

**Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Μοριακής Βιολογίας και
Βιοϊατρικής**

Εργασία μεταπτυχιακού τίτλου εξειδίκευσης:

**Αλληλεπιδράσεις της ετεροχρωματίνης με τον
πυρηνικό φάκελο.**

Πολιουδάκη Χαρά

Υπεύθυνος καθηγητής: Σπύρος Γεωργάτος

Πανεπιστήμιο Κρήτης 2001

Στους γονείς μου, το Γιάννη, τη Νίκη και το Σπύρο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επ. Καθ. Π. Θεοδορόπουλο για την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχε κατά την διάρκεια αυτής της μελέτης καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου που με ανέχτηκαν, με βοήθησαν και με στήριξαν στις δύσκολες στιγμές.

Το μεγαλύτερο μέρος της συγκεκριμένης μελέτης βρίσκεται υπό δημοσίευση:
Hara Polioudaki, Niki Kourmouli, Victoria Drosou, Panayoris A. Theodoropoulos, Prim B. Singh, Thomas Giannakouros and Spyros Georgatos
Histons H3/H4 form a tight complex with inner nuclear membrane protein LBR and Heterochromatin Protein 1. *EMBO REPORTS*, (in press).

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
Ετεροχρωματινική πρωτεΐνη 1	7
Αλληλεπιδράσεις της HP1	9
Πυρηνικός φάκελος	12
Πρωτεΐνες της έσω πυρηνικής μεμβράνης	15
Σύνδεση των πρωτεϊνών της έσω πυρηνικής μεμβράνης με τη χρωματίνη	17
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	20
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	21
<u>Παρασκευαστικές μέθοδοι</u>	21
Απομόνωση πυρήνων από ερυθροκύτταρα γαλοπούλας	21
Απομόνωση πυρηνικών φακέλων από ερυθροκύτταρα γαλοπούλας	22
Απομόνωση πυρήνων από ηπατοκύτταρα αρουραίων	22
Παρασκευή πυρηνικών φακέλων από ηπατοκύτταρα αρουραίων	24
Απομόνωση χιμαιρικών πρωτεϊνών από βακτήρια	25
Μεταβολική σήμανση πρωτεϊνών	26
<u>Βιοχημικές μέθοδοι</u>	27
Μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεϊνών	27
Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών	27
Χρώση πηκτών ακρυλαμιδίου	28

Ιστονικά πλυμένοι πυρηνικοί φάκελοι	28
Εκχύλιση πυρήνων ή πυρηνικών φακέλων με υψηλή συγκέντρωση άλατος και απορρυπαντικού	28
Διαπίδυση	29
Western blot	29
Σύνδεση των πρωτεϊνών στον πυρηνικό φάκελο	30
Σύζευξη των πρωτεϊνών με σφαιρίδια σεφαρόζης	31
Pull-down με σφαιρίδια σεφαρόζης	32
GST-pull-down	32
Έλεγχος ανταγωνισμού της πρόσδεσης των ιστονών H3/H4, με τον LBR ή την M31	32
Έλεγχος σχηματισμού συμπλόκου M31-ιστονών-LBR	33
Έλεγχος ανταγωνισμού της πρόσδεσης των ιστονών H3/H4, στον LBR από την M31	34
Έλεγχος της επίδρασης του DNA στο σχηματισμό τους συμπλόκου M31-ιστονών-LBR	34
<u>Ενζυματικές μέθοδοι</u>	35
<i>In vitro</i> ακετυλίωση	35
<u>Μοριακές μέθοδοι</u>	36
DNA ηλεκτροφόρηση	36
Απομόνωση DNA μετά από pull-down	36
Αντισώματα	37
Πλασμίδια και άλλα υλικά	38

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	39
Σύνδεση της HP1 με τον LBR μέσω των core ιστονών	39
Προσδιορισμός του σημείου σύνδεσης των ιστονών H3/H4 στην M31 και τον LBR	49
Επανασυγκρότηση του συμπλόκου M31-ιστόνες- LBR με ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες	53
Ρύθμιση της αλληλεπίδρασης των core ιστονών με την HP1 και τον LBR από ακετυλίωση	53
Ρύθμιση της τροποποίησης των core ιστονών από μια ακετυλάση του πυρηνικού φακέλου	57
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	61
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	65

Εισαγωγή

Ετεροχρωματινικές πρωτεΐνη 1

Η ετεροχρωματινική πρωτεΐνη 1 (HP1) είναι μέλος μιας μεγάλης οικογένειας πρωτεϊνών, η οποία περιλαμβάνει το *Polycomb group* και άλλα πολυπεπίδια. Όλα αυτά τα μόρια, περιέχουν μια χαρακτηριστική αμινοξική αλληλουχία που ονομάζεται chromodomain (CD). Η CD (Singh et al., 1991, Pao and Hgness, 1991) εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο της HP1 και χωρίζεται με μια ενδιάμεση περιοχή (hinge) από μια άλλη αλληλουχία, που εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο του μορίου και ονομάζεται chromo shadow domain (CSD) (Aasland and Stewart, 1995). Η CSD είναι ουσιαστικά μια παραλλαγή του CD. Οι CD και CSD αποτελούνται από τρεις αντιπαράλληλους β κλώνους που πακετάρονται απέναντι σε μια ή δυο α έλικες και χωρίζονται μεταξύ τους από μια ευκίνητη ενδιάμεση περιοχή. Η κυριότερη διαφορά ανάμεσα στις πρωτεΐνες του τύπου της HP1 και αυτών του Polycomb group είναι ότι οι τελευταίες δεν περιέχουν στο μόριο τους CSD .

Η HP1 σχηματίζει διμερή μέσω διαμοριακών αλληλεπιδράσεων (Brasher et al., 2000) στις οποίες συμμετέχει η CSD. Σε όλα τα μόρια της οικογένειας αυτής, το CD λειτουργεί ως τροποποιητής της χρωματίνης ή ρυθμιστής της έκφρασης γονιδίων. Κατασκευή χμαιρικών πρωτεϊνών οι οποίες αποτελούνται είτε από την HP1 το chromo domain της οποίας, έχει αντικατασταθεί από το

αντίστοιχο Pc κομμάτι, είτε από την Pc πρωτεΐνη, της οποίας το CD έχει αντικατασταθεί από αυτό της HP1, έδειξαν ότι τόσο το CD όσο και το CSD είναι απαραίτητα για την σωστή εντόπιση στη χρωματίνη (Platero et al., 1995). Η HP1 εμπλέκεται στο position effect variegation, ενώ το *Polycomb group*, στην σταθερή καταστολή των ομοιοτικών γονιδίων (Cavalli and Paro, 1998, Jones et al., 2000). Position effect variegation συμβαίνει όταν ένα γονίδιο το οποίο εντοπίζεται στην ευχρωματίνη τοποθετηθεί, κοντά σε ετεροχρωματινική περιοχή μετά από αναδιοργάνωση των χρωμοσωμάτων. Έχουν βρεθεί δύο είδη τροποποιητών του PEV, οι καταστολείς (suppressors) όπως η Suvar, οι οποίοι μετατρέπουν το φαινότυπο σε αγρίου τύπου και οι υποκινητές (enchancers) όπως η Enar και η HP1 που φέρουν το αντίθετο αποτέλεσμα. Υπερέκφραση της HP1 οδήγησε σε ενίσχυση του PEV (Eissenberg et al., 1990) ενώ η *Suvar(2)5* (HP1 natural mutation) καταστέλλει το φαινόμενο.

Μεταλλαγές της πρωτεΐνης αυτής, οδηγούν σε εμβρυϊκό θάνατο λόγω διαφοροποίησης στην μορφολογία των χρωμοσωμάτων, επιμήκυνση της πρόφασης και κατά συνέπεια ανωμαλίες στον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων (Kellum and Alberts., 1995). Επίσης μεταλλαγές της πρωτεΐνης μπορούν να οδηγήσουν σε παρά φύση σύνδεση των χρωμοσωμάτων και πολλαπλές χωνεύσεις τελομερών (Fanti et al., 1998).

Αρχικά, μια μόνο μορφή της HP1 αναγνωρίστηκε στη *Drosophila melanogaster* (James and Elgin, 1986). Έλεγχος με CD probes φανέρωσε όμως πολλαπλές μορφές της πρωτεΐνης σε υψηλότερους ευκαριωτικούς οργανισμούς. Στα θηλαστικά η HP1 εμφανίζεται σε τρεις ισομορφές που ονομάζονται hHP1 α , β

και γ στον άνθρωπο, και mHP1α, M31 και M32 στο ποντικό (Singh et al., 1991; Saunders et al., 1993; Le Douarin et al., 1996; Ye and Worman., 1996). Παρόλο που οι πρωτεΐνες αυτές παρουσιάζουν δομικές ομοιότητες κατανέμονται σε διαφορετικές περιοχές του κυτταρικού πυρήνα (Wreggett et al., 1996; Aagaard et al., 1999; Nielsen et al., 1999).

Αλληλεπιδράσεις της HP1

Έχει δειχθεί φυσική ή χωρική σύνδεση ανάμεσα στην HP1 και στοιχεία του origin recognition complex (ORC), την πρωτεΐνη Arp4 (actin-related proteins) καθώς και με πρωτεΐνες που περιέχουν περιοχές SET ή CD, όπως η Su(var)3-9 και Su(var)3-7 (Cleard et al., 1997; Frankel et al., 1997; Pak et al., 1997; Aagaard et al., 1999). Διαφορετικές ισομορφές της HP1 έχουν αναγνωριστεί σε σύμπλοκα που ενέχονται στην ανασυγκρότηση της χρωματίνης (remodeling factors). Ο παράγοντας CAF-1 συνδέεται με την HP1β, η BRG1/SNF2β με την HP1α, οι ενδιάμεσοι μεταγραφικοί παράγοντες α και β (transcription intermediary factors α and β) με όλες τις ισομορφές της HP1 καθώς και με άλλες πρωτεΐνες που φαίνονται στον πίνακα 1.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω οι πρωτεΐνες της οικογένειας της HP1 αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και ίσως να σχηματίζουν όμο- ή έτερο- πολυμερή. Έχει δειχθεί (Ye and Worman., 1996) ότι οι ισομορφές α και γ της HP1 συνδέονται με μια πρωτεΐνη της έσω πυρηνικής μεμβράνης του πυρηνικού φακέλου τον LBR (lamin B receptor). Πρόσφατες μελέτες από τους Bannister και

Lachner (2001) έδειξαν επίσης ότι η ετεροχρωματινική πρωτεΐνη 1 (HP1) συνδέεται με την μεθυλιωμένη στην λυσίνη 9 ιστόνη H3. Η πρόσδεση της HP1 στον πυρηνικό φάκελο έχει ιδιαίτερη σημασία. Πρώτον η αγκυροβόληση χρωματινικών περιοχών στην έσω πυρηνική μεμβράνη πιστεύεται ότι επηρεάζει την μεταγραφική ενεργότητα (Andrulis et al., 1998) και δεύτερον, η δυναμική αλληλεπίδραση ανάμεσα σε συστατικά των συμπυκνωμένων χρωμοσωμάτων και πρωτεϊνών της έσω πυρηνικής μεμβράνης θεωρείται ότι παρέχουν τη βάση για την ανασυγκρότηση του πυρηνικού φακέλου στο τέλος της μίτωσης.

Πίνακας 1

Αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών με την HP1

Αλληλεπιδρώσα πρωτεΐνη	Πρωτεΐνη HP1	Μεθοδολογία	Σχόλια
INCENP	HP1α και γ	GST-pull-down πειράματα και 2 υβριδίων	Τα αμινοξέα 135-270 της INCENP αλληλεπιδρούν με την ενδιάμεση περιοχή της HP1α και γ
TIF1α	HP1α και β	GST-pull-down πειράματα και 2 υβριδίων	Τα αμινοξέα 675-701 του TIF1α αλληλεπιδρούν με το CSD της HP1α και β
HP1α και β	HP1α	2 υβριδίων	Η HP1α και β αντιδρούν με την CSD της HP1α
BRG1/SNF2β	HP1α	2 υβριδίων	Τα αμινοξέα 295-634 της BRG1/SNF2β αλληλεπιδρούν με το CSD της HP1α
H1/H5-like proteins	HP1α	2 υβριδίων	Η H1/H5-like protein αλληλεπιδρά με το CSD της HP1α
KAP-1/Tif1β	HP1α, β και γ	2 υβριδίων, ανοσοκατακρήμνιση, ανοσοφθορισμός, GST-pull-down πειράματα	Τα αμινοξέα 483-510 της KAP-1 αλληλεπιδρούν με τα CSD των HP1α, β και γ
Lamin B receptor (LBR)	HP1α και γ	2 υβριδίων, ανοσοκατακρήμνιση, GST-pull-down πειράματα	Η δεύτερη σφαιρική περιοχή του LBR αλληλεπιδρά με το CSD της HP1γ
SP100	HP1α, β και γ	ανοσοφθορισμός, GST-pull-down πειράματα, 2 υβριδίων	Τα αμινοξέα 287-334 της SP100 αλληλεπιδρά με τα CSD των HP1α, β και γ
p150 της CAF-1	HP1β	ανοσοκατακρήμνιση, ανοσοφθορισμός	Η CSD της HP1β αλληλεπιδρά με το N-τελικό κομμάτι της p150

Πυρηνικός φάκελος

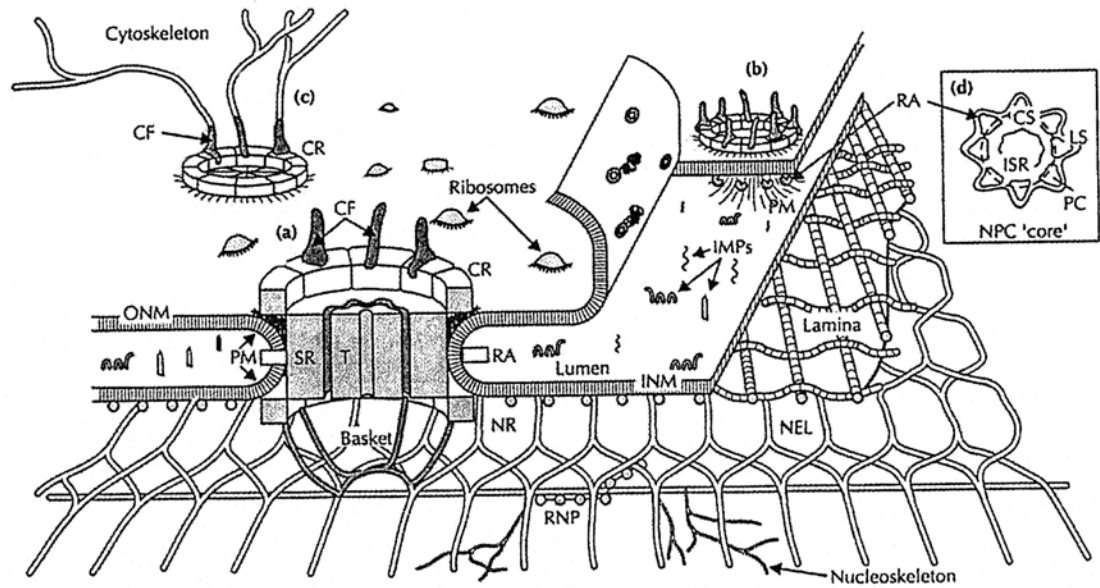
Σε προηγούμενες μελέτες μας (Kourmouli et al., 2000) δείξαμε ότι και οι τρεις ισομορφές της HP1 του ποντικού, συνδέονται με τον πυρηνικό φάκελο τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. Ο πυρηνικός φάκελος αποτελείται από τρία διακριτά τμήματα (εικ.1): την έξω πυρηνική μεμβράνη, η οποία «βλέπει» το κυτταρόπλασμα και είναι συνέχεια του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου και την έσω πυρηνική μεμβράνη, η οποία «βλέπει» το πυρηνόπλασμα και καλύπτεται από την πυρηνική λάμινα. Οι δύο μεμβράνες συνδέονται περιοδικά μέσω της μεμβράνης των πυρηνικών πόρων. Η μεμβράνη των πόρων αποτελεί μια περιοχή υψηλής εξειδικεύσεις και φιλοξενεί τα σύμπλοκα των πυρηνικών πόρων. Ουσιαστικές διαφορές, ανάμεσα στην λιπιδική σύσταση και την «ρευστότητα» της έξω και έσω πυρηνικής μεμβράνης, δεν έχουν παρατηρηθεί.

Παρόλο που ο πυρηνικός φάκελος αποτελεί συνέχεια του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου, οι κύριες πρωτεΐνες της έσω πυρηνικής μεμβράνης καθώς και τις μεμβράνης των πόρων, δεν έχουν εντοπιστεί ούτε στην έξω πυρηνική μεμβράνη ούτε στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Το αυτό γεγονός φανερώνει ότι τόσο οι πρωτεΐνες της έσω πυρηνικής μεμβράνης όσο και αυτές της μεμβράνης των πόρων, είναι σταθεροποιημένες *in situ* (Gant and Wilson, 1997).

