



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

(16)

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
“ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ”**

**ΠΡΟΤΥΠΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ, ΜΑΚΡΟΜΟΡΙΑΚΗ ΣΥΓΚΡΟΤΗΣΗ ΚΑΙ
ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΕΤΕΡΟΧΡΩΜΑΤΙΝΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ
1(HP1) ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥΣ ΤΥΠΟΥΣ**

**ΡΗΤΟΥ ΕΛΕΝΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2007



«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. Ρήτου Ελένης: 2-10-2002

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής επιτροπής: 2-10-2002 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

Σύρρου Μαρίκα Επίκουρη Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας –Ιατρικής Γενετικής, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος

Ανάγνου Νικόλαος Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, - μέλος

ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΜΕΛΟΥΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ: 8-9-2004

Γεωργάτος Σπυρίδων Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, επιβλέπων

Σύρρου Μαρίκα Επίκουρη Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας –Ιατρικής Γενετικής, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος

Μπάη Μαρία Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ορισμός Θέματος: 2-10-2002

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

Φώτης Θεόδωρος

Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων



Λαζαρίδης Ιωάννης

Ανακληρωτής Καθηγητής Γενικής Βιολογίας Ιατρικής
Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μπάη Μαρία

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Κούκλης Παναγιώτης

Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Σύρρου Μαρίκα

Επίκουρη Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας –Ιατρικής
Γενετικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου
Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 28-9-2007

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Γουδέβενος Ιωάννης

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας



Αφιερωμένο στους γονείς μου,
στον Γιώργο, στη Λίλια,
στον Μιχάλη και στη Χριστίνα



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και χρηματοδοτήθηκε στα πλαίσια του Έργου 01ΕΑΔ56, ΠΕΝΕΔ 2001.

Η επίβλεψη της παρούσας μελέτης έγινε από τον καθηγητή κ. Σπύρο Γεωργάτο, τον οποίο ευχαριστώ θερμά για την καθοριστική του συμβολή καθόλη τη διάρκεια της εργασίας αυτής. Θέλω επίσης να ευχαριστήσω την αναπληρώτρια καθηγήτρια κα. Μαίρη Μπάη, μέλος της τριμελούς μου επιτροπής, για το συνεχές ενδιαφέρον που επέδειξε για την εξέλιξη της παρούσας μελέτης, καθώς και για τον χρόνο που διέθεσε για την αξιολόγηση των δειγμάτων. Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον κ. Άγγελο Σκύρλα και τον καθηγητή κ. Παναγιώτη Καναβαρο για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Ευχαριστώ επίσης ΟΛΑ τα μέλη των Εργαστηρίων: Γενικής Βιολογίας, Βιολογικής Χημείας και Παθολογικής Ανατομίας για την άψογη συνεργασία τους. Δεν θα ήθελα να παραλείψω το προσωπικό των Εργαστηρίων Κυτταρικής Βιολογίας και Αιματολογικού του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων για την βοήθεια τους. Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να απευθύνω στον κ. Γιώργο Βαρθολομάτο για την εγκάρδια συνεργασία του.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τους συναδέλφους μου (Βασιλική, Γιάννη, Γιολάντα, Γιώργο, Δημήτρα, Κατερίνα, Μαρία, Νατάσσα και Παναγιώτα) καθώς και τον Δήμο, τον Δημήτρη, τον Πέτρο, τον Γοργι, τον Άγγελο την Αθηνά και την Παρασκευή.

Τέλος, θα να ευχαριστήσω την αναπληρώτρια καθηγήτρια κα. Μαρία Φράγκου για τη βοήθεια της και για την ηθική και ψυχολογική υποστήριξη καθώς επίσης και τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Γιάννη Λαζαρίδη.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	Εισαγωγή	3
1.1	HP1 πρωτεΐνες	4
1.1.1	HP1 ονοματολογία	5
1.1.2	Οργάνωση των HP1 γονιδίων	6
1.1.3	Δομή των HP1 πρωτεϊνών	7
1.1.4	Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της HP1	12
1.1.5	Υπο-πυρηνική κατανομή και λειτουργία των HP1 πρωτεϊνών	14
1.2	HP1 και καρκίνος	23
1.3	Σκοπός της παρούσας μελέτης	26
2	Υλικά και μέθοδοι	27
2.1	Αντισώματα	27
2.2	«Μετα-ανάλυση»	28
2.3	Στατιστική ανάλυση	29
2.4	Μορφομετρική ανάλυση	29
2.5	Μικροσκοπία	29
2.6	Μοριακές μέθοδοι	29
2.6.1	Απομόνωση RNA και RT-PCR	29
2.6.2	PCR	29
2.7	Βιοχημικές μέθοδοι	30
2.7.1	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης	30
2.7.2	Ανάλυση πρωτεϊνών	30
2.7.3	Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western	31
2.8	Μορφολογικές μέθοδοι	31
2.8.1	Έμμεσος ανοσοφθορισμός	31
2.8.2	Ανοσοϊστοχημεία	32
2.9	Μέθοδοι καλλιέργειας κυττάρων	32
2.10	Επίδραση με μιτογονικούς παράγοντες	33
2.11	Ταυτοποίηση των διαιρούμενων κυττάρων	33
2.12	Παρασκευαστικές μέθοδοι	34
2.12.1	Κυτταρικά εκχυλίσματα	34
2.12.2	Απομόνωση ανθρώπινων PBLs με βαθμίδωση φικόλης	34
3	Αποτελέσματα	35
3.1	Έκφραση και κατανομή της HP1 σε κύτταρα και ιστούς	35
3.2	Έκφραση και κατανομή των HP1 πρωτεϊνών κατά τη διαφοροποίηση	63
3.3	HP1 και κακοήγη νεοπλάσματα	68
3.3.1	Ανοσοϊστοχημική έκφραση των HP1 σε λεμφώματα	68
3.3.2	Ανοσοϊστοχημική έκφραση των HP1 σε DLBCL	69
3.4	HP1 και καρκίνος του μαστού	76
4	Συζήτηση	81
	Συμπεράσματα	86
4.1	Περίληψη	87
4.2	Summary	88
5	Βιβλιογραφία	89



1. Εισαγωγή

Στον πυρήνα των ευκαρυωτικών κυττάρων η γενετική πληροφορία αποθηκεύεται ως νουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο, την χρωματίνη. Η δομή και η σύσταση της χρωματίνης είναι πολύ σημαντική για τη επιδιόρθωση του DNA, τη μεταγραφή και άλλες διαδικασίες που αφορούν στη γενετική πληροφορία, καθώς περίπου 2m DNA πρέπει να συμπτυχθούν σε καλά οργανωμένες, αλλά ταυτόχρονα, «δυναμικές» δομές, έτσι ώστε, όταν παραστεί ανάγκη να είναι εφικτή η επιλεκτική πρόσβαση συγκεκριμένων περιοχών. Η «δυναμική» της χρωματίνης υπαγορεύεται από αλλαγές στα συστατικά της στοιχεία (π.χ την παρουσία καταστολέων, ενεργοποιητών, συμπλόκων που διαμορφώνουν την χρωματινική ίνα ή/και των δομικών της στοιχείων) καθώς και από ομοιοπολικές τροποποιήσεις των παραπάνω χρωματινικών συστατικών (όπως μεθυλίωση του DNA και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών).

Οι ιστονικές τροποποιήσεις μπορούν να επηρεάσουν την προσβασιμότητα του DNA και να αποτελέσουν θέση πρόσδεσης πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε άλλες διαδικασίες, όπως η περαιτέρω συμπύκνωση της χρωματινικής ίνας και η μεταγραφή.

Διατηρημένες δομές όπως οι Bromo, Tudor, PHD και Chromo domains (που καταλύουν ή αναγνωρίζουν ιστονικές τροποποιήσεις) αποτελούν τον λειτουργικό «πυρήνα» των παραπάνω πρωτεϊνών (Daniel et al., 2005). Ο χρωμοτομέας (CD, Chromo domain) είναι μια από τις πιο ευρέως απαντώμενες, πολυ-λειτουργικές δομές (Ball et al., 1997 και Singh et al., 1991). Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, υπάρχουν περισσότερες από 12 οικογένειες πρωτεϊνών που διαθέτουν CD, μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνονται ένζυμα, διαμορφωτές της χρωματίνης και τροποποιητές της γονιδιακής έκφρασης, όπως η ετεροχρωματινική πρωτεΐνη 1 (HP1; για ανασκόπηση βλέπε Tajul-Arifin et al., 2003).



1.1 HP1 πρωτεΐνες

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η HP1 ανήκει σε μια οικογένεια πρωτεϊνών που εμπεριέχεται στην υπερ-οικογένεια των πρωτεϊνών που διαθέτουν CD. Επιπλέον, τα μέλη της HP1 οικογένειας διαθέτουν μια δεύτερη διατηρημένη δομή τον σκιάδη χρωμοτομέα (CSD, chromoshadow domain). Μέσω των CD και CSD η HP1 αλληλεπιδρά με ένα μεγάλο φάσμα διαμορφωτών και δομικών στοιχείων της χρωματίνης (chromatin remodelers, ιστόνη H3, για ανασκόπηση βλέπε Singh and Georgatos, 2003) επηρεάζοντας την χρωματινική οργάνωση και τη γονιδιακή ρύθμιση.

Η HP1 ανακαλύφθηκε στη *Drosophila melanogaster* και οφείλει την ονομασία της στην (κατά μεγάλο μέρος) εντόπιση της στις ετεροχρωματινικές περιοχές (James and Elgin, 1986). Χαρακτηρίστηκε ως τροποποιητής (dominant suppressor) του PEV (Position Effect Variegation, φαινόμενο επίδρασης θέσεως ή αποσιώπηση μωσαϊκού τύπου). Είναι γνωστό ότι χρωμοσωμικός ανασυνδυασμός ή μετάθεση μπορούν να αλλάξουν το χρωματινικό περιβάλλον των γονιδίων. Έτσι, ένα γονίδιο που φυσιολογικά βρίσκεται σε ευχρωματινική περιοχή μπορεί να βρεθεί σε ετεροχρωματινικό περιβάλλον. Στην περίπτωση αυτή το γονίδιο αποσιωπάται. Μεταλλάξεις του γονιδίου της HP1 καταστέλλουν την απενεργοποιητική δράση της ετεροχρωματίνης κατά την γονιδιακή αποσιώπηση μωσαϊκού τύπου, ενώ υπερ-έκφραση της HP1 ενισχύει το φαινόμενο PEV (James and Elgin, 1986; James et al., 1989, Eissenberg et al., 1992 και Eissenberg et al., 1990). Μεταγενέστερες μελέτες στη *Drosophila* έδειξαν ότι HP1 εντοπίζεται επίσης στα τελομερή και συμβάλλει στη σταθερότητα των χρωμοσωμάτων. Μεταλλάξεις που οδηγούν σε απώλεια λειτουργικότητας της HP1 προκαλούν λανθασμένο/μη-φυσιολογικό διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων (Fanti et al., 1998).



Εκτός από ετεροχρωματινική εντόπιση (περι-κεντρομεριδιακή και τελομεριδιακή) έχειδειχτεί πλέον ότι μέλη των HP1 πρωτεϊνών εντοπίζονται επίσης σε ευχρωματινικές περιοχές του γονιδιώματος.

Διάφορες παραλλαγές αυτής της πρωτεΐνης έχουν βρεθεί σχεδόν σε όλο το ζωικό βασίλειο, από τους πιο απλούς έως τους πιο σύνθετους οργανισμούς (James and Elgin, 1986, Singh et al., 1991, για ανασκόπηση βλέπε Jones et al., 2000). Επιπλέον, ανάλογα με τον οργανισμό εντοπίζονται μια ή και περισσότερες HP1 ισομορφές. Για παράδειγμα, ο σχιζομύκητας (*S. pombe*) διαθέτει μια ισομορφή ενώ το *Dictyostelium* και το ποντίκι δύο και τρεις ισομορφές, αντίστοιχα (Eissenberg and Elgin 2000, Li et al., 2002 και Lomberg et al., 2006).

1.1.1 HP1 ονοματολογία

Για ιστορικούς λόγους, οι HP1 πρωτεΐνες αναφέρονται ως HP1α, HP1β και HP1γ στον άνθρωπο, HPL-1 και HPL-2 στο *C. Elegans*, HP1a, HP1b και HP1c στην *Drosophila* και ως Swi6 στον *S. Pombe* (Πίνακας 1.1.1-1).

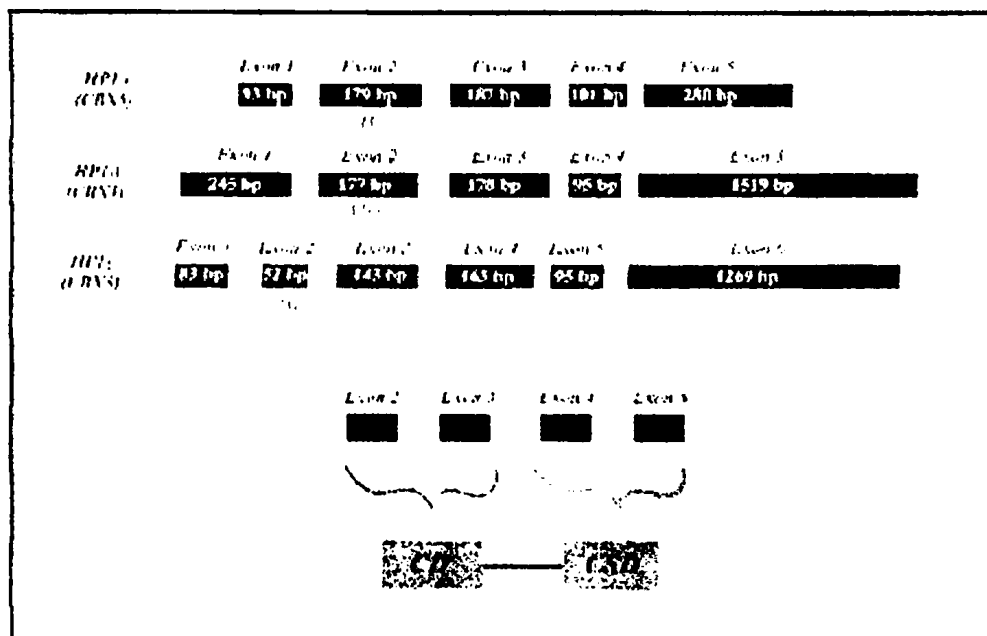
ΟΝΟΜΑ	ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ	ΜΕΓΕΘΟΣ (α.α)
Swi6	<i>S. pombe</i>	328
Hhp1p	<i>T. thermophila</i>	184
pch11	<i>P. citri</i>	173
pch12	<i>P. citri</i>	194
OnHP1	<i>D. virilis</i>	213
Xhp1α	<i>X. laevis</i>	141
Xhp1γ	<i>X. laevis</i>	171
mHP1α	<i>M. musculus</i>	191
M31 MoMOD1	<i>M. musculus</i>	185
M32 MoMOD2	<i>M. musculus</i>	173

Πίνακας 1.1.1-1 Ονοματολογία των HP1 πρωτεϊνών σε διάφορους οργανισμούς (Eissenberg and Elgin, 2000).



1.1.2 Οργάνωση των HP1 γονιδίων

Η οικογένεια των HP1 πρωτεϊνών κωδικοποιείται από τα *CBX* (chromobox) γονίδια (NCBI GeneBank). Η δομική οργάνωση των HP1 γονιδίων είναι διατηρημένη και παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα από την *Drosophila* έως τα ανώτερα θηλαστικά. Στον άνθρωπο, η HP1 απαντά σε τρεις διαφορετικές ισομορφές (HP1α, HP1β και HP1γ), προϊόντα διακριτών γονιδίων. Το γονίδιο της HP1α (*CBX5*) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 12q13.13, ενώ τα γονίδια της HP1β (*CBX1*) και της HP1γ (*CBX3*) στα χρωμοσώματα 17q21.32 και 7p15.2, αντίστοιχα. Τα γονίδια της HP1α και της HP1β διαθέτουν 5 εξόνια, ενώ το γονίδιο της HP1γ διαθέτει 6. Το σήμα έναρξης της μετάφρασης εντοπίζεται στο εξόνιο 2 και για τις τρεις HP1 ισομορφές. Η γενετική πληροφορία για την CD εμπεριέχεται στα εξόνια 2 και 3, ενώ για την CSD στα εξόνια 4 και 5 (Σχήμα 1.1.2-1).

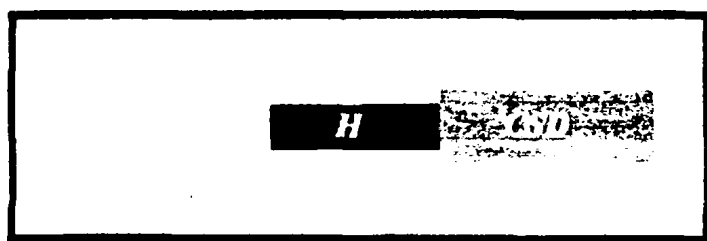


Σχήμα 1.1.2-1 Δομή των ανθρώπινων *CBX* γονιδίων. Το κωδικόνιο έναρξης (ATG) επισημαίνεται με κόκκινα γράμματα. Τα εξόνια που κωδικοποιούν τον CD και CSD επισημαίνονται με μπλε και κόκκινες αγκύλες, αντίστοιχα.

Επιπλέον, υπάρχουν αρκετά ψευδογονίδια (1 για την HP1α, 5 για την HP1β και 11 για την HP1γ), διασκορπισμένα στο ανθρώπινο γονιδίωμα (NCBI GeneBank, Norwood et al., 2004). Τα ψευδογονίδια της HP1β και της HP1γ διαθέτουν ελάχιστα ή καθόλου ιντρόνια, γεγονός που υποδηλώνει ότι έχουν υποστεί (περαιτέρω) εξελικτικές διαφοροποιήσεις. Το ψευδογονίδιο της HP1α εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 3p11.1. Τα ψευδογονίδια της HP1β εντοπίζονται στα χρωμοσώματα 1q32, 3q26, 14q24, Xp22 και Xq11, ενώ τα ψευδογονίδια της HP1γ εντοπίζονται στα χρωμοσώματα 2q24, 3p22, 5q22, 6q22.2, 11p11, 11p14, 11q14, 12p13, 12q23, 16p13 και 18p11.

1.1.3 Δομή των HP1 πρωτεϊνών

Όπως έχει περιγραφεί παραπάνω, οι HP1 πρωτεΐνες περιέχουν δύο δομικά παρόμοιες περιοχές, την CD στο άμινο- και την CSD στο καρβοξύ-τελικό άκρο τους, μεταξύ των οποίων παρεμβάλλεται ένα ενδιάμεσο, συνδετικό τμήμα (hinge) (Σχήμα 1.1.3-1).



Σχήμα 1.1.3-1 Σχηματική απεικόνιση της δομής των HP1 πρωτεϊνών.

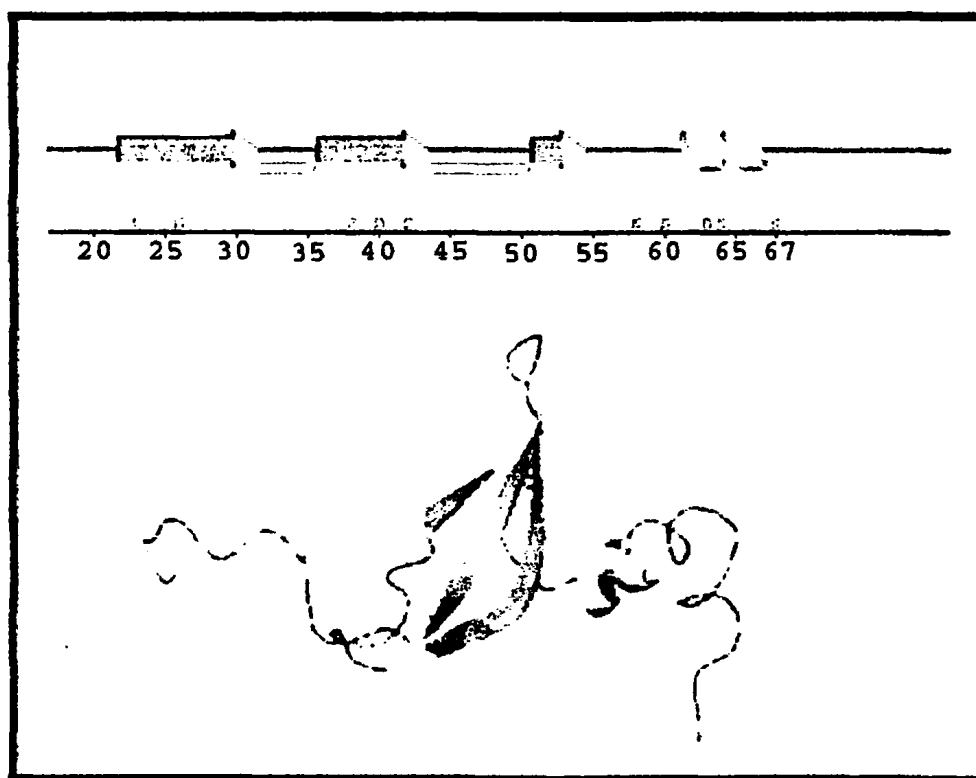
CD: χρωμοτομέας, H: ενδιάμεσο, συνδετικό τμήμα και CSD: σκιάδης χρωμοτομέας.

Οι τρισδιάστατες δομές της CD και της CSD έχουν επιλυθεί με φασματοσκοπία NMR (Ball et al., 1997 και Brasher et al., 2000). Αυτό δεν ισχύει για την hinge περιοχή, η δομή της οποίας δεν έχει ταυτοποιηθεί.

Η CD, είναι μια διατηρημένη περιοχή μεγέθους 30-60 αμινοξέων (Eissenberg, 2001 και Jones et al, 2001). Πρωτο-χαρακτηρίστηκε στις πρωτεΐνες HP1 και Polycomb (Pc) της *Drosophila melanogaster*. Διαθέτει μια καρβοξυτελική α-έλικα ($\alpha 2$) και μια αμινοτελική αντί-παράλληλη



β-πτυχωτή δομή που απαρτίζεται από 3 κλώνους. Στην περίπτωση της CD του ποντικού ένας υδρόφοβος πυρήνας σχηματίζεται από 10 μη-πολικά αμινοξέα (V23, V26, Y38, L40, W42, L58, C60, L63, I64 και L67), που είναι συντηρημένα μεταξύ διάφορων μορφών CD (Σχήμα 1.1.3-2, 3-d δομή της CD). Έξι από αυτά τα αμινοξέα (V23, L40, W42, L58, C60 και L63) εντοπίζονται στη βάση της υδρόφοβης αύλακας που εμπλέκεται σε αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (Le Douarin et al., 1996).

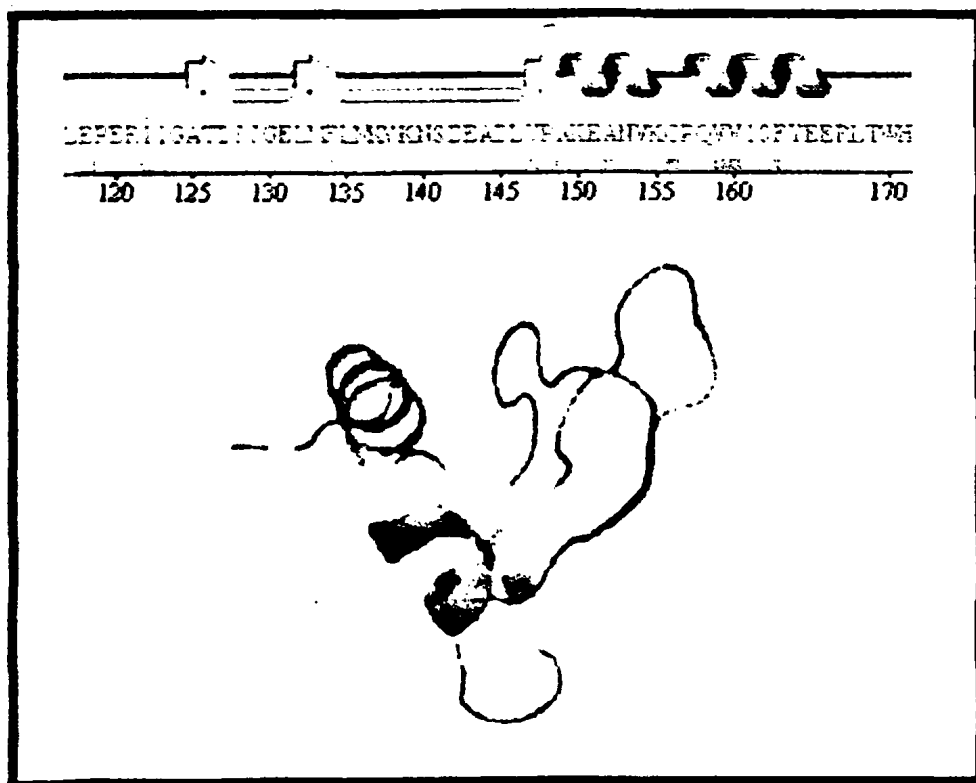


Σχήμα 1.1.3-2 Δομή της CD. Τα μωβ ορθογώνια κάτω από την αλληλουχία επισημαίνουν τα συντηρημένα αμινοξέα του υδρόφοβου πυρήνα της CD.

Η δομή της CD παρουσιάζει ομοιότητα με την περιοχή πρόσδεσης DNA των πρωτεϊνών Sac7c και Sso7d των αρχαιοβακτητηριδίων *S. acidocaldarius* και *S. Solfataricus*, αντίστοιχα. Ωστόσο, παρά την δομική ομοιότητα, σύγκριση των επιφανειακών τους φορτίων αποκάλυψε ότι η επιφάνεια της CD είναι αρνητικά φορτισμένη, πράγμα που δεν ευνοεί την πρόσδεση

του σε νουκλεϊνικά μόρια (DNA ή RNA). Αντίθετα, η CD είναι κατάλληλη για αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης.

Η CSD είναι ένα λειτουργικό μοτίβο που απαντά μόνο στην οικογένεια των HP1 πρωτεϊνών (Σχήμα 1.1.3-3). Η δομική ομοιότητα που παρατηρείται μεταξύ της CD και της CSD υποδηλώνει ότι το γονίδιο της HP1 προήλθε από διπλασιασμό μιας «αρχέγονης» αλληλουχίας που κωδικοποιούσε την CD.



Σχήμα 1.1.3-3 Δομή της CSD. Τα μωβ κουτάκια κάτω από την αλληλουχία επισημαίνουν τα συντηρημένα αμινοξέα του υδρόφοβου πυρήνα της CSD.

Η δομή της CSD είναι συμπαγής και αποτελείται από 3 αντι-παράλληλες β-αλυσίδες που σχηματίζουν μια πτυχωτή επιφάνεια και τοποθετούνται απέναντι από 2 α-έλικες (σε αντίθεση με την CD που διαθέτει μόνο μια α-έλικα).

Μια άλλη διαφορά μεταξύ της CSD και της CD είναι ότι η CSD διμερίζεται *in vitro* και *in vivo*, ενώ στις ίδιες συνθήκες, η CD παραμένει μονομερής. Κατά τον διμερισμό, η α2 έλικα του ενός μονομερούς αλληλεπιδρά με την α2 έλικα του άλλου (Σχήμα 1.1.3-4). Τα αμινοξέα A125, L132, N153, P157, Q158, I161, Y164, L168, T169 και W170 εμπλέκονται στη δημιουργία των επαφών των μονομερών. Στο διμερές, τα αμινοξέα A125, L132, N153, P157, I161, Y164, L168 και W170 εντοπίζονται στη βάση μιας υδρόφοβης αύλακας η οποία χρησιμεύει ως θέση πρόσδεσης πρωτεϊνών που διαθέτουν το πενταπεπτίδιο PxVxL στην αλληλουχία τους.

Μέσω της CSD, μονομερή της HP1 συνδέονται μεταξύ τους και σχηματίζουν ομο- ή ετερο-διμερή ή και πιθανώς υψηλότερης τάξης ολιγομερή (Cowieson et al., 2000, Ye et al., 1997 και Zhao et al., 2000). Τα ολιγομερή αυτά, που αποτελούν και τη λειτουργική μορφή του μορίου στο κυτταρικό περιβάλλον, αλληλεπιδρούν με ένα μεγάλο φάσμα πρωτεϊνών (Πίνακας 2, Li et al., 2002). Πολλές από αυτές τις αλληλεπιδράσεις επιτυγχάνονται μέσω του μοτίβου PxVxL (Brasher et al., 2000, Smothers and Henikoff, 2000)



Σχήμα 1.1.3-4. CSD
διμερισμός μέσω των α2
ελικων.

Η συνδετική (hinge) περιοχή παρουσιάζει την μικρότερη ομολογία σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας τόσο μεταξύ των ίδιων ισομορφών διαφορετικών οργανισμών όσο και μεταξύ διαφορετικών ισομορφών στο ίδιο είδος (Σχήμα 1.1.3-5). Σε αντίθεση με την CD και την CSD η περιοχή αυτή δεν διαθέτει υδρόφοβο «πυρήνα» (που προσδίδει σταθερότητα στις



τριτοταγείς δομές). Εμπεριέχει όμως, μια αρκετά διατηρημένη αλληλουχία από 25 υδρόφιλα αμινοξέα. Μέσα σ' αυτόν τον υδρόφιλο «πυρήνα» έχει χαρακτηριστεί ένα διφυές σήμα πυρηνικού εντοπισμού (bipartite NLS). Το πρώτο σήμα του NLS περιλαμβάνει 2 βασικά αμινοξέα (K ή R). Μεσολαβεί μια αλληλουχία 10 αμινοξέων, ενώ στις επόμενες 5 θέσεις εντοπίζονται αλλά 3 βασικά αμινοξέα που αποτελούν και το δεύτερο σήμα του NLS (Smothers and Henikoff, 2001).

H. sapiens α	KEGENHKPREKSESNNKRSNFSNBSADDIKSKKKRQSNDIARGFE.	74-118
H. sapiens β	HETDKSEGGKRRKADSDSEDKGSESKPKKKKESEKPE....	75-110
H. sapiens γ	KEKDGTKRKSLSDSESDSKSKKKRDAADKP.....	74-104

Σχήμα 1.1.3-5 Σύγκριση των αλληλουχιών της hinge περιοχής των HP1 πρωτεϊνών του ανθρώπου. Η σκίαση αντιστοιχεί στα 25 υδρόφιλα αμινοξέα. Τα αμινοξέα του NLS σήματος επισημαίνονται με μπλε γράμματα (Smothers and Henikoff, 2001).

Στον άνθρωπο, οι τρεις HP1 πρωτεΐνες (HP1α, HP1β και HP1γ) παρουσιάζουν σημαντική ομολογία στο επίπεδο της αμινοξικής τους αλληλουχίας. Συγκριτική ανάλυση των CD και των CSD μεταξύ των τριών ισομορφών έδειξε ότι οι περιοχές αυτές είναι σχεδόν πανομοιότυπες. (Βλέπε Σχήμα 1.1.3-6).

A.	CBX5_CD	YVVEKVL DRRNVK GKVEYLLK WKGFSE EKHITWEPFEHLD CPQIVTMYEERLTWISCPY
	CBX5_CSD	LEIFEKII GATDSC GELHFLIK WKGFDE KDLVLAKKFAIVK CPQIVTMYEERLTWISCPY
	CBX1_CD	YVVEKVL DRRNVK GKVEYLLK WKGFSD EKHITWEPFEHLD CPQIVTMYEERLTWISCPY
	CBX1_CSD	LEIFERII GATDSS GELHFLIK WKGFDE KDLVPAKFAIVK CPQIVTMYEERLTWISCPY
	CBX3_CD	EYVEKVL DRRNVN GKVEYLLK WKGFSD EKHITWEPFEHLD CPQIVTMYEERLTWISCPY
	CBX3_CSD	LDPERII GATDSS GELHFLIK WKGFDE KDLVLAKKFAIVK CPQIVTMYEERLTWISCPY
B.	CBX5_CD	YVVEKVL DRRNVK GKVEYLLK WKGFSE EKHITWEPFEHLD CPQIVTMYEERLTWISCPY
	CBX1_CD	YVVEKVL DRRNVK GKVEYLLK WKGFSD EKHITWEPFEHLD CPQIVTMYEERLTWISCPY
	CBX3_CD	EYVEKVL DRRNVN GKVEYLLK WKGFSD EKHITWEPFEHLD CPQIVTMYEERLTWISCPY
C.	CBX5_CSD	LEIFEKII GATDSC GELHFLIK WKGFDE KDLVPAKFAIVK CPQIVTMYEERLTWISCPY
	CBX1_CSD	LEIFERII GATDSS GELHFLIK WKGFDE KDLVPAKFAIVK CPQIVTMYEERLTWISCPY
	CBX3_CSD	LDPERII GATDSS GELHFLIK WKGFDE KDLVLAKKFAIVK CPQIVTMYEERLTWISCPY

Σχήμα 1.1.3-6. Σύγκριση των CD και CSD της HP1 στον άνθρωπο. (Α) Στοίχιση της αμινοξικής αλληλουχίας της CD με την αλληλουχία της CSD της HP1α (CBX5), HP1β (CBX1) και HP1γ (CBX3). Σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας της CD (B) και της CSD (C) των τριών HP1 ισομορφών. Επισημαίνονται τα αμινοξέα του υδρόφοβου «πυρήνα» (ροζ γράμματα), καθώς και κάποια αμινοξέα που είναι σημαντικά για τη διατήρηση της δομής (πράσινα γράμματα).

1.1.4 Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της HP1

Οι HP1 πρωτεΐνες δεν προσδένονται άμεσα στο DNA (Ball et al., 1997 Singh et al., 1991), μπορούν όμως να αλληλεπιδράσουν με τις ιστόνες H3 και H4 μέσω της CD και CSD, αντίστοιχα. Προκειμένου για την ιστόνη H3, η μεθυλιωμένη λυσίνη 9 (meK9-H3) αποτελεί ειδική θέση πρόσδεσης της CD (Lachner et al., 2001 και Bannister et al., 2001). Κατά την πρόσδεση, το αμινοτελικό άκρο της H3 αποκτά β-διαμόρφωση, τοποθετείται στο ίδιο επίπεδο (αλλά με αντίθετη φορά) προς τους 2 β-κλώνους της CD και έτσι δημιουργείται μια β-πτυχωτή επιφάνεια που αποτελείται από 3 β-κλώνους. Επιπλέον, το μεθυλαμμόνιο της



λυσίνης 9 περιβάλλεται από τις πλευρικές αρωματικές αλυσίδες των αμινοξέων Y28, Y48 και W45 της CD, ενώ τα ιστονικά κατάλοιπα που γειτονεύουν με την K9 αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένες θέσεις της CD. Η παραπάνω αλληλεπίδραση θεωρείται ως ο βασικός (αλλά όχι και ο μοναδικός) μηχανισμός πρόσδεσης των HP1 πρωτεϊνών στην χρωματίνη. Πρέπει να σημειωθεί ότι η πρόσδεση της HP1 σε me_3K9H3 χρωματινικό υπόστρωμα είναι ασθενική (K_D με NMR 2 μ M και K_D με ισοθερμική θερμομετρία 100 μ M). Από αυτό εικάζεται ότι για τη σταθεροποίηση της παραπάνω αλληλεπίδρασης και την ενσωμάτωση της HP1 στην ετεροχρωματίνη χρειάζεται πιθανόν η συμβολή και άλλων «βοηθητικών» παραγόντων (Eskeland, Eberharder and Imhof, 2007).

