο "SP" και θετική χρώση για το Cy3-dUTP τα κύτταρα βρίσκονται στην όψιμη S-φάση ή έχουν μόλις εξέλθει από τη μίτωση. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η σταθερή ενσωμάτωση της HP1β στις ετεροχρωματινικές εστίες λαμβάνει χώρα στο τέλος της S φάσης και στο τέλος της μίτωσης. Σε συμφωνία με την τελευταία παρατήρηση, διαμόλυνση με την HP1β-gfp και χρώση με αντι-CREST αντισώματα (που αναγνωρίζουν περιοχές του κεντρομεριδίου), δείχνει ότι η HP1β-gfp απομακρύνεται αντιστρεπτά από την



περικεντρομεριδιακή ετεροχρωματίνη κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης (Εικ. 14B).

Το ίδιο έχει παρατηρηθεί με την ενδογενή HP1 (44, 85).

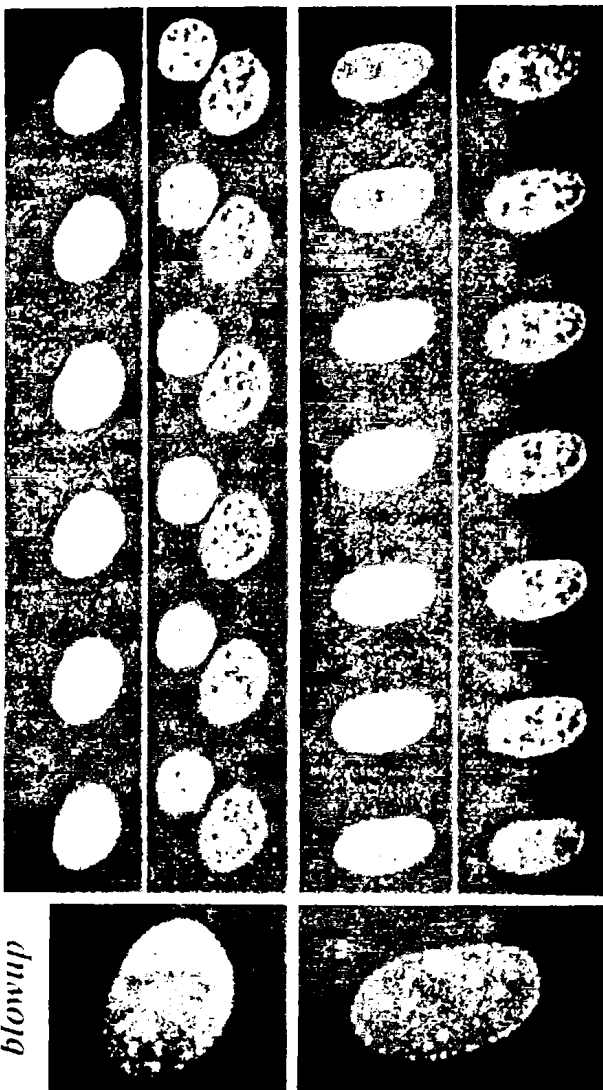
Για να μελετήσουμε το ίδιο πρόβλημα με ένα διαφορετικό τρόπο, διαμολύναμε κύτταρα που είχαν καλλιεργηθεί σε φυσιολογικά μέσα ή παρουσία κάποιου παράγοντα που αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο. Όπως φαίνεται στην Εικ. 14C, η HP1β-gfp ενσωματώνεται στην ετεροχρωματίνη στα κύτταρα-μάρτυρες αλλά ακολουθεί το πρότυπο "D" στα κύτταρα που έχουν σταματήσει στη G1/S φάση (με "block" υδροξυουρίας, θυμιδίνης, αφειδικολίνης ή μιμοσίνης). Αυτό το δραματικό αποτέλεσμα δεν ήταν συνέπεια γενικότερης «απορύθμισης», επειδή όταν έγινε διαμόλυνση ασύγχρονων και συγχρονισμένων κυττάρων με πλασμίδα-μάρτυρες (Rab7-gfp και CD39 mutant-gfp) το πείραμα έδωσε το αναμενόμενο φυσιολογικό πρότυπο σε κάθε περίπτωση (Εικ. 14C). Επίσης, όταν τα κύτταρα «απελευθερώθηκαν» από την αναστολή με υδροξυουρία και ελέγχθηκαν μετά από 8 ώρες, η πλειοψηφία τους είχε ενσωματώσει φυσιολογικά την HP1β στην ετεροχρωματίνη. Τα αποτελέσματα αυτά μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η σταθερή ενσωμάτωση της HP1β στις ετεροχρωματινικές εστίες εξαρτάται από την S φάση.



HP1β-gfp PI

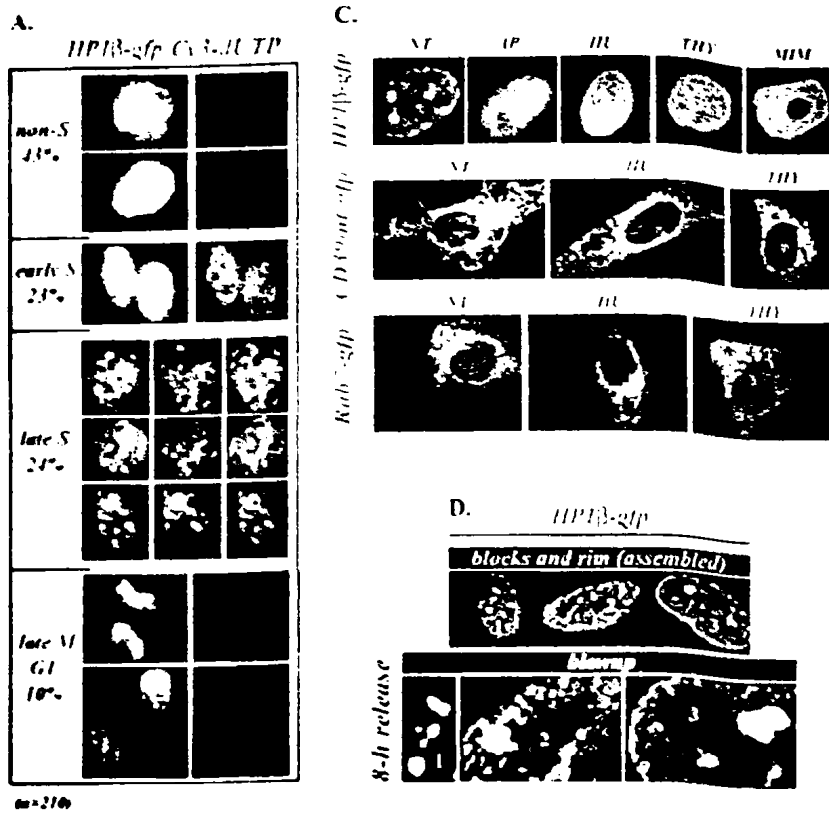
diffuse (D)

blocks, rim (SP)



Ολοκλήρωτη ενσωμάτωση της HP1 σε παροδικά διαμολυσμένη ανθρώπινη
L
κοί φαινότυποι μετά από διαμόλυνση κυττάρων HeLa με HP1β-gfp και χρώση
τίδιο (PI). Οι εικόνες αντιπροσωπεύουν διαδοχικές οπτικές τομές.





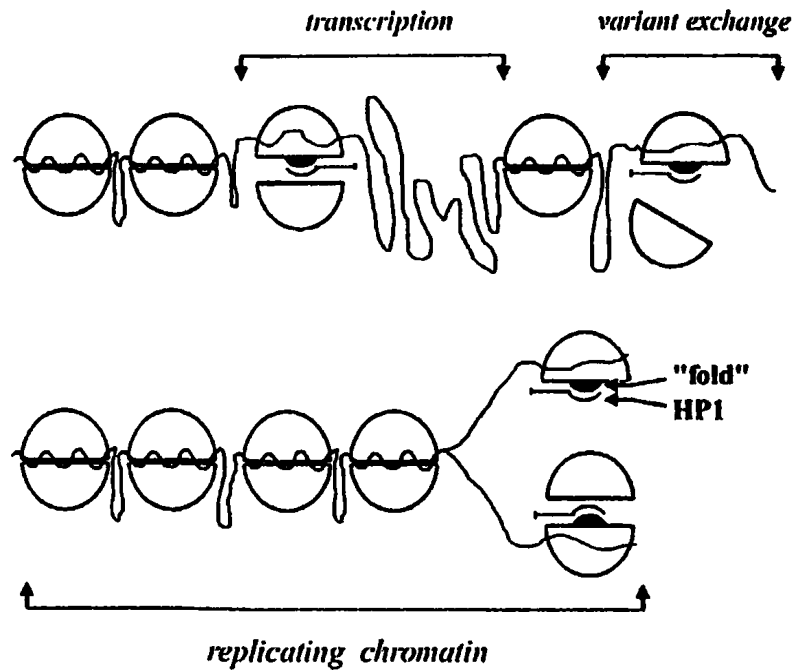
n=216

ΕΙΚΟΝΑ 14. Η ενσωμάτωση της HP1 εξαρτάται από τον κυτταρικό κύκλο.

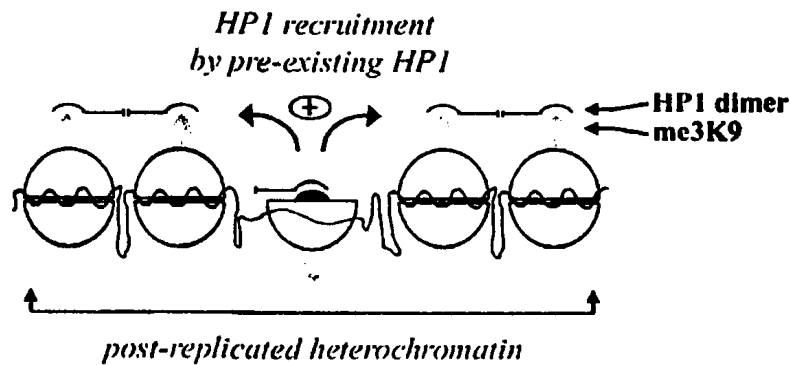
(A) Πρότυπα κατανομής της HP1β-gfp και του Cy3-dUTP μετά από ταυτόχρονη ένεση του αντιστοίχου πλασμιδίου και του φθορίζοντος αναλόγου στο κυτταρόπλασμα. Τα ποσοστά κάθε φαινότυπου παρουσιάζονται αριστερά. Το (n) αντιστοιχεί στον αριθμό των κυττάρων που μετρήθηκαν. (B) Κατανομή της HP1β-gfp και των κεντρομεριδιακών αντιγόνων CREST σε μιτωτικά κυττάρα. (C) Κατανομή της HP1β-gfp, Rab7-gfp, και του CD39mutant-gfp 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση σε κυττάρα που καλλιεργούνται σε φυσιολογικό μέσο (NT), ή μέσο που περιέχει αφειδικολίνη (AP), υδροξυουρία (HU), θυμιδίνη (THY), ή μμωσίνη (MIM). (D) Αποκατάσταση της φυσιολογικής ενσωμάτωσης της HP1β-gfp μετά από απελευθέρωση από την υδροξυουρία. Αντιπροσωπευτικοί φαινότυποι 8 ώρες μετά την μεταφορά σε φυσιολογικό καλλιεργητικό μέσο. Το (blow-up) δείχνει τμήματα των κυττάρων σε υψηλότερη μεγέθυνση. (E) Μορφομετρική ανάλυση των πειραμάτων που παρουσιάζονται στην (C). Το (n) αντιστοιχεί στον αριθμό των κυττάρων που μετρήθηκαν. Ταίριες ανοιχτό γκρι: D-cells, ταίριες σκούρο γκρι: SP-cells.



(A). Σταθερή πρόσδεση μέσω του histone fold σε χρωματινικές θέσεις που είναι διάσπαρτες



(B). Χαλαρή πρόσδεση σε συγκεντρωμένες θέσεις χαμηλής συγγένειας μέσω της me_3K9



ΕΙΚΟΝΑ 15. Πιθανοί μηχανισμοί ενσωμάτωσης της HP1 στη χρωματίνη.

Το μοντέλο αυτό υποστηρίζει ότι η ενσωμάτωση των πρωτεϊνών HP1 μπορεί να προχωρήσει με δύο διαφορετικούς τρόπους. (A) Σταθερή πρόσδεση μέσω του histone fold σε χρωματινικές θέσεις που είναι διάσπαρτες. Το histone fold γίνεται προσβάσιμο σε συγκεκριμένες συνθήκες και φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Το νουκλεοσωματικό DNA αναπαρίσταται από κυματοειδείς γραμμές και τα υποσύνθετα H2A-H2B / H3-H4 από σκιασμένα ή ανοιχτά ημκύκλια, αντίστοιχα. (B) Χαλαρή πρόσδεση σε συγκεντρωμένες θέσεις χαμηλής συγγένειας μέσω της me_3K9 . Για περισσότερες λεπτομέρειες βλέπε την ενότητα «Συζήτηση».

Στην ως τώρα μελέτη μας ασχοληθήκαμε με τις ιστονικές τροποποιήσεις των νουκλεοσωμάτων που συνδέονται με την HP1, χρησιμοποιώντας κλάσματα ολικής χρωματίνης (bulk chromatin) ή περιφερικής χρωματίνης. Η ταυτοποίηση των τροποποιήσεων στις ιστόνες που συνδέονται με την HP1 παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον διότι, όπως έχει προταθεί από την ομάδα μας η σύνδεση περιφερικής ετεροχρωματίνης-πυρηνικού φακέλου επιτυγχάνεται μέσω ενός συμπλόκου που περιλαμβάνει την HP1, τις ιστόνες H3 και H4 και την κύρια διαμεμβρανική πρωτεΐνη του πυρηνικού φακέλου LBR. Επίσης, η σύνδεση της HP1 στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη φαίνεται να έχει καθοριστική σημασία στην επανασυγκρότηση του πυρηνικού φακέλου στα τελευταία στάδια της μίτωσης, καθώς η διαδικασία αυτή αναστέλλεται *in vitro* από το αμινοτελικό τμήμα της HP1 που λειτουργεί ως "dominant-negative mutant".

Έχοντας περιγράψει λεπτομερώς τα χαρακτηριστικά των ιστονών που συνδέονται με την HP1, αποφασίσαμε να διερευνήσουμε περαιτέρω τη σύνδεση περιφερικής ετεροχρωματίνης-πυρηνικού φακέλου, εστιάζοντας την προσοχή μας στον LBR. Πιο συγκεκριμένα, αποφασίσαμε να διερευνήσουμε τη φυσική κατάσταση του ενδογενούς LBR και να χαρακτηρίσουμε το κλάσμα της περιφερικής ετεροχρωματίνης που συνδέεται ειδικά σε αυτόν.

3.7 Ο LBR αλληλεπιδρά με την περιφερική ετεροχρωματίνη

Για να μελετήσουμε τις πιθανές αλληλεπιδράσεις του LBR με τη χρωματίνη, απομονώσαμε πυρήνες σύμφωνα με καθιερωμένα πρωτόκολλα (132). Απομονωμένοι πυρήνες, μετά από εξαντλητική πέψη με DNase I και RNase A, δίνουν την εικόνα ενός πυρηνικού «φαντάσματος» (nuclear ghost, NG) που περιέχει μόνο μία λεπτή στοιβάδα περιφερικής ετεροχρωματίνης (Εικ. 16A) (146, 147). Η χρωματίνη αυτή έχει αποκοπεί σε πολλαπλές θέσεις από την DNase I και ουσιαστικά αντιπροσωπεύει μονονουκλεοσώματα με ποικίλα μήκη συνδετικού DNA (linker DNA) (Εικ. 16B). Όπως είναι αναμενόμενο (148), η χρωματίνη που αλληλεπιδρά με τον πυρηνικό φάκελο δεν είναι διμεθυλιωμένη στη λυσίνη 4 της ιστόνης H3, αλλά είναι τριμεθυλιωμένη στη λυσίνη 9 (Εικ. 16D).

