



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΙΣΤΟΝΙΚΩΝ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΩΝ
ΜΕ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ, ΒΙΟΦΥΣΙΚΕΣ
ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ**

**ΛΑΖΑΝΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2010

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

Ημερομηνία αίτησης της κ. Λαζάνη Βασιλικής: 27-2-2006

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 577^α/4-4-2006

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Γεωργάτος Σπυρίδων Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Λαζαρίδης Ιωάννης Αναπληρωτής Καθηγητής Γενικής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Πολίτου Αναστασία Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 14-4-2006

«Μελέτη Ιστονικών Τροποποιήσεων με Βιοχημικές, Βιοφυσικές και Μορφολογικές Μεθόδους»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 666^α/22-9-2009

Γεωργάτος Σπυρίδων	Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Φώτης Θεόδωρος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καναβάρος Παναγιώτης	Καθηγητής Ανατομίας που καλύπτει και την Ιστολογία –Εμβρυολογία Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Λαζαρίδης Ιωάννης	Αναπληρωτής Καθηγητής Γενικής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Παπαμαρκάκη θωμαή	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Πολίτου Αναστασία	Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Τζαβάρας Θεόδωρος	Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 9-12-2010

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας- Καρδιολογίας



Η Γραμματέας της Σχολής

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΒΕΝΤΖΟΥΡΗ-ΖΩΗ

Στο Νίκο μου

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	5
1.1. Χρωματίνη: λειτουργική οργάνωση του γονιδιώματος	7
1.1.1 Το νουκλεόσωμα	8
1.1.2 Οι ιστονικές πρωτεΐνες	9
1.1.2.1 Οι νουκλεοσωματικές ιστόνες (core histones)	9
1.1.2.2. Συνδετικές ιστόνες (linker histones)	10
1.1.3 Στάδια συμπύκνωσης της χρωματίνης	10
1.1.4 Παράγοντες που καθορίζουν τη δομή της χρωματίνης	13
1.1.4.1 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (PTMs) των ιστονών και ένζυμα που τις καταλύουν	13
1.1.4.1.1 Οι μηχανισμοί λειτουργίας των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (PTMs)	15
1.1.4.1.2 Ρόλος των PTMs στη στρατολόγηση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τη χρωματίνη	16
1.1.4.2 Ισομορφές των ιστονών	17
1.1.4.3 Αναδιαμόρφωση της χρωματίνης με δαπάνη ATP (ATP-dependent chromatin remodeling)	18
1.1.5 Η φωσφορυλίωση της ιστόνης H3 και τα ένζυμα που την καταλύουν	20
1.2. Μιτωτικές κινάσες	22
1.2.1 Οι κινάσες Aurora	22
1.2.1.1 Δομή και κυτταρική κατανομή	23
1.2.1.2 Η Aurora B και οι λειτουργίες της	25
1.2.1.2.A Ο ρόλος της Aurora B στη φωσφορυλίωση της ιστόνης H3	25
1.2.1.2.B Ο ρόλος της Aurora B στη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων και στο σημείο ελέγχου μεταξύ μετάφασης-ανάφασης	27
1.2.1.3 Κυτταρική κατανομή και ρόλος των Aurora A και Aurora C	28
1.2.1.4 Το σύμπλοκο των chromosomal passenger πρωτεϊνών (CPC)	30
1.2.2 Η κινάση Haspin	32
1.2.2.1 Η Haspin και οι λειτουργίες της	35
1.2.2.1.A Ρύθμιση της συνοχής των χρωμοσωμάτων (chromosome cohesion) στη μίτωση	35
1.2.2.1.B Φωσφορυλίωση της θρεονίνης 3 της ιστόνης H3 (T3H3)	37
1.2.2.1.Γ Άλλες πιθανές λειτουργίες της Haspin	38
1.2.3 Η κινάση Vaccinia-Related Kinase 1 (VRK 1)	38
1.3. Η ετεροχρωματινική πρωτεΐνη 1 (HP1)	40
1.3.1 Δομή και κυτταρική κατανομή	40
1.3.2 Λειτουργία και αλληλεπιδράσεις	44
1.3.3 Ο ρόλος της τριμεθυλίωσης της λυσίνης 9 στην ιστόνη 3 (me ₃ K9H3)	48

1.4 Σκοπός της παρούσας μελέτης	52
2. Υλικά και μέθοδοι	53
2.1 Μέθοδοι καλλιέργειας κυττάρων	55
2.1.1 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών	55
2.1.2 Συγχρονισμός κυττάρων	55
2.2 Παρασκευαστικές μέθοδοι	55
2.2.1 Παραγωγή των ανασυνδυασμένων χιμαιρικών πρωτεϊνών HP1β, CD-HP1β, H-HP1β, CSD-HP1β (gst-tagged proteins)	55
2.2.2 Παραγωγή των ανασυνδυασμένων ιστονών H3 και της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Aurora B (his-tagged proteins)	56
2.2.3 Απομόνωση πυρήνων από ερυθροκύτταρα πτηνών	57
2.2.4 Παρασκευή πυρηνικών φακέλων	58
2.2.5 Παρασκευή εκχυλισμάτων πυρηνικών φακέλων	59
2.2.6 Παρασκευή εκχυλισμάτων ελεύθερων ιστονών (histone-depleted extracts)	59
2.2.7 Παρασκευή μιτωτικών εκχυλισμάτων	59
2.2.8 Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων επιδεκτικών στον μετασχηματισμό	61
2.2.9 Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων	61
2.2.10 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες μικρής κλίμακας	62
2.2.11 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας	62
2.2.12 Απομόνωση θραυσμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης	63
2.2.13 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	63
2.2.14 Υποκλωνοποίηση του γονιδίου της AuroraB	67
2.3 Βιοχημικές Μέθοδοι	67
2.3.1 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης	67
2.3.2 Ανάλυση Πρωτεϊνών	67
2.3.3 Χρώση πηκτής πολυακρυλαμίδιου	68
2.3.4 Ανοσοαποτύπωση κατά western	68
2.3.5 Δοκιμασίες συγκατακρήμνισης πρωτεϊνών με σφαιρίδια αγαρόζης-γλουταθειόνης (pull-down assays)	69
2.3.6 Δοκιμασίες <i>in vitro</i> φωσφορυλίωσης	69
2.4 Μορφολογικές Μέθοδοι	70
2.4.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός	70

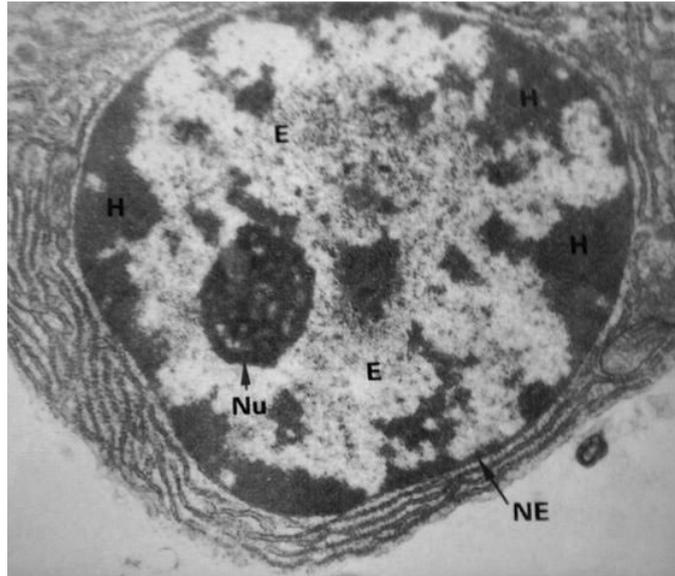
3. Αποτελέσματα	71
4. Συζήτηση	95
5. Συμπεράσματα	105
6. Περιλήψεις	107
7. Βιβλιογραφία	109

Εισαγωγή

1.1 Χρωματίνη: λειτουργική οργάνωση του γονιδιώματος

Το γενετικό υλικό των ευκαρυωτικών κυττάρων οργανώνεται σε μια σύνθετη δομή, η οποία αποτελείται από DNA και πρωτεΐνες και εντοπίζεται στον πυρήνα. Η δομή αυτή, που παρατηρήθηκε κατ' αρχήν με χρήση οξεόφιλων (αντιδραστήριο Schiff), ονομάστηκε χρωματίνη στις αρχές του 19^{ου} αιώνα (Zell substanz, Kern und Zelltheilung Flemming W., Leipzig: Vogel. 18, 1882). Το γενωμικό DNA, μήκους σχεδόν δύο μέτρων (στα ανώτερα ζώα), πρέπει να «χωρέσει» στον πυρήνα, ένα κυτταρικό διαμέρισμα με διαστάσεις μικρόμετρων και ως εκ τούτου το υλικό αυτό πρέπει να συμπυκνωθεί. Παρά όμως το μεγάλο βαθμό συμπύκνωσης, το DNA πρέπει να είναι άμεσα προσβάσιμο, ώστε να επιτρέπεται η αλληλεπίδρασή του με πρωτεϊνικές μηχανές που ρυθμίζουν τις λειτουργίες της χρωματίνης, δηλαδή την αντιγραφή, την επιδιόρθωση, τη μεταγραφή και τον ανασυνδυασμό. Επομένως, η δυναμική οργάνωση της χρωματινικής δομής επηρεάζει δυνητικά όλες τις λειτουργίες του γενώματος.

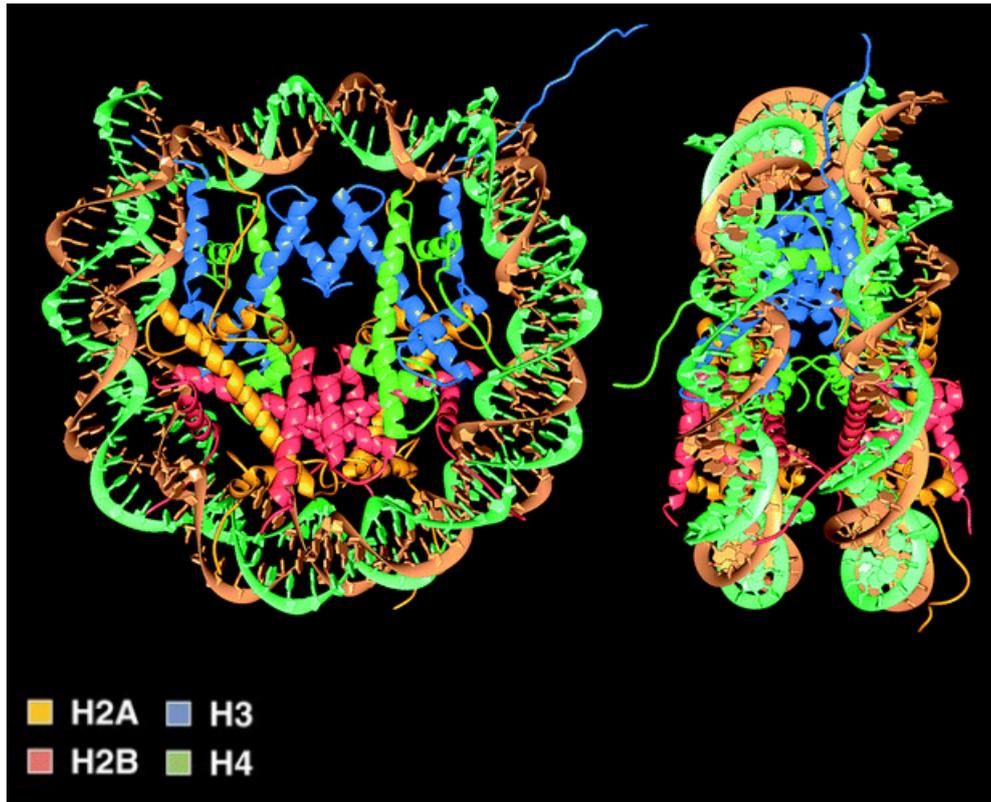
Η χρωματίνη στον πυρήνα των ευκαρυωτικών κυττάρων δεν έχει ενιαία οργάνωση, αλλά περιέχει «στοιχεία» που θα μπορούσαν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο βασικές κατηγορίες, την ευχρωματίνη και την ετεροχρωματίνη. Η ευχρωματίνη χαρακτηρίζεται από χαμηλή συμπύκνωση και υψηλή συχνότητα μεταγραφικώς ενεργών γονιδίων, ενώ η ετεροχρωματίνη χαρακτηρίζεται από υψηλό βαθμό συμπύκνωσης και χαμηλή συχνότητα γονιδίων που μεταγράφονται (εικόνα 1.1). Οι δύο αυτές μορφές της χρωματίνης φαίνεται να έχουν διαφορετικό χρόνο αντιγραφής, με την ευχρωματίνη να αντιγράφεται πιο νωρίς στην S φάση σε σχέση με την ετεροχρωματίνη. Εκτός όμως από αυτό το διαχωρισμό, η χρωματίνη μπορεί να διακριθεί σε περιοχές βάσει της λειτουργίας της, της δομής, της μοριακής σύστασης και των βιοχημικών της ιδιοτήτων. Στη βάση αυτών των ιδιοτήτων, η χρωματίνη μπορεί να διακριθεί σε κεντρομεριδιακή και τελομεριδιακή.



Εικ. 1.1 Φωτογραφία του πυρήνα με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Με Ε συμβολίζεται η ευχρωματίνη, με Η η ετεροχρωματίνη, με Nu ο πυρηνίσκος και με NE η πυρηνική μεμβράνη.

1.1.1 Το νουκλεόσωμα

Το πρώτο επίπεδο συμπύκνωσης της χρωματίνης, το νουκλεόσωμα, αποτελεί μια οργανωμένη δομή και αποτελείται από μια αριστερόστροφη υπερέλικα DNA 147 βάσεων, τυλιγμένη 1.65 στροφές γύρω από το οκταμερές των ιστονών. Το οκταμερές των ιστονών συγκροτείται *in vitro* και *in vivo* από ένα H3/H4 τετραμερές και δύο H2A/H2B διμερή (Annunziato and Seale 1984, Hansen 2000). Ένα μόριο της ιστόνης H1 (H5 στα πτηνά) προσδένεται στο συνδετικό DNA που βρίσκεται μεταξύ των νουκλεοσωμάτων, σταθεροποιώντας τη χρωματινική ίνα και «σφραγίζοντας» το νουκλεόσωμα στο σημείο εισόδου και εξόδου του συνδετικού DNA (Misteli et al., 2000). Δομικά, οι ιστόνες αποτελούνται από έναν ιδιαίτερα συμπαγή πυρήνα από δεσμίδες α-ελίκων οργανωμένων σε μοτίβα έλικας-στροφής-έλικας που προάγουν τον ολιγομερισμό. Σε αντίθεση με αυτό, οι αμινοτελικές περιοχές των ιστονών δεν φαίνεται να υιοθετούν μια συγκεκριμένη δευτεροταγή δομή. Η δομή της χρωματίνης διαμορφώνεται κυρίως από δύο μηχανισμούς: από ATP-εξαρτώμενα σύμπλοκα (Wang et al., 2007b), η δράση των οποίων αλλάζει τη θέση και/ή τη σταθερότητα των νουκλεοσωμάτων και από την υποκατάσταση των ισομορφών των ιστονών στο νουκλεόσωμα (Wang et al., 2007a).



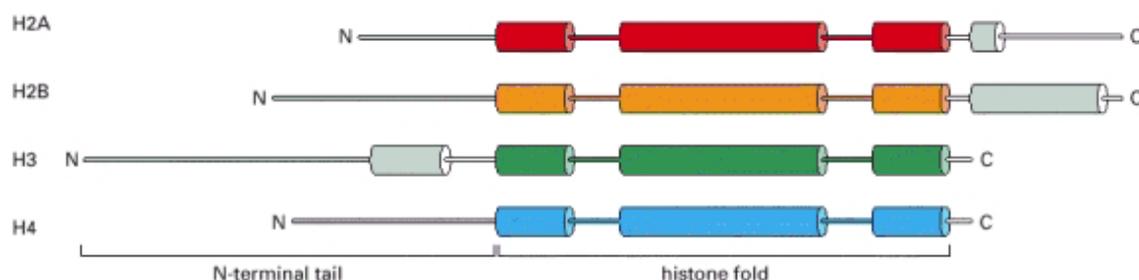
Εικ. 1.2 Η κρυσταλλική δομή του νουκλεοσώματος. (T. J. Richmond et al., 1997)

1.1.2 Οι ιστονικές πρωτεΐνες

1.1.2.1 Οι νουκλεοσωματικές ιστόνες (core histones)

Οι ιστόνες H2A, H2B, H3 και H4 είναι μικρές πρωτεΐνες, μοριακής μάζας 10-22 kDa, βασικά φορτισμένες (pI σχεδόν 12) και ιδιαίτερα διατηρημένες στην εξέλιξη (McGhee et al., 1980, Van Holde et al., 1995, Wolffe et al., 1998). Η πιο διατηρημένη περιοχή των ιστονών είναι η κεντρική (histone fold), η οποία παίρνει τη δομή 2 ελίκων που διαχωρίζονται από δύο θηλιές (Arents et al., 1991). Αντίθετα με την κεντρική αυτή περιοχή, τα αμινοτελικά άκρα των ιστονών, ή αλλιώς ουρές (histone tails), εμφανίζουν διαφορές και δεν αποκτούν συγκεκριμένη διαμόρφωση. Οι ουρές των ιστονών είναι ιδιαίτερα πλούσιες σε λυσίνες και αργινίνες, κατάλοιπα που προσδίδουν ιδιαίτερα βασικό χαρακτήρα στις ιστόνες. Επιπλέον, τα κατάλοιπα αυτής της περιοχής των ιστονών υφίστανται ένα πλήθος μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων, οι οποίες μεταβάλλουν το φορτίο και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ιστονών και επομένως την προσβασιμότητα του DNA και τις

αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών με το νουκλεόσωμα (Strahl et al., 2000). Οι νουκλεοσωματικές ιστόνες απαντώνται σε διάφορες ισομορφές (βλέπε § 1.4.3).



Εικ. 1.3 Η δομή των νουκλεοσωματικών ιστονών. (Ridgway et al., 2002)

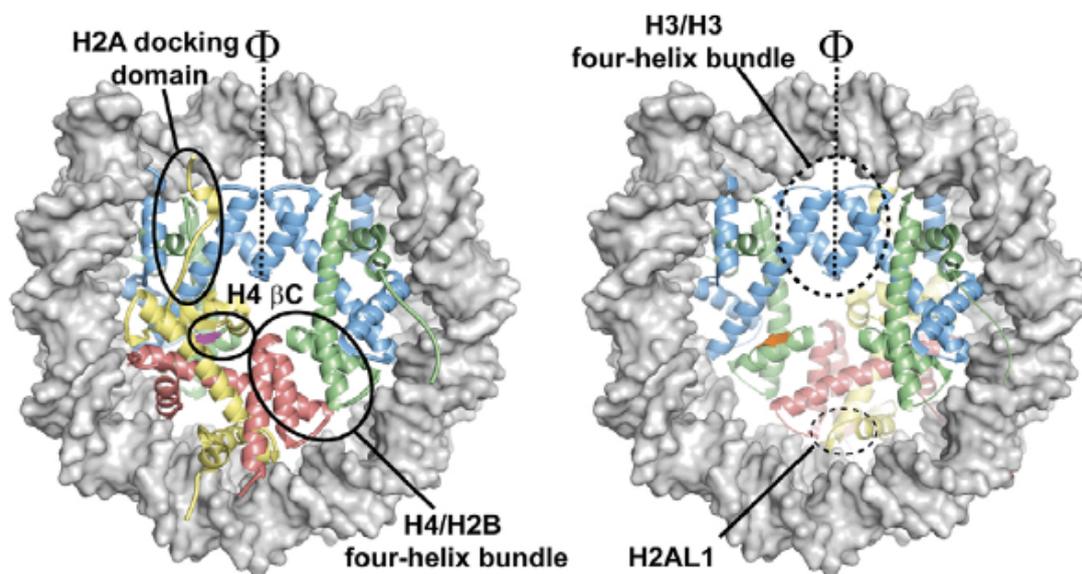
1.1.2.2 Συνδετικές ιστόνες (linker histones)

Οι συνδετικές ιστόνες (H1) συνδέονται με την περιοχή του DNA μεταξύ δύο διαδοχικών νουκλεοσωμάτων και, σε αντίθεση με τις νουκλεοσωματικές, δεν είναι τόσο καλά διατηρημένες ανάμεσα στα είδη. Υπάρχουν διάφορες μορφές συνδετικών ιστονών (Richmond and Widom, 2000, Marino-Ramirez et al., 2006). Στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς οι συνδετικές ιστόνες έχουν δομή παρόμοια με αυτή των νουκλεοσωματικών ιστονών: μια κεντρική σφαιρική περιοχή (globular domain), η οποία είναι και η πιο διατηρημένη και παίζει ρόλο στην αλληλεπίδραση με το DNA, και δύο περιοχές (την αμινοτελική και καρβοξυτελική περιοχή) που δεν έχουν συγκεκριμένη δομή και είναι θετικά φορτισμένες. Όπως και οι νουκλεοσωματικές, έτσι και οι συνδετικές ιστόνες υφίστανται ένα πλήθος μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων (Lindner et al., 2008). Οι συνδετικές ιστόνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διάταξη των νουκλεοσωμάτων πάνω στην ίνα της χρωματίνης καθώς ορίζουν την τροχιά του DNA στο σημείο εισόδου/εξόδου και επομένως την τοποθέτηση των επόμενων νουκλεοσωματικών συστοιχιών και στη συμπύκνωση της χρωματίνης και το σχηματισμό υψηλότερης τάξης δομών μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ γειτονικών νουκλεοσωμάτων (Almouzni 2002).

1.1.3 Στάδια συμπύκνωσης της χρωματίνης

Η συγκρότηση της χρωματίνης επιτυγχάνεται σε διάφορα στάδια, το πρώτο εκ των οποίων είναι ο σχηματισμός του νουκλεοσώματος. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το

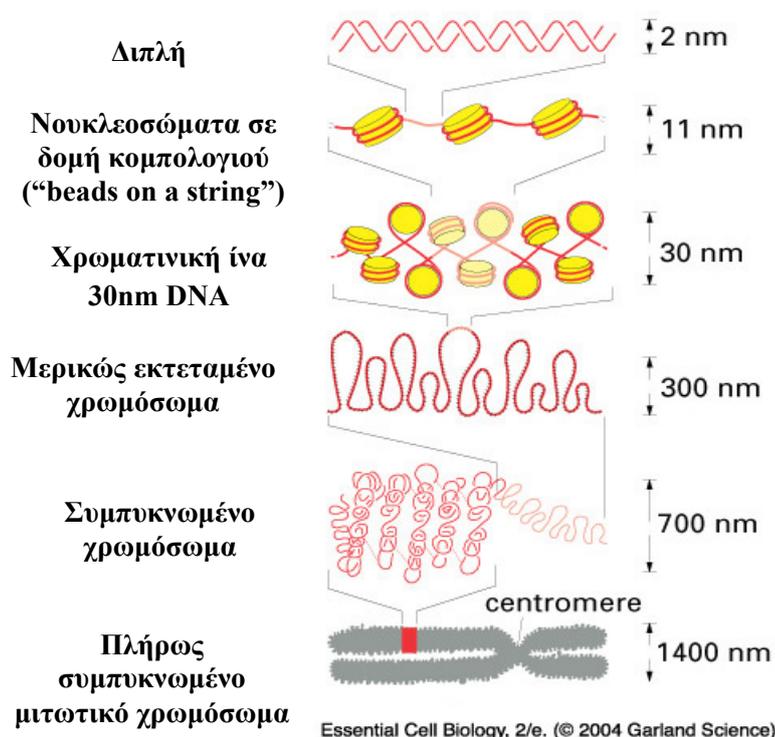
οκταμερές των ιστονών συγκροτείται *in vitro* και *in vivo* από ένα H3/H4 τετραμερές και δύο H2A/H2B διμερή (Annunziato and Seale, 1984, Hansen 2002). Το (H3-H4)₂ τετραμερές οργανώνει τα περίπου 80 κεντρικά ζεύγη βάσεων, ενώ τα περίπου 40 περιφερειακά ζεύγη βάσεων DNA συνδέονται πιο χαλαρά με το H2A-H2B διμερές, με μια μικρή συμμετοχή της αN έλικας της H3 να οργανώνει τα τελευταία 10 ζεύγη βάσεων στο σημείο εισόδου εξόδου. Το (H3-H4)₂ τετραμερές, που συγκροτείται από πολλαπλούς υδρογονοδεσμούς και ιοντικούς δεσμούς, υιοθετεί μια δομή δεματίου τεσσάρων ελίκων. Το H2A-H2B διμερές έρχεται σε στενή επαφή και με τους δύο βραχίονες του (H3-H4)₂ τετραμερούς σχήματος W. Σε αυτές τις επαφές εμπλέκεται η περιοχή διασύνδεσης (docking domain) της H2A, που αλληλεπιδρά με την καρβοξυτελική β έλικα της H4 και μέρος της H3 από τη μία πλευρά και με το δεμάτιο τεσσάρων ελίκων μεταξύ των κεντρικών περιοχών των H4 και H2B. Μια άλλη σύνδεση που σταθεροποιεί τον πυρήνα του νουκλεοσώματος είναι η επαφή μέσω της L1 θηλειά της H2A που αναπτύσσεται στο H2A-H2B διμερές (Akey et al, 2003). Οι αλληλεπιδράσεις που συνδέουν τα H2A-H2B διμερή με το (H3-H4)₂ τετραμερές απαιτούν την αλληλεπίδραση με το DNA και επομένως το οκταμερές των ιστονών δεν είναι σταθερό σε φυσιολογικές συνθήκες.



Εικ. 1.4 Η δομή του νουκλεοσώματος. Το DNA απεικονίζεται με γκρι, η H2A με κίτρινο, η H2B με κόκκινο, η H3 με μπλε και η H4 με πράσινο. Μόνο ένα από τα δύο H2A/H2B διμερή απεικονίζονται για λόγους ευκρίνειας. Ο άξονας συμμετρίας του μορίου (διακεκομμένη γραμμή) τέμνει το δεμάτιο των τεσσάρων ελίκων της H3. Οι περιοχές αλληλεπίδρασης του H2A/H2B διμερούς με το (H3/H4)₂ τετραμερές σημειώνονται με συνεχή κύκλο (αριστερή πλευρά), ενώ οι ομοτυπικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στην H3 ή την H2A με διακεκομμένο κύκλο (δεξιά πλευρά). (Park and Luger, 2008)

Άλλα 20 ζεύγη βάσεων DNA σταθεροποιούνται από τη σύνδεση της συνδετικής ιστόνης H1 (H5 στα πτηνά) στο σημείο εισόδου/εξόδου του συνδετικού DNA προς/από το νουκλεόσωμα (Noll and Kornberg, 1977, Allan et al., 1980). Η πλήρης δομή του σωματίου που περιέχει 165 βάσεις DNA (δύο στροφές), το οκταμερές των ιστονών και τη συνδετική ιστόνη H1 είναι γνωστή ως *χρωματόσωμα* (Wolffe 1998). Η “επαφή” του DNA με το οκταμερές των ιστονών επιτυγχάνεται μέσω ~240 ισχυρών αλληλεπιδράσεων (δεσμοί υδρογόνου, γέφυρες ιόντων και μη πολικές επαφές) σε 14 διαφορετικά σημεία (Luger & Richmond, 1998a).

Το *συνδετικό DNA* έχει μήκος που ποικίλει από 0 έως 80 bp, ανάλογα με τον ιστό και το είδος προέλευσης (Kornberg 1977, Widom 1992). Ολιγονουκλεοσωματικές συστοιχίες, που με την σειρά τους συσπειρώνονται σε δευτεροταγείς χρωματινικές δομές με διάμετρο 30 nm, αποτελούν την *χρωματινική ίνα*. Οι χρωματινικές ίνες μπορούν να συμπυκνωθούν περαιτέρω, υιοθετώντας τεταρτοταγείς χρωματινικές δομές (Hansen 2002, Woodcock and Dimitrov, 2001). Σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό των δομών αυτών διαδραματίζουν συνδετικές ιστόνες.



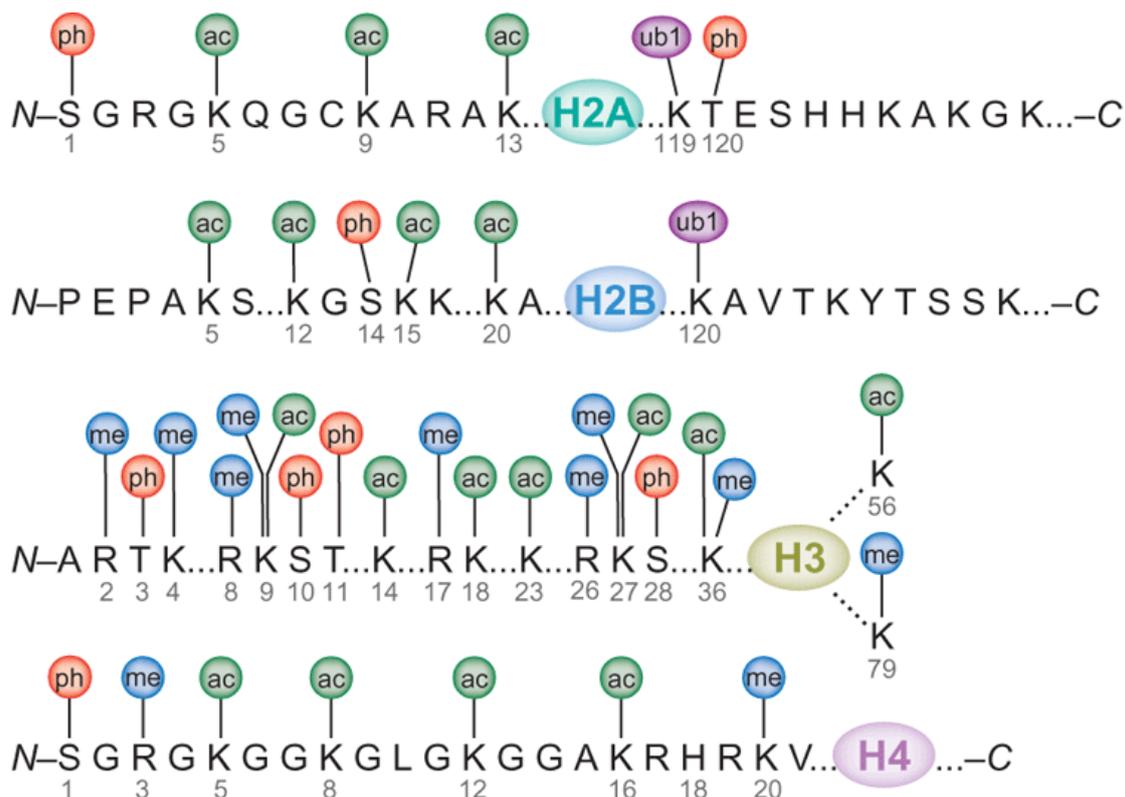
Εικ. 1.5 Η οργάνωση και συμπύκνωση του DNA στην χρωματίνη (προηγούμενη σελίδα). Το κατώτερο επίπεδο οργάνωσης της χρωματίνης είναι το νουκλεόσωμα, όπου 1.65 στροφές υπερελικωμένου DNA τυλίγεται γύρω από οκταμερές των ιστονών. Τα νουκλεοσώματα συνδέονται μεταξύ τους με μικρού μήκους αλληλουχίες συνδετικού DNA. Στο επόμενο επίπεδο οργάνωσης τα νουκλεοσώματα συμπυκνώνονται στις ίνες χρωματίνης διαμέτρου 30 nm, οι οποίες περαιτέρω σχηματίζουν υψηλότερης τάξης και συμπύκνωσης δομές.

1.1.4.1 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (PTMs) των ιστονών και ένζυμα που τις καταλύουν

Οι ιστόνες τροποποιούνται σε ένα πλήθος καταλοίπων. Τουλάχιστον οχτώ διαφορετικοί τύποι τροποποιήσεων έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα (πίνακας 1) (ανασκόπηση Kouzarides 2007).

Chromatin Modifications	Residues Modified	Functions Regulated
Acetylation	K-ac	Transcription, Repair, Replication, Condensation
Methylation (lysines)	K-me1 K-me2 K-me3	Transcription, Repair
Methylation (arginines)	R-me1 R-me2a R-me2s	Transcription
Phosphorylation	S-ph T-ph	Transcription, Repair, Condensation
Ubiquitylation	K-ub	Transcription, Repair
Sumoylation	K-su	Transcription
ADP ribosylation	E-ar	Transcription
Deimination	R > Cit	Transcription
Proline Isomerization	P-cis > P-trans	Transcription

Περισσότερα από 60 διαφορετικά κατάλοιπα έχουν βρεθεί (είτε με αντισώματα είτε με φασματοσκοπία μάζας) τροποποιημένα. Παρά ταύτα, οι έως τώρα καταγεγραμμένες τροποποιήσεις αποτελούν μόνο ένα μικρό ποσοστό του αριθμού των τροποποιήσεων που θα μπορούσαν θεωρητικά να συμβούν. Επιπλέον πολυπλοκότητα προκύπτει από το γεγονός ότι οι λυσίνες μπορούν να μονο-, δι-τριμεθυλιωθούν, ενώ οι αργινίνες να μονο- ή διμεθυλιωθούν (συμμετρικά ή ασύμμετρα). Αυτό το πλήθος των τροποποιήσεων δημιουργεί ένα τεράστιο δυναμικό λειτουργικών αποκρίσεων χωρίς οι τροποποιήσεις αυτές να υφίστανται ταυτόχρονα στην ίδια ιστόνη. Η παρουσία μιας τροποποίησης εξαρτάται από τις σηματοδοτικές συνθήκες στο κύτταρο (ανασκόπηση Kouzarides 2007).



Σχήμα 1.6 Απεικόνιση των κυριότερων μέχρι σήμερα PTMs των ιστονών. Συμπεριλαμβάνεται η ακετυλίωση (*ac*), η μεθυλίωση (*me*), η φωσφορυλίωση (*ph*) και η ουβικιτινίωση (*ub1*). Οι περισσότερες PTMs βρίσκονται στα αμινοτελικά άκρα των ιστονών με την εξαίρεση των PTMs στα κατάλοιπα H3K56 και H3K79 στο “σώμα” της ιστόνης (ωοειδείς κύκλοι). (Bhaumik et al., 2007)

Ειδικά ένζυμα που καταλύουν την προσθήκη ή την απαλοιφή αυτών των τροποποιήσεων είναι συνήθως ταυτόχρονα παρόντα και έτσι, το σύνολο των ιστονικών τροποποιήσεων σε έναν συγκεκριμένο τόπο και χρόνο είναι πρόσφορο σε συνεχείς δυναμικές αλλαγές. Οι ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών (Histone Acetyltransferases-HATs) και οι αποακετυλάσες (Histone Deacetylases-HDACs) τοποθετούν και αφαιρούν ακετυλομάδες αντίστοιχα, ενώ οι κινάσες και οι φωσφατάσες καταλύουν τη φωσφορυλίωση και την αποφωσφορυλίωση των ιστονών. Η προσθήκη μεθυλομάδας που καταλύεται από τις μεθυλτρανσφεράσες (Histone Methyltransferases-HMTs), αρχικά θεωρήθηκε ότι είναι σταθερή και μη-αναστρέψιμη. Πρόσφατα όμως διαπιστώθηκε η ύπαρξη διαφόρων ενζυμικών ενεργοτήτων που απομεθυλώνουν τις ιστονικές ουρές. Αυτές οι ενεργότητες συμπεριλαμβάνουν την απαμινάση των ιστονών PAD14 (Ye et al., 2004, Cuthbert et al., 2004), ειδικές απομεθυλάσες της αργινίνης (όπως η JMJD6) και ειδικές απομεθυλάσες της λυσίνης (όπως η LSD1). Η απομεθυλάση LSD1, που ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών jumonji, καταλύει την οξειδωση της μόνο- ή δι-

μεθυλιωμένης λυσίνης 4 της ιστόνης H3 (H3K4) (Shi Y et al., 2004), ενώ άλλα μέλη της ίδιας οικογενείας καταλύουν την αφαίρεση δι- ή τρι-μεθυλίων από άλλες λυσίνες της ιστόνης H3 (Klose et al., 2006,a,b).

1.1.4.1.1 Οι μηχανισμοί λειτουργίας των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (PTMs)

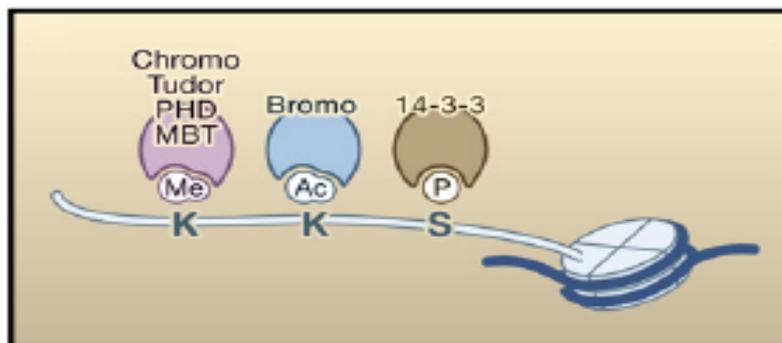
Από την ανακάλυψή τους, δεκαετίες πριν, έχει προταθεί ότι οι PTMs εμπλέκονται σε πολλές διαφορετικές λειτουργίες (Workman and Kingston, 1998). Καταρχήν, με την εξαίρεση της μεθυλίωσης, οι PTMs έχουν ως αποτέλεσμα μια αλλαγή στο συνολικό φορτίο των νουκλεοσωμάτων, που θα μπορούσε να επηρεάζει τόσο τις ενδο- όσο και τις δια-νουκλεοσωματικές αλληλεπιδράσεις. Αυτή η ιδέα υποστηρίζεται κυρίως από την παρατήρηση ότι οι ακετυλιωμένες ιστόνες μπορούν ευκολότερα να αποσυνδεθούν από το DNA *in vivo* (Reinke and Horz, 2003, Zhao et al., 2005) και *in vitro* (Chandy et al., 2006, Hassan et al., 2006). Επιπλέον, είναι γνωστό ότι οι PTMs μπορούν να αναγνωριστούν από άλλες πρωτεΐνες. Έτσι, δεδομένης της ποικιλότητας των PTMs προτάθηκε ότι ξεχωριστές PTMs ή συνδυαστικά μοτίβα τους, μπορεί να “διαβάζονται” από άλλες πρωτεΐνες που επηρεάζουν τη δυναμική της χρωματίνης και τη λειτουργία της (Jenuwein and Allis, 2001, Strahl and Allis, 2000, Turner, 2000). Πρόκειται για τη γνωστή υπόθεση του “ιστονικού κώδικα” (the histone code hypothesis). Επί τη βάση αυτής της θεώρησης, το πώς θα λειτουργήσει μια PTM εξαρτάται από την πρωτεΐνη “εκτελεστή” (effector) που την αναγνωρίζει. Όμως, είναι γνωστό ότι κάποιες PTMs έχουν άμεση επίδραση σε χρωματινικές δομές υψηλότερης τάξης. Για παράδειγμα, έχει αποδειχθεί ότι η ακετυλίωση της λυσίνης 16 της ιστόνης H4 (H4K16) αναστέλλει τη δημιουργία συμπαγών ινών χρωματίνης διαμέτρου 30nm (Shogren-Knaak et al., 2006).

Η μεγάλη ποικιλομορφία των PTMs κάνει ελκυστική την ιδέα ενός “κώδικα”. Στη μία περίπτωση ο κώδικας έχει “πληροφοριακό” περιεχόμενο και γίνεται μέσω “σημάτων” και στοιχείων που αναγνωρίζονται από πρωτεΐνες – «τελεστές» (effectors), ενώ στην άλλη ο κώδικας “μεταφράζεται” σε αλλαγές της στερεοδιαμόρφωσης που επηρεάζουν (άμεσα) τη δομή της χρωματίνης.

1.1.4.1.2 Ρόλος των PTMs στη στρατολόγηση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τη χρωματίνη

Ανάλογα με το συνδυασμό των PTMs σε μια ιστονική ουρά, προσελκύεται ή αποτρέπεται η πρόσδεση διάφορων παραγόντων στη χρωματίνη. Αυτή η λειτουργία των PTMs είναι η πλέον καλά μελετημένη. Πολλοί παράγοντες που εμπλέκονται σε διαφορετικά βιολογικά μονοπάτια έχει βρεθεί ότι προσδένονται ειδικά στις τροποποιημένες περιοχές των ιστονών. Αυτές οι πρωτεΐνες έχουν ενζυμικές ενεργότητες και τροποποιούν περαιτέρω την χρωματίνη (Εικ. 1.7). Η πρόσδεση αυτή συνήθως αφορά κάποιες χαρακτηριστικές υπομονάδες αυτών των πρωτεϊνών, που αναγνωρίζουν μεθυλομάδες (όπως τα chromo-, tudor-domains, malignant brain tumor-, WD40 repeats και PHD-finger), ακετυλομάδες (bromodomains), φωσφορικές ομάδες (14-3-3) και ατροποποίητα κατάλοιπα (SANT-domain και PHD-finger). Η πολυπλοκότητα των ιστονικών τροποποιήσεων σε συνδυασμό με την επιστράτευση μιας πλειάδας παραγόντων υπαινίσσεται την εμπλοκή των PTMs σε ένα μεγάλο αριθμό διεργασιών υψηλής ρύθμισης. Παραδείγματα τέτοιου τύπου είναι η επιστράτευση του BPTF (μέρος του NURF συμπλόκου) που αναγνωρίζει την H3K4me3 μέσω της PHD υπομονάδας του. Αυτή η στρατολόγηση, προσελκύει την ΑΤΡάση SNF2L στην περιοχή η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί την γονιδιακή έκφραση του HOXC8 γονιδίου (Wysocka et al., 2006). Άλλο ένα παρόμοιο παράδειγμα αποτελεί η στρατολόγηση της πρωτεΐνης PC2 (polycomb protein) από την H3K27me, που σχετίζεται με τη λιγύση ουβικουιτίνης της ιστόνης H2A ή η HP1 πρωτεΐνη που μέσω του χρωμοτομέα της προσδένεται στην H3K9me3 και μεταφέρει σε συγκεκριμένες θέσεις ενεργότητες αποακετυλασών και μεθυλοτρανσφερασών.

Εξίσου σημαντική είναι και η συμμετοχή των PTMs στην αναστολή της πρόσδεσης μη ιστονικών πρωτεϊνών στη χρωματίνη. Τέτοια παραδείγματα είναι περιορισμένα, αλλά είναι γνωστό για παράδειγμα ότι η H3K4me3 αποτρέπει την πρόσδεση του συμπλόκου NURD και η H3T3phos αποτρέπει την πρόσδεση του συμπλόκου INHAT στην χρωματίνη. Δεδομένου ότι και τα δύο σύμπλοκα έχουν κατασταλτικό ρόλο στην αντιγραφή του DNA, η απόρριψή τους από σήματα 'ενεργοποίησης' (όπως η H3K4me3) είναι λογική (Margueron et al., 2005).



Εικ. 1.7 Συστράτευση πρωτεϊνών στις ιστόνες. Σχήμα όπου απεικονίζονται υπομονάδες πρωτεϊνών που αναγνωρίζουν μεθυλιωμένες ή ακετυλιωμένες λυσίνες ή φωσφορυλιωμένες σερίνες. (Kouzarides, 2007)

1.1.4.2 Ισομορφές των ιστονών

Οι υψηλότερης τάξης δομές της χρωματίνης επηρεάζονται από τη φύση των αμινοξέων στην επιφάνεια του οκταμερούς των ιστονών και των ουρών τους που παίζουν ρόλο στην αλληλεπίδραση νουκλεοσωμάτων (Shogren-Knaak et al., 2006, Chodaparambil et al., 2007, Zhou et al., 2007). Έτσι, η διαμόρφωση του νουκλεοσώματος και της χρωματινικής δομής επηρεάζεται από την ενσωμάτωση ισομορφών των ιστονών που διαφέρουν στην αμινοξική αλληλουχία (ανασκόπηση Boulard et al, 2007). Όλες οι ιστόνες, εκτός της H4, έχουν ισοτύπους που κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια και διαφέρουν σε λίγα μόνο αμινοξέα (Pusarla and Bhargava, 2005). Εξάιρεση σε αυτόν τον κανόνα αποτελεί η macroH2A, η οποία περιλαμβάνει μια αμινοτελική και μια μεγάλη καρβοξυτελική περιοχή. Η καρβοξυτελική περιοχή συνδέεται με ένα ένζυμο που προκαλεί αποακετυλίωση των νουκλεοσωμάτων που περιέχουν macroH2A (Doyen et al., 2006).

Οι ισομορφές της H2A διαφοροποιούνται σε περιοχές που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση με τις άλλες ιστόνες ή σε κατάλοιπα που βρίσκονται στην επιφάνεια (Chakravarthy et al., 2004). Επομένως, τα νουκλεοσώματα έχουν διαφορετικές ιδιότητες ανάλογα με την ισομορφή H2A που περιέχουν. Για παράδειγμα, η H2A.Z σταθεροποιεί το νουκλεόσωμα (Park et al., 2004, Hoch DA et al., 2007) και άλλες ανώτερες δομές (Fan et al., 2002) *in vitro*. Η υποκατάσταση της H2A από τη macroH2A φαίνεται να σταθεροποιεί τα νουκλεοσώματα (Chakravarthy et al., 2006), διότι τόσο η απομάκρυνση μέσω πρωτεϊνών-συννοδών (chaperones) των macroH2A-

H2B διμερών όσο και η αναδιαμόρφωση των νουκλεοσωμάτων δεν ευνοούνται (Angelov et al., 2003).

