

A KÍNAI HÖRCSÖG HETEROKROMATIN PROTEIN 1 (HP1) GÉNJEINEK KLÓNOZÁSA ÉS JELLEMZÉSE

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Szakál Barnabás

Témavezető: Hadlaczky Gyula

Szeged, 2004

Irodalomjegyzék	3
Köszönetnyilvánítás	4
Rövidítések jegyzéke	5
Irodalmi áttekintés	6
A kromatin szerveződése	6
A heterokromatin	10
A HP1 általános jellemzése	15
A HP1 szerkezete	16
A HP1 funkciója	19
A HP1 transzkripció regulátor	19
A HP1 szerepe a DNS replikációban és a hibajavításban	21
A HP1 résztvesz a sejtmag és kromoszómák felépítésében	21
A HP1 kromatin szerkezetet módosító hatása	22
A HP1 funkciója az RNS interferenciában és transzkripcionális gén-csendesítésben	28
A HP1 funkcióinak szabályozása	31
A HP1 izoformáinak lokalizációja	32
Célkitűzés	33
Anyagok és módszerek	34
Rekombináns DNS technikák, plazmidok	34
Southern blot hibridizáció	34
Az izoforma specifikus DNS próbák PCR amplifikációja	35
A cDNS-ek klónozása	36
A HP1 α gén klónozása	36
A DNS bázissorozatának meghatározása, szekvencia analízis	37
DsRed és GFP fúziós konstrukciók	37
Sejtvonalak tenyésztése, sejtek transzfekciója	38
C- sáv festés	39
Natív kromoszómapreparátumok	39
A kromoszómák immunfestése	40
Fluoreszcens <i>in situ</i> hibridizáció	41
Az anti-HP1 monoklonális ellenanyag előállítása	42
Western blotting	42
Eredmények	44
A kínai hörcsög HP1 izoformáinak klónozása	44
A kínai hörcsög HP1 izoformáinak lokalizációja	50
Kínai hörcsög anti-HP1 α monoklonális ellenanyag	56
A kínai hörcsög HP1 α gén genomikus szekvenciájának azonosítása	57
A kínai hörcsög HP1 α gén kromoszómális térképezése FISH-el	61
Eredmények tárgyalása	63
A kínai hörcsög HP1 izoformái	63
A kínai hörcsög HP1 α génje	64
A kínai hörcsög HP1 izoformák lokalizációja	65
Összefoglalás	70

Summary	73
Függelék	76
Irodalomjegyzék	81

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Hadlaczky Gyulának támogatásáért, elméleti és gyakorlati tanácsaiért, emberi gondviseléséért és a bizalomért, hogy a csoportjához csatlakozhattam. A szegedi Kromoszóma Csoport tagjainak támogató közreműködése nélkül nem jöhetett volna létre az értekezés alapjául szolgáló kísérleti munka, ezért köszönetemet szeretném kifejezni csoportunk valamennyi tagjának: Dr. Cserpán Imrének, Dr. Csonka Erikának, Deák Jánosnének, Ékes Csabának, Dr. Fodor Katalinnak, Mózesné Holló Gyöngyinek, Dr. Katona Róbertnek, Kereső Juditnak, Novák Istvánnének, Dr. Praznovszky Tündének, Rózsavölgyi Mártának, Székely Szűcs Kingának, Udvardy Katalinnak. Dr. Udvardy Andornak szeretném megköszönni, hogy elméleti és gyakorlati tanácsain túl, hasznos segítséget nyújtott a dolgozat végső formájának kialakításában. Köszönettel tartozom Dr. Monostori Évának is, hogy számos, az ellenanyagok előállításában gyűjtött tapasztalatát megosztotta velem, és hogy csoportjával sikeresen együttműködhattünk.

Rövidítések jegyzéke

bp:	bázispár
cDNS:	hírvivő RNS-ről <i>in vitro</i> átírt DNS
chHP1 α , β , γ :	Kínai hörcsög heterokromatin protein 1 alfa, béta, gamma
CHD:	chromo domain
CHO:	Kínai hörcsög sejtvonat (Chinese Hamster ovary cell line)
CSD:	chromo shadow domain
DsRed:	vörös fluoreszkáló fehérje (Discosoma red)
EJ30:	emberi hólyagrákból származó sejtvonat
FITC:	Fluoreszcein-izotiocianát
GFP:	zölden fluoreszkáló fehérje
LMTK ⁻ :	timidin kináz mínusz egér fibroblaszt sejtvonat
methH3K9:	a H3 hiszton kilencedik lizinjének metilált állapota
NCBI:	National Centre for Biotechnology Information
ORF:	nyitott leolvasási keret (open reading frame)
PCR:	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
SATAC:	Szatellita DNS alapú mesterséges kromoszóma (satellite DNA based artificial chromosome)
UTR:	nem átírt régió (untranslated region)

Irodalmi áttekintés

Az örökítőanyag sejtjeinkben egy körülbelül 2 m hosszúságú DNS fonal formájában van jelen. Ahhoz, hogy ez a hosszú fonal elférhessen egy néhány mikrométeres átmérőjű sejtmag belsejében, körülbelül a tízezred részére kell rövidülnie, szorosan össze kell csomagolódnia. A kromatin szerveződése és a kromoszómák kialakulása a sejtek osztódásakor úgy kell hogy végbemenjen, hogy közben az örökítőanyagban tárolt genetikai információ megfelelő módon kifejeződhessen, továbbá az osztódások során a DNS képes legyen a pontos megkettőződésre. A DNS fonal kromatinná történő szerveződése különböző fehérjemolekulák segítségével történik, e folyamatok kezdeti lépéseiről részletes ismereteink vannak, míg a szerveződés későbbi lépései egyenlőre pontosan nem ismertek.

A kromatin szerveződése

A kromatin szerveződésének első lépése a nukleoszóma kialakulása. A nukleoszómaiban a DNS szál hiszton fehérjékből felépülő oktamerek köré csavarodik. Az oktamereket két-két H2A, H2B, H3 és H4-es hisztonfehérje építi fel (Kornberg and Lorch, 1999). A hisztonfehérjék kis méretű, bázikus proteinek, amelyek egy középső konzervált szerkezetű hiszton-fold doménből, továbbá egy másodlagos szerkezet nélküli N- és C-terminális farki részből állnak (<http://genome.nhgri.nih.gov/histones/>). Bizonyos N-terminális elhelyezkedésű aminosavak foszforilálódhatnak, acetilálódhatnak, metilálódhatnak, ADP-ribózilációs vagy ubiquitin módosítások lehetnek rajtuk. Ezeknek a posztranszlációs módosításoknak lényeges és specifikus befolyásuk van a hisztonok és az őket hordozó kromatin tulajdonságaira: különböző kombinációik alakítják ki a hiszton kódot, amely szabályozza a kromatinba ágyazott DNS transzkripciók aktivitását (Jenuwein and Allis, 2001).

A nukleoszómák összeszerelődése a DNS-en a sejtosztódás szintetikus fázisában (S fázis) történik, a DNS szintézisét követően (Verreault, 2000; Mello and Almouzni, 2001). A már meglevő hisztonfehérjék az egyik vagy másik utódszálra egyenlően elosztva épülnek rá. A DNS minden hiszton-oktamer körül 1.75-szeres fordulatot tesz egy 146 bp hosszúságú szakaszon, kialakítva ezzel a nukleoszómák magi részét (core particle), melyeket átlagosan 50-60 bp hosszúságú DNS szakaszok (linker DNS) kötnek össze. A komplett struktúrát, a core-partikulumot és a linker DNS-t nevezzük együtt nukleoszómának. A nukleoszóma fonal kialakulása jelenti a kromatin elsődleges struktúráját, amelyben a DNS hossza 7-szeres mértékben rövidül meg (1. táblázat). Ez a 10 nm vastagságú fonal alacsony ionerősségű körülmények között elektronmikroszkóppal is látható. A nukleoszóma fonal szerkezetét a DNS-hez és a core-partikulumokhoz kötődve a linker hisztonok (H1-es hisztonok és variánsaik) stabilizálják, melyek részt vesznek a fonal további kondenzációjában is. A linker hisztonok variábilis szerkezetűek, alacsonyabb rendű eukariótákból hiányozhatnak (Shen et al., 1995) de gerincesekben jelenlétük elegendhetetlen (Ausio, 2000). A linker hisztonok a core hisztonokhoz hasonlóan dinamikus egyensúlyban vannak, egy részük folyamatosan cserélődik a kromatin különböző pontjai között (Misteli et al., 2000). A nukleoszómákhoz a hisztonokon kívül egyéb fehérjék is kötődnek, a legfontosabbak ezek közül a HMG (high mobility group) proteinek, melyek a linker DNS-hez kötődve hajlítják a DNS-t. Eltérően a H1 hisztontól a HMG metafázisos kromoszómákon nem maradnak kötve, az interfázisos magokban lazítják a kromatin szerkezetét, a transzkripció stimulálásában vesznek részt (Zlatanova and van Holde, 1998).

A 10 nm-es átmérőjű nukleoszóma fonal kialakulásáról részletes ismereteink vannak, ez a szerveződési azonban szint továbbépül a kromatinban, ezért az elektronmikroszkópos felvételeken leggyakrabban megfigyelt kromatinfonal vastagsága 30 nm. Ez a szerveződés a

kromatin másodlagos struktúrája, melynek leírására két egymással versengő modell született. Szélesebb körben elfogadott a szolenoid struktúra modell (Finch and Klug, 1976), mely szerint a nukleoszóma fonal egy szabályos hélix mentén csavarodik fel úgy, hogy egy csavarulatot 6 nukleoszóma képez, miközben középen a nukleoszómák egy üreget fognak közre. A linker hisztonok a középső üreg belseje fele helyezkednek el és segítenek stabilizálni a kialakult szerkezetet (szolenoid struktúra) (Widom, 1989; Bartolome et al., 1994). Az alternatív modell szerint a nukleoszóma fonal nem szabályos csavarulatokat alkot, hanem egy szabálytalan cikk-cakk mintázat alapján szerveződik tovább (Woodcock et al., 1993; Leuba et al., 1994). A szolenoid fonalak további szerveződése, azaz a kromatin harmadlagos struktúrája jóval kevésbé ismert, mint az azt megelőző szerveződési szintek. Magas sókoncentrációjú kezelés hatására (mely a hisztonokat eltávolítja a kromoszómákról) hálózatszerű vázat figyeltek meg a kromoszómák helyén, melyekről vastagabb fonalak hurkolódnak ki (Adolph et al., 1977; Paulson and Laemmli, 1977), ezért úgy gondolják, hogy a 30 nm-es szolenoid fonalak egy szilárd belső támasztékon kromatinhurkokat (loop) képeznek (Marsden and Laemmli, 1979; Pardoll et al., 1980; Vogelstein et al., 1980). A kromoszómáknak ezt a szilárd támasztékát kromoszóma váznak (scaffold, skeleton) nevezik. A scaffold jelen van az interfázisos magokban, a mitotikus és meiotikus kromoszómákon, specifikus fehérjéket tartalmaz (Lewis and Laemmli, 1982; Wang, 1996; Heck, 1997; Hirano, 1998), megfesthető ezüstfestéssel (Sumner, 2003) és immunológia módszerekkel (Maeshima and Laemmli, 2003). Sokan mégis kétségbe vonják a szilárd kromoszómaváz létezését, mivel nem lehet megfigyelni intakt kromoszómákon, alakja nagyon változékony, inkább egy laza hálózatnak látszik, mint valódi, elkülönült, létező struktúrának, ezért úgy vélik, hogy a scaffold, kromoszómális fehérjék nem specifikus aggregációja, amely a minta preparálása során keletkezik (Okada and Comings, 1980; Hadlaczký et al., 1981; Hadlaczký et al., 1982). Mindenesetre úgy tűnik, hogy a loopok

egy középső struktúrából hurkolódnak ki és a harmadlagos szerkezet kialakulása a kromatin fonalak nagy távolságban kialakuló kölcsönhatásaival van kapcsolatban. A kromatinszerveződés egyik végső fázisaként a kromatinhurkok további rendeződését, összetekeredését (chromosome coiling) figyelték meg növényi és ritkábban emlős és emberi kromoszómákon (Ohnuki, 1965; Sumner, 1991). A folyamatot leíró modell szerint a kromoszómák kondenzációja során valószínűleg nem szabályosan csavarodnak fel a kromatinhurkok, a spirálok szorosan rendeződnek egymás mellé, különböző méretűek, ezért a kromoszómafelcsavarodás (coil) nehezen megfigyelhető (Stack and Anderson, 2001). A kromatin kromoszómákká szerveződésének másik végső fázisa lehet a kromomérek kialakulása. A kromomérek olyan kromatinfonalak aggregátumai, amelyek nem rendelkeznek egyértelmű, meghatározott orientációval. A kromoszómafelcsavarodásokhoz hasonlóan ezek a struktúrák is nehezen megfigyelhetők, leginkább a meiotikus pachitén kromoszómákon fordulnak elő (Sumner, 1986). A kromomérek egybeesnek a pachitén kromoszómák G-sáv pozitív régióival, ami arra utal hogy nem véletlenszerű aggregátumok, hanem körülhatárolható kromatin/kromoszóma régiókban kialakuló, specifikus struktúrák. Sem a kromomérek kialakulásának mechanizmusa, sem a kialakító faktorai nem ismertek.

A kromatin szerveződésének végeredménye a sejtek osztódásakor láthatóvá váló kromoszómák kialakulása. A kromatinnak mind az elsődleges, mind a másodlagos struktúráját részletesen tanulmányozták és feltárták biokémiai, biofizikai és mikroszkópos módszerekkel is (Hansen, 2002), de mindezen erőfeszítések ellenére a kromatin magasabb rendű szerveződéséről, a kromatinszerkezet dinamizmusáról és a kromoszómák végső szerveződési fázisairól kevés ismeretünk van.

Szerkezet	Hosszúság a sejtben*	Átmérő	Pakolódás mértéke
DNS molekula	2 m ($2 \times 10^6 \mu\text{m}$)	2 nm	1
Nukleosóma fonal	0.28 m ($2.8 \times 10^5 \mu\text{m}$)	10 nm	7
Szolenoidok	0.04 m ($4 \times 10^4 \mu\text{m}$)	30 nm	50
Hurkok (loop)	1 mm ($10^3 \mu\text{m}$)	0.26 μm (260 nm)	2000
Kromoszómák	200 μm	2 μm (2000 nm)	10 000

* Emberben és a legtöbb emlősben

1. táblázat: A kromatin szerveződésének fázisai és a DNS pakolódásának mértéke.

A heterokromatin

A kromoszómák mentén a kromatin nem egyenletesen kondenzálódik, megkülönböztethetünk kevésbé összecsomagolódott eukromatikus és erősebben kondenzált heterokromatikus régiókat. A heterokromatint először Heitz írta le 1928-ban mint a kromatin azon részét, amely nem dekonzenzálik a telofázis végén, hanem ugyanolyan kompakt szerkezetű marad az egész interfázisban, mint amilyen a profázis elején megfigyelhető (Heitz, 1928). A heterokromatin sokkal csomagoltabb a sejtszótódás profázisában mint az eukromatin (a kromatin többi része) (Balicek et al., 1977), ezáltal nagyobb részét foglalja el a kromoszómák hosszának metafázisban mint profázisban. Brown két csoportra osztotta a heterokromatint: fakultatív és konstitutív heterokromatinra (Brown, 1966). A fakultatív heterokromatin a sejt életének bizonyos fejlődési fázisában kondenzált kromatin, kialakulása szövetspecifikus lehet. Képes a heterokromatikus állapotból visszaalakulni eukromatikus állapotba. Emlősökben a géndózis szabályozása érdekében az egyik X kromoszóma egy erősen festődő, génkifejeződés szempontjából többé kevésbé inaktív struktúrává, a Barr testté alakul át. A dóziskompenzációt kialakító génaktivitás csökkenést az inaktív kromoszómán a fakultatív heterokromatin biztosítja, mely a homológ

kromoszómapároknak csak az egyik tagján, vagy az apai vagy az anyai ivari kromoszómán véletlenszerűen alakul ki (Schoenherr CJ and Tilghman SM, 2000). A fakultatív heterokromatin DNS összetétele megegyezik eukromatikus homológ párjának DNS összetételével, tehát olyan kromoszómális régió amelyben a génkifejeződés epigenetikus hatásokra csökken le. Ma még nem tudjuk pontosan, hogy a konstitutív heterokromatinra jellemző összes szerkezeti vonás jellemző e rá. A fakultatív heterokromatin a szex-kromoszómák egyik tagjának teljes hosszában alakul ki, ezzel szemben a konstitutív heterokromatin mindkét homológ kromoszómán, bizonyos kromoszómális régiókban figyelhető meg. A konstitutív heterokromatin specifikusan C-sáv festéssel kimutatható, amely nem mutatja ki a fakultatív heterokromatint (Sumner, 1972; Sumner, 2003). Csaknem az összes kromoszóma tartalmaz konstitutív heterokromatint a centromerikus régiójában, gyakran található a kromoszómák végi (terminális) részein, vagy az akrocentrikus kromoszómák rövid karján.

A konstitutív heterokromatin DNS összetétele alapvetően különbözik az eukromatinétól. Bár alapvetően transzkripciósan inaktívnak tartják, heterokromatinból származó átírt RNS-t találtak növényekben (Nagl and Schmitt, 1985) és gerincesekben is (Varley et al., 1980; Sperling et al., 1987). A konstitutív heterokromatint döntően sokszorosan ismétlődő szatellita DNS építi fel, ami ritkán fordul elő a kromoszómák eukromatikus régióiban. A szatelliták ismétlődő egységeinek (repeat unit) bázisösszetétele vagy hosszúsága nem mutat közös vonásokat, lehetnek G+C-ben vagy A+T-ben is gazdagok, a hosszuk változhat 2 bp-tól több százig vagy akár több ezerig (Sumner, 2003). A szatellita DNS-ek a konstitutív heterokromatinban szabadon felszaporodhatnak bármiféle károsító hatás nélkül, de nagyarányú heterokromatikus feldúsulásuk oka lehet hajlított, másodlagos struktúrájuk is (Martinez-Balbas et al., 1990). Más magyarázat szerint a klasszikus szatellitek ismétlődő

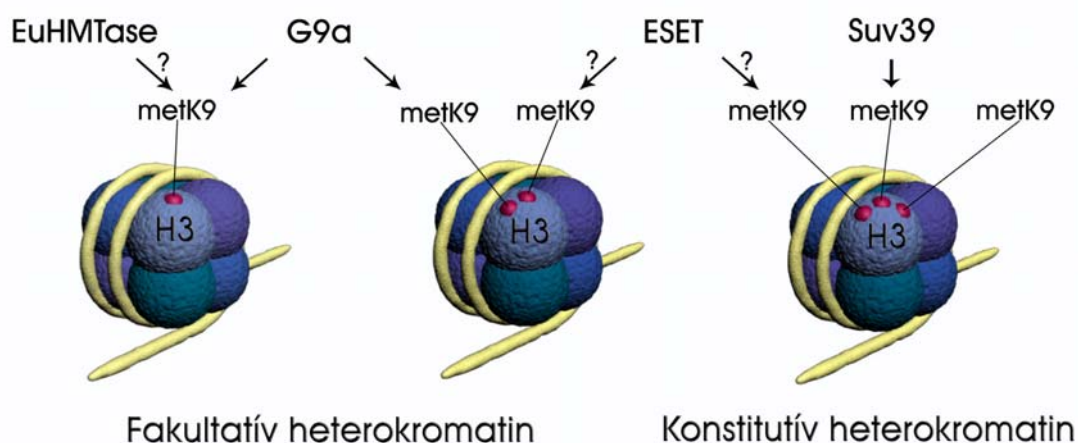
egységeinek hossza gyakran megegyezik a nukleoszómák ismétlődésének hosszával, ezáltal a nukleoszómák szorosan egymás után szerveződhetnek, erősen kondenzált kromatinstruktúrát alakíthatnak ki az ismétlődő szekvenciákon (Strauss and Varshavsky, 1984). Bizonyos esetekben a heterokromatin nem gyakran, hanem csak közepesen ismétlődő szekvenciákon épül fel, de kialakulhat transzpozon szekvenciákon is (Ananiev et al., 1998; Dimitri and Junakovic, 1999). *Drosophila melanogaster*-ben (ecetmuslica), növényekben és gerincesekben egyaránt kimutatták, hogy az ismétlődő transzgének okozhatnak heterokromatinizációt (Henikoff, 1998; Hsieh and Fire, 2000), ennek a mechanizmusa azonban még kevésbé ismert. Eddig nem találtak olyan jellegzetes DNS szekvenciát amely kizárólag a konstitutív heterokromatinra jellemző, a citozin metilációja azonban egy olyan sajátossága a DNS-nek, amely úgy tűnik lényeges a heterokromatin kialakulásában. Számos növény és emlősfaj szatellita DNS-e nagymértékben metilált (Beridze, 1986) (CSHL/WUGSC/PEB Arabidopsis sequencing Consortium 2000), a citozin demetilálása pedig a heterokromatin dekonduenzálódását okozza akár normális fejlődési folyamat eredményeként következik be (Martin et al., 1983), akár patológias állapot (Minou et al., 1994), vagy 5-azacitidin hatására (Schmid et al., 1983). A konstitutív heterokromatin jellemzően a késői S-fázisban replikálódik, alacsony számú meiotikus rekombináció jellemzi (Sumner, 2003) az eukromatinhoz mérten ellenállóbb a nem specifikus (Dnáz I) és a specifikus nukleázok számára (restrikciós endonukleázok) (Elgin, 1996). Mikrokokkusz nukleáz kezelés segítségével a heterokromatinba ágyazott transzgének (Sun et al., 2001) és a telomereken (Cryderman et al., 1999) kimutatható hogy a nukleoszómák hosszú, kiterjedt szakaszokon egyenletesen oszlanak el, azaz a heterokromatinban nukleoszóma szinten egy módosított kromatinszerkezet jön létre. A konstitutív heterokromatin a közelébe transzlokálódó gének mozaikos kifejeződését okozhatja (pozíció effektus variegáció, PEV), továbbá megfigyelték élesztőkben,

ecetmuslicában és emlősökben is, hogy megakadályozhatja a heterokromatinba ágyazódó transzgének kifejeződését (Wallrath, 1998).

Az eu- és heterokromatin néhány biokémiai sajátossága alapján is elkülöníthető egymástól. A transzkripcionálisan aktív eukromatikus kromoszómaszakaszok hisztonfehérjéi hiperacetiláltak, az inaktív heterokromatinban a hisztonok általában hipoacetiláltak (Grewal and Elgin, 2002). Az acetiláció gyakran együtt jelenik meg a H3-as hisztonokon foszforilációval, a két posztranszlációs modifikáció együtt valószínűleg kétkomponensű kódként a magas szintű génkifejeződést biztosítják az eukromatinban (Jeppesen et al., 1992; Turner et al., 1992; Braunstein et al., 1996). A heterokromatinban általában a H3-as hiszton kilencedik lizinje metilált állapotú (methH3K9) az eukromatinra a negyedik lizin metiláltsága (methH3K4) jellemző (Grewal and Elgin, 2002). Bizonyos nem hiszton típusú, kromatin asszociált fehérjék – pl. HP1 (heterokromatin protein 1) (James and Elgin, 1986), HP2 (heterokromatin protein 2) (Shaffer et al., 2002), ATRX (Picketts et al., 1996) - jellemzően a heterokromatinban halmozódnak fel. A heterokromatinra jellemző epigenetikus kód kialakítását végző enzimek (pl. SUV39H1) szintén heterokromatikus lokalizációjúak (Aagaard et al., 1999).

Ma még pontosan nem ismert, hogy a konstitutív- és fakultatív heterokromatin mely biokémiai jellemzői egyeznek meg és melyek különbözőek. A H3 K9 metilációja például mind a konstitutív heterokromatin mind pedig a fakultatív heterokromatin (inaktív X kromoszóma) kialakulásának egy korai eseménye (Heard et al., 2001; Peters et al., 2002; Boggs et al., 2002). Mindmáig nem tisztázott azonban, hogy a konstitutív heterokromatin kialakításában kulcsszerepet játszó HP1 feldúsul-e az inaktív X kromoszómákon (Grewal and Rice, 2004). Felvetődik a kérdés tehát, hogy a fakultatív heterokromatin kialakulásában esetleg más H3 K9 kötő fehérjék játszá-e a főszerepet? A H3 kilencedik lizinje lehet mono-,

di- és trimetilált, valószínűleg a különböző mértékű metilációkat más más enzimek végzik és ezáltal különböző kromatindoméneket határoznak meg (Grewal and Rice, 2004). A Suv39h1 és a Suv39h2 trimetilálnak, szerepük valószínűleg a pericentromerikus (konstitutív) heterokromatin kialakítása lehet (Rea et al., 2000; O'Carroll et al., 2000), míg a fakultatív heterokromatinban a H3 K9 metilációját valószínűleg más (G9a, ESET/SETDB1 és/vagy EuHMT) metiltranszferázok végzik (Tachibana et al., 2001; Yang et al., 2002; Ogawa et al., 2002).



1. ábra: A H3 hiszton 9-es lizinjének (H3 K9) metilációja a heterokromatinban. A Suv39h1 és a Suv39h2 hisztonmetil-transzferázok trimetilálnak, szerepük valószínűleg a konstitutív heterokromatin kialakításában van. A fakultatív heterokromatinban a H3 K9 metilációját feltehetően a G9a hisztonmetil-transzferáz végzi, amely főként dimetilál, részben pedig monometiláz aktivitása van. A maradék H3 K9 monometilációt a EuHMTase1 végzi a fakultatív heterokromatinban. Az ESET metiltranszferázok HMT aktivitását kimutatták *in vitro*, nem tisztázott azonban, hogy di- vagy trimetilázok e *in vivo*. A különböző HMT-ok tehát különböző metiltranszferáz aktivitással bírnak és különböző kromatindoméneket alakítanak ki (Grewal and Rice, 2004 nyomán).

A konstitutív heterokromatinban a HP1 alfa izoformája a H3-as hiszton trimetilált K9-éhez kapcsolódik, a mono- és dimetilált H3-at kötő kromoszómális fehérjéket valószínűleg még csak ezután fogják felfedezni (lehetséges jelöltek a HP1 β és γ izoformái, amelyek

eloszlása az eukromatinban hasonló a mono- és dimetilációhoz (Nielsen et al., 2001a; Grewal and Rice, 2004) (1. ábra).

A heterokromatin kialakulásának folyamata tehát a hisztonok biokémiai jellemzőinek megváltoztatásával (a kromatin epigenetikus modifikációjával) indul. A konstitutív heterokromatin kialakításában a speciális hiszton kód felismerésében és a kód által megindított kromatinszerveződésben a heterokromatin protein 1 (HP1) játssza a főszerepet.

