

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΑΝΑΠΑΛΗΡ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
Σ. ΜΠΟΜΑΝΟΥ-ΤΖΕΔΑΚΗ

Διερεύνηση του ρόλου των SR πρωτεϊνικών
κινασών στην γονιδιακή έκφραση: μελέτη της
βιολογικής σημασίας της μοριακής αλληλεπίδρασης
ενός καινούργιου μέλους της οικογένειας, της
SRPK1a, με τον πρωτεϊνικό παράγοντα SAFB

ΤΣΙΑΝΟΥ ΘΕΟΔΩΡΑ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ



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

Αριθ. Εισ.: 7817/1
Ημερ. Εισ.: 25-11-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιδετικός Κωδικός: Δ
572.6
ΤΣΙ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000083829

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΑΝΑΠΛΗΡ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
Σ. ΜΠΟΝΑΝΟΥ-ΤΖΕΔΑΚΗ

**Διερεύνηση του ρόλου των SR πρωτεϊνικών
κινασών στην γονιδιακή έκφραση: μελέτη της
βιολογικής σημασίας της μοριακής αλληλεπίδρασης
ενός καινούργιου μέλους της οικογένειας, της
SRPK1a, με τον πρωτεϊνικό παράγοντα SAFB**

ΤΣΙΑΝΟΥ ΘΕΟΔΩΡΑ

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2007

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΑΝΑΠΛΗΡ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
Σ. ΜΠΟΝΑΝΟΥ-ΤΖΕΔΑΚΗ

**Διερεύνηση του ρόλου των SR πρωτεϊνικών
κινασών στην γονιδιακή έκφραση: μελέτη της
βιολογικής σημασίας της μοριακής αλληλεπίδρασης
ενός καινούργιου μέλους της οικογένειας, της
SRPK1a, με τον πρωτεϊνικό παράγοντα SAFB**

ΤΣΙΑΝΟΥ ΘΕΟΔΩΡΑ

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΘΝΙΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΕΠΕΑΕΚ

ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ
ΣΥΓΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ



Η ΠΑΙΔΕΙΑ ΣΤΗΝ ΚΟΡΥΦΗ
Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Εκπαίδευσης και Αρχικής
Επαγγελματικής Κατάρτισης

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:

- Γεωργιάτσου Έλενα, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Π.Θ.

Μέλη:

- Σίμος Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Π.Θ.

- Γιαννακούρος Θωμάς, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Α.Π.Θ.

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

- Σταθάκης Νικόλαος, Καθηγητής Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Π.Θ.
- Μολυβδάς Πασχάλης-Αδάμ, Καθηγητής Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Π.Θ.
- Χατζοπούλου-Κλαδαρά Μαργαρίτα, Καθηγήτρια Βιολογίας Ανάπτυξης-Βιοχημείας του Τμήματος Βιολογίας του Α.Π.Θ.
- Μπονάνου-Τζεδάκη Σοφία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Π.Θ.
- Γιαννακούρος Θώμας, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Α.Π.Θ.
- Σίμος Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Π.Θ.
- Γεωργάτσου Έλενα, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Π.Θ.



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

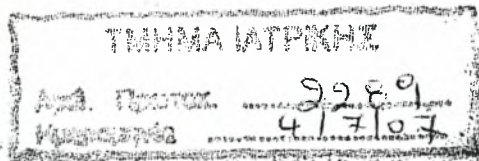


Παπακυριαζή 22 – 412 22
Λάρισα

Τηλ. 2410 5650 03, 5650 70,
Fax 2410 5650 68

Προς:

Τη Γενική Συνέλευση
Ειδικής Σύνθεσης
Του Ιατρικού Τμήματος
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας



Λάρισα 3-7-2007

Η επταμελής επιτροπή αποτελούμενη από τους:

- | | |
|------------------------------------|----------------------------------|
| 1) Καθ. κ. Νικόλαο Σταθάκη | 2) Καθ. κ. Πασχάλη-Αδάμ Μολυβδά |
| 3) Καθ. κ. Χατζοπούλου-Κλαδαρά | 4) Αναπλ. Καθ. κ. Σοφία Μπονάνου |
| 5) Αναπλ. Καθ. κ. Θωμά Γιαννακούρο | 6) Επίκ. Καθ. κ. Γεώργιο Σίμο |
| 7) Επίκ. Καθ. κ. Ελένη Γεωργάτσου | |

για την κρίση της διδακτορικής διατριβής της υποψήφιας διδάκτορα κ. Τσιάνου Θεοδώρας με θέμα: «Διερεύνηση του ρόλου των SR πρωτεϊνικών κινασών στην γονιδιακή έκφραση: μελέτη της βιολογικής σημασίας της μοριακής αλληλεπίδρασης ενός καινούργιου μέλους της οικογένειας, της SRPK1a, με τον πρωτεϊνικό παράγοντα SAFB»

αποφάσισε στις 3-7-2007 την αποδοχή της διατριβής της κ. ...Τσιάνου Θεοδώρας με βαθμόΑΡΙΣΤΑ..... και εισηγείται στη Γενική Συνέλευση να καλέσει την υποψήφια να δώσει το νενομισμένο όρκο.

Η Επταμελής Επιτροπή:

- 1)
- 2)
- 3)
- 4)
- 5)
- 6)
- 7)

*Στην καθηγήτριά μου κ. Έλενα Γεωργιάτσου
για την υποστήριξη και κατανόηση*

Σε όσους μου συμπαραστάθηκαν

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	12
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	14
A.1. ΚΙΝΑΣΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕΡΙΝΗΣ/ΑΡΓΙΝΙΝΗΣ	
(SERINE/ARGININE PROTEIN KINASES-SRPK)	14
A.1.1. Χαρακτηριστικά της δομής των κινασών πρωτεϊνών	
σερίνης/αργινίνης	17
A.1.2. Γνωστά μέλη της οικογένειας των κινασών SRPK	
στα θηλαστικά	21
A.1.2.1. SRPK1	21
SRPK1 και παθογένεια	22
A.1.2.2. SRPK1α	23
A.1.2.3. SRPK2	25
A.1.2.4. SRPK3	26
A.1.3. Εντοπισμός των κινασών πρωτεϊνών σερίνης/αργινίνης	28
A.1.4. Εξειδίκευση των κινασών πρωτεϊνών σερίνης/αργινίνης	31
A.1.5. Μηχανισμός φωσφορυλίωσης των υποστρωμάτων των	
SR κινασών	33
A.1.6. Υποστρώματα των SRPK κινασών και αντίστοιχοι	
ρόλοι τους	36
A.1.6.1. Πρωτεΐνες SR	36
Ρόλος της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών SR στη	
δράση και τον κυτταρικό εντοπισμό τους	38
A.1.6.2. Άλλα υποστρώματα των SR κινασών	43
Ο Υποδοχέας της Λαμίνης B (LBR)	43
Πρωταμίνη P1	45
Proliferation Potential Protein-Related (P2P-R)	46
A.1.7. Εναλλακτικοί ρόλοι της οικογένειας των SR κινασών	47
A.2. ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΙΚΡΙΩΜΑΤΟΣ Β (SCAFFOLD	
ATTACHMENT FACTOR Β-SAFB)	49
A.2.1. Πυρηνική μήτρα	49
A.2.1.1. Δομή της πυρηνικής μήτρας	49
Πυρηνική λάμινα	50

<i>Κεντρικά νημάτια και διάχυτος σκελετός</i>	51
<i>Πυρηνίσκος</i>	51
<i>Πυρηνικά σωμάτια</i>	51
<i>S/MARS (Scaffold/ Matrix attachment Regions)</i>	53
A.2.1.2. <i>Ρόλος της πυρηνικής μήτρας στην αντιγραφή, τη μεταγραφή και το μάτισμα</i>	55
A.2.1.3. <i>Πυρηνική μήτρα και παθογένεια</i>	57
A.2.2. Ο παράγοντας SAFB	58
A.2.2.1. Η δομή του SAFB	58
A.2.2.2. Ιστορικό του SAFB	60
A.2.2.3. Έκφραση και υποκυτταρικός εντοπισμός του SAFB	61
A.2.2.4. Μοριακές αλληλεπιδράσεις του SAFB	62
<i>Αλληλεπίδραση του SAFB με τη χρωματίνη</i>	63
<i>Αλληλεπιδράσεις του SAFB με παράγοντες μεταγραφής</i>	63
<i>Αλληλεπιδράσεις του SAFB με παράγοντες μάτισματος</i>	64
<i>Άλλες αλληλεπιδράσεις</i>	65
A.2.2.5. Οι λειτουργίες του SAFB	65
A.2.2.6. SAFB και παθογένεια	68
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	70
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	72
B.1. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ	72
<i>B.1.1. Κενοί πλασμιακοί φορείς</i>	72
B.2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ	74
B.3. ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ	75
B.4. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ	76
B.4.1. Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	76
B.4.2. Αποφωσφορυλίωση γραμμικού πλασμιακού DNA	77
B.4.3. Αντίδραση λιγάσης	77
B.4.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης	77
B.4.5. Απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης	78
B.4.6. Προσδιορισμός συγκέντρωσης DNA	78

B.4.7. Παρασκευή βακτηρίων (<i>E.coli</i>) δεκτικών στην εισαγωγή πλασμιδιακού DNA	79
B.4.8. Μετασχηματισμός βακτηρίων	80
B.5. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA	81
B.5.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας	81
<i>B.5.1.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση (mini-preparation)</i>	81
<i>B.5.1.2. Απομόνωση και καθαρισμός πλασμιδιακού DNA με τη χρήση του Spin Miniprep Kit της Qiagen</i>	82
B. 5.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας	83
<i>B.5.2.1. Απομόνωση και καθαρισμός πλασμιδιακού DNA με τη χρήση του Midi Kit Qiagen</i>	83
B.6. ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ <i>E.coli</i>	84
B.6.1. Επαγωγή της έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με IPTG	84
B.6.2. Παρασκευή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από βακτήρια	85
B.6.3. Απομόνωση πρωτεϊνών με χρωματογραφία αγκιστείας	86
<i>B.6.3.1 Απομόνωση πρωτεϊνών με επίτοπο μεταφοράς της γλουταθειόνης</i>	86
B.6.4. Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών	87
B.6.4.1 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης	88
B.6.4.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης άγνωστης πρωτεΐνης	88
B.7. ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ	89
B.7.1. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών παρουσία SDS σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE)	89
<i>B.7.1.1. Προετοιμασία της πηκτής πολυακρυλαμίδιου</i>	90
<i>B.7.1.2. Προετοιμασία των προς ανάλυση δειγμάτων</i>	91
<i>B.7.1.3. Ηλεκτροφόρηση της πηκτής και χρώση</i>	91
B.7.2. Ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση	92
<i>B.7.2.1. Μεταφορά υγρής φάσης (Wet Transfer)</i>	92
<i>B.7.2.2. Μεταφορά ημίξηρης φάσης (Semi-Dry Transfer)</i>	93
<i>B.7.2.3. Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών</i>	94

B.8. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ	95
B.8.1. Μετασχηματισμός κυττάρων <i>S. cerevisiae</i>	95
B.9. ΚΑΛΛΕΙΕΡΓΙΕΣ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	97
B.9.1.Επιμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με τη βοήθεια μη λιπιδικού πολυμερούς	97
B.9.2. Παρασκευή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από ευκαρυωτικά κύτταρα	99
B.10. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ-ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ	99
B.10.1. Μικροσκοπία ανοσοφθορισμού	100
B.10.2. Μικροσκοπία φθορισμού	101
B.11. ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	101
B.12. ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ <i>IN VITRO</i> ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ	103
B.12.1. Αυτοραδιογραφία	103
B.13. ΜΑΡΤΥΡΕΣ ΓΝΩΣΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΒΑΡΩΝ	104
B.13.1. DNA μάρτυρες μοριακών βαρών	104
B.13.2. Πρωτεϊνικοί μάρτυρες μοριακών βαρών	105
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	106
Γ.1. ΕΠΙΡΡΟΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ SRPK1a-SAFB ΣΤΗ ΔΡΑΣΗ ΚΙΝΑΣΗΣ ΤΗΣ SRPK1a	107
Γ.1.1. Υπερέκφραση των πρωτεϊνών FLAG-SRPK1a και FLAG-SRPK1 σε κύτταρα 293T	107
Γ.1.2. Επαγωγή των χιμαιρικών πρωτεϊνών GST-LBRNt και GST-SAFB1C σε βακτηριακά κύτταρα	108
Γ.1.3. Προσδιορισμός συγκέντρωσης των πρωτεϊνών GST-SAFB1C και GST-LBRNt και επιβεβαίωση της έκφρασής τους με ανοσοαποτύπωση κατά Western	109
Γ.1.4. Έλεγχος της επίδρασης του GST-SAFB1C στη ενζυμική δράση των SRPK1a και SRPK1 με υπόστρωμα τον GST-LBRNt	111
Γ.1.5. Επιβεβαίωση της αναστολής της φωσφορυλίωσης του GST-LBRNt παρουσία διαβαθμισμένων ποσοτήτων GST-SAFB1C	113

Γ.1.6. Έλεγχος της επίδρασης του GST-SAFB1C στην ενζυμική δράση της SRPK1a με υπόστρωμα τον GST-P2P-R	115
Γ.1.7 Έλεγχος της επίδρασης του GST-SAFB1C στην ενζυμική δράση της SRPK1a με υπόστρωμα συνθετικό πεπτίδιο	116
Γ.1.8. Κατασκευή βακτηριακού φορέα έκφρασης του SAFB1C από όπου λείπει η πλούσια σε RE περιοχή του	117
Γ.1.9. Κατασκευή βακτηριακού φορέα έκφρασης του καρβοξυτελικού άκρου του SAFB2	119
Γ.1.10. Επαγωγή των χμαιορικών πρωτεϊνών GST-SAFB1CΔRE και GST-SAFB2C σε βακτηριακά κύτταρα	121
Γ.1.11. Προσδιορισμός συγκέντρωσης της πρωτεΐνης GST-SAFB1C(ΔRE) και GST-SAFB2C και επιβεβαίωση της έκφρασής τους με ανοσοαποτόπωση κατά Western	122
Γ.1.12. Έλεγχος της επίδρασης του GST-SAFB1C(ΔRE) στη ενζυμική δράση της SRPK1a με υπόστρωμα τον GST-LBRNt	123
Γ.1.13. Έλεγχος της επίδρασης του GST-SAFB1C(ΔRE) στη ενζυμική δράση της SRPK1a με υποστρώματα τον GST-P2P-R και το πεπτίδιο RS ₀	125
Γ.1.14. Έλεγχος της επίδρασης του GST-SAFB2C στη ενζυμική δράση της SRPK1a κινάσης παρουσία GST-LBRNt ως υπόστρωμα	127
Γ.1.15. Έλεγχος της επίδρασης του GST-SAFB2C στη ενζυμική δράση της SRPK1a με υποστρώματα τον GST-P2P-R και το πεπτίδιο RS ₀	128
Γ.1.16. Έλεγχος αλληλεπίδρασης <i>in vitro</i> των κινασών SRPK1a και SRPK1 με SAFB1C και SAFB2C	130
Γ.1.17. Έλεγχος της επιρροής των συνασοκατακρημνισμένων GFP-SAFB1 και GFP-SAFB2 με τις κινάσες SRPK1 και SRPK1a στην δράση τους	133
Γ.2. ΕΠΙΡΡΟΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ SRPK1a-SAFB ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ ΤΗΣ SRPK1a	136
Γ.3. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΝΕΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΟΥ SAFB1 ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΔΥΟ ΥΒΡΙΔΙΩΝ	142

Γ.3.1. Παρασκευή του πλασμιδίου-δολώματος και εφαρμογή του συστήματος των δύο υβριδίων	142
Γ.3.2. Ταυτοποίηση των επιλεγθέντων πλασμιδίων βιβλιοθήκης	144
Γ.3.3. Διερεύνηση αλληλεπίδρασης του SAFB2 με τις αλληλεπιδρούσες πρωτεΐνες του SAFB1C μέσω του συστήματος των δύο υβριδίων	147
Γ.3.4. Παρασκευή του πλασμιδίου-δολώματος SAFB2	147
Γ.3.5. Έλεγχος αλληλεπίδρασης <i>in vitro</i> της ERH με τους παράγοντες SAFB1 και SAFB2	150
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	152
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	167
SUMMARY	169
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	171
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	173
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	192

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ με τίτλο: «Διερεύνηση του ρόλου των SR πρωτεϊνικών κινασών στην γονιδιακή έκφραση: μελέτη της βιολογικής σημασίας της μοριακής αλληλεπίδρασης ενός καινούργιου μέλους της οικογένειας, της SRPK1a, με τον πρωτεϊνικό παράγοντα SAFB» με επιστημονική υπεύθυνη την κ. Έλενα Γεωργιάτσου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την υπεύθυνη καθηγήτριά μου κ. Έλενα Γεωργιάτσου για την ανάθεση του θέματος της παρούσης εργασίας και την αμέριστη βοήθεια, καθοδήγηση και υπομονή που υπέδειξε καθώς και την ουσιαστική συμβολή της σε όλη τη διάρκεια της διατριβής. Η συνεργασία μαζί της αποτέλεσε άσκηση στην επιστήμη της Βιοχημείας και στην εφαρμογή της για την πραγμάτωση της βασικής έρευνας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την διευθύντρια του Εργαστηρίου Βιοχημείας την κ. Σοφία Μπονάνου και μέλος της επταμελούς επιτροπής για τις πολύτιμες συμβουλές της και την σημαντική βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.

Ευχαριστώ τον κ. Γεώργιο Σίμο, μέλος της τριμελούς επιτροπής για τις ουσιαστικές υποδείξεις σε τεχνικές δυσκολίες που αντιμετώπισα και την συμβολή του στη διαμόρφωση της επιστημονικής μου σκέψης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Θωμά Γιαννακούρο, μέλος της τριμελούς επιτροπής για το ενδιαφέρον του, την άψογη συνεργασία, καθώς και τις πολύτιμες υποδείξεις του από την αρχή της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές κ. Σταθάκη Νικόλαο, κ. Μολυβδά Πασχάλη-Αδάμ και κ. Χατζοπούλου-Κλαδαρά Μαργαρίτα, μέλη της εξεταστικής επιτροπής, για τον χρόνο που αφιέρωσαν για την ανάγνωση της εργασίας μου.

Οφείλω επίσης να ευχαριστήσω την κ. Ελένη Νικολακάκη, Επίκουρο Καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας του Α.Π.Θ., για την άριστη συνεργασία, το

ενδιαφέρον της και την συμβολή της σε τεχνικές δυσκολίες που αντιμετώπισα κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.

Ευχαριστώ επίσης τους Λέκτορες Βιοχημείας κ. Παναγιώτη Λιάκο και κ. Ανδρέα Τσακάλωφ για τις χρήσιμες συμβουλές τους και υποδείξεις που με βοήθησαν στην αποπεράτωση της διατριβής μου.

Ευχαριστίες οφείλω σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοχημείας για την συνεργασία και τις εμπειρίες που μοιραστήκαμε όλα αυτά τα χρόνια. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον μεταδιδακτορικό συνεργάτη Ηλία Μυλωνή για την σημαντική βοήθειά του στην διεξαγωγή ορισμένων πειραμάτων.

Τέλος, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω τον Σπύρο για την συνεχή υποστήριξη και κατανόηση και την οικογένειά μου για την ενθάρρυνση και την αμέριστη υλική και κυρίως ηθική συμπαράσταση που μου έχουν προσφέρει όλα αυτά χρόνια.

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1. ΚΙΝΑΣΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕΡΙΝΗΣ/ΑΡΓΙΝΙΝΗΣ (SERINE/ARGININE PROTEIN KINASES-SRPK)

Η φωσφορυλίωση αποτελεί την πιο διαδεδομένη αντιστρεπτή ομοιοπολική τροποποίηση, η οποία χρησιμοποιείται συχνά από τα ευκαρυωτικά κύτταρα για τη ρύθμιση της λειτουργίας μιας πρωτεΐνης. Η φωσφορυλίωση μιας πρωτεΐνης γίνεται με ενζυμική μεταφορά της τελικής φωσφορικής ομάδας ενός φωσφορικού νουκλεοζίτη (κατά κανόνα του ATP) στο υδροξύλιο της πλευρικής αλυσίδας μιας σερίνης, θρεονίνης ή τυροσίνης. Η αντίδραση προσθήκης μιας φωσφορικής ομάδας καταλύεται από το ένζυμο πρωτεϊνική κινάση, ενώ η αντίστροφη αντίδραση, δηλαδή η αφαίρεση μιας φωσφορικής ομάδας (αποφωσφορυλίωση), από το ένζυμο πρωτεϊνική φωσφατάση.

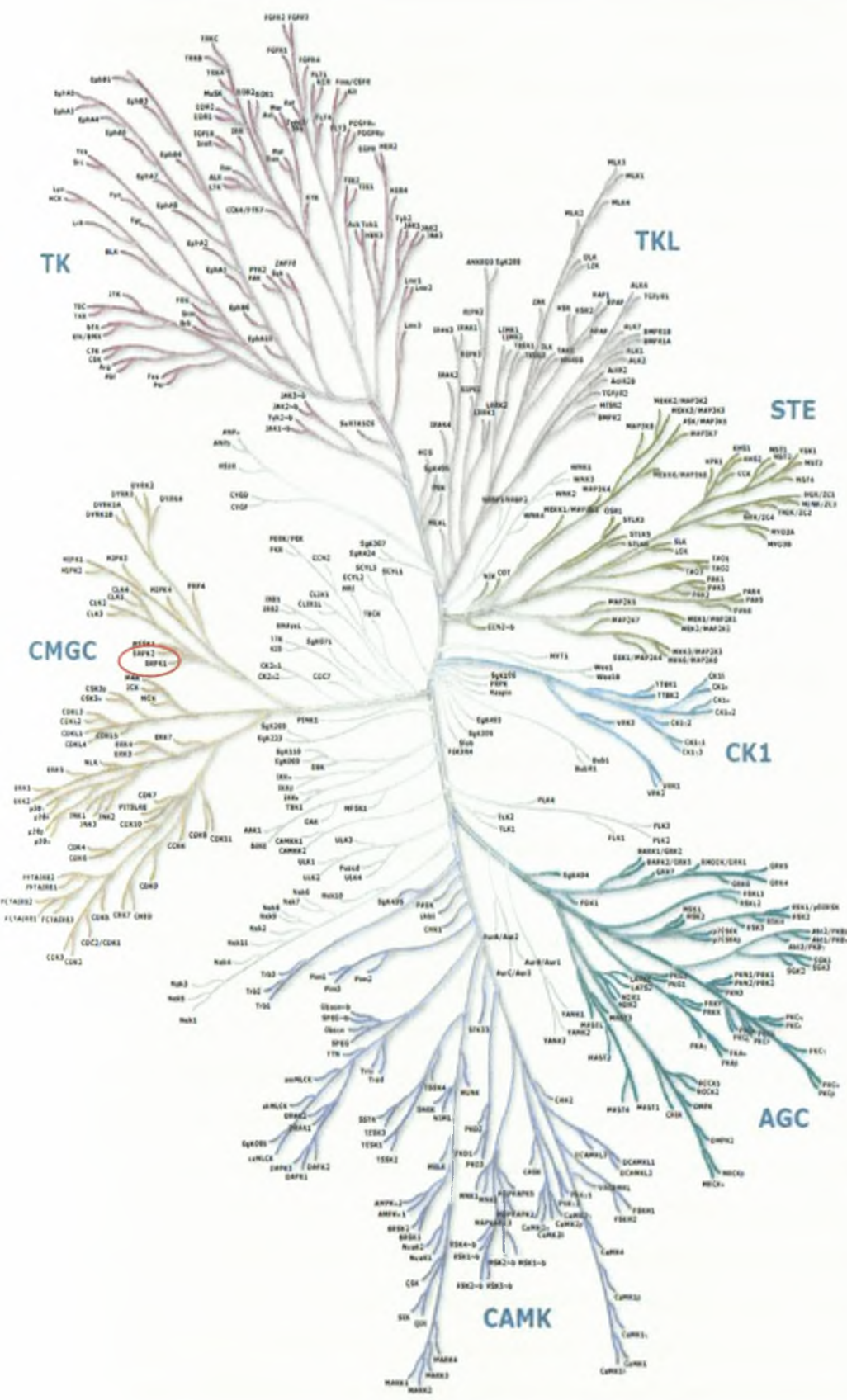
Αυτός ο αντιστρεπτός μηχανισμός της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών ελέγχει την ενεργότητα πολλών διαφορετικών πρωτεϊνών των ευκαρυωτικών κυττάρων. Σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή, περίπου πάνω από το 1/3 των 10.000 πρωτεϊνών ενός κοινού κυττάρου θηλαστικού πιστεύεται ότι είναι φωσφορυλιωμένες. Η προσθήκη και η αφαίρεση φωσφορικών ομάδων συχνά συμβαίνει σε απάντηση προς σήματα που επιφέρουν κάποια μεταβολή στην κατάσταση του κυττάρου με αποτέλεσμα οι περισσότερες από τις κύριες ενδοκυττάριες σηματοδοτικές πρωτεΐνες να λειτουργούν σαν μοριακοί διακόπτες.

Η φωσφορυλίωση, όπως και η αλλοστερική ρύθμιση, παίζει τον ρόλο του ενεργοποιητή ή του αναστολέα σε μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών ως απάντηση στα περιβαλλοντικά μηνύματα. Οι κινάσες των πρωτεϊνών αποτελούν συνιστώσες στα περισσότερα μονοπάτια μεταγωγής σήματος και κατά συνέπεια οι περισσότερες κυτταρικές λειτουργίες ρυθμίζονται μέσω της φωσφορυλίωσης. Για παράδειγμα, η περίπλοκη σειρά των γεγονότων που συμβαίνουν κατά τη διαίρεση ενός ευκαρυωτικού κυττάρου προγραμματίζεται χρονικά με αυτόν τον μηχανισμό. Επίσης, πολλά από τα σήματα που παράγονται από ορμόνες και νευροδιαβιβαστές μεταφέρονται από την κυτταρική μεμβράνη στον πυρήνα με μια ακολουθία αντιδράσεων φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών. Επιπλέον η πρωτεϊνική φωσφορυλίωση παίζει σημαντικό ρόλο και σε άλλες κυτταρικές διεργασίες όπως

είναι ο μεταβολισμός, η μεταγραφή, η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, η απόπτωση, η διαφοροποίηση και η διακυτταρική επικοινωνία, ενώ παράλληλα μεσολαβεί και σε μηχανισμούς ελέγχου της φυσιολογίας του κυττάρου, όπως η ομοιοστασία και η λειτουργία του νευρικού και ανοσοποιητικού συστήματος, μέσω της συνεχούς συναρμολόγησης ή αποσυναρμολόγησης πρωτεϊνικών συμπλόκων.

Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί πάνω από 500 πρωτεϊνικές κινάσες και ανάλυση των χαρακτηριστικών τους επέτρεψε την δημιουργία του φυλογενετικού τους δέντρου και την κατηγοριοποίηση τους με βάση την ομολογία που παρουσιάζουν ως προς την πρωτοταγή δομή, το μοντέλο ρύθμισης δράσης και την εξειδίκευσή τους (Manning *et al.*, 2002, Hanks and Hunter, 1995) (εικόνα 1).

Οι κινάσες πρωτεϊνών σερίνης/αργινίνης αποτελούν μια οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών οι οποίες φωσφορυλιώνουν σερίνες επαναλαμβανόμενων ακολουθιών διπεπτιδίων αργινίνης/σερίνης (περιοχή RS). Οι κινάσες αυτές έχουν το χαρακτηριστικό ότι παρουσιάζουν πολύ μεγάλη ομολογία στην πρωτοταγή τους δομή, στη δραστηκότητά τους ως κινάσες καθώς και στην εξειδίκευσή τους ως προς τα υποστρώματα. Επιπλέον έχουν διατηρηθεί κατά τη διάρκεια της εξέλιξης από τη ζύμη μέχρι τον άνθρωπο και φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο σε κυτταρικές λειτουργίες όπως είναι η ρύθμιση του ματίσματος του mRNA (Gui *et al.*, 1994a, Gui *et al.*, 1994b, Valcarcel *et al.*, 1996), η μεταφορά πρωτεϊνών στον πυρήνα (Yun and Fu *et al.*, 2000, Yun *et al.*, 2003, Lai *et al.*, 2000), η ανάπτυξη της σπερματικής σειράς στο *C. elegans* (Kuroyanagi, *et al.* 2000), η ανταλλαγή των ιστονών με πρωταμίνες κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης (Papoutsoroulou *et al.* 1999), η ανάπτυξη μυών (Nakagawa *et al.* 2005), η μεταφορά πολυαμινών και η ομοιοστασία ιόντων στα κύτταρα *S. cerevisiae*. (Omri *et al.* 2001).



Εικόνα 1: Φυλογενετικό δέντρο των ευκαρυωτικών κινασών. Με κόκκινο κύκλο διακρίνεται η οικογένεια των SRPK.

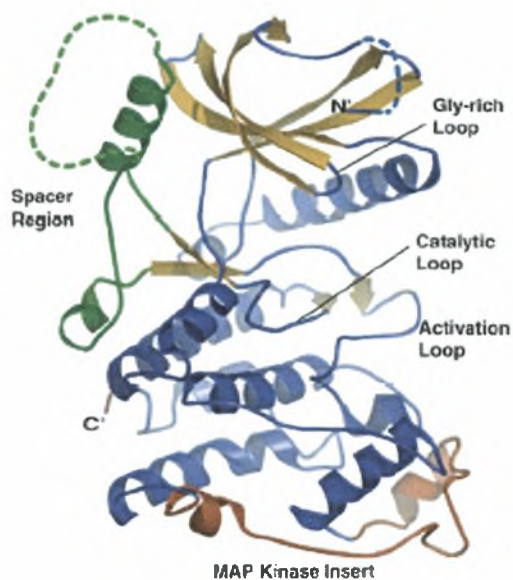
Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωρισθεί σε διάφορους οργανισμούς τουλάχιστον δεκατρία γονίδια που κωδικοποιούν κινάσες πρωτεϊνών σερίνης/αργινίνης. Στα θηλαστικά, οι ανθρώπινες μορφές των SRPK1 (accession No:U09564), SRPK1a (accession No:AJ318054), και SRPK2 (accession No:U88666A), στο ποντίκι οι μορφές των SRPK1 (accession No:AJ224115), SRPK2 (accession No:AB006036), SRPK3 (accession No AJ 292980), στο ζυμομύκητα *S. cerevisiae* η Sky1 (accession No: S55098), στο ζυμομύκητα *S. pombe* η Dsk1 (accession No: D13447), στη *Drosophila* η SRPK1 (accession No:AF01149), στο νηματοειδές *C. elegans* η SPK-1 (accession No:AF241656), στο *Trypanosoma cruzi* η TcSRPK (accession No: AY101382), στο *Dictyostelium discoideum* η SRPK1-like Kinase (accession No: AAO52163) καθώς και στο φυτό *Arabidopsis thaliana* η SRPK1 (accession No: AJ292978).

A.1.1. Χαρακτηριστικά της δομής των κινασών πρωτεϊνών σερίνης/αργινίνης

Οι κινάσες πρωτεϊνών σερίνης/αργινίνης εμφανίζουν υψηλή ομολογία μεταξύ των ειδών ως προς την πρωτοταγή τους δομή (~50% ομολογία μεταξύ ζυμομύκητα και ανθρώπου) αλλά και ως προς την ενζυμική δραστικότητα και την εξειδίκευση στα υποστρώματά τους.

Οι πληροφορίες που έχουμε για την λεπτομερή δομή των κινασών αυτών προέρχονται από την κρυσταλλογραφική ανάλυση που έγινε αρχικά στη κινάση Sky1p του *S. cerevisiae* το 2001 και αργότερα και σε μια μορφή της ανθρώπινης SRPK1 από όπου είχε αφαιρεθεί μια αλληλουχία 41 αμινοξέων στο αμινοτελικό άκρο καθώς και 217 αμινοξέα από την περιοχή που παρεμβάλλεται μεταξύ των δραστικών περιοχών της, η οποία όμως παρουσιάζει παρόμοια δραστικότητα με την πλήρους μεγέθους κινάση (Nolen *et al.*, 2001, Ngo *et al.*, 2005, Ngo *et al.*, 2007, Lukasiewicz *et al.*, 2007). Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι η SRPK1 κινάση αναδιπλώνεται σε δυο περιοχές ή λοβούς: α) τον N-τελικό λοβό, ο οποίος αποτελείται από πέντε αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες και μια μακριά α-έλικα, την αC και β) τον C-λοβό, ο οποίος είναι μεγαλύτερος και περιέχει επτά α-έλικες και τέσσερις μικρές β-πτυχωτές επιφάνειες. Μεταξύ των δύο λοβών εντοπίζεται η περιοχή όπου προσδένεται το ATP και η οποία ονομάζεται βρόχος κατάλυσης (catalytic loop), ενώ

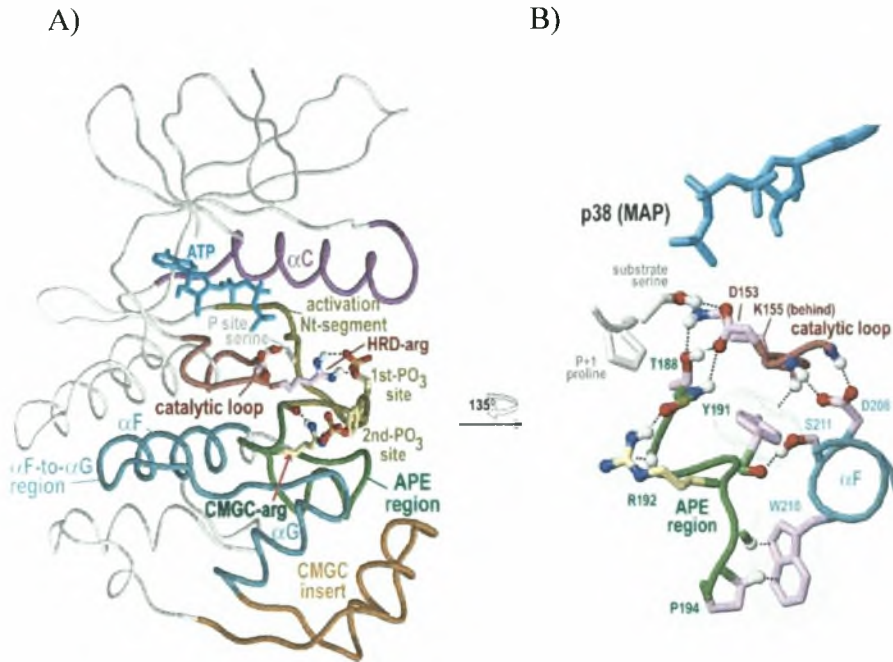
η περιοχή όπου προσδέεται το υπόστρωμα της κινάσης ονομάζεται βρόχος ενεργοποίησης (activation loop) (Ngo *et al.*, 2005) (εικόνα 2).



Εικόνα 2: Κρυσταλλική δομή της SRPK1. Ο μικρός (N-τελικός) λοβός αποτελείται κυρίως από β-ελάσματα (κίτρινο) και την έλικα αC και ο μεγάλος ο οποίος αποτελείται κυρίως από α -έλικες (μπλε). Φαίνονται επίσης ο βρόχος κατάλυσης (catalytic loop), ο βρόχος ενεργοποίησης (activation loop) και μια περιοχή πλούσια σε γλυκίνη (Gly-rich loop). Η ενδιάμεση περιοχή (spacer region) απεικονίζεται με πράσινο χρώμα ενώ το ένθετο τμήμα της MAP κινάσης (MAP kinase insert) απεικονίζεται με κόκκινο (Ngo *et al.*, 2005).

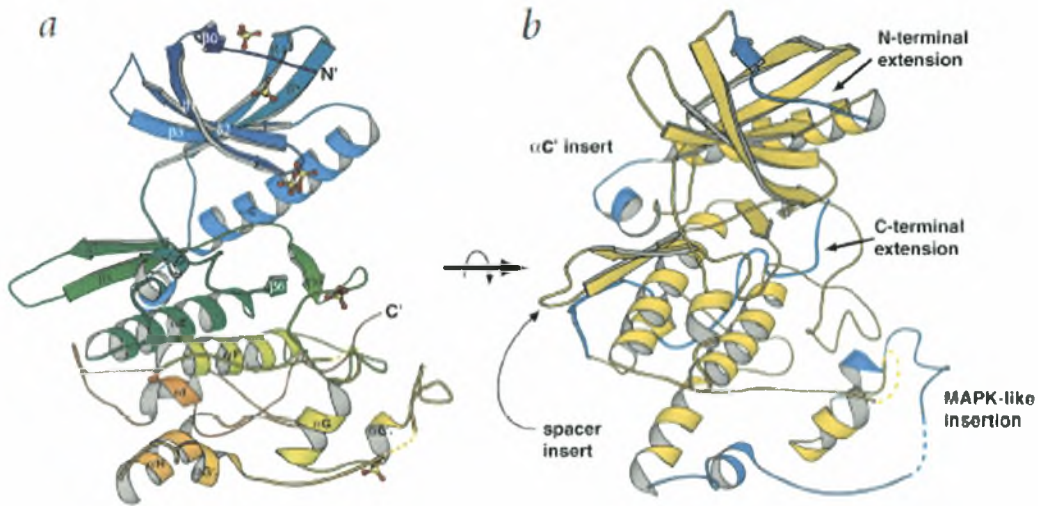
Γενικά η οικογένεια των SRPK περιέχει ορισμένες κοινές δομικές περιοχές, οι οποίες χαρακτηρίζουν και την οικογένεια των CMGC κινασών (Cyclin-Dependent protein kinases, Mitogen Activated protein kinases, Glycogen Synthase kinases, CDK-like kinases) όπου ανήκουν και είναι οι εξής: α) η περιοχή αC που αντιστοιχεί στη έλικα C της κινάσης (N-λοβός), β) ο καταλυτικός βρόχος (catalytic loop) ο οποίος περιέχει το μοτίβο HRD (ιστιδίνη, αργινίνη, ασπαραγινικό), γ) το N-τελικό τμήμα ενεργοποίησης (activation Nt- segment) που αντιστοιχεί στο αμινοτελικό άκρο του βρόχου ενεργοποίησης, δ) την περιοχή APE (αλανίνη, προλίνη, γλουταμινικό) που αντιστοιχεί στα συντηρημένα αμινοξέα που υπάρχουν εκατέρωθεν της αλληλουχίας APE και αποτελούν το καρβοξυτελικό άκρο του βρόχου ενεργοποίησης ε) την περιοχή αF - αG που εκτείνεται από την έλικα-F έως τη έλικα-G και η οποία

περιβάλλει την περιοχή APE και ζ) το ένθετο τμήμα CMGC που είναι χαρακτηριστικό μόνο της ομώνυμης οικογένειας (εικόνα 3) (Kannan *et al.*, 2004).



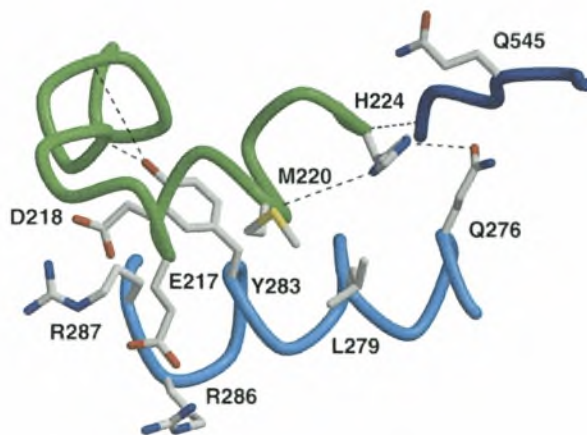
Εικόνα 3: Η τρισδιάστατη δομή της p38 MAP (CMGC κινάσης). Στο σχήμα φαίνονται οι περιοχές κλειδιά μιας CMGC πρωτεΐνης : α) N-λοβός που προσδένεται το ATP με κυανό χρώμα και που περιέχει την αC έλικα με μωβ χρώμα, β) η περιοχή μεταφοράς της γ -φωσφορικής ομάδας του νουκλεοτιδίου στο αμινοξύ του πρωτεϊνικού δέκτη (βρόχος κατάλυσης) η οποία περιέχει το μοτίβο HRD (μπορντό χρώμα), γ) C-λοβός που αποτελείται από 1) το ευθύγραμμο τμήμα Nt με λαδί χρώμα, 2) η περιοχή APE με πράσινο χρώμα, 3) η περιοχή αF - αG με κυανό χρώμα, 4) το CMGC ένθετο τμήμα με καφέ χρώμα. Οι δεσμοί υδρογόνου από άτομα οξυγόνου, αζώτου και υδρογόνου παριστάνονται με κόκκινο, μπλε και άσπρο χρώμα αντίστοιχα. Επίσης απεικονίζονται οι περιοχές φωσφορυλίωσης (1^η και 2^η) με λαδί χρώμα και οι φωσφορικές ομάδες με κόκκινο. Β. Αναπαράσταση των περιοχών που αλληλεπιδρούν και σταθεροποιούν την CMGC-αργινίνη (R 192) σε στροφή 135^ο και ενός υποτιθέμενου υποστρώματος (Kannan *et al.*, 2004).

Οι προαναφερθείσες μελέτες υπέδειξαν ορισμένα δομικά χαρακτηριστικά τα οποία είναι κοινά μεταξύ των μελών της οικογένειας των SR κινασών και εξηγούν το δεδομένο ότι η ενζυμική δράση αυτών των κινασών είναι συστατική, δηλαδή δεν ρυθμίζεται από φωσφορυλίωση όπως συμβαίνει κατά κανόνα για τις περισσότερες οικογένειες κινασών (εικόνα 4) (Nolen *et al.*, 2001).



Εικόνα 4: Κρυσταλλική δομή τύπου κορδέλας του μορίου της Sky1p. (A) Η συνολική δομή του μορίου της Sky1p δείχνει ομοιότητα με άλλες πρωτεϊνικές κινάσες. Η Sky1p περιέχει στο μόριο της ένα μικρό λοβό ο οποίος αποτελείται κυρίως από β-ελάσματα και ένα μεγάλο ο οποίος αποτελείται από α-έλικες. (B) Δομική αναπαράσταση του μορίου της Sky1p ανεστραμμένη κατά 40 μοίρες όπου παρουσιάζονται οι μη καταλυτικές περιοχές της κινάσης (Nolen *et al.*, 2001).

Ένα από αυτά τα χαρακτηριστικά είναι ότι η έλικα αC, από της οποίας τη διαμόρφωση εξαρτάται η καταλυτική δράση σε ορισμένες κινάσες πρωτεϊνών, στην περίπτωση της Sky1p περιλαμβάνει μια επιπλέον αλληλουχία αμινοξέων (αC'), η οποία επιτείνει και σταθεροποιεί τη δομή της αC φέρνοντάς την σε επαφή με την έλικα αE (εικόνα 5) (Nolen *et al.*, 2001).



Εικόνα 5: Απεικόνιση αλληλεπίδρασης του αC' τμήματος με τον μεγάλο λοβό της Sky1p. Το τμήμα αC' (πράσινο) αλληλεπιδρά με την έλικα αE (ανοιχτό μπλε) και το β-έλασμα β8 (σκούρο μπλε) σταθεροποιώντας έτσι την έλικα αC (Nolen *et al.*, 2001).

Ένα άλλο χαρακτηριστικό που διακρίνει τις κινάσες SRPK και το οποίο τις καθιστά δραστικές χωρίς να απαιτούν την φωσφορυλίωση του βρόχου ενεργοποίησης είναι η στερεοχημική διάταξη και η θέση του βρόχου ενεργοποίησης αυτού καθ'εαυτού μέσα στο μόριο. Για την Sky1p οι Nolen et al έδειξαν με πολύ κομψά πειράματα ότι το C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης στον *S. cerevisiae* σταθεροποιεί τον βρόχο ενεργοποίησης και ευθύνεται για την συστατική ενεργότητα του μορίου. Αντίθετα, για την ανθρώπινη SRPK1, αυτό δεν ισχύει και μέχρι σήμερα δεν είναι ξεκάθαρο ποια είναι ακριβώς εκείνα τα στοιχεία που σταθεροποιούν την κινάση σε μια συνεχή ενεργό μορφή (Ngo et al., 2007).

A.1.2. Γνωστά μέλη της οικογένειας των κινάσων SRPK στα θηλαστικά

A.1.2.1. SRPK1

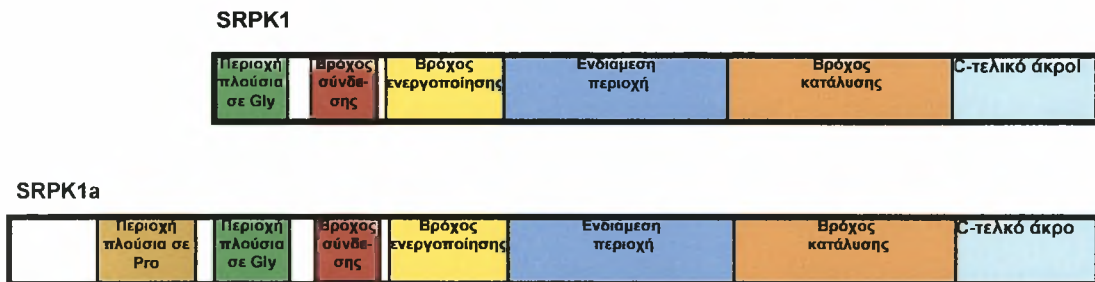
Το πρώτο μέλος της οικογένειας, που απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε ήταν η ανθρώπινη μορφή της SRPK1. Η κλωνοποίηση και ο χαρακτηρισμός της SRPK1 πραγματοποιήθηκε το 1994 από τον Dr. X-D. Fu με βάση την ικανότητά της να φωσφορυλιώνει τους παράγοντες ματίσματος που περιέχουν στο μόριο τους ακολουθίες διπεπτιδίων αργινίνης/σερίνης και να τους ανακατανέμει κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (Gui et al., 1994a, Gui et al., 1994b).

Μετά από φθορισμομετρικό *in situ* υβριδισμό σε σωματικά κύτταρα βρέθηκε ότι το γονίδιο της SRPK1 εντοπίζεται στον άνθρωπο στο χρωμόσωμα 6p21.2-p21.3, ενώ στον ποντικό στο χρωμόσωμα 17 (Wang et al., 1999). Η SRPK1 αποτελείται από 655 αμινοξέα και περιέχει μια περιοχή με δράση κινάσης (80-653 αα), η οποία χωρίζεται σε δύο μέρη από ένα ενδιάμεσο τμήμα αμινοξέων (226-490 αα). Επιπλέον περιέχει μια περιοχή πρόσδεσης του ATP (86-109 αα), μία περιοχή πλούσια σε λυσίνη (258-276 αα) και δύο πιθανά σήματα εντοπισμού στον πυρήνα (NLS), ένα στην αμινοτελική περιοχή (11-21 αα) και ένα στο κέντρο του μορίου (267-277 αα) (Gui et al., 1994a) (εικόνα 6).

Μελέτες που έγιναν όσον αφορά την κατανομή της SRPK1 στους διάφορους ιστούς, έδειξαν ότι αυτή εκφράζεται σε μεγαλύτερο βαθμό στους όρχεις και συγκεκριμένα στα σπερματογόνα κύτταρα έχοντας μικρότερα επίπεδα έκφρασης

στους άλλους ιστούς όπως το πάγκρεας, ο θύμος αδένας, η καρδιά, και ο σκελετικός μυς (Wang *et al.*, 1998a, Papoutsopoulou *et al.*, 1999, Nikolakaki *et al.*, 2001).

Γνωστά υποστρώματα που φωσφορυλιώνονται από την SRPK1 είναι οι παράγοντες ματίσματος που περιέχουν διπεπτίδια αργινίνης, ο υποδοχέας της λαμίνης B (LBR) (Papoutsopoulou *et al.*, 1999b), η πρωταμίνη P1 (Papoutsopoulou *et al.*, 1999a), η πρωτεΐνη P2PR (Proliferation Potential proteins) (Scott *et al.*, 2003) και η πυρηνική πρωτεΐνη του ιού της ηπατίτιδας Β (HBV) (Daub *et al.*, 2002, Zhou *et al.*, 1992). Έχει δειχτεί ακόμη ότι η δράση κινάσης της SRPK1 σε εκχυλίσματα όρχεων αυξάνεται κατά 6 φορές μετά από φωσφορυλίωση των σερινών της από την κινάση καζεΐνης II (CK2) στις θέσεις 51 και 555 (Mylonis *et al.*, 2002).



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση της SRPK1 και SRPK1a.

SRPK1 και παθολογία

Μελέτες έχουν δείξει ότι αυξημένα επίπεδα έκφρασης της SRPK1 σε αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα σχετίζονται με την υψηλή έκφραση μιας ογκοπρωτεΐνης, της p210BCR/ABL, η οποία θεωρείται υπεύθυνη για τη χρόνια μυελογενή λευχαιμία (Sallese *et al.*, 2004). Αυξημένα επίπεδα της SRPK1 παρατηρούνται στην οξεία ATL (Adult T-cell Leukemia) (Hashizawa *et al.*, 2005) και στη χρωμοσωμική μετατόπιση t(6;17) (p21.31;q11.2), η οποία ευθύνεται για ένα πλήθος ανωμαλιών (Mansourie *et al.*, 2005). Αντίθετα στη εγκεφαλική ισχαιμία τα

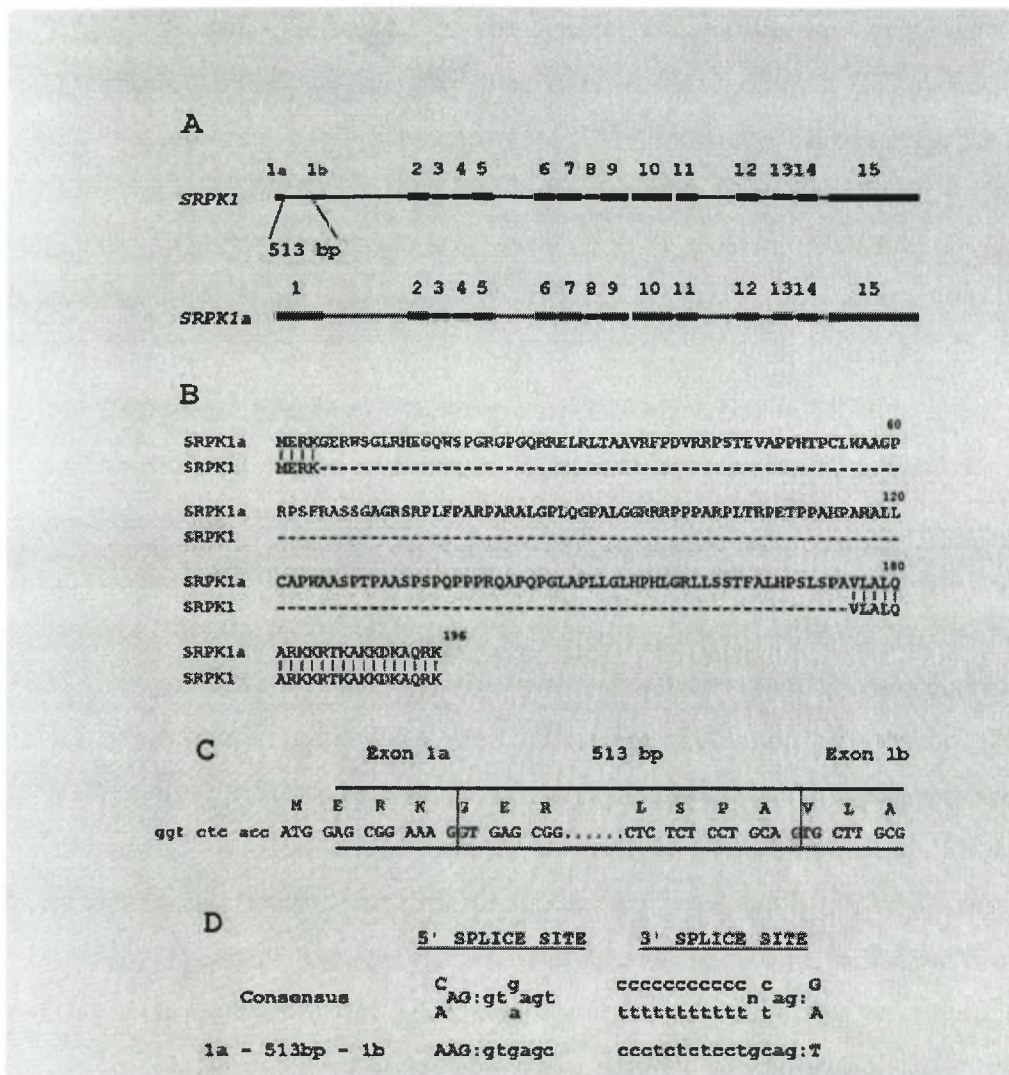
επίπεδα της SRPK1 στα βασικά γάγγλια είναι μειωμένα και φαίνεται κάποια ενδοκυττάρια μετατόπισή της (Erdo *et al.*, 2004).

Επιπλέον, το γονίδιο της SRPK1 έχει βρεθεί να προσδίδει ευαισθησία σε μερικά από τα πιο ενεργά και αποτελεσματικά αντικαρκινικά φάρμακα όπως η cis-πλατίνη και το αντιβιοτικό μπλεομυκίνη παίζοντας έτσι σημαντικό ρόλο στην κλινική εφαρμογή αυτών των φαρμάκων (Guenhael *et al.*, 2002, Schenk *et al.*, 2004).

Τέλος πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η SRPK1 υπερεκφράζεται σε καρκινώματα μαστού, παγκρέατος, και εντέρου και εμπλέκεται στη ρύθμιση μονοπατιών υπεύθυνων για ογκογένεση (Hayes *et al.*, 2006).

A.1.2.2. SRPK1a

Η SRPK1a προέρχεται από εναλλακτικό μάτισμα του μεταγράφου του γονιδίου που κωδικοποιεί την SRPK1. Αποτελείται από 826 αμινοξέα και περιέχει την ίδια αμινοξική αλληλουχία και τις ίδιες δομικές περιοχές με την SRPK1 με την μόνη διαφορά την ύπαρξη μιας εμβόλιμης ακολουθίας από 171 αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο του μορίου μεταξύ της Lys4 και Val5 της SRPK1 (εικόνα 6). Σύγκριση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της SRPK1a και SRPK1 αποκάλυψε την ύπαρξη ενός ιντρονίου μεγέθους 513 βάσεων που συμπεριλαμβάνεται στο μάτισμα της SRPK1a ενώ αποκόπτεται στην SRPK1 (εικόνα 7) (Nikolakaki *et al.*, 2001).



Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση του εναλλακτικού τρόπου ματίσματος της SRPK1a (59). (A) Αναπαράσταση της δομής του γονιδίου των SRPK1/1a. Το εξόνιο 1 της SRPK1a αποτελείται από τα εξόνια 1a και 1b της SRPK1 καθώς και από το τμήμα των 513 bp το οποίο δεν περιλαμβάνεται στην SRPK1. (B) Σύγκριση της αμινοξικής ακολουθίας που κωδικοποιείται από το εξόνιο 1 της SRPK1a με την ακολουθία που κωδικοποιούν τα εξόνια 1a και 1b της SRPK1. (C) Η νουκλεοτιδική ακολουθία που περιβάλλει το τμήμα των 513 bp. (D) Οι 5' και 3' θέσεις ματίσματος που βρίσκονται στα όρια μεταξύ των εξονίων 1a και 1b και του τμήματος των 513 bp (Nikolakaki *et al.*, 2001).

Η εμβόλιμη αυτή ακολουθία περιέχει μία περιοχή πλούσια σε προλίνες, η οποία έχει δείχτει ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών (Kay *et al.*, 2000). Συγκεκριμένα φαίνεται ότι αυτή η πρόσθετη αλληλουχία δίνει στην SRPK1a τη δυνατότητα να αλληλεπιδρά με διαφορετικές πρωτεΐνες από ό,τι η SRPK1, όπως στην περίπτωση δέσμευσής της με μια πρωτεΐνη του πυρηνικού πλέγματος, τον SAF-B (Scaffold attachment factor B) (Nikolakaki *et al.*, 2001). Στην περιοχή αυτή της SRPK1a εντοπίζονται και δύο αλληλουχίες με το μοτίβο LXXL

(¹⁴⁸LAPLL¹⁵² και ¹⁵⁸LGRL¹⁶²), το οποίο θεωρείται ότι διευκολύνει την αλληλεπίδραση διαφόρων πρωτεϊνών με πυρηνικούς υποδοχείς (Nikolakaki *et al.*, 2001). Επιπλέον στην εμβόλιμη περιοχή της SRPK1a περιέχεται το μοτίβο PXXP (X: οποιοδήποτε αμινοξύ P: προλίνη) το οποίο αποτελεί θέση πρόσδεσης με την Src Homology 3 (SH3) περιοχή, η οποία συναντάται σε κάποιες πρωτεΐνες αλλά και με τις WW-περιοχές ορισμένων πρωτεϊνών (Ren *et al.*, 1993, Chen *et al.*, 1995) (εικόνα 6).

Πειράματα υβριδισμού κατά Northern έδειξαν ότι η SRPK1a όπως και η SRPK1 εκφράζεται περισσότερο στους όρχεις και λιγότερο στους υπόλοιπους ιστούς (Nikolakaki *et al.*, 2001).

Η εξειδίκευση της SRPK1a ως προς τα υποστρώματα παρουσιάζει παρόμοια εικόνα με αυτήν της SRPK1. Πειράματα σύγκρισης δράσης κινάσης της SRPK1a και SRPK1 έδειξαν ότι και οι δύο κινάσες έχουν την ικανότητα να φωσφορυλιώνουν την RS περιοχή στο αμινοτελικό άκρο του LBR και τον παράγοντα ματίσματος ASF/SF2. Η SRPK1a όμως βρέθηκε να είναι 2-με 3-φορές πιο ενεργή στην φωσφορυλίωση του LBR και του ASF/SF2 σε σύγκριση με την SRPK1 (Nikolakaki *et al.*, 2001). Ένα άλλο υπόστρωμα επίσης της SRPK1a είναι και η πρωτεΐνη P2P-R, την οποία φωσφορυλιώνει στην πλούσια σε RS περιοχή της (Scott *et al.*, 2003). Επιπλέον, δεδομένου ότι οι κινάσες των SR πρωτεϊνών έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν το εναλλακτικό μάτισμα, πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα επιμολυσμένα με το γονίδιο tau έδειξαν ότι η SRPK1a είναι ικανή, όπως η SRPK1, αλλά με υψηλότερη δραστηριότητα, στο να προάγει το προϊόν του εναλλακτικού ματίσματος του ανθρώπινου γονιδίου tau από όπου λείπει το εξόνιο 10 (Nikolakaki *et al.*, 2001).

A.1.2.3. SRPK2

Το γονίδιο της SRPK2 εντοπίζεται στον άνθρωπο στο χρωμόσωμα 7, ενώ στον ποντικό στο χρωμόσωμα 5. Η πρωτεΐνη αποτελείται από 686 αμινοξέα και η σύγκριση της πρωτοταγούς της δομής με αυτή της SRPK1 έδειξε τα εξής: α) η SRPK2 εμφανίζει 77% ταυτότητα και 90% ομοιότητα με την αμινοξική αλληλουχία της SRPK1, β) κοινό χαρακτηριστικό των SRPK1 και SRPK2 κινασών είναι ότι οι

δύο περιοχές τους με δράση κινάσης διαχωρίζονται από μια ιδιαίτερα μεγάλη αλληλουχία αμινοξέων, η οποία συναντάται συχνά σε κινάσες τυροσίνης, αλλά σπάνια σε κινάσες σερίνης/θρεονίνης. Η μεγάλη αυτή συνδετική αλληλουχία αμινοξέων θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στη δράση και εξειδίκευσή τους ως κινάσες όσο και στην υποκυτταρική τους κατανομή και γ) και στις δύο κινάσες υπάρχει απαλοιφή μικρού τμήματος μεταξύ των περιοχών II και III καθώς και μια προσθήκη τμήματος εντός της περιοχής V (Wang *et al.*, 1998).

Επιπλέον, η SRPK2 εμφανίζει παρόμοια ενζυμική δράση και την ίδια εξειδίκευση με την SRPK1 στο να φωσφορυλιώνει υποστρώματα που περιέχουν περιοχές πλούσιες σε διπεπτίδια αργινίνης/σερίνης, όπως είναι ο ASF/SF2, ο SRp20, ο SRp40 και άλλοι παράγοντες ματίσματος (Wang *et al.*, 1998).

Η SRPK2 εμφανίζει υψηλή ομολογία με την SRPK1 στην αμινοξική ακολουθία της κεντρικής και καρβοξυτελικής περιοχής, ενώ αντίθετα το αμινοτελικό της άκρο περιέχει μια περιοχή πλούσια σε προλίνες παρόμοια με αυτό της SRPK1a. Μέσα στην περιοχή αυτή εντοπίζεται το μοτίβο PXXP, το οποίο αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με SH3 και WW περιοχές άλλων πρωτεϊνών. Η διαφορετική αυτή περιοχή της SRPK2 προφανώς συμβάλλει στην αλληλεπίδρασή της με συγκεκριμένα υποστρώματα ή άλλα ρυθμιστικά μόρια στο κύτταρο (Wang *et al.*, 1998).

Η κατανομή της SRPK2 στους διάφορους ιστούς παρουσιάζει διαφορετική εικόνα σε σχέση με την SRPK1 και SRPK1a, καθώς εκφράζεται σε μεγαλύτερο βαθμό στον εγκέφαλο και στους όρχεις, σε μέτριο βαθμό στην καρδιά και το σκελετικό μυ και ακολουθούν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασής της στον πνεύμονα, το ήπαρ και το νεφρό (Wang *et al.*, 1998, Papoutsopoulou *et al.*, 1999).

Τέλος τόσο η SRPK2 και όσο και η SRPK1 έχουν βρεθεί να δεσμεύουν την πυρηνική πρωτεΐνη του ιού της ηπατίτιδας Β (HBV) και να αναστέλλουν την αντιγραφή του μέσω μιας οδού που είναι ανεξάρτητη της φωσφορυλίωσης (Zheng *et al.*, 2005).

A.1.2.4. SRPK3

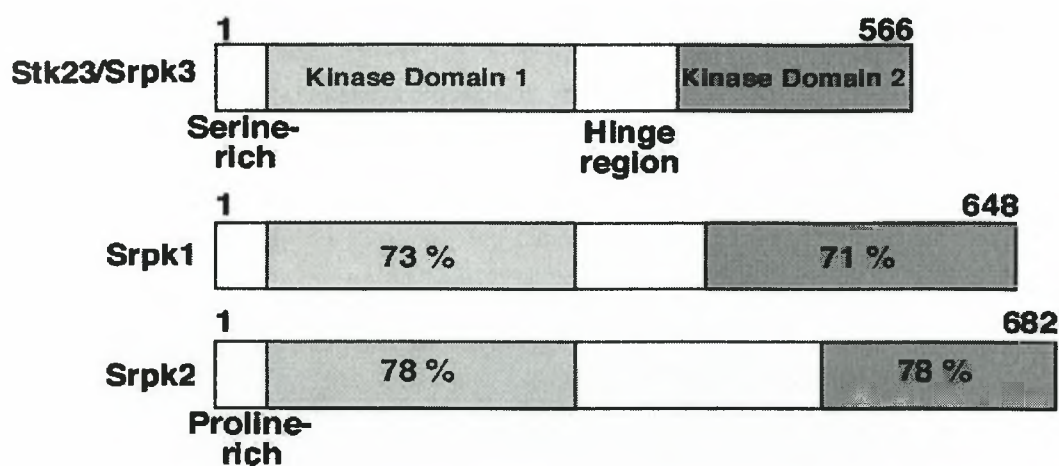
Η SRPK3, η οποία ταυτοποιήθηκε πρόσφατα στον ποντικό, αποτελεί ένα νέο μέλος της οικογένειας των SRPK κινασών. Η έκφραση του γονιδίου της SRPK3 υπόκειται σε ρύθμιση από τον μεταγραφικό παράγοντα MEF2 (myocyte enhancer

factor 2), ο οποίος ανήκει στην οικογένεια που ελέγχει την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των σκελετικών και καρδιακών μυων μαζί με την αντίστοιχη των μυϊκών πρωτεϊνών bHLH (basic helix-loop-helix) (Nakagawa *et al.*, 2005).

Η κατανομή της SRPK3 στους διάφορους ιστούς διαφέρει σε σχέση με τις SRPK1 και SRPK2, καθώς αυτή εκφράζεται ειδικά στην καρδιά και στους σκελετικούς μυς και έχει δείχτει ότι παίζει σημαντικό ρόλο μέσω ρύθμισής της από τον παράγοντα MEF2, στη φυσιολογική ανάπτυξη και ομοιοστασία του σκελετικού και καρδιακού μυός. Συγκεκριμένα, υπερέκφραση της SRPK3 στο σκελετικό μυ και την καρδιά ποντικού μπορεί να προκαλέσει σοβαρές ανωμαλίες των μυϊκών ινιδίων και διατακτική καρδιομυοπάθεια αντίστοιχα, ενώ απαλοιφή του γονιδίου της SRPK3 οδηγεί σε μια μορφή σκελετομυοπάθειας. Η διαφορετική κατανομή των SRPKs στους διάφορους ιστούς των οργανισμών φαίνεται ότι συμβάλλει στην ρύθμιση των λειτουργιών τους κατά ένα εξειδικευμένο τρόπο στο επίπεδο του κάθε ιστού ξεχωριστά (ιστοειδική έκφραση).

Η SRPK3 αποτελείται από 566 αμινοξέα και περιέχει δύο περιοχές με δράση κινάσης, οι οποίες εμφανίζουν υψηλή ομολογία τόσο με την SRPK1 (71%) όσο και με την SRPK2 (78%) του ποντικού. Σημαντικές διαφορές της SRPK3 σε σχέση με τις άλλες κινάσες εντοπίζονται στη κεντρική συνδετική περιοχή που ενώνει τις περιοχές με δραστηριότητα κινάσης καθώς και στο N-τελικό άκρο της το οποίο περιέχει μια περιοχή πλούσια σε σερίνες (Εικόνα 8).

Επιπλέον η SRPK3 εμφανίζει παρόμοια ενζυμική δραστηριότητα και εξειδίκευση με τις άλλες SR κινάσες στο να φωσφορυλιώνει *in vitro* γνωστά υποστρώματά τους όπως είναι ο παράγοντας SF2/ASF και ο LBR (Nakagawa *et al.*, 2005).

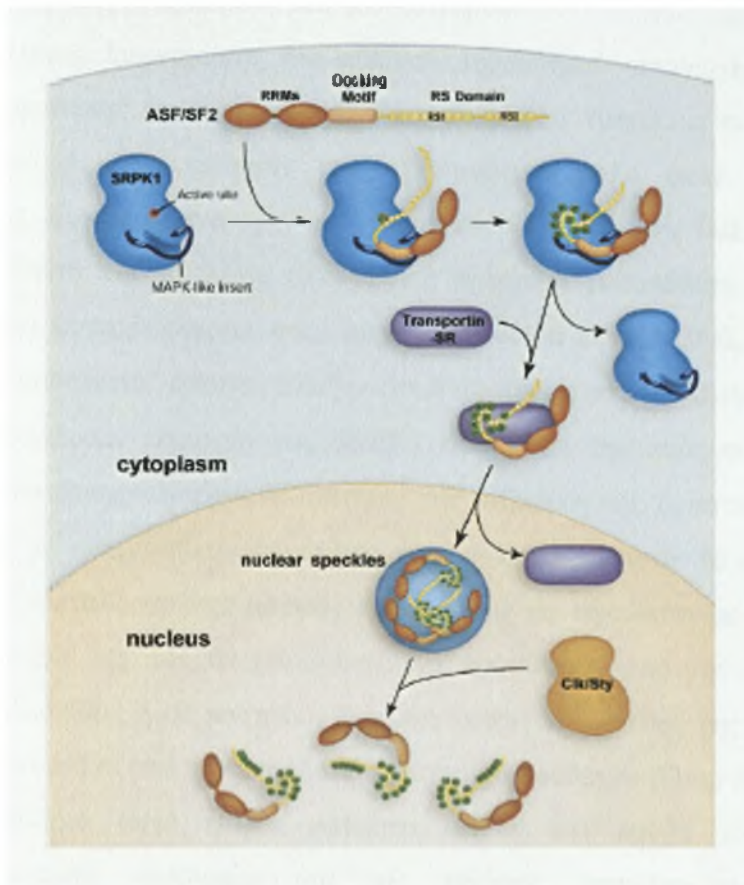


Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση της δομής των τριών κινάσων SRPK του ποντικού. Η SRPK3 περιέχει περιοχή πλούσια σε σερίνες ενώ η SRPK1 και η SRPK2 σε προλίνες. Οι τρεις κινάσες παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία στις δραστικές περιοχές της κινάσης αλλά όχι στο ενδιάμεσο τμήμα τους (Hinge region). Τα ποσοστά που αναγράφονται στα γκρι κουτιά αναφέρονται στις ομοιότητες των αμινοξικών αλληλουχιών της SRPK1 και SRPK2 με την SRPK3 (Nakagawa *et al.*, 2005).

A.1.3. Εντοπισμός των κινάσων πρωτεϊνών σερίνης/αργινίνης

Μελέτες φθορισμού και ανοσοφθορισμού που έγιναν σε κύτταρα HeLa προκειμένου να ελεγχθεί η υποκυτταρική κατανομή των μελών της οικογένειας των SRPK έδειξαν ότι οι εξωγενείς κινάσες SRPK1 και SRPK2 εκφρασμένες σε σύντηξη με τον επίτοπο GFP (green fluorescent protein) και τον επίτοπο FLAG εντοπίζονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και σε μικρότερο ποσοστό στον πυρήνα (Wang *et al.*, 1998a). Μελέτες επίσης ανοσοφθορισμού στα ίδια κύτταρα όπου χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της SRPK1 έδειξαν ότι η κατανομή της ενδογενούς SRPK1 είναι επίσης κυρίως κυτταροπλασματική και λιγότερο πυρηνική (Ding *et al.*, 2006). Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι οι SR κινάσες δεν είναι διάχυτες στο κυτταρόπλασμα αλλά εμφανίζονται προσκολλημένες σε κάποιες δομές του, παρά το γεγονός ότι τα περισσότερα υποστρώματά τους εντοπίζονται στον πυρήνα (Ding *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 1998a). Σύμφωνα όμως με το μοντέλο των Ngo *et al* για το ρόλο των SRPKs στον εντοπισμό των υποστρωμάτων τους προτείνεται ότι η κυτταροπλασματική κατανομή των SRPKs εξυπηρετεί την φωσφορυλιοεξαρτώμενη είσοδο των πρωτεϊνών SR στον πυρήνα μέσω του υποδοχέα

hMtr10, όπου η περαιτέρω φωσφορυλίωσή τους από την πυρηνική κινάση Clk1 τις ενεργοποιεί για να λάβουν έπειτα μέρος στο μάτισμα (Ngo *et al.*, 2005) (εικόνα 9).



