

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΣΕ “ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ”

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΩΝ ΔΟΜΙΚΩΝ
ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ Ν-ΤΕΛΙΚΟΥ ΑΚΡΟΥ ΤΗΣ SRPK1a ΠΟΥ
ΕΥΘΥΝΟΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΙΣ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΜΕΝΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ
ΤΗΣ

Εκπόνηση: ΓΚΟΥΝΤΟΒΑΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ

Υπεύθυνη: Ε. ΓΕΩΡΓΑΤΣΟΥ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΓΕΩΡΓΑΤΣΟΥ Ε.
ΧΑΤΖΗΓΕΩΡΓΙΟΥ Γ
ΜΠΙΟΝΑΝΟΥ Σ.

Λάρισα 2002-2003

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΠΙΛΟΓΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
Ημερομ 7.11.2003
Αριθμ Πρωτ 2466.....

αρ. εισ. 17/2003



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 914/1

Ημερ. Εισ.: 1-2-03

Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ-ΠΣΕ-ΙΒ

2003

ΓΚΟ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	2
ABSTRACT	3
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	16
Α. ΥΛΙΚΑ	16
Β. ΜΕΘΟΔΟΙ	18
1) Παρασκευή πλασμιδιακού DNA	
2) Παρασκευή πηκτής αγαρόζης	
3) Μετασχηματισμός κυττάρων <i>Saccharomyces cerevisiae</i> με DNA	
4) Παρασκευή competent βακτηριακών κυττάρων	
5) Αντίδραση υδροξυλαμίνης	
6) Μετασχηματισμός κυττάρων <i>E. Coli</i> με πλασμιδιακό DNA	
7) Πιστό αποτύπωμα	
8) Μετασχηματισμός στελεχών pJ69-4A με το πλασμίδιο pGBR9HTOH	
9) Πέψη πλασμιδιακού DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού	
10) Απομόνωση DNA από πηκτή αγαρόζης	
11) Κατεργασία πλασμιδιακού DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού και αλκαλική φωσφατάση ώστε να καταστεί φορέας κλωνοποίησης	
12) Κατακρήμιση DNA με αιθανόλη	
13) Αντίδραση σύνδεσης (ligation)	
14) Απομόνωση και διάσωση πλασμιδίου από στέλεχος <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
15) Διαχωρισμός του πλασμιδίου δολώματος από το πλασμίδιο λεία.	
16) Εύρεση αλληλουχίας πλασμιδιακού ενθέματος	
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	27
1. Παρασκευή DNA πλασμιδίων δολώματος	
2. Παρασκευή DNA πλασμιδίων λειών	
3. Μετασχηματισμός στελέχους pJ69-4A με τα πλασμίδια λείες	
4. Μεταλλαξογένεση του πλασμιδίου δολώματος pGBT9HT με υδροξυλαμίνη	
5. Μετασχηματισμός του στελέχους pJ69-4A με τα μεταλλαγμένα πλασμίδια pGBT9HTOH	
6. Δημιουργία «βιβλιοθήκης» μεταλλαγμένων ενθεμάτων δολώματος σε pGBT9	
7. Παρασκευή DNA βιβλιοθήκης pGBT9/HTOH	
8. Μετασχηματισμός στελέχους pJ69-4A με DNA «βιβλιοθήκης» pGBT9/HTOH	
9. Διάσωση (rescue) του πλασμιδίου δολώματος από το στέλεχος pJ69-4A και μεταφορά σε <i>E. Coli</i>	
10. Παρασκευή DNA των επιλεγμένων κλώνων	
11. Αποτελέσματα εύρεσης και σύγκρισης αλληλουχιών	
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	41
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ	43
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	44



Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά

- Την κ. Έλενα Γεωργιάτσου, Επίκουρο Καθηγήτρια του Εργαστηρίου Βιοχημείας, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την αμέριστη συμπαράστασή της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας εργασίας, καθώς και για τις παρατηρήσεις και υποδείξεις της κατά τη διάρκεια της συγγραφής.
- Την κ. Μπονάνου Σοφία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας για την συνεχή εξέχουσα παρουσία της στην υλοποίηση και οργάνωση του ΠΣΕ «Ιατρική Βιοχημεία» καθώς και για την κριτική ανάγνωση της εργασίας αυτής ως μέλος της Τριμελούς Επιτροπής.
- Τον κ. Χατζηγεωργίου Γεώργιο, Επίκουρο Καθηγητή Νευρολογίας για την κριτική ανάγνωση της εργασίας αυτής ως μέλος της Τριμελούς Επιτροπής.
- Τον κ. Σίμο Γεώργιο για την συμβολή του στην οργάνωση της εργαστηριακής μου δουλειάς και τις εύστοχες παρατηρήσεις του στον τρόπο εργασίας μου.

Καθοριστική υπήρξε και η συμβολή της κ. Ρασέλ Κοέν (υποψήφια διδάκτορας στο εργαστήριο Βιοχημείας), την οποία ευχαριστώ για την παροχή πληροφοριών και υλικών για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι SRPKs (SR protein kinases) αποτελούν τάξη κινασών που φωσφορυλιώνει διπεπτιδία σερίνης – αργινίνης (SR domains).

Έχουν αναγνωρισθεί 9 γονίδια που κωδικοποιούν SR πρωτεϊνικές κινάσες, σε διαφορετικούς οργανισμούς (οι SRPK1 και SRPK2 στον άνθρωπο, οι SRPK1 και SRPK2 στο ποντίκι, η SRPK1 στη μύγα *Drosophila*, η SRPK1 στο φυτό *Arabidopsis*, η SPK-1 στο σκουλήκι *C. Elegans* καθώς και οι SKY1 και Dsk1 στους σακχαρομύκητες *Cerevisiae* και *Rhizopus*, αντίστοιχα) υοδηλώνοντας μια συντηρημένη κατά τη διάρκεια της εξέλιξης οικογένεια πρωτεϊνών.

Μια isoμορφή της SRPK1 είναι η SRPK1a, που περιέχει 171 επιπλέον αμινοξέα στο N-τελικό της άκρο, βρέθηκε πρόσφατα και κλωνοποιήθηκε, ⁽²⁶⁾ με παρόμοια λειτουργία και ενζυμική δράση με αυτή της SRPK1.

Με το σύστημα των δύο υβριδίων βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά εξειδικευμένα (η SRPK1 δεν αλληλεπιδρά) με αρκετές κυτταρικές πρωτεΐνες, δυο εκ των οποίων είναι η p53 και ο SAF-B, που δεν περιέχουν SR περιοχές, γεγονός που αποτελεί πρόκληση για την ανίχνευση της συμπεριφοράς της.

Πιστεύουμε ότι η διαλεύκανση της λειτουργίας της SRPK1a θα παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για τη δράση των SR πρωτεϊνικών κινασών. Ενίσχυτικό της παραπάνω άποψης είναι ότι η περιοχή που τη χαρακτηρίζει είναι πλούσια σε προλίνες, ιδιότητα που περιγράφηκε ως ευνοϊκή για τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης – πρωτεΐνης και συμβαδίζει με το γεγονός της απομόνωσης αρκετών κυτταρικών πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν ισχυρά με τη συγκεκριμένη περιοχή.

Για να προσδιορίσουμε τα αμινοξέα που είναι υπεύθυνα για τις εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις της SRPK1a, προκαλέσαμε μειχρημική μεταλλαξογένεση τυχαίες μεταλλάξεις στο N –τελικό της άκρο και επιλέξαμε αυτές που αναιρούν τις αλληλεπιδράσεις της.

Οι πρώτοι τέσσερις μεταλλαγμένοι κλώνοι που μελετήθηκαν υποδεικνύουν συγκεκριμένα αμινοξέα της αλληλουχίας της SRPK1a ως υπεύθυνα για την αλληλεπίδραση SRPK1a-p53.

ABSTRACT

SRPKs (SR protein kinases) represent a class of kinases that phosphorylate serine-arginine dipeptides (SR domains)

Nine genes that encode SR protein kinases have been identified in different organisms (human SRPK1 and SRPK2, mouse SRPK1 and SRPK2, SRPK1 in the fruitfly *Drosophila*, SRPK1 in the plant *Arabidopsis*, SPK-1 in the worm *C. elegans* as well as SKY1 και Dsk1 in *sacchormyces cerevisiae* and *pompe* respectively), suggesting the existence of an evolutionary conserved protein family.

A new isoform of SRPK1 is SRPK1a which contains an additional 171 amino acids at its N-terminal region. It was indentified and cloned recently and it exhibits similar properties as the SRPK1.protein.²⁶

By the use of the two hybrid system it was found that SRPK1a interacts specifically with several cellular proteins such as p53 and SAF-B that do not contain SR domains, a fact that constitutes a challenge for further investigation.

We believe that the elucidation of its function will provide important information for the function of the SR protein kinases. Moreover, the area characteristic for SRPK1a is particularly rich in prolines, a property characterized as favorable for protein-protein interactions. This agrees with the fact that several cellular proteins were found to strongly interact with the specific area.

We used chemical mutagenesis to create random mutations at the N-terminal part of SRPK1a and we selected clones that no longer interact with the proteins of interest.

The first four mutated clones selected, point to specific amino acids as responsible for the interaction of SRPK1 with p53.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η φωσφορυλίωση και αποφωσφορυλίωση πρωτεϊνών αποτελεί ένα σημαντικό μηχανισμό ρύθμισης των κυτταρικών λειτουργιών. Η μεγάλη οικογένεια των κινασών περιλαμβάνει τουλάχιστον 1000 μέλη και φωσφορυλιώνει ένα μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών, ως απόκριση σε διάφορα ερεθίσματα, για πολλά από τα οποία έχουν καταγραφεί τρόποι ρύθμισης και δράσης. Υπάρχουν ωστόσο κινάσες που δεν ενεργοποιούνται από γνωστά δεύτερα μηνύματα, των οποίων η ρύθμιση λειτουργίας παραμένει άγνωστη.

Οι κινάσες SR πρωτεϊνών αποτελούν μία καινούργια τάξη ενζύμων η οποία εντοπίστηκε για την ικανότητα της να φωσφορυλιώνει διπεπτίδια αργινίνης – σερίνης (RS domains) που βρίσκονται στους παράγοντες ματίσματος⁽¹⁻³⁾. Η πρώτη SR-κινάση (SRPK1) απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε το 1994 βάση της ιδιότητας της να φωσφορυλιώνει SR πρωτεΐνες. Μέχρι σήμερα έχουν κλωνοποιηθεί η ανθρώπινη SRPK2 το 1998, πολύ συγγενής με την SRPK1 σε δομή και λειτουργία, καθώς και τα ομόλογα της SRPK1 στο ποντίκι, τους σακχαρομύκητες *cerevisiae* και *pombe*, το σκουλήκι *C. Elegans* και το φυτό *Arabidopsis thaliana*. (human, SRRK1, GenBank TM accession number U09564, human SRPK2 U88666A, mouse SRPK1 AJ224115, mouse SRPK2 B006036, *Saccharomyces cerevisiae* SKY1, S55098 *Schizosaccharomyces pombe* DsK1, D13447, Fruit Fly *Drosophila* SRPK1 AF01149, nematode *Caenorhabditis elegans* SPK-1 AF241656, *Arabidopsis thaliana* SRPK1 AJ292978).

Οι SR πρωτεΐνες που αποτελούν τα πρώτα αναγνωρισμένα υποστρώματα των SR κινασών είναι παράγοντες ματίσματος. Η διαδικασία του ματίσματος περιλαμβάνει την αποκοπή των ιντρονίων και την ένωση των εξονίων στο πρόδρομο mRNA. Εντοπίζονται σε πυρηνικές περιοχές ονομαζόμενες speckles και καταλαμβάνουν συγκεκριμένες θέσεις στον πυρήνα. Χαρακτηρίζονται από ένα C- τελικό άκρο πλούσιο σε περιοχές σερίνης –αργινίνης (RS-περιοχές) και εμπλέκονται στην επιλογή θέσεων ματίσματος κατά τη συγκέντρωση του συμπλόκου ματίσματος. Η φωσφορυλίωση των SR πρωτεϊνών, έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωσή τους από τις πυρηνικές περιοχές (speckles) όπου είναι συγκεντρωμένες, σε ενεργές θέσεις της μεταγραφής στο πυρηνόπλασμα^(4, 7, 8, 9, 10).

Επειδή ακριβώς οι αλλαγές στη συγκέντρωση των SR πρωτεϊνών στον πυρήνα παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιλογή των θέσεων ματίσματος, η φωσφορυλίωση μπορεί έμμεσα να ρυθμίσει την επιλογή εναλλακτικών θέσεων ματίσματος.⁽¹¹⁻²¹⁾

Παρ' ότι όμως η δράση των SRPK έχει συνδεθεί στενά με τη δράση των παραγόντων SR και το μάτισμα του mRNA, υπάρχουν δεδομένα που προτείνουν ευρύτερους ρόλους για αυτές.

Έτσι, η SR Κινάση στον *Saccharomyces cerevisiae* (Sky1) φωσφορυλιώνει και ρυθμίζει τη μεταφορά στον πυρήνα του παράγοντα Nr13p, που φέρεται να παίζει ρόλο στην μεταφορά του mRNA⁽²²⁾. Επιπλέον έχει δειχθεί ότι η αντίστοιχη κινάση του *C. Elegans* είναι απαραίτητη για την εμβρυογένεση και την ανάπτυξη της σπερματικής σειράς⁽²³⁾.