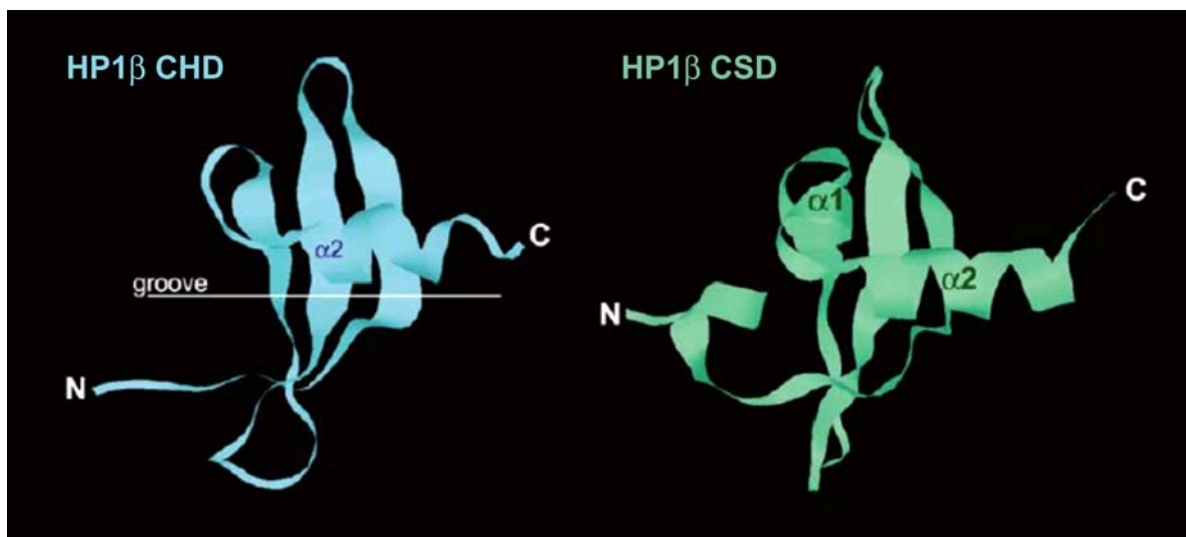
A HP1 általános jellemzése

A HP1 egy nem-hiszton típusú kromatinfehérje, amelyet először ecetmuslicában azonosítottak a kromoszómákhoz erősen kötődő fehérjék vizsgálata során (James and Elgin, 1986). Monoklonális ellenanyag segítségével kimutatták, hogy a fehérje főként a pericentromerikus (konstitutív) heterokromatinban található, izolálták a proteint kódoló cDNS-t fehérje expressziós könyvtárból (James and Elgin, 1986). Molekuláris genetikai vizsgálatok (Eissenberg et al., 1990; Eissenberg et al., 1992; Eissenberg and Hartnett, 1993) feltárták, hogy a HP1 fehérjét kódoló gén azonos egy már korábban azonosított pozíció effektus variegációt (PEV) szuppresszálo lókusszal a *Su(var)2-5*-el (Locke et al., 1988; Wustmann et al., 1989; Paro and Hogness, 1991). A *Su(var)2-5* haplo-insufficiens szuppresszora és triplo-abnormális fokozója a PEV-nak, tehát géntermékének alacsony dózisa csökkenti, magas dózisa pedig növeli a PEV-t, amely genetikailag megerősíti, hogy a HP1 egy a heterokromatin felépítésében fontos szerepet játszó szerkezeti fehérjéje. A *Su(var)2-5* null mutánsok recesszív letálisok, amely azt mutatja, hogy a HP1 életfontosságú szerepet tölt be az ecetmuslicában. HP1 homológokat később számos, az evolúció széles skáláján megtalálható élőlényekből azonosítottak, a hasadóélesztőtől kezdve az emberig (2. táblázat a Függelékben). Általános tulajdonságuk, hogy viszonylag kis méretű (15-35 kDa), konzervált

fehérjék (Eissenberg and Elgin, 2000). A HP1-nek három izotípusa van, amelyeknek aminosavszekvenciája hasonló (Eissenberg and Elgin, 2000). (Az izotípusokat a szakirodalomban helytelenül izoformáknak nevezik, a dolgozatomban az „izotípus” szó helyett én is az „izoforma” kifejezést használok a nemzetközi szakirodalomnak megfelelően.) Az emlősökben a HP1 izoformáit (α , β és γ) különböző gének kódolják (Jones et al., 2000). HP1 homológokat munkánk kezdetéig két emlősfajban írtak le: az mHP1 α , M31, és M32 izoformákat egérben azonosították (Singh et al., 1991; Le Douarin et al., 1996) melyek 98-100%-os azonosságot mutattak az emberi HP1^{Hs α} , HP1^{Hs β} és HP1^{Hs γ} ortológokkal (Singh et al., 1991; Saunders et al., 1993; Ye and Worman, 1996; Ye et al., 1997). Az emlős izoformák nemcsak egymáshoz hasonlóak, hanem az ecetmuslica HP1 izoformákhoz (HP1 a, b, c) is (Saunders et al., 1993; Le Douarin et al., 1996).

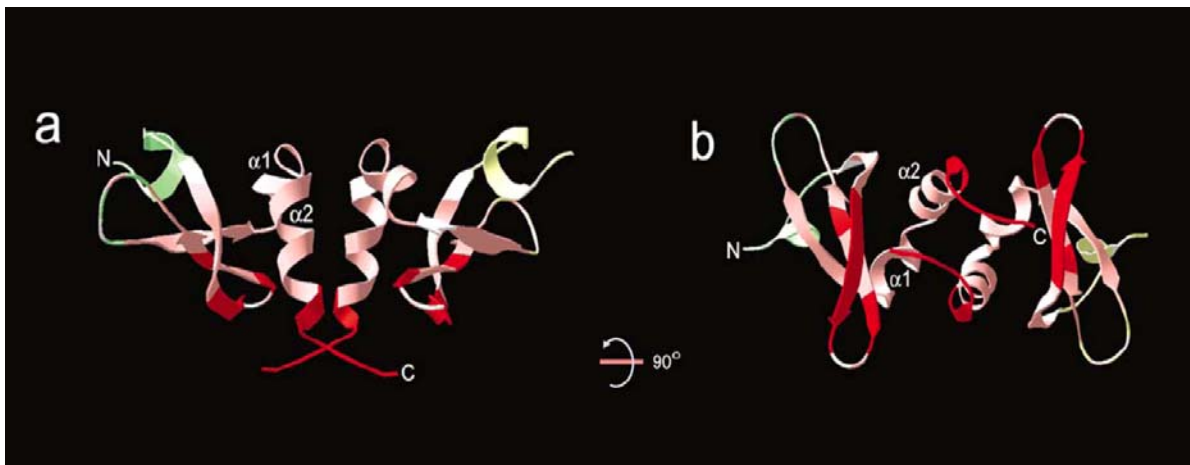
A HP1 szerkezete

A HP1 izoformáinak két konzervált, felépítésében és funkciójában is elkülöníthető szerkezeti eleme (domain, domén) van: a “chromo domain” (Chromosome Organization Modifier névből, CHD) (Paro and Hogness, 1991) és a szerkezetében hasonló „Chromo Shadow Domain” (CSD) (Aasland and Stewart, 1995), melyeket egy variábilisabb, flexibilis összekötő régió (hinge, kapocs) választ el egymástól (Ball et al., 1997; Brasher et al., 2000). Mind a CHD mind a CSD térszerkezetét meghatározták nukleáris magrezonancia-spektroszkópiás (Ball et al., 1997; Brasher et al., 2000) és röntgenkristallográfiás módszerekkel (Cowieson et al., 2000). Mindkét szerkezeti elemet három ellentétes lefutású párhuzamos szálakból álló β redőzött lemez és egy vagy két alfa hélix struktúra ($\alpha 2$ a CHD-ben; $\alpha 1$ és $\alpha 2$ a CSD-ben) alakít ki (2. ábra).



2. ábra: A chromo-domén és a chromo-shadow-domén struktúrája. **HP1β CHD:** A HP1β (aa 10-78) CHD-je 3 lapból álló ellentétes lefutású β -redőzött lemezből és az ahhoz kapcsolódó α -hélixből ($\alpha 2$) áll. A hidrofób aminosavak egy árkot formálnak (groove), amely speciális fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakítását teszi lehetővé. **HP1β CSD:** A HP1β (aa 104-171) CSD szerkezete hasonló a CHD-hez azzal a lényeges eltéréssel, hogy a CSD tartalmaz egy néhány aminosavból álló szakaszt, amely egy újabb hélixet formál ($\alpha 1$), amely nem található meg a CHD-ben. A CSD-ben a hidrofób árok nincs jelen, ezt a teret kitöltik a szomszédos aminosavak oldalláncai. (Singh and Georgatos, 2002 nyomán.)

A β redőzött lemez egyik oldalán konzervált, apoláris aminosavak egy hidrofób jellegű árkot alkotnak amely viszonylag nyitott a CHD esetében, a CSD-ben azonban a szomszédos aminosavak kitöltik ezt az üreget (2. ábra). Ezek az árkok a szerkezeti elemekre specifikus fehérje- fehérje kölcsönhatások kialakítását teszik lehetővé (Smothers and Henikoff, 2001) (lásd később). A CSD oldatban dimerizálódik (3. a ábra), míg a CHD monomer marad ugyanilyen körülmények között. A CSD-ek dimerizálódásával egy apoláris bemélyedés alakul ki, amely PxVxL konszenzus szekvenciájú pentapeptidek bekötődését teszi lehetővé (3. a,b ábra, piros és rózsaszínnel jelzett régiók). A dimerizálódásnak és az ennek következtében kialakuló kölcsönhatásoknak szintén kulcsszerepe van a HP1 funkciójában és a heterokromatin szerveződésében (lásd később).



3. ábra: A CSD dimerizációja. **A:** A CSD domén sematikus szerkezete. A CSD az $\alpha 2$ helixen keresztül dimerizálódik. **B:** A dimer 90°-os elforgatásával láthatóvá válik az az árok, amelynek szerepe van a konszenzus PxVxL pentapeptid megkötésében. A pentapeptid kötésében lényeges szerepet játszó részek pirosak, a kevésbé fontosak rózsaszínek. Azok a régiók, amelyek nem vesznek részt a kötésben sárgák és zöldek. (Singh and Georgatos, 2002 nyomán)

A kapocs régió, bár kevésbé konzervált mint az általa összekötött szerkezeti elemek, C terminálisán tartalmaz bizonyos töltött aminosavakat, amelyek konzervatívak. Feltételezik, hogy ezeknek az aminosavaknak közvetlen szerepük van a HP1 funkciójában (Li et al., 2002) és a kapocs régió több mint egy egyszerű összekötő szekvencia. Valószínűleg a kapocs régióban található szekvenciák különbségei felelősek a HP1 izoformák eltérő lokalizációs mintázataért (Platero et al., 1995; Yamada et al., 1999; Smothers and Henikoff, 2001; Meehan et al., 2003), ez a szakasz vesz részt egy eddig ismeretlen RNS molekulákkal történő kölcsönhatásban is, aminek szintén szerepe lehet a HP1 lokalizációjában (Muchardt et al., 2002).

A HP1 konzervatív szerkezeti elemei és a kapocsrégió számtalan fehérje-fehérje kölcsönhatást alakítanak ki egyéb fehérjékkel (3. táblázat a Függelékben). Ezeket a kölcsönhatásokat és a azokban részt vevő fehérjepartnereket csoportosíthatjuk funkciójuk alapján, amelyből következtethetünk a HP1 funkciójára is.

A HP1 funkciója

A HP1 transzkripció regulátor

A HP1 kölcsönható partnerei között számos olyan fehérje akad, amely maga is szerepet játszik a transzkripció szabályozásában. A SU(VAR)3-7 egy Zn-finger domén tartalmú DNS kötő fehérje, mutációja domináns szuppresszora a PEV-nak, a fehérje génkifejeződésre gátló hatással van. Kapcsolatát a HP1-el több módszerrel is kimutatták ecetmuslicában (Cleard et al., 1997; Delattre et al., 2000). A HP1 interakciós partnereként azonosítottak transzkripció intermedier faktorokat (TIF1 α és TIF1 β), amelyek kapcsolatban vannak a nukleáris hormon receptorokkal. A TIF-ok represszálják a transzkripciót, de ligand függő módon transzkripció aktivátorok is lehetnek. A HP1 transzkripciót befolyásoló interakciós partnereire a Függelékben, a 3.számú táblázatban további példák találhatók.

A HP1 transzkripcióra gyakorolt hatása rendkívül sokrétű, elsősorban mint transzkripció represszort tartják számon, mivel az ecetmuslicán végzett kezdeti vizsgálatok alapján az expressziót csökkenti a heterokromatinban, mutációi szuppresszálják a konstitutív heterokromatin pozíció effektus variegáció (PEV) hatását (James and Elgin, 1986; James et al., 1989; Eissenberg et al., 1990). Később ecetmuslicában kimutatták, hogy a HP1 represszálja a gének expresszióját eredeti eukromatikus helyükön is (Hwang et al., 2001). Más organizmusokban is leírták a génkifejeződést gátló hatását: hasadó élesztő homológja, a SWI6 transzkripció gátlást valósít meg az élesztő „mating type” kazettáin, a telomerekben és a centromerek környékén is (Lorentz et al., 1994), emlősökben a HP1-nek, retinoblasztóma (Rb) és SU(VAR) fehérjékkel együtt a *cyclin E* promóterén egyértelműen a génkifejeződést gátló hatása van (Nielsen et al., 2001b). Ha a HP1 a gének promóterének közelébe kötődik akkor

csökkentheti azoknak a transzgéneknek az expresszióját, amelyek nem a centrikus heterokromatin közelében találhatók (Vassallo and Tanese, 2002). Ez a gátló hatás azonban nem jelentkezik, ha a HP1 kikötődése 2 kb-nál távolabb történik a transzgéntől (van, V et al., 2000), ami arra utalhat, hogy a HP1 nemcsak egész domének szabályozását végzi, hanem rövid kromoszómális régiók, egyes gének expresszióját is befolyásolhatja (Li et al., 2002). A centromerikus heterokromatin közelébe inszertálódott transzgének kifejeződését a HP1 úgy csökkenti, hogy szabályosabb nukleoszóma elrendeződést, tömörebb szerkezetet hoz létre rajtuk, ezáltal a transzgének promóterei sokkal kevésbé hozzáférhetőek a transzkripció faktorok (kísérleti rendszerekben a nukleázok) számára az eukromatinban inszertálódott transzgénekéhez képest (Cryderman et al., 1998; Cryderman et al., 1999). A HP1 a centromerikus heterokromatinban zárt kromatinstruktúra létrehozásával megakadályozza, hogy a transz-ható faktorok elérjék a szabályozó funkciójú DNS szakaszokat, hasonló mechanizmus által mint ahogyan az inaktív X kromoszómákon található gének esetében, ahol a transzkripció faktorok szintén hiányoznak az inaktív génekről (Pfeifer and Riggs, 1991). A HP1 represszáló hatása mellett ugyanakkor szükséges olyan gének expressziójához, amelyek normálisan a heterokromatinban fejeződnek ki (Lu et al., 2000).

Meglepő az az új eredmény, mely szerint a HP1 eukromatikus helyeken nemcsak a génkifejeződés csendesítésében, hanem *in vivo* transzkripció indukciójukban is részt vehet (Piacentini et al., 2003). Ez a megfigyelés kiszélesíti a HP1 funkciójáról alkotott képünket, azt mutatja, hogy a HP1 nem egyszerűen a génkifejeződés represszora, funkcióját az adott kromoszómális régió és kromatinkörnyezet nagyban befolyásolja (Piacentini et al., 2003). Az hogy a HP1 hogyan képes fokozni eukromatikus gének expresszióját, ma még ismeretlen. Kromatin-immunprecipitációs vizsgálatokból kiderült, hogy a HP1 az indukált gének kódoló régiójához, nem pedig a promóter régiójukhoz kötődik (Piacentini et al., 2003). A szerzők

feltételezése szerint a HP1-nek valószínűleg nem transzkripciót indukáló hatása van, hanem inkább a transzkriptumot stabilizáló és az elongációt elősegítő hatása lehet (Piacentini et al., 2003).

A HP1 szerepe a DNS replikációban és a hibajavításban

A HP1 interakcióját kimutatták a kromatin összeszerelődését biztosító faktorról (chromatin assembly factor 1, CAF1) amely a hisztonoknak és az újonnan szintetizálódó DNS szálaknak az összeszerelődését szabályozza a replikáció során (Murzina et al., 1999; Brasher et al., 2000). A kölcsönhatás jelentősége abban lehet, hogy az adott kromoszómális szakaszon a replikáció során újonnan felépülő kromatinrégiók a HP1 jelenléte által megőrzik a szülői sejt kromatinjából epigenetikusan átöröklődő heterokromatikus szerkezetüket.

HP1 fehérjék együttes lokalizációját és erős kölcsönhatását írták le ORC (origin recognition complex) fehérjékkel is. Az ORC fehérjék (ORC 1-6) a genom replikációs origóihoz kötődnek, azt feltételezik, hogy mind az ecetmuslicában (Pak et al., 1997) mind a sütőélesztőben (Gross, 2001; Gasser and Cockell, 2001) megfigyelt interakciók az újonnan replikálódó DNS szakaszok heterokromatikus géncsendesítésében vesznek részt. További példákat a HP1 replikációban és hibajavításban betöltött szerepére a Függelékben, a 3.számú táblázatban lehet találni.

A HP1 résztvesz a sejtmag és kromoszómák felépítésében

A sejtmag telofázisban történő újraépítésében fontos szerepet töltenek be a sejtmaghártyába integráns membránfehérjeként ágyazódó Lamin B receptorok (LBR). Ezek a receptorok kötik meg a sejtmag belső felületét alkotó lamint (Worman et al., 1990; Ye and Worman, 1994). A HP1 Lamin B receptorokkal (Ye and Worman, 1994; Ye et al., 1997;

Lechner et al., 2000; Polioudaki et al., 2001) és a maghártyával (Kourmouli et al., 2000) is komplexet alkot. Mivel a sejtmag periférikus részébe kihorgonyozott heterokromatin a belső nukleáris membránhoz és a nukleáris laminához kötött, feltételezik, hogy a HP1 szerepet játszik e komplexek kialakításában, és a periférikus kromoszómaregiók transzkripció csendesítésében.

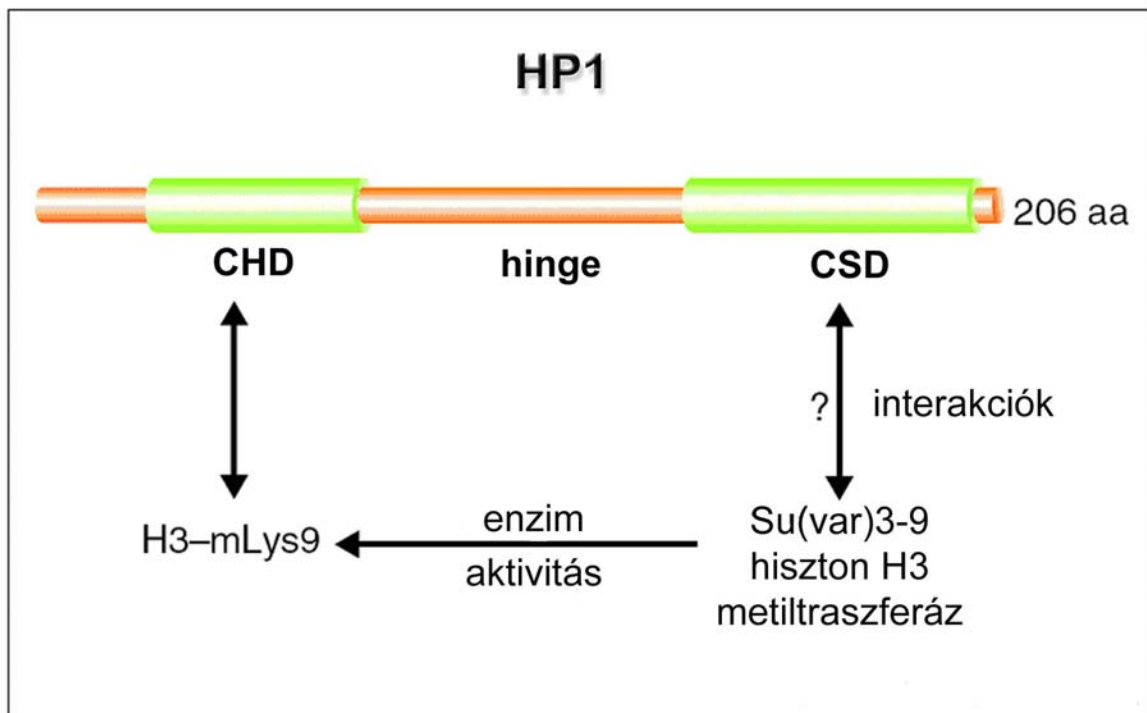
Élesztő kettős hibrid rendszer segítségével bizonyították, hogy a HP1 kölcsönhatásba lép egy centromerikus proteinnel (Inner centromere protein, INCENP), amely összetevője a mitotikus kromoszómák centromer környéki kromoszómavázának. A kölcsönhatás jelentősége nem ismert pontosan, de minden bizonnyal szerepet játszik a konstitutív centromerikus heterokromatin kialakításában (Kourmouli et al., 2000).

A HP1 a telomeren mint burkoló fehérje funkcionál, sapkaként beborítja a kromoszómák végeit, megakadályozva ezzel a fúziójukat. Szerepe a kromoszómák stabilitásának biztosítása (Fanti et al., 1998). A HP1 sejtmag- és kromoszómafelépítésben betöltött szerepével kapcsolatos további példákat a Függelékben, a 3.számú táblázatban lehet találni.

A HP1 kromatin szerkezetet módosító hatása

A hisztonok poszttranszlációs modifikációit és a transzkripciót befolyásoló lehetséges szerepüket már négy évtizede, a nukleoszómák felfedezése előtt leírták (ALLFREY et al., 1964). Ma már tudjuk, hogy a hisztonok modifikációi dinamikusan változnak a fejlődés során, eltérőek az egyes szövetekben, specifikus enzimekkel szabályozottak és egyéb epigenetikus szabályozó rendszerekkel (pl. DNS metiláció) együttműködve szabályozzák a kromatin állapotát és ezen keresztül a génexpressziót. Ez a mechanizmus biztosítja, hogy a sejtek a replikáció után is megőrzik a differenciálódásuk során kialakult génexpressziós mintázatukat,

az osztódásuk után is „emlékeznek” arra hogy milyen sejtek voltak. A sejtek osztódása során megőrzött azonosságuk fenntartásához nagyban hozzájárulnak a kromatinszerkezet állandóságát biztosító fehérjék. Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, mely szerint a heterokromatin kialakulásában kulcsfontosságú metH3K9 módosítást végző hiszton-metil-transzferáz (a SUV39H1) és a HP1 fizikai kapcsolatban van egymással az ecetmuslicában (Schotta et al., 2002). Genetikai vizsgálatokkal kimutatták azt is, hogy a HP1 és Suv39H1 mutációi ecetmuslicában befolyásolják a heterokromatin represszálo hatását (Wustmann et al., 1989), olyan egér fibroblaszt sejtekben pedig, amelyekben kiütötték a H3K9-es metilációt létrehozó *Suv39h* gént, nem volt megfelelő a HP1 lokalizációja (Lachner et al., 2001). A HP1 specifikus felismerési kódjának megléte, megerősíti a „hiszton kód” hipotézist, amely azt feltételezi, hogy a hisztonok farki részének a módosításai specifikus felismerő helyeket biztosítanak a nem hiszton típusú kromatinfehérjék számára (Jenuwein and Allis, 2001). A HP1 a kromatinban egy kettős funkciójú keresztkötő molekula: CHD-je felismeri és megköti a hisztonokon kialakított epigenetikus modifikációt, CSD-je révén pedig interakciót alakít ki a modifikációt létrehozó enzimmel és befolyásolja annak hatását (4. ábra). A H3K9 metilációja azonban még nem elégséges feltétele a HP1 heterokromatikus kötődésének, Maison és munkatársai (Maison et al., 2002; Muchardt et al., 2002) kimutatták hogy H3K9 metilációja mellett a heterokromatikus lokalizációhoz szükség van a hisztonok deacetilált állapotára továbbá egy máig kevésbé ismert RNS-, illetve bizonyos fehérje komponensekre is (Huang et al., 1998). Ezeknek a fehérje és RNS összetevőknek a pontos szerepe ma még tisztázatlan.

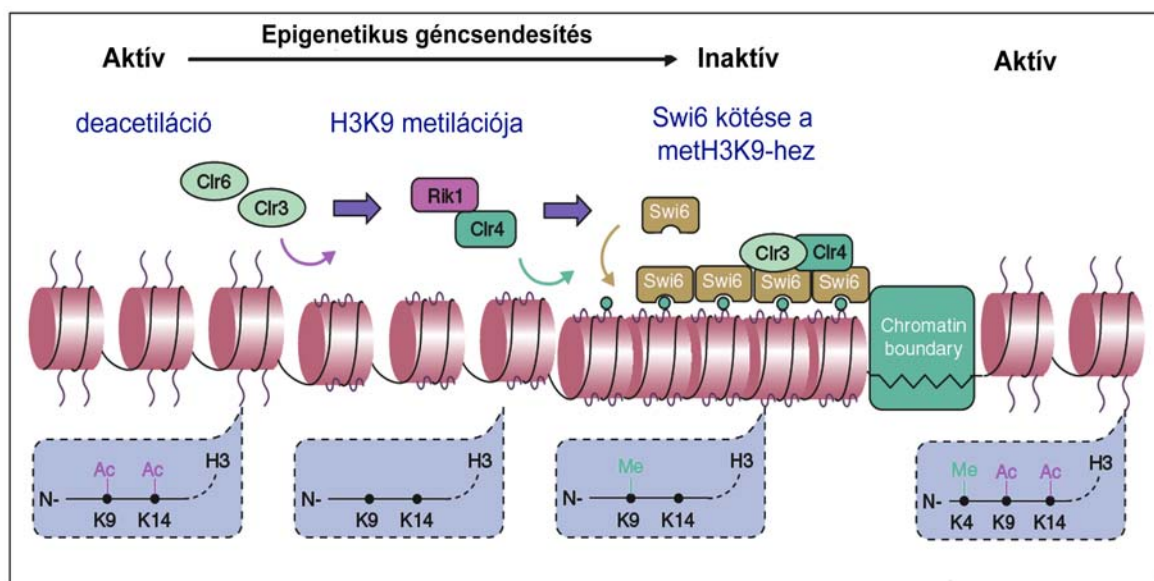


4. ábra: A HP1 struktúrája és funkciója. A HP1 egy kettős funkciójú keresztkötő fehérje: két konzervatív szerkezeti eleme van (CHD és CSD) amelyet egy variábilis rész a hinge (kapocs) régió választ el egymástól. A CHD specifikusan kötődik meth3K9-hez, míg a CSD interakciókat alakít ki számos egyéb kromoszómális fehérjével és valószínűleg direkt vagy indirekt kötőhelyet biztosít a H3 metiltransferáz számára. A nukleáris lokalizációért felelős szekvenciák a fehérje karboxi terminális és a kapocs régióiban találhatóak a *Drosophila* homológon, a heterokromatikus lokalizációban azonban mindkét szerkezeti elemnek, RNS és fehérje komponenseknek is szerepe van. (Grewal and Elgin, 2002)

A HP1 kettős keresztkötő (bifunctional crosslinker) természete lehet a kulcsa annak, hogy a kromatin hogyan képes replikáció után is megtartani szerkezetét mindkét utódszálon és ezáltal klonálisan továbbadni a génkifejeződést csendesítő kromatinállapotot. A replikáció során az eredeti kromatinszálon elhelyezkedő modifikált hisztonok véletlenszerűen, hígított formában kerülnek az újonnan kialakuló kromatida szálakra, de mindkét szálon megtartják a módosított hisztonok eredeti mintázatát. Hogy a mintázat fenntartásában szerepet játszik a HP1, azt bizonyítják a korábban már említett megfigyelések, melyek szerint élesztőben a

SWI6 protein (a HP1 élesztő homológja) az egész sejtciklus alatt stabilan hozzákötődve marad az élesztő expressziósan inaktív mating-type lókuszához (Nakayama et al., 2000), az emlős HP1 α azonos komplexben van a replikációban szerepet játszó CAF1-el (chromatin assembly factor 1) (Murzina et al., 1999), továbbá hogy az élesztő HP1 asszociált marad a hasadóélesztő DNS replikációs enzimével a Pol α -val (Ahmed et al., 2001). A replikáció folyamán tehát a HP1 hozzákötődhet az eredeti kromatinállapotot megőrző módosított hisztonokhoz, mivel már kihorgonyozva jelen van a replikációs origó fehérjekomponenseivel egy komplexben.