Μέχρι τώρα έχουν χαρακτηριστεί πέντε πρωτεΐνες της έσω πυρηνικής μεμβράνης. Οι πρωτεΐνες αυτές περιλαμβάνουν τον LBR (lamin B receptor), την LAP-1 (lamin associated polypeptide-1), την LAP-2 (lamin associated

polypeptide-2), την emerlin και την MAN1. Η έσω πυρηνική μεμβράνη πιστεύεται ότι περιέχει IP₃/IP₄ υποδοχείς, την Ire1 (Sidrauski and Walter, 1997), και την Nurim (Rolls *et al.*, 1999). Όμως δεν είναι γνωστό αν οι πρωτεΐνες αυτές εντοπίζονται αποκλειστικά στην έσω πυρηνική μεμβράνη.

Όλες οι πρωτεΐνες της εσωτερικής μεμβράνης βρίσκονται τοποθετημένες με το αμινοτελικό τους τμήμα να εκτείνεται προς το πυρηνόπλασμα. Σχεδόν όλες αυτές οι πρωτεΐνες συνδέονται είτε με την πυρηνική λάμινα είτε με την χρωματίνη. Ένα άλλο κοινό χαρακτηριστικό τους είναι ότι περιέχουν στην άκρη τους μια υδρόφιλη περιοχή η οποία οδηγεί μη πυρηνικές πρωτεΐνες, στον πυρηνικό φάκελο. Τέσσερις από τις πέντε γνωστές πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου περιέχουν στο μόριο τους δομές coiled coil (Martin 1995, Politou and Georgatos unpublished data) και ίσως να σχηματίζουν μέσω των συγκεκριμένων δομών όμο- ή έτερο- ολιγομερή.



Εικόνα 1

Σχηματική παράσταση του πυρηνικού φακέλου (Goldberg and Allen, 1994)

CF	κυτταροπλασματικά ινίδια	RA	ακτινωτοί βραχίονες
CR	κυτταροπλασματικός δακτύλιος	RNP	ριβονουκλεοπρωτεΐνες σε σύνδεση με τη NEL
CS	περιοχή κεντρικής ακτίνας	SR	δακτύλιος ακτίνας
IMPs	διαμεμβρανικές πρωτεΐνες	T	μεταφορέας
INM	έσω πυρηνική μεμβράνη	NR	πυρηνοπλασματικός δακτύλιος
ISR	δακτύλιος εσωτερικής ακτίνας	ONM	εξωτερική πυρηνική μεμβράνη
LS	περιοχή ακτίνας αυλού	PC	περιφερικό κανάλι
NEL	πλέγμα πυρηνικού φακέλου	PM	μεμβράνη πόρου

Πρωτεΐνες της έσω πυρηνικής μεμβράνης

Η πιο καλά χαρακτηρισμένη πρωτεΐνη της έσω πυρηνικής μεμβράνης είναι ο LBR. Αποτελείται από μια υδρόφιλη αμινοτελική περιοχή και από ένα υδρόφοβο καρβοξυτελικό τμήμα το οποίο περιέχει επτά πιθανά διαμεμβρανικά τμήματα (Worman *et al*, 1988, 1990). Η αμινοτελική περιοχή του LBR βρίσκεται στο πυρηνόπλασμα, είναι εξαιρετικά βασική και περιέχει πολλαπλές επαναλήψεις σερίνης / αργινίνης (SR motifs). Οι επαναλήψεις αυτές παρέχουν τμήματα κατάλληλα για αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης καθώς και στόχους φωσφορυλίωσης.

Το γονίδιο του ανθρώπινου LBR εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1q42.1 και περιέχει 13 εξόνια. Τα πέντε πρώτα κωδικοποιούν την αμινοτελική περιοχή ενώ τα υπόλοιπα η καρβοξυτελική.

Ο LBR αποτελεί μέρος ενός μεγάλου συμπλόκου (Simos and Georgatos, 1992, 1994). Το σύμπλοκο του LBR περιλαμβάνει λαμίνες τύπου A και B, μια κινάση (την κινάση του LBR), την p18 και την p32/p34.

Μια άλλη πρωτεΐνη της έσω πυρηνικής μεμβράνης είναι η LAP1. Είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II, η οποία αποτελείται από ένα πυρηνοπλασματικό αμινοτελικό τμήμα και ένα καρβοξυτελικό κομμάτι που εντοπίζεται στην περιπυρηνική αύλακα. Όπως ο LBR έτσι και η LAP1 φαίνεται ότι αποτελεί μέρος ενός μεγάλου συμπλόκου. Πειράματα συνανοσοκατακρήμνισης προτείνουν την ισχυρή σύνδεση του με τις λαμίνες τύπου B καθώς και με εξαρτώμενες από το ασβέστιο κινάσες (Maison *et al*, 1997). Η σύνδεση της LAP1 με την πυρηνική λάμινα διασπάται κατά την μιτωτική

φωσφορυλίωση (Foisner and Gerace, 1993). Οι τροποποιημένες πρωτεΐνες απελευθερώνονται από την λάμινα και διασκορπίζονται σε μιτωτικά μεμβρανικά κυστίδια.

Η LAP2 είναι μια πολυμορφική πρωτεΐνη η οποία απαντάται στον άνθρωπο σε τρεις ισομορφές (α , β , γ) και στον ποντικό σε επτά (α , β , β' , γ , ϵ , δ , ζ). Από αυτές τις ισομορφές οι β , γ , δ και ϵ αντιπροσωπεύουν μεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου II, οι οποίες αποτελούνται από ένα πυρηνοπλασματικό αμινοτελικό άκρο, μια διαμεμβρανική περιοχή, και ένα καρβοξυτελικό άκρο εκτεινόμενο στον περιπυρηνικό χώρο. Οι LAP2 α και ζ δεν διαθέτουν διαμεμβρανικό τμήμα.

Η LAP2 β φαίνεται να συμμετέχει στον σχηματισμό συμπλόκων που περιέχουν τουλάχιστον τέσσερις άλλες πυρηνικές πρωτεΐνες. Η LAP2 β αλληλεπιδρά με τις λαμίνες τύπου B όπως και η LAP1 (Foisner and Gerace 1993, Maison et al, 1997). Μετά από την μιτωτική φωσφορυλίωση η LAP2 β απελευθερώνεται από την λάμινα και κατανέμεται στα μιτωτικά μεμβρανικά κυστίδια.

Η emerin αποτελείται από μια πλούσια σε σερίνες πυρηνοπλασματική περιοχή, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και μια μικρή καρβοξυτελική περιοχή η οποία εκτείνεται στον περιπυρηνικό χώρο. Οι emerin, LBR, LAP2 β και οι λαμίνες τύπου B συν-ανοσοαπομονώνονται και είναι πιθανόν μέρος ενός μεγάλου συμπλόκου.

Το νεώτερο μέλος των πρωτεϊνών της έσω πυρηνικής μεμβράνης είναι η MAN1. Η πρωτεΐνη αυτή αποτελείται από δυο διαμεμβρανικές περιοχές, ένα

μεγάλο αμινοτελικό τμήμα και μια σχετικά μικρή καρβοξυτελική περιοχή η οποία εξέχει στο πυρηνόπλασμα (Lin *et al*, 2000). Αμινοξική ανάλυση της ακολουθίας της πρωτεΐνης έδειξε ότι η MAN1 μοιράζεται ένα μοτίβο 40 υπολειμμάτων με τις emerlin και LAP2β. Το μοτίβο αυτό ονομάζεται LEM module.

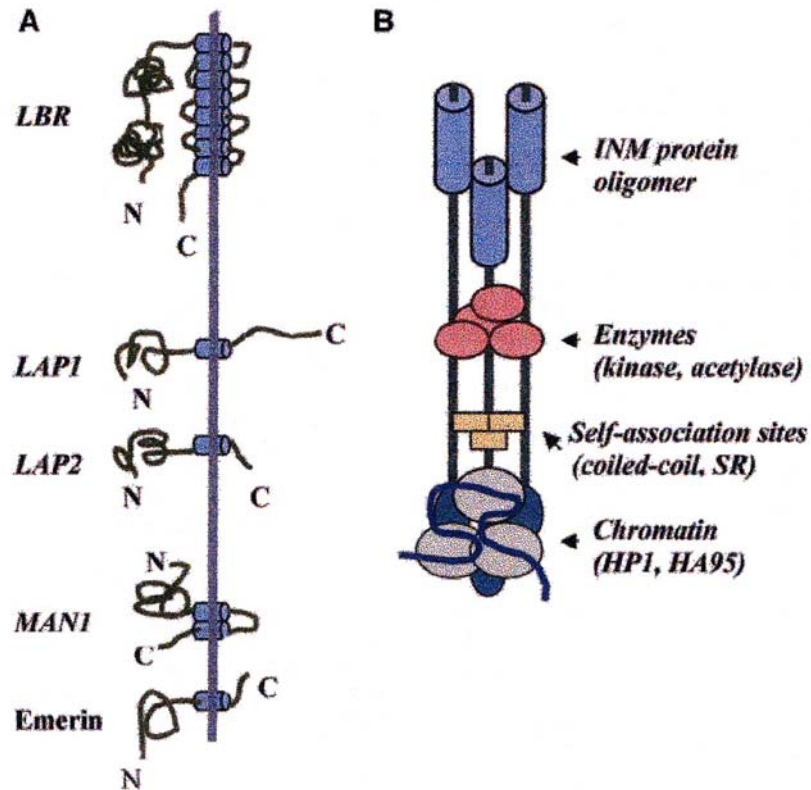
Σύνδεση των πρωτεϊνών της έσω πυρηνικής μεμβράνης με την χρωματίνη

Οι μοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών της έσω πυρηνικής μεμβράνης και της χρωματίνης (εικ.2) έχουν διπλή σημασία. Πρώτον η πρόσδεση των πρωτεϊνών αυτών στην συμπυκνωμένη χρωματίνη παρέχει την κινητήρια δύναμη για την ανασυγκρότηση του πυρηνικού φακέλου μετά την μίτωση (reviewed Georgatos and Theodoropoulos, 1999) και δεύτερον, η επαφή τους με τον πυρηνικό φάκελο φαίνεται να προκαλεί αποσιώπηση της χρωματίνης (Andrulis *et al*, 1998).

Τρία πολυπεπίδια πιστεύεται ότι διαμεσολαβούν για την σύνδεση του πυρηνικού φακέλου με το δίκτυο της χρωματίνης: η ετεροχρωματινική πρωτεΐνη 1 (HP1), η BAF (barrier-to autointegration factor) και η HA95. Η HP1 φαίνεται να συμμετέχει στην ανασυγκρότηση του πυρηνικού φακέλου μετά το τέλος της μίτωσης, διευκολύνοντας την στρατολόγηση των πρωτεϊνών της έσω πυρηνικής μεμβράνης στην επιφάνεια των χρωμοσωμάτων. Πεπίδια που περιέχουν το τμήμα πρόσδεσης στον πυρηνικό φάκελο της HP1β (M31), αναστέλλουν την στόχευση της LAP2β και των λαμινών τύπου B γύρω από τα χρωμοσώματα

συμπεριφερόμενα ως dominant negative mutants. Οι HP1 πρωτεΐνες αποχωρίζονται από τους πόλους των χρωμοσωμάτων (peri-chromosomal cap) κατά το χρονικό διάστημα που οι πρωτεΐνες της έσω πυρηνικής μεμβράνης συσσωρεύονται στην περιοχή (Kourmouli *et al*, 2000).

Η BAF είναι μια πρωτεΐνη που προσδένεται στην LAP2β και σχηματίζει δωδεκαμερή με το DNA (Zheng *et al*, 2000). Η αλληλεπίδραση αυτή με το DNA υποδηλώνει ένα ρόλο στην οργάνωση των χρωμοσωμάτων και στην δυναμική τους. Τέλος η HA95 (HAP95 ή NAKA95) είναι μια πρωτεΐνη που πρόσφατα ανακαλύφθηκε και παρουσιάζει ομολογία με την AKA95 (nuclear A-kinase anchoring protein). Το μόριο της περιέχει δυο zinc finger motifs και συνδέεται τόσο με την μεσοφασική χρωματίνη όσο και με τα μεταφασικά χρωμοσώματα. Η HA95 συνδέεται με τις λαμίνες τύπου Β και σχηματίζει σύμπλοκο με τον LBR, την LAP2β και την emerlin (Martin *et al*, 2000).



Εικόνα 2

Τοπολογία και οργάνωση των πρωτεϊνών της έσω-πυρηνικής μεμβράνης (Georgatos, 2001)

Στο A δίνονται τα δομικά και τοπολογικά, χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών της έσω πυρηνικής μεμβράνης. Με ακανόνιστες γραμμές συμβολίζονται τα υδρόφιλα άκρα των πρωτεϊνών τα οποία προεξέχουν στο πυρηνόπλασμα (αριστερά) ενώ οι διαμεμβρανικές περιοχές συμβολίζονται με κυλίνδρους. Στο B παρουσιάζεται ένα υποθετικό μοντέλο σχηματισμού συμπλόκου από πρωτεΐνες της έσω πυρηνικής μεμβράνης. Το συσσωμάτωμα αποτελείται από ολιγομερή (που συνδέονται μέσω coiled-coiled ή SR-SR αλληλεπιδράσεις) τροποποιητικά ένζυμα και συνδεδεμένα με την χρωματίνη συστατικά.

Σκοπός της παρούσας μελέτης

Προηγούμενες εργασίες είχαν προτείνει την απευθείας αλληλεπίδραση της ετεροχρωματινικής πρωτεΐνης 1 με τον LBR (Ye and Worman, 1996). Η ιδέα μιας απευθείας σύνδεσης των δύο μορίων δεν συμβαδίζει με το γεγονός ότι η HP1 εντοπίζεται σε εσωτερικά σημεία του κυτταρικού πυρήνα και όχι περιφερειακά στην περιοχή του πυρηνικού φακέλου (Wreggett *et al.*, 1994; Hosley *et al.*, 1996). Μία ιδέα που ίσως να εξηγεί αυτά τα αντικρουόμενα αποτελέσματα, προέρχεται από πειράματα μικροενέσεων. Στα πειράματα αυτά, όταν ανασυνδιασμένη HP1 ενίεται στο κυτταρόπλασμα κυττάρων συσσωρεύεται αρχικά στην περιοχή του πυρηνικού φακέλου και στην συνέχεια μετατοπίζεται σε πυρηνοπλασματικές εστίες (Kourmouli *et al.*, 2000).

Στην παρούσα εργασία προσπαθήσαμε να χαρακτηρίσουμε συγκεκριμένες θέσεις στον πυρηνικό φάκελο στις οποίες συνδέονται οι HP1 πρωτεΐνες. Βιοχημικά δεδομένα που παρουσιάζονται εδώ δείχνουν ότι οι ισομορφές της HP1 σχηματίζουν ισχυρό σύμπλοκο με δύο ιστόνες (H3/H4) και τον LBR. Οι *in vitro* αυτές αλληλεπιδράσεις αναστέλλονται από την ακετυλίωση των ιστονών. Τα δεδομένα μας είναι σε συμφωνία με προηγούμενα *in vivo* αποτελέσματα μας, και φανερώνουν ένα νέο μηχανισμό αγκυροβόλησης ετεροχρωματινικών περιοχών στον πυρηνικό φάκελο.

Υλικά και μέθοδοι

Παρασκευαστικές μέθοδοι

- *Απομόνωση πυρήνων από ερυθροκύτταρα γαλοπούλας*

Πηγή των πυρήνων ήταν 80-100ml αίματος γαλοπούλας. Μετά τη λήψη του αίματος, τα ερυθροκύτταρα πλένονταν 3 φορές με παγωμένο PBS φυγοκεντρούνταν σε table top universal 16 R, στα 3800 rpm για 10 min στους 4°C και με τη μέθοδο αυτή απομακρύνονταν με αναρρόφηση τα λευκά αιμοσφαίρια που σχηματίζουν ένα λεπτό στρώμα πάνω από το ίζημα των ερυθροκυττάρων. Το ίζημα αυτό επαναδιαλύεται σε 10 όγκους διαλύματος λύσης (5mM Na₃PO₄, 2mM MgCl₂, 1mM DTT, 1mM PMSF) και επωάζεται στον πάγο, για 10min με ανάδευση. Τα λυμένα κύτταρα φυγοκεντρούνται σε Sorval (με κεφαλή SS34) στις 10000 rpm, για 1 min στους 4°C. Μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου, το ίζημα των μεμβρανοσκελετικών δομών των ερυθροκυττάρων αναδιαλύεται με 10 όγκους διαλύματος λύσης και υφίσταται sonication (cycle 1, amplitude 70, για 25sec). Φυγοκέντρηση των ερυθροκυττάρων σε Sorval (SS34, 10000rpm, 10min, 4°C) οδηγεί στον σχηματισμό ιζήματος πυρήνων. Οι πυρήνες επαναδιαλύονται με 5 όγκους διαλύματος λύσης και εξαναγκάζονται να περάσουν 2 φορές από σύριγγα τις οποίας η βελόνα έχει καμφθεί. Οι πυρήνες φυγοκεντρούνται σε 3800g για 10 min στους 4°C (table top) και φυλάσσονταν στους -80°C.

