

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

Ανίχνευση και μελέτη των αλληλεπιδράσεων in vivo μιας
ισομορφής της ανθρώπινης κινάσης SRPK 1 με την τεχνική
των δύο υβριδίων στον *Saccharomyces cerevisiae*.

ΚΟΕΝ ΡΑΣΕΛ
ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2008



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

Αριθ. Εισ.: 7687/1
Ημερ. Εισ.: 07-11-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
572.6
ΚΟΕ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000083770

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ : ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΣΟΦΙΑ ΜΠΟΝΑΝΟΥ-ΤΖΕΛΑΚΗ

**Ανίχνευση και μελέτη των αλληλεπιδράσεων *in vivo* μιας
ισομορφής της ανθρώπινης κινάσης SRPK1 με την τεχνική
των δύο υβριδίων στον *Saccharomyces cerevisiae*.**

ΚΟΕΝ ΡΑΣΕΛ
ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Στους γονείς μου
για την αγάπη τους

Στον Ηλία και
στα αξιαγάπητα παιδιά μου
Σόλων, Λιόρ, Ναομί για την
κατανόησή τους

Στους δασκάλους μου
που αποτέλεσαν
έμπνευση ζωής

Τοιμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:

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

Μέλη:

- Μπονάνου-Τζεδάκη Σοφία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής Π.Θ., Διευθύντρια του Εργαστηρίου Βιοχημείας.
- Γιαννακούρος Θωμάς, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Α.Π.Θ.

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- Κυριακίδης Δημήτριος, Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Α.Π.Θ., Πρόεδρος του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (Ε.Ι.Ε.).
- Σταθάκης Νικόλαος, Καθηγητής Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής Π.Θ.
- Μολυβδάς Πασχάλης-Αδάμ, Καθηγητής Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής Π.Θ.
- Μπονάνου-Τζεδάκη Σοφία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής Π.Θ., Διευθύντρια του Εργαστηρίου Βιοχημείας.
- Γιαννακούρος Θωμάς, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Α.Π.Θ.
- Γεωργιάτσου Έλενα, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας-Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής Π.Θ.
- Σίμος Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής Π.Θ.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με τίτλο : «Ανίχνευση μοριακών αλληλεπιδράσεων του N-τελικού άκρου της SRPK1a (SRPK1aNt) με την μέθοδο των δύο υβριδίων», με επιστημονική υπεύθυνη την κ. Γεωργιάτσου Έλενα. Η εκπόνηση της διατριβής υποστηρίχτηκε οικονομικά από το Πρόγραμμα Σπουδών Επιλογής «Ιατρική Βιοχημεία» (Π.Σ.Ε.)

Κατ' αρχήν θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην υπεύθυνη καθηγήτριά μου, την κ. Γεωργιάτσου Έλενα, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και μου ανάθεσε το θέμα της παρούσης εργασίας και για την υποστήριξη, την υπομονή και την κατανόηση που μου παρείχε στις όποιες δύσκολες στιγμές της. Επίσης θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την άμεση καθοδήγηση και σωστή επίβλεψη των πειραμάτων, για την ουσιαστική συμβολή της σε όλη την πορεία της διατριβής αλλά και για την ηθική συμπαράσταση που μου πρόσφερε κατά την διάρκεια της εκπόνησής της.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Μπονάνου-Τζεδάκη Σοφία, Διευθύντρια του Εργαστηρίου Βιοχημείας και μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής για τις πολύτιμες συμβουλές της, την άψογη συνεργασία και τις σωστές παρατηρήσεις που μου πρόσφερε πάντα με ευγενικό τρόπο κατά την διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο.

Ευχαριστώ επίσης θερμά τον κ. Γιαννακούρο Θωμά, μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής, για τις χρήσιμες παρατηρήσεις του και τις ουσιαστικές υποδείξεις του στην πορεία των πειραμάτων. Επίσης θα ήθελα να του εκφράσω τις ευχαριστίες μου για την σημαντική βοήθεια και γνώσεις που μου προσέφερε και για την άριστη συνεργασία και αλληλοϋποστήριξη που υπήρξε καθ' όλη την διάρκεια της διατριβής μεταξύ των δύο εργαστηρίων Βιοχημείας.

Πολλά ευχαριστώ οφείλω στον καθηγητή κ. Κυριακίδη Δημήτριο, μέλος της εξεταστικής επιτροπής, που αρχικά σαν φοιτήτρια μου εμφύσησε την αγάπη για την Βιοχημεία και με καθοδήγησε στις μεταπτυχιακές σπουδές μου. Τώρα επίσης τον

ευχαριστώ για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε και το ενδιαφέρον που έδειξε στην διόρθωση της εργασίας.

Οφείλω επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Γεώργιο Σίμο μέλος της εξεταστικής επιτροπής για το ενδιαφέρον που έδειξε για τη διατριβή μου και τις ουσιαστικές επισημάνσεις του αλλά και για την αμέριστη βοήθεια που μου παρείχε κατά την διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.

Ευχαριστίες επίσης οφείλω στους καθηγητές κ. Σταθάκη Νικόλαο και κ. Μολυβδά Πασχάλη-Αδάμ μέλη της εξεταστικής επιτροπής για τις εύστοχες υποδείξεις τους και για τον χρόνο που αφιέρωσαν για την ανάγνωση της εργασίας μου.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ την κ. Ελένη Νικολακάκη, Επίκουρο καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας του Α.Π.Θ., για την πολύτιμη συμβολή της στην πραγμάτωση της διατριβής και για την άριστη συνεργασία που υπήρχε αναμεταξύ μας καθ' όλη την διάρκειά της. Επίσης την ευχαριστώ για την κλωνοποίηση του cDNA που κωδικοποιεί για το τμήμα SRPK1aNt σε φορέα Bluescript SK⁺ και για την επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου SAFB/SRPK1aNt που έγινε στο εργαστήριό της. Συγχρόνως και για την παροχή πολύτιμων γνώσεων που μου πρόσφερε σε διάφορες τεχνικές που εφαρμόστηκαν.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Βίκη Μηνά και τον κ. Μάνο Βενιέρη για την βοήθεια που μου προσέφεραν καθ' όλη την διάρκεια παρουσίας μου στο εργαστήριο και όλους τους υπόλοιπους συναδέλφους για τις ευχάριστες στιγμές που μοιραστήκαμε μαζί.

Τέλος ευχαριστώ τους γονείς μου για την συμπαράσταση που μου έχουν προσφέρει μέχρι τώρα, τον αδελφό μου για την διαμόρφωση των εικόνων της παρούσης εργασίας, τον σύζυγό μου Ηλία που χωρίς την κατανόησή του δεν θα μπορούσα να φέρω εις πέρας την παρούσα εργασία και τα παιδιά μου Σόλων, Λιόρ, Ναομί που μου προσέφεραν πάντα το χαμόγελό τους. Επίσης θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Γιώργο και στην Στέλλα που με βοήθησαν με τον τρόπο τους να αποπερατώσω την διατριβή μου.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AR	Androgen receptor, Υποδοχέας ανδρογόνων
AT	3-αμινοτριαζόλη
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
ASF/SF2	Splicing factor 2, Παράγοντας ματίσματος 2
BSA	Αλβουμίνη ορού βοός
cDNA	Συμπληρωματικό DNA
CIP	Αλκαλική φωσφατάση εντέρου βοός
CK	Κινάση καζεΐνης
cpm	Κρούσεις ανά λεπτό
CTD	Καρβοξυτελική περιοχή της RNA πολυμεράσης II
DNA	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
dNTP	Τριφωσφορικός δεοξυνουκλεοζίτης
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
DTT	Διθειοθρεϊτόλη
EDTA	Αιθυλοδιαμινοτετραοξικό οξύ
ER	Estrogen receptor, Υποδοχέας των οιστρογόνων
ESEs & ISEs	Exonic or intronic splicing enhancers, Ενισχυτές του ματίσματος
ESSs & ISSs	Exonic or intronic splicing suppressors, Σιωπηστές του ματίσματος
GFP	Πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη
GST	Τρανσφεράση της γλουταθειόνης
GTP	Τριφωσφορική γουανοσίνη
HEPES	N-2- υδροξυαιθυλ-πιπεραζιν-N'-2-αιθανοσουλφονικό οξύ
hnRNP	Ετερογενής ριβονουκλεοπρωτεΐνη
IPTG	Ισοπροπυλ-1-θειο-β-D-γαλακτοπυρανοσίδιο

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

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
A.1.ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ.....	1
Ρόλος και ρύθμιση της φωσφορυλίωσης.....	3
A.2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ.....	4
Ταξινόμηση των ευκαρυωτικών κινασών πρωτεϊνών.....	5
A.3. ΚΙΝΑΣΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕΡΙΝΗΣ/ΑΡΓΙΝΙΝΗΣ	9
Χαρακτηριστικά της δομής τους κινασών πρωτεϊνών σερίνης/αργινίνης	10
Εντοπισμός των κινασών πρωτεϊνών σερίνης/αργινίνης.....	14
Γνωστά μέλη της οικογένειας των κινασών SRPK.....	17
SRPK1.....	17
SRPK1a	19
SRPK2.....	23
SRPK3.....	24
Η καταλυτική δράση των SRPK	25
Αμινοξική αλληλουχία αναγνώρισης κινασών πρωτεϊνών σερίνης/αργινίνης...26	
Μηχανισμός φωσφορυλίωσης των υποστρωμάτων	28
Υποστρώματα των SRPK και αντίστοιχοι ρόλοι τους.....	30
Πρωτεΐνες SR	30
Εντοπισμός των SR-πρωτεϊνών.....	32
Ρύθμιση της έκφρασης των παραγόντων ματίσματος- Ρόλος της φωσφορυλίωσής τους.....	35
Ο Υποδοχέας της Λαμίνης Β (LBR).....	49
Πρωταμίνη P1.....	51
Πρωτεΐνη P2P-R.....	53
Πυρηνική πρωτεΐνη του ιού της ηπατίτιδας Β.....	54
Υποστρώματα των κινασών της οικογένειας SRPK.	55
Η έκφραση της SRPK1 σε καρκινικά σπερματοκύτταρα όρχεων.....	56
Άλλοι ρόλοι της οικογένειας των κινασών SRPK.....	57
Πρωτεΐνη του ιού Herpes virus simplex (HSV-1) ICP27.....	57

Τοποϊσομεράση Πα.....58

Ρύθμιση των πολυαμινών και ομοιοστασία των ιόντων60

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....61

B. ΜΕΘΟΔΟΙ62

B.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....62

B.2. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης.....64

B.3. Απομόνωση και καθαρισμός DNA από πηκτή αγαρόζης.....66

B.4. Κλωνοποίηση DNA σε πλασμιδιακούς φορείς.....67

B.4.1. Προετοιμασία DNA πλασμιδιακού φορέα για κλωνοποίηση.....67

B.4.1.1. Πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού.....68

B.4.1.2. Αποφωσφορυλίωση γραμμικού πλασμιδιακού DNA με αλκαλική
φωσφατάση (CIP).....69

B.4.1.3. Επώαση με πρωτεϊνάση K.....69

B.4.1.4. Καθαρισμός νουκλεϊκών οξέων με εκχυλίσεις με οργανικούς δ/τες..70

B.4.1.5. Κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων με αιθανόλη.....70

B.4.1.6. Αντίδραση σύνδεσης με λιγάση.....71

B.4.2. Προετοιμασία του DNA-ενθέματος για κλωνοποίηση.....71

B.4.2.1. Χειρισμός του DNA με Kleow πολυμεράση.....71

B.5. Παρασκευή και απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....71

B.5.1. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας με αλκαλική λύση....71

B.5.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο της λύσης με βρασμό.....73

B.5.3. Απομόνωση και καθαρισμός πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας.....74

B.5.4. Παρασκευή γλυκερινικών αποθεμάτων των στελεχών75

B.6. Μετασηματισμός κυττάρων S.c. με πλασμιδιακό DNA.....75

B.6.1. Μετασηματισμός κυττάρων σακχαρομύκητα υψηλής απόδοσης με
οξικό λίθιο.....75

B.6.2. Μετασηματισμός κυττάρων σακχαρομύκητα.....77

B.6.3. Μέθοδος μετασηματισμού των δύο υβριδίων78

B.7. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα σακχαρομύκητα80

B.8. Παρασκευή επιδεκτικών για μετασηματισμό βακτηριακών κυττάρων.....81

B.8.1. Μέθοδος για επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα Top10 ή XL1/B.....81

B.8.2. Μέθοδος για επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα KC8.....82

B.9. Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων83

B.10. Υβριδοποίηση ακινητοποιημένου DNA σε μεμβράνη με ραδιοεπισημασμένο
ανιχνευτή.....83

B.10.1. Ραδιοσήμανση με τυχαίους εκκινητές	84
B.10.2. Καθαρισμός του ανιχνευτή με χρωματογραφία σε στήλη μοριακής διήθησης.....	86
B.10.3. Μεταφορά αποικιών σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης.....	86
B.10.4. Προϋβριδισμός και υβριδισμός των μεμβρανών.....	87
B.10.5. Αυτοραδιογραφία.....	89
B.11. Προσδιορισμός της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων του DNA.....	90
B.12. Εύρεση ομολογίας-ανάλυση ακολουθιών με προγράμματα βιοπληροφορικής.	92
B.13. Έκφραση σε βακτήρια και καθαρισμός πρωτεϊνών σύντηξης με την τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST).....	93
B.14. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου	95
B.14.1. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών κάτω από μετουσιωτικές συνθήκες	97
B.14.2. Βαφή με Coomassie Brilliant Blue R-250	99
B.15. Ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση κατά Western	99
B.15.1. Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών από πηκτή σε μεμβράνη.....	99
B.15.2. Βαφή με ponceau S.....	101
B.15.3. Ανοσοανίχνευση	101
B.16. Καθίζηση πρωτεϊνών με ακετόνη.....	102
B.17. Σύνθεση RNA-μεταγραφή <i>in vitro</i>	102
B.18. Μετάφραση του RNA σε πρωτεΐνη <i>in vitro</i>	105
B.19. Σύγχρονη μεταγραφή και μετάφραση <i>in vitro</i>	108
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	110
Γ.1. Ανίχνευση και μελέτη των αλληλεπιδράσεων <i>in vivo</i> μιας ισομορφής της ανθρώπινης κινάσης SRPK1 με την τεχνική των δύο υβριδίων στο <i>S.cerevisiae</i>	110
Γ.1.1. Εισαγωγή.....	110
Εισαγωγή στη μέθοδο των δύο υβριδίων.....	110
Εργαλεία της μεθόδου.....	113
Γ.1.2. Παρασκευή & έλεγχος του πλασμιδίου-δόλωματος και των πλασμιδίων λείας.....	117
Κλωνοποίηση του δολώματος.....	117
Επιβεβαίωση ότι το δόλωμα δεν ενεργοποιεί τα γονίδια αναφοράς... Μετασχηματισμός κυττάρων σακχαρομύκητα με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο του δολώματος.....	119
Έλεγχος φαινοτύπου του μετασχηματισμένου στελέχους.....	120

Παρασκευή DNA βιβλιοθήκης.....	121
Τιτλοδότηση της βιβλιοθήκης.....	123
Γ.1.3. Εφαρμογή της μεθόδου των δυο υβριδίων	125
Μετασηματισμός του ήδη μετασηματισμένου με το πλασμίδιο-δύλωμα στελέχους S.c. με το πλασμδιακό DNA της βιβλιοθήκης.....	125
Διαλογή και κατάταξη των επιλεχθέντων κλώνων	125
Γ.1.4. Διάσωση του πλασμδιακού DNA από τα επιλεγμένα στελέχη S.c....	129
Μετασηματισμός και επιλογή κυττάρων E.coli. που περιέχουν το πλασμίδιο-λεία.	129
Γ.1.5. Επιλογή κλώνων που περιέχουν το πλασμίδιο-λεία με υβριδισμό.....	131
Μεταφορά των αποικιών σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης και υβριδισμός.....	131
Παρασκευή του ανιχνευτή και ραδιοεπισήμανσή του.....	131
Υβριδισμός των μεμβρανών νιτροκυτταρίνης.....	133
Γ.1.6. Παρασκευή των πλασμδιακών DNA - λειών	135
Γ.1.7. Επαλήθευση των φαινοτύπων	135
I. Πέψη των πλασμδιακών DNA-λειών	135
II. Μετασηματισμός του πατρικού στελέχους που περιέχει το πλασμίδιο- δύλωμα (pGBT9-SRPK1aNt), με τα πλασμίδια-λείες.....	137
III. Μετασηματισμός του πατρικού στελέχους με τα πλασμίδια λείες.....	138
Γ.1.8. Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης των «λειών» με την SRPK1.....	139
Γ.2. Ανάλυση των επιλεχθέντων πλασμιδίων-λειών.....	140
Γ.2.1. Εύρεση των αλληλουχιών των ενθεμάτων.....	145
Γ.2.2. Μελέτη της αλληλεπίδρασης <i>in vitro</i> των προϊόντων των επιλεχθέντων κλώνων με την SRPK1aNt.....	171
Γ.2.2.1. Υποκλωνοποίηση των ενθεμάτων.....	171
Παρασκευή και προετοιμασία των DNA των φορέων.....	171
Παρασκευή και προετοιμασία των DNA των ενθεμάτων (A´).....	175
Παρασκευή και προετοιμασία των DNA (B´ ομάδα).....	176
Αντίδραση κλωνοποίησης της A´ και B´ ομάδας.....	177
Επιλογή ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pGEX.....	178
Υβριδισμός των κλωνοποιημένων λειών και επιλογή τους.....	179
Παρασκευή των DNA των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων.....	179

Έλεγχος του προσανατολισμού των κλωνοποιημένων λειών.....	180
Γ.2.2.2. Έκφραση των προϊόντων των cDNA-λειών σύντηξη με την GST.	184
Έκφραση των πρωτεϊνών-λειών σε σύντηξη με την GST.....	184
Καθορισμός παραμέτρων διάσπασης βακτηρίων.....	184
Έκφραση των πρωτεϊνών GST-5A2 και GST-28Δ5.....	185
Ανοσοανίχνευση των χιμαιρικών πρωτεϊνών GST-λειών.....	187
Γ.2.2.3. Παρασκευή ραδιοσημασμένης πρωτεΐνης SRPK1aNt.....	189
Γ.2.2.3.1. Μεταγραφή του DNA της SRPK1aNt.....	190
Παρασκευή του RNA της SRPK1aNt <i>in vitro</i>	190
Προετοιμασία του DNA pBSK+-SRPK1aNt για εκμαγείο....	190
<i>In vitro</i> μεταγραφή του pBSK+-SRPK1aNt/HindIII.....	190
Γ.2.2.3.2. Μετάφραση του RNA SRPK1aNt σε πρωτεΐνη	192
Γ.2.2.3.3. Μεταγραφή - Μετάφραση <i>in vitro</i>	193
Παρασκευή και προετοιμασία των DNA.....	193
Μεταγραφή και μετάφραση των DNA.....	194
Γ.2.3. Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης SAFB1-SRPK1a.....	196
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	199
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	224
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....	225
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ.....	241
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ.....	242
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙV.....	246
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	247
SUMMARY.....	249
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	251
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	267
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	275

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι πρωτεΐνες αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος της ξηρής μάζας του κυττάρου. Όταν εξετάζουμε ένα κύτταρο με το μικροσκόπιο ή όταν αναλύουμε την ηλεκτρική ή βιοχημική δραστηριότητά του, στην ουσία παρατηρούμε τις πρωτεΐνες του. Ωστόσο οι πρωτεΐνες δεν είναι μόνο δομικοί λίθοι από τους οποίους αποτελούνται τα κύτταρα αλλά επιτελούν σημαντικούς ρόλους σε όλες σχεδόν τις βιολογικές διεργασίες. Οι λειτουργίες τους εξαρτώνται άμεσα από την δομή τους η οποία καθορίζει και τις ιδιότητές τους.

Η ενζυμική κατάλυση είναι το παράδειγμα μιας από τις σημαντικότερες λειτουργίες που επιτελούν οι πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες ένζυμα διαθέτουν περίπλοκες μοριακές επιφάνειες που αλληλεπιδρούν με άλλα μόρια και διεκπεραιώνουν πολλές χημικές αντιδράσεις του κυττάρου. Η καταλυτική δραστηριότητά τους ρυθμίζεται με διάφορους μηχανισμούς όπως αλλοστερικά, με ομοιοπολική τροποποίηση τους, με διέγερση και αναστολή από ρυθμιστικές πρωτεΐνες, με πρωτεολυτική ενεργοποίηση και συχνά με ρύθμιση του υποκυτταρικού εντοπισμού. Είναι προφανές ότι σε όλους σχεδόν τους παραπάνω μηχανισμούς υπεισέρχεται η επαφή της πρωτεΐνης με άλλες πρωτεΐνες, είτε αυτές είναι υποστρώματα, είτε άλλα ένζυμα, είτε ρυθμιστές, μεταφορείς κ.λ.π. Η βαθιά γνώση συνεπώς των αλληλεπιδράσεων των διαφόρων πρωτεϊνών μας εφοδιάζει με εργαλεία απαραίτητα για την κατανόηση των λειτουργιών του κυττάρου και κατ' επέκταση και του οργανισμού.

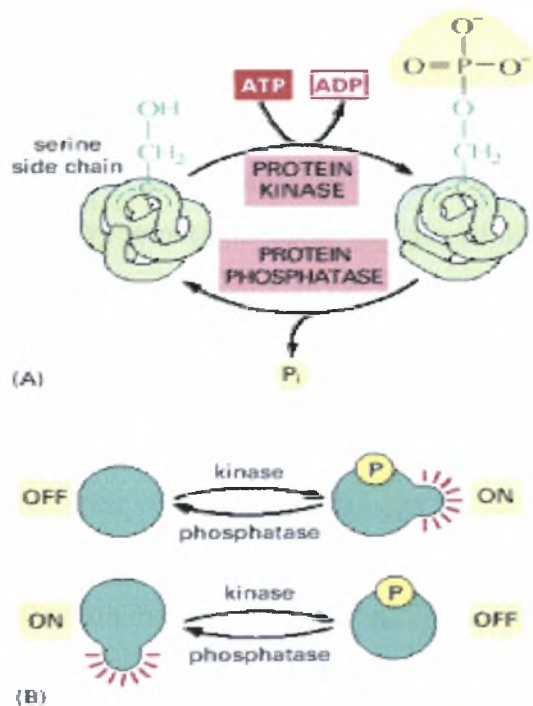
Στην παρούσα εργασία διερευνούνται οι αλληλεπιδράσεις μιας συγκεκριμένης περιοχής μιας κινάσης, ενός ενζύμου που φωσφορυλιώνει, δηλ. προσθέτει μια φωσφορική ομάδα στα υποστρώματά του μεταβάλλοντας έτσι την χημική τους δομή και κατ' επέκταση τη λειτουργία τους.

A.1. ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ

Η πιο διαδεδομένη αντιστρεπτή ομοιοπολική τροποποίηση που ρυθμίζει την ενεργότητα πολλών ενζύμων ή άλλων πρωτεϊνών είναι η φωσφορυλίωση. Η φωσφορυλίωση μιας πρωτεΐνης γίνεται με ενζυμική προσθήκη της τελικής φωσφορικής ομάδας ενός φωσφορικού νουκλεοζίτη στο υδροξύλιο της πλευρικής αλυσίδας μιας σερίνης ή θρεονίνης ή τυροσίνης της πρωτεΐνης-υπόστρωμα. Τα ένζυμα που καταλύουν την προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας ονομάζονται κινάσες.

Την αντίθετη αντίδραση, δηλ. της αποφωσφορυλίωσης, καταλύουν ένζυμα τα οποία ονομάζονται φωσφατάσες (εικόνα 1).

Ο πιο σημαντικός δότης φωσφορικών ομάδων που χρησιμοποιείται σε βιοχημικές φωσφορυλίωσεις είναι το μόριο ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη), ενώ είναι σπανιότερες οι περιπτώσεις εκείνες όπου οι κινάσες χρησιμοποιούν εξίσου καλά και το GTP (τριφωσφορική γουανοσίνη) ως δότη φωσφορικών (1).



Εικόνα 1. Α. Φωσφορυλίωση και αποφωσφορυλίωση των πρωτεϊνών
Β. Τροποποίηση της ενεργότητας μιας πρωτεΐνης μέσω φωσφορυλίωσης (2).

Είναι σημαντικό να σημειώσουμε ότι η φωσφορυλίωση και η αποφωσφορυλίωση δεν είναι η μία αντιστροφή της άλλης. Σε αντίθεση με την τροποποίηση που μπορεί να επέλθει στην δραστηκότητα ενός ενζύμου από μη ομοιοπολική αλληλεπίδραση, που είναι αμφίδρομη, ο κύκλος της φωσφορυλίωσης είναι μιας κατεύθυνσης που καταλύεται από τις κινάσες ή φωσφατάσες αντίστοιχα.

Η φωσφορυλίωση μπορεί να επηρεάσει την λειτουργία μιας πρωτεΐνης με δομικούς, θερμοδυναμικούς, κινητικούς, και ρυθμιστικούς τρόπους: α) όταν μια φωσφορική ομάδα προστεθεί σε μια πρωτεΐνη τότε επειδή αυτή φέρει δύο αρνητικά φορτία επιπλέον, μπορεί να προκαλέσει σημαντική αλλαγή διαμόρφωσης όπως να προσελκύσει μια ομάδα θετικά φορτισμένων πλευρικών αλυσίδων ορισμένων αμινοξέων. Αυτό με την σειρά του μπορεί να επηρεάσει την σύνδεση της πρωτεΐνης

με τους προσδέτες της και άρα να αλλάξει δραματικά την ενεργότητά της. β) μία φωσφορική ομάδα μπορεί να σχηματίσει 3 ή και περισσότερους δεσμούς υδρογόνου. Η τετραεδρική γεωμετρία των φωσφορικών ομάδων κάνει τους δεσμούς υδρογόνου εξαιρετικά κατευθυντήριους επιτρέποντας συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις με άλλους δότες δεσμών υδρογόνου. γ) η φωσφορυλίωση και η αποφωσφορυλίωση μπορούν να διαρκέσουν από λιγότερο από δευτερόλεπτο έως και ώρες. Η κινητική της αντίδρασης προσαρμόζεται ανάλογα με τις ανάγκες των φυσιολογικών διαδικασιών που επιτελούνται από το υπόστρωμα. δ) το μόριο ATP αποτελεί το ενεργειακό νόμισμα για την φωσφορυλίωση. Η χρήση αυτού του μορίου συνδέει την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου με την ρύθμιση του μεταβολισμού. ε) η ενέργεια που απελευθερώνεται κατά τη φωσφορυλίωση είναι -12Kcal mol^{-1} . Η μισή καταναλώνεται κάνοντας τη φωσφορυλίωση μη αντιστρεπτή και η άλλη μισή αποθηκεύεται στη φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη (2).

Ρόλος και ρύθμιση της φωσφορυλίωσης.

Ενώ οι μη ομοιοπολικές τροποποιήσεις συμβάλλουν στην ομοιοστασία του κυττάρου ο κύκλος της φωσφορυλίωσης λειτουργεί ως διακόπτης που οδηγεί το σύστημα από μία κατάσταση σε μία άλλη. Δηλ. η προσθήκη και η αφαίρεση φωσφορικών ομάδων συχνά συμβαίνει σαν απάντηση προς διάφορα σήματα που προδιαγράφουν κάποια συγκεκριμένη μεταβολή στην κατάσταση του κυττάρου. Κατά συνέπεια η φωσφορυλίωση δρώντας ως μοριακός διακόπτης ρυθμίζεται από κάποιους παράγοντες και ρυθμίζει κάποιους άλλους. Επηρεάζει κυτταρικές πρωτεΐνες όπως είναι: τα μεταβολικά ένζυμα, οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες (συμπεριλαμβάνοντας άλλες πρωτεϊνικές κινάσες και φωσφατάσες), οι υποδοχείς, οι πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, οι διάλυτοι, οι αντλίες ιόντων, οι μεταγραφικοί παράγοντες κ.ά.

Η πρωτεϊνική φωσφορυλίωση αποτελεί οδό μεταφοράς μηνυμάτων. Όπως και η αλλοστερική ρύθμιση, παίζει τον ρόλο του ενεργοποιητή ή του αναστολέα σε μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών ως απάντηση στα περιβαλλοντικά μηνύματα. Συχνά οι κινάσες των πρωτεϊνών αποτελούν συνιστώσες στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος δηλ. η μία κινάση ενεργοποιεί μία δεύτερη και αυτή μία τρίτη και με αυτή την διαδοχική ενεργοποίηση μπορεί ένα σήμα να φθάσει από την επιφάνεια του κυττάρου στο

γενετικό υλικό, με αποτέλεσμα να συμβούν αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων του και άρα και στην συμπεριφορά του.

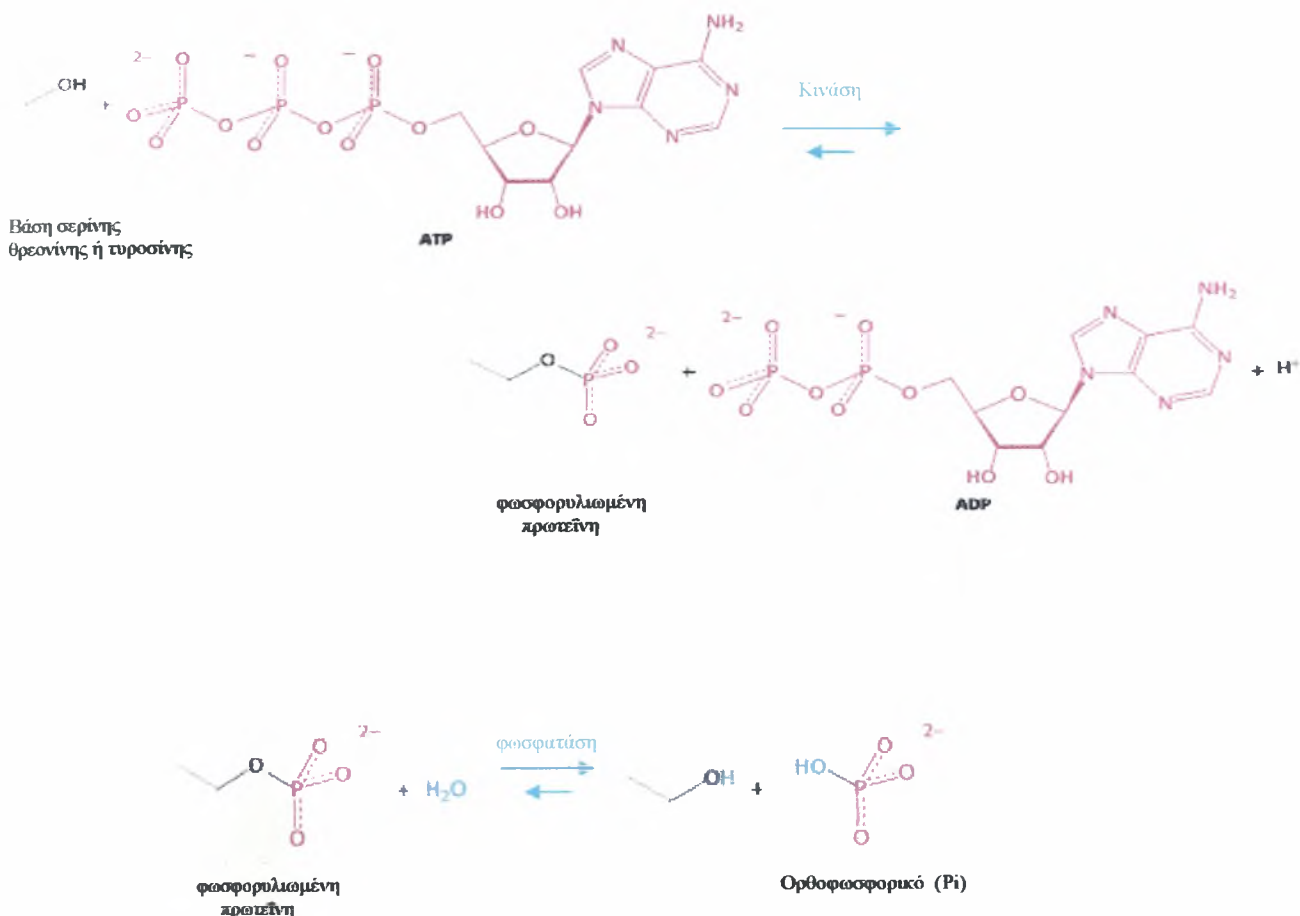
Η φωσφορυλίωση και αποφωσφορυλίωση αποτελούν γεγονότα που παίζουν σπουδαίο ρόλο στην συναρμολόγηση ή αποσυναρμολόγηση πρωτεϊνικών συμπλόκων των οποίων η συνεχής δημιουργία και διάλυση αποτελεί κομβικό σημείο των μηχανισμών ελέγχου της φυσιολογίας του κυττάρου.

