

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



926000265231





48

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»**

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΩΝ
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΩΝ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΣΩΜΑΤΙΚΩΝ
ΙΣΤΟΝΩΝ ΣΤΗΝ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΤΗΣ
ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΗΡ1 ΣΤΗ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗ**

**ΔΙΑΔΥΝΑΣ ΓΙΩΡΓΟΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2007



Αρ. α.α.:.....1933.....200.7.



«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» του κ. Διαλυνά Γεωργίου: 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

Καναβάρος Παναγιώτης Καθηγητής Ανατομίας που καλύπτει και την Ιστολογία Εμβρυολογία, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος

Τσίκαρης Βασίλειος Καθηγητής Οργανικής Χημείας Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος

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
Τσίκαρης Βασίλειος	Καθηγητής Οργανικής Χημείας Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Φώτσης Θεόδωρος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Φριλίγγος Ευστάθιος	Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Αγγελίδης Χαράλαμπος,	Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Σύρρου Μαρίκα	Επίκουρος Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας- Ιατρικής Γενετικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων



Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 19-3-2007

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Επαμεινώνδας Τσιάνος

Καθηγητής Παθολογίας



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οκτώ χρόνια, πολλές εμπειρίες, πολλά συναισθήματα, δυνατές σχέσεις και επιστέγασμα όλων αυτών ένας (κατά τη γνώμη μου) μεγάλος δάσκαλος. Οφείλω πολλά στον δάσκαλό μου, κ. Γεωργάτο, ο οποίος στάθηκε ηθικά και υλικά δίπλα μου, από την πρώτη στιγμή. Προσπάθησε και προσπαθεί ακόμα να μας μάθει γράμματα, να μας κατευθύνει στη δουλειά. Για εμένα αποτελεί πρότυπο εργατικότητας και πηγή έμπνευσης. Μου είναι αδύνατον σε τρεις γραμμές να περιγράψω τη συμβολή του όλα αυτά τα χρόνια, αλλά σίγουρα μπορώ να εκφράσω πολλά ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ και την απεριόριστη ευγνωμοσύνη μου στο πρόσωπό του.

Δεν ξεχνάω βεβαίως τον κ. Θεοδωρόπουλο, από τον οποίο έμαθα πολλά και είχαμε άψογη συνεργασία τον καιρό που το εργαστήριο ήταν στην Κρήτη. Σημαντική βοήθεια βρήκα στη συνέχεια στα Ιωάννινα από τον κ. Λαζαρίδη και την κ. Πολίτου. Ιδιαίτερη αναφορά θα ήθελα να κάνω στον κ. Φώτση που στήριξε μέσω του Ιδρύματος Βιοϊατρικών Ερευνών του Ιδρύματος Τεχνολογίας Έρευνας (ΙΒΕ/ΙΤΕ), την δραστηριότητά μου καθώς και τα εκπαιδευτικά ταξίδια που πραγματοποίησα στο Ευρωπαϊκό Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας στη Χαϊδελβέργη της Γερμανίας. Ευχαριστώ επίσης την επταμελή επιτροπή για τον χρόνο που μου διέθεσε.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω αρκετά από τα παιδιά με τα οποία συνυπήρξα και συνεργάστηκα. Στα πρώτα βήματα στο Ηράκλειο θα ήθελα να ξεχωρίσω την Νίκη, την Χαρά και την Νανά. Η 'απόβαση' του εργαστηρίου από την Κρήτη στα Ιωάννινα έγινε με τη Δήμητρα και εμένα, όπου βρήκαμε την Ελένη και τη Γιολάντα. Μετά την προσαρμογή του πρώτου διαστήματος προκύπτει η συνεργασία με την Δήμητρα. Έχω να θυμάμαι αρκετά καλά πράγματα από πολλές και ουσιαστικές συζητήσεις, ενώ μοιραστήκαμε σκέψεις και την κοινή αγωνία για το μετά. Αναμφισβήτητα σημαντικό στήριγμα σε όλη αυτή την πορεία. Δεν παραλείπω τη γειτόνισσά μου, Νάνσυ Σαλμά, ένας σπάνιος χαρακτήρας, μια πολύ καλή παρέα. Σημαντική προσθήκη στο εργαστήριο ήταν ο Γιάννης Γιαννιός ένα παιδί εργατικό, φιλότιμο και με πολύ καλό ψυχο.

Οι γονείς και η αδερφή μου στάθηκαν πλάι μου όλο αυτό τον καιρό, με στήριξαν απόλυτα σε ότι και αν χρειάστηκα, καθώς επίσης στηρίζουν και κατανοούν τις επιλογές μου για το μέλλον. Τους ευχαριστώ με όλη μου την καρδιά και τους αφιερώνω την εργασία μου.



1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
1.1	Δομή χρωματίνης	5
1.1.1	Δομή νουκλεοσώματος	7
1.1.2	Παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης	10
1.1.3	Τνα χρωματίνης (Chromatin fiber)-Χρωματινική δυναμική (Chromatin dynamics)	14
1.1.4	Χημικές τροποποιήσεις και ισομορφές ιστονών	17
1.1.4A	Χημικές τροποποιήσεις-Προτεινόμενος ιστονικός κώδικας	17
1.1.4B	Ισομορφές ιστονών	22
1.2	Ετεροχρωματινική πρωτεΐνη 1 (HP1)	25
1.2.1	Δομή και λειτουργία της HP1	25
1.2.2	Μοριακές αλληλεπιδράσεις της HP1	28
1.3	Οι αλληλεπιδράσεις HP1-χρωματίνης	32
1.3.1	Ο ρόλος της τριμεθυλιωμένης λυσίνης 9 στην ιστόνη 3 (me ₃ K9H3)	32
1.3.2	Ο ρόλος του RNA και της μεθυλίωσης του DNA	34
1.4	Σκοπός της παρούσας μελέτης	38
2	ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ	39
2.1	Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη	39
2.2	Πλασμιδιακοί φορείς	40
2.3	Βιοχημικές μέθοδοι	40
2.3.1	Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών- Χρώση πηκτών πολυακρυλαμιδίου	40
2.3.2	Μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεϊνών	41
2.3.3	Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά western (western blotting)	42
2.3.4	Συγκατακρήμιση πρωτεϊνών με σφαιρίδια γλουταθειόνης-αγαρόζης (pull-down)	42
2.3.5	Πειράματα πέψης με τη χρήση του ενζύμου τρυψίνη	43
2.3.6	Ανάλυση εκχυλισμάτων με βαθμίδωση σακχαρόζης	43
2.4	Παρασκευαστικές μέθοδοι	44
2.4.1	Απομόνωση πυρήνων από ερυθροκύτταρα γαλοπούλας	44



2.4.2	Παρασκευή πυρηνικών φακέλων από πυρήνες ερυθροκυττάρων γαλοπούλας	45
2.4.2A	Με χρήση του ενζύμου δεοξυριβονουκλεάση (DNase I)	45
2.4.2B	Με χρήση του ενζύμου μικροκοκκικής νουκλεάσης MNase	45
2.4.3	Παρασκευή κυτταρικών και πυρηνικών εκχυλισμάτων	46
2.4.4	Παρασκευή εκχυλισμάτων από κύτταρα HeLa που βρίσκονται στο όριο G1/S φάσης	46
2.4.5	Παραγωγή ανασυνδυασμένων χημικών GST πρωτεϊνών	46
2.4.6	Παραγωγή ανασυνδυασμένων χημικών His πρωτεϊνών	47
2.4.7	Παραγωγή ανασυνδυασμένης ιστόνης H3 και ιστόνης H4	48
2.4.8	Απομόνωση DNA από καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας	48
2.4.9	Μετασχηματισμός βακτηρίων με τη μέθοδο του θερμικού 'σόκ'	49
2.5	Μέθοδοι καλλιέργειας κυττάρων	49
2.5.1	Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών	49
2.5.2	Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών	50
2.5.2 ^A	Μικροενέσεις-Αυτοματοποιημένο Σύστημα Μικροενέσεων (AIS2)	50
2.5.2B	Ηλεκτροδιαπίδυση (Electroporation)	51
2.5.2Γ	Μέθοδος φωσφορικού ασβεστίου	51
2.5.3	Επίδραση με φαρμακολογικούς παράγοντες	51
2.6	Μορφολογικές μέθοδοι	52
2.6.1	Έμμεσος ανοσοφθορισμός	52
2.6.2	Δοκιμασία κυττάρων με TX-100, RNase, DNase, Trypsin	53
2.6.3	Ταυτοποίηση κυττάρων που βρίσκονται στην S φάση	54
2.7	Μέθοδοι συνεστιακής μικροσκοπίας	54
2.7.1	Συνεστιακή Μικροσκοπία	54
2.7.2	Μέθοδος ανάκτησης φθορισμού μετά από φωτοδιάχυση (FRAP, Fluorescence Recovery After Photobleaching)	55
2.8	Φασματοσκοπία μάζας	57



3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	59
3.1	Αλληλεπιδράσεις της HP1 με απομονωμένες ιστόνες και πεπτίδια ιστονών	59
3.2	Αλληλεπιδράσεις της HP1 με μονονουκλεοσώματα και συστοιχίες νουκλεοσωμάτων	61
3.3	Αλληλεπιδράσεις της HP1 με ακέραια νουκλεοσωμικά σωματίδια (particles) και υποσωματίδια (subparticles) ετεροχρωματικής προέλευσης	63
3.4	Ταυτοποίηση των τροποποιήσεων που απαντώνται στην ιστόνη H3 που συνδέεται με την HP1	68
3.5	Ενσωμάτωση της HP1 στη χρωματίνη υπό <i>in vivo</i> συνθήκες	68
3.6	Η ενσωμάτωση της HP1 στην ετεροχρωματίνη εξαρτάται από τον κυτταρικό κύκλο	73
3.7	Συζήτηση – I	78
3.8	Πρότυπα κατανομής των ενδογενών πρωτεϊνών της κατηγορίας της HP1 σε κυτταρικές σειρές και εμβρυονικά βλαστικά (ES) κύτταρα.	83
3.9	Κατανομή των HP1 πρωτεϊνών σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα από ποντικό (mouse embryonic stem cells).	88
3.10	Κατανομή και δυναμική των νεοσυντιθέμενων HP1 πρωτεϊνών σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών	90
3.11	Κατανομή και δυναμική των HP1 πρωτεϊνών σε φυσιολογικούς και μεταλλαγμένους εμβρυονικούς ινοβλάστες ποντικού	96
3.12	Συζήτηση – II	99
3.13	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	103
3.14	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	105
3.15	SUMMARY	106
4	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	



1. Εισαγωγή

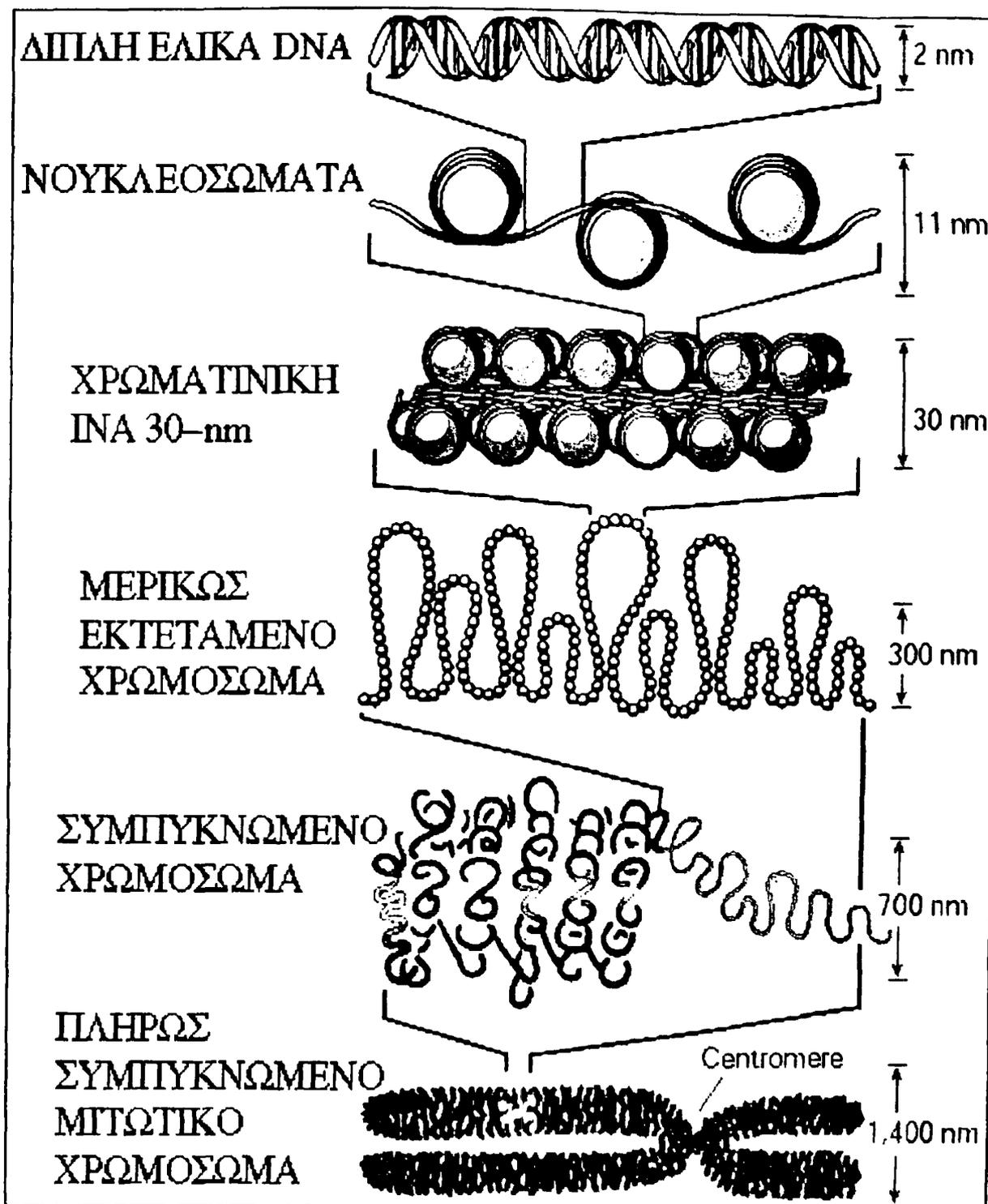
1.1 Δομή χρωματίνης

Στον πυρήνα των ευκαρυωτικών κυττάρων, οι Β-έλικες του DNA περιελίσσονται γύρω από κυλινδρικά σωματίδια που λέγονται νουκλεοσώματα. Η περαιτέρω συσπείρωση αλυσίδων νουκλεοσωμάτων και ο ταυτόχρονος σχηματισμός υπερ-ελικοειδών, ινωδών δομών (χρωματίνη) έχει ως αποτέλεσμα τη συμπίκνωση του επιμήκους μορίου του DNA (περίπου δύο μέτρα σε μήκος στον άνθρωπο) μέχρι και 10.000 φορές. Αυτό το σφιχτά «πακεταρισμένο» υλικό μπορεί πλέον να φιλοξενηθεί σε ένα σχετικά μικρό κυτταρικό διαμέρισμα, τον πυρήνα, που έχει διάμετρο περίπου 10 μm (1). Μορφολογικά, η χρωματίνη ενός μεσοφασικού κυττάρου διακρίνεται στην ευχρωματίνη (“πραγματική χρωματίνη”), που είναι πιο χαλαρά συσκευασμένη και την ετεροχρωματίνη (“διαφορετική χρωματίνη”) που είναι πιο συμπυκνωμένη (2-4). Οι δυο χρωματινικές καταστάσεις κατηγοριοποιήθηκαν το 1928 από τον Emil Heitz, ο οποίος χαρακτήρισε την ετεροχρωματίνη ως συγκεκριμένες χρωμοσωμικές θέσεις οι οποίες δεν αποσυμπυκνώνονται κατά στη μεσόφαση.

Στα τελευταία 25 χρόνια έχουν προκύψει αρκετά δεδομένα αναφορικά με τα δύο κατώτερα επίπεδα οργάνωσης της χρωματίνης: α) το νουκλεόσωμα που αποτελεί το θεμέλιο δομικό λίθο της και β) την ίνα των 30 nm που αποτελεί το αμέσως επόμενο στάδιο συσπείρωσής της. Παραμένουν όμως άγνωστες οι μοριακές αλληλεπιδράσεις και οι δομικές αλλαγές που συντελούνται ώστε να οργανωθεί η χρωματινική ίνα σε μερικώς ή πλήρως συμπυκνωμένα χρωμοσώματα (σχήμα 1).

Για αρκετά χρόνια η χρωματίνη θεωρούνταν αδρανές υλικό, μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η συμπίκνωση του DNA. Σήμερα όμως είναι σαφές ότι το υπόστρωμα για ορισμένες από τις πιο βασικές βιολογικές λειτουργίες του κυττάρου, όπως η μεταγραφή, η αντιγραφή, η επιδιόρθωση του DNA, ο ανασυνδυασμός, δεν είναι το μόριο του DNA αλλά η χρωματίνη. Από αυτό γίνεται πλέον αντιληπτή η σημασία της χρωματίνης στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και στην κυτταρική ανάπτυξη (5).



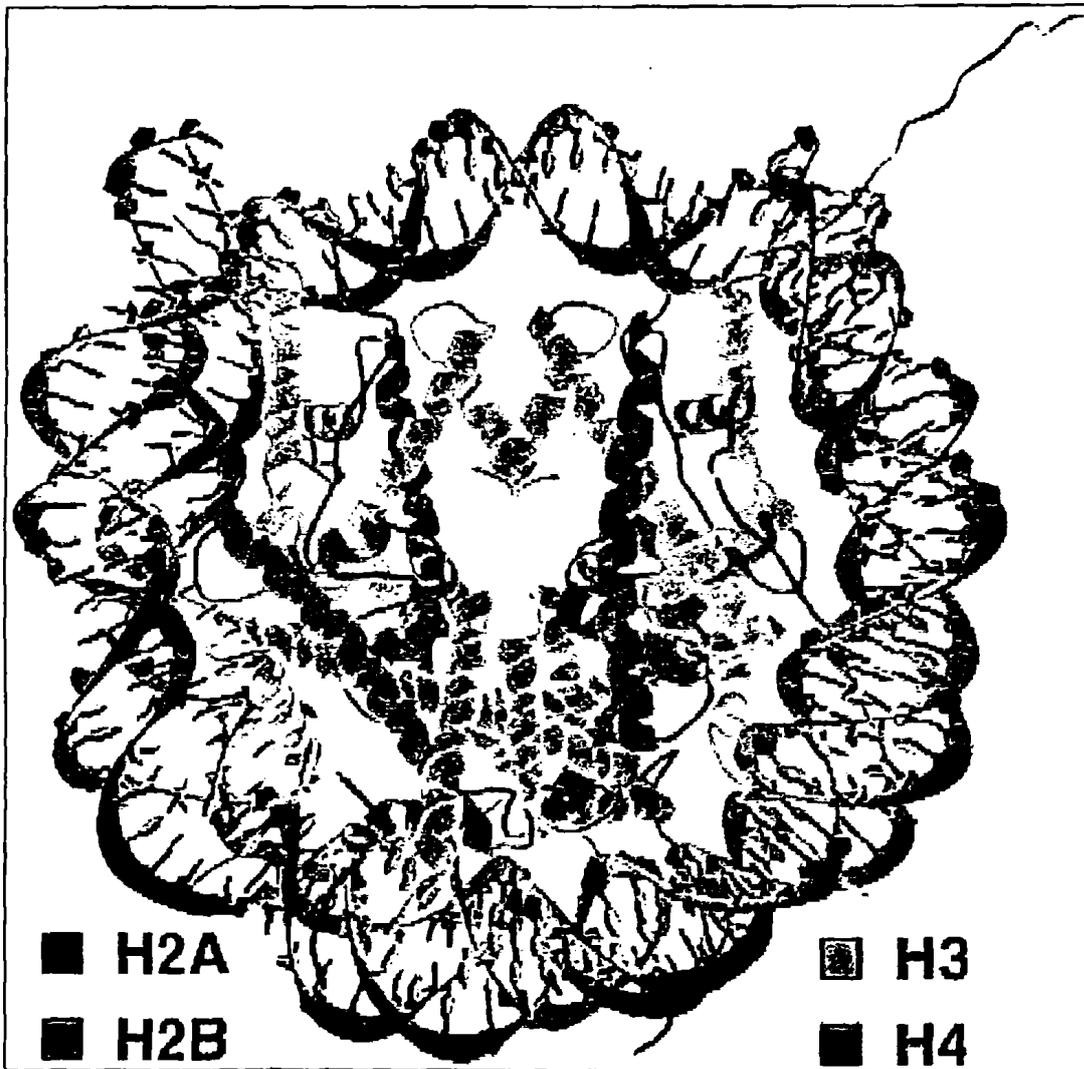


Σχίμα 1: Η οργάνωση και συμπίκνωση του DNA στην χροματινή. Το κατώτερο επίπεδο οργάνωσης της χροματινής είναι το νουκλεόσωμα, όπου 1.65 στροφές υπερελικομένου DNA τυλίγεται γύρω από το οκταμερές των ιστονών. Τα νουκλεοσώματα συνδέονται μεταξύ τους με μικρού μήκους αλληλουχίες συνδετικού DNA. Στο επόμενο επίπεδο οργάνωσης τα νουκλεοσώματα συμποκνώνονται στις ίνες χροματινής διαμέτρου 30 nm, οι οποίες περαιτέρω σχηματίζουν υψηλότερης τάξης και βαθμού συμπίκνωσης δομές. Για τα επίπεδα οργάνωσης της χροματινής πέρα από το νουκλεόσωμα δεν είναι γνωστός ο τρόπος με τον οποίο γίνεται η συμπίκνωση (προσαρμοσμένο υπό Felsenfeld & Groudine, 2003).



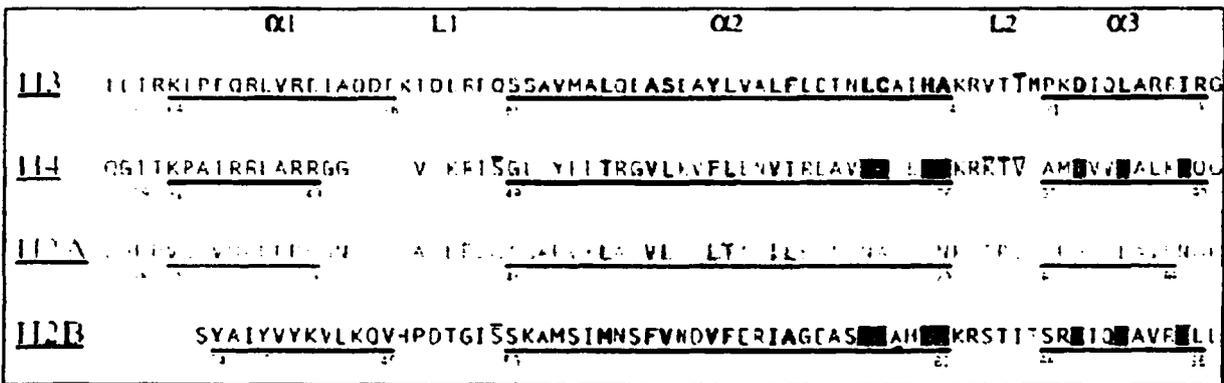
1.1.1 Δομή νουκλεοσώματος

Η δομή του νουκλεοσώματος (NPC, nucleosome core particle) απεικονίστηκε για πρώτη φορά επί τη βάσει κρυσταλλογραφικών δεδομένων σε διακριτικό όριο 7 Å (6). Σήμερα, η ανάλυση της δομής του έχει φτάσει στο όριο των 1.9 Å (7). Το νουκλεόσωμα είναι η βασική επαναλαμβανόμενη μονάδα της χρωματίνης. Έχει σχήμα κοντού κυλίνδρου (ύψους 11 nm και διαμέτρου 13 nm) και αποτελείται από τέσσερις νουκλεοσωματικές (ή πυρηνικές) ιστόνες (core histones), συνδετική ιστόνη, νουκλεοσωματικό DNA και συνδετικό DNA. Γύρω από ένα οκταμερές ιστονών περιτυλίγονται 147 ζεύγη βάσεων (base pairs, bp) σε 1.67 στροφές (σχήμα 2, 8, 9).



Σχήμα 2: Πυρηνικό σωματίο νουκλεοσώματος. Απεικονίζονται οι δυο κλώνοι του τμήματος των 146 bp του DNA (σκούρο μπλε/μοβ-κόκκινο), καθώς και το κεντρικό τμήμα κάθε αλυσίδας των οκτώ μορίων ιστόνης (H3: καφέ, H4: μοβ, H2A: ανοιχτό μπλε, H2B: πράσινο) (τροποποιημένο, από Luger et al. 1997)

Το κεντρικό τμήμα του μορίου των τεσσάρων ιστονών αποτελείται από ένα εξελικτικά συντηρημένο δομικό μοτίβο που απαρτίζεται από τρεις α-έλικες οι οποίες συνδέονται μέσω δυο βρόγχων, των L1 και L2 (σχήμα 3). Οι αλληλουχίες εκατέρωθεν του κεντρικού τμήματος κάθε ιστόνης (στο αμινοτελικό/καρβοξυτελικό άκρο) σε ορισμένες περιπτώσεις αποτελούν προέκταση του κεντρικού τμήματος (histone fold extensions) εμφανίζοντας δομή α-έλικας (στο αμινοτελικό άκρο της H3 και στο καρβοξυτελικό άκρο της H2B), ενώ σε άλλες αποτελούν τις «κουρές» κάθε ιστόνης που δεν διαθέτουν συνήθως κάποιο δομικό μοτίβο.



Σχήμα 3: Αλληλουχίες των νουκλεοσωματικών ιστονών. Το κεντρικό τμήμα των H3, H4, H2A, H2B στοιχίζεται βάσει ομοιοτήτων στην δομή. Στο σχήμα υποδεικνύονται τα στοιχεία της δευτεροταγούς δομής, όπως οι α-έλικες (α1, α2, α3) και οι βρόγχοι (L1, L2) (τροποποιημένο, από Luger et al. 1997).

Το οκταμερές των ιστονών συγκροτείται από ένα τετραμερές H3/H4 και δύο διμερή H2A/H2B. Η περιοχή επαφής του κάθε υπο-συμπλόκου καλείται «μοτίβο χειραψίας» (handshake motif) και προκύπτει από την συμπληρωματικότητα στη δομή του κεντρικού τμήματος των ιστονών. Για τον σχηματισμό του τετραμερούς H3/H4, δυο ετεροδιμερή H3/H4 συνδέονται μέσω αλληλεπιδράσεων H3-H3. Συγκεκριμένα, το καρβοξυτελικό τμήμα των ελίκων α2, α3 κάθε μορίου H3 συμμετέχει στον σχηματισμό ενός «δεματίου τεσσάρων ελίκων» (four helix bundle). Το μοτίβο αυτό σχηματίζεται επίσης κατά τη σύνδεση των δυο διμερών H2A/H2B εκατέρωθεν του τετραμερούς H3/H4 διαμέσου αλληλεπιδράσεων H2B-H4. Η H2A συνδέεται στην H4 μέσω μιας ειδικής περιοχής (docking domain), ενώ τα δύο «μισά» του νουκλεοσώματος συνδέονται μεταξύ τους μέσω αλληλεπιδράσεων H2A-H2A που εμπλέκουν τις αγκύλες L1 (10).

Το ιστονικό οκταμερές αλληλεπιδρά με τη Β-έλικα του DNA, με αποτέλεσμα την αριστερόστροφη υπερ-ελίκωσή του γύρω από το σωματίο. Το τετραμερές H3/H4 οργανώνει τις



60 bp του μεσαίου τμήματος του νουκλεοσωματικού DNA, ενώ τα δυο διμερή H2A/H2B οργανώνουν περίπου 30 bp εκατέρωθεν αυτού του τμήματος (7, 10). Έτσι απομένουν περίπου 26 bp (13x2) στα σημεία εισόδου-εξόδου του DNA που οργανώνονται από την εκτός του κεντρικού τμήματος α -έλικα που υπάρχει στο αμινοτελικό άκρο της H3. Οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται είναι δεσμοί υδρογόνου, γέφυρες ιόντων και μη πολικές επαφές μεταξύ του κεντρικού τμήματος των ιστονών και της βάσης σακχάρου του DNA.

Οι αμινοτελικές ουρές των ιστονών προεξέχουν από την επιφάνεια του νουκλεοσώματος, περνώντας ανάμεσα από τις περιελίξεις του DNA (H3 και H2B) ή το «σώμα» του οκταμερούς (H4, H2A). Οι περιοχές αυτές συχνά αλληλεπιδρούν με στοιχεία του ίδιου σωματίδιου ή γειτονικών νουκλεοσωμάτων. Τέτοιου είδους δια-νουκλεοσωματικές αλληλεπιδράσεις φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό δομών υψηλότερης τάξης, όπως η χρωματινική ίνα.

Μεταξύ δυο διαδοχικών νουκλεοσωμάτων μεσολαβεί μια ποικίλλου μήκους (50-100 bp) αλληλουχία DNA και ένα μόριο ιστόνης H1 (ή H5 στα πτηνά) που καλείται συνδετική ιστόνη (linker histone). Σε κάθε νουκλεόσωμα αντιστοιχεί ένα μόριο συνδετικής ιστόνης H1. Έχει δειχθεί ότι η *in vitro* ανασύσταση νουκλεοσώματος μπορεί να επιτευχθεί απουσία H1, ενώ οι νουκλεοσωματικές ιστόνες είναι απολύτως απαραίτητες (11). Η συνδετική ιστόνη H1 αποτελείται από ένα μικρό αμινοτελικό τμήμα, ένα κεντρικό σφαιροειδές τμήμα και ένα εκτεταμένο καρβοξυτελικό τμήμα. Στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς η H1 απαντάται σε διάφορες ισομορφές, όπως η H5 στα ερυθροκύτταρα των πτηνών και η H1⁰ σε τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα (οι ισομορφές των νουκλεοσωματικών ιστονών θα αναλυθούν παρακάτω). Μέσω του κεντρικού τμήματός της, η H1 συνδέεται στο DNA στο σημείο εισόδου-εξόδου του από το νουκλεόσωμα και πιθανόν σε μια δεύτερη περιοχή που προέρχεται από παρακείμενο νουκλεόσωμα στην αναδιπλωμένη ίνα. Η συνδετική ιστόνη για αρκετά χρόνια θεωρήθηκε απαραίτητη στην αναδίπλωση της χρωματίνης, γεγονός που δεν επαληθεύτηκε από επόμενες *in vitro* μελέτες (12). Η παρουσία της H1 φαίνεται όμως να είναι απαραίτητη στη καθόλου δομή της χρωματίνης για άλλους λόγους (ελαχιστοποιεί την ολίσθηση και την κινητικότητα των νουκλεοσωμάτων, 13, 14).

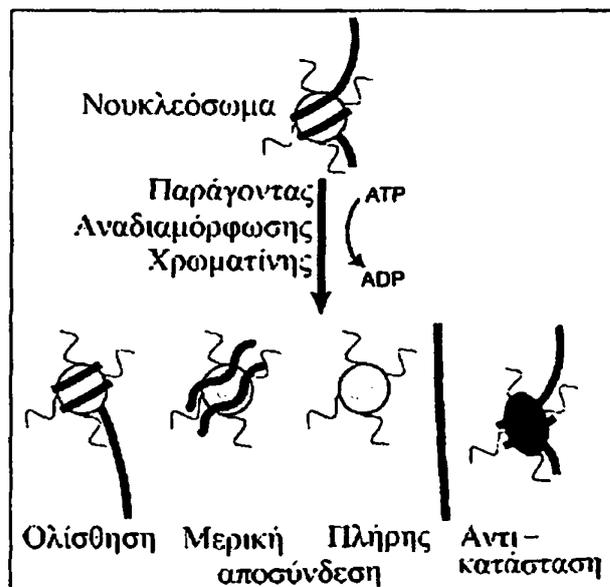


1.1.2 Παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης

Έχει ήδη αναφερθεί ότι το φυσιολογικό υπόστρωμα για πολλές λειτουργίες του κυττάρου (αντιγραφή, επιδιόρθωση και ανασυνδυασμός του DNA, ρύθμιση γονιδιακής έκφρασης) είναι η χρωματίνη. Η υπερ-δομή αυτή πρέπει να αναδιαταχθεί κατάλληλα κατά τη διάρκεια διαφόρων βιολογικών διαδικασιών, ώστε να γίνει «προσιτό» το DNA σε ρυθμιστικούς παράγοντες.

Η σταθεροποίηση του νουκλεοσωματικού DNA γύρω από το νουκλεόσωμα διαμεσολαβείται από 116 άμεσες και 358 έμμεσες (διαμέσου μορίων νερού) αλληλεπιδράσεις (7, 15). Οι παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, που ανήκουν στην κατηγορία παραγόντων που επηρεάζουν την οργάνωση και την δυναμική κατάσταση της ίνας χρωματίνης, αποτελούν ενζυμικά σύμπλοκα που είναι υπεύθυνα για την μετατόπιση του DNA σε σχέση με το νουκλεόσωμα με δαπάνη ενέργειας (σχήμα 4). Το τελικό αποτέλεσμα της δράσης των παραγόντων αναδιαμόρφωσης μπορεί να είναι:

- Ολίσθηση ενός ή περισσότερων νουκλεοσωμάτων σε διαφορετική θέση στο DNA από αυτή που αρχικά κατείχαν.
- Μερική ή πλήρης αποσύνδεση του DNA από τις ιστόνες.
- Αντικατάσταση ενός τύπου ιστόνης από μια ισομορφή της.



Σχήμα 4 : Σχηματική αναπαράσταση της διαφορετικής επίδρασης των παραγόντων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης (βλέπε κείμενο) στη σύνδεση DNA-ιστονών (από Mohrmann & Verrijzer, 2005).



Οι παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης περιέχουν μια υπομονάδα ΑΤΡασης που εμφανίζει ομολογία με την οικογένεια ΑΤΡασιών SNF2 στον *Saccharomyces cerevisiae* (16). Ανάλογα με το δομικό μοτίβο που πλαισιώνει την καταλυτικά ενεργή υπομονάδα τους διακρίνουμε στις εξής κλάσεις : α) SWI2/SNF2 (mating type switch/sucrose non-fermenting), β) ISWI (imitation switch), γ) CHD (chromo ΑΤΡase/helicase DNA binding) και δ) INO80 (inositol 80), ή ένζυμα όπου η περιοχή ΑΤΡασης διαιρείται σε δύο τμήματα.

Οι παράγοντες αναδιαμόρφωσης της κλάσης SWI2/SNF2 (π.χ. τα BAP και PBAP στην *Drosophila melanogaster*, τα SWI/SNF RSC στον σακχαρομύκητα και τα BAF και PBAF στον άνθρωπο) διαθέτουν βρομοτομέα (bromodomain), ένα συντηρημένο δομικό μοτίβο που αποτελείται από 60 αμινοξέα και αρχικά ταυτοποιήθηκε σε πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για τη ρύθμιση ομοιοτικών γονιδίων (17). Οι πρωτεΐνες που διαθέτουν βρομοτομέα έχουν την ικανότητα σύνδεσης με ακετυλιωμένα κατάλοιπα λυσινών στις ιστόνες ή μεταγραφικούς παράγοντες (18). Στον σακχαρομύκητα και τον άνθρωπο δύο γονίδια κωδικοποιούν τις ΑΤΡασιες SWI2/SNF2, ενώ στη *Drosophila* υπάρχει ένα μόνο γονίδιο που το προϊόν του συμμετέχει στον σχηματισμό δυο διαφορετικών συμπλόκων. Οι παράγοντες SWI2/SNF2 εμπλέκονται τόσο στην ενεργοποίηση, όσο και την καταστολή της μεταγραφής. Αναφορικά με την ενεργοποιητική τους δράση έχειδειχθεί ότι το σύμπλοκο SWI2/SNF2 συνεντοπίζεται με την RNA πολυμεράση II σε πολυταινικά χρωμοσώματα της *Drosophila* (19), ενώ στον σακχαρομύκητα *in vitro* μελέτες έδειξαν ότι παρουσία SWI2/SNF2 μεταβάλλεται η περιοδικότητα των νουκλεοσωμάτων (20). Τα σύμπλοκα SWI2/SNF2 στρατολογούνται στη χρωματίνη και συνδέονται στη μικρή αύλακα του DNA (μέσω του δομικού μοτίβου τύπου High Mobility Group) (21, 22), στις ιστόνες ή και σε μεταγραφικούς παράγοντες (μέσω του βρομοτομέα) (23, 24).

Η κατασταλτική δράση του SWI2/SNF2 στον σακχαρομύκητα έχειδειχθεί με πειράματα μικροσυστοιχιών (25). Στον άνθρωπο ο SWI2/SNF2 απομονώνεται μαζί με απο-ακετυλάσες των ιστονών, οι οποίες διαμεσολαβούν στη γονιδιακή καταστολή (26). Η δράση του είναι επίσης απαραίτητη για την καταστολή γονιδίων που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο από την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (Rb) (27). Τα σύμπλοκα SWI2/SNF2 προκαλούν ολίσθηση του οκταμερούς των ιστονών καθώς και μερική αποσύνδεση του DNA από το νουκλεόσωμα.

Τα σύμπλοκα ISWI (π.χ. τα ACF και CHRAC στην *Drosophila*, τα ISWI2 και γCHRAC στον σακχαρομύκητα, τα hACF και hCHRAC στον άνθρωπο) διαθέτουν δυο συντηρημένα δομικά



μοτίβα το SANT (SWI ADA2 N-CoR TFIIB) και το SLIDE (SANT-like ISWI domain). Το μοτίβο SANT εμφανίζει δομική ομοιότητα με το μοτίβο τύπου Myb που έχει ικανότητα σύνδεσης με το DNA και απαντάται σε πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μεταγραφική ρύθμιση, όπως οι ακετυλοτρανσφεράσες και απο-ακετυλάσες ιστονών. Δεν διαθέτει ικανότητα σύνδεσης στο DNA, συνδέεται όμως με τις αμινοτελικές περιοχές των ιστονών. Αντίθετα, το μοτίβο SLIDE συνδέεται με νουκλεοσωματικό DNA (28). Στον σακχαρομύκητα και τον άνθρωπο έχουν ταυτοποιηθεί δύο γονίδια που κωδικοποιούν την ΑΤΡαση του συμπλόκου ISWI, ενώ στη *Drosophila* μόνο ένα. Σύμπλοκα που περιέχουν ISWI εμπλέκονται σε αρκετές διαδικασίες, όπως η μεταγραφική ρύθμιση μέσω των RNA πολυμερασών I και II (29, 30), η καταστολή (31) και η ενεργοποίηση ορισμένων γονιδίων (32), η οργάνωση της χρωματίνης (33) και η αντιγραφή (34). Σύμπλοκα αυτής της κλάσης εμπλέκονται επίσης στη διολίσθηση συστοιχιών νουκλεοσωμάτων ως προς το DNA.

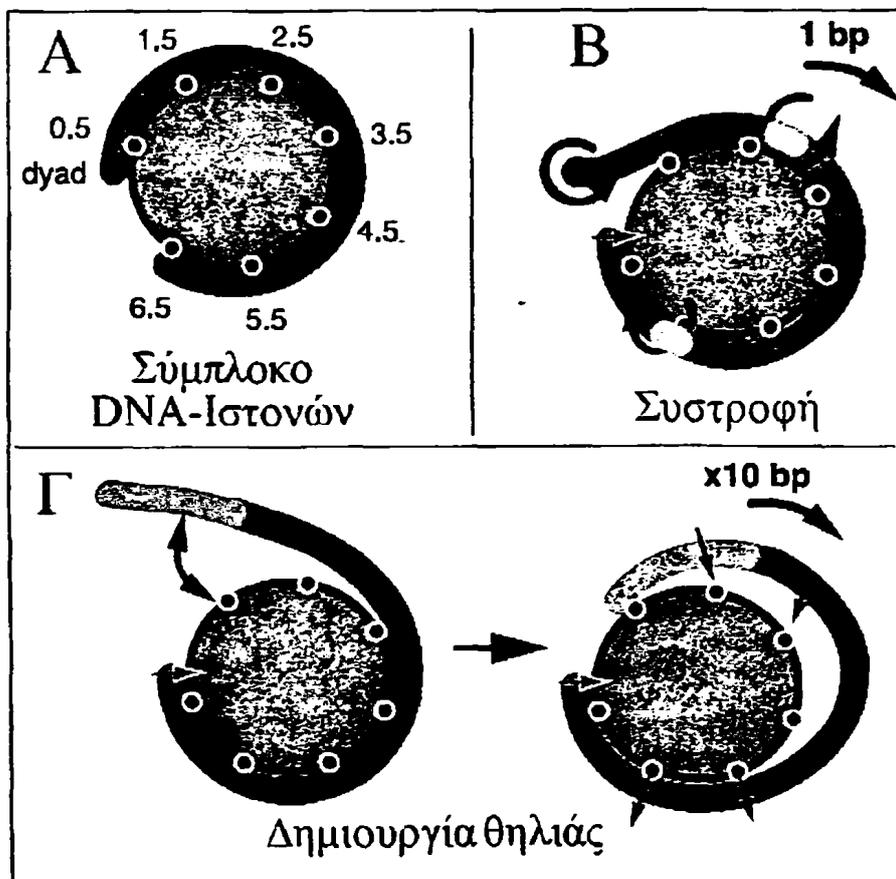
Τα σύμπλοκα της κλάσης CHD (π.χ. το dMi-2 στη *Drosophila*, και τα MeCP1, NuRD, CHD1 στον άνθρωπο) διαθέτουν δυο αντίγραφα του δομικού μοτίβου χρωμοτομέας (chromodomain, chromatin organization modifier), καθώς και δακτύλους PHD (Plant Homeo Domain). Χρωμοτομέα διαθέτει μια ποικιλία πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τη χρωματίνη όπως οι HP1, Polycomb και Su(var)3-9. Έχειδειχθεί ότι στη στρατολόγηση των πρωτεϊνών που περιέχουν το μοτίβο αυτό κύριο ρόλο διαδραματίζει το αμινοτελικό άκρο της ιστόνης H3 που φέρει τρι-μεθυλίωση στην λυσίνη 9. Οι πρωτεΐνες CHD φέρουν ακόμη δομικά μοτίβα HMG τύπου, οπότε έχουν την ικανότητα να συνδέονται με περιοχές του DNA που είναι πλούσιες σε AT. Στον σακχαρομύκητα και τον άνθρωπο έχει ταυτοποιηθεί ένα μόνο γονίδιο που κωδικοποιεί την ΑΤΡαση του συμπλόκου CHD, ενώ στη *Drosophila* δύο. Τα σύμπλοκα που περιέχουν CHD εμπλέκονται στη μεταγραφική ενεργοποίηση και καταστολή (35), στην επιγενετική τροποποίηση του DNA (μέσω σύνδεσης των συμπλόκων με πρωτεΐνες που μεθυλιώνουν το DNA) (36) και των ιστονών (μέσω σύνδεσης των συμπλόκων με απακετυλάσες των ιστονών) (37), καθώς και στην επιδιόρθωση του DNA (38). Όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις, τα σύμπλοκα CHD διαμεσολαβούν στη διολίσθηση του οκταμερούς των ιστονών ως προς το DNA.

Τέλος, τα σύμπλοκα της κλάσης INO80 (π.χ. τα INO80.com και SWR.com) δεν περιέχουν κάποιο επιπλέον δομικό μοτίβο, διαθέτουν όμως μια ένθετη αλληλουχία που χωρίζει σε δύο μέρη την περιοχή της ΑΤΡασης. Σύμπλοκα τύπου INO80 έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι στιγμής



μόνο στον σακχαρομύκητα (39). Οι υπομονάδες που τα απαρτίζουν παρουσιάζουν δράση ελικάσης (Rnb1p και Rnb2p) και πιθανώς εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA (40). Το σύμπλοκο SWR, που ανήκει στην κλάση INO80, έχειδειχθεί ότι συμμετέχει στην ανταλλαγή φυσιολογικής H2A με τις ισομορφές της (39). Επίσης, έχειδειχθεί ότι η μεταγραφή του 5% των γονιδίων του σακχαρομύκητα επηρεάζεται από το σύμπλοκο τύπου INO80 (θετικά ή αρνητικά, (41).

Τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης χρωματίνης έχουν διαφορετική δραστηριότητα ΑΤΡασης. Η SWI2 ΑΤΡαση εμφανίζει μέγιστη δράση παρουσία ελεύθερου DNA, χωρίς καμμία μεταβολή στη δραστηριότητά της παρουσία ιστονών, η Mi-2 ΑΤΡαση δρά αποκλειστικά παρουσία νουκλεοσωμικού (και όχι ελεύθερου) DNA, ενώ η ISWI δρά παρουσία ελεύθερου DNA, με αύξηση της δραστηριότητας παρουσία νουκλεοσωμικού DNA και ιστόνης H4.



Σχήμα 5 : Πιθανοί μηχανισμοί αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης. (Α) Σύμπλοκο DNA-ιστονών όπου φαίνονται οι θέσεις της υπερ-ελίκας οι οποίες αλληλεπιδρούν με τις ιστόνες. (Β) και (Γ) Σχηματική απεικόνιση των απαραίτητων στοιχείων στους δύο μηχανισμούς αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης.

Έχουν προταθεί δύο βασικοί μηχανισμοί για τον τρόπο αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης (βλέπε σχήμα 5). Σύμφωνα με τον μηχανισμό «μεταφοράς της συστροφής του DNA» (twist diffusion) το μόριο του DNA περιστρέφεται γύρω από τον άξονά του και «κυλύεται» στην επιφάνεια του νουκλεοσώματος (κατ' αναλογία, όπως προωθείται ένας κοχλίας που περιστρέφεται) με βήμα ενός ζεύγους βάσεων. Κατά τη διαδικασία αυτή δεν διαταράσσεται ταυτόχρονα το σύνολο των αλληλεπιδράσεων DNA-ιστονών (42, 43). Η συστροφή του DNA συμβαίνει κυρίως στα σημεία εισόδου-εξόδου του μορίου από το νουκλεόσωμα και η τάση μεταφέρεται στα εσωτερικά σημεία. Εναλλακτικά, προτείνεται ο μηχανισμός «θηλιάς» (bulge diffusion) κατά τον οποίο τμήμα DNA στα σημεία εισόδου-εξόδου του μορίου από το νουκλεόσωμα, (περίπου 30-35 bp) αποσυνδέεται από το ιστονικό οκταμερές σχηματίζοντας μια αγκύλη (1, 43). Η αποσύνδεση του DNA στα σημεία εισόδου-εξόδου απαιτεί λιγότερη ενέργεια σε σχέση με την αποσύνδεση ίδιου μήκους τμήματος DNA που βρίσκεται πιο εσωτερικά. Στη συνέχεια, η αγκύλη αυτή μπορεί να συνδεθεί με το ιστονικό οκταμερές στην αρχική ή σε διαφορετική θέση και κατ' αυτή την έννοια το μόριο να μετακινηθεί γύρω από το νουκλεόσωμα. Για τη διαδικασία αυτή δαπανάται σχετικά λίγη ενέργεια, αφού για κάθε επαφή DNA-ιστονών που διαταράσσεται ένας νέος δεσμός δημιουργείται.

1.1.3 Ίνα χρωματίνης (Chromatin Fiber) – Χρωματινική δυναμική (Chromatin Dynamics)

Η ίνα των 30 nm αποτελεί το επόμενο επίπεδο οργάνωσης της χρωματίνης. Η δομή αυτή αποτελείται από νουκλεοσώματα που διατάσσονται σπειροειδώς ή σε μορφή zig-zag και περιέχει επίσης H1 και μη ιστονικές πρωτεΐνες που συνδέονται με την χρωματίνη και οργανώνονται σε δομές υψηλότερης τάξης (44, 45).

Στις εναλλακτικές διαμορφώσεις μιας πολύ δυναμικής δομής, όπως η χρωματινική ίνα, σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν πολλοί παράγοντες, οι οποίοι διακρίνονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες που δρούν:

- i) στο νουκλεοσωματικό επίπεδο,
- ii) στο επίπεδο της διαμορφωμένης χρωματινικής ίνας.



Στην πρώτη κατηγορία παίζουν ρόλο οι παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης (αναλύθηκαν ξεχωριστά στο προηγούμενο κεφάλαιο), οι παράγοντες που διαμεσολαβούν την ανταλλαγή των νουκλεοσωματικών ιστονών και των ισομορφών τους, καθώς και η ενδογενής δυναμική των νουκλεοσωμάτων. Στην δεύτερη κατηγορία παίζουν ρόλο οι χρωμοσωμικές - μη ιστονικές πρωτεΐνες, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ γειτονικών νουκλεοσωμάτων που διαμεσολαβούνται από τις αμινοτελικές «ουρές» των ιστονών καθώς και οι συνδετικές ιστόνες.

Η ανταλλαγή των νουκλεοσωμικών ιστονών και των ισομορφών πραγματοποιείται μέσω μοριακών συνοδών. Οι μοριακοί συνοδοί βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στον πυρήνα, συνδέονται με υπο-σύμπλοκα ιστονών και τα εναποθέτουν σε σημεία που υπάρχει «γυμνό» DNA (46). Έχειδειχθεί ότι τα διμερή H2A/H2B ανταλλάσσονται συνεχώς μεταξύ διαφορετικών νουκλεοσωμάτων, ενώ ανταλλαγή του τετραμερούς (H3/H4)₂ συμβαίνει σε πολύ μικρότερο βαθμό (45, 47). Ο παράγοντας CAF-1 (Chromatin Assembly Factor 1) έχειδειχθεί ότι συνδέεται με τα τετραμερή (H3-H4)₂, τα οποία εναποθέτει σε νεοσυντιθέμενα νουκλεοσώματα κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA (48). Ο παράγοντας FACT (FACilitates CHromatin Transcription) έχειδειχθεί ότι απομακρύνει διμερή H2A/H2B από το οκταμερές (49) κατά την μεταγραφή, ώστε η RNA πολυμεράση II να επιτελέσει την επιμήκυνση του μεταγραφήματος. Συμμετέχει επίσης στην καθόλου συγκρότηση του οκταμερούς (σε σημεία που έχει προηγηθεί μεταγραφή) σε συνεργασία με την Spt6, έναν μοριακό συνοδό του τετραμερούς (H3/H4)₂ (50).

