



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΟΡΕΣΤΗΣ ΤΣΟΛΑΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ
ΤΗΣ ΠΡΟΘΥΜΟΣΙΝΗΣ α
ΜΕ ΤΗΝ ΙΣΤΟΝΗ Η1 ΚΑΙ ΤΗ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗ

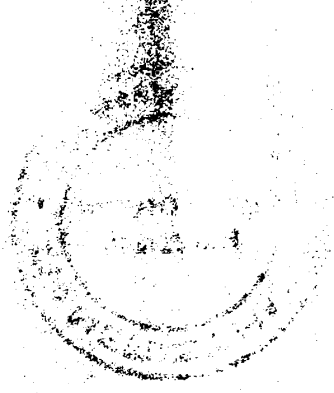
ΖΩΗ ΚΑΡΕΤΣΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2000



ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ



ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ

ΧΗΜΙΚΟΣ
ΣΤΗΝ ΚΥΒΕΡΝΗΣΗ

ΗΜΕ ΤΗΝ ΙΣΤΟΡΙΑΝ ΗΜΕ ΤΗΝ ΕΣΤΗΝ ΤΙΜΗΝ
ΤΗΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΗΝ ΕΝΩΣΗ
ΗΜΕ ΤΗΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΗΝ ΕΝΩΣΗ



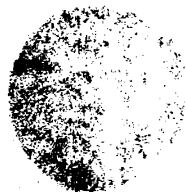
24/9/2002

ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ

ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ

ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ

ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ



ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Καθηγητής Ορέστης Τζούκας (Πανεπιστήμιο)

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Αντιπρ. Καθηγητής Κ. Στεφανίδης (Μέλος)

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Επισ. Καθηγήτρια Φ. Παπαδοπούλου (Μέλος)

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα. (Νόμος 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2)

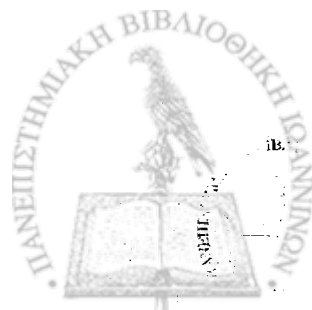


ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Καθηγητής Ορέστης Τσόλας (Επβλέπων)
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Αναπλ. Καθηγητής Κ. Σεφεριάδης (Μέλος)
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Επκ. Καθηγήτρια Θ. Παπαμαρκάκη (Μέλος)
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων



ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Καθηγητής Ορ. Τσόλας
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Καθηγητής Κ. Σέκερης
Πανεπιστήμιο Αθηνών

Καθηγητής Γερ. Παγουλάτος
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Αναπλ. Καθηγητής Σπ. Γεωργάτος
Πανεπιστήμιο Κρήτης

Αναπλ. Καθηγητής Κ. Σεφεριάδης
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Επικ. Καθηγήτρια Θ. Παπαμαρκάκη
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

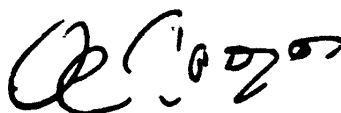


ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Έγινε σύσκεψη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής την Δευτέρα 29 Νοεμβρίου 1999 και ώρα 13:30, στην αίθουσα διδασκαλίας αρ. 8 της Ιατρικής Σχολής, μετά από πρόσκληση του Διευθυντού του Εργαστηρίου Καθηγητή Ορ. Τσόλα, για την διαδικασία αξιολόγησης και κρίσης της διδακτορικής διατριβής της κας Ζωής Καρέτσου, με τίτλο: «Αλληλεπίδραση της προθυμοσύνης α με τη συνδετική ιστόνη H1 και τη χρωματίνη»

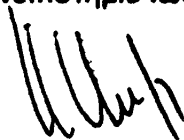
Προσήλθε η κα. Ζωή Καρέτσου, η οποία ανέπτυξε το θέμα της διατριβής της. της έγιναν ερωτήσεις από την Επιτροπή και απεχώρησε. Στην συνέχεια η Επιτροπή έκρινε το πρωτότυπο του περιεχομένου της διατριβής, την ουσιαστική συμβολή στην επιστήμη, καθώς και την επάρκεια της υποψηφίου στο γνωστικό αντικείμενο της διατριβής της. Ακολούθησε ψηφοφορία, όπου εγκρίθηκε παμψηφεί η διδακτορική διατριβή με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ».

ΤΑ ΜΕΛΗ



Καθηγητής Ορ. Τσόλας
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

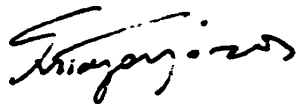
Αναπλ. Καθηγητής Κ. Σεφεριάδης
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων



Καθηγητής Κ. Σέκερης
Πανεπιστήμιο Αθηνών



Αναπλ. Καθηγήτρια Μ. Φράγκου
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων



Καθηγητής Γερ. Παγουλάτος
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων



Επικ. Καθηγήτρια Θ. Παπαμαρκάκη
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων



Αναπλ. Καθηγητής Στ. Γεωργάτος
Πανεπιστήμιο Κρήτης



REFERENCES

[illegible][illegible]

Η παρούσα Διακήρυξη εκδόθηκε από το Εργατικό Κέντρο της πόλης
Εκδόσεως του Συντακτικού του Κέντρου. Αρμόδιος υπεύθυνος ήταν ο Γεώργιος, του
Εργατοπαιών «Κοινωνίας Οικονομίας». Το θέμα του παρόντος άρθρου είναι η
πολιτική συνθήκες και τα δικαιώματα του, που για να το σκεφτεί ο άνθρωπος του
και η συντηρητικότητα του κατά τη διάρκεια της διαδρομής. Οι σχέσεις είναι
ευχρηστικές. Την επόμενη εβδομάδα της ίδιας διαδρομής, όπως τη
συνέβαλλαν, και ο άνθρωπος, για τη συντηρητικότητα της και η συντηρητική
συντηρητική διαδρομή, η οποία είναι η διαδρομή για η συντηρητική της επόμενη
συντηρητική διαδρομή, και η διαδρομή, η οποία είναι η διαδρομή της συντηρητικής
και η διαδρομή, η οποία είναι η διαδρομή του και η διαδρομή της διαδρομής.

Αποστέλλεται της ενδεικτικής μου στην Εταιρεία Αποστολές καθώς και 1.000.000 δραχμές
Αποστέλλεται για την πολεμική του ανταποδοτική της κοινότητας και της κοινότητας της
Εταιρείας Αποστολής Εταιρείας καθώς και 1.000.000 δραχμές
Γενική Γραμματεία και συντηρητική κοινότητα Στρατιωτική Γραμματεία για τη

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η προθυμοσίνη α είναι μια μικρή, όξινη πρωτεΐνη, η οποία βρίσκεται στον πυρήνα των κυττάρων των θηλαστικών σε ποσότητες ανάλογες με αυτές των δομικών ιστονών του νουκλεοσώματος. Αν και ο ρόλος της πρωτεΐνης στο κύτταρο παραμένει έως σήμερα αδιευκρίνιστος η δράση της φαίνεται να σχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η δομή της προθυμοσίνης α, η οποία περιλαμβάνει μια ισχυρά όξινη περιοχή στο κέντρο του μορίου της, είναι όμοια με τη δομή άλλων πυρηνικών πρωτεϊνών, των οποίων η λειτουργία σχετίζεται με την οργάνωση της δομής της χρωματίνης. Πρόσφατες μελέτες στο εργαστήριό μας έδειξαν ότι η προθυμοσίνη α συνδέεται εκλεκτικά με την συνδετική ιστόνη H1.

Στην παρούσα μελέτη ερευνήθηκε διεξοδικά η σύνδεση προθυμοσίνης α-ιστόνης H1 και το αποτέλεσμα της στην αλληλεπίδραση της H1 με τη χρωματίνη. Βρέθηκε ότι η όξινη περιοχή της προθυμοσίνης α και η κεντρική σφαιρική περιοχή της H1 συμμετέχουν στη σύνδεση των δύο πρωτεϊνών. Η σύνδεση αυτή είναι ειδική και ισχύει στο φυσιολογικό περιβάλλον του κυττάρου. Η χρησιμοποίηση ενός φυσιολογικού συστήματος χρωματίνης έδειξε ότι η προθυμοσίνη α εμποδίζει την ενσωμάτωση μέρους της ιστόνης H1 στη χρωματίνη. Επιπλέον, η πρωτεΐνη είναι σε θέση να απομακρύνει μόρια H1 τα οποία βρίσκονται ήδη ενσωματωμένα στη χρωματίνη.

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Αμεσος επιβλέπων ήταν ο Διευθυντής του Εργαστηρίου καθηγητής Ορέστης Τσόλας, τον οποίο ευχαριστώ θερμά τόσο για τις πολύτιμες συμβουλές και παρατηρήσεις του, όσο και για το αμείωτο ενδιαφέρον του και τη συμπαράστασή του κατά τη διάρκεια της διατριβής. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την επίκουρο καθηγήτρια Θωμαΐδα Παπαμαρκάκη, μέλος της συμβουλευτικής μου επιτροπής, για τη συμπαράστασή της και τη συνεχή και ουσιαστική βοήθειά της, η οποία ήταν καθοριστική για την ολοκλήρωση της εργασίας αυτής. Τον αναπληρωτή καθηγητή Κ. Σεφερκάδη, επίσης μέλος της συμβουλευτικής μου επιτροπής, ευχαριστώ για το ενδιαφέρον του κατά την εκπόνηση της διατριβής.

Απευθύνω τις ευχαριστίες μου στην αναπληρώτρια καθηγήτρια Μαρία Φράγκου-Λαζαρίδη για την πολύπλευρή συμπαράστασή της, καθώς και στα έτερα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής καθηγητή Κωνσταντίνο Σέκερη, καθηγητή Γεράσιμο Παγουλάτο και αναπληρωτή καθηγητή Σπυρίδωνα Γεωργάτο για τη

διάθεση μέρους του πολύτιμου χρόνου τους για να ολοκληρωθεί η διαδικασία που προβλέπεται από το νόμο.

Ευχαριστώ τον αναπληρωτή καθηγητή Δημήτριο Γαλάρη και τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου της Βιολογικής Χημείας για την άψογη συνεργασία τους και τη συμβολή τους στην περάτωση της μελέτης αυτής. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη του Εργαστηρίου της Γενικής Βιολογίας και ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα Σοφία Ευταξία για τη βοήθειά της.

Τέλος ευχαριστώ την οικογένειά μου, το σύζυγό μου Παναγιώτη Στεφάνου για την υπομονή και την πολύτιμη συμπαράστασή του, καθώς και τους γονείς μου για τη συνεχή υποστήριξη τους κατά τη διάρκεια της διατριβής.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

σελίδα

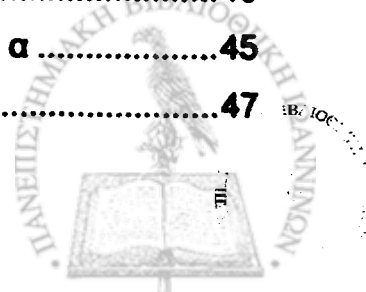
ΣΧΗΜΑΤΑ.....	i
ΠΙΝΑΚΕΣ.....	iv
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	v

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 1

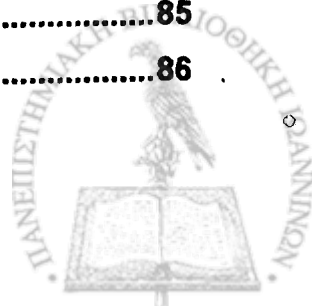
1.1 Θυμοσίνη α1 και προθυμοσίνη α.....	1
1.2 Δομή της προθυμοσίνης α.....	3
1.3 Δομή του cDNA και του γονιδίου της προθυμοσίνης α.....	7
1.4 Η προθυμοσίνη α στα κύτταρα. Ενδοκυττάρια εντόπιση της πρωτεΐνης.....	9
1.5 Βιολογικός ρόλος της προθυμοσίνης α.....	13
1.6 Δομικά χαρακτηριστικά της χρωματίνης.....	16
1.6.1 Η δομή του νουκλεοσώματος.....	16
1.6.2 Η δομή της ιστόνης H1 – Η θέση σύνδεσης της ιστόνης H1 στο νουκλεόσωμα.....	20
1.6.3 Οργάνωση της ανώτερης δομής της χρωματίνης.....	29
1.7 Βιολογικός ρόλος της συνδετικής ιστόνης.....	30
1.8 Ομοιότητα της προθυμοσίνης α με άλλες πυρηνικές πρωτεΐνες οι οποίες σχετίζονται με τη δομή της χρωματίνης.....	34
1.9 Σκοπός της διατριβής.....	38

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....39

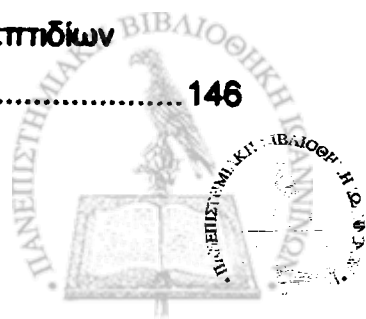
2.1 Απομόνωση πρωτεϊνών.....	39
2.2 Ανάλυση των πρωτεϊνών.....	44
2.2.1 Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών.....	44
2.2.1.1 Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο της φλουορεσκαμίνης.....	44
2.2.1.2 Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford.....	45
2.2.1.3 Ραδιοανοσολογικός προσδιορισμός (RIA) της προθυμοσίνης α.....	45
2.2.2 Ανάλυση αμινοξέων.....	47



2.2.3 Ηλεκτροφόρηση.....	50
2.2.3.1 Ηλεκτροφόρηση πηκτής SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE).....	50
2.2.3.2 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία ουρίας σε όξινο pH.....	52
2.2.3.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή αγαρόζης	53
2.2.3.4 Χρώση πηκτής πολυακρυλαμιδίου με νιτρικό άργυρο	54
2.2.3.5 Χρώση πρωτεϊνών με ινδική μελάνη	56
2.3 Σήμανση πρωτεϊνών και πεπτιδίων.....	56
2.3.1 Σήμανση της θυμοσίνης α1 με [³H]NaBH₄.....	56
2.3.2 Φωσφορυλίωση της προθυμοσίνης α από την πρωτεϊνική κινάση CKII.....	57
2.3.3 Φωσφορυλίωση της ιστόνης H1 από την πρωτεϊνική κινάση C.....	58
2.3.4. Σήμανση των πεπτιδίων θυμοσίνη α1, καρβοξυτελικό πεπτίδιο και όξινο πεπτίδιο της προθυμοσίνης α με βιοτίνη	59
2.4 Ανοσοτεχνικές	61
2.4.1 Παραγωγή αντισωμάτων έναντι της θυμοσίνης α1	61
2.4.2 Έλεγχος τίτλου του αντιορού anti-α1	62
2.4.3 Καθαρισμός αντιορών	62
2.4.4 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blot).....	66
2.4.5 Ανοσοαπομόνωση του συμπλέγματος προθυμοσίνης α-ιστόνης H1 από εκχύλισμα κυττάρων NIH 3T3	68
2.5 In vitro οργάνωση χρωματίνης.....	70
2.5.1 Παρασκευή πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα	70
2.5.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης	72
2.5.3 Σύνδεση DNA σε μαγνητικά σφαιρίδια.....	72
2.5.4 Ανασύσταση χρωματίνης σε ακινητοποιημένο DNA.....	75
2.5.5 Ανάλυση χρωματίνης με μικροκοκκική νουκλεάση	77
2.6 Κυτταροκαλλιέργειες.....	80
2.6.1 Κυτταρικές σειρές και συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας.....	80
2.6.2 Ανάπτυξη, διατήρηση και αποθήκευση κυτταρικών σειρών.....	81
2.6.3 Συγχρονισμός της κυτταρικής σειράς HeLa	82
2.7 Τεχνική αποτύπωσης προσδέματος (ligand blotting).....	83
2.8 Τεχνική αποτύπωσης κηλίδων	85
2.9. Τεχνική ενισχυμένης χημειοφωταύγειας.....	86



3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	89
3.1 Απομόνωση πρωτεϊνών.....	89
3.1.1 Απομόνωση προθυμοσίνης α από θύμο μόσχου	89
3.1.2 Απομόνωση προθυμοσίνης α από θύμο χοίρου.....	94
3.2 Αλληλεπίδραση της προθυμοσίνης α με την ιστόνη H1 σε διάλυμα.....	98
3.3 Εξάρτηση της αλληλεπίδρασης της προθυμοσίνης α με την ιστόνη H1 από το είδος του οργανισμού.	102
3.4 Απομόνωση του συμπλέγματος προθυμοσίνης α - ιστόνης H1 από εκχύλισμα κυττάρων NIH3T3	104
3.5 Ταυτοποίηση των θέσεων αλληλεπίδρασης της προθυμοσίνης α με την ιστόνη H1.....	108
3.5.1 Προσδιορισμός της θέσης με την οποία η προθυμοσίνη α συνδέεται στην ιστόνη H1	108
3.5.2 Προσδιορισμός της περιοχής σύνδεσης της ιστόνης H1 στην προθυμοσίνη α	112
3.6 Ο ρόλος της φωσφορυλίωσης της ιστόνης H1 και της προθυμοσίνης α στην αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών	116
3.6.1 Επίδραση της φωσφορυλίωσης της προθυμοσίνης α στην σύνδεσή της με την ιστόνη H1	116
3.6.2 Επίδραση της φωσφορυλίωσης της ιστόνης H1 στη σύνδεσή της με την προθυμοσίνη α.....	119
3.7 Μελέτη της αλληλεπίδρασης της προθυμοσίνης α με την ιστόνη H1 σε περιβάλλον χρωματίνης.....	125
3.7.1 Μελέτη της πιθανής σύνδεσης της προθυμοσίνης α στη χρωματίνη	125
3.7.2 Επίδραση της προθυμοσίνης α στη σύνδεση της ιστόνης H1 στη χρωματίνη	130
3.7.3 Ο ρόλος της αλληλεπίδρασης της προθυμοσίνης α με την ιστόνη H1 στο επαναλαμβανόμενο μήκος του νουκλεοσώματος	134
3.7.4 Απόσπαση της ιστόνης H1 από τη χρωματίνη παρουσία της προθυμοσίνης α	136
3.7.5 Μελέτη της επίδρασης της προθυμοσίνης α στη σύνδεση της ιστόνης H1 στο DNA.....	142
3.7.6 Απόσπαση της ιστόνης H1 από τη χρωματίνη παρουσία των πεπτιδίων της προθυμοσίνης α	146



4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	147
-------------------------	------------

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	167
-----------------------------	------------

6. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

6.1 Περίληψη στα ελληνικά.....	168
--------------------------------	-----

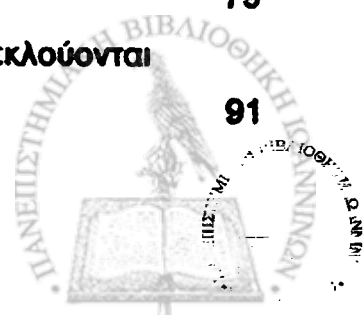
6.2 Περίληψη στα αγγλικά.....	171
-------------------------------	-----

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	174
-----------------------------	------------



ΣΧΗΜΑΤΑ

Σχήμα 1:	Υποτιθέμενη πρωτοταγής δομή της προθυμοσίνης α ανθρώπου και επίμυος όπως προκύπτει από την αλληλουχία του cDNA	5
Σχήμα 2:	Διαγραμματική απεικόνιση της πρωτοταγούς δομής της προθυμοσίνης α από θύμο βοός	6
Σχήμα 3:	Κρυσταλλογραφικό μοντέλο του οκταμερούς των ιστονών του νουκλεοσώματος	19
Σχήμα 4:	Πρωτοταγής δομή της ιστόνης H1 κουνελιού και πέστροφας	21
Σχήμα 5:	Υποδιαίρεση των H1 ομάδων των θηλαστικών βάσει της δομής των γονιδίων τους	22
Σχήμα 6:	Πρότυπα για την τοποθέτηση της σφαιρικής περιοχής της συνδετικής ιστόνης στο νουκλεόσωμα	29
Σχήμα 7:	Σύγκριση της αλληλουχίας των αμινοξέων της προθυμοσίνης α επίμυος και της νουκλεοπλασμίνης	36
Σχήμα 8:	Σύγκριση της αλληλουχίας αμινοξέων της προθυμοσίνης α και της HMG-1 πρωτεΐνης επίμυος	37
Σχήμα 9:	Απομόνωση προθυμοσίνης α (μέθοδος Α)	41
Σχήμα 10:	Απομόνωση προθυμοσίνης (μέθοδος Β)	43
Σχήμα 11:	Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για μέτρηση πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford	47
Σχήμα 12:	Ανάλυση των PTC-παραγώγων πρότυπου μίγματος αμινοξέων με HPLC	50
Σχήμα 13:	Καμπύλη τιτλοδότησης του αντιορού anti- α1	64
Σχήμα 14Α:	Διαδικασία σύνδεσης γραμμικού DNA σε μαγνητικά σφαιρίδια	74
Σχήμα 14Β:	Ανάλυση με μικροκοκκική νουκλεάση χρωματίνης που έχει ανασυσταθεί με εκχύλισμα από έμβρυα <i>Drosophila</i>	79
Σχήμα 15:	Ανάλυση σε 15% SDS-PAGE των κλασμάτων που εκλύονται μετά τη χρωματογραφία σε στήλες ιοντοανταλλαγής	91



Σχήμα 16:	Χρωματογραφική ανάλυση με HPLC της προθυμοσίνης α που απομονώθηκε με τη μέθοδο της Δρ. Θ. Παπαμαρκάκη	93
Σχήμα 17:	Χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε στήλη Sephacryl S-200 του όξινου εκχυλίσματος θύμου μόσχου	96
Σχήμα 18:	Ανάλυση σε 15% SDS PAGE των κλασμάτων που εκλούσθηκαν μετά από χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε στήλη Sephacryl S-200	97
Σχήμα 19:	Χρωματογραφική ανάλυση της περιοχής α με HPLC	98
Σχήμα 20:	Αλληλεπίδραση της προθυμοσίνης α με την ιστόνη H1 υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες	100
Σχήμα 21:	Αλληλεπίδραση προθυμοσίνης α – ιστόνης H1 σε διάλυμα	102
Σχήμα 22:	Η αλληλεπίδραση της προθυμοσίνης α με την ιστόνη H1 είναι ειδική και εξαρτάται από το είδος	104
Σχήμα 23:	Απομόνωση του συμπλέγματος προθυμοσίνης α – ιστόνης H1 από εκχυλίσματα κυττάρων NIH3T3	106
Σχήμα 24:	Ανάλυση με αποτύπωση προσδέματος των κλασμάτων που εκλούνται από τη στήλη προθυμοσίνης α αгарόζης	108
Σχήμα 25:	Ελεγχος της βιοτυνιλίωσης των πεπτιδίων θυμοσίνη α1, καρβόξυ τελικό πεπτίδιο και όξινο πεπτίδιο της προθυμοσίνης α	110
Σχήμα 26:	Προσδιορισμός της θέσης σύνδεσης της προθυμοσίνης α στην ιστόνη H1	112
Σχήμα 27:	Προσδιορισμός της περιοχής σύνδεσης της ιστόνης H1 στην προθυμοσίνη α με ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες	114
Σχήμα 28:	Ταυτοποίηση των θέσεων αλληλεπίδρασης της ιστόνης H1 με ομοιοπολική διασύνδεση μορίων	116
Σχήμα 29:	Επίδραση της φωσφορυλίωσης της προθυμοσίνης α στην αλληλεπίδραση της με την ιστόνη H1	118
Σχήμα 30:	Ανίχνευση της φωσφορυλίωσης της H1 σε πηκτή ουρίας σε όξινο pH	121



Σχήμα 31:	Επίδραση της φωσφορυλίκωσης της ιστόνης H1 στην αλληλεπίδρασή της με την προθυμοσίνη α	123
Σχήμα 32:	Ελεγχος σχηματισμού συμπλέγματος μεταξύ της φωσφορυλιωμένης ιστόνης H1 και της προθυμοσίνης α με ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες	124
Σχήμα 33:	Ελεγχος της ενσωμάτωσης της ιστόνης H1 από θύμο μόσχου στη χρωματίνη	128
Σχήμα 34:	Η προθυμοσίνη α δεν συνδέεται σε χρωματίνη η οποία περιέχει ιστόνη H1	130
Σχήμα 35:	Επίδραση της προθυμοσίνης α στη σύνδεση της ιστόνης H1 θύμου μόσχου στη χρωματίνη	132
Σχήμα 36:	Επίδραση της προθυμοσίνης α στη σύνδεση της <i>Drosophila</i> H1 στη χρωματίνη	134
Σχήμα 37:	Η προθυμοσίνη α τροποποιεί την αλληλεπίδραση της ιστόνης H1 με την χρωματίνη	136
Σχήμα 38:	Απόσπαση 5 μονάδων θύμου μόσχου από τη χρωματίνη παρουσία της προθυμοσίνης α	138
Σχήμα 39:	Απόσπαση 4 μονάδων H1 θύμου μόσχου από τη χρωματίνη	139
Σχήμα 40:	Απόσπαση διαφόρων ποσοτήτων ιστόνης H1 θύμου μόσχου από τη χρωματίνη παρουσία προθυμοσίνης α	140
Σχήμα 41:	Η προθυμοσίνη α δεν αποσπά τη <i>Drosophila</i> H1 από τη χρωματίνη	142
Σχήμα 42:	Η προθυμοσίνη α δεν αποσπά την ιστόνη H1 από το DNA	144
Σχήμα 43:	Η προθυμοσίνη α δεν αποσπά την ιστόνη H1 από μικρές ποσότητες DNA	146
Σχήμα 44:	Το όξινο πεπτιδίο της προθυμοσίνης α δεν αποσπά την ιστόνη H1 από τη χρωματίνη	148
Σχήμα 45:	Σύγκριση της αλληλουχίας αμινοξέων της κεντρικής σφαιρικής περιοχής της ιστόνης H1 θύμου μόσχου και της αντίστοιχης περιοχής της H1 της <i>Drosophila</i>	168



ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1:	Γενικά χαρακτηριστικά των συνδετικών ιστονών των σωματικών κυττάρων ποντικού	24
Πίνακας 2:	Σύσταση αρνοξέων προθυμοσίνης α	94



ΣΥΝΤΗΜΗΣΕΙΣ

ACF: ATP-dependent chromatin assembly and remodeling factor, ATP εξαρτώμενος παράγοντας ανασύστασης και αναδιοργάνωσης της χρωματίνης

Αμινοξέα: A ή Ala: αλανίνη
B ή Asx: ασπαραγίνη/ασπαρτικό οξύ
C ή Cys: κυστεΐνη
D ή Asp: ασπαρτικό οξύ
E ή Glu: γλουταμινικό οξύ
F ή Phe: φαινυλαλανίνη
G ή Gly: γλυκίνη
H ή His: ιστιδίνη
Hyr: υδροξυπρολίνη
I ή Ile: ισολευκίνη
K ή Lys: λυσίνη
L ή Leu: λευκίνη
M ή Met: μεθειονίνη
N ή Asn: ασπαραγίνη
P ή Pro: προλίνη
Q ή Gln: γλουταμίνη
R ή Arg: αργινίνη
S ή Ser: σερίνη
T ή Thr: θρεονίνη
V ή Val: βαλίνη
W ή Trp: θρυπτοφάνη
X: οποιοδήποτε αμινοξύ
Y ή Tyr: τυροσίνη
Z ή Glx: γλουταμίνη/γλουταμινικό οξύ

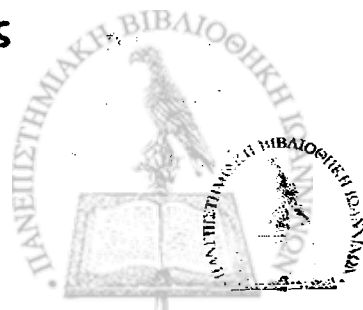
APS: ammonium persulfate, υπερθειϊκό αμμώνιο

AUFs: absorbance units full scale, μονάδες απορρόφησης στο μέγιστο της κλίμακας απορρόφησης

ATP: adenosine triphosphate, τριφωσφορικός εστέρας της αδενοσίνης

Bis: N'N' methylene bis acrylamide, N'N' -μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδιο

Bluescript: Bluescript KS M13 (+), πλασμιδιακό DNA Bluescript



BSA: Bovine serum albumin, αλβουμίνη ορού βοός

cAMP: cyclic adenine monophosphate, κυκλομονοφωσφορικός εστέρας της αδενίνης

cDNA: complementary DNA, συμπληρωματικό DNA

CAC: chromatin assembly complex, σύμπλεγμα συγκρότησης χρωματίνης

CAF 1: chromatin assembly factor 1, παράγοντας συγκρότησης χρωματίνης 1

CHRAC: chromatin accessibility complex, σύμπλεγμα πρόσβασης στη χρωματίνη

CK II: protein kinase CK II, caseine kinase II, πρωτεϊνική κινάση CK II

c-myc: cellular myc, πρωτοογκογονίδιο c-myc

CP: creatine phosphate, φωσφορική κρεατίνη

CPK: creatine phosphokinase, κινάση της φωσφορικής κρεατίνης

cpm: counts per minute, κρούσεις ανά λεπτό

DREX: *Drosophila* extract, εκχύλισμα δροσόφιλας πρώιμου σταδίου ανάπτυξης

DMSO: dimethyl sulfoxide, διμεθυλοσουλφοξείδιο

Dnase I: deoxyribonuclease I, δεοξυριβονουκλεάση I

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium, θρεπτικό υλικό DMEM

DTT: dithiothreitol, διθειοθρεϊτόλη

ECL: enhanced chemiluminescence, ενισχυμένη χημειοφωταύγεια

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid, αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ

EX buffer: extract buffer, ρυθμιστικό διάλυμα εκχυλίσματος

FCS: fetal calf serum, ορός εμβρύου βοός

HBBS: Hank's balanced salt solution

GH1: globular domain of histone H1, σφαιρική περιοχή της ιστόνης H1

Hepes: (N-[2-hydroethyl] piperazine-N-[2-ethane-sulfonic acid]), (N-[2-υδροξυαιθυλο] πιπεραζίνη-N-[2-αιθανο σουλφονικό οξύ])

HMG 1: high mobility group protein 1, πρωτεΐνη υψηλής κινητικότητας 1

HMG 14: high mobility group protein 14, πρωτεΐνη υψηλής κινητικότητας 14

HNF-3γ: hepatocyte nuclear factor 3γ, πυρηνικός ηπατικός παράγοντας 3γ

HPLC: high performance liquid chromatography, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Hsp 70: Heat shock protein 70, πρωτεΐνη του θερμικού σοκ 70 kDa

HRP: horseradish peroxidase, ραφανιδική υπεροξειδάση

IgG: immunoglobulin G, ανοσοσφαιρίνη γ

INK: india ink, σινική μελάνη

KDa, kD: kilodalton, μονάδα μοριακής μάζας



KLH: keyhole limpet haemocyanin, αιμοκυανίνη του είδους *Megathura crenulata*

LB: Luria Bertani medium, θρεπτικό υλικό Luria Bertani

LEX: late extract, εκχύλισμα δροσόφιλας μεταγενέστερου σταδίου ανάπτυξης

MMTV: mouse mammary tumor virus long terminal repeat, γονίδιο των μακρών τελικών επαναλήψεων του ογκογόνου ιού του μαστικού αδένου του ποντικού

MNase: micrococcal nuclease, μικροκοκκική νουκλεάση

NAP I: nucleosome assembly protein I, πρωτεΐνη συγκρότησης χρωματίνης I

NLS: nuclear localisation signal, σήμα μετατόπισης στον πυρήνα

NP-40: Nonidet P-40 (octylphenoxy ethanol), οκτυλφαινοξυ-αιθανόλη

NURF: nucleosome remodeling factor, παράγοντας αναδιοργάνωσης του νουκλεοσώματος

PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis, ηλεκτροφόρηση πηκτής ακρυλαμιδίου

PBS: phosphate buffer saline, φυσιολογικό ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών

pI: isoelectric point, ισοηλεκτρικό σημείο

PITC: phenylisothiocyanate, ισοθειοκυανικός φαινυλεστέρας

PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate

PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride, φαινυλο-μεθυλο-σουλφονυλο φθορίδιο

POPOP: (1,4-bis [5-phenyl-2-oxazolyl]-benzene; 2,2' phenylenebis [5-phenyloxazol])

PPO: 2,5-diphenyloxazole, 2,5 διφαινυλοξαζόλιο

ProTa: prothymosin α, προθυμοσίνη α

PTC: phenylthiocarbonyl, φαινυλοθειοκαρβαμύλιο

RIA: radioimmunoassay, ραδιοανοσολογικός προσδιορισμός

RPMI: Roswell Park Memorial Institute Medium 1640, θρεπτικό υλικό RPMI 1640

RNA: ribonucleic acid, ριβονουκλεϊκό οξύ

RNase: ribonuclease, ριβονουκλεάση

SAR: scaffold-associated regions, θέσεις σύνδεσης με τον πυρηνικό σκελετό

Sarcosyl: sodium lauryl sarkosinate, δωδεκυλικό σαρκοσινικό νάτριο

SDS: sodium dodecyl sulfate, θειικό δωδεκυλικό νάτριο

SV 40: simian virus 40

SWI/SNF: switching mating type/sucrose non fermenting

Tα1: thymosin α1, θυμοσίνη α1

TBS: Tris buffer saline, ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl, pH 7,4



TBST: Tris buffer saline-0,1% Tween 20, pH 7,4, ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl, pH 7,4-0,1%Tween 20

TCA: trichloroacetic acid, τριχλωρο οξικό οξύ

TEMED: N,N,N,N'-tetramethylethylenediamine, N,N,N,N-τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη

TFA: trifluoroacetic acid, τριφθοροξικό οξύ

v/v: volume per volume, όγκος κατ' όγκο

w/v: weight per volume, βάρος κατ' όγκο



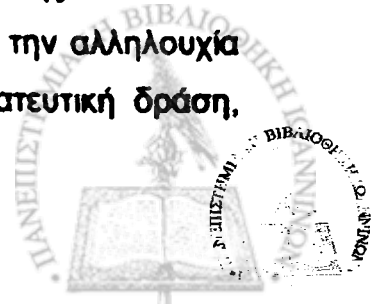
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Θυμοσίνη α1 και προθυμοσίνη α

Ο ανοσολογικός ρόλος του θύμου άρχισε να γίνεται κατανοητός στις αρχές της δεκαετίας του 1960. Πειράματα θυμεκτομών σε νεογέννητα πειραματόζωα έδειξαν ότι η απουσία του θύμου επιβράδυνε την ανάπτυξη τους και οδηγούσε σε ανοσολογική ανεπάρκεια και πρόωρο θάνατο. Το ενδιαφέρον πολλών ερευνητικών ομάδων επικεντρώθηκε στην απομόνωση διαλυτών παραγόντων που να συντίθενται και να εκκρίνονται από τα κύτταρα του θύμου και να μπορούν να υποκαταστήσουν κάποιες από τις λειτουργίες του. Ένα τέτοιο παρασκεύασμα θύμου, το οποίο θεωρήθηκε ότι είχε ανοσοενισχυτική δράση και τη δυνατότητα, σε ορισμένες περιπτώσεις, να υποκαθιστά το θύμο αδένι ήταν η θυμοσίνη-κλάσμα 5 (TF5). Περιελάμβανε 30 περίπου διαφορετικά πεπτιδία με εύρος ισοηλεκτρικών σημείων από pH 4.0 έως pH 7.0 και μοριακά βάρη από 1000 έως 15000 Da (Hooper et al. 1975).

Το 1977 απομονώθηκε για πρώτη φορά από το παραπάνω θυμικό παρασκεύασμα η θυμοσίνη α1 (Goldstein et al., 1977). Η απομόνωση της θυμοσίνης α1 από το κλάσμα 5 έγινε με ένα συνδυασμό χρωματογραφικών ιονανταλλαγής και μοριακής διήθησης. Απομονώθηκε ένα θερμοάντοχο, ισχυρά όξινο μόριο που αποτελούταν από 28 αμινοξέα (Goldstein et al., 1977). Το απομονωμένο πεπτιδίο, καθώς και το συνθετικά παρασκευασμένο ομόλογο του (Low et al., 1979) βρέθηκε από 10 έως 1000 φορές πιο ενεργό από το κλάσμα 5 σε διάφορες *in vitro* και *in vivo* δοκιμασίες στις οποίες προσδιορίστηκε η διαφοροποίηση και η λειτουργικότητα των T-κυττάρων (Goldstein et al., 1977).

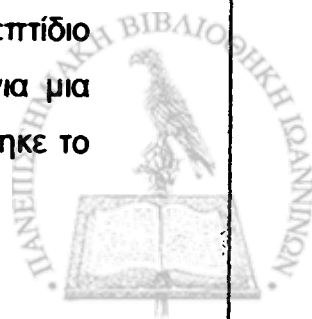
Η απομόνωση ενός πεπτιδίου από τα προϊόντα της *in vitro* μετάφρασης πολυ(A)⁺RNA θύμου, το οποίο περιείχε τις αλληλουχίες που αντιστοιχούσαν στα αμινοξέα 11-18 και 19-25 της θυμοσίνης α1, αποτέλεσε την πρώτη ένδειξη για την ύπαρξη φυσικού προδρόμου μορίου της (Freire et al., 1981). Η άποψη της δημιουργίας της θυμοσίνης α1 μετά από πρωτεόλυση ενός μεγαλύτερου μορίου ενισχύθηκε με την απομόνωση δύο ομόλογων προς αυτή πεπτιδίων από το κλάσμα 5 (TF5) θύμου βοός (Caldarella et al., 1983). Το ένα από τα πεπτιδία αυτά, η des-(25-28) θυμοσίνη α1 περιελάμβανε την αλληλουχία 1-25 της θυμοσίνης α1 ενώ το άλλο, η θυμοσίνη α11, ήταν ένα 35πεπτιδίο που περιείχε ολόκληρη την αλληλουχία της θυμοσίνης α1 (αμινοξέα 1-28). Τα δύο πεπτιδία είχαν προστατευτική δράση,



όμοια μ' αυτής της θυμοσίνης α1, σε *in vivo* δοκιμασία προστασίας ποντικών από μόλυνση με τον μύκητα *Candida albicans* (Caldarella et al., 1983).

Το πρόδρομο μόριο της θυμοσίνης α1, η προθυμοσίνη α, απομονώθηκε τελικά από θύμο επίμυος (Haritos et al., 1984a). Η διαδικασία απομόνωσης περιελάμβανε την κονιορτοποίηση του ιστού σε υγρό άζωτο εξασφαλίζοντας την αποφυγή της τυχαίας πρωτεολυτικής διάσπασης των πεπτιδίων του θύμου. Κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες απομόνωσης δεν ανιχνεύθηκε θυμοσίνη α1 ή κάποιο από τα ομόλογα πεπτίδια της. Η απομόνωση του πολυπεπτιδίου της προθυμοσίνης α, έγινε με δύο στάδια χρωματογραφίας, χρωματογραφία μοριακής διήθησης και υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Το πολυπεπτίδιο που απομονώθηκε περιελάμβανε 112 αμινοξέα, ήταν ισχυρά όξινο (pI 3,55) και περιείχε την αλληλουχία της θυμοσίνης α1 στο αμινοτελικό άκρο του. Η προθυμοσίνη α εμφάνιζε πολλές από τις βιολογικές και ανοσολογικές δραστηριότητες της θυμοσίνης α1 (Haritos et al., 1984b). Η ανίχνευση της προθυμοσίνης α κατά την απομόνωση έγινε με ραδιοανοσολογική μέθοδο χρησιμοποιώντας πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της θυμοσίνης α1.

Αργότερα, η προθυμοσίνη α απομονώθηκε και από άλλους ιστούς επίμυος όπως οι πνεύμονες, το ήπαρ, οι νεφροί και ο εγκέφαλος (Haritos et al., 1984). Μέχρι σήμερα η προθυμοσίνη α έχει απομονωθεί από ιστούς ανθρώπου (Pan et al., 1986), χοίρου (Economou et al., 1988), βοός (Panneerselvam et al., 1988) και αιγός (Frillingos et al., 1991). Επιπλέον έχει αναφερθεί η ανίχνευση της προθυμοσίνης α με ραδιοανοσολογική μέθοδο σε πτηνά και ιχθύες (Yialouris et al. 1988) και η απομόνωση από τη ζύμη *Sacharomyces cerevisiae* μιας πρωτεΐνης όμοιας με την προθυμοσίνη α (Makarova et al., 1989). Με ανιχνευτή το c-DNA προθυμοσίνης α ανθρώπου ανιχνεύτηκε μια ζώνη υβριδισμού στο γονιδίωμα της *Drosophila melanogaster* (Szabo and Wekler, 1992). Η παρουσία προθυμοσίνης α σε σχετικά μεγάλες συγκεντρώσεις σε μη λεμφικούς ιστούς όπως οι παραπάνω έθεσε για πρώτη φορά υπό αμφισβήτηση τον εξωκυττάριο ανοσολογικό ρόλο της πρωτεΐνης. Στο ίδιο συμπέρασμα οδήγησαν και οι μελέτες για το c-DNA της ανθρώπινης προθυμοσίνης α. Η απομόνωση κλώνων c-DNA από βιβλιοθήκες μετασχηματισμένων ινοβλαστών με τον ιό SV-40 (Eschenfeldt and Berger, 1986) και σπλήνα ανθρώπου (Goodall et al., 1986) έδειξε ότι δεν υπάρχει κωδικοποιούσα περιοχή για το αμινοτελικό πεπτίδιο οδηγό, ούτε σημαντικές υδρόφοβες περιοχές όπως θα ήταν αναμενόμενο για μια πρωτεΐνη που εκκρίνεται. Με την τεχνική αποτύπωσης κατά Northern ανιχνεύτηκε το



mRNA της προθυμοσίνης α στους νεφρούς, στο ήπαρ, στη σπλήνα, σε λευμοκύτταρα σε ανθρώπινα λευχαιμικά T-κύτταρα και σε μυελωματικά T-κύτταρα (Eschenfeldt and Berger, 1986). Σε επίπεδο mRNA, η προθυμοσίνη α έχει επίσης βρεθεί στους μύες, στην καρδιά, στο λεπτό έντερο, στους όρχεις και στην παρεγκεφαλίδα.

Από τις παραπάνω μελέτες και από την απομόνωση του c-DNA της πρωτεΐνης από βιβλιοθήκες σπλήνα επίμους και ανθρώπινων περιφερειακών T-κυττάρων φαίνεται ότι η πρωτεΐνη είναι ισχυρά συντηρημένη. Η ευρεία ιστική κατανομή της πρωτεΐνης, ακόμη και σε κύτταρα που δεν ανήκουν στο ανοσολογικό σύστημα, και η συντήρηση της δομής της υποδεικνύουν ότι η προθυμοσίνη α παίζει έναν βασικό ρόλο μέσα στο κύτταρο.

1.2 Δομή της προθυμοσίνης α

Πρωτοταγής δομή

Η πρώτη προσπάθεια για τον προσδιορισμό της πρωτοταγούς δομής της προθυμοσίνης α έγινε το 1985, χρησιμοποιώντας χημικές μεθόδους ανάλυσης της αλληλουχίας των πεπτιδίων της πρωτεΐνης που απομονώθηκε από θύμο επίμους (Haritos et al., 1985). Το 1988 η αλληλουχία της πρωτεΐνης επιβεβαιώθηκε και συμπληρώθηκε μετά από κλωνοποίηση του cDNA της προθυμοσίνης α από βιβλιοθήκη σπληνοκυττάρων επίμους (Frangou-Lazaridis et al., 1988). Η πρωτοταγής δομή της ανθρώπινης προθυμοσίνης α προσδιορίστηκε αρχικά με αυτόματη ανάλυση της αλληλουχίας των πεπτιδίων που προήλθαν από την ενζυμική και χημική σχάση της πρωτεΐνης που απομονώθηκε από θύμο ανθρώπου (Pan et al., 1986). Στη συνέχεια, ο προσδιορισμός της δομής ολοκληρώθηκε μετά από την κλωνοποίηση του cDNA της προθυμοσίνης α από ανθρώπινα νοβλαστικά κύτταρα, λεμφοκύτταρα (Eschenfeldt et al., 1986), σπληνοκύτταρα (Goodall et al., 1986) και περιφερειακά T-κύτταρα (Gomez-Marquez et al., 1989). Με χημικές μεθόδους ανάλυσης της αλληλουχίας πεπτιδίων βρέθηκε επίσης η πρωτοταγής δομή της προθυμοσίνης α από θύμο βοός (Pannerseivam et al., 1989), χοίρου (Economou et al., 1988) και αιγός (Frillingos et al., 1991). Το 1991 απομονώθηκε το cDNA προθυμοσίνης α ποντικού και προσδιορίστηκε η υποτιθέμενη αλληλουχία των

αμινοξέων της πρωτεΐνης (Schmidt and Werner, 1991). Από τις παραπάνω μελέτες προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

1. Η προθυμοσίνη α είναι μια πρωτεΐνη η οποία περιλαμβάνει 109-111 υπολείμματα αμινοξέων και εμφανίζεται πολύ συντηρημένη από είδος σε είδος (Σχήμα 1). Η N-τελική αλληλουχία (1-28) της πρωτεΐνης αντιστοιχεί στη θυμοσίνη α1 και είναι πλήρως συντηρημένη σε όλα τα είδη. Το N-τελικό άκρο της προθυμοσίνης α είναι ακετυλιωμένο.

2. Η δομή της πρωτεΐνης παρουσιάζει ιδιαιτερότητα. Το 50% περίπου των αμινοξέων της πρωτεΐνης είναι όξινα (Asp, Glu) και στην πλειοψηφία τους βρίσκονται συσσωρευμένα στο κεντρικό τμήμα του πολυπεπτιδίου δημιουργώντας μια όξινη περιοχή 30 περίπου αμινοξέων (Σχήμα 2). Η άμινο και η καρβοξυτελική περιοχή της προθυμοσίνης α περιέχουν βασικά και όξινα αμινοξέα. Η πρωτεΐνη στερείται αρωματικών, θειούχων αμινοξέων καθώς και ισχυρά υδρόφοβων αλληλουχιών.

3. Το C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης είναι το λιγότερο συντηρημένο. Στο άκρο αυτό έχει εντοπισθεί η αλληλουχία Lys-Lys-X-Lys η οποία θεωρείται ως σήμα μετατόπισης των πρωτεϊνών στον πυρήνα (Gomez-Marquez and Segade, 1988, Watts et al., 1989). Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι το σήμα πυρηνικής μετατόπισης της προθυμοσίνης α αποτελείται από δύο αλληλουχίες βάσεων (Rubtsov et al., 1997). Εκτός από την προαναφερθείσα αλληλουχία, η οποία βρίσκεται στα αμινοξέα 101-104, η σύντομη βασική αλληλουχία Lys-Arg (αμινοξέα 87-88) φαίνεται να παίζει ρόλο στη μετακίνηση της προθυμοσίνης στον πυρήνα. Η μετατροπή της λυσίνης 87 (Lys-87) σε γλουταμικό εμποδίζει τη μετατόπιση της πρωτεΐνης στον πυρήνα (Rubtsov et al., 1996).

Οσο αφορά τις μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις της προθυμοσίνης α, η πρωτεΐνη φωσφορυλιώνεται *in vitro* από την κινάση 2 της καζεΐνης (casein kinase 2), σε υπολείμματα σερίνης και θρεονίνης που βρίσκονται στα 14 πρώτα αμινοξέα της αλληλουχίας της (Barcia et al., 1993). Οσο αφορά την *in vivo* φωσφορυλίωση της προθυμοσίνης α οι απόψεις των ερευνητικών ομάδων διαφέρουν. Από την ομάδα του Dr. Freire υποστηρίζεται ότι η πρωτεΐνη φωσφορυλιώνεται μόνο σε υπολείμματα θρεονίνης που εντοπίζονται στα 14 πρώτα αμινοξέα της (Barcia et al., 1993).

Ωστόσο, από την ερευνητική ομάδα της Dr. Berger έχει βρεθεί ότι η προθυμοσίνη α έχει φωσφορυλιωμένη την αμινοτελική ακετυλοσερίνη της (Sburlati et al, 1993).



ΠΡΩΤΟΤΑΓΗΣ ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΠΡΟΘΥΜΟΣΙΝΗΣ α

1 10 20 30 40
 Ανθρωπος: A C S D A A V D T S S E I T T K D L K E K K E V V E E A E N G R D A P A N G N A - N E E N G E O
 Επίμυς: A C S D A A V D T S S E I T T K D L K E K K E V V E E A E N G R D A P A N G N A Q N E E N G E O

50 60 70 80 90
 E A D N E V D E E E E Q G E E E E E Q D G D G E E E D G D E D E E A E S A T G K R A A E D D E D D D
 E A D N E V D E E E E Q G E E E E E Q D G D G E E E D G D E D E E A E A P T G K R V A E D D E D D D

100 110
 V D T K K Q K T D E D D
 V E T K K Q K K T D E D D

Σχήμα 1: Υποτιθέμενη πρωτοταγής δομή της προθυμοσίνης α ανθρώπου και επίμυς όπως προκύπτει από την αλληλουχία του cDNA (Eschenfeldt and Berger, 1986, Goodall et al, 1986, Frangou-Lazaridis et al., 1988). Με πλαίσιο σημειώνονται οι διαφορές στην πρωτοταγή δομή. Η αμινοτελική υπογραμμισμένη αλληλουχία 1-28 αντιστοιχεί στη θυμοσίνη α1. Η υπογραμμισμένη αλληλουχία στο καρβοξυτελικό άκρο αποτελεί το σήμα του πυρηνικού εντοπισμού της πρωτεΐνης.

Δευτεροταγής δομή

Η δευτεροταγής δομή της προθυμοσίνης α είχε προβλεφτεί αρχικά θεωρητικά βάσει της αλληλουχίας των αμινοξέων της (Haritos et al., 1985b, Schmidt and Werner 1991). Σύμφωνα με τις προβλέψεις αυτές, η πρωτεΐνη περιλαμβάνει 5 τμήματα με διαμόρφωση α-έλικας τα οποία συνδέονται με αλληλουχίες τυχαίου σπειράματος και μια περιοχή β-πτυχωτής επιφάνειας. Ωστόσο, τα πρώτα πειραματικά δεδομένα, χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, έδειξαν ότι τα μόρια της πρωτεΐνης σε υδατικό διάλυμα εμφανίζουν διαμόρφωση τυχαίου σπειράματος (Watts et al., 1990). Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγουν και μελέτες κυκλικού διχρωϊσμού οι οποίες δείχνουν ότι η προθυμοσίνη α δεν έχει καμία δευτεροταγή δομή σε ουδέτερο pH (Οικονόμου, 1993, Watts et al., 1990). Σαν εξήγηση για την απόκλιση της δομής από τη θεωρητική, αναφέρονται οι ισχυρές απωθήσεις λόγω φορτίου. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνει πρόσφατη μελέτη πάνω στη δευτεροταγή δομή της προθυμοσίνης α η οποία χρησιμοποιεί την τεχνική του κυκλικού διχρωϊσμού σε συνδυασμό με μετρήσεις σκέδασης φωτός και ακτίνων Χ (Gast et al., 1995). Από την μελέτη αυτή προκύπτει ότι σε pH 7,4 η πρωτεΐνη δεν έχει στοιχεία δευτεροταγούς δομής ακόμη και παρουσία 2 M NaCl ή δισθενών ιόντων. Προτείνεται δε, ότι η εκτεταμένη αυτή δομή της πρωτεΐνης όταν βρίσκεται σε διάλυμα είναι σημαντική για το φυσιολογικό της ρόλο γιατί πιθανά διευκολύνει την αλληλεπιδράσή της με άλλες πρωτεΐνες.

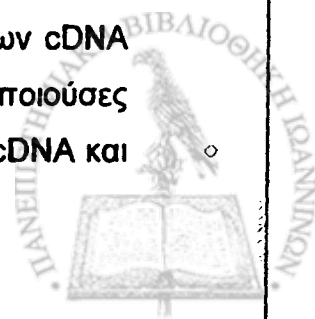
1.3 Δομή του cDNA και του γονιδίου της προθυμοσίνης α

Το cDNA της προθυμοσίνης α έχει απομονωθεί από διάφορα είδη. Το 1986 οι Goodall et al. απομόνωσαν cDNA από βιβλιοθήκη ανθρώπινων σπληνοκυττάρων χρησιμοποιώντας σαν ανιχνευτές μίγμα ολιγονουκλεοτιδίων που αντιστοιχούσαν σε περιοχές της αλληλουχίας της προθυμοσίνης α επίμυος. Ο κλώνος που απομονώθηκε είχε μέγεθος 503 bp και περιελάμβανε όλη την κωδικοποιούσα περιοχή της προθυμοσίνης α. Το cDNA αυτό χρησιμοποιήθηκε σαν ανιχνευτής για την ανίχνευση mRNA προθυμοσίνης α, μεγέθους 1400 bp, από την κυτταρική σειρά ανθρώπινων νοβλαστών WISH. Συγχρόνως, απομονώθηκε κλώνος cDNA από δύο ακόμη βιβλιοθήκες ανθρώπινων κυττάρων: από λεμφοκύτταρα ενεργοποιημένα με εντεροτοξίνη Α σταφυλόκοκκου και από νοβλάστες μετασχηματισμένους με τον ιό

SV-40 (Eschenfeldt and Berger, 1986). Στην πρώτη περίπτωση ως ανιχνευτής χρησιμοποιήθηκε ένα τμήμα του cDNA της γ-ιντερφερόνης ενώ στη δεύτερη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε ένα τμήμα του ήδη απομονωμένου κλώνου των λεμφοκυττάρων. Ο κλώνος που απομονώθηκε από τους ινοβλάστες, μεγέθους 1198 bp, διαπιστώθηκε μετά από προσδιορισμό της αλληλουχίας του, ότι κωδικοποιούσε μια ισχυρά όξινη πρωτεΐνη που είχε 90% ομολογία με την προθυμοσίνη α επίμυος. Ο ίδιος κλώνος χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του mRNA προθυμοσίνης α μεγέθους 1200 bp από ιστούς ανθρώπου και ποντικού. Το 1989 αναφέρθηκε η απομόνωση ενός ακόμη κλώνου ανθρώπινου cDNA από βιβλιοθήκη ανθρώπινων περιφερικών T-κυττάρων με ανιχνευτή δύο ολιγονουκλεοτίδια που αντιστοιχούσαν σε περιοχές του άμινο και του καρβοξυτελικού άκρου της προθυμοσίνης α επίμυος (Gomez-Marquez et al., 1989). Το cDNA αυτό χρησιμοποιήθηκε για την υβριδοποίηση του mRNA λεμφικών και μη λεμφικών ιστών επίμυος (θύμου, ωοθηκών, νεφρών, εγκεφάλου, καρδιάς, κ.α.). Σε όλες τις περιπτώσεις ανιχνεύτηκε μια ζώνη υβριδισμού 1300 νουκλεοτιδίων. Οι παραπάνω κλώνοι cDNA ανθρώπινης προθυμοσίνης α έχουν την ίδια δομή με εξαίρεση το cDNA των SV-40 μετασχηματισμένων ινοβλαστών (Eschenfeldt and Berger, 1986), ο οποίος περιέχει ένα κωδικόνιο για ένα επιπλέον γλουταμικό στη θέση 39. Διαπιστώθηκε ότι η ετερογένεια αυτή της δομής οφείλεται σε εναλλακτικό μάτισμα (alternative splicing). Η αλληλουχία **gaggag**, η οποία βρίσκεται στα όρια του ιντρονίου 2 και του εξονίου 3, παρέχει τη δυνατότητα κοπής είτε μετά την πρώτη, είτε μετά τη δεύτερη **ag** αλληλουχία, οδηγώντας σε δύο διαφορετικά mRNA για την ανθρώπινη προθυμοσίνη α (Manrow and Berger, 1993).

Ο κλώνος cDNA που περιείχε την πλήρη κωδικοποιούσα περιοχή για την προθυμοσίνη α επίμυος, απομονώθηκε από βιβλιοθήκη σπληνοκυττάρων επίμυος χρησιμοποιώντας αρχικά ως ανιχνευτή το cDNA της ανθρώπινης προθυμοσίνης α (Frangou-Lazaridis et al. 1988). Ο παραπάνω κλώνος χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση mRNA σε μη λεμφικούς ιστούς επίμυος και ποντικού (πνεύμονες, ήπαρ, νεφρά και εγκεφαλος), με την τεχνική της αποτύπωσης κατά Northern (Clinton et al., 1989). Το 1991 απομονώθηκε επίσης το cDNA από ασκητικό υγρό ποντικού (Schmidt and Werner, 1991).

Από τις παραπάνω μελέτες, διαπιστώθηκε η μεγάλη ομολογία μεταξύ των cDNA των διαφόρων ειδών, η οποία εκτείνεται και στις 3' και 5' μη κωδικοποιούσες περιοχές. Η ομολογία αυτή είναι μεγαλύτερη από 90% μεταξύ ανθρώπινου cDNA και



cDNA επίμυος. Όσο αφορά την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων της προθυμοσίνης α ποντικού παρουσιάζει 92% ομολογία με την αλληλουχία cDNA ανθρώπου και 97% ομολογία με την αλληλουχία cDNA επίμυος.

Εφαρμογή της αποτύπωσης κατά Southern στο DNA του ανθρώπινου γονιδιώματος για τον εντοπισμό του γονιδίου της προθυμοσίνης α οδήγησε στην ανίχνευση περισσότερων από μιας αλληλουχικών (Eschenfeldt et al., 1986). Τελικά, ταυτοποιήθηκαν και απομονώθηκαν 6 γονίδια από τα οποία μόνο το ένα περιείχε ιντρόνια και ήταν λειτουργικό (Eschenfeldt et al., 1989, Manrow et al. 1992). Το λειτουργικό αυτό γονίδιο αποτελείται από 5 εξόνια τα οποία διακόπτονται από 4 ιντρόνια και περιλαμβάνει τις αλληλουχίες ρύθμισης της μεταγραφής TATA και CAAT. Μετά από προσδιορισμό 1,5 kb επιπλέον από την αλληλουχία της 5' πλευρικής περιοχής του γονιδίου (Szabo et al., 1993), εντοπίστηκαν πολλές πιθανές cis-ρυθμιστικές αλληλουχίες, όπως οι θέσεις σύνδεσης για τους μεταγραφικούς παράγοντες SP1, AP2, CREB και c-myc. Στην ίδια περιοχή, 315 bp ανοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής εντοπίστηκε θέση σύνδεσης για τον μεταγραφικό παράγοντα E2F (Vareli et al., 1996) ο οποίος εμπλέκεται στη ρύθμιση γονιδίων σημαντικών για το δπλασιασμό του DNA και τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (DeGregori et al., 1995). Η 5' πλευρική περιοχή του γονιδίου της προθυμοσίνης α έδωσε τη δυνατότητα εντοπισμού του στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Το γονίδιο της προθυμοσίνης α εντοπίστηκε στο χρωμόσωμα 2 του ανθρώπινου γονιδιώματος (Szabo et al., 1993).

1.4 Η προθυμοσίνη α στα κύτταρα. Ενδοκυττάρια εντόπιση της πρωτεΐνης

Το mRNA της προθυμοσίνης α ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά σε κυτταρικό πληθυσμό το 1986 από τις ομάδες του Dr. Horecker (Goodall et al., 1986) και της Dr. Berger (Eschenfeldt and Berger, 1986). Η πρώτη ομάδα ανίχνευσε mRNA προθυμοσίνης α στην ανθρώπινη νοβλαστική σειρά WISH ενώ από τη δεύτερη ομάδα η προθυμοσίνη α εντοπίστηκε σε ανθρώπινα T-λεμφοκύτταρα, σε B-κύτταρα καθώς και στην νοβλαστική κυτταρική σειρά NIH3T3. Το 1989 το mRNA της προθυμοσίνης α βρέθηκε σε πολλαπλασιαζόμενα θυμοκύτταρα και σε ορισμένα είδη λευχαιμίας (Gomez- Marquez et al., 1989). Τα επίπεδά του mRNA στα κύτταρα αυτά ήταν πολύ υψηλότερα σε σχέση με τα ώριμα λεμφοκύτταρα γεγονός που δείχνει μια πιθανή σχέση μεταξύ της έκφρασης της προθυμοσίνης α και του κυτταρικού

πολλαπλασιασμού. Από την ίδια ερευνητική ομάδα ανιχνεύτηκε το mRNA της προθυμοσίνης α σε ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα του σπλήνα και σε πολλαπλασιαζόμενα ηπατοκύτταρα επίμυος (Bustelo et al., 1991). Η προθυμοσίνη α βρέθηκε επίσης σε ανθρώπινα αναγεννώμενα ηπατοκύτταρα παθολογικών καταστάσεων (Fraga et al., 1993), ενώ διαπιστώθηκε ότι σε φυσιολογικό ήπαρ, η προθυμοσίνη α δεν ανιχνεύεται στα ηπατοκύτταρα αλλά στα επιθηλιακά κύτταρα του χοληφόρου πόρου. Από τα παραπάνω ευρήματα φαίνεται ότι η παρουσία της προθυμοσίνης α στα κύτταρα δεν εξαρτάται από την προέλευση των κυττάρων αλλά σχετίζεται με το στάδιο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στο οποίο αυτά βρίσκονται.

Επιπλέον, η προθυμοσίνη α εντοπίστηκε σε κυτταρικές σειρές διαφορετικής προέλευσης όπως στις HCT-116, CX-1, DLD1 οι οποίες προέρχονται από καρκίνο του παχέος εντέρου, καθώς και στην κυτταρική σειρά IEC-6 η οποία προέρχεται από καρκίνο του λεπτού εντέρου (Appel et al., 1993, Contreas et al., 1990). Επίσης η προθυμοσίνη α έχει ανιχνευθεί στην προμυελωματική σειρά HL-60 (Dosil et al., 1993, Smith et al. 1993), στη σειρά θυρεοειδούς επίμυος FRTL-5 (Alvarez et al., 1993a) και στην κυτταρική σειρά βλεννογόνου επίμυος GH1 (Alvarez et al., 1993b). Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι το mRNA της προθυμοσίνης α υπάρχει σε μια ποικιλία κυτταρικών σειρών όπως προμυελωματικά κύτταρα HL-60, ανθρώπινα ερυθροβλαστικά κύτταρα λευχαιμίας K562, ερυθρολευχαιμική σειρά ποντικού MEL C88 και κύτταρα νευροβλαστώματος επίμυος N2A (Rodríguez et al., 1998). Μελέτες που έγιναν στο Εργαστήριό μας κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το mRNA της προθυμοσίνης α εντοπίζεται σε όλες τις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν (Βαρέλη, 1995). Υψηλά επίπεδα προθυμοσίνης α ανιχνεύθηκαν στις ακόλουθες κυτταρικές σειρές: παγκρεατοκύτταρα από ισουλίνωμα επίμυος RIN 5AH, κύτταρα από μυέλωμα επίμυος NSO, κύτταρα από τερατοκαρκίνωμα ποντικού F9, κύτταρα από ηπάτωμα επίμυος HTC, ινοβλάστες επίμυος FR3T3, καθώς και στις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές από ασθενή με λέμφωμα Daudi και από ασθενή με οξεία λευχαιμία Jurkat (Βαρέλη, 1995, Vareli et al., 1996). Χαμηλότερα επίπεδα mRNA ανιχνεύθηκαν στις κυτταρικές σειρές TPH1 που προέρχεται από οξεία λευχαιμία, στα κύτταρα νεφρών πιθήκου CV1 καθώς και στα μετασχηματισμένα αυτών COS και S9. Ανιχνεύσιμο ήταν το mRNA της πρωτεΐνης και στις κυτταρικές σειρές HeLa και U937 (Βαρέλη, 1995). Είναι αξιοσημείωτο ότι ενώ η προθυμοσίνη α ανιχνεύεται σε



προμονοκυτταρικές σειρές, δεν ανιχνεύτηκε σε ανθρώπινα μονοκύτταρα (Βαρέλη, 1995).

Ενδοκυττάρια εντόπιση

Η πρώτη υπόθεση για την ενδοκυττάρια εντόπιση της προθυμοσίνης α διατυπώθηκε με βάση τα δομικά της χαρακτηριστικά (Gomez-Marquez et al., 1988). Ο όξινος χαρακτήρας της και η παρουσία μιας όξινης περιοχής στο κέντρο του μορίου της αποτελούν δύο σημαντικές ομοιότητες με πυρηνικά εντοπιζόμενες πρωτεΐνες όπως η νουκλεοπλασμίνη, η νουκλεολίνη, οι N1/N2 πρωτεΐνες, οι HMG πρωτεΐνες κ.α. Επιπλέον το καρβοξυτελικό τμήμα της πρωτεΐνης περιλαμβάνει αλληλουχία αμινοξέων (Lys-Lys-Gln-Lys) που αποτελεί σήμα πυρηνικής μετατόπισης. Η εξακρίβωση της θέσης της προθυμοσίνης α στο κύτταρο βασίσθηκε σε δύο διαφορετικές προσεγγίσεις: i) σε λειτουργικές μελέτες που δείχνουν τη μετατόπιση της πρωτεΐνης στον πυρήνα και ii) σε εντόπιση της θέσης της πρωτεΐνης στο κύτταρο.

Το 1989 οι Watts et al., ενύοντας προθυμοσίνη α από θύμο βοός σε ωκύτταρα *Xenopus* παρατήρησαν ότι η πρωτεΐνη μεταναστεύει στον πυρήνα των κυττάρων (Watts et al., 1989). Το δεδομένο αυτό επιβεβαιώθηκε το 1990 με την μετακίνηση στον πυρήνα ωκυττάρων *Xenopus*, ανθρώπινης προθυμοσίνης α οπότε και εξακριβώθηκε ότι για τη μετακίνηση αυτή είναι απαραίτητη η προαναφερθείσα αλληλουχία Lys-Lys-Gln-Lys (Watts et al., 1990). Το 1991, οι Manrow et al. διαπίστωσαν ότι μετά από επιμόλυνση COS κυττάρων με χιμαιρική πρωτεΐνη, η οποία αποτελείται από την προθυμοσίνη α και από την μεγάλη, κυτταροπλασματική πρωτεΐνη β-γαλακτοσιδάση, η χιμαιρική πρωτεΐνη συσσωρεύεται στον πυρήνα των κυττάρων (Manrow et al., 1991). Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν οι Clinton et al., εκφράζοντας χιμαιρική πρωτεΐνη η οποία αποτελούταν από προθυμοσίνη α και τμήμα της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης. Η χιμαιρική αυτή πρωτεΐνη εντοπίστηκε στον πυρήνα των κυττάρων HeLa S3 τα οποία είχαν επιμολυνθεί με αυτή (Clinton et al., 1991).

Με ανοσοϊστοχημικές μελέτες, χρησιμοποιώντας πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του αμινοτελικού άκρου της, της θυμοσίνης α1, η προθυμοσίνη α ανιχνεύθηκε στον πυρήνα των αστροκυττάρων φυσιολογικού ανθρώπινου εγκεφάλου (Su et al., 1989). Το 1990 οι Contreas et al. ανίχνευσαν, με ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία, ανοσοαντιδρών υλικό της προθυμοσίνης α κυρίως στον πυρήνα της κυτταρικής σειράς λεπτού εντέρου επίμοσ ICE-6 (Contreas et al., 1990). Συγχρόνως, η

προθυμοσίνη α εντοπίστηκε στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα πρώιμων σπερματοκυττάρων (Roson et al., 1990a). Από την ίδια ομάδα η πρωτεΐνη ανιχνεύθηκε στον πυρήνα των λεμφοκυττάρων των λεμφαδένων και των αμυγδαλών και συγκεκριμένα στα όρια της ευχρωματίνης με την ετεροχρωματίνη (Gallego et al., 1992). Η πυρηνική θέση της προθυμοσίνης α διαπιστώθηκε και μετά από χρώση του πυρήνα των επιθηλιακών κυττάρων του χοληφόρου πόρου φυσιολογικού ήπατος και των πολλαπλασιαζόμενων ηπατοκυττάρων παθολογικών καταστάσεων (Fraga et al., 1993). Ανοσοϊστοχημικές μελέτες του παχέος εντέρου έδειξαν ότι σε φυσιολογικό ιστό η προθυμοσίνη α βρίσκεται στον πυρήνα των επιθηλιακών κυττάρων της κρύπτης ενώ σε καρκινικό ιστό κυρίως στον πυρήνα και πολύ λιγότερο στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών κυττάρων (Mori et al., 1993). Με πειράματα ανοσοφθορισμού και χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της αλληλουχίας 88-111 του καρβοξυ-τελικού άκρου της προθυμοσίνης α επίμυος (cI-πεπτιδίο) εντοπίστηκε η προθυμοσίνη α στον πυρήνα της κυτταρικής σειράς NIH3T3 (Vareli et al., 1996). Με την ίδια τεχνική η πρωτεΐνη ανιχνεύθηκε στον πυρήνα των κυττάρων της προμυελωματικής σειράς HL-60 (Rodriguez et al., 1998)

Σε αντίθεση με τα παραπάνω συμπεράσματα βρίσκονται τα πειραματικά δεδομένα της ερευνητικής ομάδας του Δρ. Χαρίτου (Tsitsiloni et al., 1989). Στην εργασία αυτή η προθυμοσίνη α ανιχνεύθηκε στο κυτταρόπλασμα σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των προηγούμενων εργασιών. Η διαφορά αυτή εξηγείται γιατί η προθυμοσίνη α διαφεύγει από τον πυρήνα όταν χρησιμοποιούνται συνηθισμένες βιοχημικές μέθοδοι για την απομόνωση της όπως στην παραπάνω περίπτωση (Sburlati et al., 1990). Για να αποφευχθεί η διάχυση της προθυμοσίνης α στο κυτταρόπλασμα θα πρέπει να βρεθεί τρόπος ώστε να σφραγιστεί ο πυρήνας του κυττάρου χρησιμοποιώντας για παράδειγμα, κυτοχალασίνη Β. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η πρωτεΐνη εντοπίζεται αποκλειστικά στον πυρήνα του κυττάρου (Manrow et al., 1991). Ανάλογη αναφορά κυταροπλασματικής εντόπισης της πρωτεΐνης έγινε από τους Makarova et al., με βάση την απομόνωση της σαν σύμπλεγμα με κυταροπλασματικό RNA (Makarova et al., 1989). Πάντως, το δεδομένο αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα πειραματικά αποτελέσματα της ομάδας της Dr. Berger η οποία χρησιμοποιώντας ανάλογη μέθοδο δεν ήταν σε θέση να απομονώσει το παραπάνω σύμπλοκο (Trumbore et al., 1998).

Συνοψίζοντας τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι:

1. Η ανίχνευση της προθυμοσίνης α στα κύτταρα δεν εξαρτάται άμεσα από την προέλευση των κυττάρων, αλλά σχετίζεται με την ικανότητα πολλαπλασιασμού τους.



2. Η προθυμοσίνη α εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα των κυττάρων.

1.5 Βιολογικός ρόλος της προθυμοσίνης α

Εξωκυττάριος ρόλος

Τα πρώτα δεδομένα για την λειτουργία της προθυμοσίνης α αφορούσαν την ανοσοενισχυτική δράση της σε *in vivo* και *in vitro* δοκιμασίες. Σε *in vivo* μελέτες βρέθηκε ότι η προθυμοσίνη α σε μικρότερες συγκεντρώσεις από την θυμοσίνη α1 προστατεύει ευπαθή στελέχη ποντικών από τη μόλυνση με τον μύκητα *Candida albicans* (Haritos et al., 1985b, Pan et al., 1986). *In vitro* πειράματα σε σύστημα μικτής λεμφοκυτταρικής καλλιέργειας (MLR) έδειξαν ότι η προθυμοσίνη α επάγει τον πολλαπλασιασμό περιφερειακών T-κυττάρων μέσω ενεργοποίησης των μονοκυττάρων (Baxevanis et al., 1988, Baxevanis et al., 1990a). Από την ίδια ερευνητική ομάδα υποστηρίχθηκε ότι η προθυμοσίνη α επάγει την έκφραση πρωτεϊνών ιστοσυμβατότητας τάξης II (MHC II) στην ανθρώπινη μονοκυτταρική σειρά U937 καθώς και την έκφραση του αντιγόνου HLA-DR σε μονοκύτταρα ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση (Baxevanis et al., 1992, Baxevanis et al., 1990b). Επιπλέον, παρουσία προθυμοσίνης α οι μειωμένες αποκρίσεις της μικτής λεμφοκυτταρικής καλλιέργειας των ασθενών επανέρχονται στα φυσιολογικά τους επίπεδα (Baxevanis et al., 1987). Σε ορούς ασθενών με συστηματικό ερυθηματώδη λύκο έχουν βρεθεί αυτοαντισώματα έναντι της προθυμοσίνης α (Vlachoyiannopoulos et al., 1989). Ανοσοενισχυτική δράση για την προθυμοσίνη α προτάθηκε και από την ερευνητική ομάδα της Dr. Nogueira η οποία υποστηρίζει ότι η προθυμοσίνη α επάγει *in vitro* την δραστικότητα των NK (Natural Killer) κυττάρων (Cordero et al., 1992, Cordero et al., 1995). Η ίδια ομάδα προτείνει την εξωκυττάρια δράση της πρωτεΐνης βάσει της ταυτοποίησης υποδοχέων για την προθυμοσίνη α στα μονοκύτταρα περιφερικού αίματος (Cordero et al., 1994, Cordero et al., 1996).