A.2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ

Οι κινάσες ταξινομούνται βάσει του αμινοξέος του υποστρώματος στο οποίο μεταφέρουν την γ-φωσφορική ομάδα του νουκλεοτιδίου (εικόνα 2). Οι ομάδες που προκύπτουν είναι οι εξής:

1. Κινάσες σερίνης/θρεονίνης, όταν φωσφορυλιώνεται η αλκοολική ομάδα μιας σερίνης ή θρεονίνης. Οι κινάσες πρωτεϊνών σερίνης/αργινίνης αποτελούν μια νέα οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών της παρούσας ομάδας οι οποίες τροποποιούν τα υποστρώματα τους φωσφορυλιώνοντας σερίνες, οι οποίες αποτελούν μέρος μιας επαναλαμβανόμενης ακολουθίας διπεπτιδίων αργινίνης/σερίνης (μοτίβο RS).
2. Κινάσες τυροσίνης, όταν φωσφορυλιώνεται η φαινολική ομάδα μιας τυροσίνης.
3. Κινάσες διπλής εξειδίκευσης (dual specificity), όπου ο δέκτης μπορεί να είναι είτε σερίνη/θρεονίνη είτε τυροσίνη
4. Κινάσες που φωσφορυλιώνουν ασπαραγινικό οξύ με ενδιάμεση φωσφορυλίωση μιας ιστιδίνης. Τα δύο αμινοξέα μπορούν να ανήκουν σε διαφορετικές πρωτεΐνες ή διαφορετικές περιοχές του ίδιου πολυπεπτιδίου.
5. «Πραγματικές» κινάσες ιστιδίνης

Οι τρεις πρώτες ομάδες κινασών πρωτεϊνών αποτελούν την συντριπτική πλειοψηφία κινασών στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και συχνά χαρακτηρίζονται ως «ευκαρυωτική» οικογένεια κινασών (3).



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση της αντίδρασης φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης μιας πρωτεΐνης

Ταξινόμηση των ευκαρυωτικών κινάσων πρωτεϊνών (4)

Η ταξινόμηση των ευκαρυωτικών κινάσων πρωτεϊνών προήλθε συσχετίζοντας την δομή των καταλυτικών περιοχών και την ομολογία που παρουσιάζουν στις περιοχές αυτές. Η ανάλυση των χαρακτηριστικών αυτών αποτέλεσε τη βάση για τη δημιουργία του φυλογενετικού δέντρου τους και την κατηγοριοποίησή τους σε πέντε μεγάλες οικογένειες κινάσων πρωτεϊνών. Η κάθε οικογένεια παρουσιάζει ομοιότητες στο μοντέλο ρύθμισης της δράσης τους, στην εξειδίκευση και την ομολογία των πρωτοταγών δομών τους (εικόνα 3). Οι οικογένειες αυτές είναι οι εξής:

Οικογένεια AGC (Cyclic nucleotide-regulated protein kinase family)

Η οικογένεια αυτή κινάσων πρωτεϊνών περιλαμβάνει τις κινάσες που η δράση τους ρυθμίζεται από κυκλικά νουκλεοτίδια (cAMP, cGMP) καθώς και από κινάσες

που φωσφορυλιώνουν τον β-αδρενεργικό υποδοχέα (βARK) και την ριβοσωμική πρωτεΐνη S6 αντίστοιχα. Το όνομα της ομάδας «AGC» προέρχεται από τις συντμήσεις των ονομάτων των μελών της PKA, PKG, PKC.

Οι κινάσες της κατηγορίας αυτής φαίνεται να ευνοούνται από το βασικό περιβάλλον των υποστρωμάτων τους, φωσφορυλιώνοντας έτσι σερίνες ή θρεονίνες που βρίσκονται σε γειτονικές θέσεις με βασικά αμινοξέα όπως η λυσίνη και η αργινίνη.

Οικογένεια CaMK (Ca²⁺/Calmodulin regulated protein kinase family)

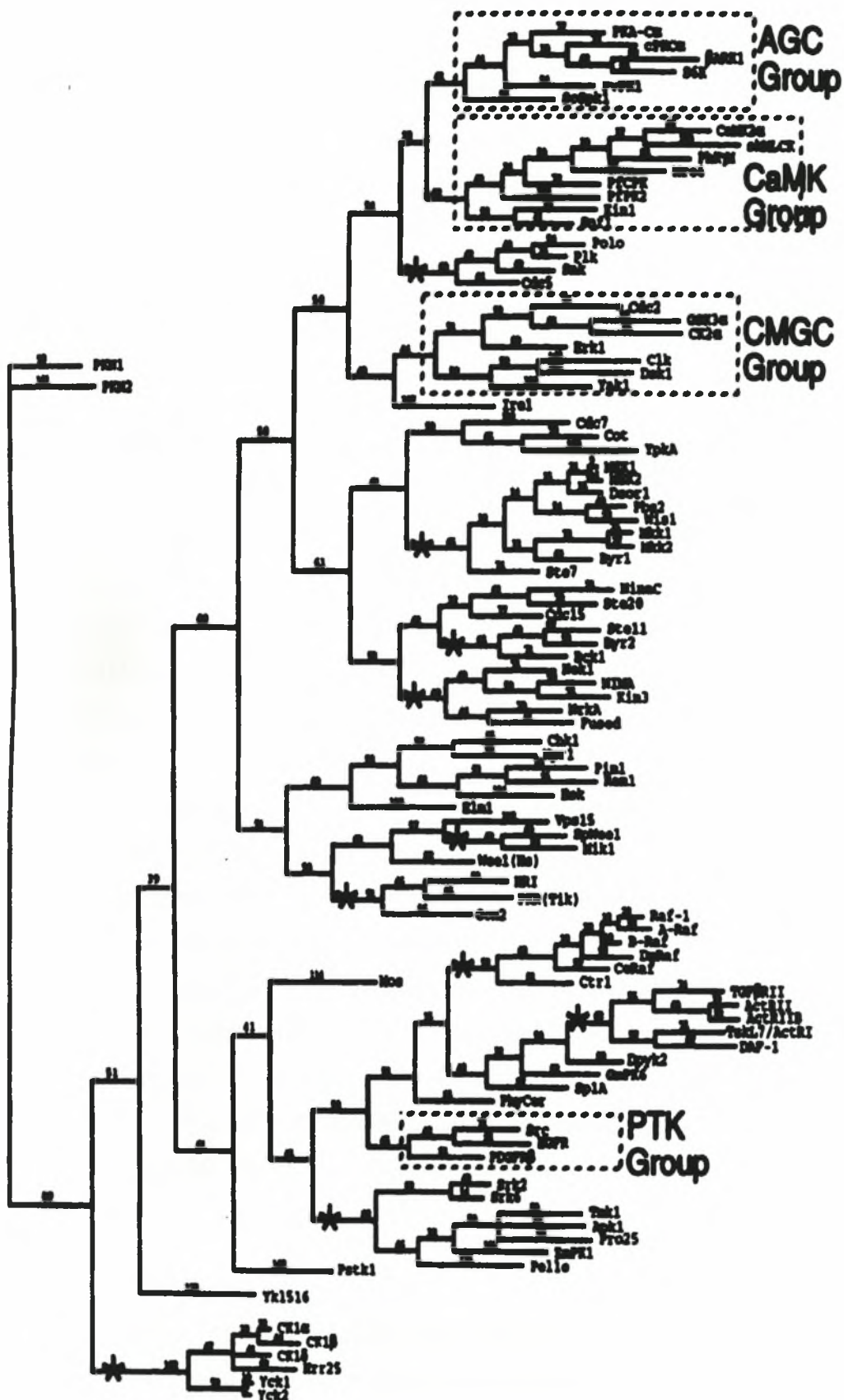
Τα μέλη της οικογένειας αυτής ενεργοποιούνται από την παρουσία καλμοδουλίνης και Ca²⁺ που δεσμεύονται σε μια μικρή περιοχή κοντά στο καρβοξυτελικό τους άκρο. Η οικογένεια αυτή κινάσων προτιμά και αυτή να φωσφορυλιώνει υποστρώματα με υψηλή περιεκτικότητα σε βασικά αμινοξέα κοντά στον δέκτη της φωσφορικής ομάδας όπως οι CaMK1, CaMK2, CaMK4, MLCK.

Οικογένεια PTK (Protein tyrosine kinase family)

Στην οικογένεια αυτή ανήκουν οι κινάσες εκείνες που φωσφορυλιώνουν τα υποστρώματα τους μόνο σε τυροσίνες και οι χαρακτηριστικές περιοχές κινάσης είναι πολύ συντηρημένες κάνοντας έτσι τον διαχωρισμό από τις κινάσες διπλής εξειδίκευσης. Τα μέλη της οικογένειας αυτής παίζουν σημαντικό ρόλο στην μεταφορά σημάτων ανάπτυξης και διαφοροποίησης. Στην οικογένεια αυτή συμπεριλαμβάνονται επίσης και μεμβρανικοί υποδοχείς οι οποίοι παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες στην δραστηριότητα και τη δομή τους (4).

Οικογένεια CMGC (Cyclin-dependent kinase family, Mitogen Activated Protein kinases, Glucogen synthase kinase 3, Casein kinase 2, Cell division cycle -like kinases)

Οι κατηγορίες των πρωτεϊνών που ανήκουν σ' αυτή την οικογένεια είναι υψηλά συντηρημένες στους οργανισμούς και ανέρχονται σε ηλικία μεγαλύτερη του ενός δισεκατομμυρίου χρόνια, δηλώνοντας ότι τα διάφορα δομικά τους γνωρίσματα έχουν σχέση με τις συντηρημένες βάσεις τους. Η οικογένεια CMGC κινάσων προτιμά να φωσφορυλιώνει υποστρώματα που παρουσιάζουν υψηλή περιεκτικότητα σε προλίνη.



Εικόνα 3 : Φυλογενετικό δέντρο των ευκαρυωτικών κινασών (4).

Η οικογένεια αυτή των πρωτεϊνικών κινασών διαιρείται σε πέντε μεγάλες κατηγορίες: την ομάδα των κινασών που η δράση τους εξαρτάται από τις κυκλίνες (CDK, Cyclin-dependent protein kinases), τις MAP κινάσες (Mitogen Activated Protein kinases), τις κινάσες της συνθάσης του γλυκογόνου (Glucogen synthase kinase 3-GSK3), τις κινάσες καζεΐνης 2 (CK2, Casein kinase 2) και τις κινάσες της Clk ομάδας (Cell division cycle -like kinases).

Οι κινάσες της πρώτης κατηγορίας εξαρτώνται από την παρουσία στο μόριό τους της κυκλίνης ως βοηθητικής υπομονάδας. Η σύνθεση και αποικοδόμηση των κυκλινών αποτελούν τον βασικό τρόπο ρύθμισης των κινασών αυτών.

Οι MAP κινάσες ευνοούνται από την παρουσία γειτονικών προλινών στις θέσεις φωσφορυλίωσης των υποστρωμάτων τους και είναι σημαντικές γιατί παίζουν ρόλο στην ανταπόκριση των κυττάρων από διάφορους αυξητικούς παράγοντες. Η δραστηριότητα τους επηρεάζεται από την φωσφορυλίωσή τους σε τυροσίνες από τις κινάσες των MAP κινασών (MEK) (4).

Για την ομάδα των GSK3 κινασών η φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων τους ευνοείται όταν βρίσκονται ανάμεσα σε περιβάλλον πλούσιο σε προλίνες, καθώς και από την παρουσία κάποιου φωσφοαμινοξέος στην P+4 θέση από το αμινοξύ που πρόκειται να φωσφορυλιώσουν οι ίδιες (4).

Οι κινάσες καζεΐνης 2 φωσφορυλιώνουν σερίνες ή θρεονίνες που ακολουθούνται από όξινα αμινοξέα (γλουταμινικά ή ασπαραγινικά), ενώ συνήθως είναι αρκετή η παρουσία ενός όξινου αμινοξέως στην P+3 θέση (S/T-X-X-E/D) (5). Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός υποστρωμάτων τους που έχει αναγνωριστεί, αλλά δεν είναι έχει ακόμη διευκρινισθεί πλήρως ο ρόλος τους στις λειτουργίες του κυττάρου.

Η ομάδα Clk κινασών περιλαμβάνει την ομώνυμη κινάση Clk/Sty και τις κινάσες σερίνης/αργινίνης (Serine/Arginine protein kinases SRPK's) που τροποποιούν τα υποστρώματα τους φωσφορυλιώνοντας σερίνες, οι οποίες αποτελούν μέρος μιας επαναλαμβανόμενης ακολουθίας διπεπτιδίων αργινίνης/σερίνης (RS περιοχή) (4).

Λοιπές κινάσες πρωτεϊνών

Στην οικογένεια αυτή περιλαμβάνονται κινάσες που δεν μπορούν να συμπεριληφθούν σε καμία από τις παραπάνω κατηγορίες και είναι δύσκολο να περιγραφούν γενικά τα λειτουργικά τους ή δομικά τους γνωρίσματα.

Μέλη της οικογένειας περιλαμβάνουν τις κινάσες καζεΐνης 1 (CK1) οι οποίες κατά κανόνα φωσφορυλιώνουν σερίνες ή θρεονίνες που βρίσκονται στην C-περιοχή αν και η παρουσία όξινων αμινοξέων στις ίδιες θέσεις μπορεί να είναι εξίσου αποτελεσματική (4).

Επίσης γνωστά μέλη της οικογένειας αυτής αποτελούν οι κινάσες των MAP κινασών (MEK) που είναι κινάσες διπλής εξειδίκευσης και παίζουν σημαντικό ρόλο στην μεταφορά μηνυμάτων στο κύτταρο.

Τέλος γνωστά μέλη αποτελούν κινάσες που εμπλέκονται στον έλεγχο της μετάφρασης όπως οι HRI, PKR/Tik και Gcn2 που προτιμούν να φωσφορυλιώνουν αμινοξέα που βρίσκονται σε βασικές περιοχές των υποστρωμάτων (4).

A.3. ΚΙΝΑΣΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕΡΙΝΗΣ/ΑΡΓΙΝΙΝΗΣ (SR-PROTEIN-SPECIFIC KINASE-SRPK)

Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί διάφορες ομάδες κινασών που φωσφορυλιώνουν πρωτεΐνες που περιέχουν επαναλαμβανόμενη ακολουθία διπεπτιδίων αργινίνης/σερίνης (RS περιοχή). Το μοτίβο RS υποδεικνύει ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη υπόκειται σε ρύθμιση κάποιων ιδιοτήτων της από φωσφορυλίωση και ότι ρυθμιστής τους είναι κάποια από τις κινάσες SR. Μερικά παραδείγματα αποτελούν η κινάση της U1 70K snRNP (8), η ομάδα των Clk/Sty κινασών (9), η DNA τοποϊσομεράση I (10), η ομάδα των κινασών SRPK (11). Σε πειράματα που έγιναν για να μελετηθεί καλύτερα η ρύθμιση του ματίσματος μέσω της φωσφορυλίωσης του παράγοντα ματίσματος ASF/SF2 η πρώτη που χαρακτηρίστηκε ήταν η ανθρώπινη μορφή της SRPK1 και η δεύτερη ήταν η Clk/Sty 1 που ονομάστηκε κινάση «διπλής εξειδίκευσης» διότι φωσφορυλιώνει τυροσίνες αλλά και σερίνες/θρεονίνες (13).

Η ομάδα των κινασών SRPK ενώ ανακαλύφθηκε πρόσφατα (1994) (11) είναι διατηρημένη κατά την διάρκεια της εξέλιξης από την ζύμη μέχρι τον άνθρωπο και φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο σε κυτταρικές λειτουργίες όπως στην ρύθμιση του ματίσματος του mRNA (6,11,14,15), στην μεταφορά των πρωτεϊνών στον πυρήνα (16-18), στην ανάπτυξη των γαμετικών κυττάρων στον *C.elegans* (7), στη μεταφορά πολυαμινών μέσα στα κύτταρα στον *S.c.* (19), στη σηματοδότηση για την ανάπτυξη των μυών (20) και για την ομοιοστασία ιόντων στον *S.c.* (19).

Τα κύρια υποστρώματά τους στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι οι λεγόμενες SR πρωτεΐνες που αποτελούν οικογένεια πρωτεϊνών απαραίτητων για το μάτισμα (συστατικό και εναλλακτικό), αναδεικνύοντας έτσι τις κινάσες SR κυρίως ως ρυθμιστές του ματίσματος. Διαφαίνεται όμως ότι ο ρόλος τους είναι πιο ευρύς, δεδομένου ότι έχει δειχθεί ότι υποστρώματά τους αποτελούν και πρωτεΐνες που δεν σχετίζονται άμεσα με τον μηχανισμό του ματίσματος, όπως ο υποδοχέας της λαμίνης B (LBR) (21) και η πρωταμίνη (22).

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

Συνοπτικά, στον άνθρωπο έχουν βρεθεί δύο γονίδια (SRPK1, SRPK2), στο ποντίκι τρία (SRPK1, SRPK2, SRPK3), στους μύκητες *S.c.* και *S.p.*, στο φυτό *Arabidopsis thaliana* και στον *C. elegans* από ένα γονίδιο.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕΡΙΝΗΣ/ΑΡΓΙΝΙΝΗΣ

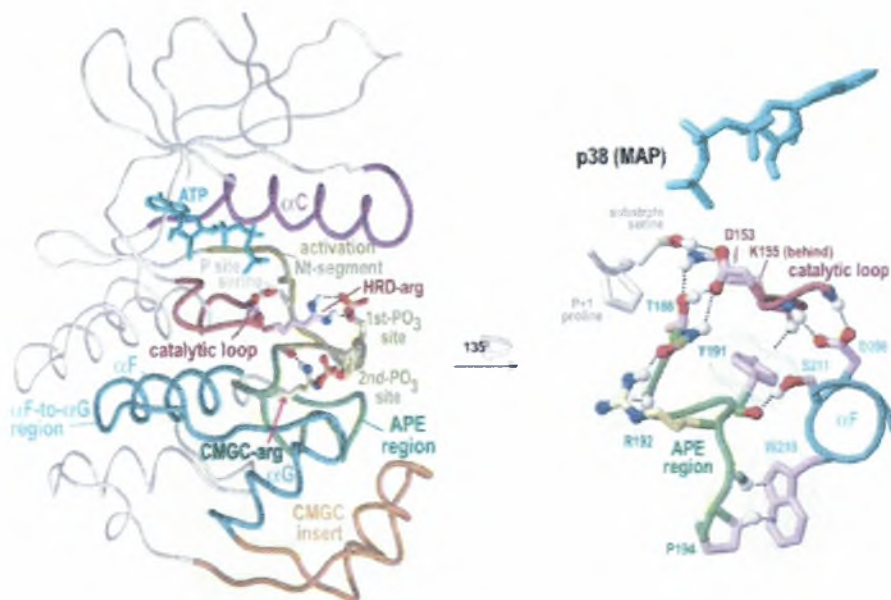
Τα μέλη της οικογένειας των SR κινάσων έχουν το χαρακτηριστικό ότι παρουσιάζουν πολύ μεγάλη ομολογία στην πρωτοταγή τους δομή, στη δραστικότητα τους ως κινάσες, καθώς και στην εξειδίκευσή τους ως προς τα υποστρώματα. Ο υψηλός βαθμός της ομολογίας τους αποτελεί ένδειξη της συντήρησης του λειτουργικού τους ρόλου μεταξύ απομακρυσμένων οργανισμών και υποδηλώνει ότι η διαδικασία της επεξεργασίας του pre-mRNA όπως και το δίκτυο των SR-πρωτεϊνών υπάρχουν από την αρχή των ευκαρυωτικών οργανισμών (23).

Η ευρύτερη οικογένεια των κινασών σερίνης/θρεονίνης αποτελείται από δύο περιοχές : α) τον N-τελικό λοβό ο οποίος αποτελείται από πέντε αντιπαράλληλα β-ελάσματα και μία μακριά α-έλικα την αC, β) τον C-λοβό ο οποίος είναι μεγαλύτερος και αποτελείται από επτά α-έλικες και τέσσερις μικρές β-αλυσίδες. Μεταξύ των δύο λοβών προσδένεται το ATP στην περιοχή που ονομάζεται P βρόγχος (P loop). Το υπόστρωμα της κινάσης προσδένεται σε ένα κεντρικό βρόγχο που ονομάζεται βρόγχος ενεργοποίησης μήκους 20-30 βάσεων (24-25).

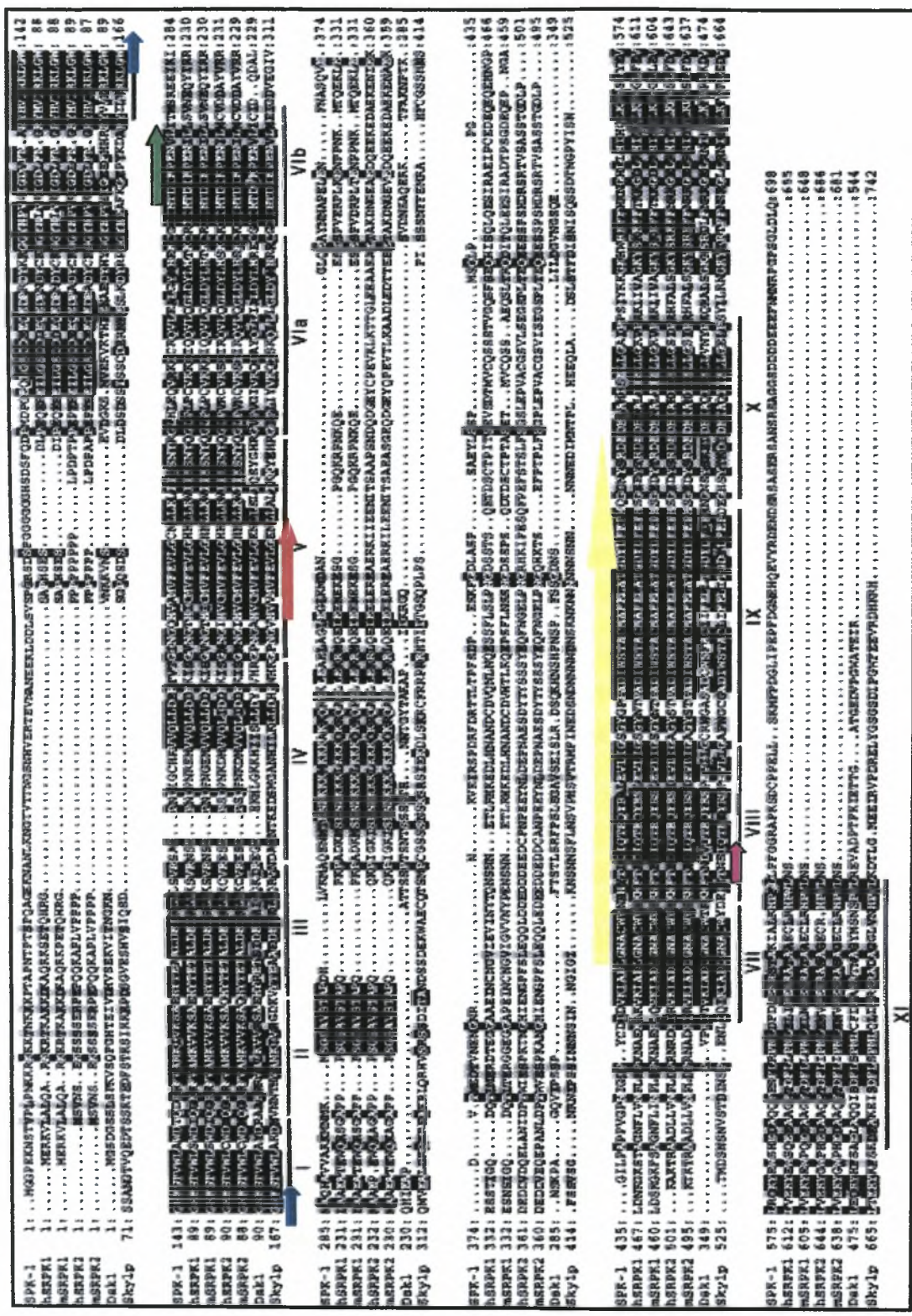
Οι συντηρημένες αυτές περιοχές υψηλής ομολογίας σχετίζονται με τις περιοχές που χαρακτηρίζουν την ενζυμική τους δραστηριότητα ως κινάσες και τους αποδίδονται τρεις διακριτοί ρόλοι: (α) δέσμευση και προσανατολισμός του ATP (GTP) (βρόγχος P). (β) δέσμευση και προσανατολισμός του πρωτεϊνικού (ή πεπτιδικού) υποστρώματος (βρόγχος ενεργοποίησης-activation loop). Η περιοχή αυτή που στις περισσότερες κινάσες πρέπει να είναι φωσφορυλιωμένη για να είναι ενεργές ονομάστηκε «τμήμα ενεργοποίησης» (activation segment) (26). Η φωσφορυλίωση της περιοχής σταθεροποιεί την κινάση σε μία ανοιχτή διαμόρφωση που επιτρέπει την δέσμευση του υποστρώματος (24). (γ) μεταφορά της γ-φωσφορικής ομάδας του νουκλεοτιδίου στο αμινοξύ του πρωτεϊνικού δέκτη (βρόγχος κατάλυσης-catalytic loop). Οι τρεις παραπάνω περιοχές διαιρούνται περαιτέρω σε 12 μικρότερες υποπεριοχές (συμβολιζόμενες με ρωμαϊκούς αριθμούς), οριζόμενες σαν τμήματα που δεν διαχωρίζονται μεταξύ τους από μεγάλες αμινοξικές ακολουθίες και που περιέχουν χαρακτηριστικές συντηρημένες ακολουθίες αμινοξέων.

Η οικογένεια των CMGC κινασών στην οποία περιλαμβάνεται και η οικογένεια των SRPK περιέχει ορισμένες χαρακτηριστικές περιοχές (σε σχέση με την ευρύτερη οικογένεια των κινασών σερίνης/θρεονίνης) που με την σειρά που εμφανίζονται στην αμινοξική τους αλληλουχία είναι α) η αC περιοχή που αντιστοιχεί στη C έλικα της κινάσης (N-λοβός), β) ο καταλυτικός βρόγχος (catalytic loop) ο οποίος περιέχει μία αργινίνη στην αλληλουχία HRD (ιστιδίνη, αργινίνη, ασπαραγινικό), γ) το N-τελικό τμήμα (Nt segment) που αντιστοιχεί στο αμινοτελικό άκρο του βρόγχου ενεργοποίησης, δ) την περιοχή APE (αλανίνη, προλίνη, γλουταμινικό) που αντιστοιχεί στις συντηρημένες βάσεις που υπάρχουν αμφότερα της αλληλουχίας APE και αποτελούν το καρβοξυτελικό άκρο του βρόγχου ενεργοποίησης ε) την αF-αG περιοχή που εκτείνονται από την F-έλικα έως τη G-έλικα και οι οποίες περιβάλλουν την APE περιοχή ζ) το CMGC ένθετο τμήμα που είναι χαρακτηριστικό μόνο της ομώνυμης οικογένειας (εικόνα 4) (27).

Τα πιο χαρακτηριστικά γνωρίσματα της οικογένειας αυτής είναι : (α) η CMGC-αργινίνη που βρίσκεται απέναντι από την περιοχή φωσφορυλίωσης του υποστρώματος P+1 (όπου P η θέση του αμινοξέος που φωσφορυλιώνεται) και η πλευρική της αλυσίδα που παίζει σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση του υποστρώματος και στην ενεργοποίηση της κινάσης, (β) η υψηλά συντηρημένη γλουταμίνη Q566 της Sky1p η οποία λόγω των δεσμών υδρογόνου που δημιουργεί με την πλευρική αλυσίδα της CMGC-αργινίνης ευθύνεται για την διαφορετική στερεοχημική διάταξη του μορίου που το καθιστά και ενεργό, (γ) η ασπαραγίνη N553 η οποία πιστεύεται ότι παίζει ρόλο στην αναγνώριση της P+1 αργινίνης του υποστρώματος (εικόνα 5).



Εικόνα 4. Η τρισδιάστατη δομή της p38 MAP (CMGC κινάσης). Στο σχήμα φαίνονται οι περιοχές κλειδιά μιας CMGC πρωτεΐνης : α) N-λοβός που προσδένεται το ATP με κυανό χρώμα και που περιέχει την αC έλικα με μωβ χρώμα, β) η περιοχή μεταφοράς της γ-φωσφορικής ομάδας του νουκλεοτιδίου στο αμινοξύ του πρωτεϊνικού δέκτη (βρόγχος κατάλυσης) η οποία περιέχει μία HRD-αργινίνη με μπορντό χρώμα, γ) C-λοβός που αποτελείται από 1) το ευθύγραμμο τμήμα Nt με λαδί χρώμα, 2) η περιοχή APE με πράσινο χρώμα, 3) η περιοχή αF-αG με κυανό χρώμα, 4) το CMGC ένθετο τμήμα με καφέ χρώμα. Οι δεσμοί υδρογόνου από άτομα οξυγόνου, αζώτου και υδρογόνου παριστάνονται με κόκκινο, μαύρο και άσπρο χρώμα αντίστοιχα. Επίσης απεικονίζονται οι περιοχές φωσφορυλίωσης (1^η και 2^η) με λαδί χρώμα και οι φωσφορικές ομάδες με κόκκινο. Β. Αναπαράσταση των περιοχών που αλληλεπιδρούν και σταθεροποιούν την CMGC-αργινίνη (R 192) σε στροφή 135^ο και ενός υποτιθέμενου υποστρώματος (27).