Η ανταλλαγή των νουκλεοσωμικών ιστονών και των ισομορφών μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί από παράγοντες αναδιαμόρφωσης όπως ο SWI-SNF, που έχειδειχθεί ότι συμμετέχει στην απομάκρυνση και ανταλλαγή διμερών H2A/H2B (51-53). Σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζει η απομάκρυνση του DNA από το νουκλεόσωμα, με αποτέλεσμα να ελατώνεται η σταθερότητα του οκταμερούς. Όπως σημειώθηκε παραπάνω, το διμερές H2A/H2B οργανώνει 30 bp στην είσοδο και έξοδο του DNA στο νουκλεόσωμα οπότε ακόμη και μερική αποκόλληση του DNA έχει ως αποτέλεσμα αποσύνδεση του H2A/H2B από το νουκλεόσωμα (52). Στην ίδια κατηγορία ανήκουν οι μοριακοί συνοδοί που εξειδικεύονται στην ανταλλαγή διμερών ή τετραμερών αντικαθιστώντας μια από τις «κλασσικές» ιστόνες με μια ισομορφή της. Ο μοριακός συνοδός NAP-1 στον σακχαρομύκητα συνδέεται με διμερή H2A-H2B και τετραμερή (H3-H4)₂ αλλά και με διμερή που περιέχουν ισομορφές ιστονών (H2A.Z-H2B) (39, 54, 55). Στην περίπτωση των διμερών H2A.Z-H2B ο NAP-1 «παραδίδει» τα διμερή



στον παράγοντα Swi1 (ATPase που αποτελεί μέρος του συμπλόκου αναδιαμόρφωσης Swi2/Snf2), ο οποίος καταλύει την ανταλλαγή τους με κατανάλωση ενέργειας ATP (55, 56).

Επιπλέον τα νουκλεοσώματα είναι εγγενώς δυναμικές δομές. Σε πρόσφατες μελέτες έχει δειχθεί ότι το νουκλεοσωμικό DNA αποσυνδέεται και επανασυνδέεται στην επιφάνεια του νουκλεοσώματος με πολύ γρήγορο ρυθμό (250 ms παραμένει συνδεδεμένο και 50 ms ελεύθερο) (57). Αυτό το χρονικό διάστημα είναι αρκετό για την πρόσδεση ενός μεταγραφικού παράγοντα καθώς και τη στρατολόγηση της βασικής μεταγραφικής μηχανής στην περιοχή του υποκινητή. Οι Li και Widom περιγράφουν ότι η δυναμική κατάσταση του νουκλεοσώματος επιτρέπει στο νουκλεοσωμικό DNA να «αναπνέει», ιδιαίτερα όσον αφορά τις ακραίες 40 bp στα σημεία εισόδου-εξόδου του DNA στο νουκλεόσωμα.

Κύριο ρόλο στη δυναμική κατάσταση στο επίπεδο της χρωματινικής ίνας παίζουν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αμινοτελικών περιοχών των νουκλεοσωματικών ιστονών με το DNA. Έχει δειχθεί σε *in vitro* μελέτες ότι το αμινοτελικό άκρο της H4 είναι απαραίτητο για τον σχηματισμό της χρωματινικής ίνας (12). Η ιστόνη H4, μέσω του αμινοτελικού της άκρου, φαίνεται να αλληλεπιδρά με μια περιοχή της ιστόνης H2A που φέρει φορτισμένα αμινοξέα και βρίσκεται στην επιφάνεια ενός γειτονικού νουκλεοσώματος (acidic patch, (10). Επίσης, είναι γνωστό ότι οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών, κυρίως στο αμινοτελικό τους άκρο, παίζουν σημαντικό ρόλο στην λειτουργική κατάσταση της χρωματινής καθώς και στη γονιδιακή ρύθμιση (βλέπε παρακάτω). Συστοιχίες ολιγονουκλεοσωμάτων που περιέχουν υπερ-ακετυλιωμένες ιστόνες H3 και H4 έχουν μικρότερη τάση για ολιγομερισμό και συμύκνωση σε δομή χρωματινικής ίνας (58). Εικάζεται ότι η εξασθένηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αμινοτελικών περιοχών των ιστονών και του DNA, που προκύπτει από την εξουδετέρωση θετικών φορτίων από τις αρνητικά φορτισμένες ακετυλομάδες, είναι υπεύθυνη για αυτό το φαινόμενο.

Με τον ίδιο τρόπο (εξουδετερώνοντας το φορτίο του συνδετικού DNA) φαίνεται ότι λειτουργεί και η συνδετική ιστόνη H1, αναφορικά με τη δυναμική της χρωματινικής ίνας. Επιπλέον σε πρόσφατες μελέτες έχει δειχθεί ότι το καρβοκυτελικό της τμήμα παίζει ρόλο στη σύνδεσή της στη χρωματίνη καθώς και στη σταθεροποίηση της δομής της χρωματινικής ίνας (12, 59, 60).

Οι μη ιστονικές πρωτεΐνες που έχουν την ικανότητα να συνδέονται με τη χρωματίνη αποτελούν την τελευταία κατηγορία παραγόντων που επηρεάζουν τη δυναμική της χρωματινικής ίνας. Η



MeCP2 ανήκει σε αυτή την κατηγορία και ταυτοποιήθηκε λόγω της ιδιότητάς της να συνδέεται με μεθυλιωμένα δινοκλεοτίδια CpG και να προκαλεί συμπύκνωση της χρωματινικής ίνας (και επακόλουθη μεταγραφική καταστολή, πιθανόν στρατολογώντας πρωτεϊνικά σύμπλοκα που συμβάλλουν στη γονιδιακή αποσιώπηση). Στην ίδια κατηγορία ανήκει και η πρωτεΐνη MENT (Myeloid and Erythroid Nuclear Termination stage-specific protein), μέλος της οικογένειας των πυρηνικών πρωτεασών σερίνης, που εμφανίζεται στο τελευταίο στάδιο της τελικής διαφοροποίησης στους πυρήνες ερυθροκυττάρων πτηνών. Η MENT, μέσω του δομικού μοτίβου τύπου θηλιάς-M που διαθέτει, προσδέεται στο συνδετικό DNA νουκλεοσωματικών συστοιχιών (πιθανόν σε συνεργασία με τις συνδετικού τύπου ιστόνες) συμμετέχοντας έτσι στη σταθεροποίηση της δομής της χρωματινικής ίνας (61). Επίσης, η MENT, μέσω του δομικού μοτίβου πρωτεάσης της σερίνης που διαθέτει, διασυνδέει γειτονικές χρωματινικές ίνες (πιθανόν μέσω αλληλεπιδράσεων με τη συνδετική ιστόνη H1).

1.1.4 Χημικές τροποποιήσεις και ισομορφές ιστονών

A) Χημικές τροποποιήσεις - Πρότεινόμενος ιστονικός κώδικας

Οι ιστόνες υφίστανται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως ακετυλίωση, μεθυλίωση, φωσφορυλίωση, ουβικουτινυλίωση, ADP-ριβοζυλίωση και σουμοϋλίωση. Οι παραπάνω τροποποιήσεις ανιχνεύονται κυρίως στην αμινοτελική περιοχή τους, απαντώνται όμως και στην κεντρική περιοχή (62). Τα τελευταία χρόνια έχουν ταυτοποιηθεί αρκετοί από τους παράγοντες που ευθύνονται για την εισαγωγή καθώς και την απομάκρυνση των παραπάνω τροποποιήσεων, ενώ έχειδειχθεί ότι συγκεκριμένα δομικά μοτίβα αναγνωρίζουν ειδικά κάποιες τροποποιήσεις ή συνδυασμούς τροποποιήσεων στην αμινοτελική περιοχή των ιστονών.

Η ακετυλίωση λαμβάνει χώρα σε όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου σε κατάλοιπα λυσινών (K), και είναι αντιστρεπτή. Κατά την ακετυλίωση μεταφέρεται μια ακετυλομάδα από το ακετυλοσυνένζυμο A σε μια ε-αμινομάδα ενός καταλοίπου λυσίνης. Δυο βασικές κατηγορίες ενζύμων ρυθμίζουν την προσθήκη και την αφαίρεση των ακετυλομάδων στις ιστόνες, οι ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών (HATs) και οι απο-ακετυλάσες των ιστονών (HDACs),



αντίστοιχα. Οι HATs υποκατηγοριοποιούνται στις τύπου A, που εντοπίζονται στον πυρήνα και ακετυλιώνουν ιστόνες που είναι συγκροτημένες σε νουκλεοσώματα, και στις τύπου B, που είναι κυτταροπλασματικές και ακετυλιώνουν τις νεοσυντιθείσες ιστόνες που πρόκειται να μεταφερθούν στον πυρήνα για τον σχηματισμό των νουκλεοσωμάτων. Η ακετυλίωση ελαττώνει το θετικό φορτίο με αποτέλεσμα να εξασθενούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του αρνητικά φορτισμένου DNA και των πολύ βασικών αμινοτελικών 'ουρών' των ιστονών, όπως και μεταξύ των ιστονών που βρίσκονται σε γειτονικά νουκλεοσώματα, καθώς και μεταξύ των ιστονών και ρυθμιστικών πρωτεϊνών (63, 64). Παράλληλα, η τροποποίηση αυτή ευνοεί την α-ελικοειδή δομή των αμινοτελικών 'ουρών' (65). Η ακετυλίωση έχει συσχετισθεί με την «χαλάρωση» της δομής της χρωματίνης και τη μεταγραφική ενεργοποίηση, ενώ, αντίθετα, οι υποακετυλιωμένες ιστόνες βρίσκονται συνήθως σε μεταγραφικά ανενεργές χρωματινικές περιοχές. Τυπικό παράδειγμα αποτελεί η ακετυλίωση στη λυσίνη 16 στην ιστόνη H4 που παρατηρείται στο χρωμόσωμα X σε αρσενικά άτομα της *Drosophila* και έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας, ώστε να εξισορροπηθεί η δόση των μεταγραφημάτων του X χρωμοσώματος μεταξύ των δυο φύλων. Η αποακετυλίωση έχει συσχετισθεί με την ακριβώς αντίθετη κατάσταση, τη γονιδιακή αποσιώπηση και την ετεροχρωματινοποίηση. Στον σακχαρομύκητα, η απο-ακετυλίωση της λυσίνης 16 της ιστόνης H4 από το ένζυμο Sir2 αποτελεί το πρώτο βήμα για τη δημιουργία ετεροχρωματινικών περιοχών. Η ακετυλιωμένη λυσίνη αναγνωρίζεται από ένα αρκετά συντηρημένο δομικό μοτίβο, τον βρομοτομέα (bromodomain/brahma-like domain), που έχει δομή αριστερόστροφου δεματίου τεσσάρων ελίκων. Η ακετυλιωμένη λυσίνη δεσμεύεται σε μια υδρόφοβη σχισμή που δημιουργείται από την αντιπαράλληλη διάταξη των θηλιών ZA και BC, που συνδέουν τις α-έλικες αZ-αA και αB-αC, αντίστοιχα. Βρομοτομέα διαθέτουν οι ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών-τύπου A (για παράδειγμα οι οικογένειες GCN5/PCAF, CBP/p300), ένζυμα που συμμετέχουν στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης (για παράδειγμα οι hSNF2α, hSNF2β, μέλη της οικογένειας SWI/SNF), καθώς και οι μεθυλοτρανσφεράσες των ιστονών (όπως οι Ash1, MLL).

Κατά τη μεθυλίωση προστίθενται μια, δυο ή τρεις μεθυλομάδες σε κατάλοιπα λυσίνης (K) και μια ή δυο (κατά συμμετρικό ή ασύμμετρο τρόπο) μεθυλομάδες σε κατάλοιπα αργινίνης (R). Οι μεθυλοτρανσφεράσες των ιστονών (HMTs) και οι πρωτεϊνικές μεθυλοτρανσφεράσες των αργινινών (PMRTs) μεθυλιώνουν κατάλοιπα λυσίνης και αργινίνης, αντίστοιχα. Σήμερα



γνωρίζουμε ότι η μεθυλίωση είναι αντιστρεπτή, όμως μέχρι πρόσφατα δεν είχαν ταυτοποιηθεί ένζυμα που να αφαιρούν μεθυλομάδες από τις ιστόνες, με αποτέλεσμα να θεωρείται αμετάβλητη επιγενετική τροποποίηση. Ένζυμα που απομεθυλιώνουν ιστόνες είναι η LSD1 (Lysine Specific Demethylase 1), ειδική για μονο-/δι-μεθυλιωμένα κατάλοιπα λυσίνης 4 της ιστόνης H3 (66) ή για μονο-/δι-μεθυλιωμένα κατάλοιπα λυσίνης 9 της ιστόνης H3 (67) και η JHDM1 (JmJc domain containing Histone Demethylase 1), ειδική για μονο-/δι-μεθυλιωμένα κατάλοιπα λυσίνης 36 της H3 (68). Η μονομεθυλομάδα στην αργινίνη δεν αφαιρείται, αλλά μετατρέπεται σε κιτρουλλίνη μέσω της δράσης του ενζύμου PAD4 (peptidylarginine deiminase 4, (69). Η μεθυλίωση δεν μεταβάλλει το συνολικό φορτίο των ιστονών, αλλά η προσθήκη μεθυλομάδων αυξάνει τον βασικό και υδρόφοβο χαρακτήρα τους και τη συγγενείά τους για ανιονικά μόρια όπως το DNA. Η μεθυλίωση έχει συσχετιστεί τόσο με τη γονιδιακή καταστολή, όσο και με τη γονιδιακή ενεργοποίηση. Μεθυλίωση στη λυσίνη 9 και στη λυσίνη 27 της ιστόνης H3 ή στη λυσίνη 12 της ιστόνης H4 παρατηρούνται σε ετεροχρωματινικές περιοχές, ενώ η μεθυλίωση στη λυσίνη 4 της H3 ανιχνεύεται σε περιοχές με υψηλή μεταγραφική ενεργότητα. Οι πρωτεΐνες που περιέχουν χρωμοτομέα, WD40, Tudor και MBT περιοχές συνδέονται ειδικά με μεθυλιωμένα κατάλοιπα λυσίνης και αργινίνης (70). Τα ένζυμα που μεθυλιώνουν κατάλοιπα λυσινών περιέχουν την περιοχή SET (με εξαίρεση την Dot1p). Η περιοχή αυτή αποτελείται από 130 αμινοξέα και ανακαλύφθηκε σε τρία γονίδια της *Drosophila* (S(var)3-9, En(zeste) και TriThorax) που εμπλέκονται σε επιγενετικά φαινόμενα. Αποτελείται από μια σειρά β-πτυχωτά φύλλα, τα οποία διατάσσονται κυκλικά, ώστε να δημιουργείται μια σχισμή στην περιοχή που παρέχει τη μεθυλομάδα. Οι πρωτεΐνες που μεθυλιώνουν κατάλοιπα αργινινών ποικίλουν σε μήκος (από 348-608 αμινοξέα), διαθέτουν μια κεντρική περιοχή που είναι αρκετά διατηρημένη και αποτελεί το ενεργό κέντρο του ενζύμου και υποδιαιρούνται σε τρεις τομείς: την περιοχή της μεθυλοτρανσφεράσης (MT domain), μια περιοχή β-βαρελιού και ενός βραχίονα διμερισμού (71). Η φωσφορυλίωση των ιστονών λαμβάνει χώρα κατά τη μίτωση και είναι αντιστρεπτή. Έχειδειχθεί ότι η ιστόνη H3 φωσφορυλιώνεται κατά την πρόφαση, μετάφαση και ανάφαση, ενώ η αποφωσφορυλίωση ξεκινά στο τέλος της ανάφασης και ολοκληρώνεται στην τελόφαση. Η φωσφορυλίωση διαμεσολαβείται από τις κινάσες Aurora B (τροποποιεί τις λυσίνες 10 και 28 στην H3), haspin (τροποποιεί τη θρεονίνη 3 της ιστόνης H3, (72) και τις MAP κινάσες (Mitogen Activated Protein kinases) (τροποποιούν την σερίνη 28 στην ιστόνη H3, μετά από έκθεση σε



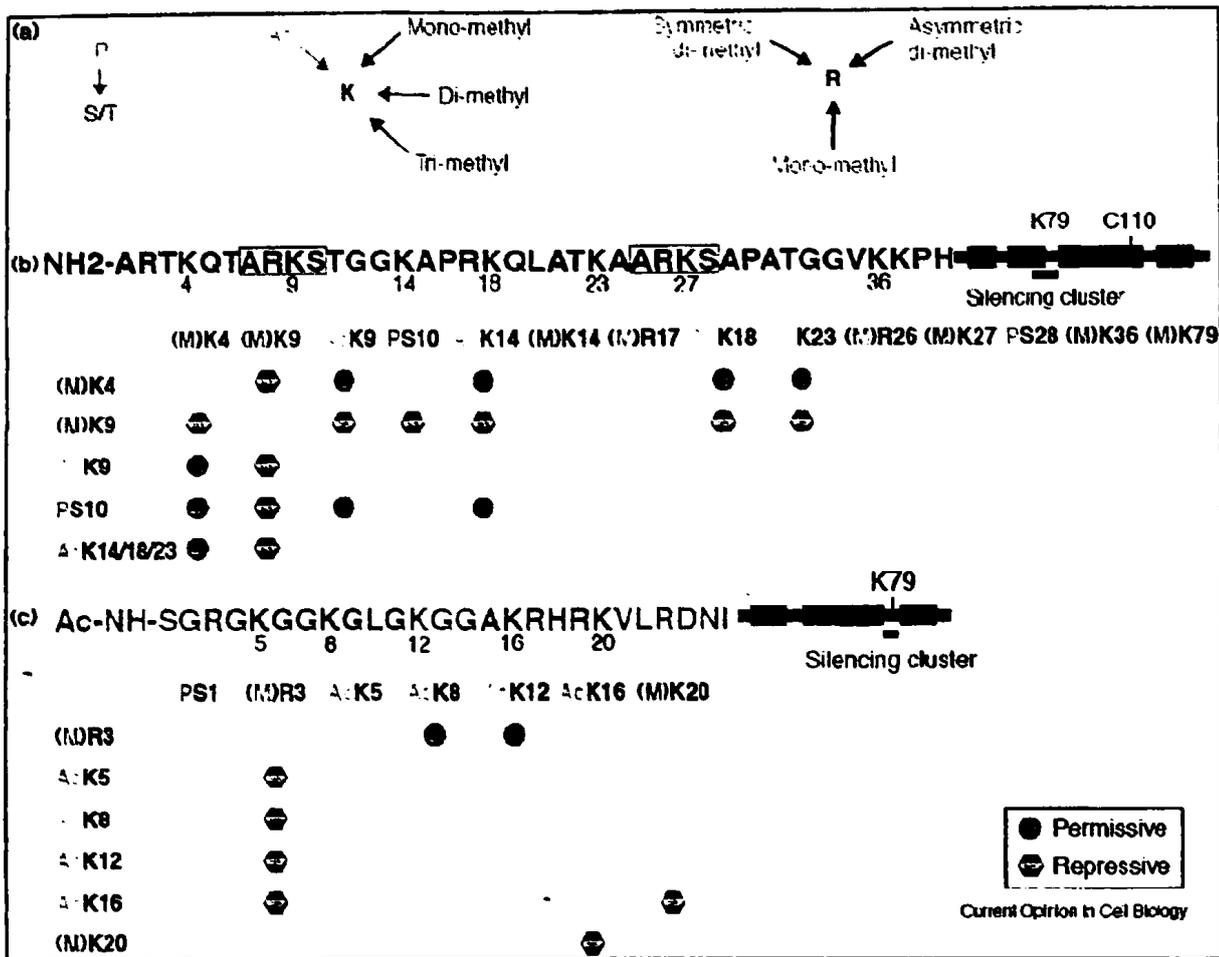
ακτινοβολία UV-B, (73, 74). Η αποφωσφορυλίωση επιτυγχάνεται από τη φωσφατάση PP1 (protein phosphatase 1, (75, 76). Η φωσφορυλίωση αυξάνει το αρνητικό φορτίο στο αμινοτελικό άκρο των ιστονών με πιθανό επακόλουθο την αποσυμπύκνωση της χρωματινικής ίνας. Η φωσφορυλίωση έχει συσχετισθεί με τη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων (επαγωγή γονιδίων άμεσης απόκρισης μετά από μιτογόνα ερεθίσματα, (77), καθώς και με τη συμπύκνωση και το σωστό διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά τη μίτωση (78, 79).

Για τον ρόλο της ADP-ριβουσύλιωσης (σε κατάλοιπα γλουταμικού) και της ουβικουΐτινυλίωσης (σε κατάλοιπα λυσινών) δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα. Σε κύτταρα που διπλασιάζονται κανονικά έχειδειχθεί ότι τα επίπεδα της ADP-ριβουσύλιωσης των νουκλεοσωματικών ιστονών είναι μεγαλύτερα σε σχέση με τα κύτταρα που δεν διπλασιάζονται, γεγονός που υποδηλώνει ότι η παραπάνω τροποποίηση μπορεί να συσχετίζεται με την αντιγραφή του DNA (80). Η προσθήκη της ουβικουΐτινης, μιας συντηρημένης πρωτεΐνης με μοριακό βάρος 8.6 KD, σε μια άλλη πρωτεΐνη σηματοδοτεί συνήθως την αποικοδόμησή της. Αντίθετα, η παραπάνω τροποποίηση στην ιστόνη H2B στη *Tetrahymena* έχειδειχθεί ότι συσχετίζεται με μεταγραφική ενεργοποίηση, αφού η ub-H2A απαντάται σε μεταγραφικά ενεργές περιοχές.

Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών επιδρούν στη δομή και την οργάνωση των νουκλεοσωμάτων και της χρωματινής και προσφέρουν μια «πλατφόρμα» για να συνδεθούν στην χρωματινή πρωτεΐνες-τελεστές (effector molecules), όπως προβλέπεται από τον λεγόμενο 'ιστονικό κώδικα' (5, 81-83). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, καθεμία από τις παραπάνω τροποποιήσεις έχει συσχετισθεί με εκ διαμέτρου αντίθετες διαδικασίες όπως η μεταφραστική ενεργοποίηση και καταστολή, γεγονός που υποδηλώνει ότι σε αρκετές περιπτώσεις η χρωματινική κατάσταση δεν πρέπει να συσχετίζεται με μια τροποποίηση αλλά με συνδυασμό τροποποιήσεων.

Η προσθήκη αρκετών μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στο αμινοτελική περιοχή των ιστονών ρυθμίζεται από προϋπάρχουσες τροποποιήσεις (θετικά ή αρνητικά), φαινόμενο που χαρακτηρίζεται ως 'δια-ρύθμιση'. Η προσθήκη της τριμεθυλίωσης στη λυσίνη 4 της ιστόνης H3 (me₃K4H3) από το ένζυμο Set9 αναστέλλει τη μεθυλίωση στη λυσίνη 9, παρεμποδίζοντας τη δράση του ενζύμου Su(var)3-9, αλλά ευνοεί την ακετυλίωση στην H3, είτε άμεσα από το ένζυμο p300 (84), είτε έμμεσα παρεμποδίζοντας την δράση απο-ακετυλάσης του ενζύμου NuRD (85). Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι υπάρχει «διάλογος» μεταξύ τροποποιήσεων που βρίσκονται σε





Σχήμα 6: Δια-ρύθμιση στο επίπεδο της αμινοτελικής 'ουράς' των ιστονών. (a) Τροποποιήσεις που υφίσταται κάθε κατάλοιπο αμινοξέος. P, φωσφορυλίωση σε σερίνη ή θρεονίνη (S/T); Ac, ακετυλίωση σε λυσίνη (K), μονο/δι/τρι-μεθυλίωση σε λυσίνη ή μονο/δι-μεθυλίωση (ασύμμετρη ή συμμετρική) σε αργινίνη (R). (b) Δια-ρύθμιση στο αμινοτελικό άκρο της ιστόνης H3. Στο επάνω μέρος αναπαριστάται η αλληλουχία του αμινοτελικού άκρου (aa 1-40) και οι τέσσερις α-έλικες (με κουτιά) του κεντρικού τμήματος της H3. Στο κάτω μέρος αναπαριστάται καθεμία τροποποίηση που επηρεάζει θετικά (με πράσινο, go/ permissive) ή αρνητικά (με κόκκινο, stop/ repressive) μια άλλη τροποποίηση σε *in vitro* δοκιμές. (c) Δια-ρύθμιση στο αμινοτελικό άκρο της ιστόνης H4. Στο επάνω μέρος αναπαριστάται η αλληλουχία του αμινοτελικού άκρου (aa 1-26) και οι τρεις α-έλικες (με κουτιά) του κεντρικού τμήματος της H3. Στο κάτω μέρος η αναπαράσταση γίνεται όπως στο (b). (τροποποιημένο, από Fischle et al., 2003)

διαφορετικές ιστόνες. Η ρύθμιση αυτού του τύπου μπορεί να περιορίζεται σε ένα νουκλεόσωμα ή να επεκτείνεται σε αλληλουχίες νουκλεοσωμάτων. Η τρι-μεθυλίωση στη λυσίνη 20 της H4, η οποία διαμεσολαβείται από τη μεθυλοτρανσφεράση PR-Set7/Set8, είναι μια τροποποίηση που εντοπίζεται στην περικεντρομεριδιακή ετεροχρωματίνη και προϋποθέτει την παρουσία της me₃K9H3, ενώ παρεμποδίζει την ακετυλίωση αυτής της ιστόνης στη λυσίνη 16. Σε άλλη



περίπτωση, η $me3K4-H3$ ευνοεί την ακετυλίωση των ιστονών H3 και H4, ενώ για να μεθυλιωθούν οι K4 και K79 στην H3 πρέπει να έχει προηγηθεί η ουβικουΐτινίωση στη K123 της H2B στον *S. cerevisiae*.

B) Ισομορφές ιστονών

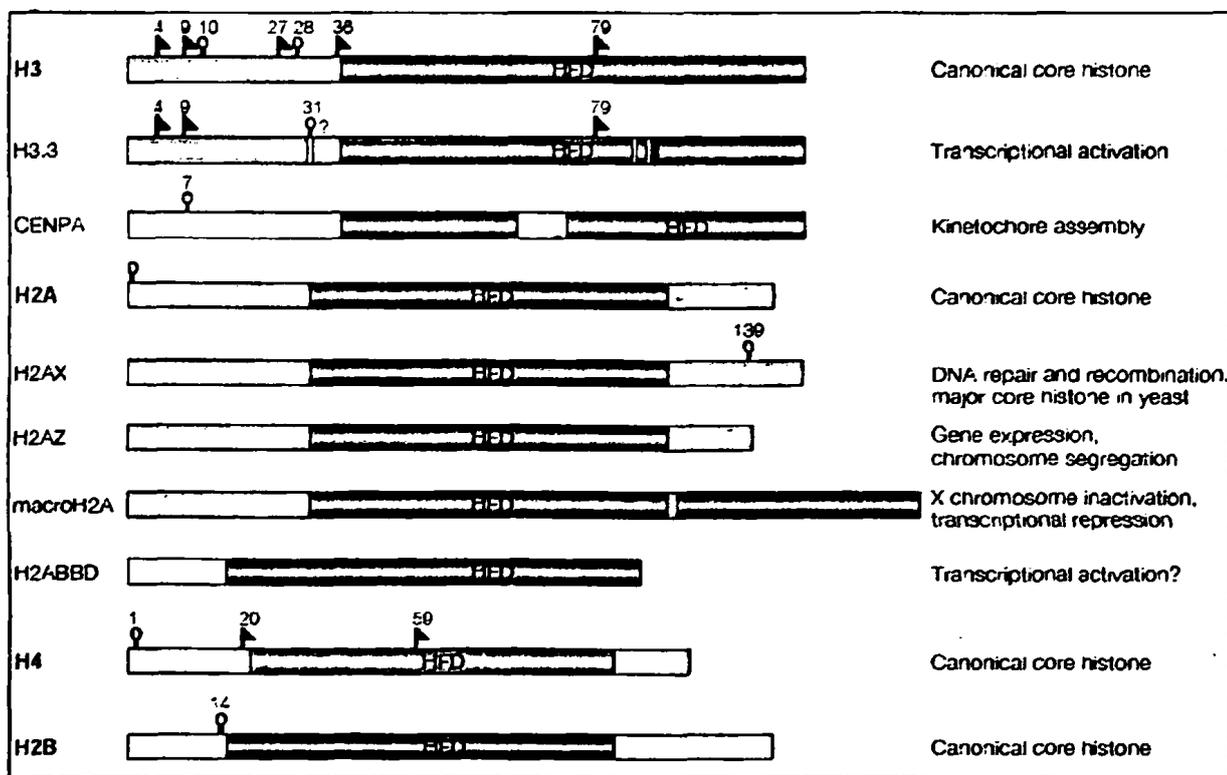
Με εξαίρεση την H4, όλες οι νουκλεοσωμικές ιστόνες διαθέτουν ισομορφές από τις οποίες συνήθως διαφέρουν πολύ λίγο. Η έκφραση των «κλασσικών» ιστονών ρυθμίζεται αυστηρά ώστε να είναι συγχρονισμένη με τον διπλασιασμό του DNA. Αντίθετα, οι ισομορφές τους εκφράζονται τόσο κατά την αντιγραφή (RD-replication dependent), όσο και σε άλλες φάσεις του κυτταρικού κύκλου (RI-replication independent). Για κάποιες ισομορφές υπάρχει επίσης ιστοειδική έκφραση. Οι ισομορφές των ιστονών έχουν διαφορετικά βιοχημικά χαρακτηριστικά και σε κάποιες περιπτώσεις η εντόπισή τους στις χρωματινικές περιοχές διαφέρει από αυτή των «κλασσικών» ιστονών (σχήμα 7). Τα γονίδια των ισομορφών των ιστονών περιέχουν ιντρόνια και τα μεταγραφήματα που κωδικοποιούν συχνά πολυαδενυλιώνονται (πράγμα που δεν συμβαίνει στις «κλασσικές» ιστόνες), γεγονός που είναι σημαντικό για τη ρύθμισή τους στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο (86).

Οι ισομορφές της ιστόνης H3 είναι οι H3.1, H3.2, H3.3, H3.4 (ιστοειδική ισομορφή των όρχεων) και CENP-A (εντοπίζεται στις κεντρομεριδιακές περιοχές). Οι H3.3 και H3.4 διαφέρουν ελάχιστα σε επίπεδο αλληλουχίας από την H3 (σε τέσσερα αμινοξέα), ενώ η CENP-A μεταξύ διαφορετικών οργανισμών εμφανίζει μεγάλη ποικιλομορφία στο μήκος της αμινοτελικής περιοχής. Η H3.3 εκφράζεται σε όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, εναποτίθεται στην χρωματίνη και εκτός της S-φάσης και εντοπίζεται σε περιοχές με υψηλή μεταγραφική ενεργότητα. Η αντικατάσταση της H3 από την H3.3 έχει ως αποτέλεσμα την «επισήμανση» της περιοχής αυτής ώστε να στρατολογηθούν μεταγραφικοί παράγοντες και να ενισχυθεί περαιτέρω η μεταγραφική δραστηριότητα. Η εναπόθεση της H3.3 στη χρωματίνη γίνεται μέσω των μοριακών συνοδών CAF-1 (Chromatin Assembly Factor-1) και HIRA (Histone Regulator A), στην S-φάση και μέσω του HIRA εκτός της S φάσης (87, 88). Η CENP-A αντικαθιστά την H3 στην περιοχή του κεντρομεριδίου και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο σωστό διαχωρισμό των



χρωμοσωμάτων (89, 90). Η CENP-A εκπληρώνει τον ρόλο της αφενός σημαίνοντας με την παρουσία της την περιοχή που θα σχηματιστεί το κεντρομερίδιο (91) και αφετέρου παρέχοντας μια πλατφόρμα στην οποία στρατολογούνται οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην δημιουργία του κινητοχώριου. Ενσωματώνεται στα νουκλεοσώματα κατά την S-φάση, χωρίς να είναι γνωστό αν αυτό γίνεται με τον ίδιο τρόπο που λαμβάνει χώρα η ενσωμάτωση της H3. Όταν η CENP-A εκφράζεται εκτός S-φάσης ενσωματώνεται κανονικά στις κεντρομεριδιακές θέσεις. Άρα, η ενσωμάτωσή της δεν πρέπει να εξαρτάται από την S-φάση (92). Μεχρι σήμερα δεν έχουν ταυτοποιηθεί πρωτεΐνες – μοριακοί συνοδοί της CENP-A που συμμετέχουν στην εναπόθεσή της στα νουκλεοσώματα.

Οι ισομορφές της H2A είναι οι H2A.Z, MacroH2A, H2A-Bbd, H2AvD (μόνο στη *Drosophila*), H2A.X. Η H2A διαφέρει από τις ισομορφές της στο μήκος και την αλληλουχία του καρβοξυτελικού άκρου, αλλά και στις χρωμοσωμικές περιοχές που εντοπίζεται. Η MacroH2A



Σχήμα 7. Οι νουκλεοσωματικές ιστόνες H3, H2A και οι ισομορφές τους. Με HFD υποδεικνύεται το κεντρικό τμήμα των ιστονών, ενώ από τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών υποδεικνύονται μόνο η μεθυλίωση (κόκκινο) και η φωσφορυλίωση (πράσινο). Στην ισορροπία H3.3 υποδεικνύονται με κίτρινο χρώμα τα αμινοξέα που διαφέρουν, ενώ η αμινοτελική περιοχή της CENPA διαφέρει από την αμινοτελική περιοχή της H3. Οι ισομορφές της H2A διαφέρουν σημαντικά από την H2A στο καρβοξυτελικό άκρο. Στο δεξιό άκρο υποδεικνύεται η πιθανή λειτουργία κάθε ισομορφής νουκλεοσωματικής ιστόνης.



εντοπίζεται στο ανενεργό X χρωμόσωμα (93) και παίζει ρόλο στη μεταγραφική καταστολή ενζυματικά (94) ή με στερική παρεμπόδιση (95). Η H2A-Bbd (Bar body deficient) εντοπίζεται στο ενεργό X χρωμόσωμα και στα αυτοσώματα (96). Στην απουσία μεγάλου τμήματος του καρβοξυτελικού της τμήματος οφείλεται η μειωμένη σταθερότητα των νουκλεοσωμάτων και η επακόλουθη «ολίσθησή» τους σε μεταγραφόμενες περιοχές (97). Οι H2A.X, H2A.Z και H2AvD εντοπίζονται σε όλο το γένωμα (98).

Η H2A.Z έχει δειχθεί ότι συσχετίζεται με πολλαπλές λειτουργίες που αφορούν τη γονιδιακή καταστολή και την ενεργοποίηση, την (απο)μόνωση-οριοθέτηση των ετεροχρωματικών περιοχών και την γενωμική σταθερότητα. Έχει δειχθεί ότι η H2A.Z εντοπίζεται σε ετεροχρωματικές περιοχές που περιέχουν την HP1α και μη ακετυλιωμένες ιστόνες H3 και H4 (99). Σε *in vitro* πειράματα η HP1α συνδέεται κατα προτίμηση με νουκλεοσώματα που περιέχουν την H2A.Z, ενώ μεταλλαγές στην H2A.Z επηρεάζουν την γονιδιακή καταστολή που διαμεσολαβείται από τις HP1 και Polycomb, αλλά και την υποκυτταρική τους εντόπιση (100). Τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν ότι η H2A.Z παίζει ρόλο στην γονιδιακή καταστολή. Δεδομένα που συσχετίζουν την H2A.Z με τη μεταγραφική ενεργοποίηση έχουν προκύψει από μελέτες στο ζυμομήκυτα, όπου έχει δειχθεί ότι η H2A.Z συνδέεται ταυτόχρονα με γονιδιακή καταστολή και ενεργοποίηση γονιδίων (101). Στο πρωτόζωο *Tetrahymena* η πρωτεΐνη αυτή εντοπίζεται στον μεταγραφικά ενεργό μακροπυρήνα (102), ενώ στον σακχαρομήκυτα και την *Drosophila* κατανέμεται κυρίως στις περιοχές υποκινητών επαγόμενων γονιδίων (103) συμβάλλοντας στην στρατολόγηση της μεταγραφικής μηχανής (104). Στους μύκητες μια χρωμοσωμική περιοχή ετεροχρωματινοποιείται μετά τη στρατολόγηση πρωτεϊνών με κατασταλτική δράση και επακόλουθη επέκτασή τους κατά μήκος του DNA, η οποία τερματίζεται με την παρουσία πρωτεϊνών που έχουν ρόλο «μονωτών» (βρίσκονται στο όριο ευ- και ετερο-χρωματινής). Στον σακχαρομήκυτα έχει προταθεί ότι σε χρωμοσωμικές περιοχές που απαντάται η H2A.Z δεν ευνοείται η στρατολόγηση των πρωτεϊνών που έχουν κατασταλτική δράση (105, 106), συμβάλλοντας στην μόνωση των χρωματινικών περιοχών. Ακόμη, η H2A.Z εντοπίζεται στην περικεντρομεριδιακή ετεροχρωματινή συμβάλλοντας έτσι στη διατήρηση της σταθερότητας του γενώματος. Κύτταρα που φέρουν μεταλλαγμένη H2A.Z αντιμετωπίζουν προβλήματα που αφορούν την επιδιόρθωση του DNA και τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων. Σε *in vitro* μελέτες έχει επίσης δειχθεί ότι η H2A.Z ευνοεί τη δημιουργία χρωματινικών ινών (Fan et al.,



2002), όχι όμως και τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις για τον σχηματισμό δομών υψηλότερης τάξης. Η ενσωμάτωση της H2A.Z στη χρωματίνη λαμβάνει χώρα εντός και εκτός S-φάσης, υποβοηθούμενη από δυο σύμπλοκα που περιέχουν διαφορετικούς μοριακούς συνοδούς: τον NAP-1 και τη Swi/Snf-like ATPase που καλείται Swr1 (56).

Η H2A.X εκφράζεται σε όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, κατανέμεται σε όλο το μήκος των χρωμοσωμάτων και παίζει ρόλο στη διατήρηση της γενωμικής σταθερότητας. Κατά την αντιγραφή ή τον ανασυνδυασμό μπορεί να συμβεί θραύση στους δυο κλώνους του DNA, η οποία θα προκαλέσει την φωσφορυλίωση της H2A.X στο σημείο θραύσης από τις κινάσες ATM και ATR και επακόλουθη στρατολόγηση των παραγόντων που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA (107), παίζοντας διπλό ρόλο στη επισήμανση του σημείου θραύσης και στην έναρξη της επιδιόρθωσης (108).

1.2 Ετεροχρωματινική Πρωτεΐνη 1 (HP1)

1.2.1 Δομή και λειτουργία της HP1

Η ετεροχρωματινική πρωτεΐνη 1 (HP1) ανακαλύφθηκε μελετώντας τη γονιδιακή αποσιώπηση μωσαϊκού τύπου (διαφορετική έκφραση ενός γονιδίου από κύτταρο σε κύτταρο). Αυτή η εκλεκτική απενεργοποίηση παρατηρείται όταν ένα γονίδιο που βρίσκεται φυσιολογικά εντός μιας ευχρωματινικής περιοχής μετατοπιστεί δίπλα ή εντός μιας ετεροχρωματινικής περιοχής. Η HP1 καταστέλλει το παραπάνω φαινόμενο, το οποίο καλείται PEV (Position Effect Variegation, φαινόμενο επίδρασης θέσης) και εμφανίζει κυρίως ετεροχρωματινική κατανομή (109, 110).

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας HP1 είναι μη ιστονικές χρωμοσωμικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη δημιουργία και τη διατήρηση της δομής της χρωματίνης. Μέλη της οικογένειας της HP1 έχουν ταυτοποιηθεί σχεδόν σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, από το σχιζομύκητα (*S. pombe*), ως τους φυτικούς και τους ζωικούς οργανισμούς (από μια ως πέντε ισομορφές), αλλά δεν υπάρχουν στον σακχαρομύκητα (*S. cerevisiae*) (όπου το PEV διαμεσολαβείται από τις κατάσταλτικές πρωτεΐνες SIR, silent information regulatory) (111). Στα θηλαστικά υπάρχουν τρεις διαφορετικές HP1 πρωτεΐνες, που κωδικοποιούνται από διαφορετικά

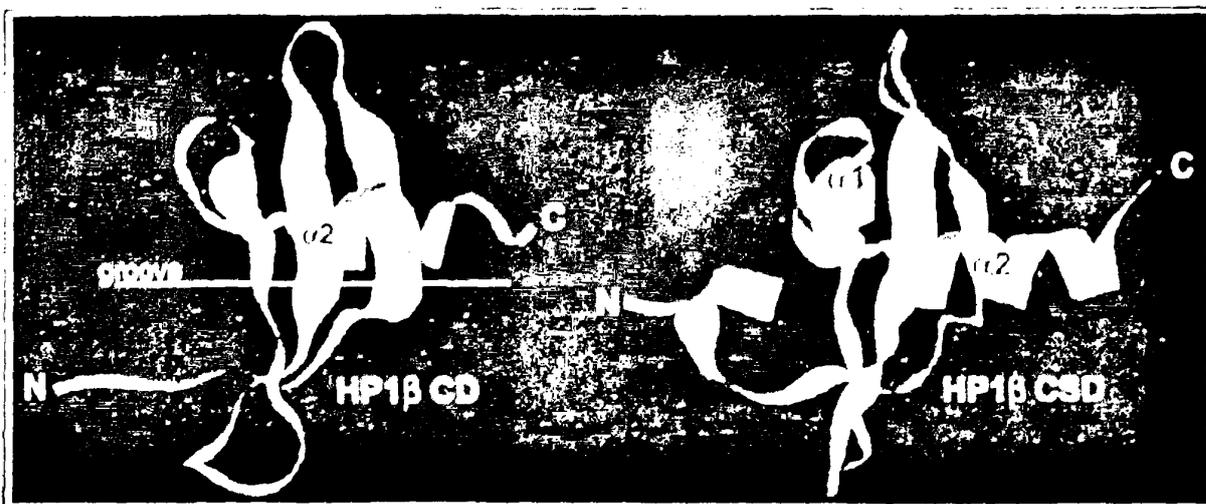


γονίδια (HP1α-CBX5, HP1β-CBX1, HP1γ-CBX3 στον άνθρωπο; (112) τα οποία βρίσκονται σε διαφορετικές χρωμοσωμικές θέσεις (12q13.13, 17q21.32, 7p15.2 στον άνθρωπο και 15qF3, 11qD, 6qB3 στο ποντίκι αντίστοιχα) (113) και εμφανίζουν 65% ομολογία μεταξύ τους (114). Η οικογένεια των HP1 πρωτεϊνών ανήκει σε μια μεγαλύτερη υπεροικογένεια πρωτεϊνών που περιέχουν τομείς (domains) που τροποποιούν την οργάνωση της χρωματίνης και καλούνται χρωμοτομείς (chromodomains). Η υπεροικογένεια των πρωτεϊνών που φέρουν χρωμοτομέα υποδιαιρείται σε τρεις οικογένειες. Η πρώτη χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενός χρωμοτομέα και μέλος της είναι η Polycomb. Στη δεύτερη απαντώνται δυο χρωμοτομείς και μέλη της είναι οι CHD1-4 (Chromo Helicase/ATPase Domain), ενώ στην τρίτη, στην οποία ανήκουν και οι HP1 πρωτεΐνες, απαντάται ένας χρωμοτομέας και ένας σκιάδης χρωμοτομέας (περιοχή στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης που εμφανίζει αρκετή ομοιότητα με τον χρωμοτομέα), ενώ μεταξύ τους παρεμβάλλεται μια ενδιάμεση, ποικίλου μήκους συνδετική περιοχή (hinge region).

Ο χρωμοτομέας (CD) βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο της HP1 και η αρκετά συντηρημένη δομή του έχει αναλυθεί με πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό (NMR, nuclear magnetic resonance) (115). Πρόκειται για μόρφωμα με σφαιροειδές σχήμα διαμέτρου 30Å που αποτελείται από τρεις αντιπαράλληλες β-αλυσίδες οι οποίες σχηματίζουν μια β-πτυχωτή επιφάνεια που τοποθετείται έναντι μιας α-έλικας (α2) (115, 116) σχήμα 7). Η πλευρά της β-πτυχωτής επιφάνειας που βρίσκεται έναντι της α-έλικας (η εσωτερική πλευρά της β-πτυχής) αποτελείται από συντηρημένα μη πολικά αμινοξέα, έχει σχήμα αύλακας (υποδεικνύεται στο σχήμα 7 με μια λευκή οριζόντια γραμμή). Ο χρωμοτομέας της HP1 έχει παρόμοια δομή με τις πρωτεΐνες των αρχαιοβακτηρίων Sac7d, Sso7d (οι οποίες, με τη σειρά τους, εμφανίζουν ομοιότητα με τις ιστόνες). Το εξωτερικό επιφανειακό φορτίο της β-πτυχής του χρωμοτομέα της HP1 είναι αρνητικό, γεγονός που υποδηλώνει ότι μέσω του χρωμοτομέα διαμεσολαβούνται πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Ο σκιάδης χρωμοτομέας (CSD) βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο. Είναι μια αρκετά συντηρημένη δομή που, όπως ο χρωμοτομέας, αποτελείται από τρεις αντιπαράλληλες β-αλυσίδες τοποθετημένες έναντι δύο α-ελίκων (α1 και α2) (117); σχήμα 7). Η περιοχή της υδρόφοβης αύλακας στην περίπτωση του σκιάδη χρωμοτομέα δεν είναι προσβάσιμη λόγω της παρεμπόδισης από την παρουσία γειτονικών αμινοξέων (116). Ο χρωμοτομέας δεν ολιγομερίζεται, ενώ ο σκιάδης χρωμοτομέας διμερίζεται κάτω από in vivo και in vitro συνθήκες



αποτέλεσμα να μην έχει ταυτοποιηθεί η τρισδιάστατη δομή της. Η συνδετική περιοχή βρίσκεται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (ιδιαίτερα σε φωσφορυλίωση; (120-122), οι οποίες επηρεάζουν την υποκυτταρική εντόπιση, τις αλληλεπιδράσεις και τη λειτουργία του ορίου.



Σχήμα 9 Συγκριση της δομής του χρομοτομίου της HP1β με τη δομή του σκισσώδη χρομοτομίου. Ο χρομοτομίου (CD), αμινοξέα 10-78) αποτελείται από τρεις β-αλυσίδες που σχηματίζουν μια β-πτυχστή δομή η οποία τοποθετείται έναντι σε μια α-έλικα ($\alpha 2$) που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό ακρο της δομής. Υδροφίλοι κατάλοιποι σχηματίζουν τη βάση της αλυσίδας (χρυσό, υποδεικνύεται με τη λεπκή οριζόντια γραμμή), διαμέσω της οποίας πραγματοποιούνται πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Η δομή του σκισσώδη χρομοτομίου της HP1β (αμινοξέα 104-171) είναι αρκετά παρόμοια με τη δομή του χρομοτομίου, με τη διαφορά ότι έναντι της β-πτυχτής τοποθετούνται δύο α-έλικες ($\alpha 1$, $\alpha 2$) (από Singh & Georgatos, 2002).

1.2.2 Μοριακές αλληλεπιδράσεις της HP1

Η κατανομή και ο ρόλος των HP1 πρωτεϊνών στη χρωματίνη έχουν μελετηθεί αναλυτικά. Οι HP1 πρωτεΐνες κατανομούνται όχι μόνο στην ετεροχρωματίνη αλλά και στην ευχρωματίνη (121, 123-125), αναλόγα με την ισομορφή. Σε κύτταρα θηλαστικών οι HP1α και HP1β έχουν ετεροχρωματινική εντόπιση, ενώ η HP1γ εντοπίζεται σε ετεροχρωματινικές και ευχρωματινικές περιοχές. Οι HP1 πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με αρκετές πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε διαφορετικές διαδικασίες (Πίνακας 1).

Έχει δειχθεί με πειράματα συγκατακρήμνισης (pull-down) ότι στον *S. pombe* η Swi6 (ομόλογη της HP1) αλληλεπιδρά μέσω του χρωμοτομέα με πρωτεΐνες του κεντρομεριδίου, όπως είναι η Psc3, η οποία παίζει ρόλο στη διατήρηση της επαφής των κεντρομεριδίων των αδελφών χρωματίδων κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (126, 127). Σε στελέχη *S. pombe* που είναι μεταλλαγμένα για την Swi6, παρατηρείται μειωμένη σύνδεση της Psc3 στα κεντρομερίδια (128), ενώ κατά τη μίτωση δεν γίνεται σωστά ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων (129). Το ίδιο επαληθεύεται και στη *Drosophila* (130). Η HP1 εκτός από την περιοχή των κεντρομεριδίων απαντάται και στα τελομερίδια, όπου φαίνεται ότι εμποδίζει τη παρά φύση σύνδεσή τους. Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στη *Drosophila* έχει δειχθεί ότι η HP1 συνδέεται στα τελομερίδια με δυο τρόπους: Μέσω των ιστονών (κατά τη γονιδιακή αποσιώπηση) και ανεξαρτητα από τις ιστόνες (πιθανόν μέσω του DNA, κατά την διατήρηση της ακεραιότητας των τελομερών; (131). Δεν έχει αποδειχθεί όμως ότι αυτός ο διπλός ρόλος της HP1 ισχύει και σε άλλους οργανισμούς.

Σε αρκετούς κυτταρικούς τύπους η HP1 εντοπίζεται στην περιφέρεια του πυρήνα, όπου απαντάται μεγάλο μέρος της ετεροχρωματινής, πιθανά αλληλεπιδρώντας με πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου. Έχει δειχθεί ότι η HP1 αλληλεπιδρά με τον LBR (Lamin B Receptor; (132) (μέσω της τεχνικής των δυο υβριδίων). Στην περίπτωση της αλληλεπίδρασης HP1-LBR η σύνδεση δεν φαίνεται όμως να είναι άμεση, αλλά πιθανώς διαμεσολαβείται από τις νουκλεοσωματικές ιστόνες H3 και H4 (133).

Οι HP1α και HP1β (σε ποντίκι και άνθρωπο) αλληλεπιδρούν μέσω CSD με τον παράγοντα p150 (που διαθέτει το πεπτίδιο PxVxL) (118, 134, 135) και είναι μέρος του συμπλόκου CAF (εναποθέτει τα σύμπλοκα των H3-H4 στη χρωματίνη). Μεταλλάξεις στην HP1 που εμποδίζουν την σύνδεσή της με τον CAF p150 δεν επηρεάζουν την αντιγραφή κατά την S-φάση, ενώ σε μια πρόσφατη μελέτη έχει δειχθεί η HP1α αλληλεπιδρά με τον CAF και συνδέεται στις εστίες περικεντρομεριδιακής χρωματινής κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA, ανεξάρτητα από τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών.

Οι πρωτεΐνες HP1, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, εντοπίζονται κυρίως σε ετεροχρωματινικές εστίες, όπου καταστέλλουν την γονιδιακή έκφραση. Είναι όμως, πιθανό να δρουν σε κάποιες περιπτώσεις ενεργοποιητικά. Η HP1 συνδέεται μέσω του χρωμοτομέα με την τριμεθυλιωμένη λυσίνη 9 της ιστόνης H3 (μια αλληλεπίδραση που θα συζητηθεί αναλυτικά παρακάτω) και



στρατολογείται στην ετεροχρωματίνη. Σύμφωνα με προκαταρκτικές παρατηρήσεις η HP1 μπορεί να αποτελεί φυσικό εμπόδιο για την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων, ενώ εναλλακτικά μόρια HP1 που βρίσκονται σε γειτονικά νουκλεοσώματα μπορεί να διμερίζονται, αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο τον βαθμό συμπύκνωσης της χρωματίνης και ελλατώνοντας παράλληλα την προσβασιμότητα μεταγραφικών παραγόντων.