A heterokromatin terjedés önfenntartó mechanizmusának szintén a HP1 kettős keresztkötő funkciója lehet az alapja. E modell szerint a SWI6/HP1 beépülése és megtartása a heterokromatinban a H3-as hisztonok metilált Lys9-én valósul meg, a beépült SWI6/HP1 pedig stabilizálja további fehérjék (hiszton deacetilázok, hiszton metil-transzferázok) jelenlétét, amelyek segítik a represszált állapot fenntartását (Nakayama et al., 2000; Bannister et al., 2001; Grewal and Elgin, 2002) és a szomszédos kromatinrégiók epigenetikus módosítását, lehetővé téve ezzel a heterokromatin tovaterjedését (Grewal and Elgin, 2002). A mechanizmus részletei az 5. ábrán láthatóak.

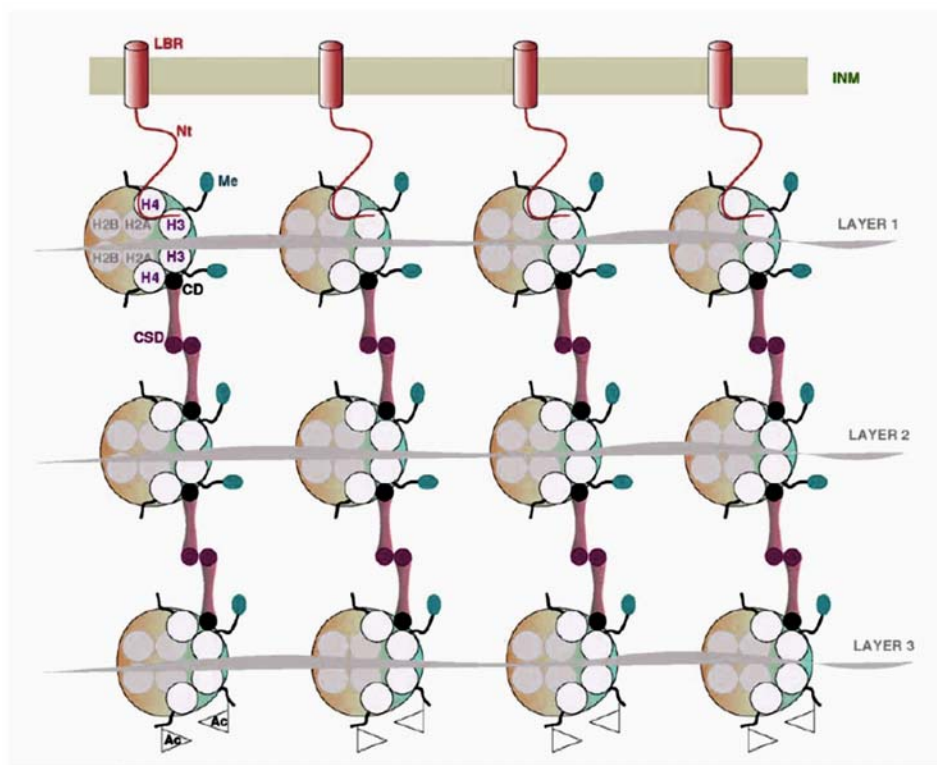


5. ábra: A heterokromatin kialakításának epigenetikus szabályozása és a heterokromatin szomszédos kromatinrégiókba történő terjedésének modellje hasadó élesztőben. A H3-as hiszton N-terminális végét hiszton-deacetiláz, majd hiszton-metiltransferáz enzimek specifikusan módosítják, melynek révén kialakítanak egy hiszton kódot a heterokromatin szerveződéséhez. Clr6/Clr3 deacetilázok eltávolítják az acetil csoportot a H3-as hiszton 9-es és 14-es lizinjéről, majd ugyanezen aminosavak a Clr4/Rik1 fehérjék által metilálódnak. A SWI6 (HP1) CHD-je specifikusan kötődik a H3-mLys9-hez. A SWI6 dimerizációja lehetővé teszi, hogy a CSD-en keresztül fehérjekapcsolatok alakuljanak ki további kromoszómális fehérjékkel, hiszton-módosító enzimekkel (hiszton-deacetilázok, hiszton-metiltransferázok). A hisztonmódosító enzimek bekötődése lehetővé teszi szomszédos kromatinrégiók epigenetikus módosítását, ezáltal a HP1 bekötődését, végeredményben a heterokromatin terjedését. A folyamatnak speciális DNS szekvenciák (határolószekvencia, boundary) szabhatnak gátat. Ez a mechanizmus lehetővé teszi azt is, hogy az sejtszétválás során az utódsejtek megőrizzék heterokromatin-struktúrájukat. (Grewal and Elgin, 2002)

A HP1 tehát a heterokromatin szerveződése során a módosított hisztonokat összekötheti nem hiszton típusú kromoszómális fehérjékkel.

A „hídfehérjeként” szolgáló HP1 dimereképződése révén lehetőséget biztosít arra is, hogy nukleosómák közötti kapcsolatokat hozzon létre, ezáltal lehetőséget teremt kromatin rétegek kialakítására, végső soron a kromatin egy magasabb rendű szerveződését valósítja meg (Singh and Georgatos, 2002). A kromatinrétegek kihorgonyozódva a magmembrán felszínéhez a mag belsejében transzkripciósan aktív, lazább szerkezetű magi tereket (territóriumokat)

hagynak szabadon (Pombo et al., 2000) a periférián pedig nagyméretű heterokromatikus rögök jönnek létre (6. ábra).



6. ábra: A periférikus heterokromatin rétegződése a nukleáris magmembrán közelében. A lamin B receptor (LBR) egy integráns magmembrán protein, amelynek N-terminális régiója a nukleoplazmába nyúlik és hiszton H3/H4 komplexeket köt, amelyek megfelelő posztranszlációs modifikációkat (MetH3K9 és deacetiláció) hordoznak. A módosított H3/H4 hisztonok HP1-et is kötnek, amely CSD-je révén dimerizációra képes. A kromatinban a H3/H4 hisztonok nukleoszmákban vannak jelen, a HP1 a nukleoszmák között teremt kapcsolatot. A modell szerint további nukleoszóma-HP1 interakciók révén kromatin rétegek jöhetnek létre, amely alapja lehet egy magasabb rendű kromatinszerkezet kialakulásának a nukleáris magmembrán közelében. A folyamat továbbhaladásának a hisztonok acetilált állapota szabhat gátat. (Singh and Georgatos, 2002 nyomán).

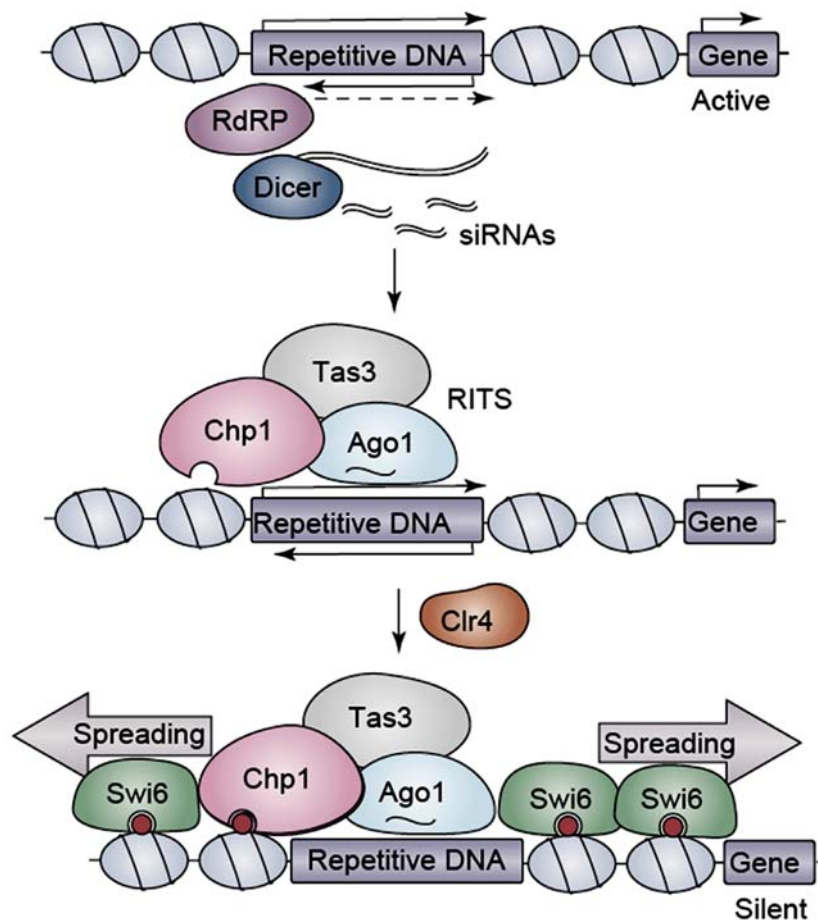
A HP1 részvételével kialakuló heterokromatin anélkül is csendesítheti a génekifejeződést, hogy kiterjedt, citológiailag is látható konstitutív heterokromatin alakulna ki az adott kromatinrégióban. A fő különbség a konstitutív heterokromatin és a transzkripciósan inaktív eukromatin között bizonyos tulajdonságok (methH3K9, HP1 kötés) kiterjedtsége, a HP1

nagymértékű terjedése főként a szatellita DNS szigeteken tud megvalósulni. Ha a HP1 terjedése elér egy kritikus tömeget, kialakulhat egy olyan magasabbrendű kromatinszerveződés, amely létrehozhat olyan nagyterjedésű kromatin-komplexeket, amelyek a citológiai is megfigyelhető konstitutív heterokromatin tulajdonságaival bírnak. A heterokromatin megnövekedett mennyisége újabb tulajdonságokkal ruházza fel ezeket a komplexeket, képesek aggregálódni szomszédos komplexekkel, áttérjedhet róluk a heterokromatin szomszédos kromoszómarégiókra, befolyásolják a komplex egész környezetét a sejtmagon belül, olyan térrészeket különítenek el, amelyek specifikus transzkripciót csökkentő faktorokat tartalmaznak.

A HP1 funkciója az RNS interferenciában és transzkripcionális gén-csendesítésben

Specifikus szekvenciájú hosszabb kettős szálú RNS-ek (dsRNA) és rövid (22-25 bp) interferencia RNS molekulák (siRNA) közreműködésével a sejtekben aktiválódik egy olyan mechanizmus, amely az említett RNS molekulákkal homológ szekvenciájú transzkriptumok degradációjához, végső soron a génkifejeződés csökkenéséhez, csendesítéséhez vezet (postranscriptional gene silencing, PTGS). Ha a dsRNS tartalmaz a transzkriptum promoterével homológ szekvenciákat, akkor a génkifejeződés már a transzkripció szintjén is blokkolódhat (transcriptional gene silencing, TGS). Ennek a mechanizmusnak valószínűleg fontos szerepe van a szatellita szigetek heterokromatinizációjában. Az ismétlődő szatellita szekvenciákról képződő RNS molekulák kétszálú RNS-t képeznek, melyeket egy speciális ribonukleáz (Dicer) rövid, ~22-25bp hosszúságú interferencia RNS-ké hasít. Gombákban, növényekben és bizonyos gerinctelen állatokban az siRNS-ek primerként szolgálnak RNS függő RNS polimerázok számára, amelyek sokszorozhatják a dsRNS molekulákat. A siRNS-ek a RITS komplexhez (RNA-induced initiator of transcriptional gene silencing)

kapcsolódnak, amely egy több fehérjéből (hasadó élesztőben: Ago1, Chp1, Tas3) álló komplex, funkciója a homológ transzkriptum degradálása és az annak megfelelő kromatinszakasz transzkripció elcsendesítése. A RITS komplexet a megfelelő kromatinrégióhoz való kötődésben az siRNS-ek segítik, valószínűleg DNS-RNS, RNS-RNS kölcsönhatások révén irányítják a célszekvenciához. A komplex hisztonmódosító enzimek (hiszton metiltranszferázok) bekötésével kialakítja azt a „hiszton kódot”, amely a kromatinrégió géncsendesítését végző SWI6/HP1 fehérjék bekötését és a komplex Chp1 fehérjén keresztüli stabilizálását teszi lehetővé. A SWI6/HP1 fehérjék a fentebb említett mechanizmusok segítségével biztosítják az RNS interferencia transzkripció szintű génkifejeződést gátló hatását (TGS), és ugyanez a mechanizmus valósítja meg a szatellita szigetek transzkripció inaktiválását és a HP1 szétterjedésével azok heterokromatinizációját (7. ábra) (Grewal and Rice, 2004).



7. ábra: Az RNAi mediált heterokromatin kialakulásának folyamata. A repetitív szekvenciákból átíródó dsRNS-eket a Dicer átalakítja siRNS-ekké, melyeket a RdRp sokszorozhat. A siRNS-ek a megfelelő kromatinrégióhoz irányítják a RITS komplexet. A RITS komplex H3K9 hiszton metil transferázokat köt meg, melyek a megfelelő epigenetikus kód kialakításával kötőhelyet biztosít a stabilizáló Chp1 és a heterokromatinizációt megindító SWI6/HP1 fehérjék számára. Bővebb magyarázat a szövegben. (Grewal and Rice, 2004 nyomán.)

A HP1 fehérjék a fent említett funkciókon túl egyéb sejten belüli folyamatokban is részt vehetnek. Egy érdekes példa, hogy a $HP1^{Hs\alpha}$ alacsony szinten fejeződik ki emlőrák metasztázisokban. Jelölt $HP1^{Hs\alpha}$ sejtekbe juttatásával a sejtek *in vitro* invazív tulajdonsága csökken, ami arra utalhat, hogy a HP1 megváltoztatja a metasztázisokhoz szükséges gének expresszióját (Kirschmann et al., 2000). A $HP1^{Hs\alpha}$ expressziójának nyomon követése akár

diagnosztikai jelentőséggel is bírhat a metasztatikus állapot vizsgálatában (Kirschmann et al., 2000).

A HP1 funkcióinak szabályozása

A HP1 izoformái sokrétűen befolyásolják a génexpressziót, felvetődhet a kérdés, hogyan valósítják meg változatos szabályozó funkciójukat? A HP1 fehérjék hajlamosak dimerek illetve homo- vagy heterotipikus oligomerek képzésére is (Ye et al., 1997; Wang et al., 2000; Brasher et al., 2000; Nielsen et al., 2001a; Nielsen et al., 2001b). Singh és Georgatos (2002) feltételezése szerint a kromatin környezettől függően a HP1 fehérjék különböző homo- és heterooligomerjei különböző szerepet tölthetnek be például az expresszió szabályozásban: a HP1 γ homodimereknek aktiváló szerepük lehet, a HP1 α –HP1 γ / HP1 β –HP1 γ hetrodimerek átmenetiek, míg a HP1 α vagy HP1 β homodimerek represszáló hatásúak (Singh and Georgatos, 2002). Ezt a feltételezést támasztja alá az a megfigyelés is, mely szerint a HP1 α és a HP1 β represszálja, míg a HP1 γ elősegíti négy emberi gén kifejeződését (Hwang and Worman, 2002). Az oligomerek kialakulását valószínűleg a HP1 fehérjék poszttranszlációs modifikációi befolyásolják (Huang et al., 1998; Minc et al., 1999). Ecetmuslicában a HP1 többszörös foszforilációja legalább nyolcféle különbözően töltött izoformát eredményez (Zhao and Eissenberg, 1999). Különböző fehérjekomplexekben a HP1 különböző foszforilációjú variánsait találták meg (Huang et al., 1998). Emlősejtekben a HP1 foszforilációja a sejtciklus során megváltozik, a HP1^{Hs α} és a HP1^{Hs γ} a mitózis során hiperfoszforilálódik (Minc et al., 1999). A foszforiláció szabályozza a különböző fehérje- fehérje kölcsönhatások kialakulását, feltételezik, hogy emlős sejtekben a mitózis során a HP1 α hiperfoszforilációja szükséges ahhoz, hogy a fehérje megőrizze lokalizációját a kromatinban (Minc et al., 1999). A HP1

izoformáinak szekvenciakülönbségeiből adódóan specifikusak a kölcsönhatásaik, ennek megfelelően specifikusak az interakciós partnereik és az egyes izoformákra jellemző a kromatinon belüli lokalizációs mintázatuk is.

A HP1 izoformáinak lokalizációja

Az ecetmuslicában a HP1a (a *Drosophila* HP1 alfa) elsősorban a kromoszómák pericentromerikus régióiban lokalizálódik, de megtalálható a telomerekben, sávos mintázatot alkotva megfigyelték az ecetmuslica négyes nyálmirigykromoszómáján és egyéb kromoszómákon kis számú eukromatikus régióban is azonosították (James et al., 1989). A HP1b (a *Drosophila* HP1 béta) izoformát megfigyelték a kromoszómák eu- és heterokromatikus régióiban is, míg a HP1c (a *Drosophila* HP1 gamma) kizárólag eukromatikus régiókban fordult elő (Smothers and Henikoff, 2001).

Az emlős alfa és béta izoformák ($mHP1\alpha/HP1^{Hs\alpha}$ és $M31/HP1^{Hs\beta}$) az emlőskromoszómák pericentromerikus konstitutív heterokromatinjába koncentrálnak (Nicol and Jeppesen, 1994; Wreggett et al., 1994; Furuta et al., 1997; Minc et al., 1999; Saffery et al., 1999).

A gamma izoformákat ($M32/HP1^{Hs\gamma}$) megfigyelték mind eu-, mind pedig a heterokromatikus kromoszómális régiókban (Horsley et al., 1996; Minc et al., 1999; Nielsen et al., 1999; Minc et al., 2000). Az izoformák lokalizációjának vizsgálata során számos ellentmondó kísérleti eredmény is született (a részletek az Eredmények tárgyalása című fejezetben olvashatók).

Célkitűzés

A HP1 proteineknek tehát sokrétű szerepük van, részt vesznek a transzkripció szabályozásában, a telomer fenntartásában, a nukleáris membrán felépítésében, a legfontosabb szerepük azonban az, hogy kettős funkciójú keresztkötő fehérjeként részt vesznek a hiszton kód leolvasásában, fehérjeinterakcióik révén elindítják és fenntartják a heterokromatinizáció folyamatát, tehát kulcsszereplői a konstitutív heterokromatin szerveződésének (Eissenberg and Elgin, 2000; Li et al., 2002). Konstitutív heterokromatin csaknem az összes ismert emlősfaj sejtjeiben megtalálható. A kínai hörcsög egy ritka kivétel, kromoszómáin nincsenek kiterjedt, citológiai jól elkülöníthető konstitutív heterokromatikus régiók. Figyelemreméltó megfigyelés azonban, hogy a CHO (kínai hörcsög ovarium) sejtekben képződött emberi szatellita DNS alapú mesterséges kromoszómák nagymértékben heterokromatikusak (Csonka et al., 2000), továbbá CHO sejtekbe átvitt egér mesterséges kromoszómák heterokromatikusak maradnak (deJong et al., 1999). Ez az egyik oka annak, hogy a kínai hörcsög sejtvonalak fontos szerepet töltenek be a mesterséges kromoszóma technológiában: a hörcsög sejtekben a nagymértékben heterokromatikus szatellit DNS alapú mesterséges kromoszómák (SATAC) egyszerű citológia módszerekkel nyomon követhetők. Felvetődött a kérdés, hogy a heterokromatin kis mennyisége a HP1 hiányára vezethető-e vissza kínai hörcsög sejtekben? A HP1-et helyettesíti-e valamilyen speciális heterokromatin-kötő fehérje a mesterséges kromoszómákon vagy a kínai hörcsög sejtek a többi emlőssel azonos HP1-et tartalmazzak-e? Annak érdekében, hogy megválaszolhassuk ezeket a kérdéseket, megkíséreltük megklónozni a hörcsög HP1 fehérjét kódoló géneket emberi izoforma specifikus próbák segítségével.

Anyagok és módszerek

Rekombináns DNS technikák, plazmidok

A plazmid DNS készítést, restrikciós enzimekkel történő emésztést, agaróz gél elektroforézist, fragment izolálást, klónozási technikákat és az *E. coli* sejtek transzformálását az általános laboratóriumi módszerek szerint (Maniatis T et al., 1982) végeztük. A szubklónozásokhoz használt pNEB193 plazmidot a New England BioLabs-tól (Beverly, MA, USA), a pEGFP és pDsRed1-N1 vektorokat a Clontech-től (San Jose, CA, USA) vásároltuk.

Southern blot hibridizáció

A stringens hibridizációs kísérleteket 65 °C-on, 12-14 órán át végeztük a (Church and Gilbert, 1984) által leírt pufferben, 2×10^6 cpm/ml jelölt próbával. A hibridizáció után a membránt 65 °C-on, 20 percig mostuk 1×SSPE-t (0.15 M NaCl, 0.01 M Na_2HPO_4 , 0.025 M EDTA) és 0.1% SDS-t tartalmazó oldattal, majd 65 °C-on, 20 percig mostuk 0.5×SSPE és 0.1% SDS tartalmú oldattal, végül 2x20 percig 65 °C-on 0.1×SSPE-t és 0.1% SDS-t tartalmazó oldattal. A nem stringens hibridizációkat 55 °C-on, 12-14 órán átvégeztük Church és Gilbert (1984) pufferben. A hibridizáció után a membránt 55 °C-on, 20 percig mostuk 1×SSPE és 0.1% SDS összetételű oldattal, majd 55 °C-on, 20 percig mostuk 0.5×SSPE-t és 0.1% SDS-t tartalmazó oldattal. A filtereken levő radioaktív jeleket röntgenfilmen tettük láthatóvá.

Az izoforma specifikus DNS próbák PCR amplifikációja

A felismerő szekvenciákat (primer) Pharmacia Gene Assembler segítségével szintetizáltuk. A kísérletekben felhasznált primerek listája:

humán HP1 α F primer: 5'-TTAAAGCTTCGGGGACCTGGTGGCCTTAGT-3'

(L07515: 91-101);

humán HP1 α R primer: 5'-AAAGATATCGCTCTTTGCTGTTTCTTTCTC-3'

(L07515: 708-688);

humán HP1 β F primer: 5'-GAAGAAAGTAGAGGAGGTGCT-3'

(U35451: 236-256);

humán HP1 β R primer: 5'-TCATCATCCTCCGAGGGGTAG-3'

(U35451: 752-732);

humán HP1 γ F primer: 5'-ATGGAAAGAGTAAAAAAGTTGA-3'

(U26312: 16-38);

humán HP1 γ R primer: 5'-TGAGCTTCATCTTCTGGACAA-3'

(U26312: 518-498).

A teljes kódoló szekvenciát hordozó 597 bp humán HP1 α DNS fragmentet, a humán HP1 β és γ izoforma-specifikus DNS próbákat PCR technikával sokszorozítottuk a humán Leukemia 5'-Stretch Plus cDNS könyvtárból (Clontech) tisztított DNS kivonatot templátként felhasználva. Az amplifikációt Takara ExTaq DNS polimerázzal végeztük az alábbi kísérleti körülmények mellett : 94 °C, 1 perc; 35 ciklus: 98 °C, 20 s; 60 °C, 30 s; 68 °C, 3 perc. Az amplifikációkat körülbelül 100 ng template DNS-en végeztük 50 pmol primer jelenlétében, 75 μ l végtérfogatban. A PCR termékeket agaróz gélelektroforézissel elválasztottuk és gélből tisztítottuk.

A cDNS-ek klónozása

A PCR-rel sokszorosított HP1 α , HP1 β és HP1 γ specifikus DNS próbákat radioaktív [α -³²P]dCTP-el jelöltük meg és használtuk CHO sejtekből készített λ -fág cDNS könyvtár (CHO Cell cDNA Library; Stratagene, La Jolla, CA, USA) plakkhibridizációs vizsgálatához. Körülbelül 24 000 fágklónt teszteltünk minden egyes próbával. A fágkönyvtár plakkhibridizációval történő vizsgálatát a gyártó cég használati útmutatásainak megfelelően (Lambda ZAP®-CMV XR Library, Instruction manual; <http://www.stratagene.com/manuals/937111.pdf>) végeztük.

A HP1 α gén klónozása

A PCR-rel sokszorosított 597 bp HP1 α próbát radioaktív [α -³²P]dCTP-el jelöltük meg. A jelölt próbát használtuk CHO sejtekből készített λ -fág genomikus DNS könyvtár (Hamster Genomic Library; Stratagene) plakkhibridizációs vizsgálatához. A fágkönyvtár vizsgálatát a gyártó cég által javasolt módszernek megfelelően (Lambda FIX® II Library Instruction manual; <http://www.stratagene.com/manuals/936001.pdf>) végeztük. A teljes genomikus bázissorrend megállapításához átfedő fágokat azonosítottunk. A fágok által hordozott DNS (inszert) végeiből PCR segítségével vagy restrikciós endonukleázokkal specifikus próbákat állítottunk elő, amelyekkel lépésről lépésre folytattuk átfedő fágklónok keresését a teljes genomikus bázissorrend megállapításáig (genomic walking, genomikus lépkedés). A genomikus lépkedés során azonosított fágok inszertjeit *Xba* I, *Eco* RI, *Sal* I - *Eco* RI vagy *Sac* I restrikciós endonukleázok segítségével térképeztük, majd pNEB193 vektorba klónoztuk.

Az így kapott átfedő szubklónsorozatok bázissorrendjeit primer lépegetés stratégiával határoztuk meg. A szekvenáláshoz 20–24 bp hosszúságú primereket terveztünk, melyek bázissorrendjét a primer lépegetés előző lépésének szekvenciadatai alapján határoztuk meg.

A DNS bázissorrendjének meghatározása, szekvencia analízis

A DNS bázissorrendjét meghatározó (szekvenálási) kísérleteket a Big DyeTM Terminator v 3.0 Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems ABI PRISM)-el végeztük el. A bázissorrend megállapításból kapott nyers szekvenciadatokat a Lasergene programcsomag (DNASTAR, Inc.) programjaival dolgoztuk fel és elemeztük. Páronkénti összehasonlításokra a National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) szerverén található Blast 2 sequences (bl2seq) programot, többszörös illesztésekhez a Multiple Sequence Alignment (Multalin, <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) programot használtuk. Homológ szekvenciákat a GenBank-ból a NCBI szerverén elérhető Blast program segítségével kerestünk.

DsRed és GFP fúziós konstrukciók

A HP1 α nyitott leolvasási keretét PCR reakcióban megfelelő cDNS templátról sokszoroztuk a HP1 α DS F (5'-AGGTGGATCCGCGTGCGACATGGGA) és HP1 α DS R (5'-CGACCATGGTCTTCGTGCTTTCTTTCTCTTTG) primerekkel. Az amplifikált DNS fragmentet *Nco* I enzimmel kezeltük, a túlnyúló véget feltöltöttük Klenow polimerázzal, majd a fragmentet *Bam* HI-el megemésztettük. A pDsRed1-N1 vektort *Bam* HI enzimmel kezeltük, a túlnyúló véget feltöltöttük Klenow polimerázzal, majd a fragmentet *Bgl* II-vel emésztettük. Az így keletkező DNS fragmenteket agaróz gélből tisztítottuk, majd összekapcsoltuk őket (ligálás).

A HP1 β nyitott leolvasási keretét PCR reakcióban sokszorozítottuk a HP1 β DS F (5'-GAAAGCTTGCGGGTACTATGGGGA) és HP1 β DS R (5'-AATCCCGGGGCTGGTTCTTGTCGTCTTT) primerek segítségével. A PCR termékeket *Sma* I és *Hind* III enzimekkel emésztettük, agaróz gélből tisztítottuk és *Sma* I-*Hind* III enzimekkel emésztett pDsRed1-N1 vektorba ligáltuk.

