



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΘΕΟΔΩΡΟΣ ΦΩΤΣΗΣ**

**ΠΥΡΗΝΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ
ΠΟΛΥΓΛΟΥΤΑΜΙΝΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ:
Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΑΘΥΜΟΣΙΝΗΣ ΣΤΗ ΔΟΜΗ
ΚΑΙ ΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ**

**GORAN MARTIC
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2005



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000336988



Αρ. εισ.:.....11049/2003.





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΘΕΟΔΩΡΟΣ ΦΩΤΣΗΣ

**ΠΥΡΗΝΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ
ΠΟΛΥΓΛΟΥΤΑΜΙΝΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ:
Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΑΘΥΜΟΣΙΝΗΣ ΣΤΗ ΔΟΜΗ
ΚΑΙ ΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ**

GORAN MARTIC
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2005



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



Ημερομηνία αιτήσεως: 3-10-2000

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 418α/ 31-10-2000

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Θωμαΐς Παπαμαρκάκη (Επιβλέπουσα)

Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Μαρία Φράγκου-Λαζαρίδη (Μέλος)

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Θεόδωρος Φώτσης (Μέλος)

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού του θέματος: 05-12-2000

Ημερομηνία καταθέσεως της Διδακτορικής Διατριβής: 06-06-2005

Ο Πρόεδρος της Ιατρικής Σχολής: Επαμεινώνδας Τσίανος, Καθηγητής Παθολογίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Θωμαΐς Παπαμαρκάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, επιβλέπουσα

Μαρία Φράγκου-Λαζαρίδη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, μέλος

Θεόδωρος Φώτσης, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, μέλος

Κωνσταντίνος Σεφεριάδης, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, μέλος

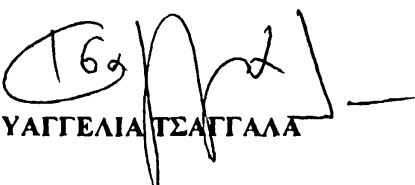
Αναστασία Πολίτου, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, μέλος

Σπύρος Γεωργάτος, Καθηγητής Γενικής Βιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, μέλος

Ραφαήλ Σανδάλτζόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, μέλος

Η Διατριβή έγινε ομόφωνα αποδεκτή με Βαθμό: "ΑΡΙΣΤΑ"

Η Γραμματέας της Σχολής


ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΤΣΑΤΣΓΑΛΑ



στην οικογένεια μου



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο πυρήνας ενός ευκαριωτικού κυττάρου περιέχει το DNA, τη δομή που ουσιαστικά υπαγορεύει τη ζωή. Το κατά προσέγγιση μήκος του 2 m πρέπει να χωρέσει σε έναν πυρήνα μεγέθους περίπου 10 μm, πράγμα που προκαλεί σημαντικά προβλήματα στα κύτταρα. Με τη βοήθεια ειδικευμένων πρωτεϊνών, οι σημαντικότερες εκ των οποίων είναι οι βασικές ιστόνες, το DNA διπλώνει κι οργανώνεται σε δομές που ονομάζονται χρωματίνη. Προφανώς, με μια αναλογία συμπίεσης μεγαλύτερη από 100.000, αυτή η δομή παίζει ένα σημαντικό ρόλο σε πολλές διαδικασίες εξαρτώμενες από το DNA. Οι ερευνητές ερευνούν τη διαμόρφωση της οργάνωσης της χρωματίνης με την ελπίδα να αποκαλυφθούν σημαντικά στοιχεία όσον αφορά στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, της αντιγραφής και της καταστροφής του DNA. Αυτές οι παρατηρήσεις θα ασκήσουν αναμφίβολα υψηλή επίδραση στην κατανόηση και την έρευνα των διαφόρων όψεων του καρκίνου και θα συμβάλουν σημαντικά στη θεραπεία διαφόρων ασθενειών.

Η παρούσα εργασία διευκρίνισε την επίδραση της παραθυμοσίνης στη δομή της χρωματίνης. Η παραθυμοσίνη είναι μέλος μιας ομάδας πρωτεϊνών που περιέχουν μακρές όξινες αλληλουχίες στην πρωτεϊνική ακολουθία τους, οι οποίες έχουν εμπλακεί στην οργάνωση της χρωματίνης. Η παραθυμοσίνη αλληλεπιδρά με τη συνδετική ιστόνη H1, ένα σημαντικό παράγοντα υπεύθυνο για την οργάνωση της χρωματίνης σε ανώτερες δομές. Τα αρχικά πειράματα που παρουσιάστηκαν σε αυτήν την εργασία διευκρίνισαν λεπτομερώς την αλληλεπίδραση των δυο πρωτεϊνών και την επίδραση της παραθυμοσίνης στη σύνδεση της συνδετικής ιστόνης H1 με την χρωματίνη. Επιπλέον, ερευνήθηκε η συμμετοχή της παραθυμοσίνης στην αποσυμπύκνωση της χρωματίνης. Τέλος, διεξήχθη έρευνα πάνω στο σχέδιο έκφρασης της παραθυμοσίνης σε διάφορα όργανα και ιστούς του σώματος. Τα στοιχεία υποδηλώνουν ένα νέο, σημαντικό βιολογικό ρόλο αυτού του όξινου πολυπεπτιδίου.

Η παρούσα επιστημονική εργασία εκτελέστηκε στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Επιβλέπουσα ήταν η Δρ. Θωμαΐς Παπαμαρκάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, στην οποία είμαι πολύ ευγνώμων για την υπομονή και τη βοήθειά της σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής. Επιπλέον, θέλω να ευχαριστήσω τα άλλα δυο



μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, τη Δρ. Μαρία Φράγκου-Λαζαρίδη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας και τον Δρ. Θεόδωρο Φώτση, Καθηγητή στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας για την υποστήριξή και τον χρόνο τους.

Επιπλέον, θέλω να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής Δρ. Κωνσταντίνο Σεφεριάδη, Καθηγητή στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, τον Δρ. Ραφαήλ Σανδαλτζόπουλο, Επίκουρο Καθηγητή στο Τμήμα Μοριακών Βιολογίας και Γενετικής του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης. Ένα μεγάλο ευχαριστώ πηγαίνει στην Δρ. Αναστασία Πολίτου, Επίκουρη Καθηγήτρια στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, για την βοήθεια και υποστήριξή της ειδικά κατά τη διάρκεια των βιοφυσικών πειραμάτων, και στον Δρ. Σπύρο Γεωργάτο, καθηγητή στο Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας, για πολλές καρποφόρες συζητήσεις.

Θέλω να ευχαριστήσω τον Δρ. Ευστάθιο Φριλίνγκο, τον Δρ. Δημήτριο Γαλάρη και την Δρ. Carol Murphy για τη βοήθειά τους, την Δρ. Μαρία Μπάη και τον κ. Άγγελο Σκύρλα για τη μεγάλη βοήθειά τους στις ανοσοϊστοχημικές μελέτες. Είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων στην Carol για τη βοήθειά της πάνω στην κυτταροκαλλιέργεια και την ομοεστιακή μικροσκοπηση κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής. Ευχαριστώ, επίσης, τα μέλη της ομάδας ποδοσφαίρου.

Είμαι ευγνώμων σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας για την βοήθειά τους, ειδικά στον Δρ. Πέτρο Μποζίδη, και στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας. Ευχαριστώ κυρίως τα μέλη του εργαστηρίου μου Δρ. Ζωή Καρέτσου, Δρ. Σάββα Χριστοφορίδη, Αλεξάνδρα Παπαφωτίκα και Τάνια Παπανικολάου. Θέλω να ευχαριστήσω συγκεκριμένα τον κ. Δήμο Μπόλη για την παρέα του και την πολύτιμη συνεισφορά του σε όλη τη διατριβή.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τον αδελφό μου και τους γονείς μου για την υποστήριξη και βοήθειά τους (συγγνώμη πατέρα, τελικά δεν έγινα γιατρός). Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τη σύζυγό μου Αντωνία, το κεντρικό άτομο στη ζωή μου και το σημαντικότερο παράγοντα ευτυχίας μου: Χωρίς εσένα, αγαπητή μου, αυτή η περιπέτεια θα ήταν δυσκολότερη και σαφώς λιγότερο διασκεδαστική.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σχήματα.....	viii
Συντμήσεις.....	x
1. Εισαγωγή.....	1
1.1. Η οργάνωση του γενετικού υλικού στον πυρήνα.....	1
1.1.1. Τα χρωμοσώματα οργανώνονται σε διάκριτες περιοχές στο μεσοφασικό πυρήνα.....	1
1.1.2. Το DNA περιέχεται στα νουκλεοσώματα και στις ίνες χρωματίνης.....	4
1.2. Δυνατότητα πρόσβασης της χρωματίνης και μηχανισμοί αναδιαμόρφωσης αυτής.....	8
1.2.1. Δυναμική της χρωματίνης μέσω τροποποιήσεων των ιστονών..	8
1.2.2. Η χρωματίνη αναδιαμορφώνεται από ATP-εξαρτώμενα σύμπλοκα.....	11
1.3. Η συνδετική ιστόνη H1 επάγει την αναδίπλωση της χρωματίνης σε δομές ανώτερης τάξης.....	13
1.3.1. Δομή της συνδετικής ιστόνης H1.....	13
1.3.2. Υποκατηγορίες της συνδετικής ιστόνης H1.....	14
1.3.3. Λειτουργίες της ιστόνης H1 στο κύτταρο.....	15
1.4. Παραθυμοσίνη: μια πυρηνική πρωτεΐνη που περιέχει πολυγλουταμικές αλληλουχίες.....	17
1.4.1. Προσδιορισμός και χαρακτηρισμός της παραθυμοσίνης (ParaT).....	17
1.4.2. Η βιολογική λειτουργία της ParaT στο κύτταρο.....	18
1.4.3. Άλλες πυρηνικές πρωτεΐνες που περιέχουν πολυγλουταμικές περιοχές.....	20
1.4.3.1. Νουκλεοπλασμίνη.....	20
1.4.3.2. Template activating factor I-Beta (TAF-Iβ).....	21
1.4.3.3. Προθυμοσίνη άλφα (ProTa).....	22
1.5. Στόχοι της εργασίας.....	24



2.	Υλικά και μέθοδοι.....	25
2.1.	Καθαρισμός της παραθυμοσίνης.....	25
2.1.1.	ParaT από ήπαρ αιγός.....	25
2.1.2.	Ανασυνδυσασμένη ParaT από <i>E. coli</i>	29
2.2.	Τεχνικές ανάλυσης πρωτεϊνών.....	30
2.2.1.	Προσδιορισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης.....	30
2.2.1.1.	Πρωτεϊνικός προσδιορισμός χρησιμοποιώντας το BCA Protein Determination Kit (Pierce).....	30
2.2.1.2.	Πρωτεϊνικός προσδιορισμός κατά Bradford.....	31
2.2.2.	Ηλεκτροφόρηση πηκτής SDS-πολυακριλαμιδίου (SDS-PAGE).....	32
2.2.3.	Τεχνικές πρωτεϊνικής χρώσης.....	34
2.2.3.1.	Χρώση Coomassie Blue.....	34
2.2.3.2.	Χρώση με άργυρο.....	34
2.2.4.	Τεχνικές πρωτεϊνικής τροποποίησης	36
2.2.4.1.	Ραδιενεργή σήμανση της ιστόνης H1 με Πρωτεϊνική Κινάση C.....	36
2.2.4.2.	Ραδιενεργή σήμανση ParaT με Κινάση Καζεΐνης II.....	37
2.3.	Τεχνικές ανάλυσης δεσοξυριβονουκλεϊνικού οξέως (DNA).....	38
2.3.1.	Κλωνοποίηση DNA σε πλασμιδιακούς φορείς.....	38
2.3.2.	Μικρής κλίμακας παρασκευή DNA ("Mini-Prep").....	39
2.3.3.	Μεγάλης κλίμακας παρασκευή DNA ("Midi-Prep").....	39
2.3.4.	Ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης.....	41
2.4.	Ανοσοχημικές τεχνικές.....	42
2.4.1.	Ομοιοπολική σύνδεση του πεπτιδίου της παραθυμοσίνης σε Affigel-matrix για τον καθαρισμό αντισωμάτων.....	42
2.4.2.	Καθαρισμός ειδικών αντισωμάτων εναντίον της ParaT από ορό κουνελιών.....	43
2.4.3.	Έμμεσος ανοσοφθορισμός και συνεστιακή μικροσκοπία.....	44
2.4.4.	Αποτύπωση κατά Western κι ανίχνευση με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (ECL).....	44
2.4.4.1.	Αποτύπωση κατά Western.....	44



2.4.4.2.	ECL (Amersham) για την ανίχνευση πρωτεϊνών σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης.....	46
2.5.	<i>In vitro</i> ανασύνθεση της χρωματίνης.....	46
2.5.1.	Σήμανση του DNA με βιοτίνη.....	46
2.5.2.	Σύνδεση βιοτινιλιωμένου DNA σε παραμαγνητικά σφαιρίδια, καλυμένα με στρεπταβιδίνη.....	47
2.5.3.	Ανασύνθεση χρωματίνης <i>in vitro</i>	48
2.5.4.	Πέψη της ανασυγκροτημένης χρωματίνης με μικροκοκκική νουκλεάση.....	50
2.6.	Διαχωρισμός της χρωματίνης από HeLa και πέψη με μικροκοκκική νουκλεάση.....	51
2.7.	Τεχνικές κυτταροκαλλιέργειας.....	53
2.7.1.	Διαδικασίες κυτταροκαλλιέργειας.....	53
2.7.2.	Συντήρηση, διαχωρισμός κι αποθήκευση των κυττάρων HeLa.	54
2.7.3.	Συγχρονισμός HeLa σε G ₀ -, G ₁ /S-, S- και M-φάση του κυτταρικού κύκλου.....	55
2.7.4.	Παροδική διαμόλυνση των κυττάρων HeLa στην καλλιέργεια	56
2.7.5.	Δημιουργία κυτταρικής σειράς HeLa που να υπερεκφράζει σταθερά ParaT.....	57
2.8.	Μελέτες αποσυμπύκνωσης της χρωματίνης.....	58
2.8.1.	Μελέτη αποσυμπύκνωσης της χρωματίνης από ανθρώπινο σπέρμα.....	58
2.8.2.	Μελέτη αποσυμπύκνωσης της χρωματίνης από HeLa κύτταρα.	59
2.8.3.	Μέτρηση της πυρηνικής επιφάνειας.....	60
2.9.	Αναστολή της έκφρασης της ParaT σε HeLa χρησιμοποιώντας τη μέθοδο RNAi.....	60
2.9.1.	Κατασκευή του πλασμιδίου pRNAi-ParaT.....	60
2.9.2.	Έλεγχος για την αναστολή της έκφρασης της ParaT σε κύτταρα HeLa.....	62
2.10.	Ανοσοκατακρήμνιση.....	63
2.11.	Ανοσοϊστοχημεία.....	64



3.	Αποτελέσματα.....	67
3.1.	Υποπυρηνικός Εντοπισμός της ParaT στα κύτταρα HeLa.....	67
3.2.	Μελέτη της κινητικότητας της ParaT με τη μέθοδο FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching)...	70
3.3.	Η ParaT μειώνει το Πυρηνικό Μήκος Επανάληψης (NRL) της ανασυγκροτημένης χρωματίνης.....	71
3.4.	Η ParaT επηρεάζει τη σύνδεση της H1 με τη χρωματίνη.....	72
3.5.	Δομικές αλλαγές της ιστόνης H1 όταν συνδέεται με την ParaT.....	75
3.6.	Αποσυμπύκνωση της χρωματίνης ανθρώπινου σπέρματος <i>in vitro</i>.....	77
3.7.	Αποσυμπύκνωση της χρωματίνης στα κύτταρα HeLa με GFP-ParaT.....	78
3.8.	Διαχωρισμός ενεργού και ανενεργού χρωματίνης από HeLa κύτταρα που υπερεκφράζουν GFP-ParaT.....	80
3.9.	Η αποσυμπύκνωση της χρωματίνης από την ParaT έχει επιπτώσεις στην ακεραιότητα των πυρηνικών φακέλων.....	83
3.10.	Ανοσοϊστοχημεία λεμφικών ιστών με αντισώματα ενάντια στην ParaT.....	83
3.10.1.	Έκφραση της ParaT στους λεμφαδένες και τη σπλήνα.....	85
3.10.2.	Η έκφραση της ParaT στους λεμφαδένες και τη σπλήνα βρίσκεται στα λεμφοκύτταρα T κι όχι B.....	87
3.10.3.	Η έκφραση της ParaT βρίσκεται κατά προτίμηση στα CD4⁺ βοηθητικά κι όχι στα CD8⁺ κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα....	91
3.10.4.	Έκφραση της ParaT στο θύμο αδένα.....	93
3.11.	Προκαταρκτικά πειράματα.....	94
3.11.1.	Προσδιορισμός των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την ParaT.....	94
3.11.2.	Μείωση της έκφρασης της ParaT στα κύτταρα HeLa.....	97



4.	Συζήτηση.....	99
4.1.	Η ParaT συνδέεται με την H1 κι αλλάζει τη συγγένεια της συνδετικής ιστόνης για τα νουκλεοσώματα.....	100
4.2.	Η ParaT αποσυμπυκνώνει τη χρωματίνη <i>in vitro</i> και <i>in vivo</i>	102
4.3.	Η ParaT δεν εντοπίζεται σε ετεροχρωματινικές περιοχές.....	104
4.4.	Δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά της αλληλεπίδρασης ParaT-H1.....	105
4.5.	Έκφραση της ParaT στους λεμφικούς ιστούς.....	107
5.	Περίληψη.....	109
6.	Summary.....	113
7.	Βιβλιογραφία.....	117



ΣΧΗΜΑΤΑ

- Σχήμα 01:** Μοντέλο CT-IC μιας λειτουργικής αρχιτεκτονικής του πυρήνα
- Σχήμα 02:** Το DNA πακετάρεται σε διαφορετικά λειτουργικά επίπεδα
- Σχήμα 03:** Το DNA περιέχεται μέσα στα νουκλεοσώματα
- Σχήμα 04:** Ο πυρήνας του νουκλεοσώματος
- Σχήμα 05:** Δυο μοντέλα συμπίκνωσης χρωματίνης ανώτερης δομής
- Σχήμα 06:** Τροποποιήσεις των ουρών των ιστονών
- Σχήμα 07:** Σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης που εξαρτώνται από ATP
- Σχήμα 08:** Η σύνδεση του σφαιροειδούς τμήματος μιας συνδετικής ιστόνης σε ένα νουκλεόσωμα
- Σχήμα 09:** Σχηματική αναπαράσταση της δομής της ParaT.
- Σχήμα 11:** Σχέδιο καθαρισμού της παραθυμοσίνης.
- Σχήμα 12:** Καθαρισμός της παραθυμοσίνης
- Σχήμα 13:** Καθαρισμός της ανασυνδυαζόμενης ParaT
- Σχήμα 14:** Φυσιολογικά αναδιαμορφωμένη χρωματίνη (Sandaltzopoulos *et al.*, 1994)
- Σχήμα 15:** Διαδικασία κλασμάτωσης της χρωματίνης.
- Σχήμα 16:** Εντοπισμός της ParaT και της EGFP-ParaT στα κύτταρα HeLa
- Σχήμα 17:** Πρωτεϊνική έκφραση της ParaT σε όλον τον κυτταρικό κύκλο.
- Σχήμα 18:** Αρχικές μελέτες FRAP σε HeLa που εκφράζουν σταθερά GFP-ParaT.
- Σχήμα 19:** Η ParaT μειώνει το NRL
- Σχήμα 20:** Η ParaT έχει επιπτώσεις στη σύνδεση της H1 στην χρωματίνη
- Σχήμα 21:** Αλλαγές της διαμόρφωσης της H1 κατά την αλληλεπίδραση με την ParaT
- Σχήμα 22:** Αποσυμπύκνωση της χρωματίνης σε ανθρώπινο σπέρμα από την ParaT
- Σχήμα 23:** Η ParaT προκαλεί αποσυμπύκνωση της χρωματίνης στα κύτταρα HeLa
- Σχήμα 24:** Κλασμάτωση της χρωματίνης
- Σχήμα 25:** Η υπερέκφραση της ParaT στα κύτταρα HeLa έχει επιπτώσεις στην ακεραιότητα των πυρηνικών φακέλων.
- Σχήμα 26:** Χρώση ParaT φυσιολογικού λεμφαδένου.
- Σχήμα 28:** Η έκφραση ParaT στους λεμφαδένες και τη σπλήνα έχει σχέση με την έκφραση της CD3.



Σχήμα 29: Η ParaT δεν εκφράζεται σε λεμφοκύτταρα B που εκφράζουν CD20.

Σχήμα 30: Η έκφραση της ParaT έχει σχέση με την έκφραση του CD4 κι όχι του CD8 στα λεμφοκύτταρα T.

Σχήμα 31: Έκφραση της ParaT στο θύμο αδένα.

Σχήμα 32: Ανοσοκατακρήμνιση

Σχήμα 33: Αποτύπωση κατά Western του ParaT-IP αποκαλύπτει την ενδιάμεση αλυσίδα κυτταροπλασματικής δυνεΐνης 70,1 kDa.



ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

A: Alanine, αμινοξύ αλανίνη

APS: ammonium persulfate, υπερ-θεικό αμμώνιο.

BSA: Bovine serum albumin, αλβουμίνη ορού βοός

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

EDTA: Ethylenetriaminetetraacetic acid, αιθυλένο-τριάμινο-τετραοξικό οξύ.

FCS: Fetal bovine calf serum, ορός εμβρύου μόσχου.

FITC: Fluroscein-5-isothiocyanate

GFP: Green fluorescence protein, πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη

K: Lysine, αμινοξύ λυσίνη

L: Leucine, αμινοξύ λευκίνη

mRNA: messenger RNA, αγγελιοφόρο RNA

N: Asparagine, αμινοξύ ασπαραγίνη

PBS: Phosphate buffer saline

PI: Propidium iodide, ιωδιούχο προπίδιο

S: Serine, αμινοξύ σερίνη

SDS: Sodium dodecacyl sulphate, δωδεκύλοθειικό νάτριο

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

Tris: Τρις-υδροξύμεθυλένο-διαμίνη

TRITC: Tetramethylrhodamine-isothiocyanate

Trypan blue: Κυανούν του τροπανίου



1. Εισαγωγή

1.1. Η οργάνωση του γενετικού υλικού στον πυρήνα

1.1.1. Τα χρωμοσώματα οργανώνονται σε διάκριτες περιοχές στο μεσοφασικό πυρήνα

Το γονιδίωμα, το σύνολο των γονιδίων ενός οργανισμού, ήταν πάντα ένα κεντρικό ερευνητικό πεδίο στον τομέα της Βιολογίας. Από τότε που οι Watson και Crick, πριν από περίπου 50 χρόνια, αντιλήφθηκαν τη σημασία του δεσοξυριβονουκλεϊνικού οξέος (DNA), έχει σημειωθεί πολλή πρόοδος για να κατανοηθεί το γονίδιο και η πρωτεϊνική ποικιλομορφία. Το αποκορύφωμα αυτής της καινοτόμου ανακάλυψης επιτεύχθηκε το έτος 2001 όταν η κοινοπραξία Celera και μια ομάδα ερευνητών διαμόρφωσαν την "Κοινοπραξία Διεθνούς Ανθρώπινου Γονιδιώματος" και προσδιόρισαν την αλληλουχία ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος (Lander, 2001; Venter, 2001).

Τα τελευταία 20 χρόνια η οργάνωση του πυρήνα έχει διευκρινιστεί κι έχει προκύψει μια νέα εικόνα της πυρηνικής οργάνωσης. Ο πυρήνας είναι μια ιδιαίτερα οργανωμένη δομή που ενισχύεται από τα εδάφη (CT) χρωμοσωμάτων κι ένα τμήμα (IC) διαχρωματίνης (Cremer and Cremer, 1993; Cremer, 2001). Μια περιοχή χρωμοσωμάτων είναι μια ευδιάκριτη φυσική μορφή ενός χρωμοσώματος στους μεσοφασικούς πυρήνες, όπου τα χρωμοσώματα καταλαμβάνουν ένα σημαντικό μέρος του πυρηνικού όγκου σε αντιδιαστολή με όταν είναι πλήρως αποσυμπυκνωμένα (Williams, 2003). Θεωρείται ότι τα χρωμοσώματα, καθώς καταλαμβάνουν μια συγκεκριμένη θέση στον πυρήνα, δεν αναμιγνύονται μεταξύ τους κι είναι επομένως αλληλοαποκλειόμενα (Visser and Aten, 1999). Αυτό το ευρέως αποδεκτό μοντέλο CT-IC (Σχήμα 1) προβλέπει ότι το IC είναι ένα τρισδιάστατο δίκτυο καναλιών που αρχίζει στους πυρηνικούς πόρους κι επεκτείνεται και μεταξύ γειτονικών CT και στο εσωτερικό μεμονωμένων CT (Cremer and Cremer, 2001).

Εκτός από τις χρωμοσωμικές περιοχές, ο κυτταρικός πυρήνας περιέχει πολλά άλλα μικρότερα τμήματα (Lamond and Earnshaw, 1998; Schul *et al.*, 1998; Spector, 1993; Spector, 2001; van Driel *et al.*, 1995), τα οποία παρουσιάζουν υψηλή λειτουργική ιδιαιτερότητα. Παραδείγματος χάριν, η μεταγραφή εμφανίζεται σε αρκετές εκατοντάδες χρωμοσωμικές θέσεις (Jackson *et al.*, 1993; Wansink *et al.*, 1993) και θέσεις αντιγραφής του DNA παρουσιάζονται οργανωμένες χωρικά και χρονικά (Manders *et al.*, 1992;



Nakayasu and Berezney, 1989). Επιπλέον και πιο ενδιαφέρον, συνδετικοί παράγοντες συγκεντρώνονται σε μικρές περιοχές που κατανέμονται στον πυρήνα κι εμφανίζονται να εκτείνονται προς τα έξω προς τα ενεργά γονίδια (Misteli *et al.*, 1997). Προκειμένου να κατανοηθεί πλήρως η έννοια του διαχωρισμού του πυρήνα σε CT και μικρότερα λειτουργικά τμήματα, πρέπει κανείς να μελετήσει τους παράγοντες τον ένα σε σχέση με τον άλλο.

Πολλή δουλειά έχει γίνει για να μελετηθεί η οργάνωση των χρωμοσωμάτων και των μικρότερων πυρηνικών τμημάτων και η τρέχουσα έρευνα εστιάζεται στην κατανόηση των σχέσεων δομής-λειτουργίας μέσα στα χρωμοσώματα. Οι σχέσεις δομής-λειτουργίας ήδη έχουν περιγραφεί καλά για τους πυρηνίσκους: οι περιοχές οργάνωσης των πυρηνίσκων είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες και RNA, διαμορφώνοντας διαμερίσματα που ειδικεύονται στην εκτέλεση διαφορετικών στόχων (Scheer and Benavente, 1990). Η πραγματική έρευνα εστιάζεται στον τρόπο με τον οποίο οι περιοχές πυκνές σε γονίδια και οι θέσεις ενεργών γονιδίων οργανώνονται στα εδάφη χρωματίνης και στον τρόπο με τον οποίο η μεταγραφική δραστηριότητα τους διαδραματίζει ένα ρόλο στον προσδιορισμό της θέσης τους στο πυρηνικό διάστημα, σε σύγκριση με τα μη μεταγραφόμενα γονίδια. Πολλά δεδομένα υποδηλώνουν ότι τα ενεργά γονίδια μπορούν να βρεθούν μέσα στο χρωμόσωμα στην επιφάνεια περιοχών συμπυκνωμένης χρωματίνης που καλύπτουν την εσωτερική επιφάνεια των IC (Mahy *et al.*, 2002) καθώς επίσης και την εξωτερική (Volpi *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2002). Επιπλέον, φαίνεται ότι η πυκνότητα και η μεταγραφή γονιδίων επηρεάζουν τον εντοπισμό των χρωμοσωμικών περιοχών έξω από τα εδάφη (Mahy *et al.*, 2002). Επίσης, όπως φαίνεται στο Σχήμα 1 (ένθετο 3), ανώτερες δομές συμπυκνωμένης χρωματίνης περιέχουν ενεργά γονίδια (άσπρες κουκίδες) στην επιφάνεια, και μη μεταγραφόμενα γονίδια (μαύρες κουκίδες) στο εσωτερικό της δομής αυτής (Belmont and Bruce, 1994). Είναι πιο ενδιαφέρον ότι η επιφανειακή θέση των ενεργών γονιδίων στις ανώτερης δομής χρωματινικές περιοχές τα εκθέτει σε διαφορετικά μικρότερα πυρηνικά τμήματα στον χώρο IC, όπως μάτισμα, μεταγραφή και σύμπλοκα επιδιόρθωσης του DNA (Σχήμα 1, ε). Επιπλέον, γονίδια ενεργούς μεταγραφής βρίσκονται σε όλο το CT, αλλά τα μη μεταγραφόμενα γονίδια εντοπίζονται στην περιοχή της ετεροχρωματίνης του κεντρομερούς (Σχήμα 1β, ένθετο 2)(Brown *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 1997; Dernburg





Σχήμα 1: Μοντέλο CT-IC μιας λειτουργικής αρχιτεκτονικής του πυρήνα.

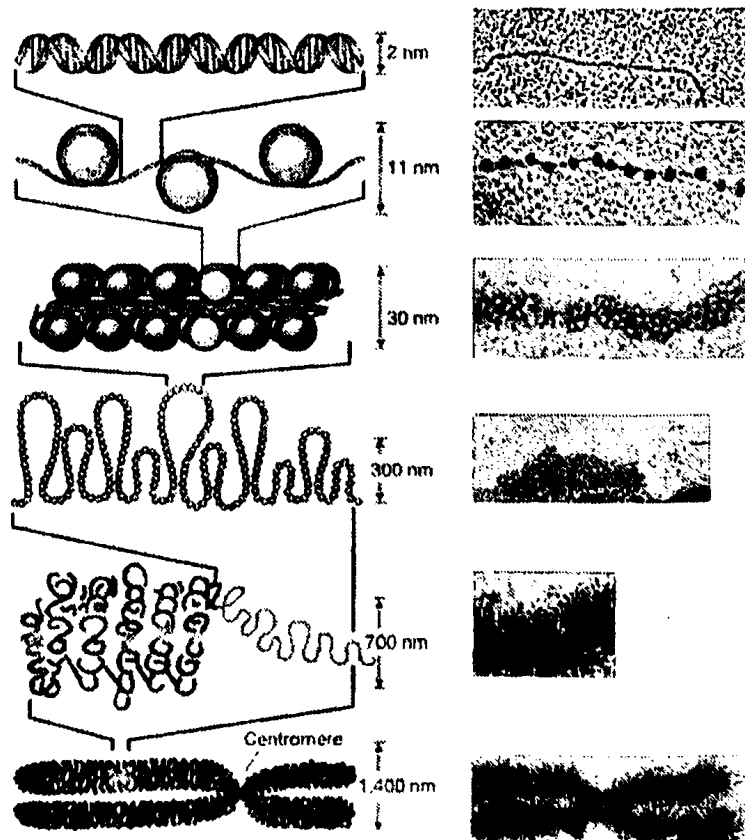
Κυτταρικός πυρήνας HeLa που εκφράζει H2B-GFP. Τα μεγενθυμένα τμήματα δείχνουν τη σχέση δομής-λειτουργίας της ρύθμισης των γονιδίων στην υποκείμενη δομή που παρουσιάζεται. α) Ένθετο 1: Ένας βρόχος DNA από ένα CT (κίτρινο) με μια συστοιχία ενεργών γονιδίων επεκτείνεται στην περιοχή IC (μαύρο). β) Τα CT διαιρούνται σε ξεχωριστές περιοχές του κοντού (πράσινο) και μακρού (κόκκινο) βραχίονα του χρωμοσώματος, (αστερίσκος) κεντρομερική ετεροχρωματίνη. Ένθετο 2: Μη μεταγραφηθέντα γονίδια βρίσκονται στην περιοχή της κεντρομερούς ετεροχρωματίνης (χαμηλότερο τμήμα, μαύρες περιοχές πάνω στο DNA), ενώ δεν υπάρχουν ενεργά μεταγράφοι γονίδια (πάνω τμήμα, άσπρες περιοχές πάνω στο DNA). γ) Η φτωχή σε γονίδια (κόκκινο) και η πλούσια σε γονίδια (πράσινο) χρωματίνη βρίσκονται χωριστά ή μια από την άλλη στα CT: οι φτωχές σε γονίδια περιοχές βρίσκονται κατά προτίμηση στην περιφέρεια του πυρήνα στο παχύ έλασμα (κίτρινο) και κοντά στον πυρηνίσκο (nu), οι πλούσιες σε γονίδια περιοχές βρίσκονται στο μεσοδιάστημα. δ) Ένθετο 3: Η ανώτερης δομής συμπιεσμένη χρωματίνη εντοπίζει ενεργά γονίδια (άσπρες κουκίδες) στην επιφάνεια, και τα μη μεταγραφόμενα γονίδια (μαύρες κουκίδες) στο εσωτερικό της δομής της. ε) Οι τοπολογικές σχέσεις μεταξύ του IC και των ενεργών κι ανενεργών γονιδίων. Τα ενεργά γονίδια (άσπρες κουκίδες) βρίσκονται στην επιφάνεια αυτών των περιοχών συμπιεσμένης χρωματίνης και τοποθετούνται προς πυρηνικά υποδιαμερίσματα (πορτοκαλί κουκίδες) που εμπλέκονται π.χ. στη μεταγραφή και στο μάτισμα. Τα μη μεταγραφηθέντα γονίδια (μαύρες κουκίδες) αντίθετα, βρίσκονται στο εσωτερικό. (Το σχέδιο πάρθηκε από τους Cremer and Cremer, 2001).



et al., 1996). Επιπλέον, οι φτωχές σε γονίδια περιοχές βρίσκονται κατά προτίμηση στο πυρηνικό έλασμα και στον πυρηνίσκο, ενώ οι πλούσιες σε γονίδια χρωματινικές περιοχές εντοπίζονται στο μεσοδιάστημα (Σχήμα 1γ). Η θέση τους στον πυρήνα υπαγορεύει επίσης τον χρόνο αντιγραφής τους, με τις πλούσιες σε γονίδια περιοχές να αντιγράφονται νωρίς και τις φτωχές σε γονίδια περιοχές να αντιγράφονται αργότερα στη φάση S.

1.1.2. Το DNA περιέχεται στα νουκλεοσώματα και στις ίνες χρωματίνης

Η έρευνα για την πυρηνική οργάνωση κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών όχι μόνο αποκάλυψε ότι τα χρωμοσώματα διαμορφώνουν ευδιάκριτα εδάφη στον μεσοφασικό πυρήνα, αλλά βοήθησε επίσης να κατανοηθεί η σύνθετη συμπίκνωση του γενετικού υλικού στον πυρήνα (Σχήμα 2).

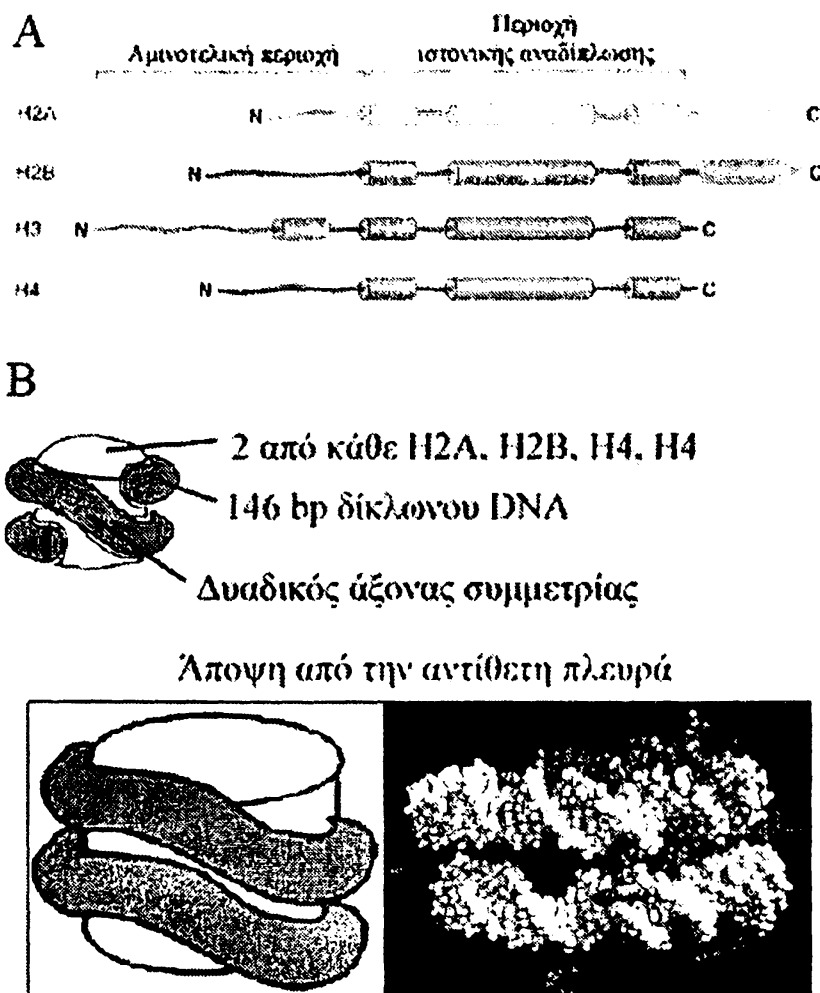


Σχήμα 2: Το DNA πακετάρεται σε διαφορετικά λειτουργικά επίπεδα.

Το DNA πακετάρεται σε 11 nm «σφαιρίδια-σε-μα-αλληλουχία», που μετά από περαιτέρω συμπίκνωση χτίζει την ίνα της χρωματίνης 30 nm. Αριστερά: Διαφορετικά επίπεδα συμπίκνωσης DNA. Δεξιά: Αντίστοιχες εικόνες EM.



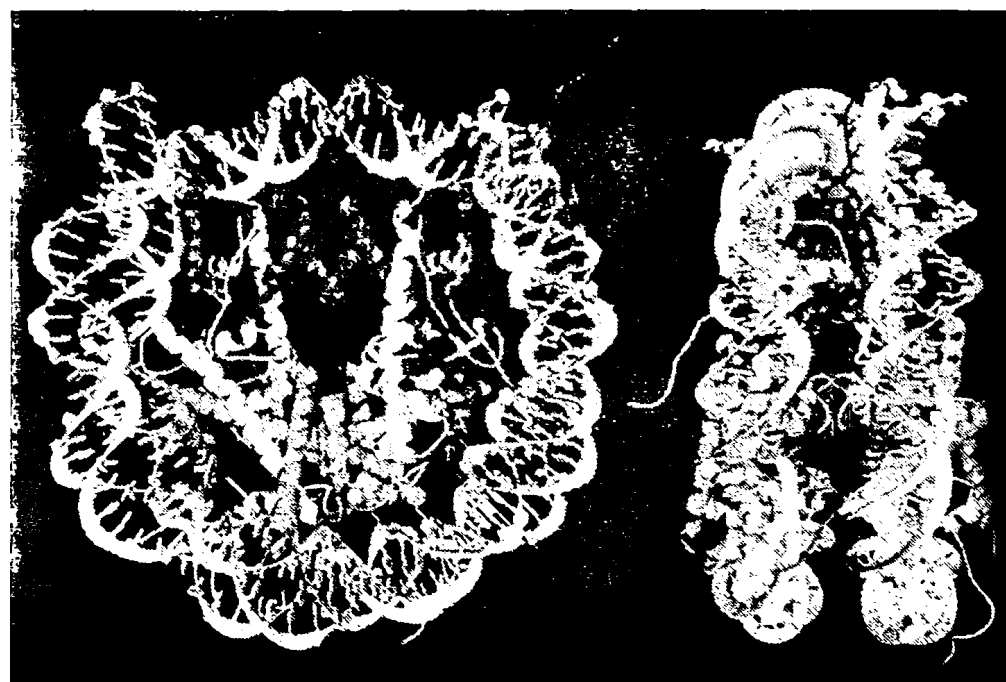
Το DNA περιέχεται γύρω από ένα οκταμερές ιστονών (δυο από κάθε H2A, H2B, H3 και H4) που δημιουργούν το νουκλεόσωμα, το οποίο είναι η βασική δομική μονάδα της χρωματίνης (van Holde, 1988; Wolffe, 1998)(Σχήμα 3). Η χρωματίνη είναι το δομικό πλαίσιο στο οποίο αναφέρονται οι ερευνητές κατά την εξέταση του DNA-πρωτεϊνικού συγκροτήματος που εξυπηρετεί όχι μόνο για τη σύνθεση αλλά για τη ρύθμιση του γενετικού υλικού.



Σχήμα 3: Το DNA περιέχεται μέσα στα νουκλεοσώματα.

A) Οι ιστόνες χτίζουν τον πυρήνα του νουκλεοσώματος. Σχηματικά σχεδιασμένη δομή των τεσσάρων ιστονών κορμού H2A, H2B, H3 και H4. Οι βασικές αμινοτελικές ουρές είναι περιοχές ποικίλων μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων. Οι περιοχές αναδίπλωσης των ιστονών ευθύνονται για αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών. **B) Το νουκλεόσωμα.** Δυο από κάθε ιστόνη κορμού χτίζουν τη δομή της πρωτεΐνης όπου τυλίγεται το DNA, δημιουργώντας τον πυρήνα του νουκλεοσώματος. (πάνω μέρος) Άποψη κοιτώντας στο σημείο εισόδου/εξόδου του DNA. (κάτω μέρος) Άποψη από την άλλη πλευρά. Δεξιά: Μοντέλο που παρουσιάζει τις βασικές αμινοτελικές ουρές των ιστονών κορμού που προεξέχουν από τον πυρήνα.

Η κρυσταλλική δομή με ακτίνες X του πυρήνα του νουκλεοσώματος έχει αναλυθεί άλυση 2.8 Å, (Luger *et al.*, 1997) που παρουσιάζει την ακριβή μορφή που παίρνει DNA και την αλληλεπίδρασή του με το οκταμερές των ιστονών (Σχήμα 4). Αυτό το εόσωμα και τον χρωματινικό φραγμό είναι που πρέπει να υπερνικήσουν οι ίνες για να εκτελέσουν τη λειτουργία τους στη μεταγραφή, την αντιγραφή, τον ρυθμισμό και την επιδιόρθωση. Πολλά στοιχεία έχουν δείξει ότι πράγματι η δυνατότητα πρόσβασης πρωτεϊνών στο DNA σχετίζεται με την αποσυμπύκνωση της χρωματίνης.



α 4: Ο πυρήνας του νουκλεοσώματος.

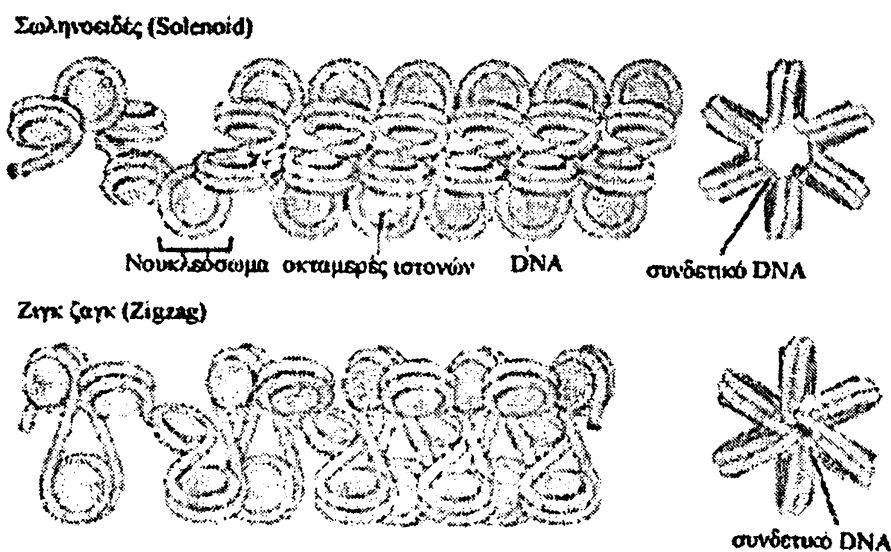
με ακτίνες X του πυρήνα του νουκλεοσώματος. Οι πρωτεΐνες ιστόνης είναι διαταγμένες οκταμερή (δύο από κάθε ιστόνη H2A, H2B, H3, και H4) και το DNA είναι τυλιγμένο από αυτά. Η H3 είναι μπλε, η H4 είναι κόκκινη, η H2A είναι πράσινη και η H2B είναι γαλάζια. Οι δύο αλυσίδες του DNA είναι πορφυρό και πορτοκαλί. Οι αμινοτελικές ουρές των ιστονών κορμού προεξέχουν από τον πυρήνα του νουκλεοσώματος και ευθύνονται για αρκετούς διαφορετικούς τύπους διανουκλεοσωμικών αλληλεπιδράσεων και είναι αντικείμενα για μεταγραφικές τροποποιήσεις. (αριστερά) Μετωπική άποψη. (δεξιά) Πλάγια άποψη μετά από στροφή 90° του κάθετου άξονα. (Το σχέδιο πάρθηκε από τον Luger *et al.*, 1997).

Έχει υποστηριχθεί ότι η συμπύκνωση της χρωματίνης συνδέεται με την υπερφόρτωση του αρνητικού φορτίου του DNA. Οι πρωτεΐνες που δρουν *in trans*, οι πιο συνηθισμένες των οποίων είναι οι συνδετικές ιστόνες, εξουδετερώνουν το φορτίο του



συνδετικού DNA κι εμπλέκονται στη συμπίκνωση της νουκλεοσωμικής σειράς σε ίνες της χρωματίνης 30 nm. Επιπλέον, οι ιστόνες κορμού που χτίζουν τα νουκλεοσώματα περιέχουν μακριές βασικές ουρές που προεξέχουν από το μόριο, οι οποίες ευθύνονται για πολλούς διαφορετικούς τύπους διανουκλεοσωματικών αλληλεπιδράσεων και για τη σταθεροποίηση της συμπίκνωσης ανώτερης χρωματινικής δομής (Carruthers and Hansen, 2000).

Δυο πρότυπα έχουν προταθεί που περιγράφουν τις πιθανές διατάξεις των νουκλεοσωμάτων σε μια ίνα χρωματίνης 30 nm (Σχήμα 5). Το μοντέλο σωληνοειδών (Finch and Klug, 1976) προτείνει μια κανονική δομή με τη συσπείρωση του συνδετικού DNA και το σχηματισμό υπερελικόμενων στροφών. Το πιο πρόσφατο εναλλακτικό μοντέλο περιγράφει ένα ανώμαλο σχέδιο ζιγκ-ζαγκ με το συνδετικό DNA μέσα στην ίνα (Woodcock *et al.*, 1993). Πρόσφατες παρατηρήσεις που χρησιμοποιούν οπτικά λέιζερ φαίνεται να ευνοούν το μοντέλο ζιγκ-ζαγκ. Η τρέχουσα αντίληψη όμως είναι ότι η διάταξη των νουκλεοσωμάτων δεν είναι τόσο ομαλή και μπορεί να περιλάβει πορείες ζιγκ-ζαγκ και μη δομημένες περιοχές (Woodcock and Dimitrov, 2001). Η προφανής πολυπλοκότητα των ινών 30 nm πιθανώς αντανakλά διάφορες καταστάσεις διαμόρφωσης των πρωτεϊνικών μορίων που εμπλέκονται στους μηχανισμούς δημιουργίας από ανενεργές ίνες ετεροχρωματίνης σε ευχρωματίνη.



Σχήμα 5: Δυο μοντέλα συμπίκνωσης χρωματίνης ανώτερης δομής.

Το σωληνοειδές μοντέλο που περιγράφηκε από τους Finch και Klug (1976) και το μοντέλο ζιγκ ζαγκ που προτιμήθηκε από τον Woodcock (1993). Και τα δυο μοντέλα τοποθετούν τη συνδετική ιστόνη στο εσωτερικό της ανώτερης δομής συμπίκνωσης.

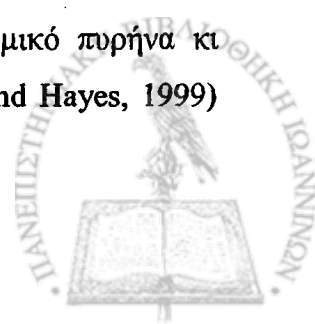


1.2. Δυνατότητα πρόσβασης της χρωματίνης και μηχανισμοί αναδιαμόρφωσης αυτής

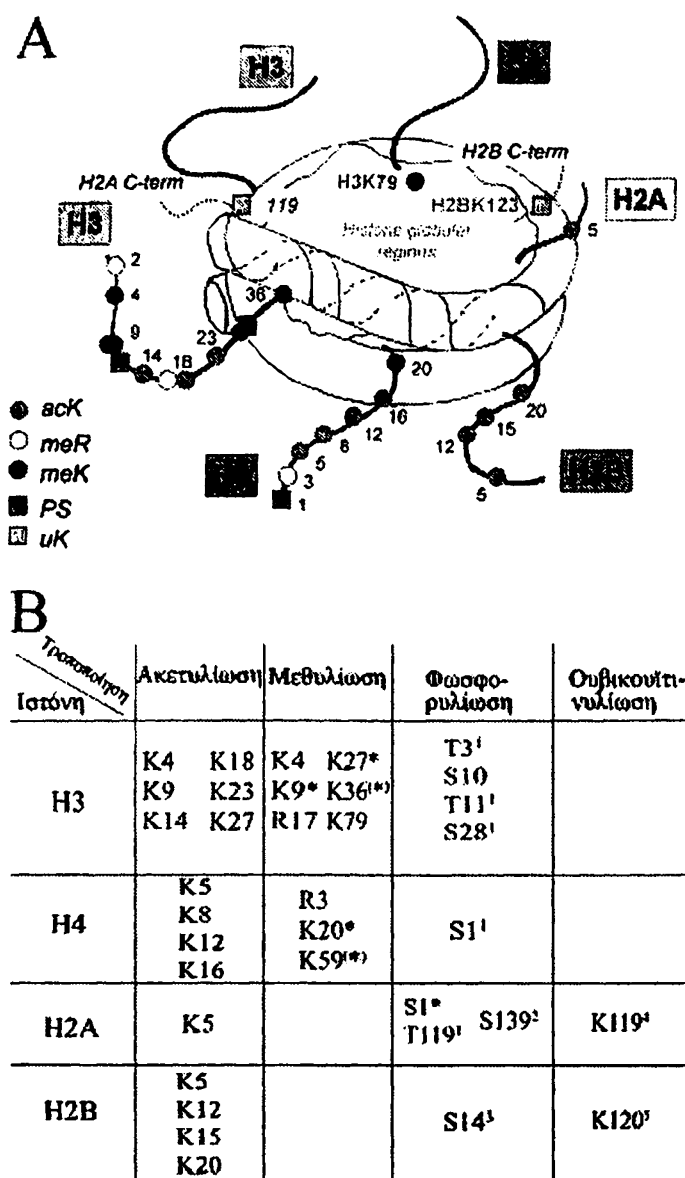
Η διαμόρφωση της χρωματίνης διαδραματίζει έναν κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση των πυρηνικών παραγόντων που θέλουν να αποκτήσουν πρόσβαση στο DNA. Ένα από τα πιο θεμελιώδη ζητήματα στην βιολογία είναι πώς χειριζόμαστε τη χρωματίνη για τη ρύθμιση της μεταγραφής συγκεκριμένων γονιδίων. Μια ευρεία ποικιλία ενζύμων συμμετέχουν σε αυτές τις διαδικασίες που μπορούν να έχουν επιπτώσεις στη σταθερότητα του νουκλεοσώματος είτε διασπώντας τις επαφές ιστόνης-DNA είτε τροποποιώντας ομοιοπολικά ιστόνες ή/και DNA. Μεταξύ των διάφορων ενζύμων τροποποίησης της χρωματίνης, υπάρχουν τρεις κύριες δομικά ευδιάκριτες κατηγορίες: α) ένζυμα που τροποποιούν ομοιοπολικά τις ιστόνες, τα οποία ακετυλιώνουν, φωσφορυλιώνουν, ουβικουϊτινυλιώνουν ή μεθυλιώνουν ιστόνες κι αλλάζουν τη συμπύκνωση της χρωματίνης β) ATP-εξαρτώμενα αναδιαμορφωτικά σύμπλοκα χρωματίνης που μπορούν να αναδιοργανώσουν τη δομή του νουκλεοσώματος και να αυξήσουν τη δυνατότητα πρόσβασης στο DNA και γ) πρωτεΐνες που περιέχουν αλληλουχίες όξινων αμινοξέων στην ακολουθία τους.

1.2.1. Δυναμική της χρωματίνης μέσω τροποποιήσεων των ιστονών

Οι αμινοτελικές ουρές των ιστονών είναι οι περιοχές διάφορων τύπων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης κατά τη διάρκεια της μεταγραφής, της αντιγραφής και της επιδιόρθωσης του DNA (Zheng and Hayes, 2003). Αυτές οι περιοχές προσδιορίστηκαν αρχικά από την ευαισθησία τους στις πρωτεάσες (Bohm and Crane-Robinson, 1984). Επόμενες μελέτες αποκάλυψαν ότι η απομάκρυνση των ουρών α) δεν αλλάζει ριζικά τη διαμόρφωση ή τις υδροδυναμικές ιδιότητες των μεμονωμένων νουκλεοσωμάτων (Ausio *et al.*, 1989) και β) δεν επηρεάζει τον προσδιορισμό της θέσης του νουκλεοσώματος ή τη σωστή συγκέντρωση των νουκλεοσωμάτων *in vitro* (Dong *et al.*, 1990; Hayes *et al.*, 1991). Οι αμινοτελικές περιοχές των ιστονών προεξέχουν από τον νουκλεοσωμικό πυρήνα κι εμπλέκονται στη συμπύκνωση των 10-nm νουκλεοσωμάτων (Wolffe and Hayes, 1999)



και στη σταθεροποίηση των δομών μέσω των οποίων η ίνα της χρωματίνης αναδιπλώνεται μέσα στο χρωμόσωμα (Annunziato *et al.*, 1988).



Σχήμα 6: Τροποποιήσεις των ουρών των ιστονών.

A) Σχέδιο. Πυρήνας του νουκλεοσώματος που απεικονίζει διαφορετικούς τρόπους τροποποίησης των ουρών των ιστονών. Οι τροποποιημένες ουρές μιας από τις δυο παραλλαγές ιστόνης παρουσιάζονται. acK: ακετυλιωμένη λυσίνη, meR: μεθυλιωμένη αργινίνη, meK: μεθυλιωμένη λυσίνη, PS: φωσφορυλιωμένη σερίνη, uK: ουβικουτίνυλιωμένη λυσίνη (Το σχέδιο πάρθηκε από τον Peterson, 2002). **B) Πίνακας.** Μια σύνοψη γνωστών τροποποιήσεων ουρών ιστονών και οι αντίστοιχες λειτουργίες τους. Τα τροποποιημένα αμινοξέα παρουσιάζονται με κωδικό ενός γράμματος και η θέση τους στην πρωτεΐνη φαίνεται με έναν αριθμό. Αν δεν υπάρχει δείκτης μετά από το τροποποιημένο αμινοξύ, αυτό δείχνει ότι η τροποποίηση σχετίζεται με μεταγραφική ενεργοποίηση, ενώ οι άλλοι δείκτες δείχνουν: Μεταγραφική αποσιώπηση (Αστερίσκος), Μίτωση (1), Επισκευή DNA (2), Απόπτωση (3), Σπερματογένεση (4) και Μείωση (5).



