



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Θέμα: Μελέτη της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών SAFB1 και SRPK1**

Ταζέ Χρύσα

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Γεωργάτσου Ελένη, αναπληρώτρια καθηγήτρια, Επιβλέπουσα
- Μυλωνής Ηλίας, επίκουρος καθηγητής
- Γερμενής Αναστάσιος, καθηγητής

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

Λάρισα, Φεβρουάριος, 2017



**UNIVERSITY OF THESSALY**  
**SCHOOL OF HEALTH SCIENCE**  
**FACULTY OF MEDICINE**



**MASTER PROGRAM IN**  
**“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”**

**MASTER THESIS**  
**The interaction of Scaffold Attachment Factor B1 (SAFB1) with SR Protein**  
**kinase 1 (SRPK1)**

**By**  
**Chrysa Taze**

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Γεωργάτσου Ελένη, αναπληρώτρια καθηγήτρια, Επιβλέπουσα
- Μυλωνής Ηλίας, επίκουρος καθηγητής
- Γερμενής Αναστάσιος, καθηγητής

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

Λάρισα ,Φεβρουάριος, 2017

## Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕΡΙΝΗΣ/ΑΡΓΙΝΙΝΗΣ (SERINE/ARGININEPROTEINKINASES).....	8
1.1.1 Δομικά χαρακτηριστικά των SRPKs.....	9
1.1.1.1 Δομικά χαρακτηριστικά της SRPK1.....	9
1.1.2 Εντοπισμός των γονιδίων των SRPKs και έκφραση στους διάφορους ιστούς.....	11
1.1.3 Υποκυτταρική κατανομή της SRPK1.....	11
1.1.4 Κύρια υποστρώματα και βιολογικός ρόλος των SRPKs.....	13
1.1.5 Μηχανισμοί ρύθμισης της δραστηριότητας της οικογένειας των SRPKs.....	16
1.2 ΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ SAFBS (SCAFFOLD ATTACHMENT FACTORS B).....	17
1.2.1 Γονίδια των SAFBs.....	18
1.2.2 Υποκυτταρικός εντοπισμός και έκφραση του SAFB στους ιστούς.....	19
1.2.3 Βιολογικός ρόλος και αλληλεπιδράσεις των SAFBs.....	19
1.3 Η ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ SAFB1-SRPK1.....	22
ΣΚΟΠΟΣ.....	23
2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	24
2.1 ΥΛΙΚΑ.....	24
2.1.1 Βακτηριακά στελέχη.....	24
2.1.2 Κυτταρικές σειρές.....	24
2.1.3 Πλασμιδιακοί φορείς.....	24
2.1.4 Εκκινητές.....	26
2.1.5 Χημικά αντιδραστήρια.....	26
2.1.6 Υλικά μοριακής βιολογίας.....	26
2.1.7 Αντισώματα.....	26
2.1.8 Μάρτυρες μοριακού βάρους.....	27
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
2.2.1 Κλωνοποίηση cDNA σε πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης.....	27
2.2.2 Ενίσχυση τμημάτων DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	28
2.2.3 Πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού.....	29
2.2.4 Αποφωσφορυλίωση του γραμμικού πλασμιδιακού DNA.....	29
2.2.5 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	29
2.2.6 Απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης.....	30

2.2.7 Αντίδραση λιγάσης.....	30
2.2.8 Παρασκευή κυττάρων δεκτικών για μετασηματισμό (competent) και μετασηματισμός <i>E.coli</i> Top10 .....	31
2.2.9 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (MiniPreparation).....	32
2.2.10 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας (MidiPreparation).....	33
2.2.11 Έλεγχος της ορθότητας των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που κατασκευάστηκαν .....	33
2.2.12 Επαγωγή της έκφρασης των His-πρωτεϊνών σε κύτταρα <i>E.coli</i> BL21RIL με IPTG .....	34
2.2.13 Λύση των κυττάρων <i>E.coli</i> με υπερήχους και απομόνωση του διαλυτού κλάσματος .....	35
2.2.14 Καθαρισμός των His-πρωτεϊνών με χρωματογραφία αγκιστείας σε στήλη Ni <sup>2+</sup> -Agarose.....	35
2.2.15 Διαπίδυση .....	36
2.2.16 In vitro χρωματογραφία αγκιστείας (Pull down).....	36
2.2.17 Κυτταροκαλλιέργειες .....	37
2.2.18 Παρασκευή ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από τα κύτταρα .....	38
2.2.19 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης .....	38
2.2.20 Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE.....	38
2.2.21 Ανοσοαποτύπωση (WesternBlotting).....	39
2.2.22 Μελέτη του ενδοκυτταρικού εντοπισμού πρωτεϊνών με μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού .....	41
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	43
3.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΟΜΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ SRPK1 ΜΕ ΤΟΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ SAFB1 .....	43
3.1.1 Κλωνοποίηση της πλήρους μεγέθους SRPK1 στον πλασμιδιακό φορέα pET30a .....	43
3.1.2 Υπερέκφραση της πρωτεΐνης His-SRPK1 σε κύτταρα <i>E.coli</i> BL21 RIL .....	46
3.1.3 Υπερέκφραση της πρωτεΐνης His-Nt-SRPK1 σε κύτταρα <i>E.coli</i> BL21 RIL .....	47
3.1.4 Υπερέκφραση της πρωτεΐνης His-Ct-SRPK1 σε κύτταρα <i>E.coli</i> BL21 RIL .....	50
3.1.5 Κλωνοποίηση της SpacerCt-SRPK1 στον πλασμιδιακό φορέα pET30a .....	52
3.1.6 Υπερέκφραση της πρωτεΐνης His-SpacerCt-SRPK1 σε κύτταρα <i>E.coli</i> BL21 RIL .....	54
3.1.7 Υπερέκφραση της πρωτεΐνης His-ΔSpacer-SRPK1 σε κύτταρα <i>E.coli</i> BL21 RIL.....	55
3.1.8 In vitro χρωματογραφία αγκιστείας της His-SRPK1 με τον GST-SAFB1CΔRE .....	56
3.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ SRPK1 ΜΕ ΤΟΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ SAFB1.....	60
3.2.1 Μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού της SRPK1 υπό στρεσογόνες συνθήκες .....	61
3.2.2 Μελέτη των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης της ενδογενούς SRPK1 υπό στρεσογόνες συνθήκες .....	63
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	65
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	70

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στα πλαίσια του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής».

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσά μου Αναπληρώτρια καθηγήτρια Βιοχημείας-Μοριακής Βιολογίας, Γεωργιάτσου Ελένη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας αλλά και για την συνεχή στήριξη και καθοδήγησή της.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη ΔΕΠ του Εργαστηρίου Βιοχημείας για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους και ιδιαίτερα των Επίκουρο καθηγητή Βιοχημείας Μυλωνή Ηλία για τις πολύτιμες συμβουλές του. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Ανοσολογίας Γερμενή Αναστάσιο για την συνεργασία ως μέλος της τριμελούς εξεταστικής μου επιτροπής.

Επίσης, θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω όλους του Διδάκτορες, Υποψήφιους Διδάκτορες και μεταπτυχιακούς φοιτητές του Εργαστηρίου Βιοχημείας για την άψογη συνεργασία, τη βοήθεια αλλά και τη φιλία τους. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως την Υποψήφια Διδάκτορα Δρακούλη Σωτηρία για τη βοήθεια και την καθοδήγηση που μου προσέφερε σε καθημερινή βάση.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κινάση SRPK1 (SR-protein kinase 1) είναι το πιο μελετημένο μέλος της οικογένειας των κινασών πρωτεϊνών σερίνης αργινίνης. Οι SRPKs, μέσω φωσφορυλίωσης των υποστρωμάτων τους σε σερίνες που βρίσκονται σε περιοχές πλούσιες σε διπεπτίδια σερίνης-αργινίνης (περιοχές RS), εμπλέκονται σε βασικές κυτταρικές διεργασίες όπως το μάτισμα και η ωρίμανση του RNA, η ρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος, η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και η οργάνωση της χρωματίνης. Αν και οι κυριότερες διαδικασίες στις οποίες εμπλέκονται διαδραματίζονται στον πυρήνα, ο υποκυτταρικός εντοπισμός τους SRPKs είναι κυρίως κυτταροπλασματικός, με ελάχιστη παρουσία στον πυρήνα.

Σε μελέτες του εργαστηρίου Βιοχημείας έχει βρεθεί η αλληλεπίδραση μεταξύ των SRPKs (SRPK1, SRPK1α) και των αποκλειστικά πυρηνικών πρωτεϊνών SAFB1 και SAFB2. Οι SAFBs είναι πρωτεΐνες της πυρηνικής μήτρας που προσδένονται σε αλληλουχίες των S/MAR περιοχών του DNA, οι οποίες διαμεσολαβούν στην δέσμευση της χρωματίνης στην πυρηνική μήτρα. Οι παράγοντες SAFB1 και SAFB2 αλληλεπιδρούν άμεσα με την SRPK1 μέσω της καρβοξυτελικής τους περιοχής και συγκεκριμένα μέσω των τελευταίων 200 αμινοξικών καταλοίπων τους πλούσια σε αργινίνη και γλυκίνη. Η αλληλεπίδραση αυτή αναστέλλει τη δράση της κινάσης *in vitro* και *in vivo*. Ωστόσο δεν είναι γνωστό με ποιο τμήμα της SRPK1 αλληλεπιδρά ο SAFB και καταστέλλει την ενζυματική της δραστηριότητα.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν:

1) Να μελετηθεί η αλληλεπίδραση SAFB1-SRPK1 δομικά και πιο συγκεκριμένα να εντοπιστούν οι περιοχές της SRPK1 που είναι απαραίτητες για την αλληλεπίδραση με τον SAFB1.

2) Να μελετηθεί η αλληλεπίδραση SAFB1-SRPK1 λειτουργικά και πιο συγκεκριμένα να διερευνηθούν συνθήκες κατά τις οποίες μεταβάλλεται η υποκυτταρική κατανομή της SRPK1.

Στο πρώτο μέρος της εργασίας κατασκευάστηκαν τμήματα της SRPK1, εκφράστηκαν σε βακτήρια και μελετήθηκε η δυνατότητά τους να προσδένονται στο καρβοξυτελικό άκρο του SAFB1 *in vitro*. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ενώ το N-τελικό άκρο της SRPK1 δεν προσκολλάται στον SAFB1, το C-τελικό άκρο (182 aa) είναι ικανό για την πρόσδεση της SRPK1 στον SAFB1.

Στο δεύτερο μέρος της εργασίας καλλιεργήθηκαν καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας (HeLa) στα οποία εξασκήθηκαν συνθήκες στέρησης γλυκόζης, συνθήκες υποξίας ή και οι δύο συνθήκες μαζί και παρατηρήθηκε η κατανομή της SRPK1 στα κύτταρα καθώς και τα πρωτεϊνικά της επίπεδα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η στέρηση γλυκόζης επηρεάζει την υποκυτταρική κατανομή της SRPK1 με εμφάνιση περισσότερων μορίων στον πυρήνα, ενώ το φαινόμενο αυτό μετριάζεται όταν ασκείται συγχρόνως και έλλειψη οξυγόνου. Ο συνδυασμός των νέων αυτών πληροφοριών με περαιτέρω μελέτη της υποκυτταρικής κατανομής και των επιπέδων των πρωτεϊνών SAFB1 και SRPK1 κάτω από διάφορες μεταβολικές ή και στρεσογόνες συνθήκες θα οδηγήσει στην κατανόηση της σημασίας της συμπλοκοποίησης των πρωτεϊνών SAFB και SRPK για το κύτταρο.

## ABSTRACT

SRPK1 (SR-protein kinase 1) is the most characterized member of the serine-arginine protein kinase family. SRPKs phosphorylate serines in regions rich in serine-arginine dipeptides (RS regions) and are implicated in fundamental cellular processes such as mRNA maturation, alternative splicing regulation, cell cycle progression and chromatin organization. Although the most prominent functions of SR protein kinases are nuclear, their sub-cellular localization is primarily cytoplasmic with low presence in nucleus. Previous studies of Laboratory of Biochemistry have shown that SRPK1 can directly interact with SAFB1 and SAFB2 which are nuclear factors that bind to DNA elements termed Scaffold/Matrix Attachment Regions (S/MAR). SAFB1 binds directly to SRPK1 and specifically via its distal C-terminal domain rich in serine-arginine (RG). This interaction inhibits the activity of the kinase in vitro and in vivo. However, it isn't known yet which region of the SRPK1 interacts with SAFB1.

The aim of the present study was:

- 1) To investigate the structural interaction of SAFB1-SRPK1 and more specifically to find the regions of SRPK1 that are necessary for the interaction with SAFB1.
- 2) To investigate the functional role of the interaction SAFB1-SRPK1 and more specifically to find conditions under which the sub-cellular localization of SRPK1 is altered.

In the first part of this thesis different regions of the SRPK1 were constructed, bacterially expressed and their ability to bind to the C-terminal of SAFB1 in vitro was investigated.

The results show that even though the N-terminal of SRPK1 does not bind to SAFB1, the C-terminal of SRPK1, and specifically the last 182 aminoacids, is capable of binding to SAFB1.

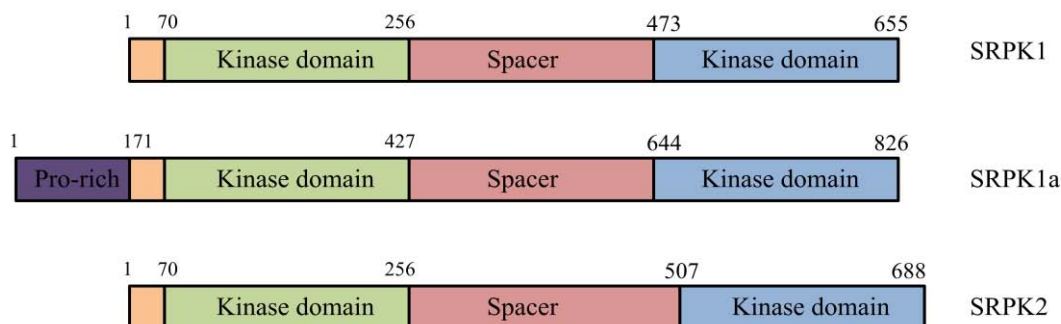
In the second part, HeLa cells were cultured under conditions of glucose deprivation, hypoxia and/or both of them. Subsequently, sub-cellular localization and protein levels of SRPK1 were observed.

The results showed that glucose deprivation affects the subcellular localization of SRPK1 displaying a higher presence of SRPK1 in the nucleus, while this effect is attenuated when cells are cultured under both glucose and oxygen deprivation. This new information in combination with further investigation of the sub-cellular localization and protein levels of SAFB1 and SRPK1 under metabolic and/or stress conditions will help unravel the significance of the SAFB-SRPK complex formation in cells.

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕΡΙΝΗΣ/ΑΡΓΙΝΙΝΗΣ (SERINE/ARGININEPROTEINKINASES)

Οι κινάσες πρωτεϊνών σερίνης/αργινίνης (SRPKs) συνιστούν μία οικογένεια κινασών πρωτεϊνών οι οποίες τροποποιούν τα υποστρώματά τους φωσφορυλιώνοντας σερίνες που βρίσκονται σε επαναλαμβανόμενα διπεπτίδια σερίνης/αργινίνης. Είναι εξαιρετικά συντηρημένες καθόλη τη διαδικασία της εξέλιξης και εντοπίζονται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Οι κινάσες αυτές φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο σε κυτταρικές λειτουργίες όπως η ρύθμιση του ματίσματος του mRNA, η πρόσδεση της ετεροχρωματίνης στον πυρηνικό φάκελο, η μεταφορά πρωτεϊνών στον πυρήνα, η αντικατάσταση των ιστονών από την πρωταμίνη 1 κατά τη διάρκεια της σπερμιόγενεσης και η ομοιοστασία ιόντων (Giannakouros et al, 2011).



**Εικόνα 1:** Σχηματική αναπαράσταση των μελών της οικογένειας των SRPKs

Το πιο μελετημένο μέλος στην οικογένεια των κινασών πρωτεϊνών σερίνης/αργινίνης είναι η SRPK1 (SR-protein specific kinase 1). Η SRPK1 φωσφορυλιώνει τους παράγοντες ματίσματος (SRSFs), ανάλογα με τη φάση του κυτταρικού κύκλου, επηρεάζοντας έτσι την υποκυτταρική τους κατανομή. Επίσης, μεγάλες ποσότητες SRPK1 έχει βρεθεί ότι οδηγούν σε αναστολή της διαδικασίας του ματίσματος (Gui et al, 1994a, Gui et al, 1994b).

Η πρωτεΐνη SRPK1a αποτελεί προϊόν εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου της SRPK1. Η SRPK1a (όπως και η SRPK1) αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη της πυρηνικής μήτρας SAFB1 (Scaffold Attachment Factor B1) και η αλληλεπίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης της κινάσης (Tsianou et al, 2009).

Η SRPK2 παρουσιάζει υψηλή ομολογία με την SRPK1 αλλά πιο περιορισμένη κατανομή στους ιστούς (Wang et al, 1998). Έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με τον προ-αποπτωτικό παράγοντα acinus, ο οποίος διαθέτει μια περιοχή πλούσια σε διπεπτίδια σερίνης/αργινίνης (Jang



et al, 2008). Επίσης, έχει βρεθεί ότι ο υποκυτταρικός εντοπισμός της SRPK2 εμπλέκεται στη διαδικασία της απόπτωσης (Jang et al, 2009, Hong et al. 2011).

Κατά τη διάρκεια πειραμάτων για την εύρεση γονιδίων στόχων του μεταγραφικού παράγοντα myocyte enhancer factor 2, ανακαλύφθηκε η SRPK3 η οποία είναι απαραίτητη για την φυσιολογική ανάπτυξη και την ομοιόσταση των μυών καθώς διαγονιδιακά ποντίκια που δεν εκφράζουν την SRPK3 εμφανίζουν κεντροπυρηνική μυοπάθεια (Nakagawa et al, 2005). Ωστόσο, λίγα είναι γνωστά για την δράση και την έκφραση της ορθόλογης SRPK3 στον άνθρωπο.

### **1.1.1 Δομικά χαρακτηριστικά των SRPKs**

Οι SRPKs δομικά αποτελούνται από μία συντηρημένη περιοχή με δράση κινάσης στην οποία παρεμβάλλεται μια μεγάλη μη συντηρημένη συνδετική αλληλουχία (περίπου 250 αμινοξέα) (εικόνα 1).

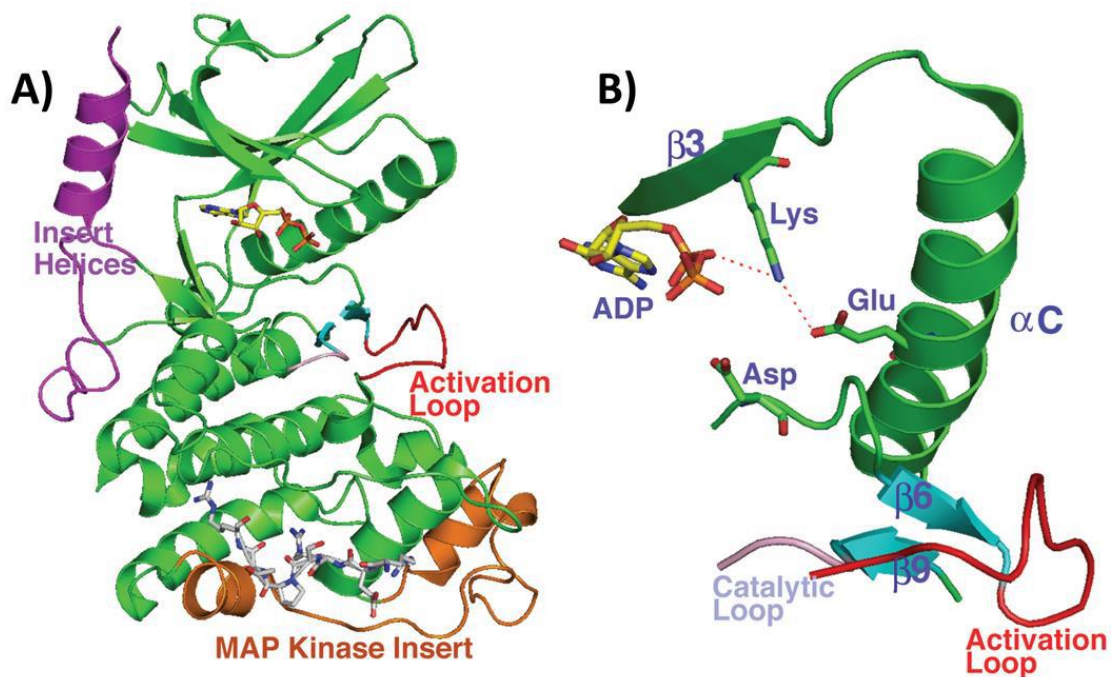
Χαρακτηριστικό γνώρισμα των SR κινασών των θηλαστικών είναι η πολύ μεγάλη ομολογία που παρουσιάζουν στην πρωτοταγή δομή των περιοχών με δράση κινάσης (kinase domain). Εκτός από την συνδετική αλληλουχία και τις περιοχές που είναι υπεύθυνες για την δραστικότητα κινάσης οι SRPKs διαθέτουν N- και C-τελικές επικράτειες που δεν παρουσιάζουν ομολογία. Έτσι, η SRPK2 διαφέρει από την SRPK1 μιας και διαθέτει μία περιοχή πλούσια σε προλίνες στο N-τελικό της άκρο και μία όξινη περιοχή στη συνδετική αλληλουχία. Στην περίπτωση της SRPK1a, η οποία αποτελεί προϊόν εναλλακτικού ματίσματος της SRPK1, παρεμβάλλεται μία αλληλουχία 171 αμινοξέων στο N-τελικό άκρο, μετά τα πρώτα τέσσερα αμινοξέα (Nikolakaki et al, 2001). Η αλληλουχία αυτή είναι πλούσια σε προλίνες παρομοιάζει το N-τελικό άκρο της SRPK2.

#### **1.1.1.1 Δομικά χαρακτηριστικά της SRPK1**

Η κρυσταλλογράφηση της SRPK1 αποκάλυψε μία δίλοβη διαμόρφωση η οποία είναι χαρακτηριστική των κινασών όλων των ευκαρυωτικών οργανισμών. Ο μικρός λοβός (αμινοτελική επικράτεια) απαρτίζεται κυρίως από β- ελάσματα και δεσμεύει το ATP, ενώ ο μεγαλύτερος λοβός (καρβοξυτελικό επικράτεια) αποτελείται από α- έλικες και φέρει τα κατάλληλα αμινοξέα για την πρόσδεση του υποστρώματος (Εικόνα 2A). Το τμήμα της συνδετικής αλληλουχίας που περιέχεται στο κρυσταλλωμένο μόριο υιοθετεί μικρές ελικοειδείς

διαμορφώσεις. Θεωρείται πως το N-τελικό άκρο (1-74 αα) αλλά και η συνδετική αλληλουχία παίζουν μόνο βοηθητικό ρόλο καθώς η κινάση παραμένει δραστική και μετά την απαλοιφή τους (Ngo et al, 2005).

Διάφορα άλλα δομικά χαρακτηριστικά είναι υπεύθυνα για την διατήρηση της συνεχούς ενεργής διαμόρφωσης της SRPK1. Πιο αναλυτικά, η SRPK1 στην καρβοξυτελική περιοχή με δραστικότητα κινάσης περιέχει μια αλληλουχία γνωστή ως MAPK αλληλουχία (MAPK insert) η οποία είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό μιας αύλακας αγκυροβόλησης (docking groove) στην οποία προσδέεται το υποστρώμα (Gosh and Adams, 2011).



**Εικόνα 2: Δομικά χαρακτηριστικά της SRPK1.** (A) Διάγραμμα τύπου κορδέλας του συμπλόκου SRPK1, ATP κι ενός μικρού πεπτιδίου-υποστρώματος (RRRERSPTR). Το πεπτίδιο δεσμεύεται κοντά στην αλληλουχία MAPK. Από την SRPK1 λείπει ένα μέρος της αμινο-τελικής περιοχής (αα 1-41) και της συνδετικής αλληλουχίας (αα 256-473). (B) Διάφορα συντηρημένα δομικά χαρακτηριστικά της SRPK1 (Gosh and Adams, 2011).

Η πρόσβαση του υποστρώματος από την αύλακα αγκυροβόλησης στο ενεργό κέντρο, όπου φωσφορυλιώνεται, διευκολύνεται από έναν βρόγχο ενεργοποίησης. Συγκριτικά με άλλες κινάσες ο βρόγχος της SRPK1 δεν απαιτεί φωσφορυλίωση από άλλες κινάσες αλλά έχει συνεχώς σταθερή διαμόρφωση η οποία επιτρέπει την πρόσβαση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο (Ngo et al, 2007). Στο ενεργό κέντρο, όλες οι κινάσες πρωτεϊνών διαθέτουν έναν καταλυτικό βρόγχο στον οποίο βρίσκεται ένα εξελικτικά συντηρημένο ασπαραγινικό οξύ που σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με το υδροξύλιο της σερίνης ή της τυροσίνης του υποστρώματος. Στην περίπτωση της SRPK1, το συντηρημένο αυτό ασπαραγινικό οξύ βρίσκεται σε ιδανική θέση για

να αποσπάσει το υδρογόνο του υδροξυλίου της σερίνης του υποστρώματος, κάτι που αποτελεί πολύ σημαντικό βήμα στη διαδικασία της φωσφορυλίωσης (Valiev et al, 2003). Ακόμη, αλληλεπιδράσεις μικρής εμβέλειας μέσα στο μικρό λοβό αλλά και μεταξύ του μικρού και μεγάλου λοβού, κοντά στο ενεργό κέντρο, συμμετέχουν στη διατήρηση της ενεργής διαμόρφωσης της κινάσης. Δύο τέτοιες συντηρημένες αλληλεπιδράσεις που εμφανίζονται σε όλες τις ενεργές κινάσες, και στην SRPK1, είναι ένας ιοντικός δεσμός μεταξύ ενός γλουταμινικού οξέος της έλικας αC και μιας λυσίνης του ελάσματος β3 του μικρού λοβού, κι ένας δεσμός υδρογόνου μεταξύ του βρόγχου ενεργοποίησης και της έλικας αC (Gosh and Adams, 2011) (Εικόνα 2B).