Στον άνθρωπο έχουν περιγραφεί τουλάχιστον άλλα δύο υποστρώματα για την SRPK1, που αν και περιέχουν RS μοτίβα δεν είναι μέλη της SR οικογένειας που συμμετέχει στο μάτισμα. Πρόκειται για τον υποδοχέα της λαμίνης B, LBR (Lamin receptor)⁽²⁴⁾ και την πρωταμίνη 1 (P1), υπεύθυνη για την περαιτέρω συμπύκνωση της χρωματίνης στα σπερματοζώαρια⁽²⁵⁾.

Όπως διαφαίνεται, οι SR κινάσες συμμετέχουν σε πληθώρα βασικών κυτταρικών λειτουργιών για πολλές από τις οποίες όμως, ο ρόλος παραμένει ασαφής. Πρόσφατα ανιχνεύθηκε η SRPK1a που προέρχεται από εναλλακτικό μάτισμα του μεταγράφου του γονιδίου της SRPK1, η οποία είναι μεγαλύτερη κατά 171 αμινοξέα από την SRPK1 στο N- τελικό άκρο. Η ενζυματική δράση, ή εξειδίκευση, ή επίδραση στη ρύθμιση του ματίσματος, ή έκφραση της στους διάφορους ιστούς καθώς και ο ενδοκυττάριος εντοπισμός της, ελάχιστα διαφέρουν από αυτά της SRPK1.

Παρ' όλα αυτά, με το σύστημα των δύο υβριδίων στον *S. cerevisiae* βρέθηκε ότι η SRPK1a αλληλεπιδρά εξειδικευμένα με πληθώρα άλλων πρωτεϊνών (βλέπε πίνακα 1). Στο πλαίσιο των ερευνών αυτών απομονώθηκαν πολλοί διαφορετικοί κλώνοι που αλληλεπιδρούν με την SRPK1a. Ένας από αυτούς κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη p53 που είναι καλά χαρακτηρισμένος παράγοντας μεταγραφής με ογκοκατασταλτική λειτουργία. Συγκεκριμένα, είναι η πρωτεΐνη που βρίσκεται πιο συχνά σε μεταλλαγμένη μορφή σε όγκους. Ένας δεύτερος κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη SAF-B, η οποία αλληλεπιδρά με την SRPK1a -αλλά όχι SRPK1 -*in vitro* και *in vivo*, μια καλά χαρακτηρισμένη S/MAR πρωτεΐνη πρόσδεσης της χρωματίνης στην πυρηνική μήτρα⁽²⁶⁻²⁷⁾. Έχει επίσης περιγραφεί ως HET (Hsp27-ERE-TA-TA-binding protein) λόγω της σύνδεσης του στον υποκινητή του γονιδίου Hsp27⁽²⁸⁾ καθώς και HAP

(hnRNP A1, associated protein) επειδή έχει βρεθεί σε σύμπλοκα hnRNP, όπου αλληλεπιδρά με την hnRNPA1 ⁽²⁹⁾. Εξάλλου έχει επισημανθεί ότι σε καταστάσεις θερμικού σοκ αλλάζει θέσεις στον πυρήνα, όπως επίσης ότι αλληλεπιδρά με την RNA πολυμεράση II και με SR πρωτεΐνες ⁽³⁰⁾.

Δεδομένου ότι η p53 και ο SAF-B δεν περιέχουν μοτίβα SR, υποθέτουμε ότι η ειδική αλληλεπίδραση με την SRPK1a εξυπηρετεί πιθανώς την προσέγγιση με άλλα υποστρώματα, σε συγκεκριμένα υποπυρηνικά διαμερίσματα.

Ένα σημαντικό στοιχείο που ενισχύει την άποψη ότι η SRPK1a αλληλεπιδρά και με άλλα υποστρώματα εκτός των SR πρωτεϊνών, είναι ότι η περιοχή που την χαρακτηρίζει είναι ιδιαίτερα πλούσια σε προλίνες (36 προλίνες σε 171 αμινοξέα), χαρακτηριστικό που έχει περιγραφεί να ευνοεί γενικότερα αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης- πρωτεΐνης (SH3, WW βλέπε παρακάτω.).



Το N-τελικό άκρο της SRPK1a είναι πλούσιο σε προλίνες (36 προλίνες /171 αμινοξέα)

ΠΡΟΛΙΝΗ

Η Προλίνη είναι ένα αμινοξύ, που παίζει σημαντικό ρόλο στη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών γιατί είναι το μοναδικό, που έχει την πλευρική αλυσίδα κυκλοποιημένη πάνω στο σκελετό. ⁽³¹⁾

Έχει τις εξής ιδιότητες:

A) Επάγει β-πτυχώσεις, αν υπάρχουν τυροσίνες ή ακολουθούν φαινυλαλανίνες και τρυπτοφάνες.

B) Εισάγει κλίσεις σε διαμεμβρανικές έλικες, ώστε οι πρωτεΐνες να αλλάζουν διαμορφώσεις.

Η προλίνη δεν έχει μεγάλες δυνατότητες αλλαγής της δομής και δείχνει προτίμηση στη δημιουργία β-ελάσματος. Σαν αποτέλεσμα πρωτεΐνες πλούσιες σε προλίνη εμφανίζουν συχνά PPII έλικα που είναι μια εκτενής δομή με 3 θέσεις ανά στροφή.

Αυτό σημαίνει ότι στο μοτίβο PxxP, οι δυο προλίνες είναι στην ίδια όψη της έλικας και έτσι έχουν καλύτερη θέση για να αλληλεπιδράσουν με άλλες πρωτεϊνικές περιοχές (π.χ. SH3) .

Η PPII έλικα είναι μια ασυνήθιστη δομή: οι προλίνες σχηματίζουν μια συνεχή υδροφοβική σειρά γύρω από την επιφάνεια της έλικας, ενώ ο σκελετός των καρβοξυλίων παρουσιάζει ιδανική θέση για δεσμούς υδρογόνου και έτσι είναι και οι δυο δομικά περιορισμένες και ηλεκτρονικά πλούσιες. Επομένως οι PPII έλικες παρουσιάζουν μια υδροφοβική επιφάνεια, όσο και μια καλή θέση δεσμού υδρογόνου. Η προσέγγιση της PPII ενισχύεται από το γεγονός ότι αυτές βρίσκονται στο N- τελικά ή καρβοξυτελικά άκρα των πρωτεϊνών όπου σχηματίζουν εκτενείς δομές που ονομάζονται “sticky arms”⁽³²⁾.

Οι PPII υπάρχουν κυρίως σε σφαιρικές πρωτεΐνες που είναι διαλυτοποιημένες και αμφιπαθείς. Είναι επίσης πιο συχνές σε πρωτεΐνες που δεν έχουν χαρακτηριστεί δομικά, γιατί είναι δύσκολο να χαρακτηριστούν με X-ray ή NMR φασματομετρία ⁽³³⁻³⁴⁾.

Η σχετική δυσκαμψία των αλληλουχιών πολυπρολινών σημαίνει ότι χάνουν λίγη εντροπία διαμόρφωσης και έτσι δένονται πιο εύκολα από άλλες μη σφαιρικές πεπτιδικές αλληλουχίες. Φυσικά οι αλληλουχίες της προλίνης δεν μπορούν να δεθούν τόσο έντονα όσο οι σφαιρικές περιοχές. Ωστόσο ασθενέστερο δέσιμο μπορεί να είναι πλεονέκτημα μια και επιτρέπει την πρόσδεση των περιοχών πλούσιων σε προλίνη να αλλάζει γρήγορα ⁽³⁶⁾. Επιτρέπει επίσης μεγάλες αλλαγές Kb με μικρή αλλαγή στην

αλληλουχία των περιοχών αυτών ή της περιοχής πρόσδεσης, είτε με αλλαγές αλληλουχίας είτε με ομοιοπολικές τροποποιήσεις όπως η φωσφορυλίωση.^(35, 32, 37)

Ο αριθμός των πρωτεϊνικών δομικών περιοχών που έχουν περιγράφει να αλληλεπιδρούν με περιοχές πλούσιες σε προλίνη γίνεται όλο και μεγαλύτερος. Πολύ καλά μελετημένες είναι οι περιοχές SH3 και WW (καθώς και τα σύμπλοκα αυτών με περιοχές πλούσιες σε προλίνη), αλλά και περιοχές όπως EVH1(Enabled, VASP, Homology1) της CD2BP2 (CD2binding protein2) και της προφιλίνης.

SH3 DOMAINS

Οι SH3 περιοχές είναι μήκους 50-70 αμινοξέων. Συχνά βρίσκονται σε ευκαρυωτικές πρωτεΐνες μεταβίβασης μηνυμάτων ή κυτταροσκελετικές όπως, Abl, μυσίνη, Nck, ρυθμιστική υπομονάδα PI3K, ras GTPase, σπεκτρίνη κλπ⁽³⁸⁻⁴¹⁾

Πειράματα κατέδειξαν ότι οι περιοχές SH3 αναγνωρίζουν αλληλουχίες πλούσιες σε προλίνη που περιέχουν την αλληλουχία PxxP, όπου x οποιοδήποτε αμινοξύ⁽⁴²⁻⁴³⁾

Βιβλιοθήκες φάγων χρησιμοποιήθηκαν για να αποκαλύψουν την εξειδίκευση των SH3 περιοχών με τις περιοχές των: Abl, Crk, Fyn, Lym, Nck, p53 BP2, PI3K, PLCγ, Tsk, Yes, και κορτακτίνη. Όλες επιλέγουν περιοχές με το μοτίβο PxxP⁽⁴⁴⁻⁴⁸⁾.

Έρευνες στη δομή του συμπλέγματος SH3- πεπτιδίου πλουσίου σε προλίνη έδειξαν ότι υπάρχουν οι εξής δύο τρόποι σύνδεσης:

Τα πεπτίδια που συνδέονται σε N → C προσανατολισμό και ονομάζονται τάξη I και τα πεπτίδια που συνδέονται σε C → N προσανατολισμό, ως προς τις SH3 περιοχές, και ονομάζονται τάξη II⁽⁴⁹⁻⁵⁰⁾. Ο προσανατολισμός του πεπτιδίου καθορίζεται από την ύπαρξη θετικά φορτισμένης περιοχής κοντά στο PxxP μοτίβο, που σχηματίζει ιονικό δεσμό με την SH3 περιοχή. Έτσι πεπτίδια που έχουν μοτίβο +xxPxxP και PxxPx+ (όπου + αναφέρεται σε θετικά φορτισμένα αμινοξέα) ανταποκρίνονται στις τάξεις I και II. Μερικές SH3 περιοχές, έχουν την ικανότητα να δένουν πεπτίδια οποιασδήποτε τάξης και στους δυο προσανατολισμούς. Οι πλευρικές αλυσίδες της προλίνης ταιριάζουν στην SH3 περιοχή και επίσης μπορούν να σχηματισθούν παρόμοιοι δεσμοί υδρογόνου στα καρβοξύλια των συνδέσμων που είναι πλούσιοι σε προλίνη.⁽⁵¹⁾

Εκτός από τις δύο τάξεις που αναφέρθηκαν παραπάνω, έχει βρεθεί και ένας τρίτος τρόπος αλληλεπίδρασης, όπου περιοχές που βρίσκονται μακριά από την πρωτεΐνη,

έρχονται κοντά, εξαιτίας της αλλαγής διαμόρφωσης και συνδέονται με SH3 περιοχές. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η αλληλεπίδραση p53 (proline rich) με την πρωτεΐνη που συνδέεται στο p53, την p53 BP2. Η SH3 περιοχή της p53 BP2, αντιδρά με δύο περιοχές της L3 θηλιάς της p53, με τρόπο ανάλογο με τα κανονικά σύμπλοκα SH3-PxxP.⁽⁵³⁻⁵⁴⁾

WW DOMAINS

Οι WW περιοχές αποτελούνται από 38- 40 αμινοξέα.

Είναι 2 τρυπτοφάνες (W) που απέχουν 20-22 αμινοξέα και παίζουν ρόλο στη δομή και λειτουργία της περιοχής.⁽⁵⁵⁾ Αν και η WWπεριοχές λειτουργικά μοιάζουν με τις SH3, μια και αλληλεπιδρούν με πλούσιες σε προλίνη περιοχές η δομή τους είναι διακριτή. Οι WW περιοχές έχουν μια δομή β-ελάσματος που σχηματίζει μια ρηχή τσέπη για πρωτεΐνες που περιέχουν το μοτίβο PpxY ή PPLP, συνήθως έχοντας γύρω τους επιπλέον προλίνες.⁽⁵⁶⁻⁵⁸⁾

Τελευταία, το PxxGMxPP μοτίβο βρέθηκε να αλληλεπιδρά με WW περιοχές, που βρίσκεται σε πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην ωρίμανση του mRNA.⁽⁵⁹⁾ Αυτές οι WW περιοχές έχουν τρεις συνεχείς τυροσίνες κεντρικά.