Όπως παρατηρούμε στην Εικ. 16C τα NG περιέχουν σημαντικά περισσότερες ιστόνες από ό,τι πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου (π.χ. λαμίνες και LBR). Εν τούτοις, με περαιτέρω κλασμάτωση σε βαθμίδωση σακχαρόζης η χρωματίνη που είναι χαλαρά συνδεδεμένη με τον πυρηνικό φάκελο αποδεσμεύεται και το υλικό που συλλέγεται από την 30-50% φάση (NEPH-



Nuclear Envelope Peripheral Heterochromatin) αποτελείται από στοιχειομετρικές ποσότητες ιστονών και πρωτεϊνών του πυρηνικού φακέλου.

Για να εξετάσουμε εάν ο LBR δεσμεύεται σε κάποιο συγκεκριμένο χρωματινικό κλάσμα, πραγματοποιήσαμε πειράματα “pull-down” χρησιμοποιώντας εξωγενή χιμαιρικό LBR-GST (rLBR). Όπως φαίνεται στην Εικ. 17 (A, B, και E) ο rLBR, που αντιστοιχεί στο αμινοτελικό (N-terminal) τμήμα της πρωτεΐνης, συγκαθίζανει με στοιχειομετρικές ποσότητες ετεροχρωματίνης. Σε αντίθεση με την πρωτεΐνη HP1β, ο rLBR δεν φαίνεται να συνδέεται σε νουκλεοσώματα που προέρχονται από ευχρωματινικό υλικό (Εικ. 17C). Η επιλεκτική αλληλεπίδραση του rLBR με νουκλεοσώματα που συναπομονώνονται με στοιχεία του πυρηνικού φακέλου υποδηλώνει μία «προτίμηση» στην περιφερική ετεροχρωματίνη. Σε συμφωνία με την ιδέα αυτή, κύτταρα HeLa έγιναν διαπερατά και επωάσθησαν με rLBR, παρατηρήσαμε ότι η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη δεσμεύεται κυρίως στην περιφέρεια του πυρήνα και όχι σε εσωτερικές ετεροχρωματινικές εστίες (Εικ 17G).

Όπως ήταν αναμενόμενο από προηγούμενες μελέτες (130), ο ακέραιος, ενδογενής LBR, απομονωμένος από παρασκευαστική ηλεκτροφόρηση και συνδεδεμένος σε Affi-Gel, επίσης επιλέγει ένα κλάσμα των νουκλεοσωμάτων που περιέχεται στα πυρηνικά εκχυλίσματα.

3.8 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της χρωματίνης που αλληλεπιδρά με τον LBR

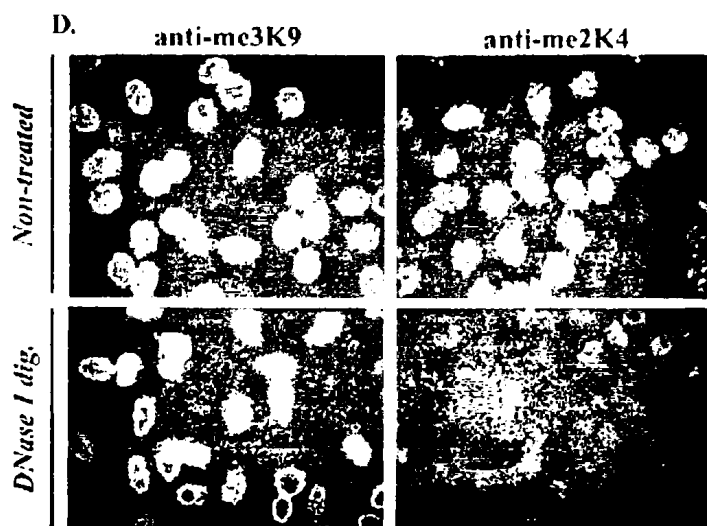
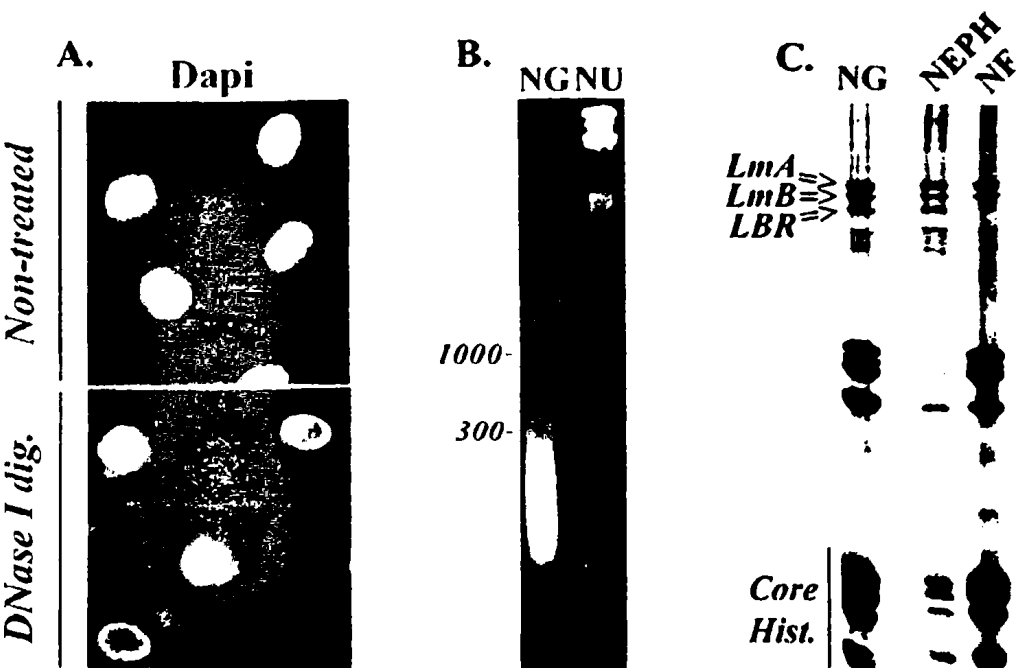
Για να χαρακτηρίσουμε καλύτερα το χρωματινικό κλάσμα που αλληλεπιδρά με τον rLBR αποκόψαμε τις ταινίες των ιστονών H3 και H4 από πηκτές πολυακρυλαμιδίου SDS (όπως φαίνεται στις Εικ. 17A, B και D) και προχωρήσαμε σε ανάλυση με φασματοσκοπία μάζας (MALDI-TOF). Για λόγους συστηματικότητας, αναλύσαμε επίσης τις ιστόνες που συγκαθίζανουν με ένα σύμπλοκο rLBR και ενδογενούς LBR. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 5, τα νουκλεοσώματα από εκχυλίσματα πυρηνικών φακέλων που συναπομονώνονται με τον LBR παρουσιάζουν σχεδόν τις ίδιες τροποποιήσεις. Μερικές από τις κορυφές που παρατηρήθηκαν στο δείγμα των ιστονών που συγκαθίζανουν με τον rLBR, ή τον συνδυασμό ενδογενούς και rLBR, δεν βρέθηκαν στα δείγματα του ενδογενούς. Οι διαφορές αυτές δεν ήταν όμως σημαντικές και ουσιαστικά δεν άλλαξαν την εικόνα που προέκυψε από τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας μάζας. Αυτό που παρουσίαζε σημαντική διαφορά ως προς τις τροποποιήσεις ήταν η συνολική χρωματίνη, σε σύγκριση με τη χρωματίνη που επιλέγει ο rLBR ή εκείνη που βρίσκεται στενά συνδεδεμένη με στοιχεία του φακέλου (149-151). Σε ότι αφορά τη χρωματίνη που συνδέεται στο φάκελο, η λυσίνη 4 της ιστόνης H3 δεν



ήταν τροποποιημένη, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του έμμεσου ανοσοφθορισμού που παρουσιάζεται στην Εικ. 16D. Επίσης, παρόλο που ανιχνεύθηκε μονοακετυλιωμένη λυσίνη 18 ή λυσίνη 23 στην ιστόνη H3, ο συνδυασμός και των δύο τροποποιήσεων δεν διαπιστώθηκε. Αυτό επιβεβαιώθηκε σε πολλές διαφορετικές παρασκευές και δεν υπήρξε καμία αλλαγή όταν η χρωματίνη απομονώθηκε παρουσία βουτυρικού νατρίου, το οποίο μειώνει την *in vitro* ακετυλίωση.

Στα νουκλεοσώματα που αλληλεπιδρούν με τον rLBR, η περιοχή του κεντρικού τμήματος (histone fold) της H3 και της H4 βρέθηκε ως επί το πλείστον μη τροποποιημένη με την εξαίρεση της λυσίνης 79 της ιστόνης H3. Η λυσίνη 27 και 36 της H3 ήταν τριμεθυλιωμένη, ενώ η ιστόνη H4 ήταν διμεθυλιωμένη στη λυσίνη 20 και μερικώς ή πλήρως ακετυλιωμένη στη λυσίνη 5, 8, 12 και 16. Η ιστόνη H3 ήταν πολλαπλά τροποποιημένη στην περιοχή 9-17, όπου απαντώνται η λυσίνη 9 και 14. Επειδή η διαφορά μάζας που αντιστοιχεί στην τριμεθυλίωση της λυσίνης είναι ισοδύναμη με την ακετυλίωση του ίδιου αμινοξέος, μία κορυφή που παρατηρήθηκε στα 971.5 Da μπορεί να αντιπροσωπεύει είτε τον συνδυασμό μεθυλίωση/ακετυλίωση, είτε τον συνδυασμό διμεθυλίωση/τριμεθυλίωση του πεπτιδίου 9-17. Αντίστοιχα, μία άλλη κορυφή στα 985.5 Da μπορεί να αντιστοιχεί τόσο σε διπλή τριμεθυλίωση όσο και σε ένα τριμεθυλιωμένο/ακετυλιωμένο πεπτίδιο. Πειράματα "pull down" με τον rLBR και ανοσοαποτύπωση κατά western με αντι-ιστονικά αντισώματα που αναγνωρίζουν αυτές τις τροποποιήσεις έδειξαν ότι στο υλικό που συγκαθιζάνει με τον rLBR η λυσίνη 9 της H3 ήταν τριμεθυλιωμένη και η λυσίνη 14 της H3 ήταν ακετυλιωμένη, αλλά σε διαφορετικό ποσοστό (Εικ. 17F). Αν και αυτό δεν αποδεικνύει άμεσα ότι τα νουκλεοσώματα που αλληλεπιδρούν με τον LBR περιέχουν ιστόνη H3 η οποία είναι ταυτοχρόνως τροποποιημένη στη λυσίνη 9 και 14, συμπεράναμε ότι η ακετυλίωση της λυσίνης 14 δεν είναι ασύμβατη με τη σύνδεση LBR-ετεροχρωματίνης.

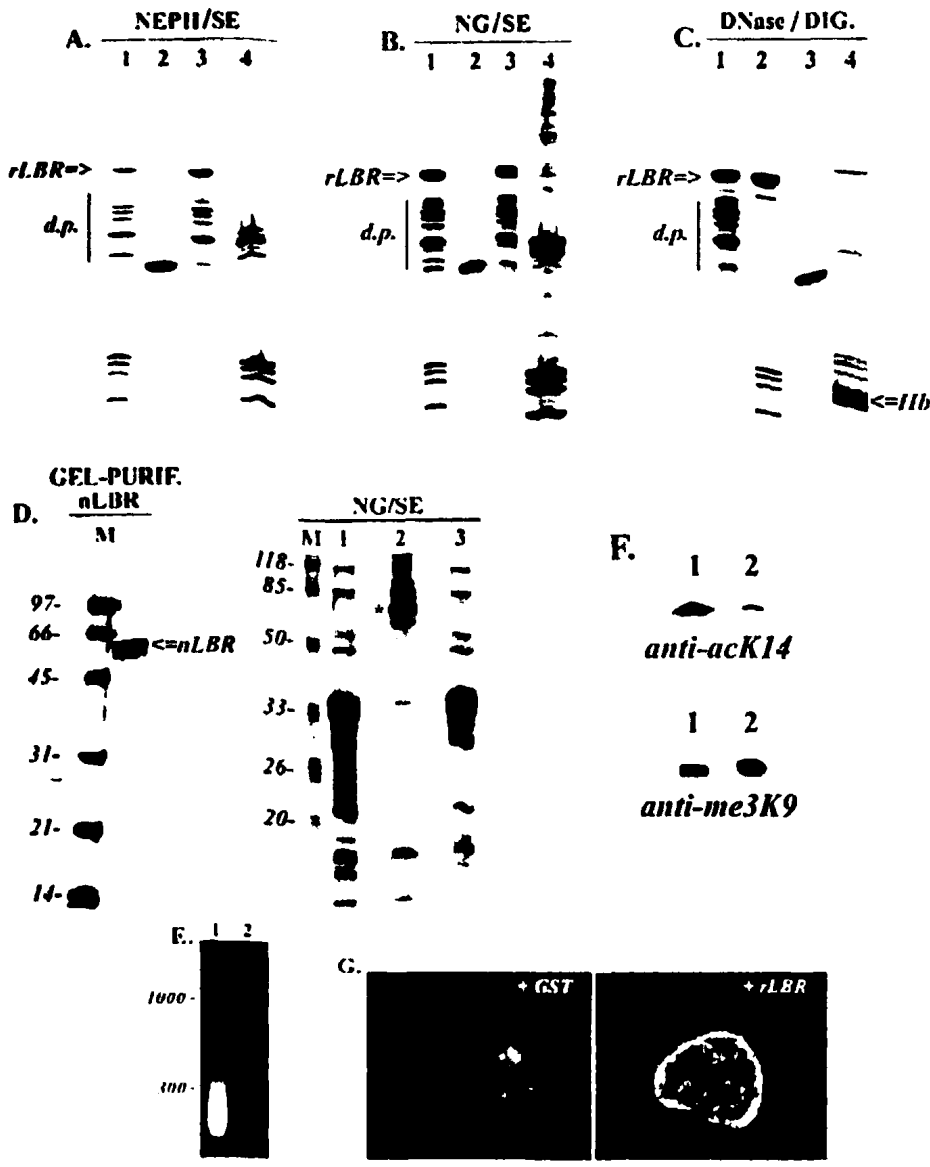




ΕΙΚΟΝΑ 16. Υποκυτταρική κλασμάτωση.

(A) Εικόνες ακέραιων (non-treated) και ενζυμικά τεμαχισμένων (DNase I dig.) πυρήνων ερυθροκυττάρων γαλοπούλας μετά από χρώση με DAPI. (B) Ηλεκτροφορητικό προφίλ του DNA που εκχυλίζεται από πυρήνικά «φαντάσματα» (NG) και από ακέραιους πυρήνες (NU). Απεικονίζονται οι θέσεις 300- και 1000-bp του δείκτη μοριακών βαρών. (C) Ηλεκτροφορητικό προφίλ από SDS-PAGE των διαφορετικών πυρήνικών κλασμάτων. Το (NEPH) αντιστοιχεί στην περιφερική ετεροχρωματίνη που συλλέγεται ύστερα από επίπλευση στην περιοχή 30-50% της βαθμίδωσης σακχαρόζης. Το (NF) αντιστοιχεί στο υλικό που δεν επίπλευσε. Απεικονίζονται οι πυρήνικές λαμίνες (LmA και LmB), ο LBR και οι πυρήνικές ιστόνες (Core Hist.). (D) Εικόνες ακέραιων (non-treated) και ενζυμικά τεμαχισμένων (DNase I dig.) πυρήνικών «φαντασμάτων» μετά από χρώση με αντισώματα που αναγνωρίζουν την τριμεθυλωμένη λυσίνη 9 (anti-me3K9) και τη διμεθυλωμένη λυσίνη 4 της ιστόνης H3 (anti-me2K4).