Εικόνα 5: Στοίχιση αμινοξικών αλληλουχιών των SRPKs από το νηματοειδές (SPK-1), άνθρωπο (hSRPK1, hSRPK2), ποντικό (mSRPK1,mSRPK2), και του σακχαρομύκητα (Dsk1, Sky1p). Οι ταυτόσημες βάσεις απεικονίζονται σε μαύρα κουτιά, οι συντηρημένες σε γκρι. Οι περιοχές των κινασών (I-XI) είναι υπογραμμισμένες. Επίσης απεικονίζονται με βέλη (α) η περιοχή πρόσδεσης των φωσφορικών ιόντων με μιλε (β) η περιοχή του προσδέτη με κόκκινο, (γ) η καταλυτική περιοχή των κινασών με πράσινο, (δ) ο βρόχος ενεργοποίησης που περιέχει την ασπαραγίνη N553 με μωβ και ε) η P+1 περιοχή με κίτρινο βέλος στην οποία περιέχεται η CMGC- αφρινίνη και η γλουταμίνη Q566 (7).

Γενικά οι κινάσες για να είναι ενεργές ρυθμίζονται κυρίως μέσω της φωσφορυλίωσης, είτε άμεσα με φωσφορυλίωση κάποιων αμινοξέων του βρόχου ενεργοποίησης είτε έμμεσα με προφωσφορυλίωση του υποστρώματος τους. Σε αντίθεση με τις άλλες ομάδες της οικογένειας CMGC οι SRPK κινάσες δεν απαιτούν την φωσφορυλίωση του βρόχου ενεργοποίησης προκειμένου να καταστούν δραστικές αλλά ευνοούν την αλληλεπίδρασή του με περιοχές του μορίου εκτός της δραστικής περιοχής, οι οποίες σταθεροποιούν τον βρόχο σε μία κατάσταση συνεχούς ενεργοποίησης. Π.χ. η Sky1p αποκτά την ενεργή της μορφή με αλληλεπίδραση της C-τελικής περιοχής της με κάποια αμινοξέα του βρόχου ενεργοποίησης (27-28).

ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΠΕΡΙΝΗΣ/ΑΡΓΙΝΙΝΗΣ.

Η κατανομή των μελών των πρωτεϊνών SRPK στους διάφορους ιστούς στον άνθρωπο παρουσιάζει σημαντικές διαφορές. Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων τους, χρησιμοποιώντας υβριδισμό κατά Northern με ιχνηλάτες ραδιενεργά επισημασμένα τμήματα των γονιδίων τους, έδειξε ότι η SRPK1 εκφράζεται σε μεγαλύτερο βαθμό στους όρχεις, ακολουθεί η έκφραση της στο πάγκρεας, και σε μέτριο βαθμό στους άλλους ιστούς όπως ο θύμος αδένας, η καρδιά και ο σκελετικός μυς (29). Συγκεκριμένα, πειράματα με υβριδισμό *in situ* και αποτύπωση κατά Western αποκάλυψαν ότι η SRPK1 εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό σε σπερματογόνα κύτταρα εκτός των σπερματοζωαρίων (22). Επίσης με υβριδισμό κατά Northern και *in situ* η SRPK1a που προκύπτει από εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου της SRPK1 φάνηκε να εκφράζεται περισσότερο στους όρχεις και λιγότερο στους υπόλοιπους ιστούς (29). Η SRPK2 δεν παρουσιάζει τόσο μεγάλη εξειδίκευση όσο η SRPK1 και δεν εκφράζεται ιδιαίτερα έντονα στους όρχεις. (15). Η SRPK3 στο ποντίκι, όπως δείχθηκε με υβριδισμό *in situ* σε τομές εμβρυακών κυττάρων, εκφράζεται ειδικά στην καρδιά και στους σκελετικούς μύες (20). Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι τα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης των κινασών αυτών στους ιστούς των οργανισμών, συμβάλλουν στην ρύθμιση των λειτουργιών των ιστών κατά έναν εξειδικευμένο τρόπο στο επίπεδο του κάθε ιστού ξεχωριστά (tissue specific regulation).

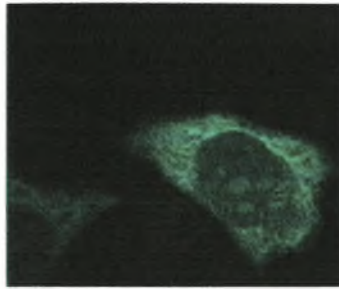
Η υποκυτταρική κατανομή των μελών της οικογένειας αυτής παρουσιάζει μια ετερογενή συμπεριφορά. Αν και όλα τα μέχρι τώρα γνωστά υποστρώματα τους είναι πυρηνικές πρωτεΐνες, οι SRPK μετά από μελέτες ανοσοφθορισμού που έγιναν σε

ζωντανά κύτταρα χρησιμοποιώντας τις SRPK1 και SRPK2 ως πρωτεΐνες σύντηξης με την GFP παρουσιάζουν μία κυρίαρχη κυτταροπλασματική εντόπιση αλλά και ορατό πυρηνικό σήμα (15) (εικόνα 6). Επίσης παρατηρήθηκε ότι στο κυτταρόπλασμα οι κινάσες SRPK1 και η SRPK2 δεν είναι διάχυτες, αντίθετα παρουσιάζονται προσκολλημένες σε κάποιες δομές του (31). Σε μελέτες που ακολούθησαν χρησιμοποιώντας την κινάση πρωτεϊνών Dsk1 της ζύμης *S. pombe*, αυτές αποκάλυψαν ότι σε κύτταρα συγχρονισμένα στην μεσόφαση η κυτταροπλασματική εντόπιση της κινάσης ήταν κυρίαρχη (31). Αντίθετα σε κύτταρα λίγο πριν την είσοδό τους στην μίτωση, το σήμα ανοσοφθορισμού της κινάσης εμφανίζεται έντονα στον πυρήνα. Και επειδή στη ζύμη ο πυρηνικός φάκελος δεν διαλύεται κατά την είσοδο του κυττάρου στην μίτωση έγιναν παρόμοια πειράματα σε κύτταρα θηλαστικών και έδειξαν ότι η μετατόπιση της κινάσης στον πυρήνα γίνεται όταν ακόμη ο πυρηνικός φάκελος είναι ανέπαφος (31). Άρα ο κυτταρικός τους εντοπισμός είναι εξαρτώμενος από το στάδιο του κυτταρικού κύκλου στο οποίο βρίσκεται το κύτταρο. Κάποιο σημάδι του κυτταρικού κύκλου επάγει την μετατόπιση της κινάσης στον πυρήνα στην αρχή της μίτωσης γεγονός που δηλώνει ότι η SRPK μπορεί να παίζει ρόλο στην εξέλιξη αυτής της διαδικασίας και πιθανόν να παίζουν και σηματοδοτικό ρόλο στην ρύθμιση του ματίσματος (31). Ο εντοπισμός στον πυρήνα συνδέεται άμεσα με την αντίδραση του ματίσματος ενώ του κυτταροπλάσματος επηρεάζει τον μεταβολισμό του RNA, η διαδικασία του οποίου ρυθμίζεται από αντίστροφη φωσφορυλίωση σε διάφορα μονοπάτια του. Πρώτον οι κυτταροπλασματικές SRPK παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην εισαγωγή νεοσυντιθέμενων SR-πρωτεϊνών στον πυρήνα γιατί οι περισσότερες από αυτές εισχωρούν με τον υποδοχέα hMtr10 με φωσφορυλιωεξαρτώμενο τρόπο (16, 18,30,32). Θεωρείται ότι με την κατανομή αυτή μόνο ένα συγκεκριμένο κλάσμα από κάθε κινάση εισέρχεται στον πυρήνα, όπου παρουσιάζει δραστηριότητα σε συγκεκριμένες περιοχές του διότι διαφορετικά η είσοδος μεγάλου αριθμού μορίων ενεργής κινάσης θα άλλαζε την οργάνωση του ματίσματος στον πυρήνα και αυτό θα ήταν με την σειρά του καταστροφικό για την φυσιολογία του κυττάρου (29,31,33). Τρίτον παίζουν ρόλο στην απελευθέρωση των SR-πρωτεϊνών από το mRNA που εξάγεται από τον πυρήνα και διευκολύνουν την είσοδο αυτών των πρωτεϊνών στον πυρήνα (34). Όλα αυτά υποδηλώνουν ότι η διαφορετική κυτταρική εντόπιση των κινασών αυτών κατά την διάρκεια των διαφόρων σταδίων του κυτταρικού κύκλου είναι σημαντική για τις εκάστοτε λειτουργίες του κυττάρου (15).

Στην περίπτωση της κινάσης πρωτεϊνών σερίνης/αργινίνης Dsk1 της ζύμης *S. pombe* βρέθηκε ότι η μεγάλη ενδιάμεση ακολουθία που χωρίζει τις δραστικές περιοχές της κινάσης παίζει σημαντικό ρόλο στην υποκυτταρική εντόπισή της. Χρησιμοποιώντας τόσο την φυσιολογική, όσο και την μορφή της κινάσης που της είχε αφαιρεθεί η εν λόγω ακολουθία βρέθηκε ότι στα κύτταρα που έφεραν την φυσιολογική μορφή το κυτταροπλασματικό σήμα είναι έντονο σε αντίθεση με την μεταλλαγμένη της μορφή η οποία εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά στον πυρήνα. Έτσι φαίνεται ότι η παρουσία του ενδιάμεσου τμήματος στο μόριο των κινασών αυτών παίζει ρυθμιστικό ρόλο στην υποκυτταρική κατανομή τους. Από πειράματα φάνηκε ότι η μετατόπιση της μεταλλαγμένης μορφής στον πυρήνα δεν φαίνεται να προέρχεται α) από αλλαγές στο καταλυτικό κέντρο της κινάσης που θα μπορούσαν να προκύψουν από την αποκοπή της ενδιάμεσης ακολουθίας, β) ούτε από παθητική διάχυση γιατί το μέγεθος της είναι μεγάλο ~90kD, γ) ούτε με την μεσολάβηση κάποιου υποδοχέα από ότι έχει δειχθεί μέχρι σήμερα (31) αλλά με την μεσολάβηση κάποιου άλλου μορίου που την μεταφέρει (ο επονομαζόμενος piggy-back μηχανισμός)(31).

Επίσης φάνηκε ότι αυτά τα ενδιάμεσα τμήματα των SRPK1 και SRPK2 δρουν σαν αυτόνομες μονάδες διότι όταν εισάχθηκε το τμήμα της SRPK2 στην SRPK1 η τελευταία διατηρούσε την ίδια κυτταροπλασματική εντόπιση (31). Συγχρόνως η έξοδος της μεταλλαγμένης μορφής από τον πυρήνα ήταν πιο αποτελεσματική από της φυσιολογικής SRPK1 γεγονός που μπορεί να εξηγηθεί με το ότι το ενδιάμεσο τμήμα ασκεί κάποια δράση ελλιμενισμού αλληλεπιδρώντας με κάποιες πρωτεΐνες του πυρήνα που δεν εκτελούν διαδρομές (29,31). Το εμβόλιμο αυτό τμήμα παίζει το ρόλο μιας «κυτταροπλασματικής άγκυρας» για τις κινάσες σερίνης/αργινίνης (15) ενώ το τμήμα της SRPK1 με δράση κινάσης είναι αναγκαίο για την είσοδο του μορίου στον πυρήνα (31). Πρόσφατα ανακοινώθηκε ότι στο ενδιάμεσο τμήμα της κινάσης Dsk1 υπάρχει μία σηματοδοτική ακολουθία πλούσια σε λευκίνες που ευθύνεται για την έξοδο της κινάσης από τον πυρήνα (nuclear export signal- NES) (35). Στην SRPK1 δεν βρέθηκε τέτοιο σήμα (αποδείχθηκε ότι δεν είναι συντηρημένο στα διάφορα μέλη της οικογένειας κινασών) αλλά ότι το ενδιάμεσο τμήμα του καταλυτικού κέντρου της κινάσης περιέχει άφθονες ακολουθίες που δρουν συνεργιστικά για να αγκυροβολήσει η κινάση στο κυτταρόπλασμα (31).

FLAG SRPK1



Εικόνα 6 : Ανοσοφθορισμός της SRPK1 σε ευκαρυωτικά κύτταρα με αντίσωμα anti-FLAG (171).

ΓΝΩΣΤΑ ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ SRPK ΣΤΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ

SRPK1 (SR-protein -specific-kinase)

Το πρώτο μέλος της οικογένειας των κινασών SRPK που απομονώθηκε και κλωνοποιήθηκε ήταν η ανθρώπινη μορφή της SRPK1 (11). Η κλωνοποίηση και ο χαρακτηρισμός της SRPK1 έγινε το 1994 στο εργαστήριο του Dr. X-D. Fu και χρησιμοποιήθηκε για αυτό η ικανότητά της να φωσφορυλιώνει τον παράγοντα ματίσματος ASF/SF2 σε πολλαπλές θέσεις φωσφορυλίωσης στα διπεπτίδια αργινίνης/σερίνης (13, 36) και να τον ανακατανέμει κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Οι SRPK φωσφορυλιώνουν διπεπτίδια σερίνης/αργινίνης (SR) που βρίσκονται σε συνέχεια και απαντώνται κυρίως σε παράγοντες ματίσματος (14).

Η SRPK1 έχει μοριακό βάρος 74,3 kDa και αποτελείται από 655 αμινοξέα. Περιέχει μία καταλυτική περιοχή με δράση κινάσης (αμινοξέα 80-653) που χωρίζεται σε δύο μέρη από ένα ενδιάμεσο τμήμα αμινοξέων (αμινοξέα 226-490). Επίσης περιέχει περιοχή πρόσδεσης του ATP (αμινοξέα 86-109), μία περιοχή πλούσια σε λυσίνη (αμινοξέα 258-276), και δύο πιθανά σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS), ένα στην αμινοτελική περιοχή ($^{11}\text{R-K-K-R-T-K-A-K-K-D-K}^{21}$) και ένα στο κέντρο του μορίου ($^{267}\text{K-K-K-K-L-K-K-K-Q-K-R}^{277}$) (11).

Η δράση της SRPK1 ως κινάσης είναι αρκετά εξειδικευμένη διότι αναγνωρίζει μόνο υποστρώματα με αργινίνη (όχι λυσίνη) και η φωσφορυλίωση λαμβάνει μέρος ειδικά στις σερίνες (όχι θρεονίνες). Η απομάκρυνση των συγκεκριμένων ακολουθιών

έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή της φωσφορυλίωσης (11). Τα πιο γνωστά υποστρώματα που φωσφορυλιώνονται από την SRPK1 είναι οι SR-πρωτεΐνες (παράγοντες ματίσματος), ο υποδοχέας της λαμίνης B, η πρωταμίνη P1, η πρωτεΐνη P2P-R, και η πρωτεΐνη του ιού της ηπατίτιδας HBV core protein (37-38).

Η SRPK1 εκφράζεται σε μεγαλύτερο βαθμό στους όρχεις, κατόπιν στο πάγκρεας, και σε μέτριο βαθμό στους άλλους ιστούς (29). Συγκεκριμένα εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό σε σπερματογόνα κύτταρα αλλά όχι στα σπερματοζώαρια. Ο λόγος της υψηλής έκφρασης της SRPK1 στα πρώιμα στάδια της σπερματογένεσης μπορεί να οφείλεται στις πολλαπλές λειτουργίες αυτής της κινάσης (22,39).

Όσον αφορά την υποκυτταρική κατανομή της αυτή εξαρτάται από το στάδιο του κυτταρικού κύκλου στο οποίο βρίσκεται το κύτταρο και εντοπίζεται και στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα.

Φωσφορυλίωση της SRPK1

Πρόσφατα βρέθηκε ότι η SRPK1 φωσφορυλιώνεται από την πρωτεϊνική κινάση της καζεΐνης II (CK2) σε εκχυλίσματα όρχεων (40). Αναλύοντας την ενζυμική δραστηριότητα της CK2 που εντοπίζεται στους πυρήνες των κυττάρων των διαφόρων ιστών, βρέθηκε ότι η υψηλότερη δραστηριότητα εντοπίζεται στους όρχεις, στον εγκέφαλο και το ήπαρ (41). Η υψηλότερη συγκέντρωση της κινάσης της καζεΐνης II που βρίσκεται στους όρχεις συμφωνεί και με τον εντοπισμό της SRPK1.

Η φωσφορυλίωση της SRPK1 από την κινάση της καζεΐνης II την ενεργοποιεί και την καθιστά 6 φορές πιο δραστική από την μη φωσφορυλιωμένη μορφή της. Μετά από μελέτες που έγιναν για την εύρεση της εξειδίκευσης της CK2 σε διάφορα υποστρώματα καθώς και συνθετικά πεπτιδία βρέθηκε ότι η ακολουθία που αναγνωρίζει ως υπόστρωμα είναι η S/T-X-X-όξινο αμινοξύ. Το ρόλο του όξινου αμινοξέος μπορούν να τον παίξουν εκτός από το ασπαραγινικό και γλουταμινικό και η φωσφορυλιωμένη σερίνη ή τυροσίνη. Στην SRPK1 υπάρχουν οκτώ πιθανές περιοχές που περιέχουν αυτό το μοτίβο αμινοξέων (Ser³⁷ Ser⁵¹ Ser²²² Ser³¹¹ Ser³⁶⁹ Ser⁴³⁶ Ser⁵⁵⁵ Ser⁶¹⁸). Για να διαπιστωθεί ποιες βάσεις σερινών φωσφορυλιώνονται εκφράστηκε η πρωτεΐνη σύντηξης GST-SRPK1 σε βακτηριακά κύτταρα αφού πρώτα δημιουργήθηκαν σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο της έτσι ώστε οι υποψήφιες σερίνες να αντικατασταθούν με αλανίνη ή γλυκίνη και να μην είναι δυνατή η φωσφορυλίωση στις θέσεις αυτές. Με βάση τα ποσοστά φωσφορυλίωσης η μεγαλύτερη αναστολή οδήγησε στο συμπέρασμα ότι τις κύριες θέσεις

φωσφορυλίωσης της SRPK1 από την κινάση καζεΐνης 2 αποτελούν οι σερίνες των θέσεων 51 και 555 (40).

SRPK1a

Η SRPK1a που βρέθηκε σε ανθρώπινη cDNA βιβλιοθήκη όρχεων αποτελεί προϊόν εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου που κωδικοποιεί για την SRPK1 (29). Η SRPK1a έχει μοριακό βάρος 92,3 kDa και αποτελείται από 826 αμινοξέα. Περιέχει όπως και η SRPK1 μία καταλυτική περιοχή με δράση κινάσης (αμινοξέα 251-824) που χωρίζεται σε δύο μέρη από ένα ενδιάμεσο τμήμα αμινοξέων (αμινοξέα 397-661), περιοχή πρόσδεσης του ATP (αμινοξέα 257-280), μία περιοχή πλούσια σε λυσίνη (αμινοξέα 429-447), και αλληλουχίες υπεύθυνες για σήμα πυρηνικού εντοπισμού (αμινοξέα 181-192 και 438-448). Η μόνη διαφορά της SRPK1a από την SRPK1 έγκειται στην ύπαρξη μιας εμβόλιμης ακολουθίας από 171 αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο του μορίου μεταξύ της Lys4 και της Val5 της SRPK1. Συγκρίσεις αλληλουχιών αποκάλυψαν τα 5' και 3' άκρα του ματίσματος και την ύπαρξη ενός ιντρονίου μεγέθους 513 βάσεων που συμπεριλαμβάνεται στο μάτισμα της SRPK1a ενώ αποκόπτεται στην SRPK1 (εικόνες 7,8,9) (29).

Η εμβόλιμη αυτή ακολουθία περιέχει έναν σημαντικό αριθμό από προλίνες. Η ιδιότητα της περιοχής που είναι πλούσια σε προλίνες έχει περιγραφεί ως ευνοϊκή για τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (42). Ο αριθμός των πρωτεϊνικών δομικών περιοχών που έχουν περιγράψει να αλληλεπιδρούν με περιοχές πλούσιες σε προλίνη γίνεται όλο και μεγαλύτερος. Πολύ καλά μελετημένες είναι οι περιοχές SH3 και WW (καθώς και τα σύμπλοκα αυτών με περιοχές πλούσιες σε προλίνη).

Μέσα στην περιοχή αυτή της SRPK1a περιέχεται και η αμινοξική αλληλουχία P-X-X-P (X : οποιοδήποτε αμινοξύ P : προλίνη) η οποία αποτελεί σημείο πρόσδεσης τουλάχιστον με την Src Homology 3 (SH₃) περιοχή που εμπεριέχουν κάποιες πρωτεΐνες (43) αλλά και με τις WW-περιοχές άλλων πρωτεϊνών (44).

Επίσης στην ιδιαίτερη περιοχή της SRPK1a περιέχονται και δύο αλληλουχίες που περιέχουν το μοτίβο L-X-X-L-L (¹⁴⁸L-A-P-L-L¹⁵² και ¹⁵⁸L-G-R-L-L¹⁶²) το οποίο θεωρείται ότι διευκολύνει την αλληλεπίδραση διαφόρων πρωτεϊνών με πυρηνικούς υποδοχείς (45).

10	20	30	40	50	60
MERKGERWSG	LRHEGQWSPG	RGPGQRREL	LTAAVRFPDV	RRPSTEVAPP	<u>HTPCLWAAGP</u>
70	80	90	100	110	120
RPSFRASSGA	GRSR <u>PLFPAR</u>	<u>PARALGPLQG</u>	PALGGRRRP	<u>PARPLTRPET</u>	<u>PPAHPARALL</u>
130	140	150	160	170	180
CAPWAASPTP	AASPS <u>PQPPP</u>	RQAPQPG <u>LAP</u>	<u>LLGLHPHLGR</u>	<u>LLSSTFALHP</u>	SLSPAVLALQ
190	200	210	220	230	240
ARKKRTKAKK	<u>DKAQRKSETQ</u>	HRGSAPHSES	DLPEQEEIIL	GSDDEQEDP	NDYCKGGYHL
250	260	270	280	290	300
VKIGDLFNGR	<u>YHVIRKLGWG</u>	HFSTVWLSWD	IQGKKFVAMK	VVKSAEHYTE	TALDEIRLLK
310	320	330	340	350	360
SVRNSDPNDP	<u>NREMVVQLLD</u>	DFKISGVNGT	HICMVFEVLG	HHLLKWIILK	NYQGLPLPCV
370	380	390	400	410	420
KKIIQOVLQG	LDYLHTKCRI	IHTDIKPENI	LLSVNEQYIR	RLAAEATEWQ	RSGAPPPSGS
430	440	450	460	470	480
AVSTAPQPKP	ADKMSKNKKK	<u>KLKKKQKROA</u>	ELLEKRMQEI	EEMEKESGPG	QKRPNKQEES
490	500	510	520	530	540
ESPVERPLKE	NPPNKMTQEK	LEESSTIGQD	QTLMERDTEG	GAAEINCNGV	IEVINYTONS
550	560	570	580	590	600
NNETLRHKED	LHNANDCDVQ	NLNQESSFLS	LPNGDSSTSQ	ETDSCTPITS	EVSDTMVCQS
610	620	630	640	650	660
SSTVGQSFSE	QHISQLQESI	RAEIPCEDEQ	EQEHNGPLDN	KGKSTAGNFL	<u>VNPLEPKNAE</u>
670	680	690	700	710	720
KLKVKIADLG	NACWVHKHFT	EDIQTRQYRS	LEVLIQSGYN	TPADIWSTAC	MAFELATGDY
730	740	750	760	770	780
LFEPHSGEEY	TRDEDHIALI	IELLGKVPRK	LIVAGKYSKE	FFTKKGDLLK	ITKLLKPWGLF
790	800	810	820		
EVLVEKYEWS	QEEAAGFTDF	LLPMLELIPE	KRATAAECLR	HPWLNS	

257-280 : **Protein kinases ATP-binding region signature**

429-447 **Lysine-rich region profile**

251-824 **Protein kinase domain profile**

38-150 **Proline-rich region profile**

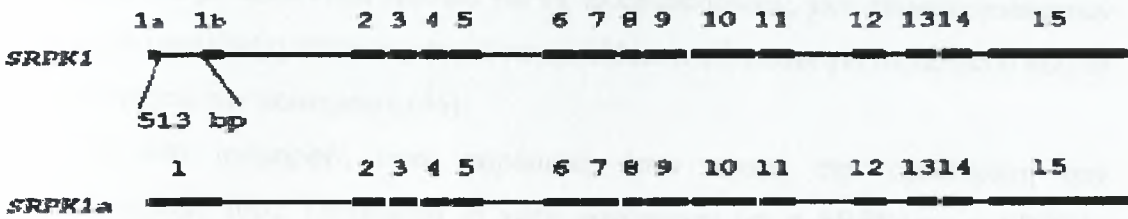
181-192 **Nuclear localization signals (NLS)**

438-448

»

Εικόνα 7 : Αμινοξική αλληλουχία της SRPK1a και απεικόνιση των διαφόρων περιοχών της. Περιοχή δέσμευσης του ATP 257-280 αμινοξέα (μωβ χρώμα). Χαρακτηριστική περιοχή κίνησης 251-824 αμινοξέα (με υπογράμμιση οι ενεργές περιοχές της που παρεμβάλλονται από ενδιάμεση ακολουθία 513 αμινοξέα). Περιοχή πλούσια σε λυσίνη 429-447 αμινοξέα (πράσινο χρώμα). Περιοχή πλούσια σε προλίνη 38-150 αμινοξέα (κόκκινο χρώμα και με έντονα κόκκινο χρώμα τα μοτίβα RxxP). Περιοχές υπεύθυνες για σήμα πυρηνικού εντοπισμού 181-191 και 438-448 αμινοξέα (με υπογράμμιση). Περιοχή μοτίβου LXXLL 148-152 και 158-162 αμινοξέα (μπλε χρώμα έντονα γράμματα).

A



B

```

SRPK1a  MERKGEKWSGLIHEGGWSPGKPGQRIELRLTAAYRFQDVRPSTEVARPHITPCIWAAGP 60
SRPK1   MERK-----
SRPK1a  KPSFKASSGAGKSNPLFPARPARALGPIQGPALGGRRRFFPARPIITRPETFFAHPARAIL 120
SRPK1   -----
SRPK1a  CAPWAASFTFAASPSIQFFPRQAPQPGIAPLLGLHSHLGRILLSTFALHPSLSSEAVLALQ 180
SRPK1   -----VLALQ
SRPK1a  AAKKKEIKAKKDKAQHK 196
SRPK1   AAKKKEIKAKKDKAQHK
    
```

C

Exon 1a					513 bp					Exon 1b						
M	E	R	K	E	E	R	L	S	F	A	V	L	A			
gat	etc	acc	ATG	GAG	CGG	AAA	GGT	GAG	CGGCTC	TCT	OCT	GCA	GTC	CTT	GGC

D

	5' SPLICE SITE	3' SPLICE SITE
Consensus	C AG:gt ^g agt A a	ccccccccccc c G n ag: A ttttttttttt t
1a - 513bp - 1b	AAG:gtgagc	ccctctctctgcag:T

Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση του εναλλακτικού τρόπου ματίσματος της SRPK1a.

A) Αναπαράσταση της δομής του γονιδίου των SRPK1/1a. Το εξόνιο 1 της SRPK1a αποτελείται από τα εξόνια 1a και 1b της SRPK1 καθώς και από το τμήμα των 513 bp το οποίο δεν περιλαμβάνεται στην SRPK1. B) Σύγκριση της αμινοξικής ακολουθίας που κωδικοποιείται από το εξόνιο 1 της SRPK1a με την ακολουθία που κωδικοποιούν τα εξόνια 1a και 1b της SRPK1. C) Η νουκλεοτιδική ακολουθία που περιβάλλει το τμήμα των 513 bp. D) Οι 5' και 3' θέσεις ματίσματος που βρίσκονται στα όρια μεταξύ των εξονίων 1a και 1b και του τμήματος των 513 bp (29).

Το μοτίβο αυτό βρίσκεται πολύ συχνά στις περιοχές με τις οποίες αλληλεπιδρούν οι συν-ενεργοποιητές της μεταγραφής των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών. Τα αμινοξέα του μοτίβου είναι κρίσιμα για τις αλληλεπιδράσεις των συν-ενεργοποιητών και τυχόν μετάλλαξη κάποιου μπορεί να εμποδίσει την δημιουργία συμπλόκου που θα ενεργοποιήσει την μεταγραφή (46).

Οι δύο ισομορφές είναι παρόμοιες όσον αφορά την εξειδίκευση των υποστρωμάτων τους. Πειράματα *in vitro* φανέρωσαν ότι η SRPK1 και η SRPK1a έχουν την ίδια εξειδίκευση στο να φωσφορυλιώνουν το αμινοτελικό άκρο του LBR (Lamin B Receptor), ενώ συγκρινόμενες με άλλες κινάσες που φωσφορυλιώνουν την περιοχή RS του LBR και του ASF/SF2 (όπως η CLK2 και τοποϊσομεράση I) οι δεύτερες παρουσίασαν μεγαλύτερη ειδική δραστηριότητα για το υπόστρωμα ASF/SF2. Όπως αναμενόταν η φωσφορυλίωση συμβαίνει στην περιοχή RS διότι η πρωτεΐνη σύντηξης GST με το αμινοτελικό άκρο του LBR χωρίς τα μοτίβα RS (*ΔRSNt*) δεν τροποποιείται από την SRPK1a.

Η δράση της SRPK1a είναι παρόμοια με της SRPK1, αλλά σε πειράματα ανοσοκαθίξεσης παρατηρήθηκε ότι η πρώτη ήταν 2- με 3-φορές πιο ενεργή στην φωσφορυλίωση του παράγοντα ματίσματος ASF/SF2 και του υποδοχέα της λαμίνης B (Lamin B Receptor-LBR) από την δεύτερη (29). Επιπλέον επειδή οι κινάσες των SR πρωτεϊνών επηρεάζουν το εναλλακτικό μάτισμα σε πειράματα ανοσοκαθίξεσης που έγιναν σε επιμολυσμένα κύτταρα με το γονίδιο *tau* φάνηκε ότι η SRPK1a είναι πιο ικανή από την SRPK1 στο να προάγει το προϊόν του εναλλακτικού ματίσματος του ανθρώπινου γονιδίου *tau* που δεν περιέχει το εξόνιο 10 (29).

Με πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Nothern σε εκχύλισμα όρχεων αρουραίου με πολυκλωνικά αντισώματα της SRPK1 και της SRPK1a η δεύτερη φάνηκε ότι εκφράζεται μόνο στους όρχεις και σε μικρότερη αναλογία της SRPK1 (29).