Ρόλος στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό

Η ευρεία ιστική κατανομή της προθυμοσίνης α και η παρουσία της σε πολλούς κυτταρικούς τύπους οι οποίοι μάλιστα δεν σχετίζονται με το ανοσολογικό σύστημα, έδειξε ότι η πρωτεΐνη θα πρέπει να εκτελεί ένα βασικό ρόλο μέσα στο κύτταρο. Η εξωκυττάρια δράση της πρωτεΐνης αμφισβητήθηκε επίσης από το γεγονός ότι η απομόνωση του cDNA της προθυμοσίνης α (Eschenfeldt et al., 1986, Goodall et al., 1986) έδειξε ότι η πρωτεΐνη α είναι κωδικοποιημένη από ένα γονίδιο που βρίσκεται στον πυρήνα του κυττάρου.

1986) έδειξε ότι η πρωτεΐνη δεν έχει πεπτιδίο το οποίο να αποτελεί σήμα για την έκκριση της. Επίσης βρέθηκε ότι το mRNA της μεταφράζεται στα ελεύθερα ριβοσωμάτια και όχι στα μεμβρανικά συνδεδεμένα πολυσωμάτια όπως συμβαίνει με τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες (Eschenfeldt et al., 1989).

Συγχρόνως, τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ότι η πρωτεΐνη εμπλέκεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα επίπεδα του mRNA της πρωτεΐνης βρέθηκαν αυξημένα σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα όπως στην ινοβλαστική σειρά NIH3T3 αμέσως μετά από την επανατροφοδότησή της με ορό (Eschenfeldt et al., 1986), σε ανώριμα πολλαπλασιαζόμενα θυμοκύτταρα και σε λευχαιμικά κύτταρα (Gomez-Marquez et al., 1989). Το mRNA της προθυμοσίνης α αυξάνεται επίσης κατά την επίδραση μιτογόνων σε T και B λεμφοκύτταρα (Bustelo et al., 1991, Szabo et al., 1992) καθώς και σε πολλαπλασιαζόμενα ηπατοκύτταρα κατά την αναγέννηση του ήπατος (Bustelo et al., 1991). Η αυξημένη παρουσία της προθυμοσίνης α σε αναπτυσσόμενους και καρκινικούς ιστούς συμφωνεί επίσης με τη σχέση της με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Για παράδειγμα, τα επίπεδα της προθυμοσίνης α στους ιστούς του επίμους είναι αυξημένα στις πρώτες περιόδους της ανάπτυξης του (Dosil et al., 1990, Frillingos and Tsolas 1991). Αυξημένα επίπεδα παρατηρήθηκαν επίσης σε καρκίνους του εντέρου και του μαστού (Mori et al., 1993, Dominguez et al., 1993, Tsitsiloni et al., 1993).

Η άποψη για το ρόλο της προθυμοσίνης α στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ενισχύθηκε από την παρατήρηση ότι το γονίδιο της επάγεται από το ογκογονίδιο c-myc το οποίο είναι γνωστό ότι δρα σαν ρυθμιστής του πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Eilers et al., 1990, Gaubatz et al., 1994). Έχειδειχθεί ότι τα επίπεδα του mRNA της προθυμοσίνης α παραλληλίζονται με τα επίπεδα του mRNA του c-myc σε περιπτώσεις καρκίνων εντέρου (Mori et al., 1993) καθώς και κατά τη διαφοροποίηση των κυττάρων HL-60 (Smith et al. 1993). Μελέτες που έγιναν στο Εργαστήριό μας έδειξαν τον παραπάνω συσχετισμό των mRNA της προθυμοσίνης α και του c-myc κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του πλακούντα, της διαφοροποίησης κυττάρων εμβρυϊκού καρκινώματος επίμους F9, της ιικής μόλυνσης κυττάρων HeLa και του θερμικού σοκ στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά Daudi και στα CV1 κύτταρα πιθήκου (Vareli et al., 1995). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ένα άλλο μέλος της οικογένειας των myc γονιδίων, το N-myc, το οποίο αυξάνει τη σύνθεση του DNA και συντομεύει τη G1 φάση κυττάρων ανθρώπινου νευροβλαστώματος, επάγει επίσης την έκφραση της προθυμοσίνης α (Lutz et al., 1996).



Η δράση της προθυμοσίνης α σε διαδικασίες πολλαπλασιασμού των κυττάρων υποστηρίχθηκε επιπλέον από πειράματα με συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια συμπληρωματικά με περιοχές του mRNA της προθυμοσίνης α (antisense oligonucleotides). Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά όταν προστέθηκαν σε καλλιέργεια ανθρώπινων μυελωματικών κυττάρων RPMI 8226 ανέστειλαν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, υποδηλώνοντας ότι η προθυμοσίνη α είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική πορεία του κυτταρικού κύκλου (Sburlati et al., 1991).

Η σύνδεση της προθυμοσίνης α με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ο οποίος σχετίζεται με τη διαφοροποίηση των κυττάρων, έθεσε το ερώτημα αν η προθυμοσίνη α εμπλέκεται στην κυτταρική διαφοροποίηση. Βρέθηκε ότι κατά τη διαφοροποίηση διαφόρων κυτταρικών σειρών όπως οι HL-60, K562, U937, MEL C88, N2A και PC12 τα επίπεδα του mRNA της προθυμοσίνης α μειώνονται (Dosil et al., 1993, Rodriguez et al., 1998). Ωστόσο, πειράματα κυτταρικής διαφοροποίησης σε ανθρώπινα προμυελωματικά κύτταρα HL-60 και στην κυτταρική σειρά ποντικού F9 έδειξαν ότι η μείωση της προθυμοσίνης α οφείλεται στην ταυτόχρονη αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και σταματά αμέσως μόλις τα κύτταρα ανακτήσουν την ικανότητα τους να πολλαπλασιάζονται (Smith et al., 1993, Vareli et al., 1995).

Προθυμοσίνη α και κυτταρικός κύκλος

Από διάφορες ερευνητικές ομάδες προσδιορίστηκε η φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία η προθυμοσίνη α παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα. Ωστόσο, τα αποτελέσματα των ερευνών ήταν αντικρουόμενα. Το 1990 οι Contreas et al., χρησιμοποιώντας ραδιοανοσολογική μέθοδο διαπίστωσαν ότι οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της προθυμοσίνης α εμφανιζόταν στη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου της σειράς εντέρου επίμιος IEC-6 (Contreas et al., 1990). Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν οι Szabo et al., μελετώντας το mRNA ανθρώπινων λεμφοκυττάρων (Szabo et al., 1992). Οι Bustelo et al., υποστηρίζουν ότι το mRNA της προθυμοσίνης α υπάρχει σε όλα τα στάδια του κυτταρικού κύκλου αλλά αυξάνεται στην αρχή της S φάσης ενεργοποιημένων θυμοκυττάρων (Bustelo et al., 1991). Σε ανθρώπινα μυελωματικά κύτταρα οι Sburlati et al., περιορίζουν τη δράση της προθυμοσίνης α κατά τη μετάβαση από την G2 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου (Sburlati et al., 1991). Σε μελέτες που έγιναν στο Εργαστήριό μας με διάφορες κυτταρικές σειρές (U937, CV1, NIH3T3), διαπιστώθηκαν αυξημένα επίπεδα του mRNA της προθυμοσίνης α στο τέλος της S και της G2/M φάσης (Vareli et al., 1996). Στην ίδια μελέτη αναφέρεται ότι η προθυμοσίνη α επάγεται από το

μεταγραφικό παράγοντα E2F ο οποίος είναι γνωστό ότι ρυθμίζει γονίδια απαραίτητα για το διπλασιασμό του DNA και τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (Gomez-Marquez et al., 1998).

Ενδεικτική για το ρόλο της προθυμοσίνης α στο κύτταρο μπορεί να θεωρηθεί και η δομή της. Η πρωτεΐνη περιέχει μια κεντρική περιοχή η οποία είναι ισχυρά όξινη. Ομοιες όξινες περιοχές έχουν ταυτοποιηθεί και σε άλλες πυρηνικές πρωτεΐνες όπως οι HMG-1 και -2, η νουκλεοπλασμίνη, οι N1/N2 πρωτεΐνες κ.α. (Earnshaw, 1987). Η λειτουργία των πρωτεϊνών αυτών σχετίζεται με την οργάνωση της δομής της χρωματίνης. Συνεπώς και η προθυμοσίνη α είναι πιθανό να έχει παρόμοια δράση ή ακόμη και να εμπλέκεται σε διαδικασίες εξαρτώμενες από τη δομή της χρωματίνης όπως η μεταγραφή και ο διπλασιασμός του DNA. Στην παραπάνω εκδοχή οδηγεί και η παρατήρηση ότι η προθυμοσίνη α συνδέεται με την συνδετική ιστόνη H1 (Papamarcaki and Tsolas, 1994) η οποία είναι υπεύθυνη για την οργάνωση και τη σταθεροποίηση των ανώτερων δομών της χρωματίνης. Συνεπώς, η αλληλεπίδρασή της με την προθυμοσίνη α είναι πιθανό να βοηθήσει στη διαλεύκανση του ρόλου της τελευταίας στο κύτταρο.

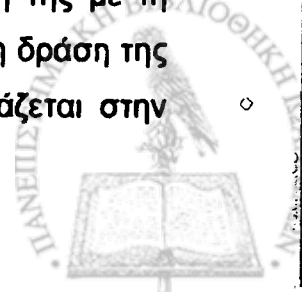
Συνοψίζοντας τα παραπάνω καταλήγουμε στα εξής:

1. Τα αυξημένα επίπεδα της προθυμοσίνης α σε καρκινικούς ιστούς, η συσχέτιση της με το ογκογονίδιο c-myc και η έντονη παρουσία της σε φάσεις πολλαπλασιασμού των κυττάρων δείχνουν ότι η λειτουργία της προθυμοσίνης α έχει άμεση σχέση με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.
2. Η προθυμοσίνη α συνδέεται με την συνδετική ιστόνη H1 του νουκλεοσώματος, η οποία είναι υπεύθυνη για την οργάνωση της ανώτερης δομής της χρωματίνης και πιθανώς επηρεάζει διαδικασίες του κυττάρου που εξαρτώνται από αυτή όπως η μεταγραφή και η αντιγραφή του DNA.

1.6 Δομικά χαρακτηριστικά της χρωματίνης

1.6.1 Η δομή του νουκλεοσώματος

Η δομική ομοιότητα της προθυμοσίνης α με πυρηνικές πρωτεΐνες οι οποίες σχετίζονται με την οργάνωση της δομής της χρωματίνης και η σύνδεση της με τη ιστόνη H1 (Papamarcaki and Tsolas, 1994) οδήγησαν στην υπόθεση ότι η δράση της προθυμοσίνης α σχετίζεται με τη χρωματίνη. Η πιθανότητα αυτή εξετάζεται στην

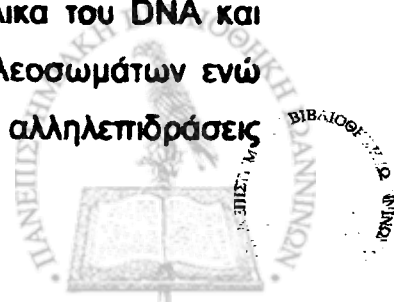


παρούσα εργασία και γι'αυτό κρίθηκε αναγκαίο να δοθούν ορισμένες πληροφορίες για τη δομή της χρωματίνης.

Η βασική και επαναλαμβανόμενη μονάδα της χρωματίνης είναι το νουκλεόσωμα. Η δομική αυτή μονάδα αποτελείται από ένα πρωτεϊνικό οκταμερές που περιλαμβάνει δύο μόρια καθεμιάς από τις τέσσερις ιστόνες του πυρήνα του νουκλεοσώματος (H2A, H2B, H3 και H4). Όπως φαίνεται από πειράματα διάθλασης ακτίνων Χ γύρω από το οκταμερές είναι τυλιγμένες 1,7 στροφές της αριστερόστροφης υπερέλικας του DNA μεγέθους περίπου 146 ζευγών βάσεων (bp) (Richmond et al., 1984).

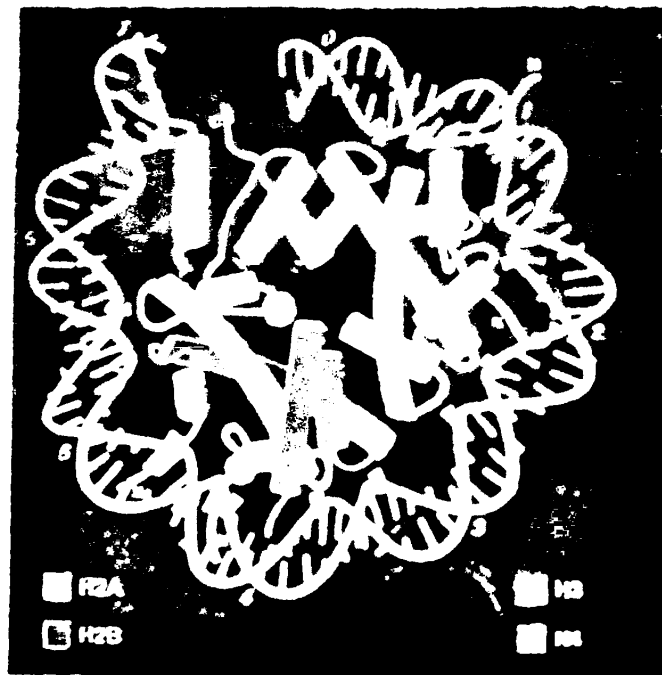
Κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ διακριτικής ικανότητας 3,1 Å, έδειξε ότι όλες οι ιστόνες του πυρήνα του νουκλεοσώματος παρουσιάζουν ένα κοινό δομικό στοιχείο το οποίο αποτελείται από μία μεγάλη κεντρική α-έλικα σε κάθε άκρο της οποίας υπάρχει ένα τμήμα που θυμίζει θηλεκά (loop) και μια μικρότερη έλικα (Arents et al., 1991). Η τριποταγής αυτή δομή λέγεται «ιστονική πτυχή» (histone fold), είναι ευρέως συντηρημένη από τους κατώτερους οργανισμούς έως τα θηλαστικά και χρησιμεύει για το σχηματισμό πρωτεϊνικών διμερών (Arents and Moudrianakis, 1995). Το οκταμερές των ιστονών είναι οργανωμένο σε τρία μέρη. Υπάρχει ένα κεντρικό (H3-H4)₂ τετραμερές το οποίο πλαiskώνεται από δύο H2A-H2B διμερή. Τα ετεροδιμερή H3-H4 και H2A-H2B σχηματίζονται μέσω της δομικής περιοχής της "ιστονικής πτυχής" καταλήγοντας σε μια δομή που μοιάζει με "χειραψία" (handshake motif) (Arents and Moudrianakis, 1995). Το τετραμερές (H3-H4)₂ και τα διμερή H2A-H2B είναι σταθερά σε φυσιολογική ιοντική ισχύ ενώ το οκταμερές είναι σταθερό μόνο σε μεγάλη ιοντική ισχύ (2 M NaCl), ή παρουσία πολυανιόντων όπως το DNA (Pruss et al., 1995). Αν και η περιοχή επαφής μεταξύ των δύο H3-H4 ετεροδιμερών είναι μικρότερη από ότι αυτή μεταξύ των (H3-H4) και (H2A-H2B) (Arents et al., 1991), η επαφή μεταξύ H3-H4 και H2A-H2B είναι η πρώτη που καταστρέφεται απουσία αντισταθμιστικών ιόντων.

Τα παραπάνω δομικά στοιχεία του νουκλεοσώματος επιβεβαιώθηκαν και μετά από προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής του πυρήνα του νουκλεοσώματος με διακριτική ικανότητα 2,8 Å (Luger et al., 1997). Στην εργασία αυτή εκτός από τις δομικές λεπτομέρειες του πυρήνα του νουκλεοσώματος μελετάται διεξοδικά και ο ρόλος των άκρων των ιστονών στη δομή του. Προκύπτει το συμπέρασμα ότι τα άμινο τελικά άκρα των ιστονών περνούν πάνω και ανάμεσα από την έλικα του DNA και είναι απαραίτητα για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ γειτονικών νουκλεοσωμάτων ενώ όπως ήταν ήδη γνωστό τα καρβοξυτελικά άκρα εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις



ιστονών μέσα στο νουκλεόσωμα. Τελικά, το σχήμα του νουκλεοσώματος μοιάζει με σφήνα πιο στενή στο ένα άκρο το οποίο σχηματίζεται από το τετραμερές (H3-H4)₂ σχήματος V και πιο φαρδιά στο σημείο όπου είναι συνδεδεμένα τα διμερή H2A-H2B με σχήμα συμπιεσμένων σφαιρών. Το οκταμερές εμφανίζει στην επιφάνεια του αυλάκια και υψώματα που χρησιμεύουν για την περιτύλιξη του DNA (Arents et al., 1995). Στο σχήμα 3 παρουσιάζεται ένα μοντέλο του οκταμερούς όπως προέκυψε από τις τελευταίες κρυσταλλογραφικές μελέτες της ομάδας του Dr. Richmond (Luger et al., 1997) (Σχήμα 3).



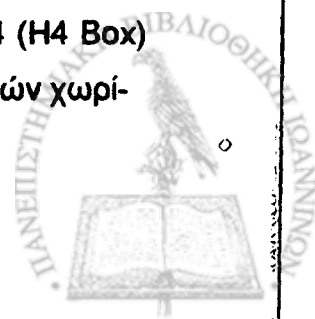


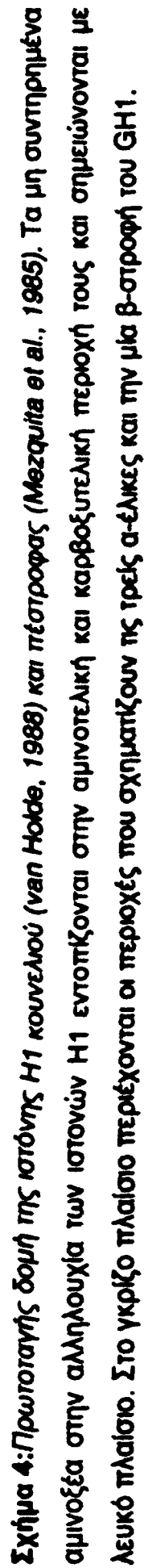
Σχήμα 3: Κρυσταλλογραφικό μοντέλο του οκταμερούς των ικτονών του νουκλεοσώματος (Luger et al., 1997). Στο σχήμα απεικονίζεται η δομή του πυρήνα του νουκλεοσώματος όπως προσδιορίστηκε με κρυσταλλογραφία διακριτικής ικανότητας 2,8 Å. Φαίνεται το μισό της δομής του νουκλεοσώματος. Μια στροφή της υπερέλικας του DNA (73 ζεύγη βάσεων) τυλίγεται γύρω από τις ιστόνες του πυρήνα του νουκλεοσώματος. Οι ιστόνες απεικονίζονται με διαφορετικά χρώματα και οι περιοχές των πρωτεϊνών που έχουν μορφή έλικας παριστάνονται από κυλίνδρους. Τα σημεία επαφής των πρωτεϊνών με το DNA απεικονίζονται με τα λευκά άγκιστρα.

1.6.2 Η δομή της ιστόνης H1 – Η θέση σύνδεσης της ιστόνης H1 στο νουκλεόσωμα

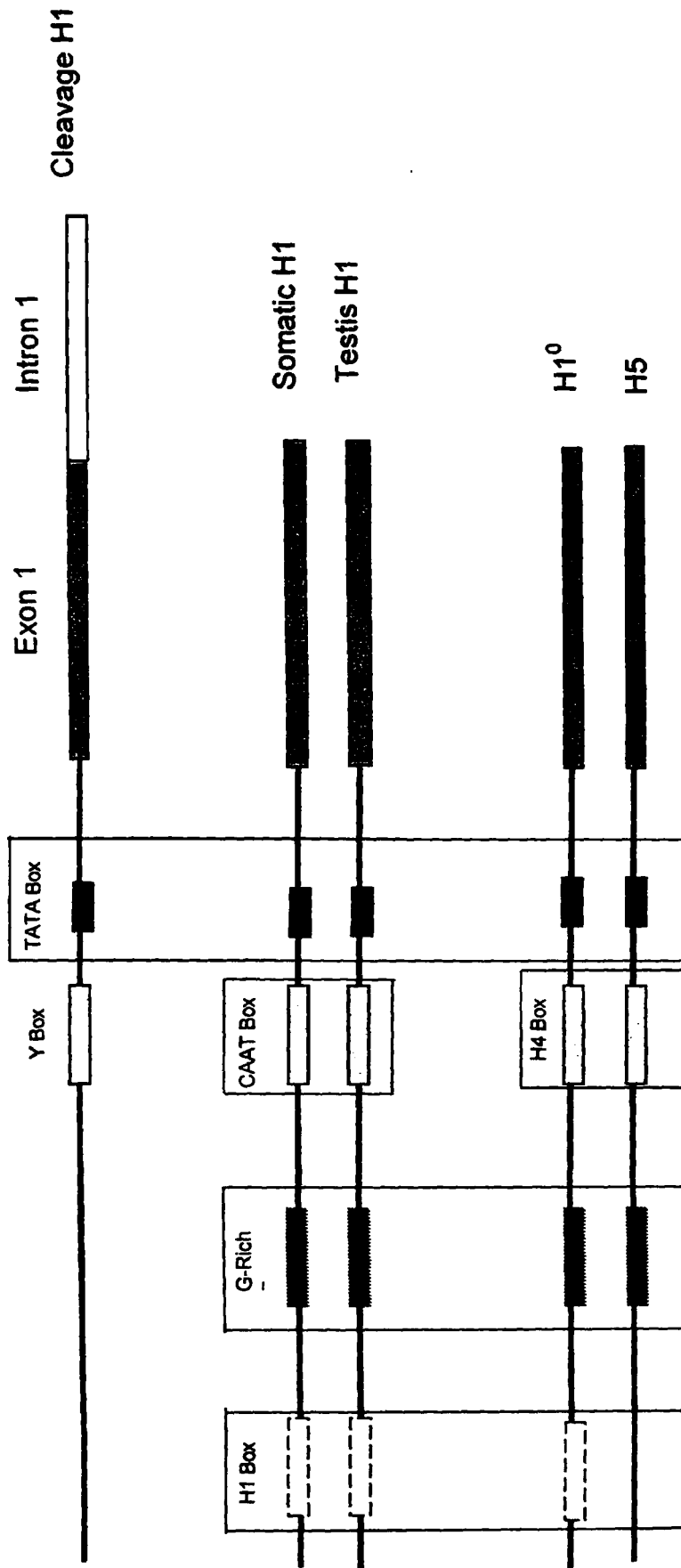
Δομή

Η συνδετική ιστόνη H1 είναι πολύ πλούσια σε υπολείμματα λυσινών (Lys/ Arg > 20) σε αντίθεση με τις ιστόνες του πυρήνα του νουκλεοσώματος (Lys/ Arg < 1). Έχει μεγαλύτερο μοριακό βάρος (22,5 kD) από τις δομικές ιστόνες (11kD-15kD) και σε ηλεκτροφόρηση SDS-πολυακρυλαμιδίου κινείται με φαινόμενο μοριακό βάρος 30 kDa περίπου. Επιπλέον, είναι λιγότερο συντηρημένη από είδος σε είδος σε σχέση με τις ιστόνες του πυρήνα του νουκλεοσώματος. Όπως φαίνεται από τη σύγκριση της πρωτοταγούς δομής H1 κουνελιού και H1 πέστροφας (σχήμα 4) η πλειοψηφία των μη συντηρημένων αμινοξέων εντοπίζεται στο αμινοτελικό και στο καρβοξυτελικό τμήμα των πρωτεϊνών. Η συνδετική ιστόνη παρουσιάζει επίσης το μεγαλύτερο αριθμό ισομορφών οι οποίες αν και βρίσκονται στον ίδιο οργανισμό διαφέρουν πολλές φορές σημαντικά ως προς την πρωτοταγή δομή τους. Γενικά, ανάλογα με τη χρονική στιγμή της έκφρασής τους και τον τύπο των κυττάρων στον οποίο βρίσκονται οι συνδετικές ιστόνες μπορούν να υποδιαιρεθούν σε τέσσερις ομάδες: i) ιστόνες που εκφράζονται κατά την ωογένεση και κατά τα πρώιμα στάδια της εμβρυογένεσης (π.χ. B4) ii) ιστόνες των σωματικών κυττάρων (π.χ. H1A, H1B, H1C) iii) ιστόνες που βρίσκονται σε αρσενικά γεννητικά κύτταρα (H1t) iv) ιστόνες που εκφράζονται σε τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα (π.χ. H5, H1⁰) (Kochbin and Wolffe, 1994). Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις παραπάνω συνδετικές ιστόνες χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες βάσει της δομής της εγγύς περιοχής του υποκινητή τους και της κωδικοποιούσας περιοχής τους (Σχήμα 5). Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει την ιστόνη της ωογένεσης, ο υποκινητής της οποίας περιέχει ρυθμιστικές περιοχές ειδικές για τα ωοκύτταρα (Box Y). Η ιστόνη αυτή είναι η μόνη από τις συνδετικές ιστόνες που περιέχει ιντρόνια. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν η σωματική συνδετική ιστόνη και η ιστόνη H1t. Το γονίδιο της κατηγορίας αυτής περιέχει μια CAAT αλληλουχία, μια περιοχή πλούσια σε GC και μια χαρακτηριστική περιοχή για τα γονίδια των συνδετικών ιστονών (H1 Box). Στην τρίτη κατηγορία, που είναι αυτή των ιστονών των τελικά διαφοροποιημένων κυττάρων η CAAT αλληλουχία έχει αντικατασταθεί από ένα τμήμα της περιοχής του υποκινητή της ιστόνης H4 (H4 Box) (Kochbin and Wolffe, 1994). Κάθε μια από τις παραπάνω ομάδες των ιστονών χωρί-





Σχήμα 4: Πρωτοταγής δομή της ιστόνης H1 κουνελιού (van Holde, 1988) και πέστροφας (*Mesquitta et al.*, 1985). Τα μη συντηρημένα αμινοξέα στην αλληλουχία των ιστονών H1 εντοπίζονται στην αμινοτελική και καρβοξυτελική περιοχή τους και σημειώνονται με λευκό πλαίσιο. Στο γκρίζο πλαίσιο περιέχονται οι περιοχές που σχηματίζουν τις τρές α-έλικες και την μία β-στροφή του GH1.



Σχήμα 5: Υποδιαίρεση των H1 ομάδων των θηλαστικών βάσει της δομής των γονιδίων τους. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις συνδετικές ιστόνες μπορούν να υποδιαιρεθούν σε τρεις μεγάλες ομάδες, λαμβάνοντας υπόψη τη δομή των εγγύς περιοχών του υποκινητή και τις κωδικοποιούσες περιοχές τους (Kochbin and Wolffe, 1994).

ζονται σε υποκατηγορίες πολυπεπτιδίων οι οποίες εμφανίζουν μικρές διαφορές ως προς την πρωτοταγή τους δομή. Οι διαφορές αυτές κάνουν δυνατό το διαχωρισμό τους με τεχνικές όπως η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (Lennox, 1984) και η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (Lidner et al., 1986). Η ομάδα των συνδετικών ιστονών των σωματικών κυττάρων είναι αυτή που διαιρείται στις περισσότερες υποκατηγορίες. Στο ποντίκι, όπου οι υποκατηγορίες των ιστονών έχουν μελετηθεί περισσότερο, αναφέρεται ότι εκτός της H1⁰ υπάρχουν 5 διαφορετικές ιστόνες των σωματικών κυττάρων (H1a-e) (Lennox, 1984). Ορισμένα από τα ιδιαίτερα στοιχεία των ιστονών των σωματικών κυττάρων του ποντικού παρουσιάζονται στον πίνακα 1. Όπως φαίνεται και από τον πίνακα η έκφραση των διαφόρων υποκατηγοριών των ιστονών είναι ιδιαίτερα αυξημένη σε συγκεκριμένα είδη ιστών και κυττάρων. Για παράδειγμα οι H1c και H1e συσσωρεύονται σε ιστούς που περιέχουν μη διαιρούμενα κύτταρα, όπως το ήπαρ και οι νεφροί ενηλίκων απ' όπου οι H1a και H1b έχουν εξαφανιστεί. Αντίθετα, σε λεμφικούς ιστούς, όπως η σπλήνα και ο θύμος, οι H1a και H1b παραμένουν μέχρι την ενηλικίωση (Lennox, 1984). Ανάλογες κατηγορίες ιστονών σωματικών κυττάρων έχουν βρεθεί στον επίμυ, στο μόσχο και στο κουνέλι. Οι σωματικοί ιστοί των θηλαστικών αυτών περιέχουν πέντε είδη ιστονών των οποίων η κατανομή στους ιστούς ακολουθεί την κατανομή των H1a-e του ποντικού (Lennox, 1984). Η διατήρηση των υποκατηγοριών των συνδετικών ιστονών κατά την εξέλιξη δείχνει ότι κάθε υποκατηγορία πιθανώς έχει το δικό της δομικό ή λειτουργικό ρόλο στο κύτταρο. Ο ρόλος αυτός δεν έχει διασαφηνιστεί, ωστόσο, είναι πιθανό ότι διαφορές στη σύσταση των υποκατηγοριών επηρεάζουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των νουκλεοσωμάτων και συνεπώς την ανώτερη δομή της χρωματίνης (van Holde, 1988).

Μια από τις μεγάλες διαφορές μεταξύ των υποκατηγοριών των ιστονών είναι το ποσοστό αλλά και οι θέσεις φωσφορυλίωσής τους κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Γενικά για τη φωσφορυλίωση της συνδετικής ιστόνης είναι γνωστό ότι *in vitro* φωσφορυλώνονται συγκεκριμένα υπολείμματα σερίνης και θρεονίνης που βρίσκονται στο αμινοτελικό και στο καρβοξυτελικό άκρο της H1. Δεν παρατηρήθηκε φωσφορυλίωση στην κεντρική σφαιρική περιοχή της H1. Δύο κινάσες είναι κυρίως υπεύθυνες για τη φωσφορυλίωση της H1: η c-AMP-εξαρτώμενη και η εξαρτώμενη από την ανάπτυξη κινάση (growth-dependent kinase). Η φωσφορυλίωση της H1 είναι αυξημένη σε ταχέως διαιρούμενα κύτταρα και μειώνεται σε κύτταρα που δεν πολλαπλασιάζονται. Κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, η φωσφορυλίωση αρχί

ΠΙΝΑΚΑΣ 1					
Χαρακτηριστικά	H1a	H1b	H1c	H1d	H1e
Συντίθεται σε διαιρούμενα κύτταρα	+	+	+	+	+
Συντίθεται σε μη διαιρούμενα κύτταρα	;	;	+	+	+
Βρίσκεται σε μη διαιρούμενα μη λεμφοειδή κύτταρα			+	+	+
Βρίσκεται σε μη διαιρούμενα λεμφοειδή κύτταρα	+	+	+	+	+
Δεν απαιτείται για τη διαίρεση των κυττάρων		+		+	

Πίνακας 1: Γενικά χαρακτηριστικά των συνδετικών ιστονών των σωματικών κυττάρων ποντικού (van Holde, 1988).



ζει στο τέλος της G1 φάσης και αυξάνει κατά την S και G2 φάση. Στο τέλος της G2 φάσης και κατά τη διάρκεια της μίτωσης η φωσφορυλίωση γίνεται μέγιστη και στη συνέχεια ελαττώνεται απότομα (van Holde, 1988, Talasz, 1996). *In vitro*, έχει βρεθεί ότι τα υπερφωσφορυλιωμένα μόρια της H1 στη μίτωση περιέχουν από 3 έως 6 φωσφορικά ανάλογα με την υποκατηγορία στην οποία ανήκουν (Langan, 1982). *In vivo*, όπως έχει δείχθει για τα NIH3T3 ινοβλαστικά κύτταρα ποντικού, οι υποκατηγορίες της συνδετικής ιστόνης των σωματικών κυττάρων χωρίζονται σε δύο ομάδες, την ομάδα χαμηλών και την ομάδα υψηλών επιπέδων φωσφορυλίωσης (Talas et al., 1996). Υψηλά ποσοστά φωσφορυλίωσης παρουσιάζουν οι ιστόνες H1b, H1d και H1e, ενώ χαμηλότερα ποσοστά φωσφορυλίωσης έχουν οι ιστόνες H1a και H1c. Η διαφορά στην κατάσταση φωσφορυλίωσης των υποκατηγοριών της H1 του ίδιου κυττάρου ενισχύει την υπόθεση ότι οι υποκατηγορίες της συνδετικής ιστόνης έχουν διαφορετική λειτουργία μέσα στο κύτταρο, η οποία επηρεάζεται από το επίπεδο φωσφορυλίωσής τους.

Πειράματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) έδειξαν ότι η πρωτοταγής δομή της συνδετικής ιστόνης αποτελείται από τρεις ξεχωριστές δομικές περιοχές (Hartman et al., 1977). Οι περιοχές αυτές είναι η αμινοτελική περιοχή που περιλαμβάνει 35-40 περίπου αμινοξέα, η κεντρική περιοχή, η οποία αποτελείται από 80 περίπου αμινοξέα, και η καρβοξυτελική περιοχή. Η κεντρική περιοχή του μορίου της συνδετικής ιστόνης αναδιπλώνεται και αποκτά σφαιρική διαμόρφωση ενώ οι περιοχές των δύο άκρων έχουν διαμόρφωση τυχαίου σπειράματος σε συνθήκες φυσιολογικές (Hartman et al., 1977). Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη με κρυσταλλογραφική μέθοδο καθορίστηκε η τριτοταγής δομή της κεντρικής περιοχής της συνδετικής ιστόνης των πτηνών (ιστόνης H5). Διαπιστώθηκε ότι η σφαιρική περιοχή αποτελείται από τρεις α-έλικες (Κεφ.1.6.2.) ενώ στο καρβοξυτελικό άκρο της H5 σχηματίζεται μία β-στροφή (Ramakrishnan et al., 1993). Ομοια δομή φαίνεται να έχει και η κεντρική περιοχή της συνδετικής ιστόνης H1 ερυθροκυττάρων κοτόπουλου όπως καθορίστηκε με φασματοσκοπία NMR δύο διαστάσεων (Cerf et al., 1994).

Θέση σύνδεσης

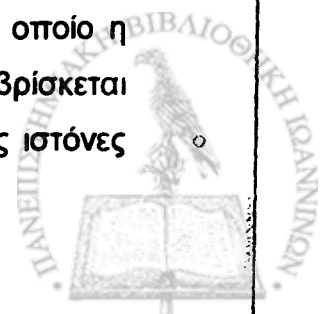
Ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τα πειράματά μας παρουσιάζει ο τρόπος με τον οποίο η πέμπτη ιστόνη του νουκλεοσώματος, η πλούσια σε υπολείμματα λυσινών ιστόνη H1 συνδέεται στο νουκλεόσωμα. Η πρωτεΐνη συνδέεται στο συνδετικό DNA του νουκλεοσώματος και το σωματίδιο που αποτελείται από το οκταμερές των ιστονών, από ένα μόριο συνδετικής ιστόνης H1 και από 160 bp DNA περίπου ονομάζεται

χρωματόσωμα (van Holde, 1988). Έχει βρεθεί ότι η σφαιρική περιοχή της ιστόνης H1, η οποία είναι ανθεκτική σε τρυψινόλυση, προστατεύει το νουκλεόσωμα κατά την επώασή του με το ένζυμο μικροκοκκική νουκλεάση εξίσου καλά με ολόκληρη την ιστόνη H1. Το γεγονός αυτό αποτέλεσε την πρώτη ένδειξη ότι η σύνδεση της ιστόνης H1 στο νουκλεόσωμα γίνεται μέσω της σφαιρικής περιοχής της (Allan et al., 1980).

Κρυσταλλογραφική μελέτη της σφαιρικής περιοχής της συνδετικής ιστόνης H5, η οποία βρίσκεται στα ερυθροκύτταρα των πτηνών, έδειξε ότι αποτελείται από ένα σύνολο τριών ελίκων (έλικες I-III) με μία «β-φουρκέτα». Από την ίδια μελέτη διαπιστώθηκε ότι στη σφαιρική περιοχή της ιστόνης H5 υπάρχουν δύο πολύ φορτισμένες και εκτεθειμένες περιοχές οι οποίες περιλαμβάνουν τις θέσεις σύνδεσης στο DNA (Ramakrishnan et al., 1993).

Το πρώτο πρότυπο που προτάθηκε για τη θέση της συνδετικής ιστόνης στο νουκλεόσωμα υποστήριζε ότι η σφαιρική περιοχή της (globular domain) βρίσκεται στον δυαδικό άξονα συμμετρίας του νουκλεοσώματος (dyad axis) και έρχεται σε επαφή συμμετρικά με το DNA στα σημεία εισόδου και εξόδου του από το νουκλεόσωμα προστατεύοντας 10 bp DNA σε κάθε πλευρά. Το πρότυπο αυτό είναι σύμφωνο με την παρατήρηση των Ramakrishnan et al. για την ύπαρξη δύο θέσεων σύνδεσης με το DNA στη σφαιρική περιοχή (Ramakrishnan et al., 1993).

Ωστόσο, πειράματα που έγιναν χρησιμοποιώντας ένα χρωματόσωμα φτιαγμένο με ένα τμήμα DNA του γονιδίου του 5S ριβοσωμικού RNA του *Xenopus*, είναι αντίθετα στη συμμετρική διευθέτηση της σφαιρικής περιοχής της συνδετικής ιστόνης στο νουκλεόσωμα. Αρχικά, παρατηρήθηκε ότι το DNA του χρωματοσώματος είναι μεγαλύτερο από το DNA του πυρήνα του νουκλεοσώματος κατά 20 bp, μετά από επεξεργασία με μικροκοκκική νουκλεάση. Αυτή όμως η αύξηση αντιστοιχεί σε προεκτάσεις 5 και 15 bp σε κάθε πλευρά του σωματιδίου και όχι σε μια συμμετρική προέκταση 2x 10 bp (Hayes and Wollfe, 1993). Η ίδια ερευνητική ομάδα υποστήριξε ότι η συνδετική ιστόνη δεν εντοπίζεται στον άξονα συμμετρίας του νουκλεοσώματος (δυαδικό άξονα). Χρησιμοποιώντας τεχνικές διασύνδεσης DNA-ιστονών και ιχνηθετημένο με φώσφορο DNA διαπιστώθηκε ότι η H1 βρίσκεται 60-68 bp μακριά από το δυαδικό άξονα του νουκλεοσώματος και είναι σε επαφή με τη μεγάλη αύλακα (major groove) του DNA (Pruss et al., 1996). Σε συνεργασία με την ερευνητική ομάδα του Δρ. Μουδριανάκη προτάθηκε για το χρωματόσωμα ένα πρότυπο στο οποίο η συνδετική ιστόνη έχει ένα μόνο σημείο επαφής με το DNA και βρίσκεται τοποθετημένη στο εσωτερικό της στροφής που το DNA κάνει γύρω από τις ιστόνες

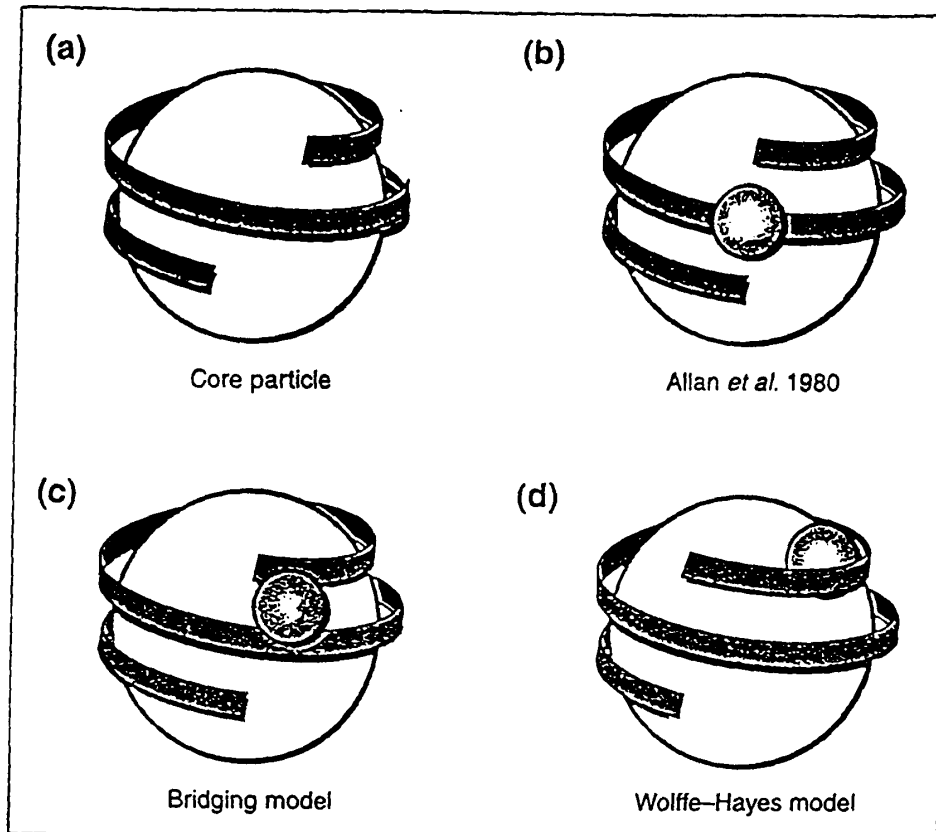


του πυρήνα. Το πρότυπο αυτό τοποθετεί την υπερέλικα της σφαιρικής περιοχής στη μία πλευρά του χρωματοσώματος και κατευθύνει το καρβοξυτελικό άκρο προς την έξοδο της έλικας του DNA επιτρέποντας του να αλληλεπιδρά και να οργανώνει τη διαμόρφωση του συνδετικού DNA. Στο ίδιο πρότυπο κατέληξε ο Hayes το 1996, χρησιμοποιώντας το γονίδιο 5S RNA του *Xenopus* και τη συνδετική ιστόνη H1⁰. Μια γλυκίνη κοντά στη σφαιρική περιοχή της πρωτεΐνης αντικαταστάθηκε από μια κυστεΐνη στην οποία ήταν συνδεδεμένο το σύμπλοκο Fe(II)-EDTA. Εισαγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου και αναγωγή του από το παραπάνω σύμπλοκο δημιούργησε ρίζες υδροξυλίου που προκαλούν διάσπαση της έλικας του γειτονικού DNA. Με τον τρόπο αυτό βρέθηκαν θραύσματα του DNA 67 bp, από το δυαδικό άξονα όπως ακριβώς περιγράφεται και στο παραπάνω πρότυπο (Hayes, 1996).

Πρόσφατες μελέτες στη δομή του χρωματοσώματος επαναφέρουν την άποψη των δύο θέσεων σύνδεσης της σφαιρικής περιοχής στο νουκλεοσωμικό DNA αν και το πρότυπο αυτό έρχεται επίσης σε αντίθεση με τη συμμετρική τοποθέτηση της συνδετικής ιστόνης στο νουκλεόσωμα (Zhou et al., 1998). Σύμφωνα με το πρότυπο των Zhou et al., η έλικα III της σφαιρικής περιοχής της συνδετικής ιστόνης H5 συνδέεται στη μεγάλη αύλακα της πρώτης στροφής του χρωματοσωμικού DNA ενώ υπάρχει μια δευτερεύουσα περιοχή σύνδεσης η οποία έρχεται σε επαφή με το νουκλεοσωμικό DNA περίπου στο μέσο του. Οι έλικες I και II της σφαιρικής περιοχής της ιστόνης H5 πιθανώς έρχονται σε επαφή με το διαλύτη και το νουκλεόσωμα αντίστοιχα. Στο πρότυπο αυτό η συνδετική ιστόνη φαίνεται να σχηματίζει μια "γέφυρα" μεταξύ ενός άκρου του DNA και του μέσου του.

Οι διαφορές του πρότυπου Wolffe-Hayes και των υπολοίπων μοντέλων πιθανώς να οφείλονται στο ότι τα χρωματοσώματα που σχηματίζονται στο *Xenopus* 5S rDNA έχουν διαφορετική οργάνωση από αυτά που σχηματίζονται με τις περισσότερες από τις άλλες DNA αλληλουχίες. Πάντως το τελευταίο πρότυπο των Zhou et al., που αναφέρθηκε, φαίνεται το επικρατέστερο αφού έρχεται σε συμφωνία με τις πειραματικές παρατηρήσεις πολλών ερευνητικών ομάδων. Το πρότυπο αυτό δικαιολογεί δύο θέσεις συνδέσης στη σφαιρική περιοχή (Ramakrishnan et al., 1993) και τοποθέτηση της συνδετικής ιστόνης εκτός του δυαδικού άξονα του χρωματοσώματος (Pruss et al., 1996). Η σχηματική απεικόνιση των προτεινόμενων προτύπων φαίνεται στο σχήμα 6.





Σχήμα 6: Πρότυπα για την τοποθέτηση της σφαιρικής περιοχής της συνδετικής ιστόνης στο νουκλεόσωμα (Travers, 1999) (a) Το νουκλεόσωμα (b) Το πρότυπο των Allan *et al.* (c) Το πρότυπο «γέφυρας» (d) Το πρότυπο των Wolffe-Hayes.

1.6.3 Οργάνωση της ανώτερης δομής της χρωματίνης

Η γραμμική παράταξη των νουκλεοσωμάτων η οποία κάτω από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο θυμίζει "κομποσχοίνι" ("beads on a string"), είναι το πρώτο επίπεδο οργάνωσης του ευκαρυωτικού DNA μέσα στο κύτταρο. Στη συνέχεια τα νουκλεοσώματα τοποθετούνται το ένα πάνω στο άλλο φθάνοντας δομές οι οποίες στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μοιάζουν με ένα με διάμετρο μεγέθους 30 nm (Alberts, 1994). Οι μηχανισμοί της αναδίπλωσης των νουκλεοσωμάτων έχουν απασχολήσει ευρέως τις ερευνητικές ομάδες με συνέπεια να προταθούν διάφορα μοντέλα για τη δομή της ίνας των 30 nm (van Holde, 1988). Σήμερα το επικρατέστερο πρότυπο είναι αυτό της "σωληνοειδούς" δομής της χρωματίνης το οποίο προκύπτει από το ελικοειδές τύλιγμα του "σχοινιού" ("string") των νουκλεοσωμάτων. Συνέπεια του προτύπου αυτού είναι το γεγονός ότι το DNA μεταξύ γειτονικών νουκλεοσωμάτων πρέπει με κάποιο τρόπο να καμφθεί ή να περιστραφεί ώστε τα γειτονικά νουκλεοσώματα να έρθουν σε επαφή μεταξύ τους. Στη διαδικασία αυτή σημαντικό ρόλο έχει η συνδετική ιστόνη του νουκλεοσώματος, η οποία είναι απαραίτητη για τη σωστή συμπίκνωση της ίνας της χρωματίνης (van Holde and Zlatanova, 1996). Από τους ίδιους συγγραφείς αναφέρεται ότι ο τρόπος δράσης της συνδετικής ιστόνης είναι η εξουδετέρωση των φορτίων του DNA με το οποίο έρχεται σε επαφή κατά τη συμπίκνωση της χρωματίνης. Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγουν και οι Clark και Kimura οι οποίοι υποστηρίζουν ότι απομάκρυνση μορίων ιστόνης H1 από τη χρωματίνη οδηγεί σε αλλαγή της δομής της ίνας της χρωματίνης στο συγκεκριμένο σημείο (Clark and Kimura, 1990).

Μέχρι σήμερα δεν είναι ξεκαθαρισμένο αν η συνδετική ιστόνη βρίσκεται στο εσωτερικό ή στο εξωτερικό της δομής του "σωληνοειδούς". Το 1984 οι Losa et al. επώασαν με χυμοτρυψίνη χρωματίνη η οποία είχε διαφορετικές διαμορφώσεις και από τα θραύσματα που προέκυψαν συμπέραναν ότι η σφαιρική περιοχή είναι τοποθετημένη στο εσωτερικό της ίνας των 30 nm (Losa et al., 1984). Ωστόσο το αποτέλεσμα αυτό αμφισβητείται από τους Leuba et al., οι οποίοι υποστηρίζουν ότι η τριψυνόλυση της H1 δεν επηρεάζεται από τη διαμόρφωση της χρωματίνης (Leuba et al. 1993). Τέλος με την τεχνική περίθλασης νετρονίων οι Graziano et al., ενισχύουν την άποψη για τοποθέτηση της ιστόνης H1 στο εσωτερικό την ίνας της χρωματίνης (Graziano et al., 1994).



Ένα άλλο ερώτημα που απασχολεί ακόμη τους ερευνητές είναι ο τρόπος με τον οποίο η συνδετική ιστόνη H1 επάγει την αναδίπλωση της χρωματίνης. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η ικανότητά της αυτή εξαρτάται άμεσα από τη σωστή τοποθέτηση της H1 και ότι το καρβόξυ τελικό τμήμα της συνδετικής ιστόνης είναι κυρίως υπεύθυνο για την ανώτερη οργάνωση της δομής της χρωματίνης (Allan et al., 1986). Το τμήμα αυτό της πρωτεΐνης περιέχει πολλά βασικά και υδρόφιλα αμινοξέα τα οποία το καθιστούν κατάλληλο για ιοντικές αλληλεπιδράσεις με το DNA (Allan et al., 1980).

1.7 Βιολογικός ρόλος της συνδετικής ιστόνης

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η συνδετική ιστόνη παίζει πρωταρχικό ρόλο στη δομή της χρωματίνης τόσο στο επίπεδο του νουκλεοσώματος, όσο και στο σχηματισμό της ανώτερης δομής. Η H1 συνδέεται μέσω της κεντρικής, σφαιρικής περιοχής της στο νουκλεοσωμικό DNA (Κεφ.1.6), ενώ το καρβοξυτελικό άκρο της είναι υπεύθυνο για την αλληλεπίδραση των γειτονικών νουκλεοσωμάτων που οδηγεί στο σχηματισμό της ίνας των 30 nm (Allan et al., 1986). Πρόσφατα πειράματα knock-out του γονιδίου της ιστόνης H1 στους πυρήνες του *Tetrahymena thermophila* έδειξαν ότι πυρήνες χωρίς το γονίδιο της H1 έχουν μεγαλύτερο μέγεθος από τους φυσιολογικούς ενώ η δομή των μιτωτικών νουκλεοσωμάτων είναι λιγότερο συμπυκνωμένη (Shen et al., 1995). Έχει αναφερθεί επίσης, ότι ο πυρηνικός παράγοντας των ηπατοκυττάρων HNF3, με τον οποίο η συνδετική ιστόνη έχει παρόμοια τριτοταγή δομή (Clark et al., 1993) συνεισφέρει όπως η H1 στη σωστή τοποθέτηση (positioning) των νουκλεοσωμάτων στο DNA (Meersseman et al., 1991).

Σημαντικό ρόλο παίζει επίσης η συνδετική ιστόνη σε διαδικασίες του κυττάρου εξαρτώμενες από το DNA όπως η μεταγραφή και η αντιγραφή. Το 1984 ο Weintraub μετά από ηλεκτροφορητική ανάλυση τμημάτων χρωματίνης που διατηρούσαν την ανώτερη δομή τους, έδειξε ότι η συνδετική ιστόνη είναι παρούσα στη δομή της χρωματίνης τόσο των ενεργών όσο και των ανενεργών γονιδίων. Ωστόσο, ο τρόπος αλληλεπίδρασης της H1 με το κάθε είδος χρωματίνης διαφέρει. Μετά από επώαση της χρωματίνης με νουκλεάση η οποία τη διασπά στις περιοχές του DNA ανάμεσα στα νουκλεοσώματα, τα πολυνουκλεοσώματα των ανενεργών περιοχών εξακολουθούν να συγκρατούνται μαζί λόγω της παρουσίας της συνδετικής ιστόνης. Αντίθετα, η H1 δεν συγκρατεί ενωμένα νουκλεοσώματα ενεργών γονιδίων μετά τη



διάσπαση του συνδετικού DNA από τη νουκλεάση (Weintraub, 1984). Το 1990 οι Kamakaka και Thomas μετά από διασύνδεση των ιστονών με το DNA με ακτινοβολία UV και ανοσοαπομόνωση των σχηματισμένων συμπλεγμάτων με αντίσωμα κατά της συνδετικής ιστόνης έδειξαν ότι όλες οι αλληλουχίες DNA που μελετήθηκαν, ενεργές και μη, ήταν συνδεδεμένες με κάποιο ποσοστό συνδετικής ιστόνης. Παρ' όλα αυτά η χρωματίνη των ενεργών γονιδίων της β-σφαιρίνης, της ιστόνης H5 και της β-ακτίνης βρέθηκε ότι περιέχει ένα μικρό μόνο ποσοστό της H1 (Kamakaka and Thomas, 1990). Αμεσες ενδείξεις για το ρόλο της H1 στη ρύθμιση της μεταγραφής προκύπτουν και από τις μελέτες της ερευνητικής ομάδας του Dr. Kadonaga (Laybourn and Kadonaga, 1991). Χρησιμοποιώντας συστήματα *in vitro* μεταγραφής έδειξαν ότι η ενσωμάτωση της H1 στο νουκλεόσωμα οδηγεί σε μια επιπλέον αναστολή της μεταγραφής. Η αναστολή αυτή μπορούσε να αναιρεθεί από τους μεταγραφικούς παράγοντες Sp-1 και GAL-VP16 όταν η ποσότητα της H1 ήταν η φυσιολογική (1 μόριο / νουκλεόσωμα). Αύξηση της H1 σε 1,5 μόρια / νουκλεόσωμα οδηγεί σε πλήρη αναστολή της μεταγραφής, η οποία δεν μπορεί να ανασταλεί από μεταγραφικούς παράγοντες. *In vitro* μεταγραφή χρησιμοποιήθηκε και από την ομάδα του Dr. Worcel (Shimamura et al., 1989) ο οποίος έδειξε ότι η μεταγραφή *in vitro* σχηματισμένων μινιχρωμοσωμάτων επάγεται με την απομάκρυνση της συνδετικής ιστόνης.

Ο ανασταλτικός ρόλος της H1 στη μεταγραφή νουκλεοσωμάτων "τοποθετημένων" (positioned) σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA, διερευνήθηκε επίσης χρησιμοποιώντας το γονίδιο των μακρών τελικών επαναλήψεων του ογκογόνου ιού του μαστικού αδένου του ποντικού (Mouse mammary tumor virus long terminal repeat, MMTV LTR). Το MMTV LTR είναι οργανωμένο σε μια σειρά συγκεκριμένα "τοποθετημένων" νουκλεοσωμάτων, η μεταγραφή των οποίων ρυθμίζεται από τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Σύνδεση του υποδοχέα στο νουκλεοσωμικό DNA έχει σαν συνέπεια την επιλεκτική απομάκρυνση της ιστόνης H1 και την ενεργοποίηση της μεταγραφής. Η απομάκρυνση αυτή προκαλεί επαναδιευθέτηση των οκταμερών των νουκλεοσωμάτων σε σχέση με το DNA διευκολύνοντας έτσι την πρόσβαση των μεταγραφικών παραγόντων στις ρυθμιστικές αλληλουχίες (Bresnick et al., 1991).

Σημαντικά στοιχεία για το ρόλο της H1 στη μεταγραφή προέκυψαν από τις μεταγραφικές μελέτες των 5S RNA γονιδίων του *Xenopus*. Το 1984 οι Schlissel και Brown διαπίστωσαν ότι σε ένα σύστημα *in vitro* μεταγραφής το σωματικό 5S RNA γονίδιο, το οποίο είναι ενεργό και *in vivo*, ήταν οργανωμένο στη χρωματίνη μαζί με

ενεργά και σταθερά συμπλέγματα μεταγραφής. Αντίθετα το ανενεργό ωκυτταρικό 5S RNA γονίδιο δεν ήταν συνδεδεμένο με μεταγραφικούς παράγοντες λόγω της ιδιαιτερότητας της δομής του η οποία οφειλόταν στην H1 (Schlissel and Brown, 1984). Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγει και η ομάδα του Dr. Wolffe (Wolffe, 1989), η οποία επιπλέον διαπίστωσε ότι η προσθήκη της συνδετικής ιστόνης σε μεταγραφικά ενεργά χρωματίνη, προκαλεί ειδικά την μεταγραφική αναστολή των ωκυτταρικών 5S RNA γονιδίων. Αντίθετα, τα σωματικά 5S RNA γονίδια παραμένουν ενεργά και μετά την προσθήκη της H1. Η ίδια ερευνητική ομάδα έδειξε τη δράση της H1 στην μεταγραφή *in vivo*. Υπερέκφραση του γονιδίου της συνδετικής ιστόνης σε έμβρυα *Xenopus* είχε σαν αποτέλεσμα την επιλεκτική αναστολή των 5S RNA γονιδίων των ωκυττάρων ενώ το ίδιο γονίδιο των σωματικών κυττάρων δεν επηρεάστηκε (Bouvet et al., 1994). Ο ρόλος της H1 στη ρύθμιση των γονιδίων διαπιστώθηκε και στο επίπεδο του μονονουκλεοσώματος. Η H1 συνδέεται στο 5' άκρο του πυρήνα του νουκλεοσώματος στο σωματικό 5S RNA γονίδιο αφήνοντας ελεύθερα ρυθμιστικά στοιχεία του επαγωγέα του γονιδίου. Αντίθετα, στο ωκυτταρικό 5S RNA γονίδιο η H1 συνδέεται στο 5' άκρο του πυρήνα του νουκλεοσώματος με τρόπο ώστε να εμποδίζει την πρόσβαση σε βασικά ρυθμιστικά στοιχεία του επαγωγέα του γονιδίου (Sera and Wolffe, 1998). Η H1 συνεισφέρει στην οργάνωση μιας εξειδικευμένης κατασταλτικής νουκλεοσωμικής δομής στο 5S RNA γονίδιο των ωκυττάρων, δείχνοντας με ποιο τρόπο ένα από τα γενικά συστατικά της χρωματίνης μπορεί να ρυθμίσει την έκφραση ενός συγκεκριμένου γονιδίου όπως είχε δείχθει και στα προηγούμενα *in vivo* πειράματα (Bouvet et al., 1994).

Η δράση της H1 ως ρυθμιστή της μεταγραφής συγκεκριμένων γονιδίων υποστηρίζεται και από πρόσφατες μελέτες στο *Tetrahymena thermophila* (Shen and Goronsky, 1996). Τα δεδομένα προήλθαν από την ανάλυση δύο γονιδίων, του *CyP* και του *ngoA*, τα οποία είναι μεταγραφικά ανενεργά σε αναπτυσσόμενα κύτταρα αλλά επάγονται κατά τη στέρηση των κυττάρων σε ορό. Είναι αξιοσημείωτο ότι η H1 ρυθμίζει τα δύο γονίδια με αντίθετο τρόπο. Είναι απαραίτητη για την αναστολή του *ngoA* γονιδίου στα αναπτυσσόμενα κύτταρα και δεν απαιτείται για την ενεργοποίηση του γονιδίου στα κύτταρα που έχουν υποστεί στέρηση ορού. Αντίθετα, δεν χρειάζεται για την αναστολή της μεταγραφής του *CyP* στα αναπτυσσόμενα κύτταρα αλλά είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του στα μη αναπτυσσόμενα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι στη συγκεκριμένη εργασία η H1 παρουσιάζεται να συνεισφέρει όχι μόνο στην καταστολή αλλά και στην ενεργοποίηση γονιδίων.



Ρόλος της H1 στην αντιγραφή

Σε αντίθεση με την πολύ καλά μελετημένη επίδραση της H1 στην μεταγραφική δραστηριότητα, λίγες πληροφορίες υπάρχουν για τη δράση της στην αντιγραφή της χρωματίνης. Τα μέχρι τώρα συστήματα αντιγραφής του DNA χρησιμοποιούσαν εκμαγεία τα οποία δεν περιείχαν H1. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες με το *in vitro* σύστημα αντιγραφής του SV-40 ιού έδειξαν ότι ενώ η αντιγραφή των SV-40 μινιχρωμοσωμάτων δεν επηρεάζεται από φυσιολογικές ποσότητες H1 (1 μόριο / νουκλεόσωμα), είναι μειωμένη σε μεγαλύτερες αναλογίες H1 / νουκλεοσώματος (H1/νουκλεόσωμα: 2/3) (Halmer and Gruss, 1995). Σε συμφωνία με τα παραπάνω αποτελέσματα είναι και τα πειραματικά δεδομένα των Lu et al., οι οποίοι μελέτησαν την επίδραση της σωματικής H1 στην αντιγραφή του DNA χρησιμοποιώντας εκχύλισμα αυγών *Xenopus*. Διαπιστώθηκε, ότι η παρουσία των ισομορφών H1c και H1⁰ στη χρωματίνη οδηγούσε σε μείωση τόσο του ρυθμού, όσο και της έκτασης της αντιγραφής (Lu et al., 1997). Προτάθηκε δε ότι η δράση της συνδετικής ιστόνης ήταν να εμποδίζει τη συγκρότηση των συμπλεγμάτων που προηγούνται της αντιγραφής (pre-replication complexes, pre-RCs) στη σπερματική χρωματίνη που χρησιμοποιείται στο σύστημα. Το σύστημα μπορούσε να ανακτήσει την ικανότητα αντιγραφής του όταν η H1 απομακρυνόταν από τη χρωματίνη (Lu et al., 1998).

Παρ' όλη τη διεξοδική μελέτη της ρυθμιστικής δράσης της H1 στη ρύθμιση DNA-εξαρτώμενων διαδικασιών και κυρίως στη μεταγραφή των γονιδίων, ο μηχανισμός δράσης της παραμένει ακόμη αδιευκρίνιστος. Δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί αν η συνδετική ιστόνη είναι απύσχα, ελλειπής, ή απλώς διαφορετικά συνδεδεμένη με τις μεταγραφικά ενεργές περιοχές της χρωματίνης. Επίσης, άγνωστοι παραμένουν οι παράγοντες οι οποίοι μεσολαβούν στις παραπάνω διαδικασίες τροποποίησης της αλληλεπίδρασης της H1 με τη χρωματίνη.

Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της διατριβής έδειξαν ότι η προθυμοσίνη α συνδέεται ειδικά με την συνδετική ιστόνη του νουκλεοσώματος. Η αλληλεπίδραση αυτή των δύο πρωτεϊνών αποκτά ιδιαίτερη σημασία επειδή η ιστόνη H1 βρίσκεται στο περιβάλλον της χρωματίνης. Συνεπώς, είναι πιθανό ο ρόλος της συνδετικής ιστόνης στο κύτταρο να συνδέεται άμεσα με την αποσαφήνιση της δράσης της προθυμοσίνης α.

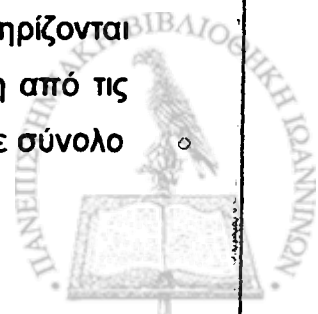


1.8 Ομοιότητα της προθυμοσίνης α με άλλες πυρηνικές πρωτεΐνες οι οποίες σχετίζονται με τη δομή της χρωματίνης

Παρ'όλο ότι ο ρόλος της προθυμοσίνης α στο κύτταρο δεν είναι ακόμη γνωστός η όξινη περιοχή της πρωτεΐνης παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με αντίστοιχες περιοχές πυρηνικών πρωτεϊνών, ο ρόλος των οποίων συνδέεται με τη χρωματίνη. Το δεδομένο αυτό ενίσχυσε την άποψη για ένα ρόλο της προθυμοσίνης α σχετικό με τη χρωματίνη, μέσω της αλληλεπίδρασής της με την ιστόνη H1. Μερικές από τις πρωτεΐνες αυτές είναι η νουκλεοπλασμίνη, οι πρωτεΐνες N1/N2 και η HMG-1 πρωτεΐνη. Στα σχήματα 7 και 8 φαίνεται η ομολογία της προθυμοσίνης α με τη νουκλεοπλασμίνη και την HMG 1 πρωτεΐνη.

Η νουκλεοπλασμίνη είναι μια όξινη πρωτεΐνη, με φαινόμενο μοριακό βάρος 29 kDa, η οποία βρίσκεται συσσωρευμένη στον πυρήνα των ωκυττάρων του *Xenopus* (Earnshaw et al., 1980). Ανάλυση της πρωτοταγούς δομής της πρωτεΐνης έδειξε ότι έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε φορτισμένα υπολείμματα αμινοξέων (36%), τα περισσότερα από τα οποία όπως φαίνεται από το ισοηλεκτρικό της σημείο είναι όξινα ($pI=5$). Τα όξινα αυτά αμινοξέα, όπως και στην περίπτωση της προθυμοσίνης α, είναι συγκεντρωμένα στην κεντρική περιοχής της πρωτεΐνης. Στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης, όπως και στην προθυμοσίνη α, έχει ταυτοποιηθεί αλληλουχία οδηγός της στον πυρήνα. Όσο αφορά το ρόλο της πρωτεΐνης έχει βρεθεί ότι είναι απαραίτητη για την *in vitro* συγκρότηση του DNA σε νουκλεοσώματα (Kleinschmidt et al., 1990). Η νουκλεοπλασμίνη βρίσκεται συνδεδεμένη με τις ιστόνες H2A και H2B και είναι υπεύθυνη για τη συμπλήρωση του σχηματισμού του πυρήνα του νουκλεοσώματος με την προσθήκη των ιστονών αυτών στο ήδη σχηματισμένο τετραμερές των ιστονών H3 και H4. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η νουκλεοπλασμίνη έχει την ικανότητα να απομακρύνει επιλεκτικά τις συνδετικές ιστόνες H1 και H1⁰ από τη χρωματίνη σωματικών πυρήνων του *Xenopus* (Dimitrov and Wollfe, 1996).

Υπεύθυνη για την τοποθέτηση του τετραμερούς των ιστονών H3 και H4 στο DNA κατά τον *in vitro* σχηματισμό νουκλεοσωμάτων είναι η πυρηνική πρωτεΐνη του *Xenopus* N1/N2 (Kleinschmidt et al., 1990). Οι πρωτεΐνη παρουσιάζει φαινόμενο μοριακό βάρος 105-110 kDa. Ανάλυση της πρωτοταγούς δομής της έδειξε ότι στο μόριο της υπάρχουν δύο αρνητικά φορτισμένες περιοχές οι οποίες χαρακτηρίζονται από τη συσσώρευση υπολειμμάτων γλουταμικών αμινοξέων. Η μεγαλύτερη από τις περιοχές αυτές περιλαμβάνει 18 γλουταμικά και 3 ασπαρτικά υπολείμματα σε σύνολο



	20	30	40	50	60	70
Προθυμοσίνη α:	EKKEVVEEAENGRDAPANGNAQNEENGECQADNEVDDEEEEGGEEEEGGDGEEEDGD					
Νουκλεοπλασμήνη:	SILPMATMVGIELTPPVTFRLKAGSGPLYISGQHVAAMEEDYSWAEEDEGEAEGEEEEEE 90 100 110 120 130 140					
	80	90	100	110		
Προθυμοσίνη α:	EDEEAAEAF T G - K R V A E D D E D D V E T K K Q K K T D E D D					
	I ::::: I :: I I ::::: I :: I I :: I I					
Νουκλεοπλασμήνη:	EEDQESPPKA VKRPAATKKAGQA KKKLLDKEDSESSEDSPTKKGKCAGRKPAAKK 150 160 170 180 190 200					

Σχήμα 7: Σύγκριση της αλληλουχίας των αμινοξέων της προθρομβίνης α επήμιος και της νοκυλεοπλασμίνης (EMBL, Databank). Τα ίδια αμινοξέα σημειώνονται με κάθετες γραμμές ενώ τα παρόμοια αμινοξέα σημειώνονται με στιγμές.


```

ProTa:          10      20      30
               SDAAVDTSSEITTKDLKEK--KEVVEEAENGRDAPANGN
               |  :: :||| | :::: ::| : ::| :
HMG 1:  GEHPGLSIGDVAKKLGEMWNNTAADDKQPYEKKAAKLKEKEYEKDIAAYRAKKGKPDAAKKG
        120      130      140      150      160      170

        40      50      60      70      80      90
ProTa:  AQNEENGEGEQEADNEVDNEEEEEEGGEGEGDGEEDGDEDEEAAPTGKRVAEDEDD
        : ::| :::: : ::| ::| ::| ::| ::| ::| ::| ::| ::| ::| ::|
HMG 1:  VVKAESKSKKKKEFEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDE
        180      190      200      210

```

Σχήμα 8: Σύγκριση της αλληλουχίας αμινοξέων της προθυμοσίνης α και της HMG-1 πρωτεΐνης επίμυος (EMBL, Databank). Τα ίδια αμινοξέα σημειώνονται με κάθετες γραμμές, ενώ τα παρόμοια αμινοξέα σημειώνονται με στιγμές.

12 αμινοξέων. Στο καρβοξυτελικό τμήμα της πρωτεΐνης υπάρχει σήμα πυρηνικής μετατόπισης της στον πυρήνα (Kleinschmidt et al., 1986).

Τέλος η πρωτεΐνη υψηλής κινητικότητας 1 (HMG-1) είναι μια πυρηνική πρωτεΐνη μοριακού βάρους 26 kDa που έχει ανιχνευθεί σε όλους τους οργανισμούς που εξετάστηκαν (van Holde, 1988). Το μόριο της παρουσιάζει μια τριμερή δομή που αποτελείται από δύο θετικά φορτισμένες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες οι οποίες ονομάζονται HMG box, και μια όξινη περιοχή που περιλαμβάνει συνεχή ασπαρτικά και γλουταμικά αμινοξέα και εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό τμήμα της πρωτεΐνης (Landsman et al., 1993). Ο ρόλος της πρωτεΐνης στο κύτταρο δεν είναι ακόμη γνωστός. Το 1984 οι Bonne-Andrea et al., υποστήριξαν ότι η HMG-1 επάγει το σχηματισμό των νουκλεοσωμάτων *in vitro* σε συνθήκες φυσιολογικής ιοντικής ισχύος (Bonne-Andrea et al., 1984). Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι η HMG-1 έχει ένα δομικό ρόλο στην οργάνωση του συνδετικού DNA στο νουκλεόσωμα (Nightingale et al., 1996).



1.9 Σκοπός της διατριβής

Η προθυμοσίνη α είναι μια μικρή, όξινη, πυρηνική πρωτεΐνη με αδιευκρίνιστο βιολογικό ρόλο. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της σύνδεσης της προθυμοσίνης α με την ιστόνη H1 έτσι ώστε να προκύψουν στοιχεία για το φυσιολογικό ρόλο της πρωτεΐνης.

Αναλυτικά, τα στάδια της μελέτης που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

1. Μελετήθηκε διεξοδικά η αλληλεπίδραση της προθυμοσίνης α με την ιστόνη H1 τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Η μελέτη επικεντρώθηκε στην πιστοποίηση της εξειδίκευσης της σύνδεσης των δύο πρωτεϊνών.
2. Εξετάστηκε αν η αλληλεπίδραση προθυμοσίνης α – ιστόνης H1 επηρεάζεται από τις μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις των δύο πρωτεϊνών. Για το σκοπό αυτό η προθυμοσίνη α φωσφορυλιώθηκε *in vitro* ενώ η ιστόνη H1 απομονώθηκε από μιτωτικά κύτταρα, τα οποία περιέχουν υπερφωσφορυλιωμένη H1.
3. Αναζητήθηκε ο πιθανός ρόλος της σύνδεσης προθυμοσίνης α – H1 στην αλληλεπίδραση της συνδετικής ιστόνης με τη χρωματίνη. Σχηματίστηκε χρωματίνη χρησιμοποιώντας το ελεύθερο κυττάρων σύστημα της *Drosophila* και στη χρωματίνη αυτή ενσωματώθηκε η H1 θύμου μόσχου με την οποία η προθυμοσίνη α είχε βρεθεί ότι συνδέεται ειδικά. Ακολούθησαν μελέτες για να διαπιστωθεί αν η προθυμοσίνη α παρεμβαίνει στη σύνδεση της H1 στη χρωματίνη ή αν αποσπά H1 η οποία βρίσκεται ήδη ενσωματωμένη στη χρωματίνη.