Εικόνα 9: Προτεινόμενο μοντέλο για τον ρόλο της SRPK1 και της Clk/Sty στην φωσφορυλίωση και τον εντοπισμό του παράγοντα μάτιματος ASF/SF2 (Ngo *et al.*, 2005).

Εξάλλου, σε πειράματα υποκυτταρικής κατανομής της κινάσης πρωτεϊνών *dsk1* της ζυμής *S. pombe*, σε κύτταρα συγχρονισμένα στη μεσόφαση, βρέθηκε να έχει και αυτή κυρίως κυτταροπλασματική εντόπιση. Σε κύτταρα όμως λίγο πριν την είσοδο τους στην μίτωση, το μεγαλύτερο ποσοστό της κινάσης εμφανίζεται κυρίως στον πυρήνα υπονοώντας ότι η διαφορετική υποκυτταρική κατανομή των κινασών είναι εξαρτώμενη από το στάδιο του κυτταρικού κύκλου στο οποίο βρίσκεται το κύτταρο (Takeuchi and Yanagida *et al.*, 1993). Αυτό επιβεβαιώθηκε και σε μελέτες που ακολούθησαν χρησιμοποιώντας την SRPK1 σε κύτταρα θηλαστικών συγχρονισμένα στην μεσόφαση, οι οποίες αποκάλυψαν ότι ένα μεγάλο ποσοστό της κινάσης αρχίζει να συσσωρεύεται στον πυρήνα πριν την έναρξη της μίτωσης και

συγκεκριμένα πριν τη διάσπαση του πυρηνικού φακέλου (Ding *et al.*, 2006). Από τα παραπάνω δεδομένα φαίνεται ότι κάποιο σήμα του κυτταρικού κύκλου επάγει την μετατόπιση της κινάσης στον πυρήνα στην αρχή της μίτωσης, γεγονός το οποίο είναι σημαντικό για τις διάφορες λειτουργίες του κυττάρου.

Στα πλαίσια διερεύνησης του πιθανού μηχανισμού εισαγωγής των SRPKs στον πυρήνα φαίνεται ότι η παρουσία του ενδιάμεσου τμήματος που χωρίζει τις δραστικές περιοχές των κινασών παίζει σημαντικό ρόλο στον υποκυτταρικό εντοπισμό τους. Συγκεκριμένα στην περίπτωση τόσο της κινάσης Dsk1 όσο και της Sky1p η αφαίρεση της εν λόγω ακολουθίας προκαλεί μετατόπιση και των δύο κινασών από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα (Brenton *et al.*, 2000, Mintz *et al.*, 1999). Επίσης πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι η αφαίρεση του ενδιάμεσου τμήματος μεταξύ των δραστικών περιοχών της SRPK1 επιταχύνει την πυρηνική είσοδο της κινάσης, η οποία όμως ταυτόχρονα διατηρεί την ενζυμική της δραστηριότητα. Αυτό επιβεβαιώθηκε με επιπρόσθετα πειράματα, τα οποία απέκλεισαν το ενδεχόμενο η μετατόπιση της μεταλλαγμένης μορφής της κινάσης να οφείλεται σε αλλαγές στο καταλυτικό κέντρο της που θα μπορούσαν να προκύψουν από την αποκοπή της ενδιάμεσης ακολουθίας ή σε παθητική διάχυση καθώς το μέγεθος της είναι μεγάλο (~90kD), αλλά ούτε και από την μεσολάβηση κάποιου υποδοχέα (Ding *et al.*, 2006).

Το εμβόλιμο αυτό τμήμα φαίνεται λοιπόν ότι παίζει το ρόλο μιας «κυτταροπλασματικής άγκυρας» για τις κινάσες αργινίνης/σερίνης μέσω αλληλεπιδράσεων με συστατικά του κυτταροσκελετού και πιθανόν επιτρέπει μόνο ένα συγκεκριμένο κλάσμα από κάθε κινάση να εισέρχεται στον πυρήνα μέσω αλληλεπίδρασης με κάποια υποστρώματά της. Η είσοδος των SR κινασών στον πυρήνα, όπου παρουσιάζουν δραστηριότητα σε συγκεκριμένες περιοχές του, και η έξοδός τους στη συνέχεια από αυτόν προφανώς εξαρτάται από την κατάσταση φωσφορυλίωσης που βρίσκονται τα συγκεκριμένα υποστρώματα των κινασών.

Επιπλέον σε μελέτες εντοπισμού των SRPK1 και SRPK2 σε κύτταρα HeLa, όταν το ενδιάμεσο τμήμα της SRPK2 είχε εισαχθεί στην SRPK1 αυτό είχε ως αποτέλεσμα την επαναφορά της SRPK1 στο κυτταρόπλασμα, γεγονός το οποίο σημαίνει ότι τα ενδιάμεσα τμήματα των SRPK1 και SRPK2 έχουν την ικανότητα να δρουν σαν αυτόνομες μονάδες που παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στην κυτταρική κατανομή αυτών των κινασών (Ding *et al.*, 2006). Έχει δειχτεί επίσης ότι στο ενδιάμεσο τμήμα της κινάσης Dsk1 υπάρχει μια σηματοδοτική ακολουθία πλούσια σε λευκίνες, η οποία είναι υπεύθυνη για την έξοδο της κινάσης από τον πυρήνα (nuclear

export signal-NES) (Fukunda *et al.*, 1997). Η συγκεκριμένη όμως σηματοδοτική ακολουθία, η οποία δεν εντοπίστηκε στην SRPK1, δεν είναι συντηρημένη μεταξύ των μελών της οικογένειας SRPK, αλλά θεωρείται ότι το ενδιάμεσο τμήμα της κινάσης περιέχει αρκετές ακολουθίες, οι οποίες μέσω της αλληλεπίδρασής τους με κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, προωθούν τον ελλιμενισμό της κινάσης στο κυτταρόπλασμα (Ding *et al.*, 2006).

Ο εντοπισμός της κινάσης στον πυρήνα συνδέεται άμεσα με την αντίδραση του ματίσματος, ενώ όταν αυτή βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα επηρεάζει διάφορα μεταβολικά μονοπάτια του RNA μέσω του μηχανισμού της αντιστρεπτής φωσφορυλίωσης. Για παράδειγμα οι κυτταροπλασματικές SRPKs παίζουν σημαντικό ρόλο στην εισαγωγή νεοσυντιθέμενων SR πρωτεϊνών στον πυρήνα καθώς οι περισσότερες από αυτές εισάγονται μέσω του υποδοχέα hMtr10 με ένα φωσφορυλιοεξαρτώμενο τρόπο (Lai *et al.*, 2000, 2001, Yun *et al.* 2003, Ngo *et al.*, 2005). Επιπλέον επειδή η υπο- και υπερφωσφορυλίωση των SR πρωτεϊνών αναστέλλει τη διαδικασία του ματίσματος, γεγονός το οποίο είναι καταστροφικό για την φυσιολογία του κυττάρου, η δραστηριότητα των SR κινασών μπορεί να ρυθμίζεται μέσω της εισαγωγής ενός συγκεκριμένου κλάσματος από κάθε κινάση στον πυρήνα (Siebel *et al.*, 1999, Ding *et al.*, 2006). Τέλος ο κυτταροπλασματικός εντοπισμός των SRPKs προφανώς εξυπηρετεί την αποφωσφορυλίωση των SR πρωτεϊνών και την εξαγωγή τους από τον πυρήνα μέσω αλληλεπίδρασης με τον παράγοντα TAP (ο οποίος εμπλέκεται στην εξαγωγή του mRNA από τον πυρήνα) (Huang *et al.*, 2003), αλλά και παίζει ρόλο στην απελευθέρωση των SR πρωτεϊνών από το mRNA που εξάγεται από τον πυρήνα διευκολύνοντας την πυρηνική είσοδο αυτών των πρωτεϊνών (Gilbert *et al.*, 2004).

A.1.4. Εξειδίκευση των κινασών πρωτεϊνών σερίνης/αργινίνης

Η εξειδίκευση των κινασών πρωτεϊνών σερίνης/αργινίνης εντοπίζεται στην ύπαρξη μιας επαναλαμβανόμενης ακολουθίας διπεπτιδίων αργινίνης-σερίνης (RS motif) στα υποστρώματά τους, στη σερίνη των οποίων γίνεται η μεταφορά της γ-φωσφορικής ομάδας του ATP. Η ελάχιστη απαίτηση για να είναι δραστικές οι κινάσες αυτές είναι η ύπαρξη τριών τουλάχιστον τέτοιων διπεπτιδίων (Nolen *et al.*, 2001). Σε πειράματα *in vitro* φωσφορυλίωσης, όπου χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη

σύντηξης GST-SRPK1 με πρωτεΐνες που περιείχαν μόνο δυο επαναλαμβανόμενα διπεπτίδια αργινίνη/σερίνης δεν ήταν δυνατή η φωσφορυλίωσή τους. Αντίθετα, για την τοποϊσομεράση I, η οποία φωσφορυλιώνει και αυτή μοτίβα RS, είναι αναγκαία η ύπαρξη πέντε τουλάχιστον επαναλαμβανόμενων διπεπτιδίων αργινίνης/σερίνης για τη φωσφορυλίωση του υποστρώματος (Rossi *et al.*, 1996).

Επίσης, μελέτες έδειξαν ότι παρόλο που οι κινάσες SRPK και Clk/Sty φωσφορυλιώνουν σερίνες σε SR πρωτεΐνες, έχουν διαφορετικές απαιτήσεις όσον αφορά στην αναγνώριση των υποστρωμάτων τους. Συγκεκριμένα σε *in vitro* πειράματα η αντικατάσταση των σερινών με θρεονίνες ή γλυκίνες σε όλα τα RS διπεπτίδια στον ASF/SF2 δεν επέτρεψε την φωσφορυλίωσή τους τόσο από την SRPK1 και SRPK2 όσο και από την Clk/Sty, αποδεικνύοντας με αυτό τον τρόπο ότι και οι τρεις κινάσες έχουν εξειδικευμένη δράση στη σερίνη. Αντίθετα αλλαγές της αργινίνης σε λυσίνη ή προλίνη απέτρεψε την φωσφορυλίωση του υποστρώματος από την SRPK1 και SRPK2 χωρίς όμως να επηρεάσει τη δράση της Clk/Sty, η οποία φαίνεται ότι επιδεικνύει ευρύτερη εξειδίκευση σε σχέση με τις SRPKs (Wang *et al.*, 1998).

Με βάση τα παραπάνω στοιχεία προκύπτει ότι τα μέλη της οικογένειας των SRPKs απαιτούν υποστρώματα που φέρουν διπεπτίδια SR και RS δείχνοντας ιδιαίτερη προτίμηση στην ύπαρξη βασικών αμινοξέων αμφίπλευρα της σερίνης που φωσφορυλιώνεται. Συγκεκριμένα οι SRPKs απαιτούν την ύπαρξη της αργινίνης στην θέση P+1 (όπου P θεωρείται κατάλοιπο σερίνης που υπόκειται σε φωσφορυλίωση) του υποστρώματος και για αυτή την επιλογή των κινασών θεωρούνται υπεύθυνα τα πολικά και όξινα αμινοξέα που βρίσκονται στην θήκη P+1 των κινασών αυτών (στην SRPK1 το Asn532 και στην SRPK2 το Asp543). Η θήκη P+1 αποτελεί συντηρημένη περιοχή, η οποία εντοπίζεται στο καταλυτικό κέντρο και των δύο κινασών και ειδικεύεται στο να επιλέγει το αμινοξύ στη θέση P+1 του υποστρώματος. Επομένως η αλληλουχία αργινίνη-σερίνη-αργινίνη (RSR) θεωρείται το καλύτερο υπόστρωμα για τις κινάσες SRPK, ενώ αντίθετα η λυσίνη, ιδιαίτερα όταν αυτή βρίσκεται στην θέση P-2 του υποστρώματος, έχει δείχτει ότι δεν ευνοεί την φωσφορυλίωση από τις κινάσες SRPK (Wang *et al.*, 1998).

Τα παραπάνω κριτήρια εξηγούν γιατί οι κινάσες της SRPK οικογένειας δεν μπορούν να φωσφορυλιώσουν κάποιες πρωτεΐνες όπως είναι η ιστόνη H1 και MBP, οι οποίες περιέχουν πολλές λυσίνες και υδροφοβικά αμινοξέα γύρω από τις θέσεις φωσφορυλίωσης. Οι συγκεκριμένες όμως πρωτεΐνες αποτελούν υποστρώματα της

Clk1, η οποία δεν φωσφορυλιώνει όξινα υποστρώματα, όπως είναι η καζεΐνη-β και η καρβοξυτελική περιοχή της c-Jun (Jun *et al.*, 1999). Στα κριτήρια όμως αυτά υπάρχουν δύο εξαιρέσεις α) οι SR κινάσες δείχνουν προτίμηση στην ύπαρξη της προλίνης στην θέση P+1 του υποστρώματος. Για παράδειγμα η πρωτεΐνη Nr13p, η οποία αποτελεί φυσικό υπόστρωμα της Sky1p, φωσφορυλιώνεται και από την SRPK1 σε μια σερίνη ακολουθούμενη από προλίνη, β) η ύπαρξη πολικών (N και Q) ή όξινων (D και E) αμινοξέων στη θέση P-2 του υποστρώματος είναι προτιμητέα από τις κινάσες Sky1p, SRPK1 και SRPK2 λόγω των συντηρημένων αργινινών που βρίσκονται στην ομόνυμη θέση (θήκη P-2) των κινάσων αυτών (R568 και R571 στη Sky1p) (Wang *et al.*, 1998). Επιπλέον έχει δειχτεί ότι οι κινάσες SRPK1 και SRPK2 φωσφορυλιώνουν την πρωταμίνη P1 σε μια αλληλουχία τριών διπεπτιδίων RS όπου παρεμβάλλεται μια γλουταμίνη ανάμεσά τους (RSQRSRS) (Papoutsopoulou *et al.*, 1999). Επιπλέον σε άλλα *in vitro* πειράματα που έγιναν, μεταλλάγματα του αμινοτελικού άκρου του υποδοχέα της λαμίνης B, όπου στην περιοχή διπεπτιδίων αργινίνης/σερίνης είχαν αντικατασταθεί κάποιες σερίνες από αλανίνη ή γλυκίνη (RSRGRSRSRS, RSRSRARSRS, RSRSRARSRS), φωσφορυλιώνονται από την κινάση SRPK1 επιτυχώς (Nikolakaki *et al.*, 1997).

A.1.5. Μηχανισμός φωσφορυλίωσης των υποστρωμάτων των SR κινάσων

Πρόσφατες μελέτες ανφέρουν ότι οι κινάσες πρωτεϊνών σερίνης/αργινίνης φωσφορυλιώνουν πολλαπλές σερίνες στις RS περιοχές των υποστρωμάτων τους με έναν διαδοχικό τρόπο και όχι ταυτόχρονα. Συγκεκριμένα έχει δειχτεί ότι η SRPK1 σχηματίζει ένα δυναμικό και λειτουργικό σύμπλοκο με τον παράγοντα ματίσματος ASF/SF2 και φωσφορυλιώνει περίπου τη μισή RS περιοχή του στο N-τελικό άκρο με ένα διαδοχικό τρόπο *in vitro*. Από τη στιγμή που η κινάση προσδένει το υπόστρωμά της, το συνεπαγόμενο σύμπλοκο δεν διαχωρίζεται μέχρι να ολοκληρωθεί η φωσφορυλίωση (Aubol *et al.*, 2003). Και για την Clk/Sty όμως έχει δειχτεί ότι είναι ικανή να φωσφορυλιώνει ολόκληρη την RS περιοχή του ASF/SF2 διαδοχικά και όχι ταυτόχρονα. Σύμφωνα με *in vitro* πειράματα οι κινάσες SRPK ανταγωνίζονται τη δράση των Clk/Sty, όταν οι πρώτες βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση, γι' αυτό το κύτταρο αποφεύγει αυτή τη διαμάχη «αγκυροβολώντας» τις SRPKs στο κυτταρόπλασμα και περιορίζοντας τις Clk/Sty κινάσες στον πυρήνα (Velazquez *et al.*, 2005).

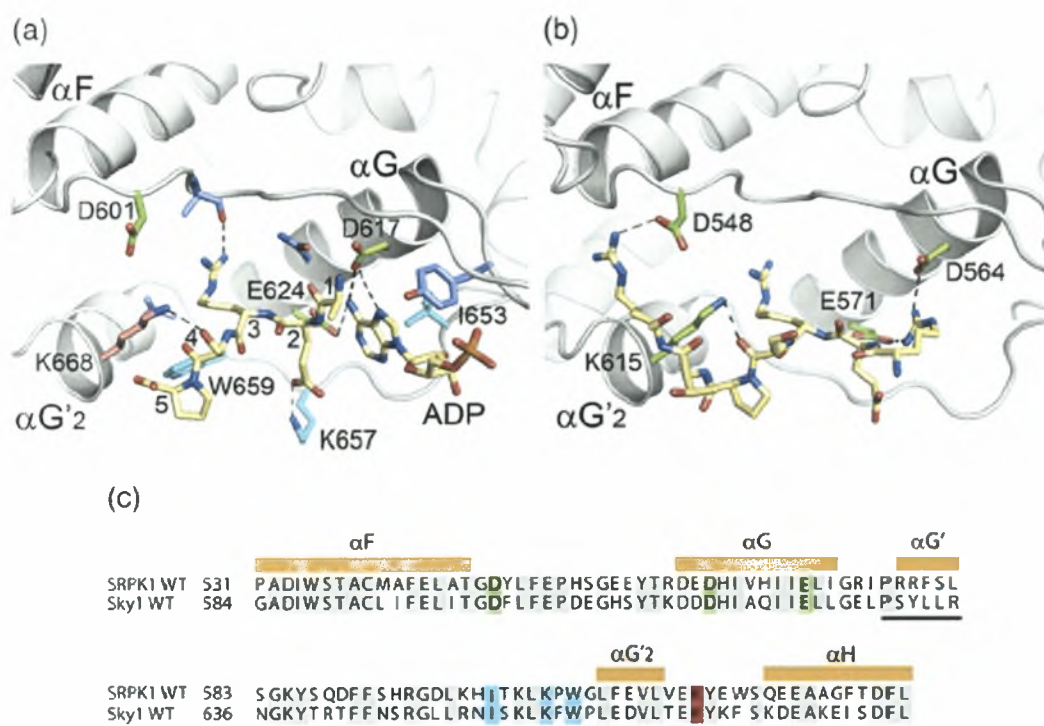
Το χαρακτηριστικό των κινασών SRPK να φωσφορυλιώνουν διαδοχικά πολλαπλές σερίνες στις RS περιοχές των υποστρώματων τους θεωρείται ότι επιτυγχάνεται μέσω της ύπαρξης δύο συντηρημένων αργινινών στη θέση P-2 της κινάσης, η οποία εντοπίζεται στη περιοχή δέσμευσης του υποστρώματός της και η οποία αναγνωρίζει φωσφοσερίνες που βρίσκονται σε θέση P-2 από τη σερίνη που πρόκειται να φωσφορυλιωθεί. Έτσι η μετατόπιση της φωσφορυλιωμένης σερίνης στη περιοχή αυτή και η δέσμευση της γειτονικής σερίνης στην καταλυτική περιοχή του ενζύμου οδηγεί στη διαδοχική φωσφορυλίωση των σερινών του υποστρώματος (Nolen *et al.*, 2001, Aubol *et al.*, 2003).

Το παραπάνω όμως μοντέλο δεν εξηγεί με ποιο τρόπο φωσφορυλιώνεται η πρώτη σερίνη του υποστρώματος. Είναι πιθανό *in vivo* το υπόστρωμα να φωσφορυλιώνεται αρχικά από μια άλλη κινάση πρωτεϊνών και ακολούθως οι κινάσες SRPK να το αναγνωρίζουν και να φωσφορυλιώνουν τις υπόλοιπες σερίνες (Nolen *et al.*, 2001). Μια άλλη πιθανότητα είναι ότι οι ίδιες οι SRPKs ξεκινούν τη φωσφορυλίωση του υποστρώματός τους αλλά με μικρότερη αποτελεσματικότητα. Όταν η αρχική αυτή φωσφορυλίωση επιτευχθεί, η κινάση συνεχίζει τη φωσφορυλίωση του υποστρώματος με υψηλότερη δραστηριότητα (Nolen *et al.*, 2001). Τέλος, είχε προταθεί ότι, τουλάχιστον στη περίπτωση των παραγόντων ματίσματος, οι κινάσες SRPK αναγνωρίζουν πιθανόν την RRM περιοχή, γεγονός το οποίο στη συνέχεια οδηγεί στο «κλειδώμα» των κινασών στο υπόστρωμά τους και στη σωστή τοποθέτηση της RS περιοχής, ώστε να επέλθει η διαδοχική φωσφορυλίωση (Aubol *et al.*, 2003, Velazquez *et al.*, 2005).

Η τελευταία υπόθεση επιβεβαιώθηκε σε κρυσταλλογραφική ανάλυση της δομικής αλληλεπίδρασης της SRPK1ΔNS1 με υπόστρωμα ένα πεπτίδιο, το οποίο προσομοιάζει την περιοχή αλληλεπίδρασης του ASF/SF2 με την κινάση και η οποία έδειξε ότι το υπόστρωμα αναγνωρίζει στην SRPK1ΔNS1 την διαμόρφωση ενός αυλακιού. Αυτό το αυλάκι ονομάζεται «αυλάκι ελλιμενισμού» (docking groove) και σχηματίζεται από το ένθεμα της MAP κινάσης, το βρόχο που συνδέει τις έλικες αF και αG και την έλικα αG της κινάσης, είναι δηλαδή μακριά από το καταλυτικό της κέντρο. Η περιοχή του υποστρώματος της SR πρωτεΐνης ASF/SF2 που αναγνωρίζει το «αυλάκι ελλιμενισμού» εντοπίστηκε με ακρίβεια από την ομάδα που έκανε τη μελέτη σε μια συγκεκριμένη αλληλουχία αμινοξέων [RVKVDGRP] μετά από τις περιοχές RRM και ακριβώς πριν από την περιοχή φωσφορυλίωσης RS (Ngo *et al.*, 2005). Το μοντέλο που προτάθηκε για την χρησιμότητα αυτής της περιοχής σε σχέση

με τη δράση και λειτουργία των κινασών SRPK1 και Clk/Sty στο συγκεκριμένο υπόστρωμα περιγράφεται στην εικόνα 9.

Πρόσφατες κρυσταλλογραφικές μελέτες απέδειξαν ότι υπάρχει και στην κινάση Sky1p «αυλάκι ελλιμενισμού» αντίστοιχο με αυτό της SRPK1, στο οποίο προσδένεται το υπόστρωμα Nr13p μέσω της RGG περιοχής του (είναι πλούσιο σε RGGY/F μοτίβα). Σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας της Sky1p και SRPK1 αποκάλυψε ότι τα αμινοξέα που εμπλέκονται στην διαμόρφωση του συγκεκριμένου αυλακιού (I653, K657, W659, D601, D617, E624, K668) είναι συντηρημένα μεταξύ των δύο κινασών (εικόνα 10) (Lukasiewicz *et al.*, 2007).



Εικόνα 10: Α) Κρυσταλλογραφική απεικόνιση της περιοχής της Sky1p, όπου προσδένεται το υπόστρωμά της, (αυλάκι ελλιμενισμού) και των αμινοξέων που εμπλέκονται στην διαμόρφωσή της τα οποία είναι: I653, K657 και W659 (με μπλε χρώμα), D601, D617 και E624 (με πράσινο χρώμα), K668 (με κόκκινο χρώμα). Β) Κρυσταλλογραφική απεικόνιση της αντίστοιχης με την Sky1p περιοχή στην SRPK1, όπου προσδένεται το υπόστρωμά της και των αμινοξικών αλληλεπιδράσεων που την διαμορφώνουν. Γ) Σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας των Sky1p και SRPK1 αποκαλύπτει ότι το «αυλάκι ελλιμενισμού» είναι υψηλά συντηρημένο μεταξύ των δύο κινασών. Με γκρι χρώμα φαίνονται τα αμινοξέα που είναι συντηρημένα μεταξύ των δύο κινασών και με πράσινο, μπλε και κόκκινο τα αμινοξέα που διαμορφώνουν το «αυλάκι ελλιμενισμού» των δύο κινασών (Lukasiewicz *et al.*, 2007).

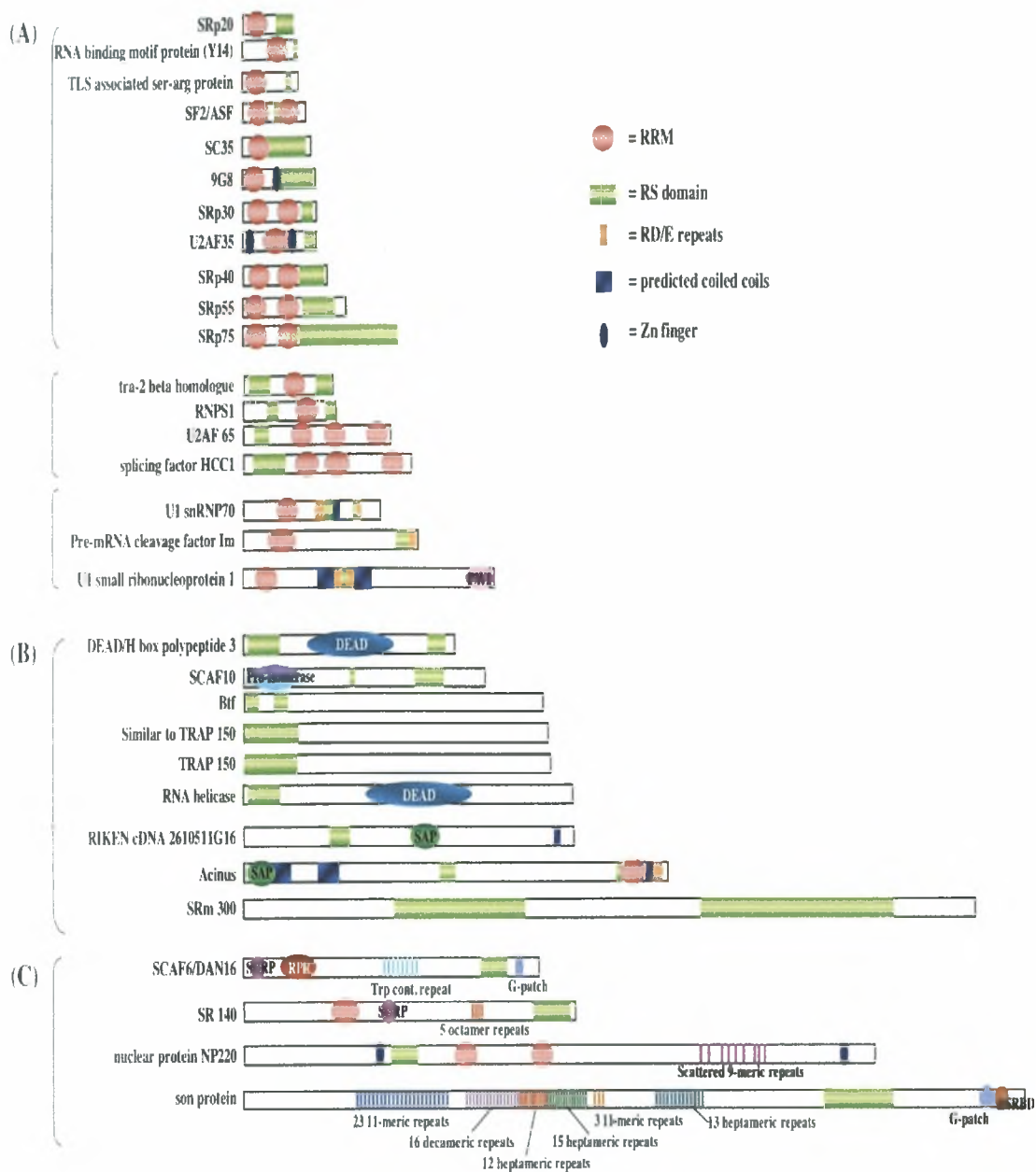
A.1.6. Υποστρώματα των SRPK κινασών και αντίστοιχοι ρόλοι τους

A.1.6.1. Πρωτεΐνες SR

Οι πρωτεΐνες SR αποτελούν μια συντηρημένη οικογένεια πρωτεϊνών που περιέχουν το μοτίβο αργινίνης σερίνης και είναι λειτουργικά μέλη των συμπλόκων που δημιουργούνται κατά τη διαδικασία ματίσματος του mRNA (Graveley 2000). Αποτελούνται δομικά συνήθως από ένα ή δύο μοτίβα αναγνώρισης του RNA στο αμινοτελικό τους άκρο (RNA Recognition Motifs, RRM) ενώ το καρβοξυτελικό τους άκρο χαρακτηρίζεται από επαναλαμβανόμενα διπεπτίδια αργινίνης/σερίνης (Εικόνα 11).

Τα RRM μέσω της εξειδικευμένης πρόσδεσης αλληλουχιών είναι σημαντικά για την καθοδήγηση του πρώιμου mRNA στο μονοπάτι του ματίσματος. Η RS περιοχή τους λειτουργεί ως διεπιφάνεια αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών και πρωτεϊνών-RNA και έχειδειχθεί ότι παίζουν αποφασιστικό ρόλο κατά τις επιλογές θέσεων ματίσματος, λειτουργία η οποία επηρεάζεται από τη συγκέντρωσή τους σε συγκεκριμένες πυρηνικές περιοχές. Πολλές από αυτές τις πρωτεΐνες εντοπίζονται και στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα καθώς μετακινούνται μεταξύ των δύο αυτών υποκυτταρικών διαμερισμάτων (Graveley, 2000, Xiang-Dong, 1995).

Οι παράγοντες ματίσματος, οι οποίοι αποτελούν τα πιο καλά μελετημένα υποστρώματα των SR κινασών, έχουνδειχθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στο ιδιοσυστατικό όσο και στο εναλλακτικό μάτισμα του πρώιμου mRNA (Corden *et al.*, 1997) και επίσης εμπλέκονται στη μεταφορά, τη σταθερότητα και μετάφραση του mRNA (Valcarcel *et al.*, 1996, Gui *et al.*, 1994a, Gui *et al.*, 1994b, Wang *et al.*, 1998a). Οι SR πρωτεΐνες συμμετέχουν συνοπτικά σε τρία στάδια κατά τη διάρκεια σχηματισμού του συμπλόκου ματίσματος: α) καθορίζουν τη θέση ματίσματος στο 5' άκρο του mRNA μέσω αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη U1snRNP β) προσδένονται στους ενισχυτές ματίσματος των εξονίων ESEs (exonic splicing enhancers) και προάγουν τη δημιουργία και σταθεροποίηση του συμπλόκου στη 3' θέση ματίσματος μέσω αλληλεπίδρασης με το ετεροδιμερές U2AF γ) αποτελούν συνδετικούς κρίκους των 3' και 5' θέσεων ματίσματος δημιουργώντας με αυτό τον τρόπο σταθερά συμπλέγματα (Graveley, 2000).



Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση των δομικών περιοχών των SR παραγόντων ματίσματος, οι οποίοι διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες. Οι πρωτεΐνες στην πρώτη κατηγορία (A) είναι χαμηλού μοριακού βάρους και περιέχουν μία ή δύο περιοχές δέσμευσης με το RNA (περιοχές RRM). Οι πρωτεΐνες στην δεύτερη κατηγορία (B) είναι μεγαλύτερου μοριακού βάρους και περιέχουν επιπρόσθετα μοτίβα αλλά όχι περιοχές RRM. Οι πρωτεΐνες στην τρίτη κατηγορία (C) είναι μεγάλου μοριακού βάρους και περιέχουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες.

Τα τρία αυτά στάδια ισχύουν τόσο στο ιδιοσυστατικό όσο και στο εναλλακτικό μάτισμα με τη διαφορά ότι το πρώτο και δεύτερο στάδιο στο εναλλακτικό μάτισμα γίνονται μετά από ρύθμιση. Επίσης SR πρωτεΐνες έχουν δείχτει ότι παίζουν σημαντικό ρόλο και σε περαιτέρω διεργασίες του ματίσματος όπως είναι

η αλληλεπίδραση των παραγόντων ματίσματος U2-U6 στη 3' θέση ματίσματος και η σύνδεση των U4/ 6, U5 snRNPs στο σχηματιζόμενο σύμπλοκο ματίσματος (Xiang-Dong, 1995).

Ρόλος της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών SR στη δράση και τον κυτταρικό εντοπισμό τους

Η φωσφορυλίωση αποτελεί το βασικό μηχανισμό ρύθμισης της δράσης των πρωτεϊνών SR σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Συγκεκριμένα η τροποποίηση των πρωτεϊνών SR μέσω της φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης επηρεάζει τις φυσικές ιδιότητες των περιοχών τους RS, οι οποίες φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο α) στη δράση τους, στη δημιουργία και ενεργοποίηση του συμπλόκου ματίσματος β) στη δράση τους στην επιλογή των θέσεων ματίσματος γ) στον υποπυρηνικό εντοπισμό τους δ) στην είσοδο και έξοδο τους μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα ε) στην επίδρασή τους στο μεταβολισμό του mRNA στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα.

α) Μελέτες *in vitro* έχουν δείξει ότι η φωσφορυλίωση των περιοχών RS των παραγόντων ματίσματος ενισχύει τις αλληλεπιδράσεις τόσο μεταξύ τους όσο και με το RNA παρεμποδίζοντας τις μη εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις στα πρώτα στάδια συγκρότησης του συμπλόκου ματίσματος (Gui *et al.*, 1994, Yue *et al.*, 2000). Όμως προκειμένου το σύμπλοκο ματίσματος να αποσυναρμολογηθεί και να προχωρήσει η αντίδραση ματίσματος περαιτέρω απαιτείται η αποφωσφορυλίωση των παραγόντων ματίσματος μέσω της δράσης των φωσφατασών (Cao *et al.*, 1997). Τα παραπάνω δεδομένα επιβεβαιώνονται σε πειράματα που έγιναν με πυρηνικά εκχυλίσματα, όπου με τη προσθήκη υψηλής συγκέντρωσης φωσφατασών πρωτεϊνών ή την παρουσία μη φωσφορυλιωμένων παραγόντων ματίσματος αναστέλλεται τόσο η δημιουργία του συμπλόκου ματίσματος όσο και η ενεργοποίησή του (Mermoud *et al.*, 1994). Η κατάσταση αυτή είναι αναστρέψιμη με την προσθήκη αναστολέων φωσφατασών πρωτεϊνών και φωσφορυλίωση των παραγόντων ματίσματος, ενώ αντίθετα μετά τη συγκρότηση του συμπλόκου ματίσματος η απουσία φωσφατασών και η προσθήκη μεγάλων συγκεντρώσεων κινάσης SRPK1 έχουν ως αποτέλεσμα την αναστολή του ματίσματος του mRNA (Cao *et al.*, 1997). Στη θεώρηση αυτή συνηγορεί και το γεγονός ότι η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης ICP27 του HSV-1 (Herpes Simplex

Virus) με την SRPK1 έχει ως αποτέλεσμα την ανώμαλη φωσφορυλίωση των παραγόντων ματίσματος και την ανικανότητα δημιουργίας λειτουργικού συμπλόκου ματίσματος (Sciabica *et al.*, 2003).

Επιπλέον έρευνες έδειξαν ότι η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών SR είναι σημαντική για την αλληλεπίδρασή τους με την πλούσια σε σερίνες καρβοξυτελική περιοχή της πολυμεράσης (CTD), η οποία αποτελεί με αυτό τον τρόπο σπουδαίο συνδετικό κρίκο στη σύνθεση του mRNA με το μάτισμα. Συγκεκριμένα εάν η CTD απαλειφθεί ή τροποποιηθεί, τότε η σύνδεση των SR πρωτεϊνών όπως του ASF/SF2 με τις θέσεις μεταγραφής δεν συμβαίνει (Caceres *et al.*, 2002). Επίσης η απαλοιφή αυτή της περιοχής παρεμποδίζει τόσο το μάτισμα του mRNA όσο και την επεξεργασία του 3' άκρου *in vivo* χωρίς όμως η διαδικασία της μεταγραφής να επηρεάζεται (Maniatis *et al.*, 2002).

β) Οι πρωτεΐνες SR παίζουν σημαντικό ρόλο όχι μόνο στο ιδιοσυστατικό αλλά και στο εναλλακτικό μάτισμα καθώς αναγνωρίζουν μέσω των RRM περιοχών τους συγκεκριμένες ακολουθίες (cis-acting elements) μέσα στα εξόνια ή ιντρόνια του mRNA, οι οποίες ενεργοποιούνται θετικά ως παραγωγείς του ματίσματος (exonic or intronic splicing enhancers-ESEs or ISEs) ή αρνητικά ως καταστολείς του (exonic or intronic splicing silencers-ESSs or ISSs).

Οι περισσότερες ακολουθίες που λειτουργούν ως ESEs αναγνωρίζονται από τις πρωτεΐνες SR, η συγκέντρωση των οποίων επηρεάζει την επιλογή θέσεων κατά το εναλλακτικό μάτισμα. Συγκεκριμένα η δράση των πρωτεϊνών SR ανταγωνίζεται τη δράση μιας άλλης οικογένειας πρωτεϊνών, των ετερογενών πυρηνικών ριβονουκλεοπρωτεϊνών (hnRNP family), οι οποίες αναγνωρίζουν κυρίως της ESSs και ISSs ακολουθίες που καταστέλλουν το μάτισμα. Η οικογένεια των hnRNPs περιέχει περιοχές πλούσιες σε γλυκίνη και άλλα αμινοξέα (όχι όμως RS περιοχές), οι οποίες εξυπηρετούν την πρόσδεσή τους στο RNA και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών (Caceres *et al.*, 1994). Οι ριβονουκλεοπρωτεΐνες επίσης συμμετέχουν στις διάφορες διεργασίες ωρίμανσης του mRNA όπως την μεταγραφή, το μάτισμα και τη μεταφορά του mRNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα (Matunis *et al.*, 1994, Camacho-Vanegas *et al.*, 1997). Μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα έκφρασης των hnRNPs αλλά και των πρωτεϊνών SR, η δράση των οποίων ρυθμίζεται μέσω του μηχανισμού φωσφορυλίωσης, εξαρτώνται από τον ιστό στον οποίο εκφράζονται και επομένως οι σχετικές συγκεντρώσεις τους αποτελούν σημαντικό ρυθμιστικό παράγοντα του εναλλακτικού ματίσματος (Caceres *et al.*, 1994).

γ) Η φωσφορυλίωση αποτελεί το βασικό μηχανισμό ελέγχου της υποπυρηνικής κατανομής των μελών της οικογένειας των SR παραγόντων ματίσματος. Μελέτες υποπυρηνικού εντοπισμού των παραγόντων ματίσματος σε μεσοφασικά κύτταρα έδειξαν ότι αυτοί είναι συγκεντρωμένοι α) στις πυρηνικές κηλίδες (speckles) (Handwerger *et al.*, 2006). β) σε περιοχές οριζόμενες ως σπειρωμένα σωμάτια (Cajal bodies ή coiled bodies) (Gall *et al.*, 2001).

Συγκεκριμένα οι πρωτεΐνες SR αφού εισαχθούν στον πυρήνα, αρχικά συγκεντρώνονται στα σπειρωμένα σωμάτια και στη συνέχεια αποθηκεύονται στις πυρηνικές κηλίδες. Η απελευθέρωση των πρωτεϊνών SR από τις πυρηνικές κηλίδες προϋποθέτει την φωσφορυλίωση της RS περιοχής τους, προκειμένου στη συνέχεια να μετακινηθούν γρήγορα στις περιοχές ενεργού μεταγραφής, οι οποίες εντοπίζονται στην περιφέρεια των πυρηνικών κηλίδων. Αντίθετα η παρουσία αναστολέα των κινασών των πρωτεϊνών RS παρεμποδίζει την απελευθέρωση των παραγόντων ματίσματος από τις πυρηνικές κηλίδες. Επιπλέον η κατάσταση αυτή σε συνδυασμό με αναστολή της μεταγραφής προκαλεί μεταβολή του σχήματος και αριθμού των πυρηνικών κηλίδων, οι οποίες στρογγυλοποιούνται και αυξάνουν σε μέγεθος καθώς συσσωρεύεται πλήθος παραγόντων ματίσματος (Misteli, 2000).

Η ρύθμιση της αποθήκευσης των παραγόντων ματίσματος σε πυρηνικές κηλίδες και της απελευθέρωσής τους από αυτές μέσω του μηχανισμού της φωσφορυλίωσης επιτρέπει στο κύτταρο i) τον έλεγχο της συγκέντρωσης των παραγόντων ματίσματος στο πυρηνόπλασμα και ιδιαίτερα στις περιοχές μεταγραφής και ματίσματος ii) την ανακύκλωση της δράσης των παραγόντων ματίσματος, οι οποίοι έχουν συγκεκριμένο χρόνο ημιζωής, μέσω της αντίστροφης φωσφορυλίωσής τους στις πυρηνικές κηλίδες (Misteli *et al.*, 1998, Misteli, 2000).

δ) Παρόλο που οι πρωτεΐνες SR εντοπίζονται σε σταθερή φάση στον πυρήνα όπως ο SC35 και ο SRp40, ορισμένες από αυτές έχουν την δυνατότητα να μετακινούνται μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος όπως ο ASF/SF2, ο Sp20 και ο 9G8. Κινητικές μελέτες έδειξαν ότι ο μεγαλύτερος χρόνος παραμονής στις κηλίδες του παράγοντα ματίσματος GFP-ASF/SF2 ήταν μικρότερος των 45 δευτερολέπτων και τουλάχιστον 10.000 μόρια του χάνονται ανά δευτερόλεπτο από την κηλίδα στο κύτταρο, ενώ άλλα επιστρέφουν επιφέροντας την ισορροπία σε λιγότερο από 2 λεπτά (Chirat *et al.*, 1993).

Για τον κυτταρικό εντοπισμό των πρωτεϊνών SR ευθύνεται η περιοχή τους RS μέσω του μηχανισμού της αντιστρεπτής φωσφορυλίωσης. Για παράδειγμα η

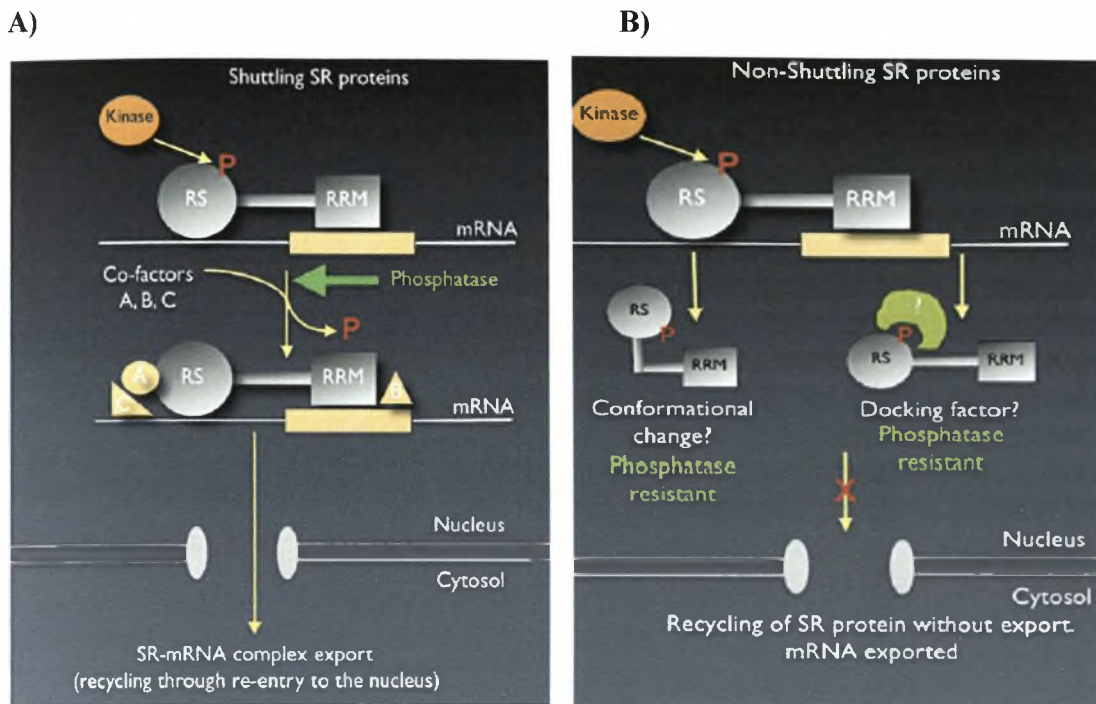
φωσφορυλίωση της RS περιοχής κάποιων παραγόντων ματίσματος όπως ο hTrab και ο ASF/SF2 απαιτείται για την πυρηνική εισαγωγή της από την τρικοπορτίνη TRN-SR2, ενώ αντίθετα η τρικοπορτίνη TRN-S1 δρα με τρόπο που δεν εξαρτάται από την φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών RS (Yun Chi *et al.*, 2003). Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται ο έλεγχος της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών SR στον πυρήνα καθώς ένα μόνο υποσύνολο μπορεί να εισαχθεί με φωσφορυλιοεξαρτώμενο ή μη τρόπο. Στη ζύμη η φωσφορυλίωση μιας RS πρωτεΐνης, της Nr13p από την κινάση Sky1p επάγει την αλληλεπίδρασή της με τον πυρηνικό υποδοχέα Mtr10p μέσω του οποίου ρυθμίζεται η είσοδος της πρωτεΐνης στον πυρήνα (Gilbert *et al* 2001).

Επιπλέον πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι η SRPK1 φωσφορυλιώνει το μοτίβο RS1 του ASF/SF2 στο κυτταρόπλασμα και έτσι αυτός αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα Mtr10p που μεσολαβεί για την μεταφορά του στον πυρήνα. Η υποφωσφορυλιωμένη μορφή του ASF/SF2 ευνοεί την αποθήκευσή του στις πυρηνικές κηλίδες όπου φωσφορυλιώνεται περαιτέρω από την Clk1 για να ενεργοποιηθεί και να λάβει μέρος στο μάτισμα. Κατόπιν η αποφωσφορυλίωση του ASF/SF2 απαιτείται για να προχωρήσει η αντίδραση του ματίσματος και συγχρόνως η υποφωσφορυλιωμένη μορφή του βοηθά για να ενωθεί με τον υποδοχέα TAP του mRNA και να εξαχθούν τα mRNAs στο κυτταρόπλασμα (Ngo *et al.*, 2005, Maniatis *et al.*, 2002).

ε) Μια άλλη σημαντική ιδιότητα των πρωτεϊνών SR είναι η μεσολάβησή τους στην πυρηνική εξαγωγή του mRNA μέσω αλληλεπίδρασής τους με τον υποδοχέα TAP/NXF1, (nuclear export receptor 1), ο οποίος είναι υπεύθυνος για την έξοδο του mRNA (Shengrong *et al.*, 2005). Και σ' αυτή τη περίπτωση απαιτείται η αποφωσφορυλίωση της περιοχής RS των πρωτεϊνών SR, προκειμένου ο υποδοχέας TAP να αλληλεπιδράσει με την αμινοτελική RRM περιοχή (Lai *et al.*, 2004, Huang *et al.*, 2004).

Συγκεκριμένα προτείνεται ένα μοντέλο σύμφωνα με το οποίο εξηγείται πώς οι πρωτεΐνες SR, που παραμένουν μόνιμα στον πυρήνα, αποφεύγουν την εμπλοκή τους με την εξαγωγή του mRNA στο κυτταρόπλασμα. Ενώ για τις πρωτεΐνες SR που μεταναστεύουν από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα η αποφωσφορυλίωσή τους αποτελεί προϋπόθεση για την σύνδεσή τους με το σύμπλοκο των ριβονουκλεοπρωτεϊνών και την εξαγωγή του mRNA, οι πρωτεΐνες SR αντίθετα που παραμένουν στον πυρήνα, αποφεύγουν την αποφωσφορυλίωσή τους μέσω πιθανής δομικής αλλαγής που προκαλείται από την φωσφορυλίωση της περιοχής τους RS ή

αλληλεπίδρασης με ένα συμπαράγοντα που προσδένεται στην φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη εμποδίζοντας έτσι την προσέγγισή της από την φωσφατάση (Scott *et al.*, 2005). (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: Προτεινόμενο μοντέλο για την έξοδο και παραμονή των SR πρωτεϊνών στον πυρήνα. Α) Οι SR πρωτεΐνες φωσφορυλιώνονται θεωρητικά από μια κινάση (πορτοκαλί), γεγονός το οποίο είναι απαραίτητο για την επεξεργασία του mRNA. Η αποφωσφορυλίωση όμως των SR πρωτεϊνών από μια φωσφατάση (πράσινο), αποτελεί δυνητικά απαραίτητη προϋπόθεση για την εξαγωγή του συμπλόκου SR-mRNA από τον πυρήνα. Β) Οι SR πρωτεΐνες που παραμένουν μόνιμα στον πυρήνα φωσφορυλιώνονται θεωρητικά από την ίδια ή άλλη κινάση (πορτοκαλί) και αποφεύγουν την αποφωσφορυλίωσή τους είτε μέσω πιθανής δομικής αλλαγής που προκαλείται από την φωσφορυλίωση της RS περιοχής τους είτε μέσω αλληλεπίδρασης με ένα συμπαράγοντα (πράσινο) που προσδένεται στην φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη εμποδίζοντας έτσι την προσέγγισή της από την φωσφατάση (Scott *et al.*, 2005).

Επιπλέον πρόσφατα πειραματικά δεδομένα προτείνουν ότι οι πρωτεΐνες SR που μεταναστεύουν στο κυτταρόπλασμα παίζουν σημαντικό ρόλο και στη μετάφραση του ώριμου mRNA. Στη θεώρηση αυτή συνηγορεί το γεγονός ότι έχουν βρεθεί πρωτεΐνες SR όπως ο ASF/SF2 και ο SRp20 να σχετίζονται με πολυριβωσώματα σε κυτταρικά εκχυλίσματα και να ενισχύουν την μετάφραση του mRNA τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (Sanford *et al.*, 2004).

Συμπερασματικά, λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω δεδομένα φαίνεται ότι οι κινάσες SRPK μέσω φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών SR, η οποία ρυθμίζει τόσο τη δράση όσο και το κυτταρικό εντοπισμό τους, παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες όπως είναι ο κυτταρικός κύκλος και η σύζευξη του ματίσματος με την μεταγραφή και την ωρίμανση του mRNA σε συνδυασμό με την έξοδο και την μετάφρασή του στο κυτταρόπλασμα.

A.1.6.2. Άλλα υποστρώματα των SR κινασών

Η δράση των SRPK έχει συνδεθεί στενά με τη δράση των παραγόντων SR και το μάτισμα του mRNA. Υπάρχουν όμως δεδομένα που προτείνουν ευρύτερους ρόλους για αυτές τις κινάσες και την εμπλοκή τους στην συμπύκνωση της χρωματίνης, καθώς έχουν βρεθεί ως υποστρώματά τους πρωτεΐνες που περιέχουν μοτίβα RS αλλά δεν ανήκουν στην οικογένεια των παραγόντων ματίσματος, όπως ο υποδοχέας της λαμίνης B, η πρωταμίνη P1 και η πρωτεΐνη P2P-R.

O Υποδοχέας της Λαμίνης B (LBR)

Ο υποδοχέας της λαμίνης B (LBR) είναι μια πρωτεΐνη της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης και θεωρείται ο κυριότερος παράγοντας για την αλληλεπίδραση μεταξύ της χρωματίνης και του πυρηνικού φακέλου. Ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του ανθρώπινου LBR έδειξε ότι περιέχει 615 αμινοξέα και αποτελείται από οκτώ υδρόφοβες διαμεμβρανικές περιοχές που διαπερνούν την εσωτερική πυρηνική μεμβράνη και δύο υδρόφιλες περιοχές στο αμινοτελικό και καρβοξυτελικό του άκρο, οι οποίες εκτείνονται προς το πυρηνόπλασμα (Worman *et al.*, 1990, Ye *et al.*, 1994). Το αμινοτελικό άκρο του, το οποίο αποτελείται από μια ακολουθία 208 αμινοξέων και έχει σφαιρικό σχήμα, περιέχει σήμα πυρηνικού εντοπισμού της πρωτεΐνης (NLS) μία περιοχή επαναλαμβανόμενων διπεπτιδίων αργινίνης/σερίνης (RS domain) και πιθανές περιοχές δέσμευσης του DNA (Appelbaum *et al.*, 1990, Soullam *et al.*, 1993), ενώ η φωσφορυλιωμένη του μορφή

μπορεί να δεσμεύσει τη λαμίνη τύπου B (Worman *et al.*, 1988, Ye *et al.*, 1994, Simos *et al.*, 1992).

Κατά την απομόνωση του υποδοχέα της λαμίνης B από ερυθροκύτταρα γαλοπούλας (τα οποία διατηρούν τον πυρήνα κατά την διαφοροποίησή τους) βρέθηκε ότι αυτός σχηματίζει ένα σύμπλοκο, το οποίο περιλαμβάνει την SRPK1, τις λαμίνες τύπου A και B και άλλες τρεις πρωτεΐνες με μοριακές μάζες 18, 34 και 150 kDa αντίστοιχα (Simos *et al.*, 1992). Όσον αφορά την SRPK1, αυτή βρέθηκε να φωσφορυλιώνει τον υποδοχέα της λαμίνης B στην ακολουθία διπεπτιδίων αργινίνης/σερίνης ($^{75}\text{RSRSRSRS}^{84}$) στο αμινοτελικό του άκρο. Συγκεκριμένα η φωσφορυλίωση αυτή γίνεται *in vitro* και *in vivo* στις Ser⁷⁶, Ser⁷⁸, Ser⁸⁰, Ser⁸², Ser⁸⁴ είτε στην μίτωση, είτε στην μεσόφαση (Nikolakaki *et al.*, 1996, Papoutsopoulou *et al.*, 1999b) και θεωρείται ότι συνεισφέρει στη δέσμευση του LBR στη χρωματίνη κατά τη διάρκεια της S φάσης (Takano *et al.*, 2004).

Το αμινοτελικό του LBR έχειδειχτεί επίσης ότι φωσφορυλιώνεται από την SRPK1a (Nikolakaki *et al.*, 2001), την πρωτεϊνική κινάση A (Kannan *et al.*, 2004) και την κινάση καζεΐνης II (Hathaway *et al.*, 1984). Παρατηρήθηκε ακόμη ότι η φωσφορυλίωση του LBR από την SRPK1 αυξάνει την ικανότητα δέσμευσης του LBR στην χρωματίνη και δεν επιτρέπει τη δέσμευση της p32 (ανάλογη μορφή στον άνθρωπο της πρωτεΐνης p34 στα πτηνά) στον LBR. Αλλά και η ικανότητα δέσμευσης της SRPK1 στο αμινοτελικό άκρο του LBR ελαττώνεται κατ'αντιστοιχία με την αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης p32. Επομένως η φωσφορυλίωση του LBR από την SRPK1 ρυθμίζει τις αλληλεπιδράσεις του LBR με την χρωματίνη (Takano *et al.*, 2004). Επίσης η φωσφορυλίωση του LBR από την κινάση cdc2 στην φάση της μίτωσης έχει βρεθεί να μειώνει την ικανότητα δέσμευσής του στην χρωματίνη, ενώ το αμινοτελικό άκρο του LBR αλληλεπιδρά και με άλλες πρωτεΐνες όπως οι ιστόνες H3 και H4 και η πρωταμίνη 1 και αποτελεί θέση «αγκυροβόλησης» της ετεροχρωματίνης (Mylonis *et al.*, 2004).

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω δεδομένα το αμινοτελικό άκρο του LBR συμμετέχει σε ένα μεγάλο αριθμό αλληλεπιδράσεων, οι οποίες τον καθιστούν σημαντικό παράγοντα στη σύνδεση της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης με την πυρηνική λάμινα και την χρωματίνη. Το αμινοτελικό άκρο του LBR μέσω της φωσφορυλίωσής του φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των αλληλεπιδράσεών του τόσο με τις πρωτεΐνες της πυρηνικής μήτρας όσο και με την χρωματίνη (Nikolakaki *et al.*, 1996, Mylonis *et al.*, 2004).

Πρωταμίνη P1

Οι πρωταμίνες αποτελούν πολύ βασικά, χαμηλού μοριακού βάρους πολυπεπτίδια, ενώ η μισή τους ακολουθία είναι πλούσια σε αργινίνες. Ο ρόλος των πρωταμινών είναι η αντικατάσταση των ιστονών κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης, με αποτέλεσμα να προκύπτει χρωματίνη με πολύ υψηλό βαθμό συμπύκνωσης (Oliva *et al.*, 1991). Κατά τα αρχικά στάδια της σπερματογένεσης οι πρωταμίνες φωσφορυλιώνονται στοιχειομετρικά, ενώ αργότερα κατά τη φάση ωρίμανσης των σπερματοζωαρίων αποφωσφορυλιώνονται στο μεγαλύτερο μέρος τους (Chirat *et al.*, 1993, Oliva *et al.*, 1991). Όλες οι πρωταμίνες P1 περιέχουν μικρές περιοχές πλούσιες σε διπεπτίδια αργινίνης/σερίνης, οι οποίες φωσφορυλιώνονται από την SRPK1 (Papoutsopoulou *et al.*, 1999a). Προτείνεται ότι η φωσφορυλίωση των πρωταμινών διευκολύνει την σωστή πρόσδεσή τους στο DNA, ενώ η μερική αποφωσφορυλίωσή τους πιθανόν αυξάνει την συμπύκνωση της χρωματίνης στο τέλος της σπερματογένεσης ή εναλλακτικά η φωσφορυλίωσή τους αποτελεί προϋπόθεση για τη συμπύκνωση της χρωματίνης. Επιπλέον θεωρείται ότι η φωσφορυλίωση των πρωταμινών P1 μειώνει τις δυνάμεις απώθησης μεταξύ γειτονικών θετικών φορτίων που δημιουργούνται λόγω της μεγάλης συγκέντρωσης πρωταμινών και άλλων βασικών πρωτεϊνών γύρω από το DNA (Papoutsopoulou *et al.*, 1999a).

Η φωσφορυλίωση της πρωταμίνης P1 από την SRPK1 έχει δείξει ότι είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδρασή της με τον LBR καθώς η μη φωσφορυλιωμένη μορφή της δεν είναι ικανή να δεσμευτεί με το φωσφορυλιωμένο αμινοτελικό άκρο του LBR, ενώ και οι δυο πρωτεΐνες εντοπίζονται συγχρόνως στην περιφέρεια του πυρήνα (Mylonis *et al.*, 2004). Επιπλέον η πρωτεΐνη p32 όταν είναι προσδεδεμένη στον LBR παρεμποδίζει την φωσφορυλίωσή του από την SRPK1 και τη σύνδεση της πρωταμίνης P1 με τον LBR. Η φωσφορυλίωση της πρωταμίνης P1 είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδρασή της με τον πυρηνικό φάκελο και τον εντοπισμό της στην πυρηνική περιφέρεια, όπου γίνεται η αντικατάσταση των ιστονών από τις πρωταμίνες. Αντίθετα η αποφωσφορυλίωση της πρωταμίνης P1 θεωρείται ότι οδηγεί στην αποδέσμευσή της από τον πυρηνικό φάκελο και την πρόσδεσή της στο DNA (Mylonis *et al.*, 2004).

Proliferation Potential Protein-Related (P2P-R)

Η πρωτεΐνη P2P-R αποτελεί προϊόν εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου P2P-R/PACT. Αποτελείται από 1560 αμινοξέα και είναι μια υψηλά βασική πρωτεΐνη. Ξεκινώντας από το N-τελικό άκρο περιλαμβάνει ένα δακτύλιο ψευδαργύρου, μια περιοχή πλούσια σε προλίνες, μια περιοχή RS, μια περιοχή δέσμησης του Rb1 και μια περιοχή δέσμησης στη p53. Η C-τελική περιοχή του μορίου μοιάζει με την N-τελική περιοχή των ιστονών και είναι πλούσια σε λυσίνες, οι οποίες πιθανόν ακετυλιώνονται (Simons *et al.*, 1997).

Η P2P-R είναι μια πυρηνική πρωτεΐνη, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης και στη μίτωση. Ο εντοπισμός της P2P-R μεταβάλλεται ανάλογα με την φάση του κυτταρικού κύκλου. Στην μεσόφαση εντοπίζεται στους πυρηνίσκους και στις πυρηνικές κηλίδες, ενώ στη μίτωση στην περιφέρεια των χρωμοσωμάτων μαζί με την νουκλεολίνη, την κύρια πρωτεΐνη του πυρηνίσκου και άλλους παράγοντες. Η έκφραση της P2P-R ανιχνεύεται σε χαμηλά επίπεδα σε κύτταρα στη φάση G₀, ενώ στη μίτωση σε 10 φορές υψηλότερο βαθμό (Gao *et al.*, 2003, Witte *et al.*, 1997).

Η P2P-R φωσφορυλιώνεται από δύο κινάσες, τη μιτωτική cdc2 και την SRPK1a. Βρέθηκε ότι η SRPK1a φωσφορυλιώνει την P2P-R στις περιοχές RS (Scott *et al.*, 2003). Δεδομένου ότι η πρωτεΐνη P2P-R αλληλεπιδρά με δύο παράγοντες των S/MAR περιοχών, τον SAFB (Renz *et al.*, 1996) και την νουκλεολίνη, έχει προταθεί ότι είναι πιθανόν να επηρεάζει την οργάνωση της χρωματίνης, όπου μπορεί να εμπλέκονται και οι ογκοκατασταλτικοί παράγοντες παράγοντες p53 και Rb1 με τις οποίες αλληλεπιδρά. Τέλος, πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι η υπερέκφρασή της συνδέεται με υψηλούς ρυθμούς πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων οισοφάγου και χαμηλή αναλογία επιβίωσης σε ασθενείς με καρκίνο του οισοφάγου (Yoshitake *et al.*, 2004).

A.1.7. Εναλλακτικοί ρόλοι της οικογένειας των SR κινασών

Στη ζύμη και συγκεκριμένα στον *S. pombe* υπάρχει η ομόλογη κινάση της SRPK1, η Dsk1, η οποία εκτός της λειτουργίας του ματίσματος εμπλέκεται στη ρύθμιση του αποχωρισμού των χρωμοσωμάτων στο στάδιο της μετάβασης από την μετάφαση στην ανάφαση κατά την μίτωση, συγχρονίζοντας έτσι το μάτισμα και τον κυτταρικό κύκλο διαίρεσης (Takeuchi *et al.*, 1993, Zhao *et al.*, 1998).

Έρευνες επίσης εμπλέκουν την κινάση πρωτεϊνών Sky1p της ζύμης *S. cerevisiae* στη ρύθμιση της μεταφοράς πολυαμινών στο κύτταρο καθώς και στην ομοιοστασία ιόντων. Συγκεκριμένα, απαλοιφή του γονιδίου Sky1p στα κύτταρα ζύμης είχε ως αποτέλεσμα μειωμένη πρόσληψη σπερμιδίνης και πουτρεσκίνης, ενώ παρουσίαζαν μεγάλη ανεκτικότητα στα ιόντα λιθίου και νατρίου και αυξημένη ευαισθησία στο ωσμωτικό σόκ (Omri & Kahana 2001).

Επιπλέον η SPK-1 στο νηματοειδές *C. elegans*, ένα άλλο μέλος της οικογένειας των κινασών αυτών παίζει ρόλο στην ανάπτυξη γαμετικών κυττάρων, όπου βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη CeSF2 (*C. elegans* splicing factor 2) την οποία φωσφορυλιώνει *in vitro* (Kuroyanagi *et al.*, 2000). Τόσο η κινάση SPK-1 όσο και το υπόστρωμά της εκφράζονται κυρίως σε γενετικά κύτταρα του *C. elegans*, όπου φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσής του (Kuroyanagi *et al.*, 2000).

Τέλος σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης η SRPK1 έχει απομονωθεί ως σύμπλοκο με την τοποϊσομεράση IIα, δύο ATPάσες-ελικάσες, δύο παράγοντες ματίσματος πρώιμων mRNA και μία HMG πρωτεΐνη. Το σύμπλοκο αυτό το οποίο ονομάστηκε «τοπόσωμα», εμπλέκεται στο διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων αλλά και στη ρύθμιση της δομής και της διαμόρφωσης των χρωμοσωμάτων (Lee *et al.*, 2004). Ο εντοπισμός της SRPK1 στο «τοπόσωμα» αποκαλύπτει τη συμμετοχή της σε λειτουργίες που μας είναι ακόμα άγνωστες και περιλαμβάνουν ανώτερες πυρηνικές δομές.

Συνοψίζοντας, τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι κινάσες SRPK έχουν ευρύτερο ρόλο στη κυτταρική ρύθμιση μέσω των αλληλεπιδράσεών τους με πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη συμπύκνωση και την οργάνωση της χρωματίνης, όπως είναι ο LBR, η πρωταμίνη P1 και ο P2P-R. Επιπλέον, η απουσία εναλλακτικού ματίσματος καθώς και η έλλειψη των πρωτεϊνών SR από το γονιδίωμα του

σακχαρομήκυτα, προτείνει ότι οι κινάσες SRPK ρυθμίζουν κυτταρικές διεργασίες διαφορετικές και επιπλέον του ματίσματος όπως φαίνεται από τις αλληλεπιδράσεις των SRPK με πρωτεΐνες που δεν περιέχουν RS μοτίβο και άρα δεν αποτελούν υποστρώματά τους. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η αλληλεπίδραση της SRPK1a με τον πρωτεϊνικό παράγοντα της πυρηνικής μήτρας SAFB1, ο οποίος δεν περιέχει μοτίβο RS στην αμινοξική του αλληλουχία (Nikolakaki *et al.*, 2001, Κοέν, 2006).

A.2. ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΙΚΡΙΩΜΑΤΟΣ Β (SCAFFOLD ATTACHMENT FACTOR B-SAFB)

A.2.1. ΠΥΡΗΝΙΚΗ ΜΗΤΡΑ

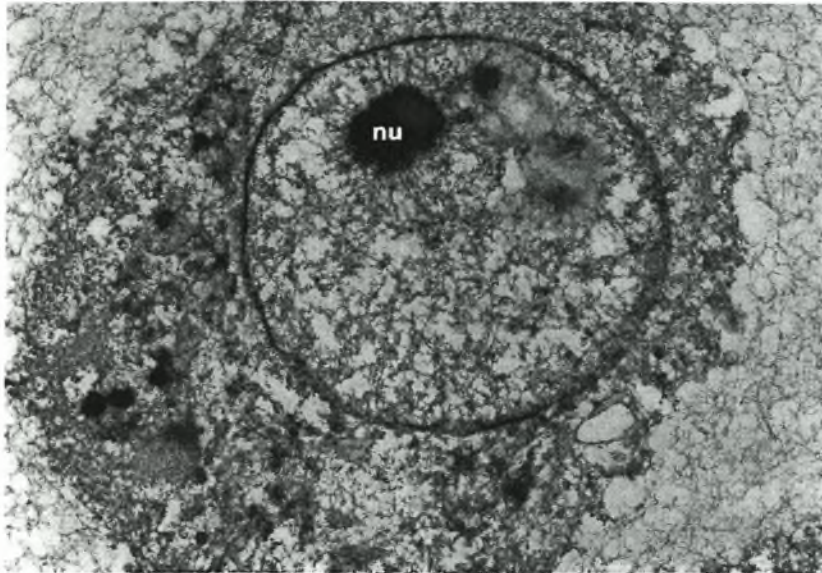
Ως πυρηνική μήτρα ή πυρηνικό σκελετό ή πυρηνικό ικρίωμα (nuclear matrix ή nucleoskeleton ή nuclear scaffold) ορίζεται το πρωτεϊνικό δίκτυο το οποίο αποτελείται από ριβονουκλεοπρωτεΐνες και μη ιστονικές πρωτεΐνες (NMP's-nuclear matrix proteins) και συμβάλλει στην οργάνωση της χρωματίνης σε μια ανώτερη τάξη δομής. Η σύσταση της πυρηνικής μήτρας, η δομή της οποίας είναι ορατή με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, έχει υπολογιστεί σε 85-95% πρωτεΐνες και 5-15% νουκλεϊνικά οξέα, τα οποία παραμένουν αδιάλυτα μετά από κατεργασία του πυρήνα με μη ιονικά απορρυπαντικά, διαλύματα αλάτων υψηλής ιοντικής ισχύος και νουκλεάσες.

Έχει περάσει πάνω από μισό αιώνα από τη στιγμή που παρατηρήθηκε για πρώτη φορά η υπολειμματική δομή της πυρηνική μήτρας έπειτα από εκχύλιση κυττάρων με διαλύματα αλάτων (Zbarsky and Debon, 1948). Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε αργότερα και από άλλες μελέτες σύμφωνα με τις οποίες παραμένει ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό δίκτυο μετά από απομάκρυνση της πυρηνικής μεμβράνης, της μεγαλύτερης ποσότητας DNA, των ιστονών καθώς και των διαλυτών συστατικών του νουκλεοπλάσματος (Zbarsky and Georgiev, 1959, Smentana *et al.*, 1963). Ο όρος πυρηνική μήτρα πρωτοαναφέρθηκε το 1974 από τους Berezney και Coffey, οι οποίοι την χαρακτήρισαν ως πυρηνική δομή με μεταβλητές λειτουργικές και δομικές ιδιότητες που σχετίζονται άμεσα με την λειτουργία του γονιδιώματος στον πυρήνα (Berezney and Coffey 1974, Berezney 1979, Berezney *et al.*, 1979, Berezney and Jeon, 1995).

A.2.1.1. Δομή της πυρηνικής μήτρας

Η πυρηνική μήτρα αποτελείται από την πυρηνική λάμινα και την εσωτερική πυρηνική μήτρα (internal nuclear matrix), η οποία περιλαμβάνει τα κεντρικά νημάτια (core filaments), το διάχυτο σκελετό (diffuse skeleton), τον πυρηνίσκο (nucleolus) και πυρηνικά σώματα (nuclear bodies) (Berezney and Jeon, 1995). Έως τώρα έχουν βρεθεί πάνω από 500 πρωτεΐνες της πυρηνικής μήτρας, οι οποίες περιλαμβάνουν

ένζυμα, δομικές πρωτεΐνες και παράγοντες αντιγραφής, επιδιόρθωσης του DNA, μεταγραφής και επεξεργασίας του RNA (Mika, *NMP-db*) (εικόνα 13).



