

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**Μελέτη των χαρακτηριστικών της *in vitro* αναστολής
της δράσης της κινάσης SRPK1a από τον παράγοντα της
πυρηνικής μήτρας SAFB1.**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΤΖΙΤΖΙΡΑ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2006



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

Αριθ. Εισ.: 5000/1
Ημερ. Εισ.: 10-11-2006
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2006
TZI

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087762

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΕΚΠΟΝΗΣΗ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Μελέτη των χαρακτηριστικών της *in vitro* αναστολής
της δράσης της κινάσης SRPK1a από τον παράγοντα της
πυρηνικής μήτρας SAFB1.**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΤΖΙΤΖΙΡΑ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ

Υπεύθυνος Καθηγητής:

Έλενα Γεωργιάτσου, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του τμήματος της Ιατρικής της Λάρισας

Μέλη Τριμελούς Επιτροπής

- Έλενα Γεωργιάτσου, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Ιατρικής της Λάρισας
- Κωνσταντίνος Σταθόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας της Λάρισας
- Μαρία Κοντού, Λέκτορας Κλινικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT	6
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
ΣΚΟΠΟΣ	20
ΜΕΘΟΔΟΙ.....	21
1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	21
2. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης.....	21
3. Καθαρισμός προϊόντων αντίδρασης PCR	22
4. Πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού.....	23
5. Απομόνωση και καθαρισμός DNA από πηκτή αгарόζης	23
6. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια βακτηρίων	24
6A. Μεσαίας κλίμακας (Midi Prep)	24
6B. Μικρής κλίμακας (Mini Prep) με αλκαλική λύση.....	25
7. Παρασκευή πλασμιδιακού φορέα κατάλληλου για κλωνοποίηση	
7A. Πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού	26
7B. Αποφωσφορυλίωση του γραμμικού πλασμιδιακού DNA με αλκαλική	
φωσφατάση (CIP)	26
7Γ. Καθαρισμός με εκχυλίσεις φαινόλης-χλωροφόρμιου	26
7Δ. Κατακρήμνιση του DNA με αιθανόλη	27
8. Αντίδραση σύνδεσης	27
9. Παρασκευή δεκτικών βακτηριακών κυττάρων	27
10. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων E.Coli.....	28
11. Επαγωγή έκφρασης πρωτεϊνών βακτηριακών κυττάρων με IPTG	29
12. Παρασκευή εκχυλίσματος βακτηριακών κυττάρων	30
13. Καθαρισμός πρωτεϊνών με επίτοπο GST	30
14. Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford	31
15. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου	31
16. Ανοσοαποτύπωμα κατά Western.....	33
17. Ανοσοκατακρήμνιση	35
18. Δοκιμασία δράσης κινάσης με in vitro φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων	
τους (kinase assay)	36
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	39
1. Κλωνοποίηση του cDNA του SAFB1CΔRE στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1	39
1A. Παραγωγή και κατεργασία του ενθέματος SAFB1CΔRE	39
1B. Απομόνωση και κατεργασία του πλασμιδιακού φορέα pGEX -4T1	41
1Γ. Αντίδραση σύνδεσης και μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων E.coli....	44
1Δ. Επιλογή ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pGEX	45
1E. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας από μετασχηματισμένα	
βακτήρια E.coli TOP10 με ανασυνδυασμένα πλασμίδια pGEX-4T1/SAFB1CΔRE	
.....	45
2. Έκφραση των πρωτεϊνών GST-SAFB1C, GST- SAFB1CΔRE και GST-LBR ..	46
2A. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων BL21(RIL) με το πλασμίδιο pGEX-4T1/SAFB1CΔRE	46
2B. Επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών, παρασκευή πρωτεϊνικού βακτηριακού	
εκχυλίσματος και καθαρισμός των πρωτεϊνών με επίτοπο GST	46

2Γ. Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford	48
2Δ. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων και ανοσοαποτύπωμα κατά Western	48
3. Δοκιμασίες δράσης κινάσης	49
4. Κλωνοποίηση του cDNA του SAFB2C(-) στον πλασμιδιακό φορέα	51
pGEX-4T1	51
4Α: Παραγωγή και κατεργασία του ενθέματος SAFB2C(-)	
4Β. Απομόνωση και κατεργασία του πλασμιδιακού φορέα pGEX-4T1	53
4Γ. Αντίδραση σύνδεσης και μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων TOP10..	54
4Δ. Επιλογή ανασυνδιασμένων πλασμιδίων pGEX	
4Ε Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας από μετασχηματισμένα βακτήρια <i>E.coli</i> TOP10 με ανασυνδιασμένα πλασμίδια pGEX-4T1/SAFB2C(-)	
5. Έκφραση της πρωτεΐνης GST-SAFB2C(-)	55
5Α. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων BL21(RIL) με το πλασμίδιο pGEX-4T1/SAFB2C(-)	55
5Β. Επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης, παρασκευή πρωτεϊνικού βακτηριακού εκχυλίσματος και καθαρισμός της πρωτεΐνης με επίτοπο GST	56
5Γ. Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford	56
5Δ. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος και ανοσοαποτύπω κατά Western	57
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	59
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	61

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά:

- Την κ. Έλενα Γεωργιάτσου, Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής της Λάρισας, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε δίνοντας μου την δυνατότητα να υλοποιήσω την διπλωματική μου εργασία στο συγκεκριμένο εργαστήριο και κυρίως για τις υποδείξεις της και τις εύστοχες παρατηρήσεις της κατά την διάρκεια της συγγραφής της εργασίας μου.
- Τον κ. Κωνσταντίνο Σταθόπουλο, Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας, ο οποίος με παρέπεμψε και με συνέστησε στο εργαστήριο Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής της Λάρισας, καθώς και για την κριτική ανάγνωση της εργασίας αυτής, ως μέλος της Τριμελούς Επιτροπής.
- Την κ. Μαρία Κοντού, Λέκτορα Κλινικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας, για την κριτική ανάγνωση της εργασίας αυτής, ως μέλος της Τριμελούς Επιτροπής.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω θερμά την υποψήφια διδάκτορα Θεοδώρα Τσιάνου για την καθημερινή και πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε, καθώς και για την υπομονή που επέδειξε για την επιτυχή ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ηλία Μυλωνή, μεταδιδακτορικό συνεργάτη του εργαστηρίου Βιοχημείας για την καταλυτική συμβολή του στη συγγραφή της εργασίας μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η SRPK1a (SR Protein kinase 1a) αποτελεί μια ισομορφή της SRPK1, δηλαδή είναι μια κινάση σερίνης αργινίνης, η οποία φωσφορυλιώνει επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες διπεπτιδίων RS. Τα πιο γνωστά υποστρώματα της SRPK1a είναι οι SR πρωτεΐνες, ο υποδοχέας της λαμίνης LBR (Lamin B Receptor) και η πρωταμίνη P1, εμπλέκοντας την κινάση αυτή στην διαδικασία του ματίσματος, αλλά και στην οργάνωση της χρωματίνης.

Οι SAFB1 και SAFB2 (Scaffold Attachment Factor 1,2) είναι δυο πρωτεΐνες που ανήκουν στην ίδια οικογένεια και παρουσιάζουν 74% ομολογία στις αμινοξικές τους αλληλουχίες. Ο SAFB1 είναι μια πρωτεΐνη της πυρηνικής μήτρας, η οποία έχει εμπλακεί σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες (μεταγραφή, διαμόρφωση χρωματίνης, μάτισμα), ενώ για τον SAFB2 λίγα είναι γνωστά.

Με το σύστημα των δύο υβριδίων βρέθηκε ότι το καρβοξυτελικό άκρο του SAFB1 αλληλεπιδρά με το αμινοτελικό άκρο της SRPK1a, κάτι το οποίο δεν συμβαίνει με την SRPK1 (έχει βρεθεί ελάχιστη αλληλεπίδραση μεταξύ των δυο αυτών μορίων). Επιπλέον, σε *in vitro* δοκιμασίες δράσης κινάσης βρέθηκε ότι η δράση της κινάσης SRPK1a αναστέλλεται παρουσία του παράγοντα αυτού όταν σαν υπόστρωμα χρησιμοποιείται ο LBR.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε μια προσπάθεια να ανιχνευθεί η αιτία αυτής της αναστολής. Δεδομένου ότι το καρβοξυτελικό άκρο του SAFB1 είναι πλούσιο σε διπεπίδια RE, τα οποία προσομοιάζουν χημικά τις αλληλουχίες RS που είναι φυσικά υποστρώματα των κινασών SRPK υποθέσαμε ότι μπορεί η RE περιοχή να είναι υπεύθυνη γι' αυτή την αναστολή. Για το λόγο αυτό δημιουργήθηκε μια πλασμιδιακή κατασκευή από την οποία παράχθηκε μια πρωτεΐνη, η οποία αντιστοιχεί στο καρβοξυτελικό άκρο του SAFB1 απαλλαγμένο από την πλούσια σε RE περιοχή του. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση της πρωτεΐνης αυτής στην δράση της κινάσης και αποδείχθηκε ότι αυτή δεν είναι ικανή να αναστείλει την φωσφορυλίωση, σε αντίθεση με το καρβοξυτελικό άκρο του SAFB1 το οποίο διαθέτει τα RE. Βάσει αυτού του αποτελέσματος επαληθεύσαμε την αρχική μας υπόθεση ότι τα RE είναι υπεύθυνα για την αναστολή της δράσης της κινάσης.

Επιπλέον, τέθηκε το ερώτημα εάν η αντίστοιχη περιοχή του παράγοντα SAFB2 είναι ικανή να αναστείλει την δράση της κινάσης, δεδομένου ότι το

καρβοξυτελικό του άκρο διαθέτει μια περιοχή πλούσια σε RE και ότι ομοιάζει σε ποσοστό 63% με αυτό του SAFB1. Γι' αυτό το λόγο δημιουργήθηκε μια πλασμιδιακή κατασκευή ικανή να παράγει την πρωτεΐνη SAFB2 με αλληλουχία αντίστοιχη με αυτή του καρβοξυτελικού άκρου του SAFB1, ώστε οι δύο πρωτεΐνες να είναι ομοίου μεγέθους. Η πρωτεΐνη αυτή εκφράστηκε με επιτυχία και θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί μελλοντικά σε πειράματα ελέγχου της δράσης της SRPK1a.

ABSTRACT

SRPK1a (SR Protein kinase 1a) is an isoform of SRPK1, a kinase which phosphorylates serine- arginine dipeptides (SR domains). The best characterized substrates of SRPK1a are the SR proteins, the Lamin B Receptor (LBR) and protamin P1, indicating that SRPK1a plays an important role in different procedures, such as pre-mRNA splicing and chromatin organization.

SAFB1 and SAFB2 (Scaffold Attachment Factor 1,2) are members of the same protein family and show 74% homology at the amino acid level. SAFB1 is localized at the nuclear matrix and has been involved in several cellular functions (transcription, chromatin organization, splicing), while much less is known for SAFB2.

By the use of the two-hybrid system it was found that the extended NH₂-terminal domain of SRPK1a interacts with the C-terminal domain of SAFB1. In addition, by in vitro kinase assays SRPK1a activity was shown to be inhibited in the presence of SAFB1, when LBR was used as substrate.

In the present study, we tried to explain the cause of the inhibition mentioned above. Based on the fact that the C-terminal domain of SAFB1 contains a RE-rich region and that the RS dipeptides resemble chemically to the phosphorylated RS dipeptides, we hypothesized that the RE region is responsible for this inhibition. For this reason, a plasmid able to express the C-terminal domain of SAFB1 devoid of the RE region was constructed. The expressed protein was tested in kinase assays and it was found to inhibit SRPK1a activity, in contrast to the RE containing SAFB1 C-terminal region. Based on this result we conclude that the RE region is responsible for the inhibition of SRPK1a activity.

Moreover, we tried to elucidate if SAFB2 has also the ability to inhibit SRPK1a, considering that its C-terminal also contains an RE domain 63% identical to SAFB1. A plasmid able to express the SAFB2 region corresponding exactly to the C-terminal of SAFB1 that inhibits SRPK1a activity was constructed. The protein was successfully expressed in bacteria in order to be tested in further kinase assays.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κινάσες πρωτεϊνών σερίνης/αργινίνης (SRPKs)

Οι κινάσες της οικογένειας των SRPK (SRPKs) αποτελούν μέλη της υπεροικογένειας των κινασών σερίνης/αργινίνης, δηλαδή φωσφορυλιώνουν πρωτεΐνες, οι οποίες περιέχουν την επαναλαμβανόμενη ακολουθία διπεπτιδίων αργινίνης/σερίνης (RS περιοχή). Η ομάδα των SRPKs ανακαλύφθηκε πρόσφατα, το 1994 (1) και τα μέλη αυτής είναι ένζυμα ιδιαίτερα συντηρημένα κατά την διάρκεια της εξέλιξης. Μέχρι σήμερα, τουλάχιστον δεκατρία διαφορετικά γονίδια που κωδικοποιούν κινάσες πρωτεϊνών σερίνης/αργινίνης έχουν αναγνωριστεί σε διάφορους οργανισμούς: στα θηλαστικά, οι ανθρώπινες SRPK1 (GenBank accession No:U09564), SRPK1a (accession No:AJ318054) και SRPK2 (accession No:U88666A), στο ποντίκι οι SRPK1 (accession No:AJ224115), SRPK2 (accession No:AB006036), SRPK3 (accession No AJ 292980), στο ζυμομύκητα *S. cerevisiae* η Sky1 (accession No: S55098), στο ζυμομύκητα *S. pombe* η Dsk1 (accession No: D13447), στη *Drosophila* η SRPK1 (accession No:AF01149), στο νηματοειδές *C. elegans* η SPK-1 (accession No:AF241656), στο τρυπανόσωμα *cruxi* η TcSRPK (accession No: AY101382), στο *Dictyostelium discoideum* η SRPK1-like kinase (accession No: AY101382), καθώς και στο φυτό *Arabidopsis thaliana* η SRPK1 (No: AJ292978).

Η ομάδα των κινασών SRPK φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες στους διάφορους οργανισμούς, όπως στην ρύθμιση του ματίσματος του mRNA (1-4), στην μεταφορά των πρωτεϊνών στον πυρήνα (6,7), στην ανάπτυξη των γαμετικών κυττάρων στον *C.elegans* (8), στη μεταφορά πολυαμινών, στην ομοιοστασία ιόντων στον *S.c* (9).και στη σηματοδότηση για την ανάπτυξη των μυών (10).

Μέχρι πρόσφατα, γνωρίζαμε ότι ο ρόλος των SR κινασών στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς περιοριζόταν σε αυτόν της ρύθμισης του ματίσματος, δεδομένου ότι οι SR πρωτεΐνες, οι οποίες εμπλέκονται στην διαδικασία του ματίσματος, ήταν τα μοναδικά γνωστά υποστρώματα των SR κινασών. Παρ' όλα αυτά, η ανακάλυψη καινούργιων υποστρωμάτων, τα οποία είναι πρωτεΐνες που δεν σχετίζονται άμεσα με τον μηχανισμό του ματίσματος, όπως ο υποδοχέας της λαμίνης B (LBR) (11) και η πρωταμίνη P1 (12),καθώς και οι προαναφερθείσες πρόσφατες

παρατηρήσεις (6-10) άφησαν ανοιχτό το ενδεχόμενο της εμπλοκής των SR κινασών σε άλλες κυτταρικές λειτουργίες.

SRPK1

Η ανθρώπινη μορφή της SRPK, η SRPK1, κλωνοποιήθηκε το 1994 (1) και χαρακτηρίστηκε για την ικανότητα της να φωσφορυλιώνει ένα παράγοντα ματίσματος, τον ASF/SF2, σε πολλαπλές θέσεις φωσφορυλίωσης στα διπεπτίδια αργινίνης/σερίνης και να τον ανακατανέμει κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (13, 32).

Η SRPK1 αποτελείται από 655 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 74,3kDa. Δομικά, αποτελείται από μία περιοχή με δράση κινάσης (80-653 αα.), η οποία χωρίζεται σε δύο μέρη από ένα ενδιάμεσο τμήμα αμινοξέων (226-490 αα.), μια περιοχή πρόσδεσης του ATP (86-109 αα.), μια περιοχή πλούσια σε λυσίνη (258-276 αα.) και δύο πιθανά σήματα πυρηνικού εντοπισμού.

Η SRPK1 εκφράζεται σε μεγαλύτερο βαθμό στους όρχεις και συγκεκριμένα στα σπερματογόνια και όχι στα σπερματοζώαρια (12), αμέσως μετά στο πάγκρεας και σε μικρότερο ποσοστό σε άλλους ιστούς (12,14). Όσον αφορά στην υποκυτταρική της κατανομή, η SRPK1 εντοπίζεται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα, παρόλο που διαθέτει δύο αλληλουχίες πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signals, NLS). Έχει αποδειχθεί ότι ο υποκυτταρικός της εντοπισμός εξαρτάται από το στάδιο του κυτταρικού κύκλου στο οποίο βρίσκεται το κύτταρο (15).

Η SRPK1, όντας μέλος της οικογένειας των κινασών σερίνης/αργινίνης φωσφορυλιώνει διπεπτίδια RS με τρόπο εξειδικευμένο, δηλαδή αναγνωρίζει στα υποστρώματα της μόνο αργινίνες (όχι λυσίνες) και φωσφορυλιώνει μόνο σερίνες (όχι θρεονίνες). Τα πιο γνωστά της υποστρώματα είναι οι SR πρωτεΐνες, ο υποδοχέας της λαμίνης LBR (11) και η πρωταμίνη P1(12). Η ύπαρξη λοιπόν αυτών των υποστρωμάτων εμπλέκει την SRPK1 σε διάφορες λειτουργίες, όπως στη ρύθμιση του ματίσματος, στην οργάνωση της χρωματίνης και στη συμπύκνωση της χρωματίνης κατά τη σπερμιογένεση.

Εμπλοκή της SRPK1 στη ρύθμιση του ματίσματος

Η SRPK1 εμπλέκεται στη ρύθμιση του ματίσματος, μέσω φωσφορυλίωσης των SR πρωτεϊνών (5). Οι SR πρωτεΐνες αποτελούν μια σημαντική κατηγορία παραγόντων και ρυθμιστών του ματίσματος (16).

Δομικά αποτελούνται από ένα ή δυο μοτίβα αναγνώρισης του RNA στο αμινοτελικό τους άκρο (RNA Recognition Motifs, RRM) και από επαναλαμβανόμενα διπεπτίδια αργινίνης/σερίνης στο καρβοξυτελικό τους άκρο, όπως υποδηλώνει άλλωστε και το όνομα τους. Οι SR πρωτεΐνες προσδέονται στο RNA μέσω των RRM και αλληλεπιδρούν με άλλες SR πρωτεΐνες, μέσω των RS περιοχών τους.

Οι SR πρωτεΐνες εντοπίζονται σε ιδιαίτερες δομές του πυρήνα, τις πυρηνικές κηλίδες (nuclear speckles). Παρ' όλα αυτά, κάποιοι παράγοντες ματίσματος εντοπίζονται εκτός του πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα και πηγαινοέρχονται μεταξύ των δυο αυτών διαμερισμάτων.

Οι SR πρωτεΐνες εμπλέκονται στο μάτισμα, τόσο στο συστατικό όσο και στο εναλλακτικό. Κατά το εναλλακτικό μάτισμα είναι δυνατή η δημιουργία πολλών διαφορετικών ώριμων mRNA από ένα γονίδιο και από ένα πρόδρομο mRNA, εξαιτίας της διαφορετικής κάθε φοράς σύζευξης των 5' και 3' θέσεων ματίσματος. Με αυτόν τον τρόπο προάγεται η ποικιλομορφία των πρωτεϊνών και αιτιολογείται η ύπαρξη πολύ μεγαλύτερου αριθμού πρωτεϊνών, αναλογικά με αυτόν των αντίστοιχων γονιδίων μέσα στο κύτταρο.