Μελέτες που έγιναν για τον εντοπισμό των γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν τα μέλη της οικογένειας των SRPK στα χρωμοσώματα των οργανισμών του ανθρώπου και του ποντικού απεκάλυψαν μετά από φθορισμομετρικό *in situ* υβριδισμό σε σωματικά κύτταρα ότι το γονίδιο της SRPK1 και κατ' επέκταση της SRPK1a βρίσκεται στον άνθρωπο τοποθετημένο στο χρωμόσωμα 6p21.2-p21.3, ενώ αντίστοιχα το γονίδιο της SRPK2 στο χρωμόσωμα 7q22-q31.1 (47). Οι περιοχές των γονιδίων που εντοπίστηκαν στα ανθρώπινα χρωμοσώματα αντιστοιχούν σε περιοχές στα χρωμοσώματα 17 και 5 του ποντικού.

SRPK1



SRPK1a



← Kinase domain →

← Kinase domain →

Εικόνα 9 : Σχηματική αναπαράσταση της SRPK1 και SRPK1a.

SRPK2

Η κινάση SRPK2 αποτελεί προϊόν έκφρασης διαφορετικού γονιδίου από της SRPK1. Συγκρίνοντας τις πρωτοταγείς δομές των SRPK1 και SRPK2 παρατηρήθηκαν τα εξής: α) 77% ταυτότητα και 90% ομολογία της αμινοξικής αλληλουχίας τους, β) ότι σ' όλα τα μέλη της οικογένειας των κινασών στα θηλαστικά οι περιοχές του μορίου που συγκροτούν το ενεργό κέντρο της κινάσης (kinase domains) χωρίζονται μεταξύ τους από ένα μεγάλο αριθμό αμινοξέων γεγονός πολύ σπάνιο για κινάσες σερίνης/θρεονίνης όπως οι ίδιες, αλλά συνηθισμένο σε κινάσες τυροσίνης. γ) Επίσης και οι δύο κινάσες έχουν μια μικρή έλλειψη μεταξύ των περιοχών II και III. Οι ομοιότητες που παρουσιάζονται μεταξύ τους σημαίνουν ότι μπορεί οι δύο κινάσες να έχουν παρόμοια δράση και υποστρώματα (15).

Οι διαφορές ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας των θηλαστικών εντοπίζονται σε μικρές αλλαγές στην αμινοξική ακολουθία στην κεντρική και καρβοξυτελική τους περιοχή οι οποίες δεν παίζουν σημαντικό ρόλο στην δραστικότητα και εξειδίκευση των δύο ενζύμων. Στο αμινοτελικό άκρο της SRPK2 λείπει η βασική περιοχή που πιθανώς είναι υπεύθυνη για τον πυρηνικό εντοπισμό της SRPK1 ενώ αντίθετα περιέχει περιοχή πλούσια σε προλίνες APLVPPPPPPPPPPPPPLPDPTPPEP παρόμοια με αυτή της SRPK1a. Μέσα στην περιοχή περιέχεται επίσης η αμινοξική

αλληλουχία P-P-X-P η οποία αποτελεί σημείο πρόσδεσης με SH3 περιοχές και με WW-περιοχές άλλων πρωτεϊνών. Η διαφορετική αυτή περιοχή της SRPK2, όπως και της SRPK1a μπορεί να παίζει τον ρόλο ενός σήματος για την αλληλεπίδραση της με συγκεκριμένα υποστρώματα ή άλλα ρυθμιστικά μόρια, σε σχέση με την SRPK1 (15).

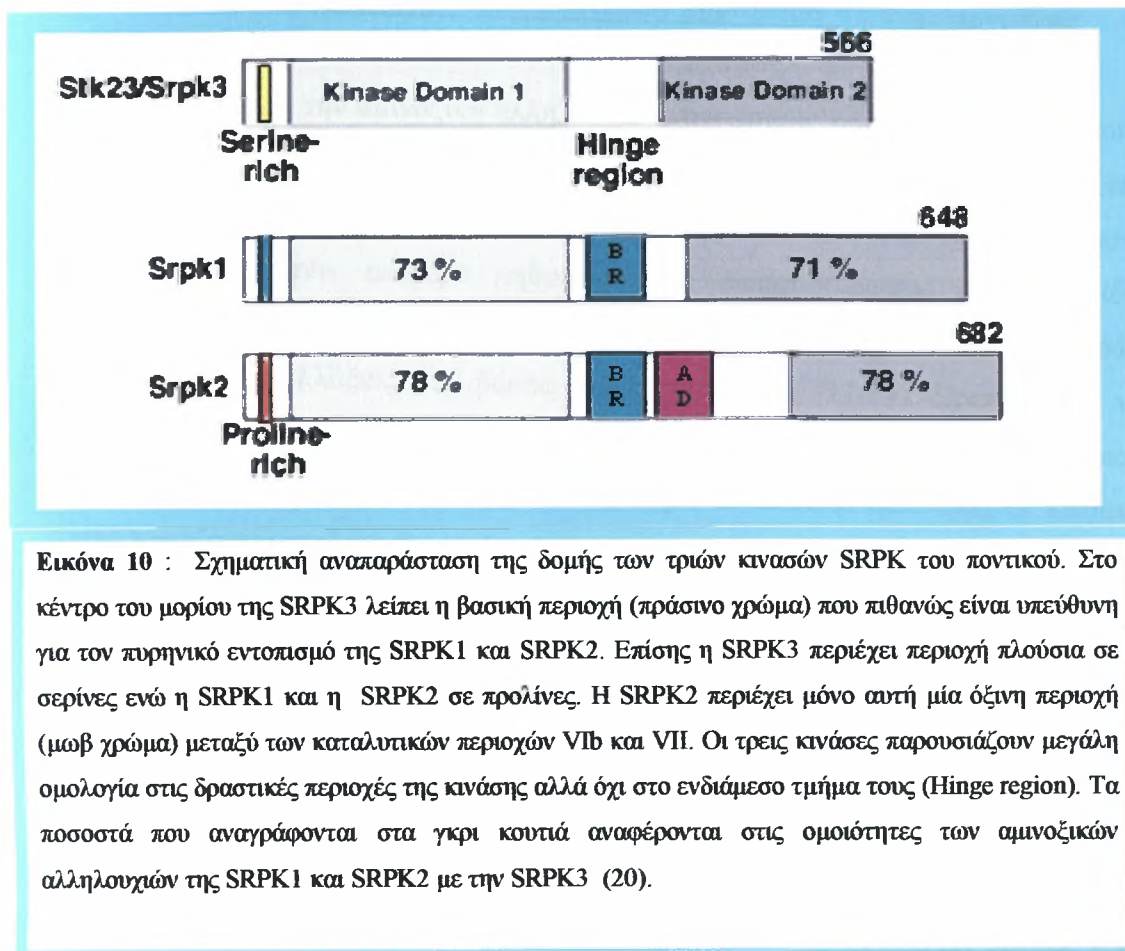
Παρόλα αυτά μέχρι τώρα έχει βρεθεί ότι η δράση της SRPK2 είναι όμοια με της SRPK1 καθώς και η εξειδίκευσή της στα υποστρώματα (η ύπαρξη των αργινινών στις ακολουθίες διπεπτιδίων είναι απαραίτητη) (15).

Η SRPK2 εκφράζεται σε διαφορετικούς ιστούς όπως : σε μεγάλο βαθμό στον εγκέφαλο, στους όρχεις και στον πνεύμονα, (21,75), μέτρια στην καρδιά και τον σκελετικό μυ, ενώ παρουσιάζει χαμηλά επίπεδα έκφρασης στο ήπαρ και στο νεφρό. Η διαφορετική έκφραση της SRPK2 από την SRPK1 μπορεί να συμβάλλει στην ρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος που διαφοροποιείται σε κάθε ιστό (15).

Ακόμη και η υποκυτταρική κατανομή της είναι όμοια με της SRPK1 που όπως αναφέρθηκε εντοπίζεται και στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα (15).

SRPK3

Πρόσφατα ταυτοποιήθηκε στον ποντικό και η STK23/SRPK3 στην προσπάθεια να βρεθούν τα γονίδια στόχοι του μεταγραφικού παράγοντα MEF2 (myocyte enhancer factor) (20) του οποίου η οικογένεια ελέγχει την διαφοροποίηση των σκελετικών μυών μαζί με την αντίστοιχη των μυικών πρωτεϊνών bHLH (έλικα-θηλιά έλικα-basic helix-loop-helix). Το γονίδιο της SRPK3 αποτελεί άμεσο στόχο του παράγοντα MEF2 και απορυθμίζεται σε έμβρυα όπου ο παράγοντας MEF2 έχει απαλειφθεί. Ο παράγοντας MEF2 αποτελεί ρυθμιστή της ανάπτυξης των καρδιακών και σκελετικών μυών και η SRPK3 η οποία ρυθμίζεται από αυτόν είναι αναγκαία για την φυσιολογική ανάπτυξη και ομοιοστασία του σκελετικού μύος. Συγκρίνοντάς την με τις άλλες κινάσες των θηλαστικών στις δύο δραστικές περιοχές κινάσης που περιέχει εμφανίζει 71-73% ομοιότητα με την SRPK1 και 78% με την SRPK2 του ποντικού. Διαφέρουν όμως στο ενδιάμεσο τμήμα που μεσολαβεί μεταξύ των δραστικών περιοχών όπως και στο αμινοτελικό άκρο που περιέχει περιοχή πλούσια σε σερίνες ενώ η SRPK1a και η SRPK2 σε προλίνες (εικόνα 10).



Εικόνα 10 : Σχηματική αναπαράσταση της δομής των τριών κινασών SRPK του ποντικού. Στο κέντρο του μορίου της SRPK3 λείπει η βασική περιοχή (πράσινο χρώμα) που πιθανώς είναι υπεύθυνη για τον πυρηνικό εντοπισμό της SRPK1 και SRPK2. Επίσης η SRPK3 περιέχει περιοχή πλούσια σε σερίνες ενώ η SRPK1 και η SRPK2 σε προλίνες. Η SRPK2 περιέχει μόνο αυτή μία όξινη περιοχή (μωβ χρώμα) μεταξύ των καταλυτικών περιοχών VIb και VII. Οι τρεις κινάσες παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα στις δραστικές περιοχές της κινάσης αλλά όχι στο ενδιάμεσο τμήμα τους (Hinge region). Τα ποσοστά που αναγράφονται στα γκρι κουτιά αναφέρονται στις ομοιότητες των αμινοξικών αλληλουχιών της SRPK1 και SRPK2 με την SRPK3 (20).

Η ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ SRPK

Γενικά

Τα υποστρώματα της οικογένειας κινασών πρωτεϊνών σερίνης/αργινίνης περιέχουν στο μόριο τους την χαρακτηριστική αλληλουχία επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών αργινίνης/σερίνης (RS) και τροποποιούνται από τις κινάσες με φωσφορυλίωση στις σερίνες. Αρχικά τα υποστρώματα που βρέθηκαν να φωσφορυλιώνονται από την SRPK1 ήταν οι SR παράγοντες ματίσματος γι' αυτό και θεωρήθηκε ότι ο ρόλος τους έχει αποκλειστική σχέση με την ρύθμιση του ματίσματος και με την μεταφορά των mRNAs στο κυτταρόπλασμα. Αργότερα όμως βρέθηκαν ως υποστρώματα της SRPK1 και πρωτεΐνες που περιέχουν μοτίβα RS αλλά δεν ανήκουν στην οικογένεια των παραγόντων ματίσματος, όπως ο υποδοχέας της λαμίνης B, η πρωταμίνη P1, η πρωτεΐνη P2P-R, και η πυρηνική πρωτεΐνη HBV του ιού της ηπατίτιδας. Τα αποτελέσματα αυτά είχαν σαν συνέπεια την διεύρυνση του ρόλου των κινασών SRPK και την εμπλοκή τους στην συμπύκνωση της χρωματίνης.

Αμινοξική αλληλουχία αναγνώρισης κινασών πρωτεϊνών σερίνης/αργινίνης

Όσον αφορά την αμινοξική αλληλουχία αναγνώρισης των κινασών SRPK αυτή διαπιστώθηκε μετά από διάφορες μελέτες που έδειξαν ότι η απάλειψη των επαναλαμβανόμενων διπεπτιδίων σερίνης/αργινίνης από τις πρωτεΐνες-υποστρώματα των SRPK κινασών επέφερε μηδενισμό της φωσφορυλίωσης (15). Το ίδιο αποτέλεσμα είχαν και οι μελέτες που χρησιμοποίησαν ως υποστρώματα των κινασών πρωτεΐνες με μεταλλάξεις στις βάσεις σερίνης/αργινίνης (11,14). Πρέπει όμως να αναφερθεί ότι δεν αποτελούν υποστρώματα των SRPK όλες οι πρωτεΐνες που περιέχουν διπεπτιδία από αργινίνες και σερίνες. Για να είναι δραστικές οι κινάσες αυτές χρειάζονται τουλάχιστον τρία τέτοια διπεπτιδία σε σειρά (22). Σε πειράματα *in vitro* φωσφορυλίωσης χρησιμοποιώντας την πρωτεΐνη σύντηξης GST-SRPK1 με πρωτεΐνες που περιείχαν μόνο δύο επαναλαμβανόμενα διπεπτιδία αργινίνης/σερίνης (RSRS ή RSXRS όπου X βρίσκεται γλυκίνη δεν ήταν δυνατή η φωσφορυλίωση τους (22). Ενώ για την τοποϊσομεράση I η οποία φωσφορυλιώνει και αυτή μοτίβα RS (10) βρέθηκε ότι είναι κρίσιμη η ύπαρξη 5 τουλάχιστον επαναλαμβανόμενων διπεπτιδίων αργινίνης/σερίνης για την ικανή φωσφορυλίωση του υποστρώματος.

Επίσης *in vitro* πειράματα που έγιναν χρησιμοποιώντας τις SRPK1 και SRPK2 με διάφορους παράγοντες ματίσματος του mRNA που προέρχονται από διαφορετικούς οργανισμούς έχει αναφερθεί ότι η αντικατάσταση της αργινίνης στα υποστρώματα από ένα άλλο βασικό αμινοξύ, τη λυσίνη, έχει ως αποτέλεσμα τη μη φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων από την SRPK1 δείχνοντας έτσι ότι η ύπαρξη των αργινινών στις ακολουθίες διπεπτιδίων είναι απαραίτητη (15). Αντίθετα η Clk1 επιδεικνύει ευρύτερη εξειδίκευση σε σχέση με την SRPK1. Αυτό αποδεικνύεται από το γεγονός ότι όταν έγιναν οι μεταλλάξεις της αργινίνης σε λυσίνη ή προλίνη των διπεπτιδίων RS του SF2 αυτή διατηρούσε τη δυνατότητα φωσφορυλίωσης των σερινών. Εκτός από την αργινίνη και η ιστιδίνη έχει γίνει αποδεχτή στην θέση αυτή. Για τους παραπάνω λόγους οι SRPK δεν φωσφορυλιώνουν την ιστόνη H1 και την MBP (myelin basic protein) (πολλές λυσίνες και υδροφοβικά αμινοξέα γύρω από την θέση της φωσφορυλίωσης), ενώ η Clk1 μπορεί και φωσφορυλιώνει πρωτεΐνες όπως η ιστόνη H1 και η MBP αλλά δεν φωσφορυλιώνει όξινα υποστρώματα όπως την β-καζεΐνη ή την καρβοξυτελική περιοχή της c-Jun (49). Αυτές οι παρατηρήσεις υποδηλώνουν ότι οι κινάσες SRPK επιζητούν βασικά αμινοξέα αμφίπλευρα της σερίνης που φωσφορυλιώνεται και το υπόστρωμα αργινίνη-σερίνη-αργινίνη (RSR)

είναι το προτιμότερο (49). Ακόμη, η αντικατάσταση της σερίνης από θρεονίνη ή γλυκίνη στις ακολουθίες διπεπτιδίων έχει σαν αποτέλεσμα τη μη φωσφορυλίωση του υποστρώματος (15).

Καταλήγοντας, το πιο έντονο χαρακτηριστικό της οικογένειας των SRPK είναι η απαίτηση για αργινίνη στην P+1 θέση του υποστρώματος και γι' αυτήν την προτίμηση θεωρούνται υπεύθυνα τα αμινοξέα που βρίσκονται στην ομώνυμη θέση (P+1 θέση) της κινάσης που είναι πολικά και όξινα (οι SRPK1 και SRPK2 έχουν τα Asn532 και Asp543 αντίστοιχα). Παρόλα αυτά υπάρχουν δύο εξαιρέσεις: (α) η ύπαρξη προλίνης στην θέση P+1 του υποστρώματος είναι επίσης προτιμητέα. Στην εξαίρεση αυτή ανήκει η πρωτεΐνη Nr13p, μία μεταφορική πρωτεΐνη του σακχαρομύκητα που αποτελεί φυσικό υπόστρωμα της Sky1p και η οποία φωσφορυλιώνεται και από SRPK θηλαστικών σε μία σερίνη που την ακολουθεί προλίνη, (β) η ύπαρξη πολικών (N και Q) ή όξινων (D και E) αμινοξέων στην θέση P-2 του υποστρώματος είναι επιλέξιμη από τις κινάσες Sky1p, SRPK1 και SRPK2 και οφείλεται στις συντηρημένες αργινίνες τους R568 και R571 (15, 28). Επίσης η φωσφορυλίωση ήταν επιτυχημένη σε πειράματα που έγιναν χρησιμοποιώντας ως ένζυμο την πρωτεΐνη σύντηξης FLAG-SRPK1 εκφρασμένη σε παροδικά επιμολυσμένα κύτταρα 293T μετά από ανοσοκατακρήμιση και ως υποστρώματα το αμινοτελικό άκρο του υποδοχέα της λαμίνης B που περιέχει την κατάλληλη περιοχή διπεπτιδίων αργινίνης/σερίνης τα οποία λειτουργούν ως στόχος φωσφορυλίωσης, καθώς και μεταλλάγματά του στα οποία είχαν εισαχθεί με σημειακές μεταλλάξεις αλανίνη ή γλυκίνη στη θέση των σερινών (RSRGRSRSRS, RRSRSRARSRS, RRSRSRSRARS) (50). Το ίδιο αποτέλεσμα είχαν και *in vitro* πειράματα που έγιναν χρησιμοποιώντας τις SRPK1 και SRPK2 με την πρωταμίνη P1 που περιείχε ένα διπεπτίδιο σερίνης/αργινίνης και άλλα δύο με μία γλουταμίνη ανάμεσα τους (RSQRSRS) (22).

Όσον αφορά τα κινητικά χαρακτηριστικά των κινάσων αυτών, έχει υπολογιστεί ότι η SRPK1 με υπόστρωμα τον ASF/SF2 είναι 150 φορές πιο δραστική από ότι η Clk με το ίδιο υπόστρωμα (49). Επίσης μελέτες που έγιναν χρησιμοποιώντας ως πηγή δράσης την SRPK1 και ως υπόστρωμα τον παράγοντα ματίσματος ASF/SF2 έδωσαν μια τιμή Km 10 μM για το ATP, και μία πολύ μικρή τιμή Km (0,07 μM) για το υπόστρωμα, τα οποία δείχνουν την πολύ μεγάλη αγχιστεία των κινάσων αυτών για τα υποστρώματά τους (14).

Μηχανισμός φωσφορυλίωσης των υποστρωμάτων.

Σύμφωνα με τα τελευταία δεδομένα οι κινάσες πρωτεϊνών σερίνης/αργινίνης φωσφορυλιώνουν διαδοχικά τις πολλαπλές σερίνες στις RS περιοχές των υποστρωμάτων τους και όχι ταυτόχρονα. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι SRPK1 ανταγωνίζεται την δράση της Clk1 κινάσης όταν η πρώτη βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση. Το κύτταρο προσπαθώντας να αποφύγει αυτήν την διαμάχη «αγκυροβολεί» τις κινάσες SRPK's στο κυτταρόπλασμα ενώ περιορίζει τις κινάσες της οικογένειας Clk/Sty στον πυρήνα και συγκεκριμένα στις πυρηνικές κηλίδες (51). Για την αρχή όμως αυτής της εξελισσόμενης φωσφορυλίωσης διατυπώθηκαν οι παρακάτω υποθέσεις:

I. Είναι πιθανό *in vivo* το υπόστρωμα να φωσφορυλιώνεται αρχικά από μία άλλη κινάση πρωτεϊνών και ακολούθως οι SRPK να το αναγνωρίζουν και να φωσφορυλιώνουν τις υπόλοιπες σερίνες, παρουσιάζοντας έτσι μία ιεραρχική φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων (28).

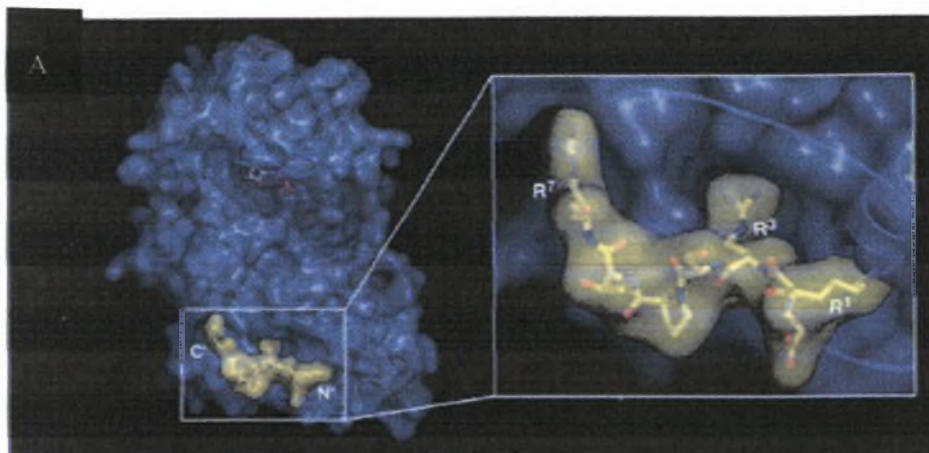
II. Μία άλλη πιθανότητα είναι η αρχική φωσφορυλίωση να γίνεται από τις ίδιες τις SRPK, αλλά με πολύ μικρότερη αποτελεσματικότητα. Όταν η αρχική αυτή φωσφορυλίωση του υποστρώματος επιτευχθεί, η κινάση συνεχίζει την φωσφορυλίωση του υποστρώματος επιδεικνύοντας υψηλότερη δραστηριότητα (28).

III. Τέλος υπάρχει και η πιθανότητα οι περιοχές αναγνώρισης από το RNA (RNA recognition motif-RRM) των παραγόντων ματίσματος να οδηγούν στην αρχική αναγνώριση του υποστρώματος από τις SRPK και να ακολουθεί «κλείδωμα» των κινασών αυτών στην RS περιοχή (52). Εκτός της επαφής του παράγοντα ματίσματος με την SRPK1 μέσω των RRM περιοχών βρέθηκε ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ ενός πεπτιδίου του υποστρώματος και μιας διαμορφωμένης αυλακιάς της κινάσης βοηθάει στο «κλείδωμα» της κινάσης στο υπόστρωμα και στην σωστή τοποθέτηση της RS περιοχής για να επέλθει η διαδοχική φωσφορυλίωση (53).

Συγκεκριμένα, οι μελέτες που έγιναν σε μια μορφή της SRPK1 από την οποία είχαν αφαιρεθεί μία αλληλουχία 41 αμινοξέων στο αμινοτελικό της άκρο, καθώς και 217 αμινοξέα (αμινοξέα 256-473) από την περιοχή που παρεμβάλλεται μεταξύ των δραστικών περιοχών της κινάσης επιβεβαιώνουν την τελευταία υπόθεση του μηχανισμού φωσφορυλίωσης των υποστρωμάτων από την κινάση SRPK. Η μεταλλαγμένη μορφή SRPK1ΔNS1 παρέμενε ενεργή, παρουσιάζοντας παρόμοια δραστηριότητα με την φυσιολογική μορφή της κινάσης. Η συνολική δομή του μορίου

ήταν παρόμοια με αυτή που παρουσιάζουν και άλλες κινάσες πρωτεϊνών (53). Η SRPK1ΔNS1 ενώνεται με το υπόστρωμά της μέσω ενός πεπτιδίου του υποστρώματος που αναγνωρίζει στην κινάση την διαμόρφωση ενός αυλακιού το οποίο ονομάστηκε «αυλάκι αγκυροβόλησης» (docking groove) (εικόνα 11). Ο παράγοντας ματίσματος ASF/SF2 που αποτελεί υπόστρωμα της SRPK1 αποτελείται στο αμινοτελικό άκρο από δύο περιοχές πρόσδεσης στο RNA (RRMs), μία μικρή σε μήκος ακολουθία που ενώνει το N-τελικό με το C-τελικό άκρο το οποίο με την σειρά του περιέχει οκτώ συνεχόμενα RS διπεπτίδια (RS1) και μία μικρότερη ακολουθία με διακεκομένα RS διπεπτίδια (RS2). Το «αυλάκι αγκυροβόλησης» της κινάσης αναγνωρίζει στο υπόστρωμα την ακολουθία R-R-R-E-R-S-P-T-R (184-197 α.α.-docking motif) που βρίσκεται μεταξύ των περιοχών RRM και RS και που είναι υπεύθυνη για την «αγκυροβόληση» του υποστρώματος σ' αυτό. Το πεπτίδιο αυτό εκτός από το ότι κατευθύνει τον τρόπο φωσφορυλίωσης του υποστρώματος είναι υπεύθυνο και για (α) τον εντοπισμό του υποστρώματος και (β) τον περιορισμό της φωσφορυλίωσης του ASF/SF2 από την SRPK1 μόνο στις 8-10 σερίνες των RS-διπεπτιδίων μεταξύ των βάσεων 199-227 στο αμινοτελικό άκρο της RS αλληλουχίας που αποτελούν το RS1 (53).

Όσον αφορά την φωσφορυλίωση των RS παραγόντων ματίσματος έχει γίνει σύγκριση της ικανότητας φωσφορυλίωσης του ASF/SF2 από τις Clk1 και SRPK1 *in vitro*. Τα γενικά συμπεράσματα ήταν ότι και οι δύο κινάσες φωσφορυλιώνουν την RS ακολουθία του ASF/SF2 αν και η ειδική δραστηριότητα της SRPK1 υπήρξε μεγαλύτερη κατά 150 φορές από αυτή της Clk1 ενώ οι Km είναι παρόμοιες (0.28μM για την SRPK1 και 0.40μM για την Clk1) (49). Το γεγονός αυτό αποδίδεται στην ύπαρξη του RS μοτίβου στο μόριο της Clk1 όπου η πιθανή αλληλεπίδρασή του με το αντίστοιχο του ASF/SF2 συμβάλλει στη δυσκολία αποσύζευξης της κινάσης μετά την φωσφορυλίωση του ASF/SF2, κάτι που δεν συμβαίνει στην περίπτωση της SRPK1 (49).



Εικόνα 11 : Απεικόνιση στον χώρο της κινάσης SRPK1 με το υπόστρωμά της στο «αλλάκι αγκυροβόλησης» (53).

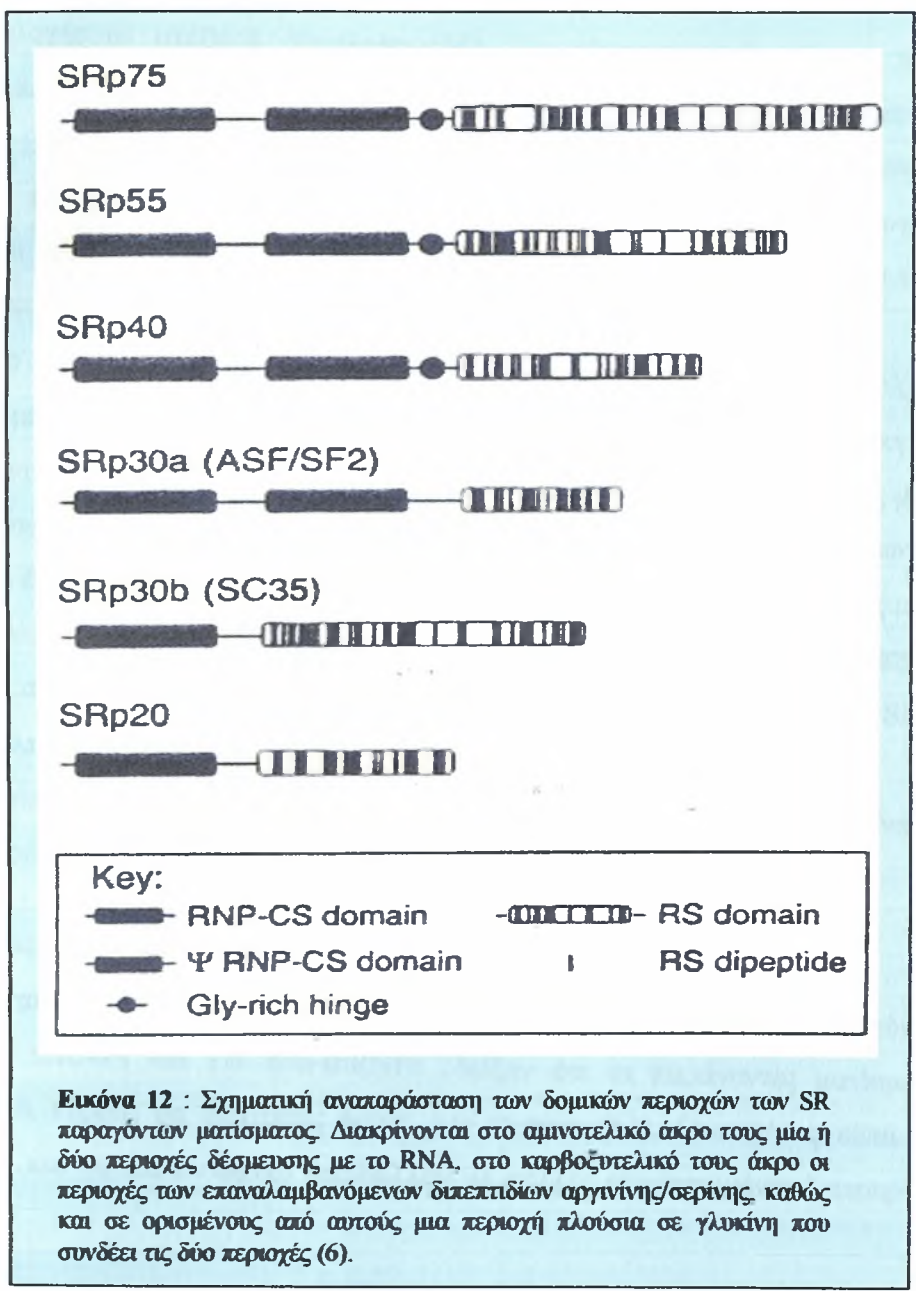
ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΤΩΝ SRPK ΚΑΙ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΟΙ ΡΟΛΟΙ ΤΟΥΣ

Πρωτεΐνες SR

Οι λεγόμενες πρωτεΐνες SR (SR proteins) είναι μία ομάδα πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μάτισμα. Οι παράγοντες ματίσματος που περιέχουν SR ανήκουν στην οικογένεια των φωσφοπρωτεϊνών και χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη αποτελείται από μη μικρές πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες (non small nuclear ribonucleoprotein particles- non snRNPs), και ονομάζεται “SR πρωτεΐνες ή SRp” και η δεύτερη αποτελείται από μικρές πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες (small nuclear ribonucleoprotein particles-snRNPs) που ονομάζονται “SR πολυπεπτίδια που σχετίζονται με τις SR πρωτεΐνες” (SR protein-related polypeptides SRrp). Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι πρωτεΐνες ASF/SF2, SC35, και άλλα τέσσερα πολυπεπτίδια με μοριακές μάζες 20, 40, 55 και 75 kDa αντίστοιχα, καθώς και p54, 9G8, κ.α. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τους παράγοντες ματίσματος U1 70K, U2AF65, U2AF35, SRm 160/300 (SR-related nuclear matrix proteins 160kDa και 300kDa αντίστοιχα), HRH1, Clk-1, Clk-2, Clk-3, και τους ρυθμιστές του ματίσματος Tra, Tra-2 κ.α. (54).