Ο αριθμός των ισομορφών της H3 διαφέρει στα διάφορα είδη. Στα θηλαστικά υπάρχουν τέσσερις ισομορφές (Zweidler, 1984): οι H3.1 και H3.2, οι οποίες εκφράζονται κατά την S φάση του κυτταρικού κύκλου, η H3.3 που εκφράζεται σε όλη τη διάρκεια του κύκλου και η κεντρομεριδιακή πρωτεΐνη A (CENP-A), η οποία εντοπίζεται μόνο στα κεντρομερίδια. Μια ακόμα ισομορφή της H3 εντοπίζεται στους όρχεις και ονομάζεται H3t (Govin et al., 2005). Στον άνθρωπο, οι ισομορφές H3.1 και H3.2 έχουν ομοιότητα 99%, ενώ οι H3.1 και H3.3 96% καθώς διαφέρουν μόνο σε πέντε αμινοξέα. Η αλληλουχία της ανθρώπινης CENP-A διαφέρει σε μεγαλύτερο βαθμό από τις άλλες ισομορφές της H3, καθώς η ομοιότητα της αλληλουχίας της με αυτήν της H3.1 είναι της τάξης του 46%, ενώ η H3t διαφέρει από την H3.1 μόνο σε τέσσερα αμινοξέα.

1.1.4.3 Αναδιαμόρφωση της χρωματίνης με δαπάνη ATP (ATP-dependent chromatin remodeling)

Οι PTMs, οι ισομορφές των ιστονών και η ενσωμάτωση της ιστόνης H1 αποτελούν εγγενή χαρακτηριστικά της χρωματίνης, που ρυθμίζουν τη δομή της. Από την άλλη πλευρά, υπάρχει μια μεγάλη κατηγορία εξωγενών παραγόντων που εμπλέκονται στη διαμόρφωση των νουκλεοσωμάτων και αποτελούν ακόμα έναν τρόπο ρύθμισης στην πρόσβαση της γενετικής πληροφορίας. Σε αυτήν την κατηγορία περιλαμβάνονται οι “ATP-εξαρτώμενοι” παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης (ATP-dependent chromatin remodelers), μεγάλα μακρομοριακά σύμπλοκα που χρησιμοποιούν την υδρόλυση του ATP για την αποσταθεροποίηση των συνδέσεων μεταξύ του DNA και των ιστονών. Οι “ATP-εξαρτώμενοι” παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης προκαλούν αλλαγές στη δομή της χρωματίνης βοηθώντας στη ρύθμιση της αντιγραφής. Οι διαφορετικές τάξεις των συμπλόκων αυτών φαίνεται να έχουν εξελιχθεί έτσι ώστε να καταλύουν εξειδικευμένες βιοχημικές αντιδράσεις εξυπηρετώντας τις ανάγκες των διαφόρων διαδικασιών γονιδιακής ρύθμισης (Racki and Narlikar, 2008). Η διαδικασία αυτή μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα αλλαγές του χρωματινικού υποστρώματος, όπως την ολίσθηση και ανατοποθέτηση νουκλεοσωμάτων στο DNA (DNA sliding), την αποσύνδεση του DNA από τις

ιστόνες και την αντικατάσταση ενός τύπου ιστόνης από μια ισομορφή της (histone variant exchange).

Γενικότερα, τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης κατηγοριοποιούνται με βάση την υπομονάδα ΑΤΡάσης που περιέχουν. Η ενζυμική δραστηριότητα κάθε συμπλόκου οφείλεται κυρίως στην καταλυτική υπομονάδα ΑΤΡάσης που αναδιαμορφώνει τα νουκλεοσώματα απουσία των υπόλοιπων υπομονάδων. Οι υπομονάδες ανήκουν στην SF2 υπεροικογένεια των ελικασών (Durr et al., 2005, Thoma et al., 2005). Οι καταλυτικές υπομονάδες ανήκουν στην υπεροικογένεια Swi2/Snf2 ΑΤΡασών και κατατάσσονται σε τέσσερις υποοικογένειες: ISWI, SWI/SNF, CHD και INO80 (Langst et al., 1999, Becker, 2004). Τα κυριότερα και εκτενέστερα χαρακτηρισμένα μέλη των συμπλόκων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης είναι αυτά των οικογενειών SWI/SNF και ISWI, στα οποία θα γίνει αναφορά στη συνέχεια.

Τα σύμπλοκα SWI/SNF εμπλέκονται στην ενεργοποίηση και αποσιώπηση γονιδίων, ενώ τα σύμπλοκα ISWI έχουν κυρίως συνδεθεί με την αποσιώπηση γονιδίων (Gangaraju et al., 2007, Cairns et al., 2005). Οι βασικοί μηχανισμοί και οι αντιδράσεις που καταλύουν αυτά τα συμπλόκα δεν είναι κοινά. Πρόσφατες μελέτες ενισχύουν την άποψη ότι η διαφορική λειτουργικότητα των συμπλόκων αναδιαμόρφωσης SWI/SNF και ISWI οφείλεται στην παρουσία ενός μικρού τμήματος στην καταλυτική υπομονάδα των ISWI που διαθέτει ενεργότητα ελικάσης (Fan et al., 2005). Στις ελικάσες μια μηχανιστική διαφορά μεταξύ των κατά τα άλλα παρόμοιων δομικά ενζύμων, είναι η ιδιότητά τους να διμερίζονται (Cho et al., 1998, Serebrov, Pyle, 2004, Maluf et al., 2003). Φαίνεται λοιπόν ότι η βασική διαφορά στη δράση αυτών των ενζύμων είναι ότι τα SWI/SNF σύμπλοκα δρουν ως μονομερή σε αντίθεση με τα ISWI σύμπλοκα που διμερίζονται.

Οι πιθανοί μηχανισμοί αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης από τα παραπάνω σύμπλοκα έχουν ως κοινό σημείο την δημιουργία μιας θηλιάς (loop or bulge) που εκτείνεται γύρω από την επιφάνεια του οκταμερούς των ιστονών (Becker, Horz W., 2002, Pazin, Kadonaga, 1997). Δύο είναι οι βασικοί μηχανισμοί (μοντέλα) που έχουν προταθεί για τον τρόπο δράσης αυτών των συμπλόκων:

α) Το μοντέλο αποσύνδεσης και μετατόπισης του DNA (DNA translocation model)

Στο μοντέλο αυτό, το σύμπλοκο αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης προωθεί την αποσύνδεση του νουκλεοσωματικού DNA από το οκταμερές των ιστονών όπου δημιουργείται μια θηλιά. Με τον τρόπο αυτό θεωρείται ότι δρουν τα σύμπλοκα ISWI.

Τα σύμπλοκα ISWI μπορούν να μετατοπίζονται κατά μήκος του DNA (Fyodorov, Kadonaga, 2002), να συσπειρώνουν τα νουκλεοσώματα και να τα κατανέμουν ομοιογενώς (regularly spaced), αλλά δεν έχουν την ιδιότητα να τα αναδιατάσσουν (Ito et al., 1997, LeRoy et al., 2000).

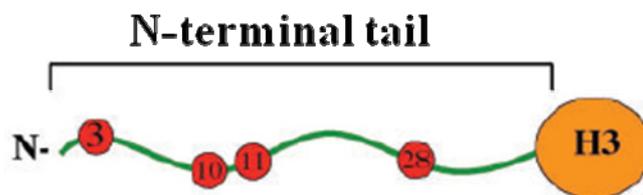
β) Ο μηχανισμός μεταφοράς της συστροφής του DNA (lateral cross-transfer mechanism)

Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, το σύμπλοκο που αναδιαμορφώνει τη χρωματίνη, αποσυνδέει το νουκλεοσωματικό DNA από τις ιστόνες με αποτέλεσμα τη συστρόφη του DNA γύρω από τον άξονά του. Η μια υπερελικωμένη στρόφη του DNA γύρω από το νουκλεόσωμα μετατοπίζεται στην επόμενη “διαδρομή”, με αποτέλεσμα την μετακίνηση και την ταυτόχρονη αποσύνδεση της ακόλουθης υπερελικωμένης στροφής από το οκταμερές των ιστονών. Αυτή η περιστροφή του DNA γύρω από τον άξονά του εμπλέκει την μετακίνηση περίπου 80 bp (Kassabov et al., 2003). Αυτός ο μηχανισμός δράσης αναφέρεται στα σύμπλοκα SWI/SNF.

1.1.5 Η φωσφορυλίωση της ιστόνης H3 και τα ένζυμα που την καταλύουν

Πέντε αμινοξικά κατάλοιπα έχουν βρεθεί να φωσφορυλιώνονται στην αμινοτελική ουρά της ιστόνης H3, η S10 (που έχει χαρακτηριστεί εκτενέστερα), η S28, η S31 (στην H3.3 ισομορφή της ιστόνης H3), η T11 και η T3 (Hendzel et al., 1997, Hsu et al., 2000, De Souza et al., 2000, Giet and Glover, 2001, Goto et al., 2002, Grosio et al., Preuss et al., 2003, 2002, Polioudaki et al., 2004, Hake, et al., 2005). Όσον αφορά στη φωσφορυλίωση των αμινοτελικών ουρών των ιστονών, η τροποποίηση αυτή έχει παρατηρηθεί σε δυο αντίθετες συνθήκες μεταγραφικής ενεργότητας: στην ενεργοποίηση γονιδίων μετά από επαγωγή με αυξητικούς παράγοντες, καθώς και σε μεταγραφικά ανενεργά μιτωτικά και μειωτικά κύτταρα (Cheung et al., 2000). Αυτή η φαινομενικά αντιφατική κατάσταση σχετίζεται ενδεχομένως με τη διαφορετική δομή της χρωματίνης, τη συμπυκνωμένη που απαντάται στα μιτωτικά χρωμοσώματα και τη

“χαλαρή” χρωματίνη των ενεργοποιημένων γονιδίων κατά τη μεσόφαση (για ανασκόπηση βλέπε Prigent and Dimitrov, 2003).



Εικ. 1.8 Τα αμινοξέα που φωσφορυλιώνονται στην ουρά της H3.
(Takashi Ito, 2007)

Η φωσφορυλίωση της σερίνης 10 (pS10H3) έχει παρατηρηθεί σε διαφορετικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένων της ενεργοποίησης, της αντιγραφής και της συμπύκνωσης των χρωμοσωμάτων στη μίτωση (Hsu et al., 2000, Kaszas et al., 2000) και τη μείωση (Wei et al., 1999). Σε ορισμένα συστήματα μετάλλαξη του συγκεκριμένου καταλοίπου της H3 σχετίζεται με μη κανονική συμπύκνωση και ανώμαλο διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων *in vivo* (Wei et al., 1999). Η σερίνη 10 της ιστόνης H3 φωσφορυλιώνεται από ένα πλήθος κινασών, όπως την Aurora B, τις MSK1 και MSK2 (mitogen and stress-activated protein kinases), την cAMP-dependent protein kinase A (PKA), τη NIMA kinase, , τη ribosomal S6 kinase 2 (RSK2) και την κινάση IκB α (IKKα) (Nowak et al., 2004).

Η φωσφορυλίωση της S10 της H3 από τις MSK1/2 έχει συνδεθεί με την ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων που κωδικοποιούν μιτογόνους παράγοντες, όπως τα c-fos και c-jun (Mahadevan et al., 1991). Πρόσφατα έχει αναφερθεί και η σχέση της με ογκογονίδια (Ge et al., 2006). Πρόσφατες πειραματικές μελέτες αποδεικνύουν ότι υφίσταται μια σχέση της pS10H3 με την ακετυλίωση και μεθυλίωση γειτονικών καταλοίπων. Η pS10H3 σχετίζεται με την ακετυλίωση της λυσίνης 14 της H3 (Cheung et al., 2000, Lo et al., 2000), την απώλεια της ακετυλίωσης της λυσίνης 9 της H3 (Edmondson et al., 2002), ενώ εμποδίζει τη μεθυλίωση της λυσίνης 9 (Rea et al., 2000).

Η υπερέκφραση της Aurora B που έχει παρατηρηθεί σε καρκινικές κυτταρικές σειρές, οδηγεί σε αύξηση της pS10H3 (Ota et al., 2002). Η φωσφορυλίωση της S10 από την Aurora B στη μίτωση οδηγεί σε απομάκρυνση της HP1 (Heterochromatin protein 1) από την μεθυλιωμένη K9 (Hirota et al., 2005, Fischle et al., 2005). Η Aurora B κατά τη διάρκεια της μίτωσης φωσφορυλιώνει επίσης τη σερίνη 28 και η

φωσφορυλίωση αυτή σχετίζεται με τη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων (Goto et al., 1999, 2002). Πιο αναλυτική περιγραφή του ρόλου της Aurora B ακολουθεί παρακάτω.

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν δύο ακόμα κατάλοιπα που φωσφορυλιώνονται στην ουρά της H3, τη θρεονίνη 3 (T3H3) (Polioudaki et al., 2006) και τη θρεονίνη 11 (T11H3) (Preuss et al., 2003). Η τροποποίηση της T3H3 καταλύεται από μια κινάση που ανακαλύφθηκε πολύ πρόσφατα, τη Haspin (Dai et al., 2005), στην οποία γίνεται ιδιαίτερη αναφορά πιο κάτω. Η φωσφορυλίωση της T11H3 καταλύεται στη μίτωση από την κινάση Dlk/ZIP (Dlk: death-associated protein (DAP)-like kinase, ZIP: Zipper interacting protein kinase) (Preuss et al., 2003), ένα ένζυμο με αδιευκρίνιστη λειτουργία, που φωσφορυλιώνει τόσο πυρηνικά (ιστόνες), όσο και κυτταροπλασματικά (ελαφρές αλυσίδες της μυοσίνης) υποστρώματα (Kögel et al., 1999). Η Dlk/ZIP εντοπίζεται φυσιολογικά στον πυρήνα και αλληλεπιδρά με παράγοντες της αντιγραφής και του ματίσματος του RNA (Page et al., 1999). Παρόλα αυτά, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, το ένζυμο αυτό παραμένει στο κυτταρόπλασμα και συμμετέχει στο μονοπάτι της απόπτωσης (Kögel et al., 1999, 2001).

1.2 Μιτωτικές κινάσες

1.2.1 Οι κινάσες Aurora

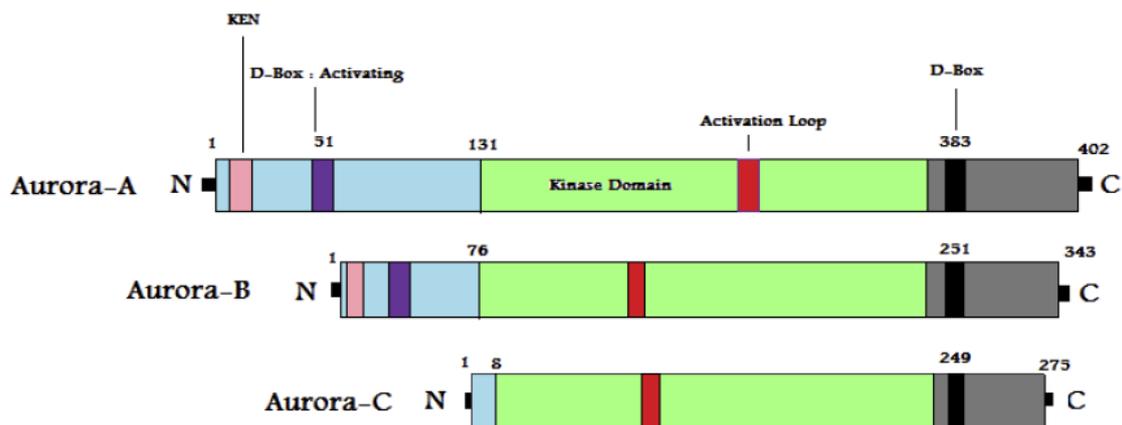
Οι κινάσες Aurora αποτελούν μια σχετικά νέα οικογένεια κινασών σερίνης/θρεονίνης με σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου. Για πρώτη φορά οι Aurora κινάσες ανακαλύφθηκαν στη Δροσόφιλα (Glover et al., 1995). Μάλιστα το όνομά τους προέρχεται από την λατινική ονομασία του Βόρειου Σέλαος (Aurora Borealis), αφού μετάλλαξη στην Aurora κινάση είχε ως αποτέλεσμα το μη σωστό διαχωρισμό του κεντροσωματίου, που οδηγεί στο σχηματισμό μονοπολικής ατράκτου, κατάσταση που προσομοιάζει με το Βόρειο Σέλας σε μικροσκόπιο φθορισμού. Έκτοτε, ομόλογες πρωτεΐνες έχουν ταυτοποιηθεί σε πολλά είδη. Στον *Saccharomyces cerevisiae* έχει βρεθεί μόνο μία Aurora κινάση, η Ipl1 (Glover et al., 1995, Chan et al., 1993), ενώ στους *Caenorhabditis elegans* (Schumacher et al., 1998 a,b), *Drosophila* (Glover et al., 1995, Mesitaly-Gross et al., 1999) και *Xenopus*

(Roghi et al., 1998, Adams et al., 2000) έχουν βρεθεί δύο τύποι Aurora κινασών, η Aurora A και η Aurora B. Στα θηλαστικά υπάρχουν τρία είδη, η Aurora A, η Aurora B και η Aurora C (Nigg et al., 2001).

Αυτή η κατηγορία κινασών απέκτησε ιδιαίτερο ενδιαφέρον όταν ανακαλύφθηκε ότι δυσλειτουργία των κινασών αυτών οδηγεί σε σοβαρές μιτωτικές ανωμαλίες. Έτσι, η αποσιώπηση της Aurora A οδηγεί σε αποδιοργάνωση της μιτωτικής ατράκτου στο *C. elegans*, στη *Drosophila*, καθώς και σε ανθρώπινα κύτταρα (Glover et al., 1995, Hannak et al., 2001, Marumoto et al., 2003). Απώλεια της λειτουργικότητας της Aurora B συνδέεται με μη φυσιολογική διάταξη των χρωμοσωμάτων και ελαττωματική κυτταροκίνηση τόσο στη *Drosophila* όσο και σε κύτταρα HeLa. Οι παρατηρήσεις αυτές υποδεικνύουν ότι οι κινάσες αυτές διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες διαδικασίες και κυρίως στη λειτουργία του κεντροσωματίου, στον διαχωρισμό των αδερφών χρωματίδων και στην κυτταροκίνηση. Τέλος, έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση των Aurora κινασών σε καρκινικές κυτταρικές σειρές, υποδεικνύοντας πιθανό ρόλο των κινασών αυτών στη δημιουργία όγκων (Zhou et al., 1998, Tatsuka et al., 1999, Katayama et al., 1999).

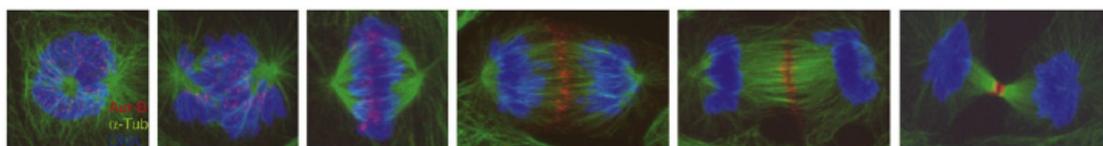
1.2.1.1 Δομή και κυτταρική κατανομή

Οι Aurora κινάσες αποτελούνται κυρίως από δύο δομικές περιοχές (domains) : ένα ρυθμιστικό domain στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης και ένα καταλυτικό στο καρβοξυτελικό άκρο. Το ρυθμιστικό domain διαφέρει τόσο στην αλληλουχία όσο και στο μήκος μεταξύ των Aurora πρωτεϊνών, ενώ η καταλυτική περιοχή παρουσιάζει ομολογία >70% ανάμεσα στις Aurora A, Aurora B και Aurora C. Οι περιοχές D-box στο καρβοξυτελικό και στο αμινοτελικό τμήμα είναι υπεύθυνες για την αποδόμηση της πρωτεΐνης. Μελέτη της αλληλουχίας και σημειακές μεταλλάξεις αποκάλυψαν ότι στην καταλυτική περιοχή υπάρχει ένα κατάλοιπο θρεονίνης, η φωσφορυλίωση του οποίου είναι απαραίτητη για να αποκτήσει η πρωτεΐνη ενεργότητα κινάσης (Bayliss et al., 2003, Eyers et al., 2004) (εικ. 2.1) Κρυσταλλικές δομές των καταλυτικών περιοχών των Aurora A και Aurora B (Cheetham et al., 2002, Bayliss et al., 2003, Sessa et al., 2005) έδειξαν ότι, όπως και σε άλλες κινάσες σερίνης/θρεονίνης, οι κινάσες αυτές σχηματίζουν δύο λοβούς που συνδέονται μεταξύ τους. Η τριτοταγής δομή του αμινοτελικού τμήματος δεν έχει διερευνηθεί ακόμα.



Εικ. 2.1 Σχηματικό διάγραμμα που αναπαριστά τις περιοχές των Aurora A, B και C κινασών. Οι N & C αμινοτελικές περιοχές περιέχουν πολλές ρυθμιστικές αλληλουχίες. Η κεντρική περιοχή (πράσινο χρώμα) αποτελεί το καταλυτικό domain των κινασών και περιέχει ένα κατάλοιπο ενεργοποίησης (activation loop). Το D-Box της αμινοτελικής περιοχής εμπλέκεται στη διαδικασία αποδόμησης της πρωτεΐνης. (Kollareddy et al., 2008)

Παρ'όλες τις ομοιότητες στη δομή και στην αλληλουχία, ο υποκυτταρικός εντοπισμός των Aurora κινασών διαφέρει σημαντικά. Πιο συγκεκριμένα, η Aurora B στην G2 φάση εντοπίζεται στον πυρήνα και στην αρχή της μίτωσης στα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα. Κατά τη διάρκεια της προμετάφασης μέχρι τη μετάφαση συγκεντρώνεται στα κεντρομερίδια. Με την έναρξη της ανάφασης η κινάση αρχίζει σταδιακά να εντοπίζεται στην κεντρική ζώνη της ατράκτου (midzone) και παραμένει στο μεσόσωμα (midbody) μέχρι την ολοκλήρωση της κυτταροκίνησης. Η κυτταρική κατανομή της Aurora B ταυτίζεται με αυτή τριών άλλων πρωτεϊνών, των INCENP, Survivin και Borealin. Οι πρωτεΐνες αυτές διαμορφώνουν ένα σύμπλοκο στο κύτταρο κατά τη διάρκεια της μίτωσης που ονομάζεται chromosomal passenger complex λόγω του ότι οι πρωτεΐνες αυτές μετακινούνται από το ένα σημείο του κυττάρου στο άλλο σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές του κυτταρικού κύκλου (επισκόπηση Fu et la., 2007).

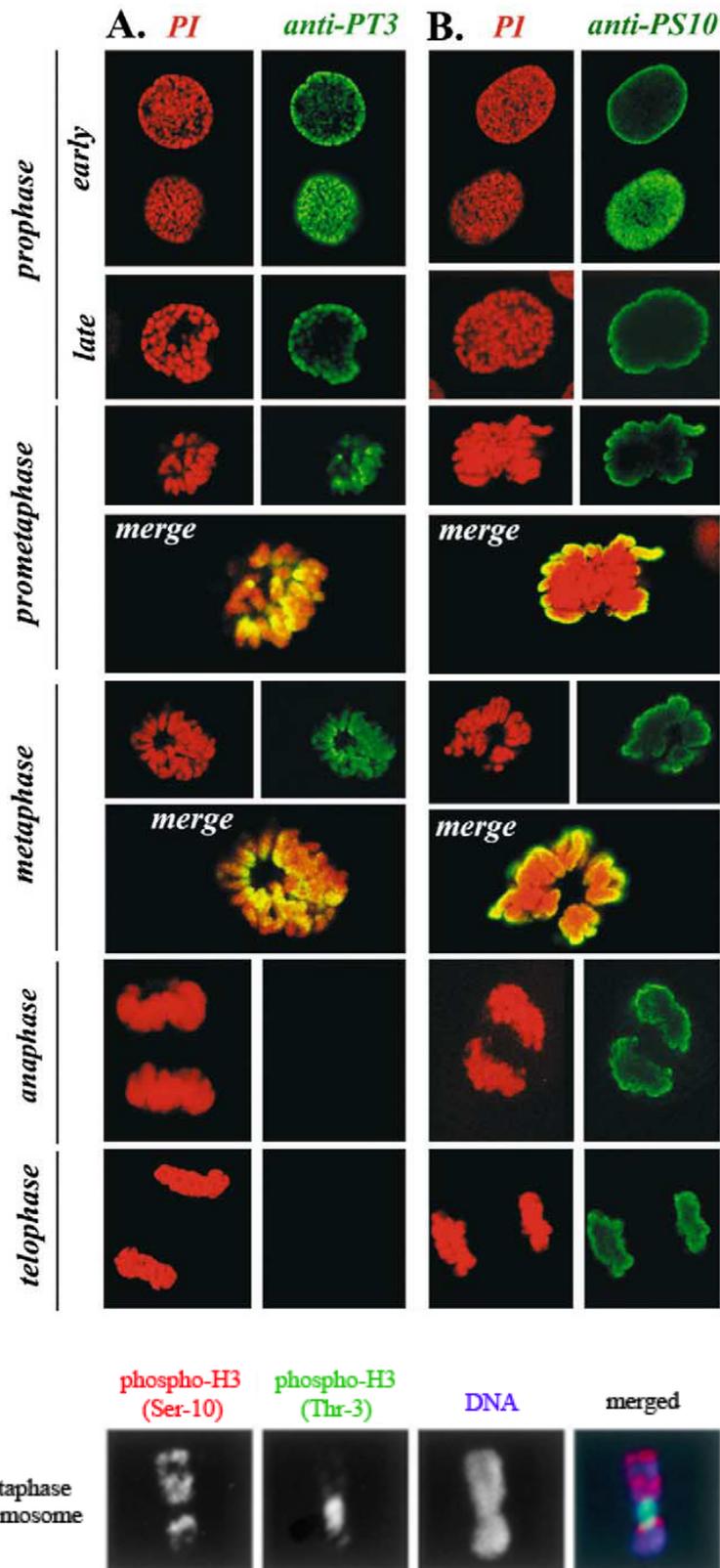


Εικ. 2.2 Πρότυπο κατανομής της Aurora B. Η Aurora B δείχνει το τυπικό πρότυπο κατανομής του συμπλόκου των chromosomal passenger πρωτεϊνών. Στην αρχή της μίτωσης εντοπίζεται στα κεντρομερίδια και στους βραχίονες των χρωμοσωμάτων. Κατά τη διάρκεια της προμετάφασης εντοπίζεται κυρίως στα κεντρομερίδια και στην ανάφαση μεταφέρεται στο κέντρο της ατράκτου και στην περιφέρεια του κυττάρου. Κατά την τελόφαση και την κυτταροκίνηση, η Aurora B συγκεντρώνεται στο μεσόσωμα. Το DNA φαίνεται με μπλε, η Aurora B με κόκκινο και η α -tubulin με πράσινο. (Gerben Vader & Susanne M.A. Lens, 2008)

1.2.1.2 Η Aurora B και οι λειτουργίες της

1.2.1.2.A Ο ρόλος της Aurora B στη φωσφορυλίωση της ιστόνης H3

Έχει βρεθεί ότι η Aurora B φωσφορυλιώνει την ιστόνη H3 στη σερίνη 10 (S10H3) και στη σερίνη 28 (S28H3) (Hsu et al., 2000, Goto et al., 2002), καθώς και την ισομορφή CENP-A στη σερίνη 7 (S7) (Zeitlin et al., 2001, Kunitoku et al., 2003) στη μίτωση. Η φωσφορυλίωση της S10H3 χρησιμοποιείται ευρέως σε δοκιμασίες για την Aurora B, ωστόσο ο λειτουργικός ρόλος αυτής της τροποποίησης δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, πιθανόν όμως να αφορά τη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων (Hsu et al. 2000, Adams et al. 2001, Giet and Glover 2001, Murnion et al. 2001).



Εικ. 2.3 Πρότυπο κατανομής της φωσφορυλωμένης H3 στη θρεονίνη 3 και στη σερίνη 10 κατά τη διάρκεια της μίτωσης. Με πράσινο φαίνονται οι pT3H3 (A) και pS10H3 (B), αντίστοιχα και με κόκκινο η χρωματίνη μετά από χρώση με ιωδιούχο προπίδιο (PI). Αριστερά αναγράφονται οι φάσεις της μίτωσης (Polioudaki et al., 2004). (Γ) Μιτωτικό χρωμόσωμα (μπλε), στο οποίο βλέπουμε το πρότυπο κατανομής των pS10H3 (πράσινο) και pT3H3 (κόκκινο) (Dai et al., 2005).

Στην *Tetrahymena*, η φωσφορυλίωση της S10H3 φαίνεται να είναι απαραίτητη για τη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων (Wei et al., 1998, Hirota et al., 2005), όμως η συσχέτιση των δύο αυτών γεγονότων δεν είναι προφανής στα θηλαστικά. Επιπλέον, σχετικά πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι η φωσφορυλίωση της S10H3 από την Aurora B στη μίτωση οδηγεί στην αποδέσμευση της ετεροχρωματινικής πρωτεΐνης 1 (HP1) από τη χρωματίνη (Hirota et al., 2005, Fischle et al., 2005), χωρίς όμως να είναι σαφής ο ρόλος αυτής της αποδέσμευσης. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι η Aurora A φωσφορυλιώνει την H3 στην S28 (Goto et al., 2002) και την ισομορφή της, CENP-A, στην S7 στην πρόφαση. Η φωσφορυλίωση της S7 από την Aurora A φαίνεται να είναι απαραίτητη για τη σύνδεση της Aurora B στην εσωτερική περιοχή του κεντρομεριδίου στην προμετάφαση. Η Aurora B με τη σειρά της είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της φωσφορυλιωμένης κατάστασης της CENP-A που πιστεύεται ότι απαιτείται για τη σωστή πρόσδεση των μικροσωλινίσκων της ατράκτου στον κινητοχώρο (Kunitoku et al., 2003).

1.2.1.2.B Ο ρόλος της Aurora B στη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων και στο σημείο ελέγχου μεταξύ μετάφασης-ανάφασης

Η Aurora B, μέλος του συμπλόκου πρωτεϊνών που είναι γνωστό ως chromosomal passenger complex (CPC), εμπλέκεται σε τρία κύρια γεγονότα της μίτωσης: τη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων, το σημείο ελέγχου μεταξύ μετάφασης-ανάφασης (spindle checkpoint) και την κυτταροκίνηση (Cooke et al. 1987, Ambrosini et al. 1997, Gassmann et al. 2004). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η κινάση αυτή φωσφορυλιώνει την ιστόνη H3 στις σερίνες 10 και 28 και φαίνεται ότι μέσω αυτής της λειτουργίας πιθανώς εμπλέκεται στη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων (Hsu et al. 2000, Adams et al. 2001, Giet and Glover 2001, Murnion et al. 2001). Ωστόσο, μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί κάποια άμεση σχέση μεταξύ του ρυθμού φωσφορυλίωσης της ιστόνης H3 και του βαθμού συμπύκνωσης των χρωμοσωμάτων (Adams et al. 2001). Επίσης, η Aurora B εμπλέκεται πιθανόν με τη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων μέσω των Condensins, καθώς RNAi που καταστέλλουν την Aurora B οδηγούν σε ελαττωματική εναπόθεση των Condensins στα χρωμοσώματα (Giet and Glover 2001, Hagstrom et al. 2002, Kaitna et al. 2002), ένας φαινότυπος που δεν παρατηρείται όμως πάντα (Losada et al. 2002, MacCallum et al. 2002).

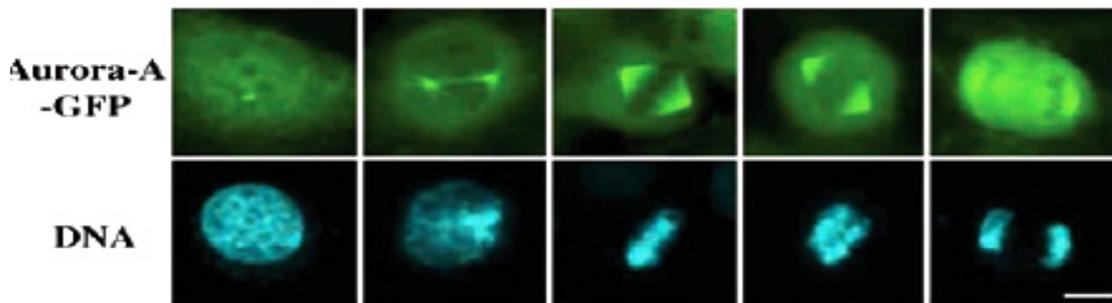
Άλλα πειράματα RNAi με χρήση ειδικών αναστολέων, όπως ο ZM447439 (Ditchfield et al. 2003) και η εσπεραδίνη (Hauf et al. 2003), ή ακόμα αντισώματα ενάντια της κινάσης, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η Aurora B συμμετέχει στην ευθυγράμμιση των χρωμοσωμάτων στο κέντρο της μεταφασικής πλάκας (congression). Τέσσερις πρωτεΐνες έχει βρεθεί ότι απαιτούνται για τη σωστή πρόσδεση των χρωμοσωμάτων στους μικροσωληνίσκους της ατράκτου: η Aurora B, η INCENP (inner centromere protein), η MCAK (mitotic centromere-associated kinesin) (Andrews et al. 2004, Lan et al. 2004) και η ICIS (inner centromere kinI stimulator) (Ohi et al. 2003). Η Aurora φωσφορυλιώνει την MCAK *in vitro* και έτσι εμποδίζει τον αποπολυμερισμό των μικροσωληνίσκων (Andrews et al. 2004, Lan et al. 2004). Έκφραση μεταλλαγμένης μη φωσφορυλιωμένης μορφής της MCAK αυξάνει τις συντελικές συνδέσεις των χρωμοσωμάτων στους μικροσωληνίσκους της ατράκτου και τον αριθμό των ασύμμετρα προσανατολισμένων χρωμοσωμάτων (Andrews et al. 2004). Τα δεδομένα αυτά αναδεικνύουν το ρόλο της κινάσης Aurora B στη διόρθωση ατελών ή λανθασμένων προσδέσεων των χρωμοσωμάτων στην άτρακτο (Biggins and Murray 2001, Ditchfield et al. 2003, Hauf et al. 2003).

Απαλοιφή της Aurora B μέσω RNAi οδηγεί επίσης σε πολυπυρηνοποίηση (Schumacher et al. 1998, Terada et al. 1998, Honda et al. 2003). Έχει αποδειχθεί ότι αυτό οφείλεται σε ανώμαλη κυτταροκίνηση και δεισλειτουργία των στοιχείων του κυτταροσκελετού (Goto et al. 2003, Kawajiri et al. 2003), τα οποία αποτελούν υποστρώματα της κινάσης.

1.2.1.3 Κυτταρική κατανομή και ρόλος των Aurora A και Aurora C

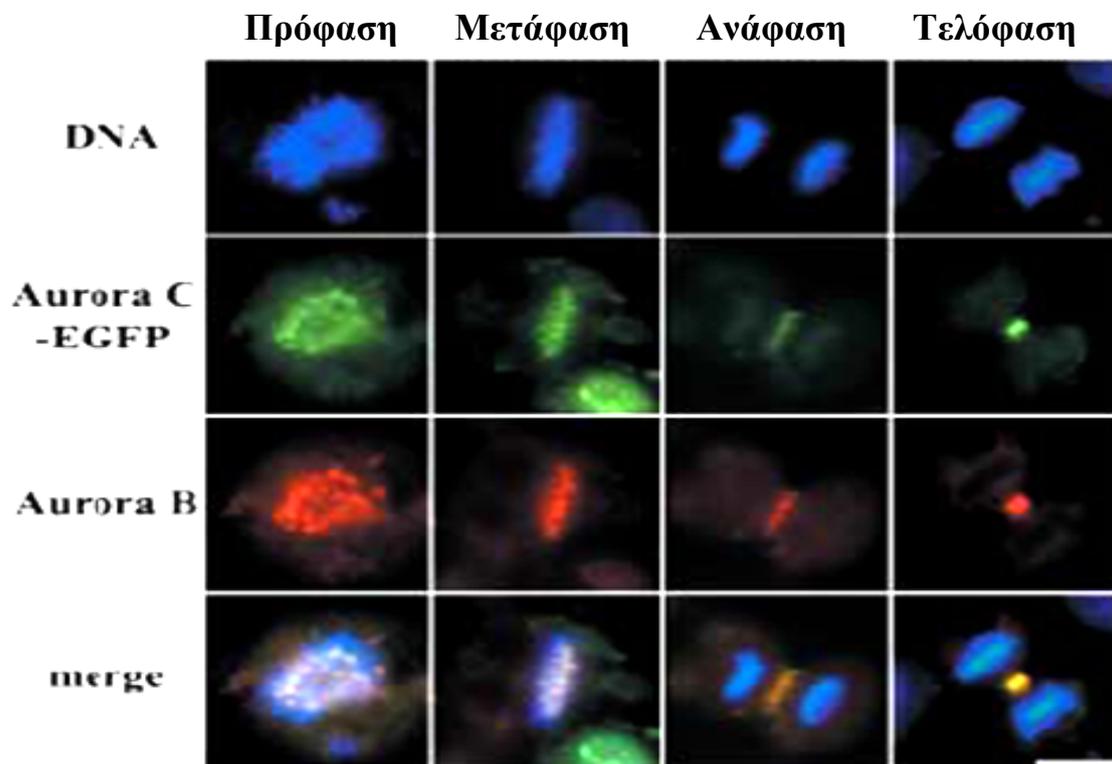
Η Aurora A ανακαλύφθηκε σε μια αναζήτηση μεταλλάξεων που επηρεάζουν τους πόλους της μιτωτικής ατράκτου στη Δροσόφιλα και πολλές από τις λειτουργίες της κινάσης αυτής σχετίζονται με την ικανότητα της να προσδένεται στους μικροσωληνίσκους καθώς και με τον κυτταρικό της εντοπισμό. Η Aurora A εντοπίζεται στην περιοχή γύρω από τα κεντριόλια από την αρχή της S φάσης μέχρι και την αρχή της επόμενης G1 φάσης, ενώ κατά τη διάρκεια της μίτωσης βρίσκεται στα άκρα των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου κοντά στους πόλους (ανασκόπηση Jingyan et al., 2007). Η κινάση αυτή φαίνεται να παίζει ρόλο στην ωρίμανση των κεντροσωματίων στρατολογώντας πρωτεΐνες του περικεντρομεριδιακού υλικού (pericentriolar material – PCM) (Hannak et al., 2001,

Toji et al., 2004, Abe et al., 2006, Mori et al., 2007) καθώς και στο σχηματισμό της διπολικής ατράκτου (Giet et al., 2002).



Εικ. 2.4 Πρότυπο κυτταρικής κατανομής της Aurora A. Στην G2 φάση η Aurora A εντοπίζεται γύρω από τα κεντριόλια, ενώ κατά τη διάρκεια κατά τη διάρκεια της μίτωσης εντοπίζεται στα άκρα των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου κοντά στους πόλους. Με πράσινο φαίνεται η Aurora A-gfp και με μπλε το DNA. (Jingyan Fu et al., 2007)

Η Aurora C είναι η λιγότερη μελετημένη από τις τρεις Aurora κινάσες. Συγκαταλέγεται στις chromosomal passenger πρωτεΐνες και αρχικά εντοπίζεται στην εσωτερική περιοχή του κεντρομεριδίου, στη συνέχεια στο κέντρο της ατράκτου και στο μεσόσωμα του μιτωτικού κυττάρου. Οι λειτουργίες της Aurora C φαίνεται να αλληλεπικαλύπτονται με αυτές της Aurora B (Kaori Sasai et al., 2004).



Εικ. 2.5 Συνετοπισμός των Aurora C και Aurora B σε κύτταρα HeLa. (Yan et al., 2005)

1.2.1.4 Το σύμπλοκο των **chromosomal passenger πρωτεϊνών (CPC)**

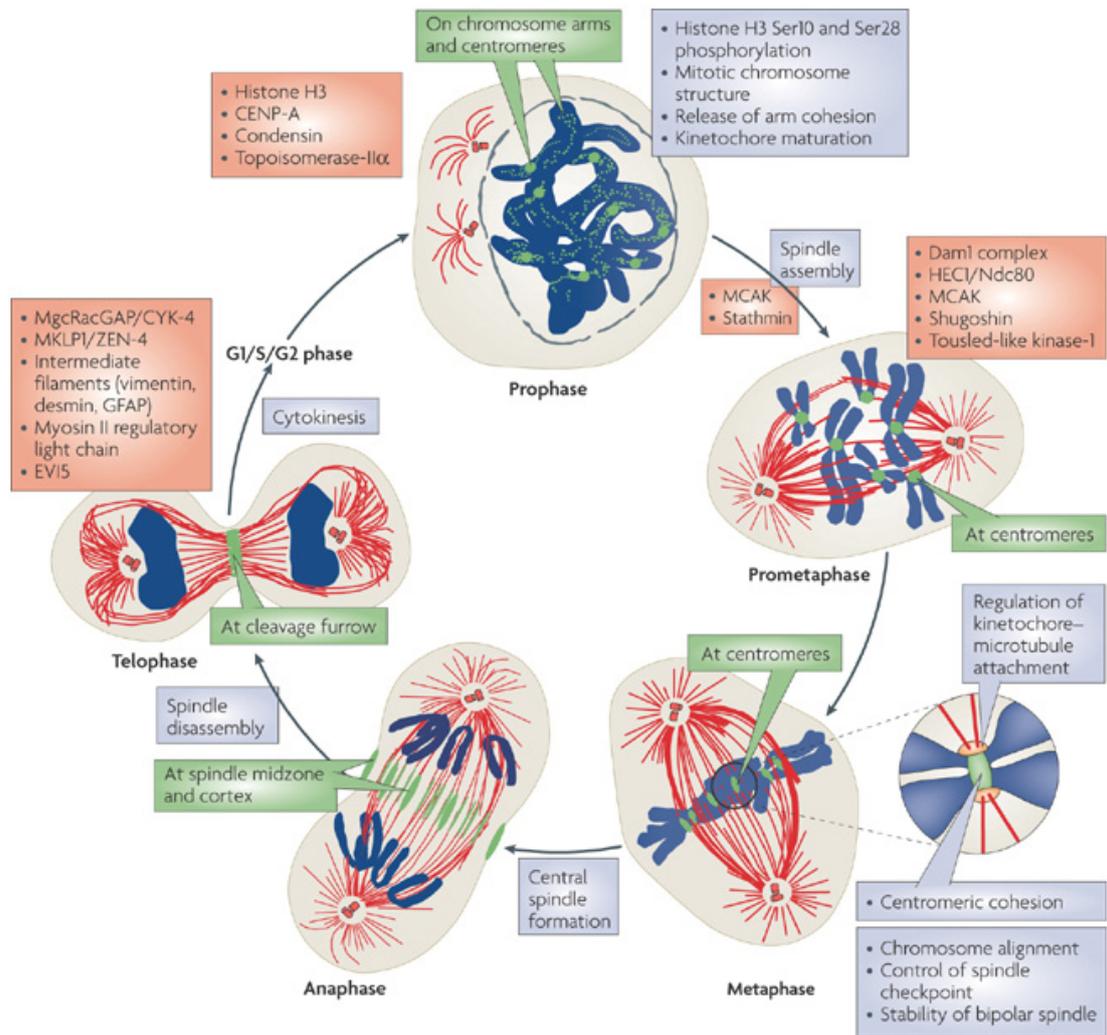
Οι chromosomal passenger πρωτεΐνες ορίζονται από το πρότυπο της κυτταρικής τους κατανομής κατά τη διάρκεια της μίτωσης. Κατά τη διάρκεια της προμετάφασης και της μετάφασης οι πρωτεΐνες του CPC εντοπίζονται στην εσωτερική πλευρά του κεντρομεριδίου, στην ανάφαση στο κέντρο της ατράκτου και στον κυτταρικό φλοιό στην πλευρά της δημιουργίας του συσταλτικού δακτυλίου (cleavage furrow) και κατά την κυτταροκίνηση στο μεσόσωμα (Cooke et al., 1987, Bolton et al., 2002, Gassmann et al., 2004, Honda et al., 2003, Ruchaud et al., 2007).

Στους περισσότερους οργανισμούς, ο πυρήνας του CPC αποτελείται από την κινάση Aurora B (Terada, et al., 1998) και τρεις μη-ενζυμικές υπομονάδες, την INCENP (Cooke et al., 1987, Earnshaw and Bernat, 1991, Terada et al., 1998, Carmena and Earnshaw, 2003, Vagnarelli and Earnshaw, 2005, Vader et al., 2006), τη survivin και την borealin (αναφέρεται επίσης και ως Dasra-B) (Honda et al., 2003, Sampath et al., 2004, Gassmann et al., 2004, Klein et al., 2006). Οι μη-ενζυμικές πρωτεΐνες του συμπλόκου ελέγχουν τη στόχευση, την ενζυμική δραστηριότητα και τη σταθερότητα της Aurora B (Lens et al., 2006). Αποσιώπηση με RNAi οποιουδήποτε μέλους του συμπλόκου έχει ως αποτέλεσμα των απεντοπισμό των υπολοίπων μελών, διακόπτει την πρόοδο της μίτωσης και πιθανόν αποσταθεροποιεί μία ή και περισσότερες από τις άλλες υπομονάδες του συμπλόκου (Honda et al., 2003, Gassmann et al., 2004, Adams et al., 2001, Carvalho et al., 2003, Lens et al., 2003, Vader et al., 2006), εντούτοις πειράματα στο *C. elegans* έδειξαν ότι στην περίπτωση αυτή η στόχευση των μη-ενζυμικών υπομονάδων δεν εξαρτάται από την Aurora B (Romano et al., 2003).