ΕΙΚΟΝΑ 17. Αλληλεπίδραση του LBR με την περιφερική ετεροχρωματίνη.
 (A) "Pull-down" με τον rLBR-GST (γραμμή 1) και την GST (γραμμή 2) χρησιμοποιώντας περιφερική ετεροχρωματίνη που παραλαμβάνεται με εκχύλιση άλατος (SE) και υποβάλλεται σε επίπλευση σε βαθμίδωση σακχαρόζης (NEPH) (γραμμή 3, LBR-GST) (γραμμή 4, ποσοστό 10% του εκχυλίσματος). Πηκτή με χρώση Coomassie Blue. (B) Όπως και στην (A) με εκχυλίσματα άλατος (SE) από πυρηνικά «φαντάσματα» (NGs). (C) Όπως και στην (A) με ευχρωματινικό κλάσμα από ακέραιους πυρήνες που έχουν υποστεί πέψη με DNase I. (γραμμή 1, με τον rLBR-GST), (γραμμή 2, με την rHP1-GST), (γραμμή 3, με την GST), (γραμμή 4, ποσοστό 10% του κλάσματος (input digest), (d.p., πρωτεολυτικά προϊόντα του rLBR), (Hb, αλυσίδες αιμοσφαιρίνης). (D) Απομόνωση της χρωματίνης που αλληλεπιδρά με τον ενδογενή LBR με χρωματογραφία συγγένειας. Το πήκτωμα στα αριστερά απεικονίζει τον ηλεκτροφορητικά απομονωμένο LBR (nLBR). Το δεξί τμήμα απεικονίζει δείγματα του εκχυλίσματος που προστέθηκαν στην στήλη AFFIGEL (γραμμή 1, SE), (γραμμή 2, προσδεμένο κλάσμα), (γραμμή 3, μη προσδεμένο κλάσμα) Ο αστερίσκος υποδεικνύει τον nLBR που «διαρρέει» από την κολώνα κατά τη διάρκεια της εκχύλισης με θερμό SDS. (γραμμές M, μάρτυρες με τα αντίστοιχα μοριακά βάρη) (E) Ηλεκτροφορητικό προφίλ DNA που συγκατακρημνίζεται με τον LBR-GST (γραμμή 1), ή με την GST (γραμμή 2). Απεικονίζονται οι θέσεις των 1000- και 300-bp μοριακών δεικτών. (F) western blot για την acK14 και την me3K9 της H3 (γραμμές 1, υλικό μη προσδεμένο στον LBR) και (γραμμές 2, υλικό προσδεμένο στον LBR). (G) *In situ* πρόσδεση της πρωτεΐνης GST (+GST) και του LBR-GST (+LBR-GST) σε διαπερατοποιημένα κύτταρα HeLa. Χρώση με αντισώματα που αναγνωρίζουν την GST.



ΠΙΝΑΚΑΣ 5

Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών όπως ανιχνεύθηκαν από τη φασματοσκοπία μάζας

ΙΣΤΟΝΗ Η3

Peak	a/a	Modifications	Bulk*	Extr	N+R	N	R	Mod.residue
704.4	3-8	nm	+	+	+	nd	+	K4
718.4		me	+	-	-	-	-	
732.4		2xme	+F	-	-	-	-	
746.4		3xme	NR	-	-	-	-	
901.5	9-17	nm	+	+	+	+	+	K9,K14
943.5		3xme	+	+	+	+	+	
		(ac)						
971.5		3xme+2xme	+	+	+	+	+	
		(ac+2xme)						
985.5		3xme+3xme	+	+	+	+	+	
		(ac+3xme)						
986.6	18-26	nm	NR	-	-	-	-	K18,K23
1028.6		ac	+	+	+	+	+	
1070.6		2xac	+	-	-	-	-	
1433.8	27-40	nm	+	-	-	-	-	K27,K36
1489.8		3xme+me	+	+	+	+	+	
1250.7	54-63	nm	+	+	+	+	+	K56
788.8	64-69	nm	+	+	+	+	+	K64
1335.6	73-83	nm	+	+	+	+	+	K79
1363.6		2xme	+	+	+	nd	+	
1384.8	117-128	nm	+	+	+	+	+	K122

ΙΣΤΟΝΗ Η4

Peak	a/a	Modifications	Bulk*	Extr	N+R	N	R	Mod.residue
1270.8	4-17	nm	+	+	+	nd	+	K5,K8, K12,K16
1310.8		1xac	+	-	-	-	-	
1354.8		2xac	+	+	+	+	+	
1396.8		3xac	+	+	+	nd	+	
515.3	20-23	nm	+	+	-	-	-	K20
529.3		1xme	+	-	-	-	-	
543.3/855.5		2xme	+	+	+	+	+	
557.3		3xme	+	-	-	-	-	
1325.7	24-35	nm	+	+	+	+	+	K31
1386.8	56-67	nm	+	+	+	+	+	K59
1290.6	68-78	nm	+	+	+	+	+	K77
1594.9	79-92	nm	+	+	+	+	+	K79,K91

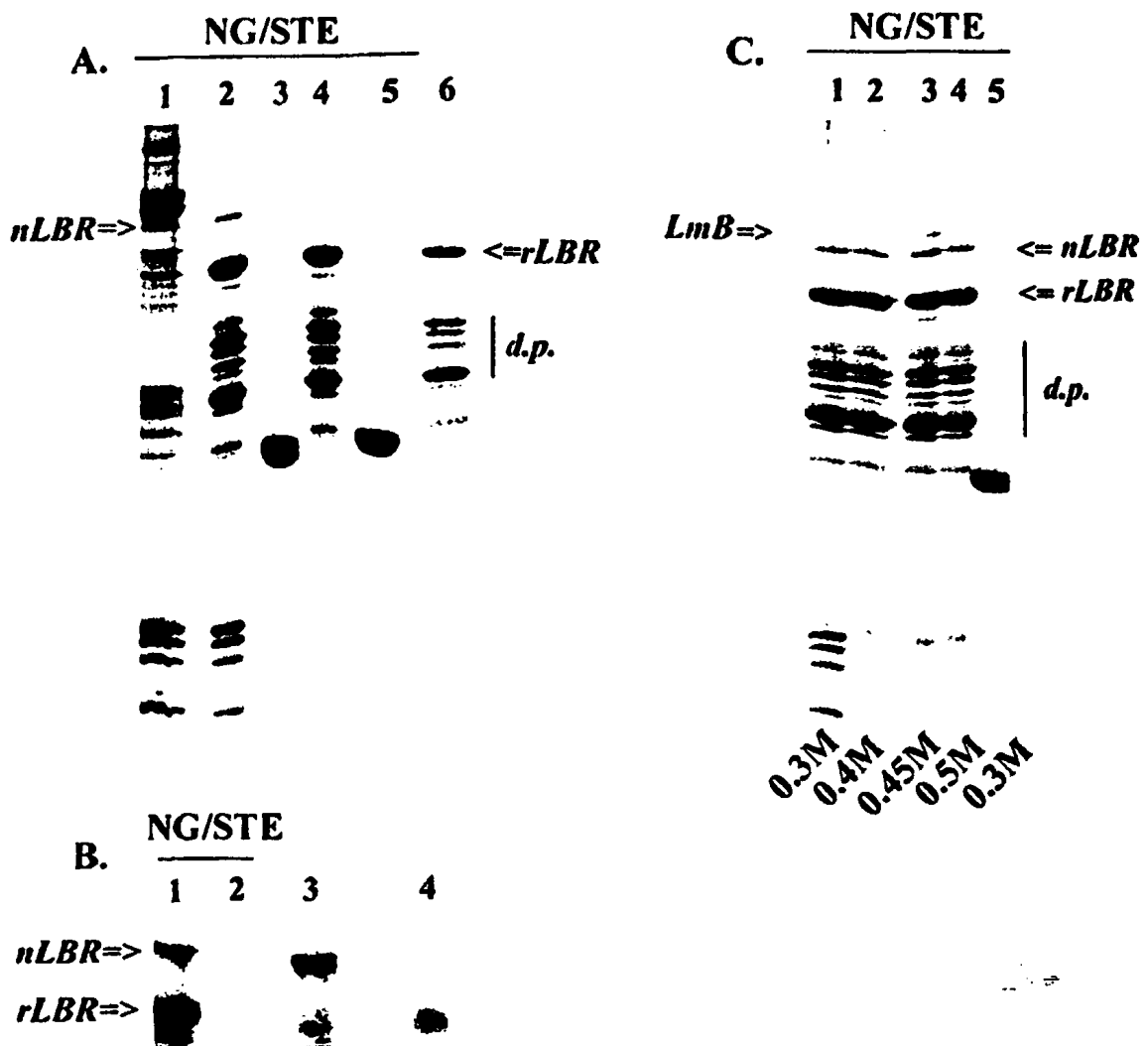
* Bulk: ολική χρωματινή όπως αναφέρεται από τους Zhang et al., 2002, Peak : κορυφή, NR: δεν καταγράφηκε, nd: δεν ανιχνεύθηκε, F: ανιχνεύθηκε με έμμεσο ανοσοφθορισμό, a/a: θέση αμινοξικού καταλοίπου, Extr: εκχύλισμα πυρηνικών φακέλων, N+R: ενδογενής και ανασυνδυασμένος LBR, N: ενδογενής LBR, R: ανασυνδυασμένος LBR, nm: μη-τροποποιημένο, ac: ακετυλιωμένο, me: μεθυλιωμένο



3.9 Ο LBR ολιγομερίζεται υπό *in vitro* συνθήκες

Σε πειράματα “pull-down” που έγιναν στη συνέχεια με εκχυλίσματα άλατος και απορρυπαντικού (salt/detergent extracts, STE) παρατηρήσαμε ότι ο rLBR συγκαθιζάνει με μία πρωτεΐνη που μεταναστεύει στο ίδιο ύψος με τον ενδογενή, πλήρους μήκους LBR. (Εικ. 18A). Η παρουσία του ενδογενούς LBR επιβεβαιώθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά western και μπορεί να ερμηνευθεί με δύο τρόπους: Ως αποτέλεσμα διασύνδεσής του μέσω νουκλεοσωμάτων και/ή λαμίνης Β, ή ως συνέπεια απευθείας σύνδεσης LBR/LBR (ολιγομερισμός). Για να διακρίνουμε μεταξύ των δύο αυτών πιθανοτήτων, πραγματοποιήσαμε πειράματα “pull-down” σε 0.3 M NaCl και στη συνέχεια τα ιζήματα πλύθηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις άλατος. Επισημαίνεται ότι η συγκαθίζηση του ενδογενούς LBR-νουκλεοσωμάτων και rLBR δεν παρατηρείται στα 0.6 M NaCl (Εικ. 18A). Όπως φαίνεται στην Εικ. 18C, ο ενδογενής LBR παραμένει στο ίζημα LBR-GST μετά από πλύσεις με 0.4, 0.45, και 0.5 M NaCl, όταν τα νουκλεοσώματα έχουν πλέον αποκολληθεί. Επιπλέον, άμεση απόδειξη για τον *in vitro* ολιγομερισμό προέκυψε από πειράματα που έγιναν με GST-χμαιοικό και His₆-χμαιοικό rLBR. Όπως φαίνεται στην Εικ. 19A, οι δύο μορφές του rLBR συγκαθιζάνουν. Επιπλέον, σύμπλοκα LBR-GST/LBR-His₆ ανιχνεύονται σε μη αποδιατακτικές πηκτές πολυακρυλαμιδίου (native gel) (Εικ. 19B). Τέλος, ο LBR-His₆ διασυνδέεται χημικά (cross-linked) με γλουταραλδεύδη, δίνοντας διμερή και υψηλότερης τάξης ολιγομερή. Κάτω από τις ίδιες συνθήκες, μία πρωτεΐνη μάρτυρας ανάλογου φορτίου και μοριακής μάζας (κυτόχρωμα c) δεν ολιγομερίζεται (cross-linked) (Εικ. 19C).

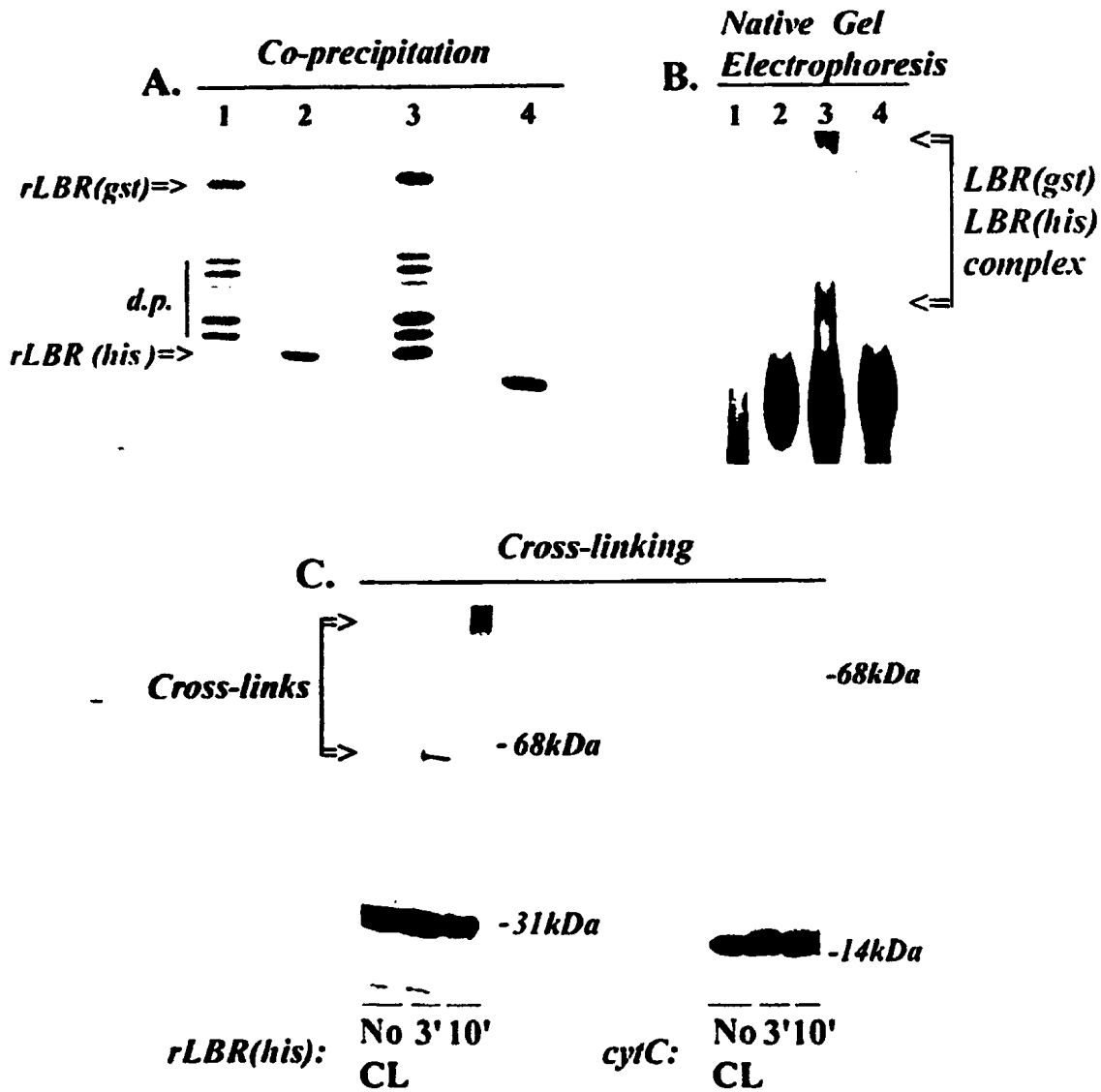




ΕΙΚΟΝΑ 18. Ο LBR αλληλεπιδρά με τον εαυτό του σε εκχυλίσματα STE.

(A) "Pull down" με rLBR και εκχυλίσματα STE. (γραμμή 1. 20% του εκχυλίσματος). (γραμμές 2 και 4. υλικό που συγκατακρημνίζεται με τον LBR-GST σε 0.3M και 0.6M NaCl αντίστοιχα). (γραμμές 3 και 5. μάρτυρες GST). (γραμμή 6. 40% του rLBR που χρησιμοποιήθηκε). Επισημαίνεται η θέση του rLBR και του ενδογενούς LBR (nLBR). (d.p., πρωτεολυτικά προϊόντα του LBR-GST). (B) western blot με αντισώματα καθαρισμένα με στήλη συγγένειας που αναγνωρίζουν τον LBR στο κοτόπουλο σε υλικό που συγκατακρημνίζεται με τον rLBR (γραμμή 1), με την GST (γραμμή 2). (C) "Pull-down" αντίστοιχα με αυτά που παρουσιάζονται στην (A). (γραμμές 1 και 5. πρωτεΐνες που συγκατακρημνίζονται με τον rLBR και την GST, αντίστοιχα σε 0.3 M NaCl) (γραμμές 2-4, υλικό που παραμένει προσδεμένο με τον rLBR στα 0.4, 0.45, και 0.5 M NaCl). (LmB, ίχνη της λαμίνης B που συγκατακρημνίζονται με τον LBR).