Εικόνα 13: Ηλεκτρονική φωτογραφία πυρηνικής μήτρας κυττάρων HeLa. Διακρίνεται ο πυρηνίσκος, ο οποίος συμβολίζεται με nu (Hozak *et al.*, 1994).

Πυρηνική λάμινα

Η πυρηνική λάμινα αποτελείται από ένα δίκτυο ενδιάμεσων ινιδίων στην πυρηνοπλασματική πλευρά της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης. Οι κύριες πρωτεΐνες της πυρηνικής λάμινας είναι οι λαμίνες, οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια των ενδιάμεσων πρωτεϊνικών ινιδίων. Διακρίνονται οι λαμίνες τύπου A και B και εκφράζονται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς εκτός από τους μονοκυττάρους. Οι λαμίνες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους σχηματίζοντας διμερή, τα οποία στη συνέχεια πολυμερίζονται για να προκύψουν τα ενδιάμεσα ινίδια πάχους 10nm. Τα ινίδια αυτά δημιουργούν ένα ετεροπολυμερές πλέγμα, το οποίο καλύπτει όλη την επιφάνεια της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης αλλά διακόπτεται στην περιοχή των πυρηνικών πόρων (Georgatos *et al.*, 1994).

Η πυρηνική λάμινα συμβάλλει στη διατήρηση της πυρηνικής μορφολογίας και εμπλέκεται σε διάφορες λειτουργίες όπως είναι η αποσυναρμολόγηση και ο επανασχηματισμός του πυρηνικού φακέλου μέσω φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης των λαμινών (Gant *et al.*, 1997), η απόπτωση (Rao *et al.*, 1996, Ruchaud *et al.*, 2002), η αντιγραφή του DNA και η μεταγραφή (Ellis *et al.*, 1997, Spann *et al.*, 1997), η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (Liou *et al.*, 2000) και η

διαφοροποίηση (Liu *et al.*, 1998, Furukawa *et al.*, 1993). Τέλος διάφορες μεταλλάξεις των λαμινών οδηγούν σε κληρονομικές ασθένειες, τις λαμινοπάθειες, όπως η μυϊκή δυστροφία Emery-Dreifuss (EDMD) (Morris, 2001, Manilal *et al.*, 1996), η καρδιομυοπάθεια (Fatkin *et al.*, 1999) και η λιποδυστροφία (Cao *et al.*, 2000, Shackleton *et al.*, 2000).

Κεντρικά νημάτια και διάχυτος σκελετός

Παρατηρήσεις παρασκευασμάτων πυρηνικής μήτρας μετά από απομάκρυνση της χρωματίνης αποκάλυψαν ότι η εσωτερική πυρηνική μήτρα είναι δομημένη πάνω σε ένα δίκτυο κεντρικών νηματίων τα οποία συνδέονται στην πυρηνική λάμινα (He *et al.*, 1990; Jackson and Cook, 1988; Nickerson *et al.*, 1997). Τα κεντρικά νημάτια αποτελούν μέλος της οικογένειας των ενδιάμεσων ινιδίων (intermediate filaments) και έχουν πάχος 10nm (Hozak *et al.*, 1995).

Μια άλλη δομή που διακρίνεται σε παρασκευές πυρηνικής μήτρας είναι ο διάχυτος σκελετός, ο οποίος βρίσκεται προσκολλημένος στα κεντρικά νημάτια (εικόνα 20). Αποτελείται από σύμπλοκα νουκλεϊνικών οξέων και πρωτεΐνες, όπως οι ετερογενείς πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες A2 και B1 (Tan *et al.*, 2000) και η πρωτεΐνη NuMA (Nuclear Mitotic Apparatus protein), η οποία εμπλέκεται στο μηχανισμό της μίτωσης αλλά έχει και δυνατότητα να δεσμεύεται στις περιοχές S/MARS του DNA και να αλληλεπιδρά *in vitro* με σύμπλοκα ματίσματος συνδέοντας έτσι τη λειτουργία του ματίσματος με την πυρηνική μήτρα (Harborth *et al.*, 1999).

Πυρηνίσκος

Ο πυρηνίσκος αποτελεί την πιο ευδιάκριτη δομή σε ένα μεσοφασικό πυρήνα. Είναι μια περιοχή στην οποία συναθροίζονται τα τμήματα των διαφόρων χρωμοσωμάτων που περιέχουν γονίδια για το ριβοσωμικό RNA. Τα γονίδια του ριβοσωμικού RNA μεταγράφονται στον πυρηνίσκο, όπου επίσης συναρμολογούνται οι ριβοσωμικές υπομονάδες χρησιμοποιώντας τις ριβοσωμικές πρωτεΐνες που έχουν εισαχθεί από το κυτταρόπλασμα (Pederson *et al.*, 1998, Olson *et al.* 2000) (εικόνα 13, 14).

Πυρηνικά σωμάτια

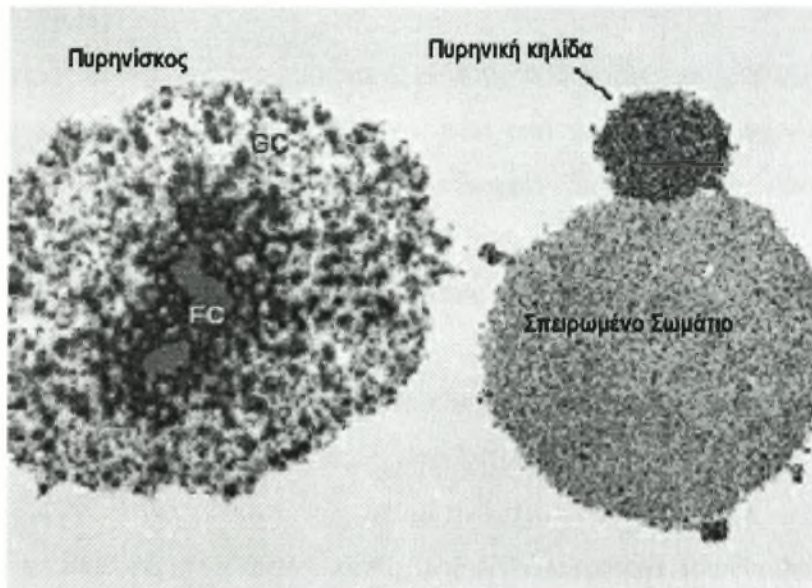
Τα πυρηνικά σωμάτια αποτελούν οργανωμένες ετερογενείς υποπυρηνικές περιοχές με δομικές και λειτουργικές ιδιότητες, οι οποίες σχηματίζονται απουσία

μεμβρανών. Σε αυτά περιλαμβάνονται τα σπειρωμένα σωμάτια (coiled bodies ή Cajal bodies), τα σωμάτια προμυελωτικής λευχαιμίας (PML) και οι πυρηνικές κηλίδες (nuclear speckles).

Τα σπειρωμένα σωμάτια περιέχουν πολλά μόρια που συμμετέχουν στη βιογένεση του RNA. Σε αυτά εντοπίζονται διάφοροι παράγοντες απαραίτητοι για τη μεταγραφή, το μάτισμα και την πολυαδενυλίωση, η πρωτεΐνη κολίνη καθώς και η πολυαδενυλιωμένη μορφή της RNA πολυμεράσης II (RNAP) (Gall *et al.*, 2001). Αποτελούν σημεία συγκρότησης των επιμέρους συμπλεγμάτων μεταγραφής και ματίσματος και επεξεργασίας των πρώιμων mRNA των ιστονών. Ο αριθμός σπειρωμένων σωματίων είναι αυξημένος σε καρκινικά κυτταρα (Murphy *et al.*, 2002, Ogg *et al.*, 2002).

Τα σωμάτια PML, τα οποία διασπώνται σε ασθενείς με προμυελωτική λευχαιμία, αποτελούνται από ένα κεντρικό πυρήνα περιβαλλόμενο από ένα πυκνό δακτύλιο, ο οποίος περιέχει κυρίως την πρωτεΐνη PML. Η πρωτεΐνη λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της ανάπτυξης (Hodges *et al.*, 1998) και ως ογκοκατασταλτικός παράγοντας (Grimwade *et al.* 1997), ενώ σε συνδυασμό με την πρωτεΐνη Rb (Retinoblastoma) θεωρείται ότι συμβάλλει στη ρύθμιση της μεταγραφής (Hodges *et al.*, 1998), στην επιδιόρθωση του DNA (Biscof *et al.*, 2001) και την έναρξη της απόπτωσης (Wang *et al.*, 1998b).

Οι πυρηνικές κηλίδες, οι οποίες καταλαμβάνουν το 20% του πυρηνικού όγκου περιέχουν μεγάλες συγκεντρώσεις παραγόντων μεταγραφής και ματίσματος (Handwerger *et al.*, 2006). Έχουν ακανόνιστο σχήμα και το μέγεθός τους ποικίλλει ανάλογα με το μεταγραφικό στάδιο του κυττάρου. Στα σωμάτια αυτά, τα οποία περιέχουν περίπου 150 πρωτεΐνες, επίσης βρέθηκαν ριβοσωμικές πρωτεΐνες, παράγοντες επεξεργασίας του 3' άκρου του RNA, ο eIF4E (παράγοντας έναρξης της μετάφρασης), ο eIF4AIII (παράγοντας αναστολής της μετάφρασης), η λαμίνη A καθώς και διάφορες υπομονάδες της RNA πολυμεράσης II (Angus *et al.*, 2006). Μορφολογικά στις πυρηνικές κηλίδες διακρίνονται δύο ξεχωριστές δομές: οι κεντρικές περιοχές αποτελούνται από συσσωματώματα κοκκίων χρωματίνης διαμέτρου 20-25nm (IGC-interchromatin granule clusters), τα οποία αποτελούν χώρους αποθήκευσης των παραγόντων ματίσματος υπό μορφή συμπλόκων, ενώ περιφερικά παρατηρούνται ινώδεις δομές διαμέτρου 3-5nm, τα περιχρωματινικά νημάτια (PF-perichromatin fibrils), στα οποία λαμβάνει χώρα η μεταγραφή και η ωρίμανση των νεοσυντιθέμενων RNA (Spector, 1996) (εικόνα 14).



Εικόνα 14: Ηλεκτρονική φωτογραφία των υποπυρηνικών δομών

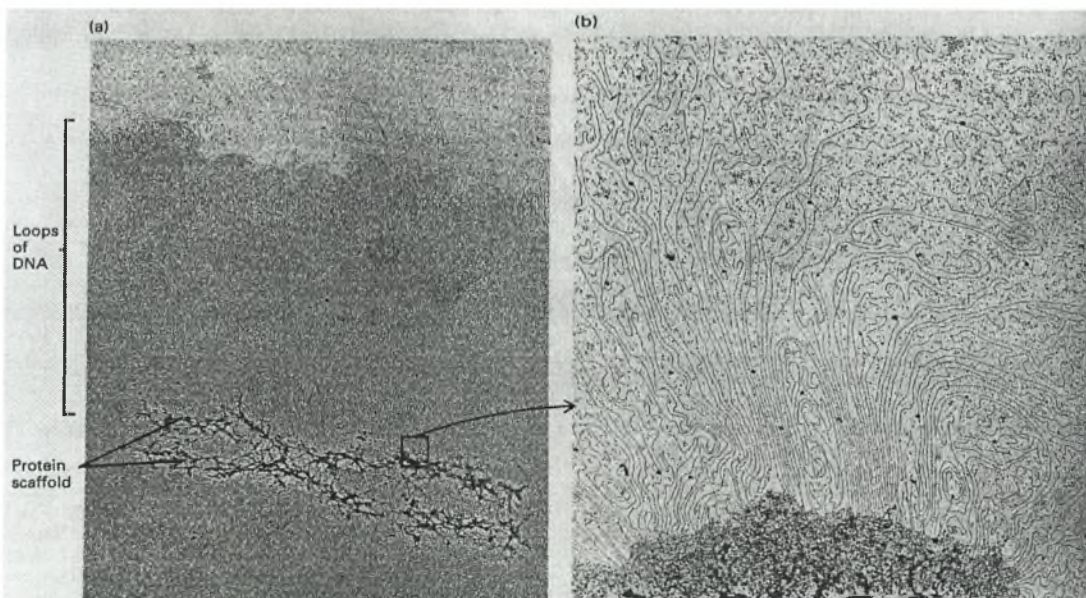
S/MARS (Scaffold/ Matrix attachment Regions)

Στον ευκαρυωτικό μεσοφασικό πυρήνα η χρωματίνη οργανώνεται σε μια ανώτερη τάξη δομής υπό τη μορφή «θηλιών». Οι θηλιές αυτές έχουν βρεθεί να παραμένουν προσκολλημένες στην πυρηνική μήτρα μετά από κατεργασία με DNaseI μέσω συγκεκριμένων περιοχών του DNA που ονομάζονται S/MARS (Berezney & Jeon 1995). Αποτελούν στοιχεία DNA στη βάση των θηλιών μήκους 300-3000bp και είναι πλουσία σε AT (πάνω 65% της σύστασης τους) (εικόνα 15).

Έχει υπολογιστεί ότι το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει περίπου 100.000 S/MARS περιοχές, οι οποίες εντοπίζονται στα ιντρόνια αρκετών μεγάλων γονιδίων (Bode *et al.*, 1996). Αρκετά S/MARS είναι συντηρημένα στην εξέλιξη όχι τόσο όσον αφορά την αλληλουχία τους όσο τη σχετική τους θέση ως προς τα αντίστοιχα γονίδια και μοιράζονται τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: εμπεριέχουν ή γειτονεύουν με περιοχές έναρξης της αντιγραφής, αποτελούν θέσεις δέσμευσης ομοιωτικών πρωτεϊνών, εμπεριέχουν αλληλουχίες δέσμευσης ή κοπής από τις τοποϊσομεράσες I ή II καθώς και περιοχές δέσμευσης παραγόντων μεταγραφής. Έχουν βρεθεί να παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες λειτουργίες όπως η οργάνωση του γονιδιώματος και της γονιδιακής έκφρασης, καθώς και εντοπίζονται συχνά σε περιοχές πρόσδεσης μεταγραφικών συμπλόκων και έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν την έκφραση

γονιδίων αναφοράς και να ρυθμίζουν την δυνατότητα προσέγγισης της χρωματίνης (Bode *et al.*, 1996).

Αρκετές πρωτεΐνες της πυρηνικής μήτρας που προσδένουν S/MAR περιοχές έχουν ανιχνευθεί και μελετηθεί διεξοδικά. Μια από τις πιο καλά χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες είναι ο SAF-A (Scaffold attachment factor A), ο οποίος αρχικά ανιχνεύθηκε να συμμετέχει σε RNP σύμπλοκα και αργότερα ως πρωτεΐνη που προσδένεται σε S/MAR περιοχές και μέσω της αλληλεπίδρασής της με τον μεταγραφικό συμπράγοντα P-300 προσελκύει τα ενεργά γονίδια στην πυρηνική μήτρα (Martens *et al* 2002). Μια άλλη πρωτεΐνη, η ARBP (Attachment region binding protein) έχει βρεθεί να αλληλεπιδρά με μεθυλιωμένο DNA σε S/MAR στοιχεία και προάγει τη μη ενεργή κατάσταση της χρωματίνης μέσω προσέλκυσης απακετυλασών ιστονών (Stratling *et al.*,1999). Επίσης ο SAFB (Scaffold attachment factor B) βρέθηκε να προσδένει ειδικά S/MAR περιοχές και λόγω της αλληλεπίδρασής του με την RNA πολυμεράση II και με παράγοντες ματίσματος πλούσιους σε διπεπτίδια αργινίνης-σερίνης (SR πρωτεΐνες), προτείνεται ότι μπορεί να λειτουργεί σαν βάση συγκρότησης της μεταγραφικής μηχανής (Nayler *et al.*, 1998). Επιπλέον μια άλλη γνωστή πρωτεΐνη της πυρηνικής μήτρας ο SATFB1, ο οποίος συναντάται κυρίως σε κύτταρα του θύμου αδένου λειτουργεί ως μεταγραφικός καταστολέας μέσω της σύνδεσής του σε S/MARS περιοχές ρυθμίζοντας έτσι την γονιδιακή έκφραση κατά τη διάρκεια της κυτταρικής ανάπτυξης (Yasui *et al.*, 2002).



Εικόνα 15: Ηλεκτρονική φωτογραφία ενός μεταφασικού χρωμοσώματος που παρασκευάστηκε από κύτταρα HeLa μετά από κατεργασία με ήπιο απορρυπαντικό α) φαίνεται η σκουρόχρωμη περιοχή της πυρηνικής μήτρας από όπου προεξέχουν οι μακριές θηλιές του DNA (50.000X) β) είναι διακριτή η επικόλληση των θηλιών DNA (S/MAR περιοχές) πάνω στην πυρηνική μήτρα (σκουρόχρωμη περιοχή) (150.000X).

Α.2.1.2. Ρόλος της πυρηνικής μήτρας στην αντιγραφή, τη μεταγραφή και το μάτισμα

Αρκετές πειραματικές μελέτες υποστηρίζουν και αποδεικνύουν ότι η πυρηνική μήτρα παίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της αντιγραφής του DNA παρέχοντας δομική υποστήριξη μέσω σημαντικών πρωτεϊνικών παραγόντων. Δεδομένου ότι έχει δειχθεί ότι το νεοσυντιθέμενο DNA είναι προσκολλημένο στην πυρηνική μήτρα, υπάρχει η υπόθεση ότι οι περιοχές έναρξης αντιγραφής (ORI) του DNA είναι και αυτές προσκολλημένες στην πυρηνική μήτρα με ένα δυναμικό τρόπο (Djeliova *et al.*, 2001). Συγκεκριμένα στα ευκαρυωτικά κύτταρα το DNA είναι οργανωμένο σε 10^4 ρεπλικόνια (τμήματα DNA που αντιγράφονται από μια κοινή αρχή), τα οποία αντιγράφονται μια φορά σε κάθε κυτταρικό κύκλο στην S φάση. Στο τέλος της G1 φάσης τα ORI συνδέονται με την πυρηνική μήτρα μέσω συμπλόκων αναγνώρισης των ORI (ORC- Origin recognition complexes) (Ohta *et al.*, 2003) και αποσυνδέονται μετά την έναρξη της αντιγραφής στην S φάση. Οι περιοχές ORI έχουν βρεθεί να γειτονεύουν συχνά με αλληλουχίες S/MARS στην περιφέρεια των θηλέων, με τις οποίες προτείνεται ότι αλληλεπιδρούν πριν την έναρξη της αντιγραφής μέσω πρωτεϊνών της πυρηνικής μήτρας π.χ. τον SAFA (Jenke *et al.*, 2004). Επιπλέον έχει δειχθεί ότι η μηχανή αντιγραφής είναι προσδεδεμένη στην πυρηνική μήτρα, καθώς πολλές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη φάση επιμήκυνσης του DNA εντοπίζονται προσκολλημένες στην πυρηνική μήτρα όπως DNA πολυμεράσες, τοποϊσομεράσες, πριμάσες, PCDNA, RPA και άλλες (Hozac *et al.*, 1993).

Η πυρηνική μήτρα επίσης έχει επιβεβαιωθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της υποκυτταρικής κατανομής των μεταγραφικών παραγόντων, η οποία είναι απαραίτητη για την πιστότητα του μεταγραφικού ελέγχου. Στην πυρηνική μήτρα έχει αναφερθεί ότι προσδένεται η υπερφοσφορυλιωμένη μορφή της μεγαλύτερης

υπομονάδας της RNA πολυμεράσης II μαζί με μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο υποδοχέας οιστρογόνων (ER-Estrogen Receptor), NMP-2 (Nuclear matrix protein-2), RFP, NF-1, YY1 (Ying-Yang1), AML-1 (Acute Myeloid Leukemia protein-1), SP1 (Specificity protein 1), GATA-1 (Merriman *et al.*, 1995, Dworetzky *et al.*, 1992, Sun *et al.*, 1994, Isomura *et al.*, 1992, van Wijnen *et al.*, 1993, Vassetzky *et al.*, 1993). Παράγοντες αναδιοργάνωσης της χρωματίνης όπως οι HDAC1/2 (Histone DeAcetylase 1/2), η HATA (Histone-Acetyl-Transferase A) καθώς και οι πρωτεΐνες SWI/SNF και BAF, οι οποίες δρουν ως ελικάσες «ξεδιπλώνοντας» την χρωματίνη, έχουν βρεθεί να σχετίζονται με την πυρηνική μήτρα (Reyes *et al.*, 1997, Zhao *et al.*, 1998). Οι ενεργά μεταγραφικές περιοχές της χρωματίνης είναι προσδεμένες με τους πρωτεϊνικούς παράγοντες της πυρηνικής μήτρας μέσω των S/MARS περιοχών, οι οποίες έχουν βρεθεί να λειτουργούν είτε ως ενισχυτές (enhancers) είτε αναστολείς (insulators) της μεταγραφής (Cook, 1994, Cook, 1995, Bagchi *et al.*, 1995, van Wijnen *et al.*, 1993, Merriman *et al.*, 1995).

Σημαντικός επίσης είναι ο ρόλος της πυρηνικής μήτρας και στην διαδικασία επεξεργασίας του νεοσυντιθέμενου RNA. Σε παρασκευές πυρηνικής μήτρας έχουν βρεθεί πρώιμα και ώριμα mRNA (Mariman *et al.*, 1982) καθώς και οι RNA πολυμεράσες I και II και παράγοντες ματίσματος, όπως ο SC35 και οι hnRNP πρωτεΐνες. Τα συσσωματώματα κοκκίων χρωματίνης (IGC), τα οποία αποτελούν χώρους όπου αποθηκεύονται υπό μορφή συμπλόκων οι παράγοντες ματίσματος του RNA, έχουν συχνά απομονωθεί από αυτά τα παρασκευάσματα πυρηνικής μήτρας (Mintz *et al.*, 1999), τα οποία έχουν την ικανότητα να αποκόπτουν *in situ* ιντρόνια με προσθήκη ATP. Για παράδειγμα οι πρωτεΐνες της πυρηνικής μήτρας SRm160 και SRm30, οι οποίες απαιτούνται για μερικές *in vitro* RNA αντιδράσεις ματίσματος, εντοπίζονται στα κοκκιώδη συμπλέγματα και θεωρούνται ότι γεφυρώνουν δυναμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συμπλόκων ματίσματος και της πυρηνικής μήτρας (Blencowe *et al.*, 2000; Blencowe *et al.*, 1998; Blencowe *et al.*, 1994).

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω δεδομένα, η πυρηνική μήτρα εμπλέκεται σχεδόν σε όλους τους μηχανισμούς του πυρήνα όπως η αντιγραφή, η μεταγραφή και η επεξεργασία του mRNA, ο κυτταρικός κύκλος, η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών και αντιστρεπτή ακετυλίωση τμημάτων χρωματίνης καθώς αποτελεί τη βάση για την οργάνωση της χρωματίνης σε μια ανώτερη τάξη δομής και τον συνδετικό κρίκο μεταξύ διαφορετικών πυρηνικών λειτουργιών, τις οποίες συντονίζει

μέσω στρατολόγησης των πρωτεϊνικών παραγόντων στην κατάλληλη θέση και χρονική στιγμή.

A.2.1.3. Πυρηνική μήτρα και παθογένεια

Πολλές είναι οι μελέτες που προτείνουν ότι η πυρηνική μήτρα παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης καθώς η πρωτεϊνική της σύσταση ποικίλλει τόσο μεταξύ κυττάρων που προέρχονται από διαφορετικούς ιστούς όσο και μεταξύ φυσιολογικών και παθολογικών κυττάρων. Δεδομένου ότι η πυρηνική μήτρα θεωρείται σε ένα βαθμό υπεύθυνη για την διατήρηση της μορφολογικής ακεραιότητας του πυρήνα και την οργάνωση του γενετικού υλικού, είναι πιθανόν διάφορα χαρακτηριστικά του καρκίνου όπως είναι χρωμοσωμικές ανακατατάξεις και η γενική χρωμοσωμική αστάθεια να οφείλονται σε μεταβολές της σύστασης της πυρηνικής μήτρας.

Αρκετές πρωτεΐνες της πυρηνικής μήτρας έχουν ανιχνευθεί αποκλειστικά σε καρκινικά κύτταρα, όπως η πρωτεΐνη PC-1/nucleoplasmin, η οποία εκφράζεται μόνο σε καρκίνους του προστάτη (Partin *et al.*, 1997), η πρωτεΐνη p114 η οποία εμφανίζεται αποκλειστικά σε καρκίνους του μαστού (Yanagisawa *et al.*, 1996), ενώ έχουν εντοπιστεί διαφορές στην πρωτεϊνική σύσταση της πυρηνικής μήτρας μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης και του ήπατος (Getzenberg *et al.*, 1994, Berezney *et al.*, 1979). Το προφίλ των πρωτεϊνών του πυρηνικού σκελετού αποτελούν τη βάση για τη διάκριση των διαφόρων καρκινικών σειρών (Fey and Penman, 1998) και επίσης έχει παρατηρηθεί ότι η υπερφωσφορυλιωμένη ή μεταλλαγμένη Rb, που απαντάται σε διάφορες μορφές καρκίνων, δεν δεσμεύεται στην πυρηνική μήτρα (Durfee *et al.*, 1994).

Τέλος αυξημένα ή μειωμένα επίπεδα έκφρασης των Α και Β λαμινών συναντώνται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως εμβρυονικά καρκινώματα, λευχαιμία, νεοπλασίες, αυτοάνοσα νοσήματα καθώς και σε μυϊκές και καρδιακές παθήσεις (Rankin *et al.*, 2006, Bosman, 1999).

A.2.2. Ο ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ SAFB

Η πρωτεΐνη SAFB αποτελεί μέλος μιας οικογένειας πυρηνικών πρωτεϊνών, οι οποίες εντοπίζονται στην πυρηνική μήτρα. Οι πρωτεΐνες αυτές ονομάζονται παράγοντες πρόσδεσης στο ικρίωμα (Scaffold attachments factors) καθώς απομονώθηκαν με βάση την ιδιότητά τους να αναγνωρίζουν και να προσδένονται ειδικά σε περιοχές S/MARS του DNA (Scaffold/matrix attachment regions) και είναι οι εξής: SAF-A, SAF-B, SAF-C και SAF-D.

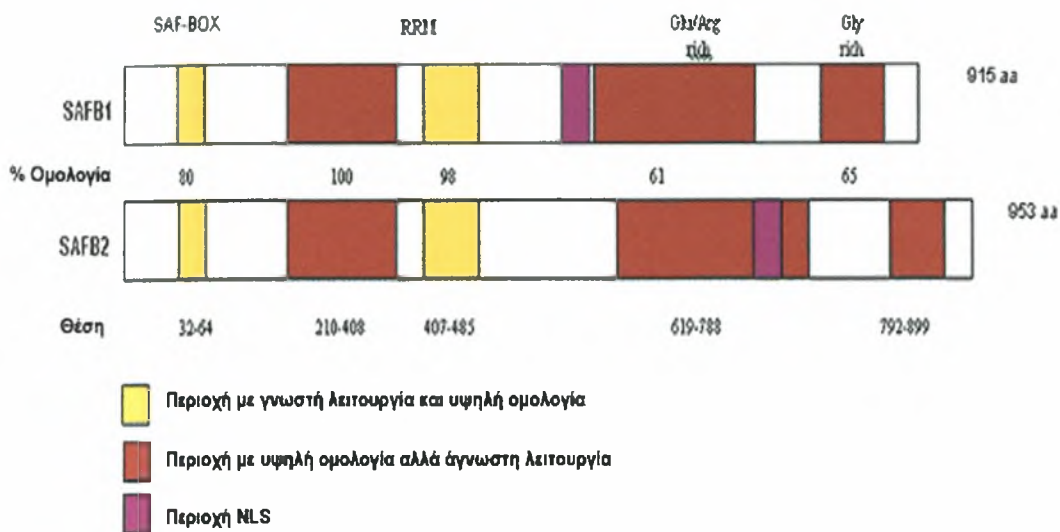
Η υποοικογένεια SAF-B περιλαμβάνει δύο από τους πιο καλά μελετημένους πρωτεϊνικούς παράγοντες της πυρηνικής μήτρας, οι οποίοι είναι ο SAFB1 και ο SAFB2.

A.2.2.1. Η δομή του SAFB

Ο SAFB1 αποτελείται από 915 αμινοξέα και είναι μια βασική πρωτεΐνη (pI: 8,8). Η δομή του SAFB1 φαίνεται σχηματικά στην εικόνα 16. Το αμινοτελικό άκρο του SAFB1 περιέχει μια περιοχή, η οποία είναι συντηρημένη μεταξύ των ευκαρυωτών και είναι γνωστή ως SAF-Box (αμινοξέα 35-67) Η περιοχή αυτή έχει βρεθεί ότι ευθύνεται για την πρόσδεση πυρηνικών πρωτεϊνών στις S/MAR περιοχές (Kipp *et al.*, 2000).

Επιπλέον ο SAFB1 περιέχει μια περιοχή RRM, (αμινοξέα 409-482) καθώς και μια περιοχή πλούσια σε διπεπίδια αργινίνης και γλουταμινικού οξέος (περιοχή RE, αμινοξέα 619-699) τα οποία ευθύνονται για την συσσώρευση θετικών και αρνητικών φορτίων στην συγκεκριμένη περιοχή. Στο καρβοξυτελικό άκρο του SAFB1 εντοπίζεται μία περιοχή πλούσια σε γλυκίνες (αμινοξέα 785-899), ενώ το τμήμα μεταξύ των αμινοξέων 599-614 περιλαμβάνει το σήμα πυρηνικού εντοπισμού της πρωτεΐνης (Townson *et al.*, 2004) (Εικόνα 16).

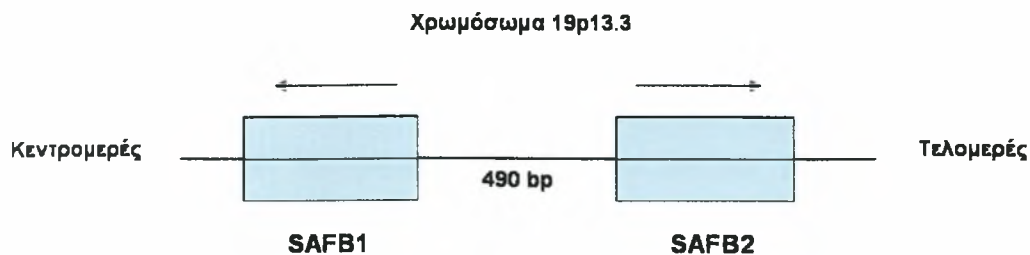
Η πρωτεΐνη SAFB2 παρουσιάζει υψηλή ομολογία (~74%) με τον SAFB1 και περιέχει αρκετές συντηρημένες περιοχές με αυτές του SAFB1. Η αλληλουχία NLS όμως στον SAFB2 εντοπίζεται μάλλον στη αμινοξική περιοχή 713-730 και εμφανίζει μικρή ομολογία με το NLS του SAFB1 στη αμινοξική θέση 599-616 (Townson *et al.*, 2003) (Εικόνα 16).



Εικόνα 16: Σχηματική αναπαράσταση της δομής των πρωτεϊνών SAF-B1 και SAF-B2, όπου απεικονίζονται το ποσοστό ομολογίας και η θέση των δυνητικά λειτουργικών τους περιοχών. Αυτές περιλαμβάνουν ένα SAF-Box (Scaffold Attachment Factor-Box), ένα RRM (RNA Recognition Motif) και τις περιοχές πλούσιες σε RE και G. Οι περιοχές με γνωστή λειτουργικότητα παρουσιάζονται με κίτρινο χρώμα ενώ αυτές με άγνωστη λειτουργικότητα με κόκκινο. Με μώβ χρώμα απεικονίζεται η NLS περιοχή των δύο πρωτεϊνών (Townson *et al.*, 2003).

Τα γονίδια SAFB1 και SAFB2 βρίσκονται στον άνθρωπο στο χρωμόσωμα 19p13.3 σε απόσταση περίπου 500bp μεταξύ τους. Το γονίδιο του SAFB2 βρίσκεται με αντίθετη κατεύθυνση «κεφαλή με κεφαλή» με το γονίδιο του SAFB1. Ανάμεσα στα δύο γονίδια παρεμβάλλεται ένας κοινός προαγωγέας διπλής κατεύθυνσης, ο οποίος είναι πλούσιος σε νουκλεοτίδια γουανίνης (G) και κυτοσίνης (C) και ρυθμίζει ταυτόχρονα την έκφρασή και των δύο γονιδίων (Εικόνα 17).

Γονίδια *SAFB1*, *SAFB2* βρέθηκαν και σε άλλους οργανισμούς όπως στο ποντίκι, το γουρούνι και το ταύρο. Παρόμοια γονίδια έχουν βρεθεί επίσης στη *Drosophila* και στο νηματοσκώληκα *C. elegans* αλλά όχι στη ζύμη, τα φυτά, τα βακτήρια και τα πρωτόζωα. (Townson *et al.*, 2003).



Εικόνα 17: Χρωμοσωμική διάταξη των γονιδίων SAFB1 και SAFB2 στο 19p13.3 στον άνθρωπο. Τα δύο γονίδια χωρίζονται από μία περιοχή 490 bp, η οποία λειτουργεί ως προαγωγέας διπλής κατεύθυνσης. Τα βέλη δηλώνουν την κατεύθυνση μεταγραφής των γονιδίων (Townson *et al.*, 2003).

A.2.2.2. Ιστορικό του SAFB

Αρχικά η πρωτεΐνη SAFB1 είχε απομονωθεί από κύτταρα HeLa και κλωνοποιήθηκε με βάση την ικανότητά της να δεσμεύεται στις S/MAR περιοχές, οι οποίες αποτελούν δομικά στοιχεία για την οργάνωση της χρωματίνης σε μια ανώτερη τάξη δομής (Renz *et al.*, 1996). Έτσι ο SAFB1 θεωρήθηκε ότι μέσω της πρόσδεσής του στις περιοχές S/MAR προσεγγίζει τις πρωτεΐνες της πυρηνικής μήτρας στην χρωματίνη συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στην οργάνωση της χρωματίνης και την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Κλωνοποιήθηκε επίσης ανεξάρτητα με βάση την ικανότητά της να δεσμεύεται στον εκκινητή του γονιδίου της hsp27 (heat shock protein 27), ο οποίος ίσως και αυτός περιέχει S/MAR περιοχή (Oesterreich *et al.*, 1997). Για αυτό το λόγο ο SAFB1 πήρε την ονομασία HET (Hsp27-ERE-TATA-binding protein).

Μια άλλη ερευνητική ομάδα το 1998 έδειξε ότι ο SAFB1 αποτελεί μέλος μεγάλων μακρομοριακών συμπλόκων που ρυθμίζουν και συνδέουν τη σύνθεση του RNA (μεταγραφή) με την ωρίμανσή του (μάτισμα) στις S/MAR περιοχές του DNA, καθώς βρέθηκε να αλληλεπιδρά μέσω του συστήματος των δύο υβριδίων με την RNA πολυμεράση II, την κινάση των SR πρωτεϊνών CLK2 καθώς και με παράγοντες ματίσματος όπως ο SC35 και ο SRp30c (Nayler *et al.*, 1998).

Ένα χρόνο αργότερα δείχτηκε η αλληλεπίδραση του SAFB1 με την πρωτεΐνη hnRNP A1, όπου οφείλεται και η ονομασία του ως HAP (hnRNP A1 associated protein). Στη συνέχεια η ερευνητική ομάδα της Dr Oesterreich αποκάλυψε μια άλλη άγνωστη μέχρι τότε πτυχή του SAFB1, καθώς βρέθηκε να αλληλεπιδρά με τον

πυρηνικό υποδοχέα ERα λειτουργώντας ως συγκαταστάσας της δράσης του (Oesterreich *et al.*, 2000, Townson *et al.*, 2004). Παράλληλα δείχτηκε ότι η υπερέκφρασή του οδηγεί σε αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, γεγονός το οποίο φανερώνει τον σημαντικό ρόλο που πιθανόν παίζει ο SAFB1 στον μηχανισμό της καρκινογένεσης (Townson *et al.*, 2003).

A.2.2.3. Έκφραση και υποκυτταρικός εντοπισμός του SAFB

Πειράματα υβριδισμού κατά Northern έδειξαν ότι τόσο ο SAFB1 όσο και ο SAFB2 εμφανίζουν όμοια επίπεδα έκφρασης σε όλους τους ιστούς και ανιχνεύονται κυρίως στην καρδιά, τον εγκέφαλο, τους πνεύμονες, τον πλακούντα, το συκώτι, το σκελετικό μυ, τα νεφρά και το πάγκρεας. Η έκφραση των δύο πρωτεϊνών επιβεβαιώθηκε επίσης σε διάφορες ανθρώπινες καρκινικές σειρές κυρίως του μαστού (MCF-7BK, MDA-MB-231, T47D και ZR75), στην μυελοβλαστική κυτταρική σειρά KG-1 καθώς και στις κυτταρικές σειρές Caco 2 και 3T3-L1 (Townson *et al.*, 2003, Debril *et al.*, 2005).

Ο SAFB1 είναι μία πρωτεΐνη της πυρηνικής μήτρας και έχει δείχτει ότι μέσω της πρόσδεσής του στις περιοχές S/MAR προσεγγίζει τις πρωτεΐνες της πυρηνικής μήτρας στην χρωματίνη. Εντοπίζεται κυρίως στα ινίδια της χρωματίνης (Perichromatin fibrils) (Chiodi *et al.*, 2000), όπου συνυπάρχει με την RNA πολυμεράση II και ορισμένες SR πρωτεΐνες όπως ο SC35 καθώς και με διάφορες ισομορφές της πρωτεΐνης hnRPD με τις οποίες αλληλεπιδρά (Nayler *et al.*, 1998, Arao *et al.*, 2000). Σε πειράματα δείχτηκε ότι σε κύτταρα HeLa τα οποία υφίστανται θερμικό σοκ, ο SAFB1 μετατοπίζεται στα σωμάτια HAP, τα οποία αποτελούνται από κοκκία χρωματίνης (Perichromatin granule clusters-PGs) και λειτουργούν σαν «αποθήκες» των RNAs που συντίθενται πριν και μετά το θερμικό σοκ, καθώς έχει αποδειχθεί ότι το στρές ελαττώνει την μεταγραφή των περισσότερων γονιδίων και αναστέλλει την ωρίμανση του mRNA στα κύτταρα (Chiodi *et al.*, 2000). Η μελέτη όμως αυτή δεν είχε συνέχεια.

Όσον αφορά στον υποκυτταρικό εντοπισμό του, αρχικά μελέτες φθορισμού έδειξαν ότι ο SAFB1 εντοπίζεται μόνο στον πυρήνα (όχι όμως στους πυρηνίσκους), ενώ ο SAFB2 και στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα (Townson *et al.*, 2003). Πρόσφατη όμως έρευνα κυτταρικού εντοπισμού των ενδογενών SAFB1 και SAFB2 σε κύτταρα HeLa και HEK 293 δείχνει ότι η θέση και των δύο πρωτεϊνών είναι

αποκλειστικά πυρηνική (Sergeant *et al.*, 2006). Συγκεκριμένα στα κύτταρα HeLa οι SAFB1 και SAFB2 εντοπίζονται συγκεντρωμένοι σε πυρηνικές κηλίδες, ενώ στα κύτταρα HEK 293 οι δύο πρωτεΐνες εμφανίζουν μια πιο διάχυτη υποκυτταρική κατανομή στον πυρήνα. Ακόμη ο SAFB2 βρέθηκε να έχει διαφορετικό υποκυτταρικό εντοπισμό στον πυρήνα σε σχέση με τον SAFB1, ενώ εμφανίζει παρόμοια πυρηνική κατανομή με τον παράγοντα ματίσματος Sam68 σε κύτταρα HeLa. Τα αποτελέσματα αυτά σε συνδυασμό με δοκιμασίες ανοσοκαθίζησης της χρωματίνης (CHIP) προτείνουν ότι ο SAFB2 σχηματίζει σταθερά μεγάλα σύμπλοκα (μέχρι και 670 kDa σε μέγεθος) με τον SAFB1 καθώς και με ρυθμιστές ματίσματος, όπως Sam68, ο T-Star και ο hnRPN. Αντίθετα ο SAFB1 εντοπίζεται κυρίως ως μονομερής πρωτεΐνη ή σε μικρότερα σύμπλοκα (όπου βρίσκεται και ο μεταγραφικός παράγοντας TAFII15), τα οποία έχουν διαφορετική πυρηνική κατανομή σε σχέση με τα σύμπλοκα του SAFB2 (Sergeant *et al.*, 2006). Φαίνεται λοιπόν από την πρόσφατη αυτή μελέτη ότι ενώ και οι δύο παράγοντες είναι πυρηνικοί, ο υποπυρηνικός τους εντοπισμός δεν είναι ίδιος, αλλά η λειτουργική σημασία αυτής της διαφοροποίησης είναι ακόμα άγνωστη.

Επιπλέον έχει αναφερθεί ότι ο SAFB1 απαιτείται για την φυσιολογική ανάπτυξη του ποντικού, η οποία όμως δεν αναπληρώνεται απουσία έκφρασης του SAFB1 σε «knockout» ποντίκια με φυσιολογική έκφραση του SAFB2 (Ivanova *et al.*, 2005) γεγονός που υποδηλώνει ότι ο SAFB2 δεν μπορεί να “αντικαταστήσει” τον SAFB1. Τα παραπάνω δεδομένα σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η έκφραση του SAFB2 στα κύτταρα Sertoli στους όρχεις βρίσκεται σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τον SAFB1 συνιστούν ότι αν και ο SAFB1 και ο SAFB2 μοιράζονται περιοχές με υψηλή ομολογία μεταξύ τους, φαίνεται ότι οι δύο αυτές πρωτεΐνες έχουν διαφορετικές μοριακές και λειτουργικές ιδιότητες (Sergeant *et al.*, 2006).

A.2.2.4. Μοριακές αλληλεπιδράσεις του SAFB

Τόσο ο SAFB1 όσο και ο SAFB2 έχουν αναφερθεί να αλληλεπιδρούν *in vitro* και *in vivo* με πολλές πρωτεΐνες, οι οποίες εμπλέκονται κυρίως στην οργάνωση της χρωματίνης, τη μεταγραφή και το μάτισμα.

Αλληλεπίδραση του SAFB με την χρωματίνη

Ο SAFB1 απομονώθηκε με βάση την ιδιότητά του να αναγνωρίζει και να προσδένεται άμεσα σε αλληλουχίες των S/MAR περιοχών του DNA, οι οποίες διαμεσολαβούν στην δέσμευση της χρωματίνης στην πυρηνική μήτρα. Με αυτό το τρόπο ο SAFB1 θεωρείται ότι συμβάλλει στη ρύθμιση της οργάνωσης της χρωματίνης μέσω πρόσδεσής του στις S/MAR περιοχές, οι οποίες επίσης είναι υπεύθυνες για την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (Renz & Fackelmayer, 1996).

Η ιδιότητα του SAFB1 να αναγνωρίζει και να προσδένεται σε S/MAR περιοχές επιβεβαιώθηκε και από την Dr Oesterreich, η οποία έδειξε ότι ο SAFB1 δεσμεύεται στον εκκινητή του γονιδίου της *hsp27* και συγκεκριμένα σε ένα πλαίσιο TATA, το οποίο θεωρείται ότι αποτελεί S/MAR περιοχή (Oesterreich *et al.*, 1997).

Αλληλεπιδράσεις του SAFB με παράγοντες μεταγραφής

Ο SAFB1 έχει δείχτεί ότι αλληλεπιδρά *in vitro* και *in vivo* με το καρβοξυτελικό άκρο της RNA πολυμεράσης II (Nayler *et al.*, 1998) καθώς και με την πρωτεΐνη CHD1 (chromodomain protein), η οποία προσδένεται σε S/MAR περιοχές του DNA και θεωρείται ότι εμπλέκεται στη δομική οργάνωση της χρωματίνης και τη ρύθμιση της μεταγραφής μέσω αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες HDACs και ορισμένους συγκαταστολείς της μεταγραφής. (Tai *et al.*, 2003). Σε κάποια είδη κυττάρων η καρβοξυτελική περιοχή του SAFB1 συγκατακρημνίζεται με την ιστόνη H1 (Izaurrable *et al.*, 1989) και τον παράγοντα SAF-A (Fackelmayer *et al.*, 1994), ενώ δεσμεύεται και σε παράγοντες του γενικού μεταγραφικού συμπλόκου όπως οι *htra2-beta1* και TAFII68 (Townson *et al.*, 2004).

Πρόσφατα δείχτηκε ότι ο SAFB1 συνδέεται *in vitro* και *in vivo* με την περιοχή DBD (DNA Binding Domain) και την περιοχή του αρμού (hinge) του πυρηνικού υποδοχέα των οιστρογόνων (estrogen receptor-ER α). Η αλληλεπίδραση αυτή λαμβάνει χώρα κυρίως μέσω της κεντρικής του περιοχής του SAFB1 (αμινοξέα 426-600) (Oesterreich *et al.*, 2000) (EID1-ER α interaction domain 1) και σε μικρότερο βαθμό μέσω της καρβοξυτελικής περιοχής του (αμινοξέα 600-915) (EID2-ER α interaction domain 2). Η σύνδεση του ER με τον SAFB συμβαίνει παρουσία ή απουσία οιστρογόνων αλλά αυξάνεται σημαντικά παρουσία ταμοξιφένης που είναι ένας ανταγωνιστής των οιστρογόνων (Oesterreich *et al.*, 2000).

Επιπλέον ο SAFB1 και SAFB2 έχουν βρεθεί να αλληλεπιδρούν *in vitro* και *in vivo* με τον συγκαταστολέα του υποδοχέα ERα, τον N-CoR (nuclear hormone receptor corepressor). Συγκεκριμένα η αλληλεπίδραση αυτή εντοπίζεται μεταξύ του καρβοξυτελικού άκρου του SAFB1 (αμινοξέα 599-915) και του αμινοτελικού τμήματος του N-CoR. Επιπλέον τα επίπεδα έκφρασης των SAFB1/2 και N-CoR εμφανίζουν υψηλή συσχέτιση μεταξύ τους σε κύτταρα από καρκίνο μαστού, ενώ πειράματα φθορισμού καθώς και δοκιμασίες ανοσοκαθίζησης της χρωματίνης (CHIP) σε MCF-7 κύτταρα παρουσία οισταδιόλης υπέδειξαν ότι οι SAFB1/2 συνυπάρχουν με τον N-CoR σε λειτουργικό σύμπλοκο μαζί με τον υποδοχέα ERα (Jiang *et al.*, 2005).

Αλληλεπιδράσεις του SAFB με παράγοντες ματίσματος

Ο SAFB1 έχει βρεθεί να αλληλεπιδρά μέσω της RRM περιοχής του με πολλές πρωτεΐνες, οι οποίες εμπλέκονται σε διάφορα στάδια του μεταβολισμού του RNA (ωρίμανση του pre-mRNA, μάτισμα, σταθερότητα, εξαγωγή από τον πυρήνα και μετάφραση). Ως μοριακοί παρτεναίρ του SAFB έχουν αναφερθεί οι hnRNP A1, U, K, I, C1/C2 και A2 (heterogenous nuclear ribonucleoprotein) (Weighart *et al.*, 1999) και κάποιες ισομορφές της hnRNPD (Arao *et al.*, 2000), οι οποίες συμμετέχουν σε διαδικασίες όπως η συμπύκνωση της χρωματίνης, το εναλλακτικό μάτισμα και η έξοδος του mRNA από τον πυρήνα (Stone *et al.*, 2003, Mahajan *et al.*, 2005).

Λόγω των παραπάνω αλληλεπιδράσεων ο SAFB θεωρήθηκε μέλος της οικογένειας hnRNP [για αυτό και η ονομασία του HAP (hnRNP A1 associated protein)]. Επιπλέον με τη μέθοδο των δύο υβριδίων η καρβοξυτελική περιοχή του SAFB1 (μέσω των RE διπεπτιδίων της) βρέθηκε να αλληλεπιδρά με τα RS διπεπτίδια των παραγόντων ματίσματος όπως ο ASF/SF2, SRp30c, U2AF35, SRp55 (Nayler *et al.*, 1998), ο SRp86 (Li *et al.*, 2003), SLM1 και Sam68 (Stoss *et al.*, 2004). Επίσης έχει επιβεβαιωθεί η αλληλεπίδρασή του με τις κινάσες SRPK1a και CLK2 και την τοποϊσομεράση II, οι οποίες φωσφορυλιώνουν διπεπτίδια αργινίνης/σερίνης σε παράγοντες ματίσματος (Nayler *et al.*, 1998, Nikolakaki *et al.*, 2001).

Δεδομένου ότι ο SAFB1 έχει βρεθεί να αλληλεπιδρά με παράγοντες του μηχανισμού επεξεργασίας του RNA καθώς και με την RNA πολυμεράση II, προτείνεται ότι η πρωτεΐνη αυτή εμπλέκεται στη δημιουργία του συμπλόκου

μεταγραφής «μεταγραφοσώματος» (transcriptosome) προσεγγίζοντας το εργοστάσιο του RNA (RNA factory) στις περιοχές S/MARS και προκαλώντας σύζευξη της δομής της χρωματίνης με την μεταγραφή και την επεξεργασία του RNA.

Άλλες αλληλεπιδράσεις

Έχει επιβεβαιωθεί η αλληλεπίδραση του SAFB1 μέσω της πλούσιας σε RE περιοχή του με την πρωτεΐνη RFP (TRIM 27), η οποία είναι μέλος της οικογένειας TRIM (tripartite motif superfamily) (Townson *et al.*, 2006). Η πρωτεΐνη RFP εκφράζεται σε διάφορα είδη κυττάρων καθώς και σε ορισμένους τύπους καρκινικών κυττάρων (Krutzfeld *et al.*, 2005), ενώ έχει δείχτει ότι λειτουργεί ως γενικός καταστολέας της μεταγραφής (Simono *et al.*, 2000) και εντοπίζεται στο ίδιο πρωτεϊνικό σύμπλοκο με τον υποδοχέα ERα χωρίς όμως να αλληλεπιδρά με αυτόν (Townson *et al.*, 2006).

Επίσης ο SAFB1 έχει δείχτει ότι αλληλεπιδρά *in vitro* και *in vivo* με την πρωτεΐνη ZO-2 (Zonula occludens 2), η οποία συμβάλλει στη δημιουργία ενδοθηλιακών και επιθηλιακών διακυτταρικών συνάψεων αλλά θεωρείται ότι συμμετέχει και στην πυρηνική σηματοδότηση (Trawger *et al.*, 2003).

Όσον αφορά τον SAFB2 έχει βρεθεί να αλληλεπιδρά *in vitro* και *in vivo* με τον SAFB1 μέσω των καρβοξυτελικών τους περιοχών, ενώ αλληλεπιδρά επιλεκτικά με τις πρωτεΐνες vimentin α και β, οι οποίες περιέχουν περιοχή SH3 και εμπλέκονται στην κυτταρική προσκόλληση, την οργάνωση του κυτταροσκελετού και τη ρύθμιση της κυτταρικής σηματοδότησης μέσω αυξητικών παραγόντων (Townson *et al.*, 2003).

A.2.2.5. Οι λειτουργίες του SAFB

Η μόνη λειτουργία του SAFB1 η οποία έχει επιβεβαιωθεί μέχρι σήμερα είναι η δράση του ως καταστολέας της μεταγραφής. Η λειτουργία του SAFB1 ως μεταγραφικός καταστολέας διαπιστώθηκε αρχικά όταν η ερευνητική ομάδα της Dr Oesterreich βρήκε ότι εμποδίζει την μεταγραφή του γονιδίου της Hsp27 μέσω της σύνδεσής του στον εκκινητή του, ο οποίος περιέχει στοιχεία απόκρισης στα

οιστρογόνα (estrogen response elements-ERE) και μετά από 13 νουκλεοτίδια ένα πλαίσιο TATA, όπου θεωρείται ότι προσδένεται ο SAFB1 (Oesterreich *et al.*, 1997).

Αργότερα ο SAFB1 αποδείχθηκε, από την ίδια ερευνητική ομάδα, ότι έχει την ικανότητα να ρυθμίζει την μεταγραφική ενεργότητα του υποδοχέα ERα καταστέλλοντας την δράση του (Oesterreich *et al.*, 2000). Λειτουργεί δηλαδή ως συγκαταστολέας του ERα μέσω της περιοχής καταστολής (repression domain-RD), η οποία εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό του άκρο, όπως έχει βρεθεί και για άλλους συγκαταστολείς (Smith *et al.*, 1993) και η οποία είναι διαφορετική της περιοχής μέσω της οποίας αλληλεπιδρά ο SAFB1 με τον υποδοχέα (ER interacting domain-EID). Συγκεκριμένα σε πείραμα που έγινε με κύτταρα MCF-7, τα οποία επιμολύνθηκαν με πλασμίδιο αναφοράς που περιέχει στοιχεία απόκρισης στα οιστρογόνα (ERE-TK-Luc reporter), με πλήρους μεγέθους SAFB1 και με SAFB1 από τον οποίο λείπει η περιοχή καταστολής RD (SAFB1ΔRD) παρατηρήθηκε ότι ο SAFB1 ανεξάρτητα από την παρουσία οιστραδιόλης καταστέλλει την μεταγραφική ενεργότητα του υποδοχέα ERα. Αντίθετα, παρουσία του SAFB1ΔRD με ή χωρίς προσθήκη συνδέτη η δραστηριότητα του υποδοχέα αυξάνεται (Townson *et al.*, 2004).

Επιπλέον, πείραμα μέτρησης της μεταγραφικής ενεργότητας του υποδοχέα ERα σε MCF-7 κύτταρα παρουσία SAFB1 πλήρους μεγέθους και SAFB1 από τον οποίο αφαιρέθηκε η RRM περιοχή μέσω της οποίας προσδένεται σε RNA (SAFB1ΔRRM), έδειξε ότι και οι δύο πρωτεΐνες είχαν την ικανότητα να καταστέλλουν την ενεργότητα του υποδοχέα. Επομένως για την κατασταλτική δράση του SAFB1 δεν είναι απαραίτητη η πρόσδεσή του στο RNA μέσω της κεντρικής RRM περιοχής του όπως συμβαίνει με άλλους συγκαταστολείς πυρηνικών υποδοχέων (Townson *et al.*, 2004).

Ακόμη η ανασταλτική αυτή δράση του SAFB1 δεν είναι άμεσα εξαρτώμενη από την αλληλεπίδρασή του με τον υποδοχέα ERα αλλά δρα ως γενικός καταστολέας της μεταγραφής όπως έχει δείξει και για τον SMRT, έναν άλλο συγκαταστολέα της μεταγραφής (Wong *et al.*, 1998). Αυτό επιβεβαιώθηκε σε πείραμα που έγινε σε κύτταρα CV-1 όπου χρησιμοποιήθηκαν το πλασμίδιο αναφοράς που αποκρίνεται στον παράγοντα GAL4 και οι πρωτεΐνες SAFB1 και SMRT σε σύντηξη με την περιοχή πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα GAL4. Όπως ο SMRT έτσι και ο SAFB1 ανέστειλε τη μεταγραφική ενεργότητα του γονιδίου αναφοράς κατά δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Αντίθετα, προσθήκη SAFB1 χωρίς την περιοχή GAL4 δεν προκαλούσε καταστολή της μεταγραφικής ενεργότητας, γεγονός το οποίο σημαίνει

ότι είναι απαραίτητη η πρόσδεση του SAFB1 στο DNA προκειμένου να δρα ως γενικός καταστολέας της μεταγραφής (Townson *et al.*, 2004).

Προτείνεται ότι η ανασταλτική δράση του SAFB1 δεν έγκειται σε παρεμπόδιση δέσμευσης του ERα στα ERE (estrogen response element) αλλά στο γεγονός ότι ο SAFB προκαλεί άμεση αναστολή της δράσης της πολυμεράσης II λόγω της αλληλεπίδρασής του με την καρβοξυτελική της περιοχή (Nayler *et al.*, 1998) ή έμμεσα μέσω της αλληλεπίδρασής του με τον μεταγραφικό παράγοντα TAFII68, ο οποίος είναι μέλος της οικογένειας TET και αλληλεπιδρά με τον παράγοντα TFII (transcription factor II) και την RNA πολυμεράση II (Bertolotti *et al.*, 1996). Η τελευταία άποψη ενισχύεται και από το γεγονός ότι όταν έγινε απαλοιφή της περιοχής του SAFB1, η οποία βρέθηκε να αλληλεπιδρά μέσω του συστήματος των δύο υβριδίων με τον μεταγραφικό παράγοντα TAFII68 (αμινοξέα 720-915), δεν παρατηρήθηκε αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του υποδοχέα (Townson *et al.*, 2004).

Μια άλλη ερευνητική ομάδα, οι Debril *et al.*, έδειξε ότι εκτός από τον ERα ο SAFB1 αναστέλλει κυρίως με την καρβοξυτελική του περιοχή την μεταγραφική δραστηριότητα ενός μεγάλου αριθμού πυρηνικών υποδοχέων, με τους οποίους και αλληλεπιδρά, όπως οι PPARα, PPARβ και PPARγ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor), FXRα (Farsenoid X Receptor), RORα1 (Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor), VDR (Vitamin D Receptor), SF-1 (Steroidogenic factor), LHR-1 (Luteinizing Hormone Receptor) ανεξάρτητα από την παρουσία συνδέτη (Debril *et al.*, 2005).

Επιπλέον έχει δειχτεί ότι ο αναστολέας των απακετυλασών (HDAC) Τριχοστατίνη (TSA), μειώνει την αναστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του ERα που επάγει ο SAFB1 (Oesterreich *et al.*, 2000b). Πειράματα όμως στα οποία χρησιμοποιήθηκαν άλλοι πυρηνικοί υποδοχείς όπως οι PPARγ και FXRα, η παρουσία διαφόρων αναστολέων της δράσης των HDACs, όπως η TSA, η νικοτιναμίδη και ο MS-275 δεν κατάφεραν να μειώσουν την αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας των συγκεκριμένων υποδοχέων που προκαλείται με την προσθήκη SAFB1. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα συνάγεται το συμπέρασμα ότι ο SAFB1 στρατολογεί γενικά διαφορετικές HDACs ή διαφορετικούς συγκαταστολείς της μεταγραφής ανάλογα με το κυτταρικό περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται καθώς και ανάλογα με τον πυρηνικό υποδοχέα και το είδος του συνδέτη που χρησιμοποιείται κάθε φορά (Debril *et al.*, 2005).

Στους συγκαταστολείς αυτούς περιλαμβάνεται η CHD1 (ChromoDomain protein 1), μια πρωτεΐνη η οποία θεωρείται ότι παίζει ρόλο στην οργάνωση της χρωματίνης και τη ρύθμιση της μεταγραφής μέσω αλληλεπίδρασης με S/MAR περιοχές και απακετυλάσες αντίστοιχα. Ο SAFB1 έχει βρεθεί επίσης να αλληλεπιδρά μέσω της RD περιοχής του με την RD ενός άλλου συγκαταστολέα του ER, του N-CoR (nuclear hormone receptor corepressor) *in vitro* και *in vivo* (Jiang *et al.*, 2006). Η συγκεκριμένη όμως αλληλεπίδραση είναι απαραίτητη εν μέρει για την μεταγραφική καταστολή του ERα, όπως αποδείχθηκε μετά από μείωση της έκφρασης του N-CoR σε κύτταρα MCF-7 μέσω της τεχνικής του siRNA (Jiang *et al.*, 2006). Αν και ο SAFB δεν έχει βρεθεί να αλληλεπιδρά με κάποια απακετυλάση, προφανώς συνδέεται έμμεσα με αυτή μέσω της αλληλεπίδρασής του με τον N-CoR, ο οποίος έχει αποδειχτεί ότι προσελκύει σύμπλοκα απακετυλασών (Jiang *et al.*, 2006, Oesterreich *et al.*, 2000b). Το ενδιαφέρον είναι ότι η περιοχή της αλληλεπίδρασης του N-CoR με την HDAC3 είναι διαφορετική από αυτήν του SAFB1, οπότε οι αλληλεπιδράσεις αυτές δεν είναι αμοιβαία ανταλλασσόμενες αλλά συμβαίνουν ταυτόχρονα (Jiang *et al.*, 2006).

Και για τον SAFB2 έχει δείχτεί ότι αναστέλλει την μεταγραφική δραστηριότητα του υποδοχέα ERα μέσω του καρβοξυτελικού του άκρου (αμινοξέα 600-953), ενώ μαζί με τον SAFB-1 εμφανίζει συνεργιστική ικανότητα αναστολής, γεγονός το οποίο σημαίνει ότι και οι δύο πρωτεΐνες δρουν κατασταλτικά μέσω ενός κοινού μηχανισμού (Townson *et al.*, 2003, Townson *et al.*, 2004). Επιπλέον, εκτός από τον SAFB1, και ο SAFB2 επηρεάζει την επιλογή της θέσης μάτισματος όπως στην περίπτωση του γονιδίου tra2β όπου παρεμποδίζει το μάτισμα ενός εξονίου του (Sergeant *et al.*, 2006) (Εικόνα 28).

A.2.2.6. SAFB και παθογένεια

Ο SAFB1 παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων και συγκεκριμένα αποδείχθηκε ότι η υπερέκφρασή του σε καρκινικά κύτταρα μαστού αναστέλλει την ανάπτυξή τους και δημιουργεί κύτταρα με πολλαπλούς πυρήνες, ανευπλοειδία και απώλεια ετεροζυγωτίας ως προς το χρωμόσωμα 19p13 σε διάφορες κυτταροκαλλιέργειες καρκινικού μαστού (Townson *et al.*, 2003). Επιπλέον, καρκινικά κύτταρα με υψηλά επίπεδα SAFB1 καθλώνουν

τον SAFB1 στο κυτταρόπλασμα και ο κυτταρικός κύκλος διακόπτεται στην G2/M φάση με αποτέλεσμα ένα μικρό κλάσμα των κυττάρων να βρίσκεται στην S φάση (Townson *et al.*, 2003, Oesterreich *et al.*, 2003), ενώ προσθήκη cis-platin σε κύτταρα MCF-7 μαστού, η οποία προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης σε μικρές δόσεις και κυτταρικό θάνατο σε μεγαλύτερες, οδηγεί σε δημιουργία συμπλόκου, όπου εντοπίζονται περιοχές S/MARs, ο SAFB1, ο ERα, ο hnRNPK και η HDAC1 (Samuel *et al.*, 1998).

Πειράματα απαλοιφής του γονιδίου του SAFB1 σε ποντίκια είχαν ως αποτέλεσμα υψηλό ποσοστό θανάτων πριν και μετά τη γέννηση, νανισμό και υπογονιμότητα τόσο στα θηλυκά όσο και στα αρσενικά πειραματόζωα. Όλες αυτές οι δυσλειτουργίες πιθανόν οφείλονται σε μεταβολές που παρατηρούνται στα επίπεδα του IGF-I (Insulin-like Growth Factor 1) και των φυλετικών ορμονών σε συνδυασμό με την απώλεια αναστολής της μεταγραφικής δραστηριότητας των υποδοχέων των ορμονών (Ivanova *et al.*, 2005).

Επιπλέον έχει δειχτεί ότι απαλοιφή του γονιδίου του SAFB1 σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες ποντικού αρχικά οδηγεί σε αθανатоποίηση και αναστολή της γήρανσης των κυττάρων μέσω αύξησης των επιπέδων έκφρασης του TBX2, ο οποίος με τη σειρά του μειώνει τα επίπεδα έκφρασης του p19ARF. Και οι δύο αυτές πρωτεΐνες εμπλέκονται στη ρύθμιση της ανάπτυξης και γήρανσης των κυττάρων (Dobrzycska *et al.*, 2006).

Τέλος ο SAFB1 θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό και στην διαφοροποίηση των κυττάρων, δεδομένου ότι τα επίπεδα έκφρασής του ελαττώνονται στα αρχικά στάδια της διαφοροποίησης των κυττάρων του λιπώδους ιστού και των εντεροκυττάρων (Debril *et al.*, 2005).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Οι SR πρωτεϊνικές κινάσες, οι οποίες θεωρούνται κύριοι ρυθμιστές του τόσο του συστατικού όσου και του εναλλακτικού ματίσματος, φωσφορυλιώνουν τα υποστρώματά τους σε σερίνες που βρίσκονται σε περιοχές πλούσιες σε αργινίνη και σερίνη (RS μοτίβα). Μεταξύ των καλύτερα χαρακτηρισμένων υποστρωμάτων τους είναι η πολυμελής οικογένεια των αποκαλούμενων SR πρωτεϊνών, οι οποίες αποτελούν λειτουργικά μέλη των συμπλόκων ματίσματος του mRNA. Έχουν όμως περιγραφεί και υποστρώματά τους τα οποία δεν φαίνεται να έχουν άμεση σχέση με το μάτισμα (LBR, πρωταμίνη P1) προσδίδοντας έτσι μια πολυδιάστατη λειτουργικότητα στις SR κινάσες. Επιπλέον το γεγονός ότι έχουν βρεθεί αντίστοιχες κινάσες και σε οργανισμούς όπου δεν συμβαίνει μάτισμα, μάς οδηγεί στην υπόθεση ότι οι SR κινάσες συμμετέχουν σε πληθώρα βασικών κυτταρικών λειτουργιών για πολλές από τις οποίες ο ρόλος τους παραμένει ασαφής.

Η SRPK1a αποτελεί ένα νέο μέλος της οικογένειας των SR κινασών. Προέρχεται από εναλλακτικό μάτισμα του μεταγράφου του γονιδίου της SRPK1 με αποτέλεσμα να είναι 171 αμινοξέα μακρύτερη από την SRPK1 στο αμινοτελικό της άκρο (Nikolakaki *et al.*, 2001). Παρόλο που η SRPK1a φαίνεται να διαφέρει ελάχιστα από την SRPK1 όσον αφορά την ενζυμική δράση, την εξειδίκευση και την έκφρασή της στους διάφορους ιστούς, το επιμηκυμένο N-τελικό της άκρο φαίνεται να εμπλέκεται σε πληθώρα αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες του κυττάρου μεταξύ των οποίων και η πρωτεΐνη της πυρηνικής μήτρας SAFB1 (Nikolakaki *et al.*, 2001).

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να διερευνηθεί η βιολογική σημασία της μοριακής αλληλεπίδρασης της SRPK1a, με τον πρωτεϊνικό παράγοντα SAFB1, ο οποίος δεν περιέχει μοτίβο RS και άρα δεν αποτελεί φυσικό υπόστρωμά της. Συγκεκριμένα η εργασία αυτή εντοπίστηκε στη διερεύνηση της ειδικής αλληλεπίδρασης της SRPK1a με τον παράγοντα SAFB1 α) με έλεγχο της επίδρασης του SAFB1 στη δράση της κινάσης β) με έλεγχο της επίδρασης του SAFB1 στον υποκυτταρικό εντοπισμό της κινάσης γ) με διερεύνηση νέων μοριακών αλληλεπιδράσεων του SAFB1.

Προκειμένου να διερευνηθεί εάν ο παραγόντας SAFB1 επηρεάζει τη δράση της κινάσης SRPK1a, εκτελέστηκαν δοκιμασίες *in vitro* φωσφορυλίωσης διαφόρων

υποστρωμάτων της κινάσης, απουσία και παρουσία SAFB1. Παράλληλα ελέγχθηκε η επίδραση του παράγοντα SAFB1 και στη δράση της SRPK1. Επιπλέον ελέγχθηκε η επιρροή στη δράση των δύο κινασών του ομόλογου με τον SAFB1 παράγοντα, SAFB2.

Ο παράγοντας SAFB1 είναι πρωτεΐνη της πυρηνικής μήτρας και έχει αναφερθεί να συνεντοπίζεται με παράγοντες ματίσματος σε μεγαλομοριακές υποπυρηνικές δομές. Προκειμένου να διερευνηθεί εάν ο παράγοντας SAFB1 επηρεάζει τον υποκυτταρικό εντοπισμό της SRPK1a, πραγματοποιήθηκαν πειράματα φθορισμού-ανοσοφθορισμού. Αντίστοιχα πειράματα έγιναν και με την SRPK1, ενώ παράλληλα μελετήθηκε και η επίδραση του παράγοντα SAFB2 στον εντοπισμό των δύο κινασών.

Τέλος, έγινε αναζήτηση νέων μοριακών παρτενέρ του SAFB1 με το σύστημα των δύο υβριδίων στον *S. cerevisiae.*, προκειμένου να βρεθούν εναλλακτικά υποστρώματα της κινάσης SRPK1a (πρωτεΐνες που περιέχουν περιοχή RS) ή και άλλες πρωτεΐνες που πιθανόν συμμετέχουν στο ίδιο σύμπλοκο με την κινάση και τον SAFB1. Οι πληροφορίες που θα προκύψουν από το συγκεκριμένο πείραμα θα βοηθήσουν στην καλύτερη κατανόηση της λειτουργικής σχέσης του SAFB1 με την SRPK1a.

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B.1. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ

Για την κλωνοποίηση και έκφραση διαφόρων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω πλασμίδια:

B.1.1. Κενοί πλασμιδιακοί φορείς

A) pGBT9. Περιέχει την περιοχή σύνδεσης με το DNA του μεταγραφικού παράγοντα GAL4 σε συνέχεια με την περιοχή που αποτελείται από πολλαπλές θέσεις κλωνοποίησης (MCS: Multiple Cloning Site). Προσδίδει με μετασχηματισμό του σε κύτταρα σακχαρομύκητα πρωτοτροφία για το αμινοξύ τρυπτοφάνη (Trp).

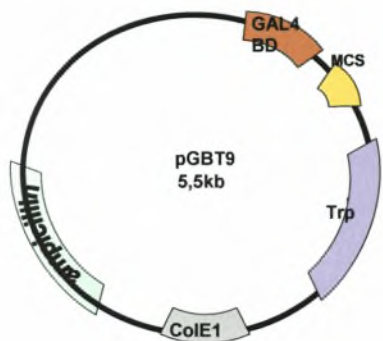
B) pVP16. Περιέχει την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής του μεταγραφικού παράγοντα VP16 σε συνέχεια με την περιοχή που αποτελείται από πολλαπλές θέσεις κλωνοποίησης (MCS). Προσδίδει με μετασχηματισμό του σε κύτταρα σακχαρομύκητα πρωτοτροφία για το αμινοξύ λευκίνη (Leu).

Γ) pGEX-4T-1-Tev (Amersham Pharmacia). Το πλασμίδιο αυτό περιέχει την περιοχή κωδικοποίησης της μεταφοράς της γλουταθειόνης (GST) στην 5' περιοχή του MCS.