Η ρύθμιση της λειτουργίας των SR πρωτεϊνών γίνεται μέσω φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης του κατάλοιπου σερίνης των RS περιοχών τους ως εξής:

- Η φωσφορυλίωση των παραγόντων ματίσματος επάγει αρχικά την απελευθέρωση τους από τις θέσεις αποθήκευσης τους, τα speckles και στη συνέχεια την κατεύθυνση τους προς τις θέσεις μεταγραφής, για την πρόσδεση τους με τα πρόδρομα mRNA
- Η φωσφορυλίωση των παραγόντων ματίσματος από την οικογένεια των SR κινασών επάγει τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις (αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης), ώστε αυτοί να συγκροτήσουν ένα πλήρως λειτουργικό σύμπλοκο, κατά τα αρχικά στάδια της διαδικασίας ματίσματος του pre-mRNA. Αφού όμως ολοκληρωθεί η διαδικασία συγκρότησης του συμπλόκου αυτού, είναι απαραίτητη

η αποσυναρμολόγησή του για να προχωρήσει η αντίδραση του ματίσματος περαιτέρω. Αυτό επιτυγχάνεται με την δράση ειδικών φωσφατασών. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει, ότι οι SR κινάσες είναι απαραίτητες μόνο στα αρχικά στάδια του ματίσματος, ενώ για την ολοκλήρωση της διαδικασίας η δράση τους είναι ανεπιθύμητη και οδηγεί σε αναστολή.

- Η φωσφορυλίωση επηρεάζει επίσης την ικανότητα πρόσδεσης των SR-πρωτεϊνών στο RNA. Οι φωσφορυλιωμένες SR-πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα να προσδέονται σε ειδικές *cis* αλληλουχίες τις ESEs (exonic splicing enhancers) και στις ISEs (intronic splicing enhancers), οι οποίες βρίσκονται μέσα στα εξόνια και στα ιντρόνια αντίστοιχα, να αλληλεπιδρώντας με τους παράγοντες ματίσματος (*trans-acting factors*) έχουν την ικανότητα να δρουν σαν επαγωγείς του ματίσματος. Διαφορετικοί ενισχυτές ESEs αναγνωρίζονται από διαφορετικές ομάδες SR-πρωτεϊνών. Κάθε τύπος κυττάρου έχει διαφορετικές SR πρωτεΐνες και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, προάγοντας έτσι την διαδικασία του εναλλακτικού ματίσματος.
- Οι αποφωσφορυλιωμένες SR πρωτεΐνες προσδέονται στο ώριμο mRNA και το βοηθούν να εξαχθεί από τον πυρήνα. Αυτό οφείλεται στην αλληλεπίδραση τους με τον υποδοχέα TAP/NXF1, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την έξοδο του mRNA από τον πυρήνα (nuclear export receptor 1) (17).
- Η κίνηση των SR πρωτεϊνών από και προς τον πυρήνα επηρεάζεται από τον κύκλο φωσφορυλίωσης - αποφωσφορυλίωσης. Πιο συγκεκριμένα, η αποφωσφορυλίωσή τους στον πυρήνα επάγει την έξοδό τους από αυτόν, ενώ η φωσφορυλίωση τους στο κυτταρόπλασμα επάγει την επιστροφή τους σε αυτόν. Η φωσφορυλίωση στο κυτταρόπλασμα πραγματοποιείται από τις κυτταροπλασματικές SRPKs. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί, ότι ορισμένες μόνο από τις SR πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα να μεταναστεύουν από και προς τον πυρήνα.
- Μία σειρά αντιδράσεων *in vitro* και *in vivo* έδειξαν επίσης, ότι η φωσφορυλίωση των SR πρωτεϊνών είναι σημαντική για την αλληλεπίδρασή τους με την καρβοξυτελική περιοχή της DNA πολυμεράσης II (CTD) (18).

Όλα τα παραπάνω δείχνουν ότι η φωσφορυλίωση των SR πρωτεϊνών παίζει ρόλο στην διαδικασία του ματίσματος, ενώ η αποφωσφορυλίωση αυτών προάγει την σύζευξη του ματίσματος με άλλες διαδικασίες που προηγούνται ή έπονται αυτού.

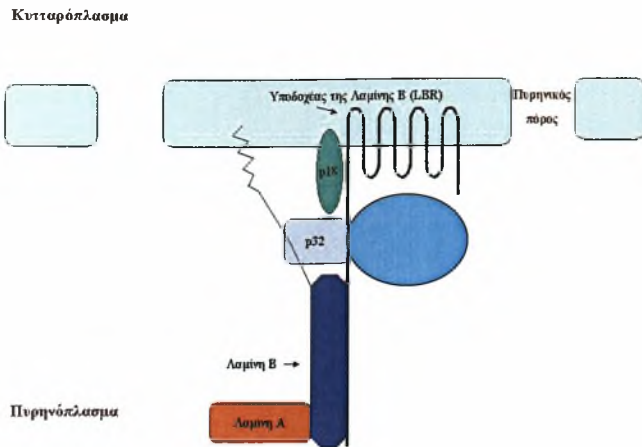
Εμπλοκή της SRPK1 στην οργάνωση της χρωματίνης

Η φωσφορυλίωση του υποδοχέα της λαμίνης Β (LBR) από την SRPK1 εμπλέκει την τελευταία στην διαδικασία οργάνωσης της χρωματίνης (11).

Ο LBR είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη (71kD) της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης του κυττάρου, η οποία δεσμεύει την πυρηνική λαμίνη Β, η οποία με τη σειρά της αποτελεί θέση πρόσδεσης της χρωματίνης. Επομένως, ο LBR είναι ο κύριος υπεύθυνος για την αλληλεπίδραση της χρωματίνης με τον πυρηνικό φάκελο.

Η φωσφορυλίωση από την SRPK1 του αμινοτελικού άκρου του LBR, το οποίο είναι πλούσιο σε διπεπτίδια RS αυξάνει την ικανότητα δέσμευσης του υποδοχέα στην χρωματίνη, ενώ η αποφωσφορυλίωσή του μειώνει δραματικά την ικανότητα δέσμευσης του με την λαμίνη Β. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει τον σημαντικό ρόλο της φωσφορυλίωσης αυτής στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πυρηνικής μεμβράνης και πυρηνικής λάμινας και κατ' επέκταση στην οργάνωση της χρωματίνης μέσα στον πυρήνα (19).

Έχει βρεθεί ακόμα ότι ο LBR αλληλεπιδρά και με άλλες πρωτεΐνες στο εσωτερικό του πυρήνα, εκτός από την λαμίνη και τις SRPK1s, δημιουργώντας κατ' αυτόν τον τρόπο ένα σύμπλοκο (LBR complex) (εικόνα 1). Μια από αυτές είναι η πρωτεΐνη p34/p32 (20), η οποία παρουσιάζει τεράστια ομολογία με την πρωτεΐνη p32, η οποία έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με τον παράγοντα ματίσματος ASF/SF2 (20). Δεδομένης λοιπόν της ύπαρξης μιας πρωτεΐνης σχετιζόμενης με το μάτισμα στο σύμπλοκο του LBR και της ύπαρξης RS περιοχών σε αυτόν, μπορούμε να υποθέσουμε ότι ο LBR μόνος του ή σε συνδυασμό με την p34/p32 μπορεί να αλληλεπιδρά με συστατικά της συσκευής του ματίσματος.



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση του συμπλόκου του Υποδοχέα της Λαμίνης Β.

Εμπλοκή της SRPK1 στη συμπύκνωση της χρωματίνης κατά τη σπερμιόγένεση

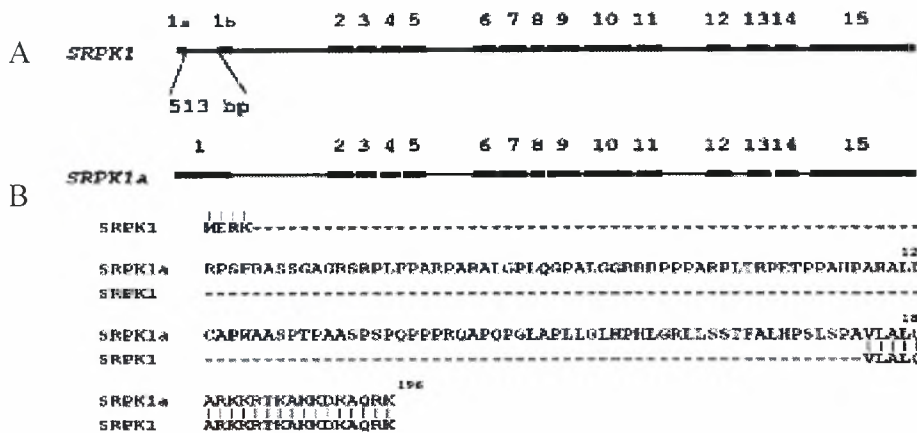
Η εμπλοκή της SRPK1 στη συμπύκνωση της χρωματίνης κατά τη σπερμιόγένεση γίνεται μέσω φωσφορυλίωσης της πρωταμίνης P1 (12).

Η πρωταμίνη P1 είναι μια πολύ βασική πρωτεΐνη του πυρήνα, η οποία περιέχει στην αμινοτελική της περιοχή μια αλληλουχία διπεπτιδίων RS και εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό κατά το στάδιο της επιμήκυνσης των σπερματίδων. Βασική λειτουργία των πρωταμινών είναι η αντικατάσταση των ιστονών, ώστε να προκύψει χρωματίνη με μεγαλύτερο βαθμό συμπύκνωσης. Κατά τα αρχικά στάδια της σπερματογένεσης οι πρωταμίνες φωσφορυλιώνονται, ενώ αργότερα στα ώριμα σπερματοζωάρια αποφωσφορυλιώνονται στο μεγαλύτερο μέρος τους (21). Το γεγονός αυτό συμφωνεί και με τον υψηλό βαθμό έκφρασης της SRPK1 στα πρώιμα στάδια της σπερματογένεσης (22).

SRPK1α

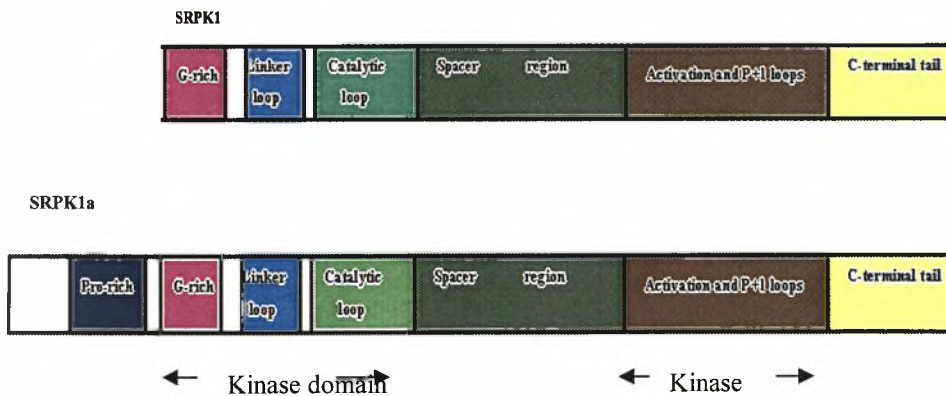
Η SRPK1α αποτελεί μια ισομορφή της SRPK1, η οποία είναι αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου της τελευταίας (εικόνα 2) (14). Το γονίδιο των δύο αυτών ισομορφών εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6p21.2-p21.3. Η πρωτεΐνη SRPK1α αποτελείται από 826 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 92,3 kDa. Δομικά αποτελείται από τις ίδιες περιοχές με την SRPK1, με την διαφορά ότι διαθέτει και μία επιπλέον περιοχή 171 αμινοξέων στο αμινοτελικό της άκρο (εικόνα 3). Η περιοχή

αυτή είναι πλούσια σε προλίνες, γεγονός που ευνοεί τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης.



Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση του εναλλακτικού τρόπου ματίσματος της SRPK1a.

A) Αναπαράσταση της δομής του γονιδίου των SRPK1/1a. Το εξόνιο 1 της SRPK1a αποτελείται από τα εξόνια 1a και 1b της SRPK1 καθώς και από το τμήμα των 513 bp το οποίο δεν περιλαμβάνεται στην SRPK1. B) Σύγκριση της αμινοξικής ακολουθίας που κωδικοποιείται από το εξόνιο 1 της SRPK1a με την ακολουθία που κωδικοποιούν τα εξόνια 1a και 1b της SRPK1



Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση της δομής των SRPK1 και SRPK1a.

Η ενζυμική δράση, η εξειδίκευση ως προς τα υποστρώματα και η ιστοειδική έκφραση της SRPK1a μοιάζουν σε μεγάλο βαθμό με αυτές της SRPK1, με κάποιες ωστόσο διαφορές. Πιο συγκεκριμένα, η SRPK1a βρέθηκε ότι φωσφορυλιώνει τόσο τον ASF/SF2 όσο και τον LBR, με ενεργότητα όμως διπλάσια έως τριπλάσια σε σχέση με αυτήν της SRPK1 (14). Ακόμα, παρατηρήθηκε έκφραση της SRPK1a στους όρχεις. Η έκφραση όμως αυτή ήταν αποκλειστική στον συγκεκριμένο ιστό και μάλιστα μικρότερη συγκριτικά με την αυτήν της SRPK (14).

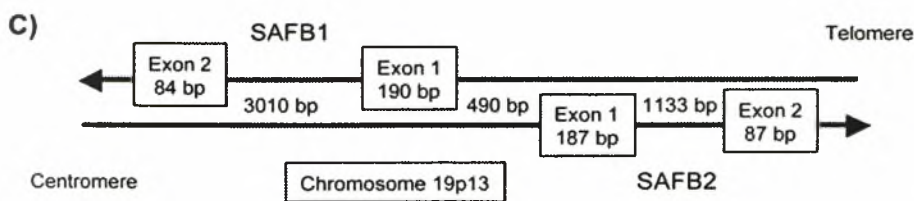
Επιπλέον, μια αξιοσημείωτη διαφορά μεταξύ των δύο αυτών ισομορφών του ίδιου ενζύμου είναι η ειδική αλληλεπίδραση της SRPK1a με αρκετές κυτταρικές

πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, με την χρήση του συστήματος των δύο υβριδίων και χρησιμοποιώντας ως «δόλωμα» την συγκεκριμένη περιοχή, απομονώθηκαν πολλές πρωτεΐνες, οι οποίες αλληλεπιδρούν με το N-τελικό άκρο της SRPK1a σε κύτταρα *S. Cerevisiae* (Racel Kohen et.al). Για μια από αυτές, τον παράγοντα της πυρηνικής μήτρας SAFB1, δείχθηκε η αλληλεπίδραση του, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, με την κινάση SRPK1a και σε πολύ μικρότερο βαθμό με την κινάση SRPK1 (14).

Scaffold Attachment Binding Factors (SAFBs)

Η οικογένεια των SAFBs περιλαμβάνει μέχρι σήμερα τις πρωτεΐνες SAFB1, SAFB2 και SAFB3, οι οποίες παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία μεταξύ τους και διαθέτουν κοινές κυτταρικές λειτουργίες, ωστόσο έχουν και μοναδικές ιδιότητες.

Τόσο το γονίδιο του SAFB1 όσο και αυτό του SAFB2 εντοπίζονται στο χρωμόσωμα 19p13.3 και είναι τοποθετημένα το ένα δίπλα στο άλλο, χωριζόμενα από μια μικρή περιοχή (<500bp) πλούσια σε GC (εικόνα 4). Η περιοχή αυτή λειτουργεί σαν δικατευθυνόμενος υποκινητής (λειτουργεί τόσο σε 5' → 3', όσο και σε 3' → 5' κατεύθυνση), γι' αυτό και τα δύο γονίδια εκφράζονται ταυτόχρονα. Πιστεύεται ότι τα δυο αυτά γονίδια προήρθαν από διπλασιασμό ενός αρχέγονου γονιδίου. Ο SAFB3 έχει συμπεριληφθεί στην οικογένεια των SAFBs λόγω ομολογίας (35%) με τον SAFB1. Παρ' όλα αυτά, δεν διαθέτουμε αξιοσημείωτες πληροφορίες γι' αυτόν.



Εικόνα 4. Διαμόρφωση των γονιδίων SAFB1 και SAFB2 πάνω στο χρωμόσωμα 19p13.

Οι πρωτεΐνες SAFBs εντοπίζονται σε αφθονία στην πυρηνική μήτρα, όπως υποδηλώνει άλλωστε και το όνομα τους.

Πυρηνική μήτρα

Ως πυρηνική μήτρα ή πυρηνικό κρίωμα ή πυρηνικό σκελετό (nuclear matrix or nuclear scaffold or nucleoskeleton) ονομάζουμε το δίκτυο πρωτεϊνών (NMP's- nuclear matrix proteins) και RNA που παραμένει αδιάλυτο έπειτα από την κατεργασία πυρήνων με μη ιονικά απορρυπαντικά, διαλύματα αλάτων υψηλής ιοντικής ισχύος και DNase I. 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.

Η πυρηνική μήτρα αποτελείται από την πυρηνική λάμινα και την εσωτερική πυρηνική μήτρα (internal nuclear matrix). Η πυρηνική λάμινα αποτελείται από τις λαμίνες τύπου A και B. Οι λαμίνες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους δίνοντας διμερή τα οποία στη συνέχεια πολυμερίζονται για να μας δώσουν τα ενδιάμεσα ινίδια (intermediate filaments) πάχους 10 nm. Τα ινίδια αυτά δημιουργούν ένα δίκτυο στη εσωτερική πλευρά της πυρηνικής μεμβράνης που ως στόχο έχει τη συντήρηση της δομικής ακεραιότητας και του σχήματος του πυρήνα. Η εσωτερική πυρηνική μήτρα αποτελείται από τα κεντρικά νημάτια (core filaments), το διάχυτο σκελετό (diffuse skeleton), τον πυρηνίσκο (nucleolus) και τα λοιπά πυρηνικά σώματα (nuclear bodies). Η σύσταση της μήτρας έχει υπολογιστεί σε 85-95% πρωτεΐνες και 15-5% νουκλεϊκά οξέα. Έως τώρα έχουν βρεθεί 398 πρωτεΐνες της εσωτερικής πυρηνικής.

Στην πυρηνική μήτρα, οι περιοχές στις οποίες παραμένουν προσκολλημένες αλληλουχίες DNA, ύστερα από κατεργασία με DNase I, ονομάζονται S/MARs (scaffold matrix attachment regions). Οι S/MARs περιοχές είναι πλούσιες σε AT και πιστεύεται ότι συμβάλλουν στην οργάνωση της χρωματίνης, αφού μεσολαβούν στην σύνδεσή της με την πυρηνική μήτρα. Ωστόσο, ο ρόλος τους στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης και στην ρύθμιση της μεταγραφής δεν είναι απόλυτα γνωστός και πρέπει να διαλευκανθεί.

SAFB1

Ο SAFB1 (915 αμινοξέα, 100,3 kD) κλωνοποιήθηκε το 1996 και χαρακτηρίστηκε σαν μια πρωτεΐνη της πυρηνικής μήτρας, η οποία έχει την ικανότητα σύνδεσης σε S/MARs περιοχές (23).

Δομικά, η πρωτεΐνη περιέχει, ξεκινώντας από το στο N-τελικό της άκρο, μια περιοχή δέσμευσης DNA (SAF-Box), μια περιοχή δέσμευσης RNA (RNA Recognition Motif), μία περιοχή πλούσια σε αργινίνες και γλουταμινικό οξύ (RE περιοχή), μία περιοχή πλούσια σε γλυκίνες κοντά στο C-τελικό άκρο (G). Το τμήμα μεταξύ των αμινοξέων 599-614 περιλαμβάνει το σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) (εικόνα 5).