### 1.1.2 Εντοπισμός των γονιδίων των SRPKs και έκφραση στους διάφορους ιστούς

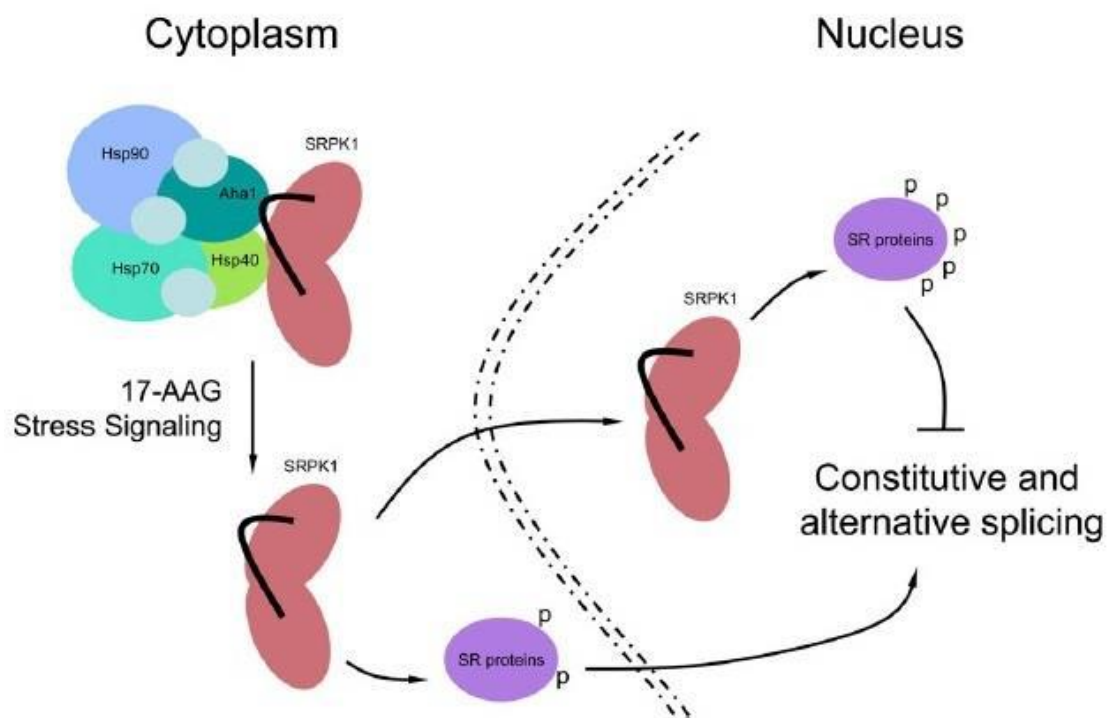
Στον άνθρωπο το γονίδιο της SRPK1 και κατ' επέκταση της SRPK1a εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6 (θέση 6p21.2-p21.3), ενώ αντίστοιχα το γονίδιο της SRPK2 στο χρωμόσωμα 7 (θέση 7q22-q31.1) και της SRPK3 στο χρωμόσωμα X (θέση Xq28). Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των SRPKs, χρησιμοποιώντας υβριδισμό κατά Northern με ιχνηλάτες ραδιενεργά επισημασμένα τμήματα των γονιδίων τους, έδειξε ότι η SRPK1 εκφράζεται σε μεγαλύτερο βαθμό στους όρχεις, έχοντας μικρότερα επίπεδα έκφρασης στους άλλους ιστούς όπως ο θύμος αδένας, το πάγκρεας, η καρδιά και ο σκελετικός μυς (Papoutsouroulou et al, 1999). Παρόμοια εικόνα έδειξε και η μελέτη των επιπέδων έκφρασης της SRPK1a, όμως στην περίπτωση αυτή τα συνολικά επίπεδα έκφρασης της στους διάφορους ιστούς ήταν σημαντικά μικρότερα (Nikolakaki et al., 2001). Η SRPK2 εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στον εγκέφαλο και τους όρχεις, λιγότερο στην καρδιά και το σκελετικό μυ, ενώ παρουσιάζει χαμηλά επίπεδα έκφρασης στον πνεύμονα, το ήπαρ και το νεφρό (Wang et al, 1998). Τέλος, η SRPK3 έχει βρεθεί ότι εκφράζεται κυρίως στην καρδιά και το σκελετικό (Nakagawa et al, 2005). Τα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης των κινασών στους ιστούς υποδεικνύουν την ιστοειδική ρύθμιση που ακούν οι κινάσες συμβάλλοντας γενικότερα στη ρύθμιση των λειτουργιών των ιστών.

### 1.1.3 Υποκυτταρική κατανομή της SRPK1

Πειράματα ανοσοφθορισμού σε καθηλωμένα κύτταρα έδειξαν ότι οι SRPKs παρουσιάζουν έναν κυρίαρχο κυτταροπλασματικό εντοπισμό, έχοντας ταυτόχρονα ένα αδύναμο πυρηνικό σήμα (Wang et al, 1998, Nikolakaki et al, 2001). Οι SRPKs περιέχουν σήματα πυρηνικής εντόπισης (Nuclear Localization Signals, NLS), ωστόσο, μελέτες έχουν αποκλείσει την παρουσία ενός

λειτουργικού NES στις SRPKs των θηλαστικών. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η υποκυτταρική κατανομή της SRPK1 είναι ανεξάρτητη της δράσης της λεπτομυκίνης B (αναστολέας της εξπορτίνης CRM-1) (Ding et al, 2006). Ακόμη δείχτηκε ότι η SRPK1, σε κύτταρα HeLa, αποκρινόμενη σε άγνωστα έως τώρα μονοπάτια μεταφοράς σήματος που λειτουργούν κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, εισέρχεται στον πυρήνα, λίγο πριν αυτά εισέλθουν στη φάση M (Ding et al, 2006).

Θεωρείται ότι η συνδετική αλληλουχία των SRPKs λειτουργεί περισσότερο ως «κυτταροπλασματική άγκυρα» η οποία, ανάλογα με τη διαμόρφωση (ενεργή ή ανενεργή) του ενζύμου, ρυθμίζει την είσοδο στον πυρήνα. Έχει βρεθεί ότι υπεύθυνες για τη σωστή διαμόρφωση της SRPK1 είναι το σύμπλοκο των μοριακών συνοδών Hsp70/Hsp90 (Zhong et al., 2009). Στην εικόνα 3 παρουσιάζεται ένα μοντέλο του τρόπου που οι μοριακές συνοδοί επηρεάζουν την υποκυτταρική εντόπιση της SRPK1.



**Εικόνα 3** Σχηματική αναπαράσταση του ρόλου των μοριακών συνοδών στην μεταφορά της SRPK1 στον πυρήνα, στη φωσφορυλίωση των SR πρωτεϊνών και στο μάτισμα του pre-mRNA (Zhong et al, 2009)

Σύμφωνα με το μοντέλο που προτείνεται η SRPK1 συνδέεται στο σύμπλοκο Hsp70/Hsp90 το οποίο την βοηθάει να πάρει την ενεργή της διαμόρφωση αλλά ταυτόχρονα την καθλώνει στην περιοχή του κυτταροπλάσματος. Υπό συνθήκες στρες (οσμωτικό στρες) η κινάση απελευθερώνεται από το σύμπλοκο των συνοδών πρωτεϊνών και μεταφέρεται στον πυρήνα του

κυττάρου. Η ελεγχόμενη μεταφορά της κινάσης στον πυρήνα ενεργοποιεί το μάτισμα ενώ κάτω από συνθήκες στρες, η υπερβολική συσσώρευση στον πυρήνα, έχει ως αποτέλεσμα την υπερφωσφορυλίωση των SR πρωτεϊνών και την αναστολή του ματίσματος του RNA.

Θεωρείται πιθανόν η είσοδος των SRPKs στον πυρήνα να γίνεται μέσω των φωσφορυλιωμένων παραγόντων ματίσματος οι οποίοι αλληλεπιδρούν με πυρηνικούς υποδοχείς όπως οι TRN-SR1 και 2 (transportin-SR1 και 2) (Lai et al, 2000; Yun et al, 2003).

Η έξοδος των SRPKs από τον πυρήνα πιστεύεται πως γίνεται μέσω των υποφωσφορυλιωμένων παραγόντων ματίσματος, οι οποίοι συνδέονται με το mRNA (Huang et al, 2004), ωστόσο ο μοριακός μηχανισμός που ρυθμίζει την έξοδο των SRPKs από τον πυρήνα δεν έχει ακόμα διαλευκανθεί. Μόνο η Dsk1 της ζύμης έχει βρεθεί ότι διαθέτει ένα ενεργό σήμα εξόδου από τον πυρήνα στην συνδετική της αλληλουχία που αναγνωρίζεται από την CRM1 αφού έχει αποδειχθεί ότι η έξοδος της Dsk1 αναστέλλεται από την επίδραση της λεπτομυκίνης B (αναστολέας της CRM1) (Fukuda et al, 1997).

#### 1.1.4 Κύρια υποστρώματα και βιολογικός ρόλος των SRPKs

Οι κινάσες πρωτεϊνών σερίνης/αργινίνης φωσφορυλιώνουν σερίνες οι οποίες αποτελούν μέρος διπεπτιδίων σερίνης/αργινίνης (RS). Τα πιο γνωστά και πλέον μελετημένα υποστρώματα των SRPKs είναι οι παράγοντες ματίσματος του mRNA SR, αλλά, κάθε πρωτεΐνη που διαθέτει RS διπεπτίδια είναι εν δυνάμει υπόστρωμα των κινασών αυτών.

##### *Ωρίμανση του mRNA*

Κοινό χαρακτηριστικό των παραγόντων ματίσματος SR είναι η ύπαρξη μίας ή δύο περιοχών αναγνώρισης και δέσμευσης του RNA, RRM (RNA Recognition Motifs), στο αμινο-τελικό τους άκρο και επαναλαμβανόμενων διπεπτιδίων αργινίνης/σερίνης στο καρβοξυ-τελικό τους (Manley and Tacke, 1996). Η SRPK1 φωσφορυλιώνει τους παράγοντες SR, επηρεάζοντας με αυτό τον τρόπο τόσο τη συγκρότηση του σωματίου ματίσματος όσο και τη διαδικασία του ματίσματος στο σύνολό της (Roscigno and Garcia-Blanco, 1995, Xiao and Manley, 1997). Επιπλέον, έχει βρεθεί πως όταν η SRPK2 φωσφορυλιώνεται από την Akt, στα νευρικά κύτταρα, εισέρχεται στον πυρήνα όπου φωσφορυλιώνει τον παράγοντα ματίσματος SC35, ο οποίος βρίσκεται μόνιμα στον πυρήνα (Jiang et al, 2009). Μελέτες επιβεβαιώνουν την αλληλεπίδραση των SRPKs με τους SR παράγοντες ματίσματος στον πυρήνα, καθώς η είσοδος των κινασών στον πυρήνα (σε συνθήκες στρες) αυξάνει τη φωσφορυλίωση των παραγόντων (Zhong et al, 2009).

Εφόσον οι παράγοντες ματίσματος φωσφορυλιωθούν, μεταφέρονται στον πυρήνα μέσω της τρानσπορτίνης SR2 και αποθηκεύονται στα πυρηνικά σωμάτια (nuclear speckles) από τα οποία απελευθερώνονται μόλις υποστούν ένα δεύτερο στάδιο φωσφορυλίωσης έτσι ώστε να συμμετάσχουν στη διαδικασία του ματίσματος. (Ngo et al, 2005). Πολύ πρόσφατα πειραματικά δεδομένα περιγράφουν μία συνεργατική σχέση, κατά την οποία η SRPK1 δημιουργεί ένα ετεροδιμερές σύμπλοκο με την Clk1, μία κατεξοχήν πυρηνική κινάση που φωσφορυλιώνει παράγοντες ματίσματος αναγνωρίζοντας επαναλαμβανόμενα διπεπτίδια σερίνης/αργινίνης και σερίνης προλίνης. Η Clk1 αναγνωρίζει τους SR παράγοντες ματίσματος μέσω ενός αποδιατεταγμένου αμινοτελικού άκρου, αντί της αύλακας ελλειμνισμού που χρησιμοποιεί η SRPK1 (Aubol et al, 2014). Έτσι λοιπόν, η SRPK1 φωσφορυλιώνει γρήγορα τα διπεπτίδια σερίνης/αργινίνης και στη συνέχεια η Clk1 φωσφορυλιώνει τα διπεπτίδια σερίνης/προλίνης. Ωστόσο, χωρίς την παρέμβαση της SRPK1 η Clk1 είναι αδύνατον να αποδεσμευτεί από τους φωσφορυλιωμένους παράγοντες ματίσματος, και συγκεκριμένα από τον SRSF1, αναστέλλοντας έτσι τη διαδικασία του ματίσματος. Βρέθηκε πως η SRPK1 αλληλεπιδρά με την Clk1, αποσπώντας το αμινοτελικό της άκρο από τον φωσφορυλιωμένο SRSF1 επάγοντας έτσι την απελευθέρωση του SRSF1 και την προώθηση του ματίσματος (Aubol et al, 2016)

Επιπροσθέτως, υπάρχουν διάφορα πειραματικά δεδομένα που καταδεικνύουν το ρόλο των SRPKs στην επιλογή της θέσης ματίσματος. Οι Hartmann et al. έδειξαν ότι τόσο η SRPK1 όσο και η SRPK1a είναι ικανές να αλλάξουν το μάτισμα ενός μινι-γονιδίου της πρωτεΐνης tau, κατά έναν δοσοεξαρτώμενο τρόπο. (Hartmann et al, 2001) Ακόμα ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στον άνθρωπο, η SRPK1 έχει βρεθεί να σχετίζεται με το U1-snRNP, το οποίο συμμετέχει στην επιλογή της 5' θέσης ματίσματος (Kamachi et al, 2002). Αντίθετα, η SRPK2 απαιτείται για τη συγκρότηση του συμπλόκου U4/U6-U5 snRNP που σχετίζεται με την επιλογή της 3' θέσης του ματίσματος (Mathew et al, 2008). Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν πως το σύμπλοκο των κινασών SRPK1 και Clk1 διευκολύνει την αλληλεπίδραση του SRSF1 με το U1 snRNP, γεγονός απαραίτητο για τον καθορισμό της 5' θέσης ματίσματος (Aubol et al, 2016)

### *Σπερμιογένεση*

Οι πρωταμίνες είναι πολύ βασικές, πλούσιες σε αργινίνες, χαμηλού μοριακού βάρους πρωτεΐνες (Balhorn, 2007), ο ρόλος των οποίων είναι η αντικατάσταση των ιστονών κατά τη διάρκεια της σπερμιογένεσης με αποτέλεσμα να προκύπτει χρωματίνη με πολύ υψηλό βαθμό συμπύκνωσης (Oliva and Dixon, 1991). Η φωσφορυλίωση της πρωταμίνης 1 από την SRPK1 είναι απαραίτητη για τη σύνδεση της πρωταμίνης στον πυρηνικό φάκελο και στη συνέχεια για την απόθεσή της στην σπερματιδική χρωματίνη (Mylonis et al, 2004).



### *Αναδιοργάνωση της χρωματίνης*

Ο LBR είναι μία πρωτεΐνη της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης που φέρει μία ακολουθία πέντε επαναλαμβανόμενων διπεπτιδίων αργινίνης/σερίνης στο πυρηνοπλασματικό N-τελικό του άκρο. Έχει βρεθεί ότι όλες οι σερίνες του φωσφορυλιώνονται από την SRPK1 και η φωσφορυλίωση αυτή επηρεάζει τη σύνδεσή του με τη χρωματίνη (Nikolakaki et al, 1996, Mylonis et al, 2004).

Η σύνδεση του LBR με τη χρωματίνη γίνεται, πιθανώς, μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των θετικά φορτισμένων αμινοξέων του αμινο-τελικού άκρου του LBR και των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων του DNA (Ye and Worman, 1994). Η φωσφορυλίωση του LBR έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση των θετικών φορτίων και ως εκ τούτου την εξασθένιση της αλληλεπίδρασης με το DNA, αλλά επιπλέον μπορεί να οδηγήσει και στην αποδόμηση της ολιγομερικής δομής του LBR (Nikolakaki et al, 2008). Επίσης, η κύρια μιτωτική κινάση (central mitotic kinase, cdk1) φωσφορυλιώνει τον LBR στη σερίνη 71, η οποία βρίσκεται λίγο πριν από την RS περιοχή (Nikolakaki et al, 1997). Είναι πιθανόν ο συνδυασμός αυτών των γεγονότων να είναι αυτός που οδηγεί στην αποδέσμευση της χρωματίνης από τον πυρηνικό φάκελο, μία διαδικασία που είναι γνωστό ότι γίνεται κατά τη διάρκεια της μίτωσης.

### *Ρύθμιση του μεταβολισμού*

Η οικογένεια των PGC-1 πρωτεϊνών παίζει βασικό ρόλο στη ρύθμιση διαφόρων μεταβολικών μονοπατιών, όπως η ομοιόσταση της γλυκόζης, των λιπιδίων και της ενέργειας, διαδικασίες που απορυθμίζονται σε μεταβολικές ασθένειες, όπως ο διαβήτης, η παχυσαρκία και η καρδιομυοπάθεια (Lin et al, 2005). Η δραστηριότητα του πρώτου μέλους αυτής της οικογένειας, η PGC-1a, ελέγχεται από ένα μεγάλο αριθμό μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, συμπεριλαμβανομένου της φωσφορυλίωσης από διάφορες κινάσες. Έχει βρεθεί ότι η SRPK1 φωσφορυλιώνει την PGC-1a σε *in vitro* πειράματα (Nikolakaki et al, 2008, Giannakouros et al, 2011), ενώ, κάτι αντίστοιχο δεν έχει ακόμα αποδειχθεί *in vivo*.

### *Καρκίνος*

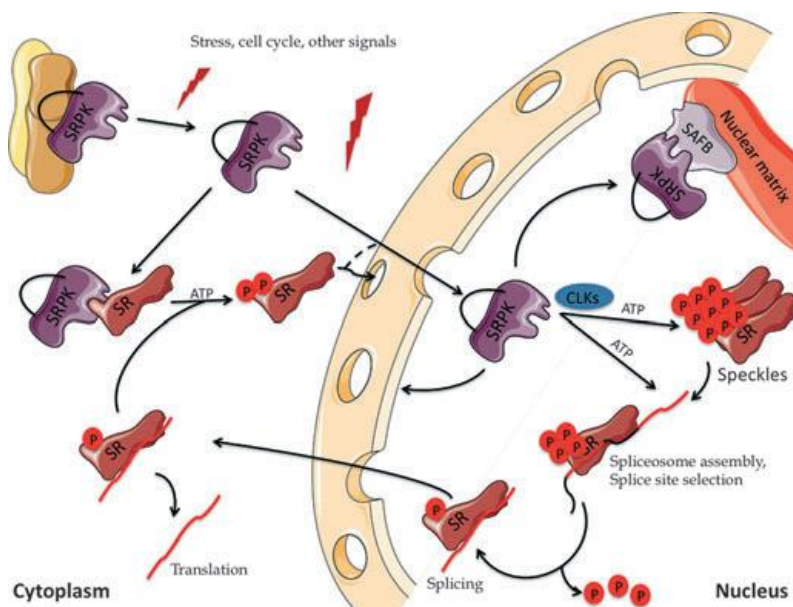
Οι κινάσες πρωτεϊνών σερίνης/αργινίνης εμπλέκονται με διαφορετικό τρόπο σε διάφορους τύπους καρκίνου και θεωρείται πως τόσο η υπερέκφραση όσο και η απαλοιφή των SRPKs μπορεί να συσχετιστεί με την εμφάνιση καρκίνου (Zhou and Fu, 2013). Ενδεικτικά, οι SRPKs παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης σε πολλούς επιθηλιακούς όγκους όπως του παγκρέατος, του μαστού, του παχέος εντέρου, των ωοθηκών, του ήπατος, του πνεύμονα (Gout et al, 2012, Hayes et al, 2007, Odunsi et al, 2012, Zhou and Fu, 2013). Επίσης έχει βρεθεί ότι η SRPK1 και η SRPK2 υπερεκφράζονται στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και η υπερέκφραση αυτή συσχετίζεται με την υπερφωσφορυλίωση των SRSF1 και SRSF2 (Gout et al, 2012).

### 1.1.5 Μηχανισμοί ρύθμισης της δραστηριότητας της οικογένειας των SRPKs

Όπως αναφέρθηκε οι SRPKs διατηρούν συνεχή ενεργή διαμόρφωση και δεν απαιτούν τροποποίηση προκειμένου να φωσφορυλιώσουν τα υποστρώματά τους. Ωστόσο υπόκεινται σε ρύθμιση με πολλούς διαφορετικούς τρόπους.

Έχει βρεθεί ότι η SRPK1 φωσφορυλιώνεται από την CK2 στη Ser51 *in vitro* και *in vivo*. Η φωσφορυλίωση αυτή ενισχύει τη δράση της SRPK1 κατά έξι φορές (Mylonis and Giannakouros, 2003).

Ένας άλλος τρόπος ρύθμισης της δραστηριότητας των SRPKs περιλαμβάνει την παροδική αλληλεπίδραση με πρωτεϊνικά σύμπλοκα μέσα στο κύτταρο. Έχει βρεθεί ότι η SRPK1a αλλά και η SRPK1 μπορούν να αλληλεπιδράσουν άμεσα με τις πρωτεΐνες της πυρηνικής μήτρας SAFB1 και SAFB2. Η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί σε αναστολή της δράσης της κινάσης (Tsianou et al., 2009). Το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες SAFB υπό συνθήκες στρες, εντοπίζονται μαζί με μόρια RNA και παράγοντες ματίσματος, σε υποπυρηνικά σωμάτια επαγόμενα από το στρες (stress induced subnuclear bodies) (Chiodi et al, 2000, Denegri et al, 2001) και ότι αλληλεπιδρούν με τις SRPK1 και SRPK1a και τις αναστέλλουν, υποδεικνύει πιθανή την ύπαρξη ενός πρόσθετου μηχανισμού ρύθμισης της δράσης των SRPKs που λειτουργεί όταν το κύτταρο πρέπει να ανταποκριθεί σε μία πληθώρα σημάτων (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Ρύθμιση του υποκυτταρικού εντοπισμού και της λειτουργίας της SRPK1 (Giannakouros et al, 2011)

Ο καθοριστικός ωστόσο παράγοντας ρύθμισης των SRPKs είναι η υποκυτταρική τους κατανομή. Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, η συνδετική αλληλουχία των SRPKs αλληλεπιδρά με μοριακές συνοδούς και δρα ως κυτταροπλασματική άγκυρα. Η αλληλεπίδραση της SRPK1 με



τις μοριακές συνοδούς μπορεί να τροποποιηθεί από διάφορα ερεθίσματα με αποτέλεσμα την απελευθέρωση και τη μετέπειτα μετακίνηση της κινάσης στον πυρήνα. (Εικόνα 4). Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν τη ρύθμιση της SRPK1 μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού του EGF (Epidermal Growth Factor), που καταλήγει στην ρύθμιση του ματίσματος στον πυρήνα. Πιο συγκεκριμένα, η μετάδοση του σήματος από τον EGF οδηγεί σε ενεργοποίηση της Akt από την PI3K. Ακολούθως, η ενεργοποιημένη Akt αλληλεπιδρά με την SRPK1 και επάγει την αυτοφωσφορυλίωση της SRPK1 με έναν αλλοστερικό μηχανισμό. Έτσι εξηγείται και το γεγονός ότι η SRPK1 φωσφορυλιώνεται μέσω της Akt, χωρίς να φέρει μοτίβο αναγνώρισης από την συγκεκριμένη κινάση. Η αλληλεπίδραση αυτή υποστηρίζεται ότι επάγει την απελευθέρωση της SRPK1 από τα σύμπλοκα που περιέχουν την Hsp70, και είναι υπεύθυνα για την παραμονή της στο κυτταρόπλασμα, και δεσμεύεται στα σύμπλοκα με την Hsp90, που υποβοηθούν την μεταφορά της στον πυρήνα (Zhou et al., 2012).

Αναφορικά με την SRPK2, έχει υποστηριχθεί ότι η Akt μεσολαβεί στη μετακίνηση της SRPK2 στον πυρήνα φωσφορυλιώνοντάς την στη θρεονίνη 492, ενώ έχει βρεθεί ότι η 14-3-3 αλληλεπιδρά με την φωσφορυλιωμένη, από την Akt, SRPK2 και αναστέλλει την πυρηνική της μετατόπιση (Jang et al., 2009).

## 1.2 ΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ SAFBS (SCAFFOLD ATTACHMENT FACTORS B)

Η πρωτεΐνη SAFB αποτελεί μέλος μιας οικογένειας πυρηνικών πρωτεϊνών, οι οποίες εντοπίζονται στην πυρηνική μήτρα. Οι πρωτεΐνες αυτές ονομάζονται παράγοντες πρόσδεσης στο ικρίωμα (Scaffold attachments factors) καθώς απομονώθηκαν με βάση την ιδιότητά τους να αναγνωρίζουν και να προσδένονται ειδικά σε περιοχές S/MARS του DNA (Scaffold/matrix attachment regions) (Renz et al 1996). Η υποοικογένεια SAF-B περιλαμβάνει δύο από τους πιο καλά μελετημένους πρωτεϊνικούς παράγοντες της πυρηνικής μήτρας, οι οποίοι είναι ο SAFB1 και ο SAFB2.

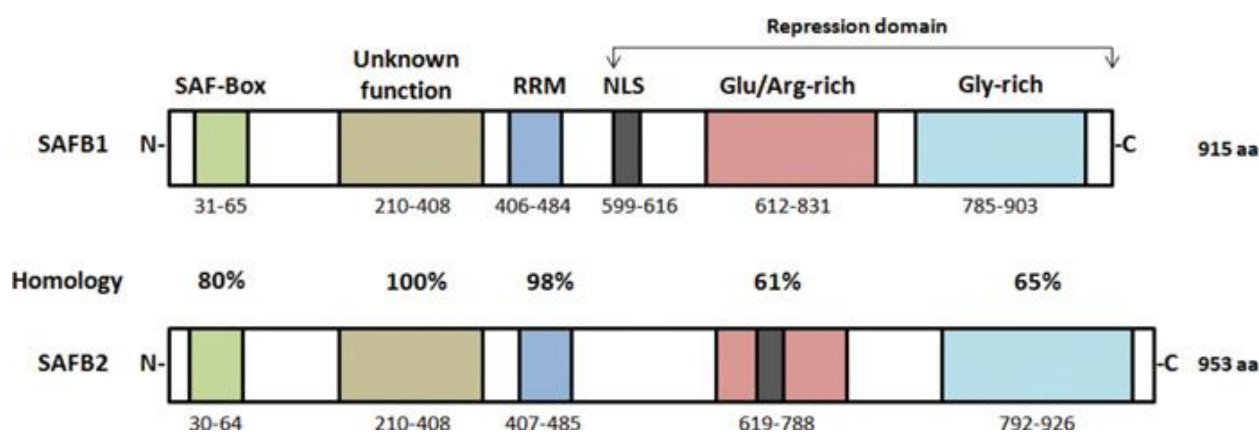
Ο SAFB1 αποτελείται από 915 αμινοξέα και είναι μια βασική πρωτεΐνη (pI: 8,8). Το αμινοτελικό άκρο του SAFB1 περιέχει μια περιοχή, η οποία είναι συντηρημένη μεταξύ των σπονδυλωτών και είναι γνωστή ως SAF-Box (αμινοξέα 35-67). Η περιοχή αυτή έχει βρεθεί ότι ευθύνεται για την πρόσδεση πυρηνικών πρωτεϊνών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

Επιπλέον ο SAFB1 περιέχει μια περιοχή RRM (αμινοξέα 409-482) μέσω της οποίας αλληλεπιδρά με διάφορα είδη RNA, καθώς και μια περιοχή πλούσια σε διπεπτίδια αργινίνης και γλουταμινικού οξέος (περιοχή RE, αμινοξέα 619-699) τα οποία ευθύνονται για την συσσώρευση

θετικών και αρνητικών φορτίων στην συγκεκριμένη περιοχή. Στο καρβοξυτελικό άκρο του SAFB1 εντοπίζεται μία περιοχή πλούσια σε γλυκίνες (αμινοξέα 785-899), ενώ το τμήμα μεταξύ των αμινοξέων 599-614 περιλαμβάνει το σήμα πυρηνικού εντοπισμού της πρωτεΐνης (Townson et al, 2004).

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

Πιο πρόσφατα, χαρακτηρίστηκε και ένα τρίτο μέλος της οικογένειας των SAFBs, ο SLTM (scaffold attachment factor -like transcription modulator) ή SAFB3 (Chan et al, 2007). Παρουσιάζει 34% ομολογία με τον SAFB1 και 36% με τον SAFB2.



**Εικόνα 5:** Λειτουργικές περιοχές των SAFB1 και SAFB2 (Hong et al, 2012)

### 1.2.1 Γονίδια των SAFBs

Τα γονίδια SAFB1 και SAFB2 βρίσκονται στον άνθρωπο στο χρωμόσωμα 19p13.3 σε απόσταση περίπου 500bp μεταξύ τους. Το γονίδιο του SAFB2 βρίσκεται σε αντίθετη κατεύθυνση με το γονίδιο του SAFB1. Η έκφραση των δύο γονιδίων ελέγχεται από έναν υποκινητή ο οποίος παρεμβάλλεται μεταξύ τους και είναι πλούσιος σε νουκλεοτίδια γουανίνης και κυτοσίνης. Γονίδια SAFB1, SAFB2 έχουν βρεθεί και σε άλλα θηλαστικά, ενώ παρόμοιά τους έχουν βρεθεί στη *Drosophila* και στο νηματοσκώληκα *C. elegans* αλλά όχι στη ζύμη, τα φυτά, τα βακτήρια και τα πρωτόζωα. (Townson et al, 2003).

### 1.2.2 Υποκυτταρικός εντοπισμός και έκφραση του SAFB στους ιστούς

Ο SAFB1 είναι μία πρωτεΐνη της πυρηνικής μήτρας και έχει δειχτεί ότι μέσω της πρόσδεσής του στις περιοχές S/MAR προσεγγίζει τις πρωτεΐνες της πυρηνικής μήτρας στην χρωματίνη. Εντοπίζεται κυρίως στα νίδια της χρωματίνης (Perichromatin fibrils) (Chiodi et al, 2000), όπου συνυπάρχει με την RNA πολυμεράση II και ορισμένες SR πρωτεΐνες όπως ο SC35 καθώς και με διάφορες ισομορφές της πρωτεΐνης hnRPD με τις οποίες αλληλεπιδρά (Nayler et al, 1998, Arao et al, 2000). Μελέτες κυτταρικού εντοπισμού των ενδογενών SAFB1 και SAFB2 σε κύτταρα HeLa και HEK 293 δείχνει ότι η θέση και των δύο πρωτεϊνών είναι αποκλειστικά πυρηνική (Sergeant et al, 2006).

