

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**  
**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ**

**Μεταπτυχιακή Εργασία**

“ Πρότυπο έκφρασης της ετεροχρωματινικής πρωτεΐνης HP1. ”

**Μονδάνου Αλκμήνη**

**Υπεύθυνος καθηγητής: Γεωργάτος Σπύρος**  
**Εργαστήριο Μοριακής-Κυτταρικής Βιολογίας**  
**Τομέας Βασικών Επιστημών**  
**Τμήμα Ιατρικής**  
**Πανεπιστήμιο Κρήτης**

**Ηράκλειο, 2001.**

# Περιεχόμενα

<b>1. Εισαγωγή</b>	<b>1</b>
1.1. Η οικογένεια των πρωτεϊνών της ετεροχρωματίνης, HP1.	1
1.2. Δομικά χαρακτηριστικά των HP1 πρωτεϊνών.	2
1.2.1. Η chromo domain περιοχή.	5
1.2.2. Η δομή της chromo shadow περιοχής.	7
1.2.3. Το τμήμα 'hinge'.	9
1.3. Αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες.	10
<b>2. Μέθοδοι-Αντιδραστήρια</b>	<b>14</b>
2.1. Απομόνωση ολικού RNA με το αντιδραστήριο TRIZOL	14
2.2. Εύρεση συγκέντρωσης RNA	14
2.3. Επεξεργασία RNA με DNase I	15
2.4. Reverse transcriptase PCR (RT-PCR)	15
2.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR (polymerase chain reaction)	16
2.6. Απομόνωση DNA από κύτταρα (Qiagen kit)	18
2.7. Εξισορρόπηση Φαινόλης	19
2.8. Εξαγωγή DNA από gel αγαρόζης	20
2.9. Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε τομές ιστών.	21
2.10. Southern Blot	23
2.10.1. Ραδιοεπισήμανση του DNA (random priming)	23
2.10.2. Μεταφορά του DNA από το gel στην μεμβράνη (transfer)	24
2.10.3. Υβριδοποίηση	26
<b>3. Αποτελέσματα</b>	<b>27</b>
3.1. Απομόνωση ολικού RNA από ιστούς ποντικού.	27
3.2. Ανάλυση με RT-PCR	27
3.3. Ανάλυση με υβριδοποίηση κατά Southern.	30
3.4. Μελέτη των HP1α, M31 και M32 με έμμεσο ανοσοφθορισμό.	33
.	
<b>4. Συζήτηση</b>	<b>43</b>
<b>5. Βιβλιογραφία</b>	<b>46</b>

## 1.Εισαγωγή

### 1.1. Η οικογένεια των πρωτεϊνών της ετεροχρωματίνης, HP1.

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, το γονιδίωμα σχηματίζει μεγάλες χρωματινικές δομές. Οι δομές αυτές διακρίνονται στην ευχρωματίνη και την ετεροχρωματίνη, που έχουν διακριτές ιδιότητες η καθεμία.

Η ετεροχρωματίνη περιλαμβάνει περιοχές του γονιδιώματος οι οποίες χαρακτηρίζονται μικροσκοπικά ως “συμπυκνωμένες” καθ’ όλη τη διάρκεια της μεσόφασης. Η αντιγραφή αυτών των περιοχών γίνεται κατά το τέλος της S φάσης (Goldman *et al.*, 1984; Hatton *et al.*, 1988). Εντοπίζονται κυρίως στην περιφέρεια του πυρήνα ή γύρω από τους πυρηνίσκους. Επίσης, μεγάλες περιοχές της ετεροχρωματίνης βρίσκονται στο απενεργοποιημένο X χρωμόσωμα κοντά στα κεντρομερή και στα τελομερή.

Όταν ένα γονίδιο μεταφερθεί μέσω χρωμοσωμικών ανασυνδυασμών από μία ευχρωματινική περιοχή, στην οποία φυσιολογικά βρίσκεται, σε μια ετεροχρωματινική, τότε υπόκειται σε αποσιώπηση. Η απενεργοποίηση του γονιδίου ποικίλλει σε βαθμό και σε έκταση δίνοντας έναν “μωσαϊκό” φαινότυπο. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται φαινόμενο επίδρασης θέσεως PEV, position-effect variegation ( Henikoff, 1990; Elgin, 1996; Wakimoto, 1998). Για την αποσιώπηση των γονιδίων υπάρχει η υπόθεση ότι είναι αποτέλεσμα της αλλαγής των δομών στη χρωματίνη από μια ευχρωματινική κατάσταση σε μια ετεροχρωματινική. Εξέταση σε variegating breakpoints σε πολυταινικούς πυρήνες έδειξε ότι μετατοπισμένη ευχρωματίνη επηρεάζει άμεσα την μορφολογία της ετεροχρωματίνης (Henikoff 1981). Περαιτέρω έχει βρεθεί ότι τα γονίδια που εμπλέκονται στο φαινόμενο PEV είναι δομικά συστατικά της ετεροχρωματίνης.

Μέχρι σήμερα έχει περιγραφεί ένα πλήθος γονιδίων που ονομάζονται τροποποιητές (modifiers) του PEV. Μεταλλαγές τους που ενισχύουν ή αντίθετα καταστέλλουν τον μωσαϊκό φαινότυπο ονομάζονται αντίστοιχα ενισχυτές (*Evars*) και καταστολείς, (*Suvars*). Τα γονίδια *Evars* προάγουν την ευχρωματινική κατάσταση, ενώ αντίθετα τα *Suvars*, ευνοούν την

ετεροχρωματινική, προσελκύοντας συστατικά της συμπαγούς δομής της χρωματίνης ή κάποια ένζυμα με τροποποιητικές ικανότητες.

Το τροποποιητικό γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη της ετεροχρωματίνης HP1 (heterochromatin protein 1) (James and Elgin, 1986; James *et al.*, 1989) είναι το πρώτο που κλωνοποιήθηκε στη *Drosophila* και χαρακτηρίστηκε καλύτερα (Eissenberg *et al.*, 1987; Eissenberg *et al.*, 1990; Reuter *et al.*, 1990). Έχει δειχθεί ότι το φαινόμενο PEV ενισχύεται με υπερέκφραση του γονιδίου *HP1* δηλαδή με αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης HP1 ενώ καταστέλλεται με τη μεταλλαγή του γονιδίου, *Suvar(2)5*.

Η πρωτεΐνη HP1 έχει μια χαρακτηριστική αμινο-τελική περιοχή που ονομάζεται chromobox ή chromodomain (chromatin organisation modifier, CD). Η chromo περιοχή βρίσκεται και σε μια άλλη πρωτεΐνη της *Drosophila*, την Polycomb (Pc) πρωτεΐνη (Paro and Hogness, 1991). Η Polycomb πρωτεΐνη αντιπροσωπεύει μια ξεχωριστή κατηγορία πρωτεϊνών που περιέχουν τη chromodomain. Το *Pc* γονίδιο, μαζί με άλλα μέλη της οικογένειας των *Pc*, εμπλέκονται στην καταστολή των ομοιοτικών γονιδίων. Παρόμοιο μοτίβο έχει βρεθεί στην πρωτεΐνη swi6 στον σακχαρομύκητα, *Schizosaccharomyces pombe*. Το γονίδιο αυτό εμπλέκεται στην καταστολή του donor mating type loci (Lorenz *et al.*, 1994).

## **1.2. Δομικά χαρακτηριστικά των HP1 πρωτεϊνών.**

Η συντηρημένη δομή της chromo περιοχής επέτρεψε την απομόνωση κι άλλων γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ομόλογες με την HP1 (Σχήμα2).

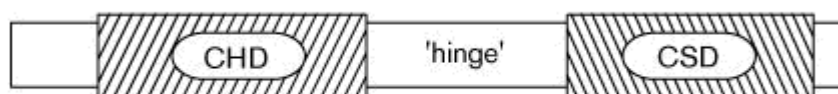
Έχουν βρεθεί διάφορα ομόλογα της HP1 στα θηλαστικά: οι HP1α, M31 (ή MOD1) και M32 (ή MOD2) στον ποντικό και αντίστοιχα οι HP1α, -β και -γ στον άνθρωπο και στον *Xenopus* (Singh *et al.*, 1991; Saunders *et al.*, 1993; Le Douarin *et al.*, 1996; Ye and Worman, 1996; Pak *et al.*, 1997).

Αν και οι παραπάνω πρωτεΐνες είναι δομικά όμοιες παρόλα αυτά κατανέμονται με διαφορετικό τρόπο στον πυρήνα των κυττάρων. Από πειράματα ανοσοφθορισμού σε μεσοφασικά κύτταρα ποντικού, οι δύο ισομορφές της HP1 πρωτεΐνης, οι HP1α και HP1β συνεντοπίζονται (Horsley *et*

*al.*, 1996). Σε μιτωτικά HeLa κύτταρα , η HP1α και ένα μέρος των HP1β και HP1γ παραμένουν προσδεδωμένες στα χρωμοσώματα. Συγκεκριμένα οι HP1α και HP1β εντοπίζονται στα κεντρομερή ενώ η HP1γ κατανέμεται σε διακριτές θέσεις στους βραχίονες των χρωμοσωμάτων. Όμως οι παρατηρήσεις σχετικά με το πρότυπο εντοπισμού των HP1 στον πυρήνα των κυττάρων διαφέρουν ανάλογα με τον τρόπο μονιμοποίησης των δειγμάτων, που μελετούνται με τον ανοσοφθορισμό.

Στα ανθρώπινα κύτταρα το πρότυπο εντόπισης τους είναι διαφορετικό. Κάθε ισομορφή της HP1 στοχεύει σε διαφορετικές περιοχές της ετεροχρωματίνης (Minc *et al.*, 1999).

Οι HP1 πρωτεΐνες περιλαμβάνουν τρεις χαρακτηριστικές περιοχές: την chromodomain (CD), στο άμινο-τελικό άκρο (37 αμινοξέα), την chromoshadow domain (CSD), στο καρβοξυ-τελικό άκρο και την μεταβλητή ενδιάμεση περιοχή, που ενώνει τις δύο προηγούμενες και ονομάζεται χαρακτηριστικά 'hinge' (Epstein *et al.*, 1992; Aasland and Stewart, 1995)(Σχήμα 1).



### **Σχήμα 1**

Σχηματική απεικόνιση της δομής των HP1 πρωτεϊνών. Το μοτίβο της άμινο-τελικής περιοχής, της chromo domain (CD), χωρίζεται από το καρβόξυ-τελική περιοχή, τη chromo shadow domain (CSD), μέσω της ποικίλης σε μήκος συνδετικής περιοχής 'hinge' (Eissenberg, J.C., and S.C.R. Elgin, 2000) .

**HP1-like proteins: Chromodomains**

hHP1α : UJREJAEKVVYRMLDPRVYVQVYVYLLKAGGPFUAEKDFWVEMKLUQPELLIAPNRYAKMKEGWE : 70  
 mHP1α : UJREJAEKVVYRMLDPRVYVQVYVYLLKAGGPFUAEKDFWVEMKLUQPELLIAPNRYAKMKEGWE : 70  
 hHP1β : LKREAEKVVYRMLDPRVYVQVYVYLLKAGGPFUAEKDFWVEMKLUQPELLIAPNRYAKMKEGWE : 79  
 hHP1γ : LKREAEKVVYRMLDPRVYVQVYVYLLKAGGPFUAEKDFWVEMKLUQPELLIAPNRYAKMKEGWE : 77  
 + MKKVVYRMLDPRVYVQVYVYLLKAGGPFUAEKDFWVEMKLUQPELLIAPNRYAKMKEGWE

**HP1-like proteins: Chromo shadow domains**

hHP1α : SFERSLEPERITTSATDQSCEDMDFLKKKMDYKADDFVLAKEBANVQDQDTLAFYBERLIMWHSPT-ED-- : 184  
 mHP1α : SFANGLDPERITTSATDQSCEDMDFLKKKMDYKADDFVLAKEBANVQDQDTLAFYBERLIMWHSPT-ED-- : 170  
 hHP1β : SFANGLDPERITTSATDQSCEDMDFLKKKMDYKADDFVLAKEBANVQDQDTLAFYBERLIMWHSPT-ED-- : 188  
 hHP1γ : SFANGLDPERITTSATDQSCEDMDFLKKKMDYKADDFVLAKEBANVQDQDTLAFYBERLIMWHSPT-ED-- : 180  
 SFERSL PELLISADDFGGLKFLKMMFLQADDFVLAKEBANVQDQDTLAFYBERLIMWHSPT-ED

**Polycomb-like Proteins: Chromodomains**

mPc1 : VFAAKCILLKSKLAKKSLKYLKMKKAGSSEKMSSEKSEKMLDPRLLAFQKKE-HEKEVQMKRKKK-- : 74  
 hPC1 : VFAAKCILLKSKLAKKSLKYLKMKKAGSSEKMSSEKSEKMLDPRLLAFQKKE-HEKEVQMKRKKK-- : 74  
 mPc2 : VFAAKCILLKSKLAKKSLKYLKMKKAGSSEKMSSEKSEKMLDPRLLAFQKKE-HEKEVQMKRKKK-- : 74  
 hPC2 : VFAAKCILLKSKLAKKSLKYLKMKKAGSSEKMSSEKSEKMLDPRLLAFQKKE-HEKEVQMKRKKK-- : 74  
 mPc3 : VFAAKCILLKSKLAKKSLKYLKMKKAGSSEKMSSEKSEKMLDPRLLAFQKKE-HEKEVQMKRKKK-- : 74  
 VFA E I KSGRSG46GVIVVIGRSGW R EIDDEEDMLDPRDGLAFQ 4E I 6 PRRG

**CHD-like proteins: Chromodomain 1**

MmCHD1 : YAVEADGDPNAGFERNKEF-CEIQYLIRKCGMSHIEHTDEETETL----- : 339  
 HsCHD1 : YAVEADGDPNAGFERNKEF-CEIQYLIRKCGMSHIEHTDEETETL----- : 341  
 HsCHD2 : YAVEADGDPNAGFERNKEF-CEIQYLIRKCGMSVIEHTDEETETL----- : 331  
 HsCHD3 : Q LDCMDFDPTPLDQDSEPEFFVKKVCLSYWECSTAKILCL----- : 571  
 HsCHD4 : F PDRDPTDPTSPFLDQDSEPEFFVKKVCLSYWECSTAKILCL----- : 561  
 aIqIP e 25 6KW G S H 3T E L

**CHD-like proteins: Chromodomain 2**

MmCHD1 : RILAKHNCSSAAGS-----EDYTCMNGLEYVBCSNEDSAL : 420  
 HsCHD1 : RILAKHNCSSAAGS-----EDYTCMNGLEYVBCSNEDSAL : 428  
 HsCHD2 : RVLAVDSSSTLQCTDPAHSHKADAESEPEYLCMNGLEYVBCSNEDSAL : 433  
 HsCHD3 : RILAKHNCSSAAGS-----EDYTCMNGLEYVBCSNEDSAL : 428  
 HsCHD4 : RILAKHNCSSAAGS-----EDYTCMNGLEYVBCSNEDSAL : 428  
 R A S H A C 4 4 1

**SET39-like proteins: Chromodomains**

SET39H1 : LYDFEVEYLDDYKRLKRCYVYLVKAGGSDSESIWEPRQNLK : 82  
 set39H1 : LYDFEVEYLDDYKRLKRCYVYLVKAGGSDSESIWEPRQNLK : 82  
 LYDFEVEYLDDYKRLKRCYVYLVKAGGSDSESIWEPRQNLK

**RBP1-like proteins: Chromodomain**

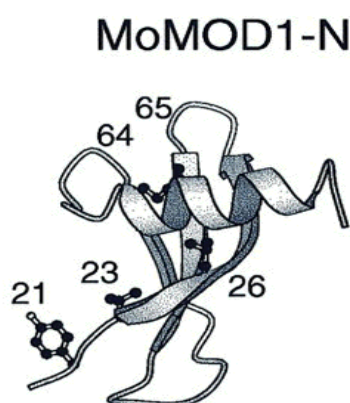
RBP1 : ---YKASLKERPTD---DSEIYVYLVKAGGSDSESIWEPRQNLK----- : 624

**Σχήμα 2**

Σύγκριση των πρωτεϊνών που έχουν chromodomain, στα θηλαστικά. Με πράσινο φαίνονται τα υδρόφοβα αμινοξέα του πυρήνα ενώ με μπλε τα βασικά αμινοξέα. Ως προς το συμβολισμό των HP1 πρωτεϊνών, για τον άνθρωπο χρησιμοποιούνται οι όροι hHP1α, hHP1β, hHP1γ. Για τον ποντικό mHP1α, mHP1β, mHP1γ ή αντίστοιχα mHP1α, M31 και M32. Για τις Pc πρωτεΐνες αντίστοιχα χρησιμοποιείται ‘H’ για τον άνθρωπο και ‘m’ για τον ποντικό. Η M33 ονομάζεται mPc1 και αντίστοιχη ανθρώπινη HPC1 (Jones, D.O., *et al.*, 2000).

### 1.2.1 Η chromo domain περιοχή

Η δομή της chromo περιοχής για την πρωτεΐνη M31, αναλύθηκε με τη φασματοσκοπία του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)(Ball et al., 1997). Πρόκειται για μια σφαιροειδή δομή που αποτελείται από τρεις αντι-παράλληλες β-αλυσίδες, που τοποθετούνται έτσι ώστε να δημιουργείται μια πτυχωτή επιφάνεια, απέναντι από μια α-έλικα στο καρβόξυ-τελικό άκρο (Σχήμα 3).