Στο σύμπλοκο η INCENP φαίνεται να αποτελεί ένα ικρίωμα που αλληλεπιδρά με τα άλλα μέλη του συμπλόκου (Kim et al., 1999, Adams et al., 2000, Wheatley et al., 2001, Chenet et al., 2003, Gassmann et al., 2004). Το καρβοξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης και συγκεκριμένα η περιοχή IN box (a.a. 822-900 στην ανθρώπινη INCENP) αποτελεί την περιοχή πρόσδεσης της Aurora B και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της δραστηριότητάς της. Η πρόσδεση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της Aurora B, η οποία στη συνέχεια φωσφορυλιώνει την INCENP (Honda et al., 2003, Bishop and Schumacher, 2002, Sessa et al., 2005). Η survivin και η borealin προσδένονται στο αμινο-τελικό άκρο της INCENP (a.a. 1-

58 στην ανθρώπινη INCENP) (Honda et al., 2003, Gassmann et al., 2004, Klein et al., 2006, Sessa et al., 2005), ενώ η borealin θα προσδεθεί ισχυρά μέσω του αμινοτελικού της άκρου στην survivin (Gassmann et al., 2004). Η survivin επίσης φωσφορυλιώνεται από την Aurora B (Carvalho et al., 2003, Wheatley et al., 2004). Η survivin φαίνεται επίσης να παίζει ρόλο στη συσσώρευση του CPC στα κεντρομερίδια καθώς προσδέεται άμεσα στη φωσφορυλιωμένη T3H3 (Wang et al., 2010, Kelly et al., 2010).

Το CPC έχει τόσο χρωμοσωμικές όσο και κυτταροσκελετικές λειτουργίες κατά τη διάρκεια της μίτωσης: φωσφορυλιώνει την H3, διορθώνει λάθη στις επαφές των ινιδίων της ατράκτου με τα κεντρομερίδια κατά τη διάρκεια της μετάφασης, συμμετέχει στην οργάνωση της ατράκτου και είναι απαραίτητο για την κυτταροκίνηση (ανασκόπηση Ruchaud et al., 2007) (εικ. 2.6).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Εικ. 2.6 Σχηματική αναπαράσταση του chromosomal passenger συμπλόκου (CPC). Απεικονίζονται η κυτταρική κατανομή του (πράσινο) σε συνδυασμό με τις πολλαπλές λειτουργίες (γκρι πλαίσια) και τους στόχους (πορτοκαλί πλαίσια) κατά τη διάρκεια των φάσεων της μίτωσης. Με κόκκινο απεικονίζονται οι μικροσωληνίσκοι και με μπλε η χρωματίνη. (ανασκόπηση Ruchaud et al., 2007)

1.2.2 Οι κινάσες Haspin

Οι πρωτεΐνες Haspin (haploid germ-cell specific nuclear protein kinase) αποτελούν μια διακριτή κατηγορία ενζύμων στην υπεροικογένεια των ευκαρυωτικών πρωτεϊνικών κινασών (ePK). Πρώτη φορά αναγνωρίστηκαν στα ποντίκια (Tanaka et al., 1999, 2001) και εντοπίστηκαν στους αρσενικούς γαμέτες, ενώ μεγαλύτερα

επίπεδα έκφρασης παρατηρήθηκαν στις απλοειδείς σπερματίδες. Αργότερα, mRNA της ανθρώπινης πρωτεΐνης Haspin εντοπίστηκε σε διπλοειδείς κυτταρικές σειρές και σε διάφορους ιστούς (Higgins 2001a). Τα επίπεδα του mRNA της Haspin βρέθηκε να είναι υψηλότερα στους ανθρώπινους όρχεις καθώς και σε όρχεις ποντικών, ενώ χαμηλότερα επίπεδα διαπιστώθηκαν στους σωματικούς ιστούς. Πιο συγκεκριμένα, επίπεδα mRNA βρέθηκαν και σε εστίες ανάπτυξης λευκοκυττάρων, όπως στο μυελό των οστών, στο θύμο αδέν, στο σπλήνα και στο ήπαρ εμβρύων. Τέλος, mRNA της Haspin εντοπίστηκε και σε βλαστικές σειρές, με υψηλότερα επίπεδα στα Ramos B κύτταρα και στα κύτταρα Jukart T (Higgins 2001a).

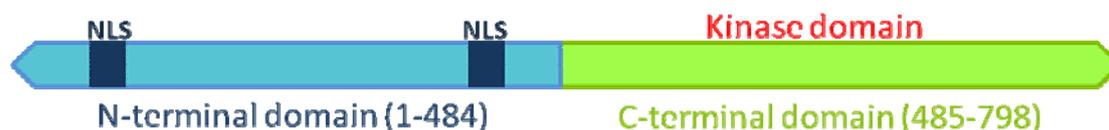
Γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που ομοιάζουν ή σχετίζονται με τη Haspin (haspin-like ή haspin-related proteins) έχουν βρεθεί στο γονιδίωμα όλων των μεγάλων ευκαρυωτικών φύλων, συμπεριλαμβανομένου των θηλαστικών, του βάτραχου *Xenopus laevis*, ψαριών, ασπόνδυλων, φυτών και μυκήτων (στη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* έχουν βρεθεί δύο ομόλογα γονίδια, τα Alk1 και Alk2, ενώ τρία ομόλογα γονίδια έχουν βρεθεί στο *Caenorhabditis elegans*), κάτι που πιθανόν σημαίνει ότι υπήρξε μια κοινή ρίζα νωρίς στην εξέλιξη των ευκαρυωτών (Higgins 2001b, Yoshimura 2001, Higgins 2003). Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι ένα ομόλογο γονίδιο έχει βρεθεί στο γονιδίωμα, του μικροσποριδίου *Encephalitozoon cuniculi*, ενός οργανισμού με ένα μικρό γονιδίωμα 2,9 μεγαβάσεων και μόνο 1,997 πιθανές περιοχές να αντιστοιχούν σε γονίδια, υποδηλώνοντας μια σημαντική και διατηρημένη εξελικτικά λειτουργία της πρωτεΐνης. Ωστόσο, ομόλογα γονίδια δεν έχουν βρεθεί στις γονιδιωματικές αλληλουχίες προκαρυωτών ή αρχαίων.

Οι Haspin είναι κινάσες σερίνης/θρεονίνης και αποτελούνται από μια καταλυτική περιοχή στο καρβοξυτελικό τους τμήμα και ένα αμινοτελικό τμήμα (Εικ. 2.7). Η μεγαλύτερη ομοιότητα που έχει βρεθεί μέχρι τώρα με τις άλλες ePK είναι η ομολογία ενός τμήματος της αμινοτελικής περιοχής της κινάσης cdc2 και του καρβοξυτελικού τμήματος της Haspin (Tanaka et al., 1999, 2001). Αυτό όμως είναι αναμενόμενο διότι τα κατάλοιπα που είναι υπεύθυνα για σύνδεση Mg^{2+} -ATP και τη δομή του καταλυτικού κέντρου είναι διατηρημένα στην πλειοψηφία των πρωτεϊνών Haspin (Higgins 2001b).

Δύο πρόσφατες μελέτες που περιγράφουν την κρυσταλλική δομή της καταλυτικής περιοχής (kinase domain) της ανθρώπινης Haspin επιβεβαιώνουν ότι έχει μια

δילוβοτή δομή παρόμοια με αυτή των ePKs, αλλά με σημαντικές δομικές διαφορές και ένθεση σε αρκετά σημεία αλληλουχιών ειδικών για τη haspin (Eswaran et al., 2009, Villa et al., 2009). Η καταλυτική περιοχή της haspin είναι ενεργή *in vitro* (Dai et al., 2005, Markaki et al., 2009, Eswaran et al., 2009). Οι δομικές μελέτες επιβεβαιώνουν ότι η φωσφορυλίωση συγκεκριμένων καταλοίπων σταθεροποιεί μια ενεργή καταλυτική διαμόρφωση ικανή να προσδεθεί σε διάφορα υποστρώματα (Eswaran et al., 2009, Villa et al., 2009).

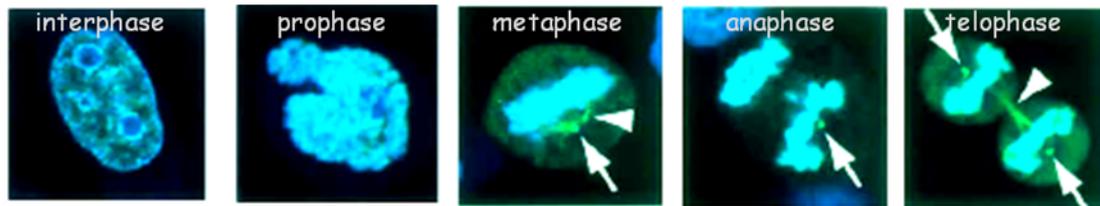
Τα ανθρώπινα γονίδια και τα γονίδια του ποντικού κωδικοποιούν πρωτεΐνες με 798 και 754 αμινοξέα αντίστοιχα. Οι δύο πρωτεΐνες έχουν 66% ομολογία στο σύνολο της αλληλουχίας τους και 83% ομολογία στην καρβοξυτελική περιοχή από τα αμινοξέα 484 έως 798. Η ομολογία για την αμινοτελική περιοχή των πρωτεϊνών είναι 53% (Tanaka et al., 2001, Higgins J2001a). Το αμινοτελικό άκρο δεν παρουσιάζει ομολογία με άλλες γνωστές πρωτεΐνες (Tanaka 1999). Η περιοχή αυτή, που είναι μια περιοχή πλούσια σε σερίνες, λυσίνες και αργινίνες, διαφοροποιείται στην εξέλιξη. Όπως φαίνεται από ανάλυση της αλληλουχίας, αλλά και από ανοσοϊστοχημικές μελέτες και έκφραση EGFP χιμαιρικών πρωτεϊνών, στο αμινοτελικό άκρο της Haspin στον άνθρωπο, στον ποντικό και τον αρουραίο υπάρχουν δύο σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) (Tanaka 1999, 2001).



Εικ. 2.7 Σχηματικό διάγραμμα που αναπαριστά τις περιοχές της Haspin. Με μπλε απεικονίζεται η αμινοτελική περιοχή της κινάσης, η οποία φέρει δύο σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS), ενώ με πράσινο η καταλυτική περιοχή της κινάσης.

Όσον αφορά το κυτταρικό πρότυπο κατανομής της κινάσης, πρέπει να επισημάνουμε ότι δεν είναι διαθέσιμα αντισώματα, τα οποία να αναγνωρίζουν την ενδογενή Haspin σε σωματικά κύτταρα με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους ή μεθόδους ανοσοφθορισμού. Έτσι, ό,τι γνωρίζουμε έως τώρα για τον κυτταρικό εντοπισμό της κινάσης βασίζεται στη μελέτη της υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης, καθώς και σε μελέτες της ενδογενούς πρωτεΐνης στις σπερματίδες που υποδεικνύουν ότι η Haspin εντοπίζεται στον πυρήνα των μεσοφασικών κυττάρων, ενώ στη μίτωση συνδέεται με

τα χρωμοσώματα. Έντονο σήμα της *egfr-Haspin* παρατηρήθηκε επίσης και στα κεντροσωμάτια μιτωτικών κυττάρων (Εικ. 2.8) (Dai et al., 2005).



Εικ. 2.8 Πρότυπο κυτταρική κατανομής της κινάσης Haspin. Με πράσινο βλέπουμε την *egfr-Haspin*, ενώ με μπλε το DNA. Τα βέλη υποδεικνύουν την παρουσία της Haspin στα κεντρομερίδια και οι κεφαλές των βελών το συσχετισμό της κινάσης με την άτρακτο. (Dai et al., 2005)

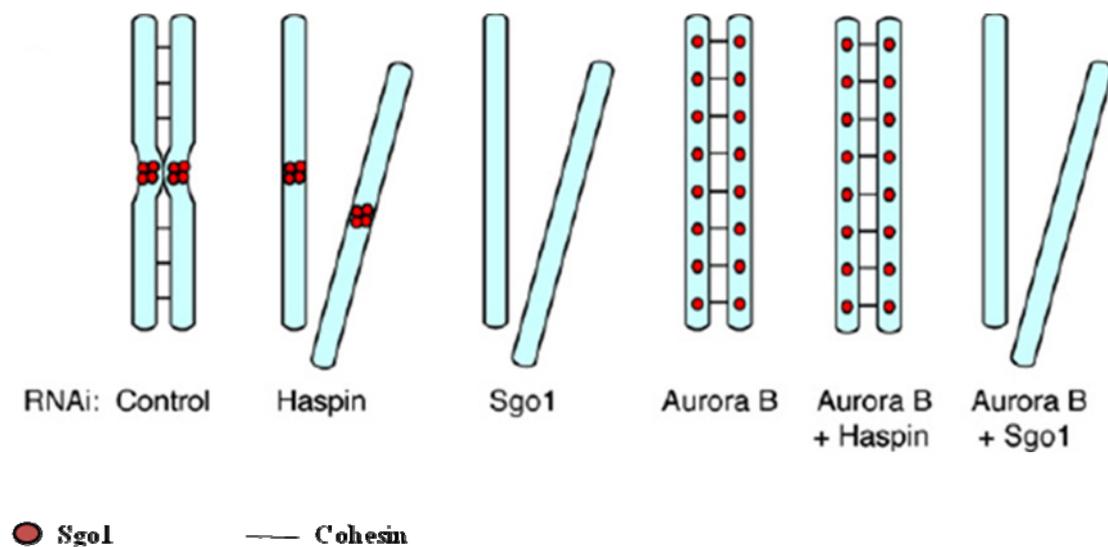
Το γονίδιο της *Haspin* στα θηλαστικά ανακαλύφθηκε μέσα σε ένα ιντρόνιο του γονιδίου της ιντεγκρίνης *Ea* (*integrin αE*) (Tanaka et al., 2001, Higgins 2001a, Yoshimura 2001). Το γονίδιο της εν λόγω κινάσης στερείται ιντρονίων και κωδικοποιεί ένα μετάγραφο μεγέθους 2,8kb.

1.2.2.1 Η *Haspin* και οι λειτουργίες της

1.2.2.1.A Ρύθμιση της συνοχής των χρωμοσωμάτων (**chromosome cohesion**) στη μίτωση

Σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, η *Haspin* είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική ευθυγράμμιση των χρωμοσωμάτων στον ισημερινό του κυττάρου στη μετάφαση (Dai et al. 2005). Είναι πιθανόν ότι η πρωτεΐνη αυτή συμβάλλει στη διατήρηση της συνοχής των αδελφών χρωματίδων, η οποία διαμεσολαβείται από την πρωτεΐνη *Cohesin* (Dai et al. 2006) (Εικ. 2.9). Στα σπονδυλωτά, η απομάκρυνση της πρωτεΐνης *Cohesin* από το μιτωτικό χρωμόσωμα λαμβάνει χώρα φυσιολογικά σε δύο στάδια. Στην πρόφαση και την προμετάφαση αυτό συμβαίνει υπό τον έλεγχο των *Polo-like kinase 1*, *Aurora B* και *Wapl*. Η πρωτεΐνη *Shugoshin* (*Sgo*) φαίνεται ότι εμποδίζει την απομάκρυνση της *Cohesin* από τα κεντρομερίδια μέσω του «μονοπατιού της πρόφασης» μέχρι η *cohesin* να εξαλειφθεί πλήρως μέσω ενός δεύτερου μονοπατιού: της απομάκρυνσης της *cohesin* στην ανάφαση μέσω της *Separase*. Η εξάλειψη της *Haspin* με πειράματα *RNAi* σε *HeLa* κύτταρα οδηγεί σε αποδέσμευση της *Cohesin* και το διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων στην ανάφαση, εμποδίζοντας τη

φυσιολογική διάταξη των χρωμοσωμάτων στη μετάφαση, ενεργοποιώντας το σημείο ελέγχου σχηματισμού της ατράκτου (spindle check point) και δεσμεύοντας το κύτταρο σε μια κατάσταση που προσομοιάζει την προμετάφαση (Dai et al. 2006). Υπερέκφραση της ανθρώπινης Haspin προκαλεί καθυστέρηση στην είσοδο των κυττάρων στη μίτωση (Dai et al. 2005) , αυξάνει τα επίπεδα της Cohesin στα χρωμοσώματα και φαίνεται να σταθεροποιεί τη συνοχή των χρωμοσωμικών άκρων (Dai et al. 2006).



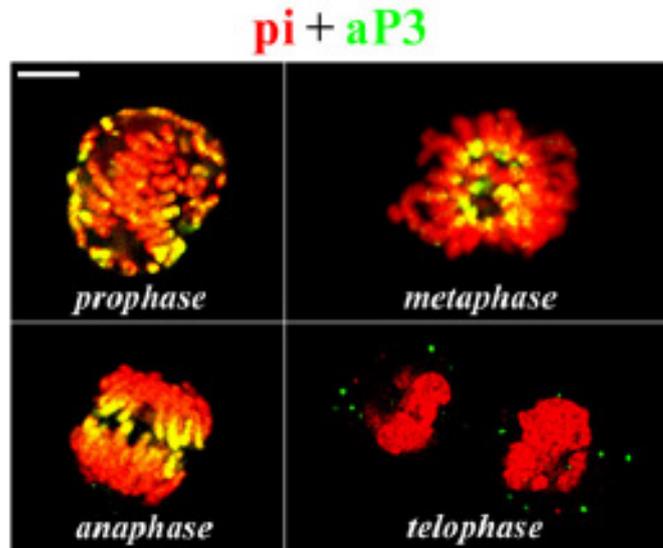
Εικ. 2.9 Σχηματικό μοντέλο της αλληλεπίδρασης των Haspin, Aurora B και Sgo1 στη ρύθμιση της σύνδεσης των αδελφών χρωματίδων. Στο πείραμα-ελέγχου (control), τα κύτταρα βρίσκονται πριν την ανάφαση, άρα και οι αδελφές χρωματίδες είναι συνδεδεμένες στην περιοχή του κεντρομεριδίου, η οποία συμπίπτει με τον εντοπισμό της Sgo1 (κόκκινοι κύκλοι). Επιπλέον, εστίες της cohesion εντοπίζονται κατά μήκος των χρωμοσωμάτων (οριζόντιες γραμμές). Μετά από πειράματα RNAi για τη Haspin, η Sgo1 παραμένει στα κεντρομερίδια, αλλά η cohesion χάνεται, με αποτέλεσμα τον αποχωρισμό των αδελφών χρωματίδων. Πειράματα RNAi για τη Sgo1 επίσης οδηγούν στον αποχωρισμό των αδελφών χρωματίδων, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι τόσο η Haspin όσο και η Sgo1 είναι απαραίτητες για τη διατήρηση της σύνδεσης των αδελφών χρωματίδων στην περιοχή του κεντρομεριδίου. Επιπλέον, RNAi πειράματα για την Aurora B οδηγούν σε απεντοπισμό της Sgo1 από το κεντρομερίδιο και η Sgo1 εντοπίζεται πλέον κατά μήκος του χρωμοσώματος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη «χαλάρωση» της σύνδεσης στην περιοχή του κεντρομεριδίου. Πειράματα διπλής αποσιώπησης με RNAi επιβεβαιώνουν η πιο ισχυρή σύνδεση μετά από αποσιώπηση της Aurora B με RNAi οφείλεται στην Sgo1 και όχι στη Haspin. (Dai et al., 2006)

Τα πειράματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η Haspin είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της συνοχής των αδελφών χρωματίδων στην αρχή της μίτωσης, πιθανόν εμποδίζοντας τη δράση του «μονοπατιού της πρόφασης» στα κεντρομερίδια. Πάντως μέχρι σήμερα δεν είναι σαφές πώς η Haspin «συνεργάζεται» με τη Shougoishin και άλλους παράγοντες που ρυθμίζουν τη συνοχή των αδελφών χρωματίδων.

1.2.2.1.B Φωσφορυλίωση της θρεονίνης 3 της ιστόνης H3 (T3H3)

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η ιστόνη H3 φωσφορυλιώνεται έντονα στη μίτωση σε διάφορα κατάλοιπα της αμινοτελικής ουράς, συμπεριλαμβανομένων της θρεονίνης 3 (Polioudaki et al. 2004, Dai *et al.* 2005), της σερίνης 10, της θρεονίνης 11 και της σερίνης 28 (Dai and Higgins 2006). Με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης φάνηκε ότι η H3 φωσφορυλιώνεται από τη Haspin και συνδέεται με αυτή. Επιπλέον, η ανθρώπινη Haspin φωσφορυλιώνει τη θρεονίνη 3 της H3 *in vitro* (Εικ. 2.10). Τέλος, απαλοιφή της Haspin, στον άνθρωπο ή στον ποντικό, μέσω RNAi εμποδίζει τη φωσφορυλίωση της θρεονίνης 3 στη μίτωση, ενώ η υπερέκφραση της Haspin προκαλεί τη μη φυσιολογική φωσφορυλίωση της θρεονίνης 3 στη μεσόφαση και αύξηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης της θρεονίνης 3 στη μίτωση. Τα αποτελέσματα αυτά συνηγορούν στο γεγονός ότι η Haspin είναι η κύρια κινάση που φωσφορυλιώνει τη θρεονίνη 3 στη μίτωση (Dai et al. 2005).

Η φωσφορυλίωση της θρεονίνης 3 της H3 εμφανίζεται σε εστίες στους βραχίονες των χρωμοσωμάτων στην αρχή της πρόφασης. Στην προμετάφαση, η φωσφορυλίωση της T3 είναι πιο έντονη στην εσωτερική περιοχή των κεντρομεριδίων (Polioudaki et al., 2004, Dai et al. 2005, Markaki et al. 2009) και η κατανομή της επικαλύπτεται (χωρίς να ταυτίζεται πλήρως) με αυτήν της κεντρομεριδιακής cohesin. Σύμφωνα λοιπόν με τα αποτελέσματα αυτά υπάρχει η πιθανότητα η Haspin να ρυθμίζει τη διατήρηση της σύνδεσης των αδερφών χρωματίδων μέσω αυτής της ιστονικής τροποποίησης (Dai et al. 2006). Πειράματα με απομονωμένες πρωτεΐνες παρέχουν ενδείξεις ότι όταν η θρεονίνη 3 φωσφορυλιώνεται, τότε παύει να αναστέλλεται η δράση της Aurora B κινάσης από ένα πεπτίδιο H3. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι είναι πιθανόν η φωσφορυλίωση της θρεονίνης 3 να διευκολύνει την ενεργοποίηση της Aurora B στα κεντρομερίδια κατά την προμετάφαση (Rosasco-Nitcher et al. 2008). Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η φωσφορυλίωση της T3 αναγνωρίζεται από το BIR domain της Survivin, διαδραματίζοντας έτσι σημαντικό ρόλο στη συγκέντρωση του CPC (chromosomal passenger complex) στα κεντρομερίδια κατά τη μίτωση (Kelly et al., 2010, Wang et al., 2010).



Εικ. 2.10 Χώρο-χρονικό πρότυπο κατανομής της φωσφορυλιωμένης θρεονίνης 3 της H3 στις διάφορες φάσεις της μίτωσης. Η pT3H3 φαίνεται με κίτρινο, ενώ το DNA με κόκκινο. (Markaki et al., 2009)

1.2.2.1.Γ Άλλες πιθανές λειτουργίες της Haspin

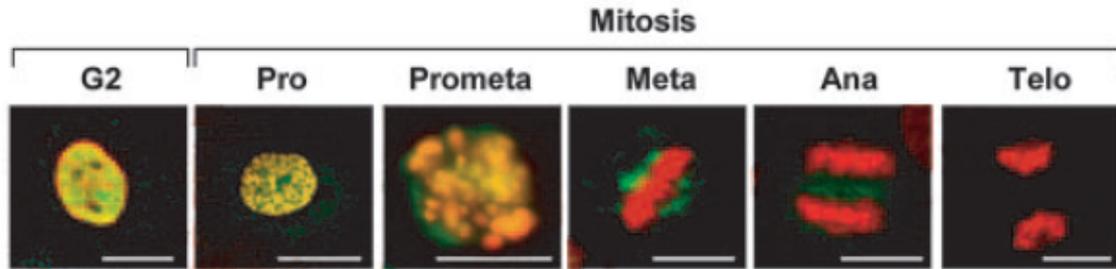
Ο εντοπισμός της Haspin, τουλάχιστον όταν αυτή υπερεκφράζεται, στους πόλους της μιτωτικής ατράκτου πιθανόν να παίζει ρόλο στη στόχευση άλλων συστατικών της ατράκτου, μεταξύ αυτών και της H3. Επίσης, υπερέκφραση της EGFP-Haspin σε ποντίκια ή μιας μεταλλαγμένης μορφή της πρωτεΐνης Haspin που δεν έχει όμως ενεργότητα κινάσης (HEK293) σε κύτταρα, οδηγούν σε συσσώρευση κυττάρων με 2N(G1) περιεχόμενο DNA (Tanaka et al. 1999). Η εξήγηση αυτού του αποτελέσματος δεν είναι γνωστή, αλλά πιθανόν να σχετίζεται με κάποια λειτουργία της Haspin εκτός μίτωσης.

1.2.3 Η κινάση Vaccinia-Related Kinase 1 (VRK 1)

Οι VRK ανήκουν σε μια νέα οικογένεια πρωτεϊνών σερίνης-θρεονίνης, η οποία έχει χωρίς διαφοροποιηθεί στην εξέλιξη από τον κλάδο που οδήγησε στις κινάσες της καζεΐνης (Manning et al., 2002). Η καταλυτική περιοχή των κινασών αυτών εμφανίζει ομολογία με ένα γονίδιο στο *Caenorhabditis elegans* που οδηγεί σε θάνατο του εμβρύου και με ένα γονίδιο του μύκητα *Schizosaccharomyces pombe* που εμπλέκεται

στην επιδιόρθωση του DNA (Dhillon et al., 1994). Η οικογένεια των VRK αποτελείται από τρία μέλη, τα οποία ταυτοποιήθηκαν λόγω της ομολογίας τους με την κινάση B1R του ιού Vaccinia (Nezu et al., 1997), ενός ενζύμου απαραίτητου για την αντιγραφή του ιικού DNA. Το cDNA των ανθρώπινων VRK1, VRK2 και VRK3 κωδικοποιεί πρωτεΐνες μεγέθους 397, 508 και 475 αμινοξέων, αντίστοιχα (Nichols and Traktman, 2004). Το γονίδιο της ανθρώπινης VRK1 βρίσκεται στην περιοχή 14q23, της VRK2 στην 2p15-16 και της VRK3 στην 19q13 χρωμοσωμική περιοχή (Nezu et al., 1997, Nichols and Traktman, 2004).

Η VRK 1 είναι το ομόλογο της κινάσης της *Drosophila* NHK1 (Nucleosomal histone kinase 1) στα θηλαστικά (Aihara et al., 2004). Οι ομοιότητες ($\approx 40\%$) στην αλληλουχία των VRK1 και NHK1 εντοπίζονται κυρίως στην καταλυτική περιοχή, ενώ το καρβοξυτελικό άκρο περιέχει ένα χαρακτηριστικό μοτίβο βάσης-οξέος-βάσης (Aihara et al., 2004). Η κινάση αυτή εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε εμβρυικούς ιστούς, στους όρχεις ενηλίκων και το θύμο αδέν, όπως επίσης και σε καρκινικά κύτταρα, με πιθανό λειτουργικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την ογκογένεση (Nezu et al., 1997). Η VRK1 συμμετέχει στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου μέσω της φωσφορυλίωσης του παράγοντα BAF (barrier-to-autointegration factor), ενός παράγοντα που παίζει δομικό ρόλο στη δομή της χρωματίνης και του πυρηνικού φακέλου, παρουσιάζει αλλαγές στον κυτταρικό εντοπισμό του κατά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (Nichols et al., 2006) και ενεργοποιεί πρωτεΐνες όπως το ρετινοβλάστωμα, η CDK 2 και η Survivin (Santos et al., 2006). Ο Tae-Hong Kang και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η VRK1 συνδέεται με τη χρωματίνη και τόσο η έκφρασή της όσο και ο κυτταρικός εντοπισμός της εξαρτώνται από τον κυτταρικό κύκλο (Εικ. 2.11). Η VRK1 στις μελέτες αυτές φαίνεται να φωσφορυλιώνει τη θρεονίνη 3 και τη σερίνη 10 σε αποσυνδεδεμένες ιστόνες καθώς και σε νουκλεοσώματα (Kang et al., 2007), δράση αμφιλεγόμενη (Higgins 2009), αφού η αποσιώπηση της Haspin με RNAi φαίνεται να εξαλείφει σχεδόν ολοκληρωτικά τη φωσφορυλίωση στην T3 στη μίτωση, όπως επίσης συμβαίνει και με την Aurora B και τη φωσφορυλίωση στην S10. Υπερέκφραση της ενεργής μορφής της VRK1 οδηγεί σε υπερσυμπύκνωση της χρωματίνης.



Εικ. 2.11 Χώρο-χρονικό πρότυπο κατανομής της κινάσης VRK1 στον κυτταρικό κύκλο. Η VRK1 απεικονίζεται με πράσινο και το DNA με κόκκινο. (Kang et al., 2007)

Πλήθος στοιχείων οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η VRK1 συμμετέχει στην κυτταρική διαίρεση. Επιπλέον, η VRK1 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα υπό συνθήκες κυτταρικής αύξησης, τόσο σε κυτταρικές σειρές (Nezu et al., 1997) όσο και κατά την εμβρυική ανάπτυξη κατά την έκπτυξη του αιμοποιητικού συστήματος (Vega et al., 2003). Στον άνθρωπο η VRK1 συνεντοπίζεται με διάφορους δείκτες της κυτταρικής αύξησης (Santos et al., 2006). Απώλεια της VRK1 με siRNA μειώνει τους ρυθμούς της κυτταρικής διαίρεσης (Vega et al., 2004), ενώ στο *C.elegans* η απενεργοποίηση του ομόλογου γονιδίου έχει ως αποτέλεσμα το θάνατο του εμβρύου και την αναστολή της ανάπτυξης στον ενήλικα οργανισμό (Kamath et al., 2003). Η VRK1 στον άνθρωπο φωσφορυλιώνει την p53 στη θρεονίνη 18 (Lopez-Borges, Lazo et al., 2000) και αυξάνει τόσο τη σταθεροποίηση όσο και την ακετυλίωση της πρωτεΐνης (Vega et al., 2004, Barcia et al., 2002).

1.3 Η ετεροχρωματινική πρωτεΐνη 1 (HP1)

1.3.1 Δομή και κυτταρική κατανομή

Η ετεροχρωματινική πρωτεΐνη 1 (HP1) αναφέρθηκε πρώτη φορά στη *Drosophila* από τους James και Elgin το 1986, οι οποίοι πρότειναν ότι η πρωτεΐνη αυτή διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της χρωματίνης μέσω της περιοχής του χρωμοτομέα (chromodomain- *chromatin modifier domain*). Η HP1 εμπλέκεται στο «φαινόμενο επίδρασης θέσης» (position-effect variegation -*PEV*), δηλαδή την εκλεκτική απενεργοποίηση ενός γονιδίου, όταν αυτό βρίσκεται φυσιολογικά εντός μιας ευχρωματινικής περιοχής και μεταφέρεται από αυτήν σε μια ετεροχρωματινική

περιοχή (ανασκόπηση Grigliatti 1991, Karpen 1994). Το εύρος αυτής απενεργοποίησης ποικίλει από κύτταρο σε κύτταρο με αποτέλεσμα να εμφανίζονται διαφορετικά πρότυπα έκφρασης του γονιδίου στον ίδιο ιστό (μωσαϊκό).

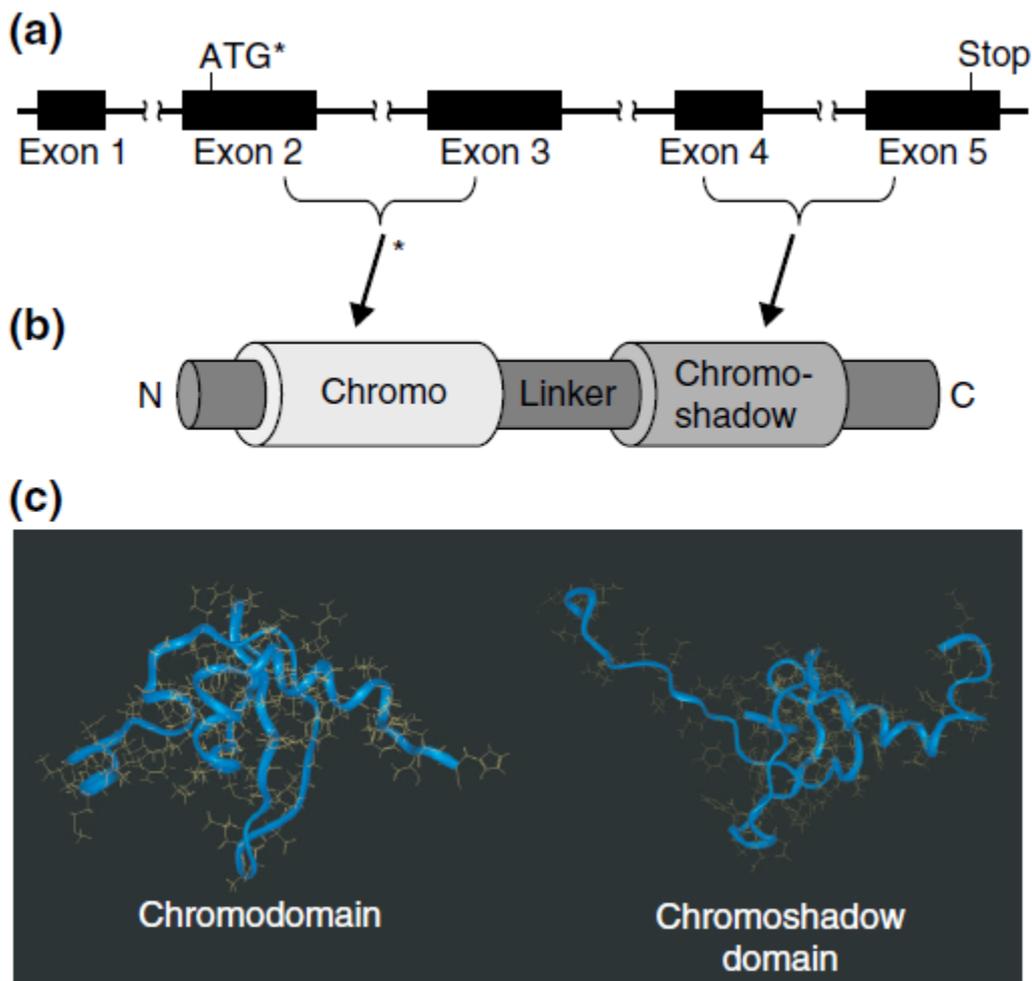
Οι HP1 πρωτεΐνες έχουν χαρακτηριστική δομή και αποτελούνται από τρεις δομικές περιοχές – τομείς (domains): τον χρωμοτομέα (CD) στο αμινοτελικό τμήμα της πρωτεΐνης και τον σκιδώδη χρωμοτομέα (CSD) στο καρβοξυτελικό τμήμα. Οι δύο αυτοί τομείς συνδέονται από μια ευέλικτη περιοχή (hinge ή linker). Εξαιτίας αυτής της σχεδόν συμμετρικής δομής, θεωρείται ότι οι HP1 πρωτεΐνες έχουν προκύψει από διπλασιασμό ενός προγονικού γονιδίου που κωδικοποιούσε το CD (Brasher et al., 2000; Cowieson et al., 2000, Dialynas et al., 2007) (ανασκόπηση Singh and Georgatos, 2002).

Ο χρωμοτομέας της HP1 έχει αρκετά συντηρημένη δομή, η οποία έχει αναλυθεί με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και με κρυσταλλογραφία (Ball et al., 1997). Πρόκειται για σημαγή δομή διαμέτρου 30Å που αποτελείται από τρεις αντιπαράλληλους β-κλώνους που σχηματίζουν μια β-πτυχωτή επιφάνεια η οποία τοποθετείται έναντι μιας α-έλικας ($\alpha 2$) (Ball LJ et al., 1997, Singh and Georgatos, 2002). Η πλευρά της β-πτυχωτής επιφάνειας που βρίσκεται έναντι της α-έλικας (η εσωτερική πλευρά της β-πτυχής) αποτελείται από συντηρημένα μη πολικά αμινοξέα και έχει σχήμα αύλακας. Ο χρωμοτομέας της HP1 έχει παρόμοια δομή με τις πρωτεΐνες των αρχαιοβακτηρίων Sac7d, Sso7d, οι οποίες, με τη σειρά τους, εμφανίζουν ομοιότητα με τις ιστόνες. Το επιφανειακό φορτίο της β-πτυχής του χρωμοτομέα της HP1 είναι αρνητικό, γεγονός που υποδηλώνει ότι μέσω του χρωμοτομέα διαμεσολαβούνται πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις ηλεκτροστατικής φύσης.

Ο σκιδώδης χρωμοτομέας βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο. Είναι μια αρκετά συντηρημένη δομή που, όπως ο χρωμοτομέας, αποτελείται από τρεις αντιπαράλληλους β-κλώνους τοποθετημένους έναντι δύο α-ελίκων ($\alpha 1$ και $\alpha 2$) (Cowieson et al., 2002). Η περιοχή της υδροφοβής αύλακας στην περίπτωση του σκιδώδη χρωμοτομέα δεν είναι προσβάσιμη λόγω της παρεμπόδισης από την παρουσία γειτονικών αμινοξέων (Singh and Georgatos, 2002). Ο σκιδώδης χρωμοτομέας διμερίζεται υπό *in vivo* και *in vitro* συνθήκες, ενώ ο χρωμοτομέας δεν ολιγομερίζεται (Brasher et al., 2000). Στο διμερισμό του σκιδώδη χρωμοτομέα συμμετέχουν οι $\alpha 2$

έλικες δυο διαφορετικών μορίων HP1 σχηματίζοντας γωνία 35° μεταξύ τους (Cowieson et al., 2002). Στην περιοχή του διμερισμού βρίσκονται συντηρημένα αμινοξέα τα οποία απαντώνται μόνο στον σκιάδη χρωμοτομέα και σχηματίζουν μια μη πολική αύλακα (στο διμερές των CSD), με την οποία μπορούν να αλληλεπιδράσουν πρωτεΐνες που περιέχουν το πενταπεπτίδιο PxVxL (Cowieson et al., 2002).

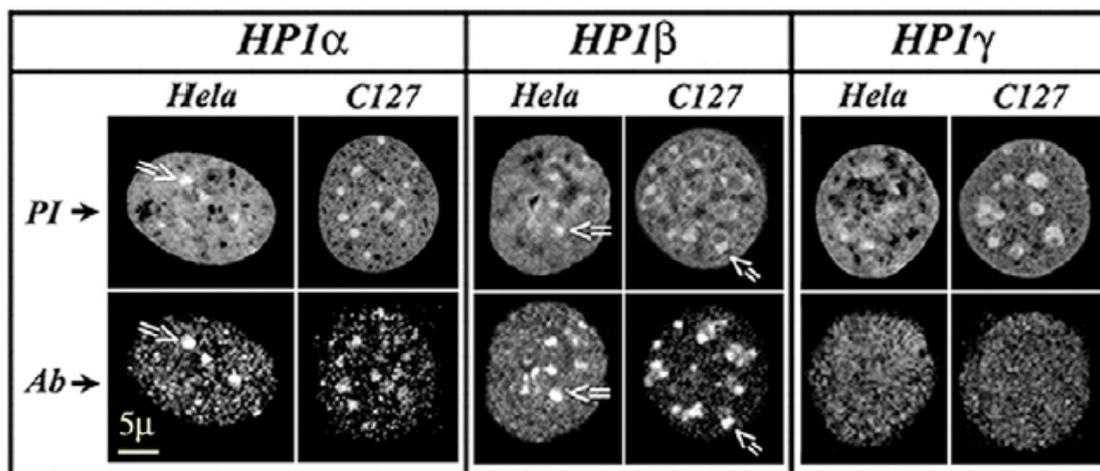
Η συνδετική περιοχή βρίσκεται μεταξύ χρωμοτομέα και σκιάδη χρωμοτομέα, είναι λιγότερο συντηρημένη ως δομή, βρίσκεται στην επιφάνεια του μορίου και είναι αρκετά εύκαμπτη (Jones et al., 2000), με αποτέλεσμα να μην έχει ταυτοποιηθεί η τρισδιάστατη δομή της. Η συνδετική περιοχή υπόκειται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (ιδιαίτερα σε φωσφορυλίωση) (Badugu et al., 2005, Lomberk et al., 2006, Zhao et al., 2001), οι οποίες επηρεάζουν την υποκυτταρική εντόπιση, τις αλληλεπιδράσεις και τη λειτουργία του μορίου.



Εικ. 3.1 Η δομή των HP1 πρωτεϊνών και των γονιδίων που τις κωδικοποιούν (προηγούμενη σελίδα). **(a)** Η εξελικτικά διατηρημένη δομή των γονιδίων που κωδικοποιούν τις HP1 πρωτεΐνες από τη Δροσόφιλα μέχρι τον άνθρωπο. Κάθε γονίδιο αποτελείται από μέχρι και πέντε εξόνια μεταξύ των οποίων παρεμβάλλονται τέσσερα ιντρόνια. Τα κωδικόνια έναρξης (ATG) και λήξης επισημαίνονται στο σχήμα. Τα εξόνια που κωδικοποιούν τον χρωμοτομέα και τον σκιώδη χρωμοτομέα επισημαίνονται με αγκύλες και βέλη. Ο αστερίσκος επισημαίνει τα σημεία στα οποία διαφέρει η Cdx3 (ποντικός) (που κωδικοποιεί την HP1γ) : το κωδικόνιο έναρξης εντοπίζεται στο εξόνιο 2 και ο χρωμοτομέας κωδικοποιείται από τα εξόνια 3 και 4 του γονιδίου. **(b)** Η διατηρημένη γραμμική δομή των HP1 πρωτεϊνών. Όπου N το αμινοτελικό άκρο και C το καρβοξυτελικό **(c)** Η τριδιάστατη δομή του χρωμοτομέα και του σκιώδη χρωμοτομέα της HP1β ποντικού. (Lomberk et al, 2006)

Μέλη της οικογένειας της HP1 έχουν ταυτοποιηθεί σχεδόν σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, από το σχιζομούκητα (*S. pombe*), ως τον άνθρωπο (από μια ως πέντε ισομορφές), αλλά δεν υπάρχουν στον σακχαρομούκητα (*S. cerevisiae*) (όπου το PEV διαμεσολαβείται από τις κατασταλτικές πρωτεΐνες SIR (silent information regulatory) (Moazed 2001). Στα θηλαστικά υπάρχουν τρεις διαφορετικές HP1 πρωτεΐνες, οι α, β και γ, που κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια (HP1α-*CBX5*, HP1β-*CBX1*, HP1γ-*CBX3* στον άνθρωπο) (Norwood et al., 2004), τα οποία βρίσκονται σε διαφορετικές χρωμοσωμικές θέσεις (12q13.13, 17q21.3sss2, 7p15.2 στον άνθρωπο και 15qF3, 11qD, 6qB3 στο ποντίκι) (Waterston et al., 2002) και εμφανίζουν 65% ομολογία μεταξύ τους (Vermaak et al., 2005).

Οι HP1 πρωτεΐνες έχουν την τάση να όμο- ή έτερο- διμερίζονται, να συνδέονται με τη χρωματίνη μέσω της ιστόνης H3 (στην τριμεθυλιωμένη λυσίνη 3 ή στην ατροποποίητη ιστόνη) και να λειτουργούν είτε ως ενεργοποιητές είτε ως αναστολείς της έκφρασης γονιδίων (de Wit et al., 2007) (ανασκόπηση Eissenberg and Elgin, 2000, Hediger and Gasser, 2006). Παρά τις δομικές και βιοχημικές ομοιότητες, οι ισομορφές της HP1 παρουσιάζουν διαφορετική κατανομή στο κύτταρο και δεν φαίνεται να έχουν τις ίδιες λειτουργίες (Filesi et al., 2002, Schott et al., 2006, Cammas et al., 2007). Σε κύτταρα στην καλλιέργεια, οι HP1α και η HP1β εμφανίζονται κυρίως σε εστίες στην συστατική ετεροχρωματίνη (constitutive heterochromatin), ενώ η HP1γ φαίνεται να έχει πιο διάχυτη κατανομή στον πυρήνα και εντοπίζεται σε ετεροχρωματινικές και ευχρωματινικές περιοχές (Bartova et al., 2007, Horsley et al., 1996, Minc et al., 1999, Nielsen et al., 1999, Schott et al., 2006, Smothers and Henikoff, 2001). Μέχρι σήμερα οι παράγοντες που καθορίζουν την τοπολογία και το λειτουργικό ρόλο των ισομορφών αυτών παραμένουν άγνωστοι.