ΕΙΚΟΝΑ 19. Ολιγομερισμός του LBR.

(A) Συγκοπήση LBR-GST και LBR-His₆. LBR-GST (γραμμή 1), LBR-His₆ (γραμμή 2), υλικό που συγκοπήθηκε με τον LBR-GST (γραμμή 3), πρωτεΐνη μάρτυρας GST (γραμμή 4). (B) Ανίχνευση συμπλόκων LBR-LBR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμίδου υπό μη μεταουσωτικές συνθήκες. LBR-GST (γραμμή 1), LBR-His₆ (γραμμή 2), LBR-GST και LBR-His₆ (γραμμή 3), LBR-His₆ και GST (γραμμή 4). Οι ζώνες που εμφανίζονται μόνο στο μείγμα LBR-GST and LBR-His₆ επισημαίνονται με βέλη. (C) Πειράματα χημικής διασύνδεσης (cross-linking). Τα δύο τμήματα δείχνουν πηκτές SDS με χρώση Coomassie Blue. (No CL, μη χημικά διασυνδεδεμένο υλικό). (3' και 10') προϊόντα χημικής διασύνδεσης μετά από επώαση με γλουταράλδεϋδη (3 και 10 λεπτά αντίστοιχα). Στα αριστερά της πηκτής απεικονίζεται ο LBR-His₆ ενώ ο αντίστοιχος μάρτυρας με το κυτόχρωμα c στα δεξιά. Δείκτες μοριακών βαρών φαίνονται στα δεξιά.



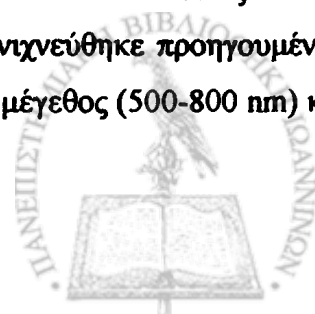
3.10 Ο LBR εντοπίζεται σε διακριτές νησίδες του πυρηνικού φακέλου υπό *in vivo* συνθήκες

Η παρατήρηση ότι το αμινοτελικό τμήμα του LBR ολιγομερίζεται *in vitro* μας οδηγεί στην υπόθεση ότι η ενδογενής πρωτεΐνη μπορεί να σχηματίζει «νησίδες» στο επίπεδο του πυρηνικού φακέλου. Για να διερευνήσουμε την ιδέα αυτή, προχωρήσαμε σε μορφολογικά πειράματα. Σε ερυθροκύτταρα πτηνών, τα οποία επώασθηκαν με ειδικά αντισώματα έναντι του LBR που έχουν καθαριστεί με στήλη συγγένειας (affinity-purified) και αναλύθηκαν με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας, παρατηρήσαμε μία ασυνεχή κατανομή στον πυρηνικό φάκελο. Η κατανομή αυτή διέφερε από την ομαλή, ομοιόμορφη χρώση της πυρηνικής περιφέρειας που παρατηρήθηκε με αντισώματα έναντι των λαμινών A και B (Εικ. 20A και B) και είναι ευδιάκριτη στις οπτικές τομές στους άξονες xy και xz. Επίσης, διακριτές νησίδες LBR παρατηρήθηκαν σε ερυθροκύτταρα διαπερατοποιημένα με Triton X-100 τα οποία αναλύθηκαν με ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία (pre-embedding immuno EM) (Εικ. 20E).

3.11 Ετερόζυγες μεταλλάξεις επηρεάζουν την οργάνωση του LBR και την καθόλου δομή του πυρήνα

Για να μελετήσουμε σε μεγαλύτερη λεπτομέρεια την οργάνωση του LBR *in vivo*, εξετάσαμε ινοβλάστες από αγρίου τύπου και μεταλλαγμένα ιχθυωσικά ποντίκια. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη (*icj*) προκαλείται με την εισαγωγή δύο βάσεων κυτοσίνης (CC) με αποτέλεσμα την αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου και συγκεκριμένα των αμινοξέων 365-385, εισάγοντας ένα κωδικόνιο τερματισμού στο αμινοξύ 386 του LBR. Οι (125) έδειξαν ότι τα ομόζυγα ζώα δεν περιέχουν ανοσοϊστοχημικά αναγνωρίσιμο LBR στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη, πιθανώς επειδή η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη αποικοδομείται αμέσως μετά τη σύνθεσή της στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER). Για τον λόγο αυτό στραφήκαμε στη μελέτη των ετερόζυγων *ic* μεταλλάξεων. Ο κολοβωμένος (truncated) *ic*-LBR έχει ένα ακέραιο αμινοτελικό τμήμα, μέσω του οποίου θα μπορούσε να ολιγομεριστεί με τον αγρίου τύπου LBR και να επαναφέρει (*rescue*) την λειτουργία της πρωτεΐνης δίνοντας έναν ενδιάμεσο και αναλύσιμο φαινότυπο.

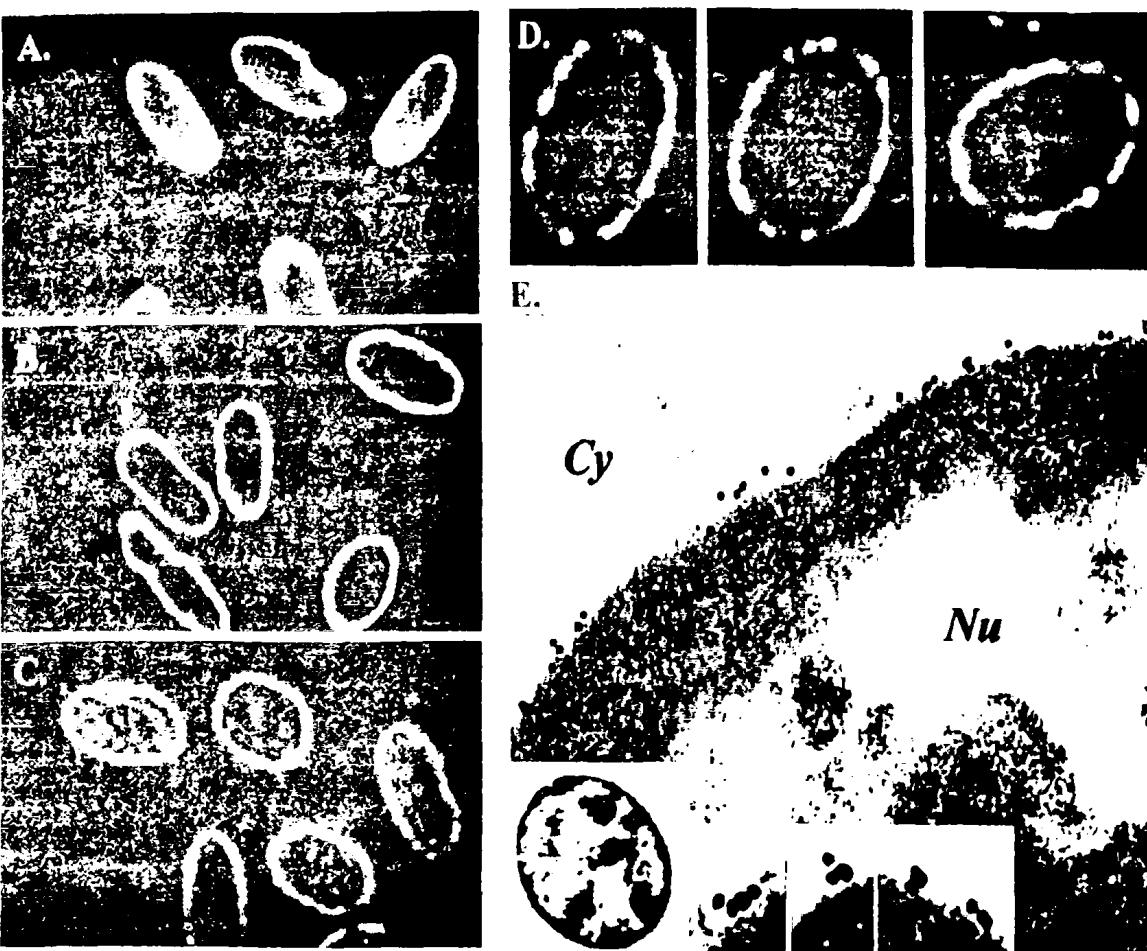
Χρώση ινοβλαστών αγρίου τύπου με ειδικά αντισώματα έναντι του LBR έδειξε ότι η πρωτεΐνη εντοπίζεται σε νησίδες δίνοντας το ίδιο πρότυπο που ανιχνεύθηκε προηγουμένως στα εμπύρηννα ερυθροκύτταρα. Οι νησίδες αυτές έχουν σημαντικό μέγεθος (500-800 nm) και



οργανώνονται «πασσαλοειδώς» κατά μήκος της περιφέρειας του πυρήνα, όπως φαίνεται καθαρά σε οπτικές τομές στον άξονα xz (Τμήμα E-G). Στους ετερόζυγους ινοβλάστες, το 50% των κυττάρων, εμφανίζει μεγάλες πυρηνοπλασματικές συσσωρεύσεις του LBR που προσομοιάζουν με εστίες περικεντρικής ετεροχρωματίνης (Εικ. 21, HETEROZ.MUTANT, B και G). Μετά από πιο προσεκτική μελέτη, διαπιστώσαμε ότι αυτές οι συσσωρεύσεις LBR γειτονεύουν αλλά δεν συμπίπτουν απόλυτα με εσωτερικές ετεροχρωματινικές εστίες (Εικ. 21A-D). Επίσης, διπλή χρώση με αντισώματα έναντι του LBR και των λαμινών (Εικ. 21E και F) και παρατήρηση τομών κατά μήκος του άξονα xz (Εικ. 21K-M) δείχνουν ότι οι συσσωρεύσεις αυτές αντικαθιστούν τις ομαλά κατανεμημένες νησίδες του LBR και αντιπροσωπεύουν υλικό που συνδέεται στενά με τον πυρηνικό φάκελο.

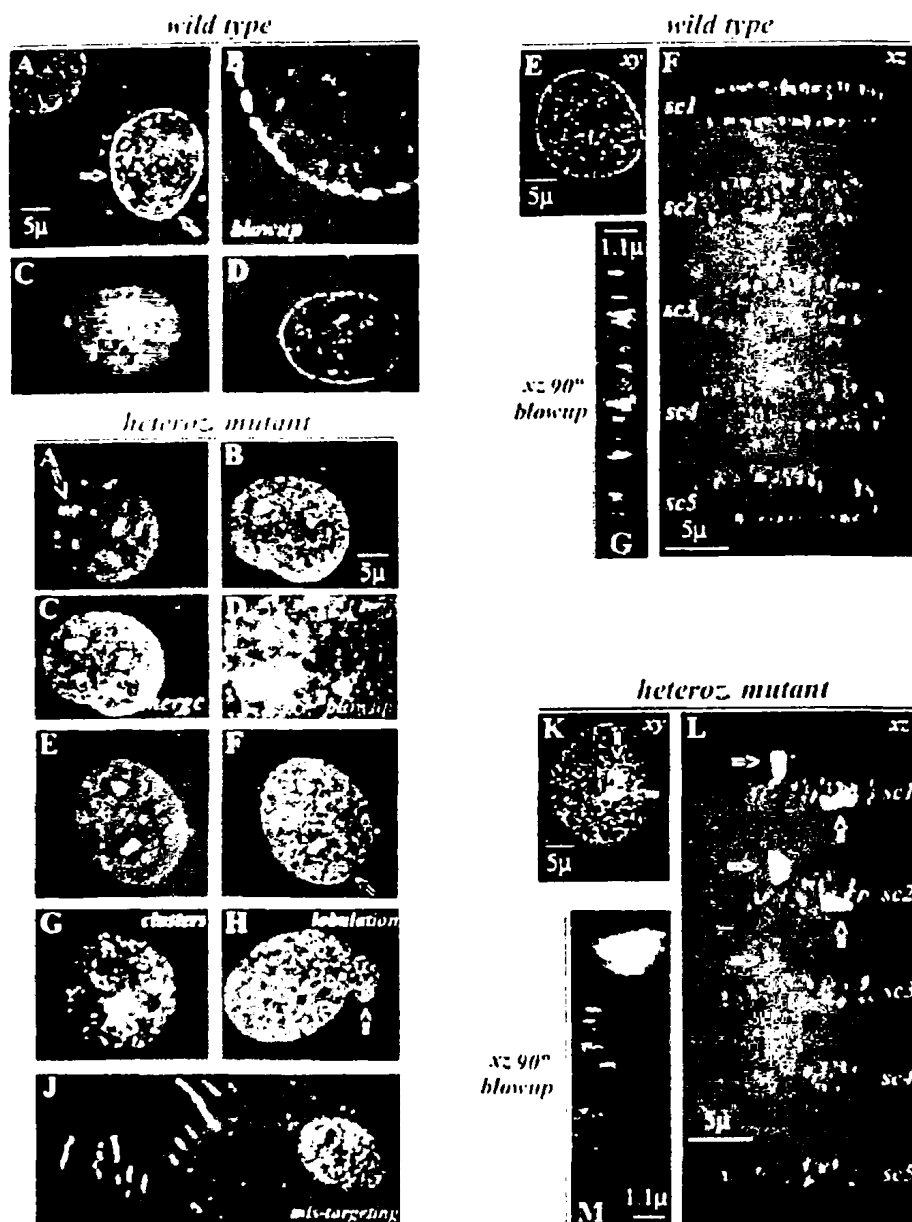
Όπως είναι αναμενόμενο, εκτός από τις επιδράσεις στην υπο-πυρηνική κατανομή του LBR, μερικά από τα μεταλλαγμένα κύτταρα παρουσίαζαν διαταραχές στην καθόλου κατανομή της πρωτεΐνης (sorting defects), με ένα μεγάλο πληθυσμό μορίων LBR να καταλήγει σε πλάκες προσκόλλησης (adhesion plaques) (Εικ. 21J, mis-targeting 60%). Επίσης, μερικά από τα μεταλλαγμένα κύτταρα, συχνά σε ομάδες, εμφάνιζαν πυρήνες ανώμαλου σχήματος (Εικ. 21H, λόβωση 30% των κυττάρων). Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν την ιδέα ότι ο LBR ολιγομερίζεται μέσω του αμινοτελικού τμήματός του και σχηματίζει διακριτές νησίδες *in vivo*. Προφανώς, η δομή των σχηματισμών αυτών επηρεάζεται στα κύτταρα *ic*, στα οποία η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το μεταλλαγμένο αλληλίο συμπεριφέρεται ως επικρατής-αρνητική μετάλλαξη (dominant-negative mutant).





ΕΙΚΟΝΑ 20. *In situ* οργάνωση του LBR στα εμπύρινα ερυθροκύτταρα των πτηνών.

Τα δείγματα είναι χρωματισμένα με αντισώματα που αναγνωρίζουν την λαμίνη Α (Α), την λαμίνη Β (Β), και τον LBR στο κοτόπουλο (C). Οι εικόνες έχουν ληφθεί στο συντασιακό μικροσκόπιο. Το (D) δείχνει αντιπροσωπευτικά προφίλ του LBR σε υψηλότερο contrast και μεγέθυνση. Όλες οι εικόνες αντιπροσωπεύουν οπτικές τομές στον ισημερινό του κυττάρου. (E) Μέρος ενός πύρινα ερυθροκυττάρου, όπως παρατηρείται μετά από ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία. Τα ένθετα στο κάτω μέρος της εικόνας δείχνουν μία μικρής ανάλυσης εικόνα ολόκληρου του πύρινα (αριστερό ένθετο) και μία σειρά λεπτών τομών διακοσμημένων με σωματίδια ανοσοχρυσού (τρία ένθετα στα δεξιά). Cy, κυτταρόπλασμα. Nu, πύρινας.



ΕΙΚΟΝΑ 21. *In situ* οργάνωση του LBR σε ινοβλάστες ποντικών.