- *Απομόνωση πυρηνικών φακέλων από ερυθροκύτταρα γαλοπούλας*

Πυρήνες από ερυθροκύτταρα γαλοπούλας επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 15min με 0.1mg/ml Dnase I (250U) σε διάλυμα 10mM Na₃PO₄, 2mM MgCl₂, 10% sucrose, 1mM PMSF, 1mM DTT. Τα κομμάτια της διαλυτής χρωματίνης απομακρύνονται με φυγοκέντρηση σε Sorval (SS34, 10000rpm, 10min, 4°C). Η πέψη αυτή επαναλαμβάνεται για άλλη μια φορά. Το ίζημα των πυρηνικών φακέλων εκχυλίζεται με διάλυμα υψηλού άλατος (2M KCl, 40mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1mM EGTA pH 8.0, 2mM MgCl₂, 1mM DTT, 1mM PMSF) και φυγοκεντρείται σε Sorval (SS34, 10000rpm, 30min, 4°C). Μετά την απομάκρυνση μεγάλου μέρους των ιστονών, το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε παγωμένο νερό και φυγοκεντρείται όπως αναφέρεται παραπάνω. Περαιτέρω εκχύλιση των πυρηνικών φακέλων με διάλυμα 8M ουρίας (8M ουρία, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 2mM EDTA pH 8.0, 1mM DTT, 1mM PMSF) οδηγεί στην απομάκρυνση των λαμινών από τις μεμβράνες. Οι μεμβράνες αυτού του τύπου παραλαμβάνονται μετά από υπερφυγοκέντρηση του μείγματος σε Beckman (με κεφαλή 70.1Ti, 40,000rpm, 1 ώρα, 18°C).

- *Απομόνωση πυρήνων από ηπατοκύτταρα αρουραίων*

Οι πυρήνες από ηπατοκύτταρα αρουραίων γίνονται σύμφωνα με μια τροποποιημένη μέθοδο των Dweyer και Blobel (1976). 10 αρουραίοι θανατώνονται με αιθέρα και αφαιρείται το ήπαρ τους. Αμέσως μετά την αφαίρεση τα συκώτια πλένονται με PBS (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 1.1mM $K_3PO_4 \cdot 3H_2O$, 6.21mM $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$) και τοποθετούνται στεγνά σε πάγο. Στην συνέχεια μεταφέρονται σε γυάλινη πλάκα όπου τεμαχίζονται με νυστέρι σε πολύ μικρά κομμάτια. Μεταφέρονται σε ογκομετρικό κύλινδρο όπου μετράμε τον όγκο τους και προσθέτουμε διπλάσιο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος 0.25 M steak (0.25M σουκρόζη, 12.5mM KCl, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 5mM DTT και 0.3mM PMSF). Το μίγμα ομογενοποιείται 15 φορές στις 17000 rpm, σε ομογενοποιητή των 50ml. Το ομογενοποίημα φιλτράρεται για να απομακρυνθούν κομματάκια ιστού που δεν έχουν ομογενοποιηθεί καλά, και φυγοκεντρείται για 15 min στις 2500rpm, σε σωλήνες corex και σε φυγόκεντρο Sorval. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης αποτελεί πηγή μεμβρανών του ενδοπλασματικού δικτύου ενώ το ίζημα περιέχει τους πυρήνες. Τα ιζήματα συγκεντρώνονται όλα μαζί και συμπληρώνονται με το παραπάνω ρυθμιστικό διάλυμα (0.25 steak) μέχρι τον όγκο των 70 ml. Στην συνέχεια το εναιώρημα ομογενοποιείται ξανά για 5 φορές στις 17000 rpm και αναμιγνύεται με δύο όγκους από το 2.3 steak (2.3M σουκρόζη, 12.5mM KCl, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 5mM DTT και 0.3mM PMSF). Το μείγμα τοποθετείται σε διαφανείς σωλήνες SW28 πάνω από ένα στρώμα 5ml του δεύτερου διαλύματος (2.3 steak) και φυγοκεντρείται για μία ώρα στις 20000rpm, σε κεφαλή SW28, στους 4°C και σε φυγόκεντρο Beckman. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 0,25 steak και φυγοκεντρείται για 10 min στις 10000rpm και

στους 4°C σε erpendorf. Το ίζημα που προκύπτει αποτελεί τους καθαρούς πυρήνες.

Κατά την παρασκευή των πυρήνων από ηπατοκύτταρα αρουραίου, όλες οι εργασίες πραγματοποιούνται στους 4°C.

- *Παρασκευή πυρηνικών φακέλων από ηπατοκύτταρα αρουραίου*

Πυρήνες από 10 συκώτια αρουραίου, διαλύονται σε 5ml διαλύματος A (0.1mM MgCl₂, 1mM DTT, 0.5mM PMSF) και σε αυτό προσθέτονται 15ml διαλύματος B (10% σουκρόζη, 20mM Tris-HCl pH8.5, 0.1mM MgCl₂, 1mM DTT και 0.5mM PMSF). Ταυτόχρονα ετοιμάζεται διάλυμα DNaseI 2 mg/ml σε PBS που περιέχει 1mM PMSF. 500μl από το διάλυμα αυτό προστίθενται στα 20 ml στα οποία έχουν αναδιαλυθεί οι πυρήνες και το μείγμα επωάζεται για 15min σε θερμοκρασία δωματίου με συνεχή ανάδευση. Στην συνέχεια, το μείγμα φυγοκεντρείται για 15min, στις 10000rpm, σε κεφαλή SS34, στους 4°C και σε φυγόκεντρο Sorval. Η πέψη με DNase I επαναλαμβάνεται με τη διαφορά ότι το pH των δύο τελευταίων διαλυμάτων είναι 7.5. Το ίζημα της δεύτερης φυγοκέντρωσης διαλύεται σε ισοτονικό διάλυμα (20mM Tris pH7.5, 150mM NaCl, 1mM MgCl₂, 1mM DTT, 1mM PMSF), φυγοκεντρείται σε erpendorf, στους 4°C και το ίζημα φυλάσσεται στους -80°C.

- *Απομόνωση χιμαιρικών πρωτεϊνών από βακτήρια*

Για την απομόνωση των χιμαιρικών πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος BL21(DE3) των βακτηρίων E.coli. Οι πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν είχαν συντηχθεί είτε με GST είτε με 6 ιστιδίνες (His₆). Αρχικά 50ml καλλιέργειας επωάζονται στους 37°C για 14 ώρες παρουσία αντιβιοτικού (Ampicillin). Την επόμενη μέρα, η καλλιέργεια αραιώνεται ως τα 500ml και αφήνεται να αναπτυχθεί μέχρι η οπτική πυκνότητα της να φτάσει το 0.8 (στα 600nm). Η επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών πραγματοποιείται είτε με τη χρήση 100mM IPTG (για τις GST χιμαιρικές πρωτεΐνες) είτε με 1mM IPTG (για τις His χιμαιρικές πρωτεΐνες) για 3 ώρες στους 30°C.

Τα βακτήρια που εκφράζουν χιμαιρικές GST πρωτεΐνες λύνονται σε 5ml διαλύματος MTPBS (PBS, 1.2mM PMSF, 0.1mM μερκαπτοαιθανόλη με τη χρήση υπέρηχων (3X10sec). Στο εναιώρημα προστίθεται 1% Triton X-100 και ακολουθεί φυγοκέντρηση (σε sorval) στα 10000rpm για 10 min στους 4°C. Στη συνέχεια το υπερκείμενο επωάζεται με glutathion-beads για μισή ώρα στην ίδια θερμοκρασία. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου, τα σφαιρίδια πλένονται 3 φορές με 30ml MTPBS (1X PBS, 10% Triton X-100, 1mM PMSF, 0,1mM ME) και η πρωτεΐνη απομονώνεται με τη χρήση διαλύματος ανηγμένης γλουταθειώνης (50mM Tris-Hcl pH 8.0, 9mg GH) .

Τα βακτήρια που εκφράζουν χιμαιρικές ιστιδίνο-πρωτεΐνες διαλυτοποιούνται σε 4ml διάλυμα λύσης A (50mM NaCl, 10% glycerol, 25mM Tris-HCl pH 7.3, 0.1mM EGTA, 1mM PMSF, 10mM μερκαπτοαιθανόλη) και

επώζονται για 1h στους 4°C. Η λύση πραγματοποιείται σε τη χρήση υπερήχων (6X10 sec). Στο εναιώρημα προστίθεται 1% Triton X-100, 2mM MgCl₂, 20μg/ml DNase I. Ακολουθεί επώαση για 15 min στους 4°C και φυγοκεντρείται για 15min στα 10000rpm (σε φυγόκεντρο sorval). Το υπερκείμενο συλλέγεται, αραιώνεται 1:1 με διάλυμα λύσης B (50mM NaCl, 25mM Tris-Hcl pH 7.3, 10% glycerol, 1mM PMSF), προστίθενται 5mM ιμιδαζόλης και ακολουθεί επώαση με Ni-beads, για 1h στους 4°C. Μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου, τα beads πλένονται 3X30ml με διάλυμα πλύσης (50mM NaCl, 25mM Tris-Hcl pH 7.3, 10% glycerol, 20mM Imidazole, 1mM PMSF) και η πρωτεΐνη εκλύεται με διάλυμα 250mM Imidazole.

- *Μεταβολική σήμανση πρωτεϊνών*

Για την μεταβολική σήμανση των πρωτεϊνών, τα βακτήρια καλλιεργούνται σε θρεπτικό χωρίς μεθειονίνη (M9) μέχρι η οπτική τους πυκνότητα να φτάσει το 0,9. Στη συνέχεια προστίθεται 0.1mM IPTG και ³⁵S-μεθειονίνη (200-300μCi) και έπεται επώαση για 3 h στους 37°C. Η διαδικασία που ακολουθείται για την απομόνωση της πρωτεΐνης είναι όμοια με αυτή που περιγράφηκε παραπάνω.

Βιοχημικές μέθοδοι

- *Μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεϊνών*

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η χρωματομετρική μέθοδος Bradford. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στο σχηματισμό συμπλόκου μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων και μορίων Coomassie Blue που απορροφούν σε μήκος κύματος 595nm. Η καμπύλη αναφοράς που χρησιμοποιείται κατασκευάζεται με μέτρηση της απορρόφησης συγκεκριμένων συγκεντρώσεων BSA.

- *Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών*

Οι πρωτεΐνες αναλύονται σε πηκτές ακρυλαμιδίου. Για τις ανάγκες της συγκεκριμένης εργασίας χρησιμοποιήθηκαν πηκτές ακρυλαμιδίου 12.5% και 13%. Το διάλυμα μέσα στο οποίο διαλύονται οι πρωτεΐνες πριν από την ηλεκτροφόρηση αποτελείται από 250mM Tris base, 9.2% SDS, 40% Glycerol, 0.2% Bromophenol blue και 100mM DTT. Τα δείγματα θερμαίνονται για 5-10min στους 95°C και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 45-50mA για 3 ώρες (μέγιστη ισχύ και τάση).

- *Χρώση πηκτών ακρυλαμιδίου*

Για την χρώση των πηκτών ακρυλαμιδίου χρησιμοποιήθηκε Coomassie Brilliant Blue. Μετά την ηλεκτροφόρηση η πηκτή βάφεται και ταυτόχρονα μονιμοποιείται με διάλυμα 50% μεθανόλης, 12% οξικού οξέος, 0.1% Coomassie Brilliant Blue και 38% νερού για μια τουλάχιστον ώρα. Η απομάκρυνση της χρωστικής πραγματοποιείται με τοποθέτηση της πηκτής ακρυλαμίδης σε διάλυμα 10% μεθανόλης και 10% οξικού οξέος, με συνεχή ανάδευση.

- *Ισοτονικά πλυμένοι πυρηνικοί φάκελοι*

Πυρηνικοί φάκελοι που έχουν κατεργαστεί με DNase I, εκχυλίζονται σε ισοτονικό διάλυμα (20mM Tris pH7.5, 150mM NaCl, 1mM MgCl₂, 1mM DTT, 1mM PMSF). Το εναιώρημα φυγοκεντρείται για μισή ώρα σε eppendorf, στους 4°C, στις 13.000 rpm.

- *Εκχύλιση πυρήνων ή πυρηνικών φακέλων γαλοπούλας με υψηλή συγκέντρωση άλατος και απορρυπαντικού*

Πυρηνικοί φάκελοι εκχυλίζονται με διάλυμα 1M NaCl, 20mM Tris-HCl pH8.0, 1% Triton X-100, 1mM MgCl₂, 1mM PMSF, 1mM DTT και φυγοκεντρώνται σε κεφαλή TLS 55 (BECKMAN), για 30 min, στα 40.000rpm στους 4°C. Τα διαλυτά

συστατικά αραιώνονται με νερό και 1% Triton X-100 ώστε η τελική συγκέντρωση άλατος να φτάσει τα 500mM. Μετά την αρραίωση, τα δείγματα φυγοκεντρώνται σε eppendorf (14.000rpm,30min, 4°C) και το υπερκείμενο χρησιμοποιείται σε πειράματα pull-down.

- *Διαπίδυση*

Η απομάκρυνση της γλουταθειόνης από τις GST πρωτεΐνες ή της ιμιδαζόλης από τις His χημεικές πρωτεΐνες γίνεται με τη μέθοδο της διαπίδυσης. Η πρωτεΐνη τοποθετείται σε ημιπερατή μεμβράνη και αφήνεται να ισορροπήσει σε 1L assay buffer (150mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH 7.4, 2mM MgCl₂, 0.1mM EGTA, 10% sucrose, 1mM PMSF) για 14 h στους 4°C, υπό ανάδευση.

- *Western blot*

Μετά το διαχωρισμό των πρωτεϊνών με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από την πηκτή ακρυλαμίδης σε νιτροκυτταρίνη (Schleicher and Schuell, 0.45μM) σε δυναμικό 35V για 2.5-3.0 ώρες. Η μεταφορά γίνεται σε διάλυμα 25mM Tris base, 192mM γλυκίνη, 0.1%SDS και 20% μεθανόλη. Στη συνέχεια η μεμβράνη πλένεται αρχικά με ένα διάλυμα 20mM Tris-HCl pH 7.4, 155mM NaCl, 0.1% Tween (washing buffer) για 10min και οι

ελεύθερες στη μεμβράνη θέσεις καλύπτονται με επώαση σε διάλυμα 20mM Tris-HCl pH 7.4, 155mM NaCl, 0.1% Tween και 1% fish skin gelatin (gelatin buffer) για τουλάχιστον 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Το πρωτογενές αντίσωμα αραιώνεται σε gelatin buffer και η μεμβράνη επωάζεται για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Η περίσσεια του αντισώματος απομακρύνεται με πλύσιμο της μεμβράνης 3 φορές επί 10min με gelatin buffer. Το δευτερογενές αντίσωμα χρησιμοποιείται σε αραιώση 1/10000 (HRP) σε gelatin buffer για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια, τα φίλτρα πλένονται 3 φορές για 10min με gelatin buffer και 3 φορές για 10 min με washing buffer. Η εμφάνιση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με τη χρήση KIT χημειοφωταύγειας (ECL KIT Amhersam).

- *Σύνδεση πρωτεϊνών στον πυρηγικό φάκελο.*

Δέκα με 50μg πυρηγικών φακέλων επωάζονται με αυξανόμενες ποσότητες GST ή His πρωτεϊνών, διαλυμένες σε assay buffer (150mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH 7.4, 2mM MgCl₂, 0.1mM EGTA, 10% sucrose) και ο τελικός όγκος των αντιδράσεων ρυθμίζεται στα 100μl. Μετά από επώαση, 45min, υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου, τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 30min στα 12,000g στους 4°C και τα ιζήματα πλένονται με 300μl assay buffer. Ακολουθεί άλλη μια φυγοκέντρηση στα 12,000g για 15min στους 4°C. Τα υπερκείμενα απομακρύνονται προσεκτικά και τα τοιχώματα των eppendorf

σκουπίζονται. Τα τελικά ιζήματα αντιπροσωπεύουν τα συνδεδεμένα με τις μεμβράνες υλικά. Η διαλυτοποίησή τους γίνεται σε scintillation fluid. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων γίνεται με μέτρηση σε scintillation counter (^{35}S methionine labeled M31- GST). Όλα τα eppendorf που χρησιμοποιούνται είχαν επικαλυφθεί με 1% βρασμένη και φιλτραρισμένη fish skin gelatin.