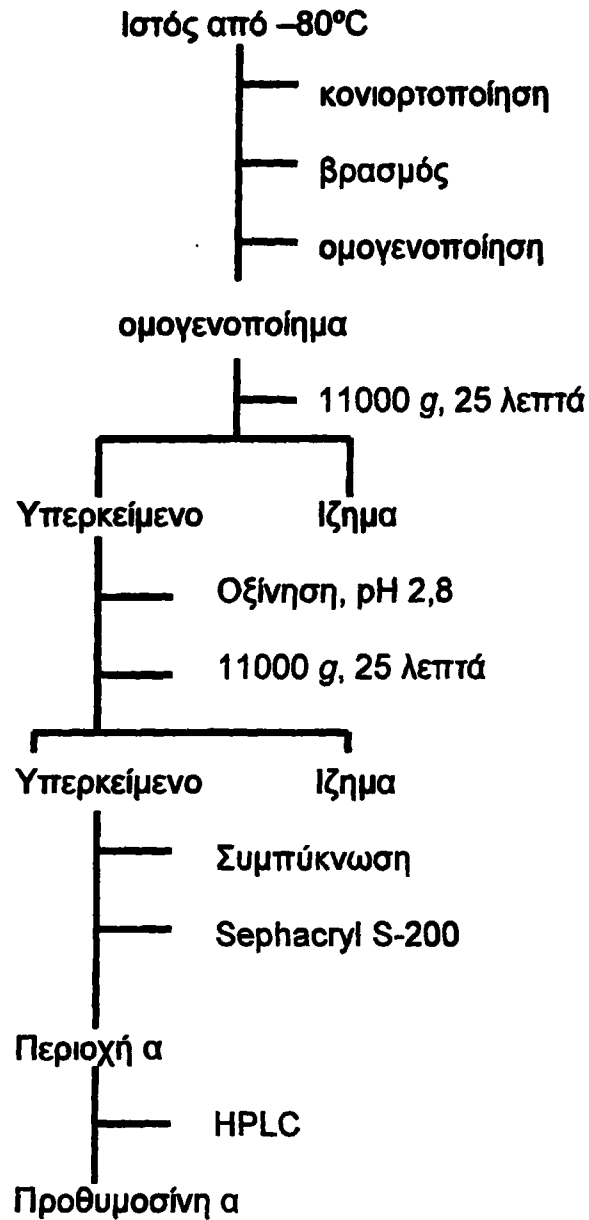
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Απομόνωση πρωτεϊνών

Η προθυμοσίνη α απομονώθηκε από θύμο μόσχου και χοίρου σύμφωνα με δύο διαφορετικές μεθοδολογίες: τη μεθοδολογία των Haritos et al. (1984a), όπως αυτή τροποποιήθηκε από τους Komiyama et al. (1986) και τη μεθοδολογία της Δρ. Θ. Παπαμαρκάκη η οποία βασίζεται σε ένα συνδυασμό των ήδη δημοσιευμένων μεθόδων των Haritos et al., (1984), Watts et al., (1989) και Komiyama et al. (1986). Σύμφωνα με την πρώτη μεθοδολογία ακολουθείται η παρακάτω πορεία (Σχήμα 9):

- Ο ιστός (20 g), από τη βαθειά κατάψυξη (-80°C) όπου βρίσκεται, μεταφέρεται αμέσως σε υγρό άζωτο και κονιορτοποιείται. Στη συνέχεια, προστίθεται γρήγορα σε εικοσαπλάσιο όγκο νερού θερμοκρασίας 100°C και ακολουθεί βρασμός του εναιωρήματος επί 7 λεπτά.
- Το ενακώρημα ψύχεται σε πάγο ($0-4^{\circ}\text{C}$) και ομογενοποιείται σε ομογενοποιητή Polytron (Kinematica AG) στο μέγιστο της ταχύτητας του επί 5 λεπτά ($0-4^{\circ}\text{C}$).
- Το ομογενοποίημα διηθείται σε υαλοβάμβακα και φυγοκεντρείται επί 25 λεπτά σε 11.000 rpm (φυγόκεντρος Sorvall RC 2B, κεφαλή GSA), σε θερμοκρασία $0-4^{\circ}\text{C}$. Στο υπερκείμενο προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος 1 M φορμικού οξέος, 0,2 M πυριδίνη, pH 2,8 και ακολουθεί φυγοκέντρωση όπως προηγούμενως.
- Το νέο όξινο υπερκείμενο συμπυκνώνεται με περιστροφικό συμπυκνωτή Rotavapor R, (Buchi, Flawil, Switzerland) μέχρι όγκου 30 ml και στη συνέχεια με φυγοκεντρικό συμπυκνωτή κενού Speed Vac μέχρι όγκου 1-2 ml.
- Το δείγμα χρωματογραφείται σε στήλη μοριακής διήθησης Sephacryl S-200 Superfine (Pharmacia Uppsala, Sweden). Το υλικό της στήλης αποτελείται από μόρια αλλυλ-δεξτράνης συνδεδεμένα με ομοιοπολικές γέφυρες N,N'-μεθυλεν-δισ-ακρυλαμιδίου. Πρέπει να σημειωθεί, ότι στο διαχωρισμό των πρωτεϊνών με το υλικό αυτό, εκτός από το μοριακό βάρος συμμετέχουν και φαινόμενα προσρόφησης στο υλικό της στήλης, κυρίως όταν το pH του διαλύματος έκλουσης είναι όξινο όπως στην περίπτωση μας. Για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών χρησιμοποιείται στήλη διαστάσεων 1,2 x 90 cm, ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης 1 M φορμικού οξέος-0,2 M πυριδίνης pH 2,8 (διάλυμα Α) και σταθερή ροή 9ml/ώρα. Τα κλάσματα (όγκου 0,9 ml) που περιέχουν προθυμοσίνη α (περιοχή α), προσδιορί-

Απομόνωση προθυμοσίνης α (μέθοδος Α)



Σχήμα 9 : Διαγραμματική απεικόνιση της διαδικασίας που ακολουθείται κατά την απομόνωση της προθυμοσίνης α σύμφωνα με τη μέθοδο των Komiyama et al., (1986).



ζονται με ανίχνευση των πρωτεϊνών με φλουορεσκαμίνη και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή 15% SDS-πολυακρυλαμιδίου. Τα κλάσματα αυτά, συλλέγονται, αναμιγνύονται και συμπυκνώνονται στο Speed Vac μέχρι όγκου 0,1 ml.

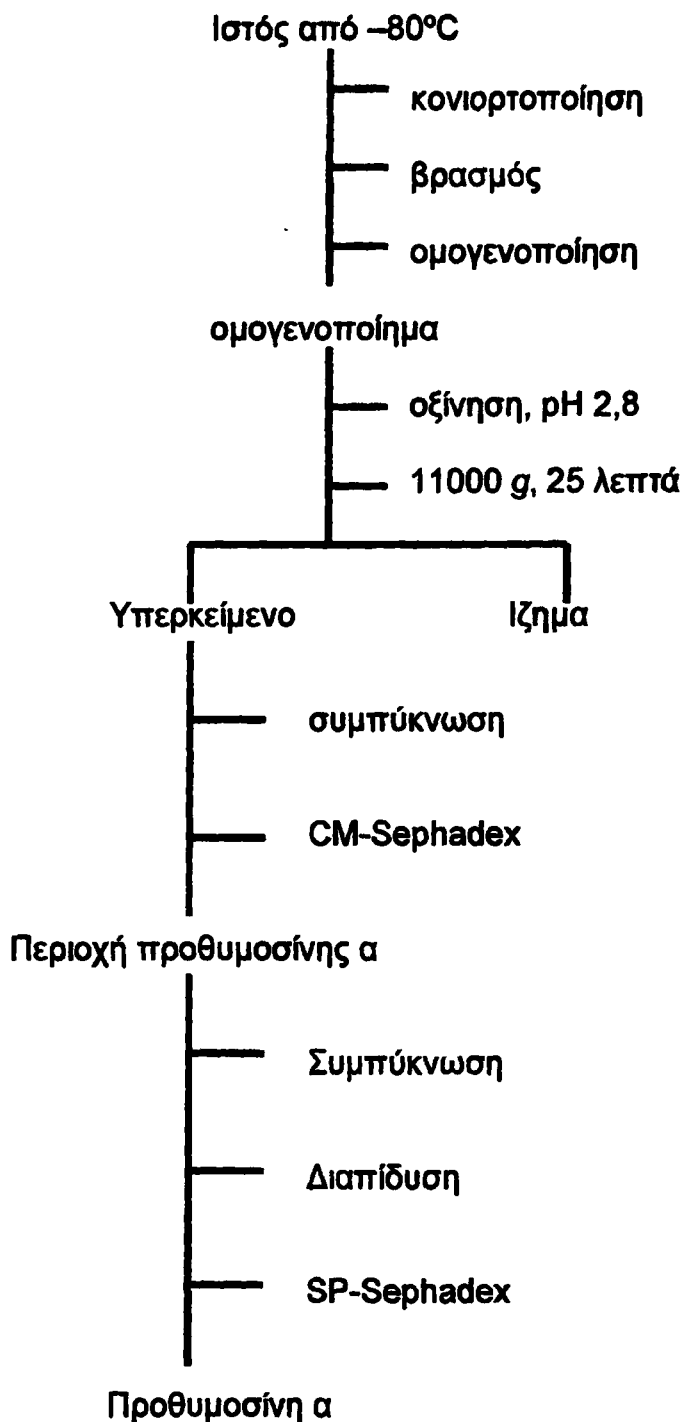
- Το παραπάνω δείγμα χρωματογραφείται σε HPLC, σε στήλη αντιστρόφου φάσης Ultrasphere ODS C18 (Beckman Instruments, Berkley, CA). Το υλικό της στήλης είναι υδρόφοβο και η έκλουση των πρωτεϊνών με πολικούς διαλύτες στηρίζεται στη σχετική υδροφοβικότητα των μορίων που χρωματογραφούνται. Το σύστημα HPLC (model 332, Beckman) που χρησιμοποιείται, περιλαμβάνει δύο αντλίες (model 110A), προγραμματιστή ροής (model 420), οργανωτή συστήματος (model 210A) και ανιχνευτή υπεριώδους (JASCO UV-975), συνδεδεμένο με καταγραφέα ολοκληρωτή της Hewlett-Packard (Avondale, PA). Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι H_2O -0,05% τριφθοροξικό οξύ (TFA) και ακετονιτρίλιο (CH_3CN)-0,05%TFA. Η έκλουση γίνεται με διαβάθμιση CH_3CN -TFA 10-20% σε H_2O -TFA επί 10 λεπτά, διαβάθμιση CH_3CN -TFA 20-38% σε H_2O -TFA επί 22 λεπτά και στη συνέχεια διαβάθμιση CH_3CN -TFA 38-40% σε H_2O -TFA επί 2 λεπτά. Χρησιμοποιείται ροή 1 ml/λεπτό και η προθυμοσίνη ανιχνεύεται με ραδιοαναστολογική μέθοδο. Η καθαρότητα της πρωτεΐνης ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση SDS-πολυακρυλαμιδίου (Κεφ. 2.2.3.1)

Σύμφωνα με τη μέθοδο της Δρ.Θ. Παπαμαρκάκη, μετά την παραλαβή του ιστού (60 g θύμου μοσχαριού), ακολουθούνται τα δύο πρώτα στάδια της μεθόδου των Komiyama et al. (κονιορτοποίηση και ομογενοποίηση). Στη συνέχεια ακολουθεί η παρακάτω διαδικασία (Σχήμα 10):

- Το ομογενοποίημα οξινίζεται με ίσο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος 1 M φορμικού οξέος-0,2 M πυριδίνης pH 2,8 .
- Το αιώρημα φυγοκεντρείται σε 11.000 rpm (φυγόκεντρος Sorvall RC 2B, κεφαλή GSA), επί 25 λεπτά στους 0-4°C.
- Το υπερκείμενο συμπυκνώνεται σε περιστροφικό συμπυκνωτή Rotavapor R, (Buchi, Flawil, Switzerland) μέχρι να σχηματιστεί ένα υλικό που μοιάζει με πηκτή. Το ίζημα διαλύεται με 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος 7,5 mM βορικού νατρίου (pH 8.8.) και τοποθετείται σε στήλη CM-Sephadex G-25 (2,2 x 39cm) η οποία έχει εξισορροπηθεί με το παραπάνω ρυθμιστικό διάλυμα. Το υλικό πλήρωσης της



Απομόνωση προθυμοσίνης α (μέθοδος Β)



Σχήμα 10: Διαγραμματική απεικόνιση της διαδικασίας απομόνωσης της προθυμοσίνης α σύμφωνα με τη μέθοδο της Δρ. Θ. Παπαμαρκάκη



στήλης αποτελείται από έναν ασθενή όξινο κατιονανταλλάκτη ο οποίος χρησιμοποιεί ως λειτουργικές ομάδες μεθυλοκαρβοξυλομάδες ($-\text{O}-\text{CH}_2\text{COO}-$). Για την έκλουση των πρωτεϊνών χρησιμοποιείται διάλυμα βορικού νατρίου 7,5 mM (pH 8,8) και σταθερή ροή 15 ml την ώρα. Συλλέγονται κλάσματα όγκου 4 ml. Ο έλεγχος των κλασμάτων που περιέχουν προθυμοσίνη α γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή 15% SDS-πολυακρυλαμιδίου παράλληλα με μάρτυρες μοριακών βαρών και δείγμα που περιέχει γνωστή ποσότητα καθαρής προθυμοσίνης α.

- Τα κλάσματα που περιέχουν κυρίως προθυμοσίνη α και όχι συνδετική ιστόνη H1 αναμιγνύονται και συμπυκνώνονται σε περιστροφικό συμπυκνωτή Rotavapor R, και στη συνέχεια σε Speed Vac (Savant) μέχρι ξηρού.
- Το ίζημα διαλύεται σε 3 ml διαλύματος 5 mM HCl, 0,02% NaN_3 . Ακολουθεί διαπίδυση του δείγματος στο ίδιο διάλυμα για 3 ώρες και ξήρανση μέχρι ξηρού σε περιστροφικό συμπυκνωτή Speed Vac.
- Το νέο ίζημα διαλύεται σε 1 ml διαλύματος 10 mM οξικού νατρίου pH 4,5 και τοποθετείται σε στήλη SP-Sephadex G-25 (1,0 x 43 cm) η οποία έχει εξισορροπηθεί με το παραπάνω διάλυμα. Το υλικό της στήλης είναι ισχυρός όξινος κατιονανταλλάκτης του οποίου οι λειτουργικές ομάδες είναι θειοπροπυλικές ομάδες ($-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3$). Σαν διαλύτης έκλουσης των πρωτεϊνών χρησιμοποιείται διάλυμα 10 mM οξικού νατρίου-0,02% NaN_3 , pH 4,5. Η ροή του διαλύτη έκλουσης ρυθμίζεται στα 15 ml/ώρα και ο όγκος των κλασμάτων είναι 1 ml. Η ανίχνευση της προθυμοσίνης α γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή 15% SDS-πολυακρυλαμιδίου.
- Τα κλάσματα που περιέχουν καθαρή την προθυμοσίνη α αναμιγνύονται, συμπυκνώνονται μέχρι ξηρού στο Speed Vac και χρωματογραφούνται σε HPLC όπως περιγράφεται στην διαδικασία απομόνωσης της προθυμοσίνης α σύμφωνα με τους Komiyama et al. Το τελευταίο αυτό βήμα γίνεται για να απομακρυνθούν τυχόν μικρές ποσότητες άλλων πρωτεϊνών και για να πιστοποιηθεί η καθαρότητα της προθυμοσίνης α.
- Τα κλάσματα που περιέχουν προθυμοσίνη α εντοπίζονται είτε με ραδιοαναστολογικό προσδιορισμό (Κεφ.2.2.2.3) είτε με ηλεκτροφόρηση SDS-πολυακρυλαμιδίου. Το πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι δίνεται η δυνατότητα να χρησιμοποιήσουμε μεγάλες ποσότητες ιστού (60 g) παρασκευάζοντας έτσι σημαντικές ποσότητες πρωτεΐνης (≈ 2 mg).



2.2 Ανάλυση των πρωτεϊνών

2.2.1 Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών

2.2.1.1 Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο της φλουορεσκαμίνης

Η μέθοδος στηρίζεται στην ιδιότητα της φλουορεσκαμίνης (4-φαινυλ-σπειρο(φουραν-2(3H), 1'φθαλαν-3,3'-δiónη), να αντιδρά σε αλκαλικό περιβάλλον με μόρια που περιέχουν πρωτοταγείς αμινομάδες και να δίνει φθορίζοντα προϊόντα (Lai, 1977). Η ευαισθησία της μεθόδου είναι της τάξης των μmol και αυξάνεται σημαντικά αν προηγηθεί ήπια αλκαλική υδρόλυση του δείγματος, έτσι ώστε να απελευθερωθούν νέες αμινομάδες (Nakai et al., 1974). Για να αποφευχθεί φωτοϋδρόλυση του μορίου προς μη φθορίζοντα παραπροϊόντα, η φλουορεσκαμίνη διαλύεται σε απεσταγμένη ακετόνη (0,2 gr / L) και φυλλάσσεται στο σκότος. Ο χειρισμός των δειγμάτων γίνεται ταχύτατα και σε σκοτεινό χώρο. Ακολουθείται το εξής πρωτόκολλο:

- Τα δείγματα ξηραίνονται σε σωληνάρια πολυπροπυλενίου (VIVE, Θ.Ν Αναπλιώτης Α.Ε., Αθήνα, τύπος 602Α).
- Γίνεται υδρόλυση των δειγμάτων με προσθήκη 0,2 ml διαλύματος NaOH, 0,5 N, σε θερμοκρασία 125°C επί 25 λεπτά.
- Τα δείγματα μεταφέρονται σε θερμοκρασία δωματίου και εξουδετερώνονται με προσθήκη 0,2 ml διαλύματος 0,5 N HCl.
- Γίνεται ρύθμιση του pH των δειγμάτων με προσθήκη 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος 0,5 M βορικού νατρίου, pH 9,33.
- Σε κάθε δείγμα προστίθενται 0,15 ml διαλύματος φλουορεσκαμίνης υπό ισχυρή ανάδευση σε Vortex.
- Τα δείγματα μεταφέρονται σε κυψελίδα και μετρώνται σε φθορισμόμετρο (λ διέγερσης: 390 nm, λ εκπομπής: 475 nm), της KRATOS Analytical Instruments, (Ramsey, NJ).

Η ποσότητα της πρωτεΐνης κάθε δείγματος προσδιορίζεται με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης. Για τον προσδιορισμό της προθυμοσίνης χρησιμοποιείται πρότυπη καμπύλη γλουταμικού οξέος λόγω της μεγάλης περιεκτικότητας της πρωτεΐνης στο αμινοξύ αυτό.



2.2.1.2 Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Η μέθοδος Bradford (1976) στηρίζεται στην παρατήρηση ότι κατά τη σύνδεση της χρωστικής Coomassie Brilliant blue G-250 στις πρωτεΐνες σε όξινο pH, το διάλυμά της παρουσιάζει μετατόπιση του μεγίστου της απορρόφησης του από τα 465 nm στα 595 nm. Η αύξηση της απορρόφησης στα 595 nm παρακολουθείται με φωτόμετρο.

Ο προσδιορισμός της ποσότητας των πρωτεϊνών γίνεται με το αντιδραστήριο Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) ως εξής:

- Το δείγμα αρακώνεται με απεσταγμένο νερό μέχρι όγκου 800 μl.
- Προστίθεται 200 μl αντιδραστήριου Bio-Rad και το δείγμα επωάζεται επί 5 λεπτά.
- Μετράται η απορρόφηση του δείγματος στα 595 nm σε φωτόμετρο (SHIMADZU UV-3000).

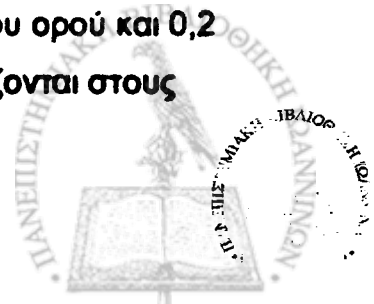
Η ποσότητα της πρωτεΐνης του δείγματος προσδιορίζεται με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης αναφοράς που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας γνωστές ποσότητες BSA (σχήμα 11).

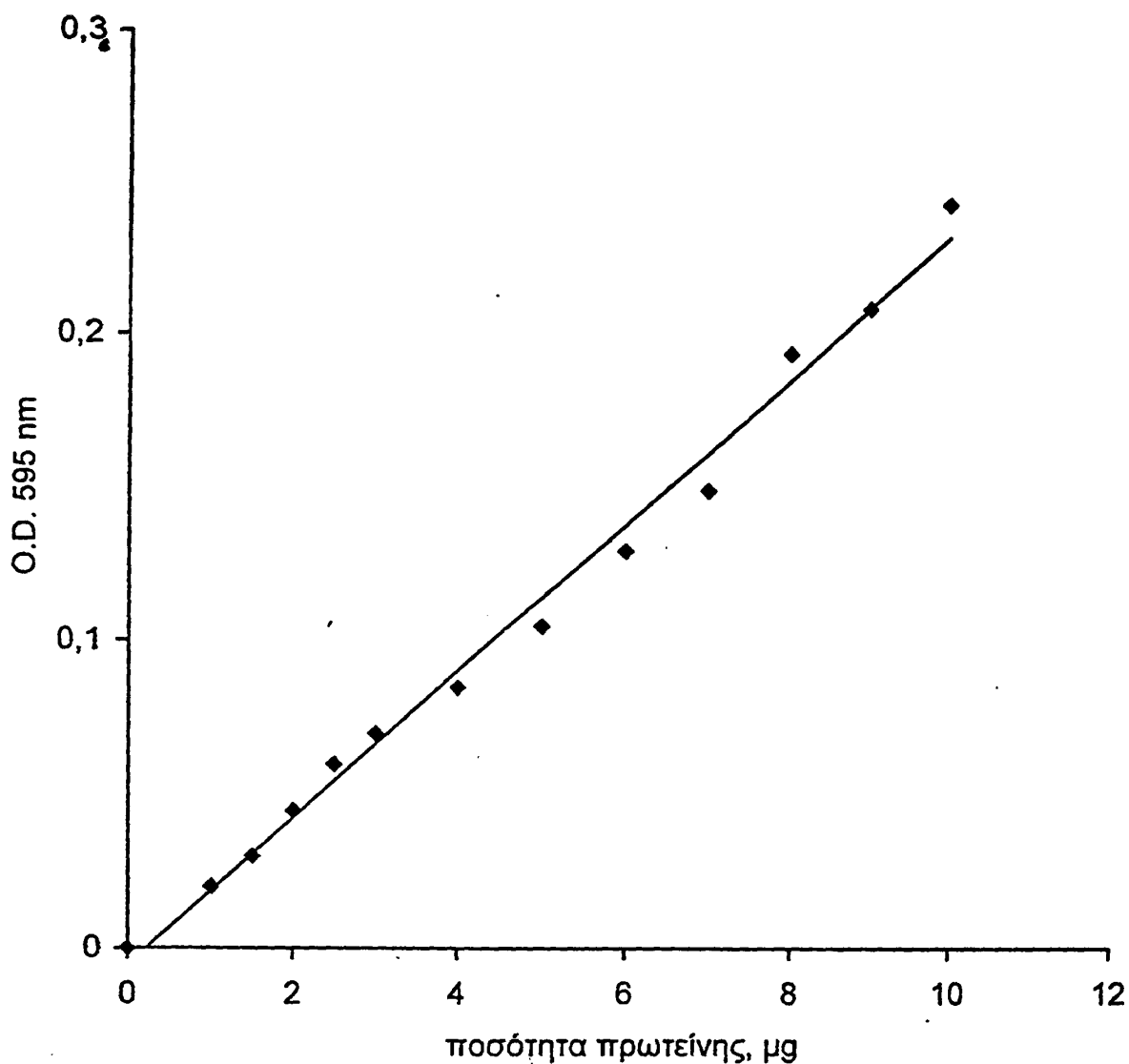
2.2.1.3 Ραδιοανοσολογικός προσδιορισμός (RIA) της προθυμοσίνης α

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στον συναγωνισμό γνωστής ποσότητας ραδιενεργά σημασμένου αντιγόνου και του αντιγόνου του δείγματος για συγκεκριμένη ποσότητα του αντίστοιχου αντισώματος (Jonhstone and Thorpe, 1986). Για την εφαρμογή της μεθόδου χρησιμοποιείται το σημασμένο με τρίτιο πεπτιδίο της θυμοσίνης α1 και πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της θυμοσίνης α1 το οποίο αναγνωρίζει την προθυμοσίνη α. Ο ραδιοανοσολογικός προσδιορισμός χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της προθυμοσίνης α μετά από τα διάφορα στάδια χρωματογραφίας.

Ακολουθείται η εξής διαδικασία (Frillingos et al., 1990):

- Τα δείγματα ξηραίνονται σε Speed Vac και επαναδιαλύονται σε 0,2 M Na_2HPO_4 - $\text{Na H}_2\text{PO}_4$, pH 7,0.
- Σε κάθε δείγμα προστίθεται ποσότητα τριπλωμένης θυμοσίνης α1 που να αντιστοιχεί σε 10000 cpm, 10 μl αντιορού, 14 μl μη ανοσοποιημένου ορού και 0,2 M Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 , pH 7,0 μέχρι όγκου 500 μl. Τα δείγματα επωάζονται στους





Σχήμα 11: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για μέτρηση πρωτεϊνών με τη μέθοδο *Bradford* (Κεφ. 2.2.1.2). Για τη χάραξη της καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιήθηκε BSA. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει το μέσο όρο δύο μετρήσεων.

4°C επί 17 ώρες.

- Ακολουθεί καταβύθιση των σχηματισμένων ανοσοσυμπλεγμάτων με προσθήκη ίσου όγκου κεκορεσμένου διαλύματος $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ και επώαση επί μία ώρα στους 4°C.
- Τα δείγματα φυγοκεντρούνται επί 3 λεπτά στις 14000 στροφές σε φυγόκεντρο Eppendorf. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα διαλύεται με ισχυρή ανάδευση με Vortex σε 250 μl πυκνού φορμικού οξέος μετά από επώαση μιας ώρας.
- Τα δείγματα μεταφέρονται σε 10 ml υγρού σπινθηρισμού (66,6% v/v, τολουόλιο, 33,3% v/v Triton X100, 0,4% PPO w/v, 0,004% w/v POPOP) και η ραδιενέργεια μετράται σε μετρητή β-ακτινοβολίας (Packard Instrument Co, model 3255).

Ο προσδιορισμός της πρωτεΐνης γίνεται με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης αναφοράς που κατασκευάζεται χρησιμοποιώντας γνωστές ποσότητες θυμοσίνης α1.

2.2.2 Ανάλυση αμινοξέων

Τα αμινοξέα κάθε δείγματος προσδιορίζονται μετά από αντίδρασή τους με ισοθειουκυανικό φαινυλεστέρα (PITC), σε αλκαλικό περιβάλλον, οπότε μετατρέπονται στα φαινυλθειοκαρβαμυλ-παράγωγά τους (PTC παράγωγα). Πριν από την σύζευξη των αμινοξέων με το PITC προηγείται όξινή υδρόλυση της πρωτεΐνης σε αέρια φάση (Bindlingmeyer et al., 1984, Φριλίγγος, 1990, Μπούμπα, 1994). Για την ταυτοποίηση των αμινοξέων της προθυμοσίνης α ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

- 5-10 g πρωτεΐνης εισάγονται σε γυάλινα σωληνάρια (0,6 x 6,0 cm, Corning Ltd, Stone Staffs, UK), ξηραίνονται στο Speed Vac και εκπλένονται τρεις φορές με 100 μl τρις απεσταγμένο νερό.
- Τα δείγματα τοποθετούνται σε κατάλληλα φιαλίδια κενού, στον πυθμένα των οποίων προστίθενται 300 μl 6 N HCl (SIGMA). Δημιουργείται κενό στο εσωτερικό των φιαλιδίων και θερμαίνονται στους 150°C επί 75 λεπτά για την υδρόλυση της πρωτεΐνης.
- Τα δείγματα ξηραίνονται υπό κενό σε ξηραντήρα NaOH για δύο τουλάχιστον ώρες. Κατόπιν εκπλένονται τρεις φορές με 100 μl τρις απεσταγμένου νερού και

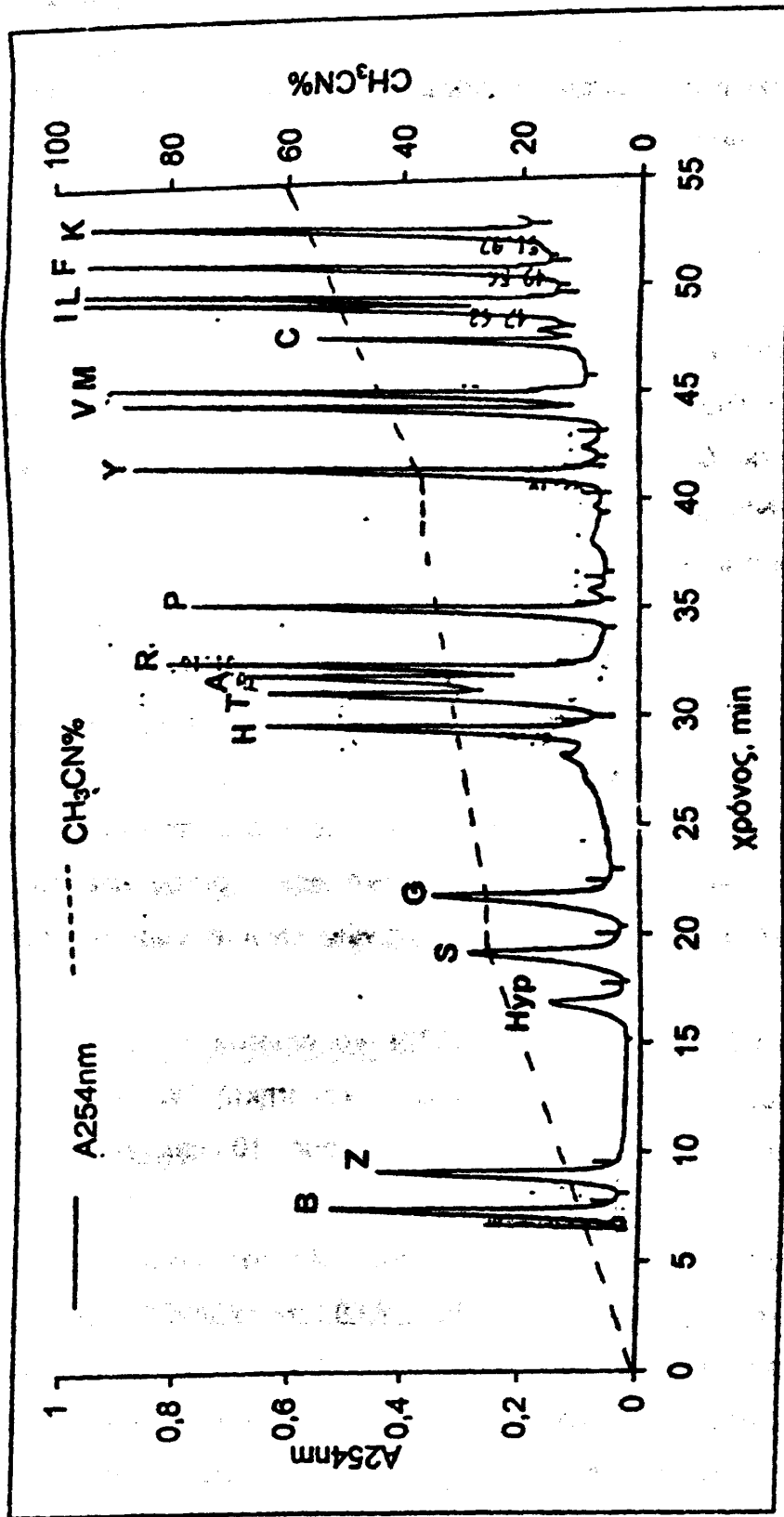


μια φορά με 50 μl αιθανολικού διαλύματος που αποτελείται από αιθανόλη , νερό και τριαιθυλαμίνη σε αναλογία όγκων 1:1:1.

- Σε κάθε δείγμα προστίθεται 50 μl διαλύματος σύζευξης που αποτελείται από αιθανόλη, νερό, τριαιθυλαμίνη και ισοθειοκυανικό φαινυλεστέρα (PITC) σε αναλογία όγκων 7:1:2:1. Το PITC (Pierce Chemical Co.) προστίθεται τελευταίο και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου επί 20 λεπτά. Η σύζευξη των ελεύθερων αμινοξέων διακόπτεται με ξήρανση των δειγμάτων στο Speed Vac.
- Τα δείγματα εκπλένονται με 100 μl τρις απεσταγμένο νερό και αποθηκεύονται στους -20°C όπου μπορούν να παραμείνουν για διάστημα πέντε ημερών μέχρι την χρωματογραφική τους ανάλυση.

Παράλληλα με τη σύζευξη των δειγμάτων γίνεται και η σύζευξη του προτύπου μίγματος αμινοξέων κάτω από τις ίδιες συνθήκες με τη διαφορά ότι η αντίδραση σταματά μετά από πέντε λεπτά. Σαν εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιείται το αμινοξύ υδροξυπρόλίνη (Hyr). Τα PTC-παράγωγα των αμινοξέων διαχωρίζονται με HPLC σε στήλη C18 η οποία θερμοστατείται στους 52°C (Timberline Instruments, Inc., Boulder, Colorado). Οι διαλύτες έκλουσης που χρησιμοποιούνται είναι υδατικό διάλυμα 0,05 M οξικού αμμωνίου pH 6,8 (διαλύτης A) και διάλυμα 0,1 M οξικού αμμωνίου σε μίγμα ακετονιτριλίου, μεθανόλης, νερού σε αναλογία όγκων 44:10:46, pH 6,8 (διαλύτης B). Το pH των διαλυμάτων ρυθμίζεται με προσθήκη πυκνού φωσφορικού οξέος. Η έκλουση των πρωτεϊνών γίνεται με διαβάθμιση διαλύτη B σε διαλύτη A εφαρμόζοντας ροή 1ml/ώρα. Η ανίχνευση των PTC-παραγώγων γίνεται στα 254 nm. Πριν τον χρωματογραφικό προσδιορισμό τους στα ξηρά δείγματα προστίθεται αρχικά μια μικρή ποσότητα διαλύτη B ώστε να διαλυθούν καλά τα υδρόφοβα PTC-αμινοξέα και ακολουθεί προσθήκη εννεαπλάσιου όγκου διαλύτη A. Στο σχήμα 12 φαίνεται ο χρωματογραφικός προσδιορισμός των PTC-παραγώγων ενός πρότυπου μίγματος αμινοξέων.





Σχήμα 12: Ανάλυση των PTC-παραγώγων πρότυπου μίγματος αμινοξέων με HPLC (Κεφ. 2.2.2). Κάθε κορυφή αντιστοιχεί σε 200 pmol του αντίστοιχου αμινοξέος.

2.2.3 Ηλεκτροφόρηση

2.2.3.1 Ηλεκτροφόρηση πηκτής SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση, η μετακίνηση δηλαδή φορτισμένων σωματιδίων υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου χρησιμοποιείται ευρύτατα για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Ειδικότερα, η πηκτή του πολυακρυλαμιδίου την οποία χρησιμοποιούμε έχει το πλεονέκτημα να παραμένει αδρανής κατά τη διαδικασία του διαχωρισμού, να αναπαράγεται πιστά και να πετυχαίνει ευρέος φάσματος διαχωρισμούς με απλή τροποποίηση της σύστασής της. Η πηκτή σχηματίζεται με πολυμερισμό μονομερών ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) (Merck, Darmstadt, Germany) σε αλυσίδες πολυακρυλαμιδίου, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με γέφυρες N,N'-μεθυλεν-δισ-ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$) (Merck). Σαν εκκινητής για τον πολυμερισμό χρησιμοποιείται διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, APS) (Serva, Heidelberg, Germany), ενώ η διαδικασία επιταχύνεται από την N,N,N',N'-τετρα-μεθυλο-αιθυλενοδιαμίνη (TEMED) (Sigma).

Το απορρυπαντικό SDS που χρησιμοποιείται, δεσμεύεται στις πρωτεΐνες σε αναλογία 1,4 g SDS/g πρωτεΐνης και τις μετουσιώνει. Το ποσό αυτό είναι αρκετό, για να καλυφθούν τα ενδογενή φορτία των πολυπεπτιδικών αλυσίδων ώστε το καθαρό φορτίο ανά μονάδα μάζας πρωτεΐνης να είναι αρνητικό και περίπου σταθερό. Συνεπώς, η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πρωτεϊνών είναι συνάρτηση του μοριακού τους βάρους.

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Laemmli (1970) χρησιμοποιείται κατά την ηλεκτροφόρηση ασυνεχές σύστημα (πηκτή επιστοίβαξης και πηκτή διαχωρισμού), κάθετων γυάλινων πλακών πάχους 0,75 mm και μήκους 10 cm. Η πηκτή παρασκευάζεται ως εξής:

1. Πηκτή επιστοίβαξης

<u>Διάλυμα</u>	<u>Ογκος, ml</u>	<u>Τελική συγκέντρωση</u>
29,2% ακρυλαμίδιο-0,8%Bis	1,5	4,5%
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8-0,4%SDS	2,5	0,375 M Tris-0,1%SDS
H ₂ O	6	
10% APS	0,1	0,1%(w/v)
TEMED	<u>0,01</u>	
	10,11 ml	



2. Πηκτή διαχωρισμού

<u>Διάλυμα</u>	<u>Ογκος</u>	<u>Τελική συγκέντρωση</u>
29,2% ακρυλαμίδιο-0,8%Bis	12,5	15%
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8-0,4%SDS	6,125	0,375 M Tris-0,1%SDS
H ₂ O	6,125	
10% APS	0,25	0,1%(w/v)
TEMED	<u>0,0125</u>	
	25,26 ml	

Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται μετά από βρασμό επί 3 λεπτά στους 100°C με ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος οπότε και γίνεται πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Η αναλογία όγκων ρυθμιστικού διαλύματος/δείγματος είναι 1/3 και η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος η εξής:

4X Ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος

0,25 M Tris-HCl, pH 6,8

9,2% SDS

40% w/v γλυκερόλη

0,2% (w/v) κυανούν της βρωμοφανόλης

100mM DTT (προστίθεται ακριβώς πριν από τη χρήση)

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου τάσης 200 V σε συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης με την ακόλουθη σύσταση:

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης

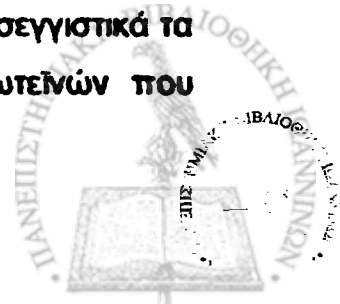
0,025 M Tris

0,192 M Glycine

0,1%SDS

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης η πηκτή βάφεται με εμβάπτιση σε διάλυμα 0,125% w/v Coomassie Blue R-250, 12% v/v οξικό οξύ και 50% v/v μεθανόλη επί δύο ώρες, υπό ανάδευση. Ο αποχρωματισμός της πηκτής γίνεται με ανακίνηση της σε διάλυμα 25% v/v μεθανόλης, 7% οξικού οξέος επί 12 ώρες περίπου. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι περίπου 0,5 µg ανά ζώνη πρωτεΐνης.

Παράλληλα με τα δείγματα τοποθετούνται στην πηκτή ως μάρτυρες πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους, ώστε να μπορούμε να προσδιορίσουμε προσεγγιστικά τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών του δείγματος. Οι δύο ομάδες πρωτεϊνών που



χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες μοριακών βαρών είναι οι εξής: i) Φωσφορυλάση b (97,4 kDa), καταλάση (58,1 kDa), αλκοολική αφυδρογονάση (39,8 kDa), ανθρακική ανυδράση (29kDa), τρυψινογόνο (24kDa), αναστολέας της θρυψίνης (20,1kDa) και λυσοζύμη (14,3 kDa) (Sigma), ii) φωσφορυλάση b (97,4 kDa), αλβουμίνη ορού βοός (80 kDa), αλβουμίνη ωού (49,5 kDa), καρβονική ανυδράση (32,5 kDa), αναστολέας της θρυψίνης (27,5 kDa) και λυσοζύμη (18,5 kDa) (Bio-Rad). Η δεύτερη ομάδα μοριακών βαρών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν πρωτεΐνες συνδεδεμένες με χρωστική (prestained markers).

2.2.3.2 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου παρουσία ουρίας σε όξινο pH

Κατά την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών παρουσία ουρίας η κινητικότητα τους εξαρτάται από το μοριακό τους βάρος και από το καθαρό τους φορτίο. Το φορτίο της πρωτεΐνης καθορίζεται από το ισοηλεκτρικό της σημείο και από το pH της ηλεκτροφόρησης. Οι βασικές πρωτεΐνες τις οποίες υποβάλλουμε σε ηλεκτροφόρηση, αποκτούν θετικό φορτίο όταν βρίσκονται σε συνθήκες όξινου pH όπως αυτές του πειραματός μας. Για τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών χρησιμοποιείται ασυνεχές σύστημα ηλεκτροφόρησης σύμφωνα με τη μεθοδολογία των Reisfeld et al. όπως αναφέρεται από τον Paulson, (1980). Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε κάθετες γυάλινες πλάκες, με πάχος πηκτής 0,75 mm και ύψος 16 cm από τα οποία 4,5 cm καταλαμβάνει η πηκτή επιστοίβαξης. Για την παρασκευή της πηκτής χρησιμοποιούνται τα παρακάτω διαλύματα: Διάλυμα Α: 29,2%w/v ακρυλαμίδιου, 0,8%w/v Bis, Διάλυμα Β (pH 4,4): 1,35% w/v KOH, 17,5% v/v CH₃COOH (glacial), Διάλυμα C (pH 6,3): 2,7%w/v KOH, 3,2%v/v CH₃COOH (glacial). Η πηκτή παρασκευάζεται ως εξής:

Πηκτή επιστοίβαξης (6% ακρυλαμίδιο, 8 M ουρία)

4,8 g ουρία

2 ml διάλυμα Α

1,25 ml διάλυμα C

10 μl TEMED

H₂O

9,9 ml



Το διάλυμα θερμαίνεται στους 37 °C ώστε να διαλυθεί η ουρία και πολυμερίζεται με προσθήκη 0,1 ml 10% APS.

Πηκτή διαχωρισμού (10% ακρυλαμίδιο, 8 M ουρία)

11,5 g ουρία
8 ml διάλυμα A
6 ml διάλυμα B
87,5 μl TEMED
H₂O

23,7 ml

Θέρμανση στους 37 °C. Προσθήκη 0,315 ml 10% APS.

Πριν από την ηλεκτροφόρηση τα δείγματα αναμειγνύονται με ίσους όγκους του παρακάτω ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος :

2X Ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος :

4,8 g ουρία (τελική συγκέντρωση 8M)
2,5 ml διάλυμα C
0,1 g 2-μερκαπτοαιθυλαμίνη
10 mg-πυρονίνη Υ
H₂O

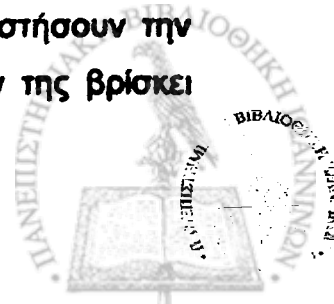
10 ml

Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης αποτελείται από 0,175 M β-αλανίνη και 0,55%v/v οξικό οξύ. Η ηλεκτροφόρηση (προς την κάθοδο) γίνεται στα 75 V μέχρις ότου η χρωστική παρακολούθησης της ηλεκτροφόρησης (πυρονίνη Υ) μπει στην πηκτή διαχωρισμού και στη συνέχεια στα 180 V μέχρι η χρωστική να φτάσει το τέλος της πηκτής (επί 7 ώρες περίπου).

Η βαφή και ο αποχρωματισμός της πηκτής ώστε να γίνουν ορατές οι πρωτεΐνες γίνεται με τον ίδιο τρόπο όπως με την πηκτή του SDS πολυακρυλαμιδίου.

2.2.3.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή αγαρόζης

Η πηκτή που παρασκευάζεται από τον πολυσακχαρήτη αγαρόζη. Η αγαρόζη ήταν από τα πρώτα μέσα στήριξης που χρησιμοποιήθηκαν για να αντικαταστήσουν την ηλεκτροφόρηση σε διάλυμα. Λόγω του μεγάλου μεγέθους των πόρων της βρίσκεται



ακόμη εφαρμογές σε περιπτώσεις ηλεκτροφόρησης μεγάλων μορίων όπως ιοί, νουκλεϊκά οξέα και κάποιες μεμβρανικές πρωτεΐνες. Κατά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης που χρησιμοποιήσαμε (Dr. C.Y. Lai, προφορική επικοινωνία) οι πρωτεΐνες κινούνται σύμφωνα με το φορτίο τους κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες. Στις συνθήκες ουδετέρου pH των πειραμάτων μας οι όξινες πρωτεΐνες είναι φορτισμένες θετικά και κατευθύνονται προς την κάθοδο ενώ οι βασικές πρωτεΐνες βρίσκονται με την μορφή ανιόντων και κινούνται προς την άνοδο. Με τη μέθοδο αυτή εξετάζεται η δημιουργία συμπλέγματος μεταξύ πρωτεϊνών ή και πεπτιδίων. Ο σχηματισμός συμπλέγματος θα καθυστερήσει την κίνηση των πρωτεϊνών προς την αναμενόμενη φορά. Τα δείγματα τοποθετούνται στο μέσο της πηκτής, η οποία βρίσκεται σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης (GNA-100, Pharmacia). Η παρασκευή της πηκτής γίνεται με ανάμιξη διαλύματος αγαρόζης 1% w/v, με ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$, pH 6,7, σε αναλογία όγκων 5 προς 1. Πριν την ηλεκτροφόρηση, τα δείγματα, τα οποία έχουν επωασθεί επί 10 λεπτά σε ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$, pH 6,7 και όγκου 20 μl αναμιγνύονται με διάλυμα δείγματος (0,2% κυανού της βρωμοφαινόλης, 40% γλυκερόλη) σε αναλογία όγκων 5 προς 1. Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης αποτελείται από 0,1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ pH 6,7. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε ηλεκτρικό πεδίο έντασης 15 mA και σταματάει όταν η χρωστική παρακολούθησης του δείγματος απομακρυνθεί κατά 2,5 cm από την αρχική θέση τοποθέτησης του. Η πηκτή βάφεται με διάλυμα χρωστικής Coomassie Blue (Κεφ.2.2.3.1) αραιωμένο 1:4 με διάλυμα αποχρωματισμού (25% μεθανόλη, 7% οξικό οξύ), σε αναλογία όγκων 1 προς 4, επί 20 λεπτά. Ο αποχρωματισμός της πηκτής διαρκεί 3 ώρες και τελικά η πηκτή εξισορροπείται σε απεσταγμένο νερό για 12 ώρες.

2.2.3.4 Χρώση πηκτής πολυακρυλαμιδίου με νιτρικό άργυρο

Η μέθοδος χρώσης της πηκτής με νιτρικό άργυρο έχει το πλεονέκτημα ότι είναι 100 φορές πιο ευαίσθητη από τη χρώση με Coomassie Brilliant Blue R-250 με όριο ευαισθησίας τα 5 ng. Ο βασικός μηχανισμός της χρώσης των μορίων είναι η αναγωγή του μονοσθενούς ιόντος του αργύρου σε μεταλλικό άργυρο. Οι πρωτεϊνικές ζώνες γίνονται ορατές στην πηκτή λόγω των διαφορών στα οξειδοαναγωγικά δυναμικά μεταξύ θέσεων στην πηκτή που καταλαμβάνονται από πρωτεΐνες και



γειπονικών θέσεων στις οποίες δεν υπάρχουν πρωτεΐνες. Σύμφωνα με την τροποποιημένη μεθοδολογία του Morigissey (1981), ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

- Η πηκτή τοποθετείται σε διάλυμα 50% μεθανόλης, 10% οξικού οξέος, όπου παραμένει επί μία ώρα ώστε να μονιμοποιηθούν οι πρωτεΐνες.
- Η πηκτή πλένεται σε απεσταγμένο νερό για μια τουλάχιστον ώρα. Γίνονται πολλές αλλαγές του νερού.
- Η πηκτή εμβαπτίζεται σε διάλυμα διθειοθρεϊτόλης (DTT) 5mg/ml, επί 30 λεπτά.
- Ακολουθεί απόχυση του διαλύματος της διθειοθρεϊτόλης, άμεση προσθήκη διαλύματος νιτρικού αργύρου (0,1% w/v AgNO_3) και επώαση επί 30 λεπτά.
- Απομακρύνεται ο νιτρικός άργυρος και η πηκτή εκπλένεται δύο φορές με απεσταγμένο νερό και μια φορά με το διάλυμα εμφάνισης (3%w/v Na_2CO_3 , 0,0185% v/v HCHO). Η πηκτή επωάζεται με το διάλυμα εμφάνισης μέχρι να γίνουν ορατές οι πρωτεϊνικές ζώνες.
- Η αντίδραση σταματά με προσθήκη διαλύματος κτρικού οξέος 2,3 M (2,5 ml/ 50 ml διαλύματος εμφάνισης) και η πηκτή φυλάσσεται σε νερό.

Όλα τα παραπάνω στάδια γίνονται υπό συνεχή ανακίνηση και κατά τους χειρισμούς χρησιμοποιούνται γάντια ώστε να μη μείνουν αποτυπώματα στην πηκτή.

Χρώση βασικών πρωτεϊνών με νιτρικό άργυρο

Ειδικά για τη χρώση με νιτρικό άργυρο βασικών πρωτεϊνών όπως οι ιστόνες, χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία των Wray et al.(1981). Η διαδικασία περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα:

- Η πηκτή τοποθετείται σε διάλυμα 50% μεθανόλης επί 12 ώρες.
- Διαλύουμε 0,8 g νιτρικού αργύρου σε 4 ml απεσταγμένου νερού (διάλυμα Α). Αναμειγνύουμε 21 ml διαλύματος 0,36% NaOH και 1,4 ml διαλύματος NH_4OH 14.8 M (διάλυμα Β)
- Παρασκευάζουμε το διάλυμα χρώσης προσθέτοντας στάγδην, υπό συνεχή ανάδευση το διάλυμα Α στο διάλυμα Β και αραιώνοντας με νερό το παρασκεύασμα μέχρι όγκου 100 ml. Το διάλυμα χρώσης πρέπει να χρησιμοποιηθεί μέσα σε 5 λεπτά.
- Η πηκτή χρωματίζεται επί 15 λεπτά και εκπλένεται με απεσταγμένο νερό επί 5 λεπτά.



- Η πηκτή επωάζεται με φρέσκο διάλυμα εμφάνισης μέχρι την εμφάνιση πρωτεϊνικών ζωνών. Το διάλυμα εμφάνισης παρασκευάζεται με ανάμιξη 2,5 ml 1% κιτρικού οξέος με 0,25 ml 38% φορμαλδεΰδη και αύξηση του όγκου με νερό μέχρι τα 500 ml.
- Ο τερματισμός της εμφάνισης γίνεται με τοποθέτηση της πηκτής σε διάλυμα 45% μεθανόλης, 10% οξικού οξέος.
- Μετά τη χρώση η πηκτή φυλάσσεται σε νερό.

2.2.3.5 Χρώση πρωτεϊνών με ινδική μελάνη

Η ινδική μελάνη χρησιμοποιείται για τη χρώση των πρωτεϊνών οι οποίες είναι ακινητοποιημένες σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η χρώση οφείλεται στην ειδική προσκόλληση των κολλοειδών σωματιδίων άνθρακα της μελάνης στις ακινητοποιημένες πρωτεΐνες της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης (Harlow and Lane, 1988). Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου είναι 50 ng πρωτεΐνης.

Ακολουθείται η εξής διαδικασία: Η μεμβράνη εκπλένεται σε TBST (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,9% NaCl, 0,1% Tween-20) επί 30 λεπτά. Στη συνέχεια βυθίζεται σε διάλυμα σινικής μελάνης (Pelikan Fount India Ink, black) 0,1% v/v σε TBST, όπου επωάζεται επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα χρώσης απομακρύνεται και η μεμβράνη αποχρωματίζεται σε TBST.

2.3 Σήμανση πρωτεϊνών και πεπτιδίων

2.3.1 Σήμανση της θυμοσίνης α1 με [^3H]NaBH₄

Η ιχνηθέτηση του πεπτιδίου της θυμοσίνης α1, το οποίο χρησιμοποιείται κατά τον ραδιοανοσολογικό προσδιορισμό της προθυμοσίνης α, γίνεται με το τριτωμένο βοροϋδρίδιο του νατρίου μετά από αλκυλίωση των ε-αμινομάδων των λυσίνων της θυμοσίνης α1 (Margolis, 1972). Η σήμανση του μορίου γίνεται ως εξής:



- 100 μg θυμοσίνης $\alpha 1$ διαλύονται σε 100 μl διαλύματος 0,2 M Na_3BO_3 , pH 9 και τοποθετούνται στον πάγο όπου και πραγματοποιούνται όλα τα επόμενα βήματα της διαδικασίας.
- Στο πεπτιδίο προστίθεται διάλυμα HCHO 0,06 M σε αναλογία mole HCHO / mole των λυσινών της θυμοσίνης $\alpha 1$, 1:7. Το δείγμα επωάζεται επί 30 δευτερόλεπτα.
- Το $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$ (ειδική ενεργότητα 13,6 Ci/mmol) διαλύεται σε 5 mM NaOH σε συγκέντρωση 40 mM. Το βοροϋδρίδιο προστίθεται στο δείγμα σε αναλογία mole $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$: HCHO , 1:2. Η προσθήκη της ποσότητας του $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$ γίνεται σε 4 δόσεις ανά 5 λεπτά υπό ανάδευση. Η αντίδραση σταματά 10 λεπτά μετά από την τελευταία προσθήκη, εισάγοντας στο δείγμα 0,3 ml 0,1M πυριδίνη ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$).
- Το δείγμα τοποθετείται σε στήλη Sep-Pak, C-18 (Waters Associates, Boston MA), ώστε να απομακρυνθεί η μη ενσωματωμένη ραδιενέργεια. Η στήλη ενεργοποιείται πριν τη χρήση με 10 ml αιθανόλη και 10 ml νερό και το πεπτιδίο εκλούεται με 5 ml διαλύματος 40% προπανόλη σε 1 M φορμικό οξύ-0,2 M πυριδίνη.
- Το δείγμα συμπυκνώνεται στο Speed Vac μέχρι όγκου 100 μl και χρωματογραφείται σε HPLC (Κεφ.2.1). Η ανίχνευση του ραδιενεργού πεπτιδίου στα κλάσματα γίνεται με μέτρηση της ραδιενέργειας σε μετρητή β-ακτινοβολίας. Τα κλάσματα με τη ραδιενεργή θυμοσίνη $\alpha 1$ φυλάσσονται στους -20°C .

2.3.2 Φωσφορυλίωση της προθυμοσίνης α από την πρωτεϊνική κινάση CKII

Η προθυμοσίνη α φωσφορυλώνεται *in vitro* από την κινάση της καζεΐνης-2 (CKII). Ως στόχοι της κινάσης θεωρούνται υπολείμματα σερίνης και θρεονίνης που βρίσκονται στα 14 πρώτα αμινοξέα της προθυμοσίνης α (Barcia et al., 1992). Είναι γνωστό ότι η κινάση της καζεΐνης-2 ενεργοποιείται από πολυαμίνες γι' αυτό και η φωσφορυλίωση της προθυμοσίνης α γίνεται παρουσία σπερμίνης. Για την φωσφορυλίωση της προθυμοσίνης α που απομονώθηκε στο εργαστήριο από θύμο μόσχου χρησιμοποιήθηκε ανθρώπινη ανασυνδυασμένη κινάση CKII (Boehringer Mannheim) και ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- 25 μg προθυμοσίνης α εισάγονται σε μικροφυγοκεντρικούς σωλήνες Eppendorf των οποίων τα τοιχώματα έχουν καλυφθεί με σιλικόνη.

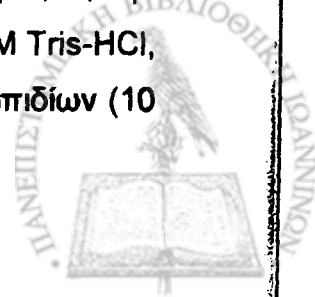


- Στο δείγμα προστίθενται 5 μl [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$] ATP (50 μCi), 2,5 μl 20 μM ATP, 1 μl 25 mM σπερμίνης, 2,5 μl 200 mM Mes (4-morpholineethanesulfonic acid, Boehringer Mannheim), 1,3 M KCl, 100 mM MgCl_2 και 10 mM DTT.
- Στη συνέχεια προστίθενται 10 μl ενζύμου (2 mU), ο όγκος του δείγματος συμπληρώνεται μέχρι τα 25 μl με νερό και ακολουθεί επώαση στους 37°C επί 30 λεπτά. Η αντίδραση σταματά με τοποθέτηση του δείγματος στον πάγο. Το δείγμα αραιώνεται με προσθήκη διαλύματος 20 mM Mes, 0,13 M KCl, 10 mM MgCl_2 και 1 mM DTT μέχρι όγκου 100 μl .
- Το δείγμα αραιώνεται με TBST (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,9% NaCl, 0,1% Tween-20) μέχρι όγκου 2 ml και τοποθετείται σε μικροσυμπυκνωτή centricon (Amicon, cut off:3000 MW), ώστε να απομακρυνθεί το ελεύθερο [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$] ATP.
- Ο έλεγχος της φωσφορυλίωσης γίνεται μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή 15% SDS-πολυακρυλαμιδίου (Κεφ.2.2.3.1) ποσότητας δείγματος, που να αντιστοιχεί σε 1 μg προθυμοσίνης α. Η πηκτή βάφεται με χρωστική Coomassie Blue, αποχρωματίζεται και ξηραίνεται στους 75°C επί 60 λεπτά. Στη συνέχεια εκτίθεται σε φωτογραφικό φιλμ (Kodak XOMAT/AR), στους -70°C για 2-6 ώρες.

2.3.3 Φωσφορυλίωση της ιστόνης H1 από την πρωτεϊνική κινάση C

Η πρωτεϊνική κινάση C φωσφορυλιώνει ένα μεγάλο αριθμό κυτταρικών πρωτεϊνών. Το ένζυμο είναι ανενεργό στη βασική του κατάσταση, αλλά ενεργοποιείται από λιπίδια μεμβρανών (φωσφατιδυλοσερίνη) και διακυλογλυκερόλες, παρουσία ασβεστίου. Για τη φωσφορυλίωση της ιστόνης H1 χρησιμοποιήθηκε πρωτεϊνική κινάση C της Boehringer Mannheim απομονωμένη από μυαλό επίμου. Ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- Ποσότητα 1 μg ιστόνης H1 από θύμο μοσχαριού (Boehringer Mannheim) ή από *Drosophila* (ευγενική προσφορά του Dr. Becker), εισάγεται σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα Eppendorf που έχει υποστεί κατεργασία με σιλικόνη, ώστε να αποφευχθεί η προσκόλληση της πρωτεΐνης στα τοιχώματα.
- Στο δείγμα προστίθενται 5 μl [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$] ATP (50 μCi), 5 μl ATP 10 μM , 2,5 μl διαλύματος πρωτεϊνικής κινάσης C συμπυκνωμένο δέκα φορές (200 mM Tris-HCl, pH 7,4, 100 mM MgCl_2 , 10 mM CaCl_2), 5 μl BSA 1%, 2,5 μl φωσφολιπιδίων (10

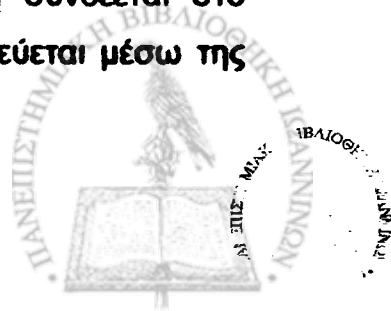


μg/μl, L-Phosphatidyl-serine, 4 μg/μl, 1,2 dioleoyl-sn-glycerol, Sigma) και ο όγκος συμπληρώνεται με νερό μέχρι τα 25 μl.

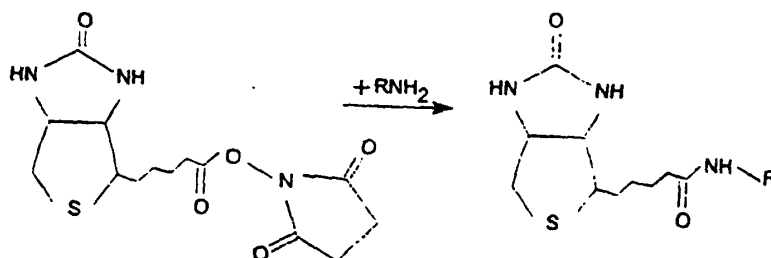
- Στη συνέχεια προστίθενται 0,1 mU πρωτεϊνικής κινάσης C και ακολουθεί επώαση στους 37°C επί 30 λεπτά.
- Η αντίδραση σταματά με τοποθέτηση του δείγματος στον πάγο και ο όγκος του δείγματος αυξάνεται με προσθήκη 75 μl διαλύματος πρωτεϊνικής κινάσης C. Το δείγμα τοποθετείται σε στήλη μοριακής διήθησης (Nick Spin Columns Sephadex G-50, Pharmacia) ώστε να διαχωριστεί η ιχνηθετημένη ιστόνη H1 από το ελεύθερο $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP. Η στήλη έχει εξισσοροπηθεί με το διάλυμα της πρωτεϊνικής κινάσης C (200 mM Tris-HCl, pH 7,4, 100 mM MgCl_2 , 10 mM CaCl_2).
- Η ιστόνη H1 εκλούεται μετά από φυγοκέντρηση της στήλης στα 500 x g επί 4 λεπτά.
- Όγκος 1 μl από τα 25 μl του δείγματος αναμειγνύεται με 1 μg μη ιχνηθετημένης ιστόνης H1 από θύμο μόσχου (Boehringer Mannheim) και ηλεκτροφορείται σε πηκτή 15% SDS-ακρυλαμίδιου η οποία στη συνέχεια ξηραίνεται στους 75°C επί 60 λεπτά. Ο έλεγχος της σήμανσης της ιστόνης H1 γίνεται με έκθεση της πηκτής σε φωτογραφικό φιλμ (Kodak XOMAT/AR), τοποθέτηση του φιλμ στους -70°C επί 2-6 ώρες και εμφάνισή του.

2.3.4. Σήμανση των πεπτιδίων θυμοσίνη α1, καρβοξυτελικό και όξινο πεπτιδίο της προθυμοσίνης α με βιοτίνη

Η ανάπτυξη και η εφαρμογή του συστήματος βιοτίνης-στρεπταβιδίνης αποτέλεσε ένα σημαντικό βήμα στον τομέα της μη ραδιενεργής σήμανσης για την ανίχνευση βιολογικά ενεργών μορίων. Η βάση του συστήματος είναι η σύνδεση της μικρού μοριακού βάρους βιταμίνης βιοτίνης με ένα ενεργό βιολογικά μόριο το οποίο μπορούμε κατόπιν να εισάγουμε σε κάποιο πειραματικό σύστημα. Το βιοπνυλκωμένο αυτό μόριο συνήθως αναγνωρίζει και συνδέεται εκλεκτικά με ένα μόριο στόχο του συστήματος. Στη συνέχεια εισάγουμε στο σύστημα μας ιχνηθετημένη στρεπταβιδίνη η οποία μέσω της ισχυρής αλληλεπίδρασής της με την βιοτίνη συνδέεται στο παραπάνω σύμπλεγμα των δύο μορίων. Το συμπλεγμά μας ανιχνεύεται μέσω της ανίχνευσης της ιχνηθετημένης στρεπταβιδίνης (Kessler, 1992).



Για την σήμανση των πεπτιδίων χρησιμοποιήσαμε τον N-υδροξυηλεκτρικό εστέρα της βιοτίνης (Boehringer Mannheim Biochemica, Germany) ο οποίος συνδέεται με τις ελεύθερες αμινομάδες (ε- αμινομάδα λυσινών και άμινο τελικό άκρο) των πεπτιδίων. Η αντίδραση είναι η εξής:



Η διαδικασία της βιοτινυλίωσης περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια (Harlow and Lane, 1988):

- Παρασκευάζεται διάλυμα N-υδροξυηλεκτρικού εστέρα της βιοτίνης συγκέντρωσης 10 mg/ml σε DMSO (Ferak). Το διάλυμα πρέπει να χρησιμοποιηθεί άμεσα.
- Παρασκευάζονται διαλύματα των πεπτιδίων 2 mg/ml σε 0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα βορικού νατρίου, pH 8,8.
- Ο ηλεκτρικός εστέρας της βιοτίνης αναμιγνύεται με κάθε ένα από τα πεπτιδία σε αναλογία μάζας 1:4. Η ανάμιξη συνεχίζεται σε θερμοκρασία δωματίου επί 4 ώρες.
- Η αντίδραση σταματά με προσθήκη 20 μl διαλύματος NH_4Cl 1 M ανά 250 μg εστέρα και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου επί 10 λεπτά.
- Γίνεται διαπίδυση των βιοτινυλιωμένων πεπτιδίων έναντι PBS, επί 48 ώρες, σε μεμβράνη διαπίδυσης με ανώτατο όριο μοριακού βάρους 500 D (Spectra/Por, molecular porous membrane). Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20 °C.

Ο έλεγχος της βιοτινυλίωσης των πεπτιδίων γίνεται με την τεχνική αποτύπωσης κηλίδων (Κεφ.2.2.9.). Στην μεμβράνη της νιτροκυταρίνης τοποθετούνται 2-10 μg κάθε πεπτιδίου τα οποία βρίσκονται σε 50 μl PBS. Η ανίχνευση των βιοτινυλιωμένων πεπτιδίων γίνεται με επώαση της μεμβράνης με στρεπταβιδίνη σε αραιώση 1:40000 επί 1 ώρα. Η στρεπταβιδίνη που χρησιμοποιείται είναι συνδεδεμένη με ραφανιδική υπεροξειδάση (horseradish peroxidase-HRP, Sigma). Για την εμφάνιση του σήματος



της αντίδρασης χρησιμοποιείται η τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL, Κεφ. 2.2.10).

2.4 Ανοσοτεχνικές

2.4.1 Παραγωγή αντισωμάτων έναντι της θυμοσίνης α1

Σαν ανοσογόνο για την παραγωγή αντισώματος, που να αναγνωρίζει την προθυμοσίνη α, χρησιμοποιείται το πεπτιδίο της θυμοσίνης α1 που αντιστοιχεί στο αμινοτελικό άκρο της προθυμοσίνης α (αμινοξέα 1-28). Η συνθετική θυμοσίνη α1 που χρησιμοποιήθηκε στην ανοσοποίηση ήταν προσφορά του Dr. A. M Felix (Hoffman-La Roche Inc., Nutley, NJ). Λόγω του μικρού μεγέθους του, το πεπτιδίο πριν τη χρησιμοποίησή του συζεύχθηκε ομοιοπολικά με αιμοκυανίνη (KLH) (Sigma, St. Louis, MO) μέσω γλουταραλδεϋδης (Sigma) (McClure et al., 1981). Η ανοσοποίηση έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Goodall et al. (1983) ως εξής:

Σύζευξη:

- Η θυμοσίνη α1 και η KLH διαλύονται σε PBS (2 mM NaH_2PO_4 , 8 mM Na_2HPO_4 , 0,9% NaCl, 0,02% NaN_3 , pH 7,4) σε συγκέντρωση 2 mg/ml.
- Αναμιγνύονται ίσοι όγκοι διαλυμάτων θυμοσίνης α1 και KLH παρουσία γλουταραλδεϋδης τελικής συγκέντρωσης 0,5% w/v. Η σύζευξη συνεχίζεται σε θερμοκρασία δωματίου επί τρεξ ώρες.
- Η περίσσεια της γλουταραλδεϋδης απομακρύνεται μετά από διαπίδυση του συζεύγματος έναντι PBS, επί 24 ώρες στους 4°C.

Ανοσοποίηση:

Για την ανοσοποίηση χρησιμοποιήθηκαν δύο θηλυκά κουνέλια ηλικίας 2 μηνών. Πριν τον εμβολιασμό των ζώων το σύζευγμα θυμοσίνης α1- KLH αραιώνεται με PBS και γίνεται γαλάκτωμα με την προσθήκη ίσου όγκου Freund's complete adjuvant (Sigma) κατά τον πρώτο εμβολιασμό και Freund's incomplete adjuvant (Sigma) κατά τους αναμνηστικούς εμβολιασμούς. Στον πρώτο εμβολιασμό χρησιμοποιούνται 300 μg θυμοσίνης α1/ζώο, ενώ στους αναμνηστικούς εμβολιασμούς (κάθε τριάντα μέρες) χρησιμοποιούνται 200 μg πεπτιδίου. Οι ενέσεις γίνονται υποδόρια στις μασχάλες και στην πλάτη του ζώου. Το αίμα συλλέγεται από τη φλέβα του αυτιού του ζώου έξι μέρες μετά από κάθε αναμνηστικό εμβολιασμό, παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου

επί 2 ώρες και ο ορός παραλαμβάνεται μετά από φυγοκέντρηση στα 5000 rpm, επί 25 λεπτά. Η φύλαξη του ορού γίνεται στους -20°C σε μικροφυγοκεντρικούς σωλήνες Eppendorf που περιέχουν μικρούς όγκους. Πριν από την ανοσοποίηση με την ίδια διαδικασία, συλλέγεται ορός από μη ανοσοποιημένα πειραματόζωα (μη ανοσοποιημένος ορός).

2.4.2. Έλεγχος τίτλου του αντιορού anti- $\alpha 1$

Η μέτρηση του τίτλου του αντιορού anti- $\alpha 1$ γίνεται με ραδιανοσολογικό προσδιορισμό.

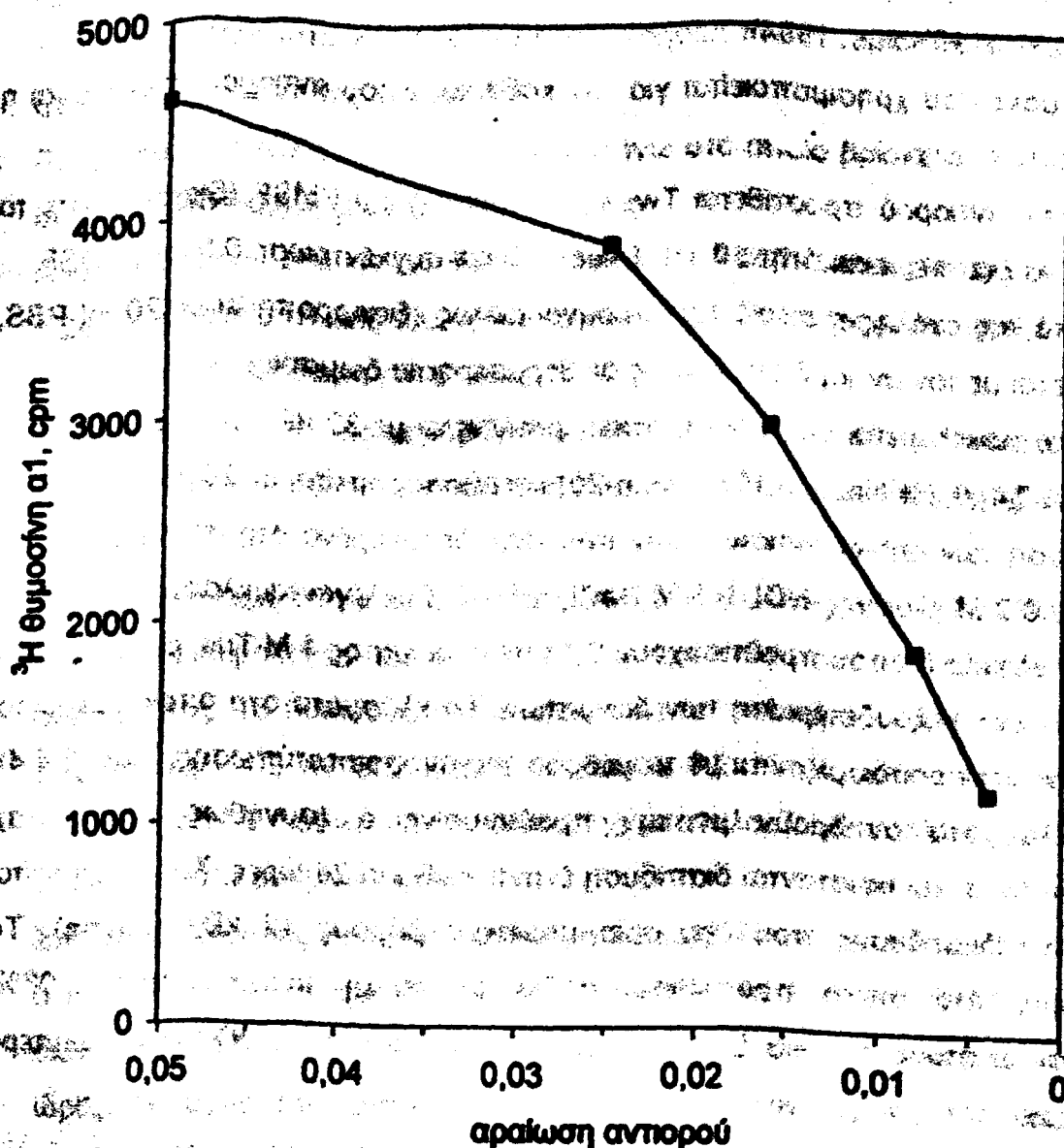
Ποσότητα τριτωμένης θυμοσίνης $\alpha 1$ που αντιστοιχεί σε 10.000 cpm (6-10 μl) εισάγεται σε σωλήνες Eppendorf. Στους ίδιους σωλήνες προστίθονται διάφοροι όγκοι αντιορού και μη ανοσοποιημένος ορός, έτσι ώστε ο συνολικός όγκος του ορού να είναι 24 μl . Τα δείγματα αραιώνονται με διάλυμα 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7 μέχρι όγκου 500 μl . Η διαδικασία συνεχίζεται όπως ακριβώς περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.2.1.3. Η καμπύλη τίτλου του αντιορού φαίνεται στο σχήμα 13.

2.4.3 Καθαρισμός αντιορών

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων εκτός από το αντίσωμα κατά της θυμοσίνης $\alpha 1$ η παραγωγή του οποίου περιγράφηκε πιο πάνω, χρησιμοποιήθηκαν ο αντιορός έναντι του καρβοξυτελικού πεπτιδίου της προθυμοσίνης α (anti-ct, αμινοξέα 87-109) και ο αντιορός έναντι της ιστόνης H1 (anti-H1). Οι αντιοροί αυτοί ήταν ευγενική προσφορά της Δρ. Θ. Παπαμαρκάκη.