A HP1 γ nyitott leolvasási keretét PCR reakcióban megsokszoroztuk a HP1 γ DS F (5'-TGAAGCTTTTGGGCTTCATCTTCTGGA) és T3 (5'-CCGCAATTAACCCTCACTAAAG) primerek segítségével. A PCR termékeket *Bam* HI-*Hind* III enzimekkel emésztettük, agaróz gélből tisztítottuk és *Bam* HI-*Hind* III enzimekkel emésztett pDsRed1-N1 vektorba ligáltuk. A klónokat megszekvenáltuk.

A fágkönyvtár vektorában (pCMV-Script EX) lévő chHP1 α cDNS-ét *Xma* I enzimmel kezeltük, a ragadós véget Klenow polimerázzal feltöltöttük, majd a kapott fragmentet *Apa* I-el emésztettük. A pEGFP-C2 vektort *Eco* RI-el emésztettük, ragadós végét Klenow polimerázzal feltöltöttük, majd *Apa* I-el kezeltük. A kapott fragmenteket gélből tisztítottuk, majd összekapcsoltuk őket.

Sejtvonalak tenyésztése, sejtek transzfekciója

A CHO C23-Z41 sejteket Csonka et al. (2000) által leírt módon, a H1D3-1C2 sejteket a (Kereso et al., 1996) által leírt módon tenyésztettük. A sejteket tranziens transzfekciójához GenePorter2 transzfekciós reagenst (GeneTherapy Systems, San Diego, USA) használtunk a gyártó használati útmutatójának megfelelően. 8 μ g cirkuláris plazmid DNS-t alkalmaztunk 5×10^6 recipiens sejt transzfekciójához.

Stabilan integrálódó vonalakat a transzfekció után 48 órával alkalmazott 400 µg/ml Geneticin (Sigma) szelekcióval állítottunk elő.

Metafázisos limfocita sejtek előállításához élő állatot használtunk fel. Egy nőivarú kínai hörcsögöt feláldoztunk, a lépét kioperáltuk, steril PBS-ben (phosphate-buffered saline: 137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 4.3 mM Na₂HPO₄; 1.47 mM KH₂PO₄) öblítettük, majd a lépét egy üvegbottal szétnyomkodtuk PBS-ben. A kapott szuszpenziót 1000 rpm-mel centrifugáltuk (Universal 16A centrifuga; Hettich) szobahőmérsékleten 10 percig, majd újraszuszpendáltuk 4 mM Glutamine-t, 10 µg/ml concanavalin-A-t (Sigma) és 10% Fetal Calf Serum-ot (FCS) (Gibco) tartalmazó RPMI tenyésztő oldatban. A sejteket 72 órán át tenyésztettük 37 °C-on, majd 5 órán át blokkoltuk 5 µg/ml colchicinnel.

C- sáv festés

A konstitutív heterokromatint specifikusan megjelölő C-sáv festést a Giemsa/barium hydroxid eljárással végeztük (Sumner, 1972) leírásának megfelelően.

Natív kromoszómapreparátumok

A 8 µg HP1-DsRed-del vagy EGFP-HP1 rekombináns plazmid DNS-sel transzfectált sejteket 24-72 óráig tenyésztettük 10% FCS-al kiegészített F12 mediumban 37 °C-on. Az osztódó sejteket metafázisos állapotukban blokkoltuk 0.1 µg/ml Colcemid 4-6 órán át történő hozzáadásával. A metafázisos sejteket enyhe pipettázás segítségével lemostuk a tenyésztőedény tenyésztőfelszínéről, begyűjtöttük, majd centrifugáltuk őket 10 percig, 1000 rpm-el (Universal 16A centrifuga; Hettich) szobahőmérsékleten. A centrifugálással ülepitett sejteket szobahőmérsékletű tenyésztőfolyadékban szuszpendáltuk, különböző mennyiségeket

tárgylemezre helyeztünk, majd enyhe nyomással fedőlemezrel lefedtük. A felesleges, kicsorduló tápfolyadékot szűrőpapírral leitattuk, a fedőlemez körömlakkal rögzítettük a tárgylemezhez. A sejtek fluoreszcenciáját Photometrics KAF1400-G2 CCD kamerával és Quips XL Genetics Workstation rendszerrel (Vysis) szerelt Olympus AH-2 mikroszkóppal vizsgáltuk.

A kromoszómák immunfestése

A C23-Z41-es sejtekből a fentebb leírtak alapján metafázisos sejteket gyűjtöttünk. A sejteket 300 µl hipotonizáló oldatban (10 mM HEPES, 30 mM glycerol, 1 mM CaCl₂, 0,8 mM Mg Cl₂) (Stenman et al., 1975) 5 percig 37 °C-on kezeltük, majd 8 percig 3500 rpm fordulattal centrifugáltuk (Universal 16A centrifuga; Hettich). A citocentrifugával tárgylemezre ültetett metafázisos és interfázisos sejteket 5 percig -20 °C-os metanolban fixáltuk, majd 0,5% Triton X-100-at (Tx100) tartalmazó PBS oldatban 5 percig szobahőmérsékleten rehidráltuk. Öt perc 0,1% Tx100-PBS mosás után alkalmaztuk az elsődleges ellenanyagot: az anti-HP1α monoklonális ellenanyag hibridóma felülúszójából 100 µl-t hígítatlanul mértünk a lemezekre, majd lefedés után 37 °C-on 1 órán nedveskamrában inkubáltuk. A lemezeket kétszer öt percig szobahőmérsékleten 0,1% Tx100-PBS-ben mostuk. Az anti-egér-fluoreszcein-izotiocianát (FITC) (Sigma) másodlagos ellenanyagot 0,1% Tx100-PBS-ben 30-szoros hígításban alkalmaztuk 37 °C-on 1 órán keresztül nedveskamrában. A lemezeket háromszor öt perces 0,1% Tx100-PBS-ben történő mosás után 0,25 ng/µl DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) tartalmú Vectashielddel (Vector) fedtük le. A kromoszómák és sejtmagok fluoreszcenciáját a fentebb említett mikroszkópos rendszerrel vizsgáltuk.

Fluoreszcens *in situ* hibridizáció

A CHO-K20 és tenyésztett limfocita sejtek kromoszómáin végzett fluoreszcens *in situ* hibridizációkat (FISH) biotinilált vagy Dig-jelölt genomikus fág DNS próbával és biotinilált HUCAFF 170 szatellit DNS (Fatyol et al., 1994) próbával végeztük. A DNS próbák jelöléséhez Biotin-Nick Translation Mix-et (Roche, Indianapolis, IN, USA) és DIG-Nick Translation Mix-et (Roche) alkalmaztuk a gyártó által javasolt módszernek megfelelően. A metafázisos preparátumokat methanol:ecetsavas fixálással készítettük elő. Az RNS mentesítés 37 °C-on, 60 percig 100µg/ml RN-áz A (Sigma) felhasználásával 2xSSC-ben (20xSSC: 3M NaCl, 0,3M tri-Na-citrát, pH=7) történt. Alkoholsorozatban történő dehidráció (70%-os, 90%-os, majd abszolút alkoholos kezelés) után a kromoszómák DNS-ét denaturáltuk (70% formamid 2xSSC oldatban 2 percig, 70-75 °C-on). Alkoholsorozatban történő dehidráció, majd szárítás után a kromoszómákat Proteinase-K (Merck) kezeléssel (6-600ng/ml 20mM Tris pH:7.5, 2mM CaCl₂ pufferben 5 percig 37 °C-on) fehérjementesítettük. A preparátumokat ismét alkoholsorozatban dehidráltuk és megszáritottuk. A jelölt DNS próbákat Hybrisol VII-ben (Oncor) 75 °C-on 5 percig denaturáltuk, 37 °C-on, 12-14 órán át nedveskamrában hibridizáltuk őket a kromoszómák DNS-éhez, majd a mintákat 4x3 percig 50% formamid-50% 2xSSC-ben 42 °C-on, 4x3 percig 2xSSC-ben 42 °C-on végül 5 percig 4xSSC-0.05% Triton X-100 pufferben (4xSSC/Tx) szobahőmérsékleten mostuk. A biotinnal jelölt próbák hibridizációs mintázatát avidin-FITC-el (Vector) és biotinilált anti-avidinnel (Vector) tettük láthatóvá. A digoxigenin-nel (Dig) jelölt próbák hibridizációját anti-Digoxigenin-Rhodamine (Roche) és anti-egér Ig-Dig (Roche) ellenanyagok segítségével tettük láthatóvá. A DNS háttérfestést Vectashield-ben oldott 0,2 ng/µl koncentrációjú DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)-val végeztük.

Az anti-HP1 monoklonális ellenanyag előállítása

A monoklonális ellenanyagot termelő hibridóma klónokat együttműködés keretében Monostori Éva laboratóriumában állítottuk elő, az alábbiak szerint.

A HP1 α -invazin rekombináns fúziós proteint kódoló DNS szakaszt pET28a vektorba (Novagene, San Diego, CA, USA) klónoztuk. A baktériumban termelődő fúziós fehérje His-tag-et hordoz, melynek segítségével Chelating Sepharose oszlopon (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England) tisztítottuk a gyártó cég által javasolt eljárásnak megfelelően ([http://www4.amershambiosciences.com/aptrix/upp00919.nsf/\(FileDownload\)?OpenAgent&docid=F2E6A89CD AEF5ACCC1256EB400417DE8&file=71500187AC+.pdf](http://www4.amershambiosciences.com/aptrix/upp00919.nsf/(FileDownload)?OpenAgent&docid=F2E6A89CD AEF5ACCC1256EB400417DE8&file=71500187AC+.pdf)).

Balb/c egereket szubkután immunizáltunk komplett Freud adjuvánsban (CFA) emulgeált 100 μ g tisztított rekombináns proteinnel. Három héttel később az egerek szubkután emlékeztető oltásként 10% CFA-ban és 90% nem komplett Freud adjuvánsban emulgeált 60 μ g proteint kaptak a bőrük alá. Újabb három hét elteltével PBS-ben oldott 60 μ g proteint adtunk be hasüregükbe. Négy nappal később eltávolítottuk a lépüket, a lépsejteket SP2/O myeloma sejtekhez fuzionáltattuk. A fúzióval létrejött és hígítási módszerrel klónozott hibridóma sejtklónokat ELISA-val, Western blotting-gal és indirekt immunfluoreszcenciás kromoszómafestéssel teszteltük.

Western blotting

Emberi limfocita sejtekből, LMTK⁻, CHO-K20 és GFP-chHP1 α fúziós fehérjét kifejező CHO-K20 sejtekből összfehérjekivonatot készítettünk, majd a fehérjéket szétválasztottuk 5-20% poliakrilamid-SDS gradiens gélen. A szeparált fehérjéket Immobilion-P polyvinylidenfluoride (PVDF) membránra (Millipore) vittük át. A filtert 4 °C-on 12-14 órán

át telítőoldatban (20% FCS, 1% BSA, 0,05% Tween-20 PBS-ben) blokkoltuk. Az anti-HP1 α monoklonális ellenanyag hibridóma felülűszót szobahőmérsékleten 10-szeres hígításban telítőoldatban, egy órán keresztül, a másodlagos ellenanyagot (HRP-konjugált anti-egér ellenanyag, Dako) 2000-szeres hígításban telítőoldatban, szobahőmérsékleten szintén egy órán át alkalmaztuk. Az ellenanyag feldúsulásának helyét a membránon Supersignal-HRP kemiluminescens szubsztrát (Pierce) felhasználásával röntgen-filmen tettük láthatóvá.

Eredmények

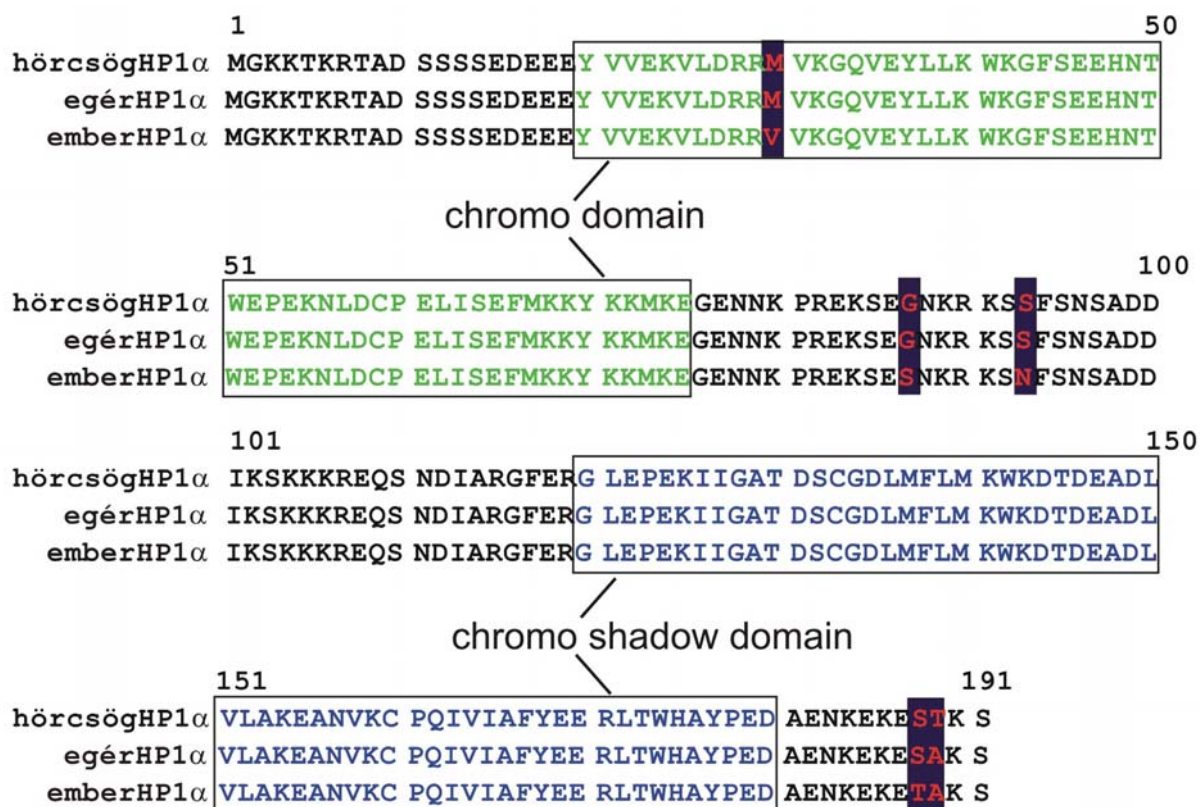
A kínai hörcsög HP1 izoformáinak klónozása

Egy emberi λ -fág cDNS könyvtárból polimeráz láncreakció (PCR) segítségével sokszorosítottuk az emberi HP1^{Hs α} fehérjét kódoló 597 bp hosszúságú DNS szakaszt. Ez a DNS próba kevésbé szigorú (nem stringens) hibridizációs körülmények között specifikus hibridizációs jelet adott Southern blot hibridizációban alkalmazva CHO (kínai hörcsög), LMTK⁻ (egér) és EJ30 (emberi) sejtekből izolált genomikus DNS-en (a kísérlet részletei az Anyagok és módszerek fejezetben találhatók meg). A hibridizáció azt mutatta, hogy az emberi HP1^{Hs α} fehérjét kódoló DNS szakaszhoz hasonló szekvenciák megtalálhatók mind az egér mind pedig a kínai hörcsög genomikus DNS-ében és az 597 bp-os emberi próba alkalmas lehet a kínai hörcsög HP1 α fehérje génjének klónozására. Ennek az emberi próbának az alkalmazásával kilenc cDNS klónt azonosítottunk egy CHO sejtek cDNS-éből készített könyvtárból plakk hibridizáció segítségével. Kilenc azonosított klón közül ötnek meghatároztuk a DNS bázissorrendjét. Mind az öt cDNS klón szekvenciája azonos volt, eltekintve a 3' végi szakasz eltérő hosszúságától. A cDNS-eken azonosítottunk egy 576 bp hosszú nyitott leolvasási keretet (ORF), amelynek bázissorrendje 95% azonosságot mutatott az egér mHP1 α (NCBI: X99641) kódoló szekvenciájával és 93% azonosságot az emberi HP1^{Hs α} (NCBI: NM_012117) kódoló szekvenciájával. Az 5' nem átírt régió (UTR) bázissorrendjei 84-93% azonosságot mutattak a három faj között (7.a ábra).

A		
	1	60
chHP1 α 5'UTR	GGGCGGCTGG CGTTGCGCAG AAGGCGGCGG TAGCGGGTGG CTTGTGGTGC AGCTTTACCA	
huHP1 α 5'UTR	-..... CG.T.-.... G..C....	
moHP1 α 5'UTR		
	61	120
chHP1 α 5'UTR	CAGAGGAACC GCGCAGGCCT TAGTGTGAGT GGTCACGTGA GATCCCGGGA ACCTGGTGGC	
huHP1 α 5'UTR	T.C.....A .G....A.G. ...C..... .A.....C.C A.....G	
moHP1 α 5'UTR	C .AA.TGG.GC--....	
	121	154
chHP1 α 5'UTR	CTTAGTCCTT CAGGTGGATC ---AGCGTG CGAC	
huHP1 α 5'UTR	T..A. ---G.T... ..	RBS
moHP1 α 5'UTR	.A..C..... AACAG..ACA	
B		
	1	60
chHP1 α 3'UTR	AAGGAGGGGG TGGTCTCTGT CATTTCCTT TGTATATAAT ACGTCCACCT TCCTGCCTCC	
huHP1 α 3'UTR	AC..... .A.T.... C.....	
moHP1 α 3'UTR	A.. CA..... .G..... ..C.TT..T.	
	61	120
chHP1 α 3'UTR	TCCCTTCTC- --CCATCCCT TTCATTCTTA --CACATCCA TAAAAACATG TGCTTATCAC	
huHP1 α 3'UTR	.T.C.T..T AC...C.... ..TA..... AA..... ..A-..	
moHP1 α 3'UTR	.T.-....C TC...C.... ..CA..... AA.G..... ..CCAC.. C...C....	
	121	180
chHP1 α 3'UTR	T-GTGA	
huHP1 α 3'UTR	-. .CTCCA CA	
moHP1 α 3'UTR	.T...CTCCA CGGGGGGAGA TGCTGGTATT GGGTTCTCCT GGTAATATAA CTGATGGATC	
	181	228
chHP1 α 3'UTR		
huHP1 α 3'UTR		
moHP1 α 3'UTR	TTGATTCCCT AAAGTTGTAG CTCTTGTA GCGTCAGGCA TTACGGTC	

7. ábra: Az ismert emlős HP1 α cDNS-ek nem transzlált régióinak (UTR) szekvencia-összehasonlítása. **A:** a HP1 α 5' UTR szekvenciái. **B:** a HP1 α 3' UTR szekvenciái. chHP1 α : kínai hörcsög HP1 α ; huHP1 α : emberi HP1 α ; moHP1 α : egér HP1 α ; RBS: riboszóma kötőhely. A megegyező bázispárokat pontok mutatják, a különbözőket betűk jelölik.

A 3' UTR-kben szintén nagyfokú szekvencia konzerváltságot figyeltünk meg (7.b ábra). A cDNS-ből származtatott fehérje aminosav szekvenciája 99% azonosságot mutatott az egér, 97% azonosságot az emberi HP1^{Hsq} aminosavszekvenciájával (8. ábra).



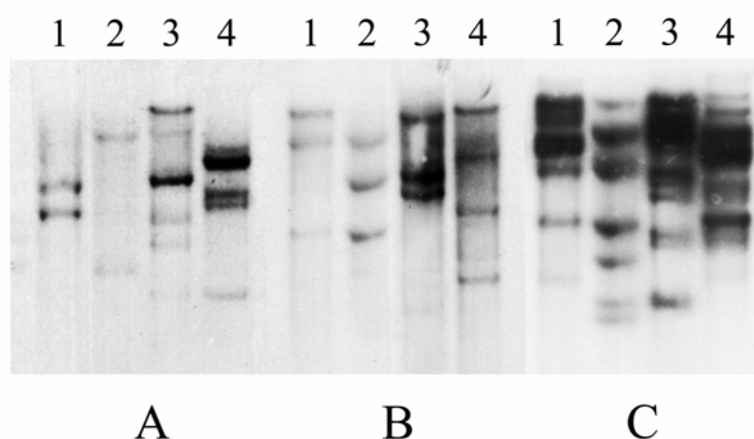
8. ábra: Az ismert emlős HP1α fehérjék aminosavszekvenciáinak összehasonlítása. Az eltérő aminosavakat fekete négyzetek mutatják.

A cDNS-ből származtatott fehérje aminosavsorrendje mindössze egy helyen tér el az egér és négy ponton emberi homológjától ami azt mutatta, hogy a kínai hőrcsög HP1 alfa fehérjét (chHP1α) kódoló cDNS-ét azonosítottuk.

A különbségek javarészt a kevésbé konzervált kapocs- és a C-terminális végi régiókban találhatók, a konzervatív „chromo domain” régióban mindössze egy hidrofób aminosavkülönbséget figyeltünk meg.

A kínai hőrcsög cDNS könyvtár vizsgálatához használt DNS próba hordozza a HP1α teljes kódoló szekvenciáját beleértve a nagy mértékben konzervált „chromo domain” és „chromo shadow domain” régiókat is. Ezek a konzervált régiók részei a HP1β és γ izoformáinak is. Ezért azt vártuk, hogy az emberi HP1α próbával kevésbé stringens

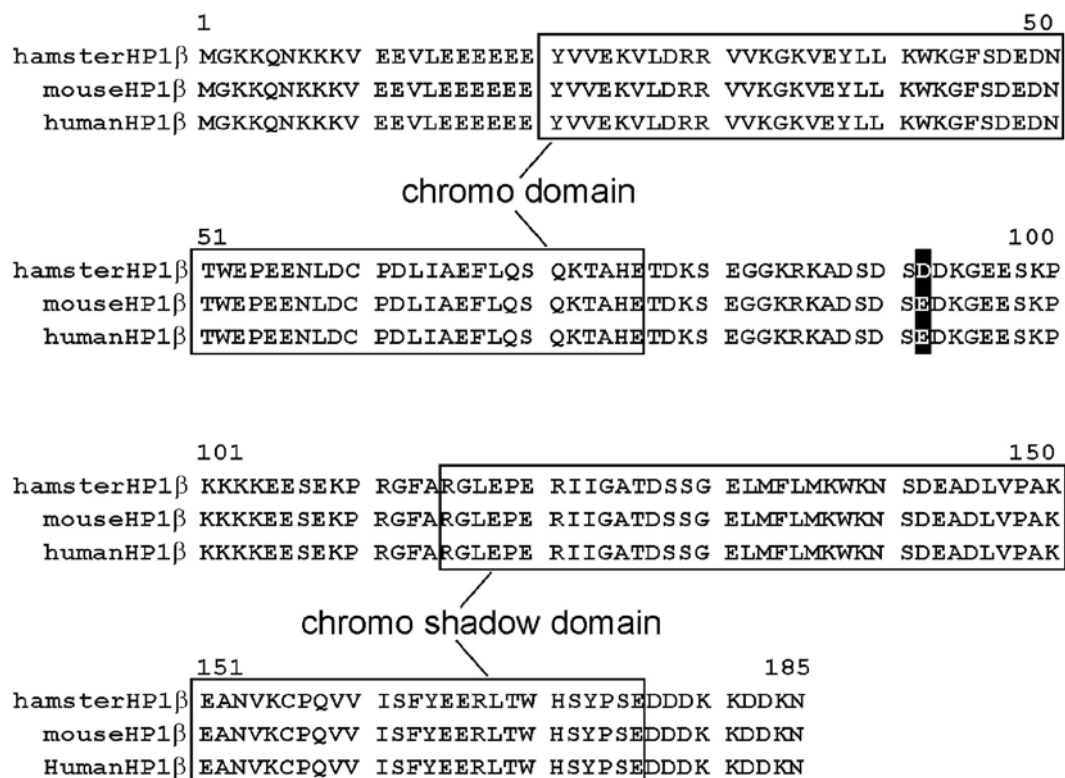
hibridizációs körülmények mellett azonosíthatunk HP1 β és γ klónokat is a hörcsög cDNS könyvtárból. A vizsgálat azonban csak alfa klónokat eredményezett. Annak érdekében, hogy kínai hörcsögben is azonosíthassuk a másik két lehetséges izoformát, PCR reakcióval béta és gamma specifikus DNS próbákat sokszorosítottunk emberi cDNS könyvtárból. Ezeket a próbákat Southern blot hibridizációban ellenőriztük CHO (kínai hörcsög) és LMTK⁻ (egér) sejtekből izolált genomikus DNS-en alacsony stringenciájú hibridizációs körülmények között. Próbáink az egyes izoformákra egyedi hibridizációs mintázatot adtak, nem kereszthibridizációt mutattak az alfa specifikus fargmentumokkal (9. a-c ábra).



9. ábra: Az izoforma specifikus próbák Southern blot analízise. A kínai hörcsög és egérsejtekből izolált genomikus DNS-t restrikciós enzimekkel emésztettük, 0.8 %-os agaróz gélen szétválasztottuk, majd a membránra transzferált DNS-t rádióaktívan jelölt specifikus próbákkal hibridizáltuk. **A:** Southern blot hibridizáció emberi HP1 α kódoló szekvenciát hordozó DNS próbával. **B:** Southern blot hibridizáció emberi HP1 β specifikus DNS próbával. **C:** Southern blot hibridizáció emberi HP1 γ specifikus DNS próbával. 1: *Eco*RI emésztett CHO-K20 genomikus DNS. 2: *Hind*III emésztett CHO-K20 genomikus DNS. 3: *Eco*RI emésztett LMTK⁻ genomikus DNS. 4: *Hind*III emésztett LMTK⁻ genomikus DNS.

Ez a mintázat azt mutatta, hogy az emberi HP1 β és γ cDNS specifikus régióihoz hasonló szekvenciák megtalálhatók mind az egér mind pedig a kínai hörcsög genomikus DNS-ében és

az izoforma specifikus emberi próbák alkalmasak lehetnek a kínai hörcsög másik két HP1 izoformájának klónozására. Ezen izoforma specifikus DNS próbák felhasználásával tíz-tíz cDNS klónt választottunk ki a kínai hörcsög cDNS fágkönyvtárból plakkehibridizációs módszerrel, alacsony stringencájú hibridizációs körülmények között, melyek közül négynek-négynek megállapítottuk a bázisrendjét. E klónok -kisebb 3' végi hosszúságkülönbségektől eltekintve- azonosnak bizonyultak. A HP1 béta próbával azonosított klónokban talált nyitott leolvasási keret bázisrendje 96% azonosságot mutatott az egér M31 (NCBI: NM_007622) és 94% azonosságot az emberi HP1^{Hsβ} (NCBI: NM_006807) ortológokhoz. A cDNS-ükből származtatott fehérje aminosavszekvenciája mindössze egy, a kapocs régióban található aminosavban különbözött az egér és emberi homológoktól (10. ábra). Ennek alapján megállapítottuk, hogy a kínai hörcsög HP1 béta (chHP1β) fehérjét kódoló cDNS-t klónoztuk meg.



10. ábra: Az ismert emlős HP1 β fehérjék aminosavszekvenciáinak összehasonlítása. Az eltérő aminosavakat fekete négyzetek mutatják.

A chHP1 β -ban azonosított szekvenciakülönbség ismereteink alapján nem konzervált vagy valamilyen funkcióban kiemelt szerepet játszó aminosavban van (Smothers and Henikoff, 2001; Muchardt et al., 2002).