- *Σύζευξη πρωτεϊνών με σφαιρίδια σεφαρόζης*

Για τις ανάγκες της σύζευξης χρησιμοποιήθηκαν 1mg M31N-His, M31L-His και GST. Οι πρωτεΐνες αυτές τοποθετήθηκαν για διαπίδυση σε διάλυμα 100mM Na_3PO_4 και 0.1mM EDTA pH 8.0 για 14 ώρες στους 4°C.

Η ενεργοποίηση της ρητίνης (που είχε προ-ενεργοποιηθεί με BrCN) πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα χαμηλού pH. Σε μια ποσότητα σφαιριδίων προστέθηκε 1M HCl και το εναιώρημα πλύθηκε για 15min με το ίδιο διάλυμα σε γυάλινο φίλτρο Buhler.

Για την σύζευξη των σφαιριδίων με την πρωτεΐνη χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 100mM Na_3PO_4 . Μετά την ανάμιξη του υποκαταστάτη με το διάλυμα σύζευξης προσθέτονται τα ενεργοποιημένα σφαιρίδια σεφαρόζης και το εναιώρημα επώάζεται υπό ανάδευση για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή για 14 ώρες στους 4°C. Μετά το τέλος της επώασης τα σφαιρίδια πλένονται με το διάλυμα σύζευξης (πέντε φορές τον όγκο των σφαιριδίων). Οι ενεργές ομάδες που παραμένουν εξουδετερώνονται με επώαση των σφαιριδίων με διάλυμα 0.1M Tris-

HCl pH 8.0 για δύο ώρες. Στην συνέχεια τα σφαιρίδια εκθέτονται εναλλάξ, για τρεις τουλάχιστον φορές, σε διάλυμα χαμηλού και υψηλού pH (0.1M acetate buffer pH 4.0, 0.5M NaCl και 0.1M Tris-HCl pH 8.0, 0.5M NaCl). Με το τελευταίο στάδιο επιτυγχάνεται η απομάκρυνση ιονικά συνδεδεμένων, μορίων του υποκαταστάτη με τα σφαιρίδια. Ακολούθως τα σφαιρίδια χρησιμοποιούνται σε πειράματα pull-down.

- *Pull-down με σφαιρίδια σεφαρόζης*

200μl σφαιριδίων στα οποία έχουν προηγουμένως συζευχθεί οι M31N, M31L ή GST επωάζονται με 1% ζελατίνη (φιλτραρισμένη και βρασμένη) σε PBS, για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και σε συνεχή ανάδευση. Μετά την αδρανοποίησή τους, τα σφαιρίδια επωάζονται με 20μg ιστονών H3 ή H4 για μία ώρα υπό ανάδευση σε διάλυμα υψηλού άλατος και 1% Triton X-100. Στην συνέχεια τα σφαιρίδια πλένονται επτά φορές με το παραπάνω διάλυμα και στο τέλος προστίθεται Laemmli buffer και χρησιμοποιούνται σε ηλεκτροφόρηση.

- *GST pull-down*

15-30μg GST χμαιοτικών πρωτεϊνών (mHP1α, M31, M32, LBR, GST) επωάζονται σε διάλυμα 500mM NaCl, 1% Triton X-100, 10 mM Tris-HCl pH8.0, 0.5 mM MgCl₂, 0,1 mM EGTA pH 8.0 (500 mM extraction buffer), με 15 μg

ιστονών, για 1 ώρα, υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια 15-30μg GST σφαιριδίων προσθέτονται σε κάθε δείγμα και επώάζονται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το τέλος της επώασης τα δείγματα πλένονται 5 φορές με 500 mM extraction buffer. Στα δείγματα προστίθεται Laemmli buffer θερμαίνονται στους 95°C για 5 min και χρησιμοποιούνται για ηλεκτροφόρηση και western blot.

- *Έλεγχος ανταγωνισμού της πρόσδεσης των ιστονών H3/H4, με τον LBR ή την M31*

15μg M31-GST ή Nt-LBR-GST δένονται αρχικά σε 20μl σφαιριδίων GST παρουσία assay buffer (150mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH 7.4, 2mM MgCl₂, 0.1mM EGTA, 10% σουκρόζη). Ο τελικός όγκος ρυθμίζεται στα 100μl. Μετά το τέλος της επώασης τα σφαιρίδια πλένονται τρεις φορές με το ίδιο διάλυμα. Στην συνέχεια τους προσθέτουμε 10μg H3 και αυξανόμενες συγκεντρώσεις H4 σε διάλυμα υψηλού άλατος (500mM NaCl, 1% Triton X-100, 20mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM MgCl₂, 0.1mM EGTA pH 8.0) διατηρώντας τον όγκο στα 100μl. Η μέγιστη ποσότητα H4 που προστίθεται στις παραπάνω αντιδράσεις είναι δέκα φορές μεγαλύτερη από αυτή της H3 (100μg). Το εναιώρημα επώάζεται για μια ώρα με συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου τα σφαιρίδια πλένονται πέντε φορές με το διάλυμα υψηλού άλατος και προσθέτονται 30μl Laemmli buffer.

- *Έλεγχος σχηματισμού συμπλόκου M31-ιστονών-LBR*

25μg Nt-LBR-GST επωάζονται με 20μl σφαιριδίων GST, σε assay buffer (150mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH 7.4, 2mM MgCl₂, 0.1mM EGTA, 10% σουκρόζη και 1% Triton X-100) για 45 min, με συνεχή ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ρυθμίζεται στα 100 μl. Στην συνέχεια τα σφαιρίδια πλένονται τρεις φορές με assay buffer. Μετά το τέλος του τρίτου πλυσίματος, προσθέτονται στα σφαιρίδια 15μg ιστόνης H3 και ίση ποσότητα H4 σε διάλυμα υψηλού άλατος (500mM NaCl, 1% Triton X-100, 20mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM MgCl₂, 0.1mM EGTA pH 8.0 και 0.1mM DTT) διατηρώντας τον όγκο στα 100 μl. Το μείγμα επωάζεται για μισή ώρα, με συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και τα σφαιρίδια πλένονται μια φορά με το διάλυμα υψηλού άλατος. Κατόπιν προσθέτονται 25μg M31-His και επωάζονται με το παραπάνω διάλυμα για 45min, όπως προηγουμένως. Μετά το τέλος της αντίδρασης τα GST σφαιρίδια πλένονται πέντε φορές με το διάλυμα υψηλού άλατος και προσθέτονται σε αυτά 30μl Laemmli buffer.

- *Έλεγχος ανταγωνισμού της πρόσδεσης των ιστονών H3/H4 στον LBR από την M31*

25μg Nt-LBR-GST συνδέονται σε σφαιρίδια GST όπως προηγουμένως. Μετά το τέλος της επώασης πλένονται και προστίθενται 15μg H3 και H4. Στην συνέχεια επωάζονται σε διάλυμα υψηλού άλατος όπως παραπάνω και προστίθενται διαδοχικά αυξανόμενες ποσότητες M31-His. Η μέγιστη ποσότητα που προστέθηκε στην αντίδραση ήταν 100μg ανταγωνιστή. Η επώαση έγινε σε υψηλό αλάτι για 45min με συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.

- *Έλεγχος της επίδρασης του DNA στο σχηματισμό του συμπλόκου M31-ιστονών- LBR*

Εκχύλισμα από πυρηνικούς φακέλους ερυθροκυττάρων γαλοπούλας, με υψηλό αλάτι και Triton X-100, επωάζεται με 100μg DNase I για 20min με συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια στο μείγμα προστίθενται 25μg M31-GST ή GST και επωάζονται για μια ώρα υπό ανάδευση. Μετά το τέλος της επώασης ακολουθείται η διαδικασία του GST-pull-down. Τα αποτελέσματα της μεθόδου ελέγχθηκαν με western blot χρησιμοποιώντας αντίσωμα που αναγνωρίζει τον LBR.

Ενζυματικές μέθοδοι

- *In vitro ακετυλίωση*

15μg καθαρών ιστονών επωάζονται με βακτηριακό εκχύλισμα CBP-GST παρουσία ή απουσία ακέτυλο-συνενζύμου A (5mM) σε assay buffer (150mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH 7.4, 2mM MgCl₂, 0.1mM EGTA, 10% sucrose) για 20min σε θερμοκρασία δωματίου με συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια ρυθμίζεται το αλάτι της αντίδρασης στα 500mM NaCl, προστίθεται 1% Triton X-100 και το μίγμα χρησιμοποιείται σε pull-down πειράματα.

Μοριακές μέθοδοι

- *DNA Ηλεκτροφόρηση*

Για την ηλεκτροφόρηση του απομονωμένου DNA χρησιμοποιήθηκε πηκτή αγαρόζης 1% σε διάλυμα TAE (39.95mM Tris-base, 1mM EDTA pH 8.0, 1.142ml acetic acid). Μετά την μερική ψύξη του διαλύματος προστέθηκε 1X βρωμιούχο αιθίδιο (10.000X stock). Το DNA ηλεκτροφορήθηκε για 30 min, στα 40V, σε διάλυμα 1X TAE. Η αποτύπωση του αποτελέσματος έγινε με έκθεση της πηκτής σε ακτίνες UV και φωτογράφιση με κάμερα.

- *Απομόνωση DNA μετά από pull-down*

Μετά το τέλος της διαδικασίας του pull-down (χρησιμοποιώντας εκχύλισμα από πυρήνες γαλοπούλας), προστίθενται στα στεγνά σφαιρίδια αγαρόζης, 100μl νερό

και αναδεύονται καλά (vortex). Στο εναιώρημα προστίθεται ίσος όγκος εξισορροπημένης φαινόλης pH 7.0, αναδεύεται καλά και φυγοκεντρείται για 5min στην erppendorf, στις 12000 rpm, σε θερμοκρασία δωματίου. Απομακρύνεται η υδατική φάση και προστίθεται σε αυτή ίσος όγκος φαινόλης-χλωροφόρμιου. Αναδεύεται και φυγοκεντρείται όπως παραπάνω. Μετά την απομάκρυνση της υδατικής φάσης προστίθεται σε αυτή διπλάσιος όγκος απόλυτης αιθανόλης. Το διάλυμα παραμένει για 30min στους -80°C μέχρι να κατακρημνιστεί το DNA. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στην erppendorf, στις 12000 rpm 5 min. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και στο ίζημα προστίθεται 70% αιθανόλη, σε όγκο ίσο με τον προηγούμενο. Μετά από φυγοκέντρωση (όμοια με την προηγούμενη) το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει για 30min στην απαγωγό εστία. Στην συνέχεια το ίζημα διαλύεται σε 10μl νερό. 3μl από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν για την ηλεκτροφόρηση και σε αυτά προστέθηκε 1μl loading buffer.

- *Αντισώματα*

Το πολυκλωνικό αντίσωμα anti-LBR, που χρησιμοποιήθηκε, έχει χαρακτηριστεί σε προηγούμενες μελέτες (Meier and Georgatos, 1994), ενώ το αντίσωμα που αναγνωρίζει την ιστόνη H3 (Santa Cruz) χρησιμοποιήθηκε σε αραιώση 1/500 για western blot ανάλυση. Τέλος το αντίσωμα που αναγνωρίζει ειδικά την μεθυλιωμένη στη λυσίνη 9 ιστόνη H3, παρασκευάστηκε με ανοσοποίηση κουνελιών χρησιμοποιώντας ένα χημικά τροποποιημένο πεπτίδιο. Το αντίσωμα

αυτό δίνει σαφή εντόπιση στον ανοσοφθορισμό και αντιδρά αποκλειστικά με τη μεθυλιωμένη H3 σε πειράματα Elisa. Σε πειράματα ανοσοφθορισμού και western blot χρησιμοποιήθηκε σε αραιώση 1/500. Σε όλα τα western blot πειράματα τα δευτερογενή αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώση 1/10000 (HRP).

- *πλασμίδια και άλλα υλικά*

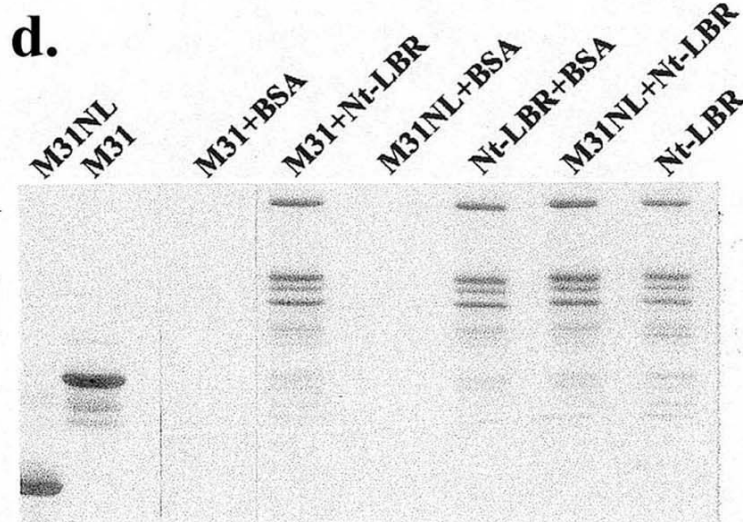
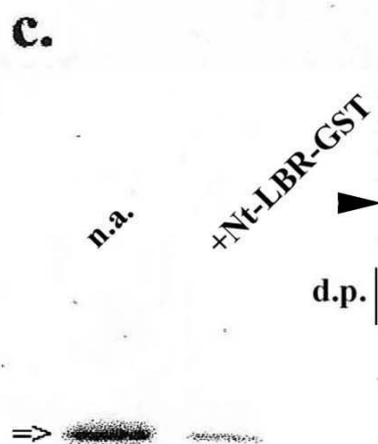
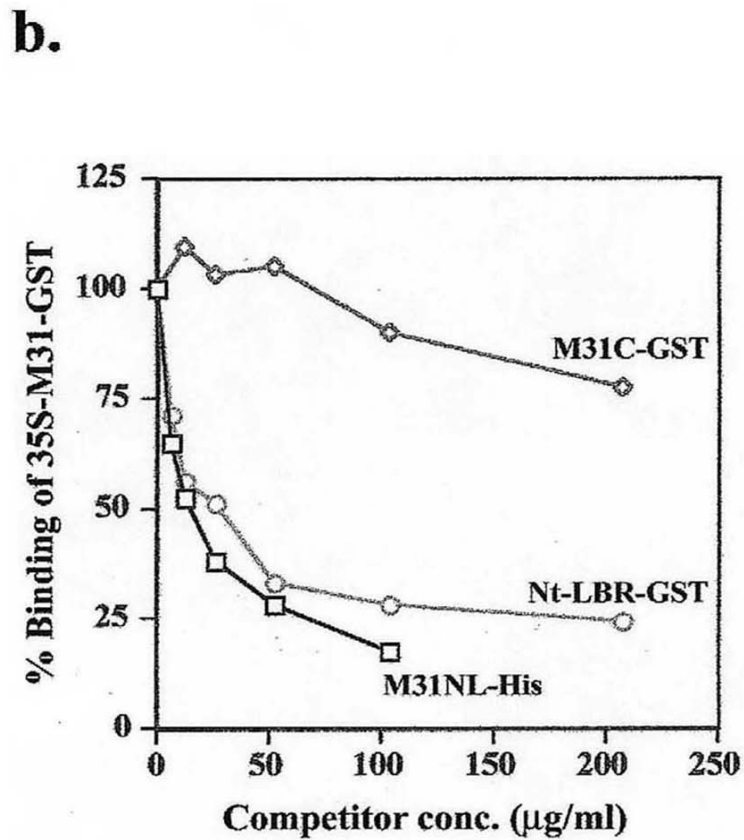
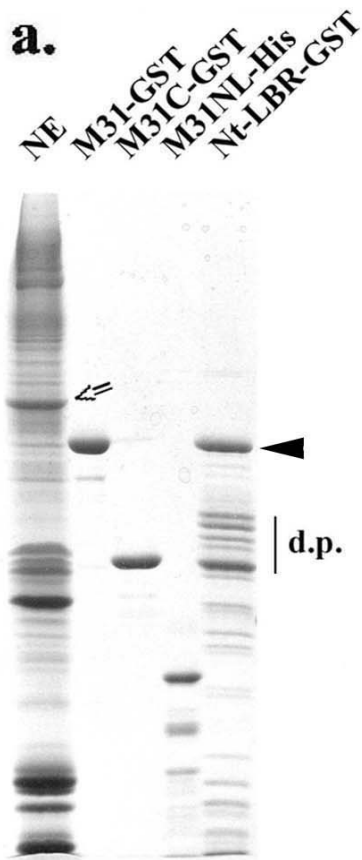
Η M31 (full length), η καρβοξυτελικό κομμάτι της M31 (M31C), καθώς και η M32 εκφράστηκαν ως χμιαϊκές με GST πρωτεΐνες χρησιμοποιώντας pGEX1. Η GST-mHP1α κλωνοποιήθηκε σε pGEX-4T-1. Η M31(full length), καθώς και η M31NL εκφράστηκαν ως χμιαϊκές His πρωτεΐνες χρησιμοποιώντας pET-25b. Οι καθαρές ιστόνες που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από την Roche. Η ανασυνδυασμένη CBP πρωτεΐνη είναι ευγενική προσφορά της Κας Νίκη Κρετσόβαλη.