Σε κάποιες περιπτώσεις γονίδια που βρίσκονται σε ετεροχρωματινικές περιοχές δεν είναι κατεσταλμένα αλλά εκφράζονται κανονικά. Για παράδειγμα, τα γονίδια *light* και *rolled* στη *Drosophila* εκφράζονται κανονικά στις περικεντρομεριδιακές περιοχές παρουσία της HP1, ενώ όταν μεταφερθούν σε ευχρωματινικό περιβάλλον εμφανίζουν μωσαϊκό πρότυπο έκφρασης. Επιπρόσθετα, όταν τα δυο γονίδια βρίσκονται σε ετεροχρωματινική περιοχή αλλά η HP1 απουσιάζει αναστέλλεται η έκφρασή τους (136-138). Δεν έχει διευκρινιστεί αν η ενεργοποιητική δράση της HP1 είναι άμεση ή αν απαιτείται συγκεκριμένη χρωματινική οργάνωση η οποία επιτυγχάνεται μέσω της παρουσίας της.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η HP1 συμμετέχει στη γονιδιακή αποσιώπηση, κυρίως σε ετεροχρωματινικές περιοχές, αλλά έχει παρόμοια δράση και στις ευχρωματινικές περιοχές. Έχειδειχθεί ότι η HP1 στρατολογείται στον υποκινητή του γονιδίου της κυκλίνης E (και καταστέλλει την έκφρασή του) αλληλεπιδρώντας με την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (Rb) και τη μεθυλοτρανσφεράση *Suv39H1* (μεθυλιώνει ειδικά την me_3K9H3). Επιπλέον, σε κύτταρα που βρίσκονται στη G_0 έχειδειχθεί ότι η HP1γ συνδέεται με το σύμπλοκο E2F-6, αλλά και με μεθυλοτρανσφεράσες που μεθυλιώνουν ειδικά τη λυσίνη 9 της H3, με αποτέλεσμα την μεταγραφική απενεργοποίηση.

Η παρουσία της HP1 σε ευχρωματινικές περιοχές σε κάποιες περιπτώσεις φαίνεται να έχει καθαρά ενεργοποιητικό ρόλο. Αναλυτική χαρτογράφηση της κατανομής της HP1 στα πολυταινικά χρωμοσώματα στη *Drosophila* έδειξε ότι μετά από θερμικό-σοκ και την επαγωγή των αντίστοιχων γονιδίων η HP1 εντοπίζεται στα σημεία που γίνεται μεταγραφή (139). Σε μια άλλη μελέτη με χρήση μικροσυστοιχιών σε γενωμική περιοχή 500Kb στη *Drosophila*, έχειδειχθεί ότι επηρεάζεται η έκφραση δέκα γονιδίων όταν η HP1 μεταλλαχθεί.

Η έκφραση των τριών από τα δέκα γονίδια ελλατώνεται, γεγονός που υποδηλώνει ότι η HP1 εμπλέκεται στην μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων που βρίσκονται σε ευχρωματινικές περιοχές (140). Έχειδειχθεί ακόμη ότι η δράση καθώς και η κατανομή των HP1 πρωτεϊνών



Examples of HP-1 interacting partners		
Protein	Hp-1 variant	Domain
Transcriptional regulators or chromatin-modifying proteins		
Histone H1	HPI	ND
Histone H3	HPI, HPI ^{Mmα} , HPI ^{Mmβ} , HPI ^{Mmγ}	CD
Methyl K9 Histone H3	Swi6, HPI, HPI ^α , HPI ^β , HPI ^γ	CD
Histone H4	HPI, HPI ^{Mmα}	CSD
SUV39H1	HPI, HPI ^α , HPI ^β , HPI ^γ	CSD
Polycomb	HPI ^{Hsα} , HPI ^{Hsγ}	CSD
Dnmt3a	HPI ^{Mmα}	ND
Dnmt3b	HPI ^α , HPI ^β	ND
Kap-1/Tif1β	HPI ^α , HPI ^β , HPI ^γ	CSD
Rb	HPI ^{Hsγ}	ND
MITR	HPI ^{Mmα}	Linker
BRG1	HPI ^{Mmα}	CSD
ATRx	HPI ^{Mmα} , HPI ^{Mmβ}	CSD
TAF _{II} 130	HPI ^{Hsα} , HPI ^{Hsγ}	CSD
PIM1	HPI ^{Hsγ}	CSD
RNA	HPI ^{Mmα} , HPI ^{Mmγ}	Linker
DNA replication and repair proteins		
CAF-1p150	HPI ^α , HPI ^β	CSD
Ku70	HPI ^{Hsα} , phosphoS83- HPI ^{Hsγ}	CSD, Linker
ORC1-6	HPI	CD, CSD
Other chromosome-associated proteins		
Psc3	Swi6	CD
INCENP	HPI ^{Hsα} , HPI ^{Hsγ}	Linker
Hsk1/CDC7	Swi6	ND
KI-67	HPI ^{Mmα} , HPI ^{Mmβ} , HPI ^{Mmγ}	CSD
SPI00	HPI ^{Hsα} , HPI ^{Hsβ} , HPI ^{Hsγ}	CSD
Nuclear structure proteins		
Nuclear envelope	HPI ^{Mmα} , HPI ^{Mmβ} , HPI ^{Mmγ}	CD
Lamin B receptor	HPI ^{Hsα} , HPI ^{Hsβ} , HPI ^{Hsγ}	CSD
Lamin B	HPI ^{Mmβ}	CD
LAP2β	HPI ^{Mmβ}	CD

Πίνακας 1. Παραδείγματα πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την HP1 (για λεπτομέρειες βλέπε κείμενο).



ρυθμίζεται από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιδίων (121).

Συμπερασματικά, όπως προκύπτει από πρόσφατες μελέτες, οι πρωτεΐνες HP1 δε μπορούν να οριστούν πλέον ως αποκλειστικά συστατικά της ετεροχρωματίνης, όπως υποδηλώνει η ονομασία τους.

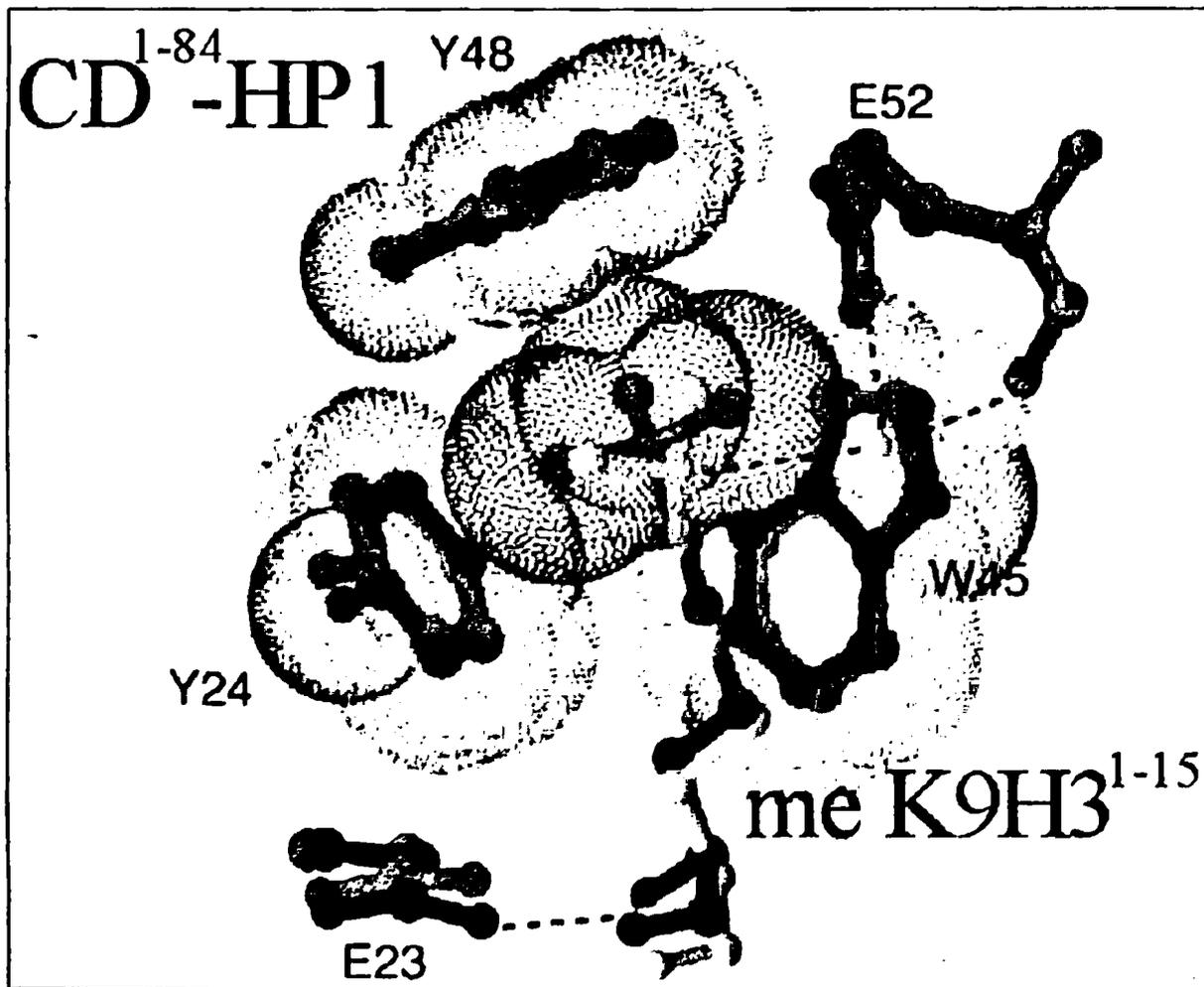
1.3 Οι αλληλεπιδράσεις HP1 – χρωματίνης

1.3.1 Ο ρόλος της τριμεθυλίωσης της λυσίνης 9 στην ιστόνη 3 (me₃K9H3)

Η μεθυλίωση στη λυσίνη 9 της ιστόνης H3 (meK9H3) καταλύεται από διαφορετικά ένζυμα μεταξύ των οποίων οι Suv39h, G9a, ESET, GLP/EuHMTase1 που απαντώνται στον άνθρωπο (141). Τα παραπάνω ένζυμα ανήκουν στην κατηγορία των μεθυλοτρανσφερασών λυσινών που περιέχουν την περιοχή SET (όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο). Η μεθυλίωση στη λυσίνη 9 της H3 αναστέλλει την τροποποίηση γειτονικών καταλοίπων, όπως την φωσφορυλίωση της σερίνης 10 και τη μεθυλίωση της λυσίνης 4, όπως επίσης και την ακετυλίωση στις ιστόνη H3 και H4 *in vitro*. Αυτό δείχνει ότι η meK9H3 προσιδιάζει στην ετεροχρωματινική, μεταγραφικά ανενεργή κατάσταση της χρωματίνης. Επίσης, οι πρωτεΐνες Suv39h καθώς και τα κατάλοιπα λυσινών που είναι δι-/τρι-μεθυλιωμένα εντοπίζονται κυρίως σε ετεροχρωματινικές εστίες, παρόλο που άλλες μεθυλοτρανσφεράσες βρίσκονται στην ευχρωματίνη για να διατηρούν (όπου απαιτείται) τα βασικά επίπεδα μεθυλίωσης των ιστονών (141). Έχει δειχθεί ότι η μεθυλίωση της K9H3 στη χρωμοσωμική περιοχή ενός ενεργού γονιδίου καταστέλλει την έκφρασή του (142), ενώ από άλλες μελέτες προκύπτει ότι η meK9H3 είναι συνδεδεμένη με την απο-ακετυλίωση σε γειτονικά κατάλοιπα (όπως στη λυσίνη 14 της H3, (143). Έχει δειχθεί ότι η HP1, μέσω του χρωμοτομέα που διαθέτει, αναγνωρίζει ειδικά την τριμεθυλιωμένη λυσίνη 9 της ιστόνης H3, ενώ η υποκυτταρική κατανομή της HP1 εξαρτάται από την ενζυμική δράση της Suv39h (144, 145). Επιπλέον, οι HP1 και Su(Var)3-9 (ομόλογη της Suv39h στη *Drosophila*) εξαρτώνται η μια από την άλλη για την ετεροχρωματινική τους εντόπιση (146). Το σύμπλοκο HP1-meK9H3 έχει μελετηθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων X και φασματοσκοπία NMR (147, 148). Η παραπάνω αλληλεπίδραση δεν είναι ισχυρή, όπως προκύπτει από την K_D της (έχει τιμή της τάξης των μM).



Η κρυσταλλογραφική ανάλυση δείχνει ότι το αμινοτελικό άκρο της H3 εισέρχεται στην β-πτυχή του χρωμοτομέα, συμπληρώνοντας έτσι τη δομή η οποία παρουσιάζει αρχιτεκτονική 'β-σάντουιτς'. Η χημική ομάδα του μεθυλαμμωνίου στη λυσίνη 9 εισχωρεί μεταξύ τριών αρωματικών δακτυλίων που εντοπίζονται στα αμινοξέα Y24, Y48, W45, που σχηματίζουν ένα υδρόφοβο κλωβό, ενώ γειτονικά αμινοξικά κατάλοιπα του χρωμοτομέα αλληλεπιδρούν με την εύκαμπτη δομή του αμινοτελικού άκρου



Σχήμα 10. Αλληλεπίδραση μεταξύ του χρωμοτομέα της HP1 και της λυσίνης 9 στο αμινοτελικό άκρο της H3. Στερεοδιάγραμμα που αναπαριστά την διμεθυλωμένη (me₂K9, με κίτρινο) και την τριμεθυλωμένη (me₃K9, με πορτοκαλί) λυσίνη 9 στο αμινοτελικό άκρο της H3 (meK9H3¹⁻¹⁵) σε σύμπλοκο με την περιοχή του χρωμοτομέα της HP1 (CD¹⁻⁸⁴-HP1, με μπλε και πράσινο, αντίστοιχα). Η αναπαράσταση των δεσμών van der Waals ανταποκρίνεται στο σύμπλοκο CD-me₃K9H3 (Jacobs & Khorasanizadeh, 2002).

της ιστόνης H3. Η γεωμετρία και αρχιτεκτονική της παραπάνω αλληλεπίδρασης εξηγεί γιατί οι μεταλλάξεις σε υδρόφοβα αμινοξέα του χρωμοτομέα της HP1 (όπως στα Y24, V26, W45, Y48) δρουν ανασταλτικά. Η συγγένεια της HP1 για την μεθυλιωμένη λυσίνη 9 της H3 αυξάνεται όσο αυξάνει ο βαθμός μεθυλίωσης της ιστόνης (149).

Έχει δειχθεί επίσης, ότι η HP1, συνδέεται μέσω του χρωμοτομέα της με το κεντρικό τμήμα της ιστόνης H3 (150). Σε *in vivo* συνθήκες η σταθερή ενσωμάτωση της HP1 στη χρωματίνη μπορεί να γίνεται σταδιακά: Αρχικά, μπορεί να συνδέεται στην meK9H3 και στη συνέχεια στο κεντρικό τμήμα της H3, σταθεροποιούμενη *in situ* διαμέσου αλληλεπιδράσεων με άλλους παράγοντες ή μόρια RNA.

Παρά την απλότητα που έχει ο «ένας-προς-ένα» μηχανισμός σύνδεσης της HP1 στην ετεροχρωματίνη μέσω της me₃K9H3, έχουν προκύψει αρκετά δεδομένα που δείχνουν ότι η κατάσταση των πραγμάτων είναι πιο σύνθετη. Για παράδειγμα, η σύνδεση της HP1 στη me₃K9-H3 επηρεάζεται από την παρουσία άλλων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και ιδιαίτερα από τη φωσφορυλίωση στη σερίνη 10, η οποία έχει ανασταλτικό χαρακτήρα. Σε πρόσφατες μελέτες έχει δειχθεί ότι κατά τη μίτωση η κινάση Aurora B φωσφορυλιώνει την σερίνη 10 στην H3 με αποτέλεσμα η HP1 να αποσυνδέεται από τα μιτωτικά χρωμοσώματα, ενώ με την ολοκλήρωση της μίτωσης η φωσφορυλίωση στην σερίνη 10 απαλείφεται και η HP1 επανασυνδέεται στην αποσυμπυκνωμένη χρωματίνη. Η αντιστρεπτή αποσύνδεση της HP1 στα μιτωτικά χρωμοσώματα μέσω της διπλής συνδυαστικής τροποποίησης methyl-K9/phospho-S10 στην ιστόνη H3 αποτελεί παράδειγμα ρυθμιστικού μηχανισμού για τη γρήγορη σύνδεση και αποσύνδεση της HP1 στην χρωματίνη. Ο τριπλός συνδυασμός τροποποιήσεων methyl-K9/phospho-S10/acetyl-K14 στην ιστόνη H3 αποτελεί μια ακόμη περίπτωση, όπου η HP1 αποσυνδέεται κατά τη μίτωση από τα χρωμοσώματα (151).

1.3.2 Ο ρόλος του RNA και της μεθυλίωσης του DNA

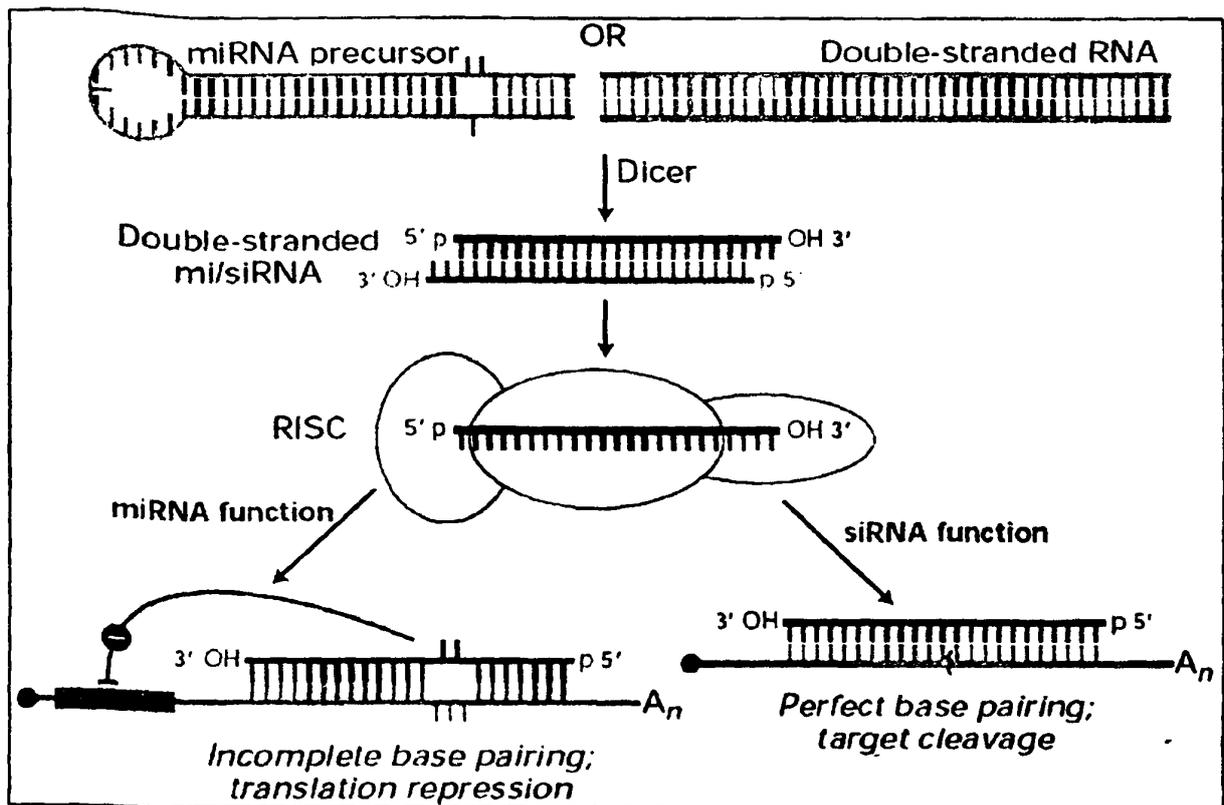
Η γονιδιακή καταστολή μέσω παρεμβολής με RNA (RNA interference, (152) είναι γνωστή εδώ και αρκετά χρόνια από μελέτες που έχουν γίνει στον οργανισμό *C. Elegans*. Ωστόσο, τελευταίες μελέτες έχουν δείξει πιο συγκεκριμένα ότι τα μικρά παρεμβαλόμενα RNA (siRNA) συμμετέχουν



στον σχηματισμό ετεροχρωματικών περιοχών. Η δράση του RNAi επιτυγχάνεται με δυο διαφορετικούς τρόπους (όπως αναπαρίσταται στο σχήμα 11), που αφορούν τον κατακερματισμό του mRNA (μέσω siRNA) και την αναστολή της μεταγραφής (μέσω microRNA), ενώ τελευταία προκύπτει και ένας τρίτος που αφορά την μεταβολή της διαμόρφωσης της χρωματίνης (μέσω siRNA).

Μελέτες στο σχιζοσاکχαρομύκητα *S. pombe* έχουν δείξει ότι ο σχηματισμός ετεροχρωματίνης στις κεντρομεριδιακές περιοχές ρυθμίζεται από την παρουσία των siRNAs. Η απαλοιφή γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μηχανισμό του RNAi, όπως οι *dicer* (*dcr1*), *Argonaute 1* (*ago1*), καθώς και η RNA πολυμεράση που εξαρτάται από RNA (*rpd1*), οδηγεί στην ενεργοποίηση γονιδίων που βρίσκονται σε κεντρομεριδιακές περιοχές και υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι κατεσταλμένα (153, 154). Παρόμοιο αποτέλεσμα προκύπτει από την απαλοιφή των γονιδίων *Dwi6* (ομόλογο της HP1) και *clr4* (H3K9 HMT) (128, 154), ενώ και στις δυο περιπτώσεις παρατηρείται απώλεια της μεθυλίωσης στη λυσίνη 9 της ιστόνης H3. Η απώλεια της γονιδιακής αποσιώπησης στις κεντρομεριδιακές περιοχές οδηγεί σε λάθος διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων και κυτταρικό θάνατο (129, 155, 156). Παρόμοιες μελέτες στη *Drosophila* έχουν δείξει ότι μετά από την απαλοιφή των γονιδίων *aubergine*, *piwi*, *spindle-E/homeless* (κωδικοποιούν πρωτεΐνες του μηχανισμού RNAi), οδηγεί επίσης σε ενεργοποίηση γονιδίων που βρίσκονται σε ετεροχρωματινικές περιοχές, ενώ παράλληλα το πρότυπο εντόπισης της HP1 μεταβάλλεται και ελλατώνονται τα επίπεδα της μεθυλίωσης στην K9-H3 (157). Σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού που είναι διπλά μεταλλαγμένα για την *Dicer*, παρατηρείται επίσης ενεργοποίηση κεντρομεριδιακών γονιδίων, ελλατωμένα επίπεδα μεθυλίωσης στην K9H3 και αλλαγή του προτύπου κατανομής των HP1β και HP1γ (158). Πέψη με ριβονουκλεάση έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή του προτύπου κατανομής της HP1α καθώς και του προτύπου meK9H3 (159). Εάν, αφού επιδράσει η νουκλεάση, προστεθεί στη συνέχεια ολικό RNA από κύτταρα θηλαστικών η HP1α επανεντοπίζεται στις ετεροχρωματινικές εστίες, αποτέλεσμα που δεν επαναλαμβάνεται όταν χρησιμοποιηθεί βακτηριακό RNA. Η σχέση που έχει ο μηχανισμός RNAi με την meK9H3 διευκρινίστηκε όταν απομονώθηκαν ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα που εμπλέκονται στο μηχανισμό RNAi, όπως το RITS (RNA-induced transcriptional silencing) που περιέχει τις Ago και Chp1. Το σύμπλοκο RITS απαντάται σε ετεροχρωματινικές θέσεις στα κεντρομερίδια και τα τελομερίδια και αλληλεπιδρά





Σχήμα 11. Μηχανισμός δράσης του RNAi. Η ριζογονκλεάση Dicer αποκόπτει τα πρόδρομα δίκλινα RNA και miRNA, ώστε να παραχθούν τα δίκλινα siRNA και miRNA μόρια. Ο ένας εκ των δυο κλώνων των siRNA και miRNA συνδέεται με το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο RISC (RNA-induced silencing complex), ώστε να υβριδοποιηθεί απόλυτα στο μόριο-στόχος RNA και κατακερματισμό του RNA στόχου ή να υβριδοποιηθεί μερικώς και να ανασταλλεί η μεταγραφή, αντιστοίχα (Lodish et al., Molecular Cell Biology).

με την meK9H3. Η παραπάνω σύνδεση φαίνεται να διαμεσολαβείται από το χρωμοτομέα της Chr1 (160). Η μεθυλίωση των βάσεων κυτοσίνης στο μόριο του DNA είναι μια επιγενετική τροποποίηση, η οποία απαντάται στις ετεροχρωματινικές εστίες. Η διατήρηση της μεθυλίωσης του DNA επιτυγχάνεται μέσω της DNMT1, η οποία αλληλεπιδρά με 'ημι-μεθυλωμένο' DNA (161), καθώς και με τη μηχανή της αντιγραφής. Στις παραπάνω ετεροχρωματινικές περιοχές, εκτός από τη μεθυλίωση διατηρείται και η κατάσταση γονιδιακής αποσιώπησης. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω παραγόντων, όπως οι MeCP2, MBD1, -2, -3, -4 που αναγνωρίζουν αλληλουχίες CpG (δινουκλεοτίδια γουανίνης και μεθυλιωμένης κυτοσίνης) και στρατολογούν πρωτεΐνες όπως η HP1 και ειδικές HMTs (162). Τα παραπάνω ένζυμα αλληλεπιδρούν επίσης με παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης και απο-ακετυλάσες των ιστονών, ώστε να

«αναγεννηθεί» μετά την αντιγραφή η ετεροχρωματίνη (163). Επιπλέον δεδομένα που δείχνουν ότι η γονιδιακή αποσιώπηση συνδέεται με την αντιγραφή του DNA προκύπτουν από την αλληλεπίδραση και τη συνεντόπιση της MBD1 και του CAF1 (164). Όταν υπερακφραστεί η καρβοξυτελική περιοχή της υπομονάδας p150, παρατηρείται αλλαγή του προτύπου εντόπισης για τις MBD1 και του ολο-συμπλόκου CAF, ενώ η εντόπιση των MeCP2 και HP1α δεν αλλάζει. Ακόμη, έχει δεχθεί ότι οι DNMT1 και DNMT3α αλληλεπιδρούν με τις SUV39H1 και HP1β (165), ενώ κύτταρα όπου απαλείφεται το γονίδιο *Suv39h*, εμφανίζουν διαφορετικό πρότυπο κατανομής για την DNMT3b και τη μεθυλίωση του DNA (166). Αυτό υποδηλώνει ότι η μεθυλίωση του DNA συνδέεται άμεσα με την meK9H3 και τον σχηματισμό ετεροχρωματινικών περιοχών μέσω των πρωτεϊνών HP1. Αυτό μπορεί να εξυπηρετεί την ταχεία μετάβαση στην ετεροχρωματινική κατάσταση, αμέσως μετά την αντιγραφή.



1.4 Σκοπός της παρούσας μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διερευνηθούν οι αλληλεπιδράσεις της ΗΡ1 με τη χρωματίνη σε διαφορετικά επίπεδα πολυπλοκότητας. Σε *in vitro* δοκιμές χρησιμοποιήσαμε ανασυνδυασμένες ιστόνες, ώστε να διερευνήσουμε τις αλληλεπιδράσεις ΗΡ1-χρωματίνης ανεξάρτητα από την παρουσία άλλων παραγόντων και από τη φυσική κατάσταση της χρωματίνης, ενώ εναλλακτικά χρησιμοποιήσαμε χρωματινικά παρασκευάσματα προερχόμενα από διαφορετικές πηγές και στάδια του κυτταρικού κύκλου για να διερευνήσουμε αν οι παραπάνω αλληλεπιδράσεις επηρεάζονται από τη φυσική κατάσταση της χρωματίνης και τις επιγενετικές τροποποιήσεις των ιστονών. Παράλληλα με την *in vitro* προσέγγιση πραγματοποιήσαμε *in vivo* δοκιμές σε κύτταρα σταθερών κυτταρικών σειρών που προέρχονται από διαφορετικά είδη (κανονικές και γενετικά τροποποιημένες) και σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (αδιαφοροποίητα και διαφοροποιημένα) που αναπτύσσονται σε κανονικές συνθήκες ή παρουσία φαρμακολογικών παραγόντων, ώστε να διερευνήσουμε το πρότυπο της υποκυτταρικής κατανομής και τον μηχανισμό ενσωμάτωσης των ΗΡ1 πρωτεϊνών στην χρωματίνη και την μεταβολή τους ανάλογα με το κυτταρικό περιβάλλον, τον κυτταρικό κύκλο, τη μεταβολική κατάσταση και το αναπτυξιακό δυναμικό.



2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

Τα αντισώματα έναντι της διμεθυλιωμένης λυσίνης 4 της ιστόνης 3, της ακετυλιωμένης λυσίνης 14 της ιστόνης 3, της τριμεθυλιωμένης λυσίνης 27 της ιστόνης 3, του SNF2 (μέρος του συμπλόκου αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης) αγοράστηκαν από την *Upstate Biotechnology, Inc. (Lake Placid, NY)*. Αντίσωμα που αναγωνρίζει τη BrdU αγοράστηκε από την *Roche*. Τα αντισώματα έναντι της τρι-μεθυλιωμένης λυσίνης 9 της ιστόνης H3 (Cowell et al., 2002), της HP1β (Wreggett et al., 1994) και της HP1γ (Horsley et al., 1996) έχουν περιγραφεί. Το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της HP1α προέρχεται από τον M235 αντι-ορρό κουνελιού και καθарίστηκε με χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη Affigel 10/15.

<u>Πρωτογενή Αντισώματα</u>	<u>Ξενιστής</u>	<u>Πολυκλωνικό/ Μονοκλωνικό</u>
SNF2	Ποντίκι	Μ
Nucleoplasmin (B23)	Κουνέλι	Π
HP1α	Κουνέλι	Π
M31 (HP1β)	Αρουραίος	Μ
M32 (HP1γ)	Αρουραίος	Μ
3meK27-H3	Κουνέλι	Π
2meK4-H3	Κουνέλι	Π
3meK9-H3	Κουνέλι	Π
acK14-H3	Κουνέλι	Π
3meK20-H4	Κουνέλι	Π
CREST	Ανθρώπινος αυτοάνοσος ορρός	Π
BrdU	Ποντίκι	Μ

Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι :

A) Goat anti-rabbit / donkey anti-rat, IgG 488 [απορρόφηση (Abs): 495 nm, εκπομπή (Em): 519 nm]



B) Goat anti-rabbit / donkey anti-rat, IgG 568 [απορρόφηση (Abs): 578 nm, εκπομπή (Em): 603 nm]

με το φθοριόχρωμα Alexa Fluor, από την εταιρία *Molecular Probes* (Eugene, OR).

2.2 Πλασμιδιακοί φορείς

Οι πλασμιδιακές κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την μελέτη είναι οι εξής:

Όνομα κατασκευής	Φορέας	<u>Ένθεμα</u>
mHP1β-GST	pGEX1	Mouse HP1β (residues 1-185)
hnHP1α-GFP	pBCHGN	Human HP1α (residues 1-191)
hnHP1β-GFP	pBCHGN	Human HP1β (residues 1-185)
hnHP1γ-GFP	pBCHGN	Human HP1γ (residues 1-183)
CD-GFP	pEGFP-C1	Human HP1β (residues 1-70)
ΔCD-GFP	pEGFP-C1	Human HP1β (residues 69-185)
GST	pGAT2	
H3	pET-3a	Xenopus H3
H4	pET-3a	Xenopus H4
CD39mutant-GFP	pCDNA3	Human CD39 mutant (αντικατάσταση του εξωκυτταρικού τμήματος της CD39 με GFP, κατασκευή Σ. Χριστοφορίδης)
Rab7-GFP	pEGFP-C1	Canine Rab7

2.3 Βιοχημικές Μέθοδοι

2.3.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών - Χρώση πηκτής πολυακρυλαμίδιου

Οι πρωτεΐνες αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδιου 12.5% (SDS-PAGE), σε ασυνεχή συστήματα ρυθμιστικών διαλυμάτων, υπό αναγωγικές συνθήκες (167). Τα διαλύματα και τα χημικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή της



πηκτής είναι: 30% διάλυμα ακρυλαμίδης/bis-ακρυλαμίδης, SDS (sodium dodecylsulphate), Tris-Base, APS (ammonium persulfate) και TEMED (n, n, n', n'-tetra-methylethylenediamine, BIO-RAD) καθώς και γλυκίνη. Πριν την ηλεκτροφόρηση, διαλύονται οι πρωτεΐνες σε Laemmli buffer, το οποίο παρασκευάζεται 4 φορές συγκεντρωμένο σε σχέση με την τελική συγκέντρωση που χρησιμοποιείται. Το Laemmli buffer έχει τη σύσταση: 250 mM Tris-HCl (pH 7), 9.2% SDS, 40% γλυκερόλη, 0.2% (βάρος κατ' όγκο) μπλε της βρωμοφαινόλης και 100 mM δι-θειο-θρεϊτόλη (DTT). Κατόπιν οι πρωτεΐνες θερμαίνονται για 5 λεπτά στους 95 °C προκειμένου να αναχθούν. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε διάλυμα που περιέχει 192 mM γλυκίνη, 25 mM Tris base, 0.1% SDS, σε ένταση ρεύματος 45mA, μέγιστη ισχύ και τάση με διάρκεια 3-4 ώρες. Χρησιμοποιούνται δείκτες μοριακού βάρους (BIO-RAD) που περιέχουν τις εξής πρωτεΐνες: μυοσίνη (250 kDa), β-γαλακτοσιδάση (115 kDa), φωσφορυλάση Β (97 kDa), αλβουμίνη ορού βοός (69 kDa), ωαλβουμίνη (46 kDa), καρβονική ανυδράση (30 kDa) και λυσοζύμη (14.3 kDa). Πραγματοποιείται χρώση των πηκτών πολυακρυλαμιδίου με Coomassie Blue G250. Μετά την ηλεκτροφόρηση, εμβαπτίζεται η πηκτή σε διάλυμα χρωστικής (50% μεθανόλη, 12% οξικό οξύ, 38% νερό, 0.1% βάρος κατ' όγκο Coomassie Blue G250) υπό ανάδευση για ελάχιστο χρονικό διάστημα μιας ώρας, για χρώση και μονιμοποίηση των πρωτεϊνών. Στη συνέχεια, απομακρύνουμε το διάλυμα της χρωστικής και εμβαπτίζουμε την πηκτή σε διάλυμα 10% μεθανόλης-10% όξικου οξέως ή 50% μεθανόλης-10% όξικου οξέως σε νερό.

2.3.2 Μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεϊνών

Καθορίζεται η πρωτεϊνική συγκέντρωση με τη χρωματομετρική μέθοδο Bradford χρησιμοποιώντας αντιδραστήριο της εταιρίας BIORAD. Η αρχή της μεθόδου (168) στηρίζεται στο σχηματισμό συμπλόκου των πρωτεϊνών με τη χρωστική Coomassie Blue και μετράμε την απορρόφηση του φωτός από το σύμπλοκο αυτό σε μήκος κύματος 595 nm. Για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιείται αλβουμίνη ορού βοός (BSA, Sigma). Η ευαισθησία της μεθόδου κυμαίνεται από 1-15mg πρωτεΐνης ανά ml.



2.3.3 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western (Western Blot)

Η ανίχνευση πρωτεϊνών με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western γίνεται σύμφωνα με καθιερωμένα πρωτόκολλα (169, 170). Οι πρωτεΐνες που πρόκειται να ανιχνευθούν διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου και μεταφέρονται σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης (Protran, 0.45 mm) εφαρμόζοντας ηλεκτρικό πεδίο τάσης 35V, για 3 ώρες. Η μεταφορά πραγματοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει 192mM γλυκίνη, 25mM Tris base, 0.1% SDS και 20% μεθανόλη. Το φίλτρο νιτροκυτταρίνης επωάζεται σε διάλυμα έκπλυσης (20mM Tris HCl pH 7.4, 0.9% β/ο NaCl και 0.1% Tween 20) για 15 λεπτά και έπειτα ολονύκτια σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα έκπλυσης που περιέχει 1% FSG (ζελατίνη δέρματος ψαριού) (διάλυμα blocking) υπό ανάδευση σε πλατφόρμα ώστε να αποφευχθεί η σύνδεση των αντισωμάτων σε μη ειδικές θέσεις. Κατόπιν, το φίλτρο νιτροκυτταρίνης επωάζεται με το πρωτεύον αντισώματα κατάλληλα αραιωμένο (σε blocking) για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και εκπλένονται οι μεμβράνες με blocking για 10 λεπτά επί 4 φορές υπό ανάδευση για να απομακρυνθεί το μη δεσμευμένο αντίσωμα. Επωάζουμε με το δευτερεύον αντίσωμα (το οποίο είναι συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση) για μία ώρα κατάλληλα αραιωμένο (σε blocking), εκπλένουμε με blocking buffer για 5 λεπτά επί 3 φορές και με διάλυμα έκπλυσης για 5 λεπτά επί 3 φορές. Εμφανίζουμε το σήμα της ανοσοαποτύπωσης με το ECL-KIT (Amersham) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.3.4 Συγκατακρήμνιση πρωτεϊνών με σφαιρίδια γλουταθειόνης-αγαρόζης (pull-down)

Επωάζεται για 30 λεπτά σε περιστρεφόμενη πλατφόρμα και θερμοκρασία δωματίου την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει (5-30 μg περίπου) παρουσία 1% FSG και σφαιριδίων γλουταθειόνης-αγαρόζης που προηγουμένως εξισορροπούνται σε διάλυμα δοκιμής (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, 10% σακχαρόζη, 1% Triton X-



100, 1 mM PMSF). Στη συνέχεια, τα σφαιρίδια εκπλένονται 3 φορές με διάλυμα δοκιμής και 1 φορά με διάλυμα δοκιμής στη κατάλληλη αλατότητα (300/600/750 mM), με σύντομες ενδιάμεσες φυγοκεντρήσεις σε φυγόκεντρο τύπου Eppendorf. Η πρωτεΐνη επωάζεται με το κατάλληλο εκχύλισμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου σε περιστρεφόμενη πλατφόρμα. Τα σφαιρίδια εκπλένονται 6 φορές με το διάλυμα δοκιμής στην κατάλληλη αλατότητα (300/600/750 mM), και 1 φορά με ισοτονικό διάλυμα δοκιμής απουσία Triton X-100. Στην τελευταία έκπλυση αφαιρείται το υπερκείμενο, προστίθενται 40 μl διαλύματος Laemmli, θερμαίνονται τα δείγματα στους 95 °C για 5 λεπτά και αναλύεται το υπερκείμενο υγρό με ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE).

2.3.5 Πειράματα πέψης πρωτεϊνών με την χρήση του ενζύμου θρυψίνη

Σε ένα τυπικό πείραμα χρησιμοποιούνται 40 μl σφαιριδίων αгарόζης διασυνδεδεμένων με το ένζυμο θρυψίνη (19.5 units /ml, Sigma). Εκπλένονται τα σφαιρίδια τρεις φορές με παγωμένο PBS 1x με σύντομες ενδιάμεσες φυγοκεντρήσεις σε φυγόκεντρο τύπου Eppendorf. Στη συνέχεια επωάζονται 150 μg/ml πρωτεΐνης σε διάλυμα 10 mM Tris-HCl pH 7.4 με τα σφαιρίδια για 0, 2, 5, 10 και 20 λεπτά στους 4 °C σε κινούμενη πλατφόρμα. Η πέψη τερματίζεται με προσθήκη αναστολέων των πρωτεασών (100 μg/ml απροτινίνη, λευπεπτίνη, πεπστατίνη, αντιπαΐνη, 200 μg/ml αναστολέα της θρυψίνης). Τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 15 λεπτά στις 13000 σ.α.λ. (10000g) στους 4 °C. Διατηρείται το υπερκείμενο για άμεση χρήση.

2.3.6 Ανάλυση εκχυλισμάτων με βαθμίδωση σακχαρόζης

Τα πυρηνικά εκχυλίσματα αναλύονται σε βαθμίδωση σακχαρόζης 10-30%. Στον πυθμένα φυγοκεντρικού σωληναρίου τοποθετείται ένα στρώμα 300μl διαλύματος ίδιας σύστασης με αυτό που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των πυρηνικών εκχυλισμάτων (διάλυμα δοκιμής) με περιεκτικότητα σακχαρόζης 30%. Χρησιμοποιείται συσκευή βαθμιδοποίησης και κατάλληλη διάταξη για την εναποθέση διαλύματος (διάλυμα δοκιμής) του οποίου η συγκέντρωση σε σακχαρόζη ελαττώνεται προοδευτικά από 30 σε 10 %. Εναποτίθεται το πυρηνικό εκχύλισμα και



φυγοκεντρούμε για 18 ώρες, στους 4 °C, στην κεφαλή SW41 Ti. Τερματίζουμε την φυγοκέντρηση χωρίς την χρήση φρένου (no brake) για να μη διαταραχθεί η βαθμίδωση και συλλέγουμε κλάσματα των 500 μl με κλασματοσυλλέκτη, τα οποία αναλύουμε με ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE).

2.4 Παρασκευαστικές μέθοδοι

2.4.1 Απομόνωση πυρήνων από ερυθροκύτταρα γαλοπούλας

Η απομόνωση πυρήνων από ερυθροκύτταρα γαλοπούλας γίνεται σύμφωνα με το τροποποιημένο πρωτόκολλο των Georgatos and Blobel (171). Λαμβάνονται περίπου 40ml αίμα γαλοπούλας. Αραιώνουμε το αίμα 1:3 σε PBS 1x-2 mM EDTA ώστε να παρεμποδιστεί η πήξη. Όλοι οι χειρισμοί γίνονται στον πάγο. Το αίμα φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 3.000 σ.α.λ. (στροφές ανά λεπτό) (1.000g) σε επιτραπέζια φυγόκεντρο και αφαιρείται το υπερκείμενο υγρό που αντιστοιχεί στο πλάσμα. Με τον ίδιο τρόπο εκπλένονται 3 φορές τα ερυθροκύτταρα με κρύο PBS 1x. Μετά την τελευταία φυγοκέντρηση αφαιρείται το υπερκείμενο, αραιώνονται τα ερυθροκύτταρα σε 10 όγκους διαλύματος λύσης (5mM Na₃PO₄, 2mM MgCl₂, 1mM DTT, 1.3mM PMSF) και τα επωάζονται για 10 λεπτά στον πάγο υπό συνεχή ανάδευση. Φυγοκεντρούνται τα λυμένα ερυθροκύτταρα για 1.5 λεπτά (σε κεφαλή SS-34 και φυγόκεντρο τύπου Sorvall) στις 10.000 σ.α.λ.. Το ίζημα της φυγοκέντρησης (που αντιπροσωπεύει τις μεμβρανοσκελετικές δομές των ερυθροκυττάρων) επαναδιαλύεται σε διάλυμα λύσης και με χρήση υπέρηχων επιτυγχάνουμε περαιτέρω τεμαχισμό και απομάκρυνση των πλασματικών μεμβρανών. Το υλικό φυγοκεντρείται σε επιτραπέζια φυγόκεντρο για 10 λεπτά στις 3000 σ.α.λ. (1000g) και οι πυρήνες παραλαμβάνονται στο ίζημα, ενώ οι πλασματικές μεμβράνες στο υπερκείμενο υγρό. Οι πυρήνες επαναδιαλύονται σε διάλυμα λύσης σε αναλογία 1:5 και στη συνέχεια μεταφέρονται δυο φορές με πίεση διαμέσου βελόνας No 22 (22 gauge) κεκαμένης σε 2 σημεία. Προστίθενται ίσος όγκος διαλύματος λύσης και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε επιτραπέζια φυγόκεντρο για 10 λεπτά στις 3000 σ.α.λ. (1000g). Το ίζημα αντιπροσωπεύει τους



τεμαχισμένους πυρήνες των ερυθροκυττάρων γαλοπούλας και το διατηρείται στους -80°C , αφού παγώσει ακαριαία σε υγρό άζωτο.

2.4.2 Παρασκευή πυρηνικών φακέλων από πυρήνες ερυθροκυττάρων γαλοπούλας

A. Με χρήση του ενζύμου δεοξυριβονουκλεάση I (DNase I)

Οι πυρήνες των ερυθροκυττάρων επαναδιαλύονται σε 10ml διαλύματος DNase I (10mM NaPO_4 , 2mM MgCl_2 , 10% σακχαρόζη, 1mM DTT, 1.3mM PMSF, 2μg/ml αναστολείς πρωτεασών), προσθέτουμε 0.1mg/ml DNase I και επωάζουμε σε κινούμενη πλατφόρμα για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 10 λεπτά στις 10000 σ.α.λ. ώστε να απομακρύνουμε το DNA μαζί με την υδατική φάση και επαναλαμβάνουμε δυο φορές την παραπάνω διαδικασία. Το μεμβρανικό ίζημα (το οποίο αποτελούν οι πυρηνικοί φάκελοι) εκπλένεται με παγωμένο νερό, το οποίο απομακρύνει τις συνδετικού τύπου ιστόνες, φυγοκεντρείται για 30 λεπτά σε φυγόκεντρο Eppendorf στα 12000g στους 4°C και διατηρείται το ίζημα στο τέλος της φυγοκέντρισης.

B. Με χρήση του ενζύμου μικροκοκκική νουκλεάση MNase

Οι πυρήνες των ερυθροκυττάρων επαναδιαλύονται σε διάλυμα που περιέχει 20 mM HEPES-KOH pH 7.4, 5 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 0.025% Triton X-100, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, αναστολείς πρωτεασών και 1,500 units/ml pellet (ή 1101 units MNase / 30 ml αίματος γαλοπούλας). Ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά στους 37°C , η αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη 2 mM EDTA και ακολουθεί επώαση στον πάγο για 10 λεπτά. Φυγοκεντρούμε για δέκα λεπτά στα 13,000 g, 4°C . Ακολουθεί συλλογή του υπερκείμενου και επαναδιαλύεται το μεμβρανικό ίζημα σε παγωμένο διάλυμα 2 mM EDTA pH 7.5 και ακολουθεί φυγοκέντριση. Συλλέγουμε το υπερκείμενο και εκχυλίζουμε το μεμβρανικό ίζημα όπως περιγράφεται παρακάτω (2.4.3).



2.4.3 Παρασκευή κυτταρικών και πυρηνικών εκχυλισμάτων

Τα εκχυλίσματα από τους πυρηνικούς φακέλους γαλοπούλας παρασκευάζονται με προσεκτική επαναδιάλυση των φακέλων σε διάλυμα που περιέχει 300 ή 600 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, 250 mM σακχαρόζη, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, αναστολείς πρωτεασών, παρουσία ή απουσία 1% Triton X-100 κατά περίπτωση. Ακολουθεί φυγοκέντριση στα 200-350,000 g για 30 λεπτά στους 4 °C. Χρησιμοποιούνται αμέσως τα διαλυτά εκχυλίσματα ή υποβάλλονται σε περαιτέρω κλασμάτωση σε 5-20% διαβάθμιση σακχαρόζης με ολονύκτια φυγοκέντριση στα 100,000 g, στους 4 °C.

2.4.4 Παρασκευή εκχυλισμάτων από κύτταρα HeLa ή C127 που βρίσκονται στο όριο G1/S φάσης

Συλλέγονται κύτταρα HeLa συγχρονισμένα στο όριο G1/S φάσης με χρήση θρυψίνης, εκπλένονται 3 φορές με ισοτονικό διάλυμα που περιέχει 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 2 mM MgCl₂, 1 mM PMSF και επαναδιαλύονται σε διάλυμα 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 2 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 250 mM σακχαρόζη, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 2 μg/ml αναστολείς πρωτεασών, 0.25% Triton X-100 παρουσία MNase όπως περιγράφεται στο τμήμα 2.4.2A & B.

2.4.5 Παραγωγή ανασυνδυασμένων χμιαϊρικών GST πρωτεϊνών

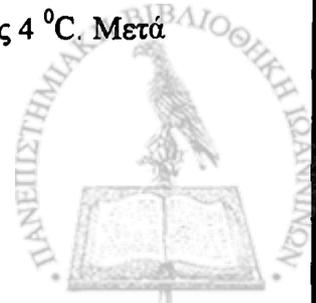
Παράγονται και απομονώνονται χμιαϊρικές GST πρωτεΐνες σύμφωνα με την μέθοδο των Smith & Johnson (1988). Αραιώνεται βακτηριακή καλλιέργεια BL21(DE3) σε οπτική πυκνότητα (Optical Density) O.D. ≈ 0.1 και αφήνεται να αναπτυχθεί έως O.D. ≈ 0.6 στους 37 °C. Επάγεται η παραγωγή της πρωτεΐνης με προσθήκη 0.2 mM IPTG (ισοπροπυλ-β-D-θειογαλακτοπυρανοσίδιο), στους 37 °C για 3 ώρες. Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται για 15 λεπτά, στις 5000



σ.α.λ. (3000g) στους 4 °C σε φυγόκεντρο τύπου Sorvall και επαναδιαλύεται το βακτηριακό ίζημα σε διάλυμα PBS 1x, 10 mM μερκαπτοαιθανόλη, 1.3 mM PMSF (φαινυλο-μεθυλο-σουλφονυλο-φλουορίδιο). Ακολουθεί σύντομη έκθεση σε υπέρηχους. Προστίθενται Triton X-100 σε τελική συγκέντρωση 1% και ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 26000 σ.α.λ. (15000g) για 45 λεπτά, στους 4 °C στην κεφαλή SW27, Beckman. Ακολουθεί συλλογή της υγρής φάσης και επώαση με 500 μl σφαιρίδια γλουταθειόνης-αγαρόζης, που έχουν εξισορροπηθεί με το παραπάνω διάλυμα, για 1 ώρα στους 4 °C υπό συνεχή ανάδευση. Κατόπιν τα σφαιρίδια εκπλένονται με το ίδιο διάλυμα, στη συνέχεια με διάλυμα PBS 1x και 1 mM PMSF και ακολουθεί έκλυση της πρωτεΐνης (10 mM ανηγμένης γλουταθειόνης, 50 mM Tris-HCl pH 8.0). Οι πρωτεΐνες φυγοκεντρώνονται στην Eppendorf στα 12,000g στους 4 °C, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν συσσωματώματα. Οι πρωτεΐνες υποβάλλονται σε διαπίδυση στο κατάλληλο διάλυμα ανάλογα με την δοκιμή που εφαρμόζεται.