Κοινό χαρακτηριστικό των SR πρωτεϊνών, είναι ότι στο άμινοτελικό τους άκρο περιέχουν μία ή δύο περιοχές αναγνώρισης του RNA (RNA Recognition Motifs, RRM), στο καρβοξυτελικό επαναλαμβανόμενα διπεπτίδια αργινίνη/σερίνης (RS-domain) καθώς και σε ορισμένους από αυτούς μια περιοχή πλούσια σε γλυκίνη που

συνδέει τις δύο περιοχές (εικόνα 12). Οι περιοχές RRM είναι υπεύθυνες για την αλληλεπίδρασή τους με το pre-mRNA (RNA binding domain) και το υποχρεώνουν να μπει στην διαδικασία του ματίσματος (63). Μελέτες έδειξαν ότι η καρβοξυτελική περιοχή τους που είναι πλούσια σε επαναλαμβανόμενα διπεπτίδια σερίνης/αργινίνης είναι αναγκαία για την μεταφορά των mRNAs μεταξύ των διαμερισμάτων αλλά όχι ικανή χωρίς την παρουσία της περιοχής RRM που μεσολαβεί για την πρόσδεση του RNA στο μόριο της SR-πρωτεΐνης (55). Επίσης η περιοχή RRM παίζει σπουδαίο ρόλο στην εξειδίκευση στο εναλλακτικό μάτισμα. Η αποκοπή της δεν επηρεάζει την ενεργή διαμόρφωση της πρωτεΐνης αλλά αλλάζει την επιλογή της 5' περιοχής του ματίσματος (56).



Οι παράγοντες ματίσματος αποτελούν τα πιο καλά μελετημένα υποστρώματα της οικογένειας των SRPK (57). Αρχικά διαπιστώθηκε ότι οι SR πρωτεΐνες εμπλέκονται στο ιδιοσυστατικό και στο εναλλακτικό μάτισμα του pre-mRNA (6) και πρόσφατα εμπλέκονται και στην μεταφορά του mRNA (6,11,14,15) στην σταθερότητά του και στην μετάφραση.

Οι SR πρωτεΐνες συμμετέχουν συνοπτικά σε τρία στάδια δημιουργίας του σωματίου του ματίσματος: (1^ο) συνεργάζονται με την πρωτεΐνη U1snRNP στον καθορισμό μίας λειτουργικής 5' θέσης, (2^ο) αναγνωρίζουν τους ενισχυτές ματίσματος των εξονίων ESEs (exonic splicing enhancers) και αλληλεπιδρούν με το ετεροδιμερές U2AF για να προάγουν/σταθεροποιήσουν το σύμπλεγμα που δημιουργείται στην 3' θέση και τέλος (3^ο) σχηματίζουν γέφυρες μεταξύ των 3' και 5' θέσεων με σκοπό να συναρμολογήσουν σταθερά σύμπλοκα (54). Στο ιδιοσυστατικό μάτισμα αυτή η διαδικασία (1^ο και 2^ο στάδιο) γίνεται ιδιοσυστατικά ενώ στο εναλλακτικό μετά από ρύθμιση (59). Είναι προφανές ότι οι SR πρωτεΐνες θεωρούνται σημαντικές στην ρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος διότι παίζουν ρόλο στην επιλογή και ταίριασμα των λειτουργικών θέσεων ματίσματος στην περίπτωση αυτού του τρόπου ματίσματος των pre-mRNAs (6, 57).

Το εναλλακτικό μάτισμα είναι μια διαδικασία κατά την οποία πολλαπλά mRNAs μπορούν να προκύψουν από το ίδιο pre-mRNA αλλά από διαφορετική σύζευξη των 5' και 3' θέσεων ματίσματος. Ο εναλλακτικός τρόπος ματίσματος μπορεί να δημιουργήσει πολλαπλά μετάγραφα που όταν κωδικοποιηθούν σε πρωτεΐνες μπορεί να έχουν λεπτές έως και αντιτιθέμενες λειτουργικές διαφορές οι οποίες με την σειρά τους μπορούν να παρουσιάσουν δραματικές βιολογικές συνέπειες και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις σχετικές συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών SR και από τις αλληλεπιδράσεις τους (60).

Ο τρόπος αυτός ματίσματος συνεισφέρει στην ποικιλομορφία των πρωτεϊνών με πολλούς τρόπους.

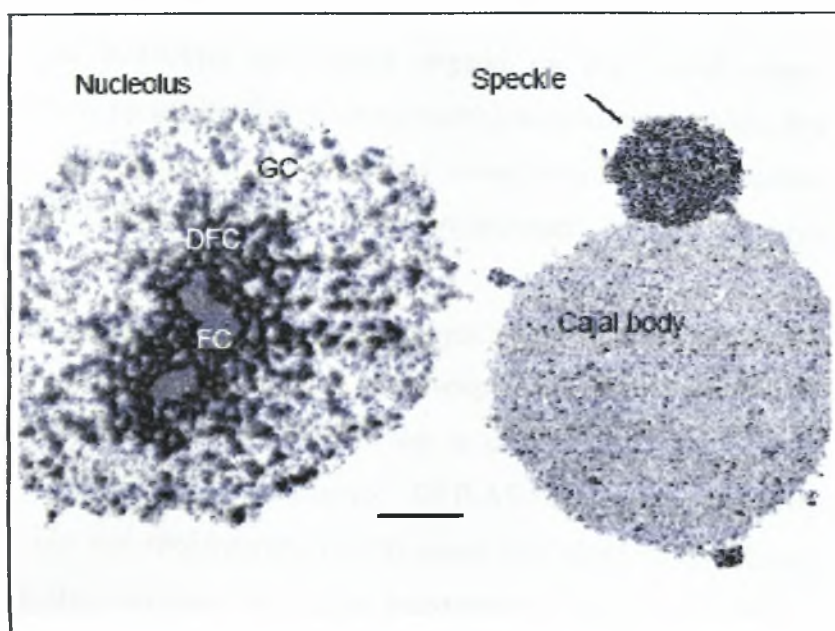
Εντοπισμός των πρωτεϊνών SR

Μετά από μελέτες εντοπισμού που έγιναν χρησιμοποιώντας αντισώματα ειδικά για snRNPs και για non-snRNPs έδειξαν ότι οι παράγοντες ματίσματος εντοπίζονται κυρίως σε ιδιαίτερες δομές του πυρήνα (61). Ο πυρήνας είναι ένα πολύπλοκο και υψηλά δυναμικό περιβάλλον με πολλές εξειδικευμένες λειτουργικά

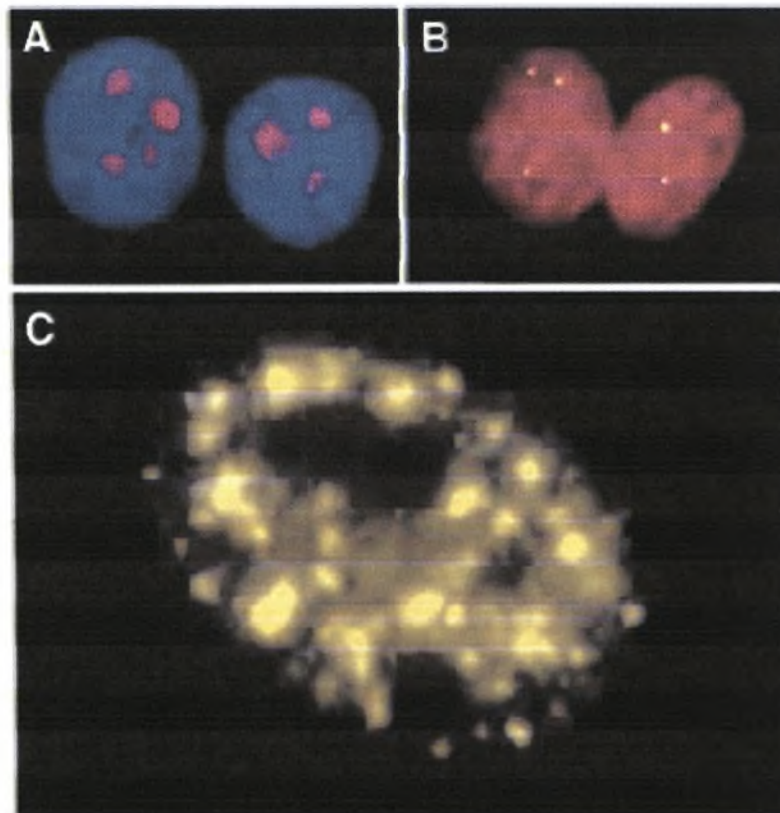
περιοχές που σχηματίζονται και διατηρούνται απουσία μεμβρανών. Το εσωτερικό του πυρήνα περιέχει πληθώρα υποδομών των οποίων ο ρόλος δεν έχει διασαφηνιστεί. Εκτός των χρωμοσωμάτων τα οποία είναι οργανωμένα χωροταξικά μέσα στον πυρήνα το δεύτερο πιο καλά μελετημένο οργανίδιο είναι ο πυρηνίσκος. Στο νουκλεόπλασμα υπάρχουν επίσης διάφορες δομές όπως τα σωμάτια PML (Promyelotic Leukemia Bodies), τα gems, τα σνουρποσωμάτια (snurposome) αλλά αυτά στα οποία θα αναφερθούμε κυρίως είναι τα σπειρωμένα σωμάτια (coiled bodies ή Cajal bodies) και οι πυρηνικές κηλίδες (nuclear speckles) (62) (εικόνες 13,14).

Τα σπειρωμένα σωμάτια περιέχουν πολλά μόρια που βοηθούν στην βιογένεση του RNA. Μέσα σ' αυτά περιέχεται η πολυαδενυλιωμένη μορφή της RNA πολυμεράσης II (RNAP), διάφοροι παράγοντες απαραίτητοι για τη μεταγραφή, το μάτισμα, και την πολυαδενυλίωση, η πρωτεΐνη κολίνη (coilin) και ο παράγοντας ματίσματος U7-snRNP (71). Στις δομές αυτές συμβαίνει (α) η συγκρότηση των επιμέρους συμπλεγμάτων του ματίσματος, όπως του τριμερούς U4/U6-U5 tri-snRNP και (β) τα τελευταία στάδια της βιογένεσης της μονάδος U2 snRNP. Όπως και στις κηλίδες έτσι και στα σπειρωμένα σωμάτια οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως η φωσφορυλίωση επηρεάζουν τον εντοπισμό τους (64).

Οι πυρηνικές κηλίδες καταλαμβάνουν το 20% του πυρηνικού όγκου και στην αρχή καθορίστηκαν από την παρουσία μεγάλων συγκεντρώσεων παραγόντων ματίσματος. Για τον λόγο αυτό ονομάζονται και «SC35 περιοχές» ή διαμερίσματα των παραγόντων ματίσματος (splicing factor compartments-SFC's). Οι κηλίδες έχουν ακανόνιστο σχήμα και διάμετρο 0,5-1,5μm όπως φαίνονται από το μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού και σ' ένα πυρήνα θηλαστικού κυττάρου στην μεσόφαση παρατηρούνται 25-50 κηλίδες. Στην προσπάθεια να αναλύσουν την σύνθεση των κηλίδων έγινε ανάλυση των πρωτεϊνών τους που έδειξε ότι σ' αυτές περιέχονται περίπου 150 πρωτεΐνες (65). Εκτός των παραγόντων ματίσματος βρέθηκαν και παράγοντες μεταγραφής, ριβοσωμικές πρωτεΐνες και παράγοντες επεξεργασίας του 3' άκρου του RNA, ο παράγοντας έναρξης της μετάφρασης eIF4E, μία πρωτεΐνη αναστολής της μετάφρασης eIF4AIII (eukaryotic translation initiation factor 4AIII) και δομικές πρωτεΐνες της εσωτερικής επιφάνειας του πυρηνικού φακέλου όπως η λαμίνη A. Επίσης ενώ η μεταγραφή δεν συμβαίνει στις κηλίδες και το DNA δεν εντοπίζεται σ' αυτές βρέθηκαν διάφορες υπομονάδες της RNA πολυμεράσης II (66).



Εικόνα 13: Φωτογραφία με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο των υποπυρηνικών δομών : Nucleolus, Speckle, Cajal body (71).



Εικόνα 14: Πυρηνικά υποδιαμερίσματα (Α) Ο πυρηνίσκος (πορφυρό), (Β) τα σπειρωμένα σωμάτια Cajal Bodies (κίτρινα) και (C) οι κηλίδες (κίτρινες) (62).

Μορφολογικά το μεγαλύτερο μέρος των κηλίδων αντιστοιχεί σε διαχρωματινικά κοκκία χρωματίνης διαμέτρου 20-25nm (Interchromatin granule clusters-IGCs) και φαίνονται να ενώνονται σε μερικά σημεία με ένα λεπτό νήμα. Περιφερικά παρατηρήθηκαν με την βοήθεια ηλεκτρονικού μικροσκοπίου ινώδεις δομές διαμέτρου 3-5 nm έξω από τις κηλίδες που ονομάστηκαν περιχρωματινικά νημάτια Perichromatin fibrils (PFs). Σ' αυτές εντοπίστηκαν κυρίως νεοσυντιθέμενα pre-mRNA.

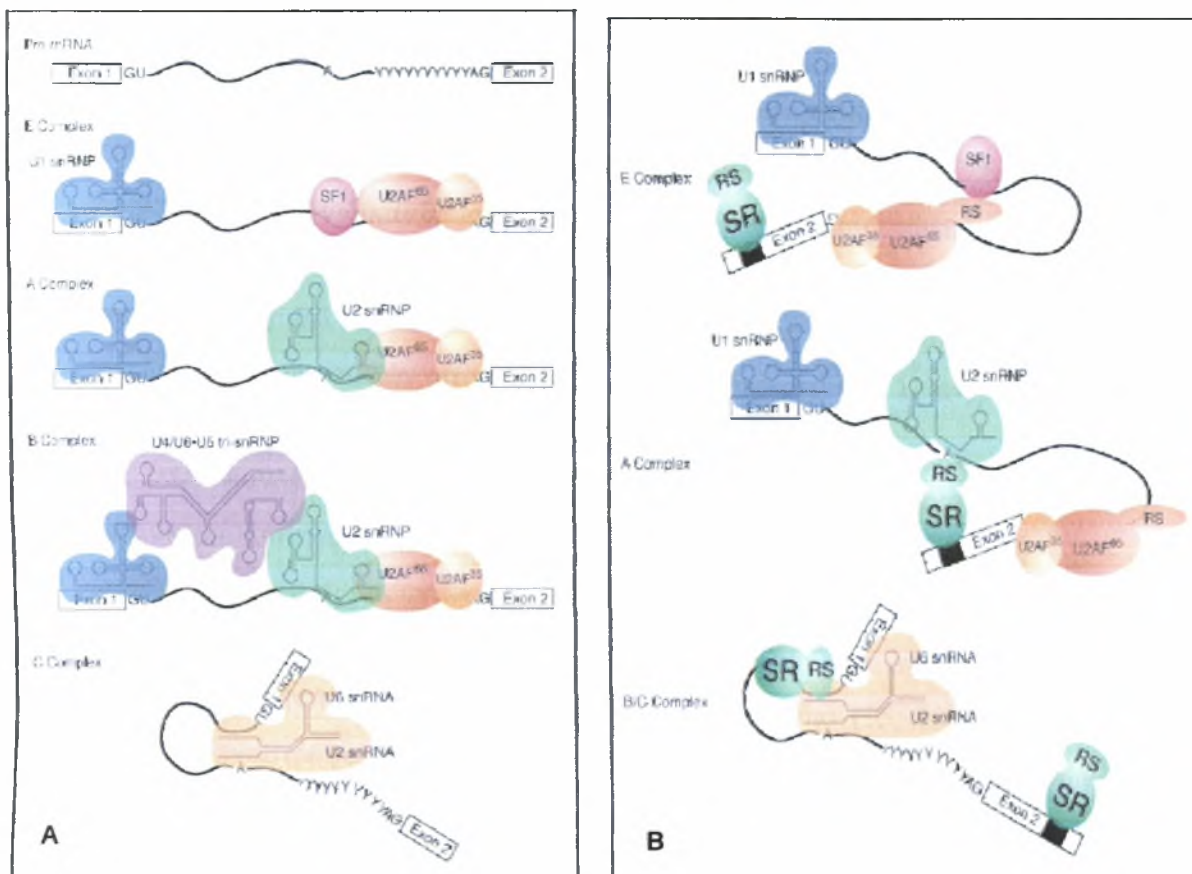
Παρόλα αυτά κάποιοι από τους παράγοντες ματίσματος εντοπίζονται εκτός του πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα και πηγαиноέρχονται μεταξύ των δύο διαμερισμάτων (36, 54). Κινητικές μελέτες έδειξαν ότι ο μεγαλύτερος χρόνος παραμονής στις κηλίδες του παράγοντα ματίσματος GFP-ASF/SF2 ήταν μικρότερος των 45 δευτερολέπτων και τουλάχιστον 10.000 μόρια του χάνονται ανά δευτερόλεπτο από την κηλίδα στο κύτταρο ενώ άλλα επιστρέφουν επιφέροντας την ισορροπία σε λιγότερο από 2 λεπτά (62). Το ερώτημα πως γίνεται η ανταλλαγή των παραγόντων που εντοπίζονται στις κηλίδες οδήγησε στην σκέψη ότι κάποιο ένζυμο είναι υπεύθυνο για την φωσφορυλίωση των παραγόντων αυτών και αργότερα στην απάντηση με την ταυτοποίηση της SRPK1 κινάσης. Η φωσφορυλίωση/αποφωσφορυλίωση καθορίζει τη βασική ταχύτητα ανταλλαγής των παραγόντων που εντοπίζονται στις κηλίδες.

Ρύθμιση της έκφρασης των παραγόντων ματίσματος-Ρόλος της φωσφορυλίωσής τους.

Η ρύθμιση της έκφρασης των SR-πρωτεϊνών γίνεται σε μεταγραφικό αλλά και σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Σε μεταγραφικό επίπεδο η έκφραση μερικών παραγόντων ρυθμίζεται από το εναλλακτικό μάτισμα. Στην δεύτερη περίπτωση ανήκει η φωσφορυλίωση και η αποφωσφορυλίωση τους. Η τροποποίηση που επέρχεται από την φωσφορυλίωσή τους είναι κρίσιμη διότι επηρεάζει τις ιδιότητες της RS περιοχής.

Οι RS περιοχές είναι υπεύθυνες για : (α) τις αλληλεπιδράσεις με άλλους παράγοντες ματίσματος, (β) τις άμεσες αλληλεπιδράσεις με το RNA και πρόσδεσή τους σ' αυτό σε συγκροτημένα σωματία ματίσματος (69, 70) (εικόνα 15), (γ) τον υποπυρηνικό κυτταρικό εντοπισμό των SR πρωτεϊνών, (δ) την είσοδο και έξοδό τους

μεταξύ κυτταροπλάσματος-πυρήνα και τέλος (ε) την μεταφορά του mRNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα.



Εικόνα 15 : Μοριακά μοντέλα της αντίδρασης του ματίσματος.

A. Δημιουργία του συμπλέγματος του ματίσματος μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων.

Το σύμπλεγμα E περιέχει την πρωτεΐνη U1snRNP η οποία συνδέεται με την 5' θέση του pre-mRNA, ενώ ο παράγοντας SF1 συνδέεται στο σημείο διακλάδωσης. Οι παράγοντες U2AF65 και U2AF35 αλληλεπιδρούν με την 3' θέση και την ακολουθία της πολυπυριμιδίνης. Στο A σύμπλεγμα ο SF1 αντικαθίσταται με την πρωτεΐνη U2snRNP στο σημείο διακλάδωσης. Η μονάδα U4/U6-U5 tri-snRNP μέσω αλληλεπιδράσεων συμβάλει στον σχηματισμό του B συμπλέγματος. Τελικά μία ανακατανομή οδηγεί στο C σύμπλεγμα το οποίο είναι καταλυτικά ενεργό όπου οι πρωτεΐνες U2 και U6 αλληλεπιδρούν και η U6 αντικαθιστά την U1 στην θέση 5'.

B. Δημιουργία του συμπλέγματος του ματίσματος μέσω διαδοχικών άμεσων αλληλεπιδράσεων των RS περιοχών με το pre-mRNA.

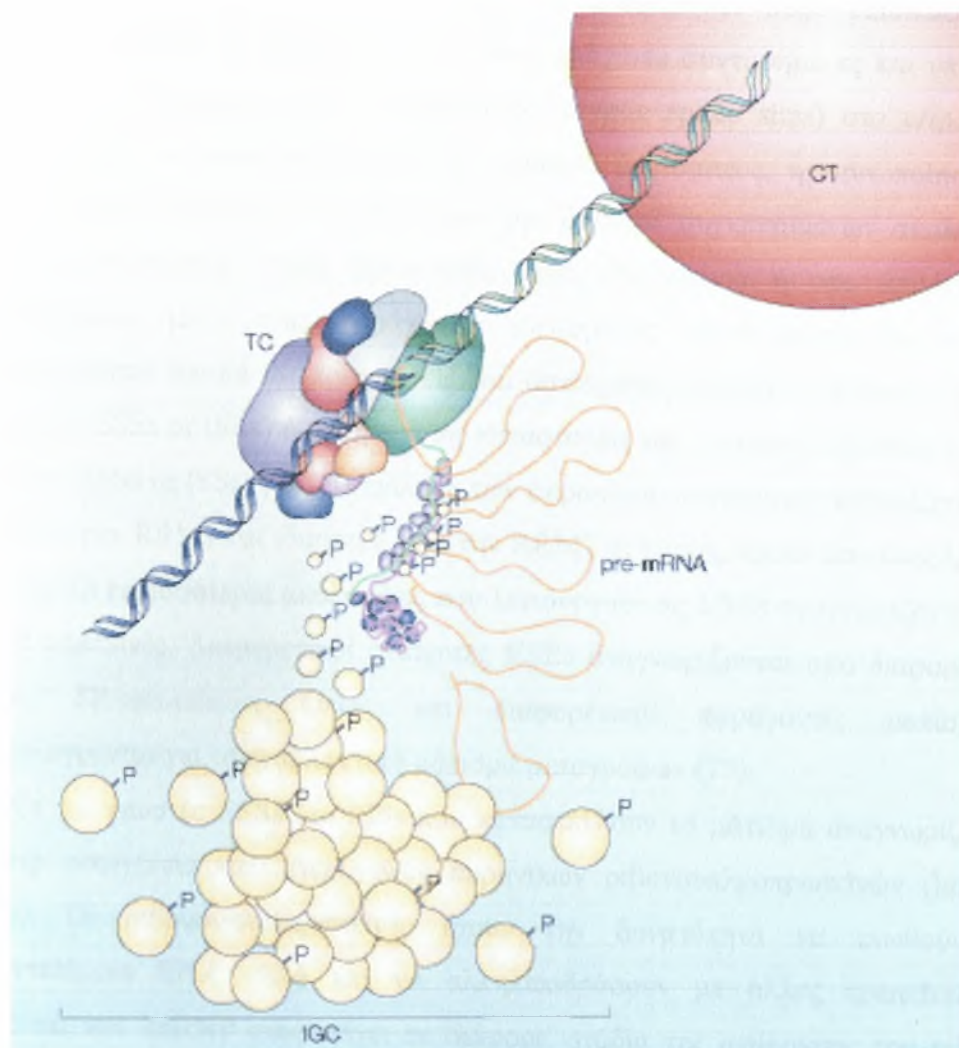
Στο σύμπλεγμα E η RS-περιοχή του U2AF65 έρχεται σε επαφή με το σημείο διακλάδωσης. Στο A σύμπλεγμα αυτή η περιοχή αντικαθίσταται με την ομόνυμη περιοχή της SR πρωτεΐνης που βρίσκεται προσδεσμένη στον προαγωγέα του ματίσματος (ESE). Στα τελευταία συμπλέγματα μία άλλη RS περιοχή από δεύτερη SR πρωτεΐνη ενώνεται με την 5' θέση του pre-mRNA ενώ ταυτόχρονα αλληλεπιδρά και με την μονάδα U6snRNA. Διαδοχικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ RS περιοχών και pre-mRNA (201).

α) Η φωσφορυλίωση των παραγόντων ματίσματος από την οικογένεια των SR κινασών πρωτεϊνών, επάγει τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις ώστε αυτοί να συγκροτήσουν ένα πλήρως λειτουργικό σύμπλοκο κατά τα αρχικά στάδια της διαδικασίας ματίσματος του pre-mRNA (11,75). Πιο συγκεκριμένα οι φωσφορυλιωμένες σερίνες επηρεάζουν την ικανότητα πρόσδεσης στο RNA των SR-πρωτεϊνών και εμποδίζουν τις μη εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις (72). Αφού όμως ολοκληρωθεί η διαδικασία συγκρότησης του συμπλόκου, είναι απαραίτητη η αποφωσφορυλίωση των παραγόντων ματίσματος ώστε το σωματίδιο ματίσματος να αποσυναρμολογηθεί και να προχωρήσει η αντίδραση του ματίσματος περαιτέρω (73). Η επίδραση φωσφατασών στο στάδιο αυτό επαναφέρει την λειτουργικότητα του συμπλόκου στα φυσιολογικά επίπεδα (εικόνα 16).

Στην ικανότητα των κινασών να προάγουν την συγκρότηση του εν λόγω συμπλόκου, συνηγορούν και δεδομένα τα οποία δείχνουν, ότι με μη φωσφορυλιωμένους παράγοντες ματίσματος ή με την παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων φωσφατασών πρωτεϊνών, το σύμπλοκο δεν συγκροτείται και το μάτισμα του mRNA αναστέλλεται στο αρχικό του στάδιο (15, 73). Η κατάσταση αυτή είναι αναστρέψιμη με προσθήκη αναστολέων φωσφατασών πρωτεϊνών και φωσφορυλίωση των παραγόντων ματίσματος. Παρόλα αυτά όμως έχει δειχθεί ότι μετά την συγκρότηση του συμπλόκου, η παρουσία μεγάλων συγκεντρώσεων SRPK1 και η απουσία φωσφατασών, οδηγούν στην αναστολή του ματίσματος του mRNA (15,73).

Τα παραπάνω συνηγορούν στην σημασία της ρυθμιζόμενης δραστηριότητας των SR κινασών πρωτεϊνών καθώς η δράση τους είναι απαραίτητη μόνο κατά τα αρχικά της στάδια του ματίσματος, ενώ για την ολοκλήρωση της διαδικασίας η δράση τους είναι ανεπιθύμητη καθώς οδηγεί σε αναστολή (15, 73, 74). Ο κύκλος φωσφορυλίωσης-αποφωσφορυλίωσης των RS-περιοχών ρυθμίζει τον κύκλο του ματίσματος.

β) Η φωσφορυλίωση επηρεάζει επίσης την ικανότητα πρόσδεσης των SR-πρωτεϊνών στο RNA. Οι παράγοντες ματίσματος λαμβάνουν μέρος σε ένα βασικό πρόβλημα στην συρραφή του pre-mRNA, της αναγνώρισης δηλ. των εξονίων των οποίων τα σύνορα είναι επακριβώς ορισμένα (76). Η «μηχανή» του ματίσματος καλείται να αναγνωρίσει τις μικρές ακολουθίες των εξονίων ανάμεσα στις απέραντες



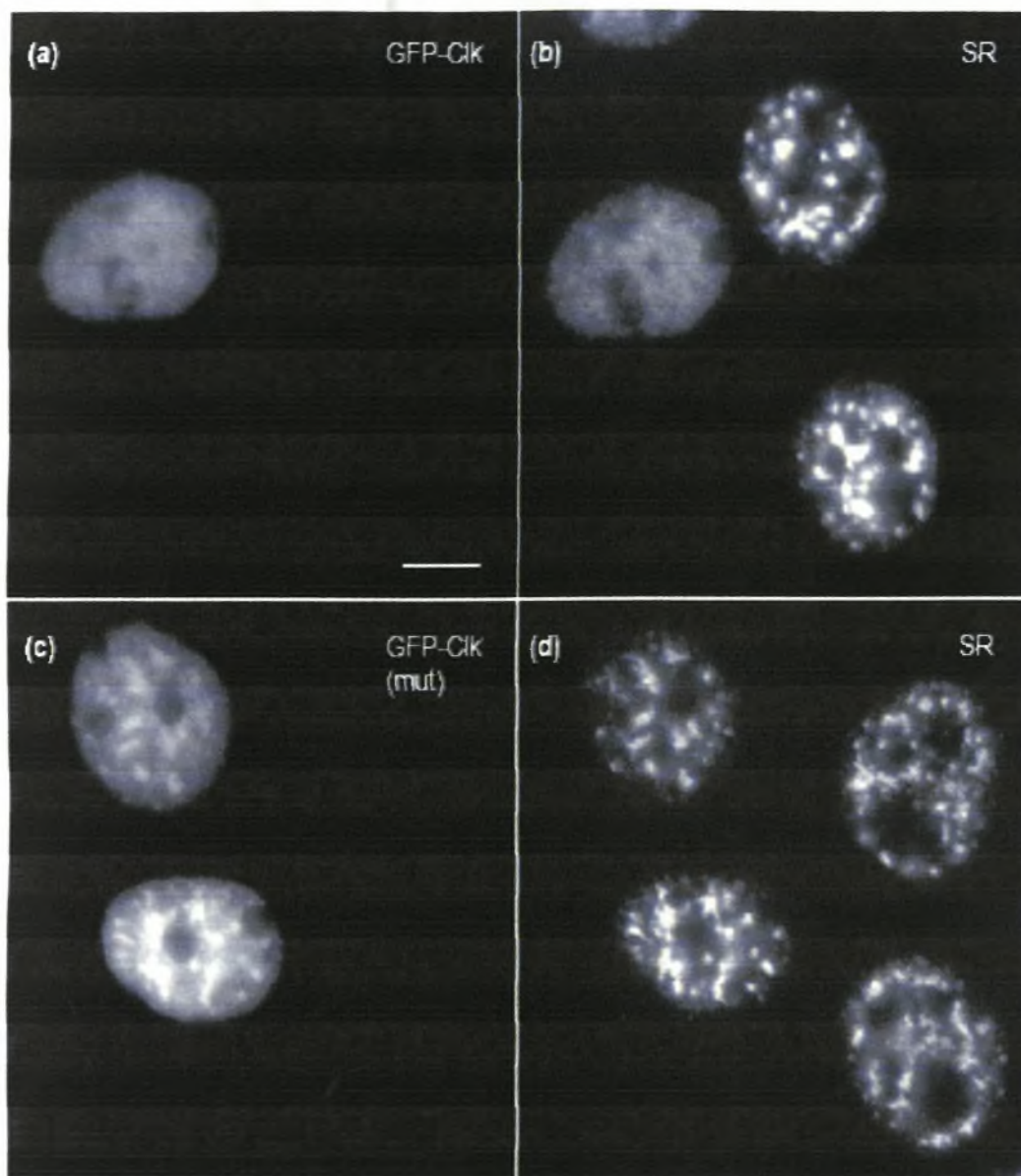
Εικόνα 16 : Σχηματική αναπαράσταση της επίδρασης που έχει η φωσφορυλίωση στην κατανομή των SR παραγόντων ματίσματος. Διακρίνεται η ανταλλαγή των παραγόντων ματίσματος μεταξύ των κηλίδων και του πυρηνοπλάσματος που ρυθμίζεται από την φωσφορυλίωση/αποφωσφορυλίωση. Η φωσφορυλίωση οδηγεί σε απελευθέρωση των παραγόντων ματίσματος από τις κηλίδες (Interchromatin granule clusters-IGC) και τη συγκρότηση συμπλόκου. Η αποφωσφορυλίωση έχει σαν αποτέλεσμα την καταλυτική δραστηριότητα του συμπλόκου που οδηγεί στο μάτισμα του mRNA και την επαναφορά τους στις περιοχές αποθήκευσης. Όπου CT : περιοχή χρωμοσώματος, TC : σύμπλοκο μεταγραφής (66).