Εικόνα 5. Δομή του παράγοντα SAFB1

Ο SAFB1 είναι εν τέλει μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω αλληλεπιδρά με το S/MAR DNA, μέσω της αμινοτελικής του περιοχής. Εκτός όμως από την αλληλεπίδραση του με DNA, ο SAFB1 έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά και με RNA, μέσω του RRM, αλλά και με πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται στην διαδικασία του ματίσματος, οι οποίες συχνά φέρουν RRM (24, 25). Μία άλλη πρωτεΐνη με το καρβοξυτελικό άκρο της οποίας έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά ο SAFB1 είναι η RNA πολυμεράση II, εμπλέκοντας τον SAFB1 στην διαδικασία της μεταγραφής, αφήνοντας έτσι ανοιχτό το ενδεχόμενο ο SAFB1 να είναι συστατικό της μεταγραφικής συσκευής καθώς και να αποτελεί συνδετικό κρίκο μεταξύ της μεταγραφής και της διαδικασίας του ματίσματος (26). Η συμμετοχή του στη μεταγραφή επιβεβαιώνεται ακόμα από την αλληλεπίδρασή του με τον υποκινητή του γονιδίου της πρωτεΐνης θερμικού σοκ Hsp27 (27) και τη σύνδεσή του με τον υποδοχέα οιστρογόνων (ERα), του οποίου τη δράση καταστέλλει (28). Ο SAFB1 έχει βρεθεί επίσης ότι αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη, παρεμποδίζοντας την φάση S του κυτταρικού κύκλου (29). Σε πειράματα που έγιναν σε SAFB1^{-/-} ποντίκια για να ανιχνευθεί ο φυσιολογικός ρόλος της πρωτεΐνης αυτής, αποδείχθηκε ότι ο SAFB1

παίζει καθοριστικό ρόλο στην εμβρυϊκή ανάπτυξη καθώς και στη δημιουργία και τη σωστή λειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος (30).

Τέλος, ο SAFB1 (του οποίου το καρβοξυτελικό άκρο είναι πλούσιο σε RE) είναι μία από τις πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά το πλούσιο σε προλίνες αμινοτελικό άκρο της SRPK1a, όπως βρέθηκε με το σύστημα των δύο υβριδίων (14). Πρέπει να σημειωθεί όμως ότι ο SAFB1 δεν αποτελεί υπόστρωμα της SRPK1a, αφού δεν διαθέτει RS περιοχές.

SAFB2

Ο SAFB2 παρουσιάζει με τον SAFB1 πολλές ομοιότητες, τόσο δομικές όσο και λειτουργικές. Πιο συγκεκριμένα, ο SAFB2 (953 αμινοξέα, 10,7kD) παρουσιάζει 75% ομολογία με τον SAFB1 σε νουκλεοτιδικό επίπεδο και 74% σε αμινοξικό (εικόνα 6). Δομικά, διαθέτει και αυτός τις ίδιες διακριτές περιοχές με τον SAFB1: SAF-Box, RRM, NLS, RE περιοχή, και μια περιοχή πλούσια σε γλυκίνη (εικόνα 7). Οι περιοχές SAF-Box και RRM είναι ιδιαίτερα συντηρημένες, ενώ η λειτουργία των τριών άλλων περιοχών δεν είναι ακόμα γνωστή. Όσον αφορά στη λειτουργία του, δρά και αυτός σαν καταστολέας του υποδοχέα των οιστρογόνων και σαν παρεμποδιστής της κυτταρικής ανάπτυξης, παρεμποδίζοντας την φάση S του κυτταρικού κύκλου. Και οι δύο πρωτεΐνες εκφράζονται σε πολλούς ιστούς.

Ωστόσο, ο SAFB1 και ο SAFB2 διαφέρουν ως προς τον ενδοκυτταρικό τους εντοπισμό, καθώς και ως προς την αλληλεπίδραση τους με διάφορα μόρια. Ο SAFB1 είναι πυρηνική πρωτεΐνη, ενώ ο SAFB2 εντοπίζεται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα (31). Επιπλέον, με το σύστημα των δύο υβριδίων βρέθηκε ότι ο SAFB2 αλληλεπιδρά με ένα μόριο του κυτταροπλάσματος, την βινεξίνη, η οποία εμπλέκεται σε φαινόμενα κυτταρικής σηματοδότησης, κυτταρικής προσκόλλησης καθώς και στην οργάνωση του κυτταροσκελετού (31). Αυτός ο κυτταροπλασματικός εντοπισμός του SAFB2 και η αλληλεπίδρασή του με την βινεξίνη πιθανόν να εμπλέκει το μόριο αυτό σε επιπρόσθετες λειτουργίες, πέραν των ήδη γνωστών που συμβαίνουν στον πυρήνα και είναι κοινές με αυτές του SAFB1. Άλλωστε, είναι γεγονός ότι ο διπλασιασμός ενός γονιδίου κατά την διάρκεια της εξέλιξης συχνά οδηγεί σε μία νέα κυτταρική λειτουργία.

χρησιμοποιείται το αμινοτελικό άκρο του LBR (μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Προτείνεται ότι η αναστολή αυτή πιθανόν να οφείλεται στις αλληλουχίες RE ,οι οποίες προσομοιάζουν χημικά με φωσφορυλιωμένες περιοχές RS.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη των χαρακτηριστικών της *in vitro* αναστολής της δράσης της κινάσης SRPK1a από τον παράγοντα της πυρηνικής μήτρας SAFB1.

Πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος της Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας αφορούν στη μελέτη της βιολογικής σημασίας της αλληλεπίδρασης του ενζύμου SRPK1a με τον παράγοντα SAFB1. Στα πλαίσια των πειραμάτων αυτών αποδείχθηκε ότι παρουσία του καρβοξυτελικού άκρου του SAFB1 αναστέλλεται η δραστικότητα της SRPK1a, σε *in vitro* δοκιμασία δράσης κινάσης, με ένζυμο απομονωμένο από κύτταρα θηλαστικών με την τεχνική της ανοσοκατακρήμνισης και υπόστρωμα βακτηριακό παρασκεύασμα LBR.

Με την εργασία αυτή προσανατολιστήκαμε συγκεκριμένα στην επίλυση δύο προβλημάτων:

1. Είναι υπεύθυνες για την αναστολή που παρατηρείται από την πρωτεΐνη SAFB1C οι πλούσιες σε RE (αργινίνη-σερίνη) αλληλουχίες της; Οι αλληλουχίες αυτές προσομοιάζουν χημικά τις αλληλουχίες RS (αργινίνη-σερίνη) που αποτελούν υπόστρωμα της κινάσης, ιδιαίτερα όταν αυτές είναι φωσφορυλιωμένες. Στοχεύσαμε στην κατασκευή πλασμιδίου σχεδιασμένου έτσι ώστε να παράγει την πρωτεΐνη SAFB1CΔRE, η οποία αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη SAFB1C, από την οποία έχουν εξαλειφθεί οι αλληλουχίες RE. Εφ' όσον θα παραγόταν η επιθυμητή πρωτεΐνη θα μελετούσαμε την επίδραση της στην δράση της κινάσης.
2. Αναστέλλεται η δράση της SRPK1a από την αντίστοιχη περιοχή της πρωτεΐνης SAFB2; Οι παράγοντες SAFB1 και SAFB2 παρουσιάζουν υψηλή ομολογία στην αμινοξική τους αλληλουχία και δεν είναι γνωστές συγκεκριμένες διαφοροποιημένες λειτουργίες τους μέχρι σήμερα. Στοχεύσαμε λοιπόν στην κατασκευή πλασμιδίου σχεδιασμένου έτσι ώστε να παράγει την πρωτεΐνη SAFB2C(-) με αλληλουχία αντίστοιχη με την αυτή της πρωτεΐνης SAFB1C (θα περιέχει αντίστοιχη περιοχή RE), με την οποία έχει δειχθεί η αναστολή. Εφ' όσον η πρωτεΐνη SAFB2C(-) παραχθεί θα μπορεί να ελεγχθεί για την επιρροή της στη δράση της κινάσης.

ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Τα αντιδραστήρια της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης είναι τα παρακάτω: (αναγράφονται οι τελικές τους συγκεντρώσεις)

- DNA εκμαγείο (template): 10-20ng
- Εκκινητής 1 (oligo 5') : 200ng
- Εκκινητής 2 (oligo 3') : 200ng
- Buffer Vent (1X)
- dNTPs :200-400μM
- 10% v/v DMSO (Διμεθυλοσουλφοξείδιο)(προαιρετικά)
- Vent : 5units
- ddH₂O : έως 50μl

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αποτελείται από τρία καθορισμένα στάδια α) την αποδιάταξη (denaturation), το οποίο πραγματοποιείται σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 90⁰C για 30 sec-5min, β) την υβριδοποίηση (annealing), η θερμοκρασία τη οποίας εξαρτάται από την θερμοκρασία αποδιάταξης των εκκινητών (συνήθως 50-60⁰C) και γ) την επιμήκυνση, η οποία πραγματοποιείται στους 72⁰C για 1 λεπτό (extension).

2. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτική αγαρόζης

- Ζυγίζουμε την κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης.
- Την διαλύουμε σε κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος 50xTAE. ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 1xTAE.
- Ανακινούμε και θερμαίνουμε στους 100⁰ C μέχρι να λιώσει.
- Όταν πέσει η θερμοκρασία του διαλύματος στους 60⁰ C, προσθέτουμε τόσο όγκο βρωμιούχου αιθιδίου 10 mg/ml ώστε στο διάλυμα η συγκέντρωσή του να είναι 0,5μg/ml.

- Ρίχνουμε το διάλυμα στην συσκευή ηλεκτροφόρησης που φέρει τις κατάλληλες εγκοπές και περιμένουμε να πήξει.
- Προσθέτουμε 1xTAE ώστε να καλυφθεί η πηκτή.
- Προσθέτουμε στα δείγματα του DNA διάλυμα χρωστικής.
- Εναποθέτουμε τα δείγματα στις εγκοπές της πηκτής.
- Συνδέουμε με ηλεκτρόδια την συσκευή και ηλεκτροφορούμε στα 100 V για τουλάχιστον 20 λεπτά.
- Τοποθετούμε την πηκτή πάνω από λάμπα υπεριώδους και φωτογραφίζουμε.

3. Καθαρισμός προϊόντων αντίδρασης PCR

Ο καθαρισμός των προϊόντων της αντίδρασης PCR γίνεται με την χρήση αντιδραστηρίων και βάση του πρωτοκόλλου του Qiaquick PCR Purification Kit Protocol της εταιρίας Qiagen.

- Προσθέτουμε πέντε όγκους διαλύματος PB1 σε έναν όγκο διαλύματος προϊόντων αντίδρασης PCR και ανακατεύουμε.
- Ελέγχουμε το χρώμα του μίγματος να είναι κίτρινο.
- Τοποθετούμε την ειδική στήλη (QIA quick spin column) σε ένα σωλήνα συλλογής των 2ml (παρέχεται από το kit).
- Για να συνδεθεί το DNA προσθέτουμε το δείγμα στη στήλη και φυγοκεντρούμε για 1λεπτό στις 10.000 rpm.
- Αποχύνουμε το αδέσμευτο κλάσμα και τοποθετούμε τη στήλη ξανά στο σωλήνα συλλογής.
- Για να ξεπλύνουμε την στήλη, προσθέτουμε 0,75ml διαλύματος PE στην στήλη και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό.
- Αποχύνουμε το αδέσμευτο κλάσμα και τοποθετούμε την στήλη ξανά στο σωλήνα συλλογής. Φυγοκεντρούμε ξανά την στήλη για ένα επιπλέον λεπτό.
- Τοποθετούμε την στήλη σε ένα καθαρό σωλήνα φυγοκέντρωσης των 1.5 ml.
- Για να εκλούσουμε το DNA προσθέτουμε στη στήλη 50μl διαλύματος EB (elution buffer) και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στις 10.000 rpm.

4. Πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Σε ένα eppendorf προσθέτουμε:

- χ μ grDNA
- το/τα κατάλληλο/α ένζυμο/α περιορισμού σε ποσότητα όχι μεγαλύτερη του 1/10 του τελικού όγκου της αντίδρασης και όχι μικρότερη του 1 unit/ μ g DNA.
- το κατάλληλο buffer ειδικά για το/τα ένζυμα σε συγκέντρωση 1X
- BSA (bovine serum albumin-αλβουμίνη από ορό βοοειδούς), ώστε η τελική συγκέντρωσή του να είναι 100 μ g/ml (σε όποιο ένζυμο χρειάζεται).
- 0.5 μ l ριβονουκλεάσης RNase A (όταν το DNA προέρχεται από παρασκευή μικρής κλίμακας και περιέχει βακτηριακό RNA).
- ddH₂O μέχρι του επιθυμητού τελικού όγκου

Η πέψη πραγματοποιείται στους 37 °C

5. Απομόνωση και καθαρισμός DNA από πηκτή αγαρόζης

Ο καθαρισμός γίνεται με την χρήση αντιδραστηρίων και βάση του πρωτοκόλλου του Qiaquick Gel Extraction Kit της εταιρίας Qiagen. Με το πρωτόκολλο αυτό μπορούμε να απομονώσουμε DNA μεγέθους από 70 bp έως 10kb.

- Ζυγίζουμε τον σωλήνα (eppendorf) των 2ml.
- Κόβουμε προσεκτικά το τμήμα της πηκτής που περιέχει το DNA με αποστειρωμένο νυστέρι.
- Ζυγίζουμε ξανά το eppendorf με το κομμάτι DNA.
- Προσθέτουμε τριπλάσιο όγκο διαλύματος QG διαλυτοποίησης της αγαρόζης (100 mg~100 μ l).
- Επωάζουμε στους 50 °C για 10' μέχρι να λιώσει η πηκτή και ταυτόχρονα αναδεύουμε.
- Προσθέτουμε έναν όγκο ισοπροπανόλης.
- Περνάμε το περιεχόμενο του eppendorf από ειδική στήλη (QIA quick spin column) για να γίνει η πρόσδεση του DNA.

- Φυγοκεντρούμε τη στήλη για 1΄ στις 13000 rpm.
- Αποχύνουμε το αδέσμευτο κλάσμα (flow through).
- Προσθέτουμε 500 μl διαλύματος QG. Φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 1 λεπτό. Χύνουμε το αδέσμευτο κλάσμα.
- Προσθέτουμε στο ίζημα 750 μl διαλύματος PE . Φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 1λεπτό. Χύνουμε το αδέσμευτο κλάσμα.
- Φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 1 λεπτό χωρίς διάλυμα για να απαλλαχτούμε από τα υπολείμματα .
- Τοποθετούμε την στήλη σε ένα erpendorf.
- Προσθέτουμε 50 μl ddH₂O για να εκλουθεί το DNA.
- Αναμένουμε 2-3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρούμε ξανά για να ανακτήσουμε το DNA.
- Φυλάσσουμε το DNA στην κατάψυξη.

6. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια βακτηρίων

6A. Μεσαίας κλίμακας (Midi Prep)

Για την απομόνωση και τον καθαρισμό πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας χρησιμοποιώντας το kit Qiagen-tip 500 ακολουθείται το παρακάτω πρωτόκολλο όπως προτείνει ο κατασκευαστής. Με το πρωτόκολλο αυτό μπορεί να απομονωθεί DNA ποσότητας μέχρι και 100μg .

- Καλλιεργούμε το κατάλληλο στέλεχος βακτηρίων E.Coli σε 100ml LB amp. ολονύχτια (O/N) στους 37°C.
- Φυγοκεντρούμε στις 4000 rpm για 15΄ στους 4°C.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και διαλύουμε το ίζημα σε 4ml Buffer P1 (προσθέτουμε RNAση αν δε έχει το διάλυμα P1).
- Προσθέτουμε 4ml Buffer P2, ανακινούμε ήπια 5-6 φορές για 5΄ σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθέτουμε 4ml Buffer P3, ανακινούμε ήπια 5-6 φορές και αφήνουμε για 15΄ στον πάγο

- Φυγοκεντρούμε στις 4000 rpm για 30' στους 4 °C.
- Ενεργοποιούμε τις στήλες με 4ml QBT.
- Φιλτράρουμε το υπερκείμενο σε γάζα και το αποχύνουμε στην στήλη.
- Ξεπλένουμε 2 φορές με QF για να εκλουστεί το DNA.
- Προσθέτουμε 3,5ml ισοπροπανόλης στο έκλουσμα.
- Φυγοκεντρούμε στις 11000 rpm για 30' στους 4 °C.
- Αποχύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε στο ίζημα 2ml αιθανόλης 70%.
- Φυγοκεντρούμε στις 11000 rpm για 10' στους 4 °C.
- Αφήνουμε την αιθανόλη να εξατμιστεί και προσθέτουμε στο ίζημα κατάλληλο όγκο ddH₂O.

6B. Μικρής κλίμακας (Mini Prep) με αλκαλική λύση

- Επιάζουμε καλλιέργεια βακτηρίων E.Coli σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες με 3ml LBamp, ολονύχτια (O/N) στους 37°C.
- Μεταφέρουμε τις καλλιέργειες σε erpendorf των 1.5ml.
- Φυγοκεντρούμε στις 14000 rpm για 1'.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε το υπόλοιπο 1.5ml των καλλιερειών.
- Φυγοκεντρούμε στις 14000 rpm για 1'.
- Αποχύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε στο ίζημα 300 μl διαλύματος TENS (0.1N NaCl, 0.5% SDS σε διάλυμα Tris10 mM - EDTA 1mM pH 7,5). Αναδεύουμε καλά στον αναδευτήρα (vortex).
- Προσθέτουμε 150μl CH₃COONa 3M pH5.8 και αναδεύουμε στον αναδευτήρα.
- Φυγοκεντρούμε στις 14000 rpm για 2' και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο erpendorf.
- Προσθέτουμε 1ml 100% αιθανόλης, αναδεύουμε και φυλάσσουμε το υπερκείμενο για 30 min στους -20 °C.
- Φυγοκεντρούμε στις 14000 rpm για 5' στους 4 °C.
- Αποχύνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο, προσθέτουμε 1ml 70% αιθανόλη και αναδεύουμε.
- Φυγοκεντρούμε στις 14000 rpm για 1' στους 4 °C.

- Αποχύνουμε το υπερκείμενο προσεκτικά και αφήνουμε το ίζημα να αποξηραθεί.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 20μl ddH₂O.

7. Παρασκευή πλασμιδιακού φορέα κατάλληλου για κλωνοποίηση

7Α. Πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Ακολουθείται το πρωτόκολλο 4

7Β. Αποφωσφορυλίωση του γραμμικού πλασμιδιακού DNA με αλκαλική φωσφατάση (CIP)

Η CIP εμποδίζει την επανασύνδεση των άκρων του πλασμιδιακού DNA, το οποίο κόπηκε με κατάλληλες ενδονουκλεάσες περιορισμού και έτσι το καθιστά κατάλληλο φορέα για κλωνοποίηση.

Στα 200μl πέψης προσθέτουμε 1U CIP/μg DNA

- Επωάζουμε για 1 ώρα στους 37⁰C.
- Προσθέτουμε 2,5mM EDTA (pH 8).
- Απενεργοποιούμε την αλκαλική φωσφατάση για 15' στους 75⁰C.

7Γ. Καθαρισμός με εκχυλίσαις φαινόλης-χλωροφόρμιου

- Προσθέτουμε ίσο όγκο διαλύματος φαινόλης-χλωροφόρμιου με τον όγκο του διαλύματος του νουκλεϊκού οξέος.
- Αναδεύουμε στον αναδευτήρα (vortex).
- Φυγοκεντρούμε στις 12000 rpm για 15'' και μεταφέρουμε την υδατική φάση (υπερκείμενο) σε αποστειρωμένο σωλήνα μικροφυγόκεντρου (eppendorf).
- Επαναλαμβάνουμε τα τρία προηγούμενα στάδια
- Προσθέτουμε ίσο όγκο χλωροφόρμιου και αναδεύουμε.
- Φυγοκεντρούμε στις 12000 rpm για 15'' και μεταφέρουμε την υπερκείμενη υδατική φάση σε νέο σωληνάκι
- Κατακρημνίζουμε το DNA με αιθανόλη.