2.4.6 Παραγωγή ανασυνδυασμένων χημικών His πρωτεϊνών

Αραιώνεται βακτηριακή καλλιέργεια BL21(DE3) σε $O.D \approx 0.1$ και αφήνεται να αναπτυχθεί έως $O.D \approx 0.6$ στους 37 °C. Η παραγωγή της πρωτεΐνης επάγεται χρησιμοποιώντας 0.2 mM IPTG, στους 37 °C για 3 ώρες. Ακολουθεί φυγοκέντρωση της καλλιέργειας για 15 λεπτά, στις 5000 σ.α.λ. (3000g), στους 4 °C, σε φυγόκεντρο τύπου Sorvall, το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε διάλυμα λύσης (50mM Tris-HCl pH 7.3, 0.1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 10 mM μερκαπτοαιθανόλη, 2 μg/ml αναστολείς πρωτεασών, 1.25 mg/ml λυσοζύμη) και επωάζεται σε κινούμενη πλατφόρμα για 1 ώρα στους 4 °C. Με υπέρηχους διασπώνται τα βακτηριακά τοιχώματα, προστίθενται 1 mM Triton X-100, 2 mM $MgCl_2$ και 20 μg/ml DNase I και ακολουθεί επώαση σε κινούμενη πλατφόρμα για 15 λεπτά στους 4 °C. Φυγοκεντρείται το υλικό για 15 λεπτά στις 10000 σ.α.λ. (7000g), συλλέγεται η υγρή φάση, αραιώνεται 1:1 με διάλυμα λύσης χωρίς μερκαπτοαιθανόλη, λυσοζύμη και EGTA, προστίθενται 5 mM ιμιδαζόλη και ακολουθεί επώαση με 600μl σφαιριδίων νικελίου (που εκπλένονται με νερό και εξισορροπούνται με διάλυμα λύσης, 5 mM ιμιδαζόλη) σε περιστρεφόμενη πλατφόρμα για 1 ώρα στους 4 °C. Μετά



την επώαση εκπλένονται τα σφαιρίδια νικελίου με 300 ml διαλύματος λύσης, 20 mM ιμιδαζόλη και εκλούεται η πρωτεΐνη με διάλυμα λύσης, 500 mM ιμιδαζόλη.

2.4.7 Παραγωγή ανασυνδυασμένης ιστόνης 3 (H3) και ιστόνης 4 (H4)

Αραιώνεται βακτηριακή καλλιέργεια BL21(DE3) σε $O.D \approx 0.1$ και αφήνεται να αναπτυχθεί έως $O.D \approx 0.6$ στους $37^\circ C$. Επάγεται η παραγωγή της πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας 0.2 mM IPTG, στους $37^\circ C$ για 3 ώρες. Φυγοκεντρείται η καλλιέργεια για 15 λεπτά, στις 5000 σ.α.λ. (3000g), στους $4^\circ C$, σε φυγόκεντρο τύπου Sorvall, επαναδιαλύεται το βακτηριακό ίζημα σε διάλυμα λύσης (7 M Guanidinium-HCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM DTT, 1 mM PMSF) και επώάζεται υπό ανάδευση για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί χρήση υπέρηχων για να διαλυτοποιηθούν τυχόν συσσωματώματα και κατόπιν φυγοκεντρούμε στις 26000 σ.α.λ. (15000g) για 40 λεπτά, στους $20^\circ C$ στην κεφαλή SW27, Beckman. Συλλέγεται η υγρή φάση, προστίθενται 10 όγκοι διαλύματος SAU-0 (7 M ουρία, 20 mM οξικό νάτριο pH 5.2, 5 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF) και ακολουθεί επώαση με 5 ml σφαιρίδια SP-sepharose (που έχουν εξισορροπηθεί την προηγούμενη μέρα) για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν μεταφέρονται τα σφαιρίδια σε χρωματογραφική στήλη και εκπλένεται με 100 ml διαλύματος SAU-0. Εκλούεται η πρωτεΐνη με 15 ml διαλύματος SAU-0, 400 mM NaCl, συλλέγονται κλασματα του 1 ml τα οποία αναλύονται με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Εξισοροπούνται τα σφαιρίδια SP-sepharose εκπλένοντας δυο φορές με 100 ml 1 M οξικού νατρίου pH 5.2, μια φορά με 100 ml 100 mM οξικού νατρίου pH 5.2, δυο φορές με 100 ml 20 mM οξικού νατρίου pH 5.2. Στη συνέχεια ακολουθεί ολονύκτια επώαση με 100 ml διαλύματος 7 M ουρία, 1 mM EDTA, 20 mM οξικό νάτριο pH 5.2.

2.4.8 Απομόνωση DNA από καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας.

Απομονώνεται DNA από καλλιέργειες μεσαίας και μεγάλης κλίμακας με χρήση στήλης QIAGEN και σύμφωνα με το εγχειρίδιο της εταιρείας.



2.4.9 Μετασχηματισμός βακτηρίων με τη μέθοδο του θερμικού “σοκ”.

Τοποθετούνται 100λ βακτηρίων σε σωλήνα των 15ml
Προστίθενται 0.5 μg καθαρού πλασμιδίου ή 10λ αντίδραση συγκόλλησης
Τοποθετούνται στον πάγο για 30 λεπτά
Θερμαίνονται στους 42 °C για 45 δευτερόλεπτα
Τοποθετούνται για 2 λεπτά σε πάγο
Προστίθενται 900λ LB
Επωάζονται για 1 ώρα στους 37 °C στις 225 στροφές
Επιστρώνονται σε πιάτο LB+Amp και επωάζουμε ολονύκτια στους 37 °C

2.5 Μέθοδοι καλλιέργειας κυττάρων

2.5.1 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HeLa (καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας από άνθρωπο), C127I (καρκινικά κύτταρα από ποντικό), MDCKII (κύτταρα νεφρού από σκύλο), NRK (επιθηλιακά φυσιολογικά κύτταρα νεφρού από αρουραίο), MCF7 (καρκινικά κύτταρα από άνθρωπο), 3T3 (εμβρυϊκοί ινοβλάστες από ποντικό), εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού (mouse Embryonic Stem cells) σε αδιαφοροποίητη (παρουσία του παράγοντα λευχαιμικής αναστολής, Leucemia Inhibitory Factor στο θρεπτικό υλικό) ή διαφοροποιημένη (απομακρύνοντας τον παράγοντα LIF από το θρεπτικό υλικό) κατάσταση. Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα iMEFs (αθανατοποιημένοι εμβρυονικοί ινοβλάστες ποντικού) αγρίου τύπου, απλά (-/-) μεταλλαγμένους για τις HP1α, HP1β, και Suvar3/9h1/2, απλά μεταλλαγμένους ταυτόχρονα για τις HP1α και HP1β καθώς και απλά μεταλλαγμένους ταυτόχρονα για την HP1α (-/-) και σε ετερόζυγη κατάσταση για την HP1β (+/-).

Καλλιεργούνται όλες τις κυτταρικές σειρές στους 37 °C, σε 5% CO₂, και σε θρεπτικό υλικό DMEM. Στα ES προστίθενται 10 mM β-μερκαπτοαιθανόλη στο θρεπτικό υλικό. Στις δυο



παραπάνω περιπτώσεις συμπληρώνεται το θρεπτικό υλικό με 10% FCS, 2mM γλουταμίνη και με τα αντιβιοτικά πενικιλίνη (100U/ml), στρεπτομυκίνη (100μg/ml). Ανακαλλιεργούνται τα κύτταρα επωάζοντας με διάλυμα θρυψίνης/EDTA για 2-3 λεπτά στους 37 °C, και τα διασπείρονται σε αραιώση ¼ σε νέα δισκία. Η καλλιέργεια των κυττάρων γίνεται σε δισκία της εταιρίας NUNC.

2.5.2 Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών

Χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές μεθόδους για την ειδαγωγή πλασμιδιακού DNA στους κυτταρικούς τύπους που μελετήσαμε:

A) Μικροενέσεις- Αυτοματοποιημένο σύστημα μικροενέσεων (AIS2)

Με την τεχνική των μικροενέσεων εισάγονται εξωγενώς μακρομόρια (νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες) ή φαρμακολογικοί παράγοντες στο εσωτερικό (στον πυρήνα ή το κυτταρόπλασμα) ενός κυττάρου. Χρησιμοποιείται το σύστημα AIS2 (Automated Injection System 2) το οποίο αποτελείται από τα εξής μέρη: α) Πρόγραμμα ελέγχου AIS2 μέσω του οποίου ορίζεται ο όγκος της ουσίας που εισάγεται στο κύτταρο (ρυθμίζοντας την πίεση και την χρονική διάρκεια της μικροένεσης) καθώς και η κίνηση της μικροπιπέτας και της βάσης του μικροσκοπίου (Cell Biology Trading), β) Προσωπικός υπολογιστής μέσω του οποίου εκτελείται το πρόγραμμα ελέγχου AIS2, γ) Σύστημα μικροχειρισμού (Luigs & Neumann) με το οποίο ορίζεται η ακριβής θέση της μικροπιπέτας στο χώρο, δ) Ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss, Axiovert 200), ε) Σύστημα αντλίας (AIS2 FemptoJet) με το οποίο ελέγχεται η πίεση της μικροένεσης. Επιπλέον κατασκευάζονται οι μικροπιπέτες χρησιμοποιώντας την συσκευή P-97 Flaming/ Brown micropipette puller (Shutter Instrument Co). Χρησιμοποιούμε γυάλινα τριχοειδή (borosilicate glass capillaries, Harvard apparatus) σωληνάκια με εξωτερική διάμετρο 1.2 mm και εσωτερική διάμετρο 0.94 mm. Η συγκέντρωση που χρησιμοποιείται για τα νουκλεϊκά οξέα είναι 50-200 ng/ml, ενώ για τις πρωτεΐνες 1-5 mg/ml, αφού προηγουμένως φυγοκεντρηθούν τα δείγματα στις 13.000 σ.α.λ. (14500g) για 15 λεπτά στους 4 °C και διατηρήσουμε το υπερκείμενο.



B) Ηλεκτροδιαπίδυση (Electroporation)

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

Γ) Μέθοδος φωσφορικού ασβεστίου

Τοποθετούνται 3×10^6 κύτταρα σε τρυβλία των 10 cm. Προστίθενται 10-40 μg DNA διαλυτοποιημένο σε 0.25 M CaCl_2 σε ίσο όγκο διαλύματος 2x HBS (274 mM NaCl; 10 mM KCl; 1.5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 12 mM dextrose; 42 mM HEPES, ρύθμιση του pH στο 7.1 ± 0.1), επωάζεται το μείγμα για 20-30 λεπτά, ώστε να σχηματιστεί το σύμπλοκο DNA-φωσφορικού ασβεστίου, κατόπιν το προστίθενται στα κύτταρα και ανακινείται κυκλικά για να κατανεμηθεί ομοιόμορφα. Ακολουθεί επώαση για 4-16 hrs, έκπλυση μια φορά με PBS 1x και προσθήκη θρεπτικού. Τα κύτταρα συλλέγονται στις 24 hrs από την προσθήκη του DNA.

2.5.3 Επίδραση με φαρμακολογικούς παράγοντες

Χρησιμοποιούνται οι παρακάτω παράγοντες :

1) Υδροξουρία (HU; $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}_2$) σε συγκέντρωση 2-5 mM για 24 hrs (αναστέλλει το κατάλοιπο της αναγωγής των ριβονουκλεοτιδίων αντιδρώντας με την ελεύθερη τυροσινική ρίζα της μικρής R2 υπομονάδας του ενεργού κέντρου του ενζύμου) για το συγχρονισμό στο στάδιο G1/S φάσης.

2) Θυμιδίνη (Thymidine; $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5$) σε συγκέντρωση 2 mM (μετατρέπεται σε τριφωσφορική δεοξυθυμιδίνη και αλλοστερικά, συνδεόμενη με την αναγωγή των ριβονουκλεοτιδίων, εμποδίζει την σύνθεση της τριφωσφορικής δεοξυκυτοσίνης). Το φάρμακο χρησιμοποιείται για 19 hrs, απομακρύνεται για 9 hrs και προστίθενται εκ νέου για 16 hrs (σχήμα διπλής αναστολής) για να επιτευχθεί συγχρονισμός στο στάδιο G1/S φάσης.



3) Αφειδικολίνη (aphidicolin; $C_{20}H_{34}O_4$) σε συγκέντρωση 5 μM για 24 hrs (δεσμεύεται ειδικά στις DNA πολυμεράσες α , δ , ϵ και ανταγωνίζεται τη δέσμευση των τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων) για να επιτευχθεί συγχρονισμός στην έναρξη της S φάσης.

4) Μιμοσίνη (mimosine; $C_8H_{10}N_2O_4$) σε συγκέντρωση 0.5 mM για 24 hrs (δεσμεύει ιόντα σιδήρου/ψευδαργύρου και αναστέλλει μη ειδικά την δράση της αναγωγάσης των ριβονουκλεοτιδίων) για να επιτευχθεί συγχρονισμός στο στάδιο G1 φάσης.

5) Τριχοστατίνη A (Trichostatin A; $C_{17}H_{22}N_2O_3$) σε συγκέντρωση 100 ng/ml για 24 hrs (αναστέλλει την δράση των απακετυλασών των ιστονών των θηλαστικών) για να επιτευχθούν υψηλά επίπεδα ακετυλίωσης των ιστονών.

6) Βουτυρικό νάτριο (Sodium butyrate; $C_4H_7NO_2$) σε συγκέντρωση 10 mM για 24 hrs (αναστέλλει την δράση των απακετυλασών των ιστονών) για να επιτευχθούν υψηλά επίπεδα ακετυλίωσης των ιστονών.

7) Κουρκουμίνη (curcumin; $C_{21}H_{20}O_6$) σε συγκέντρωση 35 μM για 24 hrs (αναστέλλει ειδικά την δράση ακετυλτρανσφεράσης του παράγοντα p300/CBP) για να επιτευχθούν χαμηλά επίπεδα ακετυλίωσης των ιστονών.

2.6 Μορφολογικές μέθοδοι

2.6.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Καλλιεργούνται τα κύτταρα για 48 ώρες σε αποστειρωμένες γυάλινες καλυπτρίδες, ώστε να βρίσκονται σε πυκνότητα 60-80% την ημέρα της δοκιμής. Όλοι οι χειρισμοί που ακολουθούν γίνονται σε θερμοκρασία δωματίου. Αφαιρείται το θρεπτικό υλικό, εκλένονται τρεις φορές με PBS 1x και μονιμοποιούνται με διάλυμα φορμαλδεύδης σε PBS 1x (η συγκέντρωση της φορμαλδεύδης και ο χρόνος επώασης καθορίζεται από το αντίσωμα που χρησιμοποιούμε). Ακολουθεί επώαση με διάλυμα γλυκίνης 20mM σε PBS 1x για 5 λεπτά και στη συνέχεια για 15 λεπτά με διάλυμα blocking το οποίο περιέχει : PBS 1x, 0.2% Triton X-100, 0.5% ζελατίνη



επιδερμίδας ψαριού, 0.1 mM EGTA και 2mM MgCl₂. Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για μια ώρα με 70 μl πρωτογενούς αντισώματος (αραιωμένο σε blocking). Εκπλένονται 3 φορές με blocking για 5 λεπτά. Επώάζονται για 1 ώρα 70 μl δευτερογενούς αντισώματος (αραιωμένο σε blocking), το οποίο είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με φθορίζουσες χρωστικές όπως φλουορεσκίνη (FITC) ή ροδαμίνη (Rhodamine) και αντιδρά με IgG αρουραίου/ποντικού ή κουνελιού ανάλογα με την προέλευση του πρώτου αντισώματος (μονοκλωνικό/πολυκλωνικό αντίστοιχα). Εκπλένουμε 3 φορές με blocking για 5 λεπτά και μια φορά με PBS 1x, επώαζουμε με 2 μg/ml DAPI (4'-6-Diamidino-2-Phenylindole) ή 5 μg/ml PI (Propidium Iodide) (αραιωμένα σε διάλυμα PBS 1x) για να επιτευχθεί χρώση των πυρήνων των κυττάρων και κατόπιν έκπλυση 3 φορές με PBS 1x. Σε αντικειμενοφόρο εναποτίθενται 4 μl διαλύματος Vectashield (εμποδίζει τον αποχρωματισμό/anti-fading των δειγμάτων κατά την παρατήρηση στο μικροσκόπιο), τοποθετείται ανεστραμμένη η καλυπτρίδα, απομακρύνεται η περρίσεια διαλύματος Vectashield και κλείνεται ερμητικά το δείγμα με διαφανή ρητίνη.

2.6.2 Δοκιμασία κυττάρων με TX-100, RNase, DNase, Trypsin

Πριν μονιμοποιηθούν τα κύτταρα εφαρμόζονται οι εξής δοκιμασίες :

α) Επεξεργασία με TX-100: Εκπλένονται τα κύτταρα με διάλυμα PBS 1x, 0.5 mM MgCl₂, 0.5 mM CaCl₂ και στη συνέχεια με διάλυμα CSK (10 mM PIPES-KOH pH 7.0, 100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM MgCl₂). Επώάζονται με διάλυμα CSK, 0.5 % TX-100, 0.5 mM PMSF, 100 μg/ml leupeptin για 5 λεπτά στους 20 °C. Εκπλένονται δυο φορές με διάλυμα CSK μια φορά με PBS 1x και μονιμοποιούνται, β) Επεξεργασία με RNaseA/DnaseI: Μετά την επεξεργασία με TX-100 επώάζονται με 1 mg/ml RNase A ή 1mg/ml Dnase I για 10 λεπτά στους 20 °C. Εκπλένονται 2 φορές με PBS 1x και μονιμοποιούνται, γ) Επεξεργασία με θρυψίνη: Μετά την επεξεργασία με TX-100 επώάζονται με διάλυμα θρυψίνης/EDTA (που χρησιμοποιούνται στην ανακαλλιέργεια των κυττάρων) αραιωμένο 100 φορές. Εκπλένονται δυο φορές με PBS 1x και μονιμοποιούνται.



2.6.3 Ταυτοποίηση κυττάρων που βρίσκονται στην S φάση

1) Ενσωμάτωση βρωμοδεοξουριδίνης (BrdU) : Κύτταρα που βρίσκονται στην S φάση ενσωματώνουν βρωμοδεοξουριδίνη κατά τον διπλασιασμό του DNA και ανιχνεύονται με το 5-Bro-mo-2-deoxy-uridine Labeling & Detection Kit I (Roche) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

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

2.7 Συνεστιακή μικροσκοπία

2.7.1 Συνεστιακή μικροσκοπία

Χρησιμοποιείται το συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS-SP Confocal Microscope, της εταιρίας Leica Optics, Germany, το οποίο αποτελείται από τα εξής μέρη: α) Ανάστροφο μικροσκόπιο (conventional microscope) φθορισμού DM-IRBE, με φίλτρα φλουορεσκίνης/ ροδαμίνης και φακούς 10x, 40x, 63x, 100x, β) Μονάδα συνεστιακής σάρωσης (confocal scanning unit) που περιλαμβάνει την πηγή εκπομπής laser ακτινοβολίας (Argon-488 nm), διχροϊκό κάτοπτρο, μονάδα σάρωσης του δείγματος, μονάδα συλλογής ανακλώμενης ακτινοβολίας, δυο διαφράγματα (pinhole) που ελέγχουν την προσπίπτουσα και την ανακλώμενη ακτινοβολία και φωτοπολλαπλασιαστές, γ) Μια μονάδα ηλεκτρονικού ελέγχου της μονάδας σάρωσης (control electronics), δ) Προσωπικό υπολογιστή που διαθέτει το κατάλληλο λογισμικό για την λήψη, επεξεργασία και αποθήκευση των δεδομένων που προκύπτουν από την ανάλυση των δειγμάτων.



2.7.2 Μέθοδος ανάκτησης φθορισμού μετά από φωτοδιάχυση (FRAP, Fluorescence Recovery After Photobleaching)

Μια από τις εφαρμογές της συνεστιακής μικροσκοπίας είναι η ανάλυση της κινητικής πρωτεϊνών σε ζωντανά κύτταρα με την μέθοδο FRAP. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη συσχέτιση του φαινομένου της φωτοδιάχυσης φθορισμογόνων δειγμάτων με την κινητική τους. Ο ακριβής μηχανισμός φωτοδιάχυσης δεν είναι γνωστός, ενώ για κάθε φθορισμογόνο (GFP, YFP κ.α.) εμφανίζει διαφορετικές ιδιότητες φωτοδιάχυσης. Η κινητικότητα και η διάχυση ενός μορίου στο κυτταρικό περιβάλλον επηρεάζεται από το μέγεθός του, τις αλληλεπιδράσεις του με άλλους παράγοντες και το ιξώδες του κυτταρικού περιβάλλοντος (τύπος Stokes/Einstein). Για την πραγματοποίηση πειραμάτων με την μέθοδο FRAP απαιτείται συνεστιακό μικροσκόπιο εξοπλισμένο με το φίλτρο AOTF (acousto-optical tunable filter) μέσω του οποίου μεταβάλλουμε στιγμιαία την ισχύ της ακτινοβολίας laser από την χαμηλή ένταση που απαιτείται για την απεικόνιση (4-8% της μέγιστης τιμής) σε υψηλή ένταση (100% της μέγιστης τιμής) που απαιτείται για την φωτοδιάχυση.

Η μεθοδολογία χωρίζεται σε τρία στάδια: την συλλογή, την επεξεργασία και την ανάλυση των δεδομένων. Τοποθετούνται σε δισκία με γυάλινη βάση κύτταρα που εκφράζουν την πρωτεΐνη που αναλύουμε σε χημική μορφή με την πρωτεΐνη GFP, την επόμενη ημέρα εκπλένεται το θρεπτικό των κυττάρων με διάλυμα PBS 1x, προστίθενται θρεπτικό διάλυμα χωρίς κόκκινο της φαινόλης (δείκτης pH) και τοποθετείται το δισκίο στην βάση του μικροσκοπίου (η συνολική διάταξη είναι σε θάλαμο με σταθερή θερμοκρασία, 37 °C). Χρησιμοποιούνται οι εξής παράμετροι :

α) Φακό μεγέθυνσης 63x, συχνότητα σάρωσης του δείγματος και προς τις δυο κατευθύνσεις (bi-directional mode) από την ακτίνα του laser 1400Hz, ανάλυση εικόνας 256x256 pixel, διαστολέας ακτίνας (beam expander) στην τιμή 3, διάφραγμα ακτίνας (pinhole) πλήρως ανοιχτό, ισχύς ακτίνας laser στο 4-8% της μέγιστης ισχύος σε όλη την διάρκεια του πειράματος, εκτός από την στιγμή της φωτοδιάχυσης που χρησιμοποιούμε μέγιστη ισχύ (100%). Με τις παραπάνω παραμέτρους αυτόματα προκύπτει η ταχύτητα λήψης εικόνων κάθε 0.208 msec.



Κατόπιν επιλέγεται ένα κατάλληλο κύτταρο και λαμβάνεται μια εικόνα, η οποία χρησιμοποιείται για να οριστεί η περιοχή ενδιαφέροντος (Region Of Interest, ROI) όπου θα προκληθεί φωτοδιάχυση. Ως ROI χρησιμοποιείται κυκλική περιοχή με διάμετρο 1 μm . Λαμβάνονται 50 εικόνες πριν την φωτοδιάχυση (pre-bleach images), ακολουθεί στιγμιαία φωτοδιάχυση και ακόλουθα λήψη 350-500 εικόνων μετά την φωτοδιάχυση (post-bleach images). Κατόπιν ορίζονται ακόμη δυο ROIs : το σύνολο της περιοχής που κατανέμεται η πρωτεΐνη που αναλύεται (ο πυρήνας για τις HP1 GFP πρωτεΐνες ή το σύνολο του κυττάρου για την GFP) καθώς και μια περιοχή στην οποία δεν εντοπίζεται η πρωτεΐνη που αναλύεται ώστε να καταγραφεί ο θόρυβος (background). Χρησιμοποιούνται αυτές τις περιοχές για την κανονικοποίηση των δεδομένων (data normalization). Η κανονικοποίηση των δεδομένων, με χρήση της περιοχής ενδιαφέροντος (I_t), της συνολικής περιοχής κατανομής της πρωτεΐνης (T_t), και της περιοχής μη-εντόπισης της πρωτεΐνης (BG) γίνεται σε τέσσερα βήματα ως εξής:

α) Αφαιρείται ο θόρυβος (background subtraction), υπολογίζοντας για κάθε χρονικό σημείο t ,

$$(I_t - BG) \& (T_t - BG)$$

β) Ορίζεται το σήμα φθορισμού που χάθηκε, υπολογίζοντας για κάθε χρονικό σημείο t ,

$$(T_{\text{prebleach}} - BG) / (T_t - BG)$$

γ) Διορθώνεται το σήμα του φθορισμού που χάνεται λόγω της φωτοδιάχυσης από την ακτινοβολία χαμηλής έντασης που χρησιμοποιείται για την λήψη των εικόνων, υπολογίζοντας για κάθε χρονικό σημείο t ,

$$(I_t - BG)(T_{\text{prebleach}} - BG)/(T_t - BG)$$

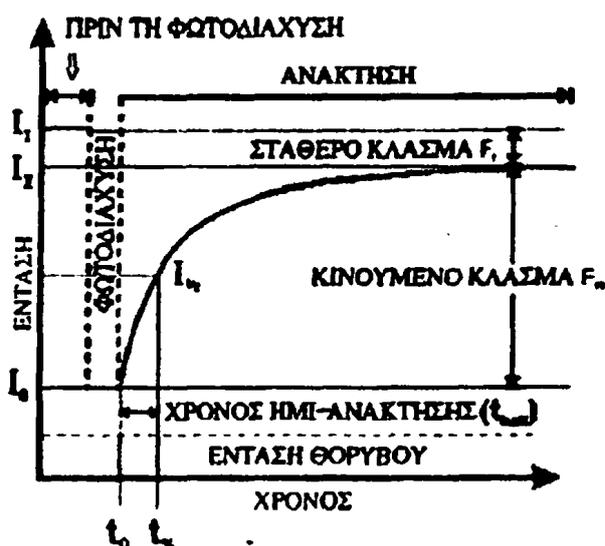
δ) Ορίζεται το σχετικό σήμα φθορισμού στην περιοχή φωτοδιάχυσης, υπολογίζοντας για κάθε χρονικό σημείο t ,

$$(T_{\text{prebleach}} - BG)(I_t - BG)/(T_t - BG)(I_{\text{prebleach}} - BG)$$

Μετά την κανονικοποίηση προκύπτει ένα γράφημα (σχήμα 12) που απεικονίζει το σήμα του φθορισμού στην περιοχή της φωτοδιάχυσης ως συνάρτηση του χρόνου. Από το γράφημα υπολογίζεται ο χρόνος ημι-ανάκτησης (recovery half-time), δηλαδή ο χρόνος που απαιτείται ώστε ο φθορισμός στην περιοχή της φωτοδιάχυσης να πάρει το $\frac{1}{2}$ της μέγιστης τελικής τιμής. Όσο μικρότερη τιμή έχει αυτή η παράμετρος τόσο μεγαλύτερη η κινητική του μορίου που



αναλύεται. Ακόμη συγκρίνεται η τελική τιμή του φθορισμού (I_E) στην περιοχή φωτοδιάχυσης με την τιμή πριν την φωτοδιάχυση (I_I). Στην περίπτωση που $I_I > I_E$ προκύπτει το συμπέρασμα ότι μέρος ($I_I - I_E$) του πληθυσμού των μορίων της πρωτεΐνης που αναλύεται είναι σταθερά συνδεδεμένο σε κάποια σταθερή δομή (immobile fraction, F_I) και το υπόλοιπο (I_E) διαχέεται (mobile fraction, F_m), ενώ όταν $I_I = I_E$ προκύπτει το συμπέρασμα ότι το σύνολο του πληθυσμού των μορίων της πρωτεΐνης που αναλύουμε διαχέεται ελεύθερα.



Σχήμα 12: Γράφημα κανονικοποιημένης καμπύλης FRAP

2.8 Φασματοσκοπία μάζας

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

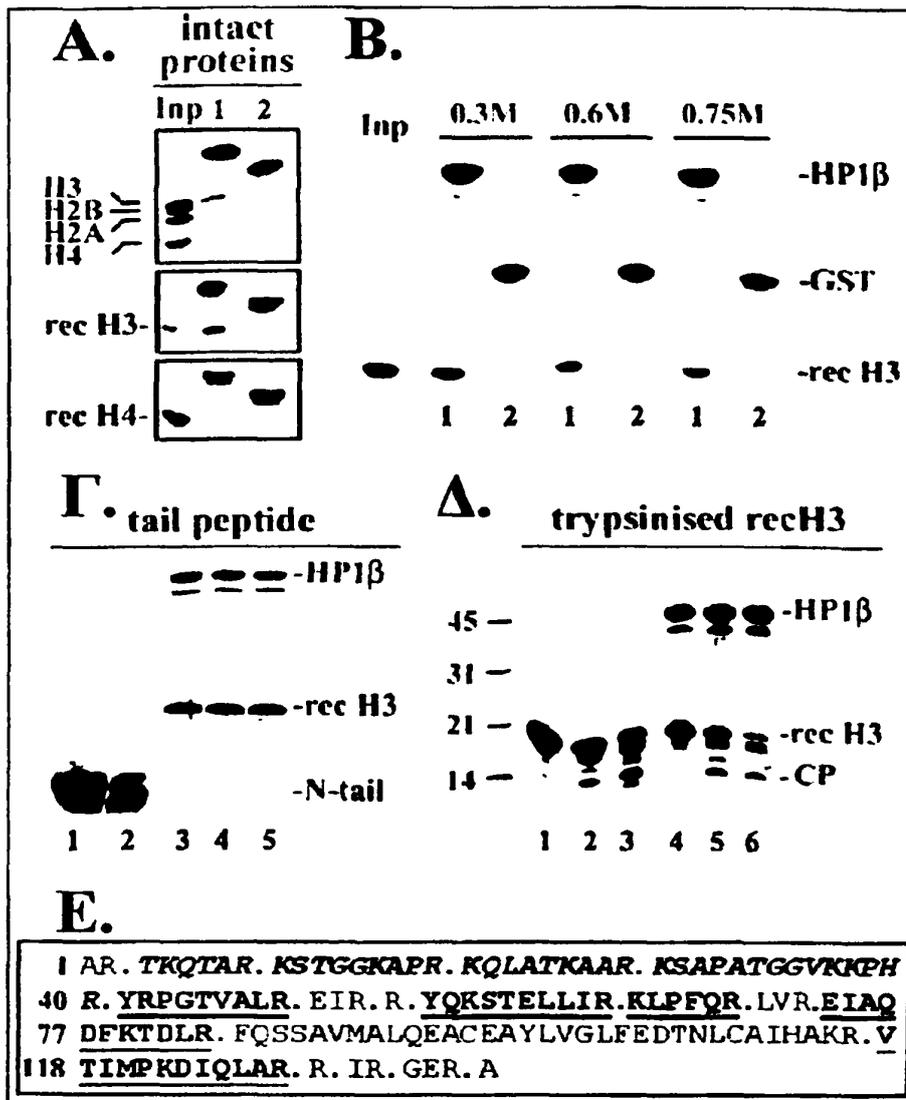
3. Αποτελέσματα

3.1 Αλληλεπιδράσεις της HP1 με απομονωμένες ιστόνες και πεπτίδια ιστονών

Για να εξετάσουμε τις αλληλεπιδράσεις της HP1 με τη χρωματίνη υποβάλλαμε την HP1 σε δοκιμασίες κατακρήμνισης (pull-down) χρησιμοποιώντας διαφορετικά παρασκευάσματα νουκλεοσωματικών ιστονών. Αρχικά δοκιμάσαμε ιστόνες που έχουν εκχυλιστεί με 0.1 M θειικού οξέος από ερυθροκύτταρα πτηνών (γαλοπούλα). Όπως φαίνεται στην Εικ. 1Α, η HP1β-GST συνδέθηκε αποκλειστικά στην ιστόνη H3, αλλά όχι στις H4, H2A, H2B. Η εκλεκτική σύνδεση της HP1β με την H3 επιβεβαιώθηκε όταν στη δοκιμή χρησιμοποιήσαμε ιστόνες H3 και H4 που είχαν παραχθεί σε βακτήρια και, ως εκ τούτου, ήταν μη τροποποιημένες (εικόνα 1B). Η σύνδεση της HP1β-GST με την απομονωμένη H3 ήταν αρκετά σταθερή, ακόμη και υπό συνθήκες υψηλής ιονικής ισχύος (0.75 M NaCl) (εικόνα 1B).

Ελέγχοντας τον ρόλο του αμινοτελικού τμήματος της H3 σε παρόμοιες δοκιμασίες, παρατηρήσαμε ότι η παρουσία ενός πεπτιδίου που αποτελείται από τα αμινοξέα 1-15 της H3 δεν επηρεάζει στο ελάχιστο τη σύνδεση της HP1β-GST στην ακέραια H3. Το ίδιο παρατηρήθηκε όταν το εν λόγω πεπτίδιο ήταν τριμεθυλιωμένο στη λυσίνη 9 (εικόνα 1Γ). Επιπλέον, δοκιμάζοντας μερικώς πρωτεολυμένη H3 που προηγουμένως είχαμε περικόψει με θρυψίνη παρατηρήσαμε ότι η HP1β-GST συνδέεται με το μεσαίο τμήμα της πρωτεΐνης (CP, core peptide) στον ίδιο βαθμό που συνδέεται με την πλήρους μήκους H3 (εικόνα 1Δ και 1Ε). Οι παραπάνω παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι σε *in vitro* συνθήκες η HP1β συνδέεται με την H3 κυρίως διαμέσου του μεσαίου τμήματός της όχι διαμέσου της αμινοτελικής περιοχής («ουρά»). Επιπλέον, η σύνδεση της HP1β με H3 βακτηριακής προελεύσεως δείχνει ότι οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις δεν είναι απαραίτητες για την παραπάνω σύνδεση υπό *in vitro* συνθήκες.





Εικόνα 1. Σύνδεση της HP1 σε απομονωμένες ιστόνες και ιστονικά πεπτιδια. (Α) Το υλικό που συγκατακρημνίζεται με την HP1β (διαδρομή 1), ή GST (διαδρομή 2) κατόπιν συνεπώσεως με μείγμα ιστονών από ερυθροκύτταρα γαλοπούλας, ανασυνδυασμένη H3 (rH3) ή ανασυνδυασμένη H4 (rH4). Το (Inp) αναπαριστά το 50% του υλικού που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε δοκιμασία. (Β) Η ανασυνδυασμένη H3 που συγκατακρημνίζεται με την HP1β (διαδρομή 1) ή GST (διαδρομή 2) σε ιονική ισχύ 0.3, 0.6 και 0.75 M άλατος. Το (Inp) είναι όπως στο (Α). (Γ) Σύνδεση της ανασυνδυασμένης H3 με την HP1β παρουσία (σε περίσσεια 200 φορές) μη τροποποιημένου (διαδρομή 3) ή τρι-μεθυλιωμένου στην λυσίνη 9 (διαδρομή 4) αμινοτελικού πεπτιδίου της H3 (αμινοξέα 1-15) ή διαλύματος (διαδρομή 5). Το ηλεκτροφορητικό προφίλ των μη-τροποποιημένων και τρι-μεθυλιωμένων πεπτιδίων απεικονίζεται στις διαδρομές 1 και 2, αντίστοιχα. Η HP1β, η ανασυνδυασμένη H3 καθώς και τα πεπτιδια (N-tail) που συγκατακρημνίζονται επισημαίνονται. (Δ) Πέψη της ανασυνδυασμένης H3 με θρυψίνη για 0 (διαδρομή 1), 2 (διαδρομή 2) και 10 λεπτά (διαδρομή 3), ενώ στις διαδρομές 4-6 απεικονίζεται το προϊόν καθεμίας από τις παραπάνω πέψεις που συγκατακρημνίζεται με την HP1β. Το πεπτιδιο που αντιστοιχεί στο μεσαίο τμήμα της H3 (CP), καθώς και η πλήρους μήκους πρωτεΐνη υποδεικνύονται. Η διαδρομή στα αριστερά απεικονίζει τους δείκτες μοριακών βαρών (σε kDa). (Ε) Η αλληλουχία του πεπτιδίου CP, όπως ανιχνεύεται με φασματοσκοπία μάζας. Με τονισμένους χαρακτήρες απεικονίζονται οι αλληλουχίες που αναμένεται να εμφανίζουν διακριτές κορυφές, ενώ πολύ μικρά ή μεγάλα προϊόντα (για να ανάλυθούν με MALDI-TOF) αποδίδονται με κανονικούς χαρακτήρες. Με υπογραμμισμένους χαρακτήρες απεικονίζονται τα πεπτιδια που ανιχνεύθηκαν. Η πέψη της πρωτεΐνης έχει γίνει με πρωτεάση που κόβει κατάλοιπα αργινίνης, ενώ η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα Mascot Search.

3.2 Αλληλεπιδράσεις της HP1 με μονονουκλεοσώματα και συστοιχίες νουκλεοσωμάτων

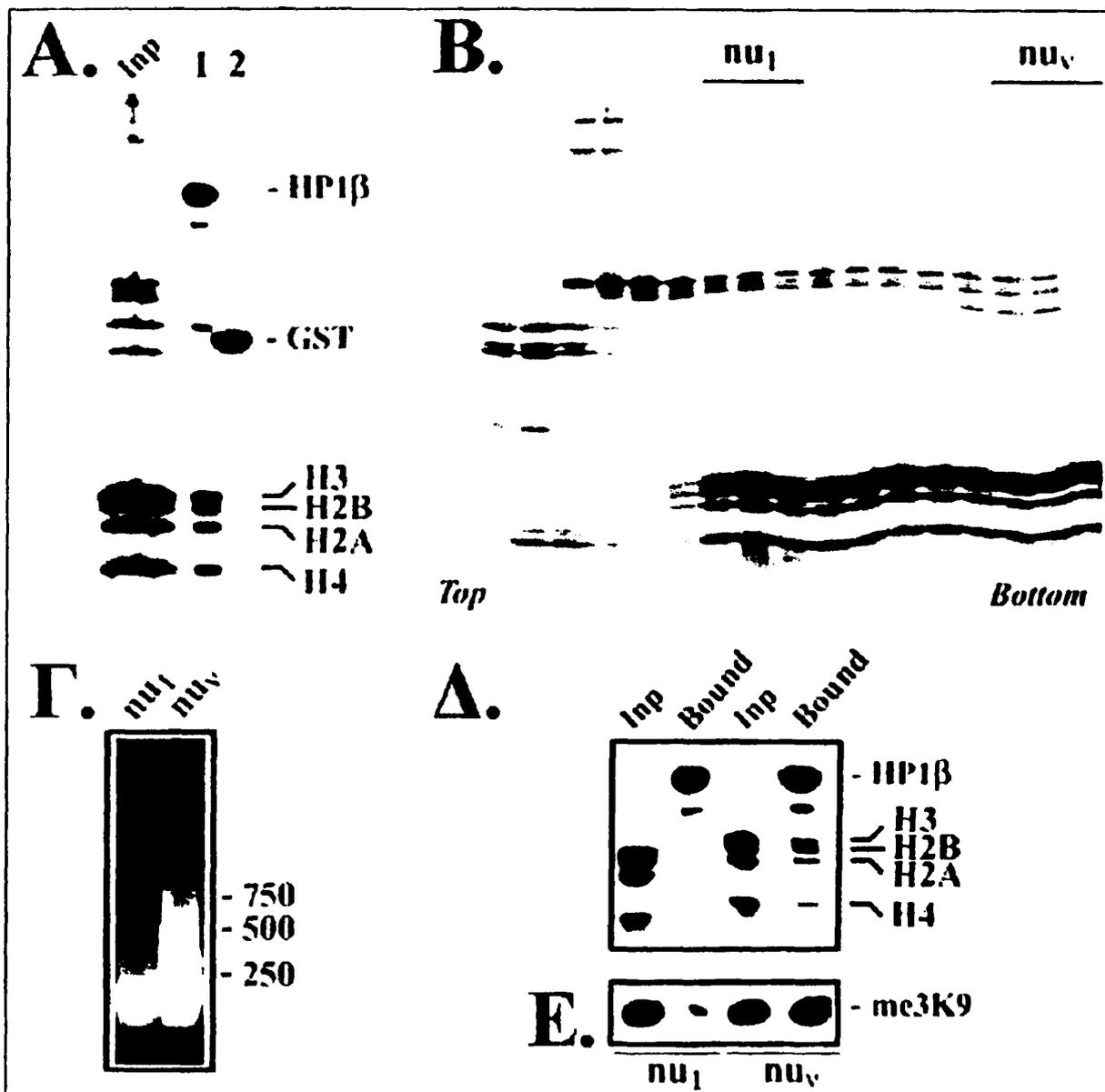
Αφού ολοκληρώσαμε τη μελέτη της σύνδεσης HP1β με απομονωμένες ιστόνες, στη συνέχεια μελετήσαμε τις αλληλεπιδράσεις της ίδιας ισομορφής με τεμάχια φυσικής χρωματίνης. Νουκλεοσωματικά κλάσματα παραλήφθηκαν από ολικό παρασκεύασμα χρωματίνης, δηλαδή υλικό που προκύπτει με πέψη των πυρήνων από ερυθροκύτταρα γαλοπούλας (που βρίσκονται στη φάση G_0) με το ένζυμο μικροκοκκική νουκλεάση (MNase). Χρησιμοποιώντας το ολικό χρωματινικό παρασκεύασμα παρατηρήσαμε ότι και οι τέσσερις νουκλεοσωματικές ιστόνες συγκατακρημνίζονται με την HP1β σε στοιχειομετρικές ποσότητες (εικόνα 2A). Το παρασκεύασμα αυτό περιέχει μονονουκλεοσώματα καθώς και συστοιχίες νουκλεοσωμάτων ποικίλου μεγέθους, όπως φαίνεται στην εικόνα 2Γ. Το χρωματινικό υλικό μπορεί να αναλυθεί περαιτέρω με κλασμάτωση σε βαθμίδωση σουκρόζης (εικόνα 2B). Σε δοκιμές κατακρήμνισης παρατηρήθηκε ότι η HP1β δεν συνδέεται με μονονουκλεοσώματα (mu_1), ενώ συνδέεται με συστοιχίες νουκλεοσωμάτων (mu_n) (εικόνα 2Δ). Η σύνδεση της HP1β με ολιγονουκλεοσωματικές συστοιχίες είναι σταθερή ανεξαρτήτως ιονικής ισχύος (σε 0.3 και 0.6 M NaCl). Ακόμη, δεν φαίνεται να υπάρχει διαφορά στο βαθμό της τριμεθυλίωσης της H3 στη λυσίνη 9 μεταξύ μονο- και ολιγο- νουκλεοσωματικών παρασκευασμάτων που να ερμηνεύει την εκλεκτική σύνδεση της HP1β στα ολιγονουκλεοσώματα (εικόνα 2E).

Σε επόμενη φάση παρασκευάσαμε χρωματίνη από κύτταρα συγχρονισμένα στη φάση της αντιγραφής του DNA (S-phase). Στη συγκεκριμένη παρασκευή περιέχονται, εκτός των μονο-/ολιγο- νουκλεοσωμάτων, υπονουκλεοσωματικά θραύσματα (Chang et al., 1997; Gruss et al., 1993). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιελάμβανε τα εξής: Μετά τον συγχρονισμό των κυττάρων με θυμιδίνη στο όριο των φάσεων G1/S, το φάρμακο απομακρύνθηκε και τα κύτταρα συλλέχθηκαν στο μέσο της S φάσης (7 ώρες μετά) (εικόνα 3A, ένθετο). Ακολουθώντας το σχήμα που περιγράφεται διαγραμματικά στην εικόνα 3A παραλάβαμε το κλάσμα F1 που αντιπροσωπεύει διαλυτό υλικό, καθώς και τα κλάσματα F2 και F3, που αντιπροσωπεύουν ευχρωματινικό και ετεροχρωματινικό υλικό, αντίστοιχα.

Σε δοκιμασίες κατακρήμνισης με το κλάσμα F1 η HP1β συνδέθηκε με ακέραια νουκλεοσώματα παρουσία 0.3 M άλατος (εικόνα 3B). Σε υψηλή ιονική ισχύ (0.6 M NaCl) η HP1β συνδέθηκε με

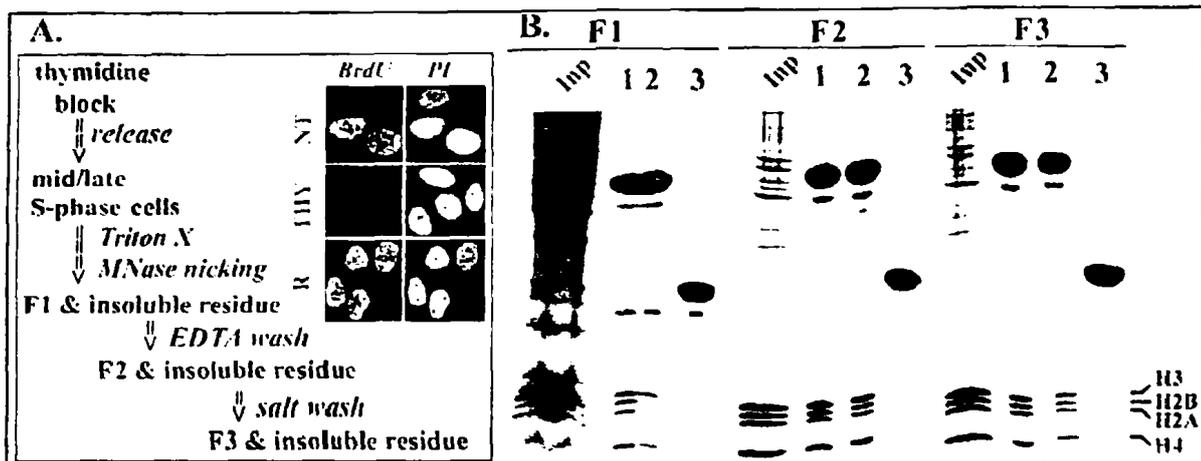


ακέρατα νουκλεοσώματα καθώς και με υπονουκλεοσωματικά θραύσματα H3/H4. Χρησιμοποιώντας τα κλάσματα F2, F3 στις αντίστοιχες δοκιμασίες παρατηρήσαμε ότι και στις



Εικόνα 2. Σύνδεση της HP1 με μονο- και oligo- νουκλεοσώματα. (A) Σύνδεση της HP1 με ολική χρωματινή που προκύπτει μετά από πέψη πυρήνων ερυθροκυττάρων γαλοπούλας με MNase. Υλικό που συγκατακρημνίζεται με την HP1β σε 0.3 M άλατος (διαδρομή 1) και την GST (διαδρομή 2). (*Imp*): Μέρος του υλικού (20%) που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε δοκιμασία. (B) Κλασμάτωση του υλικού που χρησιμοποιείται στο (A) σε βαθμίδωση συγκρότησης 10-30%. Υποδεικνύονται τα κλάσματα που περιέχουν μονο- και oligo-νουκλεοσώματα (*nu₁*) και (*nu_v*), αντίστοιχα. (C) Ηλεκτροφορητικό προφύλ. του DNA των κλασμάτων (*nu₁*) και (*nu_v*), αντίστοιχα. Δεξιά υποδεικνύονται τα μεγέθη σε ζεύγη βάσεων (bp). (D) Δοκιμές pull-down με επιλεγμένα κλάσματα από βαθμίδωση συγκρότησης. Σε κάθε περίπτωση στο *Imp* αντιπροσωπεύει μέρος του υλικού (20%) που χρησιμοποιείται σε κάθε πείραμα, ενώ το υλικό που συγκατακρημνίζεται με την HP1β υποδεικνύεται με το *Bound*. (E) Ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα έναντι στην τριμεθυλωμένη λυσίνη 9 στα δείγματα που απεικονίζονται στο (D).





Εικόνα 3. Σύνδεση της HP1β με κλάσματα χρωματινής κυττάρων που βρίσκονται στην S φάση. (Α) Διαγραμματική αναπαράσταση του πειραματικού σχήματος που ακολουθήθηκε για την απομόνωση των χρωματινικών κλασμάτων. Στο ένθετο απεικονίζονται κύτταρα HeLa μετά από χρώση με αντίσωμα έναντι της βρομο-δεοξυ-ουριδίνης (*BrdU*) και ιωδιούχο προπιδίο (*PI*), πριν το συγχρονισμό (*NT*), μετά από διατήρηση αναστολή με θυμιδίνη (*THI*), καθώς και 7 ώρες μετά την απελευθέρωση από την αναστολή (*R*). (Β) Σύνδεση της HP1β με νουκλεοσώματα που προέρχονται από HeLa κύτταρα που βρίσκονται στην S-φάση. Στις διαδρομές 1 και 2, απεικονίζεται το υλικό που συγκατακρημνίζεται με την HP1β σε συγκέντρωση άλατος 0.3 M και 0.6 M, αντίστοιχα, ενώ στην διαδρομή 3 το δείγμα-μαρτυρας με GST (σε συγκέντρωση άλατος 0.3 M). Το *Imp* αντιπροσωπεύει το 20% του υλικού που χρησιμοποιείται σε κάθε δοκιμή. Τα κλάσματα *F1*, *F2* και *F3* ανταποκρίνονται στην παρασκευή χρωματινικού υλικού μετά από διαδοχική διαλύτοποίηση με Triton X-100, EDTA και 0.3 M άλατος.

δύο συγκεντρώσεις άλατος (0.3 M, 0.6 M) η HP1β συγκατακρημνίστηκε και με τις τέσσερις ιστόνες. Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων συμπεραίνουμε ότι στο κλάσμα *F1* περιέχονται κυρίως νεοσυντιθέντα ή διασπασμένα νουκλεοσώματα, καθώς και υπονουκλεοσωματικά θραύσματα, ενώ στα κλάσματα *F2* και *F3* περιέχονται νουκλεοσώματα, ευχρωματικής και ετεροχρωματινικής προέλευσης, αντίστοιχα.