Ο αντιορός έναντι του καρβοξυτελικού πεπτιδίου της προθυμοσίνης α καθαρίστηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της χρωματογραφίας αγκιστείας. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στις ειδικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ μορίων όπως το αντιγόνο με το αντίσωμα. Κατά την εφαρμογή της μεθόδου κατάλληλο μόριο (πρόσδεμα) συνδέεται ομοιοπολικά σε υλικό το οποίο πακετάρεται σε χρωματογραφική στήλη. Στη συνέχεια ένα μίγμα συστατικών τοποθετείται στη στήλη. Τα συστατικά τα οποία δεν έχουν συγγένεια με το πρόσδεμα απομακρύνονται από τη στήλη, αφήνοντας μόνο το επιθυ-





Σχήμα 13: Καμπύλη πιλοδότησης του αντπορού αντί-α1 (Κεφ.2.4.2).

και μεσοφύλο που η ηωία ορμή ατμής σπρίδαση η φ.α.σ. φέρει στο ισταφράγητι
 γίνεται νητ ει εάλλασφφ ρέονσφφ ε νιοχρσφφ ότρη νητ



μητό συστατικό συνδεδεμένο. Η έκλουση του συστατικού αυτού μπορεί να γίνει με αλλαγή του pH ή με τη χρησιμοποίηση διαλυμάτων υψηλής ιοντικής ισχύος. Για τον καθαρισμό του anti-ct αντιορού χρησιμοποιήθηκε στήλη, με υλικό χρωματογραφίας Affigel-15 (Biorad, Hertfordshire, UK) στην οποία είχε συνδεθεί ομοιοπολικά το καρβοξυτελικό πεπτίδιο της προθυμοσίνης α το οποίο παρασκευάστηκε συνθετικά (Papamarcaki and Tsolas, 1994).

Η διαδικασία που χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό του αντιορού anti-ct είναι η εξής:

- Σε 1,5 ml αντιορού προστίθεται Tween-20 (Sigma) και PMSF (Sigma) ώστε το δείγμα να έχει περιεκτικότητα 0,1% Tween-20 και συγκέντρωση 0,5 mM PMSF.
- Το υλικό της στήλης η οποία έχει προηγουμένως εξισορροπηθεί με 20 ml PBS, επωάζεται με τον αντιορό επί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υλικό πακετάρεται σε στήλη η οποία εκπλένεται με 30 ml TBST (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,9% NaCl, 0,1% Tween-20) και εξισορροπείται με 20 ml PBS.
- Η έκλουση των anti-ct αντισωμάτων που είναι δεσμευμένα στη στήλη γίνεται με διάλυμα 0,2 M γλυκίνης-HCl, 0,5 M NaCl, pH 2,2. Συλλέγονται κλάσματα όγκου 1 ml σε σωληνάρια όπου προϋπάρχουν 0,14 ml διαλύματος 1 M Tris, pH 11,5 ώστε να γίνει άμεση εξουδετέρωση των δειγμάτων. Τα κλάσματα στα οποία εκλούεται το αντίσωμα προσδιορίζονται με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης (Κεφ. 2.4.4). Όσα κλάσματα αντιδρούν με την προθυμοσίνη α (συνήθως τα πρώτα), αναμιγνύονται και υφίστανται διαπίδυση έναντι PBS επί 24 ώρες. Χρησιμοποιείται μεμβράνη διαπίδυσης που έχει όριο μοριακού βάρους 12 kDa (Sigma). Το αντίσωμα, στο οποίο προστίθεται αζίδιο σε τελική περιεκτικότητα 0,03%, φυλάσσεται στους 4°C για διάστημα ενός μήνα ή στους -20°C για μεγαλύτερο διάστημα.

Ο καθαρισμός του αντιορού έναντι της ιστόνης H1 βασίζεται επίσης στην ειδική σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος. Η διαδικασία καθαρισμού είναι η εξής:

- Ιστόνη H1 απομονωμένη από θύμο μόσχου ηλεκτροφορείται σε πηκτή 15% SDS-πολυακρυλαμιδίου και μεταφέρεται σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης όπως περιγράφεται στο Κεφ. 2.4.4. Η ποσότητα της ιστόνης είναι 4 µg ανά διαδρομή και στην πηκτή υπάρχουν 9 διαδρομές. Παράλληλα με την πρωτεΐνη



ηλεκτροφορούνται και μεταφέρονται στην νπροκυτταρίνη μάρτυρες μοριακών βαρών.

- Η μεμβράνη βάφεται με διάλυμα 0,1 % ν/ν ινδικής μελάνης (Κεφ.2.2.3.5) σε TBST επί 15-20 λεπτά οπότε και γίνονται ορατές οι πρωτεϊνικές ζώνες. Στη συνέχεια εκπλένεται τρεις φορές επί 5 λεπτά με TBST. Η περιοχή της μεμβράνης που αντιστοιχεί στην ιστόνη H1 κόβεται και χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό του αντισώματος έναντι της ιστόνης H1.
- Επωάζουμε το τεμάχιο της μεμβράνης πάνω στο οποίο βρίσκεται η ιστόνη H1 με διάλυμα TBST-0,4% ζελατίνης για 18 ώρες.
- Αρακώνουμε τον anti-H1 αντιγόνο με διάλυμα TBST-0,4% ζελατίνη σε αραίωση 1:20, έτσι ώστε ο τελικός του όγκος να είναι 8 ml. Επωάζουμε τη μεμβράνη μας με το αρακωμένο αντίσωμα επί 8 ώρες.
- Ακολουθεί έκπλυση της μεμβράνης με διάλυμα TBST-0,4% ζελατίνη επί 1 ώρα, στη συνέχεια με TBST δύο φορές επί 5 λεπτά και τελικά με PBS τρεις φορές επί 5 λεπτά.
- Η μεμβράνη καλύπτεται με διάλυμα 1 ml 0,2 M γλυκίνης-HCl, 0,5 M NaCl, pH 2,2 επί 40 δευτερόλεπτα ώστε να γίνει η έκλυση του συνδεδεμένου anti-H1 αντισώματος. Το έκλουσμα όπου περιέχεται το αντίσωμα, συλλέγεται σε σωλήνα που περιέχει 1,2 ml διαλύματος Na_2HPO_4 0,2 M με αποτέλεσμα να αποκτήσει ουδέτερο pH. Η διαδικασία της έκλυσης επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές και τα εκλούσματα αναμιγνύονται.
- Στο υλικό έκλυσης προστίθεται Tween-20 και ζελατίνη σε τελικές συγκεντρώσεις 0,1% και 1% αντίστοιχα. Γίνεται διαπίδυση του υλικού έναντι TBST με μεμβράνη διαπίδυσης 12k D (Sigma), αρχικά για 12 ώρες και στη συνέχεια για άλλες 3 ώρες. Η ισχύς του αντισώματος ελέγχεται με την τεχνική της αποτύπωσης κηλίδων (Κεφ.2.7.) Η εμφάνιση της αντίδρασης γίνεται με ECL (Κεφ.2.9). Στο αντίσωμα προστίθεται αζίδιο σε τελική περιεκτικότητα 0,03% και φυλάσσεται στους 4°C επί ένα μήνα και στους -20°C για μεγαλύτερο διάστημα.



2.4.4 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blot)

Η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης των πρωτεϊνών περιλαμβάνει τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών σε πηκτή, την μεταφορά τους από την πηκτή σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου και την ανίχνευσή τους μετά από τη σύνδεση με ειδικό αντίσωμα (Burnette et al., 1981). Αναλυτικότερα, για την ανίχνευση της ιστόνης H1 και της προθυμοσίνης α με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιούνται οι παρακάτω μεθοδολογίες:

ι) Ανοσοαποτύπωση ιστόνης H1

Μετά από την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πηκτή 15% SDS-πολυακρυλαμιδίου, τοποθετείται πάνω στην πηκτή μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με διάμετρο πόρων 0,45 μm (BA-S 83 Reinforced nitrocellulose NC, Schleicher & Shuell, Feldbach, Switzerland) η οποία έχει ενεργοποιηθεί με εμβάπτισή της σε νερό. Απομακρύνονται οι φυσαλίδες που τυχόν έχουν εγκλωβιστεί μεταξύ της πηκτής και της μεμβράνης και οι δύο μαζί τοποθετούνται ανάμεσα σε δύο διηθητικά χαρτιά Whatman 3 mm και στη συνέχεια στο ειδικό πλαίσιο της συσκευής μεταφοράς. Το σύστημα βυθίζεται στο διάλυμα μεταφοράς (0,025 M Tris-HCl, 0,1% SDS, 20% μεθανόλη, 0,192 M γλυκίνη, pH 8,3) και εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο τάσης 30 V επί 3,5 ώρες. Μετά τη μεταφορά η μεμβράνη εκπλένεται με διάλυμα TBST επί 30 λεπτά και επωάζεται με διάλυμα TBST-0,4% ζελατίνη επί 12 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να καλυφθούν οι κενές θέσεις της. Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με το καθαρισμένο anti-H1 αντίσωμα κουνελιού (Κεφ.2.4.3.) σε αραιώση 1:20 σε διάλυμα TBST-0,4% ζελατίνη επί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Η μεμβράνη εκπλένεται επί 30 λεπτά με TBST-0,4% ζελατίνη. Κατόπιν, επωάζεται επί μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με αντιγόνο αιγός έναντι ανοσοσφαιρινών κουνελιού συζευγμένο με ραφανιδική υπεροξειδάση (goat anti rabbit IgG-HRP, Amersham). Η επώαση γίνεται σε αραιώση 1:5000 σε διάλυμα TBST-0,4% ζελατίνη. Τελικά η μεμβράνη εκπλένεται επί 30 λεπτά με διάλυμα TBST-0,4% ζελατίνη και η εμφάνιση του προϊόντος της αντίδρασης γίνεται με την τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL) (Κεφ.2.9).



ii) Ανοσοαποτύπωση προθυμοσίνης α

Για την ανοσοαποτύπωση της προθυμοσίνης α γίνεται ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πηκτή 15% SDS-πολυακρυλαμίδιου και η πηκτή εμβαπτίζεται στο διάλυμα μεταφοράς (0,02 M CH_3COONa , pH 4,5) επί 15 λεπτά ώστε να εξουδετερωθεί το αλκαλικό pH της πηκτής. Στη συνέχεια τοποθετείται στην πηκτή μεμβράνη νιτροκυτταρίνης διαμέτρου πόρων 0,2 μm (BA-S 83 Reinforced nitrocellulose NC, Schleicher & Shuell, Feldbach, Switzerland). Λόγω του μικρού μεγέθους και του φορτίου της η ακινητοποίηση της προθυμοσίνης α στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης δεν είναι δυνατή. Για το λόγο αυτό πριν τη μεταφορά η μεμβράνη τροποποιείται ώστε η προθυμοσίνη α να συνδέεται σ' αυτή ομοιοπολικά.

Η διαδικασία τροποποίησης της μεμβράνης σύμφωνα με τους Lauritzen et al. (1990), είναι η εξής:

- 1,5 ml διβινυλοσουλφόνης (Sigma) διαλύονται σε μίγμα αποτελούμενο από 3 ml διμεθυλοφορμαμίδιο και 25 ml διαλύματος 0,5 M $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$, pH 10. Η μεμβράνη επωάζεται με το παραπάνω διάλυμα επί 1 ώρα και στη συνέχεια εκπλένεται επί 15 λεπτά με νερό.
- Η μεμβράνη τοποθετείται για 30 λεπτά σε διάλυμα 1% v/v αιθυλενοδιαμίνης σε νερό και επαναλαμβάνεται η έκπλυση του προηγούμενου σταδίου.
- Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης επί 15 λεπτά σε διάλυμα 1% v/v γλουταραλδεύδης σε 0,5 M $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$, pH 10 και έκπλυση με νερό.

Η μεταφορά με την τροποποιημένη μεμβράνη γίνεται σε ηλεκτρικό πεδίο τάσης 7 V και 45 mA για 7 ώρες.

Μετά τη μεταφορά η μεμβράνη εκπλένεται με TBST επί 30 λεπτά και τοποθετείται επί 12 ώρες σε TBST-0,4% ζελατίνη. Ακολουθεί επώαση επί 2 ώρες με το anti-ct (Κεφ.2.4.3) αντίσωμα σε αραίωση 1:1000 σε TBST-0,4% ζελατίνη και έκπλυση επί 30 λεπτά με TBST-0,4% ζελατίνη. Κατόπιν, η μεμβράνη επωάζεται επί μία ώρα με αντιγόνο αιγός έναντι ανοσοσφαιρινών κουνελιού συζευγμένο με ραφανιδική υπεροξειδάση (goat anti rabbit IgG-HRP, Amersham), σε αραίωση 1:5000 σε διάλυμα TBST-0,4% ζελατίνη. Τελικά η μεμβράνη εκπλένεται επί 30 λεπτά με διάλυμα TBST-0,4% ζελατίνη και η εμφάνιση της αντίδρασης γίνεται με την τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL) (Κεφ.2.9). Όλα τα παραπάνω στάδια γίνονται σε θερμοκρασία δωματίου.



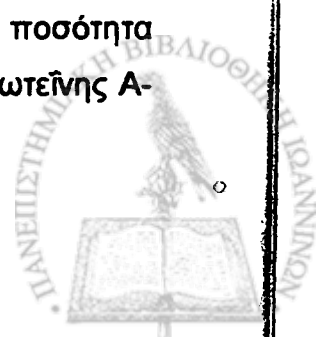
2.4.5. Ανοσοαπομόνωση του συμπλέγματος προθυμοσίνης α-ιστόνης H1 από εκχύλισμα κυττάρων NIH 3T3

Η ανοσοαπομόνωση του συμπλέγματος προθυμοσίνης α-ιστόνης H1 από το κυτταρικό εκχύλισμα γίνεται με χρωματογραφία συγγένειας. Πρώτο βήμα της μεθόδου αποτελεί η παρασκευή στήλης χρωματογραφίας πάνω στην οποία βρίσκεται ομοιοπολικά συνδεδεμένο το anti-ct αντισώμα της προθυμοσίνης α. Ένα πολύ χρήσιμο υλικό για την παρασκευή της στήλης αυτής αποτελούν τα σφαιρίδια της πρωτεΐνης A-Sepharose. Τα μόρια του αντισώματος δένονται στα σφαιρίδια της πρωτεΐνης A μέσω της Fc σταθερής περιοχής τους έτσι ώστε οι θέσεις σύνδεσης του αντιγόνου (Fab) να προσανατολίζονται σωστά για να εξασφαλίζεται η μέγιστη αντίδραση με τα αντισώματα (Harlow and Lane, 1988).

Τα στάδια παρασκευής της στήλης που χρησιμοποιείται στη χρωματογραφία συγγένειας είναι σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Harlow & Lane (1988) τα ακόλουθα:

- 270 μg (450 μl) anti-ct αντισώματος καθαρισμένου με χρωματογραφία συγγένειας (Κεφ.2.4.3.) αναμιγνύονται με 270 μl αιωρήματος σφαιριδίων πρωτεΐνης A-Sepharose σε PBS. Η ανάμιξη συνεχίζεται επί μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση.
- Τα σφαιρίδια της πρωτεΐνης A εκπλένονται με 2,5 ml διαλύματος Na_3BO_3 , 0,2 M, pH 9,0 (φυγοκέντρωση σε 3000 g επί 5 λεπτά) και επαναιωρούνται σε 2,5 ml του ίδιου διαλύματος. Στη συνέχεια προστίθενται 13 mg διμεθυλοπυρμελιμιδικού οξέος (DMP, Pierce) ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 20 mM και ακολουθεί επώαση επί 30 λεπτά υπό ανάδευση.
- Η αντίδραση τερματίζεται με έκπλυση των σφαιριδίων με διάλυμα 0,2 M γλυκίνης- NaOH , pH 8,6 και επώαση τους με το ίδιο διάλυμα επί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση.
- Τα σφαιρίδια της πρωτεΐνης A εκπλένονται με PBS, εναιωρούνται σε διάλυμα PBS-0,1% methiolate (αιθυλο-υδράργυρο θειοσαλικυλικό άλας του νατρίου) και φυλάσσονται στους 4 °C.

Παράλληλα με την παρασκευή της anti-ct στήλης χρωματογραφίας ίδια ποσότητα μη ειδικών ανοσοσφαιρινών συνδέεται σε αντίστοιχο όγκο σφαιριδίων πρωτεΐνης A-



Sepharose με την παραπάνω διαδικασία (non-immune IgG στήλη). Τα δείγματα που τοποθετούνται στη στήλη αυτή χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες.

Η διαδικασία της ανοσοαπομόνωσης συνεχίζεται με τη σύνδεση του συμπλέγματος στη στήλη και αμέσως μετά την έκλουσή του ως εξής:

- 25×10^7 NIH3T3 κύτταρα υφίστανται λύση με ενακώρησή τους σε 1,5 ml διαλύματος λύσης που αποτελείται από 20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 800 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,05mM PMSF (phenylmethylsulphonyl fluoride), 1μg/ml από κάθε ένα από τους αναστολείς πρωτεασών pepstatin, leupeptin και aprotinin. Το κυτταρικό εκχύλισμα μένει στον πάγο επί 15 λεπτά.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση του εκχυλίσματος σε 14000 g επί 10 λεπτά στους 4°C και το υπερκείμενο αρακώνεται με προσθήκη διαλύματος 20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 2 mM EDTA, 0,05 mM PMSF και 1μg/ml pepstatin, leupeptin, aprotinin ώστε η συγκέντρωση του NaCl να γίνει 150 mM.
- Το υλικό χωρίζεται σε 2 μέρη, το καθένα από τα οποία αντιστοιχεί σε $12,5 \times 10^6$ κύτταρα. Το ένα μέρος επωάζεται με την anti-cl στήλη, ενώ το δεύτερο μέρος επωάζεται με την non-immune IgG στήλη. Η επώαση γίνεται για 3 ώρες στους 4°C και στη συνέχεια για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Πριν την επώαση οι στήλες εξισορροπούνται με ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4.
- Ακολουθεί έκπλυση των στηλών με τα παρακάτω διαλύματα κατά σειρά: i) 5 ml 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4, ii) 1,5 ml 20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl pH 7,4 iii) 1,5 ml 20 mM Tris-HCl, 600 mM NaCl pH 7,4 iv) 1,5 ml 20 mM Tris-HCl, 1M NaCl pH 7,4. Όλα τα παραπάνω διαλύματα περιέχουν 2 mM EDTA, 0,05 mM PMSF, 0,1% NP-40 και από 1 μg/ml pepstatin, leupeptin και aprotinin.
- Τα δείγματα υφίστανται διαπίδυση έναντι 1 L ρυθμιστικού διαλύματος 1 mM φωσφορικών pH 7, 0,2 mM EDTA, 1 mM PMSF επί 12 ώρες στους 4°C. Στη συνέχεια τα δείγματα συμπυκνώνονται σε συμπυκνωτή Speed Vac μέχρι όγκου 40 μl, χωρίζονται στα δύο και αναλύονται με ανοσοαποτύπωση για την ανίχνευση της προθυμοσίνης α και της ιστόνης H1 (Κεφ.2.4.4.).



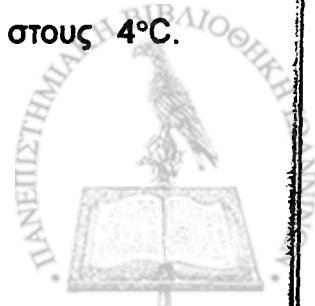
2.5 *In vitro* οργάνωση χρωματίνης

Στάδια:

2.5.1 Παρασκευή πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα (Large-scale preparation)

Για την παρασκευή πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα χρησιμοποιήθηκε 1 ml υλικού καλλιέργειας μικρής κλίμακας η οποία είχε ελεγχθεί και είχε εξακριβωθεί η σωστή ενσωμάτωση του πλασμιδιακού DNA στο βακτήριο ξενιστή. Η καλλιέργεια μικρής κλίμακας έγινε από τη Δρ. Θ. Παπαμαρκάκη και αναπτύχθηκαν μετασχηματισμένα βακτήρια JM-109 τα οποία είναι στέλεχος της *E.coli*. Η παρασκευή πλασμιδιακού DNA μεγάλης κλίμακας γίνεται ακολουθώντας τα επόμενα βήματα σύμφωνα με τη μεθοδολογία των Sambrook, Fritsch and Maniatis, (1989).

- Υλικό καλλιέργειας μικρής κλίμακας όγκου 1 ml ενοθφαλμίζεται σε 500 ml θρεπτικού υλικού Luria-Bertani (LB:1% w/v τρυπτόνη, 0,5% εκχύλισμα ζύμης και 1% w/v NaCl) όπου περιέχονται 100 µg/ml αντιβιοτικών και ακολουθεί επώαση επί 12 ώρες στους 37°C υπό ισχυρή ανάδευση.
- Γίνεται ανάκτηση των πολλαπλασιασμένων βακτηρίων από το καλλιεργητικό υλικό με φυγοκέντρωσή του σε φυγόκεντρο Sorvall (κεφαλή GSA), σε 7000 x g επί 10 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται.
- Το κυτταρικό ίζημα εναιωρείται σε 20 ml διαλύματος λύσης (25 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM γλυκόζη, 10 mM EDTA) στο οποίο μόλις έχουν προστεθεί 5mg /ml λυσοζύμη και αφήνεται στον πάγο επί 30 λεπτά.
- Στο παραπάνω υλικό προσθέτουμε 40 ml φρέσκου διαλύματος 0,2 M NaOH-1% SDS, και αναμιγνύουμε. Στη συνέχεια προσθέτουμε 30 ml διαλύματος CH₃COOK 3 M, pH 4,8 , αναμιγνύουμε και επωάζουμε στον πάγο επί 15 λεπτά.
- Ακολουθεί φυγοκέντρωση σε φυγόκεντρο Sorvall (κεφαλή SS34, φυγοκεντρικοί σωλήνες Corex), σε 7000 x g επί 10 λεπτά στους 4°C ώστε να καταβυθιστεί το χρωμοσωμικό DNA.
- Το υπερκείμενο διηθείται μέσα από διπλωμένη γάζα και τοποθετείται σε ογκομετρικό κύλινδρο. Προσθέτουμε 0,6 όγκους ισοπροπανόλης ώστε να καταβυθιστεί το πλασμιδιακό DNA και φυγοκεντρούμε σε φυγόκεντρο Sorvall (κεφαλή SS34, σωλήνες Corex), σε 8000 x g επί 10 λεπτά στους 4°C.



Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και περιμένουμε 10 λεπτά έως ότου το ίζημα στεγνώσει.

- Το ίζημα διαλύεται σε 9 ml ρυθμιστικού διαλύματος TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 7,6) και αναμιγνύεται με 9 g CsCl και 0,680 ml διαλύματος 3 mg/ml EtBr. Ο συντελεστής διάθλασης του μίγματος θα πρέπει να είναι περίπου 1,3890, διαφορετικά προσθέτουμε TE ή CsCl.
- Φυγοκεντρούμε το μίγμα σε 10000 g (φυγόκεντρος Sorvall, κεφαλή SS34) επί 10 λεπτά στους 4°C ώστε να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες και το RNA. Το υπερκείμενο τοποθετείται σε ειδικές αμπούλες και υποβάλλεται σε νέα φυγοκέντρωση σε 45000 rpm (υπερφυγόκεντρος Beckman L8-70 Ultracentrifuge, USA κεφαλή VTi 65) (170000 g), επί 18 ώρες.
- Η ζώνη η οποία αντιστοιχεί στο πλασμιδιακό DNA συλλέγεται κάτω από ακτινοβολία UV χρησιμοποιώντας σύριγγα 1 ml. Το EtBr απομακρύνεται με εκχύλιση με ίσο όγκο ισοπροπανόλης. Η εκχύλιση επαναλαμβάνεται 6 φορές και ο όγκος του διαλύματος του DNA διατηρείται κάθε φορά ίσος με τον αρχικό με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος TE.
- Για να καταβυθισθεί το πλασμιδιακό DNA προσθέτουμε αρχικά διάλυμα NaCl τελικής συγκέντρωσης 0,8 M και στη συνέχεια 0,6 όγκους ισοπροπανόλης. Αφήνουμε το δείγμα στους -20°C επί 30 λεπτά και αφού απομακρύνουμε το υπερκείμενο περιμένουμε επί 5 λεπτά έως ότου στεγνώσει το ίζημα.
- Το ίζημα διαλύεται σε 300 μl διαλύματος TE και μεταφέρεται σε φυγοκεντρικό σωλήνα Eppendorf. Καταβυθίζεται με προσθήκη αρχικά NaCl τελικής συγκέντρωσης 0,3 M και στη συνέχεια 2 όγκων μεθανόλης. Μετά από 30 λεπτά στους -20°C φυγοκεντρείται σε 16000 x g επί 10 λεπτά (φυγόκεντρος Eppendorf). Το υπερκείμενο απομακρύνεται, το ίζημα εκπλένεται με 70% αιθανόλη, ξηραίνεται στο Speed Vac και διαλύεται σε νερό.
- Η συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA προσδιορίζεται φωτομετρικά στα 260 nm σύμφωνα με τη σχέση :οπτική πυκνότητα(O.D.)₂₆₀ =1, ποσότητα DNA=50 μg. Το DNA αποθηκεύεται στους -20°C.



2.5.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Λόγω του μεγάλου μεγέθους των πόρων της, η πηκτή της αγαρόζης χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό μορίων με μεγάλη υδροδυναμική ακτίνα όπως τα νουκλεϊνικά οξέα.

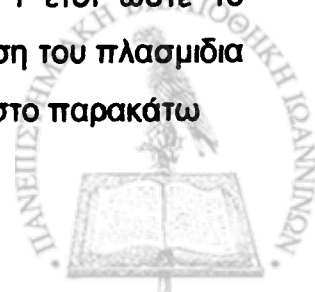
Για τον διαχωρισμό μορίων DNA χρησιμοποιείται πηκτή 0,8% w/v αγαρόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE (5x TBE: 0,089 M Tris, 0,089 M βορικό οξύ, 0,002 M EDTA, pH 8,0). Κατά την παρασκευή της πηκτής μετά το βράσιμο του διαλύματος της αγαρόζης προστίθεται στο διάλυμα της 10 µg/ml της φθορίζουσας χρωστικής του βρωμιούχου αιθιδίου η οποία συνδέεται με τα μόρια του DNA. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε οριζόντια συσκευή, στην οποία η πηκτή βρίσκεται καλυμμένη από το ρυθμιστικό διάλυμα TBE. Εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο έντασης 90 V (Τροφοδοτικό EC 105 EC Apparatus Corporation, Florida) και το DNA κινείται προς την άνοδο. Τα δείγματα πριν την τοποθέτησή τους στην πηκτή διαλύονται σε TBE και αραιώνονται 6:1 με διάλυμα δείγματος 6xType III (30% γλυκερόλη, 0,25% μπλέ της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανού της ξυλόλης).

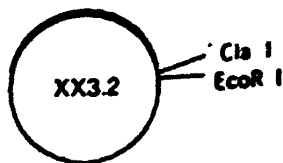
Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης η παρατήρηση του DNA γίνεται με τοποθέτηση της πηκτής σε συσκευή με λάμπες υπεριώδους ακτινοβολίας.

2.5.3 Σύνδεση DNA σε μαγνητικά σφαιρίδια

Μαγνητικά σφαιρίδια πολυστυρενίου συζευγμένα ομοιοπολικά με στρεπταβιδίνη χρησιμοποιούνται ευρέως για την ακινητοποίηση μορίων DNA το οποίο έχει γίνει προηγουμένως ευθύγραμμο και έχει βιοτινυλιωθεί εκλεκτικά στο ένα άκρο του. Το ακινητοποιημένο αυτό DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί ικανοποιητικά για διαδικασίες όπως η δημιουργία χρωματίνης και η *in vitro* μεταγραφή. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pδHSP70 XX3.2 το οποίο περιέχει το γονίδιο της πρωτεΐνης του θερμικού σοκ (*Drosophila hsp 70 gene*). Για τη σύνδεσή του στα μαγνητικά σφαιρίδια ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα (Sandaltzopoulos et al., 1994) (Σχήμα 14Α):

Γίνεται πέψη του πλασμιδίου με το περιοριστικό ένζυμο Cla I έτσι ώστε το πλασμίδιο να γίνει ευθύγραμμο. Η πέψη πραγματοποιείται με επώαση του πλασμιδικού DNA (περιεκτικότητας 2,9 µg DNA/µl) επί 2,5 ώρες στους 37°C στο παρακάτω





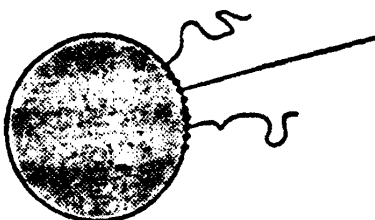
1. Πέψη προορισμού



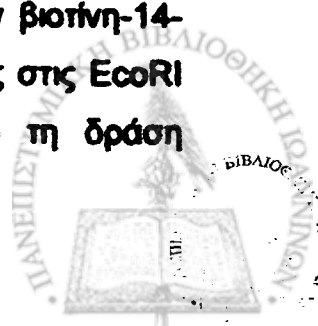
2. Συμπύκνωση άκων, χρωματισμός μικροσκοπικού ηθιού



3. Σύνδεση με Dynabeads M-280 σφαίριτσες



Σχήμα 14Α: Διαδικασία σύνδεσης γραμμικού DNA σε μαγνητικά σφαιρίδια (Sandaltzopoulos et al., 1994). Το πλασμίδιο που περιείχε το *hap 70* γονίδιο (8kb), διασπάστηκε σε δύο κομμάτια με *EcoRI* (E) και *Cla I* (C) έτσι ώστε να προκύψουν δύο τεμάχια ένα μεγάλο και ένα μικρό (21 bp). Στα άκρα προστέθηκαν βιοτίνη-14-dATP και α-θειό-dNTPs (S), έτσι ώστε να συνδεθούν επιλεκτικά βιοτίνες στις *EcoRI* θέσεις (γεμάτοι κύκλοι) και να προστατευθούν τα δύο άκρα από τη δράση εξωνουκλεασών.



μίγμα:

26,2 μl H₂O

5 μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος ενζύμου

13,8 μl (40 μg) DNA

5 μl Cla I (10U/μl, Amersham, LIFE SCIENCE)

50 μl

Ο έλεγχος της πέψης γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης (Κεφ. 2.5.2) και σύγκριση της κινητικότητας DNA επωασμένου με το ένζυμο και ανέπαφου DNA.

- Πραγματοποιείται πέψη του ευθύγραμμου πλασμιδιακού DNA με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI οπότε προκύπτουν ένα μεγάλο τμήμα DNA (~6,2Kb) το οποίο θα ακινητοποιηθεί στα μαγνητικά σφαιρίδια και ένα μικρό τμήμα DNA (21bp). Η πέψη γίνεται προσθέτοντας στο παραπάνω μίγμα τα εξής:

94 μl H₂O

11 μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος ενζύμου

5 μl EcoRI (12U/μl, Promega)

110 μl

Η επώαση γίνεται στους 37°C επί 12 ώρες.

- Το DNA καταβυθίζεται με προσθήκη οξικού αμμωνίου σε τελική συγκέντρωση 750 mM, αιθανόλης σε τελική περιεκτικότητα 70% v/v, ανάμιξη, επώαση στον πάγο επί 10 λεπτά και φυγοκέντρηση επί 15 λεπτά στα 14000 x g. Απομακρύνεται το υπερκείμενο, το ίζημα εκπλένεται με 500 μl 70% v/v αιθανόλη και ξηραίνεται επί 5 λεπτά στο Speed Vac. Το DNA διαλύεται σε 40 μl ρυθμιστικού διαλύματος TE (10mM Tris, 1mM EDTA pH 8,0, pH 7,6).
 - Γίνεται σύνδεση βιοτινυλιωμένων νουκλεοτιδίων (biotin-14-dATP, biotin-21-dUTP) στα δύο τμήματα του DNA (6,2 kb και 21 bp), στο 3'-άκρο της θέσης πέψης του EcoRI. Τα άκρα των τμημάτων του DNA προστατεύονται από τη δράση εξονουκλεασών με την σύνδεση α-thio-νουκλεοτιδίων (α-thio-dNTPs). Η προσθήκη των νουκλεοτιδίων πραγματοποιείται με την επίδραση της Klenow πολυμεράσης στο παρακάτω μίγμα:
- 40 μl DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα TE
- 7,5 μl 0,4 mM biotin-14-dATP (τελική συγκέντρωση 0,045 mM)
- 6 μl 0,5 mM biotin -21-UTP (τελική συγκέντρωση 0,045 mM)
- 1,2 μl 10mM α-thio-dCTP (τελική συγκέντρωση 0,18 mM)



1,2 μ l 10mM a-thio-dGTP (τελική συγκέντρωση 0,18 mM)

6,5 μ l 10x ρυθμιστικού διαλύματος ενζύμου

3,5 μ l Klenow πολυμεράση (5U/ μ l, Amersham LIFE SCIENCE)

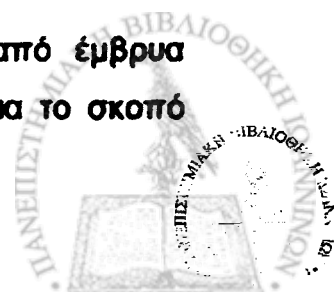
65,9 μ l

Γίνεται επώαση στους 37°C επί 2 ώρες.

- Το μίγμα χρωματογραφείται σε στήλη μοριακού ηθμού (NICK SPIN COLUMNS, Sephadex G-50, DNA-grade, Pharmacia), έτσι ώστε να απομακρυνθούν τα μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια και το μικρό τμήμα του DNA. Η στήλη εξισορροπείται με ρυθμιστικό διάλυμα TE, το δείγμα τοποθετείται στο κέντρο της στήλης και ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με φυγοκέντρηση στα 3000 rpm (500 g) επί 4 λεπτά σε επιτραπέζια φυγόκεντρο. Το βιοπνυλιωμένο μεγάλο τμήμα του DNA (6,2 kb) εκλούεται καθαρό.
- Ακολουθεί σύνδεση του DNA στα μαγνητικά σφαιρίδια (Dynabeads M-280 Streptavidin). Τα σφαιρίδια επανακωρούνται καλά και 1 ml ακωρήματος ($6-7 \times 10^8$ Dynabeads/ml) χρησιμοποιείται για την σύνδεση 40 μ g DNA. Το ακώρημα τοποθετείται σε κατάλληλο μαγνητικό πεδίο (DynaI Magnetic Particle Concentrator, MCP-E) όπου τα μαγνητικά σφαιρίδια συσπειρώνονται σχηματίζοντας ίζημα ενώ το υπερκείμενο απομακρύνεται. Τα μαγνητικά σφαιρίδια εκπλένονται μία φορά με 300 μ l διαλύματος PBS, 0,01%BSA, 0,05% NP-40 και δύο φορές με 300 μ l διαλύματος 2x Wash Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 2 M NaCl). Η σύνδεση του DNA στα μαγνητικά σφαιρίδια γίνεται με επανακώρηση των σφαιριδίων σε 2x Wash Buffer το οποίο περιέχει το καθαρό τμήμα του DNA και ανακίνηση σε περιστροφικό αναδευτήρα επί 12 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τα μαγνητικά σφαιρίδια συσπειρώνονται σε μαγνήτη, το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα σφαιρίδια επανακωρούνται σε 400 μ l 2x Wash Buffer (1 μ g DNA/10 μ l Buffer). Διατηρούνται στους 4°C για ένα μήνα τουλάχιστον.

2.5.4 Ανασύσταση χρωματίνης σε ακινητοποιημένο DNA

Η συγκρότηση της χρωματίνης γίνεται παρουσία εκχυλίσματος από έμβρυα *Drosophila* το οποίο περιέχει όλους τους απαραίτητους παράγοντες για το σκοπό



αυτό. Η χρωματίνη που σχηματίζεται με αυτόν τον τρόπο μοιάζει με τη φυσιολογική χρωματίνη ως προς το επαναλαμβανόμενο μήκος του νουκλεοσώματος (απόσταση μεταξύ γειτονικών νουκλεοσωμάτων), την πολυπλοκότητα, την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και σε ενζυμικές δραστηριότητες. Η χρήση DNA ακινητοποιημένου σε μαγνητικά σφαιρίδια για την δημιουργία χρωματίνης παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα. Η χρωματίνη διαχωρίζεται εύκολα και γρήγορα από τα υπόλοιπα συστατικά του εκχυλίσματος και μπορεί να υποστεί επαναλαμβανόμενες εκπλύσεις.

Η ανασύσταση της χρωματίνης γίνεται σύμφωνα με τη με τη μέθοδο των Becker et al., (1992) στο παρακάτω μίγμα το οποίο ανακινείται σε περιστροφικό αναδευτήρα επί 6 ώρες στους 26°C:

DREX-χρωματίνη

i) Ρυθμιστικό διάλυμα εκχυλίσματος (EX-50):	56 μ l
ii) Ρυθμιστικό διάλυμα αναγέννησης ενέργειας (McNAP):	12 μ l
iii) Εκχύλισμα <i>Drosophila</i> πρώιμου σταδίου (DREX):	40 μ l
iv) Ιστόνη H1 (1 μονάδα ιστόνης H1/ μ l):	2 μ l
v) DNA-σφαιρίδια (1 μ g):	<u>10 μl</u>
Τελικός όγκος:	120 μ l

i) Το ρυθμιστικό διάλυμα εκχυλίσματος αποτελείται από 10 mM Hepes, pH 7,6, 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,5 mM EGTA, 10% γλυκερόλη, 10 mM β -φωσφορική γλυκερόλη, 0,05% NP-40.

ii) Η απαραίτητη για τη δημιουργία χρωματίνης ενέργεια παρέχεται από ένα συμπυκνωμένο 10 φορές μίγμα το οποίο πρέπει να έχει παρασκευαστεί πρόσφατα και περιέχει 30 mM ATP, 30 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 300 mM φωσφοκρεατίνη (CP, Boehringer Mannheim) και 10 μ g/ml κινάση της φωσφοκρεατίνης (CPK, Boehringer Mannheim). Η κινάση της φωσφοκρεατίνης διατηρείται σε συγκέντρωση 20 μ g/ml σε 0,1 M ιμιδαζόλης pH 6,6, στους $-80^\circ C$ για διάστημα όχι μεγαλύτερο του ενός μήνα. Η κάθε ποσότητα διαλύματος ξεπαγώνεται μία μόνο φορά.

iii) Το εκχύλισμα *Drosophila* πρώιμου σταδίου απομονώνεται από έμβρυα *Drosophila* ηλικίας 0-100 λεπτών (Προσφορά του Dr. P. Becker, EMBL, Heidelberg). Η κατάλληλη ποσότητα για τη δημιουργία χρωματίνης προσδιορίζεται για κάθε παρτίδα εκχυλίσματος με ανάλυση της σχηματισμένης χρωματίνης με μικροκοκκική νουκλεάση (Κεφ.2.5.5). Οι ποσότητες που απαιτούνται για τον σχηματισμό



χρωματίνης με επαναλήψιμο επαναλαμβανόμενο μήκος νουκλεοσώματος όμοιου μ'αυτού της φυσιολογικής χρωματίνης κυμαίνονται από 40 έως 60 μl εκχυλίσματος.

iv) Ως μία μονάδα ιστόνης H1 ορίζεται η ποσότητα της ιστόνης που αυξάνει την απόσταση των γειγονικών νουκλεοσωμάτων κατά 20 ζεύγη βάσεων (bp) όπως αυτή προσδιορίζεται μετά από ανάλυση με μικροκοκκική νουκλεάση (Κεφ.2.5.5). Η ιστόνη H1 που χρησιμοποιείται προέρχεται είτε από θύμο μόσχου (Boehringer Mannheim) ή από *Drosophila* (Προσφορά του Dr. P. Becker, EMBL, Heidelberg).

v) Πριν τη χρήση τους τα σφαιρίδια του DNA εκπλένονται με 150 μl διαλύματος PBS, 0,01% BSA, 0,05% NP-40 και με 150 μl EX-50-0,05% NP-40. Τα σφαιρίδια προστίθενται τελευταία στο υπόλοιπο μίγμα.

Αν, μετά το τέλος της επώασης, επιθυμούμε να απομακρύνουμε την ιστόνη H1 από τη χρωματίνη, εκπλένουμε δύο φορές με 150 μl ρυθμιστικού διαλύματος EX-650 (10 mM Hepes, pH 7,6, 650 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 mM EGTA, 10% γλυκερόλη, 10 mM β-φωσφορική γλυκερόλη) 0,02% NP-40 και δύο φορές με 150 μl διάλυμα EX-150-0,02% NP-40 (150 mM σε KCl). Τέλος, τα σφαιρίδια με την ακινητοποιημένη χρωματίνη ακωρούνται σε 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 150mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,02% NP-40.

Με την ίδια ακριβώς διαδικασία δημιουργείται χρωματίνη (LEX-χρωματίνη) πάνω σε μαγνητικά σφαιρίδια χρησιμοποιώντας εκχυλίσματα *Drosophila* μεταγενέστερου σταδίου (Late-extract). Τα εκχυλίσματα αυτά προέρχονται από έμβρυα *Drosophila* 2-6 ωρών και στερούνται δομικών ιστονών. Για τον λόγο αυτό προσθέτουμε 1 μg από τις δομικές ιστόνες (Boehringer Mannheim) ανά μg DNA στο μίγμα της αντίδρασης ανασύστασης της χρωματίνης.

2.5.5 Ανάλυση χρωματίνης με μικροκοκκική νουκλεάση

Η μικροκοκκική νουκλεάση είναι ένα ένζυμο το οποίο κόβει εκλεκτικά τη χρωματίνη στο συνδετικό DNA ανάμεσα στα νουκλεοσώματα. Μερική πέψη της χρωματίνης με το ένζυμο έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό μόνο-, δι-, και ολιγο-νουκλεοσωμάτων (θραύσματα χρωματίνης). Μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης τα θραύσματα της χρωματίνης παρουσιάζουν τη μορφή "κλίμακας" DNA (DNA ladder) (Σχήμα 14B). Ο σχηματισμός μιας κανονικής "κλίμακας" DNA είναι απόδειξη ότι η ανασύσταση της χρωματίνης είναι ικανοποιητική και συγχρόνως μας επιτρέπει να





Σχήμα 14B: Ανάλυση με μικροκκοκική νουκλεάση χρωματίνης που έχει ανασυσταθεί με εκχύλισμα από έμβρυα από *Drosophila* M: Μάρτυρες μοριακού βάρους 123 bp. Ο άσπρος κύκλος δείχνει το DNA που αντιστοιχεί στο τετρανουκλεόσωμα.

υπολογίσουμε το επαναλαμβανόμενο μήκος του νουκλεοσώματος (Nucleosome Repeat Length, NRL). Το NRL δηλώνει την απόσταση μεταξύ γειτονικών νουκλεοσωμάτων και προσδιορίζεται με σύγκριση του DNA θραυσμάτων της χρωματίνης με "κλίμακα μάρτυρα" γνωστών μεγεθών DNA (Σχήμα 14B). Η διαδικασία της ανάλυσης της χρωματίνης με τη μικροκοκκική νουκλεάση περιλαμβάνει σύμφωνα με τους Becker and Wu (1992) τα παρακάτω βήματα:

- Γίνεται ανασύσταση χρωματίνης με εκχύλισμα εμβρύου *Drosophila* όπως περιγράφεται στο Κεφ. 2.5.4. χρησιμοποιώντας όμως 1 μg DNA σε διάλυμα (αντί ακινητοποιημένου DNA σε μαγνητικά σφαιρίδια).
- Στο παραπάνω μίγμα ανασύστασης της χρωματίνης όγκου 120 μl προσθέτουμε 180 μl μίγματος μικροκοκκικής νουκλεάσης το οποίο περιέχει 168 μl διαλύματος EX-50 (10 mM HEPES, pH 7,6, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl_2 , 0,5 mM EGTA, 10% γλυκερόλη, 10 mM β -φωσφορική γλυκερόλη), 9 μl διαλύματος 100 mM CaCl_2 και 3 μl μικροκοκκικής νουκλεάσης (50U/ μl σε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM HEPES, pH 7,6, 1,5 mM MgCl_2 , 0,5 mM EGTA, 10% γλυκερόλη, 10 mM β -φωσφορική γλυκερόλη, Boehringer Mannheim). Το δείγμα επωάζεται αμέσως στους 26°C.
- Μετά από 30 δευτερόλεπτα, 1 και 5 λεπτά, 100 μl απομακρύνονται από την αντίδραση και αναμειγνύονται με 25 μl 5x διαλύματος αναστολής της νουκλεάσης (5x Nuclease Stop: 2,5% Sarkosyl, 100 mM EDTA), οπότε η αντίδραση σταματάει.
- Προστίθεται 1 μl RNase και γίνεται επώαση επί 10 λεπτά στους 37°C
- Ακολουθεί ανάμιξη του κάθε δείγματος με 2 μl 20 % SDS και στη συνέχεια προσθήκη 5 μl πρωτεϊνάσης K. Γίνεται επώαση επί 12 ώρες στους 37°C.
- Προστίθεται 0,5 μl γλυκογόνου (Boehringer Mannheim) σε κάθε δείγμα και το DNA των δειγμάτων καταβυθίζεται με προσθήκη οξικού αμμωνίου τελικής συγκέντρωσης 3 M και δύο όγκων αιθανόλης. Τα δείγματα μένουν στον πάγο επί 10 λεπτά και φυγοκεντρούνται κατόπιν σε 14000 g επί 15 λεπτά σε φυγόκεντρο Eppendorf. Το ίζημα ξηραίνεται με έκθεσή του στον ατμοσφαιρικό αέρα και τα ολιγονουκλεοτίδια που αντιστοιχούν στο DNA ηλεκτροφορούνται.

Ηλεκτροφόρηση ολιγονουκλεοτιδίων

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε πηκτή 1,3% w/v αгарόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris - γλυκίνης (5 mM Tris, 384 mM γλυκίνης) σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης GNA-100, Pharmacia) στην οποία η πηκτή βρίσκεται καλυμμένη με το παραπάνω

ρυθμιστικό διάλυμα. Για να αναλυθεί το DNA διαλύεται σε 5 μl διάλυμα δείγματος (5x:50% γλυκερόλη, 5 mM EDTA, 0,3% orange G, αραίωση σε TE). Ως μάρτυρας μοριακού βάρους χρησιμοποιείται "κλίμακα" DNA η οποία περιέχει κομμάτια DNA που διαφέρουν μεταξύ τους κατά 123 ζεύγη βάσεων (Gibco, Life Technologies). Εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο τάσης 80-100 V επί 3 περίπου ώρες. Η πηκτή βάφεται σε 1 μl /ml διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου επί 30 λεπτά και αποχρωματίζεται με ανακίνηση σε H₂O επί 10 λεπτά. Το DNA γίνεται ορατό κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία.

2.6.Κυτταροκαλλιέργειες

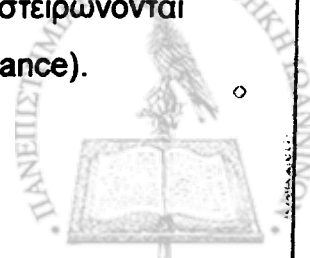
2.6.1. Κυτταρικές σειρές και συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η ανθρώπινη κυτταρική σειρά HeLa και η κυτταρική σειρά NIH3T3 από έμβρυο ποντικού. Οι πληροφορίες για τις κυτταρικές σειρές και τις συνθήκες καλλιέργειάς τους προέρχονται από την Αμερικανική Κυτταρική Συλλογή (American Type Culture Collection, ATCC).

Τα κύτταρα HeLa έχουν μορφολογία επιθηλίου και προέρχονται από ασθενή με καρκίνωμα μήτρας. Αναπτύσσονται προσκολλούμενα σε σταθερό υπόστρωμα και καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό DMEM με 10% ορό εμβρύου βοός.

Τα NIH3T3 κύτταρα προέρχονται από υποκλωνοποίηση της σειράς Swiss/3T3 και έχουν χαρακτηριστικά ινοβλαστών. Καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό DMEM με 10% ορό εμβρύου βοός, προσκολλούμενα σε σταθερό υπόστρωμα.

Ο χειρισμός των κυτάρων γίνεται σε εστία κάθετης νηματικής ροής (Gelman Instrument Laminar Air Flow Hood class 100), ώστε να εξασφαλίζεται περιβάλλον απομονωμένο από την ατμόσφαιρα προς αποφυγή μολύνσεων. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε επωαστικό κλίβανο (ASSAB Medicin AB T 304 GF, Stockholm, Sweden) στον οποίο η θερμοκρασία διατηρείται σταθερή στους 37°C, επικρατούν συνθήκες υγρασίας και η ατμόσφαιρα είναι εμπλουτισμένη με 5% CO₂ ώστε να ρυθμίζεται σε σταθερή τιμή το pH στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας. Τα γυαλικά και πλαστικά που χρησιμοποιούνται περισσότερες από μία φορές, αποστειρώνονται επί 30 λεπτά στους 121°C σε αυτόκαυστο (Subtil/Crepieux, Chassieu, France).



Το θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma) διαλύεται υπό ανάδευση στο νερό και στη συνέχεια προστίθενται 3,7 g/l NaHCO_3 ώστε να ρυθμιστεί το pH σε φυσιολογικά επίπεδα (pH 7,2). Στη συνέχεια αποστειρώνεται σε συσκευή της MILLIPORE με διήθηση μέσα από φίλτρο και προφίλτρο (Millipore, Bedford, MA), και ελέγχεται ως προς τη στεριότητά του με την παραμονή του στον επωαστικό κλίβανο για 36 ώρες. Φυλλάσσεται στους 4°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί. Πριν τη χρήση του εμπλουτίζεται με L-γλουταμίνη (Sigma) σε τελική συγκέντρωση 4 mM και γίνεται προσθήκη των αντιβιοτικών Garamycin (Gentamycin sulfate, Schering-Plough) και Fungizone (Amphotericin B, Sigma) σε τελικές συγκεντρώσεις 80 µg/ml και 0,5 mg/ml αντίστοιχα. Στο υλικό προστίθεται ορός από έμβρυο (Fetal Calf Serum) (Seromed, Sera Lab, Gibco BRL) σε τελική συγκέντρωση 10% v/v. Ο ορός έχει προηγουμένως απενεργοποιηθεί με θέρμανσή του στους 58°C επί 45 λεπτά.

Για την έκπλυση των κυτταρικών σειρών χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) το οποίο έχει την ακόλουθη σύσταση: 139 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,37 mM Na_2HPO_4 , 0,44 mM KH_2PO_4 , 4,16 mM NaHCO_3 , 5,56 mM γλυκόζη. Το διάλυμα μετά την παρασκευή του αποστειρώνεται όπως και το θρεπτικό μέσο και διατηρείται στους 4°C έως ότου χρησιμοποιηθεί.

2.6.2 Ανάπτυξη, διατήρηση και αποθήκευση κυτταρικών σειρών

Τα κύτταρα καλλιεργούνται στην ίδια φιάλη (flask, Nunc Roskilde, Denmark) μέχρι να αναπτυχθούν σε πλήρες ταπήτιο οπότε μοιράζονται σε περισσότερες φιάλες για να επανακαλλιεργηθούν σύμφωνα με την παρακάτω διαδικασία :

- Απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα εκπλένονται δύο φορές με διάλυμα HBSS (Κεφ.2.6.1.) και προστίθεται διάλυμα 0,25% τρυψίνης (Gibco, BRL) αρκετό για να καλύψει την επιφάνεια της φιάλης.
- Η τρυψίνη απομακρύνεται όταν παρατηρηθεί με τη βοήθεια του μικροσκοπίου ανάστροφης φάσης (OLYMPUS CK2) αποκόλληση των κυττάρων (μετά από 1 λεπτό περίπου). Προστίθεται DMEM με 10% FCS και τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται επί 10 λεπτά στα 1000 rpm, σε επτραπέζια φυγόκεντρο Hettisch Universal.



- Τα κυτταρικά συσσωματώματα διασπώνται με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur και επανακαλλιεργούνται αφού προσδιοριστεί ο αριθμός τους και ελεχθεί η βιωσιμότητά τους. Η βιωσιμότητα εξακριβώνεται με ανάμιξη εναιωρήματος κυττάρων με ίσο όγκο διαλύματος της χρωστικής trypan blue (0,4% w/v σε φυσιολογικό ορό). Το μίγμα τοποθετείται σε αιμοκυτταρόμετρο (TIEFE 0.2 mm, FUHS-ROSENTAL, FEIN-OPTIK, Ανατολική Γερμανία) και παρατηρείται στο μικροσκόπιο. Το trypan blue διαπερνά την πλασματική μεμβράνη των νεκρών κυττάρων που εμφανίζονται μαύρα σε αντίθεση με τα ζωντανά που παρουσιάζουν φωτεινότητα.

Για την μακροχρόνια διατήρησή τους τα κύτταρα αποθηκεύονται σε υγρό άζωτο στους -192°C . Η διαδικασία αποθήκευσης έχει ως εξής:

- Τα κύτταρα συλλέγονται με τρυπινοποίηση, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, όταν βρίσκονται σε εκθετική φάση ανάπτυξης.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 1000 rpm επί 10 λεπτά και επαναιώρηση σε συγκέντρωση 2×10^6 κύτταρα/ml σε διάλυμα 90% ορού εμβρύου βοός -10% DMSO (Ferak), το οποίο έχει διηθηθεί σε φίλτρα Sartorius 0,2 μm
- Ογκος αιωρήματος 1 ml τοποθετείται σε φιαλίδιο ψύξης Nunc και τοποθετείται στους -70°C επί 24 ώρες και στη συνέχεια σε δοχείο υγρού αζώτου (-192°C) όπου και διατηρείται.

Κατά την επανακαλλιέργεια των κυττάρων ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

- Τα κύτταρα απομακρύνονται από το υγρό άζωτο και ξεπαγώνουν αμέσως στους 37°C . Προστίθεται θρεπτικό υλικό χωρίς ορό και γίνεται φυγοκέντρηση στα 1000 rpm επί 10 λεπτά.
- Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε DMEM-10% ορό εμβρύου βοός και τοποθετούνται σε φιάλη καλλιέργειας για να επανακαλλιεργηθούν.

2.6.3. Συγχρονισμός της κυτταρικής σειράς HeLa

i) Συγχρονισμός των κυττάρων στη φάση G0 του κυτταρικού κύκλου

Η παρουσία ορού εμβρύου βοός στο θρεπτικό υλικό παρέχει όλους τους απαραίτητους παράγοντες ανάπτυξης (growth factors) για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Στέρηση του ορού για μικρό χρονικό διάστημα από το θρεπτικό υλικό έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων και τη συσώρευση



τους στη φάση G0 χωρίς όμως να επηρεάζεται η βιωσιμότητά τους. Συγκεκριμένα ο συγχρονισμός πραγματοποιείται ως εξής:

- Τα κύτταρα καλλιεργούνται μέχρι τη δημιουργία πλήρους ταπήτητου.
- Απομακρύνεται το πλήρες θρεπτικό υλικό (DMEM-10% FCS) και προστίθεται νέο υλικό στο οποίο δεν περιέχεται ορός. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων επί 36 ώρες.
- Τα κύτταρα τα οποία βρίσκονται στη G0 φάση του κυτταρικού κύκλου συλλέγονται μετά από τρυψινοποίηση (Κεφ. 2.6.2.), εκπλένονται με HBSS και χρησιμοποιούνται για περαιτέρω πειραματικές διαδικασίες.

ii) Συγχρονισμός των κυττάρων στη μίτωση

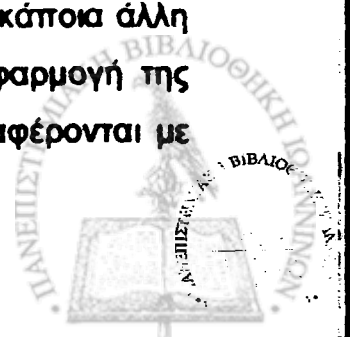
Για τον συγχρονισμό των κυττάρων στη μίτωση χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο νοκοδαζόλη (nocodazole, Sigma) το οποίο εμποδίζει το σχηματισμό των μικροσωληνίσκων αναστέλλοντας έτσι την κανονική διαίρεση των κυττάρων. Κύτταρα τα οποία επωάζονται με νοκοδαζόλη προχωρούν στη μεσόφαση αλλά η ανάπτυξή τους σταματά στην αρχή της μίτωσης (Zieve et al., 1980).

Για τον συγχρονισμό των κυττάρων στη μίτωση ακολουθείται η παρακάτω πορεία:

- Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε φιάλες καλλιέργειας σε θρεπτικό μέσο DMEM-10%FCS μέχρι να καλυφθεί το 70% της ταπήτητου της φιάλης.
- Στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων προστίθενται 50 ng/ml νοκοδαζόλης επί 12 ώρες. Τα μίωτικά κύτταρα τα οποία εμφανίζονται πιο στρογγυλά από τα υπόλοιπα συγκρατούνται χαλαρά στον πυθμένα της φιάλης. Αποκολούνται εκλεκτικά από τον πυθμένα της φιάλης καλλιέργειας μετά από έντονη ανακίνησή της.
- Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται σε 1000 rpm επί 10 λεπτά, το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα εκπλένεται με ρυθμιστικό διάλυμα HBSS (Κεφ.2.6.1.).

2.7 Τεχνική αποτύπωσης προσδέματος (ligand blotting)

Η ανίχνευση των πρωτεϊνών με την τεχνική της αποτύπωσης προσδέματος βασίζεται στην ικανότητά τους να συνδέονται ειδικά με κάποιο άλλο μόριο το οποίο μπορεί να ανιχνευθεί εύκολα. Το μόριο αυτό (πρόσδεμα) είναι συνήθως κάποια άλλη πρωτεΐνη ή πεπτιδίο ή ακόμη και κάποιο νουκλεϊκό οξύ. Κατά την εφαρμογή της τεχνικής αυτής οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση και μεταφέρονται με



την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Στη συνέχεια οι ακινητοποιημένες πάνω στην μεμβράνη πρωτεΐνες ανιχνεύονται μέσω της σύνδεσής τους με το πρόσδεμα.

Ειδικότερα, σύμφωνα με τους Georgatos and Blobel (1987) ακολουθούνται τα παρακάτω στάδια:

- Δείγματα που περιέχουν 0,1-1 μg ιστόνη H1 από θύμο μόσχου (Boehringer Mannheim), ή υποκυτταρικό κλάσμα πυρήνων που αντιστοιχεί σε 40 μg ολικής πρωτεΐνης (απομονωμένη από τη Δρ. Θ. Παπαμαρκάκη σύμφωνα με τους Aaronson & Blobel, (1975)) αναλύονται σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου (Κεφ.2.2.3.1.).
- Οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης διαμέτρου πόρων 0,45 μm (BA-S 83 Reinforced NC, Schleicher & Schuell), σε ηλεκτρικό πεδίο 30 V επί 3,5 ώρες. Χρησιμοποιείται διάλυμα μεταφοράς που περιέχει 25 mM Tris, 192 mM γλυκίνη, 0,1% SDS, 20% CH_3OH , pH 8,3).
- Η μεμβράνη εκπλένεται με διάλυμα TBST (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,9% NaCl, 0,1% Tween 20) τρεις φορές επί 10 λεπτά. Στη συνέχεια τοποθετείται σε TBST-0,4% ζελατίνη επί 12 ώρες έτσι ώστε να καλυφθούν οι κενές θέσεις.
- Η μεμβράνη επωάζεται με διάλυμα του κατάλληλου προσδέματος σε TBST-0,4% ζελατίνη επί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Σαν πρόσδεμα χρησιμοποιείται είτε μη ιχνηθετημένη προθυμοσίνη α από θύμο μόσχου, ή βιοτινυλιωμένη προθυμοσίνη α (ευγενική προσφορά της Δρ. Κ. Κονδύλη) καθώς και βιοτινυλιωμένα πεπτιδία της (Κεφ.2.3.4.).
- Γίνεται έκπλυση της μεμβράνης με διάλυμα TBST-0,4% ζελατίνης, 3 φορές επί 10 λεπτά.
- Ακολουθεί ανίχνευση του προσδέματος ανάλογα με το είδος του. Όταν το πρόσδεμα είναι η μη ιχνηθετημένη προθυμοσίνη α , η μεμβράνη επωάζεται με το anti- α αντίσωμα της προθυμοσίνης α και η ανίχνευσή της γίνεται όπως ακριβώς κατά την διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης της (Κεφ. 2.4.4). Στην περίπτωση που το πρόσδεμα έχει υποστεί βιοτινυλίωση, η μεμβράνη επωάζεται με στρεπταβιδίνη συζευγμένη με ραφανιδική υπεροξειδάση (streptavidin-HRP conjugate, Amersham). Η στρεπταβιδίνη αραιώνεται 1:40000 σε TBST-0,4% ζελατίνη και η επώαση διαρκεί μία ώρα.



- Η μεμβράνη εκπλένεται όπως περιγράφεται παραπάνω και η αντίδραση εμφανίζεται με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL)(Κεφ.2.9.)

Στην περίπτωση που οι πρωτεΐνες αναλύονται σε πηκτή ουρίας σε όξινο pH, ακολουθείται η ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι μετά την ηλεκτροφόρηση γίνεται επώαση της πηκτής στο διάλυμα μεταφοράς επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

2.8 Τεχνική αποτύπωσης κηλίδων

Η τεχνική αποτύπωσης κηλίδων είναι όπως και η ηλεκτρομεταφορά μια μέθοδος σύνδεσης των πρωτεϊνών πάνω σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια για την ανίχνευσή τους. Πλεονεκτεί έναντι της ηλεκτρομεταφοράς στο ότι δεν προηγείται αποδιάταξη των πρωτεϊνών σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου και συνεπώς η δομή της πρωτεΐνης διατηρείται ως έχει. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης για την τοποθέτηση πεπτιδίων πάνω στην μεμβράνη.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

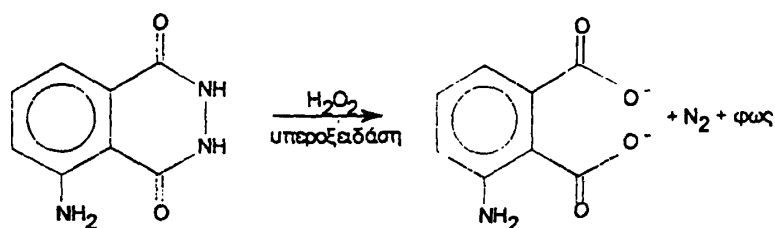
- Σε κατάλληλη συσκευή (BIO-DOT, APPARATUS, Bio-Rad), τοποθετούνται δύο χαρτιά Whatman τα οποία έχουν εμβαπτισθεί σε απεσταγμένο νερό. Πάνω στα χαρτιά τοποθετείται μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (BA-S 83 Reinforced NC, Schleicher & Schuell), η οποία έχει ενεργοποιηθεί με βύθιση της σε νερό.
- Στις θέσεις τοποθέτησης δείγματος εισάγονται 50 μl PBS, τα οποία απομακρύνονται στη συνέχεια υπό κενό.
- Δείγματα όγκου 50 μl αρακωμένα σε PBS τοποθετούνται στις κατάλληλες θέσεις και παραμένουν πάνω στην μεμβράνη επί 30 λεπτά.
- Το διάλυμα των δειγμάτων απομακρύνεται υπό κενό και στις θέσεις των δειγμάτων τοποθετούμε και απομακρύνουμε διαδοχικά δύο φορές PBS και μία φορά TBST. Η μεμβράνη απομακρύνεται από τη συσκευή και εκπλένεται με TBST δύο φορές επί 5 λεπτά.
- Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με TBST-0,4% ζελατίνη επί 12 ώρες ώστε να καλυφθούν οι κενές της θέσεις.
- Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται είτε με το κατάλληλο αντίσωμα και η ανίχνευση προχωρά όπως περιγράφηκε στη διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης



(Κεφ.2.4.4), είτε με στρεπταβιδίνη συζευγμένη με ραφανιδική υπεροξειδάση σε αραιώση 1:40000 σε TBST-0,4% ζελατίνη. Η επώαση διαρκεί μία ώρα και το σήμα της αντίδρασης εμφανίζεται με ECL (Κεφ.2.9.)

2.9. Τεχνική ενισχυμένης χημειοφωταύγειας

Σε ορισμένες χημικές αντιδράσεις σχηματίζονται προϊόντα τα οποία βρίσκονται σε διηγεμένη κατάσταση υψηλής ενέργειας. Τα προϊόντα αυτά καθώς αποδιεγείρονται μεταπίπτουν στη θεμελιώδη κατάσταση εκπέμποντας ακτινοβολία και το φαινόμενο αυτό ονομάζεται χημειοφωταύγεια. Η τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας στηρίζεται στην ανίχνευση της ακτινοβολίας που εκπέμπεται κατά την αποδιέγερση ενός παραγώγου της λουμινόλης. Η λουμινόλη οξειδώνεται από την υπεροξειδάση παρουσία H_2O_2 σε αλκαλικές συνθήκες σύμφωνα με την παρακάτω χημική αντίδραση:



Αμέσως μετά την οξείδωση η λουμινόλη βρίσκεται σε διηγεμένη κατάσταση και στη συνέχεια καταλήγει στη θεμελιώδη κατάσταση μέσω εκπομπής ακτινοβολίας. Η εκπομπή της ακτινοβολίας ενισχύεται περίπου 1000 φορές και η διάρκειά της παρατείνεται όταν η αντίδραση γίνεται παρουσία χημικών ενισχυτών όπως οι φαινόλες. Η μέγιστη ακτινοβολία η οποία παρατηρείται 5-20 λεπτά μετά την αντίδραση έχει μήκος κύματος 428 nm και ανιχνεύεται μετά από σύντομη έκθεση σε φιλμ αυτοραδιογραφίας (ECL Western blotting protocols, Amersham LIFE SCIENCE).

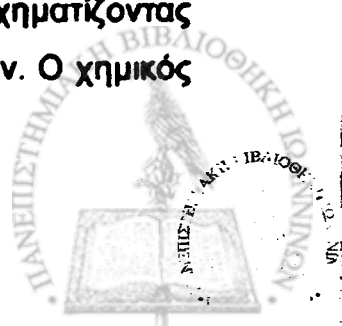
Η ανίχνευση σήματος με την τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:



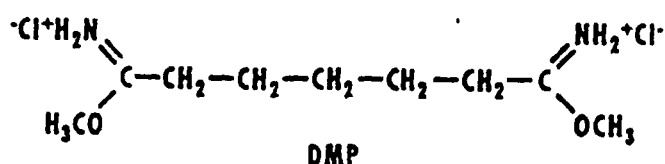
- Η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης πάνω στην οποία έχουν μεταφερθεί οι πρωτεΐνες και η οποία έχει επωασθεί είτε με το πρώτο αντίσωμα (Κεφ.2.4.4, 2.7), είτε με βιοτινυλκωμένο πρόσδεμα (Κεφ.2.7) εκπλένεται τρεις φορές επί 10 λεπτά με TBST-0,4% ζελατίνη.
- Στη συνέχεια επωάζεται είτε με αντιγόνο αιγός έναντι ανοσοσφαιρινών κουνελιού συζευγμένο με ραφανιδική υπεροξειδάση (goat anti-rabbit IgG-horseradish-peroxidase) (Κεφ. 2.4.4., 2.7) , είτε με στρεπταβιδίνη συζευγμένη με ραφανιδική υπεροξειδάση (Streptavidin-horseradish peroxidase) (Κεφ. 2.7).
- Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης (RNP 2109 ECL Western blotting detection reagent, Amersham) επί 1 λεπτό (0,125 ml υποστρώματος/cm² μεμβράνης). Η μεμβράνη τοποθετείται σε πλαστικό κάλυμμα (Saran wrap) και εκτίθεται σε φωτογραφικό φιλμ (Kodak X-OMAT/AR).
- Γίνεται εμφάνιση του φιλμ με τοποθέτηση του στο διάλυμα εμφάνισης (Kodak LX24, x-ray developer), επί 3 λεπτά και σταθεροποίηση του σήματος με τοποθέτηση του στο διάλυμα σταθεροποίησης (Kodak AL 4, x-ray fixer) επί 7 λεπτά.

2.10. Ομοιοπολική διασύνδεση μορίων (Cross-linking)

Η διασύνδεση (cross-linking) δύο μορίων, δηλαδή η εισαγωγή γεφυρών ομοιοπολικής φύσης μεταξύ τους, είναι ένας τρόπος να εξακριβωθεί ότι τα δύο μόρια όταν βρίσκονται σε διάλυμα σχηματίζουν σύμπλεγμα το οποίο σταθεροποιείται παρουσία του διασυνδετή (cross-linker). Τα μόρια διασυνδετές περιέχουν τουλάχιστον δύο δραστικές ομάδες κάθε μία από τις οποίες αντιδρά με ένα από τα συστατικά του συμπλέγματος σχηματίζοντας διαμοριακά ομοιοπολικά διμερή (cross-links). Τα διμερή αυτά και συνεπώς και η ύπαρξη συμπλέγματος μεταξύ δύο πεπτιδίων ανιχνεύεται μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδιου με την εμφάνιση καινούργιων πρωτεϊνικών ζωνών υψηλότερου μοριακού βάρους. Το διμεθυλοπιμελιδό-ιμιδικό οξύ (dimethylpimelimidate, DMP) που χρησιμοποιούμε ως διασυνδετή ανήκει στην κατηγορία των ιμιδοεστέρων και δρα σχηματίζοντας αμιδικούς δεσμούς με πρωτοταγείς αμινομάδες πεπτιδίων και πρωτεϊνών. Ο χημικός τύπος του DMP είναι ο εξής:



DMP
Dimethylpimelimidate·HCl



Η διαδικασία της διασύνδεσης έχει ως εξής:

- Τα μόρια που θα συνδεθούν επωάζονται σε διάλυμα 0,1 M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ (pH 7,0) επί 10 λεπτά ώστε να σχηματίσουν σύμπλεγμα. Το pH του δείγματος ρυθμίζεται με την προσθήκη διαλύματος Na₃BO₃, pH 9, τελικής συγκέντρωσης 1 M. Ακολουθεί προσθήκη διαλύματος DMP (Pierce), ώστε η τελική του συγκέντρωση στο δείγμα να είναι 20 mM, και επώαση επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Η αντίδραση σταματά με προσθήκη διαλύματος Tris-HCl, pH 7,4 σε τελική συγκέντρωση 80 mM. Τα δείγματα αναμιγνύονται με 4x ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος και ακολουθεί βρασμός στους 100°C και ηλεκτροφόρησή τους σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου (Κεφ.2.2.3.1.)

Η προσθήκη του διαλύματος DMP πρέπει να γίνεται αμέσως μετά την παρασκευή του γιατί ο χρόνος ημιζωής του αντιδραστηρίου είναι πολύ μικρός.



3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

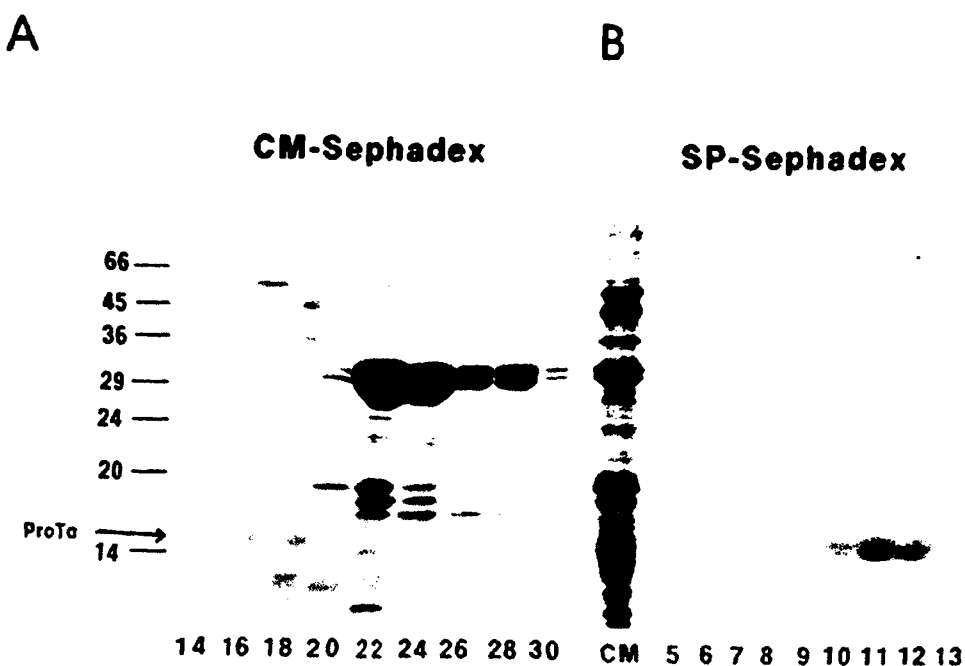
3.1 Απομόνωση πρωτεϊνών

3.1.1 Απομόνωση προθυμοσίνης α από θύμο μόσχου

Η απομόνωση της προθυμοσίνης α έγινε από θύμο μόσχου σύμφωνα με τη μέθοδο της Δρ. Θ. Παπαμαρκάκη (Karetsou et al., 1998), η οποία βασίζεται σε συνδυασμό των μεθόδων των Haritos et al., (1984), Watts et al., (1989), και Komiyama et al., (1986). Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τη χρησιμοποίηση μεγάλων ποσοτήτων ιστού δίνοντας μας τη δυνατότητα να παρασκευάζουμε μεγάλες ποσότητες προθυμοσίνης α σε σύντομο χρονικό διάστημα.