7Δ. Κατακρήμνιση του DNA με αιθανόλη

- Προσθέτουμε διπλάσιο όγκο (2V) 100% αιθανόλης και 1/10 (0,1V) του όγκου CH₃COONa 3M pH 5.2 και αναδεύουμε.
- Ψύχουμε τα δείγματα στους -20 °C για 30' έως O/N.
- Φυγοκεντρούμε στις 14000 rpm για 5' στους 4 °C.
- Αποχύνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο, προσθέτουμε 1 ml αιθανόλη 70% και αναδεύουμε.
- Φυγοκεντρούμε στις 14000 rpm για 1' στους 4 °C.
- Αποχύνουμε το υπερκείμενο προσεκτικά και αφήνουμε το ίζημα να ξηραθεί.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα στον κατάλληλο όγκο ddH₂O.

8. Αντίδραση σύνδεσης

Σε ένα eppendorf προσθέτουμε:

- 50-100 ng πλασμιδιακού φορέα
- ένθεμα σε μοριακή αναλογία 5:1 σε σχέση με τον φορέα
- 1X ρυθμιστικό διάλυμα T4 DNA λιγάσης
- 1-5 units T4 DNA λιγάση
- ddH₂O έως 20 μl

Επωάζουμε O/N σε θερμοκρασία δωματίου και απενεργοποιούμε τη λιγάση στους 65°C για 10'.

9. Παρασκευή δεκτικών βακτηριακών κυττάρων

Εφαρμόζεται για TOP10, XL1-Blue, HB101 κλπ. βακτήρια

- Παίρνουμε μια αποικία από πιάτο ή από διάλυμα αποθήκευσης βακτηρίων με γλυκερόλη (glycerol stock) που βρίσκεται στους -80 °C και εμβολιάζουμε καλλιέργεια των 5ml TYM θρεπτικού υλικού στην οποία έχει προστεθεί 5 μl στρεπτομυκίνη (100μg/μl).
- Αναδεύουμε για 16 ώρες περίπου (O/N, overnight) στους 37 °C

- (προαιρετικό στάδιο): Από την O/N καλλιέργεια παίρνουμε 30 λ και τα προσθέτουμε σε 3ml φρέσκου χωρίς αντιβιοτικά TYM θρεπτικού υλικού (αραίωση 1:100) και τα αφήνουμε να επωαστούν με ανάδευση στους 37 °C για 2-3 ώρες.
- Με TYM μηδενίζουμε το φωτόμετρο.
- Προσθέτουμε 250 λ από την καλλιέργεια σε 50 ml TYM χωρίς αντιβιοτικά (αραίωση 1:250) και επωάζουμε με ανάδευση στους 37 °C μέχρι να μεγαλώσουν και να φτάσουν OD_{600nm}=0.350-0.400.
- Φυγοκεντρούμε στα 3000rpm για 5min (4000g) στους 4 °C.
- Πετάμε το υπερκείμενο και αναδιαλύουμε το ίζημα των βακτηρίων σε 25ml (μισό του αρχικού όγκου καλλιέργειας) TFB-I διάλυμα.
- 10 min στον πάγο.
- Φυγοκεντρούμε στα 3000rpm για 5min (4000g) στους 4 °C.
- Πετάμε το υπερκείμενο και το ίζημα των βακτηρίων αναδιαλύεται σε 2ml (1:25 του αρχικού όγκου καλλιέργειας) TFB-II διάλυμα.
- 60 min στον πάγο.
- Τα βακτήρια είναι έτοιμα για transformation (μετασχηματισμό).
- Εναλλακτικά, μοιράζουμε τα βακτήρια σε eppendorfs και τα αποθηκεύουμε στους -80 °C.
- Χρησιμοποιούμε: 200λ διαλύματος κυττάρων για κάθε αντίδραση μετασχηματισμού.

10. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων E.Coli

Για να μετασχηματίσουμε 200 μl E.Coli δεκτικών κυττάρων χρησιμοποιούμε 0.05-1μg DNA ή 10μl από τα προϊόντα της αντίδρασης λιγάσης.

- Επωάζουμε τα κύτταρα με το DNA για 30' στον πάγο.
- Αφήνουμε τα κύτταρα για 2' στους 42 °C.
- Μεταφέρουμε αμέσως τα κύτταρα στον πάγο για 3'.
- Προσθέτουμε 800 μl LB.
- Επωάζουμε στους 37 °C για 1ώρα.

- Φυγοκεντρούμε για στις 14000 rpm.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο έως ότου περισσέψουν 100μl και διαλύουμε το ίζημα σε αυτόν τον όγκο.
- Απλώνουμε τα βακτήρια σε τρυβλία LB με αντιβιοτικό επιλογής και επωάζουμε στους 37°C O/N, ώστε να πολλαπλασιαστούν τα μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα.

11. Επαγωγή έκφρασης πρωτεϊνών βακτηριακών κυττάρων με IPTG

- Απλώνουμε τα βακτηριακά κύτταρα που έχουν μετασχηματιστεί με τον ανασυνδιασμένο πλασμιακό φορέα σε τρυβλίο με κατάλληλο θρεπτικό υλικό που περιέχει αντιβιοτικό επιλογής και επωάζουμε στους 37° C O/N.
- Εμβολιάζουμε υγρό θρεπτικό υλικό με αντιβιοτικό επιλογής με 3-4 αποικίες από το τρυβλίο που περιέχει τα μετασχηματισμένα βακτήρια και επωάζουμε το αιώρημα αυτό στους 37° C O/N υπό ανάδευση.
- Πραγματοποιείται αραιώση 1/10 και 1/20 και φωτομέτρηση σε OD=600nm, ώστε να υπολογιστεί η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας.
- Μεταφέρουμε κατάλληλη ποσότητα από την παραπάνω καλλιέργεια στην επιθυμητή ποσότητα θρεπτικού υλικού (LB με το ίδιο αντιβιοτικό), ώστε η καινούργια καλλιέργεια να ξεκινήσει από OD=0.05-0.07.
- Επωάζουμε την καλλιέργεια υπό ισχυρή ανάδευση στους 37° C μέχρι η απορρόφηση του αιωρήματος των κυττάρων γίνει ίση με A₅₉₀=0.6-0.7.
- Προσθέτουμε 1 mM IPTG και επωάζουμε για το επιθυμητό χρονικό διάστημα (από 1,5 έως 6 ώρες) στην ίδια θερμοκρασία κατάλληλο χρονικό διάστημα (από 1.5 έως 6 ώρες).
- Φυγοκεντρούμε την καλλιέργεια στις 4000 rpm για 15' στους 4°C (συλλογή κυττάρων).
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο.
- Προαιρετική φύλαξη στους -20°C όλη νύχτα.

Τα κύτταρα στα τρία τελευταία στάδια φυλάσσονται στον πάγο.

12. Παρασκευή εκχυλίσματος βακτηριακών κυττάρων

- Επαναιωρούμε το ξηρό ίζημα σε διάλυμα λύσης.
- Λύουμε τα κύτταρα με υπερήχους.
- Φυγοκεντρούμε το παραπάνω εκχύλισμα μετά τους υπερήχους στις 10000 rpm για 30' στους 4 °C.
- Διαχωρίζουμε το διαλυτό (υπερκείμενο) από το αδιάλυτο κλάσμα (ίζημα).

Για τον περαιτέρω καθορισμό της πρωτεΐνης χρησιμοποιούμε το διαλυτό κλάσμα. Στις παραπάνω διαδικασίες τα δείγματα φυλάσσονται στον πάγο.

lysis buffer: 1X PBS, 100mM EDTA (pH 8), 0.1mM PMSF, πρωτεϊνικοί αναστολείς

13. Καθαρισμός πρωτεϊνών με επίτοπο GST

Για τον καθαρισμό των πρωτεϊνών με επίτοπο GST χρησιμοποιούμε το διαλυτό κλάσμα από την κατεργασία των βακτηριακών κυττάρων μετά την επαγωγή, το οποίο διαπερνάμε μέσα από ειδική στήλη αγκιστείας η οποία περιέχει σφαιρίδια Σεφαρόζης-γλουταθειόνης.

- Προετοιμάζουμε τα σφαιρίδια της στήλης αγκιστείας: αιωρούμε τα σφαιρίδια (100ml για κάθε 200ml διαλυτού κλάσματος) στη στήλη και διηθούμε δύο φορές με 2 ml διαλύματος λύσης και μία φορά με 1 ml διαλύματος λύσης.
- Επωάζουμε το διαλυτό κλάσμα με τα σφαιρίδια για 1ώρα στους 4 °C με ανάδευση.
- Σταματούμε την ανάδευση και αφήνουμε για λίγα λεπτά μέχρι να συγκεντρωθούν τα σφαιρίδια στον πυθμένα της στήλης.
- Ανοίγουμε το πώμα της στήλης και αφήνουμε να περάσει το κλάσμα με τις πρωτεΐνες που δεν δεσμεύτηκαν στην στήλη (flow through).
- Πλένουμε την στήλη 3x 2 ml διαλύματος λύσης (wash).
- Πλένουμε την στήλη τρεις φορές με διάλυμα έκλυσης (glutathione elution buffer) (Elute 1, 2, 3) για να γίνει έκλυση των GST πρωτεϊνών.
- Διατηρούμε τα κλάσματα στον πάγο.

Διάλυμα έκλουσης: 10 mM γλουταθειόνης (GSH) σε 50 ml Tris-HCl 50 mM (ph 8)

14. Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford

- Σε ένα σωλήνα με 790 μl ddH₂O προσθέτουμε 10 μl από τα δείγμα της άγνωστης πρωτεΐνης, της οποίας την συγκέντρωση θέλουμε να προσδιορίσουμε.
- Σ' αυτό προσθέτουμε 200 μl αντιδραστηρίου Biorad Protein Assay Dye Reagent. Ανακατεύουμε για 2' σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μετρούμε την απορρόφηση στα 595nm .
- Με την βοήθεια της πρότυπης καμπύλης της αλβουμίνης (πρωτεΐνη αναφοράς) προσδιορίζουμε την συγκέντρωση της άγνωστης πρωτεΐνης .

Αντιδραστήριο Biorad Protein Assay Dye Reagent: διάλυμα χρωστικής coomassie brilliant blue G, φωσφορικού οξέος και μεθανόλης

15. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

- Ετοιμάζουμε την συσκευή σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Έχουμε καθαρά και στεγνά τα τζάμια, τους δύο οδηγούς και την πλαστική οδοντωτή μήτρα που θα χρησιμοποιήσουμε. Προσαρμόζουμε τους οδηγούς ανάμεσα στα δύο τζάμια και τα τοποθετούμε στο σύστημα στήριξης.
- Ετοιμάζουμε 10ml πηκτής διαχωρισμού 8% ή 10% ή 12% και την ρίχνουμε στην συσκευή αφήνοντας δυο εκατοστά από την επιφάνεια.
- Γεμίζουμε το κενό των δυο εκατοστών με ddH₂O.
- Περιμένουμε μέχρι να πολυμεριστεί η πηκτή. Όταν πολυμεριστεί χύνουμε το ddH₂O και απομακρύνουμε προσεκτικά το υπόλοιπο με διηθητικό χαρτί.
- Αφού η πηκτή διαχωρισμού πολυμεριστεί ετοιμάζουμε 5ml της πηκτής επιστοίβαξης 5% και την ρίχνουμε και αυτή στην συσκευή πάνω από την πηκτή διαχωρισμού.
- Εισάγουμε το χτενάκι και περιμένουμε να πολυμεριστεί η πηκτή.

- Αφαιρούμε το χτενάκι και γεμίζουμε τα πηγαδάκια με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer).
- Πριν φορτώσουμε τα δείγματα τα αναμειγνύουμε με διάλυμα φόρτωσης σε τελικό όγκο 1X και θερμαίνουμε στους 95 °C για 5 λεπτά. Το ίδιο κάνουμε και για τον μάρτυρα μοριακών βαρών.
- Φορτώνουμε τα δείγματα στα πηγαδάκια με σύριγγα Hamilton.
- Ηλεκτροφορούμε την πηκτή κάτω από σταθερή ένταση ρεύματος 30 mA ή 8 V/cm έως τη στιγμή που ο μάρτυρας μοριακών βαρών αρχίζει να εξέρχεται από την πηκτή.

Πηκτή διαχωρισμού (separating gel) 10% (10ml): 3.4ml 30% acrylamide, 2.5ml 4x separating buffer, H₂O μέχρι τα 10 ml, 50 μl 10% APS, 50 μl TEMED

Πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel)(8ml): 1.2ml 30% acrylamide, 2ml 4x stacking buffer, H₂O μέχρι τα 8 ml, 50 μl 10% APS, 50 μl TEMED

4x διάλυμα φόρτωσης: 0.25M Tris-HCl pH=6.8, 9.2% SDS, 40% glycerol, 0.2% bromophenol blue, 100mM DTT (προστίθεται λίγο πριν την χρήση)

4x separating buffer: 1.5M Tris, 8mM EDTA, 0.4% SDS, pH 8.8

4x stacking buffer: 0.5M Tris, 8mM EDTA, 0.4% SDS, pH 8.8

5x διαλύματος μεταφοράς (running buffer): 0.25M Tris, 1.92M glycine, 10mM EDTA, 0.5% SDS

Βαφή των πηκτών SDS-PAGE με Coomassie Brilliant Blue R-250

- Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης εμβαπτίζουμε την πηκτή σε διάλυμα χρώσης που περιέχει :
 - 0.25% Coomassie Brilliant Blue R-250,
 - 10% οξικό οξύ,
 - 45% μεθανόλη,
 όπου και ανακινείται για διάστημα 1 ώρας.

- Ανακινούμε την πηκτή σε διάλυμα αποχρωματισμού:
 - 10% οξικό οξύ,
 - 45% μεθανόλη,
- έως ότου η πηκτή αποχρωματιστεί και μείνουν μόνο οι πρωτεΐνες χρωματισμένες.
(3-4 φορές αλλαγή διαλύματος αναδεύοντας την κάθε φορά για 10 λεπτά)

16. Ανοσοαποτύπωμα κατά Western

- Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης ανοίγουμε τις γυάλινες πλάκες και πετούμε την πηκτή επιστοίβαξης. Την πηκτή διαχωρισμού την τοποθετούμε για 5 λεπτά σε διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer)
- Τοποθετούμε σε ένα δοχείο που περιέχει έξι διηθητικά χαρτί 3MM και την μεμβράνη που θα χρησιμοποιήσουμε στην μεταφορά και τα αφήνουμε να βραχούν για 5-10 λεπτά.
- Δημιουργούμε ένα «σάντουιτς» τοποθετώντας κάτω 3 διηθητικά χαρτιά, στην συνέχεια την μεμβράνη, την πηκτή και από πάνω άλλα τρία διηθητικά χαρτιά
- Με μια γυάλινη ράβδο αφαιρούμε όλες τις φυσαλίδες ανάμεσα από τα διάφορα φύλλα.
- Γεμίζουμε την συσκευή μεταφοράς με διάλυμα μεταφοράς και τοποθετούμε το «σάντουιτς» με το σωστό προσανατολισμό στην συσκευή.
- Η μεταφορά γίνεται για 1,5 ώρες κάτω από σταθερή τάση ρεύματος (40mA) ανάλογα με το μέγεθος της πηκτής και των πρωτεϊνών που πρόκειται να μεταφερθούν.
- Βγάζουμε την πηκτή και την ξεπλένουμε με νερό.
- Προσθέτουμε την βαφή 0,2% Ponceau S για 1 λεπτό.
- Ξεπλένουμε με νερό ξανά και οι πρωτεΐνες εμφανίζονται κόκκινες.
- Στην συνέχεια ξεπλένουμε τρεις φορές με PBS-Tween 1x (1X10' και 2X5') υπό συνεχή ανάδευση για να ξεβάψουμε την πηκτή.
- Επωάζουμε τη μεμβράνη για 1 ώρα με το διάλυμα μπλοκαρίσματος (blocking buffer).
- Ξεπλένουμε τρεις φορές με PBS-Tween 1x (1X10' και 2X5').
- Επωάζουμε τη μεμβράνη με το 1^ο αντίσωμα για δύο ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή 0.Ν στους 4 °C.

- Ξεπλένουμε τρεις φορές με PBS-Tween 1x (1X10' και 2X5').
- Επωάζουμε για 1 ώρα με το 2^ο αντίσωμα (αραιωμένο σε κατάλληλη συγκέντρωση σε PBS).
- Ξεπλένουμε τρεις φορές με PBS-Tween 1x (1X10' και 2X5').

Ακολουθεί προετοιμασία της μεμβράνης για εμφάνιση σε φωτογραφικό φιλμ με την μέθοδο της χημειοφωταύγειας:

- Τοποθετούμε τη μεμβράνη σε: 10ml διαλύματος λουμινόλης, 100 μl διαλύματος κουμαρικού οξέος, 30 μl 3% H₂O₂ για περίπου 5 λεπτά.
- Τοποθετούμε τη μεμβράνη μέσα σε ειδική κασετίνα. Καλύπτουμε την μεμβράνη με διάφανη μεμβράνη.
- Τοποθετούμε το φιλμ πάνω από την μεμβράνη και κλείνουμε την κασετίνα.
- Εμβαπτίζουμε τα φιλμ στα κατάλληλα αντιδραστήρια επώασης (developer and fixer) μέχρι να εμφανιστεί το αποτύπωμα πάνω στο φιλμ.

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την παραπάνω διαδικασία του ανασοαποτυπώματος:

Διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer): 48mM Tris, 39 mM glycine, 20% methanol, 1,3 mM SDS, ddH₂O

Ponceau S 0.2%: 2% Ponceau, 30% τριγλωρο-οξικό οξύ, 30% σουλφοσαλικυλικό οξύ, σε τελική αραίωση 1:10

PBS (phosphate buffer saline): 8 gr NaCl, 0.2 gr KCl, 1.44 gr Na₂HPO₄ x2 H₂O, 0.24gr KH₂PO₄, H₂O μέχρι 1Lt (για 1Lt), pH 7.4

PBS-Tween: 1xPBS, 0.1% Tween 20

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

Διάλυμα λουμινόλης (1,25mM): 0.222gr σε 0,1M Tris-Cl (για 1Lt)

διάλυμα κουμαρικού οξέος (6,8 mM) : 0.112 gr σε 100ml DMSO

17. Ανοσοκατακρήμιση (Immunoprecipitation)

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

Σύμφωνα με την τεχνική, η επώαση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος με συγκεκριμένο αντίσωμα σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, θα έχει ως αποτέλεσμα την αναγνώριση του αντιγόνου από το αντίσωμα και τη συμπλοκοποίηση του. Η προσθήκη του παραπάνω μίγματος σε στήλη σεφαρόζης-πρωτεΐνης A, εξισορροπημένης στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα, θα έχει ως αποτέλεσμα τη δέσμευση του συμπλόκου αντισώματος-αντιγόνου στα σφαιρίδια της πρωτεΐνης A και την παραλαβή του από το εκχύλισμα. Έτσι με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνουμε τον εξειδικευμένο διαχωρισμό/ καθαρισμό της φυσιολογικής μορφής μιας πρωτεΐνης μέσα από ένα μίγμα πρωτεϊνών. Η διαδικασία που ακολουθείται παρατίθεται παρακάτω:

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

- Πραγματοποιούμε τρεις πλύσεις όπως παραπάνω.
- Μετά το τέλος της τρίτης πλύσης προσθέτουμε 300 μl 20mM Tris-HCl pH=7.5, κάνουμε vortex και αναδεύουμε για 10' στους 4 °C.
- Φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 30'' και αποχύνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο.