A HP1 gamma próba segítségével kiválasztott klónokban a nyitott leolvasási keret bázisrendje szintén nagyfokú konzervativizmust mutatott: 95% azonosságot az egér M32 (NCBI: BC059831) valamint 92% azonosságot az emberi HP1^{Hsy} (NCBI: BC000954) kódoló szekvenciákhoz, a cDNS-ből származtatott fehérjék aminosavsorrendje pedig teljesen azonos

volt mindhárom faj esetében, tehát a HP1 gamma izoformáját (chHP1 γ) is azosítottuk a kínai hörcsögből.

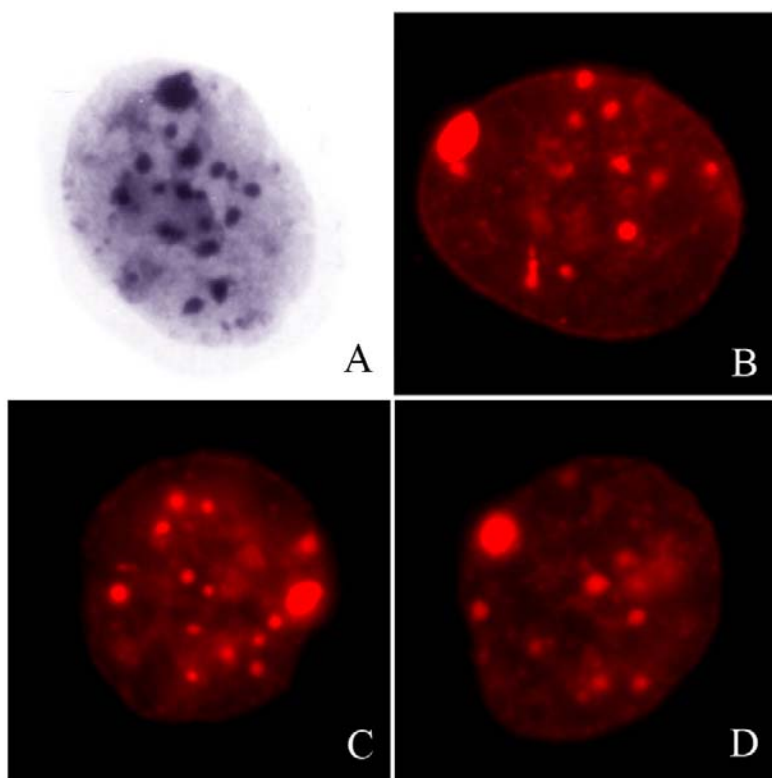
Nagymértékű hasonlóságot találtunk a béta és gamma klónok nem kódoló szekvenciáinak összevetései során is. Mindhárom fajban nagyon hasonlóak voltak a HP1 β klónok start kodont megelőző körülbelül 30 bázispáros szakaszai (91-97% bázisazonosság). A 3' nem átírt régióban (UTR) a hörcsög és emberi szekvenciák bár hosszukban kissé eltértek (1,329 bp és 1,374 bp), bázissorozatuk 87% azonosságot mutatott. Az egér HP1 β 3' UTR sem hosszában (461 bp) sem pedig szekvenciájában nem hasonlított a másik két emlős homológához. A chHP1 γ cDNS-en a 3' nem átíródó szakasz hossza közel azonos volt a három fajban, szekvenciáikban azonosítani tudtunk olyan régiókat (691-1053 bp, 1138-1220 bp, 1601-1816 bp a chHP1 γ cDNS szekvencián), amelyek 84-94% egyezést mutattak, a chHP1 γ cDNS-ének utolsó száz bázispáros szakasza pedig 100%-os homológiát mutatott az egér, 91%-os azonosságot pedig az emberi szekvenciához.

A kínai hörcsög HP1 izoformáinak lokalizációja

A HP1 izoformák lokalizációjának vizsgálatához egy tengeri korallból (*Discosoma*) származó vörös fluoreszcens proteint (DsRed, RFP) használtuk. A HP1 izoformák kódoló szekvenciáinak C terminális végéhez hozzáépítettük a vörös fluoreszcens proteint kódoló DNS szakaszt, majd a fúziós fehérjét időlegesen kifejeztettük (tranzienst transzfekció) C23-Z41 (emberi SATAC-ot hordozó CHO sejtvonal (Csonka et al. 2000) és H1D3-1C2 (nagyméretű egér SATAC-ot hordozó hörcsög-egér hibrid sejt (Kereső et al. 1996) sejtvonalakban. A vizsgálatokat natív kromoszómapreparátumokon végeztük annak érdekében, hogy elkerüljük a hipotonizáló és fixáló oldatok használatát. A metafázisos sejteket begyűjtésük után saját

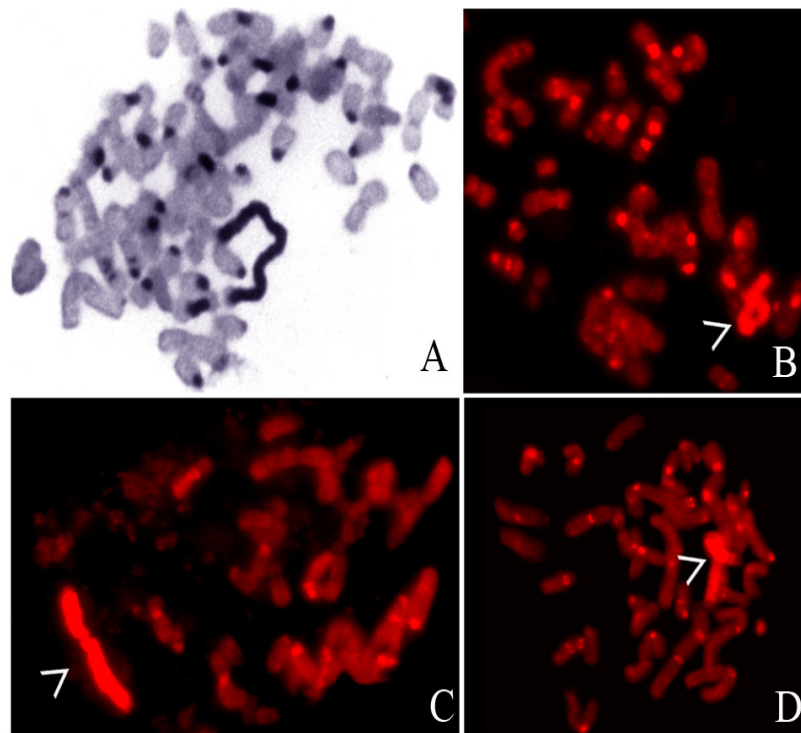
tápoldatakban szuszpendáltuk, egy tárgylemezen szétnyomtuk őket, majd fluoreszcens mikroszkópiával vizsgáltuk bennük a HP1 izoformáinak eloszlását.

H1D3-1C2 interfázisos sejtmagokban mindhárom izoforma jól körülhatárolható foltokban volt megfigyelhető. Ez a lokalizációs mintázat megegyezik a konstitutív heterokromatin kimutatására szolgáló C-sáv festés mintázatával (11. ábra).



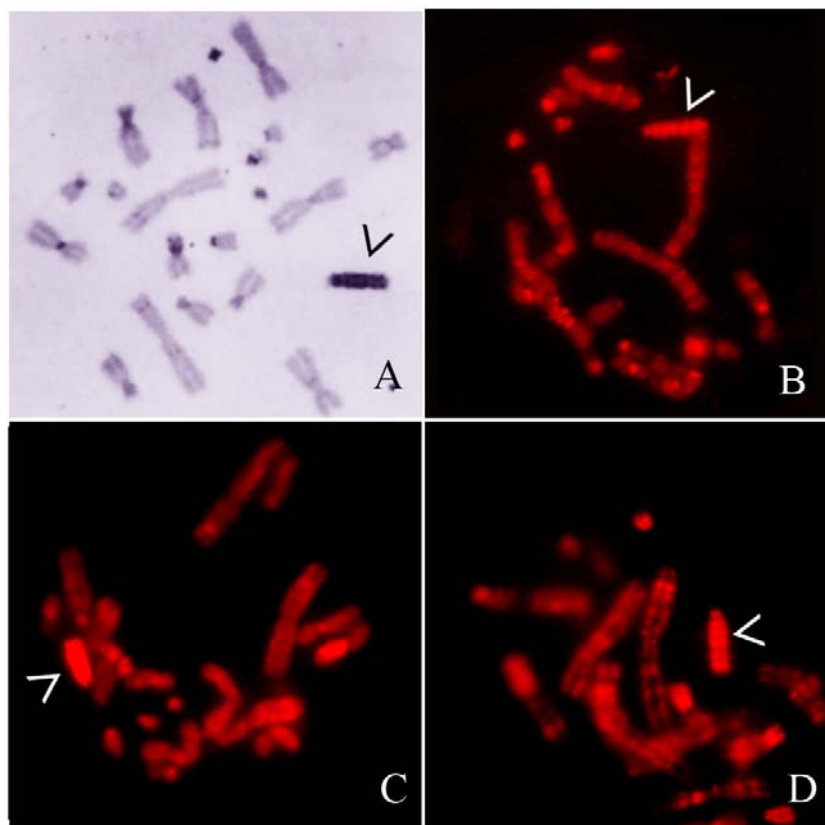
11. ábra: A HP1 izoformák lokalizációja H1D3-1C2 sejtmagokban. **A:** H1D3-1C2 sejtmagok C-sáv festése. **B:** chHP1 α -RFP lokalizációja. **C:** chHP1 β -RFP lokalizációja. **D:** chHP1 γ -RFP lokalizációja.

H1D3-1C2 metafázisos sejtekben mindhárom RFP-vel megjelölt HP1 izoforma döntően a nagy méretű szatellita DNS alapú mesterséges kromoszómákon és az egér kromoszómák centromerikus régióiban dúsult fel. Ez a lokalizációs mintázat nagyfokú hasonlóságot mutat a H1D3-1C2 sejtek kromoszómáinak C-sáv festéséhez (12. ábra).



12. ábra: A HP1 izoformák lokalizációja H1D3-1C2 kromoszómákon. **A:** H1D3-1C2 kromoszómák C-sáv festése. **B:** chHP1 α -RFP lokalizációja. **C:** chHP1 β -RFP lokalizációja. **D:** chHP1 γ -RFP lokalizációja. Az egér mesterséges kromoszómákat nyílhegyek jelzik.

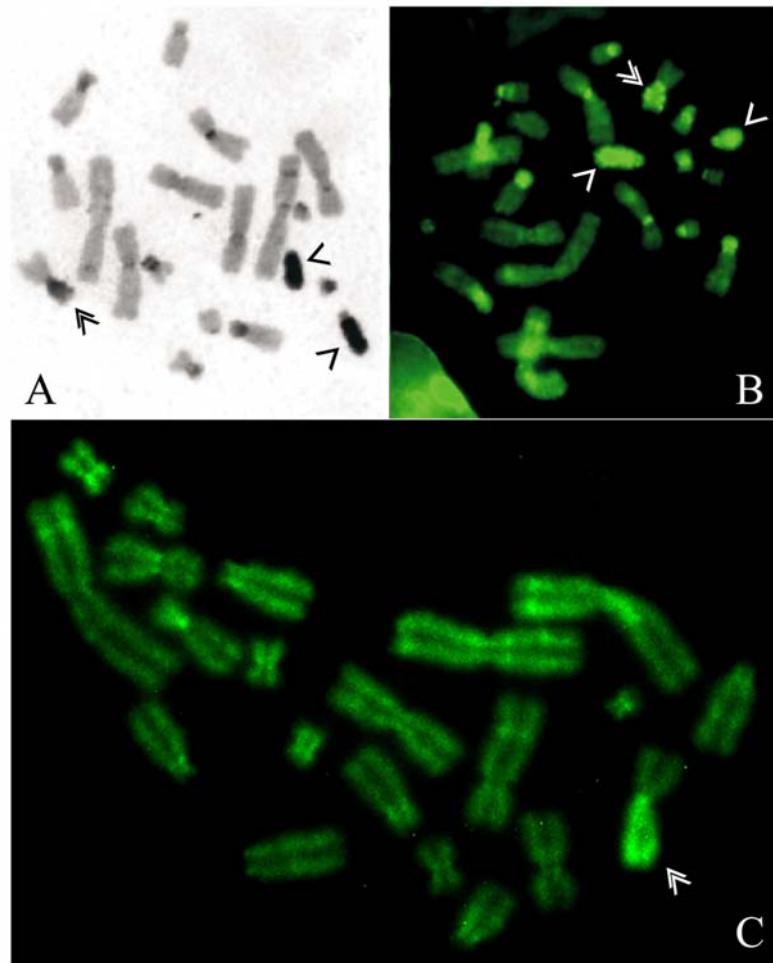
Megvizsgáltuk a HP1-RFP proteinek lokalizációját C23-Z41 (emberi mesterséges kromoszómát hordozó CHO sejtvonala) sejtekben is. A C23-Z41 sejtek mitotikus kromoszómáin a HP1 mindhárom izoformája a legnagyobb mértékben a C-sáv pozitív konstitutív heterokromatikus régiókban dúsult fel. Egy gyengébb, de specifikus lokalizációs mintázatot figyeltünk meg a kromoszómák eukromatikus régióiban is (13. ábra). Ez a mintázat a legkifejezettebb a gamma izoforma esetében volt, ennek eloszlása mind a mesterséges kromoszómák teljes hosszában, mind pedig a hörcsög kromoszómákon finom felbontású sávozottságot mutatott (13.d ábra).



13. ábra: A HP1 izoformák lokalizációja C23-Z41 kromoszómákon. **A:** C23-Z41 kromoszómák C-sáv festése. **B:** chHP1 α -RFP lokalizációja. **C:** chHP1 β -RFP lokalizációja. **D:** chHP1 γ -RFP lokalizációja. A humán mesterséges kromoszómákat nyílhegyek jelzik.

Annak eldöntésére hogy vajon a fluoreszcens fehérje helyzete befolyásolja e a HP1 lokalizációját további vizsgálatokat végeztünk az emberi és hörcsög HP1 alfa izoformáival. N-terminálisan elhelyezkedő zölden fluoreszkáló proteint (GFP) kódoló DNS-t építettünk a hörcsög chHP1 α és emberi HP1^{Hsa} fehérjéket kódoló gének nyitott leolvasási keretei elé. A fúziós proteineket hordozó plazmid DNS-t CHO és C48-5B4 (2 emberi mesterséges kromoszómát hordozó kínai hörcsög sejtvonala; Csonka et al 2000) sejtekbe transzformáltuk, majd szelekcióval olyan stabil klónokat állítottunk elő, amelyekben a konstrukciót hordozó DNS integrálódott a gazdasejt genomjába. C48-5B4 sejtekben a GFP-HP1 a kromoszómákon

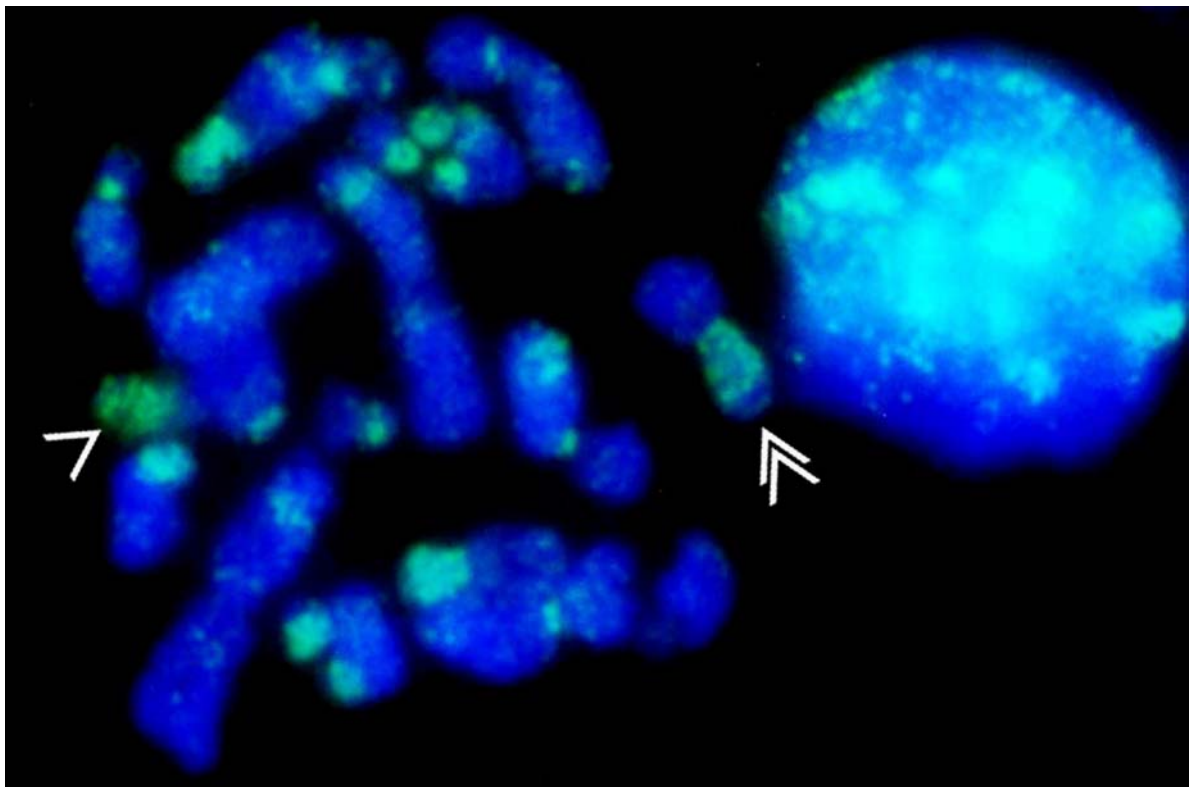
a konstitutív heterokromatint festő C-sáv mintázatának (14.a ábra) megfelelően dúsult fel: döntően a mesterséges kromoszómákon (14.b ábra), a hörcsög X kromoszóma heterokromatikus karján és a hörcsög kromoszómák kisebb kiterjedésű heterokromatikus régióiban halmozódott fel (14. b,c ábrák).



14. ábra: A GFP-HP1 α lokalizációja CHO és C48-5B4 kromoszómákon. **A:** C48-5B4 kromoszómák C-sáv festése. **B:** GFP-HP1 α ^{Hsa} lokalizációja C48-5B4 kromoszómákon. **C:** GFP-chHP1 α lokalizációja **CHO** kromoszómákon. A mesterséges kromoszómákat nyílhegyek, a hörcsög X kromoszómákat dupla nyílhegyek jelzik.

Bár a HP1 izoformák lokalizációját nem befolyásolta, hogy N- vagy C-terminális végükre klónoztuk a riporterfehérjét, megvizsgáltuk azt is, hogy maga a riporterfehérje

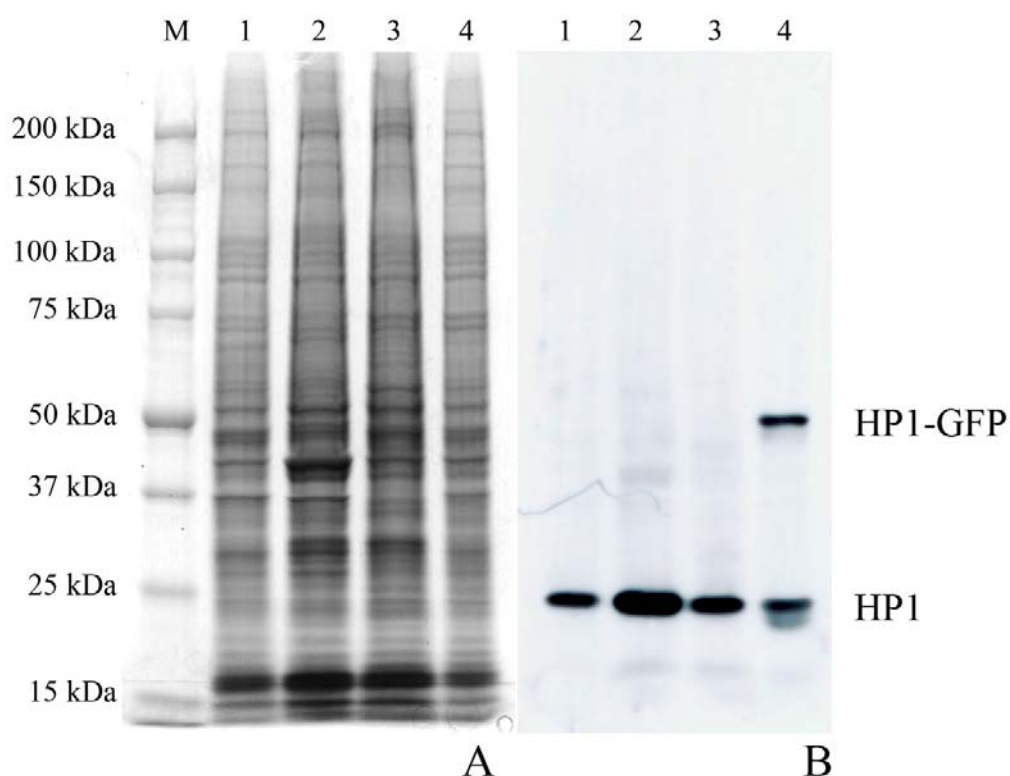
jelenléte módosítja-e a HP1 eloszlását a kromatinban. A kísérletben monoklonális ellenanyag (jellemzése a következő, Kínai hörcsög anti-HP1 α monoklonális ellenanyag című fejezetben) segítségével követtük nyomon a HP1 alfa izoformájának elhelyezkedését C23-Z41 sejtekben. Mind a sejtmagi, mind pedig a kromoszómális HP1 α eloszlása hasonló eredményt adott a fluoreszcens proteinekkel megfigyelt lokalizációhoz (15. ábra), ami azt jelenti, hogy sem a fúziós partner jelenléte, sem pedig a túltermelés nem módosítja alapvetően a HP1 eloszlását.



15. ábra: A C23-Z41-es sejtvonal interfázisos magjainak és mitotikus kromoszómainak immunfestése anti-HP1 α monoklonális ellenanyaggal és FITC-konjugált másodlagos ellenanyaggal (zöld). A DNS-t DAPI-val festettük meg (kék). A mesterséges kromoszómát nyílhegy, a hörcsög X kromoszómát dupla nyílhegy jelzi.

Kínai hörcsög anti-HP1 α monoklonális ellenanyag

A rekombináns HP1 alfa fehérjét invázin bakteriális fehérjével fúzióban prokarióta expressziós rendszerben (pET28 vector) „His-tag”-gel jelöltük meg és expresszáztattuk. Az invázin a *Yersinia* baktériumok külső sejthártyájába ágyazódó fehérje, kísérleteinkben a HP1 α fúziós partnereként abban volt szerepe, hogy fokozza a kis méretű, konzervált szekvenciájú HP1 α elleni immunreakciót az egerekben.



16. ábra: Az anti-HP1 α monoklonális ellenanyag Western blot analízise. **A:** Az 5-20%-os SDS poliakrilamid grádiens gélen szétválasztott teljes sejt fehérje kivonatok Coomassie festése. **B:** Western blot analízis a monoklonális antiHP1 α hibridóma felülúszójával teljes sejt fehérje kivonatokon. M: fehérje molekulatömeg marker; 1-es sávok: CHO-K20 sejt (kínai hörcsög); 2-es sávok: emberi limfocita; 3-as sávok: LMTK⁻ eger sejt; 4-es sávok: GFP-HP1 α fúziós fehérjét kifejező CHO-K20 sejtvonal.

Az ellenanyagot termelő hibridóma klónokat az Anyagok és módszerek fejezetben ismertetett eljárással állítottunk elő. Az ellenanyag specificitását Western blot kísérletekben ellenőriztük CHO-K20 (kínai hörcsög), GFP-HP1 α fúziós fehérjét expresszáló CHO-K20, emberi limfocita sejtek és LMTK⁻ (egér) sejtek teljes-sejt fehérjekivonatain (16. ábra).

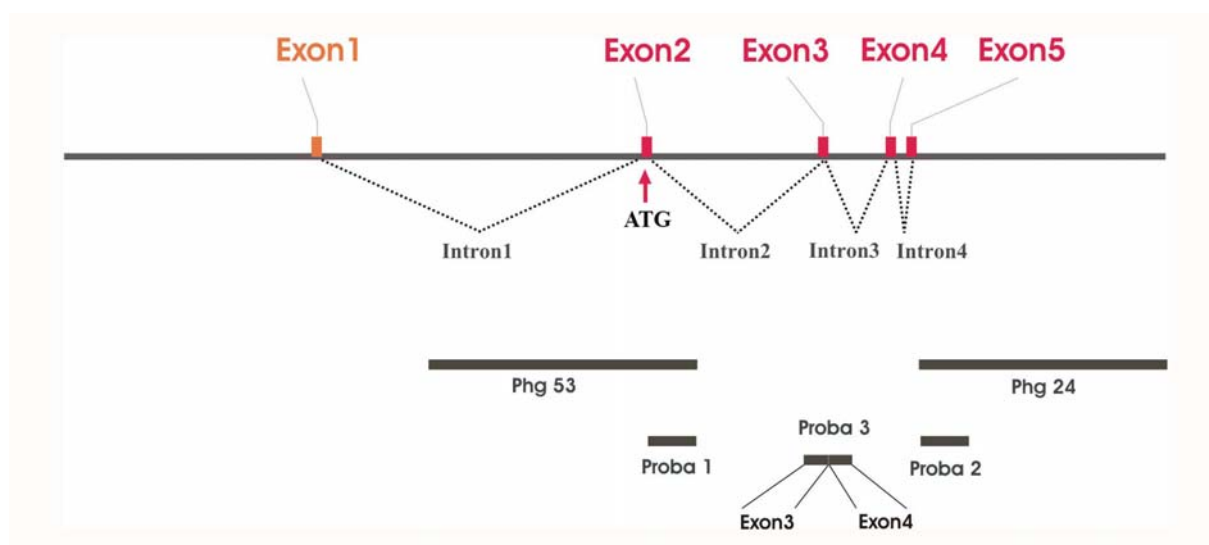
A kínai hörcsög HP1 α gén genomikus szekvenciájának azonosítása

Az emberi HP1^{Hs α} -t kódoló régiót hordozó DNS próba alkalmazásával 2 fágklónt azonosítottunk egy genomikus lambda fág könyvtárból plakkebridizációval. A könyvtárból körülbelül 250 000 fágot vizsgáltunk át, amely a kínai hörcsög teljes genomját nagyjából egyszeresen reprezentálta. Az azonosított fágok által hordozott DNS fragmentumokat restrikciós endonukleázokkal végzett hasítás alapján térképeztük, átfedő szubklón-sorozatokat készítettünk belőlük és meghatároztuk bázissorrendjüket. Az egyszeri szekvenálás számára hosszúnak bizonyuló szubfragmentek ismert bázissorrendjére primereket terveztünk, majd ezek felhasználásával addig folytattuk a szekvenálást és újabb folytatólagos primerek tervezését, míg az adott fragmentet teljesen átfedő szekvenciát kaptunk (primer walking). A fágok által hordozott DNS-ek bázissorrendjének analízise azt mutatta, hogy az egyik közülük (phg53) a HP1 α mRNS-ének első átírt exonját hordozza (exon 2 a jele, mivel az első exonról nincs fehérjeátírás), míg a másik fág (phg24) az utolsó átírt exont (exon 5) hordozza (17. ábra). A második és harmadik átírt exonokat (exon 3 és exon 4, 17. ábra) hordozó fágok azonosításához további DNS próbákat állítottunk elő:

- próba1: PCR segítségével sokszorozítottuk a phg53 (a HP1 α transzkripciójának iránya szerinti) utolsó 2,7 kb-os szakaszát;

- próba2: izoláltuk a phg24 (a HP1 α transzkripciójának iránya szerinti) első 1,5 kb-os fragmentjét;

- próba3: primereket terveztünk az emberi HP1 α cDNS harmadik és negyedik exonjára, majd ezekkel a primerekkel exon 3-4 specifikus próbát sokszorozítottunk egy erre alkalmas emberi cDNS könyvtárból (17. ábra).