Πειράματα υβριδισμού κατά Northern έδειξαν ότι τόσο ο SAFB1 όσο και ο SAFB2 εμφανίζουν παρόμοια επίπεδα έκφρασης σε όλους τους ιστούς και ανιχνεύονται κυρίως στην καρδιά, τον εγκέφαλο, τους πνεύμονες, τον πλακούντα, το συκώτι, το σκελετικό μυ, τα νεφρά και το πάγκρεας. Η έκφραση των δύο πρωτεϊνών επιβεβαιώθηκε επίσης σε διάφορες ανθρώπινες καρκινικές σειρές και κυρίως του μαστού (Townson et al, 2003, Debril et al, 2005). Επιπλέον έχει αναφερθεί ότι ο SAFB1 απαιτείται για την φυσιολογική ανάπτυξη του ποντικού, η οποία όμως δεν αναπληρώνεται απουσία έκφρασης του SAFB1 σε «knockout» ποντίκια με φυσιολογική έκφραση του SAFB2 (Ivanova et al, 2005) γεγονός που υποδηλώνει ότι ο SAFB2 δεν μπορεί να “αντικαταστήσει” τον SAFB1. Τα παραπάνω δεδομένα σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η έκφραση του SAFB2 στα κύτταρα Sertoli στους όρχεις βρίσκεται σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τον SAFB1 συνιστούν ότι αν και ο SAFB1 και ο SAFB2 μοιράζονται περιοχές με υψηλή ομολογία μεταξύ τους, φαίνεται ότι οι δύο αυτές πρωτεΐνες έχουν διαφορετικές μοριακές και λειτουργικές ιδιότητες (Sergeant et al., 2006).

### 1.2.3 Βιολογικός ρόλος και αλληλεπιδράσεις των SAFBs

Οι παράγοντες SAFB1 και SAFB2 μπορούν να αλληλεπιδράσουν με DNA, RNA αλλά και πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται κυρίως στην οργάνωση της χρωματίνης, τη μεταγραφή και την επεξεργασία του RNA (Norman et al, 2016).

#### *Ο ρόλος του SAFB στην οργάνωση της χρωματίνης*

Ο SAFB1 θεωρείται ότι συμβάλλει στη ρύθμιση της οργάνωσης της χρωματίνης μέσω πρόσδεσής του στις S/MAR περιοχές, οι οποίες επίσης είναι υπεύθυνες για την ρύθμιση της

γονιδιακής έκφρασης (Renz and Fackelmayer, 1996). Η σύνδεση των SAFBs στις S/MARs περιοχές αποτελεί διαδικασία απαραίτητη για την ανώτερη οργάνωση της χρωματίνης και τον καθορισμό της σε διακριτές τοπολογικές επικράτειες (Bode et al 1996). Επιπλέον, αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη CHD1 η οποία εμπλέκεται στην οργάνωση της χρωματίνης και συμμετέχει στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA (δες παρακάτω).

#### *Ο ρόλος του SAFB στη ρύθμιση της μεταγραφής*

Στον SAFB1 έχει αποδοθεί η ικανότητα δράσης ως συγκαταστολέας της μεταγραφής. Έχει βρεθεί ότι καταστέλλει τη δράση του υποκινητή του γονιδίου της πρωτεΐνης θερμικού σοκ hsp27, τον υποδοχέα οιστρογόνων ERα και ένα πλήθος άλλων πυρηνικών υποδοχέων (Townson et al, 2004, Debril et al, 2005 Oesterreich et al, 2010).

Επιπλέον, ο SAFB1 έχει δειχτεί ότι αλληλεπιδρά *in vitro* και *in vivo* με το καρβοξυτελικό άκρο της RNA πολυμεράσης II (Nayler et al, 1998) καθώς και με την πρωτεΐνη CHD1 (chromodomain protein), η οποία προσδένεται σε S/MAR περιοχές του DNA και θεωρείται ότι εμπλέκεται στη δομική οργάνωση της χρωματίνης και τη ρύθμιση της μεταγραφής μέσω αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες HDACs και ορισμένους συγκαταστολείς της μεταγραφής. (Tai et al, 2003).

#### *Ο ρόλος του SAFB1 στο μάτισμα και την επεξεργασία του RNA*

Μελέτες έχουν αποδείξει την ικανότητα του SAFB1 να συνδέεται στο RNA και να αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που σχετίζονται με την επεξεργασία του (Weighardt et al, 1999; Arao et al, 2000). Επιπροσθέτως, ο SAFB1 αλληλεπιδρά και αυξάνει την έκφραση του παράγοντα ματίσματος SRp86 (Li et al, 2003), καθώς και με έναν άλλο ιστοειδικό παράγοντα ματίσματος τον SLM-1 (Stoss et al, 2004).

Ο SAFB1 συμμετέχει επίσης στη διαδικασία του εναλλακτικού ματίσματος και ρυθμίζει τη δράση των SRPKs που φωσφορυλιώνουν τους SR παράγοντες ματίσματος (Nikolakaki et al 2001, Tsianou, et al 2009).

#### *Ο ρόλος του SAFB στην απόκριση του στρες*

Όπως ήδη αναφέρθηκε ο SAFB1 ρυθμίζει την έκφραση της πρωτεΐνης θερμικού σοκ hsp27 η οποία εμπλέκεται στην κυτταρική απόκριση στο στρες. Σε συνθήκες στρες ο SAFB1

μετατοπίζεται στα πυρηνικά σωματίδια του στρες όπου εκεί συνεντοπίζεται με άλλους παράγοντες απόκρισης στο στρες όπως ο sam68 και οHSF1 (HeatShockFactor 1) (Hartmann et al 1999, Weighardt et al, 1999).

Επιπλέον, ο SAFB1 στρατολογείται παροδικά σε περιοχές του DNA που έχουν υποστεί βλάβες και συμμετέχει στη σηματοδοτική απόκριση ενάντια του γενετοξικού στρες. Η στρατολόγηση του SAFB1 σε περιοχές του DNA που έχουν υποστεί βλάβες είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική φωσφορυλίωση της ιστόνης H2AX, γεγονός που επάγει τη συναρμολόγηση του συμπλόκου επιδιόρθωσης του DNA. Προτείνεται λοιπόν πως η προσέλκυση του SAFB1 είναι απαραίτητη προκειμένου να ξεπεραστούν φραγμοί, που η αρχιτεκτονική της ανώτερης οργάνωσης της χρωματίνης δημιουργεί, και να ξεκινήσει η επιδιόρθωση των βλαβών του DNA (Altmeyer et al 2013).

#### *SAFBs και καρκίνος*

Η ικανότητα αλληλεπίδρασης των SAFB1, SAFB2 με παράγοντες που έχουν ρόλους-κλειδιά στην καρκινογένεση υποδεικνύει τον σημαντικό ρόλο των SAFBs στον καρκίνο, και ειδικά στον καρκίνο του μαστού. Οι SAFBs αποτελούν υποψήφιους καταστολείς της ογκογένεσης καθώς έχει παρατηρηθεί υψηλή συχνότητα απώλειας της ετεροζυγωτίας κοντά στην χρωμοσωμική περιοχή των SAFB1 και SAFB2 γονιδίων σε ασθενείς με καρκίνου του μαστού (Oesterreich et al 2001). Επιπλέον έχει δειχθεί ότι η υπερέκφραση του SAFB1 αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη (Townson et al 2000), ενώ σε ασθενείς διεισδυτικού καρκίνου του μαστού με κακή πρόβλεψη τα επίπεδα έκφρασης των SAFB1, SAFB2 είναι χαμηλά (Hammerich et al 2009).

### 1.3 Η ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ SAFB1-SRPK1

Πειραματικά δεδομένα του εργαστηρίου βιοχημείας υποδηλώνουν την αλληλεπίδραση της κινάσης SRPK1 (αλλά και της SRPK1a) με τις πρωτεΐνες της πυρηνικής μήτρας SAFB1 και SAFB2. Η *in vitro* αλληλεπίδραση έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης της κινάσης. Επιπλέον, η SRPK1 έχει βρεθεί κατασταλαμμένη σε σύμπλοκα με τον SAFB και στον πυρήνα καρκινικών κυττάρων. Ενώ για την SRPK1a είναι γνωστό ότι η αλληλεπίδραση με τον SAFB επιτυγχάνεται και μέσω του αμινοτελικού της άκρου, μέχρι τώρα δεν έχει βρεθεί ποιο άκρο της SRPK1 είναι υπεύθυνο για αυτή την αλληλεπίδραση. Αντίθετα, για τον SAFB1 είναι γνωστό ότι η αναστολή της δράσης της κινάσης επιτυγχάνεται μέσω του καρβοξυτελικού του άκρου και ειδικότερα μέσω των τελευταίων 200 αμινοξικών καταλοίπων (Tsianou et al 2009).

Η αλληλεπίδραση SAFB1-SRPK1 παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς συμβαίνει μεταξύ δύο μορίων με διαφορετικό υποκυτταρικό εντοπισμό τα οποία ωστόσο είναι δυνατόν να βρεθούν σε σύμπλοκα και να επηρεάσουν διαδικασίες όπως το μάτισμα του mRNA και λειτουργίες στις οποίες συμμετέχουν είτε από κοινού είτε κάτω από ιδιαίτερες συνθήκες.

## Σκοπός

Ήταν γνωστό ότι η αλληλεπίδραση συμβαίνει μέσω των 200 καρβοξυτελικών αμινοξέων του SAFB1, άμεσα, στον πυρήνα και στο αποτέλεσμα είναι η καταστολή της δράσης της κινάσης.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής ήταν:

- 1) Να εντοπιστούν και οι περιοχές της SRPK1 που είναι απαραίτητες για την αλληλεπίδραση με τον SAFB1.
- 2) Να διερευνηθούν συνθήκες κατά τις οποίες μεταβάλλεται η υποκυτταρική κατανομή της SRPK1 (μεταβολικά και άλλα στρες)

Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών θα παρέχουν πληροφορίες αφ'ενός για τη δομική σχέση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο πρωτεϊνών και άρα τον μηχανισμό καταστολής της δράσης της SRPK1 από τον SAFB1 και αφ'ετέρου για τη χωροταξική συγκρότηση των συμπλόκων SAFB1-SRPK1 μέσα στο κύτταρο και συνεπώς για τη βιολογική σημασία της αλληλεπίδρασης.

## 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 ΥΛΙΚΑ

#### 2.1.1 Βακτηριακά στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα:

- TOP10 (Invitrogen): Τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για κάθε εφαρμογή κλωνοποίησης. Παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη στρεπτομυκίνη.
- BL21 RIL (Stratagene): Τα συγκεκριμένα *E.coli* κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Τα κύτταρα αυτά εκφράζουν υψηλά επίπεδα tRNA που είναι σπάνια στα βακτήρια (αυτά των αργινίνης, ισολευκίνης και λευκίνης) μέσω του πλασμιδίου RIL και παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη χλωραμφαινικόλη.

#### 2.1.2 Κυτταρικές σειρές

Χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω κυτταρική σειρά:

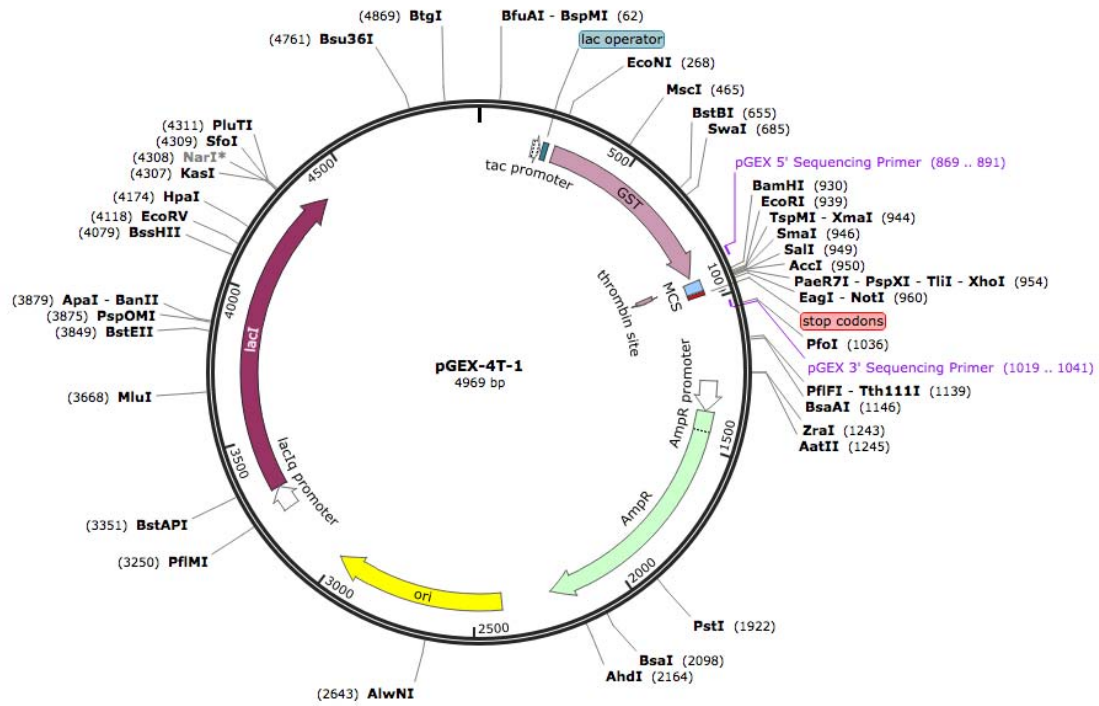
- HeLa: ανθρώπινα καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας

#### 2.1.3 Πλασμιδιακοί φορείς

- pGEX-4T1 (AmershamPharmacia)

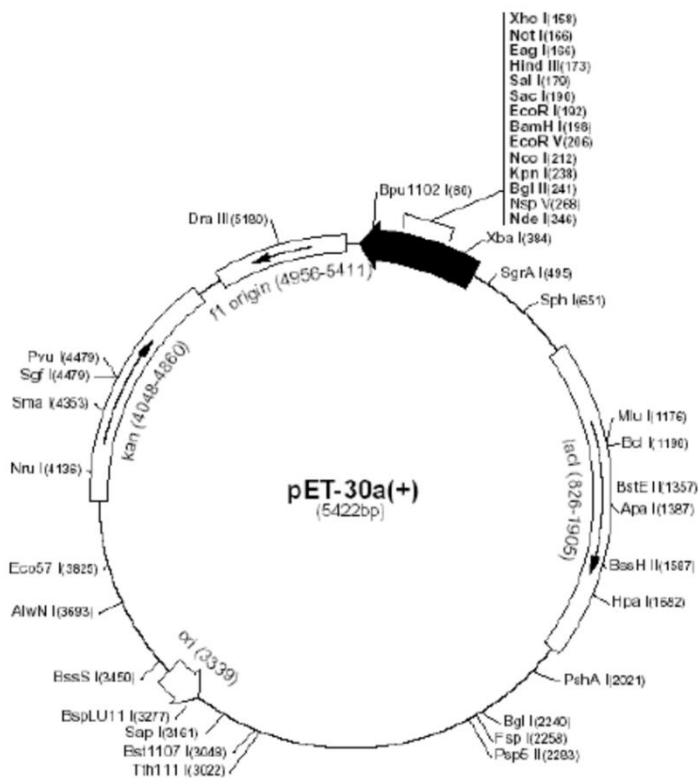
Το πλασμίδιο αυτό περιέχει την περιοχή κωδικοποίησης της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) στην 5' πλευρά της περιοχής πολλαπλής κλωνοποίησης (MCS). Ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-4T1 έχει μέγεθος 4,9 kb και περιέχειγονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμικιλίνη.





- pET 30a (Navagen)

Το πλασμίδιο αυτό κωδικοποιεί 6 αμινοξέα ιστιδίνης στη σειρά στην 5' πλευρά της περιοχής πολλαπλής κλωνοποίησης (MCS). Ο πλασμιδιακός φορέας pET 30a έχει μέγεθος 5,4kb και περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό καναμυκίνη.



### 2.1.4 Εκκινητές

Για την ενίσχυση τμήματος DNASpacerCt-SRPK1 χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εκκινητές:

Forward: 5' TT-GAA-TTC-CCA-GCT-GAC-AAA-ATG-TCA 3'

Reverse: 5' T-TGT-CGA-CGA-GTT-AAG-CCA-AGG-GTG 3'

Ο πρόσθιος (forward) εκκινητής περιλαμβάνει αλληλουχία που αναγνωρίζει το περιοριστικό ένζυμο EcoRI.

Ο οπίσθιος (reverse) εκκινητής περιλαμβάνει αλληλουχία που αναγνωρίζει το περιοριστικό ένζυμο Sall.

### 2.1.5 Χημικά αντιδραστήρια

Η προμήθεια των χημικών αντιδραστηρίων, αναλυτικής καθαρότητας έγινε από τις εταιρίες Sigma (St. Louis, USA) και ApplichemGmbH (Germany).

### 2.1.6 Υλικά μοριακής βιολογίας

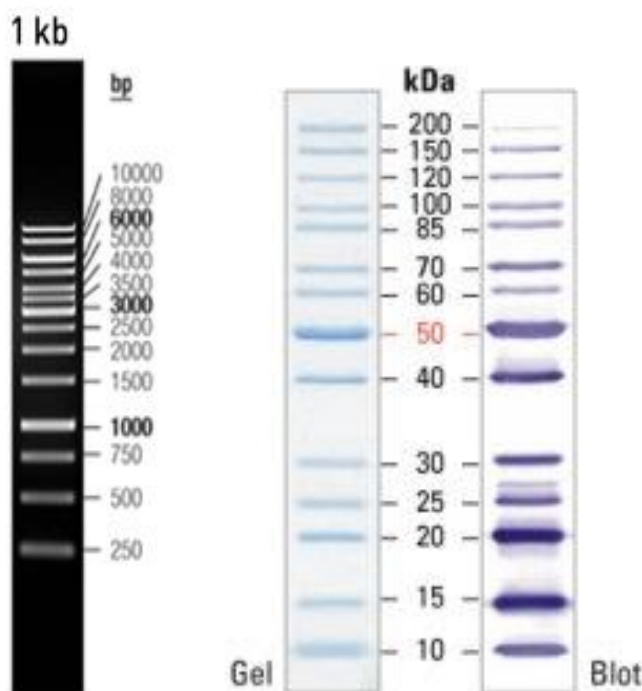
Τα υλικά μοριακής βιολογίας που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιριών New England BioLabs Inc και Fermentas.

### 2.1.7 Αντισώματα

- Πολυκλωνικό αντίσωμα αντί- GST από ορό κατσίκας σε αραιώση 1:10000 (Amersham)
- Μονοκλωνικό αντίσωμα αντί- 5xHis από ορό ποντικού σε αραιώση 1:3000 (Qiagen)
- Πολυκλωνικό αντίσωμα αντί-HIF-1α (Lyberopoulou et al, 2007) από ορό κουνελιού σε αραιώση 1:1000
- Μονοκλωνικό αντίσωμα αντί-SRPK1 από ορού ποντικού σε αραιώση 1:250
- Μονοκλωνικό αντίσωμα αντί-actin από ορό κουνελιού της εταιρείας CellSignalling σε αραιώση 1:1000.
- Αντισώματα συζευγμένα με υπεροξειδάση (για ανοσοαποτύπωση) (SantaCruz) ή με Cy3 ή FITC(για ανοσοφθορισμό) (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc) έναντι της IgG από κουνέλι ή ποντικό, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως δεύτερα αντισώματα.

## 2.1.8 Μάρτυρες μοριακού βάρους

Οι μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιριών Thermo Scientific και Fermentas.



## 2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.2.1 Κλωνοποίηση cDNA σε πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης

Τα πλασμίδια είναι μικρά, κυκλικά, δίκλινα μόρια DNA που μπορούν να αναπτύσσονται ημιαυτόνομα σε βακτήρια και φέρουν γονίδια που προσδίδουν αντίσταση σε αντιβιοτικά. Η κλωνοποίηση του cDNA του επιθυμητού γονιδίου σε πλασμιδιακούς φορείς βασίζεται στην ικανότητα του πλασμιδιακού DNA να διασπάται σε συγκεκριμένες θέσεις μετά από πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού και να συνδέεται με ένα ξένο τμήμα DNA που έχει υποστεί την ίδια κατεργασία. Το πλασμιδιακό DNA καθώς και το ξένο τμήμα DNA που έχουν κατεργαστεί με τα ίδια ένζυμα περιορισμού μπορούν να επανακυκλοποιηθούν συνδεδεμένα ομοιοπολικά στα άκρα τους μέσω της δράσης της λιγάσης του DNA. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο μπορεί να

εισαχθεί σε βακτηριακά κύτταρα, τα οποία στη συνέχεια αναπτύσσονται παρουσία κατάλληλων αντιβιοτικών για την επιλογή των ανασυνδυασμένων κυττάρων έναντι των κυττάρων που δεν περιέχουν το πλασμίδιο.

### 2.2.2 Ενίσχυση τμημάτων DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) είναι δυνατό να ενισχύονται συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA μέσω συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητών) και θερμοάντοχων πολυμερασών σε συνθήκες αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης, οι οποίες επαναλαμβάνονται σε κύκλους. Κατά αυτόν τον τρόπο το προϊόν που θέλουμε να ενισχύσουμε είναι εξειδικευμένο και μπορεί παράγεται σε μεγάλες ποσότητες.

Το μίγμα της αντίδρασης περιέχει:

- 50 ng εκμαγείο DNA
- 1x Thermopol Buffer
- 2 mM από κάθε dNTP
- 1 unit Vent πολυμεράση
- 50 pmoles/μl πρόσθιου εκκινητή
- 50 pmoles/μl οπίσθιου εκκινητή
- H<sub>2</sub>O έως όγκο 50 μl

Οι συνθήκες που πραγματοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την ενίσχυση της SpacerCt-SRPK1 ήταν οι εξής:

1<sup>ο</sup> Στάδιο, T = 94°C, 5 λεπτά

2<sup>ο</sup> Στάδιο (29 επαναλήψεις τριών κύκλων)

1<sup>ος</sup> Κύκλος, T = 95°C, 30 δευτερόλεπτα

2<sup>ος</sup> Κύκλος, T = 52°C, 30 δευτερόλεπτα

3<sup>ος</sup> Κύκλος T = 72°C, 1 λεπτό

3<sup>ο</sup> Στάδιο T = 75°C, 5 λεπτά

4<sup>ο</sup> Στάδιο T = 4°C

### 2.2.3 Πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Για την απομόνωση των ενθεμάτων για κλωνοποίηση η αντίδραση έγινε σε 50μl τελικού όγκου χρησιμοποιώντας κατάλληλα εκμαγεία και πλασμιδιακούς φορείς.

Τόσο τα εκμαγεία όσο και οι κενοί πλασμιδιακοί φορείς υφίστανται πέψη με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού.

- Το μείγμα της πέψης περιέχει:
  - 10 μg DNA από το εκμαγείο/ή από τον κάθε κενό πλασμιδιακό φορέα
  - 1xBuffer κατάλληλου για το περιοριστικό ένζυμο
  - 10 U κατάλληλο περιοριστικού ενζύμου
  - H<sub>2</sub>O έως τα 50 μl
- Επώαση για 2 ώρες στους 37°C.

### 2.2.4 Αποφωσφορυλίωση του γραμμικού πλασμιδιακού DNA

Εφόσον ο κενός πλασμιδιακός φορέας έχει υποστεί πέψη με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα ακολουθεί αντίδραση αλκαλικής φωσφατάσης (CIP) του κενού πλασμιδιακού φορέα για την απομάκρυνση της φωσφορικής ομάδας από το 5' άκρο που θα μπορούσε να οδηγήσει σε επανένωση των άκρων του πλασμιδίου. Έτσι λοιπόν ακολουθεί:

- Προσθήκη 1μl ενζύμου CIP (NewEnglandBiolabs) στο μείγμα της πέψης και επώαση για 30 λεπτά στους 37°C
- Προσθήκη άλλου 0,5μl CIP για άλλα 30 λεπτά στους 37°C.
- Απενεργοποίηση του ενζύμου με επώαση στους 75°C για 10 λεπτά.

### 2.2.5 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Στην παρούσα εργασία η ηλεκτροφόρηση των πλασμιδίων έγινε σε 1% πηκτή αγαρόζης.

Παρασκευή πηκτής 1%:

- Προστίθεται 1% αγαρόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE (4mM Tris-οξικό, 1mM EDTA pH 8)
- Θέρμανση στους 100°C
- Όταν η θερμοκρασία του διαλύματος μειωθεί προστίθεται βρωμιούχοαιθίδιο (0,5 μg/ml)
- Το διάλυμα αγαρόζης αποχύνεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης για να πολυμεριστεί σε πηκτή
- Προστίθεται διάλυμα TAE στη συσκευή ώστε να καλυφθεί η πηκτή.
- Τα δείγματα DNA που θα ηλεκτροφορηθούν αναμιγνύονται με διάλυμα φόρτωσης (5% γλυκερόλη, 0,42% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,42% μπλε του ξυλενίου)
- Τα δείγματα τοποθετούνται στις εγκοπές της πηκτής και ηλεκτροφορούνται σε 90 V.
- Οι ζώνες του DNA παρατηρούνται με τη βοήθεια λυχνίας UV (364nm).

### 2.2.6 Απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης

Για την απομόνωση και τον καθαρισμό τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε το Gel Extraction Kit της Qiagen. Συγκεκριμένα:

- Αποκόπεται το επιθυμητό τμήμα της πηκτής με αποστειρωμένο νυστέρι.
- Το τμήμα θερμαίνεται στους 50°C, με τρεις όγκους διαλύματος QG, για τον αποπολυμερισμό της αγαρόζης και την απελευθέρωση του DNA στο διάλυμα.
- Προστίθεται ένας όγκος ισοπροπανόλης σε σχέση με τη μάζα της πηκτής και μεταφέρεται σε ειδική στήλη (silica gel) για την πρόσδεση του DNA στο φίλτρο.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 4000 rpm για 1 λεπτό.
- Πλύση με 500μl διαλύματος PE για την απομάκρυνση των μη δεσμευμένων στη στήλη συστατικών.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 4000 rpm για ένα λεπτό.
- Έκλυση του δεσμευμένου στη στήλη DNA με 30μl δις αποσταγμένου H<sub>2</sub>O και φυγοκέντρωση στις 4000 rpm για ένα λεπτό.

### 2.2.7 Αντίδραση λιγάσης

Μετά από ποσοτικοποίηση των τμημάτων του DNA, μέσω ηλεκτροφόρησης ίσων όγκων από τα υποψήφια ενθέματα (inserts) καθώς και του πλασμιδιακού φορέα, ακολουθεί η αντίδραση λιγάσης.

Για την αντίδραση της λιγάσης, χρησιμοποιείται

- Πλασμιδιακός φορέας και ένθεμα σε κατάλληλη μοριακή αναλογία
- 2,5 Units λιγάσης T4 (5 Unit/μl)
- 1x Buffer λιγάσης
- ddH<sub>2</sub>O ώστε ο τελικός όγκος να είναι 20μl.

Το μείγμα επωάζεται ολονύκτια στους 16°C.

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε σαν δείγμα ελέγχου, αντίδραση που περιέχει τον κομμένο και αποφωσφορυλιωμένο πλασμιδιακό φορέα με λιγάση, χωρίς ένθεμα έτσι ώστε να ελεγχθεί αν ο φορέας έχει αποφωσφορυλιωθεί πλήρως.

## 2.2.8 Παρασκευή κυττάρων δεκτικών για μετασχηματισμό (competent) και μετασχηματισμός *E.coli* Top10

Κατά την παρασκευή δεκτικών βακτηριακών κυττάρων, τα βακτήρια εκτίθενται σε υψηλές συγκεντρώσεις συγκεκριμένων κατιόντων. Έτσι οι κυτταρικές μεμβράνες ενός μικρού μέρους των κυττάρων γίνονται διαπερατές σε ξένο DNA με ένα μηχανισμό που δεν είναι πλήρως κατανοητός.