Κύτταρα αγρίου τύπου (wild type). (A), (B) και (D-G) Χρώση ινοβλαστών αγρίου τύπου με αντισώματα που αναγνωρίζουν τον LBR. (B) Μεγέθυνση 3x της περιοχής που υποδεικνύεται με βέλη στην (A). (C) Προφίλ ιοδιούχου προπιδίου (PI) του κυττάρου που παρουσιάζεται στην (D). (F) Σειρά τομών στον άξονα xz (sc1-5) του κυττάρου που απεικονίζεται στον άξονα xy στην εικόνα (E) (G). Μεγεθυμένη εικόνα στραμμένη κατά 90° (μέρους της sc2).

Μεταλλαγμένων κυττάρων (heterozygous mutant). (B) και (F-M) Χρώση των ετερόζυγων *ic* μεταλλαγμένων κυττάρων με αντισώματα που αναγνωρίζουν τον LBR. (A) Προφίλ PI του κυττάρου που παρουσιάζεται στην (B). (C) και (D) Επιπροβολές της χρώσης με FITC και PI του (A) και (B) σε σχετικές μεγεθύνσεις 1x και 3x, αντίστοιχα. (E) Το κύτταρο που παρουσιάζεται στην (F), μετά από χρώση με αντισώματα που αναγνωρίζουν την λαμίνη A/C. Ένα συσσωμάτωμα του LBR και ένα τμήμα του πυρήνιου φακέλου που εμφανίζει φυσιολογική περιτυρητική χρώση στα δείγματα με διπλή χρώση επισημαίνεται με βέλος. (G-J) Ανωμαλίες που παρατηρούνται στα μεταλλαγμένα κύτταρα (μεγάλα συσσωματώματα LBR στην επιφάνεια του πυρήνα, λόβωση του πυρήνα (nuclear lobulation), και *mis-targeting* του LBR σε πλάκες προσκόλλησης). (K-M) Σειρά τομών, όπως έχει περιγραφεί για τα κύτταρα αγρίου τύπου. Συσσωματώματα του LBR σημειώνονται με βέλη. Οι παύλες (bars) σε κάθε ομάδα εικόνων αντιστοιχούν στη μεγέθυνση.



4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Καρκινικός φαινότυπος και πρότυπα έκφρασης της HP1

Στη μελέτη αυτή παρασκευάσαμε με PCR και RT-PCR δύο διαφορετικές γενωμικές περιοχές των HP1α και HP1β από σειρές μετασχηματισμένων κυττάρων και λεμφώματα ασθενών. Σε όλα τα δείγματα ανιχνεύσαμε την παρουσία mRNA των HP1α/β χωρίς να διαπιστώσουμε ουσιαστικές διαφορές ανάμεσα στα δείγματα. Από τα αποτελέσματα που συλλέξαμε από την έως τώρα μελέτη μας σχετικά με τον ρόλο της πρωτεΐνης HP1 ως δείκτη μεταστατικού δυναμικού δεν μπορούμε να υποστηρίξουμε την άμεση χρήση της στη διαγνωστική πράξη. Πιθανότατα όμως η HP1 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με κάποιον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Ki67) ως ένας δείκτης «αναπλαστικότητας». Επίσης, ο προσδιορισμός της σχετικής αναλογίας των HP1α, β και γ σε διάφορους τύπους και στάδια καρκίνου θα μπορούσε να έχει μεγάλη προβλεπτική ή διαγνωστική σημασία.

4.2 Η μεθυλίωση της λυσίνης 9 στην ιστόνη H3 ως καθοριστικός παράγοντας αλληλεπίδρασης με την HP1β

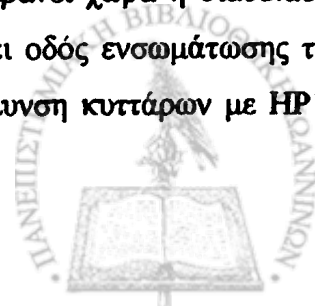
Στην εργασία αυτή δείξαμε ότι η HP1β παρουσιάζει επιλεκτική και στοιχειομετρική πρόσδεση στην ανασυνδυασμένη ιστόνη H3 (γH3) ανεξαρτήτως μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, αλληλεπιδρώντας κυρίως με το κεντρικό τμήμα (histone fold). Η παρατήρηση αυτή αμφισβητεί το δόγμα ότι η μεθυλίωση στη λυσίνη 9 της ιστόνης H3 αποτελεί τη μοναδική θέση πρόσδεσης (creates a binding site...) για την HP1β. Είναι γνωστό ότι στα κύτταρα που είναι αρνητικά για την *Sin3,9* η HP1 δεν εντοπίζεται σωστά. Υπάρχουν όμως και άλλα ευρήματα που υποστηρίζουν ότι η απαλοιφή (knockout) των δύο *Sin3,9* γονιδίων, εκτός από το να αναστέλλει την τριμεθυλίωση στη λυσίνη 9, έχει και άλλες συνέπειες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η έλλειψη τριμεθυλίωσης στη λυσίνη 20 της ιστόνης H4, η λάθος εντόπιση (mis-targeting) της DNA μεθυλάσης Dnmt3b και η αύξηση στην τριμεθυλίωση της λυσίνης 27 της ιστόνης H3 (8, 152, 153). Συνεπώς, είναι δύσκολο να διακρίνουμε εάν η λάθος εντόπιση της HP1 οφείλεται σε μία συνολική αλλαγή στην οργάνωση της ετεροχρωματίνης, ή εάν αυτό προκύπτει από απουσία κατάλληλων θέσεων πρόσδεσης.



In vitro μελέτες σχετικές με το ερώτημα του εάν και κατά πόσο η τριμεθυλίωση στη λυσίνη 9 αποτελεί τη μοναδική θέση πρόσδεσης για την HP1 δίνουν ποικίλα αποτελέσματα. Για παράδειγμα, πεπτίδια της ιστόνης H3 που περιέχουν την τριμεθυλιωμένη λυσίνη 9 συνδέονται με την HP1 με συγγένεια της τάξεως των μM , ενώ ολιγονουκλεοσωματικές συστοιχίες αποτελούμενες από ανασυνδυασμένες (δηλ. μη τροποποιημένες) ιστόνες φαίνεται να προσδέονται με συγγένεια της τάξεως των nM (49, 62, 154). Αυτό συμφωνεί με το δικό μας εύρημα ότι συνθετικά πεπτίδια που αντιπροσωπεύουν τα αμινοξέα 1-15 της ουράς της ιστόνης H3 προσδέονται με πολύ μικρή συγγένεια με την HP1 και δεν είναι ικανά να ανταγωνιστούν την ακέραια πρωτεΐνη H3, ακόμα και σε περίσσεια 200x. Αυτό μπορεί να συμβαίνει μόνο στην περίπτωση που η HP1 έχει μεγαλύτερη συγγένεια για το κεντρικό τμήμα (histone fold) της H3, όπως έχει προταθεί από τον Nielsen και άλλους (8, 13, 63). Εξ' άλλου, η HP1 φαίνεται να αλληλεπιδρά με την ανασυνδυασμένη (δηλ. μη τροποποιημένη) και τρυψινοποιημένη (δηλ. χωρίς ουρά) ιστόνη H3. Η χρωματίνη που επιλέγει η HP1 χαρακτηρίζεται από ένα πολύπλοκο συνδυασμό τροποποιήσεων που αντιβαίνει στον κανόνα «τριμεθυλιωμένη στην K9 / μη ακετυλιωμένη στην K14 / μονομεθυλιωμένη στην K27» (8, 13). Ένα άλλο χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιας «παράβασης» αποτελεί η ταυτόχρονη τροποποίηση στη λυσίνη 9 (τριμεθυλίωση), η φωσφορυλίωση στη σερίνη 10 και η ακετυλίωση στη λυσίνη 14 που έχουν προσφάτως ανιχνευθεί στο ίδιο μόριο H3 σε *in vivo* συνθήκες (155).

4.3 Η ενσωμάτωση της HP1 στη χρωματίνη συμβαίνει μέσω πολλαπλών οδών

Από τις *in vitro* και *in vivo* παρατηρήσεις οδηγηθήκαμε στο συμπέρασμα ότι η σταθερή ενσωμάτωση της HP1 στην ετεροχρωματίνη που βρίσκεται στην περιφέρεια και γύρω από τον πυρηνίσκο λαμβάνει χώρα μόνο όταν η δομή των νουκλεοσωμάτων έχει αλλάξει (44). Οι *in vivo* συνθήκες κάτω από τις οποίες κάτι τέτοιο μπορεί να συμβεί είναι πολύ συγκεκριμένες. Μερική ή ολική αποδιοργάνωση της οκταμερικής νουκλεοσωματικής δομής μπορεί να προκύψει κατά τη διάρκεια αναδιαμόρφωσης (remodeling) που σχετίζεται με τη μεταγραφή, τον ανασυνδυασμό, την ανταλλαγή ισομορφών των ιστονών, ή από την ενδογενή δυναμική που έχει η χρωματίνη σε συνθήκες σταθερής κατάστασης (steady-state chromatin dynamics) (156-158). Εν τούτοις, το πιο γνωστό στιγμιότυπο στο οποίο λαμβάνει χώρα η διαδικασία αυτή είναι η S φάση. Τα ευρήματά μας υποστηρίζουν ότι υπάρχει οδός ενσωμάτωσης της HP1 β που εξαρτάται από τον κυτταρικό κύκλο. Πράγματι, διαμόλυνση κυττάρων με HP1 β



και Cy3-dUTP αποκαλύπτει ότι η *de novo* ενσωμάτωση της HP1β απαιτεί τα κύτταρα να έχουν περάσει από την S φάση. Λίγες ώρες μετά την διαμόλυνση, πάνω από το 70% των κυττάρων που έχουν ενσωματώσει HP1β-gfp στην ετεροχρωματίνη βρίσκονται στο τέλος της S φάσης και παρουσιάζουν ένα τυπικό “heterochromatic/late replication” πρότυπο. Σε αντίθεση, τα κύτταρα που παρουσιάζουν διάχυτο πρότυπο για την HP1β είναι εκτός S φάσης, ή βρίσκονται στην αρχή της S. Αυτό το διάχυτο πρότυπο δεν παρατηρείται ποτέ σε κύτταρα που βρίσκονταν στο τέλος της S φάσης. Επίσης, κατά τη διάρκεια αναστολής των κυττάρων πριν την S φάση η ενσωμάτωση της HP1β σε ετεροχρωματινικές εστίες αναστέλλεται.

Στο υποθετικό μοντέλο που προτείνουμε, η HP1 προσδένεται αρχικά σε διάσπαρτες θέσεις που χαρακτηρίζονται ως θέσεις «υψηλής συγγένειας/μικρής διαθεσιμότητας» (high affinity/low capacity) μέσω του κεντρικού τμήματος (histone fold) της ιστόνης H3 το οποίο αποκαλύπτεται σε περιοχές όπου λαμβάνει χώρα ενεργή μεταγραφή, ανταλλαγή ισομορφών των ιστονών, ή αντιγραφή. Από τη στιγμή που έχει σχηματισθεί ένας αρχικός πυρήνας, η HP1 μπορεί να «επεκταθεί» σε μη αντιγραφόμενη ετεροχρωματίνη με την πρόσδεσή της σε γειτονικές, επαναλαμβανόμενες θέσεις που φέρουν την τροποποίηση για την τριμεθυλίωση της λυσίνης 9 (θέσεις χαμηλής συγγένειας/υψηλής διαθεσιμότητας). Προφανώς, εάν τέτοιοι καθοριστικοί παράγοντες δεν υπάρχουν στο άμεσο περιβάλλον (π.χ. ευχρωματίνη), θα παραμείνει μόνο μία ελάχιστη ποσότητα HP1 στις αρχικές θέσεις, δίνοντας την εντύπωση μίας αποκλειστικά ετεροχρωματινικής εντόπισης.

4.4 LBR και επιγενετικά χαρακτηριστικά της χρωματίνης

Στην εργασία αυτή δείξαμε ότι το αμινοτελικό τμήμα της πυρηνικής πρωτεΐνης LBR αλληλεπιδρά ειδικά και σχεδόν στοιχειομετρικά με μονονουκλεοσώματα που προέρχονται από κλάσματα εμπλουτισμένα σε ετεροχρωματίνη. Πειράματα φασματοσκοπίας μάζας έδειξαν ότι η ιστόνη H3 που απαντάται στα μονονουκλεοσώματα που αλληλεπιδρούν με τον LBR είναι μεθυλωμένη στη λυσίνη 9 και στη λυσίνη 27, μονοακετυλωμένη στη λυσίνη 18 και στη λυσίνη 23 και μη τροποποιημένη στη λυσίνη 4. Ο ίδιος τύπος ανάλυσης αποκάλυψε ορισμένους πιο πολύπλοκους συνδυασμούς μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, όπως για παράδειγμα την τριμεθυλίωση στη λυσίνη 9, σε συνδυασμό με την ακετυλίωση στη λυσίνη 14 της ιστόνης H3 και τη μερική ακετυλίωση της λυσίνης 5, λυσίνης 8, λυσίνης 12, και της λυσίνης 16 της ιστόνης H4. Μερικοί από αυτούς τους συνδυασμούς δεν είναι αναμενόμενοι από τους ισχύοντες ως τώρα κανόνες του «ιστονικού κώδικα».

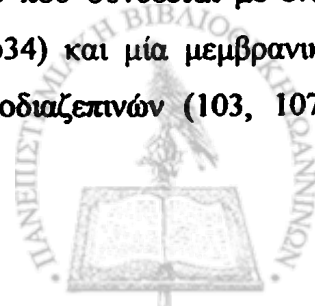


Είναι γνωστό ότι η *in vitro* ακετυλίωση των απομονωμένων ιστονών H3/H4 από το CREB-CBP μειώνει σημαντικά την *in vitro* σύνδεσή τους στον LBR (89). Συνεπώς, νουκλεοσώματα που περιέχουν ακετυλιωμένες ιστόνες δεν αναμένεται να αλληλεπιδρούν άμεσα με στοιχεία της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης. Παρόλα ταύτα, οι ιδιότητες πρόσδεσης των απομονωμένων ιστονών ή των πεπτιδίων που αντιστοιχούν στις «ουρές» των ιστονών μπορεί να είναι διαφορετικές από αυτές των φυσικών (native) νουκλεοσωμάτων. Είναι πολύ πιθανό θέσεις οι οποίες παρεμποδίζονται ή αποκρύπτονται στα ακέραια νουκλεοσώματα, να γίνονται προσβάσιμες στην περίπτωση που οι ιστόνες είναι αποσυνδεδεμένες. Επίσης, είναι πιθανό αλληλεπιδράσεις σε πιο μεγάλη έκταση μεταξύ διαφορετικών «κασσετών τροποποίησης» (modification cassettes) να μην μπορούν να λάβουν χώρα στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται ιστονικά πεπτίδια αντί για ακέραιες ιστόνες H3/H4 (13).

Είναι επίσης θεωρητικά δυνατό, νουκλεοσώματα που περιέχουν μερικώς ακετυλιωμένες ιστόνες να αλληλεπιδρούν με τον LBR μέσω άλλων νουκλεοσωμάτων που λειτουργούν ως «γέφυρες» (bridging particles) και αποτελούνται από μη ακετυλιωμένες ιστόνες. Στην περίπτωσή μας αυτό δεν είναι πολύ πιθανό επειδή οι χρωματινικές παρασκευές που χρησιμοποιήσαμε περιέχουν μονονουκλεοσώματα και επίσης η πρόσδεση του LBR στα νουκλεοσώματα είναι σχεδόν στοιχειομετρική. Στην περίπτωση που ο LBR αλληλεπιδρούσε με συστοιχίες πολυνουκλεοσωμάτων θα έπρεπε να είχαμε παρατηρήσει μη στοιχειομετρική πρόσδεση.