17. ábra: A *chHP1 α* gén szekezete és genomikus szekvenciákat hordozó a phg53 és phg24 fágok inszertjeinek viszonylagos pozíciója. A piros négyzetek az exonokat jelzik, a nyíl mutatja az átírás kezdőpontját. A négyzetekkel jelzett szekvenciaszakaszok az ábrán nem méretarányosak. Bővebb magyarázat a szövegben olvasható.

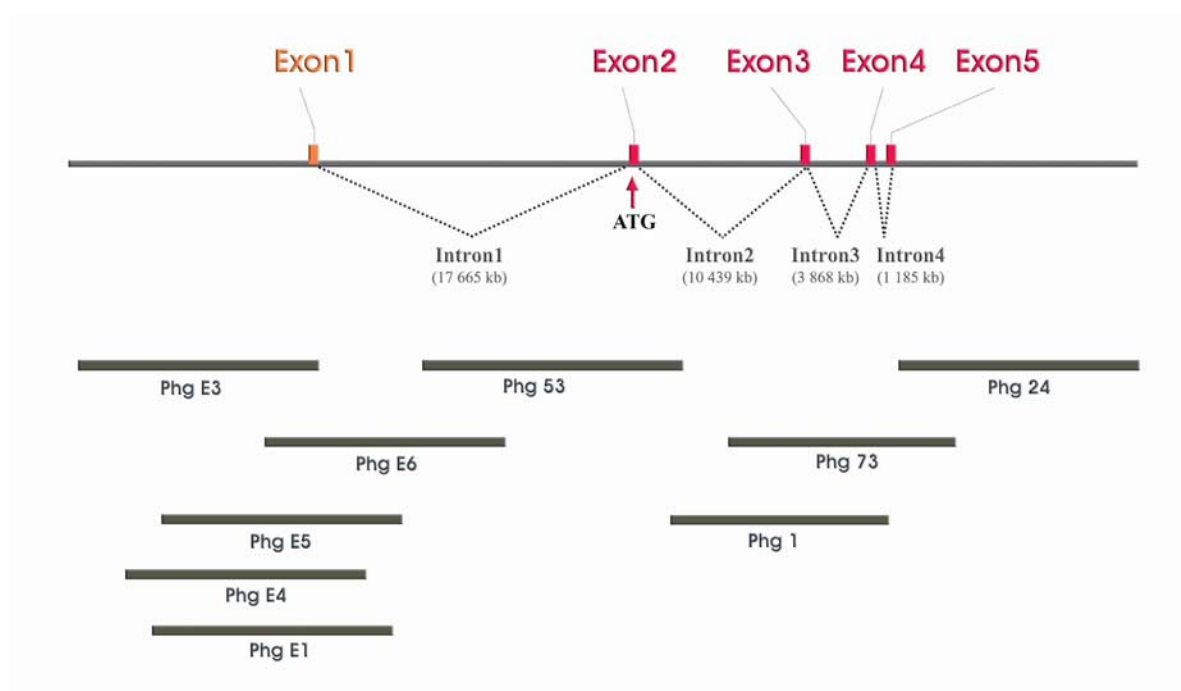
A próbáink felhasználásával a genomikus fágkönyvtárból 11 újabb fágklónt azonosítottunk.

A fágok által hordozott DNS bázissorrendjét részlegesen meghatároztuk a fágkarokról induló primerekkel, továbbá Southern blot hibridizációban analizáltuk őket a fágkönyvtár vizsgálatához felhasznált próbák segítségével. További vizsgálat céljából azokat a klónokat választottuk ki, amelyek a Southern hibridizáció alapján hordozták az exon 3-4-es kódoló régiót, másrészt pedig a részleges bázissorrend meghatározásukból származó adatok alapján a

legkisebb átfedést mutatták a már meglevő genomikus szekvenciáinkkal. A továbbiakban tehát csak azokat a fágklónokat vizsgáltuk tovább (phg1 és phg73, 18. ábra), amelyek a legnagyobb átfedést adták a hiányzó genomikus szakaszok irányába. A phg1 és phg73 által hordozott DNS fragmentumokat restrikciós endonukleázokkal végzett hasítás alapján térképeztük, átfedő szubklónsorozatokat készítettünk velük, majd primer walking segítségével megállapítottuk bázissorrendjüket.

A genomikus szekvencia 5' végének irányába (az exon1 felé) többszöri kísérlet után sem tudtunk továbblépni a már meglevő phg53-as fág szekvenciája alapján tervezett hibridizációs próbák segítségével, mert a fágnek ezen része nagy mértékben ismétlődő, szatellita szekvenciákat tartalmazott, aminek következtében újra és újra a HP1 genomikus régiójától teljesen független szekvenciájú fágklónokat azonosítottunk. Mivel a genomikus szekvenciából 5' irányban csupán az exon1 rövidke (109 bp), GC-gazdag szekvenciadarabját ismertük, ennek a segítségével kíséreltük meg a továbbhaladást. A *chHP1 α* cDNS-ének szekvenciája alapján tervezett primerek segítségével sokszorozítottuk az exon 1-nek megfelelő DNS szakaszt, majd e próba segítségével plakkhibridizációval vizsgáltuk a hörcsög genomikus fágkönyvtárát. A genomot körülbelül 2,5-szer reprezentáló fágok vizsgálata során 5 új fágklónt azonosítottunk (phgE1, E3, E4, E5, E6) (18. ábra). A fágok inszertjeinek bázissorrendjét részlegesen meghatároztuk a fágkarokról induló primerekkel, a további vizsgálatokban pedig azt az egyetlen fágklónt használtuk fel (phgE6), amelynek szekvenciája átfedést mutatott a már ismert DNS-ekből összeépített folyamatosan genomikus szakasszal. A phgE6 DNS-ét restrikciós enzimek hasítási mintázata alapján térképeztük, inszertjére átfedő szubfragmentsorozatokat készítettünk, majd primer walking stratégiával meghatároztuk bázissorrendjét. A *chHP1 α* gén bázissorrendjéből az átfedő fágok szekvenciáinak összeillesztése során 43 845 bp-t határoztunk meg (GenBank Acc.No.:AY550262).

A hörcsög, emberi és egér HP1 α gének és az azokat hordozó cDNS-ük összevetése azt mutatta, hogy a *chHP1 α* gén alapvető szerkezete megegyezik a már ismert emlősfajok homológjaival: exonjainak és intronjainak száma megegyezik az emberi és egér homológok exonjainak és intronjainak számával (18. ábra). Az intronok 5' végein megfigyeltük a GT, 3' végeiken az AG szekvenciák konzervativizmusát, ami megfelel a hirtvivő RNS érésben leírt általános szabályszerűségeknek (Harvey Lodish et al., 2000).

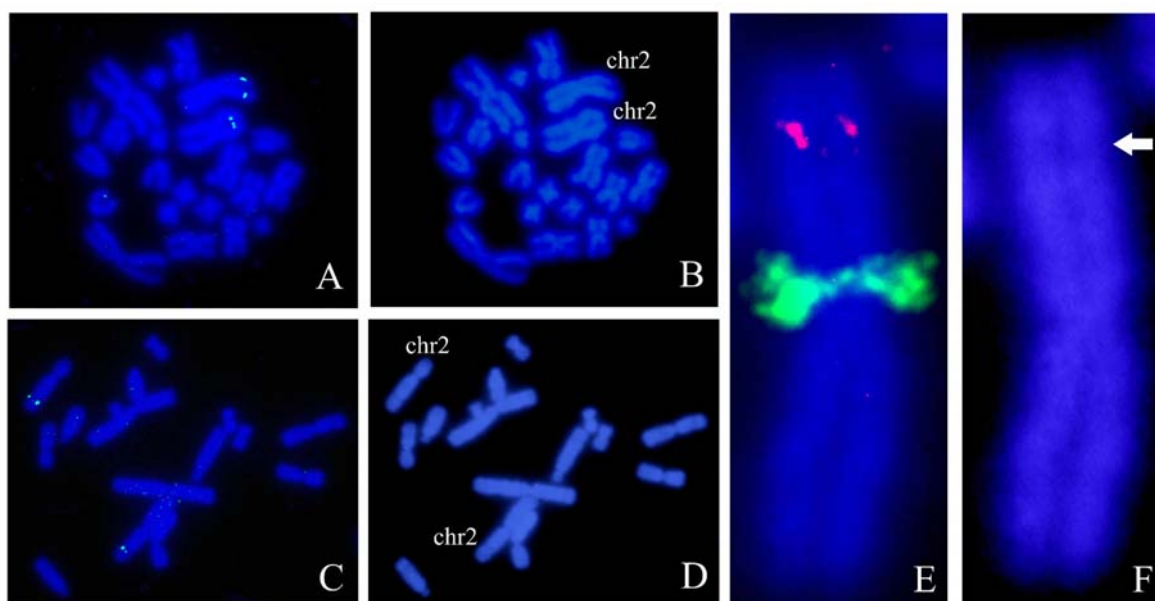


18. ábra: A *chHP1 α* gén szerkezete és a genomikus szekvenciákat hordozó fágok inszertjeinek viszonylagos pozíciója. A piros négyzetek az exonokat jelzik, a nyíl mutatja az átírási kezdőpontját. Kék négyszögekkel jelöltük a mindhárom emlősfajban konzervatív HP1 intronszekvenciák hozzávetőleges helyzetét. A négyzetekkel jelzett szekvenciaszakaszok az ábrán nem méretarányosak. Az ábra nem tünteti fel a vizsgálatunk során azonosított összes fágklónt.

Az első exonról nincs fehérjeátírás, a transzláció a második exonban kezdődik. Az intronok mérete és szekvenciája nem mutatott hasonlóságot a három emlősben. Jól ismert és jellemzett szatellita és egyéb moderáltan ismétlődő szekvenciákon kívül, három olyan szekvenciaszakaszt találtunk, amelyek nagyobb (85-88%) azonosságot mutattak mindhárom fajban (a *chHP1 α* genomikus szekvencián ezek a 6 326-6 626 bp-os és az 21 405-23 310 bp-os régiók (intron 1) és a 36 740-37 210 bp-os régió (intron 3).

A kínai hörcsög HP1 α gén kromoszómális térképezése FISH-el

A *chHP1 α* gén kromoszómális térképezését fluoreszcens *in situ* hibridizációval végeztük tenyésztett fibroblaszt (CHO-K20) és kínai hörcsög lépéből származó limfocita sejteken. A próba a genomikus szekvenciákat hordozó fágok (phg24, phg53, phg73, phg1, phg53, phgE6, és phgE3) DNS-einek keveréke volt. A *chHP1 α* genomikus lókusza a 2-es kromoszóma rövid karjára, a másodlagos befűződéstől disztálisan, a rövid kar utolsó harmadára térképeződött. A 2-es kromoszóma rövid karját a csoportunkban korábban leírt, a rövid kar pericentromerikus régiójára specifikus HUCAFF 170-es szatellita próbával (Fatyol et al., 1994) azonosítottuk (19. a-f ábra).



19. ábra: A *chHP1α* gén fluoreszcens *in situ* hibridizációs (FISH) térképezése kínai hörcsög kromoszómákon. **A:** FISH hörcsög lép limfociták metafázisos kromoszómaín. A genomikus szekvenciát hordozó fágok DNS-ének keverékét biotinnal jelöltük (zöld); a kromoszómákat 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-val festettük. **B:** DAPI-val festett hörcsög lép limfocita kromoszómák. **C:** FISH CHO-K20 sejtek kromoszómaín a genomikus szekvenciát hordozó fágok DNS-ének keverékével (zöld). A kromoszómákat DAPI-val festettük. **D:** DAPI-val festett CHO-K20 sejtek kromoszómaí. **E:** Két színű FISH hörcsög 2-es kromoszómákon biotinnal jelölt 2-es kromoszómaspecifikus szatellita DNS próbával (HUCAFF 170 szatellita) (zöld jel) és digoxigenin (DIG)-jelölt *chHP1α* specifikus DNS próbával (piros jel). **F:** DAPI-val festett hörcsög 2-es kromoszóma. A nyíl a másodlagos befűződést jelzi a kettes kromoszóma rövid karjának utolsó harmadában.

Eredmények tárgyalása

A kínai hörcsög HP1 izoformái

A HP1 izoformái nem-hiszton típusú kromoszómális fehérjék, melyek alapvető szerepet játszanak a heterokromatin felépítésében. Dolgozatom arra kereste a választ, hogy megtalálhatók-e ezek a fehérjék a kínai hörcsög sejteiben is, egy olyan élőlényben, amelynek kromoszómáin csak csekély heterokromatin található. A kínai hörcsögből azonosítottuk az emberből és egérből már ismert mindhárom izoformát. cDNS-ük kódoló régióinak szekvenciája konzervatívnak bizonyult mindhárom emlősfajban, több mint 90%-os azonosságot mutattak. A cDNS-ük bázissorendje alapján származtatott aminosavszekvenciáik ugyancsak konzervatívak voltak: a HP1 γ teljesen megegyezett mindhárom fajban, a chHP1 α és chHP1 β csupán egyetlen aminosavban különböztek egér homológjaiktól, míg a chHP1 α és az emberi HP1^{Hsa} fehérjeszekvenciájában mindössze 5 aminosav eltérést találtunk. A konzervatív funkcionális szakaszokban csupán egyetlen különbség volt, de ez nem olyan aminosavat érintett, amelynek fontos szerepe van a „chromodomain” MetH3K9 hiszton kötésében, vagy e szerkezeti elem háromdimenziós szerkezetének kialakításában (Eissenberg, 2001; Nielsen et al., 2002b). Annak érdekében hogy megtudhassuk, hogy a hörcsög izoformákban talált csekély számú aminosavkülönbségek okozhatnak e különbséget a lokalizációjukban, megvizsgáltuk az izoformák sejten belüli eloszlását natív kromoszóma és sejtmagi preparátumokon (a részletek később olvashatók). A cDNS-ek szekvenciáinak konzerváltsága nem korlátozódott a kódoló régiókra, az alfa izoforma esetében mind az 5' mind a 3' nem átírt régió (UTR) nagyfokú hasonlóságot mutatott. A béta izoforma esetében a start kodont megelőző 30 bp-os szakasz szinte azonos volt minhárom fajban. A hörcsög és

emberi HP1 β 3' UTR szekvenciák bizonyos szakaszai nagy mértékben hasonlóak, az egér HP1 β 3' UTR bázissorendje azonban ezektől mind hosszúságában, mind szekvenciájában különbözik. Erősen konzervatív szekvenciaszakaszokat a gamma izoforma 3' UTR-ben is megfigyeltünk. A cDNS szekvenciák hasonlósága nem terjed ki a cDNS-ek teljes hosszára, mind az 5', mind pedig a 3' UTR-ben bizonyos szakaszok mutatnak konzervativizmust, míg más szekvenciárészek egyediek. Az a tény, hogy bizonyos szekvenciák mindhárom fajban megtalálhatóak valamilyen funkcionális szerepre utal, ezeket a funkciókat azonban nem ismerjük. A különböző izoformák nem átvitt régiói nem hasonlítanak egymáshoz, ami arra utalhat, hogy az egyes izoformák más más transzlációs szabályozás alatt állnak.

A kínai hörcsög HP1 α génje

A HP1 α génjének alapvető szerkezete megegyezett hörcsögben, emberben és egérben: a gén 5 exonból és az ezeket elválasztó 4 intronból áll. A fehérje átírása a második exonból kezdődik, az első exonnak vélhetően szabályozó szerepe lehet, mint azt más fehérje esetében már leírták (Gottgens et al., 2002). Bár sem az intronok mérete, sem azok szekvenciái nem voltak hasonlóak a három emlősfajban, az első intronban két, a harmadik intronban egy olyan genomikus szakaszt azonosítottunk, amelyek nagyban hasonlítanak mindhárom emlősben és nem ismétlődő szekvenciákhoz tartoznak. Ezeknek a genomikus régióknak nem ismerjük a szerepét, a konzervativizmusuk azonban arra utal, hogy valamilyen funkciójuk lehet, transzkripciós enhanszer vagy egyéb transzkripciós szabályozó szereppel bírhatnak.

A *chHP1 α* gén kromoszómális helyét fluoreszcens *in situ* hibridizációval határoztuk meg. FISH jelet csak a 2-es kromoszóma rövid karján kaptunk, amely arra utal, hogy a *chHP1 α* gén egy példányban van jelen a kínai hörcsögben, vagy ha több génje van, azok

azonos citológiai lokalizáltságúak. In situ hibridizációval kimutatható, eltérő lokalizáltságú pszeudogéneket nem találtunk a hörcsög genomban.

A kínai hörcsög HP1 izoformák lokalizációja

Az emlősök sejtjeiben a HP1 α a konstitutív heterokromatinnal asszociált: a kromoszómák centromerikus és pericentromerikus régióiban figyelték meg (Horsley et al., 1996; Minc et al., 1999; Yamada et al., 1999; Minc et al., 2001). A HP1 β és HP1 γ izoformák lokalizációja metafázisos kromoszómákon már ellentmondásosabb: a HP1 β -ről korábban kimutatták, hogy az egérkromoszómák centromerikus és pericentromerikus régióiban lokalizálódik (Nicol and Jeppesen, 1994; Wreggett et al., 1994; Furuta et al., 1997); Saffery és munkatársai. azonban csak néhány, de nem az összes metafázisos kromoszómán tudták detektálni (Saffery et al., 1999). A HP1 β és HP1 γ esetében a lokalizáció vizsgálatát nagyban megnehezíti az epitop N-terminális maszkolása, ami azt jelenti, hogy a HP1 N-terminálisát felismerő ellenanyagok számára a heterokromatinba ágyazott epitop csak igen korlátozott mértékben hozzáférhető (Saunders et al., 1993; Nicol and Jeppesen, 1994; Furuta et al., 1997; Minc et al., 2000). Emiatt számos kísérleti ellentmondás született: Horsley és munkatársai szerint az M32 (az egér HP1 γ) nincs a kromoszómák heterokromatikus régióiban (Horsley et al., 1996), míg mások megfigyelték a feldúsulását mind az eukromatinban, mind pedig a heterokromatinban egér és emberi sejtekben is (Minc et al., 2000; Minc et al., 2001).

A kromatinfehérjék immunlokalizációját a metafázisos kromoszómákon nemcsak az N-terminálisos maszkolás befolyásolja, hanem a kísérleti körülmények is: azok a körülmények, amelyek hozzáférhetővé teszik a kromatinfehérjéket az ellenanyagok számára szétzilálják a kromatin szerkezetét, olyan körülmények viszont, amelyek megőrzik a struktúrát, az ellenanyag számára hozzáférhetetlenné teszik az epitopot (Minc et al. 2001). Az

immunfestésben használt rögzítőszer (formaldehid, paraformaldehid, glutáraldehid) megváltoztathatják a vizsgált fehérje epitopjának szerkezetét (Minc et al., 2001).

A lokalizációs vizsgálatokhoz fúzionált fluoreszcens riporterfehérjéket is alkalmaztak, de ennek ellenére is születtek ellentmondásos kísérleti adatok: Sugimoto és munkatársai GFP-hez fúzionált HP1 β és HP1 γ fehérjéket nem találtak az emberi kromoszómák centromerikus régióiban (Sugimoto et al., 2001), ugyanakkor GFP-vel készült fúziós riporterfehérjék segítségével mások azt mutatták ki, hogy a HP1 γ mind az eukromatinban mind pedig a heterokromatinban lokalizálódik (Minc et al., 2000). HP1 β és HP1 γ izoformákat sárgán fluoreszkáló proteinhez hozzákapcsolva csak gyengén vagy egyáltalán nem tudtak kimutatni az emberi kromoszómák centromerjében. A HP1 α izoforma lokalizációját vizsgálták vörös fluoreszcens (DsRed) riporterfehérjével is, az ektópikusan expresszált fúziós fehérje a immunlokalizációhoz hasonlóan a heterokromatinban halmozódott fel egér és indiai muntyákszarvas sejtekben (Sugimoto et al., 2001).

Kísérleteinkben a HP1 izoformák lokalizációjának vizsgálatához mi is GFP-HP1 és HP1-DsRed fúziós riporterfehérjéket alkalmaztunk, a riporterfehérjékkel kapott eredményeinket pedig ellenanyaggal végzett immunfestéssel megerősítettük.

A HP1 izoformáinak lokalizációját olyan hibrid sejtvonalakban vizsgáltuk, amelyek hörcsög-, valamint heterokromatikus egér-, és szatellita DNS alapú mesterséges kromoszómákat hordoztak (H1D3-1C2 sejtvonala) és megvizsgáltuk olyan sejtvonalaiban is, amely hörcsög- és szatellita DNS alapú mesterséges kromoszómákat (C23-Z41 sejtvonala) hordoz. Az HP1 fehérjék lokalizációját tehát teljesen azonos sejten belüli körülmények között, de különböző fajokból származó és különböző mértékben heterokromatinizálódott kromoszómarégiókon követtük nyomon, ami lehetővé teszi, hogy összevethessük az eu- és heterokromatikus régiók közti lokalizációs különbségeket. Mivel mindhárom izoforma

lokalizációját azonos kísérleti körülmények között, azonos riporterfehérjék segítségével, azonos sejttípusokon vizsgáltuk, ezáltal összevethetők egymással az egyes izoformákkal kapott lokalizációs mintázatok is. A kísérletekben natív kromoszóma- és sejtmagi preparátumokat használtunk, amelyben a hipotonizáló és keresztkötő oldatok nem befolyásolták a kromatin szerkezetét és a HP1 kromoszómális eloszlását. Megfigyeléseink alapján a HP1 mindhárom izoformája elsősorban a heterokromatikus régiókban lokalizálódott és bár lényegesen kisebb mértékben, de mindhárom izoformát megfigyeltük eukromatikus kromoszómális régiókban is, a HP1 gamma izoforma esetében pedig a natív kromoszóma-preparátumokon egy egészen finom felbontású, sávozott eloszlást mutattunk ki.

A fentebb leírt N-terminális maszkolás jelenség arra utalhat, hogy a HP1 izoformák N-terminális végüknél fogva (a „chromodomain” felől) ágyazódnak a zárt szerkezetű heterochromatinba, C-terminális végük a zárt struktúrából kifelé, az ellenanyagok számára könnyebben hozzáférhető módon helyezkedik el. Kísérleteinkben azt is megvizsgáltuk hogy befolyásolja-e a HP1 heterochromatinba történő kötődését az, hogy a fehérje melyik végére fűzionáljuk a riporterfehérjét. Mind a C-, mind pedig az N-terminális végre fűzionált riporter fehérjék összehasonlítható, azonos lokalizációt mutattak a natív kromoszómapreparátumokon, azaz a fűziós partner HP1-hez viszonyított pozíciója nem befolyosolta a heterochromatikus lokalizációt.

Erős, virális promóterekről történő expresszió esetén a rekombináns fehérjék mennyisége jelentős mértékben meghaladhatja a sejten belüli, szabályozott fehérjeszintet. A feleslegben levő fehérjék ektópikus helyekre kötődhetnek, de szélsőséges esetben a normális szintet meghaladó mennyiségű fehérjétől a sejtek aggregátumok képzésével szabadulhatnak meg. Monoklonális ellenanyag segítségével ellenőriztük, hogy az erős virális promóterről termelődő chHP1 α izoforma lokalizációs mintázata megegyezik az endogén, szabályozott

módon termelődő fehérje sejten belüli eloszlásával. Az ellenanyag kevésbé festette meg a kromoszómák eukromatikus régióit mint ahogyan azt a fluoreszcens fehérjékkel megfigyeltük, ez a különbség azonban a kétféle kísérlet detektálási sajátásaival magyarázható: direkt immunfluoreszcencia esetében (fúzionált riporterfehérjékkel végzett vizsgálat) a jelölt fluoreszcens proteint közvetlenül detektáljuk, ebben az esetben a kromatinban kötődő fehérje mennyisége lineárisan arányos a mikroszkópban megfigyelt jel nagyságával, indirekt immunfluoreszcencia esetében azonban az elsődleges ellenanyaghoz több másodlagos (fluoreszcens festékkel kapcsolt) ellenanyaggal is kötődhet, a jel erősítése nagyobb mértékű a lineárisnál. A kísérlet egyben azt is bizonyítja, hogy a HP1-hez fúzinált riporterfehérjék nem akadályozzák a megfelelő kromoszómális eloszlást/ lokalizációt.

Annak ellenére, hogy a kínai hörcsög kromoszómáin nincs citológiai értelemben vett kiterjedt konstitutív heterokromatin, a HP1 mindhárom izoformája megtalálható hörcsög sejtekben. Ezek az izoformák szinte teljesen megegyeznek a már ismert emlős homológokkal. Lokalizációjuk alapján feltételezhető, hogy hasonló módon részt vesznek a kromatinszerkezet felépítésében, mint az ismert emlős ortológok. Eredményeink azt mutatják, hogy a heterokromatin hiánya a kínai hörcsögből nem a HP1 hiányának vagy specális aminosavösszetételének a következménye, a hörcsögsejtekben megtalálhatók azok a fehérjekomponensek, amelyek képesek felépíteni a heterokromatint a szatellita DNS alapú mesterséges kromoszómákon.

Emberi és egér sejtekben a heterokromatint alkotó szatellita DNS túlnyomó része viszonylag rövid ismétlődő szakaszokból (<1 kb) épül fel, míg hörcsögben -eltekintve a centromerikus TTAGGG ismétlődésektől-, a szatellita szekvenciák jóval összetettebbek, az ismétlődő szakaszok egységeinek hossza messze meghaladja az emberi és egér szatelliták

egységeinek hosszát (Ouspenski and Brinkley, 1993; Fatyol et al., 1994; Faravelli et al., 1998). A rövid, tandem repetitív szekvenciákból felépülő humán és egér szatellita DNS alapú mesterséges kromoszómák hörcsögsejtekben heterokromatikusak. Mindezek alapján valószínű, hogy a hörcsög sejtekben a heterokromatin korlátozott mennyiségének az oka nem a HP1 hiánya vagy speciális aminosavösszetétele, hanem a kínai hörcsög kromoszómáinak speciális szatellita DNS tartalma.

Összefoglalás

Az eukarióta sejtek örökítőanyaga a DNS, fehérjékkel alkotott komplexekben a kromatinba ágyazottan található a sejtmagban. Az örökítőanyag a sejtek osztódásakor kromoszómák formájában jelenik meg. A kromoszómákon eukromatikus és eltérően festődő heterokromatikus régiók különböztethetők meg. Az eukromatikus szakaszok hordozzák az átíró gének döntő többségét, míg a heterokromatikus régiókban a DNS szorosan a kromatinba ágyazott, az expresszázó gének száma csekély. A kromoszómák heterokromatinját két csoportra oszthatjuk a kromatinszerkezet molekuláris felépítése és a sejtciklus bizonyos szakaszaiban és bizonyos specializálódott szövetekben való megjelenése alapján: konstitutív és fakultatív heterokromatinra. A fakultatív heterokromatin a sejtek egy életszakaszában epigenetikus hatásokra kialakuló represszív kromatinrégió, ma még nem pontosan tisztázott, hogy milyen szerkezeti vonásaiban különbözik a konstitutív heterokromatintól. A konstitutív heterokromatin a sejtek egész életciklusa során megfigyelhető, még az interfázisos magokban is, kialakításáért elsősorban az evolúciósan konzervált heterokromatin protein 1 (HP1) a felelős.