Η παρασκευή δεκτικών για μετασχηματισμό (competent) βακτηριακών κυττάρων *E.coli* Top10 για την εισαγωγή των πλασμιδιακών των προϊόντων των αντιδράσεων λιγάσης γίνεται ως εξής:

- Εμβολιάζονται καλλιέργειες 5ml θρεπτικού TYM (2% bacto-tryptone, 0,5% bacto-yeast extract, 0,1M NaCl, 10mM MgSO<sub>4</sub>) παρουσία του αντιβιοτικού επιλογής στρεπτομυκίνη, με αποικίες από stock καλλιέργειες Top10
- Επωάζονται ολονύχτια στους 37°C υπό ανάδευση.
- Την επόμενη μέρα γίνεται αραιώση των καλλιεργειών 1:100 σε τελικό όγκο 3ml TYM με το αντιβιοτικό επιλογής στρεπτομυκίνη
- Επωάζονται για άλλες 2-3 ώρες στους 37°C.

- Ακολουθεί νέα αραιώση 1:200 σε τελικό όγκο 50 ml TYM χωρίς αντιβιοτικό και επώαση της καλλιέργειας στους 37°C μέχρι η απορρόφηση (OD) να είναι OD<sub>600nm</sub>=0,350-0,400, η οποία δείχνει ότι τα κύτταρα βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης.
- Οι καλλιέργειες φυγοκεντρούνται στα 3000rpm για 5 min στους 4°C.
- Το ίζημα επαναιωρείται σε 25ml διαλύματος TFB-I (30mM CH<sub>3</sub>COOK, 50mM MnCl<sub>2</sub>, 100mM KCl, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 15% γλυκερόλη, pH 7,0) και επωάζεται για 10 λεπτά στον πάγο.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 3000rpm για 5 λεπτά στους 4°C.
- Το ίζημα επαναιωρείται σε 2ml διαλύματος TFB-II (10mM MOPS, 75mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM KCl, 20% γλυκερόλη, pH 7,0) και επωάζεται στον πάγο για 60 λεπτά.
- Μοιράζονται σε σωληνάκια από 50μl διαλύματος από την προηγούμενη επαναιώρηση και αποθηκεύονται στους -80 °C.

#### Μετασχηματισμός *E.coli* Top10

- Προστίθενται 0,5~1μg/μl πλασμιδίου ή 10μl από αντίδραση λιγάσης σε διαφορετικά σωληνάκια με κύτταρα δεκτικά για μετασχηματισμό και επωάζονται στον πάγο για 30 λεπτά.
- Ακολουθεί θερμικό σοκ στους 42°C για 1 λεπτό.
- Προστίθενται 450μl θρεπτικού LB(1% bacto-tryptone, 0,5% bacto-yeast extract, 0,5% NaCl) χωρίς αντιβιοτικά και επώαση στους 37°C για 45 λεπτά.
- Επιστρώνονται 50μl κυττάρων σε πιάτα LBamp ή Lbkan ανάλογα με το γονίδιο ανθεκτικότητας του κάθε πλασμιδίου.
- Ολονύκτια επώαση των τρυβλίων στους 37°C.

τρυβλίαLB<sub>amp</sub>: 1% bacto-tryptone, 0,5% bacto-yeast extract, 0,5% NaCl, 2% άγαρ, 0,1 mg/ml αμπικιλίνη

τρυβλίαLB<sub>kan</sub>: 1% bacto-tryptone, 0,5% bacto-yeast extract, 0,5% NaCl, 2% άγαρ, 0,1 mg/ml καναμυκίνη

#### 2.2.9 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (MiniPreparation)

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μικρές (3ml) καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων.



- Μια αποικία που περιέχει το προς απομόνωση πλασμίδιο αναπτύσσεται σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες με 3ml LB παρουσία του αντιβιοτικού επιλογής του πλασμιδίου, για 16 ώρες στους 37°C, υπό συνεχή ανάδευση.
- Την επόμενη ημέρα τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση και ακολουθεί λύση με 300μl διαλύματος TENS (0,1N NaCl, 0,5% SDS σε διάλυμα Tris 10mM –EDTA 1mM pH 7,5).
- Ακολουθεί προσθήκη 150μl διαλύματος 3M οξικού νατρίου, pH 5,2, και μετά από έντονη ανάδευση φυγοκέντρηση στις 20.800xg για 2 λεπτά.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα μικροφυγοκέντρου και το DNA κατακρημνίζεται μέσω προσθήκης αιθανόλης τελικής συγκέντρωσης 70% και επώασης στους -20°C για 30 λεπτά.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 20.800xg για 15 λεπτά και προσεκτική απομάκρυνση του υπερκειμένου.
- Το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει ώστε να αναδιαλυθεί τελικά σε 30μl αποστειρωμένου δις απιονισμένου νερού (ddH<sub>2</sub>O).

#### 2.2.10 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας (MidiPreparation)

Μετά από ολονύκτια επώαση καλλιεργειών μετασχηματισμένων *E.coli* Top10 σε 100ml θρεπτικού LB παρουσία αντιβιοτικού επιλογής του πλασμιδίου στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση, φυγοκεντρούνται τα κύτταρα στα 3220 xg για 15 λεπτά στους 4°C. Για τη διαδικασία απομόνωσης πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας χρησιμοποιήθηκε το midikit της Qiagen και ακολουθείται η πειραματική διαδικασία σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

#### 2.2.11 Έλεγχος της ορθότητας των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που κατασκευάστηκαν

Η ορθότητα των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που απομονώθηκαν με τη διαδικασία της mini ή τηςmididi επιβεβαιώνεται με πέψη με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού.

- Η αντίδραση πέψης γίνεται σε 20μl τελικού όγκου και το μείγμα της αντίδρασης περιέχει:
  - 0,5μg πλασμιδιακού DNA
  - 0,5U του αντίστοιχου ενζύμου (New England Biolabs)

- 1X ρυθμιστικού διαλύματος που ορίζεται για κάθε ένζυμο από την εταιρία παρασκευής
  - ddH<sub>2</sub>O έως τα 20μl
- Επώαση για 1 ώρα στους 37°C.
  - Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης 1% όπως περιγράφεται πιο πάνω.

### 2.2.12 Επαγωγή της έκφρασης των His-πρωτεϊνών σε κύτταρα *E.coli* BL21RIL με IPTG

Τα γονίδια των πρωτεϊνών κλωνοποιούνται σε πλασμίδια κάτω από τον έλεγχο κάποιου ισχυρού υποκινητή, ο οποίος συνήθως βρίσκεται συνδεδεμένος με περιοχές του «χειριστή» (operator) του οπερονίου της λακτόζης. Τα κλωνοποιημένα γονίδια βρίσκονται σε ανενεργή κατάσταση διότι η παραπάνω περιοχή του χειριστή καταστέλλεται από μια πρωτεΐνη «καταστολέα» που εκφράζεται από το *lacI* γονίδιο και η οποία δεν επιτρέπει τη σύνδεση της RNA πολυμεράσης στον υποκινητή. Το εναρκτήριο σήμα για την ενεργοποίηση των κλωνοποιημένων γονιδίων και της έκφρασης των αντίστοιχων πρωτεϊνών δίνεται από τη λακτόζη ή χημικά ανάλογα της (π.χ. IPTG), τα οποία απενεργοποιούν τον καταστολέα. Έτσι επιτυγχάνεται η ελεγχόμενη έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.

Για την επαγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με IPTG ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

- 50ml υγρού θρεπτικού υλικού LB με τα αντιβιοτικά καναμυκίνη και χλωραμφενικόλη εμβολιάζονται με μία αποικία από τρυβλίο που περιέχει κύτταρα με τα μετασηματισμένα πλασμίδια.
- Επώαση της καλλιέργειας για 16 ώρες στους 37° C υπό ανάδευση.
- Με κατάλληλη ποσότητα από την παραπάνω καλλιέργεια εμβολιάζονται 400mL LB (με αντιβιοτικά) ώστε η αραίωση να είναι 1:100.
- Επώαση υπό ανακίνηση στους 37° C έως ότου η απορρόφηση της καλλιέργειας φτάσει στα 0,4-0,6 (μέτρηση στα 600nm).
- Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας IPTG και επώαση των καλλιεργούν σε κατάλληλη θερμοκρασία.
- Μετά την πάροδο κάποιων ωρών τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 8000rpm.
- Ξέπλυμα των κυττάρων με H<sub>2</sub>O και αποθήκευση των κυττάρων στους -20° C.

### 2.2.13 Λύση των κυττάρων E.coli με υπερήχους και απομόνωση του διαλυτού κλάσματος

- Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε κατάλληλο διάλυμα λύσης (8ml διαλύματος για την επαναιώρηση κυττάρων από 400ml αρχικής καλλιέργειας).
- Λύση των κυττάρων με τη χρήση της συσκευής υπερήχων (10 παλμοί διάρκειας 10 δευτερολέπτων με ενδιάμεσες παύσεις των 60 δευτερολέπτων)
- Φυγοκέντρηση του παραπάνω εκχυλίσματος στα 10000rpm για 30 min για το διαχωρισμό του διαλυτού από το αδιάλυτο κλάσμα.

Για τον περαιτέρω καθαρισμό της πρωτεΐνης με χρωματογραφία αγκιστείας χρησιμοποιείται το διαλυτό κλάσμα.

Η παραπάνω διαδικασία έγινε σε πάγο και οι φυγοκεντρήσεις έγιναν στους 4°C.

Το διάλυμα λύσης που χρησιμοποιήθηκε για τις His-ΔSSRPK1 και His-SRPK1 πρωτεΐνες περιείχε 8,1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 138mM NaCl, 2,67mM KCl, pH 7,4, 1% TritonX100, 10% γλυκερόλη, 1mM PMSF.

Το διάλυμα λύσης που χρησιμοποιήθηκε για τις His-NtSRPK1 και His-SpacerCt-SRPK1 πρωτεΐνες περιείχε 50mM Tris pH 8, 100mM NaCl, 10% γλυκερόλη, 0,2% Triton X100, 1mM PMSF και 1mM DTT.

### 2.2.14 Καθαρισμός των His-πρωτεϊνών με χρωματογραφία αγκιστείας σε στήλη Ni<sup>2+</sup>-Agarose

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την απομόνωση πρωτεϊνών που περιέχουν έναν επίτοπο αποτελούμενο από 6 ή περισσότερα αμινοξέα ιστιδίνης στη σειρά. Το νικέλιο Ni<sup>2+</sup> παρουσιάζει συγγένεια με τις ιστιδίνες και γι αυτό είναι δυνατόν οι ιστιδίνες να προσκολληθούν σε αυτό. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο προσδέτης που ακινητοποιείται στα σφαιρίδια Ni<sup>2+</sup> (Qiagen) είναι οι ανασυνδυσμένες πρωτεΐνες με επίτοπο His. Η έκλυση των ανασυνδυσμένων πρωτεϊνών με επίτοπο His γίνεται με τη βοήθεια υψηλής συγκέντρωσης ιμιδαζολίου (250mM) το οποίο ανταγωνίζεται το νικέλιο και λόγω καλύτερης αγκιστείας οι πρωτεΐνες που ήταν προσκολλημένες στα σφαιρίδια νικελίου ξεκολλούν και εντοπίζονται στο υπερκείμενο. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθεί είναι η παρακάτω:

- Επώαση του διαλυτού κλάσματος από τη λύση βακτηριακών κυττάρων που εκφράζουν τις χμιαϊκές His-πρωτεΐνες με σφαιρίδια Ni<sup>2+</sup>-Agarose, τα οποία έχουν προηγουμένως

εξισοροποιηθεί στο διάλυμα λύσης των κυττάρων, για 1 ώρα στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση.

- Απομάκρυνση του κλάσματος των πρωτεϊνών που δεν δεσμεύονται στα σφαιρίδια με φυγοκέντρηση 3 λεπτά, 3000 rpm.
- 3 διαδοχικές πλύσεις της στήλης με 10ml διαλύματος λύσης (προσθήκη 10mM και 50mM ιμιδαζολίου στην δεύτερη και τρίτη πλύση) και απομάκρυνση του υπερκειμένου με φυγοκέντρηση 3 λεπτά, 3000 rpm.
- Έκλουση των πρωτεϊνών που δεσμεύονται στα σφαιρίδια με επώαση των σφαιριδίων με 30ml ιμιδαζολίου 250mM για 3 λεπτά και επακόλουθη συλλογή του υπερκειμένου κλάσματος με φυγοκέντρηση για 3 λεπτά, 13400 rpm.

### 2.2.15 Διαπίδυση

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται προκειμένου να γίνει απομάκρυνση των μικρομοριακών συστατικών του διαλύματος μιας πρωτεΐνης. Η αρχή της μεθόδου είναι η μετακίνηση μορίων μεταξύ δύο διαλυμάτων μέσω ημιδιαπερατής μεμβράνης έως ότου εξισωθούν οι συγκεντρώσεις τους.

- Τα δείγματα τοποθετούνται σε ημιδιαπερατή μεμβράνη (Spectra-Por MWCO6000-8000 της Spectrum).
- Η μεμβράνη με τα δείγματα εισάγονται στη συνέχεια στο κατάλληλο διάλυμα διαπίδυσης και ακολουθεί επώαση υπό συνεχή ανάδευση του διαλύματος για 16 ώρες στους 4°C.
- Τα δείγματα συλλέγονται από το εσωτερικό των μεμβρανών και αποθηκεύονται στους -20°C.

Το διάλυμα διαπίδυσης που χρησιμοποιήθηκε για τη διαπίδυση των His- ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, προκειμένου να απομακρυνθεί το ιμιδαζόλιο περιείχε 8,1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 138mM NaCl, 2,67mM KCl, pH 7,4.

### 2.2.16 In vitro χρωματογραφία αγχιστείας (Pull down)

Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατόν να βρεθεί μία άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ δύο πρωτεϊνών. Μία από τις πρωτεΐνες του ενδιαφέροντος μας ακινητοποιείται σε έναν προσδέτη με τον οποίο συνδέεται μέσω αγχιστείας και στη συνέχεια επωάζεται με άλλες πρωτεΐνες προκειμένου να προσκολληθούν όσες είναι δυνατόν να αλληλεπιδράσουν με την ακινητοποιημένη πρωτεΐνη.

Συγκεκριμένα για την *in vitro* χρωματογραφία αγκιστείας στήλες Ni<sup>2+</sup> ακολουθείται η εξής διαδικασία:

- Σφαιρίδια Ni<sup>2+</sup>-Agarose εξισορροπούνται στο διάλυμα λύσης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με επίτοπο His.
- Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες με επίτοπο His επωάζονται με τα σφαιρίδια Ni<sup>2+</sup> για 1 ώρα σε συνεχή κίνηση στους 4°C
- Η στήλη ξεπλένεται (3 πλύσεις) και το υπερκείμενο απομακρύνεται από τη στήλη με φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 3 λεπτά.
- Η δεύτερη πρωτεΐνη προστίθεται στη στήλη και επωάζεται για 1 ώρα σε συνεχή κίνηση στους 4°C.
- Ακολουθούν 3 πλύσεις των 10 λεπτών με το ίδιο διάλυμα και απομάκρυνση του υπερκειμένου με φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 3 λεπτά (στη δεύτερη και τρίτη πλύση προστίθενται 20mM και 30mM ιμιδαζολίου αντίστοιχα).
- Οι πρωτεΐνες εκλύονται από τη στήλη με προσθήκη κατάλληλου διαλύματος έκλυσης (διάλυμα ιμιδαζολίου ή Laemmli buffer) και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, 1 λεπτό vortex και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 3 λεπτά.

Για το pull down των τμημάτων His-SRPK1 με τον GST-SAFB1ΔRE, ένα μέρος από το διαλυτό κλάσμα της His ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης SRPK1 (100μl-1ml) επώαστηκε είτε με 30μg καθαρής πρωτεΐνης GST (βακτηριακά εκφρασμένης), είτε με 30μg καθαρής ανασυνδυασμένης GST-SAFB1ΔRE πρωτεΐνης, για 1 ώρα σε συνεχή κίνηση στους 4°C και στη συνέχεια προστέθηκε στη στήλη Ni<sup>2+</sup> και επώαστηκε για άλλη 1 ώρα σε συνεχή κίνηση στους 4°C. Η έκλυση έγινε με προσθήκη Laemmli buffer (62,5mM Tris-HCl pH 6,8, 2,3% SDS, 10% γλυκερόλη, 0,05% Bromophenol Blue).

### 2.2.17 Κυτταροκαλλιέργειες

Οι κυτταρικές σειρές HeLa καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) της εταιρίας Gibco το οποίο περιείχε 10% ορό εμβρύου βωός (FBS) και τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη και επώαστηκαν σε κλίβανο στους 37°C σε 5% CO<sub>2</sub>.

Για τη συνθήκη της στέρισης γλυκόζης τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό (145mM NaCl, 5,4mM KCl, 1,4mM CaCl<sub>2</sub>, 1,4mM MgSO<sub>4</sub>, 25mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,2mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM Hepes pH 7,5 και προσθήκη 126 mg/l αργινίνης, 24 mg/l κυστεΐνης, 292 mg/l γλουταμίνης, 42 mg/l ιστιδίνης, 52 mg/l ισολευκίνης, 52 mg/l λευκίνης, 73 mg/l λυσίνης, 15 mg/l μεθειονίνης, 48

mg/l θρεονίνης, 10 mg/l τρυπτοφάνης, 36 mg/l τυροσίνης, 46 mg/l βαλίνης ), απουσία γλυκόζης, στο οποίο προστέθηκε 10% ορός εμβρύου βωός μετά από διαπίδυση, καθώς και τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη.

### 2.2.18 Παρασκευή ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από τα κύτταρα

Για την παρασκευή εκχυλίσματος ολικής πρωτεΐνης από τα κύτταρα ακολουθείται η εξής διαδικασία:

- Τα κύτταρα ξεπλένονται με κρύο PBS και στη συνέχεια αποκολλούνται από το τρυβλίο σε 150 μl διαλύματος λύσης (25mM Tris-Cl pH 7,5, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 2mM PMSF). Ο αναστολέας PMSF (αναστολέας πρωτεασών) προστίθεται στο διάλυμα λύσης πριν τη χρήση.
- Μεταφορά του λύματος σε σωληνάκι των 1,5 ml
- Επώαση για 20 λεπτά στον πάγο (vortex στα 10 λεπτά)
- Φυγοκέντρηση στις 12000rpm για 15 λεπτά στους 4°C.

Για την ανάλυση των δειγμάτων με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση προστίθεται διάλυμα φόρτωσης (62,5mM Tris-HCl pH 6,8, 2,3% SDS, 10% glycerol, 0,05% Bromophenol Blue, 25mM DTT) και ακολουθεί θέρμανση στους 95°C για 5 λεπτά.

### 2.2.19 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας ενός δείγματος σε πρωτεΐνη έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford (τροποποιημένη από τον Bearden) και βασίζεται στη δημιουργία συμπλόκου πρωτεΐνης με τη χρωστική Coomassie Brilliant blue G250 σε όξινο περιβάλλον. Κατά τη συμπλοκοποίηση το μέγιστο απορρόφησης της χρωστικής μεταβάλλεται από τα 465nm στα 595nm. Το αντιδραστήριο αποτελείται από τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G250 σε διάλυμα φωσφορικού οξέος και μεθανόλης (Bio-Rad). Με βάση την απορρόφηση στα 595nm και την αναγωγή της σε συγκέντρωση πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας πρότυπη καμπύλη αναφοράς με αλβουμίνη (BSA), προσδιορίζεται η περιεκτικότητα του δείγματος σε πρωτεΐνη.

### 2.2.20 Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE

Σύμφωνα με την τεχνική αυτή επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Στην ηλεκτροφόρηση αυτή χρησιμοποιείται ως αποδιατακτικό μέσο το μετά νατρίου άλας του θειικού δωδεκυλίου (SDS). Το SDS εκτός του ότι αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες δεσμεύεται πάνω σ' αυτές μέσω υδρόφοβων δεσμών, ανεξάρτητα της ιονικής ισχύος, σε εντελώς καθορισμένα ποσά κατά βάρος (1,4 gr SDS/gr πρωτεΐνης). Τα σύμπλοκα που σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση με το SDS είναι επιμήκη, με σαφή και καθορισμένη δομή και φέρουν καθαρό αρνητικό φορτίο. Επειδή το φορτίο ανά μονάδα μάζας είναι περίπου σταθερό και οι υδροδυναμικές ιδιότητες είναι συνάρτηση μόνο του μοριακού βάρους, η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων είναι μοναδική συνάρτηση του μοριακού βάρους.

Για την παρασκευή της πηκτής για την SDS-PAGE χρησιμοποιήθηκαν οι συσκευές της Hoeffer και της Bio-Rad.

- Ανάμεσα στις πλάκες της ηλεκτροφόρησης προστίθεται πρώτα 10% πηκτής διαχωρισμού (separatin ggel) : 10% ακρυλαμίδιο, 0,375mM Tris-Cl pH 8,8, 2 mM EDTA, 0,1% SDS, 0,04% υπερθετικό αμμώνιο και 0,02% TEMED σε H<sub>2</sub>O αφήνοντας περίπου 2 cm από την κορυφή των πλακών για την πηκτή επιστοιβάξης (stacking gel): 4,5% ακρυλαμίδιο, 0,125mM Tris-Cl pH 6,8, 2mM EDTA, 0,1% SDS, 0,08% υπερθετικό αμμώνιο, 0,04% TEMED σε H<sub>2</sub>O.
- Πάνω από την πηκτή επιστοιβάξης τοποθετείται χτενάκι και όταν η πηκτή πήξει οι πλάκες τοποθετούνται στη συσκευή.
- Η συσκευή γεμίζει με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (50mM Tris-Cl pH 8,3, 0,38M glycine, 2mM EDTA, 0.1% SDS).
- Τα δείγματα φορτώνονται με τη βοήθεια της σύριγγας Hamilton, στα οποία έχει προηγουμένως προστεθεί διάλυμα φόρτωσης (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2,3% SDS, 10% glycerol, 0,05% BromophenolBlue, 25 mM DTT) και έχουν θερμανθεί στους 95°C για 5 λεπτά.
- Ηλεκτροφόρηση στα 120 V μέχρι η χρωστική του διαλύματος φόρτωσης να φτάσει στο τέλος της πηκτής.

### 2.2.21 Ανοσοαποτύπωση (Western Blotting)

- Τοποθέτηση πηκτής μαζί με μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε διάλυμα μεταφοράς Tris-Borate pH 8,5 (για 10x: 125mM Tris, 0,2% SDS, 0,5mM DTT, ρύθμιση του pH με άλας Βορικού οξέως) για 10 λεπτά.

- Μεταφορά στην συσκευή ημι-ξηρής μεταφοράς (semi-dry transfer, Bio-Rad) των πρωτεϊνών από την πηκτή στη νιτροκυτταρίνη. Στη συσκευή τοποθετούνται η νιτροκυτταρίνη και η πηκτή πολυακρυλαμιδίου ανάμεσα σε διηθητικό χαρτί (όλα έχουν εμποτιστεί με διάλυμα μεταφοράς).
- Αφαίρεση τυχόν φυσαλίδων ανάμεσα από την πηκτή και τη νιτροκυτταρίνη και μεταφορά στα 10 V για 65 λεπτά.
- Μετά το πέρας της μεταφοράς, η νιτροκυτταρίνη αφαιρείται, ξεπλένεται με νερό και τοποθετείται για 2 λεπτά σε διάλυμα Ponceau S (0.2%: 2% Ponceau, 30% τριγλωροοξικό οξύ, 30% σουλφοσαλικυλικό οξύ, σε τελική αραιώση 1:10) μέχρις ότου εμφανιστούν οι πρωτεΐνες με κόκκινο χρώμα.
- Η νιτροκυτταρίνη ξεπλένεται με PBS-0,1% Tween20 υπό συνεχή ανάδευση μέχρι να αφαιρεθεί το Ponceau.
- Επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης σε διάλυμα κορεσμού (5% γάλα σε σκόνη, και PBS-0,1% Tween 20) για 1 ώρα, για τον κορεσμό των θέσεων δέσμευσης πρωτεϊνών της μεμβράνης από τις πρωτεΐνες του γάλακτος ώστε να αποφευχθούν μη εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις του αντισώματος με τη μεμβράνη.
- 3 πλύσεις των 5 λεπτών με PBS-0,1% Tween 20.
- Ολονύχτια επώαση με το εκάστοτε πρώτο αντίσωμα στην κατάλληλη αραιώση σε PBS-0,1% Tween 20 με 5% γάλα σε σκόνη υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C.
- 3 πλύσεις των 5 λεπτών με PBS-0,1% Tween 20.
- Επώαση με κατάλληλο δεύτερο αντίσωμα, το οποίο είναι συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση και αναγνωρίζει και προσδένεται στο πρώτο αντίσωμα. Το δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιείται σε κατάλληλη αραιώση, με 5% γάλα σε σκόνη και PBS- 0,1 % Tween 20 για 1 ώρα υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.
- 3 πλύσεις των 5 λεπτών με PBS-0,1% Tween 20.
- Για την εμφάνιση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας.
- Επώαση της μεμβράνης για ένα λεπτό σε 10ml διαλύματος λουμινόλης (1,25mM σε 0,1M Tris-ClpH 8,5), στο οποίο προστίθενται 30μl 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και 100 μl κουμαρικού οξέος (6,8mM σε DMSO).
- Η εμφάνιση γίνεται στη συσκευή Uvitec Cambridge Chemiluminescence Imaging System και η μέτρηση των πρωτεϊνικών επιπέδων γίνεται με τη βοήθεια λογισμικού προγράμματος Alliance Software (έκδοση 16.06).



PBS PhosphateBufferSaline: 8,1mMNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,47mMKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 138mMNaCl, 2,67mM KCl, pH 7,4

PBS-Tween 20: 0.1% Tween 20 σε διάλυμα PBS

### 2.2.22 Μελέτη του ενδοκυτταρικού εντοπισμού πρωτεϊνών με μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού

Με τη χρήση της τεχνικής του ανοσοφθορισμού είναι δυνατή η παρατήρηση του υποκυτταρικού εντοπισμού των ενδογενών πρωτεϊνών με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι σε αυτές. Τα αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών που μας ενδιαφέρουν αναγνωρίζονται από ένα δεύτερο αντίσωμα το οποίο φέρει τη φθορίζουσα ομάδα. Ο φθορισμός επιτυγχάνεται με την επίδραση φωτός κατάλληλου μήκους κύματος και η παρατήρηση γίνεται με τη χρήση μικροσκοπίου το οποίο φέρει κατάλληλους φακούς και φίλτρα απορρόφησης του φωτός.

- Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε αποστειρωμένες καλυπτρίδες διαμέτρου 12 mm (την ημέρα του πειράματος τα κύτταρα καλύπτουν το 60%-80% της επιφάνειας της καλυπτρίδας).
- Μετά από την κατάλληλη επώαση τα κύτταρα στις καλυπτρίδες ξεπλένονται με 1X PBS.
- Μονιμοποίηση με 1X PBS/3% παραφορμαλδεύδη για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 3 πλύσεις με 1X PBS και κατεργασία με μίγμα 1X PBS /1% Triton X-100 για 15 λεπτά στους 4°C προκειμένου να γίνει διάνοιξη των μεμβρανών των κυττάρων.
- Κορεσμός των μη ειδικών θέσεων με PBS-0.1% Tween 20-1% BSA για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- Επώαση με το κατάλληλο πρώτο αντίσωμα σε διάλυμα 1X PBS-0.1% Tween/1% BSA για 16 ώρες στους 4°C.
- 3 διαδοχικές πλύσεις με 1X PBS 0.1% Tween/1% BSA.
- Επώαση με το 2ο αντίσωμα (έναντι της IgG κουνελιού συνδεδεμένο με FITC σε αραιώση 1:500 είτε έναντι της IgG ποντικού συνδεδεμένο με Cy3 σε αραιώση 1:500) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- 3 διαδοχικές πλύσεις με 1X PBS 0.1% Tween/1% BSA.
- 1 πλύση με PBS και στιγμιαία εμβάπτιση σε H<sub>2</sub>O.
- Τοποθέτηση των καλυπτρίδων πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες αφού έχουν προστεθεί 5μl υλικού σταθεροποίησης του φθορισμού (Vectashield, Vector laboratories ή

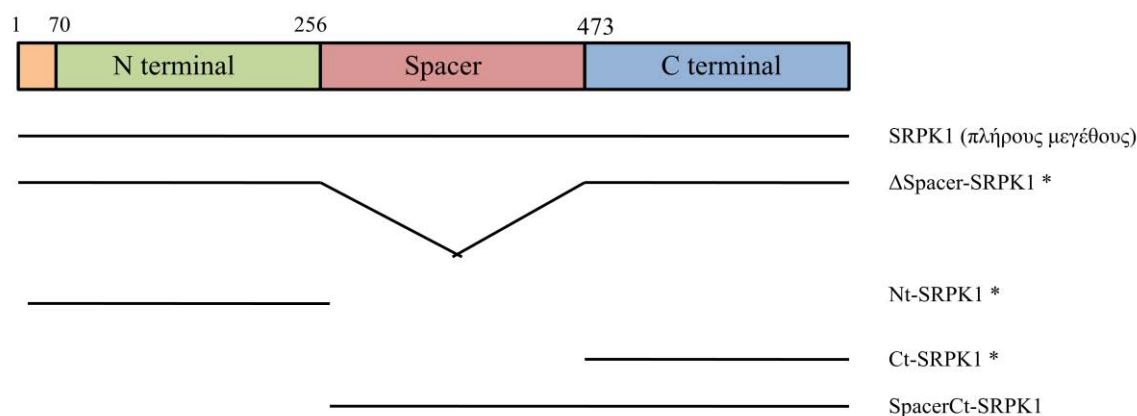
Mowiol) το οποίο περιέχει και την φθορίζουσα ουσία DAPI (4',6-διάμινο-2-φαινυλινδολη), η οποία έχει τη δυνατότητα να προσδέεται στο DNA οπότε έτσι διακρίνονται οι πυρήνες.

- Παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss Axioplan (χρησιμοποιήθηκε ο αισθητήρας Axio CamMRmCCD με φακό 40X και 100X με φίλτρα για DAPI, FITC και Cy3).

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΟΜΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ SRPK1 ΜΕ ΤΟΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ SAFB1

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η SRPK1 αλληλεπιδρά άμεσα με την καρβοξυτελική περιοχή του SAFB1, ωστόσο δεν γνωρίζουμε μέσω ποιας περιοχής της SRPK1 συμβαίνει αυτή η αλληλεπίδραση. Προκειμένου να απαντηθεί αυτό το ερώτημα τόσο η πλήρους μεγέθους SRPK1 όσο και μικρότερα τμήματά της κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pET30a και στη συνέχεια υπερέκφραστηκαν βακτηριακά με στόχο να πραγματοποιηθεί *in vitro* χρωματογραφία αγκιστείας με τον SAFB1. Στο σχήμα 1 απεικονίζονται τα τμήματα που κατασκευάστηκαν προκειμένου να ελεγχθεί η *in vitro* αλληλεπίδρασή τους με τον SAFB1.



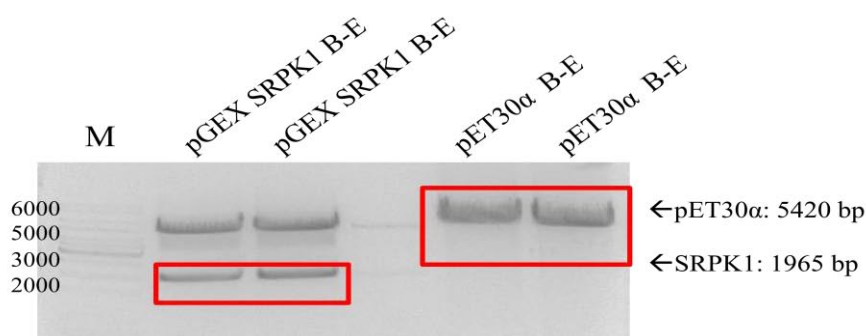
**Σχήμα 1:** Σχηματική απεικόνιση των τμημάτων της SRPK1 που χρησιμοποιήθηκαν. \* Τμήματα κλωνοποιημένα στον πλασμιδιακό φορέα pET30a που προϋπήρχαν στο Εργαστήριο Βιοχημείας .

Για την υπερέκφραση των τμημάτων που περιγράφονται στο σχήμα 1 πραγματοποιήθηκαν πολλές προσπάθειες με διαφορετικές συνθήκες επαγωγής (συγκέντρωση IPTG, χρόνος επαγωγής, θερμοκρασία) και διαλυτοποίησης της πρωτεΐνης. Στις ενότητες που ακολουθούν παρουσιάζονται επιλεγμένες προσπάθειες οι οποίες οδήγησαν στην τελική παραγωγή της εκάστοτε ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.

##### 3.1.1 Κλωνοποίηση της πλήρους μεγέθους SRPK1 στον πλασμιδιακό φορέα pET30a

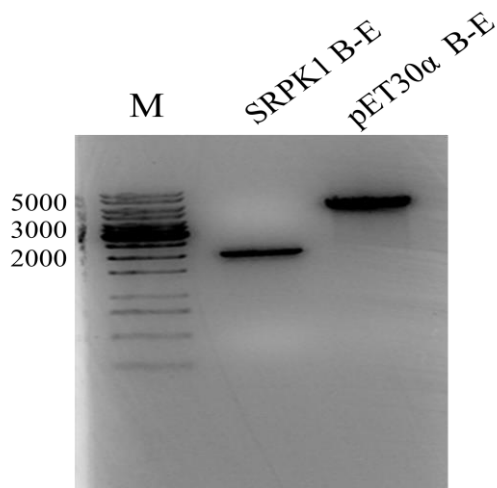
Προκειμένου η αλληλεπίδραση της πλήρους μεγέθους SRPK1 (1-655aa) με τον SAFB1 να χρησιμοποιηθεί ως θετικός μάρτυρας, η πλήρους μεγέθους SRPK1 μεταφέρθηκε με υποκλωνοποίηση από τον πλασμιδιακό φορέα pGEX- 4T1 όπου εκφράζεται σε σύντηξη με την

GST στον pET30a ώστε να εκφραστεί σε σύντηξη με His (καθώς ο SAFB1 έχει κλωνοποιηθεί στον πλασμιδιακό φορέα pGEX 4T1 και εκφράζεται σε σύντηξη με την GST). Συγκεκριμένα, 10μg DNA από το πλασμίδιο pGEX 4T1-SRPK1 υπέστησαν πέψη με τα ένζυμα EcoRI και BamHI (με αυτά τα άκρα η SRPK1 είχε εισαχθεί στον πλασμιδιακό φορέα pGEX 4T1). Επιπλέον, με τα ίδια ένζυμα περιορισμού υπέστη πέψη και ο άδειος πλασμιδιακός φορέας pET30a προκειμένου να δημιουργηθούν συμπληρωματικά με το ένθεμα (SRPK1) άκρα και στη συνέχεια αποφωσφορυλιώθηκε με αντίδραση αλκαλικής φωσφατάσης, όπως περιγράφεται στις ενότητες 2.2.3 και 2.2.4. Οι πέψεις μετά την αντίδραση αλκαλικής φωσφατάσης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1%.



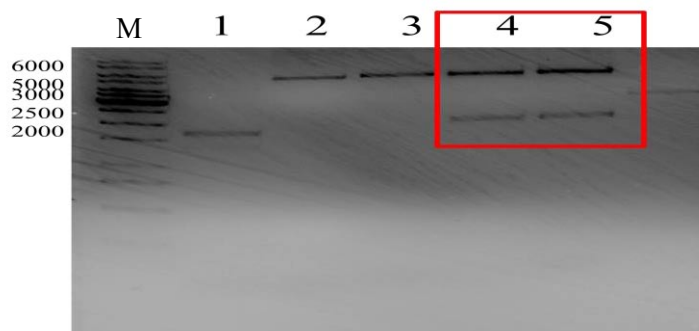
**Εικόνα 1:** Ηλεκτροφόρηση των διπλών πέψεων των πλασμιδιακών φορέων pGEX 4T1-SRPK1 και pET30a με τα ένζυμα EcoRI και BamHI σε πηκτώμα αγαρόζης 1% (M: μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών)

Στη συνέχεια τα τμήματα DNA που φαίνονται σε κόκκινο πλαίσιο στην εικόνα 1 απομονώθηκαν από την πηκτή και καθαρίστηκαν όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.2.6. Στη συνέχεια 4μl από το παρασκευασθέν DNA ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης όπως φαίνεται στην εικόνα 2 προκειμένου να ποσοτικοποιηθεί η συγκέντρωση του DNA.



**Εικόνα 2:** Ηλεκτροφόρηση καθαρού DNA του ενθέματος (SRPK1 B-E) και πλασμιδιακού φορέα (pET30a B-E) με συμπληρωματικά άκρα EcoRI και BamHI σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (M: μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών)

Εν συνεχεία, τα δύο τμήματα DNA (το cDNA της πλήρους μεγέθους SRPK1 και ο πλασμιδιακός φορέας pET30a με συμπληρωματικά άκρα BamHI- EcoRI) ενώθηκαν με αντίδραση λιγάσης όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.2.7. Τα περιεχόμενα της αντίδρασης λιγάσης μετασχημάτισαν κύτταρα Top 10, με τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.8 και επιστρώθηκαν σε τρυβλίο με αντιβιοτικό καναμυκίνη. Μετά από 24 ώρες, τα τρυβλία εξετάστηκαν για αποικίες, οι οποίες αποκολλήθηκαν από το τρυβλίο και το DNA τους απομονώθηκε σύμφωνα με τη διαδικασία της παραγράφου 2.2.9. Τέλος, το απομονωμένο προϊόν υπέστη πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI και BamHI και ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1% (εικόνα 3).



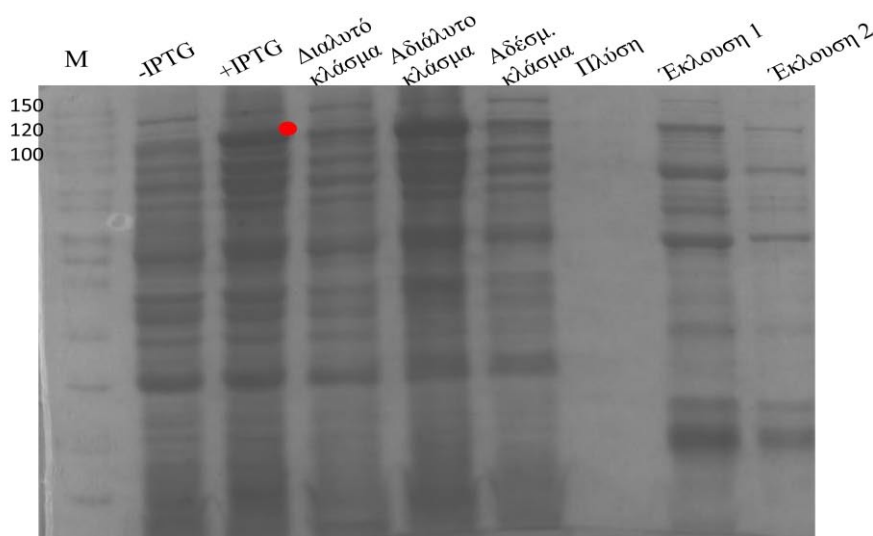
**Εικόνα 3:** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% των πέψεων του DNA που απομονώθηκε από τις αποικίες μετά την κλωνοποίηση της SRPK1 στον πλασμιδιακό φορέα pET30a (M: μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών)

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3 δύο αποικίες είχαν προσλάβει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο και η 4 επιλέχθηκε για μεσαία κλίμακας απομόνωσης DNA.

Έχοντας πλέον το πλασμίδιο pET30a-SRPK1 ακολούθησε βακτηριακή υπερέκφραση της πρωτεΐνης 6xHis-SRPK1.

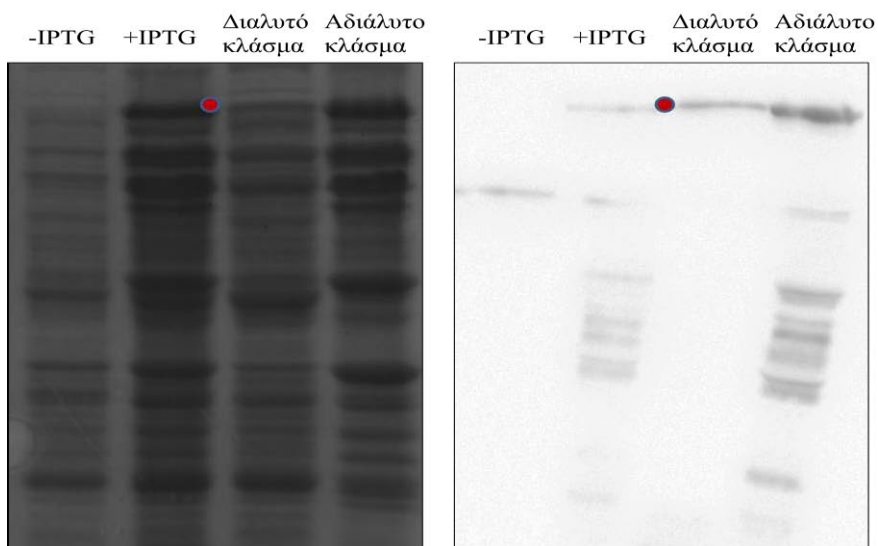
### 3.1.2 Υπερέκφραση της πρωτεΐνης His-SRPK1 σε κύτταρα *E.coli* BL21 RIL

Προκειμένου να παραχθεί η πρωτεΐνη His-SRPK1, κύτταρα *E.coli* BL21 RIL μετασηματίστηκαν με 1ngDNA του πλασμιδίου pET30a-SRPK1 όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.2.8 και στη συνέχεια επιστρώθηκαν σε πιάτα καναμυκίνης. Επιλέχθηκε μία αποικία και ακολουθήθηκε η διαδικασία επαγωγής όπως αυτή περιγράφεται στην ενότητα 2.2.12. Η επαγωγή έγινε με προσθήκη 0.2mM IPTG, στους 28°C για 3 ώρες. Στη συνέχεια τα κύτταρα λύθηκαν σε διάλυμα λύσης 50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 8, 150mM NaCl και 10μl από κάθε στάδιο αναλύθηκαν με SDS-PAGE και χρώση με Coomassie brilliant blue προκειμένου να ελεγχθεί η επαγωγή αλλά και η διαλυτότητα της πρωτεΐνης. Ακολούθησε πρόσθεση του διαλυτού κλάσματος σε σφαιρίδια Ni<sup>2+</sup> όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.2.14, προκειμένου η His-SRPK1 να απομονωθεί από τις υπόλοιπες. Ωστόσο, μετά από διαπίδυση η καθαρή πρωτεΐνη His-SRPK1 έχασε τη διαλυτότητά της και κατακρημνίστηκε σε ίζημα. Ολόκληρη η διαδικασία επαναλήφθηκε από την αρχή, αυτή τη φορά με άλλο διάλυμα λύσης (PBS 1% Triton X100, 10% γλυκερόλη, 1mM PMSF, pH 7,4). 10μl από κάθε στάδιο επεξεργασίας ηλεκτροφορήθηκαν όπως φαίνεται παρακάτω και η ζώνη της πρωτεΐνης μας εντοπίζεται στα 110kDa περίπου όπως αναμένεται με βάση το μοριακό της βάρος. Συμπεραίνουμε ότι η προσθήκη της γλυκερόλης στο διάλυμα λύσης και η ρύθμιση του pH στο 7,4 βοήθησαν στην καλύτερη διατήρηση της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης.



**Εικόνα 4:** Υπερέκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης His-SRPK1 (1-655aa) σε βακτηριακά στελέχη *E.coli*. Δείγματα πριν και μετά την επαγωγή υπερέκφρασης (-IPTG, +IPTG), διαλυτού και αδιάλυτου κλάσματος, δείγμα του κλάσματος που δεν προσδέθηκε στη στήλη, δείγμα από την πρώτη πλύση και δείγματα από την πρώτη και δεύτερη έκλουση αναλύθηκαν με SDS-PAGE και χρώση της πηκτής με Coomassie brilliant blue (M: μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών).

Ωστόσο μετά και από τις απόπειρες καθαρισμού των επομένων τμημάτων αποδείχθηκε ότι η διαλυτότητα όλων ήταν πολύ μικρή, και μερικών καθόλου, και μέσα στα βακτήρια και κατά τη διάρκεια των προσπαθειών περαιτέρω καθαρισμού. Αποφασίστηκε έτσι ότι για τη χρωματογραφία αγγιστείας θα χρησιμοποιηθεί το συνολικό διαλυτό βακτηριακό κλάσμα και όχι οι καθαρές πρωτεΐνες για όλα τα τμήματα των SRPK1 προκειμένου να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα μεταξύ τους. Στην εικόνα 5 φαίνεται η ηλεκτροφόρηση 10μL από κάθε στάδιο της παρασκευαστικής υπερέκφρασης της His-SRPK1 μετά από χρώση με Coomassie και ανοσοαποτύπωση κατά western με αντίσωμα αντί-His.

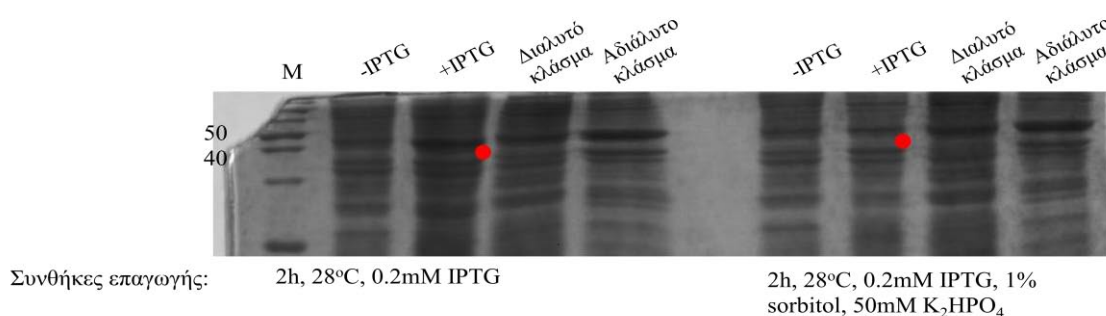


**Εικόνα 5:** Υπερέκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης His-SRPK1 (1-655aa) σε βακτηριακά στελέχη *E.coli*. Δείγματα πριν και μετά την επαγωγή υπερέκφρασης (-IPTG, +IPTG), διαλυτού και αδιάλυτου κλάσματος, αναλύθηκαν με SDS-PAGE και χρώση της πηκτής με Coomassie brilliant blue (αριστερά) και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα αντί-His (δεξιά).

### 3.1.3 Υπερέκφραση της πρωτεΐνης His-Nt-SRPK1 σε κύτταρα *E.coli* BL21 RIL

Το πλασμίδιο pET30a-Nt-SRPK1 περιέχει το αμινοτελικό άκρο της SRPK1 (1-256aa). Το αμινοτελικό άκρο της κινάσης είναι απαραίτητο για τη διαμόρφωση του καταλυτικού κέντρου της κινάσης και στην τριτοταγή του δομή σχηματίζει τον μικρό λοβό της κινάσης όπως έχει περιγραφεί στην ενότητα της εισαγωγής. Για την έκφρασή του σε σύντηξη με ιστιδίνες σε

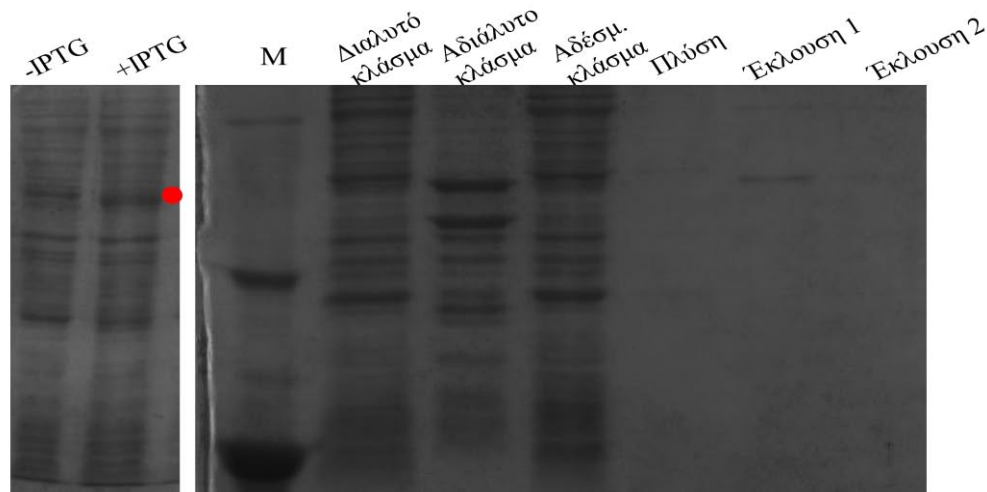
κύτταρα *E.coli* BL21 RIL ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφηκε για την υπερέκφραση της His-SRPK1. Προκειμένου να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες επαγωγής πραγματοποιήθηκε επαγωγή σε 50ml καλλιέργεια και δοκιμάστηκαν οι εξής δύο συνθήκες επαγωγής: 1) 28°C, 0.2mM IPTG για 2 ώρες, 2) 28°C, 0.2mM IPTG, 1% σορβιτόλη, 50mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> για 2 ώρες. Η λύση πραγματοποιήθηκε με 1ml διαλύματος λύσης (50mM Tris HCl pH 8, 300mM NaCl, 0.2% Triton, 5mM DTT, 10% γλυκερόλη, 1mM PMSF) και 10μl από κάθε στάδιο της διαδικασίας ηλεκτροφορήθηκαν όπως φαίνεται παρακάτω. Η σορβιτόλη χρησιμοποιείται για την επαγωγή περισσότερων πρωτεϊνών μοριακών συνοδών βοηθώντας έτσι την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη να αναδιπλωθεί σωστά και να παραμείνει διαλυτή. Το διάλυμα φωσφορικών διατηρεί σταθερό το pH σε όλη η διαδικασία της επαγωγής βοηθώντας επίσης την πρωτεΐνη να παραμείνει διαλυτή.



**Εικόνα 6:** Υπερέκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης His-Nt-SRPK1 (1-256aa) σε βακτηριακά στελέχη *E.coli*. Δείγματα πριν και μετά την επαγωγή υπερέκφρασης (-IPTG, +IPTG), διαλυτού και αδιάλυτου κλάσματος, αναλύθηκαν με SDS-PAGE και χρώση της πηκτής με Coomassie brilliant blue στις συνθήκες που αναγράφονται (M: μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών).

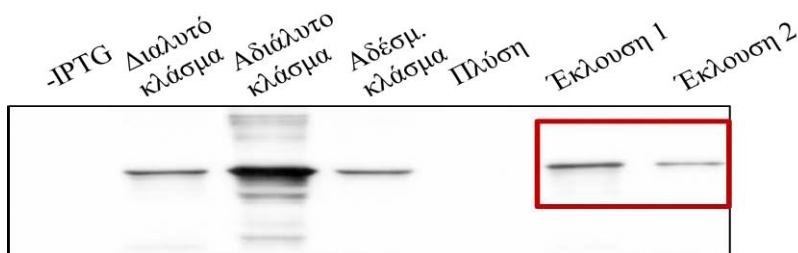
Η ζώνη της επαγωγής εντοπίζεται στα 40 kDa περίπου, όπως φαίνεται στην εικόνα 6 και για την περαιτέρω συνέχιση της διαδικασίας επιλέχθηκε η πρώτη συνθήκη. Το διαλυτό τμήμα στη συνέχεια προσκολλήθηκε σε σφαιρίδια Ni<sup>2+</sup> όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.2.14 και εκλούστηκε σε όγκο 30μl. 10μl από κάθε στάδιο επεξεργασίας ηλεκτροφορήθηκαν όπως φαίνεται στην εικόνα 7.





**Εικόνα 7:** Υπερέκφραση και καθαρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης His-Nt-SRPK1 (1-256aa) σε βακτηριακά στελέχη *E.coli*. Δείγματα πριν και μετά την επαγωγή υπερέκφρασης (-IPTG, +IPTG), διαλυτού και αδιάλυτου κλάσματος, δείγμα του κλάσματος που δεν προσδόθηκε στη στήλη, δείγμα από την πρώτη πλύση και δείγματα από την πρώτη και δεύτερη έκλουση αναλύθηκαν με SDS-PAGE και χρώση της πηκτής με Coomassie brilliant blue (M: μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών).

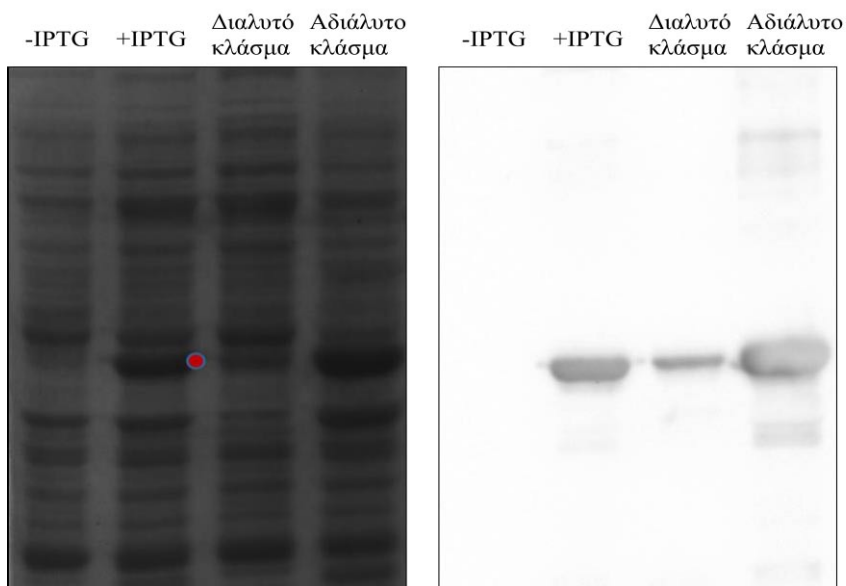
Για να επιβεβαιωθεί ότι η πρωτεΐνη που εκλύεται από τα σφαιρίδια Ni<sup>2+</sup> είναι όντως η His-Nt-SRPK1 πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι του επιτόπου His όπως φαίνεται στην εικόνα 8.



**Εικόνα 8:** Υπερέκφραση και καθαρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης His-Nt-SRPK1 (1-256aa) σε βακτηριακά στελέχη *E.coli*. Δείγματα πριν και μετά την επαγωγή υπερέκφρασης (-IPTG, +IPTG), διαλυτού και αδιάλυτου κλάσματος, δείγμα του κλάσματος που δεν προσδόθηκε στη στήλη, δείγμα από την πρώτη πλύση και δείγματα από την πρώτη και δεύτερη έκλουση αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα αντί-His.

Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το συνολικό διαλυτό βακτηριακό κλάσμα χρησιμοποιήθηκε για την *in vitro* χρωματογραφία αχιστείας με τον SAFB1ΔRE. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε επαγωγή σε μεγαλύτερη κλίμακα (400ml καλλιέργεια) και τα κύτταρα λύθηκαν με 8ml του ίδιου διαλύματος. 10μl από κάθε στάδιο της επαγωγής αναλύθηκαν με SDS-

PAGE ηλεκτροφόρηση και βάφτηκαν με coomassie brilliant blue (αριστερά) και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά western (δεξιά) με αντίσωμα αντί-His όπως φαίνεται στην εικόνα 9.