3.3 Αλληλεπιδράσεις της HP1 με ακέραια νουκλεοσωμικά σωματίδια (particles) και υποσωματίδια (subparticles) ετεροχρωματινικής προέλευσης

Συνδυάζοντας τα παραπάνω αποτελέσματα είναι εύκολο να συμπεράνουμε ότι η HP1β συνδέεται με ολιγονουκλεοσώματα και υπονουκλεοσωματικά θραύσματα που προέρχονται από χρωματίνη που βρίσκεται στην S φάση, αλλά δεν συνδέεται με μονονουκλεοσώματα από χρωματίνη που βρίσκεται στην G_0 φάση. Διερευνώντας περαιτέρω τις αλληλεπιδράσεις της HP1 με

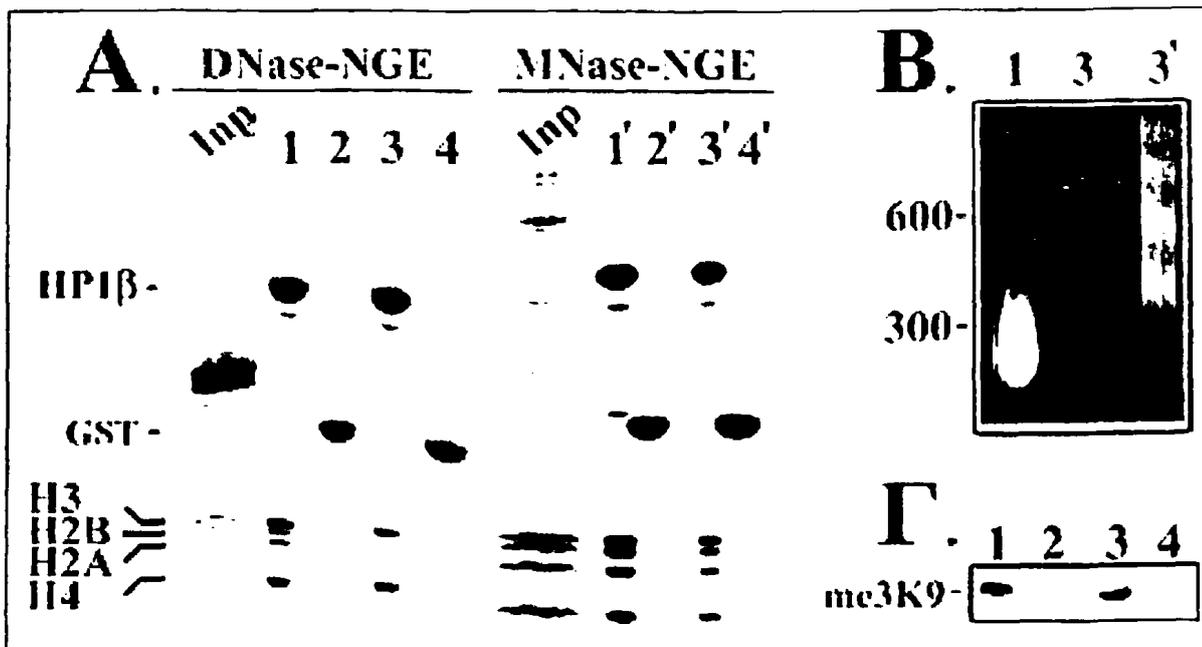
την χρωματίνη επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε ως υπόστρωμα περιφερική ετεροχρωματίνη, η οποία περιέχει νουκλεοσώματα εμπλουτισμένα σε H3 που είναι τριμεθυλωμένη στη λυσίνη 9. Η περιφερική ετεροχρωματίνη παρασκευάζεται εκχυλίζοντας πυρηνικά φαντάσματα (NGs, nuclear ghosts) με 0.3 M NaCl, ώστε να απελευθερωθούν οι περιοχές της ετεροχρωματίνης που βρίσκονται σε επαφή με τον πυρηνικό φάκελο. Τα πυρηνικά φαντάσματα έχουν προέλθει από πυρήνες ερυθροκυττάρων γαλοπούλας με εξαντλητική πέψη με DNase I (ή εναλλακτικά MNase) (DNase-NGEs/MNase-NGEs) και επεξεργασία με υπέρηχους.

Σε δοκιμασίες κατακρήμνισης με χρωματινικά παρασκευάσματα από DNase-NGEs υπό διαφορετικές συνθήκες ιονικής ισχύος, προκύπτει ένα χαρακτηριστικό και επαναλαμβανόμενο πρότυπο σύνδεσης στην HP1β. Σε 0.3 M άλατος, η HP1β συγκατακρημνίζεται με τις τέσσερις νουκλεοσωματικές ιστόνες και τμήματα 100-250 bp νουκλεοσωματικού DNA (εικόνα 4A και 4B, διαδρομή 1). Η αναλογία μεταξύ των τεσσάρων ιστονών δεν είναι ίδια, αλλά οι ιστόνες H3, H4 απαντώνται σε ελαφρά μεγαλύτερο ποσοστό. Η «προτίμηση» αυτή έγινε πιο σαφής όταν το πείραμα επαναλείφθηκε σε 0.6 M άλατος, οπότε η HP1β συνδέθηκε αποκλειστικά με σωματίδια H3/H4 τα οποία είναι ελεύθερα νουκλεοσωματικού DNA (εικόνα 4A και 4B, διαδρομή 3). Το υλικό που συγκατακρημνίζεται με την HP1β σε αλατότητα 0.3 και 0.6 M δεν διαφέρει στον βαθμό της τριμεθυλίωσης της λυσίνης 9 (εικόνα 4Γ), άρα μια πιθανή ερμηνεία είναι ότι η HP1β συνδέεται ισχυρότερα με τα υποσωματίδια H3/H4 παρά με ακέραια νουκλεοσώματα.

Το χαρακτηριστικό πρότυπο που περιγράφηκε παραπάνω δεν παρατηρήθηκε όταν το εκχύλισμα περιείχε μεγαλύτερα σωματίδια. Μετά από πέψη του ετεροχρωματινικού υλικού με MNase παραλήφθηκαν ολιγο- και πολυ- νουκλεοσώματα, ενώ με χρήση DNase I παραλήφθηκαν μονονουκλεοσώματα και υπονουκλεοσωματικά θραύσματα, επειδή η MNase είναι πολύ λιγότερο «επιθετική» ως νουκλεάση συγκριτικά με την DNase I. Όταν ελέγχθηκαν εκχυλίσματα από MNase-NGEs υπό διαφορετικές συνθήκες ιονικής ισχύος, η HP1β συγκατακρημνίστηκε και με τις τέσσερις νουκλεοσωματικές ιστόνες, ακόμη και σε 0.6 M άλατος. Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεράναμε ότι η αυξημένη συγκέντρωση άλατος δεν προκαλεί αποδιάταξη του ιστονικού οκταμερούς, όταν σε αυτό είναι περιτυλιγμένο το DNA.

Φαίνεται ότι στην περίπτωση που το νουκλεοσωμικό DNA έχει κοπεί σε πολλά σημεία, τότε το οκταμερές έχει μειωμένη σταθερότητα, η οποία γίνεται ακόμα μικρότερη παρουσία άλατος. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι το διμερές H2A/H2B διαχωρίζεται από το τετραμερές H3/H4, ενώ





Εικόνα 4. Σύνδεση της HP1 με υπονουκλεοσωματικά θραύσματα. (Α) Η HP1 συγκατακρημνίζεται με τμήματα περιφερικής ετεροχρωματινής που προκύπτουν από εκχύλιση πυρήνων μετά από πέψη με νουκλεάση (πυρήνικά φαντάσματα). Στις διαδρομές 1/1' και 3/3' απεικονίζεται το υλικό που συγκατακρημνίζεται με την HP1β 0.3 και 0.6 M NaCl, αντίστοιχα, ενώ στις διαδρομές 2/2' και 4/4' φαίνονται οι αντίστοιχες δοκιμασίες ελέγχου με GST. Το *Imp* αναπαριστά το 20% του υλικού που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε δοκιμή. Η ομάδα δειγμάτων *DNase-NGE* ανταποκρίνεται στα δείγματα που έχει χρησιμοποιηθεί εκχύλιση από πυρήνες που έχουν υποστεί πέψη με DNase I, ενώ η ομάδα των *MNase-NGE* σε εκχυλίσματα από πυρήνες που έχουν υποστεί πέψη με MNase (για περισσότερες λεπτομέρειες βλέπε Ενότητα 4.3). (Β) Το DNA που συγκατακρημνίζεται με την HP1β και τις ιστόνες στο πείραμα που παρουσιάζεται στην Εικ. 4.1. Δείκτες μοριακών βαρών (σε kbp) απεικονίζονται στα αριστερά. (Γ) Ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα έναντι της τριμεθυλιωμένης λυσίνης 9. Οι διαδρομές αντιστοιχούν σε εκείνες της εικόνας 4.1.

παράλληλα το DNA αποσυνδέεται από το οκταμερές σε συγκέντρωση άλατος μεταξύ 0.5-1.0 M. Η αποσταθεροποίηση που προκαλεί η υψηλή ιονική ισχύς εξαρτάται επιπλέον και από την συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου καθώς και από την αρχική συγκέντρωση των νουκλεοσωμάτων (144, 172-175). Για να διερευνήσουμε ότι τα υποσωματίδια προϋπήρχαν στο εκχύλισμα, προχωρήσαμε σε κλασμάτωση του εκχυλίσματος από DNase-NGE σε βαθμίδωση σουκρόζης και αλατότητα 0.3 M (εικόνα 5Α-Γ). Σε δοκιμασίες κατακρήμνισης με χαμηλής πυκνότητας κλάσματα (π.χ. *fr7*, κλάσμα 7) η HP1β συνδέθηκε αποκλειστικά στα υποσωματίδια H3/H4 και στις δυο συνθήκες (0.3 και 0.6 M NaCl) (εικόνα 5Δ). Ελέγχοντας κατά τον ίδιο τρόπο κλάσματα υψηλότερης πυκνότητας (π.χ. *fr12*, *fr19*) παρατηρήσαμε ότι αναπαράγεται το

αποτέλεσμα που προκύπτει όταν χρησιμοποιούμε ολικό εκχύλισμα που δεν έχει υποστεί κλασμάτωση σε βαθμίδωση σουκρόζης. Σε χαμηλή ιονική ισχύ συγκατακρημνίστηκαν οι τέσσερις νουκλεοσωμικές ιστόνες, ενώ σε υψηλή ιονική ισχύ μόνο οι H3/H4 (εικόνα 5Δ). Μια πιθανή ερμηνεία των παραπάνω αποτελεσμάτων παρουσιάζεται στην εικόνα 5E.

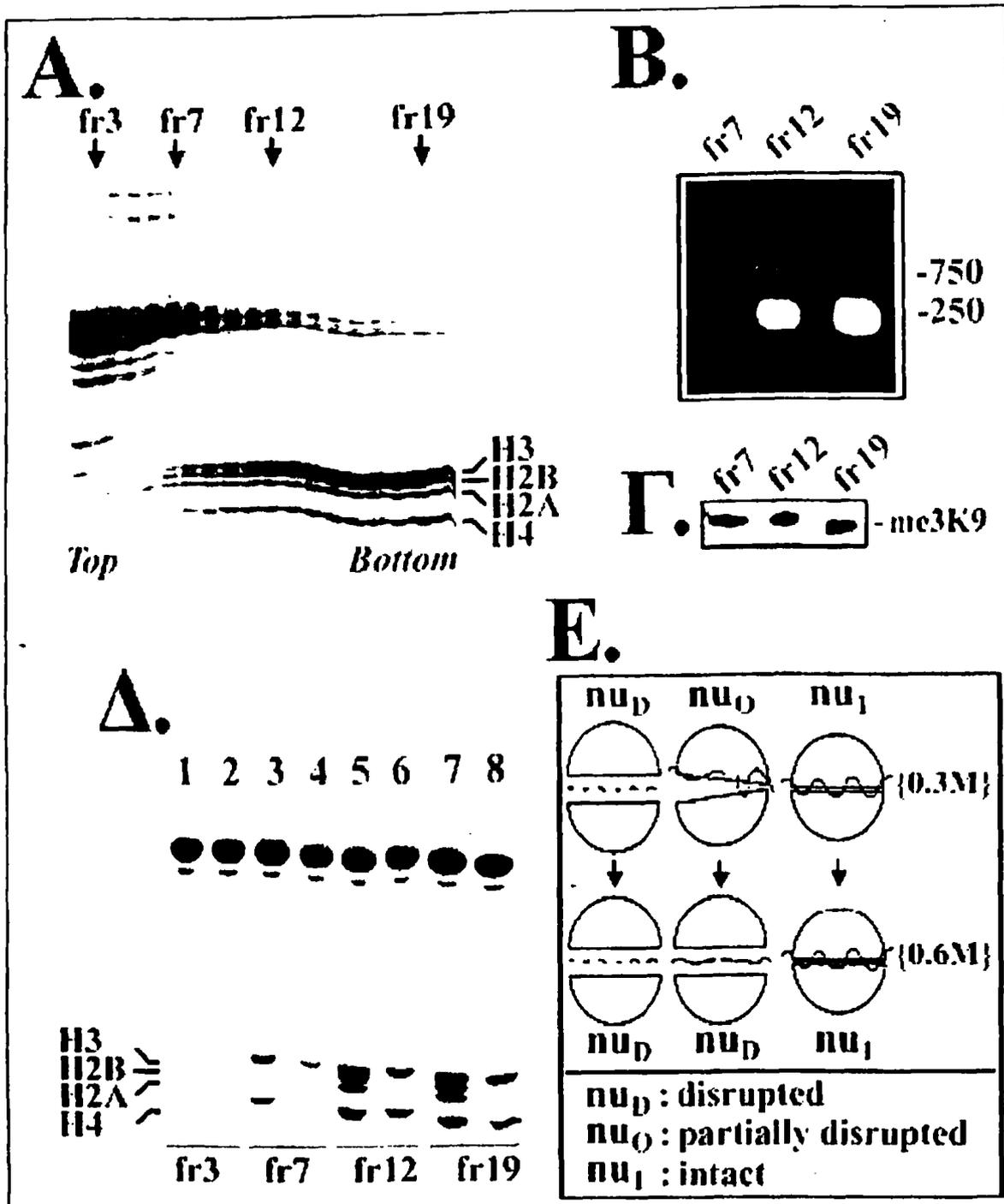
Προτείνουμε ότι κατά την παρασκευή των DNase-NGE τα μονονουκλεοσώματα απαντώνται σε τρεις διακριτές καταστάσεις:

α) Σε ακέραια μονονουκλεοσώματα (nu_1) που απαρτίζονται από το ιστονικό οκταμερές και το νουκλεοσωμικό DNA,

β) Σε διασπασμένα σωματίδια H3/H4 και H2A/H2B (nu_D), τα οποία προκύπτουν από νουκλεοσώματα των οποίων το DNA έχει κοπεί πλήρως (με αποτέλεσμα να εξασθενίσουν οι αλληλεπιδράσεις των δυο διμερών H2A/H2B με το τετραμερές H3/H4 και να προκληθεί διάσπαση του οκταμερούς), και τέλος

γ) Σε νουκλεοσώματα που είναι μερικώς ανοιγμένα (nu_O) λόγω της έλλειψης τμημάτων του νουκλεοσωμικού DNA (το οκταμερές δεν διασπάται, αλλά δεν έχει τη σταθερότητα των ακέραιων νουκλεοσωμάτων). Η HP1β δεν φαίνεται να συνδέεται με τα nu_1 , ενώ συνδέεται με τα nu_O , nu_D και νεοσυντιθέντα ή αποσταθεροποιημένα νουκλεοσώματα που υπάρχουν στην S-φάση.





Εικόνα 5. Σύνδεση της HPI με διασπασμένα νουκλεοσώματα. (Α) Κλασμάτωση του εκχυλισματος από DNAse-NGE σε βαθμίδωση συγκρότησης 10-30%. Τα κλάσματα που χρησιμοποιήθηκαν υποδεικνύονται με βέλη. (Β) και (Γ) Το ηλεκτροφορητικό πρότυπο του DNA και ανοσοοτύπωση κατά Western των κλασμάτων που έχουν υποδεικνύονται στο (Α), αντίστοιχα. Οι δείκτες μοριακών βαρών (σε bp) υποδεικνύονται στα δεξιά. (Δ) Δοκιμασίες κατακρήμνισης με τα κλάσματα που υποδεικνύονται στο (Α). Στις διαδρομές με περιττή αριθμηση φαίνονται τα δείγματα όταν το πείραμα γίνεται σε 0.3 M NaCl, ενώ στις διαδρομές με άρτια αριθμηση τα δείγματα όταν το πείραμα γίνεται σε 0.6 M NaCl. (Ε) Υποθετική διαγραμματική αναπαράσταση των σωματιδίων που περιέχονται στα εκχυλισματα που προκύπτουν από τα "πυρηνικά φαντάσματα". Το νουκλεοσωμικό DNA αναπαριστάται με διακεκομμένες ή κυματιστές γραμμές, ενώ τα H2A-H2B και H3-H4 υποσώμπλοκα απεικονίζονται ως ημικύκλια. Για περισσότερες λεπτομέριες βλέπε παράγραφο 4.3.



3.4 Ταυτοποίηση των τροποποιήσεων που απαντώνται στην H3 που συνδέεται με την HP1.

Διερευνώντας το ρόλο που διαδραματίζει η χημική σύσταση της H3 στην σύνδεσή της με την HP1β, αναλύσαμε σωματίδια H3/H4 που συνδέονται με την HP1β σε 0.6 M, καθώς και οκταμερή που συνδέονται με την HP1β σε ιονική ισχύ 0.3 M, με φασματοσκοπία μάζας (MALDI-TOF).

Σε συμφωνία με τα προηγούμενα αποτελέσματα, οι τροποποιήσεις που ανιχνεύθηκαν σε όλα τα δείγματα της H3 ήταν παρόμοιες. Ανιχνεύθηκε τριμεθυλίωση στη λυσίνη 27, η οποία συσχετίζεται με γονιδιακή αποσιώπηση μέσω του Polycomb και τριμεθυλίωση στη λυσίνη 9, η οποία ευνοεί τη στρατολόγηση της HP1 στην ετεροχρωματίνη. Μεθυλίωση στη λυσίνη 4 και η διπλή ακετυλίωση στις λυσίνες 18 και 23, που συσχετίζονται με ευχρωματινικές περιοχές, δεν ανιχνεύθηκαν. Παρ' όλα αυτά, παρατηρήθηκαν άλλες τροποποιήσεις που απαντώνται συνήθως στην ευχρωματίνη, όπως η τριμεθυλίωση στη λυσίνη 79, η ακετυλίωση στη λυσίνη 18, η ακετυλίωση στη λυσίνη 23 και η μεθυλίωση στη λυσίνη 36. Από τις τροποποιήσεις που ταυτοποιήθηκαν δεν επαληθεύεται η υπόθεση ότι ο συνδυασμός «τριμεθυλίωση στη λυσίνη 9 / μη ακετυλίωση στη λυσίνη 14 / μονομεθυλίωση στη λυσίνη 27» αποτελεί ικανή και αναγκαία συνθήκη για την στρατολόγηση της HP1 στην ετεροχρωματίνη (144, 145). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η επιλεκτική σύνδεση της HP1 με την H3 σε *in vitro* συνθήκες δεν εξαρτάται από τη χημική σύσταση της H3. Επιπλέον, από παρόμοιες αναλύσεις που έχουν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριό μας (176); Markaki et al, submitted) προκύπτει ότι οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις δεν συσχετίζονται σε απόλυτο βαθμό με την κατάσταση της χρωματίνης (ενεργού ή αποσιωπημένης).

3.5 Ενσωμάτωση της HP1 στην χρωματίνη υπό *in vivo* συνθήκες.

Οι βιοχημικές παρατηρήσεις μας έδειξαν ότι η HP1 συνδέεται με τα διάφορα νουκλεοσωματικά υποστρώματα με τρόπο ο οποίος εξαρτάται από τη φυσική κατάσταση της χρωματίνης. Η χρωματίνη και τα νουκλεοσώματα δεν είναι στατικές, αλλά δυναμικές δομές και κατά τη



διάρκεια του κυτταρικού κύκλου η φυσική τους κατάσταση μεταβάλλεται (45). Για τον λόγο αυτό, στη συνέχεια μελετήσαμε τη δυναμική οργάνωση της HP1 σε ένα κυτταρικό σύστημα, ώστε να συσχετίσουμε τις βιοχημικές παρατηρήσεις που έχουν προκύψει από τις *in vitro* δοκιμές με διαδικασίες και λειτουργίες που λαμβάνουν χώρα υπό *in vivo* συνθήκες. Για αυτόν τον σκοπό, χρησιμοποιήσαμε μεθόδους παροδικής διαμόλυνσης κυττάρων με πλασμιδιακό DNA (μικροενέσεις, μέθοδος φωσφορικού ασβεστίου και ηλεκτροδιαπύδιση) και εξετάσαμε δυο κυτταρικές σειρές ανθρώπινης προέλευσης (HeLa και MCF-7). Μετά τη διαμόλυνση ακολουθούσε παρατήρηση στο μικροσκόπιο, αφού επώαζαμε τα κύτταρα για μικρά (2-6 h) ή μεγαλύτερα (12-48 h) χρονικά διαστήματα.

Ανεξάρτητα από τη μέθοδο και το χρονικό διάστημα επώασης σε κάθε περίπτωση παρατηρούμε δύο διακριτούς φαινότυπους μεταξύ των κυττάρων που είχαν διαμολυνθεί:

i) κύτταρα με εστιακό φαινότυπο (SP, από το 'speckled') στα οποία η HP1β-GFP συγκεντρώνονταν στις θέσεις γύρω από τους πυρηνίσκους (όπου εντοπίζεται η περικεντρομεριδιακή ετεροχρωματίνη) καθώς και στην περιφέρεια του πυρήνα (περιφερική ετεροχρωματίνη) (εικόνα 6A) και

ii) κύτταρα με διάχυτο φαινότυπο (D από το 'diffuse'), στα οποία η HP1β-GFP κατανέμονταν σε όλο το πυρηνόπλασμα και σε μικρές διάσπαρτες εστίες (εικόνα 6A). Παρατηρήσαμε ότι οι δύο αυτοί φαινότυποι δεν απαντώνται σε σταθερή σχετική αναλογία, αλλά έχουν μια αντιστρόφως ανάλογη σχέση. Μετά από μικρό χρονικό διάστημα δύο ωρών ο εστιακός φαινότυπος απαντάται σε ποσοστό 30%, ενώ ο διάχυτος φαινότυπος σε ποσοστό 70%. Σε ενδιάμεσο διάστημα τεσσάρων με έξι ωρών εστιακός και ο διάχυτος φαινότυπος απαντώνται σε ποσοστό 50%, ενώ σε διάστημα εικοσιτεσσάρων ωρών ο εστιακός απαντάται σε ποσοστό 80%, ενώ ο διάχυτος σε ποσοστό 20% (εικόνα 6B).

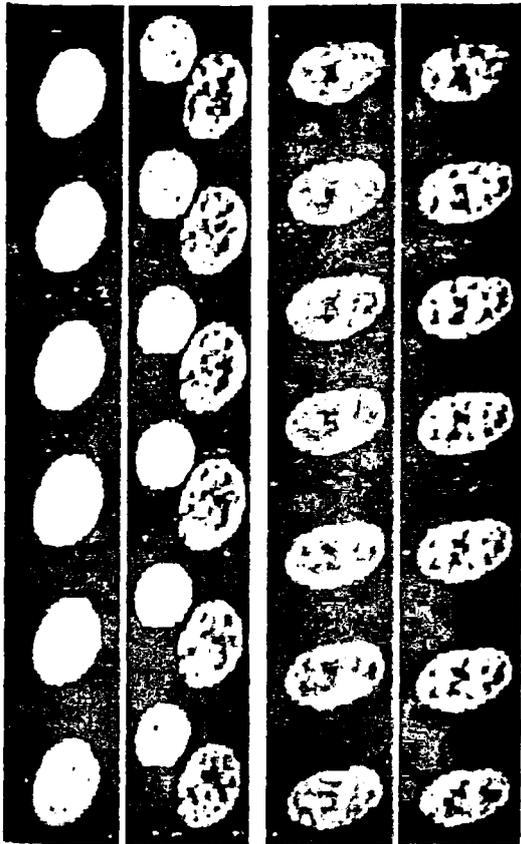
Η χρονικά εξαρτώμενη αλλαγή από το διάχυτο στον εστιακό φαινότυπο μας δημιούργησε την υπόνοια ότι η ενσωμάτωση της HP1β-GFP στις ετεροχρωματινικές εστίες μπορεί να εξαρτάται από τον κυτταρικό κύκλο. Προηγουμένως όμως έπρεπε να ελέγξουμε εάν οι φαινότυποι που παρατηρήθηκαν είναι φυσιολογικοί ή εάν η εντόπιση της HP1β-GFP είναι έκτοπη λόγω της υπερέκφρασης.

Αρχικά εξετάσαμε αν η κατανομή της HP1β-GFP συσχετίζεται με τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης καταγράφοντας την ένταση του φθορισμού της HP1β-GFP. Με βάση αυτή την

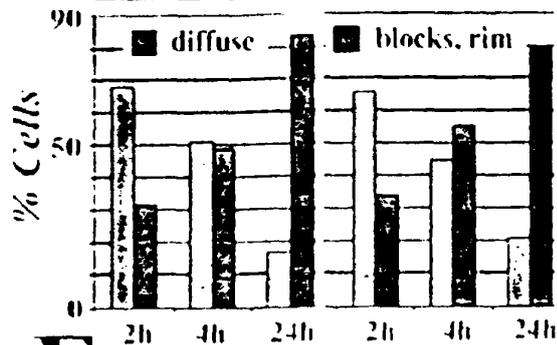


A. HP1β-gfp PI

diffuse (D) blocks, rim (SP)

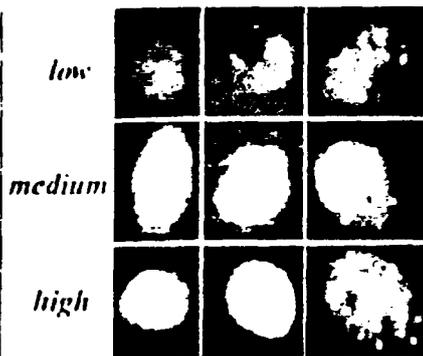


B. HeLa (n=672) MCF (n=210)



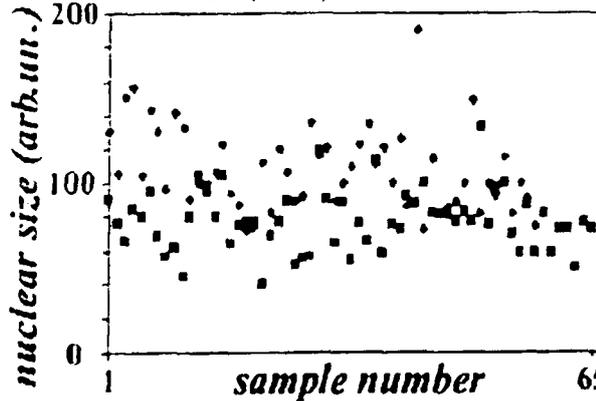
Γ.

HP1β expression



Δ.

• diffuse (n=65) • blocks, rim (n=58)



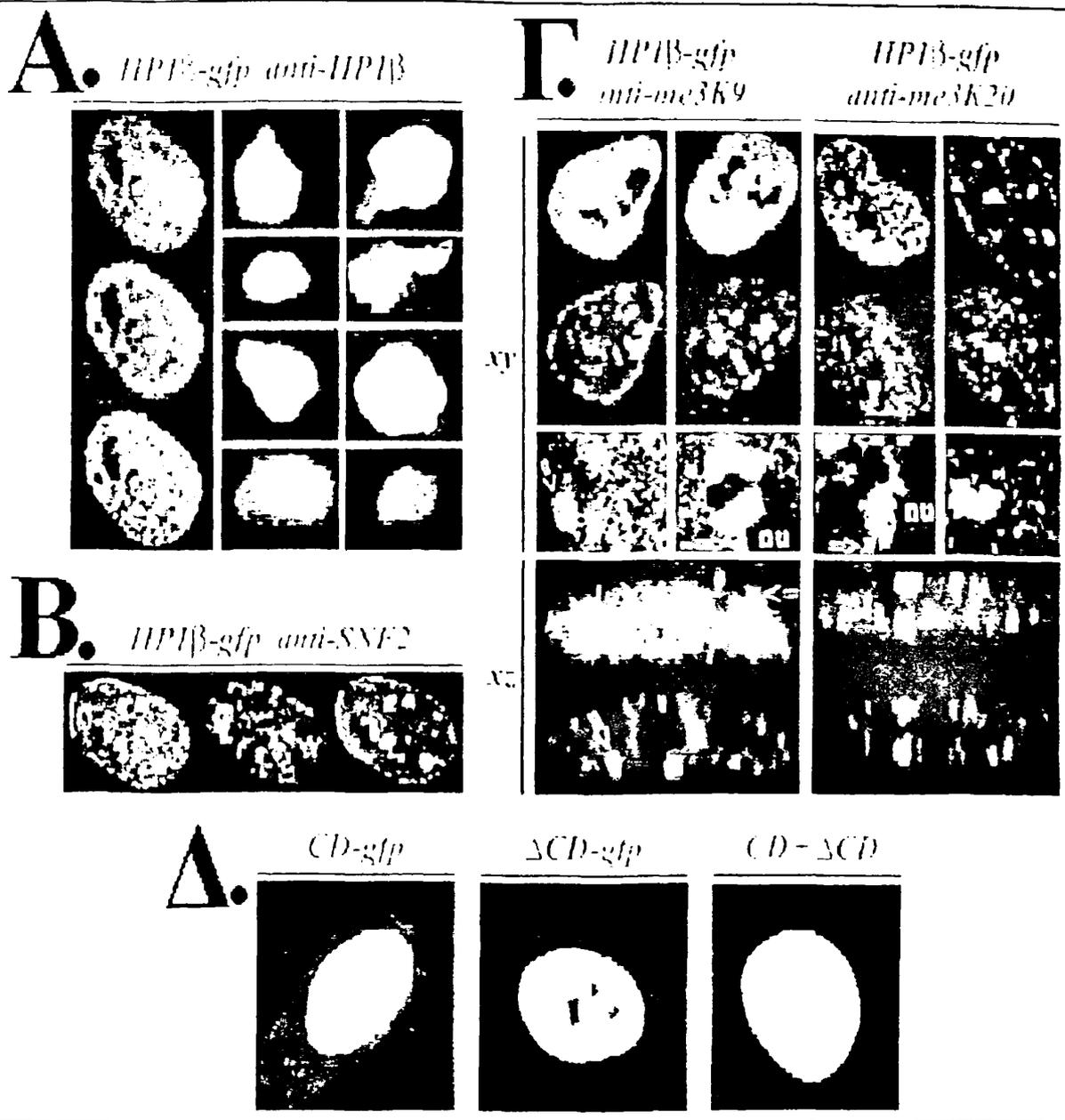
Εικόνα 6. Η *de novo* ενσωμάτωση της HP1 σε παροδικά διαμορφωμένα ανθρώπινα κύτταρα. (Α) Αντιπροσωπευτικοί φαινότυποι κυττάρων HeLa κατοπιν διαμόρφωσης με HP1β-GFP και χρώσης του πυρήνα με ιωδιούχο προπύδιο (PI). Στις στήλες απεικονίζονται διαδοχικές οπτικές τομές από συνεστιακό μικροσκόπιο. (Β) Μορφομετρική ανάλυση κυττάρων HeLa και MCF-7 κατοπιν διαμόρφωσης με το πλασμιδίο που κωδικοποιεί την HP1β-GFP. Το ποσοστό των κυττάρων που παρουσιάζουν διάχυτο ή εστιακό πρότυπο υποδεικνύεται στο ιστόγραμμα. Με *n* συμβολίζεται ο αριθμός των κυττάρων που αναλύθηκαν. (Γ) Απεικόνιση των σχετικών επιπέδων έκφρασης της HP1β-GFP σε κύτταρα που εμφανίζουν διάχυτο ή εστιακό πρότυπο κατανομής, μετά από 6-12 h επώασης (για περισσότερες λεπτομέρειες βλέπε παράγραφο 4.5). (Δ) Διαγραμματική απεικόνιση του σχετικού μεγέθους του πυρήνα διαμορφωμένων με το πλασμιδίο για την HP1β-GFP που εμφανίζουν διάχυτο ή εστιακό πρότυπο κατανομής. Με *n* συμβολίζεται ο αριθμός των κυττάρων που αναλύθηκαν (για περισσότερες λεπτομέρειες βλέπε παράγραφο 4.5).



παράμετρο, διαχωρίσαμε τα κύτταρα σε τρεις κατηγορίες (μικρή, κανονική και μεγάλη ένταση φθορισμού) και μελετήσαμε την κατανομή της φθορίζουσας πρωτεΐνης. Παρατηρήθηκε ότι ανεξάρτητα από την ένταση του φθορισμού σε κύτταρα κάθε κατηγορίας απαντώνται και οι δυο τύποι κατανομής (εικόνα 6Γ). Επίσης, παρατηρήσαμε ότι τα κύτταρα με εστιακό πρότυπο εμφανίζουν ελαφρά μεγαλύτερο πυρήνα (εικόνα 6Δ). Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήσαμε μορφομετρική ανάλυση υπολογίζοντας την αναλογία έντασης φθορισμού προς την επιφάνεια του πυρήνα και συμπεράναμε ότι το μέγεθος του πυρήνα ήταν πράγματι ελαφρά μεγαλύτερο στα κύτταρα με εστιακό πρότυπο.

Στη συνέχεια ελέγξαμε κατά πόσο η HP1β ενσωματώνεται σε ετεροχρωματικές εστίες και όχι σε έκτοπες θέσεις. Παρατηρήσαμε ότι η HP1β-GFP συνεντοπίζεται σε βαθμό άνω του 90% με την ενδογενή HP1 (εικόνα 7Α) και ετεροχρωματικούς δείκτες όπως η τριμεθυλιωμένη λυσίνη 9 στην H3 (3meK9H3) και η τριμεθυλιωμένη λυσίνη 20 στην H4 (3meK20H4) (εικόνα 7Γ). Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε συνεντόπιση με ευχρωματικούς δείκτες όπως ο SNF2 (εικόνα 7Β). Γενικά, η ενσωμάτωση της HP1β-GFP στις ετεροχρωματικές εστίες ακολουθούσε το αναμενόμενο πρότυπο. Ωστόσο, επισημάναμε κάποιες μικρές αποκλίσεις. Για παράδειγμα, η HP1β-GFP συνεντοπίζονταν με την ενδογενή HP1, όχι όμως απόλυτα με αποτέλεσμα να υπάρχουν θέσεις που απαντάται μόνο η μία εκ των δύο (εικόνα 8Α). Το ενδεχόμενο η GFP να αποτελεί ανασταλτικό στερικό παράγοντα για την HP1β-GFP δεν φαίνεται να ισχύει, αφ' ενός επειδή μεγάλο ποσοστό της HP1β-GFP εντοπίστηκε στις ίδιες θέσεις που βρίσκονταν και η ενδογενής HP1β. Αφ' ετέρου σε δοκιμασίες με την τεχνική FRAP έδειξε φυσιολογική κινητική (βλέπε παρακάτω, παράγραφο 4.6). Η HP1β-GFP επίσης δεν συνεντοπίζονταν απόλυτα με τις 3meK9H3 και 3meK20H4, γεγονός που σε συνδυασμό με τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνει ότι η ενσωμάτωση της HP1β στην χρωματίνη πιθανόν να ακολουθεί εναλλακτικά μονοπάτια, ανεξάρτητα από την παρουσία της 3meK9H3. Η παραπάνω άποψη επιβεβαιώθηκε όταν διαμολύναμε κύτταρα ανθρώπινης προέλευσης με καθεμία ξεχωριστά και μείγμα δυο μεταλλαγμένων μορφών της HP1β που αναπαριστούν τον χρωμοτομέα (CD-GFP) και το υπόλοιπο τμήμα της πρωτεΐνης (ΔCD-GFP, σκιάδη χρωμοτομέα και ενδιάμεση περιοχή). Οι δυο μεταλλαγμένες μορφές ενσωματώθηκαν ακολουθώντας το διάχυτο πρότυπο, αποτέλεσμα που δεν ήταν αναμενόμενο για την CD-GFP, η οποία διαθέτει ιδιότητες σύνδεσης με την 3meK9H3 και την χρωματίνη (147).





Εικόνα 7. Ενσωμάτωση της HPIβ-GFP σε ετεροχρωματινικές εστίες. (A) Χρώση κυττάρων που εκφράζουν HPIβ-GFP με αντίσωμα έναντι στην HPIβ. Στο δεξίο μέρος της εικόνας απεικονίζονται (σε μεγαλύτερη μεγέθυνση και αυξημένη σκίαση) ετεροχρωματινικές εστίες που παρουσιάζουν διαφορετικά προτυπα συνεντόλισης των δυο πρωτεϊνών. (B),(Γ) Χρώση κυττάρων που εκφράζουν HPIβ-GFP με αντίσωματι έναντι στον SNF-2 (anti-SNF2, ενχρωματινικός δείκτης) ή στην τριμεθυλωμένη λυσίνη 9 της H3 (anti-3meK9H3) και στην τριμεθυλωμένη λυσίνη 20 της H4 (anti-3meK20H4) (ετεροχρωματινικοί δείκτες), αντίστοιχα. Απεικονίζονται τομές που έχουν ληφθεί στους άξονες λγ και λζ. Τα βέλη επισημειώνουν εστίες όπου εντοπίζεται μοναδικό σήμα (πράσινο ή κόκκινο). Με την ένδειξη *m* επισημάνεται η περιοχή του πυρηνίσκου. Οι υπόλοιπες επισημάνσεις έχουν γίνει όπως και στις προηγούμενες εικόνες. (Δ) Το ίδιο πείραμα όπως στο (A) χρησιμοποιώντας πλασμιδικές κατασκευές δυο μεταλλαγμένων μορφών της HPIβ, την CD-GFP (chromodomain) (αμινοξέα 1-70) που απαρτίζουν τον χρομοτομέα και την ΔCD-GFP (αμινοξέα 69-185) που απαρτίζουν τον σκιδώδη χρομοτομέα και την ενδιάμεση συνδετική περιοχή.



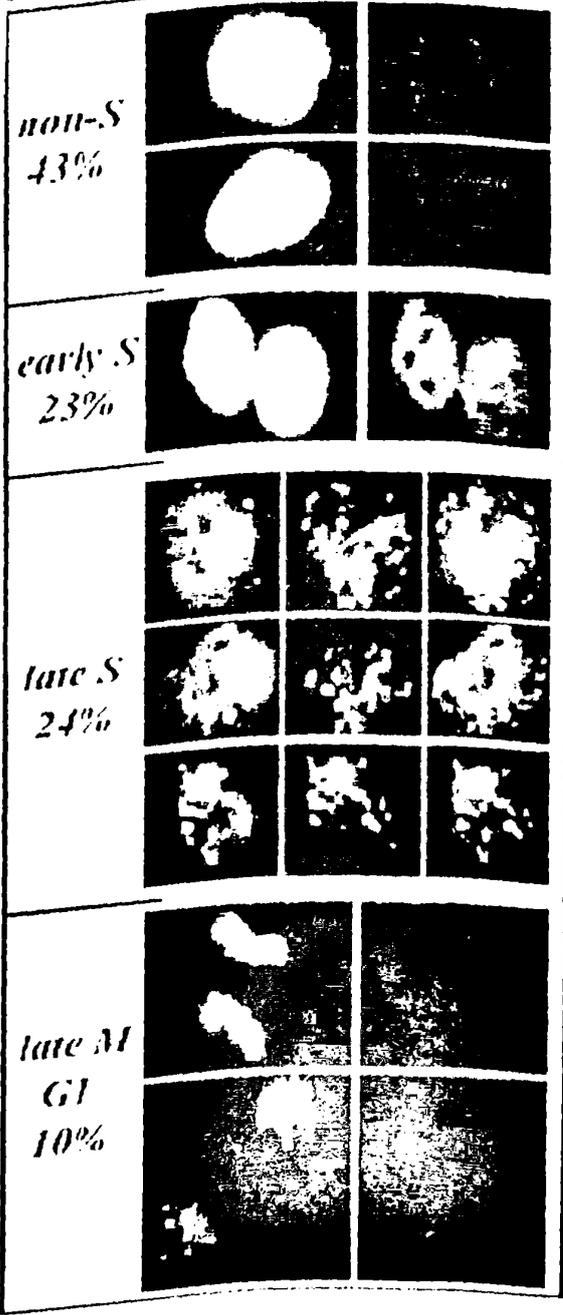
3.6 Η ενσωμάτωση της HP1β στην ετεροχρωματίνη εξαρτάται από τον κυτταρικό κύκλο.

Η διαφορά που παρατηρήσαμε παραπάνω στο μέγεθος των πυρήνων μεταξύ των κυττάρων με διάχυτο και εστιακό πρότυπο κατανομής πιθανόν να υποδηλώνει ότι βρίσκονται σε διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου, καθώς το μέγεθος του πυρήνα αυξάνει κατά τη μετάβαση από την G₁ φάση στην G₂. Για να ελέγξουμε το ενδεχόμενο αυτό σε κύτταρα ανθρώπινης προέλευσης εισάγαμε ταυτόχρονα (με μικροένεση) το πλασμίδιο για την HP1β-GFP και το ανάλογο βάσης Cy3-dUTP. Στη συνέχεια, μετά από έξι ώρες αναλύουμε μορφολογικά τα κύτταρα. Όπως διακρίνουμε στην εικόνα 8A, τα κύτταρα που εμφανίζουν διάχυτο πρότυπο κατανομής για την HP1β-GFP στις περισσότερες περιπτώσεις δεν έχουν ενσωματώσει το ανάλογο Cy3-dUTP, βρίσκονται δηλαδή εκτός της S φάσης. Σε κάποιες περιπτώσεις κυττάρων με διάχυτο φαινότυπο για την HP1β-GFP και ταυτόχρονη ενσωμάτωση του αναλόγου Cy3-dUTP, το πρότυπο κατανομής του Cy3-dUTP αντιστοιχεί σε ευχρωματικές περιοχές οι οποίες αντιγράφονται νωρίς στην S φάση. Τα κύτταρα που εμφανίζουν εστιακή κατανομή για την HP1β-GFP σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις έχουν ενσωματώσει το Cy3-dUTP στις θέσεις που αντιστοιχούν στην ετεροχρωματίνη, οι οποίες αντιγράφονται στο τέλος της S φάσης. Τα κύτταρα με εστιακό φαινότυπο για την HP1β-GFP που το Cy3-dUTP δεν ενσωματώνεται, μόλις έχουν ολοκληρώσει την μίτωση (π.χ. τα κύτταρα που βρίσκονται ανά ζεύγη κατά την τελόφαση ή νωρίς στην G₁). Η HP1β-GFP και το Cy3-dUTP, δεν συνεντοπίζονται απόλυτα (εικόνα 8A), λόγω του ότι το ανάλογο αμέσως μετά την εισαγωγή του στο κύτταρο ενσωματώνεται στις εστίες που αντιγράφονται εκείνη τη στιγμή, ενώ η σύνθεση της HP1β-GFP υστερεί. Τα παραπάνω αποτελέσματα επαληθεύτηκαν όταν παρακολουθήσαμε την ενσωμάτωση της HP1β-GFP σε σχέση με την ενσωμάτωση της βρωμοδεοξουριδίνης (BrdU). Σε αυτή την περίπτωση τα κύτταρα εξετάστηκαν 18 ώρες μετά την διαμόλυνση με την HP1β-GFP και 30 λεπτά μετά την επώαση με το ανάλογο βάσης. Αν και ο αριθμός των κυττάρων που ελέγχθηκαν με αυτή τη μέθοδο ήταν πιο μικρός (για καθαρά τεχνικούς λόγους), το αποτέλεσμα ήταν βασικά το ίδιο (εικόνα 8B).

Από αυτά τα πειράματα προκύπτει ότι η ενσωμάτωση της HP1β-GFP εξαρτάται από τον κυτταρικό κύκλο. Το 'χρονικό παράθυρο' που πληρούνται οι προϋποθέσεις ενσωμάτωσης της

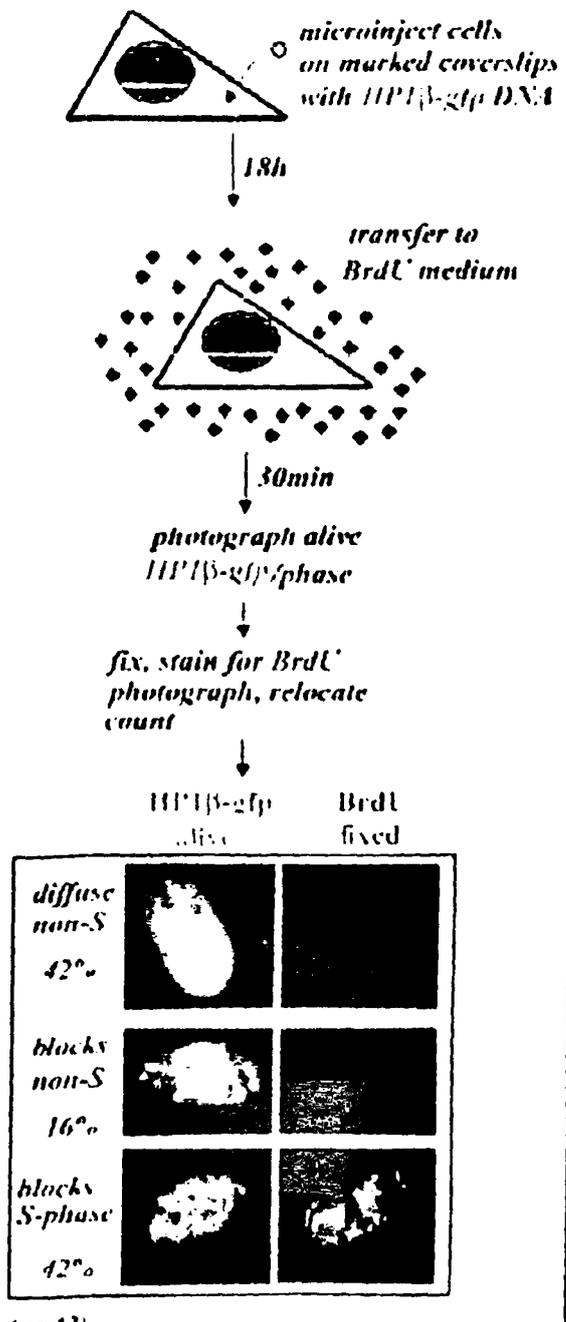


A. *HP1β-gfp* *Cy3-dUTP*



(n=210)

B.



(n=43)

Εικόνα 8. Η ενσωμάτωση της HP1 στην επροχρωματινή εξαρτάται από τον κυτταρικό κύκλο. (Α) Πρότυπα φθορισμού κυττάρων ανθρώπινης προέλευσης 6 ώρες μετά από ταυτόχρονη μικροέγχυση του πλυσμιδίου για την HP1β-GFP και του αναλόγου βύσης Cy3-dUTP. Κάθε φαινόμενο απαντάται στο ποσοστό που υποδεικνύεται στο αριστερό μέρος της εικόνας. (Β) Καταγραφή των κυττάρων που έχουν διημιολανθεί με HP1β-GFP (18 ώρες μετά τη διημιολανση) και έχουν ενσωματώσει BrdU (μετά από επίωση μισής ώρας), όπως περιγράφεται στο σχήμα. Το ποσοστό στο οποίο απαντάται κάθε φαινόμενο υποδεικνύεται στο αριστερό μέρος της εικόνας. (Με *n* συμβολίζεται ο αριθμός των κυττάρων που αναλύθηκαν).



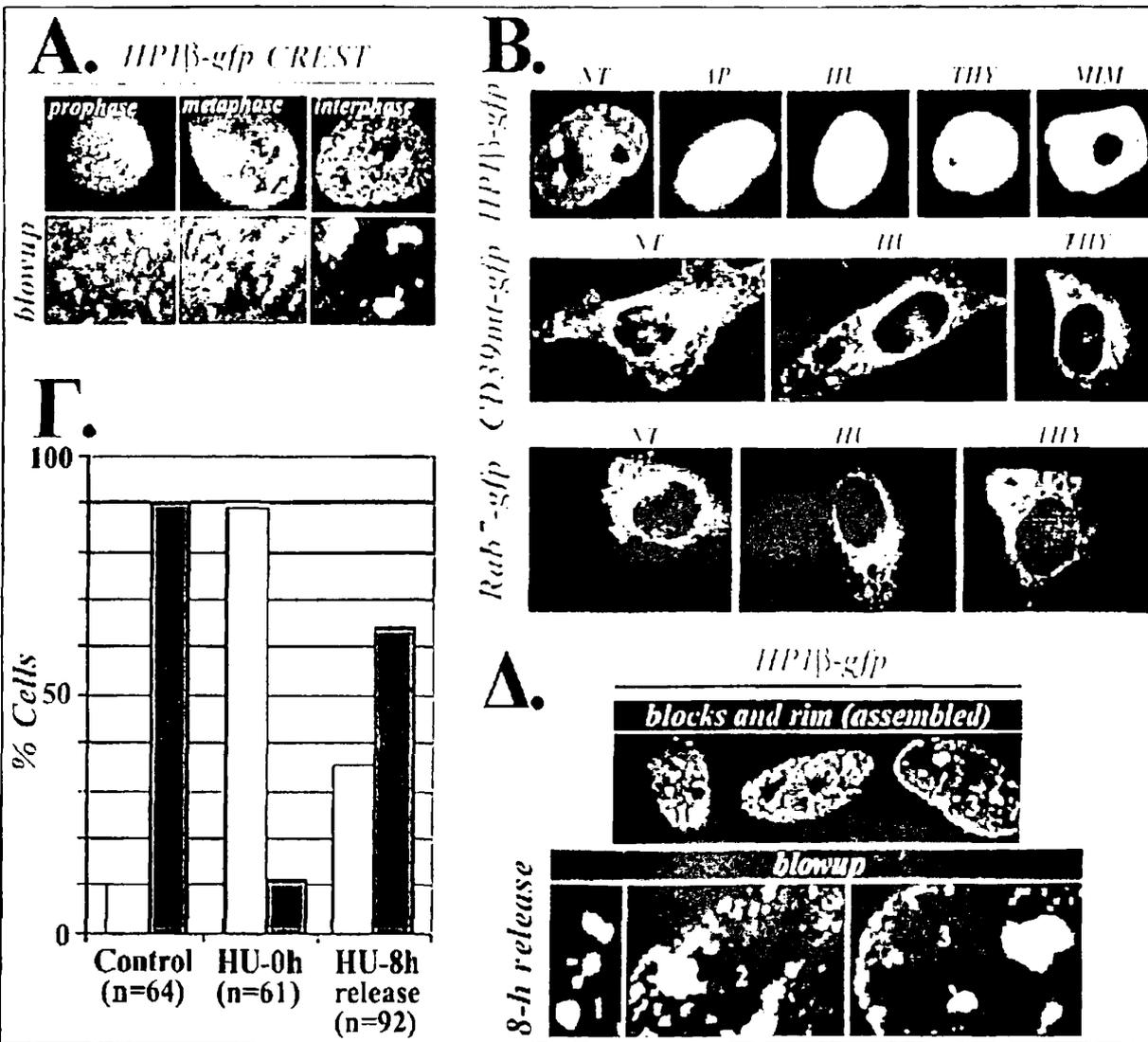
HP1 βρίσκεται σε δυο σημεία του κυτταρικού κύκλου, κατά το τέλος της S φάσης (όπου αντιγράφονται οι ετεροχρωματινικές εστίες) και κατά την ολοκλήρωση της μίτωσης. Η HP1β-GFP, όπως και η ενδογενής HP1, αποσυνδέεται από τη χρωματίνη κατά την πρώιμη πρόφαση και επανέρχεται στις ετεροχρωματινικές εστίες στην τελόφαση. Το γεγονός αυτό επαληθεύεται με ταυτόχρονη χρώση κυττάρων που εκφράζουν HP1β-GFP με αντίσωμα (CREST) έναντι των κεντρομεριδιακών περιοχών (177, 178). Κατά την μεσόφαση, στα κύτταρα με εστιακό πρότυπο, η HP1β-GFP συνεντοπίζεται με το CREST στις κεντρομεριδιακές και περικεντρομεριδιακές περιοχές, ενώ στη μίτωση η HP1β-GFP αποσυνδέεται από αυτές τις θέσεις (εικόνα 9A).