Το PpxY μοτίβο αναγνωρίστηκε σε πολλούς μεταγραφικούς παράγοντες (c-Jun, AP2, NF-E2, C/EBPα, PEBP2/ CBF), όπου μπορεί να παίζει ρόλο στη μεταγραφική ενεργοποίηση. Ίσως να προσελκύει πρωτεΐνες που περιέχουν WW περιοχές και λειτουργούν ως συνεργοποιητές.^(61,63)

Η φωσφορυλίωση είναι κοινός μηχανισμός ρύθμισης δράσης πρωτεϊνών και χρησιμοποιείται ιδιαίτερα στις περιοχές πλούσιες σε προλίνες. Αυτές οι περιοχές περιέχουν πολλές φορές σερίνη ή θρεονίνη και συγκεκριμένα ένζυμα ρυθμίζουν τη φωσφορυλίωση και αποφωσφορυλίωση αυτών.⁽⁶⁴⁻⁶⁵⁾ Είναι άγνωστο εάν η SRPK1a φωσφορυλιώνεται σε αυτή την περιοχή. Επιπλέον, δεν περιέχεται στην SRPK1a κανένα από τα μοτίβα πλούσια σε προλίνη που περιγράφονται παραπάνω.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση των δομικών στοιχείων της SRPK1a που ευθύνονται για τις εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις του αμινοτελικού της άκρου με κυτταρικές πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα: έχει δειχθεί από προηγούμενη εργασία στο Εργαστήριο Βιοχημείας (διδασκτορικό Ρασέλ Κοέν υπεύθυνη Ελένη Γεωργιάτσου) ότι ταν N-τελικό άκρο της SRPK1a αλληλεπιδρά εξειδικευμένα με διάφορες πρωτεΐνες (πίνακας 1). Βάση αυτού η έρευνα επικεντρώθηκε στην διερεύνηση εκείνων των αμινοξέων της περιοχής πλούσιας σε προλίνη στα οποία σφείλονται οι αλληλεπιδράσεις των p53 και SAF-B, (για τα οποία έχει δειχθεί ισχυρή αλληλεπίδραση *in vivo* και *in vitro*) Οι πρωτεΐνες αυτές δεν περιέχουν περιοχές όπως SH3, WW.κ.α., αλλά ούτε και το N αμινοτελικό άκρο της SRPK1a περιέχει κανένα από τα γνωστά μοτίβα προλίνης που έχουν περιγραφεί ως επιφάνειες αλληλεπίδρασης με άλλες γνωστές πρωτεΐνες.

Δεδομένου ότι οι αλληλεπιδράσεις του N-τελικού άκρου της SRPK1a έχουν ανιχνευθεί με το σύστημα των δυο υφιδίων στον σακχαρομύκητα *cerevisiae*, χρησιμοποιήσαμε το ίδιο σύστημα για την ανίχνευση μεταλλάξεων που θα αναιρούν την ιδιότητα αλληλεπίδρασης.

Πίνακας 1

ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΠΟΥ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΟΥΝ ΜΕ ΤΗΝ SRPK1α ΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΔΥΟ ΥΒΡΙΔΙΩΝ

Ταυτότητα	Αλληλεπίδραση με SRPK1α (mM AT ^R)	Αλληλεπίδραση με SRPK1 (mM AT ^R)
SAF-B	+++++	++
Similar ZFY	+++++	++
Pyruvate kinase	++++	-
P53 tu. Sup.	++++	+++
TACC2	++++	-
LEMAN	++++	0
C1/C2(hnRNP)	++++	+++
MLL2	++++	0
Ubiquitin pr.lig	+++	-
ARA55	+++	-
Mp52bp	+++	-
O-glc-Nac trans	+++	0
Laminin β2	+++	-
Hap1	+++	-
MAGED1	++	-
Lamin β2	++	-
HuD antigen	++	-
Heparin bind. pr	+	-
Smoothened	+	-
Άγνωστο	+++++	++++
Άγνωστο	+++++	-
Άγνωστο	+++++	-
Άγνωστο	++++	-
Άγνωστο	++	-
Άγνωστο	+	-

ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΔΥΟ ΥΒΡΙΔΙΩΝ

Η μέθοδος βασίζεται στο μηχανισμό έναρξης της μεταγραφής. Είναι γνωστό ότι οι παράγοντες της μεταγραφής αποτελούνται από περιοχές που μπορούν να δράσουν ξεχωριστά: DBD (DNA binding domain) και AD/(activation domain). Οι DBD αναγνωρίζουν και προσδένονται πολύ εξειδικευμένα σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA, που βρίσκονται στους υποκινητές των γονιδίων. Παράλληλα οι AD δρουν μέσω της επαφής άμεσα ή έμμεσα με τα σύμπλοκα της RNA πολυμεράσης, στα σημεία έναρξης της μεταγραφής. Η προσέγγιση των δυο αυτών περιοχών μέσω αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης **δόλωμα** με την πρωτεΐνη **λεία** στην περιοχή του υποκινητή ενός γονιδίου αναφοράς (σχ.1) θα προκαλέσει την έναρξη της μεταγραφής του γονιδίου αναφοράς.

Πρακτικά: Το σύστημα των δυο υβριδίων είναι μια μέθοδος που ανιχνεύει αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης καταλήγοντας σε συγκεκριμένους φαινοτύπους των στελεχών που φέρουν το πλασμίδιο δόλωμα και το πλασμίδιο λεία.

Πλασμίδιο δόλωμα: Πλασμίδιο το οποίο φέρει κλωνοποιημένο το DNA του γονιδίου της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος (x) σε σύντηξη με τον DBD ενός μεταγραφικού παράγοντα, του GAL4.

Πλασμίδιο λεία: Πλασμίδιο το οποίο φέρει κλωνοποιημένο το DNA του γονιδίου της πρωτεΐνης (y) που έχει βρεθεί να αλληλεπιδρά με το δόλωμα, σε σύντηξη με την AD του ιού VP16. Επιλέγησαν προς διερεύνηση: (pVP16p53, pVP16SAF-B, pVP16ZFY, pVP16Mp53bp, pVP16O-glc-Nac trans, pVP165A2 (άγνωστη)) (πίνακας.2)

Το στέλεχος στο οποίο μπορούν να ελεγχθούν τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις είναι το pJ69-4A και φέρει τρία γονίδια αναφοράς:

Το HIS3, απαραίτητο για τη βιοσύνθεση της ιστιδίνης, το ADE2, απαραίτητο για τη βιοσύνθεση της αδενίνης και το Lac-Z (γονίδιο έκφρασης που κωδικοποιεί για το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση). Και τα τρία αυτά γονίδια, είναι ενσωματωμένα στο χρωμόσωμα του στελέχους pJ69-4A και φέρουν στον προαγωγέα τους θέσεις σύνδεσης του μεταγραφικού παράγοντα GAL4.

Εφόσον τα γονίδια αναφοράς δεν εκφράζονται, το στέλεχος

α) Έχει ανάγκη εξωτερικής παροχής ιστιδίνης για να μεγαλώσει και κατ'επίπτωση πεθαίνει παρουσία 3-amino-1,2,4-triazole (AT)(συναγωνιστικός αναστολέας του ενζύμου HIS3)

β) Έχει ανάγκη εξωτερικής παροχής αδενίνης

γ) Δεν διασπά το υποστρώμα της β-γαλακτοσιδάσης (X-Gal) και άρα τα κύτταρα δεν γίνονται μπλε τα κύτταρα παρουσία X-Gal.

Η ενεργοποίηση της μεταγραφής- η οποία σηματοδοτείται από την αλληλεπίδραση δολώματος-λείας και συνεπώς προσεγγίζει τον DBD GAL4 με την AD VP16 στους υποκινητές των γονιδίων αναφοράς, καταλήγει σε επαγωγή και συγκεκριμένο φαινότυπο του στελέχους pJ69-4A. (σχήμα.1)

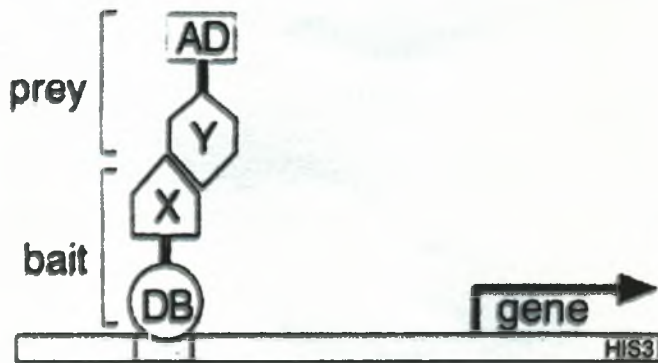
Δηλαδή:

τα κύτταρα μεγαλώνουν χωρίς ιστιδίνη και παρουσία (AT)

μεγαλώνουν χωρίς αδερίνη

γίνονται μπλε παρουσία X- Gal

Σχήμα 1



Η ισχύς των αλληλεπιδράσεων που έχουν βρεθεί με το σύστημα των δύο υβριδίων, μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με χρήση του αναλόγου του υποστρώματος του ενζύμου που κωδικοποιείται από το γονίδιο HIS3, του AT, που δρα ως συναγωγικός αναστολέας για το συγκεκριμένο ένζυμο (πίνακας 2). Συνεπώς όσο καλύτερα επιζεί το συγκεκριμένο στέλεχος παρουσία διαφορετικών αυξημένων ποσοτήτων AT τόσο περισσότερο HIS3 παράγει.

Πίνακας 2.

Ταυτότητα PJ694A με:	Αλληλεπίδραση με SRPK1α (mM AT ^R)	Αλληλεπίδραση με SRPK1 (mM AT ^R)
SAF-B	>100	5
Similar ZFY	>100	5
Pyruvate kin	>50	-
P53tu.sup.	>50	10
Άγνωστο	>100	-
ARA55	>10	-
Mp52bp	>10	-
O-glc-Nac trans	>10	0

Η προσέγγιση που ακολουθήσαμε ήταν να μεταλλάξουμε την αλληλουχία του πλασμιδίου δολώματος και να επιλέξουμε στελέχη, που περιέχουν μεταλλαγμένα πλασμίδια - δολώματα), έτσι ώστε παρουσία του πλασμιδίου -λείας να ~~μη~~ δίνει τον αναμενόμενο φαινότυπο (να είναι δηλαδή ευαίσθητα στο AT (AT^s (AT sensitive))).

ΒΑΣΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Επιγραμματικά η πειραματική εργασία αφορούσε τα παρακάτω στάδια:

- -Καλλιέργεια βακτηρίων που περιέχουν το πλασμίδιο δόλωμα και βακτηρίων που περιέχουν πλασμίδια με τις επιλεγμένες λείες.
- -Απομόνωση πλασμιδίων που φέρουν το δόλωμα. Απομόνωση πλασμιδίων που φέρουν τη λεία.
- -Μετασχηματισμός του στελέχους PJ69-4A με το πλασμίδιο που φέρει τη λεία.
- -Μετάλλαξη του πλασμιδίου που φέρει το δόλωμα (N-τελικό άκρο της SRPK1a) κλωνοποιημένο στο φορέα PGBT9 (PGBT9HT).
- -Πέψη του μεταλλαγμένου πλασμιδίου με ενδονουκλεάσες περιορισμού και απομόνωση του ενθέματος.
- -Δημιουργία «βιβλιοθήκης» μεταλλαγμένων ενθεμάτων σε pGBT9 (pGBT9/HTOH)
- -Εισαγωγή της «βιβλιοθήκης» στο στέλεχος PJ69-A4 που περιέχει τη λεία.
- -Επιλογή κλώνων στους οποίους έχει αντιστραφεί ο φαινότυπος (AT sensitive).
- -Διάσωση των πλασμιδίων που φέρουν το μεταλλαγμένο δόλωμα.
- -Ανάγνωση αλληλουχίας του μεταλλαγμένου ενθέματος ~~πλασμιδίου~~ προκειμένου να εντοπισθούν οι μεταλλάξεις.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ (M&M)

A. ΥΛΙΚΑ

- **Στελέχη E.coli:** KC-8 [U⁻ H⁻ L⁻ Trp⁻], TOP 10
- **Στελέχη yeast** *Sacharomyces cerevisiae* (S.c): pJ69-4A
- **Πλασμίδια:**
 - 1) pGBT9: φέρει αλληλουχία που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό σε E.coli και S.c
 - Φέρει το γονίδιο αντίστασης της αμπικιλίνης και για επιλογή σε E.coli και το γονίδιο trp1 Sc για επιλογή σε κύτταρα S.c
 - Φέρει θέσεις ένθεσης DNA σε συνέχεια του DNA που κωδικοποιεί για την DBD GAL4 έτσι ώστε να υπάρχει δυνατότητα παραγωγής χμιαρικής πρωτεΐνης με τον DBD GAL4
 - 2) pVP16: περιέχει το AD του μεταγραφικού παράγοντα σε σύντηξη με τις λείες.
 - Ικανό να πολλαπλασιαστεί σε E.coli και S.c.
 - Φέρει το γονίδιο αντίστασης της αμπικιλίνης για επιλογή σε E.coli και το γονίδιο Leu2 S.c για επιλογή σε κύτταρα S.c
 - Φέρει θέσεις ένθεσης DNA σε συνέχεια του DNA που κωδικοποιεί για την AD του VP16 έτσι ώστε να υπάρχει δυνατότητα παραγωγής χμιαρικής πρωτεΐνης με τον AD.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

TFBI

-30 mM KOAc
-50 mM MnCl₂
-100 mM KCl
-10 mM CaCl₂
-15% γλυκερόλη

TFBII

-10 mM MOPS
-75 mM CaCl₂
-10 mM KCl
-20% γλυκερόλη
(pH: 7.0)

RESCUE:

-100 mM NaCl
-10 mM Tris-HCl (pH: 8.0)
-1 mM EDTA
-0,1% SDS

ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ

L.B 1 litre

10gr bacto tryptone
5gr bacto yeast extract
20gr bacto-peptone
20gr αγάρ

YPD 1 litre

20gr glucose
10gr bacto-yeast extract
5gr Nacl
20 gr αγάρ

SC

20gr γλυκόζη
1,7gr YNB
5gr NH₄SO₄
2gr mixed amino acid(17a.a
NaOH 5M P.H.5,6
(+aa)
20gr αγάρ

5 X M9

Na₂HPO₄ 42,5gr
KH₂PO₄ 15gr
NaCl 2,5grl
NH₄Cl 5gr
H₂O q.s 1lt

M9+amp Petri

750ml H₂O
200ml 5XM9
2ml MgSO₄
0,1ml CaCl₂ 350
20ml γλυκόζη
+20gr αγάρ

B. ΜΕΘΟΔΟΙ

1) Παρασκευή αλκομιδιακού DNA

1α) Midi Prep (QIAGEN)

- Καλλιέργεια βακτηρίων E. Coli 50 ml LB amp ολονύκτια(ο/ν) στους 37° C
- Φυγοκέντρηση 400 rpm στους 4° C για 10΄
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και διαλύουμε το ίζημα σε 4 ml Buffer P1 (προσθέτουμε RNase αν δεν έχει το διάλυμα P1)
- Προσθέτουμε 4 ml Buffer P2 και ανακινούμε ήπια 5-6 φορές 5΄ σε θερμοκρασία δωματίου.
- 4 ml παγωμένο Buffer P3 ανακινούμε ήπια 5-6 φορές και αφήνουμε στον πάγο για 15΄.
- Φυγοκέντρηση 4000 rpm για 30΄ στους 4° C
- Ενεργοποιούμε τις στήλες με 4 ml QBT.
- Φιλτράρουμε το υπερκείμενο σε γάζα και το ρίχνουμε στις στήλες.
- Ξεπλένουμε 2 φορές με 10 ml QC.
- Εκλούουμε με 2 ml Buffer QF για να πάρουμε το DNA.
- Προσθέτουμε 1400μl ισοπροπανόλης.
- Φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 30΄ στους 4° C.
- Στο ίζημα προσθέτουμε 1ml αιθανόλη 70%
- Φυγοκέντρηση για 5΄ στις ίδιες συνθήκες.
- Στεγνώνουμε το ίζημα και προσθέτουμε 50 μl H₂O σε κάθε eppendorf.