Έχει αποδειχθεί ότι οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ουρών των ιστονών (ακετυλίωση, μεθυλίωση, φωσφορυλίωση κι ουβικουΐτινυλίωση) καθορίζουν λειτουργικές δομές της ίνας της χρωματίνης (Σχήμα 6). Αυτές οι αλλαγές στη δομή της χρωματίνης συμβάλλουν στη ρύθμιση της μεταγραφής, της αντιγραφής και της επιδιόρθωσης του DNA. Μεταξύ αυτών, η ακετυλίωση ιστόνης έχει μελετηθεί πολύ καλά κι έχει συσχετιστεί γενικά με την ενεργοποίηση των γονιδίων. Παραδείγματος χάριν, οι συνενεργοποιητές που απαιτούνται για τη μεταγραφική ενεργοποίηση λειτουργούν ως ακετυλοτρανσφεράσες ιστόνης (Brownell and Allis, 1996) ενώ οι συν-καταστολείς σαν αποακετυλάσες (Taunton *et al.*, 1996).

Εκτός από την ακετυλίωση ουρών ιστόνης, κι άλλες μορφές τροποποίησης έχουν κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων, (πχ μεθυλίωση). Σε αντίθεση με την ακετυλίωση, η μεθυλίωση δε μπορεί να εμπλέκεται αποκλειστικά είτε σε μεταγραφική ενεργοποίηση είτε σε καταστολή. Παραδείγματος χάριν, η μεθυλίωση της λυσίνης 4 στην ιστόνη H3 (H3 Lys4) συνδέεται γενικά με μεταγραφική ενεργοποίηση (Roguev *et al.*, 2001), ενώ η παρουσία μεθυλικών ομάδων στην H3 Lys9 είναι υπεύθυνη για μη μεταγραφή (Peters *et al.*, 2002; Snowden *et al.*, 2002). Ένα επιπλέον επίπεδο πολυπλοκότητας προστίθεται από τον αριθμό μεθυλικών ομάδων (μια, δυο ή τρεις) που μπορούν να ενσωματωθούν σε ένα συγκεκριμένο υπόλοιπο. Σε αντίθεση με το τεράστιο ρεπερτόριο ενζύμων ακετυλίωσης/αποακετυλίωσης που έχει προσδιοριστεί μέχρι τώρα, υπάρχει μόνο μια αναφορά για απομεθυλάση ιστόνης (Shi *et al.*, 2004). Αυτό θα μπορούσε να σημαίνει ότι η μεθυλίωση μπορεί να είναι μια λιγότερο δυναμική διαδικασία κι ένας σταθερότερος δείκτης για τις ενεργές ή μη μεταγραφόμενες περιοχές της χρωματίνης.

Η συμβολή της φωσφορυλίωσης στη γονιδιακή έκφραση έχει μελετηθεί αρκετά τα τελευταία χρόνια. Παραδείγματος χάριν, η φωσφορυλίωση της H3 Ser10 στα κύτταρα ενδιάμεσης φάσης σχετίζεται με αυξανόμενη μεταγραφή κατά τη διάρκεια α) της κυτταρικής διαφοροποίησης (DeManno *et al.*, 1999) και β) της ενεργοποίησης της μεταγραφής από μιτογόνα (Thomson *et al.*, 1999). Επιπλέον, υπάρχει ένας συσχετισμός μεταξύ της φωσφορυλίωσης της H3 Ser10 και της ακετυλίωσης της Lys9 ή Lys14, καθώς και μεταξύ της φωσφορυλίωσης της H3 Ser10 και της απομεθυλίωσης της Lys-9 (Rea *et al.*, 2000). Εκτός από τη μεταγραφική ενεργοποίηση, φωσφορυλίωση της H3 Ser10 έχει



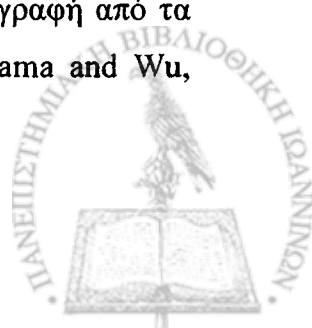
ανιχνευθεί επίσης στα κύτταρα που υποβάλλονται σε μίτωση (Hendzel *et al.*, 1997) και μείωση (Speliotes *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 1998) και συσχετίζεται με τη συμπύκνωση της χρωματίνης.

Αυτά τα συνδυασμένα συμπεράσματα για τροποποιήσεις της ουράς των ιστονών κορμού οδήγησαν στην υπόθεση ενός "ιστονικού κώδικα", που εισήχθη πρώτα από τους Strahl και Allis (Strahl and Allis, 2000). Υποτίθεται ότι το μεγάλο δίκτυο των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που διακοσμούν τις ουρές ιστόνης αντιπροσωπεύει ένα μηχανισμό για τη διαφορική ρύθμιση της δραστηριότητας της χρωματίνης σε διάφορες βιολογικές περιπτώσεις.

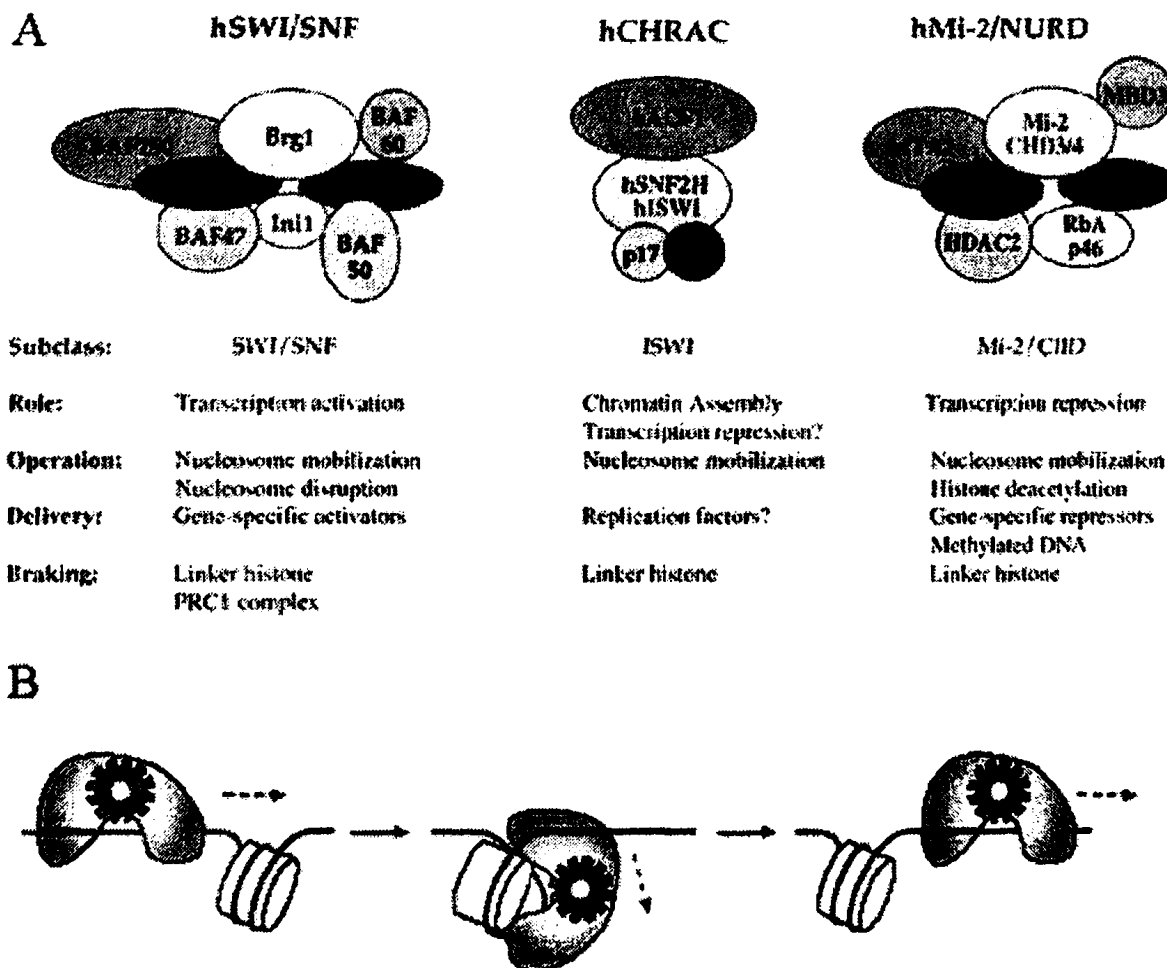
1.2.2. Η χρωματίνη αναδιαμορφώνεται από ATP-εξαρτώμενα σύμπλοκα

Εκτός από τις ομοιοπολικές τροποποιήσεις των ιστονών, οι αλληλεπιδράσεις ιστονών-DNA στα νουκλεοσώματα αναδιαμορφώνονται από μια ποικιλία ATP-εξαρτώμενων ενζύμων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης (Σχήμα 7). Αυτά τα σύμπλοκα έχουν διαφορές στην πρωτεϊνική σύνθεσή τους, αλλά όλα περιέχουν μια υπομονάδα που ανήκει στην Snf2 οικογένεια των ATPασων (Σχήμα 7Α). Το SWI/SNF σύμπλοκο, για παράδειγμα, που περιέχει την υπομονάδα Swi2/Snf2 ATPase, είναι το πιο λεπτομερώς μελετημένο σύμπλοκο αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης. Είναι ένα μεγάλο (~2 MDa) σύμπλοκο που έχει συντηρηθεί από τη ζύμη μέχρι τον άνθρωπο. Τα σύμπλοκα SWI/SNF δρουν στις μεταγραφικές ρυθμιστικές περιοχές από συγκεκριμένης ακολουθίας DNA-συνδετικούς παράγοντες για τη ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητας μέσω της αναδιαμόρφωσης της δομής της χρωματίνης (Peterson and Logie, 2000; Sudarsanam and Winston, 2000). Στη ζύμη, το SWI/SNF σύμπλοκο έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται στη ρύθμιση περίπου του 5% των γονιδίων (Sudarsanam *et al.*, 2000).

Έχει βρεθεί ότι οι παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης καταλύουν: α) την κινητοποίηση κι επαναδιάταξη των νουκλεοσωμάτων (Becker and Horz, 2002), β) τη μεταφορά του οκταμερούς ιστόνης από ένα νουκλεόσωμα σε ένα ξεχωριστό πρότυπο DNA (Varga-Weisz, 2001), γ) την εύκολη πρόσβαση των νουκλεασών στο νουκλεοσωμικό DNA (Kingston and Narlikar, 1999), δ) την εύκολη μεταγραφή από τα πρότυπα χρωματίνης (Di Croce *et al.*, 1999; Neely *et al.*, 2002; Tsukiyama and Wu,



1995) και ε) τη συγκέντρωση σειρών νουκλεοσωμάτων (Ito *et al.*, 1997; LeRoy *et al.*, 2000). Ο κυριότερος προτεινόμενος μηχανισμός των ATP-εξαρτώμενων συμπλόκων αναδιαμόρφωσης περιλαμβάνει την δημιουργία ενός βρόχου DNA (μεταβλητού μεγέθους) που πολλαπλασιάζεται διασχίζοντας την επιφάνεια του οκταμερούς των ιστονών (Σχήμα 7B)(Haushalter and Kadonaga, 2003; Lusser and Katonaga, 2003).



Σχήμα 7: Σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης που εξαρτώνται από ATP.

A) Τρεις υποκατηγορίες συμπλόκων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης που εξαρτώνται από ATP. Παρουσιάζονται εδώ αντιπροσωπευτικά μέλη των SWI/SNF, ISWI και Mi/CHD υποκατηγοριών συμπλόκων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης που βρίσκονται στα ανθρώπινα κύτταρα. Η αποτύπωση υπομονάδων είναι μόνο για σκοπούς απεικόνισης (Peterson, 2002). **B)** *Κινητικότητα του νουκλεοσώματος.* Το νουκλεόσωμα κινείται σε σχέση με το DNA από τη δραστηριότητα π.χ. μιας συγκέντρωσης χρωματίνης που χρησιμοποιεί ATP και αναδιαμορφωτικό παράγοντα (ACF). Τα διακεκομμένα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση της κίνησης της motor πρωτεΐνης (Το σχέδιο πάρθηκε από τους Haushalter, 2003, και Lusser, 2003).



Το σύμπλοκο αναδιαμόρφωσης κινείται κατά μήκος του DNA (Σχήμα 7B, α) και χωρίζει ένα τμήμα του DNA από ένα τέλος του νουκλεοσώματος (β). Ενώ το σύμπλοκο κινείται, το DNA χωρίζεται μπροστά στην επιφάνεια. Μετά από το μηχανικό διαχωρισμό, η θέση του DNA έχει αλλάξει σε σχέση με το νουκλεόσωμα κι ως εκ τούτου, το νουκλεόσωμα έχει κινηθεί κατά μήκος του DNA (γ).

1.3. Η συνδετική ιστόνη H1 επάγει την αναδίπλωση της χρωματίνης σε δομές ανώτερης τάξης

1.3.1. Δομή της συνδετικής ιστόνης H1

Ένας βασικός παράγοντας για τη ρύθμιση της δυναμικής της χρωματίνης είναι η συνδετική ιστόνη H1. Αυτή η πρωτεΐνη συνδέεται στο εξωτερικό των νουκλεοσωμάτων και σταθεροποιεί τις ιδιαίτερα συμπυκνωμένες δομές της χρωματίνης (Carruthers *et al.*, 1998; Carruthers and Hansen, 2000). Η ενσωμάτωση της H1 στη χρωματίνη συμπυκνώνει και σταθεροποιεί την ίνα της χρωματίνης κι αυξάνει την περιοχή που προστατεύεται από νουκλεάση από 146 έως 165 bp. Μια τέτοια δομή παρεμποδίζει την σύνδεση των παράγοντων μεταγραφής στο DNA.

Όλα τα μέλη της οικογένειας των συνδετικών ιστονών περιέχουν τρεις δομικές περιοχές: μια κεντρική σφαιρική που πλαισιώνεται από μακριές βασικές καρβοξυτελικές και κοντές αμινοτελικές ουρές (van Holde, 1988; Wolffe, 1998). Το παραδοσιακό μοντέλο για τη δέσμευση της H1 στον πυρήνα του νουκλεοσώματος δείχνει ότι η σφαιρική περιοχή της συνδετικής ιστόνης δεσμεύεται στο εξωτερικό του DNA, στο σημείο όπου το DNA μπαίνει κι αφήνει τη δομή του πυρήνα του νουκλεοσώματος (Σχήμα 8)(Thomas, 1999). Πιο πρόσφατα έχει γίνει σαφές ότι η συνδετική ιστόνη μπορεί στην πραγματικότητα να βρίσκεται μέσα στις σπείρες του DNA που τυλίγονται γύρω από τις ιστόνες κορμού. Αυτό δείχνει ότι η συνδετική ιστόνη δεν είναι συμμετρικά συνδεδεμένη με την είσοδο και την έξοδο του DNA, αλλά μάλλον μετατοπίζεται περίπου 60 νουκλεοτίδια από το κέντρο (άξονας δυάδας) του νουκλεοσωμικά συνδεδεμένου DNA (Σχήμα 8)(Hayes *et al.*, 1996; Pruss *et al.*, 1996).

Η αλληλεπίδραση των συνδετικών ιστονών με το DNA πετυχαίνεται μέσω της σφαιρικής περιοχής (Goytisolo *et al.*, 1996; Thomas, 1999; Travers, 1999) και της



καρβοξυτελικής ουράς (Hendzel *et al.*, 2004; Lu and Hansen, 2004). Η δομή της σφαιρικής περιοχής μοιάζει πολύ με αυτήν των πρωτεϊνών που συνδέονται στο DNA τύπου DNA winged helix και δεν παρουσιάζει καμιά ομοιότητα με την περιοχή της στονικής αναδίπλωσης (histone fold) που βρίσκεται στις ιστόνες κορμού. Η αμινοτελική ουρά, που είναι πλούσια στα αμινοξέα αλανίνη, σερίνη και λυσίνη, θεωρείται ότι υιοθετεί μια α -ελικοειδή διαμόρφωση όταν δεσμεύεται στο συνδετικό DNA. Αυτή η σύνδεση εξουδετερώνει τα φορτία στη σπονδυλική στήλη του DNA και διευκολύνει τη συμπίκνωση της χρωματίνης (Clark and Thomas, 1988; Lu and Hansen, 2004; Vila *et al.*, 2000).



Σχήμα 8: Η σύνδεση του σφαιροειδούς τμήματος μιας συνδετικής ιστόνης σε ένα νουκλεόσωμα.

Παρουσιάζεται η θέση του σφαιροειδούς τμήματος της H1 σε ένα νουκλεόσωμα. (A) Συμμετρικό μοντέλο (Allan *et al.*, 1980). (B) Bridging-μοντέλο (Zhou *et al.*, 1998). (T) Ασυμμετρικό μοντέλο (Hayes *et al.*, 1994).

1.3.2. Υποκατηγορίες της συνδετικής ιστόνης H1

Υπάρχουν επτά υποκατηγορίες συνδετικής ιστόνης στα θηλαστικά (H1.1-H1.5, H1t, H1o). Η κάθε υποκατηγορία έχει χαρακτηριστεί σε πρωτεϊνικό και μοριακό επίπεδο στον άνθρωπο (Albig *et al.*, 1997) και στον ποντικό (Wang *et al.*, 1997). Πέντε από τις επτά παραλλαγές (H1.1-H1.5) αναφέρονται ως σωματικές υποκατηγορίες, οι οποίες μοιράζονται μια ιδιαίτερα διατηρημένη ακολουθία σφαιροειδούς πεδίου ενώ



παρουσιάζουν παραλλαγή στις καρβοξυτελικές κι αμινοτελικές ουρές (Albig *et al.*, 1997). Τέσσερις από αυτές τις πέντε υποκατηγορίες υπάρχουν σε όλα τα σωματικά κύτταρα (Franke *et al.*, 1998; Parseghian *et al.*, 1994), ενώ το πέμπτο μέλος περιορίζεται στο θύμο αδένα, στους όρχεις, στον σπλήνα, και στα νευρικά κύτταρα (Franke *et al.*, 1998; Rasheed *et al.*, 1989). Η αφθονία αυτών των παραλλαγών κυμαίνεται ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο καθώς επίσης και τη φάση του κυτταρικού κύκλου, τη διαφοροποίηση και το αναπτυξιακό στάδιο (Brown, 2001; Brown, 2003; Cole, 1987; Parseghian and Hamkalo, 2001; Parseghian *et al.*, 2001). Η H1t είναι μια συνδετική ιστόνη που βρίσκεται ειδικά στους όρχεις (Seyedin *et al.*, 1981) και παρουσιάζουν αλλαγές στη σφαιρική περιοχή και στις ουρές σε σύγκριση με τις σωματικές υποκατηγορίες (Albig *et al.*, 1997). Η ιστόνη H1o έχει μια πολύ αποκλίνουσα αμινοξική ακολουθία στη σφαιρική περιοχή και στις ουρές, σε σύγκριση με τα άλλα μέλη (Albig *et al.*, 1997). Στα μη θηλαστικά, οι ερευνητές έχουν βρει μια δεύτερη παραλλαγή, την H5, η οποία έχει σχέση με την H1o κι εκφράζεται μόνο σε εμπύρηννα ερυθροκύτταρα στα πτηνά και τα αμφίβια (Khochbin and Wolffe, 1994).

1.3.3. Λειτουργίες της ιστόνης H1 στο κύτταρο

Μελέτες έλλειψης της ιστόνης H1 σε διάφορα είδη έχουν προωθήσει την κατανόησή μας σχετικά με τη λειτουργία της H1. Η έλλειψη της συνδετικής ιστόνης H1 σε *Tetrahymena Thermophila* δεν άλλαξε τον αριθμό των ώριμων RNA που παρήχθησαν από γονίδια που μεταγράφηκαν από πολυμεράσεις I, II και III (Shen and Gorovsky, 1996). Ωστόσο, βρέθηκε ότι η ιστόνη H1 απαιτείται για την καταστολή καθώς επίσης και την ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων. Αυτά τα αποτελέσματα προσδιόρισαν την H1 κι ως θετικό κι ως αρνητικό ρυθμιστή της μεταγραφής *in vivo*. Επιπλέον, έρευνα σε ποντίκια που στερούνται την H1o (Sirotkin *et al.*, 1995), έδειξε ότι αυτή η έλλειψη δεν παρουσίασε καμιά επίδραση στην κανονική ανάπτυξη των ποντικιών. Φαίνεται λοιπόν ότι οι υποκατηγορίες H1c, H1d και H1e αντιστάθμισαν την απώλεια της H1o ώστε να διατηρήσουν μια κανονική στοιχειομετρία της H1 προς τα νουκλεοσώματα. Επιπλέον, τα ελλειμματικά ποντίκια για δυο από τις τρεις υποκατηγορίες της H1 (που αναφέρθηκαν προηγουμένως) δεν παρουσίασαν καμιά επίδραση στην ανάπτυξη τους (Fan *et al.*, 2001).



Εντούτοις, η έλλειψη και των τριών από αυτές εμπόδισε την κανονική ανάπτυξη των ποντικών και τα έμβρυα πέθαναν στα μέσα της κύησης (Fan *et al.*, 2003). Επομένως, η ρύθμιση της στοιχειομετρίας H1/νουκλεοσώματος είναι κρίσιμη για κανονική ανάπτυξη.

Η λειτουργία της ιστόνης H1 έχει συσχετιστεί πολύ με τη μεταγραφική ρύθμιση δεδομένου η H1 έχει ήδη καθιερωθεί ως ένας γενικός καταστολέας της μεταγραφής (Gao *et al.*, 1998; Schlissel and Brown, 1984). Πιστευόταν ότι οι παράγοντες μεταγραφής δε μπορούσαν να έχουν πρόσβαση στις αντίστοιχες περιοχές συνδέσεών τους στο DNA λόγω της συμπύκνωσης της χρωματίνης μέσω της H1 (Laybourn and Kadonaga, 1991). Όμως, πρόσφατες μελέτες έχουν αμφισβητήσει το ρόλο της H1 ως γενικού μεταγραφικού καταστολέα (Howe *et al.*, 1998; Sera and Wolffe, 1998; Shen and Gorovsky, 1996). Αυτές οι μελέτες δείχνουν ότι, αντί να είναι ένας γενικός καταστολέας της μεταγραφής, η συνδετική ιστόνη H1 μπορεί να επηρεάζει την μεταγραφική ενεργοποίηση ή καταστολή συγκεκριμένων γονιδίων. Επιπλέον, δυο πρόσφατες μελέτες έδειξαν τη συμμετοχή της ιστόνης H1 στην παρεμπόδιση της ακετυλίωσης των ουρών των ιστονών από την ακετυλοτρανσφεράση p300/CBP, εμπλέκοντας τις συνδετικές ιστόνες στη ρύθμιση της ακετυλίωσης των ιστονών (Gunjan *et al.*, 2001; Herrera *et al.*, 2000). Η H1 έχει εμπλακεί επίσης στην παρεμπόδιση της αντιγραφής της χρωματίνης. Ο Lu και οι συνάδελφοί του έδειξαν ότι η H1 εμποδίζει τη συγκέντρωση των συμπλόκων προ-αντιγραφής (pre-RC) και την έναρξη της αντιγραφής στο DNA (Lu *et al.*, 1998).

Ωστόσο, όλες αυτές οι μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί με μια ετερογενή ομάδα υποκατηγοριών συνδετικής ιστόνης. Μόνο πρόσφατα οι ερευνητές άρχισαν να ερευνούν τη λειτουργία κάθε υποκατηγορίας ξεχωριστά για να προσδιορίσουν τους συγκεκριμένους ρόλους τους. Δυο ανεξάρτητες μελέτες που έγιναν πρόσφατα δίνουν έμφαση στο σημαντικό ρόλο των συγκεκριμένων υποκατηγοριών της H1 στην ανάπτυξη και την απόπτωση. Η H1.b, μια συγκεκριμένη υποκατηγορία της H1 στα ποντίκια που εκφράζεται στα αδιαφοροποίητα κύτταρα, καταστέλλει ειδικά την έκφραση του γονιδίου MyoD, και περιορίζει έτσι την ανάπτυξη μυών (Lee *et al.*, 2004). Επιπλέον, ανταποκρινόμενη στα σπασίματα διπλών-αλυσίδων του DNA, μόνο η H1.2 μεταφέρεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και προκαλεί την αρχή της απόπτωσης μέσω της απελευθέρωσης του κυττοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια (Konishi *et al.*, 2003).



Συλλογικά, οι ιδιότητες της συνδετικής ιστόνης H1 δείχνουν ότι τοπική μετατόπιση H1 ή/και αναδιοργάνωση είναι απαραίτητες για την αποδοτική αναδιοργάνωση της χρωματίνης κατά τη διάρκεια διάφορων DNA-εξαρτώμενων διαδικασιών. Επομένως, ο ρόλος των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της H1 είναι ένας σημαντικός ερευνητικός τομέας για την κατανόηση της λειτουργίας της H1 στο κύτταρο.

1.4. Παραθυμοσίνη: μια πυρηνική πρωτεΐνη που περιέχει πολυγλουταμικές αλληλουχίες

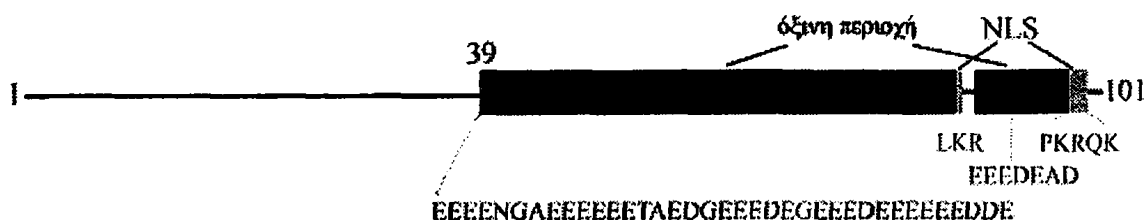
Στη δεκαετία του εξήντα ο White και οι συνάδελφοί του ξεκίνησαν να ανιχνεύσουν και να απομονώσουν χυμικούς παράγοντες από θύμο που θα αποκαθιστούσαν τη λειτουργία του θύμου π.χ. στους ανθρώπους με ασθένειες ανεπάρκειας αντισωμάτων και σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Το αρχικό υλικό ήταν κλάσμα θυμοσίνης 5 από βοοειδή θύμο αδένα, το οποίο παρασκευάστηκε με μια διαδικασία πέντε σταδίων (Goldstein *et al.*, 1966). Μεταγενέστερες εργασίες έδειξαν ότι το κλάσμα θυμοσίνης 5 αποτελείται από ένα μίγμα πολυπεπτιδίων (1000-15000 Daltons), τα οποία στη συνέχεια απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν. Αν και το κλάσμα 5 βελτίωσε τις ανοσολογικές αντιδράσεις, η έρευνα άλλων ομάδων έδειξε ότι κανένα από τα απομονωμένα πεπτίδια δεν είναι πραγματικά μια θυμική ορμόνη, αλλά αντίθετα είναι πρωτεΐνες με διαφορετικές ενδοκυτταρικές λειτουργίες.

1.4.1. Προσδιορισμός και χαρακτηρισμός της παραθυμοσίνης (ParaT)

Η ParaT απομονώθηκε αρχικά από το θύμο αδένα αρουραίων (Haritos *et al.*, 1985). Λόγω της δομικής ομοιότητας της με την προθυμοσίνη α (ProTa), μια παρόμοια πρωτεΐνη σε μέγεθος και σύνθεση αμινοξέων, ονομάστηκε παραθυμοσίνη α (Haritos *et al.*, 1985). Το ανθρώπινο γονίδιο ParaT εντοπίστηκε στην περιοχή q12----q22 του χρωμοσώματος 17 (Szabo *et al.*, 1989) στη θέση LAG-3/CD4 (Bruniquel *et al.*, 1997). Το γονίδιο αποτελείται από 5 εξόνια που διακόπτονται από ένα μεγάλο ιντρόνιο (2,5 kbp) και τρία μικρά ιντρόνια. Πιστεύεται ότι η πρωτεΐνη συντίθεται χωρίς σχηματισμό ενός μεγαλύτερου προδρόμου (Trompeter and Soling, 1992). Μελέτες σε επίπεδο mRNA



και πρωτεϊνών σε διάφορους ιστούς έδειξαν ότι η ParaT εκφράζεται ευρέως με υψηλές συγκεντρώσεις στο συκώτι, τα νεφρά και τον εγκέφαλο, και με χαμηλότερες συγκεντρώσεις στο θύμο αδένα και τη σπλήνα (Brand *et al.*, 1991; Clinton *et al.*, 1989). Γενικά, φαίνεται να υπάρχει ένα σχέδιο κατανομής της ParaT και της ProTa: οι ιστοί που περιέχουν υψηλά επίπεδα ParaT περιέχουν χαμηλά επίπεδα ProTa κι αντίστροφα (Clinton *et al.*, 1989). Όλες οι πρωτεΐνες ParaT ακετυλιώνονται στην αμινοτελική σερίνη κι αποτελούνται από 101 αμινοξέα (Σχήμα 9), ενώ δεν περιέχουν αμινοξέα που περιέχουν θείο, ιστιδίνη, ισολευκίνη κι αρωματικά αμινοξέα (Haritos *et al.*, 1985). Η κεντρική περιοχή αποτελείται κυρίως από υπολείμματα ασπαρτικού οξέος και γλουταμινικού οξέος (Σχήμα 9)(Frangou-Lazaridis, 1988). Το ισοηλεκτρικό σημείο της ParaT είναι 4,15, το οποίο είναι λιγότερο όξινο σε σχέση με το pI 3,55 της ProTa (Haritos *et al.*, 1985).



Σχήμα 9: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της ParaT.

Οι δυο κύριες όξινες αλληλουχίες της ParaT (μαύρα κουτιά) και το διμερές σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS, γκρι κουτιά) παρουσιάζονται. Οι ακολουθίες αμινοξέων παρουσιάζονται από κάτω. Οι αριθμοί δείχνουν τις θέσεις των αμινοξέων.

1.4.2. Η βιολογική λειτουργία της ParaT στο κύτταρο

Ο Haritos και οι συνάδελφοί του αρχικά υποστήριξαν ότι η ParaT μπορεί να διαμορφώνει τη δράση της ProTa στην προστασία ευαίσθητων στελεχών ποντικών από τυχαία μόλυνση με *Candida albicans* (Haritos *et al.*, 1985). Αργότερα προέκυψε μια νέα υπόθεση για τη λειτουργία της ParaT. Ο Söling και οι συνάδελφοί του προσδιόρισαν την ParaT από το συκώτι αρουραίων ως τον παράγοντα που εμποδίζει το γλυκολυτικό ένζυμο φωσφοφρουκτοκινάση-1 (Brand and Soling, 1986; Trompeter *et al.*, 1989) κι άλλα βασικά ένζυμα του μεταβολισμού υδατανθράκων (Brand and Heinicke, 1991). Η



πρωτεΐνη αποδείχθηκε ότι έχει δυο συγκεκριμένες περιοχές σύνδεσης για ψευδάργυρο ($K_D \approx 6 \mu M$) (Brand *et al.*, 1988) κι ότι περιέχει ένα διμερές πυρηνικό σήμα εντοπισμού (NLS) που ευθύνεται για την πυρηνική στόχευση της πρωτεΐνης (Trompeter *et al.*, 1996).

Η βιολογική λειτουργία της ParaT είναι ακόμα αμφισβητούμενη δεδομένου ότι η πρωτεΐνη μπορεί να παρουσιάζει διαφορετικές λειτουργίες ανάλογα με την κυτταρική θέση της. Παρά τον προσδιορισμό ενός διμερούς NLS και την πυρηνική θέση εγχυμένης ParaT στα ωκύτταρα *Xenopus* (Watts *et al.*, 1990), σε μερικούς τύπους κυττάρων η πρωτεΐνη βρέθηκε εντοπισμένη στο κυτταρόπλασμα (Brand *et al.*, 1991). Τα δωδεκαδακτυλικά και νιστιδικά cmyt κύτταρα παρουσίασαν ισχυρή πυρηνική χρώση, ενώ τα κύτταρα που βρίσκονται στην κορυφή των λαχνών παρουσίασαν κυτταροπλασματική χρώση (Brand *et al.*, 1991). Η θέση της πρωτεΐνης στο κύτταρο φαίνεται να εξαρτάται από τον τύπο, την πυκνότητα και το στάδιο πολλαπλασιασμού/διαφοροποίησης των κυττάρων (Trompeter *et al.*, 1996; Trompeter *et al.*, 1999). Στις μόνιμες κυτταρικές σειρές η ParaT βρίσκεται αποκλειστικά στον πυρήνα (Trompeter *et al.*, 1999). Πιο πρόσφατη δουλειά χρησιμοποιώντας ανοσοφθορισμό κι συνεστιακή μικροσκοπία ανίχνευσης πρότεινε ένα ρόλο της ParaT στην πρόωρη αντιγραφή (Vareli *et al.*, 2000). Επιπλέον, η ParaT αποδείχθηκε ότι συνδέεται με τον ενεργοποιημένο υποδοχέα των γλυκοκορτικοστεροειδών (GR receptor) κι εμποδίζει τη σύνδεσή του με πυρήνες *in vitro*, που υπονοεί ότι η όξινη πρωτεΐνη μπορεί να ρυθμίζει τη δράση των γλυκοκορτικοστεροειδικών υποδοχέων (Okamoto and Isohashi, 2000).

Πιο πρόσφατα, η λειτουργία της ParaT εμπλέχτηκε στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης. Η ParaT αποδείχθηκε ότι συνδέεται ειδικά με την ιστόνη H1 *in vitro* και *in vivo* (Kondili *et al.*, 1996). Είναι ενδιαφέρον ότι η ParaT δεν ήταν ικανή να συνδεθεί με την ιστόνη H1 στη *Drosophila*, παρά τις ομοιότητες στη σειρά και τη δομή μεταξύ της πρωτεΐνης της *Drosophila* και των μοσχαριών. Η σύνδεση της ParaT με την ιστόνη H1 *in vitro* ενισχύθηκε επίσης όταν προστέθηκε Zn^{2+} στο μίγμα αντίδρασης, που συμφωνεί με το γεγονός ότι αυτή η πρωτεΐνη συνδέεται με Zn-κατιόντα (Brand *et al.*, 1988; Brand and Soling, 1986). Η προσθήκη γλουταμινικού οξέως στην αντίδραση δεσμών ανέστειλε την αλληλεπίδραση ParaT-H1, υποδείχνοντας την συμμετοχή της όξινης περιοχής της ParaT στην αλληλεπίδραση αυτή.



1.4.3. Άλλες πυρηνικές πρωτεΐνες που περιέχουν πολυγλουταμικές περιοχές

Το 1987 ο Earnshaw υποστήριξε ότι οι πρωτεΐνες που φέρουν όξινες αλληλουχίες στην ακολουθία των αμινοξέων τους θα μπορούσαν να συμμετέχουν σε μηχανισμούς αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης (Earnshaw, 1987). Μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με τις ιστόνες, οι πρωτεΐνες με ανιονικές περιοχές μπορεί να αποσταθεροποιούν τις αλληλεπιδράσεις DNA-ιστόνης και να αλλάξουν τη δομή της χρωματίνης. Επίσης, προτάθηκε ότι οι πρωτεΐνες που περιέχουν ανιονικές περιοχές θα μπορούσαν να είναι συστατικά των συμπλόκων αντιγραφής ή μεταγραφής που μπορεί να αλληλεπιδρούν άμεσα με άλλες χρωματινικές πρωτεΐνες. Πιο σημαντικά, μια λειτουργία ορισμένων πρωτεϊνών με όξινες περιοχές θα μπορούσε να είναι το ξετύλιγμα της συμπυκνωμένης ανώτερης δομής ίνας της χρωματίνης, καθιστώντας το DNA πιο προσιτό για τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες

Πρόσφατες μελέτες προσδιόρισαν έναν αυξανόμενο αριθμό πρωτεϊνών που φέρουν όξινες αλληλουχίες κι έχουν δείξει τη σχέση αυτών με τη λειτουργία της χρωματίνης (Νουκλεοπλασμίνη, ProTa, TAF- Iβ, ομαδικές πρωτεΐνες υψηλής κινητικότητας (HMGB), Νουκλεοφωσμίνη/B21).

1.4.3.1. Νουκλεοπλασμίνη

Η νουκλεοπλασμίνη απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1978 από αυγά κι ωοκύτταρα των *Xenopus laevis* κι είναι η αφθονότερη πρωτεΐνη στους πυρήνες ωοκυττάρων *Xenopus* (Mills *et al.*, 1980). Ανήκει στην οικογένεια των "μοριακών συνοδών", οι οποίοι διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους στη συγκέντρωση νουκλεοσωμάτων κατά τη διάρκεια της πρώιμης ανάπτυξης των *Xenopus* (Laskey *et al.*, 1978). Η πρωτεΐνη περιέχει 200 αμινοξέα, συμπεριλαμβανομένης μιας περιοχής 20 πολυγλουταμινικών αμινοξέων (A2) στο κέντρο της πρωτεΐνης (Σχήμα 10, NSMN)(Dingwall *et al.*, 1987). Η νουκλεοπλασμίνη υιοθετεί μια πενταμερή δομή στο διάλυμα. Η δομή της ανασυνδυαζόμενης περιοχής πενταμερών πυρήνων *Xenopus* και *Drosophila* έχει προσδιοριστεί σε ανάλυση 2,3 Å και 1,5 Å, αντίστοιχα (Dutta *et al.*, 2001; Namboodiri *et al.*, 2003).



ParaT 37-VVEEEENGAEVEEEETAEDGEEEDGEEEDVEEEEDDEGPALKRAAEVEEEDADPKRQKTENGASA

ProTa 53-VDVEEEEGGVEEEVEEGDGEEEDGDEDEEAESATGKRAAEDDEDDVDTKKQKTDEDD

A2

NSMN 79-AADEDDDDDEEDDDDDDDDFDDEEAEEKAPVKKSIRDTPAKNAQKSNQNGKDSKPSSTPRSK

Σχήμα 10: Παραθυμοσίνη, προθυμοσίνη α και νουκλεοπλασμίνη ως μέλη πυρηνικών πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης.

Σύγκριση της αλληλουχίας της ParaT, της ProTa και της Νουκλεοπλασμίνης (NSMN). Η μακρά όξινη περιοχή παρουσιάζεται σε όλες τις πρωτεΐνες. A2: Η όξινη περιοχή της νουκλεοπλασμίνης που πιστεύεται ότι εμπλέκεται στη σύνδεση των ιστονών. Οι αριθμοί δείχνουν θέσεις αμινοξέων.

Η νουκλεοπλασμίνη δημιουργεί σύμπλοκα με διμερή των ιστονών H2A-H2B *in vivo* και συνδέεται με (H3-H4)₂ τετραμερή ή οκταμερή ιστονών, παρέχοντας μια σταδιακή οργανωμένη συγκέντρωση νουκλεοσωμάτων κάτω από κανονικές συνθήκες (Laskey *et al.*, 1978). Επειδή αυτή τη διαδικασία θα μπορούσαν να τη μιμηθούν πολυανιόντα όπως το πολυγλουταμινικό οξύ (Stein *et al.*, 1979), είχε υποθεθεί ότι η συγκέντρωση νουκλεοσωμάτων μπορεί να περιλάβει την όξινη περιοχή A2 που βρίσκεται μέσα στις αμινοτελικές ουρές των πρωτεϊνών (Dingwall *et al.*, 1987; Dingwall and Laskey, 1990). Επιπλέον, η νουκλεοπλασμίνη προκαλεί αποσυμπύκνωση της χρωματίνης στο σπέρμα μέσω της σύνδεσης με βασικές πρωτεΐνες που βρίσκονται συγκεκριμένα στο σπέρμα (SP-SP6) (Prieto *et al.*, 2002). Οι ιδιότητες της νουκλεοπλασμίνης αποδείχθηκε επίσης ότι έχουν επιπτώσεις στη μεταγραφική ρύθμιση καθώς *in vitro* πειράματα έδειξαν ότι η όξινη πρωτεΐνη μπορεί να ρυθμίσει τη σύνδεση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων στο DNA (Chen *et al.*, 1994).

Συμπερασματικά, η πρωτεΐνη πιστεύεται ότι είναι ένας παράγοντας αποθήκευσης για H2A-H2B διμερή στα ωκύτταρα και μαζί με ένα δεύτερο όξινο πυρηνικό συνοδό, την N1/N2, η οποία συνδέει τις ιστόνες H3 και H4 (Kleinschmidt *et al.*, 1986; Kleinschmidt *et al.*, 1985; Kleinschmidt and Franke, 1982), μεσολαβεί στην οργάνωση των νουκλεοσωμάτων κατά τη διάρκεια της γονιμοποίησης και της πρώιμης εμβρυογένεσης.

1.4.3.2. Template activating factor I-Beta (TAF-Iβ)

Το TAF-Iβ/Set προσδιορίστηκε αρχικά στην οξεία αδιαφοροποίητη λευχαιμία και κωδικοποιεί μια φωσφοπρωτεΐνη 39-kDa (Adachi *et al.*, 1994; von Lindern *et al.*, 1992).



Η ογκοπρωτεΐνη SET ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών οργάνωσης νουκλεοσωμάτων (NAPs) που συνδέονται με τις ιστόνες κορμού για να προστατεύσουν τις αλληλεπιδράσεις DNA-ιστόνης και μεσολαβούν για να υπάρχει μια οργανωμένη συγκρότηση νουκλεοσωμάτων σε φυσιολογικές συνθήκες (Akey and Luger, 2003; Philpott *et al.*, 2000).

Ο ρόλος του SET στην αναδιαμόρφωση και μεταγραφή της χρωματίνης υποστηρίχθηκε αρχικά από μελέτες που έδειξαν ότι ο SET είναι πανομοιότυπος με τον παράγοντα ενεργοποίησης Ιβ (TAF- Ιβ), μια πρωτεΐνη που υποκινεί την αντιγραφή του DNA και τη μεταγραφή του γονιδιώματος αδενοϊών (Matsumoto *et al.*, 1993; Matsumoto *et al.*, 1995). Περαιτέρω εργασία έχει καταδείξει ότι ο SET προκαλεί αποσυμπύκνωση της χρωματίνης (Matsumoto *et al.*, 1999), συνδέεται με νουκλεοσωμικές ιστόνες (Kutney *et al.*, 2004; Matsumoto *et al.*, 1999; Schneider *et al.*, 2004) κι εμποδίζει την ακετυλίωση της ιστόνης με την κάλυψη των ουρών της ιστόνης ως συστατικό του συμπλόκου INHAT (Seo *et al.*, 2001). Πρόσφατα, έχει αποδειχθεί ότι ο SET είναι ένας ισχυρός ενεργοποιητής της μεταγραφής της χρωματίνης που ενεργεί σε ένα αρχικό βήμα στη μεταγραφική διαδικασία (Gamble *et al.*, 2005).

1.4.3.3. Προθυμοσίνη άλφα (ProTa)

Η ParaT έχει μεγάλη ομοιότητα στη σύνθεση των αμινοξέων και στην ακολουθία με την ProTa (Σχήμα 10). Η ProTa είναι ιδιαίτερα συντηρημένη κι έχει απομονωθεί από άνθρωπο (Eschenfeldt and Berger, 1986; Gomez-Marquez *et al.*, 1989; Pan *et al.*, 1986), μοσχάρι (Panneerselvam, 1988), αουραίο (Frangou-Lazaridis, 1988; Haritos *et al.*, 1985), ποντίκι (Schmidt and Wermer, 1991), βάτραχο (Aniello *et al.*, 2002; De Rienzo *et al.*, 2002) και zebrafish (κώδικας προσθήκης TrEMBL, Q8QGP0). Ένα υποθετικό ομόλογο ProTa υποστηρίχθηκε ότι υπάρχει στη ζύμη (Makarova *et al.*, 1989) κι *Escherichia coli* (Vartapetian *et al.*, 1992), αν κι αυτά τα συμπεράσματα είναι ακόμα αμφισβητούμενα (Trumbore *et al.*, 1998).

Η ProTa είναι πολύ αρνητικά φορτισμένη κι υϊοθετεί μια τυχαία διαμόρφωση χωρίς κανονική δευτεροταγή δομή (Gast *et al.*, 1995). Η συμμετοχή της στον πολλαπλασιασμό είναι καλά τεκμηριωμένη, δεδομένου ότι η έκφρασή της είναι υψηλή σε ταχέως πολλαπλασιαζόμενους ιστούς συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του



εντέρου (Mori *et al.*, 1993) και του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (Wu *et al.*, 1997) και σχετίζεται με την έκφραση c-Myc mRNA (Vareli *et al.*, 1995). Σε καρκινικά κύτταρα του μαστού το mRNA της ProTa αυξήθηκε γρήγορα από οιστρογόνο, που συνοδεύθηκε από μια εξαπλάσια αύξηση στην περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη (Martini *et al.*, 2000). Η έκφραση της πρωτεΐνης αυξάνεται από τα οιστρογόνα κι η ProTa ενισχύει τη μεταγραφική δραστηριότητα του υποδοχέα της οιστραδιόλης (ER). Εκτός από την προώθηση της δημιουργίας όγκου από την υπερέκφραση της ProTa, η όξινη πρωτεΐνη αποδείχθηκε ότι συνδέεται με μια σειρά πρωτεϊνών που συμμετέχουν στον πολλαπλασιασμό κυττάρων, στη διαφοροποίηση και στην έκφραση γονιδίων. Επιπλέον, η ProTa μπορεί να εμπλέκεται στο μεταβολισμό του DNA και στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου καθώς βρέθηκε πως συνδέεται με PCNA, cdk2 και cyclin A (Freire *et al.*, 2001).

Η ProTa βρέθηκε ότι συνδέεται με τη συνδετική ιστόνη H1 (Papamarcaki and Tsolas, 1994) και τις ιστόνες κορμού (ιδιαίτερα με τις ιστόνες H3 και H4)(Diaz-Jullien *et al.*, 1996), που δείχνει ότι η πρωτεΐνη μπορεί να εμπλέκεται στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης (Gomez-Marquez and Rodriguez, 1998; Karetsoy *et al.*, 1998). Περαιτέρω στοιχεία που δείχνουν μια λειτουργία της ProTa στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης είναι η αλληλεπίδρασή της με: α) το πυρηνικό αντιγόνο ιών Epstein-Barr (EBNA3C)(Cotter and Robertson, 2000), β) την ακετυλοτρανσφεράση p300 σε EBV-μολυσμένα κύτταρα (Subramanian *et al.*, 2002), γ) τη CREB-συνδετική πρωτεΐνη CBP (Karetsoy *et al.*, 2002) και δ) τον πυρηνικό συνοδό SET/TAF-Ιβ (Karetsoy *et al.*, 2004). Η ProTa μπορεί να παίζει ένα ρόλο στην απομάκρυνση της ιστόνης H1 από το νουκλεόσωμα και να συνεργάζεται με άλλους παράγοντες που εμπλέκονται στην αποσυμπύκνωση της χρωματίνης και την ακετυλίωση των ιστονών.



1.5. Στόχοι της εργασίας

Ο στόχος αυτής της εργασίας είναι η μελέτη του ρόλου της ParaT στη δομή και λειτουργία της χρωματίνης. Η εργασία αυτή βασίστηκε σε προηγούμενη εργασία που έδειξε μια ειδική *in vivo* αλληλεπίδραση μεταξύ της ParaT και της συνδετικής ιστόνης H1 (Kondili *et al.*, 1996).

Πιο συγκεκριμένα, οι σημαντικότεροι στόχοι της παρούσας εργασίας είναι:

1. Μελέτες για τον υποκυτταρικό εντοπισμό της ParaT κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και τη σχέση της με τη χρωματίνη.
2. Βιοχημική μελέτη της επίδρασης της ParaT στη σύνδεση της συνδετικής ιστόνης H1 με τη χρωματίνη.
3. Μελέτη του ρόλου της ParaT στην αποσυμπύκνωση της δομής της χρωματίνης.
4. Ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης της ParaT σε ιστούς του λεμφικού συστήματος.



2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Καθαρισμός της παραθυμοσίνης

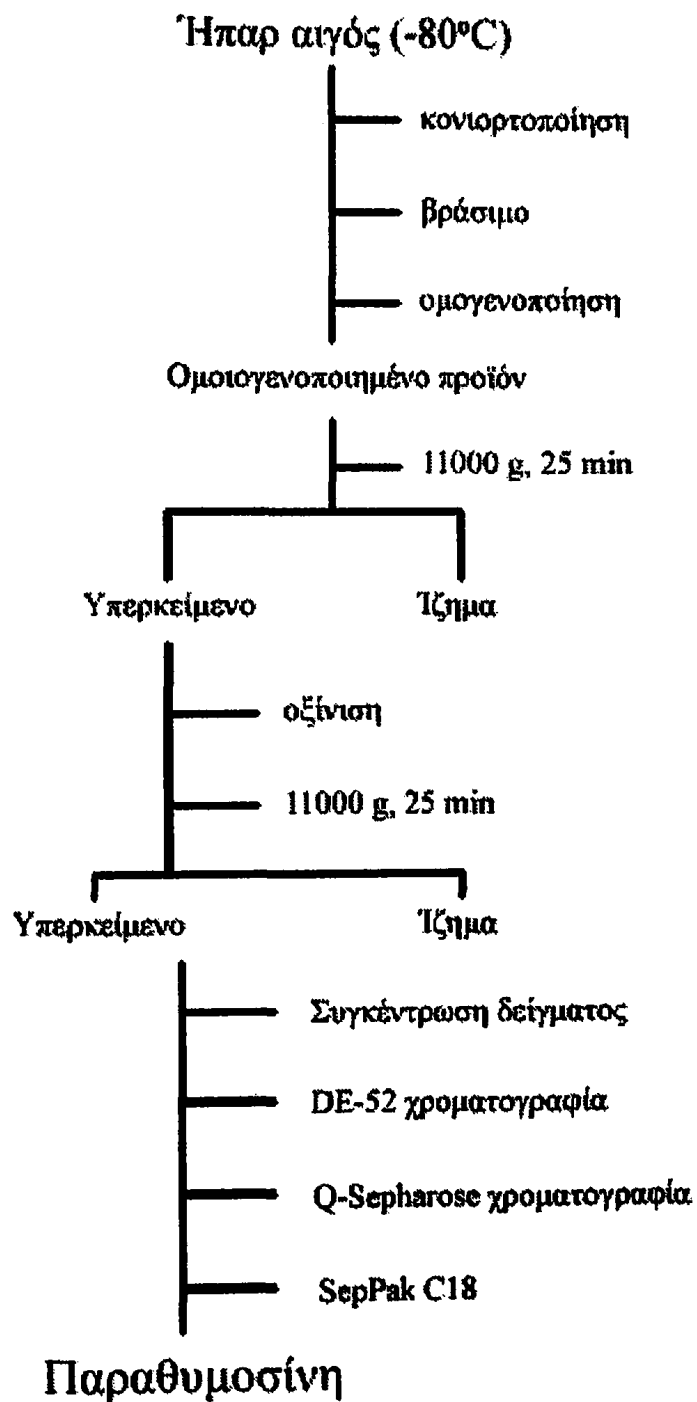
2.1.1. ParaT από ήπαρ αιγός

Η ParaT καθαρίστηκε από ήπαρ αιγός σύμφωνα με μια νέα μέθοδο που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο της Δρ. Θωμαΐδος Παπαμαρκάκη (Σχήμα 11) και βασίστηκε στις εργασίες των Haritos *et al.* (1985), Komiyama *et al.* (1986) και Kondili *et al.* (1996).

Φρέσκο ήπαρ αιγός κόπηκε σε μικρά κομμάτια, πάγωσε σε υγρό άζωτο και διατηρήθηκε στους -80°C μέχρι περαιτέρω χρήση. Για τον καθαρισμό της ParaT ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- 60 γρ. παγωμένου ιστού κονιοποιήθηκε σε υγρό άζωτο και η σκόνη βράστηκε για 10 λεπτά σε 300 ml ddH₂O.
- Το εναιώρημα ψύχθηκε σε πάγο περίπου στους 15°C κι ομογενοποιήθηκε με ομογενοποιητή Polytron (Kinematica AG) στην υψηλότερη ταχύτητα
- Το ομοιογενοποιημένο υλικό μεταφέρθηκε σε πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρωσης και φυγοκεντρήθηκε σε 11000 g (Sorvall RC 2B Centrifugation, GSA Rotor) στους 4°C για 25 λεπτά. Το ίζημα απορρίφθηκε και το pH του υπερκείμενου ρυθμίσθηκε σε pH 5,0, με 1 M CH₃COOH.
- Το υπερκείμενο φυγοκεντρήθηκε σε 11000 g για 25 λεπτά και το όξινο υπερκείμενο συγκεντρώθηκε σε περίπου 12 ml (Buchi συμπυκνωτής, Flawil, Ελβετία).
- Εγινε διαπίδυση στο όξινο συμπυκνωμένο διάλυμα όλη τη νύχτα σε 800 ml (10 mM Tris, pH 7,4, 0,5 mM PMSF, 1 mM EDTA) στους 4°C σε μεμβράνη διαπίδυσης με όριο μοριακού βάρους 3500 Da (Pierce). Για να διαχωριστούν οι πρωτεΐνες του εκχυλίσματος, χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια DEAE-Sephacel 52 (Whatman). Τα σφαιρίδια DE-52 προετοιμάστηκαν ως εξής: 25 ml DE-52 σφαιρίδια πλύθηκαν δυο φορές με 1 M Tris, pH 7,4, δυο φορές με 100 mM Tris, pH 7,4, δυο φορές με 10 mM Tris, pH 7,4 κι επώαστηκαν σε 10 mM Tris, pH 7,4 στους 4°C για μια 1 ώρα. Τέλος, τα σφαιρίδια 10 ml εξισορροπήθηκαν όλη τη





Σχήμα 11: Σχέδιο καθαρισμού της παραθυμοσίνης.

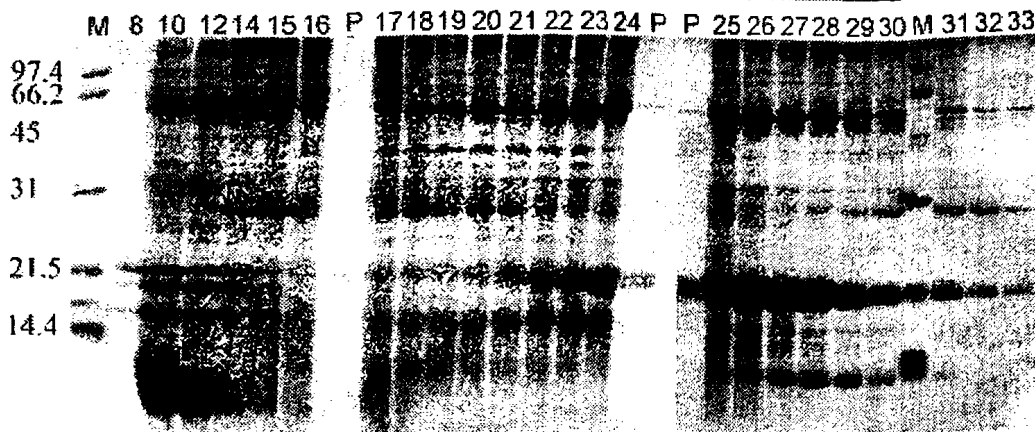
νύχτα σε ρυθμιστικό διάλυμα A στους 4°C (στήλη-υλικό: ρυθμιστικό διάλυμα A = 1:1).

