



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Θέμα: Η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων SAFB1 και SAFB2 στον άνθρωπο

Γκατζώνα Παγώνα-Χριστίνα

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Γεωργάτσου Ελένη, αναπληρώτρια καθηγήτρια Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας , επιβλέπουσα
- Μυλωνής Ηλίας, επίκουρος καθηγητής Βιοχημείας
- Γερμενής Αναστάσιος, καθηγητής Ανοσολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη Βιοχημεία.

Λάρισα, Νοέμβριος 2017



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN

“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”
MASTER THESIS

“Study of the expression of SAFB1 and SAFB2”

Gatzona Pagona-Christina

Advisory Thesis Committee:

- Georgatsou Elena, Associate Professor of Biochemistry and Molecular Biology, supervisor
- Ilias Mylonis, Assistant Professor of Biochemistry
- Anastasios Germenis, Professor of Laboratory Immunology

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Biochemistry

Larisa, November 2017

Περιεχόμενα

Πρόλογος	5
1. Εισαγωγή	10
1.1. Ο πυρήνας του κυττάρου	10
1.2. Πυρηνική μήτρα	10
1.3. S/MARS (Scaffold/Matrix Attachment Regions)	12
1.4. Πρωτεΐνες που προσδέονται στις S/MAR περιοχές	13
1.5. Οι παράγοντες SAFB	14
1.5.1. Δομή των παραγόντων SAFB	15
1.5.2. Υποκυτταρικός εντοπισμός των SAFB	16
1.5.3. Λειτουργίες των SAFB	17
A. SAFB και χρωματίνη	17
B. SAFB και μεταγραφή	17
Γ. SAFB και μάτισμα και μεταβολισμός RNA	19
Δ. SAFB και απόκριση στο στρες	19
E. SAFB και απόπτωση	19
1.6. SAFB και καρκίνος	20
Σκοπός	21
2 Υλικά και μέθοδοι	22
2.1. Υλικά	22
2.1.1. Κυτταρικές σειρές	22
2.1.2. Επίδραση αναστολέων	22
2.1.3. Χημικά	22
2.1.4. Εκκινητές	22
2.1.5. Αντισώματα	22
2.1.6. Απομόνωση RNA(kit)	23
2.2. Μέθοδοι	23
2.2.1. Κυτταροκαλλιέργειες	23
2.2.2. Παρασκευή ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από τα κύτταρα	23
2.2.3. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.	24
2.2.4. Διαπίδυση	25
2.2.5. Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE πρωτεϊνών	25
2.2.6. Ανοσοαποτύπωση (Western blotting)	26
2.2.7. Απομόνωση RNA από κύτταρα	26
2.2.7.1. Σύνθεση cDNA	27
2.2.7.2. Real time PCR	28
2.2.7.3. Ανάλυση αποτελεσμάτων Real-Time PCR και ποσοτικοποίηση της έκφρασης mRNA.	29
2.3. Υλικά και Μέθοδοι	31
2.3.1. The National Center for Biotechnology Information (NCBI)	31
2.3.2. Βάση δεδομένων Ensembl -Ensembl Genome Browser (http://www.ensembl.org)	32
2.3.3. Βάση δεδομένων Clustal omega	32
2.3.4. Consensus coding sequence database (CCDS)	33
3. Αποτελέσματα	34

3.1.	Επίδραση στέρησης γλυκόζης _____	34
3.2.	Επίδραση ακτινομυκίνης D _____	35
3.3.	Real time PCR _____	36
3.4.	Επίδραση κυκλοεξιμιδίου _____	37
3.5.	Επίδραση MG132 _____	39
<i>Αποτελέσματα βιοπληροφορικού μέρους</i> _____		41
3.6.	Σύγκριση πρωτεϊνικών αλληλουχιών SAFB1-SAFB2 _____	41
3.7.	Στοίχιση των cDNA των SAFB1 και SAFB2 _____	42
3.8.	Στοίχιση γονιδίων SAFB1 και SAFB2 _____	44
3.9.	Μελέτη της κοινής περιοχής των δυο αλληλουχιών ως προς την ύπαρξη ιντρονίων.	45
3.10.	Οι παράγοντες SAFB στον οργανισμό mus musculus _____	46
3.10.1	Σύγκριση πρωτεϊνών SAFB1 και SAFB2 στον ποντικό _____	46
3.10.2.	Στοίχιση cDNA των πρωτεϊνών SAFB1 και SAFB2 _____	47
3.11.	Μελέτη της κοινής περιοχής στις βάσεις δεδομένων _____	48
4.	<i>Συζήτηση</i> _____	51
5.	<i>Βιβλιογραφία</i> _____	55

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στα πλαίσια του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής» υπό την επίβλεψη της αναπληρώτριας καθηγήτριας Βιοχημείας-Μοριακής Βιολογίας κυρίας Γεωργιάτσου Ελένης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω αρχικά την επιβλέπουσα μου, αναπληρώτρια καθηγήτρια Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, κυρία Γεωργιάτσου Ελένη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάθεση της πτυχιακής καθώς και για τις εύστοχες συμβουλές και παρατηρήσεις της, τη γνώση που μου μετέδωσε και για την υπομονετική της καθοδήγηση.

Οφείλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερος την Υποψήφια Διδάκτορα Ταζέ Χρύσα για τη βοήθεια, την καθοδήγηση, το χρόνο που διέθετε και τις γνώσεις που μου προσέφερε σε καθημερινή βάση.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα των Επίκουρο καθηγητή Βιοχημείας Μυλωνή Ηλία για τις πολύτιμες συμβουλές, τη βοήθειά του κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων καθώς και για τις γνώσεις που μου μετέδωσε.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Ανοσολογίας Γερμενή Αναστάσιο για την συνεργασία ως μέλος της τριμελούς εξεταστικής μου επιτροπής.

Ακόμη ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοχημείας για την άψογη συνεργασία, τη βοήθεια αλλά και τη φιλία τους. Συγκεκριμένα, τους υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου Βιοχημείας, Καραγιώτα Αγγελική, Γκοτινάκου Ιωάννα, Κουκουλά Κρέων και την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Μπεφάνη Χριστίνα, καθώς και τους μεταπτυχιακούς συμφοιτητές μου Κεχαγιά Ελένη και Υφαντή Άγγελο. Δε περίμενα να αναπτύξουμε τόσο καλές σχέσεις οπότε τους ευχαριστώ πολύ για αυτό καθώς η ένταξη, η προσαρμογή μου και η καθημερινότητα μου στο εργαστήριο έγινε πολύ πιο εύκολη και ευχάριστη χάρη σε αυτούς.

Κατά τις κοινές συναντήσεις και συζητήσεις του εργαστηρίου πολύ χρήσιμες μου φάνηκαν οι καλοπροαίρετες και εύστοχες παρατηρήσεις και συμβουλές των υπόλοιπων καθηγητών της Βιοχημείας κ.κ. Γ. Σίμου, Π. Λιάκου, Α. Τσακάλωφ, Γ. Χαχάμη και τη καθηγήτρια της Φυσιολογίας κ. Ε. Παρασκευά. Τους ευχαριστώ θερμά.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου την οικογένεια μου, τον πατέρα μου Νίκο και τα δύο μου αδέρφια Άγγελο και Γιώργο για την αμέριστη αγάπη, βοήθεια και ψυχολογική στήριξη που μου παρείχαν.

Περίληψη

Οι παράγοντες SAFB (Scaffold Attachment Factor B) είναι πρωτεΐνες της πυρηνικής μήτρας και απομονώθηκαν πριν από είκοσι περίπου χρόνια με βάση το χαρακτηριστικό τους να προσδένονται σε στοιχεία S/MAR. Είναι μεγάλες πρωτεΐνες που αποτελούνται από εξαιρετικά συντηρημένες περιοχές μεταξύ των μελών της. Η οικογένεια των SAFB αποτελείται από τρία μέλη, τον SAFB1 και τον SAFB2 οι οποίοι παρουσιάζουν 72% ομολογία στην αμινοξική τους αλληλουχία και τον SLTM ο οποίος είναι πιο απομακρυσμένος εξελικτικά και παρουσιάζει περίπου 37% ομολογία με τις άλλες δυο πρωτεΐνες. Οι SAFB συνδέονται σε DNA, RNA και διάφορες πρωτεΐνες και επηρεάζουν σημαντικές λειτουργίες όπως μεταγραφή, μάτισμα και επιδιόρθωση των βλαβών του DNA. Επιπλέον ο SAFB1 (και σε κάποιο βαθμό και ο SAFB2) έχει δείχθει να εμπλέκεται στον καρκίνο ως ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη δεδομένου ότι σε καρκίνους του μαστού, του εντέρου και του παγκρέατος βρίσκεται σε χαμηλά ή μηδαμινά επίπεδα και γενικά αποτελεί κακή πρόγνωση όταν δεν εκφράζεται.

Στο πρώτο μέρος της παρούσας διπλωματικής εργασίας εξετάστηκε η επίδραση μιας στρεσογόνου συνθήκης, της έλλειψης γλυκόζης από το θρεπτικό μέσο σε κύτταρα HeLa, καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας. Στη συνθήκη στέρησης γλυκόζης τα πρωτεϊνικά επίπεδα των SAFB μειώνονται και σκοπός μας ήταν να εξετάσουμε τον μηχανισμό με τον οποίο μπορεί να συμβαίνει αυτό. Πραγματοποιήθηκε επίδραση με αναστολείς διαφόρων βασικών διεργασιών της γονιδιακής έκφρασης καθώς και ανίχνευση των επιπέδων RNA του SAFB1 με τη τεχνική της Real time PCR. Οι αναστολείς που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η ακτινομυκίνη D η οποία αναστέλλει τη μεταγραφή, το κυκλοεξιμίδιο που αναστέλλει τη μετάφραση και το MG132 που αναστέλλει την αποικοδόμηση πρωτεϊνών στο πρωτεάσωμα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τουλάχιστον για τον SAFB1 η πτώση των πρωτεϊνικών του επιπέδων δεν οφείλεται στη μεταγραφή και στο σύνολό τους υποδεικνύουν ότι η πτώση των επιπέδων των δυο πρωτεϊνών οφείλεται σε αυξημένη αποικοδόμηση τους στο πρωτεάσωμα.

Στο δεύτερο μέρος της διπλωματικής εξετάστηκε μια κοινή, απολύτως συντηρημένη περιοχή περίπου 200 αμινοξέων ανάμεσα στις πρωτεΐνες SAFB1 και SAFB2 στην οποία δεν έχει αποδοθεί ακόμη κάποια λειτουργία. Τα ευρήματά μας έδειξαν ότι η περιοχή αυτή συντηρείται και σε επίπεδο cDNA και ότι οι δυο αλληλουχίες που κωδικοποιούν για τη συντηρημένη περιοχή είναι απολύτως ταυτόσημες. Επιπλέον, δείξαμε ότι αυτή η περιοχή εκτείνεται περαιτέρω και σε τμήμα δυο ιντρονίων. Επειδή η συντήρηση ιντρονίων αποτελεί εξαιρετικά σπάνιο φαινόμενο πιστεύουμε ότι αυτή η περιοχή έχει κάποια σημαντική λειτουργία γι' αυτό

και συντηρείται. Η μελέτη συνεχίστηκε με σύγκριση των SAFB και στο γονιδίωμα του ποντικού, όπου επίσης υπάρχει συντηρημένη περιοχή ακόμα και σε επίπεδο cDNA. Η υπόθεση μας, ότι πιθανόν από αυτή τη περιοχή να προκύπτει ένα λειτουργικό, μη κωδικοποιό RNA όπως lncRNA ή miRNA δε μπόρεσε να επιβεβαιωθεί με τις συγκρίσεις αλληλουχιών που κάναμε στις βάσεις δεδομένων του γονιδιώματος ή μεταγραφώματος του ανθρώπου. Πιθανολογείται ότι είτε είναι αναγκαία μια πιο εμβαθυσμένη έρευνα στις βάσεις δεδομένων, είτε ότι αυτή η περιοχή εξυπηρετεί ένα ρόλο που δεν είναι ακόμη γνωστός και προσβάσιμος με απλά μέσα βιοπληροφορικής.

Abstract

SAFB (Scaffold Attachment Factor B) are nuclear matrix proteins isolated approximately twenty years ago based on their ability of binding to S/MAR elements. They are large proteins that consist of highly conserved domains among its members. The SAFB family consists of three proteins, SAFB1 and SAFB2, that share 72% homology between their protein sequences and SLTM that shares about 37% homology with the other two proteins. SAFBs bind to DNA, RNA and various proteins and are involved in important functions such as transcription, splicing and DNA damage repair. In addition, SAFB1 (and, to some extent, SAFB2) has been shown to be involved in cancer as a tumor suppressor protein since in breast, colon and pancreatic cancers it is found at low or negligible levels and it's generally a poor prognosis when not expressed.

In the first part of this thesis we examined the effect of a stressful condition, the lack of glucose from the medium in HeLa cells, a cervical cancer cell line. In glucose withdrawal, condition SAFB protein levels are decreased and our aim was to examine the mechanism under which this reduction occurs. We used inhibitors of various important procedures during gene expression and we detected SAFB1 RNA levels with Real time PCR. The inhibitors were actinomycin D that inhibits transcription, cycloheximide that inhibits translation and MG132 that inhibits protein degradation in the proteasome. The results showed that, at least for SAFB1, the protein levels reduction was not due to transcription and according to all the experiments, they suggest that the reduction of the SAFB levels is due to their increased degradation in the proteasome.

In the second part of the thesis, one common, totally conserved region of about 200 amino acids between the SAFB1 and SAFB2 proteins to which no function has been assigned yet was examined. Our findings have shown that this region is maintained at the cDNA level too and that the two sequences encoding the conserved region are completely identical. We also show that this sequence extends further in two neighboring introns. Since introns maintenance is an extremely rare phenomenon we consider that this area might play a role for some important function and this is the reason for its high conservation. The study was continued by comparing SAFBs in the mouse genome, where we found that there is also a conserved region even at the cDNA level. Our hypothesis that possibly a functional, non-coding RNA, such as lncRNA or miRNA, could be encoded by this region couldn't be confirmed by our sequence comparisons done in genomic or transcriptomic human

databases. It is probable that either a more thorough research in databases is needed, or that this site serves a role that is not yet known and accessible by simple bioinformatic tools.

1. Εισαγωγή

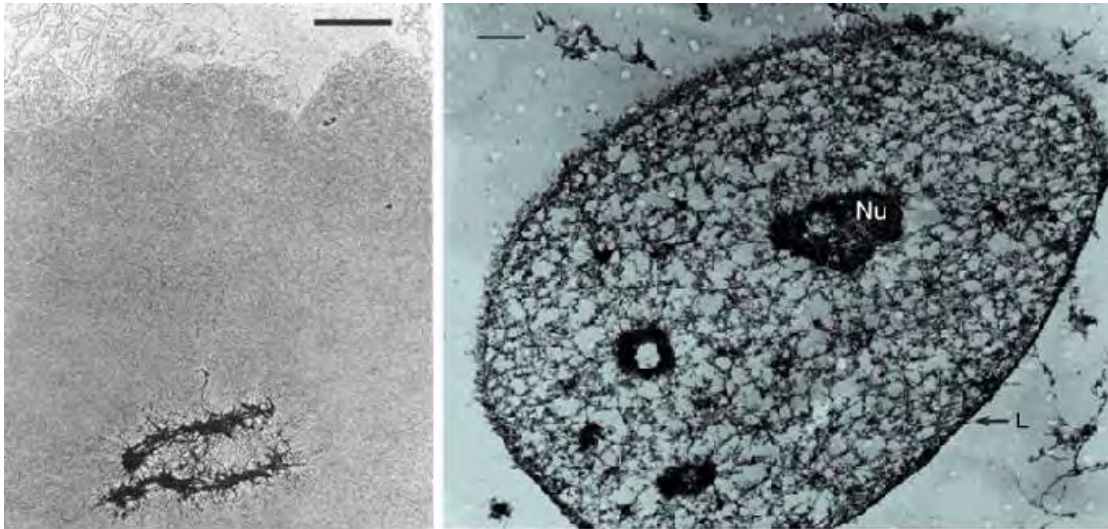
1.1. Ο πυρήνας του κυττάρου

Ο πυρήνας των ευκαρυωτικών κυττάρων είναι πολύπλοκη και οργανωμένη δομή, που είναι υπεύθυνη για βασικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της αντιγραφής του DNA, της μεταγραφής και επεξεργασίας του RNA και της συναρμολόγησης ριβοσωμάτων (Vlcek et al, 2001). Στεγάζει το γονιδίωμα του κυττάρου και διαθέτει διάφορες δομές, οι οποίες όμως δεν οριοθετούνται από μεμβράνες. Η εσωτερική οργάνωση του πυρήνα καταδεικνύεται περαιτέρω από τον καταμερισμό των περισσότερων πυρηνικών διεργασιών σε συγκεκριμένες, διακριτές περιοχές. Πολλά σημαντικά ένζυμα και πρωτεΐνες του πυρήνα εντοπίζονται σε διακριτά υποπυρηνικά σωματίδια. Ανάμεσα σε αυτά είναι ο πυρηνίσκος, τα πυρηνικά σωματίδια (nuclear speckles), τα σωματίδια PML και τα σωματίδια Cajal. Ο πυρηνίσκος (nucleolus) αποτελεί τη θέση μεταγραφής και επεξεργασίας του rRNA, καθώς και τη θέση έναρξης της συναρμολόγησης των ριβοσωμάτων. Τα πυρηνικά σωματίδια αποτελούν συστατικά της συσκευής ματίσματος του RNA. Τα σωματίδια PML αλληλεπιδρούν με τη χρωματίνη και αποτελούν θέσεις συσσώρευσης μεταγραφικών παραγόντων και πρωτεϊνών τροποποίησης της χρωματίνης. Τα σωματίδια Cajal περιέχουν τη χαρακτηριστική πρωτεΐνη κοΐλίνη (coilin) και πλήθος μικρών RNP και θεωρείται ότι λειτουργούν ως θέσεις συναρμολόγησης και επεξεργασίας των RNP (Nunes et al, 2016). Δεδομένου ότι δε διαθέτουν μεμβράνες, θεωρείται ότι η σύσταση των διαφόρων πυρηνικών σωματιδίων δεν είναι σταθερή αλλά μεταβάλλεται ανάλογα με τη κατάσταση του κυττάρου. Επιπλέον θεωρείται ότι τον πυρήνα διατρέχει ένα τρισδιάστατο πλέγμα ονομαζόμενο «πυρηνική μήτρα» το οποίο λειτουργεί ως ικρίωμα για τη χρωματίνη και άλλα συστατικά του πυρήνα και έχει και αυτή δυναμική σύσταση.

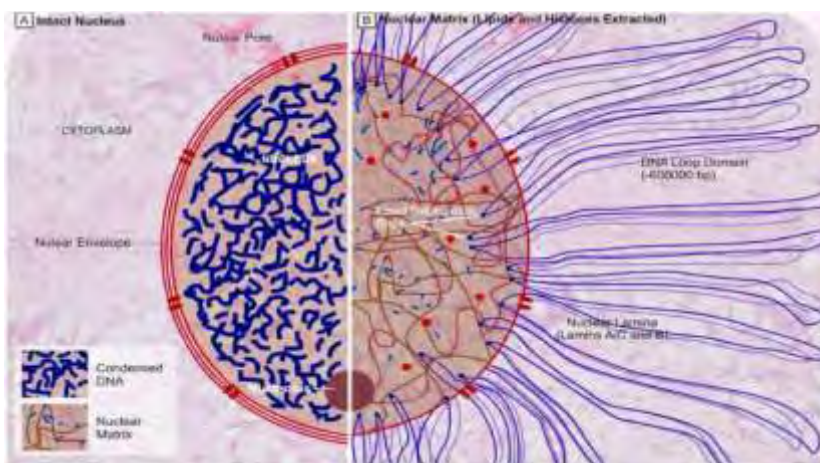
1.2. Πυρηνική μήτρα

Η πυρηνική μήτρα ή πυρηνικός σκελετός ή πυρηνικό ικρίωμα ορίστηκε από τους Berezney και Coffey, ως πυρηνική δομή με μεταβλητές λειτουργικές και δομικές ιδιότητες που σχετίζονται άμεσα με τη λειτουργία και την οργάνωση του γονιδιώματος στον πυρήνα. (Berezney et al, 1974) Η δομή της πυρηνικής μήτρας έχει παρατηρηθεί με δύο τρόπους. Ο πρώτος είναι με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου το οποίο αποτελεί την σημαντικότερη απόδειξη ύπαρξης της (Εικόνα 1) ενώ ο δεύτερος είναι με τη βιοχημική μέθοδο της κλασμάτωσης. Ουσιαστικά, ως πυρηνική μήτρα ή πυρηνικό ικρίωμα ή πυρηνικό σκελετό ονομάζουμε το δίκτυο πρωτεϊνών (NMP's-nuclear matrix proteins), DNA και RNA που παραμένει αδιάλυτο έπειτα από την κατεργασία πυρήνων με μη ιονικά

απορρυπαντικά, διαλύματα αλάτων υψηλής ιοντικής ισχύος και DNase I (Εικόνα 2). Η κατεργασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση της πυρηνικής μεμβράνης, της μεγαλύτερης ποσότητας DNA, των ιστονών καθώς και των διαλυτών συστατικών του νουκλεοπλάσματος και την παραμονή μιας δομής που είναι ορατή με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.



Εικόνα 1 : Απεικόνιση της πυρηνικής μήτρας. Αριστερά, παρουσιάζεται ηλεκτρονική φωτογραφία ενός μεταφασικού χρωμοσώματος που παρασκευάστηκε από κύτταρα HeLa μετά από κατεργασία με ήπιο απορρυπαντικό. Στα δεξιά, η απεικόνιση πυρήνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο όπου απεικονίζεται η πυρηνική μήτρα απαρτιζόμενη από τη πυρηνική λάμινα και ένα δίκτυο ινιδίων διάχυτο σε όλο τον πυρήνα .