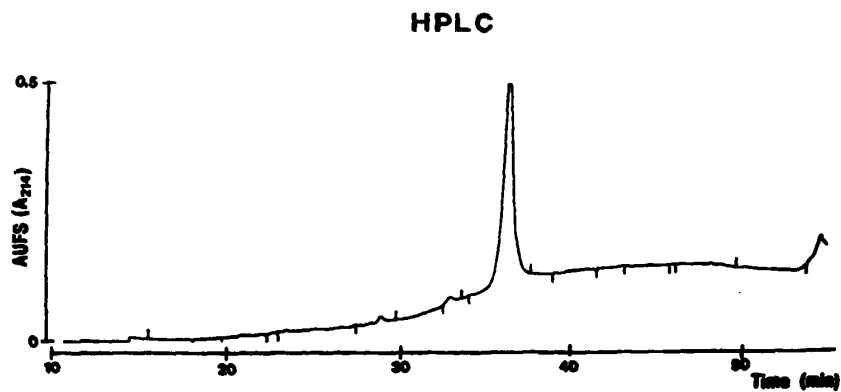
Η διαδικασία που ακολουθήθηκε (Κεφ. 2.1) περιλαμβάνει κονιορτοποίηση του ιστού, βράσιμο, ομογενοποίηση και οξίνισή του σε pH 2,8. Στη συνέχεια το όξινο ενακώρημα φυγοκεντρήθηκε και το υπερκείμενο αφού συμπυκνώθηκε χρωματογραφήθηκε σε στήλη ιονανταλλαγής CM-Sephadex C-25 σε pH 8,8. Ακολούθησε δεύτερη χρωματογραφία ιονανταλλαγής σε στήλη SP-Sephadex G-25 σε pH 4,5.

Τα κλάσματα που εκλούσθηκαν από τη CM-Sephadex στήλη ελέχθηκαν για την παρουσία προθυμοσίνης α με ηλεκτροφόρησή τους σε πηκτή 15% SDS-πολυακρυλαμίδιου παράλληλα με μάρτυρες μοριακών βαρών (Κεφ. 2.2.3.1.). Λόγω του χαμηλού ισοηλεκτρικού της σημείου η προθυμοσίνη α αποκτά αρνητικό φορτίο στο pH έκλουσης της στήλης (pH έκλουσης 8,8), με αποτέλεσμα να αποσυνδέεται από τη στήλη και να ανακτάται στα πρώτα κλάσματα (Σχήμα 15(A), κλάσματα 14-18). Διαχωρίζεται έτσι από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες και κινείται κατά την ηλεκτροφόρηση με φαινόμενο μοριακό βάρος 30 kD (Σχήμα 15 (A), κλάσματα 22-30). Τα κλάσματα που περιείχαν την προθυμοσίνη α αναμίχθηκαν, συμπυκνώθηκαν, διαλύθηκαν σε 3 ml 5 mM HCl-0,02%NaN₃ και υπεβλήθηκαν σε διαπίδυση έναντι του ίδιου διαλύματος. Στη συνέχεια χρωματογραφήθηκαν σε στήλη SP-Sephadex G-25 σε pH 4,5. Μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή 15% SDS-πολυακρυλαμίδιου παρατηρήθηκε ότι η προθυμοσίνη α συλλέγεται στα πρώτα κλάσματα (Σχήμα 15 (B), κλάσματα 9-12), ενώ το μεγαλύτερο μέρος των άλλων πρωτεϊνών παραμένει συνδεδεμένο στη στήλη. Όπως φαίνεται μετά από χρώση της πηκτής η προθυμοσίνη α εκλύεται από τη δεύτερη στήλη χρωματογραφίας χωρίς προσμίξεις. Το σύνολο των κλασμάτων που περιείχαν την προθυμοσίνη α συμπυκνώθηκαν στο Speed Vac



Σχήμα 15: Ανάλυση σε 15% SDS-PAGE των κλασμάτων που εκκλύονται μετά τη χρωματογραφία σε στήλες ιοντοανταλλαγής. (A) Στήλη CM-Sephadex: 15 μl/4 ml κλάσματος ηλεκτροφορούνται όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.2.3.1. (B) Στήλη SP-Sephadex: Διαδρομή CM, 6 μl από συμπυκνωμένο δείγμα που τοποθετήθηκε στη CM-Sephadex στήλη. Διαδρομές 5-13, 15 μl / 1 ml κλάσματος από τη στήλη SP-Sephadex. Η παρατήρηση των πρωτεϊνών γίνεται μετά από χρώση με Coomassie Blue. Οι μάρτυρες των μοριακών βαρών που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: αλβουμίνη ορού βοός (66 kDa), αλβουμίνη ωός (45 kD), δεϋδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (36kD), καρβονική ανυδράση (29kD), τρυψινογόνο (24 kD), αναστολέας τρυψίνης (20,1kD), α-λακταλβουμίνη (14,2 kDa).

και χρωματογραφήθηκαν σε στήλη αντίστροφης φάσης C18 σε HPLC (Κεφ. 2.1). Στο χρωματογράφημα παρουσιάζεται μία μόνο πρωτεϊνική κορυφή (Σχήμα 16) η οποία αντιστοιχεί σε κλάσματα που προσδιορίζονται με τη μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού πρωτεϊνών με φλουορεσκαμίνη (Κεφ.2.2.1.1). Ο ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης γίνεται μετά από ανάλυση των αμινοξέων της όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.2.2. (Πίνακας 2). Η απόδοση της μεθόδου είναι περίπου 33μg πρωτεΐνης/g ιστού.



Σχήμα 16: Χρωματογραφική ανάλυση με HPLC της προθυμοσίνης α που απομονώθηκε με τη μέθοδο της Δρ. Θ. Παπαμαρκάκη. Χρησιμοποιήθηκε στήλη χρωματογραφίας Ultrasphere ODS C18. Η έκλουση των πολυπεπτιδίων έγινε με βαθμίδωση CH_3CN -0,05% TFA σε H_2O -0,05% TFA (Κεφ.2.2). Η ανίχνευση των πολυπεπτιδίων έγινε παρακολουθώντας την απορρόφηση στα 214 nm και η ευαισθησία ήταν 0,64 AUFS.

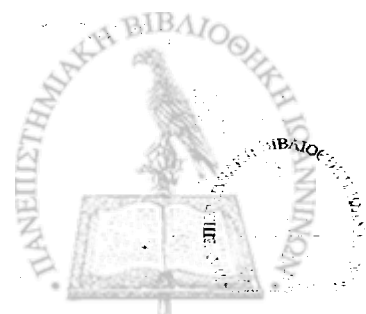


ΠΙΝΑΚΑΣ 2

Ανάλυση ούρων για την παρουσία ούρων

Σύσταση αμινοξέων προθυμοσίνης α

Αμινοξύ	Ιστός	
	Θύμος μύσχα	Σπλήνα αγός ¹
Asp	29,1	25
Glu	36,9	38
Ser	1,3	3
Gly	9,7	9
His	0	-
Thr	3,2	6
Ala	10,9	10
Arg	2,3	2
Pro	2,1	2
Tyr	0	-
Val	6,6	6
Met	0	-
Cys	0	-
Ile	0,8	1
Leu	1,0	1
Phe	0	-
Lys	6,9	9
Σύνολο	110,8	112

¹ Φριλίγγος, 1990

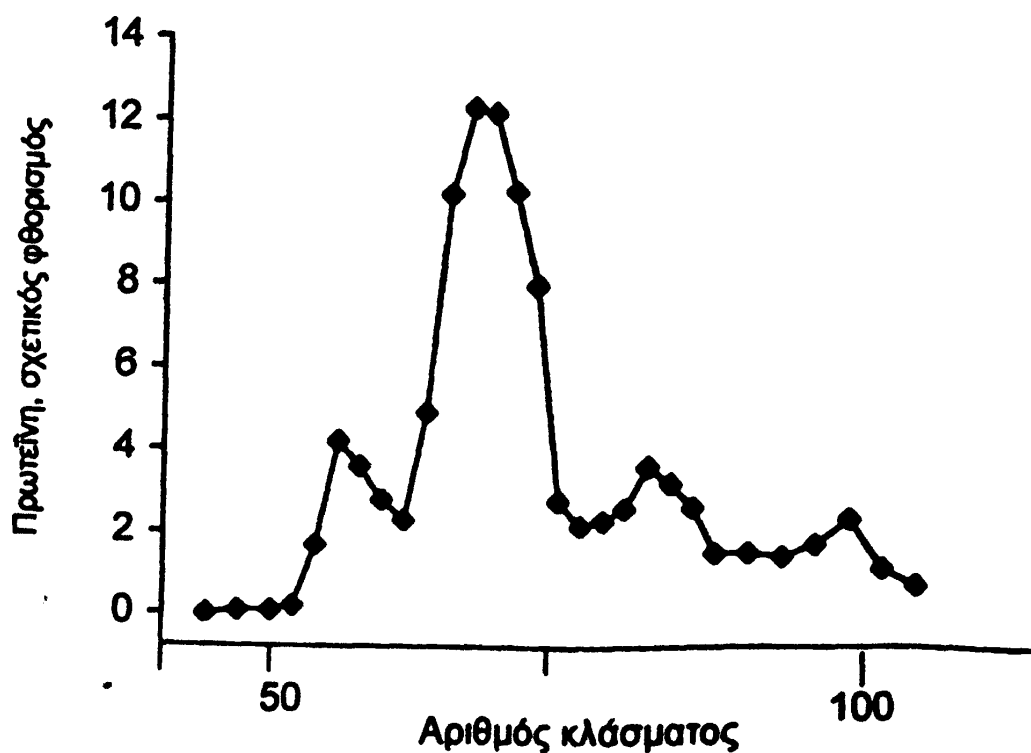
3.1.2 Απομόνωση προθυμοσίνης α από θύμο χοίρου

Η προθυμοσίνη α απομονώθηκε από θύμο χοίρου σύμφωνα με τη μεθοδολογία των Haritos et al. (1985), Komiyama et al. (1986) και Economou et al. (1988), (Κεφ.2.1). Η διαδικασία απομόνωσης περιελάμβανε κονιορτοποίηση του ιστού σε υγρό άζωτο, βρασμό, ομογενοποίηση, φυγοκέντρηση και οξίνιση του υπερκειμένου σε pH 2,8. Ακολούθησε νέα φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο συμπυκνώθηκε και η πρωτεΐνη απομονώθηκε μετά από δύο βήματα χρωματογραφίας: i) μοριακής διήθησης (Sephacryl S-200) ii) υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).

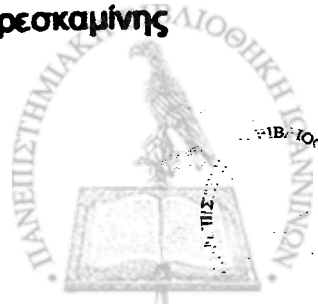
Η χρωματογραφία στη στήλη Sephacryl S-200, με διαλύτη έκλουσης ρυθμιστικό διάλυμα μυρμηγκικού οξέος-πυριδίνης έδωσε τρεις διακριτές περιοχές πρωτεϊνών (Σχήμα 17, κλάσματα 62-78, 82-90, 96-106), οι οποίες προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο του ποσοτικού προσδιορισμού των πρωτεϊνών με φλουορεσκαμίνη (Κεφ.2.2.1.1). Μετά από ανάλυση των κλασμάτων της χρωματογραφίας σε πηκτή 15% SDS-πολυακρυλαμιδίου και χρώση της πηκτής με Coomassie Blue, είδαμε ότι η πρώτη περιοχή περιέχει κυρίως την ιστόνη H1, ενώ η προθυμοσίνη α περιέχεται μαζί με άλλες πρωτεΐνες στη δεύτερη περιοχή (κλάσματα 82-90), η οποία ονομάζεται περιοχή α (Σχήμα 18).

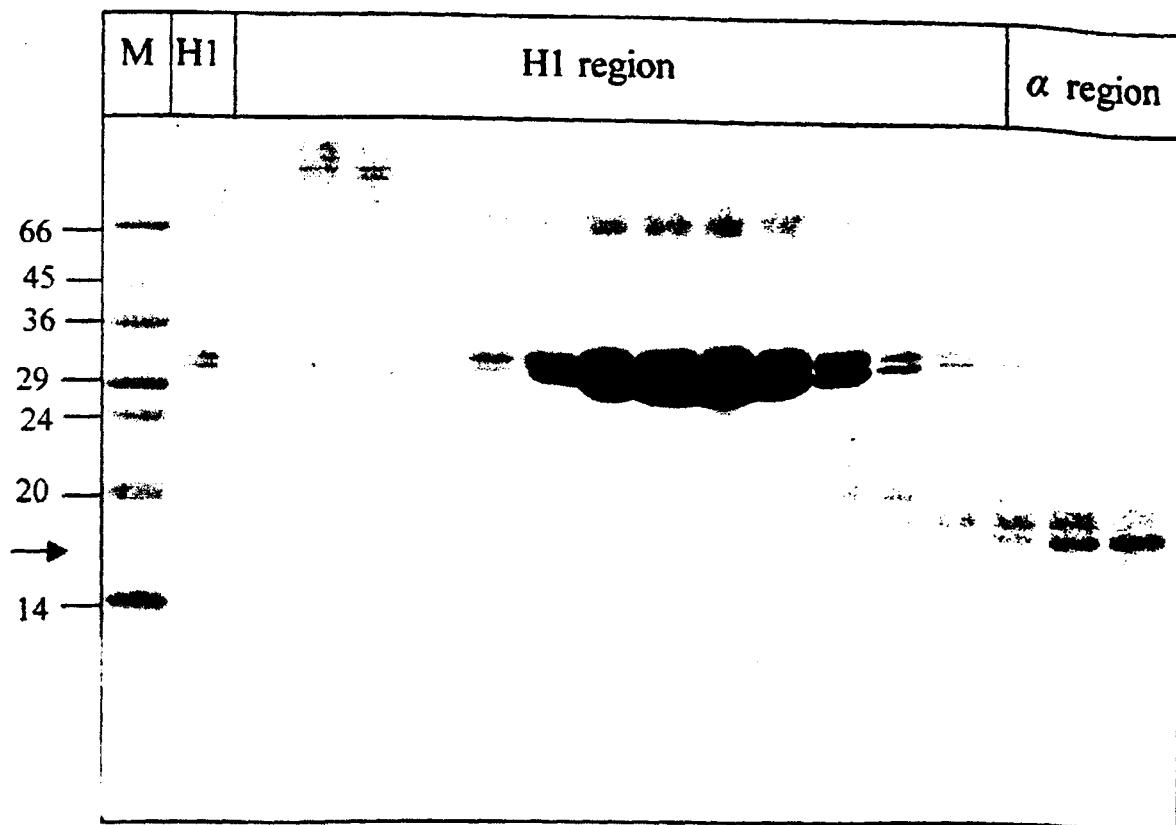
Τα κλάσματα που αντιστοιχούσαν στην περιοχή α, αναμίχθηκαν, συμπυκνώθηκαν και χρωματογραφήθηκαν με HPLC σε στήλη αντίστροφης φάσης C-18 με σύστημα έκλουσης που περιλαμβάνει ακετονιτρίλιο-0,05%TFA και νερό-0,05%TFA (Κεφ.2.1). Η έκλυση των πρωτεϊνών παρατηρήθηκε βάση της απορρόφησής τους στα 214 nm. Όπως φαίνεται στο χρωματογράφημα (Σχήμα 19), υπάρχουν δύο κύριες πρωτεϊνικές κορυφές οι οποίες εκλούνται σε χρόνους 31,47 και 39,93 λεπτά. Τα κλάσματα που περιέχουν τις αντίστοιχες πρωτεΐνες προσδιορίστηκαν με ακρίβεια με τη μέθοδο της φλουορεσκαμίνης. Η προθυμοσίνη α εντοπίστηκε στα κλάσματα της περιοχής των 39,93 λεπτών μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή 15% SDS-πολυακρυλαμιδίου παράλληλα με μάρτυρες μοριακών βαρών. Η ποσότητα της πρωτεΐνης προσδιορίστηκε μετά από ανάλυση αμινοξέων.





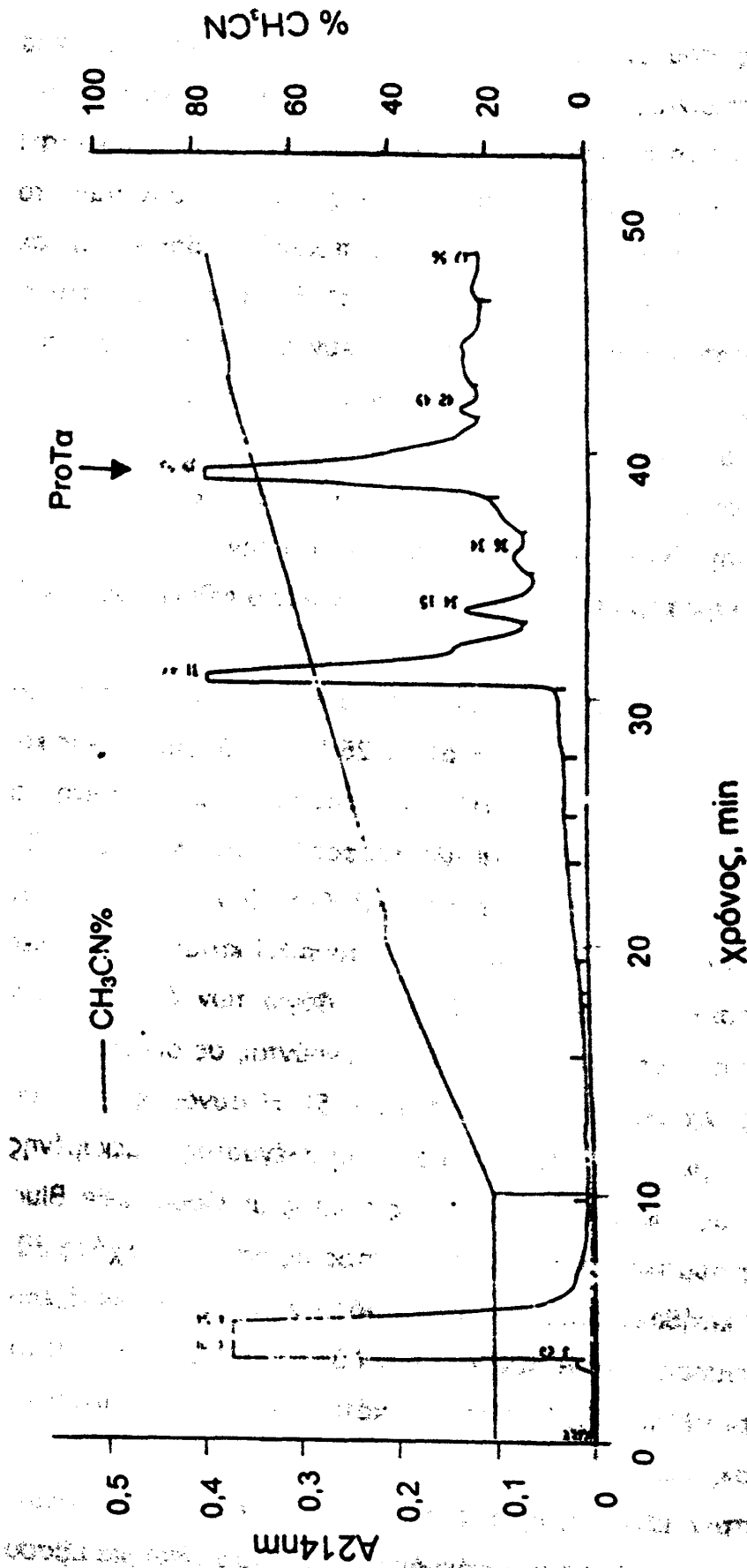
Σχήμα 17: Χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε στήλη *Sephacryl S-200* (1,5 cm x 90 cm) του όξινου εκχυλίσματος θύμου μόσχου (10 g). Σαν διαλύτης έκλουσης χρησιμοποιήθηκε 1 M φορμικό οξύ –0,2 M πυριδίνη (Κεφ. 2.1). Συλλέχθηκαν κλάσματα 0,9 ml από τα οποία χρησιμοποιήθηκαν 40 μl για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης με τη μέθοδο της φλουορεσκαμίνης (Κεφ.2.2.1.1).





Σχήμα 18: Ανάλυση σε 15% SDS-PAGE των κλασμάτων που εκλούσθηκαν μετά από χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε στήλη Sephacryl S-200 και αντιστοιχούν στην περιοχή της ιστόνης H1 και στην περιοχή α. Η περιοχή έκλουσης της προθυμοσίνης α εντοπίστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου (Κεφ. 2.2.3.1), 30μl/900 μl κλάσματος. Οι πρωτεΐνες εμφανίστηκαν μετά από χρώση της πηκτής με Coomassie Blue.





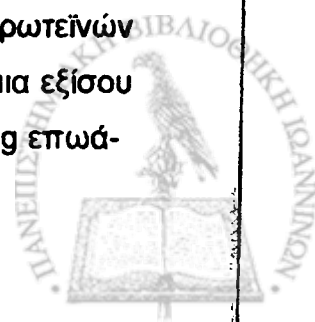
Σχήμα 19: Χρωματογραφική ανάλυση της περιοχής α με HPLC. Η έκλυση των πεπτιδίων έγινε με βαθμίδωση ακετονιτρίλιου - 0,05% TFA σε νερό - 0,05 % TFA (Κεφ.2.1). Η ροή ήταν 1 ml/min και συλλέχθηκαν κλάσματα των 0,5 ml. Η ανίχνευση των πολυπεπτιδίων έγινε παρακολουθώντας την απορρόφηση στα 214 nm, ενώ η ευαισθησία ήταν 0,5 AUFS. Η προθρυμμασία α εκλύεται στα 39,93 λεπτά.

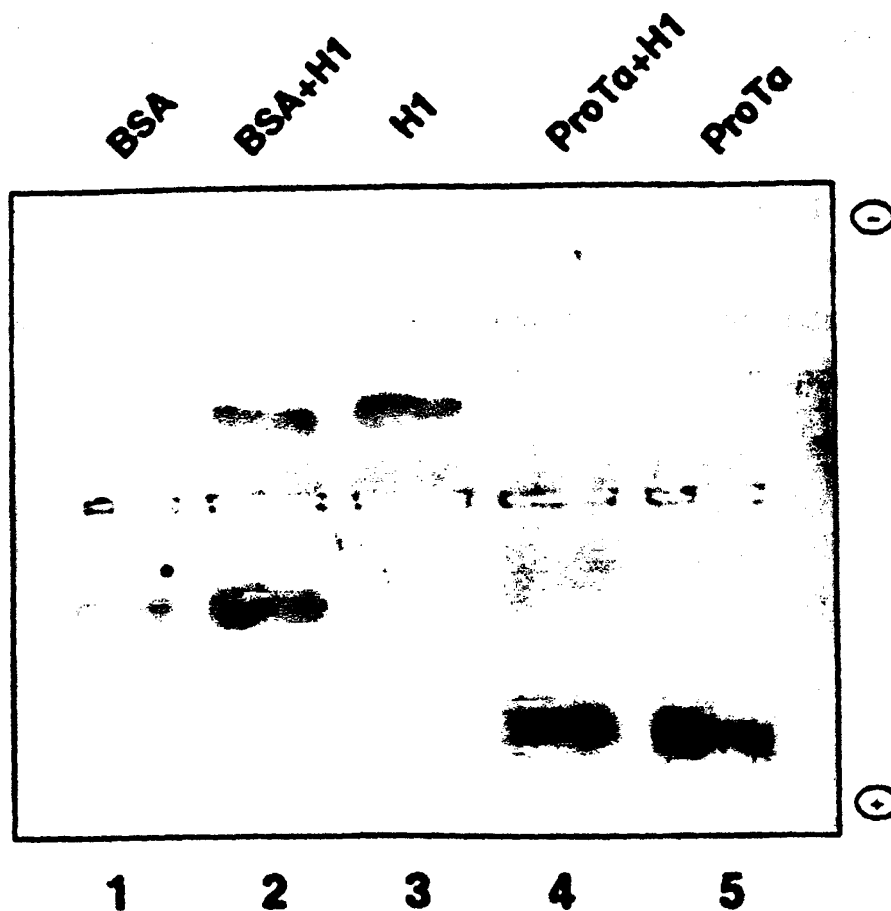
3.2 Αλληλεπίδραση της προθυμοσίνης α με την ιστόνη H1 σε διάλυμα

Σε προηγούμενες μελέτες που έγιναν στο εργαστήριό μας (Paramarcaki and Tsolas., 1994), χρησιμοποιώντας τη μέθοδο αποτύπωσης προσδέματος, διαπιστώθηκε, ότι η προθυμοσίνη α συνδέεται με την ιστόνη H1 όταν η τελευταία βρίσκεται ακινητοποιημένη σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Τέθηκε συνεπώς το ερώτημα, αν η σύνδεση αυτή διατηρείται όταν οι δύο πρωτεΐνες βρίσκονται σε διάλυμα. Έχει παρατηρηθεί, ότι όταν η συνδυαστική ιστόνη H1 βρίσκεται στο διάλυμα επώασης της μεμβράνης δρα ανταγωνιστικά, αναστέλλοντας τη σύνδεση της προθυμοσίνης α του διαλύματος με την ακινητοποιημένη H1 (Paramarcaki and Tsolas, 1994). Η παρατήρηση αυτή, αποτελεί μια έμμεση απόδειξη ότι οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν όταν βρίσκονται σε διάλυμα οπότε και έχουν τη φυσιολογική τους διαμόρφωση. Για να πιστοποιήσουμε άμεσα την αλληλεπίδραση αυτή πραγματοποιήσαμε ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή αгарόζης (Κεφ.2.2.3.2)

Ποσότητα ιστόνης H1 ίση με 2 μg επωάσθηκε με 6 μg προθυμοσίνης α σε διάλυμα 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ pH 6,7, επί 10 λεπτά, στους 25 °C. Το δείγμα καθώς και δείγματα που περιείχαν καθαρή ιστόνη H1 και καθαρή προθυμοσίνη α τοποθετήθηκαν στη μέση πηκτής αгарόζης και ηλεκτροφορήθηκαν (Κεφ. 2.2.3.2), (Σχήμα 20, διαδρομές 3-5). Στην ίδια ηλεκτροφόρηση αναλύθηκε δείγμα που περιείχε αλβουμίνη ορού βοός (BSA) που είχε προεπωασθεί με ιστόνη H1 κάτω από τις ίδιες συνθήκες και το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Λόγω των διαφορετικών ισοηλεκτρικών τους σημείων η προθυμοσίνη α και η H1 κινούνται, σε ουδέτερο pH, προς διαφορετικούς πόλους (Σχήμα 20, διαδρομές 3 και 5). Η σύνδεση των δύο πρωτεϊνών αποδεικνύεται με το σχηματισμό συμπλέγματος μειωμένης ηλεκτροφορητικής κινητικότητας. Μετά από χρώση της πηκτής με Coomassie Blue διαπιστώθηκε ο σχηματισμός συμπλέγματος ιστόνης H1-προθυμοσίνης α (Σχήμα 20, διαδρομή 4). Το σύμπλεγμα κινήθηκε προς τον θετικό πόλο με ταχύτητα μικρότερη από αυτή της καθαρής προθυμοσίνης α. Η σύνδεση των δύο πρωτεϊνών φαίνεται να είναι ειδική καθώς η BSA δεν αλληλεπιδρά με την H1 κάτω από τις ίδιες συνθήκες (Σχήμα 20, διαδρομή 2).

Για να επιβεβαιώσουμε την εξειδίκευση της σύνδεσης των δύο πρωτεϊνών χρησιμοποιήσαμε σαν ένα ακόμη μάρτυρα το κυτόχρωμα c, το οποίο είναι μια εξίσου βασική πρωτεΐνη με την ιστόνη H1. Ποσότητα προθυμοσίνης α, ίση με 6 μg επωά-





Σχήμα 20: Αλληλεπίδραση της προθυμοσίνης α με την ιστόνη H1 υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες. 2 μ g αλβουμίνη βοός (BSA, διαδρομή 1), 2 μ g αλβουμίνη βοός + 2 μ g H1 (BSA + H1, διαδρομή 2), 2 μ g H1 (H1, διαδρομή 3), 6 μ g προθυμοσίνη α + 2 μ g H1 (ProTa + H1, διαδρομή 4), και 6 μ g προθυμοσίνη α (ProTa, διαδρομή 5) επωάστηκαν και ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή 0,75% αγαρόζης (Κεφ.2.2.3.3). Οι πρωτεΐνες εμφανίστηκαν μετά από χρώση της πηκτής με Coomassie Blue. Οι ενδείξεις + και - συμβολίζουν τον θετικό και τον αρνητικό πόλο αντίστοιχα.

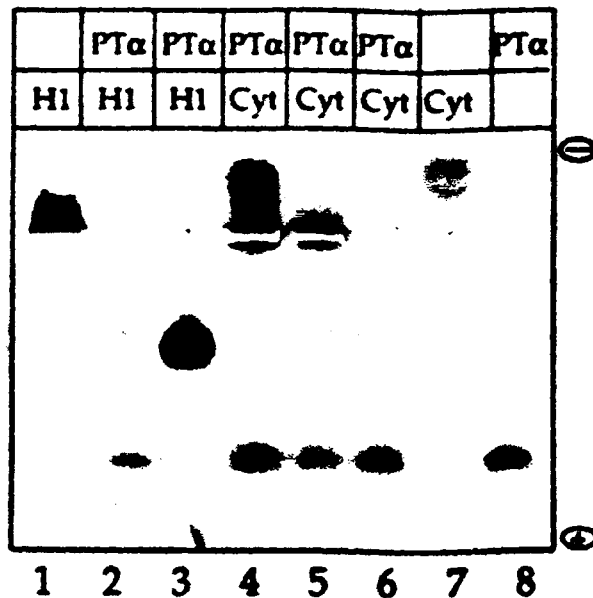
στηκε με αυξανόμενες ποσότητες ιστόνης H1 (Σχήμα 21, διαδρομές 2, 3) και κυτοχρώματος c (Σχήμα 21, διαδρομές 4-6) στις συνθήκες που περιγράφονται πιο πάνω. Μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης παρατηρήθηκε ότι η προθυμοσίνη α συνδέεται με την H1 σχηματίζοντας σύμπλεγμα (Σχήμα 21, διαδρομές 2, 3) αλλά δεν αλληλεπιδρά με το κυτόχρωμα c (σχήμα 21, διαδρομές 5-7). Η μετατόπιση του κυτοχρώματος c επηρεάστηκε παρουσία διπλάσιας και τετραπλάσιας ποσότητας προθυμοσίνης α (σχήμα 21, διαδρομές 5-6), πιθανώς λόγω μη ειδικών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Από την ποσότητα της προθυμοσίνης α που παραμένει ελεύθερη μετά την επώαση των δύο πρωτεϊνών μπορούμε προσεγγιστικά να συμπεράνουμε ότι δύο μόρια προθυμοσίνης α συνδέονται με ένα μόριο H1.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις ενισχύουν την άποψη μιας εξειδικευμένης αλληλεπίδρασης της προθυμοσίνης α με την συνδετική ιστόνη.



στην περίπτωση αυτή, η αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών είναι πιο ισχυρή από
αυτή που παρατηρείται με το ελεύθερο H1.

Η παρουσία των πρωτεϊνών H1 και ProTα σε ένα δείγμα, όπως και η παρουσία των κυτοχρώματων c, μπορεί να οδηγήσει σε αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να είναι διαφορετική από αυτή που παρατηρείται με το ελεύθερο H1. Η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να είναι διαφορετική από αυτή που παρατηρείται με το ελεύθερο H1. Η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να είναι διαφορετική από αυτή που παρατηρείται με το ελεύθερο H1.



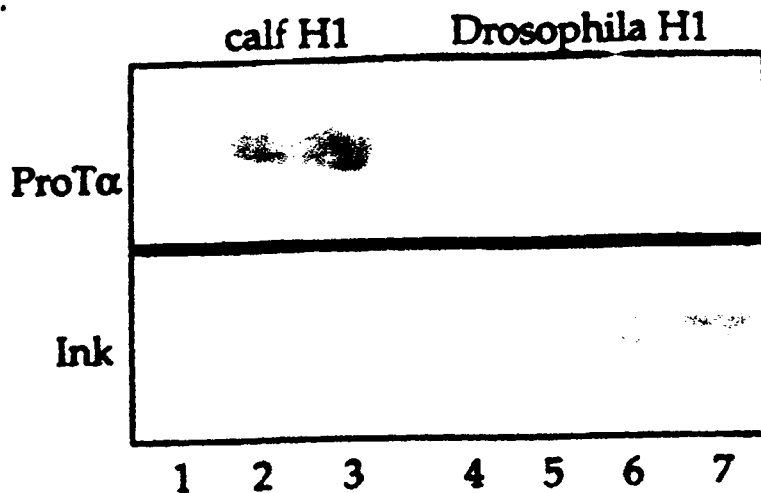
Σχήμα 21: Αλληλεπίδραση προθυμοσίνης α - ιστόνης H1 σε διάλυμα. 3 μg H1 (διαδρομή 1), 1,5 μg H1 + 6 μg ProTα (διαδρομή 2), 3 μg H1 + 6 μg ProTα (διαδρομή 3), 6 μg ProTα + 6, 3 ή 1,5 μg κυτοχρώματος c (Cyt) αντίστοιχα (διαδρομές 4-6), 3 μg κυτοχρώματος c (διαδρομή 7) και 6 μg ProTα (διαδρομή 8) επωάστηκαν σε διάλυμα φωσφορικών και ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή 0,75% αγαρόζης (Κεφ. 2.2.3.3). Οι πρωτεΐνες εμφανίστηκαν μετά από χρώση της πηκτής με Coomassie Blue. Οι ενδείξεις + και - συμβολίζουν τον θετικό και τον αρνητικό πόλο αντίστοιχα.

3.3 Εξάρτηση της αλληλεπίδρασης της προθυμοσίνης α με την ιστόνη H1 από το είδος του οργανισμού.

Σκοπεύοντας να χρησιμοποιήσουμε στις περαιτέρω μελέτες μας για την προθυμοσίνη α σύστημα ανασύστασης της χρωματίνης από έμβρυα *Drosophila*, ελέγξαμε τη σύνδεση της προθυμοσίνης α με ιστόνη H1 από *Drosophila*.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο της αποτύπωσης προσδέματος (ligand blotting) (Κεφ.2.7). Ιστόνη H1 από θύμο μόσχου (0,1-0,4 μg) και *Drosophila* H1 (0,05-0,3 μg) αναλύθηκαν σε πηκτή 15% SDS-πολυακρυλαμιδίου και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης. Η μεμβράνη επώαστηκε με διάλυμα προθυμοσίνης α, 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, επί 1,5 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε επώαση με το anti-ct αντίσωμα της προθυμοσίνης α (1:1000) επί 2 ώρες και με το δεύτερο αντίσωμα έναντι ανοσοσφαιρινών κουνελιού (1:5000), το οποίο ήταν συζευγμένο με ραφανιδική υπεροξειδάση. Το σήμα της αντίδρασης εμφανίστηκε με ECL. Παρατηρήθηκε ότι για ίσες ποσότητες των δύο ιστονών όπως φαίνεται από την πρωτεϊνική τους χρώση με σινική μελάνη (σχήμα 22, ink), το σήμα της αντίδρασης ήταν πολύ ισχυρότερο για την ιστόνη H1 από θύμο μόσχου (σχήμα 22, ProTa). Συνεπώς, η προθυμοσίνη α έχει μεγαλύτερη συγγένεια για την H1 θύμου μόσχου σε σχέση με την H1 της *Drosophila*. Η διαφορά αυτή των δύο ιστονών μπορεί να εξηγηθεί με τις διαφορές στην πρωτοταγή τους δομή. Σε αντίθεση με τις ιστόνες του πυρήνα του νουκλεοσώματος, η οικογένεια των πλούσιων σε λυσίνες ιστονών δεν είναι εξίσου συντηρημένες (Van Holde, 1988), με αποτέλεσμα η *Drosophila* H1 να παρουσιάζει μειωμένη ομολογία με το αντίστοιχο μόριο των θηλαστικών (Wells and Brown, 1991). Η μειωμένη συγγένεια της προθυμοσίνης α για την κατώτερη εξελικτικά H1 της *Drosophila* αποτελεί μια επιπλέον απόδειξη ότι η σύνδεση προθυμοσίνης α - H1 είναι ειδική και δεν οφείλεται αποκλειστικά σε αλληλεπιδράσεις φορτίων.





Σχήμα 22: Η αλληλεπίδραση της προθυμοσίνης α με την ιστόνη H1 είναι ειδική και εξαρτάται από το είδος. Ποσότητες 0,1 0,2 και 0,4 μg H1 θύμου μόσχου (διαδρομές 1-3) και 0,05, 0,1, 0,2, και 0,3 μg H1 *Drosophila* (διαδρομές 4-7) αναλύθηκαν σε 15% SDS-PAGE και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη ντροκυτταρίνης (Κεφ.2.7). Η μεμβράνη επώαστηκε με διάλυμα ProTa 0,2 μg / ml επί 1,5 ώρα. Ακολούθησε επώαση με αντίσωμα anti-ct (1:1000) και στη συνέχεια με αντίσωμα έναντι ανοσοσφαιρινών κουνελιού συζευγμένου με ραφανιδική υπεροξειδάση (1:5000). Η αντίδραση εμφανίστηκε με ECL (ProTa). Κατόπιν η μεμβράνη βάφτηκε με σιλική μελάνη (Κεφ. 2.2.3.5), ώστε να ελεγχθούν οι ποσότητες των πρωτεϊνών που μεταφέρθηκαν στην μεμβράνη (ink).

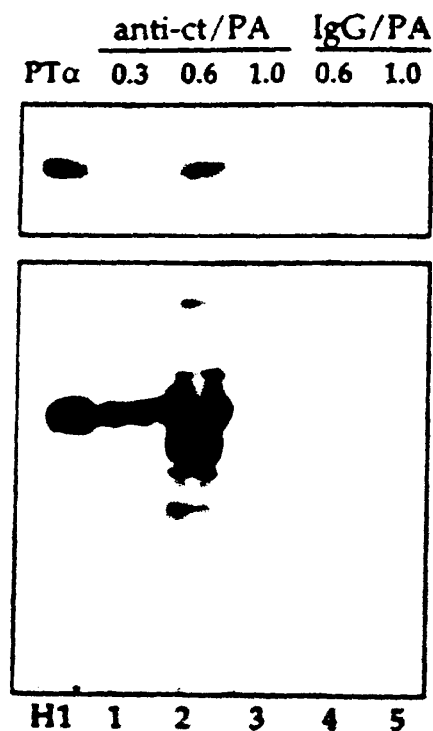


3.4 Απομόνωση του συμπλέγματος προθυμοσίνης α - ιστόνης H1 από εκχύλισμα κυττάρων NIH3T3

Από τις μέχρι τώρα μελέτες μας έχει πιστοποιηθεί η σύνδεση ιστόνης H1 – προθυμοσίνης α *in vitro*. Ωστόσο, αυτή η αλληλεπίδραση δεν αποτελεί απόδειξη για τη σχέση των δύο πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο. Για να διερευνήσουμε την συσχέτιση των πρωτεϊνών *in vivo* προσπαθήσαμε να συναπομονώσουμε την προθυμοσίνη α και την ιστόνη H1 από κυτταρικά εκχυλίσματα. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο της ανοσοαπομόνωσης (immunoprecipitation) (Κεφ. 2.4.5). Η κυτταρική σειρά η οποία επιλέχθηκε για την απομόνωση του συμπλέγματος των δύο πρωτεϊνών ήταν τα κύτταρα ινοβλάστες NIH3T3 στα οποία είχαν βρεθεί τα υψηλότερα επίπεδα προθυμοσίνης α σε σχέση με τις υπόλοιπες διαθέσιμες κυτταρικές σειρές (Βαρέλη, 1995)

Περίληπτικά, η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής (Κεφ. 2.4.5): ειδικό αντίσωμα κατά του καρβοξυτελικού άκρου της προθυμοσίνης α (anti-ct) (Κεφ.2.4.3) συνδέθηκε ομοιοπολικά σε πρωτεΐνη A-Sepharose. Το υλικό αυτό επωάσθηκε με εκχύλισμα NIH3T3 κυττάρων και οι πρωτεΐνες που συνδέθηκαν σ' αυτό εκλούσθηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις NaCl (0,3 M, 0,6 M και 1 M). Τα εκλούόμενα κλάσματα χωρίστηκαν σε δύο μέρη το ένα από τα οποία χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της προθυμοσίνης α και το άλλο για την ανίχνευση της ιστόνης H1. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών έγινε με ανοσοαποτύπωση (Κεφ.2.4.4) χρησιμοποιώντας αντισώματα anti-ct και anti-H1 καθαρισμένα με χρωματογραφία συγγένειας (Κεφ.2.4.3). Παρατηρήθηκε ότι η προθυμοσίνη α εκλύεται στο κλάσμα που αντιστοιχεί σε διάλυμα έκλυσης 0,6 M NaCl (Σχήμα 23, διαδρομή 2) ενώ η ιστόνη H1 βρίσκεται στα κλάσματα που αντιστοιχούν σε 0,3 M και 0,6 M NaCl (Σχήμα 23, διαδρομές 1, 2). Από τα παραπάνω μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η H1 και η προθυμοσίνη α αλληλεπιδρούν μέσα στο κυτταρικό εκχύλισμα. Για να αποκλείσουμε το ενδεχόμενο μη ειδικής σύνδεσης της H1 στη στήλη της πρωτεΐνης A-Sepharose χρησιμοποιήσαμε στήλη μάρτυρα η οποία παρασκευάστηκε από πρωτεΐνη A-Sepharose πάνω στην οποία είχε συνδεθεί ανοσοσφαιρίνη από μη ανοσοποιημένα ζώα (Κεφ.2.4.5). Παρ' όλο ότι η στήλη επωάστηκε με κυτταρικό εκχύλισμα κάτω από τις ίδιες συνθήκες, δεν ανιχνεύθηκε H1 μετά την έκλυση των πρωτεϊνών με NaCl (Σχήμα 23, διαδρομές 4,5).





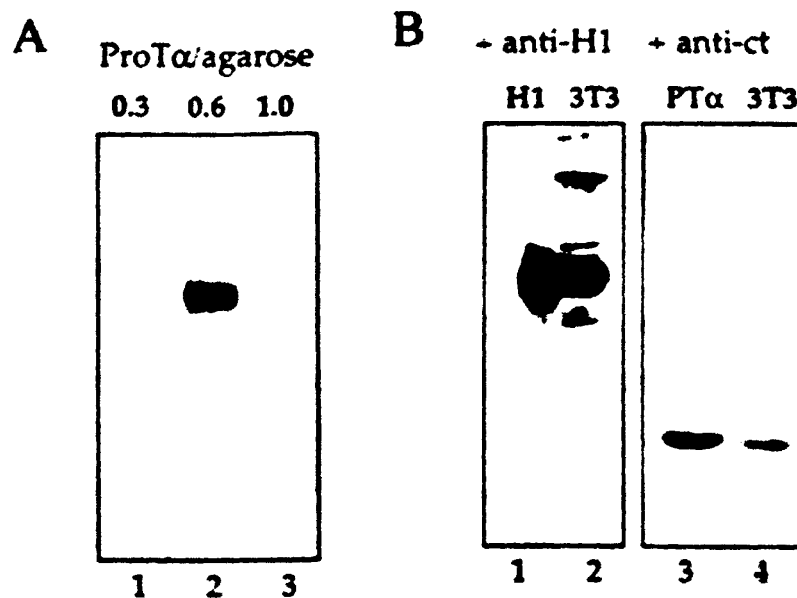
Σχήμα 23: Απομόνωση του συμπλέγματος προθυμοσίνης α-ιστόνης H1 από εκχυλίματα κυτάρων NIH3T3. Ανάλυση με ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών των κλασμάτων που εκλύονται από την anti-ct πρωτεΐνη A-Sepharose στήλη. Τα κλάσματα που εκλούσθηκαν από την anti-ct στήλη (anti-ct / PA) με 0,3, 0,6, και 1 M NaCl (διαδρομές 1-3) και αυτά που εκλούσθηκαν από τη στήλη των μη ειδικών ανοσοσφαιρινών (IgG / PA) με 0,6 και 1 M NaCl (διαδρομές 4,5), χωρίστηκαν σε δύο μέρη. (Ανω): Οι πρωτεΐνες του πρώτου μέρους αναλύθηκαν σε 15% SDS-PAGE και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη ντροκυτταρίνης ενεργοποιημένη με γλουταραλδεύδη (Κεφ. 2.4.4). Η μεμβράνη επωάστηκε με αντίσωμα anti-ct (1:1000) επί 2 ώρες και στη συνέχεια με αντίσωμα κατά ανοσοσφαιρινών κουνελιού (1:5000) συζευγμένου με ραφανιδική υπεροξειδάση, επί 1 ώρα. Διαδρομή PTα, 0,1 μg καθαρής προθυμοσίνης α. (Κάτω): Οι πρωτεΐνες του δεύτερου μέρους των κλασμάτων, αναλύθηκαν επίσης σε πηκτή 15% SDS-PAGE και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη ντροκυτταρίνης (Κεφ. 2.4.5). Η μεμβράνη επωάστηκε με anti-H1 αντίσωμα (1:20) επί 2 ώρες και στη συνέχεια με δεύτερο αντίσωμα όπως παραπάνω. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν καθαρισμένα με χρωματογραφία αγκιστείας (Κεφ.2.4.3). Διαδρομή H1, 0,2 μg καθαρής H1. Η εμφάνιση του σήματος της αντίδρασης έγινε με ECL.

Ακολουθώντας μια δεύτερη πειραματική προσέγγιση, 220 μg προθυμοσίνης α από θύμο μόσχου συνδέθηκαν ομοιοπολικά σε 1 ml σφαιριδίων αгарόζης (Affigel 15, Biorad) και το υλικό αυτό επωάστηκε με εκχύλισμα κυττάρων (Κεφ.2.4.5). Ακολούθησε έκλουση των πρωτεϊνών που συνδέθηκαν στη στήλη με 0,3, 0,6 και 1 M NaCl. Το υλικό που εκλούστηκε από τη στήλη αναλύθηκε σε πηκτή 15% SDS-πολυακρυλαμιδίου και μεταφέρθηκε σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης. Η μεμβράνη επωάστηκε με anti-H1 αντισώμα (Κεφ.2.4.4) σε αραιώση 1:20. Βρέθηκε ότι η ιστόνη H1 συνδέεται με την προθυμοσίνη α και στη συνέχεια εκλύεται στο κλάσμα που αντιστοιχεί σε 0,6 M NaCl (Σχήμα 24 (Α)). Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα της ανοσοαπομόνωσης που προαναφέρθηκαν.

Η εξειδίκευση και η ισχύς των anti-ct και anti-H1 αντισωμάτων που χρησιμοποιήσαμε στις δύο παραπάνω πειραματικές προσεγγίσεις ελέγχθηκε με ανάλυση ιστόνης H1, προθυμοσίνης α , και κυτταρικού εκχυλίσματος από κύτταρα NIH3T3 σε πηκτή 15% SDS-πολυακρυλαμιδίου και ηλεκτρομεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης (Σχήμα 24(B), anti-H1) ή σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης ενεργοποιημένη με γλουταραλδεΐδη (Σχήμα 24 (B), anti-ct) (Κεφ.2.4.5). Οι μεμβράνες επωάστηκαν με τα αντίστοιχα αντισώματα (Κεφ.2.4.4) και το σήμα της αντίδρασης εμφανίστηκε με ECL (Κεφ.2.9.). Η διαφορετική ισχύς των δύο αντισωμάτων μπορεί να εξηγήσει το ισχυρότερο σήμα που παρατηρείται στη μεμβράνη της H1 σε σχέση με αυτή της προθυμοσίνης α κατά την ανοσοαπομόνωση (Σχήμα 23). Προφανώς, η αντίδραση H1-anti-H1 είναι ισχυρότερη σε σχέση με αυτή της προθυμοσίνης α -anti-ct (Σχήμα 24B).

Τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα συνηγορούν για την ύπαρξη της αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών στις φυσιολογικές συνθήκες του κυττάρου. Η αλληλεπίδραση αυτή, ίσως είναι ενδεικτική για το ρόλο της προθυμοσίνης α μέσα στο κύτταρο.





Σχήμα 24: Ανάλυση με αποτύπωση προσδέματος των κλασμάτων που εκλύονται από τη στήλη προθυμοσίνης α-αγαρόζης (ProTα/agarose). (A): Τα κλάσματα που εκλούσθηκαν με 0,3, 0,6 και 1 M NaCl (διαδρομές 1-3) αναλύθηκαν σε 15% SDS-PAGE και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η μεμβράνη επωάσθηκε με anti-H1 αντίσωμα (1:20) καθαρισμένο με χρωματογραφία αγκιστείας (Κεφ.2.4.3) επί 2 ώρες και στη συνέχεια με αντίσωμα συζευγμένο με ραφανιδική υπεροξειδάση (Κεφ.2.4.4). Το σήμα της αντίδρασης έγινε ορατό με ECL. (B): Ελεγχος της εξειδίκευσης του anti-ct και του anti-H1 αντισώματος τα οποία έχουν καθαριστεί με χρωματογραφία συγγένειας. Ποσότητα ιστόνης H1 0,2 μg (διαδρομή 1) και εκχύλισμα 8×10^5 κυττάρων NIH3T3 (διαδρομή 2) αναλύθηκαν σε 15% SDS-PAGE και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση (Κεφ.2.4.4) με το anti-H1 αντίσωμα (1:20). Ανάλογα, 0,2 μg προθυμοσίνης α (διαδρομή 3) και κυτταρικό εκχύλισμα NIH3T3 κυττάρων (8×10^5) (διαδρομή 4), αναλύθηκαν σε 15% SDS-PAGE και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ενεργοποιημένη με γλουταραλδεϋδη. Η μεμβράνη επωάστηκε με το anti-ct αντίσωμα (1:1000) και στη συνέχεια με αντίσωμα έναντι ανοσοσφαιρινών κουνελιού συζευγμένο με ραφανιδική υπεροξειδάση (Κεφ. 2.4.4). Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν καθαρισμένα με χρωματογραφία αγκιστείας. Το σήμα των αντιδράσεων εμφανίστηκε με ECL.

3.5 Ταυτοποίηση των θέσεων αλληλεπίδρασης της προθυμοσίνης α με την ιστόνη H1

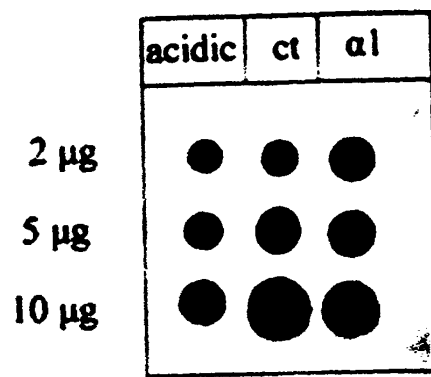
3.5.1 Προσδιορισμός της θέσης με την οποία η προθυμοσίνη α συνδέεται στην ιστόνη H1

Προηγούμενες μελέτες της αλληλεπίδρασης της προθυμοσίνης α με την ιστόνη H1 έδειξαν ότι πιθανώς η όξινη κεντρική περιοχή του μορίου της προθυμοσίνης α είναι υπεύθυνη για την σύνδεση των δύο πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, με τη μέθοδο της αποτύπωσης προσδέματος δείχθηκε ότι το πολυγλουταμικό οξύ, το οποίο είναι ένα ανάλογο της κεντρικής όξινης περιοχής της προθυμοσίνης α, συναγωνίζεται την προθυμοσίνη α και τελικά αναστέλλει τη σύνδεσή της με την ιστόνη H1 (Paramarcaki and Tsolas, 1994).

Για να εξετάσουμε άμεσα το παραπάνω ενδεχόμενο, χρησιμοποιήσαμε τρία πεπτίδια της προθυμοσίνης α (Σχήμα 2), τα οποία παρασκευάστηκαν συνθετικά σύμφωνα με τη δημοσιευμένη αλληλουχία αμινοξέων της προθυμοσίνης α από θύμο βοός (Paneerselvam et al., 1988). Τα πεπτίδια αυτά ήταν η θυμοσίνη α1 (αμινοξέα 1-28), το καρβοξυτελικό πεπτίδιο (πεπτίδιο ct) (αμινοξέα 87-109) και το όξινο πεπτίδιο, το οποίο περιελάμβανε τα 18 πρώτα αμινοξέα της όξινης περιοχής της προθυμοσίνης α (αμινοξέα 52-69). Τα πεπτίδια αυτά βιοτινυλιώθηκαν (Κεφ. 2.3.4, Σχήμα 25) και στη συνέχεια διερευνήθηκε η σύνδεση τους με την ιστόνη H1 με τη μέθοδο της αποτύπωσης προσδέματος (Ligand blotting) (Κεφ. 2.7).

Ποσότητα ιστόνης 1 μg και 40 μg υποκυτταρικού κλάσματος πυρήνων (ευγενική προσφορά της Δρ. Θ. Παπαμαρκάκη) αναλύθηκαν σε πηκτή 15% SDS-πολυακρυλαμιδίου και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Χρησιμοποιήθηκαν τρεις όμοιες μεμβράνες, κάθε μία από τις οποίες επωάσθηκε με διάλυμα 0,5 $\mu\text{g/ml}$ ενός από τα βιοτινυλιωμένα πεπτίδια της προθυμοσίνης α. Επιπλέον, μια όμοια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωάσθηκε με διάλυμα όξινου βιοτινυλιωμένου πεπτιδίου μικρότερης συγκέντρωσης (0,1 $\mu\text{g/ml}$), ενώ μια ακόμη μεμβράνη χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας και επωάσθηκε με 0,08 $\mu\text{g/ml}$ βιοτινυλιωμένης προθυμοσίνης α (ευγενική προσφορά της Δρ. Κ. Κονδύλη). Στη συνέχεια οι μεμβράνες επωάσθηκαν με στρεπταβιδίνη συζευγμένη με ραφανιδική υπεροξειδάση και το σήμα της αντίδρασης ανιχνεύτηκε με ECL (Κεφ. 2.9). Παρατηρή-





Σχήμα 25: Έλεγχος της βιοτυνίλωσης των πεπτιδίων θυμοσίνη $\alpha 1$, καρβόξυ τελικό και όξινο πεπτιδίο της προθυμοσίνης α . Τα πεπτιδία θυμοσίνη $\alpha 1$ ($\alpha 1$), καρβοξυτελικό πεπτιδίο (ct) και όξινο πεπτιδίο (acidic) σημάνθηκαν με βιοτίνη (Κεφ.2.3.4). 2, 5 και 10 μg καθενός από τα παραπάνω πεπτιδία αποτέθηκαν σε μεμβράνη νπροκυτταρίνης με την τεχνική αποτύπωσης κηλίδων (Κεφ.2.8). Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάστηκε με στρεπταβιδίνη συζευγμένη με ραφανιδική υπεροξειδάση σε αραιώση 1:40000. Το σήμα της αντίδρασης εμφανίστηκε με ECL.

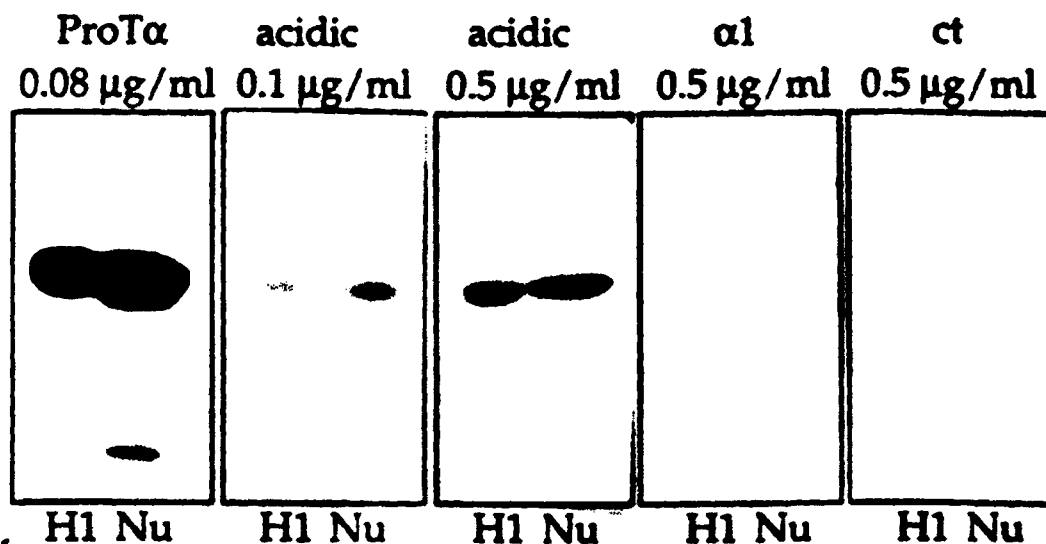


θηκε, ότι μόνο το όξινο πεπτιδίο συνδέεται με την ιστόνη H1 (Σχήμα 26, όξινο) και μάλιστα η σύνδεση είναι δοσοεξαρτώμενη (Σχήμα 26, όξινο, 0,1 $\mu\text{g/ml}$ και 0,5 $\mu\text{g/ml}$). Η έντονη αντίδραση του όξινου πεπτιδίου οφείλεται στη μεγάλη συγγένειά του με την ιστόνη H1 και όχι σε μεγαλύτερο βαθμό βιοτινυλίωσης. Η βιοτινυλίωση των πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε με τον N-υδροξυηλεκτρικό εστέρα της βιοτίνης ο οποίος συνδέεται με τις ελεύθερες αμινομάδες τους (ε-αμινομάδα λυσινών, αμινοτελικό άκρο). Το όξινο πεπτιδίο το οποίο δεν περιέχει υπολείμματα λυσινών βιοτινυλιώνεται σε μια μόνο θέση, στο ελεύθερο αμινοτελικό άκρο του. Συνεπώς, όπως παρατηρήθηκε από έλεγχο της βιοτινυλίωσης των πεπτιδίων με Dot Blot (Κεφ.2.8) αντιδρά ασθενέστερα σε σχέση με τις αντίστοιχες ποσότητες των άλλων πεπτιδίων (Σχήμα 25).

Συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις της προθυμοσίνης α και του όξινου πεπτιδίου (Σχήμα 26, ProTa, όξινο), φαίνεται ότι το πεπτιδίο συνδέεται με την H1 ασθενέστερα σε σχέση με ολόκληρη την προθυμοσίνη α. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να οφείλεται είτε στην ύπαρξη επιπλέον θέσεων σύνδεσης στην προθυμοσίνη α εκτός του όξινου πεπτιδίου, είτε στην αλλαγή της διαμόρφωσης του πεπτιδίου όταν αυτό βρίσκεται σε διάλυμα, έτσι ώστε να καλύπτονται κάποιες από τις θέσεις σύνδεσής του με την H1.

Συνοψίζοντας, συμπεραίνουμε ότι το όξινο πεπτιδίο της προθυμοσίνης α είναι υπεύθυνο για τη σύνδεση της πρωτεΐνης με την H1, χωρίς να αποκλείεται η συμμετοχή των άκρων της προθυμοσίνης α στην αλληλεπίδραση αυτή.





Σχήμα 26: Προσδιορισμός της θέσης σύνδεσης της προθυμοσίνης α στην ιστόνη H1. 1 µg ιστόνης H1 (H1) και 40 µg ολικής πυρηνικής πρωτεΐνης αναλύθηκαν σε 15% SDS-PAGE και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες νπροκυτταρίνης (Κεφ.2.7). Οι μεμβράνες επώαστηκαν με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις της βιοτυνιλωμένης προθυμοσίνης α (ProTa) ή των βιοτυνιλωμένων πεπτιδίων: όξινο πεπτίδιο (acidic), θυμοσίνη α1 (α1), και καρβοξυ-τελικό πεπτίδιο (ct). Ακολούθησε επώαση με στρεπταβιδίνη συζευγμένη με ραφανιδική υπεροξειδάση σε αραιώση 1:40000. Το σήμα της αντίδρασης εμφανίστηκε με ECL.



3.5.2 Προσδιορισμός της περιοχής σύνδεσης της ιστόνης H1 στην προθυμοσίνη α

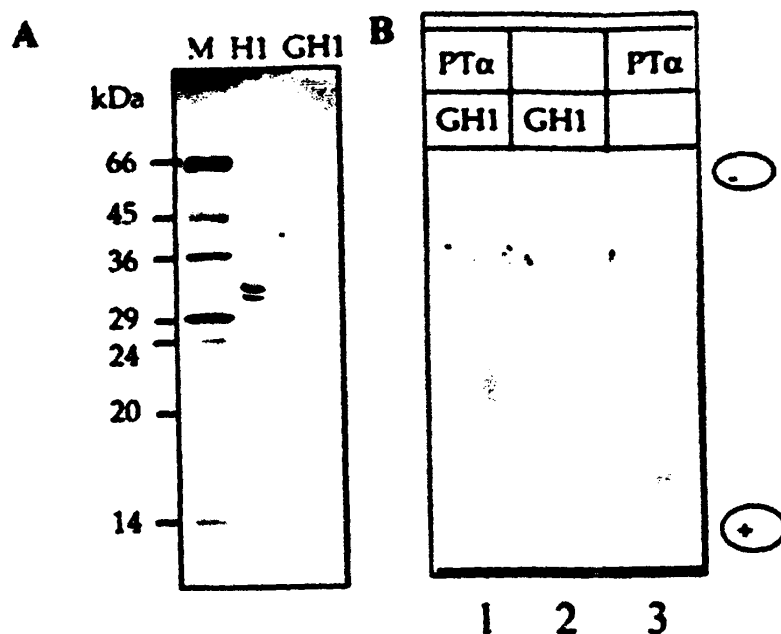
Μελέτες της πρωτοταγούς δομής της ιστόνης H1 έδειξαν ότι στο μόριό της διακρίνονται τρεις δομικές περιοχές: το άμινο τελικό άκρο, η κεντρική περιοχή και το καρβοξυτελικό άκρο (Hartman et al., 1977). Στη συνέχεια βρέθηκε ότι η κεντρική περιοχή, η οποία έχει σφαιρική διαμόρφωση, συνδέει την πρωτεΐνη στο νουκλεοσωμικό DNA (Allan et al., 1980). Μελέτες που έγιναν στο εργαστήριό μας έδειξαν ότι η παρουσία του DNA αναστέλλει τη σύνδεση της ιστόνης H1 με την προθυμοσίνη α. Υποθέσαμε λοιπόν ότι το DNA και η προθυμοσίνη α συνδέονται με την ίδια περιοχή της H1, την κεντρική σφαιρική περιοχή. Η κεντρική περιοχή της H1 που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματά μας (GH1) ήταν ευγενική προσφορά της Δρ. Κ. Κονδύλη και περιλαμβάνει 75 περίπου αμινοξέα. Παρασκευάστηκε με μερική τρυψινόλυση της ιστόνης H1, σύμφωνα με τη διαδικασία των Segers et al. (1991) (Σχήμα 27 (Α)). Η διαδικασία αυτή είχε σαν αποτέλεσμα την αποικοδόμηση των μη αναδιπλωμένων άκρων της H1, ενώ η GH1 παραμένει ανέπαφη.

Η σύνδεση της GH1 περιοχής στην προθυμοσίνη α μελετήθηκε χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικές προσεγγίσεις i) ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης και ii) ομοιοπολική διασύνδεση μορίων (cross-linking).

Ποσότητα GH1 που αντιστοιχούσε σε 8 μg ιστόνης H1 επώαστηκε με 6 μg προθυμοσίνης α σε διάλυμα 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ pH 6,7, και όγκου 20 μl . Η επώαση έγινε στους 25 °C επί 10 λεπτά. Το δείγμα ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης (Κεφ. 2.2.3.3) παράλληλα με καθαρή GH1 και καθαρή προθυμοσίνη α (Σχήμα 27 (Β), διαδρομές 2 και 3). Μετά από χρώση της πηκτής παρατηρήθηκε ότι η προθυμοσίνη α συνδέεται με τη GH1 (Σχήμα 27(Β), διαδρομή 1).

Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήξαμε μετά από ομοιοπολική σύνδεση της GH1 με την προθυμοσίνη α (Κεφ.2.10). Ποσότητα GH1 που αντιστοιχεί σε 4 μg ιστόνης επώαστηκε με αυξανόμενες ποσότητες προθυμοσίνης α σε διάλυμα φωσφορικών, στους 25 °C επί 10 λεπτά. Το pH των δειγμάτων ρυθμίστηκε με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος Na_3BO_3 , pH 9,0 ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 1 M. Προστέθηκε DMP και ακολούθησε επώαση επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το τέλος της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή 15% SDS-πολυακρυλαμιδίου. Χρώση της πηκτής με Coomassie Blue αποκά-



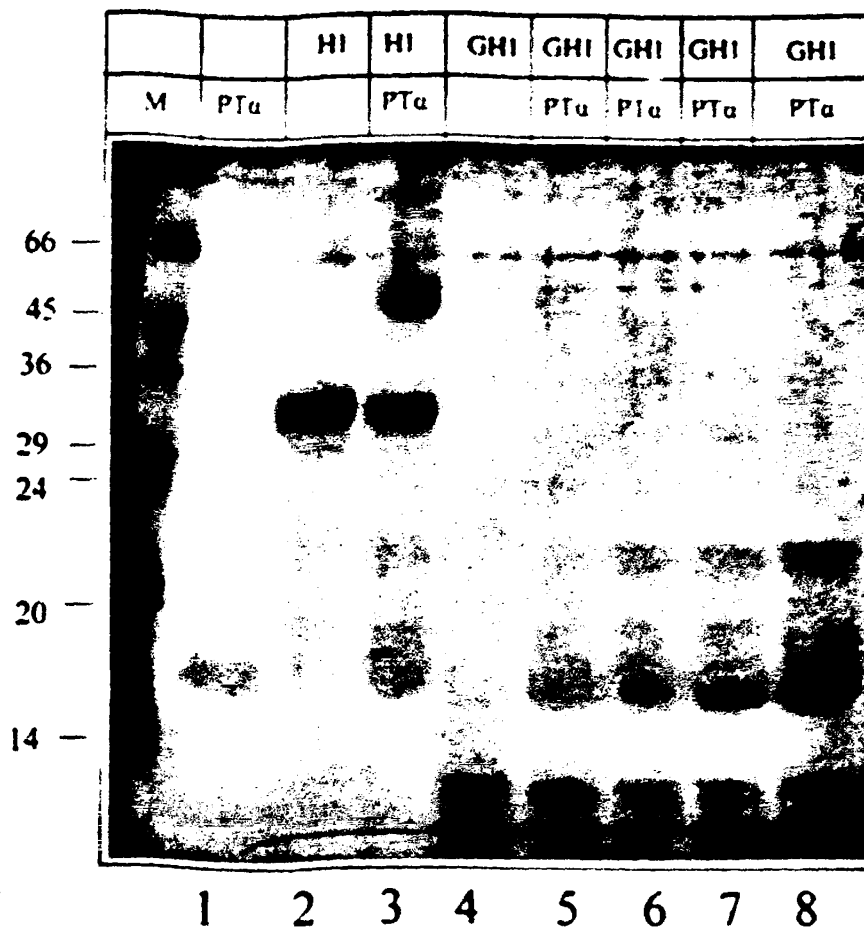


Σχήμα 27: Προσδιορισμός της περιοχής σύνδεσης της ιστόνης H1 στην προθυμοσίνη α με ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες. **(Α)** Ελεγχος της καθαρότητας της κεντρικής σφαιρικής περιοχής της ιστόνης H1 (GH1). Ποσότητα GH1 η οποία προήλθε από την τρυψινόλυση 8 μg ιστόνης H1 αναλύθηκε σε 15% SDS-PAGE και η πηκτή βάφτηκε με Coomassie Blue. M, μάρτυρες μοριακών βαρών. **(Β)** Ανίχνευση του συμπλέγματος προθυμοσίνης α-GH1 με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης. 6 μg ProTa + GH1 ισομοριακή με 8 μg H1 (διαδρομή 1), GH1 ισομοριακή με 8 μg H1 (διαδρομή 2) και 6 μg ProTa (διαδρομή 3) επωάστηκαν σε διάλυμα φωσφορικών και ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή 0,75% αгарόζης. Η εμφάνιση των πρωτεϊνών έγινε με χρώση της πηκτής με Coomassie Blue.

λυψε πρωτεϊνικές ζώνες μοριακού βάρους περίπου 22 kD (Σχήμα 28, διαδρομές 5-8), που δηλώνουν το σχηματισμό συμπλέγματος μεταξύ της GH1 και της προθυμοσίνης α. Σαν θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε H1 η οποία επωάστηκε με προθυμοσίνη α στις παραπάνω συνθήκες σχηματίζοντας σύμπλεγμα μεγάλου μοριακού βάρους (Σχήμα 28, διαδρομή 3). Κρίνοντας από τις ποσότητες της προθυμοσίνης α που απαιτούνται για τη σύνδεσή της με την H1 και τη GH1 είναι φανερό ότι η αλληλεπίδρασή της με την κεντρική σφαιρική περιοχή είναι ασθενέστερη.

Καταλήγουμε στο συμπέρασμα, ότι η κεντρική σφαιρική περιοχή της ιστόνης H1 εμπλέκεται στη σύνδεσή της με την προθυμοσίνη α, αλλά δεν αποκλείεται το ενδεχόμενο τα φορτισμένα άκρα της ιστόνης H1 να συνεισφέρουν και να σταθεροποιούν την αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών.





Σχήμα 28: Ταυτοποίηση των θέσεων αλληλεπιδράσης της ιστόνης H1 με ομοιοπολική διασύνδεση μορίων. 2 μg ProTa (διαδρομή 1), 2 μg H1 (διαδρομή 2), 4 μg ProTa + 2 μg H1 (διαδρομή 3), GHI ισομοριακή με 4 μg H1 (διαδρομή 4), GHI όπως στην διαδρομή 4 + 4, 8, 12 και 16 μg ProTa (διαδρομή 5-8) συνδέθηκαν ομοιοπολικά με DMP και στη συνέχεια αναλύθηκαν σε 15% SDS-PAGE. Η εμφάνιση των πρωτεϊνών έγινε με χρώση της πηκτής με Coomassie Blue.

3.6 Ο ρόλος της φωσφορυλίωσης της ιστόνης H1 και της προθυμοσίνης α στην αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών

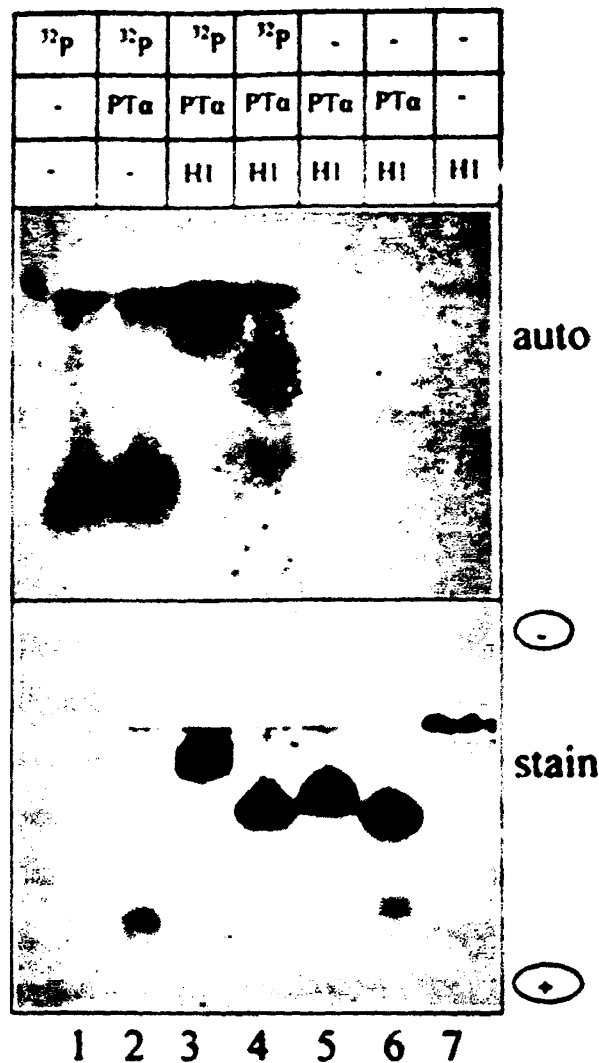
3.6.1 Επίδραση της φωσφορυλίωσης της προθυμοσίνης α στην σύνδεσή της με την ιστόνη H1

Από τα μέχρι τώρα πειράματά μας βρήκαμε ότι η προθυμοσίνη α αλληλεπιδρά με την ιστόνη H1 τόσο *in vitro* όσο και στις φυσιολογικές συνθήκες του κυττάρου. Στο επόμενο στάδιο της μελέτης μας διερευνήσαμε την επίδραση της φωσφορυλίωσης των δύο πρωτεϊνών στη σύνδεσή τους.

Για την *in vitro* φωσφορυλίωση της προθυμοσίνης α χρησιμοποιήθηκε η κινάση της καζεΐνης-2 (CKII), η οποία φωσφορυλιώνει υπολείμματα σερίνης ή θρεονίνης που βρίσκονται στο αμινοτελικό άκρο όξινων αμινοξέων. Έχει βρεθεί ότι η κινάση αυτή φωσφορυλιώνει την προθυμοσίνη α, σε υπολείμματα σερίνης και θρεονίνης που βρίσκονται στα 14 πρώτα αμινοξέα της (Barcia et al., 1993). Η σύνδεση της φωσφορυλιωμένης προθυμοσίνης α με την ιστόνη H1 ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες, σε πηκτή αγαρόζης (Κεφ.2.2.3.3).