- Τα σφαιρίδια τοποθετήθηκαν στη στήλη (8x1,5 cm.) και πλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα A που περιείχε 0,1 M NaCl. Το δείγμα τοποθετήθηκε στη στήλη και οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν με 0,1 M-0,7 M NaCl στο ρυθμιστικό διάλυμα A.
- 50 μ l κάθε κλάσματος αναλύθηκε από SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, κεφάλαιο 2.2.2.1.). Η πηκτή βάφτηκε με Coomassie Blue (κεφάλαιο 2.2.2.2.) και τα κλάσματα ελέγχθηκαν για περιεχόμενο σε ParaT. Τα κλάσματα που περιείχαν ParaT (που κανονικά κυμαίνονται από δείγματα 16 έως 20, Σχήμα 12A) συγκεντρώθηκαν και διαπιδύθηκαν όλη τη νύχτα σε ρυθμιστικό διάλυμα B (20 mM Ιστιδίνη pH 5,9, 0,5 mM PMSF, 1 mM EDTA) σε μεμβράνη διαπίδυσης με ένα όριο μοριακού βάρους 3500 DA (Pierce).
- Τα συγκεντρωμένα κλάσματα τοποθετήθηκαν σε μια στήλη Q-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) με ροή 48 ml/ώρα. Οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν με 0-1 M NaCl σε ρυθμιστικό διάλυμα B. 50 μ l κάθε κλάσμα αναλύθηκε με SDS-PAGE και χρώση Coomassie Blue (Σχήμα 12B).
- Τα κλάσματα που περιείχαν ParaT συγκεντρώθηκαν κι αναλύθηκαν μέσω μιας SepPak cartridge (Waters Associates Inc.). Μετά από την τοποθέτηση των δειγμάτων, η SepPak cartridge πλύθηκε μια φορά με 1 ml ddH₂O και συλλέχθηκαν τρία εκλούσματα 1 ml με 20% ισοπροπανόλης ddH₂O και στέγνωσαν σε SpeedVac. Το πρωτεϊνικό ίζημα πλύθηκε δυο φορές κι εναιωρήθηκε σε 150 μ l ddH₂O. Για να ελέγξουμε το πρωτεϊνικό δείγμα, 5 μ l αναλύθηκαν σε 15% SDS-PAGE και η πηκτή βάφτηκε με Coomassie Blue (Σχήμα 12C).
- Η συγκέντρωση καθαρής ParaT ποσοδιορίστηκε χρησιμοποιώντας το BCA Protein Determination Kit (Pierce, κεφάλαιο 2.2.1.1.).

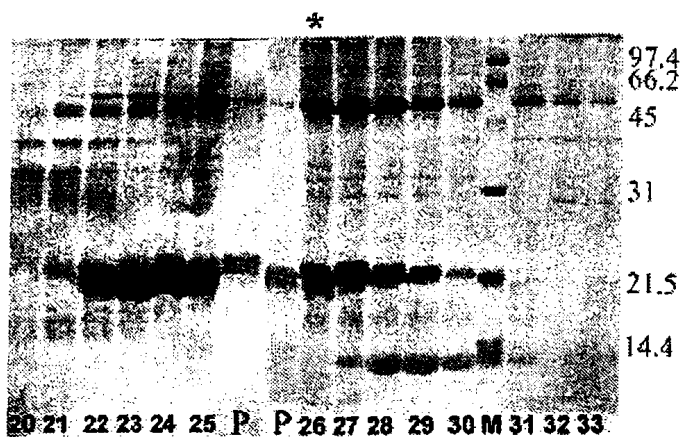
Το ποσό της ParaT που παρασκευάστηκε με αυτή τη μέθοδο ήταν 350-400 μ g.



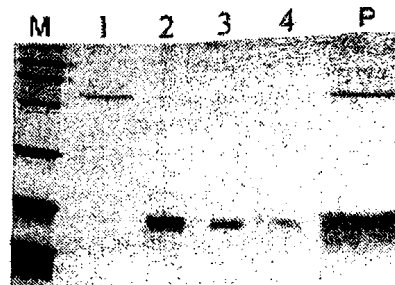
A. DE-52 χροματογραφία



B. Q-Sepharose χροματογραφία



Γ. SepPak



Σχήμα 12: Καθαρισμός της παραθυμοσίνης.

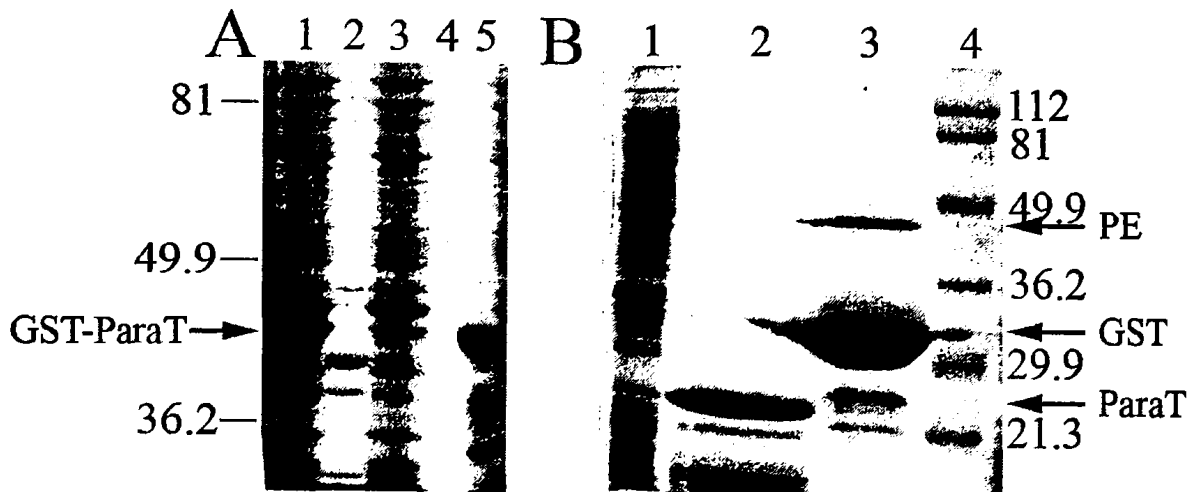
(A) **Στήλη DE-52.** 60 γρ. ομοιογενοποιημένου προϊόντος φρέσκου συκωτιού κατσίκας οξοποιήθηκε, υποβλήθηκε σε φυγοκέντρωση και εφαρμόστηκε σε μια στήλη DE-52. Η στήλη εκλούστηκε με γραμμική κλίση 0,1-0,7 M NaCl σε ρυθμιστικό διάλυμα A και 800 μl κάθε μέρους αναλύθηκαν με SDS-PAGE και Coomassie Blue χρώση. Η γραμμή (μέρη 20-30) δείχνει τα μέρη που περιέχουν παραθυμοσίνη. (P) Δείγμα ελέγχου παραθυμοσίνης. (M) Πρότυπος δείκτης πρωτεΐνης kDa. (B) **Στήλη Q-Σεφαρόζης.** Μέρη που αποκτήθηκαν από τη στήλη DE-52 που περιείχαν ParaT συγκεντρώθηκαν και εφαρμόστηκαν σε μια στήλη Q-Σεφαρόζης η οποία εκλούστηκε με γραμμική κλίση 0-1 M NaCl σε ρυθμιστικό διάλυμα B. 50 μl κάθε μέρους (800 μl) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και Coomassie Blue χρώση. Ο αστερίσκος σημειώνει το μέρος της ParaT που χρησιμοποιήθηκε για την ακόλουθη στήλη SepPak. (Γ) **Στήλη SepPak.** Το μέρος 26 φιλτραρίστηκε μέσω μιας στήλης SepPak και εκλούστηκε με 20% ισοπροπανόλη σε νερό (4 φορές, 1 ml κάθε ένα, μέρη 1-4). Καθαρά μέρη ParaT συγκεντρώθηκαν, πλύθηκαν με νερό, στεγνώσαν σε SpeedVac και διατηρήθηκαν στεγνά στους -20°C.

2.1.2. Ανασυνδυασμένη ParaT από *E. coli*

Για να παρασκευάσουμε ανασυνδυασμένη ParaT, βακτηρίδια *E. coli* BL21-DE3 μετασχηματίστηκαν με pGST-ParaT όπως περιγράφεται (κεφάλαιο 2.3.2.). Μια αποικία επιλέχτηκε κι ετοιμάστηκε μια ολονύκτια καλλιέργεια σε 20 ml LB-μέσο (+ αντιβιοτικό). 400 ml LB-μέσου που περιείχαν αντιβιοτικό εμβολιάστηκαν με 5 ml της ολονύκτιας καλλιέργειας κι επώαστηκαν κάτω από σταθερή ανάδευση στους 37°C έως ότου το βακτηριακό εναιώρημα έφτασε σε $OD_{600} = 0,6$. Έπειτα προκλήθηκε πρωτεϊνική παραγωγή στα βακτηρίδια με 300 μ M IPTG (Isopropyl-BD-Thiogalactopyranoside) για 2 ώρες. Το βακτηριακό εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε σε 6000 περιστροφές/λεπτό (Sorvall, GSA rotor) για 15 λεπτά, το υπερκείμενο πετάχτηκε και το ίζημα αποθηκεύτηκε στους -80°C μέχρι περαιτέρω χρήση. Το ίζημα εναιωρήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 10 ml TEN/NP40 (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% NP40, Μίγμα αναστολής φωσφατάσεων (Απροτινίνη, Λευπεπτίνη, Πεπστατίνη), pH 8,0). Στη συνέχεια, τα βακτηρίδια διασπάστηκαν και διαλύθηκαν (δυο φορές French press) και φυγοκεντρήθηκαν σε 12000 περιστροφές/λεπτό (Sorvall, SS34 rotor) για 40 λεπτά. Το υπερκείμενο διαιρέθηκε σε υποπολλαπλάσια 1 ml κι αποθηκεύτηκε για μακροπρόθεσμη χρήση στους -80°C.

Για να καθαρίσουμε ανασυνδυασμένη ParaT, 100 ml υπερκείμενου δεσμεύθηκαν σε 1,5 ml σφαιρίδια γλουταθειόνης (Sigma) κι επώαστηκαν στους +4°C για 1 ώρα. Τα σφαιρίδια πλύθηκαν τρεις φορές με ρυθμιστικό διάλυμα TEN/NP40 κι επώαστηκαν όλη τη νύχτα με Prescission enzyme (2 μόρια ενζύμου/μόριο GST-ParaT) σε 8 ml PE-ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, Μίγμα αναστολής φωσφατάσεων (Απροτινίνη, Λευπεπτίνη, Πεπστατίνη), pH 7). Το υπερκείμενο συγκεντρώθηκε (περίπου 6,5 ml) και 15 μ l δείγματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και Coomassie Blue χρώση. Τέλος, το δείγμα που περιείχε ParaT διαλύθηκε σε 10 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού άλατος ($K_xH_xPO_4$, με $x=1, 2$ pH 7,5). Η απόδοση της διαδικασίας καθαρισμού ήταν 1,5 mg ParaT/400 ml βακτηριακής καλλιέργειας.





Σχήμα 13: Καθαρισμός της ανασυνδυαζόμενης ParaT.

(A) **Καθαρισμός της GST-ParaT.** BL21-DE3 βακτήρια μετατράπηκαν με pGST-ParaT και παραγωγή πρωτεΐνης προκλήθηκε με 300 μ M IPTG στους $+4^{\circ}\text{C}$ για 2 ώρες. Δείγματα 18 μ l αναλύθηκαν με SDS-PAGE και Coomassie Blue χρώση. Το υπερκείμενο πριν (σειρά 1) και μετά (σειρά 3) την επώαση με 25 μ l σφαιριδίων γλουταθιόνης, αδιάλυτο ίζημα μετά την ανάλυση των κυττάρων (σειρά 2), πλύσιμο 3 από τα σφαιρίδια (σειρά 4) και τα σφαιρίδια από τα 100 μ l της επώασης (σειρά 5). (B) **Απομάκρυνση του τμήματος GST χρησιμοποιώντας Prescission Ένζυμο.** Συνδεδεμένη GST-ParaT σε σφαιρίδια γλουταθιόνης επώαστηκε όλη τη νύχτα με Prescission Ένζυμο (PE) στους $+4^{\circ}\text{C}$. Το υπερκείμενο μετά την επώαση με σφαιρίδια γλουταθιόνης (σειρά 1), ο νεκρός όγκος και τα σφαιρίδια (σειρές 2 και 3, αντίστοιχα) μετά την επώαση με PE αναλύθηκαν με 15% SDS-PAGE και Coomassie Blue χρώση. Οι αριθμοί στα δεξιά δείχνουν πρότυπα μοριακού βάρους της πρωτεΐνης σε kDa (σειρά 4: δείκτης πρωτεΐνης).

2.2. Τεχνικές ανάλυσης πρωτεϊνών

2.2.1. Προσδιορισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης

2.2.1.1. Πρωτεϊνικός προσδιορισμός χρησιμοποιώντας το BCA Protein Determination Kit (Pierce)

Η βάση της μεθόδου είναι ότι οι πρωτεΐνες σε ένα αλκαλικό μέσο ανάγουν το Cu^{2+} σε Cu^{1+} και δημιουργούν ένα σύμπλοκο tetradentate- Cu^{1+} (αντίδραση Biuret). Το Cu^{1+} αντιδρά με το BCA παράγοντας ένα πορφυρού χρώματος σύμπλοκο BCA-Cu^{1+} , το οποίο μπορεί να μετρηθεί σε ένα φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 562 nm (Smith *et al.*, 1985). Η BCA (Bicinchoninic acid assay) έχει μια κλίμακα ανίχνευσης μεταξύ 0,2 και 50 μικρογραμμάρια (Stoscheck, 1990).

Η μέθοδος περιέχει δυο αντιδραστήρια:



1. **Αντιδραστήριο Α:** 1 γρ. bicinchoninate νατρίου (BCA), 2 γρ. ανθρακικού άλατος νατρίου, 0,16 γρ. άλατος νατρίου, 0,4 γρ. NaOH, και 0,95 γρ. διττανθρακικών αλάτων νατρίου, που φέρονται σε 100 ml με αποσταγμένο νερό. Το pH προσαρμόστηκε σε 11,25 με 10 M NaOH.

2. **Αντιδραστήριο Β:** 0,4 γρ. θειϊκού άλατος δισθενούς χαλκού (5x ενυδατωμένα) σε 10 ml αποσταγμένου νερού.

Για ένα τυποποιημένο διάλυμα εργασίας (SWS), αναμίξετε 100 όγκους αντιδραστηρίου Α με 2 όγκους αντιδραστηρίου Β. Ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με τον ακόλουθο τρόπο:

- 1 ml SWS προστέθηκε σε κάθε δείγμα (0,2-50 μg πρωτεΐνης), αναμίχθηκε κι επώαστηκε στους 60°C για 60 λεπτά.
- Τα δείγματα ψύχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και μετρήθηκαν σε ένα φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 562 nm. Το χρώμα είναι σταθερό για τουλάχιστον μια ώρα.

Μια τυποποιημένη καμπύλη απορρόφησης έναντι πρωτεΐνης μικρογραμμαρίων (ή αντίστροφα) ετοιμάστηκε και τα πρωτεϊνικά ποσά στα επιθυμητά δείγματα προσδιορίστηκαν από μια τυποποιημένη καμπύλη χρησιμοποιώντας 1-20 μg BSA.

2.2.1.2. Πρωτεϊνικός προσδιορισμός κατά Bradford

Ο πρωτεϊνικός προσδιορισμός κατά Bradford (BioRad Protein Assay) είναι μια απλή χρωματομετρική μέθοδος για τη μέτρηση της συνολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης και βασίζεται στη διαδικασία πρόσδεσης της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bradford, 1976). Η χρωστική ουσία συνδέεται με τα κύρια βασικά (ειδικά αργινίνη) κι αρωματικά αμινοξέα με ευαισθησία σε περίπου 1 έως 20 μg πρωτεΐνης. Η ανάλυση βασίζεται στην παρατήρηση ότι το μέγιστο απορροφητικότητας για ένα όξινο διάλυμα Coomassie Brilliant Blue G-250 μετατρέπεται από 465 nm σε 595 nm μήκος κύματος κατά τη σύνδεση με πρωτεΐνη. Οι υδροφοβικές και οι ιοντικές αλληλεπιδράσεις σταθεροποιούν την ανιονική μορφή της χρωστικής ουσίας, προκαλώντας μια ορατή αλλαγή χρώματος που μπορεί να μετρηθεί σε ένα φασματοφωτόμετρο. Ο πρωτεϊνικός προσδιορισμός εκτελείται ως εξής:



- Προστίθενται 800 μ l πρωτεϊνικού δείγματος με μια υπολογισμένη συγκέντρωση 1-20 μ g/ml σε 200 μ l αντιδραστηρίου χρωστικής ουσίας.
- Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μέτρηση της απορρόφησης στα 595 nm μήκους κύματος.

Τα ποσά της πρωτεΐνης στα επιθυμητά δείγματα προσδιορίστηκαν με βάση μια πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιώντας 1-20 μ g BSA.

2.2.2. Ηλεκτροφόρηση πηκτής SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Οι πρωτεΐνες χωρίστηκαν βάσει της μοριακής μάζας τους με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE, που περιγράφηκε πρώτα από το Laemmli UK (Laemmli, 1970). Το SDS συνδέεται με τις περισσότερες πρωτεΐνες με σταθερό τρόπο (περίπου 1,4 γραμμάρια SDS ανά γραμμάριο πρωτεΐνης) κι επίσης καλύπτει οποιοδήποτε φορτίο της πρωτεΐνης με τη διαμόρφωση μεγάλων ανιονικών συμπλόκων. Το SDS διασπά επίσης τους δεσμούς υδρογόνου, εμποδίζει πολλές υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις και αποδιατάσσει μερικώς τα πρωτεϊνικά μόρια ελαχιστοποιώντας τις διαφορές που βασίζονται σε δευτεροταγή ή τριτοταγή δομή. Στο ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων συμπεριλαμβάνεται επίσης ένας αναγωγικός παράγοντας, όπως το DTT, προκειμένου να αποδιαταχθούν συνολικά οι πρωτεΐνες και να διαχωρισθούν οι υπομονάδες για να εξασφαλιστεί ένας διαχωρισμός βασισμένος αποκλειστικά στο μοριακό βάρος.

Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου σχηματίζεται με συμπολυμερισμό του ακρυλαμιδίου και του μεθυλεν-δισ-ακρυλαμιδίου ("bis," N, N'-μεθυλένιο-δισ-ακρυλαμίδιο). Ο πολυμερισμός αρχίζει με διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου και TEMED (τετραμεθυλενεδιαμίνη), που επιταχύνει το βαθμό σχηματισμού ελεύθερων ριζών και καταλύει στη συνέχεια τον πολυμερισμό. Οι ελεύθερες ρίζες υπερθειικού αμμωνίου μετατρέπουν τα μονομερή ακρυλαμιδίου σε ελεύθερες ρίζες που αντιδρούν με μη ενεργοποιημένα μονομερή για να αρχίσουν την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού. Οι επιμηκύνουσες πολυμερείς αλυσίδες διασυνδέονται τυχαία από την "bis", με συνέπεια μια πηκτή με χαρακτηριστικό πορώδες που εξαρτάται από τις συνθήκες πολυμερισμού και τη συγκέντρωση μονομερών. Όταν εφαρμόζεται ρεύμα στην πηκτή, οι πρωτεΐνες κινούνται μέσω του πηκτώματος προς την άνοδο.



Η πηκτή αποτελείται από δυο μέρη: την πηκτή επιστοίβαξης και την πηκτή διαχωρισμού. Στην πρώτη πηκτή, η οποία έχει μεγάλο μέγεθος πόρων, οι πρωτεΐνες συσσωρεύονται σε μια στιβάδα ώστε να εισέρχονται ταυτόχρονα στην δεύτερη πηκτή. Στην δεύτερη πηκτή γίνεται ο διαχωρισμός με βάση το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών.

1. Πηκτή συγκέντρωσης (10 ml συνολικού όγκου)

Χημικό	Όγκος (ml)	Τελική συγκέντρωση
30% Ακρυλαμίδιο/Δις-ακρυλαμίδιο	1,5	4,5%
ddH ₂ O	6	
Ρυθμιστικό διάλυμα συγκέντρωσης (0,5 M Tris-HCl pH 6,8)	2,5	0,375 M Tris
10% SDS	0,1	0,1%
10% APS	0,1	0,1% (w/v)
TEMED	0,01	0,001%

2. Πηκτή διαχωρισμού (25 ml συνολικού όγκου)

Χημικό	Όγκος (ml)	Τελική συγκέντρωση
30% Ακρυλαμίδιο/Δις-ακρυλαμίδιο	12,5	15%
ddH ₂ O	6,125	
Πηκτή διαχωρισμού (1,5 M Tris-HCl pH 8,8)	6,125	0,375 M Tris
10% SDS	0,25	0,1%
10% APS	0,25	0,1% (w/v)
TEMED	0,0125	0,0005%

Τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση αραιώθηκαν σε 4x σε ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων (0,25 M Tris-HCl pH 6,8, 9,2% SDS, 40% βάρος/όγκο γλυκερίνης, 0,2% βάρος/όγκο μπλε βρωμοφαινόλης, 0,1 M DTT) και έβρασαν για 3 λεπτά στους 100° C. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα (0,025 M Tris, 0,192 M γλυκίνης και 0,1% SDS) σε 140 V/25 mA.



2.2.3. Τεχνικές πρωτεϊνικής χρώσης

2.2.3.1. Χρώση Coomassie Blue

Οι πρωτεΐνες που διαχωρίστηκαν σε SDS-PAGE ανιχνεύονται σε ένα διάλυμα που αποτελείται από Coomassie Blue (BioRad) διαλυμένο σε ένα ψυχρό διάλυμα οξικού οξέος/μεθανόλης (40% μεθανόλη, 10% ψυχρό οξικό οξύ, 1% Coomassie Blue R-250). Μετά από τη χρώση, η πηκτή αποχρωματίζεται σε ένα διάλυμα που περιέχει 7% ψυχρό οξικό οξύ και 25% μεθανόλη. Το όριο ανίχνευσης αυτής της τεχνικής είναι 0,1-0,5 μg πρωτεΐνης.

2.2.3.2. Χρώση με άργυρο

Η χρώση με άργυρο εισήχθη για πρώτη φορά το 1997 (Merril *et al.*, 1979) και βασίζεται στην χημική αναγωγή των ιόντων Ag^+ στο μεταλλικό Ag σε μια πρωτεϊνική ζώνη. Οι πρωτεϊνικές ζώνες (5 ng τουλάχιστον) εμφανίζονται στη πηκτή λόγω των διαφορών της οξειδωσης/αναγωγής μεταξύ περιοχών της πηκτής που περιέχουν από πρωτεΐνη και γειτονικών περιοχών που δεν περιέχουν. Η πηκτή επωάζεται αρχικά με νιτρικό άλας αργύρου το οποίο αντιδρά κάτω από όξινες συνθήκες με τις πρωτεϊνικές ζώνες. Η επακόλουθη αναγωγή των ιόντων Ag στο μεταλλικό Ag εμφανίζεται με την οξειδωση της φορμαλδεΰδης κάτω από αλκαλικές συνθήκες. Το ανθρακικό άλας νατρίου ρυθμίζει το φορμικό οξύ που παράγεται από την οξειδωση της φορμαλδεΰδης, έτσι ώστε η αναγωγή του αργύρου να μπορεί να συνεχιστεί έως ότου εμφανίζονται οι πρωτεϊνικές ζώνες στη πηκτή. Στη μελέτη μας έχουμε χρησιμοποιήσει δυο διαφορετικές τεχνικές χρώσης SDS-PAGE με άργυρο. Ένα πρωτόκολλο περιγράφει τη μέθοδο που χρησιμοποιείται για να ανιχνεύσει γενικά τις πρωτεΐνες σε μία πηκτή και το άλλο για να ανιχνεύσει ειδικά βασικές πρωτεΐνες.

Για να εμφανίσουμε γενικά τις πρωτεΐνες σε ένα SDS-PAGE, εφαρμόστηκε: η ακόλουθη μέθοδος:

- Μετά από την ηλεκτροφόρηση, η πηκτή τοποθετήθηκε σε 50% μεθανόλη-10% οξικό οξύ για 1 ώρα.
- Η πηκτή πλύθηκε με πολλές αλλαγές με ddH_2O (τουλάχιστον 1 ώρα)



- Η πηκτή επώαστηκε πρώτα σε 5 $\mu\text{g/ml}$ DTT σε ddH₂O για 30 λεπτά κι έπειτα για 30 λεπτά σε διάλυμα 0,1% βάρος/όγκο Ag/NO₃ σε ddH₂O.
- Η πηκτή πλύθηκε με ddH₂O κι επώαστηκε σε διάλυμα ανάπτυξης (3% w/v Na₂CO₃, 0,0185% v/v HCHO) έως ότου εμφανίστηκαν οι πρωτεϊνικές ζώνες.
- Η ανάπτυξη σταμάτησε με 2,3 M κιτρικού οξέος (2,5 ml για 50 ml διαλύματος ανάπτυξης) και πλύθηκε με άφθονο ddH₂O.

Για τη χρώση θετικά φορτισμένων πρωτεϊνών σε SDS-PAGE, όπως οι ιστόνες (π.χ. ιστόνη H1 όπως στις δοκιμές ανασύνθεσης αναλύσεων της χρωματίνης, κεφάλαιο 2.5.3.), με την μέθοδο AgNO₃ χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε από τον Wray et al. (1981). Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε έχει ως εξής:

1. Η πηκτή εμβαπτίστηκε σε διάλυμα 50% μεθανόλης, επί 1 ώρα.
2. Ακολούθησε προετοιμασία του διαλύματος χρώσης: 0,8 g AgNO₃ διαλύθηκαν σε 4 ml απεσταγμένου νερού (διάλυμα Α). 21 ml διαλύματος 0,36% NaOH αναμίχθηκαν με 1,4 ml διαλύματος 14,8 M NH₄OH (διάλυμα Β). Το διάλυμα Α προστέθηκε στο διάλυμα Β σταγόνα σταγόνα, υπό ανάδευση κι ο όγκος συμπληρώθηκε μέχρι 100 ml με νερό. Το διάλυμα αυτό πρέπει να παρασκευασθεί 5 λεπτά πριν την χρησιμοποίησή του.
3. Η πηκτή εμβαπτίστηκε στο διάλυμα χρώσης, επί 15 λεπτά κι ακολούθησε μια έκπλυση με νερό.
4. Παράλληλα, προετοιμάσθηκε το διάλυμα ανάπτυξης: 2,5 ml διαλύματος 1% κιτρικού οξέος αναμίχθηκε με 0,25 ml διαλύματος 38% HCHO κι ο όγκος συμπληρώθηκε μέχρι 500 ml με νερό. Το διάλυμα παρασκευάσθηκε αμέσως πριν να χρησιμοποιηθεί.
5. Η πηκτή εμβαπτίστηκε στο διάλυμα ανάπτυξης, επί 10 λεπτά. Μετά την εμφάνιση των πρωτεϊνών, έγινε μια έκπλυση με νερό και η πηκτή τοποθετήθηκε σε διάλυμα μεθανόλης 50%, οπότε σταμάτησε η χρώση.

Κατά τη χρώση πρωτεϊνών με AgNO₃ απαιτείται χρήση πολύ καθαρών υαλικών και γαντιών.



2.2.4. Τεχνικές πρωτεϊνικής τροποποίησης

2.2.4.1. Ραδιενεργή σήμανση της ιστόνης H1 με Πρωτεϊνική Κινάση C

Η συνδετική ιστόνη H1 μπορεί να φωσφορυλιωθεί με Πρωτεϊνική Κινάση C (PKC) *in vitro*. Η PKC (Boehringer Mannheim) αντιπροσωπεύει μια οικογένεια δευτέρων, εξαρτώμενων από αγγελιοφόρους, πρωτεϊνικών κινάσεων που ενεργοποιούνται από Ca^{2+} ή/και φωσφολιπίδια (Newton, 1995). Για να αποφευχθούν απώλειες της ιστόνης H1 λόγω του ότι κολλάει στους πλαστικούς τοίχους του σωληναρίου erppendorf, χρησιμοποιήθηκαν σωληνάρια αντίδρασης κατεργασμένα με σιλικόνη.

Εν συντομία, η ραδιενεργή σήμανση της ιστόνης H1 έγινε ως εξής:

- 1 μg ιστόνης H1 θύμου αδένος μοσχαριών (Boehringer Mannheim) αναμίχθηκε με 2 μl από 2% BSA, 2ml 10x PKC ρυθμιστικό διάλυμα (200 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM MgCl_2 , 10 mM CaCl_2), 2 μl [γ - ^{32}P]-ATP (40 μCi), 4 μl 10 μM ATP, 2 μl 10x Φωσφολιπίδια (Sigma, 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ L-Phosphatidylserine, 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 1,2-Dioleoyl-sn-glycerol) και 7 μl ddH₂O σε συνολικό όγκο 20 μl .
- Στο μίγμα αντίδρασης προστέθηκαν 1000 μονάδες PKC κι επωάστηκαν στους 37°C για 30 λεπτά
- Η σημασμένη πρωτεΐνη χωρίστηκε από το μη συνδεδεμένο [γ - ^{32}P]-ATP χρησιμοποιώντας μια στήλη Chromaspin (Clontech). Για εξισορρόπηση, η στήλη πλύθηκε μια φορά με 1 ml και μια φορά με 2 ml 1x PKC ρυθμιστικό διάλυμα. Το δείγμα (20 μl) προστέθηκε στη μέση της στήλης, 80 μl PKC ρυθμιστικό διάλυμα προστέθηκε κι η στήλη υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση σε 1700 g για 4 λεπτά με ένα σωληνάριο φυγοκέντρησης χωρίς καπάκι που προσαρμόστηκε σε αυτή για να συλλέξει το καθαρισμένο δείγμα (περίπου 100 μl).

Για να ελέγξουμε τη φωσφορυλίωση της ιστόνης H1, 2 μl του δείγματος αναμίχθηκαν με 1 μg H1 θύμου αδένος μοσχαριών και ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων, βράστηκαν για 3 λεπτά στους 100°C κι αναλύθηκαν από SDS-PAGE. Η πηκτή βάφτηκε με Coomassie Blue και ξηράθηκε σε ένα SpeedVac στους 60°C για 1 ώρα. Για να



εμφανιστούν οι ραδιενεργά σημασμένες πρωτεΐνες, η πηκτή εκτέθηκε όλη τη νύχτα στους -70°C σε ένα φωτογραφικό φιλμ (Kodak).

2.2.4.2. Ραδιενεργή σήμανση ParaT με Κινάση Καζεΐνης II

Η ParaT φωσφορυλιώνεται *in vitro* από Κινάση Καζεΐνης II (CKII, Boehringer Mannheim). Η CKII είναι μια πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης με μια τετραμερή δομή $\alpha_2\beta_2$ και το ακόλουθο επαναλαμβανόμενο μοτίφ αναγνώρισης: S/T-X-X-E (Pearson and Kemp, 1991).

Για να φωσφορυλιώσουμε ParaT από ήπαρ αιγός με CKII:

- 1 μg καθαρισμένης πρωτεΐνης αναμίχθηκε με 2 μl $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (40 μCi), 0,4 μl 0,5 mM ATP, 2 μl CKII 10x ρυθμιστικό διάλυμα, 2 μl 100 mM MgCl_2 , 12 μl ddH₂O.
- Στο μίγμα δειγμάτων (σύνολο 20 μl), προστέθηκε 1 μl CKII-ένζυμο (1000 μονάδες) κι έγινε επώαση στους 37°C για 30 λεπτά. Χρησιμοποιήθηκε μια στήλη Chromaspin (Clontech) για να διαχωρισθεί η σημασμένη πρωτεΐνη από το ελεύθερο, μη δεσμευμένο $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$. Για εξισορρόπηση, η στήλη πλύθηκε μια φορά με 1 ml και μια φορά με 2 ml CKII ρυθμιστικό διάλυμα.
- Το δείγμα (20 ml) προστέθηκε στη μέση της στήλης, προστέθηκαν 80 ml ρυθμιστικό διάλυμα CKII κι υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρηση σε 1700 g για 4 λεπτά με ένα σωλήνα μικροφυγοκέντρησης χωρίς καπάκι που προσαρμόστηκε σε αυτή, για να συλλέξει το καθαρισμένο δείγμα (περίπου 100 μl).

Για να ελέγξουμε αν πραγματοποιήθηκε φωσφορυλίωση της ParaT ή όχι, 2 μl του δείγματος αναμίχθηκαν με 1 μg καθαρισμένης, μη σημασμένης πρωτεΐνης και ρυθμιστικού διαλύματος δειγμάτων, βράστηκε στους 100°C για 3 λεπτά κι αναλύθηκε από SDS-PAGE. Η πηκτή βάφτηκε με Coomassie Blue και στέγνωσε σε ένα SpeedVac στους 60°C για 1 ώρα. Για να εμφανισθούν οι ραδιενεργά σημασμένες πρωτεΐνες, η πηκτή εκτέθηκε όλη τη νύχτα στους -70°C σε ένα φωτογραφικό φιλμ (Kodak).



2.3. Τεχνικές ανάλυσης δεσοξυριβονουκλεϊνικού οξέως (DNA)

2.3.1. Κλωνοποίηση DNA σε πλασμιδιακούς φορείς

Σε όλη τη μελέτη παρήχθησαν τα ακόλουθα πλασμίδια: **Flag-ParaT**: Το γονίδιο ParaT αρουραίων ενισχύθηκε χρησιμοποιώντας αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και pCMV-ParaT ως πρότυπο. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: ParaEcoAc (CGG GAA TTC AAT GTC GGA GAA AAG CGT G) και ParaXho (TCC GCT CGA GTC ACG CCG ATG CCC CAT T). Εγινε πέψη του προϊόντος με *EcoRI/XhoI* και κλωνοποιήθηκε σε pFlag-πλασμιδιακό φορέα που είχε κοπεί με *EcoRI/SalI*. **ParaT-Myc**: PCR με εκκινητές ParaTEco (CCG GAA TTC ATG TCG GAG AAA AGC GTG) και ParaTXhomyc (CCG CTC GAG CCG CCG ATG CCC CAT TTT) χρησιμοποιώντας pCMV-ParaT ως πρότυπο. Το ενισχυμένο γονίδιο κλωνοποιήθηκε σε pA3M (pcDNA3Myc) έγινε πέψη με *EcoRI/XhoI*. **pEGFP-ParaT**: Απομονώθηκε το γονίδιο της paraT από το pFlag-ParaT με *EcoRI/SmaI*. Το γονίδιο κλωνοποιήθηκε σε pEGFP-C1 (Clontech) που είχε κοπεί με *EcoRI/SmaI*. **pEGFP-TAF-Ιβ**: Το γονίδιο άγριου τύπου TAF-Ιβ ενισχύθηκε με PCR με εκκινητές SetEco (CCC GAA TTC AAA TGT CGG CGC CGG CGG CC) και SetXho (CCG CTC GAG TTA GTC ATC TTC TCC TTC ATC) χρησιμοποιώντας pFlag-TAF-Ιβ ως πρότυπο. Το γονίδιο κλωνοποιήθηκε έπειτα σε pEGFP-C3 (Clontech) που είχε κοπεί με *EcoRI/XhoI*. **pUHD10-EGFP-ParaT**: Το πλασμίδιο κατασκευάστηκε με την πέψη pEGFP-ParaT με *NheI*. Τα άκρα γεμίστηκαν με νουκλεοτίδια χρησιμοποιώντας το ένζυμο Klenow και το γραμμικό τεμάχιο DNA επώασθε στη συνέχεια με *XbaI*, δημιουργώντας ένα τυφλό/*XbaI* Efgp-ParaT ένθεμα. Εγινε πέψη του πλασμιδιακού φορέα pUHD10-3 με *EcoRI*, τα άκρα γεμίστηκαν με νουκλεοτίδια χρησιμοποιώντας το ένζυμο Klenow και το DNA επώασθηκε στη συνέχεια με *XbaI*, δημιουργώντας έναν τυφλό/*XbaI* pUHD10-3 πλασμιδιακό φορέα. Σε ένα τελικό βήμα το τυφλό/*XbaI* Efgp-ParaT ένθεμα κλωνοποιήθηκε σε pUHD10-3-πλασμιδιακό φορέα (Gossen and Bujard, 1992). **pGEX-ParaT**: Το γονίδιο paraT αποκόπηκε από το pFlag-ParaT με *EcoRI/SmaI* και κλωνοποιήθηκε σε pGEX-6P3 (Pharmacia) που είχε κοπεί με *EcoRI/SmaI*. **pFASTBAC-GSTb-SET (TAF-Ιβ)**: Το πλασμίδιο κατασκευάστηκε με την αφαίρεση του γονιδίου set



από το pEGFP-Set με *KpnI/EcoRI* και την κλωνοποίηση του σε pFASTBAC-GSTb που είχε επωασθεί με *KpnI/EcoRI*.

2.3.2. Μικρής κλίμακας παρασκευή DNA ("Mini-Prep")

Για να μεταφέρουμε το επιθυμητό DNA σε έναν βακτηριακό ξενιστή (*E.coli* XL1-Blue), τουλάχιστον 10 ng DNA πλασμιδίων προστέθηκε στα επιδεκτικά βακτηρίδια κι επώαστηκε σε πάγο για 30 λεπτά. Τα βακτηρίδια θερμάνθηκαν απότομα στους 42°C για ακριβώς 1 λεπτό κι έπειτα επώαστηκαν σε πάγο για 2 λεπτά. Προστέθηκαν στα βακτηρίδια 200 μl μέσου Luria-Bertani (LB μέσο: 1% βάρος/όγκο τρυπτόνη, 1% NaCl και 0,5% Εκχύλισμα Ζύμης) κι επώαστηκαν στους 37°C για 1 ώρα. 50 μl και το υπόλοιπο του βακτηριακού διαλύματος επιστρώθηκαν σε δυο ξεχωριστά LB τρυβλία με άγαρ, που περιείχαν το κατάλληλο αντιβιοτικό για επιλογή, κι επώαστηκαν όλη τη νύχτα στους 37°C.

Για μικρής κλίμακας καθαρισμό DNA, έγινε επιλογή μιας αποικίας από μετασχηματισμένα *E. Coli* και μεταφέρθηκε σε 3 ml LB, που περιείχε αντιβιοτικά, κι έγινε καλλιέργεια όλη τη νύχτα στους 37°C. 1,5 ml της καλλιέργειας αυτής μεταφέρθηκε σε ένα σωλήνα erpendorf και φυγοκεντρήθηκε σε 13000 g για 5 λεπτά. Το ίζημα εναιωρήθηκε σε 100 μl P1 (50 mM Tris-Cl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 μg/ml RNase). Τα κύτταρα διαλύθηκαν σε 100 μl P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) και το πλασμιδιακό DNA διαλυτοποιήθηκε με 100 μl P3 (3 M Κάλιο-Οξικό άλας pH 5,5). Το διάλυμα, που περιέχει κατακρημνισμένο γονιδιωματικό DNA και διαλυτό DNA πλασμιδίων, φυγοκεντρήθηκε σε 13000 g για 5 λεπτά. Το πλασμιδιακό DNA στο υπερκείμενο κατακρημνίστηκε με 2,5 όγκους 100% αιθανόλης για 20 λεπτά και πλύθηκε έπειτα με 500 μl 70% αιθανόλης με φυγοκέντρωση σε 13000 g για 10 λεπτά. Το ίζημα που περιείχε το DNA πλασμιδίων εναιωρήθηκε σε 30 μl ddH₂O.

2.3.3. Μεγάλης κλίμακας παρασκευή DNA ("Midi-Prep")

Για να απομονώσουμε DNA πλασμιδίων σε ικανοποιητικά ποσά και σε υψηλή καθαρότητα, έγινε μεγάλης κλίμακας παρασκευή ("Midi-Prep") DNA από βακτηρίδια



χρησιμοποιώντας το Qiagen Midi-Prep Kit (Qiagen). 1 ml μιας ολονύχτιας καλλιέργειας *E. coli* μεταφέρθηκε σε 100 ml φρέσκου LB (κεφάλαιο 2.3.3.) και τα βακτήρια αναπτύχθηκαν όλη τη νύχτα στους 37°C υπό σταθερή ανάδευση. Στη συνέχεια, εκτελέστηκε η ακόλουθη διαδικασία:

- Η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε στους 4°C σε 6000 g για 15 λεπτά (GSA Rotor, Sorvall) και το ίζημα εναιωρήθηκε σε 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος P1 (κεφάλαιο 2.3.3.)
- Προστέθηκαν 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος P2 (κεφάλαιο 2.3.3.) στο βακτηριακό διάλυμα, αναμίχθηκαν κι αφέθηκαν να επωαστούν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (βακτηριακό διάλυμα).
- Προστέθηκαν 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος P3 (κεφάλαιο 2.3.3.) στο βακτηριακό διάλυμα, αναμίχθηκαν κι αφέθηκαν να επωαστούν για 20 λεπτά σε πάγο πριν το διάλυμα υποβληθεί σε φυγοκέντρωση στους 4°C σε 20000 g (Sorvall, SS- 34 Rotor) για 30 λεπτά.
- Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε μια στήλη (Qiagen), η οποία εξισορροπήθηκε προηγουμένως με ρυθμιστικό διάλυμα QBT (50 mM MOPS--NaOH, 750 mM NaCl, 15% ισοπροπανόλη, 0,15% Triton-X100, pH 7). Το πλασμιδιακό DNA συνδέθηκε στο υλικό της στήλης και διαχωρίστηκε με εκχύλιση με 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος QF (50 mM Tris-HCl, 1,25 M NaCl, 15% ισοπροπανόλη, pH 8,5).
- Το πλασμιδιακό DNA κατακρημνίστηκε με 0,7 όγκο ισοπροπανόλης, φυγοκεντρήθηκε σε 20000 g στους 4°C για 30 λεπτά και πλύθηκε μια φορά με 70% αιθανόλη (σε 20000 g στους 4°C για 10 λεπτά).
- Το κατακρημνισμένο DNA στέγνωσε με αέρα στον πάγκο κι εναιωρήθηκε σε 100 μ l ddH₂O.

Η μέθοδος καθαρισμού που περιγράφηκε παράγει περίπου 200 μ g καθαρού DNA χρησιμοποιώντας 100 ml βακτηριακής καλλιέργειας.

Για να ελέγξουμε τη συγκέντρωση και την καθαρότητα του DNA, ελέγχθηκε η απορρόφηση 1 ml διαλύματος DNA στο νερό σε ένα φασματόμετρο στα 260 και 280 nm μήκη κύματος. Η αναλογία 260/280 nm με μεταξύ 1,7 και 1,8 θεωρείται ως καθαρό διάλυμα DNA. Αναλογία κάτω από 1,7 έδειξε ότι το διάλυμα περιείχε πολλή πρωτεΐνη,



ενώ αναλογία πάνω από 1,8 έδειξε ότι το διάλυμα περιείχε πολύ RNA. Η τιμή στα 260 nm πολλαπλασιασμένη με 50 δίνει το ποσό του DNA σε μg ανά ml DNA.

2.3.4. Ηλεκτροφόρηση πηκτής αгарόζης

Τα πλασμίδια και τα μικρά τμήματα DNA μπορούν να διαχωρισθούν σύμφωνα με το μέγεθός τους σε μια πηκτή αгарόζης. Η συγκέντρωση αгарόζης είναι αντιστρόφως ανάλογη προς το μέγεθος των πόρων της πηκτής και λόγω τεχνικών δυσκολιών δεν είναι ενδεδειγμένο να γίνουν πηκτές με πάνω από 2% αгарόζη. Όταν τα δείγματα DNA φορτίζονται, ομοιόμορφο ηλεκτρικό πεδίο εφαρμόζεται στην πηκτή και το DNA χωρίζεται σύμφωνα με το μέγεθός του στο δρόμο προς την κάθοδο, με το μικρότερο DNA να τρέχει γρηγορότερα από το μεγαλύτερο. Το DNA που χωρίζεται σε πηκτή αгарόζης μπορεί να ανιχνευθεί με βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο παρεμβάλλεται στο DNA και το καθιστά ορατό κάτω από UV φως ως ζώνες DNA- βρωμιούχου αιθιδίου.

Μελέτες NRL (μήκος επανάληψης νουκλεοσώματος): Οι πηκτές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 1,3% αгарόζη σε 1x Tris-Γλυκίνη (0,5 M Tris-βάση, 0,52 M γλυκίνη) κι έτρεξαν σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x Tris-Γλυκίνη σε 60 V έως ότου το μέτωπο των δειγμάτων έφτασε $\frac{3}{4}$ του συνολικού μεγέθους της πηκτής. Η χρωστική ουσία που χρησιμοποιήθηκε για να ακολουθήσει το μέτωπο ήταν η Orange G. Η πηκτή δεν περιέχει καθόλου βρωμίδιο του αιθιδίου, για να μην παρεμποδίσει το τρέξιμο των δειγμάτων, καθώς έπειτα έπρεπε να ληφθούν ακριβείς μετρήσεις. Έγινε χρώση του DNA με επώαση της πηκτής σε 0,1 mg/ml βρωμιδίου του αιθιδίου για 10 λεπτά, και ακολούθησαν πολλές πλύσεις με ddH_2O για τουλάχιστον 1 ώρα και με πολλές αλλαγές.

Το DNA που παρασκευάσθηκε από μικρής ή μεγάλης κλίμακας μέθοδο παρασκευής (κεφάλαια 2.3.2. και 2.3.3., αντίστοιχα) αναλύθηκε σε ηλεκτροφόρηση 0,8% αгарόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x TBE (5x TBE: 0,089 M Tris-βάση, 0,089 M Βορικό οξύ, 0,002 M EDTA, pH 8,0) που έτρεξε σε 60 V σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x TBE. Αυτός ο τύπος πηκτής περιείχε 10 ng/ml βρωμιδίου του αιθιδίου που προστέθηκε στο διάλυμα της αгарόζης.



2.4. Ανοσοχημικές τεχνικές

2.4.1. Ομοιοπολική σύνδεση του πεπτιδίου της παραθυμοσίνης σε Affigel-matrix για τον καθαρισμό αντισωμάτων

Για να προετοιμάσουμε μια στήλη συγγένειας για τον καθαρισμό αντισωμάτων συνδέσαμε ομοιοπολικά το πεπτίδιο P1 (αμινοξέα 5-30) με σφαιρίδια Affigel 15 (εργαστήρια BioRad). Το πεπτίδιο συντέθηκε από Hoffmann La-Roche (ΗΠΑ) σύμφωνα με τη δημοσιευμένη αλληλουχία της ParaT αρουραίου (Haritos *et al.*, 1985) και χρησιμοποιήθηκε ως αντιγόνο για την παραγωγή αντισωμάτων. Η στήλη προετοιμάστηκε ως εξής:

- 1-1,5 mg πεπτιδίου P1 διαπιδύθηκε όλη τη νύχτα σε 0,1 M Hepes, 1 mM EDTA, 0,4 mM PMSF, pH 7,5, με τρεις αλλαγές του ρυθμιστικού διαλύματος
- Το Affigel 15 ξεπάγωσε σε θερμοκρασία δωματίου σε ένα δοχείο με ddH₂O και 2 ml του εναιωρήματος χύθηκαν σε ένα sintered glass funnel. Τα σφαιρίδια πλύθηκαν με 100% ισοπροπανόλη κι έπειτα με παγωμένο ddH₂O.
- Τα σφαιρίδια λήφθηκαν με 2 όγκους (=2 ml) ρυθμιστικού διαλύματος συζεύξεως (0,1 M Hepes, 1 mM EDTA, 0,4 mM PMSF, pH 7,5) μέσα σε ένα φρέσκο πλαστικό σωλήνα 15 ml και υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρωση σε 5000 g για 45 δευτερόλεπτα. 1 ml συσκευασμένων σφαιριδίων εναιωρήθηκαν σε 2ml ρυθμιστικού διαλύματος συζεύξεως. Οι ανωτέρω χειρισμοί πρέπει να τελειώσουν μέσα σε 15 λεπτά.
- Το διάλυμα πεπτιδίου προστέθηκε στα σφαιρίδια κι επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα και στους 4°C για 3 ώρες πάνω σε έναν περιστροφέα.
- Έγινε φυγοκέντρωση σε 5000 g για 1 λεπτό, τα σφαιρίδια πλύθηκαν σε 2 όγκους ρυθμιστικού διαλύματος δέσμευσης (1 M Tris-HCl pH 8,0), επαναιωρήθηκαν σε 2 όγκους ρυθμιστικού διαλύματος δέσμευσης κι επώαστηκαν στους 4°C για 3-6 ώρες, πάνω σε έναν περιστροφέα.
- Τα σφαιρίδια πλύθηκαν τρεις φορές με 1x ισοτονικό ρυθμιστικό διάλυμα TBS κι εξισορροπήθηκαν όλη τη νύχτα σε TBS που περιείχε 500 μg/ml BSA.

Τα σφαιρίδια πλύθηκαν δυο φορές με PBS και διατηρήθηκαν στους 4°C μέχρι ένα έτος.



2.4.2. Καθαρισμός ειδικών αντισωμάτων εναντίον της ParaT από ορό κουνελιών

Για να καθαρίσουμε τα αντισώματα της ParaT, έγινε μια χρωματογραφία συγγένειας βασισμένη στην ειδική αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισωμάτων ως εξής:

- Η στήλη P1-Affigel πλύθηκε δυο φορές με 10 ml PBS.
- Σε κάθε ml ορού προστέθηκαν 10 μ l 10% Tween-20 και 2,5 μ l 200 mM PMSF κι αναμίχθηκαν.
- Ο ορός προστέθηκε στη στήλη κι επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά και στους 23°C (δωμάτιο κυτταροκαλλιέργειας) για 1,5 ώρα πάνω σε έναν περιστροφέα.
- Η στήλη πλύθηκε δυο φορές με PSB-T (PSB-0,1 % Tween 20) και δυο φορές με PBS.
- Η έκλουση συγκεκριμένων αντισωμάτων έγινε ως εξής: Σε κάθε σωλήνα erppendorf, προστέθηκαν 100 μ l 1 M Tris-NaOH pH 11,5. Το ποσό Tris-βάσης που προστίθεται για εξουδετέρωση του pH των εκλουσμάτων έπρεπε να αξιολογηθεί κάθε φορά που γινόταν ο καθαρισμός, για να αποφευχθεί ο υπερ-οξινισμός των αντισωμάτων που διαχωρίστηκαν με εκχύλιση από τη στήλη.
- Εφαρμόστηκε στη στήλη 4 ml έκλουσης ρυθμιστικού διαλύματος (0,2 M γλυκίνη, 0,5 M NaCl, pH 2,3) και πρώτα συλλέχθηκαν τρία 1 ml.
- Το συγκεντρωμένο έκλουσμα διαπιδύθηκε όλη τη νύχτα σε PBS-0,02% NaN₃ στους 4°C με τρεις αλλαγές του ρυθμιστικού διαλύματος (cut off μεμβράνης MW 12000 Da, Sigma). Η στήλη πλύθηκε δυο φορές με 10 ml PBS και διατηρήθηκε στους 4°C σε PBS-0,02% NaN₃ μέχρι περαιτέρω χρήση.

Το καθαρισμένο δείγμα αντισωμάτων διατηρείται στους 4°C, αν χρησιμοποιείται μέσα σε ένα μήνα, ή στους -20°C για μακροχρόνια αποθήκευση σε υποπολλαπλάσια 50-100 μ l. Η αραίωση που χρησιμοποιήθηκε στον ανοσοφθορισμό και τις μελέτες αποτύπωσης κατά Western ήταν 1:25 κι 1:250, αντίστοιχα.



2.4.3. Έμμεσος ανοσοφθορισμός και συνεστιακή μικροσκοπία

Ένα πολυκλωνικό αντίσωμα ενάντια στο αμινοτελικό της ParaT (πεπτίδιο P1, υπολείμματα 5-30) αναπτύχθηκε σε κουνέλια (Davids Biotechnology, Γερμανία) κι ο ορός καθαρίστηκε σε μια στήλη (κεφάλαιο 2.4.1.). Κύτταρα HeLa που καλλιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες σταθεροποιήθηκαν με 100% μεθανόλη στους -20°C για 5 λεπτά, κι ακολούθησε επώαση σε 3,8% παραφορμαλδεΰδη σε PBS σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά και 50 mM χλωριούχου αμμωνίου σε PBS για 15 λεπτά. Οι κενές θέσεις δεσμεύθηκαν με 10% ορό εμβρύων μοσχαριών σε PBS και πραγματοποιήθηκαν επώσεις αντισωμάτων για 1 ώρα. Τα πρώτα και δεύτερα αντισώματα αραιώθηκαν σε 10% FCS. Τα Fluorescein isothiocyanate ή TRITC συζευγμένα δευτεροβάθμια αντισώματα εναντίον κουνελίων IgG αγοράστηκαν από το Dianova και χρησιμοποιήθηκαν σε διάλυση 1:200. Οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε Mowiol που περιείχε 100 mg/ml DABCO (Sigma) κι έγινε παρατήρηση χρησιμοποιώντας ένα Leica TCS-SP συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης, εξοπλισμένο με ένα λέιζερ Argon/Krypton και λογισμικό Leica TCS. Μήκη κύματος 488 nm και 568 nm χρησιμοποιήθηκαν για να διεγείρουν τα fluorescein isothiocyanate και TRITC, αντίστοιχα. Οι εικόνες μεταφέρθηκαν στο Adobe Photoshop για εξεργασία.

2.4.4. Αποτύπωση κατά Western κι ανίχνευση με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (ECL)

2.4.4.1. Αποτύπωση κατά Western

Η τεχνική αποτύπωσης κατά Western χρησιμοποιείται για τη μεταφορά πρωτεϊνών από SDS-PAGE (κεφάλαιο 2.2.2.) σε μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (OPTITRAN, BA-S 83, Ενισχυμένη Νιτροκυτταρίνη, Schleicher & Schuell). Η μεταφορά επιτυγχάνεται με την εφαρμογή μιας σταθερής ηλεκτρικής δύναμης πάνω στη πηκτή, όπου οι πρωτεΐνες, που είναι αρνητικά φορτισμένες λόγω της ενσωμάτωσης του



SDS, μετακινούνται από το αρνητικά φορτισμένο προς το θετικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο και ακινητοποιούνται στην ενδιάμεσα τοποθετημένη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

1. Γενική πρωτεϊνική μεταφορά επάνω σε μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

Για να μεταφέρουμε πρωτεΐνες πάνω σε μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 0,4 μm , τα εκχυλίσματα κυττάρων διαλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα διάλυσης (20 mM Tris, 137 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP- 40, 25 mM β -Γλυκεροφωσφορικό άλας, 5 mM NaF, Μίγμα αναστολής πρωτεάσεων (Απροτινίνη, Λευπεπτίνη, Πεπστατίνη), pH 8,0). Μετά από ηλεκτροφόρηση, η πηκτή τοποθετήθηκε σε μια συσκευή αποτύπωσης κατά Western (BioRad εργαστήρια), με τη μια πλευρά του πηκτώματος να είναι προς τη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης. Οι πρωτεΐνες στη πηκτή μεταφέρθηκαν στους 4°C σε 220 mA για 1 ώρα.