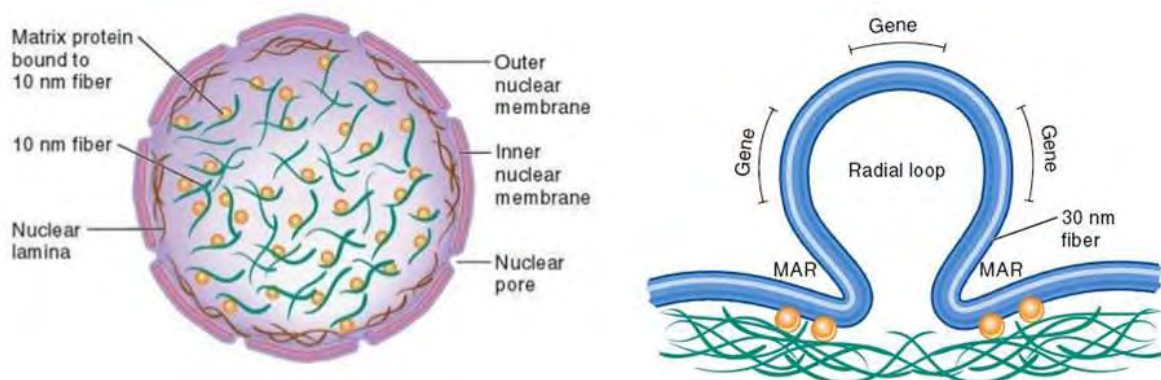
Εικόνα 2 : Απεικόνιση πυρήνα και πυρηνικής μήτρας. Αριστερά, με σκούρο μπλε απεικονίζεται το συμπυκνωμένο DNA στο εσωτερικό του πυρήνα. Δεξιά, μετά από κατεργασία με μη ιονικά απορρυπαντικά, διαλύματα αλάτων υψηλής ιοντικής ισχύος απεικονίζεται η πυρηνική μήτρα και οι θηλιές του DNA οι οποίες προσδένονται σε αυτή μέσω των S/MAR περιοχών.

Αρχικά η πυρηνική μήτρα θεωρήθηκε σαν πλατφόρμα για συναρμολόγηση ενζυμικών συμπλόκων (Berezney et al,1977). Στη συνέχεια, μετά την ανακάλυψη διαφόρων δομών στο εσωτερικό του πυρήνα, θεωρήθηκε ως δομική βάση για διαμερισματοποίηση. (Berezney et al, 1995, Razin et al, 2014) Μετά από αρκετά χρόνια θεωρήθηκε ως πλατφόρμα για τοποθέτηση και συναρμολόγηση . Σήμερα, η ύπαρξη της πυρηνικής μήτρας είναι ακόμη υπό αμφισβήτηση (Jackson et al,2003, Razin et al, 2014) Αυτό συμβαίνει γιατί πολλοί υποστηρίζουν ότι μπορεί να περιέχει ένα τεχνητό σύνολο κατακρημνισμένων πρωτεϊνών λόγω των μη φυσιολογικών συνθηκών που έχει υποστεί ο πυρήνας. (Pederson,1998)

1.3. S/MARS (Scaffold/Matrix Attachment Regions)

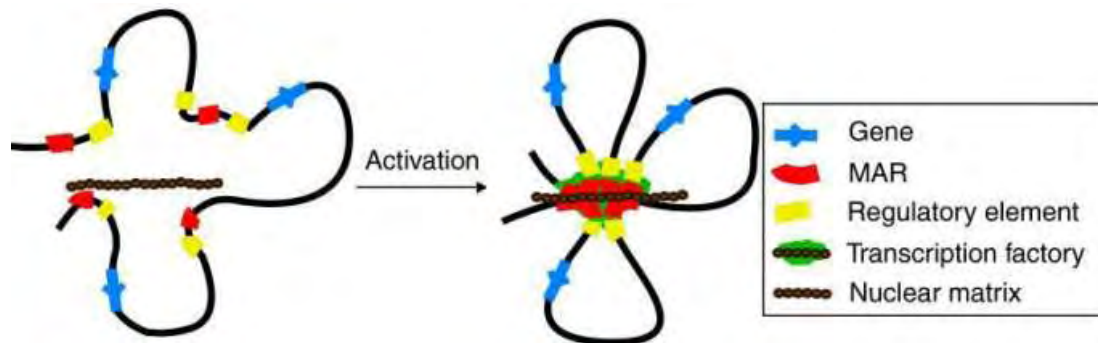
Στον ευκαρυωτικό μεσοφασικό πυρήνα η χρωματίνη οργανώνεται σε μια ανώτερη τάξη δομής υπό τη μορφή «θηλιών». (Laemmli et al,1978) Οι θηλιές αυτές έχουν βρεθεί να παραμένουν προσκολλημένες στην πυρηνική μήτρα μετά από κατεργασία με DNAση μέσω συγκεκριμένων περιοχών του DNA που ονομάζονται S/MARS (Scaffold/Matrix Attachment Regions) (Εικόνα 3). Αποτελούν στοιχεία DNA στη βάση των θηλιών και είναι πλούσια σε AT (>65% της σύστασης τους). Η πρόβλεψη της αλληλουχίας των S/MARs περιοχών είναι απροσδόκητα δύσκολη καθώς, δεν έχει βρεθεί κάποιο πρότυπο ή μοτίβο.

Οι αλληλουχίες αυτές χωρίζονται σε δυο κατηγορίες: στις δομικές (constitutive) που περιλαμβάνουν αυτές που είναι μόνιμα προσκολλημένες στη μήτρα και σκοπός τους είναι να διατηρούν τη χρωματινική δομή και τις λειτουργικές (facultative), που εμπεριέχουν ιστοειδικές περιοχές δέσμευσης παραγόντων μεταγραφής και μπορούν να αποκολληθούν από αυτήν.(Klussmann-Scott, 2008)



Εικόνα 3: Απεικόνιση πυρήνα, πυρηνικής μήτρας και S/MAR περιοχών. Διάφορες πρωτεΐνες που προσδένονται στις S/MAR περιοχές απεικονίζονται με πορτοκαλί χρώμα.

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, η σύνθεση του mRNA συγκεντρώνεται σε διακριτά «εργοστάσια μεταγραφής» ή εστίες εντός του πυρήνα, που περιέχουν RNA πολυμεράσες, μετάγραφα RNA, παράγοντες μεταγραφής και παράγοντες επεξεργασίας mRNA. Θεωρείται πως η συγκράτηση της RNA πολυμεράσης II και γενικών μεταγραφικών παραγόντων στους πυρήνες μετά από εκχύλιση διαλυτών πρωτεϊνών και πέψη με νουκλεάσες υποδηλώνει ότι τα «μεταγραφικά εργοστάσια» συναρμολογούνται πάνω στη πυρηνική μήτρα (Laemmli et al, 1998, Ottaviani et al, 2008) (Εικόνα 4)



Εικόνα 4: Μοντέλο που απεικονίζει τη δράση των MARs στη γονιδιακή ρύθμιση. Η ενεργοποίηση της μεταγραφής συνοδεύεται από την αγκυροβόληση των MAR στην πυρηνική μήτρα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός αγκυροβολημένου βρόγχου χρωματίνης. Ο μηχανισμός μεταγραφής συναρμολογείται στη θέση επαφής του πυρηνικής μήτρας με MAR. Αλληλεπίδραση των MAR με την πυρηνική μήτρα φέρνει σε επαφή αλληλουχίες κωδικοποίησης γονιδίων, ρυθμιστικά στοιχεία DNA και μηχανές μεταγραφής, επιτρέποντας έτσι τη ρύθμιση συγκεκριμένων γονιδίων. Στο τέλος της φάσης S, η μηχανή αντιγραφής αποσυναρμολογείται. (Ottaviani et al, 2008)

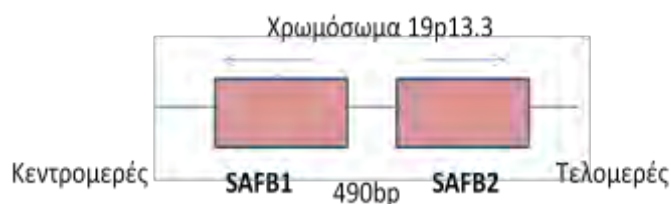
1.4. Πρωτεΐνες που προσδένονται στις S/MAR περιοχές

Υπάρχει μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών που προσδένονται στις περιοχές S/MAR και χαρακτηρίζονται ως S/MAR Binding Proteins (MARBPs). Οι περισσότερες από αυτές υπάρχουν σε συν-καταστολικά/ ενεργοποιητικά σύμπλοκα και εμπλέκονται στην αναδίπλωση χρωματίνης και στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης επηρεάζοντας την κυτταρική ανάπτυξη και τη πρόκληση κυτταρικής απόπτωσης (Wang et al, 2010). Χαρακτηριστικές τέτοιες πρωτεΐνες αποτελούν ο SATB, ο SMAR1, η Numa, ο SAF-A και ο SAF-B. Ο SATB πχ, είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που εκφράζεται κυρίως στον θύμο αδένα και συμμετέχει στην ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των T-λεμφοκυττάρων. Ενώ ο παράγοντας SMAR1 είναι μια πρωτεΐνη που στρατολογεί σύμπλοκα τροποποίησης της χρωματίνης με διάφορους τρόπους όπως αλληλεπιδρώντας με απακετυλάσες και με αυτό το τρόπο καταστέλλει την έκφραση της κυκλίνης D και όταν φωσφορυλιωθεί

ενεργοποιεί τον παράγοντα p53. Επίσης, η πρωτεΐνη Numa αποτελεί βασικό συστατικό των μεσοφασικών κυττάρων καθώς συμμετέχει στην επανασυναρμολόγηση του πυρήνα μετά τη μίτωση ενώ ο SAF-A συμμετέχει στο πακετάρισμα των hnRNPs σε ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια. Ανάμεσα στις πρωτεΐνες που προσδέονται στις περιοχές S/MAR κατατάσσονται και οι πρωτεΐνες SAFB, οι οποίες αποτελούν το θέμα της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

1.5. Οι παράγοντες SAFB

Η οικογένεια των παραγόντων SAFB αποτελείται από τρία μέλη. Τον SAFB1, ο οποίος είναι ο καλύτερα μελετημένος, τον SAFB2 και τον SLTM (SAFB-Like Transcription Modulator). Η πρωτεΐνη SAFB1 απομονώθηκε και κλωνοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1996, με βάση την ιδιότητά της να προσδέεται στις περιοχές S/MAR, ως πρωτεΐνη SAF-B. (Renz et al, 1996). Συγχρόνως, αναγνωρίστηκε και από μια άλλη ομάδα ερευνητών προσδεδεμένος στον υποκινητή της πρωτεΐνης hsp27 από τους οποίους ονομάστηκε HET (Hsp27- ERE-TATA binding protein) (Oesterreich et al, 1997). Αργότερα βρέθηκε να αλληλεπιδρά με hnRNPs και ονομάστηκε HAP (hnRNP A1 associated protein). Κάποια από τα πρώτα χαρακτηριστικά της ήταν ότι αποτελείται από δύο βασικές περιοχές τις οποίες ενώνει μία όξινη περιοχή και ότι το ισοηλεκτρικό της σημείο είναι 8,8. Το δεύτερο μέλος της οικογένειας, ο SAFB2 παρουσιάζει 74% ομολογία με τον SAFB1 σε αμινοξικό επίπεδο. Τα γονίδια των SAFB1 και SAFB2 βρίσκονται στο ίδιο χρωμόσωμα, χωρίζονται από έναν υποκινητή 490bp και έχουν αντιπαράλληλη κατεύθυνση. (Εικόνα 5)



Εικόνα 5: Χρωμοσωμική διάταξη των γονιδίων SAFB1 και SAFB2

Το τρίτο μέλος της οικογενείας των SAFB είναι ο SLTM ο οποίος χαρακτηρίστηκε σχετικά πρόσφατα και δεν έχει μελετηθεί περαιτέρω (Chan et al, 2007). Ο SLTM εμφανίζει 34% ομολογία με τον SAFB1 και 36% με τον SAFB2. Βρίσκεται σε διαφορετικό χρωμόσωμα από τους άλλους δύο, στο 15^ο.

Γενικότερα, πρόκειται για πρωτεΐνες που συνδέονται σε DNA και RNA και παίζουν ρόλο σε διάφορες σημαντικές διαδικασίες.

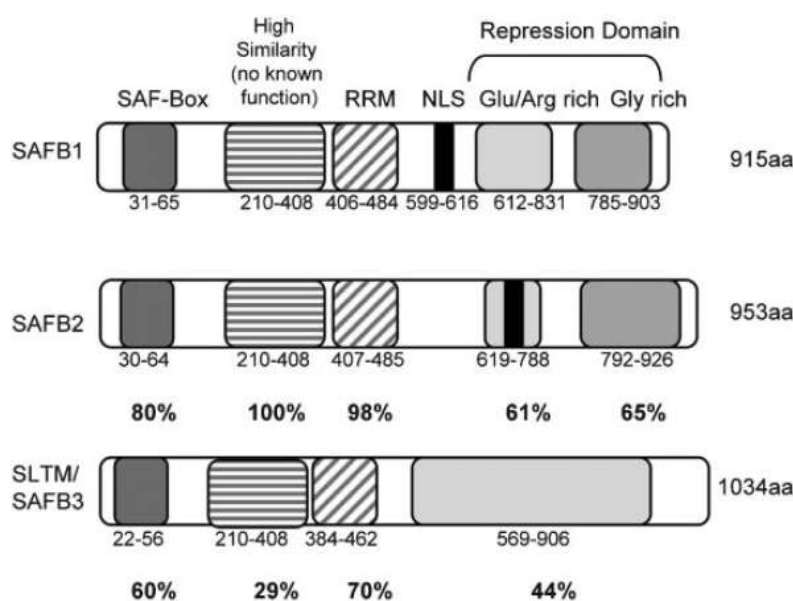
1.5.1. Δομή των παραγόντων SAFB

Οι παράγοντες SAFB είναι μεγάλες πρωτεΐνες (> 100kDa) που αποτελούνται από περιοχές εξαιρετικά συντηρημένες μεταξύ των μελών της (Εικόνα 6). Το αμινοτελικό τους άκρο περιέχει μια συντηρημένη περιοχή υπεύθυνη για την πρόσδεση των πρωτεϊνών στις περιοχές S/MAR του DNA, η οποία ονομάζεται SAF-box (Scaffold Attachment Factor - box) ή SAP domain (SAF-A/B; acinus; and PIAS domain) και είναι σημαντική για την πρόσδεση στις πλούσιες σε AT, S/MAR περιοχές.

Η κεντρική περιοχή περιλαμβάνει την περιοχή RRM (RNA Recognition Motif) γνωστή για τη πρόσδεση σε RNA και μονόκλωνο DNA και το σήμα πυρηνικού εντοπισμού NLS (Nuclear Localization Signal).

Ανάμεσα στο SAF-box και την RRM περιοχή βρίσκεται μια περιοχή με 100% ομολογία ανάμεσα στον SAFB1 και SAFB2, αλλά όχι στον SLTM (29% ομολογία), στην οποία δεν έχει αποδοθεί ακόμη κάποια λειτουργία. Το μόνο που είναι γνωστό βιβλιογραφικά για αυτή τη περιοχή είναι ότι υπάρχουν δυο λυσίνες που σουμοϋλιώνονται (K231,K294) (Garee et al, 2011).

Το καρβοξυτελικό άκρο αποτελείται από δύο περιοχές. Η μια είναι πλούσια σε διπεπτίδια αργινίνης/ γλουταμινικού οξέος (R/E) και η άλλη είναι μια περιοχή πλούσια σε διπεπτίδια αργινίνης/γλυκίνης (R/G). (Garee et al, 2010) Ο SLTM διαφέρει πέρα από την κοινή περιοχή μεταξύ SAFB1 και SAFB2 αρκετά και στο καρβοξυτελικό άκρο. Η περιοχή RE είναι περιοχή ομο- και έτεροδιμερισμού μεταξύ των τριων πρωτεινων SAFB1, SAFB2 και SLTM (Sergeant et al,2007 και δικά μας αδημοσίευτα αποτελέσματα). Το καρβοξυτελικό άκρο εμπλέκεται στις περισσότερες αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες.



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση της οικογένειας SAFB (Garee et al,2010).

1.5.2. Υποκυτταρικός εντοπισμός των 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.

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 έχει βρεθεί να συνυπάρχει με την RNA πολυμεράση II και ορισμένες SR πρωτεΐνες όπως ο SC35 καθώς και με διάφορες ισομορφές της πρωτεΐνης hnRNP με τις οποίες αλληλεπιδρά (Nayler et al, 1998). 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 στρες ελαττώνει την μεταγραφή των περισσότερων γονιδίων και αναστέλλει την ωρίμανση του mRNA στα κύτταρα (Chiodi et al, 2000).

Έχουν πραγματοποιηθεί πειράματα που αφορούν τη μελέτη της απουσίας έκφρασης του SAFB1 σε ποντίκια (Ivanova et al, 2005). Ο φαινότυπος των knockout ποντικών SAFB1^{-/-} έχει συσχετιστεί με αυξημένη θνησιμότητα των εμβρύων. Όσα ποντίκια επιβιώνουν παρουσιάζουν καθυστερημένη ανάπτυξη και χαμηλά επίπεδα IGF1, ενώ τα θηλυκά και αρσενικά παρουσιάζουν υπογονιμότητα και στειρότητα αντίστοιχα. Ο φαινότυπος αυτός υποδεικνύει ότι ο SAFB1 απαιτείται για την φυσιολογική ανάπτυξη του ποντικού η οποία όμως δεν αναπληρώνεται από τη δράση του SAFB2, δηλαδή ο SAFB2 δεν μπορεί να “αντικαταστήσει” τη δράση του SAFB1. Επίσης μελέτες σε knockout ποντίκια για τον SAFB2 έδειξαν ότι παρουσιάζουν πιο ήπιο φαινότυπο από αυτά στα οποία απουσιάζει ο SAFB1 (Jiang et al, 2015). Συγκεκριμένα, όλα τα έμβρυα επιβίωσαν και δεν είχαν προβλήματα στην ανάπτυξη και στη γονιμότητα αλλά παρουσίασαν αυξημένο βάρος όρχεων που σχετίζεται με αυξημένο αριθμό κυττάρων Sertoli. Συλλογικά, 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 προτείνουν ότι παρόλο ο SAFB1 και ο SAFB2 μοιράζονται περιοχές με υψηλή ομολογία

μεταξύ τους, φαίνεται ότι οι δύο αυτές πρωτεΐνες έχουν διαφορετικές λειτουργικές ιδιότητες (Sergeant et al, 2006).

Το τρίτο μέλος της οικογένειας των SAFB, ο SLTM, εντοπίζεται στο εσωτερικό του πυρήνα αλλά όχι στους πυρηνίσκους και σε μεγάλη έκταση συνεντοπίζεται με τον SAFB1 (Chan et al, 2007).

1.5.3. Λειτουργίες των 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. Η πιο γνωστή λειτουργία του είναι ο ρόλος του στη καταστολή της μεταγραφής. Ο SLTM δεν είναι ιδιαίτερα μελετημένος πέρα από μια εργασία στην οποία έδειξαν ένα πιθανό ρόλο του στη γονιδιακή έκφραση και απόπτωση (Chan et al, 2007)

A. SAFB και χρωματίνη

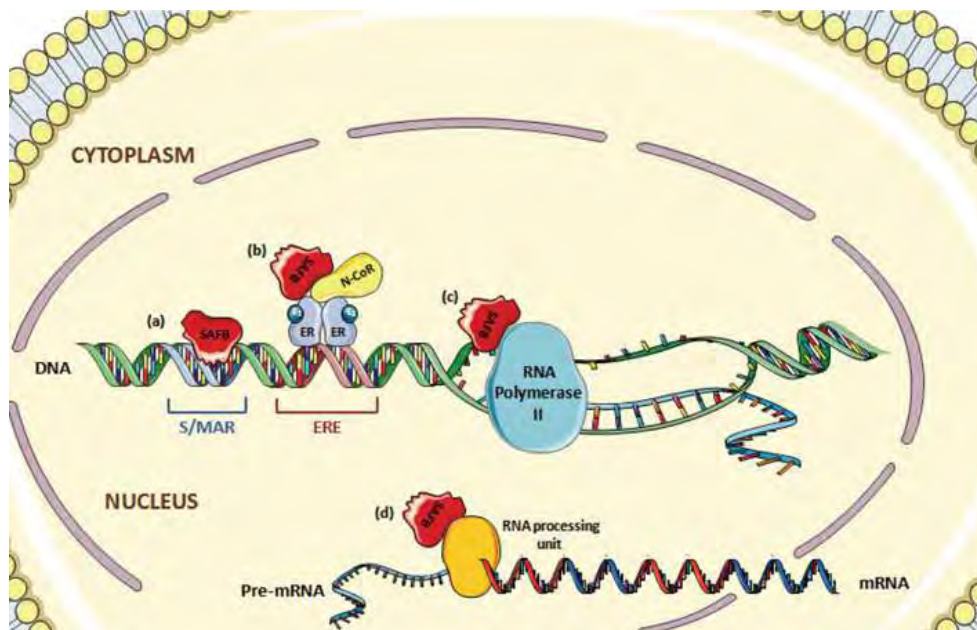
Ο SAFB1 απομονώθηκε βάσει της ιδιότητας του να αναγνωρίζει και να προσδένεται άμεσα σε αλληλουχίες των περιοχών S/MAR του DNA, οι οποίες διαμεσολαβούν στην δέσμευση της χρωματίνης στην πυρηνική μήτρα. Έτσι ο SAFB1 θεωρείται ότι συμβάλλει στη ρύθμιση της οργάνωσης της χρωματίνης μέσω πρόσδεσής του στις περιοχές S/MAR, οι οποίες επίσης είναι υπεύθυνες για την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (Renz, Fackelmayer, 1996). Η ιδιότητα του SAFB1 να αναγνωρίζει και να προσδένεται στις συγκεκριμένες περιοχές επιβεβαιώθηκε και από την Dr Oesterreich, η οποία έδειξε ότι ο SAFB1 δεσμεύεται στον υποκινητή του γονιδίου της hsp27 και συγκεκριμένα σε ένα πλαίσιο TATA, το οποίο θεωρήθηκε ότι αποτελεί περιοχή S/MAR (Oesterreich et al, 1997). Επιπλέον, αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη CHD1 η οποία εμπλέκεται στην οργάνωση της χρωματίνης και συμμετέχει στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA.