4.5 Αλληλεπιδράσεις LBR-LBR και σχηματισμός νησίδων στον πυρηνικό φάκελο

Η μελέτη των πρωτεϊνών της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης συγκλίνει στη διαπίστωση ότι πολλές από τις πρωτεΐνες αυτές (π.χ. η LAP1, η LAP2, και ο LBR) οργανώνονται σε σύμπλοκα που περιέχουν πολλές υπομονάδες και πιθανά σχηματίζουν «πλατφόρμες» όπου λαμβάνει χώρα αναδιαμόρφωση της χρωματίνης (remodeling). Σε ηπατοκύτταρα αρουραίου, η LAP1 εντοπίζεται σε νησίδες που διατάσσονται σε κανονικά διαστήματα (regularly spaced clusters) και συγκατακρημνίζεται με τις λαμίνες τύπου B και μία ασβεστοεξαρτώμενη κινάση (114). Παρομοίως, η LAP2B συνδέεται με τουλάχιστον τέσσερις άλλες πυρηνικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένου του LBR και της HA95 (159). Επίσης, ο LBR συναπομονώνεται με τις πυρηνικές λαμίνες, μία SR κινάση (SRPK1), με ένα στοιχείο που συνδέεται με έναν παράγοντα ματίσματος (splicing factor associated element, p32/p34) και μία μεμβρανική πρωτεΐνη που σχετίζεται με τους περιφερικούς υποδοχείς βενζοδιαζεπινών (103, 107).



Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι ο LBR αλληλεπιδρά με την HP1 άμεσα ή έμμεσα μέσω των ιστονών (89, 160).

Δεν είναι σαφές κατά πόσον οι πρωτεΐνες της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης συμμετέχουν στον σχηματισμό των συμπλόκων αυτών ως μονομερή ή ως ολιγομερή. Χρησιμοποιώντας *in vitro* τεχνικές, δείξαμε ότι ο LBR αλληλεπιδρά με τον εαυτό του μέσω της αμινοτελικής περιοχής και σχηματίζει ολιγομερή υπό εξαιρετικά «απαιτητικές» ιονικές συνθήκες (0.15-0.5 M). Επίσης, χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικά αντισώματα καθαρισμένα σε στήλες συγγένειας (affinity-purified) και μία ποικιλία μορφολογικών τεχνικών, δείξαμε ότι ο ενδογενής LBR εντοπίζεται σε διακριτές νησίδες στον πυρηνικό φάκελο. Από την μορφολογική ανάλυση των ετερόζυγων μεταλλάξεων για τον LBR φαίνεται ότι η φυσιολογική κατανομή καθώς και η οργάνωση των νησίδων διαταράσσεται σημαντικά σε παθολογικές περιπτώσεις, όπως είναι η ιχθύωση, ή η ανωμαλία Pelger-Hüet (125). Συνεπώς, τα ετερόζυγα ζώα αποτελούν ένα εξαιρετικό σύστημα για την περαιτέρω ανάλυση των αλληλεπιδράσεων LBR-LBR και LBR-χρωματίνης.

Επειδή η ετεροχρωματίνη αποτελείται από συστοιχίες επαναλαμβανόμενων μονάδων (π.χ. «αλυσίδες» νουκλεοσωμάτων με συγκεκριμένες τροποποιήσεις στις ουρές των ιστονών) είναι πολύ πιθανό ότι ο LBR, σχηματίζοντας ολιγομερή, παρέχει αντίστοιχες θέσεις αγκυροβόλησης της χρωματίνης. Μια πολύ ενδιαφέρουσα ιδέα είναι επίσης ότι ο LBR, μέσω του υδρόφοβου τμήματος που λειτουργεί ως αναγωγία της στερόλης, τροποποιεί το τοπικό λιπιδιακό περιβάλλον και συμβάλλει στο σχηματισμό ειδικών LBR “rafts”, αντίστοιχων με τα rafts της πλασματικής μεμβράνης (101).



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Η έκφραση των πρωτεϊνών HP1α και HP1β σε φυσιολογικά και νεοπλασματικά κύτταρα ανθρώπου και ποντικού δεν διαφέρει σημαντικά.
- Η HP1β συνδέεται με την ιστόνη H3 ανεξάρτητα από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και αλληλεπιδρά κυρίως με το κεντρικό τμήμα ("histone fold") της ιστόνης H3.
- Η HP1β παρουσιάζει επιλεκτική σύνδεση στα υποσωματίδια H3/H4.
- Η ενσωμάτωση της HP1β στην ετεροχρωματίνη εξαρτάται από τον κυτταρικό κύκλο και συγκεκριμένα από την S φάση.
- Ο LBR αλληλεπιδρά επιλεκτικά με την περιφερική ετεροχρωματίνη.
- Ο LBR συμμετέχει στις αλληλεπιδράσεις με την ετεροχρωματίνη ως ένα ολιγο/πολυμερές.
- Ετερόζυγες μεταλλάξεις που επηρεάζουν την οργάνωση του LBR προκαλούν μείζονες κυτταρικές βλάβες και αλλοιώσεις του πυρήνα.



ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

Αρχικός έλεγχος φυσιολογικών και νεοπλασματικών κυττάρων ανθρώπου και ποντικού χρησιμοποιώντας ειδικούς ανιχνευτές για την HP1α και HP1β έδειξε ότι η έκφραση των πρωτεϊνών αυτών δεν διαφέρει σημαντικά. Παράλληλα, μελέτη φυσιολογικών ιστών και πρωτογενών καλλιιεργειών που έγινε στο εργαστήριό μας έδειξε σύνθετα πρότυπα υποπυρηνικής κατανομής που δεν θα μπορούσαν εύκολα να αποδοθούν σε αυξομειώσεις της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης των HP1α/β, αλλά θα ήταν πιο συμβατά με έναν μηχανισμό ρύθμισης που εξαρτάται από αυξητικούς παράγοντες και μιτογόνα. Επί τη βάσει αυτών των δεδομένων επικεντρώσαμε τη μελέτη μας στις αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης HP1 (Heterochromatin Protein 1) με διαφορετικά χρωματινικά υποστρώματα υπό *in vitro* και *in vivo* συνθήκες. Η άποψη που ισχύει ως τώρα είναι ότι η HP1 εντοπίζεται σε μεταγραφικά ανενεργή, συστατική (constitutive) ετεροχρωματίνη συνδεόμενη ειδικά με την ιστόνη H3 που είναι μετα-μεταφραστικά τροποποιημένη (τριμεθυλιωμένη) στη λυσίνη 9 (me₃K9-H3). Το παραπάνω πρότυπο, παρά την κομψότητα και την απλότητά του δεν επαρκεί όμως για να ερμηνεύσει το ευρύ φάσμα των αλληλεπιδράσεων της HP1 με την ετεροχρωματίνη που παρατηρούνται *in vivo*. Για αυτόν τον λόγο, μελετήσαμε τις αλληλεπιδράσεις HP1-χρωματίνης σε διαφορετικά επίπεδα πολυπλοκότητας και διερευνήσαμε κατά πόσον η me₃K9-H3 αποτελεί τη μοναδική θέση πρόσδεσης της HP1. *In vitro* μελέτες έδειξαν ότι η HP1 προσδέεται επιλεκτικά σε μη τροποποιημένη ή μερικώς πρωτεολυμένη ιστόνη H3, αλληλεπιδρώντας κυρίως με το κεντρικό τμήμα της (histone fold). Επίσης δείξαμε ότι η HP1 συνδέεται πιο ισχυρά στα διασπασμένα νουκλεοσώματα (H3/H4 υποσωματίδια) από ότι στα ακέραια σωματίδια. Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά western και της φασματοσκοπίας μάζας έδειξαν ότι τα σωματίδια που επιλέγει η HP1 διαθέτουν ένα πολύπλοκο μοτίβο μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, δεν είναι ιδιαίτερα εμπλουτισμένα σε me₃K9-H3 και δεν ακολουθούν το σύνολο των κανόνων που υπαγορεύονται από τον ιστονικό κώδικα.

Αυτές οι βιοχημικές μελέτες συνηγορούν στην ιδέα ότι οι πρωτεΐνες HP1 αλληλεπιδρούν με τα διαφορετικά χρωματινικά υποστρώματα με τρόπο που εξαρτάται από τη φυσική κατάσταση της χρωματίνης. Είναι επίσης φανερό ότι οι *in vitro* παρατηρήσεις μας σχετίζονται με μία τουλάχιστον «χρωματινική κατάσταση» που απαντάται *in vivo*. Για παράδειγμα, παρατηρήσαμε ότι, η HP1 και η me₃K9-H3 δεν συνεντοπίζονται απόλυτα και παρουσιάζουν διακριτά πρότυπα. *In vivo* πειράματα έδειξαν επίσης ότι η σταθερή



ενσωμάτωση της HP1 στις ετεροχρωματικές εστίες εξαρτάται από την S φάση. Τα αποτελέσματα αυτά αμφισβητούν το δόγμα ότι η μεθυλίωση στη λυσίνη 9 της ιστόνης H3 αποτελεί τη μοναδική θέση πρόσδεσης (creates a binding site...) για την HP1 και υποστηρίζουν ένα μηχανισμό ενσωμάτωσης που βασίζεται στην αντιγραφή.

Ένα άλλο τμήμα της μελέτης μας επικεντρώθηκε στις αλληλεπιδράσεις του πυρηνικού φακέλου με την ετεροχρωματίνη. Ένα βασικό συστατικό του πυρηνικού φακέλου είναι ο LBR (Lamin B Receptor), μία πολυτοπική πρωτεΐνη της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης που συμμετέχει στην αγκυροβόληση της χρωματίνης στην περιφέρεια. Δύο βασικοί παράμετροι στις αλληλεπιδράσεις LBR-χρωματίνης είναι η φυσική κατάσταση του LBR και τα μοριακά χαρακτηριστικά της χρωματίνης με την οποία συνδέεται. Για να προσεγγίσουμε τα ερωτήματα αυτά, απομονώσαμε τμήματα περιφερικής ετεροχρωματίνης που είναι προσκολλημένα στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη. Δείξαμε ότι το αμινοτελικό τμήμα του LBR συνδέεται άμεσα με μονονουκλεοσώματα. Ανάλυση των νουκλεοσωματικών σωματιδίων που αλληλεπιδρούν με τον LBR με φασματοσκοπία μάζας αποκάλυψε πολύπλοκα πρότυπα μεθυλιωμένων/ακετυλιωμένων ιστονών που δεν περιέχουν ευχρωματικές επιγενετικές τροποποιήσεις. Επίσης, μερικοί από τους συνδυασμούς που ανιχνεύθηκαν δεν ήταν συμβατοί με τους κανόνες του «ιστονικού κώδικα».

Πολλές από τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου οργανώνονται σε πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα και σχηματίζουν πλατφόρμες αναδιαμόρφωσης χρωματίνης. Πειράματα *in vitro* έδειξαν ότι ο LBR αλληλεπιδρά με τον εαυτό του μέσω του αμινοτελικού τμήματος και σχηματίζει ολιγομερή στο επίπεδο του πυρηνικού φακέλου. Επίσης, χρησιμοποιώντας μία ποικιλία μορφολογικών τεχνικών, δείξαμε ότι ο ενδογενής LBR εντοπίζεται σε διακριτές νησίδες στον πυρηνικό φάκελο. Τέλος, μορφολογική ανάλυση των ετερόζυγων μεταλλάξεων του LBR στα ποντίκια έδειξε ότι η φυσιολογική κατανομή καθώς και η οργάνωση των νησίδων που σχηματίζει ο LBR στον φάκελο διαταράσσεται σημαντικά προκαλώντας μία ποικιλία δομικών και πυρηνικών αλλοιώσεων.



SUMMARY

Interactions and *in situ* organization of nuclear envelope transmembrane proteins: The HP1-LBR connection Dimitra Makatsori

Analysing physiological and neoplastic cells of human and mouse origin by using primers for HP1 α and HP1 β showed that the expression of these proteins does not differ. Studies on physiological tissues and primary cultures performed in our laboratory showed complex patterns of subnuclear distribution that cannot be explained just by changes in the expression levels of HP1 α/β , but comply with a mechanism that is regulated by growth factors and mitogens. Based on these facts we focused on delineating the interactions of Heterochromatin Protein 1 (HP1) with chromatin in different molecular contexts *in vitro* and *in vivo*. It is widely believed that HP1 targets transcriptionally inactive, constitutive heterochromatin by binding to the trimethylated lysine 9 of histone H3 (me₃K9-H3). Despite the elegance and simplicity of this model, binary interactions between HP1 and me₃K9-H3 do not seem to account for the whole spectrum of HP1-heterochromatin associations that are observed *in vivo*. Prompted by these controversies, we examined HP1-chromatin interactions at different levels of complexity and addressed the question whether or not me₃K9 constitutes the sole binding site for HP1. Performing *in vitro* studies, we showed that HP1 exhibits selective binding to non-modified and tailless histone H3, independent of post-translational modifications, associating primarily with the "histone fold" domain. We also demonstrated that HP1 associates more tightly with disrupted nucleosomes (H3/H4 subcomplexes) than with intact particles. Western blotting and mass spectrometry data indicate that HP1-selected particles possess a complex pattern of post-translational modifications that are not particularly enriched in me₃K9-H3 and do not conform strictly to the histone code "rules".

These biochemical studies suggested strongly that HP1 proteins associate with different chromatin substrates in a manner that depends crucially on physical state. Most importantly, we demonstrated that our *in vitro* observations had an *in vivo* correlate. Mapping of HP1 and me₃K9-H3 sites *in vivo* revealed overlapping, yet spatially distinct patterns, while *in vivo* assays showed that stable incorporation of HP1 into heterochromatin requires passage through the S-phase. These data challenge the histone code dogma that me₃K9H3 is necessary and sufficient for HP1 binding and unveil a new mode of HP1-chromatin interactions, supporting



replication timing as a mechanism in combination with code reading for dictating HP1 binding.

Another important part was the study of the interactions between the nuclear envelope (NE) and heterochromatin. A basic constituent of the nuclear envelope is the Lamin B Receptor (LBR), a polytopic inner nuclear membrane protein implicated in chromatin anchorage. Two critical parameters in LBR-chromatin interactions are the physical state of LBR and the molecular features of LBR-associated chromatin. To address these issues, we have isolated fragments of peripheral heterochromatin attached to the inner nuclear membrane. We demonstrated that LBR physically associates with peripheral heterochromatin and specifically that the N-terminal domain of LBR binds to mononucleosomes. Mass spectrometric analysis of the LBR-associated particles revealed complex patterns of methylated/acetylated histones that are devoid of "euchromatic" epigenetic marks. Most importantly, some of these combinations would not be anticipated from the currently established rules of the "histone code". Accumulating evidence suggests that several integral proteins of the NE are organized as multi-subunit complexes and may form chromatin-remodeling platforms. In our case, using *in vitro* assays, we have demonstrated that LBR self-associates through its N-terminal domain and forms specific oligomers at the level of the nuclear envelope. Furthermore, using a range of morphological techniques, we have shown that native LBR resides in distinct NE microdomains. This is of particular importance because it suggests that LBR exists in the form of multimeric particles and functions as a nuclear membrane anchor for native heterochromatin. Morphological analysis of heterozygous LBR mutants showed that the normal distribution and fine substructure of LBR microdomains is significantly affected, resulting in a variety of structural abnormalities and nuclear defects.

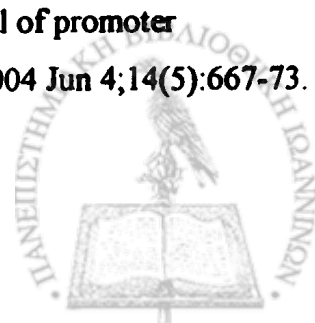


5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Khorasanizadeh S. The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):259-72.
2. Agalioti T, Chen G, Thanos D. Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell*. 2002 Nov 1;111(3):381-92.
3. Hassan AH, Neely KE, Vignali M, Reese JC, Workman JL. Promoter targeting of chromatin-modifying complexes. *Front Biosci*. 2001 Sep 1;6:D1054-64.
4. Hassan AH, Prochasson P, Neely KE, Galasinski SC, Chandy M, Carrozza MJ, et al. Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell*. 2002 Nov 1;111(3):369-79.
5. Daniel JA, Pray-Grant MG, Grant PA. Effector proteins for methylated histones: an expanding family. *Cell Cycle*. 2005 Jul;4(7):919-26.
6. Singer MS, Kahana A, Wolf AJ, Meisinger LL, Peterson SE, Goggin C, et al. Identification of high-copy disruptors of telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 1998 Oct;150(2):613-32.
7. Huyen Y, Zgheib O, Ditullio RA, Jr., Gorgoulis VG, Zacharatos P, Petty TJ, et al. Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature*. 2004 Nov 18;432(7015):406-11.
8. Schotta G, Lachner M, Sarma K, Ebert A, Sengupta R, Reuter G, et al. A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev*. 2004 Jun 1;18(11):1251-62.
9. Alcobia I, Dilao R, Parreira L. Spatial associations of centromeres in the nuclei of hematopoietic cells: evidence for cell-type-specific organizational patterns. *Blood*. 2000 Mar 1;95(5):1608-15.
10. Sims RJ, 3rd, Nishioka K, Reinberg D. Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet*. 2003 Nov;19(11):629-39.