Εκτός από τις ιστόνες, οι HP1 πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με ένα μεγάλο αριθμό μη-ιστονικών πρωτεϊνών, άμεσα ή έμμεσα (Πίνακας 1.1.4-1, για ανασκόπηση βλέπε Eissenberg and Elgin, 2000, Li et al., 2002 και Lomberg et al., 2006). Κάποιες από αυτές τις αλληλεπιδράσεις είναι ειδικές ως προς τις HP1 ισομορφές και πολλές φορές εξαρτώνται από τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις τους (βλέπε παρακάτω).

Δεδομένου ότι η συντριπτική πλειοψηφία των αλληλεπιδράσεων της HP1 με τις μη-ιστονικές πρωτεΐνες επιτυγχάνεται με της CSD, τα HP1 μόρια έχουν τη δυνατότητα να λειτουργήσουν ως «γέφυρα» μεταξύ ιστονών και μη-ιστονικών πρωτεϊνών. Η ειδική στρατολόγηση μη-ιστονικών πρωτεϊνών στην χρωματίνη αξιοποιεί την σύνδεση της CD της HP1 στην me_3K9H3 , και την επιφάνεια πρόσδεσης που σχηματίζεται μεταξύ δύο CSD κατά τον διμερισμό (Brasher et al., 2000, Nielsen et al., 2001, Cowell et al., 2002, Lachner et al., 2001, Singh and Georgatos, 2002 και Thiru et al., 2004).



ΠΡΩΤΕΙΝΗ	HP1-ΙΣΟΜΟΡΦΗ	ΠΕΡΙΟΧΗ
Transcriptional regulators or chromatin-modifying proteins		
Histone H1	HP1	?
Histone H3	HP1, HP1 ^α , HP1 ^β , HP1 ^γ	XT
MethylK9 Histone H3	Swi6, HP1, HP1 ^α , HP1 ^β , HP1 ^γ	XT
Histone H4	HP1, HP1 ^α	EXT
SUV39H1	HP1, HP1 ^α , HP1 ^β , HP1 ^γ	EXT
Polycomb	HP1 ^α , HP1 ^γ	EXT
DnmUa	HP1 ^α	?
DnmUb	HP1 ^α , HP1 ^β	?
Kap1/TNfr1	HP1 ^α , HP1 ^β , HP1 ^γ	EXT
Rb	HP1 ^α	?
MITR	HP1 ^α	ΣΥΝ. ΠΕΡ.
BRG1	HP1 ^α	EXT
ATR _α	HP1 ^α , HP1 ^β	EXT
TAF ₁₃₀	HP1 ^α , HP1 ^γ	EXT
PRM1	HP1 ^α	EXT
RNA	HP1 ^α , HP1 ^γ	ΣΥΝ. ΠΕΡ.
DNA replication and repair proteins		
CAF-1p150	HP1 ^α , HP1 ^β	EXT
Ku70	HP1 ^α , p130-Rad50-HP1 ^α	EXT, ΣΥΝ. ΠΕΡ.
ORC1-6	HP1	XT, EXT
Other chromatin-associated proteins		
Pic3	Swi6	XT
INCENP	HP1 ^α , HP1 ^γ	ΣΥΝ. ΠΕΡ.
Hsk1/CDC7	Swi6	?
K167	HP1 ^α , HP1 ^β , HP1 ^γ	EXT
SP100	HP1 ^α , HP1 ^β , HP1 ^γ	EXT
Nuclear structure proteins		
Lamin B receptor	HP1 ^α , HP1 ^β , HP1 ^γ	EXT

Πίνακας 1.1.4-1 Παραδείγματα πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τις HP1 (Li et al., 2002).

1.1.5 Υπο-πυρηνική κατανομή και λειτουργία των HP1 πρωτεϊνών

Ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει διερευνήσει τον ρόλο της HP1 στις ετεροχρωματινικές περιοχές του γονιδιώματος. Η παρουσία των HP1 πρωτεϊνών στις περικεντρομεριδιακές περιοχές φαίνεται ότι συμβάλλει στη σωστή λειτουργία των κεντομεριδίων. Μεταλλάξεις στα HP1 γονίδια του σχιζομύκητα *S.pombe* και της *Drosophila* προκαλούν απώλεια συνάφειας μεταξύ των αδελφών χρωματίδων και μη φυσιολογικό διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά τον κυτταρικό κύκλο (Bernard et al., 2001, K. Ekwall et al., 1995,



Nonaka et al., 2002, Obuse et al., 2004, Ainsztein et al., 1998 και Vagnarelli et al., 2001).

Έχει δειχθεί ότι η Swi6 (HP1 του *S. pombe*) αλληλεπιδρά με την υπομονάδα Psc3 του συμπλόκου της κοννεκτικής μέσω της CSD. Η αλληλεπίδραση HP1-Psc3 συμβάλλει στη στοχευμένη εναπόθεση του απαραίτητου αριθμού συμπλόκων στα κεντρομερίδια των αδελφών χρωματίδων. Για την παραπάνω αλληλεπίδραση απαιτείται η φωσφορυλίωση της Swi6 από τον παράγοντα Hsk1-Dfp1 (Bailis et al., 2003).

Εκτός από τα κεντρομερίδια, οι HP1 πρωτεΐνες εντοπίζονται επίσης στα τελομερή. Πειράματα στην *Drosophila* έδειξαν ότι η HP1 χρειάζεται για την προστασία τους, διότι απουσία HP1 παρατηρείται τελομεριδιακή σύντηξη (Fanti et al., 1998). Μεταγενέστερες μελέτες στα θηλαστικά έδειξαν ότι υπερ-έκφραση της HP1α ή HP1β ισομορφής (αλλά όχι της HP1γ) προκαλεί σύντηξη και «συρρίκνωση» των τελομερών, ίσως, εξαιτίας της ελαττωμένης αλληλεπίδρασης των τελομερών με την καταλυτική υπομονάδα της τελομεράσης hTERT (Cenci et al., 2005, Sharma et al., 2003, Song et al., 2001). Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι οι HP1 πρωτεΐνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη χρωματινική οργάνωση των τελομερών και αλλαγές των επιπέδων τους μπορεί να συμβάλλουν στην ανευπλοΐδια και στην τελομεριδιακή σύντηξη.

Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει η αλληλεπίδραση των HP1 με πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου, όπως τον LBR, καθώς εμπλέκει τις HP1 πρωτεΐνες με την πυρηνική οργάνωση. Η αλληλεπίδραση των HP1 με τις πρωτεΐνες της πυρηνικής μεμβράνης, τουλάχιστον σε in vitro πειράματα, μπορεί να συμβάλλει στην συγκρότηση του πυρηνικού φακέλου. Επιπλέον, η HP1 μέσω της αλληλεπίδρασης της με τον LBR, ίσως λειτουργεί ως «συνδετικός κρίκος» που συνδέει την μεταγραφικά-ανενεργή περιφερική ετεροχρωματίνη (Andrulis et al., 1998, Polioudaki et al., 2001 και Pombo et al., 2000) με την εσωτερική πυρηνική μεμβράνη.

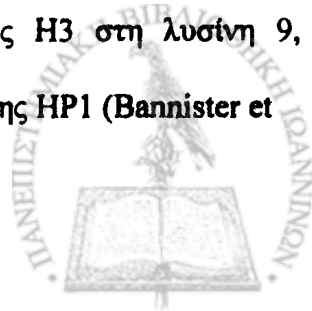
Η HP1 αλληλεπιδρά με την υπομονάδα p150 του chromatin assembly factor 1 (CAF-1). Ο CAF1 είναι ένα τριμερές σύμπλοκο (p150, p60 and p48) που εναποθέτει ιστονικά σύμπλοκα



H3-H4 στο νέο-συντιθέμενο DNA. Μεταλλάξεις στην περιοχή του p150 που καταργούν την πρόσδεση με την CSD δεν επηρεάζουν τη στρατολόγηση του CAF-1 στις εστίες αντιγραφής (ευχρωματινικές ή ετεροχρωματινικές) κατά την S φάση. Ωστόσο, αποτρέπουν την πρόσδεση με την HP1 στην ετεροχρωματίνη εκτός S φάσης (Murzina et al., 1999). Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι οι HP1α και HP1γ μέσω αλληλεπίδρασης με τον CAF-1 ενσωματώνονται στη περικεντρομεριδιακή ετεροχρωματίνη στο τέλος της S φάσης. Η πρόσδεση αυτή δεν εξαρτάται από την παρουσία ιστονικών τροποποιήσεων (πχ me₃K9) (Quivy et al., 2004). Αν και η λειτουργική σημασία της HP1-CAF-1 αλληλεπίδρασης δεν έχει πλήρως διασαφηνιστεί, τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν ότι ίσως με αυτόν τον τρόπο διασφαλίζεται η σταθερότητα του γονιδιώματος κατά τη χρωμοσωμική αποσυμπύκνωση και την έναρξη της μεταγραφής.

Η HP1 αλληλεπιδρά με το ORC, ένα σύμπλοκο που συνδέεται και στρατολογεί παράγοντες της αντιγραφής σε συγκεκριμένες αλληλουχίες (Pak et al., 1997 και Shareef et al., 2001). Μελέτες στην *Drosophila*, έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση της HP1 με το ORC επιτυγχάνεται μέσω της DmORC1. Μεταλλάξεις στην περιοχή DmORC1 αναστέλλουν την σύνδεση της HP1 στην ετεροχρωματίνη (Huang et al., 1998). Η αλληλεπίδραση της HP1 με παράγοντες της αντιγραφής υποδηλώνει την ύπαρξη κάποιου μηχανισμού που συνδέει τη δημιουργία ετεροχρωματινικών δομών με τον αναδιπλασιασμό του DNA.

Οι HP1 πρωτεΐνες εμπλέκονται επίσης στην μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων. επάγοντας την εξάπλωση «κλειστών» χρωματινικών δομών (Cryderman et al., 1998, Cryderman et al., 1999, Sun et al., 2001 και Wallrath and Elgin, 1995). Πολύ σημαντικό ρόλο στη διαδικασία αυτή διαδραματίζει η αλληλεπίδραση της CSD με τη μεθυλοτρανσφεράση Su(var)3-9 (Schotta et al., 2002 Schotta et al., 2003 και Yamamoto and Sonoda, 2003). Μέσω της περιοχής SET, η SUV39H1 καταλύει την μεθυλίωση της ιστόνης H3 στη λυσίνη 9, δημιουργώντας ένα επιγενετικό σήμα που αναγνωρίζεται από την CD της HP1 (Bannister et



al., 2001, Jacobs et al., 2001, Lachner et al., 2001, Nakayama et al., 2001 και Rea et al., 2000). Σύμφωνα με το μηχανισμό που έχει προταθεί για να εξηγήσει την εξάπλωση της ετεροχρωματίνης, η HP1 προσδένεται μέσω της CD στην me3K9 της H3 και μέσω της CSD στη SUV39H1 (Bannister et al., 2001). Η SUV39H1 καταλύει τη μεθυλίωση των ιστονών στην γειτονική της περιοχή, δημιουργώντας έτσι νέες θέσεις πρόσδεσης για την HP1 επιτρέποντας την εξάπλωση της κατά μήκος της χρωματινικής ίνας.

Έχει δειχθεί ότι η παρουσία της HP1 στις ευχρωματινικές περιοχές έχει κατασταλτικό ρόλο (Hwang et al., 2001 και Li et al., 2002). Μάλιστα, η αποσιωπητική δράση της HP1 στην ευχρωματινή είναι στοχευμένη και αφορά συγκεκριμένα γονίδια (Nielsen et al., 2001, Ogawa et al., 2002 και Ayyanathan et al., 2003). Αντυπροσωπευτικό παράδειγμα αποτελεί η απενεργοποίηση του γονιδίου της κυκλίνης E (cyclin E). Η αποσιώπηση της κυκλίνης E επιτυγχάνεται με τη συνεργιστική δράση του Rb (ρετινοβλαστώματος), της HP1 και της SUV39H1. Ο μηχανισμός με τον οποίο η HP1 στρατολογείται στον υποκινητή της κυκλίνης E δεν έχει διασαφηνιστεί. Ένα μηχανιστικό μοντέλο είναι ότι ο Rb προσελκύει απο-ακετυλάσες στην περιοχή του υποκινητή, στη συνέχεια η SUV39H1 μεθυλιώνει τη λυσίνη 9 της H3 και έτσι δημιουργεί θέσεις πρόσδεσης για την HP1.

Ένας άλλος μηχανισμός αποσιώπησης ευχρωματινικών γονιδίων που εμπλέκει τις HP1 πρωτεΐνες είναι μέσω των Krüppel-associated box zinc finger (KRAB-ZFP) πρωτεϊνών (Ryan et al., 1999 και Lechner et al., 2001). Οι πρωτεΐνες KRAB-ZFP προσδένονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA και στρατολογούν τον KAP-1/TIF1β συν-καταστολέα (corepressor) ο οποίος αλληλεπιδρά με την CSD της HP1. Τελικό αποτέλεσμα των παραπάνω αλληλεπιδράσεων είναι η συσσώρευση ετεροχρωματινικών συμπλόκων στη συγκεκριμένη περιοχή.

Ευρήματα άλλων μελετών έδειξαν ότι η HP1 ενεργοποιεί την μεταγραφή των ετεροχρωματινικών γονιδίων, δηλαδή γονιδίων που εδράζονται στην ετεροχρωματίνη



(Hearn et al., 1991, Clegg et al., 1998; Lu et al., 2000, για ανασκόπηση βλέπε Wakimoto, 1998). Χαρακτηριστικό παράδειγμα του ενεργοποιητικού ρόλου των HP1 πρωτεϊνών αποτελούν τα γονίδια *light* και *rolled* της *Drosophila*. Τα γονίδια αυτά, που βρίσκονται στις περι-κεντρομεριδιακές περιοχές εκφράζονται κανονικά παρουσία της HP1, ενώ απουσία της είναι ανενεργά. Όταν το *light* και *rolled* μετατεθούν σε ευχρωματινικό περιβάλλον δεν εκφράζονται ή παρουσιάζουν αποσιώπηση μωσαϊκού τύπου.

Ο ενεργοποιητικός ρόλος των HP1 πρωτεϊνών στην μεταγραφή έχει παρατηρηθεί και στις ευχρωματινικές περιοχές. Πειράματα στην *Drosophila* έδειξαν ότι μετά από θερμικό σοκ η HP1 δρα ενεργοποιητικά στην έκφραση των γονιδίων που επάγονται με αυτόν τον τρόπο. Η HP1 εντοπίζεται στη κωδικοποιητική περιοχή των γονιδίων-στόχων, αλλά όχι στους υποκινητές. Επιπλέον, επίδραση με RNase καταργεί τη πρόσδεση της στις παραπάνω περιοχές.

Αποτελέσματα που τεκμηριώνουν την ενεργοποιητική δράση της HP1 πρωτεΐνης προέκυψαν από μεταγενέστερες μελέτες με την χρήση μικροσυστοιχιών σε συνδυασμό με τη διερεύνηση της HP1 τοπολογίας. Η HP1 εντοπίστηκε στη περιοχή του υποκινητή των *Pros35*, *cdc2* και *CG5676* γονιδίων. Επιπρόσθετα, η πρόσδεση δεν ήταν RNA-εξαρτώμενη (Cryderman et al., 2005).

Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι η HP1γ εντοπίζεται συνδεδεμένη σε δι- ή τρι-μεθυλιωμένη λυσίνη 9 της H3 στην κωδικοποιητική περιοχή ενεργών γονιδίων των θηλαστικών. Η παρουσία της μεθυλιωμένης H3K9 και της HP1γ στις παραπάνω περιοχές εξαρτώνται από την RNA πολυμεράση II (Vakoc et al., 2005).

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι οι HP1 πρωτεΐνες δεν λειτουργούν μόνο ως καταστολείς, αλλά, σε κάποιες περιπτώσεις, και ως ενεργοποιητές της μεταγραφής (ετερο- και ευχρωματινικών) γονιδίων.



Παρά την πληθώρα των μελετών που αφορούν στην HP1, η βιολογική σημασία και η λειτουργία της στο κυτταρικό επίπεδο δεν έχει πλήρως διασαφηνιστεί. Για παράδειγμα, δεν είναι σαφές εάν η παρουσία περισσότερων της μιας ισομορφών σε κάποιους οργανισμούς αποτελεί «εξελικτική σπατάλη» χωρίς ιδιαίτερη φυσιολογική σημασία ή ένδειξη διαφορικής λειτουργίας (κύτταρο- ή ιστο-ειδικότητας). Τα πρώτα στοιχεία που συνηγορούν στην εξειδικευμένη λειτουργία των HP1 ισομορφών στο κύτταρο προέκυψαν από πειράματα με την P19 εμβρυονική κυτταρική σειρά. Διαμόλυνση των παραπάνω κυττάρων και με τις τρεις ισομορφές, πριν και μετά την επαγωγή της νευρωνικής διαφοροποίησης με RA (retinoic acid) έδειξε ότι η κάθε HP1 ισομορφή επηρεάζει διαφορετικά την E2F-εξαρτωμένη μεταγραφή. Πράγματι, διαπιστώθηκε ότι για την αποσιώπηση γονιδίων του κυτταρικού κύκλου κατά την νευρωνική διαφοροποίηση είναι απαραίτητη η HP1α, αλλά όχι η HP1γ ή η HP1β (Panteleeva et al., 2007).

Ένα άλλο θέμα που δεν έχει πλήρως διασαφηνιστεί είναι η ύπαρξη HP1 ισομορφών, που έχουν σχεδόν την ίδια δομή και βιοχημικές ιδιότητες αλλά παρουσιάζουν διαφορετική υποκυτταρική κατανομή και δυναμικές ιδιότητες (Minc et al. 1999, Minc et al. 2000, Nielsen et al. 1999 και Nielsen et al., 2001) Για παράδειγμα, στον άνθρωπο οι HP1α και HP1β εδράζονται κυρίως σε μεγάλα συσσωματώματα, ενώ η HP1γ εντοπίζεται σε μικρές, διάσπαρτες εστίες στον πυρήνα (Horsley et al., 1996, Minc et al., 1999).

Μια υπόθεση που έχει προταθεί για να εξηγήσει τις διαφορές που παρατηρούνται στην εντόπιση και τις δυναμικές ιδιότητες των HP1 ισομορφών είναι η ύπαρξη ενός «υποκώδικα» (HP1-mediated subcode) ανάλογου με αυτό των ιστονών (Lomberg et al, 2006). Διάφορες μελέτες έχουν διερευνήσει τον ρόλο των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, όπως της φωσφορυλίωσης, αναφορικά με την κατανομή και την λειτουργία των HP1 ισομορφών. Έχει προκύψει ότι, στον άνθρωπο, οι HP1α και HP1γ είναι φωσφορυλιωμένες κατά τη μεσόφαση και υπερ-φωσφορυλιωμένες κατά τη μίτωση, σε αντίθεση με την HP1β



που δεν παρουσιάζει αυτή την τροποποίηση (Minc et al., 1999). Επίσης, έχειδειχθεί ότι μόνο η φωσφορυλιωμένη μορφή της HP1γ εμπλέκεται στη μεταγραφική ενεργοποίηση (Vakoc et al., 2005 και Lomberg et al., 2006). Ένα άλλο παράδειγμα που συνηγορεί στο ρυθμιστικό ρόλο των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων για την εντόπιση και λειτουργία των HP1, προκύπτει από την αλληλεπίδρασή τους με την Ku70. Η Ku70 μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην επιδιόρθωση του DNA, αλληλεπιδρά μόνο με τη φωσφορυλιωμένη HP1γ (Ser 83), ενώ για την αλληλεπίδραση της με την HP1α δεν απαιτούνται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (Song et al., 2001 και Lomberg et al., 2006). Τέλος, άλλες μελέτες έδειξαν ότι ο μηχανισμός RNAi (RNAi machinery) επηρεάζει την κατανομή των HP1 πρωτεϊνών, τόσο στον σακχαρομύκητα όσο και σε ανώτερους οργανισμούς (Volpe et al., 2002, Pal-Bharda et al., 2004 και Kanellou et al., 2005).

Ένα άλλο ζήτημα που έχει προκύψει αφορά στα ευρήματα προσφάτων μελετών που έρχονται σε αντιπαράθεση με την αντίληψη ότι η HP1 αποτελεί συστατικό στοιχείο (δείκτη) της ετεροχρωματίνης. Η «κλασσική» άποψη είναι ότι οι HP1 πρωτεΐνες αποτελούν δομικά συστατικά που σταθεροποιούν συμπυκνωμένες χρωματινικές δομές. Σύμφωνα με την άποψη αυτή η παρουσία της HP1 είναι απαραίτητη στην ετεροχρωματίνη, καθώς τα διμερή που προκύπτουν μέσω της πρόσδεσης των CSD τους, λειτουργούν ως «γέφυρα» μεταξύ δύο νουκλεοσωμάτων που διαθέτουν me₃K9-H3, και με αυτό τον τρόπο επάγεται περαιτέρω συμπύκνωση της χρωματίνης (Nielsen et al., 2001, Lachner et al., 2001 και Thiru et al., 2004). Παρ'όλα ταύτα, πειράματα σε 3T3 ινοβλάστες αποκάλυψαν ότι η παρουσία των HP1 πρωτεϊνών δεν είναι απαραίτητη για την διατήρηση της ετεροχρωματινικής δομής στις περικεντρομεριδιακές περιοχές. Πιο αναλυτικά, ενώ κατά την διαμόλυνση της παραπάνω κυτταρικής σειράς με HP1α ή HP1β που δεν διαθέτουν λειτουργική CD, παρατηρήθηκε ελάττωση στη συσσώρευση και των τριών HP1 ισομορφών στις περικεντρομεριδιακές περιοχές, οι αλλαγές αυτές δεν συμβάδισαν με ορατές αλλαγές στην υφή της



ετεροχρωματίνης (Mateos-Langerak et al., 2007). Επιπλέον, αρκετά είδη τελικώς διαφοροποιημένων κυττάρων, για παράδειγμα κύτταρα αιμοποιητικής προελεύσεως, δεν διαθέτουν (ή περιέχουν ελάχιστη) HP1 (Gilbert et al., 2003, Porova et al., 2006 Dialynas et al., 2007 και Lukasova et al., 2005). Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε αντίθεση με την θεώρηση της HP1 ως ετεροχρωματινικού δείκτη, καθώς κατά την διάρκεια της τελικής διαφοροποίησης των αιμοποιητικών κυττάρων παρατηρείται εκτεταμένη συμπύκνωση της χρωματίνης (Francastel et al., 2000 και Grigoryev et al., 2004).

Η «στατική» φύση των HP1 αλληλεπιδράσεων με την χρωματίνη είναι μια άλλη άποψη που τείνει να εγκαταλειφθεί. FRAP and FCS πειράματα σε ινοβλάστες, αποκάλυψαν ότι ένα μεγάλο ποσοστό των HP1 μορίων που εντοπίζεται στη ετεροχρωματίνη παρουσιάζει ταχεία κινητική (Cheutin et al., 2003, Festenstein et al., 2003, Dialynas et al., 2006, Dialynas et al., 2007 και Schmiedeberg et al., 2004), ένδειξη ότι η αλληλεπίδραση HP1-χρωματίνης δεν είναι στατική. Επιπλέον, πρόσφατες *in vivo* μελέτες σε κύτταρα θηλαστικών έδειξαν ότι οι συμπυκνωμένες χρωματινικές δομές είναι προσπελάσιμες από μεγάλα μακρομόρια (Verschure et al., 2003). Μια άλλη ένδειξη της «δυναμικής» φύσης των HP1 αλληλεπιδράσεων με τη χρωματίνη είναι η παρατηρούμενη ανακατανομή των HP1 πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου καθώς και κατά τη μιτογονική ενεργοποίηση T και B λεμφοκυττάρων.

Τέλος, ένα άλλο ερώτημα που έχει ανακύψει για τις HP1 πρωτεΐνες είναι αν η πρόσδεση τους στη χρωματίνη πραγματοποιείται αποκλειστικά μέσω αλληλεπίδρασης τους με την μεθυλωμένη λυσίνη 9 της H3 ή αν υπάρχουν εναλλακτικοί μηχανισμοί. Οι πρώτες ενδείξεις για την ύπαρξη εναλλακτικών μηχανισμών πρόσδεσης προήλθαν από μελέτες σε μεταλλαγμένα στελέχη της *Drosophila*. Πιο συγκεκριμένα, η σημειακή μετάλλαξη (Val→Met) στην περιοχή της CD, επηρεάζει τον σχηματισμό της υδρόφοβης αύλακας (Nielsen et al., 2002), δηλαδή, της περιοχής που είναι απαραίτητη για τη πρόσδεση της



HP1 με την meK9-H3. Ανάλυση της HP1 χρώσης στα χρωμοσώματα της *Drosophila* αποκάλυψε την «υπολειμματική» εντόπιση της στις κεντρομεριδιακές περιοχές. Όμως, η παραπάνω μετάλλαξη δεν φαίνεται να επηρεάζει την πρόσδεση της HP1 στα τελομερή ή την ευχρωματίνη (Fanti et al., 1998). Διπλές χρώσεις με HP1 και me₃K9-H3 αντισώματα σε φυσιολογικά στελέχη της *Drosophila*, έδειξαν ότι η κατανομή των παραπάνω πρωτεϊνών δεν συμπίπτει απόλυτα. Ανάλογα αποτελέσματα προέκυψαν και σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών (Dialynas et al., 2006 και Dialynas et al., 2007). Επιπλέον, *in vitro* competition assays με συνθετικά πεπτίδια έδειξαν ότι η συγγένεια πρόσδεσης της HP1 με πεπτίδια της ιστόνης H3 που περιέχουν την τριμεθυλωμένη λυσίνη 9 είναι της τάξεως των μM (Jacobs and Khorasanizadeh, 2002 και Jacobs et al., 2001), ενώ η μεγαλύτερη σχετική συγγένεια πρόσδεσης παρατηρείται με το κεντρικό τμήμα της H3 (Fischle et al., 2003 και Nielsen et al., 2001)

Συνοψίζοντας, οι HP1 πρωτεΐνες έχουν αποτελέσει αντικείμενο μελέτης για περισσότερο από μια 15ετία. Ωστόσο, όπως προκύπτει από τα παραπάνω, αρκετά ερωτήματα για τον βιολογικό ρόλο και τους μηχανισμούς λειτουργίας των πρωτεϊνών αυτών δεν έχουν ακόμα απαντηθεί. Καταγραφή των προτύπων έκφρασης και κατανομής των παραπάνω πρωτεϊνών σε διάφορα μικροπεριβάλλοντα είναι απαραίτητη, καθώς συγκεκριμένες HP1 ισομορφές φαίνεται ότι επιτελούν εξειδικευμένες κυτταρικές λειτουργίες.



1.2 HP1 και καρκίνος

Η αφετηρία και η περαιτέρω εξέλιξη της κυτταρικής εξαλλαγής είναι το αποτέλεσμα διαδοχικών, κληρονομήσιμων τροποποιήσεων του προγράμματος γονιδιακής έκφρασης. Στο παρελθόν είχε δοθεί έμφαση στις μη-αντιστρέψιμες τροποποιήσεις του DNA που μπορούν να οδηγήσουν στη ενεργοποίηση ογκογονιδίων, απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, ή στη δημιουργία χημαιρικών πρωτεϊνικών προϊόντων. Αν και έχει χαρακτηριστεί ένας μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στη καρκινογένεση, υπάρχει πληθώρα δημοσιεύσεων που συσχετίζει επιγενετικές δυσλειτουργίες με την εμφάνιση και περαιτέρω εξέλιξη της νόσου. Καθώς ο επιγενετικός έλεγχος των γονιδίων έγκειται στη δημιουργία χρωματινικών δομών που ρυθμίζουν την μεταγραφή, δεν είναι παράδοξο μεταβολές στα επίπεδα ή στις αλληλεπιδράσεις των HP1 πρωτεϊνών να εμπλέκονται σε παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος.

Πράγματι, συγκριτική ανάλυση κυτταρικών σειρών από νεοπλάσματα του μαστού αποκάλυψαν την συσχέτιση των επιπέδων της HP1α με το μεταστατικό δυναμικό (Kirschmann et al., 1999). Πιο συγκεκριμένα, η HP1α εκφράζεται ελάχιστα ή καθόλου σε κυτταρικές σειρές με υψηλό μεταστατικό δυναμικό, όπως η MDA-MB-231, ενώ κάτι τέτοιο δεν ισχύει για την κυτταρική σειρά MCF-7 που παρουσιάζει χαμηλή διηθητική ικανότητα. Επιπλέον, η χαμηλή ή πλήρης έλλειψη της HP1α επιβεβαιώθηκε και *in vivo* στις μεταστατικές εστίες ασθενών με καρκίνο του μαστού (Kirschmann et al., 2000). Περαιτέρω στοιχεία για τη συσχέτιση της HP1α με το μεταστατικό δυναμικό προέκυψαν από πειράματα διαμόλυνσης των παραπάνω καρκινικών σειρών. Πιο συγκεκριμένα, αύξηση των HP1α επιπέδων στην κυτταρική σειρά MDA-MB-231 ελάττωσε τη διηθητική της ικανότητα, ενώ ελάττωση των επιπέδων της HP1α στα MCF-7 με RNAi αύξησε το μεταστατικό τους δυναμικό. Οι παραπάνω μεταβολές δεν συνοδεύονται από αλλαγές στο ρυθμό κυτταρικής

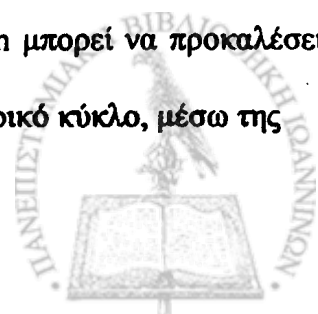


διαίρεσης (Norwood et al., 2006), πράγμα που υποδηλώνει ότι η HP1α λειτουργεί ως μεταστατικός καταστολέας, καθώς επηρεάζει το μεταστατικό δυναμικό, αλλά όχι την κυτταρική αύξηση (Berger et al., 2005 και Steeg et al., 2003).

Επιπλέον, εκτός από την διηθητική ικανότητα των καρκινικών κύτταρων οι HP1 έχουν εμπλακεί και στην εμφάνιση «αντοχής» σε θεραπευτικούς παράγοντες όπως η tamoxifen ένα φάρμακο που χρησιμοποιείται στην θεραπεία καρκίνου του μαστού. Η tamoxifen προσδένεται σε ενδοκυτταρικούς υποδοχείς «τύπου E» (οιστρογονικούς υποδοχείς), τους ERα και ERβ (Nilsson et al., 2001). Οι υποδοχείς αυτοί, αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA (estrogen-responsive DNA sequences) και ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση. Η ενεργοποιητική ή κατασταλτική λειτουργία των ERα και ERβ υποδοχέων εξαρτάται από το μόριο που έχει προσδεθεί (McDonnell et al., 2000, Katzenellenbogen et al., 2000 και Katzenellenbogen and Katzenellenbogen, 2002). Στη προκείμενη περίπτωση η tamoxifen λειτουργεί ως αντι-οιστρογόνο (Murphy and Jordan, 1990).

Έχει παρατηρηθεί ότι οι ασθενείς με καρκίνο του μαστού μετά από μακροχρόνια θεραπεία με tamoxifen συνήθως παρουσιάζουν αντοχή στο φάρμακο αυτό. Η αντοχή στο φάρμακο μπορεί να είναι αποτέλεσμα κυτταρικής επιλογής που ευνοεί την επιβίωση των κυττάρων που δεν διαθέτουν λειτουργικούς οιστρογονικούς υποδοχείς. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η παραπάνω θεραπεία μπορεί να επηρεάσει τη χρωματινική δομή και με αυτό τον τρόπο να τροποποιήσει την έκφραση οιστρογονικά-ρυθμιζόμενων γονιδίων (Badia et al., 1994 και Badia et al., 1998).

Η πρώτη μελέτη που ασχολήθηκε με τον ρόλο των HP1 πρωτεϊνών στη διάρκεια θεραπείας με tamoxifen πραγματοποιήθηκε το 2005 (Oliva et al., 2005). Τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης δείχνουν ότι η μακροχρόνια αγωγή με tamoxifen μπορεί να προκαλέσει μη αντιστρέψιμη απενεργοποίηση γονιδίων που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο, μέσω της



στρατολόγησης συμπλόκων που αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες HP1. Σύμφωνα με το μηχανιστικό μοντέλο που έχει προταθεί, ο ERα στον οποίο έχει προσδεθεί η tamoxifen συνδέεται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA, στρατολογεί το σύμπλοκο N-CoR-1 και, μέσω του TIF1β/KAP-1, προσελκύει τις HP1 στις συγκεκριμένες θέσεις.

Εκτός από τον καρκίνο του μαστού, μεταβολές των HP1α επιπέδων έχουν παρατηρηθεί και σε άλλους τύπους νεοπλασιών, όπως στον θηλοειδή καρκίνο του θυρεοειδούς (Wasenius et al., 2003) και στο μυελοβλάστωμα (Pomeroy et al., 2002). Στον θηλοειδή καρκίνο του θυρεοειδούς παρατηρείται ελάττωση των επιπέδων της HP1α στα προχωρημένα στάδια της νόσου, ενώ στο μυελοβλάστωμα χαμηλή έκφραση των HP1α πρωτεϊνών σχετίζεται με έλλειψη απαντητικότητας στην αγωγή.

Τέλος, εκτός από τα επίπεδα της HP1α έχουν παρατηρηθεί μεταβολές και στα επίπεδα της HP1β *in vitro* (σε καρκινικές σειρές μελανοκυτταρων) και *in vivo* (στους αντίστοιχους παθολογικούς ιστούς). Διαπιστώθηκε ότι η έκφραση της HP1β ελαττώνεται στα προχωρημένα στάδια της ασθένειας και, όπως και με την HP1α, η HP1β ίσως λειτουργεί ως μεταστατικός καταστολέας (Nishimura et al., 2006).