B. SAFB και μεταγραφή

Οι SAFB είναι γνωστοί κυρίως για τη δράση τους ως καταστολείς της μεταγραφής. Ο SAFB1 ανακαλύφθηκε από την ικανότητα του να προσδένεται και να καταστέλλει τον υποκινητή του γονιδίου της hsp27 ο οποίος διαθέτει ένα στοιχείο ERE (estrogen response element). Έτσι μετά από σειρά πειραμάτων δείχθηκε πως ο SAFB1 συνδέεται στον υποδοχέα των οιστρογόνων α (Estrogen Receptor α , ER α) και καταστέλλει τη μεταγραφική του ενεργότητα. (Oesterreich 2000, Townson 2004). Η κατασταλτική του δράση βρέθηκε να οφείλεται στο καρβοξυτελικό τμήμα του SAFB1. Παρόμοιες

παρατηρήσεις έχουν αναφερθεί και για τον SAFB2, γι' αυτό και οι δύο έχουν κατηγοριοποιηθεί ως συν-καταστολείς του ERα (Townson et al, 2003). Αναφέρονται ως συν-καταστολείς καθώς έχει βρεθεί ότι ο NCoR (Nuclear Hormone Receptor Corepressor), ο οποίος έχει χαρακτηριστεί ως συν-καταστολέας του ERα, αλληλεπιδρά άμεσα με το καρβοξυ-τελικό άκρο των SAFB1/2 και η απουσία του μειώνει την κατασταλτική δράση τους. Μάλιστα έχει δειχθεί ότι ο SAFB1 συνυπάρχει σε λειτουργικά σύμπλοκα με τον NCoR, διαμεσολαβώντας στην ταυτόχρονη αλληλεπίδραση του με την HDAC3 (Εικόνα 7). Αυτή η παρατήρηση υπέδειξε ότι η ικανότητα καταστολής των SAFB1/2 παρουσιάζει εν μέρει HDAC-εξαρτώμενη δράση, διαμεσολαβούμενη όμως από τον NCoR. Πέρα από τον υποδοχέα οιστρογόνων α έχουν βρεθεί αρκετοί ακόμη πυρηνικοί υποδοχείς στους οποίους ο SAFB1 ασκεί κατασταλτική δράση όπως οι PPARα, PPARβ, PPARγ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor), FXRa (Farsenoid X Receptor), VDR (Vitamin D Receptor), SF1 (Steroidogenic factor) κ.α (Debril et al,2005). Επίσης βρέθηκε ότι μπορεί να ρυθμίζει τη μεταγραφή ανεξάρτητα από τις αλληλεπιδράσεις του με τους πυρηνικούς υποδοχείς.

Σε μερικές περιπτώσεις η δράση των SAFB δεν είναι μόνο κατασταλτική. Μπορεί να δρουν θετικά όπως ο SAFB1 για παράδειγμα, που είναι θετικός ρυθμιστής της διαφοροποίησης των μυών, καθώς όταν αυτός απουσιάζει, αναστέλλεται η έκφραση των γονιδίων των σκελετικών μυών (Hernandez,2013).



Εικόνα 7 : Απεικόνιση των τριών γνωστών λειτουργιών του SAFB1 και SAFB2 σε κυτταρικό επίπεδο. Αναπαράσταση: Α. της δέσμευσης στις περιοχές S/MARs. Β. της λειτουργίας τους στη ρύθμιση των γονιδίων που διαμεσολαβείται από την άμεση στρατολόγησή τους στην περιοχή των

υποκινητών ή την έμμεση αλληλεπίδρασή τους με άλλους παράγοντες μεταγραφής C + D. της αλληλεπίδρασή τους με πρωτεΐνες που σχετίζονται με τις διεργασίες του RNA. (Hong et al,2012)

Γ. SAFB και μάτισμα και μεταβολισμός RNA

Από πολύ νωρίς βρέθηκε πως οι SAFB1 και SAFB2 παίζουν σημαντικό ρόλο στο μάτισμα και κυρίως στο συντονισμό μεταγραφής-ματίσματος. Το 1998 βρέθηκε ότι μπορεί να αλληλεπιδρά και να σχηματίζει σύμπλοκο με τις αλληλουχίες S/MAR του DNA, με SR πρωτεΐνες και με την RNA πολυμεράση II και προτάθηκε ότι μπορεί να λειτουργεί ως μοριακή βάση για τη συναρμολόγηση ενός «μεταγραφικού συμπλόκου» στην περιοχή των ενεργά μεταγραφόμενων γονιδίων. (Nayler et al,1998) Στην ίδια εργασία δείχθηκε ότι όταν ο SAFB1 υπερεκφραστεί επηρεάζει τη επιλογή θέσεων ματίσματος. Επίσης έχειδειχθεί ότι ο SAFB1 αλληλεπιδρά με τη κινάση SRPK, που φωσφορυλιώνει τους παράγοντες ματίσματος SR (Nikolakaki et al,2001). Η αλληλεπίδραση μάλιστα αυτή καταστέλλει τη δράση της SRPK1 επηρεάζοντας έτσι τη φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων της και άρα το μάτισμα (πρωτεΐνες SR) και την αρχιτεκτονική της χρωματίνης (Lamin B Receptor, LBR) (Tsianou et al, 2009)

Δ. SAFB και απόκριση στο στρες

Η ταυτοποίηση του SAFB1 ως ρυθμιστή της hsp27 οδήγησε στην υπόθεση ότι ίσως εμπλέκεται στη κυτταρική απόκριση στο στρες. Πράγματι δείχθηκε ότι όταν προκληθεί θερμικό στρες στο κύτταρο ο SAFB μετακινείται σε πυρηνικά σωμάτια του στρες (nSBs, nuclear stress bodies) ενώ φυσιολογικά, ως πρωτεΐνη της πυρηνικής μήτρας εντοπίζεται κυρίως στα ινίδια της χρωματίνης (PF, Perichromatin fibrils), Στα nSBs συνεντοπίζεται με τον HSF1 (Heat Shock Factor 1) και την Sam68 (Hartmann et al, 1999)

Βλάβες στο DNA μπορούν να προκληθούν σε διάφορες χρονικές στιγμές ακόμη και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες στο κύτταρο. Πολλές πρωτεΐνες που συνδέονται στο RNA έχειδειχθεί να παίζουν ρόλο στην επιδιόρθωση βλαβών στο DNA, μια εκ των οποίων είναι και ο SAFB1. Σε πειράματα δείχθηκε να στρατολογείται γρήγορα σε σπασίματα της διπλής έλικας και στις δυο αλυσίδες (double strand breaks) όπου χρειάζεται για την επαρκή φωσφορυλίωση της ιστόνης H2AX η οποία με τη σειρά της θα στρατολογήσει τα σύμπλοκα επιδιόρθωσης του DNA.

Ε. SAFB και απόπτωση

Με πειράματα ανοσοφθορισμού έχειδειχθεί ότι επάγοντας την απόπτωση με σταυροσπορίνη, ο SAFB1 εντοπίζεται αρχικά εκτός από τον πυρήνα, και στους πυρηνίσκους και έπειτα από δυο ώρες εντοπίζεται σε περι-πυρηνισκικές δομές δακτυλίου

(peri-nucleolar ring-like structure) (Lee et al,2007). Επίσης, σε πειράματα υπερέκφρασης του SLTM σε ποικίλες κυτταρικές σειρές δείχθηκε να προκαλεί απόπτωση (Chan et al, 2007).

1.6. SAFB και καρκίνος

Ο καρκίνος είναι ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας που παρατηρούνται σήμερα στις αναπτυγμένες χώρες. Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα τα οποία αυξάνονται, διαιρούνται και πεθαίνουν με έναν αυστηρά ελεγχόμενο τρόπο, τα καρκινικά κύτταρα διαφέρουν διότι συνεχίζουν να διαιρούνται ανεξέλεγκτα. Όσον αφορά τον μεταβολισμό τους σύμφωνα με το φαινόμενο Warburg τα περισσότερα καρκινικά κύτταρα παράγουν κυρίως ενέργεια μέσω γλυκόλυσης ακόμη και σε αερόβιες συνθήκες με ταχύτητα 200 φορές μεγαλύτερη από αυτή των φυσιολογικών κυττάρων. Υπάρχουν ενδείξεις για αλληλεπιδράσεις των SAFB με διάφορα μόρια που συμμετέχουν στην ογκογένεση, γεγονός που καταδεικνύει έναν σημαντικό ρόλο των SAFB στον καρκίνο, κυρίως στον καρκίνο του στήθους και του προστάτη. Οι SAFB1/SAFB2 έχουν περιγραφεί σαν πιθανές ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες καθώς έχει συσχετιστεί το γεγονός πως σε ασθενείς με καρκίνο του στήθους έχει παρατηρηθεί απώλεια της ετεροζυγωτίας στο χρωμόσωμα 19p13.2-3 (Oesterreich et al, 2001)και πως σε διάφορους όγκους δεν ανιχνεύτηκε καν η πρωτεΐνη SAFB1 (Hammerich-Hille et al, 2010). Μελέτες έδειξαν ότι υψηλά επίπεδα SAFB1 έχουν συσχετιστεί με αναστολή κυτταρικής ανάπτυξης σε καρκινικά σειρές μαστού και ανευπλοειδία (Townson et al, 2000). Σε πρόσφατη εργασία βρέθηκε ότι χαμηλή έκφραση των SAFB συσχετίστηκε με χαμηλότερη πιθανότητα επιβίωσης ασθενών διαγνωσμένους με καρκίνο παχέος εντέρου. Αυτό συμβαίνει διότι όταν ο SAFB είναι αρνητικά ρυθμισμένος (down – regulated) αυξάνεται η ενεργοποίηση του μονοπατιού NF-κΒ, το οποίο έχει βρεθεί ότι συμμετέχει στην ανάπτυξη διάφορων ειδών καρκίνου αλλά ο τρόπος με τον οποίο αλληλεπιδρούν είναι ακόμη άγνωστος. Επίσης, εξωγενής έκφραση των SAFB ανέστειλε την ανάπτυξη μετάστασης και in vivo και in vitro (Jiao et al, 2017) .

Σκοπός

Οι παράγοντες SAFB (Scaffold Attachment Factor B) είναι πρωτεΐνες της πυρηνικής μήτρας και απομονώθηκαν με βάση το χαρακτηριστικό τους να προσδένονται σε στοιχεία S/MAR. Είναι μεγάλες πρωτεΐνες που αποτελούνται από εξαιρετικά συντηρημένες περιοχές μεταξύ των μελών της. Συνδέονται σε DNA, RNA και διάφορες πρωτεΐνες και πρόκειται για πολυλειτουργικές πρωτεΐνες που επηρεάζουν διάφορες σημαντικές λειτουργίες όπως τη μεταγραφή το μάτισμα και την επιδιόρθωση βλαβών του DNA.

Είναι γνωστό ότι οι όγκοι εμφανίζουν αυξημένους ρυθμούς στη πρόσληψη γλυκόζης. Επίσης, τα καρκινικά κύτταρα αυξάνονται ταχύτερα από ό,τι τα αιμοφόρα αγγεία που τα τρέφουν. Καθώς οι συμπαγείς όγκοι μεγαλώνουν, είναι ανίκανοι να οξυγονωθούν και να λάβουν αποτελεσματικά τα θρεπτικά τους στοιχεία όπως τη γλυκόζη. Επίσης οι SAFB έχουν χαρακτηριστεί ως ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες καθώς σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως στον καρκίνο του στήθους παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης. Σε μελέτες του εργαστηρίου Βιοχημείας έχει βρεθεί πως ο SAFB αποκρίνεται στην υποξία. Βρέθηκε επίσης ότι η επίδραση της στέρησης γλυκόζης σε κύτταρα HeLa προκαλεί μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων των SAFB1 και SAFB2. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι:

- 1 Να διερευνηθεί ο μηχανισμός με τον οποίο συμβαίνει η πτώση των πρωτεϊνικών επιπέδων των SAFB1 και SAFB2 υπό την έλλειψη γλυκόζης.
2. Να μελετηθεί με βιοπληροφορική ανάλυση ο λόγος ύπαρξης της «κοινής», συντηρημένης κατά 100% περιοχής μεταξύ των SAFB1 και SAFB2.

2 Υλικά και μέθοδοι

2.1. Υλικά

2.1.1. Κυτταρικές σειρές

Χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα HeLa. Τα κύτταρα αυτά προέρχονται από καρκινικά κύτταρα του επιθηλίου του τραχήλου της μήτρας

2.1.2. Επίδραση αναστολέων

Κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν ορισμένοι αναστολείς βασικών κυτταρικών διαδικασιών. Για την αναστολή της μεταγραφής χρησιμοποιήθηκε ακτινομυκίνη D, για την αναστολή της μετάφρασης το κυκλοεξιμίδιο, ενώ για την αναστολή πρωτεασώματος το MG132.

Αναστολέας	Συγκέντρωση	Εταιρία
Ακτινομυκίνη	1μg/ml	Applichem
Κυκλοεξιμίδιο	10μg/ml	Applichem
MG132	10μM	Cayman

Πίνακας 1 .

2.1.3. Χημικά

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών Sigma Aldrich (USA), AppliChem (USA), Merck (Germany), Biosolve (France), Becton Dickinson and Company (USA).

2.1.4. Εκκινητές

Στα πειράματα προσδιορισμού της έκφρασης του mRNA με RT-PCR του γονιδίου SAFB1 χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εκκινητές:

Εμπρόσθιος: 5'-GGGTGACGACGGAAGTGGAGA-3'

Ανάστροφος : 5'-ATGCGTTGTTTCGCGTTCCTG-3'

2.1.5. Αντισώματα

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη παραπάνω μελέτη είναι τα εξής

- Μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-SAFB από ορό ποντικού σε αραίωση 1:2000
- Μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-tubulin από ορό ποντικού σε αραίωση 1:10000
- Αντισώματα συζευγμένα με υπεροξειδάση (για ανοσοαποτύπωση) (SantaCruz) έναντι της IgG από ποντικό, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως δεύτερα αντισώματα.

2.1.6. Απομόνωση RNA(kit)

Για την απομόνωση RNA χρησιμοποιήθηκε το kit NucleoZol της εταιρείας Macherey-Nagel.

2.2. Μέθοδοι

2.2.1. Κυτταροκαλλιέργειες

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε ανθρώπινα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας (HeLa). Οι κυτταρικές σειρές HeLa καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) της εταιρείας Biosera το οποίο περιείχε 10% ορό εμβρύου βωός (FBS) και τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη και επώαστηκαν σε κλίβανο στους 37°C σε 5% CO₂.

Για τη συνθήκη της στέρησης γλυκόζης χρησιμοποιήθηκε έτοιμο θρεπτικό της εταιρείας Gibco, στο οποίο δεν υπήρχε γλυκόζη και προστέθηκε πυροσταφυλικό νάτριο (1mM) και αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη. στη συνέχεια προστέθηκε ο ορός αφότου προηγήθηκε η διαπίδυση του σε PBS(8,1mM Na₂HPO₄, 1,47mM KH₂PO₄, 138mM NaCl, 2,67mM KCl, pH 7,4) ώστε να αποκλειστεί το ενδεχόμενο ύπαρξης αναλόγων γλυκόζης. Τέλος ο ορός αποστειρώθηκε με φίλτρο 0,2 μm.

2.2.2. Παρασκευή ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από τα κύτταρα

Για τη παρασκευή ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από τα κύτταρα πραγματοποιήθηκε λύση με δυο τρόπους, είτε με lysis buffer (25mM Tris-Cl pH 7,5, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 5mM MgCl₂, 1mM DTT, 2mM PMSF) είτε με 2x laemmli buffer. (Η σύσταση του 1x LB: 62,5mM Tris-HCl pH 6,8, 2,3% SDS, 10% glycerol, 0,05% Bromophenol Blue, 25mM DTT)

Με Lysis buffer:

- Τα κύτταρα ξεπλένονται τρεις φορές με PBS
- Αποκολλώνται από το τρυβλίο με 150μl διαλύματος Lysis buffer σε πιάτο διαμέτρου 10 cm. Ο αναστολέας PMSF (αναστολέας πρωτεασών) προστίθεται στο διάλυμα λύσης πριν τη χρήση.
- Το λύμα μεταφέρεται σε σωληνάκι των 1,5 ml.
- Επώάζεται για 20 λεπτά στον πάγο (vortex στα 10 λεπτά).
- Τοποθετούνται 40μl σε σωληνάκι των 1,5 ml ως total και ακολουθεί προσθήκη σε αυτά 40μl Laemmli buffer, 4 μl DTT.

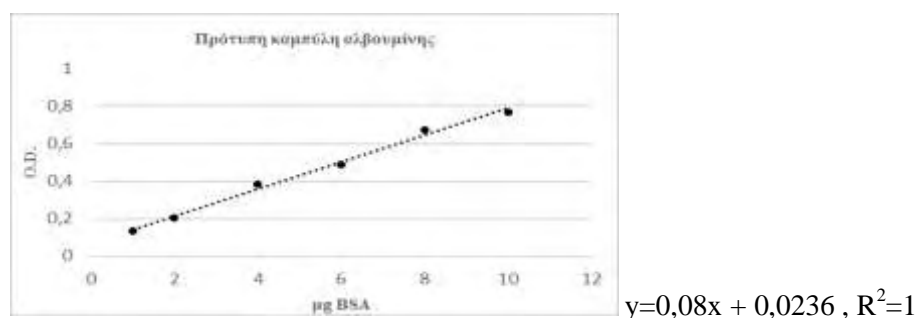
➤ Τα υπόλοιπα φυγοκεντρώνονται στα 12000 rpm για 15 λεπτά στους 4°C , συλλέγεται το υπερκείμενο και προστίθεται το διάλυμα επιφόρτωσης Laemmli buffer και ακολουθεί θέρμανση στους 95°C για 5 λεπτά.

Με 2x Laemmli buffer:

- Πλύση των κυττάρων τρεις φορές με κρύο PBS.
- Με scraper ακολουθεί η αποκόλληση κυττάρων. Συλλογή κυττάρων σε σωληνάκι των 1,5 ml.
- Ογκομέτρηση και προσθήκη ίσου όγκου Laemmli Buffer 2X.
- Χρήση υπέρηχων μέσω ειδικής συσκευής (3 παλμοί διάρκειας 2 δευτερολέπτων με ενδιάμεσες παύσεις των 10 δευτερολέπτων).
- Θέρμανση στους 95°C, για 5 λεπτά.

2.2.3. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.

Η μέθοδος Bradford βασίζεται σε συγκεκριμένες ιδιότητες της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G250. Η χρωστική αυτή κάτω από όξινες συνθήκες παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 465 nm, ενώ παρουσία πρωτεϊνών σχηματίζει με αυτές ένα σύμπλοκο που απορροφά στα 595 nm. Το διάλυμα Bradford που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα είναι της εταιρίας Biorad. Από το αντιδραστήριο αυτό χρησιμοποιούνται 200 μl αραιωμένα με νερό σε τελικό όγκο 1 ml είτε σαν τυφλό, είτε με προσθήκη 2 μl διαλύματος πρωτεϊνών, για φωτομέτρηση στα 595 nm, όπου το σύμπλοκο εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση. Ο συντελεστής απορρόφησης του συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής παραμένει σταθερός για μεγάλο εύρος συγκέντρωσης και έτσι μπορούμε να υπολογίσουμε τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης μας με βάση τη μετρούμενη οπτική πυκνότητα (O.D.). Ο υπολογισμός αυτός γίνεται με τη χρήση της πρότυπης καμπύλης αναφοράς με αλβουμίνη (BSA). (Εικόνα 8)



Εικόνα 8 : Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού συγκέντρωσης πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα εργασία.

2.2.4. Διαπίδυση

Η αρχή της μεθόδου είναι η μετακίνηση ενός μορίου μεταξύ δύο διαλυμάτων μέσω ημιδιαπερατής μεμβράνης έως ότου εξισωθεί η συγκέντρωσή τους στα δυο διαλύματα.

- Το δείγμα τοποθετείται σε ημιδιαπερατή μεμβράνη (Spectra-Por MWCO6000-8000 της Spectrum).
- Η μεμβράνη με το δείγμα εισάγονται στη συνέχεια στο διάλυμα διαπίδυσης, το οποίο είναι PBS (8,1mM Na₂HPO₄, 1,47mM KH₂PO₄, 138mM NaCl, 2,67mM KCl, pH 7,4) σε όγκο περίπου 100 φορές περισσότερο από τον συνολικό όγκο δείγματος που έχει εισαχθεί στην μεμβράνη διαπίδυσης.
- Το δείγμα επωάζεται υπό συνεχή ανάδευση του διαλύματος για 16 ώρες στους 4⁰C.
- Το δείγμα συλλέγεται από το εσωτερικό της μεμβράνης και φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στις 10000xg στους 4⁰C, για την απομάκρυνση τυχόν ιζήματος.