Εικ. 3.2 Κατανομή των ενδογενών HP1 πρωτεϊνών σε κυτταρικές σειρές ανθρώπου και ποντικού. Χρώση κυττάρων HeLa και C127 με αντισώματα (Ab) για τις HP1 α , HP1 β και HP1 γ και χρώση του DNA με ιωδιούχο προπίδιο (PI). Τα βέλη υποδηλώνουν μεγάλες ετεροχρωματινικές εστίες. (Dialynas et al, 2007)

1.3.2 Λειτουργία και αλληλεπιδράσεις

Έχει δειχθεί πειραματικά ότι ο κυτταρικός εντοπισμός των διάφορων ισομορφών της HP1 ρυθμίζεται από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η ακετυλίωση, η φωσφορυλίωση, η μεθυλίωση, η ουβικουιτυνιλίωση και η συμοϋλίωση, με τρόπο παρόμοιο με αυτό των ιστονών (Lomberk et al., 2006). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η τροποποίηση ενός συγκεκριμένου καταλοίπου, της σερίνης 83 της HP1 γ , καθορίζει τον υποπληθυσμό αυτό της HP1 γ που είναι αποκλειστικά ευχρωματινικός (Lomberk et al., 2006). Μπορεί λοιπόν να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι ο πυρηνικός εντοπισμός των HP1 πρωτεϊνών καθορίζεται όχι μόνο από τις αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες, αλλά και από το συνδυασμό των αλληλεπιδράσεων αυτών με συγκεκριμένες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (Lomberk et al., 2006). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι για τον εντοπισμό της HP1 β στην περιοχή των κεντρομεριδίων κατά τη μεσόφαση υπεύθυνη είναι η αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης που περιλαμβάνει το CD, ενώ για την κατανομή της HP1 α στο κεντρομερίδιο των μιτωτικών χρωμοσωμάτων είναι υπεύθυνο το καρβοξυτελικό της τμήμα που περιλαμβάνει το CSD και ένα τμήμα της hinge περιοχής. Φαίνεται λοιπόν ότι ο εντοπισμός των HP1 α και HP1 β στην περιοχή του κεντρομεριδίου κατά τις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου σχετίζεται με διαφορετικές περιοχές των πρωτεϊνών αυτών (Hayakawa et al., 2003). Τέλος, παρατηρήσεις στην κατανομή της HP1 β σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, ποικίλες συνθήκες στο μικροπεριβάλλον της πρωτεΐνης, αλλά και παρατηρήσεις σε βλαστικά κύτταρα, έδειξαν ότι υπάρχουν

διάφοροι υποπληθυσμοί της HP1β όσον αφορά την κινητική της στον πυρήνα (Dialynas et al., 2007, Ritou et al., 2007).

Το επαναλαμβανόμενο DNA των τελομεριδίων και των κεντρομεριδίων είναι πλούσιο σε HP1 (James TC et al., 1989). Έχει δειχθεί με πειράματα συγκατακρήμνισης (pull-down) ότι στον *S. pombe* η Swi6 (ομόλογη της HP1) αλληλεπιδρά μέσω του χρωμοτομέα με πρωτεΐνες του κεντρομεριδίου, όπως είναι η Psc3, η οποία διαμεσολαβεί στη σύνδεση των κεντρομεριδιακών περιοχών των αδελφών χρωματίδων (Bernard et al., 2001, Nonaka et al., 2002). Σε στελέχη *S. pombe* που είναι μεταλλαγμένα για την Swi6, παρατηρείται μειωμένη σύνδεση της Psc3 στα κεντρομερίδια (Ekwall et al., 1996), ενώ κατά τη μίτωση δεν γίνεται σωστά ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων (Ekwall et al., 1995). Το ίδιο επαληθεύεται και στη *Drosophila* (Kellum et al., 1995). Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στη *Drosophila* έχει δειχθεί ότι η HP1 συνδέεται στα τελομερίδια με δυο τρόπους: μέσω των ιστονών (κατά τη γονιδιακή αποσιώπηση) και ανεξαρτητα από τις ιστόνες (πιθανόν μέσω του DNA, κατά την διατήρηση της ακεραιότητας των τελομερών) (Perrini et al., 2004). Δεν έχει αποδειχθεί όμως ότι αυτός ο διπλός ρόλος της HP1 ισχύει και σε άλλους οργανισμούς. Εκτός από τις εσωτερικές χρωματινικές εστίες, οι HP1 πρωτεΐνες εντοπίζονται επίσης στην περιφέρεια του πυρήνα, κάτι που πιθανόν να σχετίζεται με την αλληλεπίδρασή τους με τον υποδοχέα της λαμίνης Β (LBR) και/ή τον περιφερικό εντοπισμό ενός μέρους της κεντρομεριδιακής ετεροχρωματινής (Ye et al., 1997, Kourmouli et al., 2001). Στην περίπτωση της αλληλεπίδρασης HP1-LBR η σύνδεση δεν φαίνεται να είναι άμεση, αλλά πιθανώς διαμεσολαβείται από τις νουκλεοσωματικές ιστόνες H3 και H4 (Polioudaki et al., 2001).

Οι HP1α και HP1β (σε ποντίκι και άνθρωπο) αλληλεπιδρούν μέσω CSD με τον παράγοντα p150, που διαθέτει το πεπτιδίο PxVxL (Brasher et al., 2000, Lechner et al., 2000, Murzina et al., 1999) και είναι μέρος του συμπλόκου CAF (εναποθέτει τα σύμπλοκα των H3-H4 στη χρωματίνη). Μεταλλάξεις στην HP1 που εμποδίζουν τη σύνδεσή της με τον CAF p150 δεν επηρεάζουν την αντιγραφή κατά την S-φάση, ενώ σε μια πρόσφατη μελέτη έχει δειχθεί ότι η HP1α αλληλεπιδρά με τον CAF και συνδέεται στις εστίες περικεντρομεριδιακής χρωματινής κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA, ανεξάρτητα από τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών.

Examples of HP-1 interacting partners		
Protein	Hp-1 variant	Domain
Transcriptional regulators or chromatin-modifying proteins		
Histone H1	HP1	ND
Histone H3	HP1, HP1 ^{Mmα} , HP1 ^{Mmβ} , HP1 ^{Mmγ}	CD
Methyl K9 Histone H3	Swi6, HP1, HP1 ^α , HP1 ^β , HP1 ^γ	CD
Histone H4	HP1, HP1 ^{Mmα}	CSD
SUV39H1	HP1, HP1 ^α , HP1 ^β , HP1 ^γ	CSD
Polycomb	HP1 ^{Hcα} , HP1 ^{Hcγ}	CSD
Dnmt3a	HP1 ^{Mmα}	ND
Dnmt3b	HP1 ^α , HP1 ^β	ND
Kap-1/Tif1β	HP1 ^α , HP1 ^β , HP1 ^γ	CSD
Rb	HP1 ^{Hcγ}	ND
MITR	HP1 ^{Mmα}	Linker
BRG1	HP1 ^{Mmα}	CSD
ATRx	HP1 ^{Mmα} , HP1 ^{Mmβ}	CSD
TAF _{II} 130	HP1 ^{Hcα} , HP1 ^{Hcγ}	CSD
PIMI	HP1 ^{Hcγ}	CSD
RNA	HP1 ^{Mmα} , HP1 ^{Mmγ}	Linker
DNA replication and repair proteins		
CAF-1p150	HP1 ^α , HP1 ^β	CSD
Ku70	HP1 ^{Hcα} , phosphoS83- HP1 ^{Hcγ}	CSD, Linker
ORC1-6	HP1	CD, CSD
Other chromosome-associated proteins		
Psc3	Swi6	CD
INCENP	HP1 ^{Hcα} , HP1 ^{Hcγ}	Linker
Hsk1/CDC7	Swi6	ND
Ki-67	HP1 ^{Mmα} , HP1 ^{Mmβ} , HP1 ^{Mmγ}	CSD
SPI00	HP1 ^{Hcα} , HP1 ^{Hcβ} , HP1 ^{Hcγ}	CSD
Nuclear structure proteins		
Nuclear envelope	HP1 ^{Mmα} , HP1 ^{Mmβ} , HP1 ^{Mmγ}	CD
Lamin B receptor	HP1 ^{Hcα} , HP1 ^{Hcβ} , HP1 ^{Hcγ}	CSD
Lamin B	HP1 ^{Mmβ}	CD
LAP2β	HP1 ^{Mmβ}	CD

Παράδειγματα πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την HP1.

Οι πρωτεΐνες HP1, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, εντοπίζονται κυρίως σε ετεροχρωματικές εστίες, όπου πιθανότατα καταστέλλουν τη γονιδιακή έκφραση, είναι όμως πιθανό να δρουν σε κάποιες περιπτώσεις ενεργοποιητικά. Η HP1 συνδέεται μέσω του χρωμοτομέα με την ιστόνη H3 (μια αλληλεπίδραση που θα συζητηθεί αναλυτικά πιο κάτω) και στρατολογείται στη χρωματίνη.

Το λειτουργικό πλαίσιο μέσα στο οποίο δρα η HP1 ποικίλλει. Για παράδειγμα, σε κάποιες περιπτώσεις γονίδια που βρίσκονται σε ετεροχρωματικές περιοχές δεν είναι κατεσταλμένα, αλλά εκφράζονται κανονικά. Για παράδειγμα, τα γονίδια *light* και *rolled* στη *Drosophila* εκφράζονται κανονικά στις περικεντρομεριδιακές περιοχές

παρουσία της HP1, ενώ όταν μεταφερθούν σε ευχρωματινικό περιβάλλον εμφανίζουν μωσαϊκό πρότυπο έκφρασης. Επιπροσθέτως, όταν τα δυο γονίδια βρίσκονται σε ετεροχρωματινική περιοχή, αλλά η HP1 απουσιάζει, αναστέλλεται η έκφρασή τους (Clegg et al., 1998, Hearn et al., 1991, Lu et al., 2000). Δεν έχει διευκρινιστεί αν η ενεργοποιητική δράση της HP1 είναι άμεση ή αν απαιτείται συγκεκριμένη χρωματινική οργάνωση, η οποία επιτυγχάνεται μέσω της παρουσίας της.

Σε άλλες περιπτώσεις, η HP1 συμμετέχει στη γονιδιακή αποσιώπηση, κυρίως σε ετεροχρωματινικές περιοχές, αλλά έχει παρόμοια δράση και στις ευχρωματινικές περιοχές. Έχειδειχθεί ότι η HP1 στρατολογείται στον υποκινητή του γονιδίου της κυκλίνης E και καταστέλλει την έκφρασή του αλληλεπιδρώντας με την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (Rb) και τη μεθυλοτρανσφεράση Suv39H1 (μεθυλιώνει ειδικά την me₃K9H3). Επιπλέον, σε κύτταρα που βρίσκονται στη G₀ έχειδειχθεί ότι η HP1γ συνδέεται με το σύμπλοκο E2F-6, αλλά και με μεθυλοτρανσφεράσες που μεθυλιώνουν ειδικά τη λυσίνη 9 της H3, με αποτέλεσμα την μεταγραφική απενεργοποίηση.

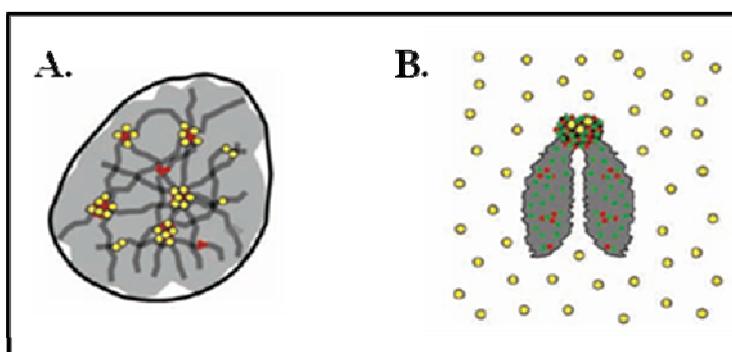
Τέλος, σε ορισμένα συστήματα, η παρουσία της HP1 σε ευχρωματινικές περιοχές σε κάποιες περιπτώσεις φαίνεται να έχει καθαρά ενεργοποιητικό ρόλο. Αναλυτική χαρτογράφηση της κατανομής της HP1 στα πολυταινικά χρωμοσώματα στη *Drosophila* έδειξε ότι μετά από θερμικό σοκ και την επαγωγή των αντίστοιχων γονιδίων η HP1 εντοπίζεται στα σημεία που γίνεται μεταγραφή (Piacentini et al., 2003). Μια άλλη μελέτη με χρήση μικροσυστοιχιών σε γενωμική περιοχή 500Kb στη *Drosophila*, έχειδείξει ότι επηρεάζεται η έκφραση δέκα γονιδίων όταν η HP1 μεταλλαχθεί. Η έκφραση των τριών από τα δέκα γονίδια ελαττώνεται, γεγονός που υποδηλώνει ότι η HP1 εμπλέκεται στην μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων που βρίσκονται σε ευχρωματινικές περιοχές (Cryderman et al., 2005).

Συμπερασματικά λοιπόν, οι πρωτεΐνες HP1 δε μπορούν να οριστούν πλέον ως «οργανικά» συστατικά της ετεροχρωματινής, όπως υποδηλώνει η ονομασία τους.

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

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι τρεις ισομορφές της HP1 προσδένονται στο αμινοτελικό τμήμα της H3 αναγνωρίζοντας την τριμεθυλιωμένη λυσίνη 9 (me₃K9H3) μέσω του CD (Lachner et al., 2001, Banniser et al., 2001, Dialynas et al., 2006). Αυτή η αλληλεπίδραση είναι σημαντική για τη στρατολόγηση των HP1 πρωτεϊνών στις ετεροχρωματινικές περιοχές του γενώματος (Platero et al., 1995, Fischle et al., 2003, Thiru et al., 2004, Stewart et al., 2005). Για αυτό το λόγο απώλεια της μεθυλοτρανσφεράσης που μεθυλιώνει την K9H3 οδηγεί σε λανθασμένη εντόπιση των HP1 (Lachner et al., 2001). *In vitro*, το CD δεν προσδέεται σταθερά στην me₃ K9H3, πράγμα που συμφωνεί με το γεγονός ότι το κύριο μέρος των HP1 στο κύτταρο δεν είναι σταθερά προσδεδεμένο στη χρωματίνη, αλλά επιδεικνύει έντονη κινητικότητα (Cheutin et al, 2003, Festenstein et al, 2003, Schmiedeberg et al, 2004, Dialynas et al., 2007).

Το πρότυπο κατανομής των HP1 στη μεσόφαση αλλάζει δραματικά με την είσοδο του κυττάρου στη μίτωση. Παρατηρήσεις σε διάφορες κυτταρικές σειρές έδειξαν ότι στη μίτωση απομακρύνεται από τη χρωματίνη σχεδόν το σύνολο των τριών HP1 ισομορφών (Kellum et al, 1995, Furuta et al, 1997, Minc 1999, Murzina et al, 1999, Sugimoro et al, 2001, Hayakawa et al, 2003). Μόνο ένας μικρός πληθυσμός της HP1α παραμένει προσδεδεμένος στην περιοχή του κεντρομεριδίου και πιθανόν εμπλέκεται στη διατήρηση της συνοχής των αδελφών χρωματίδων στο μιτωτικό χρωμόσωμα (Hayakawa et al, 2003, Obuse et al, 2004, Pidoux et al, 2004, Dialynas et al., 2009) (Εικ. 3.2).

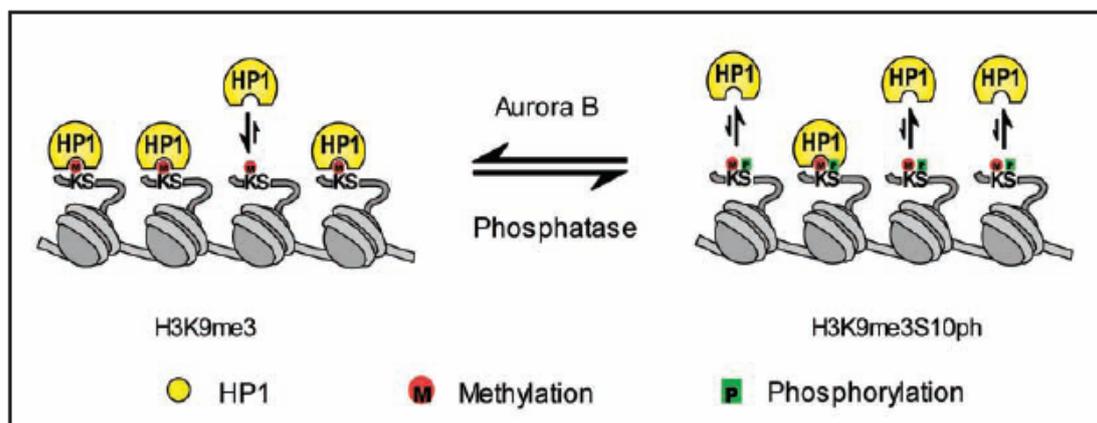


Εικ. 3.2 Σχηματική απεικόνιση της me₃K9H3 (κόκκινο), της pS10H3 (πράσινο) και της HP1 (κίτρινο) σε ένα μεσοφασικό κύτταρο (A) και στο μιτωτικό χρωμόσωμα (B). (Dormann et al, 2006)

Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι, ενώ παρατηρείται αποσύνδεση της HP1 από τη χρωματίνη, το σημείο στο οποίο προσδένεται, δηλαδή η $\text{me}_3\text{K9H3}$, συνεχίζει να υφίσταται κατά τη διάρκεια της μίτωσης (Mateescu et al, 2004, Fischle et al, 2005, McManus et al, 2006). Πρόσφατες μελέτες ασχολήθηκαν με αυτή τη «διακοπή» της αλληλεπίδρασης HP1- $\text{me}_3\text{K9H3}$ (Fischle et al, 2005, Hirota et al, 2005, Terada et al, 2006).

Κατ' αρχάς, παρατηρήθηκε πειραματικά ότι η απομάκρυνση της HP1 από τη χρωματίνη κατά τη μίτωση συμπίπτει χρονικά με την εμφάνιση της φωσφορυλίωσης της σερίνης 10 (pS10H3) (Terada et al, 2006), δηλαδή του γειτονικού καταλοίπου της $\text{me}_3\text{K9H3}$. Δεύτερον, χημικές προσεγγίσεις και αναλύσεις με φασματοσκοπία μάζας έδειξαν ότι τόσο η $\text{me}_3\text{K9H3}$ όσο και η pS10H3 συνυπάρχουν στο ίδιο μόριο της H3 κατά την έναρξη της μίτωσης (Fischle et al, 2005, Hirota et al, 2005). Τρίτον, μέσω μορφολογικών μελετών αποδείχθηκε ότι η ύπαρξη της διπλής τροποποίησης ($\text{me}_3\text{K9/pS10H3}$) αποκλείει την παραμονή της HP1 στη χρωματίνη (Fischle et al, 2005, Hirota et al, 2005). Αυτό εξάλλου υποστηρίζεται και από *in vitro* μελέτες, οι οποίες δείχνουν ότι η αλληλεπίδραση της HP1 με το διπλά τροποποιημένο πεπτίδιο της ουράς της H3, $\text{me}_3\text{K9pS10-H3}$ πεπτίδιο της H3, είναι σημαντικά ασθενέστερη συγκρινόμενη με αυτή της HP1 με το μη τροποποιημένο πεπτίδιο $\text{me}_3\text{K9-H3}$ (Fischle et al, 2005, Hirota et al, 2005, Terada et al, 2006). Η *in vitro* φωσφορυλίωση της σερίνης 10 της H3 (pS10H3) από την Aurora B διακόπτει την αλληλεπίδραση του CD της HP1 με το πεπτίδιο $\text{me}_3\text{K9-H3}$ (Fischle et al, 2005).

Συνοψίζοντας, όλα τα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν την ερμηνεία ότι η αποδέσμευση της HP1 από τα μιτωτικά χρωμοσώματα επιτυγχάνεται από έναν μηχανισμό «δυικού διακόπτη» μεθυλίωσης – φωσφορυλίωσης (“binary methylation-phosphorylation switch”) (Fischle et al, 2003), όπως περιγράφεται στην εικόνα 3.3.



Εικ. 3.3 Διαγραμματική απεικόνιση της αρχής του δικού “διακόπτη” μεθυλίωσης – φωσφορυλίωσης (binary methylation-phosphorylation switch). Κατά την έναρξη της μίτωσης, η Aurora B φωσφορυλιώνει τη S10H3, το γειτονικό κατάλοιπο αυτού στο οποίο προσδένεται η HP1, του me_3K9H3 . Η επιπλέον αυτή τροποποίηση έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της συγγένειας της HP1 με την ουρά της H3, μετατοπίζοντας έτσι την ισορροπία μεταξύ της προσδεμένης κατάστασης της HP1 και της αδέσμευτης προς την αδέσμευτη. Στην τελόφαση, η απομάκρυνση της φωσφορυλίωσης στη S10 επαναφέρει την πρόσδεση της HP1 στη χρωματίνη. (Dormann et al, 2006)

Παρόλο που έχει αποδειχθεί ο σημαντικός ρόλος της pS10H3 στην αποδέσμευση της HP1 από τη χρωματίνη στη μίτωση, δεν έχει αποδειχθεί αν αυτό το γεγονός επαρκεί. Σε πρόσφατα δημοσιευμένες μελέτες δύο διαφορετικών εργαστηρίων διαπιστώνεται μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης όλων των ισομορφών της HP1 και πιο συγκεκριμένα της περιοχής του CD με δύο διαφορετικά συνθετικά πεπτίδια της H3, ενός που φέρει τη διπλή τροποποίηση $me_3K9pS10$ (Fischle et al, 2005) και ενός me_3K9 H3 πεπτιδίου που έχει φωσφορυλιωθεί στη S10 *in vitro* από την Aurora B (Hirota et al, 2005). Επιπλέον, ο Terada και οι συνεργάτες του χρησιμοποιώντας το σύμπλοκο των chromosomal passenger πρωτεϊνών (CPC- chromosomal passenger complex) δεν παρατήρησαν καμία μείωση της ικανότητας πρόσδεσης της HP1α στο me_3K9 -H3 πεπτίδιο μετά από φωσφορυλίωση της S10 (Terada et al, 2006). Μεγαλύτερη σύγχυση δημιουργούν τα αποτελέσματα μιας άλλης μελέτης όπου παρατηρήθηκε αρκετά ισχυρή αλληλεπίδραση της ολόκληρης HP1α πρωτεΐνης με το $me_3K9pS10$ -H3 πεπτίδιο. Μόνο παρουσία μιας επιπλέον τροποποίησης, της ακετυλίωσης της λυσίνης 14 ($me_3K9pS10acK14$ -H3 πεπτίδιο), χάνεται αυτή η αλληλεπίδραση (Mateescu et al, 2004).

Αυτές οι ασυμφωνίες μπορεί να έχουν προκύψει όχι μόνο από τα ποικίλα διαφορετικά πειραματικά συστήματα, αλλά και από ενδεχόμενα διαφορετική

συμπεριφορά των διάφορων ισομορφών της HP1. Από την άλλη πλευρά, παρόλο που όλο και περισσότερες μελέτες συμβάλλουν στην κατανόηση του ρόλου της pS10H3 στη μίτωση, ο βιολογικός σκοπός της me₃K9H3 δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως.

1.4 Σκοπός της παρούσας μελέτης

Προηγουμένως είχε δειχθεί ότι σε κύτταρα «ακινητοποιημένα» στην G0 φάση η ετεροχρωματινική πρωτεΐνη 1 (HP1) αλληλεπιδρά με μια πρωτεϊνική κινάση, που φωσφορυλιώνει την ιστόνη H3 στη θρεονίνη 3 (T3H3) *in vitro*. Αρχικός στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να εξακριβώσουμε αν η T3H3 αποτελεί μοναδικό στόχο αυτής της HP1-συνδεόμενης κινάσης και να διερευνήσουμε την ύπαρξη ή όχι αυτής της αλληλεπίδρασης σε κύτταρα που «διατρέχουν» τον κυτταρικό κύκλο. Επειδή στην πορεία διαπιστώθηκε ότι η HP1β στη μίτωση αλληλεπιδρά *in vitro* με ένζυμα που φωσφορυλιώνουν όλες τις μορφές και τα μεταλλάγματα της H3, η μελέτη μας προεκτάθηκε στην ταυτοποίηση αυτών των κινασών καθώς και στην διερεύνηση των περιοχών της HP1β που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παραπάνω αλληλεπίδραση.

Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Μέθοδοι καλλιέργειας κυττάρων

2.1.1 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών

Καλλιέργειες κυττάρων HeLa και MEFS αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας 37°C, και ατμόσφαιρας εμπλουτισμένης σε 5% CO₂. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε ήταν DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) που περιείχε 2 mM L-γλουταμίνη, 2 mM πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη και 10% FCS (Fetal Calf Serum).

2.1.2 Συγχρονισμός κυττάρων

Για τον συγχρονισμό κυττάρων HeLa στη μίτωση προστέθηκε στο θρεπτικό μέσο μιας καλλιέργειας (πληρότητα 60-70%) νοκοδαζόλη σε τελική συγκέντρωση 80ng/ml για 18 ώρες.

2.2 Παρασκευαστικές μέθοδοι

2.2.1 Παραγωγή των ανασυνδυασμένων χμαιοικόν πρωτεϊνών HP1β, CD-HP1β, H-HP1β, CSD-HP1β (gst-tagged proteins)

Η παραγωγή και απομόνωση χμαιοικόν πρωτεϊνών σε συνδυασμό με την τραιοφεράση της γλουταθειόνης έγινε σύμφωνα με την μέθοδο των Smith and Johnson, (1988). Πιο αναλυτικά, βακτηριακή καλλιέργεια κυττάρων BL21(DE3), στα οποία έχει εισαχθεί το πλασμίδιο που κωδικοποιούσε την αντίστοιχη GST πρωτεΐνη, αραιώθηκε σε O.D~0.1 και αναπτύχθηκε έως O.D~0.6 στους 37°C. Η επαγωγή της πρωτεΐνης έγινε με την προσθήκη 0.2mM IPTG, στους 37°C για 3 ώρες. Η καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε σωληνάρια και φυγοκεντρήθηκε σε κεφαλή JA-14 (Beckman), 5,000rpm, 10 λεπτά στους 4°C. Το βακτηριακό ίζημα που προέκυψε επαναδιαλύθηκε σε διάλυμα PBS, 10mM μερκαπτοαιθανόλης, 1,3mM PMSF. Ακολούθησε σύντομη έκθεση σε υπερήχους στους 0°C, σε ισχύ 30% της μέγιστης, 3

φορές επί 10 δευτερόλεπτα τη φορά, με επώαση στους 0°C για 1 λεπτό ενδιάμεσα. Κατόπιν, προστέθηκε Triton X-100 σε τελική συγκέντρωση 1% και έγινε φυγοκέντρωση στις 26000 στροφές για 45 λεπτά, 4°C στην κεφαλή SW27 (Beckman). Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και επώαστηκε για 1 ώρα υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C με 500 μl σφαιρίδια γλουταθειόνης-αγαρόζης (Amersham), εξισορροπημένα με το παραπάνω διάλυμα. Μετά την επώαση το μίγμα τοποθετήθηκε σε στήλη χρωματογραφίας. Τα σφαιρίδια εκπλύθηκαν με 20 όγκους του ίδιου διαλύματος. Ακολούθησαν 5εκλούσεις της εκάστοτε πρωτεΐνης με διάλυμα έκλουσης (10mM ανηγμένης (reduced) γλουταθειόνης, 50 mM Tris-HCl pH 8). Η διαδικασία αυτή έγινε διαδοχικά με 0,5ml διαλύματος έκλουσης για 4 λεπτά. Το υλικό συλλέχθηκε και η διαδικασία επαναλήφθηκε. Τα κλάσματα υποβλήθηκαν σε ολονύκτια διαπίδυση στους 4°C, προκειμένου να απομακρυνθούν όλα τα μικρά μόρια. Οι καθαρές πρωτεΐνες, αφού τους προστέθηκε σακχαρόζη σε τελική συγκέντρωση 250mM, διατηρήθηκαν στους -80°C μέχρι τη χρήση τους.

2.2.2 Παραγωγή των ανασυνδυσμένων ιστονών H3 και της ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης Aurora B (his-tagged proteins)

Η παραγωγή της πρωτεΐνης έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Luger et al. (1997). Η βακτηριακή καλλιέργεια 3-4 λίτρων BL21(DE3) αραιώθηκε σε O.D~0.1 και αφέθηκε να αναπτυχθεί έως O.D~0.6 στους 37°C. Η επαγωγή της πρωτεΐνης έγινε με την προσθήκη 0.5mM IPTG, στους 37°C για 3 ώρες. Η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε για 15 λεπτά, στις 5000 στροφές, 4 °C σε φυγόκεντρο Sorvall και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε διάλυμα λύσης (7 M Guanidinium-HCl, 20mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM DTT, 1mM PMSF), και επώαστηκε υπό ανάδευση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια έγινε χρήση υπερήχων σε ισχύ 30% της μέγιστης, 3 φορές επί 10 δευτερόλεπτα τη φορά, με επώαση στους 0°C για 1 λεπτό ενδιάμεσα. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στην κεφαλή SW41Ti (Beckman), 40,000 στροφές, για 30 λεπτά στους 20°C. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε, αραιώθηκε με 5 έως 10 όγκους διαλύματος SAU-O (7M ουρία, 20mM οξικό νάτριο pH 5.2, 5 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 1mM EDTA, 1mM PMSF) και επώαστηκε με 5 ml εξισορροπημένων σφαιριδίων SP [Fast Flow Sepharose (Amersham)] για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Η εξισορρόπηση των σφαιριδίων έγινε ως εξής: Σφαιρίδια

μεταφέρθηκαν σε δοχείο ζέσεως και επαναδιαλύθηκαν σε 100 ml διαλύματος 1 M οξικού νατρίου pH 5.2 με ήπια ανάδευση. Το υπερκείμενο αναρροφήθηκε και ακολούθησε άλλη μία πλύση με το παραπάνω διάλυμα. Στη συνέχεια, η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε δύο φορές με 100 ml διαλύματος 20mM οξικού νατρίου pH 5.2. Στο τέλος, τα σφαιρίδια επώστηκαν ολονύχτια σε 100 ml διαλύματος 7 M ουρίας, 1mM EDTA και 20mM οξικού νατρίου pH 5.2. Μετά την επώαση το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε στις 3,000 στροφές στην κεφαλή JA-14 (Beckman), για 6 λεπτά στους 20°C. Το υπερκείμενο αναρροφήθηκε και τα σφαιρίδια μεταφέρθηκαν σε στήλη χρωματογραφίας όπου και εκπλύθηκαν με 100 ml διαλύματος SAU-O. Η έκλουση πραγματοποιήθηκε με 15 ml SAU-O.400mM NaCl και 15 ml SAU-O.600mM NaCl λαμβάνοντας κλάσματα του 1 ml.

2.2.3 Απομόνωση πυρήνων από ερυθροκύτταρα πτηνών

Για την παρασκευή πυρηνικών φακέλων χρησιμοποιήθηκε φλεβικό αίμα από πτηνά και η διαδικασία έγινε σύμφωνα με το τροποποιημένο πρωτόκολλο των Georgatos and Blobel, (1987). Το αίμα αραιώθηκε 1:3 σε διάλυμα PBS, 2mM EDTA προκειμένου να παρεμποδιστεί η πήξη του. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 1000g για 5 λεπτά στους 4°C σε φυγόκεντρο Sorvall. Το υπερκείμενο υγρό (που αντιστοιχεί στο πλάσμα) απομακρύνθηκε. Το ίζημα των ερυθροκυττάρων επαναδιαλύθηκε σε 10 όγκους διαλύματος PBS και φυγοκεντρήθηκε όπως παραπάνω. Αυτό το βήμα επαναλήφθηκε τρεις φορές, προκειμένου να εκπλυθούν επαρκώς τα ερυθροκύτταρα πριν τη λύση τους. Ακολούθησε επαναδιάλυση των κυττάρων σε 10 όγκους ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (5 mM NaPO₄ pH 7.4, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1.3 mM PMSF) και επώαση για 10 λεπτά στον πάγο υπό συνεχή ανάδευση. Τα λυμένα ερυθροκύτταρα φυγοκεντρήθηκαν για 1.5 λεπτό, στους 4°C, στις 10000 στροφές σε κεφαλή JA-14, (Beckmann). Το ίζημα αυτό περιέχει τις μεμβρανοσκελετικές δομές των κυττάρων του αίματος και ακολουθεί περαιτέρω κλασμάτωση προκειμένου να απομακρυνθούν οι κυτταρικές μεμβράνες και άλλα στοιχεία του κυτταροσκελετού. Ως εκ τούτου, το υπερκείμενο καθώς και το ορατό λευκό ίζημα που αντιπροσωπεύει τον πληθυσμό των λευκοκυττάρων αναρροφήθηκαν και ακολούθησε επαναδιάλυση του ιζήματος σε 10 όγκους διαλύματος λύσης με χρήση υπερήχων (10ml κλάσματα, 30 δευτέρα ,40% της μέγιστης ισχύς). Κατόπιν, το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε ξανά

στις 6000 στροφές για 10 λεπτά στους 4°C και έτσι επιτεύχθηκε ο διαχωρισμός των πυρήνων από τις πλασματικές μεμβράνες που παρέμειναν κατά κύριο λόγο στο υπερκείμενο και απομακρύνθηκαν. Ακολούθησε επαναδιάλυση των πυρήνων σε 5 όγκους διαλύματος λύσης και μεταφορά υπό πίεση διαμέσου κεκαμένης (σε σχήμα Z) βελόνας No. 22 (22 gauge). (Η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αποκόλληση των πλασματικών μεμβρανών που πιθανώς παρέμεναν προσκολλημένες στους πυρήνες καθώς και τον περαιτέρω τεμαχισμό των πυρήνων.) Αφού προστέθηκε ίσος όγκος διαλύματος λύσης, ακολούθησε φυγοκέντρηση όπως παραπάνω. Το υπερκείμενο αναρροφήθηκε και το ίζημα εκπλύθηκε με 5 όγκους ισοτονικού διαλύματος (150mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH 7.4, 2mM MgCl₂, 0.1mM EGTA, 10% σακχαρόζη, 1% Triton X-100, 0,1mM DTT, 1mM PMSF). Ακολούθησε αντίστοιχη φυγοκέντρηση. Τέλος, μετά την αναρρόφηση του υπερκειμένου το εναπομείναν ίζημα (τεμαχισμένοι πυρήνες) ψύχθηκε σε υγρό άζωτο και διατηρήθηκε στους -80°C.

2.2.4 Παρασκευή πυρηνικών φακέλων

Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, όλα τα διαλύματα και τα σωληνάρια διατηρήθηκαν στον πάγο. Πυρήνες των ερυθροκυττάρων επαναδιαλύθηκαν σε 10 ml διαλύματος πέψης (10 mM NaPO₄ pH 7.4, 2 mM MgCl₂, 10% σακχαρόζη, 1 mM DTT, 1.3 mM PMSF, 2 μg/ml αναστολείς πρωτεασών και 80 μg/ml DNase I) και επωάστηκαν σε κινούμενη πλατφόρμα για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε δεκάλεπτη φυγοκέντρηση στα 10000 g και επανάληψη της παραπάνω διαδικασίας μια ακόμη φορά. Το μεμβρανικό ίζημα (πυρηνικοί φάκελοι) επαναδιαλύθηκε σε 10 όγκους παγωμένου νερού και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά σε φυγόκεντρο Sorvall στα 12000g και 4 °C. (Η έκπλυση με νερό στους 0°C έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του μεγαλύτερου ποσοστού των συνδετικών ιστονών (linker histones)). Οι πυρηνικοί φάκελοι ψύχθηκαν σε υγρό άζωτο και καταψύχθηκαν στους -80°C, έως ότου να χρησιμοποιηθούν.

2.2.5 Παρασκευή εκχυλισμάτων πυρηνικών φακέλων

Οι πυρηνικοί φάκελοι επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα εκχύλισης (300 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, 250 mM σακχαρόζη, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, αναστολείς πρωτεασών), παρουσία ή απουσία 1% Triton X-100, ανάλογα με την περίπτωση και κατόπιν έγινε σύντομη χρήση υπερήχων για την καλύτερη επαναδιάλυσή τους. Το εναιώρημα υπερφυγοκεντρήθηκε στα 200-350,000g για 30 λεπτά στους 4°C. Μετά την φυγοκέντρωση, το υπερκείμενο (που αποτελεί τα διαλυτά εκχυλίσματα) συλλέχθηκε και χρησιμοποιήθηκε άμεσα.

2.2.6 Παρασκευή εκχυλισμάτων ελεύθερων ιστονών (histone-depleted extracts)

Για την παρασκευή εκχυλισμάτων που δεν περιέχουν πλέον νουκλεοσώματα (και συνεπώς ιστόνες), τα αρχικά εκχυλίσματα αραιώθηκαν με αντίστοιχο διάλυμα εκχύλισης μηδενικής όμως αλατότητας ούτως ώστε η τελική αλατότητα του εκχυλίσματος να φτάνει τα 100mM. Η μεταβολή της αλατότητας καθιστά τις ιστόνες μη διαλυτές και έτσι με υπερφυγοκέντρωση στις 40,000 στροφές, 30 λεπτά στους 4°C, κεφαλή SW41T1 (Beckman), τα νουκλεοσώματα καθιζάνουν και το υπερκείμενο υγρό αποτελεί ένα εκχύλισμα που δεν περιέχει ιστόνες. Στις περιπτώσεις όπου ίχνη ιστονών παρέμειναν στο εκχύλισμα, ακολούθησε χρωματογραφία σε στήλη ιοντοανταλλαγής. Μετά την επώαση με την ρητίνη, συλλέχθηκε το μη-συνδεδεμένο κλάσμα (flowthrough), το οποίο και χρησιμοποιήθηκε σε δοκιμασία συγκατακρίμησης.

2.2.7 Παρασκευή μιτωτικών εκχυλισμάτων

Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν έως ότου η ανάπτυξη της μονόστοιβης καλλιέργειας να είναι πλήρης (confluent). Μετά από θρυψινοποίηση, τα κύτταρα αραιώθηκαν 1:5 για επανακαλλιέργεια. 48 ώρες αργότερα έγινε προσθήκη 80ng/ml νοκοδαζόλης για 18 ώρες, ούτως ώστε να επιτευχθεί συγχρονισμός των κυττάρων στην προμετάφαση. Τα μιτωτικά κύτταρα, που είναι χαλαρά προσκολλημένα στην επιφάνεια του τρυβλίου σε σχέση με τα μεσοφασικά, συλλέχθηκαν μετά από έντονη ανατάραξη των τρυβλίων και αλλεπάλληλες εκπλύσεις με διάλυμα PBS, 1mM PMSF, 80ng/ml

νοκοδαζόλης. Το εναιώρημα συλλέχθηκε και φυγοκεντρήθηκε στα 800g για 15 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο αναρροφήθηκε και τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν στο προηγούμενο διάλυμα. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 1500 στροφές, 4°C για 7 λεπτά και έγινε αναρρόφηση του υπερκειμένου. Η παραπάνω έκπλυση επαναλήφθηκε άλλη 1 φορά προκειμένου τα κύτταρα να επαναδιαλυθούν σε αναλογία όγκου 1:5 με διάλυμα λύσης-A (10mM KCl, 10mM HEPES-KOH pH 7,9 , 1,5mM MgCl₂, 1mM DTT, 0,5mM PMSF, 20μM κυτοχλασίνη D, αναστολείς πρωτεασών και αναστολείς φωσφατασών, δηλαδή 20mM β-glycerol phosphate, 50mM NaF, 0,1μM οκαδεϊκό οξύ) και το δείγμα επώαστηκε στους 0°C για 15 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 2000g για 8 λεπτά στους 4°C και απαναδύαλση των κυττάρων σε 2 όγκους του διαλύματος A. Η λύση των κυττάρων επιτεύχθηκε με συμπίεση και ομογενοποίηση Dounce (300 παλινδρομήσεις) στους 0°C και το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε στα 1000g (επιτραπέζια φυγόκεντρος Eppendorf) για 10 λεπτά στους 4 °C.

Μετά τη φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο υγρό αναρροφήθηκε και το ίζημα (χρωμοσώματα) επαναιωρήθηκε σε αναλογία 1:5 σε διάλυμα πέψης (10 mM NaPO₄ pH 7.4, 2 mM MgCl₂, 10% σακχαρόζη, 1 mM DTT, 1.3 mM PMSF, 2 μg/ml αναστολείς πρωτεασών και 80 μg/ml DNase I) και επώαστηκαν σε κινούμενη πλατφόρμα για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε δεκάλεπτη φυγοκέντρηση στα 10000 g και επανάληψη της παραπάνω διαδικασίας μια ακόμη φορά. Το ίζημα (χρωμοσώματα) επαναδιαλύθηκε σε 10 όγκους παγωμένου νερού και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά σε φυγόκεντρο Sorvall στα 12000g και 4 °C. (Η έκπλυση με νερό στους 0°C έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του μεγαλύτερου ποσοστού των συνδετικών ιστονών (linker histones)). Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και ακολούθησε έκπλυση του ιζήματος με ισοτονικό διάλυμα (150mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH 7,5, 2mM MgCl₂, 10% sucrose, 1mM EDTA, 1mM DTT, 1mM PMSF και αναστολείς πρωτεασών) και φυγοκέντρηση 14000rpm, 30 λεπτά στους 4 °C. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε διάλυμα 300mM αλατότητας (300mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH 7,5, 2mM MgCl₂, 10% sucrose, 0,1mM EDTA, 0,1mM DTT, 1mM PMSF και αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών) και στη συνέχεια ακολούθησε η πορεία παρασκευής εκχυλίσματος ελεύθερου ιστονών (βλ. § 2.2.6)

2.2.8 Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων επιδεκτικών στον μετασχηματισμό

Τα βακτήρια ανασύρθηκαν από βακτηριακό μητρικό απόθεμα (στοκ) διαλύματος γλυκερόλης και επιστρώθηκαν σε τρυβλίο στερεού άγαρ. Ακολούθησε ολονύχτια επώαση στους 37°C. Κατόπιν, 1 μονή αποικία επιλέχθηκε για εμβολισμό 3ml Luria Broth και αφέθηκε για ολονύχτια ανάπτυξη. 2,5ml από την παραπάνω καλλιέργεια, εμβολιάστηκε σε 250ml LB και επώαστηκε στους 37°C έως ότου η οπτική της πυκνότητα, στα 600 nm, να προσεγγίσει τις 0,6 μονάδες. Στη συνέχεια, η φλάσκα με τα βακτήρια τοποθετήθηκε στον πάγο για 5 λεπτά και φυγοκεντρήθηκε στα 4000g για 10 λεπτά με την κεφαλή J-25 (Beckman). Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 30 ml παγωμένου διαλύματος TFB1(100mM RbCl, 50mM MnCl₂, 30mM οξικό κάλιο, 10mM CaCl₂, 15% γλυκερόλη, pH 5.8). Ακολούθησε επώαση στον πάγο για 1,5 ώρα και φυγοκεντρήθηκε στα 4000g, για 5 λεπτά, 4°C. Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 4 ml παγωμένου διαλύματος TFB2 (10mM MOPS, 10mM RbCl, 75mM CaCl₂, 15% γλυκερόλη, pH 6.8). Το αιώρημα διαμοιράστηκε σε αποστειρωμένα μικροσωληνάρια, τα οποία ψύχθηκαν για 15 δευτερόλεπτα σε υγρό άζωτο και εν συνεχεία τα επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

2.2.9 Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων

Ο μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων έγινε σύμφωνα με την μέθοδο του Sambrook (Sambrook et al., 1989). Πιο συγκεκριμένα, 3 ng πλασμιδιακού φορέα, ή το προϊόν αντίδρασης συγκόλλησης, προστέθηκε σε 100 μl κυτταρικού αιωρήματος και ακολούθησε επώαση στον πάγο για 20 λεπτά και θερμικό σοκ στους 42°C για 1 λεπτό. Κατόπιν, έγινε προσθήκη 900 μl LB και ανάπτυξη των βακτηρίων για 1 ώρα στους 37°C σε τροχιακό επωαστήρα. Η βακτηριακή καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στις 5,000 στροφές και το βακτηριακό ίζημα αφού επαναδιαλύθηκε σε 200 μl LB, επιστρώθηκε σε τρυβλία στερεού LB που περιείχαν αμικικιλίνη ή καναμυκίνη ανάλογα με το γονίδιο ανθεκτικότητας που φέρουν οι πλασμιδιακοί φορείς. Τέλος, τα τρυβλία επώαστηκαν ολονύχτια στους 37°C και μονές αποικίες επιλέχθηκαν για πιστοποίηση.

2.2.10 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες μικρής κλίμακας

Μια μονή αποικία ανασύρθηκε από τρυβλίο στερεού άγαρ και αναπτύχθηκε σε 3 ml LB με την προσθήκη του κατάλληλου αντιβιοτικού ανά περίπτωση σε τροχιακό επωαστήρα (37°C, ολονύχτια ανάδευση). Σε φυγοκεντρικό σωληνάριο τοποθετήθηκε 1.5ml της καλλιέργειας και φυγοκεντρήθηκε στις 12.000 στροφές, για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100 µl διαλύματος P1 (50mM Glucose, 25mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA). Στο εναιώρημα προστέθηκαν 100 µl διαλύματος P2 (0.2N NaOH, 1% w/v SDS) και έγινε ανάδευση με ήπια ανακίνηση για 5-6 φορές. Κατόπιν, προστέθηκαν 100 µl διαλύματος P3 (2.5M CH₃COONa pH 5.5), με αντίστοιχη ανακίνηση και το υλικό φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 13,000 στροφές, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο υγρό μεταφέρθηκε σε νέο φυγοκεντρικό σωληνάριο όπου προστέθηκε 1 ml παγωμένης αιθανόλης και ακολούθησε επόμενη φυγοκέντρηση στα 13,000g, για 15 λεπτά στους 4°C. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 1ml διαλύματος 70% παγωμένης αιθανόλης. Ακολούθησε φυγοκέντρηση όπως παραπάνω. Μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου, το ίζημα ξηράνθηκε σε φυγοκεντρικό συμπυκνωτή κενού (Speed Vac, Concentrator SVC100H SAVANT) ή αφέθηκε να στεγνώσει πλήρως σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, το τελικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 30 µl δις απεσταγμένου H₂O ή TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8) και διατηρήθηκε στους -20°C.