Συνοπτικά, οι μέχρι τώρα μελέτες δείχνουν ότι μεταβολές στα επίπεδα τουλάχιστον των δύο εκ των τριών ισομορφών HP1 σχετίζονται με τη ρύθμιση της διηθητικής ικανότητας των νεοπλασματικών κύτταρων και την απαντητικότητα σε θεραπευτικούς παράγοντες.



1.3 Σκοπός της παρούσας μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η συστηματική καταγραφή των πρότυπων έκφρασης και κατανομής της HP1 σε ανθρώπινους ιστούς (φυσιολογικούς και παθολογικούς), κυτταρικές σειρές και σε συστήματα διαφοροποίησης

Στόχο μας επίσης αποτέλεσε η αξιολόγηση των παραπάνω αποτελεσμάτων αναφορικά με τον λειτουργικό ρόλο των HP1 πρωτεϊνών. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε σε ερωτήματα όπως, η δομική αναγκαιότητα των HP1 στη διατήρηση της ετεροχρωματίνης, η ύπαρξη κυτταροειδικών HP1 «ρεπερτορίων», η «στατική» ή δυναμική φύση των αλληλεπιδράσεων τους με την χρωματίνη, καθώς και τα ερεθίσματα που θα μπορούσαν να μεταβάλλουν την έκφραση ή/και την υπό-κυτταρική τους κατανομή.



2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Αντισώματα

Τα αντισώματα έναντι της τριμεθυλιωμένης λυσίνης 27 και της διμεθυλιωμένης λυσίνης 4 της ιστόνης 3 διατίθεται από την *Upstate Biotechnology*, ενώ αυτά των CD20, CD4, CD8 και Ki-67/Mib από την εταιρεία DAKO. Τα αντισώματα έναντι της τριμεθυλιωμένης λυσίνης 9 της ιστόνης H3 (Cowell et al., 2002), της HP1β (Wreggett et al., 1994) και της HP1γ (Horsley et al., 1996) έχουν χαρακτηριστεί στο παρελθόν. Τέλος, τα πολυκλωνικά αντισώματα της HP1α και του LBR απομονώθηκαν με χρωματογραφία συγγένειας.

Ο Πίνακας 2.1-1 συνοψίζει τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιηθήκαν για την χρώση ιστών, ενώ στον Πίνακα 2.1-2 συνοψίζονται τα αντισώματα για τους έμμεσους ανοσοφθορισμούς.

Πίνακας 2.1-1

Πρ. Αντίσωμα	Ξενιστής	Αραίωση	Χρ. Επώασης	Θ. Επώασης
HP1α	κουνέλι	1:80	O/N	4°C
HP1β	αρουραίος	1:20	O/N	4°C
Lamnb	κουνέλι	1:1000	1h	R.T
me ₂ K4-H3	κουνέλι	1:1000	O/N	4°C
Ki-67/Mib	ποντίκι	1:50	1h	R.T
CD20	ποντίκι	1:50	1h	R.T
CD4	ποντίκι	1:25	1h	R.T
CD8	ποντίκι	1:25	1h	R.T

R.T: Θερμοκρασία δωματίου, O/N: ολονύχτια επώαση και h: ώρα.



Πίνακας 2.1-2

Πρ.Αντίσωμα	Ξενιστής	Αραίωση	Χ.Επώασης	Θ.Επώασης	Μον/ση
HP1α	κουνέλι	1:50	1h	R.T	1%FA
HP1β	αρουραίος	-	1h	R.T	1%FA
HP1γ	αρουραίος	-	1h	R.T	1%FA
me ₂ K4-H3	κουνέλι	1:100	1h	R.T	1%FA
me ₃ K9-H3	κουνέλι	1:100	1h	R.T	1%FA
LBR	κουνέλι	1:400	1h	R.T	1%FA
LamnA	κουνέλι	1:200	1h	R.T	1%FA
LamnB	κουνέλι	1:200	1h	R.T	1%FA
Emerin	κουνέλι	1:400	1h	R.T	4%FA
Ki-67/Mib	ποντίκι	1:10	1h	R.T	1%FA

R.T: Θερμοκρασία δωματίου, FA: φορμαλδεΐδη και h: ώρα.

Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη παρατίθενται παρακάτω: A) goat a-rabbit IgG 488 και donkey a-rat IgG 488 με απορρόφηση (Abs) στα 495 nm και εκπομπή (Em) στα 519 nm και B) goat a-rabbit IgG 568, goat a-mouse IgG 568 και goat a-rat IgG 568 με απορρόφηση (Abs) στα 578 nm και εκπομπή (Em) στα 603 nm. Όλα τα παραπάνω αντισώματα διατίθενται από την *Molecular Probes*, Invitrogen.

2.2 «Μετα-ανάλυση»

Στην βάση δεδομένων της Entrez GEO-Profiles (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=geo) εντοπίστηκαν 15 μελέτες που περιείχαν στοιχεία αναφορικά με την έκφραση των ανθρώπινων HP1 γονιδίων. Από αυτές επιλεχτήκαν 3 (Su et al., 2004, Ge et al., 2005 και Martens et al., 2006) στις οποίες είχε χρησιμοποιεί η GPL96 platform (Affimetrix Gene Chip Human Genome U133, array set HG-U133A) και πραγματοποιήθηκε συγκριτική



μελέτη και σύνοψη των αποτελεσμάτων για τα υποστρώματα μικροσυστοιχών (HP1α: 212126-at, HP1β: 201518-at και HP1γ: 200037-at).

2.3 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των ανοσοιστοχημικών αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό SPSS. Οι στατιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν είναι: το t test, χ^2 test, One Way ANOVA, Spearman's correlation test και Pearson's correlation test.

2.4 Μορφομετρική ανάλυση

Η μορφομετρική ανάλυση έγινε σύμφωνα με μια παγία διαδικασία. Αρχικά έγινε μεγέθυνση όλων των οπτικών τομών (0.3-04μ) και στη συνέχεια μελετήθηκε η τοπολογία των HP1 εστιών. Για την καταμέτρηση των HP1 εστιών και την μέτρηση της έντασης φθορισμού ανά μονάδα πυρηνικής επιφάνειας χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα *Image J*.

2.5 Μικροσκοπία

Για την μελέτη και τη φωτογράφιση των δειγμάτων φθορισμού χρησιμοποιήθηκε το συνεστιακό μικροσκόπιο, *Leica TCS-SP Confocal Microscope*, της εταιρείας *Leica Optics, Germany* που αποτελείται από πηγή, σύστημα σάρωσης, ιχνηθέτες φθορισμού, φωτοπολλαπλασιαστές (PMTs), υπολογιστή και λογισμικό. Η πηγή laser είναι ακτίνα Ar/Kr (αργού/κρυπτού) που επιτρέπει την λήψη οπτικών τομών πάχους της τάξης του δέκατου των μικρομέτρων.

Για τα ανοσοιστοχημικά δείγματα χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο ορατού φωτός.

2.6 Μοριακές Μέθοδοι

2.6.1 Απομόνωση RNA και RT-PCR

Συνολικό RNA απομονώθηκε από κυτταρικές σειρές και ιστούς με τη χρήση του αντιδραστηρίου Trizol (*Invitrogen*). Τα RNA που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα για την σύνθεση cDNA με το Superscript First strand synthesis kit (*Invitrogen*).



2.6.2 PCR

Τα παραπάνω cDNAs χρησιμοποιηθήκαν ως υπόστρωμα για την ενισχυμένη σύνθεση τμημάτων των ανθρώπινων γονιδίων της HP1α και HP1β με τα κατάλληλα πριμοδοτικά ολιγονουκλεοτίδια (primers). Τα ζεύγη των HP1α και HP1β (primers) καθώς και οι συνθήκες της PCR αντίδρασης που χρησιμοποιηθήκαν με υποστρώματα τα cDNAs των ιστών έχουν καθοριστεί στο παρελθόν (Lessard, Baban and Sauvageau, 1998). Στις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, για την ενισχυμένη σύνθεση ενός 537-bp τμήματος της HP1β χρησιμοποιήθηκε ένα άλλο ζεύγος primers (accession no. X56690; forward: 14-40; reverse 550-524). Η PCR αντίδραση πραγματοποιήθηκε υπό τις παρακάτω συνθήκες: μετουσίωση στους 94°C για 2 min και κατόπιν 28 κύκλοι μετουσίωσης στους 94°C για 1min, αναδιάταξης στους 52°C για 2.5 min και επιμήκυνσης στους 72°C για 1min.

2.7 Βιοχημικές μέθοδοι

2.7.1 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης

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

Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε μέγιστη τάση 5 Volt/cm.

2.7.2 Ανάλυση Πρωτεϊνών

Η ανάλυση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου συγκέντρωσης 13.5%, υπό αναγωγικές συνθήκες. Πριν την ηλεκτροφόρηση, οι πρωτεΐνες διαλύθηκαν σε διάλυμα Laemmli 4X και θερμάνθηκαν για 5 λεπτά στους 95 °C προκειμένου να αποδιαταχθούν. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε διάλυμα 192 mM γλυκίνη, 25 mM Tris base, 0.1% SDS για 3-4 ώρες στα 45 mA και σε μέγιστη τάση (voltage).



2.7.3 Ανοσο-αποτύπωση πρωτεϊνών κατά western (western blotting)

Η διαδικασία του western blotting έγινε σύμφωνα με τα καθιερωμένα πρωτόκολλα (Maison et al., 1993, Maison et al., 1997 και Meier and Georgatos, 1994). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα διαχωρίστηκαν αρχικά με ηλεκτροφόρηση σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου και οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης (Protran, 0.45mm). Η μεταφορά έγινε στα 35 V για 3 ώρες. Ακολούθησε 10λεπτη έκλυση της νιτροκυτταρίνης και επώαση με 1% FSG για 10-15 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, η νιτροκυτταρίνη επωάστηκε με το πρωτογενές αντίσωμα για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν τέσσερις 10λεπτες εκλύσεις για να απομακρυνθεί η περίσσεια του πρωτογενούς αντισώματος και επώαση με το κατάλληλο δευτερογενές αντίσωμα για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν 6 5λεπτες εκλύσεις και εμφάνιση με ECL.

2.8 Μορφολογικές μέθοδοι

2.8.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός έγινε σύμφωνα με δημοσιευμένα πρωτόκολλα (Maison et al., 1993 και Meier and Georgatos, 1994). Τα κύτταρα εκκλύθηκαν 3 φορές με PBS και τοποθετήθηκαν σε καλυπτρίδες. Ακολούθησε μονιμοποίηση με 1-4% φορμαλδεύδη και εξουδετέρωση των καταλοίπων της φορμαλδεύδης με γλυκίνη. Η διαπερατότητα των κυτταρών επιτεύχθηκε με επώαση με 0.2% Triton X-100, ενώ 0.5% FSG χρησιμοποιήθηκε για να αποτραπεί η μη-ειδική πρόσδεση των αντισωμάτων. Ακολούθησε επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα, 4 διαδοχικές εκλύσεις και επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα. Στην συνέχεια, τα δείγματα εκκλύθηκαν με PBS και μονιμοποιήθηκαν με 4% φορμαλδεύδη. Χρώση του DNA έγινε με 10 µg/ml DAPI (4'-6-Diamidino-2-Phenylindole), ή εναλλακτικά με 1 mg/ml ιωδιούχο προπίδιο (Propidium Iodide) αφού είχε προηγηθεί επώαση με 0.2u/ml RNase. Οι καλυπτρίδες εκκλύθηκαν 3 φορές με PBS και τοποθετήθηκαν πάνω σε



αντικειμενοφόρους πλάκες. Για να προστατευθεί ο φθορισμός χρησιμοποιήθηκε ο παράγοντας *Vectashield*. Τέλος, η μελέτη των δειγμάτων, καθώς και η λήψη φωτογραφιών, έγινε στο συνεστιακό μικροσκόπιο *Leica SP*.

2.8.2 Ανοσοιστοχημεία

Φυσιολογικοί και παθολογικοί ιστοί επιλεχθήκαν από το αρχείο του Τμήματος της Παθολογικής Ανατομίας του Πανεπιστημίου των Ιωαννίνων. Ιστικές τομές παραφίνης πάχους 4μ από-παραφινώθηκαν και ενυδατώθηκαν σε κατιούσα αιθανολών και, τελικά, σε απεσταγμένο νερό. Ακολούθησε ανάκληση του αντιγόνου με θερμική επεξεργασία σε θάλαμο μικροκυμάτων (12min, 700Watt) παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος υψηλού pH της εταιρείας *DAKO* και κατόπιν έγινε καταστολή της ενδογενούς υπεροξειδάσης. Οι ιστικές τομές επώαστηκαν με τα κατάλληλα αντισώματα (Βλέπε Πίνακα 1). Η ανοσο-ανίχνευση πραγματοποιήθηκε με το *UltraVision LP kit* που αξιοποιεί το χρωμογόνο DAB σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τέλος, για τις διπλές χρώσεις χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής φωσφατάσης, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της *Biogenex*.

2.9 Μέθοδοι καλλιέργειας κυττάρων

Οι κυτταρικές σειρές HUT-78, RPMI-8226, K-562, Jurkat καθώς και λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν από ανθρώπινο περιφερικό αίμα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο RPMI-1640 που περιείχε 2mM L-γλουταμίνη, 2mM πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη και 10% FCS, ενώ για τις αθανατοποιημένες σειρές HeLa, και MEL χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με 2mM L-γλουταμίνη, 2mM πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη και 10% FCS.



2.10 Επίδραση με μιτογονικούς παράγοντες και κιτοκίνες

A) φυτοαιμαγλουτίνη (PHA): Είναι μια φυτική λεκτίνη που ενεργοποιεί τα T λεμφοκύτταρα. Η ενεργοποίηση των T-περιφερικών λεμφοκυττάρων πραγματοποιήθηκε με προσθήκη PHA (5μg/ml) στο καλλιεργητικό μέσο και καλλιέργεια για 3 ημέρες.

B) λιποπολυσακχαρίτης (LPS): Είναι συστατικό στοιχείο του κυτταρικού τοιχώματος των gram(-) βακτηριδίων και λειτουργεί ως μιτογόνο για τα B λεμφοκύτταρα. Η ενεργοποίηση των B-περιφερικών λεμφοκυττάρων πραγματοποιήθηκε με προσθήκη LPS (25μg/ml) στο καλλιεργητικό μέσο και καλλιέργεια για 3 ημέρες.

Γ) χλωριούχο λίθιο (LiCl): Το LiCl αυξάνει τον ρυθμό διαίρεσης των ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων και των αθανатоποιημένων κυτταρικών σειρών. Η αύξηση του ρυθμού διαίρεσης των HUT-78 πραγματοποιήθηκε με προσθήκη LiCl (20mM) στο καλλιεργητικό μέσο και καλλιέργεια για 48h.

Δ) ιντερλευκίνη 2 (IL-2): Είναι μια κιτοκίνη που παράγεται από τα T λεμφοκύτταρα με βασική λειτουργία την επαγωγή της κυτταρικής διαίρεσης των κυττάρων που διαθέτουν τον IL-2R. Χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 40ng/ml και τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 7 ημέρες.

2.11 Ταυτοποίηση των διαιρουμένων κυττάρων

A) Με ενσωμάτωση βρωμοδεοξουριδίνης (BrdU): Κατά τον διπλασιασμό του DNA τα κύτταρα που βρίσκονται στην S φάση ενσωματώνουν βρωμοδεοξουριδίνη. Η ανίχνευση των διαιρούμενων κυττάρων έγινε με το *5-Bromo-2-deoxy-uridine Labeling & Detection Kit I* της εταιρίας Roche σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

B) Με έμμεσο ανοσοφθορισμό με τον δείκτη πολλαπλασιασμού Ki-67/Mib

Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το προηγούμενο πρωτόκολλο (βλέπε έμμεσο ανοσοφθορισμό).



2.12 Παρασκευαστικές Μέθοδοι

2.12.1 Κυτταρικά εκχυλίσματα

Για την παρασκευή κυτταρικών εκχυλισμάτων, τα κύτταρα συλλέχθηκαν με ήπια φυγοκέντριση, έγινε 3 φορές έκπλυση με PBS παρουσία 1mM PMSF και ακολούθησε επαναδιάλυση σε Laemmli 4X.

2.12.2 Απομόνωση ανθρώπινων περιφερικών λεμφοκυττάρων (PBLs) με βαθμίδωση φικόλης

Μονοπύρηνια κύτταρα απομονώθηκαν από φρέσκο ανθρώπινο περιφερικό αίμα με το αντιδραστήριο Histopaque σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πιο συγκεκριμένα, το ηπαρινισμένο αίμα εναποτέθηκε προσεχτικά σε η Histopaque-1077 και φυγοκεντρήθηκε για 30min στα 400g. Η αδιαφανής φάση συγκεντρώθηκε και ακολούθησαν πολλαπλές εκπλύσεις με PBS. Στη συνέχεια, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό μέσο για 24h. Τα κύτταρα που δεν είχαν προσκολληθεί στο τρυβλίο συλλέχθηκαν και καλλιεργήθηκαν απουσία ή παρουσία του καταλλήλου μιτογόνου.



3. Αποτελέσματα

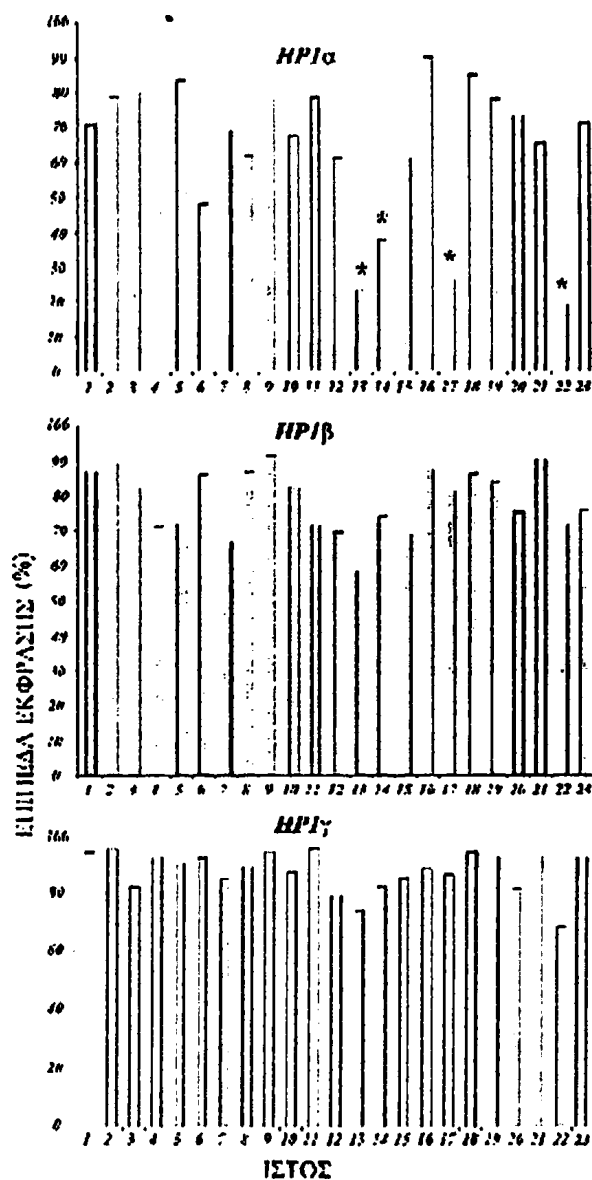
3.1 Έκφραση και κατανομή της HP1 σε κύτταρα και ιστούς

Όπως αναφέρθηκε στην «Εισαγωγή», τα πρότυπα έκφρασης και κατανομής της HP1 στους διάφορους κυτταρικούς τύπους (ιδιαίτερα του ανθρώπου) δεν έχουν μελετηθεί συστηματικά. Θελήσαμε λοιπόν να συνοψίσουμε και να εμπλουτίσουμε τις υπάρχουσες πληροφορίες σχετικά με αυτή τη λειτουργικά σημαντική πρωτεΐνη.

Αρχικά, για να διερευνήσουμε την έκφραση των γονιδίων της HP1 επιχειρήσαμε ένα είδος «μετά-ανάλυσης», αξιοποιώντας αποτελέσματα δημοσιευμένων εργασιών που αφορούν στην έκφραση διαφόρων γονιδίων σε φυσιολογικούς ανθρώπινους ιστούς. Ανατρέχοντας σε κατάλληλες βάσεις δεδομένων, εντοπίσαμε τις μελέτες που περιείχαν στοιχεία αναφορικά με την έκφραση των γονιδίων της HP1 και συγκρίναμε αποτελέσματα που είχαν προκύψει χρησιμοποιώντας τα ίδια υποστρώματα μικροσυστοιχιών (Βλέπε «Υλικά και Μέθοδοι»). Με αυτό τον τρόπο έγινε δυνατόν να συμπληρωθεί ένα μεγάλο κενό που είχε προκύψει από τη δυσκολία ανεύρεσης επαρκούς ανθρώπινου υλικού, ιδιαίτερα σε ό,τι αφορά ιστούς από «ευγενή» όργανα (π.χ., εγκέφαλος, καρδιά, κλπ.).

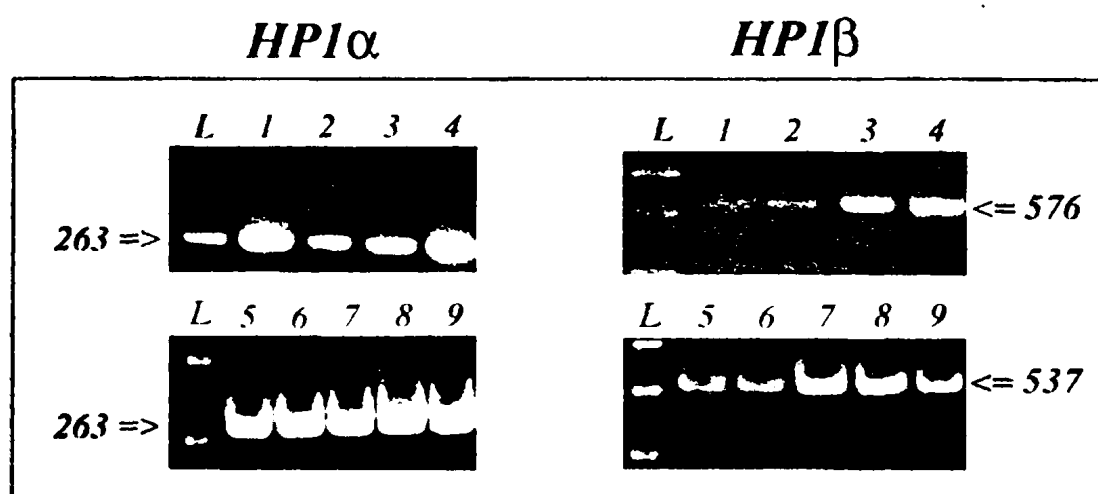
Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.1-1, η γενική εντύπωση που προκύπτει από τα ποσοτικά δεδομένα είναι ότι το γονίδιο της HP1 γ εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε όλους τους ανθρώπινους ιστούς, ενώ η έκφραση των δύο άλλων γονιδίων, ιδιαίτερα της HP1 α , παρουσιάζει διακυμάνσεις. Τα χαμηλότερα επίπεδα HP1 α mRNA ανιχνεύονται στην καρδιά (η οποία περιέχει επίσης χαμηλά επίπεδα HP1 β mRNA), το δέρμα, το ήπαρ και τη γλώσσα.





Σχήμα 3.1-1 Έκφραση των HPI πρωτεϊνών σε διάφορους ιστούς. Γραφική αναπαράσταση των συσσωρευμένων αποτελεσμάτων από μικροσυστοιχίες (Su et al., 2004, Ge et al., 2005 και Martens et al., 2006) που δείχνουν την έκφραση των 3 HPI μεταγραφημάτων σε 23 ιστούς: (1): ουροδόχος κύστη; (2): μαστός (3): εγκέφαλος; (4): πάγκρεας; (5): μυελός των οστών; (6): αίμα; (7): adrenal αδένες; (8): ωοθήκες; (9): μήτρα; (10): προστάτης αδένες; (11): λεμφαδένες; (12): πνεύμονας; (13): ήπαρ; (14): γλώσσα; (15): σιελογόνο αδένες; (16): υπόφυση; (17): δέρμα; (18): θύμος αδένες; (19): θυρεοειδής αδένες; (20): νεφρός; (21): όρχις; (22): καρδιά και (23): στόμαχος. Οι αστερίσκοι αναλογούν στα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης

Σε συμφωνία με τα παραπάνω, ανίχνευση των HP1α και HP1β μεταγραφημάτων με RT-PCR έδειξε ότι όλοι οι ιστοί και κυτταρικοί τύποι που να εξετάστηκαν περιέχουν ειδικά mRNA για τις αντίστοιχες πρωτίνες (Εικόνα 3.1-1).



Εικόνα 3.1-1 Ανίχνευση των HP1α και HP1β μεταγραφημάτων με RT-PCR σε διάφορους ιστούς και κυτταρικούς τύπους. Διαδρομή 1: αίμα (ενηλίκου), 2: αίμα από ομφάλιο λώρο, 3: λεμφαδένας, 4: θύμος αδένας, 5: κύτταρα K-562, 6: κύτταρα K-562 μετά από επαγωγή με HMBA, 7: κύτταρα Jurkat, 8: κύτταρα Jurkat μετά από επαγωγή με TPA, 9: κύτταρα Hela. (L): DNA δείκτης. Τα μεγέθη των προϊόντων της αντίδρασης (σε bp) υποδηλώνονται με βέλη. Για τις συνθήκες της αντίδρασης βλέπε «Υλικά και Μέθοδοι».

Ωστόσο, από τις μελέτες αυτές δεν ήταν δυνατόν να διαπιστωθεί εάν η έκφραση της HP1 είναι η ίδια σε όλα τα είδη κυττάρων που συνθέτουν τους διάφορους ιστούς, ή εάν υπάρχουν κύτταρο-ειδικά πρότυπα έκφρασης.

Για να διερευνήσουμε την πιθανότητα κυτταρο-ειδικότητας των HP1 πρωτεϊνών στους διάφορους ιστούς, πραγματοποιήθηκε εκτεταμένη ανοσοϊστοχημική μελέτη. Όπως φαίνεται στους Πίνακες 3.1-1, -2 και -3 διαπιστώνονται αρκετές διαφορές στην

ΙΣΤΟΣ/ ΚΥΤ. ΤΥΠΟΣ	ΙΣΟΜΟΡΦΗ	HP1α	HP1β
ΔΕΡΜΑ			
ΒΑΣΙΚΗ ΣΤΟΙΒΑΔΑ		+	+
ΑΚΑΝΘΩΤΗ ΣΤΟΙΒΑΔΑ		+	+
ΚΟΚΚΙΩΔΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΑ		+/-	-
ΔΙΑΥΓΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΑ		+/-	+
ΚΕΡΑΤΙΝΗ ΣΤΟΙΒΑΔΑ		+	+
ΣΜΗΓΜΑΤΟΓΟΝΟΙ ΑΔΕΝΕΣ		+/-	+
ΙΔΡΩΤΟΠΟΙΟΙ ΑΔΕΝΕΣ		+	+
ΗΠΛΑΡ			
ΗΠΙΑΤΟΚΥΤΤΑΡΑ		+	+
ΚΥΤΤΑΡΑ Kupffer		+	+
ΕΠΙΘ. ΧΟΛΗΦΟΡΩΝ ΠΟΡΩΝ		+	+
ΜΥΕΛΟΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ			
ΜΕΓΑΚΑΡΥΟΚΥΤΤΑΡΑ		+	-
ΠΡΟΕΡΥΘΡΟΒΛΑΣΤΕΣ		+	+
ΒΑΣΙΦΙΛΕΣ ΕΡΥΘΡΟΒΛ.		+/-	+/-
ΝΟΡΜΟΒΛΑΣΤΕΣ		+	+
ΠΡΟΜΥΕΛΟΚΥΤΤΑΡΑ		+	+
ΠΡΩΙΜΑ ΜΥΕΛΟΚΥΤΤΑΡΑ		+	+/-
ΜΕΤΑΜΥΕΛΟΚΥΤΤΑΡΑ		+/-	-
ΣΠΕΡΜΑΤΙΚΑ ΣΩΛΗΝΑΡΙΑ			
ΚΥΤΤΑΡΑ Sertoli		+	+/-
ΣΠΕΡΜΑΤΟΓΟΝΙΑ		+	+
ΠΡΩΤΟΓΕΝΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΚ.		+	+
ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΚ.		+/-	+
ΣΠΕΡΜΑΤΙΔΕΣ		+	+
ΣΤΟΜΑΧΟΣ			
ΛΕΙΕΣ ΜΥΙΚΕΣ ΙΝΕΣ		1/2	+
ΓΑΣΤΡΙΚΟΣ ΑΔ. (ΑΝΩ Μ.)		-	+
ΓΑΣΤΡΙΚΟΣ ΑΔ. (ΚΑΤ. Μ.)		+	+/-
ΣΚΕΛΕΤΙΚΟΣ ΜΥΣ			
ΜΥΙΚΕΣ ΙΝΕΣ		+/-	+/-
ΙΝΟΒΛΑΣΤΕΣ		+/-	+
ΛΙΠΟΚΥΤΤΑΡΑ		1/2	+
ΜΑΣΤΟΣ			
ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ		+/-	+
ΜΥΟΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤ.		+/-	+

Πίνακας 3.1-1 Εντόπιση των HP1α και HP1β πρωτεϊνών σε κύτταρα και ιστούς ανθρώπινης προελεύσεως. Ο πίνακας συνοψίζει τα μορφολογικά αποτελέσματα που προέκυψαν μετά από ανοσοϊστοχημική χρώση διάφορων ιστών με αντισώματα ειδικά για τις HP1α και HP1β. (+): χρώση, (-): απουσία χρώσης, (-/+): στο όριο ανίχνευσης, (+/-): διαφορική ανίχνευση, (κενό): δεν ήταν δυνατή η αξιολόγηση.

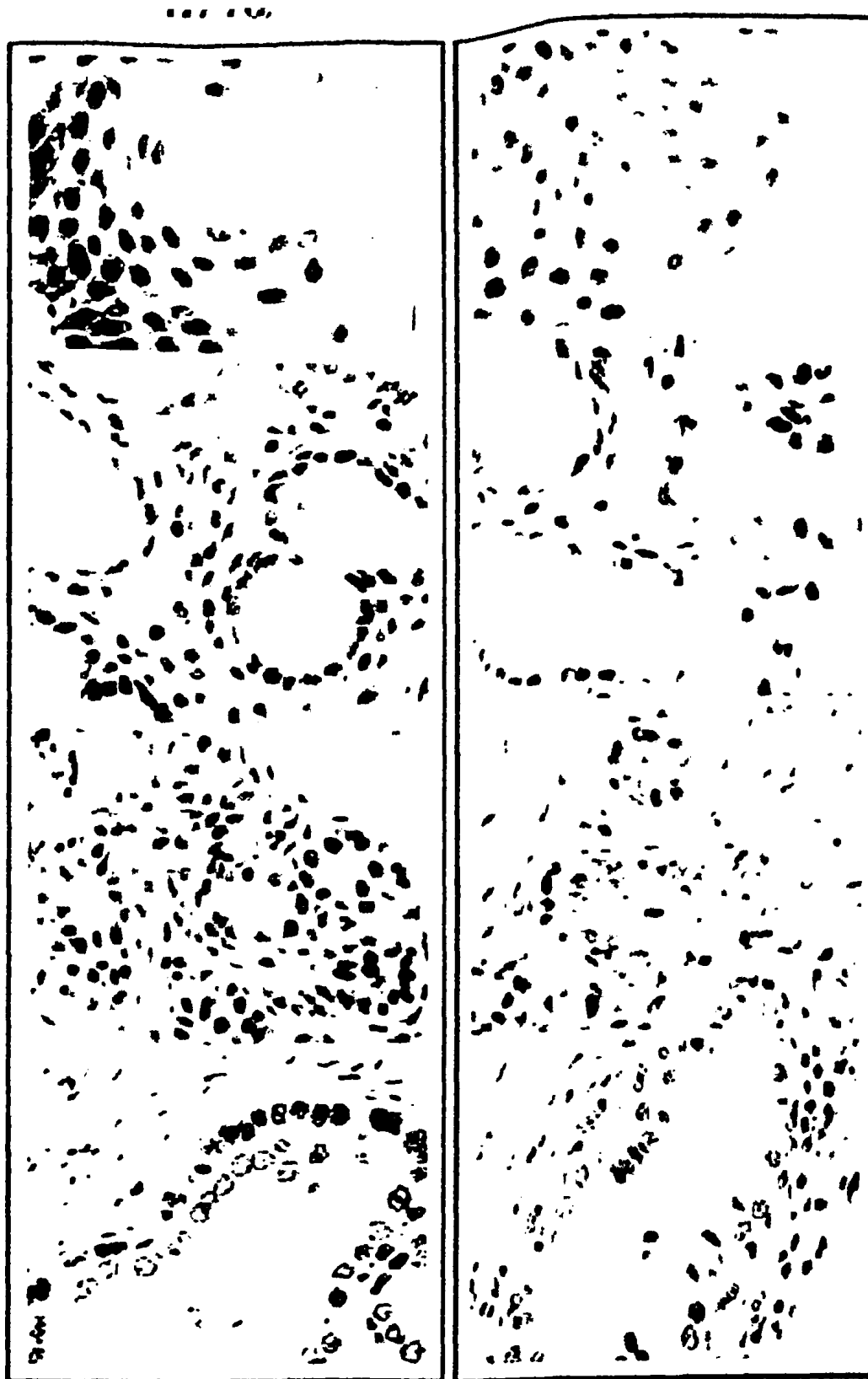


ανίχνευση των δύο HP1 πρωτεϊνών. Οι λιγότερο ορατές διαφορές παρατηρούνται στα επιθηλιακά κύτταρα που επενδύουν εκκριτικές μονάδες, όπως του στομάχου, του μαστού και του προστάτη (Εικόνα 3.1-2). Ακραίο παράδειγμα, κύτταρο-ειδικής εντόπισης των HP1α και HP1β αποτελεί το ήπαρ. Πιο συγκεκριμένα, τα επιθηλιακά κύτταρα των χοληφόρων αγγείων χρωματίζονται έντονα και για τις δύο HP1 πρωτεΐνες, στα ηπατοκύτταρα δεν ανιχνεύεται καμιά από τις παραπάνω ισόμορφες, ενώ τα κύτταρα Kupffer είναι θετικά μόνο για την HP1β (Εικόνα 3.1-3). Η επιλεκτική χρώση των κυττάρων του ηπατικού παρεγχύματος με τα δύο αντισώματα της HP1 είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών (Βλέπε Σχήμα 3.1-1) και εξηγεί για ποιό λόγο τα επίπεδα mRNA της HP1α είναι χαμηλότερα από αυτά της HP1β στο συγκεκριμένο όργανο.