Ιχνη φωσφορυλιωμένης προθυμοσίνης α (Κεφ.2.3.2), αναμίχθηκαν με δύο διαφορετικές ποσότητες μη ιχνηθετημένης πρωτεΐνης και επωάστηκαν με 3 μg H1, σε διάλυμα 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$, pH 6,7, όγκου 20 μl . Η επώαση έγινε επί 10 λεπτά, στους 25°C. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στη μέση πηκτής αγαρόζης και ηλεκτροφορήθηκαν. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή βάφτηκε με Coomassie Blue, ξηράθηκε στους 65°C σε ξηραντήρα κενού και υποβλήθηκε σε αυτοραδιογραφία. Όπως έχει παρατηρηθεί και σε προηγούμενα αντίστοιχα πειράματα (Κεφ. 3.2), η προθυμοσίνη α συνδέθηκε με τη συνδετική ιστόνη. Έτσι, η μετατόπιση της ιστόνης στην πηκτή αλλάζει και σχηματίζεται σύμπλεγμα H1 – προθυμοσίνης α το οποίο κινείται με μειωμένη ταχύτητα (Σχήμα 29, stain, διαδρομές 3-6). Από την αυτοραδιογραφία παρατηρήθηκε ότι στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκε στο μίγμα H1-προθυμοσίνης α φωσφορυλιωμένη προθυμοσίνη α, αυτή ανιχνεύτηκε αποκλειστικά στο σύμπλεγμα των δύο πρωτεϊνών που σχηματίστηκε στη συνέχεια (Σχήμα 29, auto, διαδρομές 3, 4). Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η φωσφορυλιωμένη προθυμοσίνη α συνδέεται με την H1 και συνεπώς η *in vitro*





Σχήμα 29: Επίδραση της φωσφορυλκωσης της προθυμοσίνης α στην αλληλεπίδρασή της με την ιστόνη H1. Οι ακόλουθες ποσότητες πρωτεϊνών επωάστηκαν σε διάλυμα φωσφορικών και ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή 0,75% αγαρόζης (Κεφ.2.2.3.2): ίχνη ^{32}P -ProTa (διαδρομή 1), 6 μg ProTa+ίχνη ^{32}P -ProTa (διαδρομή 2), 1 μg ProTa+ ^{32}P -ProTa + 3 μg H1 (διαδρομή 3), 3 μg ProTa+ ^{32}P -ProTa + 3 μg H1 (διαδρομή 4), 6 μg ProTa + 3 μg H1 (διαδρομή 5), 6 μg ProTa+ 6 μg H1 (διαδρομή 6), 3 μg H1 (διαδρομή 7). Η πηκτή βάφτηκε με Coomassie Blue (κάτω) και υποβλήθηκε σε αυτοραδιογραφία (άνω).



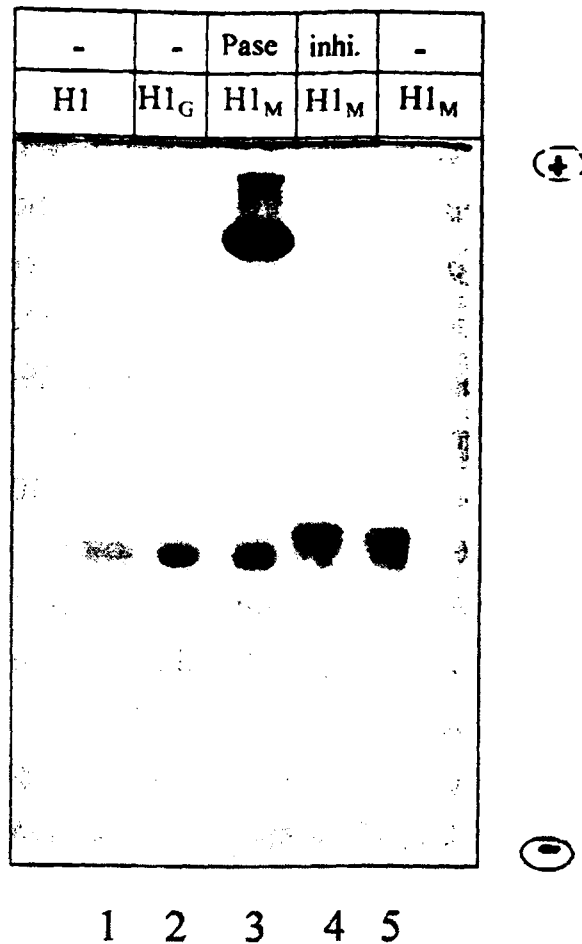
			q ¹	q ²	q ³	q ⁴
	q ¹	q ²	q ³	q ⁴	q ⁵	q ⁶
q ¹	q ²	q ³	q ⁴	q ⁵	q ⁶	q ⁷
q ²	q ³	q ⁴	q ⁵	q ⁶	q ⁷	q ⁸
q ³	q ⁴	q ⁵	q ⁶	q ⁷	q ⁸	q ⁹
q ⁴	q ⁵	q ⁶	q ⁷	q ⁸	q ⁹	q ¹⁰
q ⁵	q ⁶	q ⁷	q ⁸	q ⁹	q ¹⁰	q ¹¹
q ⁶	q ⁷	q ⁸	q ⁹	q ¹⁰	q ¹¹	q ¹²
q ⁷	q ⁸	q ⁹	q ¹⁰	q ¹¹	q ¹²	q ¹³
q ⁸	q ⁹	q ¹⁰	q ¹¹	q ¹²	q ¹³	q ¹⁴
q ⁹	q ¹⁰	q ¹¹	q ¹²	q ¹³	q ¹⁴	q ¹⁵
q ¹⁰	q ¹¹	q ¹²	q ¹³	q ¹⁴	q ¹⁵	q ¹⁶
q ¹¹	q ¹²	q ¹³	q ¹⁴	q ¹⁵	q ¹⁶	q ¹⁷
q ¹²	q ¹³	q ¹⁴	q ¹⁵	q ¹⁶	q ¹⁷	q ¹⁸
q ¹³	q ¹⁴	q ¹⁵	q ¹⁶	q ¹⁷	q ¹⁸	q ¹⁹
q ¹⁴	q ¹⁵	q ¹⁶	q ¹⁷	q ¹⁸	q ¹⁹	q ²⁰
q ¹⁵	q ¹⁶	q ¹⁷	q ¹⁸	q ¹⁹	q ²⁰	q ²¹
q ¹⁶	q ¹⁷	q ¹⁸	q ¹⁹	q ²⁰	q ²¹	q ²²
q ¹⁷	q ¹⁸	q ¹⁹	q ²⁰	q ²¹	q ²²	q ²³
q ¹⁸	q ¹⁹	q ²⁰	q ²¹	q ²²	q ²³	q ²⁴
q ¹⁹	q ²⁰	q ²¹	q ²²	q ²³	q ²⁴	q ²⁵
q ²⁰	q ²¹	q ²²	q ²³	q ²⁴	q ²⁵	q ²⁶
q ²¹	q ²²	q ²³	q ²⁴	q ²⁵	q ²⁶	q ²⁷
q ²²	q ²³	q ²⁴	q ²⁵	q ²⁶	q ²⁷	q ²⁸
q ²³	q ²⁴	q ²⁵	q ²⁶	q ²⁷	q ²⁸	q ²⁹
q ²⁴	q ²⁵	q ²⁶	q ²⁷	q ²⁸	q ²⁹	q ³⁰
q ²⁵	q ²⁶	q ²⁷	q ²⁸	q ²⁹	q ³⁰	q ³¹
q ²⁶	q ²⁷	q ²⁸	q ²⁹	q ³⁰	q ³¹	q ³²
q ²⁷	q ²⁸	q ²⁹	q ³⁰	q ³¹	q ³²	q ³³
q ²⁸	q ²⁹	q ³⁰	q ³¹	q ³²	q ³³	q ³⁴
q ²⁹	q ³⁰	q ³¹	q ³²	q ³³	q ³⁴	q ³⁵
q ³⁰	q ³¹	q ³²	q ³³	q ³⁴	q ³⁵	q ³⁶
q ³¹	q ³²	q ³³	q ³⁴	q ³⁵	q ³⁶	q ³⁷
q ³²	q ³³	q ³⁴	q ³⁵	q ³⁶	q ³⁷	q ³⁸
q ³³	q ³⁴	q ³⁵	q ³⁶	q ³⁷	q ³⁸	q ³⁹
q ³⁴	q ³⁵	q ³⁶	q ³⁷	q ³⁸	q ³⁹	q ⁴⁰
q ³⁵	q ³⁶	q ³⁷	q ³⁸	q ³⁹	q ⁴⁰	q ⁴¹
q ³⁶	q ³⁷	q ³⁸	q ³⁹	q ⁴⁰	q ⁴¹	q ⁴²
q ³⁷	q ³⁸	q ³⁹	q ⁴⁰	q ⁴¹	q ⁴²	q ⁴³
q ³⁸	q ³⁹	q ⁴⁰	q ⁴¹	q ⁴²	q ⁴³	

[illegible]

3.6.2 Επίδραση της φωσφορυλίωσης της ιστόνης H1 στη σύνδεσή της με την προθυμοσίνη

Πολλές βιοχημικές μελέτες έχουν δείξει ότι η φωσφορυλίωση της ιστόνης H1 διαφοροποιείται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, φτάνοντας στα μεγαλύτερα επίπεδα κατά τη φάση της μίτωσης (Hohmann et al., 1983). Ο ρόλος της φωσφορυλίωσης της ιστόνης H1 δεν είναι ακόμη ξεκαθαρισμένος, ωστόσο έχει δείχθει, ότι η φωσφορυλίωση οδηγεί σε τροποποίηση της δομής της χρωματίνης (Roth and Allis, 1992). Για το λόγο αυτό η διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της προθυμοσίνης α με τη φωσφορυλιωμένη H1 παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Για τη διερεύνηση αυτή χρησιμοποιήθηκαν δύο προσεγγίσεις: i) η τεχνική της αποτύπωσης προσδέματος και ii) η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Και στις δύο περιπτώσεις η φωσφορυλιωμένη H1 που χρησιμοποιήθηκε απομονώθηκε από κύτταρα HeLa τα οποία βρισκόταν στη φάση της μίτωσης (Κεφ 2.2.7). Συνοπτικά ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Τα κύτταρα (2×10^6) συγκεντρώθηκαν με φυγοκέντρηση και εκχυλίστηκαν με 5% υπερχλωρικό οξύ. Η συνδετική ιστόνη που βρισκόταν στο υπερκείμενο καταβυθίστηκε με τριχλωροξικό οξύ, τελικής συγκέντρωσης 25% w/v. Στη συνέχεια η H1 διαλύθηκε σε 1 mM HCl παρουσία αναστολέων των φωσφατασών (50 mM NaF, 80 mM β-φωσφογλυκερόλη). Η φωσφορυλίωση της μπιωτικής ιστόνης H1 ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ουρίας σε όξινο pH (Κεφ. 2.2.3.2). Κατά την ηλεκτροφόρηση σε αυτές τις συνθήκες η φωσφορυλιωμένη H1 κινείται με μικρότερη ταχύτητα σε σχέση με τη μη φωσφορυλιωμένη λόγω των επιπλέον αρνητικών της φορτίων. Μετά από χρώση της πηκτής βρέθηκε ότι η μπιωτική H1 καθυστέρησε σε σχέση με τη μη φωσφορυλιωμένη H1 (Σχήμα 30, διαδρομές 1, 2, 4). Σαν μη φωσφορυλιωμένη H1 χρησιμοποιήσαμε πρωτεΐνη που απομονώθηκε με ανάλογη διαδικασία από κύτταρα HeLa της G0 φάσης ανάπτυξης (Σχήμα 30, διαδρομή 2) ή H1 θύμου μόσχου που προμηθευτήκαμε από τη Boehringer Mannheim (Σχήμα 30, διαδρομή 1). Για να βεβαιωθούμε ότι η αλλαγή στην κινητικότητα της H1 που παρατηρήθηκε οφείλεται πράγματι στη φωσφορυλίωσή της, αντίστοιχη ποσότητα μπιωτικής ιστόνης επωάστηκε με αλκαλική φωσφατάση. Η επώαση έγινε με 2 μονάδες/ml βακτηριακού ενζύμου (Sigma), στους 37°C, επί 70 λεπτά, σε 150 mM Tris-HCl, pH 8,8 και 0,1 mM $ZnCl_2$. Βρέθηκε, ότι η επωασμένη με το ένζυμο H1, η οποία έχει αποφωσφορυλιωθεί, κινείται όπως η μη

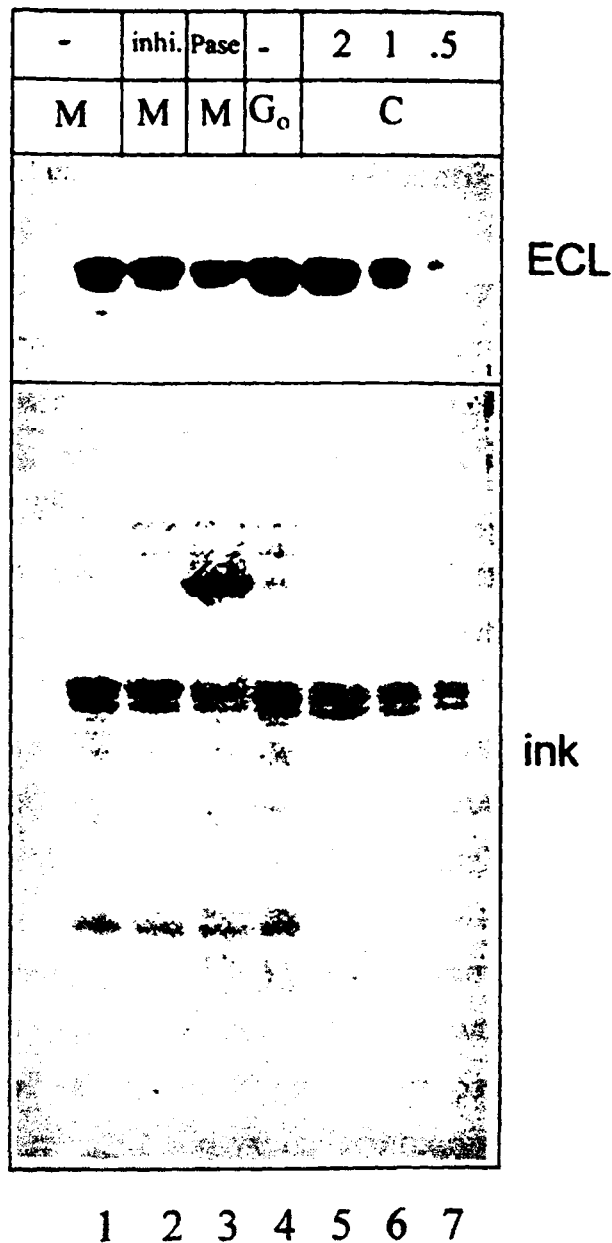


Σχήμα 30: Ανίχνευση της φωσφορυλίωσης της H1 σε πηκτή ουρίας σε όξινο pH. H1 από θύμο μόσχου ίση με 2 μ g (διαδρομή 1), H1 από 2×10^6 κύτταρα της G0 φάσης (διαδρομή 2), H1 από 2×10^6 μιτωτικά κύτταρα επωασμένα με βακτηριακή αλκαλική φωσφατάση (διαδρομή 3) και H1 από 2×10^6 μιτωτικά κύτταρα, η οποία απομονώθηκε παρουσία αναστολέων φωσφατασών (διαδρομή 4) και H1 όπως στη διαδρομή 4 χωρίς αναστολείς, αναλύθηκαν σε πηκτή ουρίας σε pH 4,4 (Κεφ.2.2.3.2). Οι πρωτεΐνες εμφανίστηκαν μετά από χρώση της πηκτής με Coomassie Blue. Η πρωτεΐνη μεγάλου μοριακού βάρους που εμφανίζεται στη διαδρομή 3 είναι η αλκαλική φωσφατάση.

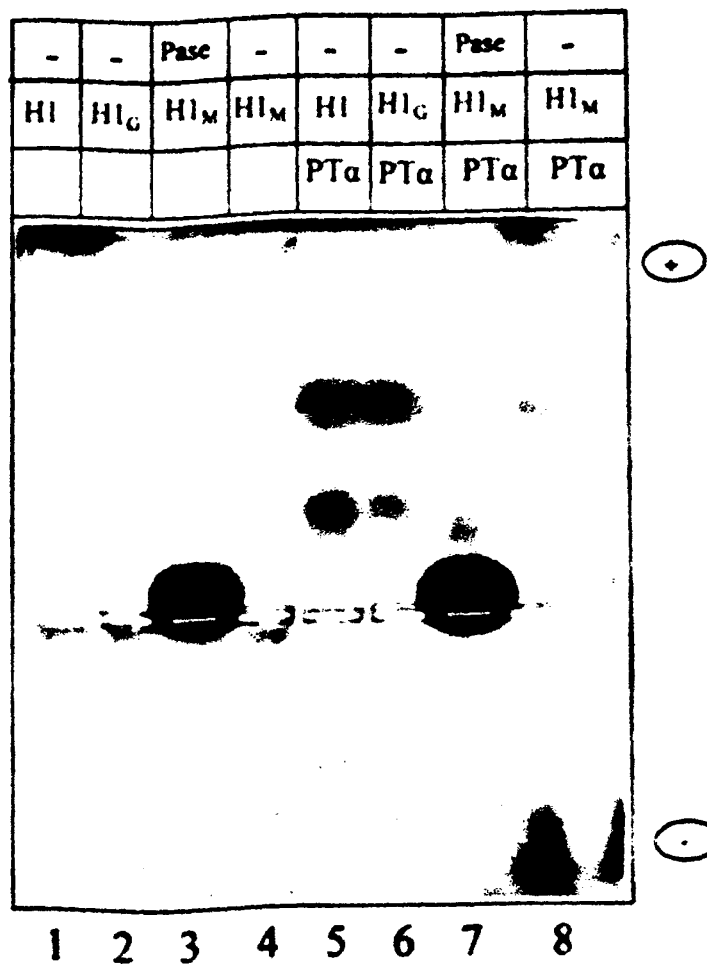
φωσφορυλκωμένη H1 της G0 φάσης (Σχήμα 30, διαδρομές 2,3). Ανάλογες παρατηρήσεις έγιναν όταν κλάσμα της H1 αποφωσφορυλκώθηκε κατά τη διαδικασία απομόνωσής του λόγω απουσίας αναστολέων των φωσφατασών (Σχήμα 30, διαδρομή 5). Το κλάσμα της H1 που αποφωσφορυλκώθηκε κινήθηκε με την ίδια ταχύτητα όπως η μη φωσφορυλκωμένη πρωτεΐνη (Σχήμα 30, διαδρομές 2, 5).

Κατά την εφαρμογή της τεχνικής αποτύπωσης προσδέματος (ligand blotting, Κεφ.2.7), μπιωτική H1 επωασμένη ή μη με αλκαλική φωσφατάση και ιστόνη H1 της G0 φάσης ανάπτυξης αναλύθηκαν σε πηκτή 15% SDS-πολυακρυλαμιδίου και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Κεφ.2.2.9). Η μεμβράνη επωάστηκε με διάλυμα προθυμοσίνης α 0,4 μg/ml, επί 2 ώρες και στη συνέχεια με το anti-α αντίσωμα της προθυμοσίνης α, σε αραιώση 1:750 επί 2 ακόμη ώρες. Ακολούθησε προσθήκη του δεύτερου αντισώματος και εμφάνιση του σήματος με ECL. Παρατηρήθηκε ότι η μπιωτική H1, η οποία αποφωσφορυλκώθηκε με αλκαλική φωσφατάση και η μη φωσφορυλκωμένη H1 της G0 φάσης έχουν την ίδια συγγένεια για την προθυμοσίνη α (Σχήμα 31, ECL, διαδρομές 2, 3, 4). Το σήμα της αντίδρασης σύνδεσης των δύο πρωτεϊνών σε κάθε περίπτωση (Σχήμα 31, ECL), είναι ανάλογο με την ποσότητα της H1 που μεταφέρθηκε στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης όπως φαίνεται από την πρωτεϊνική χρώση (Σχήμα 31, ink). Η ευαισθησία της μεθόδου ελέγχθηκε με αυξανόμενες ποσότητες ιστόνης H1 θύμου μόσχου (Σχήμα 31, διαδρομές 5-7). Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η μπιωτική H1 συνδέεται με την προθυμοσίνη α όπως και η μη φωσφορυλκωμένη πρωτεΐνη.

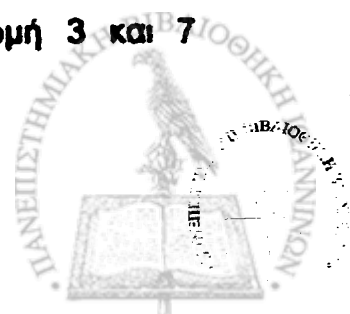
Σαν μια δεύτερη προσέγγιση χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες. Ποσότητα ιστόνης H1 η οποία προήλθε από 2×10^6 μπιωτικά κύτταρα HeLa επωάστηκε με 6 μg προθυμοσίνης α σε διάλυμα 20mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$, pH 6,7, όγκου 20μl. Η επώαση έγινε επί 10 λεπτά στους 25°C. Το δείγμα τοποθετήθηκε σε πηκτή αгарόζης (Κεφ.2.2.3.3) και ηλεκτροφορήθηκε. Μετά από χρώση της πηκτής παρατηρήθηκε ότι η μπιωτική H1 συνδέεται με την προθυμοσίνη α (Σχήμα 31, διαδρομή 8), σχηματίζοντας σύμπλεγμα το οποίο κινήθηκε με μειωμένη ταχύτητα. Ομοια, συνδέονται με την προθυμοσίνη α η μη φωσφορυλκωμένη H1 της G0 φάσης και η μπιωτική H1 η οποία έχει επωαστεί με αλκαλική φωσφατάση (Σχήμα 32, διαδρομές 6, 7). Η μικρότερη μετατόπιση τόσο του συμπλέγματος H1-προθυμοσίνης α όσο και της προθυμοσίνης α στη διαδρομή 7, οφείλεται στην αυξημένη συγκέντρωση αλατού που χρησιμοποιήθηκε για την επώα-



Σχήμα 31: Επίδραση της φωσφορυλίωσης της ιστόνης H1 στην αλληλεπίδρασή της με την προθυμοσίνη α. H1 από 10^6 μιτωτικά κύτταρα η οποία απομονώθηκε απουσία αναστολέων των φωσφατασών (διαδρομή 1), H1 όπως στη διαδρομή 1, η οποία απομονώθηκε παρουσία αναστολέων των φωσφατασών (διαδρομή 2), H1 όπως στη διαδρομή 1, η οποία επωάστηκε με βακτηριακή αλκαλική φωσφατάση (διαδρομή 3), H1 από 10^6 κύτταρα της G₀ φάσης (διαδρομή 4) και 2, 1, 0,5 μg καθαρής H1 (Boehringer Mannheim) (διαδρομή 5-7) αναλύθηκαν σε 15% SDS-PAGE και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης ώστε να εφαρμοστεί η διαδικασία της αποτύπωσης προσδέματος (Κεφ. 2.7). Η μεμβράνη της νιτροκυταρίνης επωάστηκε με 0,4 μg / ml ProTa και στη συνέχεια με το anti-ct αντίσωμα της ProTa (1:750) Η εμφάνιση του σήματος της αντίδρασης έγινε με ECL (άνω) και αμέσως μετά πραγματοποιήθηκε πρωτεϊνική χρώση της μεμβράνης με σινική μελάνη (κάτω).



Σχήμα 32: Έλεγχος σχηματισμού συμπλέγματος μεταξύ της φωσφορυλκωμένης ιστόνης H1 και της προθυμοσίνης α με ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες. Ποσότητα καθαρής H1 ίση με 3 μg (διαδρομή 1), H1 από 2×10^6 κύτταρα της G0 φάσης (διαδρομή 2), H1 από 2×10^6 μπρωτικά κύτταρα επωασμένη βακτηριακή αλκαλική φωσφατάση (διαδρομή 3), H1 από 2×10^6 μπρωτικά κύτταρα (διαδρομή 4) και 6 μg ProTa + H1 όπως στις διαδρομές 1-4 (διαδρομές 5-8), επωάστηκαν σε διάλυμα φωσφορικών και ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή 0,75 % αγαρόζης. Η εμφάνιση των πρωτεϊνών έγινε με χρώση της πηκτής με Coomassie Blue. Οι έντονες πρωτεϊνικές ζώνες που εμφανίζονται στη διαδρομή 3 και 7 οφείλονται στην αλκαλική φωσφατάση.



ση με την αλκαλική φωσφατάση. Από τη δεύτερη αυτή μεθοδολογική προσέγγιση μπορούμε επίσης να συμπεράνουμε ότι η φωσφορυλκωμένη H1 συνδέεται με την προθυμοσίνη α.

Συνοψίζοντας, μπορούμε να πούμε ότι από τα αποτελέσματα των τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν, η φωσφορυλίωση της συνδετικής ιστόνης δε επηρεάζει την αλληλεπίδρασή της με την προθυμοσίνη α.



3.7 Μελέτη της αλληλεπίδρασης της προθυμοσίνης α με την ιστόνη H1 σε περιβάλλον χρωματίνης

3.7.1 Μελέτη της πιθανής σύνδεσης της προθυμοσίνης α στη χρωματίνη

Είναι γνωστό ότι η ιστόνη H1 είναι υπεύθυνη για την οργάνωση και τη σταθεροποίηση της ανώτερης δομής της χρωματίνης (Thoma et al., 1979). Μια σειρά μελετών έχουν δείξει ότι ένα μέρος της ενεργούς χρωματίνης δεν περιλαμβάνει H1 (Karpov et al., 1982, Nacheva et al., 1989) ενώ ακόμη και όταν η H1 είναι παρούσα σε ενεργά γονίδια ο τρόπος σύνδεσής της με τη χρωματίνη έχει τροποποιηθεί (Nacheva et al. 1989, Weintraub, 1985, Kamakaka and Thomas, 1990). Αν και ο ρόλος της H1 στη μεταγραφική ικανότητα της χρωματίνης έχει μελετηθεί διεξοδικά οι παράγοντες που μεταβάλλουν τη στοιχειομετρία της H1 ή τον τρόπο αλληλεπίδρασης της με τη χρωματίνη δεν είναι ακόμη γνωστοί. Είναι πιθανό οι αλληλεπιδράσεις H1-χρωματίνης να επηρεάζονται από τη σύνδεση μη χρωμοσωμικών πρωτεϊνών (Eamshaw, 1987, Ding et al., 1997, Wolffe et al., 1996). Κάτω από αυτή την προοπτική, η μελέτη της αλληλεπίδρασης της προθυμοσίνης α με την H1, όταν η δεύτερη βρίσκεται στο περιβάλλον της χρωματίνης, παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον.

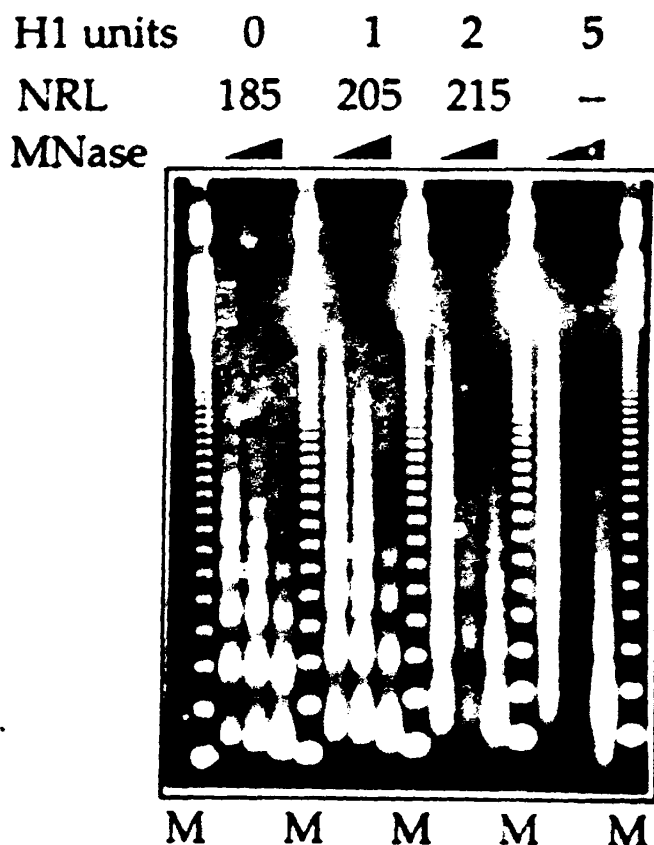
Εφόσον, από προηγούμενες μελέτες μας γνωρίζαμε ότι η προθυμοσίνη α συνδέεται με την H1 θελήσαμε να διερευνήσουμε αν συνδέεται επίσης με χρωματίνη στην οποία βρίσκεται ενσωματωμένη η συνδετική ιστόνη. Για το σκοπό αυτό έγινε ανασύσταση της χρωματίνης με DNA ακινητοποιημένο σε μαγνητικά σφαιρίδια, χρησιμοποιώντας ATP και εκχύλισμα από έμβρυα *Drosophila* το οποίο περιέχει όλους τους απαραίτητους για την ανασύσταση παράγοντες (Sandaltzopoulos et al., 1994). Το εκχύλισμα της *Drosophila* που χρησιμοποιήσαμε δεν περιέχει συνδετική ιστόνη H1, γι' αυτό η πρωτεΐνη προστέθηκε εξωγενώς στο μίγμα ανασύστασης της χρωματίνης ακριβώς πριν την προσθήκη του DNA (Κεφ. 2.5.5). Επειδή από προηγούμενες μελέτες (Κεφ.3.4, Σχήμα 22) ήταν γνωστό ότι η *Drosophila* H1 δεν αλληλεπιδρά με την προθυμοσίνη α, χρησιμοποιήθηκε H1 θύμου μόσχου. Για να ελεγχθεί η σωστή ενσωμάτωση της H1 θύμου μόσχου στο νουκλεόσωμα η χρωματίνη, η οποία σχηματίστηκε, αναλύθηκε με μικροκκοκική νουκλεάση (Κεφ. 2.5.5). Η μικροκκοκική νουκλεάση είναι ένα ένζυμο που διασπά το συνδετικό DNA που βρίσκεται ανάμεσα στα νουκλεοσώματα, το οποίο δεν προστατεύεται από τις ιστόνες του πυρήνα του νουκλεοσώματος. Δημιουργούνται έτσι ολιγονουκλεοσώματα, το

DNA των οποίων μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης έχει τη μορφή "κλίμακας" (DNA ladder). Από την "κλίμακα" αυτή του DNA μπορούμε να υπολογίσουμε την απόσταση μεταξύ δύο γειτονικών νουκλεοσωμάτων, το λεγόμενο επαναλαμβανόμενο μήκος του νουκλεοσώματος (Nucleosome Repeat Length, NRL). Η χρωματίνη η οποία συγκροτείται με ένα ελεύθερο κυττάρων σύστημα θεωρείται κατάλληλη όταν το NRL της είναι όμοιο μ' αυτό της φυσιολογικής χρωματίνης των κυττάρων. Επιπλέον, η σωστή ενσωμάτωση της συνδετικής ιστόνης στη χρωματίνη πιστοποιείται με την αύξηση του NRL (Rodriguez-Campos et al., 1989, Sandaltzopoulos et al., 1994).

Για την ανασύσταση της χρωματίνης χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα *Drosophila* πρώιμου σταδίου ανάπτυξης (DREX). Στο μίγμα της αντίδρασης προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα αναγέννησης ενέργειας (McNAP) (Κεφ.2.5.4), και ποσότητα του πλασμιδιακού DNA hsp 70, ίση με 1 μg (Κεφ.2.5.1). Το μίγμα ανακινήθηκε επί 6 ώρες στους 26°C. Ακολούθησε πέψη της χρωματίνης με μικροκκοκική νουκλεάση και στη συνέχεια με ριβονουκλεάση και πρωτεϊνάση K (Κεφ.2.5.5). Το DNA των ολιγονουκλεοτιδίων που προέκυψαν αναλύθηκε σε πηκτή 1,3% αгарόζης η οποία βάφτηκε με βρωμιούχο αιθίδιο (Κεφ.2.5.5). Απουσία της H1 το NRL, όπως υπολογίστηκε από το DNA που αντιστοιχούσε στο τετρανουκλεόσωμα ήταν ίσο με 185 ζεύγη βάσεων (Σχήμα 33, NRL, 185). Παρουσία 0,2 και 0,4 μg H1 στο μίγμα ανασύστασης της χρωματίνης το NRL αυξήθηκε στα 205 και 215 ζεύγη βάσεων αντίστοιχα (Σχήμα 33, διαδρομή 205, 215). Η ποσότητα της ιστόνης H1 που απαιτείται για την αύξηση του NLR από τα 185 στα 205 ζεύγη βάσεων ορίστηκε εμπειρικά ως 1 μονάδα ιστόνης H1 (1 Unit). Στο συγκεκριμένο πείραμα η ποσότητα αυτή αντιστοιχούσε σε 0,1 μg πρωτεΐνης.

Για να διερευνήσουμε, αν η προθυμοσίνη α συνδέεται σε χρωματίνη η οποία περιέχει ιστόνη H1, σχηματίστηκε χρωματίνη με 1 μg πλασμιδιακού DNA ακινητοποιημένου σε μαγνητικά σφαιρίδια, παρουσία 2 μονάδων ιστόνης H1 (Κεφ.2.5.4). Τα σφαιρίδια της χρωματίνης απομονώθηκαν με μαγνήτη και επωάστηκαν επί 1 ώρα στους 26°C με 120 μl ρυθμιστικού διαλύματος 150 mM NaCl (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 5 mM MgCl_2 , 0,02% NP-40 150 mM NaCl), το οποίο περιείχε προθυμοσίνη α . Η χρωματίνη απομονώθηκε ξανά σε μαγνητικό πεδίο και ακολούθησε έκλυση των συνδεδεμένων σ' αυτή πρωτεϊνών με ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 5 mM MgCl_2 , 0,02%NP-40 που περιείχε 50, 400 και 650 mM



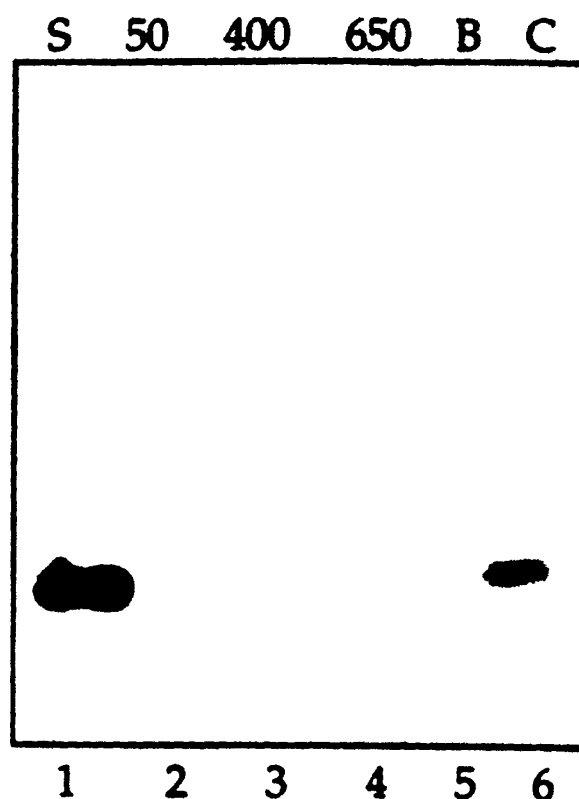


Σχήμα 33: Ελεγχος της ενσωμάτωσης της ιστόνης H1 από θύμο μόσχου στη χρωματίνη. Πραγματοποιήθηκε ανασύσταση χρωματίνης με πλασμιδιακό DNA και εκχυλίσματα εμβρύου *Drosophila* απουσία H1 (0 units) ή παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων H1 (1, 2, 5 units). Η χρωματίνη που δημιουργήθηκε επωάστηκε με μικροκοκκική νουκλεάση για 0,5, 1 και 5 λεπτά (η χρονική διάρκεια φαίνεται από τα ορθογώνια τρίγωνα) (Κεφ.2.5.5). Το DNA που αντιστοιχούσε στα ολιγονουκλεοσώματα που προέκυψαν αναλύθηκε σε πηκτή 1,3 % αγαρόζης, η οποία βάφτηκε με βρωμιούχο αιθίδιο. Η ενσωμάτωση της H1 προσδιορίστηκε από την αύξηση στο επαναλαμβανόμενο μήκος του νουκλεοσώματος (NRL, 205 και 215 bp). Οι άσπροι κύκλοι δείχνουν το DNA που προήλθε από τα τετρανουκλεοσώματα και το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του NRL. M, "κλίμακα" DNA 123 ζευγών βάσεων (bp).

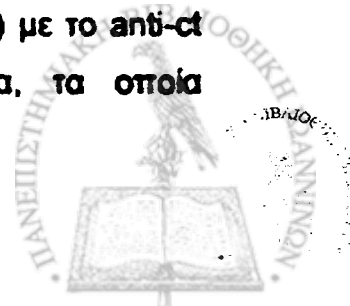
NaCl. Οι πρωτεΐνες του υπερκειμένου και των εκλουσμάτων της χρωματίνης καταβυθίστηκαν με 6 όγκους ακετόνη και αναλύθηκαν σε πηκτή 15% SDS-πολυακρυλαμιδίου παράλληλα με τις πρωτεΐνες των σφαιριδίων της χρωματίνης. Ακολούθησε ανίχνευση της προθυμοσίνης α με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης (Κεφ.2.4.4), χρησιμοποιώντας το αντίσωμα anti-ct της προθυμοσίνης α. Παρατηρήθηκε ότι η προθυμοσίνη α βρίσκεται αποκλειστικά στο υπερκείμενο (Σχήμα 33, διαδρομή 1) και όχι στις εκλουόμενες με NaCl πρωτεΐνες ή στα σφαιρίδια της χρωματίνης. Η παρατήρηση αυτή μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η προθυμοσίνη α παρά την αλληλεπίδραση της με την συνδετική ιστόνη δεν είναι σε θέση να συνδεθεί σταθερά σε χρωματίνη η οποία περιέχει H1.

Στα ίδια αποτελέσματα έχουμε καταλήξει επωάζοντας με προθυμοσίνη α με πολυνουκλεοσώματα θύμου μόσχου τα οποία περιείχαν H1 (Θ. Παπαμαρκάκη, μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Μετά από κλασμάτωση των πολυνουκλεοσωμάτων σε βαθμίδωση σακχαρόζης προέκυψε ότι η προθυμοσίνη α ανιχνεύεται στο υπερκείμενο ενώ η χρωματίνη στο ίζημα. Συνεπώς, στο συγκεκριμένο σύστημα η προθυμοσίνη α δεν συνδέεται με τη χρωματίνη-H1. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί, ότι η διαδικασία αυτή είχε μεγάλη χρονική διάρκεια, γεγονός που δυσκολεύει την ανίχνευση μιας παροδικής και όχι σταθερής αλληλεπίδρασης της προθυμοσίνης α με τη χρωματίνη. Αντίθετα, το σύστημα οργάνωσης χρωματίνης σε μαγνητικά σφαιρίδια που χρησιμοποιήσαμε επιτρέπει τη σύντομη απομόνωση της χρωματίνης χωρίς να υπεισέρχονται παράγοντες που θα μπορούσαν να αναστείλλουν μικρής συγγένειας αλληλεπιδράσεις. Το γεγονός ότι και στα δύο διαφορετικά συστήματα η προθυμοσίνη α δεν απομονώθηκε στο κλάσμα της χρωματίνης δείχνει ότι η πρωτεΐνη δεν συνδέεται σταθερά με τη χρωματίνη.





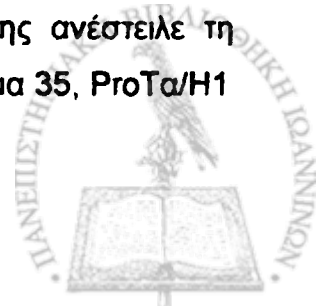
Σχήμα 34: Η προθυμοσίνη α δεν συνδέεται σε χρωματίνη η οποία περιέχει ιστόνη H1. Εγινε ανασύσταση χρωματίνης σε πλασμιδιακό DNA παρουσία 2 μονάδων H1 θύμου μόσχου. Η χρωματίνη απομονώθηκε σε μαγνητικό πεδίο και επωάστηκε με ProTa. Το δείγμα μεταφέρθηκε ξανά σε μαγνητικό πεδίο, όπου το υπερκείμενο διαχωρίστηκε από τα μαγνητικά σφαιρίδια της χρωματίνης. Η χρωματίνη εκπλύθηκε διαδοχικά με 50, 400 και 650 mM NaCl. Οι πρωτεΐνες του υπερκειμένου (S) (διαδρομή 1), των εκπλυμάτων (διαδρομές 2-4) και των σφαιριδίων (B) (διαδρομή 5) αναλύθηκαν σε πηκτή 15% SDS-PAGE και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση (Κεφ.2.4.4) με το anti-cl αντίσωμα της ProTa (1:1000). C (διαδρομή 6), 0,2 μg ProTa, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σαν θετικός μάρτυρας.

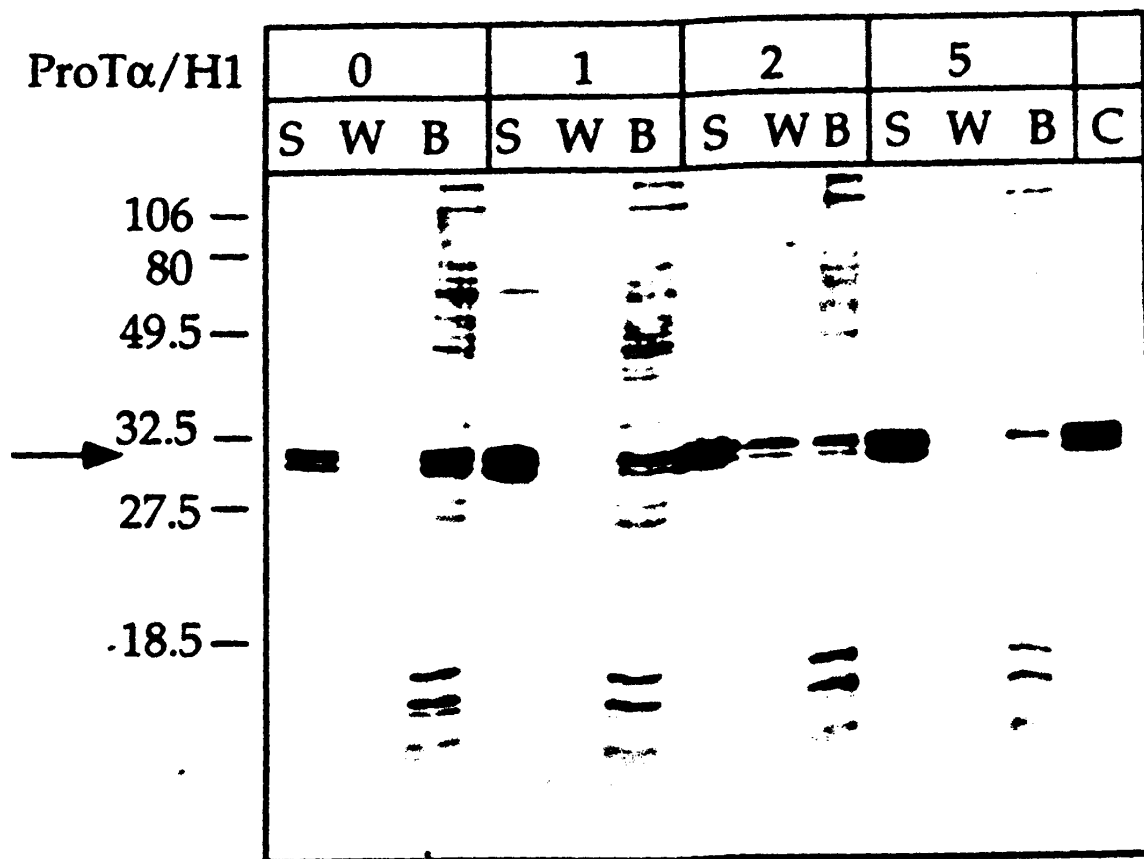


3.7.2 Επίδραση της προθυμοσίνης α στη σύνδεση της ιστόνης H1 στη χρωματίνη

Όπως προαναφέρθηκε στο μόριο της συνδετικής ιστόνης διακρίνουμε τρεις δομικές περιοχές : την κεντρική σφαιρική περιοχή και τα δύο μη αναδωλωμένα άκρα. Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι η H1 συνδέεται στο νουκλεοσωμικό DNA μέσω της κεντρικής σφαιρικής περιοχής της (Allan et al., 1980). Όπως έχει βρεθεί από προηγούμενα πειράματά μας, η ίδια περιοχή συμμετέχει στην αλληλεπίδραση της H1 με την προθυμοσίνη α (Κεφ. 3.5.2 σχήματα 27, 28). Συνεπώς, είναι πιθανόν η προθυμοσίνη α να συναγωνίζεται με τη χρωματίνη για τη σύνδεση της H1. Ο συναγωνισμός αυτός θα μπορούσε να επηρεάζει την αλληλεπίδραση της συνδετικής ιστόνης με τη χρωματίνη, βρίσκοντας εφαρμογές σε κυτταρικές διαδικασίες όπως η μεταγραφή και ο δπλασιασμός του DNA.

Για να διερευνήσουμε την παραπάνω πιθανότητα χρησιμοποιήσαμε σύστημα ανασύστασης χρωματίνης από έμβρυα *Drosophila* μεταγενέστερου σταδίου ανάπτυξης (LEX χρωματίνη). Η χρωματίνη σχηματίστηκε σε DNA ακινητοποιημένο σε μαγνητικά σφαιρίδια παρουσία ιστόνης H1 θύμου μόσχου (Κεφ.2.5.4). Τα σφαιρίδια απομονώθηκαν σε μαγνητικό πεδίο και εκπλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα EX-650 (650 mM KCl) (Κεφ.2.5.4), ώστε να απομακρυνθεί η συνδεδεμένη ιστόνη H1 και να δημιουργηθούν διαθέσιμες θέσεις σύνδεσης. Ακολούθησε εξισορρόπηση των σφαιριδίων με ρυθμιστικό διάλυμα EX-150. Στη συνέχεια, τα σφαιρίδια επώαστηκαν με 5 μονάδες ιστόνης H1 θύμου μόσχου ανά δείγμα χρωματίνης. Η επώαση έγινε σε ρυθμιστικό διάλυμα σύνδεσης (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 100 mM NaCl, 1mM MgCl₂, 0,02% NP-40) επί 50 λεπτά στους 26°C, σε συνολικό όγκο δείγματος 15 μl. Μετά το τέλος της επώασης τα σφαιρίδια μεταφέρθηκαν σε μαγνητικό πεδίο και διαχωρίστηκαν από το υπερκείμενό τους διάλυμα. Εκπλύθηκαν τρεις φορές με 15 μl διαλύματος σύνδεσης και τελικά επαναιωρήθηκαν σε 15 μl του ίδιου διαλύματος. Κατόπιν τα υπερκείμενα, το τελευταίο έκπλυμα και τα σφαιρίδια της χρωματίνης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή 15% SDS-πολυακρυλαμιδίου και έγινε χρώση της πηκτής με νιτρικό άργυρο (Κεφ.2.2.3.4). Παρατηρήθηκε, ότι απουσία προθυμοσίνης α το μεγαλύτερο μέρος της H1 συνδέθηκε στη χρωματίνη (Σχήμα 35, ProTa/H1, 0). Ωστόσο, η παρουσία της προθυμοσίνης α στο μίγμα της επώασης ανέστειλε τη σύνδεση μέρους της H1 στα σφαιρίδια της χρωματίνης (Beads) (Σχήμα 35, ProTa/H1

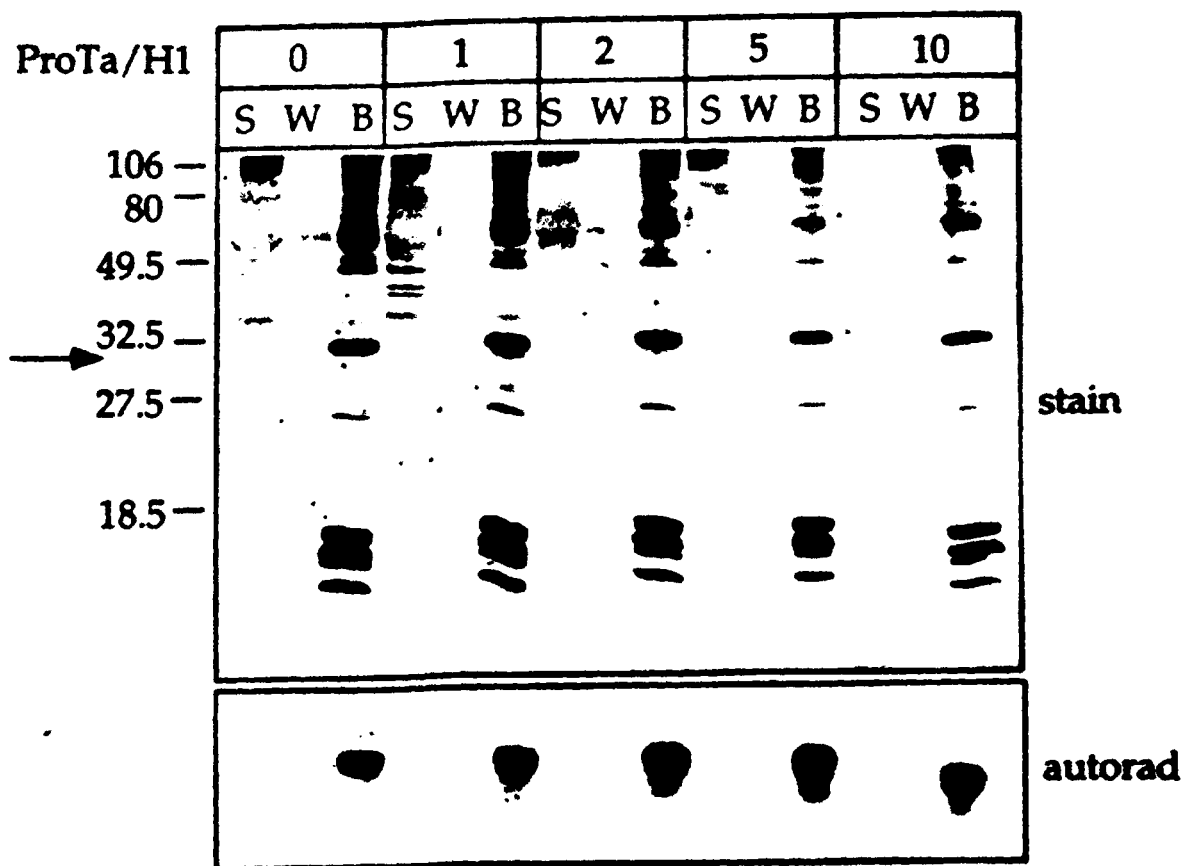




Σχήμα 35: Επίδραση της προθυμοσίνης α στη σύνδεση της ιστόνης H1 θύμου μόσχου στη χρωματίνη. Εγινε ανασύσταση χρωματίνης σε DNA ακινητοποιημένο σε μαγνητικά σφαιρίδια (Κεφ. 2.5.4), και δημιουργήθηκαν θέσεις σύνδεσης για την H1. Η χρωματίνη επωάστηκε με 5 μονάδες H1 θύμου μόσχου απουσία ProTa (ProTa / H1, 0), ή παρουσία ProTa σε αναλογία w/w ProTa:H1 1, 2 και 5 (ProTa / H1, 1, 2 και 5). Τα υπερκείμενα διαχωρίστηκαν σε μαγνητικό πεδίο και τα σφαιρίδια της χρωματίνης εκπλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα σύνδεσης. Οι πρωτεΐνες των υπερκειμένων (S), των τελευταίων εκπλυμάτων (W) και των μαγνητικών σφαιριδίων (B) αναλύθηκαν σε 15% SDS-PAGE και εμφανίστηκαν μετά από χρώση με νητρικό άργυρο (Κεφ.2.2.3.4) C, 5 μονάδες H1 από θύμο μόσχου. Οι αριθμοί στα αριστερά αντιστοιχούν σε μοριακά βάρη σε kDa. Το βέλος δείχνει την ιστόνη H1.

1). Η αναστολή αυτή εξαρτάται από την ποσότητα της προθυμοσίνης α. Αυξανόμενες ποσότητες προθυμοσίνης α έχουν σαν αποτέλεσμα την αύξηση της αναστολής (Σχήμα 35, ProTa/H1, 2 και 5), με αποτέλεσμα η H1 να ανακτάται στο υπερκείμενο (Supernatant). Πάντως, ακόμη και μεγάλες ποσότητες προθυμοσίνης α δεν μπόρεσαν να εμποδίσουν τη σύνδεση ενός μέρους της H1 στη χρωματίνη (Σχήμα 36, ProTa/H1, 5). Αντίστοιχα πειράματα έγιναν, κάτω από τις ίδιες συνθήκες, αντικαθιστώντας την H1 θύμου μόσχου με *Drosophila* H1. Όπως έχουμε δείξει, (Κεφ. 3.4, Σχήμα 22), η *Drosophila* H1 παρουσιάζει πολύ μικρή συγγένεια με την προθυμοσίνη α. Για να αυξήσουμε την ευαισθησία ανίχνευσης συμπεριλάβαμε στο μίγμα σύνδεσης της ιστόνης στη χρωματίνη ίχνη φωσφορυλιωμένης *Drosophila* H1. Η φωσφορυλίωση έγινε με $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP παρουσία της πρωτεϊνικής κινάσης C (Κεφ.2.3.3). Παρατηρήθηκε ότι, είτε απουσία προθυμοσίνης α (Σχήμα 36, ProTa/H1, 0), είτε μετά την προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων προθυμοσίνης α (Σχήμα 36, ProTa/H1, 1, 2, 5), η ποσότητα της H1 που συνδέεται στη χρωματίνη είναι η ίδια. Παρ' όλη την αυξημένη ευαισθησία της μεθόδου δεν βρέθηκε ότι η προθυμοσίνη α επηρεάζει την αλληλεπίδραση H1-χρωματίνης ακόμη και σε πολύ μεγάλες ποσότητες (Σχήμα 36, ProTa/ H1, 10).





Σχήμα 36: Επίδραση της προθυμοσίνης α στη σύνδεση της *Drosophila* H1 στη χρωματίνη. Δημιουργήθηκε χρωματίνη σε πλασμιδιακό DNA ακινητοποιημένο σε μαγνητικά σφαιρίδια, η οποία είχε διαθέσιμες θέσεις για την σύνδεση της H1. Η χρωματίνη αυτή επωάστηκε με 5 μονάδες *Drosophila* H1 και ίχνη φωσφορυλιωμένης ^{32}P -H1 (Κεφ.2.3.3), απουσία (ProTa/H1, 0) ή παρουσία ProTa σε αναλογία w/w ProTa:H1, 1, 2, 5 και 10 (ProTa/H1, 1, 2, 5 και 10). Τα υπερκείμενα διαχωρίστηκαν σε μαγνητικό πεδίο από τα σφαιρίδια της χρωματίνης τα οποία εκπλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα. Οι πρωτεΐνες των υπερκειμένων (S), του τελευταίου από τα εκπλύματα (W) και των σφαιριδίων (B) αναλύθηκαν σε 15%SDS-PAGE και η πηκτή βάφτηκε με νιτρικό άργυρο (άνω). Ακολούθησε ξήρανση της πηκτής και αυτοραδιογραφία (κάτω). Οι αριθμοί αριστερά αντιστοιχούν σε μάρτυρες μοριακών βαρών. Το βέλος δείχνει την *Drosophila* H1.

3.7.3 Ο ρόλος της αλληλεπίδρασης της προθυμοσίνης α με την ιστόνη H1 στο επαναλαμβανόμενο μήκος του νουκλεοσώματος

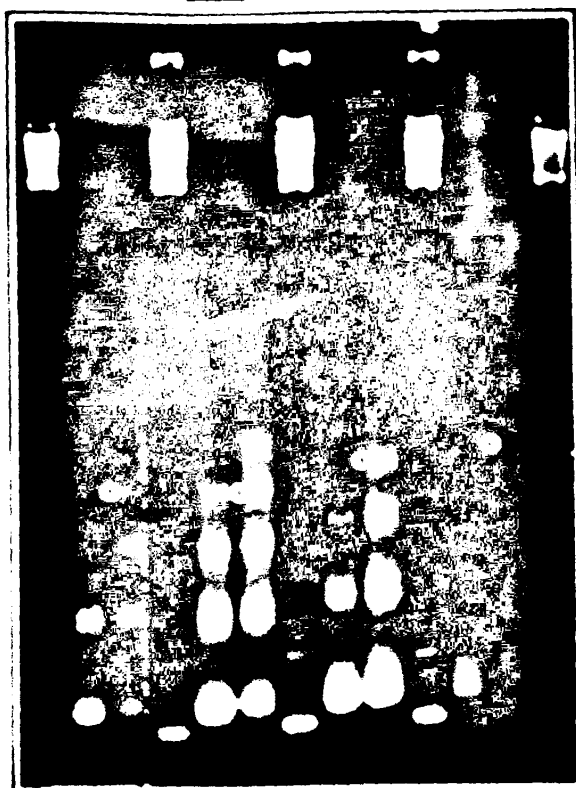
Σε μια δεύτερη προσέγγιση εξετάσαμε την επίδραση της προθυμοσίνης α κατά τη διάρκεια οργάνωσης της χρωματίνης, παρακολουθώντας το επαναλαμβανόμενο μήκος του νουκλεοσώματος (Nucleosome Repeat Length, NRL). Όπως αναφέρθηκε στο Κεφ. 3.7.1. η ενσωμάτωση της H1 στη χρωματίνη έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του NRL. Στο συγκεκριμένο πειραματικό σύστημα της *Drosophila* που χρησιμοποιήσαμε, μία μονάδα H1 (1 Unit) προκαλεί αύξηση του NRL κατά 20 ζεύγη βάσεων περίπου (Becker and Wu, 1992). Εφόσον, η προθυμοσίνη α τροποποιεί την αλληλεπίδραση συνδετικής ιστόνης – χρωματίνης (Κεφ.3.7.3., Σχήμα 36) ήταν αναμενόμενο να μεταβάλλει και το επαναλαμβανόμενο μήκος του νουκλεοσώματος.

Για να εξετάσουμε την πιθανότητα αυτή παρασκευάστηκε χρωματίνη (μεταγενέστερου σταδίου ανάπτυξης, (LEX) χρησιμοποιώντας DNA σε διάλυμα (Κεφ.2.5.5). Μετά το σχηματισμό της χρωματίνης ακολούθησε επώαση με μικροκκοκική νουκλεάση και ανάλυση του DNA των ολιγονουκλεοσωμάτων σε πηκτή 1,3% αγαρόζης (Κεφ.2.5.5). Η παρουσία της προθυμοσίνης α στο μίγμα ανασύστασης δεν επηρέασε το NRL το οποίο, όταν η χρωματίνη δεν περιλαμβάνει H1, είναι ίσο με 180 ζεύγη βάσεων (Σχήμα 37, panels 1 και 2). Η προσθήκη δύο μονάδων H1 στο μίγμα ανασύστασης, παρουσία προθυμοσίνης α, αύξησε το NRL κατά 20 ζεύγη βάσεων, γεγονός που δείχνει ότι μία μόνο μονάδα H1 ενσωματώθηκε στη χρωματίνη (Σχήμα 37, panel 3). Αντίθετα, απουσία προθυμοσίνης α, και οι δύο μονάδες της H1 ενσωματώνονται στη χρωματίνη αυξάνοντας το NRL στα 215 ζεύγη βάσεων (Σχήμα 37, panel 4).

Από τη μεταβολή του NRL βρέθηκε ότι η προθυμοσίνη α αναστέλλει τη σύνδεση μέρους της H1 στη χρωματίνη. Στο ίδιο συμπέρασμα, καταλήξαμε και στο προηγούμενο κεφάλαιο, χρησιμοποιώντας DNA ακινητοποιημένο σε μαγνητικά σφαιρίδια.



H1 units	-	-	2	2
ProTa	-	+	+	-
NRL (bp)	180	180	200	215
MNase	▲	▲	▲	▲



M 1 M 2 M 3 M 4 M

Σχήμα 37: Η προθυμοσίνη α τροποποιεί την αλληλεπίδραση της ιστόνης H1 με την χρωματίνη. Εγινε ανασύσταση χρωματίνης παρουσία εμβρύων δροσόφιλας χωρίς ιστόνη (panels 1 και 2) ή με 2 μονάδες ιστόνης H1 θύμου μόσχου (panels 3 και 4), παρουσία 6 μ g ProTa (panels 2 και 3) ή απουσία ProTa (panels 1 και 4). Ακολούθησε επώαση με μικροκκοκική νουκλεάση (για 60 sec και 30 sec όπως δείχνουν τα ορθογώνια τρίγωνα) και ηλεκτροφόρηση του DNA των ολιγονουκλεοσωμάτων που προέκυψαν σε πηκτή 1,3% αγαρόζης. Οι άσπροι κύκλοι δείχνουν το DNA που αντιστοιχεί στα τετρανουκλεοσώματα. M, "κλίμακα" DNA 123 ζευγών βάσεων (bp).

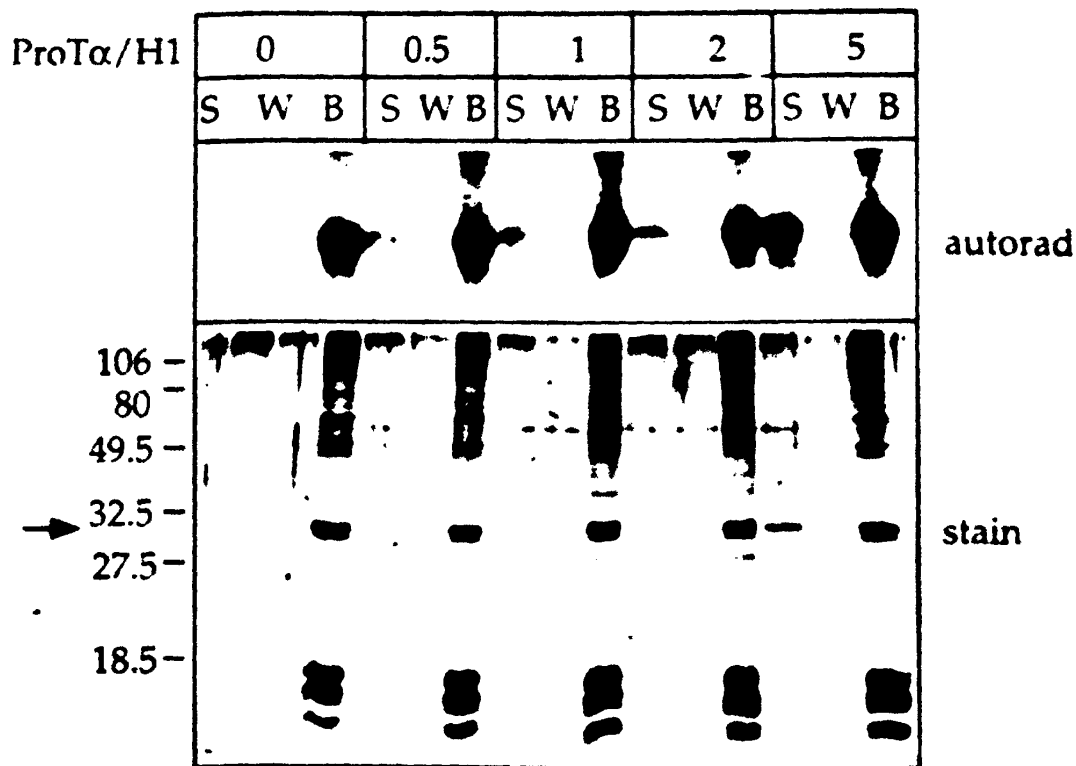


3.7.4 Απόσπαση της ιστόνης H1 από τη χρωματίνη παρουσία της προθυμοσίνης α

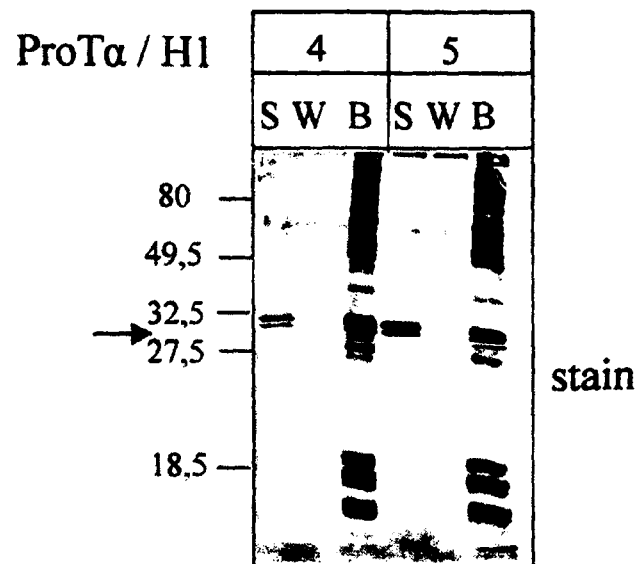
Μετά τη διαπίστωση ότι η προθυμοσίνη α αναστέλλει τη σύνδεση μέρους της ιστόνης H1 στη χρωματίνη ερευνήσαμε το ενδεχόμενο απόσπασης της ήδη ενσωματωμένης H1 από τη χρωματίνη παρουσία της προθυμοσίνης α.

Για το σκοπό αυτό έγινε ανασύσταση χρωματίνης με 5 μονάδες H1 θύμου μόσχου (Κεφ. 3.7.2.). Η H1 που προστέθηκε στο μίγμα ανασύστασης της χρωματίνης περιείχε ίχνη σημασμένης με ^{32}P H1 (Κεφ.2.3.3). Η ποσότητα της ιστόνης H1 η οποία δεν συνδέθηκε στη χρωματίνη και βρισκόταν στο υπερκείμενο, απομακρύνθηκε με μεταφορά του δείγματος σε μαγνητικό πεδίο και διαχωρισμό των μαγνητικών σφαιριδίων της χρωματίνης. Ακολούθησε επώαση της χρωματίνης-H1 σε ρυθμιστικό διάλυμα σύνδεσης επί 50 λεπτά στους 26°C, παρουσία ή απουσία προθυμοσίνης α, σε όγκο 15 μl. Τα υπερκείμενα των δειγμάτων διαχωρίστηκαν από τη χρωματίνη, η οποία εκπλύθηκε με διάλυμα σύνδεσης και επαναιωρήθηκε σε 15 μl του ίδιου διαλύματος. Οι πρωτεΐνες των υπερκειμένων, των εκπλυμάτων και των σφαιριδίων της χρωματίνης αναλύθηκαν σε πηκτή 15% SDS-πολυακρυλαμιδίου. Η πηκτή βάφτηκε με νιτρικό άργυρο και μετά την ξήρανσή της σε ξηραντήρα κενού έγινε αυτοραδιογραφία. Παρατηρήθηκε ότι μικρές ποσότητες προθυμοσίνης α απομακρύνουν από τη χρωματίνη ίχνη H1, τα οποία ανιχνεύθηκαν με την αυτοραδιογραφία (Σχήμα 38, ProTa/H1, 0,5, 1, 2). Μεγαλύτερη ποσότητα προθυμοσίνης α, αποσπά από τη χρωματίνη μια σημαντική ποσότητα H1. Η ποσότητα αυτή εμφανίζεται μετά από χρώση με νιτρικό άργυρο (Σχήμα 38, ProTa/H1, 5). Αντίστοιχα πειράματα, κάτω από τις ίδιες συνθήκες, έγιναν με χρωματίνη στην οποία συνδέθηκαν 4 μονάδες συνδετικής ιστόνης. Διατηρήθηκε η αναλογία ProTa/H1 ίση με 5/1. Όπως φαίνεται στο σχήμα 39, η προθυμοσίνη α αποσπά την H1 από χρωματίνη που έχει σχηματιστεί με μικρότερη ποσότητα ιστόνης (Σχήμα 39, ProTa/H1, 4). Ωστόσο, το ποσό της πρωτεΐνης που αποσπάται είναι μικρότερο σε σχέση με τη χρωματίνη των 5 μονάδων H1, έτσι ώστε η ποσότητα της ενσωματωμένης H1 να διατηρείται σταθερή (Σχήμα 39). Είναι επίσης αξιοσημείωτο ότι μικρότερες ποσότητες ιστόνης (1 και 2 μονάδες) δεν αποσπώνται από τη χρωματίνη ακόμη και σε αναλογία ProTa/H1 ίση με 5/1 (Σχήμα 40, H1 1, 2).

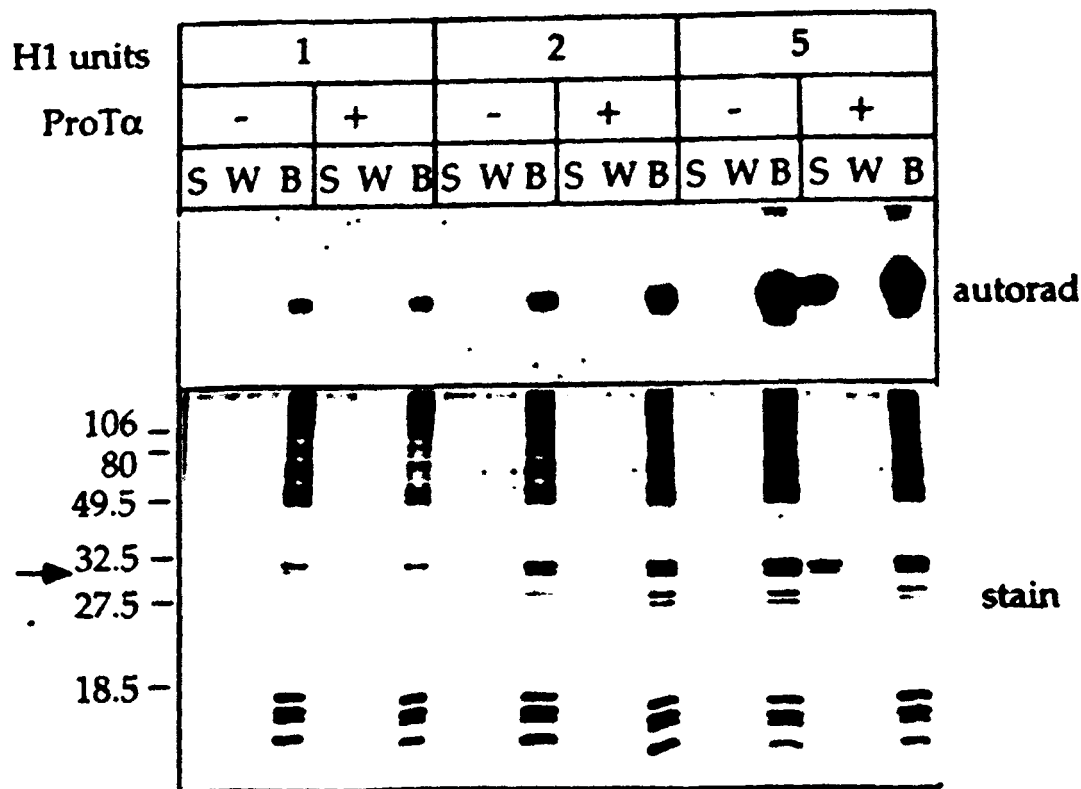




Σχήμα 38: Απόσπαση 5 μονάδων H1 θύμου μόσχου από τη χρωματίνη παρουσία της προθυμοσίνης α. Εγινε ανασύσταση χρωματίνης σε ακινητοποιημένο σε μαγνητικά σφαιρίδια DNA παρουσία 5 μονάδων ιστόνης H1 θύμου μόσχου και ιχνών φωσφορυλιωμένης με ^{32}P -H1. Η χρωματίνη απομονώθηκε σε μαγνητικό πεδίο, εκπλύθηκε με 100 mM NaCl και επωάστηκε με προθυμοσίνη α σε αναλογία ProTa:H1 (w/w), 0,5, 1, 2 και 5, ή απουσία προθυμοσίνης α (ProTa / H1, 0). Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε μαγνητικό πεδίο και τα υπερκείμενα, διαχωρίστηκαν από τα μαγνητικά σφαιρίδια, τα οποία εκπλύθηκαν με 100 mM NaCl. Οι πρωτεΐνες των υπερκειμένων (S), των εκπλυμάτων (W) και των σφαιριδίων της χρωματίνης αναλύθηκαν σε 15%SDS-PAGE. Η πηκτή βάφτηκε με νιτρικό άργυρο (κάτω) και υποβλήθηκε σε αυτοραδιογραφία (άνω). Το βέλος δείχνει την ιστόνη H1.



Σχήμα 39 : Απόσπασση 4 μονάδων H1 θύμου μόσχου από τη χρωματίνη. Όπως στο σχήμα 39 με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκαν 4 μονάδες H1 θύμου μόσχου και η αναλογία ProTa:H1 ήταν 5 / 1. Το βέλος δείχνει την ιστόνη H1.