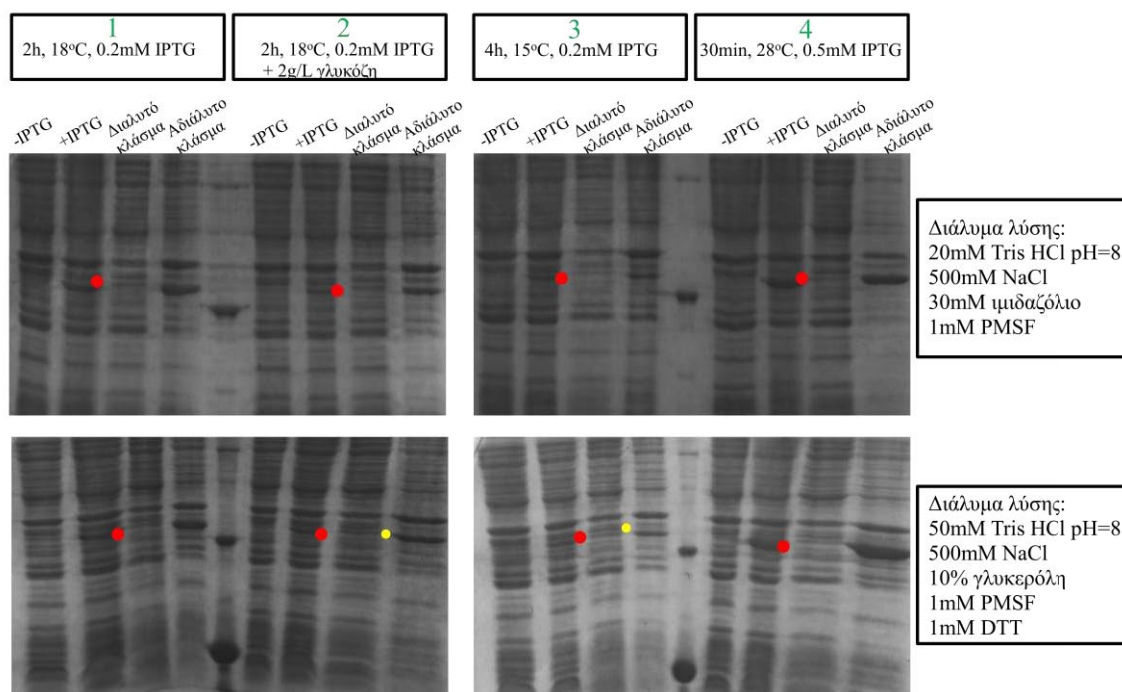
**Εικόνα 9:** Υπερέκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης His-Nt-SRPK1 (1-256aa) σε βακτηριακά στελέχη *E.coli*. Δείγματα πριν και μετά την επαγωγή υπερέκφρασης (-IPTG, +IPTG), διαλυτού και αδιάλυτου κλάσματος, αναλύθηκαν με SDS-PAGE και χρώση της πηκτής με Coomassie brilliant blue (αριστερά) και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα αντί-His (δεξιά).

### 3.1.4 Υπερέκφραση της πρωτεΐνης His-Ct-SRPK1 σε κύτταρα *E.coli* BL21 RIL

Το πλασμίδιο pET30a-Ct-SRPK1 περιέχει το καρβοξυτελικό άκρο της SRPK1 (473-655aa). Το καρβοξυτελικό άκρο της κινάσης είναι απαραίτητο για τη διαμόρφωση του καταλυτικού κέντρου της κινάσης και στην τριτοταγή του δομή σχηματίζει τον μεγάλο λοβό της κινάσης όπως έχει περιγραφεί στην ενότητα της εισαγωγής. Προκειμένου να ελέγξουμε εάν αυτό το τμήμα της κινάσης είναι ικανό να αλληλεπιδράσει με τον SAFB1 προχωρήσαμε σε βακτηριακή υπερέκφρασή του. Για την έκφρασή του σε σύντηξη με ιστιδίνες σε κύτταρα *E.coli* BL21 RIL ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφηκε για την υπερέκφραση της His-SRPK1. Για την επαγωγή δοκιμάστηκαν αρχικά οι δύο συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την υπερέκφραση του αμινοτελικού άκρου αλλά απορρίφθηκαν καθώς η πρωτεΐνη δεν παρέμενε στο διαλυτό κλάσμα. Προκειμένου να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες επαγωγής πραγματοποιήθηκε επαγωγή σε 50ml καλλιέργεια και δοκιμάστηκαν οι εξής τέσσερις συνθήκες επαγωγής: 1) 18°C, 0.2mM IPTG για 2 ώρες, 2) 18°C, 0.2mM IPTG, +2g/L γλυκόζη για 2 ώρες, 3) 15°C, 0.2mM IPTG για 4 ώρες, 4) 28°C, 0.5mM IPTG για 30 λεπτά. Επιπλέον, για τη λύση των κυττάρων δοκιμάστηκαν

τα δύο παρακάτω διαλύματα: 1) 20mM Tris HCl pH 8, 500mM NaCl, 30mM ιμιδαζόλιο, 1mM PMSF, 2) 50mM Tris HCl pH 8, 500mM NaCl, 10% γλυκερόλη, 1mM PMSF, 1mM DTT.

Οι τέσσερις διαφορετικές προσπάθειες υπερέκφρασης καθώς και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν απεικονίζονται στην εικόνα 10.



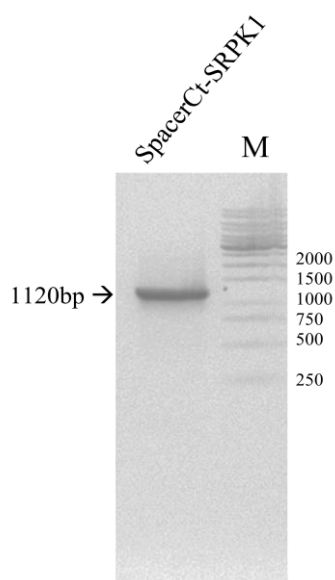
**Εικόνα 10:** Υπερέκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης His-Ct-SRPK1 (473-655aa) σε βακτηριακά στελέχη *E.coli*. Δείγματα πριν και μετά την επαγωγή υπερέκφρασης (-IPTG, +IPTG), διαλυτού και αδιάλυτου κλάσματος, αναλύθηκαν με SDS-PAGE και χρώση της πηκτής με Coomassie brilliant blue.

Δοκιμάστηκε επαγωγή σε διαφορετικές θερμοκρασίες, καθώς η θερμοκρασία σε συνδυασμό με τη χρονική διάρκεια της επαγωγής είναι παράγοντες που καθορίζουν την ποσότητα της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης που θα παραχθεί. Η χαμηλή θερμοκρασία επαγωγής οδηγεί σε παραγωγή μικρότερης ποσότητας ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης η οποία στη συνέχεια είναι πιθανό να αναδιπλωθεί σωστά παραμένοντας έτσι διαλυτή. Επιπλέον, για τη λύση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά διαλύματα λύσης με υψηλή ιοντική ισχύ και συστατικά, όπως η γλυκερόλη, που βοηθούν στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Αν και στις συνθήκες επαγωγής 2 και 3 χρησιμοποιώντας το δεύτερο διάλυμα λύσης μία μικρή ποσότητα της πρωτεΐνης μας παρέμεινε στο διαλυτό κλάσμα, όταν προχωρήσαμε σε καθαρισμό του διαλυτού κλάσματος σε στήλες νικελίου δεν ήταν δυνατή η απομόνωση της πρωτεΐνης μας. Ως εκ τούτου, αποφασίστηκε η κατασκευή νέου τμήματος που θα περιλάμβανε το καρβοξυτελικό τμήμα της SRPK1 και την ενδιάμεση (Spacer) αλληλουχία της SRPK1. Το ενδιάμεσο αυτό τμήμα γνωρίζουμε ότι δεν παίζει ρόλο στην καταλυτική δράση της κινάσης και στην αλληλεπίδραση με

τον SAFB1 αλλά είναι πιθανόν να επηρεάζει τη διαλυτότητα του καρβοξυτελικού τμήματος στο *E.coli*.

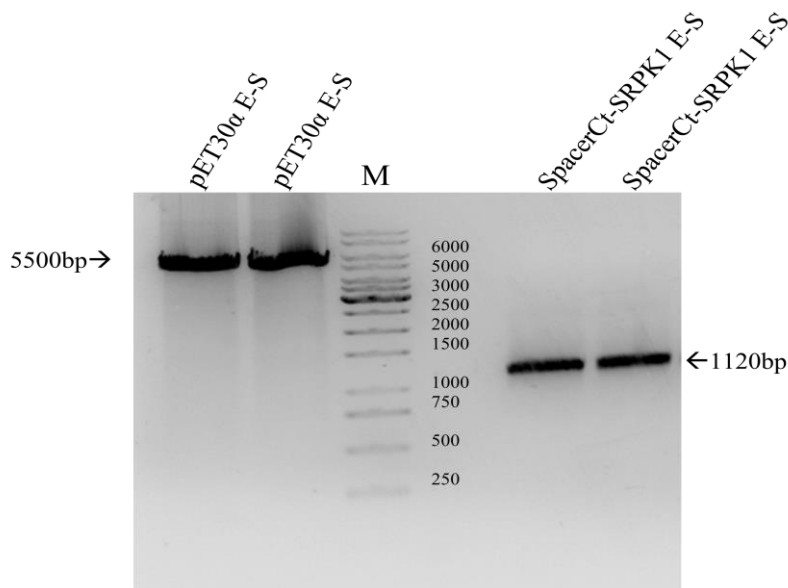
### 3.1.5 Κλωνοποίηση της SpacerCt-SRPK1 στον πλασμιδιακό φορέα pET30α

Για την κατασκευή του τμήματος SpacerCt-SRPK1 (257-655αα) χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο το cDNA της SRPK1 πλήρους μεγέθους. Η αλληλουχία που κωδικοποιεί για την SpacerCt-SRPK1 ενισχύθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και κατάλληλα ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές) τα οποία περιγράφονται στην ενότητα 2.1.4. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50μl και 3μl ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αгарόζης 1%. Το προβλεπόμενο ενισχυμένο τμήμα έχει μήκος 1120bp και εντοπίστηκε στο σωστό ύψος όπως φαίνεται στην εικόνα 11.



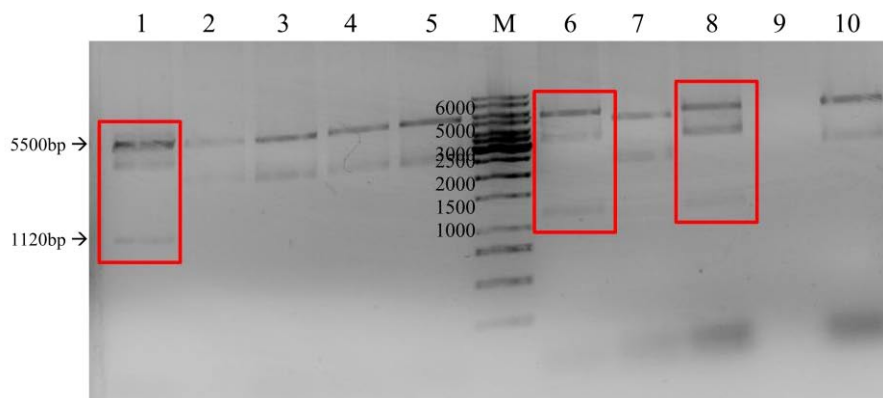
**Εικόνα 11:** Ηλεκτροφόρηση 3μl του προϊόντος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε 1% πήκτωμα αгарόζης (M: μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών)

Στη συνέχεια το προϊόν από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αгарόζης απομονώθηκε όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.2.6. Το καθαρό πλέον DNA και ο πλασμιδιακός φορέας pET30α υπέστησαν διπλή πέψη με τα ένζυμα EcoRI και SalI προκειμένου να προκύψουν τα ίδια συμπληρωματικά άκρα. Η παρασκευαστική ηλεκτροφόρηση των διπλών πέψεων του πλασμιδιακού φορέα pET30α και του ενθέματος SpacerCt-SRPK1 απεικονίζεται στην εικόνα 12.



**Εικόνα 12:** Ηλεκτροφόρηση των διπλών πέψεων με EcoRI και SalI του πλασμιδιακού φορέα pET30a και του ενθέματος SpacerCt-SRPK1 σε 1% πήκτωμα αγαρόζης (M: μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών)

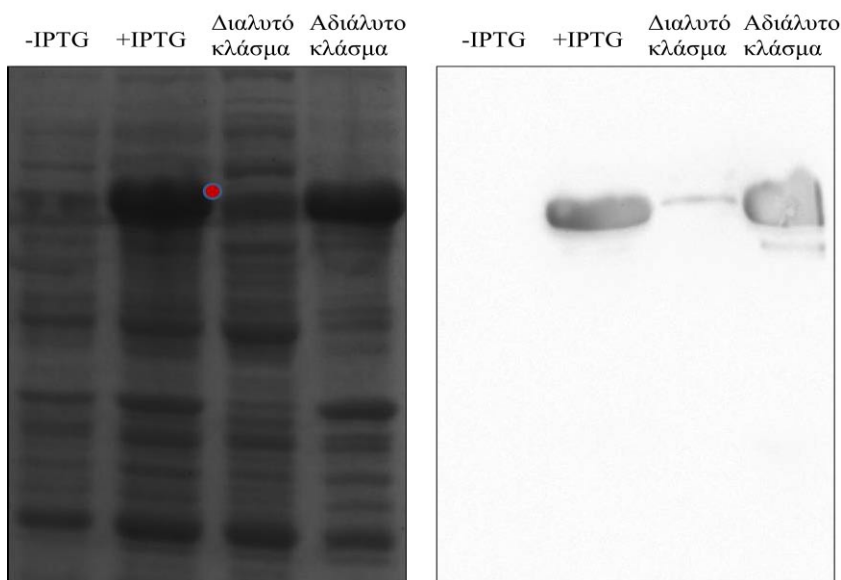
Ακολούθησε απομόνωση και καθαρισμός των παραπάνω τμημάτων τα οποία στη συνέχεια ενώθηκαν με αντίδραση λιγάσης όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.2.7. Κύτταρα Top10 μετασχηματίστηκαν με τα προϊόντα της αντίδρασης λιγάσης και στη συνέχεια αναπτύχθηκαν για 16 ώρες σε τρυβλία με αντιβιοτικό καναμυκίνη. Προκειμένου να βρεθούν οι αποικίες που είχαν μετασχηματιστεί με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET30a-SpacerCt-SRPK1 ακολούθησε καλλιέργεια και απομόνωση μικρής κλίμακας DNA όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.2.9. Το DNA που απομονώθηκε από 10 αποικίες υπέστη πέψη με τα ένζυμα EcoRI και SalI και στη συνέχεια ηλεκτροφορήθηκε, όπως φαίνεται στην εικόνα 13, με σκοπό να εντοπιστούν οι αποικίες που είχαν προσλάβει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Τρεις ήταν οι θετικές αποικίες (φαίνονται σε κόκκινο πλαίσιο) και η 1 επιλέχθηκε για μεσαίας κλίμακας απομόνωσης DNA.



**Εικόνα 13:** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% των πέψεων του DNA που απομονώθηκε από τις αποικίες κατά την κλωνοποίηση της SpacerCt-SRPK1 στον πλασμιδιακό φορέα pET30a (M: μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών)

### 3.1.6 Υπερέκφραση της πρωτεΐνης His-SpacerCt-SRPK1 σε κύτταρα *E.coli* BL21 RIL

Κύτταρα *E.coli* BL21 RIL μετασχηματίστηκαν με 1ng DNA του πλασμιδίου pET30a-SpacerCt-SRPK1 και στη συνέχεια επιστρώθηκαν σε πιάτα καναμυκίνης. Μία αποικία επιλέχθηκε και ακολουθήθηκε η διαδικασία επαγωγής όπως αυτή περιγράφεται στην ενότητα 2.2.6. Η επαγωγή έγινε στους 28°C για 3 ώρες με προσθήκη 0.2mM IPTG. Η λύση πραγματοποιήθηκε με 8ml διαλύματος λύσης (για 400ml καλλιέργειας) που περιέχει 50mM Tris HCl pH 8, 300mM NaCl, 0.2% Triton, 5mM DTT, 10% γλυκερόλη, 1mM PMSF. 10μl από κάθε στάδιο της επαγωγής αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και βάφτηκαν με Coomassie brilliant blue (αριστερά) και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά western (δεξιά) με αντίσωμα αντί-His όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα. Η ζώνη της επαγωγής εντοπίζεται στα 70 kDa περίπου όπως προβλέπεται.



**Εικόνα 14:** Υπερέκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης His-SpacerCt-SRPK1 (257-655αα) σε βακτηριακά στελέχη *E.coli*. Δείγματα πριν και μετά την επαγωγή υπερέκφρασης (-IPTG, +IPTG), διαλυτού και αδιάλυτου κλάσματος, αναλύθηκαν με SDS-PAGE και χρώση της πηκτής με Coomassie brilliant blue (αριστερά) και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα αντί-His (δεξιά).

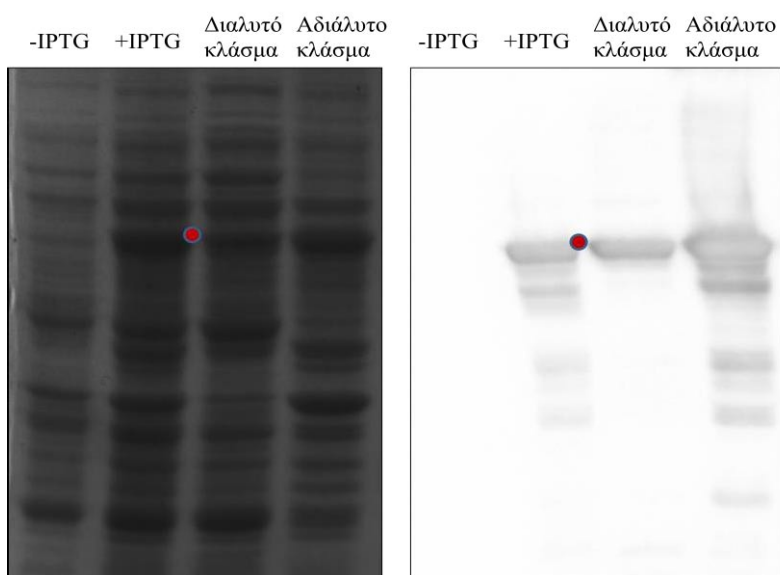
Το διαλυτό κλάσμα της υπερέκφρασης χρησιμοποιήθηκε για την *in vitro* χρωματογραφία αγκιστείας με τον SAFB1CΔRE όπως περιγράφεται σε επόμενη ενότητα.



### 3.1.7 Υπερέκφραση της πρωτεΐνης His-ΔSpacer-SRPK1 σε κύτταρα *E.coli* BL21 RIL

Όπως έχει περιγραφεί στην ενότητα της εισαγωγής, η ΔSpacerSRPK1 δεν περιλαμβάνει την ενδιάμεση αλληλουχία της SRPK1 (257-472aa) αλλά παραμένει ωστόσο λειτουργική. Έτσι λοιπόν, προκειμένου να ελέγξουμε την ικανότητα αλληλεπίδρασής της με τον SAFB1CΔRE μέσω *in vitro* χρωματογραφία αγκιστείας προχωρήσαμε σε βακτηριακή υπερέκφραση της His-ΔSpacer-SRPK1 σε *E.coli*.

Κύτταρα *E.coli* BL21 RIL μετασηματίστηκαν με 1ng DNA του πλασμιδίου pET30a-ΔSpacer-SRPK1 και στη συνέχεια επιστρώθηκαν σε πιάτα καναμυκίνης. Μία αποικία επιλέχθηκε και ακολουθήθηκε η διαδικασία επαγωγής όπως αυτή περιγράφεται στην ενότητα 2.2.6. Η επαγωγή έγινε στους 28°C για 3 ώρες με προσθήκη 0.2mM IPTG. Η λύση πραγματοποιήθηκε με 8ml διαλύματος λύσης (για 400ml καλλιέργειας) που περιείχε PBS 1% Triton X100, 10% γλυκερόλη, 1mM PMSF. 10μl από κάθε στάδιο της επαγωγής αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και βάφτηκαν με Coomassie brilliant blue (αριστερά) και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά western (δεξιά) με αντίσωμα αντί-His όπως φαίνεται στην εικόνα 15. Η ζώνη της επαγωγής εντοπίζεται στα 70 kDa περίπου όπως ήταν προβλεπόμενο.

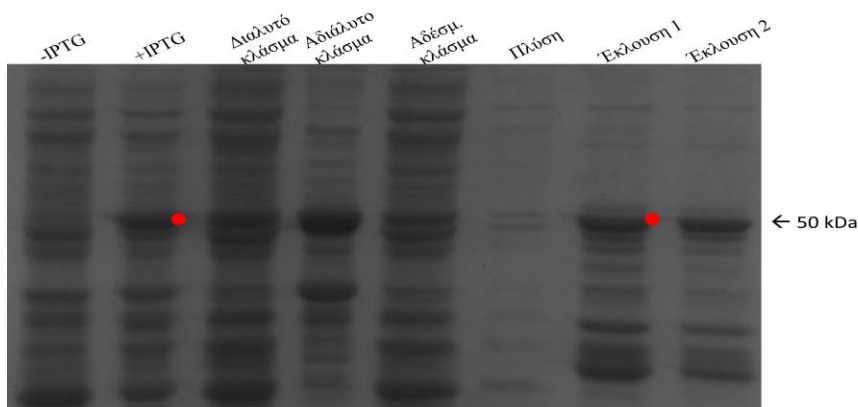


**Εικόνα 15:** Υπερέκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης His-ΔSpacer-SRPK1 (Δ257-472aa) σε βακτηριακά στελέχη *E.coli*. Δείγματα πριν και μετά την επαγωγή υπερέκφρασης (-IPTG, +IPTG), διαλυτού και αδιάλυτου κλάσματος, αναλύθηκαν με SDS-PAGE και χρώση της πηκτής με Coomassiebrilliantblue (αριστερά) και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα αντί-His (δεξιά).

Το διαλυτό κλάσμα της υπερέκφρασης χρησιμοποιήθηκε για την invitro χρωματογραφία αγγιστείας με τον SAFB1CΔRE όπως περιγράφεται σε επόμενη ενότητα.

### 3.1.8 Invitro χρωματογραφία αγγιστείας της His-SRPK1 με τον GST-SAFB1CΔRE

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η εύρεση των μικρότερων τμημάτων της SRPK1 τα οποία είναι ικανά να αλληλεπιδράσουν με τον SAFB1. Ήδη είναι γνωστό πως τόσο η πλήρους μεγέθους SRPK1 όσο και η ΔSpacer-SRPK1 αλληλεπιδρούν με τον SAFB1 και πιο ειδικά με το καρβοξυτελικό του τμήμα, SAFBICΔRE (710-915αα). Προκειμένου να ελέγξουμε εάν τα τμήματα His-Nt-SRPK1 (1-256αα) και His-SpacerCt-SRPK1 (473-655αα) είναι και αυτά ικανά να αλληλεπιδράσουν άμεσα με τον SAFBICΔRE, υπερεκφράστηκαν βακτηριακά συγχρόνως με τα His-SRPK1 (1-655αα) και His-ΔSpacer-SRPK1 (Δ257-472αα), όπως περιγράφηκε στις προηγούμενες ενότητες και το βακτηριακό διαλυτό κλάσμα της κάθε υπερέκφρασης στο οποίο εντοπίζεται το κάθε ανασυνδυασμένο τμήμα της SRPK1 επώαστηκε με τον βακτηριακά εκφρασμένο GST-SAFB1CΔRE σε καθαρή μορφή. Η υπερέκφραση και ο καθαρισμός του διαλυτού κλάσματος του GST-SAFB1CΔRE πραγματοποιήθηκε σε προηγούμενη δουλειά του εργαστηρίου, όπως φαίνεται στην εικόνα 16



**Εικόνα 16:** Υπερέκφραση και καθαρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης GST-SAFBICΔRE (710-915 αα) σε βακτηριακά στελέχη *E.coli*. Δείγματα πριν και μετά την επαγωγή υπερέκφρασης (-IPTG, +IPTG), διαλυτού και αδιάλυτου κλάσματος, δείγμα του κλάσματος που δεν προσδέθηκε στη στήλη, δείγμα από την πρώτη πλύση και δείγματα από την πρώτη και δεύτερη έκλυση αναλύθηκαν με SDS-PAGE και χρώση της πηκτής με Coomassie brilliant blue.

Κάθε τμήμα της SRPK1 επώαστηκε με το καρβοξυτελικό τμήμα του SAFB1 και προσδέθηκε σε στήλες νικελίου όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.2.16. Παράλληλα, κάθε τμήμα της SRPK1 επώαστηκε και με την τρανσφεράση της γλουταθειόνης σε καθαρή μορφή (GST)

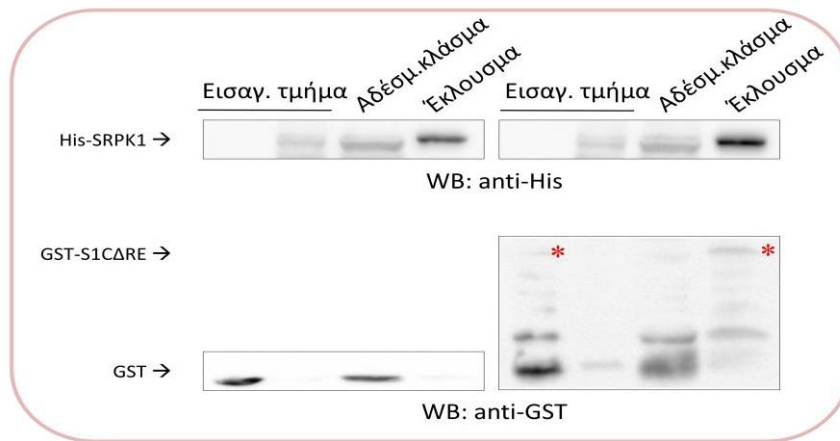


προκειμένου να επιβεβαιώσουμε ότι δεν υπάρχει μη ειδική σύνδεση της SRPK1 με την GST. Το έκλουσμα από τις στήλες Ni<sup>2+</sup> και το 1/50 του κλάσματος που δεν προσδέθηκε στη στήλη (αδέσμευτο κλάσμα) αναλύθηκε με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση κατά western. Ταυτόχρονα το 1/20 της ποσότητας των πρωτεϊνών που είχε προσκολληθεί στη στήλη αναλύθηκε επίσης με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση (εισαγόμενο τμήμα). Η ανίχνευση των τμημάτων His-SRPK1 πραγματοποιήθηκε με αντίσωμα αντί-His, ενώ η ανίχνευση του GST-SAFB1ΔRE και της GST πραγματοποιήθηκε με αντίσωμα αντί-GST.

Στην εικόνα 17α απεικονίζεται η invitro χρωματογραφία αγκιστείας της πλήρους μεγέθους His-SRPK1 με τον GST-SAFB1ΔRE. Στο αριστερό μισό της εικόνας 17α η His-SRPK1 έχει επωαστεί με την GST. Στις πρώτες δύο διαδρομές απεικονίζονται τα εισαγόμενα τμήματα της GST και της His-SRPK1 με αντίσωμα αντί-GST και αντί-His αντίστοιχα. Όπως φαίνεται στην τρίτη διαδρομή η GST εντοπίζεται στο αδέσμευτο κλάσμα. Αντίστοιχα, στο εκλούμενο από τη στήλη κλάσμα η εντοπίζεται η His-SRPK1 (άρα έχει προσκολληθεί στη στήλη νικελίου λόγω αγκιστείας) αλλά η GST όχι. Συνεπώς η GST δεν συνδέεται μη ειδικά με την His-SRPK1.

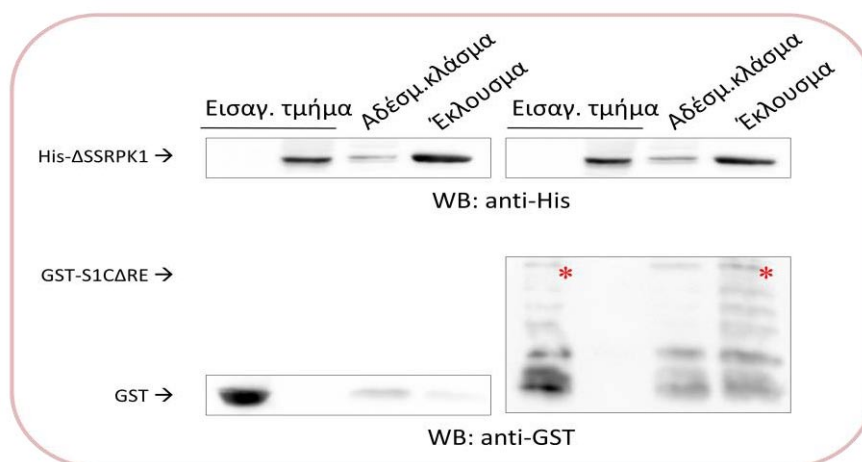
Στο δεξιό μισό της εικόνας 17α η His-SRPK1 έχει επωαστεί με τον GST-SAFB1ΔRE. Στις πρώτες δύο διαδρομές απεικονίζονται τα εισαγόμενα τμήματα του GST-SAFB1ΔRE και της His-SRPK1 με αντίσωμα αντί-GST και αντί-His αντίστοιχα. Όπως φαίνεται, στο αδέσμευτο κλάσμα ποσότητα της His-SRPK1 και του GST-SAFB1ΔRE δεν έχει δεσμευτεί στη στήλη. Στο εκλούμενο από τη στήλη κλάσμα βλέπουμε την His-SRPK1 που έχει προσκολληθεί στη στήλη (πάνω δεξιά) αλλά και τον GST-SAFB1ΔRE (κάτω δεξιά) ο οποίος δεσμεύεται στη στήλη λόγω ειδικής αλληλεπίδρασης με την SRPK1.