11. **Bienz M. The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. Trends Biochem Sci. 2006 Jan;31(1):35-40.**
12. **Eberharter A, Vetter I, Ferreira R, Becker PB. ACF1 improves the effectiveness of nucleosome mobilization by ISWI through PHD-histone contacts. Embo J. 2004 Oct 13;23(20):4029-39.**
13. **Fischle W, Wang Y, Allis CD. Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. Nature. 2003 Oct 2;425(6957):475-9.**
14. **Kellum R, Alberts BM. Heterochromatin protein 1 is required for correct chromosome segregation in Drosophila embryos. J Cell Sci. 1995 Apr;108 (Pt 4):1419-31.**
15. **Minc E, Allory Y, Worman HJ, Courvalin JC, Buendia B. Localization and phosphorylation of HP1 proteins during the cell cycle in mammalian cells. Chromosoma. 1999 Aug;108(4):220-34.**
16. **Reuter G, Spierer P. Position effect variegation and chromatin proteins. Bioessays. 1992 Sep;14(9):605-12.**
17. **Li G, Levitus M, Bustamante C, Widom J. Rapid spontaneous accessibility of nucleosomal DNA. Nat Struct Mol Biol. 2005 Jan;12(1):46-53.**
18. **Hansen JC. Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions. Annu Rev Biophys Biomol Struct. 2002;31:361-92.**
19. **Luger K, Richmond TJ. DNA binding within the nucleosome core. Curr Opin Struct Biol. 1998 Feb;8(1):33-40.**
20. **Boeger H, Griesenbeck J, Strattan JS, Kornberg RD. Nucleosomes unfold completely at a transcriptionally active promoter. Mol Cell. 2003 Jun;11(6):1587-98.**
21. **Reinke H, Horz W. Histones are first hyperacetylated and then lose contact with the activated PHO5 promoter. Mol Cell. 2003 Jun;11(6):1599-607.**
22. **Boeger H, Griesenbeck J, Strattan JS, Kornberg RD. Removal of promoter nucleosomes by disassembly rather than sliding in vivo. Mol Cell. 2004 Jun 4;14(5):667-73.**



23. Korber P, Luckenbach T, Blaschke D, Horz W. Evidence for histone eviction in trans upon induction of the yeast PHO5 promoter. *Mol Cell Biol.* 2004 Dec;24(24):10965-74.
24. Zabaronick SR, Tyler JK. The histone chaperone anti-silencing function 1 is a global regulator of transcription independent of passage through S phase. *Mol Cell Biol.* 2005 Jan;25(2):652-60.
25. Bernstein BE, Liu CL, Humphrey EL, Perlstein EO, Schreiber SL. Global nucleosome occupancy in yeast. *Genome Biol.* 2004;5(9):R62.
26. Lee CK, Shibata Y, Rao B, Strahl BD, Lieb JD. Evidence for nucleosome depletion at active regulatory regions genome-wide. *Nat Genet.* 2004 Aug;36(8):900-5.
27. Belotserkovskaya R, Oh S, Bondarenko VA, Orphanides G, Studitsky VM, Reinberg D. FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science.* 2003 Aug 22;301(5636):1090-3.
28. Belotserkovskaya R, Reinberg D. Facts about FACT and transcript elongation through chromatin. *Curr Opin Genet Dev.* 2004 Apr;14(2):139-46.
29. Schwabish MA, Struhl K. Evidence for eviction and rapid deposition of histones upon transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol.* 2004 Dec;24(23):10111-7.
30. Park YJ, Dyer PN, Tremethick DJ, Luger K. A new fluorescence resonance energy transfer approach demonstrates that the histone variant H2AZ stabilizes the histone octamer within the nucleosome. *J Biol Chem.* 2004 Jun 4;279(23):24274-82.
31. Bruno M, Flaus A, Owen-Hughes T. Site-specific attachment of reporter compounds to recombinant histones. *Methods Enzymol.* 2004;375:211-28.
32. Park YJ, Chodaparambil JV, Bao Y, McBryant SJ, Luger K. Nucleosome assembly protein 1 exchanges histone H2A-H2B dimers and assists nucleosome sliding. *J Biol Chem.* 2005 Jan 21;280(3):1817-25.
33. Fan JY, Gordon F, Luger K, Hansen JC, Tremethick DJ. The essential histone variant H2A.Z regulates the equilibrium between different chromatin conformational states. *Nat Struct Biol.* 2002 Mar;9(3):172-6.



34. Kusch T, Florens L, Macdonald WH, Swanson SK, Glaser RL, Yates JR, 3rd, et al. Acetylation by Tip60 is required for selective histone variant exchange at DNA lesions. *Science*. 2004 Dec 17;306(5704):2084-7.
35. Eissenberg JC, James TC, Foster-Hartnett DM, Hartnett T, Ngan V, Elgin SC. Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Dec;87(24):9923-7.
36. James TC, Elgin SC. Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its gene. *Mol Cell Biol*. 1986 Nov;6(11):3862-72.
37. Paro R, Hogness DS. The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Jan 1;88(1):263-7.
38. Singh PB, Miller JR, Pearce J, Kothary R, Burton RD, Paro R, et al. A sequence motif found in a *Drosophila* heterochromatin protein is conserved in animals and plants. *Nucleic Acids Res*. 1991 Feb 25;19(4):789-94.
39. Jones DO, Cowell IG, Singh PB. Mammalian chromodomain proteins: their role in genome organisation and expression. *Bioessays*. 2000 Feb;22(2):124-37.
40. Eissenberg JC, Elgin SC. The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. *Curr Opin Genet Dev*. 2000 Apr;10(2):204-10.
41. Ball LJ, Murzina NV, Broadhurst RW, Raine AR, Archer SJ, Stott FJ, et al. Structure of the chromatin binding (chromo) domain from mouse modifier protein 1. *Embo J*. 1997 May 1;16(9):2473-81.
42. Brasher SV, Smith BO, Fogh RH, Nietlispach D, Thiru A, Nielsen PR, et al. The structure of mouse HP1 suggests a unique mode of single peptide recognition by the shadow chromo domain dimer. *Embo J*. 2000 Apr 3;19(7):1587-97.



43. Cowieson NP, Partridge JF, Allshire RC, McLaughlin PJ. Dimerisation of a chromo shadow domain and distinctions from the chromodomain as revealed by structural analysis. *Curr Biol.* 2000 May 4;10(9):517-25.
44. Cheutin T, McNairn AJ, Jenuwein T, Gilbert DM, Singh PB, Misteli T. Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding. *Science.* 2003 Jan 31;299(5607):721-5.
45. Peters AH, O'Carroll D, Scherthan H, Mechtler K, Sauer S, Schofer C, et al. Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell.* 2001 Nov 2;107(3):323-37.
46. Schotta G, Ebert A, Krauss V, Fischer A, Hoffmann J, Rea S, et al. Central role of *Drosophila* SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *Embo J.* 2002 Mar 1;21(5):1121-31.
47. Litt MD, Simpson M, Gaszner M, Allis CD, Felsenfeld G. Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus. *Science.* 2001 Sep 28;293(5539):2453-5.
48. Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, et al. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature.* 2001 Mar 1;410(6824):120-4.
49. Jacobs SA, Khorasanizadeh S. Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail. *Science.* 2002 Mar 15;295(5562):2080-3.
50. Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature.* 2001 Mar 1;410(6824):116-20.
51. Nakayama J, Rice JC, Strahl BD, Allis CD, Grewal SI. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science.* 2001 Apr 6;292(5514):110-3.



52. Cowell IG, Aucott R, Mahadevaiah SK, Burgoyne PS, Huskisson N, Bongiorni S, et al. Heterochromatin, HP1 and methylation at lysine 9 of histone H3 in animals. *Chromosoma*. 2002 Mar;111(1):22-36.
53. Ringrose L, Ehret H, Paro R. Distinct contributions of histone H3 lysine 9 and 27 methylation to locus-specific stability of polycomb complexes. *Mol Cell*. 2004 Nov 19;16(4):641-53.
54. Danzer JR, Wallrath LL. Mechanisms of HP1-mediated gene silencing in *Drosophila*. *Development*. 2004 Aug;131(15):3571-80.
55. Greil F, van der Kraan I, Delrow J, Smothers JF, de Wit E, Bussemaker HJ, et al. Distinct HP1 and Su(var)3-9 complexes bind to sets of developmentally coexpressed genes depending on chromosomal location. *Genes Dev*. 2003 Nov 15;17(22):2825-38.
56. Vakoc CR, Mandat SA, Olenchock BA, Blobel GA. Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol Cell*. 2005 Aug 5;19(3):381-91.
57. Huang DW, Fanti L, Pak DT, Botchan MR, Pimpinelli S, Kellum R. Distinct cytoplasmic and nuclear fractions of *Drosophila* heterochromatin protein 1: their phosphorylation levels and associations with origin recognition complex proteins. *J Cell Biol*. 1998 Jul 27;142(2):307-18.
58. Maison C, Bailly D, Peters AH, Quivy JP, Roche D, Taddei A, et al. Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. *Nat Genet*. 2002 Mar;30(3):329-34.
59. Muchardt C, Guilleme M, Seeler JS, Trouche D, Dejean A, Yaniv M. Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1alpha. *EMBO Rep*. 2002 Oct;3(10):975-81.
60. Prasanth SG, Prasanth KV, Siddiqui K, Spector DL, Stillman B. Human Orc2 localizes to centrosomes, centromeres and heterochromatin during chromosome inheritance. *Embo J*. 2004 Jul 7;23(13):2651-63.



61. Quivy JP, Roche D, Kirschner D, Tagami H, Nakatani Y, Almouzni G. A CAF-1 dependent pool of HP1 during heterochromatin duplication. *Embo J*. 2004 Sep 1;23(17):3516-26.
62. Fan JY, Rangasamy D, Luger K, Tremethick DJ. H2A.Z alters the nucleosome surface to promote HP1 α -mediated chromatin fiber folding. *Mol Cell*. 2004 Nov 19;16(4):655-61.
63. Nielsen AL, Oulad-Abdelghani M, Ortiz JA, Remboutsika E, Chambon P, Losson R. Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins. *Mol Cell*. 2001 Apr;7(4):729-39.
64. Perrini B, Piacentini L, Fanti L, Altieri F, Chichiarelli S, Berloco M, et al. HP1 controls telomere capping, telomere elongation, and telomere silencing by two different mechanisms in *Drosophila*. *Mol Cell*. 2004 Aug 13;15(3):467-76.
65. Nielsen SJ, Schneider R, Bauer UM, Bannister AJ, Morrison A, O'Carroll D, et al. Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature*. 2001 Aug 2;412(6846):561-5.
66. Thiru A, Nietlispach D, Mott HR, Okuwaki M, Lyon D, Nielsen PR, et al. Structural basis of HP1/PXVXL motif peptide interactions and HP1 localisation to heterochromatin. *Embo J*. 2004 Feb 11;23(3):489-99.
67. Lechner MS, Begg GE, Speicher DW, Rauscher FJ, 3rd. Molecular determinants for targeting heterochromatin protein 1-mediated gene silencing: direct chromoshadow domain-KAP-1 corepressor interaction is essential. *Mol Cell Biol*. 2000 Sep;20(17):6449-65.
68. Murzina N, Verreault A, Laue E, Stillman B. Heterochromatin dynamics in mouse cells: interaction between chromatin assembly factor 1 and HP1 proteins. *Mol Cell*. 1999 Oct;4(4):529-40.
69. Lechner MS, Schultz DC, Negorev D, Maul GG, Rauscher FJ, 3rd. The mammalian heterochromatin protein 1 binds diverse nuclear proteins through a common motif that targets the chromoshadow domain. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Jun 17;331(4):929-37.
70. Li Y, Kirschmann DA, Wallrath LL. Does heterochromatin protein 1 always follow code? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Dec 10;99 Suppl 4:16462-9.



71. Pak DT, Pflumm M, Chesnokov I, Huang DW, Kellum R, Marr J, et al. Association of the origin recognition complex with heterochromatin and HP1 in higher eukaryotes. *Cell*. 1997 Oct 31;91(3):311-23.
72. Wang G, Ma A, Chow CM, Horsley D, Brown NR, Cowell IG, et al. Conservation of heterochromatin protein 1 function. *Mol Cell Biol*. 2000 Sep;20(18):6970-83.
73. Ainsztein AM, Kandels-Lewis SE, Mackay AM, Earnshaw WC. INCENP centromere and spindle targeting: identification of essential conserved motifs and involvement of heterochromatin protein HP1. *J Cell Biol*. 1998 Dec 28;143(7):1763-74.
74. Eissenberg JC, Ge YW, Hartnett T. Increased phosphorylation of HP1, a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*, is correlated with heterochromatin assembly. *J Biol Chem*. 1994 Aug 19;269(33):21315-21.
75. Badugu R, Yoo Y, Singh PB, Kellum R. Mutations in the heterochromatin protein 1 (HP1) hinge domain affect HP1 protein interactions and chromosomal distribution. *Chromosoma*. 2005 Feb;113(7):370-84.
76. Badugu R, Shareef MM, Kellum R. Novel *Drosophila* heterochromatin protein 1 (HP1)/origin recognition complex-associated protein (HOAP) repeat motif in HP1/HOAP interactions and chromocenter associations. *J Biol Chem*. 2003 Sep 5;278(36):34491-8.
77. Shareef MM, King C, Damaj M, Badugu R, Huang DW, Kellum R. *Drosophila* heterochromatin protein 1 (HP1)/origin recognition complex (ORC) protein is associated with HP1 and ORC and functions in heterochromatin-induced silencing. *Mol Biol Cell*. 2001 Jun;12(6):1671-85.
78. Landis G, Kelley R, Spradling AC, Tower J. The k43 gene, required for chorion gene amplification and diploid cell chromosome replication, encodes the *Drosophila* homolog of yeast origin recognition complex subunit 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 15;94(8):3888-92.
79. Bell SP, Kobayashi R, Stillman B. Yeast origin recognition complex functions in transcription silencing and DNA replication. *Science*. 1993 Dec 17;262(5141):1844-9.



80. Foss M, McNally FJ, Laurenson P, Rine J. Origin recognition complex (ORC) in transcriptional silencing and DNA replication in *S. cerevisiae*. *Science*. 1993 Dec 17;262(5141):1838-44.
81. Gardner KA, Rine J, Fox CA. A region of the Sir1 protein dedicated to recognition of a silencer and required for interaction with the Orc1 protein in *saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 1999 Jan;151(1):31-44.
82. Micklem G, Rowley A, Harwood J, Nasmyth K, Diffley JF. Yeast origin recognition complex is involved in DNA replication and transcriptional silencing. *Nature*. 1993 Nov 4;366(6450):87-9.
83. Sharp JA, Krawitz DC, Gardner KA, Fox CA, Kaufman PD. The budding yeast silencing protein Sir1 is a functional component of centromeric chromatin. *Genes Dev*. 2003 Oct 1;17(19):2356-61.
84. Moazed D, Kistler A, Axelrod A, Rine J, Johnson AD. Silent information regulator protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*: a SIR2/SIR4 complex and evidence for a regulatory domain in SIR4 that inhibits its interaction with SIR3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Mar 18;94(6):2186-91.
85. Kourmouli N, Theodoropoulos PA, Dialynas G, Bakou A, Politou AS, Cowell IG, et al. Dynamic associations of heterochromatin protein 1 with the nuclear envelope. *Embo J*. 2000 Dec 1;19(23):6558-68.
86. Weierich C, Brero A, Stein S, von Hase J, Cremer C, Cremer T, et al. Three-dimensional arrangements of centromeres and telomeres in nuclei of human and murine lymphocytes. *Chromosome Res*. 2003;11(5):485-502.
87. Dietzel S, Zolghadr K, Hepperger C, Belmont AS. Differential large-scale chromatin compaction and intranuclear positioning of transcribed versus non-transcribed transgene arrays containing beta-globin regulatory sequences. *J Cell Sci*. 2004 Sep 1;117(Pt 19):4603-14.