1β) Miniprep με αλκαλική λήψη

- Καλλιέργεια βακτηρίων E.coli ολονύκτια σε 3ml LBamp
- Μεταφορά των καλλιιεργειών σε eppendorf 1,5 ml.
- Φυγοκέντρηση για 1΄στις 14000 rpm .
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε το υπόλοιπο 1,5 ml των καλλιιεργειών.
- Φυγοκέντρηση για 1΄στις 14000 rpm στους 4° C..

- Προσθέτουμε στο ίζημα 400μl διάλυμα I (50 mM γλυκόζη, 10 mM EDTA, 25 mM tris HCl pH 8) αιωρούμε τα κύτταρα και τοποθετούμε 5' σε θερμοκρασία δωματίου.
- 400μl διάλυμα II (0,2 M NaOH /1%/ SDS) αναδεύουμε καλά και τοποθετούμε για 5' στον πάγο.
- 300μl διάλυμα III (5M CH₃COoK PH 5,8).
- Vortex και το τοποθετούμε 10' στον πάγο.
- Φυγοκέντρηση για 10' στις 10000 rpm στους 4° C.
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε καινούρια eppendorf και προσθέτουμε ίδια ποσότητα φαινόλη -χλωροφόρμιο
- vortex
- Φυγοκέντρηση για 2' στις 11000 rpm
- Μεταφέρουμε την υδάτινη φάση σε νέα eppendorf
- 700μl ισοπροπανόλη και φυγοκέντρηση για 10' στις 11000 rpm στο ίζημα προσθέτουμε 1ml 70% αιθανόλη
- Φυγοκέντρηση για 1'.
- Στέγνωμα του ιζήματος και επαναδιάλυση με 20μl H₂O.

2. Παρασκευή πηκτής αγαρόζης 1%.

1 g αγαρόζη 100ml 1x TAE 5μl βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml).

3. Μετασχηματισμός κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae* με DNA σε μικρή κλίμακα.

- καλλιέργεια σε YEPAD θρεπτικό υγρό ο/η στους 30° C
- Φυγοκέντρηση για 5' στις 4000 rpm στους 4° C.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο.
- 600μl 0,1M LiAc επαναδιάλυση και μεταφορά σε 6 eppendorf
- Φυγοκέντρηση για 10''
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο.
- 240 μl PEG 50% (3350MB)
- 36μl LiAc 1M
- 50μl ssDNA (salmon sperm DNA)

- 1 μg. Πλασμιδιακό DNA.
- Πολύ καλή ανάδευση σε vortex να διαλυθούν τα ιζήματα
- 30' 30° C
- 30' 42° C
- Φυγοκέντρηση για 15''
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα με 100μl H₂O.
- Απλώνουμε σε τριβλία με το κατάλληλο θρεπτικό μέσο .

4. Παρασκευή competent βακτηριακών κυττάρων

- Υγρή καλλιέργεια ο/n KC-8 σε 3ml LB θρεπτικό μέσο στους 37° C
- Αραίωση 1:100 της καλλιέργειας (δηλαδή 30μl σε 3ml LB)
- Επώαση στους 37° C για 2 ώρες.
- Νέα αραίωση 1:200 (1250μl από αρχική καλλιέργεια σε 250 ml LB)
- Επώαση στους 37° C για 3 ώρες
- Φωτομέτρηση σταδιακά (Θέλουμε να έχουμε βέλτιστη O.D. 0,350- 0,400) στα 590nm
- Φυγοκέντρηση 5' 3000 rpm 4° C
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο.
- Επαναδιάλυση με 25 ml TFB I (M&M A)
- Τοποθετούμε στον πάγο για 10 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 5' στους 4° C.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 2ml TFB II.(M&M A)
- Τοποθετούμε για 60' στον πάγο.
- Μοιράζουμε από 200μl του τελικού όγκου των κυττάρων σε ~~ε~~pendorf μικροφυγόκεντρο και αποθηκεύουμε στους -80° C.

5. Αντίδραση υδροξυλαμίνης NH₂OH

- Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων.
- 0,5 M K₂HPO₄ pH 6
- 0,5 M NH₂OH

Τοποθετούμε σε erendorf τα παρακάτω αντιδραστήρια -10μg DNA + 50μl 0,5M NH₂OH + 50μl 0,5M KH₂PO₄ pH6 και στους χρόνους που σημειώνονται αφαιρούμε 20μl DNA και το τοποθετούμε σε 80μl νερό που βρίσκεται ήδη στον πάγο

Χρόνος	PGBT9HTOH	H ₂ O σε πάγο
T ₀	20μl	80μl
T ₃₀	20μl	80μl
T ₆₀	20μl	80μl
T ₉₀	20μl	80μl
T ₁₂₀	20μl	80μl

-Ενεργοποίηση στηλών Δεξτράνης sephadex G-25.

-Μεταφέρουμε το DNA OH στις στήλες για να το καθαρίσουμε από την NH₂OH και -Επανακτούμε το DNA με 100μl νερό σε καθαρά erendorf.

-Τρέξιμο σε πηκτή αγαρόζης 10μl το καθ' ένα

6. Μετασχηματισμός κυττάρων *E.coli* με πλασμιδιακό DNA

-200 μl κύτταρα + DNA

-40' στον πάγο

-Επώαση στους 42 ° C για 90''

-Προσθέτουμε 1ml LB, επώαση στους 37° C για 60'

-10''φυγοκεντρηση

-Αφαιρούμε το υπερκείμενο

-Προσθέτουμε 100μl LB

-Απλώνουμε 100μl σε τριβλία με θρεπτικό μέσο LB amp.

- Επωάζουμε στους 37°C

7. Πιστό αποτέλεσμα (replica plating)

Τα κύτταρα που βρίσκονται σε ένα συγκεκριμένο τριβλίο (και προέρχονται από πολλαπλασιασμό αποικιών) μεταφέρονται ποσοτικά και αυτούσια όσον αφορά την τοπολογική τους κατανομή στο τριβλίο ,σε άλλα τριβλία (αντίγραφα) μέσου επαφής του αρχικού τριβλίου με αποστειρωμένο ύφασμα (βελούδο) από το οποίο και πάλι με

επαφή μεταφέρονται ποσοτικά και χωροταξικά σε ανάλογες ποσότητες στα τριβλία επιλογής.

8. Μετεσχηματισμός στελεχών pJ69-4Aa/p53 με το πλασμίδιο pGBT9HTOH

- Καλλιέργεια των στελεχών σε 10ml κατάλληλου θρεπτικού υγρού ο/η στους 30° C
- Αραίωση της καλλιέργειας σε θρεπτικό υλικό YPDAD.
- Αρχική καλλιέργεια O.D₆₀₀ 2,5
- 42,5ml YPDAD + 7,5ml αρχικής καλλιέργειας.
- O.D₆₀₀ 0,375
- Μετά από 5 ώρες στα 600nm, O.D₆₀₀ 1,5.
- Φυγοκέντρηση 5' 3000rpm πετάμε το υπερκείμενο
- Επαναιώρηση των κυττάρων σε 50ml H₂O
- φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες
- Διαλύουμε ξανά με 3ml LiAc100mM
- Επώαση 15' στους 30° C
- Μεταφορά σε 4 erentorf 500μlτο καθένα
- Προσθέτουμε 240μl PEG 50% +36μl LiAc +50μl ssDNA
- Αριθμούμε τα erentorf και προσθέτουμε με τη σειρά αρίθμησης 0,1μg, 0,5μg, 1μg, 2μg και προσθέτουμε το απαιτούμενο νερό μέχρι τα 360μl.
- Επώαση για 30' στους 30° C και για επώαση για άλλα 30' στους 42° C.
- Φυγοκέντρηση 1', πετάμε το υπερκείμενο
- Αραίωση με 200μl H₂O
- Άπλωμα 50μl και 150μl σε τριβλία με κατάλληλο θρεπτικό υλικό
- Επώαση στους 30°C

9. Πέψη πλασμιδιακού DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού

- Σε ένα erentorf τοποθετούμε τα παρακάτω με τη σειρά που αναγράφονται:
- 20μl H₂O
- 10μl NEB2
- 10μl BSA 10X
- 15μg DNA
- 5μl EcoR1

-5μl BamH1

- Επώαση στους 37°C 60'

10. Απομόνωση DNA από πηκτή αγαρόζης

-σε erpendorf τοποθετούμε τα παρακάτω:

-47μl DNA

-15μl χρωστική

-10'' φυγοκέντρηση

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

-Κόψιμο της ζώνης που περιέχει το DNA που μας ενδιαφέρει

-Ζύγισμα του κομματιού

-Προσθέτουμε 3 όγκους QG

-Επώαση στους 50° C για 10'

-Προσθέτουμε ίσο όγκο ισοπροπανόλης και το μεταφέρουμε στη στήλη

-Φυγοκέντρηση 1' αφαιρούμε το υγρό και προσθέτουμε 0,5ml QG

-Φυγοκέντρηση 1' αφαιρούμε το υγρό και προσθέτουμε 750μl PE

-Φυγοκέντρηση 1' αφαιρούμε το υγρό

-Έκλωση του DNA με 50μl EB σε νέο σωληνάκι μικροφυγόκεντρο

-Αφήνουμε 1'

-Φυγοκεντρούμε στις 14000 rpm για 1'

11. Κατεργασία πλασμιδιακού DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού και αλκαλική φωσφοτάση ώστε να καταστεί φορέας κλωνοποίησης.

-Σε ένα erpendorf τοποθετούμε τα παρακάτω με τη σειρά που αναγράφονται:

-20μl H₂O

-35μl 15μg πλασμιδιακό DNA

-10μl NEB2

-10μl BSA 10X

-5μl EcoR1

-5μl BamH1

- Επώαση στους 37° C για 60'

-Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 3μl

- Παίρνουμε τα 197μl
- Προσθέτουμε 180μl νερό (H₂O)
- Προσθέτουμε 20μl NEB 3
- 7μl CIP
- Επώαση στους 37° C 15'
- Προσθέτουμε 4μl πρωτεΐνωση K συγκέντρωσης 10mg/ml
- Προσθέτουμε ίσο όγκο Φαινόλη –χλωροφόρμιο (1:1)
- Φυγοκέντρωση 10' στις 14000 rpm
- Παίρνουμε υδατική φάση και προσθέτουμε ίσο όγκο φαινόλη –χλωροφόρμιο (1:1)
- Φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες.
- Παίρνουμε υδατική φάση και μετράμε όγκο
- Κατακρημνίζουμε το DNA αιθανόλη.

12. Κατακρήμνηση DNA με αιθανόλη.

- Προσθέτουμε 2,5 όγκους αιθανόλης 100% στο διάλυμα νουκλεϊκών οξέων και το 1/10 του όγκου CH₃COONa 3M.
- Τοποθετούμε στους -20⁰ C για 30'
- Φυγοκέντρωση για 10' στους 4⁰ C σε 12000g.
- Ξεπλένουμε το ίζημα με 1ml EtOH 70%
- Φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και ξηραίνουμε το ίζημα στον αέρα.
- Επαναδιάλυση σε 50μl απεσταγμένο νερό.

13. Αντίδραση σύνδεσης (ligation)

- Τοποθετούμε τα υλικά ως εξής:
- 20ng φορέα
- ένθεμα σε μοριακή περίσσια 4:1 σε σχέση με τον φορέα.
- 2μl ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης σύνδεσης
- H₂O έως τα 20 μl
- Επωάζουμε στους 14° C o/n

14. Απομόνωση και διάσωση (rescue) του πλασμιδίου από στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae*.

- Καλλιέργεια στους 30⁰ C ο/π, με τα κύτταρα του σακχαρομύκητα σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο 3ml
- Φυγοκέντρηση για 1'.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα των κυττάρων που πήραμε από τις καλλιέργειες σε 200μl διαλύματος RESCUE (M&M A)
- Προσθέτουμε glass beads, διαμέτρου 0,45 mm
- Αναδεύουμε για 2' καλό Vortex
- Προσθέτουμε 200μl φαινόλης
- Vortex για 1'
- Φυγοκέντρηση για 10' στις 4000 rpm.
- Μεταφέρουμε το υδατικό υπερκείμενο σε καθαρό σωλήνα μικροφυγόκεντρου, αποφεύγοντας να πάρουμε την μεσόφαση.
- Προσθέτουμε 200μl φαινόλης : χλωροφόρμιου σε αναλογία 1:1.
- Αναδεύουμε για 1'
- Φυγοκέντρηση για 10' στις 4.000. rpm.
- Μεταφέρουμε την υδατική φάση σε νέο σωλήνα μικροφυγόκεντρου.
- Συνεχίζουμε με κατακρήμνιση με αιθανόλη (M&M B12)
- Το DNA επαναδιαλύεται σε 20μl H₂O και 10μl χρησιμοποιούνται για να μετασχηματιστούν "competent" E.coli.