Για να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματά μας επαναλάβαμε τις δοκιμασίες διαμόλυνσης και στη συνέχεια αναστείλλαμε την κυτταρική ανάπτυξη με διάφορους φαρμακολογικούς παράγοντες. Όπως φαίνεται στην εικόνα 9B (επάνω τμήμα), 24 ώρες μετά την διαμόλυνση η HP1β-GFP ενσωματώνεται στις σωστές θέσεις σε κύτταρα που αναπτύσσονται σε κανονικό θρεπτικό μέσο. Υπό τις ίδιες συνθήκες αν προστεθούν παράγοντες που αναστέλλουν την κυτταρική ανάπτυξη στο όριο των φάσεων G1-S (όπως αφιδικολίνη, υδροζουρία, θυμιδίνη), ή στην φάση G1 (μυμοσίνη) παρατηρείται ότι η HP1β-GFP παραμένει διάχυτη στο κυτταρόπλασμα (εικόνα 9B, επάνω τμήμα). Τα φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν δεν φαίνεται να προκαλούν κάποια γενικότερη «βλάβη». Αυτό τεκμηριώνεται παρακολουθώντας την κατανομή δεικτών των οποίων η κατανομή δεν εξαρτάται από τον κυτταρικό κύκλο, όπως η Rab7-GFP και η μεταλλαγμένη CD39-GFP, οι οποίες δείχνουν το ίδιο πρότυπο απουσία και παρουσία των φαρμάκων (εικόνα 9B, μεσαίο και κατώτερο τμήμα). Όταν τα κύτταρα «απελευθερωθούν» από την αναστολή του κυτταρικού κύκλου συνεχίζουν να αναπτύσσονται κανονικά περνώντας από την S φάση και η HP1β-GFP ενσωματώνεται στις ετεροχρωματινικές εστίες (εικόνα 9Δ). Με άλλα λόγια, το διάχυτο πρότυπο κατανομής της HP1β-GFP που παρατηρείται παρουσία των φαρμακολογικών παραγόντων αλλάζει σε εστιακό μετά την απομάκρυνσή τους, γεγονός που μπορεί να τεκμηριωθεί με μορφομετρική ανάλυση (εικόνα 9Γ).

Σε μελέτες της κινητικής της HP1-GFP με εφαρμογή της μεθόδου FRAP έχειδειχθεί ότι σε χρόνο λίγων δευτερολέπτων η HP1 επιστρέφει στην περιοχή φωτοδιάχυσης, γεγονός που δείχνει ότι η κινητική της πρωτεΐνης είναι αρκετά γρήγορη. Επαναλαμβάνοντας την προσέγγιση τύπου FRAP και iFRAP για την HP1β-GFP σε κύτταρα HeLa παρατηρήσαμε παραπλήσια κινητική με αυτή που αναφέρεται βιβλιογραφικά (Εικ. 10). Στη δική μας προσέγγιση αναλύσαμε τόσο

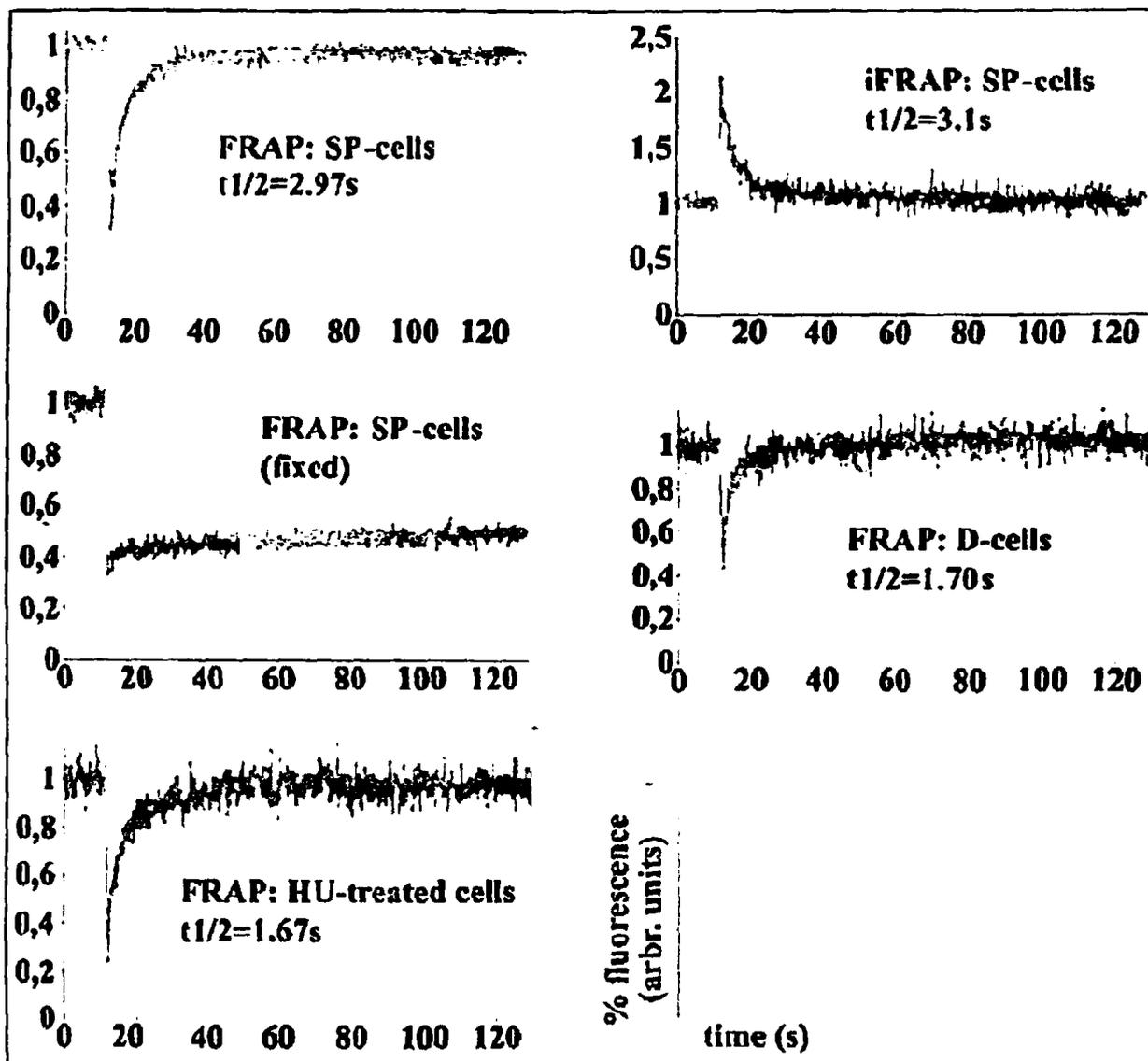


εριοχές που η HP1 εντοπίζεται σε ετεροχρωματικές εστίες όσο και σημεία του υερνοπλάσματος όπου η HP1β έχει διάχυτη κατανομή. Στις περιοχές με διάχυτη κατανομή η HP1 εμφανίζει ελαφρώς ταχύτερη κινητική σε σχέση με εκείνη που καταγράφεται σε



Εικόνα 9. Η ενσωμάτωση της HP1β στην ετεροχρωματική εξαρτάται από τον κυτταρικό κύκλο. (Α) Η κατανομή της HP1β-GFP σε σχέση με κεντρομεριδικούς δείκτες (αντίσωμα CREST) κατά την μίτωση και την μεσόφαση. (Β) Κατανομή των HP1β-GFP, Rab7-GFP, CD39mutant-GFP 24 ώρες μετά τη διαμόλυση κυττάρων που καλλιεργούνται σε κανονικό θρεπτικό (NT) ή σε θρεπτικό που περιέχει αφιδόληνη (AP), υδροζουρία (HU), θυμιδίνη (THY) ή μμοσίνη (MVA). (Γ) Διαγραμματική αναπαράσταση των μορφομετρικών δεδομένων της δοκιμής που απεικονίζεται στο (Β) (επάνω μέρος). Με n συμβολίζεται ο αριθμός των κυττάρων. Οι στήλες με ανοιχτό γκρι χρώματος αναπαριστούν τα κύτταρα με διάχυτο πρότυπο κατανομής της HP1β-GFP, ενώ οι στήλες με σκούρο γκρι τα κύτταρα με εστιακό πρότυπο. (Δ) Ενσωμάτωση της HP1β-GFP στις εστίες ετεροχρωματικής 8 ώρες μετά την απομάκρυνση της υδροζουρίας. Στο κάτω μέρος της εικόνας υποδεικνύονται τμήματα των κυττάρων σε μεγαλύτερη μεγέθυνση, και αντίθεση χρωματισμού.

ετεροχρωματικές εστίες. Επίσης, η κινητική της HP1 στα κύτταρα που έχουμε επιδράσει με υδροξυουρία είναι παρόμοια της κινητικής στις περιοχές με διάχυτη κατανομή.



Εικόνα 10. Δυναμική της HP1β-GFP. Δοκιμές FRAP και iFRAP σε κύτταρα HeLa. 12 ώρες μετά την διαμόλυνση με HP1β-GFP. Στον άξονα (y) αναπαριστάται % η ένταση του φθορισμού και στον (x) ο χρόνος σε δευτερόλεπτα. Υποδεικνύονται οι χρόνοι ημιζωής (HU): επίδραση με υδροξυουρία. (fixed): μονιμοποιημένα κύτταρα με 3% φορμαλδεΐδη για 10 λεπτά.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι το *in vivo* σύστημα που υιοθετήσαμε δεν διαφέρει από μοντέλα που έχουν χρησιμοποιηθεί προηγουμένως. Ως προς αυτό είναι σημαντικό να παρατηρήσουμε ότι κύτταρα με διάχυτο φαινότυπο, απουσία ή παρουσία φαρμάκου, εκτός από



την ομοιότητα στο μορφολογικό επίπεδο (κατανομή της HP1-GFP), εμφανίζουν την ίδια κινητική ως προς την HP1β-GFP.

3.7 Συζήτηση I

A) Η τριμεθυλιωμένη λυσίνη στη H3 (me_3K9H3) δεν αποτελεί τη μοναδική θέση σύνδεσης της HP1 στην ετεροχρωματίνη.

Είναι γνωστό ότι η απαλοιφή της *Suvn3,9* (το ένζυμο που ευθύνεται για την τριμεθυλίωση της λυσίνης 9 στην H3) έχει επίδραση στην υποκυτταρική κατανομή της HP1, η οποία υπό αυτές τις συνθήκες δεν εστιάζεται στην ετεροχρωματίνη, αλλά παραμένει διάχυτη στο πυρηνόπλασμα. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η me_3K9H3 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη στρατολόγηση της HP1. Παρόλα ταύτα, αυτή είναι μία από πολλές εναλλακτικές ερμηνείες που είναι τώρα υπό συζήτηση. Παραδείγματος χάρη, η απαλοιφή της *Suvn3,9* δεν παραβιάζει μόνο την τριμεθυλίωση της λυσίνης 9 στην H3, αλλά και την τριμεθυλίωση της λυσίνης 20 στην H4. Παράλληλα, ο χειρισμός αυτός προκαλεί λανθασμένη στόχευση της DNA μεθυλάσης Dnmt3b και αυξάνει τα επίπεδα της τριμεθυλίωσης στη λυσίνη 27 στην H3 (166, 179, 180). Ως εκ τούτου, η απουσία της HP1 από τις εστίες ετεροχρωματίνης μπορεί να οφείλεται στην συνολική αλλαγή της αρχιτεκτονικής της χρωματίνης ή στην απουσία κατάλληλων θέσεων σύνδεσης.

Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί υπό *in vitro* συνθήκες οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η me_3K9H3 δεν αποτελεί τη μοναδική θέση σύνδεσης της HP1 στην χρωματίνη. Τα πεπτίδια που περιέχουν το τμήμα 1-15 της H3 και φέρουν την me_3K9 συνδέονται στην HP1 με μικρή συγγένεια (της τάξης του μM , βλέπε (147, 148)). Ότι το αμινοτελικό τμήμα της H3 και η me_3K9H3 παίζουν μικρό ρόλο στη σύνδεση της HP1 με τη χρωματίνη, επιβεβαιώνεται επίσης από τα αποτελέσματά μας, επειδή συνθετικά πεπτίδια της H3 χωρίς ή με τροποποιήσεις δεν αναστέλλουν τη σύνδεση HP1-H3, ακόμη και σε περίσσεια 200X. Επιπλέον μελέτες ενισχύουν την παραπάνω άποψη δείχνοντας ότι η HP1 συνδέεται σε συστοιχίες νουκλεοσωμάτων που έχουν ανασυσταθεί από ανασυνδυασμένες (και ως εκ τούτου μη τροποποιημένες) ιστόνες με συγγένεια της τάξης του nM (99). Ακόμη, έχει δειχθεί ότι η HP1 συνδέεται με μεγαλύτερη



συγγένεια στο κεντρικό τμήμα της H3 (149, 150, 180). Σε συμφωνία με τα παραπάνω ευρήματα στην παρούσα μελέτη δείχνουμε ότι η HP1 συνδέεται με ανασυνδυασμένη (μη τροποποιημένη) H3, με H3 που έχει υποστεί τρυψινοποίηση (έχουν αποκοπεί τα αμινοξέα 1-40 του αμινοτελικού τμήματος), ενώ στα νουκλεοσώματα που συνδέονται με την HP1 υπάρχουν αρκετές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που δεν περιγράφονται από τον τύπο 'me₃K9/μη ακετυλίωση στη λυσίνη 14/me₁K27' όπως υπαγορεύει ο ισχύων «ιστονικός κώδικας».

B) Εναλλακτικοί τρόποι ενσωμάτωσης της HP1 στη χρωματίνη.

Έχει δειχθεί με πειράματα σταθερής διαμόλυνσης ότι οι HP1α- και HP1β-GFP εντοπίζονται σε ετεροχρωματινικές εστίες γύρω από τους πυρηνίσκους και την περιφέρεια του πυρήνα (177) και αναφορές). Εν τούτοις, όταν μελετήσαμε την πρωταρχική ενσωμάτωση (*de novo* assembly) της HP1β-GFP με παροδική διαμόλυνση (βλέπε επίσης (177, 181-183). Η κατανομή της HP1β-GFP σε διαμολυσμένα κύτταρα μπορεί να επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως ο τραυματισμός των κυττάρων (όταν υιοθετούμε την τεχνική των μικροενέσεων), ο χημικός ερεθισμός τους (λόγω φωσφορικού ασβεστίου), ή η μεταβολική αστάθεια που δημιουργείται με την παραγωγή μεγάλου ποσού εξωγενούς πρωτεΐνης. Λαμβάνοντας υπόψη τους παραπάνω περιορισμούς, στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε εναλλακτικές μεθόδους διαμόλυνσης και περισσότερες από μια κυτταρικές σειρές, ενώ αναλύσαμε κύτταρα που εκφράζουν διαφορετικά επίπεδα των εξωγενών πρωτεϊνών. Ανεξαρτήτως από τους παραπάνω παράγοντες διαπιστώσαμε δύο διαφορετικά πρότυπα ενσωμάτωσης της HP1β-GFP. Σε μια ομάδα κυττάρων η πρωτεΐνη παρέμεινε διάχυτη στο πυρηνόπλασμα, σχηματίζοντας περιστασιακά μικρού μεγέθους εστίες, ενώ σε άλλα κύτταρα ενσωματώθηκε πλήρως στις ετεροχρωματινικές εστίες. Η παραπάνω μορφολογική διαφορά δεν οφείλεται σε ανωμαλίες του πυρήνα που μπορεί να ανιχνευθούν με χρώση DAPI/PI, αντισώματα έναντι των ιστονών, της HP1, του SNF, άλλων στοιχείων του πυρηνικού φακέλου (εικόνες 6 και 7 και αδημοσίευτες παρατηρήσεις). Επιπλέον, οι δυο φαινότυποι απαντώνται σε αντιστρόφως ανάλογη σχέση, με τρόπο που εξαρτάται από την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Σε συνδυασμό με τα *in vitro* αποτελέσματα, οι μορφολογικές παρατηρήσεις μας οδηγούν στην υπόθεση ότι η ενσωμάτωση της HP1 στις ετεροχρωματινικές



εστίες γύρω από τους πυρηνίσκους και στην περιφέρεια του πυρήνα λαμβάνει χώρα υπό συνθήκες που η δομή του νουκλεοσώματος είναι περισσότερο προσβάσιμη και 'ανοιχτή'.

Οι περιστάσεις κάτω από τις οποίες παρατηρείται μερική ή πλήρης αποδιάταξη του νουκλεοσώματος *in vivo* είναι συγκεκριμένες και αφορούν τη μεταγραφή, τον γενετικό ανασυνδυασμό, την ανταλλαγή ισομορφών των ιστονών και τη δυναμική της χρωματίνης (105, 184, 185). Παρόλα ταύτα, τέτοια φαινόμενα λαμβάνουν χώρα κυρίως κατά τη φάση αντιγραφής του DNA (S-φάση). Σε κύτταρα που εκφράζουν HP1β-GFP μετά από ενσωμάτωση Cy3-dUTP ή BrdU, διαπιστώνεται ότι η ενσωμάτωση της HP1 σε ετεροχρωματινικές εστίες προϋποθέτει τη «διέλευση» του κυττάρου από την όψιμη S-φάση. Πράγματι, σε μικρό χρονικό διάστημα μετά τη διαμόλυνση των κυττάρων, αυτά που εμφανίζουν εστιακό πρότυπο βρίσκονται όψιμη S φάση, ενώ εκείνα που εμφανίζουν διάχυτο πρότυπο βρίσκονται στην αρχή της S φάσης ή εκτός αυτής. Κύτταρα με διάχυτο πρότυπο που βρίσκονται στην όψιμη S φάση συνήθως δεν ανιχνεύονται, ενώ όταν αναστέλλεται η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου στην όψιμη G1 ή στην πρώιμη S φάση πάντοτε παρατηρείται ένα διάχυτο πρότυπο.

Γ) Διακριτοί υποπληθυσμοί της HP1.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις δεν συμβαδίζουν απόλυτα με την μελέτη της κινητικής της HP1 με την μέθοδο FRAP. Από αυτή την προσέγγιση προκύπτει ότι μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα μετά τη φωτοδιάχυση ο φθορισμός ανακτάται και συνεπώς η κινητική της πρωτεΐνης είναι ταχύτατη. Αυτό το 'παράδοξο' εξηγείται λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι η ανάκτηση του φθορισμού δεν είναι πλήρης και ανέρχεται μόνο στο 70-90% της αρχικής τιμής. Μέρος του φθορισμού (10-30%) που δεν ανακτάται και αντιπροσωπεύει λοιπόν ένα 'ακίνητο κλάσμα' της πρωτεΐνης που συνδέεται ισχυρά στην ετεροχρωματίνη και μπορεί να έχει έναν «δομικό» ρόλο. Το κλάσμα της HP1 που εντοπίζεται στην ετεροχρωματίνη μπορεί, επομένως, να αποτελείται από διακριτούς υποπληθυσμούς. Αντίθετα με τον υποπληθυσμό που συνδέεται πιο χαλαρά με την χρωματίνη (και παρουσιάζει ταχεία κινητική), το κλάσμα της HP1 που βρίσκεται σε στενή σύνδεση με την ετεροχρωματίνη δεν θα αποσυνδεθεί παρά μόνο στην περίπτωση που συμβεί πλήρης αποδιάταξη του οκταμερούς ιστονών. Σε μια πρόσφατη *in vivo* μελέτη (183) έχει πράγματι ταυτοποιηθεί (μέ χρήση FRAP και FCS, Fluorescence Correlation Spectrometry) η ύπαρξη

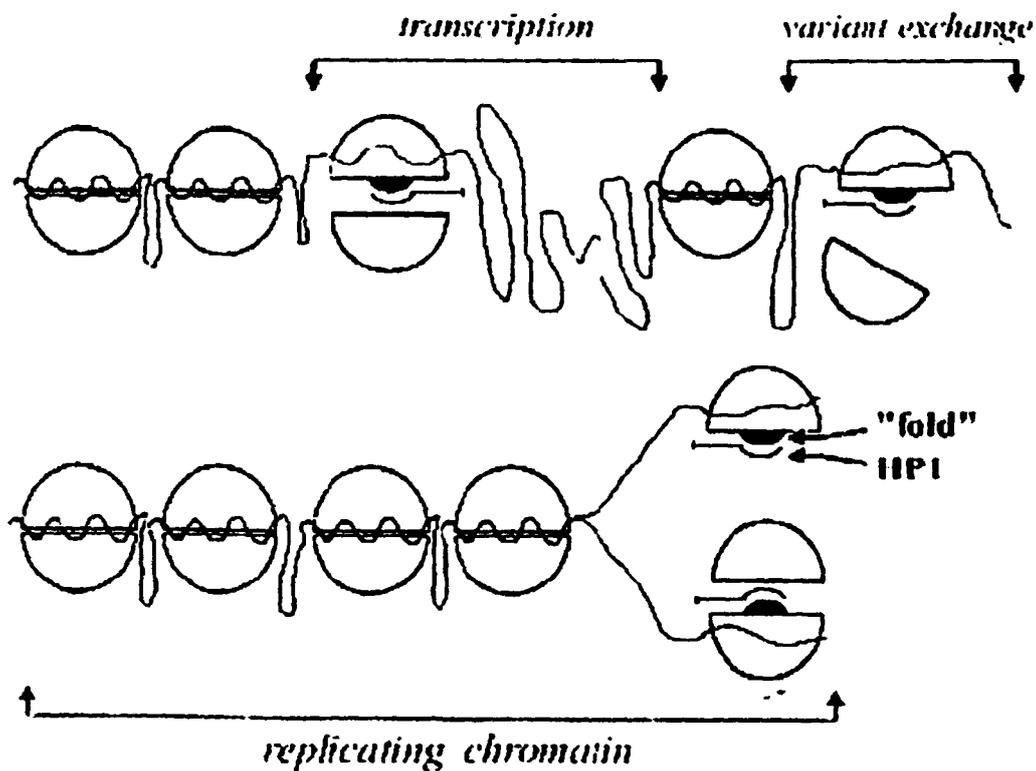


διακριτών πληθυσμών της HP1 που διαφέρουν στην κινητική. Το ακίνητο κλάσμα της HP1 (το οποίο φτάνει ως και 44% σε ορισμένες περιπτώσεις) συσχετίζεται με τον βαθμό συμπύκνωσης της χρωματίνης. Το κλάσμα της HP1 που συνδέεται σταθερά στην χρωματίνη και ο πληθυσμός της HP1 που εμφανίζει υψηλή δυναμική μπορεί να αποτελούν δυο διακριτές οντότητες. Πέρα όμως από αυτά, το 'άνοιγμα' της δομής του νουκλεοσώματος και η ενσωμάτωση της νεοσυντιθέμενης HP1 μπορεί να ρυθμίζονται από άλλους παράγοντες, όπως κάποιο μόριο RNA, μοριακούς συνοδούς, ή χημικές τροποποιήσεις της HP1.

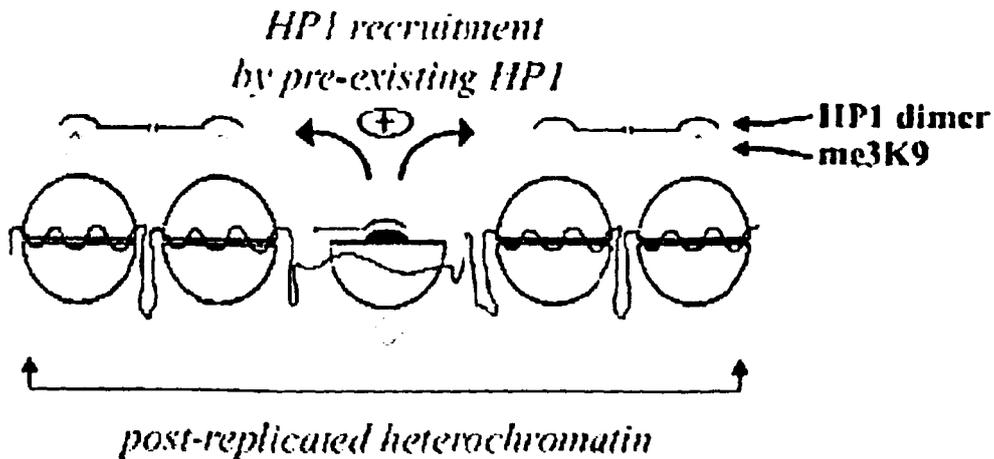
Στην εικόνα 11 προτείνουμε ότι η HP1 αρχικά προσδένεται στην κεντρική περιοχή (histone fold) της H3 σε πολλαπλές διάσπαρτες θέσεις όπου λαμβάνουν χώρα διαδικασίες όπως η μεταγραφή, η ανταλλαγή ισομορφών ιστονών, ή η αντιγραφή, προκειμένου η δομή του νουκλεοσώματος να είναι ανοικτή και η H3 διαθέσιμη. Χαρακτηρίζουμε τις θέσεις αυτές ως θέσεις υψηλής συγγένειας/μικρής διαθεσιμότητας στις οποίες δεν συμβαίνει ανταλλαγή μορίων HP1 (high affinity/low capacity binding, no exchange). Εφόσον σχηματιστεί ένας αρχικός πυρήνας στις θέσεις αυτές, η HP1 επεκτείνεται σε διπλανές μη αντιγραφόμενες περιοχές ετεροχρωματίνης συνδεόμενη με χαμηλή συγγένεια με τη H3 μέσω της me₃K9 (σημεία χαμηλής συγγένειας/μεγάλης διαθεσιμότητας με γρήγορη ανταλλαγή μορίων HP1-low affinity/high capacity, rapid exchange). Στην περίπτωση που τέτοιοι παράγοντες, όπως η me₃K9H3, δεν απαντώνται στην άμεση γειτονιά των θέσεων υψηλής συγγένειας (π.χ. ευχρωματινικές περιοχές), η HP1 παραμένει στις αρχικές θέσεις ενσωμάτωσης χωρίς να επεκτείνεται.



A. HIGH-AFFINITY BINDING TO DISPERSED ("histone fold") SITES



B. LOW-AFFINITY BINDING TO CLUSTERED (me₃K9) SITES



Εικόνα 11. Εναλλακτικά μονοπάτια ενσωμάτωσης της HP1 στη χροματίνη. Σύμφωνα με το παραπάνω υποθετικό σχήμα προτείνεται ότι η ενσωμάτωση της HP1 στη χροματίνη γίνεται με δυο τρόπους. (Α) Σταθερή ενσωμάτωση της HP1 σε διάσπαρτες θέσεις χροματίνης (μέσω του κεντρικού τμήματος της H3) που είναι διαθέσιμες σε ειδικές περιστάσεις και φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Το νουκλεοσωματικό DNA αναπαριστάται με κοματοειδής γραμμές, ενώ τα υποσώμπλοκα H2A-H2B και H3-H4 αναπαριστάται ως σκιασμένα ή ανοικτά ημικόκλια, αντίστοιχα. (Β) Ασθενής σύνδεση σε συγκεντρωμένες θέσεις μικρής συγγένειας (διαμέσου me₃K9).



3.8 Πρότυπα κατανομής των ενδογενών πρωτεϊνών της κατηγορίας της HP1 σε κυτταρικές σειρές και εμβρυονικά βλαστικά (ES) κύτταρα.

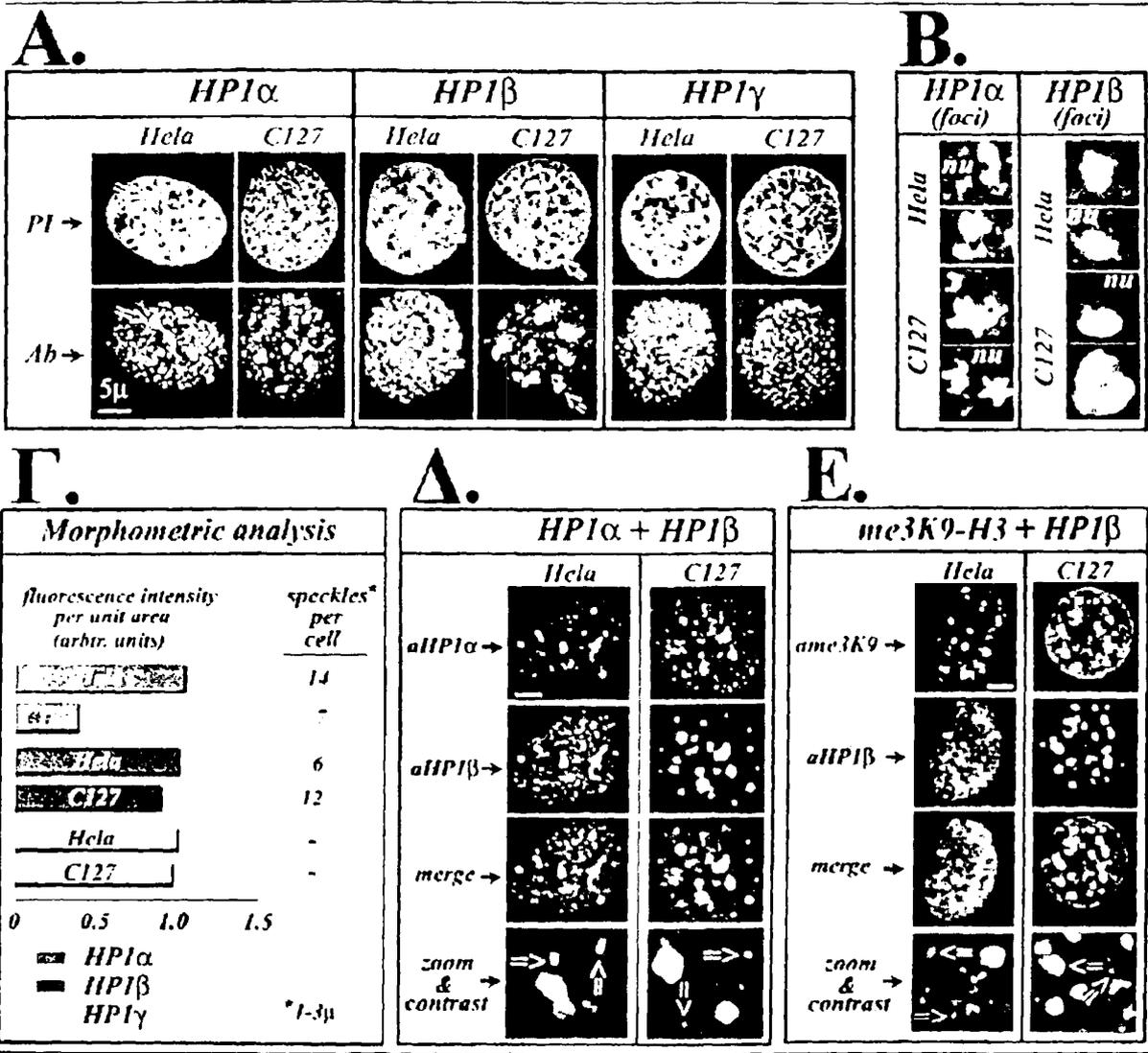
Επεκτείνοντας τη μελέτη, συγκρίναμε την κατανομή των τριών ισομορφών της HP1 σε διαφορετικά κυτταρικά συστήματα και μεταβολικές συνθήκες ώστε να διερευνήσουμε ποιοι παράγοντες παίζουν ρόλο στην ενσωμάτωσή της στη ετεροχρωματίνη.

Αρχικά, μελετήσαμε την υποκυτταρική κατανομή των ενδογενών HP1 α , β και γ σε τέσσερις κυτταρικές σειρές θηλαστικών. Χρησιμοποιήσαμε αντισώματα ειδικά για κάθε ισομορφή που αναγνωρίζουν συντηρημένους επιτόπους στον άνθρωπο (*Homo Sapiens*), στο ποντίκι (*Mus Musculus*), στον αρουραίο (*Rattus Norvegicus*) και στο σκύλο (*Canis Familiaris*). Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με συνεστιακό μικροσκόπιο και σε όλες τις περιπτώσεις τα δεδομένα αναλύθηκαν μορφομετρικά με χρήση κατάλληλων υπολογιστικών προγραμμάτων.

Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, το πρότυπο κατανομής της ενδογενούς HP1 γ στα HeLa (ανθρώπινα) και στα C127 (από ποντικό) ήταν διάχυτο και έχει λεπτή κοκκώδη υφή, γεγονός που υποδηλώνει ότι η HP1 γ εντοπίζεται εξίσου σε ετεροχρωματινικές και στις ευχρωματινικές περιοχές (εικόνα 12A, HP1 γ). Αντίθετα, οι ενδογενείς HP1 α και HP1 β έδωσαν ένα κατά βάση εστιακό πρότυπο εντόπισης, ενώ παράλληλα συνυπήρχε μικρού βαθμού διάχυτη κατανομή. Αυτό σημαίνει ότι οι δυο πρωτεΐνες συνδέονται κατ'απρόσμενη (αλλά όχι αποκλειστικά) με ετεροχρωματινικές εστίες (εικόνα 12A, HP1 α /HP1 β).

Για να ελέγξουμε κατά πόσο οι HP1 α και HP1 β εντοπίζονται στις ίδιες ετεροχρωματινικές εστίες πραγματοποιήσαμε πειράματα διπλού ανοσοφθορισμού. Στην εικόνα 12Δ και 12Ε παρατηρείται ότι οι HP1 α και HP1 β συνεντοπίζονται σε μεγάλο βαθμό, χωρίς να υπάρχει όμως πλήρης αλληλεπικάλυψη. Εμφανίζονται δηλαδή εστίες που πολλές φορές περιέχουν μόνο τη μια από τις δυο ισομορφές και στις οποίες δεν υπάρχει πλήρης συνεντόπιση με την me₃K9H3 (εικονίδια για τις α HP1 α , α HP1 β και α me₃K9H3). Επιπρόσθετα, αναλύοντας τις εικόνες σε μεγαλύτερη μεγέθυνση παρατηρήσαμε ότι η HP1 α ενσωματώνεται σε ετεροχρωματινικές εστίες που αποτελούνται από πολλά μικρότερα συσσωματώματα και έχουν ακανόνιστα όρια, ενώ οι αντίστοιχες εστίες της HP1 β είναι συμπαγείς, ομοιόμορφες και έχουν ωσειδές σχήμα (εικόνα 12B).





Εικόνα 12. Πρότυπα κυτινομής των ενδογενών HP1 πρωτεϊνών σε αθανοτοποιημένες κυτταρικές σειρές. (A) Χρόση κυττάρων HeLa και C-127 με αντισώματα έναντι των HP1 α , HP1 β και HP1 γ . Στο επάνω μέρος υποδεικνύεται η χρώση με ιωδιούχο προπιδίο (PI), ενώ στο κάτω μέρος η χρώση με το αντίσωμα (Ab). Τα βέλη υποδεικνύουν θέσεις όπου η HP1 πρωτεΐνες συνευτοπίζονται με ετεροχρωματινικές εστίες. (B) Απεικόνιση σε λεπτομέρεια των εστιών που εντοπίζονται οι HP1 α και HP1 β και του προτύπου χρώσης με ιωδιούχο προπιδίο μετά από σύνθεση (merge) σε μεγαλύτερη μεγέθυνση και αντίθεση χρωματισμού (contrast). Με (nu) υποδεικνύεται ο πυρήνισκος. (C) Μορφομετρική ανάλυση που απεικονίζει το λόγο της έντασης του φθορισμού ανά μονάδα επιφάνειας του πυρήνα (σε αυθαίρετες μονάδες) και τον αριθμητικό μέσο όρο των ετεροχρωματινικών εστιών (μειζονος τύπου) ανά κύτταρο για τις HP1 α και HP1 β . Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε 15 κύτταρα χρησιμοποιώντας την προβολή των οπτικών τομών που έχουν ληφθεί στο συνεστιακό μικροσκόπιο. (D) Διπλή χρώση κυττάρων HeLa και C127 με αντισώματα έναντι στις HP1 α και HP1 β . Τα δύο επάνω εικονίδια ανταποκρίνονται στη χρώση με τα αντισώματα (aHP1 α , aHP1 β), ενώ τα δύο κάτω εικονίδια ανταποκρίνονται στη σύνθεση των δύο προτύπων (merge, zoom & contrast). (E) Το ίδιο με το D χρώση για τα αντισώματα για την HP1 β και την τριμεθυλοποιημένη λυσίνη 9 της H3 (αλλά όχι ταυτόχρονα για τεχνικούς λόγους). Η οριζόντιες στήλες αντιπροσωπεύουν διάστημα μήκους 5 μ m.

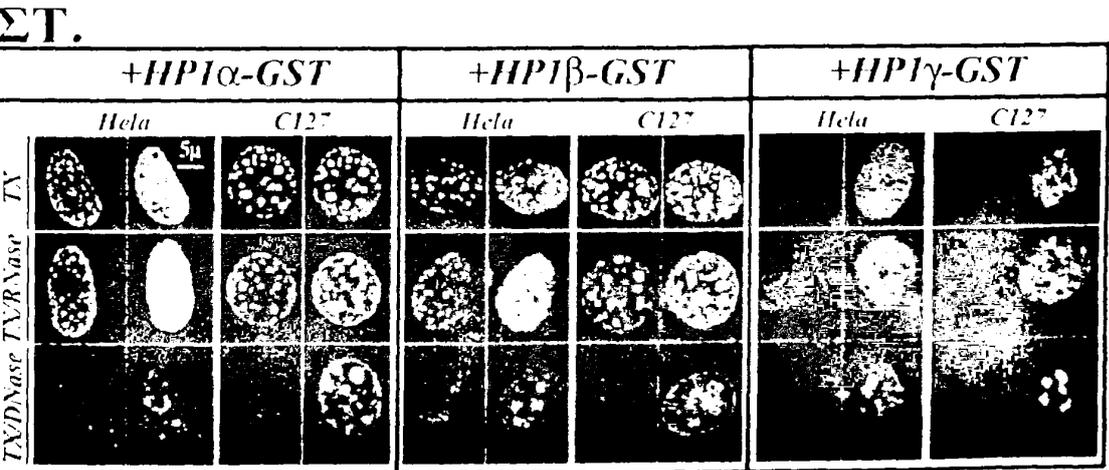
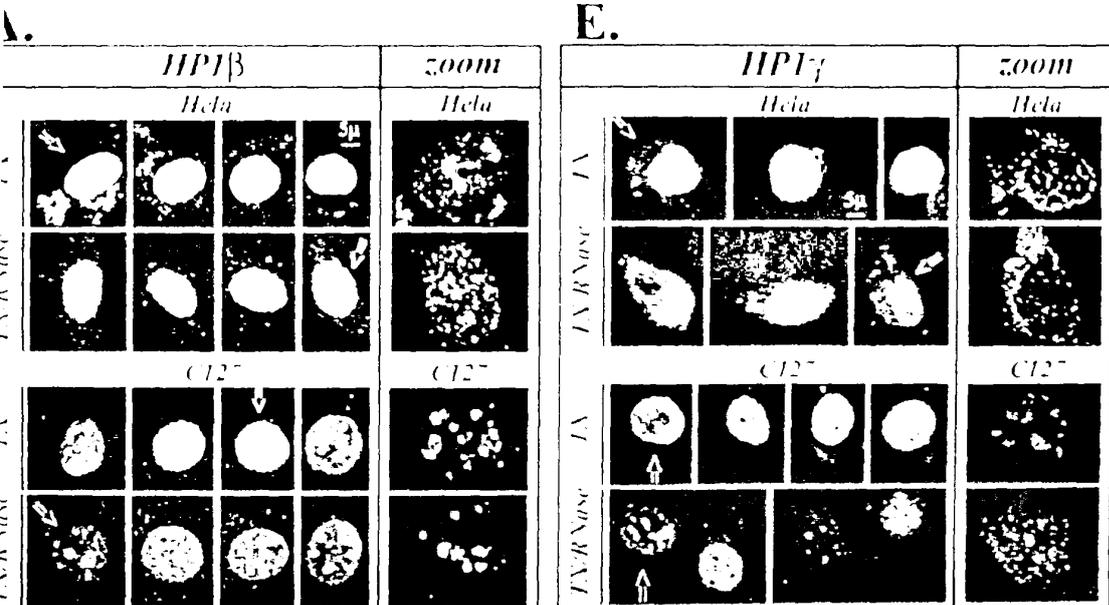
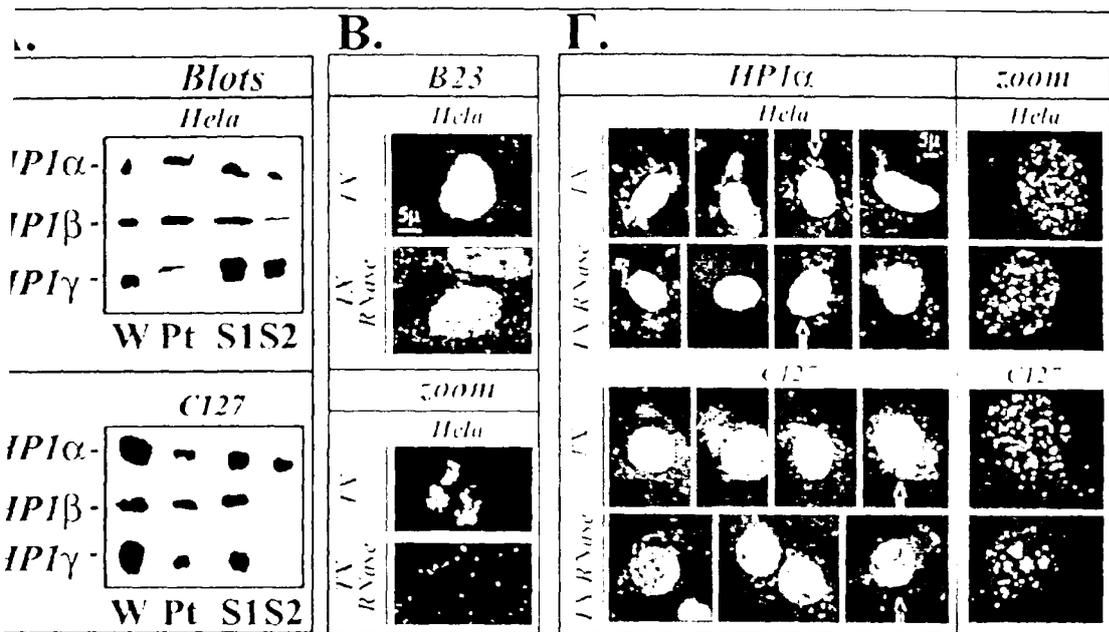


Πέρα από τις διαφορές στην κατανομή των δυο ισομορφών, παρατηρήσαμε επίσης ποσοτικές διαφορές μεταξύ τους (εικόνα 12Γ) όπως προκύπτει από την ανάλυση της έντασης του φθορισμού σε σχέση με την επιφάνεια του πυρήνα (*fluorescence/unit area*, σε αυθαίρετες μονάδες). Επιπλέον, ο αριθμός των εστιών που περιέχουν HP1α και HP1β φαίνεται να διαφέρει μεταξύ των δυο κυτταρικών τύπων, γεγονός που συμβαδίζει με τα διαφορετικά πρότυπα εντόπισης των πρωτεϊνών. Η κατανομή των πρωτεϊνών ήταν ίδια σε όλα τα μεταφασικά κύτταρα ενός δεδομένου παρασκευάσματος, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στα δείγματα HeLa και C127 δεν οφείλονται σε παράγοντες που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν όταν εξετάσαμε την κατανομή των πρωτεϊνών HP1 και σε άλλους κυτταρικούς τύπους (MCF-7, SKOV3, 3T3, NRK, MDCK-II), οπότε προκύπτει το συμπέρασμα ότι η υποκυτταρική κατανομή των πρωτεϊνών της κατηγορίας της HP1 εξαρτάται από την κάθε ισομορφή για τους περισσότερους (αν όχι όλους) τους τύπους αθανатоποιημένων κυττάρων.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, εξετάσαμε το ενδεχόμενο οι τρεις ισομορφές της HP1 να οργανώνονται *in situ* με διαφορετικό τρόπο. Για να ελέγξουμε την παραπάνω υπόθεση, διαπερατοποιούμε κύτταρα HeLa και C127 με χρήση του απορρυπαντικού Triton X-100. Η χρήση του απορρυπαντικού πριν τη μονιμοποίηση έχει ως αποτέλεσμα την έκπλυση και απομάκρυνση των διαλυτών ή των χαλαρά συνδεδεμένων, στοιχείων από τη χρωματίνη. Κατόπιν επεξεργαστήκαμε τα κυτταρικά 'φαντάσματα' με RNase A ή DNase I και τελικώς μονιμοποιήσαμε τα δείγματα (σε περίπτωση που ακολουθεί μορφολογική ανάλυση). Ακολουθώντας αυτό το σχήμα και στη συνέχεια αναλύοντας με ανοσοαποτύπωση κατά Western, παρατηρούμε ότι και οι τρεις ενδογενείς πρωτεΐνες εκπλένονται από τα κύτταρα παρουσία του απορρυπαντικού (εικόνα 13Α). Για να διαπιστώσουμε ποιος υποπληθυσμός των HP1α, HP1β, HP1γ (ετεροχρωματινικό ή το διάχυτο υλικό) επηρεάζεται περισσότερο αναλύσαμε τα δείγματα

Εικόνα 13 (επόμενη σελίδα). Εστίες των HP1 πρωτεϊνών μετά από εκχύλιση με απορρυπαντικό και πάγνωση με RNase. (Α) Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου φαίνεται η κατανομή των HP1 πρωτεϊνών μετά από επεξεργασία με απορρυπαντικό ή με και RNase. Το υπερκείμενο κάθε κλάσματος βρίσκεται στις διαδρομές με περιττή, ενώ το ίζημα στις διαδρομές με άρτια αρίθμηση. (1-3): α-HP1α, (4-6): α-HP1β, (7-9): α-HP1γ. (Β) Πείραμα ελέγχου με την πρωτεΐνη B23, που εντοπίζεται στους πυρηνίσκους (βλέπε κείμενο για λεπτομέρειες). (Γ-Ε) Κατανομή των HP1 πρωτεϊνών μετά από διαπερατοποίηση με Triton-X και επεξεργασία με RNase A σε κύτταρα HeLa και C127, όπως υποδεικνύεται. Στο αριστερό μέρος απεικονίζονται εικόνες μετά από σύνθεση των χρώσεων με ιωδιούχο προπιδίο και αντίσωμα, ενώ στο δεξιό μέρος επύλεγμένα κύτταρα (υποδεικνύονται με τα βέλη στο αριστερό μέρος) μετά από μεγέθυνση 3X. Η θέση του πυρηνίσκου υποδεικνύεται με αστερίσκο. (ΣΤ) Σύνδεση των HP1 πρωτεϊνών σε κυτταρικά 'φαντάσματα' στις θέσεις ενσωμάτωσής τους (*in situ*). Η ράβδος συμβολίζει διάστημα μήκους 5μm.





μορφολογικά. Όπως φαίνεται στην εικόνα 13Γ-Ε (εικονίδια +TX), η έκπλυση με απορρυπαντικό έχει ως αποτέλεσμα τη σχεδόν ολοκληρωτική απομάκρυνση της διάχυτης, πυρηνολασματικής HP1γ, ενώ μέρος του πληθυσμού το οποίο βρίσκεται σε ετεροχρωματικές θέσεις παραμένει. Οι HP1α και HP1β εκπλένονται σε μικρό βαθμό μετά από εκχύλιση με απορρυπαντικό, αλλά εμφανίζουν παρόμοια κατανομή πριν και μετά τη διαπερατοποίηση των κυττάρων. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο εφόσον οι δυο αυτές ισομορφές εντοπίζονται κυρίως σε ετεροχρωματικές εστίες.

Σε αντίθεση με προηγούμενα βιβλιογραφικά δεδομένα (159), μετά από επίδραση RNase A, δεν παρατηρήσαμε κάποια αλλαγή στο πρότυπο κατανομής των τριων ισομορφών (εικόνα 13Γ-Ε, εικονίδια +TX/RNase). Για να ελέγξουμε εάν αυτό οφείλεται σε ελλιπή πέψη του RNA, μελετήσαμε την κατανομή της πρωτεΐνης B23, η οποία βρίσκεται στους πυρηνίσκους και συνδέεται με RNA (186, 187). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 13Β, η εκχύλιση με απορρυπαντικό δεν επιδρά στην κατανομή της B23, ενώ μετά από επίδραση RNάσης, η πρωτεΐνη-δείκτης δεν βρίσκεται πλέον στους πυρηνίσκους, αλλά μετακινείται στο κυτταρόπλασμα.