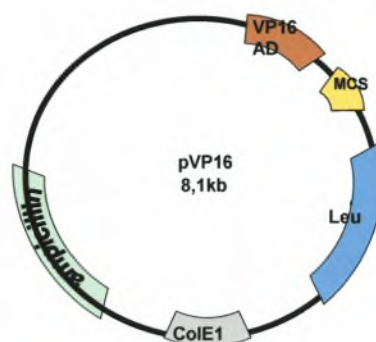
Δ) pEGFP-C1 (Clontech). Ο συγκεκριμένος φορέας δίνει τη δυνατότητα έκφρασης της κλωνοποιημένης πρωτεΐνης σε ευκαρυωτικά κύτταρα λόγω του ευκαρυωτικού επαγωγέα CMV που περιέχει. Επίσης περιέχει τη φθορίζουσα GFP πρωτεΐνη στην 5' περιοχή του MCS.

E) pCMV-FLAG-2 επιτρέπει την έκφραση των κλωνοποιημένων γονιδίων σε ευκαρυωτικά κύτταρα θηλαστικών ως πρωτεΐνες σύντηξης στο N-τελικό τους άκρο με την ακολουθία Met-FLAG (Met-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys). Η μεταγραφή των τμημάτων DNA καθοδηγείται από τη ρυθμιστική περιοχή του προαγωγού του human cytomegalovirus.

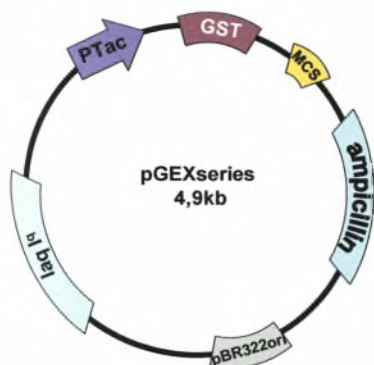
A



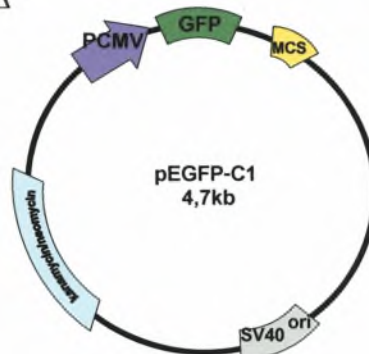
B



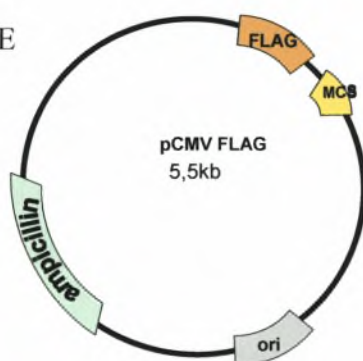
Γ



Δ



E



Σχήμα 1: Πλασμιατικοί φορείς χωρίς ένθεμα: Φαίνονται σχηματικά οι υποκινητές των πλασμιδίων, οι περιοχές έναρξης της αντιγραφής (ori), τα γονίδια ανθεκτικότητας του κάθε πλασμιδίου σε αντιβιοτικά, οι περιοχές κωδικοποίησης καθώς και η περιοχή πολλαπλής κλωνοποίησης (MCS).

Οι πλασμιδιακοί φορείς pFLAG-CMV-2/SRPK1, pFLAG-CMV-2/SRPK1a, pGEX-2T/LBRNt (1-205 αμινξέα) (Nikolakaki *et al.*, 1996), pGEX-2T/P2PR και το συνθετικό πεπτίδιο RS₀ (⁷⁰SSPSRRSRSRSRSPGRPAKG⁹¹) (Papoutsopoulou *et al.*, 1999) μάς παραχωρήθηκαν ευγενικά από την κα Νικολακάκη Ελένη (Επικ. Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΑΠΘ).

Ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-2TK/SAFB1C (αμινοξέα 623-915) (Townson *et al.*, 2004) μάς παραχωρήθηκε ευγενικά από την Δρ Steffi Oesterreich.

Οι πλασμιδιακοί φορείς pEGFP-pcDNA3/SAFB1 και pEGFP-pcDNA3/SAFB2 (πλήρους μεγέθους) μάς παραχωρήθηκαν ευγενικά από τον Δρ Elliot (Sergeant *et al.*, 2006).

Ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-4T1/ERH (αμινοξέα 1-104) μάς παραχωρήθηκε ευγενικά από τον Dr Kozlowski (Smyk *et al.*, 2006).

B.2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

-TOP10 (InVitrogen) : Τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για κάθε σχεδόν εφαρμογή κλωνοποίησης. Παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη στρεπτομυκίνη.

-BL21 RIL (Stratagene): Τα συγκεκριμένα κύτταρα *E.coli* χρησιμοποιήθηκαν για έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Από τα κύτταρα αυτά απουσιάζουν οι πρωτεάσες Lon και OmpT. Επιπλέον τα κύτταρα αυτά επιτρέπουν την έκφραση υψηλών επιπέδων tRNA που είναι σπάνια στα βακτήρια (αυτά των αργίνινης, ισολευκίνης και λευκίνης) μέσω του RIL πλασμιδίου.

-BL21(DE3)RIL (Stratagene): Έχουν ακριβώς τα ίδια χαρακτηριστικά με το προηγούμενο κυτταρικό στέλεχος με τη διαφορά ότι στο γονιδίωμα τους περιέχουν το DE3 γονίδιο για την έκφραση της T7 RNA πολυμεράσης το οποίο βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή του lac οπερονίου. Χρησιμοποιούνται για την έκφραση πλασμιδίων που βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο του T7 υποκινητή (pET σειρά).

-KC8 (Clontech): Βακτηριακό στέλεχος τροποποιημένο έτσι ώστε να μην παράγονται τα αμινοξέα λευκίνη, τρυπτοφάνη, ουρακίλη, ιστιδίνη και αδενίνη. Παρόλο που τα κύτταρα αυτά έχουν χαμηλή απόδοση μετασχηματισμού από πλασμίδια, είναι χρήσιμα στην περίπτωση που θέλουμε να διαχωρίσουμε ένα πλασμίδιο από κάποιο

άλλο. Συγκεκριμένα, η πρωτοτροφία σε κάποιο αμινοξύ που προσδίδει στα κύτταρα το πλασμίδιο αυτό, π.χ. πρωτοτροφία για το αμινοξύ λευκίνη και η καλλιέργεια των κυττάρων στο ανάλογο θρεπτικό μέσο επιλογής, βοηθάει στην επιλογή των κυττάρων που έχουν μετασχηματιστεί με το επιθυμητό πλασμίδιο.

Το στέλεχος του σακχαρομύκητα που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

PJ69-4A (P. James, J. Halladay Genetics 1996): Τα συγκεκριμένα κύτταρα του *S. cerevisiae* χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα στάδια της εφαρμογής του συστήματος των δύο υβριδίων. Περιέχουν ενσωματωμένα στο γονιδιώμά τους τα γονίδια αναφοράς LacZ, ADE2 και HIS3 των οποίων ο υποκινητής περιλαμβάνει θέσεις δέσμησης του μεταγραφικού παράγοντα GAL4.

B.3. ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ

Οι αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι:

-νοηματικός εκκινητής(sense primer):

5S1CΔRE [5' -TTTGGATCCGCGGTGCGGCGGC-3']

αντινοηματικός εκκινητής (antisense primer):

3S1CΔRE: [5' -TTGAATTCTCAGTAGCGGCGAGTGAA-3']

-νοηματικός εκκινητής(sense primer):

5'S2C [5' - TTTGGATCCGAGCGCGAGCAGCGGG-3']

αντινοηματικός εκκινητής (antisense primer):

3'S2C [5' -TTGAATTCTTAGTAGCGGCGGGTGAA-3']

-νοηματικός εκκινητής(sense primer):

5'S1bS2 [5' -TTGAATTCGAGCTGAAACCCGGAC-3']

αντινοηματικός εκκινητής (antisense primer):

3'S1bS2 [5' -TTTGGATCCCACGACCGTCCGCTC-3']

-νοηματικός εκκινητής(sense primer):

safb/EcoRI [5' -TGGAATTCGGCAAGATGATCTCGGT-3']

αντινοηματικός εκκινητής (antisense primer):

safb/BamHI [5' -CGGGATCCATCACTGGGTCTGCT-3']

Η ανάλυση της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων έγινε στην εταιρεία MWG.

B.4. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

Η κλωνοποίηση DNA σε πλασμιδιακούς φορείς βασίζεται στην ικανότητα του πλασμιδιακού DNA να διασπάται σε συγκεκριμένες θέσεις μετά από πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού και να συνδέεται με ένα ξένο τμήμα DNA που έχει υποστεί την ίδια κατεργασία. Τα πλασμίδια μπορούν να αναπτύσσονται ημιαυτόνομα σε βακτήρια και φέρουν γονίδια που προσδίδουν αντίσταση σε αντιβιοτικά. Το πλασμιδιακό DNA καθώς και το ξένο τμήμα DNA που έχουν κατεργαστεί με τα ίδια ένζυμα περιορισμού μπορούν να επανακυκλοποιηθούν συνδεδεμένα ομοιοπολικά στα άκρα τους μέσω της δράσης της λιγάσης του DNA. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο μπορεί να εισαχθεί σε κύτταρα τα οποία στη συνέχεια αναπτύσσονται παρουσία κατάλληλων αντιβιοτικών τα οποία επιτρέπουν την επιλογή κυττάρων που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο έναντι αυτών που δεν το περιέχουν.

B.4.1. Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων και κάτω από ορισμένες συνθήκες προκαλούν την πέψη του DNA σε μικρότερα τμήματα. Ανάλογα με την ενεργότητα (Unit/μl) του κάθε ενζύμου καθορίζεται και η ποσότητα που χρησιμοποιείται σε μια αντίδραση πέψης. Ισχύει ότι 1 unit ενζύμου αντιστοιχεί στην ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για να πέσει πλήρως 1μg DNA σε όγκο αντίδρασης 50μl σε μια ώρα και σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα.

Η πέψη με ένζυμα περιορισμού χρησιμοποιήθηκε είτε για τον έλεγχο του μεγέθους των κομματιών DNA που κλωνοποιήθηκαν και τον σωστό προσανατολισμό τους ή για την απομόνωση συγκεκριμένων κομματιών που προορίζονται για κλωνοποίηση. Για μια αντίδραση πέψης σε τελικό όγκο 20 μl, χρησιμοποιείται 1μg πλασμιδιακού DNA, περίσσεια του αντίστοιχου ενζύμου και 2 μl κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος για κάθε ένζυμο. Το υπόλοιπο του όγκου της αντίδρασης συμπληρώνεται με αποστειρωμένο και δις απεσταγμένο H₂O (ddH₂O). Η επώαση γίνεται για τουλάχιστον 1-2 ώρες στην καθορισμένη για κάθε ένζυμο θερμοκρασία.

B.4.2. Αποφωσφορυλίωση γραμμικού πλασμιδιακού DNA

Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται η αφαίρεση της 5' φωσφορικής ομάδας από μονόκλιωνα ή δίκλιωνα τμήματα DNA (κυρίως πλασμίδια) μετά από την πέψη με μια περιοριστική ενδονουκλεάση, εμποδίζοντας την επανασύνδεσή του.

➤ Η αποφωσφορυλίωση γίνεται με τη χρήση του ενζύμου της αλκαλικής φωσφατάσης CIP (New England BioLabs).

-Προσθέτουμε στο μίγμα της πέψης 30 Units αλκαλικής φωσφατάσης

εντέρου βοός (CIP) 10000 unit/ml (New England Biolabs)

-Επωάζουμε για 1 ώρα στους 37⁰C.

Απενεργοποιούμε τη CIP με προσθήκη 5mM EDTA (pH 8)

Θερμαίνουμε την αντίδραση για 10 λεπτά στους 75⁰C.

B.4.3. Αντίδραση λιγάσης

Η DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T4 καταλύει την δημιουργία φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ 3'-υδροξυλικών και 5'-φωσφορικών άκρων. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η σύνδεση μεταξύ 2 τμημάτων δίκλιονου DNA με την προϋπόθεση ότι έχουν συμπληρωματικά ή τυφλά 3' και 5' άκρα.

➤ Για την αντίδραση της λιγάσης, χρησιμοποιήθηκαν

- Πλασμιδιακός φορέας και ένθεμα σε μοριακή αναλογία 1 /3,

-2,5 Units λιγάσης T4 (5 Unit/μl, Fermentas)

-2 μl ρυθμιστικού διαλύματος λιγάσης

-ddH₂O ώστε ο τελικός όγκος να είναι 20μl.

Το μίγμα επώαστηκε 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και η απενεργοποίηση της λιγάσης έγινε στους 65⁰C για 10 λεπτά.

B.4.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Τα διάφορα τμήματα DNA διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Συγκέντρωση αγαρόζης 1% είναι ιδανική για το διαχωρισμό κομματιών DNA από 500 βάσεις έως 7000 βάσεις. Για την παρασκευή προστίθεται 1% αγαρόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE (4 mM Tris-οξικό, 1 mM EDTA) και ακολουθεί θέρμανση στους 100⁰ C. Όταν η θερμοκρασία του διαλύματος μειωθεί προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο (0,5 μg/ml) το οποίο έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται

ανάμεσα στις βάσεις του DNA. Στη συνέχεια το διάλυμα αγαρόζης αποχύνεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης για να πολυμεριστεί σε πηκτή. Προστίθεται διάλυμα TAE στη συσκευή ώστε να καλυφθεί η πηκτή. Τα δείγματα DNA που θα ηλεκτροφορηθούν αναμιγνύονται με μίγμα χρωστικών: 5% γλυκερόλη, 0,42% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,42% μπλε του ξυλενίου τοποθετούνται στις εγκοπές της πηκτής και η ηλεκτροφορούνται σε 100 V για 20 λεπτά τουλάχιστον. Τα τμήματα του DNA πάνω στην πηκτή ανιχνεύονται μέσω της ιδιότητας του βρωμιούχου αιθιδίου να απορροφά υπεριώδη ακτινοβολία και να την επανεκπέμπει στο κόκκινο ορατό φάσμα.

B.4.5. Απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης

Για την απομόνωση και τον καθαρισμό τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε το Gel Extraction Kit της Qiagen. Το κομμάτι αγαρόζης που περιέχει το προς απομόνωση DNA αφαιρείται από την πηκτή με αποστειρωμένο νυστέρι. Προκειμένου να αποπολυμεριστεί η αγαρόζη και να απομονωθεί το DNA γίνεται θέρμανση του κομματιού με διάλυμα QG στους 50⁰ C για 10 λεπτά. Προστίθεται ισοπροπανόλη και το διάλυμα μεταφέρεται σε ειδική στήλη (silica gel) στην οποία το DNA δεσμεύεται κάτω από συνθήκες υψηλής αλατότητας και pH 7,5. Η απομάκρυνση των μη δεσμευμένων στη στήλη συστατικών γίνεται με πλύση με διάλυμα PE. Η έκλυση του δεσμευμένου στη στήλη DNA γίνεται με 30 μl ddH₂O σε pH 8.

B.4.6. Προσδιορισμός συγκέντρωσης DNA

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA γίνεται με μέτρηση της απορρόφησης στα 260nm. Παράλληλα, γίνεται μέτρηση της απορρόφησης στα 280nm για να προσδιοριστεί η καθαρότητα του DNA. Απορρόφηση ίση με 1 αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 50 μg/ml δίκλωνου DNA κι επομένως η συγκέντρωση του δείγματος DNA υπολογίζεται ως εξής: Συγκέντρωση DNA = 50μg/ml x A₂₆₀ x παράγοντας αραίωσης. Στη συνέχεια, γίνεται μέτρηση της απορρόφησης στα 280nm (A₂₈₀) και υπολογίζεται ο λόγος A₂₆₀ / A₂₈₀. Για το καθαρό από προσμίξεις DNA ο λόγος A₂₆₀ / A₂₈₀ είναι μεταξύ 1,8-2,0.

B.4.7. Παρασκευή βακτηρίων *E.coli* δεκτικών στην εισαγωγή πλασμιδιακού DNA

Στη συγκεκριμένη τεχνική τα βακτήρια εκτίθενται σε υψηλές συγκεντρώσεις συγκεκριμένων κατιόντων και έτσι οι μεμβράνες των κυττάρων γίνονται διαπερατές σε ξένο DNA. Με την μέθοδο που ακολουθεί δημιουργούνται δεκτικά βακτήρια (TOP10, XL1-Blue και άλλα βακτήρια), τα οποία μετά από κατεργασία με ψυχρά διαλύματα CaCl_2 και ακολούθως θερμοασμένα μπορούν να προσλάβουν το πλασμίδιο επιλογής.

Διαδικασία

1. Παίρνουμε μια αποικία από πιάτο ή από διάλυμα αποθήκευσης βακτηρίων με γλυκερόλη (glycerol stock) που βρίσκεται στους -80°C και εμβολιάζουμε καλλιέργεια των 5ml TYM θρεπτικού υλικού (στην οποία έχει προστεθεί 5 μl Streptomycin 100μg/μl στη περίπτωση των TOP10).
2. Ανάδευση 16 ώρες περίπου (O/N, overnight) στους 37°C (προαιρετικό στάδιο): Από την O/N καλλιέργεια παίρνουμε 30 λ και τα προσθέτουμε σε 3ml φρέσκου χωρίς αντιβιοτικά TYM θρεπτικού υλικού (αραίωση 1:100) και τα αφήνουμε να επωαστούν με ανάδευση στους 37°C για 2-3 ώρες.
3. Με TYM μηδενίζουμε το φωτόμετρο
4. Προσθέτουμε 250 λ από την καλλιέργεια σε 50 ml TYM χωρίς αντιβιοτικά (αραίωση 1:250) και επωάζουμε με ανάδευση στους 37°C μέχρι να μεγαλώσουν και να φτάσουν $\text{OD}_{600\text{nm}}=0,350-0,400$
5. Φυγοκεντρούμε στα 3000 rpm για 5min (4000xg) στους 4°C
6. Πετάμε το υπερκείμενο και το ίζημα των βακτηρίων επανααιωρείται σε 25ml (μισό του αρχικού όγκου καλλιέργειας) TFB-I διάλυμα
7. Επωάζουμε για 10 min στον πάγο
8. Φυγοκεντρούμε στα 3000rpm για 5min (4000xg) στους 4°C
9. Πετάμε το υπερκείμενο και το ίζημα των βακτηρίων επανααιωρείται σε 2ml (1:25 του αρχικού όγκου καλλιέργειας) TFB-II διάλυμα 60 min στον πάγο
10. Προχωρούμε στο μετασχηματισμό των βακτηρίων ή
11. Αποθηκεύουμε σε δείγματα όγκου 200μl σε σωλήνες μικροφυγόκεντρου (τύπου erpendorf) στους -80°C .

Stock διαλύματα(1M)

TYM	TFB-I	TFB-II
2% Tryptone	30 mM CH ₃ COOK	10 mM MOPS
0.5% Yeast Extract	50 mM MnCl ₂	75 mM CaCl ₂
0.1 M NaCl	100 mM KCl	10 mM KCl
10 mM MgSO ₄	10 mM CaCl ₂	20% Glycerol
	15% Glycerol	
	pH 7.0	pH 7.0
αποστείρωση	αποστείρωση	Filter sterile

B.4.8. Μετασηματισμός βακτηρίων

Ο μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων E.coli με το καταλληλό πλασμιδιακό DNA (0.05-1μg) γίνεται ως εξής:

1. Τοποθετούμε τους σωλήνες στους 42 °C για 2 min.
2. Προσθέτουμε 1 ml LB χωρίς αντιβιοτικά και αφήνεται για επώαση 1 ώρα στους 37 °C.
3. Φυγοκεντρούμε στα 5000 rpm (3000xg) για 3min
4. Αφαιρούμε το υπερκείμενο εκτός από τα τελευταία 100λ.
5. Επανααιωρούμε τα κύτταρα και τα επιστρώνουμε σε άγαρ πιάτο με κατάλληλο θρεπτικό υλικό που περιέχει αντιβιοτικά για επιλογή (Αμπικιλίνη, τελική συγκέντρωση 100μg/ml)

Παρασκευή υγρού θρεπτικού μέσου LB (1 Λίτρο)

Ζυγίζουμε 5g Yeast Extract, 10g Tryptone και 5g NaCl και τα διαλύουμε σε 1λίτρο απεσταγμένο νερό σε δοχείο ζέσεως. Μοιράζουμε σε μπουκάλια τύπου Pyrex και τα αποστειρώνουμε στο αυτόκαυστο για 15 λεπτά στους 120⁰C.

Παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου LB (1 Λίτρο)

Ζυγίζουμε: 5g Yeast Extract, 10g Tryptone, 5g NaCl και 20g Agar και τα διαλύουμε σε 1λίτρο απεσταγμένο νερό σε μπουκάλι τύπου Pyrex. Αποστειρώνουμε στο αυτόκαυστο για 15 λεπτά στους 120⁰C.

B.5. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

B.5.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας

B.5.1.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση (mini-preparation)

1. Επιάζουμε ολονύχτια καλλιέργεια 3mL κυττάρων E.coli σε θρεπτικό μέσο LB.
2. Αποχύνουμε σε σωληνάκι φυγοκέντρου (1,5 mL) 1,5mL καλλιέργειας.
3. Φυγοκεντρούμε στις 14.000rpm (eppendorf 5417C, rotor: F45-30-11) για 12sec.
4. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε το υπόλοιπο της καλλιέργειας (1,5mL) πάνω στο ίζημα.
5. Φυγοκεντρούμε στις 14.000rpm για 12sec.
6. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο, προσθέτουμε 300μL TENS και αναδεύουμε σε κυκλοτερή αναδευτήρα (vortex).
7. Προσθέτουμε 150μL 3M Οξικού Νατρίου (CH₃COONa) και αναδεύουμε σε κυκλοτερή αναδευτήρα (vortex).
8. Φυγοκεντρούμε στις 14.000rpm για 2min και μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε καινούργιο σωληνάκι φυγοκέντρου (1,5 mL).
9. Εκχυλίζουμε με φαινόλη : χλωροφόρμιο (1:1) (προαιρετικά).
10. Προσθέτουμε 1mL 100% αιθανόλη, αναδεύουμε και ψύχουμε στους -20oC για 30min.
11. Φυγοκεντρούμε στις 14.000rpm για 5min.
12. Απομακρύνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο. Το ίζημα που προκύπτει είναι μικρό και λευκό.
13. Προσθέτουμε 1mL 70% αιθανόλη και φυγοκεντρούμε στις 14.000rpm για 1min.
14. Απομακρύνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο, στεγνώνουμε το ίζημα και επαναδιαλύουμε σε 20μL δις αποσταγμένου H₂O ή TE.

Διάλυμα TENS

0,1N NaOH

0,5% SDS in TE

Διάλυμα TE

10mM Tris pH 7,5

1mM EDTA

B.5.1.2 Απομόνωση και καθαρισμός πλασμιδιακού DNA με τη γρήση του Spin Miniprep Kit της Qiagen

Το πρωτόκολλο αυτό είναι σχεδιασμένο για απομόνωση έως και 20μg πλασμιδιακού DNA από ολονύχτιες υγρές καλλιέργειες 1-5 mL κυττάρων E.coli σε θρεπτικό μέσο LB.

1. Επανααιωρούμε το βακτηριακό ίζημα της υγρής καλλιέργειας σε 250μL διαλύματος P1+RNase A.
2. Αναδεύουμε μέχρι τα κύτταρα να αιωρηθούν καλά και αφού το διάλυμα γίνει ομοιογενές, μεταφέρουμε σε σωληνάκι φυγοκέντρου (1,5 mL).
3. Προσθέτουμε 250μL διαλύματος P2 και ανακινούμε.
4. Προσθέτουμε 350μL διαλύματος N3 και ανακινούμε.
5. Φυγοκεντρούμε* για 10min.
6. Περνάμε το υπερκείμενο στη στήλη (QIAprep spin column).
7. Φυγοκεντρούμε για 30-60sec και απορρίπτουμε το υγρό που διαπέρασε τη στήλη.
8. Ξεπλένουμε τη στήλη με 0,5mL διαλύματος PB, επαναφυγοκεντρούμε για 30-60sec και απορρίπτουμε το υγρό που διαπέρασε τη στήλη.
9. Ξεπλένουμε τη στήλη με 0,75mL διαλύματος PE και επαναφυγοκεντρούμε για 30-60sec.
10. Απορρίπτουμε το υγρό που διαπέρασε τη στήλη και φυγοκεντρούμε για 1 min να φύγουν τα υπολείμματα.
11. Τοποθετούμε τη στήλη σε καθαρό σωληνάκι φυγοκέντρου (1,5 mL). Για την έκλουση του DNA προσθέτουμε 50μL ρυθμιστικού διαλύματος EB ή δις αποσταγμένου H₂O στο κέντρο της στήλης. Αφήνουμε για 1min σε θερμοκρασία δωματίου και το DNA ανακτάται με φυγοκέντρηση για 1min.

* Όλες οι φυγοκεντρήσεις του πρωτοκόλλου πραγματοποιούνται στις 13.000rpm (Eppendorf 5417C, rotor: F45-30-11).

B. 5.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας

B.5.2.1. Απομόνωση και καθαρισμός πλασμιδιακού DNA με τη χρήση του Midi Kit Qiagen

Το πρωτόκολλο αυτό είναι σχεδιασμένο για απομόνωση έως και 100μg πλασμιδιακού ή κοσμιδιακού DNA από ολονύχτια καλλιέργεια 100mL κυττάρων *E. coli* σε θρεπτικό μέσο LB.

1. Μεταφέρουμε τη καλλιέργεια (50mL) σε σωλήνα φυγοκέντρου των 50mL (Falcon) και φυγοκεντρούμε στις 4.000rpm (eppendorf 5810R, rotor: A-4-62) για 15min στους 4°C.
2. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε τα υπόλοιπα 50mL της καλλιέργειας στο ίζημα.
3. Φυγοκεντρούμε στις 4.000rpm (eppendorf 5810R, rotor: A-4-62) για 15min στους 4°C.
4. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 4mL διαλύματος P1+RNase A.
5. Προσθέτουμε 4mL διαλύματος P2, ανακινούμε απαλά 4-6 φορές και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 5min.
6. Προσθέτουμε 4mL κρού διαλύματος P3, ανακινούμε αμέσως αλλά απαλά 4-6 φορές και επωάζουμε στον πάγο για 15min.
7. Φυγοκεντρούμε στις 4.000rpm για 20min και αποχύνουμε το υπερκείμενο μέσω ειδικής γάζας σε άλλο σωλήνα φυγοκέντρου (Falcon 50mL).
8. Περνάμε από τη στήλη (QIAGEN-tip 100) 4mL QBT.
9. Όταν η στήλη αδειάσει, προσθέτουμε το υπερκείμενο.
10. Όταν η στήλη αδειάσει, ξεπλένουμε δύο φορές με 10mL διαλύματος QC.
11. Για την έκλυση του DNA προσθέτουμε στη στήλη 5mL διαλύματος QF. Η συλλογή του εκλουόμενου υγρού γίνεται σε σωλήνα φυγοκέντρου των 10mL.
12. Προσθέτουμε στο εκλουόμενο υγρό 3,5mL ισοπροπανόλης για να γίνει καθίζηση του DNA. Ανακινούμε και φυγοκεντρούμε αμέσως στις 10.000rpm (SORVAL SA-600 rotor) για 30min στους 4°C. Αποχύνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο.

13. Ξεπλένουμε το ίζημα DNA με 2mL 70% αιθανόλη και φυγοκεντρούμε στις 10.000rpm (SORVAL SA-600 rotor) για 10min. Αποχύνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα.
14. Στεγνώνουμε το ίζημα για 5-10min και επαναδιαλύουμε το DNA σε κατάλληλο όγκο διαλύματος (π.χ. TE διάλυμα, pH 8,0 ή 10mM Tris-Cl, pH 8,5).

B.6. ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ *E.coli*

B.6.1. Επαγωγή της έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με IPTG

Η τεχνική αυτή επιτρέπει την έκφραση των πρωτεϊνών σε βακτηριακά κύτταρα με υψηλή απόδοση και τον εύκολο διαχωρισμό τους από το πρωτεϊνικό εκχύλισμα. Τα γονίδια των πρωτεϊνών που πρόκειται να εκφραστούν κλωνοποιούνται σε πλασμιδιακούς φορείς, οι οποίοι περιέχουν στο μόριο τους κατάλληλο προαγωγέα (π.χ. T5, T7 κ.α.) που επιτρέπει υψηλά επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών και συνήθως βρίσκεται συνδεδεμένος με περιοχές του «χειριστή» (operator) του οπερονίου της λακτόζης. Τα κλωνοποιημένα γονίδια βρίσκονται σε ανενεργή κατάσταση διότι η παραπάνω περιοχή του χειριστή καταστέλλεται από μια πρωτεΐνη «καταστολέα» που εκφράζεται από το *lacI* γονίδιο και η οποία δεν επιτρέπει τη σύνδεση της RNA πολυμεράσης στον υποκινητή. Η ελεγχόμενη ενεργοποίηση των κλωνοποιημένων γονιδίων επιτυγχάνεται μέσω της προσθήκης λακτόζης ή χημικών αναλόγων της (π.χ. IPTG), τα οποία αναστέλλουν τον καταστολέα επάγοντας έτσι την έκφραση των αντίστοιχων πρωτεϊνών.

Διαδικασία:

1. Από το κατάλληλο τρυβλίο που περιέχει βακτηριακές αποικίες συλλέγουμε 3-4 και τις τοποθετούμε σε LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό.
2. Επωάζουμε όλη νύχτα (14-16 ώρες) στους 37°C.
3. Μεταφέρουμε κατάλληλη ποσότητα από την παραπάνω καλλιέργεια σε 500 ml θρεπτικού υλικού (LB με το ίδιο αντιβιοτικό), ώστε η νέα καλλιέργεια να ξεκινήσει από OD=0,05-0,07 περίπου.
4. Επωάζουμε την καλλιέργεια στους 37°C με 225 rpm ανάδευση έως ότου η καλλιέργεια φτάσει σε OD=0,4

5. Συνέχεια της επώασης στη θερμοκρασία επαγωγής (συνήθως 25⁰C) για 15 λεπτά (OD=0,6 περίπου)
6. Προσθήκη 1mM IPTG στην καλλιέργεια και επώαση για 2-4 ώρες στην ίδια θερμοκρασία.
7. Φυγοκέντρηση της καλλιέργειας στις 4000rpm (σε συσκευή Eppendorf 5417, 1.700xg) στους 4⁰C για 15 λεπτά. Αφαίρεση του υπερκείμενου θρεπτικού υλικού.
8. Ξέπλυμα (επαναιώρηση) του ιζήματος των κυττάρων με απεσταγμένο H₂O.
9. Φυγοκέντρηση της καλλιέργειας στις 4000rpm στους 4⁰C για 15 λεπτά. Αφαίρεση του υπερκείμενου.
10. Συνέχεια με βακτηριακή λύση των κυττάρων ή διατήρηση του ιζήματος των κυττάρων στους -20⁰C για όσο χρειαστεί.

*Τα κύτταρα στα βήματα 7-10 πρέπει να κρατούνται σε πάγο

B.6.2. Παρασκευή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από βακτήρια

1. Παίρνουμε το ίζημα των κυττάρων μετά την επαγωγή και το επαναιωρούμε σε κατάλληλο διάλυμα λύσης (ίζημα κυττάρων από 500ml αρχικής καλλιέργειας επαναιωρείται σε 25ml διαλύματος). Στο διάλυμα προστίθενται πριν τη χρήση και κατάλληλοι αναστολείς πρωτεασών (PMSF και EDTA-free protease inhibitors).
2. Λύνουμε τα κύτταρα με τη χρήση της συσκευής υπερήχων (10 παλμοί διάρκειας 10 δευτερολέπτων με ενδιάμεσες παύσεις των 10 δευτερολέπτων).
3. Φυγοκεντρούμε το παραπάνω εκχύλισμα μετά τους υπερήχους στις 10.000 rpm (10.600xg) για 30min.
4. Διαχωρίζουμε το διαλυτό (υπερκείμενο) από το αδιάλυτο (ίζημα) κλάσμα.
5. Για περαιτέρω καθαρισμό της πρωτεΐνης χρησιμοποιούμε το διαλυτό κλάσμα

Σε όλη τη διαδικασία τα κύτταρα πρέπει να διατηρούνται σε πάγο και οι φυγοκεντρήσεις να γίνονται στους 4⁰C.

Για τον έλεγχο της όλης διαδικασίας κρατάμε 100μl δείγματος από όλες τις φάσεις (εκχύλισμα μετά τους υπέρηχους –συνολικό ομογενοποίημα-, διαλυτό και αδιάλυτο κλάσμα)

Διάλυμα λύσης για πρωτεΐνες
με GST επίτοπο
1xPBS
50mM PMSF
1% Triton-X

B.6.3. Απομόνωση πρωτεϊνών με χρωματογραφία αγγιστείας

Η απομόνωση μιας πρωτεΐνης από ένα μίγμα πρωτεϊνών μπορεί να επιτευχθεί με βάση την εξειδικευμένη και αντιστρεπτή δέσμευση της, πάνω σε προσδέτες (ligands) που βρίσκονται καθηλωμένα πάνω σε αδρανές υλικό χρωματογραφίας. Προσδέτες που είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν για το διαχωρισμό πρωτεϊνών είναι το υπόστρωμα ή ένα ανάλογο του υποστρώματος ενός ενζύμου, ένα συνένζυμο, ένας αναστολέας ή ακόμη μια άλλη πρωτεΐνη που δεσμεύεται στην προς απομόνωση πρωτεΐνη. Η έκλουση των δεσμευμένων πρωτεϊνών από τη στήλη επιτυγχάνεται είτε με τη διαβίβαση του ίδιου του προσδέτη ή αναλόγου του από τη στήλη, είτε με τη μεταβολή της ιοντικής ισχύος του διαλύματος έκλουσης, προκαλώντας έτσι την εξασθένηση των δεσμών που αναπτύσσονται μεταξύ προσδέτη-πρωτεΐνης.

B.6.3.1 Απομόνωση πρωτεϊνών με επίτοπο τρανσφεράσης της γλουταθειόνης

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την απομόνωση πρωτεϊνών που περιέχουν έναν επίτοπο που κωδικοποιεί για την τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST). Ο καθαρισμός της πρωτεΐνης σύντηξης με την τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) γίνεται με στήλη αγγιστείας που περιέχει γλουταθειόνη καθηλωμένη σε αδρανές υλικό (σεφαρόζη). Με αυτό τον τρόπο ο διαχωρισμός της πρωτεΐνης από το εκχύλισμα επιτυγχάνεται μέσω της καθήλωσης της στα σφαιρίδια της στήλης, η οποία γίνεται δυνατή χάρη στην αλληλεπίδραση της GST με τη γλουταθειόνη. Η έκλουση της πρωτεΐνης πραγματοποιείται με την προσθήκη διαλύματος γλουταθειόνης σε περίσσεια. Η διαδικασία αυτή έκλουσης επιτρέπει την εύκολη και ποσοτική ανάκτηση της πρωτεΐνης από τη στήλη και επίσης έχει το πλεονέκτημα ότι γίνεται σε πολύ ήπιες συνθήκες χωρίς να υπάρχει κίνδυνος αλλαγών στη δομή και τη δράση της πρωτεΐνης σύντηξης.

Διαδικασία:

1. Χρησιμοποιούμε για τον καθαρισμό το διαλυτό κλάσμα από την κατεργασία των βακτηριακών κυττάρων μετά την επαγωγή.
2. Εξισορροπούμε σφαιρίδια GSH-Sepharose (Amersham) (250 μl σφαιριδίων για υλικό που προέρχεται από 500 ml καλλιέργειας) στο διάλυμα λύσης των κυττάρων.
3. Επωάζουμε το διαλυτό κλάσμα με τα σφαιρίδια GSH Sepharose για 1 ώρα στους 40C με συνεχή ανάδευση
4. Μεταφέρουμε το παραπάνω μίγμα σε κατάλληλες στήλες των 10 ml (Qiagen) και αφήνουμε για μερικά λεπτά να συγκεντρωθούν τα σφαιρίδια στον πυθμένα της στήλης.
5. Ανοίγουμε το πάμα της στήλης και αφήνουμε να περάσει το κλάσμα με τις πρωτεΐνες που δεν έχουν δεσμευτεί στη στήλη (Flow Through)
6. Πλένουμε τη στήλη με 3x10ml διάλυμα λύσης.
7. Ακολουθεί έκλυση των πρωτεϊνών που έχουν δεσμευτεί στα σωματίδια με 0,5 ml διάλυμα έκλυσης.
8. Διατηρούμε τα κλάσματα στον πάγο.

Η διαδικασία πρέπει να γίνει στους 4⁰C και οι πρωτεΐνες να διατηρούνται στον πάγο. Για να ελέγξουμε όλα τα στάδια του καθαρισμού κρατάμε 100μl δείγματος από τα στάδια πριν και μετά την επώαση με τα σωματίδια καθώς και από τα στάδια των πλυσιμάτων και της έκλυσης.

Αναλύουμε 50μl από τα παραπάνω δείγματα σε SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση. Τα υπόλοιπα χρησιμοποιούνται για προσδιορισμό συγκέντρωσης πρωτεΐνης.

B.6.4. Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών

Σε έναν τυπικό προσδιορισμό συγκέντρωσης πρωτεϊνών, ένα χημικό αντιδραστήριο προστίθεται σε ένα δείγμα πρωτεϊνών, παράγοντας συνήθως αλλαγή χρώματος στο δείγμα. Η αλλαγή αυτή μπορεί να μετρηθεί με τη βοήθεια φωτομέτρου και να συγκριθεί με μια πρότυπη καμπύλη, στην οποία γνωστές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης αντιδρούν με το αντιδραστήριο.

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας ενός δείγματος σε πρωτεΐνη γίνεται σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford (τροποποιημένη από τον Bearden). Η μέθοδος Bradford στηρίζεται στη χρωματική αλλαγή που προκαλεί η πρόσδεση μιας χρωστικής, του Coomassie brilliant blue G, σε μια άγνωστη πρωτεΐνη και στην ποσοτικοποίηση αυτής με τη βοήθεια διαφορετικών συγκεντρώσεων από μια πρωτεΐνη αναφοράς. Η πρωτεΐνη αναφοράς που χρησιμοποιείται συνήθως για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης είναι η αλβουμίνη (BSA).

B.6.4.1 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης

1. Σε 10 σωλήνες βάζουμε αυξανόμενους όγκους BSA 1mg/ml (1, 2, 4, 6, 8, 10μl). Συμπληρώνουμε μέχρι τα 800μl με H₂O.
2. Χρησιμοποιούμε 2 σωλήνες με 800μl H₂O για τυφλά.
3. Σε όλα τα δείγματα προσθέτουμε 200μl διαλύματος Biorad Protein Assay Dye Reagent. Ανακατεύουμε και αφήνουμε για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Μετρούμε την απορρόφηση στα 595nm.
5. Κατασκευάζουμε μια πρότυπη καμπύλη, όπου στον έναν άξονα τοποθετούμε τις συγκεντρώσεις του BSA που χρησιμοποιήθηκαν και στον άλλον τις τιμές της απορρόφησης στα 595nm.

B.6.4.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης άγνωστης πρωτεΐνης

1. Σε ένα σωλήνα με 790μl H₂O προσθέτουμε 10μl από το δείγμα της άγνωστης πρωτεΐνης, της οποίας τη συγκέντρωση θέλουμε να προσδιορίσουμε.
2. Σ' αυτό προσθέτουμε 200μl διαλύματος Biorad Protein Assay Dye Reagen (Biorad). Ανακατεύουμε και αφήνουμε για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Μετρούμε την απορρόφηση στα 595nm.
4. Με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης προσδιορίζουμε τη συγκέντρωση της άγνωστης πρωτεΐνης.
5. Αν η συγκέντρωση της άγνωστης πρωτεΐνης είναι πολύ υψηλή, αραιώνουμε την πρωτεΐνη ή κατασκευάζουμε μια πρότυπη καμπύλη με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις BSA.

Διάλυμα Coomassie brilliant blue
-χρωστική coomassie brilliant blue G
-φωσφορικό οξύ
-μεθανόλη

B.7. ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ

B.7.1. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών παρουσία SDS σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών ενός δείγματος πραγματοποιείται καθώς οι πρωτεΐνες, ως φορτισμένα μόρια, κινούνται διαμέσου των πόρων μίας πηκτής υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η κίνηση των πρωτεϊνών στην πηκτή εξαρτάται από τη διαφορά δυναμικού του ηλεκτρικού πεδίου (E) και το φορτίο της πρωτεΐνης σύμφωνα με την εξίσωση: $v = E * q / f$ όπου ο παράγοντας της εξίσωσης f εκφράζει την εξάρτηση από τη μάζα και το σχήμα της πρωτεΐνης καθώς και το ιξώδες της πηκτής μέσα στο οποίο κινείται η πρωτεΐνη.

Ο σχηματισμός των πηκτών πολυακρυλαμιδίου βασίζεται στον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) και του N,N μεθυλενο-δισακρυλαμιδίου ή bis-ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}-\text{CH}_2$) που συνδέει τις αλυσίδες του πρώτου. Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται ένα πολυμερές πλέγμα που διαθέτει πόρους των οποίων το μέγεθος εξαρτάται από το βαθμό πολυμερισμού και τη συγκέντρωση των μονομερών στο διάλυμα. Στην ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικά πηκτώματα, το πήκτωμα επιστοιβάξης που είναι υπεύθυνο για τη συμπύκνωση των πρωτεϊνών του δείγματος σε μια πολύ λεπτή στοιβάδα, και το πήκτωμα διαχωρισμού που είναι υπεύθυνο για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών σε λεπτές ζώνες κατά την κίνηση τους μέσα σ' αυτό. Τα διαλύματα από τα οποία παρασκευάζονται τα δύο πηκτώματα είναι διαφορετικά ως προς το pH και τη σύστασή τους. Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε αποδιατακτικές συνθήκες γίνεται παρουσία του απορρυπαντικού SDS (sodium dodecyl sulfate). Το SDS αποδιατάσει τις πρωτεΐνες και δεσμεύεται πάνω σ' αυτές μέσω υδρόφοβων δεσμών, ανεξάρτητα της ιονικής ισχύος, σε καθορισμένα ποσά κατά βάρος (1.4 gr SDS/gr πρωτεΐνης). Τα σύμπλοκα που σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση με το SDS

φέρουν καθαρό αρνητικό φορτίο το οποίο είναι σταθερό ανά μονάδα μάζας κι έτσι η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων είναι μοναδική συνάρτηση του μοριακού τους βάρους.

B.7.1.1. Προετοιμασία της πηκτής πολυακρυλαμίδιου

Το σύστημα που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των διαφόρων πρωτεϊνικών παρασκευασμάτων κατά τη διάρκεια της εργασίας αποτελείται από το *πήκτωμα διαχωρισμού*, ύψους 7,5 cm και πάχους 1 mm και το *πήκτωμα επιστοιβαξης* όπου οι πρωτεΐνες διανύουν απόσταση 1 cm πριν εισχωρήσουν στο *πήκτωμα διαχωρισμού*. Οι θέσεις εισαγωγής του δείγματος δημιουργούνται με τη βοήθεια πλαστικής οδοντωτής μήτρας, η οποία αφαιρείται μετά τον πολυμερισμό του πηκτώματος επιστοιβαξης.

Η σύσταση των επιμέρους στοιχείων του συστήματος είναι η εξής:

Πήκτωμα επιστοιβαξης

4,5% ακρυλαμίδιο:bis
0.1% SDS,
0.125 M Tris-Cl pH 6.8,
2 mM EDTA
για τον πολυμερισμό
0.08% APS
0.04% TEMED

Πήκτωμα διαχωρισμού

8-12% ακρυλαμίδιου:bis
0.1% SDS
0.375 M Tris-Cl pH 8.8
2 mM EDTA
για τον πολυμερισμό
0.08% APS
0.04% TEMED

Διάλυμα δοχείων ηλεκτροφόρησης

50 mM Tris
0.38 M γλυκίνη
2 mM EDTA
0.1% SDS, pH 8.9

B.7.1.2. Προετοιμασία των προς ανάλυση δειγμάτων

Τα δείγματα πριν εισαχθούν στο πήκτωμα επιστοιίβαξης διαλύονται στο διάλυμα επιφόρτωσης των δειγμάτων Ακολουθεί βρασμός για 3-5 λεπτά στους 95⁰C. Τα δείγματα τοποθετούνται στις εσοχές της πηκτής με τη βοήθεια σύριγγας τύπου Hamilton.

Διάλυμα επιφόρτωσης

62,5 mM

Tris-HCl_{pH 6,8}

2,3% SDS

10% γλυκερόλη

0,05% (w/v) μπλέ της βρωμοφαινόλης

25 mM DTT)

B.7.1.3. Ηλεκτροφόρηση της πηκτής και χρώση

Η ηλεκτροφόρηση της πηκτής γίνεται κάτω από σταθερή ένταση ρεύματος 30 mA για 30-60 λεπτά. Η ηλεκτροφόρηση ολοκληρώνεται όταν το «μέτωπο» (μπλε γραμμή της χρωστικής) φτάσει στο χαμηλότερο άκρο της πηκτής.

Για να βαφούν οι πρωτεϊνικές ζώνες, η πηκτή εμβαπτίζεται σε διάλυμα χρώσης όπου και ανακινείται για διάστημα 30 λεπτών. Στο διάλυμα αυτό γίνεται συγχρόνως και στερέωση των πρωτεϊνικών ζωνών στην πηκτή. Ο αποχρωματισμός της πηκτής γίνεται με ανακίνηση σε διάλυμα αποχρωματισμού.

Διάλυμα χρώσης πρωτεϊνών

αποχρωματισμού

-0.25% Coomassie Brilliant Blue R-25

-50% αιθανόλη

-10% οξικό οξύ

Διάλυμα

-30% αιθανόλη

-10% οξικό οξύ

B.7.2. Ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση

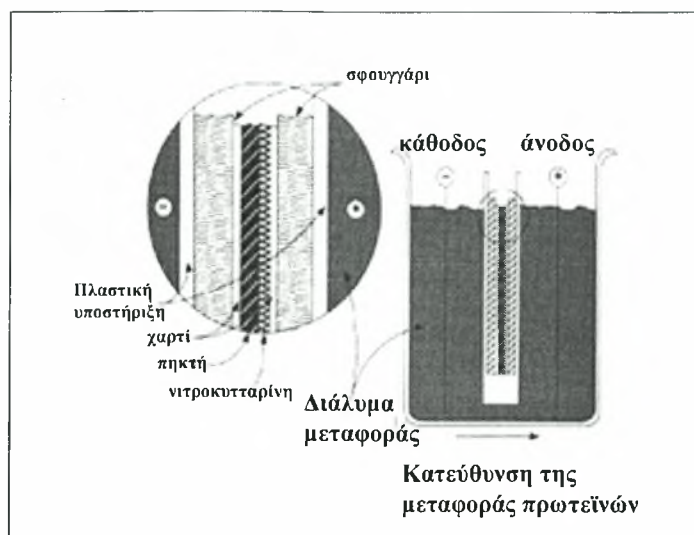
Η τεχνική αυτή αποτελείται από δυο μέρη. Το πρώτο μέρος είναι η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μια μεμβράνη συνήθως νιτροκυτταρίνης η οποία μπορεί να γίνει σε υγρή φάση (Wet transfer) ή σε ημίξηρη φάση (Semi-dry transfer). Η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη, βασίζεται στην κίνηση των πρωτεϊνών, που βρίσκονται υπό τη μορφή συμπλόκου με το SDS και είναι αρνητικά φορτισμένες, από την πηκτή προς τη μεμβράνη κατά την εφαρμογή διαφοράς δυναμικού και στον εγκλωβισμό τους στο πλέγμα της μεμβράνης.

Το δεύτερο μέρος είναι η ανοσοανίχνευση που επιτρέπει τον εντοπισμό μιας καθηλωμένης σε μεμβράνη πρωτεΐνης με τη βοήθεια αντισώματος. Η τεχνική βασίζεται στο ότι όταν η καθηλωμένη πρωτεΐνη-αντιγόνο αλληλεπιδράσει με το αντίσωμα, η αλληλεπίδραση αυτή ανιχνεύεται με τη βοήθεια ενός δευτέρου αντισώματος το οποίο εκτός ότι είναι ικανό να αναγνωρίσει και να δεσμευθεί με τις ανοσοσφαιρίνες IgG του αρχικού, περιέχει στο μόριο του συζευγμένο κάποιο ένζυμο-δείκτη (όπως το ένζυμο HRP) το οποίο αντιδρώντας με εξωγενώς προστιθέμενο υπόστρωμα δίνει χαρακτηριστική χρωμοαντίδραση ή εκλύει φωταύγεια καταδεικνύοντας έτσι τη ζώνη του αντιγόνου.

B.7.2.1. Μεταφορά υγρής φάσης (Wet Transfer)

Μετά την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται η πηκτή διαχωρισμού για την μεταφορά των πρωτεϊνών στην μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης. Έξι διηθητικά χαρτιά Whatman των 3mm και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εξισορροπούνται στο διάλυμα μεταφοράς (48mM Tris, 39mM Glycine, 1,3mM SDS, 20% μεθανόλη). Έπειτα τοποθετούνται κατά τέτοιον τρόπο ώστε να δημιουργείται ένα «σάντουιτς» με τα χαρτιά Whatman τη μεμβράνη και την πηκτή, όπως φαίνεται στην Εικόνα 18. Το σάντουιτς τοποθετείται με το σωστό προσανατολισμό στη συσκευή Transport Electrophoration Unit της Høefer, η οποία είναι γεμάτη με το διάλυμα μεταφοράς.

Η ηλεκτρομεταφορά συμβαίνει για 1,5 ώρες στα 400 mA, μετά η μεμβράνη χρωματίζεται προσωρινά με τη χρωστική Ponceau S 0,2% για τον εντοπισμό των θέσεων των πρωτεϊνών και γίνεται αποχρωματισμός με PBS.



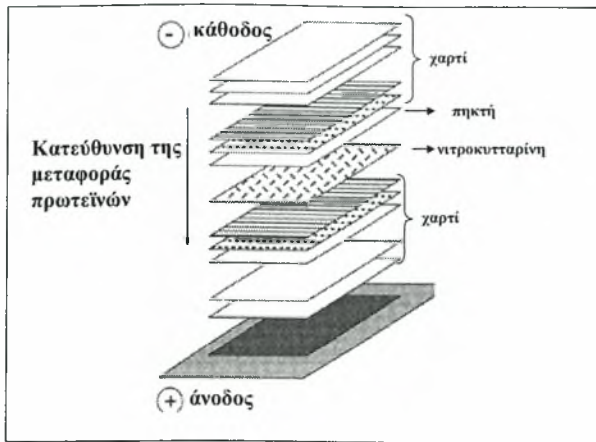
Εικόνα 18: Διάταξη του σάντουιτς πηκτής-μεμβράνης στη μεταφορά πρωτεϊνών υγρής φάσης

Διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer)

	1000ml
48mM Tris	5,82gr
39mM Glycine	2,93gr
1,3mM SDS	0,375gr
ddH ₂ O	Συμπληρώνουμε μέχρι τα 1000ml

B.7.2.2. Μεταφορά ημίξηρης φάσης (Semi-Dry Transfer)

Με αυτήν την τεχνική η μεταφορά των πρωτεϊνών γίνεται μεταξύ 2 μεγάλων ηλεκτροδίων, χωρίς τη χρήση μεγάλης ποσότητας διαλύματος μεταφοράς (48mM Tris, 39mM Glycine, 1,3mM SDS). Η διαφορά με την προηγούμενη μέθοδο είναι ότι το «σάντουιτς» που δημιουργείται τοποθετείται σε οριζόντια θέση σε συσκευή Trans-Blot SD της BioRad. Η μεταφορά διαρκεί 1 ώρα στα 10Volt και η μεμβράνη χρωματίζεται προσωρινά με Ponceau S 0,2%.



Εικόνα 19: Διάταξη του σάντουιτς πηκτής-μεμβράνης κατά τη μεταφορά πρωτεϊνών ημι-ξηρής φάσης

B.7.2.3. Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών

Η ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση έγινε ως εξής:

1. Ξεπλένουμε την μεμβράνη στην οποία έχουν μεταφερθεί οι πρωτεΐνες με PBS
2. Επιάζουμε για 1 ώρα με το διάλυμα μπλοκαρίσματος
3. Ξεπλένουμε 3 φορές x 5 λεπτά με PBS
4. Επιάζουμε για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή όλη νύχτα στους 4°C με το 1^ο αντίσωμα (αραιωμένο σε κατάλληλη συγκέντρωση σε PBS)
5. Ξεπλένουμε 3 φορές x 5 λεπτά με PBS
6. Επιάζουμε για 1 ώρα με 2^ο αντίσωμα (αραιωμένο σε κατάλληλη συγκέντρωση σε PBS)
7. Ξεπλένουμε 3 φορές x 5 λεπτά με PBS
8. Εμφανίζουμε με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας:

-Προσθήκη 30μl 3% H₂O₂ και 100μl διαλύματος κουμαρικού οξέος σε 10ml διαλύματος λουμινόλης

-Επώαση της μεμβράνης με το παραπάνω μείγμα για 1 λεπτό

-Στέγνωμα και κάλυψη της μεμβράνης με διαφανή μεμβράνη

-Τοποθέτηση του φιλμ πάνω από τη μεμβράνη για τον κατάλληλο χρόνο

-Εμφάνιση του φιλμ με τα αντιδραστήρια εμφάνισης και σταθεροποίησης

Πίνακας 1: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ανοσοαποτύπωση στα διάφορα πειράματα. Απεικονίζεται η προέλευση των αντισωμάτων, η αραιώση που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και η εταιρία από την οποία προμηθεύτηκαν.

Πρώτα αντισώματα	Προέλευση	Αραιώση	Εταιρεία
anti-SAFB	ποντίκι	1/2000	Stratagene
anti-GST	κατσίκα	1/5000	Amersham
anti-GFP	κουνέλι	1/1000	Roche
Anti-FLAG	ποντίκι	1/10000	Sigma

Δεύτερα αντισώματα	Προέλευση	Αραιώση	Εταιρεία
anti-IgG ποντικού	κατσίκα	1/3000	BioRad
anti-IgG κουνελιού	κατσίκα	1/3000	Cell Signalling
anti-IgG κατσίκας	ποντίκι	1/3000	Jackson Immunores.

PBS (1Lt)

8gr NaCl

0,2gr KCl

1,44gr Na₂HPO₄·2H₂O

0,24gr KH₂PO₄

Διάλυμα μπλοκαρίσματος : 5% γάλα σε σκόνη (χωρίς λιπαρά) σε PBS

Διάλυμα λουμινόλης (1,25mM) : 0,222gr σε 0,1M Tris-Cl pH 8,5 (για 1lt)

Διάλυμα κουμαρικού οξέος (6,8mM) : 0,112gr σε 100ml DMSO

Διάλυμα εμφάνισης: 1400ml H₂O, 500ml διάλυμα A (Fuji films), 500ml διάλυμα B (Fuji films), 1min στον πάγκο, 50ml διάλυμα C (Fuji films), 1min στον πάγκο

Διάλυμα Σταθεροποίησης: 225ml διάλυμα A(Fuji films), 27,5 διάλυμα B, H₂O έως 1lt.

B.8. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ

B.8.1. Μετασχηματισμός κυττάρων *S. cerevisiae*

Το πρωτόκολλο αυτό ενδείκνυται για μετασχηματισμό υψηλής απόδοσης κυττάρων σακχαρομύκητα

Λαδικασία

1. Επώαζουμε 3 ml υγρής καλλιέργειας με το επιθυμητό στέλεχος *S.c.* στο κατάλληλο θρεπτικό μέσο SC (Synthetic Complete) στους 30⁰ C όλη νύχτα.
2. Φωτομετρούμε την καλλιέργεια στα 600 nm και μεταφέρουμε ποσότητα αυτής σε 10 ml θρεπτικού YPD (Yeast Extract-Peptide-Dextrose).
3. έτσι ώστε η απορρόφηση OD_{600nm} να είναι 0,200.

4. Επωάζουμε σε αναδευτήρα στους 30⁰ C έως ότου η απορρόφηση να φτάσει περίπου στο 0,800 (θέλουμε μετά από δύο διπλασιασμούς, η καλλιέργεια να βρίσκεται ακόμη σε λογαριθμική φάση, OD<1).
5. Φυγοκεντρούμε την καλλιέργεια για 5 λεπτά στις 4.000rpm στην φυγόκεντρο Eppendorf 5810R (2.880xg). Αφαιρούμε το υπερκείμενο.
6. Αιωρούμε τα κύτταρα σε 5 ml δις απεσταγμένου H₂O και ξαναφυγοκεντρούμε στις ίδιες συνθήκες. Αφαιρούμε το υπερκείμενο.
7. Επαναιωρούμε το ίζημα των κυττάρων σε 500μl CH₃COOLi 100mM και μεταφέρουμε το αιώρημα σε σωληνάκι μικροφυγοκέντρου.
8. Φυγοκεντρούμε για 10 δευτερόλεπτα στις 12.000rpm στην φυγόκεντρο Eppendorf 5417C (15.300g). Αφαιρούμε το υπερκείμενο.
9. Επαναιωρούμε το ίζημα των κυττάρων σε τελικό όγκο 100 μl CH₃COOLi 100mM.
10. Φυγοκεντρούμε στις ίδιες συνθήκες. Αφαιρούμε το υπερκείμενο.
11. Στο ίζημα των κυττάρων προσθέτουμε τα παρακάτω αντιδραστήρια με την σειρά που δίνεται:
 - 240 μl 50% (w/v) PEG 3350
 - 36 μl CH₃COOLi 1M
 - 50μl DNA από σπέρμα σολομού 2mg/ml (το οποίο πρώτα έχουμε θερμάνει στους 100⁰ C για τουλάχιστον 10 λεπτά).
 - 10μl από κάθε πλασμιδιακό DNA (από 0,1-10 μg)
 - 14μl δις απεσταγμένου H₂O
12. Αναδεύουμε το μίγμα έως ότου τα κύτταρα αιωρηθούν καλά
13. Επωάζουμε για 30 λεπτά στους 30⁰ C.
14. Επωάζουμε για 20 λεπτά στους 42⁰ C.
15. Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα στις 12.000rpm στην φυγόκεντρο Eppendorf 5417C (15.300xg) για 10 δευτερόλεπτα. Αφαιρούμε το υπερκείμενο.
16. Επαναιωρούμε το ίζημα των κυττάρων σε 150μl δις απεσταγμένου H₂O.
17. Απλώνουμε το αιώρημα σε τρυβλία με το κατάλληλο θρεπτικό μέσο επιλογής και επωάζουμε για 2-4 ημέρες στους 30⁰ C.

Υγρά θρεπτικά υλικά

YPD

Για 1 λίτρο
10 g Bacto-Yeast extract
20 g bacto-peptone
20g glucose

SC

Για 1 λίτρο
1.7 g YNB-AA/AS
0.5 g CSM-AA
5 g (NH₄)₂SO₄
20g glucose
pH 5.5 (350μl NaOH 5N)

Το υγρό θρεπτικό μέσο SC (Synthetic Complete) μπορεί να υποστηρίξει την ανάπτυξη κυττάρων ζύμης που δεν έχουν διατροφικές ανάγκες (δεν παρουσιάζουν δηλαδή αυξοτροφία). Πιο συχνά όμως χρησιμοποιείται ως το βασικό θρεπτικό υλικό στο οποίο προστίθενται άλλα διατροφικά συμπληρώματα

Σε περιπτώσεις που τα κύτταρα που μεγαλώνουν έχουν διατροφικές ανάγκες και με βάση αυτές θέλουμε να προχωρήσουμε στην επιλογή, τότε στο θρεπτικό υλικό μπορεί να προστεθούν τα εξής: Ade, Ura, Trp, His, Leu, Lys σε τελικές συγκεντρώσεις 1x. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων αποθήκευσης έχουν ως εξής:

Ade	166x	0.170 g/ 50 ml
Ura	100x	0.112 g/ 50 ml
Trp	100x	0.560 g/ 50 ml
His	330x	1.048 g/ 50ml
Leu	90x	1.180 g/ 50ml
Lys	100x	0.250 g/ 50ml

Στερεά θρεπτικά υλικά

Τα στερεά θρεπτικά υλικά παρασκευάζονται με τη προσθήκη άγαρ σε συγκέντρωση 2% (20 gr/l). Υπολογίζουμε για κάθε τρυβλίο 30 ml.

B.9. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

B.9.1.Επιμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με τη βοήθεια μη λιπιδικού πολυμερούς

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την εισαγωγή πλασμιδιακού DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα θηλαστικών μέσω ενός ιζήματος, που σχηματίζεται με το

διάλυμα ενός μη λιπιδικού κατιοντικού πολυμερούς (Transpass D2, BioLabs) που προσκολλάται στην επιφάνεια των κυττάρων.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιούνται τα ανθρώπινα 293T κύτταρα και κύτταρα HeLa για την υπερέκφραση των κλωνοποιημένων γονιδίων ως πρωτεΐνες σύντηξης με χαρακτηριστικές αλληλουχίες που είναι εύκολα ανιχνεύσιμες. Η επιμόλυνση των κυττάρων με πλασμιδιακό DNA γίνεται ως εξής:

Διαδικασία

1. Όλα τα υλικά που έρχονται σε επαφή με τα κύτταρα θα πρέπει να είναι αποστειρωμένα.
2. Μοιράζουμε την προηγούμενη μέρα τα κύτταρα στα τρυβλία, όπου διατηρούνται σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, High Glucose, 1mM sodium pyruvate) (Gibco BRL), στο οποίο προστίθεται 10% ορός εμβρύου μόσχου (Biochrom KG Seromed) και μίγμα αντιβιοτικών (antibiotic-antimycotic solution) (Gibco BRL).
-Τα κύτταρα πρέπει να είναι κατανεμημένα ομοιόμορφα σε συγκέντρωση 60-90% για τη μέρα της επιμόλυνσης.
3. Ετοιμάζουμε το ίζημα που θα ρίξουμε στα κύτταρα.
-Για κάθε τρυβλίο ετοιμάζουμε ένα σωληνάκι πολυπροπυλενίου 1,5 ml (τύπου erpendorf) στο οποίο προσθέτουμε 10 µg DNA σε 3 ml θρεπτικού υλικού DMEM χωρίς ορό.
-Αφου αναδεύσουμε προσεκτικά το αντιδραστήριο διαμόλυνσης (Transpass D2) πριν τη χρήση, προσθέτουμε 10µl Transpass D2 σε κάθε σωληνάκι πολυπροπυλενίου που ετοιμάσαμε και αφήνουμε 20-30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να σχηματιστούν τα σύμπλοκα διαμόλυνσης.
-Ξεπλένουμε τα κύτταρα μια φορά με θρεπτικό υλικό χωρίς ορό και προσθέτουμε στα κύτταρα το μίγμα διαμόλυνσης.
4. Ρίχνουμε σιγά-σιγά το μίγμα με ανακίνηση ώστε να μοιράζεται σε όλο το τρυβλίο.
5. Αφήνουμε τα κύτταρα στο θάλαμο επώασης για 2-3 ώρες.
6. Αντικαθιστούμε το μίγμα διαμόλυνσης με φρέσκο θρεπτικό υλικό που περιέχει 10% ορό και αφήνουμε τα κύτταρα να επωασθούν 24-72 ώρες.

B.9.2 Παρασκευή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από ευκαρυωτικά κύτταρα

Διαδικασία

1. Ξεπλένουμε το τρυβλίο με 3 ml κρύο 1x PBS
2. Τα κύτταρα αποκολλούνται από το τρυβλίο σε 1 ml διαλύματος λύσης με τη βοήθεια ειδικής σπάτουλας και μεταφέρεται σε σωλήνες τύπου eppendorf.
3. Επωάζουμε για 10 λεπτά στον πάγο και φυγοκεντρούμε στα 10000xg για 30 λεπτά στους 4⁰C.
4. Κρατάμε 200μl από το υπερκείμενο όπου προσθέτουμε διάλυμα επιφόρτωσης για ανάλυση με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση και θερμαίνουμε στους 95⁰C για 5 λεπτά. Στο υπόλοιπο υπερκείμενο προσθέτουμε 10% γλυκερόλη και το διατηρούμε στους -80⁰C.

Διάλυμα λύσης

10 mM Tris-HCl pH 8.0

1 mM EDTA

150 mM NaCl

1% Triton X-100

0,1% SDS

1 mM DTT

100 μg/ml PMSF

αναστολείς πρωτεασών

B.10. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ-ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

Στην μικροσκοπία ανοσοφθορισμού η ανίχνευση ενδοκυττάρων πρωτεϊνών γίνεται με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων τα οποία αλληλεπιδρούν με τα αντίστοιχα αντιγόνα τους που εντοπίζονται στις διάφορες υποκυτταρικές περιοχές των ευκαρυωτικών κυττάρων. Η επώαση των κυττάρων με δεύτερα αντισώματα ειδικά για τα πρώτα, τα οποία φέρουν συζευγμένες φθορίζουσες ομάδες επιτρέπει τον εντοπισμό των θέσεων των πρωτεϊνών στα κύτταρα. Στη μικροσκοπία φθορισμού δεν είναι απαραίτητη η χρήση αντισωμάτων καθώς είναι δυνατός ο ενδοκυττάριος εντοπισμός πρωτεϊνών οι οποίες είναι σε σύντηξη με φθορίζοντα επίτοπο (GFP). Ο

φθορισμός και στις δύο περιπτώσεις επιτυγχάνεται με την επίδραση φωτός κατάλληλου μήκους κύματος. Η παρατήρηση γίνεται με τη χρήση μικροσκοπίου το οποίο φέρει κατάλληλους φακούς και φίλτρα απορρόφησης του φωτός.

B.10.1. Μικροσκοπία ανοσοφθορισμού

Διαδικασία

1. Μια μέρα πριν την έναρξη του πειράματος μοιράζουμε τα κύτταρα σε πιάτα με 6 πηγαδάκια, στα οποία έχουν τοποθετηθεί καλυπτρίδες.
2. (Σε κάθε πηγαδάκι τοποθετούνται 400.000 κύτταρα, ώστε κατά την έναρξη του πειράματος να καλύπτουν το 60-70% της επιφάνεια.).
3. Αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό από τα κύτταρα και πλένουμε με κρύο 1x PBS.
4. Μονιμοποιούμε τα κύτταρα με 1x PBS + 3% φορμαλδεύδη για 5 λεπτά και πλένουμε με κρύο 1x PBS 2 φορές από 5 λεπτά.
5. Αφήνουμε τα κύτταρα για 15 λεπτά με 1x PBS + 1% Triton X-100 στους 4°C ή 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
(Οι μεμβράνες των κυττάρων γίνονται διαπερατές)
6. Πλένουμε με κρύο 1x PBS. Στη συνέχεια, γίνεται μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων στις καλυπτρίδες με PBS-0,1% Tween 20 – 3% BSA στους 4°C για όλη τη νύχτα.
7. Την επόμενη μέρα σηκώνουμε τις καλυπτρίδες, στεγνώνουμε καλά και τοποθετούμε σε άλλο πιάτο (24 wells), το οποίο είναι στεγνό.
8. Προσθέτουμε το πρώτο αντίσωμα σε PBS-Tween 1% BSA για 1,5 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή για όλη τη νύχτα στους 4°C.
9. Απομακρύνουμε το πρώτο αντίσωμα με 3 διαδοχικές πλύσεις 1x PBS-0,1% Tween-1% BSA.
10. Προσθέτουμε το δεύτερο αντισώμα 1/50 σε PBS-0,1% Tween-1% BSA για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου ή παραπάνω στους 4°C.
11. Απομακρύνουμε το δεύτερο αντίσωμα με 3 διαδοχικές πλύσεις με 1x PBS-0,1% Tween-1% BSA.
12. Ακολουθεί ένα τελικό πλύσιμο με νερό, στεγνώνουμε τις καλυπτρίδες σε χαρτί και τις τοποθετούμε ανάποδα σε αντικειμενοφόρο πλάκα με 2μl vectashield (Vector laboratories).

13. Για την παρατήρηση των πυρήνων στην αντικειμενοφόρο πλάκα προσθέτουμε 1% 4', 6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλιο (DAPI), το οποίο χρωματίζει τους πυρήνες μπλε. Η παρατήρηση γίνεται άμεσα σε μικροσκόπιο φθορισμού Optiphot-2 και η φωτογράφιση με τη χρήση κάμερας UFX-DX (Nikon).

B.10.2. Μικροσκοπία φθορισμού

Διαδικασία

1. Μια μέρα πριν την έναρξη του πειράματος μοιράζουμε τα κύτταρα σε πιάτα με 6 πηγαδάκια, στα οποία έχουν τοποθετηθεί καλυπτρίδες.
2. (Σε κάθε πηγαδάκι τοποθετούνται 400.000 κύτταρα, ώστε κατά την έναρξη του πειράματος να καλύπτουν το 60-70% της επιφάνεια.).
3. Αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό από τα κύτταρα και πλένουμε με κρύο 1x PBS.
4. Μονιμοποιούμε τα κύτταρα με 1x PBS + 3% φορμαλδεύδη για 5 λεπτά και πλένουμε με κρύο 1x PBS 2 φορές από 5 λεπτά.
5. Απομακρύνουμε τη φορμαλδεύδη με διαδοχικές πλύσεις με PBS και H₂O.
6. Τοποθετούμε τις καλυπτρίδες ανάποδα σε αντικειμενοφόρο με 2μl vectashield (Vector laboratories).
7. Για την παρατήρηση των πυρήνων στην αντικειμενοφόρο πλάκα προσθέτουμε 1% 4', 6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλιο (DAPI), το οποίο χρωματίζει τους πυρήνες μπλε. Η παρατήρηση γίνεται άμεσα σε μικροσκόπιο φθορισμού Optiphot-2 και η φωτογράφιση με τη χρήση κάμερας UFX-DX (Nikon).