A HP1 fehérjecsalád tagjai kisméretű proteinek, három (alfa, béta és gamma) izoformával rendelkeznek. Az egyes izoformák különböznek egymástól lokalizációs mintázatukban, funkcióik vélhetőleg részben átfedőek, részben specifikusak. Konstitutív heterokromatint megfigyelhetünk a legtöbb emlősfaj kromoszómáinak pericentromerikus régióiban. Egy ritka kivétel a kínai hörcsög, amelynek kromoszómáin nincs citológiai értelemben vett kiterjedt konstitutív heterokromatin. Ez az egyik oka annak, hogy a kínai hörcsög sejtvonalak fontos szerepet töltenek be a mesterséges kromoszóma technológiában: a

hörcsög sejtekben az erősen heterokromatikus szatellit DNS alapú mesterséges kromoszómák egyszerű citológia módszerekkel nyomon követhetők.

Vizsgálatainkban arra kerestük a választ, hogy a kínai hörcsög sejtekben megfigyelt csekély mértékű heterokromatinizációnak lehet-e az oka a HP1 hiánya? Megtalálhatók-e a HP1 izoformái a hörcsög sejtekben, szerepet játszanak-e a szatellit DNS alapú mesterséges kromoszómákon kialakuló heterokromatin felépítésében, vagy esetleg más fehérje helyettesíti őket?

Kimutattuk, hogy a HP1 mindhárom izoformája megtalálható a kínai hörcsögben. A HP1 izoformáinak aminosavsorrendje alig különbözik az eddig ismert emlős (egér és emberi) HP1 proteinek aminosavsorrendjétől. Az eltérő aminosavak a funkció szempontjából nem lényeges, nem konzervatív pozíciókban vannak.

Elvégeztük a fehérjeizoformák fúziós riporterfehérjék segítségével történő lokalizációs vizsgálatát natív kromoszóma preparátumokon. Vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy a kínai hörcsög sejtekben a HP1 fehérjék éppúgy felhalmozódnak a szatellit DNS alapú mesterséges kromoszómákon kialakuló heterokromatinban mint más magasabbrendű eukarióták kromoszómáin a pericentromerikus régiókban, vagyis a hörcsög HP1 izoformái részt vesznek a konstitutív heterokromatin felépítésében. A fluoreszcens riporterfehérjékkel végzett vizsgálataink eredményeit megerősítettük a sejten belül, természetes módon termelődő fehérjék elleanyaggal történő festésével.

Izoláltuk a kínai hörcsög HP1 alfa izoformájának génjét, meghatároztuk bázissorrendjét és tenyésztett laboratóriumi szövetkultúrákból valamint élő állatból származó sejtek kettes kromoszómáinak rövid karjára térképeztük.

Kísérleteink eredményei bizonyítják, hogy a kínai hörcsögben megvannak a konstitutív heterokromatin kialakításához szükséges fehérjekomponensek, a konstitutív heterokromatin

hiányának oka a hörcsög kromoszómákról nem a HP1 hiánya vagy speciális aminosavösszetétele, hanem vélhetően a hörcsögek kromoszómák sajátos szatellit DNS tartalma.

A doktori értekezés a „Cloning, characterization and localization of Chinese hamster HP1 isoforms” című közlemény alapján készült (Szakal et al., 2004).

Summary

In the nucleus of eukaryotic cells, the DNA interacts with a large number of proteins, and forms a tightly-packed DNA-protein complex called chromatin. During cell divisions the genetic material is further compacted, which results in the formation of chromosomes. The degree of DNA packaging is diverse along the chromosomes, the genome is organized into euchromatic and heterochromatic regions and give rise to distinct functional domains. Heterochromatin is the most condensed region of the genome that intensively stained throughout the cell cycle. The majority of the expressed genes are in the euchromatic regions; in the heterochromatin, the number of transcriptionally active genes is very low due to the tightly packed structure of the chromatin. There are two functionally distinct forms of heterochromatin. The facultative heterochromatin is condensed and inactive in only certain developmental stages, due to epigenetic modifications. The constitutive heterochromatin remains condensed and inactive throughout the life cycle of the cells on both members of the homolog chromosome pairs. The structural attributes characterizing the facultative or the constitutive heterochromatin are not yet completely known. The main protein component of the constitutive heterochromatin is HP1 (heterochromatin protein 1), which is a highly conserved protein, in the eukaryotes.

There are three isoforms of HP1, in all eukaryotic species studied so far. The isoforms exhibit different localization patterns along the chromosomes, and presumably have both redundant and specific functions.

There are large constitutive heterochromatic blocks in the chromosomes of most mammals. Chinese hamster is one of the few mammalian species that are characterized by the relatively poor heterochromatin content. This is one of the reasons why hamster cell lines are

important in the artificial chromosome technology; in these cells, the highly heterochromatic satellite DNA based artificial chromosomes (SATAC) may be easily examined by simple cytological techniques. It was intriguing to test whether or not the lack of large blocks of heterochromatin in the hamster chromosomes could be correlated with the absence or species-specific alterations of the HP1 proteins, the main structural components of heterochromatin. Furthermore, it was important to test whether the heterochromatic nature of SATACs in Chinese hamster cells is due to other hamster-specific heterochromatin-binding proteins substituting HP1. To answer all these questions we attempted the isolation, identification and characterization of HP1 proteins from Chinese hamster.

All three known HP1 isoforms have been identified in hamster. High degree of sequence conservation was observed in the amino acid sequences of the hamster isoforms compared with the known mammalian (human and mouse) orthologues. Divergent amino acids were found only outside of the functionally significant, highly conserved positions.

Using fluorescent reporter-proteins fused to HP1 we have established the localization of the HP1 isoforms on native chromosome preparations. We have found, that all three HP1 isoforms were enriched on the heterochromatic SATACs, similarly to the preferred localization of HP1 proteins in the pericentric regions of other higher eukaryotic chromosomes. These results have been confirmed by indirect immunofluorescent studies using HP1-specific monoclonal antibody. We have demonstrated that all three HP1 isoforms contribute to the chromatin structure in a similar way as was described for the mouse and human orthologues.

The genomic copy of the hamster HP1 alpha gene was also cloned, sequenced. The hamster HP1 alpha gene was mapped to the short arm of hamster chromosome 2 by fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

Our results demonstrate that all three isoforms of HP1, which required for heterochromatin formation are present in hamster cells. The limited amount of constitutive heterochromatin of the Chinese hamster chromosomes, may probably be attributed to the unusual structure of the satellite DNAs of the hamster genome rather than to the lack of HP1 proteins.

Függelék

Név	Élőlény	Méret (aminosav szám)	Referencia
Swi6p	<i>S. pombe</i>	328	(Lorentz et al., 1994)
Hhp1p	<i>T. thermophila</i>	184	(Huang et al., 1999)
pchet1	<i>P. citri</i>	173	(Epstein et al., 1992)
pchet2	<i>P. citri</i>	194	(Epstein et al., 1992)
HP1a	<i>D. melanogaster</i>	206	(James and Elgin, 1986)
HP1b	<i>D. melanogaster</i>	240	(Adams et al., 2000; Smothers and Henikoff, 2001)
HP1c	<i>D. melanogaster</i>	237	(Adams et al., 2000; Smothers and Henikoff, 2001)
DvH P1	<i>D. virilis</i>	213	(Clark and Elgin, 1992)
emblCAB07241	<i>C. elegans</i>	175	(a)
gi/3702834	<i>C. elegans</i>	184	(a)
Xhp1 α	<i>X. laevis</i>	141	(Platero et al., 1998)
Xhp1 γ	<i>X. laevis</i>	171	(Platero et al., 1998)
CHCB1	<i>G. gallus</i>	185	(Yamaguchi et al., 1998)
CHCB2	<i>G. gallus</i>	174	(Yamaguchi et al., 1998)
mHP1 α	<i>M. musculus</i>	191	(Le Douarin et al., 1996)
M31; MoMOD1	<i>M. musculus</i>	185	(Singh et al., 1991)
M32; MoMOD2	<i>M. musculus</i>	173	(Singh et al., 1991)
HP1 ^{hsα}	<i>H. sapiens</i>	191	(Saunders et al., 1993)
HP1 ^{hsβ}	<i>H. sapiens</i>	185	(Singh et al., 1991)
HP1 ^{hsγ}	<i>H. sapiens</i>	173	(Ye and Worman, 1996)

(a) GenBank database.

2. táblázat: A HP1 ismert homológjai.

Fehérje	Élőlény	HP1 variáns	Módszer	HP1 domén	Hivatkozások
Transzkripció/s reguláció/kromatin szerkezetet módosító fehérjék					
H1	<i>Drosophila</i>	HP1	rPD	nd	(Nielsen et al., 2001a)
HP1-BP74 H1-like	Egér	mHP1 α	Y2H, FW, rPD	Hinge region	(Le Douarin et al., 1996; Nielsen et al., 2001a)
H3	Egér	mHP1 α , M31, M32	FW, rPD, exIP	CD	(Polioudaki et al., 2001; Nielsen et al., 2001a)
H3	<i>Drosophila</i>	HP1	rPD	nd	(Nielsen et al., 2001a)
Methylated K9 of H3	<i>S. pombe</i>	Swi6	rPD, ChIP	CD	(Bannister et al., 2001; Nakayama et al., 2001)
Methylated K9 of H3	<i>Drosophila</i>	HP1	IF, FAITC, NMR	CD	(Jacobs et al., 2001; Jacobs and Khorasanizadeh, 2002)
Methylated K9 of H3	Egér	mHP1 α , M31, M32	rPD	CD	(Lachner et al., 2001)
Methylated K9 of H3	Ember	HP1 ^{Hsα} HP1 ^{Hsβ} HP1 ^{Hsγ}	rPD, SPRA	CD	(Bannister et al., 2001)
H4	Egér	M31	rPD	nd	(Polioudaki et al., 2001)
H4	<i>Drosophila</i>	HP1	<i>In vitro</i> cross-linking	CSD	(Zhao et al., 2000)
MacroH2A1.2*	Egér	M31	IF	nd	(Turner et al., 2001)
SUVAR3-9	<i>Drosophila</i>	HP1	IF, Y2H, exIP	CSD	(Schotta et al., 2002)
Suv39h1	Egér	M31	IF, exIP, SED	nd	(Aagaard et al., 1999; Czvitkovich et al., 2001)
SUV39H1	Ember	HP1 ^{Hsβ}	IF, exIP, SED	nd	(Aagaard et al., 1999; Czvitkovich et al., 2001)

Suvar3-7	<i>Drosophila</i>	HP1	IF, Y2H, exIP	CSD	(Cleard et al., 1997; Delattre et al., 2000)
KAP-1/TIF1 β	Ember	HP1 ^{Hsα} , HP1 ^{Hsγ}	IF, rPD, exIP, SPRA, GFC	CSD	(Ryan et al., 1999; Brasher et al., 2000; Lechner et al., 2000)
KAP-1/TIF1 β	Egér	mHP1 α , M31, M32	IF, rPD, Y2H, exIP, GFC	CSD	(Le Douarin et al., 1996; Ryan et al., 1999; Murzina et al., 1999; Brasher et al., 2000)
TRF1/PIN2	Egér	M31	IF	nd	(Netzer et al., 2001)
TAF _{II} 130	Ember	HP1 ^{Hsα} , HP1 ^{Hsγ}	Y2H, transPD, exPD	CSD	(Vassallo and Tanese, 2002)
TIF1 α	Egér	mHP1 α , M31, M32	Y2H, rPD	CSD	(Le Douarin et al., 1996; Nielsen et al., 1999)
mSNF2 β	Egér	mHP1 α	Y2H	CSD	(Le Douarin et al., 1996)
Rb	Ember	HP1, HP1 ^{Hsγ}	Y2H, exPD, exIP, ChIP	nd	(Williams and Grafi, 2000; Nielsen et al., 2001b)
Rb	Maize	HP1 γ	rPD, Y2H	nd	(Williams and Grafi, 2000)
Dnmt3a	Egér sejt	mHP1 α	IF	nd	(Bachman et al., 2001)
Dnmt3b	Egér sejt	mHP1 α	IF	nd	(Bachman et al., 2001)
ATRX/HP1- BP38	Egér	mHP1 α , M31	Y2H, IF	CSD	(Le Douarin et al., 1996; McDowell et al., 1999)
Pim-1	Ember	HP1 ^{Hsγ}	Y2H, exIP, rPD	CSD	(Koike et al., 2000)
CKII	<i>Drosophila</i>	HP1a	<i>In vitro</i> phosphorylation	nd	(Zhao and Eissenberg, 1999)
BRG1	Ember	HP1 ^{Hsα}	exIP	CSD	(Nielsen et al., 2002a)
dAF10	<i>Drosophila</i>	HP1a	transPD	CSD	(Linder et al., 2001)

DNS replikáció és hibajavítás					
CAF-1 p150	Egér	mHP1 α , M31	IF, Y2H, rPD, GFC, NMR	CSD	(Murzina et al., 1999; Brasher et al., 2000)
CAF-1 p150	Ember	HP1 ^{Hsα}	rPD	CSD	(Lechner et al., 2000)
Ku70	Ember	HP1 ^{Hsα}	Y2H, rPD, exIP	CSD	(Song et al., 2001)
BRCA-1*	Ember	HP1 ^{Hsα}	IF	nd	(Maul et al., 1998)
ORC1	<i>Drosophila</i>	HP1a	transIP	CD, CSD	(Pak et al., 1997)
ORC2	<i>Drosophila</i>	HP1a	IF, exPD, exIP, transIP	CD, CSD	(Pak et al., 1997)
ORC3	<i>Drosophila</i>	HP1a	transIP	CD, CSD	(Pak et al., 1997)
ORC4	<i>Drosophila</i>	HP1a	transIP	CD, CSD	(Pak et al., 1997)
ORC5	<i>Drosophila</i>	HP1a	exIP, transIP	CD, CSD	(Pak et al., 1997)
ORC6	<i>Drosophila</i>	HP1a	exIP, transIP	CD, CSD	(Pak et al., 1997)
Xorc1	<i>Xenopus</i>	XHP1 α , XHP1 γ	Y2H	nd	(Pak et al., 1997)
HOAP	<i>Drosophila</i>	HP1a	IF, exIP	nd	(Shareef et al., 2001)
Sejtmag felépítés (Nuclear architecture)					
Lamin B receptor	Ember	HP1 ^{Hsα} , HP1 ^{Hsβ} , HP1 ^{Hsγ}	Y2H, rPD, exPD, transPD, exIP	CSD	(Ye and Worman, 1996; Ye et al., 1997; Lechner et al., 2000; Polioudaki et al., 2001)
HP1-BP84	Egér	mHP1 α , M31	Y2H	CSD	(Le Douarin et al., 1996)
Lamin B	Egér	M31	BA	CD	(Kourmouli et al., 2000)
LAP2 β	Egér	M31	BA	CD	(Kourmouli et al., 2000)
INCENP	Ember	HP1 ^{Hsα} , HP1 ^{Hsγ}	Y2H, transPD	Hinge region	(Ainsztein et al., 1998; Platero et al., 1998)
Nuclear envelope	Egér	mHP1 α , M31, M32	IF, BA	CD	(Kourmouli et al., 2000)

Egyéb kromoszóma-hoz-kötődő fehérjék					
Psc3	<i>S. pombe</i>	Swi6	IF, Y2H, exPD, ChIP	CD+Glu-rich	(Nonaka et al., 2002)
DDP1	<i>Drosophila</i>	HP1a	IF	nd	(Cortes et al., 1999)
Arp4/dArp6	<i>Drosophila</i>	HP1a	IF	nd	(Frankel et al., 1997; Kato et al., 2001)
Ki-67	Ember	mHP1 α , M31, M32	Y2H, exPD, IF	CSD	(Scholzen et al., 2002)
SP100B	Ember	HP1 ^{Hsα} , HP1 ^{Hsβ} , HP1 ^{Hsγ}	IF, Y2H, rPD, transPD	CSD	(Seeler et al., 1998; Lehming et al., 1998; Lechner et al., 2000)
<u>EST</u> <u>AA153281</u>	Egér	mHP1 α , M31	Y2H, rPD	CSD	(Murzina et al., 1999)
<u>EST</u> <u>AA003533</u>	Egér	mHP1 α , M31	Y2H, rPD	CSD	(Murzina et al., 1999)

BA, kötés vizsgálat (binding assay); ChIP, kromatin immunprecipitáció; exIP, ko-immunprecipitáció extraktummal; exPD, pull-down assay extraktummal;; FAITC, fluorescens anizotrópia, izotermális titrációs kalorimetria; FW, far Western analízis; GFC, gel filtrációs kromatográfia; IF, immunfluorescens kolokalizáció; nd, nem meghatározott; rIP, koprecipitáció rekombináns fehérjékkel; rPD, pull-down assay rekombináns fehérjékkel; transIP, immunprecipitáció *in vitro*-transzlált fehérjével; transPD, pull-down assay *in vitro* transzlált fehérjével; SED, sedimentation assay (ülepítési vizsgálat); SPRA, surface plasmon resonance analysis; Y2H, élesztő kettőshibrid rendszer.

3. táblázat: A HP1 izoformák interakciós partnerei.

Irodalomjegyzék

Aagaard,L., Laible,G., Selenko,P., Schmid,M., Dorn,R., Schotta,G., Kuhfittig,S., Wolf,A., Lebersorger,A., Singh,P.B., Reuter,G., and Jenuwein,T. (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.

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.

Adams,M.D., Celniker,S.E., Holt,R.A., Evans,C.A., Gocayne,J.D., Amanatides,P.G., Scherer,S.E., Li,P.W., Hoskins,R.A., Galle,R.F., George,R.A., Lewis,S.E., Richards,S., Ashburner,M., Henderson,S.N., Sutton,G.G., Wortman,J.R., Yandell,M.D., Zhang,Q., Chen,L.X., Brandon,R.C., Rogers,Y.H., Blazej,R.G., Champe,M., Pfeiffer,B.D., Wan,K.H., Doyle,C., Baxter,E.G., Helt,G., Nelson,C.R., Gabor,G.L., Abril,J.F., Agbayani,A., An,H.J., Andrews-Pfannkoch,C., Baldwin,D., Ballew,R.M., Basu,A., Baxendale,J., Bayraktaroglu,L., Beasley,E.M., Beeson,K.Y., Benos,P.V., Berman,B.P., Bhandari,D., Bolshakov,S., Borkova,D., Botchan,M.R., Bouck,J., Brokstein,P., Brottier,P., Burtis,K.C., Busam,D.A., Butler,H., Cadieu,E., Center,A., Chandra,I., Cherry,J.M., Cawley,S., Dahlke,C., Davenport,L.B., Davies,P., de Pablos,B., Delcher,A., Deng,Z., Mays,A.D., Dew,I., Dietz,S.M., Dodson,K., Doup,L.E., Downes,M., Dugan-Rocha,S., Dunkov,B.C., Dunn,P., Durbin,K.J., Evangelista,C.C., Ferraz,C., Ferriera,S., Fleischmann,W., Fosler,C., Gabrielian,A.E., Garg,N.S., Gelbart,W.M., Glasser,K., Glodek,A., Gong,F., Gorrell,J.H., Gu,Z., Guan,P., Harris,M., Harris,N.L., Harvey,D., Heiman,T.J., Hernandez,J.R., Houck,J., Hostin,D., Houston,K.A., Howland,T.J., Wei,M.H., Ibegwam,C., Jalali,M., Kalush,F., Karpen,G.H., Ke,Z., Kennison,J.A., Ketchum,K.A., Kimmel,B.E., Kodira,C.D., Kraft,C., Kravitz,S., Kulp,D., Lai,Z., Lasko,P., Lei,Y., Levitsky,A.A., Li,J., Li,Z., Liang,Y., Lin,X., Liu,X., Mattei,B., McIntosh,T.C., McLeod,M.P., McPherson,D., Merkulov,G., Milshina,N.V., Mobarry,C., Morris,J., Moshrefi,A., Mount,S.M., Moy,M., Murphy,B., Murphy,L., Muzny,D.M., Nelson,D.L., Nelson,D.R., Nelson,K.A., Nixon,K., Nusskern,D.R., Pacleeb,J.M., Palazzolo,M., Pittman,G.S., Pan,S., Pollard,J., Puri,V., Reese,M.G., Reinert,K., Remington,K., Saunders,R.D., Scheeler,F., Shen,H., Shue,B.C., Siden-Kiamos,I., Simpson,M., Skupski,M.P., Smith,T., Spier,E., Spradling,A.C., Stapleton,M., Strong,R., Sun,E., Svirskas,R., Tector,C., Turner,R., Venter,E., Wang,A.H., Wang,X., Wang,Z.Y., Wassarman,D.A., Weinstock,G.M., Weissenbach,J., Williams,S.M., Woodage,T., Worley,K.C., Wu,D., Yang,S., Yao,Q.A., Ye,J., Yeh,R.F., Zaveri,J.S., Zhan,M., Zhang,G., Zhao,Q., Zheng,L., Zheng,X.H., Zhong,F.N., Zhong,W., Zhou,X., Zhu,S., Zhu,X., Smith,H.O., Gibbs,R.A., Myers,E.W., Rubin,G.M., and Venter,J.C. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-2195.

Adolph,K.W., Cheng,S.M., and Laemmli,U.K. (1977). Role of nonhistone proteins in metaphase chromosome structure. *Cell* 12, 805-816.

Ahmed,S., Saini,S., Arora,S., and Singh,J. (2001). Chromodomain protein Swi6-mediated role of DNA polymerase alpha in establishment of silencing in fission Yeast. *J. Biol. Chem.* 276, 47814-47821.

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

ALLFREY,V.G., FAULKNER,R., and MIRSKY,A.E. (1964). ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 51, 786-794.

Ananiev,E.V., Phillips,R.L., and Rines,H.W. (1998). Complex structure of knob DNA on maize chromosome 9. Retrotransposon invasion into heterochromatin. *Genetics* 149, 2025-2037.

Ausio,J. (2000). Are linker histones (histone H1) dispensable for survival? *Bioessays* 22, 873-877.

Bachman,K.E., Rountree,M.R., and Baylin,S.B. (2001). Dnmt3a and Dnmt3b are transcriptional repressors that exhibit unique localization properties to heterochromatin. *J. Biol. Chem.* 276, 32282-32287.

Balicek,P., Zizka,J., and Skalska,H. (1977). Length of human constitutive heterochromatin in relation to chromosomal contraction. *Hum. Genet.* 38, 189-193.

Ball,L.J., Murzina,N.V., Broadhurst,R.W., Raine,A.R., 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.

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 the HP1 chromo domain. *Nature* 410, 120-124.

Bartolome,S., Bermudez,A., and Daban,J.R. (1994). Internal structure of the 30 nm chromatin fiber. *J. Cell Sci.* 107 (Pt 11), 2983-2992.

Beridze,T. (1986). *Satellite DNA*. (Berlin: Springer-Verlag).

Boggs,B.A., Cheung,P., Heard,E., Spector,D.L., Chinault,A.C., and Allis,C.D. (2002). Differentially methylated forms of histone H3 show unique association patterns with inactive human X chromosomes. *Nat. Genet.* 30, 73-76.

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.

- Braunstein,M., Sobel,R.E., Allis,C.D., Turner,B.M., and Broach,J.R. (1996). Efficient transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae* requires a heterochromatin histone acetylation pattern. *Mol. Cell Biol.* *16*, 4349-4356.
- Brown,S.W. (1966). Heterochromatin. *Science* *151*, 417-425.
- Church,G.M. and Gilbert,W. (1984). Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *81*, 1991-1995.
- Clark,R.F. and Elgin,S.C. (1992). Heterochromatin protein 1, a known suppressor of position-effect variegation, is highly conserved in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* *20*, 6067-6074.
- Cleard,F., Delattre,M., and Spierer,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.
- Cortes,A., Huertas,D., Fanti,L., Pimpinelli,S., Marsellach,F.X., Pina,B., and Azorin,F. (1999). DDP1, a single-stranded nucleic acid-binding protein of *Drosophila*, associates with pericentric heterochromatin and is functionally homologous to the yeast Scp160p, which is involved in the control of cell ploidy. *EMBO J.* *18*, 3820-3833.
- Cowieson,N.P., Partridge,J.F., Allshire,R.C., and McLaughlin,P.J. (2000). Dimerisation of a chromo shadow domain and distinctions from the chromodomain as revealed by structural analysis. *Curr. Biol.* *10*, 517-525.
- Cryderman,D.E., Cuaycong,M.H., Elgin,S.C., and Wallrath,L.L. (1998). Characterization of sequences associated with position-effect variegation at pericentric sites in *Drosophila* heterochromatin. *Chromosoma* *107*, 277-285.
- Cryderman,D.E., Morris,E.J., Biessmann,H., Elgin,S.C., and Wallrath,L.L. (1999). Silencing at *Drosophila* telomeres: nuclear organization and chromatin structure play critical roles. *EMBO J.* *18*, 3724-3735.
- Csonka,E., Cserpan,I., Fodor,K., Hollo,G., Katona,R., Kereso,J., Praznovszky,T., Szakal,B., Telenius,A., deJong,G., Udvardy,A., and Hadlaczky,G. (2000). Novel generation of human satellite DNA-based artificial chromosomes in mammalian cells. *J. Cell Sci.* *113 (Pt 18)*, 3207-3216.
- Czvitkovich,S., Sauer,S., Peters,A.H., Deiner,E., Wolf,A., Laible,G., Opravil,S., Beug,H., and Jenuwein,T. (2001). Over-expression of the SUV39H1 histone methyltransferase induces altered proliferation and differentiation in transgenic mice. *Mech. Dev.* *107*, 141-153.
- deJong,G., Telenius,A.H., Telenius,H., Perez,C.F., Drayer,J.I., and Hadlaczky,G. (1999). Mammalian artificial chromosome pilot production facility: large-scale isolation of functional satellite DNA-based artificial chromosomes. *Cytometry* *35*, 129-133.
- Delattre,M., Spierer,A., Tonka,C.H., and Spierer,P. (2000). The genomic silencing of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*: interaction between the heterochromatin-associated proteins Su(var)3-7 and HP1. *J. Cell Sci.* *113 Pt 23*, 4253-4261.

Dimitri,P. and Junakovic,N. (1999). Revising the selfish DNA hypothesis: new evidence on accumulation of transposable elements in heterochromatin. *Trends Genet.* *15*, 123-124.

Eissenberg,J.C. (2001). Molecular biology of the chromo domain: an ancient chromatin module comes of age. *Gene* *275*, 19-29.

Eissenberg,J.C. and Elgin,S.C. (2000). The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *10*, 204-210.

Eissenberg,J.C. and Hartnett,T. (1993). A heat shock-activated cDNA rescues the recessive lethality of mutations in the heterochromatin-associated protein HP1 of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* *240*, 333-338.

Eissenberg,J.C., James,T.C., Foster-Hartnett,D.M., Hartnett,T., Ngan,V., and Elgin,S.C. (1990). Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *87*, 9923-9927.

Eissenberg,J.C., Morris,G.D., Reuter,G., and Hartnett,T. (1992). The heterochromatin-associated protein HP-1 is an essential protein in *Drosophila* with dosage-dependent effects on position-effect variegation. *Genetics* *131*, 345-352.

Elgin,S.C. (1996). Heterochromatin and gene regulation in *Drosophila*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *6*, 193-202.

Epstein,H., James,T.C., and Singh,P.B. (1992). Cloning and expression of *Drosophila* HP1 homologs from a mealybug, *Planococcus citri*. *J. Cell Sci.* *101 (Pt 2)*, 463-474.

Fanti,L., Giovinazzo,G., Berloco,M., and Pimpinelli,S. (1998). The heterochromatin protein 1 prevents telomere fusions in *Drosophila*. *Mol. Cell* *2*, 527-538.

Faravelli,M., Moralli,D., Bertoni,L., Attolini,C., Chernova,O., Raimondi,E., and Giulotto,E. (1998). Two extended arrays of a satellite DNA sequence at the centromere and at the short-arm telomere of Chinese hamster chromosome 5. *Cytogenet. Cell Genet.* *83*, 281-286.