15. Διαχωρισμός του πλασμιδίου δολώματος από τα πλασμιδία λεία.

-Από το μετασχηματισμό σε κύτταρα E.coli με τα πλασμίδια δόλωμα και λεία και αφού επώαστηκαν σε LB πιάτα, μεταφέρθηκαν σε M9UAHL και σε πιάτα M9UAHT για να γίνει ο διαχωρισμός των πλασμιδίων σύμφωνα με τα γονίδια αναφοράς που προσδίδουν πρωτοτροφία στα κύτταρα.

16. Εύρεση αλληλουχίας πλασμιδιακού ενθέρματος

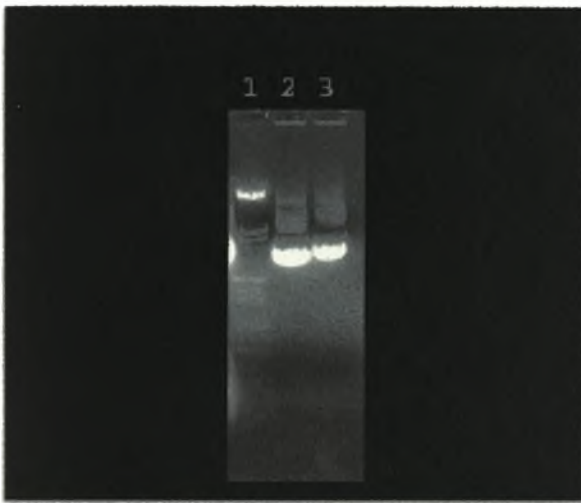
DNA παρασκευασμένο με τη μέθοδο midiprep QIAGEN (M&M 1α) εστάλη στο εργαστήριο Microchemistry Lab F.O.R.T.H, P.O Box 1527, 71110 Heraklion, Crete,

για εύρεση της αλληλουχίας του. Ο εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο «matchmaker 5'» και η μέθοδος, η μέθοδος Sanger.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Παρασκευή DNA πλασμιδίων: α) δολόματος β) λειών.

α) Παρασκευάστηκε DNA του πλασμιδίου – δόλωμα PGBT9HT που εκφραζόμενο σε κύτταρα ρJ69-4A θα παράγει τη χμιαρική πρωτεΐνη DBD GAL4-SRPK1a N-terminal (HT) με τη μέθοδο midi prep QIAGEN (M&M B1a).



Εικόνα 1.

Ηλεκτροφόρηση πλασμιδιακού DNA σε πηκτή αγαρόζης 1%.

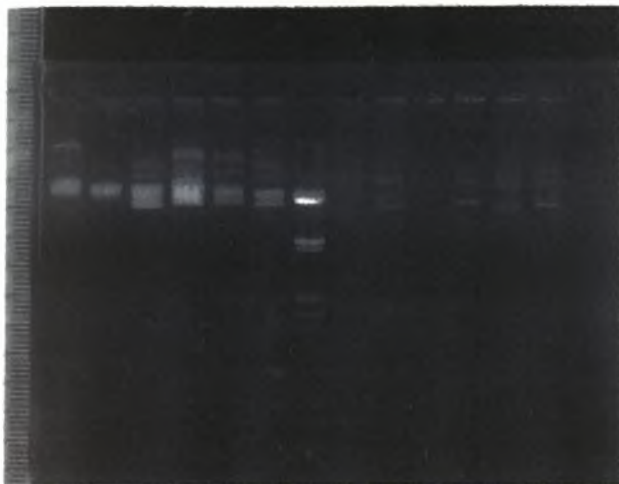
Διαδρομή 1: Μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών λ/ Hind EcoR1 (3μl)

Διαδρομή 2 : PGBT9(3μl)

Διαδρομή 3 : PGBT9HT (3μl)

β) Παρασκευάστηκε DNA των πλασμιδίων (pVP16-p53, pVP16-SAF-B, pVP16-ZFY, pVP16-Mp53bp, pVP16-O-glc-Nac trans, pVP16-5A2(άγνωστη), που όταν εισέλθουν σε κύτταρα ρJ69-4A θα παράγουν τις χμιαρικές πρωτεΐνες λείες (AD/pVP16-p53, AD/pVP16-SAF-B, AD/pVP16-ZFY, AD/ pVP16-Mp53bp, AD/pVP16-O-glc-Nac trans, AD/pVP16-5A2(άγνωστη)) όπως περιγράφεται (mini-preps) (M&M B1β)

1 2 3 4 5 6 7



Εικόνα 2,

Ηλεκτροφόρηση πλασμιδιακού DNA (mini-preps).

Διαδρομή 1: -pVP16-5A2(άγνωστη) (2μl)

Διαδρομή 2: -pVP16-p53, (2μl)

Διαδρομή 3: -pVP16-SAF-B(2μl)

Διαδρομή 4: -pVP16-ZFY(2μl)

Διαδρομή 5: - pVP16-Mp53bp(2μl)

Διαδρομή 6: -pVP16-O-glc-Nac trans(2μl)

Διαδρομή 7: λ/ Hind EcoRI (3μl)

3. Μετασχηματισμός στέλεχος *p J69-4A* με τα πλασμίδια λείες.

Τα πλασμίδια (AD/pVP16-p53, AD/pVP16-SAF-B, AD/pVP16-ZFY, AD/ pVP16-Mp53bp, AD/pVP16-O-glc-Nactrans, AD/pVP16-5A2(άγνωστο) εισήχθηκαν στο στέλεχος *p J69- 4A* όπως περιγράφεται (M&M B3).

Τα μετασχηματισμένα κύτταρα επιλέχθηκαν με βάση τις αυξοτροφίες που συμπληρώνουν τα συγκεκριμένα πλασμίδια στο αρχικό στέλεχος, στην περίπτωση αυτή η αυξοτροφία είναι για την λευκίνη. (M&mM B3).

4. Μεταλλαξογένεση του πλασμιδίου δολώματος *PGBT9HT* με υδροξυλαμίνη

Η υδροξυλαμίνη (NH_2OH) είναι ένας εξειδικευμένος μεταλλαξογόνος παράγοντας που αντιδρά με την κυτοσίνη και τη μετατρέπει σε ένα παράγωγο που ζευγαρώνει με

την αδενίνη αντί της γουανίνης, προκαλώντας έτσι μονοσήμαντη μεταστροφή CG σε AT.

Ελέγξαμε την αποτελεσματικότητα της μεταλλαξογέννεσης του πλασμιδιακού DNA από την υδροξυλαμίνη σε συνάρτηση με το χρόνο. Ως μάρτυρα χρησιμοποιήσαμε το γονίδιο TRP1 που φέρεται στο πλασμίδιο PGBT9HT και προσδίδει στο βακτηριακό στέλεχος KC-8 την ικανότητα να αναπτύσσεται χωρίς εξωγενή χορήγηση τρυπτοφάνης (συμπληρώνει την αυξοτροφία του στελέχους σε τρυπτοφάνη). Δεδομένου ότι η υδροξυλαμίνη προκαλεί μεταλλάξεις σε όλη την έκταση του πλασμιδίου, αναμέναμε να δημιουργηθούν και τέτοιες που θα καταστρέψουν το γονίδιο TRP1.

10μg πλασμιδίου PGBT9HT επώστηκαν παρουσία υδροξυλαμίνης. Το DNA μετά από επώαση (PGBT9/HTOH) αποχωρίστηκε από την υδροξυλαμίνη με χρωματογραφία διήθησης (sephadex G-25) (M&M B5). Βακτηριακά κύτταρα E.coli KC-8 μετασχηματίστηκαν με το πλασμίδιο μετά από την επώαση του με υδροξυλαμίνη όπως περιγράφεται (M&M B6) και ελέγχθηκαν για τη δυνατότητα αύξησης σε θρεπτικό μέσο με ή χωρίς τρυπτοφάνη με τη μέθοδο του πιστού αποτυπώματος (M&M B7).

Πίνακας 3.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΥΔΡΟΞΥΛΑΜΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ
ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΡΥΠΤΟΦΑΝΗΣ.

Αριθμός αποικιών

ΧΡΟΝΟΣ	+Trp	-Trp	Διαφορά	Θνησιμότητα λόγω έλλειψης τρυπτοφάνης %
T0	623	623	0	0
T30	752	745	7	0,93
T60	795	780	15	1,88
T90	220	208	12	5,95



*Οι τιμές που αναγράφονται είναι ο μέσος όρος τριών πειραμάτων.

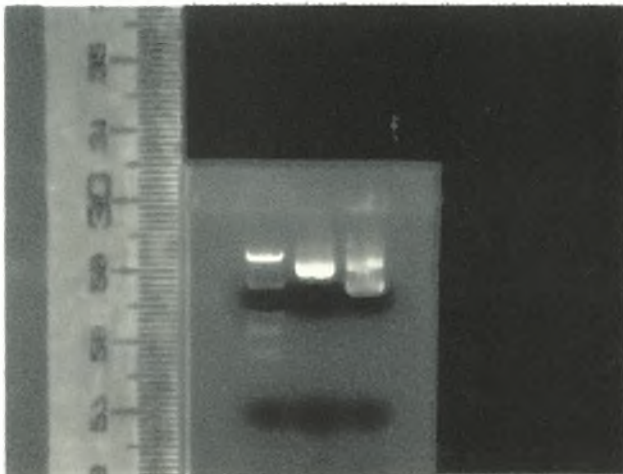
Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η επώαση του DNA με υδροξυλαμίνη, σε διάρκεια μιας ώρας προκαλεί μεταλλάξεις οι οποίες αναιρούν τη λειτουργία του γονιδίου της τρυπτοφάνης στο περίπου 2% των μορίων. Αυτό είναι ικανό ποσοστό αριθμού μεταλλάξεων για κάλυψη του τμήματος DNA που μας ενδιαφέρει χωρίς μεγάλο ποσοστό διπλών και τριπλών αλλαγών, γεγονός που θα επέφερε σύγχυση στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων (Chulnie- G. R. Fink- Methods Enzymology V194 Guide to Yeast genetics and molecular biology.).

4 Επώαση DNA PGBT9HT με NH₂OH.

10μg πλασμιδίου PGBT9HT επώστηκαν παρουσία υδροξυλαμίνης για χρονικό διάστημα μιας ώρας (t60), όπως περιγράφεται (M&M B5).

500ng ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης πριν και μετά την επώαση.

1 2 3



Εικόνα 3. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Διαδρομή 1. λ/ Hind EcoRI (3μλ)

Διαδρομή 2. PGBT9HTOH (μετά την αντίδραση υδροξυλαμίνης)

Διαδρομή 3. PGBT9HT(πριν την αντίδραση υδροξυλαμίνης)

Στη διαδρομή 2, φαίνεται η μετατροπή του υπέρ-ελικωμένου πλασμιδίου σε χαλαρό εξαιτίας της διάσπασης των ομοιοπολικών δεσμών που προκαλεί η υδροξυλαμίνη.

5. Μετασχηματισμός του στελέχους rJ69-4A με τα μεταλλαγμένα πλασμιδία pGBT9HTOH

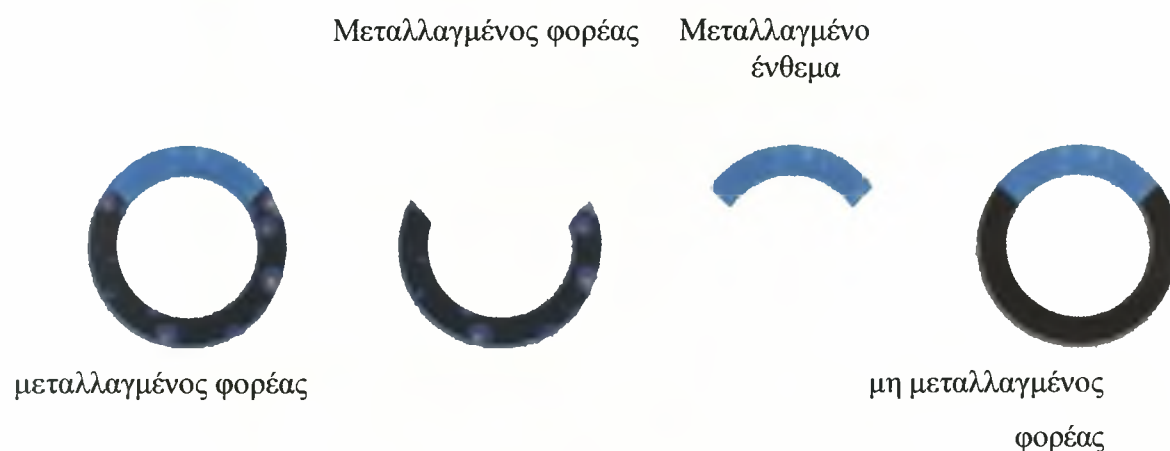
Στη συνέχεια μετασχηματίσαμε κύτταρα rJ69-4Aa που περιέχουν τις λείες με το σύνολο των μεταλλαγμένων πλασμιδίων. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που περιγράφεται στις μεθόδους M&M B8, η οποία όμως έδωσε πολύ φτωχά αποτελέσματα (ο αριθμός μετασχηματισμένων κυττάρων δεν ήταν ικανός για να καλύψει τον αριθμό μεταλλάξεων που χρειαζόμαστε).