Για να βεβαιωθούμε ότι η απουσία χρώσης στα παραπάνω είδη κυττάρων δεν οφείλεται σε μειωμένη προσβασιμότητα των αντισωμάτων, χρωματίστηκαν τομές ήπατος με αντισώματα που αναγνωρίζουν τη λαμίνη Β (laminB), ή τη διμεθυλιωμένη (me2K4) ιστόνη H3. Όπως είναι φανερό από την Εικόνα 4, όλα τα κύτταρα του ήπατος είναι θετικά στην χρώση με τα δύο αντισώματα. Ως εκ τούτου, η αδυναμία ανίχνευσης των HP1 πρωτεϊνών σε συγκεκριμένα είδη κυττάρων του ηπατικού παρεγχύματος, ηπατοκύτταρα και κύτταρα Kupffer, θα μπορούσε να αποδοθεί είτε στη πολύ χαμηλή τους έκφραση, ή εναλλακτικά, στην πλήρη έλλειψη τους στα εν λόγω κύτταρα.

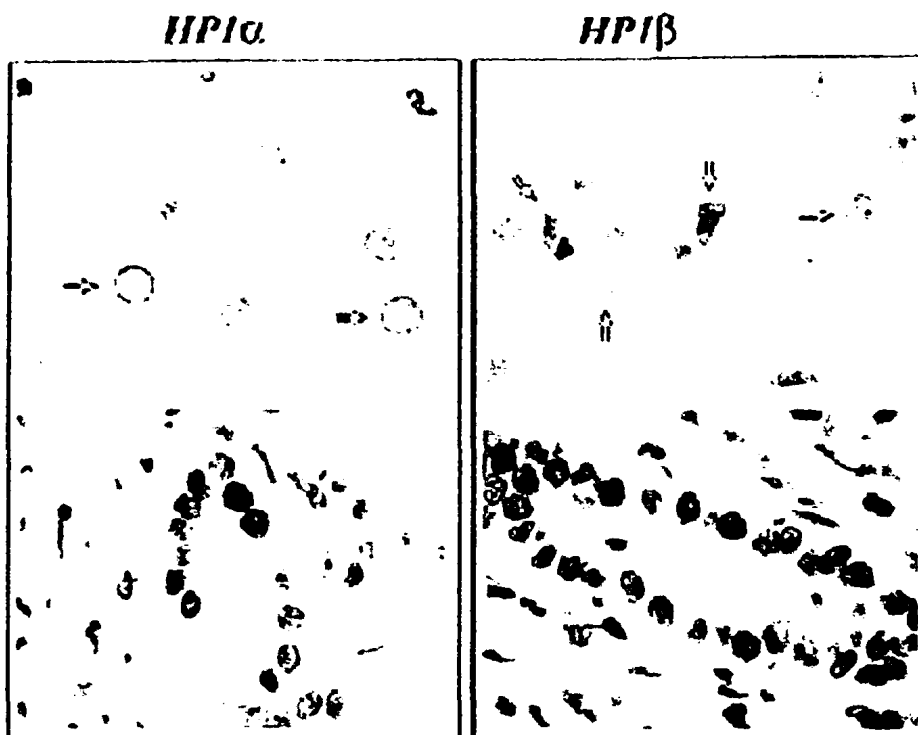
Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης το γεγονός ότι κατά την ωρίμανση των κυττάρων της αιμοποιητικής σειράς παρατηρείται σταδιακή ελάττωση και τελικώς αδυναμία ανίχνευσης της μίας ή και των δύο HP1 πρωτεϊνών (Πίνακας 3.1-1). Αυτό όμως δεν φαίνεται να ισχύει για τα λεμφοκύτταρα, πράγμα που μας ώθησε να μελετήσουμε την κατανομή των HP1α και HP1β σε διάφορα λεμφικά όργανα.



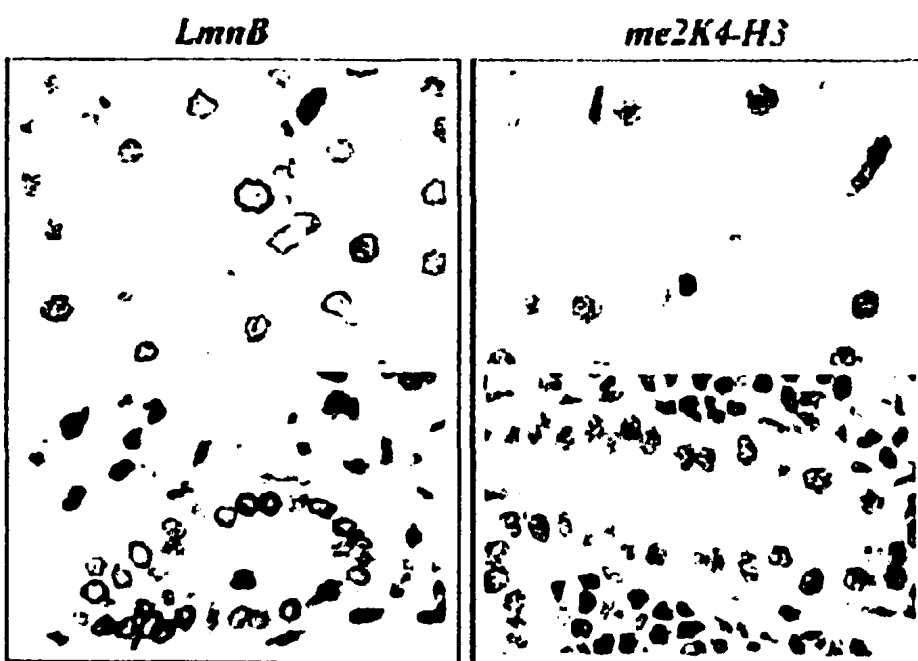


Εικόνα 3.1-2 Πρότυπα κατανομής των *HPIA* και *HPIB* πρωτεϊνών σε διάφορα είδη ανθρώπινων ιστών. Ανοσοϊστοχημική ανίχνευση των *HPI* (καφέ) σε επιδερμίδα, στομάχι, μαστό και προστάτη (από πάνω προς τα κάτω).

ΠΕΡ. ΧΟΛ. Π. ΗΠ. ΛΟΒΟΣ

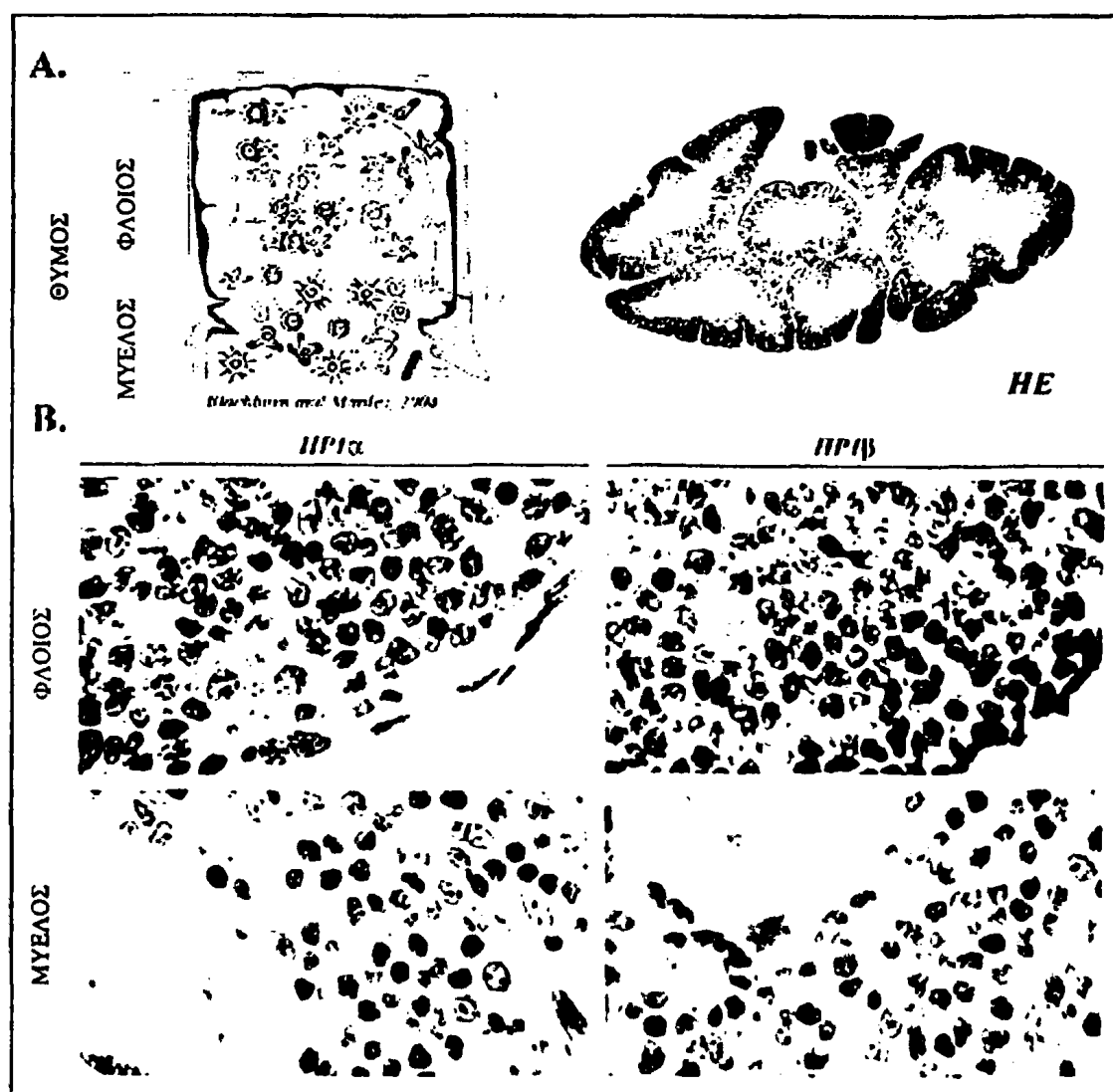


ΠΕΡ. ΧΟΛ. Π. ΗΠ. ΛΟΒΟΣ



Εικόνα 3.1-3 Ανίχνευση των *HP1α*, *HP1β*, *me2K4-H3* και *LaminB* στο ήπαρ. Τα κόκκινα βέλη επισημαίνουν τα κύτταρα *Kupffer*, ενώ τα μαύρα βέλη τα ηπατοκύτταρα.

Αρχικά, διερευνήσαμε τα πρότυπα κατανομής των HP1 πρωτεϊνών στο θύμο αδέν. Ο θύμος είναι πρωτογενές λεμφικό όργανο στο οποίο επιτελείται η ωρίμανση και διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων. Διαθέτει δύο μορφολογικά διακριτές περιοχές: το φλοιό (περιοχή των πρόδρομων και μη-ανοσοϊκανών θυμοκυττάρων) και το μυελό (που χαρακτηρίζεται από την παρουσία ώριμων T λεμφοκυττάρων). Βλέπε διαγραμματική αναπαράσταση στην Εικόνα 3.1-4.



Εικόνα 3.1-4 (Α) Σχηματική αναπαράσταση θύμου αδέν. και αντιπροσωπευτική ιστολογική τομή μετά από χρώση με αιματοξυλίνη-ηωσίνη (HE). (Β) Ανίχνευση των HP1α και HP1β στον φλοιό και τον μυελό ανθρώπινου θύμου αδέν.

HP1α			
Φ	ΚΥΤ. ΤΥΠΟΣ	ΧΡΩΣΗ	[%]
	ΕΠΙΘ. / ΜΟΝΟΚΥΤ. ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ	+/-	> 50 < 5
Μ	ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤ. ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ	+/-	> 50 > 50
HP1β			
Φ	ΚΥΤ. ΤΥΠΟΣ	ΧΡΩΣΗ	[%]
	ΕΠΙΘ. / ΜΟΝΟΚΥΤ. ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ	+/-	< 25 > 50
Μ	ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤ. ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ	+/-	< 25 > 50

Πίνακας 3.1-2 Εκατοστιαία αναλογία των HP1 θετικών κύτταρων του θύμου αδένος.

(+/-): διαφορική ανίχνευση, (Φ.): φλοιός και (Μ): μυελός.

Η ανοσοϊστοχημική μελέτη θυμικών τομών έδειξε ότι ο φλοιός χρωματίζεται σχετικά ομοιόμορφα για την HP1β, ενώ η κατανομή της HP1α είναι πιο επιλεκτική. Αντιθέτως, ο μυελός φαίνεται να χρωματίζεται εξίσου καλά και από τα δύο αντισώματα (Εικόνα 3.1-4B). Τα θυμοκύτταρα του φλοιού διακρίνονται σε DN (Double negative, 2%) και DP (Double positive) που αποτελούν και το 85-90% του συνολικού πληθυσμού των Τ λεμφοκυττάρων. Τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής μελέτης συνηγορούν στη επιλεκτική εντόπιση της HP1α στον DN πληθυσμό, ενώ η HP1β ισομορφή φαίνεται να συσχετίζεται με τα πολυπληθέστερα DP κύτταρα. Η ανίχνευση των HP1 αντιγόνων φαίνεται να ποικίλει στα ώριμα, ανοσοϊκανά Τ λεμφοκύτταρα του θύμου.

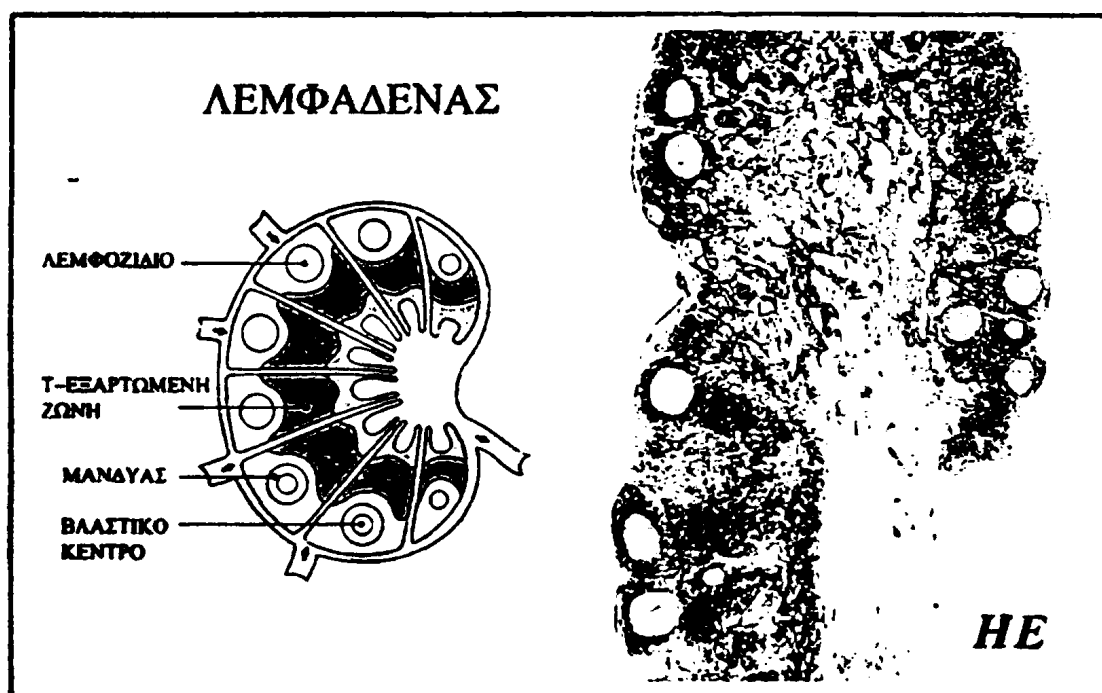
Ένα πολύ εντυπωσιακό «περιοχικό» πρότυπο κατανομής των δύο ισομορφών παρατηρήθηκε μετά από ανοσοϊστοχημική χρώση λεμφαδενικών τομών. Ο λεμφαδένας είναι ένα μικρό μórφωμα που χαρακτηρίζεται από μεγάλη κυτταρική ετερογένεια και παρέχει το κατάλληλο μικροπεριβάλλον για την ανοσολογική απόκριση. Από ιστολογικής απόψεως, διακρίνεται σε τρεις περιοχές: το φλοιό, τον παραφλοιό και το μυελό. Τη λειτουργική μονάδα του λεμφαδένα απαρτίζουν το λεμφοζίδιο (B-εξαρτώμενη ζώνη) και ένα διαμέρισμα πλούσιο σε T κύτταρα (T-εξαρτώμενη ζώνη; βλέπε διαγραμματική αναπαράσταση στην Εικόνα 3.1-5).

Στην Εικόνα 3.1-6 παρουσιάζονται χρώσεις φυσιολογικών ανθρώπινων λεμφαδένων με αντισώματα που αναγνωρίζουν τις HP1α και HP1β ισομορφές. Το πρότυπο κατανομής των δύο αυτών πρωτεϊνών φαίνεται να είναι συμπληρωματικό, τουλάχιστον στη B-εξαρτωμένη ζώνη. Πιο συγκεκριμένα, τα βλαστικά κέντρα των δευτερογενών λεμφοζιδίων χρωματίζονται έντονα με το αντίσωμα της HP1α ενώ, αντιθέτως, η HP1β εντοπίζεται στην περιοχή του μανδύα και στα πρωτογενή λεμφοζίδια. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.1-6B, στην T-εξαρτώμενη περιοχή δεν παρατηρείται κάποιο συγκεκριμένο πρότυπο κατανομής: οι βλάστες βάφονται έντονα με το αντίσωμα της HP1α, ενώ τα μικρά λεμφοκύτταρα δεν παρουσιάζουν επιλεκτική χρώση για κάποια από τις δύο ισομορφές. Διπλή χρώση με διάφορους κυτταρικούς δείκτες (CD20, CD4, CD8) δεν έδειξε συσχέτιση των HP1 πρωτεϊνών με την B ή την T σειρά (Εικόνες 3.1-7 και -8).

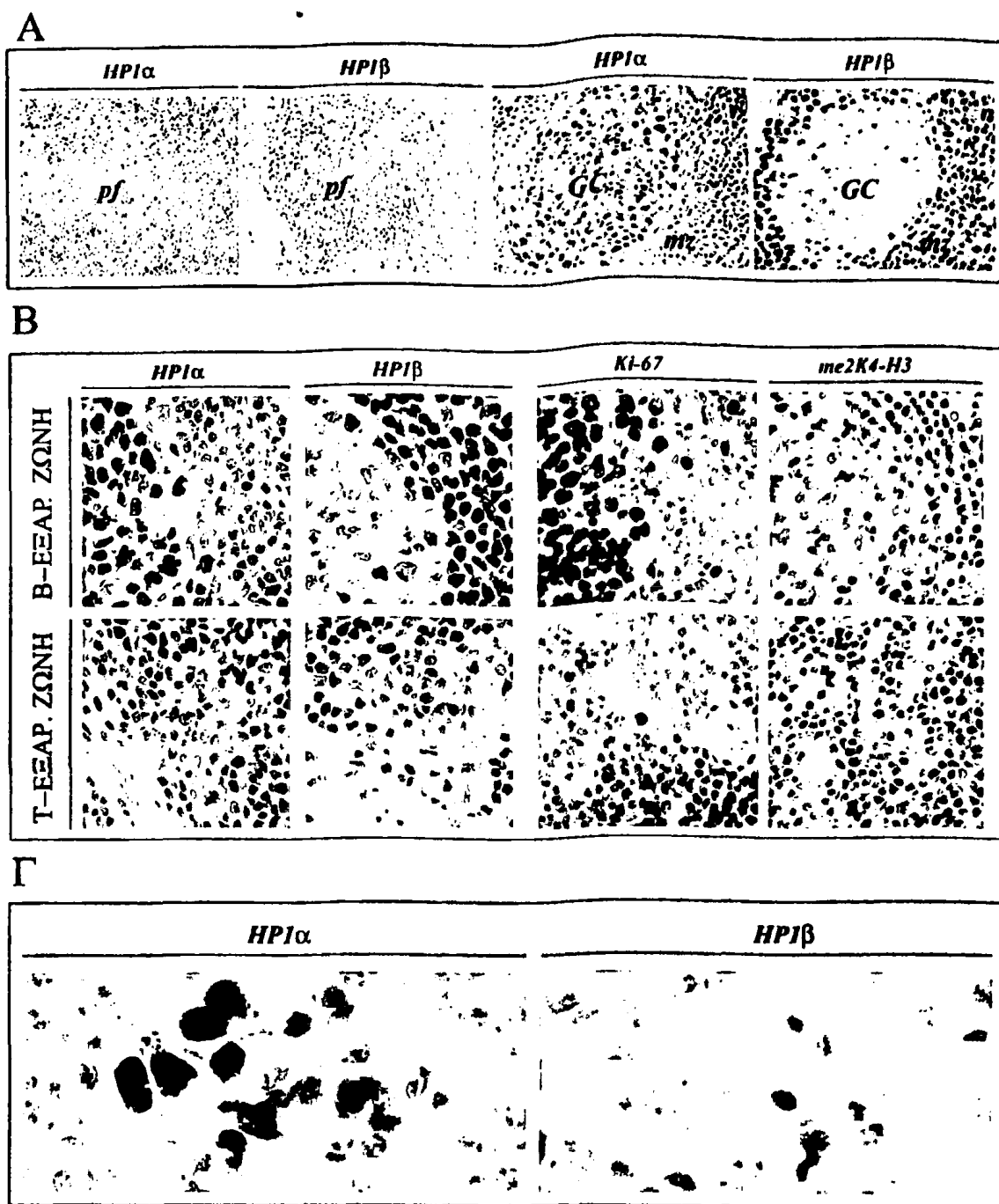
Για να επιβεβαιώσουμε ότι η εκλεκτική χρώση που παρατηρείται στην B-εξαρτώμενη ζώνη αντιπροσωπεύει πράγματι μια διαφορετική κατανομή των HP1α και HP1β, έγινε βαφή των δειγμάτων για πυρηνικά αντιγόνα που παρουσιάζουν ομοιόμορφο (me2K4-H3) ή επιλεκτικό (Ki-67) πρότυπο έκφρασης. Είναι φανερό από την Εικόνα 3.1-6B ότι το αντίσωμα για την me2K4 χρωματίζει αδιάκριτα όλους τους κυτταρικούς τύπους που απαρτίζουν το λεμφαδένα. Αντιθέτως, το αντίσωμα που αναγνωρίζει την Ki-67 εντοπίζεται μόνο στα δυνητικώς διαιρούμενα κύτταρα του βλαστικού κέντρου και της T ζώνης (T και B βλάστες).



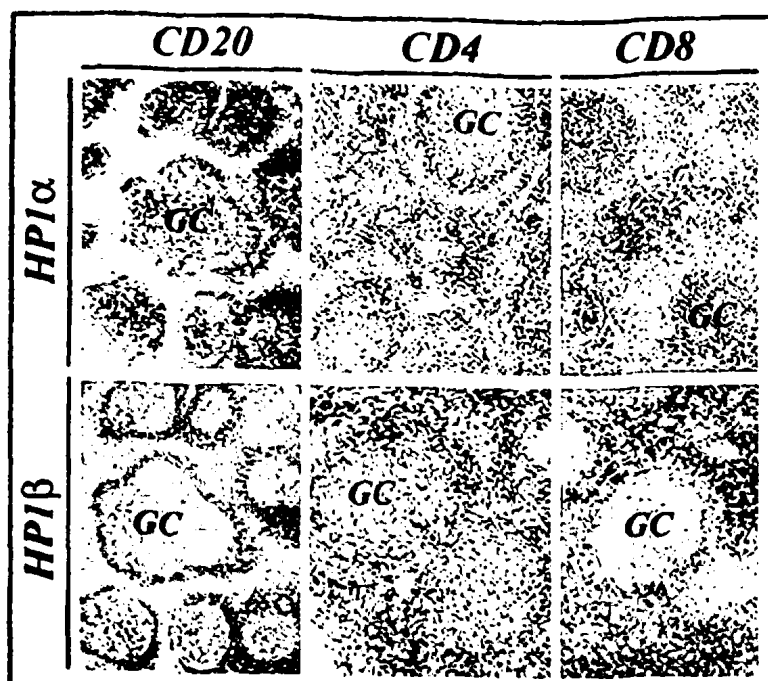
Οι παραπάνω παρατηρήσεις σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα πρόσφατης μεταγραφικής ανάλυσης της αντίδρασης του βλαστικού κέντρου (δηλ. της μετάβασης των άδολων Β-λεμφοκυττάρων σε κεντροβλάστες και κεντροκύτταρα, και στη συνέχεια σε Β-κύτταρα μνήμης), η οποία δείχνει σημαντική αύξηση του mRNA της HP1α κατά τη διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων (Klein et al., 2003) συνηγορούν για τη γνησιότητα του συμπληρωματικού πρότυπου εντόπισης των HP1 πρωτεϊνών.



Εικόνα 3.1-5. Σχηματική αναπαράσταση λεμφαδένα και αντιπροσωπευτική ιστολογική τομή μετά από χρώση με αιματοξυλίνη-ηωσίνη (HE).

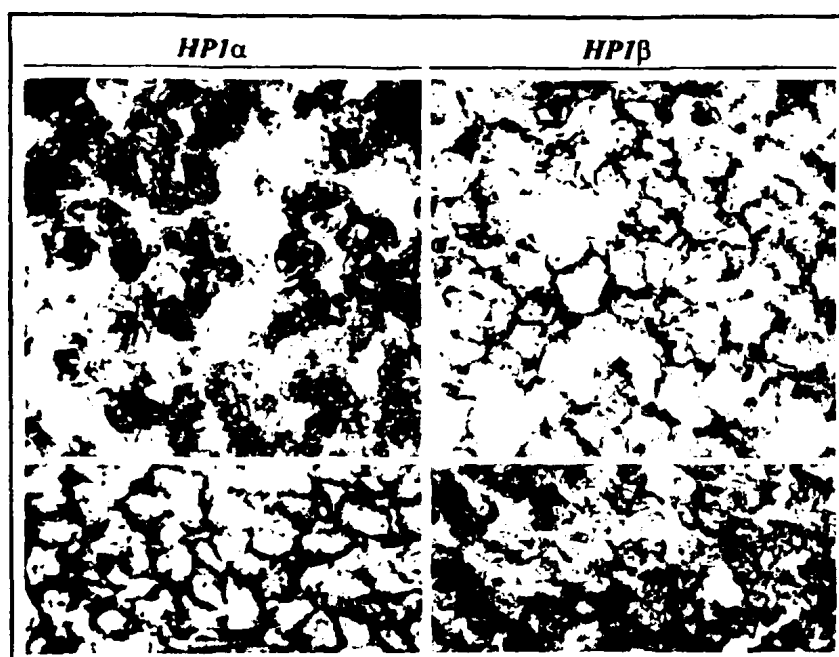


Εικόνα 3.1-6 (A): Τομές φυσιολογικού ανθρώπινου λεμφαδένα χρωματισμένες με αντισώματα κατά της HP1α και HP1β (καφέ) και αιματοζυλίνη (πρωτογενές λεμφοζίδιο και βλαστικό κέντρο). **(B):** Τομές φυσιολογικού ανθρώπινου λεμφαδένα χρωματισμένες με αντισώματα κατά της HP1α, HP1β, Ki-67 και me2K4-H3 (καφέ) και αιματοζυλίνη (B- και T-εξαρτώμενες περιοχές). **(Γ):** Εντόπιση των HP1α και HP1β στα πρώιμα στάδια της αντίδρασης του βλαστικού κέντρου. GC=βλαστικό κέντρο, mz=μανδύας, pf=πρωτογενές λεμφοζίδιο.



Εικόνα 3.1-7. Διπλή χρώση ανθρώπινων λεμφαδένων με αντισώματα κατά των *HPIα* και *HPIβ* ισομορφών (καφέ) και τους *B* (*CD20*) και *T* (*CD4* ή *CD8*) δείκτες (κόκκινο).

GC: βλαστικό κέντρο.



Εικόνα 3.1-8 Εντοπισμός των *HPIα/HPIβ* (καφέ) και *CD20* (κόκκινο) στο βλαστικό κέντρο (πάνω) και τον μανδύα (κάτω).

ΛΕΜΦΑΔΕΝΑΣ			
HP1α			
B-ΕΞ. ΖΩΝΗ	ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ Τ.	ΧΡΩΣΗ	[%]
	B-ΒΛΑΣΤΕΣ, ΚΕΝΤΡ.	+++	> 90
	ΜΙΚΡΑ Β ΚΥΤ.	-	> 90
	ΜΙΚΡΑ Τ ΚΥΤ.	+/-	5-40
	ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ	-/+	> 90
T-ΕΞ. ΖΩΝΗ	T-ΒΛΑΣΤΕΣ	+++	> 90
	ΜΙΚΡΑ Τ ΚΥΤ.	+/-	50
	ΜΙΚΡΑ Β ΚΥΤ.	-	> 90
	IDC	-/+	> 90
	ΙΝΟΒΛΑΣΤΕΣ	-	> 90
	ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ Κ.	-	> 90
	HEV	+/-	20
	ΛΕΙΕΣ ΜΥΙΚΕΣ ΙΝΕΣ	-	> 90
HP1β			
B-ΕΞ. ΖΩΝΗ	ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ Τ.	ΧΡΩΣΗ	[%]
	B-ΒΛΑΣΤΕΣ, ΚΕΝΤΡ.	-	> 90
	ΜΙΚΡΑ Β ΚΥΤ.	+++	> 90
	ΜΙΚΡΑ Τ ΚΥΤ.	+/-	50
	ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ	+	> 90
T-ΕΞ. ΖΩΝΗ	T-ΒΛΑΣΤΕΣ	-	> 90
	ΜΙΚΡΑ Τ ΚΥΤ.	+/-	60
	ΜΙΚΡΑ Β ΚΥΤ.	+++	> 90
	IDC	+++	> 90
	ΙΝΟΒΛΑΣΤΕΣ	+	> 90
	ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ Κ.	+	> 90
	HEV	-	> 90
	ΛΕΙΕΣ ΜΥΙΚΕΣ ΙΝΕΣ	+	> 90

Πίνακας 3.1-3 Εκατοστιαία αναλογία των HP1 θετικών κύτταρων στον λεμφαδένα. (-): αρνητική, (+++): έντονα θετική, (+): θετική, (+/-): διαφορική αντίχνευση, (-/+): στο όριο αντίχνευσης.

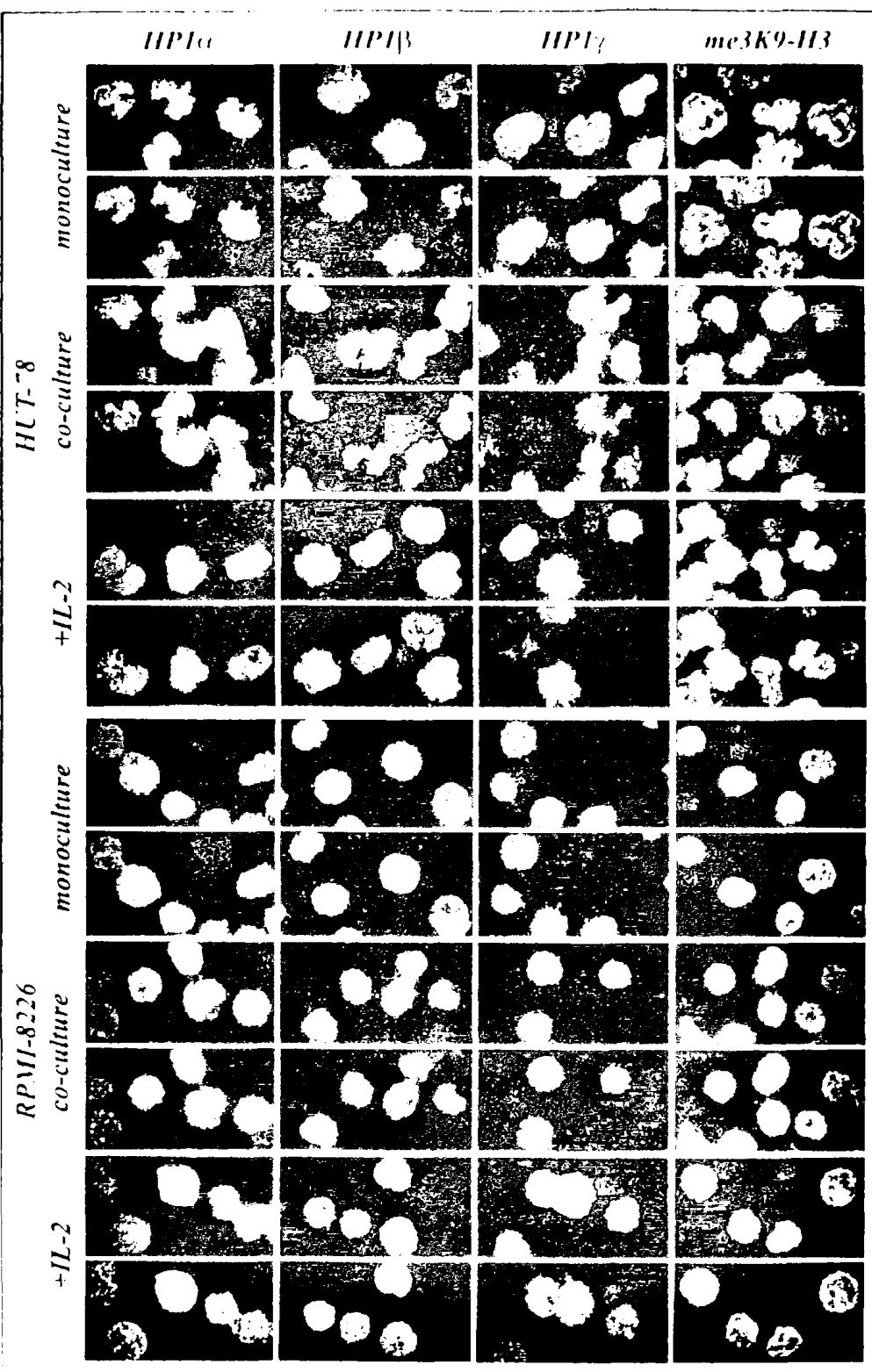


Για να μελετηθεί η έκφραση και υποκυτταρική κατανομή των HP1α και HP1β σε μονήρη κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν δύο ανθρώπινες σειρές που αντιστοιχούν σε ώριμα T- (HUT-78) και B- (RPMI-8226) λεμφοκύτταρα. Οι κυτταρικές σειρές HUT-78 και RPMI-8226 παρουσιάζουν χαρακτηριστικά ώριμων, βοηθητικών (Th0) λεμφοκυττάρων και ώριμων πλασματοκυττάρων, αντίστοιχα.