2. Μεταφορά των δειγμάτων ParaT πάνω σε μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

Για την μεταφορά της ParaT πάνω σε μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 0,2 μm χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε από τους Kondili *et al.* (1996). Λόγω της οξύτητάς της και του μικρού μεγέθους της ParaT, η σύνδεσή της πάνω στη μεμβράνη δεν είναι ισχυρή. Για να σταθεροποιηθούν οι πρωτεΐνες που συνδέονται στη μεμβράνη, η μεταφορά και η σταθεροποίηση της ParaT στη νιτροκυτταρίνη πραγματοποιήθηκε ως εξής:

- Εκχυλίσματα κυττάρων HeLa αναλύθηκαν σε 15% SDS-PAGE, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.2.2. Η πηκτή πλύθηκε σε 20 mM CH_3COONa pH 5,0 για 10 λεπτά (το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης άλλαξε μετά από 5 λεπτά) και μεταφέρθηκαν σε 30 V και 160 mA σε CH_3COONa , pH 5,0 πάνω σε μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 0,2 μm για 3 ώρες.
- Η μεμβράνη πλύθηκε σύντομα με PBS και οι πρωτεΐνες που συνδέθηκαν στη μεμβράνη σταθεροποιήθηκαν με PBS-0,5% γλουταραλδεύδη (Gibco) για 10 λεπτά. Το διάλυμα σταθεροποίησης άλλαξε μετά από 5 λεπτά.
- Η μεμβράνη πλύθηκε σε διάλυμα γλυκίνης PSB-50 mM για 5 λεπτά, σε TBS για 5 λεπτά, σε TBS-T (TBS-0,1% Tween 20) για 5 λεπτά και σε PBS-T-5% άπαχο γάλα (ρυθμιστικό διάλυμα δέσμευσης, Nestle Carnation) για 5 λεπτά.



- Η μεμβράνη επώασθηκε για 1 ώρα σε διάλυμα δέσμευσης κι έπειτα επώαστηκε με ένα διάλυμα αντισωμάτων εναντίον της ParaT 1:250 σε διάλυμα δέσμευσης για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- Η μεμβράνη πλύθηκε τρεις φορές με διάλυμα δέσμευσης κι επώαστηκε σε ένα διάλυμα αντισωμάτων αιγός εναντίον κουνελιού IgG-HRP (Amersham Pharmacia Biotech) 1:5000 σε ρυθμιστικό διάλυμα δέσμευσης για 40 λεπτά.

2.4.4.2. ECL (Amersham) για την ανίχνευση πρωτεϊνών σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης

Η χημειοφωταύγεια είναι το δημοφιλέστερο σύστημα ανίχνευσης πρωτεϊνών που χρησιμοποιείται για αποτύπωση κατά Western. Η αρχή της στηρίζεται στην ενζυματική μετατροπή ενός μορίου λουμινόλης σε ένα αντιδρόν μόριο από την υπεροξειδάση αγριοράπανου (HRP). Το μόριο παράγει φως παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου. Η εκπομπή ενισχύεται συνήθως από έναν ενισχυτή. Αυτή η μέθοδος είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη, δεν απαιτεί ακριβά όργανα, και δεν παράγει επιβλαβή απόβλητα. Επιπλέον, το φως που παράγεται με αυτόν τον τρόπο κορυφώνεται μετά από 5-20 λεπτά και μειώνεται σιγά σιγά έκτοτε. Μετά από την επώαση της μεμβράνης με το διάλυμα ανίχνευσης για 1 λεπτό, το επιπλέον υγρό στραγγίστηκε και η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε ένα κουτί για έκθεση σε φιλμ. Τα ακόλουθα βήματα ακολουθήθηκαν στο σκοτεινό θάλαμο υπό ένα κόκκινο φως χαμηλού μήκους κύματος. Ένα Blue-ευαίσθητο φιλμ (Kodak) τοποθετήθηκε πάνω στη μεμβράνη κι επώαστηκε στο σκοτάδι για 1 λεπτό. Το φιλμ αποσύρθηκε και τοποθετήθηκε σε ένα διάλυμα εμφάνισης για 2,5 λεπτά, πλύθηκε σύντομα με νερό και τοποθετήθηκε σε ένα διάλυμα σταθεροποίησης για κατά προσέγγιση 5 λεπτά.

2.5. *In vitro* ανασύνθεση της χρωματίνης

2.5.1. Σήμανση του DNA με βιοτίνη

Για *in vitro* πειράματα χρωματίνης, DNA pXX3.2 πλασμιδίων (που περιείχε *Drosophila* hsp70 heat shock γονίδιο) έγινε γραμμικό με *Cla*I και *Eco*RI (Fermentas) και σημάνθηκε με βιοτίνη ως εξής (Σχήμα 14)(Sandaltzopoulos *et al.*, 1994):



- 40 μ g DNA πλασμιδίων επώαστηκε με 60 μονάδες *ClaI* σε 1x ρυθμιστικό διάλυμα περιορισμού ενζύμων στους 37°C για 2,5 ώρες σε συνολικό όγκο 60 μ l.
- Η γραμμικότητα του πλασμιδίου ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή agarόζης (MW 6,2 kb). Στη συνέχεια έγινε πέψη του DNA με 60 μονάδες *EcoRI* σε 1x ρυθμιστικό διάλυμα περιορισμού ενζύμων στους 37°C για 2,5 ώρες σε συνολικό όγκο 160 μ l.
- Το *ClaI/EcoRI*-αφομοιωμένο DNA κατακρημνίστηκε με 0,7 όγκους 7,5 M οξικού άλατος αμμωνίου και 2,5 όγκους 100% αιθανόλης. Το ίζημα πλύθηκε με 80% αιθανόλη κι έπειτα στέγνωσε σε SpeedVac για 5 λεπτά. Το ίζημα εναιωρήθηκε ξανά σε 40 μ l TE ρυθμιστικού διαλύματος (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4).
- Για να σημανθεί με βιοτίνη το γραμμικό DNA, DNA επώαστηκε στους 37°C για 2 ώρες στο ακόλουθο μίγμα αντίδρασης:
 40 μ l DNA σε TE ρυθμιστικό διάλυμα (από το προηγούμενο βήμα)
 7,5 μ l 0,4 mM βιοτίνη-14-dATP
 1,2 μ l 10 mM a-thio-dTTP
 1,2 μ l 10 mM a-thio-dCTP
 1,2 μ l 10 mM a-thio-dGTP
 6 μ l 10 x ρυθμιστικό διάλυμα για ένζυμο Klenow
 3,5 μ l ένζυμο Klenow (5 U/ μ l)
- Για να καθαρίσουμε το βιοτινιλωμένο DNA, το μίγμα αντίδρασης τοποθετήθηκε πάνω σε μια στήλη Chromaspin 100 (Clontech) και διαχωρίστηκε με εκχύλιση με ddH₂O.

2.5.2. Σύνδεση βιοτινιλωμένου DNA σε παραμαγνητικά σφαιρίδια, καλυμένα με στρεπταβιδίνη

Το βιοτινιλωμένο DNA συνδέθηκε με καλυμένα με στρεπταβιδίνη σφαιρίδια (Dynabeads M280 Streptavidin) ως εξής (Σχήμα 14A). 1 ml εναιωρήματος σφαιριδίων χρησιμοποιήθηκε για 40 μ g DNA και πλύθηκε μια φορά με ένα ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε PBS, 0,01% BSA, 0,05% NP-40 και δυο φορές με 300 μ l 2x ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 2 M NaCl, pH 7,5) και τα σφαιρίδια



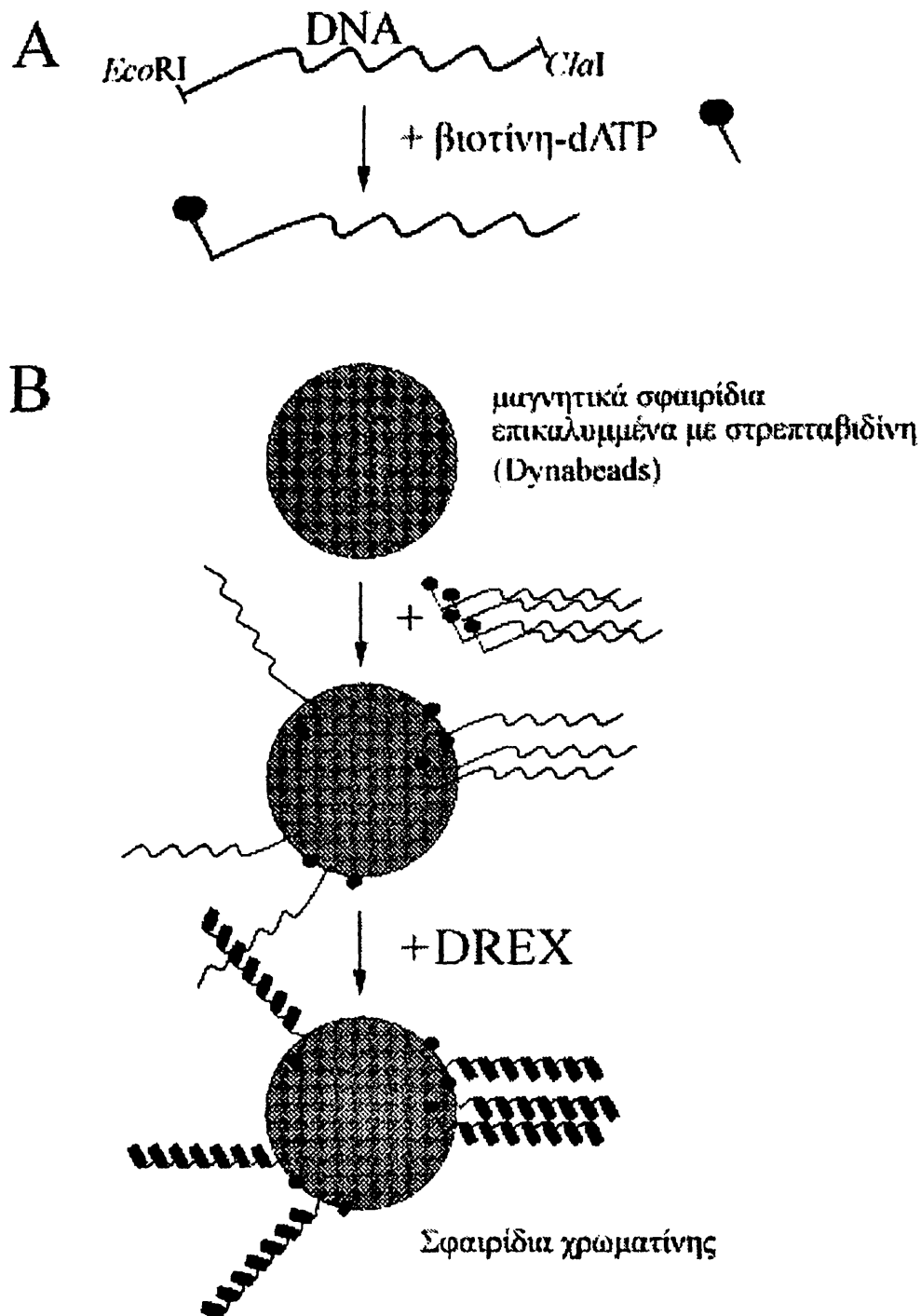
επώστηκαν σε 2x ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης που περιστρεφόταν όλη τη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου. Τα μαγνητικά σφαιρίδια συλλέχθηκαν έπειτα με ένα συμπυκνωτή μαγνητικών μορίων, πλύθηκαν μια φορά με 2x ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης και διατηρήθηκαν στους 4°C σε 2x ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης σε μια συγκέντρωση 0,1 $\mu\text{g DNA}/\mu\text{l}$ σφαιριδίων.

2.5.3. Ανασύνθεση χρωματίνης *in vitro*

Το εκχύλισμα από πρώιμα έμβρυα *Drosophila* παρασκευάστηκε σύμφωνα με τους (Becker and Wu, 1992) και η ακινητοποίηση πλασμιδίων σε παραμαγνητικά σφαιρίδια έγινε όπως περιγράφεται παραπάνω (Sandaltzopoulos *et al.*, 1994) (Σχήμα 14B). Η ενέργεια που απαιτείται για να δημιουργηθεί φυσιολογική χρωματίνη *in vitro* παρέχεται από ένα συγκεκριμένο σύστημα ενεργειακής ανασύνθεσης (McNAP), που περιέχει 30 mM ATP, 30 mM MgCl_2 , 10 mM DTT, 300 mM φωσφορικό άλας κρεατίνης (CP, Boehringer Mannheim) και 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ κινάση φωσφοκρεατίνης (CPK, Boehringer Mannheim). Η κινάση διατηρήθηκε συγκεντρωμένη σε υποπολλαπλάσια στους -80°C και, όταν απαιτήθηκε, ξεπάγωσε κι αραιώθηκε σε 0,1 M ιμιδαζόλη, pH 6,6 σε συγκεντρώσεις 20 mg/ml. Το εκχύλισμα πρώιμων εμβρύων *Drosophila* (DREX) έγινε από 0-100 λ. έμβρυα σύμφωνα με τα δημοσιευμένα πρωτόκολλα των Becker και Wu (Becker and Wu, 1992) και Sandaltzopoulos *et al.* (Sandaltzopoulos *et al.*, 1994) και ήταν ένα δώρο του Καθηγ. Δρ. P. Becker, Adolf-Butenandt-Institute, Μόναχο. Το εκχύλισμα περιέχει όλους τους απαραίτητους παράγοντες για ανασυγκρότηση της χρωματίνης *in vitro*, αλλά στερείται συνδετικής ιστόνης H1 που πρέπει να προστεθεί εξωτερικά στο μίγμα συγκεντρώσεως. Μια μονάδα H1 ορίζεται ως η ποσότητα της πρωτεΐνης που απαιτείται για να αυξηθεί το μήκος επανάληψης νουκλεοσώματος (NRL) κατά 20 bp. Πριν από τη συγκέντρωση της χρωματίνης, τα σφαιρίδια DNA πλύθηκαν δυο φορές σε 150 μl PBS, 0,01% BSA, 0,05% NP-40 και δυο φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα EX (10 mM Hepes pH 7,6, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl_2 , 0,5 mM EGTA, 10% γλυκερίνη, 10 mM β-φωσφορικό άλας γλυκερίνης) που περιείχε 0,05% NP-40. Τα σφαιρίδια προστέθηκαν τελευταία στο μίγμα της αντίδρασης.

Η ακόλουθη αντίδραση οργάνωσης της χρωματίνης έγινε στους 26°C για 6 ώρες:





Σχήμα 14: Φυσιολογικά αναδιαμορφωμένη χρωματίνη (Sandaltzopoulos *et al.*, 1994)

(A) *Μαρκάρισμα του DNA με βιοτίνη.* DNA πλασμιδίων αφομοιώθηκε διπλά με EcoRI/ClaI και το κλώδες EcoRI ξαναγεμίστηκε με βιοτινιωμένα dATP χρησιμοποιώντας το ένζυμο Klenow. (B) *Ανασύνθεση της χρωματίνης in vitro.* Βιοτινιωμένο DNA πλασμιδίων επωάστηκε με παραμαγνητικά, επικαλυμμένα με στρεπταβιδίνη σφαιρίδια. Για την ανασύνθεση της χρωματίνης σε DNA ακινητοποιημένο σε σφαιρίδια, σφαιρίδια DNA επωάστηκαν με εκχύλισμα πρώιμων εμβρύων *Drosophila* (Becker PB *et al.*, 1992) παρουσία 2 U ιστόνης H1 θύμου αδένος μοσχαριών (Sigma).



EX-50 ρυθμιστικό διάλυμα:	66,7 μ l
McNAP-διάλυμα:	12 μ l
Εκχύλισμα <i>Drosophila</i> :	30 μ l
DNA-σφαιρίδια:	10 μ l (= 1 μ g DNA)
Ιστόνη H1 (1 μ g/ μ l):	<u>0,65 μl (2 Μονάδες)</u>
	Σύνολο 120 μ l

Για να συνθέσουμε χρωματίνη με ελεύθερες περιοχές συνδέσεων της H1, η ακινητοποιημένη χρωματίνη πλύθηκε δυο φορές με EX-650 (EX ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 650 mM NaCl), έπειτα δυο φορές με EX-150 (EX ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 150 mM NaCl), κι εξισορροπήθηκε τελικά σε 120 μ l ρυθμιστικού διαλύματος (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,02% NP-40, pH 7,4).

2.5.4. Πέψη της ανασυγκροτημένης χρωματίνης με μικροκοκκική νουκλεάση

Η μικροκοκκική νουκλεάση είναι ένα ένζυμο που κόβει δίκλωνο DNA στο οποίο δεν έχουν συνδεθεί άλλοι παράγοντες. Σε ένα χρωματινικό περιβάλλον, το ένζυμο κόβει το DNA μεταξύ δυο γειτονικών νουκλεοσωμάτων, χωρίζοντάς τα και δημιουργώντας μια ολιγονουκλεοσωμική "DNA-σκάλα". Κατά συνέπεια, με την ανάλυση της "DNA σκάλας" σε μιά πηκτή αгарόζης με βρωμίδιο του αιθιδίου, είναι δυνατό να ελεγχθεί η χρωματίνη. Σε αυτήν τη μελέτη, η ανάλυση της χρωματίνης με πέψη μικροκοκκικής νουκλεάσης έγινε σύμφωνα με τους Becker και Wu (Becker and Wu, 1992):

- Η χρωματίνη οργανώθηκε σε κυκλικό πλασμιδιακό DNA (pXX3.2) χρησιμοποιώντας εκχύλισμα πρώιμων εμβρύων *Drosophila* (DREX) ως εξής: 30 μ l DREX προστέθηκαν σε ένα μίγμα 1 μ g DNA (pXX3.2), 0,4 μ g ιστόνης μοσχαριών H1 (Sigma), 1x McNAP (κεφάλαιο 2.5.3.1.) κι EX ρυθμιστικό διάλυμα (κεφάλαιο 2.5.3.1.) σε ένα συνολικό όγκο 120 μ l. 6 μ g ParaT προστέθηκαν στο μίγμα (όχι στα δείγματα ελέγχου) κι επωάστηκαν στους 25°C για 6 ώρες.
- 180 μ l μίγματος πέψης που περιείχαν 168 μ l EX-50 ρυθμιστικού διαλύματος, 9 μ l ενός διαλύματος 100 mM CaCl₂ και 3 μ l μικροκοκκικής νουκλεάσης (Boehringer



Mannheim, 50 μονάδες/μl διαλύματος σε EX-50) προστέθηκαν σε κάθε δείγμα. Το μίγμα επώασης μεταφέρθηκε αμέσως σε ένα heat-block για 25°C.

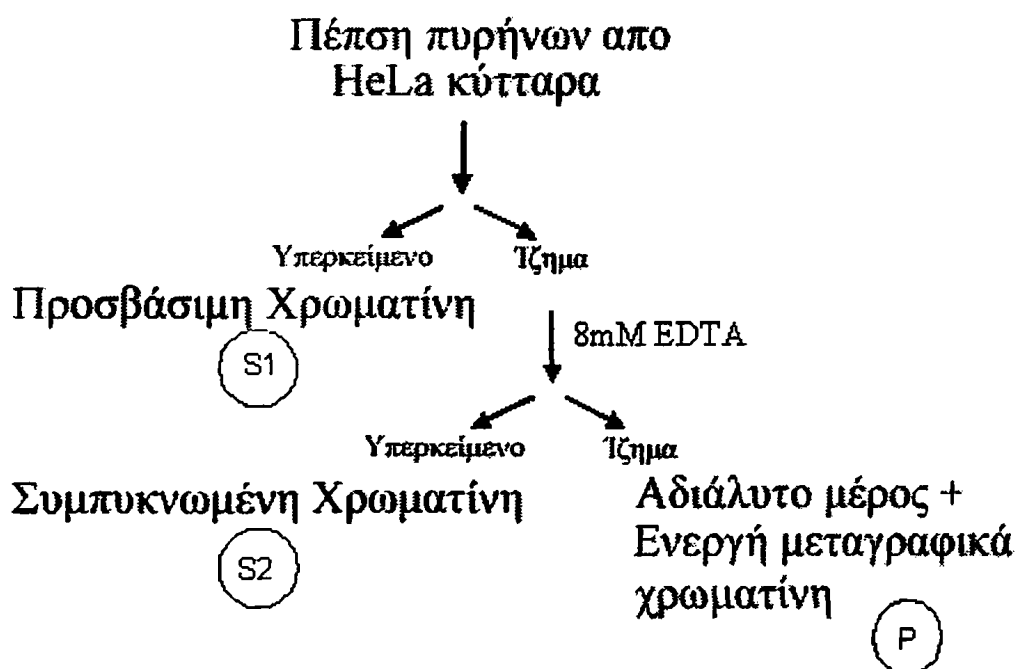
- 100 μl δείγματος ανακτήθηκαν μετά από 0,5, 1 και 3 λεπτά και μεταφέρθηκαν αμέσως σε ένα σωλήνα eppendorf που περιείχε 25 μl 5x μίγμα παύσης νουκλεάσης (5x NSM: 2,5% Sarcosyl, mM EDTA 100), που σταματά την ενζυματική δραστηριότητα της μικροκοκκικής νουκλεάσης.
- 1 μl από ένα διάλυμα 10 mg/ml RNase προστέθηκε στο μίγμα της αντίδρασης κι επώαστηκε στους 37°C για 10 λεπτά.
- 2 μl 20% διαλύματος SDS και 5 μl από 10 mg/ml διαλύματος πρωτεΐνάσης K προστέθηκαν σε κάθε δείγμα κι επώαστηκαν όλη τη νύχτα στους 37°C.
- Για κατακρήμνιση του DNA, 0,5 μl γλυκογόνου (20 mg/ml), 90 μl 7,5 M αμμωνικού άλατος και 450 μl 100% αιθανόλης προστέθηκαν κι επώαστηκαν στους -20°C για 10 λεπτά. Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε επιτραπέζια φυγοκέντρωση στους 4°C για 15 λεπτά και πλύθηκαν έπειτα μια φορά με παγωμένη 80% αιθανόλη.
- Μετά από στέγνωμα με αέρα των ιζημάτων στον πάγκο, τα δείγματα εναιωρήθηκαν ξανά σε 4 μl TE ρυθμιστικού διαλύματος. προστέθηκε 1 μl 5x Orange-G ρυθμιστικό διάλυμα και 1 μl των δειγμάτων έτρεξε σε μία πηκτή αγαρόζης 1,3% (βλ. κεφάλαιο 2.3.4.).

2.6. Διαχωρισμός της χρωματίνης από HeLa και πέψη με μικροκοκκική νουκλεάση

Για να διαχωρίσουμε την ενεργό από την ανενεργό μεταγραφικά χρωματίνη χρησιμοποιήσαμε μια μέθοδο που παρασκευάζει διαδοχικά τρία κλάσματα που περιέχουν υλικό που είναι διαλυτό σε δισθενή μέταλλα (*S1*), διαλυτό σε EDTA (*S2*) κι ένα υπόλοιπο αδιάλυτο μέρος (*P*) (Σχήμα 15)(Rose and Garrard, 1984). Η λεπτομερής ανάλυση της πρωτεϊνικής σύστασης των κλασμάτων αυτών έχει δείξει ότι το *S1* έχει έλλειψη H1 σε σχέση με το *S2* που περιέχει συμπαγέστερη χρωματίνη, ενώ το ανθεκτικό στη νουκλεάση μέρος *P* είναι εμπλουτισμένο σε ενεργά μεταγραφόμενα γονιδία. Η απομόνωση των κλασμάτων εκτελέστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Rose και Garrard



(Rose and Garrard, 1984), με μικρές τροποποιήσεις. Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν σε ένα πιάτο κυτταροκαλλιέργειας 10 εκατοστών σε πληρότητα 50% και διαμολύνθηκαν με GFP-πλασμιδιακό φορέα ή GFP-ParaT χρησιμοποιώντας τη μέθοδο CaCl_2 (κεφάλαιο 2.7.4.). 36 ώρες μετά τη διαμόλυνση τα κύτταρα ξύθηκαν από το πιάτο με μια αποστειρωμένη πλαστική ξύστρα, υποβλήθηκαν σε επιτραπέζια φυγοκέντρωση σε 4000 g για 5 λεπτά κι επώαστηκαν σε 1 ml υποτονικού ρυθμιστικού διαλύματος A (20 mM Hepes, 20 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM ATP, μίγμα αναστολς φωσφατάσεων (Απροτινίνη, Πεπστατίνη και Λευπεπτίνη), pH 7,9) σε πάγο για 15 λεπτά. Μετά την επώαση τα κύτταρα έσπασαν με ένα θραύστη κυττάρων (EMBL Heidelberg, Γερμανία, μέγεθος σφαιριδίων 4 χιλ.) και υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρωση σε 3000 g. Το πυρηνικό μέρος εναιωρήθηκε ξανά σε 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος B (20 mM Hepes, 0,5 mM MgCl_2 , 1 mM ATP, 0,3 mM σακχαρόζη, 2 mM CaCl_2 , 150 mM NaCl, pH 7,9) και το περιεχόμενο DNA προσδιορίστηκε με ένα φωτοφασματομετρητή σε 260 nm σε 2M



Σχήμα 15: Διαδικασία κλασμάτωσης της χρωματίνης.

Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας που χρησιμοποιείται για κλασμάτωση της χρωματίνης HeLa που δεν έχει H1 (S1), εμπλουτισμένη με συμπαγή χρωματίνη (S2) και χρωματίνη εμπλουτισμένη με ενεργά μεταγραφόμενες αλληλουχίες γονιδίων και συστατικά πυρηνικής μήτρας (P). Η κλασμάτωση εκτελέστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Rose και Garrard (1984), με μικρές τροποποιήσεις.



NaCl. Εναιώρημα πυρήνων (200 μ l) που περιείχε 200 μ g DNA επώαστηκε με 8 U MNase στους 15°C για 10 λεπτά και 90 μ l του δείγματος της αντίδρασης σταμάτησαν με τη μεταφορά τους σε ένα φρέσκο σωλήνα erpendorf που περιείχε 10 μ l 10x STOP διάλυμα (20 mM EDTA, 10 mM EGTA, 5% SDS). Το υπόλοιπο δείγμα ψύχθηκε στον πάγο για 10 λεπτά, το μίγμα υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση σε 3000 g για 5 λεπτά και 90 μ l του υπερκείμενου μεταφέρθηκαν σε ένα φρέσκο σωλήνα erpendorf που περιείχε 10 μ l 10x διαλύματος STOP (μέρος S1). Το ίζημα εναιωρήθηκε ξανά σε 100 μ l από 8 mM EDTA και υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση όπως ανωτέρω. Το νέο υπερκείμενο (S2) μεταφέρθηκε σε έναν καθαρό σωλήνα erpendorf που περιείχε 10 μ l 10x STOP διάλυμα.

Για την ανάλυση DNA, τα μέρη κλάσματα S1, S2, και P επώασθηκαν με 1 μ g/ μ l RNase στους 25°C για 10 λεπτά και οι πρωτεΐνες τους απομακρύνθηκαν με 1 μ g/ μ l πρωτεϊνάσης K στους 37°C για 2 ώρες. Το DNA καθαρίστηκε με φαινόλη-χλωροφόρμιο και κατακρημνίστηκε με αιθανόλη ως εξής: Σε 110 μ l δείγματος 90 μ l ddH₂O, προστέθηκαν 100 μ l φαινόλης (Sigma) και 100 μ l χλωροφορμίου (Gibco). Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε σε 13000 g για 5 λεπτά για να διαχωριστεί η οργανική από την ανόργανη φάση. Το DNA (κατώτερη φάση) εισήχθη με σταγονόμετρο προσεκτικά σε ένα erpendorf και κατακρημνίστηκε με 2,5 όγκους 100% αιθανόλης. Το ίζημα DNA στέγνωσε σε SpeedVac κι εναιωρήθηκε ξανά σε 5 μ l 1x Orange-G ρυθμιστικού διαλύματος. 2 μ l κάθε δείγματος αναλύθηκαν σε 1,3% πηκτή αγαρόζης σε 1 x TBE (κεφάλαιο 2.3.4.) και η πηκτή έπειτα βάφτηκε με βρωμίδιο του αιθιδίου (0,1 μ g/ml, ddH₂O για 10 λεπτά).

2.7. Τεχνικές κυτταροκαλλιέργειας

2.7.1. Διαδικασίες κυτταροκαλλιέργειας

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε σε αυτήν τη μελέτη ήταν HeLa (American Type Culture Collection, ATCC), μια επιθηλιακή σειρά ανθρώπινων κυττάρων που απομονώθηκε από έναν ασθενή με καρκίνωμα τραχήλου (Puck *et al.*, 1956). Τα κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν σε ένα περιβάλλον με σταθερή θερμοκρασία (37°C) και σταθερή συγκέντρωση CO₂ (5%) σε DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma) που συμπληρώθηκε με 10% (v/v) εμβρυϊκό ορό μοσχαριών ή βοοειδών



(Gibco), 2 mM L-Γλουταμίνη κι αντιβιοτικά (100 μονάδες/ml Πενικιλίνη, 100 $\mu\text{g/ml}$ Στρεπτομυκίνη). Ο ορός επώαστηκε στους 58°C για 30 λεπτά, πριν προστεθεί στο διάλυμα της κυτταροκαλλιέργειας. Για να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος μολύνσεων των κυττάρων και του μέσου, οι διαδικασίες κυτταροκαλλιέργειας έγιναν κάτω από μια Laminar Air Flow Hood (Microflow biological safety cabinet) σε ένα χωριστό κλιματιζόμενο (θερμοκρασία δωματίου 23°C) δωμάτιο κύτταροκαλλιέργειας. Σταθερές 37% και συγκεντρώσεις 5% CO₂ διατηρήθηκαν σε έναν επωαστήρα (FormaScientific CO₂ επωαστήρας καλυμμένος με νερό) που βρισκόταν στο δωμάτιο κυτταροκαλλιέργειας. Τα καλλιεργημένα κύτταρα πλύθηκαν με αποστειρωμένο διάλυμα PBS (120°C για 15 λεπτά). Για να απομακρυνθούν τα κύτταρα από το πιάτο καλλιέργειας, επώαστηκαν σε 0,25% διαλύματος τρυψίνης (Gibco) στους 37°C για 2 λεπτά. Όλα τα διαλύματα, π.χ. DMEM, PBS ή τρυψίνη, προθερμάνθηκαν στους 37°C για 20 λεπτά πριν από την χρήση.

2.7.2. Συντήρηση, διαχωρισμός κι αποθήκευση των κυττάρων HeLa

Για συντήρηση της κυτταρικής σειράς, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πιάτα κυτταροκαλλιέργειας 10 εκατοστών ως εξής:

- Τα κύτταρα πλύθηκαν δυο φορές με PBS κι επώαστηκαν σε 0,25% διαλύματος τρυψίνης σε 37°C/5% CO₂ για 2 λεπτά.
- Τα κύτταρα εναιωρήθηκαν ξανά σε 4 ml φρέσκου DMEM. Ένα πλήρες πιάτο 10 εκατοστών περιείχε περίπου 8 εκατομμύρια κύτταρα HeLa, το οποίο ελέγχθηκε με υπολογισμό των κυττάρων σε ένα cell counter chamber (βάθους 0,2 χιλ., Fuchs-Rosenthal, FEIN-OPTIC, Γερμανία). Για αυτόν το λόγο, 10 μl του εναιωρήματος κυττάρων αναμίχθηκαν με 10 μl διαλύματος Trypan Blue (0,4% (w/v) σε PBS) και 10 μl μετρήθηκαν με μικροσκόπιο (Olympus CK2) στο cell counter chamber. Η χρωστική ουσία Trypan Blue χρησιμοποιήθηκε για να διακρίνουμε μεταξύ ζωντανών και νεκρών κυττάρων στο μικροσκόπιο, δεδομένου ότι η χρωστική ουσία είναι ικανή να διαπεράσει τη μεμβράνη των νεκρών κυττάρων και να τα βάψει σκούρα. Τα ζωντανά κύτταρα παραμένουν διαφανή στο μικροσκόπιο. Το ποσό των κυττάρων που μετρήθηκε στις μακρινές



τέσσερις γωνίες του πλέγματος πολλαπλασιάστηκε με 25, που μας έδωσε τη συγκέντρωση των κυττάρων ανά χιλιοστό του λίτρου του κυτταρικού εναιωρήματος.

- Για συντήρηση, περίπου 1,5 έως 2 εκατομμύρια κύτταρα τοποθετήθηκαν σε ένα νέο πιάτο κυτταροκαλλιέργειας που περιείχε 10 ml φρέσκου DMEM κι επωάστηκαν σε 37°C/5% CO₂.

Για μακροπρόθεσμη αποθήκευση, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε έναν πλαστικό σωλήνα 15 ml (Greiner) κι υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρωση (Hettisch Universal Centrifuge) σε 2000 g για 10 λεπτά. Το ίζημα των κυττάρων εναιωρήθηκε σε 1 ml διαλύματος αποθήκευσης που περιείχε 90% εμβρυϊκό ορό μοσχαριών ή βοοειδών και 10% DMSO (Sigma) κι αποθηκεύτηκε σε ένα σωλήνα κυτταροκαλλιέργειας (Nunc., συγκρατεί τις πολύ χαμηλές θερμοκρασίες) στους -80°C για 3-5 ημέρες. Έπειτα, μεταφέρθηκαν σε ένα δοχείο αποθήκευσης +4°C, το οποίο περιείχε υγρό άζωτο (θερμοκρασία αποθήκευσης -192°C).

Αν είναι απαραίτητο, τα κύτταρα μπορούν να ανακτηθούν από τη δεξαμενή υγρού αζώτου και να ξαναμπούν σε καλλιέργεια. Σε αυτήν την περίπτωση, τα κύτταρα ξεπάγωναν γρήγορα σε ένα υδρόλουτρο 37°C κάτω από σταθερή ανάδευση κι εναιωρούνταν ξανά σε 10 ml DMEM. Η εναιώρηση των κυττάρων υποβαλλόταν σε φυγοκέντρωση σε 2000 g για 10 λεπτά, εναιωρούταν ξανά σε φρέσκα 10 ml DMEM, μεταφερόταν σε ένα νέο πιάτο κυτταροκαλλιέργειας κι επωαζόταν σε 37°C/5% CO₂.

2.7.3. Συγχρονισμός HeLa σε G₀-, G₁/S-, S- και M-φάση του κυτταρικού κύκλου

Για να συγχρονιστούν τα κύτταρα HeLa στη φάση G₀, καλλιεργήθηκαν ασύγχρονα αναπτυσσόμενα κύτταρα μέχρι την πληρότητα σε έναν επωαστήρα σε μέσο πλήρους ανάπτυξης (DMEM). Στη συνέχεια, το μέσο αντικαταστάθηκε από φρέσκο DMEM που δεν είχε ορό και τα κύτταρα αφέθηκαν να αναπτυχθούν για άλλες 36 ώρες. Για να συγχρονιστούν τα HeLa στο όριο G₁/S, προστέθηκαν 2,5 mM θυμιδίνης στα ασύγχρονα αναπτυσσόμενα κύτταρα για 16 ώρες. Τα κύτταρα απελευθερώθηκαν με την προσθήκη φρέσκου DMEM για 8 ώρες. Σε ένα πρόσθετο block θυμιδίνης τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για άλλες 16 ώρες σε DMEM που περιείχε 2,5 mM. Έπειτα, ξεπλύθηκαν



δυο φορές με PBS και δείγματα κυττάρων συλλέχθηκαν κι αναλύθηκαν. Ο συγχρονισμός των κυττάρων HeLa στη φάση S επιτεύχθηκε αφήνοντας τα συγχρονισμένα κύτταρα της G₁/S φάσης για άλλες 2-4 ώρες σε φρέσκο μέσο DMEM (Vareli K, Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων) κι έπειτα συλλέχθηκαν. Για τη φάση M, τα κύτταρα που συγχρονίστηκαν στη φάση G₁/S επωάστηκαν για 5-7 ώρες σε φρέσκο DMEM (Vareli K, Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων) ή ασύγχρονα αναπτυσσόμενα HeLa καλλιιεργήθηκαν για 18 ώρες σε DMEM που περιείχε 0,15 μg/ml νοκοδαζόλης.

2.7.4. Παροδική διαμόλυνση των κυττάρων HeLa στην καλλιέργεια

Τα κύτταρα που αναπτύσσονται σε καλλιέργεια μπορούν να διαμολυνθούν με πλασμίδια DNA που περιέχουν το γονίδιο που μας ενδιαφέρει. Για την εισαγωγή DNA σε κύτταρα HeLa, έχουμε χρησιμοποιήσει μια τροποποιημένη μέθοδο φωσφορικού άλατος ασβεστίου που περιγράφηκε αρχικά από τους Graham και van der Eb (Graham and van der Eb, 1973) και Wigler *et al.* (1978). Σε αυτήν τη μέθοδο, όταν προστίθεται ένα διάλυμα 250 mM CaCl₂ σε 2x διάλυμα φωσφορικού άλατος (Hepes buffered saline, pH 7,15), παράγεται ένα ίζημα φωσφορικού άλατος ασβεστίου και συν-καταβυθίζει το DNA στο διάλυμα. Το κατακρημνισμένο DNA επικαλύπτει την επιφάνεια του κυττάρου κι ενσωματώνεται στο κύτταρο μέσω ενδοκύττωσης. Ο κρίσιμος παράγοντας στις διαμολύνσεις συνκατακρήμνισης CaPO₄ είναι το pH του διαλύματος που πρέπει να είναι μεταξύ pH 7,05 και 7,2, επειδή μόνο σε αυτό το pH παράγεται το ίζημα. Επιπλέον, κύτταρα HeLa πρέπει να καλλιεργούνται σε πιάτα 10 εκατοστών σε πληρότητα 50%-60%.

- Διαλύματα:

2 x Hepes buffered saline (HEBS):	8,0 γρ. NaCl
	0,37 γρ. KCl
	0,099 γρ. Na ₂ HPO ₄
	1 γρ. Δεξτρόζης
	5 γρ. Hepes (άλας νατρίου)



Τα συστατικά διαλύονται σε 450 ml αποστειρωμένου ddH₂O και το pH ρυθμίζεται σε 7,05. Τελικός όγκος διαλύματος 500 ml με αποστειρωμένο ddH₂O.

2,5 M CaCl₂: 0,26 γρ. Hepes (άλας νατρίου)
27,75 γρ. CaCl₂

Τα συστατικά διαλύονται σε 90 ml αποστειρωμένο ddH₂O και το pH ρυθμίζεται σε 7,2. Τελικός όγκος διαλύματος 500 ml με αποστειρωμένο ddH₂O.

- DNA (15-20 μg για ένα πιάτο 10 εκατοστών σε 450 μl TE) αναμίχθηκε με 50 μl 2,5 M CaCl₂.
- Το μίγμα DNA-CaCl₂ προστέθηκε με σταγόνα σταγόνα σε 0,5 ml 2x HEBS και επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά.
- Το ίζημα DNA-CaCl₂ προστέθηκε σταγόνα σταγόνα στα μέσα που περιείχαν τα κύτταρα, το πιάτο αναδεύθηκε ήπια και τα HeLa επώαστηκαν όλη τη νύχτα σε αυτό το μέσο διαμόλυνσης. Τα κύτταρα της επόμενης ημέρας πλύθηκαν κι επώαστηκαν σε φρέσκο DMEM, για άλλες 24 ώρες.

Για τα πειράματα πέψης μικροκοκκικής νουκλεάσης, η μέθοδος ασβεστίου τροποποιήθηκε ελαφρώς: Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με 16 μg DNA που περιείχε 1,5 μg pPur (Clontech), ένα πλασμίδιο που παρέχει αντίσταση στην πουρομυκίνη. Μετά από 6 ώρες, το μέσο διαμόλυνσης άλλαξε και τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες σε DMEM που περιείχε 0,25 μg/ml πουρομυκίνης (Sigma). Η αποδοτικότητα της διαμόλυνσης κυμαινόταν από 75-90%.

2.7.5. Δημιουργία κυτταρικής σειράς HeLa που να υπερεκφράζει σταθερά ParaT

Για να μελετηθεί η κινητική της ParaT σε ζωντανά κύτταρα, κατασκευάστηκε μια κυτταρική σειρά HeLa που να εκφράζει σταθερά ParaT συζευγμένη με την ενισχυμένη πράσινη πρωτεΐνη φθορισμού (EGFP-ParaT). Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε είναι



ευρέως αποδεκτό και εισήχθη αρχικά από τον M. Gossen (Gossen and Bujard, 1992). Χρησιμοποιήσαμε το σύστημα Tet-off, όπου ένας χημεικός ενεργοποιητής παράγεται για να ρυθμίσει τη μεταγραφή του γονιδίου που μας ενδιαφέρει από ένα μη μεταγραφόμενο υποκινητή. Στο σύστημα Tet-off, ο ενεργοποιητής συνδέεται στο Tet Response Element (TRE) στο μη μεταγραφόμενο υποκινητή κι ενεργοποιεί τη μεταγραφή μόνο ελλείψει επαγωγέα (τετρακυκλίνη (Tet) ή δοξυκυκλίνη (Dox)). Επομένως, συνδιαμολύναμε 20 μg pUHD10-EGFP-ParaT και 2 μg pPur (δίνει αντίσταση στην πουρομυκίνη) σε κύτταρα HeLa που εκφράζουν τον ενεργοποιητή που ελέγχεται από Tet (G418 επιλεγμένο), σε ένα μέσο με Dox (1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Πουρομυκίνη (1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) και G418 (0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Όταν τα διαμολυσμένα κύτταρα έφτασαν σε πληρότητα στο πιάτο, χωρίστηκαν 3 φορές σε 1:50 και 3 φορές σε 1:30 προκειμένου να υπάρξουν μεμονωμένες αποικίες καλλιεργούμενες για επιλογή. Τα κύτταρα αφέθηκαν να αναπτυχθούν για 14 ημέρες και το μέσο που περιείχε τα αντιβιοτικά άλλαζε κάθε 2 ημέρες. Μετά από αυτήν τη διαδικασία, επιλέξαμε 72 αποικίες, που ελέγχθηκαν στη συνέχεια για σταθερή ενσωμάτωση pUHD10-EGFP-ParaT. Οι αποικίες καλλιεργήθηκαν σε μέσο με ή χωρίς Dox κι ανιχνεύθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού για να ελεγχθεί η επαγωγιμότητα της EGFP-ParaT. Τα κύτταρα HeLa διατηρήθηκαν σε υγρό άζωτο για μακροπρόθεσμη αποθήκευση.

Για ανάλυση FRAP, κύτταρα HeLa που εξέφραζαν σταθερά EGFP-ParaT μεταφέρθηκαν σε μέσο χωρίς Phenol-red κι αναπτύχθηκαν σε μια καλυπτρίδα Lab-Tek II chambered (Nunc). Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος χρησιμοποιώντας ένα σύστημα Zeiss LSM510 Meta με ένα φακό λαδιού 40x Plan-Neofluar (NA 1,3). Για συνεχή ανίχνευση, η ισχύς του λέιζερ 488nm τέθηκε σε 6%. Ένα μικρό μέρος του πυρήνα φωτολευκάνθηκε με 5 επαναλήψεις ανίχνευσης σε ισχύ λέιζερ 100% (22 mW). Οι εικόνες επεξεργάστηκαν σε ImageJ.

2.8. Μελέτες αποσυμπύκνωσης της χρωματίνης

2.8.1. Μελέτη αποσυμπύκνωσης της χρωματίνης από ανθρώπινο σπέρμα

Ανθρώπινο σπέρμα λήφθηκε από υγιή γόνιμο δότη και διατηρήθηκε παγωμένο μέχρι την χρήση. Πυρήνες ανθρώπινου σπέρματος χωρίς μεμβράνη προετοιμάστηκαν



όπως περιγράφεται (Matsumoto *et al.*, 1999) κι επώσθηκαν με 6 μg πρωτεΐνης σε θερμοκρασία δωματίου σε 10 μl μίγματος αντίδρασης που περιείχε 8 mM Hepes pH 7,5, 8 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 200 mM γλυκόζης και σύστημα αναγέννησης ATP (McNaP, κεφάλαιο 2.5.3.1.). Μετά από την επώαση, 1 μl του μίγματος αντίδρασης προστέθηκε σε 1 μl PBS που περιείχε 50% γλυκερίνη, 7,4% φορμαλδεΰδη και 5 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33258. Έγινε παρατήρηση με μικροσκόπιο φθορισμού του DNA που βάφτηκε με την χρωστική ουσία, και το μέγεθος του πυρήνα προσδιορίστηκε με το πρόγραμμα AutoCAD 2000 (κεφάλαιο 2.8.3.).

2.8.2. Μελέτη αποσυμπύκνωσης της χρωματίνης από HeLa κύτταρα

Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν σε πληρότητα 50% σε γυάλινες καλυπτρίδες και διαμολύνθηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ασβεστίου-φωσφορικού άλατος (κεφάλαιο 2.7.4). Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με GFP-πλασμιδιακό φορέα, Flag-πλασμιδιακό φορέα, GFP-ParaT, Flag-ParaT και GFP-TAF-Ιβ. 36 ώρες μετά τη διαμόλυνση, τα κύτταρα επώσθηκαν με 3,8% παραφορμαλδεΰδη σε PBS για 15 λεπτά και με 50 mM NH_4Cl σε PBS για 10 λεπτά. Τα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με Flag-πλασμιδιακό φορέα συνδιαμολύνθηκαν με το 1/5 του συνολικού DNA με GFP-πλασμιδιακό φορέα για να είναι δυνατή η διάκριση μεταξύ διαμολυσμένων και μη διαμολυσμένων κυττάρων. Για διαμόλυνση Flag-πλασμιδιακού φορέα ή Flag-ParaT, τα κύτταρα επώσθηκαν με ένα ρυθμιστικό διάλυμα δέσμησης (10% ορού εμβρύων βοοειδών σε PBS) για 20 λεπτά κι έπειτα με το αντίσωμα εναντίον του Flag σε ρυθμιστικό διάλυμα δέσμησης σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Μετά από το πρώτο αντίσωμα, τα κύτταρα πλύθηκαν τρεις φορές με PBS κι επώσθηκαν με το δευτεροβάθμιο αντίσωμα εναντίον ποντικών-TRITC σε ρυθμιστικό διάλυμα δέσμησης για 40 λεπτά. Τα κύτταρα βάφτηκαν με 2,5 ng/ml Hoechst σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά, οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν με Mowiol σε μια γυάλινη διαφάνεια και παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss Axiovert). Το μέγεθος των πυρήνων μετρήθηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα AutoCAD 2000 (κεφάλαιο 2.8.3.).



2.8.3. Μέτρηση της πυρηνικής επιφάνειας

Πυρήνες κυττάρων σπέρματος ή HeLa βάφτηκαν με 2,5 ng/ml Hoechst για 5 λεπτά και παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού. Λήφθηκαν εικόνες ανοσοφθορισμού με μια φωτογραφική μηχανή CCD και εισήχθησαν ως αρχεία TIFF στο πρόγραμμα AutoCAD. Η περίμετρος των πυρήνων και η περιοχή επιφάνειας μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας την εντολή spline του προγράμματος. Η spline προσαρμόζεται σε μια ομαλή καμπύλη στην ακολουθία σημείων μέσα σε μια διευκρινισμένη περιοχή. Το AutoCAD χρησιμοποιεί μαθηματικά NURBS (ανομοιόμορφες λογικές B-splines) που αποθηκεύουν και προσδιορίζουν μια κατηγορία καμπύλης και στοιχείων επιφάνειας. Οι αποκτηθείσες τιμές και για τα δυο πειράματα ταξινομήθηκαν αυθαίρετα σε τρεις ομάδες, που αντιπροσωπεύουν τις διαφορετικές περιοχές επιφάνειας πυρήνων.

2.9. Αναστολή της έκφρασης της ParaT σε HeLa χρησιμοποιώντας τη μέθοδο RNAi

2.9.1. Κατασκευή του πλασμιδίου pRNAi-ParaT

Για να αναστείλουμε την πρωτεϊνική έκφραση της ParaT σε κύτταρα HeLa, έχουμε χρησιμοποιήσει ένα πλασμίδιο για τη σύνθεση μικρών παρεμβαλλόμενων RNA (siRNAs) σε κύτταρα θηλαστικών (Brummelkamp *et al.*, 2002). Σε αναζήτηση μιας κατάλληλης περιοχής mRNA για να χρησιμοποιηθεί ως στόχος για σύνδεση siRNA, χρησιμοποιήσαμε ένα πρόγραμμα λογισμικού (Oligoengine) που έδωσε 6 υποθετικές περιοχές. Το πρόγραμμα λογισμικού προσδιόρισε τις υποθετικές περιοχές mRNA για σύνδεση siRNA σύμφωνα με τέσσερα κριτήρια: i) οι περιοχές πρέπει να είναι 100 bp μακριά από το αρχικό τριπλό νουκλεοτίδιο, ii) το πρώτο AA στην ακολουθία προσδιορίστηκε και τα επόμενα 19 bp ελέγχθηκαν για 30-50% GC-αφθονία, iii) 3'-end μετά από την 19 bp ακολουθία θα πρέπει ιδανικά να έχουν TT, και iv) καμιά αλληλουχία τεσσάρων ή περισσότερων αδενινών ή θυμιδινών δεν πρέπει να υπάρχει σε αυτά τα 19 bp. Οι έξι προτεινόμενες περιοχές 19nt χρησιμοποιήθηκαν στο πρόγραμμα BLAST, για να ελέγξουν οποιαδήποτε ομολογία ακολουθίας σε άλλο mRNAs εκτός από την ParaT. Καμιά από τις προτεινόμενες 19nt δεν παρουσίασε σημαντική ομολογία ακολουθίας σε



άλλο mRNAs εκτός από την ParaT κι επιλέξαμε την περιοχή 6 με τις χαμηλότερες συνολικές περιοχές. Τα ολιγονουκλεοτίδια 64 bp που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη για να δημιουργηθεί το πλασμίδιο pRNAi-ParaT αγοράστηκαν από το Mwg-Biotech AG (Γερμανία) και ήταν τα ακόλουθα:

Ολιγονουκλεοτίδιο εκκινητής περιοχής 5'	5' - GAT CCC CGA AAC TGC CGA GGA TGG AGT TCA AGA GAC TCC ATC CTC GGC AGT TTC TTT TTG GAA A - 3'
Ολιγονουκλεοτίδιο εκκινητής περιοχής 3'	5' – AGC TTT TCC AAA AAG AAA CTG CCG AGG ATG GAG TCT CTT GAA CTC CAT CCT CGG CAG TTT CGG G – 3'

Το υπογραμμισμένο bp αντιπροσωπεύει την ακολουθία ParaT που επιλέχθηκε για αυτήν τη μελέτη (151-169 bp της ParaT άγριου τύπου). Η διακεκομμένη γραμμή είναι το αντίστροφο συμπλήρωμα σε αυτήν την ακολουθία που βοηθά στη δημιουργία ενός βρόχου στο mRNA, επιτρέποντας ως εκ τούτου το σχηματισμό dicer (Brummelkamp *et al.*, 2002).

Τα λυοφιλημένα ολιγονουκλεοτίδια αραιώθηκαν σε ddH₂O σε τελική συγκέντρωση 3 mg/ml και σε πρώτη φάση ανασυνδέθηκαν μεταξύ τους ως εξής:

- Κάθε ολιγονουκλεοτίδιο αραιώθηκε περαιτέρω σε 50 μ l νερού και 1 μ l από κάθε ένα προστέθηκε σε 48 μ l ρυθμιστικού διαλύματος ανασύνδεσης (30 mM Hepes-KOH, pH 7,4, 100 mM οξικού άλατος καλίου, 2 mM οξικού άλατος μαγνήσιου).
- Τα ολιγονουκλεοτίδια επωάστηκαν στους 95°C για 4 λεπτά, στους 70°C για 10 λεπτά κι έπειτα αφέθηκαν να ψυχθούν αργά στους 4°C.

Για να φωσφορυλιώσουμε τα ανασυνδεδεμένα ολιγονουκλεοτίδια, εκτελέστηκε η ακόλουθη διαδικασία:

- 2 μ l των ανασυνδεδεμένων ολιγονουκλεοτιδίων προστέθηκαν σε 1 μ l ρυθμιστικού διαλύματος T4 PNK (κινάση πολυνουκλεοτιδίων), 1 μ l 1 mM ATP, 1 μ l T4 PNK και 5 μ l ddH₂O.
- Για να αδρανοποιήσουμε με θερμότητα το PNK, το μίγμα αντίδρασης επωάστηκε στους 37°C για 30 λεπτά και στους 70°C για 10 λεπτά.



Έγινε πέψη του πλασμιδίου pSUPER (5 μ g) πρώτα με *Hind*III, έπειτα με *Bgl*II και στη συνέχεια αποφωσφορυλιώθηκε με CIP (Φωσφατάση Εντέρων Μοσχαριών, Fermentas) στους 37°C για 1 ώρα. Η αντίδραση σταμάτησε με 0,5 M EDTA, το ένζυμο αδρανοποιήθηκε με θερμότητα στους 70°C για 1 ώρα και το DNA καθαρίστηκε με φαινόλη/χλωροφόρμιο, κατακρημνίστηκε με αιθανόλη και τέλος εναιωρήθηκε ξανά σε 25 μ l. Για να υπολογίσουμε το ποσό των πλασμιδιακών φορέων κι ολιγονουκλεοτιδίων, διαλύθηκαν 1:5 (πλασμίδιο-DNA) και 1:15 (ανασυνδεδεμένα ολιγονουκλεοτίδια) σε ddH₂O κι έγινε ανάλυση σε μια πηκτή αγαρόζης. 1 μ l αραιωμένου DNA πλασμιδίων επώασθηκε με 0,5 μ l αραιωμένα ανασυνδεδεμένα ολιγονουκλεοτίδια σε συνολικό όγκο 10 μ l σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Η λιγάση αδρανοποιήθηκε στους 65°C για 10 λεπτά και η σύνδεση μετασχηματίστηκε σε ικανά XL1-Blue κύτταρα. Έγινε πέψη πρώτα με *Bgl*II (απώλεια της περιοχής περιορισμού κατά τη σωστή κλωνοποίηση) και οι θετικοί κλώνοι ελέγχθηκαν πάλι με διπλή πέψη *Hind*III και *Eco*RI. Η διπλή πέψη στους κλώνους *E. coli* που περιείχαν το σωστό πλασμίδιο pRNAi-ParaT δίνει μια ζώνη του πλασμιδιακού φορέα κι ένα ένθεμα σε 360 bp, ενώ το μέγεθος των ενθεμάτων ελέγχου ήταν 300 bp. Η παραγωγή pRNAi-ParaT επιβεβαιώθηκε με αλληλούχιση των νουκλεοτιδίων.

2.9.2. Έλεγχος για την αναστολή της έκφρασης της ParaT σε κύτταρα HeLa

Για να ελέγξουμε αν το πλασμίδιο pRNAi-ParaT θα μπορούσε πράγματι να μειώσει την έκφραση της ParaT, διαμολύναμε κύτταρα HeLa που καλλιιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες είτε με pRNAi-ParaT είτε με pPNAi-πλασμιδιακό φορέα ελέγχου (pSuper-πλασμιδιακό φορέα). Για να εντοπίσουμε τα διαμολυμένα κύτταρα, pEGFP διαμολύνθηκε με τις κατασκευές RNAi (1/5 του συνολικού DNA). Όλα τα βήματα πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, εκτός κι αν αναφέρεται αλλιώς. Μετά από διαμόλυνση για 36 ώρες στους -72°C, τα κύτταρα επώασθηκαν με 100% παγωμένη μεθανόλη στους -20°C για 5 λεπτά, επώασθηκαν με 3,8% παραφολμαλδεϋδη σε PBS για 15 λεπτά και με 50 mM NH₄Cl σε PBS για 10 λεπτά. Τα κύτταρα επώασθηκαν με 10% εμβρυϊκού ορού βοοειδών σε PBS (ρυθμιστικό διάλυμα δέσμευσης) για 30 λεπτά κι στη συνέχεια με αντίσωμα εναντίον της ParaT σε ρυθμιστικό διάλυμα δέσμευσης για 1 ώρα.