### Σχήμα 3

Δομή της chromo περιοχής από την πρωτεΐνη MoMOD1-N (Ball et al., 1997).

Η όλη δομή αποτελείται από έναν υδρόφοβο πυρήνα που περιέχει αμινοξέα τα οποία είναι συντηρημένα ανάμεσα στις chromo περιοχές των διαφορετικών χρωμο-πρωτεϊνών (Σχήμα 4). Μεταλλαγές που έχουν βρεθεί στην HP1 και έχουν σαν αποτέλεσμα την απώλεια της λειτουργίας της αφορούν αμινοξέα που βρίσκονται σε αυτόν τον υδρόφοβο πυρήνα (Platero et al., 1995).

		15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70																																																
<b>Chromo domains</b>																																																													
MoMOD1-A	15-74	E	E	E	E	E	E	E	Y	V	E	K	V	L	D	R	R	V	V	K	G	K	V	E	Y	L	L	K	W	K	G	F	S	D	E	D	N	T	W	E	P	E	E	N	L	D	C	P	D	L	I	A	E	F	L	Q	S	Q	K	T	A
MoMOD2-A	14-73	E	A	E	P	E	E	F	V	E	K	V	L	D	R	R	V	V	N	G	K	V	E	Y	F	L	K	W	K	G	F	T	D	A	D	N	T	W	E	P	E	E	N	L	D	C	P	E	L	I	E	D	F	L	N	S	Q	K	A	G	
DmHP1-A	18-77	E	E	E	E	E	E	Y	A	V	E	K	I	L	D	R	R	V	R	K	G	K	V	E	Y	L	K	W	K	G	Y	P	E	T	E	N	T	W	E	P	E	N	N	L	D	C	Q	D	L	I	Q	Q	Y	E	A	S	R	K	D	E	
DvHP1-A	18-77	E	E	E	E	E	Y	A	V	E	K	I	L	D	R	R	V	R	K	G	K	V	E	Y	L	K	W	K	G	Y	A	E	T	E	N	T	W	E	P	E	G	N	L	D	C	Q	D	L	I	Q	Q	Y	E	L	S	R	K	D	E		
HuHP1-A	14-73	S	E	D	E	E	E	E	Y	V	E	K	V	L	D	R	R	V	V	K	G	Q	V	E	Y	L	L	K	W	K	G	F	S	E	E	H	N	T	W	E	P	E	K	N	L	D	C	P	E	L	I	S	E	F	M	K	K	Y	K	K	M
MoMOD3	6-65	S	V	G	E	Q	V	F	A	A	E	C	I	L	S	K	R	L	R	K	G	K	L	E	Y	L	V	K	W	R	G	W	S	S	K	H	N	S	W	E	P	E	E	N	I	L	D	P	R	L	L	A	F	Q	K	K	E	H	E	K	
DmPc	20-79	D	P	V	D	L	V	Y	A	A	E	K	I	Q	K	R	V	K	K	G	V	V	E	Y	R	V	K	W	K	G	W	N	Q	R	Y	N	T	W	E	P	E	V	N	I	L	D	R	R	L	I	D	I	Y	E	Q	T	N	K	S	S	
DvPc	20-79	D	P	V	D	L	V	Y	A	A	E	K	I	Q	K	R	V	K	K	G	V	V	E	Y	R	V	K	W	K	G	W	N	Q	R	Y	N	T	W	E	P	E	V	N	I	L	D	R	R	L	I	D	I	Y	E	Q	T	N	K	S	S	
<b>Shadow chromo domains</b>																																																													
MoMOD1-B	111-170	R	G	F	A	R	G	L	E	P	E	R	I	I	G	A	T	D	S	S	G	E	L	M	F	L	M	K	W	K	N	S	D	E	A	D	L	V	P	A	K	E	A	N	V	K	C	P	Q	V	V	I	S	F	Y	E	E	R	L	T	W
MoMOD2-B	105-164	R	G	F	A	R	G	L	D	P	E	R	I	I	G	A	T	D	S	S	G	E	L	M	F	L	M	K	W	K	D	S	D	E	A	D	L	V	L	A	K	E	A	N	M	K	C	P	Q	I	V	I	A	F	Y	E	E	R	L	T	W
DmHP1-B	141-200	T	G	F	D	R	G	L	E	A	E	K	I	L	G	A	S	D	N	N	G	R	L	T	F	L	I	Q	F	K	G	V	D	Q	A	E	M	V	P	S	S	V	A	N	E	K	I	P	R	M	V	I	H	F	Y	E	E	R	L	S	W
DvHP1-B	148-207	T	G	F	D	R	G	L	E	A	E	K	I	L	G	A	S	D	N	N	G	R	L	T	F	L	I	Q	F	K	G	V	D	Q	A	E	M	V	P	S	T	V	A	N	V	K	I	P	Q	M	V	I	R	F	Y	E	E	R	L	S	W
HuHP1-B	115-174	R	G	F	E	R	G	L	E	P	E	K	I	I	G	A	T	D	S	C	G	D	L	M	F	L	M	K	W	K	D	T	D	E	A	D	L	V	L	A	K	E	A	N	V	K	C	P	Q	I	V	I	A	F	Y	E	E	R	L	T	W

#### Σχήμα 4

Ομολογία ακολουθίας αμινοξέων ανάμεσα στη chromo περιοχή της MoMOD1 και σε άλλες αντιπροσωπευτικές chromo περιοχές. Τα συντηρημένα αμινοξέα του υδρόφοβου πυρήνα χρωματίζονται κίτρινα, ενώ τα πράσινα αφορούν Gly και Pro. Τα μπλε κατάλοιπα είναι τα βασικά (Ball *et al.*, 1997).

Η chromo περιοχή διαθέτει επίσης μια υδρόφοβη αύλακα μέσα στην οποία υπάρχουν τα κατάλοιπα 23, 40, 42, 58, 60 και 63. Η αύλακα αυτή μπορεί να αποτελεί θέση αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (Le Douarin *et al.*, 1996). Στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών, σημαντικό ρόλο παίζει το γεγονός ότι στην επιφάνεια της δομής της chromo περιοχής υπάρχουν πολλά αρνητικά φορτία. Μεταλλαγές σε αμινοξέα της αύλακας, επηρεάζουν τη λειτουργία της πρωτεΐνης και αναστέλλουν την αποσιώπηση γονιδίων (Ball *et al.*, 1997). Έχουν βρεθεί διάφοροι παράγοντες που αλληλεπιδρούν με τις HP1 πρωτεΐνες, μέσω των CD μοτίβων.

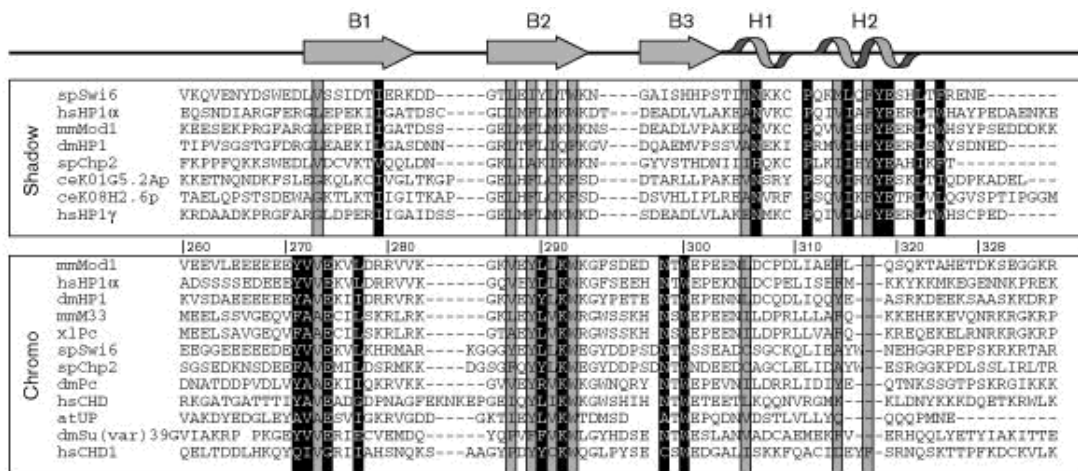


### 1.2.2 Η δομή της chromo shadow περιοχής.

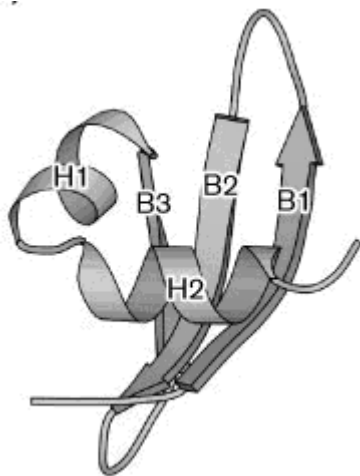
Όπως προαναφέρθηκε, το άλλο χαρακτηριστικό μοτίβο στο καρβόξυ-τελικό άκρο των HP1 πρωτεϊνών, είναι η περιοχή chromo shadow domain. Ανάμεσα σε αυτή και στη chromo domain υπάρχουν πολλές ομοιότητες με πολλά από τα απόλυτα διατηρημένα αμινοξέα, να βρίσκονται και στις δύο περιοχές (Σχήμα 4). Όμως μερικές δομικές διαφορές οδηγούν στην υπόθεση ότι έχουν διακριτούς ρόλους.

Η chromo shadow περιοχή έχειδειχθεί ότι σχηματίζει διμερή. (Cowieson *et al.*, 2000). Παρόμοια με τη δομή της chromo περιοχής, κάθε μονομερές σχηματίζει μια σφαιροειδή δομή στην οποία τρεις αντι-παράλληλες β-αλυσίδες σχηματίζουν μια πτυχωτή επιφάνεια που βρίσκεται απέναντι από δύο όμως α-έλικες (H1 και H2) στο καρβόξυ-τελικό άκρο (Σχήμα 5).

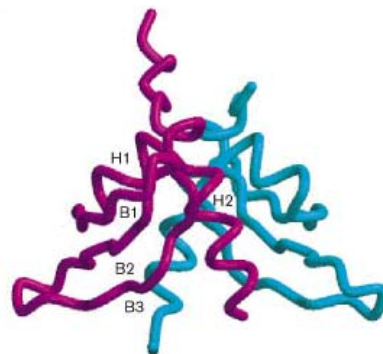
(α)



(β)



(γ)



### Σχήμα 5

(α) Συστοίχιση των αλληλουχιών των CD και CSD, βασισμένη στα δομικά τους χαρακτηριστικά. Τα είδη των οργανισμών γράφονται με συντομία ως εξής: sp, *S. pombe*; hs, *H. sapiens*; mm, *M. musculus*; ce, *Caenorhabditis elegans*; dm, *D. melanogaster*; xl, *Xenopus laevis*; at, *Arabidopsis thaliana*, (β) Δομή της μονομερούς υπομονάδας της chromo shadow περιοχής και (γ) Στερεοδομή του διμερούς. Το κάθε μόριο είναι χρωματισμένο διαφορετικά. Φαίνονται οι χαρακτηριστικές έλικες H1 και H2 καθώς και οι τρεις αλυσίδες B1,

B2 και B3. Η εικόνα είναι παράλληλη με τον άξονα C2 (Cowieson, N.P., *et al.*, 2000)

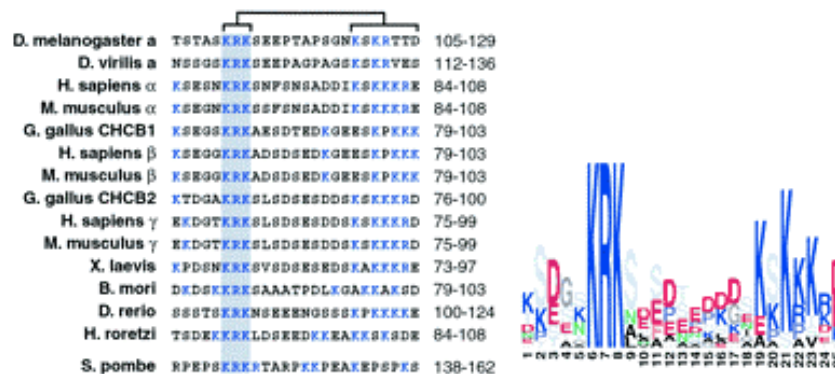
Η διεπιφάνεια διμερισμού σχηματίζεται μεταξύ των δύο α-ελίκων H2 από την κάθε υπομονάδα. Έχει περισσότερα μη πολικά αμινοξέα απ'ότι αναμένεται σε μια διεπιφάνεια πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, αλλά μικρότερο μήκος.

Όπως και στην *chromo* περιοχή, έτσι κι εδώ, υπάρχει μια διατηρημένη υδρόφοβη αύλακα, η οποία χρησιμεύει σαν υπόστρωμα με το οποίο αλληλεπιδρούν οι διάφορες πρωτεΐνες. Ένα συγκεκριμένο μοτίβο πενταπεπτιδίου βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά με την υδρόφοβη αυτή περιοχή. Έτσι οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τις *chromo shadow* περιοχές έχουν τη σταθερή αλληλουχία PxVxL. Πιο συγκεκριμένα, για τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τη CSD της HP1 στη *Drosophila*, βρέθηκε ότι το πεπτίδιο έχει ως εξής: [PL][WRY]V[MIL][MLV] (Smothers and Henikoff, 2001). Το πενταπεπτίδιο μπορεί να παρεισφρήσει μέσα στη διεπιφάνεια που σχηματίζεται μεταξύ των υπομονάδων του διμερούς.

### 1.2.3 Το τμήμα 'hinge'

Έχει βρεθεί ότι η περιοχή του 'hinge' έχει υδρόφιλο χαρακτήρα και δεν διαθέτει υδρόφοβο πυρήνα, ο οποίος θα της προσέδιδε μια σφαιροειδή τριτοταγή δομή. Το τμήμα αυτό δίνει πιθανότατα στην πρωτεΐνη την ευκαιρία να αλληλεπιδρά με άλλα κυτταρικά συστατικά. Επίσης περιέχει μια σταθερή αλληλουχία που αποτελείται από τα αμινοξέα Lys-Arg-Lys (KRK). Το διατηρημένο αυτό μοτίβο ίσως έχει μια καθορισμένη λειτουργία. Τέλος, παρατηρείται μέσα σε αυτό, η ύπαρξη ενός πιθανού διμερούς σήματος πυρηνικού εντοπισμού πρωτεϊνών NLS (Nuclear Localisation Signal). Το ένα τμήμα του σήματος περιλαμβάνει την αλληλουχία KRK με δύο βασικά αμινοξέα (K ή R). Ακολουθεί μια περιοχή 10 καταλοίπων και μετά, στις επόμενες πέντε θέσεις, βρίσκεται το δεύτερο τμήμα του υποθετικού σήματος NLS με τρία βασικά αμινοξέα. Μετά από σύγκριση με άλλα ομόλογα γονίδια όπως το *Swi6*, είναι προφανής η διατηρημένη φύση του διμερούς NLS, καθώς και η εμφάνιση της σταθερής αλληλουχίας KRK (Σχήμα 6). Σύμφωνα και με άλλες παρατηρήσεις, του αποδίδεται ο πιθανός ρόλος του στην είσοδο των

πρωτεϊνών HP1 στον πυρήνα (Dingwall and Laskey, 1991; Smothers and Henikoff, 2001).



## Σχήμα 6

Το τμήμα του 'hinge' αποτελείται από μια μεταβλητή αλληλουχία, στην οποία εντοπίζεται το διμερές σήμα του NLS και φαίνεται με τις αγκύλες. Τα μπλε αμινοξέα αντιστοιχούν στα βασικά και τα κόκκινα στα όξινα. Το μέγεθος στα γράμματα των αμινοξέων δηλώνει το βαθμό συντήρησης του (Smothers J.F., and S. Henikoff, 2001).

### 1.3. Αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες

Παρόλο που οι HP1 πρωτεΐνες δεν προσδένονται άμεσα στο DNA (Singh et al., 1991; Ball et al., 1997) αλληλεπιδρούν με διάφορες πρωτεΐνες, κυρίως μέσω της chromo shadow περιοχής.

Η μόνη γνωστή αλληλεπίδραση μέσω της chromo περιοχής έχει βρεθεί στη *Drosophila* μεταξύ της HP1 και του συμπλόκου origin recognition complex (ORC), που είναι απαραίτητο για την έναρξη της αντιγραφής του ευκαρυωτικού DNA (Pak et al., 1997). Η υπομονάδα που αλληλεπιδρά κυρίως με την HP1 είναι η DmORC1. Βρέθηκε ότι για την πρόσδεση είναι απαραίτητες οι δύο χαρακτηριστικές περιοχές, chromo και chromo shadow

της πρωτεΐνης HP1. Μεταλλαγές της DmORC1 καταργούν τον εντοπισμό της HP1 στην ετεροχρωματίνη και οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το σύμπλοκο έχει πιθανό ρόλο στη δημιουργία των συμπυκνωμένων δομών (Huang *et al.*, 1998). Επίσης, με μεταλλαγές στην υπομονάδα ORC2 χάνεται ο εντοπισμός της HP1 στην ετεροχρωματίνη. Έχει προταθεί ότι το σύμπλοκο ORC μαζί με άλλους παράγοντες που προσδένονται στο DNA, στρατολογούν την HP1 και τους ετεροχρωματινικούς παράγοντες στις θέσεις στόχευσής τους. Η αλληλεπίδραση ORC:HP1 πιθανότατα θα παρατηρηθεί και στα θηλαστικά, αφού το σύμπλοκο ORC αποτελεί ένα πολύ καλά διατηρημένο σύνολο πρωτεϊνών είναι απαραίτητο για την αντιγραφή του DNA. Είναι όμως αξιοσημείωτο ότι η HP1 είναι χωρικά περιορισμένη ενώ το σύμπλοκο ORC βρίσκεται σε όλες τις θέσεις αντιγραφής του γονιδιώματος.