Προσεγγίζοντας το ίδιο πρόβλημα από διαφορετική γωνία, πραγματοποιήσαμε δοκιμασίες σύνδεσης (*in situ* binding assays) προσθέτωντας εξωγενώς ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες. Μετά από επώαση διαπερατοποιημένων κυττάρων HeLa και C127 με τις HP1α- και HP1β-GST, διαπιστώθηκε ότι οι δυο πρωτεΐνες συνδέονται ισχυρά στις ετεροχρωματικές θέσεις (εικόνα 13ΣΤ, εικονίδια +HP1α-GST/HP1β-GST, TX). Όταν τα κύτταρα επώαστηκαν με την HP1γ-GST δεν παρατηρήθηκε παρόμοια σύνδεση (εικόνα 13ΣΤ, εικονίδια, +HP1γ-GST, TX), γεγονός που υποδηλώνει ότι η HP1γ-GST εμφανίζει ασθενέστερη σύνδεση στις ετεροχρωματικές εστίες σε σύγκριση με τις HP1α- και HP1β-GST. Ακόμη, όταν διαπερατοποιημένα κύτταρα προ-επώαστηκαν με DNase I, πριν την επώαση με τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, παρατηρήσαμε ότι η σύνδεση των HP1α- και HP1β-GST στις ετεροχρωματικές εστίες ελλαττώθηκε σε μεγάλο βαθμό, πράγμα που δεν συνέβει όταν η προ-επώαση έγινε με RNase A (εικόνα 13ΣΤ, εικονίδια +HP1α-GST/HP1β-GST και TX+DNase/TX+RNase). Στα ίδια πειράματα, η HP1γ-GST δεν φάνηκε να συνδέεται στην χρωματίνη υπό καμμία συνθήκη (εικόνα 13ΣΤ, εικονίδια +HP1γ-GST και TX+DNase/ TX+RNase). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι οι ισομορφές της HP1 οργανώνονται με διαφορετικό τρόπο στις ετεροχρωματικές εστίες και ότι, επίσης, το RNA δεν φαίνεται να συμμετέχει ενεργά στις αλληλεπιδράσεις των HP1



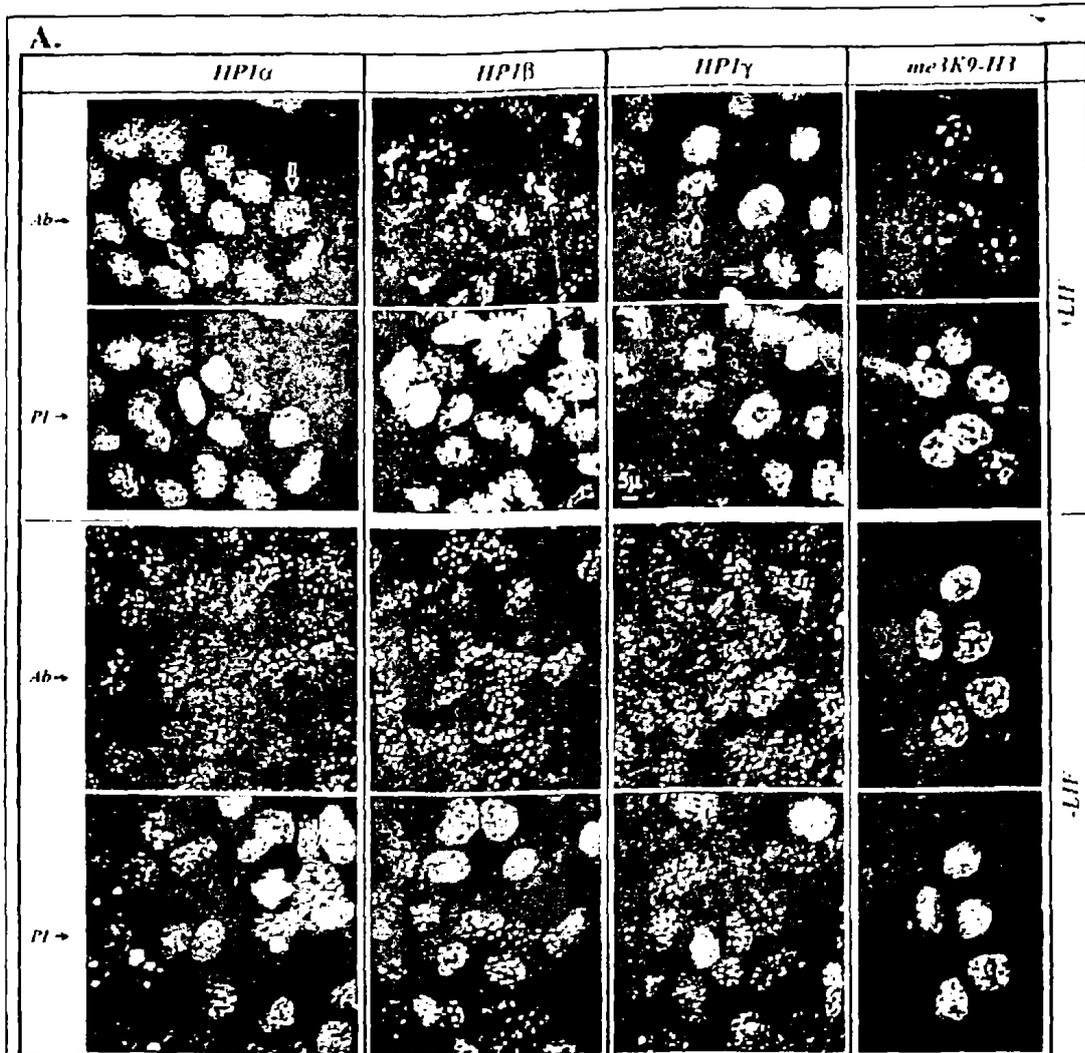
πρωτεϊνών με την ετεροχρωματίνη. Επισημαίνεται ωστόσο ότι με την παραπάνω προσέγγιση δεν είναι δυνατό να διευκρινιστεί ο ρόλος των μικρών παρεμβατικών RNA (siRNA), εφόσον αυτό το είδος RNA παραμένει άθικτο από την δράση της RNase A (Θ. Γιαννακούρος, *προσωπική επικοινωνία*).

3.9 Κατανομή των HP1 πρωτεϊνών σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα από ποντικό (mouse embryonic stem cells).

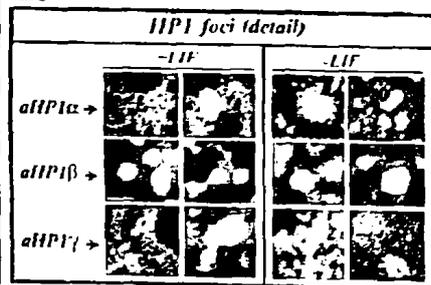
Στη συνέχεια μελετήσαμε την κατανομή των HP1 πρωτεϊνών σε σχέση με την κυτταρική διαφοροποίηση. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιήσαμε ως σύστημα μελέτης εμβρυονικά κύτταρα από ποντικό (mouse ES cells) (τύπου E14, 129/Ola line, (188), τα οποία διατηρούνται στην αδιαφοροποίητη κατάσταση παρουσία του παράγοντα LIF (Leukemia Inhibitory Factor), ενώ διαφοροποιούνται απουσία του. Παρατηρήσαμε ότι η υποκυτταρική κατανομή των HP1 πρωτεϊνών εμφανίζει αρκετά μεγάλη ετερογένεια. Όπως φαίνεται στην εικόνα 14A και B, οι HP1α και HP1γ άλλοτε παρουσιάζουν εστιακό πρότυπο κατανομής (διακριτές εστίες) και άλλοτε διάχυτο (λεπτή κοκκώδης υφή). Η παραπάνω διαφορές δεν οφείλονται σε κυτταρική βλάβη ή αποδιοργάνωση της ετεροχρωματίνης, εφόσον η HP1β παρουσιάζει αποκλειστικά εστιακό πρότυπο κατανομής σε όλα τα κύτταρα (εικόνα 14A και B). Η μορφομετρική ανάλυση (εικόνα 14Γ) επιβεβαίωσε τις παραπάνω παρατηρήσεις, αποδεικνύοντας ότι περίπου στο 40-50% των κυττάρων η HP1α εμφανίζει διάχυτη κατανομή και στο υπόλοιπο 50-60% εστιακή κατανομή. Ακόμη μικρό ποσοστό των κυττάρων (σχεδόν 1 στα 10) εμφανίζει εστιακό πρότυπο κατανομής της HP1γ, ενώ το υπόλοιπο (περίπου 9 στα 10) εμφανίζει διάχυτο πρότυπο κατανομής.

Είναι γνωστό ότι όταν ο παράγοντας LIF απομακρύνεται από το θρεπτικό υλικό, τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα διαφοροποιούνται *in vitro*. Κατά τη διαφοροποίηση των κυττάρων ES παρατηρήθηκαν αρκετές αλλαγές στην κατανομή των πρωτεϊνών HP1 (Εικόνα 14A και B). Για παράδειγμα, η HP1α μετά τη διαφοροποίηση ανακατανέμεται σε περισσότερες και μικρότερου μεγέθους εστίες. Η HP1β επίσης ανακατανέμεται σε περισσότερες, αλλά μεγαλύτερου μεγέθους εστίες. Τέλος, η HP1γ ανακατανέμεται σε οριακά περισσότερες, αλλά αρκετά μικρότερου μεγέθους εστίες. Συνοψίζοντας διαπιστώνουμε ότι κατά την διαφοροποίηση των ES κυττάρων





B.



Γ.

Morphometric analysis

variant type	LIF	% cells w/speckles > 1 μ	speckles per cell		n
			[1-2 μ /3-6 μ] total	fold	
HP1 α	+	38	1.06	3.1	113
HP1 α	-	54	1.75	5.5	
HP1 β	+	100	0.77	3.9	80
HP1 β	-	100	0.44	11.0	
HP1 γ	+	16	0.81	4.0	87
HP1 γ	-	13	3.50	4.5	

Εικόνα 14. Κατανομή των ενδογενών πρωτεϊνών της κατηγορίας της HP1. (Α) Κατανομή των πρωτεϊνών HP1 α , HP1 β , HP1 γ και των θέσεων τρι-μεθυλωμένης λυσίνης 9 (me3K9-H3) της H3 στα αδιαφοροποίητα (παρουσία LIF, +LIF) και διαφοροποιημένα (απουσία LIF, -LIF) κύτταρα E14 (mESC's-E14). Τα βέλη υποδεικνύουν κύτταρα με εστιακή κατανομή. Σε ξεχωριστά εικονίδια παρουσιάζονται το ιωδιούχο προπιδίο (PI) καθώς και η χρώση κάθε αντισώματος (Ab). Κάθε εικονίδιο αναπαριστά προβολή οπτικών τμημών από συνεστιακό μικροσκόπιο. (B) Ετεροχρωματικές εστίες σε μεγαλύτερη μεγέθυνση και αντίθεση φωτισμού μετά από ταυτόχρονη χρώση με μια εκ των HP1 α , HP1 β και HP1 γ και PI. (Γ) Μορφομετρική ανάλυση όπου παρατίθενται για κάθε δείγμα το ποσοστό των κυττάρων με εστιακό φαινότυπο (% cells w speckles > 1 μ), ο λόγος των εστιών μικρής (1-2 μ) έναντι μεγάλης (3-6 μ) διαμέτρου, ο συνολικός αριθμός των εστιών (total) και ο λόγος των εστιών των διαφοροποιημένων (-LIF) έναντι των αδιαφοροποίητων (+LIF) κυττάρων (fold). Με n συμβολίζεται ο αριθμός των κυττάρων που ανάλυθηκαν.



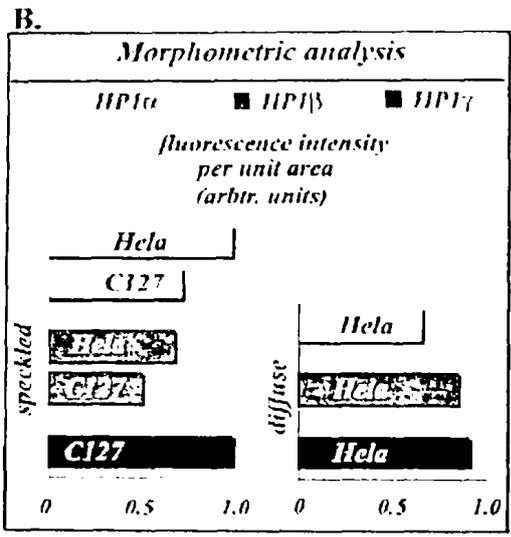
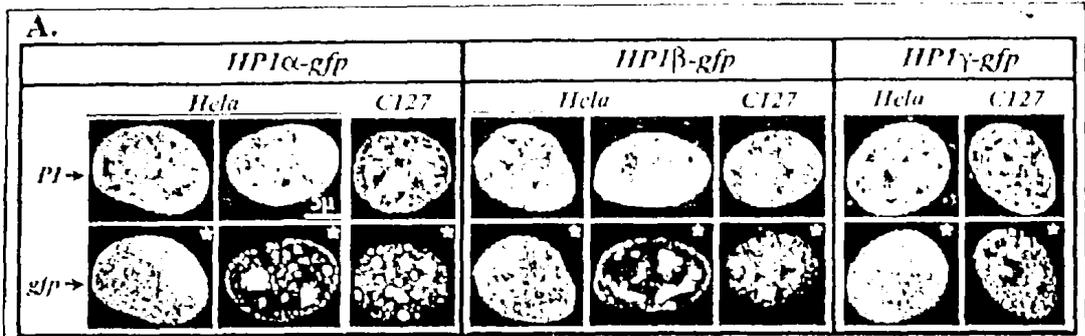
και οι τρεις ισομορφές (σε μεγαλύτερο βαθμό οι HP1α και HP1β) τείνουν να ανακατανεμηθούν σε περισσότερες εστίες, οι οποίες έχουν μικρότερο μέγεθος για τις HP1α και HP1γ και μεγαλύτερο για την HP1β.

Η ετερογένεια που παρατηρήθηκε στα πρότυπα κατανομής των HP1α και HP1γ μπορεί να εξαρτάται από αλλαγές στο επιγενετικό ή το δομικό επίπεδο. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ακόμη ότι η HP1γ μπορεί να ενσωματώνεται σε ετεροχρωματικές εστίες, παρόμοια με τις HP1α και HP1β, κάτω από ορισμένες αναπτυξιακές συνθήκες (για λεπτομέρειες βλέπε παρακάτω). Για να ελέγξουμε αν οι επιγενετικές τροποποιήσεις που απαντώνται στη χρωματίνη επηρεάζουν την κατανομή των HP1 πρωτεϊνών στα ES κύτταρα καταγράψαμε την κατανομή της me_3K9H3 , ενός κλασσικού ετεροχρωματικού δείκτη. Παρατηρήσαμε ότι οι ετεροχρωματικές εστίες στις οποίες απαντάται η παραπάνω τροποποίηση έχουν μικρότερο μέγεθος και είναι περισσότερες στα διαφοροποιημένα κύτταρα, όπως συμβαίνει και στις εστίες των HP1α και HP1γ. Παρ' όλα ταύτα, ποικιλομορφία στην κατανομή της me_3K9H3 μεταξύ των κυττάρων της ίδιας αποικίας (Εικόνα 14Α) δεν διαπιστώθηκε, πράγμα που σημαίνει ότι δεν υφίσταται άμεση συσχέτιση της κατανομής των HP1 πρωτεϊνών με τις επιγενετικές τροποποιήσεις των ιστονών (βλέπε επίσης εικόνα 12Ε). Επιπλέον, μια τέτοια συσχέτιση δεν κατοχυρώνεται από την κατανομή της HP1β, η οποία μεταβάλλεται κατά τρόπο διαφορετικό από τις HP1α και HP1γ κατά τη διαφοροποίηση των ES κυττάρων.

3.10 Κατανομή και δυναμική των νεοσυντιθέμενων HP1 πρωτεϊνών σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, μετά από παροδική επιμόλυνση κυττάρων ανθρώπινης προέλευσης (HeLa και MCF-7) με την HP1β-GFP παρατηρήθηκαν δυο διαφορετικοί φαινότυποι, ένας εστιακός και ένας διάχυτος. Το πρότυπο κατανομής σε κάθε κύτταρο δεν φάνηκε να εξαρτάται από τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης, αλλά από την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (η διάχυτη κατανομή δίνει σταδιακά τη θέση της στην εστιακή καθώς τα κύτταρα διέρχονται από την S φάση).

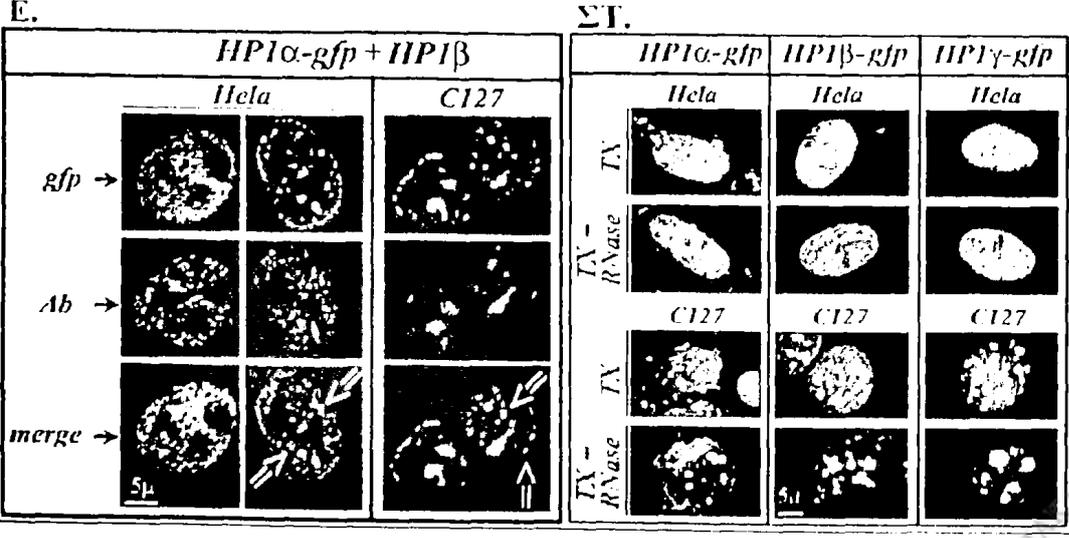
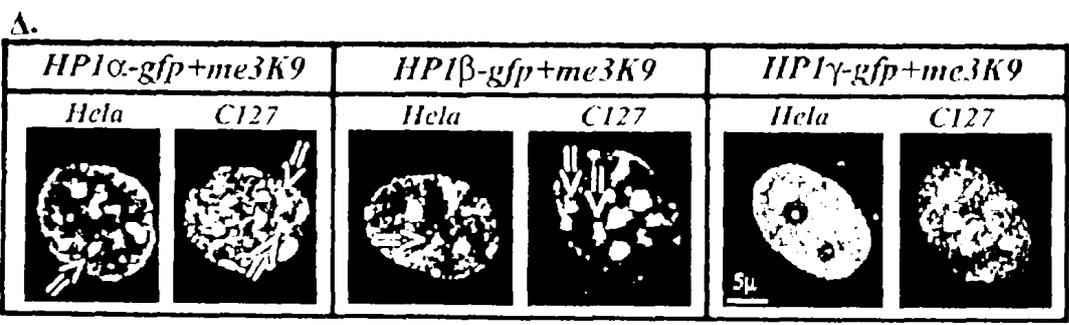




F. FRAP

Protein	Cell Type	IF (%)	(t/2 (s))	# exp.
gfp	Hela	n.d.	0.36	15
HP1 α	Hela (SP)	2.50	2.40	21
HP1 α	C127 (SP)	5.30	2.20	14
HP1 β	Hela (SP)	2.60	3.30	15
HP1 β	C127 (SP)	3.60	2.30	14
HP1 γ	Hela (D)	2.60	1.40	19
HP1 γ	C127 (SP)	2.50	1.60	10

Key:
 IF: immobile fraction (t/2: fluorescence recovery half-time)
 n.d.: not detected
 # exp.: number of experiments



Εικόνα 15 (προηγούμενη σελίδα). Κατανομή και δυναμική HP1-GFP πρωτεϊνών σε αθανατοποιημένες κυτταρικές σειρές θηλαστικών. (Α) Κατανομή των HP1-GFP πρωτεϊνών σε κύτταρα HeLa και C127. Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα διάχυτης και εστιακής κατανομής υποδεικνύονται (αστερίσκοι). (Β) Μορφομετρική ανάλυση όπου παρατίθενται η ένταση του φθορισμού ανά μονάδα επιφάνειας του πυρήνα (σε αυθαίρετες μονάδες) και ο αριθμός των εστιών των HP1α/β/γ-GFP ανά κύτταρο σε κάθε δείγμα. Προβολές διαδοχικών οπτικών τομών 15 κυττάρων αναλύθηκαν σε κάθε περίπτωση. (Γ) Δεδομένα μετά από ανάλυση FRAP των HP1α/β/γ-GFP σε κύτταρα HeLa και C127. Η ένδειξη (SP) ανταποκρίνεται στον εστιακό φαινότυπο και η ένδειξη (D) στον διάχυτο φαινότυπο. (Δ) Σχετική κατανομή των HP1β/-GFP και $\text{me}_3\text{K9H3}$ (όπως αυτή ανιχνεύεται με ειδικό αντίσωμα). Παρατίθενται εικόνες διπλής ταυτόχρονης χρώσης (merge). Με βέλη υποδεικνύονται θέσεις όπου οι δύο δείκτες δεν συνεντοπίζονται. (Ε) Σχετική κατανομή της HP1α-GFP και της ενδογενούς HP1β (όπως ανιχνεύεται με ειδικό αντίσωμα). Παρατίθενται εικόνες απλής και διπλής ταυτόχρονης χρώσης. Με βέλη υποδεικνύονται οι θέσεις όπου δεν συνεντοπίζονται οι δύο δείκτες. (ΣΤ) Κατανομή των HP1-GFP πρωτεϊνών μετά από διαπερατοποίηση των κυττάρων με Triton X-100 και επεξεργασία με RNase. Παρατίθενται μόνο εικόνες διπλής ταυτόχρονης χρώσης. Για περισσότερες λεπτομέρειες βλέπε εικόνα 13. Κάθε ράβδος συμβολίζει διάστημα μήκους 5μm.

Βασιζόμενοι στις παραπάνω παρατηρήσεις, διευρύνουμε την προσέγγιση μας και συγκρίναμε την υποκυτταρική κατανομή των τριών ισομορφών σε κύτταρα διαφορετικής προέλευσης. Όπως φαίνεται στην εικόνα 15Α, μετά από διαμόλυνση των κυττάρων HeLa με HP1α-GFP και HP1β-GFP παρατηρούνται τόσο διάχυτο όσο και εστιακό πρότυπο κατανομής. Αντίθετα, έκφραση των παραπάνω πρωτεϊνών σε κύτταρα C127 δίνει αποκλειστικά εστιακό πρότυπο. Επιπροσθέτως, η κατανομή της HP1γ-GFP στα κύτταρα C127 παρουσιάζει αποκλειστικά εστιακό φαινότυπο, παρόλο που η ενδογενής πρωτεΐνη στα ίδια κύτταρα εμφανίζει αποκλειστικά διάχυτο πρότυπο κατανομής.

Εκτιμώντας τα επίπεδα του φθορισμού ανά μονάδα επιφάνειας του πυρήνα διαπιστώσαμε ότι δεν προκύπτουν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης των HP1-GFP πρωτεϊνών μεταξύ κυττάρων που εμφανίζουν διάχυτο και εστιακό πρότυπο κατανομής (εικόνα 15Β). Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με προηγούμενες παρατηρήσεις σύμφωνα με τις οποίες δεν προκύπτει συσχέτιση του προτύπου κατανομής των εξωγενών HP1-GFP πρωτεϊνών με τα επίπεδα της ενδοκυτταρικής τους συγκέντρωσης.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι η κατανομή των HP1-GFP πρωτεϊνών εξαρτάται από το είδος των κυττάρων. Για να ελέγξουμε εάν η οργάνωση των HP1 πρωτεϊνών συσχετίζεται με διαφορές στη δυναμική τους επιχειρήσαμε ανάλυση FRAP. Όπως φαίνεται στην εικόνα 15Γ, κάθε ισομορφή παρουσιάζει παρόμοια κινητική μεταξύ των δυο κυτταρικών σειρών. Συγκρίνοντας τις τρεις ισομορφές μεταξύ τους παρατηρήσαμε ότι η HP1γ-GFP εμφανίζει ταχύτερη κινητική, ενώ η πιο αργή κινητική παρατηρείται για την HP1β-GFP. Το κλάσμα το

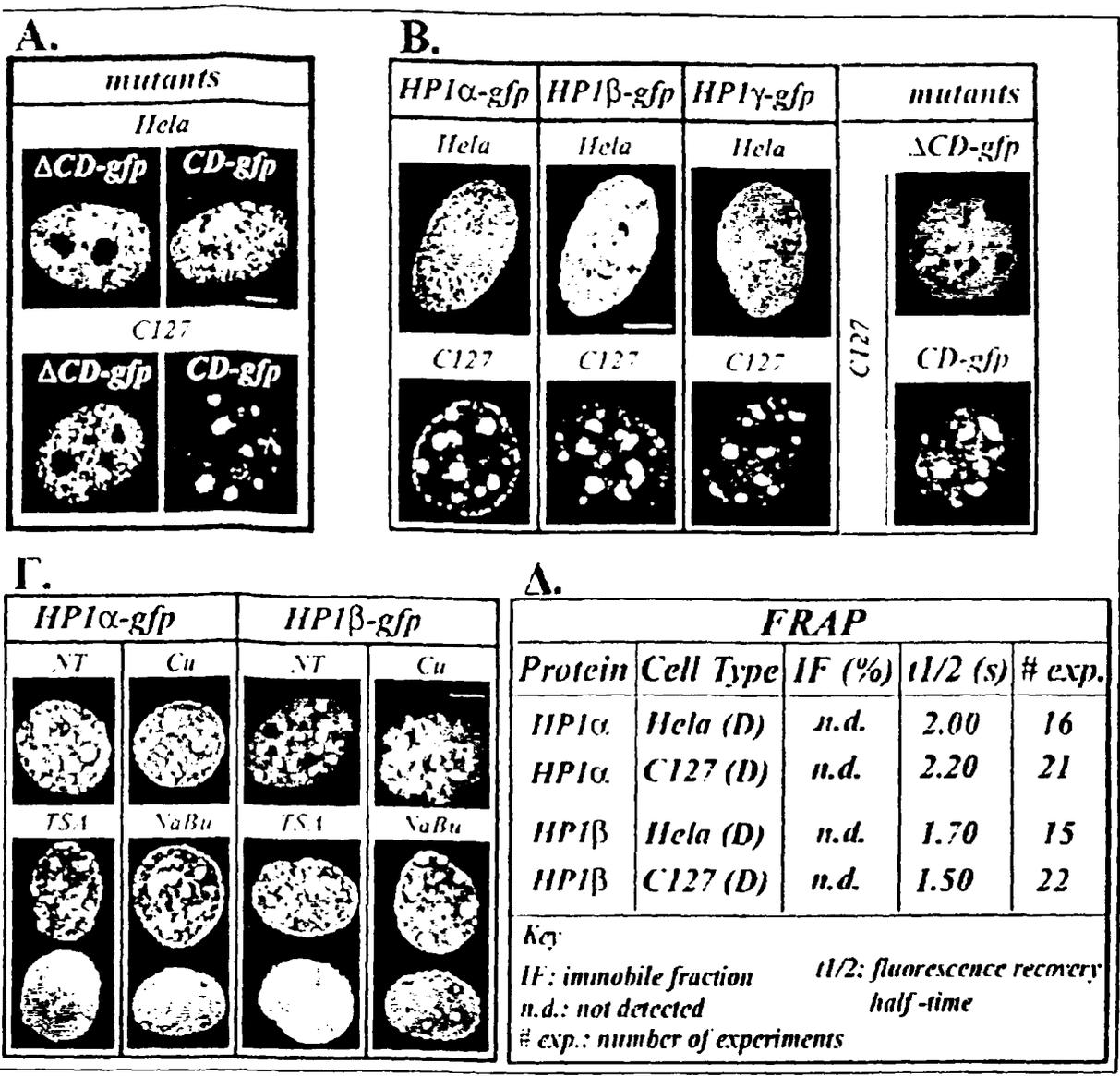


οποίο δεν ανταλλάσσεται («ακίνητο» κλάσμα/ 'immobile fraction') κυμαίνεται από 2.5-5.3% για κάθε ισομορφή και στις δυο σειρές, γεγονός που υποδηλώνει ότι σε κάθε περίπτωση ένα μικρό κλάσμα των HP1-GFP πρωτεϊνών είναι ισχυρά συνδεδεμένο στη χρωματίνη. Το ενδεχόμενο το «ακίνητο κλάσμα» να προκύπτει από πληθυσμό μορίων όπου η GFP έχει υποστεί φωτοχημική βλάβη αποκλείστηκε εκφράζοντας μόνο GFP, όπου δεν παρατηρήθηκε «ακίνητο κλάσμα» (εικόνα 15Γ). Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι η κατανομή των HP1-GFP πρωτεϊνών δεν συσχετίζεται με την κινητική τους, όπως αυτή καταγράφεται με την μέθοδο FRAP. Το πιο αντιπροσωπευτικό παράδειγμα που επιβεβαιώνει την παραπάνω παρατήρηση αποτελεί η HP1 γ -GFP, η οποία με διάχυτη κατανομή στο πυρηνόπλασμα στα κύτταρα HeLa, και με εστιακή κατανομή στα C127, παρουσιάζει αρκετά παρόμοια κινητική καθώς και ταυτόσημο ποσοστό «ακίνητου» κλάσματος (εικόνα 15Γ, HP1 γ -GFP, HeLa/D και C127/SP).

Σε συμφωνία με παραπάνω αποτελέσματα, μετά από χρώση διαμολυσμένων κυττάρων που έχουν διαμολυνθεί με αντισώματα που αναγνωρίζουν me₃K9-H3 παρατηρούμε ότι η συνεντόπιση των HP1 α -GFP και HP1 β -GFP με τις θέσεις me₃K9-H3 είναι αρκετά μεγάλη αλλά δεν είναι απόλυτη (εικόνα 15Δ, βέλη). Το γεγονός αυτό δείχνει ότι οι HP1-GFP πρωτεΐνες δεν εντοπίζονται αποκλειστικά σε ετεροχρωματινικές θέσεις. Στο ίδιο αποτέλεσμα καταλήγουμε όταν συγκρίνουμε την κατανομή της ενδογενούς HP1 β με την εντόπιση της HP1 α -GFP (και το αντίστροφο), στις δυο κυτταρικές σειρές (εικόνα 15Ε), όπου παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει εντόπιση ακριβώς στις ίδιες θέσεις. Ακόμη όταν επεξεργαστούμε με Triton-X και στη συνέχεια με RNase A πριν την μονιμοποίηση τα κύτταρα που εκφράζουν HP1-GFP πρωτεΐνες παρατηρούμε ότι μέρος των πρωτεϊνών εκπλένεται, ενώ κάποιο ποσοστό παραμένει στις θέσεις αρχικής ενσωμάτωσης (εικόνα 15ΣΤ), δεδομένα που είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του αντίστοιχου πειράματος με τις ενδογενείς πρωτεΐνες.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι οι HP1-GFP πρωτεΐνες εμφανίζουν διαφορετικό πρότυπο ενσωμάτωσης στα κύτταρα HeLa σε σχέση με τα C127. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται όταν συγκρίνουμε την κατανομή δυο μεταλλαγμένων μορφών της HP1 β , μιας που περιέχει τον χρωμοτομέα (CD-GFP) και μίας στην οποία ο χρωμοτομέας απουσιάζει (Δ CD-GFP). Όπως φαίνεται στην εικόνα 16Α, στα κύτταρα HeLa και οι δυο μεταλλαγμένες μορφές εμφανίζουν διάχυτη κατανομή. Αντίθετα, στα κύτταρα C127 η CD-GFP εντοπίζεται αποκλειστικά σε ετεροχρωματινικές εστίες, ενώ η CSD-GFP παραμένει διάχυτη στο κυτταρόπλασμα. Οι





Εικόνα 16. Κατανομή φυσιολογικών και μεταλλαγμένων μορφών HP1-GFP παρουσία φαρμακολογικών παραγόντων. (Α) Κατανομή των πρωτεϊνών CD-GFP (αναπαριστά τον χρομοτομέα της HP1 β) και Δ CD-GFP (αναπαριστά την HP1 β χωρίς τον χρομοτομέα) κατοπιν διαμόλυνσης σε κύτταρα HeLa και C127. Παρατηρούμε ότι η CD-GFP εντοπίζεται (όπως προβλέπεται) σε ετεροχρωματινικές εστίες στα κύτταρα C127, ενώ παραμένει διάχυτη στα κύτταρα HeLa. (Β) Το ίδιο πείραμα σε κύτταρα HeLa και C127 μετά από αναστολή με υδροξυουρία. Παρατηρούμε ότι οι HP1 α /HP1 β -GFP κεραιμένον διάχυτες στα κύτταρα ανθρώπινης προέλευσης, αλλά ενσωματώνονται σε ετεροχρωματινικές εστίες στα κύτταρα που προέρχονται από ποντικό. Η ενσωμάτωση της HP1 γ -GFP στις ετεροχρωματινικές εστίες στα κύτταρα από ποντικό δεν μεταβάλλεται υπό την επίδραση του φαρμάκου που αναστέλλει την S φάση. (Γ) Κατανομή των HP1 α -GFP και HP1 β -GFP σε κύτταρα C127 που αναπτύσσονται σε κανονικό θρεπτικό υλικό (NT), ή σε θρεπτικό υλικό που περιέχει κουρκουμίνη (Cu), τριχωστατίνη A (TSA) και βουτυρικό νάτριο (NaBu). Παρατηρούμε ότι παρουσία αναστολέων των απο-ακετυλασών μεταβάλλεται η κατανομή των HP1 πρωτεϊνών σε μέρος του πληθυσμού των κυττάρων C127, αποτέλεσμα που επαναλαμβάνεται και στα κύτταρα HeLa (δεν παρατίθεται). (Δ) Δεδομένα μετά από ανάλυση FRAP σε κύτταρα που έχουν επουστει με βουτυρικό νάτριο και εμφανίζουν διάχυτη κατανομή. Παρατηρούμε ότι το «ακίνητο» κλάσμα δεν ανιχνεύεται σε καμία περίπτωση, ενώ ο χρόνος ημίσειας ζωής ελλοτώνεται σε όλες τις περιπτώσεις συγκριτικά με τους αντίστοιχους χρόνους που προκύπτουν από τα κύτταρα που μεγαλώνουν σε κανονικό θρεπτικό (βλέπε εικόνα 15Γ).



παραπάνω παρατηρήσεις στα κύτταρα C127 επιβεβαιώθηκαν και σε άλλες κυτταρικές σειρές ποντικού (3T3, εμβρυονικούς ινοβλάστες). Επιπλέον, ανάλογα δεδομένα προέκυψαν όταν επιδράσαμε με φαρμακολογικούς παράγοντες που αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο στο όριο G1/S (HU, υδροξουρία) και παρακολουθήσουμε την κατανομή των πρωτεϊνών HP1. Όπως φαίνεται στην εικόνα 16B, οι HP1α/β/γ-GFP παρουσιάζουν διάχυτο πρότυπο κατανομής στα κύτταρα HeLa που βρίσκονται πριν την έναρξη της S φάσης, ενώ εμφανίζουν εστιακό πρότυπο κατανομής στα κύτταρα C127. Το ενδεχόμενο η HU να μην έχει την ίδια δράση στα κύτταρα C127 (και έτσι τα κύτταρα να μην συγχρονίζονται στο όριο των φάσεων G1/S) αποκλείστηκε μετά από ενσωμάτωσης των αναλόγων BrdU και Cy3dUTP.

Παρατηρήσαμε ότι μεταβάλλοντας το επίπεδο της ακετυλίωσης στο κυτταρικό σύστημα αλλάζει το πρότυπο κατανομής των πρωτεϊνών HP1. Αρχικά, μειώσαμε το επίπεδο της ακετυλίωσης των ιστονών στα κύτταρα C127, αναστέλλοντας την ακετυλ-τρανσφεράση p300/CBP, μέσω του παράγοντα κουρκουμίνη, αλλά διαπιστώσαμε ότι η κατανομή των HP1α-GFP και HP1β-GFP δεν μεταβάλλεται (εικόνα 16Γ). Όταν αυξήσαμε όμως το «γενικό» επίπεδο της ακετυλίωσης, αναστέλλοντας τις απο-ακετυλάσες των ιστονών μέσω του βουτυρικού νατρίου ή τριχοστατίνης A, παρατηρήσαμε ότι οι πρωτεΐνες HP1α-GFP και HP1β-GFP εμφανίζουν διάχυτο πρότυπο κατανομής σε μέρος του πληθυσμού των κυττάρων C127 (περίπου 30%) (για σχετικές παρατηρήσεις βλέπε (189)).

Αναλύοντας με την τεχνική FRAP τη δυναμική των πρωτεϊνών HP1-GFP σε κύτταρα C127 και HeLa που έχουν καλλιεργηθεί παρουσία βουτυρικού νατρίου παρατηρήσαμε ότι το «ακίνητο» κλάσμα ήταν μηδενικό (εικόνα 16Δ). Η παραπάνω παρατήρηση είναι απόλυτα συμβατή με τα μορφολογικά δεδομένα, σύμφωνα με τα οποία η υπερακετυλίωση των ιστονών φαίνεται να αναστέλει τη σύνδεση των πρωτεϊνών HP1 στις ετεροχρωματινικές εστίες. Επιπλέον, καταγράψαμε μια σχετική ελάττωση του χρόνου ημι-ανάκτησης ($t_{1/2}$), κυρίως στην HP1β-GFP και λιγότερο στην HP1α-GFP, αλλά η HP1α-GFP στα κύτταρα C127 δεν φάνηκε να επηρεάζεται (εικόνα 16Δ). Συμπερασματικά, από τα παραπάνω αποτελέσματα διαπιστώνουμε ότι η κατανομή των πρωτεϊνών HP1 εξαρτάται από παράγοντες που επηρεάζουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, τη μεταβολική κατάσταση των κυττάρων, καθώς και το κυτταρικό σύστημα που μελετάμε. Το πρότυπο κατανομής καθεμιάς από τις HP1-GFP πρωτεΐνες σε κάθε είδος κυττάρων που μελετήσαμε δεν φαίνεται να σχετίζεται άμεσα με την κινητική τους (όπως



καταγράφεται μέσω της μεθόδου FRAP), όπως θα προβλέπονταν από μια κατάσταση κλασσικής χημικής ισορροπίας.

4.11 Κατανομή και δυναμική των HP1 πρωτεϊνών σε φυσιολογικούς και μεταλλαγμένους εμβρυονικούς ινοβλάστες ποντικού.

Σε προηγούμενες *in vitro* μελέτες έχει δειχθεί ότι οι πρωτεΐνες HP1 έχουν την ικανότητα ομο- ή ετερο-διμερισμού, μέσω αλληλεπιδράσεων που διαμεσολαβούνται από την περιοχή του σκιάδους χρωμοτομέα (CSD) (118). Δραστική ανακατανομή των πρωτεϊνών HP1 θα μπορούσε, επομένως, να προκύψει εάν μια ισομορφή με ετεροχρωματινική εντόπιση (που εκφράζεται σε περίσσεια) στρατολογήσει μια άλλη ισομορφή και αντιστρόφως. Για να διευκρινίσουμε κατά πόσο οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών πρωτεϊνών HP1 παίζουν ρόλο στην εντόπισή τους, μελετήσαμε την κατανομή των HP1 πρωτεϊνών σε εμβρυονικούς ινοβλάστες ποντικού (MEFs) στους οποίους έχουν απαλειφθεί ταυτόχρονα οι HP1α και HP1β.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 17A/B, στα κύτταρα MEF α⁻/β⁻ οι ενδογενείς HP1α και HP1β δεν ανιχνεύονται, ενώ η HP1γ παρουσιάζει διάχυτο πρότυπο κατανομής. Αντίθετα στα φυσιολογικά MEF ανιχνεύονται και οι τρεις ισομορφές, η HP1γ με διάχυτο πρότυπο κατανομής, η HP1β με εστιακό, ενώ η HP1α εμφανίζει ταυτόχρονα εστιακή και διάχυτη κατανομή, αντίστοιχη εκείνης που παρατηρήθηκε στα αδιαφοροποίητα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (εικόνα 14A). Η παραπάνω παρατήρηση υποδηλώνει ότι η εντόπιση της HP1α εξαρτάται τόσο από το βαθμό όσο και από την κατεύθυνση της διαφοροποίησης.

Όταν εκφράσαμε τις HP1α-GFP και HP1β-GFP σε φυσιολογικά και διπλά μεταλλαγμένα (α⁻/β⁻) MEFs, παρατηρήσαμε ένα κλασσικό, εστιακό πρότυπο κατανομής. Η εντόπιση των πρωτεϊνών HP1α-GFP και HP1β-GFP υποδηλώνει ότι οι συγκεκριμένες ισομορφές έχουν μια εγγενή ικανότητα σύνδεσης με την ετεροχρωματίνη, χωρίς να αλληλοεξαρτώνται η μία από την άλλη. Αντίθετα, η εικόνα που προέκυψε για την HP1γ ήταν εντελώς διαφορετική. Όπως σε όλα τα κυτταρικά συστήματα με προέλευση από ποντίκι, έτσι και στα φυσιολογικά MEF η HP1γ-GFP εμφανίζει εστιακό πρότυπο κατανομής. Στην περίπτωση όμως των διπλά μεταλλαγμένων (α⁻/β⁻) MEF η HP1γ-GFP εμφάνιζε πάντοτε διάχυτο πρότυπο κατανομής (εικόνα 17Γ). Αυτό σημαίνει

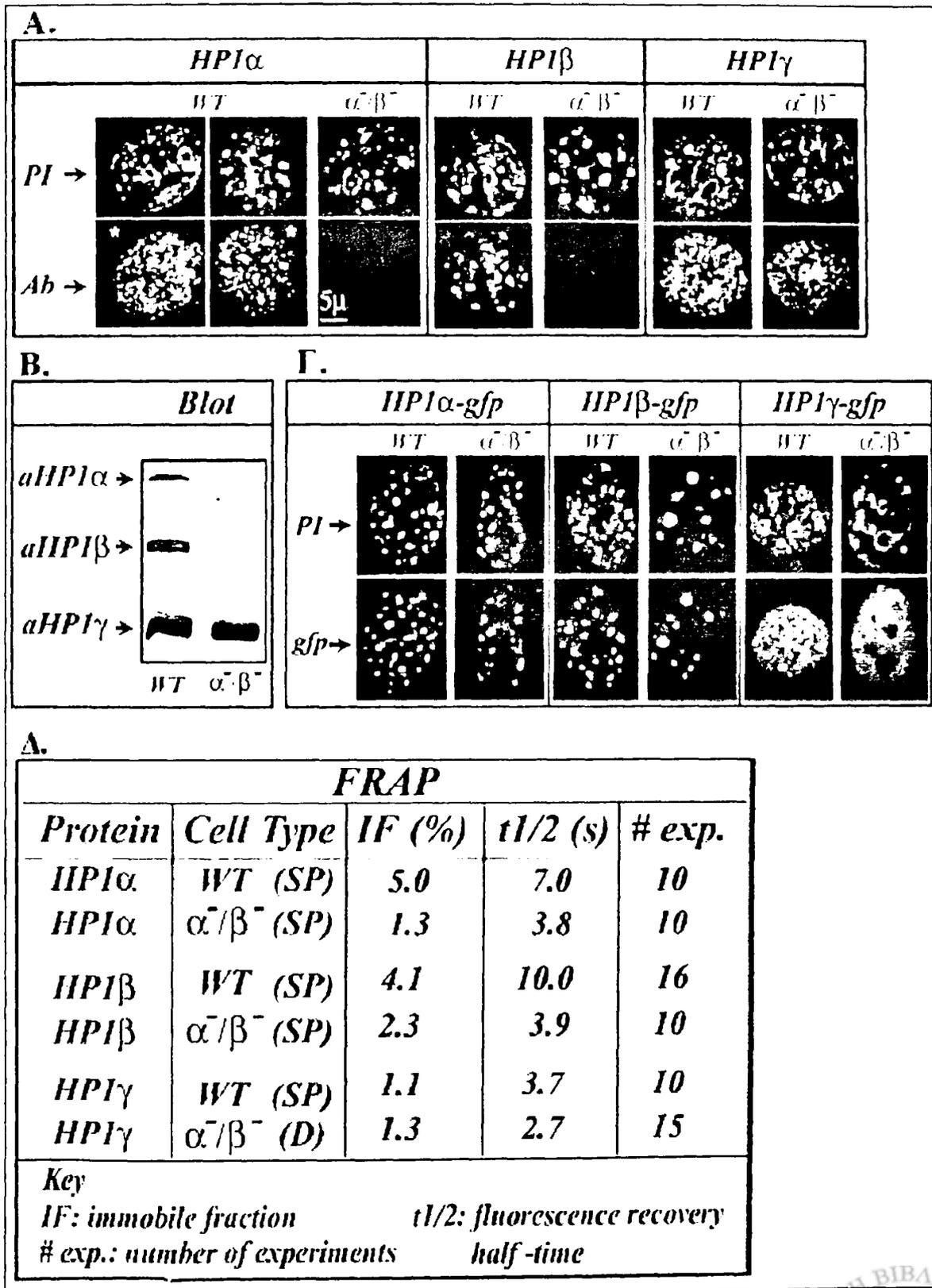


ότι η HP1 γ δεν έχει εγγενή ικανότητα σύνδεσης με την ετεροχρωματίνη, αλλά στρατολογείται στις συγκεκριμένες θέσεις είτε μέσω των HP1 α /HP1 β , είτε μέσω κάποιου παράγοντα που συνδέεται με αυτές.

Στη συνέχεια μελετήσαμε την κινητική των HP1-GFP πρωτεϊνών στα κύτταρα MEF, μέσω της τεχνικής FRAP. Η HP1 γ -GFP εμφανίζει παρόμοια κινητική σε κανονικά και μεταλλαγμένα (α/β) κύτταρα MEF (παρόμοια με εκείνη που είχε παρατηρηθεί σε HeLa και C127) και σχετικά μικρό «ακίνητο» κλάσμα. Αντίθετα, οι HP1 α -GFP και HP1 β -GFP εμφανίζουν ταχύτερη κινητική στα διπλά μεταλλαγμένα κύτταρα MEF (παρόμοια με εκείνη που είχε παρατηρηθεί σε HeLa και C127) σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα MEF, πράγμα που σημαίνει ότι η παρουσία και η ενσωμάτωση των ενδογενών HP1 α/β επηρεάζει την κινητική τους. Ανεξάρτητα από την κινητική τους, οι HP1 α -GFP και HP1 β -GFP εμφανίζουν εστιακό πρότυπο κατανομής σε όλους τους τύπους MEF, δεδομένο που αποτελεί ακόμη μια ένδειξη ότι η κινητική κάθε ισομορφής των HP1 πρωτεϊνών δεν συσχετίζεται άμεσα με την υποκυτταρική κατανομή τους.

Εικόνα 17 (επόμενη σελίδα). Κατανομή και δυναμική των πρωτεϊνών HP1 σε εμβρυονικούς ινοβλάστες ποντικού (MEFs). (A) Κατανομή των HP1 $\alpha/\beta/\gamma$ σε φυσιολογικά (WT) και διπλά μεταλλαγμένα (α/β) MEFs. Σε ξεχωριστά εικονίδια παρουσιάζονται δείγματα μετά από χρώση με ιωδιούχο προπιδίο (PI) και το κατάλληλο αντισώμα (Ab). (B) Ανοσοαποτύπωση κατά Western σε MEFs WT και α/β με τα αντισώματα για τις τρεις ισομορφές της HP1. (C) Κατανομή των πρωτεϊνών HP1-GFP στους δυο τύπους κυττάρων MEFs που χρησιμοποιήσαμε στο (A). Σε ξεχωριστά εικονίδια παρουσιάζονται δείγματα μετά από χρώση με ιωδιούχο προπιδίο (PI) και ο φθορισμός των HP1-GFP πρωτεϊνών. Παρατηρούμε την αξιοσημείωτη διαφορά στην κατανομή της HP1 γ -GFP σε κανονικά (WT) και διπλά μεταλλαγμένα (α/β) MEFs. (D) Δεδομένα μετά από ανάλυση FRAP σε φυσιολογικά και διπλά μεταλλαγμένα MEF. Παρατηρούμε την αξιοσημείωτη διαφορά στο χρόνο ημι-ανάκτησης ($t_{1/2}$) σε σύγκριση με τους χρόνους ημι-ανάκτησης στα κύτταρα HeLa και C127 που φαίνεται στην εικόνα 15Γ. Με (SP) συμβολίζουμε τα κύτταρα που εμφανίζουν εστιακό και με (D) τα κύτταρα που εμφανίζουν διάχυτο πρότυπο κατανομής. Κάθε ράβδος συμβολίζει διάστημα μήκους 5 μ m.





3.12 Συζήτηση II.

A) Οι πρωτεΐνες HP1 «αναφέρονται» στην χωρική οργάνωση της χρωματίνης και χρησιμεύουν ως εργαλεία κυτταρικής ταυτοποίησης

Στην παρούσα μελέτη καταγράψαμε την παρουσία εναλλακτικών προτύπων κατανομής των πρωτεϊνών HP1 σε κύτταρα θηλαστικών. Η εικόνα που προκύπτει από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι ότι οι πρωτεΐνες αυτές, και ειδικότερα οι HP1α και HP1γ, παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια στην κατανομή τους σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα, εμφανίζοντας διάφορα είδη εστιακών, μικρο-εστιακών έως και διάχυτων πρότυπων. Παρόμοια ετερογένεια εντόπισης εμφανίζει η HP1α (και σε αρκετά μικρότερο βαθμό η HP1β) σε ιστούς ανθρώπου και λεμφοκύτταρα που αναπτύσσονται *ex vivo* (Ritou E., Bai M. and Georgatos S.D., *in preparation*), αλλά και σε κύτταρα P19 (εμβρυονικού καρκινώματος) που διαφοροποιούνται *in vitro* (190). Οι παρατηρήσεις αυτές είναι σύμφωνες με προσφάτως δημοσιευμένες μελέτες που αφορούν άλλα είδη ES κυτταρών και κυτταρικές σειρές (191). Είναι πολύ πιθανό τα εναλλακτικά πρότυπα κατανομής των HP1 πρωτεϊνών να έχουν λειτουργική σημασία. Σε πρόσφατη ανασκόπηση (192) έχει προταθεί ότι η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης πιθανό να συσχετίζεται με τη μετακίνηση ενός γονιδιακού τόπου από το χρωματινικό μικρο-περιβάλλον που βρίσκεται αρχικά σε ένα διαφορετικό μικρο-περιβάλλον (ενεργοποιητικού ή κατασταλτικού χαρακτήρα). Κατά την ίδια λογική, η ανακατανομή των πρωτεϊνών HP1 μπορεί να αντικατοπτρίζει τη λειτουργική διαμερισματοποίηση του πυρήνα και δυναμική προσαρμογή του χρωματινικού δικτύου στις μεταβαλλόμενες ανάγκες ενός κυτταρικού συστήματος. Μια παρόμοια ιδέα συνδέει την ποικιλία των προτύπων κατανομής των πρωτεϊνών HP1 με την τύχη ενός κυτταρικού πληθυσμού κατά την διαφοροποίηση. Είναι γνωστό ότι οι πρωτεΐνες αυτές διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην διατήρηση των επιγενετικής κατάστασης ενός κυττάρου από τη μια γενιά στην επόμενη. Είναι επίσης σαφές ότι οι τρεις ισομορφές της HP1 συμμετέχουν στη μεταβίβαση των προτύπων γονιδιακής έκφρασης και καταστολής (193) διαμέσου αλληλεπιδράσεων με τον μηχανισμό μεθυλίωσης του DNA (165, 166, 194). Επομένως, εάν το πρότυπο κατανομής των πρωτεϊνών HP1 μεταβληθεί, είναι αναμενόμενο να



αλλάζει η επιγενετική κατάσταση και το πρότυπο της γονιδιακής έκφρασης. Με βάση τα παραπάνω θεωρούμε ότι οι HP1 πρωτεΐνες συμμετέχουν στη λειτουργική διαμερισματοποίηση του πυρήνα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταξινόμηση των κυτταρικών πληθυσμών που έχουν διαφορετικό αναπτυξιακό δυναμικό. Η υπόθεση αυτή παρουσιάζεται διαγραμματικά στην εικόνα 18Α.