Τα κύτταρα πλύθηκαν τρεις φορές για 5 λεπτά με ρυθμιστικό διάλυμα δέσμευσης κι επωάσθηκαν με αντίσωμα εναντίον-κουνελιών-TRITC σε ρυθμιστικό διάλυμα δέσμευσης για άλλα 40 λεπτά. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε γυάλινες καλυπτρίδες και παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο.

2.10. Ανοσοκατακρήμνιση

Για να ανιχνεύσουμε πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την ParaT, έγιναν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης με εκχύλισμα κυττάρων HeLa χρησιμοποιώντας απομονωμένα με συνάφεια αντισώματα εναντίον της ParaT. Αντισώματα εναντίον της ParaT ή του IgG (~ 350 μ g) συνδέθηκαν πάνω σε 300 μ l σφαιριδίων Πρωτεΐνης A (Amersham) για 1,5 ώρα και στη συνέχεια διασυνδέθηκαν ομοιοπολικά πάνω στα σφαιρίδια με 20 mM DMP (Pierce) σε 0,2 M βορικού άλατος νατρίου (pH 9,0) σε θερμοκρασία δωματίου με επώαση με περιστροφή για 30 λεπτά. Η αντίδραση σταμάτησε με το πλύσιμο των σφαιριδίων με πολύ μεγάλο όγκο 0,2 M γλυκίνης-NaOH (pH 8,6). Τα σφαιρίδια πλύθηκαν σε ένα τελικό βήμα δυο φορές με PBS και διατηρήθηκαν στους 4°C σε 0,01% NaN_3 -PBS.

Για να λάβουμε το εκχύλισμα των κυττάρων για ανοσοκατακρήμνιση, 60×10^6 κύτταρα επωάσθηκαν σε πάγο σε 400 μ l ρυθμιστικού διαλύματος ανάλυσης (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 137 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM NaF, mM β -φωσφορικού άλατος γλυκερίνης, 1% Nonidet-NP40, 1 μ g/ml κάθε ενός από τους παράγοντες αναστολής πρωτεάσεων (απροτινίνη, λευπεπτίνη, πεπστατίνη) για 10 λεπτά, το ομοιογενοποιημένο προϊόν υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση σε 13000 g στους 4°C για 30 λεπτά. Το εκχύλισμα κυττάρων επωάσθηκε με 20 μ g σφαιριδίων control IgG σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά με επώαση με περιστροφή και διαιρέθηκε σε δυο μέρη (~ 200 μ g της συνολικής πρωτεΐνης). Ένα μέρος επωάστηκε με 40 μ g IgG ελέγχου και το άλλο με 40 μ g αντισώματος εναντίον της ParaT (ή αντισώματος εναντίον του 70,1) όλη τη νύχτα στους 4°C με επώαση με περιστροφή. Το υπερκείμενο πετάχτηκε και τα σφαιρίδια πλύθηκαν δυο φορές με 500 mM NaCl ρυθμιστικού διαλύματος ανάλυσης, διαχωρίστηκαν με εκχύλιση δυο φορές με 20 μ l 0,2 M γλυκίνης (pH 2,3) κι έγινε εξουδετέρωση του pH των εκλουσμάτων με NH_4 -αέριο. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πηκτή κλίσης SDS-PAGE



(γραμμική κλίση 6%-15%) σε 50 mA/140 V κι ανιχνεύτηκαν πρωτεΐνες με χρώση νιτρικού αργύρου ή με αποτύπωση κατά Western (στη μεμβράνη). Για αναλύσεις ανοσοκατακρήμνισης χρησιμοποιώντας Flag ή Myc αντισώματα, κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με ParaT συζευγμένη με Flag ή Myc, αντίστοιχα, και η ανοσοκατακρήμνιση εκτελέστηκε όπως περιγράφεται παραπάνω, χρησιμοποιώντας τα αντίστοιχα μονοκλωνικά αντισώματα (εναντίον του Flag κι εναντίον του Myc, αντίστοιχα).

2.11. Ανοσοϊστοχημεία

Για να μελετήσουμε την κατανομή της ParaT στους ιστούς, δείγματα σταθεροποιημένα με παραφίνη λήφθηκαν από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων. Για ανοσοϊστοχημικές μελέτες, 4-5 μm τμημάτων ιστού προετοιμάστηκαν και στρώθηκαν πάνω σε μια γυάλινη διαφάνεια. Όλα τα βήματα πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα ιστού τοποθετήθηκαν σε ένα φούρνο 60°C όλη τη νύχτα και στη συνέχεια προστέθηκε σε αυτά 100% ξυλένιο στους 60°C για 30 λεπτά. Έπειτα, οι ιστοί ξαναυδατώθηκαν με πλύση δυο φορές σε 10% ξυλένιο, 100% αιθανόλη, 96% αιθανόλη και ddH₂O. Για την ανάκτηση αντιγόνων, οι ιστοί βράστηκαν δυο φορές για 5 λεπτά σε 1 mM διαλύματος EDTA σε ένα φούρνο μικροκυμάτων (750 W) κι αφέθηκαν να ψυχθούν σε νερό για 15 λεπτά. Η ενεργότητα της ενδογενούς υπεροξειδάσης, που θα παρεμπόδιζε τη διαδικασία χρώσης μας, ανεστάλη με προσθήκη H₂O₂ για 10 λεπτά. Για να βάψουμε τους ιστούς, ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία σύμφωνα με το πρωτόκολλο των κατασκευαστών (LabVision):

- Ο ιστός πλύθηκε τρεις φορές με PBS για 3 λεπτά και μη συγκεκριμένες περιοχές σύνδεσης αντισωμάτων δεσμεύθηκαν με διάλυμα δέσμευσης Ultra-V για 5 λεπτά.
- Το απομονωμένο με συνάφεια αντισώματα αντίσωμα εναντίον της ParaT (βλ. κεφάλαιο 2.4.2.) προστέθηκε σε ένα 1:20 διάλυμα διάλυσης αντισωμάτων (DAKO) στα δείγματα ιστού κι επωάστηκε όλη τη νύχτα στους 4°C σε έναν υγρό θάλαμο.
- Οι γυάλινες καλυπτρίδες πλύθηκαν τρεις φορές με PBS για 3 λεπτά κι επωάστηκαν με Ενισχυτή Πρώτου Αντισώματος για 20 λεπτά.



- Οι γυάλινες καλυπτρίδες πλύθηκαν τρεις φορές για 3 λεπτά με PBS κι επώαστηκαν με HRP-Πολυμερές για 20 λεπτά.
- Οι γυάλινες καλυπτρίδες πλύθηκαν τρεις φορές με PBS για 3 λεπτά κι επώαστηκαν σε έναν κλειστό θάλαμο με διάλυμα DAB-χρωμογόνου (3,3'-διαμινοβενζιδίνη, 2 σταγόνες DAB σε 1 ml διαλύματος υποστρώματος) για 3 λεπτά.
- Τα δείγματα πλύθηκαν προσεκτικά με ddH₂O και οι πυρήνες διαμολύνθηκαν για 1 ½ λεπτό με μια διάλυση 1:10 αιματοξυλίνης σε νερό.
- Οι ιστοί πλύθηκαν με άφθονο νερό κι αφυδατώθηκαν δυο φορές με 96% αιθανόλη για 5 λεπτά, δυο φορές με 100% ξυλένιο για 5 λεπτά.
- Οι ιστοί καλύφθηκαν με μια γυάλινη καλυπτρίδα, τοποθετήθηκαν μαζί με ένα μη υδατικό διάλυμα τοποθέτησης κι αφέθηκαν να στεγνώσουν στον πάγκο. Διατηρήθηκαν στους 4°C μέχρι περαιτέρω χρήση.

Για διπλή χρώση, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του Supersensitive Detection Kit (BioGenex). Οι ιστοί επώαστηκαν πρώτα με 1:20 διάλυση αντισώματος εναντίον της ParaT όλη τη νύχτα, και μετά από την επώαση DAB, τα δείγματα δεν διαμολύνθηκαν με αιματοξυλίνη, αλλά αντ' αυτού επώαστηκαν με μια 1:50 διάλυση καθενός από τα αντισώματα CD3, CD4, CD8 και CD20 (DAKO) για 30 λεπτά. Οι ιστοί πλύθηκαν τρεις φορές με PBS για 5 λεπτά, επώαστηκαν με Multi-LINK διάλυμα για 20 λεπτά και μαρκαρίστηκαν με αλκαλική φωσφατάση για 20 λεπτά. Στη συνέχεια, οι ιστοί επώαστηκαν (ακολουθήστε την εμφάνιση της κόκκινης χρωστικής ουσίας) με υπόστρωμα αλκαλικών φωσφατάσεων (Chromogen Fast Red διάλυμα, DAKO) για 3-10 λεπτά. Τέλος, τα δείγματα πλύθηκαν τρεις φορές με PBS και με 1:10 διάλυση του διαλύματος αιματοξυλίνης για 1 ½ λεπτά. Τέλος, οι ιστοί τοποθετήθηκαν μαζί με ένα διάλυμα ύδατος και στέγνωσαν στον πάγκο. Τα δείγματα ιστού παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο και λήφθηκαν εικόνες με μια ψηφιακή φωτογραφική μηχανή (Olympus, ανάλυση 5,1 megapixel) και εισήχθησαν σε Photoshop (Adobe Inc).



3. Αποτελέσματα

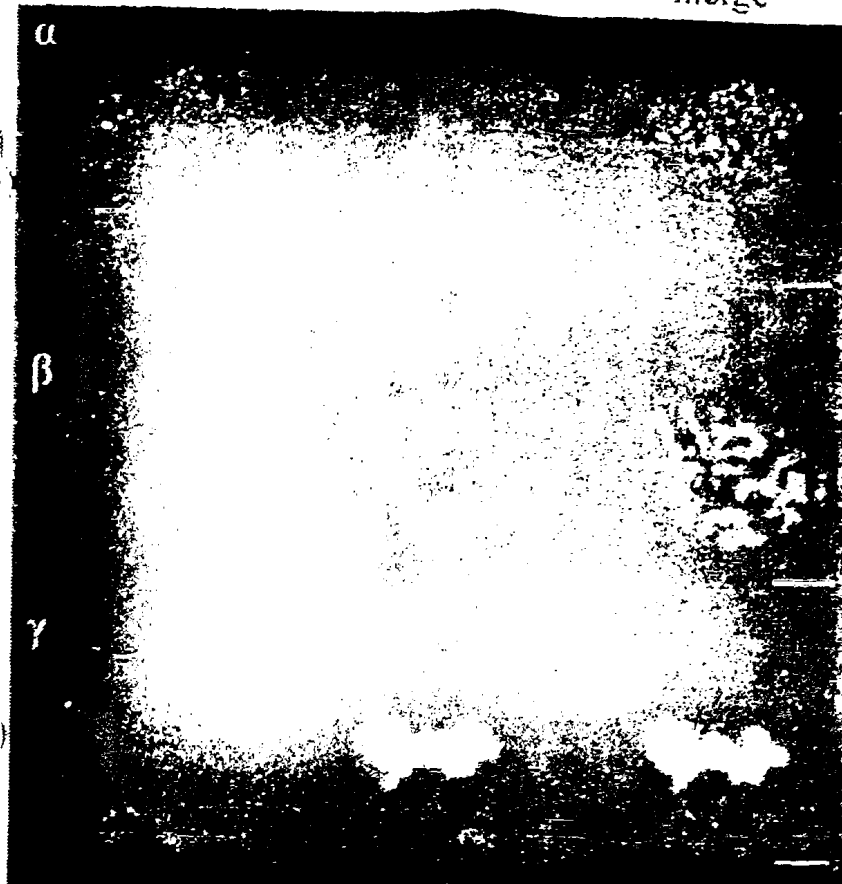
3.1. Υποπυρηνικός Εντοπισμός της ParaT στα κύτταρα HeLa

Αρχικές εργασίες έχουν δείξει ότι η ParaT εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο (Brand *et al.*, 1991). Πιο πρόσφατη δουλειά προσδιόρισε την ParaT ως μια πυρηνική πρωτεΐνη που συνδέεται με περιοχές αντιγραφής (early replication sites) που υποδηλώνουν ένα ρόλο αυτού του όξινου πολυπεπτιδίου στην ενεργό χρωματίνη (Vareli *et al.*, 2000). Σε μια προσπάθεια να μελετηθεί ο εντοπισμός της ParaT στη μεσόφαση και μίτωση σε σχέση με τη χρωματίνη, εκτελέσαμε έμμεσο ανοσοφθορισμό κι συνεστιακή μικροσκοπία ανίχνευσης λείζερ στα κύτταρα HeLa χρησιμοποιώντας αντισώματα από χρωματογραφία συγγένειας στην αμινοτελική περιοχή της ParaT. Το DNA βάφτηκε με ιωδιούχο προπίδιο (Σχήμα 16Α, PI), το οποίο συνδέεται ανάλογα με τη συγκέντρωση του DNA και βάφει κυρίως την ετεροχρωματίνη (α, PI). Παρατηρήθηκε μια στικτή πυρηνική χρώση στη μεσόφαση (α, ParaT). Αν κρίνουμε από την επικάλυψη της χρώσης ParaT με PI, οι θέσεις της ParaT βρέθηκαν να είναι διασκορπισμένες σε όλο το πυρηνόπλασμα και να αποκλείονταν εντελώς από τις πυκνές ετεροχρωματικές περιοχές (α, συγχώνευση). Κατά την αρχική φάση της μίτωσης, η ParaT ανιχνεύθηκε σε ευδιάκριτες θέσεις που εντοπίστηκαν κυρίως κοντά στα χρωμοσώματα (β, ParaT). Στις τελικές μιτωτικές φάσεις, η ParaT συγκεντρώθηκαν γύρω από τα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα (γ, ParaT). Αυτά τα στοιχεία υποστηρίζουν ότι η ParaT συνδέεται κυρίως με ευχρωματικές νουκλεοσωμικές περιοχές παρά με συμπυκνωμένες ετεροχρωματικές περιοχές.

Για να υποστηρίξουμε περαιτέρω αυτήν την υπόθεση, χρησιμοποιήσαμε αντισώματα για έναν καλά χαρακτηρισμένο δείκτη ετεροχρωματίνης, την τριμεθυλωμένη λυσίνη 9 στην ιστόνη H3 (Lachner *et al.*, 2001; Nakayama *et al.*, 2001). Τα κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με EGFP- ParaT κι ελέγχθηκε η κατανομή της ParaT όσον αφορά στις ετεροχρωματικές περιοχές H3K9. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 16Β, η EGFP-ParaT εντοπίζεται σε ευδιάκριτες πυρηνικές θέσεις, αλλά βρέθηκε επίσης διασκορπισμένη σε όλον τον πυρήνα (α, GFP). Όπως ήταν αναμενόμενο, αντισώματα εναντίον της H3K9 έβαψαν τις ετεροχρωματικές περιοχές του πυρήνα, όπως φαίνεται με



ParaT PI merge



GFP H3K9 merge



τισμός της ParaT και της EGFP-ParaT στα κύτταρα HeLa.

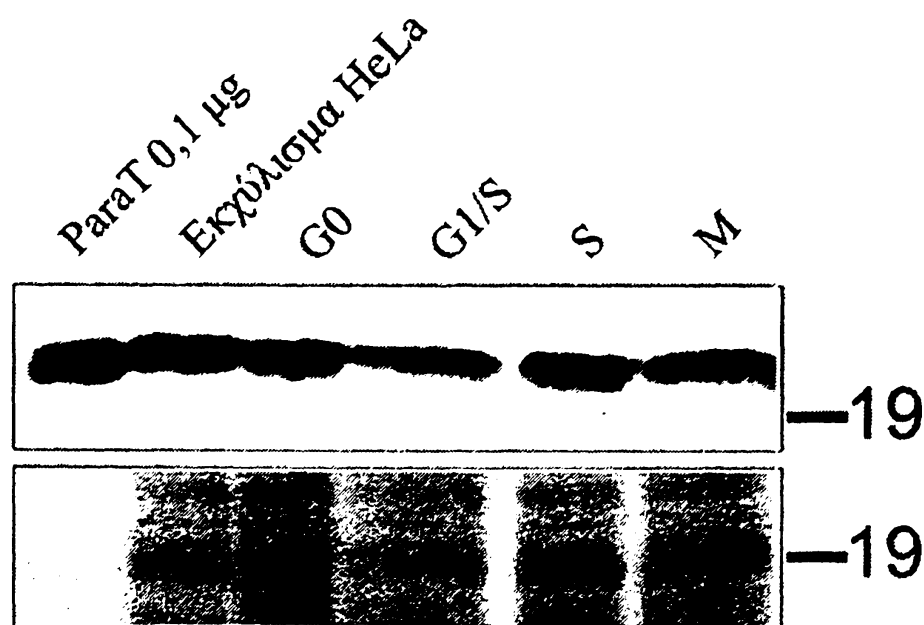
ή διανομή της ParaT. Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες απομονωμένο με συνάφεια αντίσωμα εναντίον της ParaT. (ParaT) Κύτταρα για ενδογενή ParaT σε διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου, (β) προφάση, (γ) μετάφαση. (PI) DNA χρώση με ιωδιούχο προεπικάλυψη χρώσης ParaT και PI. Κλίμακα, 2 μm. (B) Οι θέσεις EGFP- στις ετεροχρωματικές περιοχές. Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με αντίσωμα ανιτ-H3K9. (GFP) GFP-φθορισμός. (H3K9) (ιστήκε για H3K9. (συγχώνευση) Επικάλυψη του GFP-φθορισμού και ιζονται μεμονωμένα οπτικά τμήματα. Κλίμακα, 10 μm.



την ισχυρή χρώση της περιφερειακής πυρηνικής περιοχής, όπου υπάρχει πιο χαρακτηριστική συμπιεσμένη χρωματίνη (β , H3K9).

Επιπλέον, όπως φαίνεται από την επικάλυψη του GFP και τη χρώση της H3K9, οι θέσεις της ParaT αποκλείστηκαν από τις ετεροχρωματικές περιοχές του πυρήνα (γ , συγχώνευση). Αυτά τα στοιχεία συνολικά υποδηλώνουν ότι η ParaT μπορεί να εντοπιστεί στις ευχρωματικές περιοχές του πυρήνα κι εμπλέκουν τη λειτουργία της πρωτεΐνης σε διαδικασίες όπου απαιτείται ενεργός χρωματίνη.

Εκτός από τις έμμεσες μελέτες ανοσοφθορισμού ενδογενούς ParaT στα κύτταρα, μελετήσαμε τα επίπεδα της ParaT σε διαφορετικά στάδια του κυτταρικού κύκλου. Για αυτόν το σκοπό, καλλιεργήθηκαν κύτταρα HeLa και συγχρονίστηκαν σε G₀-, G₁/S-, S- και M-φάση (κεφάλαιο 2.7.3.). Τα κύτταρα συλλέχθηκαν, και 30 μ g κάθε δείγματος αναλύθηκαν με αποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας αντισώματα εναντίον της ParaT. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 17, τα επίπεδα της ParaT δεν άλλαξαν σημαντικά σε όλον τον κυτταρικό κύκλο (πάνω πίνακας), υποδηλώνοντας ότι η ParaT δε συνδέεται με τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.



Σχήμα 17: Πρωτεϊνική έκφραση της ParaT σε όλον τον κυτταρικό κύκλο.

Τα επίπεδα της ParaT παραμένουν σταθερά σε όλον τον κυτταρικό κύκλο. (πάνω πλαίσιο) Κύτταρα HeLa συγχρονίστηκαν σε G₀-, G₁/S-, S- και M-φάση κι αναλύθηκαν. 30 μ g κάθε δείγματος αναλύθηκαν με αποτύπωση κατά Western με αντισώματα εναντίον της ParaT. *(κάτω πλαίσιο)* Χρώση Coomassie Blue του σχετικού μέρους του πηκτώματος για ίση φόρτιση. Ο αριθμός στα δεξιά δείχνει τη σχετική μοριακή μάζα σε kDa.



Παρά τα σταθερά πρωτεϊνικά επίπεδα, ένα ποσό ParaT μπορεί να τροποποιηθεί μετα-μεταφραστικά (π.χ. να φωσφορυλιωθεί) κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, πράγμα που θα μπορούσε να έχει επιπτώσεις στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου.

3.2. Μελέτη της κινητικότητας της ParaT με τη μέθοδο FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching)

Για να ελέγξουμε άμεσα την κινητικότητα της ParaT στον πυρήνα των ζωντανών κυττάρων, χρησιμοποιήσαμε την τεχνική FRAP (Carrero *et al.*, 2003; Houtsmuller and Vermeulen, 2001; Lippincott-Schwartz *et al.*, 2001). Η τεχνική FRAP έχει γίνει ένα σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη των πρωτεϊνών στα ζωντανά κύτταρα. Οι μετρήσεις έντασης που λαμβάνονται μετά από τη φωτολεύκανση ενός κυττάρου που εκφράζει μια φθορίζουσα πρωτεΐνη μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να καθορίσουν την κινητικότητά της και να τη συγκρίνουν με άλλες πρωτεΐνες. Για αυτόν το λόγο, δημιουργήσαμε μια σειρά κυττάρων HeLa που εκφράζουν σταθερή GFP-ParaT (κεφάλαιο 2.7.5.). Μετά από τη φωτολεύκανση μιας μικρής περιοχής στον πυρήνα των κυττάρων HeLa που εκφράζουν ParaT σταθερά συζευγμένη με GFP, παρατηρήθηκε μια πολύ γρήγορη αποκατάσταση του σήματος φθορισμού σε μια χρονική κλίμακα περίπου 220 χιλιοστών του δευτερολέπτου (Σχήμα 18).



Σχήμα 18: Αρχικές μελέτες FRAP σε HeLa που εκφράζουν σταθερά GFP-ParaT.

(Pre) Πυρήνας πριν από τη λεύκανση. (0, 110 και 220) Χρόνος σε λεπτά που δείχνουν τη διάρκεια κατά την οποία η ακτίνα λέιζερ εφαρμόστηκε στον πυρήνα. Το βέλος απεικονίζει τη θέση όπου η ακτίνα λέιζερ χτυπά τον κυτταρικό πυρήνα. Κυτταρικός πυρήνας HeLa μετα-χρωματισμένος σε Photoshop (Adobe Inc.) για καλύτερη απεικόνιση.



Όταν συγκρίθηκε με την κινητικότητα της συνδετικής ιστόνης H1 (Lever, *et al.*, 2000; Misteli *et al.*, 2000), η κινητικότητα της ParaT στον πυρήνα ήταν σημαντικά υψηλότερη από αυτήν της H1 (1-2 λεπτά). Ο Misteli και οι συνάδελφοί του προσδιόρισαν με μελέτες FRAP δυο διαφορετικές ομάδες H1 που μπορούν να διακριθούν μέσω των δυναμικών ιδιοτήτων τους: μια ομάδα με κινητικότητα 1-2 λεπτά και μια δεύτερη ομάδα που αναφέρεται σε H1 συνδεδεμένη με ετεροχρωματίνη κι έχει μειωμένη κινητικότητα (Misteli *et al.*, 2000). Επομένως, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η ParaT κινείται πολύ γρήγορα σε όλον τον πυρήνα και μπορεί να έχει πρόσβαση στην H1 κυρίως στις ευχρωματικές νουκλεοσωμικές περιοχές.

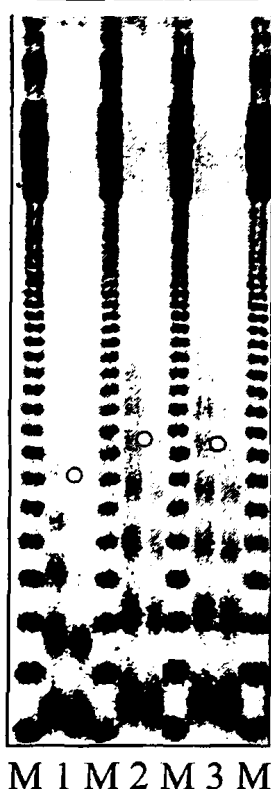
3.3. Η ParaT μειώνει το Πυρηνικό Μήκος Επανάληψης (NRL) της ανασυγκροτημένης χρωματίνης

Παλιότερες εργασίες από αυτό το εργαστήριο έχουν δείξει μια ειδική *in vivo* αλληλεπίδραση μεταξύ της ParaT και της συνδετικής ιστόνης H1 (Kondili *et al.*, 1996). Πιο συγκεκριμένα, *in vitro* αναλύσεις έδειξαν αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ParaT και της σφαιρικής περιοχής της H1 (Kondili *et al.*, 1996). Λαμβάνοντας υπόψη τον καλά χαρακτηρισμένο ρόλο της H1 στη συμπίκνωση της χρωματίνης, υποθέσαμε ότι η ParaT μπορεί να επηρεάζει τη σύνδεση της H1 με τη χρωματίνη. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει μια σχέση μεταξύ του NRL και της σύνδεσης της H1 με τα νουκλεοσώματα (Blank and Becker, 1995). Με βάση αυτό, μελετήσαμε αρχικά την επίδραση της ParaT στην αλληλεπίδραση της H1 με τη χρωματίνη με την απεικόνιση των αλλαγών στο μήκος επανάληψης νουκλεοσώματος (NRL). Το NRL ορίζεται ως η απόσταση σε ζευγάρια βάσεων μεταξύ δυο γειτονικών νουκλεοσωμάτων. Η ανάλυσή μας βασίστηκε σε ένα σύστημα ανασύνθεσης της χρωματίνης χρησιμοποιώντας εκχυλίσματα που προήλθαν από πρώιμα έμβρυα *Drosophila* (Blank and Becker, 1995). Η ανασύνθεση της χρωματίνης ελλείπει της συνδετικής ιστόνης H1 και της επακόλουθης πέψης με μικροκοκκική νουκλεάση αποκαλύπτει χαρακτηριστικό 170bp NRL (Σχήμα 19, πίνακας 1), που δείχνει σωστή οργάνωση χρωματίνης. Όπως ήταν αναμενόμενο, η προσθήκη 2 μονάδων συνδετικής ιστόνης H1 (0,64 μ g) στο μίγμα αντίδρασης και η ενσωμάτωση της ιστόνης στα νουκλεοσώματα αύξησαν το NRL από 170bp σε 205bp (πίνακας 2).



Ωστόσο, όταν προστέθηκε ParaT στην αντίδραση μαζί με H1, το NRL μειώθηκε σε 195bp (πίνακας 3), αλλά δεν έφθασε σε 170bp NRL της χρωματίνης χωρίς την ιστόνη H1. Αυτά τα στοιχεία υποστηρίζουν το συμπέρασμα ότι η H1 που συνδέεται από την ParaT τροποποιείται δομικά με τέτοιο τρόπο η σύνδεση της στη χρωματίνη να αλλάζει το μήκος επανάληψης της χρωματίνης

H1	-	+	+
ParaT	-	-	+
NRL (bp)	170	205	195
MNase	▲	▲	▲



Σχήμα 19: Η ParaT μειώνει το NRL.

DNA πλασμιδίων συγκεντρώθηκε σε χρωματίνη με εκχυλίσματα *Drosophila* χωρίς H1 (πλαίσιο 1) ή με 2 μονάδες ιστόνης H1 (πλαίσια 2, 3) ελλείψει (πλαίσιο 2) ή παρουσία 6 μg ParaT (πλαίσιο 3). Ανασυγκροτημένη χρωματίνη αφομοιώθηκε με MNase για 30 δευτερόλεπτα ή 1 λεπτό. Καθαρισμένο DNA αναλύθηκε σε ένα πήκτωμα αγαρόζης 1.3% και βάφτηκε με βρωμίδιο του αιθιδίου. Οι άσπροι κύκλοι χαρακτηρίζουν το πεντανουκλεοσωμικά-παραγόμενο DNA, απεικονίζοντας τις αλλαγές σε NRL. (M) Σκάλα 123 bp (BRL).

3.4. Η ParaT επηρεάζει τη σύνδεση της H1 με τη χρωματίνη

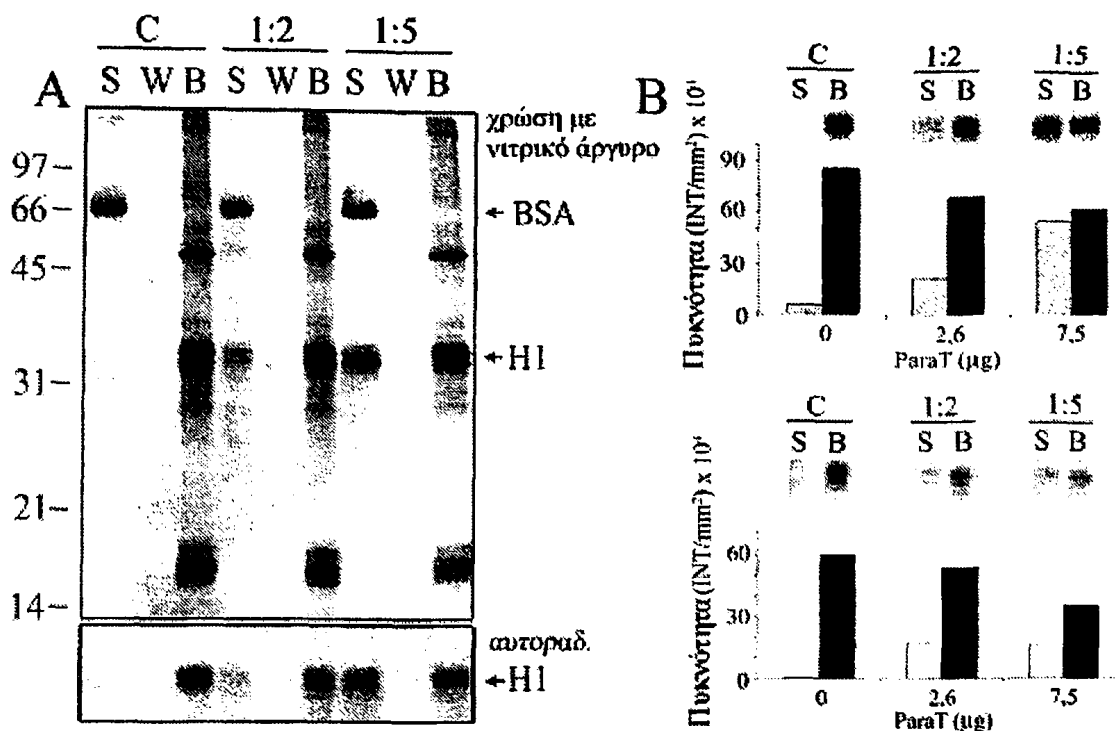
Για να ερευνήσουμε την υπόθεση ότι η ParaT μπορεί να εμποδίζει ή να αποδυναμώνει τη σύνδεση της H1 με τη χρωματίνη χρησιμοποιήσαμε ένα *in vitro* σύστημα ανασύνθεσης χρωματίνης χρησιμοποιώντας DNA ακινητοποιημένο σε μαγνητικά σφαιρίδια (Sandaltzopoulos *et al.*, 1994). Αυτό το σύστημα δημιουργεί νουκλεοσώματα στο DNA που συνδέονται με παραμαγνητικά σφαιρίδια και δίνει την



ευκαιρία να μελετηθεί η επίδραση πρωτεϊνών στην αλληλεπίδραση της H1 με τη χρωματίνη. Το εκχύλισμα πρώιμων εμβρύων *Drosophila* (DREX), που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη, περιείχε όλους τους παράγοντες που είναι απαραίτητοι για την οργάνωση φυσιολογικής χρωματίνης (Sandaltzopoulos *et al.*, 1994), αλλά δεν περιείχε ιστόνη H1 που έπρεπε να προστεθεί εξωτερικά. Η χρωματίνη ανασυγκροτήθηκε αρχικά στο ακινητοποιημένο DNA παρουσία 2 μονάδων ιστόνης H1 (0,64 μ g), κι έπειτα η H1 ξεπλύθηκε από τα σφαιρίδια με 650 mM NaCl, για να δημιουργηθούν νουκλεοσώματα με ελεύθερες H1-συνδετικές περιοχές. Στη συνέχεια, τα σφαιρίδια χρωματίνης επωάστηκαν με 4 μονάδες H1 (1,3 μ g) που περιείχαν ίχνη από [32 P]-φωσφορυλιωμένη H1 ελλείψει ή παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων της ParaT. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε 15% SDS-PAGE κι έγινε χρώση με νιτρικό άργυρο και μέτρηση της ραδιενέργειας. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 20A, η χρωματίνη περιείχε το πλήρες συμπλήρωμα ιστονών παρουσία (δείγματα 1:2 και 1:5) ή απουσία της ParaT (δείγμα ελέγχου Γ). Εντούτοις, η σύνδεση της H1 με τη χρωματίνη εμποδίστηκε σημαντικά παρουσία της ParaT (δείγματα 1:2 και 1:5), δείχνοντας μια παρεμπόδιση της σύνδεσης της συνδετικής ιστόνης με τη χρωματίνη. Για να υπολογίσουμε την αύξηση της H1 στο υπερκείμενο, μετρήσαμε την πυκνότητα του σήματος της ραδιενέργειας με το πρόγραμμα Quantity One (Εργαστήρια BioRad). Η πυκνότητα ορίζεται ως η ένταση του σήματος σε μια συγκεκριμένη περιοχή (mm^2). Οι τιμές παρουσιάστηκαν σε μια γραφική παράσταση χρησιμοποιώντας αυθαίρετες μονάδες (Σχήμα 20B, πάνω πίνακας). Ο ποσοτικός προσδιορισμός της πυκνότητας των ζωνών αποκάλυψε ότι η αναστολή της σύνδεσης της συνδετικής ιστόνης H1 στη χρωματίνη είναι ανάλογη της ποσότητας της ParaT (Σχήμα 20B, πάνω πίνακας).

Σε μια άλλη προσπάθεια να μελετήσουμε την επίδραση της ParaT στην αλληλεπίδραση H1/χρωματίνης, ερευνήσαμε αν η ParaT είναι σε θέση να απομακρύνει H1 από τη χρωματίνη. Για αυτόν το σκοπό, οργανώθηκε χρωματίνη στο DNA που ακινητοποιήθηκε σε παραμαγνητικά σφαιρίδια με 2 μονάδες H1 του θύμου αδένος μοσχαριών (0,64 μ g) και η H1 απομακρύνθηκε από τα νουκλεοσώματα, όπως προηγουμένως. Έπειτα, η χρωματίνη ξαναεπωάστηκε με 4 μονάδες H1 που περιείχαν ίχνη από [32 P]-φωσφορυλιωμένη H1. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι παρουσία αυξανόμενων ποσών της ParaT, ένα σημαντικό ποσό H1 απομακρύνθηκε από τη





Σχήμα 20: Η ParaT έχει επιπτώσεις στη σύνδεση της H1 στην χρωματίνη.

(Α) Η ParaT εμποδίζει τη σύνδεση της H1 στην χρωματίνη. Χρωματίνη με ελεύθερες περιοχές σύνδεσης H1 ανασυγκροτήθηκε σε ακινητοποιημένο DNA κι έπειτα επώαστηκε με 4 μονάδες ιστόνης μοσχαριών H1 και ίχνη [32 P]-φωσφορυλιωμένης H1, ελλείψει (πλαίσιο Γ) ή παρουσία ParaT (H1/ParaT αναλογίες 1:2, 1:5 w/w). Τα υπερκείμενα αποσύρθηκαν και τα σφαιρίδια πλύθηκαν τρεις φορές με το ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης. Το υπερκείμενο (S), η τελευταία πλύση (W) και τα σφαιρίδια (B) αναλύθηκαν με 15% SDS-PAGE. Το πηκτώμα βάφτηκε με silver. Οι αριθμοί στα αριστερά δείχνουν τις σχετικές μοριακές μάζες σε kDa. **(Β) Προσδιορισμός της ποσότητας της H1 από το αυτοραδιογράφημα.** (πάνω πλαίσιο) Το αυτοραδιογράφημα του silver πηκτώματος που φαίνεται στο (Α) υποβλήθηκε σε πυκνομέτρηση για να προσδιορίσει την ενσωμάτωση της H1 στα νουκλεοσώματα. Η πυκνότητα των ζωνών H1 στο υπερκείμενο και τα σφαιρίδια χρωματίνης προσδιορίστηκε και παρουσιάστηκε στη γραφική παράσταση χρησιμοποιώντας αυθαίρετες μονάδες (κάτω πλαίσιο) Η χρωματίνη ανασυγκροτήθηκε σε ακινητοποιημένο DNA με 4 μονάδες ιστόνης μοσχαριών H1 και ίχνη [32 P]-φωσφορυλιωμένης H1 (πλαίσιο Γ), και υπέστη επεξεργασία με ParaT (H1/ParaT αναλογίες 1:2, 1:5 w/w). Τα υπερκείμενα αφαιρέθηκαν και τα σφαιρίδια πλύθηκαν τρεις φορές με το ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης. Το υπερκείμενο (S), η τελευταία πλύση (W) και τα σφαιρίδια (B) αναλύθηκαν με 15% SDS-PAGE. Η ανάλυση της πυκνομέτρησης των υπερκείμενων και των σφαιριδίων παρουσιάζεται σε μια γραφική παράσταση χρησιμοποιώντας αυθαίρετες μονάδες..

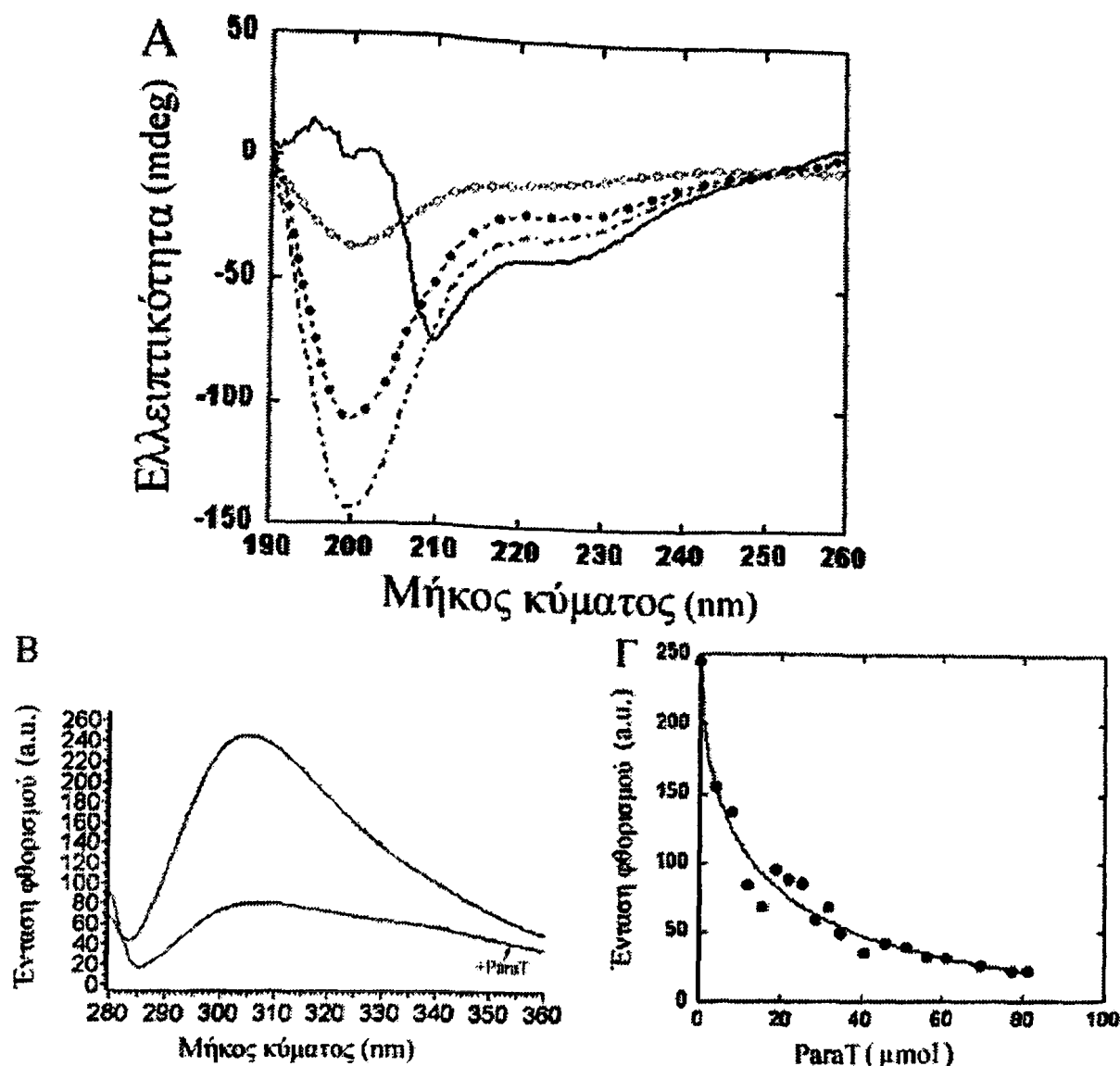
χρωματίνη. Για να ποσοτικοποιήσουμε την επίδραση της ParaT, μετρήσαμε την πυκνότητα (INT/mm^2) του σήματος που λήφθηκε στην καταγραφή της ραδιενέργειας, όπως περιγράφηκε προηγουμένως, και παρουσιάσαμε τις τιμές σε μια γραφική παράσταση χρησιμοποιώντας αυθαίρετες μονάδες (Σχήμα 20B, κάτω πίνακας). Συλλογικά, αυτά τα στοιχεία υποστηρίζουν την άποψη ότι η ParaT τροποποιεί τη σύνδεση της ιστόνης H1 με τα νουκλεοσώματα και δείχνουν έναν ρόλο της ParaT στην αναδιαμόρφωση της δομής της χρωματίνης.

3.5. Δομικές αλλαγές της ιστόνης H1 όταν συνδέεται με την ParaT

Στη συνέχεια ερευνήσαμε αν η αλλαγή στο NRL και η παρεμπόδιση της σύνδεσης της H1 με τη χρωματίνη παρουσία της ParaT οφείλονται σε δομικές αλλαγές της H1 ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασής της με την ParaT (αυτή η εργασία εκτελέστηκε σε συνεργασία με την Dr. Anastasia Politou). Για αυτόν το σκοπό, χρησιμοποιήσαμε Κυκλική Φασματοσκοπία Διχροϊσμού (CD), μια τεχνική καθιερωμένη στον τομέα της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης (Greenfield, 2004). Καταγράφηκαν φάσματα CD καθαρής ιστόνης H1 και ParaT (α) πριν από και (β) αφότου αναμίχθηκαν σε διάφορες μοριακές αναλογίες (Σχήμα 21A). Σε όλες τις περιπτώσεις το φάσμα CD του μίγματος ήταν διαφορετικό από το σύνολο των φασμάτων CD των μεμονωμένων πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, το CD που παρατηρήθηκε για το μίγμα των δυο πρωτεϊνών ήταν ενδεικτικό δευτεροταγούς δομής με υψηλότερο περιεχόμενο α-έλικας σε σύγκριση με τα CD των μεμονωμένων πρωτεϊνών και σε σύγκριση με το αριθμητικό σύνολό τους (Σχήμα 21A). Μια τέτοια διαφορά θα μπορούσε μόνο να προκύψει από μια αλλαγή στη διαμόρφωση μιας ή και των δυο πρωτεϊνών. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η αλληλεπίδραση των δυο πρωτεϊνών συνοδεύεται από μια διαμορφωτική αλλαγή τουλάχιστον μιας από τις δυο πρωτεΐνες, αλλά δε δείχνει ποιας.

Για να εξετάσουμε αυτό το συγκεκριμένο ερώτημα, χρησιμοποιήσαμε μετρήσεις φασματοσκοπίας φθορισμού. Και οι δυο πρωτεΐνες είναι φτωχές σε αρωματικά αμινοξέα: δεν υπάρχει κανένα τέτοιο αμινοξύ στην ακολουθία της ParaT και μόνο ένα (Tyr70) στη σφαιρική περιοχή της ιστόνης H1, το οποίο θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως εγγενές χρωμοφόρο φθορισμού. Προηγούμενες μελέτες δείχνουν ότι η Tyr70 είναι θαμμένη στον





Σχήμα 21: Αλλαγές της διαμόρφωσης της H1 κατά την αλληλεπίδραση με την ParaT.

(A) *Αναλύσεις σύνδεσης Κυκλικού Διχροϊσμού.* Φάσματα κυκλικού διχροϊσμού H1 (ανοικτοί κύκλοι, -o-), ParaT (κλειστοί κύκλοι, -●-) κι ενός μίγματος ParaT και H1 σε μοριακή αναλογία 3:1 (γραμμή) πρωτεϊνικών διαλυμάτων σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Για σύγκριση, το αριθμητικό ποσό των φασμάτων H1 και ParaT παρουσιάζεται επίσης (γραμμή με παύλες και κουκίδες). (B) *Φάσματα εκπομπής φθορισμού.* Τα φάσματα εκπομπής φθορισμού ενός διαλύματος 15 μM H1 σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS (πάνω) και του ίδιου διαλύματος μετά από την προσθήκη ενός στοιχειομετρικού ποσού ParaT (κάτω). Η διέγερση ήταν σε 276 nm. (Γ) *Ανάλυση της σύνδεσης βασισμένη σε φθορισμό.* Η σύνδεση των H1-ParaT ακολουθήθηκε με τον έλεγχο της έντασης του φθορισμού που εκπέμφθηκε σε 306 nm από το μεμονωμένο υπόλειμμα τυροσίνης της H1 μετά από διέγερση σε 276 nm. H1 σε μια αρχική συγκέντρωση 15 μM αναλύθηκε ποσοτικά με αυξανόμενα ποσά ενός πυκνού διαλύματος 270 μM ParaT σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Η γραμμή αντιπροσωπεύει την καμπύλη της σύνδεσης που προκύπτει από την ανάλυση της μη γραμμικής μείωσης των τιμών έντασης φθορισμού σε 306 nm, που διορθώνεται για διάλυση και συμβολή ρυθμιστικού διαλύματος.



υδροφοβικό πυρήνα της πρωτεΐνης (Jacobs *et al.*, 2001). Κατά συνέπεια, είναι λογικό να περιμένουμε ότι οποιαδήποτε αλλαγή στο φάσμα φθορισμού της H1 κατά τη σύνδεσή της με την ParaT θα προέκυπτε μόνο από μια αναδιοργάνωση της διαμόρφωσης της H1. Η σύνδεση της H1 με την ParaT ελέγχθηκε με φασματοσκοπία φθορισμού. Παρατηρήθηκε μια σαφής και βαθμιαία μετατόπιση της έντασης και του μήκους κύματος της μέγιστης εκπομπής φθορισμού όταν προστέθηκαν αυξανόμενα ποσά ParaT στην H1 (Σχήμα 21B). Μια τέτοια μετατόπιση μπορεί μόνο να προκύψει αν το μικροπεριβάλλον του χρωμοφόρου της H1 αλλάξει σημαντικά. Επομένως, τα αποτελέσματα φθορισμού υποδηλώνουν μια αλλαγή της διαμόρφωσης της H1 όταν συνδέεται με την ParaT. Ωστόσο, δε μπορούμε να αποκλείσουμε τη πιθανότητα η ParaT να υφίσταται παρόμοιες αλλαγές επίσης, οι οποίες δε μπορούν να ανιχνευθούν από τα πειράματα φθορισμού μας λόγω της έλλειψης ενός εγγενούς χρωμοφόρου στην αμονοξική αλληλουχία της ParaT.

Η παρατηρηθείσα βαθμιαία αλλαγή στην ένταση φθορισμού της H1 κατά την προσθήκη της ParaT χρησιμοποιήθηκε ως βάση για ποσοτικό προσδιορισμό της σταθεράς σύνδεσης της αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών. Λήφθηκε μια καμπύλη σύνδεσης με τον έλεγχο της αλλαγής στην ένταση φθορισμού σε 306 nm ως παράμετρος της συγκέντρωσης της ParaT σε μια σταθερή θερμοκρασία (Σχήμα 21C). Υπολογίσαμε μια τιμή K_D $19,6 \pm 11,3$ μM για την αλληλεπίδραση H1-ParaT. Μια τέτοια μέτρια συγγένεια δεν είναι ασυνήθιστη για αλληλεπιδράσεις μεταξύ της χρωματίνης και των παραγόντων αναδιαμόρφωσής της (Jacobs *et al.*, 2001; Knapp *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 2002) και θα μπορούσε να οφείλεται σε διάφορους λόγους (βλ. Συζήτηση).

3.6. Αποσυμπύκνωση της χρωματίνης ανθρώπινου σπέρματος *in vitro*

Δεδομένου ότι η ParaT έχει επιπτώσεις στη σύνδεση της H1 με τα νουκλεοσώματα και η ιστόνη H1 είναι ο σημαντικότερος καθοριστικός παράγοντας της αναδίπλωσης ανώτερων δομών χρωματίνης (Cartuthers *et al.*, 1998), θελήσαμε να ερευνήσουμε την επίδραση της ParaT στη δομή της χρωματίνης. Για αυτόν το σκοπό, χρησιμοποιήσαμε χρωματίνη σπέρματος ως ένα *in vitro* σύστημα, δεδομένου ότι το σπέρμα έχει μια εξαιρετικά πυκνή χρωματίνη σε σχέση με αυτή που υπάρχει στους πυρήνες των σωματικών κυττάρων κι έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε μελέτες

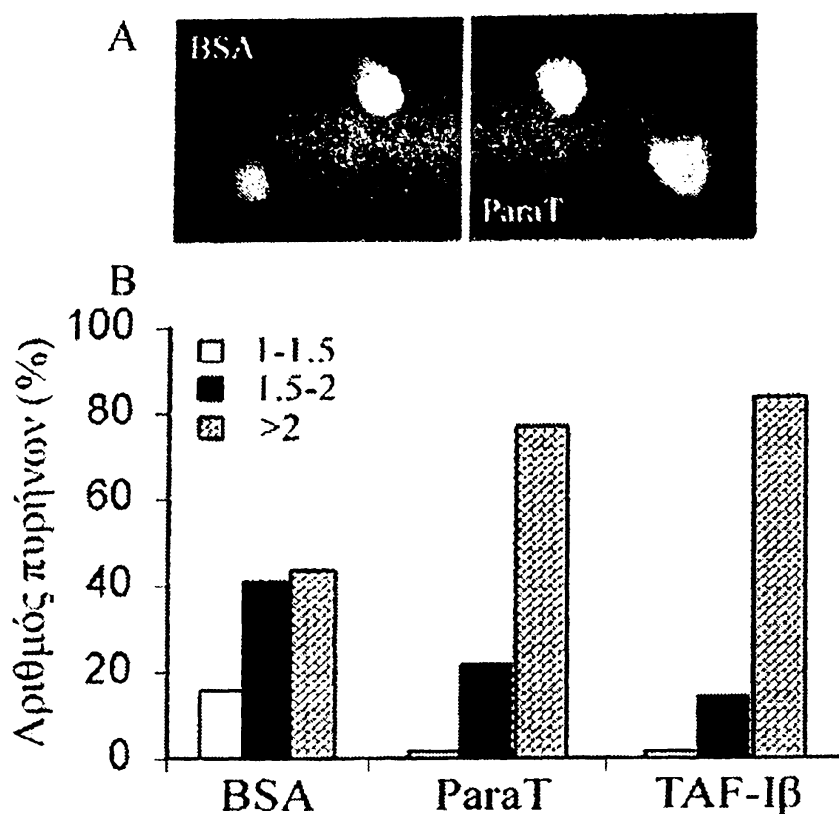


αποσυμπύκνωσης της χρωματίνης (Dingwall *et al.*, 1987; Matsumoto *et al.*, 1999). Στην εργασία μας, χρησιμοποιήσαμε πυρήνες ανθρώπινου σπέρματος, που είναι περίπου σφαιρικοί σε σχέση με τη σπειροειδή μορφή των πυρήνων *Xenopus*, προκειμένου να ποσοτικοποιηθεί ακριβέστερα η αποσυμπύκνωση του σπέρματος. Πυρήνες ανθρώπινου σπέρματος χωρίς τη μεμβράνη επώαστηκαν με ParaT, με τον παράγοντα αποσυμπύκνωσης TAF-Ιβ (Matsumoto *et al.*, 1999) ή BSA, που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί κι αρνητικοί έλεγχοι, αντίστοιχα. Μετά την επώαση, οι πυρήνες βάφτηκαν με Hoechst 33258 κι έγινε παρατήρηση σε ένα μικροσκόπιο φθορισμού που περιείχε ένα φίλτρο UV. Λήφθηκαν εικόνες με μια ασπρόμαυρη φωτογραφική μηχανή CCD που προσαρμόστηκε πάνω στο μικροσκόπιο και τα αρχεία μεταφέρθηκαν σε έναν υπολογιστή για περαιτέρω ανάλυση. Με την επώαση των πυρήνων σπέρματος με ParaT, οι πυρήνες εμφάνισαν μια περίπου διπλή αύξηση στην επιφάνειά τους (Σχήμα 22Α, ParaT) έναντι των δειγμάτων πυρήνων σπέρματος τα οποία επώαστηκαν με BSA. Χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα AutoCAD 2000 (κεφάλαιο 2.8.3.), ο μέσος όρος της επιφάνειας 50 πυρήνων με BSA, ParaT ή TAF-Ιβ βρέθηκε ότι είναι 2,0, 3,1 και 3,2, αντίστοιχα. Για να διακρίνουμε μεταξύ των διαφορετικών υποομάδων, οι τιμές του κάθε πειράματος ταξινομήθηκαν αυθαίρετα σε τρεις κατηγορίες (1-1,5, 1,5-2 και > 2), που αντιστοιχούν σε μικρή, μέση και μεγάλη επιφάνεια. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Σχήμα 22Β δείχνουν ότι ο αριθμός των πυρήνων σπέρματος με μεγάλη περιοχή επιφάνειας διπλασιάζεται όταν προστίθεται ParaT, σε σχέση με πυρήνες σπέρματος επωασμένους με BSA. Μια τέτοια επίδραση είναι συγκρίσιμη με αυτήν που λαμβάνεται με TAF-Ιβ (συγκρίνετε τις στήλες > 2).

3.7. Αποσυμπύκνωση της χρωματίνης στα κύτταρα HeLa με GFP-ParaT

Στη συνέχεια εξετάσαμε αν η ParaT μπορεί να λειτουργήσει ως παράγοντας αποσυμπύκνωσης της χρωματίνης *in vivo*. Πλασμίδια έκφρασης GFP-ParaT και ParaT συζευγμένα με Flag διαμολύνθηκαν προσωρινά στα κύτταρα HeLa χρησιμοποιώντας τη μέθοδο φωσφορικού άλατος ασβεστίου. 36 ώρες μετά τη διαμόλυνση, τα κύτταρα βάφτηκαν με Hoechst 33258. Η υπερέκφραση της ParaT οδήγησε στην αύξηση του





Σχήμα 22: Αποσυμπύκνωση της χρωματίνης σε ανθρώπινο σπέρμα από την ParaT.

(Α) *Αποσυμπύκνωση της χρωματίνης σε ανθρώπινο σπέρμα.* Χρωματίνη στο σπέρμα επώαστηκε με 6 μ g ParaT ή BSA, όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Μετά την επώαση, τα υποπολλαπλάσια αναμίχθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα σταθεροποίησης που περιείχε τη χρωστική ουσία Hoechst και το χρωμοσωμικό DNA φάνηκε σε μικροσκόπιο φθορισμού. (Β) *Μετρήσεις της επιφάνειας των πυρήνων.* Ποσοτικός προσδιορισμός της επιφάνειας των πυρήνων του πειράματος που περιγράφεται στο (Α) με το πρόγραμμα AutoCAD 2000. TAF-Iβ: ενεργοποιών παράγοντας προτύπων Ιβ που χρησιμοποιείται ως θετικός έλεγχος. Οι μετρήσεις της επιφάνειας των πυρήνων ταξινομήθηκαν αυθαίρετα σε τρεις ομάδες (1-1.5, 1.5-2 και >2) που αντιπροσωπεύουν την έκταση της αποσυμπύκνωσης της χρωματίνης στο σπέρμα.