ακολουθίες των ιντρονίων. Η αρχική αναγνώριση των θέσεων ματίσματος επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες και περιλαμβάνει «συνομιλία» μεταξύ πολλαπλών αλληλεπιδράσεων που συνεισφέρουν στην δημιουργία του συμπλέγματος E το οποίο υποχρεώνει το pre-mRNA να προχωρήσει στην διαδικασία του ματίσματος. Επειδή οι θέσεις 5' και 3' είναι ελάχιστα συντηρημένες και υπάρχουν επίσης και «κρυμμένες θέσεις ματίσματος» (cryptic splice sites) στα ιντρόνια οι οποίες πρέπει να αποφευχθούν από το σωματίο ματίσματος, η ταυτοποίηση των φυσιολογικών θέσεων επιτυγχάνεται με την βοήθεια συγκεκριμένων ακολουθιών (*cis-acting elements*). Αυτές βρίσκονται μέσα στα εξόνια ή στα ιντρόνια και αλληλεπιδρούν με τους παράγοντες ματίσματος (*trans-acting factors*) και ενεργοποιούνται θετικά ως προαγωγείς του ματίσματος (exonic or intronic splicing enhancers- ESEs or ISEs) ή αρνητικά ως καταστολείς του (exonic or intronic splicing silencers- ESSs or ISSs) (76). Η επιλογή των άκρων του ματίσματος καθορίζεται από την φύση των RRMs και ιδιαίτερα από την RRM2 οι οποίες δρουν σαν ανεξάρτητες μονάδες. Οι περισσότερες ακολουθίες που λειτουργούν ως ESEs αναγνωρίζονται από τις SR-πρωτεΐνες. Διαφορετικοί ενισχυτές ESEs αναγνωρίζονται από διαφορετικές ομάδες SR-πρωτεϊνών. Όπως και διαφορετικοί παράγοντες ματίσματος στρατολογούνται για το εναλλακτικό μάτισμα μεταγράφων (77).

Οι πιο γνωστές ESSs και ISSs που καταστέλλουν το μάτισμα αναγνωρίζονται από την οικογένεια των ετερογενών πυρηνικών ριβονουκλεοπρωτεϊνών (hnRNP family). Οι ριβονουκλεοπρωτεΐνες έχουν την δυνατότητα να ενωθούν με νεοσυντιθέμενα RNA αλλά και να αλληλεπιδράσουν με άλλες πρωτεΐνες. Η οικογένεια των hnRNP συμμετέχει σε διάφορα στάδια της ωρίμανσης του mRNA όπως στο μάτισμα του pre-mRNA (78), στην μεταφορά του mRNA μεταξύ πυρήνα-κυτταροπλάσματος (79), πιθανόν στην μετάφραση (80) και στον διαχωρισμό σε τμήματα του mRNA κατά την εμβρυογένεση (81). Οι μελέτες που έχουν γίνει προτείνουν ότι κάθε τύπος κυττάρου έχει διαφορετικό μωσαϊκό SR πρωτεϊνών και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις που καθορίζουν τις θέσεις του εναλλακτικού ματίσματος (60). Επομένως οι παραλλαγές των σχετικών συγκεντρώσεων των SR-πρωτεϊνών και των hnRNPs αποτελούν σημαντικό ρυθμιστικό παράγοντα του εναλλακτικού ματίσματος (83). Παρατηρήθηκε ακόμη ότι η έκφραση αυτών εξαρτάται από τον ιστό στον οποίο εκφράζονται και από το στάδιο ανάπτυξης του οργανισμού (60, 83).

Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι μερικές SR-πρωτεΐνες δρουν ως καταστολείς του ματίσματος ενώ μερικές hnRNP πρωτεΐνες δρουν σαν ενεργοποιητές του ανάλογα με την περιοχή του RNA που θα προσδεθούν (83, 84). Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις τους μπορούν να ρυθμίσουν την επιλογή των άκρων ματίσματος. Η αντιστρέψιμη φωσφορυλίωση των SR-πρωτεϊνών είναι ένας σημαντικός μηχανισμός που ελέγχει το εναλλακτικό μάτισμα στα θηλαστικά κύτταρα. Έχει όντως διαπιστωθεί ότι το εναλλακτικό μάτισμα *in vivo* μπορεί να ρυθμιστεί (i) από τις τροποποιήσεις των SR-πρωτεϊνών που επιφέρει η φωσφορυλίωση τους, (ii) από την συγκέντρωσή τους (6, 84) και (iii) από τις αλληλεπιδράσεις τους με ακολουθίες του pre-mRNA (ESEs, ESSs, ISEs, ISSs) (60).

γ) Ένας άλλος ρόλος της φωσφορυλίωσης αναφέρεται ότι είναι και η αποσύνδεση των παραγόντων ματίσματος από τις θέσεις αποθήκευσης τους στον πυρήνα (nuclear speckles), όπου βρίσκονται συγκεντρωμένοι σε μεγάλα ανενεργά σύμπλοκα. Οι παράγοντες ματίσματος όπως αναφέρθηκε εντοπίζονται σε κύτταρα που βρίσκονται στην μεσόφαση (α) στις κηλίδες (speckles) και (β) σε περιοχές που ονομάζονται σπειρωμένα σωμάτια (Cajal bodies ή coiled bodies). Η συμπεριφορά των δομών αυτών είναι δυναμική δηλ. το σχήμα, το μέγεθος, και ο αριθμός τους αλλάζει ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου και εάν είναι του ίδιου τύπου τότε ανάλογα με το επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης που βρίσκεται αυτό (66). Όταν η μεταγραφή εμποδίζεται ανεξάρτητα εάν προέρχεται από αναστολέα ή από θερμικό σοκ τότε οι κηλίδες στρογγυλοποιούνται και μεγαλώνουν διότι συσσωρεύεται πλήθος παραγόντων ματίσματος (86). Ενώ όταν η μεταγραφή βρίσκεται σε υψηλό επίπεδο όπως στην περίπτωση μιας μόλυνσης από ιό, οι παράγοντες ματίσματος μειώνονται διότι κατανέμονται στις θέσεις μεταγραφής (87). Η περιοχή RS έχει δειχθεί ότι είναι αναγκαία και ικανή για να κατευθύνει μερικούς από τους παράγοντες ματίσματος στις κηλίδες (56, 88). Η φωσφορυλίωση των SR-πρωτεϊνών τις καθιστά ενεργές και έτσι έχοντας αποκτήσει την «ελεύθερη» δραστική μορφή τους, είναι δυνατή η μεταφορά τους σε ενεργές περιοχές μεταγραφής, συγκεκριμένα στα ινίδια χρωματίνης (PFs) όπου και συμμετέχουν στην καταλυτική διαδικασία παραλαβής του ώριμου mRNA (11, 64, 89) (εικόνα 17).

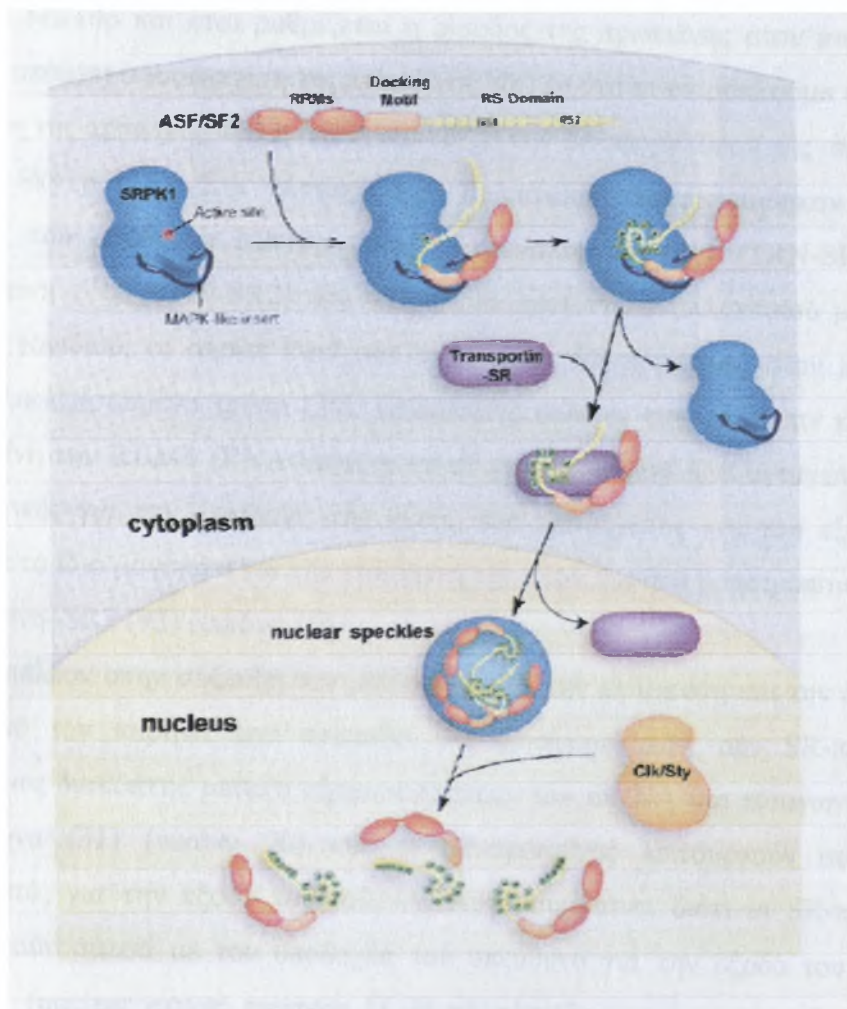


Εικόνα 17: Η φωσφορυλίωση των SR-πρωτεϊνών αλλάζει την δομή και λειτουργία των κηλίδων. Όταν υπερεκφράζεται η κινάση SR GFP-CIk/Sty (a), ο ίδιος πυρήνας παρουσιάζει ανακατανομή του παράγοντα ματίσματος SC35 (b) ενώ οι άλλοι δύο παρουσιάζουν το τυπικό σχέδιο των κηλίδων. Όταν υπερεκφράζεται η ανενεργή GFP-CIk/Sty (c) ο SC35 παραμένει στις κηλίδες (d) (71).

Κατά συνέπεια η φωσφορυλίωση έχει ως αποτέλεσμα την διάσπαρτη κατανομή των SR- πρωτεϊνών κατά την διάρκεια της μίτωσης (9) η οποία συμβαίνει α) με την απομάκρυνση των παραγόντων ματίσματος από τις κηλίδες (μέσω της φωσφορυλίωσης της RS-περιοχής) και (β) με τη σύνδεση τους στις περιοχές της μεταγραφής με το pre-mRNA (90).

δ) Επίσης η κίνηση των SR πρωτεϊνών από το πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και το αντίστροφο επηρεάζεται από την φωσφορυλίωση τους. Παρόλο που οι SR-πρωτεΐνες εντοπίζονται στον πυρήνα σε σταθερή φάση ένα κλάσμα αυτών των πρωτεϊνών (SF2/ASF, Sp20, 9G8) κινείται μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος ενώ ένα άλλο παραμένει στον πυρήνα (SC35, SRp40). Το γεγονός ότι κάποιες από αυτές είναι μεταφερόμενες ενώ κάποιες όχι οδήγησε στο συμπέρασμα ότι παρόλες τις ομοιότητες που έχουν στη δομή και τις βιοχημικές ιδιότητες τους, έχουν μοναδικές λειτουργίες. Για παράδειγμα η SRPK1 φωσφορυλιώνει το μοτίβο RS1 του παράγοντα ματίσματος ASF/SF2 στο κυτταρόπλασμα και έτσι αυτός αντιδρά με τον υποδοχέα Mtr10p που μεσολαβεί για την μεταφορά του στον πυρήνα. Μέσα στον πυρήνα μεταπίπτει στην υποφωσφορυλιωμένη μορφή του η οποία ευνοεί την αποθήκευσή του στις πυρηνικές κηλίδες, όπου φωσφορυλιώνεται περαιτέρω από την Clk1 για να ενεργοποιηθεί και να πάρει μέρος στο μάτισμα. Κατόπιν αποφωσφορυλιώνεται για να προχωρήσει η αντίδραση του ματίσματος και συγχρόνως η υποφωσφορυλιωμένη μορφή του βοηθά για να ενωθεί με τον υποδοχέα TAP του mRNA και να εξαχθούν τα mRNAs στο κυτταρόπλασμα (91) (εικόνα 18).

Αφού εξαχθούν στο κυτταρόπλασμα η εισαγωγή τους ξανά στον πυρήνα γίνεται με φωσφορυλιωεξαρτώμενο τρόπο. Αυτό επιβεβαιώθηκε από μελέτες που έγιναν όπου απουσία της φωσφορυλίωσης που καταλύουν οι SRPK κινάσες οι SR-πρωτεΐνες βρέθηκαν συσσωρευμένες στο κυτταρόπλασμα. Συγκεκριμένα η έκφραση μίας ανενεργούς μεταλλαγμένης μορφής της SRPK2 κινάσης οδηγεί σε συσσώρευση του SF2/ASF στο κυτταρόπλασμα (36). Με την παρατήρηση αυτή διαπιστώθηκε ότι η φωσφορυλίωση των SR πρωτεϊνών από το κυτταροπλασματικό κλάσμα των κινασών, βοηθά σημαντικά στην μετακίνηση τους στον πυρήνα αλλά και στον ενδοπυρηνικό εντοπισμό τους στις διάφορες λειτουργικές ή αποθηκευτικές περιοχές του πυρήνα (89).



Εικόνα 18 : Προτεινόμενο μοντέλο για τον ρόλο της SRPK1 και της Clk/Sty στην φωσφορυλίωση και τον εντοπισμό του παράγοντα ματίσματος ASF/SF2 (53).

Στη ζύμη η κινάση Sky1p που φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη Nr13p (RS-πρωτεΐνη) στο καρβοξυτελικό άκρο της εμπλέκεται στην διαδικασία αυτή. Μέσω αυτής της φωσφορυλίωσης επάγεται η αλληλεπίδραση της Nr13p με τον πυρηνικό υποδοχέα Mtr10p και έτσι ρυθμίζεται η είσοδος της πρωτεΐνης στον πυρήνα (32). Αντίθετα υπάρχει συσώρευση της πρωτεΐνης Nr13p στο κυτταρόπλασμα εάν συμβεί μεθυλίωση της αργινίνης 410 η οποία εμποδίζει την φωσφορυλίωση της σερίνης 411 από την Sky1p (16). Στα κύτταρα των θηλαστικών ταυτοποιήθηκαν ομόλογες πρωτεΐνες του υποδοχέα Mtr10p όπως η τρानσπορτίνη-SR1 (TRN-SR1) και η τρानσπορτίνη-SR2 (TRN-SR2) που αποτελούν προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος του ίδιου γονιδίου, οι οποίες εισάγουν τις τυπικές SR-πρωτεΐνες στον πυρήνα με φωσφορυλιωεξαρτώμενο τρόπο (30). Πρόσφατες μελέτες ταυτοποίησαν και μία μη SR-πρωτεΐνη την RBM4 (RNA-binding motif protein 4) που δρα ανταγωνιστικά με τις αυθεντικές για την επιλογή της θέσης του ματίσματος και του εξονίου και μοιράζεται το ίδιο μονοπάτι για την εισαγωγή της στον πυρήνα χρησιμοποιώντας την τρानσπορτίνη-SR2 (92) (εικόνα 19).

ε) Επιπλέον στην σύζευξη του ματίσματος με την ωρίμανση και την έξοδο του mRNA από τον πυρήνα έχει προταθεί ότι φωσφορυλίωση των SR-πρωτεϊνών λειτουργεί ως διακόπτης μεταξύ «ξεφορτώματος» του mRNA και εισαγωγής αυτών στον πυρήνα (31) (εικόνα 20) και οι SR-πρωτεΐνες λειτουργούν σαν μόρια προσαρμοστές για την έξοδο του mRNA. Αυτό συμβαίνει διότι οι SR-πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν άμεσα με τον υποδοχέα τον υπεύθυνο για την έξοδο του mRNA, TAP/NXF1 (nuclear export receptor 1). Η αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα TAP συμβαίνει με κάποιες ακολουθίες που υπάρχουν στην αμινοτελική RRM περιοχή αφού πρώτα αποφωσφορυλιωθεί η καρβοξυτελική περιοχή των RS. Παρατηρήθηκε ότι ο παράγοντας ASF/SF2 όταν βρίσκεται υποφωσφορυλιωμένος έχει μεγαλύτερη συγγένεια με τον TAP που συνδέεται με ώριμα mRNA ενώ όταν είναι υπερφωσφορυλιωμένος βρίσκεται σε σύμπλοκα με ετερογενείς πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες hnRNPs. Η διαδικασία αυτή ρυθμίζεται από διαφορετική φωσφορυλίωση της RS περιοχής του (91).

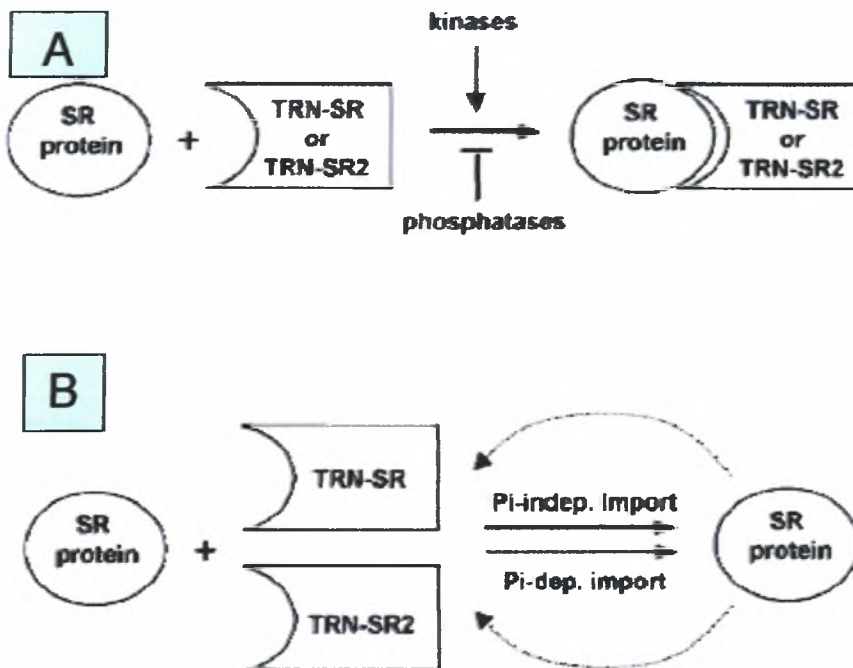
Τα παραπάνω δεδομένα μαζί με άλλα (9, 93) είναι σύμφωνα με το μοντέλο ότι η οικογένεια SRPK εμπλέκεται στην μεταφορά των SR πρωτεϊνών στον πυρήνα ενώ η

αγκυροβολημένη στο πυρήνα Clk/Sty παίζει τον ρόλο του μεσολαβητή για την χρήση των SR πρωτεϊνών στον πυρήνα (51).

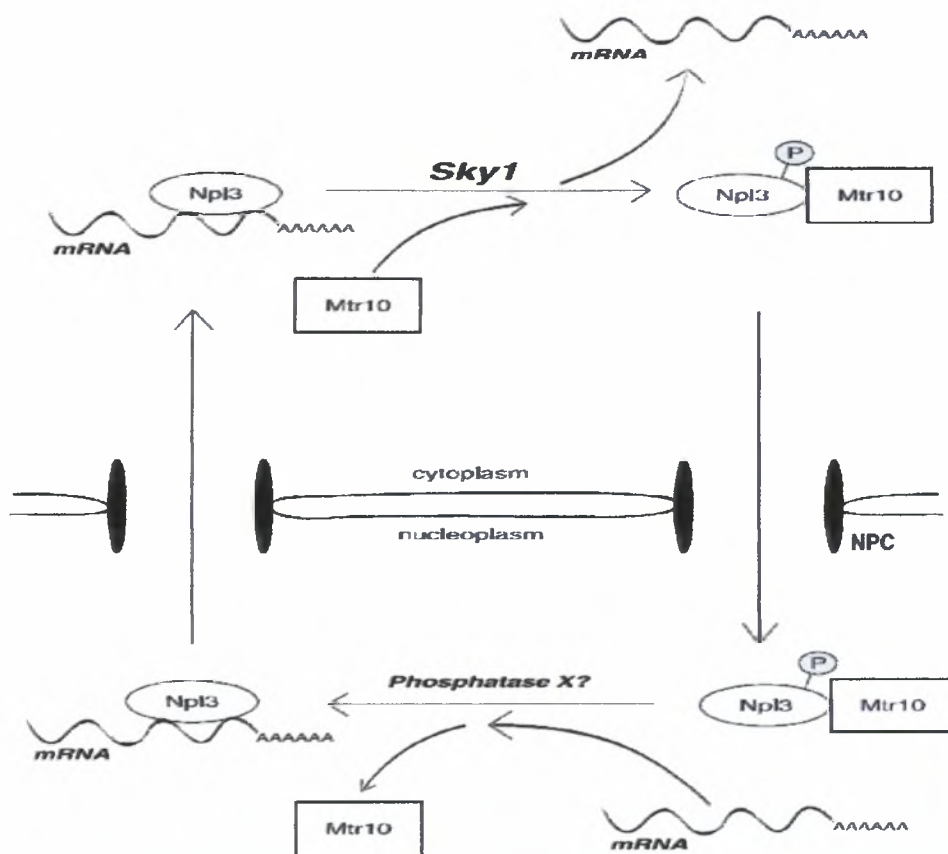
Μία σειρά αντιδράσεων *in vitro* και *in vivo* έδειξαν επίσης ότι η φωσφορυλίωση των SR πρωτεϊνών είναι σημαντική για την αλληλεπίδραση τους με την καρβοξυτελική περιοχή της πολυμεράσης (CTD). Η καρβοξυτελική περιοχή της πολυμεράσης II CTD αποτελείται από 27 επαναλαμβανόμενες επτάδες στον ζαχαρομύκητα και 52 στον άνθρωπο των οποίων η φωσφορυλίωση και αποφωσφορυλίωση τους αποτελεί κρίσιμο μηχανισμό για την λειτουργία της. Η CTD αποτελεί ένα σπουδαίο κρίκο στην σύνθεση του mRNA με το μάτισμά του διότι βρέθηκε να αλληλεπιδρά με τις SR πρωτεΐνες (εικόνα 21). Συγκεκριμένα εάν απαλείψουμε την CTD ή την τροποποιήσουμε τότε η σύνδεση των SR-πρωτεϊνών όπως του ASF/SF2 με τις θέσεις μεταγραφής δεν συμβαίνει (82, 83, 94). Επίσης η απαλειφή της περιοχής επηρεάζει αρνητικά και το μάτισμα του pre-mRNA και την επεξεργασία του 3' άκρου *in vivo* ενώ της μεταγραφής όχι.

Από τα προαναφερόμενα φαίνεται ο πολυσήμαντος ρόλος της αντιστρεπτής φωσφορυλίωσης των SR-πρωτεϊνών στην σύζευξη του ματίσματος με άλλες διαδικασίες που προηγούνται ή που έπονται (31).

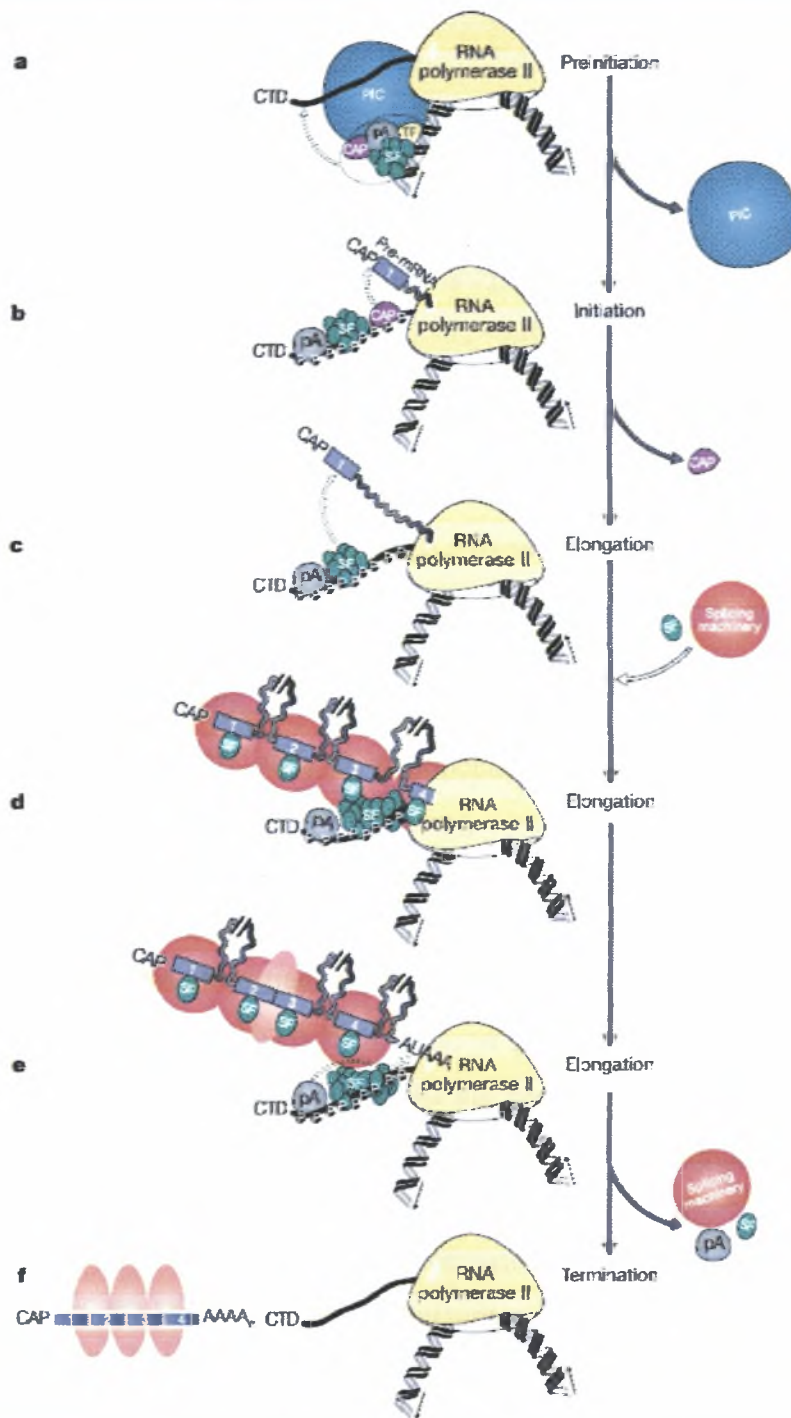
Συνοψίζοντας, οι πρωτεΐνες που περιέχουν RS περιοχές και οι κινάσες αυτών (SRPK) αποτελούν ένα δίκτυο που ρυθμίζει την σύζευξη του ματίσματος, της μεταγραφής, της ωρίμανσης και της εξόδου του mRNA και του κυτταρικού κύκλου στα θηλαστικά (57, 58).



Εικόνα 19 : Μοντέλο για την δυναμική λειτουργική σημασία της εισαγωγής στον πυρήνα των πρωτεϊνών SR. A. Πιθανή ρύθμιση της αλληλεπίδρασης των SR-πρωτεϊνών και των υποδοχέων εισαγωγής από τις κινάσες και τις φωσφατάσες. Η τρανοσπορτίνη-SR1 (TRN-SR1) και η τρανοσπορτίνη-SR2 (TRN-SR2) εισάγουν τις τυπικές SR-πρωτεΐνες στον πυρήνα B. Εναλλακτικά οι εισαγόμενες SR-πρωτεΐνες αλλάζουν την εισαγωγή των υποδοχέων στον πυρήνα και επιτρέπουν ένα μόνο υποσύνολο να εισαχθεί με φωσφορυλιο-εξαρτώμενο ή μη τρόπο (30).



Εικόνα 20 : Ο ρόλος της φωσφορυλίωσης στον πυρηνικό κύκλο μεταφοράς της πρωτεΐνης Np13p. Στο κυτταρόπλασμα η φωσφορυλίωση της Np13p από την Sky1p προωθεί την αποσύνδεση της Np13p από τα εξερχόμενα RNPs. Η αποσύνδεση διευκολύνεται από τη ένωση της Mtr10p στην Np13p. Η φωσφορυλιωμένη Np13p εισέρχεται στον πυρήνα. Στον πυρήνα ενώνεται με καινούργια mRNA και αποχωρίζεται από την Mtr10p. Αυτή η ανταλλαγή της Np13p μπορεί να διεγείρεται και από ατοφωσφορυλίωσή της (32).