2.2.5. Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE πρωτεϊνών

Αποτελεί μία τεχνική η οποία χρησιμεύει για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα. Στην ηλεκτροφόρηση αυτή, χρησιμοποιείται SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) ως ανιονικός αποδιατακτικός παράγοντας. Η χρήση του συγκεκριμένου παράγοντα έχει διπλό ρόλο. Αφενός συμβάλλει στην αποδιάταξη των πρωτεϊνικών αλυσίδων και αφετέρου προσδίδει σε κάθε πρωτεΐνη ενιαίο αρνητικό ηλεκτρικό φορτίο, ανάλογο του μοριακού της βάρους. Για την παρασκευή της πηκτής για την SDS-PAGE χρησιμοποιήθηκαν οι συσκευές της Bio-Rad.

- Ανάμεσα στις πλάκες της ηλεκτροφόρησης προστίθεται πρώτα 10% πηκτής διαχωρισμού (separating gel) : 10% ακρυλαμίδιο, 0,375mM Tris-Cl pH 8,8, 2 mM EDTA, 0,1% SDS, 0,04% υπερθειικό αμμώνιο και 0,02% TEMED σε H₂O αφήνοντας περίπου 2 cm από την κορυφή των πλακών για την πηκτή επιστοιβάξης (stacking gel): 4,5% ακρυλαμίδιο, 0,125mM Tris-Cl pH 6,8, 2mM EDTA, 0,1% SDS, 0,08% υπερθειικό αμμώνιο, 0,04% TEMED σε H₂O.
- Πάνω από την πηκτή επιστοιβάξης τοποθετείται χτενάκι και όταν η πηκτή πήξει οι πλάκες τοποθετούνται στη συσκευή.
- Η συσκευή γεμίζει με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (50mM Tris-Cl pH 8,3, 0,38M glycine, 2mM EDTA, 0.1% SDS).
- Τα δείγματα φορτώνονται με τη βοήθεια της σύριγγας Hamilton, στα οποία έχει προηγουμένως προστεθεί διάλυμα LB και έχουν θερμανθεί στους 95⁰C για 5 λεπτά.
- Ηλεκτροφόρηση στα 120 V μέχρι η χρωστική του διαλύματος φόρτωσης να φτάσει στο τέλος της πηκτής.

2.2.6. Ανοσοαποτύπωση (Western blotting)

- Το gel, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και 4 διηθητικά χαρτιά επωάζονται σε διάλυμα Tris-Borate pH 8,5 για 10 λεπτά.
- Τοποθετούνται στη συσκευή ημι-ξηρής μεταφοράς (semi-dry transfer, Biorad) τα παραπάνω υλικά με την εξής σειρά: τα δύο διηθητικά χαρτιά, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, η πηκτή και τέλος τα άλλα δύο διηθητικά χαρτιά.
- Αφαιρούνται με προσοχή τυχόν φυσαλίδες που μπορεί να έχουν σχηματιστεί.
- Ρυθμίζεται τη συσκευή στα 10V για 65 λεπτά, όπου και πραγματοποιείται η μεταφορά των πρωτεϊνών από το gel στη μεμβράνη. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εμβαπτίζεται για 1-2 λεπτά σε διάλυμα Ponceau S (0,5% w/v Ponceau, 1% οξικό οξύ), προς χρωματισμό των πρωτεϊνών. Ακολουθεί πλύση με H₂O για μεγαλύτερη ευκρίνεια των ζωνών και έπειτα πλύση με PBS-0,1% Tween 20, υπό συνεχή ανάδευση ~10 λεπτά, έως τον πλήρη αποχρωματισμό της μεμβράνης.
- Η μεμβράνη επωάζεται για 1 ώρα σε διάλυμα κορεσμού (5% γάλα σε σκόνη σε PBS-0,1% Tween 20).
- Ακολουθεί πλύση 3 φορές για 5 λεπτά σε PBS-0,1% Tween 20 και επώαση ολονύκτια 4°C, υπό συνεχή ανάδευση με το 1^ο αντίσωμα (αραιωμένο σε κατάλληλη συγκέντρωση σε 5 % γάλα σκόνη σε PBS-0,1% Tween 20)
- Την επόμενη μέρα πραγματοποιείται πλύση 3 φορές για 5 λεπτά σε PBS-0,1% Tween 20 και επώαση για 1 ώρα με 2^ο αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση, έναντι της IgG από κουνέλι ή ποντίκι (αραιωμένο σε κατάλληλη συγκέντρωση σε 5 % γάλα σκόνη σε PBS-0,1% Tween 20). Στο τέλος ακολουθεί η εμφάνιση της ανοσοαποτύπωσης με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας:
- Προσθήκη 30μl 3% H₂O₂ και 100μl διαλύματος κουμαρικού οξέος (6,8 mM σε DMSO) σε 10ml διαλύματος λουμινόλης (1,25mM σε 0,1M Tris-Cl pH 8,5).
- Επώαση της μεμβράνης με το παραπάνω μείγμα για 1 λεπτό.
- Το σήμα χημειοφωταύγειας ανιχνεύεται και φωτογραφίζεται με τη χρήση ειδικού ηλεκτρονικού εξοπλισμού της Uvitec Alliance

2.2.7. Απομόνωση RNA από κύτταρα

Η απομόνωση ολικού RNA πραγματοποιείται από κύτταρα που αναπτύσσονται σε τρυβλίο διαμέτρου 10cm, όταν αυτά καλύπτουν το 70-80% της επιφάνειας του τρυβλίου. Για την απομόνωση ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο NucleoZOL και εφαρμόστηκε

το πρωτόκολλο που προτείνει η εταιρεία με μικρές παραλλαγές. Πρόκειται για ένα φαινολικό αντιδραστήριο που επιτυγχάνει την απομόνωση ολικού RNA. Η διαδικασία έχει ως εξής.

- Αφαίρεση θρεπτικού και πλύση με PBS.
- Προσθήκη 400μl Nucleozol για λύση και ακολουθεί μεταφορά του λύματος των κύτταρων σε eppendorf.
- Προσθήκη 160μl H₂O οπότε παρατηρούνται οι δύο φάσεις, υδατική και φαινολική και στη συνέχεια αναμιγνύονται με ισχυρή ανάδευση με vortex για 15 s. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5-15 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση στα 12000g για 15 λεπτά. Παρατηρούνται τρεις φάσεις, μια υπερκείμενη υδατική που περιέχει το RNA, μια ενδιάμεση που περιέχει το DNA και μια φαινολική που περιέχει πρωτεΐνες. Τοποθέτηση σε νέο σωληνάκι 1 ml από το υπερκείμενο και προσθήκη σε αυτό 100% ισοπροπανόλη σε αναλογία 1:1 και ανάδευση ώστε να κατακρημνιστεί το RNA. Επώαση 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκέντρηση στα 12000g για 10 λεπτά. Το RNA εμφανίζεται ως λευκό ίζημα. Αφαίρεση υπερκείμενου.
- Δυο πλύσεις με 500μl αιθανόλη 75%
- Φυγοκέντρηση στα 6000g για 3 λεπτά. Απομάκρυνση της αιθανόλης.
- Προσθήκη 25-30μl H₂O απαλλαγμένο από RNAση (RNase free) για επαναδιαλυτοποίηση ιζήματος.
- Μέτρηση στο nanodrop της εταιρίας Thermo Scientific για τη ποσοτικοποίηση σε απορρόφηση στο υπεριώδες (260nm)

2.2.7.1. Σύνθεση cDNA

Η σύνθεση του cDNA πραγματοποιείται με το PrimeScript RT reagent K της Takara. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- Το RNA αφήνεται να ξεπαγώσει στον πάγο. Παράλληλα ξεπαγώνουν τα ακόλουθα διαλύματα: Quantiscript Reverse Transcriptase, Quantiscript RT buffer, RT primer mix και RNase free water.
- Στην αντίδραση χρησιμοποιείται 1 μg RNA. Η αντίδραση ετοιμάζεται όπως φαίνεται στον πίνακα 2.

Template RNA	1μg (x μl)
Random primer mix	2μl
10x buffer	2μl
Reverse Transcriptase	1μl
Nuclease free water	20-x μl
Τελικός όγκος	20μl

Πίνακας 2.

Τα δείγματα επωάζονται σε θερμοκυκλοποιητή στις παρακάτω συνθήκες:

- 5min: 25°C (σύνδεση των εκκινητών)
- 1h: 42°C (ανάστροφη μεταγραφή)
- 20min: 65°C (απενεργοποίηση)
- 4°C (ψύξη)

2.2.7.2. Real time PCR

Στη παρούσα εργασία η real-time PCR πραγματοποιήθηκε σε σύστημα LightCycler® 96 System (Roche) με τη χρήση του αντιδραστηρίου Syber Green mix (KapaBiosystems) το οποίο περιέχει την Taq πολυμεράση, τη φθορίζουσα χρωστική Sybr Green I, MgCl₂, dNTPs και σταθεροποιητές. Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές για το cDNA του γονιδίου SAFB1, αλλά και αυτό της β-ακτίνης που χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων, καθώς τα επίπεδα mRNA της τελευταίας δεν επηρεάζονται στις πειραματικές συνθήκες που εξετάζονται.

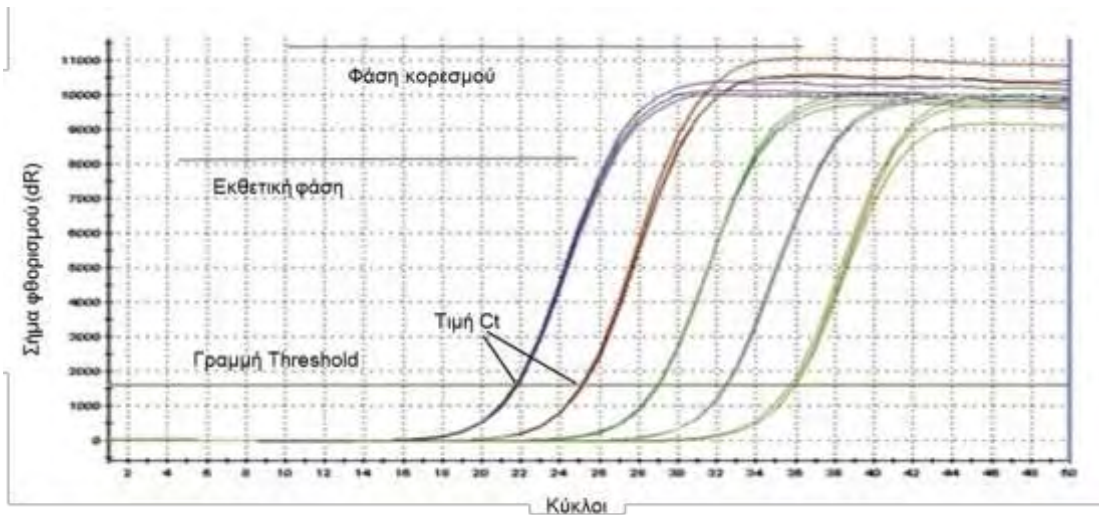
Παρασκευάζονται δύο μείγματα για τα δύο διαφορετικά γονίδια που περιέχουν Sybr Green Mix και τους εμπρόσθιους και ανάστροφους εκκινητές σε τελική συγκέντρωση 0.5 pMol/μl ο καθένας. Για το διάλυμα χρησιμοποιείται αποστειρωμένο H₂O απαλλαγμένο από RNάσες και DNάσες (ThermoFisher Scientific). Σε 9 μl μείγματος προσθέτουμε 1 μl cDNA. Κάθε συνθήκη ελέγχεται εις τριπλούν, ενώ χρησιμοποιούνται ως αρνητικοί μάρτυρες αφενός δείγμα της αντίδρασης σύνθεσης cDNA σε απουσία ανάστροφης μεταγραφάσης και αφετέρου δείγμα με H₂O αντί για cDNA. Οι συνθήκες της αντίδρασης είναι οι ακόλουθες:

1. 50°C για 2 λεπτά – ενεργοποίηση του SYBR Green.
2. 95°C για 10 λεπτά – ενεργοποίηση της Taq DNA πολυμεράσης.
3. 95°C για 15 δευτερόλεπτα – αποδιάταξη του δίκλωνου cDNA.

4. 60°C για 1 λεπτό – σύνδεση εκκινητών και επιμήκυνση.
5. Επανάληψη σταδίων 3 και 4 για 39 φορές.
6. 60-90°C έως την ολοκλήρωση της αντίδρασης – αποδιάταξη των προϊόντων

2.2.7.3. Ανάλυση αποτελεσμάτων Real-Time PCR και ποσοτικοποίηση της έκφρασης mRNA.

Το διάγραμμα της καμπύλης ενίσχυσης παρουσιάζει σε πραγματικό χρόνο την αύξηση των δίκλωνων μορίων DNA. Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε: εκθετική φάση και τη φάση κορεσμού. Η μεταβολή των φάσεων σχετίζεται με την σταδιακή εξάντληση των αντιδραστηρίων (π.χ. dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση) και τη συσσώρευση μορίων που δρουν ανασταλτικά για την αντίδραση. Έτσι ενώ στην εκθετική φάση ο διπλασιασμός του αρχικού προϊόντος γίνεται ιδανικά, ακολούθως η αντίδραση επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητα της, και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεών τους. Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης. Σημαντική παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή Ct (threshold cycle). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background). Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος (Bustin et al., κλ2005; Kubista et al., 2006).



Εικόνα 9 : Καμπύλη ενίσχυσης cDNA δειγμάτων με ποσοτική Real-Time PCR. Ανατύπωση και προσαρμογή στα ελληνικά: από www.bioline.com

Η ενίσχυση των προϊόντων ακολουθείται από την αποδιάταξή τους σε ένα στάδιο αυξανόμενης θερμοκρασίας. Καθώς η θερμοκρασία τήξης των δίκλωνων μορίων επηρεάζεται, κυρίως, από το μήκος τους και το περιεχόμενό τους σε γουανίνη και κυτοσίνη, το σημείο τήξης T_m (θερμοκρασία στην οποία το 50% των ζευγών βάσεων του κλώνου έχει αποδιαταχθεί) είναι χαρακτηριστικό του κάθε προϊόντος. Από την άλλη, με την αποδιάταξη των κλώνων, η χρωστική SYBR Green αποδεσμεύεται και ο φθορισμός μειώνεται. Αυτό μας δίνει τη δυνατότητα ποιοτικής ανάλυσης των προϊόντων της Real-Time PCR μέσω μιας καμπύλης τήξης. Η καμπύλη αυτή εμφανίζει τον φθορισμό σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία και σε επόμενο στάδιο το λόγο της μεταβολής του φθορισμού προς τη μεταβολή της θερμοκρασίας ($-dF/dT$). Η ανάλυση της καμπύλης τήξης βοηθάει στον έλεγχο της ειδικότητας και της καθαρότητας των προϊόντων αντίδρασης ενίσχυσης, καθώς αποκαλύπτει πιθανό διμερισμό εκκινητών ή επιμόλυνση με ξένο DNA. Τα μόρια DNA που ενισχύθηκαν στοχευμένα κατά την αντίδραση, αναμένονται να συμβαδίζουν και να συσσωρεύονται σε κοινή κορυφή στη καμπύλη τήξης. Αντίθετα, επιμολύνσεις θα δώσουν μεταβολή φθορισμού σε πολλαπλά σημεία τήξης.

Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων mRNA γίνεται με τη μέθοδο της $\Delta\Delta C_t$ (διαφορά της διαφοράς των κύκλων). Για κάθε δείγμα που αντιστοιχεί σε συγκεκριμένη συνθήκη, υπολογίζεται αρχικά η διαφορά C_t (ΔC_t) του γονιδίου στόχου (SAFB1) και της β -ακτίνης και στη συνέχεια από το ΔC_t κάθε δείγματος αφαιρείται το ΔC_t του δείγματος μάρτυρα. Στη συνέχεια υπολογίζεται η δύναμη με βάση το δύο $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ που εκφράζει τη μεταβολή των επιπέδων mRNA του γονιδίου στόχου σε σχέση με το δείγμα μάρτυρα.

Μελέτη της συντηρημένης περιοχής των SAFB1 και SAFB2. Χρήση βάσεων δεδομένων βιοπληροφορικής.

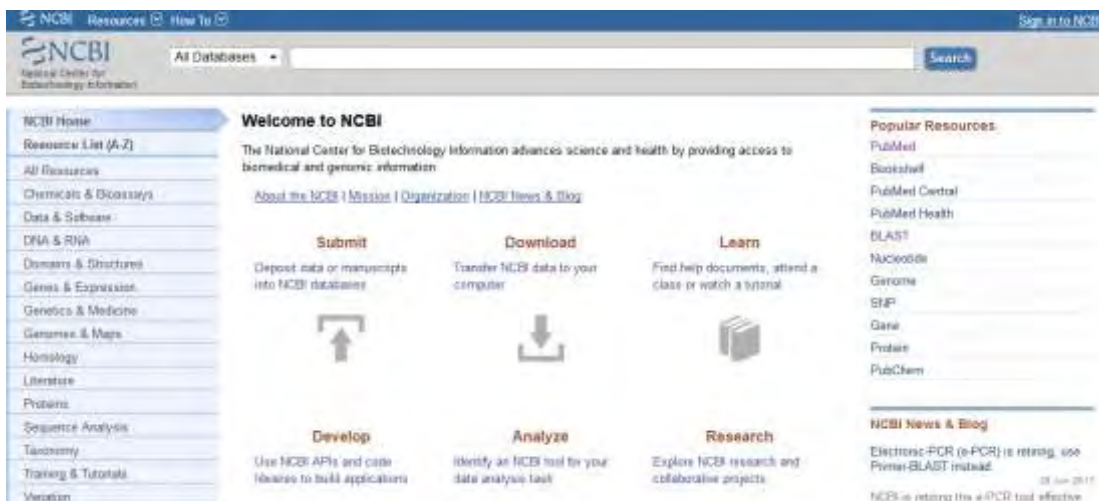
2.3. Υλικά και Μέθοδοι

Για να πραγματοποιηθεί η βιοπληροφορική ανάλυση αυτού του τμήματος της εργασίας, χρησιμοποιήθηκαν μια σειρά από βάσεις δεδομένων για τα οποία θα δοθεί μια σύντομη εισαγωγή και ο τρόπος με τον οποίο ανακτήθηκαν τα δεδομένα.

2.3.1. The National Center for Biotechnology Information (NCBI)

Το Εθνικό Κέντρο Πληροφοριών για τη Βιοτεχνολογία (NCBI) στεγάζει μια σειρά από βάσεις δεδομένων που σχετίζονται με τη βιοτεχνολογία και την βιοιατρική. Σημαντικές βάσεις δεδομένων είναι η Genbank που περιλαμβάνει πληροφορίες για αλληλουχίες DNA και η Pubmed, μια βιβλιογραφική βάση δεδομένων για βιοιατρική βιβλιογραφία. Το NCBI έχει δημιουργήσει περιηγητές και για είδη οργανισμών για τα οποία υπάρχουν λίγες η και καθόλου γονιδιωματικές ακολουθίες (Baxevanis, 2016).

Το BLAST είναι ένας αλγόριθμος που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της ομοιότητας αλληλουχίας μεταξύ αλληλουχιών όπως DNA και πρωτεϊνών. (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)



Εικόνα 10 : Ιστοσελίδα εθνικού κέντρου πληροφοριών βιοτεχνολογίας –NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.)

2.3.2. Βάση δεδομένων Ensembl -Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org>)

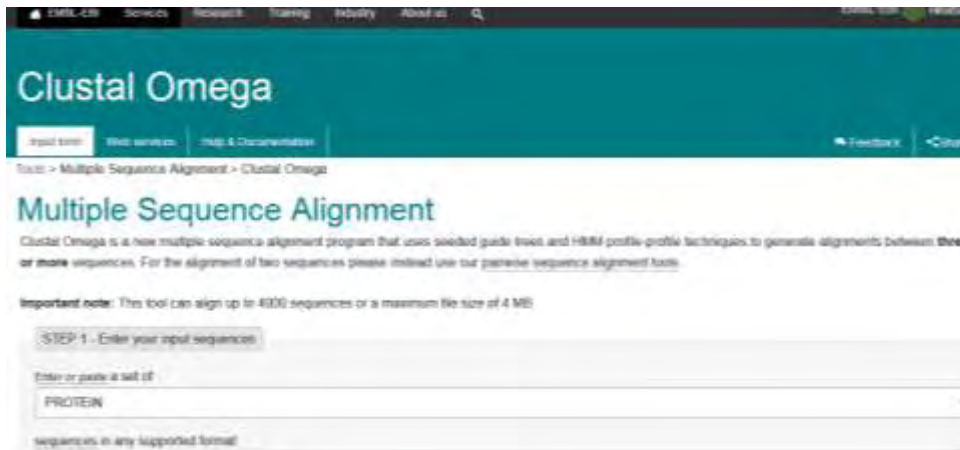
Πρόκειται για μια βάση δεδομένων που ξεκίνησε το 1999, λίγα χρόνια πριν ολοκληρωθεί η αποκρυπτογράφηση ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος. Σκοπός του project ήταν η μελέτη ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος (3 δισεκατομμύρια ζεύγη βάσεων) και η δημοσιοποίηση αυτής της μελέτης ενώ το 2000 και μετά προστέθηκε πληθώρα γονιδιωμάτων διαφορετικών ειδών στη βάση αυτή. Η Ensembl Genome Browser περιλαμβάνει πάνω από 30 είδη, η πλειονότητα των οποίων είναι σπονδυλωτά, συμπεριλαμβανόμενου του ανθρώπου, του ποντικού, του αρουραίου, του zebrafish καθώς και μια γκάμα οργανισμών που χρησιμοποιούνται ευρέως σε ερευνητικές μελέτες.



Εικόνα 11 : Αρχική σελίδα του Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>)

2.3.3. Βάση δεδομένων Clustal omega (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo)

Αυτή η βάση δεδομένων χρησιμοποιείται για πολλαπλή στοίχιση περισσότερων από τριών αλληλουχιών. Οι ακολουθίες προς στοίχιση μπορεί να είναι είτε DNA, είτε RNA, είτε πρωτεΐνες. Επίσης μπορούν να μελετηθούν εξελικτικές σχέσεις μέσα από κλαδογράμματα και φυλογράμματα.