B.11. ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ιδιότητα της πρωτεΐνης G (Protein G) του μικροοργανισμού *Staphylococcus aureus* να δεσμεύεται στις ανοσοσφαιρίνες. Χρησιμοποιώντας την ιδιότητα αυτή, τα αντισώματα που έχουν δεσμεύσει το αντιγόνο τους από ένα πρωτεϊνικό εκχύλισμα δεσμεύονται στη συνέχεια στην πρωτεΐνη A η οποία είναι καθηλωμένη σε ένα αδρανές υλικό. Στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται μονοκλωνικά αντισώματα όπως είναι το αντίσωμα που αναγνωρίζει την ακολουθία FLAG σε πρωτεΐνες σύντηξης, η στήλη που

χρησιμοποιείται είναι πρωτεΐνη G-σεφαρόζη. Η διαδικασία που ακολουθείται παρατίθεται παρακάτω:

- Επωάζουμε το κυτταρικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα με αντίσωμα anti-FLAG (0.5 μl αντισώματος για κάθε 300μg πρωτεΐνης ολικής πρωτεΐνης, προερχόμενης από κυτταρικά εκχύλισμα) για 3 ώρες στους 4 °C με συνεχή ανάδευση.
- Προετοιμάζουμε τα σφαιρίδια-G: σε erpendorf προσθέτουμε 20-25 μl σφαιριδίων (για κάθε αντίδραση) και ακολουθούν πλύσεις αυτών: προσθέτουμε 500μl IP buffer, αναδεύουμε στον αναδευτήρα και μετα αναδεύουμε για 10 λεπτά στους 4 °C, φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 30'' και αποχύνουμε το υπερκείμενο. Επαναλαμβάνουμε την παραπάνω διαδικασία άλλες δύο φορές.
- Προσθέτουμε στο erpendorf που περιέχει τα σφαιρίδια το πρωτεϊνικό εκχύλισμα που περιέχει το αντίσωμα anti-FLAG συνδεδεμένο με την επιθυμητή πρωτεΐνη και επωάζουμε O/N στους 4 °C με συνεχή ανάδευση.
- Πραγματοποιούμε τρεις πλύσεις όπως παραπάνω.
- Μετά το τέλος της τρίτης πλύσης προσθέτουμε 300 μl 20mM Tris-HCl pH=7.5, κάνουμε vortex και αναδεύουμε για 10' στους 4 °C.
- Φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 30'' και αποχύνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο.

Διάλυμα ανοσοκατακρήμνισης (IP buffer): 2.5 ml Tris-HCL 1M, 5ml NaCl 3M, 1 ml Triton100x, 1ml PMSF 0,1M, 500 μl DTT 1M, 99 ml H₂O (για 100 ml)

Ρυθμιστικό διάλυμα

50 mM Tris-HCl pH 7.5,

1% Triton X-100

0.1 M NaCl

B.12. ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ IN VITRO ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ

Η ανίχνευση της ύπαρξης δράσης κινάσης στηρίζεται στην επώαση μικρών ποσοτήτων των κυτταρικών εκχυλισμάτων ή της κινάσης, η οποία έχει απομονωθεί από κυτταρικό εκχύλισμα μέσω ανοσοκατακρήμνισης, με ένα κατάλληλο υπόστρωμα. Ως δότης φωσφορικών χρησιμοποιείται το $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP.

Το μίγμα επώασης επίσης περιλαμβάνει 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl_2 , 80 mM NaCl, 0.6 μCi $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP και 25 μM ψυχρό ATP. Ο τελικός όγκος επώασης είναι 25 μl και ρυθμίζεται με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας ddH_2O . Τα δείγματα επιάζονται για 30 min σε θερμοκρασία 30° C. Μετά το τέλος της επώασης προστίθενται 50 mM DTT και διάλυμα διαλυτοποίησης των δειγμάτων που χρησιμοποιείται στην SDS ηλεκτροφόρηση και στη συνέχεια τα δείγματα ηλεκτροφορούνται.

Ακολουθεί βαφή της πηκτής με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250 και αποχρωματισμός της. Στη συνέχεια γίνεται ξήρανση της πηκτής, αυτοραδιογραφία και κοπή των ζωνών της πηκτής που αντιστοιχούν στο μοριακό βάρος του υποστρώματος σε συμφωνία και με τις ζώνες που εμφανίζονται στο film της αυτοραδιογραφίας. Ακολουθεί η μέτρηση των ραδιενεργών ζωνών σε σπινθηριστή Wallac 1409 (Liquid Scintillation Counter). Κατ' αυτό τον τρόπο ανιχνεύεται η επιθυμητή δραστηριότητα κινάσης πρωτεϊνών καθώς και η έκταση της ενσωμάτωσης της ραδιενέργειας από το $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP στα αντίστοιχα υποστρώματα.

B. 12.1. Αυτοραδιογραφία

Η τεχνική βασίζεται στην ικανότητα του ακτινογραφικού film, να προσβάλλεται από την εκπεμπόμενη ακτινοβολία του ισοτόπου που χρησιμοποιείται για την επισήμανση των διάφορων μορίων.

Στην περίπτωση των πηκτωμάτων που έχουν στερεωθεί, το πήκτωμα ανακινείται για 30 min σε νερό ώστε να ξεπλυθεί και εν συνεχεία ξηραίνεται σε χαρτί Whatman 3MM (Whatman International Ltd. Kent, England) υπό την παρουσία κενού σε ειδική συσκευή.

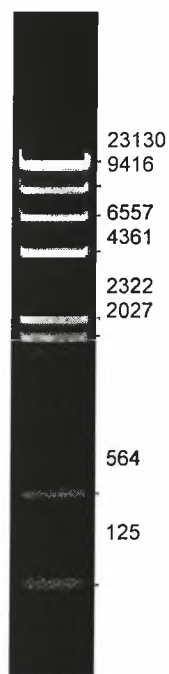
Το πήκτωμα στη συνέχεια τοποθετείται σε επαφή με το φιλμ σε φωτοστεγή κασετίνα, η οποία διατηρείται στους -80 °C. Η εμφάνιση και στερέωση του film γίνεται με εμβάπτιση υπό ανακίνηση σε X-Ray developer και X-Ray fixer αντίστοιχα.

B.13. ΜΑΡΤΥΡΕΣ ΓΝΩΣΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΒΑΡΩΝ

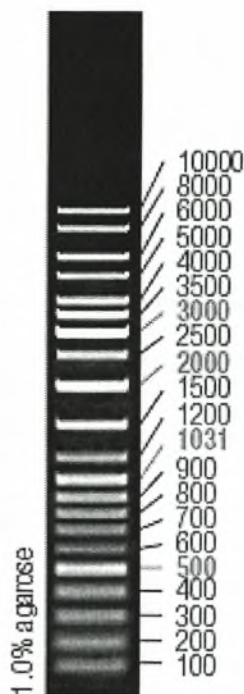
Απεικονίζονται οι μάρτυρες μοριακών βαρών που χρησιμοποιήθηκαν στην περίπτωση της ηλεκτροφόρησης ή της ποσοτικοποίησης DNA και στην περίπτωση της ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Όλοι οι μάρτυρες είναι της εταιρίας Fermentas και η συγκέντρωση καθενός ήταν 0,5 μg/μl.

Οι αριθμοί αναφέρονται στις έντονες ζώνες που αντιστοιχούν σε θραύσματα του DNA.

B.13.1. DNA μάρτυρες μοριακών βαρών



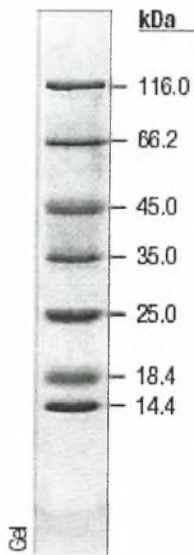
Lambda DNA / HindIII Marker



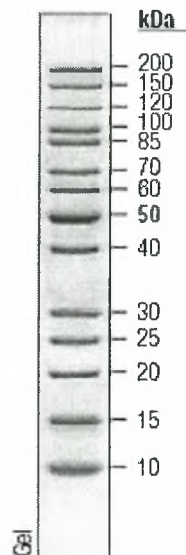
O' Gene Ruler™ DNA Ladder Mix

B.13.2. Πρωτεϊνικοί μάρτυρες μοριακών βαρών

Προκειμένου να εκτιμηθεί το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που αναφέρονται στα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκαν οι μοριακοί μάρτυρες που απεικονίζονται. Δίνονται τα kDa για κάθε ζώνη. Όλοι οι μάρτυρες είναι της εταιρίας Fermentas.



Unstained Protein Molecular
Weight Marker



Page Ruler™ Unstained
Protein Ladder

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η αλληλεπίδραση της SRPK1a με τον παράγοντα της πυρηνικής μήτρας SAFB1, ο οποίος δεν περιέχει περιοχή RS, φανερώνει τη πιθανή συμμετοχή της κινάσης και σε άλλες λειτουργίες εκτός του ματίσματος.

Προκειμένου να διερευνηθεί η βιολογική σημασία της μοριακής αλληλεπίδρασης της SRPK1a με τον πρωτεϊνικό παράγοντα SAFB1, ακολουθήθηκαν στην παρούσα εργασία τρεις κατευθύνσεις:

1) Μελέτη της επίδρασης του παράγοντα SAFB1 στη δράση της κινάσης

Έγιναν δοκιμασίες φωσφορυλίωσης γνωστών υποστρωμάτων της κινάσης SRPK1a παρουσία της πρωτεΐνης SAFB1. Δεδομένου ότι ο παράγοντας SAFB1 έχει βρεθεί να αλληλεπιδρά και με την κινάση SRPK1 (αν και σε μικρότερο βαθμό) (Nikolakaki *et al.*, 2001, Κοέν, 2006), έγιναν σε αρκετές περιπτώσεις παράλληλα πειράματα και με την κινάση SRPK1. Επιπλέον ελέγχθηκε και η επιρροή στη δράση των δύο κινασών του ομόλογου με τον SAFB1 παράγοντα, SAFB2. Ως υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν το αμινοτελικό τμήμα του υποδοχέα της λαμίνης B LBR, τμήμα του παράγοντα P2P-R και ένα πεπτίδιο προερχόμενο από την περιοχή RS του LBR. Για τον έλεγχο της επίδρασης των πρωτεϊνών SAFB1 και SAFB2 χρησιμοποιήθηκαν τμήματά τους σε *in vitro* πειράματα ή και ολόκληρες οι πρωτεΐνες σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης.

2) Μελέτη της επίδρασης του παράγοντα SAFB1 στον κυτταρικό εντοπισμό της κινάσης SRPK1a

Δεδομένου ότι οι κινάσες SR έχουν βρεθεί να είναι κυρίως κυτταροπλασματικές, πραγματοποιήθηκαν πειράματα φθορισμού-ανοσοφθορισμού μετά από συνέκφραση των δύο πρωτεϊνών σε καλλιέργειες κυττάρων, προκειμένου να διερευνηθεί εάν ο παράγοντας SAFB1 επηρεάζει τον υποκυτταρικό εντοπισμό της κινάσης SRPK1a. Παράλληλα διερευνήθηκε η επίδρασή του στον εντοπισμό της SRPK1, καθώς και η επίδραση του SAFB2 στον εντοπισμό των δύο κινασών.

3) Αναζήτηση νέων μοριακών αλληλεπιδράσεων του SAFB1 μέσω του συστήματος των δύο υβριδίων στον *S. cerevisiae*.

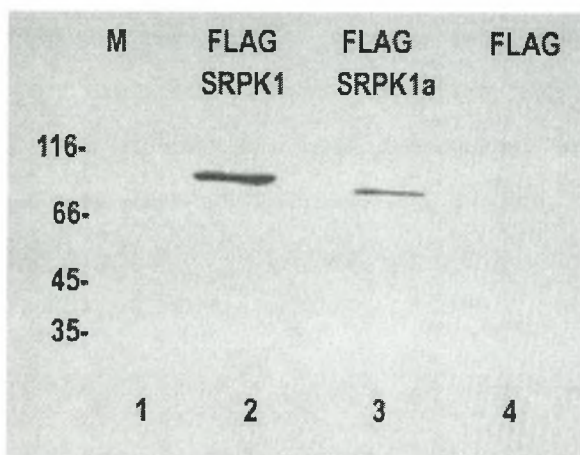
Από τις νέες μοριακές αλληλεπιδράσεις του SAFB1 που προέκυψαν και δεδομένου ότι καμία δεν περιείχε περιοχή RS, ούτε μια προφανή και άμεση σχέση με τις κινάσες RS, επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτη εκείνη η οποία επιδείκνυε διαφορετική συμπεριφορά (όπως και οι κινάσες SR) μεταξύ SAFB1 και SAFB2, η πρωτεΐνη επονομαζόμενη ERH (Enhancer of Rudimentary Homologue).

Γ.1. ΕΠΙΡΡΟΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ SRPK1a-SAFB ΣΤΗ ΔΡΑΣΗ ΚΙΝΑΣΗΣ ΤΗΣ SRPK1a

Έγιναν προσπάθειες να παρασκευαστεί η SRPK1a υπό μορφή σύντηξης σε GST σε βακτήρια, επειδή όμως αυτό αποδείχθηκε μη εφικτό αποφασίστηκε η απομόνωση των κινασών με ανοσοκατακρήμιση από κύτταρα θηλαστικών.

Γ.1.1. Υπερέκφραση των πρωτεϊνών FLAG-SRPK1a και FLAG-SRPK1 σε κύτταρα 293T

Έγινε επιμόλυνση κυττάρων 293T με τους πλασμιδιακούς φορείς pFLAG-CMV-2-SRPK1a και pFLAG-CMV-2-SRPK1 (ή pFLAG-CMV), οι οποίοι κωδικοποιούν για τις χμιαϊκές πρωτεΐνες FLAG-SRPK1a (~92kDa) και FLAG-SRPK1(~74kDa) αντίστοιχα. Μετά την πάροδο 24 ωρών έγινε λύση των κυττάρων και καθορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών του κυτταρικού εκχυλίσματος. Ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών σε 10% SDS-PAGE και επιβεβαίωση της έκφρασής τους με ανοσοαποτύπωση κατά Western με χρήση του anti-FLAG αντισώματος (Εικόνα 20).



Εικόνα 20: Ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα anti-FLAG των εκχυλισμάτων από κύτταρα 293T που υπερεκφράζουν τις πρωτεΐνες που αναγράφονται στις διαδρομές 2, 3 και 4. Στη διαδρομή 1 ηλεκτροφορήθηκε ο μάρτυρας μοριακών βαρών.

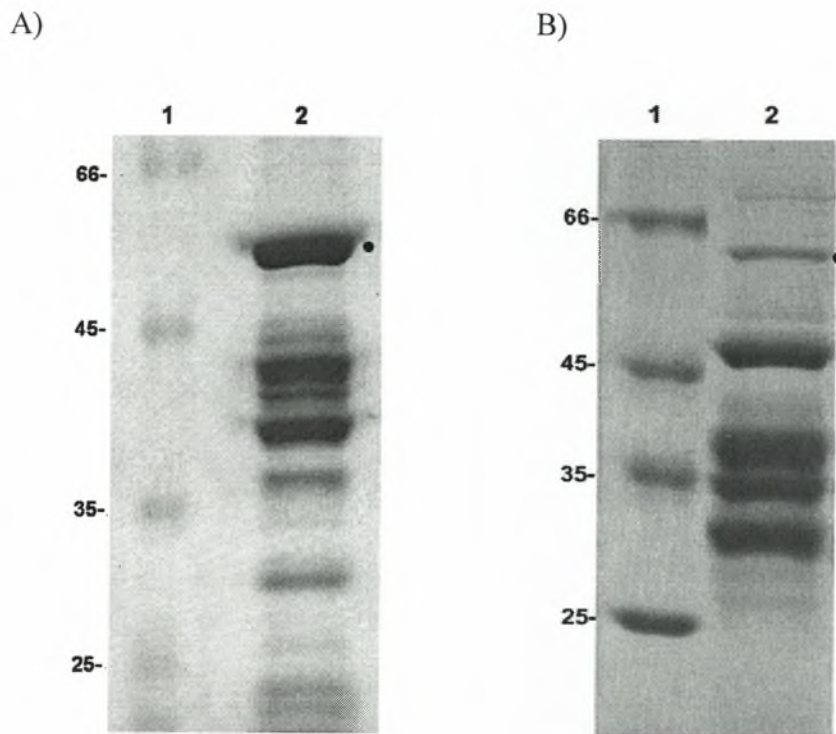
Γ.1.2. Επαγωγή των χιμαιρικών πρωτεϊνών GST-LBRNt και GST-SAFB1C σε βακτηριακά κύτταρα

Τα γονίδια που κωδικοποιούν το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης LBR (LBRNt) (αμινοξέα 1-205) κλωνοποιημένο στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-2T (pGEX-2T/LBRNt) και το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης SAFB1 (SAFB1C) (αμινοξέα 623-915) κλωνοποιημένο στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-2TK (pGEX-2TK/SAFB1C) μετασχημάτισαν κατάλληλα στελέχη *E. coli* (BL21-RIL) και έγινε επαγωγή των αντίστοιχων χιμαιρικών πρωτεϊνών με IPTG.

Σημειώνεται ότι προκειμένου να παρασκευασθεί και να ελεγχθεί ολόκληρη η πρωτεΐνη SAFB1 σε δοκιμασίες φωσφορυλίωσης *in vitro*, δοκιμάστηκαν και άλλες πλασμιδιακές κατασκευές αλλά δεν κατέστη δυνατό να παραχθεί πλήρους μεγέθους χιμαιρική πρωτεΐνη GST-SAFB1 σε βακτήρια. Παρόλο που δοκιμάστηκαν διάφορες συνθήκες έκφρασης της πρωτεΐνης όσον αφορά τη χρονική διάρκεια και την θερμοκρασία επώασης της βακτηριακής καλλιέργειας κατά τη διάρκεια της επαγωγής με IPTG, στα παρασκευάσματα οι χιμαιρικές πρωτεΐνες GST-SAFB1 ήταν πάντα μεγέθους μικρότερου του αναμενόμενου.

Ακολούθησε λύση των κυττάρων, ειδική κατεργασία των κυτταρικών εκχυλισμάτων και καθαρισμός των πρωτεϊνών GST-LBRNt και GST-SAFB1C. Από τα εκλούσματα των δύο πρωτεϊνών μέσω στήλης σεφαρόζης-γλουταθειόνης παραλήφθηκαν 20 μl, τα οποία ηλεκτροφορήθηκαν κάτω από μετουσιωτικές συνθήκες σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 10%. Η επιτυχής έκφραση των χιμαιρικών

πρωτεϊνών GST-LBRNt και GST-SAFB1C με αναμενόμενο μοριακό βάρος ~50kDa και ~58kDa αντίστοιχα ταυτοποιήθηκε μετά από βαφή της πηκτής με χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250. Φαίνονται (με τελεία) οι πλήρους μεγέθους πρωτεΐνες, ενώ οι υπόλοιπες ζώνες αντιπροσωπεύουν προϊόντα πρωτεόλυσης των δυο πρωτεϊνών (εικόνα 21).



Εικόνα 21: Ανάλυση με SDS PAGE και βαφή με Coomassie Brilliant Blue R-250 των εκφρασμένων σε βακτηριακά κύτταρα πρωτεϊνών GST-LBRNt (διαδρομή 2A) και GST-SAFB1C (διαδρομή 2B). Στις διαδρομές 1A, 1B απεικονίζονται οι μάρτυρες μοριακών βαρών.

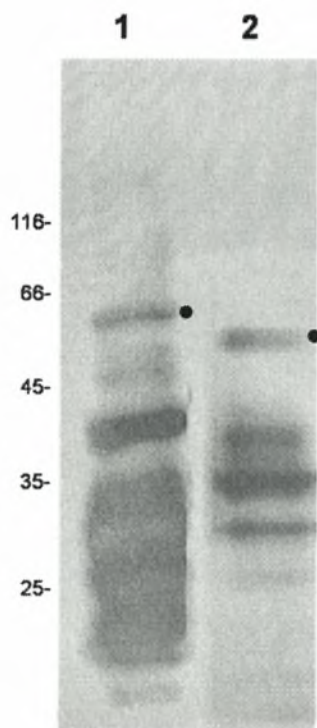
Γ.1.3. Προσδιορισμός συγκέντρωσης των πρωτεϊνών GST-SAFB1C και GST-LBRNt και επιβεβαίωση της έκφρασής τους με ανοσοαποτύπωση κατά Western

Έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GST-SAFB1C και GST-LBRNt με τη μέθοδο Bradford. Με βάση τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης για την κάθε πρωτεΐνη και την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης της πρωτεΐνης αναφοράς υπολογίσαμε τις συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών (πίνακας 2).

Πίνακας 2: Πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις

GST-πρωτεΐνη	Συγκέντρωση (C)
GST-SAFB1C	2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
GST-LBRNt	1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Στη συνέχεια επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη των επιθυμητών GST πρωτεϊνών στα εκλούσματα των GST-SAFB1C και GST-LBRNt με ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας το αντίσωμα anti-GST (εικόνα 22).



Εικόνα 22: Ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα anti-GST. Ηλεκτροφορήθηκαν 20 μg GST-SAFB1C (διαδρομή 1) και 2 μg GST-LBRNt (διαδρομή 2).

Η έκφραση και των δύο πρωτεϊνών ήταν επιτυχής όσον αφορά το μέγεθος καθώς στην εικόνα φαίνονται: α) στην διαδρομή 1 μία ζώνη μοριακού βάρους ~ 60 kD

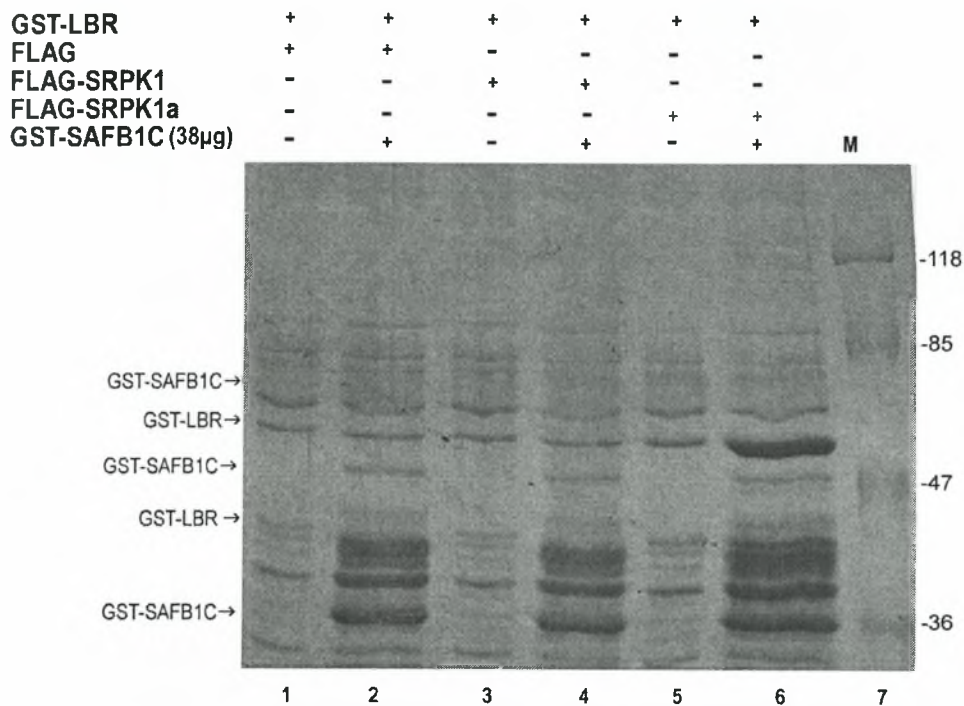
η οποία αντιστοιχεί στον πλήρους μεγέθους GST-SAFB1C, β) στην διαδρομή 2 μία ζώνη μοριακού βάρους ~50 kD η οποία αντιστοιχεί στον πλήρους μεγέθους GST-LBRNt. Φαίνονται (με τελεία) οι πλήρους μεγέθους πρωτεΐνες, ενώ οι υπόλοιπες ζώνες αντιπροσωπεύουν προϊόντα πρωτεόλυσης των δυο πρωτεϊνών. Όσον αφορά στα επίπεδα έκφρασης της πλήρους μεγέθους GST-SAFB1C, αυτά αποτελούν μόνο περίπου το 5% της συνολικής βακτηριακής παρασκευής σε όσες συνθήκες δοκιμάστηκαν

Γ.1.4. Έλεγχος της επίδρασης του GST-SAFB1C στη ενζυμική δράση των SRPK1a και SRPK1 με υπόστρωμα τον GST-LBRNt

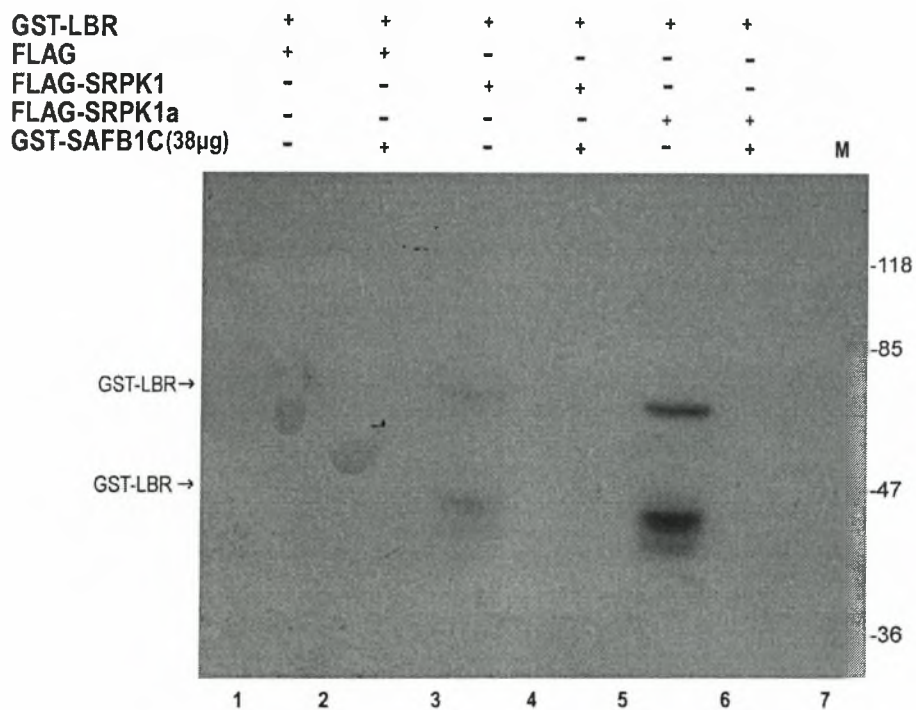
Πραγματοποιήθηκε έλεγχος της επιρροής της παρουσίας της απομονωμένης από *E.coli* χμιαϊκής πρωτεΐνης GST-SAFB1C στη δράση των απομονωμένων FLAG-SRPK1/1a κινασών, μέσω δοκιμασίας *in vitro* φωσφορυλίωσης της χμιαϊκής πρωτεΐνης GST-LBRNt, η οποία περιέχει μια περιοχή πλούσια σε διπεπτίδια RS. Για το σκοπό αυτό, έγινε ανοσοκατακρήμνιση των FLAG-SRPK1/1a κινασών και FLAG (ως αρνητικό control) με χρήση του αντισώματος anti-FLAG από 100μg εκχυλίσματος κυττάρων 293T που υπερεκφράζουν τις αντίστοιχες πρωτεΐνες. Στη συνέχεια οι ανοσοκατακρημνισμένες κινάσες επώαστηκαν με 2μg GST-LBRNt και [γ -³²P]ATP παρουσία ή απουσία της χμιαϊκής πρωτεΐνης GST-SAFB1C (38μg) για 15 min στους 30°C.

Ακολούθησε ανάλυση των δειγμάτων σε 10% SDS-PAGE και ανίχνευση των ραδιενεργά επισημασμένων πρωτεϊνών με αυτοραδιογραφία (εικόνα 23).

A)



B)



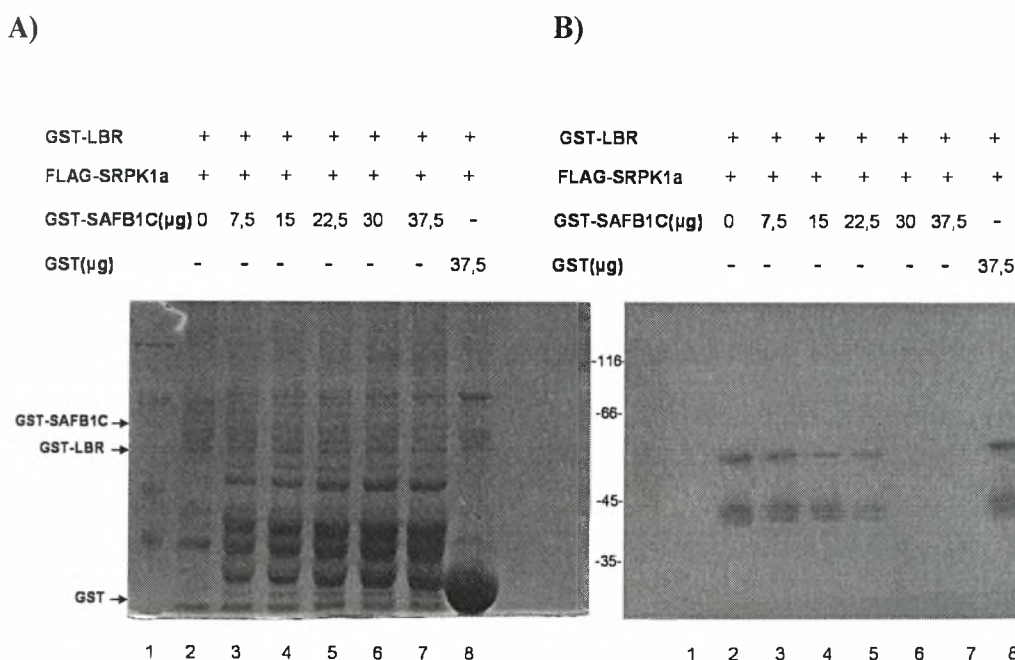
Εικόνα 23: Α) Ανάλυση σε SDS-PAGE των πρωτεϊνών των αντιδράσεων φωσφορυλίωσης. Η βαφή των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με Coomassie Brilliant Blue R-250. Στη διαδρομή 7 απεικονίζεται ο μάρτυρας μοριακών βαρών Β) Αυτοραδιογραφία της ηλεκτροφόρησης στην Α).

Αυτό που παρατηρήθηκε είναι ότι απουσία της πρωτεΐνης GST-SAFB1C, ο GST-LBRNt φωσφορυλιώνεται τόσο από την FLAG-SRPK1a όσο και από την FLAG-SRPK1 (σε μικρότερο βαθμό), ενώ όταν ο GST-SAFB1C είναι παρών η φωσφορυλίωση του GST-LBRNt αναστέλλεται και από τις δύο κινάσες (Εικόνα 23B). Επομένως ο SAFB1C αναστέλλει την ενζυμική δράση τόσο της SRPK1 όσο και της SRPK1a.

Γ.1.5. Επιβεβαίωση της αναστολής της φωσφορυλίωσης του GST-LBRNt παρουσία διαβαθμισμένων ποσοτήτων GST-SAFB1C

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η αναστολή φωσφορυλίωσης του GST-LBRNt που παρατηρήθηκε παρουσία του GST-SAFB1C, πραγματοποιήθηκε δοκιμασία *in vitro* φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης GST-LBRNt (2μg) παρουσία σταδιακά αυξανόμενων ποσοτήτων GST-SAFB1C 0, 7,5, 15, 22,5, 30 και 37,5μg.

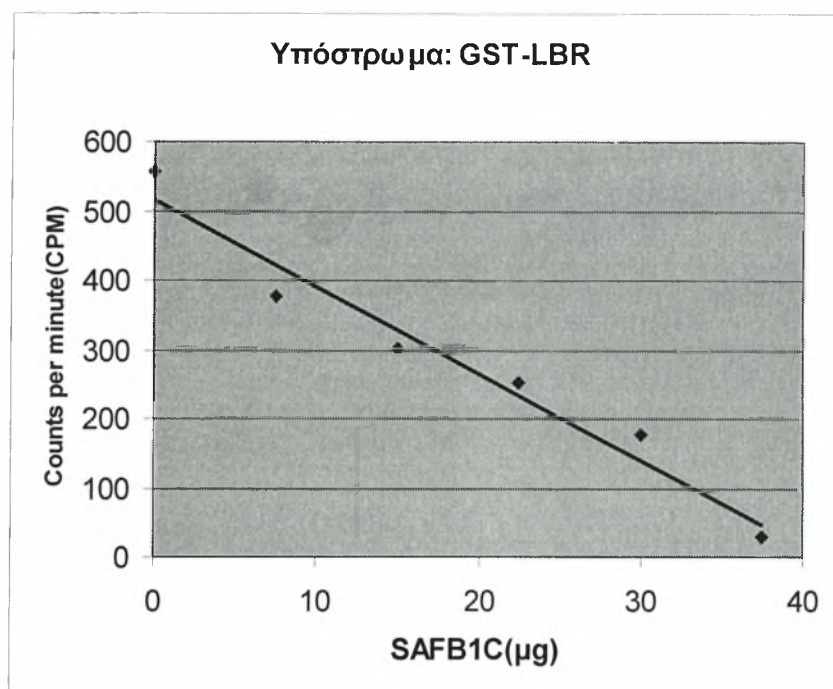
Ακολούθησε ανάλυση των δειγμάτων σε 10% SDS-PAGE και ανίχνευση των ραδιενεργά σημασμένων πρωτεϊνών με αυτοραδιογραφία (εικόνα 24).



Εικόνα 24: A) Ανάλυση σε SDS-PAGE των πρωτεϊνών των αντιδράσεων φωσφορυλίωσης. Η βαφή των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με Coomassie Brilliant Blue R-250. Στη διαδρομή 1 απεικονίζεται ο μάρτυρας μοριακών βαρών B) Αυτοραδιογραφία της ηλεκτροφόρησης στην A).

Αυτό που παρατηρήθηκε είναι ότι η δράση της SRPK1a ελαττώνεται σταδιακά σε σχέση με την προοδευτικά αυξανόμενη ποσότητα του GST-SAFB1C (εικόνα 24B). Επομένως η αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας της SRPK1a *in vitro* σχετίζεται ποσοτικά με τη συγκέντρωση του GST-SAFB1C. Όταν προστίθεται στην δοκιμασία η πρωτεΐνη GST (ως αρνητικό control) αντί για τον GST-SAFB1C (σε ποσότητα ίση με τη μέγιστη που χρησιμοποιήθηκε για τον GST-SAFB1C), ο GST-LBRNt φωσφορυλιώνεται εξίσου καλά όπως και απουσία GST-SAFB1C (διαδρομή 8B).

Έγινε μέτρηση των κρούσεων των ραδιενεργά σημασμένων ζωνών του φωσφορυλιωμένου υποστρώματος GST-LBRNt και κατασκευάστηκε καμπύλη η οποία επιβεβαιώνει ότι η αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας της SRPK1a σχετίζεται γραμμικά με την αύξηση της συγκέντρωσης του SAFB1C (εικόνα 25).

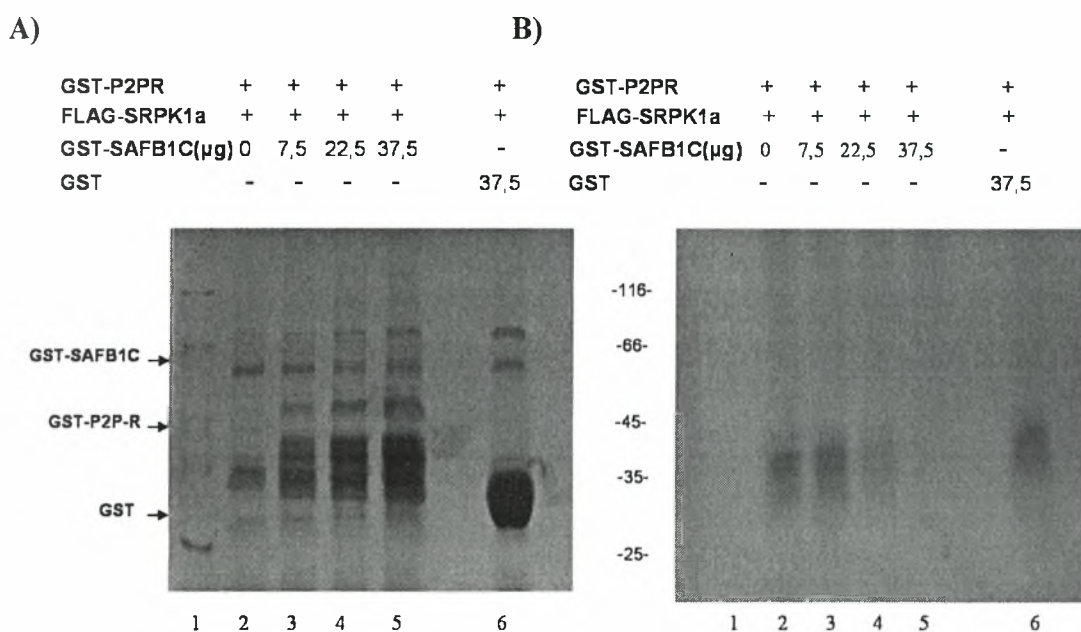


Εικόνα 25: Καμπύλη συσχέτισης της ενζυμικής δραστηριότητας της κινάσης SRPK1a με την ποσότητα του αναστολέα SAFB1C με βάση την ποσότητα του ενσωματωμένου ραδιενεργού φωσφόρου στο υπόστρωμα.

Γ.1.6. Έλεγχος της επίδρασης του GST-SAFB1C στην ενζυμική δράση της SRPK1a με υπόστρωμα τον GST-P2P-R

Προκειμένου να διερευνηθεί εάν η αναστολή που ασκείται από τον GST-SAFB1C στην ενζυμική δράση της SRPK1a ισχύει και για άλλα υποστρώματα, πραγματοποιήθηκε δοκιμασία *in vitro* φωσφορυλίωσης όπου χρησιμοποιήθηκε ένα άλλο γνωστό υπόστρωμα της κινάσης, η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη GST-P2P-R (4μg).

Ακολούθησε ανάλυση των δειγμάτων σε 10% SDS-PAGE και ανίχνευση των ραδιενεργά σημασμένων πρωτεϊνών σύντηξης με αυτοραδιογραφία (εικόνα 26). Αυτό που παρατηρήθηκε είναι ότι η δράση της κινάσης ελαττώνεται σταδιακά σε σχέση με την προοδευτικά αυξανόμενη ποσότητα του GST-SAFB1C, όταν χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα ο P2P-R (εικόνα 26B). Παρουσία GST ο P2P-R φωσφορυλιώνεται από την κινάση εξίσου καλά όπως και απουσία GST-SAFB1C (διαδρομή 6B).

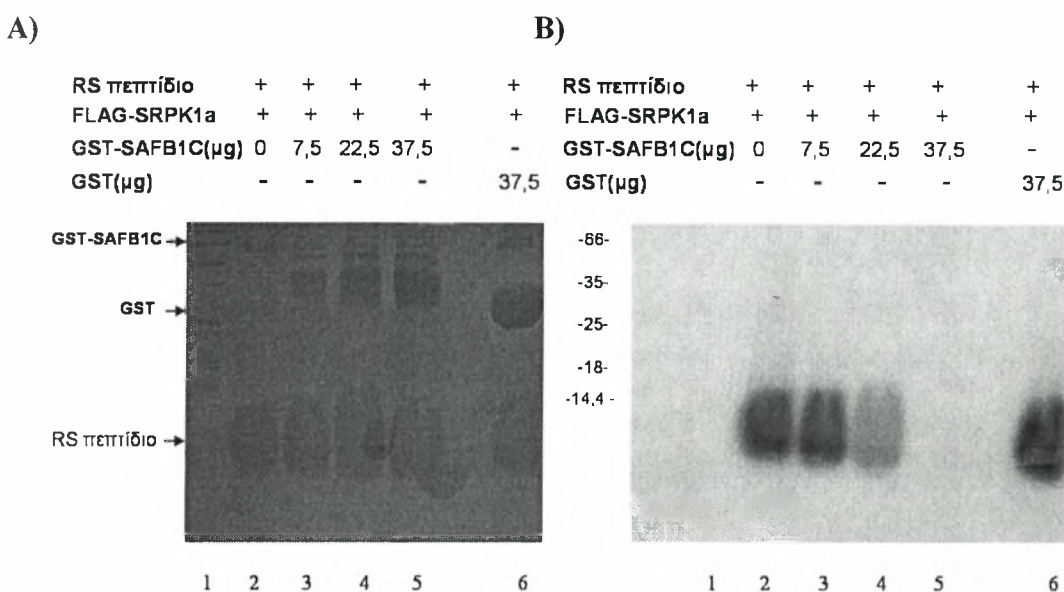


Εικόνα 26: Α) Ανάλυση σε SDS-PAGE των πρωτεϊνών των αντιδράσεων φωσφορυλίωσης. Η βαφή των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με Coomassie Brilliant Blue R-250. Στη διαδρομή 1 απεικονίζεται ο μάρτυρας μοριακών βαρών Β) Αυτοραδιογραφία της ηλεκτροφόρησης στην Α).

Γ.1.7. Έλεγχος της επίδρασης του GST-SAFB1C στην ενζυμική δράση της SRPK1a με υπόστρωμα συνθετικό πεπτίδιο

Για να αποκλειστεί τυχόν αλληλεπίδραση του SAFB1 με περιοχές των υποστρωμάτων της κινάσης, πραγματοποιήθηκε δοκιμασία *in vitro* φωσφορυλίωσης όπου χρησιμοποιήθηκε ένα συνθετικό πεπτίδιο σερίνης-αργινίνης (10μg) ως υπόστρωμα της SRPK1a. Το συνθετικό πεπτίδιο RS₀ κατασκευάστηκε με βάση την περιοχή RS του αμινοτελικού άκρου του LBR (Papoutsopoulou *et al*, 1999).

Ακολούθησε ανάλυση των δειγμάτων σε 10% SDS-PAGE και ανίχνευση των ραδιενεργά σημασμένων πρωτεϊνών σύντηξης με αυτοραδιογραφία (εικόνα 27).

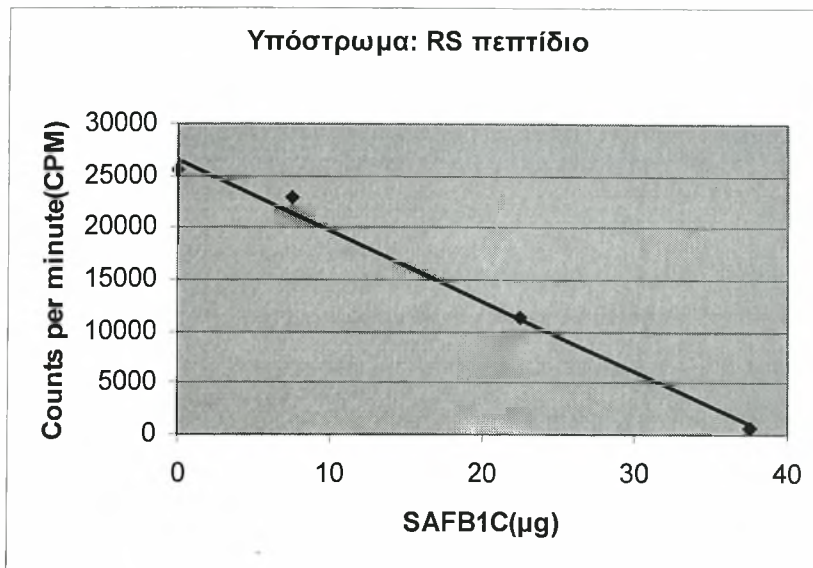


Εικόνα 27: Α) Ανάλυση σε SDS-PAGE των πρωτεϊνών των αντιδράσεων φωσφορυλίωσης. Η βαφή των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με Coomassie Brilliant Blue R-250. Στη διαδρομή 1 απεικονίζεται ο μάρτυρας μοριακών βαρών Β) Αυτοραδιογραφία της ηλεκτροφόρησης στην Α).

Όπως φαίνεται στην εικόνα 27B, το πεπτίδιο RS₀ φωσφορυλιώνεται από την ανοσοκατακρημνισμένη FLAG-SRPK1a μόνο κατά την απουσία του GST-SAFB1C. Επομένως με αυτό το αποτέλεσμα επιβεβαιώνεται ότι η αναστολή που ασκεί ο SAFB1C στην ενζυμική δράση της SRPK1a κινάσης είναι ανεξάρτητη του υποστρώματος που χρησιμοποιείται και δεν οφείλεται σε τυχόν ειδική δομική αλληλεπίδραση του SAFB1C με τον LBR ή τον P2P-R, η οποία πιθανόν

παρεμποδίζει την προσέγγιση και την φωσφορυλίωση της περιοχής RS από την κινάση.

Ακολούθησε μέτρηση των ραδιενεργά σημασμένων ζωνών του υποστρώματος και κατασκευή καμπύλης (εικόνα 28). Αυτή επιβεβαιώνει ότι η αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας της SRPK1a σχετίζεται ποσοτικά με τη συγκέντρωση του SAFB1C.



Εικόνα 28: Καμπύλη συσχέτισης της ενζυμικής δραστηριότητας της κινάσης SRPK1a με την ποσότητα του αναστολέα SAFB1C με βάση την ποσότητα του ενσωματωμένου ραδιενεργού φωσφόρου στο υπόστρωμα.

Γ.1.8. Κατασκευή βακτηριακού φορέα έκφρασης του SAFB1C από όπου λείπει η πλούσια σε RE περιοχή του

Δεδομένου ότι η καρβοξυτελική περιοχή του SAFB1 που χρησιμοποιήθηκε στις προηγούμενες *in vitro* δοκιμασίες περιέχει περιοχή πλούσια σε διπεπτίδια αργινίνης-γλουταμινικού οξέος, υποθέτουμε ότι η συγκεκριμένη περιοχή μπορεί να είναι υπεύθυνη για την αναστολή καθώς εμφανίζει ομοιότητα με μια φωσφορυλιωμένη περιοχή αργινίνης-σερίνης (το γλουταμινικό οξύ προσομοιάζει χημικά τη φωσφοσερίνη και η κινάση έχει θέση αναγνώρισης φωσφοσερίνης). Για αυτό το λόγο δημιουργήθηκε πλασμιδιακή κατασκευή, η οποία κωδικοποιεί την πρωτεΐνη GST-SAFB1C από την οποία έχει αφαιρεθεί η πλούσια σε διπεπτίδια

αργινίνης-γλουταμινικού οξέος περιοχή (GST-SAFB1CΔRE) (Εικόνα 29). Η κατασκευή του πλασμιδιακού φορέα πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με την φοιτήτρια Αλεξάνδρα Τζιτζιρα. (Τζιτζιρα Α., 2006).

```

          63Q          64Q          65Q          66Q
          SRVRSERERE QRMQAQWERE EREERLEIARE RLAFQQRLE
67Q          68Q          69Q          70Q          71Q          72Q
REPMERERLE RERMHVHER RREQERIHRE REELRRQOEI RYEQERRPAV RRPYDLDRD
73Q          74Q          75Q          76Q          77Q          78Q
DAYWPEAKRA GLDERYHSDF NRQERFHDFD HRDRGRYPDH SVDRREGSRS MMGEREGQH Y
79Q          80Q          81Q          82Q          83Q          84Q
PERHGGPERH GRDSRDGWWG YGSDKRMSEG RGLPPPPRRD WGDHGRRED D RSWQGTADGG
85Q          86Q          87Q          88Q          89Q          90Q
MMDRDHKRWQ GGERSMSGHS GPGHMMNRGG MSGRGSFAPG GASRGHPIPH GGMQGGFGGQ
91Q
SRGSRPSDARFTRRY

```

Εικόνα 29: Αμινοξική αλληλουχία του καρβοξυτελικού άκρου του GST-SAFB1C. Με κόκκινο απεικονίζεται η πλούσια σε RE περιοχή και με μπλε η περιοχή που ενισχύθηκε με PCR.

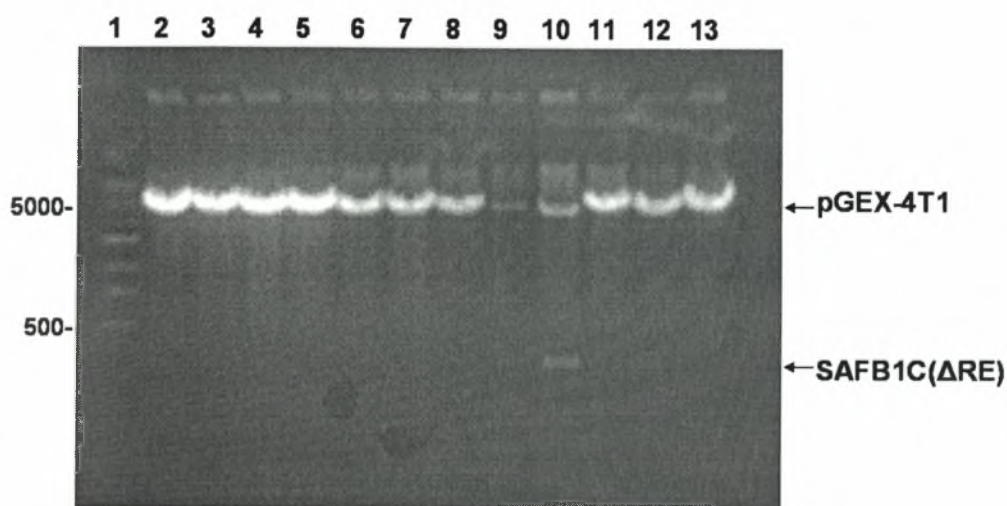
Πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) όπου σαν εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε η πλασμιδιακή κατασκευή pGEX-2TK/SAFB1C. Οι εκκινητές έχουν θέσεις αναγνώρισης των ενδονουκλεασών περιορισμού BamHI (ο νοηματικός εκκινητής) και EcoRI (ο αντινοηματικός) για να είναι τα άκρα τους συμβατά με το πλασμίδιο φορέα pGEX-4T1. Ως νοηματικός εκκινητής χρησιμοποιήθηκε ο 5S1CΔRE και ως αντινοηματικός ο 3S1CΔRE.

Το προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης SAFB1C(ΔRE), αφού πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του, απομονώθηκε από πηκτή αγαρόζης, ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1% όπου υπολογίστηκε η συγκέντρωση του και επώαστηκε με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού BamHI και EcoRI.

Παράλληλα, προκειμένου το πλασμίδιο pGEX-4T1 να καταστεί κατάλληλος φορέας για την κλωνοποίηση του ενθέματος, 10 μg πλασμιδιακού DNA επώασθηκαν με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού EcoRI και BamHI, επιβεβαιώθηκε ότι η πέψη του ήταν πλήρης, έγινε επεξεργασία του με αλκαλική φωσφατάση (CIP), εκχυλίσαι με φαινόλη/χλωροφόρμιο, κατακρήμνιση με αιθανόλη και τέλος επαναδιάλυσή του σε 50μl ddH₂O.

Στη συνέχεια ακολούθησε αντίδραση σύνδεσης, όπου η μοριακή αναλογία φορέα-ενθέματος ήταν 1:5, μετασχηματισμός με τα προϊόντα της αντίδρασης σύνδεσης βακτηριακών κυττάρων *E.coli* Top10 και από τις αποικίες που προέκυψαν επιλέχθηκαν τυχαία 12 από τις οποίες απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA μικρής κλίμακας. Ακολούθησε πέψη των πλασμιδιακών DNA με τις ενδονουκλεάσες

περιορισμού BamHI και EcoRI και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης για να διαπιστωθεί ποια μόρια περιέχουν το επιθυμητό ένθεμα (εικόνα 30). Από την φωτογραφία φαίνεται ότι τα πλασμιδιακά DNA των διαδρομών 9 και 10 παρουσίασαν το ένθεμα του σωστού μεγέθους (624bp) μετά την πέψη τους με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού EcoRI-BamHI. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι τα πλασμίδια των συγκεκριμένων διαδρομών είναι ανασυνδυασμένα και κατάλληλα για την παραγωγή της πρωτεΐνης GST-SAFB1C(ΔRE).



Εικόνα 30: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%. Διαδρομή 1: 1 μl μάρτυρας μοριακών βαρών, Διαδρομές 2-13: 10 μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με EcoRI-BamHI.

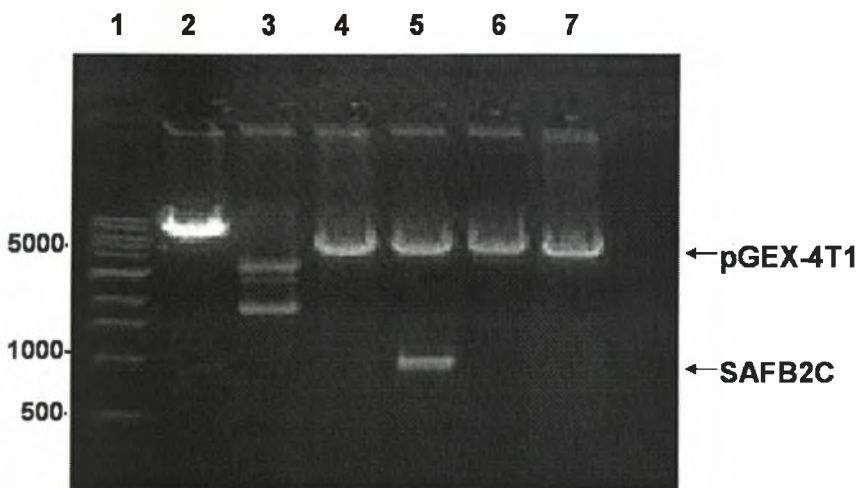
Γ.1.9. Κατασκευή βακτηριακού φορέα έκφρασης του καρβοξυτελικού άκρου του SAFB2

Προκειμένου να διερευνηθεί η επιρροή της παρουσίας του SAFB2 στην δράση της κινάσης SRPK1a δημιουργήθηκε πλασμιδιακή κατασκευή, η οποία κωδικοποιεί το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης SAFB2 (αμινοξέα 641-953) με αλληλουχία αντίστοιχη με αυτή του SAFB1C σε σύντηξη με GST (GST-SAFB2C). Η κατασκευή του πλασμιδιακού φορέα πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με την φοιτήτρια Αλεξάνδρα Τζιτζιρα (Τζιτζιρα Α., 2006). Πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) όπου σαν εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε η πλασμιδιακή

κατασκευή pEGFP-SAFB2. Οι εκκινητές έχουν θέσεις αναγνώρισης των ενδονουκλεασών περιορισμού BamHI (ο νοηματικός εκκινητής) και EcoRI (ο αντινοσηματικός) για να είναι τα άκρα τους συμβατά με το πλασμίδιο φορέα pGEX-4T1. Ως νοηματικός εκκινητής χρησιμοποιήθηκε ο 5S2C και ως αντινοσηματικός ο 3S2C.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι ίδια με αυτή της κλωνοποίησης του SAFB1CΔRE στο πλασμίδιο pGEX-4T1. Αφού έγινε κατεργασία των επιθυμητών DNA που προέκυψαν κάτω από ειδικές συνθήκες ακολούθησε αντίδραση σύνδεσης, όπου η μοριακή αναλογία φορέα-ενθέματος ήταν 1:5.

Στη συνέχεια έγινε μετασηματισμός με τα προϊόντα της αντίδρασης σύνδεσης βακτηριακών κυττάρων *E.coli* Top10 και από τις αποικίες που προέκυψαν επιλέχθηκαν τυχαία 7 από τις οποίες απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA μικρής κλίμακας. Ακολούθησε πέψη των πλασμιδιακών DNA με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού BamHI και EcoRI και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης για να διαπιστωθεί ποια μόρια περιέχουν το επιθυμητό ένθεμα (εικόνα 31). Από την φωτογραφία φαίνεται ότι το πλασμιδιακό DNA της διαδρομής 5 παρουσίασε το ένθεμα του αναμενόμενου μεγέθους (942bp) μετά από την πέψη τους με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού EcoRI και BamHI. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι το πλασμίδιο της συγκεκριμένης διαδρομής είναι ανασυνδυασμένο και κατάλληλο για παραγωγή της πρωτεΐνης GST-SAFB2C.

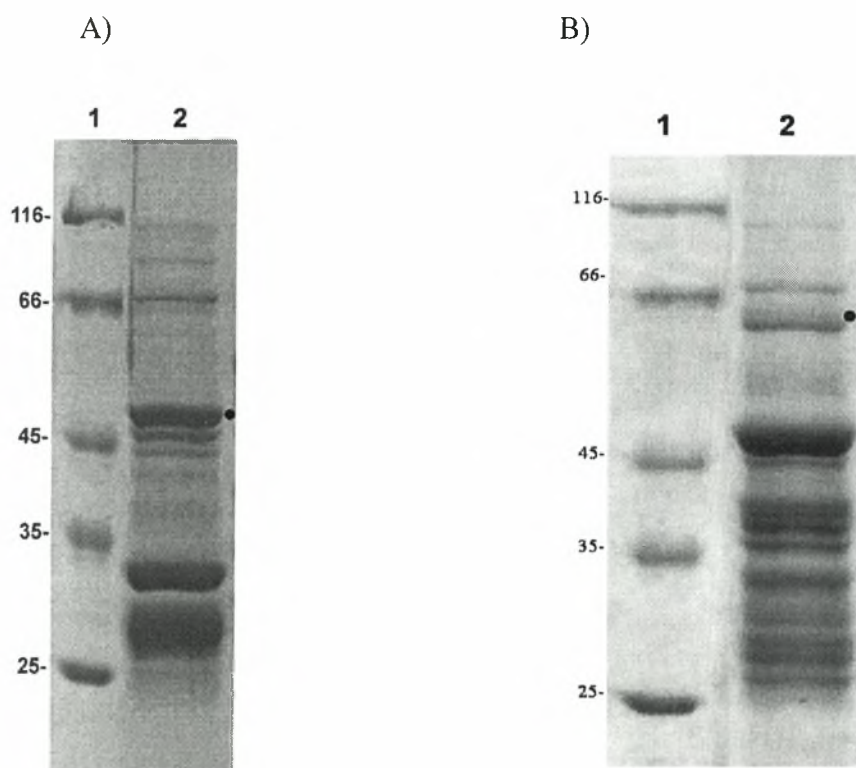


Εικόνα 31 : Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%. Διαδρομή 1: 1 μl μάρτυρας μοριακών βαρών, Διαδρομές 2-7: 10 μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με EcoRI-BamHI.

Γ.1.10. Επαγωγή των χμαιοικών πρωτεϊνών GST-SAFB1CARE και GST-SAFB2C σε βακτηριακά κύτταρα

Μετά την κατασκευή των πλασμιδίων που έφεραν τα επιθυμητά cDNA και τον μετασχηματισμό τους σε κατάλληλα στελέχη *E. coli* (BL21-RIL), έγινε επαγωγή των αντίστοιχων χμαιοικών πρωτεϊνών με IPTG. Ακολούθησε λύση των κυττάρων, ειδική κατεργασία των κυτταρικών εκχυλισμάτων και καθαρισμός των πρωτεϊνών GST-SAFB1CARE και GST-SAFB2C. Από τα εκλούσματα των δύο πρωτεϊνών μέσω στήλης σεφαρόζης-γλουταθειόνης παραλήφθηκαν 20 μl, τα οποία ηλεκτροφορήθηκαν κάτω από μετουσιωτικές συνθήκες σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10%.

Η επιτυχής έκφραση των χμαιοικών πρωτεϊνών GST-SAFB1CARE και GST-SAFB2C με αναμενόμενο μοριακό βάρος ~49kDa και ~60kDa αντίστοιχα ταυτοποιήθηκε μετά από βαφή της πηκτής με χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250 (εικόνα 32). Φαίνονται (με τελεία) οι πρωτεΐνες πλήρους μεγέθους.



Εικόνα 32: Ανάλυση με SDS PAGE και βαφή με Coomassie Brilliant Blue R-250 των εκφρασμένων σε βακτηριακά κύτταρα πρωτεϊνών GST-SAFB1CARE (διαδρομή 2A) και GST-SAFB2C (διαδρομή 2B). Στις διαδρομές 1A, 1B απεικονίζονται οι μάρτυρες μοριακών βαρών.

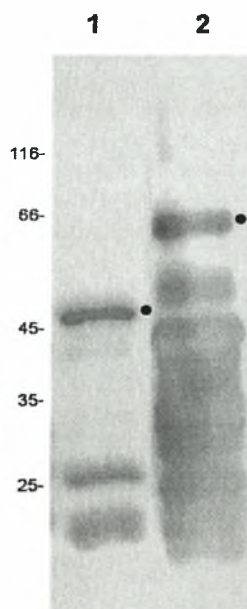
Γ.1.11. Προσδιορισμός συγκέντρωσης της πρωτεΐνης GST-SAFB1C(ΔRE) και GST-SAFB2C και επιβεβαίωση της έκφρασής τους με ανοσοαποτύπωση κατά Western

Έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GST-SAFB1C(ΔRE) και GST-SAFB2C με τη μέθοδο Bradford. Με βάση τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης για την κάθε πρωτεΐνη και την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης της πρωτεΐνης αναφοράς υπολογίσαμε τις συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών (πίνακας 3)

Πίνακας 3: Πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις

GST-πρωτεΐνη	Συγκέντρωση (C)
GST-SAFB1C(ΔRE)	2.5 μg/μl
GST-SAFB2C	1.8 μg/μl

Στη συνέχεια επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη των επιθυμητών GST πρωτεϊνών στα εκλούσματα των GST-SAFB1CΔRE και GST-SAFB2C με ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας το αντίσωμα anti-GST (εικόνα 33).



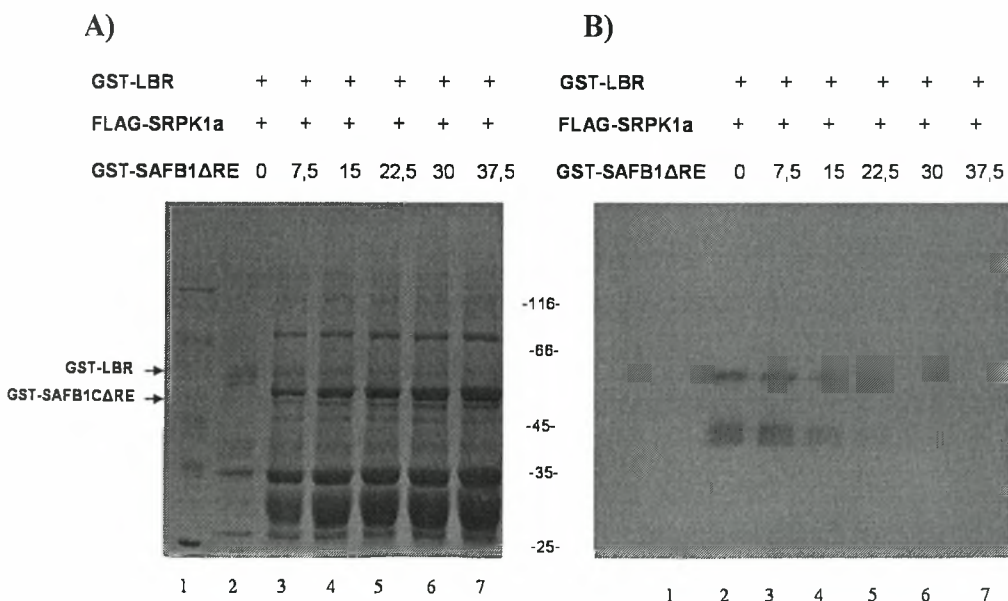
Εικόνα 33: Ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα anti-GST. Ηλεκτροφορήθηκαν 20 μg GST-SAFB1CΔRE (διαδρομή 1) και 2 μg GST-LBRNTt (διαδρομή 2).

Η έκφραση και των δύο πρωτεϊνών ήταν επιτυχής καθώς στην εικόνα φαίνονται: α) στην διαδρομή 1 μία ζώνη μοριακού βάρους ~49 kD η οποία αντιστοιχεί στον πλήρους μεγέθους GST-SAFB1C(ΔRE), β) στην διαδρομή 2 μία ζώνη μοριακού βάρους ~60 kD η οποία αντιστοιχεί στον πλήρους μεγέθους GST-SAFB2C. Φαίνονται (με τελεία) οι πλήρους μεγέθους πρωτεΐνες, ενώ οι υπόλοιπες ζώνες αντιπροσωπεύουν προϊόντα πρωτεόλυσης των δυο πρωτεϊνών. Όσον αφορά στα επίπεδα έκφρασης της πλήρους μεγέθους GST-SAFB2C αυτά αποτελούν μόνο περίπου το 10% της συνολικής βακτηριακής παρασκευής σε όσες συνθήκες δοκιμάστηκαν.

Γ.1.12. Έλεγχος της επίδρασης του GST-SAFB1C(ΔRE) στη ενζυμική δράση της SRPK1a με υπόστρωμα τον GST-LBRNt

Προκειμένου να διερευνηθεί η επιρροή του SAFB1C(ΔRE) στη δράση της κινάσης FLAG-SRPK1a, πραγματοποιήθηκε δοκιμασία *in vitro* φωσφορυλίωσης του υποστρώματος GST-LBRNt (2μg) παρουσία σταδιακά αυξανόμενων ποσοτήτων GST-SAFB1C(ΔRE) 0, 7,5, 15, 22,5, 30 και 37,5μg.

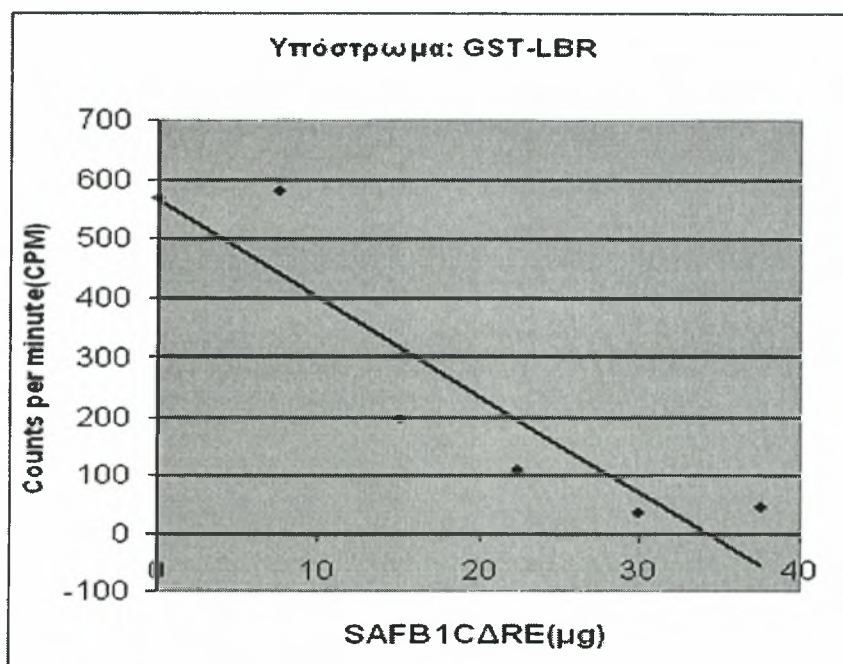
Έγινε ανάλυση των δειγμάτων σε 10% SDS-PAGE και ανίχνευση των ραδιοενεργά σημασμένων πρωτεϊνών σύντηξης με αυτοραδιογραφία (εικόνα 34).



Εικόνα 34: Α) Ανάλυση σε SDS-PAGE των πρωτεϊνών των αντιδράσεων φωσφορυλίωσης. Η βαφή των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με Coomassie Brilliant Blue R-250. Στη διαδρομή 1 απεικονίζεται ο μάρτυρας μοριακών βαρών Β) Αυτοραδιογραφία της ηλεκτροφόρησης στην Α).

Όπως φαίνεται στην εικόνα 34B η δράση της κινάσης SRPK1a ελαττώνεται σταδιακά σε σχέση με την προοδευτικά αυξανόμενη ποσότητα του GST-SAFB1C(ΔRE), όταν χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα ο LBRNt. Όπως και στην περίπτωση του SAFB1C, η φωσφορυλίωση του υποστρώματος αναστέλλεται πλήρως παρουσία GST-SAFB1C(ΔRE).

Ακολούθησε μέτρηση των ραδιενεργά σημασμένων ζωνών του υποστρώματος και κατασκευή καμπύλης (εικόνα 35). Αυτή επιβεβαιώνει ότι η αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας της SRPK1a σχετίζεται ποσοτικά με τη συγκέντρωση του SAFB1C(ΔRE). Επομένως η πλούσια σε διπεπτίδια αργινίνης-σερίνης περιοχή του SAFB1C που αφαιρέθηκε δεν φαίνεται να παίζει ρόλο στη αναστολή της ενζυμικής δράσης της κινάσης SRPK1a.

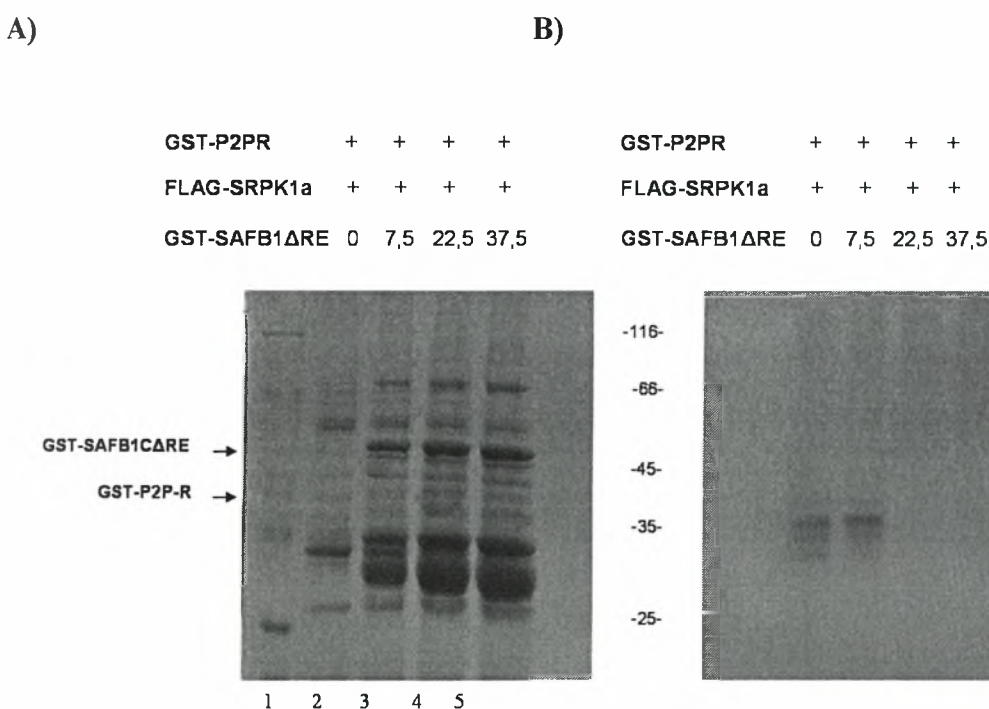


Εικόνα 35: Καμπύλη συσχέτισης της ενζυμικής δραστηριότητας της κινάσης SRPK1a με την ποσότητα του αναστολέα SAFB1C(ΔRE) με βάση την ποσότητα του ενσωματωμένου ραδιενεργού φωσφόρου στο υπόστρωμα.