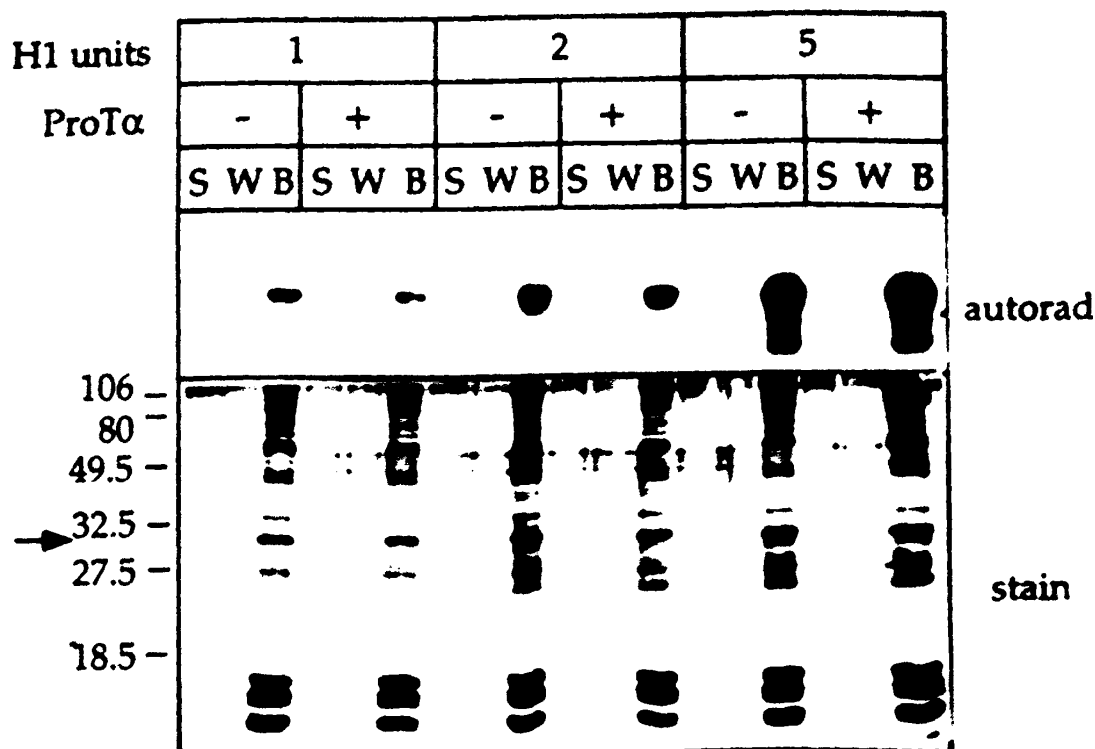


Σχήμα 40: Απόσπαση διαφόρων ποσοτήτων ιστόνης H1 θύμου μόσχου από τη χρωματίνη παρουσία προθυμοσίνης α. Δημιουργήθηκε χρωματίνη με πλασμιδιακό DNA ακινητοποιημένο σε μαγνητικά σφαιρίδια παρουσία 1, 2 και 5 μονάδων H1 θύμου μόσχου (H1 units, 1, 2 και 5). Η χρωματίνη απομονώθηκε σε μαγνητικό πεδίο και αφού εκπλύθηκε με 100 mM NaCl επωάστηκε απουσία (-), ή παρουσία (+) ProTa σε αναλογία ProTa:H1 (w/w) 5 / 1. Τα υπερκείμενα των δειγμάτων διαχωρίστηκαν υπό την επίδραση μαγνητικού πεδίου από τη χρωματίνη, η οποία εκπλύθηκε με 100 mM NaCl. Τα υπερκείμενα (S), τα εκπλύματα (W) και τα μαγνητικά σφαιρίδια (B) αναλύθηκαν σε 15%SDS-PAGE. Ακολούθησε χρώση με νιτρικό άργυρο (άνω) και αυτοραδιογραφία (κάτω).

Τα παραπάνω πειράματα επαναλήφθηκαν, κάτω από τις ίδιες συνθήκες, αντικαθιστώντας την H1 θύμου μόσχου με *Drosophila* H1. Η αναλογία ProTa/H1 διατηρήθηκε ίση με 5/1. Δεν παρατηρήθηκε απόσπαση της ιστόνης ακόμη και όταν σχηματίστηκε χρωματίνη με 5 μονάδες H1 (Σχήμα 41, H1 5 Units). Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο εφόσον όπως έχουμε δείξει σε προηγούμενα πειράματα η προθυμοσίνη α δεν παρουσιάζει συγγένεια για τη *Drosophila* H1 (Σχήμα 22).

Συνοψίζοντας τα παραπάνω, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η προθυμοσίνη α έχει τη δυνατότητα να αποσπά μέρος της H1 από τη χρωματίνη. Πρέπει όμως να τονιστεί, ότι δεν είναι δυνατό να απομακρυνθεί η συνολική ποσότητα της συνδετικής ιστόνης όσο μεγάλη ποσότητα προθυμοσίνης α και αν χρησιμοποιήσουμε.





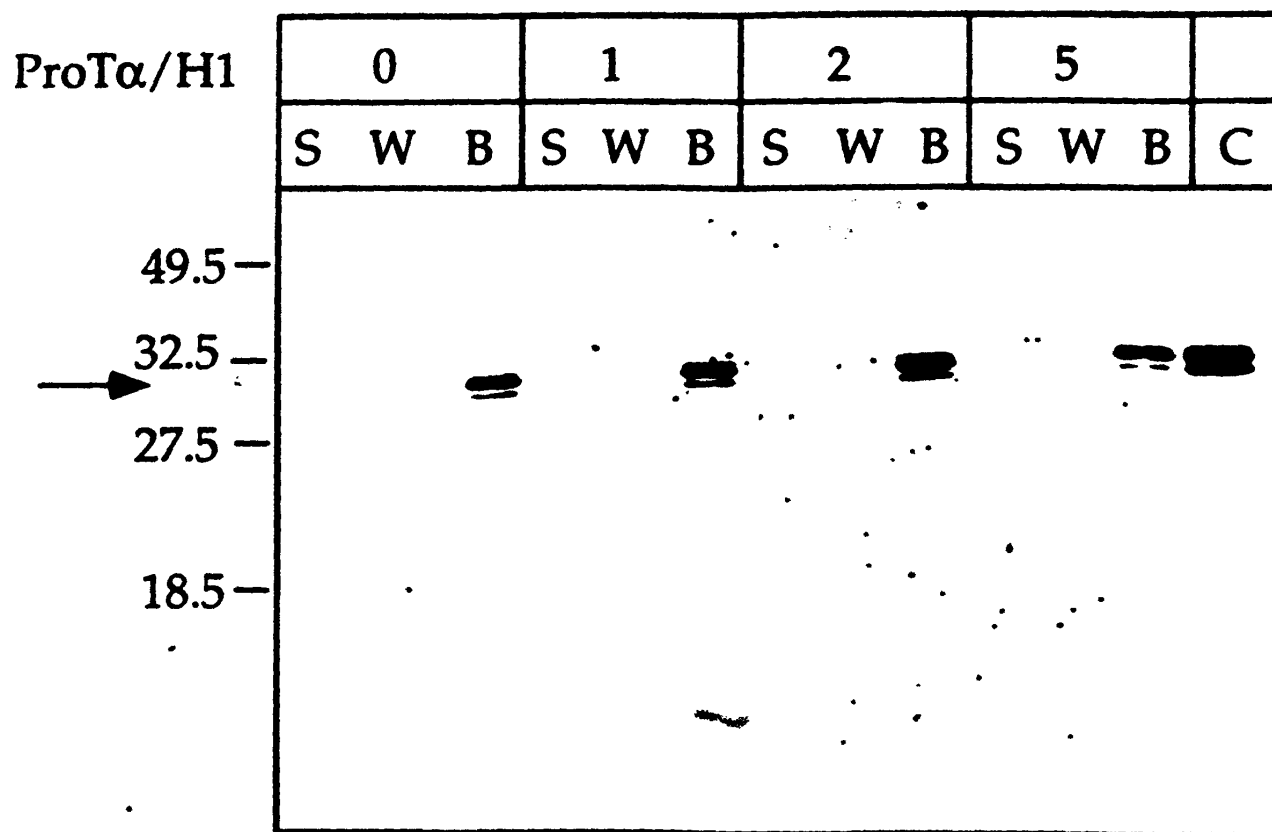
Σχήμα 41: Η προθυμοσίνη α δεν αποσπά τη *Drosophila* H1 από τη χρωματίνη. Εγινε ανασύσταση χρωματίνης σε πλασμιδιακό DNA ακινητοποιημένο σε μαγνητικά σφαιρίδια παρουσία 1, 2 και 5 μονάδων *Drosophila* H1 και ιχνών φωσφορυλκωμένης ^{32}P -*Drosophila* H1. Η χρωματίνη απομονώθηκε σε μαγνητικό πεδίο, εκπλύθηκε με 100 mM NaCl και επωάστηκε απουσία (-), ή παρουσία (+) ProTa σε αναλογία ProTa:H1 5 / 1. Τα υπερκείμενα των δειγμάτων διαχωρίστηκαν υπό την επίδραση μαγνητικού πεδίου από τη χρωματίνη, η οποία εκπλύθηκε με 100 mM NaCl. Τα υπερκείμενα (S), τα εκπλύματα (W) και τα μαγνητικά σφαιρίδια (B) αναλύθηκαν σε 15% SDS-PAGE. Ακολούθησε χρώση με νηρικό άργυρο (κάτω) και αυτοραδιογραφία (άνω). Σε αντίθεση με την H1 θύμου μόσχου η *Drosophila* H1 δεν απομακρύνεται από τη χρωματίνη παρουσία της προθυμοσίνης α.

3.7.5 Μελέτη της επίδρασης της προθυμοσίνης α στη σύνδεση της ιστόνης H1 στο DNA

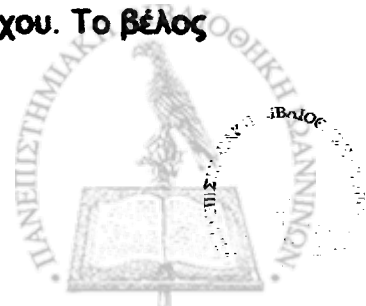
Η διαπίστωση ότι η προθυμοσίνη α αποσπά μέρος της ιστόνης H1 από τη χρωματίνη, έθεσε το ερώτημα αν τα μόρια της H1 που απομακρύνονται είναι μόρια συνδεδεμένα με μη νουκλεοσωμικό DNA. Για να εξεταστεί αυτό το ενδεχόμενο ελέγχθηκε αν η προθυμοσίνη α μπορεί να απομακρύνει μόρια συνδετικής ιστόνης από το πλασμιδιακό DNA. Όπως και κατά την ανασύσταση της χρωματίνης χρησιμοποιήθηκε ποσότητα 1 μg hsp 70 DNA στο οποίο προστέθηκαν 1,3 μg συνδετικής ιστόνης θύμου μόσχου. Τα 1,3 μg πρωτεΐνης αντιστοιχούν σε πέντε μονάδες H1 με βάση την αύξηση που η συγκεκριμένη H1 προκάλεσε στο επαναλαμβανόμενο μήκος του νουκλεοσώματος (NRL). Η σύνδεση H1 - DNA έγινε σε ρυθμιστικό διάλυμα σύνδεσης (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 0,02% NP-40) στους 26°C, επί 50 λεπτά και συνολικό όγκο 15 μl . Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε μαγνητικό πεδίο, τα υπερκείμενα απορρίφθηκαν και το DNA εκπλύθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα σύνδεσης. Ακολούθησε επώαση του DNA-H1 (26°C, 50 λεπτά) με αυξανόμενες ποσότητες προθυμοσίνης α ή απουσία προθυμοσίνης α σε ρυθμιστικό διάλυμα σύνδεσης. Τα υπερκείμενα των δειγμάτων διαχωρίστηκαν από τα σφαιρίδια, τα οποία εκπλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα σύνδεσης και στη συνέχεια τα υπερκείμενα, τα εκπλύματα και τα σφαιρίδια του DNA ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή 15% SDS-πολυακρυλαμιδίου η οποία βάφτηκε με νιτρικό άργυρο (Κεφ. 2.2.3.4). Παρατηρήθηκε ότι η προθυμοσίνη α δεν αποσπά την H1 από τα σφαιρίδια του DNA ακόμη και όταν η αναλογία ProTa/H1 είναι 5/1 (Σχήμα 42, ProTa/H1 1,2,5), ικανή δηλαδή για να αποσπάσει H1 από DNA στο οποίο θα είχε συγκροτηθεί χρωματίνη (Κεφ.3.7.1., σχήμα 38).

Στα πειράματα απόσπασης της H1 τόσο από τη χρωματίνη όσο και από το γυμνό DNA χρησιμοποιήθηκε 1 μg πλασμιδιακού DNA. Κατά τη διαδικασία ανασύστασης της χρωματίνης μέρος του DNA συνδέθηκε με τις δομικές ιστόνες του νουκλεοσώματος με αποτέλεσμα να μειωθεί η ποσότητα του η οποία ήταν διαθέσιμη για τη σύνδεση της H1. Αντίθετα, κατά την απόσπαση της συνδετικής ιστόνης από το ελεύθερο DNA ολόκληρη η ποσότητα του (1 μg) διατίθεται για τη σύνδεση της H1. Θα μπορούσε κανείς να ισχυριστεί, ότι η εξειδίκευση στην απόσπαση της H1 (απόσπαση μόνο από τη χρωματίνη) που παρατηρήθηκε, οφείλεται στη μειωμένη ποσότητα του





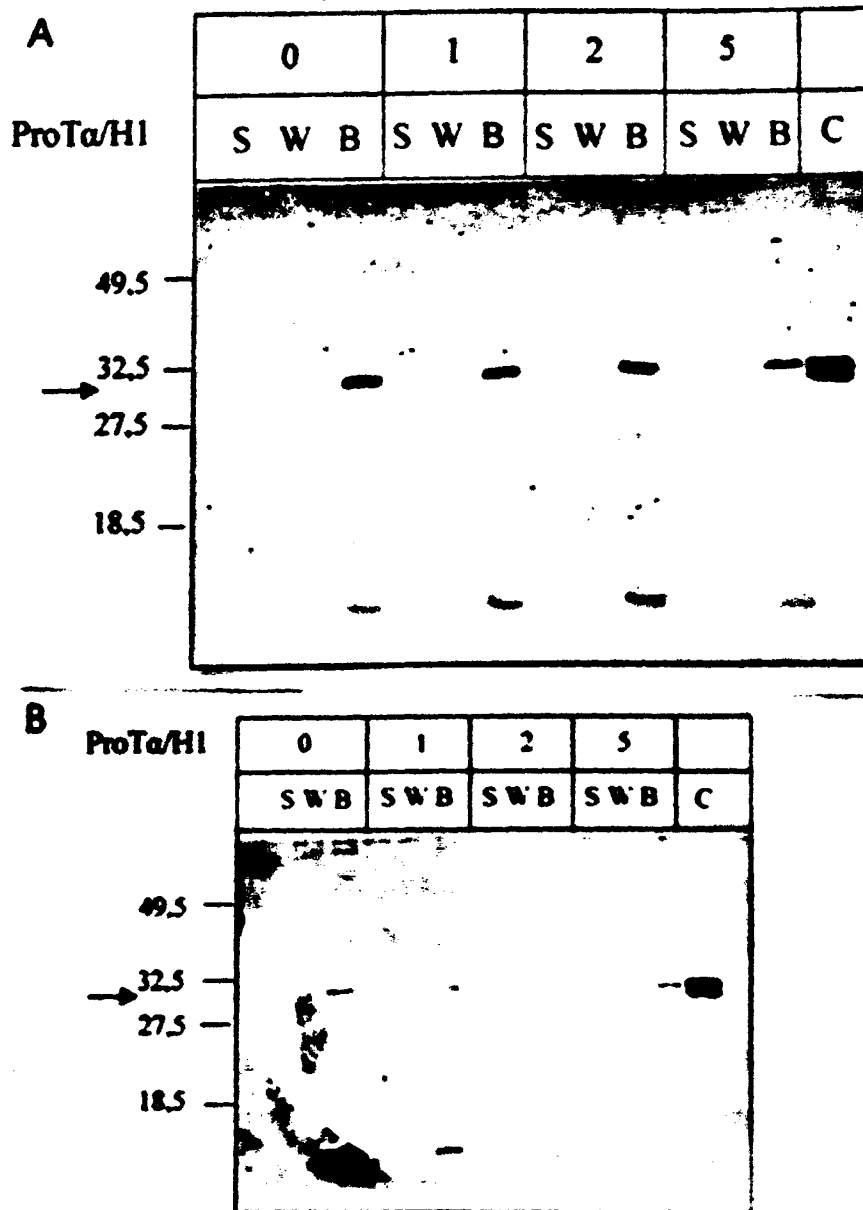
Σχήμα 42: Η προθυμοσίνη α δεν αποσπά την ιστόνη H1 από το DNA. Ποσότητα ιστόνης H1 θύμου μόσχου ίση με 1,3 μg επωάστηκε με 1 μg πλασμιδιακού DNA ακινητοποιημένου σε μαγνητικά σφαιρίδια έτσι ώστε να σχηματιστούν συμπλέγματα H1-DNA. Τα σφαιρίδια εκπλύθηκαν με 150 mM NaCl και επωάστηκαν απουσία (ProTa/H1, 0) ή παρουσία ProTa σε αναλογία ProTa:H1 (w/w) 1, 2 και 5. Τα υπερκείμενα διαχωρίστηκαν από τα σφαιρίδια τα οποία εκπλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα σύνδεσης. Οι πρωτεΐνες των υπερκειμένων (S), των εκπλυμάτων (W) και των σφαιριδίων του DNA (B), αναλύθηκαν σε 15% SDS-PAGE και εμφανίστηκαν μετά από χρώση με νιτρικό άργυρο. (C) 1,3 μg καθαρής H1 θύμου μόσχου. Το βέλος δείχνει την H1.



DNA που παραμένει διαθέσιμο για να συνδεθεί με την συνδετική ιστόνη. Για να αποκλείσουμε αυτό το ενδεχόμενο επαναλάβουμε την παραπάνω πειραματική διαδικασία χρησιμοποιώντας μικρότερες ποσότητες DNA. Βρέθηκε, ότι η απόσπαση της συνδετικής ιστόνης παρουσία προθυμοσίνης α δεν ήταν δυνατή ούτε όταν η H1 συνδέθηκε με 0,5 μg και 0,2 μg DNA (Σχήμα 43).

Από τα μέχρι τώρα πειραματικά δεδομένα συμπεραίνουμε ότι ο ρόλος της προθυμοσίνης α στην αλληλεπίδραση της ιστόνης H1 με τη χρωματίνη είναι εξειδικευμένος. Η προθυμοσίνη α δεν αποσπά την H1 από DNA όταν αυτό δε βρίσκεται σε περιβάλλον χρωματίνης. Το αποτέλεσμα αυτό αποκτά ιδιαίτερη βαρύτητα με δεδομένο το γεγονός ότι η H1 συνδέεται στο ελεύθερο DNA με μικρότερη συγγένεια απ' ότι στη χρωματίνη (Hayes and Wolffe, 1993).





Σχήμα 43: Η προθυμοσίνη α δεν αποσπά την ιστόνη H1 από μικρές ποσότητες DNA. (A) Απόσπαση από 0,5 μg DNA. Σχηματίστηκαν σύμπλοκα H1-DNA μετά από επώαση 1,3 μg H1 με 0,5 μg DNA ακινητοποιημένου σε μαγνητικά σφαιρίδια. Το DNA εκπλύθηκε με 150 mM NaCl και επωάστηκε απουσία (ProTa/H1, 0) ή παρουσία ProTa σε αναλογία ProTa:H1 1, 2 και 5 (w/w). Τα υπερκείμενα διαχωρίστηκαν από τα σφαιρίδια τα οποία εκπλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα σύνδεσης. Οι πρωτεΐνες των υπερκειμένων (S), των εκπλυμάτων (W) και των σφαιριδίων του DNA (B), αναλύθηκαν σε 15% SDS-PAGE και εμφανίστηκαν μετά από χρώση με νηρικό άργυρο. (C) 1,3 μg καθαρής H1 θύμου μόσχου. (B) Απόσπαση από 0,2 μg DNA. Οπως στο (A), με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκαν 0,2 μg DNA. Το βέλος δείχνει την H1.

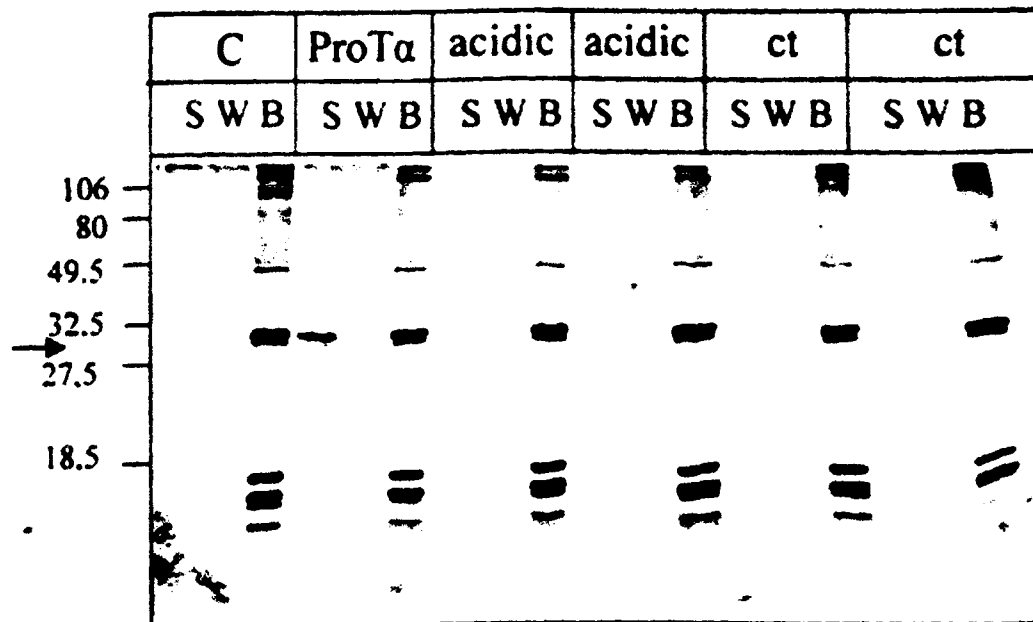
3.7.6 Απόσπαση της ιστόνης H1 από τη χρωματίνη παρουσία των πεπτιδίων της προθυμοσίνης α

Από τα προηγούμενα πειράματα μας (Κεφ.3.5.1) καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι το όξινο πεπτίδιο της προθυμοσίνης α είναι κυρίως υπεύθυνο για τη σύνδεση της με την ιστόνη H1 (Σχήμα 26). Θεωρήθηκε επομένως ενδιαφέρον να εξετάσουμε αν το πεπτίδιο αυτό μπορεί επίσης να τροποποιήσει την αλληλεπίδραση της H1 με τη χρωματίνη. Για να εξετάσουμε αυτή την πιθανότητα ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

Σχηματίστηκε χρωματίνη με 1 μ g DNA ακινητοποιημένο σε μαγνητικά σφαιρίδια, χρησιμοποιώντας εκχύλισμα από έμβρυα *Drosophila* μεταγενέστερου σταδίου ανάπτυξης (LEX χρωματίνη) (Κεφ. 2.5.4). Η ενσωματωμένη H1 απομακρύνθηκε από τη χρωματίνη στην οποία στη συνέχεια προσφέρθηκαν 5 μονάδες H1 θύμου μόσχου. Η επώαση έγινε σε ρυθμιστικό διάλυμα επί 50 λεπτά στους 26°C σε συνολικό όγκο δείγματος 15 μ l. Η μη ενσωματωμένη H1 απομακρύνθηκε από τη χρωματίνη η οποία επωάστηκε είτε με προθυμοσίνη α ή με ένα από τα πεπτίδια της (όξινο πεπτίδιο, καρβοξυτελικό πεπτίδιο). Χρησιμοποιήθηκε ποσότητα προθυμοσίνης α σε αναλογία ProTa/H1 (w/w): 5/1. Οι ποσότητες των πεπτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ισομοριακές με την προθυμοσίνη α ή πενταπλάσιες των ισομοριακών. Τα υπερκείμενα χωρίστηκαν από τα σφαιρίδια της χρωματίνης τα οποία εκπλύθηκαν και επαναιωρήθηκαν σε 15 μ l ρυθμιστικού διαλύματος. Οι πρωτεΐνες των υπερκειμένων των εκπλυμάτων και των σφαιριδίων αναλύθηκαν σε πηκτή 15% SDS-πολυακρυλαμίδιου, η οποία βάφτηκε με νιτρικό άργυρο.

Παρατηρήσαμε ότι τα πεπτίδια της προθυμοσίνης α δεν ήταν σε θέση να απομακρύνουν την H1 από τη χρωματίνη (Σχήμα 44, acidic, ct) Το αποτέλεσμα αυτό, το οποίο για το όξινο πεπτίδιο δεν ήταν το αναμενόμενο, μπορεί να εξηγηθεί βάσει των προηγούμενων παρατηρήσεών μας. Σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα του Κεφ.3.5.1 (Σχήμα 26), το όξινο πεπτίδιο έχει πολύ μικρότερη συγγένεια για την H1 σε σχέση με την προθυμοσίνη α. Το γεγονός αυτό πιθανώς εξηγεί γιατί μόνο του το πεπτίδιο δεν είναι ικανό να απομακρύνει την H1 από τη χρωματίνη.





Σχήμα 44: Το όξινο πεπτιδίο της προθυμοσίνης α δεν αποσπά την ιστόνη H1 από τη χρωματίνη. Εγινε ανασύσταση χρωματίνης με DNA ακινητοποιημένο σε μαγνητικά σφαιρίδια παρουσία 5 μονάδων ιστόνης H1 (Κεφ.2.5.4). Μετά από έκπλυση με 100 mM NaCl η χρωματίνη επωάστηκε με την ProTα, με καθένα από τα πεπτιδία της, όξινο πεπτιδίο (acidic), θυμοσίνη α1(α1), και καρβοξυτελικό πεπτιδίο (ct) ή με ρυθμιστικό διάλυμα σύνδεσης (control). Τα υπερκείμενα διαχωρίστηκαν από τα σφαιρίδια της χρωματίνης, τα οποία εκπλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα σύνδεσης. Οι πρωτεΐνες των υπερκειμένων (S), των εκπλυμάτων (W) και των σφαιριδίων (B) αναλύθηκαν σε 15%SDS-PAGE και εμφανίστηκαν μετά από χρώση με νητρικό άργυρο. Το βέλος δείχνει την H1.



4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η προθυμοσίνη α είναι μια μικρή, όξινη (pI 3,55) πρωτεΐνη που απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1984 σαν πρόδρομο μόριο του πεπτιδίου θυμοσίνη α1 (Haritos et al., 1984). Αρχικά αποδόθηκε στην πρωτεΐνη ανοσοενισχυτική δράση. Βρέθηκε ότι η προθυμοσίνη α προστατεύει ευπαθή στελέχη ποντικών από τη μόλυνση με τον μύκητα *Candida albicans* (Haritos et al., 1985b, Pan et al., 1986). Ωστόσο, η ευρεία ιστική κατανομή της προθυμοσίνης α και η παρουσία της τόσο σε λεμφικούς όσο και σε μη λεμφικούς ιστούς οδήγησε σε μια ενδοκυττάρια δράση της πρωτεΐνης. Η απομόνωση του cDNA της προθυμοσίνης α (Goodall et al., 1986, Eschenfeldt et al., 1986, Frangou-Lazaridis et al., 1988) ενίσχυσε την άποψη της ενδοκυττάριας δράσης της καθώς δεν ανιχνεύθηκε στο μόριο της πεπτιδίου το οποίο να είναι σήμα για την έκκριση της. Βρέθηκε επίσης, ότι η προθυμοσίνη α παράγεται στα ελεύθερα ριβοσωμάτια, αντίθετα από τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες οι οποίες βρίσκονται συνδεδεμένες στα μεμβρανικά (Eschenfeldt et al., 1989).

Παράλληλα, ο ενδοκυττάριος ρόλος της πρωτεΐνης υποστηρίχθηκε από τη θέση της στο κύτταρο. Οι Watts et al., έδειξαν ότι η προθυμοσίνη α μεταναστεύει στον πυρήνα των ωκυττάρων του *Xenopus* (Watts et al., 1989) και υπεύθυνη για τη μεταφορά αυτή είναι η αλληλουχία Lys-Lys-Gln-Lys (Watts et al., 1990). Η αλληλουχία αυτή εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης και αποτελεί σήμα πυρηνικής εντόπισης. Εκτός από τις λειτουργικές μελέτες για την εντόπιση της προθυμοσίνης α στον πυρήνα των κυττάρων (Manrow et al., 1991, Clinton et al., 1991) χρησιμοποιήθηκαν και ανοσοϊστοχημικές μελέτες. Με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της θυμοσίνης α1 η προθυμοσίνη α ανιχνεύθηκε στον πυρήνα κυττάρων και κυτταρικών σειρών (Su et al., 1989, Contreas et al., 1990, Roson et al., 1990a).

Σύμφωνος με την πυρηνική εντόπιση της προθυμοσίνης α αλλά και με την ενδοκυττάρια δράση της είναι και ο προτεινόμενος ρόλος της στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα επίπεδα της προθυμοσίνης α βρίσκονται αυξημένα σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα καθώς και σε αναπτυσσόμενους και καρκινικούς ιστούς (Bustelo et al., 1991, Frilingos and Tsolas 1991, Mori et al., 1993, Tsitsiloni et al., 1993). Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι το γονίδιο της προθυμοσίνης α επάγεται από το ογκογονίδιο c-myc (Eilers et al., 1990, Gaubatz et al., 1994). Τα επίπεδα του mRNA της προθυμοσίνης α ακολουθούν τα επίπεδα mRNA του c-myc σε περιπτώσεις καρκίνων, διαφοροποίησης κυττάρων, ιικής μόλυνσης και θερμικού σοκ (Mori et al.,



1993, Vareli et al., 1995). Από την ομάδα της Dr. Berger βρέθηκε ότι προσθήκη ολιγονουκλεοτιδίων συμπληρωματικών με περιοχές του mRNA της προθυμοσίνης α (antisense oligonucleotides) σε καλλιέργεια κυττάρων RPMI 8226 αναστέλουν τον πολλαπλασιασμό τους (Sbulati et al., 1991). Πρόσφατα, δείχθηκε στο Εργαστήριο μας, ότι η προθυμοσίνη α επάγεται από τον μεταγραφικό παράγοντα E2F ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση πρωτεϊνών απαραίτητων για το δπλασιασμό του DNA και τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (Vareli et al., 1996).

Η ασυνήθιστη δομή της προθυμοσίνης α μας οδηγεί επίσης σε ορισμένες εκδοχές για τη δράση της πρωτεΐνης στο κύτταρο. Το 50 % των αμινοξέων της πρωτεΐνης είναι υπολείμματα ασπαρτικών και γλουταμικών τα οποία είναι συσσωρευμένα στο κεντρικό τμήμα του πολυπεπτιδίου. Τα άκρα της πρωτεΐνης περιέχουν βασικά και όξινα αμινοξέα ενώ από το μόριο απουσιάζουν τα αρωματικά και τα θειούχα αμινοξέα. Παρόμοιες εκτεταμένες περιοχές όξινων αμινοξέων έχουν βρεθεί και σε άλλες όξινες πρωτεΐνες όπως η νουκλεοπλάσμινη και η πρωτεΐνη υψηλής κινητικότητας 1 (HMG-1). Είναι γνωστό ότι οι πρωτεΐνες αυτές έχουν ένα ρόλο που σχετίζεται με την οργάνωση της χρωματίνης (Earnshaw, 1987). Επιπλέον, *in vitro* μελέτες έδειξαν ότι η προθυμοσίνη α αλληλεπιδρά ειδικά με την συνδετική ιστόνη H1 (Paramarcaki and Tsolas, 1994). Η H1 είναι υπεύθυνη για την οργάνωση και τη σταθεροποίηση της ανώτερης δομής της χρωματίνης. Θεωρείται επίσης ότι μπορεί να επηρεάσει DNA-εξαρτώμενες διαδικασίες όπως η μεταγραφή ορισμένων γονιδίων και η αντιγραφή του DNA (Shen and Gorovsky, 1996, Halmer and Gruss, 1995). Μια σειρά από μελέτες έχουν δείξει ότι οι περιοχές της ενεργής χρωματίνης περιέχουν μικρές μόνο ποσότητες H1 πιθανότατα επειδή η H1 έχει μικρή συγγένεια για τις περιοχές αυτές (Karpov et al., 1982, Nacheva et al., 1989). Ακόμη και στις περιπτώσεις που η H1 βρίσκεται συνδεδεμένη σε ενεργά γονίδια, ο τρόπος αλληλεπίδρασής της με τη χρωματίνη είναι διαφορετικός σε σχέση με την ανενεργή χρωματίνη (Weintraub et al., 1985, Kamakaka and Thomas, 1990). Καθώς οι παράγοντες που ρυθμίζουν την αλληλεπίδραση της H1 με τη χρωματίνη δεν είναι γνωστοί, η μελέτη πρωτεϊνών όπως η προθυμοσίνη α που συνδέονται με την H1 πιθανώς να βοηθήσει στη διεκρίνιση των μηχανισμών δράσης της συνδετικής ιστόνης.

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε αναλυτικά η αλληλεπίδραση της προθυμοσίνης α με την ιστόνη H1 και διερευνήθηκαν οι συνέπειες της αλληλεπίδρασης αυτής στη σύνδεση της H1 στη χρωματίνη και στο DNA. Αναζητήθηκαν επίσης τρόποι

ρύθμισης της αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών και εξετάστηκε η φωσφορυλίωση τους. Βρέθηκε ότι η προθυμοσίνη α είναι σε θέση να επηρεάζει στη σύνδεση της H1 με τη χρωματίνη και να την τροποποιεί. Η φωσφορυλίωση κάθε μιας από τις δύο πρωτεΐνες δεν φαίνεται να επηρεάζει τη αλληλεπίδρασή τους.

Εξειδίκευση της αλληλεπίδρασης της προθυμοσίνης α με την ιστόνη H1

Στη διάρκεια της παρούσας μελέτης διερευνήθηκε διεξοδικά η σύνδεση της προθυμοσίνης α με την ιστόνη H1 και οι συνέπειές της στην αλληλεπίδραση της δεύτερης με τη χρωματίνη. Επιβεβαιώθηκε η ειδικότητα της σύνδεσης προθυμοσίνης α-H1 η οποία βασίζεται στα παρακάτω δεδομένα:

- 1) Με την τεχνική της αποτύπωσης προσδέματος διαπιστώθηκε ότι η προθυμοσίνη α συνδέεται μόνο με την H1 αν και στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης υπάρχουν ακινητοποιημένες πολλές πρωτεΐνες, όπως οι ιστόνες του νουκλεοσώματος οι οποίες είναι επίσης θετικά φορτισμένες. Η αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών εξαρτάται: i) από την ποσότητα της ακινητοποιημένης στη μεμβράνη ιστόνης, ii) από τη συγκέντρωση της προθυμοσίνης α και iii) από τη θερμοκρασία (Paramarcaki and Tsolas, 1994).
- 2) Οι δύο πρωτεΐνες συνδέονται όταν βρίσκονται σε διάλυμα όπως διαπιστώθηκε με ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες.
- 3) Η προθυμοσίνη α δεν συνδέεται με το κυτόχρωμα c παρ'όλο ότι πρόκειται για μια βασική πρωτεΐνη με μικρό μέγεθος (10,5 kDa) και σύσταση βασικών αμινοξέων 18:1, όμοια μ' αυτή της ιστόνης H1 (Lys /Arg >20:1).
- 4) Η προθυμοσίνη α συνδέεται με τη ιστόνη H1 θύμου μόσχου, ενώ έχει πολύ μικρή συγγένεια για την H1 της *Drosophila*, παρά τη σημαντική ομολογία των δύο πρωτεϊνών. Το δεδομένο αυτό ενισχύει την άποψη της εξειδίκευσης της αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών η οποία είναι διαφορετική από είδος σε είδος.
- 5) Το σύμπλεγμα προθυμοσίνης α-H1 έχει ανοσοαπομονωθεί από εκχύλισμα κυττάρων NIH3T3, γεγονός που υποστηρίζει την αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών *in vivo*.



Το 1996, η ομάδα του Dr. Freire δημοσίευσε αποτελέσματα σύμφωνα με τα οποία η προθυμοσίνη α συνδέεται όχι μόνο με την H1 αλλά και με τις ιστόνες του πυρήνα του νουκλεοσώματος (Diaz-Julien et al., 1996). Τα δεδομένα αυτά δεν συμφωνούν με τα δικά μας πειραματικά αποτελέσματα παρ' όλο που και από τις δύο ερευνητικές ομάδες έχουν χρησιμοποιηθεί αντίστοιχες μεθοδολογίες. Μια πιθανή εξήγηση για τη διαφωνία αυτή είναι ότι η ομάδα του Dr. Freire έχει χρησιμοποιήσει πολύ μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνών κατά τη μελέτη της αλληλεπίδρασής τους. Για παράδειγμα, στην τεχνική αποτύπωσης προσδέματος, οι ποσότητες των ιστονών που ακινητοποιήθηκαν στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης (10 μg από κάθε ιστόνη) είναι δέκα φορές μεγαλύτερες από αυτές που χρησιμοποιήθηκαν από τη δική μας ερευνητική ομάδα (Diaz-Julien et al., 1996, Paramarcaki and Tsolas, 1994). Αντίστοιχα μεγαλύτερες είναι και οι συγκεντρώσεις της προθυμοσίνης α με τις οποίες επωάστηκαν οι μεμβράνες, οι οποίες για την ομάδα του Dr. Freire κυμαίνονται 1 μg ProTa / ml έως 25 μg ProTa / ml. Με αυτές τις υπερβολικές ποσότητες η αντίδραση προθυμοσίνης α-ιστονών ίσως οφείλεται σε μη ειδικές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Επιπλέον, τα αποτελέσματα της ομάδας του Dr. Freire έρχονται σε αντίθεση και με τα δεδομένα για τη δομή και τη σύσταση των ιστονών. Η οικογένεια των συνδετικών ιστονών παρουσιάζει μεγάλες διαφορές από τις υπόλοιπες ιστόνες (H2A, H2B, H3, H4):

- 1) Η οικογένεια των συνδετικών ιστονών είναι πλούσια σε υπολείμματα λυσίνης (Lys/Arg: 20), ενώ οι ιστόνες του πυρήνα του νουκλεοσώματος έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε αργινίνη (Lys/Arg:<1).
- 2) Η τριτοταγής δομή των συνδετικών ιστονών περιλαμβάνει μια κεντρική περιοχή που αποτελείται από τρεις α-έλικες και μια β-στροφή και έχει σφαιρική διαμόρφωση (Ramakrishnan et al., 1993). Το άμινο και καρβοξυτελικό άκρο της συνδετικής ιστόνης έχει διαμόρφωση τυχαίου σπειράματος σε φυσιολογικές συνθήκες (Hartman et al., 1977). Αντίθετα, η δομή των ιστονών του νουκλεοσώματος αποτελείται από μια μεγάλη κεντρική α-έλικα σε κάθε άκρο της οποίας υπάρχει μια θηλεκά και μια μικρότερη α-έλικα. Η δομή αυτή λέγεται "πτυχή ιστονών" (histone fold) και είναι απαραίτητη για το σχηματισμό των ετεροδιμερών H3-H4 και H2A-H2B του νουκλεοσώματος (Arents et al., 1991) (βλέπε σχήμα 3).

Τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν ότι οι δύο οικογένειες των ιστονών διαφέρουν σημαντικά για να μπορούν να αλληλεπιδρούν με τις ίδιες κυτταρικές πρωτεΐνες.



Ταυτοποίηση των περιοχών σύνδεσης της προθυμοσίνης α με την H1.

Μετά τη διαπίστωση της εξειδίκευσης της σύνδεσης προθυμοσίνης α - ιστόνης H1 ερευνήσαμε τις περιοχές των δύο πρωτεϊνών που μπορούν να συμμετέχουν στη σύνδεση αυτή. Στο πρώτο στάδιο της διερεύνησης χρησιμοποιήσαμε βιοτινυλιωμένα πεπτιδία της προθυμοσίνης α και βρήκαμε ότι το πεπτιδίο που αντιστοιχεί στην όξινη περιοχή συνδέεται με την H1. Ανάλογα αποτελέσματα έχουν βρεθεί και για τις πρωτεΐνες νουκλεοπλασμίνη και HMG-14, οι οποίες προκαλούν την αναδιοργάνωση της χρωματίνης μέσω της αλληλεπίδρασής τους με την ιστόνη H1 (Dimitrov and Wolffe, 1996, Ding et al., 1997). Πάντως, συγκρίνοντας τη σύνδεση του όξινου πεπτιδίου και της προθυμοσίνης α βλέπουμε ότι η συγγένεια της πρωτεΐνης για την H1 είναι πολύ μεγαλύτερη και συνεπώς το άμινο και το καρβοξυτελικό άκρο της θα πρέπει να έχουν κάποιο ρόλο στη σύνδεση. Πρέπει να σημειωθεί, ότι το όξινο πεπτιδίο δεν είναι σε θέση να απομακρύνει κάποια ποσότητα της H1 από τη χρωματίνη παρ' όλο ότι συνδέεται με την H1.

Στο δεύτερο στάδιο της μελέτης μας αναζητήσαμε την περιοχή της ιστόνης H1 που αλληλεπιδρά με την προθυμοσίνη α. Από προηγούμενα πειράματα γνωρίζαμε ότι προεπώαση της H1 με πλασμιδιακό DNA παρεμποδίζει τη σύνδεση της με την προθυμοσίνη α. Ήταν συνεπώς πιθανό το DNA και προθυμοσίνη α να συνδέονται με την ίδια περιοχή της H1. Μια σειρά από μελέτες έδειξαν ότι περιοχή της H1 που συνδέεται στο νουκλεοσωμικό DNA είναι η κεντρική περιοχή της (Allan et al., 1980, Ramakrishnan et al., 1993). Η περιοχή αυτή έχει σφαιρική διαμόρφωση και είναι ανθεκτική σε περιορισμένη επώαση της H1 με τρυψίνη (Segers et al., 1991). Αντίθετα, τα φορτισμένα άκρα της H1 τα οποία δεν είναι αναδπλωμένα αποικοδομούνται. Η σύνδεση της κεντρικής περιοχής της H1 με την προθυμοσίνη α διαπιστώθηκε μετά από ηλεκτροφόρηση του συμπλέγματος τους υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες. Η σύνδεση της προθυμοσίνης α με τη συγκεκριμένη περιοχή της H1 η οποία έχει τριτοταγή δομή διαφορετική από αυτή των άλλων ιστονών μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η μεταξύ τους αλληλεπίδραση είναι ειδική. Ωστόσο, τα πειραματικά μας ευρήματα δεν αποκλείουν το ενδεχόμενο τα μη αναδπλωμένα άκρα της ιστόνης H1 να συμμετέχουν στη σύνδεση των δύο πρωτεϊνών.

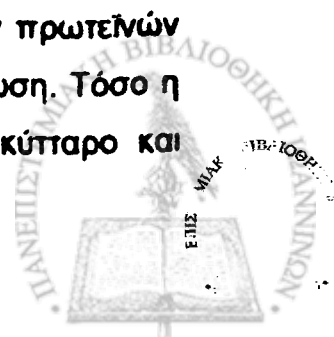
Εφόσον διαπιστώθηκε ότι η σφαιρική περιοχή της H1 είναι υπεύθυνη για τη σύνδεσή της με την προθυμοσίνη α αναζητήθηκαν οι διαφορές μεταξύ των σφαιρικών

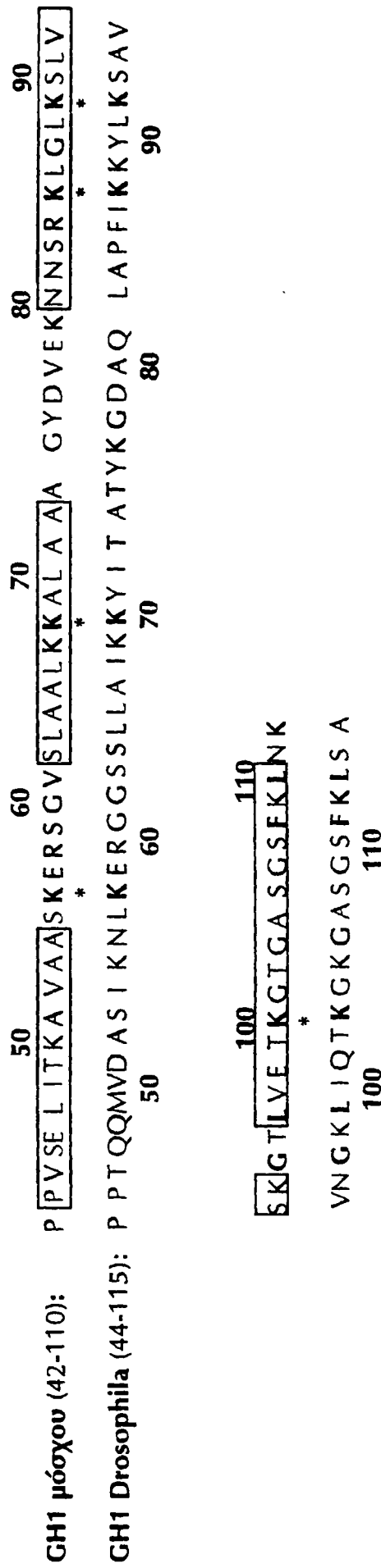


περιοχών της συνδετικής ιστόνης από θύμο μόσχου και από *Drosophila* οι οποίες θα μπορούσαν να δικαιολογήσουν τη μικρή συγγένεια της προθυμοσίνης α με την *Drosophila* H1 σε σχέση με την H1 θύμου μόσχου. Είναι γνωστό ότι οι συνδετικές ιστόνες είναι λιγότερο συντηρημένες σε σχέση με τις ιστόνες του πυρήνα του νουκλεοσώματος έτσι ώστε να παρουσιάζονται διαφορές στην αλληλουχία ακόμη και ανάμεσα σε διαφορετικές ισομορφές του ίδιου είδους κυττάρων (van Holde, 1988). Στο σχήμα 45 συγκρίνονται οι αλληλουχίες των αμινοξέων της κεντρικής περιοχής της ιστόνης H1 θύμου μόσχου (Macleod et al., 1977) και της H1 της *Drosophila* (Kremer and Hennig, 1990). Βλέπουμε ότι οι δύο αλληλουχίες έχουν συντηρημένα αμινοξέα τα οποία είναι σημαντικά για τη διαμόρφωση της κεντρικής περιοχής της πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, τα αμινοξέα Lys 84 και Lys 88 της έλικας III και Lys 100 της β-στροφής που σχηματίζουν την πρώτη περιοχή σύνδεσης της H1 στο νουκλεοσωμικό DNA καθώς και τα αμινοξέα Lys 56 και Lys 67 που σχηματίζουν τη δεύτερη περιοχή σύνδεσης (Cerf et al., 1994), παρουσιάζουν υψηλό βαθμό συντήρησης. Ωστόσο, η διαφορά ακόμη και σε περιορισμένο αριθμό αμινοξέων είναι δυνατό να προκαλέσει τροποποίηση των αλληλεπιδράσεων της σφαιρικής περιοχής. Πειράματα μεταλλαξογένεσης ειδικής θέσης (site-directed mutagenesis) έδειξαν ότι η απουσία της λυσίνης 64 (Lys 64) από τη σφαιρική περιοχή της ιστόνης H5 τροποποιεί την αλληλεπίδρασή της με το νουκλεόσωμα το οποίο δεν προστατεύεται όπως στην περίπτωση του άγριου τύπου της πρωτεΐνης (Buckle et al., 1992). Όπως φαίνεται στο σχήμα 45 οι διαφορές μεταξύ των σφαιρικών περιοχών μόσχου και *Drosophila* εντοπίζονται κυρίως στις έλικες I και III. Για παράδειγμα τα υδρόφοβα υπολείμματα Val 44, Ala 51 και Ala 53 της H1 θύμου μόσχου έχουν αντικατασταθεί με υδρόφιλα αμινοξέα στην H1 της *Drosophila*. Είναι πιθανό οι συγκεκριμένες διαφορές να διαφοροποιούν την αλληλεπίδραση των δύο ιστονών με την προθυμοσίνη α.

Αλληλεπίδραση των φωσφορυλιωμένων μορίων της προθυμοσίνης α και της ιστόνης H1

Ενας από τους τρόπους ρύθμισης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών είναι οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και ειδικότερα η φωσφορυλίωση. Τόσο η ιστόνη H1 όσο και η προθυμοσίνη α φωσφορυλιώνονται μέσα στο κύτταρο και





Σχήμα 45: Σύγκριση της αλληλουχίας αμινοξέων της κεντρικής σφαιρικής περιοχής της ιστόνης H1 θύμου μόσχου και της αντίστοιχης περιοχής της H1 της *Drosophila* (MacLeod et al., 1977, Kremer and Hennig, 1990.) Με πλαίσια σημειώνονται οι περιοχές που σχηματίζουν τις τρεις α-έλικες και την β-στροφή στην H1. Με έντονα γράμματα έχουν γραφεί τα αμινοξέα που συμβάλλουν στο σχηματισμό της τριτοταγούς δομής. Τα υπολείμματα των αμινοξέων που σχηματίζουν τις δύο περιοχές σύνδεσης με το DNA, έχουν γραφεί με έντονα γράμματα και σημειώνονται με αστερίσκο (G: globular, σφαιρική).

συνεπώς ήταν σημαντικό να εξετάσουμε αν η φωσφορυλίωση τους επηρεάζει τη μεταξύ τους αλληλεπίδραση.

Η φωσφορυλίωση της συνδετικής ιστόνης έχει απασχολήσει πολλούς ερευνητές. Σήμερα γνωρίζουμε ότι οι θέσεις αλλά και το ποσοστό της φωσφορυλίωσης διαφέρει μεταξύ των ισομορφών ακόμη και στο ίδιο κύτταρο (Ajiro et al., 1981, Talasz et al., 1996). Πάντως, σε όλες τις περιπτώσεις τα υπολείμματα των αμινοξέων που φωσφορυλώνονται είναι σερίνες και θρεονίνες που εντοπίζονται στα μη αναδιπλωμένα άκρα των μορίων των ιστονών (van Holde, 1988). Στην αναζήτηση του ρόλου της φωσφορυλίωσης *in vivo* μελετήθηκε η φωσφορυλίωση της H1 στη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου σε διαφορετικούς οργανισμούς και κυτταρικούς τύπους. Σε όλες τις περιπτώσεις βρέθηκε ότι η φωσφορυλίωση της H1 είναι πολύ χαμηλή στην G1 φάση του κύκλου και αυξάνεται κατά τη διάρκεια της S φάσης και της μίτωσης όπου γίνεται μέγιστη (van Holde, 1988, Talasz et al., 1996). Εφόσον η H1 συμμετέχει στην ανώτερη δομή της χρωματίνης, η φωσφορυλίωση της πιθανώς να επιδρά στη ρύθμιση της δομής αυτής. Βρέθηκε ότι, υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της φωσφορυλίωσης της H1 και της συμπίκνωσης της δομής της χρωματίνης και αρχικά προτάθηκε ότι τα φωσφορυλιωμένα άκρα της H1 αλληλεπιδρούν ασθενέστερα με το DNA, επάγωντας τις αλληλεπιδράσεις H1-H1 μεταξύ των νουκλεοσωμάτων οι οποίες είναι απαραίτητες για το σχηματισμό της ίνας των 30nm της χρωματίνης (Bradbury, 1974). Ωστόσο, άλλοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η αύξηση του αρνητικού φορτίου που συνεπάγεται η φωσφορυλίωση προκαλεί άπωση των γειτονικών ινών του DNA οδηγώντας σε αποσυμπύκνωση της χρωματίνης (Roth and Allis, 1992). Επειδή είναι γνωστές διαφορετικές κινάσες οι οποίες φωσφορυλώνουν την H1 *in vitro* επιλέξαμε να απομονώσουμε υπερφωσφορυλιωμένη H1 από μπιωτικά κύτταρα ώστε να προσεγγίσουμε περισσότερο την *in vivo* κατάσταση.

Εναλλακτικά, η ρύθιση της αλληλεπίδρασης H1-προθυμοσίνης α θα μπορούσε να γίνεται μέσω της φωσφορυλίωσης της προθυμοσίνης α. Αντίστοιχα, έχει προταθεί ότι η φωσφορυλίωση της όξινης πυρηνικής πρωτεΐνης νουκλεοπλασμίνης αυξάνει την ικανότητά της να αλληλεπιδρά με τις βασικές συνδετικές ιστόνες επάγωντας την αποσυμπύκνωση της χρωματίνης στο *Xenopus* (Dimitrov and Wolffe, 1996). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει, ότι η φωσφορυλιωμένη μορφή της νουκλεοπλασμίνης είναι περισσότερο ικανή να απομακρύνει από τη χρωματίνη



βασικές πρωτεΐνες κατά τη διαδικασία αποσυμπύκνωσης της δομής της (Leno et al., 1996).

Η φωσφορυλίωση της προθυμοσίνης α μελετήθηκε από δύο διαφορετικές ερευνητικές ομάδες τα αποτελέσματα των οποίων δεν συμφωνούν πλήρως. Το 1992 η ερευνητική ομάδα του Dr. Freire έδειξε ότι η προθυμοσίνη α από θυμοκύτταρα μόσχου φωσφορυλιώνεται από την κινάση της καζεΐνης II. Η κινάση είχε σαν στόχους υπολείμματα σερίνης και θρεονίνης που εντοπιζόταν στα 14 πρώτα αμινοξέα του μορίου της προθυμοσίνης α (Barcia et al., 1992). Από την ίδια ερευνητική ομάδα υποστηρίζεται ότι η ίδια περιοχή της προθυμοσίνης α φωσφορυλιώνεται *in vivo* όμως τα φωσφορικά εντοπίζονται μόνο στα υπολείμματα θρεονίνης (Barcia et al., 1993). Πρόσφατα, χαρακτηρίστηκε από την ίδια ερευνητική ομάδα η ενεργότητα, η οποία είναι πιθανώς υπεύθυνη για την παρατηρούμενη φωσφορυλίωση της προθυμοσίνης α *in vivo*. Πρόκειται για ένα ένζυμο μοριακού βάρους 180 kD που αποτελείται από δύο υπομονάδες μοριακού βάρους 64 και 60 kD. Παρ' όλο ότι το ένζυμο δεν ταυτίζεται με την κινάση της καζεΐνης II (CK II), φωσφορυλιώνει *in vitro* το αμινοτελικό δεκατετραπεπτιδίο της προθυμοσίνης α (Perez-Estevez et al., 1997).

Η ερευνητική ομάδα της Dr. Berger αρχικά υποστήριξε, ότι η προθυμοσίνη α φωσφορυλιώνεται *in vivo* στην αμινοτελική ακετυλοσερίνη της. Ένα ποσοστό μόνο 2% από την πρωτεΐνη φωσφορυλιώνεται και το επίπεδο της φωσφορυλίωσης διατηρείται σταθερό κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου σε ένα συγχρονισμένο πληθυσμό ανθρώπινων μυελωματικών κυττάρων (Sburlati et al., 1993). Ωστόσο, πρόσφατα η ίδια ερευνητική ομάδα διατύπωσε μια νέα άποψη για τη φωσφορυλίωση της προθυμοσίνης α. Σύμφωνα με αυτή οι αρχικές θέσεις για την *in vivo* φωσφορυλίωση είναι υπολείμματα γλουταμικών τα οποία είναι φωσφορυλιωμένα στοιχειομετρικά (Trumbore et al., 1997). Τα φωσφορικά αυτά είναι πάρα πολύ ασταθή και κατά την απομόνωση της πρωτεΐνης είτε υδρολύονται είτε μεταφέρονται σε γειτονικά υπολείμματα σερίνης και θρεονίνης όπου σταθεροποιούνται. Η ενέργεια που εκλύεται κατά την υδρόλυση είναι μεγαλύτερη από αυτή του ATP και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διαδικασίες που διεξάγονται στον πυρήνα του κυττάρου. Η εκδοχή αυτή φαίνεται να δικαιολογεί και τις διαφορές στη φωσφορυλίωση της σερίνης ή της θρεονίνης που παρατηρήθηκαν από τις δύο ομάδες.

Λόγω της δυσκολίας απομόνωσης φωσφορυλιωμένης προθυμοσίνης α από τα κύτταρα, η πρωτεΐνη φωσφορυλιώθηκε *in vitro* με την κινάση της καζεΐνης II (CK II).



Η CK II φωσφορυλώνει υπολείμματα σερίνης και θρεονίνης που βρίσκονται στο άμινοτελικό άκρο όξινων αμινοξέων και απαιτεί σπερμίνη για τη δράση της.

Από τα πειράματά μας δεν βρέθηκε η φωσφορυλκωση μιας εκ των δύο πρωτεϊνών να τροποποιεί τη μεταξύ τους αλληλεπίδραση. Θα πρέπει όμως να σημειωθεί ότι όσο αφορά την προθυμοσίνη α η φωσφορυλκωμένη μορφή που χρησιμοποιήθηκε παρασκευάστηκε *in vitro*. Πιθανώς, η *in vivo* φωσφορυλκωμένη μορφή της προθυμοσίνης α να επηρεάζει την αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών. Πάντως, σύμφωνα με τα αποτελέσματά των Dr. Freire και συνεργατών η *in vitro* φωσφορυλκωμένη προθυμοσίνη α, η οποία απομονώθηκε από πολλαπλασιαζόμενα θυμοκύτταρα, αλληλεπιδρά όπως και η μη φωσφορυλκωμένη με τις ιστόνες (Diaz-Julien et al., 1996)

Ρόλος της αλληλεπίδρασης της προθυμοσίνης α με την ιστόνη H1

Επίδραση του νουκλεοσώματος στη μεταγραφή

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς το DNA είναι "πακεταρισμένο" στη χρωματίνη έτσι ώστε το γονιδίωμα να έχει την οργάνωση και τη συμπυκνωμένη δομή που απαιτείται για διαδικασίες όπως ο αναδοπλασιασμός του DNA και η ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων. Η επαναλαμβανόμενη μονάδα της χρωματίνης είναι το νουκλεόσωμα. Ένα τυπικό νουκλεόσωμα περιλαμβάνει 180- 210 ζεύγη βάσεων DNA, το οκταμερές των ιστονών του πυρήνα του νουκλεοσώματος (μια δομή που αποτελείται από δύο αντίγραφα των ιστονών H2A, H2B, H3 και H4) και ένα μόριο της συνδετικής ιστόνης H1 (ή κάποιας από της ισομορφές της, όπως η H1⁰ και η H5). Η δομή της χρωματίνης σχετίζεται άμεσα με την ενεργότητα των γονιδίων. Η χρωματίνη επηρεάζει την μεταγραφική ικανότητα των γονιδίων τόσο στο επίπεδο του νουκλεοσώματος όσο και στο επίπεδο της ανώτερης δομής όταν υπάρχει ενσωματωμένη ιστόνη H1.

Στο επίπεδο του νουκλεοσώματος η τοποθέτηση του οκταμερούς των ιστονών σε συγκεκριμένα γονίδια αναστέλλει τη σύνδεση πρωτεϊνών ρυθμιστικών για τη μεταγραφή ή εμποδίζει την επιμήκυνση της αλυσίδας του RNA από την RNA πολυμεράση II. Η μελέτη της δομής και της ενεργότητας των γονιδίων *in vitro* έδειξαν ότι η μεταγραφική τους ενεργοποίηση συνοδεύεται από μετατροπές στη δομή της χρωματίνης στις περιοχές των επαγωγέων και των ενισχυτών της μεταγραφής, έτσι

ώστε να διευκολύνεται η πρόσβαση των μεταγραφικών παραγόντων. Μεθοδολογικά οι δομικές αυτές μετατροπές παρακολουθούνται με την αυξημένη πρόσβαση του ενζύμου δεοξυριβονουκλεάση I (DNase I) στη χρωματίνη. Οι περιοχές της χρωματίνης οι οποίες είναι μεταγραφικά ενεργές παρουσιάζουν μια «ανοιχτή» δομή με αποτέλεσμα να προσβάλλονται εύκολα από τη DNase I. Για παράδειγμα, η σύνδεση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στον επαγωγέα του ογκογόνου ιού του μαστικού αδένος των θηλαστικών επάγει το σχηματισμό μιας περιοχής της χρωματίνης υπερευαίσθητης στη νουκλεάση δηλαδή μιας «ανοιχτής δομής» και συνεπώς ενεργοποιεί τη μεταγραφή (Archer et al., 1992). Ένα δεύτερο παράδειγμα ρύθμισης της μεταγραφής μέσω της τροποποίησης της δομής της χρωματίνης είναι αυτό του επαγωγέα του γονιδίου PHO5 της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* του οποίου η επαγωγή συμβαδίζει επίσης με την αναδιοργάνωση της χρωματίνης.

Ο μηχανισμός με τον οποίο γίνεται η αναδιοργάνωση της χρωματίνης, ώστε να ξεπεραστεί η ανασταλτική δράση της “τοποθέτησης” του πυρήνα του νουκλεοσώματος σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Πρόσφατα, έχουν απομονωθεί συμπλέγματα πρωτεϊνών με δυνατότητα τροποποίησης της δομής της χρωματίνης. Τα συμπλέγματα αυτά χρησιμοποιούν την ενέργεια που προκύπτει από την υδρόλυση του ATP για να δράσουν και χαρακτηρίζονται ως “μηχανές” αναδιοργάνωσης της χρωματίνης. Μέχρι τώρα έχουν απομονωθεί τα εξής συμπλέγματα:

i) *SWI/SNF (SWitching mating type or Sucrose Non Fermenting)*

Το SWI/SNF απομονώθηκε για πρώτη φορά από τη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* και έχει μοριακό βάρος 2 MDa. Ομόλογα σύμπλοκα με το SWI/SNF εντοπίστηκαν στη *Drosophila* και στον άνθρωπο (Peterson and Tamkun, 1995). Επίσης, τρία ακόμη πρωτεϊνικά συμπλέγματα με ανάλογη δράση απομονώθηκαν από εκχυλίσματα εμβρύων *Drosophila*.

ii) *NURF (Nucleosome Remodeling Factor)*

Το 1995 η ομάδα των Tsukiyama και Wu δημοσίευσε τον καθαρισμό του παράγοντα αναδιοργάνωσης νουκλεοσώματος NURF (Nucleosome Remodeling Factor) (Tsukiyama and Wu, 1995). Ο NURF έχει μοριακό βάρος 500 kD, αποτελείται από 4 πολυπεπτίδια και μεσολαβεί στην ATP-εξαρτώμενη σύνδεση των μεταγραφικών παραγόντων στην χρωματίνη.

iii) *CHRAC (CHromatin Accessibility Complex)*



Το 1997 η ομάδα του Dr. Becker απομόνωσε μια ακόμη "μηχανή" αναδιοργάνωσης της χρωματίνης. Ο παράγοντας απομονώθηκε από έμβρυα *Drosophila* και ονομάστηκε σύμπλεγμα πρόσβασης στη χρωματίνη (Chromatin Accessibility Complex, CHRAC). Ο CHRAC αποτελείται από 5 υπομονάδες και έχει μοριακό βάρος 670 kD. Απομονώθηκε ως ένας παράγοντας που προκαλούσε ATP-εξαρτώμενη πρόσβαση των περιοριστικών ενζύμων σε χρωματίνη που είχε ανασυσταθεί *in vitro* (Varga-Weisz et al., 1997).

iv) ACF (ATP-dependent Chromatin assembly and remodeling Factor)

Συγχρόνως, η ομάδα του Dr. Kadonaga καθάρισε τον ATP-εξαρτώμενο παράγοντα ανασύστασης και αναδιοργάνωσης της χρωματίνης, ACF (ATP-dependent Chromatin assembly and remodeling Factor), (Ito et al., 1997). Ο ACF έχει μοριακό βάρος 220 kD και αποτελείται από 4 υπομονάδες. Απομονώθηκε σαν ένας ATP-εξαρτώμενος παράγοντας που ρύθμιζε την σωστή απόσταση μεταξύ των νουκλεοσωμάτων (spacing) κατά την ανασύσταση χρωματίνης στην εκτεταμένη δομή των 10 nm. Ωστόσο, σχετίζεται και με την αλλαγή της δομής της χρωματίνης όπως και οι NURF και CHRAC.

Τα πρωτεϊνικά συμπλέγματα που αναφέρθηκαν παρουσιάζουν ομοιότητες και διαφορές (Varga-Weisz and Becker, 1998):

- i) τα συμπλέγματα που απομονώθηκαν από τη *Drosophila* περιέχουν ως υπομονάδα την DNA-εξαρτώμενη ATPάση ISWI (imitating switch) και έχουν ως στόχους νουκλεοσώματα.
- ii) οι CHRAC και ACF έχουν την ικανότητα να επάγουν την παράταξη των νουκλεοσωμάτων σε κανονικές αποστάσεις (regular spacing) όταν βρεθούν σε περιβάλλον χρωματίνης με ακανόνιστα τοποθετημένα νουκλεοσώματα.
- iii) μέχρι σήμερα είναι γνωστό ειδικά για τον ACF ότι μπορεί να προκαλέσει τη οργάνωση των νουκλεοσωμάτων χρησιμοποιώντας μόνο ATP, πλασμιδιακό DNA, ιστόνες και την πρωτεΐνη συνοδό των ιστονών Nap I (Nucleosome assembly protein I).

Παρά τις ομοιότητες τους στη δομή και στη λειτουργία, τα παραπάνω συμπλέγματα δεν είναι εκφυλισμένα (redundant). Είναι πιθανότατα εξειδικευμένα και συνεισφέρουν σε συγκεκριμένες και διακριτές διαδικασίες σχετικές με τη χρωματίνη (Cairns, 1998). Είναι πολύ πιθανό οι δράσεις των παραπάνω παραγόντων να έχουν άμεση σύνδεση και αλληλεξάρτηση.



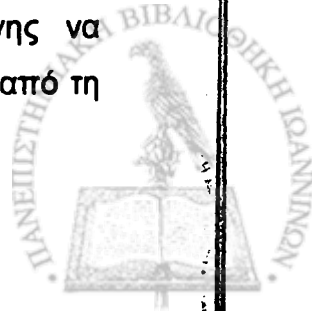
Επίδραση της συνδετικής ιστόνης στη μεταγραφή

Η συνδετική ιστόνη, η παρουσία της οποίας στο νουκλεόσωμα του δίνει το όνομα χρωματόσωμα, είναι υπεύθυνη για τη συμπύκνωση της εκτεταμένης δομής της χρωματίνης των 10 nm (δομή "κομποσχοινιού") στην ανώτερη δομή της, την ίνα των 30 nm. Η συνδετική ιστόνη έχει τη δική της συνεισφορά στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων. Η δράση της στη μεταγραφή είναι διακριτή και ανεξάρτητη από τη δράση του οκταμερούς του πυρήνα του νουκλεοσώματος που προαναφέρθηκε. Για παράδειγμα, η παρουσία του μεταγραφικού παράγοντα GAL-VP16 είναι σε θέση να αναιρέσει τη μεταγραφική αναστολή των ιστονών του πυρήνα αλλά όχι και την ανασταλτική δράση της H1 (Laybourn and Kadonaga, 1991). Η απομάκρυνση της H1 από τη χρωματίνη ή η τροποποίηση του τρόπου σύνδεσης της οδηγεί στην αλλαγή της δομής και στη μεταγραφική ενεργοποίηση. Η ανασταλτική δράση της H1 έχει μελετηθεί σε δύο διαφορετικά συστήματα i) σε χρωματίνη με ανώτερη δομή (Bouvet et al., 1994) ii) στο μεμονωμένο χρωματόσωμα (Sera and Wolffe, 1998). Αντίθετα, από την περίπτωση του πυρήνα του νουκλεοσώματος οι παράγοντες που μεσολαβούν για την αναδιοργάνωση του χρωματοσώματος και στο "άνοιγμα" της ανώτερης δομής της χρωματίνης η οποία επάγεται παρουσία της H1, δεν είναι γνωστοί. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι το "ξεδίπλωμα" συγκεκριμένων περιοχών της χρωματίνης γίνεται μέσω αλληλεπιδράσεων της H1 με όξινες πρωτεΐνες. Την άποψη αυτή υποστηρίζουν τα παρακάτω πειραματικά δεδομένα:

1) Το πολυγλουταμικό οξύ εκτοπίζει την H1 από περιοχές της χρωματίνης οι οποίες είναι συνδεδεμένες με τον πυρηνικό σκελετό (SAR, Scaffold Associated Regions), (Izaurralde et al., 1989, Kas et al., 1993).

2) Η πρωτεΐνη υψηλής κινητικότητας 14 (HMG-14) προκαλεί το ξεδίπλωμα της ανώτερης δομής της χρωματίνης η οποία επάγεται από την H1, και σταματά την ανασταλτική δράση της στη μεταγραφή. Η HMG-14 δρα μέσω της όξινης καρβοξυτελικής περιοχής της και η δράση της παραμένει ακόμη και αν η περιοχή αυτή αντικατασταθεί από τις όξινες περιοχές του GAL ή της HMG-2 (Ding et al., 1997).

3) Η όξινη πρωτεΐνη του *Xenopus* νουκλεοπλασμίνη, επάγει την αναδιοργάνωση της χρωματίνης των σωματικών κυττάρων σε εκχυλίσματα αυγών *Xenopus*. Η αναδιοργάνωση αυτή γίνεται λόγω της ικανότητας της νουκλεοπλασμίνης να απελευθερώνει επιλεκτικά την συνδετική ιστόνη H1 και την ισομορφή της H1⁰ από τη



χρωματίνη, αυξάνοντας τη μεταγραφική ικανότητα των γονιδίων (Dimitrov and Wolffe, 1996).

Τα πειραματικά μας δεδομένα που αφορούν τη σύνδεση προθυμοσίνης α-ιστόνης H1 δείχνουν ότι η προθυμοσίνη α θα μπορούσε να παίξει ένα ρόλο παρόμοιο μ' αυτόν των παραπάνω όξινων πρωτεϊνών. Έχει βρεθεί ότι η προθυμοσίνη α αλληλεπιδρά, μέσω της κεντρικής όξινης περιοχής της, με την κεντρική σφαιρική περιοχή της H1. Με την ίδια περιοχή η H1 συνδέεται στο νουκλεοσωμικό DNA και συνεπώς η προθυμοσίνη α επηρεάζει την αλληλεπίδραση της με τη χρωματίνη. Παρουσία της προθυμοσίνης α αναστέλλεται η σύνδεση της H1 στη χρωματίνη, αλλά και αποσπάται μέρος της ήδη ενσωματωμένης H1. Η δράση αυτή της προθυμοσίνης α είναι ειδική. Η πρωτεΐνη δεν είναι σε θέση να απομακρύνει την H1 από το ελεύθερο DNA. Επιπλέον, δεν επιδρά στη σύνδεση της χρωματίνης με τη *Drosophila* H1, με την οποία έχει χαμηλή συγγένεια. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η προθυμοσίνη α θα μπορούσε να συμμετέχει στην αναδιοργάνωση της δομής της χρωματίνης. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από τα πειραματικά δεδομένα των Gomez-Marquez και Rodriguez οι οποίοι έδειξαν ότι η υπερέκφραση της προθυμοσίνης α σε κύτταρα HL-60 οδηγεί σε αυξημένη πρόσβαση του ενζύμου της μικροκοκκικής νουκλεάσης στη χρωματίνη, γεγονός που δηλώνει την τροποποίηση της δομής της (Gomez-Marquez and Rodriguez, 1998). Στην ίδια εργασία αναφέρεται ότι σε κύτταρα που υπερεκφράζουν προθυμοσίνη α το ποσοστό της χρωματίνης η οποία δεν περιέχει ιστόνη H1 είναι αυξημένο.

Ο ρόλος της προθυμοσίνης α στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης μπορεί να σχετίζεται και με την απομάκρυνση της H1 κατά τη διάρκεια άλλων φυσιολογικών διαδικασιών εκτός της μεταγραφής, όπως για παράδειγμα η αντιγραφή του DNA. Αλλωστε, από τα βιβλιογραφικά δεδομένα, είναι γνωστό ότι κατά τη συγκεκριμένη διαδικασία η παρουσία της H1 έχει σε ορισμένες περιπτώσεις ανασταλτική δράση (Halmer and Gruss, 1995, Lu et al., 1998).

Εναλλακτικά, η προθυμοσίνη α θα μπορούσε να δρα σαν ένα μόριο φορέας για τα μόρια της ιστόνης H1 που απομακρύνονται από τη χρωματίνη κατά την τροποποίηση της δομής της από άλλες ενεργότητες, ενισχύοντας τη δράση τους. Ανάλογα, έχει προταθεί ότι η νουκλεοπλασμίνη, η οποία παρουσιάζει δομικές ομοιότητες με την προθυμοσίνη α, διευκολύνει τη δράση του παράγοντα αναδιοργάνωσης της χρωματίνης SWI/SNF (Peterson and Tamkun, 1995). Η παρουσία του SWI/SNF τροποποιεί τη δομή της χρωματίνης έτσι ώστε να επιτρέπεται η σύνδεση του



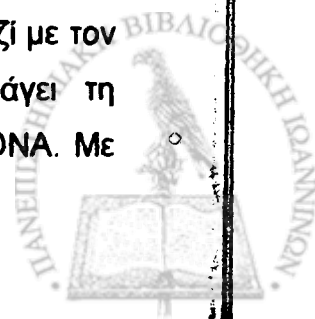
μεταγραφικού παράγοντα GAL4-AH. Μικρές συγκεντρώσεις νουκλεοπλασμίνης βοηθούν το έργο του SWI/SNF, έτσι ώστε να διπλασιάζεται η ποσότητα του GAL-AH που συνδέεται στη χρωματίνη.