Έχει βρεθεί ότι μέσω των chromo shadow περιοχών, η πρωτεΐνη mHP1β (M31 ή MOD1) σχηματίζει ομοδιμερή σε διάλυμα (Brasher *et al.*, 2000). Ομοδιμερή επίσης έχουν παρατηρηθεί της mHP1α και ετεροδιμερή mHP1α-mHP1γ ή mHP1β-mHP1γ (Le Douarin *et al.*, 1996). Όσον αφορά την HP1 στον άνθρωπο, έχουν επίσης παρατηρηθεί ομοδιμερή της HP1α και ετεροδιμερή της με την mHP1β (Ye *et al.*, 1997). Ο φυσιολογικός ρόλος των μορφών αυτών είναι ασαφής.

Η δημιουργία διμερούς CSD στην πρωτεΐνη HP1β παρατηρήθηκε ότι είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση με τον παράγοντα αποσιώπησης TIFβ (Brasher *et al.*, 2000). Με την μέθοδο του δύο-υβριδίων, βρέθηκε ότι οι HP1α και HP1β αλληλεπιδρούν με τον παράγοντα TIF1β/KAP-1 (Le Douarin *et al.*, 1996). Ο παράγοντας αυτός έχει απομονωθεί σαν συγκαταστολέας πρωτεϊνών με τη χαρακτηριστική περιοχή KRAB που αποτελεί μια ευρέως διαδεδομένη περιοχή καταστολής στα θηλαστικά. Οι πρωτεΐνες που διαθέτουν την περιοχή KRAB προσδένονται στο DNA και συνδέονται με τις HP1 πρωτεΐνες μέσω του παράγοντα KAP-1. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση ετεροχρωματινικών συμπλόκων στην περιοχή όπου επιτελείται καταστολή (Ryan *et al.*, 1999).

Μια άλλη πρωτεΐνη που βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά με τις HP1α και HP1β είναι η διαμεμβρανική πρωτεΐνη του πυρηνικού φακέλου, lamin B receptor, LBR (Ye and Worman, 1996). Ο υποδοχέας LBR προσδένει lamins τύπου-B

και πιθανότατα συμβάλλει στη διασύνδεση της χρωματίνης με τον πυρηνικό φάκελο.

Οι HP1α και HP1γ αλληλεπιδρούν με την inner centromere protein, (INCENP). Η πρωτεΐνη INCENP αποτελεί συστατικό των μιτωτικών χρωμοσωμάτων. Στην αρχή της μετάφασης εντοπίζεται στα κεντρομερή αλλά στη συνέχεια μετατοπίζεται στα ινίδια της ατράκτου και στην πλασματική μεμβράνη της δακτυλιοειδούς περίσφιγξης (Ainsztein *et al.*, 1998, Mackay *et al.*, 1993).

Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που βρέθηκε να συνδέεται με τις πρωτεΐνες HP1 και συγκεκριμένα την MOD1, είναι ο chromatin assembly factor, CAF (Murzina *et al.*, 1999). Η σύνδεση αποδίδεται στην υπομονάδα p150 του CAF. Μεταλλαγές στην υπομονάδα αυτή δεν επιτρέπουν τη σύνδεση του CAF στην ετεροχρωματίνη αλλά δεν επηρεάζουν τη φυσιολογική του λειτουργία στην αντιγραφή. Η σημασία της αλληλεπίδρασης δεν έχει εξακριβωθεί. Έχει προταθεί ότι μετά την αλληλεπίδραση της HP1 με το σύμπλοκο ORC στα σημεία αντιγραφής ακολουθεί επιστράτευση του παράγοντα CAF για να γίνει η αντιγραφή της ετεροχρωματίνης στο τέλος της S φάσης.

Αν και δεν έχει εξακριβωθεί ο μηχανισμός σύνδεσης των HP1 πρωτεϊνών με τη χρωματίνη, διάφορες μελέτες έχουν δείξει την αλληλεπίδραση HP1-νουκλεοσωμάτων. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί η πρόσδεση όλων των mHP1 πρωτεϊνών με την ιστόνη H3 μέσω της chromo περιοχής (Nielsen *et al.*, 2000). Η ιστόνη H3 έχει βρεθεί ότι παίζει ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής και στις διαδικασίες της αποσιώπησης γονιδίων και μεταγραφικής ενεργοποίησης. Αλληλεπιδρά με πολλούς παράγοντες μέσω κυρίως της άμινο-τελικής ουράς της (Hartzog and Winston, 1997; Strahl and Allis, 2000). Αλληλεπίδραση της HP1 με την ιστόνη H3 παρατηρήθηκε επίσης με το καρβόξυ τελικό άκρο της, το οποίο έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται στις επαφές των ιστονών μεταξύ τους και με το DNA.

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι και οι τρεις ισομορφές mHP1 προσδένονται πρόσκαιρα στον πυρηνικό φάκελο (Kourmouli *et al.*, 2000). Υποστηρίζοντας ότι στην παραπάνω πρόσδεση συμβάλλουν η πρωτεΐνη LBR και οι core ιστόνες H3/H4 οι οποίες σχηματίζουν ένα ειδικό σύμπλοκο (Polioudaki *et al.*, 2001).

Οι πρωτεΐνες αυτές όταν μικρο-ενεθούν συσσωρεύονται πρώτα στον πυρηνικό φάκελο και στη συνέχεια μετακινούνται σε περιοχές ετεροχρωματίνης. Αυτό το γεγονός και με βάση άλλες μελέτες που έδειξαν την αλληλεπίδραση της HP1 πρωτεΐνης με τον LBR, υποστηρίχθηκε πρόσφατα ότι στην πρόσδεση της HP1 στον πυρήνα συμβάλει η πρωτεΐνη του LBR μαζί με τις core ιστόνες H3 και H4.

### **Στόχος της ερευνητικής εργασίας**

Σκοπός της ερευνητικής εργασίας ήταν να μελετηθεί η έκφραση των τριών ισομορφών της πρωτεΐνης HP1: HP1α, M31 και M32, στον ποντικό. Η HP1 είναι η καλύτερα χαρακτηρισμένη πρωτεΐνη της ετεροχρωματίνης με καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία της γονιδιακής αποσιώπησης .

Η σπουδαιότητα στην μελέτη της έγκειται στο γεγονός ότι η HP1, εκτός από τη ρύθμιση έκφρασης γονιδίων, καθορίζει επίσης και τη δομή της χρωματίνης και συμμετέχει σε πολλές άλλες λειτουργίες μέσω της αλληλεπίδρασης της με διάφορες πρωτεΐνες.

Στο ερευνητικό αυτό πλαίσιο ήταν απαραίτητο να μελετηθεί η έκφραση των mRNA των τριών πρωτεϊνών σε διαφορετικούς ιστούς. Μέχρι την εκπόνηση αυτής της εργασίας δεν είχε πραγματοποιηθεί μια παρόμοια μελέτη.

Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τις αντιδράσεις της αντιστροφής μεταγραφής και της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμερισμού. Για τον σκοπό αυτό σχεδιάστηκαν κατάλληλα ζευγάρια ειδικών εκκινήτων.

Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια ιστολογικής προσέγγισης για να διερευνηθεί το εάν όλα τα κύτταρα ενός ιστού περιέχουν την κάθε ισομορφή της HP1.

## **2. Μέθοδοι-Αντιδραστήρια**

### **2.1. Απομόνωση ολικού RNA με το αντιδραστήριο TRIZOL**

- α. Λαμβάνεται δείγμα ιστού από ποντικό και ομογενοποιείται χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο TRIZOL (δ/μα φαινόλης και ισοθειοκυανιούχου γουανιδίνης).
- β. Το ομογενοποιημένο δείγμα (50-100mg ιστού / 1ml TRIZOL) επωάζεται για 5min σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να ολοκληρωθεί ο διαχωρισμός των νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων.
- γ. Προστίθεται 0,2ml χλωροφόρμιο και το δείγμα αναδεύεται ισχυρά με το χέρι και επωάζεται για 2-3min σε θερμοκρασία δωματίου.
- δ. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε <math><12000g</math> για 15min και σε <math>4^{\circ}C</math>. Το αποτέλεσμα είναι ο διαχωρισμός της οργανικής (κόκκινη) από την υδατική φάση (άχρωμη), στην οποία παραμένει το RNA.
- ε. Η υδατική φάση απομακρύνεται, για να κατακρημνιστεί το RNA με 0,5ml ισοπροπυλικής αλκοόλης. Το δείγμα φυγοκεντρείται όπως και πριν.
- στ. Λαμβάνεται το ίζημα και πλένεται με 75% αιθανόλη. Φυγοκεντρείται στο μισό των παραπάνω στροφών για 10 min και σε <math>4^{\circ}C</math>. Το RNA με μορφή ιζήματος αφήνεται για να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.
- ζ. Στο τέλος της διαδικασίας, το ίζημα διαλύεται σε μια μικρή ποσότητα Rnase-free νερού, ώστε το RNA να έχει μια ικανοποιητική τελική συγκέντρωση.

### **2.2. Εύρεση συγκέντρωσης RNA**

Δείγμα 4μl RNA, μεταφέρεται σε μια κυψελίδα και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι 1ml, με H<sub>2</sub>O. Μετρίεται η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος  $\lambda=260nm$ . Σύμφωνα με την συνθήκη όπου για  $A_{260nm}=1$  ισχύει  $C=40\mu g/ml$ , υπολογίζεται η συγκέντρωση του RNA, λαμβάνοντας υπόψη και την αραιώση:



$$C = \frac{40 \mu\text{g} / \text{ml} \times A}{1} = 0,04 \mu\text{g} / \mu\text{l} \times A = \frac{0,04 \mu\text{g} / \mu\text{l} \times A}{4 \mu\text{l} / 1000 \mu\text{l}} = 10 \times A \mu\text{g} / \mu\text{l}$$

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω η δεκαπλάσια τιμή της απορρόφησης A, του αραιωμένου δείγματος, δίνει τη συγκέντρωση του RNA στις παραπάνω μονάδες.

### 2.3. Επεξεργασία RNA με DNase I

Επειδή κρίνεται απαραίτητη η απομάκρυνση του DNA που πιθανόν έχει συν-εκχυλιστεί με το RNA, ακολουθεί η παρακάτω επεξεργασία:

- α. Σε κάθε δείγμα ~10μg RNA, προστίθεται 2μl του RNase-free ενζύμου DNase I (3Kunitzs units/μl) + 1μl αναστολέα ριβονουκλεασών (recombinant RNase-out, 40u/μl).
- β. Επωάζεται το δείγμα σε θερμοκρασία δωματίου για 25min.
- γ. Προστίθεται στη συνέχεια αποστειρωμένο PBS μέχρι  $V_{\text{τελ}}=100\mu\text{l}$ .

**PBS** :

- 80gr NaCl	}	V <sub>ολ</sub> = 1lit, pH: 7,4
- 2gr KCl		
- 3gr K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O		
- 9,7gr NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O		

- δ. Τέλος γίνεται απομόνωση του RNA με ίσο όγκο διαλύματος φαινόλη-χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1).

Η διαδικασία συνεχίζεται όπως με το αντιδραστήριο του TRIZOL. Προστίθεται ισοπροπανόλη για την καταβύθιση του RNA και αιθανόλη για τον περαιτέρω καθαρισμό του.

### 2.4. Reverse transcriptase PCR (RT-PCR)

- α. Για την αντίδραση αυτή είναι απαραίτητη η προετοιμασία ενός μίγματος (RT mix), που αποτελείται από τα παρακάτω:

- ◆ Reverse Transcriptase (200units/μl)

Η επιθυμητή συγκέντρωση του ενζύμου για την σύνθεση του cDNA είναι 200units (1μl) για κάθε μg mRNA σε τελικό όγκο αντίδρασης 20μl.

- ◆ 5x RT-PCR δ/μα

Το δ/μα αυτό, προσφέρεται με το ένζυμο και χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 1x.

♦ Μίγμα dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP).

Φτιάχνεται ένα μίγμα στο οποίο, κάθε δεοξυνουκλεοτίδιο έχει συγκέντρωση 10mM οπότε η συνολική τελική συγκέντρωση και των τεσσάρων είναι 40mM. Χρησιμοποιείται κατάλληλη ποσότητα ώστε στην τελική αντίδραση να είναι η συγκέντρωση των δεοξυνουκλεοτιδίων  $C_{dNTPs}=2mM$ . Το λειτουργικό όριο κυμαίνεται από 1-4mM.

♦ Rnasin (recombinant RNase-out, 40u/μl).

♦ Random hexamers (3μg/μl)

Αποτελούν ολιγονουκλεοτίδια, κυρίως εξαμερή και χρησιμοποιούνται σαν εκκινήτες. Αραιώνονται σε αναλογία 1:3 ώστε στην αντίδραση να είναι 1μg/μl.

♦ ddH<sub>2</sub>O

Ο προτεινόμενος τελικός όγκος της αντίδρασης είναι  $V_{τελ}=20μl$ .

β. Το κάθε δείγμα του RNA (1-12μl) με  $C=1μg$ , τοποθετείται στο μηχάνημα της PCR για να αποδιαταχθεί με το πρόγραμμα: 70°C, 4min. Μεταφέρεται στη συνέχεια στον πάγο.

γ. Σε κάθε σωλήνα που περιέχει το RNA, προστίθεται η ανάλογη ποσότητα μίγματος και τα δείγματα επωάζονται για: 1ώρα, 37°C. Τέλος στους 95°C για 5min για απενεργοποίηση του ενζύμου.

## 2.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR (polymerase chain reaction).

### α. Επιλογή εκκινήτων (primers) για PCR

Αρχικά βρέθηκαν οι αλληλουχίες βάσεων των mRNA για τις τρεις ισομορφές, με βάση τους αριθμούς καταχώρησης τους (Accession number) στη βάση δεδομένων EMBL. Οι αριθμοί αυτοί για τις πρωτεΐνες HP1α, M31 και M32 είναι αντίστοιχα X99641, X56690 και X56683. Το μέγεθος της αλληλουχίας τους είναι (865bp) για την HP1α, (558bp) για την M31 και (522bp) για την M32.

Σύμφωνα με αυτά τα στοιχεία και με τη βοήθεια του προγράμματος Oligocalculator, βρέθηκαν τα καταλληλότερα ζεύγη εκκινητών:

**HP1α** forward:5'-GCA AGT GGA ATA TCT GTT GAA GTG G-3'  
Από τη θέση 162bp ως την 185bp  
reverse:5'-CAT CCT CTG GAT ATG CGT GCC AC-3'  
(582bp – 604bp)

**M31** forward:5'-AAA ACA AGA AGA AAG TGG AGG AGG TAC-3'  
(14bp – 40bp)  
reverse:5'-TGT CGT CTT TTT TGT CAT CAT CCT CTG-3'  
(524bp – 550bp)

**M32** forward:5'-GAC TTT CTT AAT TCT CAA AAA GCT GG-3'  
(193bp – 218bp)  
reverse:5'-GCT TCA TCT TCA GGA CAA GAA TG-3'  
(493bp – 515bp)

Έγινε προσπάθεια επιλογής κατάλληλων, απόλυτα ειδικών τμημάτων από τις αλληλουχίες, για να αποτελέσουν τους εκκινητές. Παράλληλα με το πρόβλημα της μεγάλης ομολογίας των τριών ισομορφών, έπρεπε να βεβαιωθούμε ότι οι εκκινητές είχαν κατάλληλες τιμές όσον αφορά χαρακτηριστικά τους όπως: μήκος, θερμοκρασία αναδιάταξης, ποσοστό περιεκτικότητας σε GC.

### **β. Αντίδραση PCR**

Όπως και στην RT-PCR, ανάλογα και εδώ προετοιμάζεται το μίγμα που αποτελείται από τα παρακάτω:

♦ **10x PCR δ/μα**

Το δ/μα αυτό, προσφέρεται με το ένζυμο και χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 1x.

♦ **Μίγμα dNTPs** (dATP, dTTP, dGTP, dCTP).

Χρησιμοποιείται ποσότητα από το stock των 40mM ώστε στην τελική αντίδραση να είναι  $C_{dNTPs}=0,8mM$ .

♦ **Δ/μα MgCl<sub>2</sub>**

Από το stock των 50mM, προστίθεται ποσότητα ώστε  $C_{TEA}=1,5mM$ .  
Προτεινόμενο εύρος 1,5-2mM.

◆ Primer forward

◆ Primer reverse

Οι δύο εκκινητές (primers) χρησιμοποιούνται σε τελική συγκέντρωση 1μM.

◆ Tag polymerase (5U/μl)

Από το ένζυμο χρησιμοποιούνται 1,5U

◆ ddH<sub>2</sub>O

Ένας λειτουργικός τελικός όγκος της αντίδρασης είναι  $V_{TEA}=50\mu l$ .