Υποθέσαμε ότι το παραπάνω οφειλόταν σε υπολειπόμενα ποσά υδροξυλαμίνης.

Προσπαθήσαμε να απομακρύνουμε την υδροξυλαμίνη με επανειλημμένους καθαρισμούς (στήλη G-25-sephadex, QIAquick) αλλά η απόδοση του μετασχηματισμού δεν αυξήθηκε ικανοποιητικά.

Θεωρώντας ότι η χαμηλή απόδοση του μετασχηματισμού οφείλεται στις βλάβες που έχει πάθει το πλασμιδιακό DNA και σε άλλα σημεία εκτός από την περιοχή στην οποία μας ενδιέφερε να προκαλέσουμε μεταλλάξεις, αποφασίσαμε να μεταφέρουμε το σύνολο των μεταλλαγμένων ενθεμάτων μας σε "καινούργιο" (μη μεταλλαγμένο) πλασμιδιακό φορέα pGBT9 όπως φαίνεται στο σχήμα 2.

Σχήμα 2



-Μαύρο χρώμα: φορέας pGBT9

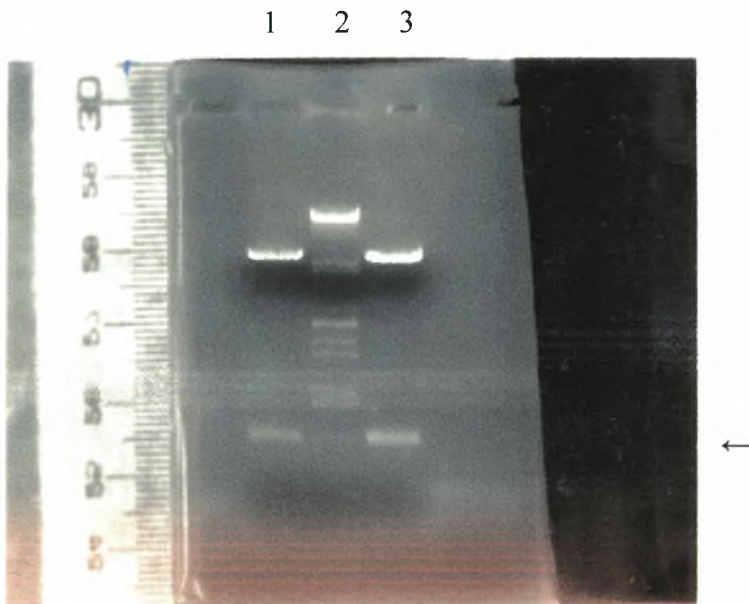
-Μπλε χρώμα: ένθεμα

-Με άσπρες κουκκίδες αντιπροσωπεύονται οι μεταλλάξεις που προήλθαν από την υδροξυλαμίνη.

6. Δημιουργία "βιβλιοθήκης" μεταλλαγμένων ενθεμάτων δευτέρου σε pGBT9

6α) Πέψη του pGBT9 HT με EcoRI και BamHI

15μg DNA pGBT9HT επωάστηκε με τις ενδονουκλεάσεις περιορισμού EcoRI και BamHI (M&M B9) δεδομένου ότι το αρχικό ένθεμα (HT) έχει κλωνοποιηθεί στις θέσεις EcoRI και BamHI του πλασμιδίου pGBT9. Η αντίδραση πέψης ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης.



Εικόνα 4.

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Διαδρομή 1. pGBT9HT/EcoRI+Bam HI

Διαδρομή 2.Μαρτυρας μοριακού βάρους λ/ Hind EcoRI (3μλ)

Διαδρομή 3. pGBT9HTOH/EcoRI+Bam HI

Φαίνεται από την ηλεκτροφόρηση ότι στο μεταλλαγμένο πλασμίδιο αναγνωρίζονται οι θέσεις EcoRI και BamHI από τα αντίστοιχα ένζυμα με αποτέλεσμα να προκύπτει η αναμενόμενη ζώνη 500 bp (Εικόνα 4, βέλος)

6β. Απομόνωση ενθεμάτων ΗΤΟΗ

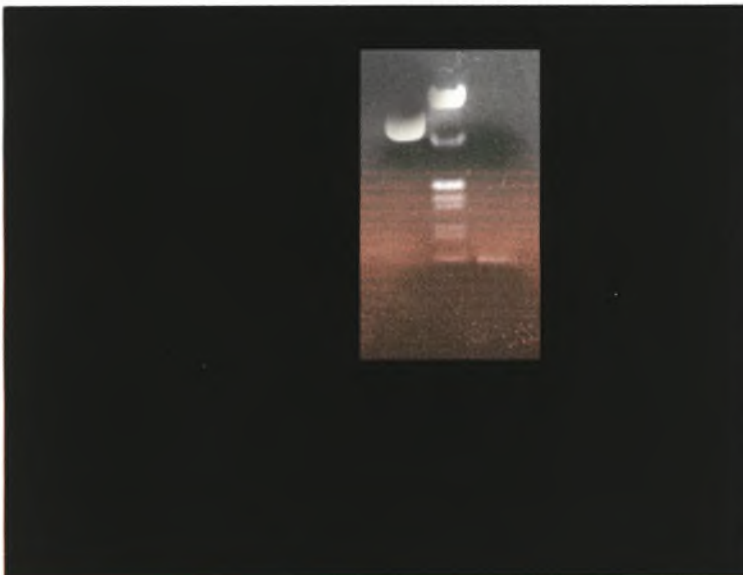
Η ζώνη που μας ενδιέφερε και που περιέχει τα μεταλλαγμένα ενθέματα (ΗΤΟΗ) απομονώθηκε από την πηκτή αγαρόζης με τη μέθοδο QIAquick (M &M B10). Στη συνέχεια ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης (εικόνα 5)

6γ. Προετοιμασία του φορέα pGBT9 για τη δημιουργία "βιβλιοθήκης" πλασμιδίων.

15μg φορέα pGBT9 επωάστηκε με τα ένζυμα περιορισμού EcoRI και BamHI και στη συνέχεια με αλκαλική φωσφατάση (calf intestinal phosphatase - CIP) έτσι ώστε να μην μπορεί να κυκλοποιηθεί παρουσία λιγάσης, εάν δεν υπάρχει ένθεμα που θα προσφέρει τις φωσφορικές ομάδες για τη δημιουργία του φωσφοδιεστερικού δεσμού. (M&M B11)

Στη συνέχεια το DNA pGBT9/EcoRI+BamHI+CIP διαχωρίστηκε από τις πρωτεΐνες με εκχύλιση με φαινόλη, συμπυκνώθηκε με καθίζηση με αιθανόλη και ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης (M &M B12).

1 2 3



Εικόνα 5.

Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης.

Διαδρομή 1. pGBT9/EcoRI+BamHI+CIP

Διαδρομή 2. λ/ Hind EcoRI (3μλ)

Διαδρομή 3. ένθεμα (ΗΤΟΗ).

6δ. Αντίδραση σύνδεσης (ligation) φορέα pGBT9 με τα απομονωμένα ενθέματα ΗΤΟΗ

Ο φορέας pGBT9/EcoRI+BamHI+CIP επώαστηκε παρουσία του παρασκευασθέντος ενθέματος (ΗΤΟΗ) και παρουσία λιγάσης έτσι ώστε να δημιουργηθούν ανασυνδυασμένα πλασμίδια, όπως περιγράφεται (M&M B13)

Οι αντιδράσεις σύνδεσης (ΑΣ) περιγράφονται στον πίνακα που ακολουθεί:

ΠΙΝΑΚΑΣ 4

	ΑΣ 1	ΑΣ 2	ΑΣ 3.
pGBT9/EcoRI+BamHI+CIP	2 ng	2 ng	2 ng
ΗΤΟΗ	5 ng	-	-
Ρυθμ. διάλυμα αντίδρασης λιγάσης	2μl	2μl	2μl
Ligase	1μl	1μl	-
H ₂ O	Εως 20μl	Εως 20μl	Εως 20μl

6ε. Μετασηματισμός κυττάρων E.coli με τις αντιδράσεις σύνδεσης.

Κύτταρα E- Coli Top 10 "competent" (M&M B4) μετασηματίστηκαν από τα DNA των αντιδράσεων σύνδεσης (M &M B6) με τα ακόλουθα αποτελέσματα:

ΠΙΝΑΚΑΣ 5

	DNA	ΑΡ. ΑΠΟΙΚΙΩΝ ΣΕ LB
pGBT9	1ng	6000
ΑΣ 1.	1μl	2700
ΑΣ 2.	1μl	140
ΑΣ 3.	1μl	94

Τα στατιστικά αποτελέσματα δείχνουν ότι:

-94 από τις 2700 αποικίες (διαφορά απουσία ή παρουσία λιγάσης) (3.5%) προέρχονται από pGBT9 που εξαρχής δεν είχε κοπεί από τα ένζυμα και άρα μπορεί να μετασηματίσει κύτταρα E.coli

-46 (140-94) (1.7%) αποικίες οφείλονται σε μόρια φορέα όπου τα φωσφορικά δεν είχαν απομακρυνθεί με αποτέλεσμα ο φορέας να μπορεί να κυκλοποιηθεί μόνος του (χωρίς ένθεμα) και άρα να μετασηματίσει κύτταρα E.coli.

-2560 (2700-140) (95%) αποικίες της ΑΣ 1. είναι ανασυνδυασμένα πλασμίδια PGBT9/ΗΤΟΗ.

Άρα έχουμε δημιουργήσει τη «βιβλιοθήκη» ενθέματος ΗΤΟΗ σε PGBT9.

7. Παρασκευή DNA «βιβλιοθήκης» pGBT9/ΗΤΟΗ.

Μετασηματίσαμε E-Coli TOP 10 με την ΑΣ1 σε μεγάλη κλίμακα (10X) με αποτέλεσμα να έχουμε ~ 20.000 αποικίες αντιπροσωπευτικές του πληθυσμού των μεταλλάξεών μας.

Τα βακτήρια από τις αποικίες αυτές εκλούστηκαν από τα τριβλία αγαρόζης, πολλαπλασιάστηκαν πάλι σε τριβλία αγαρόζης (προκειμένου να αποφευχθεί τυχόν υπέρ ή υπο αντιπροσώπευση κλώνων με επώαση σε υγρή καλλιέργεια) και αφού ένα μέρος τους αποθηκεύτηκε για τυχόν μελλοντική χρήση, από τα υπόλοιπα έγινε παρασκευή DNA (M&M B1α).

8. Μετασηματισμός στελέχους pJ69-4A/p53 με DNA "βιβλιοθήκης" pGBT9/ΗΤΟΗ

Το στέλεχος pJ69-4A ήδη μετασηματισμένο με το πλασμίδιο-λεία p53 μετασηματίστηκε επιπλέον με τη "βιβλιοθήκη" DNA PGBT9/ΗΤΟΗ όπως περιγράφεται (M&M B8). Τα μετασηματισμένα κύτταρα επιλέχθηκαν για τη συμπλήρωση της αυξοτροφίας σε τρυπτοφάνη (που φέρεται από το πλασμίδιο pGBT9)

- Τα μετασηματισμένα κύτταρα εφόσον περιέχουν το αρχικό πλασμίδιο-δόλωμα (μη μεταλλαγμένο) αναμένεται να μπορούν να επιζούν σε 50mM AT (βλεπε πίνακα 2) Οι

αποικίες που περιέχουν πλασμίδια με μεταλλάξεις που αναιρούν την αλληλεπίδραση p53-SRPK1a δεν θα εκφράσουν τα γονίδια αναφοράς άρα δεν θα μεγαλώσουν παρουσία 50 mM AT. Περίπου 16000 αποικίες ελέγχθηκαν για την ικανότητά τους να επιζούν σε AT με τη μέθοδο του «πιστού αποτυπώματος» (M&M B7)

Επιλέχθηκαν 212 αποικίες που δεν επιζούν σε 50 mM AT, (βλέπε πίνακα 6) οι οποίες ελέγχθηκαν και πάλι με την ίδια μέθοδο(M&M B7) (εικόνα 6) και από τις οποίες καταλήξαμε σε 54.

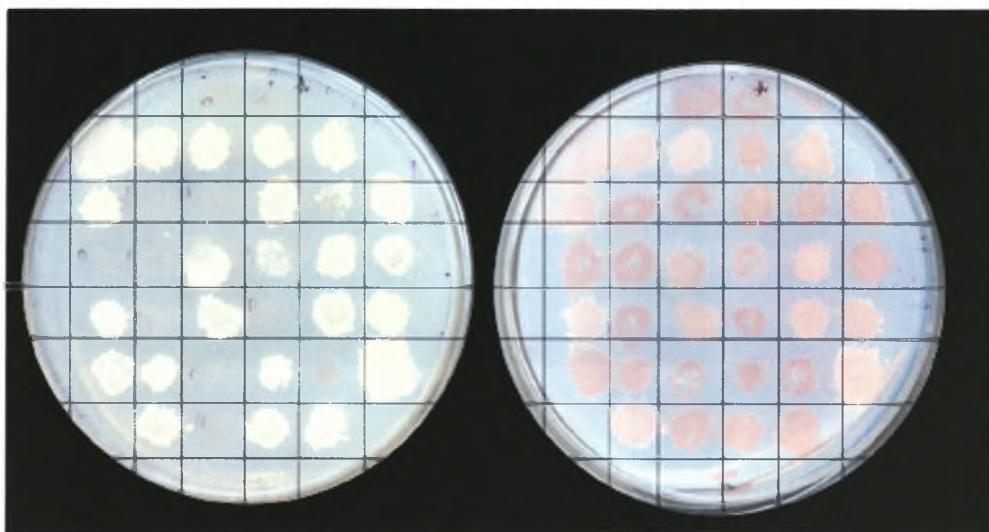
ΠΙΝΑΚΑΣ 6

Τριβλία	Αριθμός αποικίων	Αριθμός αποικίων που δεν επιζούν	Αριθμός αποικίων που δεν επιζούν
	-AT	+50mM AT (πρώτο έλεγχος)	+50mM AT (δέυτερος έλεγχος)
1	1200	10	3
2	1600	17	4
3	1800	22	7
4	2000	14	2
5	2200	18	1
6	1100	20	9
7	800	29	6
8	1400	24	3
9	1700	30	11
10	1900	28	8
Σύνολο	15700	212	54

•

+ 50mM AT

- AT



Εικόνα 6 .Παράδειγμα «πιστού αποτυπώματος» δευτέρου ελέγχου.