2.2.11 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα χρησιμοποιήθηκαν τα πακέτα QIAGEN ή Nucleobond PC 100, τα οποία αποτελούν τροποποιημένη μέθοδο της αλκαλικής λύσης των βακτηρίων με πρόσδεση του πλασμιδιακού DNA σε ειδική στήλη χρωματογραφίας. Η χρήση των πακέτων έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών.

2.2.12 Απομόνωση θραυσμάτων DNA από πηκτική αγαρόζης

Η διαδικασία έγινε με το πακέτο (kit) της QIAGEN gel extraction kit και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.2.13 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

1) Σε αυτήν την περίπτωση, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) πραγματοποιήθηκε για δύο λόγους. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία σημειακής μετάλλαξης στο γονίδιο της ιστόνης H3, ούτως ώστε στην αμινοξική αλληλουχία η σερίνη της θέσης 10 να αντικατασταθεί με μια αλανίνη. Παράλληλα, με τη δημιουργία κατάλληλων άκρων στα PCR προϊόντα έγινε δυνατή η ένθεσή τους σε πλασμιδιακό φορέα που φέρει το γονίδιο της GST πρωτεΐνης ή έξι ιστοιδίνες (his-tagged), για να δημιουργηθούν χμαιρικά μόρια και να εκφραστεί η αντίστοιχη πρωτεΐνη.

Οι πριμοδοτικές αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου της ιστόνης H3 από τον πλασμιδιακό φορέα pETedH3 ήταν οι ακόλουθες:

Forward primer: 5'-CCG GAA TCC CCC ATG GCC CGT ACC AAG CAG ACC
GCC CGT AAA GCC ACC GGA GGG AAG-3'

Reverse primer : 5'-CGC GGA TCC CTA AGC CCT CTC GCC TCG GA-3'

Πρόγραμμα κυκλοποίησης

Αρχική αποδιάταξη: 94°C για 5 λεπτά

Αποδιάταξη (denaturing) : 94°C για 1 λεπτό

Υβριδισμός (annealing) : 76 °C για 1 λεπτό

Σύνθεση (extension) : 72 °C για 1 λεπτό

Για 30 κύκλους και

Τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 10 λεπτά.

II) Πραγματοποίηση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) με στόχο την αλλαγή πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου της Haspin και παράλληλα, τη δημιουργία κατάλληλων άκρων στο PCR προϊόν ώστε να είναι δυνατή η ένθεσή του σε πλασμιδιακό φορέα που φέρει το γονίδιο της GST πρωτεΐνης ή έξι ιστιδίνες (his-tagged), για να δημιουργηθούν χημικώς μέρη και να εκφραστεί η αντίστοιχη πρωτεΐνη. Ο αρχικός πλασμιδιακός φορέας ήταν ο pBluescriptR και ο κλώνος προερχόταν από την εταιρία ImaGenes (κωδικός προϊόντος IRAKp961K0191Q). Οι πριμοδοτικές αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

Forward: 5'-CCG GAA TTC ATG GCG GCT TCG CTC-3'

Reverse: 5'-CCG CCT GAG TTA CTT AAA CAG ACT GTG CTG-3'

Πρόγραμμα κυκλοποίησης

Αρχική αποδιάταξη: 98°C για 2 λεπτά

Αποδιάταξη (denaturing) : 98°C για 30 δευτερόλεπτα

Υβριδισμός (annealing) : 55 °C για 30 δευτερόλεπτα

Σύνθεση (extension) : 72 °C για 1 λεπτό

Για 35 κύκλους και

Τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 10 λεπτά.

Το προϊόν της αντίδρασης κλωνοποιήθηκε στα πλασμίδια pGEX-6P-1, pHAT2 και pFastBacHTa.

III) Πραγματοποίηση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) με στόχο την υποκλωνοποίηση τμημάτων του γονιδίου της HP1β (των αντίστοιχων τμημάτων που κωδικοποιούν τον χρωμοτομέα-CD, τη συνδετική περιοχή-H και τον σκιώδη χρωμοτομέα-CSD) και παράλληλα, τη δημιουργία κατάλληλων άκρων στο PCR προϊόν ώστε να είναι δυνατή η ένθεσή του σε πλασμιδιακό φορέα που φέρει το γονίδιο της GST πρωτεΐνης ή έξι ιστιδίνες (his-tagged), για να δημιουργηθούν χημικώς μέρη και να εκφραστεί η αντίστοιχη πρωτεΐνη. Ο αρχικός πλασμιδιακός

φορέας ήταν ο pBCHGN (για το CD και H) και ο pEGFP-C1 (για το CSD και CSDm). Οι πριμοδοτικές αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

- Για το CD-HP1β

Forward: 5'-CCG GAA TTC ATG GCG GCT TCG CTC-3'

Reverse: 5'-CCG CCT GAG TTA CTT AAA CAG ACT GTG CTG-3'

Πρόγραμμα κυκλοποίησης

Αρχική αποδιάταξη: 95°C για 2 λεπτά

Αποδιάταξη (denaturing) : 95°C για 30 δευτερόλεπτα

Υβριδισμός (annealing) : 52 °C για 30 δευτερόλεπτα

Σύνθεση (extension) : 72 °C για 1 λεπτό

Για 30 κύκλους και

Τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 10 λεπτά.

Το προϊόν της αντίδρασης κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pGEX-6P-1.

- Για το H-HP1β

Forward: 5'-CGC GGA TCC CAG TCA CAG AAA ACA GCA- 3'

Reverse: 5'-GAA TTC CTA TCC TCG AGC AAA GCC TCG- 3'

Πρόγραμμα κυκλοποίησης

Αρχική αποδιάταξη: 95°C για 2 λεπτά

Αποδιάταξη (denaturing) : 95°C για 30 δευτερόλεπτα

Υβριδισμός (annealing) : 60 °C για 30 δευτερόλεπτα

Σύνθεση (extension) : 72 °C για 1 λεπτό

Για 30 κύκλους και

Τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 10 λεπτά.

Το προϊόν της αντίδρασης κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pGEX-6P-1.

- Για το CSD-HP1β

Forward: 5'-CGG AAT TCG CTC GAG GT-3'

Reverse: 5'-CCA AGC TTA GTT CTT GTC-3'

Πρόγραμμα κυκλοποίησης

Αρχική αποδιάταξη: 94°C για 3 λεπτά

Αποδιάταξη (denaturing) : 94°C για 30 δευτερόλεπτα

Υβριδισμός (annealing) : 58 °C για 30 δευτερόλεπτα

Σύνθεση (extension) : 72 °C για 1 λεπτό

Για 35 κύκλους και

Τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 10 λεπτά.

Το προϊόν της αντίδρασης κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pGAT2.

- Για το CSDm-HP1β

Forward: 5'-CGG AAT TCG CTC GAG GT-3'

Reverse: 5'-CCC AAG CTT ATG GGC ACT-3'

Πρόγραμμα κυκλοποίησης

Αρχική αποδιάταξη: 94°C για 3 λεπτά

Αποδιάταξη (denaturing) : 94°C για 30 δευτερόλεπτα

Υβριδισμός (annealing) : 58 °C για 30 δευτερόλεπτα

Σύνθεση (extension) : 72 °C για 1 λεπτό

Για 35 κύκλους και

Τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 10 λεπτά.

Το προϊόν της αντίδρασης κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pGAT2.

Τα προϊόντα της αντίδρασης αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης και εφόσον πιστοποιήθηκε το σωστό μέγεθος της κατασκευής, καθαρίστηκαν από τις προσμίξεις της αντίδρασης με το πακέτο της QIAGEN PCR purification kit.

2.2.14 Υποκλωνοποίηση του γονιδίου της AuroraB

- AuroraB

Το γονίδιο της AuroraB εισήχθη στον πλασμιδιακό φορέα pHAT2 χρήση των περιοριστικών ενζύμων EcoRI και XhoI. Ο αρχικός φορέας ήταν ο pGEX-4T.

2.3 Βιοχημικές Μέθοδοι

2.3.1 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Θραύσματα DNA αναλύθηκαν σε πηκτές 0.8 έως 1.5% αγαρόζης, ανάλογα με το μέγεθος των θραυσμάτων DNA προς ανάλυση. Η σκόνη αγαρόζης διαλύθηκε μετά από βρασμό σε διάλυμα 1xTAE και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα 1xTAE (50xTAE: 40mM Tris-acetate και 1mM EDTA pH 8.0). Οι πηκτές αγαρόζης περιείχαν 0,5 mg/ml βρωμιούχου αιθιδίου, ούτως ώστε τα θραύσματα του DNA να είναι ορατά σε υπεριώδες φως.

2.3.2 Ανάλυση Πρωτεϊνών

Η ανάλυση των πρωτεϊνών έγινε σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, που περιέχει δωδεκυλθειϊκό νάτριο (SDS-PAGE), υπό αναγωγικές συνθήκες, σύμφωνα με την μέθοδο του Laemmli (1970).

Πριν την ηλεκτροφόρηση στα πρωτεϊνικά δείγματα προστέθηκε 4 φορές συγκεντρωμένο διάλυμα Laemmli [Tris-HCl (pH 7), 9.2% SDS, 40% γλυκερόλη, 0.2% (βάρος κατ' όγκο) μπλε της βρωμοφαινόλης και 100 mM DTT] και ακολούθησε

θέρμανση στους 95°C για 10 λεπτά. Κατόπιν, τα ανηγμένα δείγματα εφαρμόστηκαν στην πηκτή και η ηλεκτροφόρηση έγινε σε διάλυμα που περιείχε 192 mM γλυκίνη, 25 mM Tris base και 0.1% SDS για 3 ώρες στα 45 mA και σε σταθερή μέγιστη τάση.

2.3.3 Χρώση πηκτής πολυακρυλαμιδίου

Για τη χρώση των πηκτών πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιήθηκε Coomassie Blue G250. Πιο συγκεκριμένα, αμέσως μετά την ηλεκτροφόρηση ακολούθησε μονιμοποίηση και ταυτόχρονη χρώση των πηκτών σε διάλυμα 50% μεθανόλης, 12% οξικού οξέος και 0.1% w/v Coomassie Blue. Κατόπιν, η περίσσεια χρωστικής απομακρύνθηκε και έγινε επώαση σε διάλυμα 10-40% μεθανόλης, 10% οξικού οξέος έως ότου να εμφανιστούν καθαρές ζώνες πρωτεϊνών.

2.3.4 Ανοσοαποτύπωση κατά western

Η διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης κατά western έγινε σύμφωνα με καθιερωμένα πρωτόκολλα. Αρχικά, τα πρωτεϊνικά δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Ακολούθησε μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης (Protran, 0.45mm) χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (192 mM γλυκίνη, 25 mM Tris-base, 0.1% SDS και 20% μεθανόλη) κάτω από σταθερό ηλεκτρικό πεδίο τάσης 35 V για 3 ώρες. Μετά τη μεταφορά, η νιτροκυτταρίνη εκπλύθηκε 3 φορές με διάλυμα 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 155 mM NaCl και 0.1% Tween 20 και επώαστηκε ολονύχτια στο ίδιο διάλυμα παρουσία 1% ζελατίνης ψαριού (Fish Skin Gelatin, FSG), σε περιστρεφόμενη πλατφόρμα και θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, η νιτροκυτταρίνη επώαστηκε για 3 ώρες κατά τον ίδιο τρόπο, με το πρωτεύον αντίσωμα, αραιωμένο σε διάλυμα έκπλυσης. Μετά την επώαση πραγματοποιήθηκαν 4 πλύσεις των 10 λεπτών στο ίδιο διάλυμα. Το δευτερεύον αντίσωμα επώαστηκε κατά τον ίδιο τρόπο για 1 ώρα. Ακολούθησαν 3 διαδοχικές πλύσεις στο ίδιο διάλυμα διάρκειας 5 λεπτών και άλλες 3 πλύσεις σε διάλυμα έκπλυσης. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL, PIERCE) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.3.5 Δοκιμασίες συγκατακρήμισης πρωτεϊνών με σφαιρίδια αγαρόζης-γλουταθειόνης (pull-down assays)

Σφαιρίδια γλουταθειόνης εξισορροπήθηκαν με 3 πλύσεις σε διάλυμα επώασης (150mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH 7.4, 2mM MgCl₂, 0.1mM EGTA, 10% σακχαρόζη, 1% Triton X-100, 0,1mM DTT, 1mM PMSF) με ενδιάμεσες φυγοκεντρήσεις σε φυγόκεντρο Eppendorf για 20 δευτερόλεπτα. Οι ανασυνδυασμένες gst-πρωτεΐνες (μετά από διαπίδυση σε διάλυμα επώασης) αποψύχθηκαν από τους -80°C, φυγοκεντρήθηκαν για 30 λεπτά στους 4°C (13,000 στροφές σε φυγόκεντρο Eppendorf) για να απομακρυνθούν τυχόν συσσωματώματα. Κατόπιν, ~30μg πρωτεΐνης προστέθηκαν σε εναιώρημα σφαιριδίων (~30μl καθαρός όγκος σφαιριδίων), παρουσία 1% FSG και ο τελικός όγκος του εναιωρήματος προσαρμόστηκε στα 200 μl. Ακολούθησε επώαση 45 λεπτών υπό συνεχή ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να ακινητοποιηθούν οι gst-πρωτεΐνες επάνω στα σφαιρίδια. Τα σφαιρίδια εκπλύθηκαν 3 φορές και μια ακόμα φορά με διάλυμα αντίστοιχης αλατότητας (π.χ. 150mM, 300mM, 600mM) με αυτήν του δείγματος που θα επακολουθούσε. Το δείγμα αυτό και η gst-πρωτεΐνη επώαστηκαν μετά για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Τα σφαιρίδια εκπλύθηκαν 5 φορές με το ίδιο διάλυμα και μία φορά με το διάλυμα επώασης απουσία Triton X-100..

2.3.6 Δοκιμασίες *in vitro* φωσφορυλίωσης

Πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες συγκατακρήμισης πρωτεϊνών με σφαιρίδια αγαρόζης- γλουταθειόνης, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Τα συγκατακρημνίσματα επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα επώασης και προστέθηκαν 5-30μg πρωτεϊνικού υποστρώματος προς φωσφορυλίωση (π.χ. ιστόνη H3) και 2μCi γ-ATP (³²P). Ακολούθησε επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και αυτοραδιογραφία.

2.4 Μορφολογικές Μέθοδοι

2.4.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός έγινε σύμφωνα με τα δημοσιευμένα πρωτόκολλα των Maison et al., (1993) και Meier and Georgatos, (1994). Πιο αναλυτικά, κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε καλυπτρίδες μονιμοποιήθηκαν σε 1 - 4% φορμαλδεΰδη αραιωμένη σε PBS για 5 - 10 λεπτά. Ακολούθησαν 3 εκπλύσεις με PBS και το μέσο μονιμοποίησης εξουδετερώθηκε μετά από επώαση 5 λεπτών σε διάλυμα 5mM γλυκίνης διαλυτοποιημένης σε PBS. Τα δείγματα εκπλύθηκαν με PBS και επώαστηκαν για 10 λεπτά σε διάλυμα A (150mM NaCl, 20mM HEPES pH 7.4, 2mM MgCl₂, 0,1mM EGTA, 0.2% Triton X-100, 0.5% FSG). Το πρωτεύον αντίσωμα, αραιωμένο στην κατάλληλη συγκέντρωση, προστέθηκε στις καλυπτρίδες και ακολούθησε επώαση για 1 ώρα σε θάλαμο υψηλής υγρασίας και θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα πλύθηκαν 3 φορές με διάλυμα A, ακολούθησε επώαση με το δευτερεύον αντίσωμα και πλύσεις κατά τον ίδιο τρόπο. Στο πέρας της διαδικασίας έγινε μετα-μονιμοποίηση με 4% φορμαλδεΰδη αραιωμένη σε PBS για 10 λεπτά (post-fixation) και έκπλυση με PBS. Η χρώση του DNA έγινε είτε με DAPI (4'-6-Diamidino-2-Phenylindole) συγκέντρωσης 10 µg/ml είτε με ιωδιούχο προπίδιο (propidium iodide-PI) συγκέντρωσης 5µg/ml για 4 ή 10 λεπτά αντίστοιχα. Για τη χρώση με ιωδιούχο προπίδιο, πραγματοποιήθηκε επώαση με 1mg/ml RNάση αραιωμένης σε PBS για 30 λεπτά πριν την μετα-μονιμοποίηση των δειγμάτων. Τέλος, οι καλυπτρίδες πλύθηκαν 5 φορές με PBS και αφού στεγνώθηκαν ελαφρώς προστέθηκε Vectashield (διάλυμα παρεμπόδισης του αποχρωματισμού κατά την παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού), επιστρώθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες και στεγανοποιήθηκαν με βερνίκι.

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

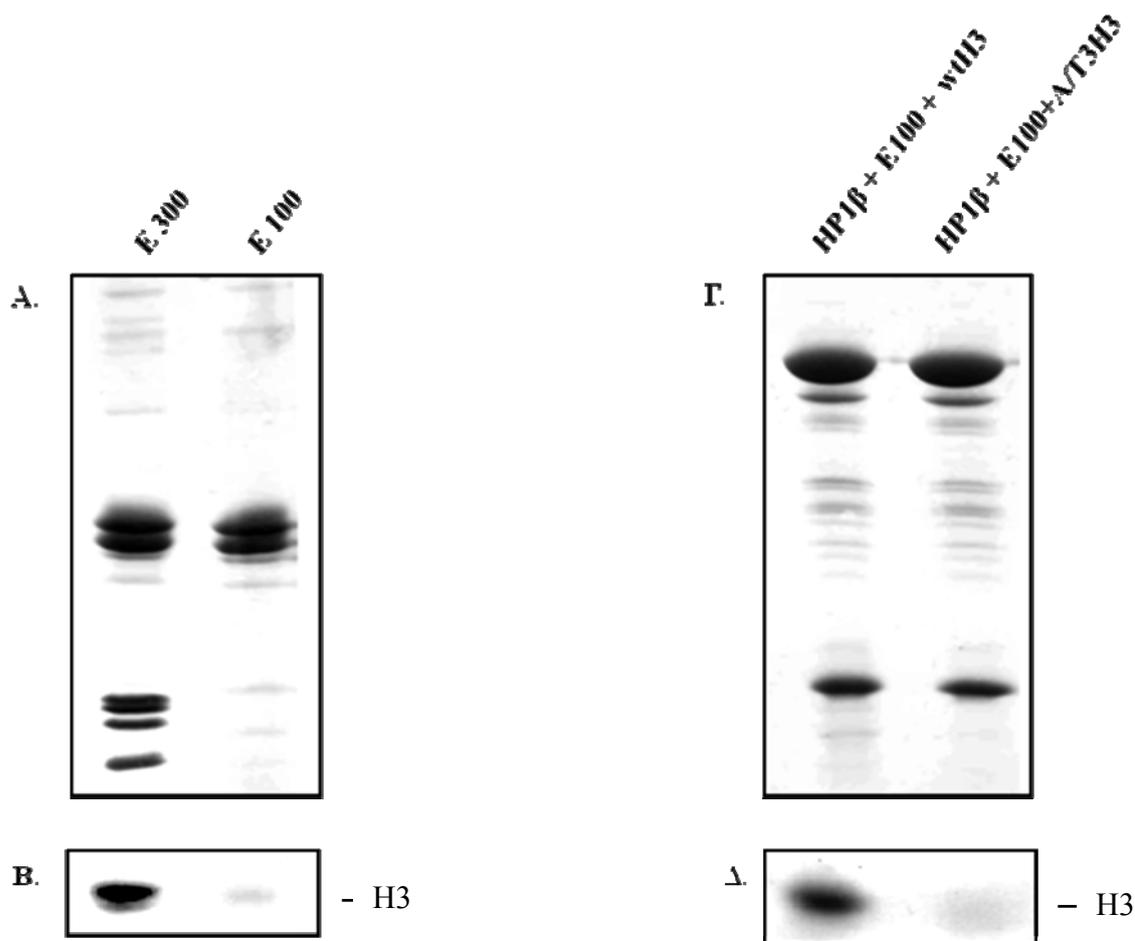
Αποτελέσματα

Όπως συζητήθηκε στην Εισαγωγή, οι μέχρι τώρα γνωστοί «στόχοι» πρωτεϊνικών κινασών που τροποποιούν την αμινο-τελική ουρά της H3 είναι οι σερίνες 10 (S10) και 28 (S28) που φωσφορυλιώνονται από την κινάση Aurora B, η θρεονίνη 3 (T3) που φωσφορυλιώνεται από την κινάση Haspin και η θρεονίνη 11 (T11) που φωσφορυλιώνεται από την κινάση Dlk/Zip (Hendzel et al., 1997, Hsu et al., 2000, De Souza et al., 2000, Giet and Glover, 2001, Preuss et al., 2003, Goto et al., 2002, Grosio et al., 2002, Hake, et al., 2005). Πρόσφατα αναφέρθηκε στη βιβλιογραφία μία ακόμα κινάση, η VRK1, που φωσφορυλιώνει την H3 στην T3 και τη S10, καθώς και την ιστόνη H2B (Kang T-H. et al., 2007), δράση αμφιλεγόμενη (Higgins J.M.G., 2009), αφού η αποσιώπηση της Haspin με RNAi φαίνεται να εξαλείφει σχεδόν ολοκληρωτικά τη φωσφορυλίωση στην T3 στη μίτωση, όπως επίσης συμβαίνει και με την Aurora B και τη φωσφορυλίωση στην S10.

Υπό *in vitro* συνθήκες, η HP1 συγκατακρημνίζεται με νουκλεοσώματα καθώς και μια άγνωστη ταυτότητας κινάση, η οποία φωσφορυλιώνει την ιστόνη H3 στην T3 (T3H3) (Polioudaki et al., 2004). Για να εξακριβώσουμε αν η T3H3 αποτελεί μοναδικό στόχο αυτής της HP1-συνδεόμενης κινάσης (γεγονός που θα την καθιστούσε παρόμοια με τη Haspin) στην πρώτη φάση της μελέτης κατασκευάσαμε και χρησιμοποιήσαμε μια μεταλλαγμένη μορφή της ιστόνης H3 στην οποία η T3 έχει υποκατασταθεί από αλανίνη (A/T3H3), δηλαδή ένα μη φωσφορυλιώσιμο αμινοξύ. Ακολουθώντας το ίδιο πειραματικό πρωτόκολλο με βάση το οποίο ανιχνεύθηκε η T3H3 κινάση στην αρχική μελέτη, ως πηγή τροποποιητικών ενζύμων της H3 χρησιμοποιήθηκε ένα αλατούχο εκχύλισμα περιφερικής ετεροχρωματίνης (NEPH-Nuclear Envelope-Peripheral-Heterochromatin, βλ. Makatsori et al., 2004). Το συγκεκριμένο κλάσμα παρασκευάζεται μετά από επώαση μηχανικά κατακερματισμένων πυρήνων με το ένζυμο DNase I και συνακόλουθη εκχύλιση με 300mM NaCl. Το κεκαθαμένο υπερκείμενο (clarified supernatant) που παραλαμβάνεται μετά από αυτή τη διαδικασία περιέχει κυρίως μονο-νουκλεοσώματα, διαλυτές χρωματινικές πρωτεΐνες, πυρηνικές λαμίνες και ένζυμα. Ωστόσο, όταν η αλατότητα του εκχυλίσματος μειωθεί από 300 mM σε 150mM, τα νουκλεοσώματα και οι ενδογενείς ιστόνες κατακρημνίζονται σχεδόν ποσοτικά και μπορεί να απομακρυνθούν με υπερφυγοκέντρηση.

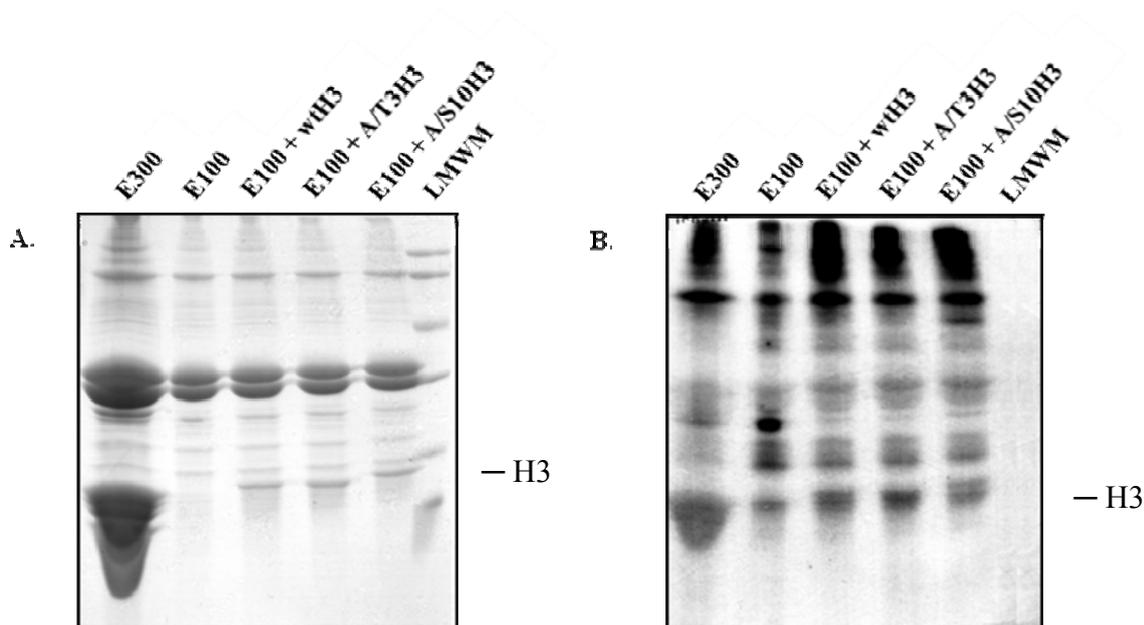
Σε πειράματα *in vitro* φωσφορυλίωσης, εκχύλισμα NEPH παρασκευασμένο από πυρήνες ερυθροκυττάρων όρνιθας προ-επώαστηκε με τη χημική πρωτεΐνη HP1β-

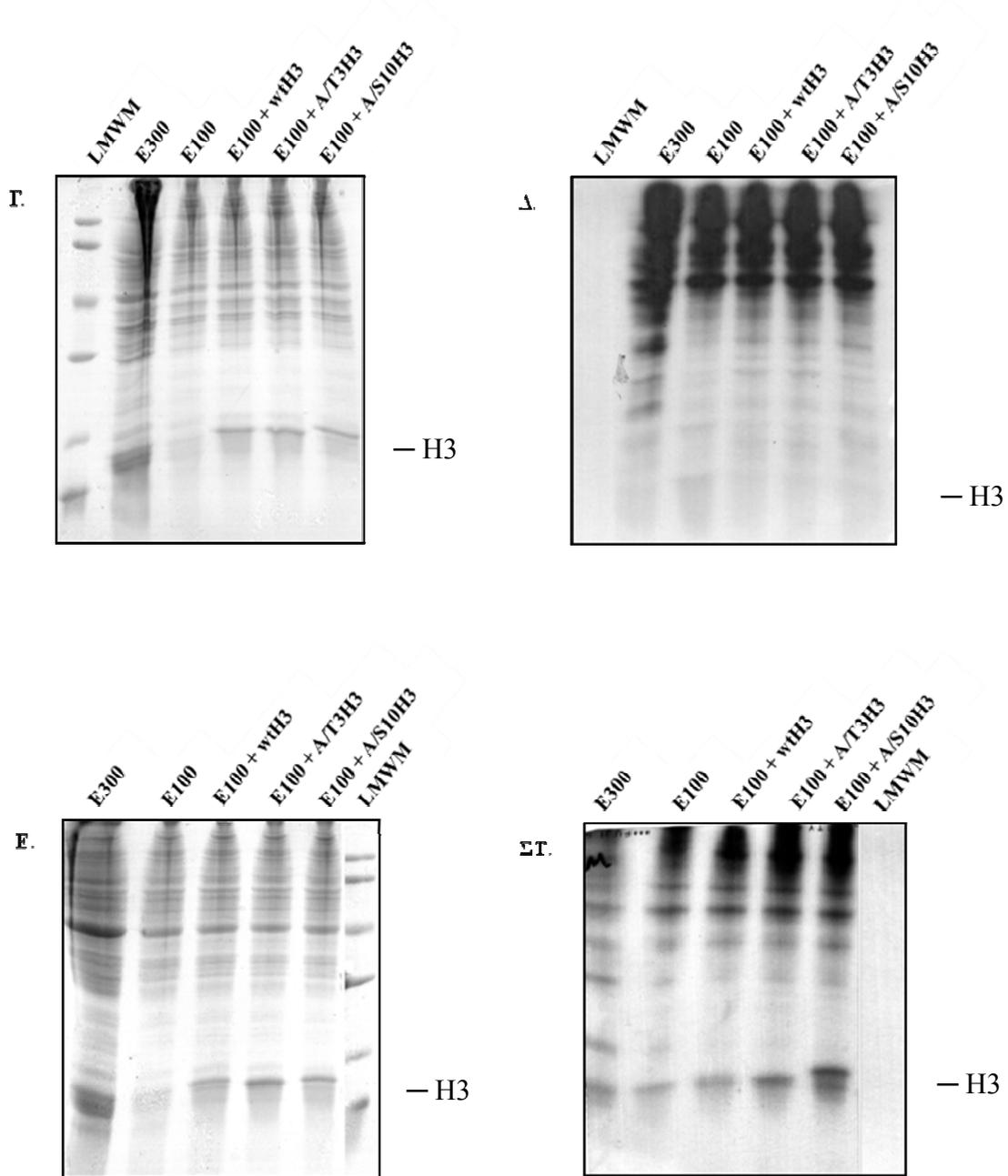
gst, η οποία είχε ακινητοποιηθεί σε σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης. Τα στοιχεία που συνδέονται με την HP1 συλλέχθηκαν μετά από σύντομη φυγοκέντρηση και σε αυτό το υλικό προστέθηκαν στη συνέχεια ως υποστρώματα για φωσφορυλίωση η wtH3 ή η A/T3H3. Από δοκιμασίες αυτού του τύπου διαπιστώθηκε ότι η HP1β συνδέεται πράγματι με μια πρωτεϊνική κινάση, η οποία φωσφορυλιώνει μόνο την wtH3 και όχι τη μεταλλαγμένη μορφή A/T3H3.



Εικ 3.1 Ανίχνευση ενεργότητας T3H3 κινάσης της ιστόνης H3 που συνδέεται με την HP1 στο εκχύλισμα NEPH από ερυθροκύτταρα όρνιθας. (A) Δοκιμασίες *in vitro* φωσφορυλίωσης. Η διαδρομή (E300) δείχνει ένα ηλεκτροφορητικό προφίλ του παρασκευάσματος, ενώ η διαδρομή (E100) δείχνει το ίδιο κλάσμα απαλλαγμένο από τις ενδογενείς ιστόνες μετά από προσαρμογή του άλατος στα 150mM NaCl και υπερφυγοκέντρηση. (B) Προφίλ που αντιστοιχεί στην αυτοραδιογραφία μετά από επώαση των E300 και E100 με ^{32}P -ATP. (Γ) Δοκιμασίες συγκατακρήμνισης (Pull down)/*in vitro* φωσφορυλίωσης χρησιμοποιώντας το ίδιο εκχύλισμα. Το εκχύλισμα επώαστηκε με HP1β-gst πρωτεΐνη ακινητοποιημένη σε σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης. Το υλικό που συγκατακρημνίστηκε επώαστηκε σε δεύτερη φάση με ^{32}P -ATP αφού προστέθηκαν εξωγενώς ιστόνες (wtH3 ή A/T3H3). Τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση. (Δ) Προφίλ αυτοραδιογραφίας, στο οποίο φαίνεται το σήμα της φωσφορυλιωμένης wtH3.

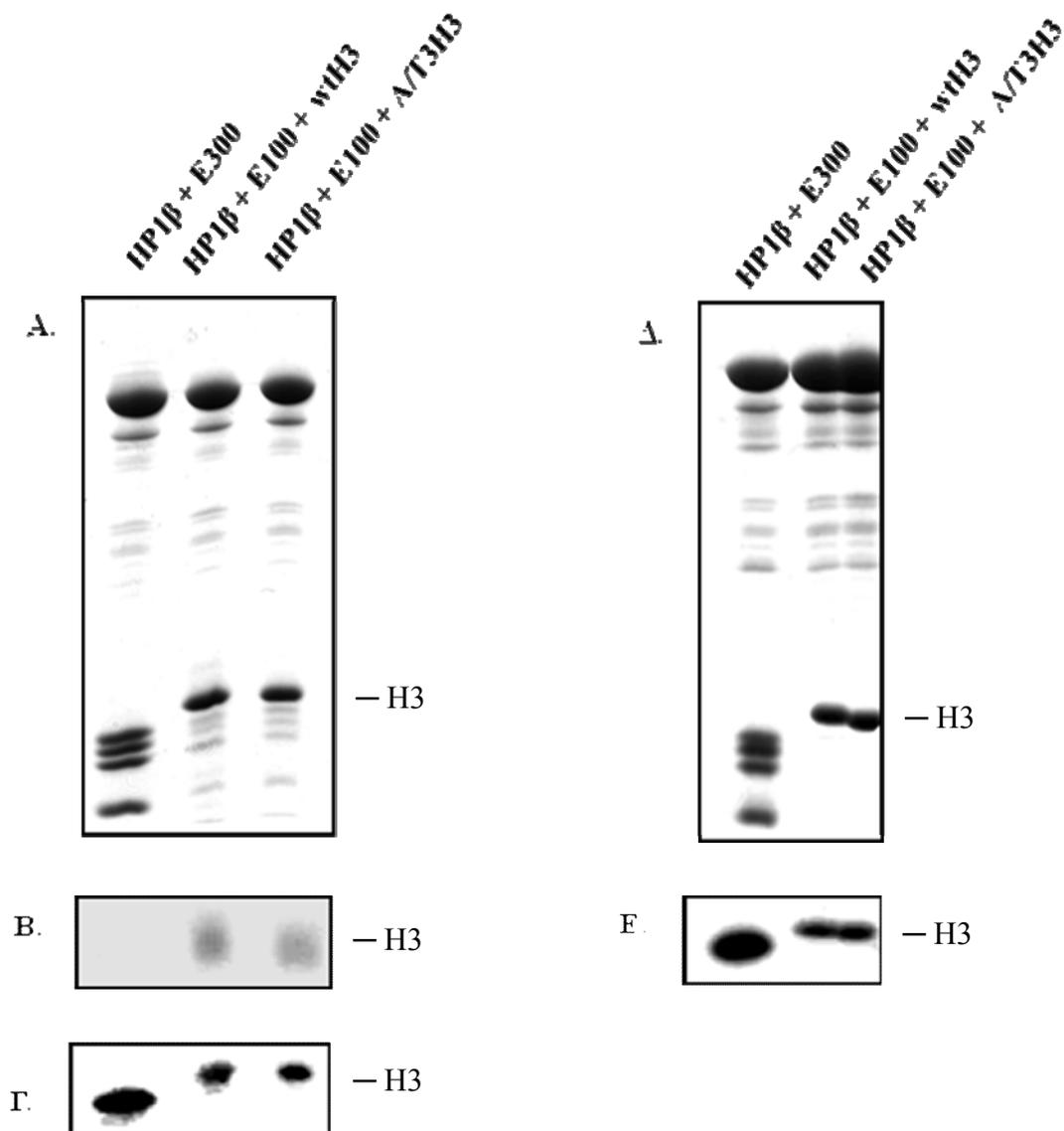
Διερωτηθήκαμε εάν εκείνο που παρατηρήσαμε στα εκχυλίσματα NEPH από ερυθροκύτταρα όρνιθας (κύτταρα τα οποία είναι «ακίνητοποιημένα» στην G0 φάση), ισχύει επίσης και για κύτταρα που «διατρέχουν» τον κυτταρικό κύκλο. Για να απαντηθεί αυτό το ερώτημα χρησιμοποιήσαμε εκχυλίσματα NEPH και εκχυλίσματα χρωμοσωμάτων από μεσοφασικά και μιτωτικά κύτταρα HeLa, αντίστοιχα. Στην εικόνα 3.2 παρουσιάζονται τα αντίστοιχα αποτελέσματα, όταν χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα εξωγενείς ιστόνες (η wtH3, η A/T3H3, αλλά και μια ακόμη μεταλλαγμένη μορφή της H3, η A/S10H3, όπου η S10 έχει αντικατασταθεί με αλανίνη). Όπως φαίνεται στην αντίστοιχη αυτοραδιογραφία, τα εκχυλίσματα NEPH από μεσοφασικά κύτταρα περιέχουν ελάχιστη έως μηδενική ενεργότητα κινασών που φωσφορυλιώνουν την H3. Παρόλα ταύτα, τα εκχυλίσματα χρωματίνης από τα μιτωτικά κύτταρα φάνηκε ότι περιέχουν ένζυμα που φωσφορυλιώνουν όλες τις μορφές και τα μεταλλάγματα της H3.





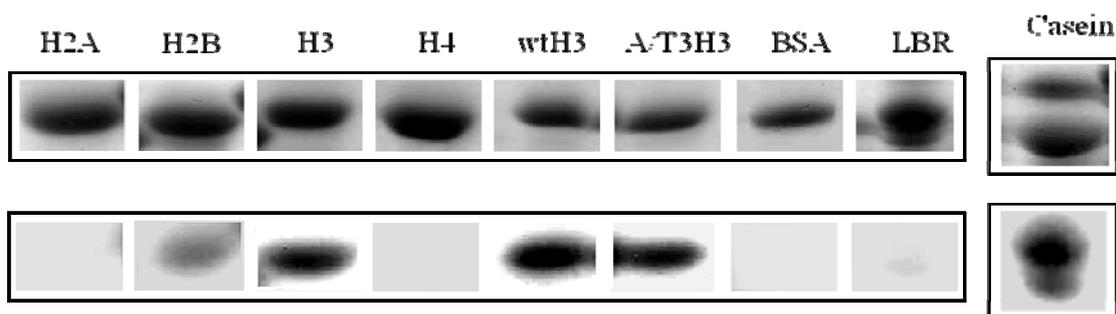
Εικ 3.2 Ανίχνευση ενεργότητας ενδογενών πρωτεϊνικών κινασών από εκχύλισμα περιφερικής ετεροχρωματίνης (NEPH). (A) Δοκιμασίες *in vitro* φωσφορυλίωσης χρησιμοποιώντας εκχύλισμα NEPH ερυθροκυττάρων όρνιθας. Η διαδρομή (E300) απεικονίζει ένα SDS-PAGE/Coomassie blue προφίλ του παρασκευάσματος, ενώ η διαδρομή (E100) δείχνει το ίδιο κλάσμα απαλλαγμένο από τις ενδογενείς ιστόνες (βλ. προηγούμενες εικόνες). Οι υπόλοιπες διαδρομές δείχνουν ανάλογο πείραμα, στο οποίο το απαλλαγμένο από ενδογενείς ιστόνες E100 εκχύλισμα επωάζεται παρουσία ιστονών που προστέθηκαν εξωγενώς, δηλαδή wtH3, A/T3H3, A/S10H3 και ^{32}P -ATP μετά από ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. (B) Αντίστοιχο προφίλ αυτοραδιογραφίας. (C) Δοκιμασίες *in vitro* φωσφορυλίωσης χρησιμοποιώντας εκχύλισμα NEPH από ασύγχρονη καλλιέργεια κυττάρων HeLa. (Δ) Αντίστοιχο προφίλ αυτοραδιογραφίας. (E) Δοκιμασίες *in vitro* φωσφορυλίωσης με εκχύλισμα NEPH από καλλιέργεια κυττάρων HeLa συγχρονισμένη στη μίτωση. (ZT) Αντίστοιχο προφίλ αυτοραδιογραφίας.

Δοκιμασίες *in vitro* φωσφορυλίωσης μετά από συγκατακρήμνιση με την HP1β-gst έδειξαν ότι η εν λόγω πρωτεΐνη αλληλεπιδρά πιθανότατα με περισσότερες από μία μιτωτικές κινάσες, αφού και οι δύο μορφές της H3 φωσφορυλιώθηκαν υπό τις συνθήκες του πειράματος (τόσο σε ό,τι αφορά τα μεσοφασικά όσο και τα μιτωτικά εκχυλίσματα) (εικ 3.3). Βέβαια, στην περίπτωση των μεσοφασικών κυττάρων, η φωσφορυλίωση της H3 είναι πολύ μικρότερης έκτασης (βλ. εικ. 3.3 Β).



Εικ 3.3 Ανίχνευση ενεργότητας ενδογενών πρωτεϊνικών κινασών της ιστόνης H3. (A) Δοκιμασίες συγκατακρήμνισης (Pull down)/*in vitro* φωσφορυλίωσης με εκχύλισμα NEPH από ασύγχρονη καλλιέργεια κυττάρων HeLa. Η διαδρομή (HP1β + E300) δείχνει ένα ηλεκτροφορητικό προφίλ του παρασκευάσματος, το οποίο επώαστηκε με HP1β-gst πρωτεΐνη ακινητοποιημένη σε σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης. Το υλικό που συγκατακρημνίστηκε επώαστηκε σε δεύτερη φάση με ^{32}P -ATP. Οι επόμενες διαδρομές δείχνουν δοκιμασίες συγκατακρήμνισης (Pull down)/*in vitro* φωσφορυλίωσης με το ίδιο κλάσμα απαλλαγμένο από τις ενδογενείς ιστόνες (E100). Το εκχύλισμα επώαστηκε με HP1β- gst πρωτεΐνη ακινητοποιημένη σε σφαιρίδια γλουταθειόνης. Το υλικό που συγκατακρημνίστηκε επώαστηκε σε δεύτερη φάση με ^{32}P -ATP, αφού προστέθηκαν εξωγενώς ιστόνες (wtH3 ή A/T3H3). Τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. (B, Γ) Προφίλ αυτοραδιογραφίας μικρής (B) και μεγάλης έκθεσης (Γ). (Δ) Δοκιμασίες συγκατακρήμνισης (Pull down)/*in vitro* φωσφορυλίωσης με εκχύλισμα NEPH από καλλιέργεια κυττάρων HeLa συγχρονισμένη στη μίτωση. (E) Αντίστοιχο προφίλ αυτοραδιογραφίας.

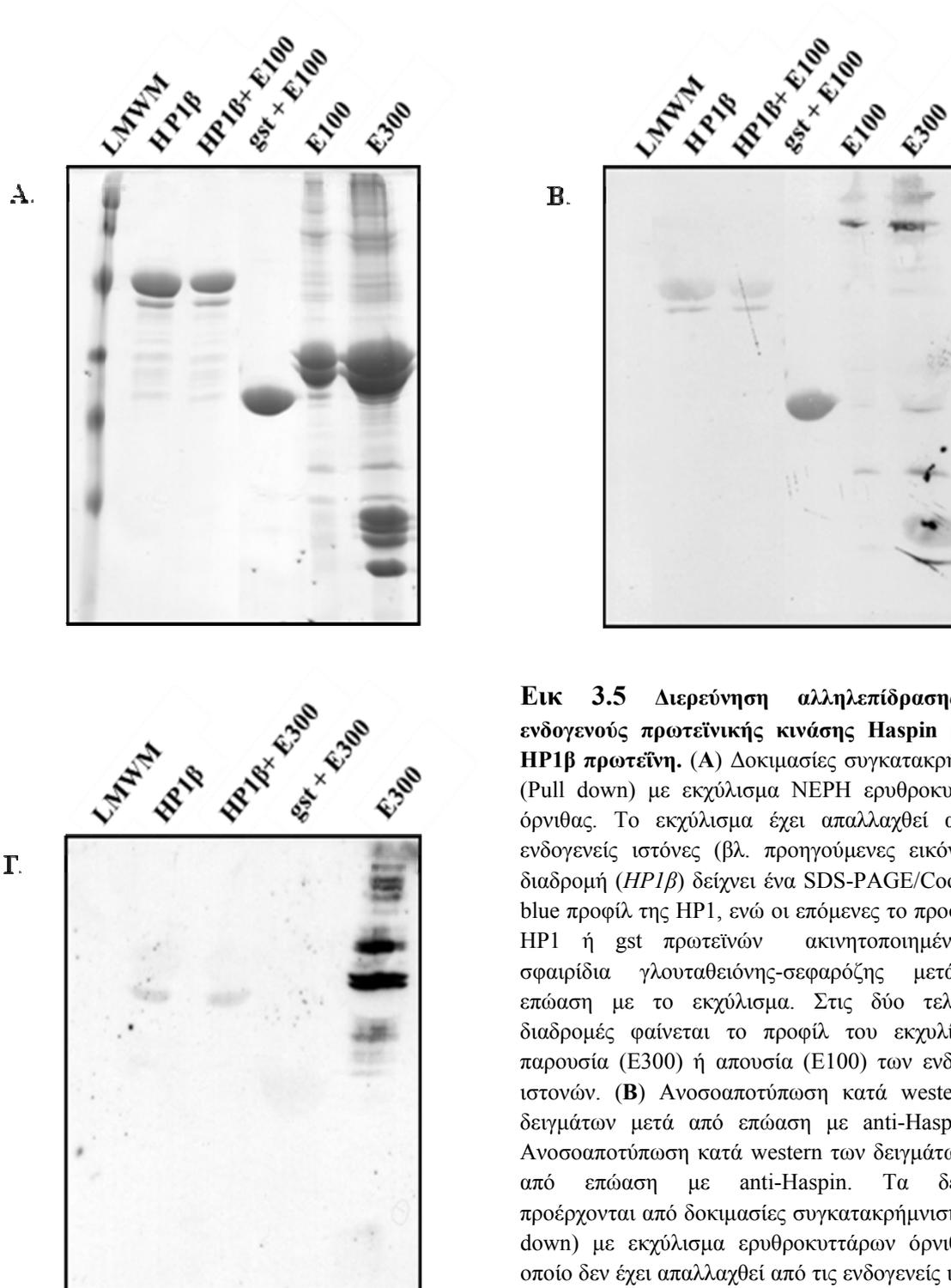
Για να διαπιστωθεί η ειδικότητα της *in vitro* φωσφορυλίωσης επαναλάβαμε τις δοκιμασίες που περιγράφηκαν παραπάνω χρησιμοποιώντας πολλαπλά υποστρώματα. Έτσι, εκτός από τις ανασυνδυασμένες ιστόνες, ελέγχθηκαν επίσης φυσικές ιστόνες απομονωμένες από θύμο αδένα βοός, καζεΐνη του γάλακτος, ένα αμινοτελικό τμήμα του υποδοχέα της λαμίνης Β (LBR) που περιέχει αλληλουχίες RS και αλβουμίνη του ορού. Μετά από παρατεταμένη έκθεση παρατηρήθηκε φωσφορυλίωση της wtH3 και της A/T3H3, της καζεΐνης καθώς και της ιστόνης H2B (σε μικρότερο βαθμό).