β. Μόλις χωριστεί το μίγμα στους σωλήνες, προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα cDNA (200-500ng) που θα χρησιμοποιηθεί σαν υπόστρωμα (template) για να ξεκινήσει η αντίδραση πολυμερισμού.

γ. Τέλος πάνω από κάθε δείγμα απλώνεται mineral oil (2 σταγόνες) για την αποφυγή εξάτμισης από τα δείγματα.

δ. Τοποθετούνται τα δείγματα στο μηχάνημα της PCR (T3 Thermocycler της Biometra) και το πρόγραμμα που τίθεται σε λειτουργία είναι:

I. Αρχική αποδιάταξη : 94 °C, 4min

II. Αναδιάταξη : 94 °C, 1min – 52 °C, 2,5min – 72 °C, 1min  
(x28 κύκλοι)

III. Τελική επιμήκυνση : 72 °C, 5min

## 2.6. Απομόνωση DNA από κύτταρα (Qiagen kit)

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο της Qiagen. Σε καλλιέργεια 100ml με θρεπτικό υλικό LB, επωάζονται βακτήρια που περιέχουν το προς απομόνωση, πλασμίδιο. Τα κύτταρα απομονώνονται με φυγοκέντρηση της καλλιέργειας σε ~6000rpm, για 15min στους 4°C. Στη συνέχεια ακολουθείται το εξής πρωτόκολλο:

1) Το βακτηριακό ίζημα, επαναδιαλύεται σε 10ml δ/τος P1 .

- 2) Προστίθεται 10ml δ/τος P2 (NaOH/SDS) και το μίγμα αφήνεται για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, για 5min. Προκαλείται η λύση των κυττάρων και η απελευθέρωση του γονομικού DNA.
- 3) Αμέσως μετά προστίθεται 10ml δ/τος P3 (όξινο δ/μα οξικού νατρίου), για 20min σε πάγο. Με αυτόν τον τρόπο καταβυθίζεται και απομακρύνεται το χρωμοσωμικό DNA, μαζί με τις πρωτεΐνες.
- 4) Το μίγμα φυγοκεντρείται σε 12000rpm, για 30min και 4°C.
- 5) Λαμβάνεται το υπερκείμενο που περιέχει το πλασμιδιακό DNA. Για να απομονωθεί, χρησιμοποιείται στήλη ανιοανταλλακτικής ρητίνης. Η στήλη αρχικά εξισορροπείται με 10ml δ/τος QBT.
- 6) Το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης, αφήνεται να περάσει από τη στήλη. Το πλασμιδιακό DNA προσδένεται σε αυτήν.
- 7) Η στήλη ξεπλένεται με 2x30ml δ/τος QC (δ/μα 1MNaCl), με σκοπό την απομάκρυνση ανεπιθύμητων συστατικών (πρωτεΐνες, RNA κτλ.)
- 8) Η έκλυση του DNA, γίνεται με 15ml δ/τος QF (δ/μα 1,25MNaCl, pH:8,5) λόγω αλλαγής της ιονικής ισχύς.
- 9) Το DNA κατακρημνίζεται με 0,7V ισοπροπανόλης και φυγοκεντρείται σε 11000rpm, για 30min και 4°C.
- 10) Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά και ξεπλένεται με 70% αιθανόλη, στεγνώνεται και επαναδιαλύεται σε δ/μα TE.  
Η συγκέντρωση του υπολογίζεται φωτομετρικά και η ποιότητα του ελέγχεται σε gel 1% αγαρόζης.

## 2.7. Εξισορρόπηση Φαινόλης

- 1) Λαμβάνεται στερεή φαινόλη και θερμαίνεται στους 65°C, για να υγροποιηθεί.
- 2) Προστίθεται 0,1% 8-Hydroxyquinolin. Αποτελεί αντιοξειδωτικό και μερικώς αναστολέα για RNase. Η φαινόλη επίσης αποκτά κίτρινο χρώμα για τον εύκολο διαχωρισμό των φάσεων.
- 3) Χρησιμοποιείται ίσος όγκος δ/τος 1M Tris-Cl, pH: 7,5, για να αποκτήσει το δ/μα της φαινόλης pH~7. Συγκεκριμένα αναμιγνύονται τα δύο διαφορετικά δ/τα. Όταν αφεθούν σε ηρεμία για να διαχωριστούν οι δύο φάσεις, αφαιρείται το υπερκείμενο δ/μα του Tris-Cl (άχρωμη φάση) και

ελέγχεται το pH της φαινόλης. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται περισσότερο από μια φορές.

- 4) Όταν εξισορροπηθεί η φαινόλη, επαναλαμβάνεται το παραπάνω βήμα με H<sub>2</sub>O.
- 5) Τέλος το δ/μα της φαινόλης, με μια μικρή φάση H<sub>2</sub>O στην επιφάνεια, φυλάσσεται σε σκοτεινό μπουκάλι και στους 4°C.

## **2.8. Εξαγωγή DNA από gel αγαρόζης**

Το δείγμα του DNA ηλεκτροφορεύεται σε gel αγαρόζης, οπότε μετά απομονώνεται ως εξής:

- 1) Το τεμάχιο αγαρόζης που περιέχει το δείγμα, αποκόπτεται με νυστέρι και ζυγίζεται. Προστίθεται ίσος όγκος εξισορροπημένης φαινόλης
- 2) Ακολουθεί ανάδευση με *vortex* και ψύξη στους -70°C.
- 3) Το δείγμα φυγοκεντρείται για 10min, σε 13000rpm.
- 4) Γίνεται διαχωρισμός δύο φάσεων και λαμβάνεται η πάνω υδατική, η οποία περιέχει το DNA.  
\*Σε περίπτωση που δεν έχει διαλυθεί η στερεή αγαρόζη επαναλαμβάνονται τα βήματα 2 και 3.
- 5) Προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης-χλωροφόρμιο (1:1) και 1/10V NaCH<sub>3</sub>COO, 3M, pH: 5,2. Το μίγμα αναδεύεται με *vortex* και φυγοκεντρείται για ~5min.
- 6) Απομακρύνεται και κρατείται η πάνω υδατική φάση από την οποία θα απομονωθεί το DNA. Για το σκοπό αυτό, προστίθεται 100% αιθανόλη και το δείγμα παγώνει στους -70°C.
- 7) Στη συνέχεια φυγοκεντρείται για 30min, 13000rpm και 4°C.
- 8) Το DNA κατακρημνίζεται και το ίζημα πλένεται με 70% αιθανόλη.
- 9) Αφού στεγνώσει, σε θερμοκρασία δωματίου, επαναδιαλύεται σε H<sub>2</sub>O και υπολογίζεται η συγκέντρωση του.

### Εύρεση συγκέντρωσης DNA

Η συγκέντρωση του DNA υπολογίζεται με ανάλογο τρόπο με το RNA. Λαμβάνεται δείγμα 5μl DNA σε 1ml H<sub>2</sub>O και μετριέται η απορρόφηση σε μήκος κύματος λ=260nm. Εδώ ισχύει για  $A_{260nm}=1 \rightarrow C=50\mu\text{g/ml}$ . Λαμβάνοντας υπόψη αυτή την αραιώση τότε η δεκαπλάσια τιμή της απορρόφησης A, δίνει τη συγκέντρωση του DNA στις παραπάνω μονάδες.

## 2.9. Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε τομές ιστών.

Λαμβάνεται ιστός από ποντικό και τοποθετείται αμέσως σε ειδικό υλικό (Jung, tissue freezing medium) και στους -70°C. Με τη χρήση κρυοτόμου, αφαιρούνται τομές με πάχος από 3-7μm. Τοποθετούνται σε ειδικές γυάλινες αντικειμενοφόρους, οι οποίες έχουν υποστεί μια επεξεργασία επίστρωσης με δ/μα gelatin (subbing), για αποφυγή ολίσθησης του δείγματος.

### Subbing

- Πλένονται οι αντικειμενοφόροι με α) H<sub>2</sub>O (2 φορές)  
β) 100% αιθανόλη (2 φορές)  
και αφήνονται να στεγνώσουν.
- Τοποθετούνται για 3min στο εξής διάλυμα:  
5gr *gelatin* (σκόνη) σε 1lit H<sub>2</sub>O → ζεσταίνεται για να διαλυθεί (χωρίς βρασμό). Μόλις κρυώσει προστίθεται 0,5gr *Chrome Alum*  
[KCr(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·12H<sub>2</sub>O]
- Οι αντικειμενοφόροι αφήνονται να στεγνώσουν.  
Μόλις ετοιμαστούν, τοποθετούνται πάνω σ' αυτές οι τομές και τα δείγματα είναι έτοιμα να μελετηθούν με την μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού, σύμφωνα με το εξής πρωτόκολλο:
  - 1) Πλύσιμο με PBS (3x)
  - 2) Μονιμοποίηση με δ/μα φορμαλδεύδης  
Το δ/μα της φορμαλδεύδης παρασκευάζεται με αραιώση από stock 36,5% σε PBS. Η συγκέντρωση του δ/τος (1% ή 4%) που χρησιμοποιείται για το φιξάρισμα και ο χρόνος (5-10min), εξαρτώνται από το αντίσωμα που θα χρησιμοποιηθεί στα δείγματα. Με τον τρόπο αυτό μονιμοποιείται το

δείγμα πάνω στην αντικειμενοφόρο.

3) Πλύσιμο με δ/μα PBS (3x)

4) Προσθήκη δ/τος Quench [20mM glycine σε PBS] για 5min.

Σκοπός του, η απομάκρυνση υπολειμμάτων φορμαλδεΐδης.

5) Πλύσιμο με δ/μα Blocking (3x 5min)

*Δ/μα Blocking:* - 0,2% Triton X-100

- 2mM MgCl<sub>2</sub>

- 1x PBS

- 0,5% fish gelatin

Με τη διαδικασία αυτή προετοιμάζονται τα δείγματα δηλαδή γίνονται διαπερατές οι κυτταρικές δομές, για να δεχθούν το αντίσωμα. Παράλληλα αποφεύγεται η μη ειδική δέσμευση του αντισώματος.

6) Προσθήκη 1<sup>ου</sup> αντισώματος (45min)

Το αντίσωμα αραιώνεται σε δ/μα Blocking με αναλογία που είναι ειδική για το καθένα.

7) Πλύσιμο με δ/μα Blocking (3x 5min)

8) Προσθήκη 2<sup>ου</sup> αντισώματος (45min)

Το αντίσωμα αραιώνεται ομοίως όπως πριν σε δ/μα Blocking. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με τη φθορίζουσα χρωστική FITCH (fluorescein isothiocyanate).

9) Πλύσιμο με δ/μα Blocking (3x 5min)

10) Πλύσιμο με δ/μα PBS (3x 5min)

11) Επώαση με δ/μα RNase σε αραιώση 1:10<sub>2</sub> (30 min)

δ/μα RNase : - 26,3mg RNase (73Kunitzs units/mg)

- 50mM NaCl

- 10mM Tris-Cl, pH: 7,5

12) Πλύσιμο με δ/μα PBS (3x 5min)

13) Βαφή με propidium iodide

Η χρωστική αυτή χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 1μg/ml, για βαφή του DNA.

14) Πλύσιμο με δ/μα PBS (3x 5min)



Τα δείγματα ακινητοποιούνται πάνω στις αντικειμενοφόρους με καλειπτρίδες, στις οποίες τοποθετείται δ/μα *mounting*. Έτσι αποφεύγεται η εξασθένιση της χρωστικής (bleaching), λόγω φαινομένου οξειδωσης . Για τη σταθεροποίηση χρησιμοποιείται βερνίκι νυχιών.

Η όλη διαδικασία γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου, με προσοχή για την αποφυγή ξήρανσης των δειγμάτων.

Η μελέτη των αποτελεσμάτων γίνεται με τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου του μοντέλου TCS NT της εταιρίας Leica Optics.

## **2.10. Southern Blot**

### **2.10.1. Ραδιοεπισημάνση του DNA (random priming)**

Για την παρασκευή DNA ιχνηθέτη (probe), ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

- 1) Χρησιμοποιείται ποσότητα DNA 100ng. Το επιθυμητό μήκος των probe πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 100 και 1000bp.
- 2) Προστίθεται H<sub>2</sub>O ώστε ο τελικός όγκος να είναι  $V_{\text{τελ}} = 7,6\mu\text{l}$ .
- 3) Το δείγμα βράζεται στους 100 °C, για 2-3min με σκοπό την αποδιάταξη της διπλής έλικας του DNA. Αμέσως μετά τοποθετείται στον πάγο για να παραμείνει σε αυτή την μορφή.
- 4) Στη συνέχεια στο δείγμα, προστίθεται 11,4μl 2xLS + 1μl BSA (10mg/ml)

**2xLS:** -25μl 1M Hepes, pH:6,6      **DTM:** 0,1mM από [dGTP + dTTP] σε TM  
-25μl DTM  
- 7μl oligos

**TM:** -250mM Tris-Cl, pH:8                      **Oligos:** - 25mM EDTA, pH:7,5  
- 25mM MgCl<sub>2</sub>                                      - 250mM Tris-Cl, pH:7,5  
- 50mM 2-mercaptoethanol                      - 90U/ml oligos

\*Τα oligos είναι εξαμερή  $pd(N)_6$  5'-PO<sub>4</sub>,Na+salt και η σκόνη αντιστοιχεί σε 50U.

- 5) Το δείγμα φυγοκεντρείται και προστίθεται 5units Klenow fragment της DNA polymerase I αφού έχει τοποθετηθεί στον πάγο.
- 6) Ακολουθεί η προσθήκη ραδιενεργών αATP\* (2μl) και αCTP\* (2μl) για να παραχθεί ο ιχνηθέτης.
- 7) Το μίγμα επωάζεται στους 37 °C, για 3 ώρες ή σε θερμοκρασία δωματίου, όλο το βράδυ.
- 8) Στο τέλος προστίθεται 100μl TE [10mM Tris-Cl, pH:7,4 + 1mM EDTA, pH:8] για να τερματίσει η αντίδραση. Ο όγκος του μίγματος είναι τώρα  $V_{\text{τελ}}=125\mu\text{l}$ .
- 9) Παράλληλα προετοιμάζεται στήλη με υλικό προσρόφησης Sephadex G50. Η κατασκευή της γίνεται σε σύριγγα ινσουλίνης του 1ml, της οποίας το άκρο έχει κλείσει με υαλοβάμβακα. Το πακετάρισμα πραγματοποιείται σταδιακά με φυγοκεντρήσεις των 5min, 2500rpm.
- 10) Το ραδιενεργό υλικό μεταφέρεται στη στήλη και φυγοκεντρείται όπως πριν. Για να ληφθεί ο probe, τοποθετείται σωλήνας κάτω από τη σύριγγα, ενώ στην κολώνα κατακρατείται ότι δεν έχει χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή του επισημασμένου τμήματος DNA.

Ο probe είναι έτοιμος για να χρησιμοποιηθεί, διαφορετικά αν φυλαχθεί, είναι επιθυμητό να βράσει στους 100 °C, για 5min πριν τη χρήση του.

### **2.10.2. Μεταφορά του DNA από το gel στην μεμβράνη (transfer)**

- α) Τα δείγματα του DNA τα οποία θα χαρακτηριστούν με την μέθοδο του Southern, ηλεκτοφορούνται σε πηκτή (gel) αγαρόζης.
- β) Ακολουθούν πλυσίματα του gel με τα παρακάτω δ/τα, πριν να γίνει η μεταφορά των δειγμάτων στην μεμβράνη:

- Denaturation buffer : 1,5M NaCl  
(2x30min)      0,5N NaOH

Προκαλείται η αποδιάταξη των δίκλωνων τμημάτων DNA ώστε να επιτευχθεί η υβριδοποίηση.

- Neutralization buffer : 1,5M NaCl  
(2x30min) 0,5M Tris-Cl, pH:7,0

Επανερχεται η απαραίτητη τιμή του pH, ώστε να μπορέσει να μεταφερθεί το DNA και να προσδεθεί στην νιτροκυτταρίνη.

γ) Προετοιμάζεται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (S&S Protran). Αρχικά διαβρέχεται σε H<sub>2</sub>O και μετά σε δ/μα 20xSSC.

**20xSSC:** - 3M NaCl  
- 0,3M Na<sub>3</sub>citrate

δ) Το gel τοποθετείται σε μια διάταξη ώστε να επιτευχθεί η μεταφορά των δειγμάτων πάνω στην μεμβράνη:

- i) Ένας δίσκος γεμίζεται με δ/μα 20xSSC. Φτιάχνεται πάνω σε αυτήν, ένα είδος πλατφόρμας με γυαλί, η οποία σκεπάζεται με Whatman 3MM χαρτί. Το χαρτί πρέπει να εφάπτεται με το δ/μα του δίσκου, ώστε να είναι συνεχώς υγρό. Πάνω σε αυτό, τοποθετούνται επιπλέον 2 φύλλα Whatman, στο μέγεθος του gel.
- ii) Στη συνέχεια θα πρέπει το gel να τοποθετηθεί πάνω σε αυτά και ανάποδα. Δηλαδή η πλευρά από την οποία φορτώθηκαν τα δείγματα, θα πρέπει να βρίσκεται προς τα κάτω.
- iii) Ακολουθεί η μεμβράνη, που έχει το ίδιο μέγεθος με το gel. Για να αποφευχθεί η δημιουργία φυσαλίδων, χρησιμοποιείται μια γυάλινη πιπέτα.
- iv) Πάνω από την μεμβράνη, τοποθετούνται όπως πριν, 3 φύλλα απορροφητικού χαρτιού Whatman. Όλα τα χαρτιά έχουν εμποτιστεί με το δ/μα 20xSSC.
- v) Στην κορυφή τοποθετούνται πολλά στεγνά απορροφητικά χαρτιά με τα οποία θα δημιουργηθούν τα τριχοειδή φαινόμενα και θα γίνει η μεταφορά.
- vi) Τέλος είναι απαραίτητο να υπάρχει πάνω από όλη τη διάταξη ένα μεγάλο βάρος.