88. Dialynas GK, Makatsori D, Kourmouli N, Theodoropoulos PA, McLean K, Terjung S, et al. Methylation-independent binding to histone H3 and cell cycle-dependent incorporation of HP1beta into heterochromatin. *J Biol Chem*. 2006 May 19;281(20):14350-60.
89. Polioudaki H, Kourmouli N, Drosou V, Bakou A, Theodoropoulos PA, Singh PB, et al. Histones H3/H4 form a tight complex with the inner nuclear membrane protein LBR and heterochromatin protein 1. *EMBO Rep*. 2001 Oct;2(10):920-5.
90. Ye Q, Callebaut I, Pezhman A, Courvalin JC, Worman HJ. Domain-specific interactions of human HP1-type chromodomain proteins and inner nuclear membrane protein LBR. *J Biol Chem*. 1997 Jun 6;272(23):14983-9.
91. Bernard P, Maure JF, Partridge JF, Genier S, Javerzat JP, Allshire RC. Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. *Science*. 2001 Dec 21;294(5551):2539-42.
92. Ekwall K, Javerzat JP, Lorentz A, Schmidt H, Cranston G, Allshire R. The chromodomain protein Swi6: a key component at fission yeast centromeres. *Science*. 1995 Sep 8;269(5229):1429-31.
93. Nonaka N, Kitajima T, Yokobayashi S, Xiao G, Yamamoto M, Grewal SI, et al. Recruitment of cohesin to heterochromatic regions by Swi6/HP1 in fission yeast. *Nat Cell Biol*. 2002 Jan;4(1):89-93.
94. Dutrillaux B, Gerbault-Seureau M, Zafrani B. Characterization of chromosomal anomalies in human breast cancer. A comparison of 30 paradiploid cases with few chromosome changes. *Cancer Genet Cytogenet*. 1990 Oct 15;49(2):203-17.
95. Komitowski D, Janson C. Quantitative features of chromatin structure in the prognosis of breast cancer. *Cancer*. 1990 Jun 15;65(12):2725-30.
96. Umbricht C, Oberholzer M, Gschwind R, Christen H, Torhorst J. Prognostic significance (relapse, non-relapse) of nuclear shape parameters in lymph node negative breast cancer. *Anal Cell Pathol*. 1989 Feb;1(1):11-23.



97. Kirschmann DA, Lininger RA, Gardner LM, Seftor EA, Odero VA, Ainsztein AM, et al. Down-regulation of HP1Hsalpha expression is associated with the metastatic phenotype in breast cancer. *Cancer Res.* 2000 Jul 1;60(13):3359-63.
98. Seeler JS, Marchio A, Sitterlin D, Transy C, Dejean A. Interaction of SP100 with HP1 proteins: a link between the promyelocytic leukemia-associated nuclear bodies and the chromatin compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jun 23;95(13):7316-21.
99. Worman HJ, Evans CD, Blobel G. The lamin B receptor of the nuclear envelope inner membrane: a polytopic protein with eight potential transmembrane domains. *J Cell Biol.* 1990 Oct;111(4):1535-42.
100. Worman HJ, Yuan J, Blobel G, Georgatos SD. A lamin B receptor in the nuclear envelope. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Nov;85(22):8531-4.
101. Holmer L, Pezhman A, Worman HJ. The human lamin B receptor/sterol reductase multigene family. *Genomics.* 1998 Dec 15;54(3):469-76.
102. Schuler E, Lin F, Worman HJ. Characterization of the human gene encoding LBR, an integral protein of the nuclear envelope inner membrane. *J Biol Chem.* 1994 Apr 15;269(15):11312-7.
103. Simos G, Georgatos SD. The inner nuclear membrane protein p58 associates in vivo with a p58 kinase and the nuclear lamins. *Embo J.* 1992 Nov;11(11):4027-36.
104. Simos G, Georgatos SD. The lamin B receptor-associated protein p34 shares sequence homology and antigenic determinants with the splicing factor 2-associated protein p32. *FEBS Lett.* 1994 Jun 13;346(2-3):225-8.
105. Nikolakaki E, Simos G, Georgatos SD, Giannakouros T. A nuclear envelope-associated kinase phosphorylates arginine-serine motifs and modulates interactions between the lamin B receptor and other nuclear proteins. *J Biol Chem.* 1996 Apr 5;271(14):8365-72.
106. Papoutsopoulou S, Nikolakaki E, Giannakouros T. SRPK1 and LBR protein kinases show identical substrate specificities. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Feb 24;255(3):602-7.



107. Simos G, Maison C, Georgatos SD. Characterization of p18, a component of the lamin B receptor complex and a new integral membrane protein of the avian erythrocyte nuclear envelope. *J Biol Chem.* 1996 May 24;271(21):12617-25.
108. Meier J, Georgatos SD. Type B lamins remain associated with the integral nuclear envelope protein p58 during mitosis: implications for nuclear reassembly. *Embo J.* 1994 Apr 15;13(8):1888-98.
109. Chaudhary N, Courvalin JC. Stepwise reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis. *J Cell Biol.* 1993 Jul;122(2):295-306.
110. Collas P, Courvalin JC, Poccia D. Targeting of membranes to sea urchin sperm chromatin is mediated by a lamin B receptor-like integral membrane protein. *J Cell Biol.* 1996 Dec;135(6 Pt 2):1715-25.
111. Ellenberg J, Siggia ED, Moreira JE, Smith CL, Presley JF, Worman HJ, et al. Nuclear membrane dynamics and reassembly in living cells: targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis. *J Cell Biol.* 1997 Sep 22;138(6):1193-206.
112. Foisner R, Gerace L. Integral membrane proteins of the nuclear envelope interact with lamins and chromosomes, and binding is modulated by mitotic phosphorylation. *Cell.* 1993 Jul 2;73(7):1267-79.
113. Martin L, Crimando C, Gerace L. cDNA cloning and characterization of lamina-associated polypeptide 1C (LAP1C), an integral protein of the inner nuclear membrane. *J Biol Chem.* 1995 Apr 14;270(15):8822-8.
114. Maison C, Pyrpasopoulou A, Theodoropoulos PA, Georgatos SD. The inner nuclear membrane protein LAP1 forms a native complex with B-type lamins and partitions with spindle-associated mitotic vesicles. *Embo J.* 1997 Aug 15;16(16):4839-50.
115. Yang L, Guan T, Gerace L. Integral membrane proteins of the nuclear envelope are dispersed throughout the endoplasmic reticulum during mitosis. *J Cell Biol.* 1997 Jun 16;137(6):1199-210.



116. Dechat T, Korbei B, Vaughan OA, Vlcek S, Hutchison CJ, Foisner R. Lamina-associated polypeptide 2alpha binds intranuclear A-type lamins. *J Cell Sci.* 2000 Oct;113 Pt 19:3473-84.
117. Nagano A, Koga R, Ogawa M, Kurano Y, Kawada J, Okada R, et al. Emerin deficiency at the nuclear membrane in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet.* 1996 Mar;12(3):254-9.
118. Cartegni L, di Barletta MR, Barresi R, Squarzoni S, Sabatelli P, Maraldi N, et al. Heart-specific localization of emerin: new insights into Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 1997 Dec;6(13):2257-64.
119. Squarzoni S, Sabatelli P, Capanni C, Petrini S, Ognibene A, Toniolo D, et al. Emerin presence in platelets. *Acta Neuropathol (Berl).* 2000 Sep;100(3):291-8.
120. Clements L, Manilal S, Love DR, Morris GE. Direct interaction between emerin and lamin A. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Jan 27;267(3):709-14.
121. Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S, Becane HM, Hammouda EH, Merlini L, et al. Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet.* 1999 Mar;21(3):285-8.
122. Lin F, Blake DL, Callebaut I, Skerjanc IS, Holmer L, McBurney MW, et al. MAN1, an inner nuclear membrane protein that shares the LEM domain with lamina-associated polypeptide 2 and emerin. *J Biol Chem.* 2000 Feb 18;275(7):4840-7.
123. Lin F, Morrison JM, Wu W, Worman HJ. MAN1, an integral protein of the inner nuclear membrane, binds Smad2 and Smad3 and antagonizes transforming growth factor-beta signaling. *Hum Mol Genet.* 2005 Feb 1;14(3):437-45.
124. Hoffmann K, Dreger CK, Olins AL, Olins DE, Shultz LD, Lucke B, et al. Mutations in the gene encoding the lamin B receptor produce an altered nuclear morphology in granulocytes (Pelger-Huet anomaly). *Nat Genet.* 2002 Aug;31(4):410-4.



125. Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, Gott B, Samuels R, Schweitzer PA, et al. Mutations at the mouse ichthyosis locus are within the lamin B receptor gene: a single gene model for human Pelger-Huet anomaly. *Hum Mol Genet.* 2003 Jan 1;12(1):61-9.
126. Waterham HR, Koster J, Mooyer P, Noort Gv G, Kelley RI, Wilcox WR, et al. Autosomal recessive HEM/Greenberg skeletal dysplasia is caused by 3 beta-hydroxysterol delta 14-reductase deficiency due to mutations in the lamin B receptor gene. *Am J Hum Genet.* 2003 Apr;72(4):1013-7.
127. Bione S, Maestrini E, Rivella S, Mancini M, Regis S, Romeo G, et al. Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet.* 1994 Dec;8(4):323-7.
128. Ben Yaou R, Muchir A, Arimura T, Massart C, Demay L, Richard P, et al. Genetics of laminopathies. *Novartis Found Symp.* 2005;264:81-90; discussion -7, 227-30.
129. Vergnes L, Peterfy M, Bergo MO, Young SG, Reue K. Lamin B1 is required for mouse development and nuclear integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jul 13;101(28):10428-33.
130. Pyrpasopoulou A, Meier J, Maison C, Simos G, Georgatos SD. The lamin B receptor (LBR) provides essential chromatin docking sites at the nuclear envelope. *Embo J.* 1996 Dec 16;15(24):7108-19.
131. Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene.* 1988 Jul 15;67(1):31-40.
132. Georgatos SD, Blobel G. Lamin B constitutes an intermediate filament attachment site at the nuclear envelope. *J Cell Biol.* 1987 Jul;105(1):117-25.
133. Maison C, Horstmann H, Georgatos SD. Regulated docking of nuclear membrane vesicles to vimentin filaments during mitosis. *J Cell Biol.* 1993 Dec;123(6 Pt 1):1491-505.
134. Bohm L, Crane-Robinson C. Proteases as structural probes for chromatin: the domain structure of histones. *Biosci Rep.* 1984 May;4(5):365-86.



135. Ausio J, Dong F, van Holde KE. Use of selectively trypsinized nucleosome core particles to analyze the role of the histone "tails" in the stabilization of the nucleosome. *J Mol Biol.* 1989 Apr 5;206(3):451-63.
136. Fletcher TM, Hansen JC. Core histone tail domains mediate oligonucleosome folding and nucleosomal DNA organization through distinct molecular mechanisms. *J Biol Chem.* 1995 Oct 27;270(43):25359-62.
137. Chang L, Loranger SS, Mizzen C, Ernst SG, Allis CD, Annunziato AT. Histones in transit: cytosolic histone complexes and diacetylation of H4 during nucleosome assembly in human cells. *Biochemistry.* 1997 Jan 21;36(3):469-80.
138. Gruss C, Wu J, Koller T, Sogo JM. Disruption of the nucleosomes at the replication fork. *Embo J.* 1993 Dec;12(12):4533-45.
139. Cheutin T, Gorski SA, May KM, Singh PB, Misteli T. In vivo dynamics of Swi6 in yeast: evidence for a stochastic model of heterochromatin. *Mol Cell Biol.* 2004 Apr;24(8):3157-67.
140. Makatsori D, Kourmouli N, Polioudaki H, Shultz LD, McLean K, Theodoropoulos PA, et al. The inner nuclear membrane protein lamin B receptor forms distinct microdomains and links epigenetically marked chromatin to the nuclear envelope. *J Biol Chem.* 2004 Jun 11;279(24):25567-73.
141. Oohara I, Wada A. Spectroscopic studies on histone-DNA interactions. II. Three transitions in nucleosomes resolved by salt-titration. *J Mol Biol.* 1987 Jul 20;196(2):399-411.
142. Oohara I, Wada A. Spectroscopic studies on histone-DNA interactions. I. The interaction of histone (H2A, H2B) dimer with DNA: DNA sequence dependence. *J Mol Biol.* 1987 Jul 20;196(2):389-97.
143. Yager TD, van Holde KE. Dynamics and equilibria of nucleosomes at elevated ionic strength. *J Biol Chem.* 1984 Apr 10;259(7):4212-22.
144. Luger K, Hansen JC. Nucleosome and chromatin fiber dynamics. *Curr Opin Struct Biol.* 2005 Apr;15(2):188-96.



145. Oudet P, Germond JE, Sures M, Gallwitz D, Bellard M, Chambon P. Nucleosome structure I: all four histones, H2A, H2B, H3, and H4, are required to form a nucleosome, but an H3-H4 subnucleosomal particle is formed with H3-H4 alone. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1978;42 Pt 1:287-300.
146. Harris JR, Brown JN. Fractionation of the avian erythrocyte: an ultrastructural study. *J Ultrastruct Res.* 1971 Jul;36(1):8-23.
147. Harris JR. The biochemistry and ultrastructure of the nuclear envelope. *Biochim Biophys Acta.* 1978 Apr 10;515(1):55-104.
148. Fischle W, Wang Y, Allis CD. Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol.* 2003 Apr;15(2):172-83.
149. Zhang K, Tang H. Analysis of core histones by liquid chromatography-mass spectrometry and peptide mapping. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003 Jan 5;783(1):173-9.
150. Zhang K, Tang H, Huang L, Blankenship JW, Jones PR, Xiang F, et al. Identification of acetylation and methylation sites of histone H3 from chicken erythrocytes by high-accuracy matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight, matrix-assisted laser desorption ionization-postsource decay, and nanoelectrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Biochem.* 2002 Jul 15;306(2):259-69.
151. Zhang L, Eugeni EE, Parthun MR, Freitas MA. Identification of novel histone post-translational modifications by peptide mass fingerprinting. *Chromosoma.* 2003 Aug;112(2):77-86.
152. Kourmouli N, Jeppesen P, Mahadevhaiah S, Burgoyne P, Wu R, Gilbert DM, et al. Heterochromatin and tri-methylated lysine 20 of histone H4 in animals. *J Cell Sci.* 2004 May 15;117(Pt 12):2491-501.
153. Lehnertz B, Ueda Y, Derijck AA, Braunschweig U, Perez-Burgos L, Kubicek S, et al. Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr Biol.* 2003 Jul 15;13(14):1192-200.



154. Jacobs SA, Taverna SD, Zhang Y, Briggs SD, Li J, Eissenberg JC, et al. Specificity of the HP1 chromo domain for the methylated N-terminus of histone H3. *Embo J*. 2001 Sep 17;20(18):5232-41.
155. Mateescu B, England P, Halgand F, Yaniv M, Muchardt C. Tethering of HP1 proteins to chromatin is relieved by phosphoacetylation of histone H3. *EMBO Rep*. 2004 May;5(5):490-6.
156. Flaus A, Owen-Hughes T. Mechanisms for ATP-dependent chromatin remodelling: farewell to the tuna-can octamer? *Curr Opin Genet Dev*. 2004 Apr;14(2):165-73.
157. Korber P, Horz W. In vitro assembly of the characteristic chromatin organization at the yeast PHO5 promoter by a replication-independent extract system. *J Biol Chem*. 2004 Aug 13;279(33):35113-20.
158. Kimura H, Cook PR. Kinetics of core histones in living human cells: little exchange of H3 and H4 and some rapid exchange of H2B. *J Cell Biol*. 2001 Jun 25;153(7):1341-53.
159. Martins SB, Eide T, Steen RL, Jahnsen T, Skalhegg BS, Collas P. HA95 is a protein of the chromatin and nuclear matrix regulating nuclear envelope dynamics. *J Cell Sci*. 2000 Nov;113 Pt 21:3703-13.
160. Ye Q, Worman HJ. Interaction between an integral protein of the nuclear envelope inner membrane and human chromodomain proteins homologous to *Drosophila* HP1. *J Biol Chem*. 1996 Jun 21;271(25):14653-6.