Μορφολογική ανάλυση έδειξε ότι η HP1γ κατανέμεται διάχυτα στον πυρήνα των παραπάνω κύτταρων, όπως ήταν αναμενόμενο από παλαιότερες μελέτες. Η κατανομή της HP1β, δηλ. ο ειδικός εντοπισμός σε ευκρινείς ετεροχρωματινικές εστίες, ήταν επίσης η αναμενόμενη (Εικόνα 3.1-9). Ωστόσο, διαπιστώθηκε ότι το πρότυπο κατανομής της HP1α διαφέρει σημαντικά από το πρότυπο που είχε παρατηρηθεί σε άλλες κυτταρικές σειρές (π.χ κύτταρα HeLa). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.1-9, η HP1α δεν εντοπίζεται σε μεγάλες ετεροχρωματινικές εστίες, αλλά κατανέμεται σε μικρές κοκκιώδεις συναθροίσεις διασκορπισμένες σε όλη την έκταση του πυρήνα.

Για να εξετάσουμε αν η κατανομή των HP1α και HP1β στα HUT-78 και RPMI-8226 είναι “δυναμική” έγινε συν-καλλιέργεια των παραπάνω κυτταρικών τύπων. Πιο συγκεκριμένα, οι εν λόγω κυτταρικές σειρές τοποθετήθηκαν σε ειδικό τρυβλίο που χωρίζεται σε δύο διαμερίσματα από ημιπερατή μεμβράνη (transwell system) και επιτρέπει τη διέλευση διαλυτών ουσιών. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.1-9 το πρότυπο κατανομής της HP1α αλλάζει δραματικά μετά από συν-καλλιέργεια, καθώς η HP1α πρωτεΐνη εντοπίζεται τώρα σε μεγάλες εστίες που αντιστοιχούν σε ετεροχρωματινικές περιοχές. Σε αντίθεση με την HP1α, η κατανομή της HP1β παρουσιάζει λιγότερο προφανείς μεταβολές ενώ, η HP1γ δεν μεταβάλλεται ουσιωδώς με την συν-καλλιέργεια. Ορατές μεταβολές δεν παρατηρηθήκαν και στην κατανομή της τριμεθυλιωμένης (me₃K9) ιστόνης H3, ενός κλασσικού ετεροχρωματινικού δείκτη.





1-9 Υπό-πυρηνική κατανομή των *HP1 α* , *HP1 β* , *HP1 γ* και *me3K9-H3* (πράσινο) σε *HCT-8* και *RPMI-8226* υπό διάφορες συνθήκες καλλιέργειας (μονοκαλλιέργεια, συν-καλλιέργεια ή καλλιέργεια παρουσία IL-2). Ο πυρήνας έχει χρωματιστεί με PI.

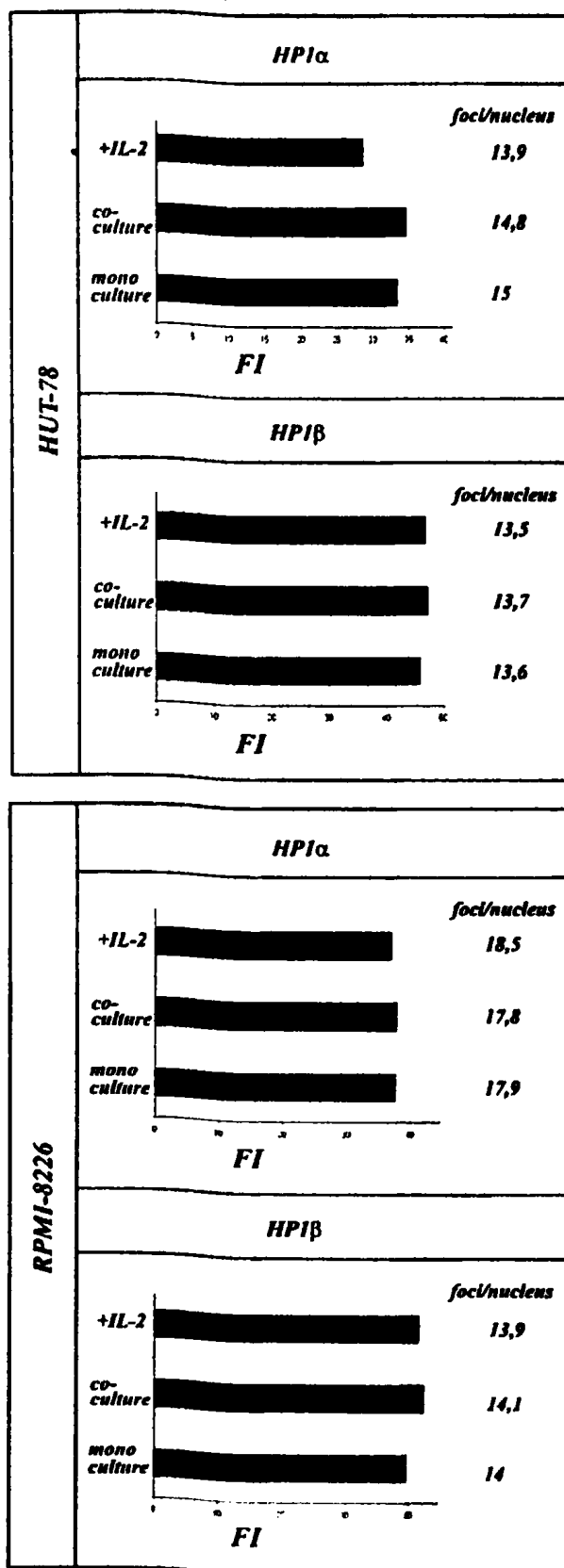


Επειδή οι συνθήκες συν-καλλιέργειας δεν επιτρέπουν τη φυσική επαφή των Τ και Β κυττάρων, θεωρήσαμε ότι η παρατηρούμενη εστιακή εντόπιση πρέπει να οφείλεται σε κάποιον/κάποιους παράγοντες που εκκρίνονται από τα κύτταρα. Καθώς τα HUT-78 διαθέτουν υποδοχείς για κυτοκίνες θελήσαμε να διερευνήσουμε εάν ο HP1α εστιακός φαινότυπος αναπαράγεται με την προσθήκη «χυμικών» παραγόντων. Όπως φαίνεται την Εικόνα 3.1-9, προσθήκη IL-2 στο μέσο καλλιέργειας είναι αρκετή για να προκαλέσει συσσώρευση της HP1α σε μεγάλες ετεροχρωματικές εστίες.

Διπλή χρώση με αντισώματα της HP1α και HP1β αποκάλυψε την συν-κατανομή κατανομή των δύο πρωτεϊνών στις παραπάνω συνθήκες (μόνο-καλλιέργεια, συν-καλλιέργεια και παρουσία IL-2). Όπως είναι φανερό από την Εικόνα 3.1-10 οι μεγάλες HP1α συσσωρεύσεις που παρατηρούνται μετά από συν-καλλιέργεια ή προσθήκη IL-2 εμπεριέχουν HP1β.

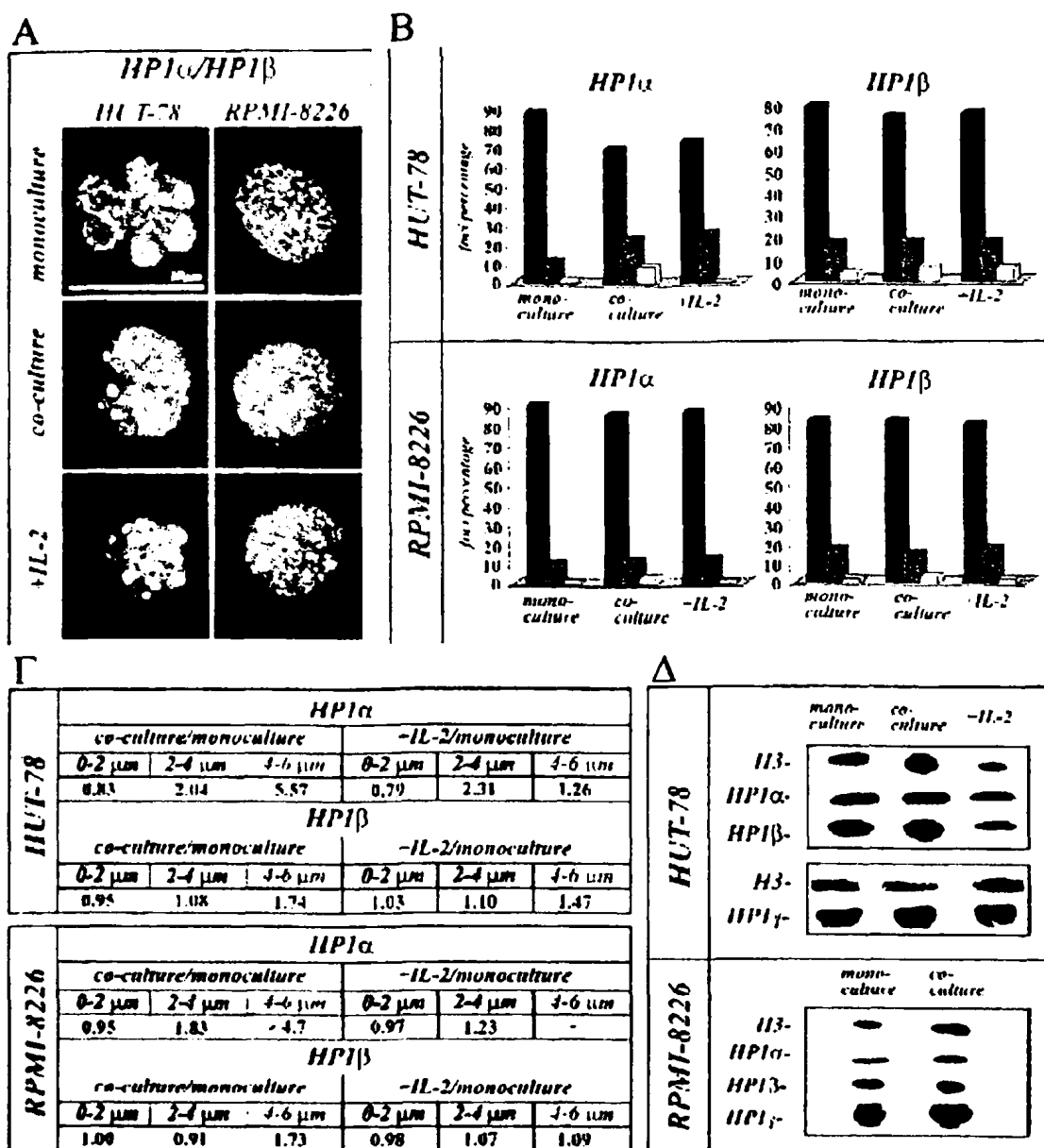
Για να διερευνήσουμε περαιτέρω τα πρότυπα κατανομής της HP1 προχωρήσαμε σε μορφομετρική ανάλυση. Ο συνολικός αριθμός των HP1 εστιών ανά κύτταρο και η σχετική ένταση φθορισμού ανά μονάδα πυρηνικής επιφάνειας δεν φαίνεται να μεταβάλλονται σημαντικά μετά από συν-καλλιέργεια ή παρουσία IL-2 (Γράφημα 3.1-1). Ωστόσο, ακριβέστερη καταγραφή αποκάλυψε ότι οι HP1α εστίες σε κύτταρα που έχουν συν-καλλιεργηθεί ή επωασθεί με IL-2, είναι πολύ μεγαλύτερες σε μέγεθος. Για παράδειγμα, ο αριθμός των HP1α εστιών μεγέθους 2-4μ (ενδιάμεση κατηγορία) είναι διπλάσιος στα HUT-78 κύτταρα που έχουν συν-καλλιεργηθεί σε σύγκριση με τους μάρτυρες (μόνο-καλλιέργεια), ενώ οι εστίες μεγέθους 4-6μ παρουσιάζουν σχετική αύξηση 5.6X (Εικόνα 3.1-10 Γράφημα Β, Πίνακας Γ). Διαπιστώθηκε επίσης ότι, παρουσία IL-2, η ενδιάμεση κατηγορία αυξάνεται κατά 2.3X.





Γράφημα 3.1-1 Γραφική απεικόνιση της σχετικής έντασης φθορισμού ανά μονάδα πυρηνικής επιφάνειας και μέσος όρος του αριθμού των HPI εστιών ανά κύτταρο, σε μονο-καλλιέργειες HUT-78 RPMI-8226, μετά από συν-καλλιέργεια ή παρουσία IL-2.





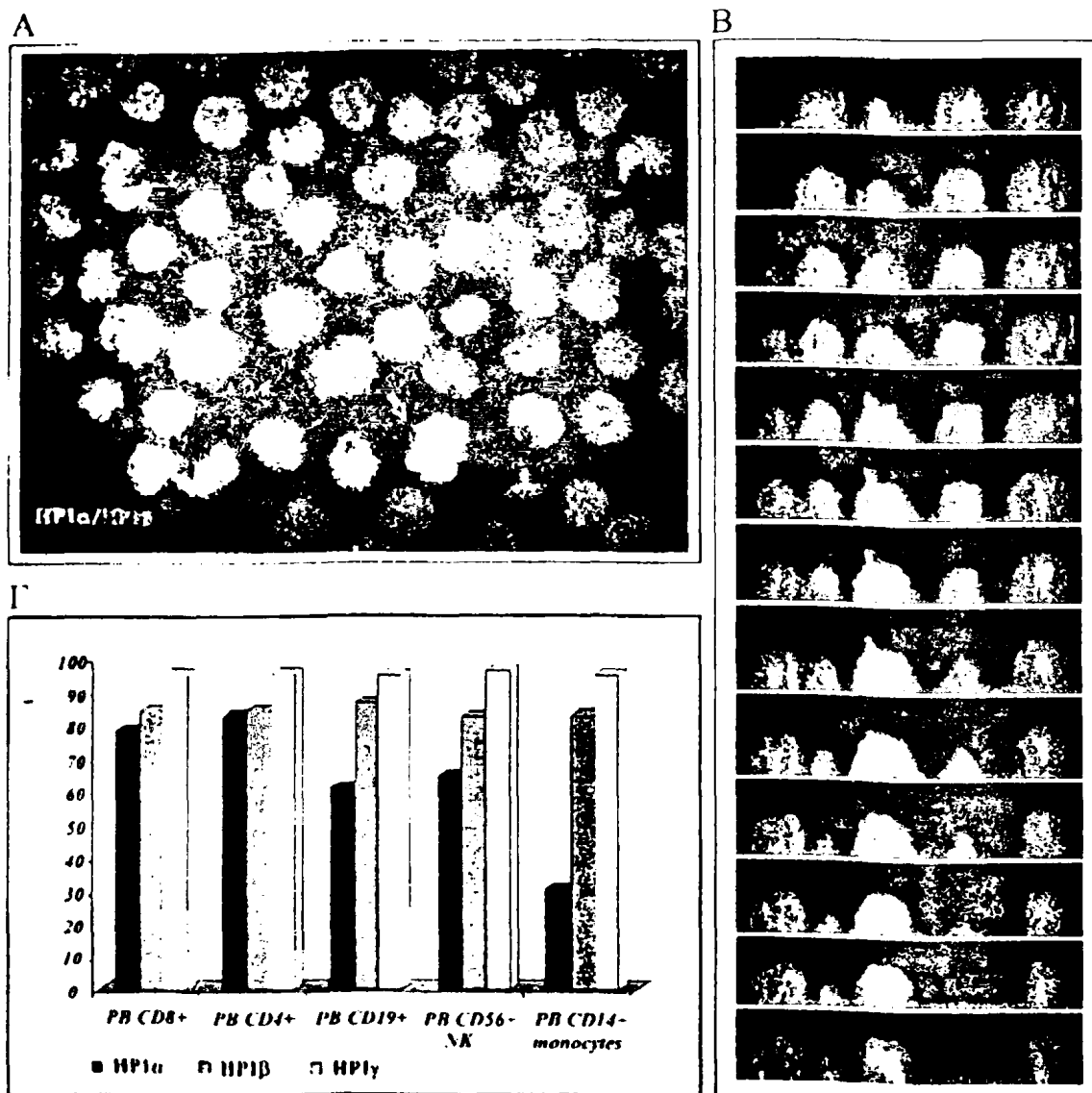
Εικόνα 3.1-10 Ανακατανομή των HP1 πρωτεϊνών σε αθανатоποιημένες T- και B- κυτταρικές σειρές. (Α) Διπλή χρώση με αντισώματα κατά των HP1 α (πράσινο) και HP1 β (κόκκινο) σε μονο-, συν-καλλιέργειες, ή παρουσία IL-2. (Β) Μορφομετρικά αποτελέσματα που δείχνουν την αναλογία των HP1 α και HP1 β εστιών στους πυρήνες των HUT-78 και RPMI-8226 κυττάρων σε διαφορές συνθήκες καλλιέργειας (κυανή στήλη: εστίες μεγέθους 0-2 μ , πράσινη στήλη: εστίες μεγέθους 2-4 μ και κίτρινη στήλη: εστίες μεγέθους 4-6 μ). (Γ) Λόγος των διάφορων κατηγοριών των HP1 εστιών μετά από συν-καλλιέργεια ή παρουσία IL-2 σε σχέση με τις μονο-καλλιέργειες. (Δ) Ανοσοαποτύπωση κατά Western που δείχνει τα επίπεδα των HP1 α , HP1 β και της ιστόνης H3 σε πυρηνικά εκχυλίσματα HUT-78 και RPMI-8226 κυττάρων πριν και μετά από τη συν-καλλιέργεια ή παρουσία IL-2.



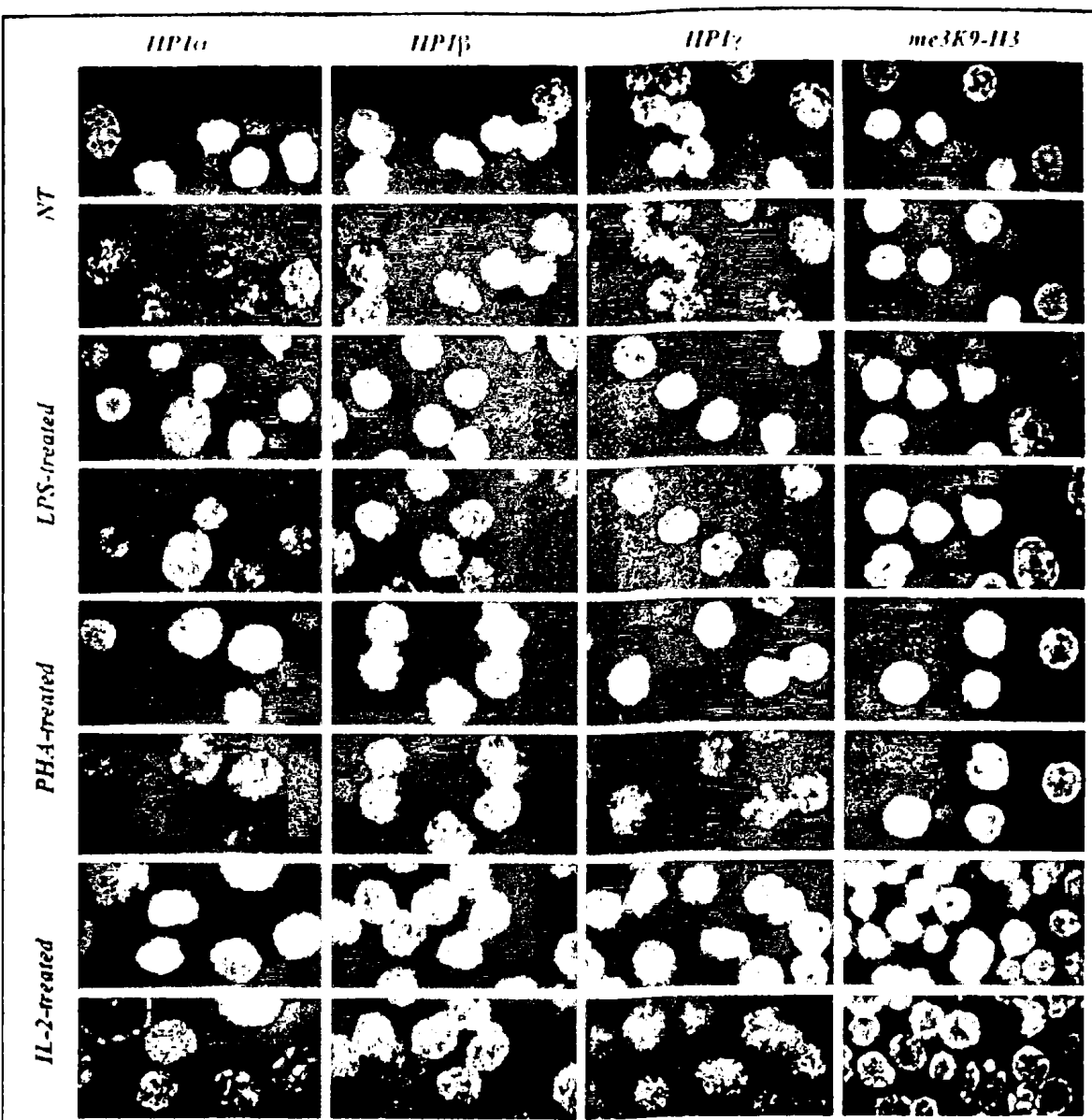
Αντιθέτως, δεν παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές στο μέγεθος των HP1β συσσωρεύσεων. Ο αριθμός των HP1β εστιών της ενδιάμεσης κατηγορίας δεν φαίνεται να μεταβάλλεται μετά από συν-καλλιέργεια ή παρουσία IL-2, ενώ μεγαλύτερη σχετική αύξηση (περίπου 1.7X) παρατηρείται μετά από συν-καλλιέργεια στις εστίες μεγέθους 4-6μ. Ανάλογα ήταν τα αποτελέσματα και στην κυτταρική σειρά RPMI-8226, παρόλο που οι διαφορές στις HP1α εστίες δεν ήταν το ίδιο εντυπωσιακές (Εικόνα 3.1-10, Γράφημα Β και Πίνακας Γ). Η παραπάνω μορφομετρική ανάλυση, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από ανάλυση κατά western υποδηλώνουν ότι τα εξωκυττάρια ερεθίσματα επηρεάζουν μάλλον την κατανομή και όχι τα επίπεδα έκφρασης της HP1α πρωτεΐνης.

Ένα σύνθηδες ερώτημα που προκύπτει από μελέτες που χρησιμοποιούν κυτταρικές σειρές είναι αν τα απορρέοντα αποτελέσματα χαρακτηρίζουν την «αθανатоποιημένη» κατάσταση, ή αν έχουν ευρύτερη φυσιολογική σημασία. Για να επιβεβαιώσουμε τις *in vitro* παρατηρήσεις υπό φυσιολογικές συνθήκες, μελετήσαμε την κατανομή των HP1 πρωτεϊνών σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος. Καθώς τα λεμφοκύτταρα αποτελούν περίπου το 30-40% του συνολικού πληθυσμού των κυττάρων στο αίμα, έγινε εμπλουτισμός του λεμφοκυτταρικού πληθυσμού χρησιμοποιώντας βαθμιδώσεις φικόλλης. Χρώση με ειδικά αντισώματα έδειξε ότι η πλειοψηφία των κυττάρων διαθέτει σχετικά ευκρινείς HP1β εστίες ενώ, η HP1α και HP1γ κατανέμονται διάχυτα (Εικόνα 3.1-11 και -12). Ωστόσο, διαπιστώθηκε ότι υπάρχει ένας πολύ μικρός αριθμός κύτταρων που διαθέτουν μεγάλες HP1α εστίες, πράγμα το οποίο επιβεβαιώνεται και σε εγκάρσιες τομές που έχουν ληφθεί με συνεστιακό μικροσκόπιο (Εικόνα 3.1-11). Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι ένα μικρό ποσοστό (~3%) των περιφερικών λεμφοκυττάρων είναι ενεργοποιημένα. Επομένως, για να εξετάσουμε αν κατά την ενεργοποίησή τους η HP1α συγκεντρώνεται σε μεγάλες εστίες, καλλιεργήσαμε περιφερικά λεμφοκύτταρα παρουσία μιτογόνων.

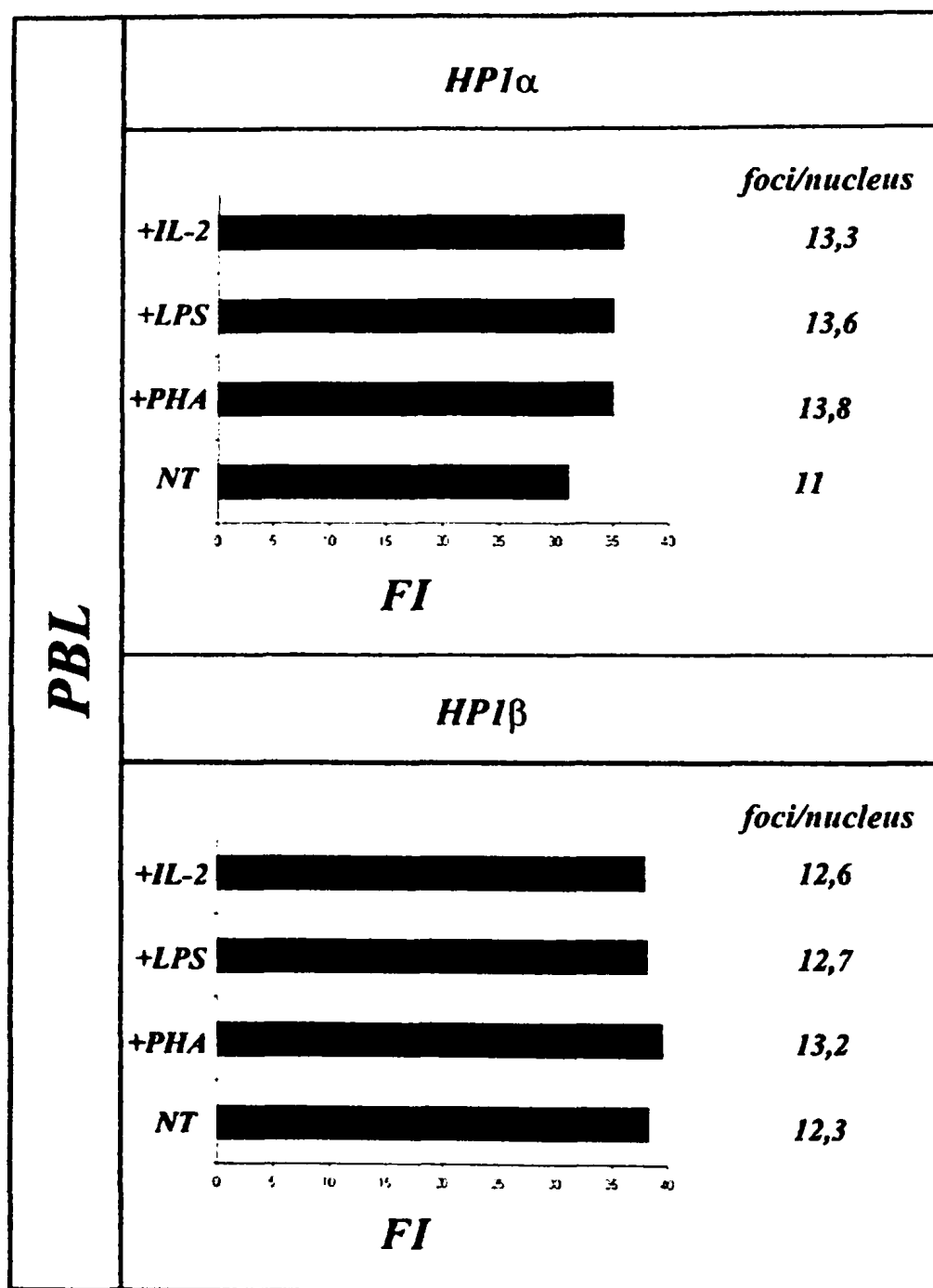




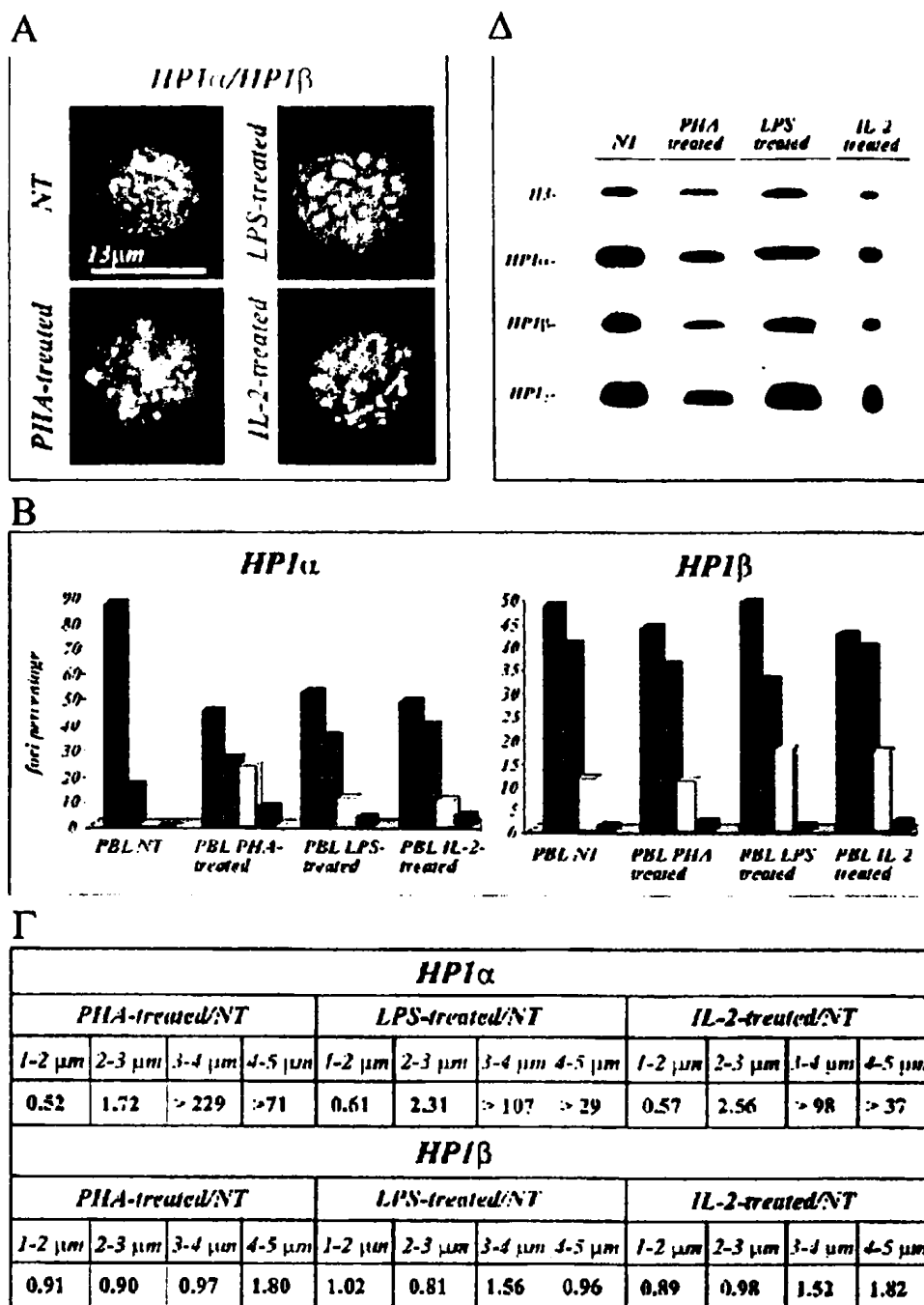
Εικόνα 3.1-11 Έκφραση και κατανομή των HP1 πρωτεϊνών σε κύτταρα ανθρώπινου περιφερικού αίματος. (Α) και (Β) διπλή χρώση με αντισώματα κατά της HP1α (πράσινο) και HP1β (κόκκινο). Το βέλος στην (Α) επισημαίνει ένα σπάνιο υπό-πληθυσμό λεμφοκυττάρων που διαθέτουν μεγάλες HP1α εστίες πριν την ενεργοποίηση με μιτογόνα. Στην (Β) παρουσιάζονται διαδοχικές τομές που έχουν ληφθεί στον xz άξονα. (Γ) Γραφική αναπαράσταση αποτελεσμάτων από μελέτη μικροσυστοιχιών που δείχνουν την σχετική έκφραση των HP1 ισομορφών σε διαφορά είδη κυττάρων του περιφερικού αίματος.



Σχήμα 3.1-12 Κατανομή διαφόρων χρωματινικών δεικτών σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος. Χρώση με αντισώματα κατά της HP1 α , HP1 β , HP1 γ ή me3K9-H3 (πράσινο) και PI (κόκκινο). Τα λεμφοκύτταρα έχουν καλλιεργηθεί ως εξής: NT: χωρίς την παρουσία κάποιου μιτογόνου (μάρτυρες), PHA-treated: παρουσία φυτο-αιμαγλουτινίνης, LPS-treated: παρουσία λιπο-πολυσακχαρίτη και IL-2-treated: παρουσία ιντερλευκίνης 2.



Γράφημα 3.1-2 Γραφική απεικόνιση της σχετικής έντασης φθορισμού ανά μονάδα πυρηνικής επιφάνειας και μέσος όρος του αριθμού των HP1 εστιών ανά κύτταρο, σε διάφορες συνθήκες καλλιέργειας.



Εικόνα 3.1-13 Ανακατανομή των *HP1* πρωτεϊνών σε λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος. (Α) Διπλή χρώση με αντισώματα κατά των *HP1α* (πράσινο) και *HP1β* (κόκκινο) πριν ή μετά από καλλιέργεια με PHA, LPS ή IL-2. (Β) Μορφομετρικά αποτελέσματα που δείχνουν την αναλογία των *HP1α* και *HP1β* εστιών στους πυρήνες των λεμφοκυττάρων σε διάφορες συνθήκες καλλιέργειας (κυανή στήλη: εστίες μεγέθους 1-2μ, πράσινη στήλη: εστίες μεγέθους 2-3μ, κίτρινη στήλη: εστίες μεγέθους 4-5μ και γαλάζια στήλη: εστίες μεγέθους 4-5μ). (Γ) Λόγος των διάφορων κατηγοριών των *HP1* εστιών μετά από καλλιέργεια PHA, LPS ή παρουσία IL-2 σε σχέση με τους μάρτυρες. (Δ) Ανοσοαποτύπωση κατά Western που δείχνει τα επίπεδα των *HP1α*, *HP1β* και της ιστόνης H3 σε πυρηνικά εκχυλίσματα κυττάρων πριν και μετά από καλλιέργεια με PHA, LPS ή παρουσίας IL-2.