Η όλη διαδικασία ολοκληρώνεται σε 2-16ώρες.

ε) Μόλις γίνει η μεταφορά του DNA στην μεμβράνη, είναι απαραίτητο να

μονιμοποιηθούν τα δείγματα, οπότε η μεμβράνη 'ψήνεται' στους 80°C για 2ώρες. Προηγουμένως ξεπλένεται με 2xSSC για την απομάκρυνση προσκολλημένης αγαρόζης.

Η μεμβράνη είναι έτοιμη για την υβριδοποίηση με τον ανάλογο probe.

### 2.10.3. Υβριδοποίηση

Για την υβριδοποίηση της μεμβράνης με τον DNA probe, χρησιμοποιείται το πρωτόκολλο του *Church* :

1) Αρχικά επωάζεται (προ-υβριδοποίηση) η μεμβράνη με το παρακάτω δ/μα, στους 65°C, για 1-2ώρες.

*Church buffer*. - 100mM δ/μα P<sub>i</sub> , pH: 7,0 όπου δ/μα P<sub>i</sub> { 0,4M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
- 1% BSA { 0,6M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
- 7% SDS  
- 1mM EDTA

2) Προστίθεται ο probe στο δ/μα προ-υβριδοποίησης, για να επωαστεί η μεμβράνη και να υβριδοποιηθεί στην ίδια θερμοκρασία, όλο το βράδυ.

3) Πλένεται η μεμβράνη με το δ/μα: - 50mM δ/μα P<sub>i</sub> }  
[ προθερμασμένο ] - 1% SDS } 4x15min, R.T\*  
[ στους 65°C ] - 1mM EDTA }

\* R.T : room temperature (θερμοκρασία δωματίου)

4) Πλένεται η μεμβράνη με το δ/μα: - 10mM δ/μα P<sub>i</sub> }  
[ προθερμασμένο ] - 1% SDS } 2x15min, R.T  
[ στους 65°C ] - 1mM EDTA }

5) Αποξηραίνεται σε χαρτί Whatman και έκθεση σε X-ray φιλμ.

### **3. Αποτελέσματα**

#### **3.1. Απομόνωση ολικού RNA από ιστούς ποντικού.**

Για να μελετηθεί η έκφραση των τριών ισομορφών της ετεροχρωματινικής πρωτεΐνης HP1 σε διαφορετικούς ιστούς αφαιρέθηκαν τα παρακάτω όργανα από ποντικούς: καρδιά, θύμος, εγκέφαλος, οφθαλμός, σπλήνας, συκώτι, νεφρά, ωοθήκες, μαστός και πνεύμονες. Αμέσως μετά, τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση ολικού RNA όπως προσδιορίζεται στην ενότητα "Μέθοδοι-Αντιδραστήρια" και αναλύθηκαν σε gel 1% αγαρόζης.

Για την παρακάτω πορεία των πειραμάτων, είναι απαραίτητο τα δείγματα του RNA να μην έχουν μολυνθεί από ίχνη DNA κατά τη διαδικασία της απομόνωσης. Για το σκοπό αυτό, τα δείγματα επεξεργάζονται περαιτέρω με το ένζυμο της DNaseI, για την απομάκρυνση DNA.

#### **3.2. Ανάλυση με RT-PCR.**

Αφού απομονώθηκε και υπολογίστηκε η συγκέντρωση του κάθε διαφορετικού mRNA, έγινε αντίστροφη μεταγραφή. Το cDNA που παράχθηκε από την παραπάνω αντίδραση χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού PCR. Η εύρεση κατάλληλων ζευγαριών εκκινητών έγινε όπως αναφέρεται στην ενότητα 'Μέθοδοι-Αντιδραστήρια'.

Η επιλογή των εκκινητών αποτέλεσε μια δύσκολη διαδικασία που οφείλονταν στο γεγονός ότι οι τρεις ισομορφές της HP1 παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία. Είναι γνωστό ότι η χήσιμο περιοχή της M32 παρουσιάζει ομοιότητα σε ποσοστό 86% με εκείνη της M31. Επίσης, καθεμία από τις M31 και M32 παρουσιάζει ποσοστό ομοιότητας 51% με την HP1α.

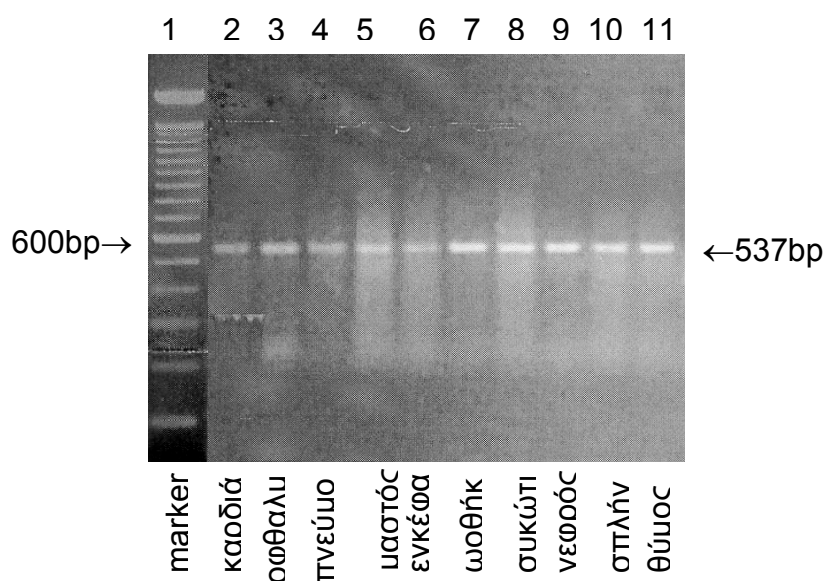
Το γεγονός επιβεβαιώθηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Clustal X(1.8) με το οποίο έγινε ευθυγράμμιση και σύγκριση των τριών αλληλουχιών παράλληλα. Το ζευγάρι των εκκινητών που επιλέχθηκε για την μία πρωτεΐνη θα έπρεπε να μη συμπίπτει με ομόλογη περιοχή στην άλλη πρωτεΐνη για να

υπάρχει η βεβαιότητα ότι το cDNA που παράγεται ανταποκρίνεται σε αυτήν για την οποία έχουν σχεδιαστεί οι εκκινητές.

Τα δείγματα από τις αντιδράσεις της PCR, αναλύθηκαν όπως προηγουμένως. Σύμφωνα με τις αλληλουχίες των τριών cDNAs και τις θέσεις των εκκινητών σε αυτές, υπολογίζεται ότι τα προϊόντα του DNA από την παραπάνω αντίδραση πρέπει να έχουν μήκος 443bp, 537bp και 323bp, για καθεμία από τις τρεις πρωτεΐνες HP1α, M31 και M32.

Η ανάλυση των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση έδειξε ότι τα μεγέθη ανταποκρίνονται στις προβλεπόμενες τιμές, χωρίς όμως να είναι δυνατόν η ύπαρξη μεγάλης ακρίβειας (Σχήματα 7 και 8).

### PCR για cDNA της M31

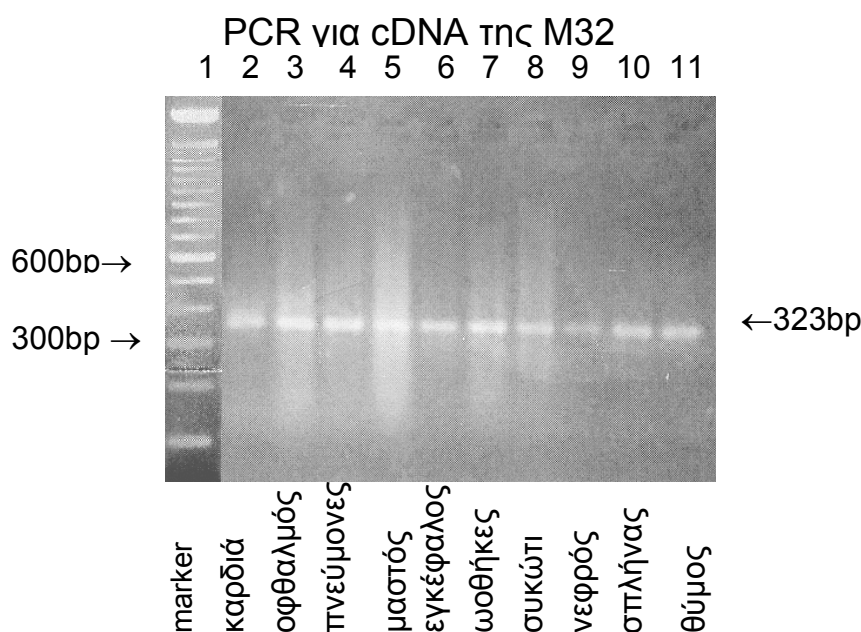


#### Σχήμα 7

Προϊόν PCR με εκκινητές που αντιστοιχούν στο cDNA της M31.

Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή 1% αγαρόζης. Η σειρά τους αντιστοιχεί στους εξής ιστούς: 1.marker, 2.καοδιά, 3.οφθαλμός, 4.πνεύμονες, 5.μαστός, 6.εγκέφαλος, 7.ωοθήκες, 8.συκώτι, 9.νεφρός, 10.σπλήνας, 11.θύμος.

Από το Σχήμα 7 φαίνεται ότι το μέγεθος του προϊόντος που παράγεται από την αντίδραση της PCR, με τους εκκινητές για το cDNA της M31, ανταποκρίνεται σε αυτό που είχε αρχικά υπολογιστεί. Η αναμενόμενη τιμή του είναι 537bp οπότε στην πηκτική φαίνεται η ζώνη πιο κάτω από το ύψος στο οποίο βρίσκεται η ζώνη των 600bp του marker.



### Σχήμα 8

Προϊόν PCR με εκκινητές που αντιστοιχούν στο cDNA της M32.

Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτική 1% αγαρόζης. Η σειρά τους αντιστοιχεί στους εξής ιστούς: 1.marker, 2.καρδιά, 3.οφθαλμός, 4.πνεύμονες, 5.μαστός, 6.εγκέφαλος, 7.ωοθήκες, 8.συκώτι, 9.νεφρός, 10.σπλήνας, 11.θύμος.

Στο Σχήμα 8 φαίνεται η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων από την αντίδραση της PCR με εκκινητές που αντιστοιχούν στο cDNA της M32. Η θέση της ζώνης του παραγόμενου προϊόντος στην πηκτική, φαίνεται ότι

βρίσκεται ανάμεσα στις ζώνες των 400bp και 300bp του marker . Το μέγεθος που αρχικά είχε υπολογιστεί είναι 323bp.

Όσον αφορά την πρωτεΐνη HP1α, μια σειρά προκαταρκτικών πειραμάτων έδωσε τα αναμενόμενα αποτελέσματα ως προς το μέγεθος του προϊόντος της PCR, όμως είναι απαραίτητο να επαναληφθούν. Τα πειράματα αυτά πρέπει να επαναληφθούν λόγω του ενδιαφέροντος που παρουσιάζει η πρωτεΐνη αυτή.

Σε πρόσφατη μελέτη (Kirschmann *et al.*, 2000), φάνηκε ότι η έκφραση της ανθρώπινης ισομορφής της HP1α μειώνεται τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε πρωτεΐνη, σε καρκινική σειρά κυττάρων από μαστό με *invasive/metastatic* φαινότυπο. Η μείωση συμβάλλει στον παραπάνω φαινότυπο. Επίσης παρατηρήθηκε η μείωση του επιπέδου της πρωτεΐνης σε τομές καρκινικών ιστών.

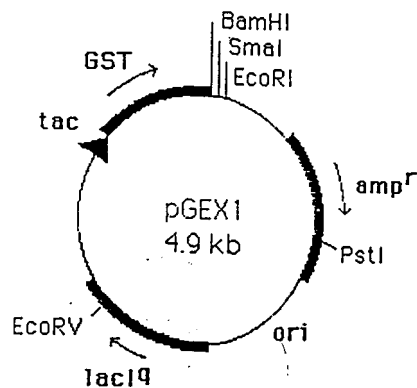
### **3. 3. Ανάλυση με υβριδοποίηση κατά Southern.**

Η προηγούμενη ανάλυση έδωσε τις αναμενόμενες τιμές στα μεγέθη των προϊόντων του DNA από τις αντιδράσεις της PCR. Όμως κρίθηκε απαραίτητο να χαρακτηριστούν περαιτέρω διότι η αλληλουχία τους πρέπει να είναι ειδική για τα γονίδια που αντιπροσωπεύουν. Για τον σκοπό αυτό, ο χαρακτηρισμός των προϊόντων της PCR έγινε με την μέθοδο Southern.

Σαν ιχνηθέτες, χρησιμοποιήθηκαν μονόκλωνες αλληλουχίες βάσεων, συμπληρωματικές για τα cDNAs των M31 και M32. Το συμπληρωματικό τμήμα του DNA παρασκευάστηκε με την μέθοδο του *random priming*.

Για να παρασκευαστούν οι probes, χρησιμοποιήθηκαν τα cDNAs των M31 και M32 σαν εκμαγεία. Αυτά απομονώθηκαν με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων κοπής BamHI και EcoRI, από τον πλασμιδιακό φορέα PGEX1 (Σχήμα 9).





### Σχήμα 9

Φορέας κλωνοποίησης των πρωτεϊνών M31 και M32, στις θέσεις κοπής των περιοριστικών ενζύμων BamHI και EcoRI.

Σε αυτόν τον φορέα είχαν κλωνοποιηθεί τα πλήρη μήκη των cDNAs στις θέσεις των ενζύμων που αναφέρθηκαν και τα πλασμίδια εστάλησαν από το εργαστήριο του Dr P. Singh (Τμήμα Ανάπτυξης και Γενετικής, Ινστιτούτο BABRAHAM). Τα πλασμίδια εισήχθησαν σε κύτταρα *E.coli* XL1(transformation) και στη συνέχεια απομονώθηκε το DNA.

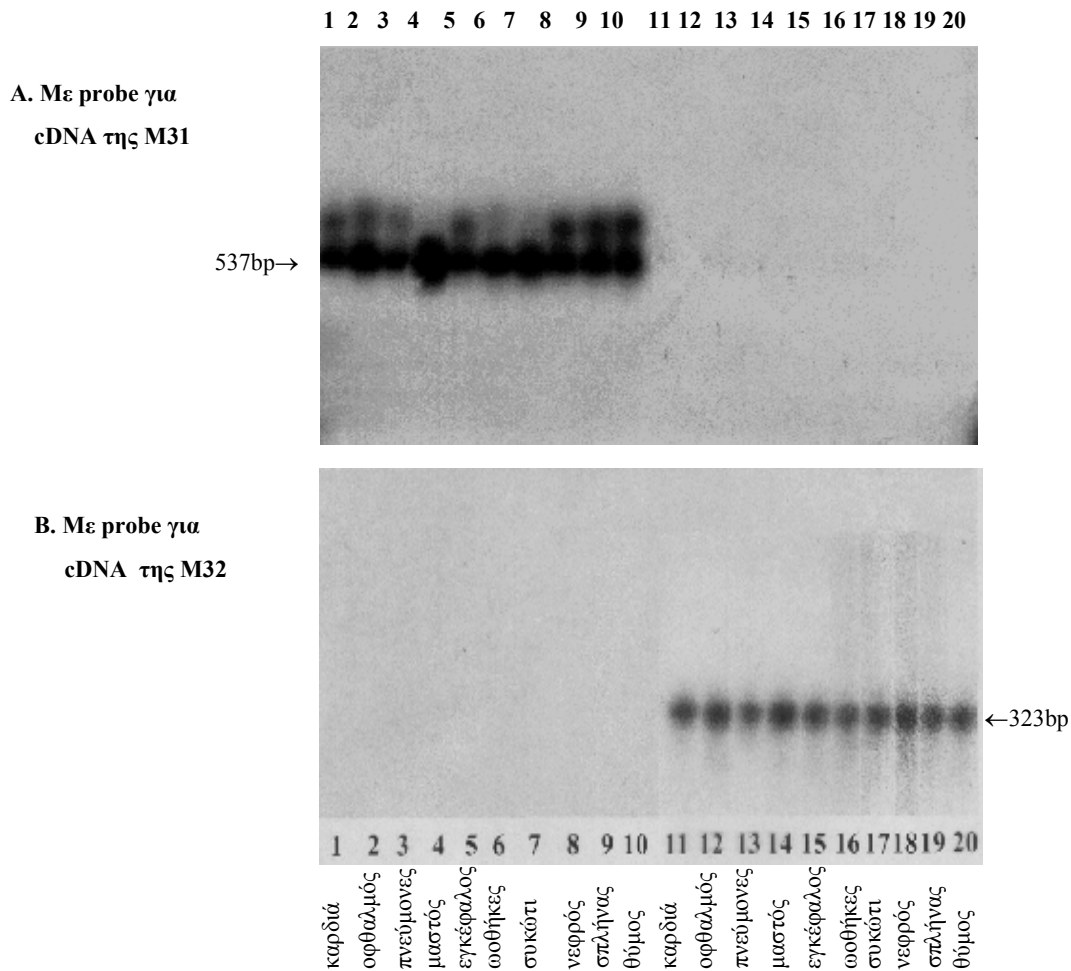
Αφού ετοιμάστηκαν οι probes χρησιμοποιώντας το DNA των M31 και M32 που απομονώθηκε, συνεχίστηκε η διαδικασία της μεθόδου Southern. Η μέθοδος της υβριδοποίησης χρησιμοποιώντας ραδιοσημασμένο DNA probe είναι ευαίσθητη και επιλεκτική. Ανιχνεύεται η αλληλουχία των νουκλεϊκών οξέων, η οποία είναι συμπληρωματική με τον probe που χρησιμοποιείται.