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

18. Δοκιμασία δράσης κινάσης με in vitro φωσφορύλιωση των υποστρωμάτων τους (kinase assay)

Για την πραγματοποίηση ενός πειράματος ελέγχου δράσης κινάσης απαιτούνται: α) η κινάση β) το υπόστρωμα της κινάσης γ) [γ -P³²]-ATP δ) πιθανοί αναστολείς. Το μίγμα επώασης περιλαμβάνει επίσης 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 2.5mM ψυχρό ATP και [γ -P³²]-ATP. Τα δείγματα επωάζονται για 15 min σε θερμοκρασία 30 °C. Μετά το τέλος της επώασης προστίθενται 50 mM DTT και διάλυμα διαλυτοποίησης των δειγμάτων που χρησιμοποιείται στην SDS ηλεκτροφόρηση και στη συνέχεια τα δείγματα ηλεκτροφορούνται.

Ακολουθεί βαφή της πηκτής με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250 και αποχρωματισμός της. Στη συνέχεια γίνεται ξήρανση της πηκτής και εμφάνιση της με αυτοραδιογραφία

Αυτοραδιογραφία

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

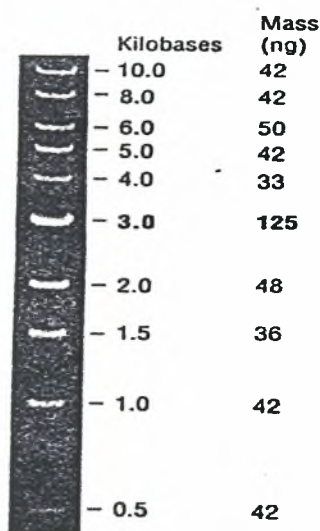
Στην περίπτωση των πηκτωμάτων που έχουν στερεωθεί και έχουν υποστεί χρώση, το πήκτωμα ανακινείται για 30 min σε διάλυμα αποχρωματισμού, ώστε να ξεπλυθεί και εν συνεχεία ξηραίνεται σε χαρτί Whatman 3MM υπό την παρουσία κενού σε ειδική συσκευή.

Το πήκτωμα στη συνέχεια τοποθετείται σε επαφή με το φιλμ σε φωτοστεγή κασετίνα, η οποία διατηρείται στους -80°C .

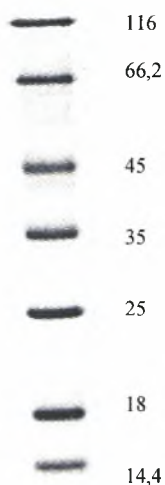
Η εμφάνιση και στερέωση του film γίνεται με εμβάπτιση υπό ανακίνηση σε X-Ray developer και X-Ray fixer αντίστοιχα.

ΜΑΡΤΥΡΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΒΑΡΩΝ DNA ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.

1Kb DNA ladder

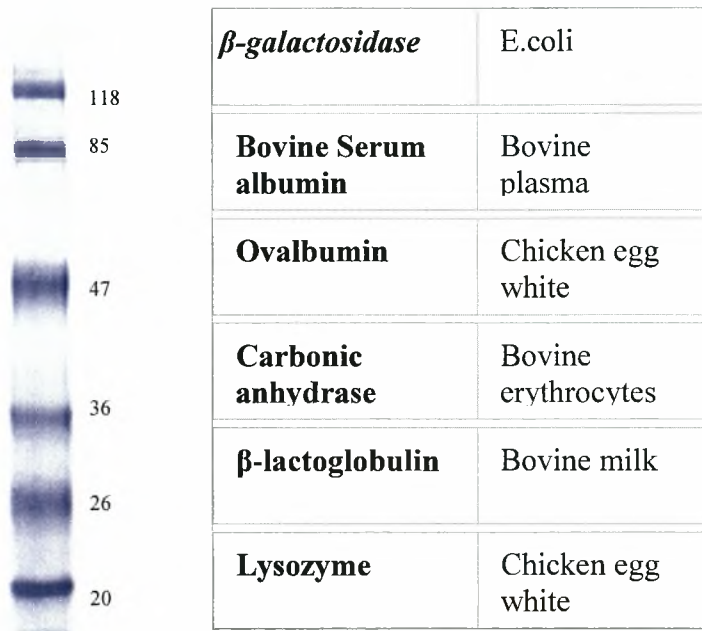


Μάρτυρας μοριακών βαρών πρωτεΐνης



Πρωτεΐνη	Πηγή	Μοριακό βάρος (kDa)
b-galactosidase	E.coli	116
Bovine serum albumin	bovine plasma	66,2
ovalbumin	chicken egg white	45
Lactate dehydrogenase	porcine muscle	35
Re <i>Bsp</i> 981	E.coli	25
b- lactoglobulin	bovine milk	18
Lysosyme	chicken egg	14.4

Prestained Protein Molecular Weight Marker Fermentas



Ο μάρτυρας μοριακών βαρών DNA που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις ηλεκτροφορήσεις είχε συγκέντρωση 0.5μg/μl. Στον μάρτυρα πρωτεϊνικών μοριακών βαρών η κάθε πρωτεΐνη έχει συγκέντρωση 0,1-0,2 mg/ml.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Κλωνοποίηση του cDNA του SAFB1ΔRE στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1

Σκοπός της δημιουργίας της κατασκευής pGEX-4T1/ SAFB1ΔRE ήταν η διερεύνηση της υπόθεσης ότι η πλούσια σε RE περιοχή του SAFB1 είναι υπεύθυνη για την *in vitro* αναστολή της δράσης της κινάσης SRPK1a.

1Α. Παραγωγή και κατεργασία του ενθέματος SAFBICARE

Με τη χρήση κατάλληλων εκκινήτων, και με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης ενισχύθηκε η περιοχή του γονιδίου του SAFB1 που έπεται των RE (εικόνα 8). Το τμήμα του SAFBIC το οποίο είναι απαλλαγμένο από την RE περιοχή θα έχει μέγεθος 624bp και το προϊόν έκφρασής του (SAFBICΔRE) θα αποτελείται, όπως φαίνεται και στην εικόνα, από 207 αμινοξέα και ως εκ' τούτου θα έχει μοριακό βάρος 22,7 kD. Σε σύντηξη με τον πρωτεϊνικό επίτοπο GST θα έχει μοριακό βάρος 49 kD, δεδομένου ότι η πρωτεΐνη GST έχει μοριακό βάρος περίπου 26 kD.

```

                                     630           640           650           660
                               SRVRSERER QRMQAQWERE EREERLEIARE RLAFORQRLR
670  RERMERERLE  680  RERMHVEHER  690  RREQERIHR  700  REELRRQEL  710  RYEQERRPAV  720  RRPYDLDRR
730  DAYWPEAKRA  740  GLDERYHSD  750  NRQERFHDF  760  HRDRGRYPD  770  SVDRRREGSR  780  MMGEREGQH
790  PERHGGPERH  800  GRDSRDGWG  810  YGSDKRMS  820  RGLPPPPRR  830  WGDHGRRED  840  RSWOGTADG
850  MMDRDHKRW  860  GGERMSGHS  870  GFGHMMNR  880  MSGRGSFAP  890  GASRGHP  900  GGMQGF  910  GFGG
SRGSRPSDARFTRY
```

Εικόνα 8. Αμινοξική αλληλουχία του καρβοξυτελικού άκρου του SAFB1. Με κόκκινο απεικονίζεται η πλούσια σε RE περιοχή περιοχή και με μπλε η περιοχή που ενισχύθηκε με PCR

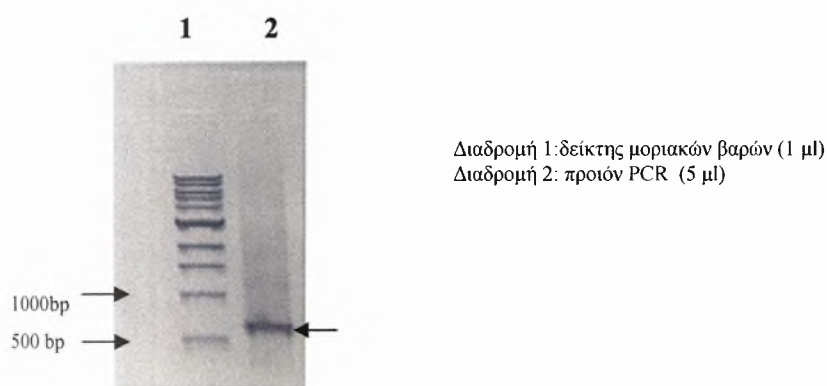
Αρχικά, πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο 1. Σαν εκμαγείο χρησιμοποιήθηκαν 20ng pGEX-2TK/SAFBIC (προυπάρχουσα

πλασμιδιακή κατασκευή που παράγει σε βακτήρια την πρωτεΐνη GST-SAFB1C). Χρησιμοποιήθηκαν ακόμα 0.8 μl θερμοανθεκτικής πολυμεράσης Vent. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50 μl. Οι εκκινητές περιέχουν θέσεις αναγνώρισης των ενδονουκλεασών περιορισμού EcoRI και BamHI (οι θέσεις κοπής είναι υπογραμμισμένες) και οι αλληλουχίες τους είναι:

Εκκινητές: 51CΔRE: 5' -TTTGGATCCGCGGTGCGGCGGC-3' (BamHI)
31CΔRE: 5' -TTGAATTCTCAGTAGCGGCGAGTGAA-3' (EcoRI)

Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η αντίδραση της PCR είναι: 94°C για 1 min (στάδιο αποδιάταξης), 52°C για 30 sec (στάδιο υβριδοποίησης), 72°C για 1min. (στάδιο επιμήκυνσης), για 30 κύκλους. Η αρχική απόδιάταξη έγινε στους 94°C για 5 min και η τελική επιμήκυνση στους 72°C για 5 min.

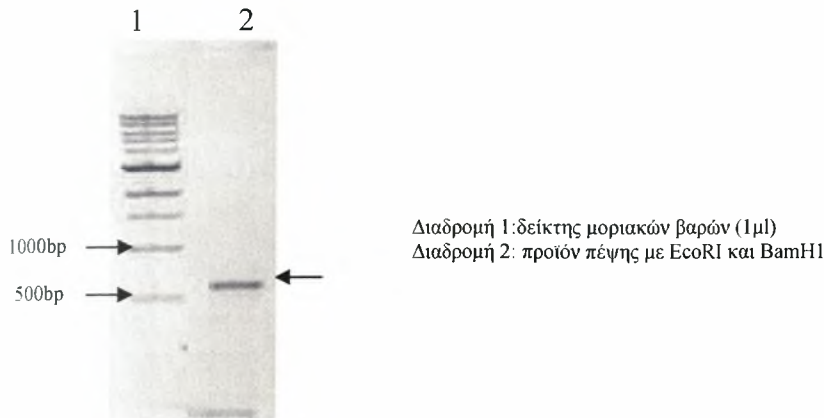
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο 2 (εικόνα 9). Όπως φαίνεται στην εικόνα το προϊόν της αντίδρασης ήταν στο αναμενόμενο μέγεθος των 624bp.



Εικόνα 9. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR. Με βέλος σημειώνεται το προϊόν της αντίδρασης

Αφού πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των προϊόντων της PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο 3, ακολούθησε πέψη τους με τα ένζυμα περιορισμού BamHI και EcoRI και με βάση το πρωτόκολλο 4. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 50μl απομονωμένου DNA, 5μl EcoRI, 5μl BamHI. Η πέψη έγινε σε τελικό όγκο 100μl. Κατόπιν, αφού ακολούθησε απομόνωση και καθαρισμός των προϊόντων της πέψης, με βάση το πρωτόκολλο 5, ακολούθησε ηλεκτροφόρησή τους σε πηκτή αγαρόζης 1% με την οποία επιβεβαιώθηκε ότι το DNA εκλούστηκε και δεν χάθηκε κατά την

παραπάνω διαδικασία (εικόνα 10). Με βέλος σημειώνεται το προϊόν της πέψης στο αναμενόμενο μέγεθος των ~600bp.



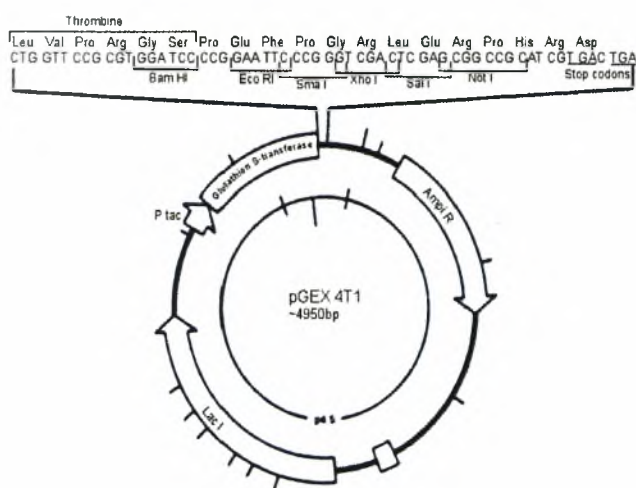
Εικόνα 10. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης με EcoRI και BamHI. Με βέλος σημειώνεται το προϊόν της πέψης.

1B. Απομόνωση και κατεργασία του πλασμιδιακού φορέα pGEX-4T1

Για την κλωνοποίηση του κατεργασμένου προϊόντος της PCR, με απώτερο σκοπό την έκφραση της αντίστοιχης πρωτεΐνης, χρησιμοποιήθηκε ως φορέας κλωνοποίησης το πλασμίδιο pGEX, από το οποίο παράγονται χημικώς πρωτεΐνες με αμινοτελικό τους άκρο την πρωτεΐνη GST (Glutathion-S-transferase)

Ο πλασμιδιακός φορέας pGEX (4948 bp) περιέχει α) μια περιοχή έναρξης αντιγραφής (origin of replication), β) το γονίδιο *lac I^h* το οποίο κωδικοποιεί μία κατασταλτική πρωτεΐνη, η οποία προσδένεται στην περιοχή χειρισμού του *tac* προαγωγέα και εμποδίζει την έκφρασή του μέχρι την εισαγωγή του IPTG (ισοπροπυλ-β-D-θειογαλακτοπυρανοσίδης), γ) το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (*Amp^r*), ώστε να είναι δυνατή η επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων και δ) το γονίδιο της τρανσφεράσης της γλνταθειόνης (GST), το οποίο περιέχει την αλληλουχία έναρξης της μετάφρασης ATG για την έκφραση της πρωτεΐνης και θέση πρόσδεσης στα ριβοσωμάτια και βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του προαγωγέα *tac* ε) τον προαγωγέα *tac* που ευθύνεται για την επαγωγή υψηλής έκφρασης πρωτεϊνών και τέλος ζ) την περιοχή κλωνοποίησης του πλασμιδίου, σε συνέχεια με το γονίδιο της GST, όπου βρίσκονται οι θέσεις αναγνώρισης των ενδονουκλεασών περιορισμού BamHI, SmaI και EcoRI που χρησιμοποιούνται για την εισαγωγή των ξένων αλληλουχιών DNA. Οι φορείς αυτοί υπάρχουν στο εμπόριο σε τρεις μορφές όπου η κάθε μία διαφέρει από την άλλη κατά ένα νουκλεοτίδιο στην περιοχή μεταξύ του γονιδίου της GST και της περιοχής

κλωνοποίησης, επιτρέποντας την κλωνοποίηση οποιουδήποτε ενθέματος σε συνέχεια με το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης της GST. Επίσης περιέχεται ένα κωδικόνιο τερματισμού σε κάθε αναγνωστικό πλαίσιο. Οι πρωτεΐνες που παράγονται σε βακτηριακά κύτταρα από τον φορέα pGEX μπορούν κατόπιν να απομονωθούν με χρωματογραφία αχιστείας σε στήλες Σεφαρόζης- γλουταθειόνης. Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-4T1 (εικόνα 11).

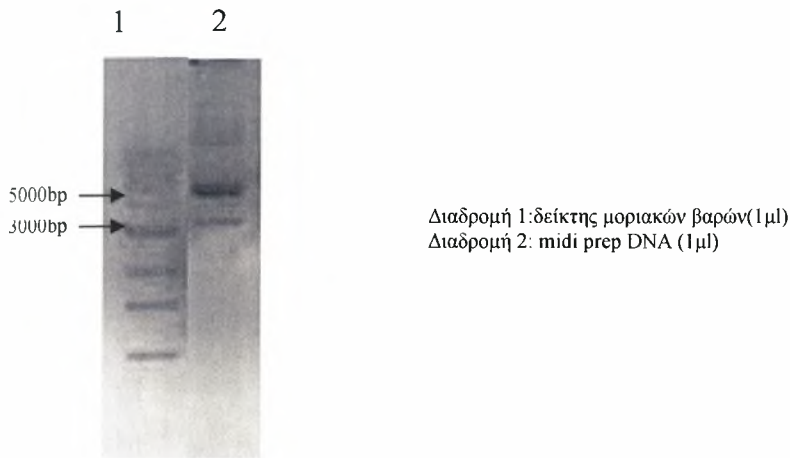


Εικόνα 11. Πλασμιδιακός φορέας pGEX-4T1

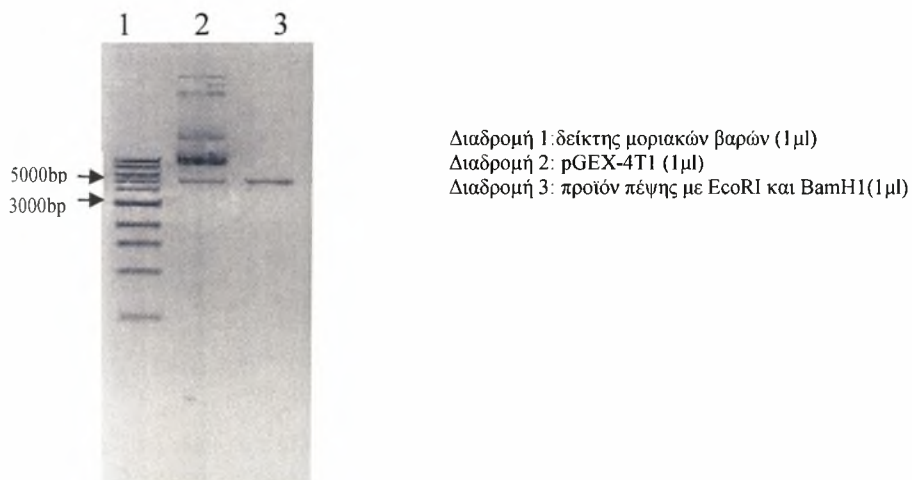
Ο φορέας κλωνοποίησης pGEX-4T1 αρχικά απομονώθηκε από καλλιέργεια βακτηριακών κύτταρων *E.coli* TOP10 με την χρήση του Qiagen midi kit, όπως αναφέρεται στο πρωτόκολλο 6A. Στη συνέχεια ακολούθησε φωτομέτρηση του πλασμιδιακού DNA στα 260nm UV και βρέθηκε ότι η συγκέντρωση του είναι C=0,41μg/μl. Η απομόνωσή του επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% (εικόνα 12). Στη συνέχεια, 10 μg της παρασκευής επωάστηκαν με 10μl EcoRI και 10μl BamHI (πρωτόκολλο 4), σε τελικό όγκο 200 μl. Με αυτόν τον τρόπο ο φορέας αποκτά άκρα συμβατά με αυτά του ενθέματος. Επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης ότι η πέψη ήταν επιτυχής (εικόνα 13) (πήραμε μια ζώνη μεγέθους ~5000bp, η οποία αντιστοιχεί στον γραμμικό pGEX-4T1).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αποφωσφορυλίωσή του μετά από επώαση με αλκαλική φωσφατάση (πρωτόκολλο 7B), καθαρισμός με εκχυλίσεις με φαινόλη/χλωροφόρμιο (πρωτόκολλο 7Γ) και κατακρήμνιση με αιθανόλη (πρωτόκολλο 7Δ). Μετά την κατεργασία του ενθέματος και του πλασμιδίου pGEX-4T1, ώστε να

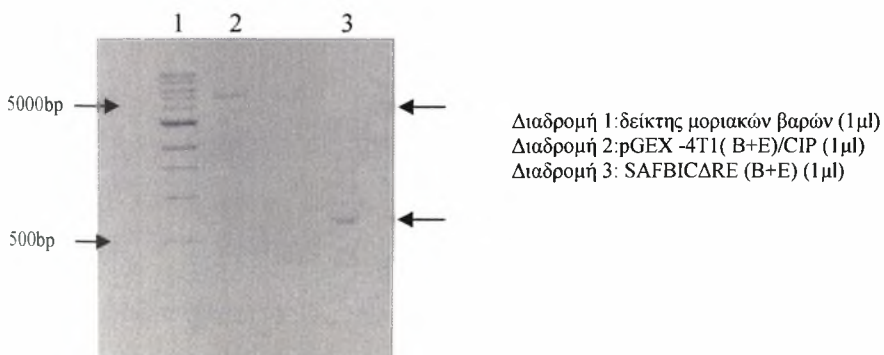
καταστεί κατάλληλος φορέας κλωνοποίησης, ηλεκτροφορήσαμε συγχρόνως και τα δύο δείγματα για να κάνουμε συγκριτική ποσοτικοποίησή τους (εικόνα 14). Από την φωτεινότητα των ζωνών συγκριτικά πάντα με τον μάρτυρα μοριακών βαρών συμπεραίνουμε ότι σε 1μl δείγματος φόρτωσης έχουμε περίπου 60 ng ενθέματος και περίπου 60 ng φορέα κλωνοποίησης



Εικόνα 12. Ηλεκτροφόρηση του απομονωμένου πλασμιδιακού DNA pGEX-4T1



Εικόνα 13. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης του απομονωμένου pGEX-4T1 με EcoRI και BamHI



Εικόνα 14. Ηλεκτροφόρηση του γραμμικού φορέα pGEX-4T1(B+E) /CIP και του SAFBICΔRE(B+E)

1Γ. Αντίδραση σύνδεσης και μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων *E.coli*.