B) Μικροσκοπική υφή και δυναμική κατάσταση των πρωτεϊνών HP1 σε κύτταρα θηλαστικών.

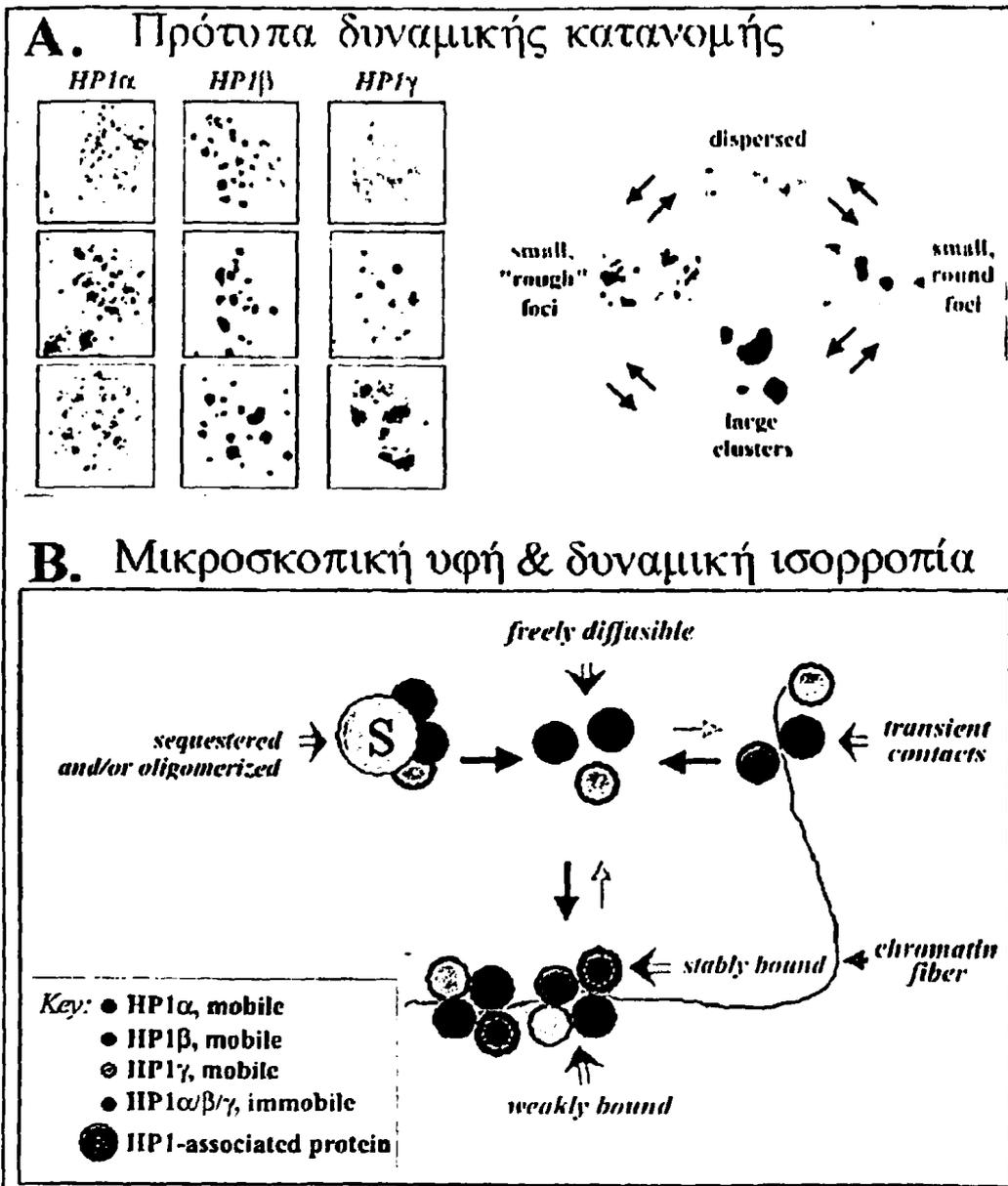
Όπως έχει ήδη αναφερθεί, σημαντικά στοιχεία που αφορούν στη δυναμική των πρωτεϊνών HP1 έχουν προκύψει από μελέτες FRAP (177, 182, 183, 195). Μέσω της μεθόδου αυτής μπορούμε να παρακολουθήσουμε τη δυναμική των πρωτεϊνών *in vivo*, χωρίς να υπάρχει όμως η δυνατότητα καταγραφής των φυσικών τους αλληλεπιδράσεων. Το σχήμα που παρουσιάζεται στην εικόνα 18B αναλύει με περισσότερες λεπτομέρειες αυτές τις πιθανές αλληλεπιδράσεις στις οποίες μπορεί να συμμετέχουν οι πρωτεΐνες HP1.

Υποστηρίζουμε ότι το πρότυπο κατανομής των πρωτεϊνών HP1 στον πυρήνα των κυττάρων εξαρτάται από τέσσερις διαφορετικούς παράγοντες, που είναι:

- i) Τα επίπεδα των ελεύθερων υπομονάδων, που είναι διαθέσιμα για να αλληλεπιδράσουν με την χρωματίνη, τα οποία ρυθμίζονται από τη σύνδεση / αποσύνδεση με μοριακούς συνοδούς ή άλλους παράγοντες,
- ii) Η παροδική (και πιθανά με «στοχαστικό» τρόπο) σύνδεση των πρωτεϊνών HP1 με την χρωματίνη που τους επιτρέπει να «σαρώνουν» το γονιδίωμα και να εντοπίζουν τις περιοχές που απαιτείται γονιδιακή αποσιώπηση,
- iii) Η σταθερή ενσωμάτωση των HP1 πρωτεϊνών σε χρωματινικές θέσεις υψηλής συγγένειας/μικρής διαθεσιμότητας,
- iv) Η χαλαρή σύνδεση των ίδιων πρωτεϊνών σε χρωματινικές θέσεις χαμηλής συγγένειας / υψηλής διαθεσιμότητας διαμέσου αλληλεπιδράσεων με τις αμινοτελικές 'ουρές' των ιστονών που φέρουν τις κατάλληλες επιγενετικές τροποποιήσεις ή με τις μορφές HP1 που είναι ήδη σταθερά ενσωματωμένες στην χρωματίνη.

Αρκετές ενδείξεις υποστηρίζουν την παραπάνω υποθετική διαγραμματική αναπαράσταση. Αρχικά, όπως έχει δειχθεί στην παρούσα και σε άλλες μελέτες, πάντοτε υπάρχει ένα μικρό





Εικόνα 18. Υποθετική διαγραμματική αναπαράσταση που επεξηγεί την ανακατανομή και τη δυναμική των HP1 πρωτεϊνών. (A) Πρότυπα κατανομής των HP1 πρωτεϊνών σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους και στάδια της ανάπτυξης. Στο δεξί μέρος παρατίθενται εικόνες από συνεστακτικό μικροσκόπιο (αρνητική χρώση για μεγαλύτερη αντίθεση φωτισμού) που αναπαριστούν τα εναλλακτικά πρότυπα εντόπισης των HP1 πρωτεϊνών. Στο αριστερό μέρος παρατίθενται εικόνες από αντιπροσωπευτικά πρότυπα κατανομής των πρωτεϊνών HP1α/β/γ σε διάφορους κυτταρικούς τύπους. (B) Μικροσκοπική υφή και δυναμική ισορροπία που είναι πιθανό να βρίσκονται οι HP1 πρωτεΐνες. Η κεντρική αρχή του προτεινόμενου μηχανισμού είναι ότι οι HP1 πρωτεΐνες συμμετέχουν σε πολλαπλές αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους ή με άλλους παράγοντες, όπως μοριακούς συνοδούς ή παράγοντες εναπόθεσης ιστανών (μεγάλες σφαίρες με την ένδειξη 'S'). Διακριτοί υποπληθυσμοί της HP1 συνδέονται σταθερά στην χρωματίνη (μικρές σφαίρες με πράσινο εσωτερικό), συνδέονται ασθενώς με περιοχές που περιέχουν me_3K9H3 ή HP1 (πράσινες, μπλε κ κόκκινες σφαίρες), σαρώνουν αδιάληπτα την χρωματίνη ή παραμένουν σε διάχυτη κατάσταση στο πυρήνoplασμα. Στοιχεία που υποστηρίζουν τις παραπάνω ιδέες παρατίθενται στο β' μέρος της συζήτησης.



κλάσμα HP1-GFP, το οποίο δεν ανακτά τον φθορισμό μετά από φωτοδιάχυση, δίνοντας την εντύπωση ότι συνδέεται σταθερά και μη αντιστρεπτά με τη χρωματίνη. Αυτό το 'ακίνητο κλάσμα' δεν αντιπροσωπεύει υλικό που έχει υποστεί μη αντιστρεπτή βλάβη (από την ενέργεια που μεταφέρεται από την πηγή του laser), γιατί δεν ανάλογο φαινόμενο δεν παρατηρείται σε πειράματα ελέγχου με την GFP πρωτεΐνη, αλλά σε πειράματα με HP1-GFP παρουσία αναστολέων των απο-ακετυλασών. Επιπλέον, όπως έχει δειχθεί στην παρούσα μελέτη, δεν υπάρχει πλήρης συνεντόπιση ενδογενών HP1 ή HP1-GFP πρωτεϊνών με τις θέσεις που περιέχουν me_3K9-H3 . Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες παρατηρήσεις, στις οποίες τεκμηριώνεται ότι οι HP1 πρωτεΐνες συνδέονται ισχυρότερα με «αποσταθεροποιημένα» νουκλεοσώματα (195), αλλά και με νουκλεοσώματα που βρίσκονται σε περιοχές που έχει προηγηθεί αναδιαμόρφωση της χρωματινικής ίνας μέσω του παράγοντα ACF (196), ανεξαρτήτως της μεθυλίωσης των ιστονών. Παρόλα ταυτά, ο ρόλος των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των ιστονών, αλλά και των ίδιων των πρωτεϊνών HP1 δεν πρέπει να παραβλέπεται: είναι πλέον γνωστό ότι οι HP1 πρωτεΐνες δεν συνδέονται με την χρωματίνη όταν φωσφορυλιώνεται η ιστόνη H3 (197). Επίσης, η συμμετοχή των πρωτεϊνών HP1 στη γονιδιακή αποσιώπηση έχει συσχετιστεί με τη παρουσία φωσφορυλίωσης σε συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα τους (121).



3.13 Συμπεράσματα

1. Η τριμεθυλίωση στη λυσίνη 9 στην ιστόνη H3 δεν αποτελεί μοναδική θέση σύνδεσης της HP1 στην ετεροχρωματίνη.
2. Η HP1 εμφανίζει εναλλακτικούς τρόπους ενσωμάτωσης στη χρωματίνη.
3. Υπάρχουν διακριτοί υποπληθυσμοί της HP1.
4. Οι HP1 πρωτεΐνες συνδέονται σε ετεροχρωματινικές και ευχρωματινικές εστίες.
5. Η κατανομή των HP1 πρωτεϊνών εμφανίζει ετερογένεια, η οποία εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο, το αναπτυξιακό δυναμικό των κυττάρων και τον κυτταρικό κύκλο.
6. Οι πρωτεΐνες HP1α/β έχουν εγγενή ικανότητα σύνδεσης στη χρωματίνη, ενώ η ενσωμάτωση της HP1γ στη χρωματίνη εξαρτάται από την παρουσία των HP1α/β.



3.14 Περίληψη

Εξετάσαμε τις αλληλεπιδράσεις της HP1 με τη χρωματίνη σε διαφορετικά επίπεδα πολυπλοκότητας σε *in vivo* και *in vitro* συνθήκες. Σε *in vitro* δοκιμές δείξαμε ότι η HP1 συνδέεται εκλεκτικά, στοιχειομετρικά και ανεξάρτητα από τις ιονικές συνθήκες στην ανασυνδυασμένη ιστόνη H3, μέσω του κεντρικού τμήματος της ιστόνης («histone fold»). Επίσης χρησιμοποιώντας τεμάχια φυσικής χρωματίνης, χρωματίνη από κύτταρα συγχρονισμένα στη S-φάση, και περιφερική ετεροχρωματίνη δείξαμε ότι η HP1 συνδέεται πιο ισχυρά με αποσταθεροποιημένα και διασπασμένα (σωματίδια H3/H4) νουκλεοσώματα σε σχέση με τα ακέραια νουκλεοσώματα. Ακόμη με ανάλυση με ανοσοαποτύπωση κατά Western και με φασματοσκοπία μάζας δείξαμε ότι τα σωματίδια που επιλέγει η HP1 διαθέτουν ένα πολύπλοκο μοτίβο μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, δεν είναι ιδιαίτερα εμπλουτισμένα σε me₃K9-H3 και δεν ακολουθούν το σύνολο των κανόνων που υπαγορεύονται από τον λεγόμενο 'ιστονικό κώδικα'. Οι βιοχημικές παρατηρήσεις μας έδειξαν ότι η HP1 συνδέεται με τα διάφορα νουκλεοσωματικά υποστρώματα με τρόπο ο οποίος εξαρτάται από τη φυσική κατάσταση της χρωματίνης. Για τον λόγο αυτό, στη συνέχεια μελετήσαμε τη δυναμική οργάνωση της HP1 σε ένα κυτταρικό σύστημα, ώστε να συσχετίσουμε τις βιοχημικές παρατηρήσεις με διαδικασίες και λειτουργίες που λαμβάνουν χώρα υπό *in vivo* συνθήκες. Παρατηρήσαμε ότι η HP1 και η me₃K9-H3 δεν συνεντοπίζονται απόλυτα και παρουσιάζουν διακριτά πρότυπα κατανομής, ενώ η σταθερή ενσωμάτωση της HP1 στις ετεροχρωματινικές εστίες εξαρτάται από την S φάση. Τα αποτελέσματα αυτά αμφισβητούν το δόγμα ότι η me₃K9-H3 αποτελεί τη μοναδική θέση πρόσδεσης για την HP1 και υποστηρίζουν ένα μηχανισμό ενσωμάτωσης που βασίζεται στην αντιγραφή.

Επεκτείνοντας τη μελέτη, συγκρίναμε την κατανομή των τριών ισομορφών της HP1 καθώς και την ενσωμάτωση και την δυναμική των HP1-GFP πρωτεϊνών σε διαφορετικά κυτταρικά συστήματα και μεταβολικές συνθήκες. Καταγράψαμε την παρουσία εναλλακτικών προτύπων κατανομής των πρωτεϊνών HP1 σε κύτταρα θηλαστικών που καθορίζονται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των HP1 πρωτεϊνών, τον κυτταρικό κύκλο και το αναπτυξιακό δυναμικό των κυττάρων, ανεξάρτητα από τη παρουσία της me₃K9-H3.



3.15 Summary

The role of post-translational modifications of nucleosomal core histones in HP1 incorporation to heterochromatin

George Dialynas

We have examined HP1 -chromatin interactions in different molecular contexts *in vitro* and *in vivo*. Employing purified components we show that HP1 exhibits selective, stoichiometric, and salt-resistant binding to recombinant histone H3, associating primarily with the helical "histone fold" domain. Furthermore, using "bulk" nucleosomes released by MNase digestion, S-phase extracts, and fragments of peripheral heterochromatin, we demonstrate that HP1 associates more tightly with destabilized or disrupted nucleosomes (H3/H4 subcomplexes) than with intact particles. Western blotting and mass spectrometry data indicate that HP1 -selected H3/H4 particles and subparticles possess a complex pattern of posttranslational modifications but are not particularly enriched in me3K9-H3. Consistent with these results, mapping of HP1 and me3K9-H3 sites *in vivo* reveals overlapping, yet spatially distinct patterns, while transient transfection assays with synchronized cells show that stable incorporation of HP1 -gfp into heterochromatin requires passage through the S-phase. The data amassed challenge the dogma that me3K9H3 is necessary and sufficient for HP1 binding and unveil a new mode of HP1-chromatin interactions. We have compared the distribution of the three HP1 variants (α , β and γ) in immortalized epithelial cells, embryonic stem cells and fibroblasts obtained from wild type or HP1-knockout animals. In parallel, we have interrogated assembly and dynamics of newly expressed HP1-gfp proteins under normal culture conditions and upon cell cycle arrest or treatment with HDAC or HAT inhibitors. The results reveal a range of cell type/state specific patterns that do not conform to the concept of a spatially fixed, me₃K9-histone H3-anchored protein network. Instead, our observations show that targeting of HP1 proteins to heterochromatin is regulated by both intrinsic and extrinsic factors, including HP1-HP1 interactions, cell cycle signals and developmental cues. These data provide new evidence for HP1 plasticity under shifting microenvironmental conditions and offer a concrete conceptual framework for understanding chromatin dynamics *in vivo*.



4 Βιβλιογραφία

1. Widom J. Structure, dynamics, and function of chromatin in vitro. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1998;27:285-327.
2. Grigoryev SA, Bulyanko YA, Popova EY. The end adjusts the means: heterochromatin remodelling during terminal cell differentiation. *Chromosome Res* 2006;14(1):53-69.
3. Hennig W. Heterochromatin. *Chromosoma* 1999;108(1):1-9.
4. Richards EJ, Elgin SC. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* 2002;108(4):489-500.
5. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001;293(5532):1074-80.
6. Richmond TJ, Finch JT, Rushton B, Rhodes D, Klug A. Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature* 1984;311(5986):532-7.
7. Davey CA, Richmond TJ. DNA-dependent divalent cation binding in the nucleosome core particle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(17):11169-74.
8. Kornberg RD. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 1974;184(139):868-71.
9. Oudet P, Gross-Bellard M, Chambon P. Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* 1975;4(4):281-300.
10. Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 1997;389(6648):251-60.
11. Thomas JO. The higher order structure of chromatin and histone H1. *J Cell Sci Suppl* 1984;1:1-20.
12. Dorigo B, Schalch T, Bystricky K, Richmond TJ. Chromatin fiber folding: requirement for the histone H4 N-terminal tail. *J Mol Biol* 2003;327(1):85-96.
13. Pennings S, Meersseman G, Bradbury EM. Linker histones H1 and H5 prevent the mobility of positioned nucleosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(22):10275-9.
14. Varga-Weisz PD, Becker PB. Transcription factor-mediated chromatin remodelling: mechanisms and models. *FEBS Lett* 1995;369(1):118-21.



15. Luger K, Richmond TJ. DNA binding within the nucleosome core. *Curr Opin Struct Biol* 1998;8(1):33-40.
16. Eisen JA, Sweder KS, Hanawalt PC. Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct sequences and functions. *Nucleic Acids Res* 1995;23(14):2715-23.
17. Haynes SR, Dollard C, Winston F, Beck S, Trowsdale J, Dawid IB. The bromodomain: a conserved sequence found in human, *Drosophila* and yeast proteins. *Nucleic Acids Res* 1992;20(10):2603.
18. Yang XJ. Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling. *Bioessays* 2004;26(10):1076-87.
19. Armstrong JA, Papoulas O, Daubresse G, Sperling AS, Lis JT, Scott MP, et al. The *Drosophila* BRM complex facilitates global transcription by RNA polymerase II. *Embo J* 2002;21(19):5245-54.
20. Cote J, Quinn J, Workman JL, Peterson CL. Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science* 1994;265(5168):53-60.
21. Thomas JO. HMG1 and 2: architectural DNA-binding proteins. *Biochem Soc Trans* 2001;29(Pt 4):395-401.
22. Ringrose L, Ehret H, Paro R. Distinct contributions of histone H3 lysine 9 and 27 methylation to locus-specific stability of polycomb complexes. *Mol Cell* 2004;16(4):641-53.
23. Armstrong JA, Sperling AS, Deuring R, Manning L, Moseley SL, Papoulas O, et al. Genetic screens for enhancers of brahma reveal functional interactions between the BRM chromatin-remodeling complex and the delta-notch signal transduction pathway in *Drosophila*. *Genetics* 2005;170(4):1761-74.
24. Kal AJ, Mahmoudi T, Zak NB, Verrijzer CP. The *Drosophila* brahma complex is an essential coactivator for the trithorax group protein zeste. *Genes Dev* 2000;14(9):1058-71.
25. Holstege FC, Jennings EG, Wyrick JJ, Lee TI, Hengartner CJ, Green MR, et al. Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell* 1998;95(5):717-28.



26. Sif S. ATP-dependent nucleosome remodeling complexes: enzymes tailored to deal with chromatin. *J Cell Biochem* 2004;91(6):1087-98.
27. Trouche D, Le Chalony C, Muchardt C, Yaniv M, Kouzarides T. RB and hbrm cooperate to repress the activation functions of E2F1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(21):11268-73.
28. Boyer LA, Shao X, Ebright RH, Peterson CL. Roles of the histone H2A-H2B dimers and the (H3-H4)₂ tetramer in nucleosome remodeling by the SWI-SNF complex. *J Biol Chem* 2000;275(16):11545-52.
29. Morillon A, Karabetsou N, O'Sullivan J, Kent N, Proudfoot N, Mellor J. Isw1 chromatin remodeling ATPase coordinates transcription elongation and termination by RNA polymerase II. *Cell* 2003;115(4):425-35.
30. Santoro R, Li J, Grummt I. The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription. *Nat Genet* 2002;32(3):393-6.
31. Zhou Y, Santoro R, Grummt I. The chromatin remodeling complex NoRC targets HDAC1 to the ribosomal gene promoter and represses RNA polymerase I transcription. *Embo J* 2002;21(17):4632-40.
32. Granok H, Leibovitch BA, Shaffer CD, Elgin SC. Chromatin. Ga-ga over GAGA factor. *Curr Biol* 1995;5(3):238-41.
33. Fyodorov DV, Kadonaga JT. Dynamics of ATP-dependent chromatin assembly by ACF. *Nature* 2002;418(6900):897-900.
34. Bozhenok L, Wade PA, Varga-Weisz P. WSTF-ISWI chromatin remodeling complex targets heterochromatic replication foci. *Embo J* 2002;21(9):2231-41.
35. Tran HG, Steger DJ, Iyer VR, Johnson AD. The chromo domain protein chd1p from budding yeast is an ATP-dependent chromatin-modifying factor. *Embo J* 2000;19(10):2323-31.
36. Wade PA, Geggion A, Jones PL, Ballestar E, Aubry F, Wolffe AP. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet* 1999;23(1):62-6.



37. Zhang Y, LeRoy G, Seelig HP, Lane WS, Reinberg D. The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities. *Cell* 1998;95(2):279-89.
38. Schmidt DR, Schreiber SL. Molecular association between ATR and two components of the nucleosome remodeling and deacetylating complex, HDAC2 and CHD4. *Biochemistry* 1999;38(44):14711-7.
39. Krogan NJ, Keogh MC, Datta N, Sawa C, Ryan OW, Ding H, et al. A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1. *Mol Cell* 2003;12(6):1565-76.
40. Shen X, Mizuguchi G, Hamiche A, Wu C. A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature* 2000;406(6795):541-4.
41. Jonsson ZO, Dhar SK, Narlikar GJ, Auty R, Wagle N, Pellman D, et al. Rvb1p and Rvb2p are essential components of a chromatin remodeling complex that regulates transcription of over 5% of yeast genes. *J Biol Chem* 2001;276(19):16279-88.
42. Flaus A, Owen-Hughes T. Dynamic properties of nucleosomes during thermal and ATP-driven mobilization. *Mol Cell Biol* 2003;23(21):7767-79.
43. Schiessel H, Gelbart WM, Bruinsma R. DNA folding: structural and mechanical properties of the two-angle model for chromatin. *Biophys J* 2001;80(4):1940-56.
44. Hansen JC. Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2002;31:361-92.
45. Luger K, Hansen JC. Nucleosome and chromatin fiber dynamics. *Curr Opin Struct Biol* 2005;15(2):188-96.
46. Akey CW, Luger K. Histone chaperones and nucleosome assembly. *Curr Opin Struct Biol* 2003;13(1):6-14.
47. Louters L, Chalkley R. Exchange of histones H1, H2A, and H2B in vivo. *Biochemistry* 1985;24(13):3080-5.
48. Smith S, Stillman B. Purification and characterization of CAF-I, a human cell factor required for chromatin assembly during DNA replication in vitro. *Cell* 1989;58(1):15-25.



49. Belotserkovskaya R, Oh S, Bondarenko VA, Orphanides G, Studitsky VM, Reinberg D. FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science* 2003;301(5636):1090-3.
50. Schwabish MA, Struhl K. Evidence for eviction and rapid deposition of histones upon transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 2004;24(23):10111-7.
51. Bruno M, Flaus A, Stockdale C, Rencurel C, Ferreira H, Owen-Hughes T. Histone H2A/H2B dimer exchange by ATP-dependent chromatin remodeling activities. *Mol Cell* 2003;12(6):1599-606.
52. Park YJ, Dyer PN, Tremethick DJ, Luger K. A new fluorescence resonance energy transfer approach demonstrates that the histone variant H2AZ stabilizes the histone octamer within the nucleosome. *J Biol Chem* 2004;279(23):24274-82.
53. Vicent GP, Nacht AS, Smith CL, Peterson CL, Dimitrov S, Beato M. DNA instructed displacement of histones H2A and H2B at an inducible promoter. *Mol Cell* 2004;16(3):439-52.
54. McBryant SJ, Park YJ, Abemathy SM, Laybourn PJ, Nyborg JK, Luger K. Preferential binding of the histone (H3-H4)₂ tetramer by NAP1 is mediated by the amino-terminal histone tails. *J Biol Chem* 2003;278(45):44574-83.
55. Mizuguchi G, Shen X, Landry J, Wu WH, Sen S, Wu C. ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* 2004;303(5656):343-8.
56. Kobor MS, Venkatasubrahmanyam S, Meneghini MD, Gin JW, Jennings JL, Link AJ, et al. A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin. *PLoS Biol* 2004;2(5):E131.
57. Li G, Widom J. Nucleosomes facilitate their own invasion. *Nat Struct Mol Biol* 2004;11(8):763-9.
58. Tse C, Georgieva EI, Ruiz-Garcia AB, Sendra R, Hansen JC. Gcn5p, a transcription-related histone acetyltransferase, acetylates nucleosomes and folded nucleosomal arrays in the absence of other protein subunits. *J Biol Chem* 1998;273(49):32388-92.



59. Dorigo B, Schalch T, Kulangara A, Duda S, Schroeder RR, Richmond TJ. Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber. *Science* 2004;306(5701):1571-3.
60. Lu X, Hansen JC. Identification of specific functional subdomains within the linker histone H10 C-terminal domain. *J Biol Chem* 2004;279(10):8701-7.
61. Springhetti EM, Istomina NE, Whisstock JC, Nikitina T, Woodcock CL, Grigoryev SA. Role of the M-loop and reactive center loop domains in the folding and bridging of nucleosome arrays by MENT. *J Biol Chem* 2003;278(44):43384-93.
62. van Leeuwen F, Gottschling DE. Genome-wide histone modifications: gaining specificity by preventing promiscuity. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14(6):756-62.
63. Edmondson DG, Roth SY. Chromatin and transcription. *Faseb J* 1996;10(10):1173-82.
64. Hecht A, Laroche T, Strahl-Bolsinger S, Gasser SM, Grunstein M. Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell* 1995;80(4):583-92.
65. Wang X, Moore SC, Laszczak M, Ausio J. Acetylation increases the alpha-helical content of the histone tails of the nucleosome. *J Biol Chem* 2000;275(45):35013-20.
66. Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, et al. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 2004;119(7):941-53.
67. Metzger E, Wissmann M, Yin N, Muller JM, Schneider R, Peters AH, et al. LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature* 2005;437(7057):436-9.
68. Tsukada Y, Fang J, Erdjument-Bromage H, Warren ME, Borchers CH, Tempst P, et al. Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* 2006;439(7078):811-6.
69. Wang Y, Wysocka J, Sayegh J, Lee YH, Perlin JR, Leonelli L, et al. Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethyliminination. *Science* 2004;306(5694):279-83.
70. Millar CB, Grunstein M. Genome-wide patterns of histone modifications in yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7(9):657-66.



71. Cheng X, Collins RE, Zhang X. Structural and sequence motifs of protein (histone) methylation enzymes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2005;34:267-94.
72. Dai J, Sultan S, Taylor SS, Higgins JM. The kinase haspin is required for mitotic histone H3 Thr 3 phosphorylation and normal metaphase chromosome alignment. *Genes Dev* 2005;19(4):472-88.
73. Zhong S, Jansen C, She QB, Goto H, Inagaki M, Bode AM, et al. Ultraviolet B-induced phosphorylation of histone H3 at serine 28 is mediated by MSK1. *J Biol Chem* 2001;276(35):33213-9.
74. Zhong S, Zhang Y, Jansen C, Goto H, Inagaki M, Dong Z. MAP kinases mediate UVB-induced phosphorylation of histone H3 at serine 28. *J Biol Chem* 2001;276(16):12932-7.
75. Goto H, Yasui Y, Nigg EA, Inagaki M. Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation. *Genes Cells* 2002;7(1):11-7.
76. Mumion ME, Adams RR, Callister DM, Allis CD, Earnshaw WC, Swedlow JR. Chromatin-associated protein phosphatase 1 regulates aurora-B and histone H3 phosphorylation. *J Biol Chem* 2001;276(28):26656-65.
77. Sassone-Corsi P, Mizzen CA, Cheung P, Crosio C, Monaco L, Jacquot S, et al. Requirement of Rsk-2 for epidermal growth factor-activated phosphorylation of histone H3. *Science* 1999;285(5429):886-91.
78. Hendzel MJ, Sun JM, Chen HY, Rattner JB, Davie JR. Histone acetyltransferase is associated with the nuclear matrix. *J Biol Chem* 1994;269(36):22894-901.
79. Wei Y, Yu L, Bowen J, Gorovsky MA, Allis CD. Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell* 1999;97(1):99-109.
80. Boulikas T, Bastin B, Boulikas P, Dupuis G. Increase in histone poly (ADP-ribosylation) in mitogen-activated lymphoid cells. *Exp Cell Res* 1990;187(1):77-84.
81. Spotswood HT, Turner BM. An increasingly complex code. *J Clin Invest* 2002;110(5):577-82.
82. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000;403(6765):41-5.
83. Turner BM. Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* 2000;22(9):836-45.



84. Lo WS, Duggan L, Emre NC, Belotserkovskya R, Lane WS, Shiekhattar R, et al. Snf1—a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription. *Science* 2001;293(5532):1142-6.
85. Zegerman P, Canas B, Pappin D, Kouzarides T. Histone H3 lysine 4 methylation disrupts binding of nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) repressor complex. *J Biol Chem* 2002;277(14):11621-4.
86. Old RW, Woodland HR. Histone genes: not so simple after all. *Cell* 1984;38(3):624-6.
87. Tagami H, Ray-Gallet D, Almouzni G, Nakatani Y. Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* 2004;116(1):51-61.
88. Ray-Gallet D, Quivy JP, Scamps C, Martini EM, Lipinski M, Almouzni G. HIRA is critical for a nucleosome assembly pathway independent of DNA synthesis. *Mol Cell* 2002;9(5):1091-100.
89. Blower MD, Karpen GH. The role of *Drosophila* CID in kinetochore formation, cell-cycle progression and heterochromatin interactions. *Nat Cell Biol* 2001;3(8):730-9.
90. Oegema K, Desai A, Rybina S, Kirkham M, Hyman AA. Functional analysis of kinetochore assembly in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 2001;153(6):1209-26.
91. Ouspenski, II, Van Hooser AA, Brinkley BR. Relevance of histone acetylation and replication timing for deposition of centromeric histone CENP-A. *Exp Cell Res* 2003;285(2):175-88.
92. Sullivan KF, Hechenberger M, Masri K. Human CENP-A contains a histone H3 related histone fold domain that is required for targeting to the centromere. *J Cell Biol* 1994;127(3):581-92.
93. Costanzi C, Pehrson JR. Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature* 1998;393(6685):599-601.
94. Ladumer AG. Inactivating chromosomes: a macro domain that minimizes transcription. *Mol Cell* 2003;12(1):1-3.
95. Abbott DW, Laszczak M, Lewis JD, Su H, Moore SC, Hills M, et al. Structural characterization of macroH2A containing chromatin. *Biochemistry* 2004;43(5):1352-9.



96. Chadwick BP, Willard HF. A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome. *J Cell Biol* 2001;152(2):375-84.
97. Angelov D, Verdel A, An W, Bondarenko V, Hans F, Doyen CM, et al. SWI/SNF remodeling and p300-dependent transcription of histone variant H2ABbd nucleosomal arrays. *Embo J* 2004;23(19):3815-24.
98. Redon C, Pilch D, Rogakou E, Sedelnikova O, Newrock K, Bonner W. Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev* 2002;12(2):162-9.
99. Fan JY, Rangasamy D, Luger K, Tremethick DJ. H2A.Z alters the nucleosome surface to promote HP1 α -mediated chromatin fiber folding. *Mol Cell* 2004;16(4):655-61.
100. Swaminathan J, Baxter EM, Corces VG. The role of histone H2Av variant replacement and histone H4 acetylation in the establishment of *Drosophila* heterochromatin. *Genes Dev* 2005;19(1):65-76.
101. Meneghini MD, Wu M, Madhani HD. Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell* 2003;112(5):725-36.
102. Allis CD, Richman R, Gorovsky MA, Ziegler YS, Touchstone B, Bradley WA, et al. hvl is an evolutionarily conserved H2A variant that is preferentially associated with active genes. *J Biol Chem* 1986;261(4):1941-8.
103. Dhillon N, Kamakaka RT. A histone variant, Htz1p, and a Sir1p-like protein, Esc2p, mediate silencing at HMR. *Mol Cell* 2000;6(4):769-80.
104. Laroche M, Gaudreau L. H2A.Z has a function reminiscent of an activator required for preferential binding to intergenic DNA. *Embo J* 2003;22(17):4512-22.
105. Kimura H, Cook PR. Kinetics of core histones in living human cells: little exchange of H3 and H4 and some rapid exchange of H2B. *J Cell Biol* 2001;153(7):1341-53.
106. Zhang Y, Griffin K, Mondal N, Parvin JD. Phosphorylation of histone H2A inhibits transcription on chromatin templates. *J Biol Chem* 2004;279(21):21866-72.
107. Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 1999;146(5):905-16.
108. Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* 2000;10(15):886-95.



109. Eissenberg JC, James TC, Foster-Hartnett DM, Hartnett T, Ngan V, Elgin SC. Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(24):9923-7.
110. James TC, Elgin SC. Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its gene. *Mol Cell Biol* 1986;6(11):3862-72.
111. Moazed D. Enzymatic activities of Sir2 and chromatin silencing. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13(2):232-8.
112. Norwood LE, Grade SK, Cryderman DE, Hines KA, Furiasse N, Toro R, et al. Conserved properties of HP1(Hsalpha). *Gene* 2004;336(1):37-46.
113. Waterston RH, Lander ES, Sulston JE. On the sequencing of the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(6):3712-6.
114. Vermaak D, Henikoff S, Malik HS. Positive selection drives the evolution of rhino, a member of the heterochromatin protein 1 family in *Drosophila*. *PLoS Genet* 2005;1(1):96-108.
115. Ball LJ, Murzina NV, Broadhurst RW, Raine AR, Archer SJ, Stott FJ, et al. Structure of the chromatin binding (chromo) domain from mouse modifier protein 1. *Embo J* 1997;16(9):2473-81.
116. Singh PB, Georgatos SD. HP1: facts, open questions, and speculation. *J Struct Biol* 2002;140(1-3):10-6.
117. Cowieson NP, Partridge JF, Allshire RC, McLaughlin PJ. Dimerisation of a chromo shadow domain and distinctions from the chromodomain as revealed by structural analysis. *Curr Biol* 2000;10(9):517-25.
118. Brasher SV, Smith BO, Fogh RH, Nietlispach D, Thiru A, Nielsen PR, et al. The structure of mouse HP1 suggests a unique mode of single peptide recognition by the shadow chromo domain dimer. *Embo J* 2000;19(7):1587-97.
119. Jones DO, Cowell IG, Singh PB. Mammalian chromodomain proteins: their role in genome organisation and expression. *Bioessays* 2000;22(2):124-37.



120. Badugu R, Yoo Y, Singh PB, Kellum R. Mutations in the heterochromatin protein 1 (HP1) hinge domain affect HP1 protein interactions and chromosomal distribution. *Chromosoma* 2005;113(7):370-84.
121. Lomberk G, Bensi D, Fernandez-Zapico ME, Urrutia R. Evidence for the existence of an HP1-mediated subcode within the histone code. *Nat Cell Biol* 2006;8(4):407-15.
122. Zhao T, Heyduk T, Eissenberg JC. Phosphorylation site mutations in heterochromatin protein 1 (HP1) reduce or eliminate silencing activity. *J Biol Chem* 2001;276(12):9512-8.
123. Fanti L, Berloco M, Piacentini L, Pimpinelli S. Chromosomal distribution of heterochromatin protein 1 (HP1) in *Drosophila*: a cytological map of euchromatic HP1 binding sites. *Genetica* 2003;117(2-3):135-47.
124. Horsley D, Hutchings A, Butcher GW, Singh PB. 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* 1996;73(4):308-11.
125. Minc E, Courvalin JC, Buendia B. HP1 gamma associates with euchromatin and heterochromatin in mammalian nuclei and chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 2000;90(3-4):279-84.
126. Bernard P, Maure JF, Partridge JF, Genier S, Javerzat JP, Allshire RC. Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. *Science* 2001;294(5551):2539-42.
127. Nonaka N, Kitajima T, Yokobayashi S, Xiao G, Yamamoto M, Grewal SI, et al. Recruitment of cohesin to heterochromatic regions by Swi6/HP1 in fission yeast. *Nat Cell Biol* 2002;4(1):89-93.
128. Ekwall K, Nimmo ER, Javerzat JP, Borgstrom B, Egel R, Cranston G, et al. Mutations in the fission yeast silencing factors *clr4+* and *rik1+* disrupt the localisation of the chromodomain protein Swi6p and impair centromere function. *J Cell Sci* 1996;109 (Pt 11):2637-48.
129. Ekwall K, Javerzat JP, Lorentz A, Schmidt H, Cranston G, Allshire R. The chromodomain protein Swi6: a key component at fission yeast centromeres. *Science* 1995;269(5229):1429-31.



130. Kellum R, Raff JW, Alberts BM. Heterochromatin protein 1 distribution during development and during the cell cycle in *Drosophila* embryos. *J Cell Sci* 1995;108 (Pt 4):1407-18.
131. Perrini B, Piacentini L, Fanti L, Altieri F, Chichiarelli S, Berloco M, et al. HP1 controls telomere capping, telomere elongation, and telomere silencing by two different mechanisms in *Drosophila*. *Mol Cell* 2004;15(3):467-76.
132. Ye Q, Callebaut I, Pezhman A, Courvalin JC, Worman HJ. Domain-specific interactions of human HP1-type chromodomain proteins and inner nuclear membrane protein LBR. *J Biol Chem* 1997;272(23):14983-9.
133. Polioudaki H, Kourmouli N, Drosou V, Bakou A, Theodoropoulos PA, Singh PB, et al. Histones H3/H4 form a tight complex with the inner nuclear membrane protein LBR and heterochromatin protein 1. *EMBO Rep* 2001;2(10):920-5.
134. Lechner MS, Begg GE, Speicher DW, Rauscher FJ, 3rd. Molecular determinants for targeting heterochromatin protein 1-mediated gene silencing: direct chromoshadow domain-KAP-1 corepressor interaction is essential. *Mol Cell Biol* 2000;20(17):6449-65.
135. Murzina N, Verreault A, Laue E, Stillman B. Heterochromatin dynamics in mouse cells: interaction between chromatin assembly factor 1 and HP1 proteins. *Mol Cell* 1999;4(4):529-40.
136. Clegg NJ, Honda BM, Whitehead IP, Grigliatti TA, Wakimoto B, Brock HW, et al. Suppressors of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster* affect expression of the heterochromatic gene *light* in the absence of a chromosome rearrangement. *Genome* 1998;41(4):495-503.
137. Hearn MG, Hedrick A, Grigliatti TA, Wakimoto BT. The effect of modifiers of position-effect variegation on the variegation of heterochromatic genes of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 1991;128(4):785-97.
138. Lu BY, Emtage PC, Duyf BJ, Hilliker AJ, Eissenberg JC. Heterochromatin protein 1 is required for the normal expression of two heterochromatin genes in *Drosophila*. *Genetics* 2000;155(2):699-708.



139. Piacentini L, Fanti L, Berloco M, Perrini B, Pimpinelli S. Heterochromatin protein 1 (HP1) is associated with induced gene expression in *Drosophila* euchromatin. *J Cell Biol* 2003;161(4):707-14.
140. Cryderman DE, Grade SK, Li Y, Fanti L, Pimpinelli S, Wallrath LL. Role of *Drosophila* HP1 in euchromatic gene expression. *Dev Dyn* 2005;232(3):767-74.
141. Sims RJ, 3rd, Nishioka K, Reinberg D. Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet* 2003;19(11):629-39.
142. Snowden AW, Gregory PD, Case CC, Pabo CO. Gene-specific targeting of H3K9 methylation is sufficient for initiating repression in vivo. *Curr Biol* 2002;12(24):2159-66.
143. Nakayama J, Rice JC, Strahl BD, Allis CD, Grewal SI. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* 2001;292(5514):110-3.
144. Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, et al. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 2001;410(6824):120-4.
145. Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 2001;410(6824):116-20.
146. Schotta G, Ebert A, Krauss V, Fischer A, Hoffmann J, Rea S, et al. Central role of *Drosophila* SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *Embo J* 2002;21(5):1121-31.
147. Jacobs SA, Khorasanizadeh S. Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail. *Science* 2002;295(5562):2080-3.
148. Jacobs SA, Tavema SD, Zhang Y, Briggs SD, Li J, Eissenberg JC, et al. Specificity of the HP1 chromo domain for the methylated N-terminus of histone H3. *Embo J* 2001;20(18):5232-41.
149. Fischle W, Wang Y, Jacobs SA, Kim Y, Allis CD, Khorasanizadeh S. Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev* 2003;17(15):1870-81.



150. Nielsen AL, Oulad-Abdelghani M, Ortiz JA, Remboutsika E, Chambon P, Losson R. Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins. *Mol Cell* 2001;7(4):729-39.
151. Mateescu B, England P, Halgand F, Yaniv M, Muchardt C. Tethering of HP1 proteins to chromatin is relieved by phosphoacetylation of histone H3. *EMBO Rep* 2004;5(5):490-6.
152. Guo S, Kempthues KJ. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 1995;81(4):611-20.
153. Hall IM, Shankaranarayana GD, Noma K, Ayoub N, Cohen A, Grewal SI. Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. *Science* 2002;297(5590):2232-7.
154. Volpe TA, Kidner C, Hall IM, Teng G, Grewal SI, Martienssen RA. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* 2002;297(5588):1833-7.
155. Partridge JF, Scott KS, Bannister AJ, Kouzarides T, Allshire RC. cis-acting DNA from fission yeast centromeres mediates histone H3 methylation and recruitment of silencing factors and cohesin to an ectopic site. *Curr Biol* 2002;12(19):1652-60.
156. Provost P, Silverstein RA, Dishart D, Walfridsson J, Djupedal I, Kniola B, et al. Dicer is required for chromosome segregation and gene silencing in fission yeast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(26):16648-53.
157. Pal-Bhadra M, Leibovitch BA, Gandhi SG, Rao M, Bhadra U, Birchler JA, et al. Heterochromatic silencing and HP1 localization in *Drosophila* are dependent on the RNAi machinery. *Science* 2004;303(5658):669-72.
158. Kanellopoulou C, Muljo SA, Kung AL, Ganesan S, Drapkin R, Jenuwein T, et al. Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev* 2005;19(4):489-501.
159. Maison C, Bailly D, Peters AH, Quivy JP, Roche D, Taddei A, et al. Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. *Nat Genet* 2002;30(3):329-34.



160. Motamedi MR, Verdel A, Colmenares SU, Gerber SA, Gygi SP, Moazed D. Two RNAi complexes, RITS and RDRC, physically interact and localize to noncoding centromeric RNAs. *Cell* 2004;119(6):789-802.
161. Araujo FD, Knox JD, Szyf M, Price GB, Zannis-Hadjopoulos M. Concurrent replication and methylation at mammalian origins of replication. *Mol Cell Biol* 1998;18(6):3475-82.
162. Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP, Kouzarides T. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem* 2003;278(6):4035-40.
163. Wade PA. Methyl CpG binding proteins: coupling chromatin architecture to gene regulation. *Oncogene* 2001;20(24):3166-73.
164. Reese BE, Bachman KE, Baylin SB, Rountree MR. The methyl-CpG binding protein MBD1 interacts with the p150 subunit of chromatin assembly factor 1. *Mol Cell Biol* 2003;23(9):3226-36.
165. Fuks F, Hurd PJ, Deplus R, Kouzarides T. The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res* 2003;31(9):2305-12.
166. Lehnertz B, Ueda Y, Derijck AA, Braunschweig U, Perez-Burgos L, Kubicek S, et al. Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr Biol* 2003;13(14):1192-200.
167. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680-5.
168. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
169. Maison C, Horstmann H, Georgatos SD. Regulated docking of nuclear membrane vesicles to vimentin filaments during mitosis. *J Cell Biol* 1993;123(6 Pt 1):1491-505.
170. Meier J, Georgatos SD. Type B lamins remain associated with the integral nuclear envelope protein p58 during mitosis: implications for nuclear reassembly. *Embo J* 1994;13(8):1888-98.



171. Georgatos SD, Blobel G. Two distinct attachment sites for vimentin along the plasma membrane and the nuclear envelope in avian erythrocytes: a basis for a vectorial assembly of intermediate filaments. *J Cell Biol* 1987;105(1):105-15.
172. Oohara I, Wada A. Spectroscopic studies on histone-DNA interactions. II. Three transitions in nucleosomes resolved by salt-titration. *J Mol Biol* 1987;196(2):399-411.
173. Oohara I, Wada A. Spectroscopic studies on histone-DNA interactions. I. The interaction of histone (H2A, H2B) dimer with DNA: DNA sequence dependence. *J Mol Biol* 1987;196(2):389-97.
174. Yager LN, Kaumeyer JF, Lee I, Weinberg ES. Insertion of an intermediate repetitive sequence into a sea urchin histone-gene spacer. *J Mol Evol* 1987;24(4):346-56.
175. Yager TD, van Holde KE. Dynamics and equilibria of nucleosomes at elevated ionic strength. *J Biol Chem* 1984;259(7):4212-22.
176. Makatsori D, Kourmouli N, Polioudaki H, Shultz LD, McLean K, Theodoropoulos PA, et al. The inner nuclear membrane protein lamin B receptor forms distinct microdomains and links epigenetically marked chromatin to the nuclear envelope. *J Biol Chem* 2004;279(24):25567-73.
177. Cheutin T, McNairn AJ, Jenuwein T, Gilbert DM, Singh PB, Misteli T. Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding. *Science* 2003;299(5607):721-5.
178. Kourmouli N, Theodoropoulos PA, Dialynas G, Bakou A, Politou AS, Cowell IG, et al. Dynamic associations of heterochromatin protein 1 with the nuclear envelope. *Embo J* 2000;19(23):6558-68.
179. Kourmouli N, Jeppesen P, Mahadevhaiah S, Burgoyne P, Wu R, Gilbert DM, et al. Heterochromatin and tri-methylated lysine 20 of histone H4 in animals. *J Cell Sci* 2004;117(Pt 12):2491-501.
180. Schotta G, Lachner M, Sarma K, Ebert A, Sengupta R, Reuter G, et al. A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev* 2004;18(11):1251-62.
181. Cheutin T, Gorski SA, May KM, Singh PB, Misteli T. In vivo dynamics of Swi6 in yeast: evidence for a stochastic model of heterochromatin. *Mol Cell Biol* 2004;24(8):3157-67.



182. Festenstein R, Pagakis SN, Hiragami K, Lyon D, Verreault A, Sekkali B, et al. Modulation of heterochromatin protein 1 dynamics in primary Mammalian cells. *Science* 2003;299(5607):719-21.
183. Schmiedeberg L, Weisshart K, Diekmann S, Meyer Zu Hoerste G, Hemmerich P. High- and low-mobility populations of HP1 in heterochromatin of mammalian cells. *Mol Biol Cell* 2004;15(6):2819-33.
184. Flaus A, Owen-Hughes T. Mechanisms for ATP-dependent chromatin remodelling: farewell to the tuna-can octamer? *Curr Opin Genet Dev* 2004;14(2):165-73.
185. Korber P, Horz W. SWRred not shaken; mixing the histones. *Cell* 2004;117(1):5-7.
186. Pinol-Roma S. Association of nonribosomal nucleolar proteins in ribonucleoprotein complexes during interphase and mitosis. *Mol Biol Cell* 1999;10(1):77-90.
187. Zatschina OV, Todorov IT, Philipova RN, Krachmarov CP, Trendelenburg MF, Jordan EG. Cell cycle-dependent translocations of a major nucleolar phosphoprotein, B23, and some characteristics of its variants. *Eur J Cell Biol* 1997;73(1):58-70.
188. Nichols J, Evans EP, Smith AG. Establishment of germ-line-competent embryonic stem (ES) cells using differentiation inhibiting activity. *Development* 1990;110(4):1341-8.
189. Bartova E, Kozubek S. Nuclear architecture in the light of gene expression and cell differentiation studies. *Biol Cell* 2006;98(6):323-36.
190. Bartova E, Pachemik J, Kozubik A, Kozubek S. Differentiation-specific association of HP1alpha and HP1beta with chromocentres is correlated with clustering of TIF1beta at these sites. *Histochem Cell Biol* 2007;127(4):375-88.
191. Meshorer E, Yellajoshula D, George E, Scambler PJ, Brown DT, Misteli T. Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells. *Dev Cell* 2006;10(1):105-16.
192. Misteli T. Concepts in nuclear architecture. *Bioessays* 2005;27(5):477-87.
193. Elgin SC, Grewal SI. Heterochromatin: silence is golden. *Curr Biol* 2003;13(23):R895-8.
194. Freitag M, Hickey PC, Khlafallah TK, Read ND, Selker EU. HP1 is essential for DNA methylation in neurospora. *Mol Cell* 2004;13(3):427-34.



195. Dialynas GK, Makatsori D, Kourmouli N, Theodoropoulos PA, McLean K, Terjung S, et al. Methylation-independent binding to histone H3 and cell cycle-dependent incorporation of HP1 beta into heterochromatin. *J Biol Chem* 2006;281(20):14350-60.
196. Eskeland R, Eberharter A, Imhof A. HP1 binding to chromatin methylated at H3K9 is enhanced by auxiliary factors. *Mol Cell Biol* 2007;27(2):453-65.
197. Fischle W, Tseng BS, Dormann HL, Ueberheide BM, Garcia BA, Shabanowitz J, et al. Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* 2005;438(7071):1116-22.