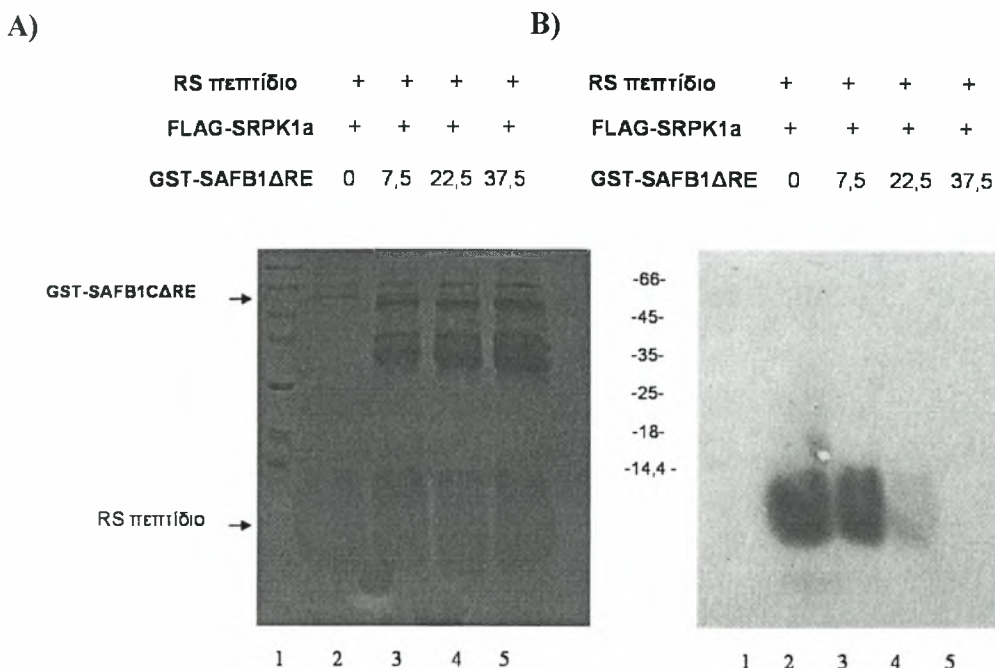
Γ.1.13. Έλεγχος της επίδρασης του GST-SAFB1C(ΔRE) στη ενζυμική δράση της SRPK1a με υποστρώματα τον GST-P2P-R και το πεπτίδιο RS₀

Πραγματοποιήθηκε *in vitro* δοκιμασία φωσφορυλίωσης με εναλλακτικά υποστρώματα της κινάσης, με σκοπό να διερευνηθεί εάν η αναστολή που ασκείται από τον GST-SAFB1C(ΔRE) στην ενζυμική δραστηριότητα της SRPK1a είναι εξαρτώμενη από το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα ο GST-P2P-R (4μg) και το συνθετικό πεπτίδιο RS₀ (10μg) παρουσία σταδιακά αυξανόμενων ποσοτήτων GST-SAFB1C(ΔRE) 0, 7,5, 22,5 και 37,5μg.

Έγινε ανάλυση των δειγμάτων σε 10% SDS-PAGE και ανίχνευση των ραδιενεργά σημασμένων πρωτεϊνών σύντηξης με αυτοραδιογραφία (εικόνες 36, 37). Αυτό που παρατηρήθηκε είναι ότι η δραστηριότητα της κινάσης SRPK1a ελαττώνεται σταδιακά σε σχέση με την προοδευτικά αυξανόμενη ποσότητα του GST-SAFB1C(ΔRE), όταν χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα τόσο ο GST-P2P-R (εικόνα 36B) όσο και το πεπτίδιο RS₀ (εικόνα 37B).

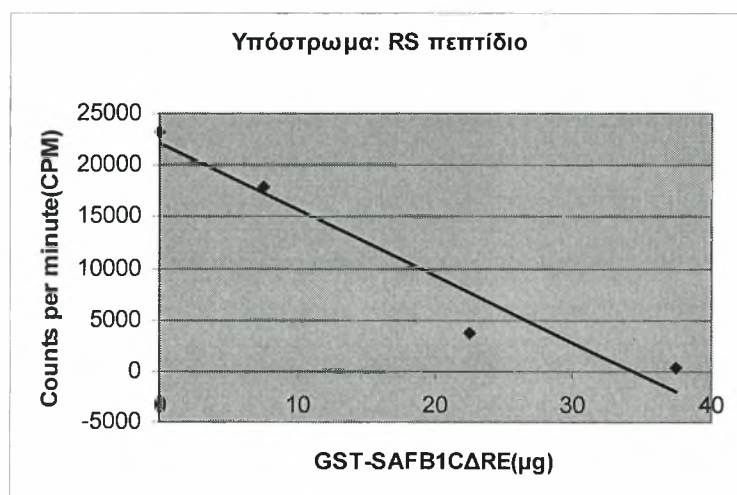


Εικόνα 36: A) Ανάλυση σε SDS-PAGE των πρωτεϊνών των αντιδράσεων φωσφορυλίωσης. Η βαφή των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με Coomassie Brilliant Blue R-250. Στη διαδρομή 1 απεικονίζεται ο μάρτυρας μοριακών βαρών B) Αυτοραδιογραφία της ηλεκτροφόρησης στην A).



Εικόνα 37: Α) Ανάλυση σε SDS-PAGE των πρωτεϊνών των αντιδράσεων φωσφορυλίωσης. Η βαφή των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με Coomassie Brilliant Blue R-250. Στη διαδρομή 1 απεικονίζεται ο μάρτυρας μοριακών βαρών Β) Αυτοραδιογραφία της ηλεκτροφόρησης στην Α).

Ακολούθησε μέτρηση των ραδιενεργά σημασμένων ζωνών του πεπτιδίου RS_0 και κατασκευή καμπύλης (εικόνα 38). Αυτή επιβεβαιώνει ότι η αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας της SRPK1a σχετίζεται ποσοτικά με τη συγκέντρωση του SAFB1C(ΔRE) και δεν είναι εξαρτώμενη από το υπόστρωμα της κινάσης.

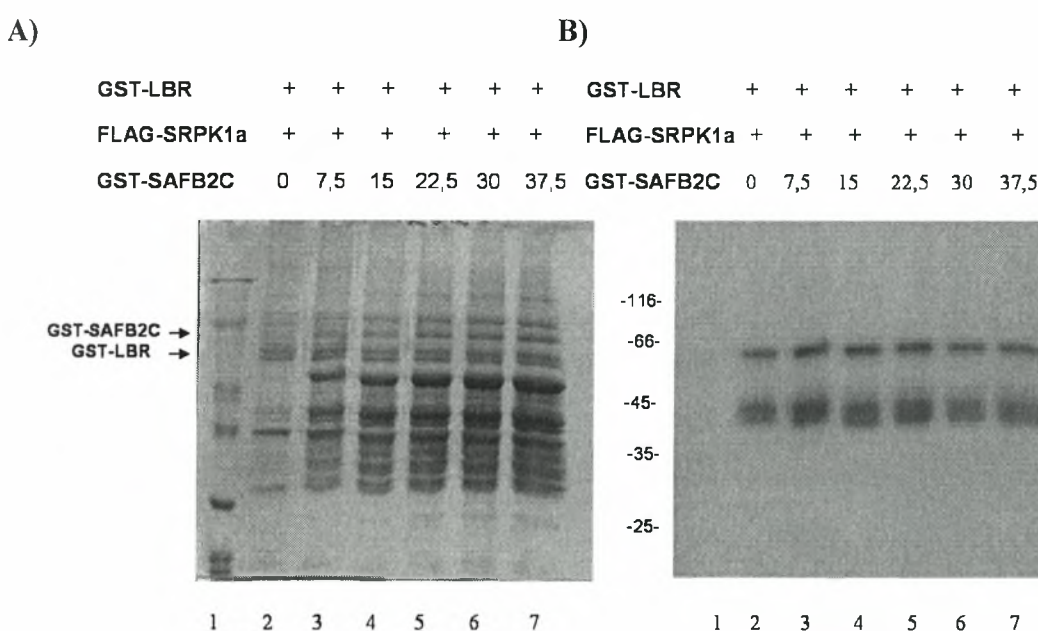


Εικόνα 38: Καμπύλη συσχέτισης της ενζυμικής δραστηριότητας της κινάσης SRPK1a με την ποσότητα του αναστολέα SAFB1C(ΔRE) με βάση την ποσότητα του ενσωματωμένου ραδιενεργού φωσφόρου στο υπόστρωμα.

Γ.1.14 Έλεγχος της επίδρασης του GST-SAFB2C στη ενζυμική δράση της SRPK1a κινάσης παρουσία GST-LBRNt ως υπόστρωμα

Προκειμένου να ελεγχθεί εάν ο SAFB2C επηρεάζει την ενζυμική δράση της SRPK1a, έγινε *in vitro* πείραμα φωσφορυλίωσης του υποστρώματος GST-LBRNt (2μg) παρουσία σταδιακά αυξανόμενων ποσοτήτων GST-SAFB2C 0, 7,5, 15, 22,5, 30 και 37,5μg.

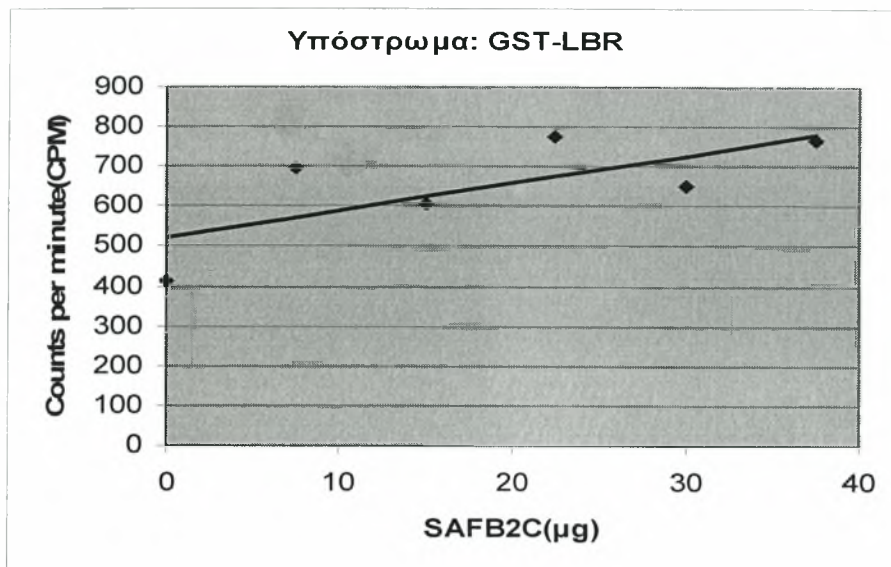
Ακολούθησε ανάλυση των δειγμάτων σε 10% SDS-PAGE και ανίχνευση των ραδιενεργά σημασμένων πρωτεϊνών σύντηξης με αυτοραδιογραφία (εικόνα 39).



Εικόνα 39: Α) Ανάλυση σε SDS-PAGE των πρωτεϊνών των αντιδράσεων φωσφορυλίωσης. Η βαφή των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με Coomassie Brilliant Blue R-250. Στη διαδρομή 1 απεικονίζεται ο μάρτυρας μοριακών βαρών Β) Αυτοραδιογραφία της ηλεκτροφόρησης στην Α).

Όπως φαίνεται στην εικόνα 39B, η δράση της κινάσης SRPK1a δεν επηρεάζεται από την παρουσία του GST-SAFB2C, καθώς δεν παρατηρείται αναστολή της φωσφορυλίωσης του GST-LBRNt ακόμη και όταν χρησιμοποιείται η μέγιστη ποσότητα του GST-SAFB2C (διαδρομές 2B-7B).

Έγινε μέτρηση των ραδιενεργά σημασμένων ζωνών του υποστρώματος GST-LBRNt και η καμπύλη που προέκυψε επιβεβαιώνει ότι η ενζυμική δραστηριότητα της SRPK1a δεν αναστέλλεται παρουσία του SAFB2C (εικόνα 40).

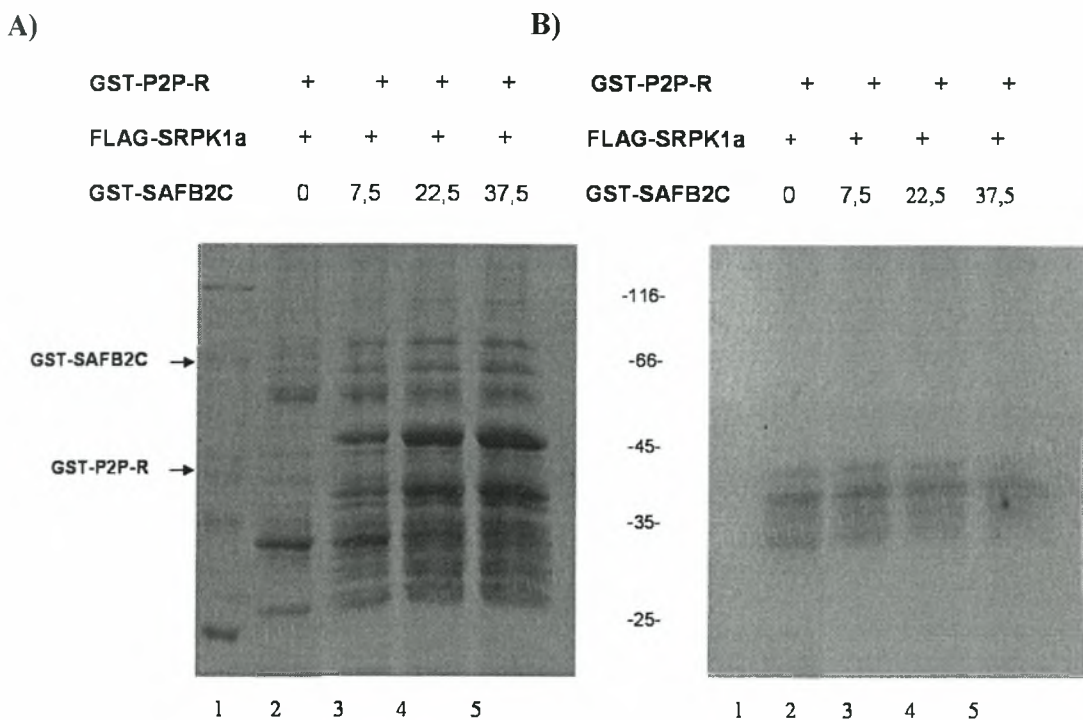


Εικόνα 40: Καμπύλη συσχέτισης της ενζυμικής δραστηριότητας της κινάσης SRPK1a με την ποσότητα του SAFB2C με βάση την ποσότητα του ενσωματωμένου ραδιενεργού φωσφόρου στο υπόστρωμα.

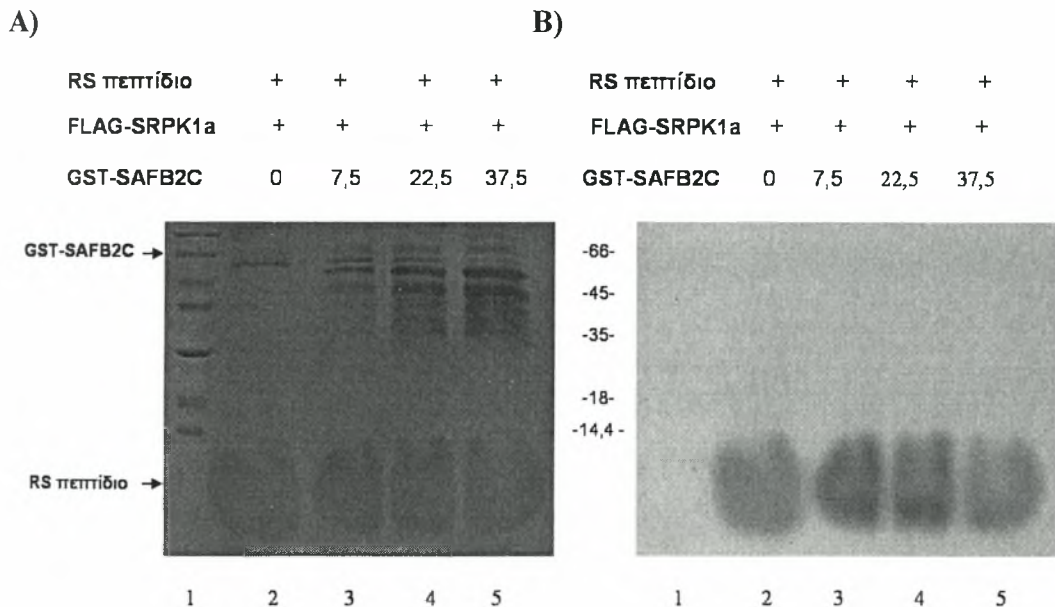
Γ.1.15. Έλεγχος της επίδρασης του GST-SAFB2C στη ενζυμική δράση της SRPK1a με υποστρώματα τον GST-P2P-R και το πεπτίδιο RS₀

Πραγματοποιήθηκε *in vitro* δοκιμασία φωσφορυλίωσης όπου χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα ο GST-P2P-R (4μg) και το συνθετικό πεπτίδιο RS₀ (10μg) παρουσία σταδιακά αυξανόμενων ποσοτήτων GST-SAFB2C 0, 7,5, 22,5 και 37,5μg.

Ακολούθησε ανάλυση των δειγμάτων σε 10% SDS-PAGE και ανίχνευση των ραδιενεργά σημασμένων πρωτεϊνών σύντηξης με αυτοραδιογραφία (εικόνες 41, 42). Αυτό που παρατηρήθηκε είναι ότι η δράση της κινάσης SRPK1a δεν επηρεάζεται από την παρουσία του GST-SAFB2C, καθώς δεν παρατηρείται αναστολή της φωσφορυλίωσης τόσο του GST-P2P-R όσο και του πεπτιδίου RS₀.

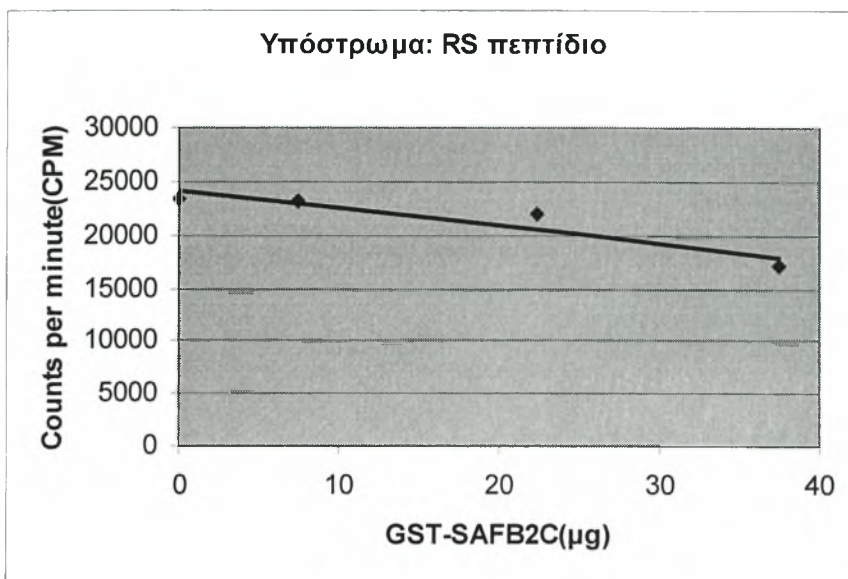


Εικόνα 41: A) Ανάλυση σε SDS-PAGE των πρωτεϊνών των αντιδράσεων φωσφορυλίωσης. Η βαφή των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με Coomassie Brilliant Blue R-250. Στη διαδρομή 1 απεικονίζεται ο μάρτυρας μοριακών βαρών B) Αυτοραδιογραφία της ηλεκτροφόρησης στην A).



Εικόνα 42: A) Ανάλυση σε SDS-PAGE των πρωτεϊνών των αντιδράσεων φωσφορυλίωσης. Η βαφή των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με Coomassie Brilliant Blue R-250. Στη διαδρομή 1 απεικονίζεται ο μάρτυρας μοριακών βαρών B) Αυτοραδιογραφία της ηλεκτροφόρησης στην A).

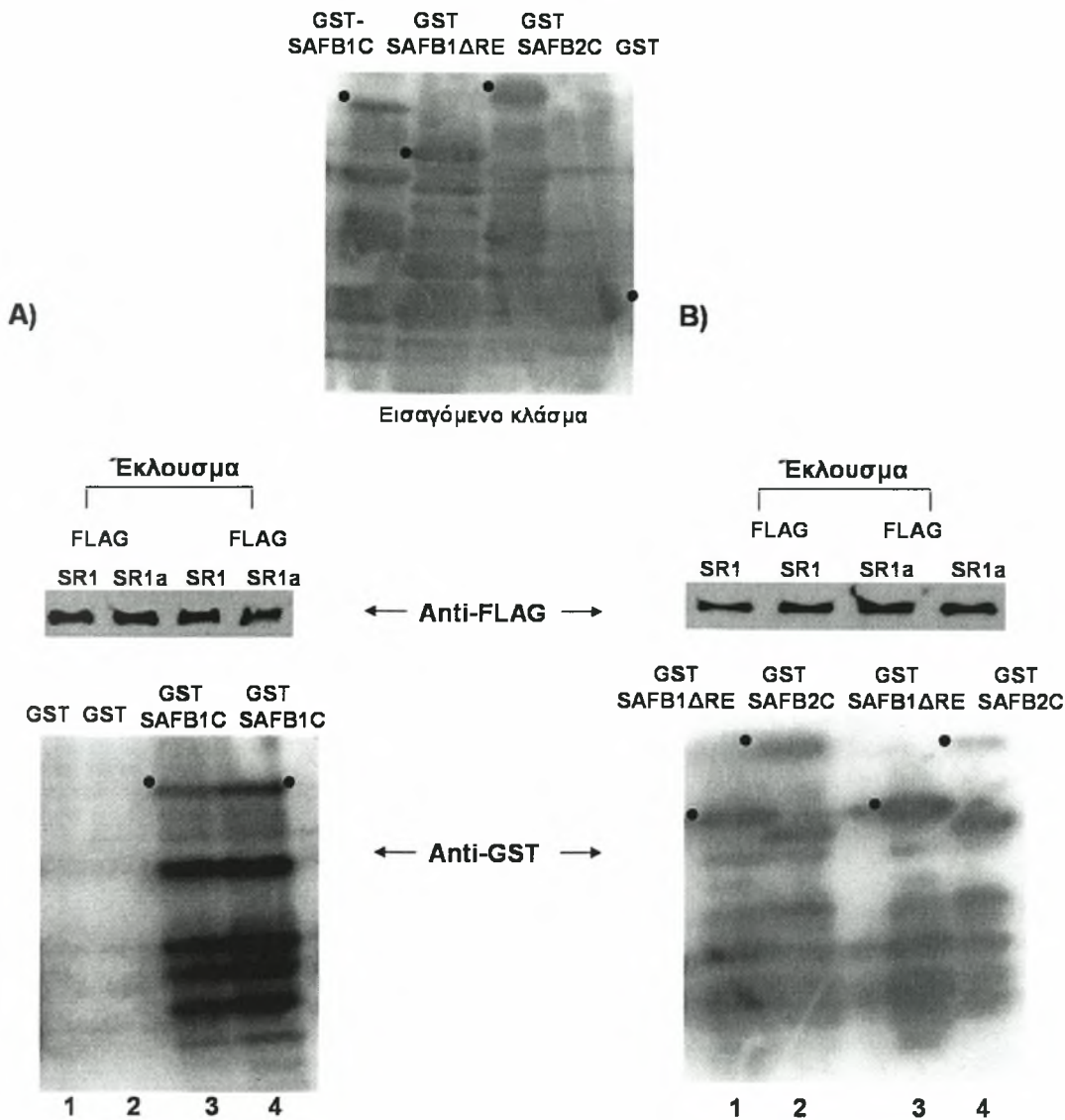
Έγινε μέτρηση των ραδιενεργά σηματομενών ζωνών του πεπτιδίου RS₀ και κατασκευή καμπύλης. Αυτή επιβεβαιώνει ότι η ενζυμική δραστικότητα της SRPK1a δεν επηρεάζεται παρουσία του SAFB2C, γεγονός το οποίο είναι ανεξάρτητο από το υπόστρωμα της κινάσης (εικόνα 43).



Εικόνα 43: Καμπύλη συσχέτισης της ενζυμικής δραστικότητας της κινάσης SRPK1a με την ποσότητα του SAFB2C με βάση την ποσότητα του ενσωματωμένου ραδιενεργού φωσφόρου στο υπόστρωμα.

Γ.1.16. Έλεγχος αλληλεπίδρασης *in vitro* των κινασών SRPK1a και SRPK1 με SAFB1C και SAFB2C

Από τα αποτελέσματα της διαφοροποίησης μεταξύ των SAFB1 και SAFB2 όσον αφορά στην αναστολή που ασκούν στη δράση των SR κινασών ετέθη το ερώτημα της τυχόν διαφοροποιημένης αλληλεπίδρασής τους με τις δύο κινάσες. Για την διερεύνηση της δέσμευσης των πρωτεϊνών SAFB στις κινάσες με χρωματογραφία αγκιστείας έγινε πρόσδεση των εκφρασμένων σε 293T κύτταρα FLAG-SRPK1a και FLAG-SRPK1 σε σφαιρίδια πρωτεΐνης G και επώασή τους με τις καθαρισμένες πρωτεΐνες GST-SAFB1C, GST-SAFB1C(ΔRE) και GST-SAFB2C. Αφού έγιναν οι κατάλληλες πλύσεις των σφαιριδίων, ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western της ηλεκτροφόρησης των εκλουσμάτων με χρήση των αντισωμάτων anti-FLAG και anti-GST (εικόνα 44).



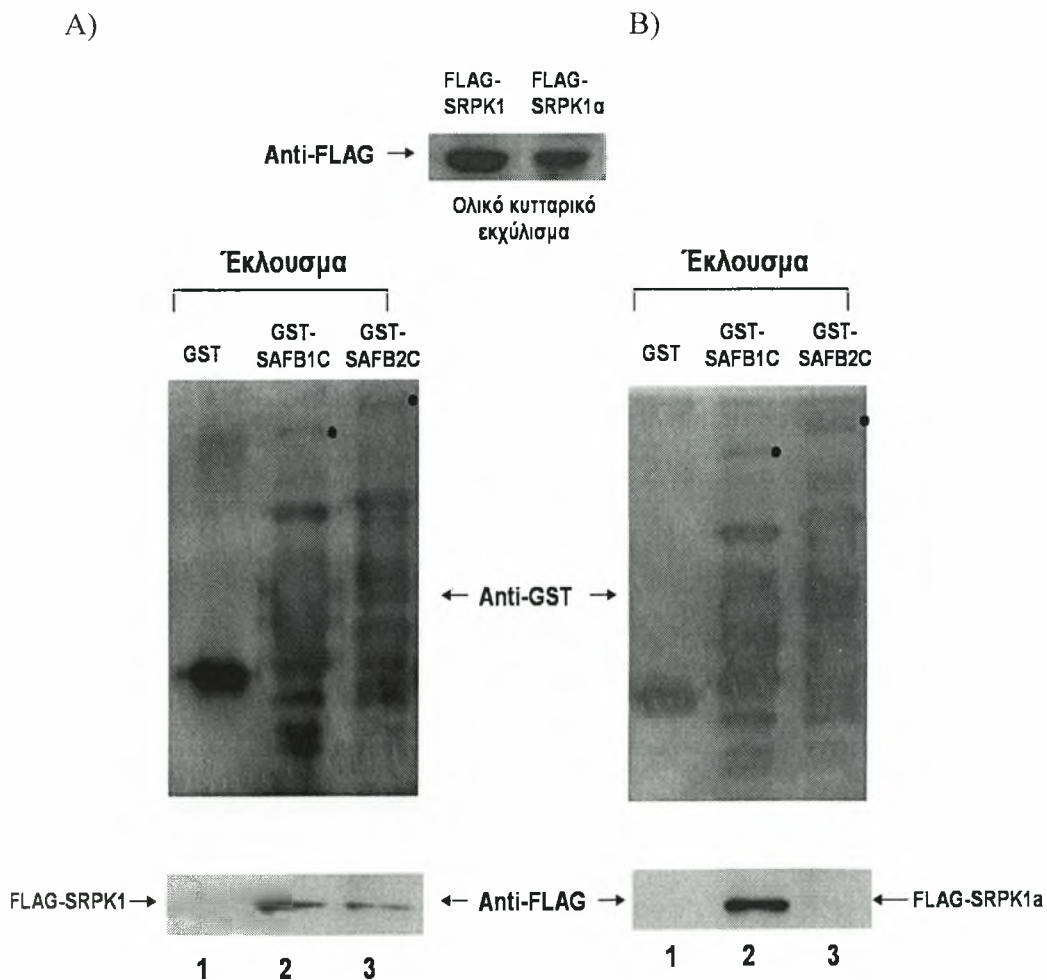
Εικόνα 44:: Χρωματογραφία αγκιστείας των κυτταρικά εκφρασμένων πρωτεϊνών FLAG-SRPK1 και FLAG-SRPK1α με σφαιρίδια πρωτεΐνης G επωασμένα με τις βακτηριακά εκφρασμένες GST-SAFB1C, GST-SAFB1C(ΔRE) και GST-SAFB2C ή GST. Φαίνονται (με τελεία) οι πλήρους μεγέθους πρωτεΐνες. Έγινε ανάλυση των δειγμάτων σε SDS-PAGE και ανοσοανίχνευση με αντίσωμα anti-FLAG και anti-GST. Απεικονίζεται το 1/10 του εισαγόμενου κλάσματος που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε περίπτωση.

Όπως φαίνεται στην εικόνα, ο GST δεν κατακρατείται από καμία εκλουσμένη κινάση(διαδρομές 1A και 2A), ενώ και στις δύο κινάσες έχουν προσδεθεί τα πρωτεολύματα και των τριών GST πρωτεϊνών. Επιπλέον ο πλήρους μεγέθους GST-SAFB1C εντοπίζεται στο έκλουσμα τόσο της FLAG-SRPK1α όσο και της FLAG-SRPK1(σε μικρότερη ποσότητα) (διαδρομές 4A και 3A). Ο πλήρους μεγέθους GST-SAFB1C(ΔRE) κατακρατείται και αυτός από τις δύο κινάσες (διαδρομές 1B και 3B). Ο πλήρους μεγέθους GST-SAFB2C όμως, ενώ εντοπίζεται στο έκλουσμα της FLAG-

SRKK1 (σε μικρότερη ποσότητα σε σχέση με τον GST-SAFB1C), δεν κατακρατείται σχεδόν καθόλου από την FLAG-SRPK1α (διαδρομές 2B και 4B). Επομένως οι SAFB1C και SAFB1C(ΔRE) αλληλεπιδρούν *in vitro* και με τις δύο κινάσες, ενώ ο SAFB2C αλληλεπιδρά λιγότερο ισχυρά με την FLAG-SRPK1 και σχεδόν καθόλου με την FLAG-SRPK1α.

Η αλληλεπίδραση των δύο κινάσων με το SAFB1 και το SAFB2 διερευνήθηκε *in vitro* και με ένα άλλο πείραμα χρωματογραφίας αγγιστείας.

Έγινε έκφραση των χμιαρικών πρωτεϊνών GST- SAFB1C και GST-SAFB2C (ή GST) σε βακτήρια BL21 RIL και αφού αυτές απομονώθηκαν σε σφαιρίδια γλουταθειόνης (GSH-Sepharose) επώασθησαν με εκχύλισμα κυττάρων 293T που υπερεκφράζουν τις κινάσες FLAG-SRPK1 και FLAG- SRPK1α. Αφού έγιναν οι κατάλληλες πλύσεις των σφαιριδίων, ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western της ηλεκτροφόρησης των εκλουσμάτων με χρήση των αντισωμάτων anti-GST και anti-FLAG (εικόνα 45).

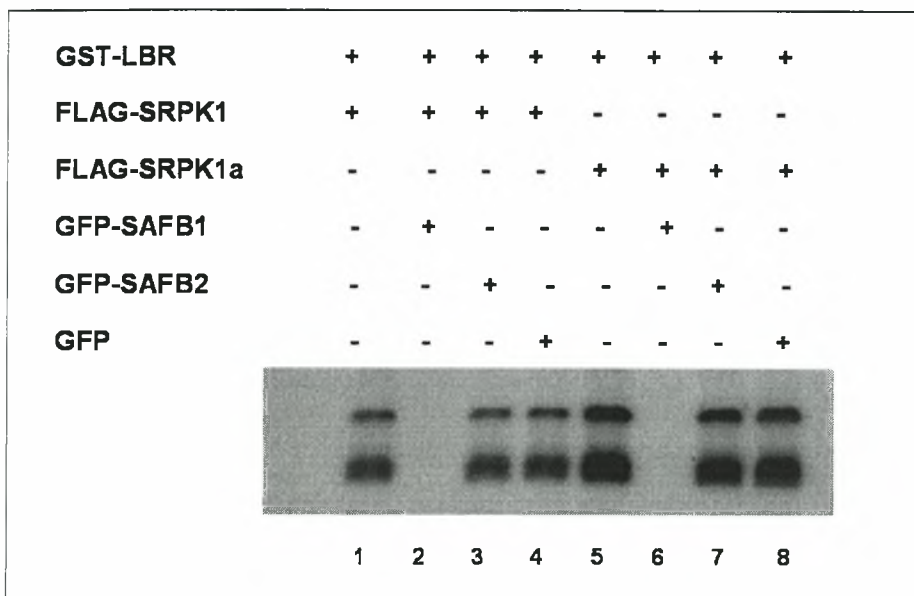


Εικόνα 45: Χρωματογραφία αχιστείας των καθαρισμένων πρωτεϊνών GST-SAFB1C, GST-SAFB2C ή GST με σφαιρίδια γλουταθειόνης επωασμένα με κυτταρικά εκχυλίσματα που υπερεκφράζουν FLAG-SRPK1, FLAG-SRPK1α. Φαίνονται (με τελεία) οι πλήρους μεγέθους πρωτεΐνες. Έγινε ανάλυση των δειγμάτων σε SDS-PAGE και ανοσοανίχνευση με αντίσωμα anti-GST και anti-FLAG. Απεικονίζεται το 1/10 του ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε περίπτωση.

Όπως φαίνεται στην εικόνα, η FLAG-SRPK1 εντοπίζεται στο έκλουσμα τόσο του GST-SAFB1C όσο και του GST-SAFB2C (σε μικρότερη ποσότητα) (διαδρομές 2A και 2B). Η FLAG-SRPK1α εντοπίζεται και αυτή στο έκλουσμα του GST-SAFB1C αλλά δεν φαίνεται να εκλούεται μαζί τον GST-SAFB2C (διαδρομές 3A και 3B). Επομένως ο SAFB1C αλληλεπιδρά *in vitro* και με τις δύο κινάσες, ενώ ο GST-SAFB2C αλληλεπιδρά λιγότερο ισχυρά με την FLAG-SRPK1 και καθόλου με την FLAG-SRPK1α.

Γ.1.17. Έλεγχος της επιρροής των συνασοκατακρημνισμένων GFP-SAFB1 και GFP-SAFB2 με τις κινάσες SRPK1 και SRPK1α στην δράση τους

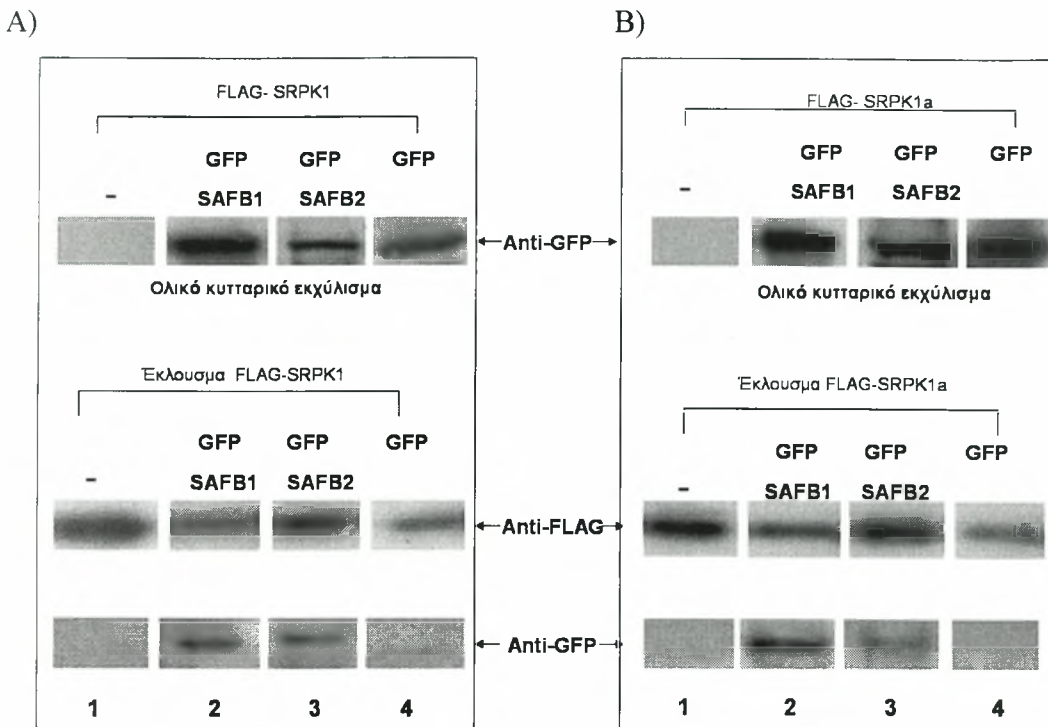
Δεδομένου ότι στα *in vitro* πειράματα χρησιμοποιήθηκαν μεγάλες ποσότητες των καρβοξυτελικών άκρων του SAFB1 και SAFB2 λόγω του μεγάλου ποσοστού πρωτεόλυσής τους κατά την βακτηριακή τους έκφραση, έγινε συνέκφραση των FLAG-SRPK1 και FLAG-SRPK1α κινασών και των πλήρους μεγέθους χιμαιρικών πρωτεϊνών GFP-SAFB1 (~170kDa) και GFP-SAFB2 (~170kDa) καθώς και GFP ως αρνητικό control σε κύτταρα HeLa. Μετά την πάροδο 24 ωρών έγινε λύση των κυττάρων και ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα anti-FLAG μετά από επώαση του κυτταρικού εκχυλίσματος με σφαιρίδια πρωτεΐνης G. Αφού έγιναν οι κατάλληλες πλύσεις των σφαιριδίων, ακολούθησε έλεγχος της δράσης των κινασών SRPK1 και SRPK1α παρουσία του υποστρώματος GST-LBRNt και [γ - 32 P]ATP (εικόνα 46).



Εικόνα 46: Ανίχνευση με αυτοραδιογραφία της ηλεκτροφόρησης των δοκιμασιών φωσφορυλίωσης στις οποίες έχουν προστεθεί τα ενδεικνυόμενα.

Στην εικόνα φαίνεται ότι κατ' αρχήν και οι δύο κινάσες φωσφορυλιώνουν το υπόστρωμά τους (διαδρομές 1 και 5) και αυτό δεν επηρεάζεται όταν οι κινάσες προέρχονται από κύτταρα που συνεκφράζουν την GFP (διαδρομές 4 και 8). Αντίθετα, όταν οι κινάσες έχουν ανοσοκατακρημινιστεί από κύτταρα που εκφράζουν GFP-SAFB1, ο GST-LBRnt δεν φωσφορυλιώνεται (διαδρομές 2 και 6). Τέτοια αναστολή δεν είναι εμφανής στην περίπτωση της ανοσοκατακρήμνισης των κινασών από κύτταρα που εκφράζουν GFP-SAFB2 (διαδρομές 3 και 7).

Τα αποτελέσματα αυτά θέτουν το ερώτημα του κατά πόσον οι ανοσοκατακρημνισμένες κινάσες SRPK1 και SRPK1a έχουν σε κάθε περίπτωση δεσμεύσει και συμπαρασύρει κατακρημνιζόμενες και τους παράγοντες SAFB αντίστοιχα. Προκειμένου να απαντηθεί αυτό το ερώτημα ίση ποσότητα των ανοσοκατακρημνισμένων κινασών με αυτή που μπήκε στη δοκιμασία εκλούστηκε και ηλεκτροφορήθηκε και πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western με χρήση των αντισωμάτων anti-FLAG και anti-GFP, ώστε να εκτιμηθεί η παρουσία των κινασών αλλά και των παραγόντων SAFB στα εκλούσματα (εικόνα 47).



Εικόνα 47: Έγινε συνέκφραση των πρωτεϊνών FLAG-SRPK1, FLAG-SRPK1α, GFP-SAFB1, GFP-SAFB2 και GFP σε κύτταρα HeLa. Το ολικό εκχύλισμα των κυττάρων επώαστηκε με μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-FLAG και σφαιρίδια πρωτεΐνης G. Απεικονίζεται το 1/10 του ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοκατακρήμνιση. Ακολούθησε ανάλυση σε SDS-PAGE και η ανοσοανίχνευση έγινε με αντίσωμα anti-FLAG και anti-GFP.

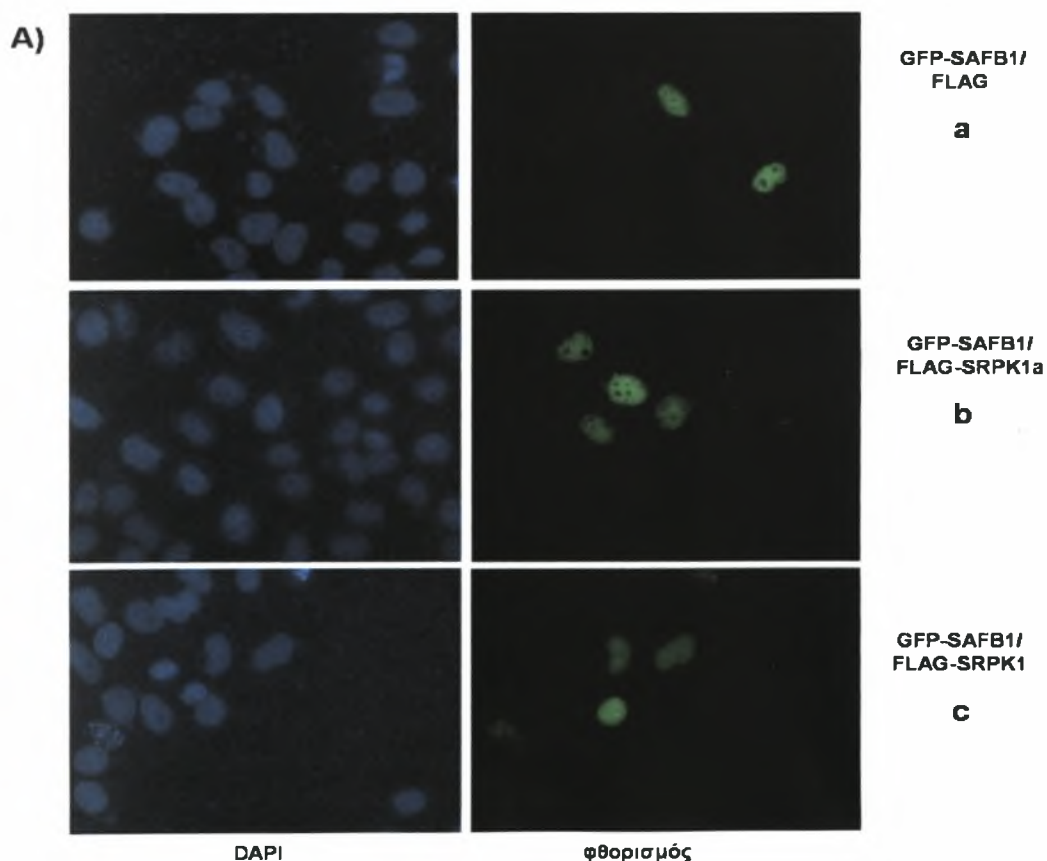
Όπως φαίνεται στην εικόνα, στα εκλούσματα τόσο της FLAG-SRPK1 (A) όσο και της FLAG-SRPK1α (B) εντοπίζεται ο GFP-SAFB1 (διαδρομές 2A και 2B) και ο GFP-SAFB2 (διαδρομές 3A και 3B), ενώ αντίθετα δεν ανιχνεύεται η πρωτεΐνη GFP στα εκλούσματα καμίας από τις δύο κινάσες (διαδρομές 4A και 4B), αν και η έκφρασή της είναι προφανής στα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα (επάνω μέρος, A και B).

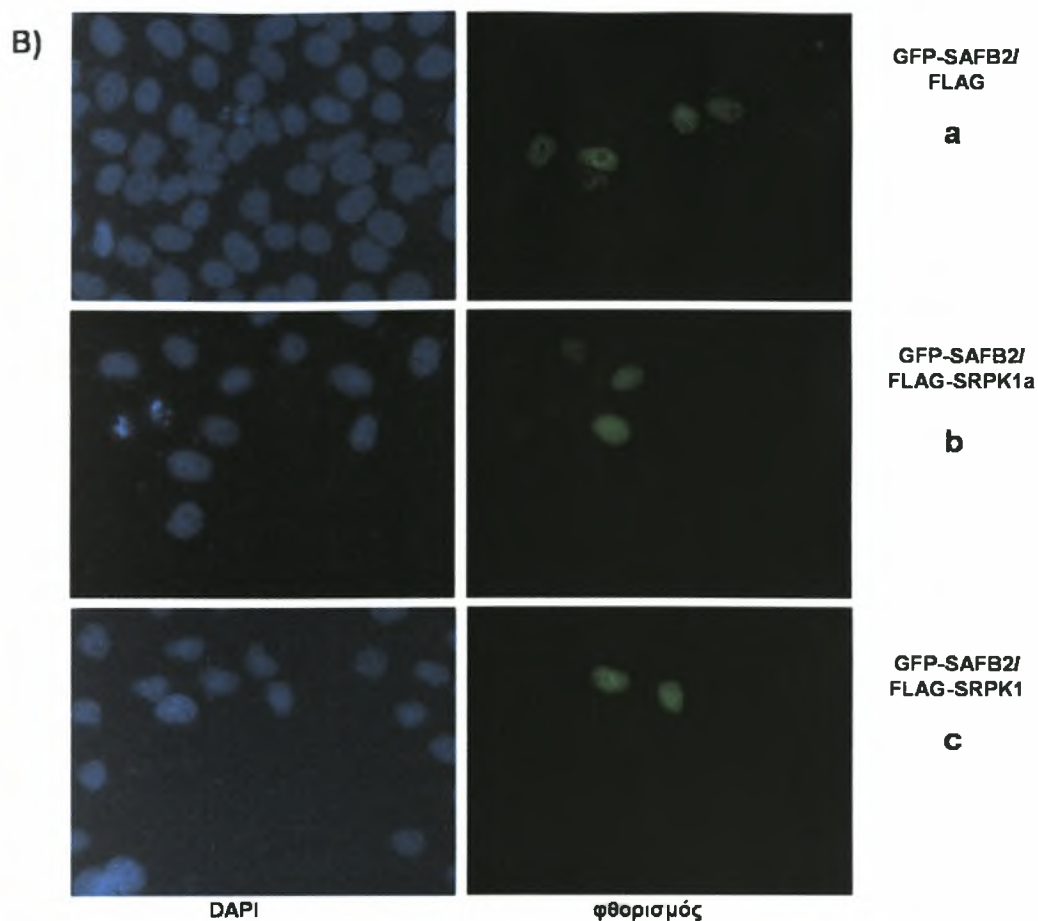
Αξίζει να σημειωθεί ότι, αν και οι ποσότητες των υπερεκφρασμένων μετά από επιμόλυνση πρωτεϊνών στα ολικά εκχυλίσματα των κυττάρων δεν μπορούν να ελεγχθούν και να μετρηθούν με ακρίβεια, παρ'όλα αυτά η σύγκριση των λόγων των ζωνών των πρωτεϊνών GFP προς FLAG σε κάθε περίπτωση κατά μέσο όρο συμφωνούν με τα αποτελέσματα των προηγούμενων *in vitro* πειραμάτων πρόσδεσης πρωτεϊνών.

Γ.2. ΕΠΙΡΡΟΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ SRPK1a-SAFB ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ ΤΗΣ SRPK1a

Προκειμένου να αξιολογηθεί η επίδραση της παρουσίας του παράγοντα SAFB1 στον υποκυτταρικό εντοπισμό της SRPK1a, οι δύο πρωτεΐνες συνεκφράστηκαν σε κύτταρα HeLa και ο εντοπισμός τους παρατηρήθηκε στο μικροσκόπιο. Επειδή η σύγχρονη παρατήρησή τους δεν ήταν εφικτή, ήταν δυνατόν να παρατηρηθεί είτε ο SAFB1 με φθορισμό λόγω έκφρασής του υπο μορφή GFP-SAFB1, είτε η SRPK1a με ανοσοφθορισμό με αντίσωμα anti-FLAG λόγω έκφρασής της υπο μορφή FLAG-SRPK1a. Αντίστοιχα πειράματα έγιναν για την SRPK1 και τον παράγοντα SAFB2.

Κύτταρα HeLa επιμολύνθηκαν αρχικά με πλασμίδια που εκφράζουν τους παράγοντες SAFB1 και SAFB2 υπο μορφή σύντηξης με την πρωτεΐνη GFP σε συνεπιμόλυνση με το πλασμίδιο που εκφράζει είτε μόνο τον επίτοπο FLAG, είτε καθεμία από τις δύο κινάσες, SRPK1a και SRPK1. Είκοσι τέσσερις ώρες μετά την επιμόλυνση τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και μετά από κατάλληλη επεξεργασία παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο και φωτογραφήθηκαν (εικόνα 48).

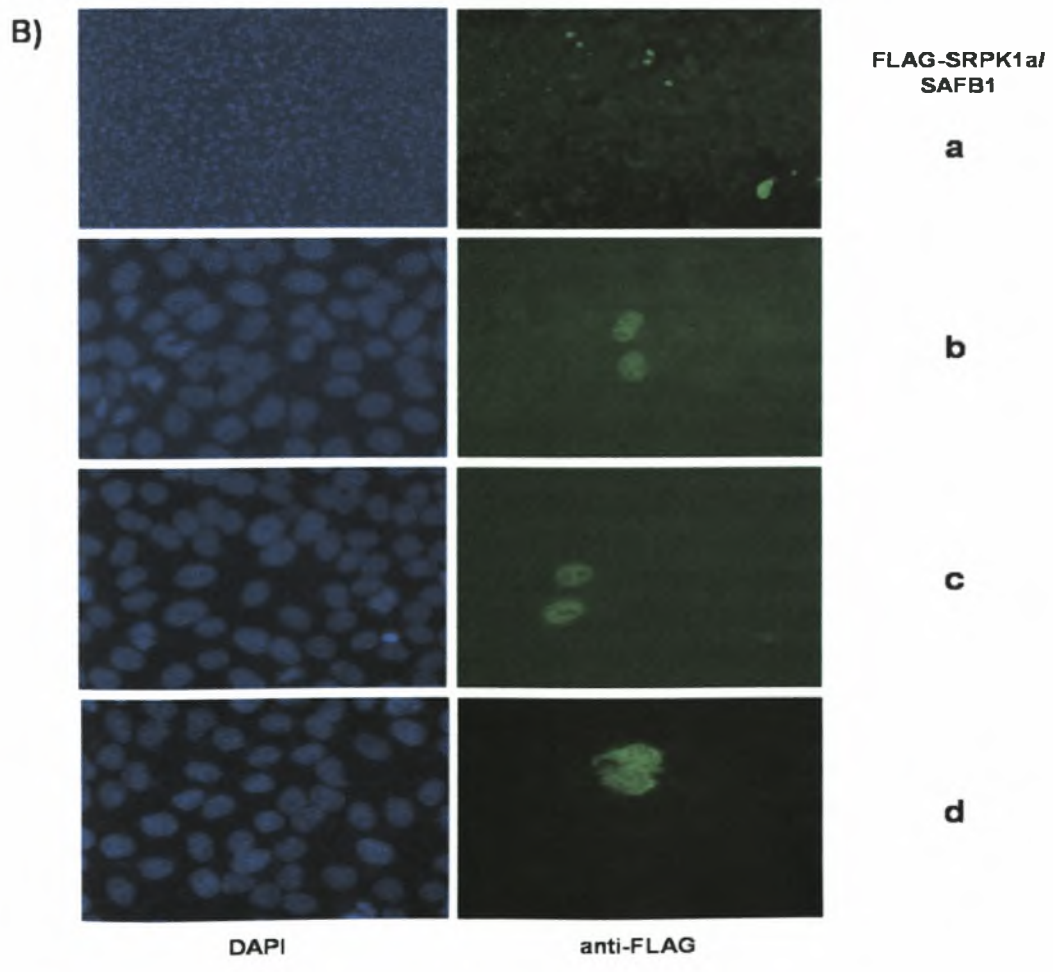
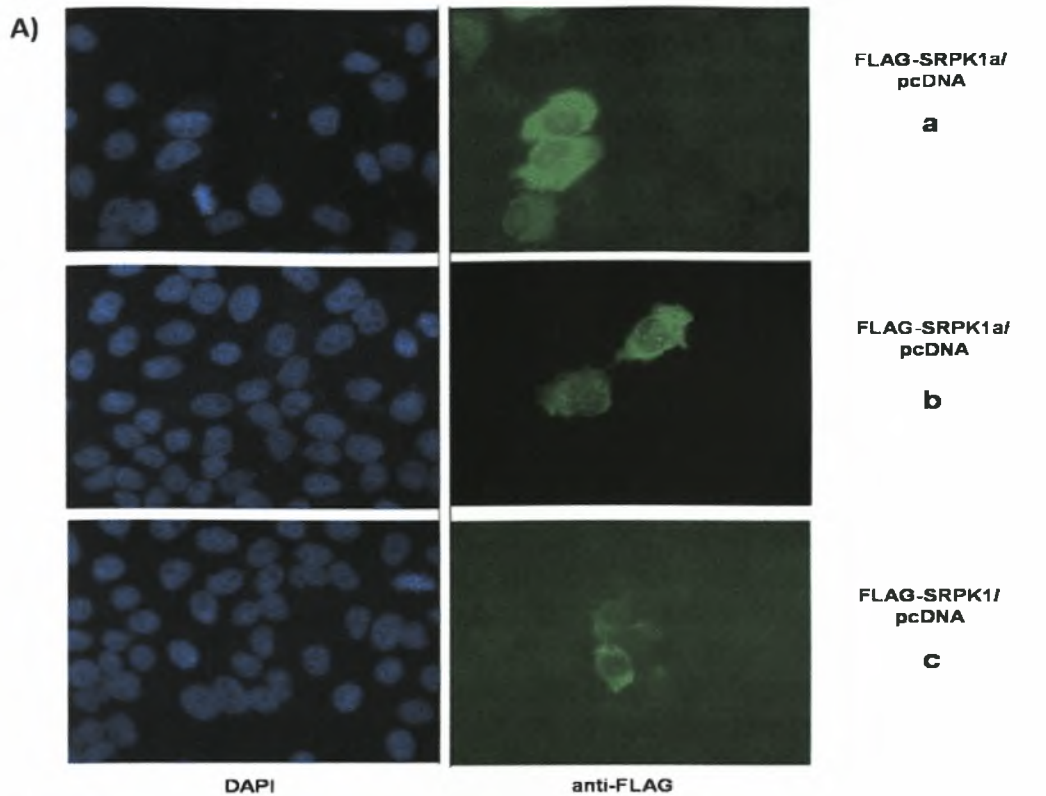




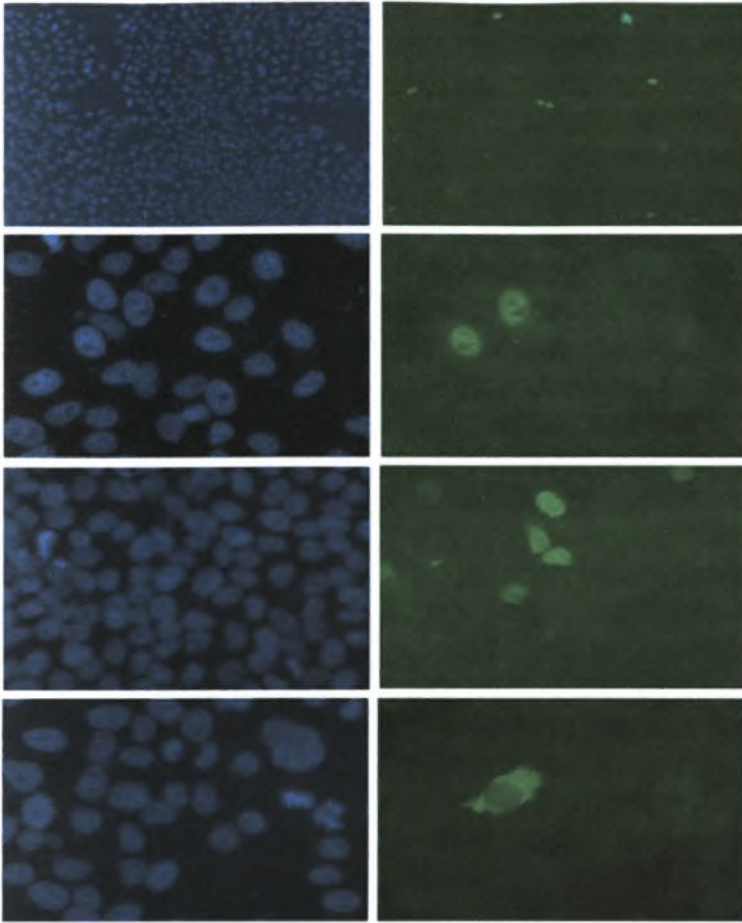
Εικόνα 48: Υποκυτταρικός εντοπισμός των παραγόντων SAFB1 και SAFB2 μέσω φθορισμού παρουσία των κινασών SRPK1a και SRPK1 σε κύτταρα HeLa.

Όπως φαίνεται στην εικόνα, και οι δύο πράσινες φθορίζουσες πρωτεΐνες έχουν καθαρά πυρηνικό εντοπισμό (Εικόνα 48Aa και Ba) και αυτός δεν μεταβάλλεται όταν υπάρχει συνέκφραση της SRPK1a ή της SRPK1 (Εικόνα 48 Ab, Ac, Bb, Bc).

Στη συνέχεια επιτελέστηκε αντίστοιχο πείραμα όπου οι πρωτεΐνες SAFB εκφράζονταν από πλασμίδια που τις παρήγαγαν σε φυσική μορφή (pcDNA1-SAFB1, pcDNA3-SAFB2), δηλαδή όχι σε σύντηξη με κάποιο πεπτίδιο. Έτσι οι κινάσες εκφράστηκαν υπο μορφή FLAG-SRPK1a/1 είτε σε συνεπιμόλυνση με τον φορέα pcDNA είτε με το πλασμίδιο που παράγει SAFB1 ή SAFB2. Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν, επεξεργάστηκαν κατάλληλα με αντίσωμα anti-FLAG, με δεύτερο αντίσωμα FITC, παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο και φωτογραφήθηκαν (Εικόνα 49).



C)



FLAG-SRPK1/
SAFB1

a

b

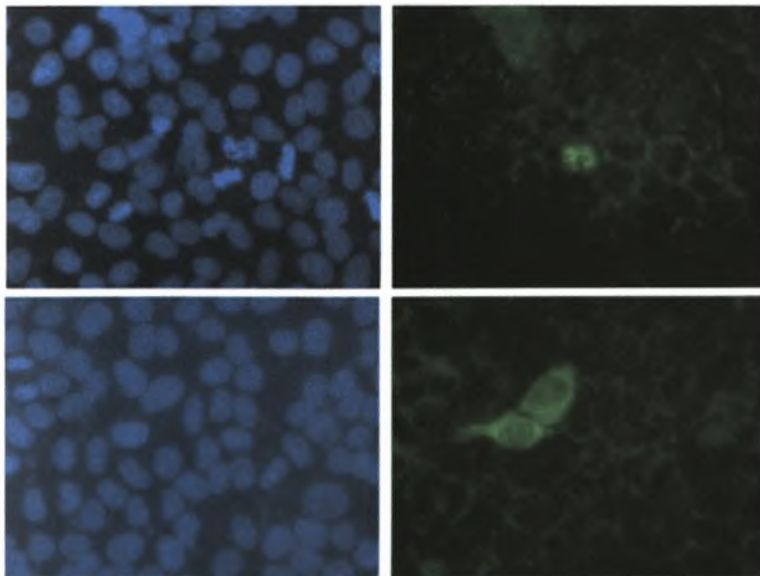
c

d

DAPI

anti-FLAG

D)



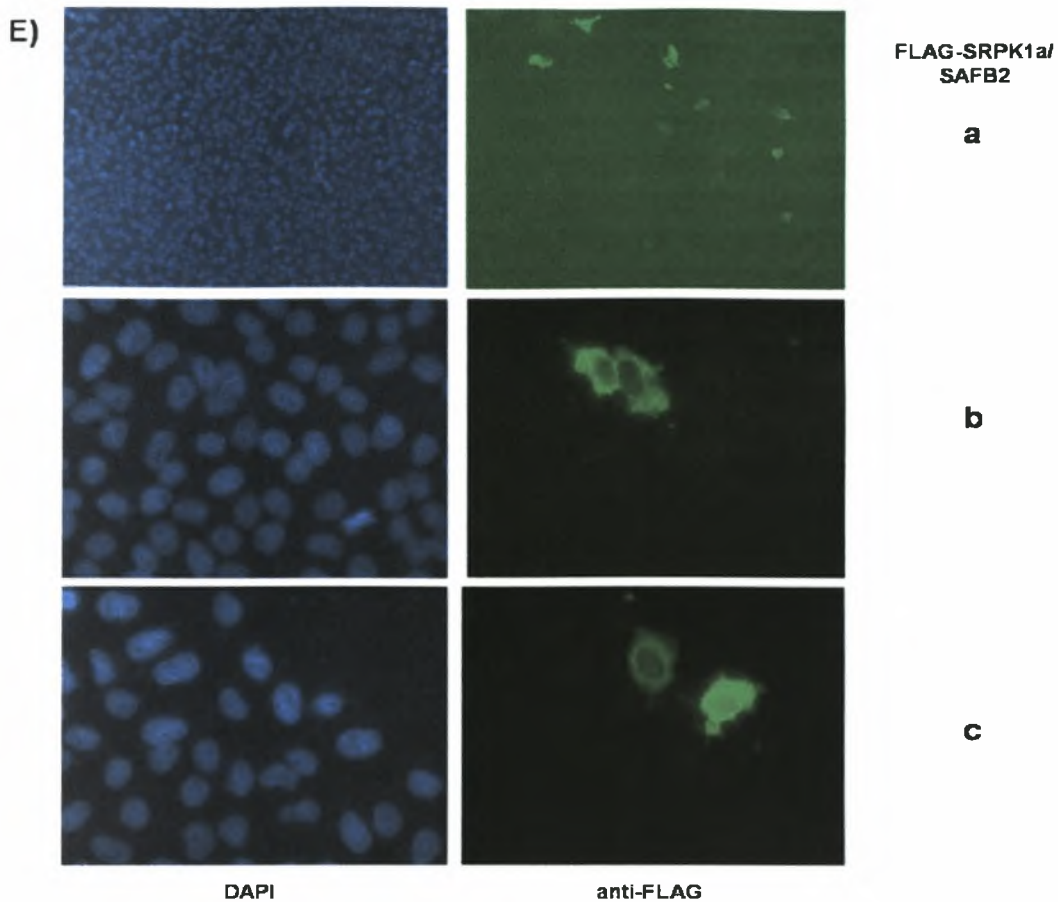
FLAG-SRPK1/
SAFB2

a

b

DAPI

anti-FLAG



Εικόνα 49: Υποκυτταρικός εντοπισμός των κινασών SRPK1a και SRPK1 μέσω ανοσοφθορισμού παρουσία των παραγόντων SAFB1 και SAFB2 σε κύτταρα HeLa.

Παρατηρήθηκε ότι όταν η κινάση SRPK1a εκφράζεται χωρίς την παρουσία των παραγόντων SAFB1 και SAFB2, αυτή εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και λιγότερο στον πυρήνα όπως έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφία για την SRPK1. Η εικόνα αυτή παρατηρείται ανεξάρτητα από τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης στα κύτταρα, όπως φαίνεται στην εικόνα 49 Aa, Ab.

Αντίστοιχο εντοπισμό εμφανίζει και η SRPK1 όταν εκφράζεται μόνη της, όπως ήταν αναμενόμενο (Εικόνα 49 Ac). Συνεπώς οι δύο κινάσες σε κύτταρα HeLa έχουν γενικά κατά την μεσόφαση κυρίως κυτταροπλασματικό και λιγότερο πυρηνικό εντοπισμό. Σε μικρό βαθμό σε κάποια κύτταρα εμφανίζονται και κηλίδες στους πυρήνες (Εικόνα 49 Ab).

Σε κύτταρα όπου η SRPK1a συνεκφράζεται με τον παράγοντα SAFB1, αυτό που παρατηρείται είναι ότι αυτή μετατοπίζεται στον πυρήνα και δεν εντοπίζεται καθόλου στο κυτταρόπλασμα, ιδιαίτερα όταν τα επίπεδα έκφρασής της είναι χαμηλά

(Εικόνα 49 Ba, Bb, Bc.). Σε ένα μικρό ποσοστό των κυττάρων η SRPK1a εντοπίζεται ομοιόμορφα στον πυρήνα αλλά και στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 49 Bd). Αυτό παρατηρείται μόνο στις περιπτώσεις που τα κύτταρα εμφανίζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης της κινάσης, γεγονός το οποίο σημαίνει πιθανόν ότι παρουσία SAFB1 μια συγκεκριμένη ποσότητα κινάσης μετατοπίζεται στον πυρήνα, ενώ το υπόλοιπο κλάσμα συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα. Εξάλλου, όπως φαίνεται και στην φωτογραφία Ba ο εντοπισμός της SRPK1a φαίνεται να είναι καθαρά πυρηνικός όσο η έκφρασή της βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα και να επεκτείνεται επιπλέον και στο κυτταρόπλασμα όταν αυξάνονται τα ποσά της έκφρασής της.

Όσον αφορά στην επίδραση της παρουσίας του SAFB1 στον εντοπισμό της SRPK1 αντίστοιχα φαίνεται να ισχύει περίπου το ίδιο φαινόμενο, καθ' όσον παρατηρείται αποκλειστικά πυρηνικός εντοπισμός της SRPK1 σε χαμηλή έκφραση της κινάσης, ο οποίος συμπληρώνεται και από κυτταροπλασματική έκφραση όταν τα επίπεδα έκφρασης της κινάσης είναι υψηλά (εικόνα 49 Ca, Cb, Cc, Cd).

Όταν η SRPK1a συνεκφράζεται με τον παράγοντα SAFB2 ο εντοπισμός της δεν μεταβάλλεται και παραμένει κυρίως κυτταροπλασματικός ανεξάρτητα από τα επίπεδα έκφρασής της (εικόνα 49 Ea, Eb, Ec). Φαίνεται καθαρά στην εικόνα 49 Ea όπου διακρίνονται κύτταρα με ιδιαίτερα χαμηλή, ενδιάμεση και ιδιαίτερα υψηλή έκφραση της SRPK1a, ότι σε όλες περιπτώσεις αυτή εμφανίζει την ίδια κατανομή στα κύτταρα.

Αντίθετα, η SRPK1 όταν συνεκφράζεται με τον SAFB2 και εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα, εμφανίζεται στο πυρήνα όπως φαίνεται στην Εικόνα 49 Da. Σε υψηλότερα επίπεδα έκφρασης η κινάση εμφανίζεται και στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 49 Db).

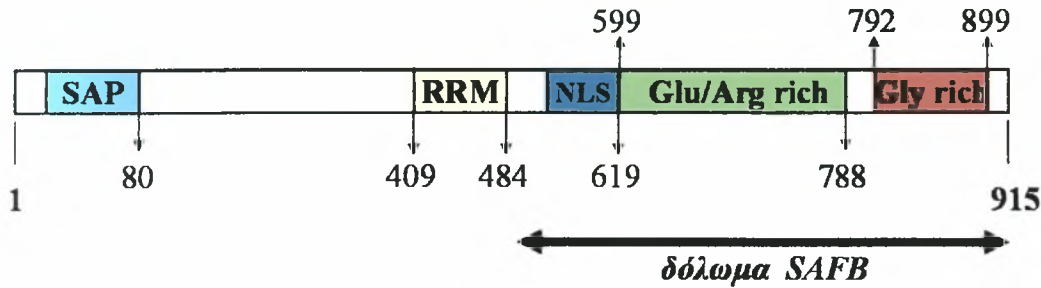
Γ.3. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΝΕΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΟΥ SAFB1 ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΔΥΟ ΥΒΡΙΔΙΩΝ

Η μέθοδος των δύο υβριδίων είναι μια τεχνική που εκμεταλλεύεται την ιδιότητα που έχουν οι περιοχές σύνδεσης με το DNA (BD, Binding Domain) και ενεργοποίησης της μεταγραφής (AD, Activation Domain) των μεταγραφικών παραγόντων να δρουν χωριστά. Χρησιμοποιεί επίσης γονίδια αναφοράς των οποίων η έκφραση προσδίδει κάποιο φαινότυπο στα κύτταρα της ζύμης όπως αντίσταση σε αντιβιοτικά ή επιβίωση σε περιβάλλον έλλειψης απαραίτητων αμινοξέων και βρίσκεται υπό τον έλεγχο του μεταγραφικού παράγοντα.

Το γονίδιο της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος («δόλωμα», όπως αποκαλείται) είναι κλωνοποιημένο σε σύντηξη με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA [DNA Binding Domain (BD)] του μεταγραφικού παράγοντα GAL4 (πλασμίδιο-δόλωμα), ενώ μία βιβλιοθήκη cDNA, τα προϊόντα των οποίων θέλουμε να δούμε αν αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει, είναι κλωνοποιημένη σε σύντηξη με την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής [Activation Domain (AD)] του ιού VP16. Με τον τρόπο αυτό και εφ'όσον οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν, ο μεταγραφικός παράγοντας γίνεται ενεργός, οπότε έχουμε έκφραση των γονιδίων αναφοράς στους προαγωγείς των οποίων υπάρχουν περιοχές πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα GAL4 και εμφάνιση του φαινοτύπου. Επιπλέον, συνήθως το επίπεδο της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς αποτελεί μέτρο της αγγιστείας μεταξύ των δύο πρωτεϊνών.