Για την αντίδραση σύνδεσης ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο 8, σύμφωνα με το οποίο χρειαζόμαστε μοριακή αναλογία φορέα-ενθέματος 1:5. Δεδομένου όμως ότι ο φορέας κλωνοποίησης είναι 8 φορές μεγαλύτερος σε μέγεθος (5000bp) σε σχέση με το ένθεμα (622bp) και εφ' όσον στην αντίδραση σύνδεσης θα χρησιμοποιήσουμε 60 ng φορέα pGEX-4T1 πρέπει να προσθέσουμε $60 \cdot 5 \cdot 1/8 = 37,5$ ng ενθέματος. Με βάση την ποσοτικοποίηση που προηγήθηκε οι παραπάνω ποσότητες αντιστοιχούν σε 1μl pGEX-4T1 και 0,6μl ενθέματος. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκαν τρεις αντιδράσεις σύνδεσης, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 1):

Πίνακας 1: Σύσταση των αντιδράσεων σύνδεσης

	Αντίδραση 1	Αντίδραση 2	Αντίδραση 3
Φορέας	1μl	1μl	1μl
Ένθεμα	-	-	0,6μl
Ρυθμιστικό διάλυμα	2μl	2μl	2μl
λιγάνης 10X			
Λιγάνη	-	1μl	1μl
ddH ₂ O	17 μl	16 μl	15,4 μl
Υτελ.	20μl	20μl	20μl

Με το βακτηριακό μετασχηματισμό οι αποικίες που θα προκύψουν θα οφείλονται για την αντίδραση 1 σε άκοπα μόρια φορέα, για την αντίδραση 2 σε άκοπα αλλά και κομμένα μη φωσφορυλιωμένα μόρια φορέα και για την αντίδραση 3 σε μόρια των δύο προηγούμενων κατηγοριών αλλά και σε ανασυνδιασμένα με το ένθεμα μόρια φορέα.

Στη συνέχεια τα προϊόντα της αντίδρασης σύνδεσης εισήχθηκαν σε κύτταρα *E.coli* TOP10 με μετασχηματισμό (σε κάθε αντίδραση μετασχηματισμού προσθέσαμε 10μl προϊόντος αντίδρασης σύνδεσης για να μετασχηματίσουμε 200 μl δεκτικών βακτηριακών κυττάρων). Κατόπιν, έγινε επίστρωση σε τρυβλία Petri LB+amp και επώαση στους 37°C O/N (πρωτόκολλο 10). Χρησιμοποιήθηκαν τρία τρυβλία (ένα για κάθε αντίδραση σύνδεσης) και ένα τέταρτο σαν μάρτυρας, στο οποίο επιστρώθηκαν βακτήρια μετασχηματισμένα με 1ng πλασμιδίου αναφοράς, το οποίο ξέρουμε ότι έχει την ικανότητα να μετασχηματίζει τα κύτταρα μας. Με αυτό τον τρόπο θα

ανιχνεύσουμε πιθανό πρόβλημα στην απόδοση του μετασχηματισμού των δεκτικών μας κυττάρων.

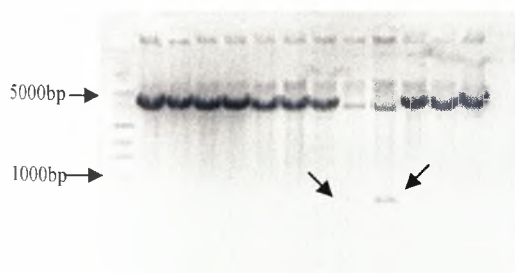
1Δ. Επιλογή ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pGEX

Στο τρυβλίο το οποίο περιέχει βακτήρια με προϊόντα της πρώτης αντίδρασης σύνδεσης αναπτύχθηκαν 7 αποικίες, στο δεύτερο καμία, στο τρίτο 180 και στο τέταρτο 300 αποικίες. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι είχαμε πολύ μικρό ποσοστό τόσο άκοπων φορέων όσο και φορέων οι οποίοι δεν έχουν αποφωσφορυλιωθεί. Επιλέξαμε, 12 αποικίες από το τρυβλίο με την αντίδραση 3 για να είναι βέβαιη η απόκτηση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου εν μέσω επανακυκλοποιημένων μορίων φορέα χωρίς ένθεμα, και τις καλλιεργήσαμε σε LB_{amp}O/N.

1Ε. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας από μετασχηματισμένα βακτήρια *E.coli* TOP10 με ανασυνδυασμένα πλασμίδια pGEX-4T1/SAFB1CARE

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας έγινε με βάση το ειδικό πρωτόκολλο 5B. Στην συνέχεια ακολούθησε πέψη του με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI και BamHI (πρωτόκολλο 4). Σε κάθε αντίδραση πέψης προστέθηκαν 4μl DNA, 1 μl EcoRI, 1μl BamHI, 0.5μl RNAση και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 20μl. Τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% (εικόνα 15). Όπως φαίνεται στην εικόνα τα πλασμίδια των διαδρομών 9 και 10 απελευθέρωσαν θραύσματα DNA μεγέθους 600bp (βέλη) μετά από πέψη με τα ένζυμα EcoRI και BamHI. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι τα πλασμίδια των συγκεκριμένων διαδρομών είναι ανασυνδυασμένα και κατάλληλα για την παραγωγή της πρωτεΐνης GST-SAFB1CARE.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



Διαδρομή 1: δείκτης μοριακών βαρών (1μl)
Διαδρομές 2-13: Mini Prep DNA (B+E) (20μl)

εικόνα 15. Ηλεκτροφόρηση των 12 παρασκευών DNA μικρής κλίμακας μετά από πέψη με EcoRI και BamHI

2. Έκφραση των πρωτεϊνών GST-SAFB1C, GST- SAFBICΔRE και GST-LBR

2A. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων BL21(RIL) με το πλασμίδιο pGEX-4T1/SAFBICΔRE

Για να μετασχηματίσουμε δεκτικά κύτταρα BL21(RIL) χρησιμοποιήσαμε 1μl του πλασμιδιακού DNA N^o10, σύμφωνα με το πρωτόκολλο 10. Τα συγκεκριμένα βακτήρια προτιμούνται έναντι άλλων για την έκφραση ανθρώπινων πρωτεϊνών, γιατί έχουν την ικανότητα να παράγουν τα ανθρώπινα tRNA των αντίστοιχων αμινοξέων (αργινίνη, ισολευκίνη, λευκίνη) σε μεγάλες ποσότητες, κάτι το οποίο δεν συμβαίνει φυσιολογικά μέσα στα βακτήρια.

Στο εργαστήριο προϋπήρχαν μετασχηματισμένα βακτήρια BL21(RIL) με pGEX- SAFB1C και XL1 με pGEX-LBR.

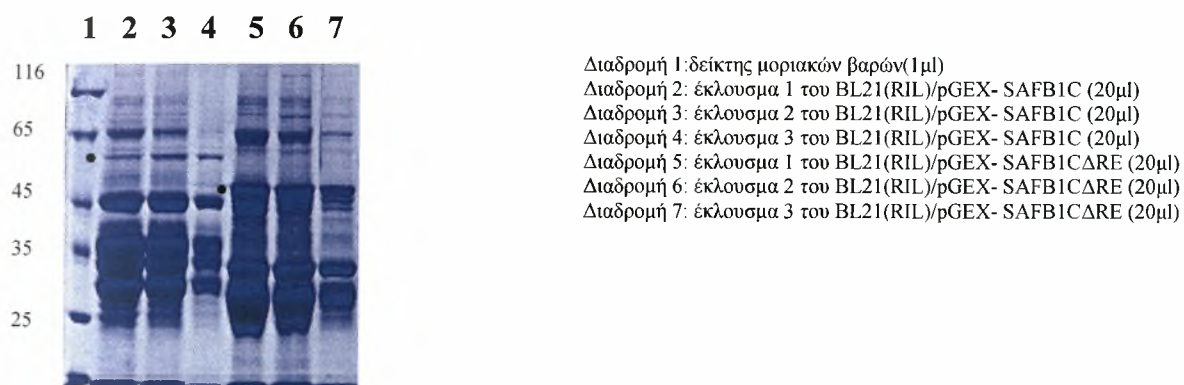
2B. Επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών, παρασκευή πρωτεϊνικού βακτηριακού εκχυλίσματος και καθαρισμός των πρωτεϊνών με επίτοπο GST

Για να πραγματοποιηθεί η έκφραση των πρωτεϊνών GST-SAFB1C (58kD) και GST- SAFBICΔRE (49 kD) σε βακτήρια BL21(RIL) και του αμινοτελικού άκρου του GST-LBR (50kD) σε βακτήρια XL1, αρχικά έγινε επαγωγή με την χρήση IPTG (πρωτόκολλο 11), ακολούθησε παρασκευή του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος μετά από λύση των κυττάρων με υπερήχους (πρωτόκολλο 12) και καθαρισμός των πρωτεϊνών με την βοήθεια ειδικών στηλών αγκιστείας (πρωτόκολλο 13).

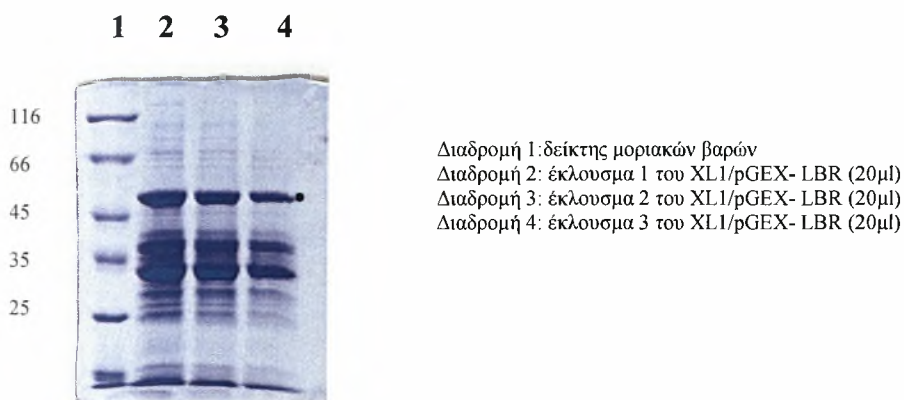
Πρέπει να επισημανθεί ότι η αρχική έκφραση των πρωτεϊνών GST-SAFB1C, και GST-LBR πραγματοποιήθηκε από την υποψήφια διδάκτορα Δώρα Τσιάνου και ότι τα παραπάνω πειράματα έγιναν με σκοπό την παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας αυτών των πρωτεϊνών.

Στη συνέχεια ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου βάσει του πρωτοκόλλου 15, για να επιβεβαιωθεί ότι η έκλουσή τους ήταν επιτυχής. Πιο συγκεκριμένα, κατασκευάστηκαν δύο πηκτές πολυακρυλαμιδίου 10%, μία για τις πρωτεΐνες GST-SAFB1C (58 kD) και GST-SAFBICΔRE (49 kD) και μία για την πρωτεΐνη GST-LBR (50 kD). Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης μετά από χρώση με Coomassie Brilliant Blue R-250 φαίνονται παρακάτω (εικόνες 16, 17)

Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρούμε ότι τα παρασκευάσματα περιέχουν πολλαπλές ζώνες. Σε κάθε περίπτωση όμως υπάρχει και η ζώνη στο αναμενόμενο μέγεθος (σημειωμένη με τελεία). Οι υπόλοιπες ζώνες προέρχονται είτε από ατελή προϊόντα μετάφρασης στα βακτηριακά κύτταρα, είτε από προϊόντα αποικοδόμησης των χιμαιρικών πρωτεϊνών, ή ακόμα και από βακτηριακές πρωτεΐνες που συνδέονται μη ειδικά στην στήλη γλουταθειόνης. Χρησιμοποιήθηκε ως εκ τούτου η μέθοδος του ανοσοαποτυπώματος κατά Western με αντίσωμα αντί- GST για να επιβεβαιωθεί η παρουσία προϊόντων πλήρους μεγέθους στα παρασκευάσματα, αλλά και για να αξιολογηθεί η σχετική τους ποσότητα. Επιπλέον, προσδιορίστηκε η συνολική συγκέντρωση πρωτεϊνών στα παρασκευάσματα με την μέθοδο Bradford.



Εικόνα 16. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών εκλουσμάτων μετά από χρώση με Coomassie Blue



Εικόνα 17. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών εκλουσμάτων μετά από χρώση με Coomassie Blue

2Γ. Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford

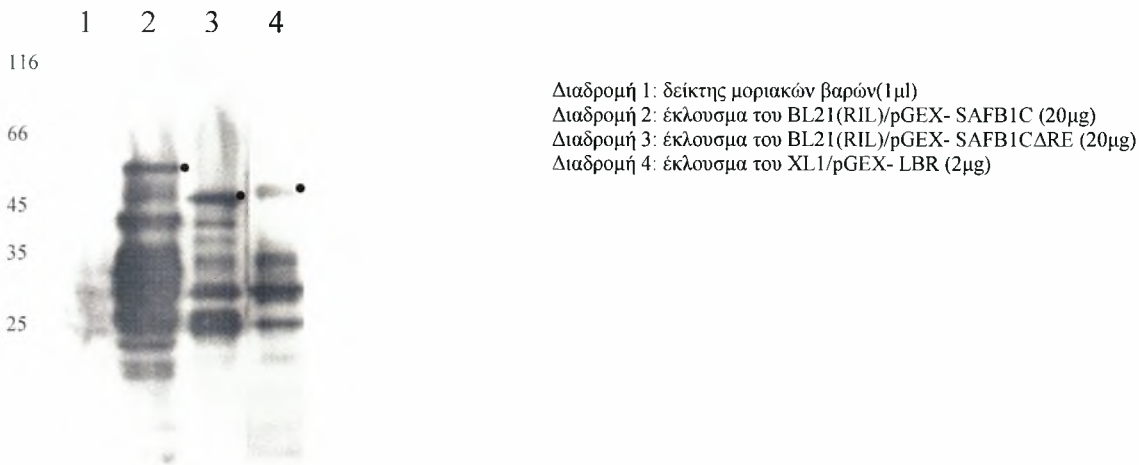
Για να πραγματοποιηθεί προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών GST-SAFBIC, GST- SAFBICΔRE και GST-LBR στα εκλούσματα ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο 14. Με βάση τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης για την κάθε πρωτεΐνη και την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης της πρωτεΐνης αναφοράς υπολογίσαμε τις συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών (πίνακας 2):

Πίνακας 2. Πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις

<i>GST-πρωτεΐνη</i>	<i>Συγκέντρωση (C)</i>
<i>GST-SAFBIC</i>	2.47 μg/μl
<i>GST- SAFBICΔRE</i>	2.804 μg/μl
<i>GST-LBR</i>	1.39 μg/μl

2Δ. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών εκλουσμάτων και ανοσοαποτύπωμα κατά Western

Για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνικών εκλουσμάτων και το ανοσοαποτύπωμα ακολουθήθηκαν τα πρωτόκολλα 15 και 16. Αφού αναμείξαμε τα εκλούσματα 1 και 2 κάθε πρωτεΐνης τα ηλεκτροφορήσαμε σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10% στα 30 mA για 1 ώρα. Στην συνέχεια ακολούθησε αποτύπωση της πηκτής σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, βαφή με Ponceau για να ελεγχθεί η πιστότητα της μεταφοράς, επώαση της μεμβράνης με το 1^ο αντίσωμα αραιωμένο 1:3000 (επωάζεται με διάλυμα που περιέχει 6ml PBS, 0,3gr γάλακτος και 2μl αντισώματος κατσίκας αντί-IgG-GST), επώαση της μεμβράνης με 2^ο αντίσωμα αραιωμένο 1:10000 (επωάζεται με διάλυμα που περιέχει 6ml PBS, 0,3gr γάλακτος και 0,6μl αντισώματος ποντικού αντί-κατσίκας) και τέλος εμφάνιση με την μέθοδο της χημειοφωταύγειας (ECL) (εικόνα 18). Με αυτόν τον τρόπο επιβεβαιώνουμε την ύπαρξη των επιθυμητών GST πρωτεϊνών στα βακτηριακά εκχυλίσματα.



Εικόνα 18. Ανοσοαποτύπωμα κατά Western με αντίσωμα αντι-GST

Η έκφραση των πρωτεϊνών ήταν επιτυχής. Στην εικόνα φαίνονται (με τελεία) α) μία ζώνη στην διαδρομή 2 στα 58 kD, η οποία αντιστοιχεί στον GST-SAFB1C, β) μία ζώνη στα 49 kD, στην διαδρομή 3, η οποία αντιστοιχεί στον GST-SAFB1CΔRE, και γ) μία ζώνη στα 50 kD στην διαδρομή 4, η οποία αντιστοιχεί στον GST-LBR.

3. Δοκιμασίες δράσης κινάσης

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων ελέγχου δράσης κινάσης χρησιμοποιήθηκαν:

- **η κινάση:** SRPK1a
- **υπόστρωμα:** α) το N-τελικό άκρο του υποδοχέα της λάμινης B (LBR) που περιέχεται μεταξύ των αμινοξέων 1 έως 205, εκφρασμένο ως πρωτεΐνη σύντηξης με GST στα *E. coli* (GST-1-205).
- **[γ -P³²] ATP**, ως δότης φωσφορικών
- **πιθανοί αναστολείς:** SAFB1, SAFB2

Με τα παραπάνω περιγραφόμενα πειράματα έχουμε εξασφαλίσει το υπόστρωμα και τους "αναστολείς", όχι όμως το ένζυμο. Γι' αυτό, πραγματοποιήσαμε πείραμα ανοσοκατακρήμνισης της FLAG-SRPK1a, με βάση το ειδικό πρωτόκολλο 17, από πρωτεϊνικό κυτταρικό εκχύλισμα. Συγκεκριμένα, για την πραγματοποίηση αυτού του πειράματος χρησιμοποιήθηκε πρωτεϊνικό εκχύλισμα, προερχόμενο από τη λύση 293T κυττάρων επιμολυσμένων με FLAG-SRPK1a, το οποίο προϋπήρχε στο

εργαστήριο. Για την κατακρήμιση της SRPK1a χρησιμοποιήθηκαν 100μg ολικής πρωτεΐνης (14μl πρωτεϊνικού εκχυλίσματος B C_B =7.1 μg/μl), 1,2 μl αντι- FLAG αντισώματος, και 486μl διαλύματος ανοσοκατακρήμισης (Vτελ=500μl).