μεγέθους των πυρήνων σε σύγκριση με τα μη διαμολυσμένα κύτταρα και με τα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με control πλασμιδιακούς φορείς με μια συνακόλουθη μείωση της έντασης της χρώσης του DNA (Σχήμα 23Α). Για να ποσοτικοποιήσουμε αυτήν την επίδραση, συλλέξαμε τις εικόνες περίπου 100 πυρήνων (μέτρια ή πολύ διαμολυσμένων) από κάθε πείραμα διαμόλυνσης, και μετρήσαμε την περιοχή επιφάνειας των πυρήνων χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Autocad (κεφάλαιο 2.8.3). Η μέση περιοχή επιφάνειας κυττάρων δαμολυσμένων με GFP-ParaT, Flag-ParaT και GFT-TAF-Iβ βρέθηκε ότι είναι

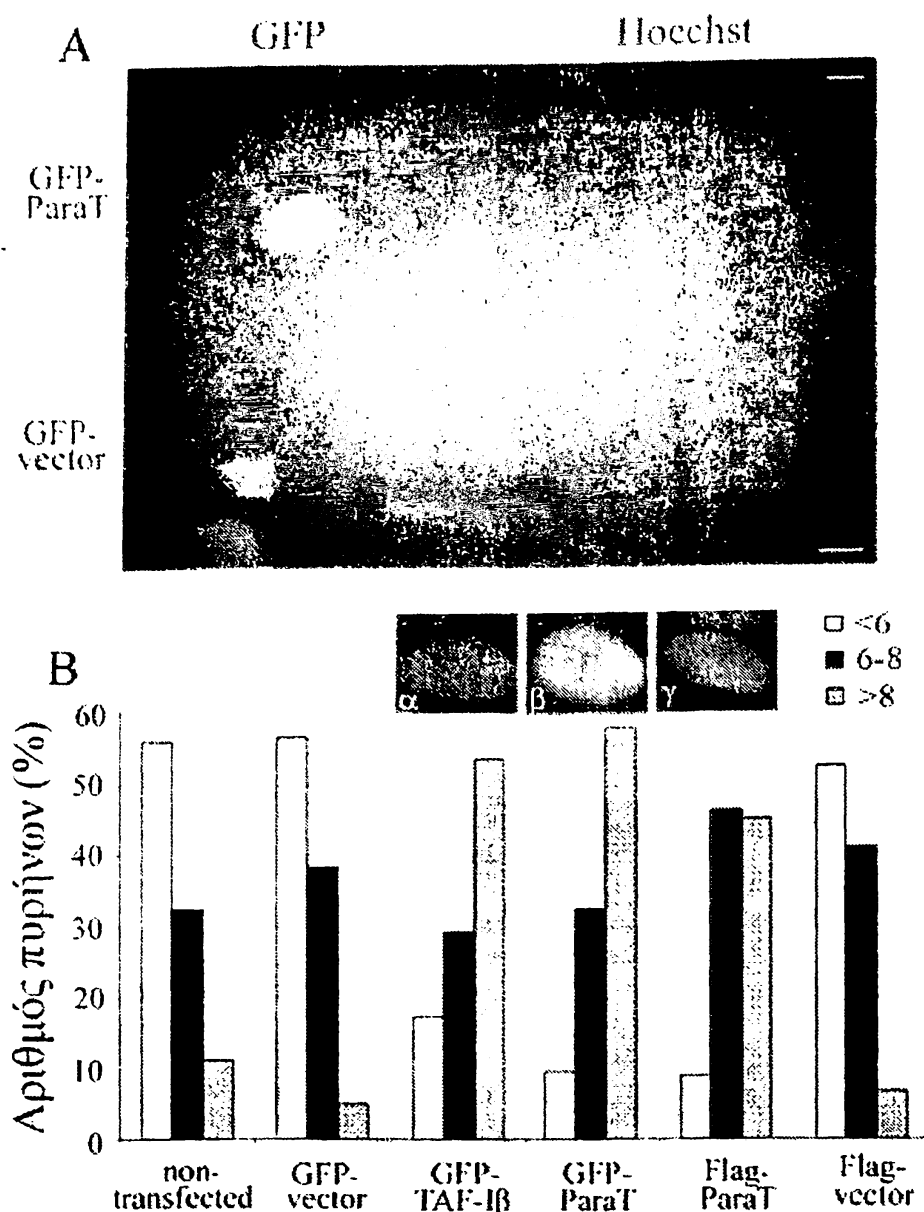


9,1, 8,4 και 8,6, αντίστοιχα. Αντίθετα, τα μη διαμολυσμένα κύτταρα ή τα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με κενά φορείς έκφρασης έδειξαν μια μέση περιοχή επιφάνειας 6,3, 5,9 και 5,8, αντίστοιχα. Η ταξινόμηση των τιμών αυθαίρετα σε τρεις ομάδες (< 6 , $6-8$ και > 8), αποκάλυψε μια δεκαπλάσια αύξηση των κυττάρων με μεγαλύτερους πυρήνες στα δείγματα που διαμολύνθηκαν με πλαμίδια που εκφράζουν Para-T (Σχήμα 23B, GFP-ParaT και Flag-ParaT, σύγκρινε τις στήλες > 8), σε σύγκριση με μη διαμολυσμένα κύτταρα. Ένα παρόμοιο αποτέλεσμα λήφθηκε για τα κύτταρα HeLa που υπερεκφράζουν τον παράγοντα αποσυμπύκνωσης της χρωματίνης TAF-I β (Σχήμα 23B, GFP-TAF-I β). Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η ParaT έχει δραστηριότητα αποσυμπύκνωσης της χρωματίνης *in vivo*.

3.8. Διαχωρισμός ενεργού και ανενεργού χρωματίνης από HeLa κύτταρα που υπερεκφράζουν GFP-ParaT

Σε μια άλλη προσπάθεια να μελετήσουμε την επίδραση της ParaT στη δομή της χρωματίνης, προσπαθήσαμε να απομονώσουμε κλάσματα ενεργού κι ανενεργού χρωματίνης, χρησιμοποιώντας μια καθιερωμένη διαδικασία διαχωρισμού στην οποία οι πυρήνες υποβάλλονται σε ήπια πέψη με μικροκοκκική νουκλεάση και στη συνέχεια εκχύλιση με EDTA (Rose and Garrard, 1984). Με αυτήν την τεχνική παρασκευάζονται τρία κλάσματα που περιέχουν υλικό χρωματίνης που είναι διαλυτό στα δισθενή μέταλλα (S1), διαλυτό σε EDTA (S2) κι ένα υπόλοιπο αδιάλυτο μέρος (P). Η λεπτομερής ανάλυση των πρωτεϊνικών συστατικών αυτών των κλασμάτων έχει δείξει ότι το S1 περιέχει μικρές ποσότητες H1 σε σχέση με το S2 που περιέχει συμπαγέστερη χρωματίνη, ενώ το ανθεκτικό στη νουκλεάση μέρος P είναι εμπλουτισμένο σε ενεργά μεταγραφόμενα γονίδια και περιέχει πυρηνικά τμήματα μητρών (Kreiz *et al.*, 2001; Rose and Garrard, 1984). Μετά από αυτήν τη διαδικασία (κεφάλαιο 2.6), κύτταρα HeLa που υπερέκφραζαν GFP-ParaT ή GFP μόνο επώαστηκαν με μικροκοκκική νουκλεάση και υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρηση για να αποκτηθεί το S1. Στη συνέχεια, το ίζημα επαναιωρήθηκε σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε EDTA κι υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση για να παρασκευασθεί το S2 και το υπόλοιπο αδιάλυτο κλάσμα P. Όπως παρουσιάζεται από την ανάλυση DNA σε πηκτή αгарόζης, το σχεδιάγραμμα της πέψης





Σχήμα 23: Η ParaT προκαλεί αποσυμπύκνωση της χρωματίνης στα κύτταρα HeLa.

(Α) Υπερέκφραση της ParaT στα κύτταρα HeLa. Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν προσωρινά με 6 μg pGFP-ParaT ή pGFP-πλασμιδιακό φορέα. 36 ώρες μετά τη διαμόλυνση τα κύτταρα καθορίστηκαν, βάφτηκαν με Hoechst και παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού. Αριστερά: GFP-φθορισμός, Δεξιά: Χρώση DNA. Κλίμακα, 10 μm. **(Β) Μετρήσεις της επιφάνειας των πυρήνων.** Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν προσωρινά με 6 μg pGFP-, pGFP TAF-Iβ, pGFP-ParaT, pFlag-ParaT και pCMV-Flag πλασμίδια έκφρασης, όπως υποδεικνύεται pFlag-ParaT, και pCMV-Flag διαμολυσμένα κύτταρα ανιχνεύθηκαν μέσω συνδιαμόλυνση ενός 1 μg pGFP πλασμιδιακού φορέα μεταγραφής. (πάνω πλαίσιο) Εικόνες ανοσοφθορισμού που δείχνουν τον πυρηνικό εντοπισμό του GFP-TAF-Iβ (α), GFP-ParaT (β) και Flag-ParaT (γ) (κάτω πλαίσιο) Η περιοχή της επιφάνειας των διαμολυσμένων πυρήνων μετρήθηκε με το πρόγραμμα AutoCAD 2000 και οι τιμές ταξινομήθηκαν αυθαίρετα σε τρεις ομάδες (4-6, 6-8 >8).



μικροκοκκικής νουκλεάσης των κλασμάτων S1 και S2 ήταν παρόμοιο και στους δυο πληθυσμούς κυττάρων (Σχήμα 24, λωρίδες 1-5). Εντούτοις, το DNA που απομονώθηκε από το κλάσμα της χρωματίνης, που είναι ανθεκτικό στη νουκλεάση (P) των κυττάρων υπερπαραγωγής ParaT, έδωσε μια χαρακτηριστική νουκλεοσωμική σκάλα με μια ισχυρή μονο-νουκλεοσωμική ζώνη (λωρίδα 7). Αντίθετα, το αντίστοιχο μέρος του DNA που λήφθηκε από τα κύτταρα ελέγχου ήταν πιο ετερογενές και παρουσίαζε νεφελώδες προφίλ (λωρίδα 6). Το προφίλ DNA που λαμβάνεται από το πείραμα διαχωρισμού της χρωματίνης δείχνει ότι η υπερέκφραση της ParaT στα κύτταρα HeLa αύξησε τη δυνατότητα πρόσβασης της χρωματίνης στην πέψη μικροκοκκικής νουκλεάσης και, μαζί με τα προηγούμενα στοιχεία που αποκτήθηκαν, καταδεικνύει σαφώς τη συμμετοχή της ParaT στην αποσυμπύκνωση ινών της χρωματίνης.



Σχήμα 24: Κλασμάτωση της χρωματίνης.

Πυρήνες ετοιμάστηκαν από pGFP ή pGFP-ParaT διαμολυσμένα κύτταρα HeLa, αφομοιώθηκαν με μικροκοκκική νουκλεάση και χωρίστηκαν σε υπερκείμενο (S1) και ίζημα, όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Το ίζημα εξήχθη με EDTA και υποβλήθηκε σε φυγοκέντρωση για να παραγάγει υπερκείμενο (S2) και (P) μέρη χρωματίνης. Από τα μέρη αφαιρέθηκαν οι πρωτεΐνες κι αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση πηκτωμάτων αгарόζης και χρώση βρωμιδίου του αιθιδίου. Τα C, T δείχνουν το DNA που λήφθηκε από τα κύτταρα HeLa που διαμολύνθηκαν με pGFP ή pGFP-ParaT, αντίστοιχα. (M) Σκάλα 123 bp (BRL).

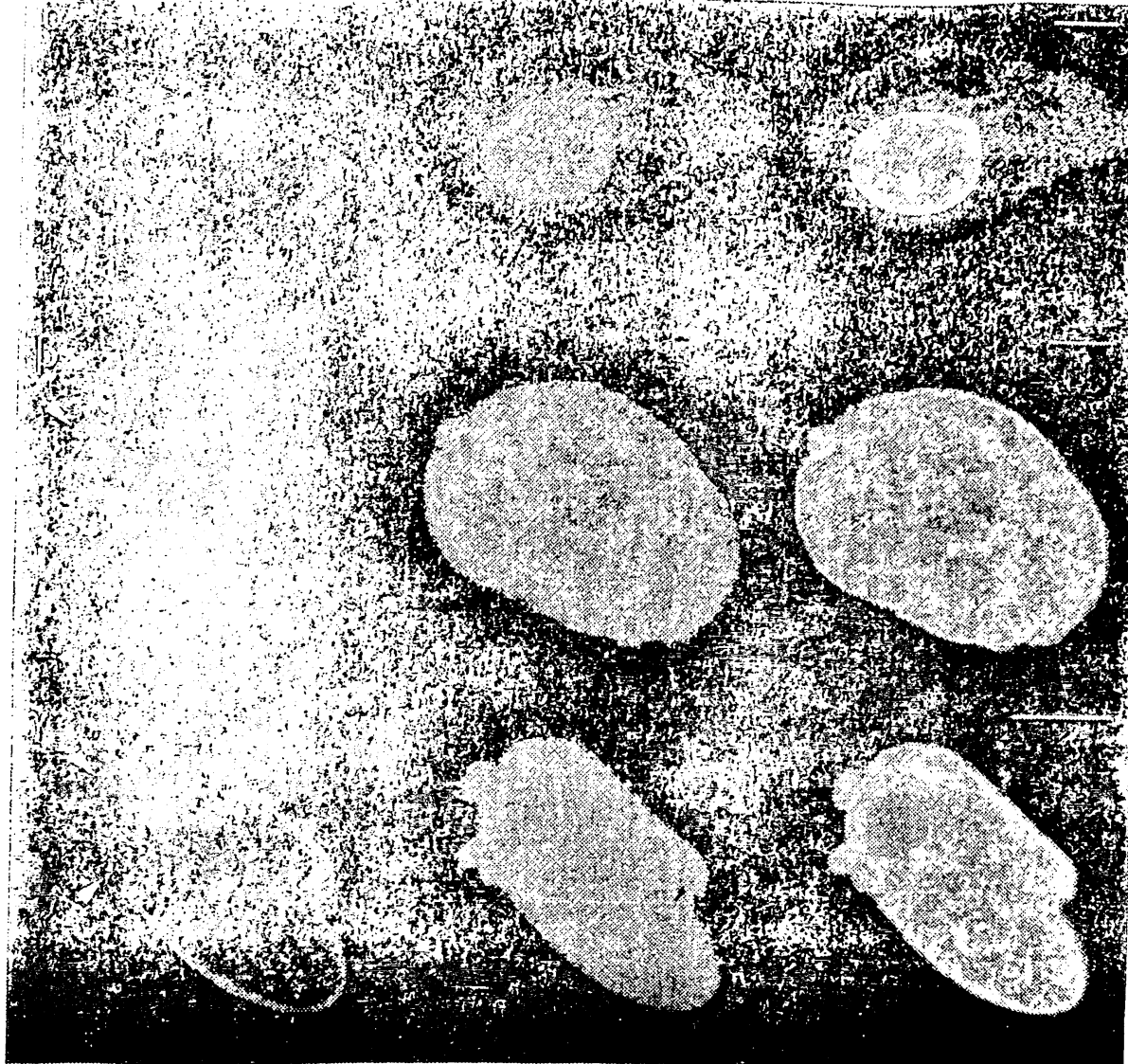
3.9. Η αποσυμπύκνωση της χρωματίνης από την ParaT έχει επιπτώσεις στην ακεραιότητα των πυρηνικών φακέλων

Λαμβάνοντας υπόψη την αύξηση στο μέγεθος του πυρήνα κατά την υπερέκφραση της ParaT στα καλλιεργημένα κύτταρα HeLa, ελέγξαμε έπειτα την ακεραιότητα του πυρηνικού φακέλου των κυττάρων αυτών. Διεξήγαμε έμμεσο ανοσοφθορισμό κι συνεστιακή μικροσκοπία σε κύτταρα HeLa που υπερεξέφραζαν GFT-ParaT κι ελέγξαμε την κατανομή της λαμίνης B χρησιμοποιώντας αντισώματα εναντίον της λαμίνης B. Είναι ευρέως γνωστό ότι η λαμίνη B είναι αναπόσπαστο τμήμα των πυρηνικών φακέλων, πράγμα που την κάνει κατάλληλο δείκτη στη μελέτη μας. Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν πάνω σε γυάλινες καλυπτρίδες και διαμολύνθηκαν με EGFP-ParaT χρησιμοποιώντας τη μέθοδο φωσφορικού άλατος ασβεστίου (κεφάλαιο 2.7.4.). 36 ώρες μετά τη διαμόλυνση, τα κύτταρα επώαστηκαν με αντισώματα εναντίον της λαμίνης B. Σύμφωνα με τις προηγούμενες παρατηρήσεις μας, τα κύτταρα HeLa που διαμολύνθηκαν με GFP-διάνυσμα δεν παρουσίασαν καμιά αύξηση στο μέγεθος του πυρήνα (Σχήμα 25α), παρόμοια με τα μη διαμολυσμένα κύτταρα. Αντίθετα, τα κύτταρα HeLa που διαμολύνθηκαν με EGFP-ParaT παρουσίασαν μια σημαντική αύξηση στο μέγεθος του πυρήνα (Σχήμα 25β και γ). Είναι ενδιαφέρον ότι η χρώση του πυρηνικού φακέλου με αντίσωμα εναντίον της λαμίνης B (Σχήμα 25, Λαμίνη B) στους μεγάλους πυρήνες δείχνει χάσματα στον πυρηνικό φάκελο (β και γ, κεφαλές βελών) και σε μερικές περιπτώσεις παρατηρήθηκε απελευθέρωση ParaT στο κυτταρόπλασμα (γ). Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η υπερέκφραση της ParaT στα κύτταρα HeLa οδηγεί στην απώλεια της ακεραιότητας των πυρηνικών φακέλων, πιθανότατα λόγω της αυξανόμενης πίεσης που παράγεται από την αποσυμπύκνωση της χρωματίνης.

3.10. Ανοσοϊστοχημεία λεμφικών ιστών με αντισώματα ενάντια στην ParaT

Σε μια προσπάθεια να γίνει περαιτέρω κατανοητή η βιολογική λειτουργία της ParaT, διεξήγαμε μελέτες ανοσοϊστοχημείας σε ιστούς του ανοσοποιητικού συστήματος.





Σχήμα 25: Η υπερέκφραση της ParaT στα κύτταρα HeLa έχει επιπτώσεις στην ακεραιότητα των πυρηνικών φακέλων.

Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν είτε με EGFP-πλασμιδιακό φορέα (α) είτε με EGFP-ParaT (β και γ) και μαρκαρίστηκαν χρησιμοποιώντας αντισώματα εναντίον της λαμίνης B. Το τοπικό υπερεκφράζον GFP-ParaT παρουσιάζουν διακεκομμένη χρώση λαμίνης B (κεφαλές βελών). (Λαμίνη B) Χρώση λαμίνης B. (GFP) GFP φθορισμός. (συγκριτική) Επικάλυψη χρώσης λαμίνης B και GFP φθορισμού. Κλίμακες, 5 μ m.

Το ανοσοποιητικό σύστημα αποτελείται από πολλά διαφορετικά όργανα και έχουν διάφορες λειτουργίες στην ανάπτυξη των ανοσολογικών αντιδράσεων. Η λειτουργία τους, μπορούν να διαιρεθούν σε βασικά και δευτερεύοντα. Ο θύμος αδένας και ο μυελός των οστών είναι τα βασικά λεμφοειδή όργανα, όπου πραγματοποιείται η ωρίμανση των λεμφοκυττάρων. Οι λεμφαδένες, η σπλήν και τα δευτερεύοντα λεμφοειδή όργανα, τα οποία παγιδεύουν το αντιγόνο και περιτοχές για να αλληλεπιδράσουν τα ώριμα λεμφοκύτταρα με αυτό το αντιγόνο.



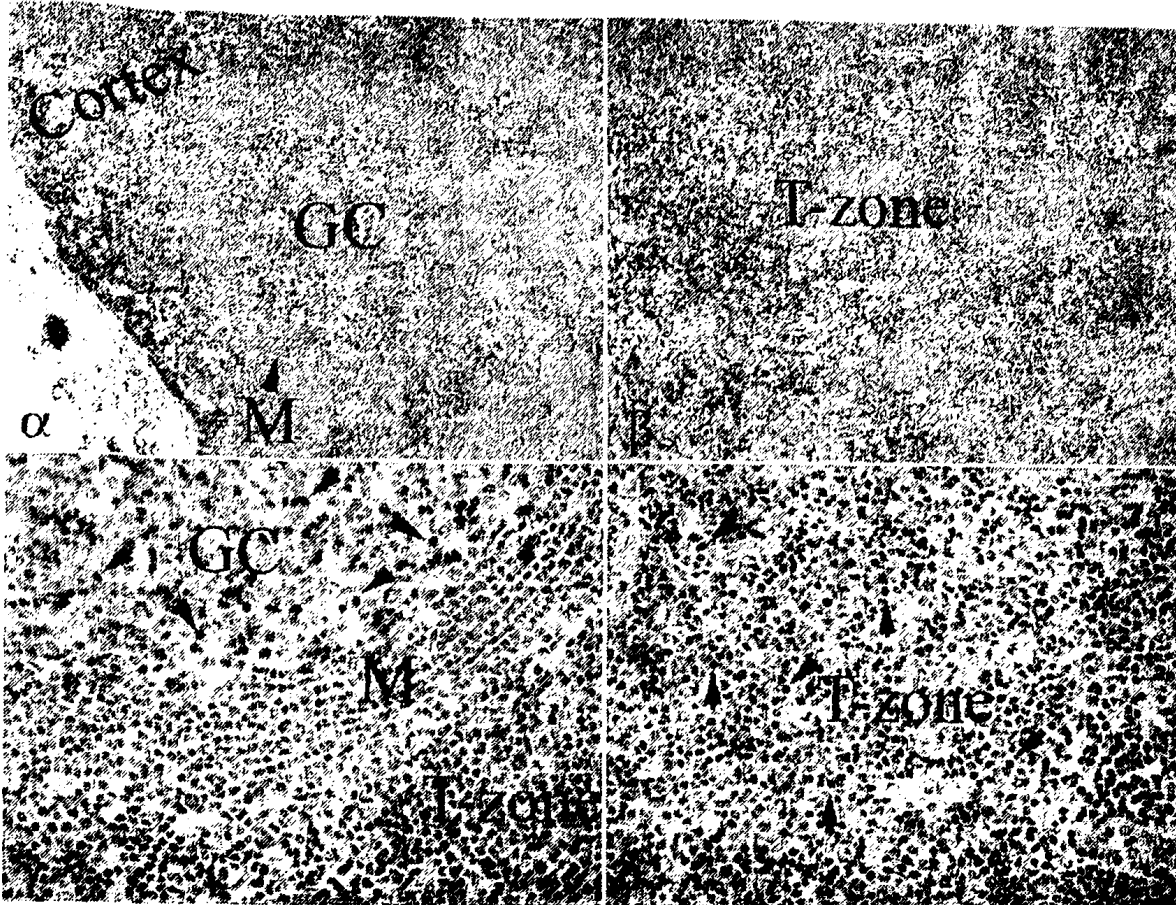
Αυτό το σύστημα είναι πολύ καλά χαρακτηρισμένο και παρέχει τη δυνατότητα να μελετηθούν σε ένα σύνθετο περιβάλλον ποικίλα κύτταρα που αποτελούν το ανοσοποιητικό σύστημα. Η ανάπτυξη, διαφοροποίηση κι ενεργοποίηση των κυττάρων T ήταν ιδιαίτερου ενδιαφέροντος και συσσωρευμένες πληροφορίες δείχνουν την ανάμειξη της αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης σε αυτές τις διαδικασίες (Georgopoulos, 2002; Kioussis and Ellmeier, 2002).

3.10.1. Έκφραση της ParaT στους λεμφαδένες και τη σπλήνα

Για να μελετήσουμε την έκφραση της ParaT στα κύτταρα του λεμφικού συστήματος, τμήματα φυσιολογικού λεμφαδένα, σπλήνας και θύμου αδένος με ενσωματωμένη παραφίνη λήφθηκαν από το Τμήμα Παθολογικής Ανατομίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Το Σχήμα 26 παρουσιάζει τμήματα του φυσιολογικού λεμφαδένα που επώαστηκε με αντισώματα εναντίον της ParaT και χρώση διαμινοβενζιδίνης (DAB). Η πρωτεϊνική έκφραση της ParaT (καφέ χρωστική ουσία) είναι διασκορπισμένη σε συγκεκριμένες περιοχές του λεμφαδένα. Η πρωτεΐνη βρίσκεται σε κύτταρα του φλοιού (Σχήμα 26α) καθώς επίσης και σε κύτταρα της βαθιάς φλοιώδους ζώνης (ζώνη T, Σχήμα 26β και δ), μια περιοχή που αποτελείται κυρίως από λεμφοκύτταρα T. Είναι αξιοσημείωτο ότι, όταν τα λεμφοκύτταρα οργανώνονται στα σφαιρικά λυμφοειδή θυλάκια (Σχήμα 26α), η χρώση της ParaT περιορίζεται στο σπερματικό κέντρο (GC) και δε βρίσκεται στην περιοχή του μανδύα (Σχήμα 26α και γ, M). Η έκφραση της ParaT στα κύτταρα του GC βρίσκεται σχεδόν αποκλειστικά στον πυρήνα (Σχήμα 26γ, κεφαλές βελών), με μόνο λίγα κύτταρα να παρουσιάζουν εξασθενημένη κυτταροπλασματική χρώση. Περίπου 30% του συνολικού ποσού των κυττάρων που βρίσκεται στο GC είναι θετικό σε ParaT. Αντίθετα, η μεγάλη πλειοψηφία των κυττάρων στη ζώνη T είναι θετική για ParaT και η πρωτεΐνη βρίσκεται σχεδόν αποκλειστικά στον πυρήνα (Σχήμα 26δ, κεφαλές βελών).

Στη συνέχεια, ελέγξαμε την έκφραση της ParaT σε ιστό σπλήνας. Η σπλήνα υγιών ατόμων επώαστηκε με αντισώματα ParaT, βάφτηκε με DAB και παρατηρήθηκε στο μικροσκόπιο. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 27 (α και β), χρώση ParaT (καφέ χρωστική ουσία) βρέθηκε αποκλειστικά τοπικά γύρω από τις μικρές αρτηρίες (άσπρη περιοχή

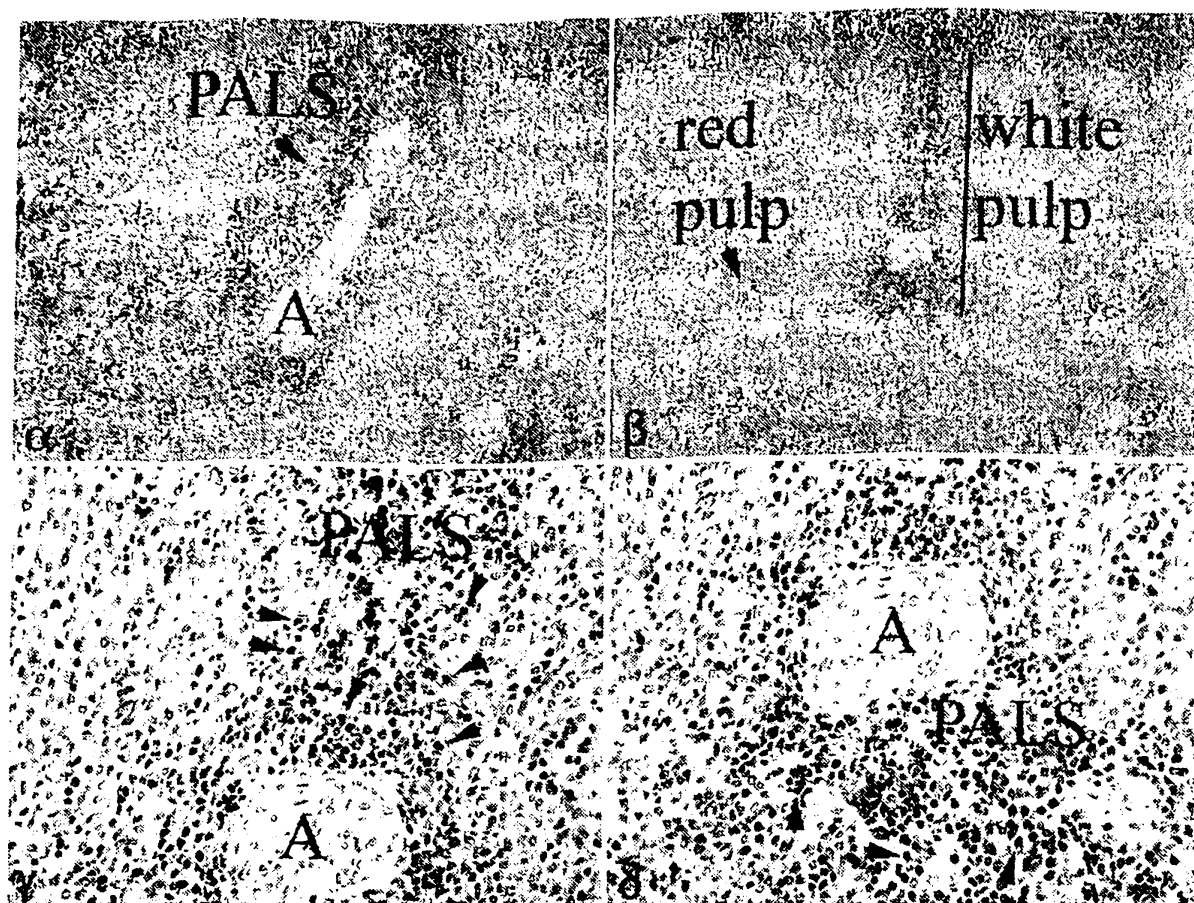




Σχήμα 26: Χρώση ParaT φυσιολογικού λεμφαδένα.

Αντισώματα εναντίον της ParaT βάφουν κύτταρα στο σπερματικό κέντρο (GC), αλλά όχι στην περιοχή του μανδύα (M) δευτεροβάθμιων λεμφοειδών θυλακίων (α και γ). Χρώση ParaT (καφετιά χρωστική ουσία) παρατηρείται κυρίως στον πυρήνα (γ και δ, κεφαλές βελών). Έκφραση ParaT βρίσκεται στη μεγάλη πλειοψηφία των κυττάρων στη βαθιά φλοιώδη ζώνη (T-zone, β και δ, κεφαλές βελών). Τα δείγματα υπέστησαν επεξεργασία με διάλυμα αιματοξυλίνης (μπλε χρώση πυρήνα). (α, β: μεγένθυση x100. γ, δ: μεγένθυση x400)

πολφού) και ήταν απύσχα στην κόκκινη μήτρα πολφού (υπόλοιπο του ιστού). Η περιοχή γύρω από τις μικρές αρτηρίες αποτελείται κυρίως από λεμφοκύτταρα T που είναι μέρος της περιαρτηριακής λεμφοειδούς θήκης (PALS). Όπως παρατηρήθηκε στους λεμφαδένες που ήταν βαμμένοι με αντισώματα ParaT, η πρωτεΐνη βρίσκεται κυρίως στον πυρήνα των κυττάρων (Σχήμα 27 γ και δ, κεφαλές βελών).



Σχήμα 27: Χρώση ParaT φυσιολογικής σπλήνας.

ParaT (καφετιά χρωστική ουσία) εκφράζεται σε κύτταρα της περιαρτηριακής λεμφοειδούς σπλεατη (PALS) στην περιοχή άσπρου πολτού (white pulp) κι όχι σε κύτταρα της μήτρας κόκκινου πολτού (red, pulp, α και β). Η ParaT βρίσκεται σχεδόν αποκλειστικά στον πυρήνα (γ και δ, κεφαλές βελών). Τα δείγματα υπέστησαν επεξεργασία με διάλυμα αιματοξυλίνης. A: Αρτηρίες. (α, β: μεγέθυνση x100. γ, δ: μεγέθυνση x400).

3.10.2. Η έκφραση της ParaT στους λεμφαδένες και τη σπλήνα βρίσκεται στα λεμφοκύτταρα T κι όχι B

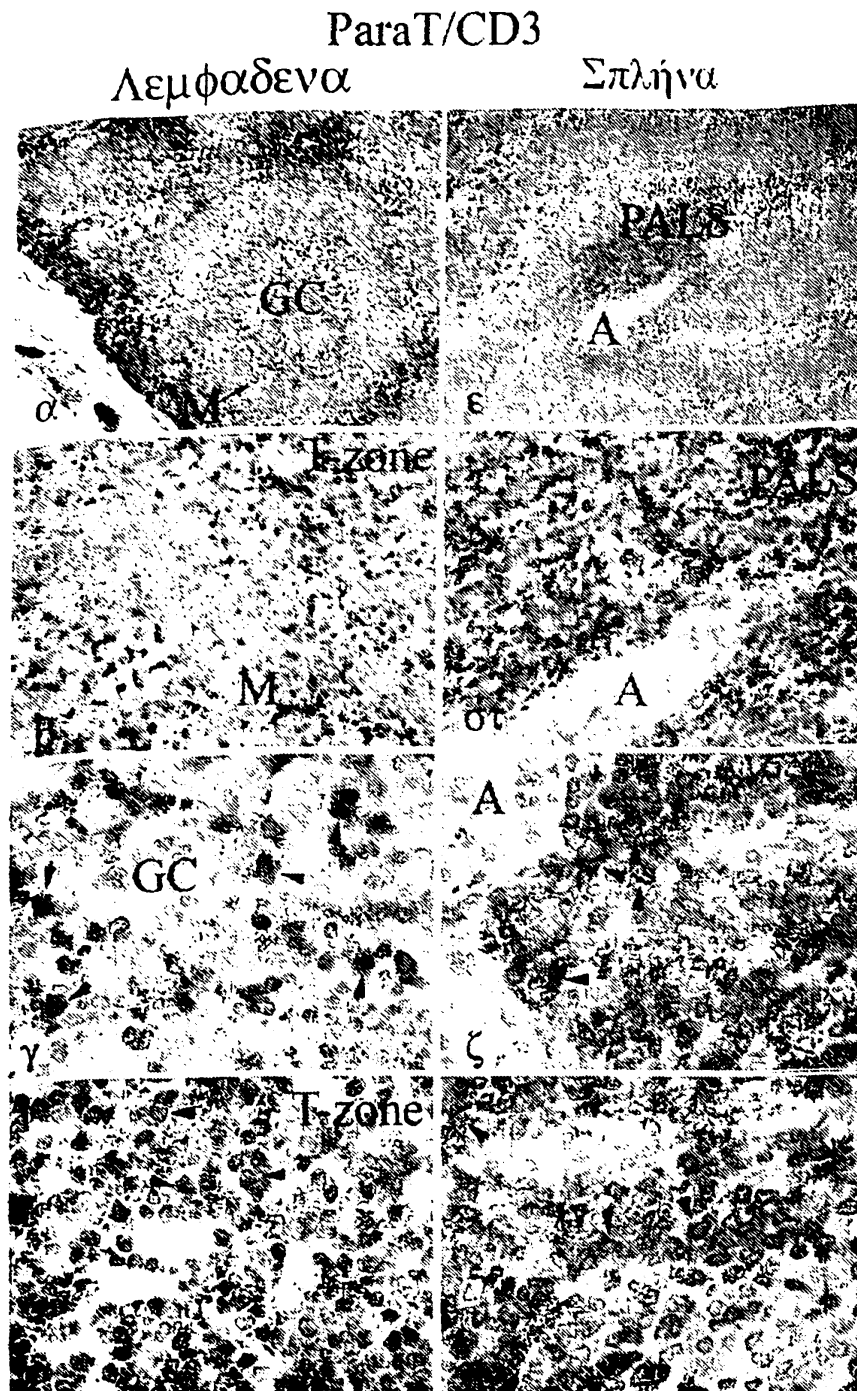
Τα λεμφοειδή θυλάκια είναι η σημαντικότερη περιοχή όπου εντοπίζονται τα λεμφοκύτταρα B και πολλαπλασιάζονται σε κύτταρα μνήμης B. Στο GC τα κύτταρα B μετατρέπονται σε κεντροβλάστες και στη συνέχεια σε κεντροκύτταρα, στην οποία μορφή περνούν στη φλοιώδη ζώνη (και τα αρθρωτά σχοινιά), όπου ωριμάζουν σε κύτταρα μνήμης B (Calame *et al.*, 2003; Klein *et al.*, 2003). Η περιοχή του μανδύα ενός λεμφοειδούς θυλακίου περιέχει κυρίως λεμφοκύτταρα B, ενώ το GC περιέχει κύτταρα B καθώς επίσης και T. Σε μια προσπάθεια να διακρίνουμε μεταξύ των λεμφοκυττάρων T



και B και για να συσχετίσουμε την έκφραση της ParaT με ένα συγκεκριμένο τύπο λεμφοκυττάρων, εκτελέσαμε πειράματα διπλής χρώσης με ParaT κι αντισώματα είτε CD3 ή CD20. Τα αντισώματα CD3 αντιδρούν με την έψιλον αλυσίδα του CD3 αντιγόνου/δέκτη αντιγόνων κυττάρων T (TCR) κι επομένως βάφουν λεμφοκύτταρα T, ενώ το αντιγόνο CD20 είναι μια φωσφοπρωτεΐνη που εκφράζεται σε λεμφοκύτταρα B. Το Σχήμα 28 παρουσιάζει ParaT και CD3 διπλά χρωματισμένους ιστούς λεμφαδένων και σπλήνας. Η έκφραση της ParaT βρέθηκε ότι ταιριάζει με την έκφραση του δείκτη κυττάρων T CD3 στη λύμφη (α-δ) και τη σπλήνα (ε-η). Οι περιοχές και τα κύτταρα που δε βάφονται με CD3 δε βάφονται από αντισώματα ParaT, π.χ. η περιοχή του μανδύα του GC στους λεμφαδένες (Σχήμα 28α και β, M). Επιπλέον, τα κύτταρα μέσα στο GC και στη ζώνη T παρουσιάζουν συνέκφραση της ParaT και του CD3 (Σχήμα 28γ και δ, αντίστοιχα, κεφαλές βελών). Αυτά τα σημαντικά συμπεράσματα ταιριάζουν με τα στοιχεία που αποκτήθηκαν με το διπλά χρωσμένο ParaT/CD3 ιστό σπλήνας. Όπως ήταν αναμενόμενο, τα κύτταρα που βρίσκονται στο PALS είναι χρωσμένα με δείκτη λεμφοκυττάρων T CD3 (Σχήμα 28ε και η, κόκκινη χρωστική ουσία), μια χρώση που είναι πολύ παρόμοια με αυτή που παρατηρείται με τα αντισώματα της ParaT (Σχήμα 27). Επιπλέον και σε συμφωνία με τις παρατηρήσεις στους λεμφαδένες, τα κύτταρα που εκφράζουν CD3 έχουν έκφραση της ParaT (Σχήμα 28ζ και η, καφέ χρωστική ουσία, κεφαλές βελών). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η χρώση της ParaT στον ιστό λεμφαδένων και σπληνών συσχετίζεται με την έκφραση του δείκτη των T λεμφοκυττάρων.

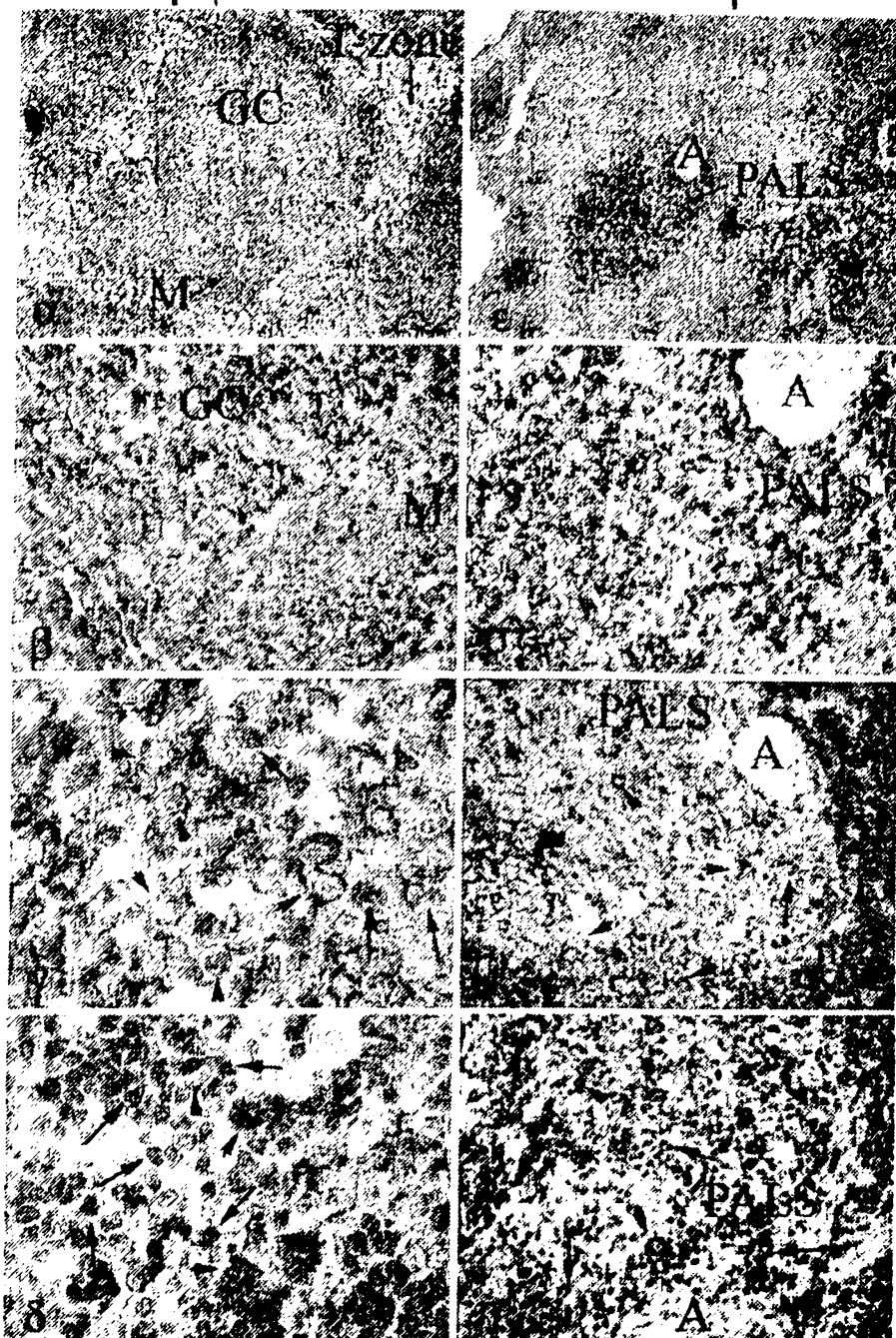
Εκτός από τη διπλή χρώση ParaT/CD3, εκτελέσαμε σε αυτούς τους ιστούς πειράματα διπλής χρώσης με ParaT και το δείκτη λεμφοκυττάρων B CD20. Όπως αναμενόταν, τα CD20 κύτταρα στο λεμφαδένα (Σχήμα 28α-δ, κόκκινη χρωστική ουσία) βρίσκονται κατά προτίμηση στην περιοχή του GC και του μανδύα (GC και M, αντίστοιχα) κι ένας μικρότερος αριθμός στη ζώνη T (Σχήμα 29α). Επιπλέον και πιο σημαντικό, κύτταρα που παρουσιάζουν χρώση CD20 δεν εκφράζουν ParaT (Σχήμα 29γ και δ, κεφαλές βελών). Αντίθετα, κύτταρα που εκφράζουν ParaT δεν εκφράζουν CD20 (Σχήμα 29γ και δ, βέλη). Μια παρόμοια εικόνα λήφθηκε όταν ο ιστός σπλήνας βάφτηκε διπλά πρώτα με ParaT κι έπειτα με αντισώματα CD20 (Σχήμα 29ε-η). Η ParaT εκφράζεται σε μια διαφορετική περιοχή της άσπρης περιοχής πολφού από το B δείκτη





Σχήμα 28: Η έκφραση ParaT στους λεμφαδένες και τη σπλήνα έχει σχέση με έκφραση της CD3.

Οι εικόνες α-δ δείχνουν λεμφαδένια διπλής χρώσης ParaT/CD3, οι εικόνες ε-η δείχνουν σπλήνας διπλής χρώσης. Τα κύτταρα που εκφράζουν ParaT (καφετιά χρωστική) παρουσιάζουν έκφραση CD3 στην περιοχή GC (γ) και στη ζώνη T (δ, T-zone, κέ χρωστική ουσία, κεφαλές βελών). Ένα παρόμοιο σχέδιο συνέκφρασης ParaT παρατηρείται στη σπλήνα (ζ και η, κεφαλές βελών). Όλα τα δείγματα υπέστη επεξεργασία με διάλυμα αιματοξυλίνης. (α και ε: μεγέθυνση x100. β και στ: μεγέθυνση γ, δ, ζ, η: μεγέθυνση x1000).



Η ParaT δεν εκφράζεται σε λεμφοκύτταρα Β που εκφράζουν CD20.

α-δ δείχνουν λεμφοδενά διπλής χρώσης ParaT/CD20, οι εικόνες ε-η δείχνουν ιστό χωρίς χρώση. Στο λεμφοδένεα τα κύτταρα που εκφράζουν ParaT (καφετιά χρώση) δεν παρουσιάζουν έκφραση CD20 στο GC (γ, βέλη) και τα κύτταρα που εκφράζουν CD20 (κόκκινη χρωστική ουσία) δεν είναι βαμμένα με αντισώματα εναντίον της ParaT (κεφαλές βελών). Το ίδιο σχέδιο χρώσης βρίσκεται στη ζώνη T (δ, T-zone, τα βέλη δείχνουν χρώση αντισωμάτων εναντίον της ParaT και οι κεφαλές βελών δείχνουν χρώση αντισωμάτων εναντίον του CD20). Το ίδιο σχέδιο χρώσης ParaT/CD20 παρατηρείται στη ζώνη PALS η χρώση αντισωμάτων εναντίον της ParaT (καφετιά χρωστική ουσία) δεν έχει σχέση με την χρώση CD20 (κόκκινη χρωστική ουσία, ζ και η, κεφαλές βελών). Τα δείγματα υπέστησαν επεξεργασία με διάλυμα αιματοξυλίνης. (α, ε: μεγέθυνση x400. γ, δ: μεγέθυνση x1000).

λεμφοκυττάρων CD20. Σύμφωνα με την παρατήρηση της διπλής χρώσης ParaT/CD20 στους λεμφαδένες, τα κύτταρα που εκφράζουν CD20 δεν παρουσιάζουν χρώση ParaT (Σχήμα 29ζ και η, κεφαλές βελών) κι αντίθετα, τα κύτταρα που εκφράζουν ParaT δεν παρουσιάζουν έκφραση της CD20 (βέλη). Λαμβάνοντας υπ'όψιν όλα αυτά τα στοιχεία, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι τα T-λεμφοκύτταρα στους λεμφαδένες και στη σπλήνα παρουσιάζουν μια έκφραση της ParaT. Μια τέτοια έκφραση είναι απύσχα στα λεμφοκύτταρα B, πράγμα που εμπλέκει αυτήν τη μικρή όξινη πρωτεΐνη στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων των T-λεμφοκυττάρων.

3.10.3. Η έκφραση της ParaT βρίσκεται κατά προτίμηση στα CD4⁺ βοηθητικά κι όχι στα CD8⁺ κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα

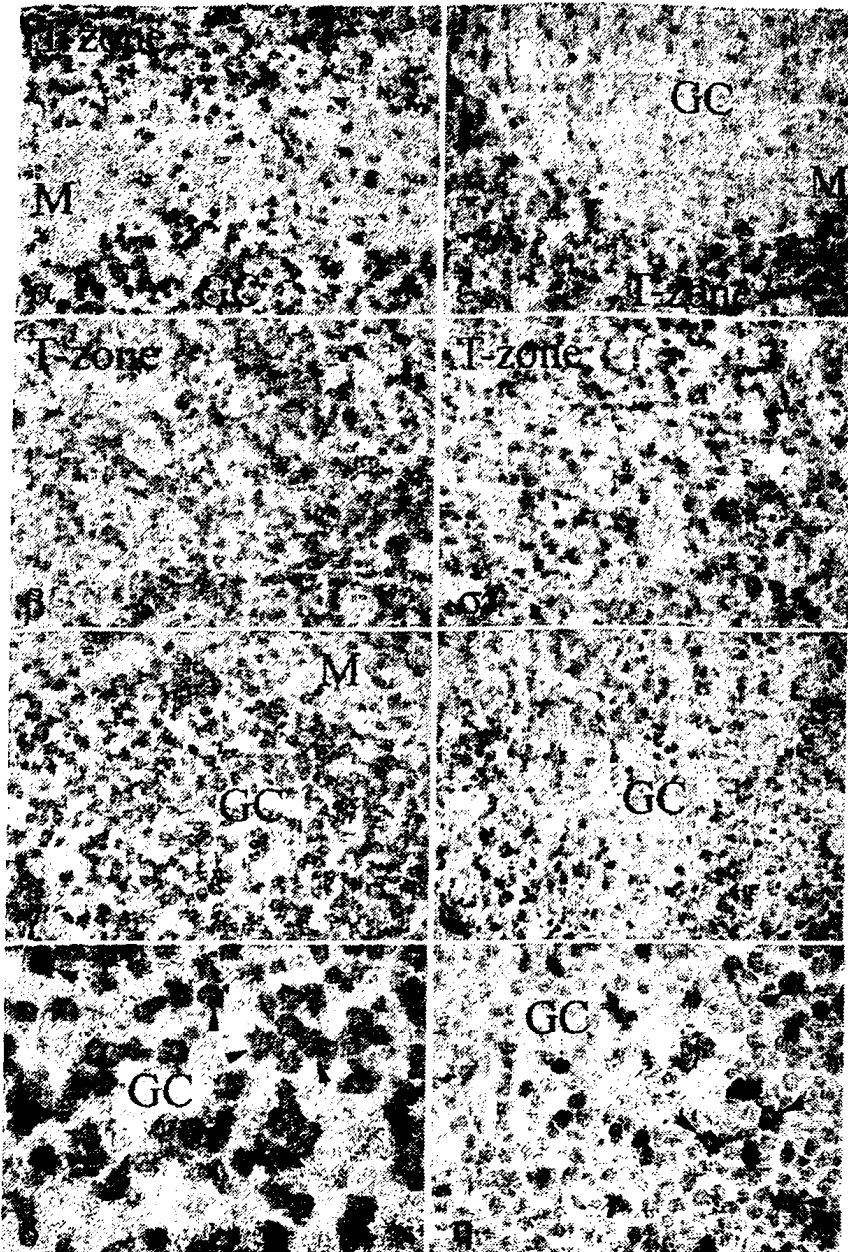
Τα T-λεμφοκύτταρα αναπτύσσονται στο θύμο αδένα από CD4⁺CD8⁻ (DN) είτε σε βοηθητικά CD4⁺ είτε σε CD8⁺ κυτταροτοξικά θετικά κύτταρα (SP) T (Germain, 2002). Προκειμένου να ελέγξουμε την έκφραση της ParaT στους ανωτέρω υποπληθυσμούς των T-λεμφοκυττάρων, διεξήγαμε ανοσοϊστοχημικές μελέτες με ParaT κι αντισώματα είτε CD4 ή CD8 στους ιστούς των λεμφαδένων και της σπλήνας. Το Σχήμα 30 α-δ κι ε-η παρουσιάζει διπλά χρωσμένους λεμφαδένες ParaT/CD4 και ParaT/CD8, αντίστοιχα. Έκφραση της ParaT παρατηρείται σχεδόν σε όλα τα CD4-θετικά κύτταρα στο GC (Σχήμα 30δ, κεφαλές βελών) καθώς επίσης και στα περισσότερα CD4-θετικά κύτταρα της ζώνης T (Σχήμα 30β). Εντούτοις, υπάρχουν θετικά κύτταρα ParaT στη ζώνη T που δεν συνεκφράζουν CD4. Αντίθετα, διπλά χρωσμένοι ιστοί με ParaT και CD8 αποκαλύπτουν έναν αρνητικό συσχετισμό έκφρασης. Τα κύτταρα που βάφτηκαν με το δείκτη CD8 στο GC και στη ζώνη T δεν παρουσιάζουν πρόσθετη χρώση ParaT (Σχήμα 30η, κεφαλές βελών). Όπως παρατηρήθηκε με το δείκτη CD4 στα κύτταρα της ζώνης T, μερικά κύτταρα που εκφράζουν ParaT, όμως, παρουσιάζουν συνέκφραση της CD8 (Σχήμα 30η, βέλη). Η πλειοψηφία των κυττάρων και στις δυο περιοχές που εκφράζουν ParaT, ωστόσο, δεν παρουσιάζει έκφραση του δείκτη CD. Τα συμπεράσματα υποδηλώνουν ότι η έκφραση της ParaT μπορεί να σχετίζεται με την έκφραση του δείκτη CD4 κι όχι του CD8.



Λεμφαδενα

ParaT/CD4

ParaT/CD8



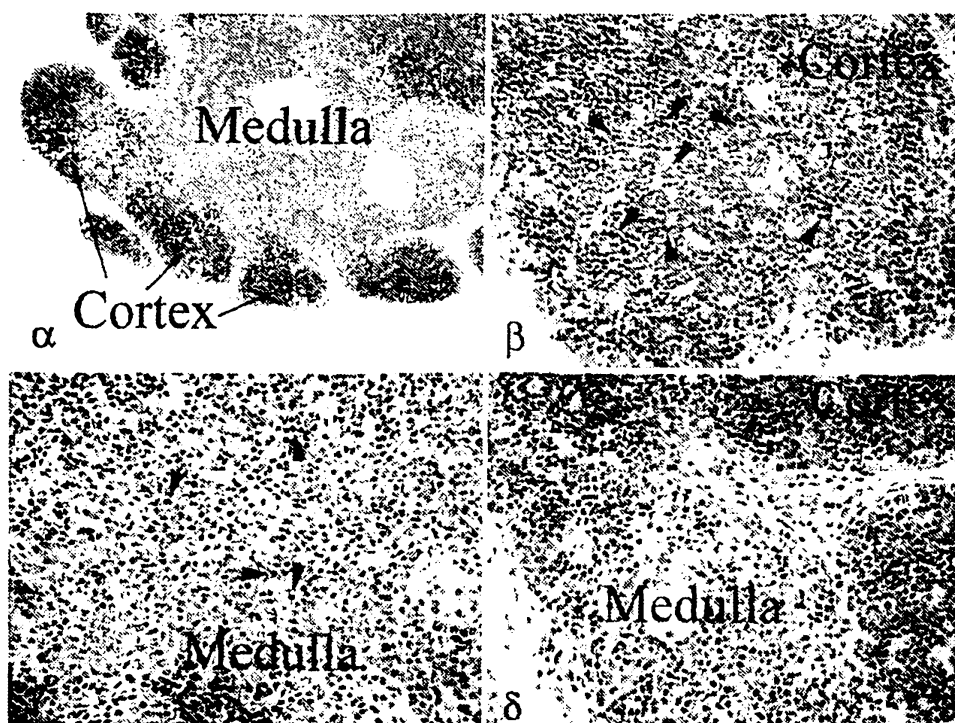
Η έκφραση της ParaT έχει σχέση με την έκφραση του CD4 κι όχι του CD8 στα κύτταρα T.