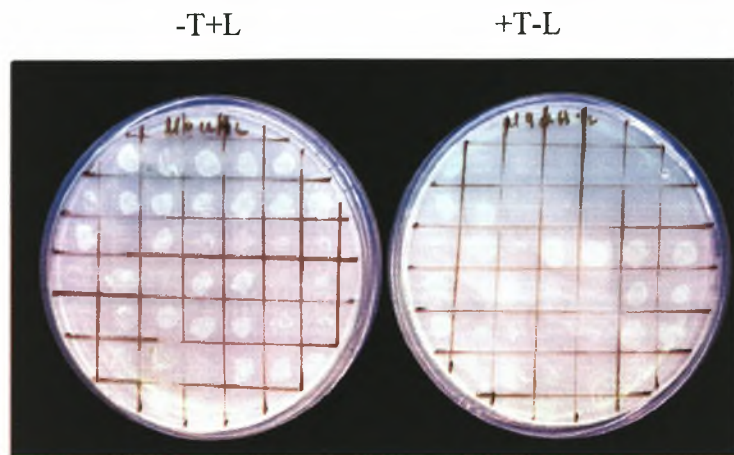
Η απεικόνιση των τριβλίων προέρχεται από πιστό αποτύπωμα pJ69-4A/p53+ pGBT9/HTOH) σε τριβλία με ή χωρίς 50 mM AT. Εννέα στελέχη δεν μεγάλωσαν και επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση (βλέπε πίνακα 6)

10. Διάσωση (rescue) του πλασμιδίου δολώματος από το στέλεχος pJ69-4Aa και μεταφορά σε E-Coli.

Επιλέχθηκαν 4 στελέχη από τα 54, των οποίων τα πλασμίδια-δολώματα μεταφέρθηκαν σε E-Coli KC-8 με τη μέθοδο της διάσωσης (M&M B14).

Τα πλασμίδια -δολώμα διαχωρίστηκαν από τα πλασμίδια- λείες (που συνυπήρχαν στα εν λόγω στελέχη) με βάση την ιδιότητά τους να συμπληρώνουν την αυξοτροφία σε τρυπτοφάνη του στελέχους E-Coli KC-8 (M&M A)

Συγκεκριμένα, οι μετασηματισμένες αποικίες E.coli μεταφέρθηκαν σε τριβλία είτε με τρυπτοφάνη και χωρίς λευκίνη (αυξοτροφία που συμπληρώνεται από το πλασμίδιο-λεία) είτε σε τριβλία με λευκίνη και χωρίς τρυπτοφάνη (αυξοτροφία που συμπληρώνεται από το πλασμίδιο -δολώμα). (παράδειγμα στην εικόνα 7)



Εικόνα 7

Παράδειγμα επιλογής βακτηριακών κλώνων που περιέχουν το πλασμίδιο-δόλωμα

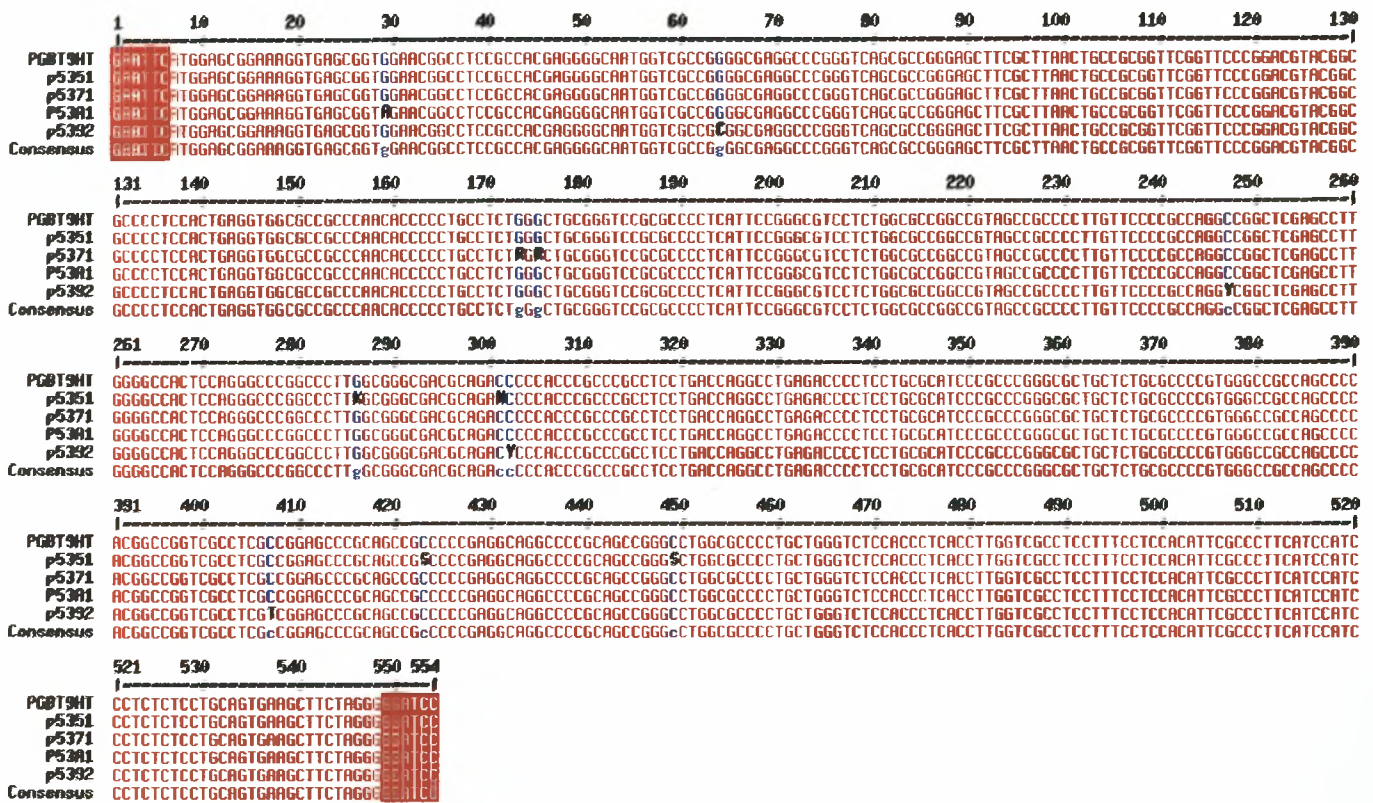
Επιλέχθηκαν τα στελέχη που περιείχανε πλασμίδια που συμπληρώνουν την αυξοτροφία σε τρυπτοφάνη.

10. Παρασκευή DNA των επιλεγμένων κλώνων

Το DNA των 4 πλασμιδίων παρασκευάστηκε σε μεγάλη ποσότητα με τη μέθοδο QIAGEN (M&M B1α) και ταυτοποιήθηκε η αλληλουχία τους με τη μέθοδο Sanger.

11. Αποτελέσματα εύρεσης και σύγκρισης αλληλουχιών

Οι αλληλουχίες των τεσσάρων επιλεγμένων κλώνων p53A1, p5392, p5351, p5371, συγκρίθηκαν και στοιχίστηκαν με την αρχική αλληλουχία (PGBT9HT) (εικόνα 8) Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα [Multalin at INRA] www.us.expasy.org .



Εικόνα 8. Στοιχισή αλληλουχιών

Με άσπρους χαρακτήρες σε κόκκινο υπόβαθρο υποδεικνύονται οι θέσεις κλωνοποίησης του ενθέματος EcoRI και BamHI

Με μαύρους χαρακτήρες υποδηλώνεται η παρουσία μετάλλαξης στην συγκεκριμένη αλληλουχία.

Αμφισημίες: R=A,C Y=G,T S=C,G K=G,T N=A,C,G, T.

Φαίνεται ότι και οι τέσσερις αλληλουχίες διαφέρουν από την αρχική:

P5371: G→R (θέση 173), G→R (θέση 175)

P5351: G→K (θέση 286), C→N (θέση 301), C→S (θέση 423), C→S (θέση 449)

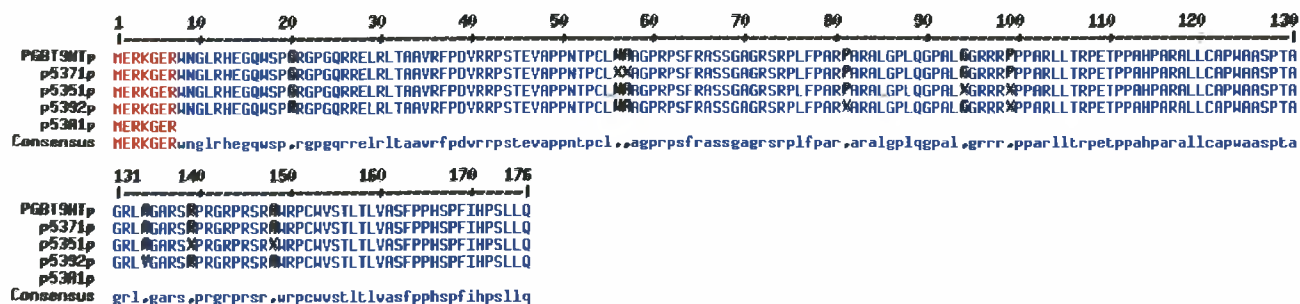
P53A1: G→A (θέση 29)

P5392: G→C (θέση 64), C →Y (θέση 247), C→Y (θέση 302), C→T (θέση 407)

Παρατηρούμε ότι πολλές αλλαγές οφείλονται σε αμφισημίες κατά την εύρεση της αλληλουχίας και πρέπει να επιβεβαιωθούν.

Στη συνέχεια οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες μεταφράστηκαν σε αμινοξικές και στοιχίστηκαν με το ίδιο πρόγραμμα (εικόνα9)

Εικόνα 9. Στοιχισή αμινοξικών αλληλουχιών



X: θεωρείται θέση που προέρχεται από αμφισημία στη νουκλεοτιδική αλληλουχία.

Από τη σύγκριση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών p5371p, p5351p, p53A1p, p5392p με την αρχική pGBT9HTp προκύπτει:

P5371: W→X (θέση 56), A→X (θέση 57)

P5351: R→X (θέση 139), A→X (θέση 148)

P53A1: W→STOP

P5392: G→R (θέση 20), A→Y (θέση 134)

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο της χημικής μεταλλαξογένεσης για να εισάγουμε μεταλλάξεις στο DNA της περιοχής της SR κινάσης SRPK1a που βρέθηκε να αλληλεπιδρά με πολλές κυτταρικές πρωτεΐνες και συγκεκριμένα με την p53. Επιλέξαμε μεταλλαγμένους κλώνους που έχουν χάσει τη δυνατότητα αλληλεπίδρασης με την p53 και ταυτοποιήσαμε, με ανάγνωση της αλληλουχίας τεσσάρων απ'αυτούς, τις αλλαγές που αυτές επιφέρουν στην αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης SRPK1a. Τα αποτελέσματα που πήραμε από την ανάγνωση της αλληλουχίας των επιλεγμένων κλώνων, υποδεικνύουν την ύπαρξη μεταλλάξεων σε κάθε έναν απ'αυτούς και επιβεβαιώνουν την μέθοδο επιλογής τους (αναίρεση της αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη p53 στο σύστημα των δύο υβριδίων (διδασκτορικό Ρασέλ Κοέν, υπ. Ε. Γεωργιάτσου)).

Στους τέσσερεις κλώνους που επιλέχθηκαν βρεθήκανε οι εξής μεταλλάξεις:

1) στον κλώνο p53A1, στη θέση 23, έχουμε αλλαγή της βάσης γουανίνης (G) σε αδενίνη (A) (Εικόνα 8).

Η παραπάνω μετάλλαξη στην αμινοξική θέση 8 δημιουργεί κωδικόνιο τερματισμού (stop) (UAG). Έτσι, σταματάει η επιμήκυνση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και δεν παράγεται η πρωτεΐνη SRPK1a, γεγονός που αποκλείει εξ ορισμού την αλληλεπίδρασή της με την πρωτεΐνη p53 (υπό κανονικές συνθήκες στη θέση αυτή κωδικοποιείται το αμινοξύ τρυπτοφάνη) (Εικόνα 9)

2) στον κλώνο p5392 εντοπίζονται δύο μεταλλαγμένες θέσεις που καταλήγουν σε μεταλλάξεις στην αλληλουχία της πρωτεΐνης: στη θέση 20 αργινίνη αντί για γλυκίνη και στη θέση 134 βαλίνη αντί για αλανίνη. Είναι πιθανόν η πρώτη μετάλλαξη να είναι μεγαλύτερης σημασίας εξαιτίας της διαφοράς των δύο αμινοξέων: η γλυκίνη είναι το πιο μικρό αμινοξύ (δεν έχει πλευρική αλυσίδα), ενώ η πλευρική αλυσίδα της αργινίνης είναι από τις πιο μεγάλες και είναι θετικά φορτισμένη. Η δεύτερη μετάλλαξη (εικόνα 9) πιθανόν να μην παίζει σημαντικό ρόλο λόγω του γεγονότος ότι τα αμινοξέα αυτά έχουν παρόμοιες ιδιότητες (αλειφατικά, υδρόφοβα με μικρή διαφορά στο μέγεθος). Δεν αποκλείεται οι δύο μεταλλάξεις να αλληλοεξαρτώνται για τον φαινότυπό τους.