Εικ 3.4 Ανίχνευση ενεργότητας ενδογενών πρωτεϊνικών κινασών σε διάφορα υποστρώματα, κυρίως H3 ιστόνες. (Α) Δοκιμασίες συγκατακρήμνισης (Pull down)/*in vitro* φωσφορυλίωσης με εκχύλισμα NEPH απαλλαγμένο από τις ενδογενείς ιστόνες (βλ. προηγούμενες εικόνες) από καλλιέργεια κυττάρων HeLa συγχρονισμένη στη μίτωση. Στις διαδρομές φαίνεται το SDS-PAGE/Coomassie blue προφίλ των διαφορετικών υποστρωμάτων φωσφορυλίωσης του παρασκευάσματος. Το εκχύλισμα επώαστηκε με HP1β- gst πρωτεΐνη ακινητοποιημένη σε σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης (δεν απεικονίζεται). Το υλικό που συγκατακρημνίστηκε επώαστηκε σε δεύτερη φάση με ^{32}P -ATP και προστέθηκαν εξωγενώς ιστόνες, H2A, H2B, H3, H4 (από θύμο αδένα βοοειδών), wtH3, A/T3H3, καθώς και οι πρωτεΐνες BSA, LBR και καζεΐνης. Τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. (Β) Αντίστοιχο προφίλ αυτοραδιογραφίας στο οποίο φαίνεται το σήμα των φωσφορυλιωμένων H3 ιστονών, της ιστόνης H2B (σε μικρότερο βαθμό) καθώς και της καζεΐνης.

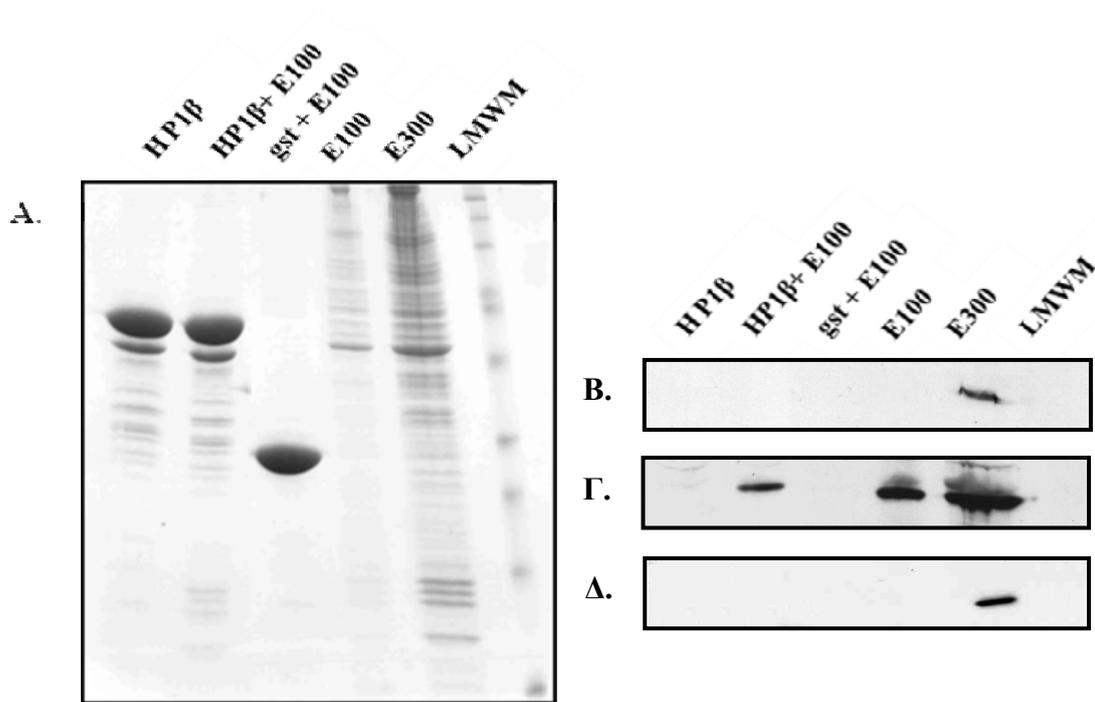
Για να επιβεβαιώσουμε ότι HP1 αλληλεπιδρά *in vitro* με μια από τις μιτωτικές κινάσες που είναι γνωστές ως τώρα στη βιβλιογραφία, προχωρήσαμε στη διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων αυτών με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων και ανοσοαποτύπωσης κατά western. Αρχικά, η ανάλυση έγινε με αντίσωμα για την κινάση Haspin (ένζυμο που φωσφορυλιώνει την T3H3). Ως πηγή της κινάσης αυτής χρησιμοποιήθηκε αρχικά εκχύλισμα NEPH από ερυθροκύτταρα όρνιθας (εικ 3.5 Α, Β). Τα πειράματα μας έδειξαν ότι η HP1 δεν αλληλεπιδρά με τη Haspin, δεδομένου ότι το σήμα που αντιστοιχεί στο μοριακό βάρος της κινάσης παρατηρείται μόνο στη διαδρομή με το εκχύλισμα αλατότητας 300mM. Επομένως, συμπεραίνουμε ότι μεγάλο μέρος της κινάσης χάνεται μετά τη μείωση της αλατότητας και την

υπερφυγοκέντρωση, μαζί με τις ιστόνες που αυτό-καθιζάνουν σε συνθήκες χαμηλής ιοντικής ισχύος (βλ. εικ 3.5 Β). Για αυτό το λόγο, το πείραμα επαναλήφθηκε με εκχύλισμα αλατότητας 300mM (εικ 3.5 Γ), αλλά, ακόμη και υπό αυτές τις συνθήκες, δεν διαπιστώσαμε αλληλεπίδραση της κινάσης Haspin με την HP1.



Εικ 3.5 Διερεύνηση αλληλεπίδρασης της ενδογενούς πρωτεϊνικής κινάσης Haspin με την HP1β πρωτεΐνη. (Α) Δοκιμασίες συγκατακρήμνισης (Pull down) με εκχύλισμα NEPH ερυθροκυττάρων όρνιθας. Το εκχύλισμα έχει απαλλαχθεί από τις ενδογενείς ιστόνες (βλ. προηγούμενες εικόνες). Η διαδρομή (HP1β) δείχνει ένα SDS-PAGE/Coomassie blue προφίλ της HP1, ενώ οι επόμενες το προφίλ των HP1 ή gst πρωτεϊνών ακινητοποιημένων σε σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης μετά από επώαση με το εκχύλισμα. Στις δύο τελευταίες διαδρομές φαίνεται το προφίλ του εκχυλίσματος παρουσία (E300) ή απουσία (E100) των ενδογενών ιστονών. (Β) Ανοσοαποτύπωση κατά western των δειγμάτων μετά από επώαση με anti-Haspin. (Γ) Ανοσοαποτύπωση κατά western των δειγμάτων μετά από επώαση με anti-Haspin. Τα δείγματα προέρχονται από δοκιμασίες συγκατακρήμνισης (Pull down) με εκχύλισμα ερυθροκυττάρων όρνιθας, το οποίο δεν έχει απαλλαχθεί από τις ενδογενείς ιστόνες, στην ίδια λογική που περιγράφεται στην (Α).

Ακολούθησαν πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε ως πηγή κινασών εκχύλισμα μιτωτικών χρωμοσωμάτων από HeLa κύτταρα και ανοσοαποτύπωση κατά western τόσο με αντίσωμα για τη Haspin όσο και με αντισώματα για την κινάση Aurora B και τη cdc2 (βλ. εικ. 3.6)



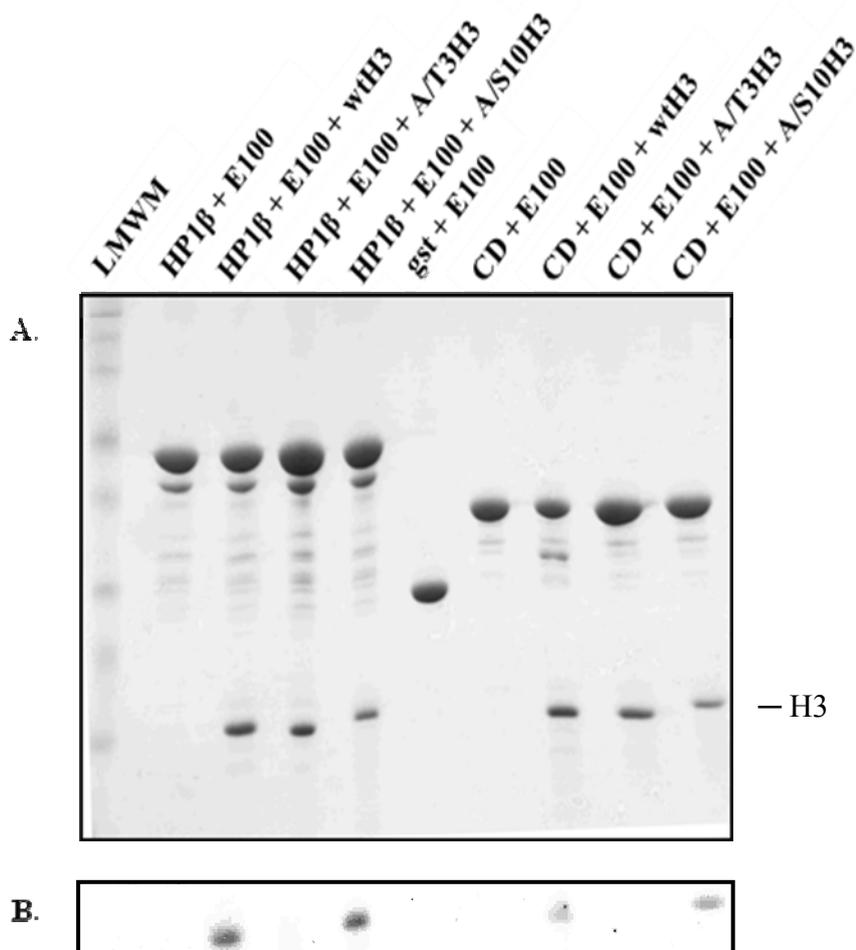
Εικ 3.6 Διερεύνηση αλληλεπίδρασης ενδογενών πρωτεϊνικών κινασών με την HP1β πρωτεΐνη. (Α) Δοκιμασίες συγκατακρήμνισης (Pull down) με εκχύλισμα NEPH από καλλιέργεια κυττάρων HeLa συγχρονισμένη στη μίτωση. Το εκχύλισμα έχει απαλλαχθεί από τις ενδογενείς ιστόνες. Η διαδρομή (HP1β) δείχνει ένα SDS-PAGE/Coomassie blue προφίλ της HP1, ενώ οι επόμενες το προφίλ των HP1 ή gst πρωτεϊνών ακινητοποιημένων σε σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης μετά από επώαση με το εκχύλισμα. Στις δύο τελευταίες διαδρομές φαίνεται το προφίλ του εκχυλίσματος απουσία (E100) ή παρουσία (E300) των ενδογενών ιστονών. (Β) Ανοσοαποτύπωση κατά western των δειγμάτων μετά από επώαση με anti-Haspin. (Γ) Ανοσοαποτύπωση κατά western των δειγμάτων μετά από επώαση με anti-Aurora B. (Δ) Ανοσοαποτύπωση κατά western των δειγμάτων μετά από επώαση με anti- cdc2.

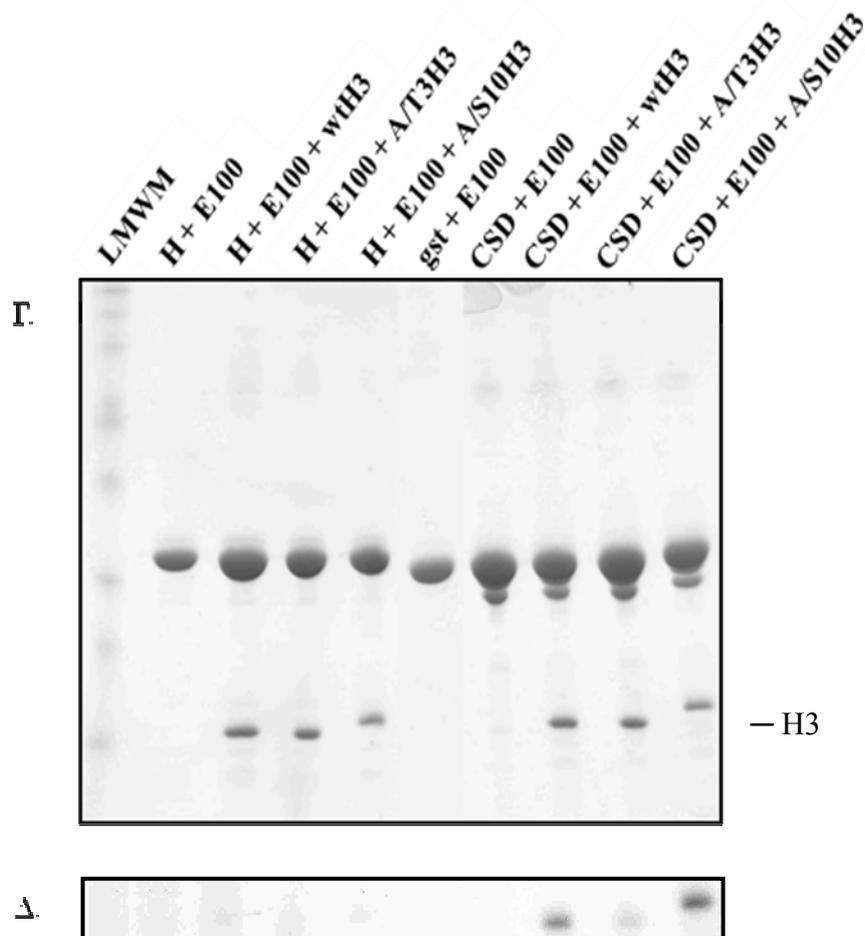
Η ανάλυση αυτή αποκάλυψε ότι η HP1β αλληλεπιδρά *in vitro* με την Aurora B, πράγμα που δεν έχει αναφερθεί έως τώρα στη βιβλιογραφία. Αντίθετα, δεν διαπιστώθηκε αλληλεπίδραση με τη Haspin ή τη cdc2.

Όπως αναφέρθηκε στην Εισαγωγή, η HP1β αποτελείται από δύο δομικές περιοχές, τον χρωμοτομέα (CD) και τον σκιδώδη χρωμοτομέα (CSD), οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους μέσω μιας περιοχής που ονομάζεται hinge (H). Τα τρία τμήματα του

γονιδίου της HP1β που κωδικοποιούν τις αντίστοιχες περιοχές κλωνοποιήθηκαν στο πλασμίδιο pGEX-6P-1. Στη συνέχεια, παρήχθησαν και απομονώθηκαν χημεικές πρωτεΐνες (CD-gst, H-gst και CSD-gst). Οι πρωτεΐνες αυτές χρησιμοποιήθηκαν σε δοκιμασίες κατακρήμνισης (pull-down) και *in vitro* φωσφορυλίωσης προκειμένου να εξετάσουμε με ποιο τμήμα της HP1β αλληλεπιδρούν οι κινάσες της H3.

Σε πρώτη φάση, ως πηγή H3 κινασών χρησιμοποιήθηκε ένα εκχύλισμα NEPH από ερυθροκύτταρα όρνιθας, όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Το εκχύλισμα αυτό επώαστηκε κατόπιν με τη χημεική πρωτεΐνη HP1β-gst καθώς και με τις CD-gst, H-gst και CSD-gst, οι οποίες είχαν ακινητοποιηθεί σε σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης. Στη συνέχεια, προστέθηκαν υποστρώματα για φωσφορυλίωση, δηλαδή wt H3, A/T3H3 και A/S10H3 (εικ 3.7).



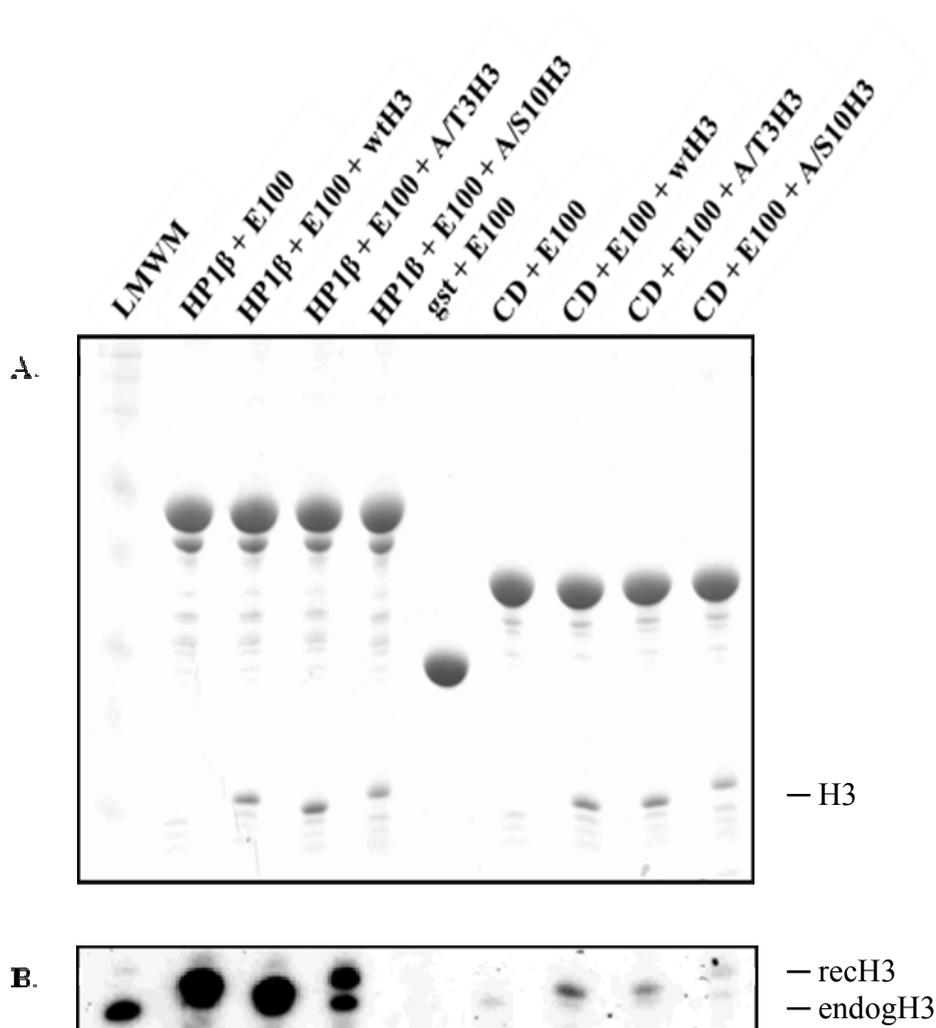


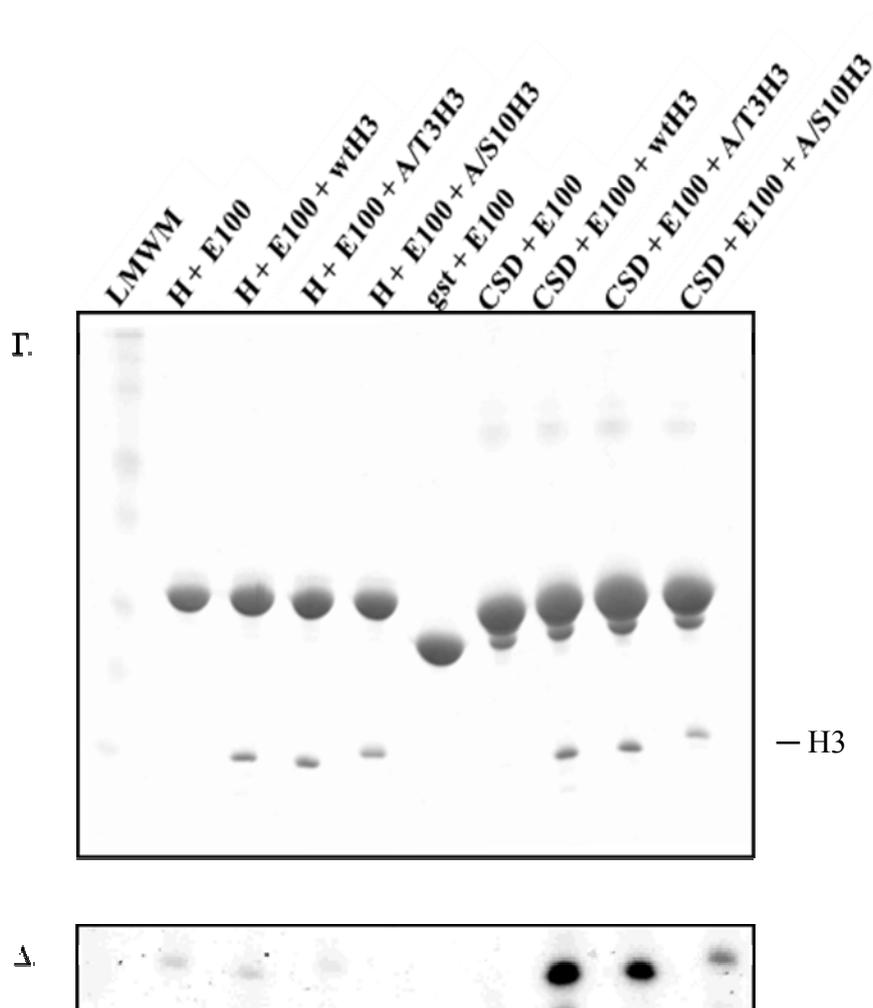
Εικ 3.7 Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης ενεργότητας μιας ενδογενούς πρωτεϊνικής κινάσης της ιστόνης H3 με τις διάφορες δομικές περιοχές της HP1β. Δοκιμασίες συγκατακρήμνισης (Pull down)/*in vitro* φωσφορυλίωσης με εκχύλισμα NEPH ερυθροκυττάρων όρνιθας. Στις διαδρομές φαίνονται τα SDS-PAGE/Coomassie blue προφίλ των δειγμάτων. (Α) Το εκχύλισμα επώαστηκε με ακέραια HP1β-gst πρωτεΐνη και την CD-gst ακινητοποιημένες σε σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης. Το υλικό που συγκατακρημνίστηκε επώαστηκε σε δεύτερη φάση με ^{32}P -ATP και προστέθηκαν εξωγενώς ιστόνες (wtH3, A/T3H3 και A/S10H3). Τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. (Β) Προφίλ αυτοραδιογραφίας, στο οποίο φαίνεται το σήμα της φωσφορυλιωμένης wtH3 και της και A/S10H3, ενώ η A/T3H3 δεν φωσφορυλιώνεται. (Γ) Το εκχύλισμα επώαστηκε με H-gst πρωτεΐνη και την CSD-gst ακινητοποιημένες σε σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης. Το υλικό που συγκατακρημνίστηκε επώαστηκε σε δεύτερη φάση με ^{32}P -ATP και προστέθηκαν εξωγενώς ιστόνες (wtH3, A/T3H3 και A/S10H3). Τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. (Δ) Προφίλ αυτοραδιογραφίας, στο οποίο φαίνεται το σήμα της φωσφορυλιωμένης wtH3 και της και A/S10H3, ενώ η A/T3H3 δεν φωσφορυλιώνεται. Η κινάση ή οι κινάσες δεν φαίνεται να αλληλεπιδρούν με την H-gst, αλλά αλληλεπιδρούν με την CSD-gst.

Από τα παραπάνω πειράματα διαπιστώθηκε ότι η κινάση που συγκατακρημνίζεται με την HP1β φωσφορυλιώνει, όντως, μόνο την T3 (στην εικόνα βλέπουμε

φωσφορυλίωση τόσο τη wtH3 όσο και της A/S10H3, ενώ δεν φωσφορυλιώνεται η A/T3H3). Η κινάση αυτή φαίνεται ότι συνδέεται κυρίως στο CSD της HP1β, σε μικρότερο βαθμό στο CD και καθόλου στη H περιοχή της HP1β.

Η ίδια σειρά πειραμάτων πραγματοποιήθηκε και με χρωματινικό εκχύλισμα HeLa κυττάρων συγχρονισμένων στη μίτωση, όπως έχει ήδη περιγραφεί. Το εκχύλισμα αυτό επώαστηκε κατόπιν με τη χμαιοική πρωτεΐνη HP1β-gst καθώς και με τις CD-gst, H-gst και CSD-gst, όπως προηγουμένως. Στη συνέχεια, προστέθηκαν ως υποστρώματα για φωσφορυλίωση η wt H3, η A/T3H3 και η A/S10H3 (εικ 3.8).



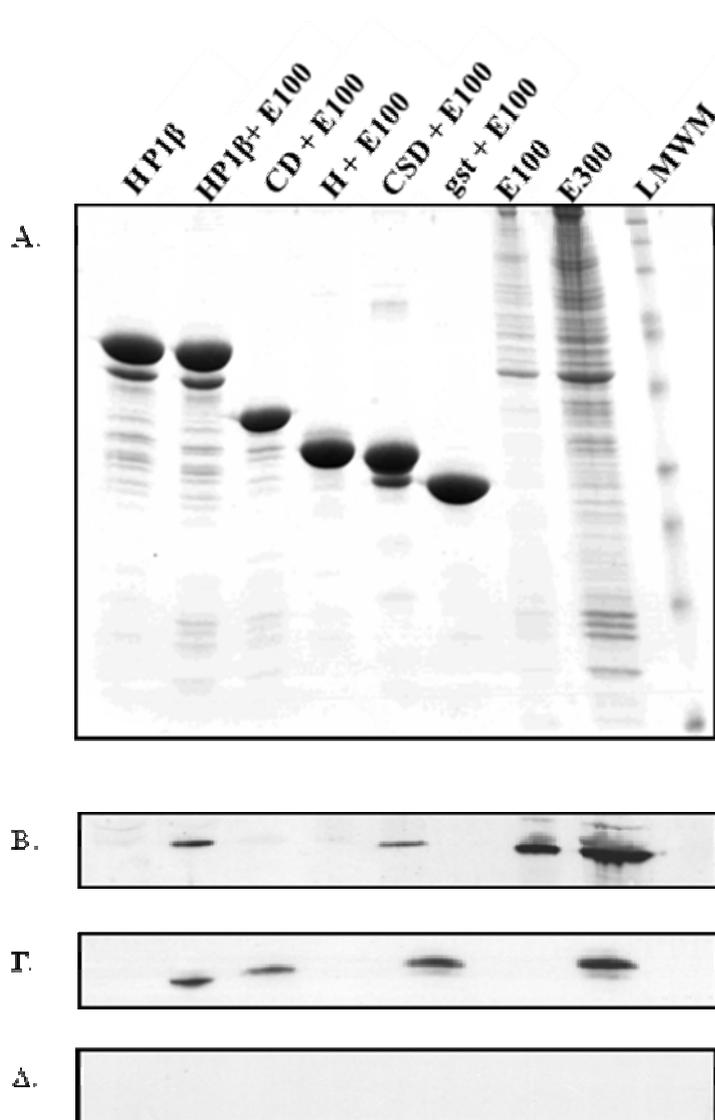


Εικ 3.8 Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης ενεργότητας μιας ενδογενούς πρωτεϊνικής κινάσης της ιστόνης H3 με τις διάφορες δομικές περιοχές της HP1β. Δοκιμασίες συγκατακρήμνισης (Pull down)/*in vitro* φωσφορυλίωσης με εκχύλισμα χρωματίνης από καλλιέργεια κυττάρων HeLa συγχρονισμένη στη μίτωση. Στις διαδρομές φαίνονται τα ηλεκτροφορητικό προφίλ των δειγμάτων. (Α) Το εκχύλισμα επώαστηκε με HP1β-gst πρωτεΐνη και την CD-gst ακινητοποιημένες σε σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης. Το υλικό που συγκατακρημνίστηκε επώαστηκε σε δεύτερη φάση με ^{32}P -ATP και προστέθηκαν εξωγενώς ιστόνες (wtH3, A/T3H3 και A/S10H3). Τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Η αλληλεπίδραση της κινάση ή των κινασών είναι πολύ πιο έντονη με την ακέραια HP1 σε σχέση με αυτή με την CD. (Β) Προφίλ αυτοραδιογραφίας, στο οποίο φαίνεται το σήμα των φωσφορυλιωμένων μορφών της H3 (wtH3, A/S10H3, A/T3H3). (Γ) Το εκχύλισμα επώαστηκε με H-gst πρωτεΐνη και την CSD-gst ακινητοποιημένες σε σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης. Το υλικό που συγκατακρημνίστηκε επώαστηκε σε δεύτερη φάση με ^{32}P -ATP και προστέθηκαν εξωγενώς ιστόνες (wtH3, A/T3H3 και A/S10H3). Τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. (Δ) Προφίλ αυτοραδιογραφίας, στο οποίο φαίνεται το σήμα των φωσφορυλιωμένων μορφών της H3 (wtH3, A/S10H3, A/T3H3). Η κινάση ή οι κινάσες δεν φαίνεται να αλληλεπιδρούν με την H-gst, αλλά αλληλεπιδρούν με την CSD-gst.

Παρατηρήσαμε ότι μία ή περισσότερες κινάσες που φωσφορυλιώνουν την H3 συγκατακρημνίζονται με την HP1β και μάλιστα με την CSD. Με την περιοχί

φαίνεται να αλληλεπιδρά *in vitro* η Aurora B, αφού παρατηρείται σημαντική μείωση της φωσφορυλίωσης στην A/S10H3 στα δείγματα με την CSD.

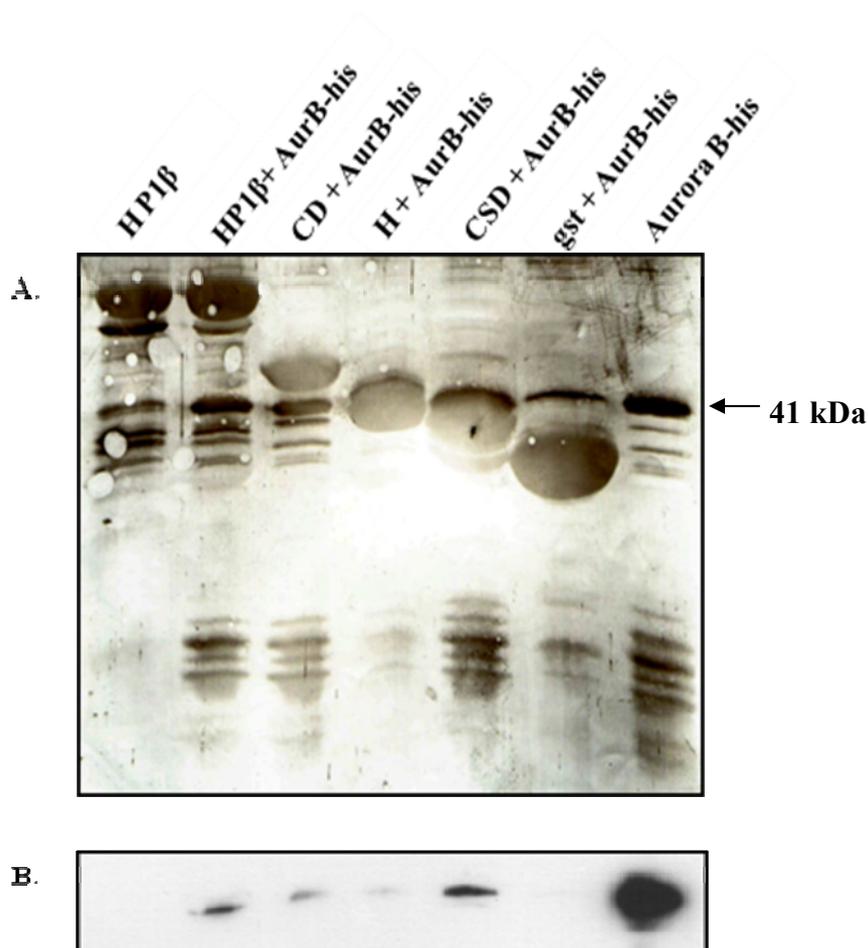
Προς επιβεβαίωση του αποτελέσματος αυτού, πραγματοποιήθηκε ανάλυση με ανοσοαποτύπωση κατά western. Το αντίστοιχο πείραμα έγινε τόσο σε συνθήκες αλάτωσης 300mM (εικ 3.9 Β) όσο και σε συνθήκες αλατότητας 150mM (εικ 3.9 Γ). Για περαιτέρω επαλήθευση πραγματοποιήθηκε επίσης μια δοκιμασία με εκχύλισμα NEPH από ερυθροκύτταρα όρνιθας που δεν διαθέτουν Aurora B, αφού βρίσκονται στην G0 φάση του κυτταρικού κύκλου.



Εικ 3.9 Διερεύνηση αλληλεπίδρασης της ενδογενούς Aurora B κινάσης με τις διάφορες δομικές περιοχές της HP1β (προηγούμενη σελίδα). (Α) Δοκιμασίες συγκατακρήμνισης (Pull down) με εκχύλισμα NEPH από καλλιέργεια κυττάρων HeLa συγχρονισμένη στη μίτωση. Το εκχύλισμα έχει απαλαχθεί από τις ενδογενείς ιστόνες. Η διαδρομή (HP1β) δείχνει ένα ηλεκτροφορητικό προφίλ της HP1, ενώ οι επόμενες το προφίλ των HP1, των τριών δομικών περιοχών της HP1 (CD, H, CSD) ή της *gst* ακινητοποιημένων σε σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης μετά από επώαση με το εκχύλισμα. Στις δύο τελευταίες διαδρομές φαίνεται το προφίλ του εκχυλίσματος απουσία (E100) ή παρουσία (E300) των ενδογενών ιστονών. (Β) Ανοσοαποτύπωση κατά western των δειγμάτων μετά από επώαση με anti-Aurora B. Η δοκιμασία συγκατακρήμνισης (Pull down) έχει γίνει σε συνθήκες αλατότητας 300mM. Στο πείραμα αυτό φαίνεται η *in vitro* αλληλεπίδραση της Aurora B με την HP1β και την CSD περιοχή. (Γ) Ανοσοαποτύπωση κατά western των δειγμάτων μετά από επώαση με anti-Aurora B. Η δοκιμασία συγκατακρήμνισης (Pull down) έχει γίνει σε συνθήκες αλατότητας 150mM. Στο πείραμα αυτό φαίνεται η *in vitro* αλληλεπίδραση της Aurora B με την HP1β, την CSD περιοχή, αλλά και τη CD. (Δ) Ανοσοαποτύπωση κατά western των δειγμάτων μετά από επώαση με anti-Aurora B. Στις δοκιμασίες συγκατακρήμνισης (Pull down) έχει χρησιμοποιηθεί εκχύλισμα NEPH ερυθροκυττάρων όρνιθας. Η Aurora B δεν εκφράζεται στα κύτταρα αυτά, αφού βρίσκονται στην G0 φάση.

Στο παραπάνω πείραμα επιβεβαιώθηκε η αλληλεπίδραση της Aurora B τόσο με την ακέραια HP1β όσο και με την περιοχή της CSD. Στην περίπτωση όμως που το πείραμα πραγματοποιούνταν σε λιγότερο «απαιτητικές» συνθήκες (150mM αλατότητα) παρατηρούμε αλληλεπίδραση της κινάσης και με το CD της HP1 (εικ 3.9 Γ).

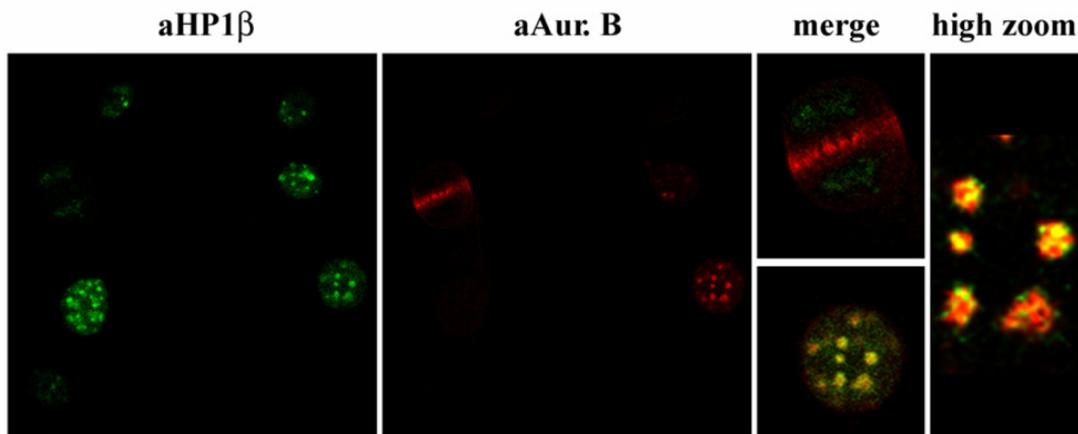
Σε ένα επόμενο βήμα, επιχειρήσαμε να διερευνήσουμε εάν η αλληλεπίδραση της Aurora B με την HP1β είναι έμμεση ή άμεση. Για να απαντηθεί αυτό το ερώτημα παρήχθη και απομονώθηκε χμαιρική Aurora B με έξι ιστιδίνες στο αμινοτελικό της άκρο (Aurora B-his). Η πρωτεΐνη αυτή επώαστηκε με HP1β-*gst* καθώς και με τις CD-*gst*, H-*gst* και CSD-*gst*, οι οποίες είχαν ακινητοποιηθεί σε σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης. Το αντίστοιχο πείραμα πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες αλατότητας 300mM και εκτιμήθηκε μετά από western με αντισώματα κατά της Aurora B (εικ 3.10).



Εικ 3.10 Διερεύνηση αλληλεπίδρασης της χιμαιρικής Aurora B-his κινάσης με τις διάφορες δομικές περιοχές της HP1β-gst. (A) Δοκιμασίες συγκατακρήμνισης (Pull down) με εκχύλισμα NEPH από καλλιέργεια κυττάρων HeLa συγχρονισμένη στη μίτωση. Το εκχύλισμα έχει απαλλαχθεί από τις ενδογενείς ιστόνες. Η εικόνα δείχνει μια μεμβράνη σελοουλόζης χρωσμένη με μελάνη. Στη διαδρομή (HP1β) φαίνεται το προφίλ της HP1, ενώ στις επόμενες το προφίλ των HP1, των τριών δομικών περιοχών της HP1 (CD, H, CSD) ή της gst ακινητοποιημένων σε σφαιρίδια γλουταθειόνης μετά από επώαση με το εκχύλισμα. Στην τελευταία διαδρομή φαίνεται το προφίλ της Aurora B-his. (B) Ανοσοαποτύπωση κατά western των δειγμάτων μετά από επώαση με anti-Aurora B. Στο πείραμα αυτό φαίνεται η *semi in vivo* αλληλεπίδραση της Aurora B με την HP1β και την CSD περιοχή.

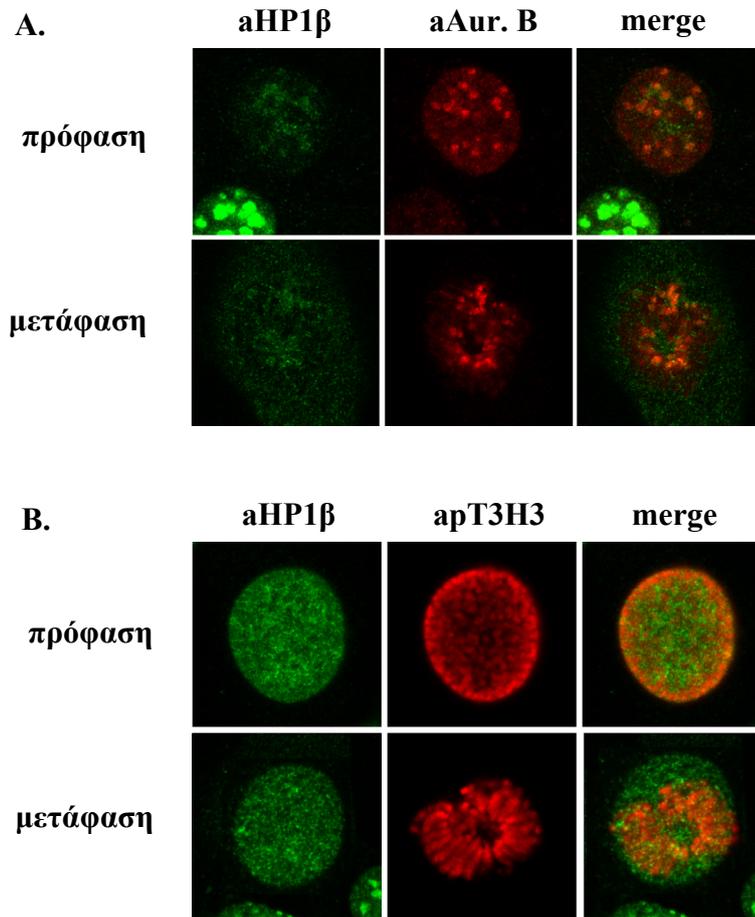
Όντως, από το πείραμα αυτό είδαμε ότι η Aurora B αλληλεπιδρά άμεσα με την ολόκληρη HP1, αλλά και με την CSD, λιγότερο με την CD και σχεδόν καθόλου με το H.

Προκειμένου να διαπιστωθεί η *in vivo* αλληλεπίδραση της Aurora B με την HP1β πραγματοποιήσαμε μορφολογικά πειράματα, χρησιμοποιώντας κύτταρα ποντικού (C127), στα οποία οι εστίες της ετεροχρωματίνης είναι πιο διακριτές και ανιχνεύσαμε τα G2/M κύτταρα με αντίσωμα για την HP1β και την Aurora B. Στη μεσόφαση η HP1β εντοπίζεται σε εστίες ετεροχρωματίνης, ενώ στην αρχή της G2 φάσης αρχίζει να εκφράζεται η Aurora B. Παρατηρήσαμε ότι οι δύο πρωτεΐνες συνεντοπίζονται στις εστίες της ετεροχρωματίνης στην G2 φάση (εικ. 3.11).



Εικ. 3.11 Χρώση επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων μαστικού αδένου από ποντικό (C127). Ευρύ πεδίο κυττάρων χρωσμένων με το αντίσωμα έναντι της HP1β (πράσινο) (aHP1β) και το αντίσωμα έναντι της Aurora B (κόκκινο) (aAur. B) καθώς και σύνθεση των δύο προτύπων (merge). Επιλεγμένη μεγέθυνση ετεροχρωματινικών εστιών (high zoom).