Σε βάφτηκε διπλά με αντισώματα εναντίον της ParaT κι εναντίον του CD4 (α-δ) ή του CD8 (ε-η). Η μεγάλη πλειοψηφία των κυττάρων στη ζώνη T (T-zone) που είναι ParaT (καφετιά χρωστική ουσία) παρουσιάζει χρώση CD4 (β, κόκκινη χρωστική) κι όχι CD8 (στ, κόκκινη χρωστική ουσία). Επιπλέον, σχεδόν όλα τα κύτταρα T στο φράζον το δείκτη CD4 συνεκφράζουν ParaT (α και δ, κεφαλές βελών), ένας που δεν μπορεί να βρεθεί με τα κύτταρα T που εκφράζουν το δείκτη CD8 (ζ και η, κεφαλές βελών). Όλα τα δείγματα υπέστησαν επεξεργασία με διάλυμα αιματοξυλίνης λε πυρήνων). (α-γ, ε-ζ: μεγέθυνση x400. δ και η: μεγέθυνση x1000).



3.10.4. Έκφραση της ParaT στο θύμο αδέν

Στη συνέχεια έγινε χρώση θύμου αδέν με αντισώματα εναντίον της ParaT κι ελέγξαμε την έκφραση της πρωτεΐνης στις διαφορετικές περιοχές του οργάνου αυτού. Ελπίζαμε να βρούμε ενδείξεις για μια διαφορετική έκφραση της ParaT στα κύτταρα του θύμου αδέν. Το Σχήμα 31 παρουσιάζει τα διαφορετικά μέρη του θύμου αδέν, απεικονίζοντας την πυκνότερη φλοιώδη περιοχή και τη λιγότερο πυκνή ζώνη μυελού (Σχήμα 31α). Η ParaT (καφέ χρωστική ουσία) βρίσκεται σχεδόν αποκλειστικά στον πυρήνα των κυττάρων και στις δυο περιοχές (β και γ, κεφαλές βελών). Στο θύμο αδέν εμφανίζεται θετική κι αρνητική επιλογή σε λειτουργικά διαφοροποιημένα θετικά CD4 ή CD8 T κύτταρα. Η φλοιώδης περιοχή περιέχει κυρίως ανώριμα λεμφοκύτταρα με επιθηλιακά και δενδριτικά κύτταρα διασκορπισμένα στο χώρο.



Σχήμα 31: Έκφραση της ParaT στο θύμο αδέν.

Έκφραση της ParaT (καφετιά χρωστική ουσία) βρίσκεται σε περίπου 70% των κυττάρων στις πυκνά πακεταρισμένες φλοιώδεις περιοχές (β, Cortex, κεφαλές βελών). α: δείχνει μια επισκόπηση της χρώσης του θύμου αδέν με αντισώματα εναντίον της ParaT (μεγέθυνση x100). β-δ: δείχνουν πιο λεπτομερώς την χρώση της ParaT στις περιοχές του θύμου αδέν (μεγέθυνση x400). Η μυελώδης ζώνη (Medulla) παρουσιάζει ένα πολύ μικρότερο ποσό κυττάρων (περίπου 40% και λιγότερα) με έκφραση της ParaT (γ, κεφαλές βελών). Το δείγμα υπέστη επεξεργασία με διάλυμα αιματοξυλίνης (μπλε χρώση πυρήνων).



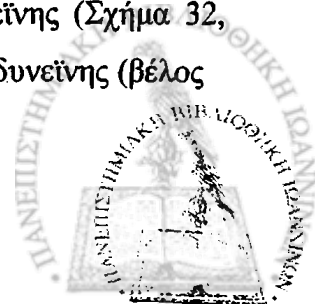
Η μυελώδης ζώνη, ως αποτέλεσμα της διαδικασίας ωρίμανσης και διήθησης, περιέχει λιγότερα λεμφοκύτταρα. Περίπου 70% των κυττάρων που βρίσκονται στη φλοιώδη περιοχή παρουσιάζουν ευδιάκριτη έκφραση της ParaT (Σχήμα 31β), ενώ μόνο περίπου 40% των κυττάρων στη μυελώδη ζώνη έχουν χρώση ParaT (Σχήμα 31γ και δ). Η έκφραση της ParaT που παρατηρείται στο θύμο αδένα υποδηλώνει ότι όλα τα διπλά-αρνητικά T κύτταρα που εισάγονται στο όργανο εκφράζουν ParaT. Μετά όμως από τη διαφοροποίησή τους είτε σε βοηθητικά $CD4^+$ είτε σε $CD8^+$ κυτταροτοξικά κύτταρα T, το $CD8$ -θετικό υποσύνολο καταστέλλει την έκφραση αυτού του πολυπεπτιδίου (κεφάλαιο 3.10.3).

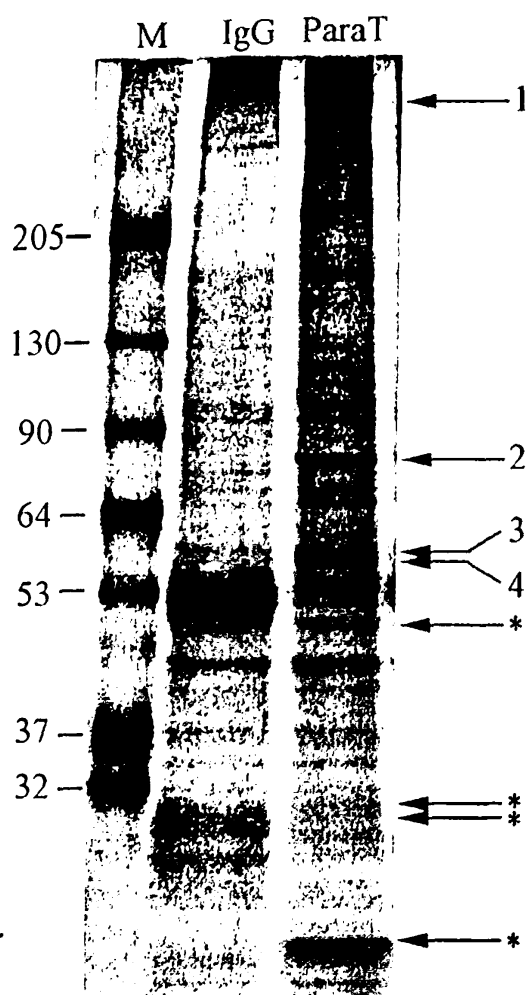
3.11. Προκαταρκτικά πειράματα

3.11.1. Προσδιορισμός των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την ParaT

Σε αναζήτηση των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την ParaT, εκτελέσαμε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης (IP) σε εκχύλισμα κυττάρων HeLa χρησιμοποιώντας αντισώματα εναντίον της ParaT. Αντίσωμα εναντίον της ParaT επώαστηκε με εκχύλισμα HeLa προεπωασμένο με IgG και το σύμπλοκο αναλύθηκε με SDS-PAGE (γραμμική κλίση 6%-15%) και χρώση με νιτρικό άργυρο. Τέσσερις κύριες (Σχήμα 32, βέλη 1-4) και τέσσερις λιγότερο χαρακτηριστικές πρωτεϊνικές ζώνες (βέλη με αστερίσκο) ήταν ορατές στην ανοσοκατακρήμνιση της ParaT (ParaT), οι οποίες δεν ήταν παρούσες στο IgG-ανοσοκατακρημνισμένο δείγμα ελέγχου με IgG. Οι τέσσερις κύριες πρωτεΐνες έτρεχαν σε περίπου 250-300 kDa, 75-80 kDa και 53-60 kDa. Για να ελέγξουμε την ειδικότητα της ανοσοκατακρήμνισης, προσπαθήσαμε να εμποδίσουμε το σχηματισμό του συμπλόκου με την προσθήκη του αντιγονικού πεπτιδίου (αμινοξέα 5-30) στο εκχύλισμα κυττάρων πριν από την προσθήκη του αντισώματος. Πράγματι, κατά την προσθήκη του πεπτιδίου στο εκχύλισμα, οι τέσσερις κύριες ζώνες στο ανοσοσύμπλοκο μειώθηκαν σημαντικά.

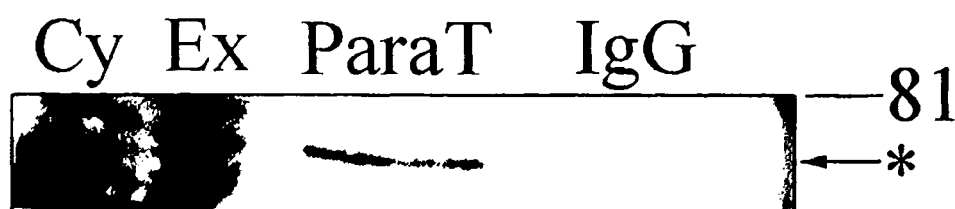
Για να πάρουμε πληροφορίες για την ταυτότητα αυτών των πρωτεϊνών, αποκόψαμε τις ζώνες από την πηκτή για ανάλυση MS. Οι ανοσοκατακρημνισμένες πρωτεΐνες αναγνωρίστηκαν ως εξής: η πρωτεΐνη υψηλού μοριακού βάρους που τρέχει σε περίπου 250 kDa ως η βαριά αλυσίδα της κυτταροπλασματικής δυνεΐνης (Σχήμα 32, βέλος 1), η 75 kDa ως η ενδιάμεση αλυσίδα 2 της κυτταροπλασματικής δυνεΐνης (βέλος





Σχήμα 32: Ανοσοκατακρήμνιση

Εκτελέσθηκε ανοσοκατακρήμνιση με ολόκληρα εκχυλίσματα κυττάρων HeLa που προκαθαρίστηκαν με αντισώματα IgG. Έγινε ολονύκτια επώαση αντισωμάτων εναντίον της ParaT κι εναντίον του IgG ελέγχου με επώαση με περιστροφή στους 4°C. Άνοσα σύμπλοκα ανακτήθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα χαμηλού pH, διαχωρίστηκαν με 15% SDS-PAGE και το πήκτωμα βάφτηκε με silver. Οι αριθμοί στα αριστερά αντιπροσωπεύουν τους πρωτεϊνικούς δείκτες σε kDa. Οι αριθμοί στα δεξιά αντιπροσωπεύουν τέσσερις πρωτεϊνικές ζώνες που είχαν υποβληθεί σε ανάλυση MS. Αυτές οι πρωτεΐνες αναγνωρίστηκαν ως εξής: (1) Βαριά Αλυσίδα Κυτταροπλασματικής Δυνεΐνης (2) Μέση Αλυσίδα Κυτταροπλασματικής Δυνεΐνης (3) Πυρουβατική κινάση (M1 Ισοένζυμο) (4) Ελαφριά Μέση Αλυσίδα Κυτταροπλασματικής Δυνεΐνης. Τα βέλη που σημειώνονται με αστερίσκο δείχνουν προς τις πρωτεΐνες των οποίων δεν προσδιορίστηκε η αλληλουχία για τεχνικούς λόγους.



Σχήμα 33: Αποτύπωση κατά Western του ParaT-IP αποκαλύπτει την ενδιάμεση αλυσίδα κυτταροπλασματικής δυνεΐνης 70,1 kDa.

Αποτύπωση κατά Western κυτταροπλασματικού εκχυλίσματος (Cy), εκχυλίσματος ολόκληρων κυττάρων (Ex), ανοσο-ιζημάτων ParaT και IgG (ParaT και IgG, αντίστοιχα) με ένα αντίσωμα κατά της ενδιάμεσης αλυσίδας της κυτταροπλασματικής δυνεΐνης 70,1 kDa. Ο αριθμός στα δεξιά αντιπροσωπεύει το δείκτη σχετικού μοριακού βάρους σε kDa. Ο αστερίσκος δείχνει προς την ενδιάμεση αλυσίδα 70,1 kDa.

2), η 55-60 kDa ως πυρριβική κινάση (M1 ισοένζυμο, βέλος 3) και η χαμηλότερου μοριακού βάρους πρωτεϊνική ζώνη ως η ελαφριά ενδιάμεση αλυσίδα 1 της κυτταροπλασματικής δυνεΐνης (βέλη 4). Οι επιπλέον πρωτεΐνες στο ανοσο-ίζημα (βέλη με αστερίσκο) δε χαρακτηρίστηκαν για τεχνικούς λόγους. Η ταυτότητα της ζώνης 70,1 kDa ως ενδιάμεσης αλυσίδας της κυτταροπλασματικής δυνεΐνης επιβεβαιώθηκε με αποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας ένα μονοκλωνικό αντίσωμα σε αυτήν την υπομονάδα δυνεΐνης (Σχήμα 33).

Για να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματα της ανοσοκατακρήμνισης, ελέγξαμε αν το αντίσωμα εναντίον της ParaT παρουσιάζει μη ειδική αντίδραση με την κυτταροπλασματική δυνεΐνη. Η ανάλυση αποτύπωσης κατά Western στα εκχυλίσματα HeLa ή στο κυτταρόπλασμα του εγκεφάλου αρουραίων έδειξε ότι το αντίσωμα εναντίον της ParaT δεν αντιδρά με καμιά από τις αλυσίδες της κυτταροπλασματικής δυνεΐνης.

Επομένως, προχωρήσαμε με την περαιτέρω ανάλυση της υποθετικής αλληλεπίδρασης της ParaT και της κυτταροπλασματικής δυνεΐνης με μια σειρά πειραμάτων:

α) Far-Western αναλύσεις με ParaT ή βιοτινιλυόμενη ParaT χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το ανοσοκατακρημνισμένο υλικό.

β) πειράματα GST-pull down με GST-ParaT σε εκχυλίσματα κυττάρων HeLa ή σε εκχυλίσματα από εγκέφαλο αρουραίων (εμπλουτισμένα σε κυτταροπλασματική δυνεΐνη).

γ) Χρωματογραφία συγγένειας με εκχυλίσματα κυττάρων HeLa ή κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα εγκεφάλου αρουραίων χρησιμοποιώντας στήλες που περιέχουν ομοιοπολικά συνδεδεμένη ParaT ή BSA για αρνητικό μάρτυρα.

δ) Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης σε εκχυλίσματα κυττάρων HeLa που διαμολύνθηκαν με pFlag-ParaT ή ParaT-Myc με αντισώματα εναντίον του Flag ή του Myc, αντίστοιχα.

ε) Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης σε εκχυλίσματα κυττάρων HeLa κι εκχυλίσματα εγκεφάλου αρουραίων χρησιμοποιώντας το αντίσωμα 70,1 kDa έναντι της ενδιάμεσης αλυσίδας της κυτταροπλασματικής δυνεΐνης.



Εντούτοις, όλες οι προσπάθειες να ανιχνευθεί κυτταροπλασματική δυνεΐνη στα δείγματα ParaT (κι αντίστροφα) απέτυχαν. Επομένως, παραμένει ασαφές αν η κυτταροπλασματική δυνεΐνη είναι πράγματι συνεργάτης της ParaT.

3.11.2. Μείωση της έκφρασης της ParaT στα κύτταρα HeLa

Σε μια άλλη προσπάθεια να διερευνήσουμε περαιτέρω τη φυσιολογική λειτουργία της ParaT *in vivo*, προσπαθήσαμε να μειώσουμε την έκφραση της ParaT χρησιμοποιώντας RNAi. Το RNAi είναι ένα πρόσφατα ανακαλυφθέν ισχυρό εργαλείο για τη μελέτη της λειτουργίας των πρωτεϊνών στο κύτταρο. Βασίζεται στην παρεμπόδιση της πρωτεϊνικής έκφρασης με τη στόχευση για καταστροφή του αντίστοιχου mRNA (Dykxhoorn *et al.*, 2003; Hutvagner and Zamore, 2002; Matzke and Birchler, 2005). Με αυτόν το σκοπό, συνδιαμολύναμε προσωρινά τα κύτταρα HeLa με pRNAi-ParaT και pEGFP-C1 (1/5 του συνολικού DNA) χρησιμοποιώντας τη μέθοδο φωσφορικού άλατος ασβεστίου και 36 ή 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση, τα κύτταρα καθορίστηκαν, διαπερατώθηκαν κι επώαστηκαν με το αντίσωμα εναντίον της ParaT. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η εισαγωγή του πλασμιδίου στα κύτταρα δεν οδήγησε σε απώλεια έκφρασης της ParaT, δείχνοντας ότι η αμινοξική αλληλουχία που επιλέχτηκε για την κατασκευή pRNAi-ParaT δεν οδηγούσε το mRNA της ParaT σε καταστροφή. Σε μελλοντικές μελέτες, πρέπει να ελεγχθούν άλλες κατασκευές για την επιτυχή παρεμπόδιση της έκφρασης της ParaT κι επομένως παραμένει ασαφές ποιόν φαινότυπο έχουν τα κύτταρα που δεν εκφράζουν ParaT.



10

100

10

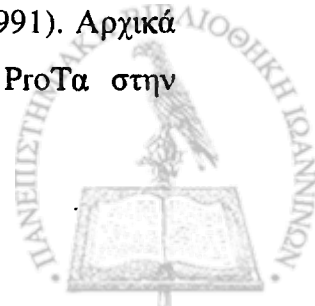


4. Συζήτηση

Το DNA των ευκαριωτικών κυττάρων οργανώνεται στα νουκλεοσώματα, τη θεμελιώδη μονάδα της χρωματίνης. Η χρωματίνη είναι το δομικό σύμπλοκο DNA-πρωτεΐνης το οποίο συμπυκνώνει το γενετικό υλικό ενός κυττάρου ώστε να χωρέσουν 2 m DNA σε ένα φυσιολογικό ευκαριωτικό πυρήνα με αναλογία συμπύκνωσης μεγαλύτερη από 100 000. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι οι παράγοντες που εμπλέκονται σε διαδικασίες που απαιτούν πρόσβαση στο DNA χρειάζεται να αποσυμπυκνώνουν τη δομή της χρωματίνης. Παραδείγματος χάριν, όταν οι πρωτεΐνες VP16-lac συνδέθηκαν σε χρωμοσωμικές περιοχές που περιείχαν επαναλήψεις του χειριστή της λακτόζης (lac operator repeats), προκλήθηκε αναδιαμόρφωση της χρωματίνης σε μεγάλη κλίμακα, που συνοδεύθηκε από αυξανόμενη μεταγραφή και υπερακετυλίωση ιστονών μέσω της όξινης περιοχής ενεργοποίησης VP16 (Tumbar *et al.*, 1999). Σε μια άλλη κυτταρική σειρά, η οποία περιέχει επαναλήψεις του υποκινητή MMTV, η αποσυμπύκνωση κι επανασυμπύκνωση της χρωματίνης βρέθηκε να ρυθμίζεται από τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR receptor)(Muller *et al.*, 2001).

Είναι ενδιαφέρον ότι οι πρωτεΐνες που περιέχουν μακρές πολυγλουταμικές περιοχές στην αμινοξική τους αλληλουχία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης. Παραδείγματος χάριν, η νουκλεοπλασμίνη εμπλέκεται στη οργάνωση των νουκλεοσωμάτων κατά τη διάρκεια της γονιμοποίησης και της πρώιμης εμβρυογένεσης (Laskey *et al.*, 1978), ενώ εμπλέκεται και στη μεταγραφική ενεργοποίηση (Chen *et al.*, 1994). Η προθυμοσίνη άλφα (ProTa), μια πυρηνική πρωτεΐνη που περιέχει περίπου 50% όξινα αμινοξέα στην πρωτεϊνική της αλληλουχία i) συνδέεται με την ιστόνη H1, ii) προκαλεί αποσυμπύκνωση της χρωματίνης iii) συνδέεται με τον μεταγραφικό συνενεργοποιητή CREB-συνδετική πρωτεΐνη (CBP) κι επάγει τη μεταγραφή (Karetsou *et al.*, 2002; Karetsou *et al.*, 2004; Karetsou *et al.*, 1998). Επομένως, οι πρωτεΐνες που περιέχουν ανιονικές περιοχές αποδεικνύεται ότι έχουν λειτουργίες σχετικές με την οργάνωση της χρωματίνης.

Η ParaT είναι μια μικρή, όξινη πρωτεΐνη (Haritos *et al.*, 1985) που εκφράζεται σε διάφορα κύτταρα και ιστούς (Brand and Heinickel, 1991; Clinton *et al.*, 1991). Αρχικά χαρακτηρίστηκε ως πεπτίδιο που μπορεί να ρυθμίζει τη δράση της ProTa στην



προστασία των ευαίσθητων στελεχών ποντικών από τυχαίες μολύνσεις με *Candida Albicans* (Haritos *et al.*, 1985). Επόμενες μελέτες έδειξαν μια ισχυρή ανασταλτική επίδραση αυτής της πρωτεΐνης στα ένζυμα της γλυκόλυσης (Brand and Heinickel, 1991; Brand and Soling, 1986).

Αρχικές μελέτες έδειξαν ότι η πρωτεΐνη εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα των περισσότερων κυτταρικών τύπων καθώς επίσης και στον πυρήνα των δωδεκαδακτυλικών και νηστιδικών κυττάρων crypt (Brand and Heinickel, 1991). Ο Watts και οι συνάδελφοί του (Watts *et al.*, 1990) έδειξαν ότι το πεπτίδιο εντοπίζεται στον πυρήνα όταν εγχύθηκε η πρωτεΐνη με μικροενέσεις στα ωκύτταρα *Xenopus*. Επίσης, ο Soling και η ομάδα του προσδιόρισαν ένα διμερές πυρηνικό σήμα εντοπισμού που είναι υπεύθυνο για αυτήν τη μεταφορά (Trompeter *et al.*, 1996). Επίσης βρέθηκε ότι η πυρηνική/κυτταροπλασματική κατανομή της ParaT εξαρτάται από την πυκνότητα και τον πολλαπλασιασμό/διαφοροποίηση των κυττάρων (Trompeter *et al.*, 1999).

Πιο πρόσφατα, η ParaT βρέθηκε ότι εντοπίζεται σε περιοχές πρώιμης αντιγραφής στον πυρήνα (Vareli *et al.*, 2000) κι αναστέλλει τη σύνδεση του ενεργοποιημένου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών σε πυρήνες ή DNA *in vitro* (Okamoto and Isohashi, 2000). Επιπλέον, η λειτουργία της πρωτεΐνης συνδέθηκε με τη δομή της χρωματίνης όταν ανιχνεύθηκε η αλληλεπίδραση της με τη συνδετική ιστόνη H1 *in vitro* και *in vivo* (Kondili *et al.*, 1996). Η εργασία αυτή έδειξε ότι η όξινη περιοχή της ParaT ήταν υπεύθυνη για τη σύνδεση με την ιστόνη H1 και πρότεινε ότι αυτή η αλληλεπίδραση μπορεί να επηρεάζει τη λειτουργία της συνδετικής ιστόνης και γενικότερα τη δομή της χρωματίνης.

4.1. Η ParaT συνδέεται με την H1 κι αλλάζει τη συγγένεια της συνδετικής ιστόνης για τα νουκλεοσώματα

Στην παρούσα εργασία, μελετήσαμε την επίδραση της ParaT στην αλληλεπίδραση της ιστόνης H1 με τη χρωματίνη χρησιμοποιώντας ένα σύστημα ανασυγκρότησης της χρωματίνης σε DNA ακινητοποιημένο σε μαγνητικά σφαιρίδια (Sandaltzopoulos *et al.*, 1994). Αυτό το σύστημα της χρωματίνης μπορεί να οργανώσει νουκλεοσώματα με ή χωρίς την H1 σε DNA που συνδέεται στα παραμαγνητικά



σφαιρίδια και προσφέρει την ευκαιρία να μελετηθεί η αλληλεπίδραση της H1 με τα νουκλεοσώματα υπό διαφορετικές συνθήκες και παρουσία διαφόρων παραγόντων (Sandaltzopoulos *et al.*, 1994). Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η ParaT ανέστειλε τη σύνδεση της H1 με τη χρωματίνη. Επιπλέον, η παρουσία αυτής της όξινης πρωτεΐνης κατά τη διάρκεια της οργάνωσης της χρωματίνης είχε σαν αποτέλεσμα τη συγκρότηση χρωματίνης με μειωμένη νουκλεοσωμική απόσταση (NRL). Επιπλέον, μελέτες φασματοσκοπίας κυκλικού διχροϊσμού και φθορομετρικές μελέτες έδειξαν αλλαγές στη διαμόρφωση της δομής της H1 κατά τη σύνδεση της ParaT.

Αν θέλει κανείς να ερμηνεύσει αυτά τα αποτελέσματα, είναι σημαντικό να λάβει υπόψιν το τρόπο σύνδεσης της H1 με τη χρωματίνη και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της αμινοξικής αλληλουχίας της ParaT. Η αλληλεπίδραση της H1 με τη χρωματίνη είναι δυναμική και διαμεσολαβείται από την κεντρική σφαιρική περιοχή (Goytisolo *et al.*, 1996) κι από την καρβοξυτελική ουρά της H1 (Hendzel *et al.*, 2004; Lu and Hansen, 2004). Η σφαιρική περιοχή της H1 συνδέεται κατά προτίμηση στις διασταυρώσεις των διπλών αλυσίδων στο υπερελικόμενο DNA (Varga-Weisz, 1994), περιέχει δυο περιοχές σύνδεσης για DNA (Goytisolo *et al.*, 1996) και προστατεύει επιπλέον 20bp από πέψη μικροκοκκικής νουκλεάσης (An *et al.*, 1998; van Holde and Zlatanova, 1996). Η βασική καρβοξυτελική περιοχή της H1 υιοθετεί μια δευτεροταγή α-ελικοειδή δομή κατά τη σύνδεσή της με το DNA (Lu and Hansen, 2004) κι έχει χαρακτηριστεί ως ο καθοριστικός παράγοντας της σύνδεσης της H1 με τη χρωματίνη *in vitro* (Allan *et al.*, 1980; Lu and Hansen, 2004) και *in vivo* (Hendzel *et al.*, 2004). Σύμφωνα με νεότερες μελέτες έχει προταθεί ότι η σφαιρική περιοχή αγκυροβολεί την H1 στο νουκλεοσωμικό DNA, ενώ η σύνδεση της καρβοξυτελικής ουράς επάγει τη συμπύκνωση της χρωματίνης. Επομένως, σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας είναι δυνατόν η σύνδεση της ParaT στη σφαιρική περιοχή της H1 να έχει τέτοιες επιπτώσεις στη συνδετική ιστόνη ώστε η συγγένεια σύνδεσης της H1 για τη χρωματίνη να αλλάζει. Τα αποτελέσματα που βασίζονται σε CD δείχνουν την ύπαρξη υψηλότερου ποσοστού δευτεροταγούς δομής όταν αναμιγνύονται οι δυο πρωτεΐνες, ενώ τα αποτελέσματα των πειραμάτων φθορισμού επιβεβαιώνουν το γεγονός ότι η διαμόρφωση της H1 επηρεάζεται από την αλληλεπίδραση των δυο πρωτεϊνών. Επίσης, η ParaT παρουσιάζει όλα τα χαρακτηριστικά των "natively disordered" πρωτεϊνών (Dunker *et al.*, 2001), οι οποίες έχουν δομική πλαστικότητα



μπορούν να πάρουν διαφορετικές δομές κατά τη σύνδεση τους με συγκεκριμένες πρωτεΐνες, είναι ιδιαίτερα πολικές, παρουσιάζοντας χαμηλή δομική πολυπλοκότητα σε ουδέτερο pH; αναδιπλώνονται μερικώς σε χαμηλό pH, ενδεχομένως λόγω της μείωσης του φορτίου και της ελαχιστοποίησης των αλληλεπιδράσεων φορτίου/φορτίου σε όξινες συνθήκες. Τα ιδιαίτερα αυτά χαρακτηριστικά της ParaT υποδεικνύουν την πιθανότητα να εμπλέκεται σε ιδιαίτερα δυναμικές αλληλεπιδράσεις.

Μια τέτοια δυναμική αλληλεπίδραση μπορεί να μην είναι ανιχνεύσιμη με το πειραματικό σύστημά μας, πράγμα που δίνει μια πιθανή εξήγηση στο γεγονός ότι η πρωτεΐνη δεν ανιχνεύθηκε στα σφαιρίδια χρωματίνης. Παρά τη σχετικά μέτρια συγγένεια της αλληλεπίδρασης H1-ParaT (~19 μ M), μια τέτοια σύνδεση μπορεί να συμβαίνει *in vivo* καθώς τέτοιες τιμές δεν είναι ασυνήθιστες για αλληλεπιδράσεις μεταξύ της χρωματίνης και των πυρηνικών πρωτεϊνών (Jacobs *et al.*, 2001; Knapp *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 2002). Παραδείγματος χάριν, η πρωτεΐνη HP1 που σχετίζεται με την ετεροχρωματίνη συνδέεται ειδικά με μεθυλιωμένη λυσίνη 9 (μεθύλιο-K9) στην ιστόνη H3 με ένα K_D περίπου 100 μ M.

Τα αποτελέσματά μας προτείνουν δυο πιθανούς μηχανισμούς δράσης της ParaT. Κατ' αρχάς, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι άλλοι πρόσθετοι παράγοντες μπορεί να εμπλέκονται στη σταθεροποίηση της αλληλεπίδρασής της με την H1 *in vivo*. Δεύτερον, μπορεί η βιολογικά σημαντική αλληλεπίδραση H1-ParaT να συμβαίνει μόνο αν η τοπική συγκέντρωση της ParaT είναι αρκετά υψηλή, το οποίο είναι συμβατό με τον εντοπισμό της ParaT σε συγκεκριμένες υποπυρηνικές περιοχές. Συνολικά, τα στοιχεία μας δείχνουν ότι η αλληλεπίδραση H1-ParaT προκαλεί αλλαγές στη διαμόρφωση της συνδετικής ιστόνης με συνέπεια μια μειωμένη συγγένεια της H1 για το νουκλεόσωμα.

4.2. Η ParaT αποσυμπυκνώνει τη χρωματίνη *in vitro* και *in vivo*

Με βάση το ρόλο της H1 να συμπυκνώνει την χρωματίνη και να επάγει τη δημιουργία δομών χρωματίνης ανώτερης τάξης (van Holde, 1988; Wolffe, 1998; Carruthers *et al.*, 1998) υπάρχουν διάφορες συνέπειες των αλλαγών της στοιχειομετρίας της H1 είτε στο επίπεδο του νουκλεοσώματος είτε συνολικά στο επίπεδο του πυρήνα κυττάρων. Τα πειραματικά μας αποτελέσματα χρησιμοποιώντας χρωματίνη ανθρώπινου



σπέρματος ως *in vitro* πρότυπο σύστημα υποστηρίζουν ένα ρόλο της ParaT στην αποσυμπύκνωση της χρωματίνης. Η χρωματίνη σπέρματος αντιπροσωπεύει ένα φυσιολογικά συμπτυνωμένο πρότυπο χρωματίνης, σε σύγκριση με τα *in vitro* ανασυγκροτημένα πρότυπα χρωματίνης που δε μπορούν να αναπαράγουν δομές χρωματίνης ανώτερης τάξης.

Παλιότερα πειράματα έχουν ερευνήσει λεπτομερώς την αποσυμπύκνωση της χρωματίνης σπέρματος κατά την επώαση με όξινες πρωτεΐνες. Παραδείγματος χάριν, σημαντική διόγκωση των πυρήνων παρατηρήθηκε όταν το σπέρμα επωάσθηκε με τον παράγοντα αποσυμπύκνωσης σπέρματος TAF-Iβ (Matsumoto *et al.*, 1999) ή νουκλεοπλασμίνη, μια ιδιαίτερα όξινη, πρωτεΐνη στα εκχυλίσματα αυγών *Xenopus* (Dingwall *et al.*, 1987). Η TAF-Iβ είναι μια ιδιαίτερα όξινη πρωτεΐνη (pI 4,12) που διευκολύνει την οργάνωση των νουκλεοσωμάτων (Kawase *et al.*, 1996), αναδιαμορφώνει τη δομή της χρωματίνης κι επάγει τη μεταγραφή (Okuwaki and Nagata, 1998). Η νουκλεοπλασμίνη είναι ο βασικός παράγοντας αποσυμπύκνωσης της χρωματίνης σπέρματος κατά τη διάρκεια της γονιμοποίησης (Philpott and Leno, 1992). Αξίζει να αναφέρουμε ότι η ParaT μοιάζει και με τη νουκλεοπλασμίνη και με την TAF-Iβ όσον αφορά στην κεντρική περιοχή της που περιέχει την πολυγλουταμινική αλληλουχία, πράγμα που υποδηλώνει παρόμοιες λειτουργίες αυτών των πρωτεϊνών. Στη μελέτη μας χρησιμοποιήσαμε πυρήνες ανθρώπινου σπέρματος που έχουν στρογγυλή μορφολογία κι επιτρέπουν έναν ακριβή προσδιορισμό του μεγέθους των πυρήνων. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι οι πυρήνες του σπέρματος ήταν ιδιαίτερα αποσυμπυκνωμένοι κατά την επώαση τους με ParaT σε σύγκριση με πυρήνες που είχαν επωασθεί με BSA.

Σύμφωνα με τα *in vitro* στοιχεία, η υπερέκφραση της ParaT στα κύτταρα HeLa οδήγησε επίσης σε μια αύξηση του πυρηνικού μεγέθους σε σύγκριση με τα κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με πλασμίδια μάρτυρες.

Η επίδραση της ParaT στην αποσυμπύκνωση της δομής της χρωματίνης επιβεβαιώθηκε περαιτέρω μετά από πέψη χρωματίνης από κύτταρα HeLa που υπερεξέφραζαν ParaT με μικροκοκκική νουκλεάση (Mnase). Όταν τα κύτταρα αυτά επωάσθηκαν με MNase, το κλάσμα της χρωματίνης που περιείχε την ανθεκτική στη νουκλεάση χρωματίνη εμφανίσθηκε επιδεκτικό στην ενζυματική πέψη, πράγμα που αντανάκλα τη δυνατότητα πρόσβασης της χρωματίνης στην ενζυματική πέψη κι ως εκ



τούτου, την κατάσταση αποσυμπύκνωσης της χρωματίνης.. Αντίθετα, ανάλογη "νουκλεοσωμική σκάλα" ήταν απύουσα στο αντίστοιχο κλάσμα της χρωματίνης που απομονώθηκε από τα κύτταρα μάρτυρες. Αξίζει να σημειώσουμε ότι η ανθεκτική στη νουκλεάση χρωματίνη περιέχει RNA II πολυμεράση (Kreitz *et al.*, 2001; Rose and Garrard, 1984) και σύμπλοκο αναδιαμόρφωσης ανθρώπινης χρωματίνης SW1/SNF (Reyes *et al.*, 1997), ενδεικτικά της ενεργού μεταγραφικά χρωματίνης. Τα συνδυασμένα αυτά στοιχεία δείχνουν μια πιθανή λειτουργία της ParaT στην ενεργό χρωματίνη.

Περίληπτικά, τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στη εργασία αυτή προτείνουν την ParaT ως ένα νέο μέλος της ομάδας πρωτεϊνών που διαμορφώνουν την αλληλεπίδραση της H1 με τη χρωματίνη και ρυθμίζουν τη συμπύκνωση των ινών της χρωματίνης.

4.3. Η ParaT δεν εντοπίζεται σε ετεροχρωματινικές περιοχές

Μελέτες ανοσοφθορισμού με αντισώματα εναντίον της ParaT έδειξαν ότι η πρωτεΐνη αυτή δεν εντοπίζεται στους πυρηνίσκους και σε περιοχές της συμπυκνωμένης χρωματίνης. Είναι ενδιαφέρον ότι η πυρηνική αυτή κατανομή είναι παρόμοια με αυτήν του hSW1/SNF, ενός συμπλόκου που συμμετέχει στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης των γονιδίων (Reyes *et al.*, 1997). Η κατανομή της ParaT σε ευδιάκριτες υποπυρηνικές περιοχές δείχνει ότι η τοπική συγκέντρωση της ParaT είναι σημαντικά υψηλότερη στις συγκεκριμένες χρωματινικές περιοχές. Πρόσφατα στοιχεία έχουν δείξει ότι διάφορες υποπυρηνικές περιοχές περιέχουν παράγοντες που συμμετέχουν στην επεξεργασία και τη μεταγραφή του RNA, ενώ άλλες λειτουργούν ως πλατφόρμες που συγκεντρώνουν παράγοντες που είναι απαραίτητοι στην αντιγραφή ή μεταγραφή (Lamond and Earnshaw, 1998; Spector, 2001; van Driel *et al.*, 1995). Επομένως, η ανίχνευση πρωτεϊνών που εντοπίζονται σε πυρηνικές περιοχές μαζί με την ParaT θα προσφέρει σημαντικές πληροφορίες που θα συμβάλλουν στη διερεύνηση του φυσιολογικού ρόλου αυτού του όξινου πολυπεπτιδίου.

Η αποκατάσταση φθορισμού μετά από τα πειράματα φωτολεύκανσης (FRAP) που πραγματοποιήθηκαν με ParaT συζευγμένη με GFP έδειξε ότι η πρωτεΐνη κινείται πολύ γρήγορα σε όλον τον κυτταρικό πυρήνα. Η γρήγορη κινητικότητα είναι ένα



χαρακτηριστικό γνώρισμα πυρηνικών πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε διάφορες διαδικασίες εξαρτώμενες από τη χρωματίνη. Οι πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μεταγραφική ενεργοποίηση, στην τροποποίηση της δομής της χρωματίνης, στην επιδιόρθωση του DNA, στο μάτισμα κι επεξεργασία του RNA παρουσιάζουν μια δυναμική συμπεριφορά (Carrero *et al.*, 2003; Misteli, 2001). Δεδομένου ότι η H1 έχει επίσης γρήγορη δυναμική σύνδεσης/αποσύνδεσης με τα νουκλεοσώματα (Misteli *et al.*, 2000), η ParaT είναι δυνατόν να έχει πρόσβαση στη συνδετική ιστόνη στα νουκλεοσώματα και να διαμορφώνει τη δυναμική αλληλεπίδραση της H1 με τη χρωματίνη, είτε συνολικά είτε τοπικά. Μια τέτοια δυναμική αλληλεπίδραση είναι σύμφωνη με τη σταθερά συγγένειας που προσδιορίστηκε από τα πειράματα φθορισμού. Μια παρόμοια συγγένεια (9 μ M) έχει αναφερθεί για μια ενδομοριακή αλληλεπίδραση που μοιάζει πολύ με αυτήν της ParaT-H1, δηλαδή αυτή μεταξύ της όξινης ουράς της πρωτεΐνης υψηλής κινητικότητας ομάδας B1 (HMGB1) και της A περιοχής της (Knapp *et al.*, 2004). Αξίζει να αναφερθεί ότι η όξινη ουρά πιστεύεται ότι όχι μόνο διαμορφώνει τις αλληλεπιδράσεις της HMGB1 με το DNA αλλά επίσης και την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με τα νουκλεοσώματα και τους χρωματινικούς αναδιαμορφωτές (Bonaldi *et al.*, 2002; Travers, 2003).

4.4. Δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά της αλληλεπίδρασης ParaT-H1

Η λειτουργική σημασία των αλλαγών της στοιχειομετρίας της ιστόνης H1 με τη χρωματίνη έχει μελετηθεί εντατικά κατά την τελευταία δεκαετία. Η σύνδεση της συνδετικής ιστόνης με τη χρωματίνη σταθεροποιεί δομές χρωματίνης ανώτερης τάξης (Bednar *et al.*, 1998; Carruthers *et al.*, 1998). Αν και αρχικές μελέτες υποστήριζαν την άποψη ότι η H1 μπορεί να λειτουργήσει ως επί το πλείστον ως γενικός μεταγραφικός καταστολέας, υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι η στοιχειομετρία της συνδετικής ιστόνης μπορεί να επηρεάσει την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων τόσο θετικά όσο και αρνητικά (Brown *et al.*, 1996; Shen and Gorovsky, 1996; Zlatanova *et al.*, 2000). Επιπλέον, βιοχημικές μελέτες δείχνουν ότι οι συνδετικές ιστόνες απουσιάζουν από τη μεταγραφικά ενεργό χρωματίνη κι έχει υποστηριχθεί ότι η απομάκρυνση της H1 απο



συγκεκριμένα γονίδια είναι απαραίτητα για την ενεργοποίηση αυτών (Zlatanova *et al.*, 2000). Σύμφωνα με αυτήν την ιδέα, βρέθηκε ότι ο υποκινητής που συνδέεται με τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών έχει μειωμένη αλληλεπίδραση με τη συνδετική ιστόνη με το DNA (Flavin *et al.*, 2004). Επιπλέον, έμβρυα ποντικών που δεν περιέχουν τρεις υποκατηγορίες H1 (H1c, H1d και H1e) πεθαίνουν από τα μέσα της κυοφορίας (Fan *et al.*, 2003). Αντίθετα, έμβρυα που στερούνται μια ή δυο υποκατηγορίες H1 (Fan *et al.*, 2001; Sirotkin *et al.*, 1995) δεν παρουσίασαν καμιά επίδραση στην ανάπτυξή τους. Αυτά τα στοιχεία δείχνουν ότι η σωστή στοιχειομετρία H1-νουκλεοσωμάτων είναι κρίσιμη για την φυσιολογική ανάπτυξη των οργανισμών. Επομένως, αλλαγές στη στοιχειομετρία της H1 μπορούν να επάγουν το σχηματισμό ανώτερων δομών χρωματίνης και να ρυθμίσουν διαφορετικές λειτουργικές καταστάσεις.

Πολλές εργασίες έχουν ανιχνεύσει πυρηνικές πρωτεΐνες που μπορούν να αλλάξουν τη στοιχειομετρία της H1 με τη χρωματίνη. Μεταξύ αυτών είναι οι πρωτεΐνες που περιέχουν μακρές όξινες αλληλουχίες, όπως οι πρωτεΐνες ομάδας υψηλής κινητικότητας (HMG)(Catez *et al.*, 2004) και η προθυμοσίνη α (Karetsou *et al.*, 1998). Παραδείγματος χάριν, η μικροέγχυση HMGN σε κύτταρα που εκφράζουν H1-GFP είχε σαν αποτέλεσμα αυξανόμενη ανταλλαγή H1 (Catez *et al.*, 2002). Δεδομένου ότι η αυξανόμενη ανταλλαγή είναι ενδεικτική της μειωμένης σύνδεσης, οι πρωτεΐνες HMGN θεωρούνται ότι έχουν μια αντίθετη επίδραση στη χρωματίνη από αυτήν της H1. Δηλαδή, μειώνουν τη συμπύκνωση κι ενισχύουν τη μεταγραφή (Bustin, 2001; Catez *et al.*, 2002). Είναι αξιοσημείωτο ότι η έγχυση HMGN δεν είχε επιπτώσεις στο κλάσμα της H1 με τη μικρή κινητικότητα, παρόμοια με τη μειωμένη δυνατότητα της ParaT να προσδέσει σε ταινία την H1 από τη χρωματίνη. Επιπλέον, η αλληλεπίδραση της προθυμοσίνης α με την H1 μείωσε το νουκλεοσωμικό μήκος επανάληψης κι εμπόδισε τη σύνδεση της H1 με τη χρωματίνη *in vitro*. Επίσης, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης αυτής αύξησε το μέγεθος των πυρήνων των θηλαστικών *in vivo* (Karetsou *et al.*, 2004; Karetsou *et al.*, 1998). Συνδυασμένα, αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι μια δυναμική αλληλεπίδραση μεταξύ πυρηνικών πρωτεϊνών και H1 θα μπορούσε να οδηγήσει σε τοπικές αλλαγές στη συμπύκνωση της χρωματίνης. Η επίδραση των πρωτεϊνών αυτών στη σύνδεση της H1 με τη χρωματίνη μπορεί να είναι συνεργατική ανάλογα με το χρονικό/χωρικό εντοπισμό στις συγκεκριμένες χρωματινικές περιοχές και την πρωτεϊνική τους έκφραση ανάλογα με



το είδος του ιστού ή με τη στάδιο ανάπτυξης. Επομένως, με βάση τα αποτελέσματα μας προτείνουμε ότι η ParaT μπορεί να συμμετέχει στην αναδιαμόρφωση της δομής της χρωματίνης κατά την έκφραση των γονιδίων.

4.5. Έκφραση της ParaT στους λεμφικούς ιστούς

Η ParaT αλληλεπιδρά με την H1 κι αποσυμπυκνώνει τη δομή της χρωματίνης. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η στοιχειομετρία της H1 κατά τη διάρκεια της γονιδιακής έκφρασης αλλάζει σημαντικά. Σε μια προσπάθεια να εξετάσουμε πιο συγκεκριμένα τη λειτουργία της ParaT στο κύτταρο, πραγματοποιήσαμε ανοσοϊστοχημικές μελέτες στους ιστούς του λεμφικού συστήματος. Αυτό το σύστημα έχει μελετηθεί ιδιαίτερα καλά ενώ πρόσφατα έχουν χαρακτηριστεί πολλοί παράγοντες που εμπλέκονται στη γονιδιακή έκφραση. Επιπλέον, πρόσφατα στοιχεία δείχνουν τη συμμετοχή των παραγόντων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης στη διαφοροποίηση των T-λεμφοκυττάρων (Georgopoulos, 2002; Kioussis and Ellmeier, 2002). Οι μελέτες μας έδειξαν ότι η ParaT βρίσκεται κυρίως στον πυρήνα των T-λεμφοκυττάρων στους λεμφαδένες, τη σπλήνα και το θύμο αδέν, που υποδείχνει έναν πιθανό ρόλο της ParaT στην ωρίμανση των T-λεμφοκυττάρων. Πιο σημαντικά, η έκφραση της πρωτεΐνης φαίνεται να ρυθμίζεται στα B-λεμφοκύτταρα, δεδομένου ότι τα B κύτταρα που εκφράζουν το δείκτη CD20 δεν παρουσιάζουν καμιά έκφραση της ParaT στους λεμφαδένες και τη σπλήνα.

Με βάση τα συμπεράσματα αυτά προκύπτουν διάφορες ενδιαφέρουσες υποθέσεις. Στο αιματοποιητικό σύστημα, η ανάπτυξη αρχίζει με ένα αιματοποιητικό κύτταρο μίσχων (HSC) (Spangrude *et al.*, 1988). Η επιλογή για μια από τις δυο κύριες αιματοποιητικές σειρές, μυελοερυθροειδή ή λεμφοειδή, γίνεται από τους άμεσους απογόνους του HSC (Kawamoto *et al.*, 1998; Lacaud *et al.*, 1998). Οι λεμφοειδείς πρόδρομοι χάνουν την έκφραση των συγκεκριμένων γονιδίων καταγωγής στο δρόμο τους προς την τελική διαφοροποίηση. Παραδείγματος χάριν, τα άδολα T-λεμφοκύτταρα αναπτύσσονται στο μυελό των οστών σε διπλά αρνητικά για δυο γνωστούς δείκτες, τον CD4 και τον CD8. Τα κύτταρα μπαίνουν στο θύμο αδέν σε αυτήν την κατάσταση και μέσω των διαδικασιών ωρίμανσης (θετική κι αρνητική επιλογή) γίνονται είτε CD4⁺ είτε CD8⁺ βοηθητικά κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα (Germain, 2002). Η ParaT μπορεί να



είναι υπεύθυνη για τον καθορισμό της διαφοροποίησης κατευθύνοντας την έκφραση/καταστολή συγκεκριμένων γονιδίων μέσω μιας αλληλεπίδρασης με τη συνδετική ιστόνη H1. Πράγματι, η ανάλυση RT-PCR σε πληθυσμούς διπλά αρνητικών T-λεμφοκυττάρων κατέδειξε την έκφραση ParaT σε δυο υποκατηγορίες αυτού του πληθυσμού T-λεμφοκυττάρων, δείχνοντας ότι η ParaT εκφράζεται νωρίς, πριν να ληφθούν αποφάσεις για τη μοίρα των T-λεμφοκυττάρων (Gounari F, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Επιπλέον, η έκφραση της ParaT στους λεμφαδένες και τους ιστούς σπλήνας βρίσκεται κατά προτίμηση στα T-λεμφοκύτταρα εκφράζοντας το δείκτη CD4, που θα μπορούσε να δείξει ότι αυτή η όξινη πρωτεΐνη είναι ένας σημαντικός παράγοντας στη διαφοροποίηση βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων. Είναι ενδιαφέρον ότι η πλειοψηφία των λεμφοκυττάρων που βρίσκονται στη φλοιώδη και μυελώδη περιοχή του θύμου αδένος παρουσιάζει ευδιάκριτη έκφραση ParaT, που ενισχύει την άποψη ότι η ParaT εκφράζεται νωρίς κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των T-λεμφοκυττάρων και μπορεί να εμπλέκεται στη διαφοροποίηση αυτών. Είναι αναγκαίο, όμως, να συνεχισθούν οι μελέτες αυτές ώστε να εξετασθεί πλήρως μια πιθανή συμβολή της ParaT στη διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών. Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψη το καλά χαρακτηρισμένο λεμφικό σύστημα, τα ελλειμματικά ποντίκια θα βοηθούσαν σαφώς στο να διευκρινιστεί η συμμετοχή της ParaT στη διαδικασία αυτή.

Συνολικά, η εργασία μας με βάση την αλληλεπίδραση της ParaT με τη συνδετική ιστόνη H1 ξεκίνησε να μελετήσει την επίδραση του όξινου πολυπεπτιδίου στη σύνδεση της H1 με τη δομή της χρωματίνης. Τα συμπεράσματα υποστηρίχθηκαν περαιτέρω από μελέτες κυτταροκαλλιέργειας. Σε ένα πιο σύνθετο πλαίσιο, τα ανοσοϊστοχημικά πειράματά μας υποστηρίζουν την πιθανή συμμετοχή της πρωτεΐνης στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης των T-λεμφοκυττάρων. Περαιτέρω δοκιμές ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης (ChiPw) θα ρίξουν φως στο ρόλο της ParaT στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και μπορούν να οδηγήσουν στον προσδιορισμό συγκεκριμένων γονιδίων που ρυθμίζονται από αλλαγές της στοιχειομετρίας της H1 λόγω της αλληλεπίδρασης με αυτήν τη μικρή όξινη πρωτεΐνη.



5. Περίληψη

Πυρηνικές πρωτεΐνες που περιέχουν πολυγλουταμινικές αλληλουχίες: Ο ρόλος της παραθυμοσίνης στη δομή και λειτουργία της χρωματίνης

Διδακτορική Διατριβή

Goran Martić

Η παραθυμοσίνη (ParaT) είναι μια μικρή (101 aa), πυρηνική πρωτεΐνη που εκφράζεται ευρέως σε κύτταρα και ιστούς. Ο βιολογικός ρόλος της ParaT παραμένει άγνωστος. Αρχικά, θεωρήθηκε ότι η ParaT έχει ανοσορρυθμιστική δραστηριότητα. Επόμενες μελέτες αποκάλυψαν ένα ρόλο αυτού του πολυπεπτιδίου στη ρύθμιση της γλυκόλυσης. Άλλες πρωτεΐνες που περιέχουν αλληλουχίες όξινων αμινοξέων έχουν καλά χαρακτηρισμένο ρόλο σχετικό με την οργάνωση της χρωματίνης. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει μια ειδική αλληλεπίδραση της ParaT με την ιστόνη H1. Η ιστόνη H1 είναι ο σημαντικότερος παράγοντας που επάγει την οργάνωση ανωτέρων δομών χρωματίνης. Επιπλέον, υπάρχουν στοιχεία τα οποία δείχνουν ότι η στοιχειομετρία της H1 διαδραματίζει έναν κρίσιμο ρόλο σε πολλές διαδικασίες που εξαρτώνται από τη χρωματίνη. Επομένως, η διευκρίνιση της φυσιολογικής σημασίας και της λειτουργικής συνέπειας της αλληλεπίδρασης της ParaT με την H1 μπορεί να παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τη λειτουργία αυτού του όξινου πολυπεπτιδίου σε διαδικασίες σχετικές με τη χρωματίνη.

Σε αυτήν τη μελέτη και βάσει προηγούμενων μελετών, παρουσιάζουμε τα πρώτα στοιχεία για τις συνέπειες της αλληλεπίδρασης της ParaT με τη συνδετική ιστόνη H1 στη δομή της χρωματίνης. Ερευνήσαμε τις αλλαγές στο μήκος επανάληψης του νουκλεοσώματος (NRL) της χρωματίνης που περιέχει H1 παρουσία της ParaT *in vitro*. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας ένα φυσιολογικό σύστημα οργάνωσης της χρωματίνης, αξιολογήσαμε την επίδραση της ParaT στην σύνδεση της ιστόνης H1 με τη χρωματίνη. Οι μελέτες μας δείχνουν ότι η ParaT συνδέεται με τη συνδετική ιστόνη H1 κι ότι αυτή η αλληλεπίδραση έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση του NRL και την παρεμπόδιση της



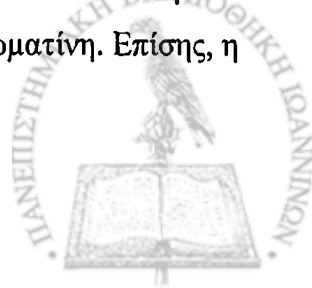
σύνδεσης της H1 με τη χρωματίνη. Τα στοιχεία υποστηρίζουν ότι, κατά την αλληλεπίδραση της H1 με την ParaT, η συνδετική ιστόνη αλλάζει τον τρόπο αλληλεπίδρασής της με το πρότυπο της χρωματίνης.

Μελέτες κυκλικού διχροϊσμού (CD) και φασμάτων εκπομπής φθορισμού δείχνουν ότι, κατά τη σύνδεσή της με την ParaT, η H1 αλλάζει διαμόρφωση. Υπολογίσαμε δε μια τιμή K_d $19.6 \pm 11.3 \mu\text{M}$ για την αλληλεπίδραση H1-ParaT.

Χρησιμοποιήσαμε *in vitro* και *in vivo* μελέτες αποσυμπύκνωσης της χρωματίνης για να μελετήσουμε τον λειτουργικό ρόλο της αλληλεπίδρασης της ParaT με την H1. Και στα δυο συστήματα, η ParaT προκάλεσε μια σημαντική αύξηση στην επιφάνεια των πυρήνων που δείχνει δραστηρότητα αποσυμπύκνωσης της χρωματίνης. Επιπλέον, όταν η χρωματίνη που απομονώθηκε από κύτταρα HeLa τα οποία υπερεξέφραζαν GFP-ParaT υποβλήθηκε σε πέψη μικροκοκκικής νουκλεάσης, η δυνατότητα πρόσβασης της χρωματίνης σε ενζυμική πέψη βρέθηκε αυξημένη. Δεδομένου ότι η συνδετική ιστόνη H1 είναι ο σημαντικότερος παράγοντας ο οποίος είναι υπεύθυνος για την οργάνωση δομών χρωματίνης ανωτέρας τάξης, τα πειραματικά μας δεδομένα υποδεικνύουν ένα ρόλο της ParaT στην αναδιοργάνωση της χρωματινικής δομής μέσω της αλληλεπίδρασής της με την ιστόνη H1 και γενικότερα στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

Σε μια προσπάθεια να διευκρινιστεί περαιτέρω ο ρόλος της ParaT στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων διεξήγαμε ανοσοϊστοχημικές μελέτες σε ιστούς του λεμφικού συστήματος για να μελετήσουμε την έκφραση της ParaT σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους. Αυτό το σύστημα είναι καλά μελετημένο και είναι γνωστό από πρόσφατες μελέτες ότι οι παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των λεμφοκυττάρων. Τομές που λήφθηκαν από λεμφαδένα, σπλήνα και θύμο επώαστηκαν με αντισώματα εναντίον της ParaT και με γνωστούς κυτταρικούς δείκτες (CD3, CD4, CD8 και CD20). Οι μελέτες μας αποκάλυψαν ένα συγκεκριμένο πρωτεϊνικό προφίλ της ParaT στα T-λεμφοκύτταρα. Επιπλέον, τα στοιχεία μας δείχνουν ότι η ParaT εκφράζεται ειδικά σε βοηθητικά CD4 T-λεμφοκύτταρα.