Για την διευκρίνιση της επιρροής των συγκεκριμένων αμινοξέων στην αλληλεπίδραση που διερευνούμε, πρέπει να δημιουργηθούν κλώνοι που να φέρουν μόνο μία από τις δύο μεταλλάξεις.

- 3) Στον κλώνο p5351, βρέθηκαν μεταλλάξεις στην αμινοξική θέση 139 όπου φυσιολογικά κωδικοποιείται αργινίνη. Η μετάφραση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε αμινοξική μας έδωσε X (εικόνα 9). Το X προέρχεται από θέση αμφισημίας στην νουκλεοτιδική αλληλουχία (εικόνα 8). Το ίδιο συμβαίνει και στη θέση 148, όπου φυσιολογικά κωδικοποιείται αλανίνη.

Είναι απαραίτητο να επιβεβαιωθεί η νουκλεοτιδική αλληλουχία προκειμένου να συζητηθεί περαιτέρω η σημασία των συγκεκριμένων μεταλλάξεων

- 4) Στον κλώνο p5371, βρέθηκαν μεταλλάξεις στις θέσεις 56 και 57, όπου φυσιολογικά κωδικοποιούνται τρυπτοφάνη και αλανίνη αντίστοιχα (εικόνα 9).

Η μετάφραση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε αμινοξική δίνει X, δηλ. αμφίβολη μετάλλαξη. Όπως και με τον κλώνο p5351, είναι αναγκαία η εκ νέου ανάγνωση της αλληλουχίας του κλώνου και η περαιτέρω διερεύνηση του ζητήματος.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Είναι φανερό ότι η μέθοδος που χρησιμοποιήσαμε

A) λειτούργησε όσον αφορά στην πρόκληση μεταλλάξεων στο DNA

B) λειτούργησε όσον αφορά στην επιλογή των κλώνων βάσει του συγκεκριμένου φαινοτύπου, όπως φαίνεται από τον κλώνο p53A1 (βλέπε αποτελέσματα και συζήτηση), όπου είναι απολύτως προφανής ο λόγος της αναίρεσης της αλληλεπίδρασης (δεν παράγεται SRPK1a).

Από τους τέσσερεις κλώνους που μελετήθηκαν, οι δύο περιέχουν μεταλλάξεις που ορίζουν συγκεκριμένες αλλαγές στην αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης. Οι υπόλοιποι δύο περιέχουν αμφισημίες στον καθορισμό της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας που προτείνουν αμφίβολες αλλαγές στην πρωτεϊνική αλληλουχία, θα πρέπει λοιπόν να επαναληφθεί ο προσδιορισμός της αλληλουχίας τους.

Η μελέτη περισσότερων κλώνων, που θα περιέχουν διαφορετικές μεταλλάξεις που επηρεάζουν την αλληλεπίδραση SRPK1a-p53 θα μας επιτρέψει τον καθορισμό των αμινοξέων που είναι απαραίτητα για την αλληλεπίδραση. Μπορούν περαιτέρω να μελετηθούν οι δομικές ιδιότητες πεπτιδίων που περιέχουν τις συγκεκριμένες μεταλλάξεις έτσι ώστε να οριστούν δευτεροταγείς δομές που είναι υπεύθυνες για την δημιουργία της επιφάνειας επαφής μεταξύ των δύο πρωτεϊνών.

Τελικά, με την ίδια διαδικασία μπορούν να μελετηθούν τα δομικά στοιχεία της SRPK1a που καθορίζουν τις αλληλεπιδράσεις της με μόρια όπως ο SAF-B και άλλες πρωτεΐνες που παρουσιάζουν βιολογικό ενδιαφέρον.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Fu, X-D (1995) RNA 1 663-680 (MED-LINE)
2. Manley, J.L and Tacke, R (1996) Genes Dev.10 1569- 1579 (CrossRef) Med
3. Valcarcel, J and Green. M.R. (1996) Trends Biochem. Sci, 296-301 (CrossRef) Med
4. Wang H- Y Lin, W Dyck, J.A. Yeakly. J.M. Songyang, Z, Cantley L.C.and Fu. X-D (1998) J. Cell Biol.140, 737-750 (Abstract/Full text)
- 5.Valcarcel J. Gaur, R.K. Singh, R, and Green, M.R. 1996) Science 273. 1706-1709 (Abstract/Full text)
6. Xiao. SH and Manley, S, Z, (1997) Genes Dev. 11 334-344 (Abstract/Full text)
7. Cui. J- F, Lane W.S. and Fu, X-D (1994) Nature 369, 678-682 (MED-LINE)
8. Colwill, K, Pawson, T, Andrews, B, Prasad, J, Manley,Beil, J, C. and Duncan, P.I (1996) EMBOJ. 15 265-275 (Abstract)
9. Misteli, T. Caseres, J. F and Spector D. L. (1997) Nature 387, 523-527 (MED-LINE)
10. Misteli, T. Caseres J.F, Clement, J.Q, Krainer A.R.Wilkinson M, F and Spector, D. I. (1998) J. Cell Biol. 143 297-307 (Abstract/Full text)
11. Mayeda, A, and Krainer, A.R. (1992) Cell 68, 365-375 (MED-LINE)
12. Zahler, A, M, Neugebauer, K. M. Lane, W.S, and Roth, M.B. (1993) Science 260. 219-222 (MED-LINE)

13. Caceres, J. E. Sstamin, S, Helfman, D.M. and Krainer, A.R. (1994) *Science* 265, 1706- 1709 (MED-LINE)
14. Sreaton, G. R. Caceres, J. E, Mayeda, A. Bell, M.V, Pledanski, M. Jackson, D.G. Bell, J.I and Krainer, A.R. (1995) *EMBO J.* 14 4336-4349 (Abstract)
15. Wang, J and Manley J.L (1995) *RNA (N.Y)* 1, 335-346 (MED-LINE)
16. Bennet, M. Michaud, S. Kington, J. and Reed, R (1992) *Genes Dev.* 6. 1986-2000
17. Lamm, G. M. and Lamond, A, I (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1973, 247-265
18. Moore, J. M, Query, C.C. an Sharp, P.A in the *RNA word* (Cesteland, R.F and Atkins, I. F. eds) p.p. 303- 358 (Cold Spring Harbor Press)
19. Lamond, A. L. and Carmo-Fonseca, M. (1993) *Trends Cell Biol.* 3, 198-204
20. Spector, D.L. (1993) *Annu. Rev. Cell. Biol.* 9. 265-315
21. Fakans, S. (1994) *Trends Cell. Biol.* 4. 86-90
22. Gilbert W. Siebel and C. Guthrie (2001) Phosphorylation by SKY 1p Promotes Np13p Shuttling and Mrna dissociation *RNA* 7. 302-313.
23. Kuroyanagi H. Kimura T. Kazuhiro W. Hisamoto N. Matsumoto K and M. Hagiwara (2000) *Mech Dev* 99, 51-64
24. Papoutsopoulou S, Nikolakaki E and T. Giannakoyros (1999a) SRPK1 and LBR protein Kinases show identical substrase specificities *Bioch. Biophys. Res. Commun* 255, 602-607
25. Ppapoutsopoulou S, Nikolakaki E, Chalepakis G. Kruftiv Cheraillier P and Giannakouros (1999 b) SR- Protein Specific Kinase 1 is highly expressed in testis and phosphorylates protamine 1 *Nuc. Acids Res.* 27 2972- 2980

26. Nikolakaki E, Kohen R, Hartmann AM, Stamms, Georgatsou E and T. Giannakopoulos (2001) Cloning and characterization of an alternatively splices form of SR protein kinase 1 that interacts specifically with scaffold Attachment factor B1. *Biol. Chem.* 276 40175-40182
27. Renz A. and O. Fackelmayer (1996) *Nuc. Acids Res.* 24. 843- 849
28. Oesterreich S, Lee Av, Suplivan TM, Samuel SK, Davie JR and SA Fugua (1997) *Cell. Bioch.* 67. 275- 286.
29. Weighardt F, Cobianchi F, Carteghi L, Chiodi L, Villa A, Riva S and G. Biamonti (1999) *Cell.* 112. 1465-1476
30. Nayler O, Stratling W, Bourgvin J-P, Stagljar I, Lindermann L, Jasper H, Hartmann AM, Fackelmayer F.O.Vilrich A and S. Stamm (1998). *Nuc. Acids Res* 26., 3542-3549
31. Mac Arthur, M., W., and Thornton, J., M. (1991). *Mol. Biol.* 218, 397-412.
32. Williamson, M., P. (1994). *Biochem. J.* 297, 249-260.
33. Adzhubei, A., A., and Sternberg, T. P.(1993). *Mol. Biol.* 229, 472-493.
34. Stapley, B. J., and Creamer, T. P.(1999). *Protein Sci* 8, 587-595.
35. Creamer, T. P.(1998) *Proreins : Struct. Funct .Genet.* 33, 218-226.
36. Yu, H., Chen, J. K., Feng, S., Dalgarno, D. C., Brauer, A. W., and Schreiber, S.L.(1994). *Cell.* 76, 933-945.
37. Petrella, E. C., Machesky, L. M., Kaiser, D. A., and Pollard, T. D.(1996). *Biochemistry* 35, 16535-16543.
38. Koch, C., Anderson, D., Moran, M., Ellis, C., and Pawson T., (1991). *Science* 252, 668- 674.

39. Bar-Sagi, D., Rotin, D., Batzer, A., Mandiyan, V., and Schlessinger, J., (1993). *Cell* 74, 83-91.
40. Franz, W. M., Berger, P., and Wang, J., Y. (1989). *EMBO J.* 8, 137-147.
41. Jackson, P., and Baltimore, D., (1989) *EMBO J.* 8, 449-456.
42. Feller R, Ren, R Hanafusa H and Baltimore D (1994) *trends Biochem. Sci* 19, 453-458
43. Mayer B.J and Eck. M. J. (1995) *Curr. Biol* 5, 364-367.
44. Rickles, R. J., Botfield, M. C., Weng, Z., Taylor, J. A., Creen, O. M., Brugge, J. S., and Zoller, M. J., (1994) *EMBO J.* 13, 5598-5604.
45. Bunnell, S. C., Henry, P. A., Kolluri, R., Kirchhauzen, T., Rickles, R. J., and Berg, L. J., (1996). *Biol. Chem.* 271, 25646-25656.
46. Quilliam, L. A., Lambert, Q. T., Westwick, J. K., Mickelson-Young, L. A., Copeland, N. G., and Der, C.J. (1996). *Biol. Chem.* 271, 28772-28775.
47. Sparks, A., Rider, J., Hoffman, N., Fowlkes, D., Quilliam, L., and Kay, B. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1540-1544.
48. Grabs, D., Stepnev, V. I., Songyang, Z., David, C., Lynch, M., Cantley, L., C., and De Camilli, P. (1997). *Biol. Chem.* 272, 13419-13425.
49. Feng S, Chen J, Yu H, Simman J and Schreider S (1994). *Science* 266, 1241-1274
50. Lim W.A, Richards F.M. and Fox R. (1994). *Nature (London)* 372, 375-379.
51. Saraste, M., and Musacchio, A., (1994). *Nat. Struct. Biol.* 1, 835-837.

52. Morken, J., Kapoor, T., Feng, S., Shirai, F., and Schreider, S. (1998). *J. Am. Chem. Soc.* 120, 30-36.
53. Corina, S., and Pavletich, N., P. (1996). *Science* 274, 1001-1005
54. Ruaro, E., M. Collavin, L., Del Sal, G., Haffner, R., Oren, M., Levine, A. J., and Schneider, C. (1997). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4675-4680.
55. Bork, P., and Sudol, M. (1994). *Trends Biochem. Sci* 19, 531- 533.
56. Chen, H. I., and Subol, M. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7819- 7823.
57. Bedford, M., T., Chan, D. C., and Leder, P. (1997). *EMBO J.* 16, 2376- 2383.
58. Linn, H., Ermekova, K., S., Rentschler, S., Sparks, A. B., Kay, B. K. and Subol, M. (1997). *Biol. Chem.* 378, 531- 537.
59. Bedford, M. T., Reed, R., and Leder, P. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 10602- 10607
60. Macias, M. J., Hyvonen, M., Baraldi, E., Schultz, J., Sudol, M., Saraste, M., and Oschkinat, H., (1996). *Nature (London)* 382, 646- 649.
61. Mosser, E. A., Kasanov, J. D., Forsberg, E. C., Kay, B.K., Ney, P.A., and Bresnick, E. H. (1998). *Biochemistry* 37, 13686- 13695.
62. Chen, H. I., Einbond, A. Kwak, S. J., Linn, H., Koepf, E., Peterson, S., Kelly, J. W., and Sudol, M. (1997). *J. Biol. Chem.* 272, 17070-17077.
63. Cavva, N. R., Cavva, R. Ermekova, K., Sudol, M., and Shen, C. J., (1997). *J. Biol. Chem.* 272, 24105- 24108.
64. Pelech, S., L., and Sanghera, J. S. (1992). *Trends Biochem. Sci.* 17, 233- 238.



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

Τηλ.: 74.760-61 ΛΑΡΙΣΑ

240-565077
565078



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000057245