Προσθήκη PHA ή LPS φάνηκε να αυξάνει δραματικά το ποσοστό των κυττάρων που παρουσιάζουν τον HP1α-εστιακό φαινότυπο (Εικόνα 3.1-12). Συσσώρευση της HP1α σε μεγάλες ετεροχρωματινικές εστίες παρατηρήθηκε επίσης και μετά από καλλιέργεια περιφερικών λεμφοκυττάρων με IL-2 (Εικόνα 3.1-12). Σε αντίθεση με τη δραματική ανακατανομή που παρατηρήθηκε στην HP1α, τα πρότυπα κατανομής των HP1β, HP1γ και μεθυλιωμένης ιστόνης H3 δεν έδειξαν καμιά μεταβολή (Εικόνα 3.1-12). Διπλή χρώση με αντισώματα της HP1α και HP1β αποκάλυψε ότι οι μεγάλες HP1α συσσωρεύσεις που παρατηρούνται μετά από προσθήκη μιτογόνων εμπεριέχουν HP1β (Εικόνα 3.1-13).

Από τη μορφομετρική ανάλυση που ακολούθησε διαπιστώθηκε ότι κατά την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων το μέγεθος των HP1α εστιών αυξάνεται σημαντικά, σε αντίθεση με τις οριακές μεταβολές που παρατηρούνται στις HP1β εστίες (Εικόνα 3.1-13). Όπως φαίνεται χαρακτηριστικά στον Πίνακα Β, προσθήκη PHA προκαλεί εντυπωσιακή αύξηση (229X) των HP1α εστιών της ενδιάμεσης κατηγορίας (3-4μ) ενώ, κάτι τέτοιο δεν ισχύει για τις HP1β συσσωρεύσεις μιας και η μέγιστη μεταβολή που παρατηρείται είναι μόλις 1.8X στην κατηγορία εστιών 4-5μ.

Ένα άλλο ενδιαφέρον στοιχείο που προκύπτει από τον Πίνακα Γ της Εικόνας 3.1-13 είναι ότι οι μεταβολές στο μέγεθος των HP1α εστιών φαίνεται να εξαρτώνται από το εκάστοτε μιτογόνο. Πιο συγκεκριμένα, οι εστίες μεγέθους 4-5μ και 3-4μ παρουσιάζουν μέγιστη αύξηση με την προσθήκη PHA ενώ, η IL-2 προκαλεί μέγιστη αύξηση των εστιών 2-3μ. Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι το κάθε μιτογόνο επάγει συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους (πχ η PHA ενεργοποιεί τα Τ λεμφοκύτταρα). Επομένως η «επιλεκτική» μεταβολή στο μέγεθος των HP1 συσσωρεύσεων υποδηλώνει ότι το πρότυπο κατανομής της κάθε πρωτεΐνης είναι κύτταρο-ειδικό. Όπως και στη HUT-78 κυτταρική σειρά, ο συνολικός αριθμός των HP1α και HP1β εστιών δεν αλλάζει σημαντικά μετά από επαγωγή, ενώ η αύξηση στον αριθμό των εστιών μεσαίου και μεγάλου μεγέθους συνοδεύεται από μικρή

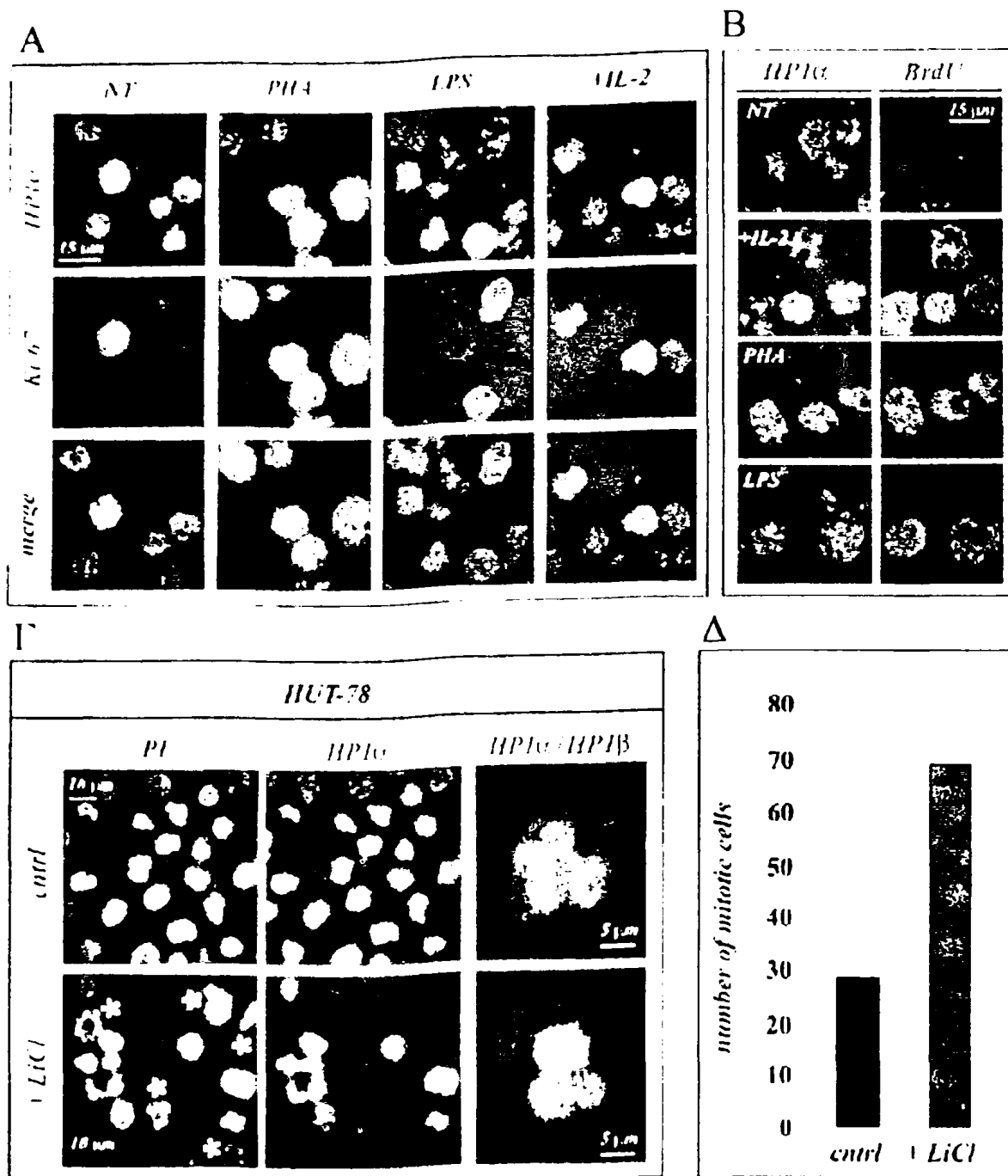


πτώση στο αριθμό των μικρότερων εστιών (δηλ. εστιών μεγέθους $<3\mu$, Εικόνα 3.1-13). Αυτό δείχνει ότι στα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα ο εστιακός φαινότυπος της HP1α δεν αντανakλά αύξηση των επιπέδων της συγκεκριμένης ισομορφής, αλλά προκύπτει από ανάκατανομή της προϋπάρχουσας πρωτεΐνης. Η παραπάνω ερμηνεία ενισχύεται από τα αποτελέσματα της ανάλυσης κατά western (Εικόνα 3.1-13Δ).

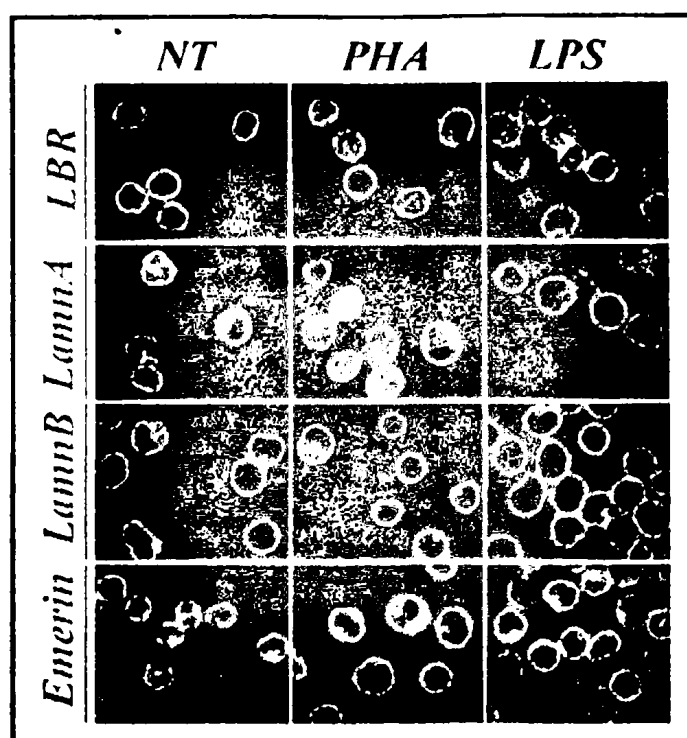
Για να διερευνήσουμε αν τα κύτταρα που διαθέτουν μεγάλες HP1α εστίες βρίσκονται σε διαδικασία πολλαπλασιασμού έγινε διπλή χρώση PBL πριν και μετά από μιτογονική ενεργοποίηση με HP1α και Ki-67 (δείκτης πολλαπλασιασμού). Πράγματι, διπλή χρώση με τα παραπάνω αντισώματα αποκάλυψε ότι τα δυνητικώς διαιρούμενα κύτταρα (Ki-67 θετικά) περιέχουν μεγάλες, διακριτές εστίες HP1α (Εικόνα 3.1-14Α). Η παρατήρηση αυτή φαίνεται να επιβεβαιώνεται από ταυτόχρονη χρώση με BrdU και HP1α (Εικόνα 3.1-14Β). Αντίθετα, μορφολογική ανάλυση με άλλα πυρηνικά αντισώματα δεν έδειξε την ύπαρξη τέτοιας συσχέτισης (Εικόνα 3.1-15).

Καθώς η λεμφοκυτταρική ενεργοποίηση μέσω υποδοχέων αντιγόνου εμπλέκει δύο ταυτόχρονες διαδικασίες, δηλαδή την επαγωγή της κυτταρικής διαίρεσης και την λειτουργική διαφοροποίηση θελήσαμε να εξετάσουμε αν αύξηση του ρυθμού της κυτταρικής διαίρεσης είναι αρκετή για να προκαλέσει ανακατανομή της HP1α. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το LiCl, μια ουσία που αυξάνει το ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων (Hart, 1979, Bray et al., 1981, Kucharz et al., 1988 και Gauwerky and Golde, 1982). Καθώς η δράση του LiCl περιορίζεται μόνο στα ήδη ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά HUT-78. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.1-14, το LiCl δεν επηρεάζει την κυτταρικής διαίρεσης





Εικόνα 3.1-14 Συσχέτιση της HP1 α ανακατανομής με την λεμφοκυτταρική ενεργοποίηση. (Α) Διπλή χρώση με αντισώματα κατά της HP1 α (πράσινο) και Ki-67 (κόκκινο) περιφερικών λεμφοκυττάρων πριν (NT) και μετά από καλλιέργεια με PHA, LPS ή IL-2. (Β) Διπλή χρώση περιφερικών λεμφοκυττάρων σε διάφορες συνθήκες καλλιέργειας, με αντισώματα κατά της HP1 α (πράσινο) και BrdU (κόκκινο). (Γ) Χρώση HUT-78 κυττάρων πριν και μετά από καλλιέργεια με LiCl με HP1 αντισώματα. Τα μιτωτικά κύτταρα επισημαίνονται με αστερίσκους. (Δ) Γραφική αναπαράσταση του μιτωτικού δείκτη των HUT-78 κυττάρων παρουσίας ή απουσίας LiCl.

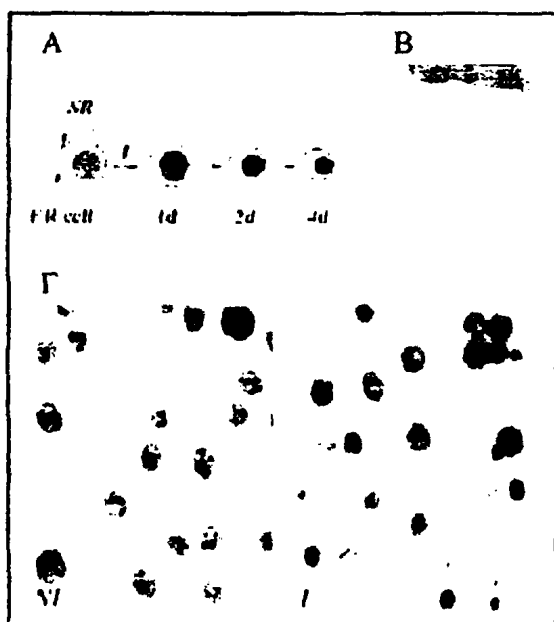


Εικόνα 3.1-15 Κατανομή διάφορων πυρηνικών πρωτεϊνών σε ανθρώπινα περιφερικά λεμφοκύτταρα. Απλή χρώση με αντισώματα κατά των *LBR*, *LamnB*, *LamnA* και *Emerin* σε λεμφοκύτταρα πριν και μετά από καλλιέργεια με *PHA* ή *LPS*.

πυρηνική κατανομή της HP1α. Για να επιβεβαιώσουμε ότι το LiCl αυξάνει το ρυθμό κυτταρικής διαίρεσης στο συγκεκριμένο σύστημα έγινε καταμέτρηση των μιτωτικών κυττάρων. Πράγματι, όπως φαίνεται και από την Εικόνα 3.1-14Γ, τα κύτταρα που επώαστηκαν με LiCl παρουσίασαν 2.4X αύξηση των μιτώσεων. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η ενσωμάτωση της HP1α σε μεγάλες ετεροχρωματινικές εστίες συσχετίζεται μάλλον με τη λειτουργική διαφοροποίηση και όχι με την κυτταρική διαίρεση αυτή καθαυτή.

3.1 Έκφραση και κατανομή των HP1 πρωτεϊνών κατά τη διαφοροποίηση

Για να διερευνηθεί η βιολογική «συμπεριφορά» των HP1 πρωτεϊνών κατά τη διαφοροποίηση, επιλέχθηκαν οι ερυθρολευχαιμικές κυτταρικές σειρές MEL και K562, δύο καλά-χαρακτηρισμένα *in vitro* μοντέλα ερυθροποίησης. Τα MEL (ποντικού) και τα K562 (ανθρώπου) είναι κύτταρα με προερυθροβλαστικούς χαρακτήρες τα οποία παρουσία διαφόρων επαγωγέων, διαφοροποιούνται προς ορθοβλάστες. Η μετάβαση από τη μη-διαφοροποιημένη στη διαφοροποιημένη κατάσταση χαρακτηρίζεται από αυξημένη παραγωγή αιμοσφαιρίνης. Επιπλέον, η “ωρίμανση” αυτή συνοδεύεται από πύκνωση του πυρήνα και πεπερασμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων. Ο νορμοβλαστικός φαινότυπος παρατηρείται μετά από 4-ήμερη καλλιέργεια παρουσία του κατάλληλου επαγωγέα (Εικόνα 3.2-1).

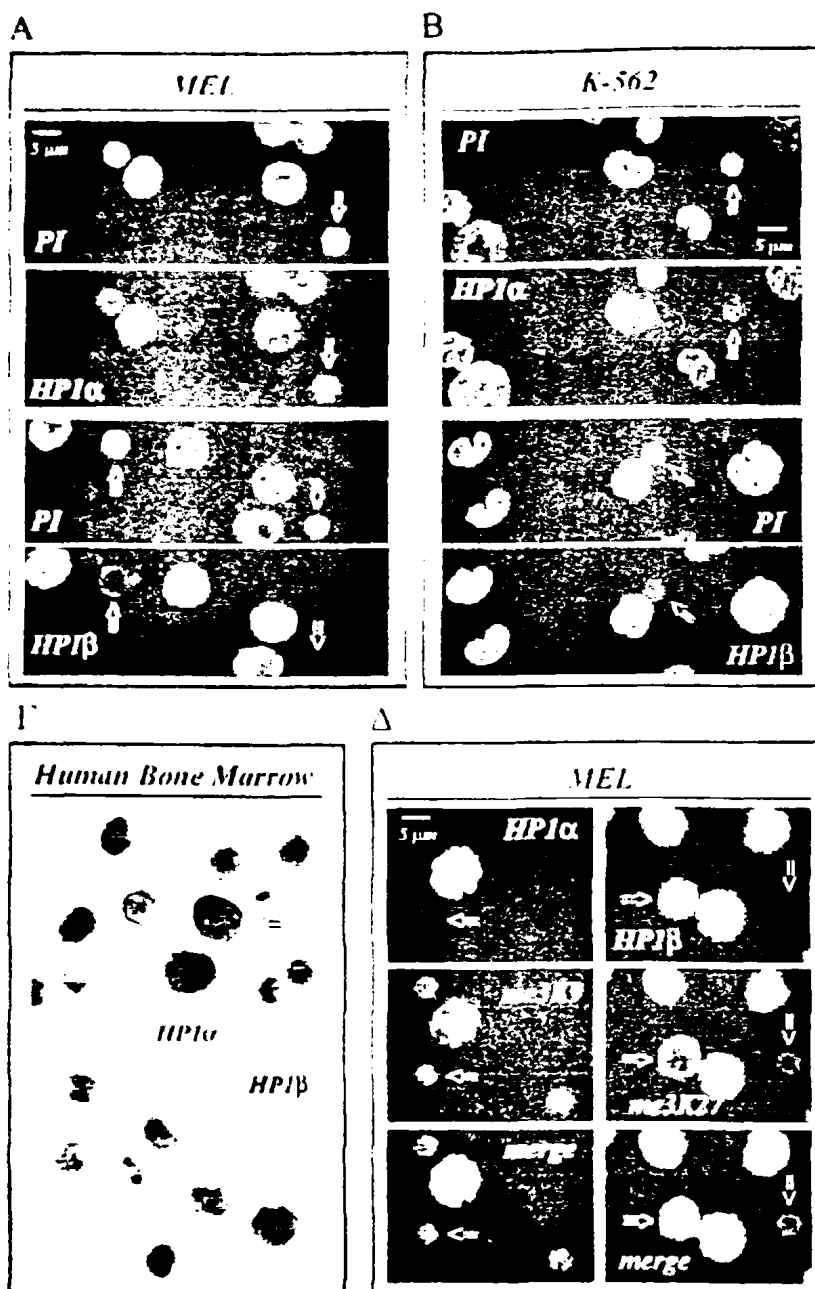


Εικόνα 3.2-1 Διαφοροποίηση ερυθρολευχαιμικών κυττάρων MEL *in vitro*. (Α) Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας. ER cell: πρόδρομο, μη διαφοροποιημένο κύτταρο, SR: αυτο-ανανέωση αρχέγονου πληθυσμού, I: επαγωγέας, 1, 2, 3, 4d: ημέρες μετά την επίδραση του επαγωγέα (Β) Ίζημα κυττάρων πριν (NI) και μετά (I) την επίδραση επαγωγέα. Παρατηρείστε το κόκκινο χρώμα που οφείλεται στη συσσώρευση αιμοσφαιρίνης. (Γ) Χρώση διαφοροποιημένων και μη κυττάρων με Giemsa. Κύτταρα K562 δίνουν ανάλογα αποτελέσματα.

Μορφολογική ανάλυση με ειδικά αντισώματα για τις HP1α και HP1β έδειξε ότι στα μη-διαφοροποιημένα ή μερικώς διαφοροποιημένα κύτταρα παρατηρείται το αναμενόμενο (εστιακό) πρότυπο κατανομής πράγμα που δεν ισχύει στις ώριμες νορμοβλάστες. Πράγματι, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.2-2 οι πυρήνες των πλήρως διαφοροποιημένων κύτταρων χρωματίζονται πολύ αχνά (ή καθόλου) με τα παραπάνω αντισώματα. Η «υπολειμματική» ή/και πλήρης έλλειψη χρώσης των ώριμων νορμοβλαστών με τα HP1α αντισώματα μπορεί να εξηγηθεί από την αποσιώπηση των HP1 γονιδίων στα τελικά στάδια της ερυθροποίησης, ή εναλλακτικά, από την μειωμένη προσβασιμότητα των αντισωμάτων (λόγω της πυκνώσης του πυρήνα). Επειδή τα πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα απαρτίζουν μόλις το 20-30% το συνολικού πληθυσμού, το ερώτημα αυτό δεν ήταν δυνατό να απαντηθεί με RT-PCR ή ανίχνευση κατά western. Επομένως, προχωρήσαμε σε διπλό ανοσοφθορισμό με αντισώματα που αναγνωρίζουν την HP1β και τη me3K27-H3 ή τη me3K9-H3. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.2-2, τόσο η κατανομή όσο και η ένταση του σήματος ιστονικών τροποποιήσεων παραμένουν αμετάβλητες μεταξύ των μη-διαφοροποιημένων και διαφοροποιημένων κυττάρων. Αυτό δεν ισχύει για το σήμα της HP1β, το οποίο, στις νορμαβλαστες, είναι αχνό και ανιχνεύεται είτε σε όλη την επιφάνεια του πυρήνα είτε σαν ένα μικρό «στεφάνι» γύρω από τον πυρηνικό φάκελο. Επομένως, είναι λογικό να υποθέσουμε ότι η περιορισμένη ανίχνευση της HP1 στις ώριμες ερυθροβλάστες δεν οφείλεται στην μειωμένη προσβασιμότητα της χρωματίνης.

Για να διερευνηθεί αν τα *in vitro* αποτελέσματα ισχύουν στη φυσιολογική ερυθροποίηση, μελετήθηκαν με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους δείγματα ανθρώπινου μυελού των οστών.





Εικόνα 3.2-2 Ελάττωση των *HP1α* και *HP1β* επιπέδων κατά την ερυθροποίηση των θηλαστικών. Κατανομή των *HP1α* και *HP1β* σε καλλιέργειες ερυθρολευχαιμικών κυττάρων MEL (A) και K-562 (B). Χρώση με PI (κόκκινο) και ειδικά αντι-*HP1* αντισώματα (πράσινο). Τα άσπρα βέλη δείχνουν διαφοροποιημένες νορμοβλάστες που περιέχουν ένα μικρό ποσό *HP1*, ενώ τα μωβ νορμοβλάστες στις οποίες δεν ανιχνεύεται καθόλου *HP1*. (Γ) Ανοσοϊστοχημική ανίχνευση των *HP1α* και *HP1β* σε τομές ανθρώπινου μυελού των οστών. Πρώιμες και ώριμες ερυθροβλάστες επισημαίνονται με κόκκινα βέλη. (Δ) Διπλός έμμεσος ανοσοφθορισμός σε κύτταρα MEL με αντισώματα που αναγνωρίζουν την *HP1β*, τη *me3K4-H3*, ή τη *me2K4-H3* (πράσινο) με ταυτόχρονη χρώση PI (κόκκινο). Τα βέλη δείχνουν διαφοροποιημένες νορμοβλάστες.

Στον ιστό αυτό, οι πρώιμες και ώριμες ερυθροβλάστες σχηματίζουν διακριτές συναθροίσεις, τις ερυθροβλαστικές νησίδες. Διάκριση ανάμεσα στις άωρες και ώριμες βλάστες είναι δυνατή βάσει των ιδιαίτερων μορφολογικών τους χαρακτηριστικών. Πιο συγκεκριμένα, κατά την ωρίμανση ο πυρήνας γίνεται μικρότερος, σφαιρικός και χάνει τους πυρηνίσκους του. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 18Γ τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής χρώσης επιβεβαιώνουν τις προηγούμενες παρατηρήσεις σε καλλιέργειες MEL και K562.

Για να διαπιστώσουμε αν η κατανομή των HP1 πρωτεϊνών παρουσιάζει διάφορες και σε άλλα αναπτυξιακά συστήματα μελετήσαμε τους σπερματοφόρα σωληνάρια των όρχεων. Το επιθήλιο των σπερματοφόρων σωληναρίων παρέχει το κατάλληλο μικροπεριβάλλον για την διαφοροποίηση των σπερματοκυττάρων. Τα σπερματοκύτταρα είναι διατεταγμένα σε ομόκεντρες στοιβάδες, με τα πιο διαφοροποιημένα κύτταρα (σπερματίδες) στο κεντρικότερο τμήμα του σπερματοφόρου σωληναρίου και τα πιο πρώιμα (σπερματογόνια) στην περιφέρεια του. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 19, ανοσοϊστοχημική χρώση με αντισώματα που αναγνωρίζουν τις HP1α και HP1β έδειξε ότι το πρότυπο κατανομής τους κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης είναι εν μέρη αντίστροφο από αυτό της ερυθροκυτταρικής σειράς. Πιο αναλυτικά, το αντίσωμα της HP1β χρωματίζει έντονα τους πυρήνες των άωρων σπερματοκυττάρων, αλλά η ένταση της χρώσης μειώνεται στα πιο διαφοροποιημένα κύτταρα και είναι εκμηδενίζεται στα τελικά στάδια ωρίμανσης (σπερματίδες). Αντιθέτως, η πρωτεΐνη HP1α ανιχνεύεται (οριακά) μόνο στα πρωτογενή και δευτερογενή σπερματοκύτταρα (Εικόνα 3.2-3).





Εικόνα 3.2-3 Ανίχνευση των *HP1α* και *HP1β* κατά την σπερματογένεση.

3.3. HP1 και κακοήθη νεοπλάσματα

3.3.1 Ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών HP1 σε λεμφώματα

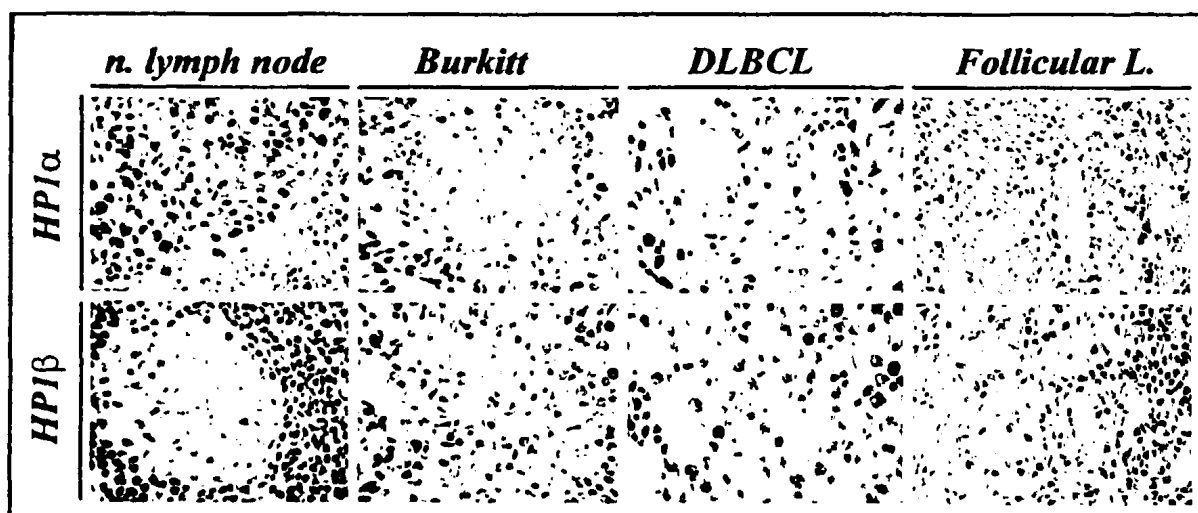
Παρακινούμενοι από το συμπληρωματικό πρότυπο εντόπισης των HP1α και HP1β στα δευτερογενή λεμφοζίδια (βλέπε ανοσοϊστοχημική μελέτη φυσιολογικών λεμφαδένων) μελετήσαμε την κατανομή των παραπάνω πρωτεϊνών σε κακοήθη νεοπλάσματα που ιστογενετικά προέρχονται από κύτταρα του βλαστικού κέντρου. Για τη μελέτη αυτή, επιλέχτηκαν αντιπροσωπευτικά περιστατικά από λέμφωμα Burkitt (Burkitt Lymphoma, BL), διάχυτο B-λέμφωμα από μεγάλα κύτταρα (Diffuse Large B Cell Lymphoma, DLBCL) και λεμφοζιδιακό λέμφωμα (Follicular Lymphoma, FL). Από τα αποτελέσματα της αρχικής ανοσοϊστοχημικής μελέτης (Πίνακας 3.3.1-1) προκύπτει ότι καμιά από τις δύο HP1 πρωτεΐνες δεν είναι δείκτης του βλαστικού κέντρου.

Τύπος λεμφώματος	HP1α θετικά κύτταρα (%)	HP1β θετικά κύτταρα (%)
BL	75	70
BL	80	80
BL	100	10
BL	70	0
BL	90	0
DLBCL	80	50
DLBCL	90	10
DLBCL	65	80
FL	100	90

Πίνακας 3.3.1-1 Ανοσοϊστοχημική ανίχνευση των πρωτεϊνών HP1α και HP1β σε BL, DLBCL και FL λεμφώματα.



Όπως αναμένεται, στα παραπάνω λεμφώματα η κυτταρική κατανομή των HP1 πρωτεϊνών είναι αποκλειστικά πυρηνική, όπως και στους φυσιολογικούς λεμφαδένες. Ωστόσο, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά B κύτταρα του βλαστικού κέντρου (κεντροκύτταρα και κεντροβλάστες) που είναι αρνητικά για την HP1β, τα νεοπλασματικά κύτταρα των παραπάνω λεμφωμάτων (BL, DLBCL και FL), σε ένα μεγάλο ποσοστό, είναι θετικά για την πρωτεΐνη αυτή (Εικόνα 3.3.1-1).



Εικόνα 3.3.1-1 Πυρηνική εντόπιση των HP1α και HP1β πρωτεϊνών σε φυσιολογικούς λεμφαδένες, BL, DLBCL και FL λεμφώματα.

3.3.2 Ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών HP1 στα DLBCL

Για να εξεταστεί περαιτέρω η κατανομή των πρωτεϊνών HP1 σε λεμφώματα του βλαστικού κέντρου, μελετήθηκαν 64 πρωτοπαθή DLBCL περιστατικά. Τα παραπάνω δείγματα είχαν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για να διερευνηθεί η έκφραση των ρυθμιστικών πρωτεϊνών της απόπτωσης, και του κυτταρικού κύκλου. Επιπλέον, τα δείγματα αυτά είχαν ταξινομηθεί ιστογενετικά στις προγνωστικά σημαντικές κατηγορίες GCB- (καλό προσδόκιμο επιβίωσης) και non-GCB-DLBCL (κακό προσδόκιμο επιβίωσης) (Bai et al., 2003 και Bai et al., 2004).

Έκφραση των HP1α και HP1β παρατηρήθηκε σε 52/64 (81,25%) των περιπτώσεων DLBCL (Πίνακας 3.3.2-1).

Ανοσοφαινότυπος	Αριθμός περιστατικών	
	HP1α	HP1β
GCB DLBCL		
CD 10 ⁺ /Bcl-6 ⁺ /MUM1 ⁺	22	18
CD 10 ⁺ /Bcl-6 ⁺ /MUM1 ⁻	1	1
CD 10 ⁻ /Bcl-6 ⁺ /MUM1 ⁻	-	-
Σύνολο	23	19
Non-GCB DLBCL		
CD 10 ⁻ /Bcl-6 ⁺ /MUM1 ⁺	16	18
CD 10 ⁻ /Bcl-6 ⁻ /MUM1 ⁺	13	15
Σύνολο	29	33

Πίνακας 3.3.2-1 Ιστολογική ταξινόμηση των DLBCL περιστατικών

Είναι φανερό ότι η HP1α ανιχνεύεται σε μεγαλύτερο ποσοστό νεοπλασματικών κυττάρων (mean=76,1%, Std.D=11,7%) και παρουσιάζει μικρότερη διακύμανση σε σχέση με την HP1β (mean=44,9%, Std.D=34,7%) (Πίνακας 3.3.2-2).

	HP1α	HP1β
<i>N</i>	52	52
<i>MIN</i>	50,00	0,00
<i>MAX</i>	95,00	100,00
<i>MEAN</i>	76,10	44,90
<i>Std. D</i>	11,70	34,70
<i>Std. Er.</i>	1,62	4,81

Πίνακας 3.3.2-2 Εκατοστιαία αναλογία των HP1

θετικών νεοπλασματικών κυττάρων.

N: αριθμός περιπτώσεων, *Min*: ελάχιστη τιμή, *Max*: μέγιστη τιμή,

Std. D.: απόκλιση από την μέση τιμή,

Std. Er.: υπολογιζόμενο λάθος



Παρά τις παραπάνω διαφορές, η έκφραση της HP1α σε σχέση με αυτή της HP1β δεν παρουσιάζει (θετική ή αρνητική) συσχέτιση όπως προκύπτει από την στατιστική ανάλυση κατά Pearson και Spearman ($r=0,169$, $P=0,297$; $r=0,235$, $P=0,144$, αντίστοιχα).

Στην συνέχεια μελετήθηκε η σχέση των πρωτεϊνών HP1 με τους δείκτες διαφοροποίησης CD10, Bcl-6 και MUM1. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι η HP1β παρουσιάζει αρνητική συσχέτιση με την CD10 (Πίνακας 3.3.2-3).

	Pearson's test		Spearman's test	
	HP1α	HP1β	HP1α	HP1β
CD10	$r=0,143$ $P=0,315$	$r=-0,246$ $P=0,079$	$r=0,085$ $P=0,551$	$r=-0,298$ $P=0,032$
Bcl-6	$r=-0,098$ $P=0,495$	$r=-0,099$ $P=0,486$	$r=-0,013$ $P=0,930$	$r=-0,211$ $P=0,133$
MUM1	$r=-0,055$ $P=0,701$	$r=0,119$ $P=0,401$	$r=-0,021$ $P=0,386$	$r=0,148$ $P=0,295$

Πίνακας 3.3.2-3 Συσχέτιση των πρωτεϊνών HP1 με τους δείκτες διαφοροποίησης CD10, Bcl-6 και MUM1.

Ωστόσο, καμιά από τις δύο HP1 πρωτεΐνες δεν συσχετίζεται με τους κύριους ιστογενετικούς υπότυπους (GCB ή non-GCB) (Πίνακας 3.3.2-4).

GCB vs non-GCB		
	T test	ANOVA
HP1α	$P=0,700$	$P=0,652$
HP1β	$P=0,510$	$P=0,509$

Πίνακας 3.3.2-4 Συσχέτιση της έκφρασης των HP1 πρωτεϊνών με τους δύο κύριους ιστογενετικούς υπότυπους (GCB και non-GCB).



Κατόπιν, ακολούθησε ανάλυση της έκφρασης των HP1 πρωτεϊνών με τον αποπτωτικό δείκτη AI (μέθοδο TUNEL) και με πρωτεΐνες που ρυθμίζουν την απόπτωση (Bcl-2, Bax, Bak, Bid, Bad και Bcl-X_L). Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 3.3.2-5 η μόνη συσχέτιση που παρατηρείται είναι μεταξύ της HP1β και της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2.