Εικόνα 12: Βάση δεδομένων Clustal Omega. (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo)

2.3.4. Consensus coding sequence database (CCDS)

Η CCDS είναι μια βάση δεδομένων που περιέχει πληροφορίες για τις κωδικές περιοχές του ανθρώπινου γονιδιώματος και του ποντικού. Συνεργάζεται με διάφορες βάσεις δεδομένων όπως η EBI και NCBI. Ο μακροπρόθεσμος στόχος του CCDS είναι η κατηγοριοποίηση των σχολιασμών του συνόλου των γενετικών παραλλαγών που έχουν βρεθεί μέχρι τώρα.



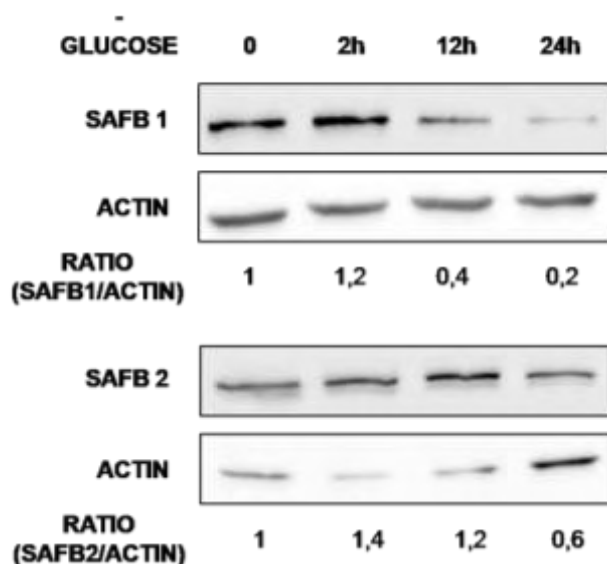
Εικόνα 13: Εύρεση κωδικών αλληλουχιών μέσω της βάσης δεδομένων CCDS (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/CCDS/CcidsBrowse.cgi>)

3. Αποτελέσματα

3.1. Επίδραση στέρησης γλυκόζης

Γενικά, η στέρηση γλυκόζης αποτελεί μια κυτταρική συνθήκη που συναντάται σε πολλές ασθένειες, όπως σε ισχαιμίες και καρκίνο και συμβαίνει λόγω ανεπαρκούς αγγειογένεσης. Επίσης είναι γνωστό ότι κάτω από στρεσογόνες συνθήκες η οργάνωση της χρωματίνης αλλάζει, συμβάλλοντας στην γενωμική σταθερότητα του κυττάρου. Ο SAFB1 έχει μελετηθεί κάτω από την επίδραση θερμικού σοκ, όπου παρατηρήθηκε η υπο-πυρηνική μετακίνηση του σε δομές που ονομάζονται stress-induced sub-nuclear bodies (SNBs) (βλέπε εισαγωγή). Επίσης ο SAFB έχει προταθεί ως ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη σε καρκίνους όπως του μαστού, του προστάτη κ.α (εισαγωγή 1.6) Κρίθηκε λοιπόν σκόπιμη η μελέτη των παραγόντων SAFB και ως απόκριση σε μια μεταβολική στρεσογόνα συνθήκη, όπως αυτή της στέρησης θρεπτικών συστατικών, κυρίως της γλυκόζης, συνθήκη που απαντάται σε γρήγορα αναπτυσσόμενους στερεούς όγκους .

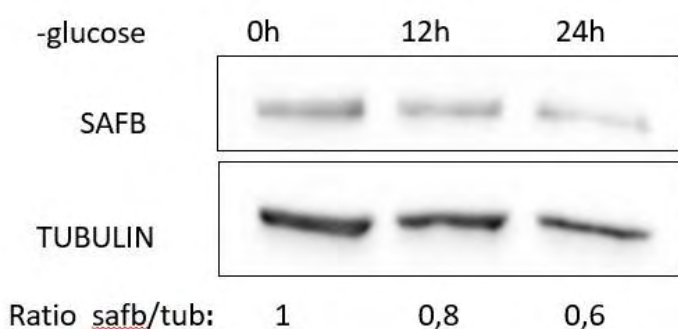
Πρώτο βήμα στη πειραματική διαδικασία ήταν η επαλήθευση των προηγούμενων αποτελεσμάτων του εργαστηρίου σύμφωνα με τα οποία ο SAFB1 και ο SAFB2 μειώνονται κατά τη συνθήκη στέρησης της γλυκόζης (Εικόνα 14). Στην εικόνα παρατηρούμε ότι τα επίπεδα του SAFB1 μειώνονται ταχύτερα και περισσότερο απ' ότι αυτά του SAFB2 μέχρι τις 24 ώρες στέρησης γλυκόζης.



Εικόνα 14: Επίδραση στέρησης γλυκόζης από προηγούμενα πειράματα στο εργαστήριο με αντίσωμα που διαχωρίζει τις δυο πρωτεΐνες SAFB1-2 (Δρακούλη Σ., 2017)

Προκειμένου να επαναλάβουμε και να επιβεβαιώσουμε τα προηγούμενα αποτελέσματα του εργαστηρίου, κύτταρα HeLa αναπτύχθηκαν όπως περιγράφηκε ήδη στα Υλικά και

Μέθοδοι (Y&M 2.1.7.) και υποβλήθηκαν σε στέρηση γλυκόζης για 12 και για 24 ώρες και το αποτέλεσμα της ανοσοαποτύπωσης(Y&M 2.2.6) φαίνεται στην εικόνα 15. Σαν control χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM (25 mM D-γλυκόζη). Για την εκτέλεση του πειράματος χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα α-SAFB το οποίο αναγνωρίζει μια συγκεκριμένη περιοχή στις πρωτεΐνες SAFB1 και SAFB2 και δεν διαχωρίζει μεταξύ των δυο πρωτεϊνών. Ως δείκτης ισοφορτώματος χρησιμοποιήθηκε η τουμπουλίνη.

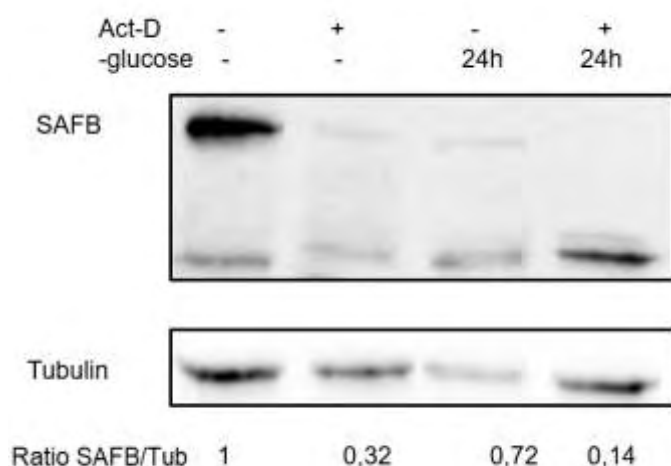


Εικόνα 15: Επίδραση στέρησης γλυκόζης στα επίπεδα του ενδογενούς SAFB και της τουμπουλίνης σε ολικά εκχυλίσματα κύτταρων HeLa που καλλιεργήθηκαν για 12 και 24 ώρες.

Παρατηρούμε ότι τα αποτελέσματα αυτά (Εικόνα 15) συνάδουν με τα προηγούμενα αποτελέσματα του εργαστηρίου (Εικόνα 14). Οι τιμές της ποσοτικοποίησης που αντιστοιχούν στα πρωτεϊνικά επίπεδα των SAFB χρησιμοποιώντας το αντίσωμα που αναγνωρίζει και τις δυο πρωτεΐνες SAFB έρχονται σε συμφωνία με αυτές καθενός ξεχωριστά (Εικόνα 14) καθώς μπορούν να αποτελούν κατά προσέγγιση μια μέση τιμή των τιμών (λόγος safb/actin) που βρέθηκαν μελετώντας τον καθένα ξεχωριστά.

3.2. Επίδραση ακτινομυκίνης D

Με σκοπό να διερευνηθεί αν η μείωση που παρατηρείται συμβαίνει σε μεταγραφικό επίπεδο χρησιμοποιήθηκε ένας αναστολέας του μηχανισμού της μεταγραφής, η ακτινομυκίνη D (Act-D). Κύτταρα HeLa προ-επωάστηκαν για μια ώρα με 1 μg/ml ActD (ακολούθως αφαιρέθηκε) και ακολούθησε επώαση σε κανονικές συνθήκες ή με στέρηση γλυκόζης για 24 ώρες. Στα τρυβλία που δεν τοποθετήθηκε ακτινομυκίνη τοποθετήθηκε ο διαλύτης της, το DMSO. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα των SAFB μελετήθηκαν με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης (εικόνα 16) Η παρουσία του αναστολέα της μεταγραφής επηρέασε τα επίπεδα των παραγόντων SAFB.

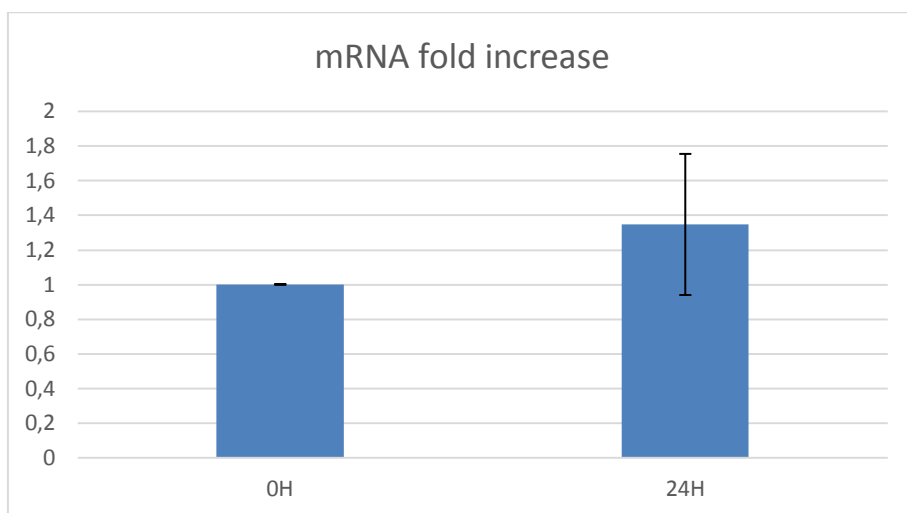


Εικόνα 16 : Επίδραση ακτινομυκίνης D για μια ώρα σε ολικά εκχυλίσματα κύτταρων HeLa που καλλιεργήθηκαν σε στέρηση γλυκόζης για 24 ώρες. Σαν control χρησιμοποιήθηκε η συνθήκη με πλήρες θρεπτικό μέσο χωρίς προσθήκη ακτινομυκίνης.

Με το συγκεκριμένο πείραμα διερευνήθηκε κατά πόσον με τη προσθήκη ακτινομυκίνης τα επίπεδα SAFB μειώνονται σε σχέση με τη μείωση που προκαλεί αποκλειστικά η στέρηση. Τα αποτελέσματα δείχνουν περαιτέρω μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων με τη χρήση του αναστολέα της μεταγραφής, οπότε εικάζουμε πως η μεταγραφή σαν διαδικασία πιθανόν να συμμετέχει στον μηχανισμό μείωσης των επιπέδων SAFB κατά τη στέρηση γλυκόζης. Εφόσον η στέρηση γλυκόζης και η επίδραση ακτινομυκίνης αποτελούν επιδράσεις που προκαλούν μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων SAFB, είναι δύσκολο να οδηγηθούμε σε συμπέρασμα. Αποφασίσαμε στη συνέχεια, να μελετήσουμε τα επίπεδα mRNA, με Real Time PCR για να εξακριβωθεί αν η μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης οφείλεται σε μείωση των επιπέδων mRNA των πρωτεϊνών. Στη συγκεκριμένη περίπτωση μπορούμε να παρακολουθήσουμε τον SAFB1 με ειδικούς εκκινητές.

3.3. Real time PCR

Τα αποτελέσματα της Real-Time PCR για τον SAFB1 ποσοτικοποιήθηκαν με τη μέθοδο της διαφοράς της διαφοράς των κύκλων ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) και εκφράζονται ως μεταβολή σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς (θρεπτικό πλήρες σε γλυκόζη συγκέντρωση γλυκόζης 25mM.) Σύμφωνα με αυτά, (Πίνακας 3) σε συνθήκη 24 ωρών στέρησης γλυκόζης τα επίπεδα mRNA του SAFB1 δε μεταβάλλονται σημαντικά. Επομένως, η μείωση των επιπέδων του SAFB1 υπό την επίδραση της στέρησης γλυκόζης δεν οφείλεται σε πτώση των επιπέδων mRNA του.

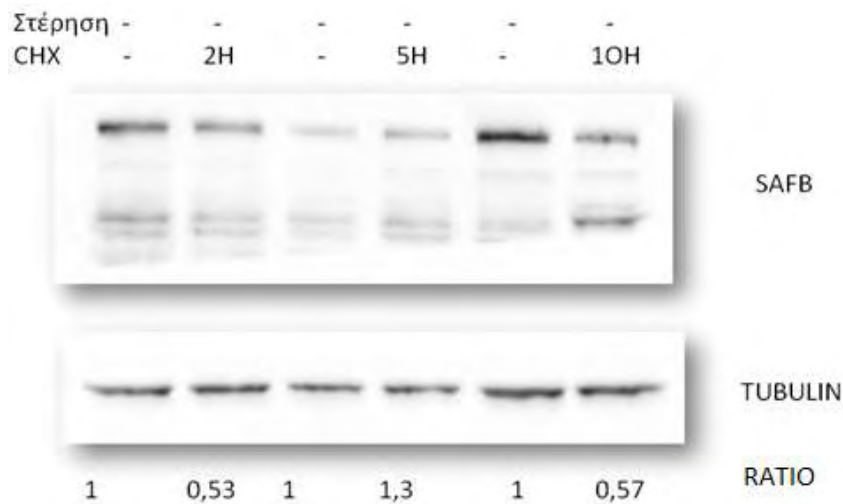


Πίνακας 3 : Επίπεδα mRNA του SAFB1 μετά από επίδραση στέρησης γλυκόζης για 24 ώρες. Δεν παρουσιάζεται στατιστικά σημαντική μεταβολή.

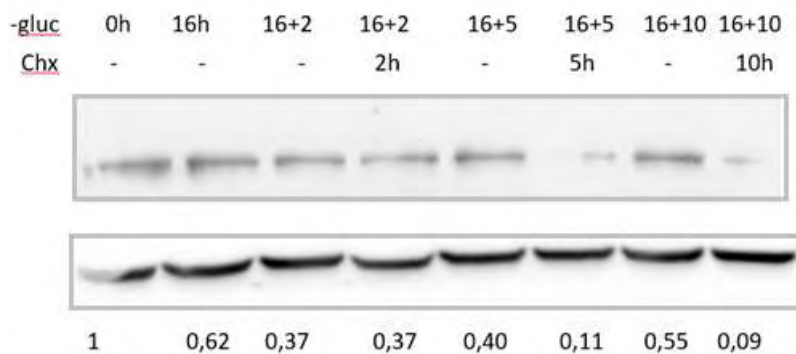
3.4. Επίδραση κυκλοεξιμιδίου

Δεδομένου ότι φάνηκε ότι τουλάχιστον για τον SAFB1, τα επίπεδα του mRNA του δεν μειώνονται κατά τη στέρηση γλυκόζης διερευνήσαμε αν η πτώση των πρωτεϊνικών επιπέδων SAFB συμβαίνει λόγω γρηγορότερης αποικοδόμησης των πρωτεϊνών κάτω από αυτές τις συνθήκες. Χρησιμοποιήθηκε ένας αναστολέας της μετάφρασης, το κυκλοεξιμίδιο (10mg/ml), προκειμένου να ανιχνευτούν τα επίπεδα πρωτεϊνών SAFB σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία χωρίς να παράγεται καινούρια πρωτεΐνη μέσω της μετάφρασης. αν επηρεάζεται ο χρόνος ημιζωής της πρωτεΐνης όταν εφαρμόζεται η στέρηση γλυκόζης . Τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία κυκλοεξιμιδίου για 2, 5 και 10 ώρες σε πλήρες θρεπτικό μέσο και σε μέσο χωρίς γλυκόζη. Στα control που δε περιέχουν κυκλοεξιμίδιο τοποθετήθηκε ο διαλύτης του, το DMSO.

Τα τρυβλία επώαστηκαν για 16 ώρες σε κανονικό θρεπτικό ή σε στέρηση γλυκόζης και στη συνέχεια επιδράσαμε με κυκλοεξιμίδιο για 2, 5 και 10 ώρες. Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης παρουσιάζονται στις εικόνες 17 και 18.

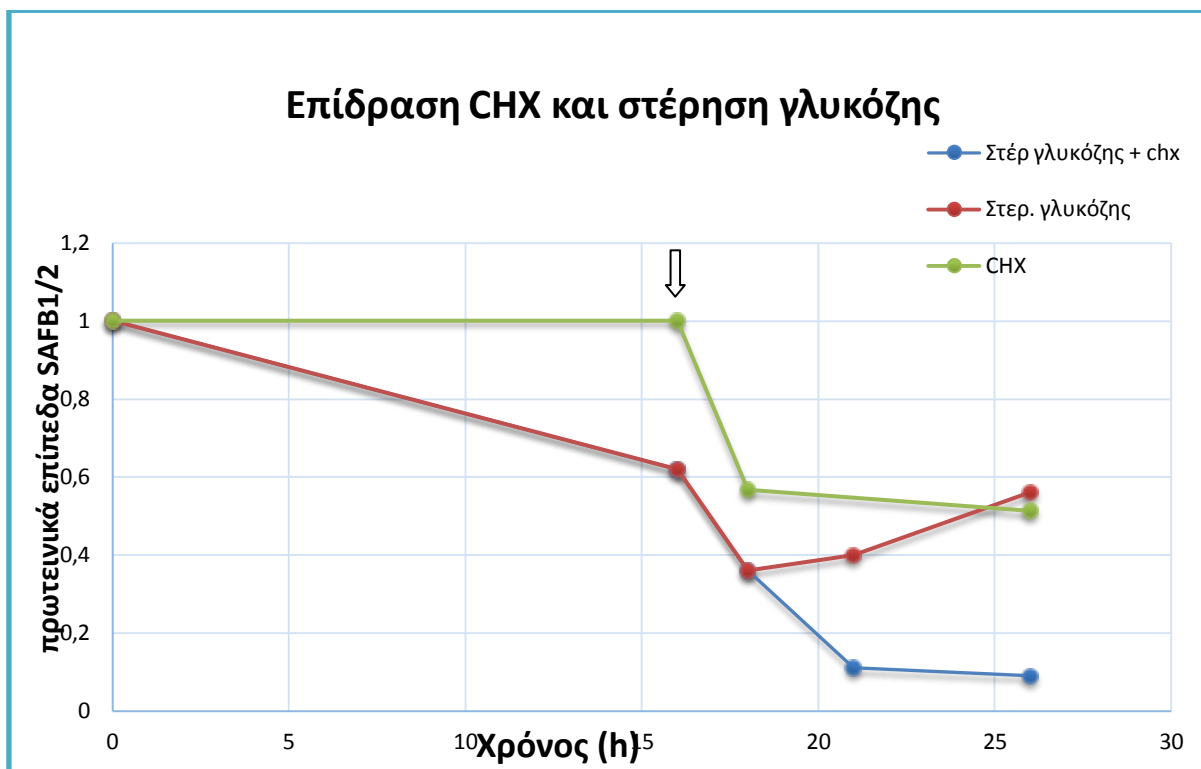


Εικόνα 17 : Ολικά εκχυλίσματα κυττάρων HeLa που αναπτύχθηκαν σε συγκέντρωση κυκλοεξιμιδίου 10 mg/ml για 2, 5 και 10 ώρες σε πλήρες θρεπτικό μέσο.



Εικόνα 18: Ολικά εκχυλίσματα κυττάρων HeLa που στερούνται τη γλυκόζη για 16 ώρες με επιπλέον προσθήκη κυκλοεξιμιδίου για 2, 5 και 10 ώρες.

Σαν συνθήκη, η προσθήκη κυκλοεξιμιδίου στα κύτταρα προκαλεί από μόνη της μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων SAFB περίπου στο μισό. Παρ' όλα αυτά το κυκλοεξιμιδίο σε κύτταρα που στερούνται γλυκόζης προκαλεί πολλαπλάσια μείωση στα επίπεδα των πρωτεϊνών SAFB (4-6 φορές). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων των εικόνων 17 και 18 παρουσιάζονται σε γράφημα στον πίνακα 4.

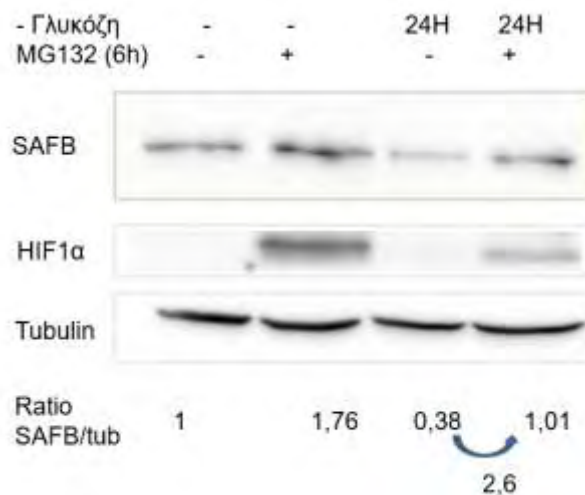


Πίνακας 4: Απεικόνιση πρωτεϊνικών επιπέδων SAFB μετά από επίδραση κυκλοεξιμιδίου σε κύτταρα αναπτυγμένα σε πλήρες θρεπτικό μέσο (πράσινο χρώμα), επίδραση στέρησης γλυκόζης (κόκκινο) και συνδυαστική επίδραση κυκλοεξιμιδίου σε κύτταρα που ήδη στερούνται τη γλυκόζη για 16 ώρες (μπλε). Με βέλος επισημαίνεται η στιγμή που τοποθετείται το κυκλοεξιμίδιο.