Αποτελέσματα

- *Σύνδεση της HP1 με τον LBR μέσω των core ιστονών*

Προηγούμενες μελέτες (Kourmouli *et al.*, 2000, 2001) έχουν δείξει ότι, και οι mHP1α, M31, και M32 συνδέονται ειδικά σε πυρηνικούς φακέλους που έχουν υποστεί εκχύλιση και περιέχουν κυρίως ενσωματωμένες πρωτεΐνες και ισχυρά προσδεμένες ιστόνες (εικ.3α, NE). Βασιζόμενοι σε αυτό το δεδομένο θεωρήσαμε ότι ο LBR, ένα από τα κύρια συστατικά της έσω πυρηνικής μεμβράνης, θα αποτελούσε υποψήφιο για την πρόσδεση της HP1 στον πυρηνικό φάκελο. Για να ελέγξουμε την υπόθεση μας, προχωρήσαμε σε ποσοτικές δοκιμασίες χρησιμοποιώντας ραδιενεργά σημασμένη ή «κρύα», M31-GST (ομόλογη της mHP1β). Οι πρωτεΐνες αυτές επωάστηκαν με πυρηνικούς φακέλους παρουσία Nt-LBR (το αμινοτελικό κομμάτι του LBR που αποτελείται από 200 αμινοξέα, είναι υδατοδιαλυτό και αντιπροσωπεύει ολόκληρη την πυρηνοπλασματική περιοχή της πρωτεΐνης, βλέπε εικόνα 3α στις γραμμές M31-GST, Nt-LBR-GST).

Όπως ήταν αναμενόμενο ο Nt-LBR-GST ανέστειλε την πρόσδεση της M31-GST στους πυρηνικούς φακέλους με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Στο ίδιο πείραμα φάνηκε ότι η M31NL-His, μια ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που περιέχει την περιοχή σύνδεσης της M31 με τους πυρηνικούς φακέλους προκαλεί το ίδιο φαινόμενο. Αντίθετα, προσθήκη της M31C-GST, του καρβοξυτελικού τμήματος



Εικόνα 3

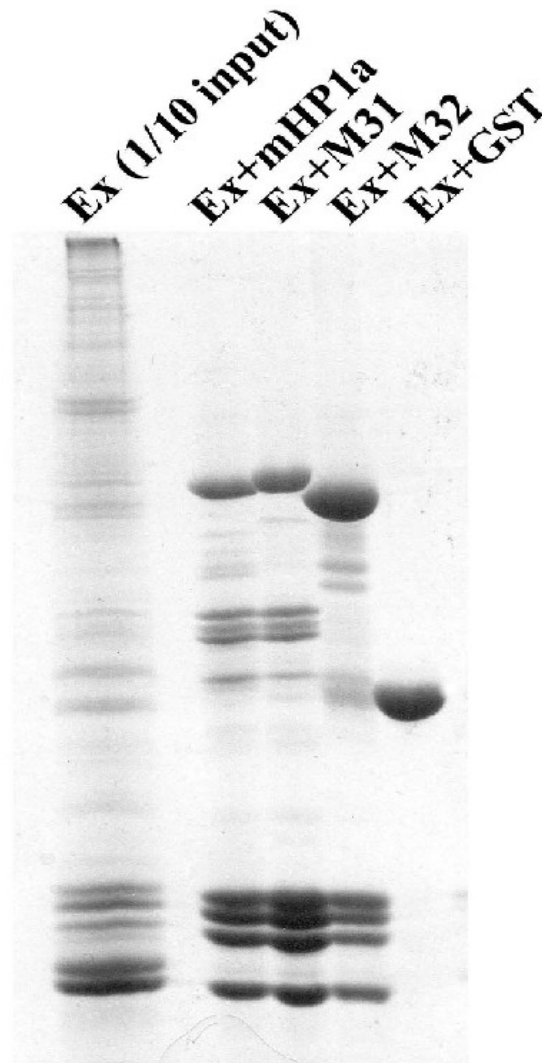
Η αμινοτελική περιοχή του LBR αναστέλλει την πρόσδεση της M31, στον πυρηνικό φακέλο, αν και οι δύο πρωτεΐνες δεν συνδέονται άμεσα

(a) Ηλεκτροφορητικό προφίλ των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα σύνδεσης. Το NE αντιστοιχεί σε παρασκευάσματα πυρηνικών φακέλων. Το άσπρο βέλος δείχνει τη θέση του LBR. Η αιχμή του βέλους υποδηλώνει τη θέση της αμινοτελικής περιοχής του LBR (Nt-LBR-GST), ενώ το d.p. δείχνει τα χαρακτηριστικά πρωτεολυτικά προϊόντα της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης που παράγονται μετά από την έκφρασή της σε βακτήρια. Στο (b) φαίνεται η σχετική σύνδεση της ³⁵S-M31-GST σε πυρηνικούς φακέλους παρουσία Nt-LBR-GST, M31-GST και M31-His όπως διαπιστώνεται από πειράματα σύνδεσης. Στο (c) δίνονται πειράματα ανάλογα με το (b) χρησιμοποιώντας μη σημασμένη M31-GST και western blot με αντίσωμα που ανιχνεύει την M31. Το “ + Nt-LBR-GST ”: δείγμα στο οποίο έχει προστεθεί Nt-LBR-GST σε συγκέντρωση 200μg/ml. Στο “n.a.”: δεν έχει προστεθεί Nt-LBR-GST και αντιστοιχεί στο control Στο (d) παρουσιάζονται pull-down πειράματα με Nt-LBR-GST και M31-GST (M31), M31NL-His (M31NL) ή bovine serum albumin (BSA). Στην πηκτή ακρυλαμίδης φαίνονται τα υλικά που κατακρημνίζονται με τα σφαιρίδια γλουταθειώνης μετά από χρώση του με Coomassie blue.

της M31 το οποίο δεν περιέχει το τμήμα της πρωτεΐνης που συνδέεται με τους πυρηνικούς φακέλους, δεν μεταβάλλει τα επίπεδα πρόσδεσης της ακέραιης πρωτεΐνης. Τα παραπάνω αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 3b όπου δίνεται η σχετική σύνδεση της ^{35}S -M31-GST στον πυρηνικό φάκελο παρουσία Nt-LBR-GST, M31NL-His ή M31C-CST. Στην εικόνα 3c παρουσιάζεται παρόμοιο πείραμα στο οποίο χρησιμοποιήθηκε μη σημασμένη M31-GST και το προϊόν της αντίδρασης αναλύθηκε με western blot και αντίσωμα που αναγνωρίζει την M31.

Για να εξετάσουμε αν η σύνδεση της M31 στον πυρηνικό φάκελο πραγματοποιείται μέσω του LBR εφαρμόστηκαν δοκιμασίες GST pull-down. Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες Nt-LBR-GST, M31-His και M31NL-His. Όπως φαίνεται και από την εικόνα 3d, σε καμία περίπτωση δεν μπορούσαμε να ανιχνεύσουμε την ύπαρξη της M31 στα ιζήματα του Nt-LBR-GST. Το αρνητικό αποτέλεσμα δεν οφείλεται στην περιορισμένη ευαισθησία της μεθόδου, διότι επανάληψη του πειράματος και χρήση western blot/ECL με αντίσωμα που αναγνωρίζει την M31 επαλήθευσε το προηγούμενο αποτέλεσμα.

Για να εξετάσουμε εάν κάποια τρίτη πρωτεΐνη (ή πρωτεΐνες) διαμεσολαβούν στην σύνδεση LBR-M31, πήραμε πυρήνες από ερυθροκύτταρα γαλοπούλας και τους εκχυλίσαμε με υψηλό αλάτι και Triton X-100. Μετά από την υπερφυγοκέντρωση, το εκχύλισμα, που περιείχε κυρίως ιστόνες επωάστηκε με M31-GST, M32-GST, mHP1α-GST ή GST και χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα GST pull-down. Τα προϊόντα αυτών των αντιδράσεων αναλύθηκαν με



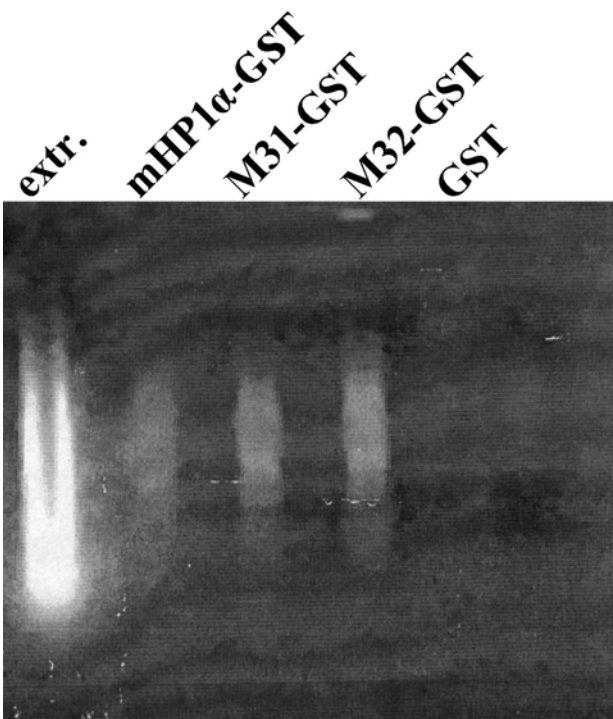
Εικόνα 4

Οι τρεις ισομορφές της HP1 συν-κατακρημνίζονται με τις ιστόνες από εκχυλίσματα πυρήνων

Εκχύλισμα πυρήνων με υψηλό αλάτι και Triton επωάζεται με τις mHP1a-GST, M31-GST, M32-GST ή την GST (για control) και χρησιμοποιείται σε GST-pull-down. Όπως φαίνεται και οι τρεις ισομορφές της HP1 κατακρημνίζουν τις ιστόνες. Με EX συμβολίζεται το εκχύλισμα που χρησιμοποιήθηκε για το πείραμα. Στην εικόνα φαίνεται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου.

ηλεκτροφόρηση και όπως φαίνεται στην εικόνα 4. Τόσο η M31 όσο και οι άλλες δύο ισομορφές της, συν-κατακρημνίζονται με τις ιστόνες H2A, H2B, H3 και H4. Η σύνδεση αυτή μπορεί να οφείλεται είτε σε σύνδεση της M31 με κάθε μια από τις ιστόνες χωριστά είτε σε σύνδεση με μία από αυτές και συγκατακρήμνιση των υπολοίπων λόγω ύπαρξης νουκλεοσωμάτων. Θέλοντας να ξεχωρίσουμε ποια από τις δύο υποθέσεις ισχύει επαναλάβουμε το παραπάνω GST pull-down και μετά το τέλος του πειράματος απομονώσαμε DNA τόσο από το κατακρημνιζόμενο στα σφαιρίδια αгарόζης υλικό, όσο και από ισοδύναμη, με αυτή που χρησιμοποιήθηκε στο GST pull-down, ποσότητα εκχυλίσματος. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε 1% πηκτή αгарόζης έδειξε την ύπαρξη DNA σε όλα τα δείγματα όπως φαίνεται από την εικόνα 5. Άρα, οι ιστόνες στην συγκεκριμένη περίπτωση κατακρημνίζονται με την μορφή νουκλεοσωμάτων

Για να διερευνήσουμε περαιτέρω ποιες ιστόνες διαμεσολαβούν στην σύνδεση της M31 με τον LBR πήραμε πυρηνικούς φακέλους από ερυθροκύτταρα γαλοπούλας και τους εκχύλισαμε με υψηλό αλάτι και triton X-100. Τα διαλυτά συστατικά επώαστηκαν με M31-GST, M32-GST, mHP1α, ή GST και αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι η M31 (και οι άλλες δύο ισομορφές της) κατακρημνίζεται ειδικά με τις ιστόνες H3 και H4, όπως φαίνεται στην εικόνα 6a. Ανάλυση του ίδιου πειράματος με western blot/ECL και αντίσωμα που αναγνωρίζει τον LBR έδειξε ότι, παρουσία των ιστονών H3 και H4, ο LBR καθιζάνει μαζί με την M31-GST. Το πείραμα αυτό φαίνεται στην εικόνα 6b. Η ανίχνευση του LBR με χρώση Coomassie blue, ήταν αδύνατη λόγω της σχετικά μικρής ποσότητας που υπήρχε



Εικόνα 5

Η HP1 συν-κατακρημνίζει DNA από εκχύλισμα πυρήνων με υψηλό αλάτι και Triton

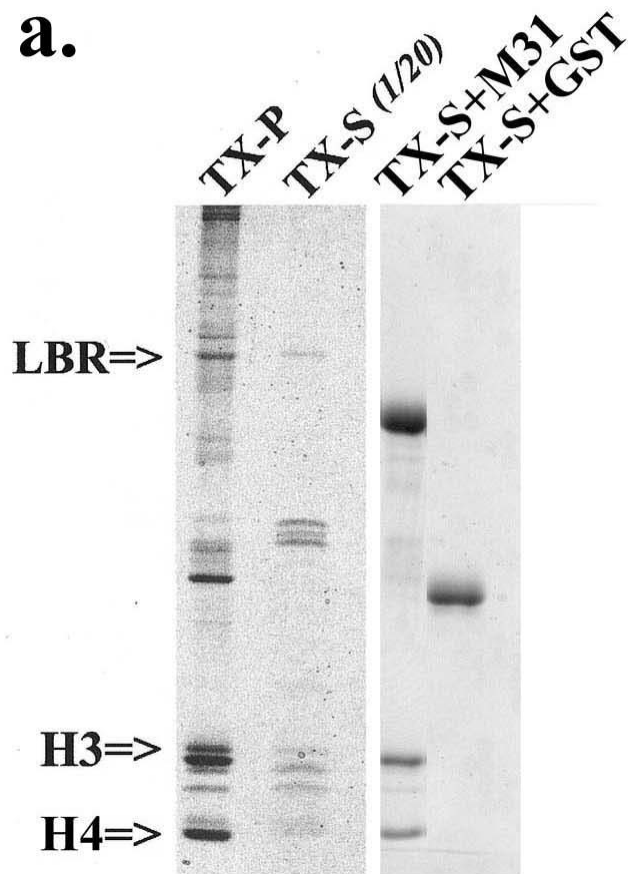
Στην εικόνα φαίνεται DNA που απομονώθηκε μετά από GST-pull-down με τις mHP1α-GST, M31-GST, M32-GST ή GST και εκχύλισμα πυρήνων με υψηλό αλάτι και Triton. Με extr αναφέρεται το εκχύλισμα που χρησιμοποιήθηκε στις παραπάνω αντιδράσεις.

στο ίζημα με την M31-GST. Όπως παρατηρείται τόσο ο LBR όσο και οι ιστόνες H3 και H4 δεν συνδέονται με το GST control. Στα παραπάνω πειράματα η συμπεριφορά και των άλλων ισομορφών της HP1 είναι ταυτόσημη και για αυτό δεν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα αυτά.

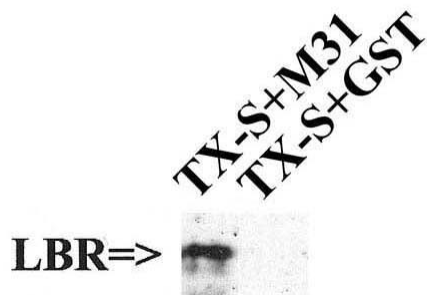
Για να εξετάσουμε την πιθανότητα να οφείλεται ο σχηματισμός του συμπλόκου στην σύνδεση με DNA, εκχύλισμα από πυρηνικούς φακέλους γαλοπούλας επώαστηκε για 30min σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση παρουσία 100μg DNase I. Στο εκχύλισμα αυτό προσθέσαμε είτε M31-GST είτε GST. Μετά την επώαση το διάλυμα χρησιμοποιήθηκε σε GST pull-down. Το πείραμα αναλύθηκε με western blot/ECL και αντίσωμα που αναγνωρίζει τον LBR. Το σύμπλοκο LBR-H3-H4-M31 σχηματίζεται κανονικά υποδηλώνοντας ότι το DNA δεν συμμετέχει σε αυτή τη διαδικασία.