Γ.3.1. Παρασκευή του πλασμιδίου-δολώματος και εφαρμογή του συστήματος των δύο υβριδίων

Στο σύστημα των δύο υβριδίων, που πραγματοποιήθηκε, ως δόλωμα χρησιμοποιήθηκε περιοχή μεγέθους 1430bp που κωδικοποιεί για το καρβοξυτελικό άκρο του SAFB1 (Εικόνα 50).



Εικόνα 50 : Σχηματική αναπαράσταση της περιοχής του SAFB1 που χρησιμοποιήθηκε ως «δόλωμα» στη μέθοδο των δύο υβριδίων.

Η κατασκευή του πλασμιδίου δολώματος, η παρασκευή και τιτλοδότηση της βιβλιοθήκης, καθώς και όλη η διαδικασία μέχρι την επιλογή και ταυτοποίηση των επιλεγμένων κλώνων έγινε από τις κ. Λυμπεροπούλου Αγγελική και Γεωργιάτσου Έλενα και θα περιγραφούν μόνο επιγραμματικά.

Η περιοχή αυτή απομονώθηκε με ενίσχυση μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αλληλουχιών του πλασμιδίου SAF-B-PC (Nayler *et al.*, 1998) και κλωνοποιήθηκε στον φορέα pGBT9. Ως νοηματικός εκκινητής χρησιμοποιήθηκε ο *safb/EcoRI* και ως αντινοηματικός ο *safb/BamHI*.

Αφού επιβεβαιώθηκε με ανάγνωση της αλληλουχίας του ενθέματος της κατασκευής που προέκυψε ότι θα παρήγαγε την αναμενόμενη πρωτεΐνη σύντηξης και ότι όταν μετασχημάτιζε το στέλεχος *S.c.* pJ69-4A δεν ενεργοποιούσε τα γονίδια αναφοράς, χρησιμοποιήθηκε ως πλασμίδιο-δόλωμα. Έτσι, το στέλεχος pJ69-4A συμμετασχηματίστηκε σε μεγάλη κλίμακα με το πλασμίδιο-δόλωμα και τη βιβλιοθήκη cDNA εμβρύου ποντικού 9.5 και 10.5 ημερών, σε τέτοιες συνθήκες ώστε ο αριθμός των μετασχηματισμένων αποικιών να διασφαλίζει την αντιπροσώπευση όλων των κλώνων της βιβλιοθήκης (περίπου 12×10^6 κλώνοι για πολυπλοκότητα 2.5×10^6 της βιβλιοθήκης). Ανάμεσα στους μετασχηματισμένους με δύο πλασμίδια κλώνους επιλέχθηκαν εκείνοι που μπορούσαν να αναπτυχθούν παρουσία 5mM AT, που εξέφραζαν δηλαδή το γονίδιο αναφοράς HIS3, γεγονός που υποδηλώνει αλληλεπίδραση των προϊόντων του πλασμιδίου-δολώματος και του πλασμιδίου της βιβλιοθήκης.

Εκατό τέτοιοι κλώνοι επιλέχθηκαν κατ'αρχήν και κατηγοριοποιήθηκαν με βάση την ικανότητα επιβίωσής τους σε αυξανόμενες ποσότητες AT (μέχρι 100mM) αλλά και την ένταση του μπλε χρώματος που παρήγαγαν σε X-gal λόγω της ενεργοποίησης του γονιδίου αναφοράς της β-γαλακτοσιδάσης. Για 26 κλώνους που εμφάνιζαν ισχυρή ενεργοποίηση των γονιδίων αναφοράς έγινε διάσωση του

πλασμιδίου της βιβλιοθήκης σε βακτήρια, επιβεβαίωση της επανάκτησης του αρχικού φαινοτύπου με επαναεισαγωγή στο αρχικό στέλεχος *S.c.* pJ69-4A που περιέχει το πλασμιδιο-δύλωμα και τελικά ταυτοποίηση του κλωνοποιημένου cDNA με ανάγνωση της αλληλουχίας του.

Γ.3.2. Ταυτοποίηση των επιλεγθέντων πλασμιδίων βιβλιοθήκης

Αφού βρέθηκαν οι 26 αλληλουχίες με συγκρίσεις που έγιναν σε βάσεις δεδομένων ανιχνεύθηκαν οι ταυτόσημές τους πρωτεΐνες. Οι απομονωμένοι πλασμιδιακοί κλώνοι μπορούν να καταταχθούν σε δύο κατηγορίες: αυτούς που εμφανίζουν υψηλή ομολογία σε επίπεδο αλληλουχίας αμινοξέων με την πρωτεΐνη SAFB1 και σε αυτούς που δεν εμφανίζουν συγγένεια με την πρωτεΐνη SAFB1.

Η ύπαρξη της πρώτης ομάδας υποδηλώνει τον ομο- και ετερο-διμερισμό του SAFB1 με μέλη της ίδιας οικογένειας πρωτεϊνών: με τον ίδιο τον SAFB1, τον SAFB2, ο οποίος εμφανίζει 59% ομολογία με τον SAFB1 και μια τρίτη άγνωστη πρωτεΐνη που αποκαλούμε SAFB3 επειδή παρουσιάζει ομολογία και με τους δύο παράγοντες (Πίνακας 4) (Lymperopoulou *et al.*, 2003). Η ιδιότητα εξάλλου της δημιουργίας συσσωματωμάτων είναι χαρακτηριστικό πολλών S/MAR προσδεδεμένων πρωτεϊνών (Renz *et al.*, 1996).

Πίνακας 4: Ταυτοποίηση των πλασμιδιακών κλώνων που εμφανίζουν υψηλή αμινοξική ομολογία με την πρωτεΐνη SAFB1.

Όνομα πρωτεΐνης	Ανθεκτικότητα σε AT (mM)	Ομολογία με την πρωτεΐνη SAFB1	Αριθμός κλώνων
SAFB1	50	100%	11
SAFB2	50	59%	3
SAFB3	50	35%	1

Έγινε περαιτέρω διερεύνηση της ομοιότητας μεταξύ των τριών μελών της οικογένειας SAFB. Συγκεκριμένα στον πίνακα 5 φαίνονται τα ποσοστά ταυτότητας για τον άνθρωπο και τον ποντικό. Το γεγονός ότι η συντήρηση του κάθε γονιδίου μεταξύ των ειδών είναι ισχυρή, προτείνει ιδιαίτερες λειτουργίες για καθένα από αυτά.

Πίνακας 5 : Ποσοστό ταυτότητας των αμινοξικών αλληλουχιών των τριών μελών της οικογένειας SAFB στον άνθρωπο και τον ποντικό H1: Human SAFB1, H2: Human SAFB2, H3: Human SAFB3, M1: Mus Musculus SAFB1, M2: Mus Musculus SAFB2, M3: Mus Musculus SAFB3

	H1	H2	H3	M1	M2	M3
H1	100%	70%	34%	84%	56%	35%
H2		100%	32%	64%	69%	34%
H3			100%	32%	32%	90%
M1				100%	59%	35%
M2					100%	33%
M3						100%

Οι υπόλοιποι κλώνοι που δεν εμφανίζουν συγγένεια με την πρωτεΐνη SAFB1 φαίνονται στον πίνακα. 6. Συγκεκριμένα βρέθηκαν δύο πρωτεΐνες, η TRIM27 και η TRIM2. Ανήκουν στην υπεροικογένεια TRIM (Tripartite motif protein), η οποία περιέχει 37 πρωτεΐνες που μοιράζονται κοινά δομικά μοτίβα (RING domain, B-box 1, B-box 2, Coiled Coil domain) στα οποία έχει αποδοθεί η ιδιότητά τους να ομοπολυμερίζονται σε μεγάλα σύμπλοκα. Έχουν βρεθεί να καταλαμβάνουν συγκεκριμένες θέσεις στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα και εμπλέκονται σε διάφορες λειτουργίες όπως η μεταγραφή, η κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση (Reymond *et al.*, 2001). Από αυτές η TPIM27 ή RFP (RET finger protein) έχει δειχθεί ότι βρίσκεται μέσα σε PML πυρηνικά σωματίδια, εκφράζεται σε διάφορα είδη κυττάρων καθώς και σε ορισμένους τύπους καρκινικών κυττάρων, ενώ έχει δειχτεί ότι λειτουργεί ως γενικός καταστολέας της μεταγραφής (Krutzfeld *et al.*, 2005). Ο RFP έχει βρεθεί και από την ερευνητική ομάδα της Dr Oesterreich ότι αλληλεπιδρά με τον SAFB1 μέσω του συστήματος των δύο υβριδίων (Townson *et al.*, 2006). Η TPIM2 ή NARF (Neural activity-related ring finger protein) εντοπίζεται σε ινίδια του κυτταροπλάσματος και σύμφωνα με πειράματα υβριδισμού κατά Northern εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο, τα νεφρά, το πάγκρεας και τον σπλήνα (Reymond *et al.*, 2001).

Βρέθηκαν επίσης άλλες δύο πρωτεΐνες που σχετίζονται με τους μικροσωληνίσκους, η mastrin (mouse astrin), η οποία πιστεύεται πως έχει δομικό

ρόλο και έχει δείχθει ότι εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στους όρχεις και η δυνακίνη (dynactin), η οποία συνεργάζεται με την δυνείνη και είναι απαραίτητη για την κυτταροπλασματική κίνηση οργανιδίων κατά μήκος των μικροσωληνίσκων (Deacon *et al.*, 2003).

Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας άλλων δύο κλώνων έδειξε ότι πρόκειται για την πρωτεΐνη ERH (Enhancer of Rudimentary Homologue), η οποία είναι εξαιρετικά συντηρημένη μεταξύ των ειδών και έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται σε διάφορες λειτουργίες κυρίως όμως στη ρύθμιση της μεταγραφής (Pogge *et al.*, 2001, Wan *et al.*, 2005).

Τέλος απομονώθηκαν τέσσερις ακόμα κλώνοι, οι αλληλουχίες των οποίων όμως δεν βρέθηκαν ταυτόσημες με καμία από τις υπάρχουσες αλληλουχίες που υπάρχουν στις βάσεις δεδομένων και είναι οι εξής: ATP/GTP binding protein, RIKEN (Q8VEJ7), RIKEN(Q8CFC7).

Πίνακας 6: Ταυτοποίηση των πλασμιδιακών κλώνων που δεν εμφανίζουν συγγένεια με την πρωτεΐνη SAFB1.

Όνομα πρωτεΐνης	Ανθεκτικότητα σε AT (mM)	Αριθμός κλώνων
TRIM27	10	1
TRIM2	10	2
Mastrin	10	1
Dynactin	50	1
ERH	50	2
ATP/GTP binding protein	10	2
RIKEN (Q8VEJ7)	50	1
RIKEN(Q8CFC7)	10	1

Η ανίχνευση μοριακών αλληλεπιδράσεων του SAFB1, αντίθετα από τις προσδοκίες μας, δεν παρουσίασε πρωτεΐνες που να περιέχουν μοτίβα RS, ούτε κάποιες οι οποίες θα μπορούσαν να θεωρηθούν ότι σχετίζονται με προφανή τρόπο με κάποια από τις λειτουργίες των SR κινασών.

Γ.3.3. Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του SAFB2 με τις αλληλεπιδρούσες πρωτεΐνες του SAFB1C μέσω του συστήματος των δύο υβριδίων

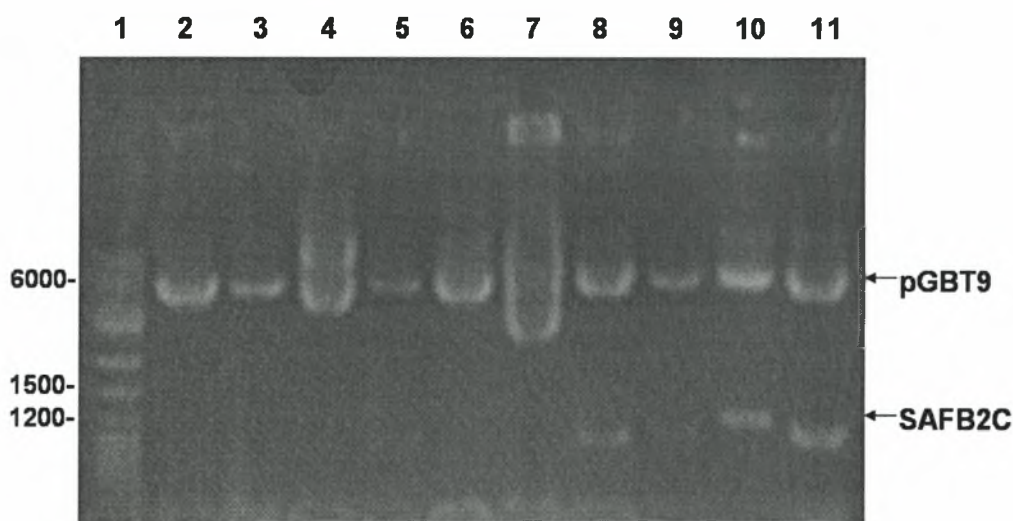
Δεδομένης α) της αποκάλυψης ότι τα θηλαστικά φέρουν και γονίδιο SAFB2, κατά 70% ομόλογο ως προς την προβλεπόμενη αμινοξική αλληλουχία προς το γονίδιο SAFB1 και στο οποίο δεν είχε (και δεν έχει ακόμα) αποδοθεί ειδική λειτουργία και β) επειδή οι SR κινάσες με βάση τα αποτελέσματα της παρούσης εργασίας διαφοροποιούν λειτουργικά (και πολύ πιθανόν και φυσικά) μεταξύ των παραγόντων SAFB1 και SAFB2, εξετάστηκε η αλληλεπίδραση της καθεμίας από τις πρωτεΐνες που προέκυψαν να αλληλεπιδρούν με τον SAFB1 στο σύστημα των δύο υβριδίων, με την αντίστοιχη περιοχή του SAFB2.

Δημιουργήθηκε πλασμιδιακή κατασκευή “pGBT9-SAFB2C”, η οποία κωδικοποιεί περιοχή του καρβοξυτελικού άκρου της ανθρώπινης πρωτεΐνης SAFB2 (αμινοξέα 549-953). Η συγκεκριμένη πλασμιδιακή κατασκευή χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθεί μέσω του συστήματος των δύο υβριδίων, εάν τα μόρια για τα οποία έχει προκύψει ότι αλληλεπιδρούν με τον παράγοντα SAFB1, εμφανίζουν την ίδια συμπεριφορά και με τον SAFB2, καθώς δεν έχει βρεθεί κάποια ιδιότητα που να αποδίδει στα δύο μόρια διαφορετική λειτουργία.

Γ.3.4. Παρασκευή του πλασμιδίου-δολώματος SAFB2

Αρχικά πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης όπου σαν εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε η πλασμιδιακή κατασκευή pEGFP/SAFB2. Ως νοηματικός εκκινητής χρησιμοποιήθηκε ο 5'S1bS2 και ως αντινοηματικός ο 3'S1bS2.

Το προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης SAFB2C καθώς και ο φορέας pGBT9 αφού υπέστησαν τις κατάλληλες κατεργασίες, ακολούθησε αντίδραση σύνδεσης και μετασχηματισμός σε βακτήρια *E. coli* Top10. Από τις αποικίες που προέκυψαν επιλέχθηκαν τυχαία 12 από τις οποίες απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA, ακολούθησε πέψη των πλασμιδιακών DNA με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού BamHI και EcoRI και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης για να διαπιστωθεί ποια μόρια περιέχουν το επιθυμητό ένθεμα (εικόνα 51). Από την φωτογραφία φαίνεται ότι το πλασμιδιακό DNA των διαδρομών 8, 9, 10 και 11 παρουσιάζει το ένθεμα του σωστού μεγέθους (1220bp). Η αρτιότητα της κατασκευής επιβεβαιώθηκε με ανάγνωση της αλληλουχίας του ενθέματος. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι το συγκεκριμένο πλασμίδιο είναι ανασυνδυασμένο και κατάλληλο για την παραγωγή της χμιαϊκής πρωτεΐνης GAL4-SAFB2C.



Εικόνα 51: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%. Διαδρομή 1: 1 μl μάρτυρας μοριακών βαρών, Διαδρομές 2-11: 10 μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με EcoRI-BamHI.

Στη συνέχεια στο σύστημα των δυο υβριδίων που πραγματοποιήθηκε, η πλασμιδιακή κατασκευή “pGBT9-SAFB2C” εισήχθη στο στέλεχος *S.c.* pJ69-4A μαζί με κάθε ένα από τα πλασμίδια που βρέθηκαν να περιέχουν cDNA των οποίων τα προϊόντα αλληλεπιδρούν με τον SAFB1. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα εκτιμήθηκαν

για την ικανότητα τους να αναπτύσσονται παρουσία 5mM, 10mM, and 50mM AT (3-αμινοτριαζόλη) καθώς και για την ενεργοποίηση του γονιδίου LacZ σε τριβλία X-gal. Όπως φαίνεται στον πίνακα 7 ο GAL4-SAFB2C φαίνεται να αλληλεπιδρά με τους κλώνους της πρώτης ομάδας υποδεικνύοντας ομο- και ετερο-διμερισμό παρόμοιο με αυτόν του SAFB1. Επίσης ο GAL4-SAFB2C βρέθηκε να αλληλεπιδρά και με τους κλώνους της δεύτερης ομάδας εξίσου καλά με τον GAL4-SAFB1 με εξαίρεση τρεις κλώνους (με κόκκινο στον πίνακα 7). Δύο από αυτούς (η μαστρίνη και η πρωτεΐνη που περιέχει μοτίβο πρόσδεσης ATP/GTP αλληλεπιδρούν και με τον SAFB2 αλλά πολύ ισχυρότερα απ' ότι με τον SAFB1, ενώ ο τρίτος, ο οποίος αλληλεπιδρά πολύ ισχυρά με τον SAFB1 δεν αλληλεπιδρά καθόλου με τον SAFB2.

Πίνακας 7: Έλεγχος της ανθεκτικότητας σε AT των μετασχηματισμένων κυττάρων *S.c.* με τα πλαμίδια- δολώματα και πλασμίδια-λείες. Με κόκκινο φαίνονται οι λείες που διαφοροποιούνται μεταξύ του SAFB1 και SAFB2.

Λείες του SAFB1	Ανθεκτικότητα σε AT (mM)	
	pGBT9- SAFB1	pGBT9-SAFB2C
SAFB1	50mM	50mM
SAFB2	50mM	50mM
SAFB3	50mM	50mM
DYNACTIN	50mM	50mM
TRIM2	10mM	10mM
TRIM2	10mM	10mM
RIKEN (Q8VEJ7)	50mM	50mM
TRIM27	10mM	10mM
RIKEN(Q8CFC7)	10mM	10mM
MASTRIN	10mM	50mM
ATP/GTP binding protein (function unknown)	10mM	50mM
ERH	50mM	-

Συνεπώς επιλέχθηκε να διερευνηθεί περαιτέρω η αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών με την πρωτεΐνη ERH, καθώς είναι το μόνο πολυπεπτίδιο που εμφανίζει σαφή διάκριση ανάμεσα στους δυο παράγοντες. Επιπλέον η ERH είναι μια μικρή πρωτεΐνη με ιδιαίτερα ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά καθώς είναι εντυπωσιακά συντηρημένη μεταξύ των ειδών και φέρει πρωτότυπη τριτοταγή δομή.

Η διαφοροποιημένη αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης ERH με τους παράγοντες SAFB1 και SAFB2 επιβεβαιώθηκε στο σύστημα των δυο υβριδίων με τη χρήση πολλών και διαφορετικού μεγέθους κλώνων των τριών πρωτεϊνών (πίνακας 8). Τα cDNA του SAFB2C μεταφέρθηκαν από πλασμίδια της βιβλιοθήκης στον πλασμιδιακό φορέα pGBT9 για να δημιουργηθούν οι πλασμιδιακές κατασκευές pGBT9-SAFB2C(405aa), pGBT9-SAFB2C(166aa) και pGBT9-SAFB2C(328aa).

Πίνακας 8: Έλεγχος της ανθεκτικότητας σε AT των μετασχηματισμένων κυττάρων *S.c.* με διαφορετικού μεγέθους κλώνους των πρωτεϊνών ERH, SAFB1 και SAFB2.

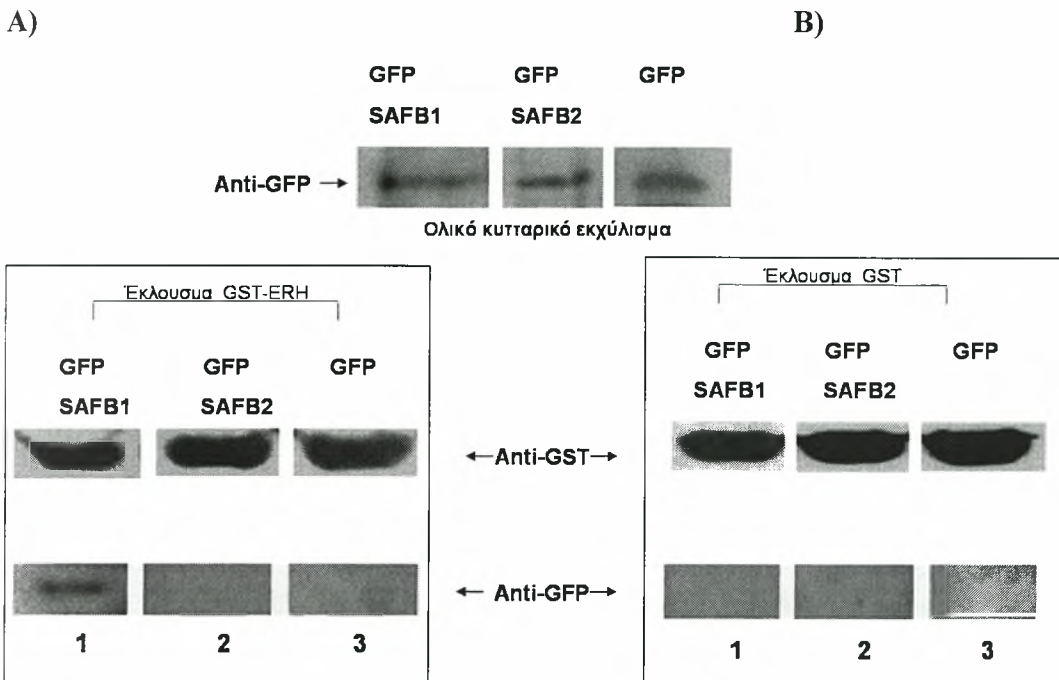
Πλασμίδιο- Δόλωμα	Ανθεκτικότητα σε AT (mM)	
	Λεία pVP16-ERH πλήρους μεγέθους (104aa)	Λεία pVP16-ERH (100aa)
pGBT9-SAFB1(450aa)	50mM	50mM
pGBT9-SAFB2C(405aa)	-	-
pGBT9-SAFB2C(166aa)	-	-
pGBT9-SAFB2C(328aa)	-	-

Γ.3.5. Έλεγχος αλληλεπίδρασης *in vitro* της ERH με τους παράγοντες SAFB1 και SAFB2

Η δομική βάση της διαφοροποιημένης αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης ERH με τους παράγοντες SAFB1 και SAFB2 διερευνήθηκε περαιτέρω *in vitro* με χρωματογραφία αγκιστείας.

Έγινε έκφραση της χμιαϊκής πρωτεΐνης GST-ERH (και GST) σε κατάλληλα στελέχη *E. coli* (BL21-RIL). Στη συνέχεια η πρωτεΐνη απομονώθηκε από το βακτηριακό εκχύλισμα μέσω σφαιριδίων γλουταθειόνης (GSH-Sepharose), τα οποία επώστηκαν με κυτταρικά εκχυλίσματα όπου είχαν υπερεκφραστεί οι χμιαϊκές πρωτεΐνες GFP-SAFB1, GFP-SAFB2 και GFP. Αφού έγιναν οι κατάλληλες πλύσεις, ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western της ηλεκτροφόρησης των εκλουσμάτων

των σφαιριδίων με χρήση των αντισωμάτων anti-GST και anti-GFP που αναγνωρίζουν τις χημικικές πρωτεΐνες GST-ERH και GFP-SAFB1/2 αντίστοιχα (εικόνα 52).



Εικόνα 52:: Χρωματογραφία αχχιστείας της καθαρισμένης πρωτεΐνης GST-ERH ή GST με σφαιρίδια γλουταθειόνης επωασμένα με κυτταρικά εκχυλίσματα που υπερεκφράζουν GFP-SAFB1, GFP-SAFB2 και GFP. Έγινε ανάλυση των δειγμάτων με SDS-PAGE και ανοσοανίχνευση με αντίσωμα anti-GST και anti-GFP. Απεικονίζεται το 1/10 του ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε περίπτωση.

Όπως φαίνεται στην εικόνα, ενώ τα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα περιέχουν καθεμία από τις τρεις πρωτεΐνες σε ανιχνεύσιμες ποσότητες (πάνω μέρος της εικόνας, με αντίσωμα anti-GFP) καμία από αυτές δεν προσδένεται στα σφαιρίδια στα οποία είναι προσκολλημένη μόνο η GST (B). Ομοίως, η πρωτεΐνη GFP δεν προσδένεται στην GST-ERH (διαδρομή A3) και τέλος, στο έκλουσμα της GST-ERH περιέχεται και GFP-SAFB1 ενώ αντίθετα δεν συγκρατείται ο GFP-SAFB2 (διαδρομές 1A και 2A). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν και *in vitro* τα δεδομένα που προέκυψαν *in vivo* σε κύτταρα σακχαρομύκητα, ότι δηλαδή η πρωτεΐνη ERH αλληλεπιδρά με τον παράγοντα SAFB1, αλλά όχι με τον παράγοντα SAFB2.

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία διερευνάται η βιολογική σημασία της αλληλεπίδρασης ενός καινούργιου μέλους των κινασών SR, της SRPK1a, με έναν πρωτεϊνικό παράγοντα της πυρηνικής μήτρας, τον SAFB1, ο οποίος δεν περιέχει μοτίβο RS στην αμινοξική του αλληλουχία. Η κινάση SRPK1a προέρχεται από εναλλακτικό μάτισμα του μεταγράφου του γονιδίου της SRPK1 με αποτέλεσμα να είναι 171 αμινοξέα μακρύτερη από την SRPK1 στο αμινοτελικό της άκρο (Nikolakaki *et al.*, 2001). Η ενζυμική δράση, η εξειδίκευση, η επίδρασή της στη ρύθμιση του ματίσματος καθώς και η έκφρασή της στους διάφορους ιστούς ελάχιστα διαφέρουν από αυτά της SRPK1.

Το επιμηκυσμένο N-τελικό άκρο της SRPK1a φαίνεται ότι εμπλέκεται σε πληθώρα αλληλεπιδράσεων με πρωτεΐνες του κυττάρου. Σε προηγούμενη μελέτη, κατά την οποία έγινε αναζήτηση μοριακών παρτενέρ αυτής της περιοχής με το σύστημα των δύο υβριδίων στον *S. cerevisiae*, απομονώθηκαν πολλοί διαφορετικοί κλώνοι. Ένας από αυτούς κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη SAFB1 για την οποία δείχθηκε ότι όντως αλληλεπιδρά με την SRPK1a *in vitro* και *in vivo* σε κύτταρα θηλαστικών υποδεικνύοντας ιδιαίτερη βιολογική σημασία για την συγκεκριμένη αλληλεπίδραση, καθώς ο SAFB1 δεν διαθέτει περιοχή RS και άρα δεν αποτελεί φυσικό υπόστρωμα της κινάσης (Nikolakaki *et al.*, 2001, Κοέν, 2006). Επιπρόσθετα πειράματα έδειξαν ότι ο SAFB1 αλληλεπιδρά και με την κινάση SRPK1 σε μικρότερο όμως βαθμό, γεγονός το οποίο φανερώνει ότι υπάρχει και άλλη περιοχή, κοινή και στις δύο κινάσες, η οποία ευθύνεται για την αλληλεπίδρασή τους με τον SAFB1.

Για την διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της SRPK1a με τον παράγοντα SAFB1 στην παρούσα εργασία ακολουθήθηκαν τρεις κατευθύνσεις: α) μελετήθηκε η επίδραση του παράγοντα SAFB1 στη δράση της κινάσης SRPK1a β) μελετήθηκε η επίδραση του παράγοντα SAFB1 στον υποκυτταρικό εντοπισμό της SRPK1a γ) έγινε αναζήτηση νέων μοριακών αλληλεπιδράσεων του SAFB1 προκειμένου να αποκαλυφθούν νέες ιδιότητες του μορίου που πιθανόν να παίζουν ρόλο στη λειτουργική του σχέση με την SRPK1a.

Κατά τις δοκιμασίες *in vitro* φωσφορυλίωσης οι ανθρώπινες κινάσες SRPK1a και SRPK1 ήταν απομονωμένες από εκχυλίσματα κυττάρων 293T υπό μορφή σύντηξης με τον επίτοπο FLAG μέσω ανοσοκατακρήμνισης με το αντίσωμα anti-

FLAG. Και οι δύο κινάσες ήταν πλήρους μεγέθους και εμφάνιζαν πλήρη δραστικότητα *in vitro* με δραστικότερη την SRPK1a όπως έχει περιγραφεί (Nikolakaki *et al.*, 2001). Ως υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν ο LBR, ο P2P-R και το συνθετικό πεπτίδιο RS₀ του οποίου η αλληλουχία προέρχεται από την RS περιοχή του LBR, τα οποία φωσφορυλιώνονται και από τις δύο κινάσες στις *in vitro* δοκιμασίες φωσφορυλίωσης.

Τέλος, η πρωτεΐνη SAFB1 παρασκευάστηκε σε βακτήρια σε σύντηξη με την πρωτεΐνη GST. Από πλασμίδια που περιείχαν το πλήρες cDNA του SAFB1 δεν ήταν δυνατόν να παρασκευαστεί ευδιάλυτη πλήρους μεγέθους πρωτεΐνη και έτσι χρησιμοποιήθηκε το καρβοξυ-τελικό ήμισυ της πρωτεΐνης, δεδομένου ότι σε αυτό το τμήμα ευρίσκεται η περιοχή αλληλεπίδρασης με την SRPK1a, όπως είναι γνωστό από τα αποτελέσματα της μεθόδου των δύο υβριδίων. Πράγματι, από πλασμίδια που περιείχαν μόνο το cDNA που κωδικοποιεί για το καρβοξυ-τελικό ήμισυ της πρωτεΐνης SAFB1 (αμινοξέα 623-915) και SAFB2 (αμινοξέα 641-953) επετεύχθη παρασκευή ευδιάλυτης πλήρους μεγέθους πρωτεΐνης GST-SAFB1C και GST-SAFB2C με σύγχρονη όμως επιμόλυνση από θραύσματα GST-πρωτεΐνης μικρότερων μεγεθών. Η ποσότητα SAFB1C και SAFB2C που προστέθηκε στις δοκιμασίες *in vitro* φωσφορυλίωσης υπολογίστηκε με βάση το σύνολο των θραυσμάτων GST-πρωτεΐνης τα οποία περιείχαν ένα μόνο μικρό ποσοστό πλήρους μεγέθους GST-SAFB1C ή GST-SAFB2C.

Στις δοκιμασίες *in vitro* φωσφορυλίωσης που έγιναν όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων προκύπτει επαναλήψιμα ότι ο SAFB1C αναστέλλει την κινάση SRPK1a ανεξάρτητα από το ποιο υπόστρωμα χρησιμοποιείται και η αναστολή αυτή είναι σε όλες τις περιπτώσεις γραμμική συνάρτηση της ποσότητας του αναστολέα που προστίθεται στην αντίδραση. Συνεπώς, η παρατηρούμενη αναστολή δεν οφείλεται κατ'αρχή σε κάποια ειδική αλληλεπίδραση του SAFB1 με κάποιο από τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν.

Επιπλέον, η παρουσία του SAFB1 αναστέλλει τη φωσφορυλίωση των τριών υποστρωμάτων και από την SRPK1 (κεφάλαιο αποτελεσμάτων και αποτελέσματα που δεν παρουσιάζονται).

Σε μια προσπάθεια να εντοπισθεί με μεγαλύτερη ακρίβεια η περιοχή του SAFB1C που προκαλεί την αναστολή, αφαιρέθηκε η πλούσια σε RE περιοχή του, δημιουργώντας έτσι την πρωτεΐνη GST-SAFB1C(ΔRE). Τα εναλλασόμενα κατάλοιπα αργινινών με γλουταμινικά οξέα σε αυτή την περιοχή θα μπορούσαν να

επηρεάζουν ποικιλοτρόπως την προσέγγιση την κινάσης με τα υποστώματά της, την αναγνώριση των φωσφορυλιωμένων υποστρωμάτων, αλλά και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ φωσφορυλιωμένων και μη φωσφορυλιωμένων υποστρωμάτων, δεδομένου ότι προσομοιάζουν εναλασσόμενες αργινίνες με φωσφοσερίνες (βλέπε συζήτηση παρακάτω). Παρατηρήθηκε ωστόσο ότι και η πρωτεΐνη GST-SAFB1C(ΔRE) ανέστειλε τις κινάσες με ιδιότητες εφάμιλλες με εκείνες της GST-SAFB1C, αποδίδοντας έτσι τις ανασταλτικές ιδιότητες της πρωτεΐνης σε αλληλουχίες που περιέχονται καρβοξυτελικά της πλούσιας σε RE περιοχής της.

Επιπλέον, όταν στις αντιδράσεις *in vitro* φωσφορυλίωσης προστέθηκε GST-SAFB2C, η SRPK1a (αλλά και η SRPK1) παρέμειναν δραστικές, ανεξάρτητα από το ποιο υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει ότι η πλούσια σε RE περιοχή δεν είναι απαραίτητη για την αναστολή, δεδομένου ότι ο SAFB2 περιέχει αντίστοιχη με αυτήν του SAFB1 (εικόνα 53), αλλά παρ'όλα αυτά δεν αναστέλλει τις κινάσες.

Σε όλες τις *in vitro* δοκιμασίες δράσης κινάσης χρησιμοποιήθηκαν μεγάλες ποσότητες των παρασκευών του SAFB1C και SAFB2C, προκειμένου να προστεθεί η κατάλληλη ποσότητα των πλήρους μεγέθους καρβοξυτελικών άκρων των πρωτεϊνών. Για το λόγο αυτό αλλά και για να παραχθούν οι ανθρώπινοι παράγοντες σε πλήρες μέγεθος και σε σύστημα πλησιέστερο σε αυτό όπου εκφράζονται φυσικά, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της δράσης των κινασών SRPK1a και SRPK1 παρουσία SAFB1 και SAFB2 οι οποίοι είχαν εκφραστεί ως πλήρους μεγέθους πρωτεΐνες σε κύτταρα HeLa. Συγκεκριμένα, οι κινάσες FLAG-SRPK1a/1 ανοσοκατακρημνίστηκαν από κύτταρα HeLa που συνέκφραζαν τον εκάστοτε παράγοντα SAFB και ελέγχθηκε η δράση τους σε *in vitro* δοκιμασίες φωσφορυλίωσης. Παρατηρήθηκε ότι παρουσία του SAFB1 για ακόμη μία φορά η ενζυμική δράση και των δύο κινασών αναστέλλεται, αλλά και πάλι δεν φαίνεται να επηρεάζεται παρουσία του SAFB2, επιβεβαιώνοντας έτσι τα αποτελέσματα των *in vitro* δοκιμασιών.

Συνεπώς, από τις δοκιμασίες *in vitro* φωσφορυλίωσης προκύπτουν αρχικά τα συμπεράσματα: α) ο SAFB1 είναι αναστολέας της δράσης των κινασών SRPK1a και SRPK1 ενώ ο SAFB2 δεν είναι και β) οι αλληλουχίες του SAFB1 οι υπεύθυνες για την αναστολή περιλαμβάνονται στο καρβοξυ-τελικό του άκρο, στην περιοχή 709 έως 915.

Στο μέρος αυτό της διατριβής έγιναν, παράλληλα με τις δοκιμασίες *in vitro* φωσφορυλίωσης και πειράματα δέσμευσης με χρωματογραφία αγχιστείας των

παραγόντων SAFB στις κινάσες και αντίθετα. Τα πειράματα αυτά αν και δεν ενδείκνυνται για ακριβείς ποσοτικοποιήσεις, επέτρεψαν την εξαγωγή κάποιων συσχετισμών για τη συγγένεια μεταξύ των τεσσάρων πρωτεϊνών: τη μεγαλύτερη αγγιστεία μεταξύ τους έχουν η SRPK1a με τον SAFB1 ενώ την μικρότερη η SRPK1a με τον SAFB2. Ενδιάμεσα ευρίσκεται η SRPK1 η οποία δείχνει μεγαλύτερη αγγιστεία για τον SAFB1 και μικρότερη για τον SAFB2 (Πίνακας 9).

Πίνακας 9: Κλίμακα αγγιστείας κινασών και παραγόντων SAFB με φθίνουσα ισχύ αλληλεπίδρασης.

Κινάση/παράγοντας SAFB	Ισχύς αλληλεπίδρασης
SRPK1a/SAFB1	++++
SRPK1/SAFB1	++
SRPK1/SAFB2	+
SRPK1a/SAFB2	±

Δεδομένου ότι ο SAFB1 δεν αποτελεί φυσικό υπόστρωμα της κινάσης αφού δεν διαθέτει περιοχή RS, η ερμηνεία της αναστολής της ενζυμικής δράσης των δύο κινασών μπορεί να προσεγγιστεί ως εξής:

α) Είναι πιθανό ο SAFB1 να αποτελεί αλλοστερικό αναστολέα της SRPK1a, ο οποίος προκαλεί αλλαγή στη στεροδιαμόρφωση της κινάσης κατά την δέσμευσή του στο αμινοτελικό της άκρο, με αποτέλεσμα την αναστολή της δραστηριότητάς της. Δεδομένου όμως ότι ο SAFB1C αναστέλλει επιπλέον τη δράση της κινάσης SRPK1, το ενδεχόμενο αυτό μπορεί να απορριφθεί. Ο SAFB1 μεταβάλλει ίσως τη στεροδιαμόρφωση των δύο κινασών μέσω δέσμευσης σε μια άλλη περιοχή, η οποία είναι κοινή και στις δύο κινάσες. Είναι βέβαιο ότι μία τέτοια περιοχή υπάρχει, επειδή ο SAFB1 δεσμεύεται και στις δύο κινάσες, αλλά δεν είναι γνωστό εάν η δέσμευση αυτή καθ' εαυτή είναι υπεύθυνη και για την αναστολή. Το ερώτημα αυτό θα απαντηθεί με μελέτες ενζυμικής κινητικής απουσία και παρουσία αναστολέα.

β) Υπάρχει η πιθανότητα ο SAFB1C να αλληλεπιδρά με τα φυσικά υποστρώματα της κινάσης, εμποδίζοντας κατ' αυτό τον τρόπο την πρόσδεσή της σε

αυτά. Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί ότι περιοχές μη φωσφορυλιωμένων RS έχουν την τάση να αλληλεπιδρούν με φωσφορυλιωμένα διπεπτίδια RS (Xiao & Manley 1997, Mylonis *et al.*, 2004). Το καρβοξυτελικό άκρο του SAFB1 περιέχει μια περιοχή πλούσια σε διπεπτίδια αργινίνης και γλουταμινικού οξέος (περιοχή RE), τα οποία ευθύνονται για τη συσσώρευση θετικών και αρνητικών φορτίων στη συγκεκριμένη περιοχή. Επομένως, τόσο στις RE περιοχές όσο και στις φωσφορυλιωμένες RS περιοχές υπάρχει θετικά φορτισμένη αργινίνη συνδεδεμένη με ένα αρνητικά φορτισμένο αμινοξύ (γλουταμινικό και φωσφοσερίνη αντίστοιχα). Δεδομένου ότι η RE περιοχή προσομοιάζει χημικά με τα φωσφορυλιωμένα διπεπτίδια RS μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η περιοχή αυτή είναι ικανή να αλληλεπιδρά με τα μη φωσφορυλιωμένα διπεπτίδια των RS των υποστρωμάτων της κινάσης, εμποδίζοντας έτσι την πρόσδεση της σε αυτά.

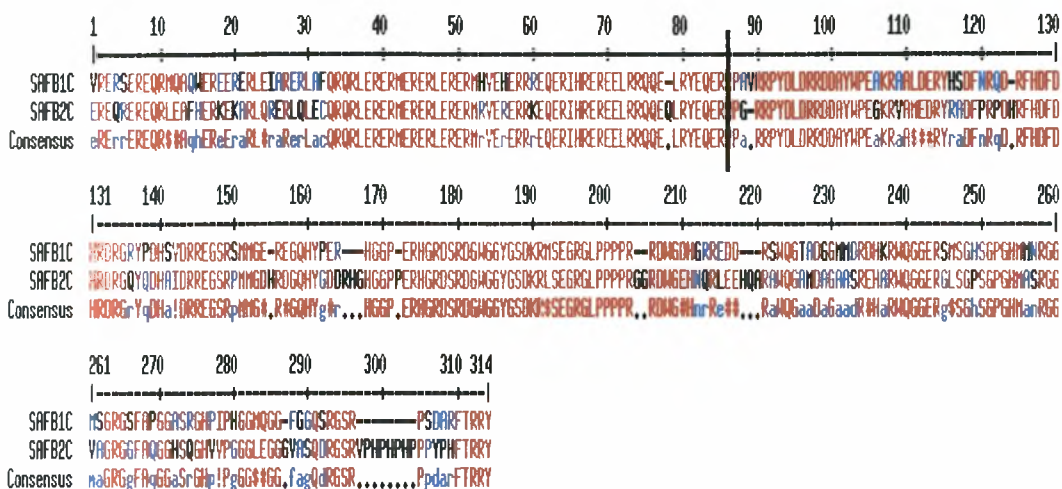
Τα αποτελέσματα με την πρωτεΐνη GST-SAFB1C(ΔRE) δηλώνουν ότι η πλούσια σε RE περιοχή του SAFB1 δεν παίζει σημαντικό ρόλο στην αναστολή και συνεπώς θα μπορούσε η περίπτωση αυτή να απορριφθεί. Παρ'όλα αυτά, η προσεκτική παρατήρηση της αλληλουχίας της πρωτεΐνης (εικόνα 53) δείχνει ότι υπάρχουν ακόμα διάσπαρτες αλληλουχίες διπεπτιδίων αργινίνης-γλουταμινικού οξέος που θα μπορούσαν να παίξουν το ρόλο που μόλις αναφέρθηκε. Κινητικές μελέτες όπως δοκιμασίες ελέγχου της δράσης της SRPK1a σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις υποστρώματος παρουσία του SAFB1C θα μπορούσαν να δείξουν εάν η αναστολή της δράσης της SRPK1a οφείλεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ του SAFB1C και των υποστρωμάτων της ή εάν είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ του SAFB1C και της ίδιας της κινάσης.

γ) Υπάρχει το ενδεχόμενο ο SAFB1 να είναι ένας συναγωνιστικός αναστολέας, ο οποίος συναγωνίζεται τα φυσικά υποστρώματα της κινάσης και δεν επιτρέπει την πρόσδεση τους σε αυτήν. Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές το χαρακτηριστικό των κινάσων SR να φωσφορυλιώνουν διαδοχικά πολλαπλές σερίνες στις περιοχές RS των υποστρωμάτων επιτυγχάνεται μέσω της ύπαρξης δύο αργινινών στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (θήκη P-2), το οποίο αναγνωρίζει φωσφοσερίνες καθώς και πολικά (N και Q) ή όξινα (D και E) αμινοξέα στη θέση P-2 του υποστρώματος (όπου P θεωρείται κατάλοιπο σερίνης που υπόκειται σε φωσφορυλίωση). Στην περιοχή αυτή μετατοπίζεται η φωσφορυλιωμένη σερίνη επιτρέποντας έτσι τη δέσμευση της γειτονικής σερίνης στην καταλυτική περιοχή του ενζύμου και τη διαδοχική φωσφορυλίωση του υποστρώματος (Nolen *et al.*, 2001,

Aubol *et al.*, 2003). Είναι λοιπόν πιθανό τα γλουταμινικά των περιοχών RE του SAFB1 να δεσμεύονται στη θήκη P-2 του ενεργού κέντρου της κινάσης, αφού προσομοιάζουν χημικά με τα φωσφορυλιώμενα RS αναστέλλοντας έτσι την προσέγγιση του υποστρώματος. Από τα αποτελέσματά της αναστολής με την πρωτεΐνη GST-SAFB1C(ΔRE) σε συνδυασμό με το γεγονός ότι ο SAFB2C, ο οποίος επίσης περιέχει πλούσια σε RE περιοχή, δεν αναστέλλει την δράση της SRPK1a, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η αναστολή που προκαλείται από τον SAFB1C δεν οφείλεται στην περιοχή των επαναλαμβανόμενων RE.

Υπάρχει λοιπόν κάποια άλλη περιοχή του SAFB1C, η οποία ευθύνεται για την αναστολή και η οποία πιθανόν εντοπίζεται μετά την περιοχή RE. Υπέρ αυτής της άποψης συνηγορεί και το γεγονός ότι ενώ το καρβοξυτελικό άκρο του SAFB1 βρέθηκε να αλληλεπιδρά με την SRPK1a, η αντίστοιχη περιοχή του SAFB2 αλληλεπιδρά πολύ λιγότερο με την κινάση (πειράματα δέσμευσης, εικόνες 44, 45, 47). Ωστόσο, η πλούσια σε RE περιοχή τόσο του SAFB2C όσο και του SAFB1C βρέθηκε να αλληλεπιδρά *in vitro* και με τις δύο κινάσες (παρατηρήσεις που προκύπτουν από τα πειράματα δέσμευσης των διαφόρου μεγέθους βακτηριακών θραυσμάτων GST-SAFB1 και GST-SAFB2 σε ακινητοποιημένες πλήρους μεγέθους κινάσες, εικόνα 44). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω δεδομένα μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η περιοχή που ευθύνεται για την λειτουργία του SAFB1 ως αναστολέας προφανώς εντοπίζεται μετά την πλούσια σε RE περιοχή του.

Η σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας των καρβοξυτελικών άκρων του SAFB1 και SAFB2 έδειξε ότι υπάρχουν αμινοξέα τα οποία διαφέρουν μεταξύ των δύο πρωτεϊνών. Ο SAFB2C περιέχει ως επι το πλείστον επιπρόσθετα κατάλοιπα αμινοξέων, τα οποία πιθανόν να παρεμποδίζουν την αλληλεπίδρασή του με την κινάση (εικόνα 53).



Εικόνα 53: Ομοπαράθεση της αμινοξικής αλληλουχίας του SAFB1C και SAFB2C. Μέχρι τη μαύρη διαχωριστική γραμμή εντοπίζεται η πλούσια σε RE περιοχή των δύο πρωτεϊνών η οποία απουσιάζει από την πρωτεΐνη SAFB1C(ΔRE).

Θα ήταν πολύ ενδιαφέρον να εντοπιστούν με μεγαλύτερη ακρίβεια, κατ' αρχή με τη δημιουργία καινούργιων κατασκευών και στη συνέχεια με τη δημιουργία μεταλλάξεων, οι αλληλουχίες εκείνες οι οποίες ευθύνονται για την αλληλεπίδραση μεταξύ κινάσης-SAFB και εκείνες οι οποίες είναι υπεύθυνες για την αναστολή. Τέλος μελέτες ενζυμικής κινητικής με ομογενείς παρασκευές μορίων θα ξεκαθαρίσουν τι είδους αναστολή ασκεί ο SAFB1 στη δράση του ενζύμου.

Στο δεύτερο μέρος της εργασίας μελετήθηκε η επίδραση της συνέκφρασης των κινασών με τους παράγοντες SAFB στον υποκυτταρικό τους εντοπισμό. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η SRPK1a η οποία εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στο κυτταρόπλασμα και δευτερευόντως στον πυρήνα, όταν συνεκφράζεται με τον παράγοντα SAFB1 εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα (και το ίδιο συμβαίνει με την SRPK1). Παρατηρήθηκε επιπλέον ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον φαινόμενο: φαίνεται ότι ο εντοπισμός των κινασών εξαρτάται από τα επίπεδα έκφρασής τους μέσα στο κύτταρο. Κύτταρα που εμφανίζουν χαμηλή έκφραση της κινάσης (όπως αυτή φαίνεται στο μικροσκόπιο) δείχνουν αποκλειστικά πυρηνικό εντοπισμό (με αποκλεισμό από τους πυρηνίσκους) ο οποίος συμπίπτει με εκείνον του SAFB1/2, ενώ όταν η έκφραση είναι ισχυρότερη και τα ποσά της κινάσης αυξάνονται, τότε αυτή φαίνεται και στους πυρηνίσκους αλλά και στο κυτταρόπλασμα. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε σε κύτταρα που συνεκφράζουν SRPK1 και SAFB2 (αν και με μειωμένο τον αριθμό των κυττάρων με αμιγή πυρηνικό εντοπισμό), ενώ σε κύτταρα

που συνεκφράζουν SRPK1a και SAFB2 η SRPK1a επιδεικνύει ακριβώς την ίδια εικόνα με εκείνη που έχει όταν εκφράζεται απουσία παραγόντων SAFB και η οποία είναι η ίδια ανεξάρτητα από τα επίπεδα έκφρασής της.

Είναι επομένως καθαρό ότι η δομική συγγένεια που παρουσιάζουν οι κινάσες με τους παράγοντες SAFB επιδρά στην τοποθέτησή τους μέσα στο κύτταρο. Η ισχύς δε της αλληλεπίδρασης μεταξύ κινάσης-SAFB αντικατοπτρίζεται και στο κλάσμα της κινάσης που είναι δεσμευμένο στον πυρήνα όπου εδράζει ο εκάστοτε παράγοντας. Αυτό φαίνεται από την παράθεση της ισχύος της αλληλεπίδρασης του εκάστοτε ζεύγους κινάσης/παράγοντα SAFB και την επίδραση του αντίστοιχου παράγοντα στον υποκυτταρικό εντοπισμό της κινάσης (Πίνακας 10). Η εικόνα της αμιγώς πυρηνικής κατανομής των κινασών που παρατηρείται είναι ταυτόσημη με εκείνη των SAFB, δεδομένο που σημαίνει ότι μάλλον οι κινάσες βρίσκονται σε αυτές τις περιπτώσεις σε κοινά σύμπλοκα με τους παράγοντες SAFB. Δεδομένου οι δύο παράγοντες SAFB εντοπίζονται σε ξεχωριστές υποπυρηνικές δομές και μπορούν να παρατηρηθούν ξεχωριστά κάτω από συνεστιακό μικροσκόπιο (Sergeant *et al.*, 2006) θα ήταν πολύ ενδιαφέρον να εκτελεστεί ένα τέτοιο πείραμα υπό αυτές τις συνθήκες.

Δεν είναι γνωστό με ποιόν μηχανισμό γίνεται η μεταβολή της υποκυτταρικής κατανομής της κινάσης παρουσία SAFB1 μέσα στο κύτταρο. Έχει προταθεί ότι η λεγόμενη “spacer region” της κινάσης είναι υπεύθυνη για την αγκυροβόλησή της στο κυτταρόπλασμα (Ding *et al.*, 2006) και ίσως να είναι η ίδια αυτή περιοχή εκείνη στην οποία δεσμεύεται ο παράγοντας SAFB1 στις δύο κινάσες.

Αυτή η περιοχή έχει αναφερθεί πρόσφατα να είναι μία από τις πολλές περιοχές της κινάσης, η οποία μπορεί σε συνδυασμό με άλλες να σταθεροποιήσει την περιοχή ενεργοποίησής της και να την κρατά σε σταθερά ενεργή μορφή (Ngo *et al.*, 2007). Εάν ο SAFB1 δεσμεύεται σε αυτή την περιοχή της κινάσης θα την “απαγκιστρώνει” από το κυτταρόπλασμα και θα αποσταθεροποιεί συγχρόνως την περιοχή ενεργοποίησής της αναστέλλοντας πιθανόν έτσι τη δράση της. Θα μπορούσε έτσι η δέσμευση, ο εντοπισμός και η αναστολή της δράσης της κινάσης SRPK1a από τον παράγοντα SAFB1 να είναι φαινόμενα αλληλένδετα και σε αυτό συνηγορούν γενικά και τα περισσότερα αποτελέσματα που παρουσιάζονται για την SRPK1 και τον SAFB2. Εξάλλου, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα, οι ιδιότητες της αναστολής της δράσης αλλά και της συγκράτησης στον πυρήνα συμβαδίζουν με την αγκιστεία που έχουν οι κινάσες για τους παράγοντες SAFB (Πίνακας 10).

Πίνακας 10: Συσχετισμός της αναστολής δράσης και μεταβολής της υποκυτταρικής κατανομής των κινασών με την αγχιστεία τους για τους παράγοντες SAFB.

Αναστολή δράσης	Κινάση/παράγοντας SAFB	Ισχύς αλληλεπίδρασης	Επίδραση στην υποκυτταρική κατανομή
+	SRPK1a/SAFB1	++++	+
+	SRPK1/SAFB1	++	+
-	SRPK1/SAFB2	+	±
-	SRPK1a/SAFB2	±	-

Με βάση τα σημερινά δεδομένα οι υποπυρηνικές δομές δεν είναι σταθερές, αλλά βρίσκονται σε δυναμικές ισορροπίες όπου οι πρωτεΐνες που απαρτίζουν τα μεγαλομοριακά σύμπλοκα εναλλάσσονται συνέχεια. Η σύσταση των συμπλόκων αλλάζει ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν στο κύτταρο και επηρεάζονται π.χ. από τη φάση του κυτταρικού κύκλου, την κατάσταση πολλαπλασιασμού, τη διαφοροποίηση, εξωτερικά ερεθίσματα κ.α. (εικόνα 54). Οι ιδιότητες των πρωτεϊνών που απαρτίζουν τα σύμπλοκα μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με τις πρωτεΐνες με τις οποίες συνευρίσκονται στο εκάστοτε σύμπλοκο. Η κινάση SRPK1a έχει ήδη προταθεί να εμφανίζεται με τις πρωτεΐνες SAFB1 και P2P-R σε ένα τέτοιο υποπυρηνικό σύμπλοκο (Scott *et al.*, 2003).

Ο παράγοντας SAFB1 (και ο SAFB2) είναι συγκαταστολέας του υποδοχέα των οιστρογόνων (ERα) αλλά φαίνεται να καταστέλλει τη μεταγραφική δραστηριότητα των πυρηνικών υποδοχέων γενικότερα και αυτό συμβαίνει μέσω άμεσης δέμευσής του σε συγκεκριμένες περιοχές τους (Debril *et al.*, 2005). Συγχρόνως, έχει δείχθει ότι η έκφρασή του μεταβάλλεται κατά τη διαφοροποίηση κάποιων ιστών (Debril *et al.*, 2005) και φαίνεται ότι παίζει ρόλο στη διαφοροποίηση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Επιπλέον, και οι δύο παράγοντες SAFB1/2 αναστέλλουν το εναλλακτικό μάτισμα ενός εξονίου από το γονίδιο *tra2β* *in vivo* σε μελέτη των Sergeant *et al.* Είναι πιθανόν η παρατηρούμενη αναστολή του ματίσματος να οφείλεται στην αναστολή των SR κινασών, οι οποίες πιθανόν συνεντοπίζονται με τους υπερεκφρασμένους στη μελέτη SAFB1/2 παράγοντες.

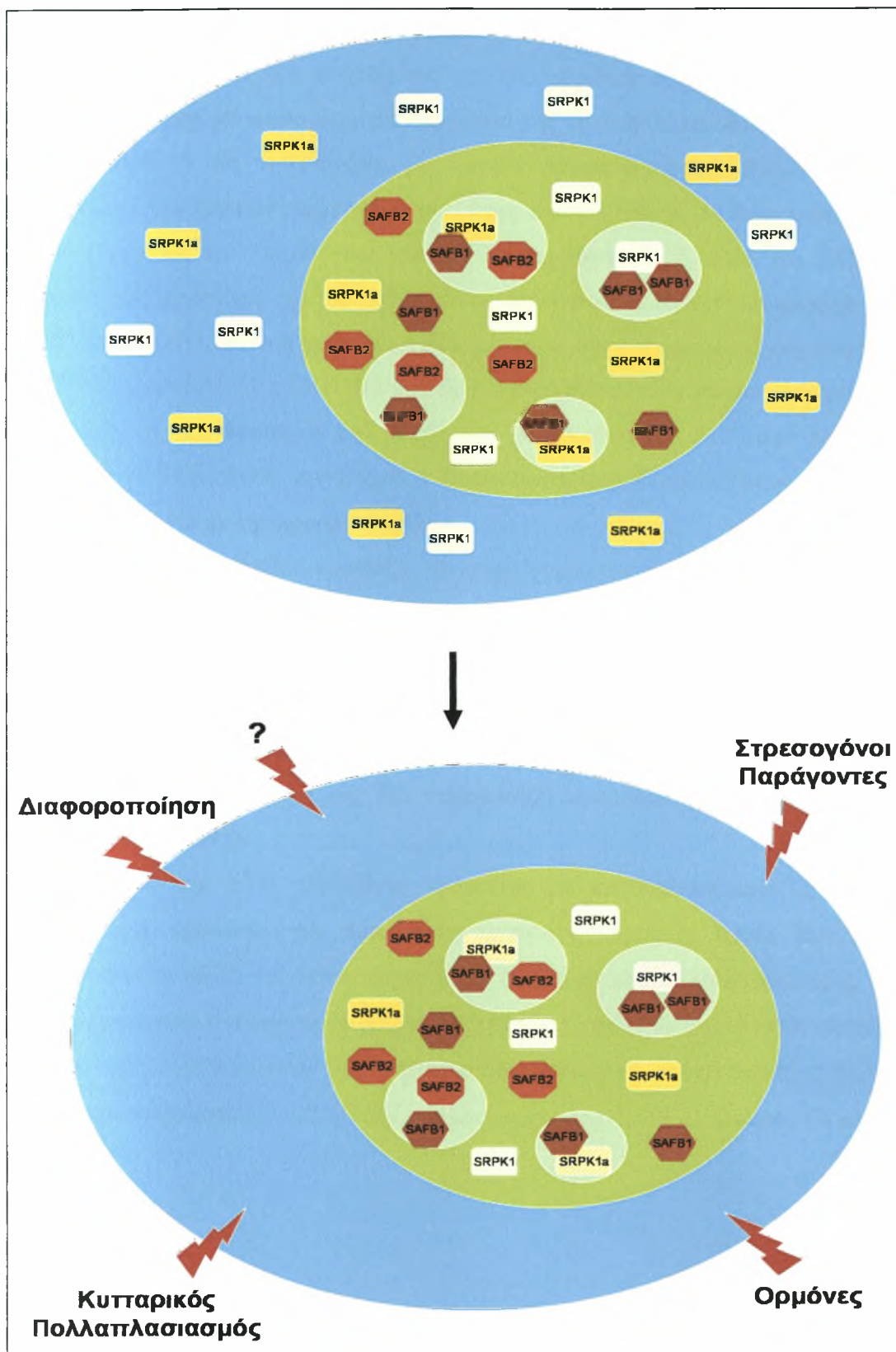
Είναι γνωστό ότι οι SR κινάσες είναι απαραίτητες για το εναλλακτικό μάτισμα και συχνά παίζουν το ρόλο ρυθμιστή μέσω φωσφορυλίωσης των κατάλληλων SR πρωτεϊνών (Graveley, 2000, Caceres *et al.*, 2002). Επίσης, όπως διαφαίνεται όλο και περισσότερο, η διαδικασία της κυτταρικής διαφοροποίησης στηρίζεται σε μεγάλο βαθμό στο εναλλακτικό μάτισμα δεδομένου ότι ο αριθμός των διαφορετικών γονιδίων που περιέχονται στο ανθρώπινο γονιδίωμα εμφανίζεται όλο και μικρότερος με την πάροδο του χρόνου.

Είναι πιθανό η κινάση και ο SAFB να συνυπάρχουν κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες σε υποπυρηνικά σύμπλοκα στα οποία η κινάση θα παραμένει ανενεργή και πιθανόν να υπάρχουν ερεθίσματα που να ελέγχουν τις μετακινήσεις αυτών των πρωτεϊνών και τις δημιουργίες και μεταφορές των εν λόγω συμπλόκων (εικόνα 54).

Τέλος, υπάρχουν αρκετά πειραματικά δεδομένα που δείχνουν ότι ένας μεγάλος αριθμός καρκινικών κυττάρων εμφανίζει διαταραχές της μηχανής του ματίσματος του mRNA. Έχουν βρεθεί σε πολλές περιπτώσεις καρκίνου και καρκινικών σειρών ισομορφές πρωτεϊνών, οι οποίες εμπλέκονται στην διέγερση της καρκινικής ανάπτυξης να περιέχουν μεταλλάξεις που προκύπτουν κατά τη διαδικασία του ματίσματος (Hayes *et al.*, 2006). Οι κινάσες SR, οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του ματίσματος και υπερεκφράζονται σε καρκινικές σειρές (Nikolakaki *et al.*, 2001), μελετώνται ολοένα και περισσότερο για τυχόν εμπλοκή τους στον μηχανισμό της καρκινογένεσης. Για παράδειγμα η SRPK1 έχει βρεθεί πρόσφατα ότι υπερεκφράζεται σε διάφορα καρκινώματα, ενώ η μείωση της έκφρασής της προσδίδει ευαισθησία σε μερικά από τα πιο ενεργά και αποτελεσματικά αντικαρκινικά φάρμακα.

Και για τον παράγοντα SAFB έχει επιβεβαιωθεί ότι υπερεκφράζεται σε διάφορες ανθρώπινες καρκινικές σειρές, ενώ η υπερέκφρασή του σε καρκινικά κύτταρα μαστού αναστέλλει την ανάπτυξή τους (Townson *et al.*, 2003). Μέσω της αλληλεπίδρασής του με άλλους συγκαταστολείς της μεταγραφικής δραστηριότητας πυρηνικών υποδοχέων όπως ο ERα, ο SAFB, ρυθμίζοντας την ορμονοεξαρτώμενη ανταπόκριση του κυττάρου φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό ελέγχου της φυσιολογίας του κυττάρου.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω δεδομένα τόσο οι SRPKs όσο και ο παράγοντας SAFB φαίνεται ότι εμπλέκονται στη ρύθμιση μονοπατιών υπεύθυνα για ογκογένεση και παίζουν σημαντικό ρόλο στην διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

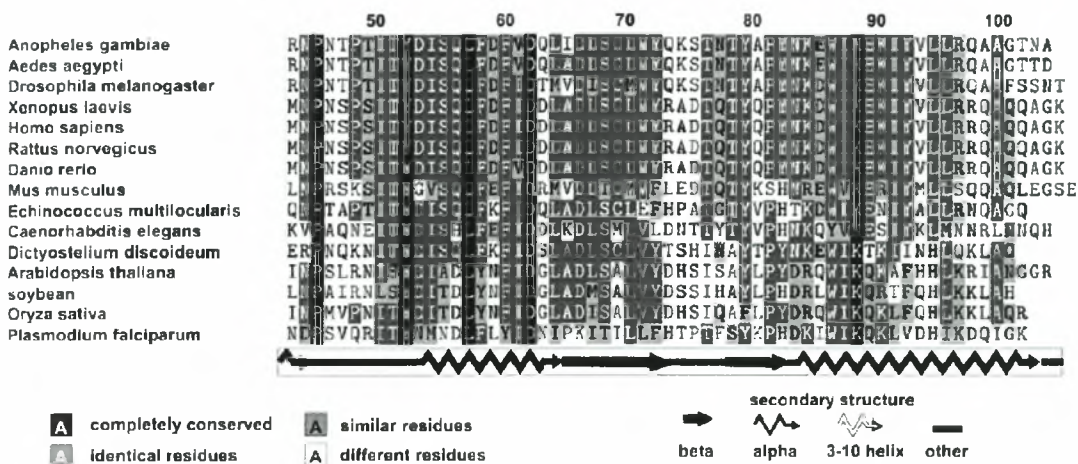
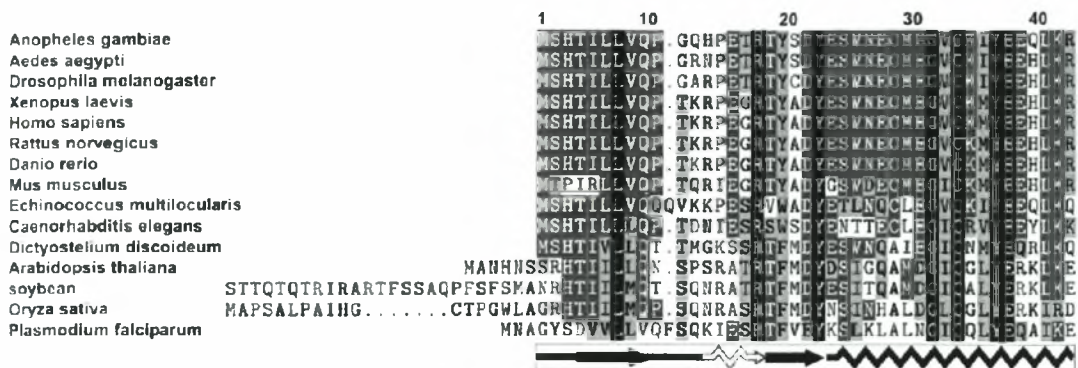


Εικόνα 54: Μοντέλο αλληλεπίδρασης των παραγόντων SAFB με τις SR κινάσες κάτω από ιδιαίτερες συνθήκες του κυττάρου.

Όπως περιγράφεται αναλυτικά στο τρίτο μέρος του κεφαλαίου των αποτελεσμάτων, οι πρωτεΐνες που βρέθηκαν να αλληλεπιδρούν με το καρβοξυτελικό άκρο του SAFB1 μέσω του συστήματος των δύο υβριδίων όχι μόνο δεν περιέχουν μοτίβο RS και άρα δεν αποτελούν υποστρώματα της κινάσης αλλά ούτε και μπορούν να συσχετισθούν με την κινάση με κάποιο προφανή τρόπο. Επιλέξαμε να μελετήσουμε την πρωτεΐνη εκείνη η οποία, όπως και η SRPK1a, θα διαφοροποιούσε δομικά (και ίσως και λειτουργικά) μεταξύ των παραγόντων SAFB1 και SAFB2. Ανάμεσα στις πρωτεΐνες της βιβλιοθήκης που φαίνονται να διακρίνουν μεταξύ του SAFB1 και SAFB2, μόνο η πρωτεΐνη ERH εμφανίζει σαφή διαφοροποίηση ανάμεσά τους. Ενώ με τον SAFB1 η ERH αλληλεπιδρά ισχυρά σε κύτταρα σακχαρομήκυτα, με τον SAFB2 η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση δεν υφίσταται. Γι' αυτό το λόγο επιλέχθηκε να διερευνηθεί περαιτέρω η διαφοροποιημένη αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων SAFB με την πρωτεΐνη ERH.

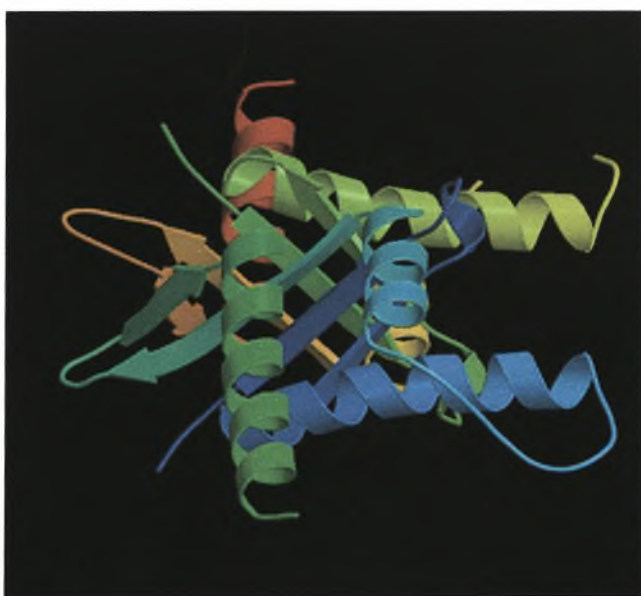
Η ERH ως πρωτεΐνη εμφανίζει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, γεγονός το οποίο αποτελεί έναν επιπλέον λόγο για τον οποίο επιλέξαμε να μελετήσουμε το συγκεκριμένο μόριο. Είναι μια πρωτεΐνη μικρού μοριακού βάρους (104 αμινοξέα), εξαιρετικά συντηρημένη μεταξύ των ειδών, για παράδειγμα είναι πανομοιότυπη μεταξύ του ανθρώπου και του βατράχου (εικόνα 55). Εμφανίζει γενικευμένη έκφραση, ενώ η αλληλουχία της δεν παρουσιάζει ομολογία με καμία πρωτεΐνη (Gelsthorpe *et al.* 1997).

Η δομή της ERH αναλύθηκε πρόσφατα με κρυσταλλογραφία, η οποία φανέρωσε ότι πρόκειται για πρωτότυπη τριτοταγή δομή, η οποία δεν έχει χαρακτηριστεί σε άλλη πρωτεΐνη. Αποτελείται από 4 αντιπαράλληλες αλυσίδες, οι οποίες δημιουργούν β-πτυχωτή επιφάνεια με 3 έλικες τοποθετημένες σε κάθε πλευρά της επιφάνειάς της (Wan *et al.* 2005) (εικόνα 56). Υπάρχουν επίσης ενδείξεις βάσει δομικών και πειραματικών δεδομένων για λειτουργία της ERH ως διμερές (Wan *et al.*, 2005).



A completely conserved A similar residues \rightarrow secondary structure
A identical residues A different residues beta alpha 3-10 helix other

Εικόνα 55: Ομοπαράθεση των αμινοξικών αλληλουχιών της ERH ορισμένων ευκαρυωτικών ειδών.



Εικόνα 56: Αναπαράσταση της τρισδιάστατης δομής της ERH.

Αρχικά η πρωτεΐνη ERH είχε προταθεί ότι εμπλέκεται στο μονοπάτι της βιοσύνθεσης των πυριμιδινών καθώς και στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (Wojcik *et al.*, 1994, *et al.*, Gelsthorpe *et al.*, 1997). Αργότερα μια άλλη ερευνητική ομάδα έδειξε ότι η ERH αποτελεί μεταγραφικό καταστολέα του ιστοειδικού μεταγραφικού παράγοντα HNF-1 (hepatocyte nuclear factor-1). Συγκεκριμένα δείχτηκε ότι η αναστολή της μεταγραφής του HNF-1 επιτυγχάνεται μέσω πρόσδεσης του συνενεργοποιητή DCoH (dimerization cofactor of HNF-1), ο οποίος βρέθηκε να αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη ERH μέσω του συστήματος των δύο υβριδίων (Pogge *et al.*, 2001). Η ίδια ομάδα έδειξε ότι η ERH λειτουργεί και ως γενικός καταστολέας της μεταγραφής.