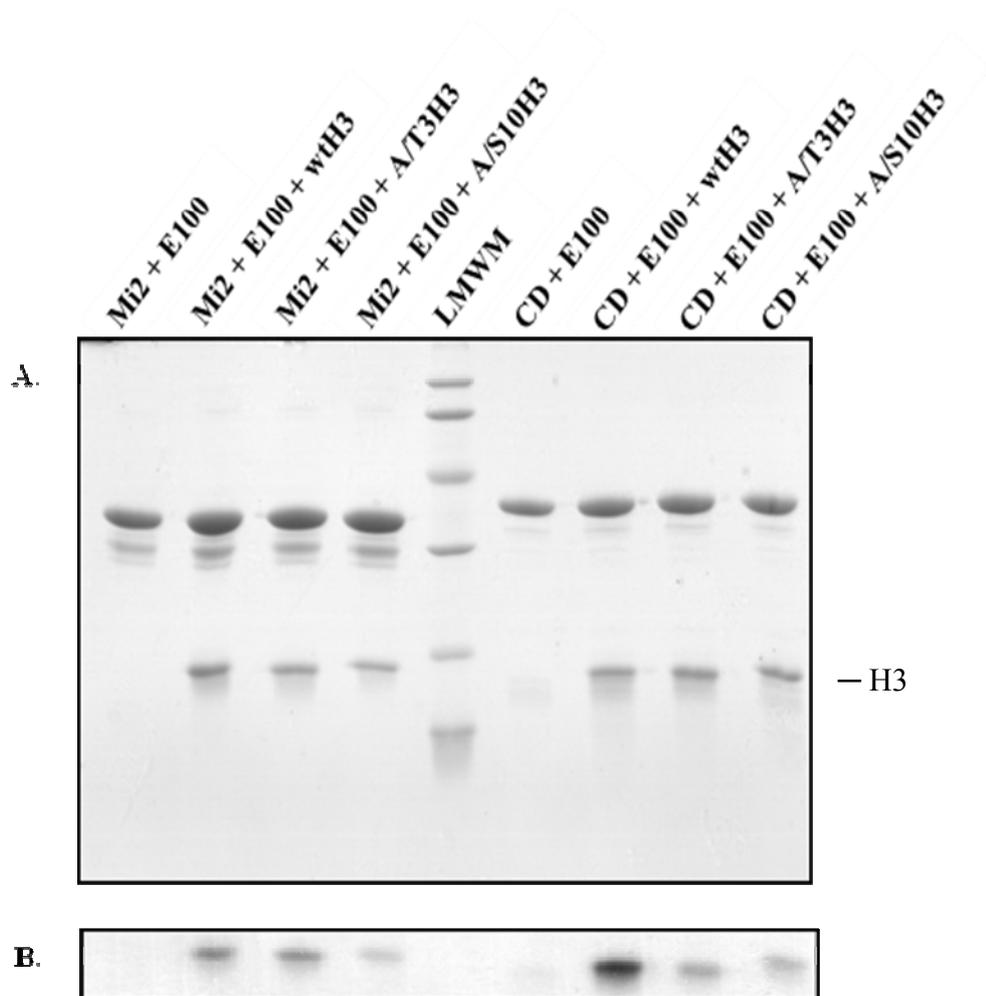
Στην εικόνα 3.12 (A) παρατηρήσαμε με αντίσωμα για την HP1β και την Aurora B την κατανομή των δύο πρωτεϊνών στις φάσεις της πρόφασης και της ανάφασης. Στην πρόφαση η HP1β έχει αποσυνδεθεί από τη χρωματίνη και βρίσκεται διάχυτη σε όλο τον πυρήνα, ενώ η Aurora B εντοπίζεται στα χρωμοσώματα. Στη μετάφαση η HP1β παραμένει διάχυτη στον πυρήνα, ενώ η Aurora B συγκεντρώνεται στα κεντρομερίδια. Στην εικόνα 3.12 (B) βλέπουμε κύτταρα στη φάση της πρόφασης και της μετάφασης χρωσμένα με το αντίσωμα έναντι της HP1β και το αντίσωμα έναντι της φωσφορυλιωμένης T3H3. Η φωσφορυλιωμένη T3H3 εντοπίζεται στα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα στην πρόφαση και στην περιφέρεια του πυρήνα, ενώ στη μεσόφαση συγκεντρώνεται στα κεντρομερίδια.

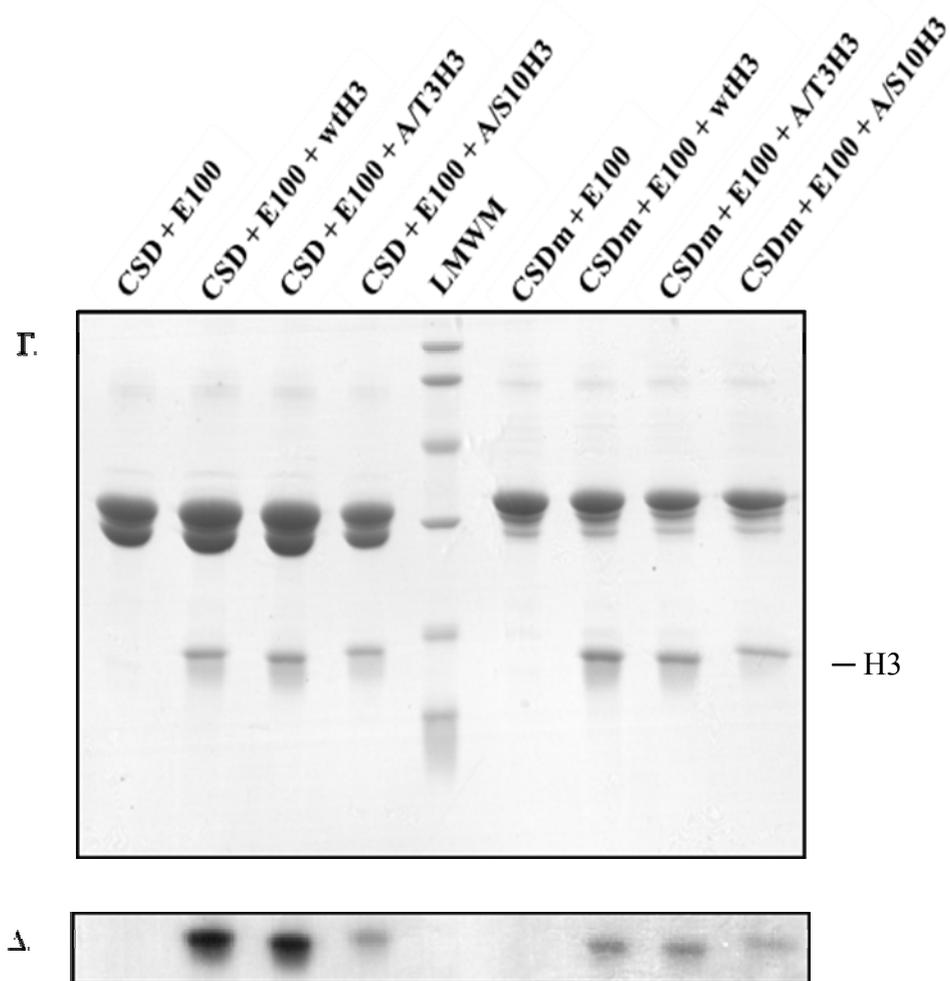


Εικ. 3.12 Χρώση επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων μαστικού αδένου από ποντικό (C127). **(A)** Κύτταρα C127 στη φάση της πρόφασης και της μετάφασης χρωσμένα με το αντίσωμα έναντι της HP1β (πράσινο) (*aHP1β*) και το αντίσωμα έναντι της Aurora B (κόκκινο) (*aAur. B*) καθώς και σύνθεση των δύο προτύπων (*merge*). **(B)** Κύτταρα C127 στη φάση της πρόφασης και της μετάφασης χρωσμένα με το αντίσωμα έναντι της HP1β (πράσινο) (*aHP1β*) και το αντίσωμα έναντι της φωσφορυλιωμένης T3 της H3 (κόκκινο) (*apT3H3*) καθώς και σύνθεση των δύο προτύπων (*merge*).

Όπως ήδη αναφέρθηκε στο πείραμα που απεικονίζεται στην εικ 3.9 Γ, η Aurora B αλληλεπιδρά με την CD σε συνθήκες μικρότερης αλατότητας (150mM). Δομικά, η ουσιαστική διαφορά των CD και CSD είναι μία επιπλέον α-έλικα στη δομή της CSD. Έτσι, στο πλασμίδιο pGEX-6P-1 που φέρει το CSD τμήμα της HP1β, αποκόψαμε την α-έλικα από την CSD και παρασκευάσαμε μια μεταλλαγμένη μορφή, δηλαδή μια πρωτεΐνη πολύ συγγενική δομικά της CD, την CSD delta α1 (CSDm). Επιπλέον, εκφράσαμε τον χρωμοτομέα της πρωτεΐνης Mi2 (Mi2-gst). Ακολούθησαν διαδικασίες *in vitro* φωσφορυλίωσης με αλατούχο εκχύλισμα χρωμοσωμάτων μιτωτικών

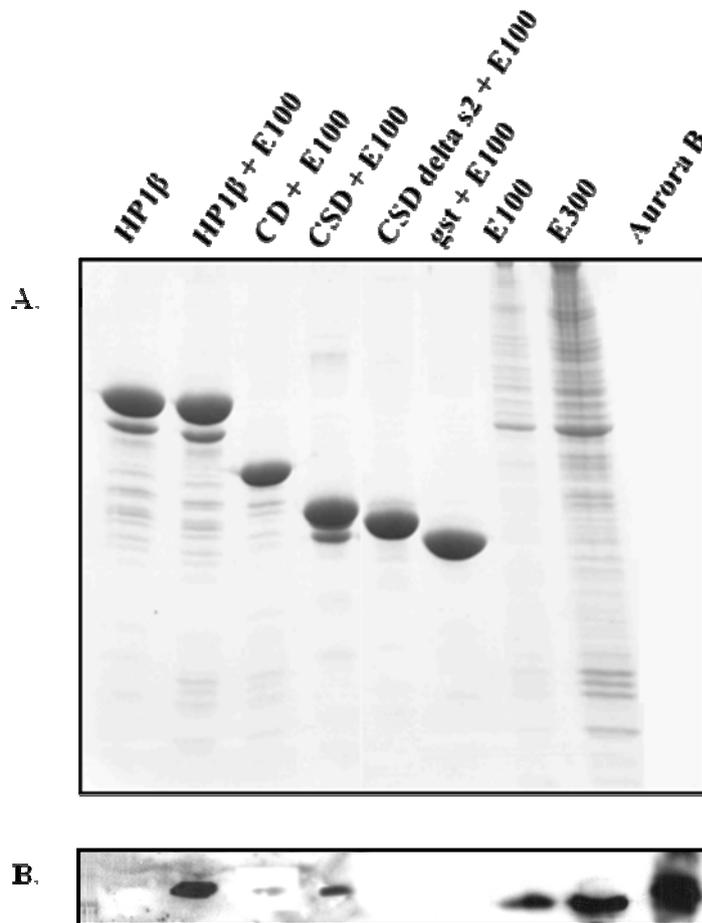
κυττάρων, όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Το εκχύλισμα αυτό επωάστηκε κατόπιν με τη χιμαιρική πρωτεΐνη CSD delta α 1-gst (CSDm) και την Mi2-gst καθώς και με τις CD-gst και CSD-gst, οι οποίες είχαν ακινητοποιηθεί σε σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης (εικ 3.13).





Εικ 3.13 Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης ενεργότητας ενδογενών πρωτεϊνικών κινασών της ιστόνης H3 με CD και CSD περιοχές της HP1β, καθώς και τη μεταλλαγμένη CSD delta α1 (CSDm) και την Mi2. Δοκιμασίες συγκατακρήμνισης (Pull down)/*in vitro* φωσφορυλίωσης με εκχύλισμα NEPH από καλλιέργεια κυττάρων HeLa συγχρονισμένη στη μίτωση. Στις διαδρομές φαίνονται τα ηλεκτροφορητικά προφίλ των δειγμάτων. (Α) Το εκχύλισμα επώαστηκε με την Mi2-gst και την CD-gst ακινητοποιημένες σε σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης. Το υλικό που συγκατακρημνίστηκε επώαστηκε σε δεύτερη φάση με ^{32}P -ATP και προστέθηκαν εξωγενώς ιστόνες (wtH3, A/T3H3 και A/S10H3). Τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. (Β) Προφίλ αυτοραδιογραφίας, στο οποίο φαίνεται το σήμα των φωσφορυλιωμένων μορφών της H3 (wtH3, A/S10H3, A/T3H3) αισθητά πιο μειωμένο συγκρινόμενο με τα δείγματα CSD-gst που απεικονίζονται στο (Γ). (Γ) Το εκχύλισμα επώαστηκε με την CSD-gst και την CSDm-gst ακινητοποιημένες σε σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης. Το υλικό που συγκατακρημνίστηκε επώαστηκε σε δεύτερη φάση με ^{32}P -ATP και προστέθηκαν εξωγενώς ιστόνες (wtH3, A/T3H3 και A/S10H3). Τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. (Δ) Προφίλ αυτοραδιογραφίας, στο οποίο φαίνεται το σήμα των φωσφορυλιωμένων μορφών της H3 (wtH3, A/S10H3, A/T3H3). Το σήμα της φωσφορυλίωσης είναι αισθητά πιο μειωμένο στα δείγματα CSDm-gst σε σχέση με αυτά με το CSD-gst.

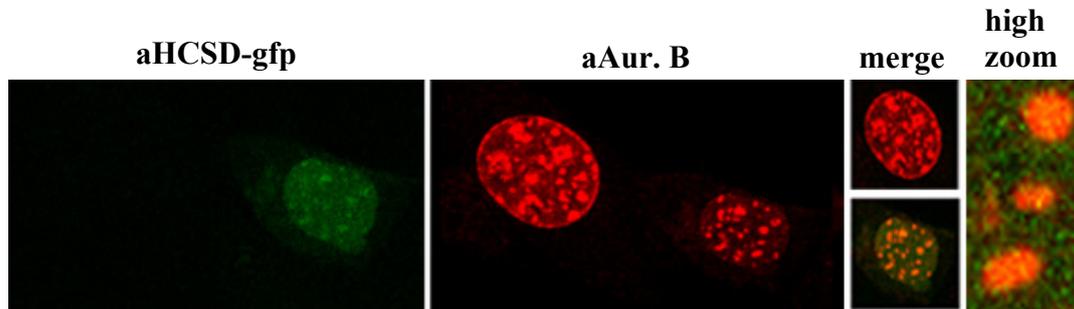
Εκχύλισμα από μιτωτικά χρωμοσώματα επώαστηκε με τη χιμαιρική πρωτεΐνη HP1β-gst καθώς και με τις CD-gst, CSD-gst και την CSD delta α1-gst (CSDm) και αναλύθηκε με αποτύπωση κατά western με το αντίσωμα για την Aurora B (εικ 3.14).



Εικ 3.14 Διερεύνηση αλληλεπίδρασης της ενδογενούς Aurora B κινάσης με τις διάφορες δομικές περιοχές της HP1β. (A) Δοκιμασίες συγκατακρήμνισης (Pull down) με εκχύλισμα NEPH από καλλιέργεια κυττάρων HeLa συγχρονισμένη στη μίτωση. Το εκχύλισμα έχει απαλλαχθεί από τις ενδογενείς ιστόνες. Η διαδρομή (HP1β) δείχνει ένα ηλεκτροφορητικό προφίλ της HP1, ενώ οι επόμενες το προφίλ των HP1, των δύο εκ των τριών δομικών περιοχών της HP1 (CD, CSD), της μεταλλαγμένης CSDm και της gst ακινητοποιημένων σε σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης μετά από επώαση με το εκχύλισμα. Στις τρεις τελευταίες διαδρομές φαίνεται το προφίλ του εκχυλίσματος απουσία (E100) ή παρουσία (E300) των ενδογενών ιστονών, καθώς και η Aurora B-his. (B) Ανοσοαποτύπωση κατά western των δειγμάτων μετά από επώαση με anti-Aurora B.

Παρατηρήσαμε ότι η Aurora B αλληλεπιδρά κυρίως με την ακέραια HP1 αλλά και με την CSD, όπως ήδη έχουμε δει, ενώ δεν αλληλεπιδρά με την CD ούτε και με τη μεταλλαγμένη μορφή της CSD, την CSD delta α1. Φαίνεται δηλαδή ότι αυτή η δομική διαφορά στις δύο περιοχές (domains) της HP1, η επιπλέον α1 έλικα του CSD, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση της HP1 με την κινάση.

Στη συνέχεια διαμολύναμε τα κύτταρα ποντικού (C127) με το πλασμιδιακό DNA που εκφράζει τμήμα της χιμαιρικής πρωτεΐνης HP1β-egfp (HCSD-egfp) και ανιχνεύσαμε τα κύτταρα με αντίσωμα έναντι της Aurora B (εικ 3.15).



Εικ. 3.15 Η *de novo* ενσωμάτωση του σκιάδους χρωμοτομέα της HP1 σε παροδικά διαμολυσμένα κύτταρα ποντικού. Αντιπροσωπευτικοί φαινότυποι κυττάρων C127 κατόπιν διαμόλυνσης με HCSD-gfp (πράσινο) και χρώσης με το αντίσωμα έναντι της Aurora B (κόκκινο) (*aAur. B*) καθώς και σύνθεση των δύο προτύπων (*merge*). Επιλεγμένη μεγέθυνση ετεροχρωματινικών εστιών (*high zoom*).

Παρατηρούμε ότι στο διαμολυσμένο κύτταρο το πρότυπο κατανομής της Aurora B είναι ίδιο με το κύτταρο που δεν είναι διαμολυσμένο. Επομένως η υπερέκφραση του σκιάδους χρωμοτομέα της HP1 δεν οδηγεί σε απομάκρυνση της Aurora B από τις χρωματινικές εστίες.

Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στη διερεύνηση και το χαρακτηρισμό αλληλεπιδράσεων της ετεροχρωματινικής πρωτεΐνης 1 (HP1) με πρωτεϊνικές κινάσες που φωσφορυλιώνουν την ιστόνη H3. Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου είχε ανιχνευθεί μια τέτοια κινάση με δοκιμασίες συγκατακρήμνισης με την HP1β. Διαπιστώθηκε ότι η εν λόγω κινάση είναι υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση της ιστόνης H3 στην θρεονίνη 3 και δείχτηκε ότι η παρουσία της H3 κινάσης στο HP1β κατακρήμνισμα βασίζεται στην αλληλεπίδρασή της με την ίδια την HP1β και όχι στη σύνδεση της με τα νουκλεοσώματα που συναπομονώνονται (Polioudaki et al., 2004). Ένα χρόνο αργότερα η ερευνητική ομάδα του M.G. Higgins ανακάλυψε ότι μια κινάση υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση της T3H3 είναι η Haspin (Dai et al., 2005). Η Haspin εντοπίζεται στον πυρήνα των μεσοφασικών κυττάρων, ενώ στη μίτωση συνδέεται με τα χρωμοσώματα και φωσφορυλιώνει τη θρεονίνη 3 (Dai et al., 2005). Τα επίπεδα του mRNA της Haspin είναι υψηλότερα στους ανθρώπινους όρχεις καθώς και σε όρχεις ποντικών, ενώ χαμηλότερα επίπεδα διαπιστώθηκαν στους σωματικούς ιστούς (Higgins, 2001a).

Για να διερευνήσουμε περαιτέρω το κατά πόσο η HP1 συνδέεται με μία ή περισσότερες της μίας κινάσες, αρχικά πραγματοποιήσαμε δοκιμασίες *in vitro* φωσφορυλίωσης χρησιμοποιώντας ως «πηγή» κινασών διάφορα κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα (αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται) ή εκχυλίσματα περιφερικής ετεροχρωματινής (NEPH-Nuclear Envelope-Peripheral-Heterochromatin) από διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Δείξαμε ότι η H3 αποτελεί στόχο κινασών που είναι συνδεδεμένες με τα μιτωτικά χρωμοσώματα ή την περιφερική ετεροχρωματινή G0 κυττάρων, αλλά όχι κυττάρων που βρίσκονται σε άλλα στάδια της μεσόφασης (λ.χ. G1, S, G2)

Επεκτείνοντας τη μελέτη, με χρήση τόσο της wtH3 όσο και της μεταλλαγμένης μορφής της A/T3H3, διαπιστώσαμε ότι, όταν ως πηγή της κινάσης χρησιμοποιούμε εκχύλισμα NEPH από κύτταρα HeLa συγχρονισμένα στη μίτωση, η HP1β συνδέεται με μία ή περισσότερες H3 κινάσες που φωσφορυλιώνουν την H3 σε άλλα κατάλοιπα (εκτός της T3). Όπως είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία, η H3 φωσφορυλιώνεται στη μίτωση από τις κινάσες Haspin (φωσφορυλίωση της T3), Aurora B (φωσφορυλίωση της S10 και S28) και Dlk/Zip (φωσφορυλίωση της T11) (Hendzel et al., 1997, Hsu et al., 2000, De Souza et al., 2000, Giet and Glover, 2001, Preuss et al., 2003, Goto et al., 2002, Grosio et al., 2002, Hake, et al., 2005). Πρόσφατα αναφέρθηκε μία ακόμα

κινάση (Aihara et al., 2004), η VRK1, με αμφιλεγόμενη όμως δράση όσον αφορά στη φωσφορυλίωση της T3 και της S10 της H3 (Higgins, 2009).

Μια προσέγγιση που χρησιμοποιήσαμε, προκειμένου να ταυτοποιήσουμε την ή τις κινάσες που αλληλεπιδρούν με την HP1, ήταν η ανοσοαποτύπωση κατά western. Αντικειμενική δυσκολία παρουσιάστηκε από το γεγονός το μόνο αντίσωμα για την κινάση Haspin που ήταν διαθέσιμο δεν είχε την απαιτούμενη ευαισθησία. Περαιτέρω, η απομάκρυνση των ενδογενών ιστονών μετά από προσαρμογή του άλατος στα 150mM NaCl και υπερφυγοκέντρηση είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια, σε κάποιο βαθμό, της Haspin. Παρά τους περιορισμούς, τα πειράματά μας έδειξαν ότι η κινάση Haspin δεν αλληλεπιδρά *in vitro* με την HP1β. Επίσης, δεν ανιχνεύθηκε αλληλεπίδραση με άλλες μιτωτικές κινάσες, όπως η cdc2.

Η T3 της H3 είναι το μόνο υπόστρωμα της Haspin που είναι γνωστό μέχρι σήμερα. Πειραματικά δεδομένα στη βιβλιογραφία όμως αφήνουν ανοιχτό το ενδεχόμενο ύπαρξης και άλλων υποστρωμάτων. Στα φυτά, το πρότυπο κατανομής της φωσφορυλίωσης της T3H3 στη μίτωση είναι αντίθετο με αυτό που παρατηρείται στα θηλαστικά (Houben et al., 2007). Η φωσφορυλίωση της T3H3 ξεκινά στην πρόφαση στην περιοχή γύρω από τα κεντρομερίδια και κατανέμεται κατά μήκος των χρωμοσωμικών βραχιόνων στην προμετάφαση (Houben et al., 2007, Caperta et al., 2008). Επίσης, παρόλο που υπάρχουν πρωτεΐνες ομόλογες της Haspin, δεν είναι γνωστό αν φωσφορυλιώνουν την T3H3 στη μίτωση. Όσον αφορά στο ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* είναι γνωστό ότι οι δύο ομόλογες πρωτεΐνης της Haspin, Alk1 και Alk2, δεν φωσφορυλιώνουν τις ιστόνες *in vitro* (Nespoli et al., 2006), ενώ δεν έχει αναφερθεί φωσφορυλίωση της T3H3 στους μύκητες. Επομένως είναι πιθανό η Haspin που εκφράζεται στα ερυθροκύτταρα των πτηνών να έχει κάποιον άλλο ρόλο και να μη φωσφορυλιώνει την T3H3. Ενδεχομένως, η φωσφορυλίωση που παρατηρούμε να επιτελείται από κάποια άλλη κινάση, η οποία αλληλεπιδρά *in vitro* με την HP1β.

Ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον εύρημα της μελέτης μας αποτέλεσε η ανίχνευση της *in vitro* αλληλεπίδρασης ανάμεσα στην HP1β και την κινάση Aurora B. Η Aurora B αποτελεί μέλος του συμπλόκου των πρωτεϊνών που χαρακτηρίζονται ως «chromosomal passenger complex» (CPC) (Adams et al., 2000). Το πρότυπο κατανομής της κινάσης αυτής παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με αυτό της Haspin

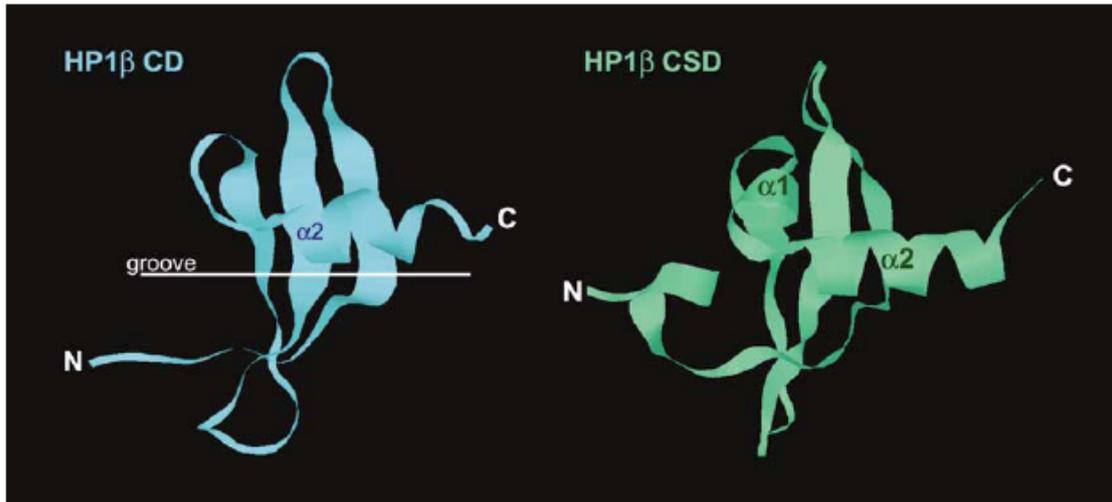
(δηλαδή, όπως η Haspin, η Aurora B φωσφορυλιώνει την H3 στη μίτωση). Κατά την έναρξη της μίτωσης, η Aurora B φωσφορυλιώνει τη S10H3 (Hsu et al., 2000, Goto et al., 2002), το γειτονικό κατάλοιπο της λυσίνης, στην τριμεθυλιωμένη μορφή της οποίας προσδένεται η HP1 (me₃K9). Η φωσφορυλίωση της S10H3 έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της συγγένειας της HP1 για την me₃K9, αποδεδειγμένα το μεγαλύτερο ποσοστό της HP1 από τη χρωματίνη. Στην τελόφαση, η αποφωσφορυλίωση της S10 οδηγεί στην εκ νέου πρόσδεση της HP1 στη χρωματίνη μέσω της σύνδεσης στην H3 (Fischle et al., 2003) .

Το ερώτημα που προέκυψε μετά την ανίχνευση αυτής της αλληλεπίδρασης ήταν με ποια περιοχή της HP1β αλληλεπιδρά η Aurora B κινάση. Οι HP1 πρωτεΐνες έχουν χαρακτηριστική δομή και αποτελούνται από τρεις δομικές περιοχές – τομείς (domains): τον χρωμοτομέα (CD) στο αμινοτελικό τμήμα της πρωτεΐνης και τον σκιάδη χρωμοτομέα (CSD) στο καρβοξυτελικό τμήμα. Οι δύο αυτοί τομείς συνδέονται από μια ευέλικτη περιοχή (hinge ή linker) (Brasher et al., 2000, Cowieson et al., 2000, Dialynas et al., 2007). Η CD συνδέεται με την me₃K9H3, ενώ η CSD είναι υπεύθυνη για το διμερισμό της πρωτεΐνης (Brasher et al., 2000) και για την αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες που φέρουν το μοτίβο PXVXL (Cowieson et al., 2002). Η περιοχή hinge δεν έχει συγκεκριμένη τρισδιάστατη δομή και υπόκειται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (ιδιαίτερα σε φωσφορυλίωση) (Badugu et al., 2005, Lomberk et al., 2006, Zhao et al., 2001), οι οποίες επηρεάζουν την υποκυτταρική εντόπιση της HP1, όπως επίσης τις αλληλεπιδράσεις και τη λειτουργία του μορίου. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι για τον εντοπισμό της HP1β στην περιοχή των κεντρομεριδίων κατά τη μεσόφαση υπεύθυνη είναι η αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης που περιλαμβάνει το CD, ενώ για την κατανομή της HP1α στο κεντρομερίδιο των μιτωτικών χρωμοσωμάτων είναι υπεύθυνο το καρβοξυτελικό της τμήμα που περιλαμβάνει το CSD και ένα τμήμα της hinge περιοχής (Hayakawa et al., 2003). Η περιοχή hinge έχει ιδιότητες που χαρακτηρίζουν τις εγγενώς εύκαμπτες πρωτεΐνες (Intrinsically disordered proteins - IDPs), οι οποίες δεν διαθέτουν συγκεκριμένη διαμόρφωση υπό φυσιολογικές συνθήκες, αλλά αποκτούν, όταν αλληλεπιδράσουν με άλλα μόρια. Επομένως, περιοχή αυτή παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς μπορεί να αποτελεί περιοχή σύνδεσης κινασών τις οποίες, πιθανόν, οδηγεί στη χρωματίνη.

Ακολούθησαν πειράματα *in vitro* φωσφορυλίωσης με συν-επώαση διάφορων περιοχών της HP1β και εκχυλισμάτων NEPH από ερυθροκύτταρα πτηνών ή χρωματινικών εκχυλισμάτων. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι τόσο μία κινάση που φωσφορυλιώνει αποκλειστικά την T3H3 στα ερυθροκύτταρα πτηνών όσο και μία ή περισσότερες κινάσες στην περίπτωση των χρωματινικών εκχυλισμάτων, αλληλεπιδρούν, πέραν της ακέραιας HP1β, κυρίως με την CSD, αλλά και σε μικρότερο βαθμό με την CD. Φαίνεται λοιπόν ότι η περιοχή CSD διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην *in vitro* αλληλεπίδραση της HP1β με H3 κινάσες. Μάλιστα, στην περίπτωση των μιτωτικών εκχυλισμάτων το σήμα της φωσφορυλιωμένης A/S10H3 ήταν πολύ χαμηλό. Η παρατήρηση αυτή υποδεικνύει την Aurora B, την κινάση που φωσφορυλιώνει την S10H3 στη μίτωση, το οποίο και επιβεβαιώσαμε με ανοσοαποτύπωση κατά western. Επιπλέον παρατηρήσαμε μικρή μείωση του σήματος τόσο της φωσφορυλιωμένης A/T3H3 όσο και της φωσφορυλιωμένης A/S10H3 στην περίπτωση του CD.

Με ανοσοαποτύπωση κατά western επιβεβαιώθηκε επίσης η *semi in vivo* αλληλεπίδραση της ανασυνδυασμένης Aurora B με την ακέραια HP1β και με την CSD.

Σε πειράματα υπό λιγότερο «απαιτητικές» συνθήκες (150mM αλατότητα) παρατηρήσαμε ότι η Aurora B αλληλεπιδρά τόσο με την περιοχή CSD όσο και με την CD. Μορφολογικά και δομικά, η ουσιαστική διαφορά των CD και CSD είναι μία επιπλέον α έλικα στη δομή της CSD.



Εικ. 4.1 Η CD (aa 10–78) περιοχή της HP1β αποτελείται από τρεις β-κλώνους που διαμορφώνουν μία β-πτυχωτή επιφάνεια στην αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης και μία α-έλικα ($\alpha 2$) στην καρβοξυτελική της περιοχή. Η ευθεία γραμμή δείχνει την υδρόφοβη αύλακα, μέσω της οποίας διαμεσολαβούνται πολλαπλές πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Η τοπολογία της HP1β CSD (aa 104–171) είναι παρόμοια με αυτή της CD με κύρια διαφορά το γεγονός ότι το CSD περιέχει ένα μικρό τμήμα που έχει διαμόρφωση α-έλικας ($\alpha 1$). Το τμήμα αυτό δεν υπάρχει στο CD (Ball et al., 1997, Brasher et al., 2000, Singh P.B. and Georgatos S.D., 2003).

Έτσι, παρασκευάσαμε μια μεταλλαγμένη μορφή της CSD-gst, την CSD del $\alpha 1$ -gst, δηλαδή μια CSD-gst πρωτεΐνη από την οποία αφαιρέσαμε την $\alpha 1$ έλικα και επαναλάβαμε τις δοκιμασίες pull-down/*in vitro* φωσφορυλίωσης με επώαση των χμαιρικών CD-gst, CSD-gst, CSD del $\alpha 1$ -gst και Mi2-gst με μιτωτικά εκχυλίσματα. Η Mi2 ανήκει στην οικογένεια των CHD συμπλόκων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, η οποία χαρακτηρίζεται από δύο διαδοχικούς χρωμοτομείς (CD) στην αμινοτελική περιοχή της καταλυτικής υπομονάδας.

Διαπιστώσαμε ότι το σήμα της φωσφορυλίωσης ήταν ανάλογο στην περίπτωση της CSD del $\alpha 1$ και του χρωμοτομέα της Mi2 και σημαντικά πιο χαμηλό σε σχέση με αυτό του CSD. Το αποτέλεσμα αυτό οδηγεί στο πιθανό συμπέρασμα ότι η επιπλέον α-έλικα του CSD διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση της HP1β με τις H3 κινάσες.

Το σύνολο των αποτελεσμάτων που παρουσιάζονται στη μελέτη μας συμβάλλουν στη διεύρυνση της αντίληψής μας για το λειτουργικό ρόλο των πρωτεϊνών του CPC στην αποδέσμευση της HP1 κατά τη μετάβαση από την G2 φάση στη μίτωση. Στο τέλος της G2 φάσης, η αρχίζει η φωσφορυλίωση της H3 στην περιοχή του κεντρομεριδίου. Παράλληλα, η HP1 αποδεσμεύεται σταδιακά από τη χρωματίνη

(Murzina et al., 1999). Οι HP1 πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με ένα πλήθος άλλων στοιχείων (βλέπε Εισαγωγή), μεταξύ των οποίων και η INCENP. Η αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης αυτής αλληλεπιδρά με την hinge περιοχή της HP1, ενώ η καρβοξυτελική με την Aurora B (Kaitna et al., 2000, Adams et al., 2001).

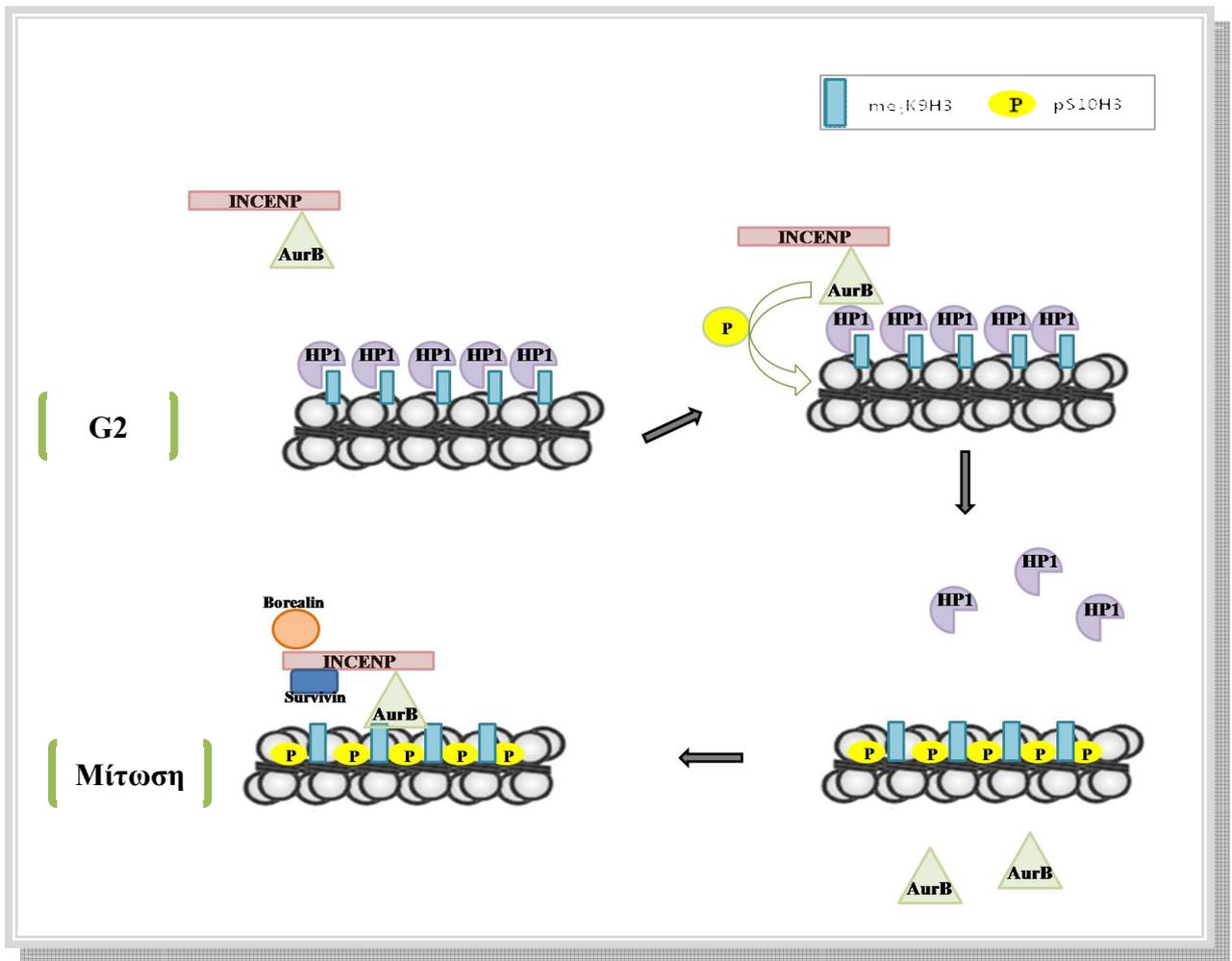
Με πειράματα ανοσοφθορισμού είδαμε ότι η HP1β και η Aurora B συνεντοπίζονται στις ετεροχρωματινικές εστίες στη G2 φάση του κυτταρικού κύκλου. Επομένως, ένα πιθανό σενάριο είναι ότι η Aurora B στρατολογείται στην περιοχή των κεντρομεριδίων από μια πρωτεΐνη (πιθανόν την INCENP) και στη συνέχεια συνδέεται παραδοικά με το CSD της HP1 (Εικ. 4.2).

Πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί προκειμένου να διασαφηνιστούν οι μηχανισμοί στόχευσης του CPC στη μίτωση. Παλαιότερες μελέτες είχαν δείξει ότι η αμινοτελική περιοχή της INCENP (συγκεκριμένα τα αμινοξέα 1-58 της ανθρώπινης INCENP) επαρκεί προκειμένου η πρωτεΐνη να συγκεντρωθεί στην περιοχή του κεντρομεριδίου (Ainsztein et al., 1998). Επιπλέον, η Survivin (μέλος του CPC) προσδένεται στην αμινοτελική περιοχή της INCENP *in vitro* και *in vivo* (Honda et al., 2003, Gassmann et al., 2004, Sessa et al., 2005, Klein et al., 2006) και εμπλέκεται στη στόχευση του CPC στα κεντρομερίδια. Πρόσφατες μελέτες προσδίδουν σημαντικό ρόλο, όσον αφορά στη συγκέντρωση του CPC στα κεντρομερίδια κατά τη μίτωση, στη φωσφορυλίωση της T3, η οποία αναγνωρίζεται από το BIR domain της Survivin (Kelly et al., 2010, Wang et al., 2010). Ρόλο στη στόχευση του CPC φαίνεται να διαδραματίζει και η Borealin, καθώς σε κύτταρα που η πρωτεΐνη έχει εξαλειφθεί η Survivin δεν προσδένεται στην INCENP (Lens et al., 2006). Τέλος, πέραν της φωσφορυλιωμένης T3H3 και άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών πιθανόν εμπλέκονται στη στόχευση του CPC στα κεντρομερίδια. Κάποιες μελέτες υποστηρίζουν ότι η φωσφορυλίωση της σερίνης 7 της CENP-A από την Aurora A στην αρχή της πρόφασης στρατολογεί την Aurora B στην εσωτερική περιοχή του κεντρομεριδίου (Zeitlin et al., 2001, Kunitoku et al., 2003). Επίσης, η INCENP προσδένεται στην ισομορφή H2A.Z (Rangasamy et al., 2003).

Εδώ πρέπει να τονίσουμε ότι ο εντοπισμός της Aurora B στη μίτωση εξαρτάται αποκλειστικά από μια μικρή αλληλουχία στην καρβοξυτελική περιοχή. Η αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης δεν είναι απαραίτητη ούτε για τον εντοπισμό ούτε για τις λειτουργίες της πρωτεΐνης στη μίτωση (Scrittore et al., 2005). Όμως τα

δεδομένα αλλάζουν όσον αφορά στον εντοπισμό της Aurora B στη G2 φάση του κυτταρικού κύκλου. Σε πρόσφατη μελέτη (Rannou et al., 2008) εξετάστηκαν ανθρώπινα κύτταρα που εξέφραζαν το αμινοτελικό τμήμα της Aurora B. Στην περίπτωση αυτή, ένα ποσοστό της πρωτεΐνης της τάξης του $84,9\% \pm 1,2\%$ εντοπίζεται στο πυρήνα. Επιπλέον, χιμαιρικές πρωτεΐνες στις οποίες η αμινοτελική περιοχή της Aurora B είχε συνδυαστεί με την καρβοξυτελική της Aurora A εντοπιζόταν στο πυρήνα σε ποσοστό $72,5\% \pm 3,4\%$. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η αμινοτελική περιοχή της ανθρώπινης Aurora B αυξάνει την πυρηνική κατανομή της κινάσης στη G2. Περαιτέρω πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν τη σημασία της καρβοξυτελικής περιοχής στη διατήρηση των Aurora πρωτεϊνών στον πυρήνα.

Καθ' όλη τη διάρκεια της μεσόφασης, η HP1 είναι συγκεντρωμένη στις περιοχές των κεντρομεριδίων μέσω της αλληλεπίδρασης του χρωμοτομέα της με την K9me₃H3 (Lachner et al., 2001, Banniser et al., 2001, Dialynas et al., 2006). Ένας πιθανός μηχανισμός είναι η συγκέντρωση της Aurora B στην HP1-CD-H3 επιφάνεια μέσω της αλληλεπίδρασής της με την HP1. Η γεινίαση αυτή έχει ως αποτέλεσμα η Aurora B να αρχίσει να φωσφορυλιώνει την H3 στην S10. Αυτή η φωσφορυλίωση οδηγεί στην αποσύνδεση της HP1 από τη χρωματίνη (Terada et al, 2006). Είναι πιθανό ότι με κάποιο μηχανισμό, η αποσύνδεση αυτή προκαλεί αλλαγή στη διαμόρφωση της HP1 με αποτέλεσμα την αποδέσμευση της Aurora B, η οποία θα συγκεντρωθεί στα κεντρομερίδια με μηχανισμούς που αναφέρθηκαν πιο πάνω. Προφανώς, περαιτέρω πειράματα χρειάζονται για να επιβεβαιωθεί η υπόθεση αυτή.



Εικ. 4.2 Σχηματική απεικόνιση του προτεινόμενου μοντέλου.

5. Συμπεράσματα

1. Η HP1β αλληλεπιδρά *in vitro* με μία πρωτεϊνική κινάση που φωσφορυλιώνει αποκλειστικά την T3H3 και εντοπίζεται σε ετεροχρωματικά εκχυλίσματα κυττάρων «ακίνητοποιημένων» στην G0 φάση (εκχυλίσματα NERH παρασκευασμένα από πυρήνες ερυθροκυττάρων όρνιθας). Η κινάση αυτή δεν φαίνεται να είναι Haspin, δηλαδή το ένζυμο που έχει χαρακτηριστεί από άλλους ως η μόνη T3H3 κινάση.
2. Η T3H3 κινάση συνδέεται κυρίως στον σκιάδη χρωμοτομέα της HP1β, σε μικρότερο βαθμό στο CD και καθόλου στη H περιοχή της HP1β.
3. Η HP1β, όταν επωάζεται με χρωμοσωμικά εκχυλίσματα κυττάρων HeLa, αλληλεπιδρά *in vitro* με ένζυμα που φωσφορυλιώνουν όλες τις μορφές και τα μεταλλάγματα της H3.
4. Μία από τις κινάσες που εντοπίζεται στα χρωμοσώματα και αλληλεπιδρά με την HP1β είναι η Aurora B, το ένζυμο που φωσφορυλιώνει την S10H3 (και σε μικρότερο βαθμό την S28H3).
5. Η Aurora B αλληλεπιδρά άμεσα με την ακέραια HP1.
6. Η Aurora B αλληλεπιδρά κυρίως με τον σκιάδη χρωμοτομέα της HP1β (CSD) και σε μικρότερο βαθμό με τον χρωμοτομέα (CD).
7. Στις παραπάνω αλληλεπιδράσεις (2, 6) ρόλο φαίνεται να παίζει η α1-έλικα που είναι παρούσα στο CSD, αλλά απουσιάζει από το CD.

6. Περίληψη

Κλάσματα πυρηνικών φακέλων περιφερικής ετεροχρωματίνης (NEPH) που συνδέονται ισχυρά στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη περιλαμβάνουν πολλά ένζυμα που τροποποιούν τις ιστόνες. Μια από αυτές τις ενεργότητες σε κύτταρα «ακινητοποιημένα» στην G0 φάση (ερυθροκύτταρα όρνιθας) προσδένεται ειδικά στην ετεροχρωματινική πρωτεΐνη 1 και φωσφορυλιώνει την ιστόνη H3 στη θρεονίνη 3 *in vitro*. Με τη χρήση ειδικού αντισώματος για την κινάση Haspin (ένζυμο που φωσφορυλιώνει την T3H3) και ανοσοαποτύπωση κατά western, δείξαμε ότι η κινάση αυτή δεν είναι Haspin.