Για να αποδείξουμε πιο αυστηρά αυτή τη θέση, επαναλάβαμε τα πειράματα σύνδεσης χρησιμοποιώντας, απομονωμένες πρωτεΐνες. Οι ιστόνες που χρησιμοποιήσαμε ήταν από τη Roche. Κάθε μία από τις παρακάτω ιστόνες H2A, H2B, H3, H4 δοκιμάστηκαν είτε ξεχωριστά είτε σε συνδυασμό ως προς την ικανότητα σύνδεσής τους με την M31-GST και με τον Nt-LBR-GST. Όλα τα GST-pull-down πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε υψηλό αλάτι και Triton X-100. Στην εικόνα 7a φαίνεται ότι το αμινοτελικό άκρο του LBR συνδέεται κατά προτίμηση με τις ιστόνες H3 και H4 ενώ το GST control δεν συνδέεται με καμία ιστόνη. Επίσης, η M31-GST συνδέεται μόνο με τις H3 και H4 είτε αυτές βρίσκονται σε συνδυασμό είτε ξεχωριστά (εικ.7b). Η πρόσδεση του Nt-LBR-GST και της M31-GST στις ιστόνες H3/H4 είναι περίπου στοιχειομετρική

a.



b.



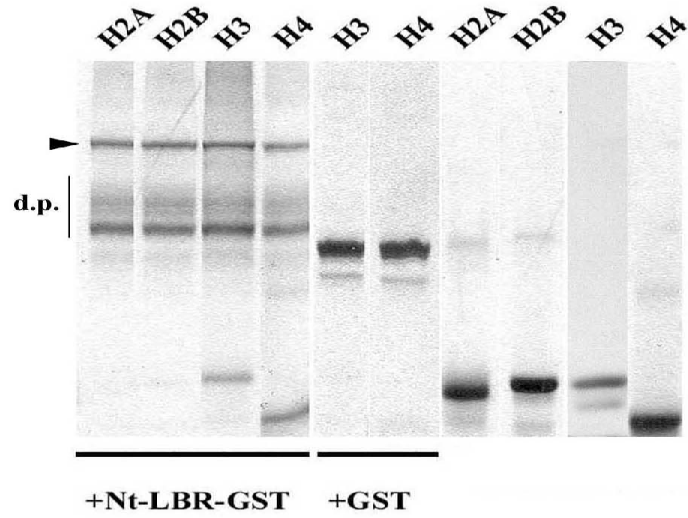
Εικόνα 6

Η M31-GST συν-κατακρημνίζεται από εκχυλίσματα πυρηνικών φακέλων με τον LBR και τις ιστόνες H3/H4

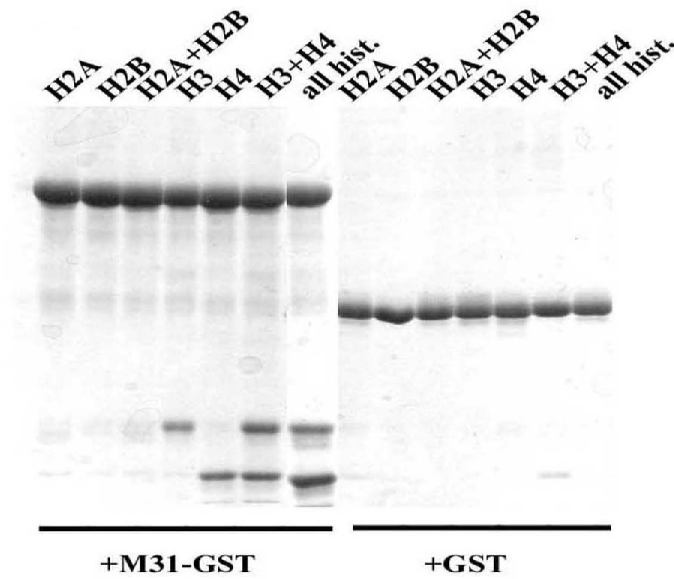
Πυρηνικοί φάκελοι εκχυλίστηκαν με 1M NaCl και 1% Triton, όπως αναφέρεται στα υλικά και μέθοδοι. Το αλάτι ρυθμίζεται στα 500mM, στο διαλυτό κλάσμα και χρησιμοποιούνται σε πειράματα pull-down με M31-GST ή GST. Στην εικόνα δίνεται το ηλεκτροφορητικό προφίλ των ακόλουθων δειγμάτων: (TX-P) τα υπολείμματα των πυρηνικών

φακέλων μετά από την εκχύλιση με υψηλό αλάτι και απορρυπαντικό, (TX-S) εκχύλισμα με αλάτι και Triton που αντιστοιχεί στο 1/20 του TX-P, (TX-S+M31) το κατακρημνιζόμενο με την M31 υλικό, (TX-S+GST) το κατακρημνιζόμενο με την GST υλικό. Στο a δίνεται χρώση της πηκτής με Coomassie blue, ενώ στο b φαίνεται μέρος του blot με αντίσωμα που αναγνωρίζει τον LBR.

a.



b.



Εικόνα 7

Πρόσδεση των ιστονών H3/H4 στην M31 και τον LBR.

Στο (a) φαίνεται πείραμα pull-down στο οποίο χρησιμοποιήθηκε απομονωμένες ιστόνες και Nt-LBR-GST ενώ στο (b) το ίδιο πείραμα με M31-GST. Και στις δύο περιπτώσεις φαίνεται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου.

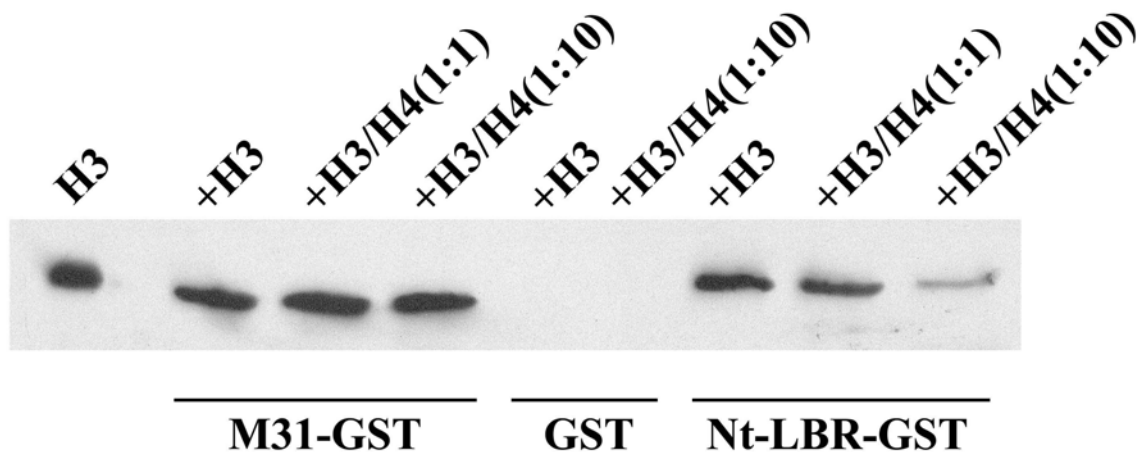
και μπορεί να συμβεί ακόμα και παρουσία 0.5-0.6M άλατος. Και στις δύο περιπτώσεις τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου.

- *Προσδιορισμός του σημείου σύνδεσης των ιστονών H3/H4 στην M31 και στον LBR*

Για να προσδιορίσουμε το σημείο σύνδεσης των ιστονών H3 και H4 κατά μήκος του μορίου της M31 και του LBR, προχωρήσαμε πειράματα ανταγωνισμού (competition assays). Σε αυτά τα πειράματα διατηρήσαμε σταθερή την ποσότητα της ιστόνης H3 που επώαστηκε με την M31-GST, τον Nt-LBR-GST ή την GST παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων H4. Η περίσσεια της H4 στην αντίδραση δεν εκτόπισε την ιστόνη H3 από την M31. Στην εικόνα 8 αποτυπώνεται το αποτέλεσμα του πειράματος με western blot/ECL και αντίσωμα που αναγνωρίζει την H3. Αντίθετα αυξανόμενες ποσότητες H4 απομακρύνουν την H3 από τον LBR όπως φαίνεται στην εικόνα 8. Σύμφωνα με τα παραπάνω οι δύο ιστόνες συνδέονται σε διαφορετικά σημεία του μορίου της M31 αλλά στο ίδιο σημείο στο μόριο του LBR.

Για να απαντήσουμε στο ερώτημα πιο είναι το σημείο πρόσδεσης των ιστονών στο μόριο της M31 χρησιμοποιήσαμε τμήματα της πρωτεΐνης αυτής, που περιείχαν είτε το chromo domain (M31N-His) είτε την hinge (M31L-His) περιοχή της. Ως control χρησιμοποιήσαμε την GST. Οι πρωτεΐνες αυτές ενώθηκαν

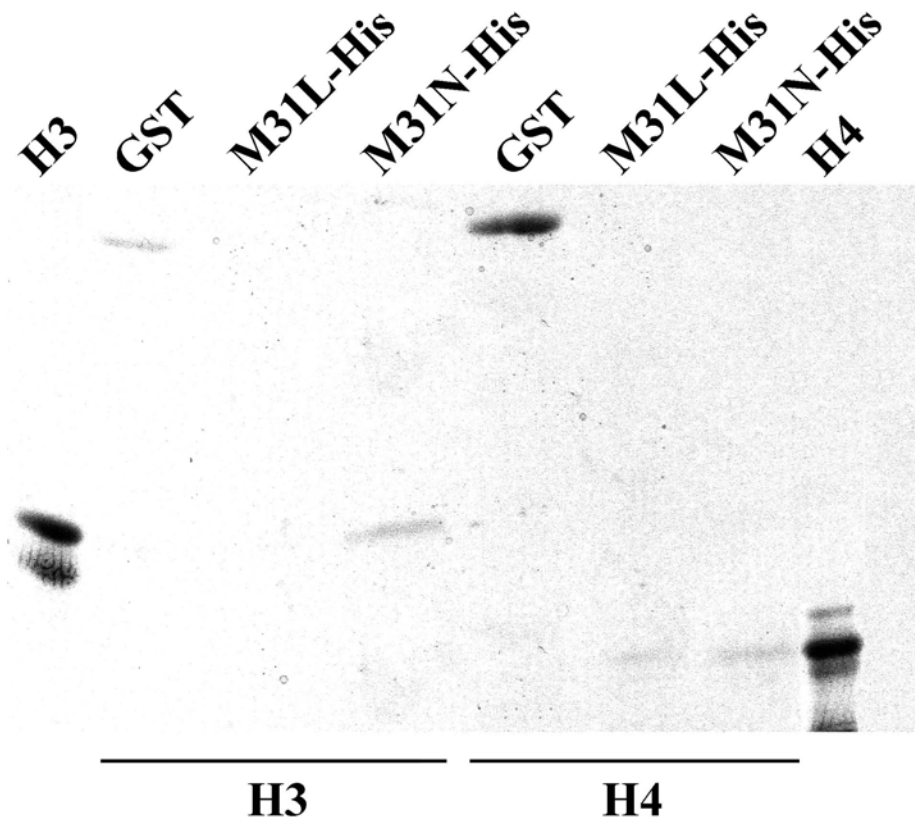
ομοιοπολικά με σφαιρίδια σεφαρόζης. Τα σφαιρίδια στην συνέχεια δοκιμάστηκαν ως προς την ικανότητα πρόσδεσης τους με τις ιστόνες H3 και H4 σε διάλυμα υψηλού άλατος και Triton X-100. Μπορέσαμε να εντοπίσουμε το κομμάτι της M31 στο οποίο συνδέεται η H3, στο chromo domain. Η παρατήρηση αυτή συμβαδίζει με πρόσφατα δημοσιευμένες παρατηρήσεις των Lachner *et al.*, 2001, Bannister *et al.*, 2001. Ο προσδιορισμός του σημείου σύνδεσης της H4 στην M31 παρουσίασε ασαφή αποτελέσματα. Αφού τόσο το αμινοτελικό άκρο της M31 (περιέχει τα αμινοξέα 1-69) όσο και η ενδιάμεση περιοχή (περιέχει τα αμινοξέα 70-114) εμφανίζουν παρόμοια συγγένεια ως προς την H4. Η εικόνα 9 παρουσιάζει το ηλεκτροφορητικό προφίλ των παραπάνω πειραμάτων. Πιο λεπτομερής ανάλυση απαιτείται, για τον χαρακτηρισμό του σημείου σύνδεσης της H4. Συστηματική προσέγγιση του προβλήματος θα δείξει κατά πόσο διαφορετικά μετά-μεταφραστικά τροποποιημένες μορφές της H4 συνδέονται με διαφορετικά τμήματα της M31.



Εικόνα 8

Οι core ιστόνες συνδέονται στην ίδια περιοχή του LBR, αλλά σε διαφορετικές περιοχές του μορίου της M31

Πείραμα ανταγωνισμού χρησιμοποιώντας M31-GST, GST ή Nt-LBR-GST, στο οποίο διατηρείται σταθερή η συγκέντρωση της ιστόνης H3 ενώ αυξάνεται το ποσό της H4. Η συν-κατακρήμιση με τις GST πρωτεΐνες ανιχνεύθηκε με ECL/western blot, χρησιμοποιώντας αντίσωμα που αναγνωρίζει στην ιστόνη H3.



Εικόνα 9

Η πρόσδεση των ιστονών H3 και H4 στην M31

Αρχικά, M31L-His, M31N-His ή GST συζεύχθηκαν ομοιοπολικά σε σφαιρίδια. Στην συνέχεια τα σφαιρίδια αυτά επώαστηκαν αναλόγως είτε με την ιστόνη H3 είτε με την H4. Με M31L συμβολίζεται το τμήμα της M31 ανάμεσα στο chromo domain και στο chromo shadow domain, ενώ με M31N συμβολίζεται το αμινοτελικό άκρο της M31 (70 αμινοξέα, chromo domain). Όπως φαίνεται στην εικόνα η ιστόνη H3 συνδέεται ειδικά στην M31N. Αντίθετα η ιστόνη H4 συνδέεται περίπου στο ίδιο ποσοστό τόσο με την M31N όσο και με την M31L.

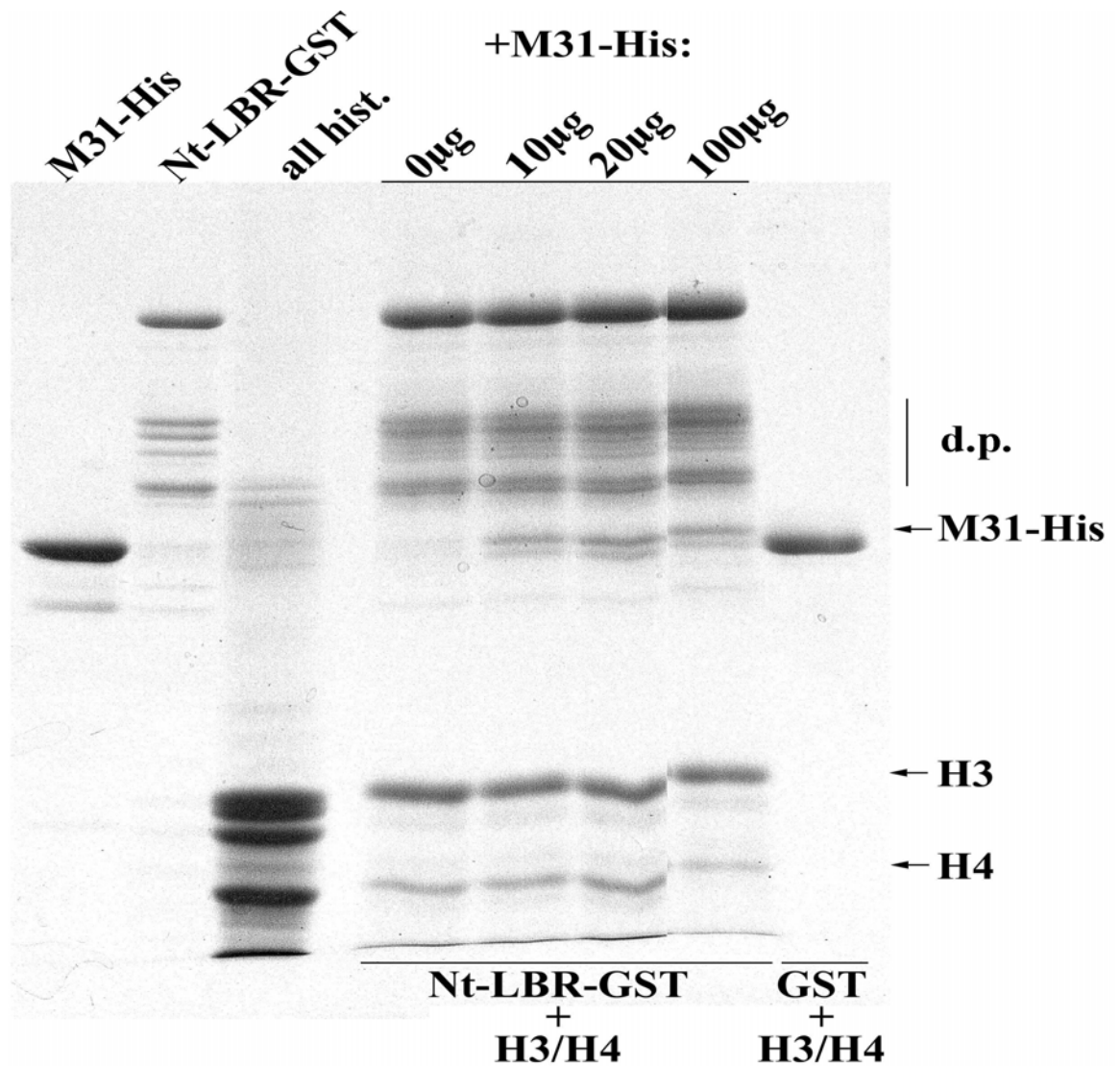
- *Επανασυγκρότηση του συμπλόκου M31-ιστόνες-LBR με ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες*

Για να διαπιστώσουμε αν οι core ιστόνες διαμεσολαβούν τον σχηματισμό του συμπλόκου M31-LBR ή συνδέονται με τις δύο πρωτεΐνες με αμοιβαία αποκλειόμενο τρόπο, χρησιμοποιήσαμε σε GST-pull-down πειράματα, απομονωμένες από βακτήρια πρωτεΐνες (M31-His, Nt-LBR-GST) και καθαρές H3, H4. Αρχικά μίγμα καθαρών ιστονών H3/H4 επώαστηκαν με Nt-LBR-GST. Στην συνέχεια προστέθηκαν αυξανόμενες ποσότητες M31-His. Όπως φαίνεται στην εικόνα 10, η M31-His συν-κατακρημνίζεται με τον Nt-LBR ενώ δεν απομακρύνει της ιστόνες H3/H4 από το σύμπλοκο. Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα της εικόνας 1d, τα οποία δείχνουν ότι η M31-His δεν συνδέεται με τον Nt-LBR απουσία ιστονών. Συνοψίζοντας τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι ο LBR, η M31 και οι ιστόνες H3/H4 σχηματίζουν ένα σταθερό σύμπλοκο.