Όπως ήταν αναμενόμενο ο SAFB1ΔRE αλληλεπιδρά άμεσα και ειδικά με την πλήρους μεγέθους SRPK1 και ανιχνεύεται στο έκλουσμα. Η ορθότητα του πειράματος εξασφαλίζεται με την μη-σύνδεση της GST στη στήλη Ni<sup>2+</sup> στην οποία έχει προσδεθεί λόγω αγκιστείας η His-SRPK1. Η συνθήκη αυτή λειτουργεί ως αρνητικός μάρτυρας και επιβεβαιώνει την ειδική σύνδεση του SAFB1 με την SRPK1.



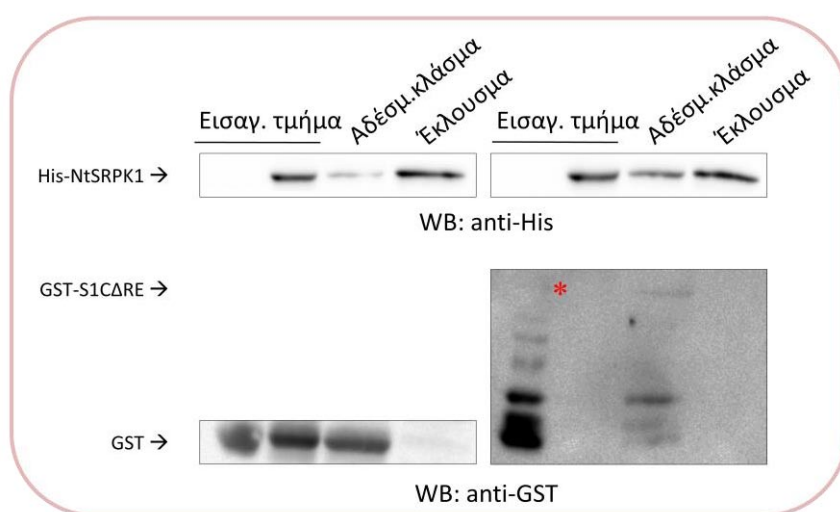
**Εικόνα 17α** :In vitro χρωματογραφία αγκιστείας της His-SRPK1 με τον GST-SAFB1CΔRE. Τα δείγματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση κατά western με αντισώματα αντί-His και αντί-GST. Το αποτέλεσμα προκύπτει από δύο ανεξάρτητα πειράματα.

Παρομοίως στην εικόνα 17 β απεικονίζεται η in vitro χρωματογραφία αγκιστείας της His-ΔSpacer-SRPK1 με τον GST-SAFB1CΔRE. Επωάζοντας την μεμβράνη με αντίσωμα αντί-His η His-ΔSpacerSRPK1 εντοπίζεται στο εκλουόμενο κλάσμα της στήλης τόσο στην περίπτωση επώασης της με την GST (πάνω αριστερά) όσο και στην περίπτωση επώασης με τον GST-SAFB1CΔRE (πάνω δεξιά). Αντίστοιχα επωάζοντας τη μεμβράνη με αντίσωμα αντί- GST, η GST εντοπίζεται στο αδέσμευτο κλάσμα και όχι στο εκλουόμενο (κάτω αριστερά) ενώ ο GST-SAFB1CΔRE εντοπίζεται τόσο στο αδέσμευτο όσο και στο εκλουόμενο κλάσμα (κάτω δεξιά). Άρα, ο GST-SAFB1CΔRE αλληλεπιδρά με την His-ΔSpacer-SRPK1 όπως ήταν αναμενόμενο.



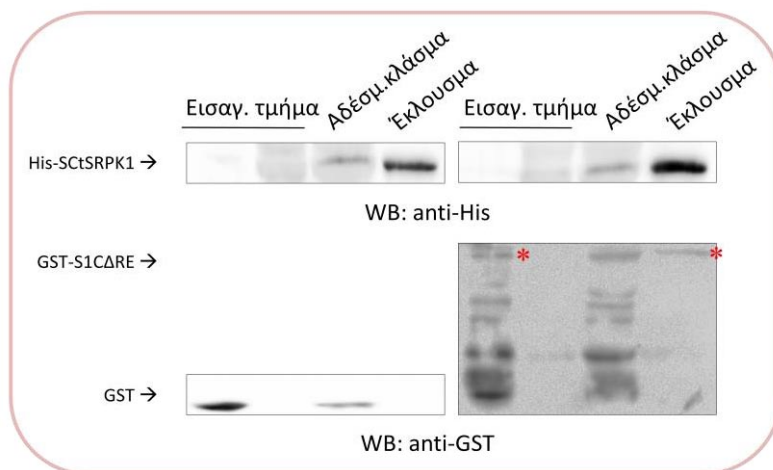
**Εικόνα 17β** :In vitro χρωματογραφία αγκιστείας της His-ΔSpacerSRPK1 με τον GST-SAFB1CΔRE. Τα δείγματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση κατά western με αντισώματα αντί-His και αντί-GST. Το αποτέλεσμα προκύπτει από δύο ανεξάρτητα πειράματα.

Στην εικόνα 17γ απεικονίζεται η invitro χρωματογραφία αγκιστείας της His-Nt-SRPK1 με τον GST-SAFB1CΔRE. Επωάζοντας την μεμβράνη με αντίσωμα αντί-His η Nt-SRPK1 εντοπίζεται στο εκλούμενο κλάσμα της στήλης τόσο στην περίπτωση επώασης της με την GST (πάνω αριστερά) όσο και στην περίπτωση επώασης με τον GST-SAFB1CΔRE (πάνω δεξιά). Επωάζοντας τη μεμβράνη με αντίσωμα αντί- GST, η GST εντοπίζεται στο αδέσμευτο κλάσμα και όχι στο εκλούμενο (κάτω αριστερά) όπως και ο GST-SAFB1CΔRE ο οποίος εντοπίζεται μόνο στο αδέσμευτο κλάσμα (κάτω δεξιά). Άρα, η His-Nt-SRPK1 δεν είναι ικανή να αλληλεπιδράσει με τον GST-SAFB1CΔRE.



**Εικόνα 17γ** :Invitro χρωματογραφία αγκιστείας της His-Nt-SRPK1 με τον GST-SAFB1CΔRE. Τα δείγματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση κατά western με αντισώματα αντί-His και αντί-GST. Το αποτέλεσμα προκύπτει από δύο ανεξάρτητα πειράματα.

Στην εικόνα 17δαπικονίζεται η invitro χρωματογραφία αγκιστείας της His-SpacerCt-SRPK1 με τον GST-SAFB1CΔRE. Επωάζοντας την μεμβράνη με αντί-His αντίσωμα η His-SpacerCtSRPK1 εντοπίζεται στο εκλούμενο κλάσμα της στήλης τόσο στην περίπτωση επώασης της με την GST (πάνω αριστερά) όσο και στην περίπτωση επώασης με τον GST-SAFB1CΔRE (πάνω δεξιά). Αντίστοιχα επωάζοντας τη μεμβράνη με αντί-GST αντίσωμα, η GST εντοπίζεται στο αδέσμευτο κλάσμα και όχι στο εκλούμενο (κάτω αριστερά) ενώ ο GST-SAFB1CΔRE εντοπίζεται τόσο στο αδέσμευτο όσο και στο εκλούμενο κλάσμα (κάτω δεξιά). Άρα, ο GST-SAFB1CΔRE αλληλεπιδρά με την His-SpacerCt-SRPK1 και γι αυτό συνεντοπίζεται στο εκλούμενο από τη στήλη κλάσμα.



**Εικόνα 17 δ** :In vitro χρωματογραφία αγγιστείας της His-SpacerCt-SRPK1 με τον GST-SAFB1ΔRE. Τα δείγματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση κατά western με αντισώματα αντί-His και αντί-GST. Το αποτέλεσμα προκύπτει από δύο ανεξάρτητα πειράματα.

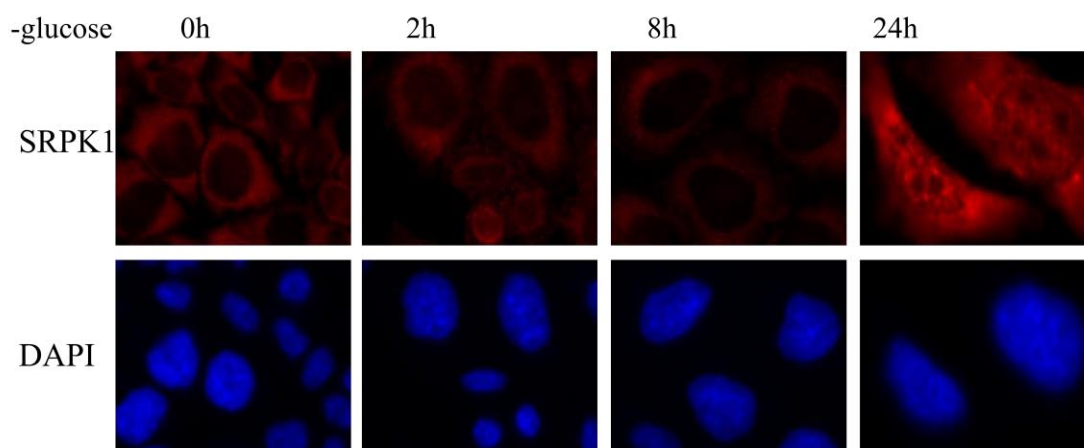
Συμπερασματικά λοιπόν, εξετάσαμε την ικανότητα *in vitro* αλληλεπίδρασης των τεσσάρων τμημάτων της SRPK1 με τον GST-SAFB1ΔRE. Τόσο η πλήρους μεγέθους SRPK1 όσο και η ΔSpacer-SRPK1 αλληλεπιδρούν άμεσα με τον GST-SAFB1ΔRE όπως ήταν αναμενόμενο. Ωστόσο για πρώτη φορά βρέθηκε πως και ένα μικρότερο τμήμα της (182 αα) είναι ικανό να αλληλεπιδράσει με τον SAFB1 και ειδικότερα με το καρβοξυτελικό του τμήμα, ενώ αντίθετα το αμινοτελικό τμήμα της SRPK1, Nt-SRPK1 (1-256αα) δεν αλληλεπιδρά.

### 3.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ SRPK1 ΜΕ ΤΟΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ SAFB1

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, η SRPK1 έχει κυρίως κυτταροπλασματικό εντοπισμό ενώ ένα μικρό μόνο ποσοστό της εντοπίζεται στον πυρήνα. Στο εργαστήριο βιοχημείας έχει βρεθεί ότι ο SAFB1 αλληλεπιδρά με την SRPK1 και αναστέλλει τη δράση της (Tsianou et al 2009). Δεδομένου ότι οι SAFBs έχουν αποκλειστικά πυρηνικό εντοπισμό, ο δεύτερος στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η εύρεση συνθηκών που πιθανόν να μεταβάλλουν τον υποκυτταρικό εντοπισμό της SRPK1. Στην παρούσα εργασία δοκιμάστηκαν στρεσογόνες συνθήκες όπως η στέρηση γλυκόζης η οποία προκαλεί μεταβολικό στρες στο κύτταρο, η υποξία καθώς και ο συνδυασμός τους, συνθήκες που προσομοιάζουν το περιβάλλον της ισχαιμίας στον ανθρώπινο οργανισμό.

### 3.2.1 Μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού της SRPK1 υπό στρεσογόνες συνθήκες

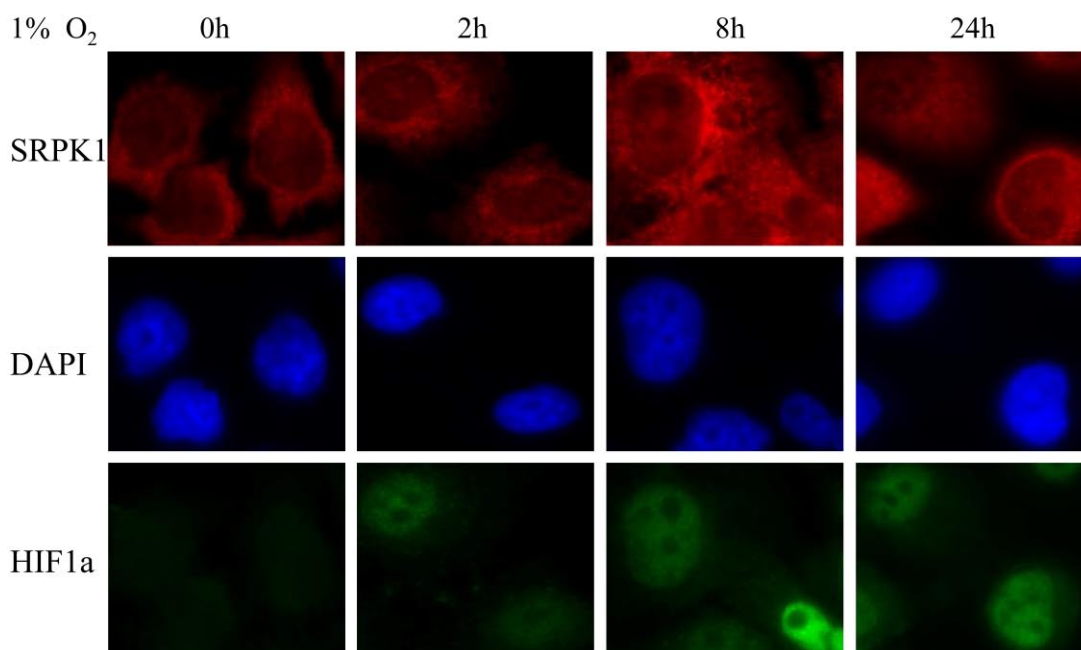
Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο χωρίς γλυκόζη, σε υποξία και σε συνδυασμό των δύο αυτών συνθηκών για 2, 8 και 24 ώρες και χρησιμοποιώντας αντίσωμα anti-SRPK1, παρατηρήθηκε με ανοσοφθορισμό ο υποκυτταρικός εντοπισμός της ενδογενούς SRPK1.



**Εικόνα 18α:** Υποκυτταρικός εντοπισμός της ενδογενούς SRPK1 σε συνθήκες στέρησης γλυκόζης σε κύτταρα HeLa. Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες στέρησης γλυκόζης για 2,8 και 24 ώρες και η ενδογενής SRPK1 παρατηρήθηκε στο κόκκινο κανάλι με αντίσωμα αντί-SRPK1 με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Για την παρατήρηση των πυρήνων έγινε χρώση του DNA με DAPI.

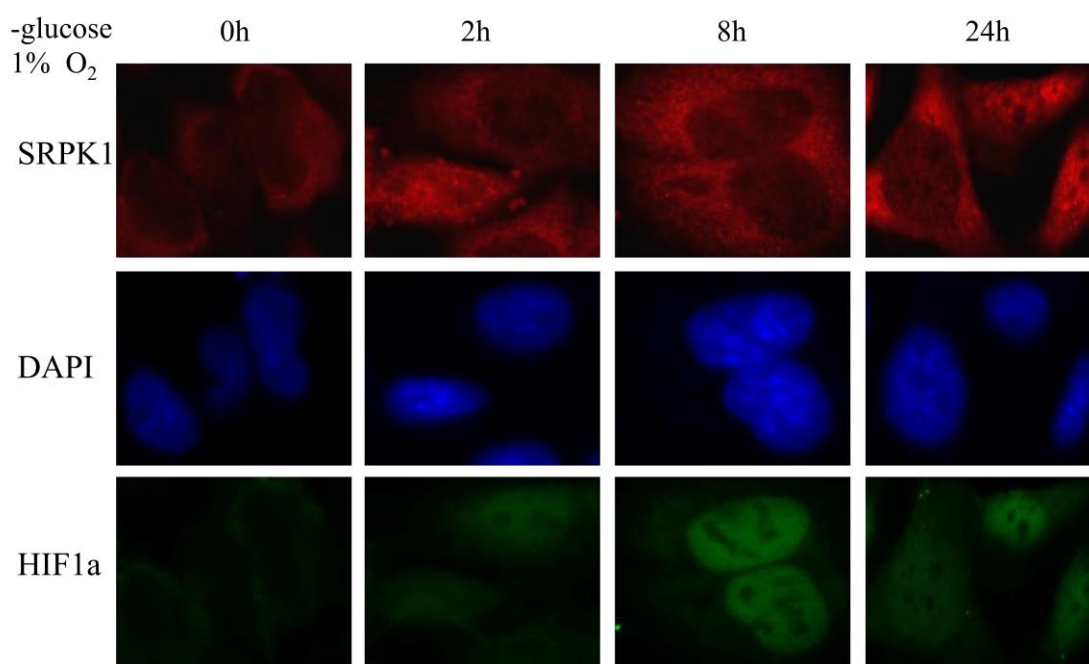
Όπως φαίνεται στην εικόνα 18α η συνθήκη της στέρησης γλυκόζης φαίνεται να επηρεάζει τον υποκυτταρικό εντοπισμό της SRPK1 καθώς στις 2 ώρες ήδη η SRPK1 οργανώνεται σε κυτταροπλασματικές δομές κοντά στην περιφέρεια της πλασματικής μεμβράνης. Στις 8 ώρες στέρησης γλυκόζης η SRPK1 φαίνεται να επαναδιαχέεται στο κυτταρόπλασμα χωρίς να μετατοπίζεται στον πυρήνα, ενώ στις 24 ώρες παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης της SRPK1 στον πυρήνα η οποία πιθανότατα οφείλεται σε μετατόπιση κλάσματος της κυτταροπλασματικής SRPK1 στον πυρήνα. Στον πυρήνα, η SRPK1 φαίνεται να είναι οργανωμένη σε speckles (speckle pattern) και το σήμα φθορισμού της μοιάζει με την οργάνωση της χρωματίνης όπως αυτή παρατηρείται μετά την επώαση των κυττάρων με DAPI.

Στη συνθήκη της υποξίας (1%O<sub>2</sub>), όπως φαίνεται στην εικόνα 18β, η SRPK1 παρουσιάζει υποκυτταρικό εντοπισμό παρόμοιο με αυτόν που παρατηρείται στα κύτταρα ελέγχου. Και στις τρεις χρονικές περιόδους (2, 8, 24 ώρες) ο υποκυτταρικός εντοπισμός της SRPK1 είναι κυρίως κυτταροπλασματικός και δεν μεταβάλλεται συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου. Συνεπώς η συνθήκη της υποξίας δεν φαίνεται να επάγει την μετατόπιση μέρους της ενδογενούς SRPK1 στον πυρήνα.



**Εικόνα 18β:** Υποκυτταρικός εντοπισμός της ενδογενούς SRPK1 σε συνθήκες υποξίας σε κύτταρα HeLa. Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν σε υποξία (1%O<sub>2</sub>) για 2,8 και 24 ώρες και η ενδογενής SRPK1 παρατηρήθηκε στο κόκκινο κανάλι με αντίσωμα αντί-SRPK1 με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Ο ενδογενής HIF-1a παρατηρήθηκε στο πράσινο κανάλι με αντίσωμα αντί- HIF1a. Για την παρατήρηση των πυρήνων έγινε χρώση του DNA με DAPI.

Στη συνέχεια ελέγξαμε και την επίδραση της υποξίας και στέρηση γλυκόζης ταυτόχρονα στον υποκυτταρικό εντοπισμό της ενδογενούς SRPK1. Έτσι λοιπόν κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν σε 1% O<sub>2</sub> και σε θρεπτικό χωρίς γλυκόζη για 2,8 και 24 ώρες και η ενδογενής SRPK1 παρατηρήθηκε με έμμεσο ανοσοφθορισμό.





**Εικόνα 18γ:** Υποκυτταρικός εντοπισμός της ενδογενούς SRPK1 σε συνθήκες υποξίας και στέρησης γλυκόζης σε κύτταρα HeLa. Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν σε υποξία (1%O<sub>2</sub>) και στέρηση γλυκόζης για 2,8 και 24 ώρες και η ενδογενής SRPK1 παρατηρήθηκε στο κόκκινο κανάλι με αντίσωμα αντί-SRPK1 με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Ο ενδογενής HIF1α παρατηρήθηκε στο πράσινο κανάλι με αντίσωμα αντί-HIF-1α. Για την παρατήρηση των πυρήνων έγινε χρώση του DNA με DAPI.

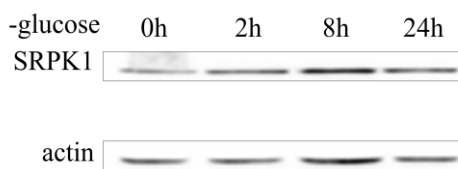
Όπως φαίνεται και στην εικόνα 18γ, ο συνδυασμός της υποξίας και της στέρησης γλυκόζης επάγει σε μικρότερο βαθμό την αναδιοργάνωση και την μετατόπιση κλάσματος της SRPK1 στον πυρήνα. Πιο αναλυτικά, στις 2 ώρες σε ένα ποσοστό των κυττάρων παρατηρείται αναδιοργάνωση της SRPK1 σε κυτταροπλασματικές δομές κοντά στην πλασματική μεμβράνη, φαινόμενο ανάλογο με αυτό που παρατηρήθηκε στις 2 ώρες στέρησης γλυκόζης. Στις 8 ώρες, όπως και στην συνθήκη της στέρησης γλυκόζης, η SRPK1 επαναδιαχέεται στο κυτταρόπλασμα χωρίς να μετατοπίζεται στον πυρήνα. Τέλος, στις 24 ώρες υποξίας και στέρησης γλυκόζης παρατηρούνται δύο πληθυσμοί κυττάρων. Στο μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων κλάσμα της SRPK1 έχει μετατοπιστεί στον πυρήνα του κυττάρου, όπου και εντοπίζεται, ενώ ένα μικρότερο ποσοστό των κυττάρων παρουσιάζει φαινότυπο παρόμοιο με αυτό στη συνθήκη της υποξίας, με την SRPK1 να παραμένει στο κυτταρόπλασμα.

Συμπερασματικά προκύπτει ότι η συνθήκη της υποξίας μετριάζει το φαινόμενο της αναδιοργάνωσης και της μετατόπισης κλάσματος της ενδογενούς SRPK1 στον πυρήνα κυττάρων HeLa υπό την επίδραση της στέρησης γλυκόζης.

### 3.2.2 Μελέτη των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης της ενδογενούς SRPK1 υπό στρεσογόνες συνθήκες

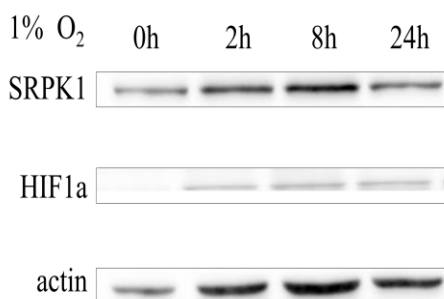
Παράλληλα με τα παραπάνω πειράματα ανοσοφθορισμού ελέγξαμε σε όλες τις παραπάνω συνθήκες τα πρωτεϊνικά επίπεδα της SRPK1. Συγκεκριμένα, κύτταρα HeLa επωάστηκαν για 2,8 και 24 ώρες στις προαναφερθείσες συνθήκες και στη συνέχεια λύθηκαν με το διάλυμα λύσης όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.2.18, και τα πρωτεϊνικά επίπεδα ελέγχθηκαν με τη μέθοδο της ανοσοαπύπωσης κατά western με αντίσωμα αντί-SRPK1.

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 19α η στέρηση γλυκόζης δεν επηρεάζει τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της ενδογενούς SRPK1 σε κύτταρα HeLa. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνεται και από προηγούμενα αποτελέσματα του εργαστηρίου.



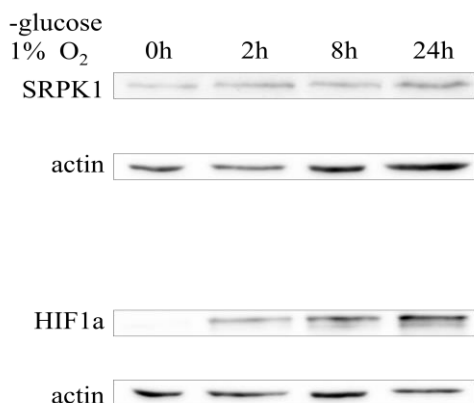
**Εικόνα 19α:** Επίδραση της στέρησης γλυκόζης στην έκφραση της ενδογενούς SRPK1 ανοσοαποτύπωση με αντισώματα ενάντια στην SRPK1 και την ακτίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων HeLa που καλλιεργήθηκαν για 2,8 και 24 ώρες σε θρεπτικό χωρίς γλυκόζη.

Στην συνθήκη της υποξίας επίσης δεν παρατηρείται αλλαγή στα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης ενδογενούς SRPK1 καθώς σε όλες τις χρονικές περιόδους παραμένουν πρακτικά αμετάβλητα (εικόνα 19β). Το αποτέλεσμα αυτό επίσης επιβεβαιώνεται από προηγούμενα εργαστηριακά αποτελέσματα.



**Εικόνα 19β:** Επίδραση της υποξίας στην έκφραση της ενδογενούς SRPK1 ανοσοαποτύπωση με αντισώματα ενάντια στην SRPK1, τον HIF-1α και την ακτίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων HeLa που καλλιεργήθηκαν για 2,8 και 24 ώρες σε υποξία (1%O<sub>2</sub>).

Τέλος, όπως φαίνεται και στην εικόνα 19γ ούτε η συνθήκη της υποξίας και στέρησης γλυκόζης επηρεάζει τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της ενδογενούς SRPK1 σε καμία χρονική περίοδο.





Εικόνα 19γ: Επίδραση της υποξίας και της στέρησης γλυκόζης στην έκφραση της ενδογενούς SRPK1. Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα ενάντια στην SRPK1, τον HIF-1α και την ακτίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων HeLa που καλλιεργήθηκαν για 2,8 και 24 ώρες σε υποξία (1%O<sub>2</sub>) και στέρηση γλυκόζης.

Συμπεραίνουμε ότι τυχόν διαφορές που παρατηρούμε στα επίπεδα των SRPK1 στο μικροσκόπιο δεν οφείλονται σε μεταβολές στα πρωτεϊνικά της επίπεδα

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι κινάσες πρωτεϊνών σερίνης-αργινίνης (SRPKs) διαδραματίζουν πολύπλοκους ρόλους και επηρεάζουν διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες με σημαντικότερη αυτή του ματίσματος. Η SRPK1, ανάλογα με τη φάση του κυτταρικού κύκλου, φωσφορυλιώνει τους παράγοντες ματίσματος (SRSFs) και με αυτό τον τρόπο επηρεάζει την υποκυτταρική τους κατανομή και τη διαδικασία του ματίσματος. Οι SRPKs μπορούν να φωσφορυλιώσουν τόσο κυτταροπλασματικούς όσο και πυρηνικούς παράγοντες ματίσματος κάτω από συνθήκες οι οποίες ελέγχονται από το κύτταρο.

Η πρωτεΐνη SAFB αποτελεί μέλος μιας οικογένειας πυρηνικών πρωτεϊνών, οι οποίες εντοπίζονται στην πυρηνική μήτρα. Οι παράγοντες SAFB1 και SAFB2 μπορούν να αλληλεπιδράσουν τόσο με το DNA όσο και με το RNA αλλά και με πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται κυρίως στην οργάνωση της χρωματίνης, τη μεταγραφή και την επεξεργασία του RNA. Μία από τις κυριότερες ιδιότητες που έχει αποδοθεί στον SAFB είναι η κατασταλτική του ενεργότητα η οποία εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό του άκρο.