Τα αποτελέσματα αυτά, προτείνουν ότι είναι πιθανόν η πτώση των επιπέδων SAFB1/2 κάτω από τη στέρηση γλυκόζης να οφείλεται σε γρηγορότερη αποικοδόμηση τους.

3.5. Επίδραση MG132

Προκειμένου να εξετάσουμε την υπόθεση της γρηγορότερης αποικοδόμησης των SAFB στη συνθήκη της στέρησης γλυκόζης χρησιμοποιήσαμε τον αναστολέα MG132 που αναστέλλει τη πιο γνωστή οδό αποικοδόμησης πρωτεϊνών, αυτή του πρωτεασώματος. Επιδράσαμε με MG132 για 6 ώρες σε κύτταρα αναπτυγμένα σε πλήρες θρεπτικό μέσο και σε κύτταρα που στερούνται τη γλυκόζη για 24 ώρες. Το MG132 τοποθετήθηκε 6 ώρες πριν λήξει η 24ωρη στέρηση. Το αποτέλεσμα της ανοσοαποτύπωσης φαίνεται παρακάτω (Εικόνα 19)



Εικόνα 19: Πρωτεϊνικά επίπεδα SAFB μετά από επίδραση στέρησης γλυκόζης και MG132. Ως control χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα αναπτυγμένα σε πλήρες θρεπτικό μέσο. Για να δείχθει ότι ο αναστολέας είναι ενεργός χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι του HIF1α, μιας ενδεικτικής πρωτεΐνης που είναι γνωστό ότι αποικοδομείται στα πρωτεασώματα και δεν ανιχνεύεται σε συνθήκες νορμοξίας χωρίς τον αναστολέα.

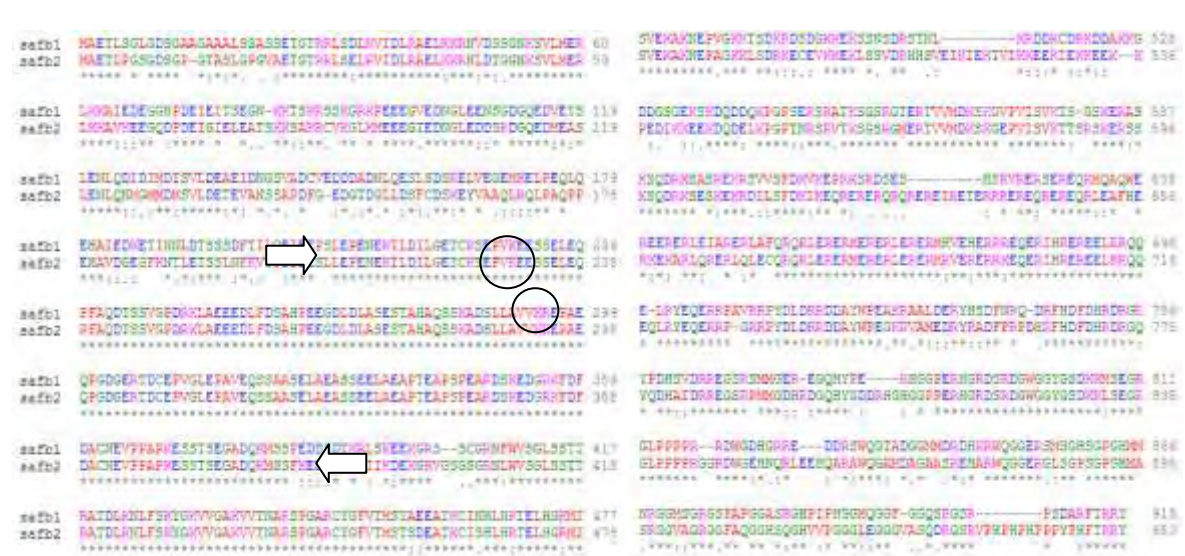
Παρατηρώντας την επίδραση του αναστολέα MG132 στη συνθήκη control, δηλαδή στα κύτταρα με πλήρες θρεπτικό μέσο παρατηρούμε μια αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των SAFB (1,76) που υποδηλώνει ότι αυτοί αποικοδομούνται στα πρωτεασώματα (Εικόνα 19). Επίσης στη στέρηση γλυκόζης τα πρωτεϊνικά επίπεδα των SAFB είναι 2,6 φορές μεγαλύτερα μετά τη προσθήκη του αναστολέα απ' ό,τι τα επίπεδα μόνο κατά τη συνθήκη στέρησης. Το γεγονός ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα των SAFB επανέρχονται πλήρως με τη συνθήκη στέρησης και αναστολέα υποδηλώνει ότι κατά τη στέρηση γλυκόζης οι SAFB οδηγούνται στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση και για αυτό το λόγο μειώνονται τα πρωτεϊνικά τους επίπεδα.

Αποτελέσματα βιοπληροφορικού μέρους

Έχει παρατηρηθεί από συγκρίσεις αλληλουχιών ότι υπάρχει μια περιοχή (210-382) όπου οι πρωτεΐνες SAFB1 και SAFB2 παρουσιάζουν σε μεγάλη έκταση 100% ταυτότητα μεταξύ τους, χωρίς να έχει βρεθεί η ίδια περιοχή, επικράτεια η μοτίβο και σε άλλες πρωτεΐνες. Το μόνο γνωστό για αυτή τη «συντηρημένη» περιοχή είναι ότι σε αυτή βρίσκονται δυο λυσίνες (βλέπε) που εφόσον σουμοϋλιωθούν στον SAFB1 επηρεάζουν τη δράση του ως συγκαταστολέα του υποδοχέα των οιστρογόνων. (Garee et al, 2011). Επίσης είναι γνωστό ότι αυτές οι δυο λυσίνες υπάρχουν και στις τρεις πρωτεΐνες της οικογένειας SAFB (Norman et al, 2016) . Παρόλα αυτά στην τρίτη πρωτεΐνη της οικογένειας, τον SLTM, η περιοχή αυτή δεν είναι συντηρημένη. (Εικόνα 6)

3.6. Σύγκριση πρωτεϊνικών αλληλουχιών SAFB1-SAFB2

Αρχικά, μέσω της βάσης δεδομένων Clustal έγινε η σύγκριση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών των SAFB1 και SAFB2. Συνολικά οι δυο πρωτεϊνικές αλληλουχίες παρουσίασαν 72,6% ομολογία. Μέσω της στοίχισης βρέθηκε μια περιοχή ομόλογη που περιλαμβάνει 172 αμινοξέα απολύτως όμοια (Εικόνα 20)



Εικόνα 20 : Σύγκριση πρωτεϊνικών αλληλουχιών SAFB1 και SAFB2 με το πρόγραμμα ClustalW. Με βέλη φαίνονται οι όμοιες αλληλουχίες ανάμεσα στις δυο πρωτεΐνες. Με κύκλο σημαίνονται οι δυο λυσίνες που σουμοϋλιώνονται.

	SAFB1	SAFB2
1: SAFB1PROTEIN	100.00	72.64
2: SAFB2PROTEIN	72.64	100.00

3.7. Στοιχίση των cDNA των SAFB1 και SAFB2

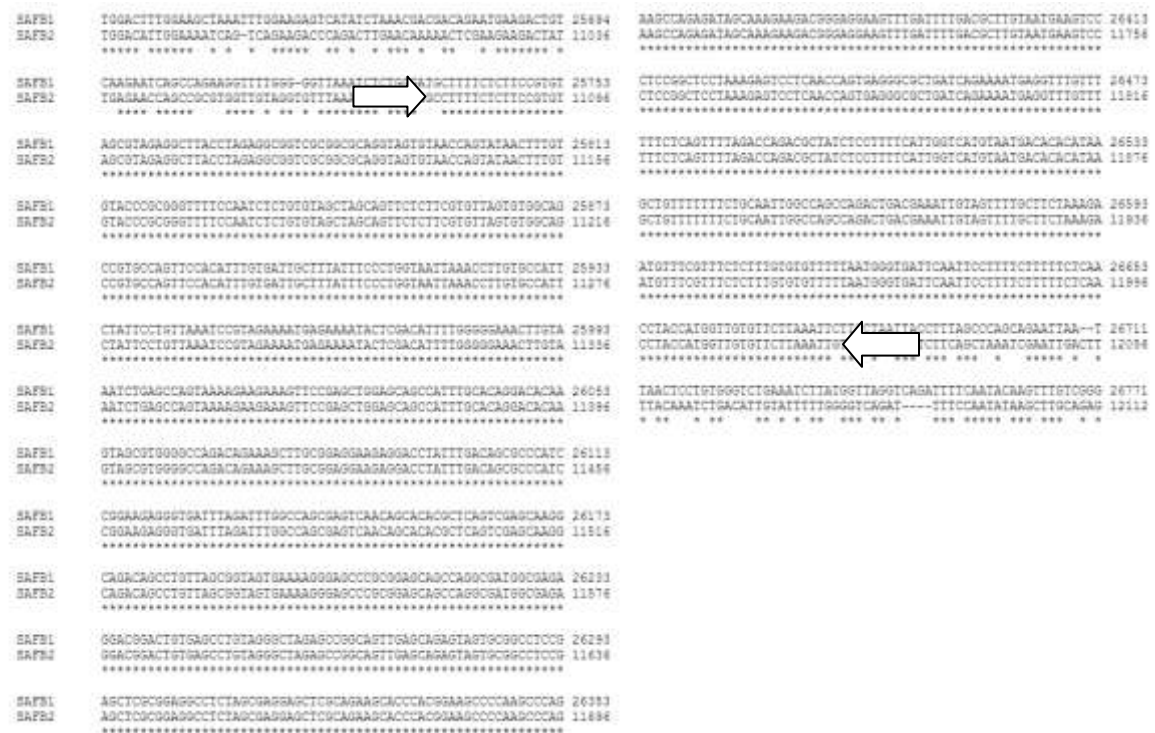
Διερευνήσαμε ποια είναι η ομολογία των δυο περιοχών μεταξύ SAFB1 και SAFB2 σε νουκλεοτιδικό επίπεδο. Επομένως πραγματοποιήθηκε σύγκριση των cDNA των δυο πρωτεϊνών με το πρόγραμμα Clustal και τα αποτελέσματα δίνονται στην εικόνα 33. Οι δυο κωδικές αλληλουχίες συνολικά παρουσίασαν 74,6% ομολογία σε επίπεδο cDNA και 100% ομολογία σε νουκλεοτιδικό επίπεδο στην περιοχή. Δεν εντοπίστηκε μεταλλαξη ούτε στο τρίτο νουκλεοτίδιο κανενός κωδικονίου, όπως συνήθως συμβαίνει λόγω του εκφυλισμού του γενετικού κώδικα. Στη συγκεκριμένη περιοχή βρέθηκαν 515 ταυτόσημα ζεύγη νουκλεοτιδίων μεταξύ των δυο αλληλουχιών (630-1145).

safb1	ATGGCGAGACTCTTCTCAGGCTCAGTGTGATCTTGGAGCGCGGGCGGGCGCTCTGAGC	60	safb1	GACGCTTGTAAATGAATCCCTCCGGCTCTTAAGAGTCTCTCAACAGTGAAGGCGCTGAT	1137
safb2	ATGGCGAGACTCTTCTCAGGCTCAGTGTGATCTTGGAGCGCGGGCGGGCGCTCTGAGC	57	safb2	GACGCTTGTAAATGAATCCCTCCGGCTCTTAAGAGTCTCTCAACAGTGAAGGCGCTGAT	1134
safb1	TCGCGCTCTCTCAGAGACCGGACCGCGCGCTCAGCGACTCGGAGTGTATCGATCTGGG	120	safb1	CAGAAATGAGTCTCTCCGAGAGTGTCTCGGATCAAAAAGGCTTCTCAAAGAGGAAA-	1196
safb2	CGGGCGTTTCGAGAGACTGGACAGGCGCGCTCAGCGAGTCTCGGAGTGTATCGATCTGGG	117	safb2	CAGAAATGAGTCTCTTAAGAGAGAAAAGATATAAGCCAGTCTAAAGATGAAAAA	1194
safb1	GCAGAGCTGAGGAACCGAAATGTGGACTCGAGCGCGCAACAGAGCGTGTGTATGGAGCGG	180	safb1	-----GGTCCAGCAGTGTGTGTAGAAATTTCTGGTGTATGTGGACTCTCTCTACAACC	1251
safb2	GCAGAGCTGAGGAACCGAAATGTGGACTCGAGCGCGCAACAGAGCGTGTGTATGGAGCGG	177	safb2	GGTCCGGTTCGAGCGGTTCTGTGTGGAACTGTGGTTCAGCGGGTGTGTCTCCACAACA	1254
safb1	CTGGAGAGGCAATTAAGATTAAGGTGTATCTCTGACGAAATGAAATACCTCCGAG	240	safb1	AGAGCTACAGATTTGAGGAACTTTTCAGCAAAATATGGAGGTGTGTGGCGCAAGTIT	1311
safb2	CTCAGAGAGCGGTTAAAGAGAGCGGGCAGAGTCTGTATTAATTTGGATCTGGATTAAG	237	safb2	CGCGCTACGATCTCAGAACTTTTCAGCAAGTATGGAGGTGTGTGGCGCAAGTITG	1314
safb1	GGAAACAGAA--CATCAAGGGTCTAGCAAGGGCCAAACCGAGAGAGAGGTT	297	safb1	GTGACAAATGCCCGAGTCTTGGAGCTCCGCTGTAGGGTTTGTCCAGATGTCCAGAGCA	1371
safb2	GCCACTAGCAGAAATAGCCACAGAGATGTGTAAAGGACTGAAGATGGAGAGGAAAGC	297	safb2	GTACAGAAAGCGCGCAGCGCGGGGGCTCGATGCTATGGATGTGTCCAGATGTCCAGATCT	1374
safb1	GTGGAGATACCGGCTGGAGAAATCTGTGGGATGGAGAGAGGATGTGGAGCGAGT	357	safb1	GAAGAGCCACAAATGCAATTAAGCACTCCACAGAGAGCGAGCTCCAGGAAAGATGATC	1431
safb2	ACAGAAATATGGCTGGAGAAATCTCCAGAGCGGGCAGAGAGAGATGTGGAGCGAGT	357	safb2	GACGAGCCAGCAAGTGCATCAGCGACTCTCCAGAGAGTACTGCGATGAGAGATGTATC	1434
safb1	CTGGAGAACTTCAGAGCATCGACATCATGGATCATGTGTGTGTATGAAAGCAAAAT	417	safb1	TCCGTGGAGAGCCAAAATGAACTGTGGGAAAGAAACTCTTACAAAAGAGAGCT	1491
safb2	CTGGAGAACTTCAGAGCATCGACATCATGGATCATGTGTGTGTATGAAAGCAAAAT	417	safb2	TCCGTAGAGAGCCAAAATGAACTGTGGGAAAGAAACTCTTCCAGCAAAAAGAGTGC	1494
safb1	GATAATGGAGAGTTCAGAGTGTGTGTGGAGAGCATGTGTGTATGAAAGCAAAAT	477	safb1	GACGGAAAGAGAGAGAGTGGAGAGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT	1550
safb2	GCAATAGCAGTTCAGAGTGTGTGTGGAGAG--TGGAGCGAGCGGGCTTCTCGATTC	474	safb2	GAGTGAAGAGAGAGAGATATCAGGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT	1554
safb1	CTGTCCGATAGTGAAGAGTGTGTGTGGAGAGCATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT	537	safb1	-----TAAATGTGACGAAAGATGAT--CTAAGAGGG-----TGAAGAC	1590
safb2	TTTTGT	534	safb2	GAAAAAATCTGTAAATGAAGAGAGAGAGATTAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG	1614
safb1	GAAGT	597	safb1	GGAGTGGAGAAAGAGTGAAGAGCAAGATGATCAGAACTGGCGGCTCAGAGCGATCT	1650
safb2	GAAGT	594	safb2	GATTAAGAGAGAGAGAGAGAGAGATTAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG	1674
safb1	ACTATATACAGAAATTAAGAGAGCATCTCCCTGGAGCCAGAAATGAGAAATATCTGGAC	657	safb1	CGAGCCACAAATCAGGAATCGAGGACCGAGAGACTGTAGTAAATGATAAATCCAAA	1710
safb2	AAAGTAACTCGAGCATTAAGAGAGTCTTTTGGAGCCAGAAATGAGAAATATCTGGAC	654	safb2	AGAGTCAACAAATCAGGAAGCAGAGAGATGGAGCGAGCGTGTGTGTGTGTGTGTGT	1734
safb1	ATTTTGGGGAAACTTGTAAATCTGGAGCATTAAGAGAGAGAGTTCGGAGCTGGAGCAG	717	safb1	GGGTCCTTGT	1767
safb2	ATTTTGGGGAAACTTGTAAATCTGGAGCATTAAGAGAGAGAGTTCGGAGCTGGAGCAG	714	safb2	GGAGAGCGGCTCATTAGGCTGAAAGCAGCAGAGCTCCAAAAGAGAGAGTCCAGAGT	1794
safb1	CCATTTCAGAGGACAGAGTACGCTGGGGCCAGCAGAGAGCTTCCGAGAGAGAGAC	777	safb1	CAGATTCGAAATCAGCCAGCAGAAAGAGCGGTCGCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT	1827
safb2	CCATTTCAGAGGACAGAGTACGCTGGGGCCAGCAGAGAGCTTCCGAGAGAGAGAC	774	safb2	CAGATTCGAGTCAAAAAGCAGAAAGAGAGAGAGACTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT	1854
safb1	CTATTTCAGAGCGCCATCCGAGAGAGGTTGATTTAGATTTGGCCAGCGATCAACAGCA	837	safb1	GACGCTGGAGTCAAGAGACTCAGAGTCCATA-----TGTGTGTGTGTGTGTGTGT	1861
safb2	CTATTTCAGAGCGCCATCCGAGAGAGGTTGATTTAGATTTGGCCAGCGATCAACAGCA	834	safb2	GACAAAGAGAGAGAGAGCGCGAGAGCGAGCGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG	1914
safb1	CAGGCTCAGTGGAGCAAGCGAGCAGCTGTAGCGGTTAGTGAAGAGAGAGCGCGCGAG	897	safb1	-GCAGGTCGCTGAGCGCATGAAACCGAAACAGCATGAGAGCGAGTGGAGCGCGAG	1920
safb2	CAGGCTCAGTGGAGCAAGCGAGCAGCTGTAGCGGTTAGTGAAGAGAGAGCGCGCGAG	894	safb2	CGGGGGAGCGCGAGCGAGCGGGAGCGGGAGCAAGCGCTGAGGCTTCCATGAGCGAG	1974
safb1	CAGCCAGCGAATGGCGAGAGAGCGAGTGTGGCTGTAGGGCTAGAGCGCGCAGTTGAG	957	safb1	GACGCTGAGCGCTGGAGTTCCCGAGAGAGAGCTTGGCGCTTCCAGCGCGAGCGGCTGG	2034
safb2	CAGCCAGCGAATGGCGAGAGAGCGAGTGTGGCTGTAGGGCTAGAGCGCGCAGTTGAG	954	safb2	GAGAGAGCGCGCTTACAGCGAGAGAGCGGCTGAGCTGAGTGTGGAGCGCGAGCGGCT	2034
safb1	CAGAGT	1017	safb1	CGGAGCGCATGGAGCGGAGCGGCTGGAGCGCGAGCGAGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT	2040
safb2	CAGAGT	1014	safb2	CGGAGCGCATGGAGCGGAGCGGCTGGAGCGCGAGCGAGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT	2094
safb1	CAGAGT	1077	safb1	AGGCGGAGCAGAGCGCATCCAGCGTGAAGCGAGAGAGCTGAGGCGCCAGCAGAGAAATG	2100
safb2	CAGAGT	1074	safb2	AGAAAGAGCAGAGCGCATCCAGCGTGAAGCGAGAGAGCTGAGGCGCCAGCAGAGAAATG	2134
safb1	ACGAGAGCCCAAGCCAGAGAGAGAGAGATGCAAGAGAGAGCGGAGAGAGTGTGATTTT	1077	safb1	CGCTATGAGCAGAGCGCGCGCGCGGCTGTGGCGCGCTTACAGCTGGAGCGCGAGAT	2160
safb2	ACGAGAGCCCAAGCCAGAGAGAGAGAGATGCAAGAGAGAGCGGAGAGAGTGTGATTTT	1074	safb2	CTCGTGTACAGCAGAGAGCGCGCGCGGCTGTGGCGCGCTTACAGCTGGAGCGCGAGAT	2214

	SAFB1	SAFB2
1: SAFB1	100.00	74.62
2: SAFB2	74.62	100.00

3.8. Στοιχισή γονιδίων *SAFB1* και *SAFB2*

Το επόμενο ερώτημα ήταν εάν η 100% νουκλεοτιδική ταύτιση είναι περιορισμένη στη κωδική περιοχή ή εάν εκτείνεται και περαιτέρω, σε μη κωδικές περιοχές (ιντρόνια). Μελετώντας εστιασμένα την περιοχή που παρουσίασε ομολογία 100% (εικόνα 23) βρέθηκαν 940 ζεύγη νουκλεοτιδίων ταυτόσημα μεταξύ των αλληλουχιών *SAFB1* και *SAFB2*. Επειδή μέσω αυτής τη στοιχισής προέκυψε μεγαλύτερος αριθμός όμοιων νουκλεοτιδίων σε σχέση με τη στοιχισή των κωδικών αλληλουχιών των δυο γονιδίων, επόμενο βήμα κρίθηκε να γίνει η μελέτη των γονιδίων ως προς τα εξόνια και ιντρόνια από τα οποία αυτά αποτελούνται.