- *Ρύθμιση της αλληλεπίδρασης των core ιστονών με την HP1 και τον LBR από ακετυλίωση*

Σε προηγούμενες μελέτες είχαμε δείξει, χρησιμοποιώντας *in vivo* τεχνικές, ότι η σύνδεση της HP1 με τον πυρηνικό φάκελο καταστρέφεται κάτω από συνθήκες υπέρ-ακετυλίωσης (προσθήκη TSA ή βουτυρικού νατρίου σε κύτταρα,

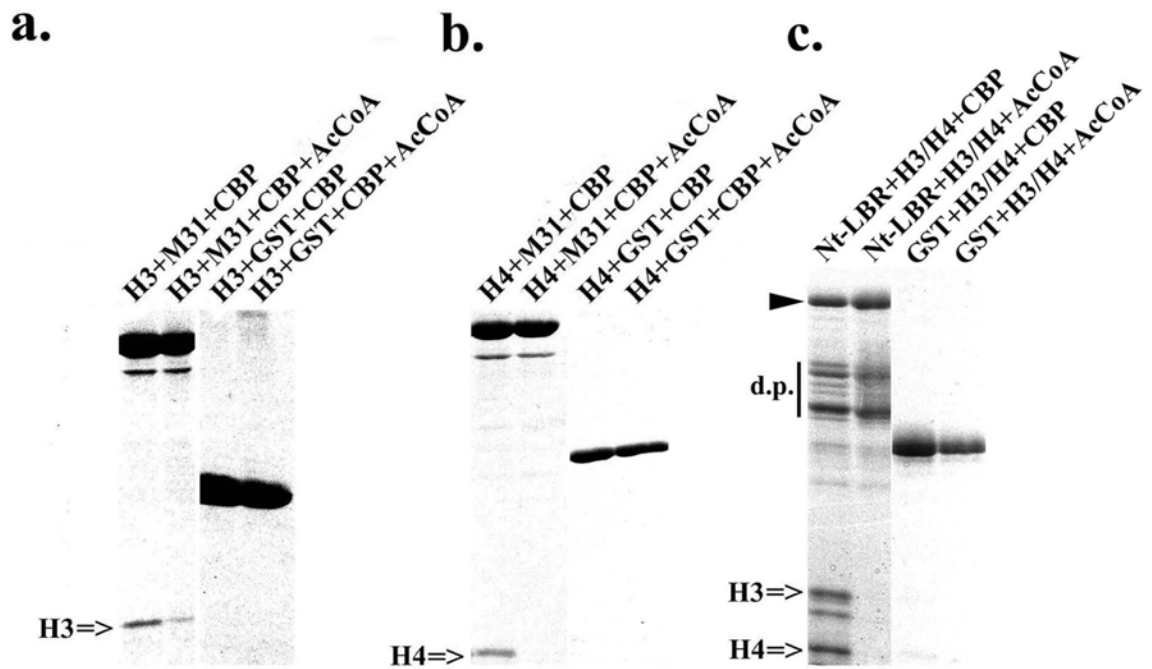
Kourmouli *et al.*, 2000). Έχοντας υπόψη τα αποτελέσματα αυτά, θελήσαμε να μελετήσουμε τον ρόλο της ακετυλίωσης των ιστονών, στον σχηματισμό του συμπλόκου M31- H3-H4 -LBR. Η τροποποίηση των core ιστονών έγινε κάτω από ελεγχόμενες, *in vitro* συνθήκες, χρησιμοποιώντας ανασυνδιασμένη CBP (CREB binding protein). Οι ακετυλιωμένες ή μη ιστόνες επωάζονται με M31-GST ή Nt-LBR-GST και η σύνδεση τους εξετάζεται με pull-down κάτω από τις συνηθισμένες συνθήκες. Το ηλεκτροφορητικό πρότυπο δίνεται στην εικόνα 11. Όπως φαίνεται, οι ακετυλιωμένες ιστόνες H3/H4 δεν συνδέονται ούτε με την M31 ούτε και με τον LBR. Η αναστολή δεν παρατηρείται όταν απουσιάζει το ακέτυλο συνένζυμο A από την αντίδραση, υποδηλώνοντας ένα πολύ ειδικό φαινόμενο.



Εικόνα 10

Η M31 σχηματίζει ένα τετραμερές σύμπλοκο με τις H3/H4 και τον LBR

Ο Nt-LBR-GST ακινητοποιείται σε σφαιρίδια γλουταθειώνης. Στην συνέχεια αντιδρά διαδοχικά με ένα σταθερό ποσό ιστονών H3/H4 και με αυξανόμενες ποσότητες M31-His. Ο σχηματισμός του τετραμερούς συμπλόκου πραγματοποιήθηκε με pull-down πειράματα και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδιου.



Εικόνα 11

Η αλληλεπίδραση των ιστονών με την M31 ή τον LBR αναστέλλεται από την ακετυλίωση μέσω CBP

Πειράματα pull-down με M31-GST και την ιστόνη H3 (a), με την M31-GST και την ιστόνη H4 (b) και Nt-LBR-GST με μίγμα ιστονών στο (c). Οι ιστόνες ακετυλώθηκαν *in vitro* από ανασυνδυασμένη CBP. Η GST χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα σαν control. AcCoA αντιστοιχεί στο ακέτυλο-συνένζυμο A.

- *Ρύθμιση της τροποποίησης των core ιστονών από μια ακετυλάση του πυρηνικού φακέλου*

Θέτοντας τις παραπάνω παρατηρήσεις σε φυσιολογικό πλαίσιο, αναρωτηθήκαμε αν υπάρχει, στον πυρηνικό φάκελο, μια ακετυλάση τύπου CBP που να τροποποιεί *in situ* τις core ιστόνες. Πειράματα western blot με αντίσωμα που αναγνωρίζει τη CBP έδειξαν ότι δεν υπάρχει τέτοιο ένζυμο, σε ισοτονικά πλυμένους πυρηνικούς φακέλους, όπως φαίνεται και στην εικόνα 12. Ίδιου τύπου μεμβράνες, από ερυθροκύτταρα γαλοπούλας, χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα σύνδεσης της M31 με τους πυρηνικούς φακέλους. Οι μεμβράνες αρχικά επώαστηκαν είτε με ακέτυλο-συνένζυμο A ή με το διάλυμα της ακετυλίωσης, σε θερμοκρασία δωματίου. Στο μίγμα προστέθηκε ραδιενεργά σημασμένη M31-GST (^{35}S M31-GST) και μετρήθηκε το ποσοστό της πρωτεΐνης που συν-κατακρημνίζεται με τις μεμβράνες. Όπως φαίνεται στο ραβδόγραμμα της εικόνας 13a, παρουσία ακέτυλο συνενζύμου A, το ποσό της M31 που συνδέεται στους φακέλους ελαττώνεται σημαντικά.

Στην συνέχεια, ίδιου τύπου μεμβράνες από γαλοπούλα ή αρουραίο, οι οποίες περιέχουν ένα κλάσμα των core ιστονών, επώαστηκαν με ραδιενεργό ακέτυλο-συνένζυμο A ($^3\text{HAcCoA}$) και αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση / αυτοραδιογραφία. Στην εικόνα 13b, φαίνεται ότι υπάρχει μια ακετυλάση στον πυρηνικό φάκελο τόσο των ερυθροκυττάρων γαλοπούλας όσο και των ηπατοκυττάρων αρουραίου. Η ακετυλάση αυτή ακετυλιώνει, στην περίπτωση των

πυρηνικών φακέλων γαλοπούλας, τις ιστόνες H3, H2A, H4, ενώ στην περίπτωση των πυρηνικών φακέλων αρουραίου, και την H1. Η διαφορά στην ένταση της ακετυλίωσης στα δύο είδη πυρηνικών φακέλων οφείλεται σε διαφορετικό ποσοστό ιστονών και ενζύμου που περιέχεται στην ίδια ποσότητα μεμβρανών.

a.



b.

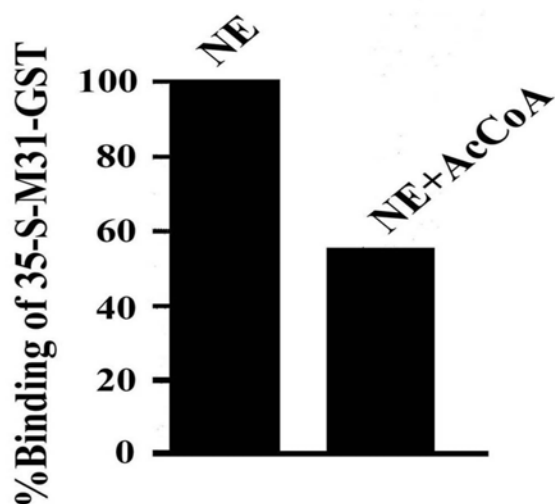


Εικόνα 12

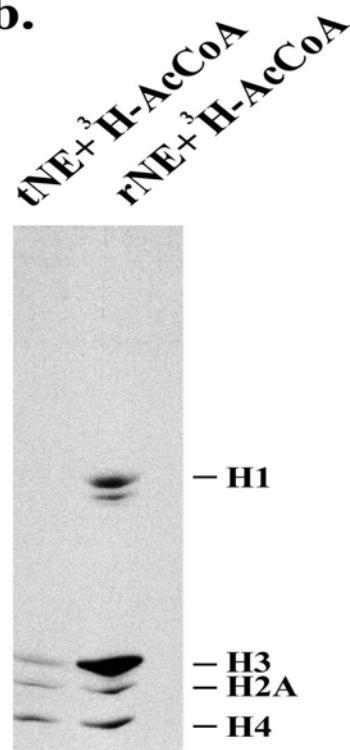
Ανίχνευση πρωτεϊνών τύπου CBP στο πυρηνικό φάκελο

Ισοτονικά πλυμένοι πυρηνικοί φάκελοι χρησιμοποιήθηκαν σε western blot πειράματα για την ανίχνευση ακετυλάσης τύπου CBP. Στο a, χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα που αναγνωρίζει το αμινοτελικό άκρο της CBP (Santa Cruz), ενώ στο b, χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα που αναγνωρίζει το καρβοξυτελικό άκρο της CBP από την ίδια εταιρία. Και στις δύο περιπτώσεις δεν αναγνωρίζεται, από τα αντισώματα, η CBP στους πυρηνικούς φακέλους.

a.



b.



Εικόνα 13

Μια συνδεόμενη με τον πυρηνικό φάκελο ακετυλάση τροποποιεί τις core ιστόνες και αναστέλλει την σύνδεση της M31

(a) Σχετική πρόσδεση της 35S-M31-GST στους πυρηνικούς φακέλους παρουσία και απουσία ακετυλο-συνενζύμου A. Η ικανότητα πρόσδεσης της M31 στον πυρηνικό φάκελο ελαττώνεται περίπου στο μισό παρουσία ακετυλο-συνενζύμου A. Με τον τρόπο αυτό δίνεται η δυνατότητα στην ακετυλάση να δράσει. Στο (b) ιστονικά πλυμένοι πυρηνικοί φάκελοι από ηπατοκύτταρα αρουραίου (rNE) ή από ερυθροκύτταρα γαλοπούλας (tNE) επωάζονται παρουσία ραδιενεργά σημασμένου ακετυλο-συνενζύμου A ($^3\text{H-AcCoA}$) και αναλύονται με ηλεκτροφόρηση και αυτοραδιογραφία.

Συζήτηση

Χρησιμοποιώντας *in vitro* προσεγγίσεις, βρήκαμε ότι η πρωτεΐνη της έσω πυρηνικής μεμβράνης LBR συνδέεται με την ετεροχρωματινική πρωτεΐνη 1 μέσω των ιστονών H3/H4. Τα δεδομένα αυτά διαφέρουν από τα δημοσιευμένα αποτελέσματα των Ye και Worman, οι οποίοι υποστηρίζουν την απευθείας σύνδεση της HP1 με τον LBR βασιζόμενοι σε πειράματα two-hybrid και pull-down με *in vitro* μεταγραμμένες / μεταφρασμένες πρωτεΐνες (Ye and Worman., 1996; Ye et al.,1997). Τα αποτελέσματα του two-hybrid μπορούν να ερμηνευθούν με έμμεσες αλληλεπιδράσεις που ενέχουν τις ενδογενείς ιστόνες του σακχαρομύκητα. Τα αντικρουόμενα όμως αποτελέσματα που προέρχονται από βιοχημικά πειράματα δεν μπορούν να ερμηνευθούν εύκολα. Η μόνη δυνατή ερμηνεία είναι η ύπαρξη ηλεκτροστατικής, χαμηλής συγγένειας σύνδεση, ανάμεσα στο βασικό (pI=10) αμινοτελικό άκρο του LBR και κάποιας όξινης περιοχής στο μόριο της HP1. Τέτοιες ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες μπορεί επίσης να ευθύνονται για την σύνδεση του αμινοτελικού άκρου του LBR με γυμνό DNA (Ye and Worman., 1996; Duband-Goulet and Courvalin,2000), είναι απίθανο να συμβαίνουν κάτω από περιοριστικές συνθήκες (όπως είναι η παρουσία 0.5M άλατος) και ως εκ τούτου μπορεί να μην έχουν φυσιολογική σημασία.