Αφού έγινε μεταφορά των προϊόντων της PCR για την M31 και M32, από το gel ηλεκτροφόρησης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ακολούθησε υβριδοποίηση με τους probe που είχαν παρασκευαστεί και έκθεση σε φιλμ.

Πρέπει να διευκρινιστεί ότι σε δύο ξεχωριστές μεμβράνες έγινε ταυτόχρονη μεταφορά δειγμάτων από δύο ξεχωριστά gel. Σε κάθε gel έγινε ομοίως ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για την M31 παράλληλα με τα προϊόντα της PCR για την M32, για τα δέκα διαφορετικά δείγματα των ιστών.

Η εμφάνιση του φιλμ έδωσε το αποτέλεσμα που φαίνεται στο παρακάτω σχήμα:

### Southern Blot



### Σχήμα 10

#### *Southern Blot.*

A. Στην πάνω εικόνα φαίνεται ένα Southern blot με probe για το cDNA της M31. Η έκθεση έγινε για μία ώρα. B. Στην άλλη εικόνα κατά ανάλογο τρόπο φαίνεται το φιλμ της μεμβράνης μετά από υβριδοποίηση με probe για το cDNA της M32. Η έκθεση εδώ έγινε για μία μέρα. Η σειρά των δειγμάτων που έχουν ηλεκτροφορηθεί είναι: 1.καρδιά, 2.οφθαλμός, 3.πνεύμονες, 4.μαστός, 5.εγκέφαλος, 6.ωοθήκες, 7.συκώτι, 8.νεφρός, 9.σπλήνας, 10.θήμος.

Η εμφάνιση του φιλμ έδωσε ειδικά σήματα, μετά από διαφορετικά χρονικά διαστήματα έκθεσης για την κάθε μεμβράνη. Όσον αφορά την M31, χρειάστηκε έκθεση για 1 ώρα, ενώ για την M32, χρειάστηκε 12 ώρες. Το γεγονός αυτό πιθανότατα οφείλεται στο βαθμό που επισημάνθηκε ραδιενεργά ο ιχνηθέτης.

Όσον αφορά το ύψος των ζωνών που εντοπίζονται, αυτό ανταποκρίνεται στο αναμενόμενο μέγεθος των δύο διαφορετικών προϊόντων M31 και M32. Επιβεβαιώνεται με φωτογράφιση των gels πριν την μεταφορά, ενώ έχουν τοποθετηθεί δίπλα σε χάρακα που εκπέμπει φθορισμό στο U.V. Το ύψος τους με βάση το χάρακα ανταποκρίνεται στο αντίστοιχο ύψος του σήματος που εμφανίζεται στο φιλμ.

Παράλληλα με το παραπάνω πείραμα επιβεβαιώθηκε η εξειδίκευση των probes για τα συγκεκριμένα προϊόντα. Στην πρώτη εικόνα παρατηρείται έλλειψη σήματος στη μισή δεξιά πλευρά της μεμβράνης. Σε αυτό το τμήμα έχουν μεταφερθεί τα προϊόντα από την PCR για την M32. Οπότε η υβριδοποίηση με τον probe για M31 δεν επιτεύχθηκε σε αυτό το τμήμα της μεμβράνης. Παρόμοια στην δεύτερη εικόνα δεν πραγματοποιήθηκε η υβριδοποίηση με τον probe για M32 στο τμήμα που ανταποκρίνεται στα προϊόντα από την PCR για την M31.

#### **3.4. Μελέτη των HP1α, M31 και M32 με έμμεσο ανοσοφθορισμό.**

Με τη βοήθεια κρυοτόμου ελήφθησαν τομές από εγκέφαλο, συκώτι και νεφρό, χωρίς να έχει προηγηθεί η μονιμοποίηση του ιστού. Στη συνέχεια οι τομές εξετάθηκαν με έμμεσο ανοσοφθορισμό προκειμένου να μελετηθεί η κατανομή των HP1 πρωτεϊνών στα διάφορα είδη κυττάρων.

Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα μονοκλωνικά αντισώματα από αρουραίο, MAC353 και MAC385 για τις πρωτεΐνες M31 και M32 αντίστοιχα (Wreggett *et al.*, 1994; Horlsey *et al.*, 1996; Aagaard *et al.*, 1999). Η μονιμοποίηση των τομών έγινε με δ/μα 1% φορμαλδεύδης σε PBS για 5min. Επίσης χρησιμοποιήθηκε το πολυκλωνικό αντίσωμα M234 από κουνέλι, για την HP1α. Εδώ η μονιμοποίηση έγινε με δ/μα 4% φορμαλδεύδης σε PBS για 10min. Σαν δευτερογενές χρησιμοποιήθηκε ένα αντίσωμα, a-rat και a-rabbit

αντίστοιχα, με προσδεμένη τη χρωστική fluorescein (FITC fluorescein isothiocyanate) που εκπέμπει πράσινο φως.

Από τις εικόνες του ανοσοφθορισμού παρατηρήθηκε ότι τόσο η ενδογενής HP1α όσο και η M31 εντοπίστηκαν διάσπαρτα στον πυρήνα των κυττάρων, με μορφή συμπαγών μαζών. Στις εικόνες φάνηκαν μεγάλα κοκκία που σχηματίζονταν από τις πρωτεΐνες και εντοπίζονταν κυρίως στα σημεία της ετεροχρωματίνης, γύρω από τους πυρηνίσκους. Τα κοκκία της M31 παρατηρήθηκαν πιο διάστικτα γεγονός που επιβεβαιώνεται και από προηγούμενες μελέτες (Kourmouli *et al.*, 2000, Horsley *et al.*, 1996).

Ο ανοσοφθορισμός έδωσε ερμηνεύσιμα αποτελέσματα για τις M31 και HP1α, αλλά όχι για την M32. Για την τελευταία δοκιμάστηκαν διαφορετικές συνθήκες στη διαδικασία του ανοσοφθορισμού όπως για παράδειγμα μονιμοποίηση με μεθανόλη, διαφορετικές συγκεντρώσεις φορμαλδεΐδης και χρόνοι επώασης όπως επίσης και άλλες συγκεντρώσεις αντισωμάτων, που όμως δεν έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα.

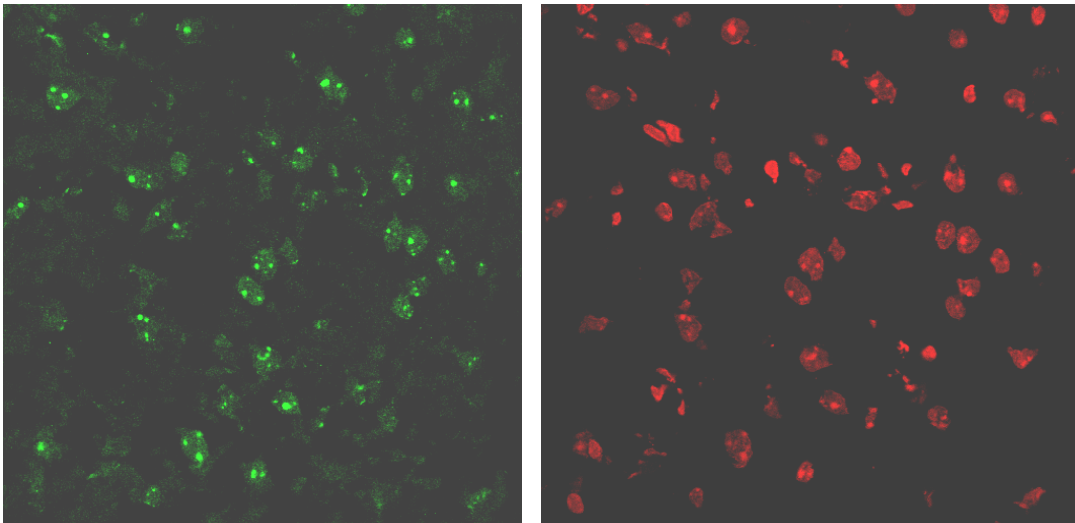
Η μελέτη των τομών με τη βοήθεια του μικροσκοπίου έδωσε κάποιες εικόνες στις οποίες παρατηρήθηκε συσσώρευση του αντισώματος για την M32, σε περιοχές έξω από τον πυρήνα του κυττάρου. Η έντονη μη ειδική χρώση οφειλόταν πιθανότατα στο μεγάλο πάχος της τομής ή στο στέγνωμα του ιστού με αποτέλεσμα το αντίσωμα να προσκολλάται στο σημείο που τοποθετείται χωρίς να είναι ικανό να δράσει.

(α)

anti-HP1α

(β)

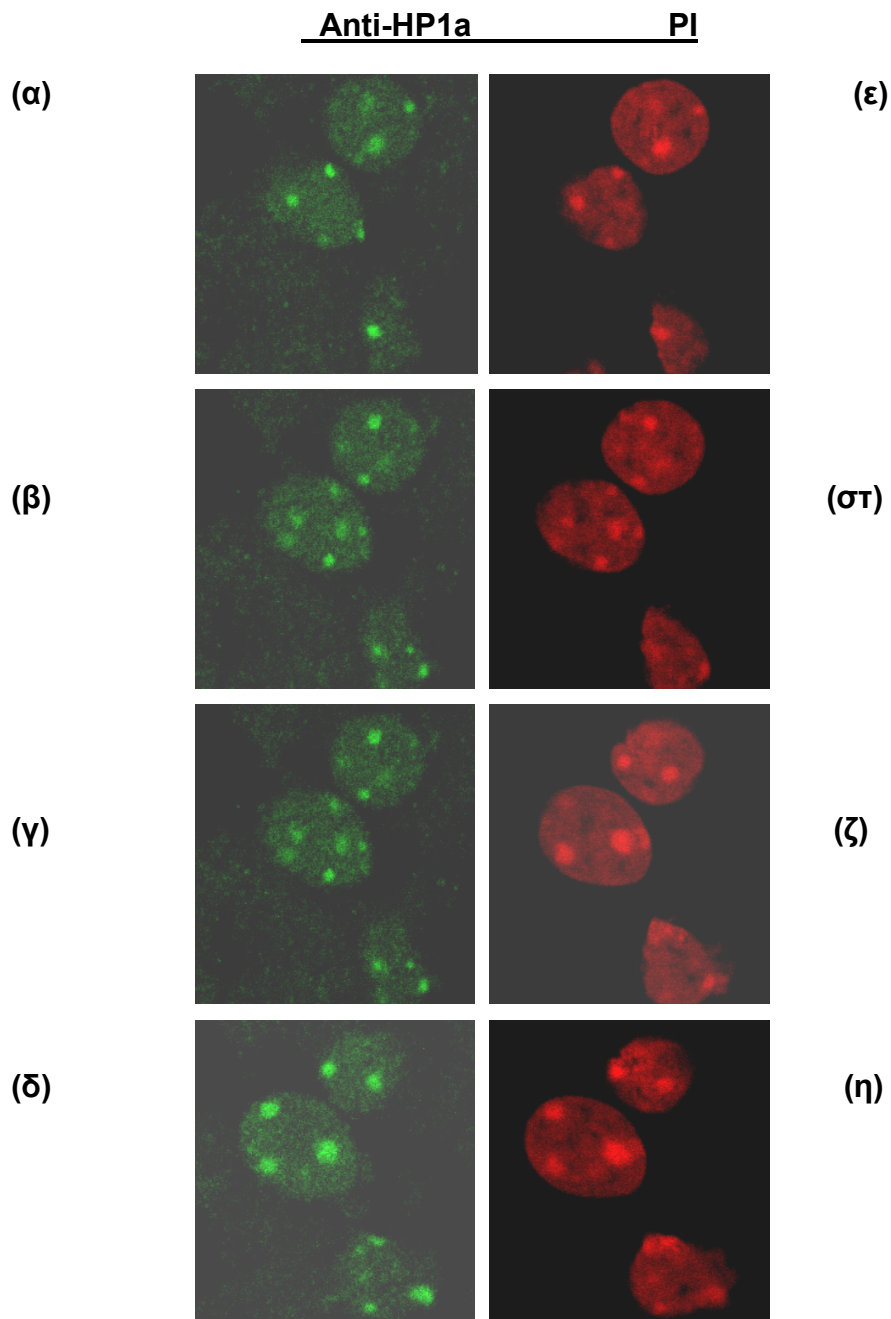
PI



**Σχήμα 11**

Εντοπισμός της HP1α σε κύτταρα από εγκέφαλο.

Στην εικόνα (α) φαίνεται με πράσινο φθορισμό, ένα γενικό πρότυπο κατανομής της πρωτεΐνης σε κύτταρα από ιστό εγκεφάλου και στην εικόνα (β) η αντίστοιχη μορφή των πυρήνων στον ιστό (κόκκινος φθορισμός).

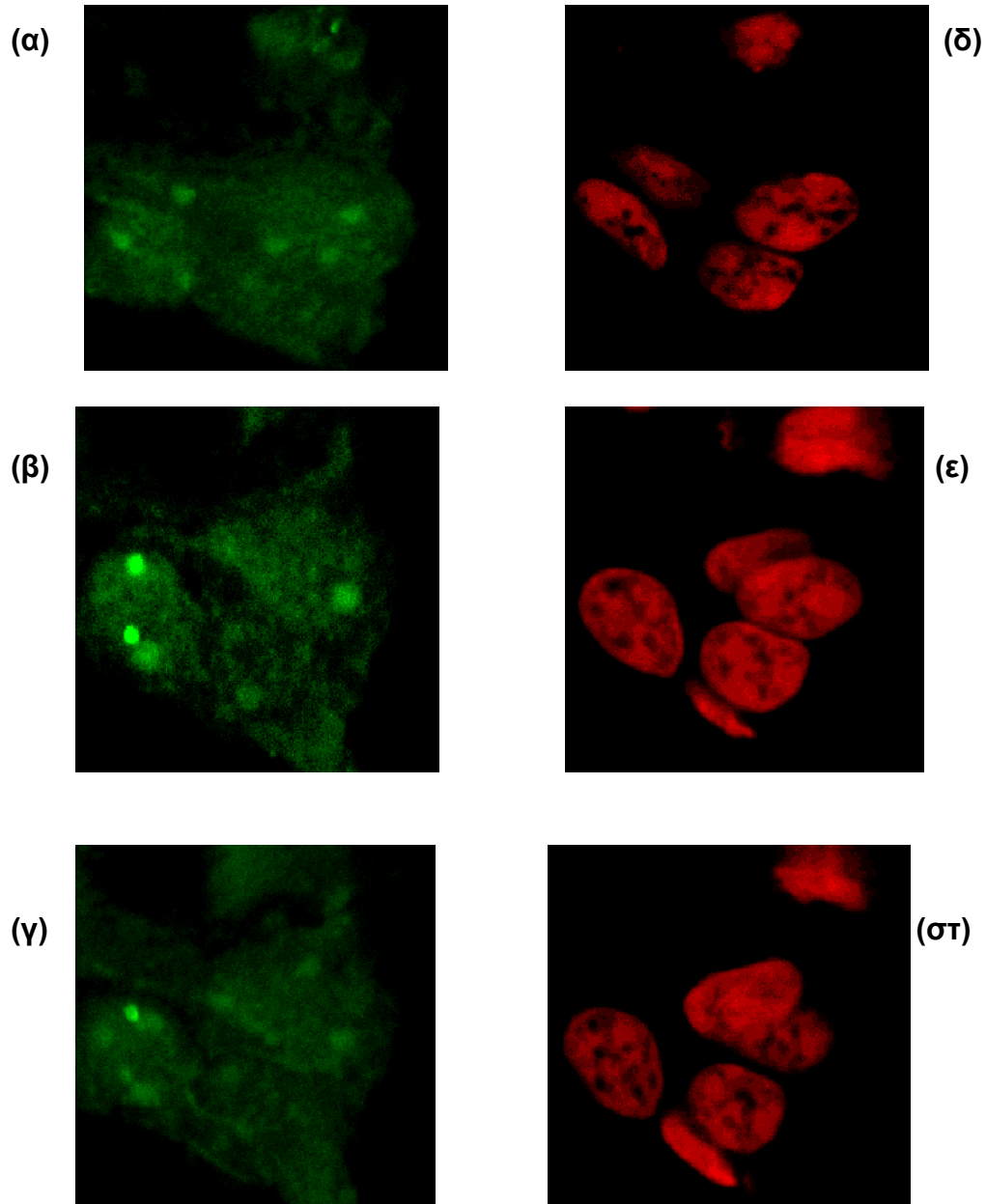


### Σχήμα 11

Εντοπισμός της HP1α σε κύτταρα από εγκέφαλο.