Πίνακας 3.3.2-5 Συσχέτιση της έκφρασης των HP1α και HP1β με πρωτεΐνες της απόπτωσης (Pearson's και Spearman's correlation test).

	HP1α		HP1β	
	Pearson's test	Spearman's test	Pearson's test	Spearman's test
AI	r=0,115 P=0,469	r=0,150 P=0,342	r=-0,123 P=0,436	r=-0,167 P=0,290
Bcl-2	r=0,126 P=0,383	r=0,050 P=0,728	r=0,314 P=0,025	r=0,269 P=0,056
Bax	r=0,166 P=0,245	r=-0,020 P=0,890	r=-0,167 P=0,237	r=-0,191 P=0,175
Bak	r=0,190 P=0,182	r=0,147 P=0,303	r=-0,059 P=0,677	r=0,051 P=0,720
Bid	r=0,044 P=0,757	r=-0,023 P=0,874	r=0,002 P=0,988	r=-0,016 P=0,919
BAD	r=-0,007 P=0,962	r=0,009 P=0,949	r=-0,262 P=0,060	r=0,254 P=0,069
Bcl-X _L	r=0,014 P=0,923	r=-0,003 P=0,984	r=0,093 P=0,519	r=0,102 P=0,478

Σε επόμενο στάδιο διερευνήθηκε η έκφραση των HP1 πρωτεϊνών αναφορικά με τον δείκτη πολλαπλασιασμού (PI, όπως έχει προσδιοριστεί ανοσοστοϊχημικά από την έκφραση της πρωτεΐνης Ki-67/Mib) και τις πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου.



Η HP1α παρουσιάζει θετική συσχέτιση με την Ki-67 και την p14 και αρνητική με την p21. Προκειμένου για την HP1β, η έκφραση αυτής της πρωτεΐνης δεν παρουσιάζει καμία συσχέτιση με τις πρωτεΐνες που μελετήθηκαν (Πίνακας 3.3.2-6).

Πίνακας 3.3.2-6 Συσχέτιση της HP1α και HP1β με πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου (Pearson's και Spearman's correlation test)

	HP1α		HP1β	
	Pearson's test	Spearman's test	Pearson's test	Spearman's test
Ki-67 (PI)	r=-0,271 P=0,055	r=0,280 P=0,046	r=-0,063 P=0,656	r=-0,060 P=0,673
Cyclin A	r=-0,062 P=0,666	r=-0,042 P=0,771	r=-0,042 P=0,770	r=-0,066 P=0,644
Cyclin B	r=0,153 P=0,285	r=0,084 P=0,558	r=0,042 P=0,765	r=-0,058 P=0,686
Cyclin D3	r=0,080 P=0,575	r=0,017 P=0,903	r=0,061 P=0,669	r=0,067 P=0,638
Cyclin E	r=-0,211 P=0,137	r=-0,147 P=0,304	r=-0,055 P=0,699	r=-0,007 P=0,959
p14	r=0,301 P=0,040	r=0,344 P=0,018	r=-0,028 P=0,852	r=-0,021 P=0,890
p21	r=-0,305 P=0,037	r=-0,117 P=0,433	r=0,036 P=0,800	r=0,073 P=0,609
p27	r=-0,010 P=0,947	r=-0,040 P=0,782	r=-0,041 P=0,771	r=-0,126 P=0,372
p16	r=-0,200 P=0,159	r=-0,216 P=0,129	r=-0,190 P=0,178	r=-0,022 P=0,876
Rb	r=0,267 P=0,058	r=0,248 P=0,080	r=-0,044 P=0,757	r=-0,015 P=0,915
p53	r=0,019 P=0,897	r=-0,157 P=0,272	r=0,103 P=0,466	r=0,149 P=0,291

Τέλος, μελετήθηκε η έκφραση των HP1 πρωτεϊνών σε σχέση με την κλινική σταδιοποίηση των DLBCL. (Βλέπε κύρια στατιστικά δεδομένα της έκφρασης των HP1α και HP1β στα



κλινικά στάδια 1-4 και αναφορικά με τα δύο πρώτα (πρώιμα) και τα δύο τελευταία (όψιμα) στάδια της νόσου στον Πίνακα 3.3.2-7). Ανάλυση με το test One Way ANOVA δεν αποκάλυψε καμία συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της HP1α και την κλινική σταδιοποίηση της νόσου ($P=0,401$) ακόμη και μετά από ομαδοποίηση σε πρώιμα και όψιμα στάδια ($P=0,165$).

HP1α						
Στάδιο	N	min	max	mean	Std.D	Std.Er.
1	17	35,00	90,00	73,53	13,67	3,31
2	17	50,00	95,00	78,24	11,45	2,78
3	7	50,00	95,00	71,43	16,26	6,14
4	10	50,00	95,00	69,00	17,61	5,57
1+2	34	35,00	90,00	75,88	12,64	2,17
3+4	17	30,00	95,00	70,00	16,58	4,04
HP1β						
Στάδιο	N	min	max	mean	Std.D	Std.Er.
1	21	0,00	90,00	43,14	33,05	7,21
2	17	0,00	90,00	37,06	35,82	8,95
3	7	5,00	95,00	55,71	36,68	13,86
4	10	30,00	100,00	80,63	22,27	7,87
1+2	37	35,00	95,00	40,51	33,92	5,58
3+4	15	30,00	95,00	69,00	31,46	8,12

Πίνακας 3.3.2-7 Βασικά στατιστικά δεδομένα της έκφρασης των HP1α και HP1β στα κλινικά στάδια 1-4 καθώς και στα πρώιμα (1-2) και όψιμα (3-4) στάδια.

Σε αντίθεση με την HP1α, το test one way ANOVA έδειξε ότι η έκφραση της HP1β παρουσιάζει θετική συσχέτιση με την κλινική σταδιοποίηση ($P=0,024$) κάτι που επιβεβαιώθηκε και με το χ^2 test ($P=0,013$). Η συσχέτιση της έκφρασης της HP1β με τα κλινικά στάδια του DLBCL ενισχύεται όταν τα δύο πρώτα και τα δύο τελευταία στάδια



ομαδοποιηθούν ($P=0,007$). Τέλος, η παραπάνω συσχέτιση επιβεβαιώθηκε και με το χ^2 test ($P=0,003$).

Συνοψίζοντας από τη διερεύνηση των παραπάνω λεμφωμάτων προκύπτει ότι καμιά από τις HP1 πρωτεΐνες δεν μπορεί να αξιοποιηθεί ως ιστογενετικός δείκτης των νεοπλασματικών κυττάρων. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες αυτές δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ανοσοιστοχημική ταυτοποίηση του GCB και non-GCB-DLBCL ανοσοφαινότυπου. Ωστόσο, η έκφραση της HP1β στα DLBCL παρουσιάζει ενδιαφέρον. Αν και η πρωτεΐνη αυτή, στους φυσιολογικούς λεμφαδένες, δεν εντοπίζεται στα Β-κύτταρα του βλαστικού κέντρου ένα μεγάλο ποσοστό νεοπλασματικών κυττάρων στα DLBCL είναι HP1β θετικό. Επιπλέον, το ποσοστό αυτό αυξάνεται στα όψιμα κλινικά στάδια της νόσου. Τέλος, η αρνητική συσχέτιση που παρουσιάζει η HP1β με τον δείκτη διαφοροποίησης CD10 (ο οποίος σχετίζεται με καλύτερη συνολική επιβίωση, OS) είναι ένδειξη ότι η έκφραση της HP1β μπορεί να έχει κάποια προγνωστική αξία αν και κάτι τέτοιο απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.



3.4 HP1 και καρκίνος του μαστού

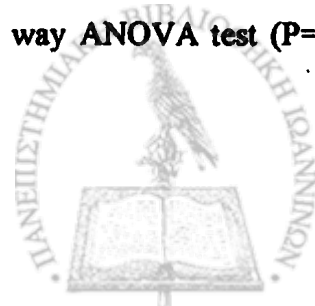
Πρόσφατα δημοσιεύματα υποστηρίζουν εμμέσως ότι η HP1 επηρεάζει το μεταστατικό δυναμικό του καρκίνου του μαστού (Kirschmann et al., 2002; Norwood et al., 2006). Επιβεβαίωση της παρατήρησης αυτής είναι σημαντική τόσο σε ερευνητικό όσο και διαγνωστικό επίπεδο. Από διαγνωστικής απόψεως, η εμπλοκή της HP1α θα μπορούσε να αξιοποιηθεί στη ανίχνευση και πρόγνωση του καρκίνου του μαστού. Στο ερευνητικό επίπεδο, θα μπορούσε να βοηθήσει στην κατανόηση των κυτταρικών μηχανισμών που διέπουν (καθορίζουν) την επιθετικότητα της νόσου.

Αρχικά εξετάσαμε την έκφραση και των 3 γονιδίων της HP1 σε δείγματα καρκίνου του μαστού, επιχειρώντας ένα είδος «μετά-ανάλυσης» όπως και στη περίπτωση των φυσιολογικών ιστών.

	gene	N	min	max	mean	Std. D.	Std. Er.
ΦΥΣ. Μ.	HP1α	6	87	94	91,83	2,86	1,17
	HP1β	6	94	97	95	1,10	0,45
	HP1γ	6	98	98	98	0,00	0,00
ΠΑΘ. Μ.	HP1α	89	71	97	83,97	5,34	0,57
	HP1β	89	75	98	92,66	4,16	0,44
	HP1γ	89	94	100	97,60	1,32	0,14

Πίνακας 3.4-1. Βασικά στατιστικά δεδομένα της έκφρασης των HP1 γονιδίων σε φυσιολογικά και καρκινικά δείγματα.

Είναι φανερό από τον Πίνακα 1 ότι δεν παρατηρούνται ουσιαστικές διαφορές στην έκφραση των HP1β και HP1γ γονιδίων μεταξύ των φυσιολογικών και καρκινικών δειγμάτων. Αυτό δεν ισχύει για τα επίπεδα των μεταγραφών της HP1α, τα οποία ελαττώνονται στα καρκινικά δείγματα (Πίνακας 3.4-1). Ανάλυση με το t ($P=0,0006$) και το One way ANOVA test ($P=0,001$) έδειξε ότι η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική.



Έτσι λοιπόν, μελετήθηκε πιο συστηματικά η έκφραση της HP1a σε 37 δείγματα από καρκίνο του μαστού (Πίνακας 3.4-2). Όλα τα παραπάνω περιστατικά είχαν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για να διερευνηθεί η έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με την απόπτωση και τον κυτταρικό κύκλο.

	GRADE 3	GRADE 2	GRADE 1	ND	Total
Ductal	13	11	1	1	26
Lobular	2	1	2	-	5
Medullar	1	1	-	-	2
ND	-	1	-	3	4

Πίνακας 3.4-2. Ιστολογική ταξινόμηση των δειγμάτων με καρκίνο του μαστού. ND: δεν ήταν δυνατόν να αξιολογηθεί

Είναι φανερό ότι το ποσοστό των HP1a θετικών νεοπλασματικών κυττάρων παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις (σύγκρινε τη μέγιστη και την ελάχιστη τιμή, Πίνακας 3.4-3).

	HP1a
<i>N</i>	53
<i>MIN</i>	1
<i>MAX</i>	95
<i>MEAN</i>	53,3
<i>Std. D</i>	28,5
<i>Std. Er.</i>	3,91

Πίνακας 3.4-3 Βασικά στατιστικά δεδομένα της έκφρασης της HP1a σε δείγματα με καρκίνο του μαστού.

N: αριθμός περιπτώσεων, *Min*: ελάχιστη τιμή, *Max*: μέγιστη τιμή, *Std. D.*: απόκλιση από την μέση τιμή, *Std. Er.*: υπολογιζόμενο λάθος

Κατόπιν διερευνήθηκε η έκφραση της HP1a σε σχέση με τον τύπο του καρκίνου, το βαθμό κακοήθειας και με το αν παρουσιάζουν μετάσταση στους λεμφαδένες. Τα βασικά στατιστικά δεδομένα παρατίθενται στους Πίνακες 3.4-4A, -B και -Γ αντίστοιχα.

Όπως είναι φανερό από το Πίνακα 4A δεν παρατηρούνται ουσιώδεις διαφορές στην έκφραση της HP1a μεταξύ των δύο τύπων καρκίνου, παρατήρηση που επιβεβαιώθηκε από το t



($P=0,608$) και το One Way ANOVA ($P= 0,602$) test. Επιπλέον, η έκφραση της HP1α δεν σχετίζεται με το βαθμό κακοήθειας. Πράγματι, τα αποτελέσματα του t test ($P=0,850$) έδειξαν ότι το ποσοστό των HP1α θετικών νεοπλασματικών κυττάρων δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του βαθμού κακοήθειας 2 και 3. Ανάλογα ήταν επίσης τα αποτελέσματα του t test όταν έγινε σύγκριση μεταξύ του G2 και G1 ($P=0,290$) καθώς και μεταξύ G3 και G1 ($P= 0,400$). Τέλος, η έκφραση της HP1α δεν παρουσιάζει συσχέτιση με την μετάσταση στους λεμφαδένες όπως προκύπτει από το t ($P=0,8356$) και το One way ANOVA ($P=0,827$) test.

A

type	N	min	max	Mean	Std. D.	Std. Er.
Ductal	25	1	95	43,12	31,99	6,40
Lobular	6	20	90	50,83	33,08	13,51

B

Grade	N	min	max	mean	Std. D.	Std. Er.
G1	4	15,00	65,00	31,25	25,30	12,65
G2	13	10,00	80,00	46,50	24,61	6,82
G3	16	1,00	90,00	48,90	39,07	9,77

Γ

LN status	N	min	max	mean	Std. D.	Std. Er.
LN -	11	1,00	90,00	45,45	37,85	11,40
LN+	18	3,00	95,00	48,22	29,58	6,97

Πίνακας 3.4-4 Βασικά στατιστικά δεδομένα της έκφρασης της HP1α σε σχέση (A) με τον τύπο του καρκίνου, (B) το βαθμό κακοήθειας και (Γ) με τη διηθητική ικανότητα των νεοπλασματικών κυττάρων στους λεμφαδένες.

Τέλος διερευνήθηκε έκφραση της HP1α σε σχέση με τις πρωτεΐνες της απόπτωσης και του κυτταρικού κύκλου. Από την στατιστική ανάλυση προκύπτει ότι η έκφραση της HP1α



παρουσιάζει θετική συσχέτιση την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-xL, την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bax, την κυκλίνη D3 ($P=0,015$), την p27 ($P=0,024$) και την p21 ($P=0,045$) (Πίνακες 3.4-5 και -6). Ωστόσο, η βιολογική σημασία των παραπάνω συσχετίσεων δεν είναι σαφής.

Spearman's test

	<u>HP1α</u>
Bcl-2	$r=0,319$ $P=0,070$
Bax	$r=0,468^{**}$ $P=0,009$
Bak	$r=-0,152$ $P=0,400$
Bcl-X _L	$r=0,670^{**}$ $P=0,000$

Πίνακας 3.4-5 Συσχέτιση της έκφρασης της HP1α με πρωτεΐνες της απόπτωσης.

(**): η συσχέτιση είναι στατιστικά σημαντική για $P<0,01$.

Spearman's test

	<u>HP1α</u>
Ki-67 (PI)	$r=-0,098$ $P=0,581$
Cyclin D3	$r=0,424$ $P=0,015$
Cyclin D2	$r=0,157$ $P=0,426$
Cyclin D1	$r=0,293$ $P=0,087$
Cyclin A	$r=0,018$ $P=0,920$
Cyclin B1	$r=0,037$ $P=0,835$
p21	$r=0,346$ $P=0,045$
p16	$r=-0,035$ $P=0,859$
p27	$r=0,386$ $P=0,024$
Rb	$r=0,224$ $P=0,203$
p53	$r=-0,290$ $P=0,096$

Πίνακας 3.4-6 Συσχέτιση της HP1α με πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου.



4. Συζήτηση

Είναι η HP1 απαραίτητο δομικό συστατικό της ετεροχρωματίνης;

Σύμφωνα με το μηχανισμό που έχει προταθεί για να εξηγήσει τη διατήρηση και την εξάπλωση της ετεροχρωματίνης, η HP1 προσδένεται μέσω της CD στην me3K9 της H3 και μέσω της CSD στη SUV39H1 (Bannister et al., 2001). Η SUV39H1 καταλύει τη μεθυλίωση των ιστονών στην γειτονική περιοχή, δημιουργώντας έτσι νέες θέσεις πρόσδεσης για την HP1 επιτρέποντας την εξάπλωση της κατά μήκος της χρωματινικής ίνας. Το παραπάνω μοντέλο προϋποθέτει την παρουσία HP1 μορίων στην ετεροχρωματίνη που αποτελούν τον «πυρήνα» για την εξάπλωση κλειστών χρωματινικών δομών.

Η θεώρηση της HP1 ως ετεροχρωματινικού δείκτη αποδεικνύεται υπεραπλουστευμένη σε σχέση με τη λειτουργική σημασία αυτών των μορίων καθώς δεν εναρμονίζεται με ευρήματα όπως η μερική συνεντόπισή της με την τροποποιημένη me3K9-H3 (Dialynas et al., 2007), ή τη διατήρηση της ετεροχρωματινικής υφής σε κύτταρα στα οποία απουσιάζουν εντελώς οι HP1 πρωτεΐνες (Mateos-Langerak et al., 2007). Επιπλέον, η πλήρης έλλειψη των HP1 ισομορφών σε τελικώς διαφοροποιημένα ερυθροκύτταρα, είναι ένα ακόμα εύρημα που ενισχύει την άποψη ότι οι πρωτεΐνες αυτές δεν είναι απαραίτητες για τη διατήρηση της χρωματινικής δομής. Πιο συγκεκριμένα, απουσία HP1 έχει καταγραφεί στα ώριμα ερυθροκύτταρα των αμφίβιων και των πτηνών (Gilbert et al., 2003) που είναι εμπύρρινα και περιέχουν υπερ-συμπυκνωμένη χρωματίνη (Francastel et al., 2000). Η μεγάλης έκτασης ετεροχρωματινοποίηση του πυρήνα των ώριμων ερυθροκυττάρων (η οποία, προφανώς, δεν επιτυγχάνεται μέσω της HP1) υποδηλώνει ότι οι πρωτεΐνες αυτές, αν και μπορούν να δράσουν ως σταθεροποιητές της χρωματίνης, δεν είναι λειτουργικά αναντικατάστατες. Σε συμφωνία με την υπόθεση ότι οι HP1 δεν διαδραματίζουν καίριο ρόλο στη διατήρηση και την εξάπλωση της ετεροχρωματίνης, από την παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε ότι οι HP1



πρωτεΐνες δεν ανιχνεύονται ανοσοϊστοχημικά σε αρκετά είδη διαφοροποιημένων κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των ηπατοκυττάρων, ινοβλαστών και ορισμένων επιθηλιακών κυττάρων. Παράλληλα, ελάττωση ή/και πλήρης απουσία των HP1 πρωτεϊνών παρατηρείται σε δύο «κλασσικά» κυτταρικά μοντέλα της ερυθροκυτταρικής διαφοροποίησης των θηλαστικών (MEL και K562). Η ελάττωση των HP1 επιπέδων εναρμονίζεται με ανοσοϊστοχημικά αποτελέσματα που προέκυψαν από ανάλυση ανθρώπινου μυελού των οστών. Η ελάττωση στα επίπεδα των HP1 πρωτεϊνών στα παραπάνω συστήματα δεν είναι παράδοξη, όπως φαίνεται με μια πρώτη ματιά, διότι όταν τα κύτταρα είναι πλήρως διαφοροποιημένα δεν υπάρχει προφανής ανάγκη για ένα δυναμικό μόριο όπως η HP1. Προφανώς, σε αυτές τις περιπτώσεις, η δομή της χρωματίνης είναι δυνατό να διατηρηθεί μέσω άλλων πρωτεϊνών, όπως η MENT (Istomina et al., 2003) και εξειδικευμένες ισομορφές των συνδετικών ιστονών (Gilbert et al., 2003).

Αποτελούν τα εναλλακτικά πρότυπα κατανομής της HP1 ένδειξη μιας εξειδικευμένης λειτουργίας;

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε συστηματικά η έκφραση και η κατανομή των HP1 ισομορφών σε ένα μεγάλο αριθμό ανθρώπινων ιστών και κυττάρων. Τα αποτελέσματα αποκαλύπτουν μια ποικιλία ιστό- και κυτταρο-ειδικών προτύπων εντόπισης, παρόμοια με εκείνη που έχει πρόσφατα καταγραφεί σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα και κυτταρικές σειρές (Dialynas et al., 2007 και Meshorer et al., 2006)

Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι η χωροταξική οργάνωση του γονιδιώματος στον μεσοφασικό πυρήνα διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής λειτουργίας. Πιο συγκεκριμένα, η διάταξη των χρωμοσωμάτων στον πυρήνα δεν είναι τυχαία, αφού κάποια χρωμοσώματα έχουν την τάση να τοποθετούνται στο κέντρο του πυρήνα



ενώ, αλλά παρουσιάζουν «επιλεκτική» εντόπιση στην πυρηνική περιφέρεια. Κατ' αυτόν τον τρόπο, είναι δυνατό να δημιουργηθούν συγκεκριμένες γονιδιακές «γειτονιές» (Misteli, 2005, Parada and Misteli, 2002 και Kozubek et al., 2002). Επιπλέον, οι διάφοροι κυτταρικοί τύποι και ιστοί παρουσιάζουν διαφορετικά πρότυπα γονιδιακής οργάνωσης (δηλ. θέση των χρωμοσωμάτων και γονιδιακές γειτονιές) κάτι που ίσως σχετίζεται με τη διαφορική γονιδιακή έκφραση που παρατηρείται κατά την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των κύτταρων (Boyle et al., 2001, Parada et al., 2004 και Cremer et al., 2003). Επί τη βάσει αυτών των δεδομένων, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι τα εναλλακτικά πρότυπα κατανομής των HP1α και HP1β να αντανακλούν τις μεταβολές της χρωματινικής οργάνωσης των κυττάρων και να έχουν λειτουργική σημασία.

Η παραπάνω υπόθεση υποστηρίζεται από την «πλαστικότητα» που παρατηρείται στην κατανομή και την έκφραση της HP1α στα περιφερικά λεμφοκύτταρα και τα λεμφικά όργανα. Είναι φανερό από τις ανοσοϊστοχημικές παρατηρήσεις, ότι η HP1α εντοπίζεται στα Ki-67-θετικά κύτταρα του βλαστικού κέντρου των λεμφαδένων, ενώ παραμένει μη-ανιχνεύσιμη στα άδολα (G0) λεμφοκύτταρα του μανδύα. Η επιλεκτική εντόπιση της HP1α αντανακλά την μεταγραφική ρύθμιση της παραπάνω πρωτεΐνης στα Β λεμφοκύτταρα του βλαστικού κέντρου, καθώς ανάλυση του γονιδίου της HP1α έχει δείξει αύξηση των αντίστοιχων mRNA στις κεντροβλάστες και τα κεντροκύτταρα (Klein et al., 2003). Εκτός από τη μεταγραφική ρύθμιση, που πιθανόν καθορίζει τα επίπεδα των HP1 πρωτεϊνών, η υπό-κυτταρική κατανομή (τουλάχιστον στα PBLs) καθορίζεται σε μετά-μεταγραφικό επίπεδο. Η ενσωμάτωση της HP1α σε ετεροχρωματικές εστίες επάγεται από μιτογονικά ερεθίσματα και IL-2, χωρίς εμφανή αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης. Οι μεταβολές που παρατηρούνται στην τοπολογία της HP1α κατά την ενεργοποίηση των PBLs είναι σε συμφωνία με ευρήματα προγενέστερων μελετών που δείχνουν ανακατανομή της macroH2A και της HP1α σε σπληνοκύτταρα ποντικού μετά από ενεργοποίηση με Con A (Grigoryev et al., 2004). Η



μεταβολή που παρατηρείται στην υπό-πυρηνική κατανομή της HP1α (δηλ. η μετάβαση από διάχυτο σε εστιακό φαινότυπο) θα μπορούσε επομένως να αποδοθεί στη εναπόθεση των μορίων της HP1α σε διαφορετικές χρωματινικές περιοχές ή εναλλακτικά, σε μεταβολές της χρωματινικής τοπολογίας.

Μια άλλη ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι ότι, στην κυτταρική σειρά HUT-78, αύξηση του ρυθμού της κυτταρικής διαίρεσης δεν προκαλεί αλλαγές στην υπό-κυτταρική κατανομή της HP1α. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι στα T λεμφοκύτταρα οι αλλαγές που παρατηρούνται στην HP1α σχετίζονται μάλλον με τη λειτουργική ενεργοποίησή τους (functional activation) και όχι αναγκαστικά με την είσοδο τους στον κυτταρικό κύκλο. Η ερμηνεία αυτή συνάδει με την αντίληψη ότι η λειτουργική ενεργοποίηση των Th κυττάρων καθορίζεται από επιγενετικούς μηχανισμούς που ρυθμίζουν τη δομή της χρωματίνης στις περιοχές που κωδικοποιούν δραστικές (effector) κυτοκίνες (Ansel, Lee and Rao, 2003, Sanders, 2006, και Reiner 2005).

Οι παραπάνω παρατηρήσεις παραπέμπουν στην ύπαρξη «διακριτών HP1 ρεπερτορίων» τα οποία πιθανόν αναγνωρίζουν συνδυασμούς επιγενετικών τροποποιήσεων σε ιστονικές και μη-ιστονικές πρωτεΐνες και συνδέονται με συγκεκριμένες λειτουργίες (Singh and Georgatos, 2002).

HP1 και κακοήγη νεοπλάσματα

Από τη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε πρωτογενείς όγκους του μαστού δεν παρατηρήθηκε κάποιο συγκεκριμένο πρότυπο εντόπισης της HP1α. Τα αποτελέσματα αυτά ευθυγραμμίζονται με ευρήματα προηγούμενων μελετών σύμφωνα με τα οποία ελάττωση των HP1α επιπέδων παρατηρείται μόνο στις μεταστατικές εστίες και όχι στους πρωτογενείς όγκους.



Μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν ωστόσο αποτελέσματα από την ανάλυση λεμφωμάτων του βλαστικού κέντρου. Πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται πολύ χαρακτηριστικά στα δείγματα του λεμφοζιδιακού λεμφώματος, η εντόπιση των HP1α και HP1β πρωτεϊνών παύει να είναι «συμπληρωματική». Πρόσφατα δημοσιεύματα υποστηρίζουν ότι η χωροταξική οργάνωση του γονιδιώματος των κύτταρων μπορεί να εμπλέκεται στη καρκινική εξαλλαγή. Για παράδειγμα, αλλαγή της πυρηνικής τοπολογίας κάποιου ή κάποιων γονιδίων (που συνεπάγεται αλλαγή στη γονιδιακή έκφραση) μπορεί να προηγείται της ανάπτυξης νεοπλαστικών ιδιοτήτων. Επομένως, τέτοιου είδους μεταβολές μπορεί να έχουν προγνωστική σημασία.

Από τη διερεύνηση των B-λεμφωμάτων προκύπτει ότι η HP1α και η HP1β δεν μπορούν να αξιοποιηθούν ως ιστογενετικοί δείκτες του σταδίου διαφοροποίησης των νεοπλασματικών κυττάρων. Επιπλέον, οι παραπάνω πρωτεΐνες δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ανοσοϊστοχημική ταυτοποίηση του GCB και non-GCB-DLBCL ανοσοφαινότυπου. Ωστόσο, η αύξηση του αριθμού των HP1β-θετικών κυττάρων στα προχωρημένα στάδια της ασθένειας μπορεί να έχει προγνωστική σημασία. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται επίσης από την αρνητική συσχέτιση που παρουσιάζει η HP1β με τον δείκτη διαφοροποίησης CD10 (ο οποίος σχετίζεται με καλύτερη συνολική επιβίωση, OS).



Συμπεράσματα

- *Η κατανομή των HP1α και HP1β πρωτεϊνών στους ανθρώπινους ιστούς είναι κυτταρο-ειδική*
- *Η υπο-κυτταρική κατανομή της HP1α παρουσιάζει «πλαστικότητα» και εξαρτάται από εξωκυττάρια ερεθίσματα*
- *Ελάττωση των HP1 επιπέδων στα τελικά στάδια της ερυθροποίησης*
- *Στα DLBCL η έκφραση της HP1β σχετίζεται με την κλινική σταδιοποίηση της νόσου*



4.4 Περίληψη

Στην παρούσα μελέτη έγινε καταγραφή των προτύπων έκφρασης και κατανομής των HP1α και HP1β πρωτεϊνών σε *in vivo*, *ex vivo* και *in vitro* συνθήκες καθώς και σε νεοπλασματικά δείγματα. Σε συμφωνία με την άποψη ότι οι HP1 πρωτεΐνες δεν είναι απαραίτητες για τη διατήρηση της ετεροχρωματινικής υφής, παρατηρήθηκε ελάττωση των επιπέδων τους κατά τη διάρκεια της ερυθροποίησης καθώς και σε αρκετούς τύπους τελικώς διαφοροποιημένων κυττάρων. Παράλληλα, κύτταρο- και ιστο-ειδικά πρότυπα κατανομής παρατηρηθήκαν σχεδόν σε όλα τα είδη των ιστών που μελετηθήκαν. Το πιο αντιπροσωπευτικό παράδειγμα περιοχικής κατανομής των HP1α και HP1β καταγράφηκε στους λεμφαδένες όπου οι δυο HP1 ισομορφές, στην B-εξαρτωμένη ζώνη, παρουσιάζουν συμπληρωματικό πρότυπο εντόπισης. Επιπλέον, στα περιφερικά λεμφοκύτταρα η HP1α παρουσιάζει εναλλακτικά πρότυπα κατανομής (διάχυτο ή εστιακό φαινότυπο) που εξαρτώνται από το μικρο-περιβάλλον (παρουσία μιτογόνων ή κυτοκινών).

Στα νεοπλάσματα του βλαστικού κέντρου η εντόπιση των HP1α και HP1β πρωτεϊνών παύει να είναι «συμπληρωματική». Η αύξηση του αριθμού των HP1β-θετικών νεπλασματικών κυττάρων συσχετίζεται με τα όψιμα στάδια της νόσου και αποτελεί ένδειξη ότι η έκφραση της ισομορφής αυτής μπορεί να έχει διαγνωστική αξία.



4.5 Summary

We have examined the distribution patterns of HP1 α and HP1 β under *in vivo*, *ex vivo* and *in vitro* conditions as well as in neoplastic samples. Consistent with a non-essential role in heterochromatin maintenance, both proteins are down-regulated during mammalian erythropoiesis and are diminished or undetectable in several types of terminally differentiated cells. Variant-specific patterns are observed in almost all human tissues examined. Yet, the most instructive example of HP1 plasticity is observed in the lymph nodes, where HP1 α and HP1 β exhibit regional patterns that are exactly complementary to one another. Furthermore, while HP1 α exhibits a dispersed sub-nuclear distribution in the vast majority of peripheral blood lymphocytes, it coalesces into large heterochromatic foci upon stimulation with various mitogens and IL-2. The effect of proliferative signals on HP1 α distribution is reproduced by co-culture of immortalized T- and B-cells and can be confirmed using cell cycle-specific markers. These complex patterns reveal an unexpected plasticity in HP1 variant expression and further suggest that the sub-nuclear distribution of HP1 proteins is regulated by humoral signals and microenvironmental cues.

Furthermore, in GC-derived neoplasms the complementary distribution patterns of HP1 α and HP1 β cease to exist. The increase in the number of HP1 β -positive neoplastic cells correlates with the clinical stage of the disease, an indication that the expression of this isoform may have some prognostic significance.



5. Βιβλιογραφία

1. Ainsztein, A. M., Kandels-Lewis, S. E., Mackay, A. M., and Earnshaw, W. C. (1998). INCENP centromere and spindle targeting: identification of essential conserved motifs and involvement of heterochromatin protein HP1. *J Cell Biol* 143, 1763-1774.
2. Andrulis, E. D., Neiman, A. M., Zappulla, D. C. and Sternglanz, R. (1998). Perinuclear localization of chromatin facilitates transcriptional silencing. *Nature* 394, 592-595.
3. Ansel, K. M., Lee, D. U. and Rao, A. (2003). An epigenetic view of helper T cell differentiation. *Nat Immunol.* 4, 616-623.
4. Ayyanathan, K., Lechner, M. S., Bell, P., Maul, G. G., Schultz, D. C., Yamada, Y., Tanaka, K., Torigoe, K. and Rauscher, F. J., 3rd (2003). Regulated recruitment of HP1 to a euchromatic gene induces mitotically heritable, epigenetic gene silencing: a mammalian cell culture model of gene variegation. *Genes Dev.* 17, 1855-1869.
5. Badia, E., Duchesne, M. J., Fournier-Bidoz, S., Simar-Blanchet, A. E., Terouanne, B., Nicolas, J. C. and Pons, M. (1994). Hydroxytamoxifen induces a rapid and irreversible inactivation of an estrogenic response in an MCF-7-derived cell line. *Cancer Res.* 54, 5860-5866.
6. Badia, E., Duchesne, M. J., Nicolas, J. C. and Pons, M. (1998). Rapid tamoxifen-induced inactivation of an estrogenic response is accompanied by a localized epigenetic modification but not by mutations. *Breast Cancer Research and Treatment*, 47, 71-81.
7. Badugu, R., Yoo, Y., Singh, P. B. and Kellum, R. (2005). Mutations in the heterochromatin protein 1 (HP1) hinge domain affect HP1 protein interactions and chromosomal distribution. *Chromosoma.* 113, 370-384.



7. Bai, M., Skyras, A., Agnantis, N. J., Kamina, S., Kitsoulis, P., and Kanavaros P. (2004). Cluster analysis of apoptosis-associated bcl2 family proteins in diffuse large B-cell lymphomas. Relations with the apoptotic index, the proliferation profile and the B-cell differentiation immunophenotypes. *Anticancer Res.* **24**, 3081-3088.
8. Bai, M., Tsanou, E., Agnantis, N. J., Chaidos, A., Dimou, D., Skyras, A., Dimou, S., Vlychou, M., Galani, V., and Kanavaros, P. (2003). Expression of cyclin D3 and cyclin E and identification of distinct clusters of proliferation and apoptosis in diffuse large B-cell lymphomas. *Histol Histopathol.* **18**, 449-457.
9. Bailis, J. M., Bernard, P., Antonelli, R., Allshire, R. C. and Forsburg, S. L. (2003). Hsk1-Dfp1 is required for heterochromatin-mediated cohesion at centromeres. *Nat Cell Biol.* **5**, 1111-1116.
10. Ball, L. J., Murzina, N. V., Broadhurst, R. W., Raine, A. R., Archer, S. J., Stott, F. J., Murzin, A. G., Singh, P. B., Domaille, P. J. and Laue, E. D. (1997). Structure of the chromatin binding (chromo) domain from mouse modifier protein 1. *EMBO J.* **16**, 2473-2481.
11. Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R.C. and Kouzarides, T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature.* **410**, 120-124.
12. Berger, J. C., Vander Griend, D. J., Robinson, V. L., Hickson, J. A. and Rinker-Schaeffer, C. W. (2005). Metastasis Suppressor Genes: From Gene Identification to Protein Function and Regulation. *Cancer Biol Ther.* **4**
13. Bernard, P., Maure, J. F., Partridge, J. F., Genier, S., Javerzat, J. P., and Allshire, R. C. (2001). Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. *Science* **294**, 2539-2542.