Το γεγονός ότι η αλληλεπίδραση των ιστονών με την HP1 επηρεάζεται έντονα από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις έρχεται σε συμφωνία με τις πρόσφατες παρατηρήσεις των Lancher et al. (2001) και Bannister et al. (2001), οι

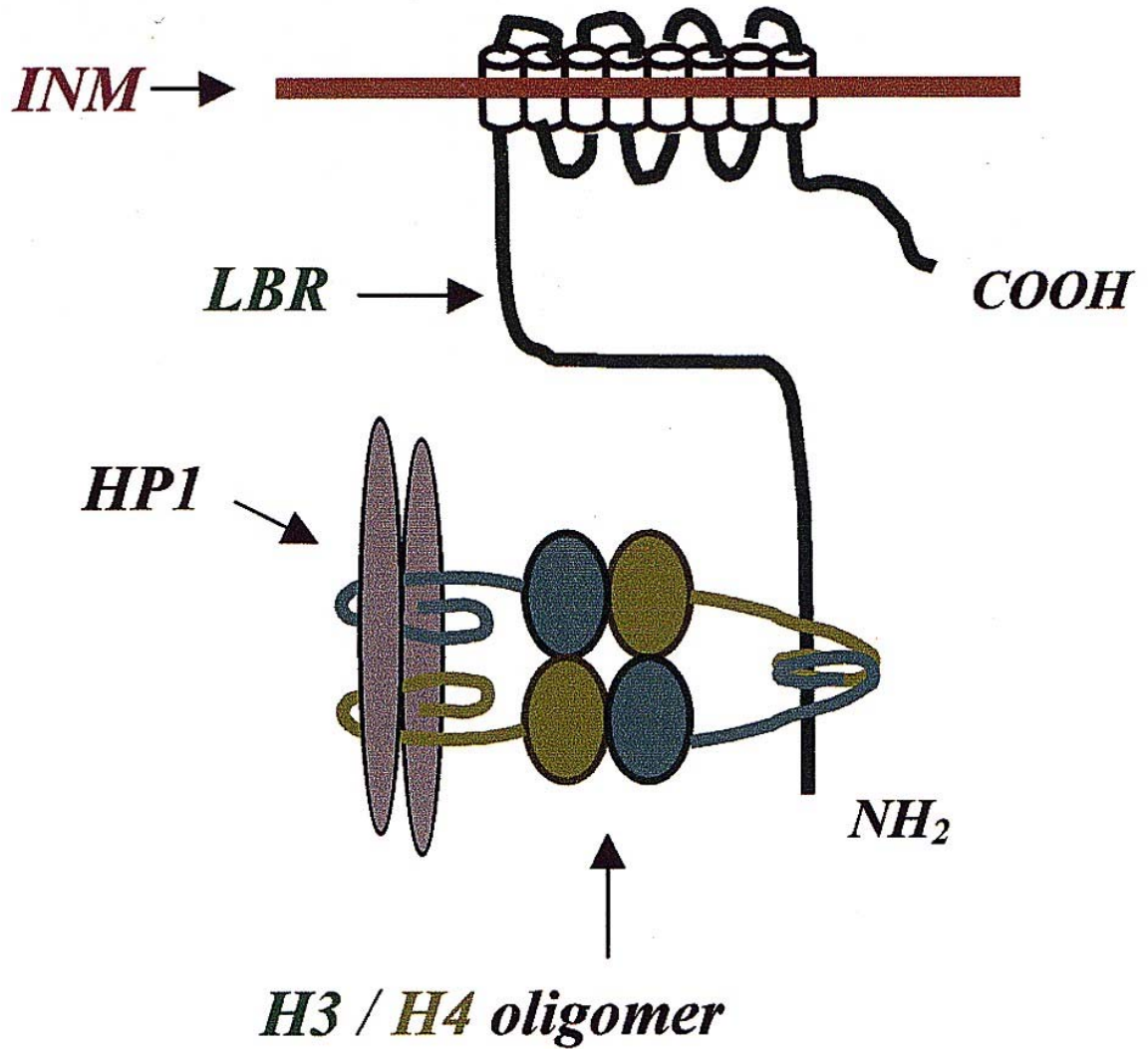
οποίοι έδειξαν ότι η HP1 συνδέεται ειδικά με την μεθυλιωμένη ιστόνη H3. Σύμφωνα με τις παραπάνω εργασίες, σε αυτήν την περίπτωση σημαντική είναι η μεθυλίωση στην λυσίνη 9. Εφόσον η συγκεκριμένη μεθυλίωση δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί όταν η λυσίνη 9 είναι ακετυλιωμένη (Rea et al., 2000), ίσως τα δυο διαφορετικά είδη τροποποιήσεων να σηματοδοτούν ένα on/off μηχανισμό που επιτρέπει την ελεγχόμενη πρόσδεση της HP1 στο core particle. Είναι επίσης πιθανό, οι τροποποιήσεις στις ουρές των ιστονών να επηρεάζουν τις αλληλεπιδράσεις της HP1 με το “histone fold” τμήμα των μορίων H3 και H4, όπως προτείνεται σε μια πρόσφατη δημοσίευση των Nielsen et al. (2001).

Συμφωνώντας εν μέρει με τα αποτελέσματα των Zhao et al. (2000) βρήκαμε ότι η ιστόνη H4 (ανεξάρτητα από την H3) συνδέεται τόσο με τον LBR όσο και με την HP1 κάτω από in vitro συνθήκες. Η σύνδεση της HP1 με την H4 δεν παρατηρήθηκε από τους Lancher et al. (2001), οι οποίοι χρησιμοποίησαν στα πειράματα τους, ένα συνθετικό πεπτίδιο που αντιστοιχεί στο αμινοτελικό άκρο της ιστόνης H4. Η αλληλεπίδραση αυτή δεν εντοπίστηκε ούτε από τους Bannister et al. (2001), οι οποίοι χρησιμοποίησαν H4, αγορασμένη από την ίδια με εμάς εταιρία. Μια παράμετρος που ίσως είναι σημαντική για αυτές τις ανακολουθίες είναι η τροποποιήσεις των core ιστονών. Ένα μη τροποποιημένο συνθετικό πεπτίδιο που αντιπροσωπεύει την ουρά της H4 παρουσιάζει φυσικές διαφορές από το μερικά τροποποιημένο (π.χ. φωσφορυλιωμένο) μόριο της H4 που απαντάται στο κυτταρικό περιβάλλον. Επιπλέον, οι εμπορικές παρασκευές της H4 ίσως να διαφέρουν ως προς την κατάσταση ακετυλίωσής τους, ανάλογα με την πηγή και την μέθοδο απομόνωσης. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι από τα 6

εμπορικά παρασκευάσματα της H4 που χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες της εργασίας αυτής, 1 περιείχε μια αδρανή μορφή της πρωτεΐνης η οποία συνεχώς δεν συνδεόταν με την HP1 κάτω από της καθορισμένες συνθήκες του πειράματος.

Εφόσον ο LBR και οι H3/H4 συν-καθιζάνουν με την HP1-GST από εκχυλίσματα πυρηνικών φακέλων είναι πιθανόν οι πρωτεΐνες αυτές να σχηματίζουν ένα ειδικό σύμπλοκο. Το σύμπλοκο αυτό ίσως αντιπροσωπεύει κομβικά σημεία στα οποία έχει αγκυροβολήσει η ετεροχρωματίνη που είναι εμπλουτισμένη πάνω στον πυρηνικό φάκελο.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω είναι πιθανόν οι H3/H4 να συμπεριφέρονται σαν πολλαπλοί υποκαταστάτες (σχηματίζοντας ίσως τετραμερή), διαμεσολαβώντας έτσι την σύνδεση των LBR-HP1, η οποία δεν πραγματοποιείται απευθείας. Ένα υποθετικό μοντέλο δίνεται στην εικόνα 17. Εξαρτώμενο από την σταθερότητα του ολιγομερούς, το σύμπλοκο LBR-ιστόνες-HP1 μπορεί να απαντά ανάμεσα σε δύο διαφορετικές καταστάσεις: την πλήρως συγκροτημένη (το ακέραιο ολιγομερές ενώνει σταθερά το LBR με την HP1) και την μερικώς αποδιοργανωμένη κατάσταση (διάσπαση του ολιγομερούς των ιστονών και αποσύνδεση του LBR από την HP1).



Εικόνα 17

Ένα πιθανό μοντέλο για το σύμπλοκο LBR-ιστόνες-M31

Η σύνδεση των LBR και M31 απαιτεί την ύπαρξη H3/H4 ολιγομερών (τετραμερών). Βασιζόμενοι στα βιοχημικά αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην εργασία αυτή, προτείνουμε ότι οι H3/H4 συνδέονται στην ίδια περιοχή του LBR, αλλά αλληλεπιδρούν με διαφορετικές περιοχές του μορίου στις HP1 (στο μοντέλο εμφανίζεται ως διμερές), μέσω των ουραίων περιοχών τους.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Aasland, R. and Stewart, A.F. (1995) The chromo shadow domain, a second chromo domain in heterochromatin-binding protein 1, HP1. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 3168-3174.
2. Aagaard, L. et al. (1999) Functional mammalian homologues of the *Drosophila* PEV-modifier Su(var)3-9 encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31. *EMBO J.*, **18**, 1923-1938.
3. Andrulis, E. D., Neiman, A.M., Zappulla, D. C. and Sternglanz, R. (1998) Perinuclear localization of chromatin facilitates transcriptional silencing. *Nature*, **394**, 592-595.
4. Ball, L.J., Murzina, N.V., Broadhurst, R.W., Raine, A.R.C., Archer, S.J., Stott, F.J., Murzin, A.G., Singh, P.B., Dmaille, P.J. and Laue, E.D. (1997) Structure of the chromatin binding (chromo) domain from mouse modifier protein 1. *EMBO J.*, **16**, 2473-2481.
5. Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C. and Kouzarides, T. (2001) Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by HP1 chromo domain. *Nature*, **410**, 120-124.
6. Brasher, S.V., Smith, B.O., Fogh, R.H., Nietlispach, D., Thiru, A., Nielsen, P.R., Broadhurst, R.W., Ball, L.J., Murzina, N.V. and Laue E.D. (2000) The structure of mouse HP1 suggests a unique mode of single peptide recognition by the shadow chromo domain dimer. *EMBO J.*, **19**, 1587-1597.
7. Cavalli, G. and Paro, R. (1998) Chromo-domain proteins: linking chromatin structure to epigenetic regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **10**, 354-360.
8. Cleard, F., Delattre, M. and Spiere, P. (1997) Su(VAR)3-7, a *Drosophila* heterochromatin-associated protein and companion of HP1 in the genomic silencing of position effect variegation. *EMBO J.*, **16**, 5280-5288.
9. Duband-Goulet, I. and Courvalin, J.-C. (2000) Inner nuclear membrane protein LBR preferentially interacts with DNA secondary structures and nucleosomal linker *Biochemistry*, **39**, 6483-6488.

10. Eissenberg, J.C., James, T.C., Foster-Hartnett, D.M., Hartnett, T., Ngan, V. and Elgin, S.C.R. (1990) Mutation in the heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **87**, 9923-9927.
11. Fanti, L., Giovinazzo, G., Berloco, M. and Pempinelli, S. (1998) The heterochromatin protein 1 prevents telomeres fusion in *Drosophila*. *Mol. Cell*, **2**, 527-538.
12. Foisner, R. and Gerace, L. (1993) Integral membrane proteins of the nuclear envelope interact with lamins and chromosomes and binding is modulated by mitotic phosphorylation. *Cell*, **73**, 1267-1279.
13. Gant, T.M. and Wilson, K.L. (1997) Nuclear assembly. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **13**, 669-695.
14. Georgatos, S.D. and Blobel, G. (1987) Two distinct attachment sites for vimentin along the plasma membrane and the nuclear envelope in avian erythrocytes: a basis for a vectorial assembly of intermediate filaments. *J. Cell Biol.*, **105**, 105-115.
15. Georgatos, S.D. and Theodoropoulos, P.A. (1999) Rules to remodel by: what drives nuclear envelope disassembly and reassembly during mitosis? *Cri. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, **9**, 373-381.
16. James, T.C. and Elgin, S.C. (1986) Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its genes. *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 3862-3872.
17. Jones, D.O., Cowell, I.G. and Singh, P.B. (2000) Mammalian chromodomain proteins: their role in genome organisation and expression. *BioEssays*, **22**, 124-137.
18. Kellum, R. and Alberts, B.M. (1995) Heterochromatin protein 1 is required for correct chromosome segregation in *Drosophila* embryos. *J. Cell Sci.*, **108**, 1419-1431.
19. Kourmouli, N., Theodoropoulos, P. A., Dialynas, G., Bakou, A., Politou, A. S., Cowell, I. G., Singh, P. B. and Georgatos, S. D. (2000) Dynamic associations of heterochromatin protein 1 with the nuclear envelope. *EMBO J.*, **19**, 6558-6568.

20. Kourmouli, N., G. Dialynas, C. Petraki, A. Pырpasopoulou, P. B. Singh, S. D. Georgatos, and P. A. Theodoropoulos (2001) Binding of Heterochromatin Protein 1 to the nuclear envelope is regulated by a soluble form of tubulin. *J. Biol. Chem.*, **276**, 13007-13014.
21. 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.
22. Le Douarin, B. Nielsen, A.L. Garnier, J.M., Ichinose, H. Jeanmougin, F., Losson, R. and Chambon, P. (1996) A possible involvement of TIF1 α and TIF1 β in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors. *EMBO J.*, **15**, 6701-6715.
23. Lin, F., Blake, D.L., Callebaut, I., Skerjanc, I.S., Holmer, L., McBurney, M.W., Paulin-Levasseur, m. and Worman, H.J. (2000) MAN1, an inner nuclear membrane protein that shares the LEM domain with Lamina-associated Polypeptide 2 and Emerin. *J. Biol. Chem.*, **275**, 4840-4847.
24. Maison, C., Pырpasopoulou, A., Theodoropoulos, P.A. and Georgatos, S.D. (1997) The inner nuclear membrane protein LAP1 forms a native complex with B-type lamins and partitions with spindle-associated mitotic vesicles. *EMBO J.*, **16**, 4839-4850.
25. Martin, L., Crimando, C. and Gerace, L. (1995) cDNA cloning and characterization of lamina associated polypeptide 1C (LAP1C), an integral protein of the inner nuclear membrane. *J. Biol. Chem.*, **270**, 8822-8828.
26. Meier, J. and Georgatos, S.D. (1994) Type B lamins remain associated with the integral membrane protein p58 during mitosis: implications for nuclear reassembly. *EMBO J.*, **13**, 1888-1898.
27. Nielsen, A.L., Ortiz, J.A., You, J., Oulad-Abdelghani, M., Khechumian, R., Gansmuller, A., Chambon, P. and Losson, R. (1999) Interaction with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family and histone deacetylation are differentially involved in transcriptional silencing by members of the TIF1 family. *EMBO J.*, **18**, 6385-6395.
28. Nielsen, A.L., Oulad-Abdelghani, M., Ortiz, J.A., Remboutsika, E., Chambon, P. and Losson, R. (2001) heterochromatin formation in mammalian cells:

- interactions between histones and HP1 proteins. *Mol. Cell*, **4**, 729-739.
29. Nikolakaki, E., Simos, G., Georgatos, S. D. and Giannakouros, T. (1996) A nuclear envelope-associated kinase phosphorylates arginine-serine motifs and modulates interactions between the lamin B receptor and other nuclear proteins. *J. Biol. Chem*, **271**, 8365-8372.
 30. Pak, D.T., Pflumm, M., Chesnokov, I., Huang, D.w., Kellum, R., Marr, J., Romanowski, P. and Botcham, M.R. (1997) Association of the origin recognition complex with heterochromatin and HP1 in higher eukaryotes. *Cell*, **91**, 311-323.
 31. Paro, R. and Hogness, D.S. (1991) The polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of Drosophila. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 263-267.
 32. Platero, J.S., Hartnett, T. and Eisenberg, J.C. (1995) Functional analysis of the chromo domain of HP1, *EMBO J.*, **14**, 3977-3986.
 33. 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.
 34. Rolls, M.M., Stein, P.A., Taylor, S.S., Ha, E., McKeon, F. Rapoport, T.A. (1999) A visual screen of a GFP-fusion library identifies a new type of nuclear envelope membrane protein. *J. Cell Biol.*, **146**, 29-43.
 35. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1993) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring harbor, NY.
 36. Saunders et al., (1993) Molecular cloning of a human homologue of Drosophila heterochromatin protein HP1 using anti-centromere autoantibodies with anti-chromo specificity. *J. Cell Sci.*, **14**, 573-582.
 37. Simos, G. and Georgatos, S.D. (1992) The inner nuclear membrane protein p58 associates in vivo with ap58 kinase and the nuclear lamins. *EMBO J.*, **11**, 427-436.

38. Simos,G. and Georgatos,S.D. (1994) The lamin B receptor associated protein p34 shares sequence homology and antigenic determinants with the splicing factor 2-associated protein p32. *FEBS Lett.*, **346**, 225-228.
39. Sidrauski,C. and Walter,P. (1997) the transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell*, **90**, 1031-1039.
40. Singh, P.B., Miller, J.R., Pearce, J., Kothary, R., Burton, R.D., Paro, R., James, T.C. and Gaunt, S.J. (1991) A sequence motif found in a *Drosophila* heterochromatin protein is conserved in animals and plants. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 789-794.
41. Worman, H. J., Yuan, G., Blobel, G. and Georgatos, S. D. (1988) A lamin B receptor at the nuclear envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 8531-8534.
42. Worman, H. J., Evans,C. and Blobel, G (1990) The lamin B receptor of the nuclear envelope inner membrane: a polytopic protein with eight potential transmembrane domains. *J.Cell Biol.*, **111**, 1535-1542.
43. Ye, Q. and Worman, H.J. (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.
44. Ye, Q., Callebaut, I., Pezhman, A., Courvalin, J.C. and Worman, H.J. (1997) Domain-specific interactions of human HP1-type chromodomain proteins and inner nuclear membrane protein LBR. *J. Biol. Chem.*, **272**, 14983-14989.
45. Zhao, T., Heyduk, T., Allis, C. D., and Eissenberg, J. C. (2000) Heterochromatin protein 1 (HP1) binds to nucleosomes and DNA *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, **275**, 28332-28338.