Προκειμένου να εξακριβώσουμε αν η T3H3 αποτελεί μοναδικό στόχο αυτής της HP1-συνδεόμενης κινάσης σε κύτταρα που «διατρέχουν» τον κυτταρικό κύκλο πραγματοποιήσαμε δοκιμασίες *in vitro* φωσφορυλίωσης μετά από συγκατακρήμιση με την HP1β με εκχυλίσματα χρωματίνης από μεσοφασικά και μιτωτικά κύτταρα HeLa. Διαπιστώθηκε ότι η HP1β αλληλεπιδρά με ένζυμο που φωσφορυλιώνουν όλες τις μορφές και τα μεταλλάγματα της H3, αν και στην περίπτωση των μεσοφασικών κυττάρων, η φωσφορυλίωση της H3 είναι πολύ μικρότερης έκτασης από ότι στη μίτωση.

Για να επιβεβαιώσουμε ότι HP1β αλληλεπιδρά *in vitro* με μια από τις μιτωτικές κινάσες που είναι γνωστές από τη βιβλιογραφία, προχωρήσαμε στη διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων αυτών με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων και ανοσοαποτύπωση κατά western. Διαπιστώσαμε ότι μία από τις κυριότερες μιτωτικές κινάσες, η Aurora B (η κινάση που φωσφορυλιώνει της S10 και σε μικρότερο βαθμό την S28 στη μίτωση), αλληλεπιδρά *in vitro* με την HP1β και μάλιστα ότι η κινάση αυτή συνδέεται κυρίως στην CSD της HP1β, σε μικρότερο βαθμό στην CD και καθόλου στην hinge (H) περιοχή της HP1β. Χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες HP1β και Aurora B παρατηρήσαμε ότι η Aurora B αλληλεπιδρά άμεσα με την ακέραια HP1 κυρίως μέσω της CSD, λιγότερο μέσω της CD και σχεδόν καθόλου μέσω της περιοχής H. Με τη χρήση ενός μεταλλάγματος της HP1β, στο οποίο είχε απαλειφθεί η α2 έλικα της περιοχής CSD, είδαμε ότι αυτή η δομική διαφορά στις δύο περιοχές (domains) της HP1 (δηλαδή η επιπλέον α1 έλικα του CSD) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση της HP1 με την παραπάνω κινάση.

Summary

Study of histone modifications with the use of biochemical, biophysical and morphological methods

by Vasiliki Lazani

Nuclear envelope vesicles associated with fragments of peripheral heterochromatin were found to contain multiple histone-modifying activities. *In vitro* pull down assays revealed that one of these activities in cells arrested at G0 (chicken erythrocytes) binds specifically to heterochromatin protein 1 β and phosphorylates histone H3 at threonine 3. In a western blot analysis, Haspin kinase (which has been previously identified as the major H3T3 specific kinase) was not found to be present in the pull down precipitate.

By employing *in vitro* phosphorylation assays using HP1 precipitates of interphase and mitotic HeLa cell extracts we aimed at identifying other histone kinases potentially recruited by HP1 in distinct cell cycle phases. Moreover, we examined the possibility of other than H3T3 phosphorylation targets on the histone H3 molecule. As it turns out HP1 β interacts with enzymatic activities that phosphorylate wtH3 as well as T3- and S10-mutants derived from all cell cycle phases, although the phosphorylation is predominant in mitotic fractions.

To denote candidate interacting mitotic kinases we used specific antibodies in a western blot analysis. Interestingly, a major mitotic histone kinase, Aurora B, which phosphorylates S10H3 and S28H3 during mitosis, was found to interact with the entire HP1 molecule mainly through the CSD domain, to a lesser extent with the CD domain, while there seems to be no interaction with the hinge region. Furthermore, using recombinant proteins (HP1 and Aurora B) we showed that Aurora B interacts directly with the entire HP1 mainly through the CSD domain, less with the CD domain, while it seems to be no interaction with the hinge region. Finally, we used an HP1 mutant, where the α 2-helix of the CSD domain was eliminated, and we demonstrated that this structural difference between the CSD and the CD (i.e. the α 1-helix of the CSD domain) plays an important role in the interaction between HP1 and Aurora B.

7. Βιβλιογραφία

Abarna Thiru, Daniel Nietlispach, Helen R Mott, Mitsuru Okuwaki, Debbie Lyon, Peter R Nielsen, Miriam Hirshberg, Alain Verreault, Natalia V Murzina and Ernest D Laue. Structural basis of HP1/PXVXL motif peptide interactions and HP1 localization to heterochromatin. *EMBO J.* (2004) 23, 489 - 499

Adams RR, Wheatley SP, Gouldsworthy AM, et al. INCENP binds the Aurora-related kinase AIRK2 and is required to target it to chromosomes, the central spindle and cleavage furrow. *Curr Biol* (2000) 10:1075 – 8.

Adams RR, Maiato H, Earnshaw WC, Carmena M. Essential roles of *Drosophila* inner centromere protein (INCENP) and aurora B in histone H3 phosphorylation, metaphase chromosome alignment, kinetochore disjunction, and chromosome segregation. *J Cell Biol.* (2001) 153, 414

Aihara, H., T. Nakagawa, K. Yasui, T. Ohta, S. Hirose, N. Dhomae, K. Takio, M. Kaneko, Y. Takeshima, M. Muramatsu, and T. Ito. Nucleosomal histone kinase-1 phosphorylates H2A Thr 119 during mitosis in the early *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* (2004) 18:877–888

Ainsztein, A. M., Kandels-Lewis, S. E., Mackay, A. M. & Earnshaw, W. C. INCENP centromere and spindle targeting: identification of essential conserved motifs and involvement of heterochromatin protein HP1. *J. Cell Biol.* (1998), 143, 1763–1774

Akey CW, Luger K: Histone chaperones and nucleosome assembly. *Curr Opin Struct Biol* (2003), 13:6-14

Allan, J., P. G. Hartman, et al.. "The structure of histone H1 and its location in chromatin." *Nature* (1980) 288(5792): 675-9

Ambrosini G, Adida C, Altieri DCA novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*, (1997) 3

Andrews PD, Ovechkina Y, Morrice N, Wagenbach M, Duncan K, Wordeman L, Swedlow JRAurora B regulates MCAK at the mitotic centromere. *Dev Cel* (2004) 1, 6

Angelov D, Molla A, Perche PY, Hans F, Cote J, Khochbin S, Bouvet P, Dimitrov S: The histone variant MacroH2A interferes with transcription factor binding and SWI/SNF nucleosome remodeling. *Mol Cell* (2003), 11:1033-1041

Annunziato, A. T. and R. L. Seale. Presence of nucleosomes within irregularly cleaved fragments of newly replicated chromatin. *Nucleic Acids Res* (1984) 12(15): 6179-96

Arents G, Burlingame RW, Wang BC, Love WE, Moudrianakis EN. The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc Natl Acad Sci USA* (1991), 88: 10148-52.

- Badugu R, Yoo Y, Singh PB, Kellum R. Mutations in the heterochromatin protein 1 (HP1) hinge domain affect HP1 protein interactions and chromosomal distribution. *Chromosoma* (2005), 113(7):370-84
- Ball LJ, Murzina NV, Broadhurst RW, Raine AR, Archer SJ, Stott FJ, et al. Structure of the chromatin binding (chromo) domain from mouse modifier protein 1. *Embo J* (1997), 16(9):2473-81
- Barcia R, Lopez-Borges S, Vega FM, Lazo PA. Kinetic Properties of p53 Phosphorylation by the Human Vaccinia-Related Kinase 1. *Arch Biochem Biophys* (2002) 399: 1–5
- Bartova, E., Pachernik, J., Kozubik, A. and Kozubek, S.. Differentiationspecific association of HP1alpha and HP1beta with chromocentres is correlated with clustering of TIF1beta at these sites. *Histochem. Cell Biol.* (2007)127, 375-388
- Bayliss R, Sardon T, Vernos I, Conti E. Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle. *Mol Cell* (2003), 12:851 – 62
- Becker, P. B. and W. Horz. ATP-dependent nucleosome remodelling. *Annu Rev Biochem* (2002) 71: 247-73.
- Bernard P, Maure JF, Partridge JF, Genier S, Javerzat JP, Allshire RC. Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. *Science* 2001;294(5551):2539-42.
- Biggins S, Murray AWThe budding yeast protein kinase Ipl1/Aurora allows the absence of tension to activate the spindle checkpoint. *Genes Dev* (2001), 15, 231
- Bishop, J. D. & Schumacher, J. M. Phosphorylation of the carboxyl terminus of inner centromere protein (INCENP) by the Aurora B kinase stimulates Aurora B kinase activity. *J. Biol. Chem.* (2002) 277, 27577–27580
- Bolton, M. A. Lan, W., Powers, S.E., McClelland, M.L., Kuang, J., and Stukenberg, P.T. Aurora B kinase exists in a complex with survivin and INCENP and its kinase activity is stimulated by survivin binding and phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* (2002) 13, 3064–3077
- Boulard M, Bouvet P, Kundu TK, Dimitrov S: Histone variant nucleosomes: structure, function and implication in disease. *Subcell Biochem* (2007), 41:71-89
- Brasher SV, Smith BO, Fogh RH, Nietlispach D, Thiru A, Nielsen PR, et al. The structure of mouse HP1 suggests a unique mode of single peptide recognition by the shadow chromo domain dimer. *Embo J* (2000), 19(7):1587-97
- Cairns, B. R.. Chromatin remodeling complexes: strength in diversity, precision through specialization. *Curr Opin Genet Dev* (2005) 15(2): 185-90

Cammas, F., Janoshazi, A., Lerouge, T. and Losson, R.. Dynamic and selective interactions of the transcriptional corepressor TIF1beta with the heterochromatin protein HP1 isoforms during cell differentiation. *Differentiation* (2007) 75, 627-637

Carmena, M. & Earnshaw, W. C. The cellular geography of aurora kinases. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* (2003) 4, 842–854

Carruthers, L. M., J. Bednar, et al. Linker histones stabilize the intrinsic salt-dependent folding of nucleosomal arrays: mechanistic ramifications for higher-order chromatin folding. *Biochemistry* . (1998) 37(42): 14776-87

Carvalho, A. *et al.* Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated HeLa cells. *J. Cell Sci.* (2003) 116, 2987–2998

Chakravarthy S, Bao Y, Roberts VA, Tremethick D, Luger K: Structural characterization of histone H2A variants. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* (2004), 69:227-234

Chakravarthy S, Luger K: The histone variant macro-H2A preferentially forms 'hybrid nucleosomes'. *J Biol Chem* (2006), 281:25522-25531

Chan CS, Botstein D. Isolation and characterization of chromosome-gain and increase-in-ploidy mutants in yeast. *Genetics* (1993), 135:677 – 91

Cheetham GM, Knegt RM, Coll JT, et al. Crystal structure of aurora-2, an oncogenic serine/threonine kinase. *J Biol Chem* (2002), 277:42419 – 22

Chen, J. *et al.* Survivin enhances Aurora-B kinase activity and localizes Aurora-B in human cells. *J. Biol.Chem.* (2003), 278, 486–490

Cheung, P., Tanner, K.G., Cheung, W.L., Sassone-Corsi, P., Denu, J.M., and Allis, C.D.. Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol. Cell* (2000), 5, 905–915

Chodaparambil J, Barbera AJ, Lu X, Kaye KM, Hansen JC, Luger K: A charged and contoured surface on the nucleosome regulates chromatin compaction. *Nat Struct Mol Biol* (2007), 14:1105-1107

Cooke, C. A., Heck, M. M. & Earnshaw, W. C. The inner centromere protein (INCENP) antigens: movement from inner centromere to midbody during mitosis. *J. Cell Biol.* (1987), 105, 2053–2067

Cowieson NP, Partridge JF, Allshire RC, McLaughlin PJ. Dimerisation of a chromatin shadow domain and distinctions from the chromodomain as revealed by structural analysis. *Curr Biol* (2000), 10(9):517-25

Clegg NJ, Honda BM, Whitehead IP, Grigliatti TA, Wakimoto B, Brock HW, et al. Suppressors of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster* affect

expression of the heterochromatic gene light in the absence of a chromosome rearrangement. *Genome* (1998), 41(4):495-503

Cooke CA, Heck MM, Earnshaw WC The inner centromere protein (INCENP) antigens: movement from inner centromere to midbody during mitosis. *J Cell Biol.* (1987), 105, 5

Cryderman DE, Grade SK, Li Y, Fanti L, Pimpinelli S, Wallrath LL. Role of *Drosophila* HP1 in euchromatic gene expression. *Dev Dyn* (2005), 232(3):767-74

Cuthbert, G. L., S. Daujat, et al.. Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* (2004), 118(5): 545-53

Dai J, Higgins JM. Haspin: a mitotic histone kinase required for metaphase chromosome alignment. *Cell Cycle* (2005), 4

Dai J, Sultan S, Taylor SS, Higgins JM. The kinase haspin is required for mitotic histone H3 Thr 3 phosphorylation and normal metaphase chromosome alignment. *Genes Dev* (2005), 19, 4

Dai J, Sullivan BA, Higgins JM. Regulation of mitotic chromosome cohesion by Haspin and Aurora B. *Dev Cel* (2006) 1, 11

Davey CA, Sargent DF, Luger K, Maeder AW, Richmond TJ. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 a resolution. *J Mol Biol* (2002), 319:1097–1113

De Souza, C. P., A. H. Osmani, et al.. Mitotic histone H3 phosphorylation by the NIMA kinase in *Aspergillus nidulans*. *Cell* (2000), 102(3): 293-302

Dhillon, N. and Hoekstra, M.F. Characterization of two protein kinases from *Schizosaccharomyces pombe* involved in the regulation of DNA repair. *EMBO J.* (1994), 13, 2777-2788

George K, Dialynas, Stefan Terjung, Jeremy P. Brown, Rebecca L. Aucott, Bettina Baron-Luhr, Prim B. Singh and Spyros D. Georgatos. Plasticity of HP1 proteins in mammalian cells. *J Cell Sci.* (2007), 120(Pt 19):3415-24

Ditchfield C, Johnson VL, Tighe A, Ellston R, Haworth C, Johnson T, Mortlock A, Keen N, Taylor SS Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J Cell Biol.* (2003), 161, 228

Durr H, Korner C, Muller M, Hickmann V, Hopfner KP. X-ray structures of the *Sulfolobus solfataricus* SWI2/SNF2 ATPase core and its complex with DNA. *Cell* (2005), 121:363–373

- Edmondson, D.G., Davie, J.K., Zhou, J., Mirnikjoo, B., Tatchell, K., and Dent, S.Y.. Site-specific loss of acetylation upon phosphorylation of histone H3. *J. Biol.Chem.* (2002), 277, 29496–29502
- Eissenberg, J. C. and Elgin, S. C. The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* (2000), 10, 204-210
- Ekwall K, Javerzat JP, Lorentz A, Schmidt H, Cranston G, Allshire R. The chromodomain protein Swi6: a key component at fission yeast centromeres. *Science* (1995), 269(5229):1429-31. 117
- Ekwall K, Nimmo ER, Javerzat JP, Borgstrom B, Egel R, Cranston G, et al. Mutations in the fission yeast silencing factors *clr4+* and *rik1+* disrupt the localisation of the chromo domain protein Swi6p and impair centromere function. *J Cell Sci* (1996) 109 (Pt 11):2637-48
- Earnshaw, W. C. & Bernat, R. L. Chromosomal passengers: toward an integrated view of mitosis. *Chromosoma* (1991), 100, 139–146
- Eyers PA, Maller JL. Regulation of Xenopus Aurora A activation by TPX2. *J Biol Chem* (2004), 279:9008 – 15
- Fan JY, Gordon F, Luger K, Hansen JC, Tremethick DJ: The essential histone variant H2A.Z regulates the equilibrium between different chromatin conformational states. *Nat Struct Biol* (2002), 19:172-176
- Fan, H. Y., K. W. Trotter, et al.. Swapping function of two chromatin remodeling complexes. *Mol Cell* (2005), 17(6): 805-15
- Fanti L, Berloco M, Piacentini L, Pimpinelli S: Chromosomal distribution of heterochromatin protein 1 (HP1) in *Drosophila*: a cytological map of euchromatic HP1 binding sites. *Genetica* (2003), 117:135-147
- Filesi, I., Cardinale, A., van der Sar, S., Cowell, I. G., Singh, P. B. and Biocca, S.. Loss of heterochromatin protein 1 (HP1) chromodomain function in mammalian cells by intracellular antibodies causes cell death. *J. Cell Sci.* (2002), 115, 1803-1813
- Fischle, W., Tseng, B.S., Dormann, H.L., Ueberheide, B.M., Garcia, B.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Funabiki, H., and Allis, C.D. Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* (2005), 438, 1116–1122
- Fu J, Bian M, Jiang Q, Zhang C. Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Mol Cancer Res.* (2007) 5(1):1-10
- Gangaraju, V. K. and B. Bartholomew. Dependency of ISW1a chromatin remodeling on extranucleosomal DNA. *Mol Cell Biol* (2007), 27(8): 3217-25

Gangaraju, V. K. and B. Bartholomew. Mechanisms of ATP dependent chromatin remodeling. *Mutat Res* (2007), 618(1-2): 3-17

Gassmann R, Carvalho A, Henzing AJ, Ruchaud S, Hudson DF, Honda R, Nigg EA, Gerloff DL, Earnshaw WC. Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. *J Cell Biol* (2004), 166, 219

Ge, Z., Liu, C., Bjorkholm, M., Gruber, A., and Xu, D. Mitogen-activated protein kinase cascade-mediated histone H3 phosphorylation is critical for telomerase reverse transcriptase expression/telomerase activation induced by proliferation. *Mol. Cell Biol.* (2006), 26, 230–237

Giet R, Glover DM. *Drosophila* aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis. *J Cell Biol* (2001), 152, 419

Glover DM, Leibowitz MH, McLean DA, Parry H. Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell* (1995), 81:95 – 105

Goto, H., Tomono, Y., Ajiro, K., Kosako, H., Fujita, M., Sakurai, M., Okawa, K., Iwamatsu, A., Okigaki, T., Takahashi, T., et al. Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation. *J. Biol. Chem.* 2(1999), 74, 25543–25549

Goto H, Yasui Y, Nigg EA, Inagaki M. Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation. *Genes Cells* (2002), 7:11–7

Goto H, Yasui Y, Kawajiri A, Nigg EA, Terada Y, Tatsuka M, Nagata K, Inagaki M. Aurora-B regulates the cleavage furrow-specific vimentin phosphorylation in the cytokinetic process. *J Biol Chem* (2003), 278, 107

Grigliatti T. Position-effect variegation: an assay for nonhistone chromosomal proteins and chromatin assembly and modifying factors. In: Hamkalo BA, Elgin SCR (eds) *Functional organization of the nucleus: a laboratory guide*. Academic Press (1991), San Diego, pp 588–628

Hagstrom KA, Holmes VF, Cozzarelli NR, Meyer BJC. *elegans* condensin promotes mitotic chromosome architecture, centromere organization, and sister chromatid segregation during mitosis and meiosis. *Genes Dev* (2002), 16, 615

Hake, S. B., B. A. Garcia, et al. Serine 31 phosphorylation of histone variant H3.3 is specific to regions bordering centromeres in metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005), 102(18): 6344-9

Hannak E, Kirkham M, Hyman AA, Oegema K. Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* (2001), 155:1109 – 16

Hansen, J. C. Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* (2002), 31: 361-92

Hauf S, Cole RW, LaTerra S, Zimmer C, Schnapp G, Walter R, Heckel A, van Meel J, Rieder CL, Peters JM The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol* (2003), 161, 228

Hediger, F. and Gasser, S. M. Heterochromatin protein 1, don't judge the book by its cover! *Curr. Opin. Genet. Dev.* (2006), 16, 143-150

Hearn MG, Hedrick A, Grigliatti TA, Wakimoto BT. The effect of modifiers of position-effect variegation on the variegation of heterochromatic genes of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* (1991), 128(4):785-97

Henzel, M. J., Y. Wei, et al. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* (1997), 106(6): 348-60

Higgins JM. Structure, function and evolution of haspin and haspin-related proteins, a distinctive group of eukaryotic protein kinases. *Cell Mol Life Sci*, (2003), 60, 3

Higgins JM. Haspin-like proteins: a new family of evolutionarily conserved putative eukaryotic protein kinases. *Protein Sci* (2001), 10, 8

Hirota T, Lipp JJ, Toh BH, Peters JM. Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature* (2005), 438:1176 – 80

Hoch DA, Stratton JJ, Gloss LM: Protein-protein Förster resonance energy transfer analysis of nucleosome core particles containing H2A and H2A.Z. *J Mol Biol* (2007), 371:971-988

Honda R, Körner R, Nigg EA. Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis. *Mol Biol Cell* (2003), 14, 3325–3341

Horsley D, Hutchings A, Butcher GW, Singh PB: M32, a murine homologue of *Drosophila* heterochromatin protein 1 (HP1), localises to euchromatin within interphase nuclei and is largely excluded from constitutive heterochromatin. *Cytogenet Cell Genet* (1996), 73:308-311

Hsu JY, Sun ZW, Li X, Reuben M, Tatchell K, Bishop DK, Grushcow JM, Brame CJ, Caldwell JA, Hunt DF, Lin R, Smith MM, Allis CD. Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* (2000), 102, 34

James TC, Eissenberg JC, Craig C, Dietrich V, Hobson A, Elgin SC: Distribution patterns of HP1, a heterochromatin-associated nonhistone chromosomal protein of *Drosophila*. *Eur J Cell Biol* (1989), 50:170-180

Jones DO, Cowell IG, Singh PB. Mammalian chromodomain proteins: their role in genome organisation and expression. *Bioessays* (2000), 22(2):124-37

Kaitna, S., Mendoza, M., Jantsch-Plunger, V. & Glotzer, M. INCENP and an aurora-like kinase form a complex essential for chromosome segregation and efficient completion of cytokinesis. *Curr. Biol.* (2000), 10, 1172–1181

Kaitna S, Pasierbek P, Jantsch M, Loidl J, Glotzer M. The aurora B kinase AIR-2 regulates kinetochores during mitosis and is required for separation of homologous Chromosomes during meiosis. *Curr Biol* (2002), 12, 1014

Kamath RS, Fraser AG, Dong Y, Poulin G, Durbin R, et al. Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* (2003), 421: 231–237

Kang TH, Park DY, Choi YH, Kim KJ, Yoon HS, Kim KT. Mitotic histone H3 phosphorylation by vaccinia-related kinase 1 in mammalian cells. *Mol Cell Biol* (2007), 27, 24

Kannan N, Taylor SS, Zhai Y, Venter JC, Manning G. Structural and functional diversity of the microbial kinome. *PLoS Biol* (2007), 5, 3

Karpen GH. Position-effect variegation and the new biology of heterochromatin. *Curr Opin Genet Dev* (1994), 4:281–291

Kaszas, E. and Cande, W.Z. Phosphorylation of histone H3 is correlated with changes in the maintenance of sister chromatid cohesion during meiosis in maize, rather than the condensation of the chromatin. *J. Cell Sci.* (2000), 113 (Pt 18), 3217–3226

Katayama H, Ota T, Jisaki F, et al. Mitotic kinase expression and colorectal cancer progression. *J Natl Cancer Inst* (1999), 91:1160 2

Kawajiri A, Yasui Y, Goto H, Tatsuka M, Takahashi M, Nagata K, Inagaki M. Functional significance of the specific sites phosphorylated in desmin at cleavage furrow: Aurora-B may phosphorylate and regulate type III intermediate filaments during cytokinesis coordinately with Rho-kinase. *Mol Biol Cell* (2003), 14, 4

Kim, J. H., Kang, J. S. & Chan, C. S. Sli15 associates with the Ipl1 protein kinase to promote proper chromosome segregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* (1999) 145, 1381–1394

Kiyoshi Furuta, Edward K.L. Chan, Kendo Kiyosawa, Georg Reimer, Christoph Luderschmidt, Eng M. Tan. Heterochromatin protein HP1Hsb (p25b) and its localization with centromeres in mitosis. (1996)

- Klein, U. R., Nigg, E. A. & Gruneberg, U. Centromere targeting of the chromosomal passenger complex requires a ternary subcomplex of borealin, survivin, and the N-terminal domain of INCENP. *Mol. Biol. Cell* (2006), 17, 2547–2558
- Kellum R, Raff JW, Alberts BM. Heterochromatin protein 1 distribution during development and during the cell cycle in *Drosophila* embryos. *J Cell Sci* (1995), 108 (Pt 4):1407-18
- D. Kögel, H. Bierbaum, U. Preuss, K.H. Scheidtmann: C-terminal truncation of Dlk/ZIP kinase leads to abrogation of nuclear transport and high apoptotic activity. *Oncogene* (1999), 18, 7212-8
- D. Kögel, C. Reimertz, P. Mech, M. Poppe, M. C. Frühwald, H. Engemann, K. H. Scheidtmann, J. H. Prehn: Dlk/ZIP kinase-induced apoptosis in human medulloblastoma cells: requirement of the mitochondrial apoptosis pathway. *Br J Cancer* (2001), 85, 1801-8
- Klose, R. J., E. M. Kallin, et al. JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat Rev Genet* (2006), 7(9): 715-27
- Klose, R. J., K. Yamane, et al. The transcriptional repressor JHDM3A demethylates trimethyl histone H3 lysine 9 and lysine 36. *Nature* (2006), 442(7100): 312-6
- Kornberg, R. D. Structure of chromatin. *Annu Rev Biochem* (1977), 46: 931-54
- Kourmouli N, Theodoropoulos PA, Dialynas G, Bakou A, Politou AS, Cowell IG, Singh PB, Georgatos SD. Dynamic associations of heterochromatin protein 1 with the nuclear envelope. *EMBO J* (2000), 19:6558-6568
- Kunitoku N, Sasayama T, Marumoto T, et al. CENP-A phosphorylation by Aurora-A in prophase is required for enrichment of Aurora-B at inner centromeres and for kinetochore function. *Dev Cell* (2003), 5:853 – 864
- Lan W, Zhang X, Kline-Smith SL, Rosasco SE, Barrett-Wilt GA, Shabanowitz J, Hunt DF, Walczak CE, Stukenberg PT. Aurora B phosphorylates centromeric MCAK and regulates its localization and microtubule depolymerization activity. *Curr Biol* (2004), 14, 417
- Langst, G., E. J. Bonte, et al. Nucleosome movement by CHRAC and ISWI without disruption or trans-displacement of the histone octamer. *Cell* (1999), 97(7): 843-52
- Lechner MS, Begg GE, Speicher DW, Rauscher FJ, 3rd. Molecular determinants for targeting heterochromatin protein 1-mediated gene silencing: direct chromoshadow domain-KAP-1 corepressor interaction is essential. *Mol Cell Biol* (2000), 20(17):6449-65
- Lens, S. M. A. *et al.* Survivin is required for a sustained spindle checkpoint arrest in response to lack of tension. *EMBO J.* (2003), 22, 2934–2947

- Lens, S. M. *et al.* Uncoupling the central spindle-associated function of the chromosomal passenger complex from its role at centromeres. *Mol. Biol. Cell* (2006), 17, 1897–1909
- Lindner HH. Analysis of histones, histone variants, and their post-translationally modified forms. *Electrophoresis*, (2008) 29(12):2516-32
- Lo, W.S., Trievel, R.C., Rojas, J.R., Duggan, L., Hsu, J.Y., Allis, C.D., Marmorstein, R., and Berger, S.L. Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol. Cell* (2000), 5, 917–926
- Lomberk G, Bensi D, Fernandez-Zapico ME, Urrutia R. Evidence for the existence of an HP1-mediated subcode within the histone code. *Nat Cell Biol* (2006), 8(4):407-15
- Lopez-Borges S, Lazo PA. The human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) phosphorylates threonine-18 within the mdm-2 binding site of the p53 tumour suppressor protein. *Oncogene* (2000), 19: 3656–3664
- Losada A, Hirano M, Hirano T. Cohesin release is required for sister chromatid resolution, but not for condensin-mediated compaction, at the onset of mitosis. *Genes Dev* (2002), 16, 231
- Lu BY, Emtage PC, Duyf BJ, Hilliker AJ, Eissenberg JC. Heterochromatin protein 1 is required for the normal expression of two heterochromatin genes in *Drosophila*. *Genetics* (2000), 155(2):699-708. 118
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* (1997), 389:251–260
- Luger, K., T. J. Rechsteiner, et al. Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria." *J Mol Biol* (1997), 272(3): 301-11
- MacCallum DE, Losada A, Kobayashi R, Hirano T. ISWI remodeling complexes in *Xenopus* egg extracts: identification as major chromosomal components that are regulated by INCENP-aurora B. *Mol Biol Cell* (2002), 13, 1
- Mahadevan, L.C., Willis, A.C., and Barratt, M.J. Rapid histone H3 phosphorylation in response to growth factors, phorbol esters, okadaic acid, and protein synthesis inhibitors. *Cell* (1991), 65, 775–783
- Maluf, N. K., J. A. Ali, et al. Kinetic mechanism for formation of the active, dimeric UvrD helicase-DNA complex." *J Biol Chem* (2003), 278(34): 31930-40
- Maluf, N. K., C. J. Fischer, et al. A Dimer of *Escherichia coli* UvrD is the active form of the helicase in vitro." *J Mol Biol* (2003), 325(5): 913-35

Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T. and Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298 (2002), 1912-1934

Marino-Ramirez, L.; Hsu, B.; Baxevanis, A. D.; Landsman, D. The Histone Database: a comprehensive resource for histones and histone fold-containing proteins. *Proteins* (2006), 62 (4), 838–42

Marumoto T, Honda S, Hara T, et al. Aurora-A kinase maintains the fidelity of early and late mitotic events in HeLa cells. *J Biol Chem* 2003;278:51786 – 95. 16. Tatsuka M, Katayama H, Ota T, et al. Multinuclearity and increased ploidy caused by overexpression of the aurora- and Ipl1-like midbody-associated protein mitotic kinase in human cancer cells. *Cancer Res* 1998;58:4811 – 6.

McGhee, J. D., Felsenfeld, G. Nucleosome structure. *Annu. Rev. Biochem.* (1980), 49, 1115–1156

Mesilaty-Gross S, Reich A, Motro B, Wides R. The *Drosophila* STAM gene homolog is in a tight gene cluster, and its expression correlates to that of the adjacent gene *ial*. *Gene* (1999), 231:173 – 86

Minc, E., Allory, Y., Worman, H. J., Courvalin, J. C. and Buendia, B. Localization and phosphorylation of HP1 proteins during the cell cycle in mammalian cells. *Chromosoma* (1999), 108, 220-234

Minc E, Courvalin JC, Buendia B: HP1 γ associates with euchromatin and heterochromatin in mammalian nuclei and chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* (2000), 90:279-284

Minc E., Allory Y., Worman H.J., Courvalin J., Buendia B. Localization and phosphorylation of HP1 proteins during the cell cycle in mammalian cells. *Chromosoma* (1999), 108, 4, 220-234

Misteli T, Gunjan A, Hock R, Bustin M, Brown DT. Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells. *Nature* (2000), 408:877–81

Moazed D. Enzymatic activities of Sir2 and chromatin silencing. *Curr Opin Cell Biol* (2001), 13(2):232-8

Murzina N, Verreault A, Laue E, Stillman B. Heterochromatin dynamics in mouse cells: interaction between chromatin assembly factor 1 and HP1 proteins. *Mol Cell* (1999), 4(4):529-40.

Nezu J, Oku A, Jones MH, Shimane M Identification of two novel human putative serine/threonine kinases, VRK1 and VRK2, with structural similarity to vaccinia virus B1R kinase. *Genomics* (1997), 45: 327–331

Nichols, R. J., M. S. Wiebe, and P. Traktman. The vaccinia-related kinases phosphorylate the N₂ terminus of BAF, regulating its interaction with DNA and its retention in the nucleus. *Mol. Biol. Cell* (2006), 17:2451–2464

Nielsen, A. L., Oulad-Abdelghani, M., Ortiz, J. A., Remboutsika, E., Chambon, P. and Losson, R. Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins. *Mol. Cell* (2001), 7, 729-739

Nigg EA. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2001), 2:21 – 32

Noll, M. and R. D. Kornberg Action of micrococcal nuclease on chromatin and the location of histone H1. *J Mol Biol* (1977), 109(3): 393-404

Nonaka N, Kitajima T, Yokobayashi S, Xiao G, Yamamoto M, Grewal SI, et al. Recruitment of cohesin to heterochromatic regions by Swi6/HP1 in fission yeast. *Nat Cell Biol* (2002), 4(1):89-93

Norwood LE, Grade SK, Cryderman DE, Hines KA, Furiasse N, Toro R, et al. Conserved properties of HP1(Hsalpha). *Gene* (2004), 336(1):37-46

Nowak, S.J. and Corces, V.G. Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet.* (2004), 20, 214–220

Ohi R, Coughlin ML, Lane WS, Mitchison TJ An inner centromere protein that stimulates the microtubule depolymerizing activity of a KinI kinesin. *Dev Cell* (2003), 5, 2

Ota, T., Suto, S., Katayama, H., Han, Z.B., Suzuki, F., Maeda, M., Tanino, M., Terada, Y., and Tatsuka, M. Increased mitotic phosphorylation of histone H3 attributable to AIM-1/Aurora-B overexpression contributes to chromosome number instability. *Cancer Res.* (2002), 62, 5168–5177

G. Page, D. Kögel, V. Rangnekar, K. H. Scheidtmann: Interaction partners of Dlk/ZIP kinase: co-expression of Dlk/ZIP kinase and Par-4 results in cytoplasmic retention and apoptosis. *Oncogene* (1999), 18, 7265-73

Park YJ, Dyer PN, Tremethick DJ, Luger K: A new fluorescence resonance energy transfer approach demonstrates that the histone variant H2AZ stabilizes the histone octamer within the nucleosome. *J Biol Chem* (2004), 279:24274-24282

Park YJ, Luger K. Histone chaperones in nucleosome eviction and histone exchange. *Curr Opin Struct Biol.* (2008), 18(3):282-9

Pazin, M. J. and J. T. Kadonaga. SWI2/SNF2 and related proteins: ATP-driven motors that disrupt protein-DNA interactions? *Cell* (1997), 88(6): 737-40

Pérez-Cadahía B, Drohic B, Davie JR. H3 phosphorylation: dual role in mitosis and interphase. *Biochem Cell Biol.* (2009), 87(5):695-709

Perrini B, Piacentini L, Fanti L, Altieri F, Chichiarelli S, Berloco M, et al. HP1 controls telomere capping, telomere elongation, and telomere silencing by two different mechanisms in *Drosophila*. *Mol Cell* (2004), 15(3):467-76

Piacentini L, Fanti L, Berloco M, Perrini B, Pimpinelli S. Heterochromatin protein 1 (HP1) is associated with induced gene expression in *Drosophila* euchromatin. *J Cell Biol* (2003), 161(4):707-14

Polioudaki H, Kourmouli N, Drosou V, Bakou A, Theodoropoulos PA, Singh PB, et al. Histones H3/H4 form a tight complex with the inner nuclear membrane protein LBR and heterochromatin protein 1. *EMBO Rep* (2001), 2(10):920-5

Polioudaki H, Markaki Y, Kourmouli N, Dialynas G, Theodoropoulos PA, Singh PB, Georgatos SD. Mitotic phosphorylation of histone H3 at threonine 3. *FEBS Lett* (2004), 560, 1-3, 27

Preuss, U., Landsberg, G., and Scheidtmann, K.H. Novel mitosis-specific phosphorylation of histone H3 at Thr11 mediated by Dlk/ZIP kinase. *Nucleic Acids Res.* (2003), 31, 878–885

Prigent, C. and S. Dimitrov. Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *J Cell Sci* (2003), 116(Pt 18): 3677-85

Racki R.L and Narlikar J.G (2008). ATP-dependent Chromatin Remodeling Enzymes: Two Heads are not Better, Just Different *Curr Opin Genet Dev.* (2008), 18(2): 137–144

Rangasamy, D., Berven, L., Ridgway, P. & Tremethick, D. J. Pericentric heterochromatin becomes enriched with H2A.Z during early mammalian development. *EMBO J.* (2003), 22, 1599–1607

Rannou Y, Troadec MB, Petretti C, Hans F, Dutertre S, Dimitrov S, Prigent C. Localization of aurora A and aurora B kinases during interphase: role of the N-terminal domain. *Cell Cycle.* (2008), 7(19):3012-20

Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D., et al. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* (2000), 406, 593–599

Rempel, R. E., M. K. Anderson, E. Evans, and P. Traktman. Temperature-sensitive vaccinia virus mutants identify a gene with an essential role in viral replication. *J. Virol.* (1990), 64:574–583

Richmond TJ, Widom J Elgin SCRW, J. L., ed. Nucleosome and chromatin structure. *Chromatin Structure and Gene Expression.* Oxford: IRL Press. (2000), 1-19

Roghi C, Giet R, Uzbekov R, et al. The *Xenopus* protein kinase pEg2 associates with the centrosome in a cell cycle-dependent manner, binds to the spindle microtubules and is involved in bipolar mitotic spindle assembly. *J Cell Sci* (1998), 111:557 – 72

Romano, A. *et al.* CSC-1: a subunit of the aurora b kinase complex that binds to the survivin-like protein BIR-1 and the INCENP-like protein ICP-1. *J. Cell Biol.* (2003), 161, 229–236

Rosasco-Nitcher SE, Lan W, Khorasanizadeh S, Stukenberg PT. Centromeric Aurora-B activation requires TD-60, microtubules, and substrate priming phosphorylation. *Science* (2008), 319, 5862

Ruchaud, S., Carmena, M., and Earnshaw, W.C. Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2007), 8, 798–812

Sampath, S. C. *et al.* The chromosomal passenger complex is required for chromatin-induced microtubule stabilization and spindle assembly. *Cell* (2004), 118, 187–202

Santos, C. R., M. Rodriguez-Pinilla, F. M. Vega, J. L. Rodriguez-Peralto, S. Blanco, A. Sevilla, A. Valbuena, T. Hernandez, A. J. van Wijnen, F. Li, E. de Alava, M. Sanchez-Céspedes, and P. A. Lazo. VRK1 signaling pathway in the context of the proliferation phenotype in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol. Cancer Res.* (2006), 4:177–185

Schott, S., Coustham, V., Simonet, T., Bedet, C. and Palladino, F. Unique and redundant functions of *C. elegans* HP1 proteins in post-embryonic development. *Dev. Biol.* (2006), 298, 176-187

Schumacher JM, Golden A, Donovan PJ. AIR-2: An Aurora/Ipl1-related protein kinase associated with chromosomes and midbody microtubules is required for polar body extrusion and cytokinesis in *Caenorhabditis elegans* embryos. *J Cell Biol* (1998), 143, 614

Schumacher JM, Ashcroft N, Donovan PJ, Golden A. A highly conserved centrosomal kinase, AIR-1, is required for accurate cell cycle progression and segregation of developmental factors in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Development* (1998), 125:4391 – 402

Scrittore L, Skoufias DA, Hans F, Gerson V, Sassone-Corsi P, Dimitrov S, Margolis RL. A small C-terminal sequence of Aurora B is responsible for localization and function. *Mol Biol Cell* (2005), 16:292-305

Sessa, F. *et al.* Mechanism of Aurora B activation by INCENP and inhibition by hesperadin. *Mol. Cell* (2005), 18, 379–391

Shi, Y., F. Lan, et al. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* (2004), 119(7): 941-53

Shogren-Knaak M, Ishii H, Sun JM, Pazin MJ, Davie JR, Peterson CL: Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* (2006), 311:844-847

Serebrov, V. and A. M. Pyle (2004). "Periodic cycles of RNA unwinding and pausing by hepatitis C virus NS3 helicase." *Nature* 430(6998): 476-80.

Sessa F, Mapelli M, Ciferri C, et al. Mechanism of Aurora B activation by INCENP and inhibition by hesperadin. *Mol Cell* (2005), 18:379 – 91

Singh PB, Georgatos SD. HP1: facts, open questions, and speculation. *J Struct Biol* (2002), 140(1-3):10-6

Smothers, J. F. and Henikoff, S. The hinge and chromo shadow domain impart distinct targeting of HP1-like proteins. *Mol. Cell. Biol.* (2001), 21, 2555-2569

Strahl BD, Allis DC. The language of covalent histone modifications. *Nature* (2000), 403: 41-45.

Tanaka H, Yoshimura Y, Nozaki M, Yomogida K, Tsuchida J, Tosaka Y, Habu T, Nakanishi T, Okada M, Nojima H, Nishimune Y. Identification and characterization of a haploid germ cell-specific nuclear protein kinase (Haspin) in spermatid nuclei and its effects on somatic cells. *J Biol Chem* (1999), 274, 24, 11

Tanaka H, Iguchi N, Nakamura Y, Kohroki J, de Carvalho CE, Nishimune Y. Cloning and characterization of human haspin gene encoding haploid germ cell-specific nuclear protein kinase. *Mol Hum Reprod* (2001), 7, 3

Terada Y, Tatsuka M, Suzuki F, Yasuda Y, Fujita S, Otsu M. AIM-1: a mammalian midbody-associated protein required for cytokinesis. *EMBO J* (1998), 17, 32

Thoma NH, Czyzewski BK, Alexeev AA, Mazin AV, Kowalczykowski SC, Pavletich NP. Structure of the SWI2/SNF2 chromatin-remodeling domain of eukaryotic Rad54. *Nat Struct Mol Biol* (2005), 12:350–356.

Tomohiro Hayakawa, Tokuko Haraguchi, Hiroshi Masumoto and Yasushi Hiraoka. Cell cycle behavior of human HP1 subtypes: distinct molecular domains of HP1 are required for their centromeric localization during interphase and metaphase. *Journal of Cell Science* (2003), 116, 3327-3338

Vader, G., Kauw, J. J., Medema, R. H. & Lens, S. M. Survivin mediates targeting of the chromosomal passenger complex to the centromere and midbody. *EMBO Rep.* (2006), 7, 85–92

Vader, G., Medema, R. H. & Lens, S. M. The chromosomal passenger complex: guiding Aurora-B through mitosis. *J. Cell Biol.* (2006), 173, 833–837

- Vagnarelli, P. & Earnshaw, W. C. Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events. *Chromosoma* (2004), 113, 211–222
- Van Holde, K., Zlatanova, J., Arents, G., Moudrianakis, E. (Eds.), *Elements of Chromatin Structure: Histones, Nucleosomes and Fibres*, IRL Press, Oxford, UK (1995)
- Vega FM, Gonzalo P, Gaspar ML, Lazo PA. Expression of the VRK (vaccinia-related kinase) gene family of p53 regulators in murine hematopoietic development. *FEBS Lett* (2003). 544: 176–180.
- Vega FM, Sevilla A, Lazo PA. p53 Stabilization and Accumulation Induced by Human Vaccinia-Related Kinase 1. *Mol Cell Biol* (2004), 24: 10366–10380.
- Vermaak D, Henikoff S, Malik HS. Positive selection drives the evolution of rhino, a member of the heterochromatin protein 1 family in *Drosophila*. *PLoS Genet* (2005), 1(1):96-108.
- Wang GG, Allis CD, Chi P. Chromatin remodeling and cancer. Part I. Covalent histone modifications. *Trends Mol Med* (2007a), 13:363–72
- Wang GG, Allis CD, Chi P. Chromatin remodeling and cancer. Part II. ATP-dependent chromatin remodeling. *Trends Mol Med* (2007b), 13:373–80
- Waterston RH, Lander ES, Sulston JE. On the sequencing of the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2002), 99(6):3712-6
- Wei Y, Mizzen CA, Cook RG, Gorovsky MA, Allis CD. Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in *Tetrahymena*. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1998), 95:7480 – 4
- Wei Y, Yu L, Bowen J, Gorovsky MA, Allis CD. Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell* (1999), 97:99 – 109
- Wheatley, S. P., Carvalho, A., Vagnarelli, P. & Earnshaw, W. C. INCENP is required for proper targeting of survivin to the centromeres and the anaphase spindle during mitosis. *Curr. Biol.* (2001), 11, 886–890
- Wheatley, S. P. *et al.* Aurora-B phosphorylation *in vitro* identifies a residue of survivin that is essential for its localization and binding to inner centromere protein (INCENP) *in vivo*. *J. Biol. Chem.* (2004), 279, 5655–5660
- Widom, J. A relationship between the helical twist of DNA and the ordered positioning of nucleosomes in all eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1992), 89(3): 1095-9

de Wit, E., Greil, F. and van Steensel, B. High-resolution mapping reveals links of HP1 with active and inactive chromatin components. *PLoS Genet.* (2007), 3, e38

Wolffe, A. P. (Ed.), *Chromatin: Structure and Function*, Academic Press, New York (1998), pp. 7–157

Woodcock, C. L. and S. Dimitrov. Higher-order structure of chromatin and chromosomes." *Curr Opin Genet Dev* (2001), 11(2): 130-5

Ye Q, Callebaut I, Pezhman A, Courvalin JC, Worman HJ. Domainspecific interactions of human HP1-type chromodomain proteins and inner nuclear membrane protein LBR. *J Biol Chem* (1997), 272:14983-14989

Zhao T, Heyduk T, Eissenberg JC. Phosphorylation site mutations in heterochromatin protein 1 (HP1) reduce or eliminate silencing activity. *J Biol Chem* (2001), 276(12):9512-8

Zhou H, Kuang J, Zhong L, et al. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet* (1998), 20:189 – 93

Zhou J, Fan JY, Rangasamy D, Tremethick DJ: The nucleosome surface regulates chromatin compaction and couples it with transcriptional repression. *Nat Struct Mol Biol* (2007), 14:1070-1076

Zeitlin SG, Shelby RD, Sullivan KF. CENP-A is phosphorylated by Aurora B kinase and plays an unexpected role in completion of cytokinesis. *J Cell Biol* (2001), 155:1147 – 1157