Fatyol,K., Cserpan,I., Praznovszky,T., Kereso,J., and Hadlaczky,G. (1994). Cloning and molecular characterization of a novel chromosome specific centromere sequence of Chinese hamster. *Nucleic Acids Res.* *22*, 3728-3736.

Finch,J.T. and Klug,A. (1976). Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *73*, 1897-1901.

Frankel,S., Sigel,E.A., Craig,C., Elgin,S.C., Mooseker,M.S., and Artavanis-Tsakonas,S. (1997). An actin-related protein in *Drosophila* colocalizes with heterochromatin protein 1 in pericentric heterochromatin. *J. Cell Sci.* *110 (Pt 17)*, 1999-2012.

Furuta,K., Chan,E.K., Kiyosawa,K., Reimer,G., Luderschmidt,C., and Tan,E.M. (1997). Heterochromatin protein HP1Hsbeta (p25beta) and its localization with centromeres in mitosis. *Chromosoma* *106*, 11-19.

- Gasser,S.M. and Cockell,M.M. (2001). The molecular biology of the SIR proteins. *Gene* 279, 1-16.
- Gottgens,B., Barton,L.M., Chapman,M.A., Sinclair,A.M., Knudsen,B., Grafham,D., Gilbert,J.G., Rogers,J., Bentley,D.R., and Green,A.R. (2002). Transcriptional regulation of the stem cell leukemia gene (SCL)--comparative analysis of five vertebrate SCL loci. *Genome Res.* 12, 749-759.
- Grewal,S.I. and Elgin,S.C. (2002). Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 178-187.
- Grewal,S.I. and Rice,J.C. (2004). Regulation of heterochromatin by histone methylation and small RNAs. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 230-238.
- Gross,D.S. (2001). Sir proteins as transcriptional silencers. *Trends Biochem. Sci.* 26, 685-686.
- Hadlaczký,G., Praznovszky,T., and Bisztray,G. (1982). Structure of isolated protein-depleted chromosomes of plants. *Chromosoma* 86, 643-659.
- Hadlaczký,G., Sumner,A.T., and Ross,A. (1981). Protein-depleted chromosomes. II. Experiments concerning the reality of chromosome scaffolds. *Chromosoma* 81, 557-567.
- Hansen,J.C. (2002). Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 31, 361-392.
- Harvey Lodish, Arnold Berk, Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, and James Darnell (2000). RNA Processing, Nuclear Transport, and Post-Transcriptional Control. In *Molecular Cell Biology*, (New York: W. H. Freeman & Co).
- Heard,E., Rougeulle,C., Arnaud,D., Avner,P., Allis,C.D., and Spector,D.L. (2001). Methylation of histone H3 at Lys-9 is an early mark on the X chromosome during X inactivation. *Cell* 107, 727-738.
- Heck,M.M. (1997). Condensins, cohesins, and chromosome architecture: how to make and break a mitotic chromosome. *Cell* 91, 5-8.
- Heitz,E. (1928). Das Heterochromatin der Moose. *Jahrb Wiss Botanik* 69, 762-818.
- Henikoff,S. (1998). Conspiracy of silence among repeated transgenes. *Bioessays* 20, 532-535.
- Hirano,T. (1998). SMC protein complexes and higher-order chromosome dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 317-322.
- Horsley,D., Hutchings,A., Butcher,G.W., and Singh,P.B. (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.

- Hsieh,J. and Fire,A. (2000). Recognition and silencing of repeated DNA. *Annu. Rev. Genet.* *34*, 187-204.
- Huang,D.W., Fanti,L., Pak,D.T., Botchan,M.R., Pimpinelli,S., and Kellum,R. (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.
- Huang,H., Smothers,J.F., Wiley,E.A., and Allis,C.D. (1999). A nonessential HP1-like protein affects starvation-induced assembly of condensed chromatin and gene expression in macronuclei of *Tetrahymena thermophila*. *Mol. Cell Biol.* *19*, 3624-3634.
- Hwang,K.K., Eissenberg,J.C., and Worman,H.J. (2001). Transcriptional repression of euchromatic genes by *Drosophila* heterochromatin protein 1 and histone modifiers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *98*, 11423-11427.
- Hwang,K.K. and Worman,H.J. (2002). Gene regulation by human orthologs of *Drosophila* heterochromatin protein 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *293*, 1217-1222.
- Jacobs,S.A. and Khorasanizadeh,S. (2002). Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail. *Science* *295*, 2080-2083.
- Jacobs,S.A., Taverna,S.D., Zhang,Y., Briggs,S.D., Li,J., Eissenberg,J.C., Allis,C.D., and Khorasanizadeh,S. (2001). Specificity of the HP1 chromo domain for the methylated N-terminus of histone H3. *EMBO J.* *20*, 5232-5241.
- James,T.C., Eissenberg,J.C., Craig,C., Dietrich,V., Hobson,A., and Elgin,S.C. (1989). Distribution patterns of HP1, a heterochromatin-associated nonhistone chromosomal protein of *Drosophila*. *Eur. J. Cell Biol.* *50*, 170-180.
- James,T.C. and Elgin,S.C. (1986). Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its gene. *Mol. Cell Biol.* *6*, 3862-3872.
- Jenuwein,T. and Allis,C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* *293*, 1074-1080.
- Jeppesen,P., Mitchell,A., Turner,B., and Perry,P. (1992). Antibodies to defined histone epitopes reveal variations in chromatin conformation and underacetylation of centric heterochromatin in human metaphase chromosomes. *Chromosoma* *101*, 322-332.
- 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.
- Kato,M., Sasaki,M., Mizuno,S., and Harata,M. (2001). Novel actin-related proteins in vertebrates: similarities of structure and expression pattern to Arp6 localized on *Drosophila* heterochromatin. *Gene* *268*, 133-140.
- Kereso,J., Praznovszky,T., Cserpan,I., Fodor,K., Katona,R., Csonka,E., Fatyol,K., Hollo,G., Szeles,A., Ross,A.R., Sumner,A.T., Szalay,A.A., and Hadlaczky,G. (1996). De novo

chromosome formations by large-scale amplification of the centromeric region of mouse chromosomes. *Chromosome. Res.* 4, 226-239.

Kirschmann,D.A., Lininger,R.A., Gardner,L.M., Seftor,E.A., Odero,V.A., Ainsztein,A.M., Earnshaw,W.C., Wallrath,L.L., and Hendrix,M.J. (2000). Down-regulation of HP1Hsalpha expression is associated with the metastatic phenotype in breast cancer. *Cancer Res.* 60, 3359-3363.

Koike,N., Maita,H., Taira,T., Ariga,H., and Iguchi-Ariga,S.M. (2000). Identification of heterochromatin protein 1 (HP1) as a phosphorylation target by Pim-1 kinase and the effect of phosphorylation on the transcriptional repression function of HP1(1). *FEBS Lett.* 467, 17-21.

Kornberg,R.D. and Lorch,Y. (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 98, 285-294.

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.

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.

Le Douarin,B., Nielsen,A.L., Garnier,J.M., Ichinose,H., Jeanmougin,F., Losson,R., and Chambon,P. (1996). A possible involvement of TIF1 alpha and TIF1 beta in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors. *EMBO J.* 15, 6701-6715.

Lechner,M.S., Begg,G.E., Speicher,D.W., and Rauscher,F.J., III (2000). Molecular determinants for targeting heterochromatin protein 1-mediated gene silencing: direct chromoshadow domain-KAP-1 corepressor interaction is essential. *Mol. Cell Biol.* 20, 6449-6465.

Lehming,N., Le Saux,A., Schuller,J., and Ptashne,M. (1998). Chromatin components as part of a putative transcriptional repressing complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 7322-7326.

Leuba,S.H., Yang,G., Robert,C., Samori,B., van Holde,K., Zlatanova,J., and Bustamante,C. (1994). Three-dimensional structure of extended chromatin fibers as revealed by tapping-mode scanning force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 11621-11625.

Lewis,C.D. and Laemmli,U.K. (1982). Higher order metaphase chromosome structure: evidence for metalloprotein interactions. *Cell* 29, 171-181.

Li,Y., Kirschmann,D.A., and Wallrath,L.L. (2002). Does heterochromatin protein 1 always follow code? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99 Suppl 4, 16462-16469.

Linder,B., Gerlach,N., and Jackle,H. (2001). The Drosophila homolog of the human AF10 is an HP1-interacting suppressor of position effect variegation. *EMBO Rep.* 2, 211-216.

Locke,J., Kotarski,M.A., and Tartof,K.D. (1988). Dosage-dependent modifiers of position effect variegation in *Drosophila* and a mass action model that explains their effect. *Genetics* 120, 181-198.

Lorentz,A., Ostermann,K., Fleck,O., and Schmidt,H. (1994). Switching gene *swi6*, involved in repression of silent mating-type loci in fission yeast, encodes a homologue of chromatin-associated proteins from *Drosophila* and mammals. *Gene* 143, 139-143.

Lu,B.Y., Emtage,P.C., Duyf,B.J., Hilliker,A.J., and Eissenberg,J.C. (2000). Heterochromatin protein 1 is required for the normal expression of two heterochromatin genes in *Drosophila*. *Genetics* 155, 699-708.

Maeshima,K. and Laemmli,U.K. (2003). A two-step scaffolding model for mitotic chromosome assembly. *Dev. Cell* 4, 467-480.

Maison,C., Bailly,D., Peters,A.H., Quivy,J.P., Roche,D., Taddei,A., Lachner,M., Jenuwein,T., and Almouzni,G. (2002). Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. *Nat. Genet.* 30, 329-334.

Maniatis T, Fritsch EF, and Sambrook JE (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. (Cold Spring Harbour, N. Y.: Cold Spring Harbour Laboratory).

Marsden,M.P. and Laemmli,U.K. (1979). Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model. *Cell* 17, 849-858.

Martin,R.H., Balkan,W., Burns,K., Rademaker,A.W., Lin,C.C., and Rudd,N.L. (1983). The chromosome constitution of 1000 human spermatozoa. *Hum. Genet.* 63, 305-309.

Martinez-Balbas,A., Rodriguez-Campos,A., Garcia-Ramirez,M., Sainz,J., Carrera,P., Aymami,J., and Azorin,F. (1990). Satellite DNAs contain sequences that induced curvature. *Biochemistry* 29, 2342-2348.

Maul,G.G., Jensen,D.E., Ishov,A.M., Herlyn,M., and Rauscher,F.J., III (1998). Nuclear redistribution of BRCA1 during viral infection. *Cell Growth Differ.* 9, 743-755.

McDowell,T.L., Gibbons,R.J., Sutherland,H., O'Rourke,D.M., Bickmore,W.A., Pombo,A., Turley,H., Gatter,K., Picketts,D.J., Buckle,V.J., Chapman,L., Rhodes,D., and Higgs,D.R. (1999). Localization of a putative transcriptional regulator (ATRX) at pericentromeric heterochromatin and the short arms of acrocentric chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 13983-13988.

Meehan,R.R., Kao,C.F., and Pennings,S. (2003). HP1 binding to native chromatin in vitro is determined by the hinge region and not by the chromodomain. *EMBO J.* 22, 3164-3174.

Mello,J.A. and Almouzni,G. (2001). The ins and outs of nucleosome assembly. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11, 136-141.

Minc,E., Allory,Y., Courvalin,J.C., and Buendia,B. (2001). Immunolocalization of HP1 proteins in metaphasic mammalian chromosomes. *Methods Cell Sci.* 23, 171-174.

- Minc,E., Allory,Y., Worman,H.J., Courvalin,J.C., and Buendia,B. (1999). Localization and phosphorylation of HP1 proteins during the cell cycle in mammalian cells. *Chromosoma* 108, 220-234.
- Minc,E., Courvalin,J.C., and Buendia,B. (2000). HP1gamma associates with euchromatin and heterochromatin in mammalian nuclei and chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.* 90, 279-284.
- Miniou,P., Jeanpierre,M., Blanquet,V., Sibella,V., Bonneau,D., Herbelin,C., Fischer,A., Niveleau,A., and Viegas-Pequignot,E. (1994). Abnormal methylation pattern in constitutive and facultative (X inactive chromosome) heterochromatin of ICF patients. *Hum. Mol. Genet.* 3, 2093-2102.
- Misteli,T., Gunjan,A., Hock,R., Bustin,M., and Brown,D.T. (2000). Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells. *Nature* 408, 877-881.
- Muchardt,C., Guilleme,M., Seeler,J.S., Trouche,D., Dejean,A., and Yaniv,M. (2002). Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1alpha. *EMBO Rep.* 3, 975-981.
- Murzina,N., Verreault,A., Laue,E., and Stillman,B. (1999). Heterochromatin dynamics in mouse cells: interaction between chromatin assembly factor 1 and HP1 proteins. *Mol. Cell* 4, 529-540.
- Nagl,W. and Schmitt,H.P. (1985). Transcription of repetitive DNA in condensed plant chromatin. *Mol. Biol. Rep.* 10, 143-146.
- Nakayama,J., Klar,A.J., and Grewal,S.I. (2000). A chromodomain protein, Swi6, performs imprinting functions in fission yeast during mitosis and meiosis. *Cell* 101, 307-317.
- Nakayama,J., Rice,J.C., Strahl,B.D., Allis,C.D., and Grewal,S.I. (2001). Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* 292, 110-113.
- Netzer,C., Rieger,L., Brero,A., Zhang,C.D., Hinzke,M., Kohlhase,J., and Bohlander,S.K. (2001). SALL1, the gene mutated in Townes-Brocks syndrome, encodes a transcriptional repressor which interacts with TRF1/PIN2 and localizes to pericentromeric heterochromatin. *Hum. Mol. Genet.* 10, 3017-3024.
- Nicol,L. and Jeppesen,P. (1994). Human autoimmune sera recognize a conserved 26 kD protein associated with mammalian heterochromatin that is homologous to heterochromatin protein 1 of *Drosophila*. *Chromosome. Res.* 2, 245-253.
- 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.
- Nielsen,A.L., Oulad-Abdelghani,M., Ortiz,J.A., Remboutsika,E., Chambon,P., and Losson,R. (2001a). Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins. *Mol. Cell* 7, 729-739.

Nielsen,A.L., Sanchez,C., Ichinose,H., Cervino,M., Lerouge,T., Chambon,P., and Losson,R. (2002a). Selective interaction between the chromatin-remodeling factor BRG1 and the heterochromatin-associated protein HP1alpha. *EMBO J.* 21, 5797-5806.

Nielsen,P.R., Nietlispach,D., Mott,H.R., Callaghan,J., Bannister,A., Kouzarides,T., Murzin,A.G., Murzina,N.V., and Laue,E.D. (2002b). Structure of the HP1 chromodomain bound to histone H3 methylated at lysine 9. *Nature* 416, 103-107.

Nielsen,S.J., Schneider,R., Bauer,U.M., Bannister,A.J., Morrison,A., O'Carroll,D., Firestein,R., Cleary,M., Jenuwein,T., Herrera,R.E., and Kouzarides,T. (2001b). Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* 412, 561-565.

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

O'Carroll,D., Scherthan,H., Peters,A.H., Opravil,S., Haynes,A.R., Laible,G., Rea,S., Schmid,M., Lebersorger,A., Jerratsch,M., Sattler,L., Mattei,M.G., Denny,P., Brown,S.D., Schweizer,D., and Jenuwein,T. (2000). Isolation and characterization of Suv39h2, a second histone H3 methyltransferase gene that displays testis-specific expression. *Mol. Cell Biol.* 20, 9423-9433.

Ogawa,H., Ishiguro,K., Gaubatz,S., Livingston,D.M., and Nakatani,Y. (2002). A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science* 296, 1132-1136.

Ohnuki,Y. (1965). Demonstration of the spiral structure of human chromosomes. *Nature* 208, 916-917.

Okada,T.A. and Comings,D.E. (1980). A search for protein cores in chromosomes: is the scaffold an artifact? *Am. J. Hum. Genet.* 32, 814-832.

Ouspenski,I.I. and Brinkley,B.R. (1993). Centromeric DNA cloned from functional kinetochore fragments in mitotic cells with unreplicated genomes. *J. Cell Sci.* 105 (Pt 2), 359-367.

Pak,D.T., Pflumm,M., Chesnokov,I., Huang,D.W., Kellum,R., Marr,J., Romanowski,P., and Botchan,M.R. (1997). Association of the origin recognition complex with heterochromatin and HP1 in higher eukaryotes. *Cell* 91, 311-323.

Pardoll,D.M., Vogelstein,B., and Coffey,D.S. (1980). A fixed site of DNA replication in eucaryotic cells. *Cell* 19, 527-536.

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. U. S. A* 88, 263-267.

Paulson,J.R. and Laemmli,U.K. (1977). The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell* 12, 817-828.

- Peters,A.H., Mermoud,J.E., O'Carroll,D., Pagani,M., Schweizer,D., Brockdorff,N., and Jenuwein,T. (2002). Histone H3 lysine 9 methylation is an epigenetic imprint of facultative heterochromatin. *Nat. Genet.* 30, 77-80.
- Pfeifer,G.P. and Riggs,A.D. (1991). Chromatin differences between active and inactive X chromosomes revealed by genomic footprinting of permeabilized cells using DNase I and ligation-mediated PCR. *Genes Dev.* 5, 1102-1113.
- Piacentini,L., Fanti,L., Berloco,M., Perrini,B., and Pimpinelli,S. (2003). Heterochromatin protein 1 (HP1) is associated with induced gene expression in *Drosophila* euchromatin. *J. Cell Biol.* 161, 707-714.
- Picketts,D.J., Higgs,D.R., Bachoo,S., Blake,D.J., Quarrell,O.W., and Gibbons,R.J. (1996). ATRX encodes a novel member of the SNF2 family of proteins: mutations point to a common mechanism underlying the ATR-X syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 5, 1899-1907.
- Platero,J.S., Csink,A.K., Quintanilla,A., and Henikoff,S. (1998). Changes in chromosomal localization of heterochromatin-binding proteins during the cell cycle in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* 140, 1297-1306.
- Platero,J.S., Hartnett,T., and Eissenberg,J.C. (1995). Functional analysis of the chromo domain of HP1. *EMBO J.* 14, 3977-3986.
- Polioudaki,H., Kourmouli,N., Drosou,V., Bakou,A., Theodoropoulos,P.A., Singh,P.B., Giannakouros,T., and Georgatos,S.D. (2001). Histones H3/H4 form a tight complex with the inner nuclear membrane protein LBR and heterochromatin protein 1. *EMBO Rep.* 2, 920-925.
- Pombo,A., Jones,E., Iborra,F.J., Kimura,H., Sugaya,K., Cook,P.R., and Jackson,D.A. (2000). Specialized transcription factories within mammalian nuclei. *Crit Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 10, 21-29.
- 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.
- Ryan,R.F., Schultz,D.C., Ayyanathan,K., Singh,P.B., Friedman,J.R., Fredericks,W.J., and Rauscher,F.J., III (1999). KAP-1 corepressor 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.
- Saffery,R., Earle,E., Irvine,D.V., Kalitsis,P., and Choo,K.H. (1999). Conservation of centromere protein in vertebrates. *Chromosome. Res.* 7, 261-265.
- Saunders,W.S., Chue,C., Goebel,M., Craig,C., Clark,R.F., Powers,J.A., Eissenberg,J.C., Elgin,S.C., Rothfield,N.F., and Earnshaw,W.C. (1993). Molecular cloning of a human homologue of *Drosophila* heterochromatin protein HP1 using anti-centromere autoantibodies with anti-chromo specificity. *J. Cell Sci.* 104 (Pt 2), 573-582.

Schmid,M., Grunert,D., Haaf,T., and Engel,W. (1983). A direct demonstration of somatically paired heterochromatin of human chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.* 36, 554-561.

Schoenherr CJ and Tilghman SM (2000). Epigenetics in mammals. In *Chromatin Structure and Gene Expression*, SCR Elgin and JL Workman, eds. (Oxford: Oxford University Press), pp. 252-277.

Scholzen,T., Endl,E., Wohlenberg,C., van der,S.S., Cowell,I.G., Gerdes,J., and Singh,P.B. (2002). The Ki-67 protein interacts with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family: a potential role in the regulation of higher-order chromatin structure. *J. Pathol.* 196, 135-144.

Schotta,G., Ebert,A., Krauss,V., Fischer,A., Hoffmann,J., Rea,S., Jenuwein,T., Dorn,R., and Reuter,G. (2002). Central role of *Drosophila* SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *EMBO J.* 21, 1121-1131.

Seeler,J.S., Marchio,A., Sitterlin,D., Transy,C., and Dejean,A. (1998). Interaction of SP100 with HP1 proteins: a link between the promyelocytic leukemia-associated nuclear bodies and the chromatin compartment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 7316-7321.

Shaffer,C.D., Stephens,G.E., Thompson,B.A., Funches,L., Bernat,J.A., Craig,C.A., and Elgin,S.C. (2002). Heterochromatin protein 2 (HP2), a partner of HP1 in *Drosophila* heterochromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 14332-14337.

Shareef,M.M., King,C., Damaj,M., Badagu,R., Huang,D.W., and Kellum,R. (2001). *Drosophila* heterochromatin protein 1 (HP1)/origin recognition complex (ORC) protein is associated with HP1 and ORC and functions in heterochromatin-induced silencing. *Mol. Biol. Cell* 12, 1671-1685.

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

Singh,P.B. and Georgatos,S.D. (2002). HP1: facts, open questions, and speculation. *J. Struct. Biol.* 140, 10-16.

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.

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

Song,K., Jung,Y., Jung,D., and Lee,I. (2001). Human Ku70 interacts with heterochromatin protein 1alpha. *J. Biol. Chem.* 276, 8321-8327.

Sperling,K., Kalscheuer,V., and Neitzel,H. (1987). Transcriptional activity of constitutive heterochromatin in the mammal *Microtus agrestis* (Rodentia, Cricetidae). *Exp. Cell Res.* 173, 463-472.

Stack,S.M. and Anderson,L.K. (2001). A model for chromosome structure during the mitotic and meiotic cell cycles. *Chromosome. Res.* 9, 175-198.

Strauss,F. and Varshavsky,A. (1984). A protein binds to a satellite DNA repeat at three specific sites that would be brought into mutual proximity by DNA folding in the nucleosome. *Cell* 37, 889-901.

Sugimoto,K., Tasaka,H., and Dotsu,M. (2001). Molecular behavior in living mitotic cells of human centromere heterochromatin protein HPLalpha ectopically expressed as a fusion to red fluorescent protein. *Cell Struct. Funct.* 26, 705-718.

Sumner,A.T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75, 304-306.

Sumner,A.T. (1986). Electron microscopy of the parameres formed by the centromeric heterochromatin of human chromosome 9 at pachytene. *Chromosoma* 94, 199-204.

Sumner,A.T. (1991). Scanning electron microscopy of mammalian chromosomes from prophase to telophase. *Chromosoma* 100, 410-418.

Sumner,A.T. (2003). *Chromosomes, organization and function.* (Oxford: Blackwell Publishing).

Sun,F.L., Cuaycong,M.H., and Elgin,S.C. (2001). Long-range nucleosome ordering is associated with gene silencing in *Drosophila melanogaster* pericentric heterochromatin. *Mol. Cell Biol.* 21, 2867-2879.

Szakal,B., Cserpan,I., Csonka,E., Monostori,E., Udvardy,A., and Hadlaczky,G. (2004). Cloning, characterization and localization of Chinese hamster HP1 isoforms. *Chromosome. Res.* 12, 483-493.

Tachibana,M., Sugimoto,K., Fukushima,T., and Shinkai,Y. (2001). Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3. *J. Biol. Chem.* 276, 25309-25317.

Turner,B.M., Birley,A.J., and Lavender,J. (1992). Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila* polytene nuclei. *Cell* 69, 375-384.

Turner,J.M., Burgoyne,P.S., and Singh,P.B. (2001). M31 and macroH2A1.2 colocalise at the pseudoautosomal region during mouse meiosis. *J. Cell Sci.* 114, 3367-3375.

van,d., V, den Blaauwen,J.L., Sewalt,R.G., van Driel,R., and Otte,A.P. (2000). Transcriptional repression mediated by polycomb group proteins and other chromatin-associated repressors is selectively blocked by insulators. *J. Biol. Chem.* 275, 697-704.

Varley,J.M., Macgregor,H.C., and Erba,H.P. (1980). Satellite DNA is transcribed on lampbrush chromosomes. *Nature* 283, 686-688.

- Vassallo,M.F. and Tanese,N. (2002). Isoform-specific interaction of HP1 with human TAFII130. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 5919-5924.
- Verreault,A. (2000). De novo nucleosome assembly: new pieces in an old puzzle. *Genes Dev.* *14*, 1430-1438.
- Vogelstein,B., Pardoll,D.M., and Coffey,D.S. (1980). Supercoiled loops and eucaryotic DNA replicaton. *Cell* *22*, 79-85.
- Wallrath,L.L. (1998). Unfolding the mysteries of heterochromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *8*, 147-153.
- Wang,G., Ma,A., Chow,C.M., Horsley,D., Brown,N.R., Cowell,I.G., and Singh,P.B. (2000). Conservation of heterochromatin protein 1 function. *Mol. Cell Biol.* *20*, 6970-6983.
- Wang,J.C. (1996). DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* *65*, 635-692.
- Widom,J. (1989). Toward a unified model of chromatin folding. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* *18*, 365-395.
- Williams,L. and Grafi,G. (2000). The retinoblastoma protein - a bridge to heterochromatin. *Trends Plant Sci.* *5*, 239-240.
- Woodcock,C.L., Grigoryev,S.A., Horowitz,R.A., and Whitaker,N. (1993). A chromatin folding model that incorporates linker variability generates fibers resembling the native structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *90*, 9021-9025.
- Worman,H.J., Evans,C.D., 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.
- Wreggett,K.A., Hill,F., James,P.S., Hutchings,A., Butcher,G.W., and Singh,P.B. (1994). A mammalian homologue of *Drosophila* heterochromatin protein 1 (HP1) is a component of constitutive heterochromatin. *Cytogenet. Cell Genet.* *66*, 99-103.
- Wustmann,G., Szidonya,J., Taubert,H., and Reuter,G. (1989). The genetics of position-effect variegation modifying loci in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* *217*, 520-527.
- Yamada,T., Fukuda,R., Himeno,M., and Sugimoto,K. (1999). Functional domain structure of human heterochromatin protein HP1(Hsalph α): involvement of internal DNA-binding and C-terminal self-association domains in the formation of discrete dots in interphase nuclei. *J. Biochem. (Tokyo)* *125*, 832-837.
- Yamaguchi,K., Hidema,S., and Mizuno,S. (1998). Chicken chromobox proteins: cDNA cloning of CHCB1, -2, -3 and their relation to W-heterochromatin. *Exp. Cell Res.* *242*, 303-314.

Yang,L., Xia,L., Wu,D.Y., Wang,H., Chansky,H.A., Schubach,W.H., Hickstein,D.D., and Zhang,Y. (2002). Molecular cloning of ESET, a novel histone H3-specific methyltransferase that interacts with ERG transcription factor. *Oncogene* 21, 148-152.

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.

Ye,Q. and Worman,H.J. (1994). Primary structure analysis and lamin B and DNA binding of human LBR, an integral protein of the nuclear envelope inner membrane. *J. Biol. Chem.* 269, 11306-11311.

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.

Zhao,T. and Eissenberg,J.C. (1999). Phosphorylation of heterochromatin protein 1 by casein kinase II is required for efficient heterochromatin binding in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* 274, 15095-15100.

Zhao,T., Heyduk,T., Allis,C.D., and Eissenberg,J.C. (2000). Heterochromatin protein 1 binds to nucleosomes and DNA in vitro. *J. Biol. Chem.* 275, 28332-28338.

Zlatanova,J. and van Holde,K. (1998). Linker histones versus HMG1/2: a struggle for dominance? *Bioessays* 20, 584-588.