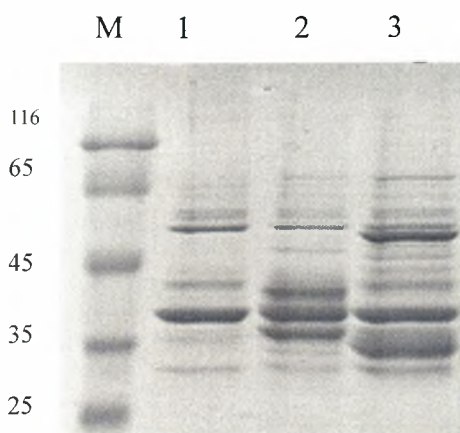
Έλεγχος δραστικότητας της SRPK1a παρουσία SAFB1C και SAFB1CΔRE

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμιση της SRPK1a και ακολούθησε πείραμα ελέγχου της δραστικότητας του ενζύμου παρουσία SAFB1C (control) και SAFB1CΔRE, με υπόστρωμα τον LBR. Παρακάτω παρατίθενται οι ποσότητες των αντιδραστηρίων των 3 αντιδράσεων φωσφορυλίωσης (πίνακας 3).

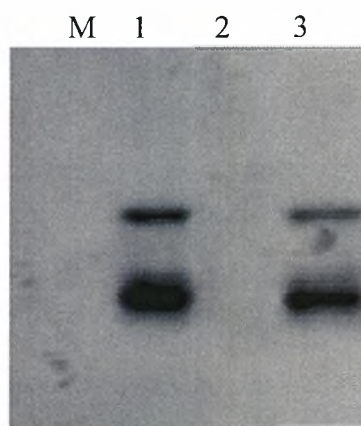
Πίνακας 3. Σύσταση των αντιδράσεων φωσφορυλίωσης

	1	2	3
<i>Ig-SRPKa</i>)	-	-	-
<i>GST-SAFB1C</i>	-	20μg	-
<i>GST-SAFB1CΔRE,</i>	-	-	13μg
<i>GST-LBR</i>	2μg	2μg	2μg
<i>Tris-Cl.7.5(200Mm)(μl)</i>	3,75	3,75	3,75
<i>MgCl2(100mM)(μl)</i>	3	3	3
<i>NaCl(3M)(μl)</i>	0,8	0,8	0,8
<i>ATP(10⁻²)(μl)</i>	0,75	0,75	0,75
<i>ATP*(μl)</i>	0,15	0,15	0,15
<i>ddH₂O</i>	19	17	15
<i>Vτελ (μl)</i>	30,45	30,45	30,45

Στην συνέχεια τα τρία δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτική πολυακρυλαμίδιου 10% στα 30 mA για 1 ώρα (εικόνα 19) και στην συνέχεια έγινε εμφάνιση της πηκτής με αυτοραδιογραφία (εικόνα 20)



εικόνα 19. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών της αντίδρασης φωσφορυλίωσης σε SDS-page



Εικόνα 20. Αυτοραδιογραφία

Στην εικόνα 19, σε όλες τις διαδρομές παρατηρούμε μια ζώνη στα 50 kD, η οποία αντιστοιχεί στο αμινοτελικό άκρο του GST-LBR και υποδεικνύει ότι σε όλες τις αντιδράσεις υπάρχει η ίδια ποσότητα υποστρώματος. Από τα αποτελέσματα της αυτοραδιογραφίας επιβεβαιώνουμε ότι παρουσία GST-SAFB1C παρατηρείται αναστολή της δράσης της κινάσης και διαπιστώνουμε ότι παρουσία GST-SAFB1CΔRE επιτελείται κανονικά η φωσφορυλίωση του LBR από την SRPK1a. Έτσι θα μπορούσαμε να επιβεβαιώσουμε την αρχική μας υπόθεση ότι τα RE είναι υπεύθυνα για την αναστολή της φωσφορυλίωσης.

4. Κλωνοποίηση του cDNA του SAFB2C(-) στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1

Το ερώτημα εάν και κατά πόσο ο SAFB2 είναι ικανός να αναστείλει και αυτός την δράση της κινάσης SRPK1a μας οδήγησε στην δημιουργία μιας νέας πλασμιδιακής κατασκευής, η οποία θα παράγει τον SAFB2, με αλληλουχία αντίστοιχη με αυτή του SAFB1C. Για την παραγωγή του καρβοξυτελικού άκρου του SAFB2 [SAFB2C(-)], ώστε να είναι όσο το δυνατόν ίδιου μεγέθους με τον SAFB1C, έγινε χρήση κατάλληλων εκκινήτων, οι οποίοι διαθέτουν αλληλουχίες αναγνώρισης από περιοριστικά ένζυμα με σκοπό την μετέπειτα εισαγωγή του σε πλασμιδιακό φορέα και τον μετασχηματισμό σε κύτταρα *E.coli* TOP10. Η πρωτεΐνη SAFB2C(-) θα αποτελείται από 313 αμινοξέα και θα έχει μοριακό βάρος 34kD, ενώ η GST-SAFB2C(-) θα έχει μοριακό βάρος 60kD. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία θα έχει μέγεθος 942bp.

SAFB1C	VRERSEREQR	MQAQWEREER	ERLEIARERL	AFQRQLERE	RMERERLERE
SAFB2C-	EREQREREQR	LEAFHERKEK	ARLQERLQL	ECQRQLERE	RMERERLERE
Consensus	eRErREEREQR	##AqHEReEr	aRL#raRerL	acQRQLERE	RMERERLERE
SAFB1C	RMHVEHERRR	EQERIHREER	ELRRQOE.LR	YEQERRPAVR	RPYDLDRRDD
SAFB2C-	RMRVERERRK	EQERIHREER	ELRRQOEQLR	YEQERRPG.R	RPYDLDRRDD
Consensus	RMrVERERRr	EQERIHREER	ELRRQOE.LR	YEQERRPa.R	RPYDLDRRDD
SAFB1C	AYWPEAKRAA	LDERYHSDFN	RQD.RFHDFD	HRDRGRYPDH	SVDRREGSRS
SAFB2C-	AYWPEGKRVA	MEDRYRADFP	RPDHRFHDFD	HRDRGQYQDH	AIDRREGSRP
Consensus	AYWPEaKRAa	##RYraDFn	RqD.RFHDFD	HRDRGrYqDH	a!DRREGSRp
SAFB1C	MMGE.REGQH	YPER...HGG	P.ERHGRDSR	DGUGGYGSDK	RMSEGRGLPP
SAFB2C-	MMGDHRDQGH	YGDDRHGHGG	PFERHGRDSR	DGUGGYGSDK	RLSEGRGLPP
Consensus	MMG#.R#GQH	Yq#r...HGG	P.ERHGRDSR	DGUGGYGSDK	R\$SEGRGLPP
SAFB1C	PPR..RDWGD	HGRREDD...	RSWQGTADGG	MMDRDHKRWQ	GGERSMSGHS
SAFB2C-	PPRGGRDWGE	HNQRLEEHOA	RAWQGAMDAG	AASREHARWQ	GGERGLSGPS
Consensus	PPR..RDWG#	HnrRe##...	RaWQGaaDaG	aadR#HaRWQ	GGERg\$SGHS
SAFB1C	GPGHMMNRGG	MSGRGSFAPG	GASRGHPIPH	GGMQGG.FGG	QSRGSR....
SAFB2C-	GPGHMASRGG	VAGRGGFAQG	GHSQGHVVPG	GGLEGGGVAS	QDRGSRVPHP
Consensus	GPGHManRGG	maGRGgFAqG	GaSrGHp!Pg	GG\$#GG.fag	QdRCSR....
SAFB1CPSDARF	TTRY			
SAFB2C-	HPHPPYPHF	TTRY			
ConsensusPpdarF	TTRY			

Εικόνα 21. Ομοπαράθεση της αμινοξικής αλληλουχίας του SAFB1C (620-915αμιν.) και του SAFB2C(-) (641-953αμιν.)

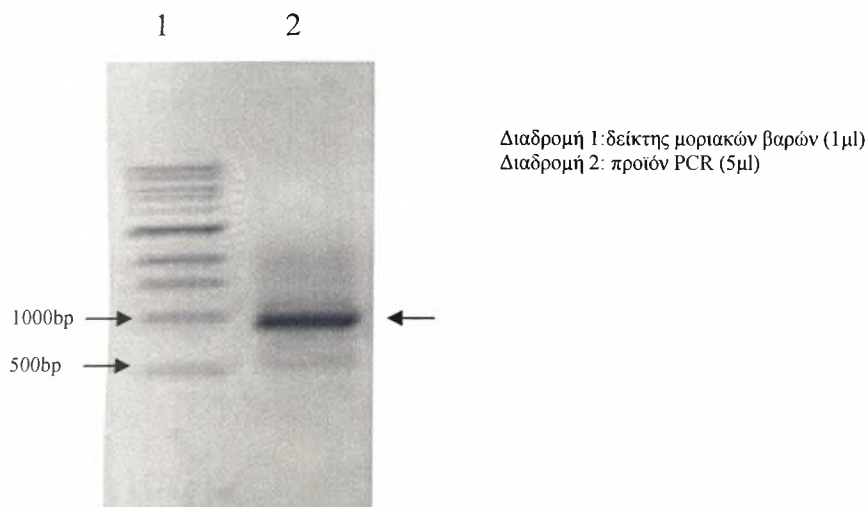
4A: Παραγωγή και κατεργασία του ενθέματος SAFB2C(-)

Αρχικά πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR), με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών και σύμφωνα με το πρωτόκολλο 1. Σαν εκμαγείο χρησιμοποιήθηκαν 20ng από προϋπάρχουσα πλασμιδιακή κατασκευή που περιέχει το γονίδιο του SAFB2. Η αντίδραση έγινε σε τελικό όγκο 50μl. Οι εκκινητές έχουν θέσεις αναγνώρισης των ενδονουκλεασών περιορισμού EcoRI και BamHI και οι αλληλουχίες τους είναι:

Εκκινητές : 52AC: 5'- TTTGGATCCGAGCGCAGCAGCGGG-3' (BamHI)
: 32AC: 5'- TTGAATTCTTAGTAGCGGCGGGTGAA-3' (EcoRI)

Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η αντίδραση της PCR είναι: 94°C για 1 min (στάδιο αποδιάταξης), 52°C για 30 sec (στάδιο υβριδοποίησης), 72°C για 1min (στάδιο επιμήκυνσης), για 30 κύκλους. Η αρχική αποδιάταξη έγινε στους 94°C για 5 min και η τελική επιμήκυνση στους 72°C για 5 min.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% (εικόνα 22). Όπως φαίνεται στην εικόνα, το προϊόν της αντίδρασης ήταν στο αναμενόμενο μέγεθος των 942bp. Ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων της PCR (πρωτόκολλο 3), πέψη τους με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI και BamHI σύμφωνα με το πρωτόκολλο 4 (εικόνα 23) και καθαρισμός των προϊόντων της πέψης (πρωτόκολλο 5).

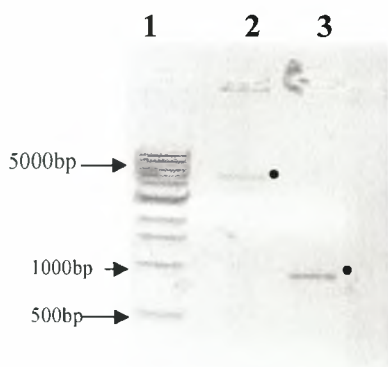


Εικόνα 22. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR. Με βέλος απεικονίζεται το προϊόν της PCR.

4B. Απομόνωση και κατεργασία του πλασμιδιακού φορέα pGEX-4T1

Σαν φορέας κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pGEX-4T1, το οποίο χρησιμοποιήθηκε και στην κλωνοποίηση του cDNA του SAFB1CΔRE (παράγραφος 1B). Υπενθυμίζουμε ότι το πλασμίδιο αυτό είχε απομονωθεί από βακτήρια TOP10 (C=1.13μg/μl), σύμφωνα με το πρωτόκολλο 6A και είχε δεχθεί ειδική επεξεργασία για να καταστεί κατάλληλος για κλωνοποίηση φορέας (πρωτόκολλο 7).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης του προϊόντος της PCR και του γραμμικού pGEX -4T1 σε πηκτή αγαρόζης 1% για συγκριτική ποσοτικοποίησή τους (εικόνα 23). Με τελεία επισημαίνεται ο γραμμικός pGEX-4T1(B+E/CIP) στο αναμενόμενο μέγεθος των ~5000bp και ο SAFB2C(-) (B+E) στο αναμενόμενο μέγεθος των ~942bp. Από την φωτεινότητα των ζωνών συγκριτικά πάντα με τον μάρτυρα μοριακών βαρών συμπεραίνουμε ότι σε 1μl δείγματος-φόρτωσης έχουμε περίπου 100 ng ενθέματος και περίπου 60 ng φορέα κλωνοποίησης



Διαδρομή 1: δείκτης μοριακών βαρών (1μl)
 Διαδρομή 2: προϊόν πέψης (B+E) του pGEX-4T1 (1μl)
 Διαδρομή 3: προϊόν πέψης (B+E) του PCR προϊόντος (1μl)

Εικόνα 23. Ηλεκτροφόρηση των pGEX-4T1 και SAFB2C(-) μετά από πέψη με EcoRI και BamHI

4Γ. Αντίδραση σύνδεσης και μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων TOP10

Πραγματοποιήθηκαν τέσσερις αντιδράσεις σύνδεσης (πρωτόκολλο 8) του pGEX-4T1(B+E) με το ένθεμα SAFB2C(-)(B+E), όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 4).

Πίνακας 4. Σύσταση των αντιδράσεων σύνδεσης

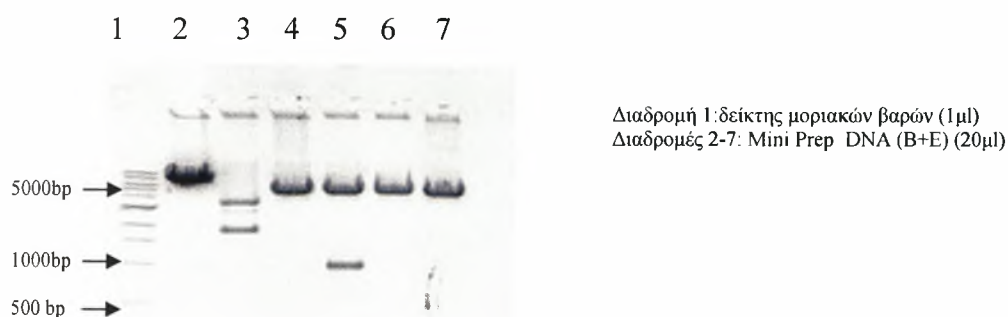
	Ligation 1	Ligation 2	Ligation 3	Ligation 4
Φορέας	1μl	1μl	1μl	2 μl
Ένθεμα	-	-	1μl	1 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα	2μl	2 μl	2μl	2 μl
λιγάζης 10X				
Λιγάζη	-	1μl	1μl	1 μl
ddH ₂ O	17 μl	16 μl	15 μl	14 μl
Υπελ.	20μl	20μl	20μl	20μl

Κατόπιν, έγινε μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων *E.coli* TOP10, επίστρωση σε τρυβλία Petri LB+amp και επώαση στους 37 °C O/N (πρωτόκολλο 10). Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα τρυβλία (ένα για κάθε αντίδραση σύνδεσης) και ένα πέμπτο σαν μάρτυρας, στο οποίο επιστρώθηκαν βακτήρια μετασχηματισμένα με 1ng πλασμιδίου αναφοράς, το οποίο ξέρουμε ότι έχει την ικανότητα να μετασχηματίζει τα κύτταρα μας.

4Δ. Επιλογή ανασυνδιασμένων πλασμιδίων pGEX

4Ε Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας από μετασχηματισμένα βακτήρια *E.coli* TOP10 με ανασυνδιασμένα πλασμίδια pGEX-4T1/SAFB2C(-)

Μετά την ολονύχτια επώαση πήραμε αποικίες μόνο στα δύο από τα πέντε πιάτα. Συγκεκριμένα, πήραμε έξι αποικίες στο πιάτο που περιέχει τα προϊόντα της τέταρτης αντίδρασης σύνδεσης και 300 αποικίες στο πέμπτο. Σηκώσαμε και τις έξι αποικίες από το τέταρτο πιάτο και τις προσθέσαμε σε έξι δοκιμαστικούς σωλήνες αντίστοιχα (μία αποικία σε κάθε σωλήνα) με LB και αμπικιλίνη. Αφού έγινε επώαση της καλλιέργειας O/N πραγματοποιήθηκε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας από τα μετασχηματισμένα βακτήρια *E.coli* TOP10 (πρωτόκολλο 5B), πέψη του με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI και BamHI (πρωτόκολλο 4) και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% για την εύρεση των ανασυνδιασμένων πλασμιδίων pGEX-4T1/SAFB2C(-) (εικόνα 24). Όπως φαίνεται και στην εικόνα μόνο το δείγμα 5 απελευθέρωσε θραύσματα DNA μεγέθους ~942bp μετά από πέψη με τα ένζυμα και επομένως μόνο το συγκεκριμένο φέρει ανασυνδιασμένο πλασμίδιο.



Εικόνα 24: Ηλεκτροφόρηση των 6 DNA μικρής κλίμακας μετά από πέψη με EcoRI και BamHI

5. Έκφραση της πρωτεΐνης GST-SAFB2C(-)

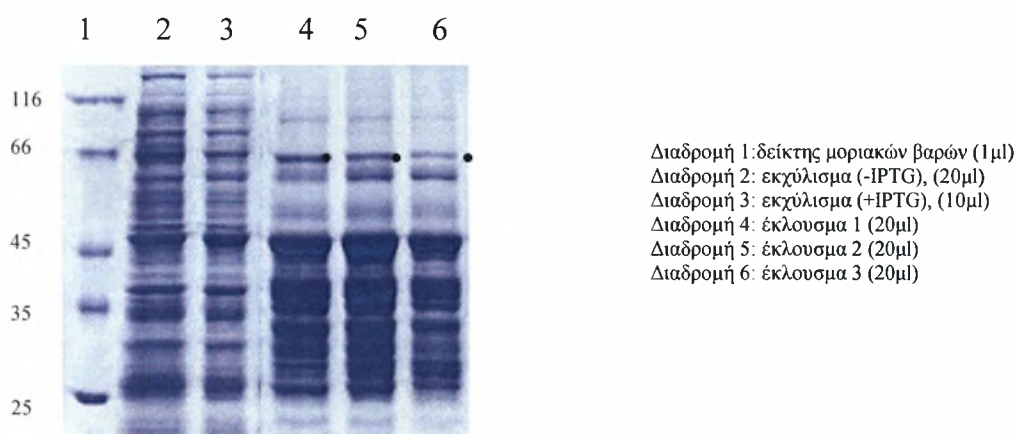
5Α. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων BL21(RIL) με το πλασμίδιο pGEX-4T1/SAFB2C(-)

Για να μετασχηματίσουμε δεκτικά κύτταρα BL21(RIL) χρησιμοποιήσαμε 1μl του πλασμιδιακού DNA N^ο 5 μικρής κλίμακας, σύμφωνα με το πρωτόκολλο 10.