Επίσης μελέτες ανοσοφθορισμού σε κύτταρα HeLa έδειξαν ότι η ERH εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα όπου συνεντοπίζεται με τον παράγοντα DCoH αλλά και στον πυρήνα. Σύμφωνα με πειράματα υβριδισμού κατά Northern η πρωτεΐνη ERH εκφράζεται ιδιαίτερα κατά την εμβρυογένεση, ενώ στους ενήλικες εντοπίζεται σχεδόν σε όλους τους ιστούς και ιδιαίτερα στους ενδοκρινείς αδένες (Pogge *et al.*, 2001, Smyk *et al.*, 2006).

Στη βιβλιογραφία μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί διάφορες *in vitro* και *in vivo* αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης ERH που την εμπλέκουν στο μηχανισμό της ρύθμισης της μεταγραφής και της αντιγραφής αλλά και του κυτταρικού κύκλου. Έχει βρεθεί να αλληλεπιδρά μέσω χρωματογραφίας αχιστείας με τους δύο παράγοντες επιμήκυνσης της μεταγραφής, την φωσφατάση της μεγάλης υπομονάδας της RNA πολυμεράσης II (Amente *et al.*, 2004) και με τον μεταγραφικό καταστολέα SPT5 (Kwak *et al.*, 2003).

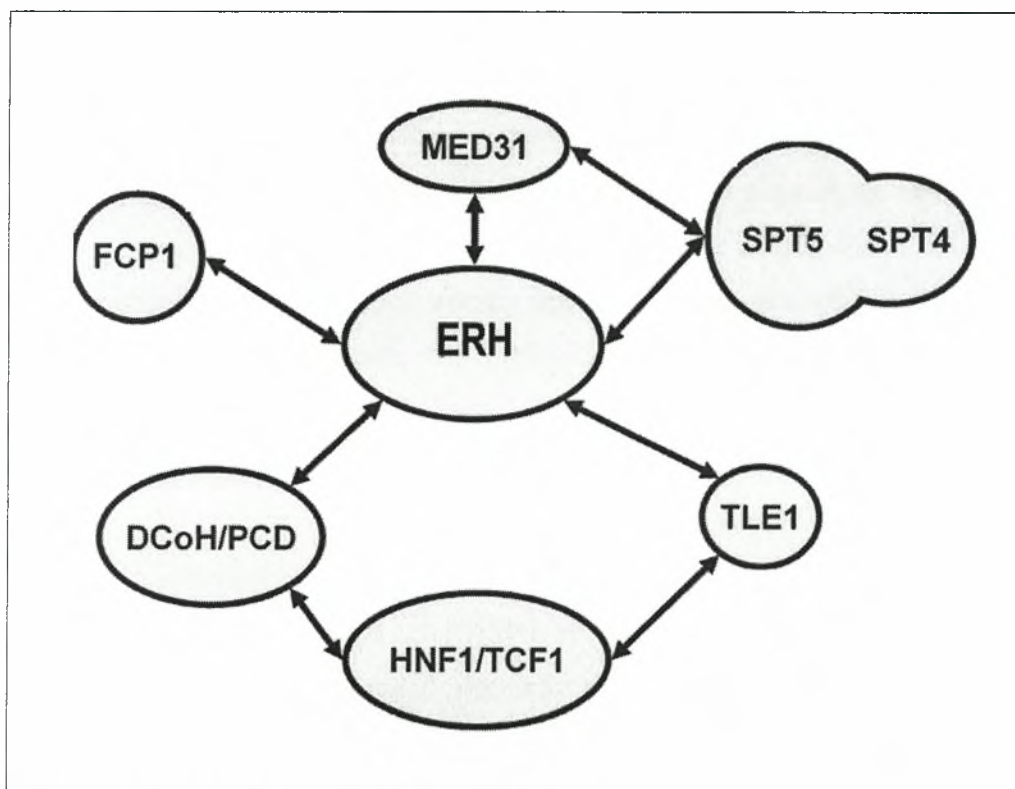
Επιπλέον μέσω συστημάτων των δύο υβριδίων μεγάλης κλίμακας στο σακχαρομήκυτα η ERH βρέθηκε να αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη MED31, η οποία αποτελεί υπομονάδα της RNA πολυμεράσης II (van de Peppel *et al.*, 2005) καθώς και με έναν παράγοντα της πυρηνικής μήτρας, την πρωτεΐνη TLE1 η οποία είναι μέλος της οικογένειας Groucho/TLE/R-esp και έχει αναφερθεί ότι λειτουργεί ως καταστολέας της μεταγραφής (Javed *et al.*, 2000) (Εικόνα 57). Πρόσφατα βρέθηκε να αλληλεπιδρά *in vitro* και με τον παράγοντα PDIP46/SKAR, ο οποίος σχετίζεται με την υπομονάδα p50 της DNA πολυμεράσης δ και την S6K1, έναν ρυθμιστικό παράγοντα του κυτταρικού κύκλου (Smyk *et al.*, 2006).

Η δομική βάση της διαφοροποιημένης αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης ERH με τους παράγοντες SAFB1 και SAFB2 διερευνήθηκε στην παρούσα εργασία

περαιτέρω σε *in vitro* πειράματα με χρωματογραφία αγκιστείας. Βρέθηκε πράγματι ότι η βακτηριακά εκφρασμένη ERH αλληλεπιδρά *in vitro* με την πλήρους μεγέθους πρωτεΐνη SAFB1 αλλά όχι με τον SAFB2, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα του συστήματος των δύο υβριδίων.

Είναι ενδιαφέρον να χαρακτηριστεί με ακρίβεια η περιοχή του SAFB1 που αλληλεπιδρά με την ERH και να βρεθεί πώς αυτή σχετίζεται δομικά με εκείνη που αλληλεπιδρά με την κινάση. Εξάλλου δεν είναι προφανώς τυχαίο το γεγονός ότι η πρωτεΐνη ERH έχει χαρακτηριστεί, όπως ο SAFB1, ως μεταγραφικός καταστολέας και διαφαίνεται ως πρωτεΐνη που συμμετέχει σε πολυάριθμες διαδικασίες στις οποίες παίζει ρόλο η χρωματίνη.

Αποτελεί πρόκληση να διερευνηθεί κατά πόσον η κοινή ικανότητα διαφοροποίησης της ERH και της SRPK1a μεταξύ των δύο παραγόντων SAFB αποτελεί στοιχείο λειτουργικού συσχετισμού μεταξύ τους. Αναμένεται η διερεύνηση της δομικής και λειτουργικής σχέσης της SRPK1a με την πρωτεΐνη ERH να αποκαλύψει καινούργια δεδομένα για τη δράση και λειτουργία των SR κινασών και τη βιολογική τους σχέση με τους παράγοντες της πυρηνικής μήτρας SAFB1/SAFB2.



Εικόνα 57: Αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης ERH.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η SRPK1a αποτελεί ένα νέο μέλος της οικογένειας των SR πρωτεϊνικών κινασών, οι οποίες φωσφορυλιώνουν υποστρώματα που περιέχουν περιοχές πλούσιες σε αργινίνη και σερίνη (μοτίβα RS). Το μετάγραφο της SRPK1a προέρχεται από εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου της SRPK1 και διαφέρει μόνο κατά ένα επιπλέον εξόνιο στο 5' άκρο του.

Στην παρούσα διατριβή μελετάται η βιολογική σημασία της αλληλεπίδρασης της SRPK1a με έναν πρωτεϊνικό παράγοντα της πυρηνικής μήτρας, τον SAFB1, ο οποίος δεν περιέχει μοτίβο RS και άρα δεν αποτελεί φυσικό υπόστρωμα της κινάσης. Με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση του παράγοντα SAFB1 στη δράση της SRPK1a, πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες *in vitro* φωσφορυλίωσης γνωστών υποστρωμάτων της κινάσης. Βρέθηκε ότι η δράση της SRPK1a και της SRPK1 (η οποία αλληλεπιδρά σε μικρότερο βαθμό με τον SAFB1) αναστέλλεται παρουσία αυτού του παράγοντα. Επιπρόσθετες δοκιμασίες *in vitro* φωσφορυλίωσης έδειξαν ότι η πλούσια σε διπεπίδια RE περιοχή του SAFB1 που προσομοιάζει χημικά με φωσφορυλιωμένη αλληλουχία RS, δεν ευθύνεται για την συμπεριφορά του ως αναστολέα καθώς παρουσία του SAFB1 χωρίς αυτή τη περιοχή αναστέλλεται και πάλι η δράση της SRPK1a, ενώ παρουσία του SAFB2, ο οποίος επίσης περιέχει στο καρβοξυτελικό του άκρο περιοχή πλούσια σε RE, η δράση της κινάσης δεν αναστέλλεται.

Στα πλαίσια της διερεύνησης της επίδρασης του παράγοντα SAFB1 στον κυτταρικό εντοπισμό της SRPK1a, πραγματοποιήθηκαν πειράματα φθορισμού-ανοσοφθορισμού μετά από συνέκφραση των δύο πρωτεϊνών σε κύτταρα HeLa. Παρατηρήθηκε ότι ενώ απουσία του SAFB1 η SRPK1a εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και λιγότερο στον πυρήνα, παρουσία του SAFB1 ο κυτταρικός εντοπισμός της γίνεται αποκλειστικά πυρηνικός. Παράλληλα διερευνήθηκε και η επίδραση του SAFB2 στον εντοπισμό της SRPK1a παρουσία του οποίου βρέθηκε ότι η κινάση παραμένει κυρίως κυτταροπλασματική.

Η διαφορετική επίδραση του SAFB1 σε σχέση με τον SAFB2 στη δράση και τον εντοπισμό των κινασών φαίνεται από αποτελέσματα πειραμάτων χρωματογραφίας αγκιστείας να αντικατοπτρίζει τη διαφορετική αγκιστεία που παρουσιάζουν οι παράγοντες SAFB για τις δύο κινάσες.

Τέλος, προκειμένου να αποκαλυφθούν νέες ιδιότητες του SAFB1 που πιθανόν παίζουν ρόλο στη λειτουργική του σχέση με την SRPK1a είχε γίνει αναζήτηση νέων

μοριακών παρτενέρ του SAFB1 μέσω του συστήματος των δύο υβριδίων. Από τις νέες μοριακές αλληλεπιδράσεις του SAFB1 επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτη η πρωτεΐνη ERH, η οποία αλληλεπιδρά ισχυρά με τον SAFB1 αλλά όχι με τον SAFB2 (όπως και η SRPK1a). Με πειράματα χρωματογραφίας αγκιστείας επιβεβαιώθηκε *in vitro* η ικανότητα δομικής διάκρισης της ERH μεταξύ των SAFB1 και SAFB2.

SUMMARY

SRPK1a is a new member of the SR protein kinase family, which specifically phosphorylates substrates containing regions rich in arginine-serine dipeptides (RS motifs). The SRPK1a transcript is the product of alternative splicing of the SRPK1 gene containing an additional exon at its 5' end.

In the present thesis the biological significance of the interaction of SRPK1a with the nuclear matrix protein SAFB1 that does not contain an RS motif and therefore is not a physical substrate of the kinase was studied. In order to investigate the effect of SAFB1 on the activity of SRPK1a, *in vitro* phosphorylation assays of known substrates of the kinase were carried out. In these experiments it was found that the activity of SRPK1a and SRPK1 (which interacts with SAFB1 at a lower degree) is inhibited by the presence of this factor. Additional *in vitro* phosphorylation assays showed that the region of SAFB1 rich in RE dipetides, that resemble chemically phosphorylated RS dipeptides, is not responsible for its behavior as an inhibitor, because in the presence of SAFB1 lacking this region the activity of SRPK1a is inhibited, while in the presence of SAFB2 which also contains a region rich in RE at its carboxy-terminal domain, the activity of the kinase is not inhibited.

In order to investigate the effect of SAFB1 on the subcellular localization of SRPK1a, fluorescence and immunofluorescence experiments were carried out following co-expression of the two proteins in HeLa cells. It was observed that although in the absence of SAFB1, SRPK1a is localized mainly in the cytoplasm and at a lower extent in the nucleus, in the presence of SAFB1 it becomes exclusively nuclear. In parallel, the effect of SAFB2 on the localization of SRPK1a was examined but the kinase was found to remain mainly cytoplasmic in its presence.

The different effect of SAFB1 in regard to SAFB2 on the activity and localization of the kinases seems from the results of the affinity chromatography experiments to relate with the affinity that the factors SAFB1 and SAFB2 exhibit for the two kinases.

Finally, in order to discover novel properties of SAFB1 that may play a role in its functional relationship with SRPK1a, a search for new molecular partners of SAFB1 had been performed via the two hybrid system. Among the new molecular interactions of SAFB1 that emerged, the protein ERH, which interacts strongly with

SAFB1 but not with SAFB2 (just like SRPK1a), was chosen for further study. The ability of structural discrimination of the protein ERH between SAFB1 and SAFB2 was confirmed *in vitro* by affinity chromatography experiments.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AT	3-αμινοτριαζόλη
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
ASF/SF2	Splicing factor 2, Παράγοντας ματίσματος 2
BSA	Αλβουμίνη ορού βοός
cDNA	Συμπληρωματικό DNA
CIP	Αλκαλική φωσφατάση εντέρου βοός
CK	Κινάση καζεΐνης
CMV	Cytomegalovirus
Cpm	Κρούσεις ανά λεπτό
DNA	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
dNTP	Τριφωσφορικός νουκλεοζίτης
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
DTT	Διθειοθρεϊτόλη
EDTA	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
ER	Estrogen receptor, Υποδοχέας των οιστρογόνων
ESEs & ISEs	Exonic or intronic splicing enhancers, Ενισχυτές ματίσματος
ESSs & ISSs	Exonic or intronic splicing suppressors, Σιωπηστές ματίσματος
FBS	Ορός εμβρύου βοός
FITC	Ισοθιοκυανική φλουοροσκεΐνη
GFP	Πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη
GST	Τρανσφεράση της γλουταθειόνης
GTP	Τριφωσφορική γουανοσίνη

HEPES	N-2- υδροξυαιθυλ-πιπεραζιν-N'-2-αιθανοσουλφονικό οξύ
hnRNP	Ετερογενής ριβονουκλεοπρωτεΐνη
IPTG	Ισοπροπυλ-1-θειο-β-D-γαλακτοπυρανοσίδιο
LBR	Lamin B receptor, Υποδοχέας της λαμίνης B
MCS	Multiple cloning site, Περιοχή πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης
MOPS	4-μορφόλινο-πρόπανο-σουλφονικό οξύ
Nuclear speckles	Πυρηνικές κηλίδες
PBS	Διάλυμα φυσιολογικής συγκέντρωσης φωσφορικών ιόντων
PMSF	Φαινυλομεθυλο φθοριούχος εστέρας του σουλφονικού οξέος
RNA	Ριβονουκλεϊκό οξύ
RRM	Περιοχή αναγνώρισης του RNA
SDS	Δωδεκακυλοθειϊκό νάτριο
TAE	Tris-οξικό οξύ-EDTA
TBE	Tris-βορικό-EDTA
TEMED	N,N,N,N-τετραμεθυλο-αιθυλενο-διαμίνη
Tris	Τρις-υδροξυμεθυλ-αμινομεθάνιο
X-gal	5-βρωμο-4-χλωρο-3- ινδολυλ-β-D-γαλακτοσίδης

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adachi, Y., E. Kas, and U. K. (1989). Laemmli. Preferential, cooperative binding of DNA topoisomerase II to scaffold-associated regions. *EMBO J.* 8: 3997–4006.

Amente S., Napolitano G., Licciardo P., Montib Piero M., Puccib, Laniaa Luigi, Majello Barbara (2005) Identification of proteins interacting with the RNAPII FCP1 phosphatase:FCP1 forms a complex with arginine methyltransferase PRMT5 and it is a substrate for PRMT5-mediated methylation. *FEBS Letters* 579 683-689.

Angus I. Lamond and David L. Spector. (2006) Nuclear speckles: A model for nuclear organelles. *Nature Reviews : Molecular Cell Biology* 4, 605-612.

Appelbaum, J., Blobel G. and Georgatos S.D. (1990) In vivo phosphorylation of the lamin B receptor. Binding of lamin B to its nuclear membrane receptor is affected by phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 265, 4181-4184.

Arao Y., Kuriyama, R., Kayama, F., Kato, S. (2000) A nuclear matrix-associated factor, SAF-B, interacts with specific isoforms of AUF1/hnRNP D. *Arch. Biochem. Biophys.*, 380, 228-236.

Aubol, B. E., Chakrabarti, S., Ngo, J., Shaffe,r J., Nolen, B., Fu, X. D., Ghosh, G., Adams, J. A. (2003) Processive phosphorylation of alternative splicing factor/splicing factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 100, 12601-12606.

Bagchi M, VanWijnen A, KatarM, Merriman H, Lian J, SteinJ, Stein G & Maisel H (1995) *J. Cell. Biochem.* 58: 1–5

Berezney, R. and Coffey, D. S. (1974) Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 60, 1410-1417.

Berezney, R. B. (1979) Dynamic properties of the nuclear matrix. In: Busch H (ed): "The Cell Nucleus." San Diego, CA: Academic press, Inc, pp413-456.

Berezney, R., Basler, J., Hughes, B. B., Kaplan, S. C. (1979) Isolation and characterization of the nuclear matrix from Zajdela ascites hepatoma cells. *Cancer Res.*, 39, 3031-3039.

Berezney, R. and Jeon, K. W. (1995). *Nuclear Matrix. Structural and Functional Organization*, Academic Press, New York.

Berezney, R., Dubey, D. D., Huberman, J. A. (2000) Heterogeneity of eukaryotic replicons, replicon clusters, and replication foci. *Chromosoma.*, 108, 471-484.

Bertolotti A., Lutz Y., Heard D. J., Chambon P., and Tora L. (1996) hTAF(II)68, a novel RNA/ssDNA-binding protein with homology to the pro-oncoproteins TLS/FUS and EWS is associated with both TFIID and RNA polymerase II. *EMBO J.* September 16; 15(18): 5022–5031.

Bischof, O., Kim, S. H., Irving, J., Beresten, S., Ellis, N. A., Campisi, J. (2001) Regulation and localization of the Bloom syndrome protein in response to DNA damage. *J. Cell. Biol.*, 153, 367-380.

Blasquez, V. C., Hale, M. A., Trevorrow, K. W., Garrard, W. T. (1992) Immunoglobulin kappa gene enhancers synergistically activate gene expression but independently determine chromatin structure. *J. Biol. Chem.*, 267, 23888-23893.

Blencowe, B. J., Nickerson, J. A., Issner, R., Penman, S. and Sharp, P. A. (1994). Association of nuclear matrix antigens with exon-containing splicing complexes. *J. Cell Biol.* 127, 593-607.

Blencowe, B. J., Issner, R., Nickerson, J. A. and Sharp, P. A. (1998). A coactivator of pre-mRNA splicing. *Genes Dev.* 12, 996-1009.

Blencowe, B. J., Bauren, G., Eldridge, A. G., Issner, R., Nickerson, J. A., Rosonina, E. and Sharp, P. A. (2000). The SRm160/300 splicing coactivator subunits. *RNA* 6, 111-120.

Bode, J., Stengert-Iber, M., Kay, V., Schlacke, T. And Dietz-Pfeilstetter, A. (1996) Scaffold/matrix –attached regions: topological switches with multiple regulatory functions. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, 6, 115-138.

Bohm Friederike, Kappes Ferdinand, Scholten Ingo, Richter Nicole, Matsuo Hiroshi, Knippers Rolf and Waldmann Tanja (2005) The SAF-box domain of chromatin protein DEK. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33, 3 1101–1110.

Bosman Fred T. (1999) The nuclear matrix in pathology. *Virchows Arch* 435:391–399.

Brian K. Kay, Michael P. Williamson, and Marius Sudol. (2000). The importance of being proline : the interaction of proline-rich motifs in signalling proteins with their cognate domains. *Faseb journal* 14, 231-241.

Caceres JF, Stamm S, Helfman DM, Krainer AR. (1994) Regulation of alternative splicing in vivo by overexpression of antagonistic splicing factors. *Science*. Sep 16, 265 (5179):1706-9.

Caceres Javier F, and Alberto R. Kornblihtt (2002) Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends in Genetics* 18: 4, 186-193.

Camacho-Vanegas O. F. Weighardt C. Ghigna F. Amaldi S. Riva G. Biamonti (1997) Growth-dependent and growth-independent translation of messengers for heterogeneous nuclear ribonucleoproteins. *Nucleic Acids Research* 25: 3950-3954.

Cao, W., Jamison, S.F. and Garcia-Blanco, M.A. (1997) Both phosphorylation and dephosphorylation of ASF/SF2 are required for pre-mRNA splicing in vitro. *RNA*, 3, 1456-1467.

Cao H. and Hegele R. A. (2000) Nuclear lamin A/C R482Q mutation in canadian kindreds with dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum.Mol.Genet.* 9: 109-112.

Celenza, J.L. and Carson, M. (1986) A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase. *Science*, 233, 1175-1180.

Chen, H. I., and M. Sudol. (1995) The WW of Yes associated protein binds a proline-rich ligand that differs from the consensus established for Src homology 3-binding modules. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*92:7819-7823.

Chiodi, I., Biggiogera, M., Denegri, M., Corioni, M., Weighardt, F., Cobianchi, F., Riva, S., Biamonti, G. (2000) Structure and dynamics of hnRNP-labelled nuclear bodies induced by stress treatments. *J. Cell. Sci.*, 113, 4043-4053.

Chirat, F., Arkhis, A., Martinage, A., Jaquinod, M., Chevaillier, P. and Sautiere, P. (1993) Phosphorylation of human sperm protamines HP1 and HP2: identification of phosphorylation sites. *Biochim. Biophys. Acta*, 1203, 109-114.

Clemson, C. M., McNeil, J. A., Willard, H. F. and Lawrence, J. B. (1996) XIST RNA paints the inactive X chromosome at interphase: evidence for a novel RNA involved in nuclear/chromosome structure. *J. Cell Biol.* 132, 259-275.

Cook PR (1994) *BioEssays* 16:6: 425–430.

Cook PR (1995) *J. Cell Sci.* 108: 2927–2935.

Corden L. Jeffry and Meera Patturajan (1997) A CTD function linking transcription to splicing. *Trends Biochemistry Science* 22, 413-416.

Daub Henrik, Blencke Stephanie, Habenberger Peter, Kurtenbach Alexander, Dennenmoser Julia, Wissing Josef, Ullrich Axel, and Matt Cotton (2002) Identification of SRPK1 and SRPK2 as the Major Cellular Protein Kinases Phosphorylating Hepatitis B Virus Core Protein. *J Virol August*; 76 (16) 8124–8137.

Deacon, S.W., Serpinskaya, A.S., Vaughan, P.S., Fanarraga, M, Vernos, K., Vaughan, K.T. and V.I. Gelfand. (2003) *J. Cell Biol.* 160, 291-293.

Debril M-B., Dubuquoy L., Feige J-N, W Wahli, Desvergne B., Auwerx J. and Gelman L. (2005) Scaffold attachment factor B1 directly interacts with nuclear receptors in living cells and represses transcriptional activity. *Journal of Molecular Endocrinology* 35, 503–517.

Derenzini, M., Pession-Brizzi, A., Betts-Eusebi, C., Novello, F. J. (1981) Relationship between the fine structural organization of chromatin and nucleic acid synthesis in regenerating rat hepatocytes. *Ultrastruct. Res.*, 75, 229-242.

Ding, J. H., Zhong, X. Y., Hagopian, J. C., Cruz, M. M., Ghosh, G., Feramisco, J., Adams, J. A., Fu, X. D. (2006) Regulated cellular partitioning of SR protein-specific kinases in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell.*, 17, 876-85.

Djeliova V, Russev G, Anachkova B. 2001 Distribution of DNA replication origins between matrix-attached and loop DNA in mammalian cells. *J Cell Biochem* 80:353–359.

Dobrzycka KM, Kang K, Jiang S, Meyer R, Rao PH, Lee AV, Oesterreich S. (2006) Disruption of Scaffold Attachment Factor B1 Leads to TBX2 Up-regulation, Lack of p19ARF Induction, Lack of Senescence, and Cell Immortalization. *Cancer Res.* 16, 7859-7863.

Durfee, T., Mancini, M. A., Jones, D., Elledge, S. J., Lee, W. H. (1994) The amino-terminal region of the retinoblastoma gene product binds a novel nuclear matrix protein that co-localizes to centers for RNA processing. *J. Cell. Biol.*, 127, 609-622.

Dworetzky, S. I., Wright, K. L., Fey, E. G., Penman, S., Lian, J. B., Stein, J. L., Stein, G. S. (1992) Sequence-specific DNA-binding proteins are components of a nuclear matrix-attachment site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 89, 4178-4182.

Ellis D. J., Jenkins H., Whitfield W. G. and Hutchison C. J. (1997) GST-lamin fusion proteins act as dominant negative mutants in *Xenopus* egg extract and reveal the function of the lamina in DNA replication. *J. Cell Sci.* 110: 2507–2518.

Erdo, F., Trapp, T., Mies, G., Hossmann, K. A. (2004) Immunohistochemical analysis of protein expression after middle cerebral artery occlusion in mice. *Acta Neuropathol.*, 107, 127-136.

Fackelmayer, F. O., Dahm, K., Renz, A., Ramsperger, U., Richter, A. (1994) Nucleic-acid-binding properties of hnRNP-U/SAF-A, a nuclear-matrix protein which binds DNA and RNA in vivo and in vitro. *Eur. J. Biochem.*, 221, 749-757.

Fatkin D., MacRae C., Sasaki T., Wolff M. R., Porcu M., Frenneaux M., *et al.*, (1999) Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease *N. Engl. J. Med.* 341, 1715-1724.

Fey, E. G. and Penman, S. (1988) Nuclear matrix proteins reflect cell type of origin in cultured human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 85, 121-125.

Fukuda M., Asano S., Nakamura T., Adachi M., Yoshida M., Yanagida M., *et al.*, (1997) CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by nuclear export signal. *Nature* 390:308-311.

Gant T. M. and Wilson K. L. (1997) Nuclear assembly. *Annu.Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 669–695.

Furukawa K. and Hotta Y. (1993) cDNA cloning of a germ cell specific lamin B3 from mouse spermatocytes and analysis of its function by ectopic expression in somatic cells. *EMBO J.*12: 97–106

Gall, J.G. (2001) A role for Cajal bodies in assembly of the nuclear transcription machinery. *FEBS Lett.* 498, 164–167

Gao, S. Scott, R.E. (2003) Stable overexpression of specific segments of the P2P-R protein in human MCF-7 cells promotes camptothecin-induced apoptosis, *J. Cell. Physiol.* 197:445-452.

Gelsthorpe M, Pulumanti M, McCallum C, Dang-Vu K, & Tsubota SI. (1997) *Gene* 186, 189-195.

Georgatos, S.D., Meier, J. and Simos, G. (1994) Lamins and lamin-associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 6, 347-353.

Getzenberg, R. H. (1994) Nuclear matrix and the regulation of gene expression: tissue specificity. *J. Cell. Biochem.*, 55, 22-31.

Gilbert, W., Siebel, C.W. and Guthrie, C. (2001) Phosphorylation by Sky1p promotes Np13p shuttling and mRNA dissociation. *RNA*, 7, 302-313.

Gilbert, W., and Guthrie, C. (2004) The Glc7p nuclear phosphatase promotes mRNA export by facilitating association of Mex67p with mRNA. *Mol Cell.*, 13, 201-212.

Graveley Brenton R. (2000) Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA* 6, 1197-1211.

Grimwade, D. and Solomon, E. (1997) Characterisation of the PML/RAR alpha rearrangement associated with t(15;17) acute promyelocytic leukaemia. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 220, 81-112.

Grondin B, Bazinet M & Aubry M. (1996) *J. Biol. Chem.* 271:15 458-15 467.

Guenhael Sanz, Lluís Mir and Alain Jacquemin-Sablon. (2002) Bleomycin resistance in mammalian cells expressing a genetic suppressor element derived from the *SRPK1* Gene. *Cancer Research* 62, 4453-4458.

Gui, J-F., Lane, W.S. and Fu, X-D. (1994a) A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factor in the cell cycle. *Nature*, 369, 678-682.

Gui J-F., Tronchere H., Chandler S.D. and Fu X-D. (1994b) Purification and characterization of a kinase specific for the serine- and arginine-rich pre-mRNA splicing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91, 10824-10828.

Handwerger Korie E. and Gall G. Joseph (2006) Subnuclear organelles: new insights into form and function. *TRENDS in Cell Biology* 16, 19-26.

Hanks Steven K. and Hunter Tony (1995). The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *The FASEB journal* 9, 576-596.

Harborth, J., Wang, J., Gueth-Hallonet, C., Weber, K. and Osborn, M. (1999). Self assembly of NuMA: multiarm oligomers as structural units of a nuclear lattice. *EMBO J.* 18, 1689-1700.

Hardie, D.G., Carling, D. and Halford, N.G. (1994) Roles of the snf1/Rkin1/AMP-activated protein kinase family in the response to environmental and nutritional stress. *Seminars in Cell Biology*, 5, 409-416.

Hardie G. and Hanks S. (1995) *The protein kinase Facts Book*.

Hathaway, G.M. and Traugh, J.A. (1984) Interaction of polyamines and magnesium with casein kinase II. *Arch. Biochem. Biophys.*, 233, 133-138.

Hayes Gregory M., Carrigan Patricia E., Beck Alison M., and Miller Laurence J. (2006) Targeting the RNA Splicing Machinery as a Novel Treatment Strategy for Pancreatic Carcinoma. *Cancer Res.* 66: (7) 3819-3827.

He, D. C., Nickerson, J. A. and Penman, S. (1990). Core filaments of the nuclear matrix. *J. Cell Biol.* 110, 569-580.

Hendzel, M. J., Sun, J. M., Chen, M. Y., Rattner, J. B., Davie, J. R. (1994) Histone acetyltransferase is associated with the nuclear matrix. *J. Biol. Chem.*, 269, 22894-22901.

Hishizawa, M., Imada, K., Sakai, T., Ueda, M., Hori, T., Uchiyama, T. (2005) Serological identification of adult T-cell leukaemia-associated antigens. *Br. J. Haematol.*, 130, 382-390.

Hodges, M., Tissot, C., Howe, K., Grimwade, D., Freemont, P. S. (1998) Structure, organization, and dynamics of promyelocytic leukemia protein nuclear bodies. *Am. J. Hum. Genet.*, 63, 297-304.

Hozak, P., Hassan, A. B., Jackson, D. A., Cook, P. R. (1993) Visualization of replication factories attached to nucleoskeleton. *Cell.*, 73, 361-373.

Hozak, P., Sasseville, A. M., Raymond, Y., Cook, P. R. (1995) Lamin proteins form an internal nucleoskeleton as well as a peripheral lamina in human cells. *J. Cell. Sci.*, 108, 635-644.

Huang, Y., Gattoni, R., Stevenin, J., Steitz, J. A. (2003). SR splicing factors serve as adapter proteins for TAP-dependent mRNA export. *Mol. Cell.*, 11, 837-843.

Huang, Y., T.A., and Steitz, J.A. (2004). A molecular link between SR protein, dephosphorylation and mRNA export. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 9666-9670.

Isomura, T., Tamiya-Koizumi, K., Suzuki, M., Yoshida, S., Taniguchi, M., Matsuyama, M., Ishigaki, T., Sakuma, S., Takahashi, M. (1992) RFP is a DNA binding protein associated with the nuclear matrix. *Nucleic. Acids Res.*, 20, 5305-5310.

Ivanova, M., Dobrzycka, K. M., Jiang, S., Michaelis, K., Meyer, R., Kang, K., Adkins, B., Barski, O. A., Zubairy, S., Divisova, J., Lee, A. V., Oesterreich, S. (2005)

Scaffold attachment factor B1 functions in development, growth, and reproduction. *Mol. Cell. Biol.*, 25, 2995-3006.

Izaurralde, E., Kas, E., Laemmli, U. K. (1989) Highly preferential nucleation of histone H1 assembly on scaffold-associated regions. *J. Mol. Biol.*, 210, 573-585.

Jackson, D. A. and Cook, P. R. (1988). Visualization of a filamentous nucleoskeleton with a 23 nm axial repeat. *EMBO J.* 7, 3667-3677.

Javed Amjad, Guo Bo, Hiebert Scott, Choi Je-Yong et al. (2000) Groucho/TLE/R-esp proteins associate with the nuclear matrix and repress RUNX (CBFa/AML/PEBP2a) dependent activation of tissue-specific gene transcription *Journal of Cell Science* 113, 2221-2231

Jenke AC, Stehle IM, Herrmann F, Eisenberger T, Baiker A, Bode J, Fackelmayer FO, Lipps HJ. (2004) Nuclear scaffold/matrix attached region modules linked to a transcription unit are sufficient for replication and maintenance of a mammalian episome. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:11322–11327.

Jiang, S., Meyer, R., Kang, K., Osborne, C. K., Wong, J., Oesterreich, S. (2006) Scaffold attachment factor SAFB1 suppresses estrogen receptor alpha-mediated transcription in part via interaction with nuclear receptor corepressor. *Mol. Endocrinol.* 20, 311-320.

Jun Koizumi, Yoshichika Okamoto, Hiroshi Onogi, Akila Mayeda, Adrian R. Krainer, and Masatoshi Hagiwara. (1999) The subcellular localization of SF2/ASF is regulated by direct interaction with SR protein kinases (SRPKs). *J. Biol. Chem.*, 274, 16, 11125-11131.

Kannan Natarajan and Andrew F. Neuwald. (2004) Evolutionary constraints associated with functional specificity of the CMGC protein kinases MAPK, CDK, GSK, SRPK, DYRK, and CK2 α . *Protein Science* 13:2059-2077.

Kemp, B.E. and Pearson, R.B. (1990) Protein kinase recognition sequence motifs. *Trends Biochem. Sci.*, 15, 343-346.

Kipp Michael, Gohring Frank, Ostendorp Thorsten, Vans Drunen Cornelis and Fackelmayer O Frank (2000) SAF-Box, A conserved protein domain that specifically recognizes scaffold attachment region DNA. *Mol. and Cel. Biology*, 20, 7480-7489.

Krützfeldt Maja, Ellis Mark, Daniel B. Weekes, Jonathan J. Bull, Martin Eilers, Maria d M. Vivanco, William R. Sellers, and Sibylle Mittnacht, (2005) Selective Ablation of Retinoblastoma Protein Function by the RET Finger Protein. *Mol. Cell* 18, 213-224.

Kuroyanagi, H., Kimura, T., Wada, T., Hisamoto, N., Matsumoto, K. and Hagiwara, M. (2000) SPK-1, a *C. elegans* SR protein kinase homologue, is essential for embryogenesis and required for germline development. *Mech. Dev.*, 99, 51-64.

Kwak Youn Tae, Guo Jun, Prajapati Shashi, Park Kyu-Jin, SurabhRama, Miller Brady, Gehrig Peter, and Gaynor Richard B (2003) Methylation of SPT5 regulates its interaction with RNA polymerase II and transcriptional elongation properties. *Mol. Cell*, 11, 1055-1066.

Lai, M.C., Lin, R.I., Huang, S.Y., Tsai, C.W., and Tarn, W.Y. (2000) A human importin beta family protein, transportin-SR2, interacts with the phosphorylated RS domain of SR proteins. *J. Biol Chem* 275, 7950-7957.

Lai, M. C., Lin, R. I., and Tarn, W. Y. (2001) Transportin-SR2 mediates nuclear import of phosphorylated SR proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 10154-110159.

Lai, M.C., and Tarn, W.Y. (2004) Hypophosphorylated ASF/SF2 binds TAP and is present in messenger ribonucleoproteins. *J Biol Chem* 279, 31745-31749.

Lee, C. G., Hague, L. K., Li, H., Donnelly, R. (2004) Identification of toposome, a novel multisubunit complex containing topoisomerase IIalpha. *Cell Cycle.*, 3, 638-647.

Liu J. and Wolfner M. F. (1998) Functional dissection of YA, an essential, developmentally regulated nuclear lamina protein in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* 18: 188-197.

Liu J., Rolef-Ben Shahr T., Riemer D., Spann, P., Treinin M., Weber K. et al. (2000) Essential roles for *Caenorhabditis elegans* lamin gene in nuclear organization, cell cycle progression and spatial organization of nuclear pore complexes. *Mol. Biol. Cell* 11: 3937-3947.

Lyberopoulou A, Kohen R, Goudovas M, Sanidas I, Panayotou G, Nikolakaki E, & E. Georgatsou. (2003) *Newsletter* 50, 391-396.

Lukasiewicz Randall, Nolen Bradley, Adams Joseph A. and Ghosh Gourisankar (2007) The RGG Domain of Npl3p Recruits Sky1p Through Docking Interactions. *J. Mol. Biol.* 367, 249-261.

Mahajan MC, Narlikar GJ, Boyapaty G, Kingston RE, Weissman SM. (2005) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2, MeCP1, and SWI/SNF form a chromatin remodeling complex at the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci* Oct 18;102 (42):15012-7.

Maniatis Tom and Reed Robin. (2002) An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* 416, 499-506.

Manilal S., Nguyen T. M., Sewry C. A. and Morris G. E. (1996) The Emery-Dreifuss muscular dystrophy protein, emerin, is a nuclear membrane protein. *Hum. Mol. Genet.* 5:801-808.

Manning G., D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam (2002) The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* 298, 1912-1934.

Mansouri, M. R., Carlsson, B., Davey, E., Nordenskjold, A., Wester, T., Anneren, G., Lackgren, G., Dahl, N. (2006) Molecular genetic analysis of a de novo balanced translocation t(6;17)(p21.31;q11.2) associated with hypospadias and anorectal malformation. *Hum. Genet.*, 119, 162-168.

Mariman, E. C., van Eekelen, C. A., Reinders, R. J., Berns, A. J., van Venrooij, W. J. (1982) Adenoviral heterogeneous nuclear RNA is associated with the host nuclear matrix during splicing. *J. Mol. Biol.*, 154, 103-119.

Martens JHA, Verlaan M, Kalkhoven E, Dorsman JC, Zantema A. (2002) Scaffold/Matrix attachment region elements interact with a p300-scaffold attachment factor A complex and are bound by acetylated nucleosomes. *Mol Cell Biol* 22:2598-2606.

Mattout-Drubezki A. and Gruenbaum Y. (2003) Dynamic interactions of nuclear lamina proteins with chromatin and transcriptional machinery. *CMLS* 60, 2053-2063.

Matunis, E. L., R. Kelley, and G. Dreyfuss. (1994) Essential role for a heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) in oogenesis: hrp40 is absent from the germ line in the dorsoventral mutant squid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2781-2784.

Mermoud, J.E., Cohen PTW, Lamond, A.I. (1994) Regulation of mammalian spliceosome assembly by a protein phosphorylation mechanism. *EMBO J*, 13: 5679-5688.

Merriman, H. L., van Wijnen, A. J., Hiebert, S., Bidwell, J. P., Fey, E., Lian, J., Stein, J., Stein, G. S. (1995) The tissue-specific nuclear matrix protein, NMP-2, is a member of the AML/CBF/PEBP2/runt domain transcription factor family: interactions with the osteocalcin gene promoter. *Biochemistry.*, 34, 13125-13132.

Mika, S. *NMP-db* Available from: <http://cubic.bioc.columbia.edu/db/nmpdb/>.

Mintz, P. J., Patterson, S. D., Neuwald, A. F., Spahr, C. S. and Spector, D.L. (1999) Purification and biochemical characterization of interchromatin granule clusters. *EMBO J*. 18, 4308-4320.

Misteli Tom, Caseres F. Javier, Clement Q.Jade, Krainer R. Adrian, Wilkinson F. Miles, Spector L. David. (1998) Serine phosphorylation of SR proteins is required for their recruitment to sites of transcription in vivo. *The Journal of Cell Biology* 143:2,297-307.

Misteli Tom (2000) Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function. *Journal of Cell Science* 113, 1841-1849.

Morris G. E. (2001) The role of the nuclear envelope in Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Trends Mol. Med.* 7:572-577.

Mortillaro, M. J., Blencowe, B. J., Wei, X., Nakayasu, H., Du, L., Warren, S. L., Sharp, P. A., Berezney, R. (1996) A hyperphosphorylated form of the large subunit of RNA polymerase II is associated with splicing complexes and the nuclear matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 93, 8253-8257.

Murphy, C., Wang, Z., Roeder, R. G., Gall, J. G. (2002) RNA polymerase III in Cajal bodies and lampbrush chromosomes of the *Xenopus* oocyte nucleus. *Mol. Biol. Cell.*, 13, 3466-3476.

Mylonis Hlias, and Thomas Giannakouros (2002) Protein kinase CK2 phosphorylates and activates the SR protein-specific kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 301(3), 650-656.

Mylonis, I., Drosou, V., Brancorsini, S., Nikolakaki, E., Sassone-Corsi, P., Giannakouros, T. (2004) Temporal association of protamine 1 with the inner nuclear membrane protein lamin B receptor during spermiogenesis. *J. Biol. Chem.*, 279, 11626-11631.

Nakagawa Osamu ,Michael Arnold , Masayo Nakagawa, Hideaki Hamada, John M. Shelton, Hajime Kusano, Thomas M. Harris, Geoffrey Childs, Kevin P. Campbell James A. Richardson, Ichizo Nishino and Eric N. Olson. (2005) Centronuclear myopathy in mice lacking a novel muscle-specific protein kinase transcriptionally regulated by MEF2 *Genes & development*, 19, 2066-2077.

Nakayasu, H. and Berezney, R. (1991) Nuclear matrices: identification of the major nuclear matrix proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 88, 10312-10316.

Nayler, O., Stratling, W., Bourquin, J. P., Stagljar, I., Lindemann, L., Jasper, H., Hartmann, A. M., Fackelmayer, F. O., Ullrich, A., Stamm, S. (1998) SAF-B protein couples transcription and pre-mRNA splicing to SAR/MAR elements. *Nucleic Acids Res.*, 26, 3542-3549.

Ngo Jacky-Chi Ki, Sutapa Chakrabarti, Jian-Hua Ding, Adolfo Velazquez-Dones, Brand Nolen, Brandon E. Aubol, Joseph A. Adams, Xiang-Dong Fu, Gourisankar Ghosh (2005) Interplay between SRPK and Clk/Sty kinases in phosphorylation of the splicing factor ASF/SF2 is regulated by a docking motif in ASF/SF2. *Molecular Cell* 20, 77-89.

Ngo Jacky Chi Ki, Gullingsrud Justin, Giang Kayla, Jean Yeh Melinda, Fu Xiang-Dong, Adams Joseph A., J. Andrew McCammon and Ghosh Gourisankar (2007) SR Protein Kinase 1 Is Resilient to Inactivation. *Structure* 15, 123-133.

Nickerson, J. A., Krockmalnic, G., Wan, K. M. and Penman, S. (1997). The nuclear matrix revealed by eluting chromatin from a cross-linked nucleus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 94, 4446-4450.

Nickerson, J. A. (2001) Experimental observations of a nuclear matrix. *J. Cell. Sci.*, 114, 463-474.

Nikolakaki E., Simos, G., Georgatos S.D. and Giannakouros T. (1996) Nuclear envelope associated kinase phosphorylates arginine-serine motifs and modulates interactions between the lamin B receptor and other nuclear proteins. *J. Biol. Chem.* 271, 8365-8372.

Nikolakaki, E., Meier, J., Simos, G., Georgatos, S.D. and Giannakouros, T. (1997) Mitotic phosphorylation of the lamin B receptor by a serine/arginine kinase and p34/cdc2. *J. Biol. Chem.*, 272, 6208-6213.

Nikolakaki, E., Kohen, R., Hartmann, A.M., Stamm, S., Georgatsou, E. and Giannakouros, T. (2001) Cloning and characterization of an alternatively spliced form of SR protein kinase 1 that interacts specifically with Scaffold Attachment Factor-B. *J. Biol. Chem.*, 276(43), 40175-82.

Nikolakaki, E., Cheng, D., Lai, J., Giannakouros, T., Cantley, L. and Rabinow, L. (2002) Phosphorylation by LAMMER protein kinases. Determination of a Consensus Site, Identification of In vitro Substrates and Implications for substrate preferences. *Biochemistry* 41(6), 2055-66.

Nolen, B., Yun, C.Y., Wong, C.F., McCammon, J.A., Fu, X-D. and Ghosh, G. (2001) The structure of Sky1p reveals a novel mechanism for constitutive activity. *Nature Structural Biology*, 8, 176-183.

Oesterreich, S., Lee, A. V., Sullivan, T. M., Samuel, S. K., Davie, J. R., Fuqua, S. A. (1997) Novel nuclear matrix protein HET binds to and influences activity of the HSP27 promoter in human breast cancer cells. *J. Cell. Biochem.*, 67, 275-286.

Oesterreich, S., Zhang, Q., Hopp, T., Fuqua, S. A., Michaelis, M., Zhao, H. H., Davie, J. R., Osborne, C. K., Lee, A. V. (2000) Tamoxifen-bound estrogen receptor (ER) strongly interacts with the nuclear matrix protein HET/SAF-B, a novel inhibitor of ER-mediated transactivation. *Mol. Endocrinol.*, 14, 369-381.

Oesterreich, S., Zhang, Q. P., Lee, A. V. (2000b) Inhibition of oestrogen receptor activity by the co-repressor HET/SAF-B is relieved by blockade of histone deacetylase activity. *Eur. J. Cancer.*, 36, Suppl 4, 43-4.

Oesterreich S, Allredl DC, Mohsin SK, Zhang Q, Wong H, Lee AV, Osborne CK and Connell P O. (2001) High rates of loss of heterozygosity on chromosome 19p13 in human breast cancer. *British Journal of Cancer* 84(4), 493-498.

Oesterreich Steffi (2003) Scaffold Attachment Factors SAFB1 and SAFB2: Innocent Bystanders or Critical Players in Breast Tumorigenesis? *JBC*, 90, 653-661.

Ogg, S.C. and Lamond, A.I. (2002) Cajal bodies and coilin – moving towards function. *J. Cell Biol.* 159, 17-21.

Ohta, S., Tatsumi, Y., Fujita, M., Tsurimoto, T., Obuse, C. (2003) The ORC1 cycle in human cells: II. Dynamic changes in the human ORC complex during the cell cycle. *J. Biol. Chem.*, 278, 41535-41540.

Oliva, R. and Dixon G.H. (1991).Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.*, 40, 25-94.

Oliver Stoss,a, Tatyana Novoyatleva, Marieta Gencheva, Manuela Olbrich, Natalya Benderska, and Stefan Stamm (2004) p59fyn-mediated phosphorylation regulates the activity of the tissue-specific splicing factor rSLM-1. *Mol. Cell. Neurosci.* 27, 8-21.

Olson, M. O. J., Dundr, M. and Szebeni, A. (2000) *The nucleolus* : An old factory with unexpected capabilities. *Trends Cell Biol.* 10, 189-196.

Omri, E. and Kahana, C. (2001) Screening for modulators of spermine tolerance identifies Sky1, the SR protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, as regulator of polyamine transport and ion homeostasis. *Molecular and Cellular Biology*, 21, 175-184.

Papoutsopoulou, S., Nikolakaki, E., Chalepakis, G., Krufft, V., Chevaillier, P. and Giannakouros, T. (1999a) SR protein-specific kinase 1 is highly expressed in testis and phosphorylates protamine 1. *Nucleic Acids Research*, 27, 2972-2980.

Papoutsopoulou, S., Nikolakaki, E. and Giannakouros, T. SRPK1 and LBR protein kinases show identical substrate specificities. (1999b) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 255, 602-607.

Partin, A. W., Briggman, J. V., Subong, E. N., Szaro, R., Oreper, A., Wiesbrock, S., Meyer, J., Coffey, D. S., Epstein, J. I. (1997) Preliminary immunohistochemical characterization of a monoclonal antibody (PRO:4-216) prepared from human prostate cancer nuclear matrix proteins. *Urology.*, 50, 800-808.

Pederson,T. (1998) The plurifunctional nucleolus. *Nucleic Acids Res.*, 26, 3871–3876.

Pines, J. (1994) Protein kinases and cell cycle control. *Seminars in Cell Biology*, 5, 399-408.

Pogge von Strandmann E, Senkel S, & Ryffel GU. (2001) *Biol.Chem.* 382, 1379-1385.

Polioudaki H., Kourmouli N., Drosou V., Bakou A., Theodoropoulos P. A., Singh P. B. et al. (2001) Histones H3/H4 form a tight complex with the inner nuclear membrane protein LBR and heterochromatin protein 1. *EMBO Rep.* 2:920–935.

Portal Daniel, Lobo S.Guillermo, Kadener Sebastian, Prasad Jayendra, Espinosa M. Joaquin, Pereira Claudio, Zhaohua Tang, Lin Ren-Jang, Manley James, Korndliht Alberto, Flawia Mirtha, Torres Hector. (2003) Trypanosoma cruzi TcSRPK, the first protozoan member of the SRPK family, is biochemically and functionally conserved with metazoan SR protein-specific kinases. *Molecular and biochemical parasitology* 127, 9-21.

Pyrpasopoulou, A., Meier, J., Maison, C., Simos, G. and Georgatos, S.D. (1996) The lamin B receptor (LBR) provides essential chromatin docking sites at the nuclear envelope. *EMBO J.*, 15, 7108-7119.

Rando, O. J., Zhao, K. and Crabtree, G. R. (2000) Searching for a function for nuclear actin. *Trends Cell Biol.* 10, 92-97.

Rankin J, Ellard S. (2006) The laminopathies: a clinical review. *Clin Genet.*70: 261–274.

Rao L., Perez D. and White E. (1996) Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J. Cell Biol.* 135: 1441–1455.

Ren, R., B.J. Mayer, P. Cicchetti, and D. Baltimore (1993) Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science.*259:1157-1161.

Renz A, Fackelmayer FO (1996) Purification and molecular cloning of the scaffold attachment factor (SAF-B), a novel human nuclear protein that specifically binds to S/MAR-DNA. *Nucleic acids Res.*, (1996) 24:843-849.

Retief, J.D., Winkfein, R.J., Dixon, G.H., Adroer, R., Queralt, R., Ballabriga, J. and Oliva, R. (1993) Evolution of protamine P1 genes in primates. *J. Mol. Evol.*, 37, 426-434.

Reyes, J-C., Muchardt, C., and Yaniv, M. (1997) Components of the human SWI/SNF complex are enriched in active chromatin and are associated with the nuclear matrix. *J. Cell Biol.*, 137: 263–274.

Reymond, A, Meroni, G., Meria, G., Cairo, S., Luzi, L., Riganelli, D., Zanaria, E., Messali, S., Cainarca, S., Guffanti, A., Minucci, S., Pelicci, PG, and A. Ballabio. (2001) *EMBO J.* 20, 2140-2151

Roach, P.J. (1991) Multisite and hierarchical protein phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 266, 14139-14142.

Rossi, F., Labourier, E., Forne, T., Divita, G., Derancourt, J., Riou, J-F., Antoine, E., Cathala, G., Brunel, C. and Tazi, J. (1996) Specific phosphorylation of SR proteins by mammalian topoisomerase I. *Nature*, 381, 80-82.

Ruchaud S., Korfali N., Villa P., Kottke T. J., Dingwall C., Kaufmann S. H. et al. (2002) Caspase-6 gene disruption reveals a requirement for lamin A cleavage in apoptotic chromatin condensation. *EMBO J.* 21: 1967–1977.

Salesse, S., Dylla, S. J., Verfaillie, C. M. (2004) p210BCR/ABL-induced alteration of pre-mRNA splicing in primary human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Leukemia.*, 18, 727-733.

Samuel, S. K., Spencer, V. A., Bajno, L., Sun, J. M., Holth, L. T., Oesterreich, S., Davie, J. R. (1998) In situ cross-linking by cisplatin of nuclear matrix-bound transcription factors to nuclear DNA of human breast cancer cells. *Cancer Res.*, 58, 3004-3008.

Sanford Jeremy R., Gray Nicola K., Beckmann Karsten and Cáceres Javier F. A novel role for shuttling SR proteins in mRNA translation *Genes & Dev.* 2004 18: 755-768.

Saydam, O., Steiner, F., Vogt, B., Schwyzer, M. (2006) Host cell targets of immediate-early protein BICP22 of bovine herpesvirus 1. *Vet. Microbiol.*, 113, 185-192.

Schenk PW, Stoop H, Bokemeyer C, Mayer F, Stoter G, Oosterhuis JW, Wiemer E, Looijenga LH, Nooter K. (2004) Resistance to platinum-containing chemotherapy in testicular germ cell tumors is associated with downregulation of the protein kinase SRPK1. *Neoplasia*, 6 : 4 297-301.

Scherl, A. et al. (2002) Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Mol. Biol. Cell* 13, 4100–4109

Sciabica, K. S., Dai, Q. J., Sandri-Goldin, R. M. (2003) ICP27 interacts with SRPK1 to mediate HSV splicing inhibition by altering SR protein phosphorylation. *E.M.B.O. J.* 22, 1608-1619.

Scott, R. E., Giannakouros, T., Gao, S., Peidis, P., (2003) Functional Potential of P2P-R: A Role in the Cell Cycle and cell Differentiation Related to its Interactions With Proteins That bind to Matrix Associated Regions of DNA. *J. Cell. Biochem.*, 90, 6-12.

Scott A. Tenenbaum and Julio A. Aguirre-Ghiso (2005) Dephosphorylation shows SR proteins the way out. *Mol. Cell* 20, 499-501.

Sergeant Kate A., Bourgeois Cyril F., Dalglish Caroline, Venables Julian P., Stevenin James and Elliott David J. (2006) Alternative RNA splicing complexes containing the scaffold attachment factor SAFB2. *J. Cell Science* 120, 309-319.

Shackleton S., Lloyd D. J., Jackson S. N., Evans R., Niermeijer M. F., Singh B. M. et al. (2000) LMNA, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy. *Nat. Genet.* 24: 153–156.

Shengrong Lin, Ran Xiao, Peiqing Sun, Xiangdong Xu and Xiang-Dong Fu (2005) Dephosphorylation-dependent sorting of SR splicing factors during mRNP maturation. *Mol Cell* 20, 413-425.

Siebel, C.W., Feng, L., Guthrie, C. and Fu, X-D. (1999) Conservation in budding yeast of a kinase specific for SR splicing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 5440-5445.

Simons A, Melamed-Bessudo C, Wolkowicz R, Sperling J, Sperling R, Eisenbach L, Rotter (1997). V. PACT: cloning and characterization of a cellular p53 binding protein that interacts with Rb. *Oncogene. Jan* 16;14(2):145-55.

Simos, G. and Georgatos, S.D. (1992) The inner nuclear membrane protein p58 associates in vivo with a p58 kinase and the nuclear lamins. *EMBO J.*, 11, 4027-4036.

Smetana, K., Steele, W. J., Busch, H. (1963) A nuclear ribonucleoprotein network. *Exp. Cell Res.*, 31, 198-201.

Smith DF, Toft DO 1993 Steroid receptors and their associated proteins. *Mol. Endocrinol* 7: 4-11.

Smyk A, Szuminska M, Uniewich K, Gravew L and Kozłowski P. (2006) Human enhancer of rudimentary is a molecular partner of PDIP46/SKAR, a protein interacting with DNA polymerase δ and S6K1 cell growth. *The FEBS Journal* 273 4728-4741.

Soullam B. and Worman H.J. (1993) The amino terminal domain of the lamin B receptor is a nuclear envelope targeting signal. *J. Cell Biol.*, 120, 1093-10100.

Spann T. P., Moir R. D., Goldman A. E., Stick R. and Goldman R. D. (1997) Disruption of nuclear lamin organization alters the distribution of replication factors and inhibits DNA synthesis. *J. Cell Biol.* 136: 1201-1212.

Spector, D. L (1996). Nuclear organization and gene expression. *Exp Cell Res. Dec* 15;229(2):189-97.

Stratling WH, Yu F (1999) Origin and roles of nuclear matrix proteins. Specific functions of the MAR-binding protein MeCP2/ARBP. *Crit Rev Eukaryotic Gene Expr* 9: 31-318.

Stone JR, Maki JL, Collins T. (2003) Basal and hydrogen peroxide stimulated sites of phosphorylation in heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2. *Biochemistry*, Feb11;42(5):1301-8.

Sun, J. M., Chen, H. Y., Davie, J.R. (1994) Nuclear factor 1 is a component of the nuclear matrix. *J. Cell. Biochem.*, 55, 252-263.

Tai, H. H., Geisterfer, M., Bell, J. C., Moniwa, M., Davie, J. R., Boucher, L., McBurney, M. W. (2003) CHD1 associates with NCoR and histone deacetylase as well as with RNA splicing proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 308, 170-176.

Takano, M., Koyama, Y., Ito, H., Hoshino, S., Onogi, H., Hagiwara, M., Furukawa, K., Horigome, T. (2004) Regulation of binding of lamin B receptor to chromatin by SR protein kinase and cdc2 kinase in *Xenopus* egg extracts. *J. Biol. Chem.*, 279, 13265-13671.

Takeuchi, M. and Yanagida, M. (1993) A mitotic role for a novel fission yeast protein kinase *dsk1* with cell cycle stage dependent phosphorylation and localization. *Mol. Biol. Cell.*, 4, 247-260.

Tan, J., Wooley, J. C. and LeStourgeon, W. M. (2000). Nuclear matrix-like filaments and fibrogranular complexes form through the rearrangement of specific nuclear ribonucleoproteins. *Mol. Biol. Cell* 11, 1547-1554.

Townson Steven M., Sullivan Toby, Zhang QingPing, Clark Gary M., C. Osborne Kent, Lee Adrian V., and Oesterreich Steffi. (2000) HET/SAF-B Overexpression Causes Growth Arrest and Multinuclearity and Is Associated with Aneuploidy in Human Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* Vol. 6, 3788–3796.

Townson, S. M., Dobrzycka, K. M., Lee, A. V., Air, M., Deng, W., Kang, K., Jiang, S., Kioka, N., Michaelis, K., Oesterreich, S. (2003) SAFB2, a new scaffold attachment factor homolog and estrogen receptor corepressor. *J. Biol. Chem.*, 278, 20059-20068.

Townson, S. M., Kang, K., Lee, A. V., Oesterreich, S. (2004) Structure-function analysis of the estrogen receptor alpha corepressor scaffold attachment factor-B1: identification of a potent transcriptional repression domain. *J. Biol. Chem.*, 279, 26074-26081.

Townson Steven M., Kang Kaiyan, Lee Adrian V., Oesterreich Steffi (2006) Novel role of the RET finger protein in estrogen receptor-mediated transcription in MCF-7 cells. *BBRC*, 349, 540-548.

Traweger, A., Fuchs, R., Krizbai, I. A., Weiger, T. M., Bauer, H. C., Bauer, H. (2003) The tight junction protein ZO-2 localizes to the nucleus and interacts with the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein scaffold attachment factor-B. *J. Biol. Chem.*, 278, 2692-2700.

Valcarcel, J. and Green, M.R. (1996) The SR protein family: pleiotropic functions in pre-mRNA splicing. *Trends Biochem. Sci.*, 21, 296-301.

van de Peppel Jeroen, Kettelarij Nienke, van Bakel Harm, et al. (2005) Mediator Expression Profiling Epistasis Reveals a Signal Transduction Pathway with Antagonistic Submodules and Highly Specific Downstream Targets. *Mol. Cell* 3593-3596.

van Wijnen, A. J., Bidwell, J. P., Fey, E. G., Penman, S., Lian, J. B., Stein, J. L., Stein, G. S. (1993) Nuclear matrix association of multiple sequence-specific DNA binding activities related to SP-1, ATF, CCAAT, C/EBP, OCT-1, and AP-1. *Biochemistry.*, 32, 8397-8402.

Vassetzky, Y. S., De Moura Gallo C. V., Bogdanova, A. N., Razin S. V., Scherrer, K. (1993) The sequence-specific nuclear matrix binding factor F6 is a chicken GATA-like protein. *Mol. Gen. Genet.*, 238, 309-314.

Velazquez-Dones Adolfo, Jonathan C.Hagopian, Chen-Ting Ma, Xiang-Yang Zhong, Huilin Zhou, Gourisankar Ghosh, Xiang-Dong Fu, and Joseph Adams. (2005) Mass spectrometric and kinetic analysis of ASF/SF2 phosphorylation by SRPK1 and CLK/STY. *J Biol Chem.* Dec 16; 280(50):41761-8.

Vlcek S., Just H., Dechat T. and Foisner R. (1999) Functional diversity of LAP2alpha and LAP2beta in postmitotic chromosome association is caused by an alpha-specific nuclear targeting domain. *EMBO J.* 18: 6370–6384

Vlcek S., Dechat T. and Foisner R. (2001) Nuclear envelope and nuclear matrix: interactions and dynamics. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 1758–1765.

Wan C, Tempel W, Liu Z-J, Wang B-C, & Rose RB. (2005) *Biochem.* 44, 5017-5023.

Wang, H-Y., Arden, K.C., Bermingham, J.R., Jr., Viars, C.S., Lin, W., Boyer, A.D. and Fu, X-D. (1999) Localisation of serine kinases, SRPK1 (SFRSK1) and SRPK2 (SFRSK2), specific for the SR family of splicing factors in mouse and human chromosomes. *Genomics*, 57, 310-315.

Wang, H-Y., Lin, W., Dyck, J.A., Yeakley, J.M., Songyang, Z., Cantley, L.C. and Fu, X-D. (1998a) SRPK2: A differentially Expressed SR Protein specific Kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells. *J. Cell Biol.*, 140, 737-750.

Wang, Z. G., Ruggero, D., Ronchetti, S., Zhong, S., Gaboli, M., Rivi, R., Pandolfi, P. P. (1998b) PML is essential for multiple apoptotic pathways. *Nat. Genet.*, 20, 266-272.

Weighardt, F., Cobianchi, F., Cartegni, L., Chiodi, I., Villa, A., Riva, S., Biamonti, G. (1999) A novel hnRNP protein (HAP/SAF-B) enters a subset of hnRNP complexes and relocates in nuclear granules in response to heat shock. *Journal of Cell. Science.*, 112, 1465-1476.

Witte, M. M., and Scott, R.E. (1997) The proliferation potential protein-related (P2P-R) gene with domains encoding heterogeneous nuclear ribonucleoprotein association and Rb1 binding shows repressed expression during terminal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1212-1217.

Wojcik E, Murphy AM, Fares H, Dang-Vu K, & Tsubota SI. (1994) *Genetics* 138, 1163-1170.

Wong, C. W., and Privalsky, M. L. (1998) *Mol. Cell. Biol.* 18, 5500–5510.

Worman, J.H., Yuan, J., Blobel, G. and Georgatos, S.D. (1988) A lamin B receptor in the nuclear envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 8531-8534.

Worman, J.H., 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.

Xiang-Dong Fu. The superfamily of arginine/serine splicing factors. *RNA* 1:663-680, (1995).

Xiao, S. H. and Manley J. L. (1997) Phosphorylation of the ASF/SF2 RS domain affects both protein-protein and protein-RNA interactions and is necessary for splicing. *Genes Dev.*, 11, 334-344.

Yanagisawa, J., Ando, J., Nakayama, J., Kohwi, Y., Kohwi-Shigematsu, T. (1996) A matrix attachment region (MAR)-binding activity due to a p114 kilodalton protein is found only in human breast carcinomas and not in normal and benign breast disease tissues. *Cancer Res.*, 56, 457-462.

Yasui D, Miyano M, Varga-Weisz P, Kohwi-Shigematsu T. (2002) SATB1 regulates gene expression over long distances.

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. *J. Biol. Chem.*, 269, 11306-11311.

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

Yoshitake, Y., Nakatsura, T., Monji, M., Senju, S., Matsuyoshi, H., Tsukamoto, H., Hosaka, S., Komori, H., Fukuma, D., Ikuta, Y., Katagiri, T., Furukawa, Y., Ito, H., Shinohara, M., Nakamura, Y., Nishimura, Y. (2004) Proliferation potential-related protein, an ideal esophageal cancer antigen for immunotherapy, identified using complementary DNA microarray analysis. *Clin. Cancer. Res.*, 10, 6437-6448.

Yue, B-G., Ajuh, P., Akusjarvi, G., Lamond, A.I. and Kreivi, J-P. (2000) Functional coexpression of serine protein kinase SRPK1 and its substrate ASF/SF2 in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 28, E14.

Yun Chi Y. and Fu Xiang-Dong. (2000) Conserved SR protein kinase functions in nuclear import and its action is counteracted by arginine methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, 150 : 4 707-717.

Yun Chi Y., Velazquez-Dones Adolfo L., Lyman Susan K., and Fu Xiang-Dong (2003). Phosphorylation-dependent and- independent nuclear import of RS domain-containing splicing factors and regulators. *J. Cell Biol* 278:20 18050-18055.

Zbarsky, I. B., Debov, S. S. (1948) Protein fractions in the cell nuclei. *Biokhimiia*, 16, 390-5.

Zbarsky IB, Georgiev GP. (1959) Cytological characteristics of protein and nucleoprotein fractions of cell nuclei. *Biochim Biophys Acta* 32:301-2.

Zhao, K., Wang, W., Rando, O. J., Xue, Y., Swiderek, K., Kuo, A., and Crabtree, G. R. (1998) Rapid and phosphoinositol-dependent binding of the SWI/SNF-like BAF complex to chromatin after T lymphocyte receptor signaling. *Cell*, 95: 625-636.

Zhaohua Tang, Mitsuhiro Yanagida, and Ren-Jang Lin. (1998) Fission yeast mitotic regulator Dsk1 is an SR protein specific kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 273:10 5963-5969.

Zheng, Y., Fu, X. D., Ou, J. H. (2005) Suppression of hepatitis B virus replication by SRPK1 and SRPK2 via a pathway independent of the phosphorylation of the viral core protein. *Virology*, 342, 150-8.

Zhou, S., and D. N. Standring. (1992) Hepatitis B virus capsid particles are assembled from core-protein dimer precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10046-10050.

Κοεν Ρ. Ανίχνευση μοριακών αλληλεπιδράσεων του Ν-τελικού άκρου της SRPK1a (SRPK1aNt) με την μέθοδο των δύο υβριδίων, Λάρισα 2006, Διδακτορική διατριβή, Εργαστήριο Βιοχημείας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Τζίτζιρα Α. Μελέτη των χαρακτηριστικών της *in vitro* αναστολής της δράσης της κινάσης SRPK1a από τον παράγοντα της πυρηνικής μήτρας SAFB1, Λάρισα 2006, Διπλωματική Εργασία, Εργαστήριο Βιοχημείας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Επώνυμο: Τσιάνου
Όνομα: Θεοδώρα
Πατρώνυμο: Κωνσταντίνος
Ημερομηνία γέννησης: 10-12-1976
Τόπος γέννησης: Γιοχάνεσμπουργκ-Ν. Αφρική
Διεύθυνση κατοικίας: Ιουστινιανού 61, Λάρισα
Τηλέφωνο: 6945547447
e-mail: dtsianou@med.uth.gr

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

1994: Αποφοίτηση από το Γενικό Λύκειο Αγριάς-Βόλου.

1995-1997: Φοίτηση στο Δημόσιο ΙΕΚ Βόλου.

1997: Λήψη διπλώματος στην ειδικότητα «Διοικητικό και Οικονομικό Στέλεχος Επιχειρήσεων».

1998: Εισαγωγή στο Τμήμα Ιατρικής Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

1998-2003: Φοίτηση στο Τμήμα Ιατρικής Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

2003: Αποφοίτηση με βαθμό πτυχίου 8,34 «Λίαν Καλώς».

2003-σήμερα: Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με θέμα «Διερεύνηση του ρόλου των SR πρωτεϊνικών κινασών στην γονιδιακή έκφραση: μελέτη της βιολογικής σημασίας της μοριακής αλληλεπίδρασης ενός καινούργιου μέλους της οικογένειας, της SRPK1a, με τον πρωτεϊνικό παράγοντα SAFB», υπό την επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας κ. Ε. Γεωργιάτσου.

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Γνώση της Αγγλικής και Γερμανικής Γλώσσας σε ικανοποιητικό επίπεδο.

Λήψη των εξής τίτλων σπουδών:
-Cambridge Proficiency in English.
-Michigan Proficiency in English.
-Zertificat Deutsch als Fremdsprache

ΆΛΛΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

Πολύ καλή γνώση χειρισμού Η/Υ, προγραμματισμού και εφαρμογών βιολογικού ενδιαφέροντος.

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

2001: Εκπόνηση Βιβλιογραφικής Εργασίας στο Τμήμα Ιατρικής Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με θέμα «Γενετικές Ασθένειες Υποδοχέων και Μεταγωγής Σήματος Ορμονών και Αυξητικών Παραγόντων», υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Βιοχημείας κ. Σ. Μπονάνου-Τζεδάκη.

2003: Εκπόνηση Διπλωματικής Εργασίας στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με θέμα «Ανίχνευση της ΔF508 μετάλλαξης σε ασθενείς με Κυστική Ίνωση», υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Βιοχημείας κ. Σ. Μπονάνου-Τζεδάκη.

ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

2003-σήμερα: Παράδοση ερευνητικών και βιβλιογραφικών σεμιναρίων στα μέλη του Εργαστηρίου Βιοχημείας της Ιατρικής Λάρισας.

2004-2005: Συμμετοχή στην οργάνωση των εργαστηρίων του μαθήματος «Κυτταρική Σηματοδότηση και Ρύθμιση της Γονιδιακής Έκφρασης» του μεταπτυχιακού Προγράμματος του Τμήματος Ιατρικής Λάρισας με τίτλο «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής» και επίβλεψη των μεταπτυχιακών φοιτητών στο αντίστοιχο εργαστήριο.

2005-2006: Συμμετοχή στην επίβλεψη εκπόνησης διπλωματικής εργασίας από φοιτήτρια του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Λάρισας.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- Tsianou D., Lyberopoulou A., Kohen R., Bonanou S., Georgatsou E. (2005) “Analysis of molecules differentially interacting with the highly homologous SAFB1 and SAFB2 proteins” *Hellenic society of biochemistry & molecular biology, Book of Abstracts of the 57th meeting*, 52, 210.
- Tsianou D, Lyberopoulou A, Kohen R, Bonanou S, Georgatsou E. (2006) “Analysis of molecules differentially interacting with the highly homologous ERα corepressors SAFB1 and SAFB2” *31th FEBS Congress, The FEBS Journal*, 273, Supplement 1, Abstracts, 87.
- Tsianou D, Tzitzira A, Voukkalis N, Nikolakaki E, Bonanou S, Georgatsou E. (2006) “Scaffold attachment factor B1 inhibits SR protein kinase 1a activity *in vitro*” *Hellenic society of biochemistry & molecular biology, Book of Abstracts of the 58th meeting*, 53, 219.