Συμπερασματικά, αυτή η μελέτη συμπληρώνει την προηγούμενη γνώση μας για την αλληλεπίδραση της ParaT με τη συνδετική ιστόνη H1 και δείχνει έναν πιθανό τρόπο δράσης αυτού του όξινου πολυπεπτιδίου στη σύνδεση της H1 με τη χρωματίνη. Επίσης, η



εργασία μας υποδεικνύει για πρώτη φορά μια σημαντική βιολογική λειτουργία αυτής της πυρηνικής πρωτεΐνης στην ανάπτυξη και τη λειτουργία των Τ-λεμφοκυττάρων.



6. Summary

Nuclear proteins containing polyglutamic stretches:

The role of parathymosin in the structure and function of chromatin

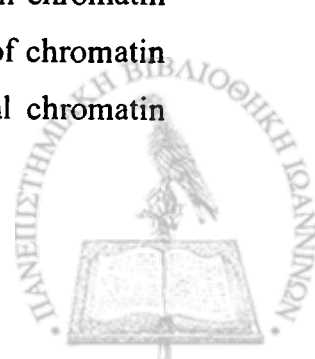
Doctorate thesis

Goran Martić

Parathymosin (ParaT) is a small (101 aa), ubiquitously expressed nuclear protein. It contains a central acidic amino acid stretch and a bipartite nuclear localisation signal. The biological role of ParaT remains controversial. Initially, it was thought that ParaT has immunomodulating activity. Subsequent studies revealed a putative role of this polypeptide in regulating the glycolytic pathway. Latest work proposed a role of this protein in early replication.

Other proteins containing long acidic stretches in their amino acid sequence have well-characterised functions related to the organisation of chromatin. Previous studies identified linker histone H1 as a specific interacting partner of ParaT. Histone H1 is the major component that organises chromatin fibers into higher order structures. In addition, there is accumulating evidence that H1 stoichiometry plays a crucial role in many chromatin dependent processes. Therefore, the elucidation of the physiological significance and the functional consequence of the interaction of ParaT with H1 may provide additional information on the function of this acidic polypeptide in chromatin related processes and its biological role in the cell.

In this study and on the basis of previous interaction studies, we present first evidence on the effect of the interaction of ParaT with linker histone H1 on chromatin structure. We investigated the changes in nucleosome repeat length (NRL) of chromatin assembled with H1 and ParaT *in vitro*. Furthermore, using a physiological chromatin

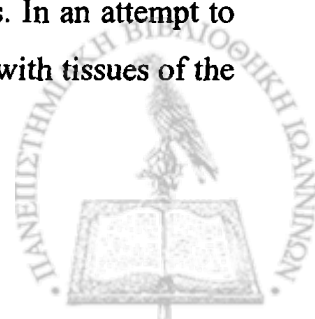


reconstitution system we assessed the effect of ParaT on histone H1 binding to chromatin. Our studies indicate that ParaT binds to linker histone H1 and that this interaction leads to a decrease in the NRL and an inhibition of H1 binding to chromatin. The data suggest that upon interaction of H1 with ParaT the linker histone alters its mode of interaction with the chromatin template.

We performed biophysical experiments to assess a possible conformational change of H1 upon binding to ParaT. Circular Dichroism (CD) and fluorescence emission spectra studies indicate that H1 undergoes a conformational change when binding to ParaT occurs. A quantitative fluorescence-based binding assay revealed a K_d value of 19.6 ± 11.3 μM for the H1-ParaT interaction.

Since linker histone H1 is the major factor responsible for the organisation of higher order chromatin structure, the obtained data indicate a putative involvement of ParaT in creating a relaxed chromatin structure through an interaction with histone H1. In a subsequent step we used *in vitro* and *in vivo* chromatin decondensation assays to study this putative functional consequence of an interaction of ParaT with H1. In both systems, ParaT induced a significant increase in nuclear surface indicating chromatin decondensation activity. In addition, fractionated chromatin of control GFP- and GFP-ParaT over-expressing HeLa cells was subjected to micrococcal nuclease digestion to visualise a change in chromatin accessibility. In the ParaT over-expressing HeLa cells the fraction containing chromatin remodeling complexes and actively transcribed genes showed a different, more 'relaxed' DNA profile when compared to control chromatin. Furthermore, indirect immunofluorescence and confocal scanning microscopy indicate that upon overproduction of ParaT the nuclear envelope shows gaps in the lamin B staining and ParaT content is released in the cytoplasm. These observations suggest that overproduction of ParaT leads to an increased pressure in the nucleus generated by chromatin, most probably due to the decondensation of chromatin by ParaT.

All collected data point to a function of the protein in chromatin decondensation through an interaction with linker histone H1. It is well established that chromatin relaxation is obligatory for nuclear factors to access DNA during gene-expression and the findings indicate a possible biological role of ParaT during this process. In an attempt to elucidate this hypothesis, we performed immunohistochemistry studies with tissues of the



lymphoid system to study ParaT expression in different cell-types in an organised environment. This system is well studied and it is becoming evident that chromatin remodeling factors play a crucial role during lymphocyte differentiation and T-cell function. Sections obtained from lymph node, spleen and thymus were incubated with antibodies against ParaT and with known cell specific markers of the lymphoid lineage (CD3, CD4, CD8 and CD20). Our studies revealed a cell-type specific protein profile of ParaT in T lymphocytes. Moreover, our data indicate that ParaT expression might be restricted to CD4 helper and absent in CD8 cytotoxic T cells.

In conclusion, this study extends our previous knowledge about the interaction of ParaT with linker histone H1 and indicates a possible mode of action and consequence of this acidic polypeptide on H1 binding to chromatin. Most specifically, our work imply for the first time the involvement of ParaT in thymocyte development and T cell function and point to an important biological function of this nuclear protein.



7. Βιβλιογραφία

- Adachi, Y., Pavlakis, G.N. and Copeland, T.D. (1994) Identification and characterization of SET, a nuclear phosphoprotein encoded by the translocation break point in acute undifferentiated leukemia. *J Biol Chem*, **269**, 2258-2262.
- Akey, C.W. and Luger, K. (2003) Histone chaperones and nucleosome assembly. *Curr Opin Struct Biol*, **13**, 6-14.
- Albig, W., Kioschis, P., Poustka, A., Meergans, K. and Doenecke, D. (1997) Human histone gene organization: nonregular arrangement within a large cluster. *Genomics*, **40**, 314-322.
- Albig, W., Meergans, T. and Doenecke, D. (1997) Characterization of the H1.5 gene completes the set of human H1 subtype genes. *Gene*, **184**, 141-148.
- Allan, J., Hartman, P.G., Crane-Robinson, C. and Aviles, F.X. (1980) The structure of histone H1 and its location in chromatin. *Nature*, **288**, 675-679.
- An, W., Leuba, S.H., van Holde, K. and Zlatanova, J. (1998) Linker histone protects linker DNA on only one side of the core particle and in a sequence-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 3396-3401.
- Aniello, F., Branno, M., De Rienzo, G., Ferrara, D., Palmiero, C. and Minucci, S. (2002) First evidence of prothymosin alpha in a non-mammalian vertebrate and its involvement in the spermatogenesis of the frog *Rana esculenta*. *Mech Dev*, **110**, 213-217.
- Annunziato, A.T., Frado, L.L., Seale, R.L. and Woodcock, C.L. (1988) Treatment with sodium butyrate inhibits the complete condensation of interphase chromatin. *Chromosoma*, **96**, 132-138.
- Ausio, J., Dong, F. and van Holde, K.E. (1989) Use of selectively trypsinized nucleosome core particles to analyze the role of the histone "tails" in the stabilization of the nucleosome. *J Mol Biol*, **206**, 451-463.
- Becker, P.B. and Horz, W. (2002) ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu Rev Biochem*, **71**, 247-273.
- Becker, P.B. and Wu, C. (1992) Cell-free system for assembly of transcriptionally repressed chromatin from *Drosophila* embryos. *Mol Cell Biol*, **12**, 2241-2249.



- Bednar, J., Horowitz, R.A., Grigoryev, S.A., Carruthers, L.M., Hansen, J.C., Koster, A.J. and Woodcock, C.L. (1998) Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14173-14178.
- Belmont, A.S. and Bruce, K. (1994) Visualization of G1 chromosomes: a folded, twisted, supercoiled chromonema model of interphase chromatid structure. *J Cell Biol*, **127**, 287-302.
- Bharath, M.M., Chandra, N.R. and Rao, M.R. (2003) Molecular modeling of the chromatosome particle. *Nucleic Acids Res*, **31**, 4264-4274.
- Blank, T.A. and Becker, P.B. (1995) Electrostatic mechanism of nucleosome spacing. *J Mol Biol*, **252**, 305-313.
- Bohm, L. and Crane-Robinson, C. (1984) Proteases as structural probes for chromatin: the domain structure of histones. *Biosci Rep*, **4**, 365-386.
- Bonaldi, T., Langst, G., Strohner, R., Becker, P.B. and Bianchi, M.E. (2002) The DNA chaperone HMGB1 facilitates ACF/CHRAC-dependent nucleosome sliding. *Embo J*, **21**, 6865-6873.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Brand, I.A. and Heinickel, A. (1991) Key enzymes of carbohydrate metabolism as targets of the 11.5-kDa Zn(2+)-binding protein (parathymosin). *J Biol Chem*, **266**, 20984-20989.
- Brand, I.A., Heinickel, A., Kratzin, H. and Soling, H.D. (1988) Properties of a 19-kDa Zn²⁺-binding protein and sequence of the Zn²⁺-binding domains. *Eur J Biochem*, **177**, 561-568.
- Brand, I.A., Heinickel, A. and Soling, H.D. (1991) Localization of a 11.5 kDa Zn(2+)-binding protein (parathymosin) in different rat tissues. Cell type-specific distribution between cytosolic and nuclear compartment. *Eur J Cell Biol*, **54**, 157-165.
- Brand, I.A. and Soling, H.D. (1986) Zn²⁺-dependent reversible inactivation of rat liver phosphofructokinase-1. Purification of the inactivating protein and characterization of the inactivation reaction. *J Biol Chem*, **261**, 5892-5900.



- Bridger, J.M., Herrmann, H., Munkel, C. and Lichter, P. (1998) Identification of an interchromosomal compartment by polymerization of nuclear-targeted vimentin. *J Cell Sci*, **111** (Pt 9), 1241-1253.
- Brown, D.T. (2001) Histone variants: are they functionally heterogeneous? *Genome Biol*, **2**, REVIEWS0006.
- Brown, D.T. (2003) Histone H1 and the dynamic regulation of chromatin function. *Biochem Cell Biol*, **81**, 221-227.
- Brown, D.T., Alexander, B.T. and Sittman, D.B. (1996) Differential effect of H1 variant overexpression on cell cycle progression and gene expression. *Nucleic Acids Res*, **24**, 486-493.
- Brown, K.E., Baxter, J., Graf, D., Merkenschlager, M. and Fisher, A.G. (1999) Dynamic repositioning of genes in the nucleus of lymphocytes preparing for cell division. *Mol Cell*, **3**, 207-217.
- Brown, K.E., Guest, S.S., Smale, S.T., Hahm, K., Merkenschlager, M. and Fisher, A.G. (1997) Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin. *Cell*, **91**, 845-854.
- Brownell, J.E. and Allis, C.D. (1996) Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr Opin Genet Dev*, **6**, 176-184.
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R. and Agami, R. (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, **296**, 550-553.
- Bruniquel, D., Borie, N. and Triebel, F. (1997) Genomic organization of the human LAG-3/CD4 locus. *Immunogenetics*, **47**, 96-98.
- Bustin, M. (2001) Chromatin unfolding and activation by HMGN(*) chromosomal proteins. *Trends Biochem Sci*, **26**, 431-437.
- Calame, K.L., Lin, K.I. and Tunyaplin, C. (2003) Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells. *Annu Rev Immunol*, **21**, 205-230.
- Carrero, G., McDonald, D., Crawford, E., de Vries, G. and Hendzel, M.J. (2003) Using FRAP and mathematical modeling to determine the in vivo kinetics of nuclear proteins. *Methods*, **29**, 14-28.



- Carruthers, L.M., Bednar, J., Woodcock, C.L. and Hansen, J.C. (1998) Linker histones stabilize the intrinsic salt-dependent folding of nucleosomal arrays: mechanistic ramifications for higher-order chromatin folding. *Biochemistry*, **37**, 14776-14787.
- Carruthers, L.M. and Hansen, J.C. (2000) The core histone N termini function independently of linker histones during chromatin condensation. *J Biol Chem*, **275**, 37285-37290.
- Catez, F., Brown, D.T., Misteli, T. and Bustin, M. (2002) Competition between histone H1 and HMGN proteins for chromatin binding sites. *EMBO Rep*, **3**, 760-766.
- Catez, F., Yang, H., Tracey, K.J., Reeves, R., Misteli, T. and Bustin, M. (2004) Network of dynamic interactions between histone H1 and high-mobility-group proteins in chromatin. *Mol Cell Biol*, **24**, 4321-4328.
- Chen, H., Li, B. and Workman, J.L. (1994) A histone-binding protein, nucleoplasmin, stimulates transcription factor binding to nucleosomes and factor-induced nucleosome disassembly. *Embo J*, **13**, 380-390.
- Clark, D.J. and Thomas, J.O. (1988) Differences in the binding of H1 variants to DNA. Cooperativity and linker-length related distribution. *Eur J Biochem*, **178**, 225-233.
- Clinton, M., Frangou-Lazaridis, M., Panneerselvam, C. and Horecker, B.L. (1989) Prothymosin alpha and parathymosin: mRNA and polypeptide levels in rodent tissues. *Arch Biochem Biophys*, **269**, 256-263.
- Cole, R.D. (1987) Microheterogeneity in H1 histones and its consequences. *Int J Pept Protein Res*, **30**, 433-449.
- Cotter, M.A., 2nd and Robertson, E.S. (2000) Modulation of histone acetyltransferase activity through interaction of epstein-barr nuclear antigen 3C with prothymosin alpha. *Mol Cell Biol*, **20**, 5722-5735.
- Cremer, T. and Cremer, C. (2001) Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet*, **2**, 292-301.
- Cremer, T., Kurz, A., Zirbel, R., Dietzel, S., Rinke, B., Schrock, E., Speicher, M.R., Mathieu, U., Jauch, A., Emmerich, P. and et al. (1993) Role of chromosome territories in the functional compartmentalization of the cell nucleus. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **58**, 777-792.



- De Rienzo, G., Di Sena, R., Ferrara, D., Palmiero, C., Chieffi Baccari, G. and Minucci, S. (2002) Temporal and spatial localization of prothymosin alpha transcript in the Harderian gland of the frog, *Rana esculenta*. *J Exp Zool*, **292**, 633-639.
- DeManno, D.A., Cottom, J.E., Kline, M.P., Peters, C.A., Maizels, E.T. and Hunzicker-Dunn, M. (1999) Follicle-stimulating hormone promotes histone H3 phosphorylation on serine-10. *Mol Endocrinol*, **13**, 91-105.
- Dernburg, A.F., Broman, K.W., Fung, J.C., Marshall, W.F., Philips, J., Agard, D.A. and Sedat, J.W. (1996) Perturbation of nuclear architecture by long-distance chromosome interactions. *Cell*, **85**, 745-759.
- Di Croce, L., Koop, R., Venditti, P., Westphal, H.M., Nightingale, K.P., Corona, D.F., Becker, P.B. and Beato, M. (1999) Two-step synergism between the progesterone receptor and the DNA-binding domain of nuclear factor 1 on MMTV minichromosomes. *Mol Cell*, **4**, 45-54.
- Diaz-Jullien, C., Perez-Estevez, A., Covelo, G. and Freire, M. (1996) Prothymosin alpha binds histones in vitro and shows activity in nucleosome assembly assay. *Biochim Biophys Acta*, **1296**, 219-227.
- Dingwall, C., Dilworth, S.M., Black, S.J., Kearsey, S.E., Cox, L.S. and Laskey, R.A. (1987) Nucleoplasmin cDNA sequence reveals polyglutamic acid tracts and a cluster of sequences homologous to putative nuclear localization signals. *Embo J*, **6**, 69-74.
- Dingwall, C. and Laskey, R.A. (1990) Nucleoplasmin: the archetypal molecular chaperone. *Semin Cell Biol*, **1**, 11-17.
- Dong, F., Hansen, J.C. and van Holde, K.E. (1990) DNA and protein determinants of nucleosome positioning on sea urchin 5S rRNA gene sequences in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 5724-5728.
- Dunker, A.K., Lawson, J.D., Brown, C.J., Williams, R.M., Romero, P., Oh, J.S., Oldfield, C.J., Campen, A.M., Ratliff, C.M., Hipps, K.W., Ausio, J., Nissen, M.S., Reeves, R., Kang, C., Kissinger, C.R., Bailey, R.W., Griswold, M.D., Chiu, W., Garner, E.C. and Obradovic, Z. (2001) Intrinsically disordered protein. *J Mol Graph Model*, **19**, 26-59.
- Dutta, S., Akey, I.V., Dingwall, C., Hartman, K.L., Laue, T., Nolte, R.T., Head, J.F. and Akey, C.W. (2001) The crystal structure of nucleoplasmin-core: implications for histone binding and nucleosome assembly. *Mol Cell*, **8**, 841-853.



- Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D. and Sharp, P.A. (2003) Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 457-467.
- Earnshaw, W.C. (1987) Anionic regions in nuclear proteins. *J Cell Biol*, **105**, 1479-1482.
- Eschenfeldt, W.H. and Berger, S.L. (1986) The human prothymosin alpha gene is polymorphic and induced upon growth stimulation: evidence using a cloned cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 9403-9407.
- Fan, Y., Nikitina, T., Morin-Kensicki, E.M., Zhao, J., Magnuson, T.R., Woodcock, C.L. and Skoultchi, A.I. (2003) H1 linker histones are essential for mouse development and affect nucleosome spacing in vivo. *Mol Cell Biol*, **23**, 4559-4572.
- Fan, Y., Sirotkin, A., Russell, R.G., Ayala, J. and Skoultchi, A.I. (2001) Individual somatic H1 subtypes are dispensable for mouse development even in mice lacking the H1(0) replacement subtype. *Mol Cell Biol*, **21**, 7933-7943.
- Finch, J.T. and Klug, A. (1976) Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **73**, 1897-1901.
- Flavin, M., Cappabianca, L., Kress, C., Thomassin, H. and Grange, T. (2004) Nature of the accessible chromatin at a glucocorticoid-responsive enhancer. *Mol Cell Biol*, **24**, 7891-7901.
- Frangou-Lazaridis, M., Clinton, M., Goodall, G.J. and Horecker, B.L. (1988) Prothymosin alpha and parathymosin: amino acid sequences deduced from the cloned rat spleen cDNAs. *Arch Biochem Biophys*, **263**, 305-310.
- Franke, K., Drabent, B. and Doenecke, D. (1998) Expression of murine H1 histone genes during postnatal development. *Biochim Biophys Acta*, **1398**, 232-242.
- Freire, J., Covelo, G., Sarandeses, C., Diaz-Jullien, C. and Freire, M. (2001) Identification of nuclear-import and cell-cycle regulatory proteins that bind to prothymosin alpha. *Biochem Cell Biol*, **79**, 123-131.
- Gamble, M.J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Freedman, L.P. and Fisher, R.P. (2005) The histone chaperone TAF-I/SET/INHAT is required for transcription in vitro of chromatin templates. *Mol Cell Biol*, **25**, 797-807.
- Gao, B., Jaffe, H. and Kunos, G. (1998) Histone H1 isoforms purified from rat liver bind nonspecifically to the nuclear factor 1 recognition sequence and serve as generalized transcriptional repressors. *Mol Cell Biochem*, **178**, 187-196.



- Gast, K., Damaschun, H., Eckert, K., Schulze-Forster, K., Maurer, H.R., Muller-Frohne, M., Zirwer, D., Czarnecki, J. and Damaschun, G. (1995) Prothymosin alpha: a biologically active protein with random coil conformation. *Biochemistry*, **34**, 13211-13218.
- Georgopoulos, K. (2002) Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros. *Nat Rev Immunol*, **2**, 162-174.
- Germain, R.N. (2002) T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol*, **2**, 309-322.
- Goldstein, A.L., Slater, F.D. and White, A. (1966) Preparation, assay, and partial purification of a thymic lymphocytopoietic factor (thymosin). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **56**, 1010-1017.
- Gomez-Marquez, J. and Rodriguez, P. (1998) Prothymosin alpha is a chromatin-remodelling protein in mammalian cells. *Biochem J*, **333** (Pt 1), 1-3.
- Gomez-Marquez, J., Segade, F., Dosil, M., Pichel, J.G., Bustelo, X.R. and Freire, M. (1989) The expression of prothymosin alpha gene in T lymphocytes and leukemic lymphoid cells is tied to lymphocyte proliferation. *J Biol Chem*, **264**, 8451-8454.
- Gossen, M. and Bujard, H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 5547-5551.
- Goytisolo, F.A., Gerchman, S.E., Yu, X., Rees, C., Graziano, V., Ramakrishnan, V. and Thomas, J.O. (1996) Identification of two DNA-binding sites on the globular domain of histone H5. *Embo J*, **15**, 3421-3429.
- Graham, F.L. and van der Eb, A.J. (1973) Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology*, **54**, 536-539.
- Greenfield, N.J. (2004) Circular dichroism analysis for protein-protein interactions. *Methods Mol Biol*, **261**, 55-78.
- Gunjan, A., Sittman, D.B. and Brown, D.T. (2001) Core histone acetylation is regulated by linker histone stoichiometry in vivo. *J Biol Chem*, **276**, 3635-3640.
- Haritos, A.A., Blacher, R., Stein, S., Caldarella, J. and Horecker, B.L. (1985) Primary structure of rat thymus prothymosin alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 343-346.



- Haritos, A.A., Salvin, S.B., Blacher, R., Stein, S. and Horecker, B.L. (1985) Parathymosin alpha: a peptide from rat tissues with structural homology to prothymosin alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 1050-1053.
- Haushalter, K.A. and Kadonaga, J.T. (2003) Chromatin assembly by DNA-translocating motors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 613-620.
- Hayes, J.J., Bashkin, J., Tullius, T.D. and Wolffe, A.P. (1991) The histone core exerts a dominant constraint on the structure of DNA in a nucleosome. *Biochemistry*, **30**, 8434-8440.
- Hayes, J.J., Kaplan, R., Ura, K., Pruss, D. and Wolffe, A. (1996) A putative DNA binding surface in the globular domain of a linker histone is not essential for specific binding to the nucleosome. *J Biol Chem*, **271**, 25817-25822.
- Hayes, J.J., Pruss, D. and Wolffe, A.P. (1994) Contacts of the globular domain of histone H5 and core histones with DNA in a "chromatosome". *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 7817-7821.
- Hendzel, M.J., Lever, M.A., Crawford, E. and Th'ng, J.P. (2004) The C-terminal domain is the primary determinant of histone H1 binding to chromatin in vivo. *J Biol Chem*, **279**, 20028-20034.
- Hendzel, M.J., Wei, Y., Mancini, M.A., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B.R., Bazett-Jones, D.P. and Allis, C.D. (1997) 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*, **106**, 348-360.
- Herrera, J.E., West, K.L., Schiltz, R.L., Nakatani, Y. and Bustin, M. (2000) Histone H1 is a specific repressor of core histone acetylation in chromatin. *Mol Cell Biol*, **20**, 523-529.
- Houtsmuller, A.B. and Vermeulen, W. (2001) Macromolecular dynamics in living cell nuclei revealed by fluorescence redistribution after photobleaching. *Histochem Cell Biol*, **115**, 13-21.
- Howe, L., Itoh, T., Katagiri, C. and Ausio, J. (1998) Histone H1 binding does not inhibit transcription of nucleosomal *Xenopus laevis* somatic 5S rRNA templates. *Biochemistry*, **37**, 7077-7082.
- Hutvagner, G. and Zamore, P.D. (2002) RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev*, **12**, 225-232.



- Ito, T., Bulger, M., Pazin, M.J., Kobayashi, R. and Kadonaga, J.T. (1997) ACF, an ISWI-containing and ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor. *Cell*, **90**, 145-155.
- Jackson, D.A. and Cook, P.R. (1985) Transcription occurs at a nucleoskeleton. *Embo J*, **4**, 919-925.
- Jackson, D.A., Hassan, A.B., Errington, R.J. and Cook, P.R. (1993) Visualization of focal sites of transcription within human nuclei. *Embo J*, **12**, 1059-1065.
- Jacobs, S.A., Taverna, S.D., Zhang, Y., Briggs, S.D., Li, J., Eissenberg, J.C., Allis, C.D. and Khorasanizadeh, S. (2001) Specificity of the HP1 chromo domain for the methylated N-terminus of histone H3. *Embo J*, **20**, 5232-5241.
- Jenuwein, T. and Allis, C.D. (2001) Translating the histone code. *Science*, **293**, 1074-1080.
- Karetsou, Z., Kretsovali, A., Murphy, C., Tsolas, O. and Papamarcaki, T. (2002) Prothymosin alpha interacts with the CREB-binding protein and potentiates transcription. *EMBO Rep*, **3**, 361-366.
- Karetsou, Z., Martic, G., Tavoulari, S., Christoforidis, S., Wilm, M., Gruss, C. and Papamarcaki, T. (2004) Prothymosin alpha associates with the oncoprotein SET and is involved in chromatin decondensation. *FEBS Lett*, **577**, 496-500.
- Karetsou, Z., Sandaltzopoulos, R., Frangou-Lazaridis, M., Lai, C.Y., Tsolas, O., Becker, P.B. and Papamarcaki, T. (1998) Prothymosin alpha modulates the interaction of histone H1 with chromatin. *Nucleic Acids Res*, **26**, 3111-3118.
- Kawamoto, H., Ohmura, K. and Katsura, Y. (1998) Presence of progenitors restricted to T, B, or myeloid lineage, but absence of multipotent stem cells, in the murine fetal thymus. *J Immunol*, **161**, 3799-3802.
- Kawase, H., Okuwaki, M., Miyaji, M., Ohba, R., Handa, H., Ishimi, Y., Fujii-Nakata, T., Kikuchi, A. and Nagata, K. (1996) NAP-I is a functional homologue of TAF-I that is required for replication and transcription of the adenovirus genome in a chromatin-like structure. *Genes Cells*, **1**, 1045-1056.
- Khochbin, S. and Wolffe, A.P. (1994) Developmentally regulated expression of linker-histone variants in vertebrates. *Eur J Biochem*, **225**, 501-510.
- Kingston, R.E. and Narlikar, G.J. (1999) ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev*, **13**, 2339-2352.



- Kioussis, D. and Ellmeier, W. (2002) Chromatin and CD4, CD8A and CD8B gene expression during thymic differentiation. *Nat Rev Immunol*, **2**, 909-919.
- Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G.A., Keller, J.L., Haddad, J., Jr., Miljkovic, V., Cattoretti, G., Califano, A. and Dalla-Favera, R. (2003) Gene expression dynamics during germinal center transit in B cells. *Ann N Y Acad Sci*, **987**, 166-172.
- Kleinschmidt, J.A., Dingwall, C., Maier, G. and Franke, W.W. (1986) Molecular characterization of a karyophilic, histone-binding protein: cDNA cloning, amino acid sequence and expression of nuclear protein N1/N2 of *Xenopus laevis*. *Embo J*, **5**, 3547-3552.
- Kleinschmidt, J.A., Fortkamp, E., Krohne, G., Zentgraf, H. and Franke, W.W. (1985) Co-existence of two different types of soluble histone complexes in nuclei of *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem*, **260**, 1166-1176.
- Kleinschmidt, J.A. and Franke, W.W. (1982) Soluble acidic complexes containing histones H3 and H4 in nuclei of *Xenopus laevis* oocytes. *Cell*, **29**, 799-809.
- Knapp, S., Muller, S., Digilio, G., Bonaldi, T., Bianchi, M.E. and Musco, G. (2004) The long acidic tail of high mobility group box 1 (HMGB1) protein forms an extended and flexible structure that interacts with specific residues within and between the HMG boxes. *Biochemistry*, **43**, 11992-11997.
- Kondili, K., Tsolas, O. and Papamarcaki, T. (1996) Selective interaction between parathymosin and histone H1. *Eur J Biochem*, **242**, 67-74.
- Konishi, A., Shimizu, S., Hirota, J., Takao, T., Fan, Y., Matsuoka, Y., Zhang, L., Yoneda, Y., Fujii, Y., Skoultchi, A.I. and Tsujimoto, Y. (2003) Involvement of histone H1.2 in apoptosis induced by DNA double-strand breaks. *Cell*, **114**, 673-688.
- Kreitz, S., Ritzi, M., Baack, M. and Knippers, R. (2001) The human origin recognition complex protein 1 dissociates from chromatin during S phase in HeLa cells. *J Biol Chem*, **276**, 6337-6342.
- Kurz, A., Lampel, S., Nickolenko, J.E., Bradl, J., Benner, A., Zirbel, R.M., Cremer, T. and Lichter, P. (1996) Active and inactive genes localize preferentially in the periphery of chromosome territories. *J Cell Biol*, **135**, 1195-1205.
- Kutney, S.N., Hong, R., Macfarlan, T. and Chakravarti, D. (2004) A signaling role of histone-binding proteins and INHAT subunits pp32 and Set/TAF-Ibeta in integrating chromatin hypoacetylation and transcriptional repression. *J Biol Chem*, **279**, 30850-30855.



- Lacaud, G., Carlsson, L. and Keller, G. (1998) Identification of a fetal hematopoietic precursor with B cell, T cell, and macrophage potential. *Immunity*, **9**, 827-838.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K. and Jenuwein, T. (2001) Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*, **410**, 116-120.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lamond, A.I. and Earnshaw, W.C. (1998) Structure and function in the nucleus. *Science*, **280**, 547-553.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B. et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, **409**, 860-921.
- Laskey, R.A., Honda, B.M., Mills, A.D. and Finch, J.T. (1978) Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature*, **275**, 416-420.
- Laybourn, P.J. and Kadonaga, J.T. (1991) Role of nucleosomal cores and histone H1 in regulation of transcription by RNA polymerase II. *Science*, **254**, 238-245.
- Lee, H., Habas, R. and Abate-Shen, C. (2004) MSX1 cooperates with histone H1b for inhibition of transcription and myogenesis. *Science*, **304**, 1675-1678.
- LeRoy, G., Loyola, A., Lane, W.S. and Reinberg, D. (2000) Purification and characterization of a human factor that assembles and remodels chromatin. *J Biol Chem*, **275**, 14787-14790.
- Lever, M.A., Th'ng, J.P., Sun, X. and Hendzel, M.J. (2000) Rapid exchange of histone H1.1 on chromatin in living human cells. *Nature*, **408**, 873-876.
- Lewis, J.D., Saperas, N., Song, Y., Zamora, M.J., Chiva, M. and Ausio, J. (2004) Histone H1 and the origin of protamines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 4148-4152.
- Lippincott-Schwartz, J., Snapp, E. and Kenworthy, A. (2001) Studying protein dynamics in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 444-456.
- Lu, X. and Hansen, J.C. (2004) Identification of specific functional subdomains within the linker histone H10 C-terminal domain. *J Biol Chem*, **279**, 8701-8707.



- Lu, Z.H., Sittman, D.B., Romanowski, P. and Leno, G.H. (1998) Histone H1 reduces the frequency of initiation in *Xenopus* egg extract by limiting the assembly of prereplication complexes on sperm chromatin. *Mol Biol Cell*, **9**, 1163-1176.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. and Richmond, T.J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, **389**, 251-260.
- Lusser, A. and Kadonaga, J.T. (2003) Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. *Bioessays*, **25**, 1192-1200.
- Mahy, N.L., Perry, P.E. and Bickmore, W.A. (2002) Gene density and transcription influence the localization of chromatin outside of chromosome territories detectable by FISH. *J Cell Biol*, **159**, 753-763.
- Mahy, N.L., Perry, P.E., Gilchrist, S., Baldock, R.A. and Bickmore, W.A. (2002) Spatial organization of active and inactive genes and noncoding DNA within chromosome territories. *J Cell Biol*, **157**, 579-589.
- Makarova, T., Grebenshikov, N., Egorov, C., Vartapetian, A. and Bogdanov, A. (1989) Prothymosin alpha is an evolutionary conserved protein covalently linked to a small RNA. *FEBS Lett*, **257**, 247-250.
- Manders, E.M., Stap, J., Brakenhoff, G.J., van Driel, R. and Aten, J.A. (1992) Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy. *J Cell Sci*, **103** (Pt 3), 857-862.
- Martini, P.G., Delage-Mourroux, R., Kraichely, D.M. and Katzenellenbogen, B.S. (2000) Prothymosin alpha selectively enhances estrogen receptor transcriptional activity by interacting with a repressor of estrogen receptor activity. *Mol Cell Biol*, **20**, 6224-6232.
- Matsumoto, K., Nagata, K., Miyaji-Yamaguchi, M., Kikuchi, A. and Tsujimoto, M. (1999) Sperm chromatin decondensation by template activating factor I through direct interaction with basic proteins. *Mol Cell Biol*, **19**, 6940-6952.
- Matsumoto, K., Nagata, K., Okuwaki, M. and Tsujimoto, M. (1999) Histone- and chromatin-binding activity of template activating factor-I. *FEBS Lett*, **463**, 285-288.
- Matsumoto, K., Nagata, K., Ui, M. and Hanaoka, F. (1993) Template activating factor I, a novel host factor required to stimulate the adenovirus core DNA replication. *J Biol Chem*, **268**, 10582-10587.



- Matsumoto, K., Okuwaki, M., Kawase, H., Handa, H., Hanaoka, F. and Nagata, K. (1995) Stimulation of DNA transcription by the replication factor from the adenovirus genome in a chromatin-like structure. *J Biol Chem*, **270**, 9645-9650.
- Matzke, M.A. and Birchler, J.A. (2005) RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat Rev Genet*, **6**, 24-35.
- Merril, C.R., Switzer, R.C. and Van Keuren, M.L. (1979) Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detected by two-dimensional electrophoresis and a highly sensitive silver stain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4335-4339.
- Mills, A.D., Laskey, R.A., Black, P. and De Robertis, E.M. (1980) An acidic protein which assembles nucleosomes in vitro is the most abundant protein in *Xenopus* oocyte nuclei. *J Mol Biol*, **139**, 561-568.
- Misteli, T. (2001) Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression. *Science*, **291**, 843-847.
- Misteli, T., Caceres, J.F. and Spector, D.L. (1997) The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature*, **387**, 523-527.
- Misteli, T., Gunjan, A., Hock, R., Bustin, M. and Brown, D.T. (2000) Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells. *Nature*, **408**, 877-881.
- Mori, M., Barnard, G.F., Staniunas, R.J., Jessup, J.M., Steele, G.D., Jr. and Chen, L.B. (1993) Prothymosin- α mRNA expression correlates with that of c-myc in human colon cancer. *Oncogene*, **8**, 2821-2826.
- Muller, W.G., Walker, D., Hager, G.L. and McNally, J.G. (2001) Large-scale chromatin decondensation and recondensation regulated by transcription from a natural promoter. *J Cell Biol*, **154**, 33-48.
- Nakayama, J., Rice, J.C., Strahl, B.D., Allis, C.D. and Grewal, S.I. (2001) Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science*, **292**, 110-113.
- Nakayasu, H. and Berezney, R. (1989) Mapping replicational sites in the eucaryotic cell nucleus. *J Cell Biol*, **108**, 1-11.
- Namboodiri, V.M., Dutta, S., Akey, I.V., Head, J.F. and Akey, C.W. (2003) The crystal structure of *Drosophila* NLP-core provides insight into pentamer formation and histone binding. *Structure (Camb)*, **11**, 175-186.



- Neely, K.E., Hassan, A.H., Brown, C.E., Howe, L. and Workman, J.L. (2002) Transcription activator interactions with multiple SWI/SNF subunits. *Mol Cell Biol*, **22**, 1615-1625.
- Newton, A.C. (1995) Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem*, **270**, 28495-28498.
- Nielsen, P.R., Nietlispach, D., Mott, H.R., Callaghan, J., Bannister, A., Kouzarides, T., Murzin, A.G., Murzina, N.V. and Laue, E.D. (2002) Structure of the HP1 chromodomain bound to histone H3 methylated at lysine 9. *Nature*, **416**, 103-107.
- Okamoto, K. and Isohashi, F. (2000) Purification and primary structure of a macromolecular-translocation inhibitor II of glucocorticoid-receptor binding to nuclei from rat liver. Inhibitor II is the 11.5-kDa Zn²⁺-binding protein (parathymosin). *Eur J Biochem*, **267**, 155-162.
- Okuwaki, M. and Nagata, K. (1998) Template activating factor-I remodels the chromatin structure and stimulates transcription from the chromatin template. *J Biol Chem*, **273**, 34511-34518.
- Pan, L.X., Haritos, A.A., Wideman, J., Komiyama, T., Chang, M., Stein, S., Salvin, S.B. and Horecker, B.L. (1986) Human prothymosin alpha: amino acid sequence and immunologic properties. *Arch Biochem Biophys*, **250**, 197-201.
- Panneerselvam, C., Wellner, D. and Horecker, B.L. (1988) The amino acid sequence of bovine thymus prothymosin alpha. *Arch Biochem Biophys*, **265**, 454-457.
- Papamarcaki, T. and Tsolas, O. (1994) Prothymosin alpha binds to histone H1 in vitro. *FEBS Lett*, **345**, 71-75.
- Parseghian, M.H. and Hamkalo, B.A. (2001) A compendium of the histone H1 family of somatic subtypes: an elusive cast of characters and their characteristics. *Biochem Cell Biol*, **79**, 289-304.
- Parseghian, M.H., Henschen, A.H., Krieglstein, K.G. and Hamkalo, B.A. (1994) A proposal for a coherent mammalian histone H1 nomenclature correlated with amino acid sequences. *Protein Sci*, **3**, 575-587.
- Parseghian, M.H., Newcomb, R.L. and Hamkalo, B.A. (2001) Distribution of somatic H1 subtypes is non-random on active vs. inactive chromatin II: distribution in human adult fibroblasts. *J Cell Biochem*, **83**, 643-659.



- Pearson, R.B. and Kemp, B.E. (1991) Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations. *Methods Enzymol*, **200**, 62-81.
- Peters, A.H., Mermoud, J.E., O'Carroll, D., Pagani, M., Schweizer, D., Brockdorff, N. and Jenuwein, T. (2002) Histone H3 lysine 9 methylation is an epigenetic imprint of facultative heterochromatin. *Nat Genet*, **30**, 77-80.
- Peterson, C.L. (2002) Chromatin remodeling enzymes: taming the machines. Third in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep*, **3**, 319-322.
- Peterson, C.L. and Logie, C. (2000) Recruitment of chromatin remodeling machines. *J Cell Biochem*, **78**, 179-185.
- Philpott, A., Krude, T. and Laskey, R.A. (2000) Nuclear chaperones. *Semin Cell Dev Biol*, **11**, 7-14.
- Philpott, A. and Leno, G.H. (1992) Nucleoplasmin remodels sperm chromatin in *Xenopus* egg extracts. *Cell*, **69**, 759-767.
- Prieto, C., Saperas, N., Arnan, C., Hills, M.H., Wang, X., Chiva, M., Aligue, R., Subirana, J.A. and Ausio, J. (2002) Nucleoplasmin interaction with protamines. Involvement of the polyglutamic tract. *Biochemistry*, **41**, 7802-7810.
- Pruss, D., Bartholomew, B., Persinger, J., Hayes, J., Arents, G., Moudrianakis, E.N. and Wolffe, A.P. (1996) An asymmetric model for the nucleosome: a binding site for linker histones inside the DNA gyres. *Science*, **274**, 614-617.
- Puck, T.T., Marcus, P.I. and Cieciura, S.J. (1956) Clonal growth of mammalian cells in vitro; growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a feeder layer. *J Exp Med*, **103**, 273-283.
- Rasheed, B.K., Whisenant, E.C., Ghai, R.D., Papaioannou, V.E. and Bhatnagar, Y.M. (1989) Biochemical and immunocytochemical analysis of a histone H1 variant from the mouse testis. *J Cell Sci*, **94** (Pt 1), 61-71.
- 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. and Jenuwein, T. (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, **406**, 593-599.
- Reyes, J.C., Muchardt, C. and Yaniv, M. (1997) Components of the human SWI/SNF complex are enriched in active chromatin and are associated with the nuclear matrix. *J Cell Biol*, **137**, 263-274.



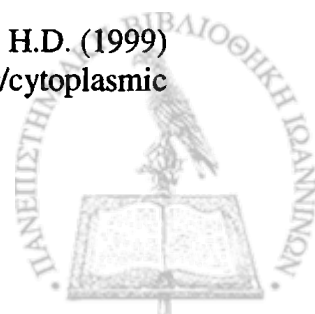
- Roguev, A., Schaft, D., Shevchenko, A., Pijnappel, W.W., Wilm, M., Aasland, R. and Stewart, A.F. (2001) The *Saccharomyces cerevisiae* Set1 complex includes an Ash2 homologue and methylates histone 3 lysine 4. *Embo J*, **20**, 7137-7148.
- Rose, S.M. and Garrard, W.T. (1984) Differentiation-dependent chromatin alterations precede and accompany transcription of immunoglobulin light chain genes. *J Biol Chem*, **259**, 8534-8544.
- Sandaltzopoulos, R., Blank, T. and Becker, P.B. (1994) Transcriptional repression by nucleosomes but not H1 in reconstituted preblastoderm *Drosophila* chromatin. *Embo J*, **13**, 373-379.
- Scheer, U. and Benavente, R. (1990) Functional and dynamic aspects of the mammalian nucleolus. *Bioessays*, **12**, 14-21.
- Schlissel, M.S. and Brown, D.D. (1984) The transcriptional regulation of *Xenopus* 5s RNA genes in chromatin: the roles of active stable transcription complexes and histone H1. *Cell*, **37**, 903-913.
- Schmidt, G. and Werner, D. (1991) Nucleotide sequence of the murine prothymosin alpha cDNA and its deduced primary and secondary protein structure. *Biochim Biophys Acta*, **1088**, 442-444.
- Schneider, R., Bannister, A.J., Weise, C. and Kouzarides, T. (2004) Direct binding of INHAT to H3 tails disrupted by modifications. *J Biol Chem*, **279**, 23859-23862.
- Schul, W., de Jong, L. and van Driel, R. (1998) Nuclear neighbours: the spatial and functional organization of genes and nuclear domains. *J Cell Biochem*, **70**, 159-171.
- Seo, S.B., McNamara, P., Heo, S., Turner, A., Lane, W.S. and Chakravarti, D. (2001) Regulation of histone acetylation and transcription by INHAT, a human cellular complex containing the set oncoprotein. *Cell*, **104**, 119-130.
- Sera, T. and Wolffe, A.P. (1998) Role of histone H1 as an architectural determinant of chromatin structure and as a specific repressor of transcription on *Xenopus* oocyte 5S rRNA genes. *Mol Cell Biol*, **18**, 3668-3680.
- Seyedin, S.M., Cole, R.D. and Kistler, W.S. (1981) H1 histones from mammalian testes. The widespread occurrence of H1t. *Exp Cell Res*, **136**, 399-405.
- Shen, X. and Gorovsky, M.A. (1996) Linker histone H1 regulates specific gene expression but not global transcription in vivo. *Cell*, **86**, 475-483.



- Shen, X., Yu, L., Weir, J.W. and Gorovsky, M.A. (1995) Linker histones are not essential and affect chromatin condensation in vivo. *Cell*, **82**, 47-56.
- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A. and Shi, Y. (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*, **119**, 941-953.
- Sirotkin, A.M., Edelman, W., Cheng, G., Klein-Szanto, A., Kucherlapati, R. and Skoultschi, A.I. (1995) Mice develop normally without the H1(0) linker histone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 6434-6438.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, **150**, 76-85.
- Snowden, A.W., Gregory, P.D., Case, C.C. and Pabo, C.O. (2002) Gene-specific targeting of H3K9 methylation is sufficient for initiating repression in vivo. *Curr Biol*, **12**, 2159-2166.
- Spangrude, G.J., Heimfeld, S. and Weissman, I.L. (1988) Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*, **241**, 58-62.
- Spector, D.L. (1993) Macromolecular domains within the cell nucleus. *Annu Rev Cell Biol*, **9**, 265-315.
- Spector, D.L. (2001) Nuclear domains. *J Cell Sci*, **114**, 2891-2893.
- Speliotes, E.K., Uren, A., Vaux, D. and Horvitz, H.R. (2000) The survivin-like *C. elegans* BIR-1 protein acts with the Aurora-like kinase AIR-2 to affect chromosomes and the spindle midzone. *Mol Cell*, **6**, 211-223.
- Stein, A., Whitlock, J.P., Jr. and Bina, M. (1979) Acidic polypeptides can assemble both histones and chromatin in vitro at physiological ionic strength. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 5000-5004.
- Stoscheck, C.M. (1990) Quantitation of protein. *Methods Enzymol*, **182**, 50-68.
- Strahl, B.D. and Allis, C.D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*, **403**, 41-45.
- Stratling, W.H. (1987) Gene-specific differences in the supranucleosomal organization of rat liver chromatin. *Biochemistry*, **26**, 7893-7899.



- Subramanian, C., Hasan, S., Rowe, M., Hottiger, M., Orre, R. and Robertson, E.S. (2002) Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C and prothymosin alpha interact with the p300 transcriptional coactivator at the CH1 and CH3/HAT domains and cooperate in regulation of transcription and histone acetylation. *J Virol*, **76**, 4699-4708.
- Sudarsanam, P., Iyer, V.R., Brown, P.O. and Winston, F. (2000) Whole-genome expression analysis of snf/swi mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 3364-3369.
- Sudarsanam, P. and Winston, F. (2000) The Swi/Snf family nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control. *Trends Genet*, **16**, 345-351.
- Szabo, P., Clinton, M., Macera, M. and Horecker, B.L. (1989) Localization of the gene coding for parathymosin to chromosome 17 in humans. *Cytogenet Cell Genet*, **50**, 91-92.
- Taunton, J., Hassig, C.A. and Schreiber, S.L. (1996) A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science*, **272**, 408-411.
- Thomas, J.O. (1999) Histone H1: location and role. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 312-317.
- Thomson, S., Clayton, A.L., Hazzalin, C.A., Rose, S., Barratt, M.J. and Mahadevan, L.C. (1999) The nucleosomal response associated with immediate-early gene induction is mediated via alternative MAP kinase cascades: MSK1 as a potential histone H3/HMG-14 kinase. *Embo J*, **18**, 4779-4793.
- Travers, A. (1999) The location of the linker histone on the nucleosome. *Trends Biochem Sci*, **24**, 4-7.
- Travers, A.A. (2003) Priming the nucleosome: a role for HMGB proteins? *EMBO Rep*, **4**, 131-136.
- Trompeter, H.I., Blankenburg, G., Brugger, B., Menne, J., Schiermeyer, A., Scholz, M. and Soling, H.D. (1996) Variable nuclear cytoplasmic distribution of the 11.5-kDa zinc-binding protein (parathymosin-alpha) and identification of a bipartite nuclear localization signal. *J Biol Chem*, **271**, 1187-1193.
- Trompeter, H.I., Brand, I.A. and Soling, H.D. (1989) The primary sequence of the PFK-1 inactivating zinc-binding protein as deduced from cDNA sequencing. Identity of the zinc-binding protein with rat parathymosin. *FEBS Lett*, **253**, 63-66.
- Trompeter, H.I., Schiermeyer, A., Blankenburg, G., Hennig, E. and Soling, H.D. (1999) Factors involved in the cell density-dependent regulation of nuclear/cytoplasmic



distribution of the 11.5-kDa Zn(2+)-binding protein (parathymosin-alpha) in rat hepatocytes. *J Cell Sci*, **112** (Pt 22), 4113-4122.

Trompeter, H.I. and Soling, H.D. (1992) Cloning and characterisation of a gene encoding the 11.5 kDa zinc-binding protein (parathymosin-alpha). *FEBS Lett*, **298**, 245-248.

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

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

Tumbar, T., Sudlow, G. and Belmont, A.S. (1999) Large-scale chromatin unfolding and remodeling induced by VP16 acidic activation domain. *J Cell Biol*, **145**, 1341-1354.

van Driel, R., Wansink, D.G., van Steensel, B., Grande, M.A., Schul, W. and de Jong, L. (1995) Nuclear domains and the nuclear matrix. *Int Rev Cytol*, **162A**, 151-189.

van Holde, K. E. (1988) *Chromatin*, Spring Verlag, New York, NY

van Holde, K. and Zlatanova, J. (1996) What determines the folding of the chromatin fiber? *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 10548-10555.

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

Vareli, K., Frangou-Lazaridis, M., van der Kraan, I., Tsolas, O. and van Driel, R. (2000) Nuclear distribution of prothymosin alpha and parathymosin: evidence that prothymosin alpha is associated with RNA synthesis processing and parathymosin with early DNA replication. *Exp Cell Res*, **257**, 152-161.

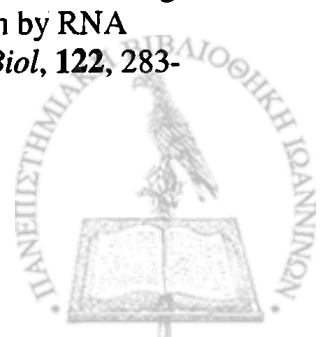
Vareli K, Doctoral Dissertation, University of Ioannina

Varga-Weisz, P. (2001) ATP-dependent chromatin remodeling factors: nucleosome shufflers with many missions. *Oncogene*, **20**, 3076-3085.

Varga-Weisz, P., Zlatanova, J., Leuba, S.H., Schroth, G.P. and van Holde, K. (1994) Binding of histones H1 and H5 and their globular domains to four-way junction DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 3525-3529.



- Vartapetian, A., Chichkova, N., Lyakhov, I., Makarova, T., Evstafieva, A. and Bogdanov, A. (1992) Segments of *Escherichia coli* genome similar to the exons of human prothymosin alpha gene. *FEBS Lett*, **313**, 95-97.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W. et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science*, **291**, 1304-1351.
- Verschure, P.J., van Der Kraan, I., Manders, E.M. and van Driel, R. (1999) Spatial relationship between transcription sites and chromosome territories. *J Cell Biol*, **147**, 13-24.
- Vila, R., Ponte, I., Jimenez, M.A., Rico, M. and Suau, P. (2000) A helix-turn motif in the C-terminal domain of histone H1. *Protein Sci*, **9**, 627-636.
- Visser, A.E. and Aten, J.A. (1999) Chromosomes as well as chromosomal subdomains constitute distinct units in interphase nuclei. *J Cell Sci*, **112** (Pt 19), 3353-3360.
- Visser, A.E., Eils, R., Jauch, A., Little, G., Bakker, P.J., Cremer, T. and Aten, J.A. (1998) Spatial distributions of early and late replicating chromatin in interphase chromosome territories. *Exp Cell Res*, **243**, 398-407.
- Visser, A.E., Jaunin, F., Fakan, S. and Aten, J.A. (2000) High resolution analysis of interphase chromosome domains. *J Cell Sci*, **113** (Pt 14), 2585-2593.
- Volpi, E.V., Chevret, E., Jones, T., Vatcheva, R., Williamson, J., Beck, S., Campbell, R.D., Goldsworthy, M., Powis, S.H., Ragoussis, J., Trowsdale, J. and Sheer, D. (2000) Large-scale chromatin organization of the major histocompatibility complex and other regions of human chromosome 6 and its response to interferon in interphase nuclei. *J Cell Sci*, **113** (Pt 9), 1565-1576.
- von Lindern, M., van Baal, S., Wiegant, J., Raap, A., Hagemeijer, A. and Grosveld, G. (1992) Can, a putative oncogene associated with myeloid leukemogenesis, may be activated by fusion of its 3' half to different genes: characterization of the set gene. *Mol Cell Biol*, **12**, 3346-3355.
- Wang, Z.F., Sirotkin, A.M., Buchold, G.M., Skoultschi, A.I. and Marzluff, W.F. (1997) The mouse histone H1 genes: gene organization and differential regulation. *J Mol Biol*, **271**, 124-138.
- Wansink, D.G., Schul, W., van der Kraan, I., van Steensel, B., van Driel, R. and de Jong, L. (1993) Fluorescent labeling of nascent RNA reveals transcription by RNA polymerase II in domains scattered throughout the nucleus. *J Cell Biol*, **122**, 283-293.



- Watts, J.D., Cary, P.D., Sautiere, P. and Crane-Robinson, C. (1990) Thymosins: both nuclear and cytoplasmic proteins. *Eur J Biochem*, **192**, 643-651.
- Wei, Y., Mizzen, C.A., Cook, R.G., Gorovsky, M.A. and Allis, C.D. (1998) 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*, **95**, 7480-7484.
- Wigler, M., Pellicer, A., Silverstein, S. and Axel, R. (1978) Biochemical transfer of single-copy eucaryotic genes using total cellular DNA as donor. *Cell*, **14**, 725-731.
- Williams, R.R. (2003) Transcription and the territory: the ins and outs of gene positioning. *Trends Genet*, **19**, 298-302.
- Williams, R.R., Broad, S., Sheer, D. and Ragoussis, J. (2002) Subchromosomal positioning of the epidermal differentiation complex (EDC) in keratinocyte and lymphoblast interphase nuclei. *Exp Cell Res*, **272**, 163-175.
- Wolffe, A. P. (1998) *Chromatin: Structure and Function*, Academic Press, USA
- Wolffe, A.P. and Hayes, J.J. (1999) Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res*, **27**, 711-720.
- Woodcock, C.L. and Dimitrov, S. (2001) Higher-order structure of chromatin and chromosomes. *Curr Opin Genet Dev*, **11**, 130-135.
- Woodcock, C.L., Grigoryev, S.A., Horowitz, R.A. and Whitaker, N. (1993) A chromatin folding model that incorporates linker variability generates fibers resembling the native structures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 9021-9025.
- Wray, W., Boulikas, T., Wray, V.P. and Hancock, R. (1981) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, **118**, 197-203.
- Wu, C.G., Boers, W., Reitsma, P.R., van Deventer, S.J. and Chamuleau, R.A. (1997) Overexpression of prothymosin alpha, concomitant with c-myc, during rat hepatic carcinogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, **232**, 817-821.
- Zheng, C. and Hayes, J.J. (2003) Structures and interactions of the core histone tail domains. *Biopolymers*, **68**, 539-546.



- Zhou, Y.B., Gerchman, S.E., Ramakrishnan, V., Travers, A. and Muyldermans, S. (1998) Position and orientation of the globular domain of linker histone H5 on the nucleosome. *Nature*, **395**, 402-405.
- Zirbel, R.M., Mathieu, U.R., Kurz, A., Cremer, T. and Lichter, P. (1993) Evidence for a nuclear compartment of transcription and splicing located at chromosome domain boundaries. *Chromosome Res*, **1**, 93-106.
- Zlatanova, J., Caiafa, P. and Van Holde, K. (2000) Linker histone binding and displacement: versatile mechanism for transcriptional regulation. *Faseb J*, **14**, 1697-1704.





... ..
... ..
... ..
... ..

... ..
... ..
... ..
... ..

... ..
... ..
... ..
... ..