14. **Blackburn, C. C. and Manley, N. R. (2004)** Developing a new paradigm for thymus organogenesis. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 278-289.

15. **Boyle, S., Gilchrist, S., Bridger, J. M., Mahy, N. L., Ellis, J. A, et al. (2001).** The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum Mol Genet* **10**: 211-219.

16. **Brasher, S. V., Smith, B. O., Fogh, R. H., Nietlispach, D., Thiru, A., Nielsen, P. R., Broadhurst, R.W., Ball, L. J., Murzina, N. V., Laue, E. D. (2000).** The structure of mouse HP1 suggests a unique mode of single peptide recognition by the shadow chromo domain dimer. *EMBO J.* **19**, 1587-1597.

17. **Bray, J., Turner, R. A., and Dusel, F. (1981).** Lithium and the mitogenic response of human lymphocytes. *Clin. Immun. Immunopath.* **19**, 284-288.

18. **Bunn, P. A. Jr. and Foss, F. M. (1996).** T-cell lymphoma cell lines (HUT102 and HUT78) established at the National Cancer Institute: history and importance to understanding the biology, clinical features, and therapy of cutaneous T-cell lymphomas (CTCL) and adult T-cell leukemia-lymphomas (ATLL). *J Cell Biochem Suppl.* **24**, 12-23.

19. **Cammas, F., Janoshazi, A., Lerouge, T. and Losson, R. (2007)** Dynamic and selective interactions of the transcriptional corepressor TIF1beta with the heterochromatin protein HP1 isoforms during cell differentiation. *Differentiation. In press.*

20. **Cenci, G., Ciapponi, L. and Gatti, M. (2005).** The mechanism of telomere protection: a comparison between *Drosophila* and humans. *Chromosoma.* **114**, 135-145.

21. **Cheutin, T., McNairn, A. J., Jenuwein, T., Gilbert, D. M., Singh, P. B., and Misteli, T. (2003).** Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding. *Science* **299**, 721-725.



22. Clegg, N. J., Honda, B. M., Whitehead, I. P., Grigliatti, T. A., Wakimoto, B., Brock, H. W., Lloyd V. K. and Sinclair D. A. R. (1998) Suppressors of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster* affect expression of the heterochromatic gene *light* in the absence of a chromosome rearrangement. *Genome* 41, 495–503.
23. Cowell, I. G., Aucott, R., Mahadevaiah, S. K., Burgoyne, P. S., Huskisson, N., Bongiorno, S., Prantera, G., Fanti, L., Pimpinelli, S., Wu, R., et al. (2002). Heterochromatin, HP1 and methylation at lysine 9 of histone H3 in animals. *Chromosoma* 111, 22-36.
24. Cowieson, N. P., Partridge, J. F., Allshire, R. C. and McLaughlin, P. J. (2000). Dimerisation of a chromo shadow domain and distinctions from the chromodomain as revealed by structural analysis. *Curr Biol.* 10, 517-525.
25. Cremer, M., Kupper, K., Wagler, B., Wizelman, L., Hase, Jv. J., et al. (2003). Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei. *J Cell Biol* 162, 809-820.
26. Cryderman, D. E., Cuaycong, M. H., Elgin, S. C. R. and Wallrath, L. L. (1998). Characterization of sequences associated with position-effect variegation at pericentric sites in *Drosophila* heterochromatin. *Chromosoma* 107, 277–285.
27. Cryderman, D. E., Tang, H. B., Bell, C., Gilmour, D. S. and Wallrath, L. L. (1999). Heterochromatic silencing of *Drosophila* heat shock genes acts at the level of promoter potentiation. *Nucleic Acids Res* 27, 3364–3370.
28. Cryderman, D. E., Grade, S. K., Li, Y., Fanti, L., Pimpinelli, S. and Wallrath, L. L. (2005) Role of *Drosophila* HP1 in euchromatic gene expression. *Dev Dyn.* 232, 767-774.
29. Daniel, J. A., Pray-Grant, M. G. and Grant, P. A. (2005). Effector proteins for *methyalted histones: an expanding family*. *Cell Cycle* 4, 919-926.



30. Dialynas, G. K., Makatsori, D., Kourmouli, N., Theodoropoulos, P. A., McLean, K., Terjung, S., Singh, P. B. and Georgatos, S. D. (2006). Methylation-independent binding to histone H3 and cell cycle-dependent incorporation of HP1beta into heterochromatin. *J Biol Chem.* 281, 14350-1460.
31. Dialynas, G. K., Terjung, S., Brown, J. P., Aucott, R. L., Baron-Luhr, B., Singh, P. B., Georgatos, S. D. (2007). Plasticity of HP1 proteins in mammalian cells. *J Cell Sci.* 120, 3415-3424.
32. Eissenberg, J. C., and Elgin, S. C. (2000). The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. *Curr Opin Genet Dev* 10, 204-210.
33. Eissenberg, J. C., James, T. C., Foster-Hartnett, D. M., Hartnett, T., Ngan. V. and Elgin, S. C. (1990). 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.* 87, 9923-9927.
34. Eissenberg, J. C., Morris, G. D., Reuter, G., and Hartnett, T. (1992). The heterochromatin-associated protein HP-1 is an essential protein in *Drosophila* with dosage-dependent effects on position-effect variegation. *Genetics.* 13, 345-352.
35. Ekwall, K., Javerzat, J. P., Lorentz, A., Schmidt, H., Cranston, G., and Allshire, R. (1995). The chromodomain protein Swi6: a key component at fission yeast centromeres. *Science* 269, 1429-1431.
36. Elgin, S. C. and Grewal, S. I. (2003). Heterochromatin: silence is golden. *Curr Biol.* 13, R895-898.
37. Eskeland, R., Eberharter, A. and Imhof, A. (2007). HP1 binding to chromatin methylated at H3K9 is enhanced by auxiliary factors. *Mol Cell Biol.* 2, 453-65.



38. Fanti, L., Giovino, G., Berloco M. and Pimpinelli, S. (1998). The heterochromatin protein 1 prevents telomere fusions in *Drosophila*. *Mol Cell* 2, 527-538.
39. Fanti, L., Berloco, M., Piacentini, L. and Pimpinelli, S. (2003). Chromosomal distribution of heterochromatin protein 1 (HP1) in *Drosophila*: a cytological map of euchromatic HP1 binding sites. *Genetica* 117, 135-147.
40. Festenstein, R., Pagakis, S. N., Hiragami, K., Lyon, D., Verreault, A., Sekkali, B. and Kioussis, D. (2003). Modulation of heterochromatin protein 1 dynamics in primary Mammalian cells. *Science*. 299, 719-721.
41. Filesi, I., Cardinale, A., van der Sar, S., Cowell, I. G., Singh, P. B. and Biocca, S. (2002). Loss of heterochromatin protein 1 (HP1) chromodomain function in mammalian cells by intracellular antibodies causes cell death. *J Cell Sci*. 115, 1803-1813.
42. Fischle, W., Wang, Y., Jacobs, S. A., Kim, Y., Allis, C. D. and Khorasanizadeh S. (2003). Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev*. 17, 1870-1881.
43. Francastel, C., Schubeler, D., Martin, D.I. and Groudine, M. (2000). Nuclear compartmentalization and gene activity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 1, 137-143.
44. Freitag, M., Hickey, P. C., Khlafallah, T. K., Read, N. D. and Selker, E. U. (2004). HP1 is essential for DNA methylation in neurospora. *Mol Cell*. 13, 427-434.
45. Freund, G. G., Kulas, D. T. and Mooney, R. A. (1993). Insulin and IGF-1 increase mitogenesis and glucose metabolism in the multiple myeloma cell line, RPMI 8226. *J Immunol*. 151, 1811-1820.
46. Gauwerky, C. E. and Colde, D. W. (1982). Lithium enhances growth of human leukaemia cells in vitro. *Br. J. Haematol*. 51, 431-438.



47. Ge, X., Yamamoto, S., Tsutsumi, S., Midorikawa, Y., Ihara, S., Wang, S. M. and Aburatani, H. (2005). Interpreting expression profiles of cancers by genome-wide survey of breadth of expression in normal tissues. *Genomics* 86, 127-141.
48. Gilbert, N., Boyle, S., Sutherland, H., de Las Heras, J., Allan, J., Jenuwein, T. and Bickmore, W. A. (2003). Formation of facultative heterochromatin in the absence of HP1. *EMBO J.* 22, 5540-5550.
49. Giuliani, N., Colla, S., Sala, R., Moroni, M., Lazzaretti, M., La Monica, S., Bonomini, S., Hojden, M., Sammarelli, G., Barille, S., Bataille, R. and Rizzoli, V. (2002). Human myeloma cells stimulate the receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) in T lymphocytes: a potential role in multiple myeloma bone disease. *Blood* 100, 4615-4621.
50. Gooding, R. P., Bybee, A., Cooke, F., Little, A., Marsh, S. G., Coelho, E., Gupta, D., Samson, D. and Apperley, J. F. (1999). Phenotypic and molecular analysis of six human cell lines derived from patients with plasma cell dyscrasia. *Br J Haematol.* 106, 669-681.
51. Grigoryev, S. A. and Woodcock, C. L. (1993). Stage-specific expression and localization of MENT, a nuclear protein associated with chromatin condensation in terminally differentiating avian erythroid cells. *Exp Cell Res.* 206, 335-343.
52. Grigoryev, S. A., Nikitina, T., Pehrson, J. R., Singh, P. B. and Woodcock, C. L. (2004). Dynamic relocation of epigenetic chromatin markers reveals an active role of constitutive heterochromatin in the transition from proliferation to quiescence. *J Cell Sci.* 117, 6153-6162.
53. Hart, D. A. (1979). Potentiation of Phytohemagglutinin stimulation of lymphoid cells by lithium. *Exp. Cell Res.* 119, 47-53.
54. Hediger, F. and Gasser, S.M. (2006). Heterochromatin protein 1: don't judge the book by its cover! *Curr Opin Genet Dev.* 16, 143-150.



55. Hearn, M. G., Hedrick, A., Grigliatti, T. A. and Wakimoto, B. T. (1991). The effect of modifiers of position-effect variegation on the variegation of heterochromatic genes of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **128**, 785-797.
56. Hiragami, K., and Festenstein, R. (2005). Heterochromatin protein 1: a pervasive controlling influence. *Cell Mol Life Sci.* **62**, 2711-2726.
57. Horsley, D., Hutchings, A., Butcher, G.W. and Singh, P. B. (1996). M32, a murine homologue of *Drosophila* heterochromatin protein 1 (HP1), localises to euchromatin within interphase nuclei and is largely excluded from constitutive heterochromatin. *Cytogenet Cell Genet.* **73**, 308-311.
58. Huang, D. W., Fanti, L., Pak, D. T., Botchan, M. R., Pimpinelli, S. and Kellum, R. (1998). Distinct cytoplasmic and nuclear fractions of *Drosophila* heterochromatin protein 1: their phosphorylation levels and associations with origin recognition complex proteins. *J Cell Biol.* **142**, 307-318.
59. Hwang, K. K. and Worman, H. J. (2002). Gene regulation by human orthologs of *Drosophila* heterochromatin protein 1. *Biochem Biophys Res Commun.* **293**, 1217-1222.
60. Istomina, N. E., Shushanov, S. S., Springhetti, E. M., Karpov, V. L., Krasheninnikov, I. A., Stevens, K., Zaret, K. S., Singh, P. B. and Grigoryev, S. A. (2003). Insulation of the chicken beta-globin chromosomal domain from a chromatin-condensing protein, MENT. *Mol Cell Biol.* **23**, 6455-6468.
61. James, T. C., and Elgin, S. C. (1986). Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its gene. *Mol Cell Biol* **6**, 3862-3872.



62. James, T. C., Eissenberg, J. C., Craig, C., Dietrich, V., Hobson, A., and Elgin, S. C (1989). Distribution patterns of HP1, a heterochromatin-associated nonhistone chromosomal protein of *Drosophila*. *Eur J Cell Biol.* 50, 170-180.
63. James, T. C. and Elgin, S. C. (1986). Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its gene. *Mol Cell Biol.* 6, 3862-3872.
64. Jacobs, S.A., Taverna, S.D., Zhang, Y., Briggs, S. D., Li, J., Eissenberg, J.C., Allis, C. D., and Khorasanizadeh, S. (2001). Specificity of the HP1 chromo domain for the methylated N-terminus of histone H3. *EMBO J.* 20, 5232-5241.
65. Jacobs, S. A., Harp, J. M., Devarakonda, S., Kim, Y., Rastinejad, F. And Khorasanizadeh, S. (2002). The active site of the SET domain is constructed on a knot. *Nat Struct Biol.* 9, 833-838.
66. Jones, D. O., Cowell, I. G., and Singh, P. B. (2000). Mammalian chromodomain proteins: their role in genome organisation and expression. *Bioessays* 22, 124-137.
67. Jones, D. O., Mattei, M. G., Horsley, D., Cowell, I. G. and Singh, P. B. (2001). The gene and pseudogenes of Cbx3/mHP1 gamma. *DNA Seq.* 12, 147-160.
68. Kanellopoulou, C., Muljo, S. A., Kung, A. L., Ganesan, S., Drapkin, R., Jenuwein, T., Livingston, D. M. and Rajewsky, K. (2005). Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev.* 19, 489-501.
69. Katzenellenbogen, B. S. (2000). Mechanisms of action and cross-talk between estrogen receptor and progesterone receptor pathways. *J Soc Gynecol Investig.* 7, S33-37.
70. Katzenellenbogen, B. S., Katzenellenbogen, J. A. (2002). Biomedicine. Defining the "S" in SERMs. *Science* 295, 2380-2381.



71. Kirschmann, D. A., Seftor, E. A., Nieva, D. R., Mariano, E. A. and Hendrix, M. J. (1999). Differentially expressed genes associated with the metastatic phenotype in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* **55**, 127-136.
72. Kirschmann, D. A., Lininger, R. A., Gardner, L. M., Seftor, E. A., Odero, V. A., Ainsztein, A. M., Earnshaw, W. C., Wallrath, L. L. and Hendrix, M. J. (2000). Down-regulation of HP1Hsalpha expression is associated with the metastatic phenotype in breast cancer. *Cancer Res.* **60**, 3359-3363.
73. Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G. A., Keller, J. L., Haddad, J. Jr., Miljkovic, V., Cattoretti, G., Califano, A. and Dalla-Favera, R. (2003). Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2639-2644.
74. Kourmouli, N., Theodoropoulos, P. A., Dialynas, G., Bakou, A., Politou, A. S., Cowell, I. G., Singh, P. B. and Georgatos, S. D. (2000). Dynamic associations of heterochromatin protein 1 with the nuclear envelope. *EMBO J.* **19**, 6558-6568.
75. Koeffler, H.P. and Golde, D. W. (1980). Human myeloid leukemia cell lines: a review. *Blood.* **56**, 344-350.
76. Kozubek, S., Lukasova, E., Jirsova, P. Koutna, I., Kozubek M, et al. (2002). 3D Structure of the human genome: order in randomness. *Chromosoma* **111**, 321-331.
77. Kucharz, E. J., Sierakowski, S., Staite, N. D. and Goodwin, J. S. (1988). Mechanism of lithium-induced augmentation of T-cell proliferation. *Int. J. Immunopharmac.* **10**, 253-259.
78. Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K. and Jenuwein, T. (2001) Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature.* **410**, 116-120.
79. Le Douarin, B., Nielsen, A. L., Garnier, J. M., Ichinose, H., Jeanmougin, F., Losson, R. and Chambon, P. (1996). A possible involvement of TIF1 alpha and TIF1 beta in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors. *EMBO J.* **15**, 6701-6715.



80. Lessard, J., Baban, S. and Sauvageau, G. (1998). Stage-specific expression of polycomb group genes in human bone marrow cells. *Blood* 91, 1216-1224.
81. Li, Y., Kirschmann, D. A. and Wallrath, L. L. (2002). Does heterochromatin protein 1 always follow code? *Proc Natl Acad Sci U S A. Suppl 4*, 16462-16469.
82. Lomberk, G., Bensi, D., Fernandez-Zapico, M. E. and Urrutia, R. (2006). Evidence for the existence of an HP1-mediated subcode within the histone code. *Nat Cell Biol.* 8, 407-415.
83. Lu, B. Y., Emtage, P. C., Duyf, B. J., Hilliker, A. J., and Eissenberg, J. C. (2000). Heterochromatin protein 1 is required for the normal expression of two heterochromatin genes in *Drosophila*. *Genetics.* 155, 699-708.
84. Lukasova, E., Koristek, Z., Falk, M., Kozubek, S., Grigoryev, S., Kozubek, M., Ondrej, V. and Kroupova, L. (2005). Methylation of histones in myeloid leukemias as a potential marker of granulocyte abnormalities. *J Leukoc Biol.* 77, 100-111.
85. Maison, C., Horstmann, H. and Georgatos, S. D. (1993). Regulated docking of nuclear membrane vesicles to vimentin filaments during mitosis. *J Cell Biol.* 123, 1491-1505.
86. Maison, C., Pyrpassopoulou, A., Theodoropoulos, P. A., and Georgatos, S. D. (1997). The inner nuclear membrane protein LAP1 forms a native complex with B-type lamins and partitions with spindle-associated mitotic vesicles. *EMBO J* 16, 4839-4850.
87. Marks, P. A. and Rifkind, R. A. (1978). Erythroleukemic differentiation. *Annu Rev Biochem.* 47, 419-448.
88. Martens, J. H., Kzhyshkowska, J., Falkowski-Hansen, M., Schledzewski, K., Gratchev, A., Mansmann, U., Schmuttermayr, C., Dippel, E., Koenen, W., Riedel, F., Sankala, M., Tryggvason, K., Kobzik, L., Moldenhauer, G., Arnold, B. and Goerdts, S. (2006). Differential expression of a gene signature for scavenger/lectin



- receptors by endothelial cells and macrophages in human lymph node sinuses, the primary sites of regional metastasis. *J Pathol.* **208**,574-589.
89. Mateos-Langerak, J., Brink, M. C., Luijsterburg, M. S., van der Kraan, I., van Driel, R., and Verschure, P. J. (2007). Pericentromeric heterochromatin domains are maintained without accumulation of HP1. *Mol Biol Cell.* **18**, 1464-1471.
90. McDonnell, D. P. (2000). Selective estrogen receptor modulators (SERMs): A first step in the development of perfect hormone replacement therapy regimen. *J Soc Gynecol Investig.* **7**, S10-5.
91. Meier, J. and Georgatos, S. D. (1994). Type B lamins remain associated with the integral nuclear envelope protein p58 during mitosis: implications for nuclear reassembly. *EMBO J* **13**, 1888-1898.
92. Meshorer, E., Yellajoshula, D., George, E., Scambler, P. J., Brown, D. T. and Misteli, T. (2006). Hyperdynamic Plasticity of Chromatin Proteins in Pluripotent Embryonic Stem Cells. *Dev. Cell* **10**,105-116.
93. Minc, E., Allory, Y., Worman, H. J., Courvalin, J. C. and Buendia, B. (1999). Localization and phosphorylation of HP1 proteins during the cell cycle in mammalian cells. *Chromosoma* **108**, 220-234.
94. Minc, E., Courvalin, J. C. and Buendia, B. (2000). HP1gamma associates with euchromatin and heterochromatin in mammalian nuclei and chromosomes. *Cytogenet Cell Genet.* **90**, 279-284.
95. Murphy, C. S. and Jordan, V. C. (1990). The biological significance of the interaction of estrogen agonists and antagonists with the estrogen receptor. *Receptor.* **1**, 65-82.
96. Murzina, N., Verreault, A., Laue, E., and Stillman, B. (1999). Heterochromatin dynamics in mouse cells: interaction between chromatin assembly factor 1 and HP1 proteins. *Mol Cell.* **4**, 529-540.



97. Nakayama, J., Rice, J. C., Strahl, B. D., Allis, C. D., and Grewal, S. I. (2001). Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* 292, 110-113.
98. Nielsen, A. L., Ortiz, J. A., You, J., Oulad-Abdelghani, M., Khechumian, R., Gansmuller, A., Chambon, P. and Losson, R. (1999). Interaction with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family and histone deacetylation are differentially involved in transcriptional silencing by members of the TIF1 family. *EMBO J.* 18, 6385-6395.
99. Nielsen, A. L., Oulad-Abdelghani, M., Ortiz, J. A., Remboutsika, E., Chambon, P. and Losson, R. (2001). Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins. *Mol Cell.* 7, 729-739.
100. Nielsen, P. R., Nietlispach, D., Mott, H. R., Callaghan, J., Bannister, A., Kouzarides, T., Murzin, A. G., Murzina, N. V. and Laue, E. D. (2002). Structure of the HP1 chromodomain bound to histone H3 methylated at lysine 9. *Nature* 416, 103-107.
101. Nielsen, S. J., Schneider, R., Bauer, U. M., Bannister, A. J., Morrison, A., O'Carroll, D., Firestein, R., Cleary, M., Jenuwein, T., Herrera, R. E. and Kouzarides, T. (2001). Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* 412, 561-565.
102. Nilsson, S., Makela, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M., and Gustafsson, J. A. (2001). Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev.* 81, 1535-1565.
103. Nishimura, K., Hirokawa, Y. S., Mizutani, H. and Shiraishi, T. (2006). Reduced heterochromatin protein 1-beta (HP1beta) expression is correlated with increased invasive activity in human melanoma cells. *Anticancer Res.* 26, 4349-4356.



104. Nonaka, N., Kitajima, T., Yokobayashi, S., Xiao, G., Yamamoto, M., Grewal, S. L., and Watanabe, Y. (2002). Recruitment of cohesin to heterochromatic regions by Swi6/HP1 in fission yeast. *Nat Cell Biol* 4, 89-93.
105. Norwood, L. E., Grade, S. K., Cryderman, D. E., Hines, K. A., Furiasse, N., Toro, R., Li, Y., Dhasarathy, A., Kladde, M. P., Hendrix, M. J., Kirschmann, D. A. and Wallrath, L. L. (2004). Conserved properties of HP1 (Hsalpha). *Gene* 336, 37-46.
106. Obuse, C., Iwasaki, O., Kiyomitsu, T., Goshima, G., Toyoda, Y. and Yanagida, M. (2004). A conserved Mis12 centromere complex is linked to heterochromatic HP1 and outer kinetochore protein Zwint-1. *Nat Cell Biol.* 6, 1135-1141.
107. O'Connell, M. A., Cleere, R., Long, A., O'Neill, L. A. and Kelleher, D. (1995). Cellular proliferation and activation of NF kappa B are induced by autocrine production of tumor necrosis factor alpha in the human T lymphoma line HUT 78. *J Biol Chem.* 270, 7399-7404.
108. Ogawa, H., Ishiguro, K., Gaubatz, S., Livingston, D. M. and Nakatani, Y. (2002). A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science.* 296, 1132-1136.
109. Oliva, J., El Messaoudi, S., Pellestor, F., Fuentes, M., Georget, V., Balaguer, P., Cavailles, V., Vignon, F. and Badia, E. (2005). Involvement of HP1alpha protein in irreversible transcriptional inactivation by antiestrogens in breast cancer cells. *FEBS Lett.* 579, 4278-4286.
110. Pak, D. T., Pflumm, M., Chesnokov, I., Huang, D. W., Kellum, R., Marr, J., Romanowski, P., and Botchan, M. R. (1997). Association of the origin recognition complex with heterochromatin and HP1 in higher eukaryotes. *Cell* 91, 311-323.



111. Piacentini, L., Fanti, L., Berloco, M., Perrini B. and Pimpinelli, S. (2003). Heterochromatin protein 1 (HP1) is associated with induced gene expression in *Drosophila* euchromatin. *J Cell Biol.* **161**, 707-714.
112. Pal-Bhadra, M., Leibovitch, B. A., Gandhi, S. G., Rao, M., Bhadra, U., Birchler, J. A. and Elgin, S. C. (2004). Heterochromatic silencing and HP1 localization in *Drosophila* are dependent on the RNAi machinery. *Science.* **303**, 669-762.
113. Panteleeva, I., Boutillier, S., See, V., Spiller, D. G., Rouaux, C., Almouzni, G., Bailly, D., Maison, C., Lai, H. C., Loeffler, J. P. and Boutilli, A. L. (2007). HP1alpha guides neuronal fate by timing E2F-targeted genes silencing during terminal differentiation. *EMBO J.* **26**, 3616-3628.
114. Parada, L. and Misteli, T. (2002). Chromosome positioning in the interphase nucleus. *Trends Cell Biol* **12**, 425.
115. Parada, L., McQueen, P. and Misteli, T. (2004). Tissue-specific spatial organization of genomes. *Genome Biology* **7**, R44.
116. Platero, J. S., Hartnett, T. and Eissenberg, J. C. (1995). Functional analysis of the chromo domain of HP1. *EMBO J.* **16**, 3977-3986.
117. Polioudaki, H., Kourmouli, N., Drosou, V., Bakou, A., Theodoropoulos, P. A., Singh, P. B., Giannakouros, T. and Georgatos, S. D. (2001). Histones H3/H4 form a tight complex with the inner nuclear membrane protein LBR and heterochromatin protein 1. *EMBO Rep.* **2**, 920-925.
118. Pombo, A., Jones, E., Iborra, F. J., Kimura, H., Sugaya, K., Cook, P. R. and Jackson, D. A. (2000). Specialized transcription factories within mammalian nuclei. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* **10**, 21-29.



119. Pomeroy, S. L., Tamayo, P., Gaasenbeek, M., Sturla, L. M., Angelo, M., McLaughlin, M. E., Kim, J. Y., Goumnerova, L. C., Black, P. M., Lau, C., Allen, J. C., Zagzag, D., Olson, J. M., Curran, T., Wetmore, C., Biegel, J. A., Poggio, T., Mukherjee, S., Rifkin, R., Califano, A., Stolovitzky, G., Louis, D. N., Mesirov, J. P., Lander, E. S. and Golub, T. R. (2002). Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. *Nature*. **415**, 436–442.
120. Popova, E. Y., Claxton, D. F., Lukasova, E., Bird, P. I. and Grigoryev, S. A. (2006). Epigenetic heterochromatin markers distinguish terminally differentiated leukocytes from incompletely differentiated leukemia cells in human blood. *Exp Hematol*. **34**, 453-462.
121. Quivy, J. P., Roche, D., Kirschner, D., Tagami, H., Nakatani, Y., and Almouzni, G. (2004). A CAF-1 dependent pool of HP1 during heterochromatin duplication. *EMBO J* **23**, 3516-3526.
122. Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B. D., Sun, Z. W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C. P., Allis, C. D. et al. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**, 593 -599.
123. Reiner, S. L. (2005). Epigenetic control in the immune response. *Hum Mol Genet*. **14**, R41-46.
124. Ryan, R. F., Schultz, D. C., Ayyanathan, K., Singh, P. B., Friedman, J. R., Fredericks, W. J. and Rauscher, F. J. 3rd. (1999) KAP-1 corepressor protein interacts and colocalizes with heterochromatic and euchromatic HP1 proteins: a potential role for Kruppel-associated box-zinc finger proteins in heterochromatin-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol*. **19**, 4366-4378.
125. Sanders, V. M. (2006). Epigenetic regulation of Th1 and Th2 cell development. *Brain Behav Immun*. **20**, 317-324.



126. Shareef, M. M., King, C., Damaj, M., Badagu, R., Huang, D. W., and Kellum, R. (2001). 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* 12, 1671-1685.
127. Schmiedeberg, L., Weisshart, K., Diekmann, S., Meyer Zu Hoerste, G. and Hemmerich, P. (2004). High- and low-mobility populations of HP1 in heterochromatin of mammalian cells. *Mol Biol Cell* 15, 2819-2833.
128. Schotta, G., Ebert, A., Krauss, V., Fischer, A., Hoffmann, J., Rea, S., Jenuwein, T., Dorn, R., and Reuter, G. (2002). Central role of Drosophila SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *EMBO J* 21, 1121-1131.
129. Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., Reinberg, D., and Jenuwein, T. (2003). A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev* 18, 1251-1262.
130. Sharma, G. G., Gupta, A., Wang, H., Scherthan, H., Dhar, S., Gandhi, V., Iliakis, G., Shay, J. W., Young, C. S. and Pandita T. K. (2003). hTERT associates with human telomeres and enhances genomic stability and DNA repair. *Oncogene* 22,131-146.
131. Singh, P. B., Miller, J. R., Pearce, J., Kothary, R., Burton, R. D., Paro, R., James, T. C. and Gaunt, S. J. (1991). A sequence motif found in a Drosophila heterochromatin protein is conserved in animals and plants. *Nucleic Acids Res.* 19, 789-794.
132. Singh, P. B. and Georgatos, S. D. (2002). HP1: facts, open questions, and speculation. *J Struct Biol.* 140, 10-16.
133. Smothers, J. F. and Henikoff, S. (2000). The HP1 chromo shadow domain binds a consensus peptide pentamer. *Curr Biol* 10, 27-30.



134. Smothers, J. F. and Henikoff, S. (2001). Predicting in vivo protein peptide interactions with random phage display. *Comb Chem High Throughput Screen.* 4, 585-591.
- Song, K., Jung, Y., Jung, D. and Lee, I. (2001). Human Ku70 interacts with heterochromatin protein 1 α . *J. Biol. Chem.* 276, 8321-8327.
135. Steeg, P. S., Ouatas, T., Halverson, D., Palmieri, D., and Salerno, M. (2003). Metastasis suppressor genes: basic biology and potential clinical use. *Clin Breast Cancer.* 4, 51-62.
136. Strahl, B. D and Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature.* 403, 41-45.
137. Su, A. I., Wiltshire, T., Batalov, S., Lapp, H., Ching, K. A., Block, D., Zhang, J., Soden, R., Hayakawa, M., Kreiman, G., Cooke, M. P., Walker, J. R. and Hogenesch, J. B. (2004). A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci US A* 101, 6062-6067.
138. Sun, F. L., Cuaycong, M. H., Craig, C. A., Wallrath, L. L., Locke, J. and Elgin, S. C. R. (2000). The fourth chromosome of *Drosophila melanogaster*: interspersed euchromatic and heterochromatic domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 5340-5345.
139. Tajul-Arifin, K., Teasdale, R., Ravasi, T., Hume, D. A., Mattick, J. S., RIKEN GER Group and GSL Members. (2003). Identification and analysis of chromodomain-containing proteins encoded in the mouse transcriptome. *Genome Res.* 13, 1416-1429.
140. Thiru, A., Nietlispach, D., Mott, H. R., Okuwaki, M., Lyon, D., Nielsen, P. R., Hirshberg, M., Verreault, A., Murzina, N. V., and Laue, E. D. (2004). Structural basis of HP1/PXVXL motif peptide interactions and HP1 localisation to heterochromatin. *EMBO J* 23, 489-499.
141. Thon, G. and Verhein-Hansen, J. (2000). Four chromo-domain proteins of *Schizosaccharomyces pombe* differentially repress transcription at various chromosomal locations. *Genetics* 155, 551-568.



142. Tsiftoglou, A. S., Pappas, I. S. and Vizirianakis, I. S. (2003). Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells. *Pharmacol Ther.* 100, 257-290.
143. Vagnarelli, P. B. and Earnshaw, W. C. (2001). INCENP loss from an inactive centromere correlates with the loss of sister chromatid cohesion. *Chromosoma.* 110, 393-401.
144. Vakoc, C. R., Mandat, S. A., Olenchok, B. A. and Blobel, G. A. (2005). Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol Cell.* 19, 381-391.
145. Verschure, P.J., van der Kraan, I., Manders, E. M., Hoogstraten, D., Houtsmuller, A. B. and van Driel, R. (2003). Condensed chromatin domains in the mammalian nucleus are accessible to large macromolecules. *EMBO Rep.* 4, 861-866.
146. Volpe, T. A., Kidner, C., Hall, I. M., Teng, G., Grewal, S. I. and Martienssen, R. A. (2002). Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science.* 297, 1833-1837.
147. Wakimoto, B. T. (1998). Beyond the nucleosome: epigenetic aspects of position-effect variegation in *Drosophila*. *Cell.* 93, 321-324.
148. Wallrath, L. L. and Elgin, S. C. (1995). Position effect variegation in *Drosophila* is associated with an altered chromatin structure. *Genes Dev.* 9, 1263 -1277
149. Wang, G., Ma, A., Chow, C. M., Horsley, D., Brown, N. R., Cowell, I. G. and Singh P. B. (2000). Conservation of heterochromatin protein 1 function. *Mol Cell Biol.* 20, 6970-6983.
150. Wasenius, V. M., Hemmer, S., Kettunen, E., Knuutila, S., Franssila, K. and Joensuu, H. (2003). Hepatocyte growth factor receptor, matrix metalloproteinase-11, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and fibronectin are up-regulated in papillary thyroid carcinoma: a cDNA and tissue microarray study. *Clin Cancer Res.* 9, 68-75.



151. Wreggett, K. A., Hill, F., James, P. S., Hutchings, A., Butcher, G. W. and Singh P. B. (1994). A mammalian homologue of *Drosophila* heterochromatin protein 1 (HP1) is a component of constitutive heterochromatin. *Cytogenet Cell Genet.* **66**, 99-103.
152. Wolffe, A. P. (1998). Packaging principle: how DNA methylation and histone acetylation control the transcriptional activity of chromatin. *J Exp Zool.* **282**, 239-244.
153. Yamamoto, K. and Sonoda, M. (2003). Self-interaction of heterochromatin protein 1 is required for direct binding to histone methyltransferase, SUV39H1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **301**, 287 -292
154. Ye, Q., Callebaut, I., Pezhman, A., Courvalin, J. C. and Worman, H. J. (1997). Domain-specific interactions of human HP1-type chromodomain proteins and inner nuclear membrane protein LBR. *J Biol Chem.* **272**, 14983-14989.
155. Zhao, T., Heyduk, T., Allis, C. D. and Eissenberg, J. C. (2000). Heterochromatin protein 1 binds to nucleosomes and DNA in vitro. *J Biol Chem.* **275**, 28332-28338.
156. Zhao, T., Heyduk, T., and Eissenberg, J. C. (2001). Phosphorylation site mutations in heterochromatin protein 1 (HP1) reduce or eliminate silencing activity. *J Biol Chem.* **276**, 9512-9518.