Στις εικόνες (α), (β), (δ) και (γ) φαίνεται ο εντοπισμός της πρωτεΐνης μέσω του πράσινου φθορισμού που οφείλεται στο δευτερογενές αντίσωμα και στις εικόνες (ε), (στ), (ζ) και (η) φαίνεται το πρότυπο των πυρήνων των κυττάρων μέσω του κόκκινου φθορισμού που οφείλεται στο ιωδιούχο προπίδιο.

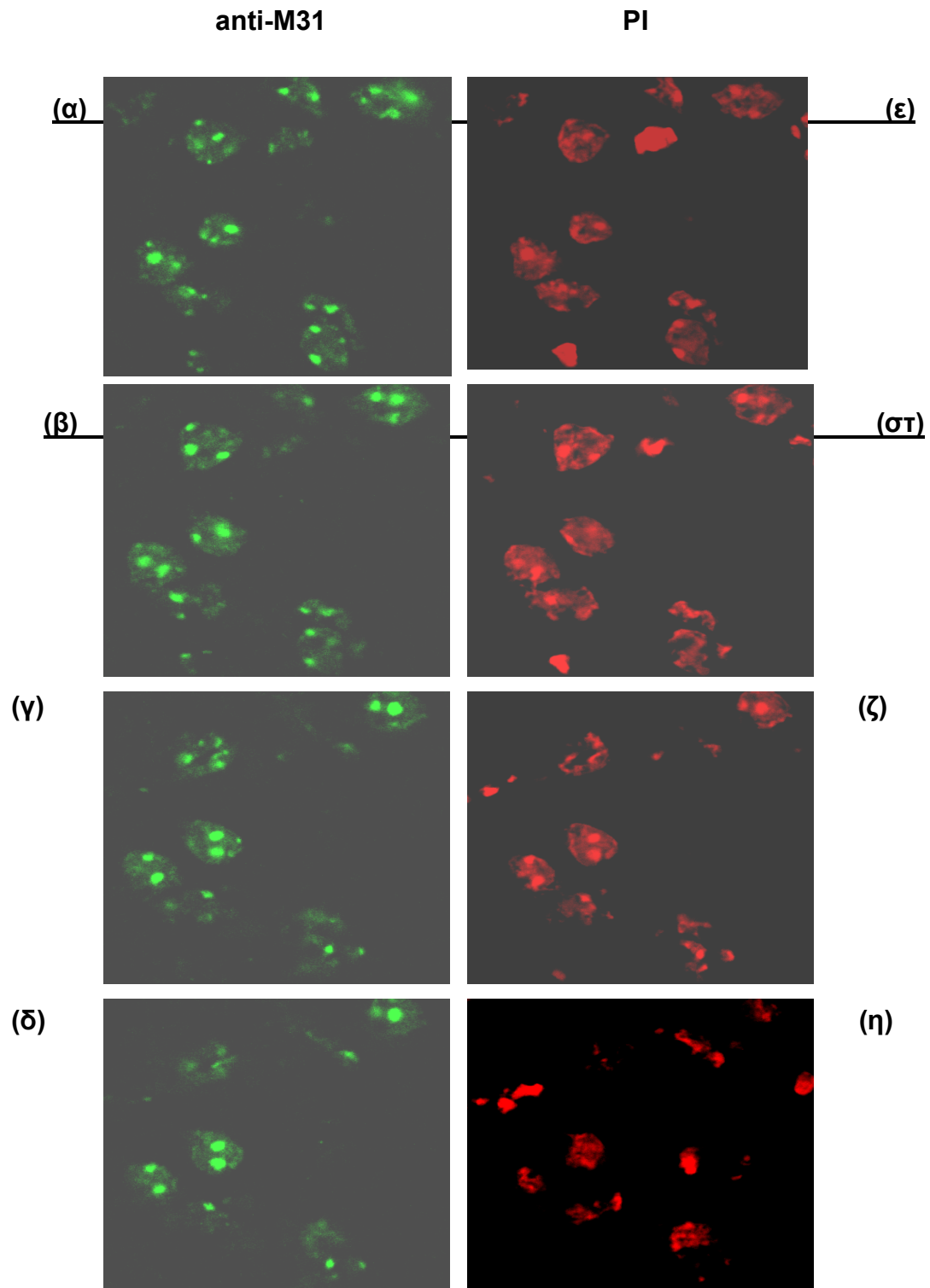
### anti-HP1a



### Σχήμα 13

Εντοπισμός της HP1a σε κύτταρα από ιστό νεφρού.

Στις εικόνες (α), (β) και (γ), φαίνεται η κατανομή της πρωτεΐνης στον πυρήνα των κυττάρων (πράσινο χρώμα), ενώ στις εικόνες (δ), (ε) και (στ), φαίνεται η αντίστοιχη μορφή του πυρήνα (κόκκινο χρώμα).



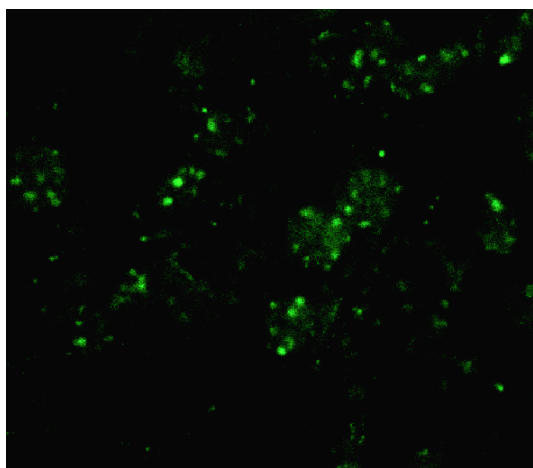
**Σχήμα 14**

Εντοπισμός M31 σε κύτταρα από ιστό εγκεφάλου. Στις εικόνες (α), (β), (γ) και (δ), φαίνεται η πράσινη φθορίζουσα χρωστική που οφείλεται στο δευτερογενές αντίσωμα ενώ στις εικόνες (ε), (στ), (ζ) και (η), φαίνεται το πρότυπο του πυρήνα, που δημιουργείται από την κόκκινη φθορίζουσα χρωστική του ιωδιούχου προπιδίου. Οι εικόνες ανταποκρίνονται σε φωτογραφίες που έχουν παρθεί σε διαφορετικά επίπεδα της τομής του ιστού.



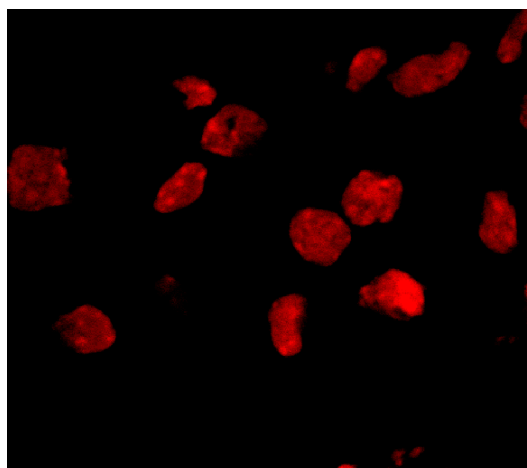
(α)

anti-M31



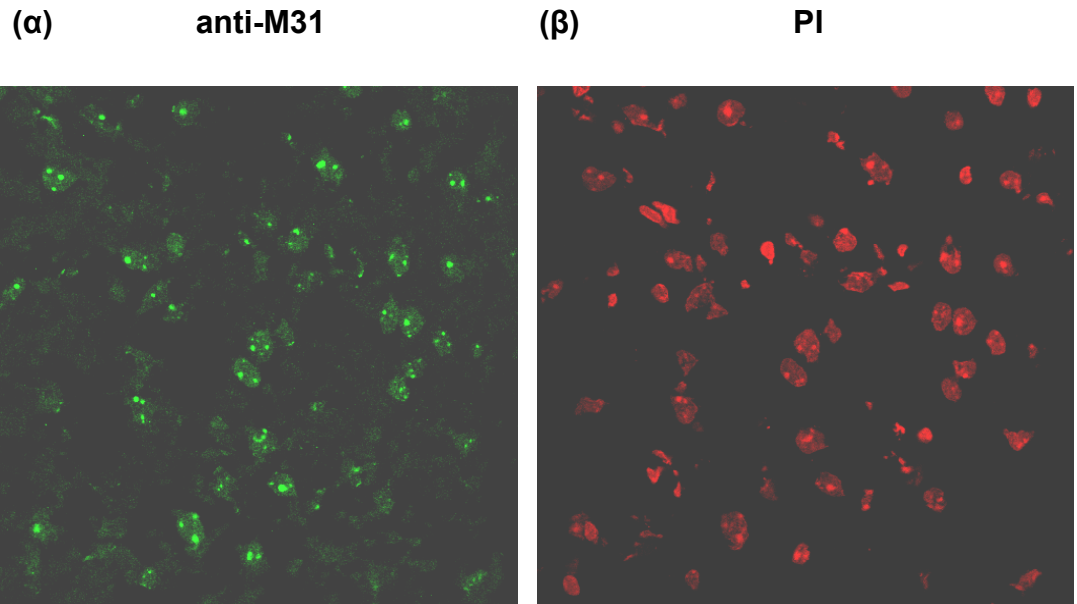
(β)

PI



### Σχήμα 15

Στην εικόνα (α) φαίνεται μια γενική εικόνα των κυττάρων ως προς τον εντοπισμό του δευτερογενούς αντισώματος (πράσινο χρώμα) και στην εικόνα (β) φαίνεται η αντίστοιχη μορφή των πυρήνων των κυττάρων (κόκκινο χρώμα).



**Σχήμα 16**

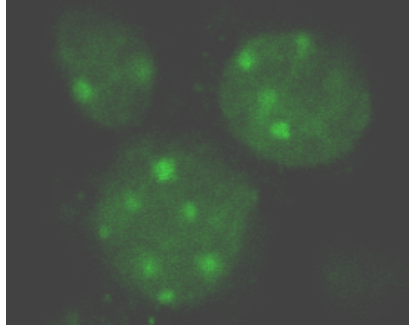
Εντοπισμός της ενδογενούς πρωτεΐνης M31 σε ιστό συκωτιού.

Η φωτογραφία δείχνει μια γενική εικόνα των κυττάρων στον ιστό. (α) Το πράσινο χρώμα ομοίως με πριν ανταποκρίνεται στο δευτερογενές FITCH και στην (β) το κόκκινο οφείλεται στο ιωδιούχο προπύδιο.

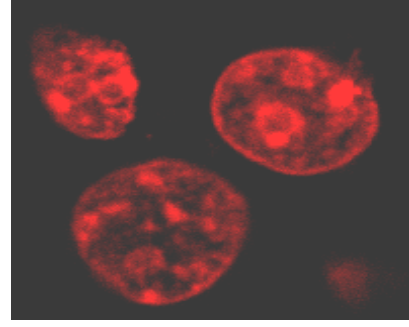
Anti-M31

PI

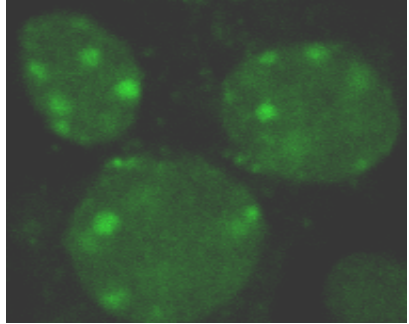
(α)



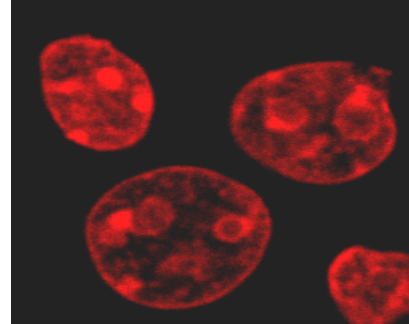
(δ)



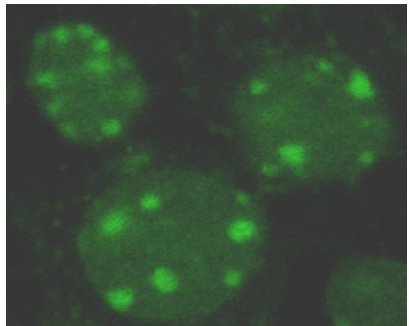
(β)



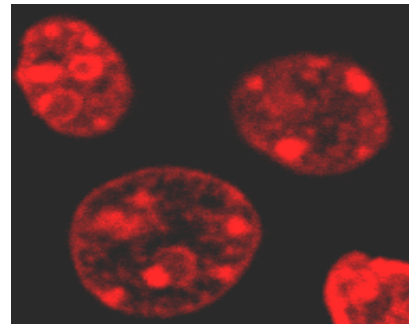
(ε)



(γ)

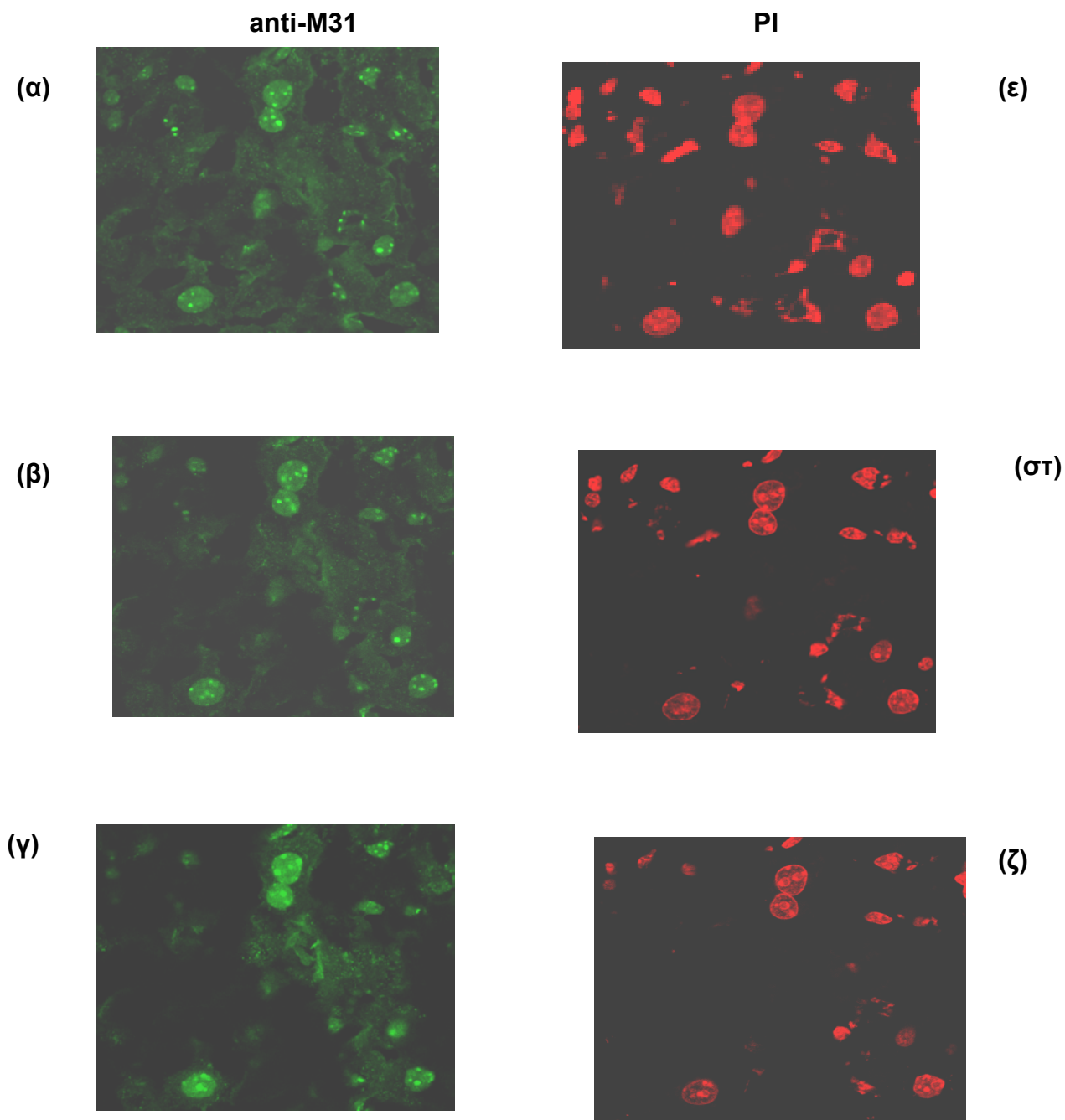


(ζ)



### Σχήμα 17

Κατανομή της ενδογενούς M31 πρωτεΐνης σε τομή από ιστό συκωτιού. Στις εικόνες (α), (β) και (γ) φαίνεται ο εντοπισμός της ενδογενούς πρωτεΐνης σε μια περιοχή του ιστού στην οποία φαίνονται τρία κύτταρα. Από το ίδιο δείγμα έχουν παρθεί φωτογραφίες από διαφορετικά επίπεδα. Η πράσινη χρώση οφείλεται στο δευτερογενές αντίσωμα FITCH. Στις εικόνες (δ), (ε) και (ζ), η κόκκινη χρώση οφείλεται στο ιωδιούχο προπίδιο.