Εικόνα 23: Στοιχισή γονιδίων *SAFB1* και *SAFB2*. Εστίαση στη περιοχή με 100% ομολογία. (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo)

	SAFB1	SAFB2
1: SAFB1	100.00	58.83
2: SAFB2	58.83	100.00

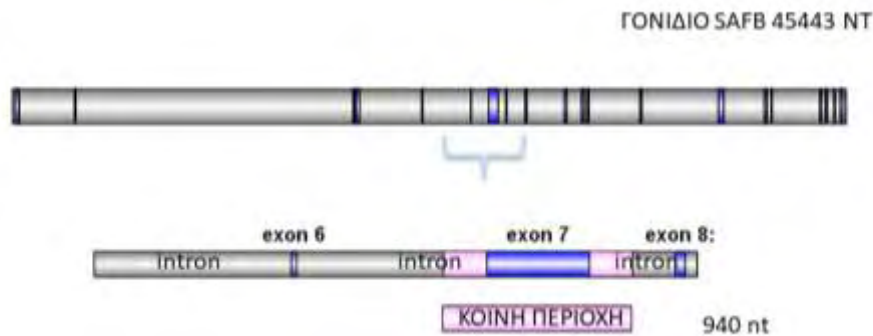
3.9. Μελέτη της κοινής περιοχής των δυο αλληλουχιών ως προς την ύπαρξη ιντρονίων.

Τα εξόνια όλων των γονιδίων του ανθρώπου είναι γνωστά κάνοντας χρήση των βάσεων δεδομένων, συγκεκριμένα είναι καταχωρημένα και στην NCBI. Έτσι γνωρίζοντας και τα όρια της κοινής περιοχής υπήρξε η δυνατότητα ελέγχου ως προς το αν σε αυτή παρεμβάλλονται και ιντρόνια. Τα όρια της κοινής περιοχής είναι 5.648.773-5.649.713 οπότε περιλαμβάνει ένα εξόνιο, συγκεκριμένα το όγδοο και μέρος του καθενός των δυο εκατέρωθεν ιντρονίων. (Εικόνα 24,25)

Nucleotide Sequence (2748 nt):

```
ATGGCGGAGACTCTGTCTAGGCCTAGGTGATTCTGGAGCGGGCGGGCGGGCTCTGAGCTCCGCTCGT
CAGAGACCGGGACGCGGGCGCCTCAGCGACCTGCGAGTGATCGATCTGCGGGCGGAGCTGAGGAAACGGAA
TGTGGACTCGAGCGGCAACAAGAGCGTTTTGATGGAGCGGCTGAAGAAGGCAATTGAAGATGAAGGTGGT
AATCCTGACGAAATTGAAATTACCTCCGAGGGAAACAAGAAAACATCAAAGAGGTCTAGCAAAGGGCGCA
AACCAGAAGAGAGGGTGTGGAAGATAACGGGCTGGAGGAAAACCTCTGGGGATGGACAGGAGGATGTTGA
GACCAGTCTGGAGAACTTGCAGGACATCGACATCATGGATATCAGTGTGTTGGATGAAGCAGAAAATTGAT
AATGGAAGCGTTGCAGATTGTGTGGAAGACGATGATGCTGATAACCTCCAGGAGTCCCTGTCCGATAGTA
GAGAGCTAGTTCGAGGGGAAAATGAAAGAGCTTCCGGAGCAGCTTCAGGAACATGCTATAGAGGACAAAAGA
AACTATAAACAAATTTAGATACTTCATCATCTGACTTCACTATATTACAGGAAATTGAAGAGCTGCTG
GAGCCAGAAAATGAGAAAATACTCGACATTTTGGGGGAAACTTGTAATCTGAGCCAGTAAAAGAGAAA
GTTCCGAGCTGGAGCAGCCATTTGCACAGGACACAAGTAGCGTGGGGCCAGACAGAAAAGCTTGCGGAGGA
AGAGGACCTATTTGACAGCGCCCATCCGGAAGAGGGTGATTTAGATTTGGCCAGCGAGTCAACAGCACAC
GCTCAGTCGAGCAAGGCAGACAGCCTGTTAGCGGTAGTGAAGAGGGAGCCCGCGGAGCAGCCAGGCGATG
GCGAGAGGACGGACTGTGAGCCTGTAGGGCTAGAGCCGGCAGTTGAGCAGAGTAGTGCGGCCTCCGAGCT
CGCGGAGGCTCTAGCGAGGAGCTCGCAGAAGCACCCACGGAAGCCCAAGCCAGAACCCAGAGATAGC
AAAGAAGACGGGAGGAAGTTTGATTTTGCAGCTTGTAAATGAAGTCCCTCCGGCTCCTAAAGAGTCCCTCAA
CCAGTGAGGGCGCTGATCAGAAAATGAGTTTAAAGATGACTCGGATACAAAAGGCTTTCCAAAAGA
GGAAAAGGGTTCGAGCAGTTGTGGTAGAAAATTTCTGGGTAGTGGACTCTCTTCTACAACCAGAGCTACA
GATTTGAAGAATCTTTTCAGCAAATATGGGAAGTGGTGGGGCCCAAGGTTGTGACAAATGCCCGGAGTC
CTGGAGCTCGCTGTTACGGTTTTGTACGATGTCCACAGCAGAAGAGGCCACAAAATGCATTAACCACCT
GCACAAGACGGAGCTCCACGGAAAAGATGATCTCCGTGGAGAAAAGCCAAAATGAACCTGTGGGAAAAGAAA
ACCTCTGACAAAAGAGACAGTGACGGGAAAAGGAGAAGTTCGAGCAACAGTGACAGATCTACAAAACCTTA
AGAGGGATGATAAATGTGACAGAAAAGATGATGCTAAGAAGGGTGACGACGGAAGTGGAGAAAAGAGTAA
GGACCAAGATGATCAGAAAACCTGGCCCTCAGAGCGATCTCGAGCCACAAAAGTCAAGGAAAGTCAAGGGACC
GAACGGACTGTAGTAATGGATAAATCCAAAGGGGTGCTGTGATTAGTGTAAAAACGTCCGGGTCCAAAAG
AGAGAGCTTCCAAAAGCCAGGATCGCAAATCAGCCAGCAGAGAGAAGCGGTCCGTGCTGCTTTTGATAA
GGTCAAGGAGCCTCGGAAGTCAAGAGACTCAGATCCCATAGCAGGGTGCCTGAAACGCAAGTGAACGCGAA
CAACGCATGCAGGCGCAGTGGGAGCGCGAGGAGCGTGAGCGGCTGGAGATTGCCCGAGAGAGGCTGGCCT
TCCAGCGCCAGCGGCTGGAGCGGGAGCGCATGGAGCGGGAACGGCTGGAGCGCGAACGCATGCACGTGGA
GCACGAGCGCAGGCGGAGCAGGAGCGCATCCACCGTGAGCGGAGGAGCTGAGGCGCCAGCAGGAACTG
CGCTATGAGCAGGAGCGGGCGGCCCGGGTGCGGCGGCCCTACGACCTGGACCGCGAGATGATGCCTATT
GGCCGGAAGCCAAGCGGGCCGCCCTGGATGAGCGCTACCATTCTGACTTTAACCGCCAGGACCGCTTCCA
CGACTTTGACCACAGGGACCGGGCCGCTACCCCGACCACTCGGTGGACAGGAGAGAAGGTTCAAGGTCA
ATGATGGGAGAACGAGAAGGACAGCATTACCCAGAAGCCATGGAGGACCAAGAGCGCCACGGCCGGGACT
CCCGCGATGGCTGGGGGGCTATGGCTCTGACAAAGAGGATGAGCGAGGGCCGGGGGCTGCCTCCTCCCCC
CAGACGTGACTGGGGGGACCATGGCCGAAGAGAGGATGACCGGTGATGGCAGGGCACGGCCGACGGGGGC
ATGATGGACAGGGATCACAAAGAGGTGGCAAGTGGCGAGAGAAGCATGTCCGGTCACTCCGGGCCTGGCC
ACATGATGAACCGAGGAGGAATGTGAGGGCGCGGCAGCTTTGCCCCAGGCGGGGCTCCCGGGGCCACCC
CATCCACACGGTGGCATGCAGGGCGGGTTTTGGAGGCCAGAGCCGGGGGAGCAGGCCACGCGATGCCCGC
TTCCTCGCCGCTACTGA
```

Εικόνα 24: Παρουσίαση κωδικής αλληλουχίας SAFB1. Η εναλλαγή χρωμάτων δηλώνει διαφορετικό εξόνιο. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/CCDS/>)



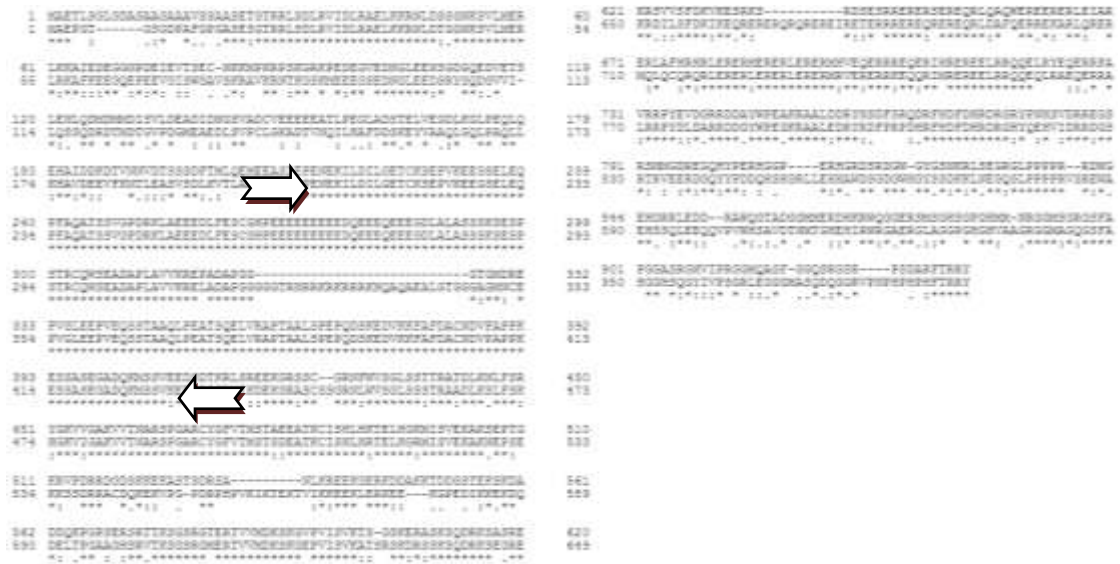
Εικόνα 25: Απεικόνιση γονιδίου SAFB. Με γκρι απεικονίζονται τα ιντρόνια του γονιδίου ενώ με μπλε τα εξόνια. Υπάρχει στη συνέχεια εστίαση στη περιοχή που περιλαμβάνει τη συντηρημένη περιοχή (25.738-26678) η οποία περιέχεται σε ένα εξόνιο (στο 7ο) και δύο ιντρόνια .

3.10. Οι παράγοντες SAFB στον οργανισμό *mus musculus*

Η ύπαρξη της ταυτόσημης περιοχής ανάμεσα στον SAFB1 και SAFB2 αποτελεί ένα ιδιαίτερο, ασυνήθιστο φαινόμενο. Προσπαθώντας να δώσουμε κάποια εξήγηση σε αυτό, προβήκαμε στη μελέτη της συγκεκριμένης περιοχής και σε ένα άλλο είδος, τον ποντικό εφόσον διαθέτει επίσης τα τρία μέλη της οικογένειας SAFB. Έτσι μπορούμε να αποκλείσουμε φαινόμενα όπως ανακρίβεις ή επαναλαμβανόμενες καταχωρίσεις αλληλουχιών στις βάσεις δεδομένων ή έναν πρόσφατο αναδιπλασιασμό σε αυτή τη περιοχή στον άνθρωπο.

3.10.1. Σύγκριση πρωτεϊνών SAFB1 και SAFB2 στον ποντικό

Με στοίχιση των αλληλουχιών του ποντικού με τη βάση δεδομένων Clustal διαπιστώθηκε περίπου 65% ομολογία μεταξύ των SAFB1 και SAFB2 στο συνολικό τους μέγεθος. (Πίνακας 4). Παρ' όλα αυτά εμφανίζεται ομολογία 100% των δυο μελών σε 202 αμινοξέα (205-407) εκτός από ένα κενό στη στοίχιση (gap) (Εικόνα 26) Άρα η περιοχή είναι ιδιαίτερα συντηρημένη μεταξύ των SAFB1 και SAFB2 και στον ποντικό.

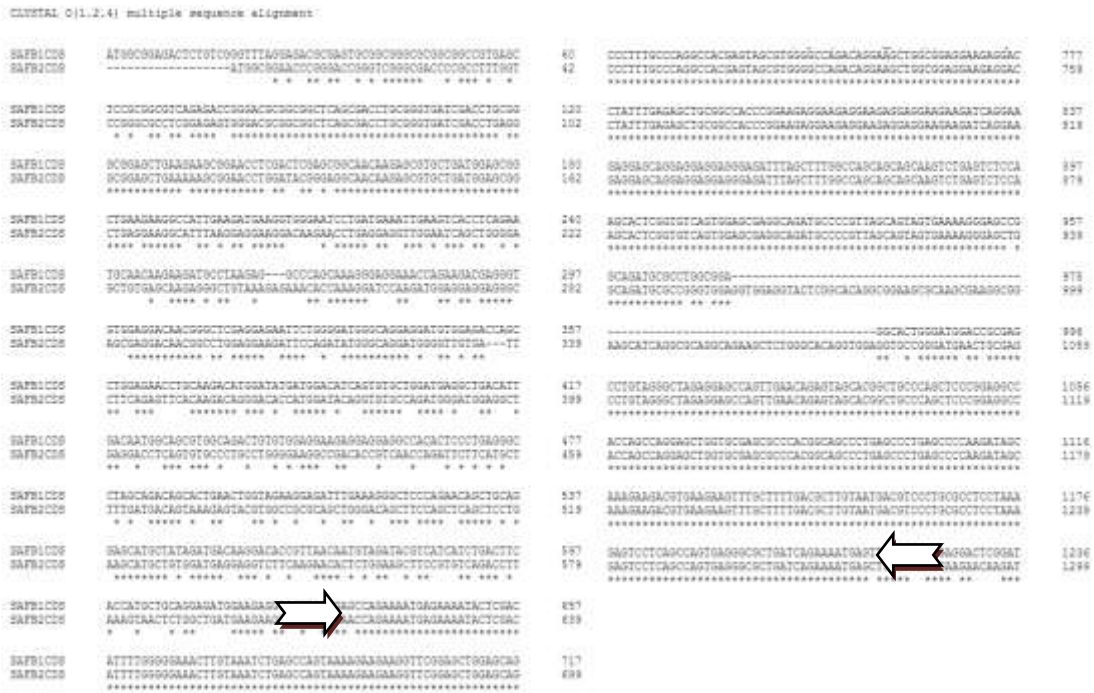


Εικόνα 26: Σύγκριση αμινοξικής αλληλουχίας SAFB1 και SAFB2 στον οργανισμό *mus musculus*

	SAFB1	SAFB2
1: SAFB1MOUSE	100.00	65.44
2: SAFB2	65.44	100.00

3.10.2. Στοίχιση cDNA των πρωτεϊνών SAFB1 και SAFB2

Πραγματοποιήθηκε στοίχιση και των κωδικών αλληλουχιών (cDNA) των δυο πρωτεϊνών προκειμένου να διαπιστωθεί αν η ομοιότητα τους υπάρχει και σε νουκλεοτιδικό επίπεδο, όπως συμβαίνει και στον άνθρωπο (βλέπε ενότητα 3.2.). Παρατηρούμε λοιπόν (Εικόνα 27) ότι και στον ποντικό η περιοχή που κωδικοποιεί για τα συντηρημένα αμινοξέα είναι ταυτόσημη μεταξύ SAFB1 και SAFB2, χωρίς αλλαγή ούτε στις τρίτες βάσεις των κωδικονίων.



Εικόνα 27: Σύγκριση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας SAFB1-SAFB2. Clustal

SAFB1-CDS SAFB2-CDS

1: SAFB1MOUSECCDS	100.00	70.21
2: SAFB2MOUSECCDS	70.21	100.00

Αρα δεδομένου ότι η «κοινή» περιοχή υπάρχει και στον *mus musculus* μπορούμε να αποκλείσουμε τη περίπτωση ανακρίβειών στις βάσεις δεδομένων ή τη περίπτωση ενός πρόσφατου τυχαίου ανασυνδυασμού στον άνθρωπο. Προκειμένου να διερευνήσουμε ότι από τη συγκεκριμένη περιοχή μπορεί να παράγεται κάποιο λειτουργικό, μη κωδικό RNA συγκρίναμε τη νουκλεοτιδική αυτή αλληλουχία με γονιδιακές ή μεταγραφωματικές (transcriptome) βάσεις δεδομένων του ανθρώπου.

3.11. Μελέτη της κοινής περιοχής στις βάσεις δεδομένων

Μέσω της βάσης δεδομένων Blast χρησιμοποιήσαμε τη συντηρημένη νουκλεοτιδική περιοχή ως αναζήτηση για την εύρεση ομόλογων αλληλουχιών στο γονιδίωμα ή μεταγράφομα του ανθρώπου (εικόνα 28). Το αποτέλεσμα της αναζήτησης ήταν μόνο τα γονίδια SAFB1/2 καθώς και εναλλακτικά τους μετάγραφα. Δεν εμφανίστηκε ομολογία με κάποιο long non coding RNA (lncRNA) ή κάποιο microRNA (miRNA).

NIH U.S. National Library of Medicine | NCBI National Center for Biotechnology Information | Sign in as NCBI

BLAST » blastn suite » RID-XUSAJ575015 | Home | Recent Results | Saved Strategies | Help

BLAST Results

Job title: Nucleotide Sequence (941 letters)

Query ID: j3j/Query_345175 | Database Name: Human G+T (2 databases)
 Description: None | Description: P-site details
 Molecule type: nucleic acid | Program: BLASTN 2.7.0+ @Gatan
 Query Length: 941

Other reports: Search Summary (Taxonomy reports) | Statistics (View of results) | Database view | MM4 viewer

Graphic Summary

Distribution of the top 16 Blast-Hits on 14 subject sequences

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select All | None | Selected 0

Alignments

Description	Max score	Total score	Query cover	E-value	Ident	Accession
Transcript						
PROCESSED_HUMAN sapiens scaffold attachment factor B2 (SAFB2) transcript variant S2, mRNA	1341	1341	77%	0.0	100%	XM_017027520.1
PROCESSED_HUMAN sapiens scaffold attachment factor B2 (SAFB2) transcript variant S1, mRNA	948	948	54%	0.0	100%	XM_01528448.2
PROCESSED_HUMAN sapiens scaffold attachment factor D (SAFD) transcript variant S2, mRNA	948	948	54%	0.0	100%	XM_017027115.1
PROCESSED_HUMAN sapiens scaffold attachment factor B (SAFB) transcript variant X1, mRNA	948	948	54%	0.0	100%	XM_017027114.1
HUMAN sapiens scaffold attachment factor B (SAFB) transcript variant 4, mRNA	948	948	54%	0.0	100%	U046122572.1
HUMAN sapiens scaffold attachment factor B (SAFB) transcript variant 5, mRNA	948	948	54%	0.0	100%	U046122571.1
HUMAN sapiens scaffold attachment factor B (SAFB) transcript variant 4, mRNA	948	948	54%	0.0	100%	U046122574.1
HUMAN sapiens scaffold attachment factor B (SAFB) transcript variant 2, mRNA	948	948	54%	0.0	100%	U046122573.1
HUMAN sapiens scaffold attachment factor B (SAFB) transcript variant 1, mRNA	948	948	54%	0.0	100%	U046122572.1
HUMAN sapiens scaffold attachment factor B (SAFB) transcript variant 1, mRNA	948	948	54%	0.0	100%	U046122567.1
HUMAN sapiens scaffold attachment factor B2 (SAFB2), mRNA	948	948	54%	0.0	100%	U04614495.2
PROCESSED_HUMAN sapiens scaffold attachment factor B2 (SAFB2) transcript variant S2, mRNA	929	929	53%	0.0	100%	XM_01528448.2
Genomic coordinates (chr:pos:nt)						
HUMAN sapiens chromosome 19, alternate assembly CHM1, 1-1	1738	3477	100%	0.0	100%	NC_000019.3.2
HUMAN sapiens chromosome 19, GRCh38.p7 Primary Assembly	1738	3477	100%	0.0	100%	NC_000019.3.1

Alignments

Εικόνα 28: Blast στη συντηρημένη αλληλουχία για αναζήτηση άλλων αλληλουχιών που εμφανίζουν ομοιότητα.

Συνοπτικά λοιπόν, συγκρίνοντας τις αλληλουχίες των SAFB βρέθηκαν τα εξής αποτελέσματα:

	SAFB1-SAFB2	SAFB1-SLTM	SAFB2-SLTM
Αμινοξέα	72%	39,6%	37,4%
Κωδική	74%	50%	51%
Γονίδιο	58%	54,5%	52%

Πίνακας 5.

Παρατηρούμε ότι οι SAFB1 και SAFB2 είναι πιο συντηρημένοι μεταξύ τους σε σχέση με τον SLTM σε αμινοξικό επίπεδο ενώ σε επίπεδο γονιδίου δε διαφέρουν σε τόσο μεγάλο βαθμό.

	SAFB1 Human	SAFB2 human	SLTM Human	SAFB1 Mouse	SAFB2 Mouse	SLTM mouse
SAFB1 human	100%	72%	39%	86%	61%	39%
SAFB2 human	72%	100%	38%	67%	73%	38%
SLTM human	38%	38%	100%	39%	34%	91%
SAFB1 mouse	86%	67%	39%	100%	65%	38%
SAFB2 mouse	61%	73%	34%	65%	100%	34%
SLTM mouse	39%	38%	91%	38%	34%	100%

Πίνακας 6.