Εικόνα 21: Απεικόνιση της σύζευξης μεταγραφής και ματίσματος. Αρχικά σε αυτό το μοντέλο οι παράγοντες i) σχηματισμού καλύπτρας (CAP), ii) του ματίσματος (splicing factors-SF) και iii) της πολυαδενυλίωσης (polyadenylation factors-pA) συναρμολογούνται στο σύμπλεγμα της προετοιμασίας για την μεταγραφή (Preinitiation complex-PIC). (a) Στο στάδιο αυτό ο παράγοντας μεταγραφής (transcription factor-TF) είναι συνδεδεμένος με την μη φωσφορυλιωμένη η καρβοξυτελική περιοχή της της RNA πολυμεράσης II (C-terminal domain-CTD). Στην έναρξη της μεταγραφής η CTD της RNA πολυμεράσης II φωσφορυλιώνεται, το σύμπλεγμα PIC απελευθερώνει τους παράγοντες επεξεργασίας του pre-mRNA και αποχωρίζεται από την CTD. (b) Όπως το DNA ξετυλίγεται στην «μηχανή» της μεταγραφής και τα καινούργια mRNA παράγονται από το κανάλι της RNA πολυμεράσης οι παράγοντες ματίσματος μετακινούνται από την CTD στα εξόνια. (c) Η αλληλεπίδραση μεταξύ των παραγόντων ματίσματος της CTD και των εξονίων διαρκεί μέχρι να αναδυθεί καινούργιο εξόνιο από την RNA πολυμεράση. (d) Αυτή η ένωση παίζει ρόλο στην αναγνώριση του επόμενου εξονίου. Όταν το μάτισμα φτάνει στο τέλος του οι παράγοντες πολυαδενυλίωσης πλησιάζουν. (e) Τέλος η CTD αποφωσφορυλιώνεται, οι παράγοντες ματίσματος απελευθερώνονται και το ώριμο mRNP απελευθερώνεται από την θέση της μεταγραφής (94).

Ο Υποδοχέας της Λαμίνης Β (LBR).

Η εσωτερική πυρηνική μεμβράνη του κυττάρου έχει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και περιέχει εξειδικευμένες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που δημιουργούν θέσεις δέσμευσης πάνω στην μεμβράνη για την ετεροχρωματίνη και την πυρηνική λάμινα (96). Τέτοιες πρωτεΐνες είναι ο Υποδοχέας της λαμίνης Β (LBR, Lamin B Receptor) (97), μία οικογένεια πρωτεϊνών που αναφέρονται ως LAP (Lamina Associated Polypeptides), η εμερίνη καθώς και η πρωτεΐνη MAN1 (98).

Ο LBR θεωρείται ο κυριότερος παράγοντας για την αλληλεπίδραση μεταξύ της χρωματίνης και του πυρηνικού φακέλου διότι η ανοσοαπομάκρυνση του LBR μειώνει δραματικά την ικανότητα σύνδεσης του πυρηνικού φακέλου στην χρωματίνη (99-100). Ο υποδοχέας της λαμίνης Β (Lamin B Receptor LBR ή p58) αποτελεί ακόμη ένα υπόστρωμα της SRPK1 κινάσης. Ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του αποκάλυψε ότι αποτελείται από 8 υδρόφοβες διαμεμβρανικές περιοχές που διαπερνούν την εσωτερική πυρηνική μεμβράνη, καθώς και δύο υδρόφιλες περιοχές στο αμινοτελικό και καρβοξυτελικό του άκρο τα οποία εκτείνονται προς το πυρηνόπλασμα (101-102).

Αν και δεν έχει γίνει συστηματική μελέτη των διαμεμβρανικών τμημάτων της πρωτεΐνης και του καρβοξυτελικού της άκρου, οι ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά του αμινοτελικού της άκρου έχουν μελετηθεί διεξοδικά. Το αμινοτελικό άκρο του υποδοχέα της λαμίνης Β αποτελείται από μία ακολουθία 208 αμινοξέων και έχει σφαιρικό σχήμα. Στο τμήμα αυτό περιέχονται το σήμα πυρηνικού εντοπισμού της πρωτεΐνης (NLS), μία περιοχή επαναλαμβανόμενων διπεπτιδίων αργινίνης/σερίνης (RS domain), καθώς και πιθανές περιοχές δέσμευσης του DNA (103, 104, 106, 107).

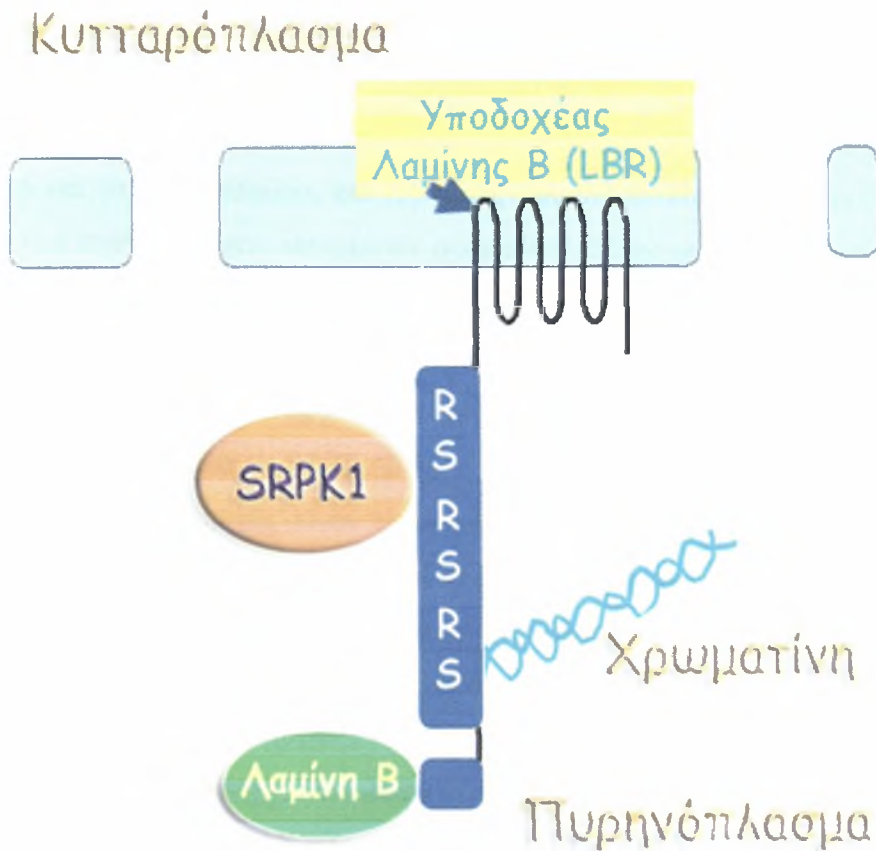
Κατά την απομόνωση του υποδοχέα της λαμίνης Β από ερυθροκύτταρα γαλοπούλας (τα οποία διατηρούν τον πυρήνα κατά την διαφοροποίηση τους), βρέθηκε ότι αυτός σχηματίζει ένα σύμπλοκο το οποίο απαρτίζεται από πολλές πρωτεΐνες του πυρήνα (108). Το σύμπλοκο αυτό περιλαμβάνει εκτός του υποδοχέα, τις λαμίνες τύπου Α και Β, μία εξειδικευμένη δράση κινάσης απέναντι στην ακολουθία αργινίνης/σερίνης του LBR, και άλλες τρεις πρωτεΐνες με μοριακές μάζες 18, 34 και 150 kDa αντίστοιχα (105).

Όσον αφορά την κινάση που απομονώνεται ως μέρος του συμπλόκου LBR αυτή είναι η SRPK1 (21). Η ακολουθία των επαναλαμβανόμενων διπεπτιδίων αργινίνης/σερίνης (⁷⁵RSRSRSRSRS⁸⁴) υπόκειται σε φωσφορυλίωση των σερινών της από την SRPK1. Στην περίπτωση αυτή η φωσφορυλίωση *in vitro* και *in vivo* γίνεται στις θέσεις Ser⁷⁶ Ser⁷⁸ Ser⁸⁰ Ser⁸² Ser⁸⁴ είτε στην μίτωση, είτε στην μεσόφαση (21,106).

Η φωσφορυλίωση του LBR από την SRPK1 ή SRPK1a αυξάνει την ικανότητα δέσμευσης του LBR στην χρωματίνη και η μη φωσφορυλιωμένη μορφή του παρουσιάζει ανάλογα δραστικά μειωμένη ικανότητα δέσμευσης με την λαμίνη B, γεγονός που καταδεικνύει τον σημαντικό ρόλο της φωσφορυλίωσης αυτής στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πυρηνικής μεμβράνης και λάμινας (103,109-110). Παρατηρήθηκε ακόμη ότι η φωσφορυλίωση του LBR από την SRPK1 δεν επιτρέπει την δέσμευση της p32 στον LBR αλλά και η ικανότητα δέσμευσης της SRPK1a στο αμινοτελικό άκρο του LBR ελαττώνεται κατ' αντιστοιχία με την αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης p32. Επομένως η φωσφορυλίωσή του από την SRPK1 ρυθμίζει ή και διατηρεί τις αλληλεπιδράσεις του με την χρωματίνη (110). Αντίθετα η φωσφορυλίωσή του από άλλες κινάσες όπως η cdc2 κινάση μειώνει την ικανότητα δέσμευσης του LBR στην χρωματίνη στην φάση της μίτωσης. Βρέθηκε ότι η εξαρτώμενη από τον κύκλο του κυττάρου ικανότητα δέσμευσης του LBR στην χρωματίνη ρυθμίζεται από την φωσφορυλίωσή της RS περιοχής του και από άλλες κινάσες όπως η πρωτεϊνική κινάση A (109-110). Επίσης το αμινοτελικό άκρο του LBR φωσφορυλιώνεται από την κινάση της καζεΐνης II (109) και συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες του πυρήνα όπως οι ιστόνες H3 και H4 (112) και η πρωταμίνη 1 (39).

Ο μεγάλος αριθμός αλληλεπιδράσεων του αμινοτελικού άκρου του LBR με πρωτεΐνες του πυρήνα του προσδίδουν σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης με την πυρηνική λάμινα. Οι κινάσες SRPK διαμέσου της φωσφορυλίωσης ρυθμίζουν αυτές τις αλληλεπιδράσεις. Επίσης ο LBR αποτελεί και μία θέση «αγκυροβόλησης» της ετεροχρωματίνης. Συνονίζοντας, η φωσφορυλίωση του χαρακτηριστικού μοτίβου στο αμινοτελικό άκρο του υποδοχέα, που συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση αλληλεπιδράσεων μεταξύ του LBR και πρωτεϊνών που γειτονεύουν με τον LBR

(106), στην καθήλωση διαφόρων πυρηνικών πρωτεϊνών στην πυρηνική περιφέρεια με την ταυτόχρονη απομάκρυνση τους από το πυρηνόπλασμα (39) και ρυθμίζει τις αλληλεπιδράσεις του με την χρωματίνη (εικόνα 22).



Εικόνα 22: Σχηματική αναπαράσταση του συμπλόκου του Υποδοχέα της Λαμίνης Β.

Πρωταμίνη P1

Ένα άλλο υπόστρωμα της SRPK1 αποτελεί η πρωταμίνη P1 (22). Ο ρόλος των πρωταμινών είναι η αντικατάσταση των ιστονών κατά την διάρκεια της σπερματογένεσης με αποτέλεσμα να προκύπτει χρωματίνη με πολύ υψηλό βαθμό συμύκνωσης (113). Κατά τα αρχικά στάδια της σπερματογένεσης οι πρωταμίνες φωσφορυλιώνονται στοιχειομετρικά, ενώ αργότερα στα ώριμα σπερματοζώαρια αποφωσφορυλιώνονται στο μεγαλύτερο μέρος τους (68,113). Το γεγονός αυτό

συμφωνεί και με τον υψηλό βαθμό έκφρασης της SRPK1 στα πρώιμα στάδια της σπερματογένεσης (39).

Οι πρωταμίνες είναι πολυπεπτίδια χαμηλού μοριακού βάρους με ισοηλεκτρικό σημείο μεγαλύτερο του 11 (πολύ βασικά) και τα μισά τους αμινοξέα αποτελούνται από αργινίνες. Έχουν περιγραφεί οι πρωταμίνες P1 που υπάρχουν σε όλα τα σπονδυλωτά και οι P2 που βρέθηκαν σε μερικά είδη. Είναι πρωτεΐνες πολύ συντηρημένες κατά την διάρκεια της εξέλιξης και οι πρωταμίνες P1 διαιρούνται σε δύο κατηγορίες: (α) αυτές που δεν περιέχουν κυστεΐνες και συναντώνται στα πτηνά, στα ερπετά και τα μαρσιποφόρα, και (β) αυτές των θηλαστικών με πλακούντα που περιέχουν 6-9 κυστεΐνες που επιτρέπουν στον πυρήνα των γαμετικών κυττάρων να σχηματίζει ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς που σταθεροποιούν την δομή του (113, 114). Όμως και στις δύο κατηγορίες των P1 πρωταμινών περιέχονται επαναλαμβανόμενα διπεπτίδια αργινίνης/σερίνης τα οποία μπορούν να αποτελέσουν στόχο φωσφορυλίωσης από τις SRPK (22).

Επειδή οι RS περιοχές είναι υπεύθυνες για αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών και η πρωταμίνη και ο LBR περιέχουν τέτοια επαναλαμβανόμενα διπεπτίδια και συγχρόνως εντοπίζονται και οι δύο στην περιφέρεια του πυρήνα αναζητήθηκε τυχόν αλληλεπίδρασή τους. Τελικά διαπιστώθηκε ότι η πρωταμίνη P1 συνδέεται με τον LBR αφού πρώτα τροποποιηθεί από την κινάση διότι η μη φωσφορυλιωμένη πρωταμίνη P1 δεν είναι ικανή να δεσμευτεί με το φωσφορυλιωμένο αμινοτελικό άκρο του LBR. Επιπρόσθετα η p32 πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα της λαμίνης B (όπως προαναφέρθηκε) όταν είναι δεσμευμένη μ' αυτόν εμποδίζει την φωσφορυλίωσή του από την SRPK1 αλλά και ανταγωνίζεται την πρωταμίνη P1 για την RS περιοχή του (39). Η SRPK1 φωσφορυλιώνει την ανθρώπινη πρωταμίνη στην Ser⁸ και στην Ser¹⁰. Η φωσφορυλίωση του LBR και της πρωταμίνης από την SRPK1 ανιχνεύθηκε και στο κυτταρόπλασμα και στο πυρήνα σε κύτταρα όρχεων (39).

Παλιότερα είχε προταθεί ότι ο ρόλος της φωσφορυλίωσης διευκολύνει την σωστή σύνδεση των πρωταμινών με το DNA, ενώ η αποφωσφορυλίωση τους κατά τα τελικά στάδια της σπερματογένεσης οδηγεί πιθανότατα σε μία περαιτέρω συμπύκνωση της χρωματίνης (68) ή εναλλακτικά η φωσφορυλίωσή τους αποτελεί προϋπόθεση για την συμπύκνωση της χρωματίνης. Στη συνέχεια διατυπώθηκε η άποψη ότι επειδή υπάρχει μεγάλη συγκέντρωση πρωταμινών και άλλων βασικών

πρωτεϊνών γύρω από το DNA, η φωσφορυλίωση σε συγκεκριμένες θέσεις στο μόριο των P1 πρωταμινών θα μειώνει τις δυνάμεις απώθησης μεταξύ γειτονικών θετικών φορτίων (22). Πρόσφατα αποτελέσματα μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η φωσφορυλίωση της P1 πρωταμίνης είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση της με τον πυρηνικό φάκελο (39). Δεδομένου δε ότι η αντικατάσταση των ιστονών από τις πρωταμίνες γίνεται στην πυρηνική περιφέρεια, η φωσφορυλίωση της P1 πρωταμίνης και η συνεπακόλουθη εντόπιση της στην πυρηνική περιφέρεια, μάλλον συνεισφέρει στην διαδικασία αντικατάστασης. Αντίθετα η αποκόλληση της πρωταμίνης P1 από τον πυρηνικό φάκελο και η πρόσδεσή της στο DNA γίνεται με την αποφωσφορυλίωσή της. Συμφωνούν με αυτή την υπόθεση και τα ευρήματα που βρίσκουν την πρωταμίνη κυρίως αποφωσφορυλιωμένη στην χρωματίνη των ώριμων σπερματοζωαρίων (68,113).

Επιπλέον κάποιες μελέτες έδειξαν ότι και η ομόλογη της SRPK1 στον *S. pombe* Dsk1, η οποία ρυθμίζεται από τον κυτταρικό κύκλο, εμπλέκεται στην ρύθμιση του αποχωρισμού της χρωματίνης μεταξύ των φάσεων μετάφασης/ανάφασης.

Τελικά η φωσφορυλίωση της πρωταμίνης από την SRPK1 ρυθμίζει την αλληλεπίδρασή της με τον LBR και τη σύνδεσή της με την χρωματίνη και τον πυρηνικό φάκελο.

Πρωτεΐνη P2P-R (Proliferation potential protein- related).

Η πρωτεΐνη P2P-R έχει αποδειχθεί ότι είναι προϊόν εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου *p2p-r/pact*. Είναι 250kDa και αποτελεί μία υψηλά βασική πυρηνική πρωτεΐνη με ισοηλεκτρικό σημείο 9,6. Περιέχει πολλά σήματα πυρηνικού εντοπισμού αλλά και μία σειρά από σημαντικές περιοχές. Ξεκινώντας από την αμινοτελική περιοχή και προχωρώντας προς την καρβοξυτελική υπάρχει ένας δάκτυλος ψευδαργύρου, μία περιοχή πλούσια σε προλίνες, μία RS περιοχή και μία περιοχή πλούσια σε λυσίνες. Συγκεκριμένα έχει εξακριβωθεί ότι η ακολουθία 735-908 α.α. προσδένεται στην περιοχή «τσέπης» του Rb1 που αποτελεί ογκοκατασταλτικό παράγοντα ενώ η ακολουθία 1204-1314 αμινοξέα προσδένεται στη καρβοξυτελική ρυθμιστική περιοχή του p53 ενός ακόμη πολύ γνωστού ογκοκαταστολέα (115).

Ο εντοπισμός της πρωτεΐνης αυτής παρουσιάζει αλλαγές ανάλογα με την φάση του κυτταρικού κύκλου. Στην μεσόφαση εντοπίζεται στους πυρηνίσκους και στις πυρηνικές κηλίδες. Στο στάδιο της διαίρεσης στο οποίο οι πυρηνίσκοι δεν υπάρχουν η P2P-R βρίσκεται στην περιφέρεια των χρωμοσωμάτων μαζί με την νουκλεολίνη, την κύρια πρωτεΐνη του πυρηνίσκου και με άλλους παράγοντες. Η P2P-R ανιχνεύεται σε χαμηλά επίπεδα σε κύτταρα στην φάση G₀ ενώ στην μίτωση σε 10 φορές υψηλότερο βαθμό. Έχει προταθεί ότι η P2P-R αποτελεί μέρος μιας καινούργιας οικογένειας πρωτεϊνών που μοιράζονται μία οργανωμένη κοινή περιοχή και έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν το πυρηνικό πλέγμα νουκλεοπρωτεϊνών (116, 128).

Η P2P-R φωσφορυλιώνεται από δύο κινάσες τη μιτωτική cdc2 και την SRPK1a. Η SRPK1a βρέθηκε ότι φωσφορυλιώνει την P2P-R στις RS-περιοχές (117). Οι ακριβείς περιοχές που φωσφορυλιώνεται από τις δύο κινάσες δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί. Είναι πιθανό από τις αλλαγές που παρατηρήθηκαν στον εντοπισμό της P2P-R η πρωτεΐνη να συνδέεται με το πυρηνικό πλέγμα (nuclear matrix) και όντως πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η P2P-R αλληλεπιδρά με δύο παράγοντες των περιοχών πυρηνικού ικριώματος (scaffold/matrix attachments regions - S/MARs) τον SAFB (118) και την νουκλεολίνη (119). Οι περιοχές S/MARs συγκεντρώνονται στις πυρηνικές κηλίδες και στους πυρηνίσκους και αυτό το στοιχείο συμφωνεί και με τον εντοπισμό της P2P-R στην μεσόφαση .

Η υπερέκφραση της P2P-R επιφέρει στάση στη μίτωση στο στάδιο της προμετάφασης ή μιτωτική απόπτωση. Η λειτουργία της P2P-R προκύπτει από τις προαναφερθείσες αλληλεπιδράσεις της και μπορεί να επηρεάζεται από τις τροποποιήσεις που υφίσταται από τις κινάσες. Είναι πιθανόν να επηρεάζει την οργάνωση της χρωματίνης αφού αλληλεπιδρά με τον παράγοντα SAFB (117) και σε αυτό μπορεί να εμπλέκονται και οι παράγοντες p53 και Rb1 με τις οποίες αλληλεπιδρά. Επίσης μπορεί μαζί με την νουκλεολίνη να εντοπίζεται στο πυρηνικό πλέγμα όπου συμβαίνει η διαδικασία της μεταγραφής του rRNA. Στο σύμπλεγμα αυτό πιθανόν ξανά να εμπλέκονται οι παράγοντες p53 και Rb1 άμεσα επηρεάζοντας τις περιοχές MARs ή έμμεσα επηρεάζοντας τους παράγοντες που είναι συνδεδεμένους με αυτές. Παρόλα τα γνωστά μοριακά και βιοχημικά χαρακτηριστικά της P2P-R η κεντρική λειτουργία της δεν έχει διασαφηνιστεί.

Πυρηνική πρωτεΐνη του ιού της ηπατίτιδας Β (HBV core protein)

Ο ιός της ηπατίτιδας Β (HBV) ανήκει στην οικογένεια των Hepadnaviridae και προκαλεί οξεία και χρόνια ηπατίτιδα στον άνθρωπο. Το ώριμο ιοσωμάτιο του HBV αποτελείται από ένα ανεπτυγμένο σφαιρικό νουκλεοκαψίδιο το οποίο περιέχει το DNA του ιού και μία κεντρική πρωτεΐνη 21 kDa (HBV core protein). Η πρωτεΐνη αυτή συναρμολογείται με την βοήθεια δισουλφιδικών δεσμών από διμερή σύμπλοκα της μονομερούς πρωτεΐνης του καψιδίου p21.5 αλλά ο ρόλος της παραμένει άγνωστος.

Πολλές μελέτες έδειξαν ότι η κεντρική πρωτεΐνη HBV φωσφορυλιώνεται σε ανέπαφα κύτταρα. Οι σερίνες των τριών επαναλαμβανόμενων μοτίφ SPRRR που βρίσκονται στην πλούσια σε αργινίνη καρβοξυτελική περιοχή της είναι οι θέσεις της φωσφορυλίωσης (S155, S162, S170). Και επειδή καμία ιική πρωτεΐνη δεν φανερώνει δράση κινάσης η φωσφορυλίωση πρέπει να συμβαίνει από κινάση του ξενιστή. Αρχικά ανιχνεύθηκαν δύο πρωτεΐνες μοριακών βαρών 95 και 115kDa αντίστοιχα. Με την βοήθεια του φασματογράφου μάζας καθαρίστηκε και ταυτοποιήθηκε η 95kDa πρωτεΐνη που ήταν η SRPK1 κινάση. Ενώ με ανοσοανίχνευση βρέθηκε ότι η 115kDa πρωτεΐνη ήταν η SRPK2 κινάση (37, 38). Το μοτίφ της πρωτεΐνης αυτής παρουσιάζει αργινίνη στην P-3 θέση και προλίνη στην P+1. Τα δύο αυτά χαρακτηριστικά έχουν βρεθεί να είναι όμοια με τις προτιμήσεις της SRPK2 στα υποστρώματά της όπως έχει αναφερθεί.

ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΤΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ SRPK.

Στη ζύμη και συγκεκριμένα στον *S. pombe* υπάρχει η ομόλογη της SRPK1 κινάση η Dsk1 η οποία στην αρχή βρέθηκε ως ρυθμιστής της μίτωσης (120) και αργότερα ότι φωσφορυλιώνει πρωτεΐνες που περιέχουν RS περιοχή (121). Μία από αυτές είναι η πρωτεΐνη Prp2/Miss11 που απαιτείται για την διαδικασία του ματίσματος στον σακχαρομύκητα και είναι ομόλογη του ανθρώπινου παράγοντα ματίσματος U2AF65 που φωσφορυλιώνεται από την SRPK1 αντίστοιχα. Επίσης βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη mis11-453, που αποτελεί προϊόν του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου του γονιδίου της πρωτεΐνης Prp2, καταστέλλει τον διαχωρισμό των

χρωμοσωμάτων και αποτελεί υπόστρωμα της Dsk1 (121). Οι άλλες δύο SR-πρωτεΐνες της ζύμης που τροποποιούνται από την Dsk1 είναι οι Srp1 και η Srp2 (Serine-rich RNA polymerase I suppressor protein 1 & 2) (95). Η Dsk1 αποτελεί πρωτεΐνη ιδιαίτερου ενδιαφέροντος διότι όπως προαναφέρθηκε, εκτός της λειτουργίας του ματίσματος λαμβάνει μέρος στην ρύθμιση του αποχωρισμού των χρωμοσωμάτων στο στάδιο της μετάβασης από την μετάφαση στην ανάφαση της μίτωσης. Κατά συνέπεια συγχρονίζει το μάτισμα και τον κυτταρικό κύκλο διαίρεσης. Το ερώτημα που υπάρχει ακόμη είναι εάν η Dsk1 ρυθμίζει το μάτισμα και την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου μέσω διαφορετικών μονοπατιών ή με το να επηρεάζει το μάτισμα και μόνο.

Ένα άλλο μέλος της οικογένειας αυτών των κινασών, η SPK-1, στο νηματοειδές *C. elegans* παίζει ρόλο στην ανάπτυξη των γαμετικών κυττάρων (7). Η SPK-1 δεσμεύεται με την πρωτεΐνη CeSF2 (*C. elegans* splicing factor 2) και την φωσφορυλιώνει *in vitro* (7). Επίσης δείχθηκε ότι η κινάση και το υπόστρωμα της εκφράζονται κυρίως σε γεννητικά κύτταρα του νηματοειδούς *C. elegans* και παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμβρυογένεση του (7).

Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ SRPK1 ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΣΠΕΡΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΑ ΟΡΧΕΩΝ (GERM CELL TUMORS-GCTS) ΕΧΕΙ ΑΜΕΣΗ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΣΤΗΝ CIS-ΠΛΑΤΙΝΗ ΚΑΙ ΜΠΛΕΟΜΥΚΙΝΗ.

Η cis-πλατίνη αποτελεί ένα από τα πιο ενεργά και αποτελεσματικά αντικαρκινικά φάρμακα για την θεραπεία στερεών όγκων όπως του εγκεφάλου, των όρχεων και των ωοθηκών. Οι όγκοι σπερματικών κυττάρων στους άνδρες είναι εξαιρετικά ευαίσθητοι στην χημειοθεραπεία με cis-πλατίνη και μόνο 10% παρουσιάζουν ανθεκτικότητα. Ο λόγος που άλλοι όγκοι αντιδρούν θετικά και άλλοι αρνητικά στην θεραπεία με cis-πλατίνη δεν έχει βρεθεί ακόμη.

Σε μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκε σαν πειραματικό μοντέλο η ζύμη, διαπιστώθηκε ότι το *Sky1* είναι ένα γονίδιο του οποίου η απαλοιφή προκαλεί αντίσταση στην cis-πλατίνη, καρβοπλατίνη, και ανθρακυκλίνη. Στα μεταλλαγμένα κύτταρα της ζύμης με διαγραφή του γονιδίου *Sky1Δ* η έκφραση της ομόλογης ανθρώπινης SRPK1 κινάσης επανέφερε την ευαισθησία στην cis-πλατίνη. Παρατηρήθηκε ακόμη ότι η υπερέκφραση της Sky1p κινάσης στην ζύμη και της

SRPK1 σε κύτταρα θηλαστικών αυξάνει την ευαισθησία στην *cis*-πλατίνη. Τα δεδομένα αυτά οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι το γονίδιο της *Srpkl* προσδίδει ευαισθησία στην *cis*-πλατίνη και μπορεί να παίζει ρόλο στην κλινική εφαρμογή του φαρμάκου.

Τα παραπάνω στοιχεία συμφωνούν και με τα αποτελέσματα μιας άλλης ερευνητικής ομάδας που έδειξε ότι η έκφραση ενός κυρίαρχου αρνητικού αναστολέα της SRPK1 επιφέρει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό μπλεομυκίνη που αποτελεί μέρος της βασικής χημειοθεραπείας στα καρκινικά σπερματοκύτταρα όρχεων (122).

Τελικά και οι δύο μελέτες (122,123) καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η SRPK1 εμπλέκεται στον έλεγχο της ευαισθησίας των κυττάρων σε αντικαρκινικούς παράγοντες.

Η καλύτερη κατανόηση των κυτταρικών μηχανισμών στους οποίους εμπλέκονται οι SRPK θα μας βοηθήσει στην κατανόηση της λειτουργίας των κυττάρων και μακροπρόθεσμα στην φαρμακευτική παρέμβαση.

ΑΛΛΟΙ ΡΟΛΟΙ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ SRPK

Παρ' ότι η δράση των SRPK έχει συνδεθεί στενά με τη δράση των παραγόντων SR και το μάτισμα του mRNA, υπάρχουν δεδομένα που προτείνουν ευρύτερους ρόλους για αυτές. Συγκεκριμένα η έλλειψη των πρωτεϊνών SR στο γονιδίωμα του σακχαρομύκητα και του εναλλακτικού ματίσματος προτείνει ότι οι κινάσες αυτές ρυθμίζουν κυτταρικές διεργασίες διαφορετικές από το μάτισμα όπως φαίνεται από τις πρωτεΐνες της παρακάτω κατηγορίας που δεν περιέχουν μοτίβο RS και η αλληλεπίδραση δεν οφείλεται σε φωσφορυλίωση. Ένα σημαντικό στοιχείο που ενισχύει την άποψη ότι η SRPK1a αλληλεπιδρά και με άλλες πρωτεΐνες εκτός των πρωτεϊνών SR, είναι και τα αποτελέσματα της παρούσης εργασίας από τα οποία δεν προέκυψαν πρωτεΐνες SR και από το ότι η περιοχή της SRPK1a που την χαρακτηρίζει είναι ιδιαίτερα πλούσια σε προλίνες χαρακτηριστικό που έχει περιγραφεί να ευνοεί γενικότερα αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (SH3, WW όπως έχει προαναφερθεί).