### Σχήμα 18

Κατανομή της ενδογενούς M31 πρωτεΐνης σε τομή από ιστό συκωτιού. Στις εικόνες (α), (β) και (γ) φαίνεται ο εντοπισμός της ενδογενούς πρωτεΐνης στα κύτταρα του ιστού. Από το ίδιο δείγμα έχουν παρθεί φωτογραφίες από διαφορετικά επίπεδα. Η πράσινη χρώση οφείλεται στο δευτερογενές αντίσωμα FITCH. Στις εικόνες (δ), (ε) και (ζ), η κόκκινη χρώση οφείλεται στο ιωδιούχο προπύδιο.

#### 4. Συζήτηση

Μετά την ανακάλυψη του γονιδίου της HP1 έγινε διερεύνηση σε cDNA βιβλιοθήκη για ποντικό με τη βοήθεια της γνωστής αλληλουχίας της πρωτεΐνης και βρέθηκαν άλλα δύο ομόλογα γονίδια (Singh *et al.*, 1991). Το ένα ήταν το γονίδιο για την πρωτεΐνη M31 και το άλλο για την M32 με 86% ποσοστό ομολογίας όσον αφορά την αμινοξική τους ακολουθία. Οι αμινοξικές αλληλουχίες και των δύο πρωτεϊνών (M31 και M32) είχαν 50% ποσοστό ομολογίας με εκείνη της HP1.

Σύγκριση των αλληλουχιών έδειξε ότι η πιο συντηρημένη περιοχή ανταποκρινόταν στο γνωστό και επίσης συντηρημένο μοτίβο του chromo box. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει την υψηλού βαθμού διατήρηση που υπάρχει εξελικτικά όσον αφορά την chromo περιοχή. Παράλληλα δείχνει το σπουδαίο ρόλο της παρουσίας του στην κατηγορία αυτών των τροποποιητικών πρωτεϊνών.

Στην παρούσα εργασία έγινε μια προσπάθεια μελέτης του προτύπου έκφρασης των τριών ισομορφών της πρωτεΐνης HP1, στον ποντικό.

Οι HP1 πρωτεΐνες εντοπίζονται με διαφορετική κατανομή μέσα στον πυρήνα του κυττάρου στις διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Σε ανθρώπινες και ποντικίσιας κυτταρικές σειρές, η HP1α εντοπίζεται κυρίως στα κεντρομερή, η HP1β (MOD1) κατανέμεται διάσπαρτα στο χρωμόσωμα και η HP1γ (MOD2) εντοπίζεται κυρίως στην ευχρωματίνη (Minc *et al.*, 1999)

Από την επεξεργασία των εικόνων που έδωσε ο ανοσοφθορισμός στις τομές των ιστών φάνηκε η έντονη παρουσία των πρωτεϊνών σε συγκεκριμένες θέσεις στον πυρήνα. Εντοπίστηκαν με την μορφή κοκκίων διαφορετικού μεγέθους, ιδιαίτερα στην ετεροχρωματίνη γύρω από τους πυρηνίσκους, σύμφωνα και με άλλες ερευνητικές εργασίες. Οι εικόνες δίνουν ένα παρόμοιο πρότυπο εντοπισμού των δύο ισομορφών HP1α και M31 σύμφωνα και με πειράματα σε ανθρώπινες και κυτταρικές σειρές (Koumouli *et al.*, 2000).

Ακόμα έχει βρεθεί ότι η HP1α και η HP1γ φωσφορυλιώνονται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια της μίτωσης και λιγότερο κατά την μεσόφαση, ενώ η HP1β παραμένει μη φωσφορυλιωμένη.

Οπότε παρά την μεγάλη συντήρηση που υπάρχει στις αλληλουχίες των τριών ισομορφών φαίνεται ότι υπάρχουν διαφορετικά πρότυπα εντοπισμού τους στον πυρήνα και τροποποιήσεων τους όπως η φωσφορυλίωση, καθόλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Οι μέτα-μεταγραφικές τροποποιήσεις πιθανότατα συμβάλλουν στη στόχευση σε διαφορετικές θέσεις στην χρωματίνη και στην αλληλεπίδραση με διαφορετικές πρωτεΐνες. Οπότε διαφορετικά σύμπλοκα αποσκοπούν σε διαφορετική γονιδιακή ρύθμιση και εκτέλεση πιθανόν διαφορετικών λειτουργιών.

Μελέτες έχουν δείξει ότι τα μέλη της οικογένειας των HP1 πρωτεϊνών, αλληλεπιδρούν μεταξύ τους σχηματίζοντας όμο-ολιγομερή. Έχουν παρατηρηθεί τέτοιες αλληλεπιδράσεις για την HP1<sup>hsα</sup> και για την mHP1α ξεχωριστά αλλά και ετερογενείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ των HP1<sup>hsα</sup> και HP1<sup>hsγ</sup> (Le Douarin *et al.*, 1996; Ye *et al.*, 1997). Η σύνδεση αυτή φαίνεται να πραγματοποιείται μέσω των chromo shadow περιοχών και αποτελεί μια δυναμική κατάσταση που συμβαίνει σε πλήθος ευκαρυωτικών κυττάρων. Η ικανότητα των HP1 πρωτεϊνών να ολιγομερίζονται και να αλληλεπιδρούν με πολλαπλές και διαφορετικού ρόλου πρωτεΐνες εξηγεί τη δυνατότητα των HP1 πρωτεϊνών να εμπλέκονται σε πολλές διαφορετικές λειτουργίες. Όπως για παράδειγμα η επαγωγή της διαδικασίας της μεταγραφικής αποσιώπησης πιθανότατα πραγματοποιείται με τη δημιουργία πολυμερών συμπλόκων που προσδένουν σε μεγάλες χρωματινικές περιοχές.

Τίθεται λοιπόν το ερώτημα κατά πόσο η δημιουργία τέτοιων συμπλόκων είναι απαραίτητη στο κύτταρο και ποιο σκοπό υπηρετεί, όπως επίσης αν το σήμα που προέρχεται από τον ανοσοφθορισμό ανταποκρίνεται σε μονομερείς ή πολυμερείς πρωτεϊνικές δομές. Οι διαφορετικές ισομορφές των HP1 πρωτεϊνών, οι ποικίλοι συνδυασμοί αλληλεπιδράσεων ανάμεσα τους αλλά και οι διάφορες τροποποιήσεις που υφίστανται, πιθανότατα να εξυπηρετεί τις πολλαπλές αλληλεπιδράσεις των HP1 πρωτεϊνών με άλλους παράγοντες για τις διάφορες λειτουργίες του κυττάρου.

Ο πυρήνας αποτελεί μια οργανωμένη δομή σε δυναμική κατάσταση όπου οι διάφοροι παράγοντες βρίσκονται σε μια ισορροπία μεταξύ της ελεύθερης και διάσπαρτης συγκέντρωσης τους στον πυρήνα και της συγκεκριμένης θέσης τους σε οργανωμένες δομές μέσα σε αυτόν. Η οργάνωση των επιμέρους τμημάτων του πυρήνα είναι αποτέλεσμα των απαιτήσεων που έχει ο

πυρήνας. Τα μεγάλα οργανωμένα δομικά στοιχεία πιθανότατα συμβάλλουν στη συγκέντρωση όλων των απαιτούμενων μορίων με παρόμοιες λειτουργίες που θα οδηγήσουν στην ενίσχυση της ικανότητας του πυρήνα να πραγματοποιήσει τις βασικές του διαδικασίες όπως η διάσπαση της πυρηνικής του μεμβράνης και η επανασυγκρότηση του κατά την κυτταρική διαίρεση.

## 5. Βιβλιογραφία

- Aasland, A., and A.F. Stewart. 1995. The chromo shadow domain, a second chromo domain in heterochromatin-binding protein 1, HP1. *Nucleic Acids Res.* 23:3168-3173.
- Ainstzein, A.M., S.E. Kandels-Lewis, A.M. Mackay, W.C. Earnshaw. 1998. INCENP centromere and spindle targeting: identification of essential conserved motifs and involvement of heterochromatin protein HP1. *J. Cell. Biol.* 143:1763-1774.
- Ball, L.J., N.V. Murzina, R.W. Broadhurst, A.R. Raine, S.J. Archer, F.J. Stott, A.G. Murzin, P.B. Singh, P.J. Domaille, E.D. Laue. 1997. Structure of the Chromatin binding (chromo) domain from mouse modifier protein 1. *EMBO J.* 16:2473-2481.
- Brasher, S.V., B.O. Smith, R.H. Fogh, D. Netlispach, A. Thiru, P.R. Nielsen, R.W. Broadhurst, L.J. Ball, N.V. Murzina, and E.D. Laue. 2000. The structure of mouse HP1 suggests a unique mode of single peptide recognition by the shadow chromodomain dimer. *EMBO J.* 19:1587-1597.
- Cowieson, N.P., J.F. Patridge, R.C. Allshire, and P.J. McLaughlin. 2000. Dimerisation of a chromo shadow domain and distinctions from the chromodomain as revealed by structural analysis. *Curr. Biol.* 10:517-525.
- Dingwall, C., and R.A. Laskey. 1991. Nuclear targeting sequences-a consensus? *Trends Biochem. Sci.* 16:478-481.
- Eissenberg, J.C., S.C.R. Elgin, T.C. James. 1987. *Genetics*, 116, s4.
- Eissenberg, J.C., T.C. James, D.M. Foster-Hartnett, T. Hartnett, V. Ngan and S.C.R. Elgin. 1990. Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with the suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:9923-9927.
- Elgin, S.C. 1996. Heterochromatin and gene regulation in *Drosophila*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6:193-202.
- Epstein, H., T.C. James and P.B. Singh. 1992. Cloning and expression of *Drosophila* HP1 homologs from the mealybug, *Planococcus citri*. *J. Cell. Sci.* 101:463-474.
- Goldman, M.A., G.P. Holmquist, M.C. Gray, L.A. Caston, and A. Nag. 1984.



- Replication timing of genes and middle repetitive sequences. *Science*. 224:686-692.
- Hartzog, G.A., and F. Winston. 1997. Nucleosomes and transcription: recent lessons from genetics. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7:192-198.
- Hatton, K.S., V. Dhar, E.H. Brown, M.A. Iqbal, S. Stuart, V.T. Didamo, and C.L. Schildkraut. 1988. Replication program of active and inactive multigene families in mammalian cells. *Moll. Cell. Biol.* 8:2149-2158.
- Henikoff, S., 1981. Position-effect variegation and the chromosome structure of a heat shock puff in *Drosophila*. *Chromosoma*. 83:381-393.
- Henikoff, S. 1990. Position-effect variegation after 60 years. *Trends Genet.* 6:422-426.
- Horsley, D., A. Hutchings, G.W. Butcher, and P.B. Singh. 1996. M32, a murine homologue of *Drosophila* heterochromatin protein 1 (HP1), localises to euchromatin within interphase nuclei and is largely excluded from constitutive heterochromatin. *Cytogenet. Cell. Genet.* 73:308-311.
- Huang, D.W., L. Fanti, D.T. Pak, R.B. Botcham, S. Pimpinelli, and R. Kellum. 1998. Distinct cytoplasmic and nuclear fractions of *Drosophila* Heterochromatin protein 1: Their phosphorylation levels and associations with origin recognition complex proteins. *J. Cell. Biol.* 142:307-318.
- James, T.C., and S.C. Elgin. 1986. Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its gene. *Moll. Cell. Biol.* 6:3862-3872.
- James, T.C., J.C. Eissenberg, C. Craig, V. Dietrich, A. Hohson, and S.C. Elgin. 1989. Distribution patterns of HP1, a heterochromatin-associated nonhistone chromosomal protein of *Drosophila*. *Eur. J. Cell. Biol.* 50:170-180.
- Kischmann, D.A., R.A. Lininger, L.M.G. Gardner, E.A. Seftor, V.A. Odero, A.M. Ainsztein, W.C. Earnshaw, L.L. Wallrath, and M.J.C. Hendrix. 2000. Down-Regulation of HP1<sup>Hsq</sup> expression is associated with the metastatic phenotype in breast cancer. *Cancer Res.* 60:3359-3363.
- Kourmouli, N., P.A. Theodoropoulos, G. Dialynas, A. Bakou, A.S. Politou, I.G. Cowell, P.B. Singh, and S.D. Georgatos. 2000. Dynamic associations of heterochromatin protein 1 with the nuclear envelope. *EMBO J.* 19:6558-6568.

- Le Douarin, B., A.L. Nielsen, J.M. Garnier, H. Ichinose, F. Jeanmougin, R. Losson, and R. Chambon. 1996. A possible involvement of TIF1 alpha and TIF1 beta in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors. *EMBO J.* 15:6701-6715.
- Lorentz, A., K. Ostermann, O. Fleck, H. Schmiac. 1994. The switching gene *swi6*, involved in the repression of the silent mating-type loci in fission yeast, encodes a homologue of chromatin-associated proteins from *Drosophila* and mammals. *Gene.* 143:139-143.
- Mackay, A.M., D.M. Eckley, C. Chue, W.C. Earnshaw. 1993. Molecular analysis of the INCENPs: separate domains are required for association with microtubules during interphase and with central spindle during anaphase. *J. Cell. Biol.* 123:373-385.
- Minc, E., Y. Allory, H.J. Worman, J.C. Courvalin, and B. Buendia. 1999. Localization and phosphorylation of HP1 proteins during the cell cycle in mammalian cells. *Chromosoma.* 108:220-234.
- Murzina, N., A. Verreault, E. Laue, B. Stillman. 1999. Heterochromatin dynamics in mouse cells: interaction between chromatin assembly factor 1 and HP1 proteins. *Moll. Cell.* 4:529-540.
- Nielsen, A.L., M.O. Abdelghani, J.O. Ortiz, E. Remboutsika, P. Chambon, and R. Losson. 2000. Heterochromatin formation in mammalian cells: Interaction between histones and HP1 proteins. *Moll. Cell.* 7:729-739.
- Pak, D.T., M. Pflumm, I. Chesnokov, D.W. Huang, R. Kellum, J. Marr, P. Romanowski, and M.R. Botchan. 1997. Association of the origin recognition complex with heterochromatin and HP1 in higher eucaryotes. *Cell.* 91:311-323.
- Paro, R., and D.S. Hogness. 1991. The Polycomb protein shares a homologous region with a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:263-267.
- Platero, J.S., T. Hartnett, and J.C. Eissenberg. 1995. Functional analysis of the chromo domain of HP1. *EMBO J.* 14:3977-3986.
- Polioudaki, H., N. Kourmouli, V. Drosou, A. Bakou, P.A. Theodoropoulos, P.B. Singh, T. Giannakouros, and S.D. Georgatos. 2001. Histones H3/H4 form a tight complex with the inner nuclear membrane protein LBR and heterochromatin protein 1. *EMBO J* in press.

- Reuter, G., M. Giarre, J. Farah, J. Gausz, A. Spierer and P. Spierer. 1990. *Nature*. 344:219-223.
- Ryan, R.F., P.B. Singh, D.C. Schultz, J.R. Freidman, F.J. Rauscher. 1999. KAP-1 co-repressor protein interacts and colocalizes with heterochromatic and euchromatic HP1 proteins: a potential role for Kruppel-associated box zinc finger proteins in heterochromatin-mediated gene silencing. *Mol. Cell. Biol.* 19:4366-4378.
- Saunders, W.S., C. Chue, M. Goebel, C. Graig, R.F. Clark, J.A. Powers, J.C. Eissenberg, S.C. Elgin, N.F. Rothfield, and W.C. Earnshaw. 1993. Molecular cloning of a human homologue of *Drosophila* heterochromatin protein HP1 using anti-centromere autoantibodies with anti-chromosomal specificity. *J. Cell. Sci.* 104:573-582.
- Singh, P.B., J.R. Miller, J. Pearce, R. Kothary, R.D. Burton, R. Paro, T.C. James, and S.J. Gaunt. 1991. A sequence motif found in a *Drosophila* heterochromatin protein is conserved in animals and plants. *Nucleic Acids Res.* 19:789-794.
- Smothers, J.F., and S. Henikoff. 2001. The Hinge and Chromo Shadow Domain impart distinct targeting of HP1-like proteins. *Mol. Cell. Biol.* 21:2555-2569.
- Smothers, J.F., and S. Henikoff. 2000. The HP1 chromo shadow domain binds a consensus peptide pentamer. *Curr. Biol.* 10:27-30.
- Strahl, B.D., and C.D. Allis. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 403:41-45.
- Strutt, H., and R. Paro. 1997. The Polycomb group protein complex of *Drosophila melanogaster* has different compositions at different target Genes. *Mol. Cell. Biol.* 17:6773-6783.
- Wakimoto, B.T. 1998. Beyond the nucleosome: epigenetic aspects of position-effect variegation in *Drosophila*. *Cell*. 93:321-324
- Wallrath, L.L. 1998. Unfolding the mysteries of heterochromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8:147-153.
- Ye, Q., and H.J. Worman. 1996. Interaction between an integral protein of the nuclear envelope inner membrane and human chromodomain proteins homologous to *Drosophila* HP1. *J. Biol. Chem.* 271:14653-14656.

Ye, Q., I. Callebaut, A. Pezhman, J.C. Courvalin, and H.J. Worman. 1997. Domain-specific interactions of human HP1-type chromodomain proteins and inner nuclear membrane protein LBR. *J. Biol. Chem.* 272:14983-14989.