4. Συζήτηση

1) Πειραματικό μέρος

Η πυρηνική μήτρα φαίνεται να οργανώνει τη σωστή ρύθμιση των πυρηνικών διεργασιών και της γονιδιακής έκφρασης. Σχηματίζει ένα τρισδιάστατο δίκτυο πρωτεϊνών, DNA και RNA πάνω στην οποία είναι προσκολλημένη η χρωματίνη υπό τη μορφή θηλιών. Η πρόσδεση χρωματίνης και της πυρηνικής μήτρας συμβαίνει σε ειδικές θέσεις, οι οποίες ονομάζονται περιοχές προσάρτησης της μήτρας ή του ικριώματος (S/MARs). Στις περιοχές S/MAR έχουν αποδοθεί λειτουργίες που σχετίζονται με την προσέγγιση της χρωματίνης και την γονιδιακή έκφραση καθώς και την πρόσδεση μεταγραφικών συμπλόκων. Οι παράγοντες SAFB, ανάμεσα σε αρκετές ακόμη πρωτεΐνες, έχουν την ικανότητα να προσδένονται σε αυτές τις περιοχές. Πρόκειται για πρωτεΐνες που συνδέονται σε DNA, RNA και διάφορες πρωτεΐνες και επηρεάζουν σημαντικές λειτουργίες όπως μεταγραφή και μάτισμα.

Η εφαρμογή στέρησης γλυκόζης σε καρκινικά κύτταρα HeLa προκαλεί μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων των SAFB1 και SAFB2. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής ήταν να διαπιστωθεί με ποιο μηχανισμό συμβαίνει αυτή η μείωση.

Πρώτο βήμα στη πειραματική διαδικασία ήταν η επιβεβαίωση των προηγούμενων αποτελεσμάτων του εργαστηρίου Βιοχημείας οπότε εφαρμόστηκε η συνθήκη στέρησης γλυκόζης και παρατηρήθηκε μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων των SAFB. Στη συνέχεια αναρωτηθήκαμε με ποιο μηχανισμό πραγματοποιείται αυτή η μείωση. Προκειμένου να απαντηθούν τα ερωτήματα αυτά χρησιμοποιήσαμε αναστολείς διάφορων σημαντικών διαδικασιών όπως της μεταγραφής, της μετάφρασης και της αποικοδόμησης.

Επιλέξαμε αρχικά, να επιδράσουμε σε κύτταρα που στερούνται τη γλυκόζη με έναν αναστολέα της μεταγραφής, την ακτινομυκίνη D. Τα αποτελέσματα ήταν δύσκολα να αναλυθούν επειδή και οι δυο επιδράσεις προκαλούν μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων των SAFB. Επειδή παρατηρήσαμε ότι συνδυαστικά οι δυο επιδράσεις προκάλεσαν περαιτέρω μείωση στα επίπεδα των SAFB απ' ότι η καθεμία ξεχωριστά θεωρήσαμε ότι ίσως να παίζει κάποιο ρόλο η μεταγραφή σαν διαδικασία στη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων. Για να εξακριβωθεί αν η μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων είναι μεταγραφικό φαινόμενο ώστε θελήσαμε να δούμε άμεσα τα επίπεδα του mRNA και προχωρήσαμε στη Real Time PCR. Με ειδικούς εκκινητές επιλέξαμε να δούμε το mRNA του SAFB1. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δε μεταβάλλονται τα επίπεδα mRNA του στη συνθήκη 24ωρης

στέρησης γλυκόζης από το θρεπτικό μέσο. Άρα το φαινόμενο της μείωσης της πρωτεΐνης SAFB1 δεν οφείλεται στη πτώση των επιπέδων mRNA του.

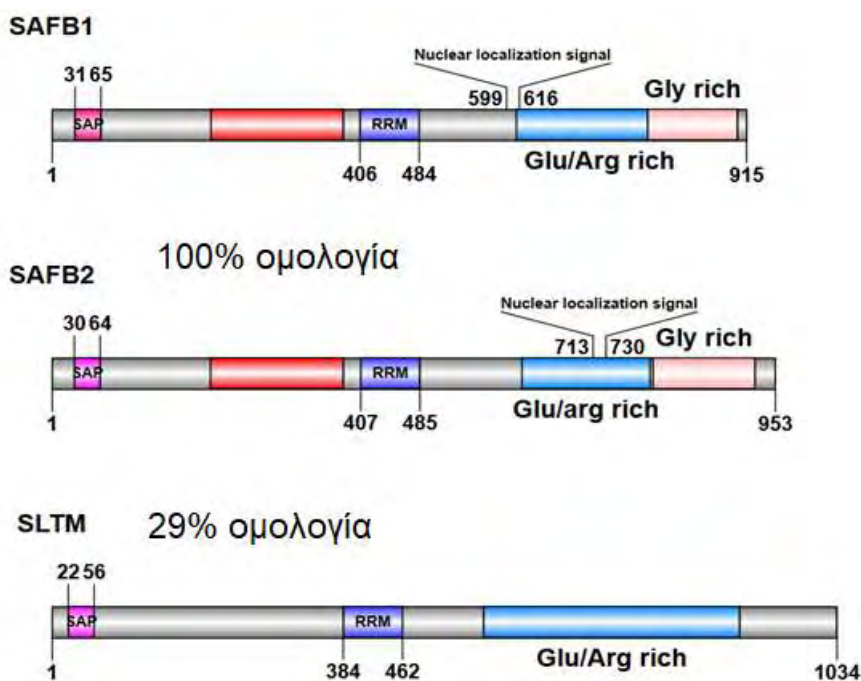
Εφόσον τουλάχιστον για τον SAFB1, τα επίπεδα mRNA του δεν μειώνονται υπό τη επίδραση της στέρησης ακολούθησε η επίδραση στα κύτταρα με έναν αναστολέα της μετάφρασης, το κυκλοεξιμίδιο ώστε να ανιχνευτούν τα πρωτεϊνικά επίπεδα των SAFB σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία χωρίς να παράγεται καινούρια πρωτεΐνη μέσω της μετάφρασης. Επομένως, σε κύτταρα στα οποία απουσιάζει η γλυκόζη προσθέσαμε κυκλοεξιμίδιο και τα αποτελέσματα έδειξαν πως κατά τη προσθήκη του, τα πρωτεϊνικά επίπεδα SAFB μειώνονται ακόμη περισσότερο. Αυτή η περαιτέρω μείωση υποδεικνύει ότι ίσως η πτώση των επιπέδων του κάτω από την στέρηση γλυκόζης να οφείλεται σε γρηγορότερη αποικοδόμηση τους.

Οδηγηθήκαμε λοιπόν, στον έλεγχο της υπόθεσης αυτής, δηλαδή αν η αυξημένη αποικοδόμηση των πρωτεϊνών είναι η αιτία για τη πτώση των επιπέδων SAFB. Επιλέξαμε να ελέγξουμε τη κύρια οδό αποικοδόμησης των πρωτεϊνών, το πρωτεάσωμα, οπότε προσθέσαμε έναν αναστολέα της αποικοδόμησης του πρωτεασώματος, το MG132. Παρατηρήσαμε ότι όταν προσθέσαμε τον αναστολέα σε κύτταρα που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό μέσο τα πρωτεϊνικά επίπεδα των πρωτεϊνών SAFB αυξήθηκαν επομένως αυτό το πείραμα υποδεικνύει ότι η οδός αποικοδόμησης των SAFB είναι το πρωτεάσωμα. Όταν προσθέσαμε MG132 σε κύτταρα που στερούνται τη γλυκόζη τα επίπεδα των SAFB επανήλθαν οπότε το πείραμα υπέδειξε ότι πιθανότερη αιτία για τη πτώση των πρωτεϊνικών επιπέδων των SAFB είναι η αυξημένη αποικοδόμηση τους στο πρωτεάσωμα.

Θεωρούμε ότι θα ήταν ενδιαφέρον κάποια από τα παραπάνω πειράματα να επαναληφθούν με ειδικά αντισώματα α -SAFB1 και α -SAFB2 δεδομένου ότι εξ' αρχής οι δυο πρωτεΐνες δείχνουν διαφορετική κινητική στην απόκρισή τους στη στέρηση γλυκόζης.

II) Βιοπληροφορική

Η ύπαρξη της “συντηρημένης” περιοχής περίπου 200 αμινοξέων μεταξύ των δυο πρωτεϊνών έχει επισημανθεί πολλάκις σε διάφορα ερευνητικά άρθρα.



Εικόνα 29 : Δομή των SAFB. Με κόκκινο χρώμα επισημαίνεται η συντηρημένη περιοχή μεταξύ των δυο πρωτεϊνών.

Το μόνο που είναι γνωστό για αυτή τη περιοχή είναι ότι εκεί βρίσκονται δυο λυσίνες που εφόσον σουμοϋλιωθούν στον SAFB1 επηρεάζουν τη δράση του ως μεταγραφικού παράγοντα ως συγκαταστολέα του υποδοχέα των οιστρογόνων (Garee et al, 2011). Η συντήρηση αυτή μας προκάλεσε το ενδιαφέρον και επειδή δεν έχει μελετηθεί ιδιαίτερα και δεν της έχει αποδοθεί κάποια λειτουργία ακόμη αποφασίσαμε να εστιάσουμε περαιτέρω.

Πρώτο μας βήμα στη παρούσα εργασία ήταν να δούμε αν η συντηρημένη περιοχή συναντάται και σε νουκλεοτιδικό επίπεδο. Η εύρεση ότι συναντάται ακόμη και σε επίπεδο cDNA μας κίνησε το ενδιαφέρον για περαιτέρω μελέτη. Παράλληλα, η εύρεση αυτή αποκλείει τη συντήρηση της περιοχής λόγω σουμοϋλίωσης καθώς μια τέτοια υπόθεση θα εξηγούσε μόνο τη συντήρηση σε αμινοξικό επίπεδο και όχι σε νουκλεοτιδικό.

Αναρωτηθήκαμε στη συνέχεια αν η συντηρημένη περιοχή περιλαμβάνει και ιντρόνια πέραν της κωδικής περιοχής. Εντύπωση στα ευρήματά μας έκανε το γεγονός ότι η συντηρημένη περιοχή εκτός από εξόνια περιλαμβάνει και ιντρόνια στον SAFB1 και SAFB2. Γενικά στα ιντρόνια συμβαίνουν μεταλλάξεις με πιο συχνό ρυθμό απ' ότι σε

εξόνια. Συνεπώς, η συντήρηση ιντρονίων αποτελεί σπάνιο φαινόμενο. Προκειμένου να εξηγήσουμε αυτή τη συντήρηση προβήκαμε στην δημιουργία ορισμένων υποθέσεων. .

Μια υπόθεση ήταν ότι έχει συμβεί στον άνθρωπο κάποιος τυχαίος ανασυνδυασμός σχετικά πρόσφατα που να δικαιολογεί την ομολογία των δυο περιοχών. Επίσης θα μπορούσε να έχουν συμβεί επαναλαμβανόμενες ή ανακριβείς καταχωρήσεις στις βάσεις δεδομένων οι οποίες να προκαλούν παραπλανητικά αποτελέσματα. Και οι δυο αυτές υποθέσεις καταρρίπτονται από το γεγονός ότι η αυτή η συντήρηση βρίσκεται και στο γονιδίωμα του ποντικού οπότε δε πρόκειται για κάποιο τυχαίο γεγονός αφού συναντάται πάνω από μια φορά σε δυο είδη που έχουν διαχωριστεί εδώ και 80 εκατομμύρια χρόνια.

Υποθέσαμε ακόμη ότι αυτή η περιοχή μπορεί να κωδικοποιεί κάποιο λειτουργικό, μη κωδικό RNA. Αυτό θα δικαιολογούσε τη συγκεκριμένη συντήρηση καθώς μεταλλάξεις συμβαίνουν πιο συχνά σε περιοχές χωρίς κάποια λειτουργία. Προβήκαμε λοιπόν, χρησιμοποιώντας ως αναζήτηση τη συγκεκριμένη περιοχή, να εντοπίσουμε κάποιο μόριο RNA με εργαλεία βιοπληροφορικής με ομολογία σε αυτή σε βάσεις δεδομένων του μεταγραφώματος και του γονιδιώματος χωρίς όμως να εντοπίσουμε κάποιο. Επομένως η συγκεκριμένη υπόθεση χρειάζεται περισσότερη διερεύνηση πιθανόν με περισσότερα βιοπληροφοριακά μέσα. Τέλος, είναι πιθανόν η συγκεκριμένη γενωμική περιοχή να παίζει ένα δομικό, λειτουργικό ρόλο ο οποίος είναι ιδιαίτερος και όχι ακόμα γνωστός και ελπίζουμε να αποκαλυφθεί μελλοντικά

5. Βιβλιογραφία

1. Vlcek S, Dechat T, Foisner R. Nuclear envelope and nuclear matrix: interactions and dynamics. *Cell Mol Life Sci.* 2001 Nov;58(12-13):1758-65.
2. Berezney R, Coffey DS. Identification of a nuclear protein matrix. *Biochemical and biophysical research communications.* 1974;60:1410-1419.
3. Berezney R, Coffey DS. The nuclear protein matrix: isolation, structure, and functions. *Adv Enzyme Regul.* 1976;14:63-100.
4. Berezney, R., Mortillaro, M. J., Ma, H., Wei, X., Samarabandu, J. (1995) The nuclear matrix: a structural milieu for genomic function, *Int. Rev. Cytol.*, 162A, 1-65.
5. Razin S.V, Iarovaia O.V, Vassetzky Y.S. A requiem to the nuclear matrix: from a controversial concept to 3D organization of the nucleus, *Chromosoma* 2014
6. Razin S.V, V. Borunova, O. V. Iarovaia, Y. S. Vassetzky, Nuclear Matrix and Structural and Functional Compartmentalization of the Eucaryotic Cell Nucleus, *Biochemistry (Moscow)* 2014, vol79, No7
7. Jackson D.A, The principles of nuclear structure, *Chromosome Research* 2003, Volume 11, Issue 5, pp 387–401
8. Pederson T: Thinking about a nuclear matrix . *J Mol Biol* (1998)277: 147-159.
9. Laemmli UK. Levels of organization of the DNA in eukaryotic chromosomes. *Pharmacol Rev* 1978; 30: 469-76.
10. Ma H, Siegel AJ, Berezney R. Association of chromosome territories with the nuclear matrix. Disruption of human chromosome territories correlates with the release of a subset of nuclear matrix proteins. *The Journal of cell biology.* 1999;146(3):531-542.
11. Klussmann, Scott : Protein-protein interactions as new drug targets.2008
12. Ottaviani D ,Lever E ,Takousis P Sheer D. Anchoring the genome, *Genome Biology* 2008;9:201
13. Renz A, Fackelmayer FO. Purification and molecular cloning of the scaffold attachment
14. factor B (SAF-B), a novel human nuclear protein that specifically binds to S/MAR-DNA. *Nucleic acids research.* 1996;24(5):843-849.
15. Oesterreich S, Lee AV, Sullivan TM, Samuel SK, Davie JR, Fuqua SA. Novel nuclear matrix protein HET binds to and influences activity of the HSP27 promoter in human breast cancer cells. *Journal of cellular biochemistry.* 1997;67(2):275-286.

16. Oesterreich S. Scaffold attachment factors SAFB1 and SAFB2: Innocent bystanders or critical players in breast tumorigenesis? *Journal of cellular biochemistry*. 2003;90(4):653-661.
17. Oesterreich S. Scaffold attachment factors SAFB1 and SAFB2: Innocent bystanders or critical players in breast tumorigenesis? *Journal of cellular biochemistry*. 2003;90(4):653-661
18. Oesterreich S, Zhang Q, Hopp T, Fuqua SA, Michaelis M, Zhao HH, et al. Tamoxifen-bound estrogen receptor (ER) strongly interacts with the nuclear matrix protein HET/SAF-B, a novel inhibitor of ER-mediated transactivation. *Mol Endocrinol*. 2000;14(3):369-381.
19. Oesterreich S, Zhang QP, Lee AV. Inhibition of oestrogen receptor activity by the co-repressor HET/SAF-B is relieved by blockade of histone deacetylase activity. *Eur J Can*88.
20. Oesterreich S, Allred DC, Mohsin SK, Zhang Q, Wong H, Lee AV, et al. High rates of loss of heterozygosity on chromosome 19p13 in human breast cancer. *Br J Cancer*. 2001;84(4):493-498. *cer*. 2000;36 Suppl 4:S43-44.
21. Weighardt F, Cobianchi F, Cartegni L, Chiodi I, Villa A, Riva S, et al. A novel hnRNP protein (HAP/SAF-B) enters a subset of hnRNP complexes and relocates in nuclear granules in response to heat shock. *J Cell Sci*. 1999;112 (Pt 10):1465-1476.
22. Chan CW, Lee YB, Uney J, Flynn A, Tobias JH, Norman M. A novel member of the SAF (scaffold attachment factor)-box protein family inhibits gene expression and induces apoptosis. *The Biochemical journal*. 2007;407(3):355-362.
23. Townson SM, Dobrzycka KM, Lee AV, Air M, Deng W, Kang K, et al. SAFB2, a new scaffold attachment factor homolog and estrogen receptor corepressor. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(22):20059-20068.
24. Norman M, Rivers C, Lee YB, Idris J, Uney J. The increasing diversity of functions attributed to the SAFB family of RNA-/DNA-binding proteins. *The Biochemical journal*. 2016;473(23):4271-4288
25. Garee JP, Meyer R, Oesterreich S. Co-repressor activity of scaffold attachment factor B1 requires sumoylation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2011;408(4):516-522.
26. Garee JP, Oesterreich S. SAFB1's multiple functions in biological control-lots still to be done! *Journal of cellular biochemistry*. 2010;109(2):312-319.
27. Hernandez-Hernandez, J.M., Mallappa, C., Nasipak, B.T., Oesterreich, S. and Imbalzano, A.N. (2013) The Scaffold attachment factor b1 (Safb1) regulates myogenic differentiation

- by facilitating the transition of myogenic gene chromatin from a repressed to an activated state. *Nucleic Acids Res.* 41, 5704–5716
28. Lee YB, Colley S, Norman M, Biamonti G, Uney JB. SAFB re-distribution marks steps of the apoptotic process. *Experimental cell research.* 2007;31:3914-3923.
 29. Townson SM, Sullivan T, Zhang Q, Clark GM, Osborne CK, Lee AV, Oesterreich S (2000) HET/ SAF-B overexpression causes growth arrest and multinuclearity and is associated with aneuploidy in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 6, 3788–3796.
 30. Hammerich-Hille S, Bardout VJ, Hilsenbeck SG, Osborne Ck, Oesterreich S (2010) Low SAFB levels are associated with worse outcome in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 121, 503–509.
 31. Tsianou D, Nikolakaki E, Tzitzira A, Bonanou S, Giannakouros T, Georgatsou E (2009) The enzymatic activity of SR protein kinases 1 and 1a is negatively affected by interaction with scaffold attachment factors B1 and 2. *FEBS J.* 276:5212-27.
 32. Nikolakaki E, Kohen R, Hartmann AM, Stamm S, Georgatsou E, 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.* 276:40175-82.
 33. Altmeyer M, Toledo L, Gudjonsson T, Grofte M, Rask MB, Lukas C, et al. The chromatin scaffold protein SAFB1 renders chromatin permissive for DNA damage signaling. *Molecular cell.* 2013;52:206-220
 34. Boulikas T. Homeodomain protein binding sites, inverted repeats, and nuclear matrix attachment regions along the human beta-globin gene complex. *Journal of cellular biochemistry.* 1993;52:23-36.
 35. Tsutsui K, Sano K, Tsutsui Ken. Dynamic View of the Nuclear Matrix. *Acta Medica Ookayama*, 2005 Vol . 59 , No. 4, pp. 113-120
 36. Nunes S, Moretti S. Nuclear subcompartments: an overview, *Cell Biol Int* 41 (2017) 2–7 2016
 37. Hong EA, Gautrey HL, Elliott DJ, Tyson-Capper AJ. SAFB1- and SAFB2-mediated transcriptional repression: relevance to cancer. *Biochemical Society transactions.* 2012;40(4):826-830.
 38. Hong E, Best A, Gautrey H, Chin J, Razdan A, Curk T, et al. Unravelling the RNA-Binding Properties of SAFB Proteins in Breast Cancer Cells. *BioMed research international.* 2015;2015:395816.
 39. Annibaldi A. and Widmann C. Glucose metabolism in cancer cells. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 2010, 13:466–470

40. Graham N, Tahmasian M, Kohli B, Komisopoulou E, Zhu M, Vivanco I, Teitell M, Hong Wu, Ribas A, Lo R, Mellinshoff I, Mischel P, Graeber T. Glucose deprivation activates a metabolic and signaling amplification loop leading to cell death, *Molecular Systems Biology* 8; 589; doi:10.1038.2012
41. Jiao H.L, Ye YP, Yang R., Sun H., Wang, YX Wang, Zhi-Yuan Xiao, L. He, JJ Cai, WT Wei, Chen, CC Gu, YL Cai, YT Hu, QH Lai, JF Qiu, Li Liang, GW Cao, WT Liao, YQ Ding, Down-regulation of SAFB sustains the NF- κ B pathway by targeting TAK1 during the progression of colorectal cancer, *American Association for Cancer Research*, 2017
42. Jiang S, T. Katz, JP. Garee, FJ. DeMayo, A.V. Lee, S. Oesterreich, Scaffold attachment factor B2 (SAFB2)-null mice reveal non-redundant functions of SAFB2 compared with its paralog, SAFB1, *Disease Models & Mechanisms* (2015) 8, 1121-1127
43. Wang TY, Han ZM, Chai YR, Zhang JH, A mini review of MAR-binding proteins, *Mol Biol Rep*, 37:3553–3560, 2010