5B. Επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης, παρασκευή πρωτεϊνικού βακτηριακού εκχυλίσματος και καθαρισμός της πρωτεΐνης με επίτοπο GST

Για να πραγματοποιηθεί έκφραση της πρωτεΐνης GST- SAFB2C(-) (60kD) σε βακτήρια BL21(RIL) αρχικά έγινε επαγωγή με την χρήση IPTG (πρωτόκολλο 11), ακολούθησε παρασκευή του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος μετά από λύση των κυττάρων με υπερήχους (πρωτόκολλο 12) και καθαρισμός της πρωτεΐνης με την βοήθεια στηλών αγκιστείας Σεφαροζης-γλουταθειόνης (πρωτόκολλο 13).

Στη συνέχεια ακολούθησε ηλεκτροφόρηση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 10%, βάσει του πρωτοκόλλου 15, για να επιβεβαιωθεί ότι η έκλυση ήταν επιτυχής (εικόνα 25). Όπως φαίνεται και στην εικόνα τα εκλούσματα περιέχουν πολλαπλές ζώνες. Παρ' όλα αυτά όμως υπάρχει μια ζώνη (σημειωμένη με τελεία), η οποία αντιστοιχεί στην GST- SAFB2C(-) πλήρους μεγέθους (εικόνα 25). Αυτή η ζώνη όμως έχει μέγεθος μεγαλύτερο από το αναμενόμενο και για το λόγο αυτό προχωρήσαμε σε ανοσοανίχνευση του εκχυλίσματος με αντίσωμα αντι-GST.



Εικόνα 25. Ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνικών εκλουσμάτων μετά από χρώση με Coomassie Blue

5Γ. Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford

Πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της συνολικής συγκέντρωσης της πρωτεΐνης του εκλούσματος 2 με βάση το πρωτόκολλο 14. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης GST- SAFB2C(-) στο έκλουσμα αυτό είναι 1,26μg/μl.

5Δ. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος και ανοσοαποτύπωμα κατά Western

Για την ηλεκτροφόρηση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος και το ανοσοαποτύπωμα ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο 16 (ηλεκτροφορήθηκαν παράλληλα και τα εκλούσματα SAFB1C και SAFB1CΔRE του πειράματος 2B). Το 1^ο αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν αντίσωμα κατσίκας αντι- GST, 1:5000 αραιωμένο και το 2^ο αντίσωμα ήταν αντίσωμα ποντικού αντί-IgG κατσίκας, 1:10000 αραιωμένο. Με αυτόν τον τρόπο επιβεβαιώσαμε την παρουσία της πλήρους μεγέθους επιθυμητής GST πρωτεΐνης στο βακτηριακό παρασκεύασμα (εικόνα 26).



Εικόνα 26. Ανοσοαποτύπωμα κατά Western με αντίσωμα αντι-GST

Η έκφραση των πρωτεϊνών όπως φαίνεται στο ανοσοαποτύπωμα κατά Western ήταν επιτυχής. Στην εικόνα φαίνονται α) μία ζώνη στην διαδρομή 1 στα 58 kD η οποία αντιστοιχεί στον GST-SAFB1C, β) μία ζώνη στα 49 kD, στην διαδρομή 2 η οποία αντιστοιχεί στον GST-SAFB1CΔRE και γ) μία ζώνη στα >60 kD στην διαδρομή 3, η οποία αντιστοιχεί στον GST- SAFB2C(-). Παρατηρούμε ότι παρόλο που το αναμενόμενο μέγεθος του GST- SAFB2C(-) είναι 60 kD (σχεδόν ίδιο με αυτό του GST-SAFB1C) εμείς ανιχνεύσαμε μία ζώνη που αντιστοιχεί σε πρωτεΐνη μεγαλύτερου μεγέθους. Η παρατήρηση αυτή δεν αποκλείει η παραγόμενη πρωτεΐνη να είναι η επιθυμητή, δεδομένου ότι στις ηλεκτροφορήσεις σε πηκτή SDS έχει παρατηρηθεί ότι η μετανάστευση των πρωτεϊνών σε μερικές περιπτώσεις δεν είναι απόλυτα συσχετισμένη με το μοριακό τους βάρος, αλλά μπορεί να σχετίζεται και με άλλους δομικούς παράγοντες.

Μετά την επιτυχή έκφραση της πρωτεΐνης GST- SAFB2C(-) μπορεί να μελετηθεί η επίδρασή της στη δράση της κινάσης SRPK1a.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Με το σύστημα των δυο υβριδίων έχει διαπιστωθεί η αλληλεπίδραση του καρβοξυτελικού άκρου του SAFB1 με την αμινοτελική περιοχή της κινάσης πρωτεϊνών SRPK1a. Επιπλέον, σε *in vitro* δοκιμασίες δράσης κινάσης πρωτεϊνών βρέθηκε ότι το καρβοξυτελικό άκρο του SAFB1 (GST-SAFB1C) αναστέλλει ποσοτικά την δράση της SRPK1a, με υπόστρωμα το αμινοτελικό άκρο του LBR (μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Δεδομένου ότι ο GST-SAFB1C δεν αποτελεί φυσικό υπόστρωμα της κινάσης, αφού δεν διαθέτει RS περιοχή, τρία πιθανά ενδεχόμενα μπορούν να ερμηνεύσουν την παραπάνω αναστολή.

Σύμφωνα με το πρώτο ενδεχόμενο, ο GST-SAFB1C αποτελεί έναν αλλοστερικό αναστολέα της SRPK1a, ο οποίος προκαλεί αλλαγή στην στερεοδιαμόρφωση της κινάσης κατά την δέσμευσή του στο αμινοτελικό της άκρο, με αποτέλεσμα την αναστολή της δραστηριότητάς της. Ωστόσο, σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Βιοχημείας διαπιστώθηκε επιπλέον αναστολή της κινάσης SRPK1 από τον παράγοντα SAFB1C (μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Υπενθυμίζουμε ότι έχει παρατηρηθεί ελάχιστη αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο αυτών μορίων με το σύστημα των δύο υβριδίων. Δεδομένης λοιπόν αυτής της αναστολής παρά την απουσία του εμβόλιμου αμινοτελικού άκρου στην SRPK1, το ενδεχόμενο αυτό μπορεί να απορριφθεί.

Σύμφωνα με το δεύτερο ενδεχόμενο, ο SAFB1C αλληλεπιδρά με τα φυσικά υποστρώματα της κινάσης SRPK1a, εμποδίζοντας κατ' αυτό τον τρόπο την πρόσδεσή της σε αυτά. Στην βιβλιογραφία έχει αναφερθεί ότι περιοχές μη φωσφορυλιωμένων RS έχουν την τάση να αλληλεπιδρούν με φωσφορυλιωμένα διπεπτίδια RS (33). Ακόμα, τόσο στις RE περιοχές όσο και στις φωσφορυλιωμένες RS περιοχές έχουμε θετικά φορτισμένη αργινίνη συνδεδεμένη με ένα αρνητικά φορτισμένο αμινοξύ (γλουταμινικό και φωσφοσερίνη αντίστοιχα). Απο τα πάνω συμπεραίνουμε ότι αφού η RE περιοχή προσομοιάζει χημικά με τα φωσφορυλιωμένα διπεπτίδια RS πιθανολογείται ότι είναι ικανή να αλληλεπιδρά με τα μη φωσφορυλιωμένα διπεπτίδια των RS των υποστρωμάτων της κινάσης, εμποδίζοντας έτσι την πρόσδεση της σε αυτά.

Σύμφωνα με το τρίτο ενδεχόμενο, ο SAFB1C είναι ένας συναγωνιστικός αναστολέας, ο οποίος συναγωνίζεται τα φυσικά υποστρώματα της κινάσης και δεν

επιτρέπει την πρόσδεση τους σε αυτήν. Η πρόσδεση αυτή φαίνεται να οφείλεται στην RE περιοχή του, η οποία προσομοιάζει χημικά με τις φωσφορυλιωμένες RS περιοχές, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Κρυσταλλογραφικές μελέτες που έχουν γίνει στην ομόλογη της SRPK1 της ζύμης *S.cerevisiae*, έδειξαν ότι στην περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου υπάρχει μια δομή, η οποία αναγνωρίζει φωσφοσερίνες. Εκεί, μετατοπίζονται οι σερίνες μόλις φωσφορυλιωθούν (34). Πιθανόν λοιπόν τα γλουταμινικά των RE περιοχών, να δεσμεύονται στην περιοχή αυτή, αφού ομοιάζουν χημικά με τα φωσφορυλιωμένα RS αναστέλλοντας έτσι την προσέγγιση του υποστρώματος.

Η δημιουργία της πλασμιδιακής κατασκευής η οποία παρήγαγε την πρωτεΐνη SAFB1C απαλλαγμένη από την RE περιοχή (GST-SAFB1CΔRE) επέτρεψε τον έλεγχο της δραστηριότητας της SRPK1a σε *in vitro* δοκιμασίες δράσης κινάσης με υπόστρωμα τον LBR. Από τα αποτελέσματα, σύμφωνα με τα οποία δεν παρατηρείται αναστολή παρουσία της πρωτεΐνης GST-SAFB1CΔRE επιβεβαιώνεται η υπόθεση ότι η περιοχή των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών αργινίνης / γλουταμινικού είναι υπεύθυνη για την παρατηρούμενη αναστολή της δραστηριότητας της κινάσης SRPK1a.

Ωστόσο, η παραπάνω διαπίστωση δεν επιβεβαιώνει αλλά ούτε και αποκλείει κανένα από τα δύο τελευταία ενδεχόμενα. Ενζυμικές κινητικές μελέτες (π.χ δοκιμασίες ελέγχου της δράσης της SRPK1a σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις LBR παρουσία του SAFB1C) θα μπορούσαν να δείξουν εάν η αναστολή της δράσης της SRPK1a οφείλεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ του SAFB1C και των υποστρωμάτων της (έμμεση αναστολή) ή εάν είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ του SAFB1C και της ίδιας της κινάσης (άμεση αναστολή).

Ο SAFB2, όπως και ο SAFB1 περιέχει μια περιοχή πλούσια σε RE. Επομένως, αναμένεται και αυτός να προκαλεί αναστολή στη δραστηριότητα της κινάσης SRPK1a. Για να ελεγχθεί η περίπτωση αυτή, δημιουργήθηκε μια πλασμιδιακή κατασκευή, η οποία εκφράζει την καρβοξυτελική περιοχή της πρωτεΐνης SAFB2 ως πρωτεΐνη σύντηξης με την τρανσφεράση της γλουταθειόνης [GST-SAFB2C(-)]. Με *in vitro* δοκιμασίες δράσης κινάσης θα ελεγχθεί η υπόθεση αυτή και αναμένεται να παρατηρηθεί αντίστοιχη αναστολή στην δραστηριότητα της SRPK1a από την πρωτεΐνη GST-SAFB2C(-), όπως και με την GST-SAFB1C. Εάν το αποτέλεσμα είναι το αναμενόμενο θα αποτελεί μια επιπλέον ένδειξη ότι τα RE είναι υπεύθυνα για την αναστολή της δράσης της κινάσης και θα αφήνει ανοιχτό το ενδεχόμενο αλληλεπίδρασης μεταξύ του SAFB2 και της SRPK1a.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Gui, J-F., Lane, W.S. and Fu, X-D. A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factor in the cell cycle. *Nature*, 369, 678-682, (1994)
2. Valcarcel, J. and Green, M.R. The SR protein family: pleiotropic functions in pre-mRNA splicing. *Trends Biochem. Sci.*, 21, 296-301 (1996).
3. Gui, J-F., Lane, W.S. and Fu, X-D. A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factor in the cell cycle. *Nature*, 369, 678-682, (1994).
4. Wang, H-Y., Lin, W., Dyck, J.A., Yeakley, J.M., Songyang, Z., Cantley, L.C. and Fu, X-D. SRPK2: A differentially Expressed SR Protein specific Kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells. *J. Cell Biol.*, 140, 737-750, (1998).
5. Gui J-F., Tronchere H., Chandler S.D. and Fu X-D. Purification and characterization of a kinase specific for the serine- and arginine-rich pre-mRNA splicing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91, 10824-10828, (1994).
6. Chi Y. Yun and Xiang-Dong Fu. Conserved SR protein kinase functions in nuclear import and its action is counteracted by arginine methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, 150 : 4 707-717, (2000).
7. Chi Y. Yun, Adolfo L. Velazquez-Dones, Susan K. Lyman, and Xiang-Dong Fu. Phosphorylation-dependent and- independent nuclear import of RS domain-containing splicing factors and regulators. *J. Cell Biol* 278:20 18050-18055, (2003).
8. Kuroyanagi, H., Kimura, T., Wada, T., Hisamoto, N., Matsumoto, K. and Hagivara, M. SPK-1, a *C. elegans* SR protein kinase homologue, is essential for embryogenesis and required for germline development. *Mech. Dev.*, 99, 51-64, (2000).
9. Omri, E. and Kahana, C. Screening for modulators of spermine tolerance identifies Sky1, the SR protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, as regulator of polyamine transport and ion homeostasis. *Molecular and Cellular Biology*, 21, 175-184, (2001).
10. Osamu Nakagawa ,Michael Arnold , Masayo Nakagawa, Hideaki Hamada, John M. Shelton, Hajime Kusano, Thomas M. Harris, Geoffrey Childs, Kevin P. Campbell, James A. Richardson, Ichizo Nishino and Eric N. Olson. Centronuclear myopathy in mice lacking a novel muscle-specific protein kinase transcriptionally regulated by MEF2 *Genes & development* 19:2066-2077, (2005).
11. Papoutsopoulou, S., Nikolakaki, E. and Giannakouros, T. SRPK1 and LBR protein kinases show identical substrate specificities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 255, 602-607, (1999).
12. Papoutsopoulou, S., Nikolakaki, E., Chalepakis, G., Kruff, V., Chevaillier, P. and Giannakouros, T. SR protein-specific kinase 1 is highly expressed in testis and phosphorylates protamine 1. *Nucleic Acids Research*, 27, 2972-2980, (1999).

13. Nikolakaki, E., Cheng, D., Lai, J., Giannakouros, T., Cantley, L. and Rabinow, L. Phosphorylation by LAMMER protein kinases. Determination of a Consensus Site, Identification of In vitro Substrates and Implications for substrate preferences. *Biochemistry* 41(6): 2055-66, (2002).
14. Nikolakaki E., Kohen R., Hartmann A.M., Stamm S., Georgatsou E. and Giannakouros, T. Cloning and characterization of an alternatively spliced form of SR protein kinase 1 that interacts specifically with Scaffold Attachment Factor-B. *J. Biol. Chem.*, 276 (43) 40175-40182, (2001).
15. Ding JH, Zhong XY, Hagopian JC, Cruz MM, Ghosh G, Feramisco J, Adams JA, Fu XD. Regulated Cellular Partition of SR Protein-specific Kinases in Mammalian Cells. *Mol Biol Cell*.17, 876-885 ,(2006)
16. Manley, J. L. and Tacke, R. SR proteins and splicing control. *Genes Dev.*, 10. 1569-1579 (1996)
17. Lai, M.C., and Tarn, W.Y. Hypophosphorylated ASF/SF2 binds TAP and is present in messenger ribonucleoproteins. *J Biol Chem* 279, 31745-31749, (2004).
18. Du L, Warren SL. A functional interaction between the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II and pre-mRNA splicing. *J. Biol. Chem.* 136(1):5-18 (1997)
19. Takano M, Takeuchi M, Ito H, Kazuhiro Furukawa, Kenji Sugimoto, Saburo Omata, Tsuneyoshi Horigome. The binding of lamin B receptor to chromatin is regulated by phosphorylation in the RS region. *Eur.J.Biochemistry*269, 943-953 *FEBS* (2002).
20. A nuclear envelope-associated kinase phosphorylates arginine-serine motifs and modulates interactions between the lamin B receptor and other nuclear proteins *J. Biol. Chem.* 271, 8365-8372.
21. Chirat, F., Arkhis, A., Martinage, A., Jaquinod, M., Chevaillier, P. and Sautiere, P. Phosphorylation of human sperm protamines HP1 and HP2: identification of phosphorylation sites. *Biochim. Biophys. Acta*, 1203, 109-114 (1993).
22. Mylonis Hlias, Victoria Drosou, Stefano Brancorsini, Eleni Nikolakaki, Paolo Sassone-Corsi, and Thomas Giannakouros. Temporal Association of Protamine 1 with the Inner Nuclear Membrane Protein Lamin B Receptor during Spermiogenesis . *J. Biol. Chem.*, 279: 12, 11626-11631, (2004).
23. Renz A., Fackelmayer F.O. "Purification and molecular cloning of the scaffold attachment factor B (SAF-B), a novel human nuclear protein that specifically binds to S/MAR-DNA." *Nucleic Acids Res.* 24:843-849(1996).
24. Denegri, M., I. Chiodi, M. Corioni, F. Cobianchi, S. Riva, and G. Biamonti. 2001. Stress-induced nuclear bodies are sites of accumulation of pre-mRNA processing factors. *Mol. Biol. Cell* 12:3502-3514.

25. Weighardt, F., F. Cobianchi, L. Cartegni, I. Chiodi, A. Villa, S. Riva, and G. Biamonti. 1999. 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.* **112**:1465-1476.
26. Nayler, O., W. Stratling, J. P. Bourquin, I. Stagljar, L. Lindemann, H. Jasper, A. M. Hartmann, F. O. Fackelmayer, A. Ullrich, and S. Stamm. 1998. SAF-B protein couples transcription and pre-mRNA splicing to SAR/MAR elements. *Nucleic Acids Res.* **26**:3542-3549.
27. Oesterreich, S., A. V. Lee, T. M. Sullivan, S. K. Samuel, J. R. Davie, and S. A. Fuqua. 1997. Novel nuclear matrix protein HET binds to and influences activity of the HSP27 promoter in human breast cancer cells. *J. Cell. Biochem.* **67**:275-286.
28. Oesterreich, S., Q. Zhang, T. Hopp, S. A. Fuqua, M. Michaelis, H. H. Zhao, J. R. Davie, C. K. Osborne, and A. V. Lee. 2000. Tamoxifen-bound estrogen receptor (ER) strongly interacts with the nuclear matrix protein HET/SAF-B, a novel inhibitor of ER-mediated transactivation. *Mol. Endocrinol.* **14**:369-381
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. Margarita Ivanova, Klaudia M. Dobrzycka, Shiming Jiang, Kai Michaelis, Rene Meyer, Kaiyan Kang, Brian Adkins, leg A. Barski, Simeen Zubairy, Jana Divisova, Adrian V. Lee, and Steffi Oesterreich. 2005. Scaffold Attachment Factor B1 Functions in Development, Growth, and Reproduction. *Molecular and Cellular Biology*, **25**(2995-3006)
31. Townson, S. M., K. M. Dobrzycka, A. V. Lee, M. Air, W. Deng, K. Kang, S. Jiang, N. Kioka, K. Michaelis, and S. Oesterreich. 2003. SAFB2, a new scaffold attachment factor homolog and estrogen receptor corepressor. *J. Biol. Chem.* **278**:20059-20068.
32. Jun Koizumi, Yoshichika Okamoto, Hiroshi Onogi, Akila Mayeda, Adrian R. Krainer, and Masatoshi Hagiwara. The subcellular localization of SF2/ASF is regulated by direct interaction with SR protein kinases (SRPKs). *J. Biol. Chem.*, **274**, :16, 11125-11131, (1999).
33. Xiao, S. H. and Manley J. L. Phosphorylation of the ASF/SF2 RS domain affects both protein-protein and protein-RNA interactions and is necessary for splicing. *Genes Dev.*, **11**, 334-344, (1997).
34. Nolen, B., Yun, C.Y., Wong, C.F., McCammon, J.A., Fu, X-D. and Ghosh, G. The structure of Sky1p reveals a novel mechanism for constitutive activity. *Nature Structural Biology*, **8**, 176-183, (2001).