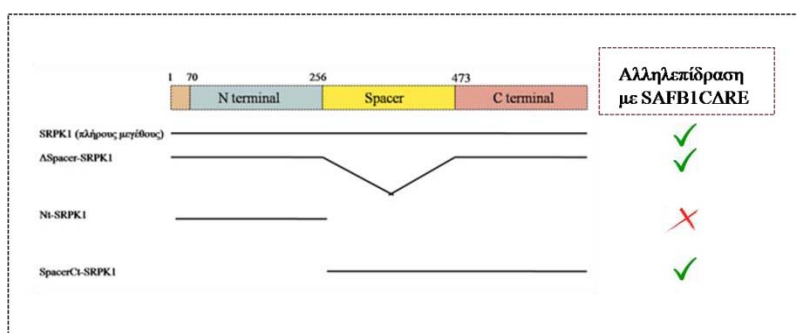
Στο εργαστήριό Βιοχημείας έχει βρεθεί η αλληλεπίδραση της SRPK1 (και της SRPK1α) με τις πρωτεΐνες της πυρηνικής μήτρα SAFB1 και SAFB2. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι ο SAFB1 αλληλεπιδρά άμεσα με την κινάση SRPK1 και αναστέλλει τη δράση της (Tsianouetal 2009). Η αλληλεπίδραση συμβαίνει μέσω της καρβοξυτελικής περιοχής του SAFB1 και κυρίως μέσω της RG περιοχής, ενώ για την SRPK1 δεν είναι γνωστό το τμήμα το οποίο προσδένεται στον SAFB1. Κρίθηκε λοιπόν αναγκαίο, και αποτέλεσε τον πρώτο στόχο της παρούσας εργασίας, η αναζήτηση μικρότερων τμημάτων της SRPK1 τα οποία αλληλεπιδρούν με τον SAFB1. Για αυτό το σκοπό έγιναν προσπάθειες κλωνοποίησης και στη συνέχεια υπερέκφρασης διαφορετικών τμημάτων της SRPK1 όπως περιγράφηκαν αναλυτικά στην ενότητα των αποτελεσμάτων. Η διαδικασία δεν ήταν εύκολη καθώς η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη λόγω μη σωστής αναδίπλωσης έχανε τη διαλυτότητα της. Μετά από πολλές δοκιμαστικές προσπάθειες προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες επαγωγής και λύσης των βακτηριακών κυττάρων για κάθε ένα από τα τμήματα της SRPK1. Όπως φαίνεται στον πίνακα 1 η προσθήκη σορβιτόλης και διαλύματος φωσφορικών δεν βοήθησε στην επαγωγή έκφρασης των πρωτεϊνών ενώ αντίθετα η προσθήκη σορβιτόλης στο διάλυμα λύσης βοήθησε την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη να διατηρήσει τη διαλυτότητά της. Επιπλέον, σταδιοποιήθηκαν οι συνθήκες της invitro χρωματογραφίας αχιστείας μεταξύ των βακτηριακά εκφρασμένων SAFB1 και τμημάτων της SRPK1. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται συνοπτικά οι συνθήκες που δοκιμάστηκαν και βοήθησαν στην επαγωγή έκφρασης και τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης.

	ΕΠΑΓΩΓΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ		ΛΥΣΗ
	Προσθήκη 1% σορβιτόλης	Προσθήκη φωσφορικού διαλύματος	Προσθήκη γλυκερόλης
His-SRPK1	-	-	✓
His- ΔSpacer-SRPK1	-	-	✓
His-Nt-SRPK1	X	X	✓
His-Ct-SRPK1	X	X	-
His-SpacerCt-SRPK1	-	-	✓

**Πίνακας 1:** Συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την επαγωγή και λύση των πρωτεϊνών

✓	Η συνθήκη βοήθησε στην καλύτερη επαγωγή ή διαλυτότητα
X	Η συνθήκη βοήθησε στην καλύτερη επαγωγή ή διαλυτότητα
-	Η συνθήκη δεν δοκιμάστηκε

Για πρώτη φορά μέσω *in vitro* χρωματογραφίας αγκιστείας βρέθηκε ότι το καρβοξυτελικό τμήμα της SRPK1 μαζί με την ενδιάμεση (spacer) περιοχή (SpacerCt-SRPK1) συνδέεται άμεσα με το καρβοξυτελικό τμήμα του SAFB1 (SAFB1CΔRE). Αντίθετα το αμινοτελικό άκρο της SRPK1 (Nt-SRPK1) αποδείχθηκε μη ικανό να αλληλεπιδράσει με τον SAFB1. Επιπλέον, βρέθηκε ότι και το τμήμα της SRPK1 από το οποίο λείπει η ενδιάμεση περιοχή (ΔSpacer-SRPK1) είναι ικανό να αλληλεπιδράσει άμεσα με καρβοξυτελικό τμήμα του SAFB1. Οι αλληλεπίδραση του κάθε τμήματος SRPK1 με τον SAFB1CΔRE συνοψίζονται στο σχήμα 1.



**Σχήμα 1:** Σύνοψη των τμημάτων SRPK1 που αλληλεπιδρούν με το καρβοξυτελικό τμήμα του SAFB1

Δεδομένου, λοιπόν, ότι η ενδιάμεση αλληλουχία της SRPK1 δεν είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση με τον SAFB1, εμμέσως προκύπτει ότι το μόνο ικανό και απαραίτητο τμήμα της

SRPK1 για την αλληλεπίδραση SAFB1-SRPK1 είναι το καρβοξυτελικό τμήμα της και συγκεκριμένα τα τελευταία 182 αμινοξέα. Θα ήταν ενδιαφέρον η περαιτέρω αναζήτηση πρωτεϊνών οι οποίες αλληλεπιδρούν είτε με το καρβοξυτελικό άκρο του SAFB1 είτε της SRPK1 καθώς και η διερεύνηση του ρόλου τους στην αλληλεπίδραση του SAFB1 με την SRPK1

Λαμβάνοντας υπόψη τα χαρακτηριστικά της δομής των δύο μορίων (SRPK1- SAFB1) γίνεται κατανοητός ο ρόλος που ασκεί ο SAFB1 στηνSRPK1. Υπενθυμίζεται ότι, η SRPK1 διατηρεί συνεχώς ενεργή διαμόρφωση και τόσο το αμινοτελικό όσο και το καρβοξυτελικό άκρο συμμετέχουν στη δημιουργία του καταλυτικού κέντρου δράσης της κινάσης. Τα δύο άκρα υιοθετούν μία δίλοβη διαμόρφωση και είναι απαραίτητα για το σχηματισμό της αύλακας αγκυροβόλησης στην οποία εισέρχεται το υπόστρωμα προκειμένου να φωσφορυλιωθεί από την κινάση. Η ικανότητα αλληλεπίδρασης μόνο του καρβοξυτελικού άκρου της κινάσης με τον SAFB1 υποδηλώνει ότι η κινάση δεν αντιμετωπίζει τον SAFB1 ως υπόστρωμά της. Η θεωρία αυτή ενισχύεται και από το γεγονός ότι ο SAFB1 αλληλεπιδρά με την κινάση όχι μέσω της RE περιοχής, η οποία θα μπορούσε να δράσει φωσφομιμητικά και να συμπεριφερθεί ως υπόστρωμα της SRPK1, αλλά μέσω της RG περιοχής η οποία είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση του SAFB1 με άλλες πρωτεΐνες. Προτείνεται λοιπόν ότι ο SAFB1 συμμετέχει στη ρύθμιση της ενεργότητας της SRPK1 μέσω της δημιουργίας παροδικών συμπλόκων μαζί της. Είναι πιθανό η αναστολή της δράσης της SRPK1 που προκαλεί ο SAFB1 να συμβαίνει μέσω της πρόσδεσής του στο καρβοξυτελικό άκρο της κινάσης. Η πρόσδεση αυτή είναι πιθανό να αλλάζει τη διαμόρφωση της κινάσης κοντά στο ενεργό της κέντρο (το οποίο εντοπίζεται και στο καρβοξυτελικό τμήμα με δραστηριότητα κινάσης) καθιστώντας αδύνατη τη φωσφορυλίωση του υποστρώματος. Επιπλέον, η πρόσδεση του SAFB1 θα μπορούσε να συμβαίνει κοντά στην αύλακα αγκυροβόλησης, μέσω της οποίας τα υποστρώματα της κινάσης προσέρχονται στο ενεργό κέντρο εμποδίζοντας έτσι την πρόσδεση των υποστρωμάτων στην κινάση.

Αναζητώντας τον βιολογικό ρόλο της αλληλεπίδρασης της SRPK1 με τον SAFB1 τέθηκε ως δεύτερος στόχος της παρούσας εργασίας η διερεύνηση συνθηκών που μπορούσαν να επάγουν την μετατόπιση της SRPK1 στον πυρήνα και τη συγκρότηση περισσότερων συμπλόκων SAFB1-SRPK1. Υπενθυμίζεται ότι η SRPK1 έχει κυρίως κυτταροπλασματικό εντοπισμό και ένα μικρό μόνο ποσοστό της εντοπίζεται στον πυρήνα. Υπεύθυνη για τον κυτταροπλασματικό της εντοπισμό είναι η ενδιάμεση συνδετική αλληλουχία η οποία αλληλεπιδρά με κυτταροπλασματικές συνοδές πρωτεΐνες και συγκρατεί την SRPK1 στο κυτταρόπλασμα. Βιβλιογραφικά έχει αναφερθεί ότι σε συνθήκες οσμωτικού στρες η κινάση χάνει τη σύνδεσή της με αυτές τις συνοδές πρωτεΐνες και κλάσμα της μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου ενεργοποιεί τη διαδικασία του ματίσματος (Zhong et al 2009).

Δεδομένου του ρόλου που διαδραματίζει η SRPK1 στο μεταβολισμό, καθώς *in vitro* φωσφορυλιώνει την PGC-1α η οποία εμπλέκεται στην ομοιοστασία της γλυκόζης, επιλέξαμε τη μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού της SRPK1 έχοντας υποβάλλει τα κύτταρα σε μεταβολικό στρες στέρησης γλυκόζης. Τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού υποστηρίζουν τον ενεργό ρόλο της SRPK1 στην ομοιοστασία της γλυκόζης, καθώς σε στέρηση γλυκόζης παρατηρήθηκε μετατόπιση κλάσματος της SRPK1 στον πυρήνα και σήμα φθορισμού που προσομοιάζει με την οργάνωση της χρωματίνης όπως αυτή παρατηρείται μετά την επώαση των κυττάρων με DAPI. Ακόμη, ως δεύτερη συνθήκη στρες μελετήθηκε η υποξία, κατάσταση έλλειψης οξυγόνου η οποία παρατηρείται συχνά στο μικροπεριβάλλον των όγκων και άλλων παθολογικών καταστάσεων. Στη συνθήκη της υποξίας η SRPK1 δεν φαίνεται να επηρεάσει κάποια πυρηνική λειτουργία καθώς ο υποκυτταρικός εντοπισμός της και τα πρωτεϊνικά επίπεδά της παραμένουν αμετάβλητα. Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα προκύπτει οι μοριακοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν την κυτταρική απόκριση στις δύο αυτές συνθήκες είναι διαφορετικοί και πιθανώς αντικρουόμενοι. Όταν μελετήσαμε τον υποκυτταρικό εντοπισμό και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της SRPK1 σε συνθήκες μεταβολικού στρες και υποξίας ταυτόχρονα, (συνθήκες που μπορούν να προσομοιάσουν το μικροπεριβάλλον της ισχαιμίας στον ανθρώπινο οργανισμό) προέκυψε ότι η συνθήκη της υποξίας είναι πιθανό να μετριάξει το φαινότυπο που προκαλεί η στέρηση γλυκόζης, καθώς η υποκυτταρική μετατόπιση της SRPK1 φαίνεται να συμβαίνει σε μικρότερο βαθμό. Θα ήταν ενδιαφέρον να γίνει διερεύνηση περισσότερων ειδών στρες για τη διασαφήνιση του ρόλου της αλληλεπίδρασης της SRPK1 με τον SAFB, καθώς και η παρατήρηση των τυχόν μετακινήσεων και αλλαγών των επιπέδων και των μορίων SAFB. Τέλος η πιο ακριβής παρατήρηση με μεθοδολογία βιοχημικής κλασμάτωσης ή και συνεστιακής μικροσκοπίας θα ήταν πληροφοριακή για πιθανές συνθήκες δημιουργίας των συμπλόκων SAFB- SRPK1 μέσα στο κύτταρο.

Συμπερασματικά, τόσο η SRPK1 όσο και ο SAFB είναι πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε πληθώρα κυτταρικών λειτουργιών. Παρουσιάζουν διαφορετική κατανομή στον υποκυτταρικό χώρο, ωστόσο, είναι σε θέση να αλληλεπιδρούν και πιθανόν να επηρεάζουν την κυτταρική απόκριση σε διάφορες στρεσογόνες συνθήκες. Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψη τον ρόλο που μπορεί να διαδραματίζουν σε διάφορους τύπους καρκίνου, η περαιτέρω διερεύνηση της μοριακής βάσης της αυτής αλληλεπίδρασης μπορεί να διαλευκάνει τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στον καρκίνο και να αποτελέσει έναυσμα για αντικαρκινική θεραπεία.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Altmeyer M, Toledo L, Gudjonsson T, Grofte M, Rask MB, Lukas C, Akimov V, Blagoev B, Bartek J, Lukas J (2013) The chromatin scaffold protein SAFB1 renders chromatin permissive for DNA damage signaling. *Mol Cell*. 52:206-20.
- Arao Y, Kuriyama R, Kayama F, Kato S (2000) A nuclear matrix-associated factor, SAF-B, interacts with specific isoforms of AUF1/hnRNP D. *Arch Biochem Biophys* 380:228.
- Aubol BE, Plocinik RM, Keshwani MM, McGlone ML, Hagopian JC, Ghosh G, Fu XD, Adams JA (2014) N-terminus of the protein kinase CLK1 induces SR protein hyperphosphorylation. *Biochem J*. 462:143-52.
- Aubol BE, Wu G, Keshwani MM, Movassat M, Fattet L, Hertel KJ, Fu XD, Adams JA (2016) Release of SR Proteins from CLK1 by SRPK1: A Symbiotic Kinase System for Phosphorylation Control of Pre-mRNA Splicing. *Mol Cell*. 63:218-28.
- Balhorn R (2007) The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol*. 8:227.
- Bode J, Stengert-Iber M, Kay V, Schlake T, Dietz-Pfeilstetter A (1996) Scaffold/matrix-attached regions: Topological switched with multiple regulatory functions. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 6:115–138.
- Chan CW, Lee Y-B, Uney J, Flynn A, Tobias JH, Norman M (2007) A novel member of the SAF (scaffold attachment factor)-box protein family inhibits gene expression and induces apoptosis. *Biochem J* 407(3):355–362.
- Chiodi I, Biggiogera M, Denegri M, Corioni M, Weighardt F, Cobianchi F, Riva S, Biamonti G (2000) Structure and dynamics of hnRNP-labelled nuclear bodies induced by stress treatments. *J Cell Sci* 113(22):4043–4053.
- Debril MB, Dubuquoy L, Feige JN, Wahli W, Desvergne B, Auwerx J, Gelman L (2005) Scaffold attachment factor B1 directly interacts with nuclear receptors in living cells and represses transcriptional activity. *J Mol Endocrinol*. 35(3):503-17.
- Denegri M, Chiodi I, Corioni M, Cobianchi F, Riva S, Biamonti G (2001) Stress-induced nuclear bodies are sites of accumulation of pre-mRNA processing factors. *Mol Biol Cell*. 12:3502-14.
- Ding JH, Zhong XY, Hagopian JC, Cruz MM, Ghosh G, Feramisco J, Adams JA, Fu XD (2006) Regulated cellular partitioning of SR protein-specific kinases in mammalian cells. *Mol Biol Cell*. 17:876-85.

- Fukuda M, Asano S, Nakamura T, Adachi M, Yoshida M, Yanagida M, Nishida E (1997) CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature*. 390:308-11.
- Ghosh G, Adams JA (2011) Phosphorylation mechanism and structure of serine-arginine protein kinases. *FEBS J*. 278:587-97.
- Giannakouros T, Nikolakaki E, Mylonis I, Georgatsou E (2011) Serine-arginine protein kinases: a small protein kinase family with a large cellular presence. *FEBS J*. 278:570-86.
- Gout S, Brambilla E, Boudria A, Drissi R, Lantuejoul S, Gazzeri S, Eymin B (2012) Abnormal expression of the pre-mRNA splicing regulators SRSF1, SRSF2, SRPK1 and SRPK2 in non small cell lung carcinoma. *PLoS One*. 7:e46539.
- Gui JF, Lane WS, Fu XD (1994a) A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle. *Nature* 369:678-82.
- Gui JF, Tronchere H, Chandler SD, Fu XD (1994b) Purification and characterization of a kinase specific for the serine- and arginine-rich pre-mRNA splicing factors. *Proc Natl Acad Sci* 91:10824-8.
- Hammerich-Hille S, Bardout V, Hilsenbeck S, Osborne C, Oesterreich S. (2009) Low SAFB levels are associated with worse outcome in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 121:503-9.
- Hartmann AM, Nayler O, Schwaiger FW, Obermeier A, Stamm S (1999) The interaction and colocalization of Sam68 with the splicing-associated factor YT521-B in nuclear dots is regulated by the Src family kinase p59fyn. *Mol Biol Cell* 10(11):3909–3926.
- Hartmann AM, Rujescu D, Giannakouros T, Nikolakaki E, Goedert M, Mandelkow EM, Gao QS, Andreadis A, and Stamm S (2001) Regulation of alternative splicing of human tau exon 10 by phosphorylation of splicing factors. *Mol Cell Neurosci*. 18:80-90.
- Hayes GM, Carrigan PE, Miller LJ (2007) Serine- arginine protein kinase 1 overexpression is associated with tumorigenic imbalance in mitogen-activated protein kinase pathways in breast, colonic, and pancreatic carcinomas. *Cancer Res*. 67:2072-80.
- Hong Y, Jang SW, Ye K (2011) The N-terminal Fragment from Caspase-cleaved Serine/Arginine Protein-specific Kinase2 (SRPK2) Translocates into the Nucleus and Promotes Apoptosis. *J Biol Chem*. 286: 777–786.

- Huang Y, Yario TA, Steitz JA (2004) A molecular link between SR protein dephosphorylation and mRNA export. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101:9666-70.
- Ivanova M, Dobrzycka KM, Jiang S, Michaelis K, Meyer R, Kang K, Adkins B, Barski OA, Zubairy S, Divisova J, Lee AV, Oesterreich S (2005) Scaffold attachment factor B1 functions in development, growth, and reproduction. *Mol Cell Biol* 25(8):2995–3006.
- Jang SW, Yang SJ, Ehlen A, Dong S, Khoury H, Chen J, Persson JL, Ye K (2008) Serine/arginine protein-specific kinase 2 promotes leukemia cell proliferation by phosphorylating acinus and regulating cyclin A1. *Cancer Res*. 68:4559-70.
- Jang SW, Liu X, Fu H, Rees H, Yepes M, Levey A, Ye K (2009) Interaction of Akt-phosphorylated SRPK2 with 14-3-3 mediates cell cycle and cell death in neurons. *J Biol Chem*. 284:24512-25.
- Jiang K, Patel NA, Watson JE, Apostolatos H, Kleiman E, Hanson O, Hagiwara M, Cooper DR (2009) Akt2 regulation of Cdc2-like kinases (Clk/Sty), serine/arginine-rich (SR) protein phosphorylation, and insulin-induced alternative splicing of PKCbetaII messenger ribonucleic acid. *Endocrinology*. 150:2087-97.
- Kamachi M, Le TM, Kim SJ, Geiger ME, Anderson P, Utz PJ (2002) Human autoimmune sera as molecular probes for the identification of an autoantigen kinase signaling pathway. *J Exp Med*. 196:1213-25.
- Kipp M, Gohring F, Ostendorp T, van Drunen CM, van Driel R, Przybylski M, Fackelmayer FO (2000) SAF-box, a conserved protein domain that specifically recognizes scaffold attachment region DNA. *Mol Cell Biol* 20(20):7480–7489.
- Lai MC, Lin RI, Huang SY, Tsai CW, Tarn WY (2000) A human importin-beta family protein, transportin-SR2, interacts with the phosphorylated RS domain of SR proteins. *J Biol Chem*. 275:7950-7.
- Li J, Hawkins IC, Harvey CD, Jennings JL, Link AJ, Patton JG (2003) Regulation of alternative splicing by SRrp86 and its interacting proteins. *Mol Cell Biol* 23(21):7437–7447.
- Lin J, Handschin C, Spiegelman BM (2005) Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab*. 6:361-70.
- Manley JL, Tacke R (1996) SR proteins and splicing control. *Genes Dev*. 10:1569-79.



- Mathew R, Hartmuth K, Mohlmann S, Urlaub H, Ficner R, Luhrmann R (2008) Phosphorylation of human PRP28 by SRPK2 is required for integration of the U4U6-U5 tri-snRNP into the spliceosome. *Nat Struct Mol Biol.* 15:435-43.
- Mylonis I, Drosou V, Brancorsini S, Nikolakaki E, Sassone-Corsi P, Giannakouros T, (2004) Temporal association of protamine 1 with the inner nuclear membrane protein lamin B receptor during spermiogenesis. *J Biol Chem.* 279:11626-31.
- Mylonis I, Giannakouros T (2003) Protein kinase CK2 phosphorylates and activates the SR proteinspecific kinase 1. *Biochem Biophys Res Commun.* 301:650-6.
- Nakagawa O, Arnold M, Nakagawa M, Hamada H, Shelton JM, Kusano H, Harris TM, Childs G, Campbell KP, Richardson JA, Nishino I, Olson EN (2005) Centronuclear myopathy in mice lacking a novel muscle-specific protein kinase transcriptionally regulated by MEF2. *Genes Dev.* 19:2066-77.
- Nayler O, Stratling W, Bourquin JP, Stagljar I, Lindemann L, Jasper H, Hartmann AM, Fackelmayer FO, Ullrich A, Stamm S (1998) SAF-B protein couples transcription and pre-mRNA splicing to SAR/MAR elements. *Nucl Acids Res* 26:3542–3549.
- Ngo JC, Chakrabarti S, Ding JH, Velazquez-Dones A, Nolen B, Aubol BE, Adams JA, Fu XD, Ghosh G (2005) Interplay between SRPK and Clk/Sty kinases in phosphorylation of the splicing factor ASF/SF2 is regulated by a docking motif in ASF/SF2. *Mol Cell.* 20:77-89.
- Ngo JC, Gullingsrud J, Giang K, Yeh MJ, Fu XD, Adams JA, McCammon JA, Ghosh G, (2007) SR protein kinase 1 is resilient to inactivation. *Structure.* 15:123-33.
- Nikolakaki E, Drosou , Sanidas I, Peidis P, Papamarcaki T, Iakoucheva LM, Giannakouros T (2008) RNA association or phosphorylation of the RS domain prevents aggregation of RS domain-containing proteins. *Biochim Biophys Acta.* 80:214-25.
- Nikolakaki E, Kohen R, Hartmann AM, Stamm S, Georgatsou E, Giannakouros T (2001) Cloning and characterization of an alternatively spliced form of SR protein kinase 1 that interacts specifically with scaffold attachment factor-B. *J Biol Chem.* 276:40175-82.
- Nikolakaki E, Meier J, Simos G, Georgatos SD, Giannakouros T (1997) Mitotic phosphorylation of the lamin B receptor by a serine/arginine kinase and p34(cdc2). *J Biol Chem.* 272:6208-13.

- **Nikolakaki E, Simos G, Georgatos SD, Giannakouros T (1996) A nuclear envelope-associated kinase phosphorylates arginine-serine motifs and modulates interactions between the lamin B receptor and other nuclear proteins. *J Biol Chem.* 271:8365-72.**
- **Norman M, Rivers C, Lee YB, Idris J, Uney J (2016) The increasing diversity of functions attributed to the SAFB family of RNA-/DNA-binding proteins. *Biochem J.* 473:4271-4288.**
- **Odunsi K, Mhaweche-Fauceglia P, Andrews C, Beck A, Amuwo O, Lele S, Black JD, Huang RY (2012) Elevated expression of the serine-arginine protein kinase 1 gene in ovarian cancer and its role in Cisplatin cytotoxicity in vitro. *PLoS One.* 7:e51030.**
- **Oesterreich S, Allredl DC, Mohsin SK, Zhang Q, Wong H, Lee AV, Osborne CK, O'Connell P (2001) High rates of loss of heterozygosity on chromosome 19p13 in human breast cancer. *Br J Cancer* 84(4):493.**
- **Oesterreich S, Lee AV, Davidson NE (2010) Is it time to ReSET the standard for estrogen receptor testing in breast cancer? *J Clin Oncol.* 28:4101-3.**
- **Oliva R, Dixon GH (1991) Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 40:25-94.**
- **Papoutsopoulou S, Nikolakaki E, Chalepakis G, Krufft V, Chevallier P, Giannakouros T (1999) SR protein-specific kinase 1 is highly expressed in testis and phosphorylates protamine 1. *Nucleic Acids Res.* 27:2972-80.**
- **Renz A, Fackelmayer FO (1996) 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(5):843–849.**
- **Roscigno RF, Garcia-Blanco MA (1995) SR proteins escort the U4/U6.U5 tri-snRNP to the spliceosome. *RNA.* 1:692-706.**
- **Sergeant KA, Bourgeois CF, Dalgliesh C, Venables JP, Stevenin J, Elliott DJ (2007) Alternative RNA splicing complexes containing the scaffold attachment factor SAFB2. *J Cell Sci* 120(2):309–319.**
- **Stoss O, Novoyatleva T, Gencheva M, Olbrich M, Benderska N, Stamm S (2004) p59fyn-mediated phosphorylation regulates the activity of the tissuespecific splicing factor rSLM-1. *Mol Cell Neurosci* 27(1):8–21.**
- **Tai HH, Geisterfer M, Bell JC, Moniwa M, Davie JR, Boucher L, McBurney MW (2003). CHD1 associates with NCoR and histone deacetylase as well as with RNA splicing proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 308(1):170.**

- Townson SM, Lee AV, Air M, Deng W, Kang K, Jiang S, Kioka N, Michaelis K, Oesterreich S (2003) SAFB2, a new scaffold attachment factor homolog and estrogen receptor corepressor. *J Biol Chem* 278:20059–20068.
- Townson SM, Lee AV, Oesterreich S (2004) Structure-function analysis of the estrogen receptor alpha corepressor scaffold attachment factor B1: Identification of a potent transcriptional repression domain. *J Biol Chem* 279:26074–26081.
- Townson SM, 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.
- Tsianou D, Nikolakaki E, Tzitzira A, Bonanou S, Giannakouros T, Georgatsou E (2009) The enzymatic activity of SR protein kinases 1 and 1a is negatively affected by interaction with scaffold attachment factors B1 and 2. *FEBS J.* 276:5212-27.
- Valiev M, Kawai R, Adams JA, Weare JH (2003) The Role of the Putative Catalytic Base in the Phosphoryl Transfer Reaction in a Protein Kinase: First-Principles Calculations. *J Am Chem Soc.* 125:9926-7.
- Wang HY, Lin W, Dyck JA, Yeakley JM, Songyang Z, Cantley LC, Fu XD (1998) 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.* 140:737-50.
- Weighardt F, Cobianchi F, Cartegni L, Chiodi I, Villa A, Riva S, Biamonti G (1999) A novel hnRNP protein (HAP/SAF-B) enters a subset of hnRNP complexes and relocates in nuclear granules in response to heat shock. *J Cell Sci* 112(10):1465–1476.
- Xiao SH, Manley JL (1997) Phosphorylation of the ASF/SF2 RS domain affects both protein-protein and protein-RNA interactions and is necessary for splicing. *Genes Dev.* 11:334-44
- Ye Q, Worman HJ (1994) Primary structure analysis and lamin B and DNA binding of human LBR, an integral protein of the nuclear envelope inner membrane. *J Biol Chem.* 269:11306-11.
- Yun CY, Velazquez-Dones AL, Lyman SK, Fu XD (2003) Phosphorylation-dependent and -independent nuclear import of RS domain-containing splicing factors and regulators. *J Biol Chem.* 278:18050-5.

- **Zhong XY, Ding JH, Adams JA, Ghosh G, Fu XD (2009) Regulation of SR protein phosphorylation and alternative splicing by modulating kinetic interactions of SRPK1 with molecular chaperones. *Genes Dev.* 23:482-95.**
- **Zhou Z, Fu XD (2013) Regulation of splicing by SR proteins and SR protein-specific kinases. *Chromosoma.* 122:191-207.**
- **Zhou Z, Qiu J, Liu W, Zhou Y, Plocinik RM, Li H, Hu Q, Ghosh G, Adams JA, Rosenfeld MG, Fu XD (2012) The Akt-SRPK-SR axis constitutes a major pathway in transducing EGF signaling to regulate alternative splicing in the nucleus. *Mol Cell.* 47:422-33.**