Η ύπαρξη υψηλών συγκεντρώσεων προθυμοσίνης α σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα (Frillingos et al., 1991, Sburlati et al., 1991), υποδυκνείει μια άλλη πιθανή λειτουργία της στο κύτταρο. Στα διαιρούμενα κύτταρα, η συγκρότηση χρωματίνης με το νέο DNA που έχει προέλθει από το διπλασιασμό του αρχικού DNA απαιτεί τη σωστή ενσωμάτωση της ιστόνης H1. Μέχρι τη στιγμή της ενσωμάτωσης της η συνδετική ιστόνη θα πρέπει να βρίσκεται συνδεδεμένη με μόρια "συνοδούς". Η μη ειδική συσχέτισή της πρωτεΐνης με άλλα μόρια θα μπορούσε να είναι θανατηφόρα για το κύτταρο. Παρόμοιοι μηχανισμοί είναι γνωστοί για τις ιστόνες του πυρήνα του νουκλεοσώματος οι οποίες χρειάζονται επιπλέον κυτταρικούς παράγοντες για την ρυθμιζόμενη εναπόθεση τους στη χρωματίνη κατά το διπλασιασμό του DNA.

Για παράδειγμα, έχει βρεθεί ότι τα ωκύτταρα του *Xenopus laevis* περιέχουν μία δεξαμενή ιστονών η οποία χρησιμοποιείται για την συγκρότηση της χρωματίνης κατά τη διάρκεια των πολύ γρήγορων κύκλων διπλασιασμού του DNA στην πρώιμη εμβρυογένεση. Δύο όξινης πρωτεΐνες χρησιμοποιούνται για τη διατήρηση των ιστονών του πυρήνα σε διαλυτή μορφή στα ωκύτταρα του *Xenopus*. Οι H3 και H4 ιστόνες σχηματίζουν σύμπλεγμα με την πρωτεΐνη N1/N2, ενώ οι H2A και H2B ιστόνες είναι συνδεδεμένες με την νουκλεοπλασμίνη. Οι δύο παραπάνω πρωτεΐνες περιέχουν σήμα μετακίνησης στον πυρήνα καθώς και εκτεταμένες περιοχές υπολειμμάτων όξινων αμινοξέων.

Σε ανθρώπινα κύτταρα εντοπίζεται ο παράγοντας συγκρότησης χρωματίνης 1 (Chromatin Assembly Factor 1, CAF 1) ο οποίος απομονώθηκε βάση της ικανότητας του να επάγει την *de novo* συγκρότηση νουκλεοσωμάτων κατά τον *in vitro* διπλασιασμό πλασμιδιακού DNA που περιέχει την περιοχή έναρξης της αντιγραφής του SV-40 ιού. Το μεγαλύτερο μέρος της CAF-1 πρωτεΐνης που βρίσκεται στον πυρήνα των ανθρώπινων κυττάρων 293 βρίσκεται συνδεδεμένο με τις ιστόνες του πυρήνα του νουκλεοσώματος H3 και H4 σχηματίζοντας το λεγόμενο σύμπλεγμα συγκρότησης της χρωματίνης (Chromatin Assembly Complex, CAC) (Verreault et al., 1996).

Πρόσφατα κλωνοποιήθηκε η πρωτεΐνη NAP-1 της *Drosophila*, η οποία, μαζί με τον παράγοντα συγκρότησης χρωματίνης της *Drosophila* 1 (dCAF-1), επάγει τη συγκρότηση της χρωματίνης η οποία είναι ανεξάρτητη της αντιγραφής του DNA. Με



ανοσοκαταβύθιση βρέθηκε ότι η dNAP-1 είναι συνδεδεμένη με τις ιστόνες H2A και H2B σε εκχύλισμα εμβρύων *Drosophila*, γεγονός που δηλώνει ότι η dNAP-1 συνδέεται με τις H2A και H2B *in vivo* (Ito et al., 1996). Ανάλυση της πρωτοταγούς δομής της dNAP-1 αποκάλυψε την ύπαρξη ενός ισχυρά όξινου τμήματος κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο της, το οποίο πιθανώς είναι υπεύθυνο για την σύνδεση της με τις ιστόνες.

Εκτός από τις δομικές ομοιότητες με τις παραπάνω πρωτεΐνες η υπόθεση ότι η προθυμοσίνη α δρά σαν ένα μόριο συνοδός για την H1 υποστηρίζεται από τη μελέτη της κατανομής της κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Βρέθηκε ότι η προθυμοσίνη α είναι σε υψηλότερα επίπεδα κατά την S-φάση του κυτταρικού κύκλου και ότι ο επαγωγέας του γονιδίου της μπορεί να επαχθεί από τον μεταγραφικό παράγοντα E2F (Vareli et al., 1996). Ο μεταγραφικός παράγοντας E2F έχει σαν στόχο του γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στις διαδικασίες της αντιγραφής του DNA και της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου (DeGregori et al., 1995).

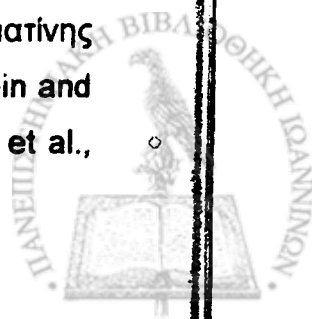
Μηχανισμός δράσης της προθυμοσίνης α στη ρύθμιση της αλληλεπίδρασης της H1 με τη χρωματίνη

Τα πειραματικά μας δεδομένα υποστηρίζουν ότι η σύνδεση μεταξύ της προθυμοσίνης α και της H1 είναι εξειδικευμένη. Επιπλέον, η προθυμοσίνη α τροποποιεί την αλληλεπίδραση της ιστόνης H1 με τη χρωματίνη (Paramarcaki and Tsolas, 1994, Karetsoy et al., 1998). Είναι αξιοσημείωτο, ότι η προθυμοσίνη α μπορεί να απομακρύνει μια συγκεκριμένη ποσότητα H1 από τη χρωματίνη αλλά όχι το σύνολο της. Συνεπώς, θα πρέπει να υπάρχει ένας μηχανισμός ο οποίος θα ρυθμίζει την αλληλεπίδραση της με συγκεκριμένα μόρια της συνδετικής ιστόνης. Παρ'όλο ότι ο μηχανισμός αυτός δεν είναι γνωστός υπάρχουν οι εξής εκδοχές:

- 1) Είναι γνωστό ότι η χρωματίνη περιέχει κατά μέσο όρο 1 μόριο ιστόνης H1 ανά νουκλεόσωμα. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις όπου δύο μόρια συνδετικής ιστόνης βρίσκονται στο οκταμερές των ιστονών, όπως στη χρωματίνη των πυρήνων ερυθροκυττάρων κοτόπουλου (Bates and Thomas, 1981). Η σύνδεση δεύτερου μορίου H1 ανά νουκλεόσωμα έχει δείχθει και με *in vitro* πειράματα. Η H1 απομακρύνθηκε από τη χρωματίνη και όταν στη συνέχεια

καθαρή H1 επανασυνδέθηκε στη χρωματίνη αυτή, με διαπίδυση βαθμίδωσης αλατιού, διαπιστώθηκε ότι υπήρχε δεύτερη θέση σύνδεσης ανά οκταμερές (Nelson et al., 1979). Επίσης, κατά τη συγκρότηση χρωματίνης με τα ελεύθερα κυττάρων συστήματα του *Xenopus* και της *Drosophila*, βρέθηκε ότι υπάρχει δυνατότητα ενσωμάτωσης ενός δεύτερου μορίου H1 στο νουκλεόσωμα (Rodriguez-Campos et al., 1989, Sandaltzopoulos et al., 1994). Πρόσφατα, οι Nightingale et al., βρήκαν, με τεχνικές επιβράδυνσης του συνδετικού DNA σε πηκτή και προστασίας του από τη μικροκκοκική νουκλεάση, ότι δύο μόρια H1 συνδέθηκαν σε ένα μόνο οκταμερές ιστονών το οποίο περιείχε το 5 S rRNA γονίδιο του *Xenopus borealis* (Nightingale et al., 1996). Η συγγένεια του δεύτερου μορίου της H1 για το νουκλεόσωμα είναι 5 φορές μικρότερη σε σχέση με το πρώτο μόριο. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, η διαφορά αυτή της συγγένειας θα μπορούσε ίσως να εξηγήσει γιατί η H1 έχει σε ορισμένες μόνο περιπτώσεις ανασταλτική δράση στη μεταγραφή των γονιδίων. Είναι πιθανό η προθυμοσίνη α να αλληλεπιδρά μόνο με τα μόρια εκείνα της H1 που δεν συνδέονται σταθερά με τη χρωματίνη, έχοντας έτσι κάποιο ρυθμιστικό ρόλο στη μεταγραφή των γονιδίων.

- 2) Η συνδετική ιστόνη αποτελεί μια μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών που περιλαμβάνει ισομορφές οι οποίες διαφέρουν αρκετά ως προς την αλληλουχία τους. Η ταυτοποίηση διαφορετικών ισομορφών της H1 στα διαφορετικά είδη κυττάρων του ίδιου οργανισμού δηλώνει ότι οι πρωτεΐνες αυτές έχουν εξειδικευμένες λειτουργίες. Εφόσον η συνδετική ιστόνη παίζει σημαντικό ρόλο στην δομή της χρωματίνης, είναι πιθανό οι διαφορές στη σύσταση των ισομορφών της H1 να επηρεάζουν την ανώτερη δομή της χρωματίνης και τη μεταγραφική ικανότητα των γονιδίων που εξαρτάται από τη δομή αυτή (van Holde, 1988). Έχειδειχθεί ότι η υπερέκφραση δύο ισομορφών H1 ποντικού σε ινοβλαστικά κύτταρα BALB/c 3T3 έχει αντίθετα αποτελέσματα στην έκφραση των γονιδίων (Brown et al., 1997). Η υπερέκφραση της H1⁰ οδηγεί σε μείωση των επιπέδων μεταγραφής όλων των γονιδίων της πολυμεράσης II που ελέγχθηκαν, ενώ αντίθετα υπερέκφραση της H1c οδηγεί σε αύξηση της μεταγραφής. Ανάλογα, στο *Xenopus* η διαδοχική έκφραση των ισομορφών B4 (συνδετική ιστόνη πρώιμου σταδίου ωογένεσης), H1s (συνδετική ιστόνη σωματικών κυττάρων) και H1⁰ (συνδετική ιστόνη τελικά διαφοροποιημένων κυττάρων) συσχετίζεται με αλλαγές στη δομή της χρωματίνης καθώς και στην ικανότητα μεταγραφής και διπλασιασμού του DNA (Khochbin and Wollfe, 1994). Χρησιμοποιώντας σαν εκμαγείο ένα δινουκλεόσωμα, οι Ura et al.,



έδειξαν ότι η συνδετική ιστόνη B4 του σταδίου διαίρεσης του *Xenopus*, συνδέεται στη χρωματίνη με μικρότερη συγγένεια από ότι η ιστόνη των σωματικών κυττάρων H1 (Ura et al., 1996). Το γεγονός αυτό είναι δυνατόν να οδηγεί στο σχηματισμό λιγότερο σταθερών δομών χρωματίνης οι οποίες αντιγράφονται και μεταγράφονται ευκολότερα. Είναι πιθανόν, η προθυμοσίνη α να συνδέεται με κάποιες μόνο από τις ισομορφές της H1 θύμου μόσχου, απομακρύνοντας αυτές από τη χρωματίνη. Αλλωστε, όπως έχει δείχθει από τους Brown et al., οι διαφορές στην κεντρική περιοχή της H1 των ισομορφών ευθύνονται για τις διαφορετικές αλληλεπιδράσεις τους. Χρησιμοποιώντας χημειρικές H1 πρωτεΐνες στις οποίες οι τρεις δομικές περιοχές των H1s και H1⁰ εναλλασσόταν συστηματικά βρέθηκε ότι η κεντρική σφαιρική περιοχή ήταν υπεύθυνη για τη διαφορετική δράση των ισομορφών (Brown et al., 1997). Όπως έχουμε διαπιστώσει, η περιοχή αυτή συμμετέχει και στη σύνδεση H1-προθυμοσίνης α και συνεπώς είναι πιθανό η προθυμοσίνη α να έχει διαφορετική συγγένεια για τις διάφορες ισομορφές.

- 3) Η ικανότητα της προθυμοσίνης α να απομακρύνει μέρος της ιστόνης H1 από τη χρωματίνη, πιθανώς να οφείλεται στο διαφορετικό περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται τα μόρια της H1 και το οποίο δημιουργείται λόγω των μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων των ιστονών του πυρήνα του νουκλεοσώματος. Έχει βρεθεί ότι τα άκρα των δομικών ιστονών τα οποία δεν συμμετέχουν στο σχηματισμό του οκταμερούς, αλληλεπιδρούν με την H1 και πιθανώς ρυθμίζουν τη σταθερότητα της σύνδεσης της με τη χρωματίνη. Μια σειρά από μελέτες υποστηρίζουν, ότι η αλληλεπιδράση των άκρων των ιστονών και της H1 είναι σημαντική για τη λειτουργία του κυττάρου (Petry and Annunziato, 1991, Juan et al., 1994). Πρωταρχικό ρόλο στην παρσπάνω αλληλεπιδράση έχουν οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των άκρων των ιστονών και κυρίως η ακετυλίωσή τους. Η ακετυλίωση των ιστονών στα υπολείμματα των λυσινών του αμινοτελικού άκρου τους είναι μια από τις βασικές διαδικασίες του κυττάρου η οποία αποτελεί ορόσημο της μεταγραφικά ενεργής χρωματίνης. Με την ακετυλίωση εξουδετερώνονται τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα των λυσινών και μειώνεται η συγγένειά τους για το DNA, με συνέπεια τα αμινοτελικά άκρα να απομακρύνονται από τα νουκλεοσώματα τα οποία ξεδιπλώνονται, επιτρέποντας την πρόσβαση σε μεταγραφικούς παράγοντες (Grunstein, 1997). Μια σειρά από μελέτες έχουν δείξει ότι η ακετυλίωση των δομικών ιστονών αλλάζει την ικανότητα

της H1 να επάγει τη συμπυκνωμένη μορφή της χρωματίνης η οποία οδηγεί σε μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας των γονιδίων. Οι Ridsdale και συνεργάτες χρησιμοποίησαν ένα σύστημα που περιλάμβανε τμήματα χρωματίνης που αντιστοιχούσαν σε ενεργά γονίδια. Παρουσία της H1 η χρωματίνη αυτή αποκτούσε πιο συμπυκνωμένη δομή με αποτέλεσμα να καταβυθίζεται σε 0,15 M NaCl. Βρέθηκε ότι η υπερακετυλίωση των δομικών ιστονών αύξανε την ικανότητα της χρωματίνης αυτής να αντιστέκεται στην καταβύθιση η οποία οφειλόταν στην προσθήκη της H1 (Ridsdale et al, 1990). Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι η ακετυλίωση των ιστονών του νουκλεοσώματος αναιρεί την ανασταλτική δράση στη μεταγραφή του *hsp26* γονιδίου, η οποία προκαλείται από την ενσωμάτωση μορίων H1 στη συγκεκριμένη χρωματίνη (Nightingale et al., 1998). Τα παραπάνω, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι τα ακετυλιωμένα άκρα ευνοούν μια λιγότερο σταθερή αλληλεπίδραση της H1 με τον πυρήνα του νουκλεοσώματος. Συνεπώς, περιορίζουν την παρεμποδιστική δράση της H1 στη σύνδεση μεταγραφικών παραγόντων στη χρωματίνη. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξε και η ερευνητική ομάδα του Dr. Workman μετά τη μελέτης της σύνδεσης του μεταγραφικού παράγοντα USF στα νουκλεοσώματα (Juan et al., 1994). Βρέθηκε ότι ενώ η παρουσία της H1 στο νουκλεόσωμα ανέστειλε τη σύνδεση του USF, η αυξημένη ακετυλίωση των ιστονών περιορίσε την αναστολή αυτή. Από τα δεδομένα αυτά μπορούμε να υποθέσουμε, ότι η προθυμοσίνη α στοχεύει στα μόρια εκείνα της H1 τα οποία συνδέονται με ακετυλιωμένα μόρια ιστονών του πυρήνα με συνέπεια τη μη σταθερή αλληλεπίδρασή τους με την χρωματίνη. Ανάλογα, μπορούμε να σκεφτούμε ότι άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών του πυρήνα του νουκλεοσώματος, όπως η φωσφορυλίωση, θα επηρέαζε τη σύνδεση μεταξύ της H1 και της χρωματίνης. Έχει δειχθεί, ότι αυτή η φωσφορυλίωση επιδρά στη σύνδεση των H1 ιστονών του *Xenopus* στη χρωματίνη (Dimitrov et al., 1994).

- 4) Τέλος θα μπορούσαμε να πούμε ότι η προθυμοσίνη α απομακρύνει από τη χρωματίνη μέρος της H1, αφήνοντας στο νουκλεόσωμα ποσότητα ίση με αυτή που απαντάται φυσιολογικά στο κύτταρο. Συγκεκριμένοι μεταγραφικοί παράγοντες όπως οι Sp-1 και GAL-VP16 δεν επηρεάζονται από την υπάρχουσα ποσότητα της H1 αλλά η αύξηση των μορίων της H1 έχει σαν αποτέλεσμα την πλήρη αναστολή της μεταγραφής (Laybourn and Kadonaga, 1991).

Η δράση της όξινης πυρηνικής πρωτεΐνης προθυμοσίνης α στο κύτταρο δεν έχει ακόμη διασαφηνιστεί. Ωστόσο, από τη σύνδεσή της με την H1 και την ικανότητά της



της να τροποποιεί την αλληλεπίδρασή της με τη χρωματίνη, φαίνεται πιθανό να συμμετέχει σε DNA-εξαρτώμενες διαδικασίες όπως η αντιγραφή του DNA και η μεταγραφή. Περαιτέρω μελέτες προς αυτή την κατεύθυνση, όπως επίσης και προς την κατανόηση το μηχανισμού ρύθμισης της σύνδεσης των δύο πρωτεϊνών, θα παρουσίαζαν μεγάλο ενδιαφέρον.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τη μελέτη της αλληλεπίδρασης της προθυμοσίνης α με την ιστόνη H1 και τη χρωματίνη προκύπτουν τα παρακάτω συμπεράσματα:

1. Η προθυμοσίνη α συνδέεται ειδικά με την ιστόνη H1 τόσο *in vitro* όσο και στις φυσιολογικές συνθήκες του κυττάρου.
2. Η όξινη περιοχή της προθυμοσίνης α, η οποία εντοπίζεται στο κέντρο του μορίου της, ευθύνεται κυρίως για τη σύνδεση των δύο πρωτεϊνών.
3. Η κεντρική σφαιρική περιοχή της συνδετικής ιστόνης συμμετέχει στην αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών.
4. Η φωσφορυλίωση μιας από τις δύο πρωτεΐνες κάτω από συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες δεν επηρεάζει την αλληλεπίδρασή τους.
5. Η προθυμοσίνη α δεν συνδέεται σταθερά με τη χρωματίνη.
6. Η προθυμοσίνη α εμποδίζει την σύνδεση ενός μέρους της ιστόνης H1 στη χρωματίνη.
7. Η προθυμοσίνη α έχει την ικανότητα να απομακρύνει μόρια συνδετικής ιστόνης που βρίσκονται ήδη ενσωματωμένα στη χρωματίνη.



ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΟΘΥΜΟΣΙΝΗΣ α ΜΕ ΤΗ ΣΥΝΔΕΤΙΚΗ ΙΣΤΟΝΗ Η1 ΚΑΙ ΤΗ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗ

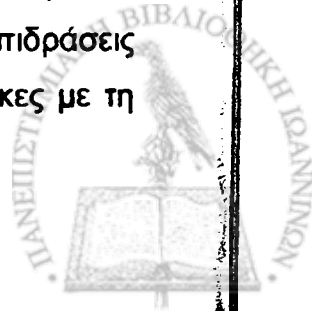
ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η προθυμοσίνη α είναι μια μικρή (12,5 kDa), συντηρημένη, όξινη (pI 3,5) πρωτεΐνη, που εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων. Ο βιολογικός ρόλος της πρωτεΐνης παραμένει μέχρι σήμερα αδιευκρίνιστος. Αρχικά, θεωρήθηκε ότι η προθυμοσίνη α έχει ανοσοενισχυτική δράση, ωστόσο μια σειρά δεδομένων υποστηρίζουν έναν ενδοκυττάριο ρόλο που σχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η έκφραση της προθυμοσίνης α είναι υψηλή σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα και τα επίπεδά της πρωτεΐνης αυξάνονται σε αναπτυσσόμενους και καρκινικούς ιστούς. Το mRNA της προθυμοσίνης α αυξάνεται κατά την S/G2 φάση του κυτταρικού κύκλου και επάγεται από τον μεταγραφικό παράγοντα E2F ο οποίος θεωρείται ότι ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το διπλασιασμό του DNA ή/και τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.

Η ασυνήθιστη δομή της προθυμοσίνης α ίσως είναι ενδεικτική για το ρόλο της στο κύτταρο. Η πρωτεΐνη χαρακτηρίζεται από μια εκτεταμένη, μη αναδιπλωμένη διαμόρφωση, που της επιτρέπει να αλληλεπιδρά με άλλα συστατικά του κυττάρου. Στο κέντρο του μορίου της εντοπίζεται μια ισχυρά όξινη περιοχή. Ομοιες όξινες περιοχές έχουν βρεθεί και σε άλλες πυρηνικές πρωτεΐνες όπως οι HMG-1 και η νουκλεοπλασμίνη, των οποίων η λειτουργία σχετίζεται με την οργάνωση της δομής της χρωματίνης.

Πρόσφατες μελέτες στο εργαστήριό μας έδειξαν ότι η προθυμοσίνη α συνδέεται εκλεκτικά με την συνδετική ιστόνη H1. Η H1 είναι υπεύθυνη για την οργάνωση της ανώτερης δομής της χρωματίνης και επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων. Συνεπώς, η αλληλεπίδρασή της με την προθυμοσίνη α πιθανώς να βοηθήσει τη διερεύνηση του ρόλου της τελευταίας στο κύτταρο.

Στην παρούσα μελέτη ερευνήθηκε διεξοδικά η σύνδεση προθυμοσίνης α – H1 και το αποτέλεσμά της στην αλληλεπίδραση της H1 με τη χρωματίνη. Στο πρώτο στάδιο της μελέτης, με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης υπό μη διατακτικές συνθήκες, διαπιστώθηκε ότι οι δύο πρωτεΐνες συνδέονται όταν βρίσκονται σε διάλυμα. Η σύνδεση αυτή είναι εξειδικευμένη και δεν οφείλεται απλώς σε αλληλεπιδράσεις φορτίων καθώς η προθυμοσίνη α δεν συνδέεται κάτω από τις ίδιες συνθήκες με τη



μικρή βασική πρωτεΐνη κυτόχρωμα c. Οι δύο πρωτεΐνες συναπομονώθηκαν με χρωματογραφία συγγένειας από εκχύλισμα κυτάρων NIH3T3, γεγονός που δείχνει ότι αλληλεπιδρούν υπό φυσιολογικές συνθήκες. Επιπλέον, βρέθηκε ότι η αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών εξαρτάται επίσης από το είδος του οργανισμού. Η προθυμοσίνη α παρουσιάζει μειωμένη συγγένεια για την κατώτερη εξελικτικά H1 της *Drosophila* σε σχέση με την H1 θύμου μόσχου.

Στο επόμενο στάδιο της μελέτης αναζητήθηκαν οι περιοχές των δύο πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη σύνδεσή τους. Με την τεχνική της αποτύπωσης προσδέματος και χρησιμοποιώντας συνθετικά παρασκευασμένα πεπτίδια της προθυμοσίνης α (θυμοσίνη α1, καρβοξυτελικό πεπτίδιο και όξινο πεπτίδιο) παρατηρήθηκε, ότι η όξινη, κεντρική περιοχή της προθυμοσίνης α συνδέεται με την H1. Όσο αφορά την περιοχή της H1 που αλληλεπιδρά με την προθυμοσίνη α ηλεκτροφόρηση υπό μη διατακτικές συνθήκες και ομοιοπολική διασύνδεση μορίων, έδειξαν ότι η προθυμοσίνη α συνδέεται με την κεντρική σφαιρική περιοχή της H1. Διερευνήθηκε επίσης αν η φωσφορυλίωση της προθυμοσίνης α ή της συνδετικής ιστόνης, επηρεάζει την αλληλεπίδρασή τους. Βρέθηκε ότι, προθυμοσίνη α, η οποία φωσφορυλκώθηκε *in vitro* με την κινάση της καζεΐνης II συνδέεται με την H1. Εναλλακτικά, η μπιωτική υπερφωσφορυλκωμένη H1 συνδέεται με την προθυμοσίνη α.

Εφόσον, η προθυμοσίνη α συνδέεται με την H1, εξετάσαμε το ενδεχόμενο να συνδέεται με τη χρωματίνη. Για τη συγκρότηση της χρωματίνης χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα εμβρύων *Drosophila*, ένα σύστημα αναγέννησης ενέργειας και DNA το οποίο σε ορισμένες περιπτώσεις ήταν ακινητοποιημένο σε μαγνητικά σφαιρίδια. Με ανοσοαποτύπωση βρέθηκε ότι η προθυμοσίνη α δεν συνδέεται σταθερά στην χρωματίνη. Ωστόσο, η προθυμοσίνη α τροποποιεί τη σύνδεση της H1 με τη χρωματίνη. Όταν η συνδετική ιστόνη προστέθηκε σε σχηματισμένη χρωματίνη, παρουσία προθυμοσίνης α, ένα μέρος της συνδετικής ιστόνης δεν ενσωματώθηκε στη χρωματίνη. Επιπλέον, η προθυμοσίνη α εμποδίζει την ενσωμάτωση της H1, η οποία προστέθηκε στο μίγμα συγκρότησης της χρωματίνης. Είναι αξιοσημείωτο, ότι όταν η *Drosophila* H1 χρησιμοποιήθηκε σε παρόμοια πειράματα, η προθυμοσίνη α δεν εμποδίζει τη σύνδεσή της στη χρωματίνη.

Διαπιστώθηκε επίσης, ότι η προθυμοσίνη α μπορεί να απομακρύνει ορισμένα μόρια H1 τα οποία είναι ήδη ενσωματωμένα στη χρωματίνη. Πρέπει να τονίσουμε ότι τα μόρια αυτά είναι συνδεδεμένα σε νουκλεοσωμικό DNA γιατί όπως διαπιστώσαμε η προθυμοσίνη α δεν μπορεί να αποσπάσει H1 από γυμνό DNA. Αντίστοιχα πειράματα

με την *Drosophila* H1 έδειξαν ότι ακόμη και μεγάλες ποσότητες προθυμοσίνης α δεν αποσπούν την *Drosophila* H1 από τη χρωματίνη.

Ο ρόλος της προθυμοσίνης α στο κύτταρο δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Ωστόσο, βάσει της ικανότητας της να συνδέεται με την ιστόνη H1 και να τροποποιεί την αλληλεπίδρασή της με τη χρωματίνη, είναι πιθανό η προθυμοσίνη α να συμμετέχει μαζί με άλλους παράγοντες σε διαδικασίες που απαιτούν την αναδιοργάνωση της δομής της χρωματίνης, όπως η αντιγραφή του DNA και η μεταγραφή. Πιστεύουμε ότι επιπλέον μελέτες προς αυτή την κατεύθυνση, καθώς και προς την εξακρίβωση του μηχανισμού που ρυθμίζει την αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών θα παρουσίαζαν μεγάλο ενδιαφέρον.



SUMMARY

THE INTERACTION OF PROTHYMOSIN α WITH HISTONE H1 AND CHROMATIN

DOCTORATE THESIS

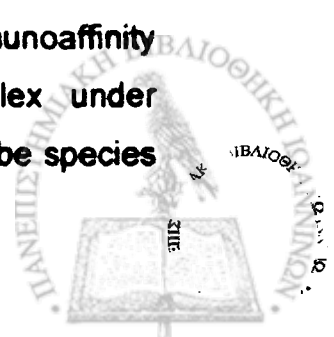
Zoe Karetsou

Prothymosin α (ProT α), is a small (12,5 kDa), conserved, acidic (pI 3,5) polypeptide, localized in the cell nucleus. The biological role of this polypeptide remains unclear. Although the protein was initially thought to have an immunoenhancing action, several lines of evidence suggest an intracellular role related to cell proliferation. ProT α expression is elevated in proliferating cells, malignant tissues and in response to increased levels of c-myc. Prothymosin α mRNA increases at the S/G₂ phase of the cell cycle and can be induced by the transcription factor E2F.

The unusual structure of prothymosin α might be indicative of its function. The protein has an extended, non folded conformation, which favors its interaction with other cellular components. Moreover, ProT α contains an acidic region in the center of the molecule. Similar acidic domains have been found in other nuclear proteins, such as HMG-1 and nucleoplasmin, which have well documented functions related to the organisation of chromatin.

Recent studies in our laboratory have shown that ProT α binds selectively to linker histone H1. Histone H1 is responsible for the organization of the higher order structure of chromatin and affects gene expression. Therefore, its interaction with ProT α may provide information for the function of ProT α in the cell.

In this study, we present a detailed analysis of the interaction of ProT α with H1 and its effect on the association of H1 with chromatin. At the first stage of the study we further characterized ProT α - H1 interaction. Using a bandshifting assay, we found that the two proteins interact in solution. This interaction is specific, since ProT α did not bind to the basic protein cytochrome c under the same conditions. ProT α and histone H1 were co-isolated from crude cell extracts by immunoaffinity chromatography, suggesting the occurrence of ProT α - H1 complex under physiological conditions. In addition, ProT α - H1 interaction was found to be species



dependent. ProT α exhibited a reduced affinity for *Drosophila* H1 compared with calf H1.

We next attempted to identify the interacting sites between ProT α and histone H1. Using far western analysis and biotinylated peptides of ProT α , we found that the acidic domain of ProT α was involved in the interaction with H1. Concerning the binding site of ProT α within the H1 molecule, bandshifting assay and cross-linking analysis revealed that ProT α binds to the central, globular domain of H1. We also studied whether the phosphorylation of ProT α or histone H1 affects the interaction of these proteins. We found that casein kinase II phosphorylated ProT α associated with H1. Alternatively, mitotic, hyperphosphorylated H1 interacted with ProT α .

The final objective of our study was the investigation of a potential association of ProT α and chromatin. We reconstituted chromatin, using extracts derived from *Drosophila* embryos, an energy regenerating system and DNA immobilized on paramagnetic beads. Immunoblotting analysis revealed that ProT α did not associate stably with H1 - containing chromatin. Interestingly, it was found that ProT α was able to modulate the interaction of H1 with chromatin. When ProT α was added to a chromatin assembly mixture it prevented the interaction of bulk H1 with chromatin. Consistently, when H1 was added to assembled chromatin, in the presence of ProT α , the excess of H1 did not incorporate in chromatin. Remarkably, when *Drosophila* H1 was used in a similar experiment, ProT α did not affect its binding to chromatin. Finally, we found that ProT α was able to detach an amount of histone H1 from chromatin. Importantly, the H1 molecules that were stripped from chromatin by ProT α did not represent linker histones bound to non nucleosomal DNA, because ProT α was unable to dissociate H1 from naked DNA. As expected, the interaction of *Drosophila* H1 with chromatin was not affected by ProT α .

Although, the role of prothymosin α remains elusive, its ability to interact with histone H1 and chromatin may provide insight into its physiological function.



7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aaronson, R.T. and Blobel, G. (1975) Isolation of nuclear pore complexes in association with lamina, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 1007-1011.

Ajiro, K., Borun, T. W. and Cohen, L. H. (1981) Phosphorylation states of different histone 1 subtypes and their relationship to chromatin functions during the HeLa Cell Cycle, *Biochemistry* 20, 1445-1454.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. D. (1994) *Molecular Biology of the Cell*, 3rd edition, Garland Publishing, Inc., New York.

Allan, J., Hartman, P. G., Crane-Robinson, C., and Aviles, F. X. (1980) The structure of histone H1 and its location in chromatin, *Nature* 288, 675-679.

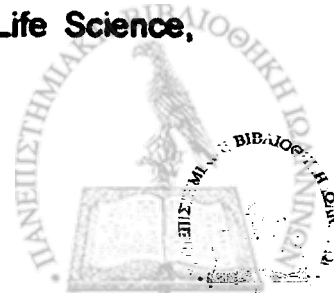
Allan, J., Mitchell, T., Harborne, N., Bohm, L., & Crane-Robinson, C. (1986) Roles of H1 domains in determining higher order chromatin structure and H1 location, *J. Mol. Biol.* 187, 591-601.

Alvarez, C. V., Zalvide, E. C., Cancio, E., Dieguez, C., Regueiro, B. J., Vega, F. V. and Dominguez, F. (1993) Prothymosin α mRNA is expressed in competent and proliferating rat thyroid cells (FRTL-5) but is not sufficient to elicit cell progression through the cell cycle, *J. Mol. Endocr.* 11, 249-256.

Alvarez, C. V., Zalvide, E. C., Cancio, E., Dieguez, C., Regueiro, B. J., Vega, F. V. and Dominguez, F. (1993) Regulation of prothymosin α mRNA levels in rat pituitary tumor cells, *Neuroendocrinology* 57, 1048-1056.

Andrews, A. T. (1986) *Electrophoresis*, Oxford Science Publications, Oxford.

Anonymous (1994) *ECL Western blotting protocols*, Amersham Life Science, Little Chalfont, Buckinghamshire, England.



Appel, J. L., Arnold, E. B., Contreas, C., Bergsman, K. L. and Luk, G. (1993) Relationship of thymosin α 1 immunoreactivity and exogenous stimulation on proliferation of human colon cancer cell lines, *Biochem. Arch.* **9**, 355-363.

Arents, G., Burlingame, R. W., Wang, B.-C., Love, W. E. and Moudrianakis, E. N. (1991) The nucleosomal core histone octamer at 3,1 Å resolution: A tripartite protein assembly and a left-handed superhelix, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10148-10152.

Arents, G. and Moudrianakis, E. N. (1995) The histone fold: A ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 11170-11174.

Bates, D. L. & Thomas, J.O. (1981) Histones H1 and H5: one or two molecules per nucleosome?, *Nucleic Acids Res.* **9**, 5883-5894.

Barcia, M. G., Castro, J. M., Jullien, C. D., Gonzalez, C. G. and Freire, M. (1992) Prothymosin α is phosphorylated by casein kinase 2, *FEBS Lett.* **312**, 152-156.

Barcia, M. G., Castro, J. M., Jullien, C. D. and Freire, M. (1993) Prothymosin α is phosphorylated in proliferating stimulated cells, *J. Biol. Chem.* **268**, 47094-4708.

Βαρέλη, Κ. (1995) Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης της προθυμοσίνης α και της παραθυμοσίνης σε κυτταρικούς πληθυσμούς, Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

Baxevanis, C. N., Reclos, G. J., Papamichail, M. and Tsokos G. C. (1987) Prothymosin α restores the depressed autologous and allogeneic mixed lymphocyte responses in patients with systemic lupus erythematosus, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **9**, 429-440.



Baxevanis, C. N., Redos G. J., Economou M., Arsenis, P., Katsiyannis, A., Seferiades, K., Papadopoulos, G., Tsolas, O. and Papamichail M. (1988) Mechanism of action of prothymosin α in the human autologous mixed lymphocyte response, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **10**, 443-461.

Baxevanis, C.N., Anastasopoulos, E., Redos, G. J. and Papamichail M. (1990) Prothymosin α enhances HLA-DR antigen expression on monocytes from patients with multiple sclerosis, *J. Neuroimmunol.* **27**, 141-147.

Baxevanis, C. N., Thanos, D., Redos, G. J., Anastasopoulos, E., Tsokos, G. C., Papamatheakis, J. and Papamichail, M. (1992) Prothymosin α enhances human and murine MHC class II surface antigen expression and messenger RNA accumulation, *J. Immunol.* **148**, 1979-1984.

Bayer, E. A., & Wilchek, M. (1980) The use of avidin-biotin complex as a tool in molecular biology, *Methods Biochem. Anal.* **26**, 1-45.

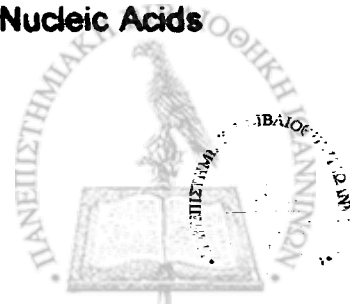
Becker, P. B., & Wu, C. (1992) Cell-free system for assembly of transcriptionally repressed chromatin from *Drosophila* embryos, *Mol. Cell. Biol.* **12**, 2241-2249.

Bidlingmeyer, B. A., Cohen, S. A. and Tarvin, T.L. (1984) Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization, *J. Chromatography* **336**, 98-104.

Blank, T. A., & Becker, P. B. (1996) The effect of nucleosome phasing sequences and DNA topology on nucleosome spacing, *J. Mol. Biol.* **260**, 1-8.

Blank, T. A., Sandaltzopoulos, R., & Becker, P. B. (1997) Biochemical analysis of chromatin structure and function using *Drosophila* embryo extracts, *Methods* **12**, 28-35.

Bresnick, E. H., Bustin, M., Marsaud, V., Richard-Foy, H., & Hager, G. L. (1991) The transcriptionally active MMTV promoter is depleted of histone H1, *Nucleic Acids Res.* **20**, 273-278.



Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

Bonne-Andrea, C., Harper, F., Sobezak, J. and de Recondo, A.-M. (1984) Rat liver HMG1: a physiological nucleosome assembly factor, *EMBO J.* **3**, 1193-1199.

Bouvet, P., Dimitrov, S., & Wolffe, A. P. (1994) Specific regulation of *Xenopus* chromosomal 5S rRNA gene transcription *in vivo* by histone H1, *Genes Dev.* **8**, 1147-1159.

Buckle, R. S., Maman, J. D. and Allan, J. (1992) Site-directed mutagenesis studies on the binding of the globular domain of linker histone H5 to the nucleosome, *J. Mol. Biol.* **223**, 651-659.

Buckland, R. M. (1986) Strong signals from streptavidin-biotin, *Nature* **320**, 557-558.

Bustelo X. R., Otero A., Gomez-Marquez J. and Freire M. (1991) Expression of the rat prothymosin α gene during T-lymphocyte proliferation and liver regeneration, *J. Biol. Chem.* **266**, 1443-1447.

Burnette, W. N. (1981) "Western Blotting". Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A, *Anal. Biochem.* **112**, 195-203.

Cairns, B. R. (1998) Chromatin remodeling machines: similar motors, ulterior motives, *TIBS* **23**, 20-25.



Caldarella, J., Goodall, G. J., Felix, A. M., Heimer, E. P., Salvin, S. B. and Horecker, B. L. (1983) Thymosin α_{11} : A peptide related to thymosin α_1 isolated from thymosin fraction 5, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 7424-7427.

Cerf, C., Lippens, G., Muyldermans, S., Segers, A., Ramakrishnan, V., Wodak, S.J., Hallenga, K., & Wyns, L. (1993) Homo-and heteronuclear two-dimensional NMR studies of the globular domain of histone H1: Sequential assignment and secondary structure, *Biochemistry* **32**, 11345-11351.

Cerf, C., Lippens, G., Ramakrishnan, V., Muyldermans, S., Segers, A., Wyns, L., Wodak, S. J. and Hallenga, K. (1994) Homo- and heteronuclear two-dimensional NMR studies of the globular domain of histone H1: full assignment, tertiary structure, and comparison with the globular domain of histone H5, *Biochemistry* **33**, 11079-11086.

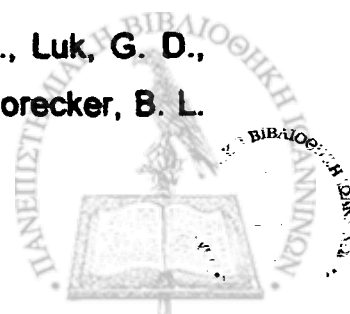
Clark, D. J. and Kimura, T. (1990) Electrostatic mechanism of chromatin folding, *J. Mol. Biol.* **211**, 883-896.

Clark, D. J. and Thomas, J. O. (1986) Salt-dependent co-operative interaction of histone H1 with linear DNA, *J. Mol. Biol.* **187**, 569-580.

Clark, K. L., Halay, E. D., Lai, E. and Burley, S. K. (1993) Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5, *Nature* **364**, 412-420.

Clinton, M., Graeve, L., El-Dorry, H., Rodriguez-Boulan, E. and Horecker, B. L. (1991) Evidence for nuclear targeting of prothymosin α and parathymosin synthesized *in situ*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 6608-6612.

Contreas, C. N., Mutchnick, M. G., Palmer, K. C., Weller, F. E., Luk, G. D., Naylor, P. H., Erdos, M. R., Goldstein, A. L., Panneerselvam, C. and Horecker, B. L.



(1990) Cellular levels of thymosin immunoreactive peptides are linked to proliferative events: Evidence for a nuclear site of action, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3269-3273.

Cordero, O. J., Sarandeses, C. S., Lopez, J. L. and Nogueira, M. (1992) Prothymosin α enhances human natural killer cell cytotoxicity role in mediating signals for NK activity, *Lymph. Cytok. Research* **11**, 277-285.

Cordero, O. J., Sarandeses, C. S. and Nogueira, M. (1994) Prothymosin α receptors on peripheral blood mononuclear cells, *FEBS Lett.* **341**, 23-27.

Cordero, O. J., Sarandeses, C. S., Lopez-Rodriguez, J. L. and Nogueira, M. (1995) The presense and cytotoxicity of CD16+CD2- subset from PBL and NK cells in long-term IL-2 cultures enhanced by prothymosin- α , *Immunopharmacology*, **29**, 215-223.

Cordero, O. J., Sarandeses, C. S. and Nogueira, M. (1996) Binding of ^{125}I -prothymosin α to lymphoblasts through the non-thymosin α_1 sequence, *Life Sciences* **58**, 1757-1770.

Creighton, T. E. (1989) *Protein function, a practical approach*, IRL Press, Oxford.

Croston, G. E., Lira, L. M., and Kadonaga, J. T. (1991) A general method for purification of H1 histones that are active for repression of basal RNA polymerase II transcription, *Protein Expression Purif.* **2**, 162-169.

DeGregori, J., Kowalik, T., & Nevins, J. R. (1995) Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis and G₁/S-regulatory genes, *Mol. Cell. Biol.* **15**, 4215-4224.



Díaz-Jullien, C., Pérez-Estévez, A., Covelo, G., and Freire, M. (1996) Prothymosin α binds histones in vitro and shows activity in nucleosome assembly assay, *Biochim. Biophys. Acta* 1296, 219-227.

Dimitrov, S., and Wolffe, A. P. (1996) Remodeling somatic nuclei in *Xenopus laevis* egg extracts: molecular mechanisms for the selective release of histones H1 and H1⁰ from chromatin and the acquisition of transcriptional competence, *EMBO J.* 15, 5897-5906.

Ding, H-F, Bustin, M., and Hansen, U. (1997) Alleviation of histone H1-mediated transcriptional repression and chromatin compaction by the acidic activation region in chromosomal protein HMG-14, *Mol. Cell. Biol* 17, 5843-5855.

Dominguez, F., Magdalena, C., Cancio E., Roson, E., Paredes, J., Loidi, L., Zalvide, J., Fraga, M., Forteza, J., Regueiro, B. J. and Puente, J. L. (1993) Tissue concentrations of prothymosin alpha: A novel proliferation index of primary breast cancer, *Eur. J. Cancer* 29, 893-897 .

Dosil, M., Alvarez-Fernandez L. and Marquez-Gomez J. (1993) Differentiation-linked expression of prothymosin α gene in human myeloid leukemic cells, *Exp. Cell Research* 204, 94-101.

Earnshaw, W. C., Honda, B. M. and Laskey, R. A. (1980) Assembly of nucleosomes: the reaction involving *X. laevis* nucleoplasmin, *Cell* 21, 373- 383.

Earnshaw, W. C. (1987) Anionic regions in nuclear proteins, *J. Cell. Biol.* 105, 1479-1482.

Economou, M., Seferiadis, K., Frangou-Lazaridis, M., Horecker, B. L. and Tsolas, O. (1988) Isolation and partial characterization of prothymosin α from porcine tissues, *FEBS Lett.* 233, 342-346.



Eilers, M., Schirm, S., & Bishop, J. M. (1991) The MYC protein activates transcription of the α -prothymosin gene, *EMBO J.* **10**, 133-141.

Eschenfeldt, W. H. and Berger, S. L. (1986) The human prothymosin α gene is polymorphic and induced upon growth stimulation: evidence using a cloned cDNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 9403-9407.

Eschenfeldt, W. H., Manrow, R. E., Krug, M. S. and Berger, S. L. (1989) Isolation and partial sequencing of the human prothymosin α gene family, *J. Biol. Chem.* **264**, 7546-7555.

Frangou-Lazaridis, M., Clinton M., Goodall, G. J. and Horecker, B. L. (1988) Prothymosin α and parathymosin: Amino acid sequences deduced from the cloned rat spleen cDNAs, *Arch. Biochem. Biophys.* **263**, 305-310.

Freire, M., Hannappel, E., Rey, M., Freire, J. M., Kido, H. and Horecker, B. L. (1981) Purification of thymus mRNA coding for a 16000-dalton polypeptide containing the thymosin α_1 sequence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 192-195.

Fraga M., Garcia-Gaballero T., Dominguez F., Perez-Becerra E., Beiras A. and Forteza J. (1993) Immunohistochemical location of prothymosin alpha in regenerating human hepatocytes and hepatocellular carcinomas, *Virchows Archiv A Pathol. Anat.* **423**, 449-452.

Frillingos, S., Frangou-Lazaridis, M., Seferiadis, K., Hulmes, J. D., Pan, Y-C.E. and Tsolas, O. (1991) Isolation and partial sequence of goat spleen prothymosin α , *Mol. Cell. Biochem.* **108**, 85-94.

Φριλίγγος, Ε. (1990) Απομόνωση και δομή προθυμοσίνης α αιγός και συμβολή στη διερεύνηση της βιολογικής δραστηριότητας της προθυμοσίνης α , Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.



Gallego, R., Roson, E., Garcia-Caballero, T., Fraga, M., Forteza, J., Dominguez, F. and Beiras, A. (1992) Prothymosin alpha expression in lymph nodes and tonsils: An optical and ultrastructural study. *Acta Anat.* **143**, 219-222.

Gast, K., Damaschun, H., Eckert, K., Schulze-Foster, K., Maurer, R., Möller-Frohne, M., Zirwer, D., Czarniecki, J., & Damaschun, G. (1995) Prothymosin α : a biologically active protein with random coil conformation, *Biochemistry* **34**, 13211-13218.

Gaubatz, S., Meichle, A., and Eilers M. (1994) An E-Box element localized in the first intron mediates regulation of the prothymosin α gene by c-myc, *Mol. Cell. Biol.* **14**, 3853-3862.

Georgatos, S. D. and Blobel, G. (1987) Lamin B constitutes an intermediate filament attachment site at the nuclear envelope, *J. Cell Biol.* **105**, 117-125.

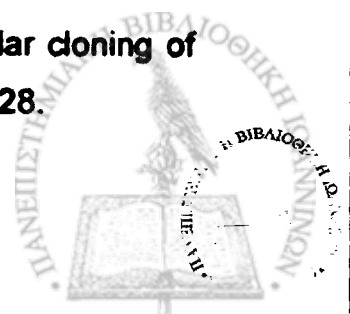
Goldstein, A. L., Low, T. L. K., McAdoo, M., McClure, J., Thurman, G. B., Rossio, J., Lai, C.-Y., Chang, D., Wang, S.-S., Harvey, C., Ramel, A. H. and Meienhofer, J. (1977) Thymosin α_1 : Isolation and sequence analysis of an immunologically active thymic polypeptide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 725-729.

Gómez-Marquez, J., Segade, F., Dosil, M., Pichel, J. G., Bustelo, X.R. & Freire, M. (1989) The expression of prothymosin α gene in T lymphocytes and leukemic lymphoid cells is tied to lymphocyte proliferation, *J. Biol. Chem.* **264**, 8451-8454

Gómez-Marquez, J. and Rodriguez, P. (1998) Prothymosin α is a chromatin-remodelling protein in mammalian cells, *Biochem. J.* **333**, 1-3.

Goodall, G. J., Hempstead, J. L. and Morgan, J. I (1983) Production and characterization of antibodies to thymosin β_4 , *J. Immunol.* **131**, 821-825.

Goodall, G. J., Dominguez, F. and Horecker, B. L. (1986) Molecular cloning of cDNA for human prothymosin α , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 8926-8928.



Graziano, V., Gerchman, S. E., Schneider, D. K. and Ramakrishnan, V. (1994) Histone H1 is located in the interior of the chromatin 30-nm filament, *Nature* **368**, 351-354.

Grunstein, M. (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription, *Nature* **389**, 349-352.

Halmer, L. and Gruss C. (1995) Influence of histone H1 on the *in vitro* replication of DNA and chromatin, *Nucl. Acids Res.* **23**, 773-778.

Haritos, A. A., Goodall, G. J. and Horecker, B. L. (1984a) Prothymosin α : Isolation and properties of the major immunoreactive form of thymosin α 1 in rat thymus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1008-1011

Haritos, A. A., Tsolas, O. and Horecker, B. L. (1984b) Distribution of prothymosin α in rat tissues, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1391-1393.

Haritos A. A., Blacher R., Stein S., Caldarella J. and Horecker B. L. (1985) Primary structure of rat thymus prothymosin α , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 343-346.

Harlow, E. and Lane, R. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Hartman, P. G., Chapman, G. E., Moss, T. and Bradbury, E. M. (1977) Studies on the role and mode of operation of the very-lysine-rich histone H1 in eukaryote chromatin, *Eur. J. Biochem.* **77**, 45-51.

Hayes, J. J., Clark, D. J. and Wolffe, A. P. (1991) Histone contributions to the structure of DNA in the nucleosome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 6829-6833.



Hayes, J. J. and Wolffe, A. P. (1993) Preferential and asymmetric interaction of linker histones with 5S DNA in the nucleosome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6415-6419.

Hayes, J. J., Pruss, D. and Wolffe, A. P. (1994) Histone domains required to assemble a chromatosome including the *Xenopus borealis* somatic 5S rRNA gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7817-7821.

Hayes, J. J. (1996) Site-directed cleavage of DNA by a linker histone-Fe(II) EDTA conjugate: Localization of a globular domain binding site within a nucleosome, *Biochemistry* **35**, 11931-11937.

Hooper, J. A., McDaniel, M. C., Thurman, G. B., Cohen, G. H., Schulof, R. S. and Goldstein, A. L. (1975) Purification and properties of bovine thymosin, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **249**, 125-144.

Ito, T., Bulger, M., Kobayashi, R. and Kadonaga, J. T. (1996) *Drosophila* NAP-1 is a core histone chaperone that functions in ATP-facilitated assembly of regularly spaced nucleosomal arrays, *Mol. Cell. Biol.* **16**, 3112-3124.

Ito, T., Bulger, M., Pazin, M. J., Kobayashi, R. and Kadonaga, J. T. (1997) ACF, an ISWI-Containing and ATP-Utilizing Chromatin Assembly and Remodeling Factor, *Cell* **90**, 145-155.

Izaurralde, E., Kas, E. and Laemmli, U. K. (1989) Highly preferential nucleation of histone H1 assembly on scaffold-associated regions, *J. Mol. Biol.* **210**, 573-585.

Johnstone, A. and Thorpe, R. (1982), *Immunochemistry in practice*, Blackwell Scientific Publications, Oxford.



Juan, L.-J., Utley, R. T., Adams, C. C., Vettese-Dadey, M. and Workman, J. L. (1994) Differential repression of transcription factor binding by histone H1 is regulated by the core histone amino termini, *EMBO J.* **13**, 6031-6040.

Kamakaka, R. T. and Thomas, J. O. (1990) Chromatin structure of transcriptionally competent and repressed genes, *EMBO J.* **9**, 3997-4006.

Karpov, V. L., Bavykin, S. G., Preobrazhenskaya, O. V., Belyavsky, A. V. and Mirzabekov, A. D. (1982) Alignment of nucleosomes along DNA and organization of spacer DNA in *Drosophila* chromatin, *Nucl. Acids Res.* **10**, 4321-4337.

Kessler, C. (1992) Nonradioactive labelling and detection of biomolecules, Springer-Verlag, Berlin.

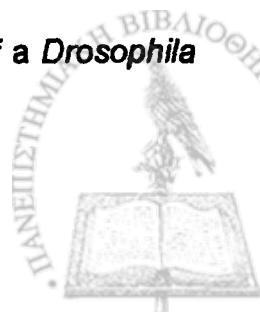
Kleinschmidt, J. A., Dingwall, C., Maier, G. and Franke, W. W. (1986) Molecular characterization of a karyophilic histone-binding protein: cDNA cloning, amino acid sequence and expression of nuclear protein N1/N2 of *Xenopus laevis*, *EMBO J.* **5**, 3547-3552.

Kleinschmidt, J. A., Seiter, A. and Zentgraf, H. (1990) Nucleosome assembly in vitro: separate histone transfer and synergistic interaction of native histone complexes purified from nuclei of *Xenopus laevis* oocytes, *EMBO J.* **9**, 1309-1318.

Khochbin, S. and Wolffe, A. P. (1994) Developmentally regulated expression of linker-histone variants in vertebrates, *Eur. J. Biochem.* **225**, 501-510.

Komiyama, T., Pan, L.-X., Haritos, A. A., Wideman, J. W., Pan, Y.-C. E., Chang, M., Rogers, I. and Horecker, B. L. (1986) The primary structure of rat parathymosin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 1242-1245.

Kremer, H. and Hennig W. (1990) Isolation and characterization of a *Drosophila hydei* histone DNA repeat unit, *Nucleic Acids Res.* **18**, 1573-1580.



Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680-685.

Lai, C.-Y. (1977) Detection of peptides by fluorescence methods, *Methods Enzymol.* **47**, 236-243.

Landsman, D. and Bustin, M. (1993) A signature for the HMG-1 box DNA-binding proteins, *BioEssays* **15**, 539-546.

Langan (1982) Characterization of highly phosphorylated subcomponents of rat thymus H1 histone *J. Biol. Chem.* **25**, 14835-14846.

Laybourn, P. J. and Kadonaga, J. T. (1991) Role of nucleosomal cores and histone H1 in regulation of transcription by RNA polymerase II, *Science* **241**, 238-245.

Lauritzen, E., Masson, M., Rubin, I. and Holm, A. (1990) Dot immunobinding and immunoblotting of picogram and nanogram quantities of small peptides on activated nitrocellulose, *J. Immunol. Meth.* **131**, 257-267.

Leno, G. H., Mills, A. D., Philpott, A. and Laskey, R. A. (1996) Hyperphosphorylation of nucleoplasmin facilitates *Xenopus* sperm decondensation at fertilization, *J. Mol. Biol.* **271**, 7253-7256.

Leuba, S., Zlatanova, J. and van Holde, K. (1993) On the location of histones H1 and H5 in the chromatin fiber, *J. Mol. Biol.* **229**, 917-929.

Lindner, H., Helliger, W. and Puschendorf, B. (1986) Histone separation by high performance liquid chromatography on C4 reverse-phase columns, *Anal. Biochem.*, **158**, 424-430.



Losa, R., Thoma, F. and Koller, T. (1984) Involvement of the globular domain of histone H1 in the higher order structures of chromatin, *J. Mol. Biol.* **175**, 529-551.

Low, T. L. K., Thurman, G. B., McAdoo, M., McClure, J., Rossio, J. L., Naylor, P., H. and Goldstein, A. L. (1979) The chemistry and biology of thymosin I. Isolation, characterization and biological activities of thymosin α 1 and polypeptide β 1 from calf thymus, *J. Biol. Chem.* **258**, 262-268.

Lu, Z. H., Sittman, D. B., Brown, D.T., Munshi, R. and Leno, G. H. (1997) Histone H1 modulates DNA replication through multiple pathways in *Xenopus* egg extract, *J. Cell Sci.* **110**, 2745-2758.

Lu, Z. H., Sittman, D. B., Brown, D.T., Romanowski, P. and Leno, G. H. (1998) Histone H1 reduces the frequency of initiation in *Xenopus* egg extract by limiting the assembly of prereplication complexes on sperm chromatin, *Mol. Biol. Cell* **9**, 1163-1176.

Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. and Richmond, T. J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution, *Nature* **389**, 251-260.

Lutz, W., Stohr, M., Schurmann, J., Wenzel, A., Lohr, A. and Schwab, M. (1996) Conditional expression of N-myc in human neuroblastoma cells increases expression of α -prothymosin and ornithine decarboxylase and accelerates progression into S-phase early after mitogenic stimulation of quiescent cells, *Oncogene* **13**, 803-812.

Margolis, F. L. (1972) Solid-phase radioimmune assay using ^3H -labeled antigen for the mouse olfactory bulb specific protein, *Anal. Biochem.* **50**, 602-607.

Macleod, A. R., Wong, N. C. and Dixon, G. H. (1977) The amino acid sequence of trout-testis histone H1, *Eur. J. Biochem.* **78**, 281-291.



Makarova, T., Grebenshikov, N., Egorov, C., Vartapetian, A., & Bogdanov, A. (1989) Prothymosin α is an evolutionarily conserved protein covalently linked to a small RNA, FEBS Lett. 257, 247-250.

Manrow, R. E., Sburlati, A. R., Hanover, J. A., & Berger, S. L. (1991) Nuclear targeting of prothymosin α , J. Biol. Chem. 266, 3916-3924.

Manrow R. E., Leone, A., Krug, M. S., Eschenfeldt, W. H., and Berger S. L. (1992) The human prothymosin α family contains several processed pseudogenes lacking deleterious lesions, Genomics 13, 319-331.

Manrow R. E. and Berger S. B. (1993) An unusual form of alternative splicing in prothymosin α pre-mRNA, J. Mol. Biol. 234, 281-288.

McClure, J. E., Lameris, N., Wara, D. W. and Goldstein, A. L. (1981) Immunochemical studies on thymosin, Radioimmunoassay of thymosins, J. Immunol. 128, 368-375.

Meersseman, G., Pennings, S. and Bradbury, E. M. (1991) Chromosome positioning on assembled long chromatin, J. Mol. Biol. 220, 89-100.

Mori, M., Barnard, G. F., Staniunas, R. J., Jessup, J. M., Steele, G. D. and Chen, L.-B. (1993) Prothymosin α mRNA expression correlates with that of *c-myc* in human colon cancer, Oncogene 8, 2821-2826

Morrissey, J. H. (1981) Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity, Anal. Biochem. 117, 307-310.

Μπούμπα, Β. (1994) Απομόνωση, δομή και ιδιότητες της πρωτεΐνης υψηλής κινητικότητας 17 (HMG 17) από θύμο χοίρου, Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.



Nacheva, G. A., Guschin, D. Y., Preobrazhenskaya, O. V., Karpov, V. L., Ebralidse, K. K. and Mirzabekov, A. D. (1989) Change in the pattern of histone binding to DNA upon transcriptional activation, *Cell* **58**, 27-36.

Nakai, N., Lai, C.-Y. and Horecker, B. L. (1974). Use of fluorescamine in the chromatographic analysis of peptides from proteins, *Anal. Biochem.* **58**, 563-570.

Nightingale, K. P., Pruss, D. and Wolffe, A. P. (1996) A single high affinity binding site for histone H1 in a nucleosome containing the *Xenopus borealis* 5 S ribosomal RNA gene, *J. Biol. Chem.* **271**, 7090-7094.

Nelson, P. P., Albright, S. C., Wiseman, J. M. and Garrard, W. T. (1979) Reassociation of histone H1 with nucleosomes, *J. Biol. Chem.* **254**, 11751-11760.

Οικονόμου, Μ. (1993). Απομόνωση και χαρακτηρισμός των πολυπεπτιδίων προθυμοσίνη α και παραθυμοσίνη από ιστούς χοίρου (*Sus scrofa*). Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

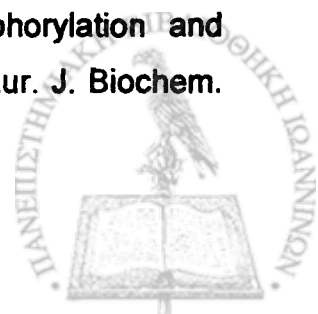
Palvimo, J. and Linnala-Kankkunen, A. (1990) Identification of a low-Mr acidic nuclear protein as prothymosin α, *FEBS Lett.* **277**, 257-260.

Pan, L.-X., Haritos A. A., Wideman, J., Komiyama, T., Chang, M., Stein, S., Salvin, S. B. and Horecker, B.L. (1986) Human prothymosin α: Amino acid sequence and immunologic properties, *Arch. Biochem. Biophys.* **250**, 197-201.

Panneerselvam, C., Wellner, D. and Horecker, B. L. (1988) The amino acid sequence of bovine thymus prothymosin α, *Arch. Biochem. Biophys.* **265**, 454-457.

Papamarcaki, T. and Tsolas, O. (1994) Prothymosin α binds to histone H1 *in vitro*, *FEBS Lett.* **345**, 71-75.

Paulson J. R. (1980) Sulfhydryl reagents prevent dephosphorylation and proteolysis of histones in isolated HeLa metaphase chromosomes, *Eur. J. Biochem.* **111**, 189-197.



Perez-Estevez, A., Diaz-Julien, C., Covelo, G., Salgueiro, M. L. and Freire M. (1997) A 180-kDa protein kinase seems to be responsible for the phosphorylation of prothymosin α observed in proliferating cells, *J. Biol. Chem.* 272, 10506-10513.

Peterson, C. L. and Tamkun J. W. (1995) The SWI-SNF complex: a chromatin remodeling machine? *TIBS* 20, 143-146.

Pruss, D., Hayes, J. J. and Wolffe, A. (1995) Nucleosomal anatomy-where are the histones?, *BioEssays* 17, 161-170.

Pruss, D., Bartholomew, B., Persinger, J., Hayes, J., Arents, G., Moudrianakis, E. N. and Wolffe, A. (1996) An asymmetric model for the nucleosome: A binding site for linker histones inside the DNA gyres, *Science* 274, 614-617

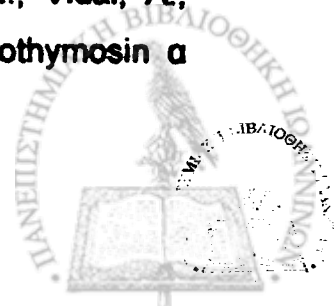
Ramakrishnan, V., Finch, J. T., Graziano, V., Lee, P. L. and Sweet, R. M. (1993) Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding, *Nature* 362, 219-223.

Richmond, T. J., Finch, J. T., Rushton, B., Rhodes, D. and Klug, A. (1984) Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution, *Nature* 311, 532-537.

Risdale, A. J., Hendzel, M. J., Delcuve, G. P and Davie J. R. (1990) Histone acetylation alters the capacity of the H1 histones to condense transcriptionally active/competent chromatin, *J. Biol. Chem.* 9, 5159-5156.

Rodriguez-Campos, A., Shimamura, A. and Worcel, A. (1989) Assembly and properties of chromatin containing histone H1, *J. Mol. Biol.* 209, 135-150

Rodriguez, P., Vinuela, J. E., Alvarez-Fernandez, L., Buceta, M., Vidal, A., Dominguez, F. and Gomez-Marquez, J. (1998) Overexpression of prothymosin α



accelerates proliferation and retards differentiation in HL-60 cells, *Biochem. J.* **331**, 753-761.

Roson, E., Garcia-Caballero, T., Heimer, E. P., Felix, A. M. and Dominguez, F. (1990) Cellular distribution of prothymosin alpha and parathymosin in rat thymus and spleen, *J. Histochem. Cytochem.* **38**, 1889-1894.

Roson, E., Garcia-Caballero, T., Heimer, E. P., Felix, A. M. and Dominguez, F. (1990) Prothymosin alpha expression is associated to cell division in rat testis, *Histochemistry* **94**, 597-599

Roth, Y. S., and Allis, C. D. (1992) Chromatin condensation: does histone H1 dephosphorylation play a role?, *TIBS* **17**, 93-97.

Rubtsov Y. and Vartapetian A. (1996) Lysine-87 is a functionally important residue in human prothymosin α , *FEBS Lett.* **97**, 215-218.

Rubtsov Y. P., Zolotukin, A. S., Vorobjev I. A., Chichkova N. V., Pavlov N. A., Karger A. M., Evstafieva A. G., Felber K. and Vartapetian A.B. (1997) Mutational analysis of human prothymosin α reveals a bipartite nuclear localization signal, *FEBS Lett.* **413**, 135-141.

Russo, I., Barboro, P., Alberti, I., Parodi, S. and Balbi, C. (1995) Role of H1 in chromatin folding. A thermodynamic study of chromatin reconstitution by differential scanning calorimetry, *Biochemistry* **34**, 301-311

Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989) "Molecular cloning", A Laboratory Manual. Second Edition CSH. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sandaltzopoulos, R., Blank, T. and Becker, P. B. (1994) Transcriptional repression by nucleosomes but not H1 in reconstituted preblastoderm *Drosophila* chromatin, *EMBO J.* **13**, 373-379.



Sburlati, A. R., Manrow, R. E. and Berger, S. L. (1990). Human prothymosin α : Purification of a highly acidic nuclear protein by means of a phenol extraction. *Protein Express. Purif.* 1, 184-190.

Sburlati, A. R., Manrow, R. E., & Berger, S. L. (1991) Prothymosin α antisense oligomers inhibit myeloma cell division, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 253-257.

Sburlati, A. R., De La Rosa, A., Batey D. W., Kurys G. L., Manrow, R. E., Pannell, L. K., Martin, B. M. Sheeley, D. M. and Berger, S. L. (1993) Phosphorylation of human and bovine prothymosin α *in vivo*, *Biochemistry* 32, 4587-4596.

Schlissel, M. S. and Brown, D. D. (1984) The transcriptional regulation of *Xenopus* 5S RNA genes in chromatin: The roles of active stable transcription complexes and histone H1, *Cell* 37, 903-913.

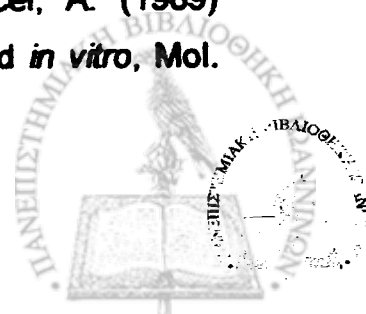
Segers, A., Muyldermans, S. and Wyns, L. (1991) The interaction of Histone H5 and its globular domain with core particles, depleted chromatosomes, polynucleosomes, and a DNA decamer, *J. Biol. Chem.* 266, 1502-1508.

Sera, T. and Wolffe, A. P. (1998) Role of histone H1 as an architectural determinant of chromatin structure and as a specific repressor of transcription on *Xenopus* oocyte 5S rRNA genes, *Mol. Cell. Biol.* 18, 3268-3680.

Shen, X., Yu, L., Weir, J. W. and Gorovsky, M. A. (1995) Linker histones are not essential and affect chromatin condensation *in vivo*, *Cell* 82, 47-56.

Shen, X., & Gorovsky, M. A. (1996) Linker histone H1 regulates specific gene expression but not global transcription *in vivo*, *Cell* 86, 475-483

Shimamura, A., Sapp, M., Rodriguez-Campos, A. and Worcel, A. (1989) Histone H1 represses transcription from minichromosomes assembled *in vitro*, *Mol. Cell. Biol.* 9, 5573-5584.



Smith, G. and Werner, D. (1991) Nucleotide sequence of the murine prothymosin α cDNA and its deduced primary and secondary protein structure, *Bioch. Bioph. Acta* **1088**, 442-444

Smith, M. R., Al-Katib, A. Mohammad, R., Silverman, A., Szabo, P., Khilnani, S., Kohler, W., Nath, R. and Mutchnick, M. G. (1993) Prothymosin α gene expression correlates with proliferation, not differentiation, of HL-60 Cells, *Blood* **82**, 1127-1132.

Szabo, P., and Weksler, M. E. (1992) Is thymosin α_1 a thymic hormone?, *Clin. Immunol. Immunopathol.* **65**, 195-200.

Szabo, P., Ehleiter, D., Whittington, E. and Weksler, M. E. (1992) Prothymosin α expression occurs during G1 in proliferating B or T lymphocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **185**, 953-959.

Szabo, P., Panneerselvam, C., Clinton, M., Frangou-Lazaridis, M., Weksler, D., Whittington, E., Macera, M. J., Grzeschik, K.-H., Selvakumar, A., and Horecker, B. L. (1993) Prothymosin α gene in humans: organization of its promoter region and localization to chromosome 2, *Hum. Genet.* **90**, 629-634.

Su, Y., Ho, K. L., Dalakas, M. C. and Mutchnick, M. G. (1989) Localization of immunoreactive thymosin α_1 in astrocytes of normal human brain, *Ann. Neurol.* **26**, 277-280.

Talasz, H., Helliger, W., Puschendorf, B. and Linder, H. (1996) *In vivo* phosphorylation of histone H1 variants during the cell cycle, *Biochemistry* **35**, 1761-1767.

Thoma, F., Koller, T., & Klug, A. (1979) Involvement of H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin, *J. Cell. Biol.* **83**, 403-427.



Trumbore, M. W., Manrow, R. E. and Berger S. L. (1998) Prothymosin α is not found in yeast, *Protein Express. Purif.* **13**, 383-388.

Tsitsiloni, O. E., Yialouris, P., Sekeri-Pataryas, K. and Haritos, A. A. (1989) Prothymosin α is not a nuclear polypeptide, *Experientia* **45**, 332-334.

Tsitsiloni, O. E., Stiakakis, J., Koutselinis, A., Gogas, J., Markopoulos, C., Yialouris, P., Bekris, S., Panoussopoulos, D., Kiortsis, V., Voelter, W. and Haritos, A. A. (1993) Expression of α -thymosins in human tissues in normal and abnormal growth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9504-9507.

Tsukiyama, T., Becker, P. B. and Wu, C. (1994) ATP-dependent nucleosome disruption at a heat-shock promoter mediated by binding of GAGA transcription factor, *Nature* **367**, 525-532.

Tsukiyama, T. and Wu, C. (1995) Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodeling factor, *Cell* **83**, 1011-1020.

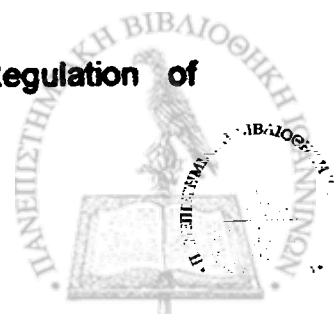
Ura, K., Nightingale, K., Wolffe, A. P. (1996) Differential association of HMG1 and linker histones B4 and H1 with dinucleosomal DNA structural transitions and transcriptional repression, *EMBO J.* **15**, 4959-4969.

van Holde, K. E. (1988) *Chromatin*, Springer-Verlag, New York.

Varga-Weisz, P. D. and Becker P. B. (1998) Chromatin-remodeling factors: machines that regulate?, *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 346-353.

Vareli, K., Frangou-Lazaridis, M. and Tsolas, O. (1995) Prothymosin α mRNA levels vary with c-myc expression during tissue proliferation, viral infection and heat shock, *FEBS Lett.* **371**, 337-340.

Vareli, K., Tsolas, O. and Frangou-Lazaridis, M. (1996) Regulation of prothymosin α during the cell cycle, *Eur. J. Biochem.* **238**, 799-806.



Verreault, A., Kaufman, P. D., Kobayashi, R. and Stillman, B. (1996) Nucleosome assembly by a complex of CAF-1 and acetylated histones H3/H4, *Cell* **87**, 95-104.

Vlachoyiannopoulos, P.G., Frilingos, S., Tzioufas, A. G., Seferiadis, K., Moutsopoulos, H. M. and Tsolas, O. (1989) Circulating antibodies to prothymosin α in systematic lupus erythematosus, *Clin. Immunol. Immunopathol.* **53**, 151-160.

Watts, J. D., Cary P. D. and Crane-Robinson C. (1989) Prothymosin α is a nuclear protein, *FEBS Lett.* **245**, 17-20.

Watts, J. D., Cary, P. D., Sautiere, P. and Crane-Robinson, C. (1990) Thymosins: both nuclear and cytoplasmic proteins, *Eur. J. Biochem.* **192**, 643-651.

Weintraub, H. (1984) Histone H1-dependent chromatin superstructures and the suppression of gene activity, *Cell* **38**, 17-27.

Wolffe, A. P. (1989) Dominant and specific repression of *Xenopus* oocyte 5S RNA genes and satellite I DNA by histone H1, *EMBO J.* **8**, 527-537.

Wray, W., Boulikas, T., Wray, V. P. and Hancock, R. (1981) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels, *Anal. Biochem.* **118**, 197-203.

Yialouris, P. P., Evangelatos, G. P., Soteriadis-Vlahos, C., Heimer, E. P., Felix, A. M., Tsitsiloni, O. E. and Haritos, A. A. (1988) The identification of prothymosin α material in vertebrate lymphoid organs by a radioimmunoassay for the N-terminal decapeptide, *J. Immunol. Meth.* **106**, 267-275.

Zhou, Y-B. Gerchman, S. E., Ramakrishnan, V. Travers, A. and Muyldermans, S. (1998) Position and orientation of the globular domain of linker histone H5 on the nucleosome, *Nature* **362**, 402-405.



Zieve, G. W., Turnbull, D., Mullins, M. J. and McIntosh, R. J. (1980) Production of large numbers of mitotic mammalian cells by use of the reversible microtubule inhibitor nocodazole, *Exp. Cell Res.* 126, 397-405.

Zlatanova, J. and van Holde, K. (1996) The linker histones and chromatin structure: new twists, *Progr. in Nucleic Acids Res. and Mol. Biol.* 52, 217-259.