Πρωτεΐνη του ιού Herpes simplex virus (HSV-1) ICP27 (124)

Η μόλυνση με κάποιους ιούς μπορεί να επιφέρει αλλαγή στο κυτταρικό mRNA για να ωφεληθεί η έκφραση του ιικού γονιδιώματος. Η πρωτεΐνη του ιού Herpes virus simplex (HSV-1) ICP27 είναι μία πρωτεΐνη πλούσια σε προλίνες στο αμινοτελικό άκρο της (αμινοξέα 59-249) και περιέχει δύο μοτίβα RS (αμινοξέα 254-255, 271-272) όχι όμως συνεχόμενα. Έχει βρεθεί ότι αναστέλλει το μάτισμα του κυττάρου του ξενιστή με αποτέλεσμα να μειώνονται τα επίπεδα των mRNAs που έχουν υποστεί συρραφή και η πρωτεϊνική σύνθεση να σταματά. Βρέθηκε ότι η ICP27 αλληλεπιδρά με την SRPK1 με αποτέλεσμα την υποφωσφορυλίωση των SR πρωτεϊνών. Το γεγονός αυτό έχει ως συνέπεια την αλλαγή στον σχηματισμό του σωματιδίου του ματίσματος. Η ICP27 στρατολογεί την SRPK1 στον πυρήνα όπου εκεί αλλάζει την ικανότητα φωσφορυλίωσης των SR πρωτεϊνών. Έχει βρεθεί ότι η αναστολή του ματίσματος είναι πρόσκαιρη και αντιστρέψιμη και συμβαίνει τις πρώτες ώρες της μόλυνσης. Σε πειράματα *in vitro* με εκχυλίσματα κυττάρων που προετοιμάστηκαν 6 ώρες μετά ή και περισσότερο από την μόλυνση του κυττάρου διαπιστώθηκε ότι το μάτισμα ήταν εφικτό. Υπάρχουν πολλές πιθανές εξηγήσεις για την υποφωσφορυλίωση των SR πρωτεϊνών: (α) η ICP27 μπορεί να συναγωνίζεται τις SR πρωτεΐνες για την πρόσδεσή τους με την SRPK1 οπότε σε αυτήν τη περίπτωση αποτελεί υπόστρωμά της, (β) υπάρχει επίσης η πιθανότητα η ICP27 να αλληλεπιδρά και με τις SR πρωτεΐνες και με την SRPK1 αλλά με διαφορετικές περιοχές της. Η αλληλεπίδρασή της με την κινάση μπορεί να αλλάζει την διαμόρφωση της τελευταίας και αυτό να έχει συνέπεια στη δραστηριότητά της ή η ICP27 να καλύπτει πιθανά σημεία φωσφορυλίωσης των SR πρωτεϊνών. Επιπλέον μελέτες θα διαλευκάνουν τον τρόπο με τον οποίο η ICP27 επηρεάζει τη δράση της SRPK1 (124).

Τοποϊσομεράση IIα

Η τοποϊσομεράση αποτελεί μία από τις χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες της πυρηνικής μήτρας (nuclear scaffold/matrix) (202). Αρχικά η τοποϊσομεράση IIα ταυτοποιήθηκε ως δομικό συστατικό του μιτωτικού κριώματος (scaffold). Λαμβάνει μέρος στη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων αλλά έχει βρεθεί ότι εάν αναστείλουμε

την δράση της μετά την συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων τότε τα κύτταρα παραμένουν στην μετάφαση και οι χρωματίδες αποτυγχάνουν να χωρίσουν. Δεν έχει βρεθεί ακόμη ο μηχανισμός που διεγείρει την λειτουργία της στην μίτωση. Η τοποϊσομεράση II του σακχαρομύκητα αυξάνει την ελίκωση είτε χαλαρών μορφών DNA είτε υπερλικωμένων. Σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης απομονώθηκε μαζί με την SRPK1 και με ακόμη πέντε πρωτεΐνες. Από αυτές οι δύο είναι ATPάσες /ελικάσες [RNA helicase A (RHA), και η RHII/Gu], η μία είναι HMG πρωτεΐνη (SSRP1) και οι άλλες δύο πρωτεΐνες είναι pre-mRNA παράγοντες ματίσματος (PRP8, hnRNP C) (125). Επειδή η τοποϊσομεράση IIα λειτουργεί ως ρυθμιστής της δομής των χρωμοσωμάτων αλλά και της διαμόρφωσής τους, το σύμπλεγμα αυτό ονομάστηκε «τοπόσωμα». Επίσης διευκρινίστηκε ότι η δράση της κινάσης SRPK1 παραμένει ενεργή στο σύμπλεγμα και διατηρεί την εξειδίκευση στα υποστρώματά της αλλά και η σύνδεση της τοποϊσομεράσης IIα στο «τοπόσωμα» δεν αλλάζει την καταλυτική του ικανότητα. Προηγούμενα διαπιστώθηκε ότι το «τοπόσωμα» εμπλέκεται στην διαδικασία προσκόλλησης των κυττάρων (126).

Αξίζει να σημειωθεί ότι τρεις από τις πρωτεΐνες του «τοποσώματος» έχουν ενεργητικό ρόλο στο μάτισμα του pre-mRNA όπως οι παράγοντες ματίσματος PRP8 (κύρια πρωτεΐνη του σωματιδίου ματίσματος) και hnRNP C και η κινάση SRPK1. Μεταξύ αυτών η SRPK1 είναι απαραίτητη για το μάτισμα κάποιων ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου. Ο εντοπισμός της στο «τοπόσωμα» μας αποκαλύπτει μία ακόμη άγνωστη λειτουργία της.

Παρόλο που ο υποκυτταρικός εντοπισμός των ενζύμων αλλάζει δυναμικά κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου όλες οι πρωτεΐνες που συναρμολογούν το «τοπόσωμα» είναι παρούσες κατά την διάρκεια της μίτωσης στον πυρήνα. Η Dsk1 ομόλογη της SRPK1 στον *S. pombe* είναι αποκλειστικά παρούσα στο κυτταρόπλασμα ενώ στην μίτωση εντοπίζεται στον πυρήνα. Σε αντίθεση η ανθρώπινη SRPK1 ανιχνεύεται και στα δύο κυτταρικά διαμερίσματα. Συγκεκριμένα στην μεσόφαση ανιχνεύεται σε μεγάλο βαθμό στο κυτταρόπλασμα ενώ αυξάνεται το ποσοστό της στον πυρήνα στην φάση G2/M όπου συνεντοπίζεται και η φωσφορυλιωμένη μορφή της τοποϊσομεράσης IIα. Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η κινάση SRPK1 εξυπηρετεί ως μεσολαβητής για την συναρμολόγηση του «τοποσώματος» του οποίου

η ενεργότητα ρυθμίζεται από τον κυτταρικό κύκλο με σκοπό να διευκολύνει τον διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων (125).

Ρύθμιση των πολυαμινών και ομοιοστασία των ιόντων.

Πρόσφατες αναφορές εμπλέκουν την κινάση πρωτεϊνών Sky1 της ζύμης *S. cerevisiae* στην ρύθμιση της μεταφοράς πολυαμινών στο κύτταρο καθώς και στην ομοιοστασία ιόντων (19). Δεν είναι γνωστό ακόμη εάν αυτό επιτυγχάνεται διαμέσου της φωσφορυλίωσης ή όχι. Μεταλλαγμένα κύτταρα ζύμης όπου έγινε απαλειφή του γονιδίου *Sky1* ανέπτυξαν μεγάλη ανεκτικότητα σε τοξικές συγκεντρώσεις σπερμίνης. Αυτός ο ανθεκτικός φαινότυπος των κυττάρων χάθηκε με επιμόλυνση των κυττάρων με το γονίδιο που κωδικοποιεί την Sky1p. Επιπρόσθετα, φυσιολογικά κύτταρα που υπερέκφραζαν την Sky1p έδειξαν αυξημένη ευαισθησία στην σπερμίνη. Η απαλειφή του γονιδίου *Sky1* στα κύτταρα της ζύμης έδωσε μειωμένη πρόσληψη σπερμιδίνης και πουτρεσκίνης. Η ίδια μεταλλαγμένη μορφή των κυττάρων έδειξε ακόμα και μία μεγάλη ανεκτικότητα στα ιόντα λιθίου και νατρίου και αυξημένη ευαισθησία στο οσμωτικό σοκ. Η Sky1p αποτελεί ένα μόριο «κλειδί» στην ρύθμιση των πολυαμινών όπως η πουτρεσκίνη, σπερμίνη, σπερμιδίνη και στην ομοιοστασία των ιόντων. Κατ' επέκταση η SRPK1 μπορεί να παίζει ένα ρόλο στην σπερματογένεση μέσω της άμεσης ή έμμεσης ρύθμισης των ενδοκυττάρων συγκεντρώσεων των πολυαμινών (19).

Συνοψίζοντας, τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι κινάσες των SRPK έχουν ευρύτερο ρόλο στην κυτταρική ρύθμιση από ότι πιστευόταν αρχικά. Πολλές από τις προαναφερθείσες αλληλεπιδράσεις της SRPK1 έχουν σχέση με την συμπύκνωση της χρωματίνης (LBR, πρωταμίνη P1, P2P-R). Πιθανώς αυτές οι λειτουργίες της να είναι ανεξάρτητες ή παράπλευρες της ενζυμικής δραστηριότητάς της. Για να δοθεί απάντηση στο παραπάνω ερώτημα πρέπει να μελετηθούν περαιτέρω *in vivo* οι στόχοι της SRPK1.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι κινάσες της οικογένειας των SRPK θεωρούνται κύριοι ρυθμιστές του ματίσματος (συστατικού και εναλλακτικού) μέσω των φωσφορυλιώσεων που επιφέρουν στις SR πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στην αναγνώριση των εξονίων. Παρ' όλα αυτά έχουν βρεθεί και σε οργανισμούς όπου δεν συμβαίνει μάτισμα όπως επίσης και κάποια αναγνωρισμένα υποστρώματά τους δεν φαίνεται να σχετίζονται άμεσα με τη διαδικασία του ματίσματος. Είναι κατά συνέπεια εύλογο να υποτεθεί ότι αυτές οι κινάσες εξυπηρετούν και άλλες λειτουργίες μέσα στο κύτταρο οι οποίες δεν έχουν ακόμα αναγνωρισθεί.

Η SRPK1a είναι ένα νέο μέλος της οικογένειας των ανθρώπινων SRPK της οποίας το μετάγραφο προέρχεται από εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου της SRPK1 καταλήγοντας σε μια ισομορφή της με ένα πρόσθετο τμήμα 171 αμινοξέων στο N-τελικό άκρο της (εκτός της περιοχής κατάλυσης). Η ειδική για την SRPK1a αλληλουχία είναι ιδιαίτερα πλούσια σε προλίνες, ένα χαρακτηριστικό περιοχών που δημιουργούν επιφάνειες διεπαφής μεταξύ πρωτεϊνών.

Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν η ανίχνευση μορίων που αλληλεπιδρούν με το πρόσθετο N-τελικό τμήμα της SRPK1a. Η διευκρίνιση και μελέτη αυτών των αλληλεπιδράσεων θα έδινε πληροφορίες για τη λειτουργία της SRPK1a ειδικά, αλλά πιθανόν και γενικότερα για τους ρόλους των κινασών SRPK. Λόγω του πλούσιου σε προλίνες χαρακτήρα της συγκεκριμένης περιοχής είχε προβλεφθεί ότι ήταν πολύ πιθανό να προκύψει αρκετά μεγάλος αριθμός πιθανών αλληλεπιδράσεων.

Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα των δύο υβριδίων στον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, μια τεχνική η οποία ανιχνεύει αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, οι οποίες σε μεγάλο ποσοστό αποδεικνύονται να ισχύουν και *in vivo* όπως προκύπτει από πολλαπλές αναφορές στη βιβλιογραφία.

Η ανίχνευση νέων μοριακών παρτενέρ της SRPK1a είναι το πρώτο βήμα για την αποκάλυψη νέων συσχετισμών στις λειτουργίες των SR κινασών.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι κινάσες της οικογένειας των SRPK θεωρούνται κύριοι ρυθμιστές του ματίσματος (συστατικού και εναλλακτικού) μέσω των φωσφορυλιώσεων που επιφέρουν στις SR πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στην αναγνώριση των εξονίων. Παρ' όλα αυτά έχουν βρεθεί και σε οργανισμούς όπου δεν συμβαίνει μάτισμα όπως επίσης και κάποια αναγνωρισμένα υποστρώματά τους δεν φαίνεται να σχετίζονται άμεσα με τη διαδικασία του ματίσματος. Είναι κατά συνέπεια εύλογο να υποτεθεί ότι αυτές οι κινάσες εξυπηρετούν και άλλες λειτουργίες μέσα στο κύτταρο οι οποίες δεν έχουν ακόμα αναγνωρισθεί.

Η SRPK1a είναι ένα νέο μέλος της οικογένειας των ανθρώπινων SRPK της οποίας το μετάγραφο προέρχεται από εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου της SRPK1 καταλήγοντας σε μια ισομορφή της με ένα πρόσθετο τμήμα 171 αμινοξέων στο N-τελικό άκρο της (εκτός της περιοχής κατάλυσης). Η ειδική για την SRPK1a αλληλουχία είναι ιδιαίτερα πλούσια σε προλίνες, ένα χαρακτηριστικό περιοχών που δημιουργούν επιφάνειες διεπαφής μεταξύ πρωτεϊνών.

Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν η ανίχνευση μορίων που αλληλεπιδρούν με το πρόσθετο N-τελικό τμήμα της SRPK1a. Η διευκρίνιση και μελέτη αυτών των αλληλεπιδράσεων θα έδινε πληροφορίες για τη λειτουργία της SRPK1a ειδικά, αλλά πιθανόν και γενικότερα για τους ρόλους των κινασών SRPK. Λόγω του πλούσιου σε προλίνες χαρακτήρα της συγκεκριμένης περιοχής είχε προβλεφθεί ότι ήταν πολύ πιθανό να προκύψει αρκετά μεγάλος αριθμός πιθανών αλληλεπιδράσεων.

Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα των δύο υβριδίων στον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, μια τεχνική η οποία ανιχνεύει αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, οι οποίες σε μεγάλο ποσοστό αποδεικνύονται να ισχύουν και *in vivo* όπως προκύπτει από πολλαπλές αναφορές στη βιβλιογραφία.

Η ανίχνευση νέων μοριακών παρτενέρ της SRPK1a είναι το πρώτο βήμα για την αποκάλυψη νέων συσχετισμών στις λειτουργίες των SR κινασών.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι κινάσες της οικογένειας των SRPK θεωρούνται κύριοι ρυθμιστές του ματίσματος (συστατικού και εναλλακτικού) μέσω των φωσφορυλιώσεων που επιφέρουν στις SR πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στην αναγνώριση των εξονίων. Παρ' όλα αυτά έχουν βρεθεί και σε οργανισμούς όπου δεν συμβαίνει μάτισμα όπως επίσης και κάποια αναγνωρισμένα υποστρώματά τους δεν φαίνεται να σχετίζονται άμεσα με τη διαδικασία του ματίσματος. Είναι κατά συνέπεια εύλογο να υποτεθεί ότι αυτές οι κινάσες εξυπηρετούν και άλλες λειτουργίες μέσα στο κύτταρο οι οποίες δεν έχουν ακόμα αναγνωρισθεί.

Η SRPK1a είναι ένα νέο μέλος της οικογένειας των ανθρώπινων SRPK της οποίας το μετάγραφο προέρχεται από εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου της SRPK1 καταλήγοντας σε μια ισομορφή της με ένα πρόσθετο τμήμα 171 αμινοξέων στο N-τελικό άκρο της (εκτός της περιοχής κατάλυσης). Η ειδική για την SRPK1a αλληλουχία είναι ιδιαίτερα πλούσια σε προλίνες, ένα χαρακτηριστικό περιοχών που δημιουργούν επιφάνειες διεπαφής μεταξύ πρωτεϊνών.

Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν η ανίχνευση μορίων που αλληλεπιδρούν με το πρόσθετο N-τελικό τμήμα της SRPK1a. Η διευκρίνιση και μελέτη αυτών των αλληλεπιδράσεων θα έδινε πληροφορίες για τη λειτουργία της SRPK1a ειδικά, αλλά πιθανόν και γενικότερα για τους ρόλους των κινασών SRPK. Λόγω του πλούσιου σε προλίνες χαρακτήρα της συγκεκριμένης περιοχής είχε προβλεφθεί ότι ήταν πολύ πιθανό να προκύψει αρκετά μεγάλος αριθμός πιθανών αλληλεπιδράσεων.

Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα των δύο υβριδίων στον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, μια τεχνική η οποία ανιχνεύει αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, οι οποίες σε μεγάλο ποσοστό αποδεικνύονται να ισχύουν και *in vivo* όπως προκύπτει από πολλαπλές αναφορές στη βιβλιογραφία.

Η ανίχνευση νέων μοριακών παρτενέρ της SRPK1a είναι το πρώτο βήμα για την αποκάλυψη νέων συσχετισμών στις λειτουργίες των SR κινασών.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι κινάσες της οικογένειας των SRPK θεωρούνται κύριοι ρυθμιστές του ματίσματος (συστατικού και εναλλακτικού) μέσω των φωσφορυλιώσεων που επιφέρουν στις SR πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στην αναγνώριση των εξονίων. Παρ' όλα αυτά έχουν βρεθεί και σε οργανισμούς όπου δεν συμβαίνει μάτισμα όπως επίσης και κάποια αναγνωρισμένα υποστρώματά τους δεν φαίνεται να σχετίζονται άμεσα με τη διαδικασία του ματίσματος. Είναι κατά συνέπεια εύλογο να υποτεθεί ότι αυτές οι κινάσες εξυπηρετούν και άλλες λειτουργίες μέσα στο κύτταρο οι οποίες δεν έχουν ακόμα αναγνωρισθεί.

Η SRPK1a είναι ένα νέο μέλος της οικογένειας των ανθρώπινων SRPK της οποίας το μετάγραφο προέρχεται από εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου της SRPK1 καταλήγοντας σε μια ισομορφή της με ένα πρόσθετο τμήμα 171 αμινοξέων στο N-τελικό άκρο της (εκτός της περιοχής κατάλυσης). Η ειδική για την SRPK1a αλληλουχία είναι ιδιαίτερα πλούσια σε προλίνες, ένα χαρακτηριστικό περιοχών που δημιουργούν επιφάνειες διεπαφής μεταξύ πρωτεϊνών.

Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν η ανίχνευση μορίων που αλληλεπιδρούν με το πρόσθετο N-τελικό τμήμα της SRPK1a. Η διευκρίνιση και μελέτη αυτών των αλληλεπιδράσεων θα έδινε πληροφορίες για τη λειτουργία της SRPK1a ειδικά, αλλά πιθανόν και γενικότερα για τους ρόλους των κινασών SRPK. Λόγω του πλούσιου σε προλίνες χαρακτήρα της συγκεκριμένης περιοχής είχε προβλεφθεί ότι ήταν πολύ πιθανό να προκύψει αρκετά μεγάλος αριθμός πιθανών αλληλεπιδράσεων.

Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα των δύο υβριδίων στον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, μια τεχνική η οποία ανιχνεύει αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, οι οποίες σε μεγάλο ποσοστό αποδεικνύονται να ισχύουν και *in vivo* όπως προκύπτει από πολλαπλές αναφορές στη βιβλιογραφία.

Η ανίχνευση νέων μοριακών παρτενέρ της SRPK1a είναι το πρώτο βήμα για την αποκάλυψη νέων συσχετισμών στις λειτουργίες των SR κινασών.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι κινάσες της οικογένειας των SRPK θεωρούνται κύριοι ρυθμιστές του ματίσματος (συστατικού και εναλλακτικού) μέσω των φωσφορυλιώσεων που επιφέρουν στις SR πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στην αναγνώριση των εξονίων. Παρ' όλα αυτά έχουν βρεθεί και σε οργανισμούς όπου δεν συμβαίνει μάτισμα όπως επίσης και κάποια αναγνωρισμένα υποστρώματά τους δεν φαίνεται να σχετίζονται άμεσα με τη διαδικασία του ματίσματος. Είναι κατά συνέπεια εύλογο να υποτεθεί ότι αυτές οι κινάσες εξυπηρετούν και άλλες λειτουργίες μέσα στο κύτταρο οι οποίες δεν έχουν ακόμα αναγνωριστεί.

Η SRPK1a είναι ένα νέο μέλος της οικογένειας των ανθρώπινων SRPK της οποίας το μετάγραφο προέρχεται από εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου της SRPK1 καταλήγοντας σε μια ισομορφή της με ένα πρόσθετο τμήμα 171 αμινοξέων στο N-τελικό άκρο της (εκτός της περιοχής κατάλυσης). Η ειδική για την SRPK1a αλληλουχία είναι ιδιαίτερα πλούσια σε προλίνες, ένα χαρακτηριστικό περιοχών που δημιουργούν επιφάνειες διεπαφής μεταξύ πρωτεϊνών.

Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν η ανίχνευση μορίων που αλληλεπιδρούν με το πρόσθετο N-τελικό τμήμα της SRPK1a. Η διευκρίνιση και μελέτη αυτών των αλληλεπιδράσεων θα έδινε πληροφορίες για τη λειτουργία της SRPK1a ειδικά, αλλά πιθανόν και γενικότερα για τους ρόλους των κινασών SRPK. Λόγω του πλούσιου σε προλίνες χαρακτήρα της συγκεκριμένης περιοχής είχε προβλεφθεί ότι ήταν πολύ πιθανό να προκύψει αρκετά μεγάλος αριθμός πιθανών αλληλεπιδράσεων.

Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα των δύο υβριδίων στον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, μια τεχνική η οποία ανιχνεύει αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, οι οποίες σε μεγάλο ποσοστό αποδεικνύονται να ισχύουν και *in vivo* όπως προκύπτει από πολλαπλές αναφορές στη βιβλιογραφία.

Η ανίχνευση νέων μοριακών παρτενέρ της SRPK1a είναι το πρώτο βήμα για την αποκάλυψη νέων συσχετισμών στις λειτουργίες των SR κινασών.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι κινάσες της οικογένειας των SRPK θεωρούνται κύριοι ρυθμιστές του ματίσματος (συστατικού και εναλλακτικού) μέσω των φωσφορυλιώσεων που επιφέρουν στις SR πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στην αναγνώριση των εξονίων. Παρ' όλα αυτά έχουν βρεθεί και σε οργανισμούς όπου δεν συμβαίνει μάτισμα όπως επίσης και κάποια αναγνωρισμένα υποστρώματά τους δεν φαίνεται να σχετίζονται άμεσα με τη διαδικασία του ματίσματος. Είναι κατά συνέπεια εύλογο να υποτεθεί ότι αυτές οι κινάσες εξυπηρετούν και άλλες λειτουργίες μέσα στο κύτταρο οι οποίες δεν έχουν ακόμα αναγνωριστεί.

Η SRPK1a είναι ένα νέο μέλος της οικογένειας των ανθρώπινων SRPK της οποίας το μετάγραφο προέρχεται από εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου της SRPK1 καταλήγοντας σε μια ισομορφή της με ένα πρόσθετο τμήμα 171 αμινοξέων στο N-τελικό άκρο της (εκτός της περιοχής κατάλυσης). Η ειδική για την SRPK1a αλληλουχία είναι ιδιαίτερα πλούσια σε προλίνες, ένα χαρακτηριστικό περιοχών που δημιουργούν επιφάνειες διεπαφής μεταξύ πρωτεϊνών.

Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν η ανίχνευση μορίων που αλληλεπιδρούν με το πρόσθετο N-τελικό τμήμα της SRPK1a. Η διευκρίνιση και μελέτη αυτών των αλληλεπιδράσεων θα έδινε πληροφορίες για τη λειτουργία της SRPK1a ειδικά, αλλά πιθανόν και γενικότερα για τους ρόλους των κινασών SRPK. Λόγω του πλούσιου σε προλίνες χαρακτήρα της συγκεκριμένης περιοχής είχε προβλεφθεί ότι ήταν πολύ πιθανό να προκύψει αρκετά μεγάλος αριθμός πιθανών αλληλεπιδράσεων.

Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα των δύο υβριδίων στον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, μια τεχνική η οποία ανιχνεύει αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, οι οποίες σε μεγάλο ποσοστό αποδεικνύονται να ισχύουν και *in vivo* όπως προκύπτει από πολλαπλές αναφορές στη βιβλιογραφία.

Η ανίχνευση νέων μοριακών παρτενέρ της SRPK1a είναι το πρώτο βήμα για την αποκάλυψη νέων συσχετισμών στις λειτουργίες των SR κινασών.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι κινάσες της οικογένειας των SRPK θεωρούνται κύριοι ρυθμιστές του ματίσματος (συστατικού και εναλλακτικού) μέσω των φωσφορυλιώσεων που επιφέρουν στις SR πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στην αναγνώριση των εξονίων. Παρ' όλα αυτά έχουν βρεθεί και σε οργανισμούς όπου δεν συμβαίνει μάτισμα όπως επίσης και κάποια αναγνωρισμένα υποστρώματά τους δεν φαίνεται να σχετίζονται άμεσα με τη διαδικασία του ματίσματος. Είναι κατά συνέπεια εύλογο να υποτεθεί ότι αυτές οι κινάσες εξυπηρετούν και άλλες λειτουργίες μέσα στο κύτταρο οι οποίες δεν έχουν ακόμα αναγνωρισθεί.

Η SRPK1a είναι ένα νέο μέλος της οικογένειας των ανθρώπινων SRPK της οποίας το μετάγραφο προέρχεται από εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου της SRPK1 καταλήγοντας σε μια ισομορφή της με ένα πρόσθετο τμήμα 171 αμινοξέων στο N-τελικό άκρο της (εκτός της περιοχής κατάλυσης). Η ειδική για την SRPK1a αλληλουχία είναι ιδιαίτερα πλούσια σε προλίνες, ένα χαρακτηριστικό περιοχών που δημιουργούν επιφάνειες διεπαφής μεταξύ πρωτεϊνών.

Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν η ανίχνευση μορίων που αλληλεπιδρούν με το πρόσθετο N-τελικό τμήμα της SRPK1a. Η διευκρίνιση και μελέτη αυτών των αλληλεπιδράσεων θα έδινε πληροφορίες για τη λειτουργία της SRPK1a ειδικά, αλλά πιθανόν και γενικότερα για τους ρόλους των κινασών SRPK. Λόγω του πλούσιου σε προλίνες χαρακτήρα της συγκεκριμένης περιοχής είχε προβλεφθεί ότι ήταν πολύ πιθανό να προκύψει αρκετά μεγάλος αριθμός πιθανών αλληλεπιδράσεων.

Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα των δύο υβριδίων στον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, μια τεχνική η οποία ανιχνεύει αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, οι οποίες σε μεγάλο ποσοστό αποδεικνύονται να ισχύουν και *in vivo* όπως προκύπτει από πολλαπλές αναφορές στη βιβλιογραφία.

Η ανίχνευση νέων μοριακών παρτενέρ της SRPK1a είναι το πρώτο βήμα για την αποκάλυψη νέων συσχετισμών στις λειτουργίες των SR κινασών.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι κινάσες της οικογένειας των SRPK θεωρούνται κύριοι ρυθμιστές του ματίσματος (συστατικού και εναλλακτικού) μέσω των φωσφορυλιώσεων που επιφέρουν στις SR πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στην αναγνώριση των εξονίων. Παρ' όλα αυτά έχουν βρεθεί και σε οργανισμούς όπου δεν συμβαίνει μάτισμα όπως επίσης και κάποια αναγνωρισμένα υποστρώματά τους δεν φαίνεται να σχετίζονται άμεσα με τη διαδικασία του ματίσματος. Είναι κατά συνέπεια εύλογο να υποτεθεί ότι αυτές οι κινάσες εξυπηρετούν και άλλες λειτουργίες μέσα στο κύτταρο οι οποίες δεν έχουν ακόμα αναγνωριστεί.

Η SRPK1a είναι ένα νέο μέλος της οικογένειας των ανθρώπινων SRPK της οποίας το μετάγραφο προέρχεται από εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου της SRPK1 καταλήγοντας σε μια ισομορφή της με ένα πρόσθετο τμήμα 171 αμινοξέων στο N-τελικό άκρο της (εκτός της περιοχής κατάλυσης). Η ειδική για την SRPK1a αλληλουχία είναι ιδιαίτερα πλούσια σε προλίνες, ένα χαρακτηριστικό περιοχών που δημιουργούν επιφάνειες διεπαφής μεταξύ πρωτεϊνών.

Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν η ανίχνευση μορίων που αλληλεπιδρούν με το πρόσθετο N-τελικό τμήμα της SRPK1a. Η διευκρίνιση και μελέτη αυτών των αλληλεπιδράσεων θα έδινε πληροφορίες για τη λειτουργία της SRPK1a ειδικά, αλλά πιθανόν και γενικότερα για τους ρόλους των κινασών SRPK. Λόγω του πλούσιου σε προλίνες χαρακτήρα της συγκεκριμένης περιοχής είχε προβλεφθεί ότι ήταν πολύ πιθανό να προκύψει αρκετά μεγάλος αριθμός πιθανών αλληλεπιδράσεων.

Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα των δύο υβριδίων στον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, μια τεχνική η οποία ανιχνεύει αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, οι οποίες σε μεγάλο ποσοστό αποδεικνύονται να ισχύουν και *in vivo* όπως προκύπτει από πολλαπλές αναφορές στη βιβλιογραφία.

Η ανίχνευση νέων μοριακών παρτενέρ της SRPK1a είναι το πρώτο βήμα για την αποκάλυψη νέων συσχετισμών στις λειτουργίες των SR κινασών.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι κινάσες της οικογένειας των SRPK θεωρούνται κύριοι ρυθμιστές του ματίσματος (συστατικού και εναλλακτικού) μέσω των φωσφορυλιώσεων που επιφέρουν στις SR πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στην αναγνώριση των εξονίων. Παρ' όλα αυτά έχουν βρεθεί και σε οργανισμούς όπου δεν συμβαίνει μάτισμα όπως επίσης και κάποια αναγνωρισμένα υποστρώματά τους δεν φαίνεται να σχετίζονται άμεσα με τη διαδικασία του ματίσματος. Είναι κατά συνέπεια εύλογο να υποτεθεί ότι αυτές οι κινάσες εξυπηρετούν και άλλες λειτουργίες μέσα στο κύτταρο οι οποίες δεν έχουν ακόμα αναγνωρισθεί.

Η SRPK1a είναι ένα νέο μέλος της οικογένειας των ανθρώπινων SRPK της οποίας το μετάγραφο προέρχεται από εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου της SRPK1 καταλήγοντας σε μια ισομορφή της με ένα πρόσθετο τμήμα 171 αμινοξέων στο N-τελικό άκρο της (εκτός της περιοχής κατάλυσης). Η ειδική για την SRPK1a αλληλουχία είναι ιδιαίτερα πλούσια σε προλίνες, ένα χαρακτηριστικό περιοχών που δημιουργούν επιφάνειες διεπαφής μεταξύ πρωτεϊνών.

Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν η ανίχνευση μορίων που αλληλεπιδρούν με το πρόσθετο N-τελικό τμήμα της SRPK1a. Η διευκρίνιση και μελέτη αυτών των αλληλεπιδράσεων θα έδινε πληροφορίες για τη λειτουργία της SRPK1a ειδικά, αλλά πιθανόν και γενικότερα για τους ρόλους των κινασών SRPK. Λόγω του πλούσιου σε προλίνες χαρακτήρα της συγκεκριμένης περιοχής είχε προβλεφθεί ότι ήταν πολύ πιθανό να προκύψει αρκετά μεγάλος αριθμός πιθανών αλληλεπιδράσεων.

Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα των δύο υβριδίων στον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, μια τεχνική η οποία ανιχνεύει αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, οι οποίες σε μεγάλο ποσοστό αποδεικνύονται να ισχύουν και *in vivo* όπως προκύπτει από πολλαπλές αναφορές στη βιβλιογραφία.

Η ανίχνευση νέων μοριακών παρτενέρ της SRPK1a είναι το πρώτο βήμα για την αποκάλυψη νέων συσχετισμών στις λειτουργίες των SR κινασών.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι κινάσες της οικογένειας των SRPK θεωρούνται κύριοι ρυθμιστές του ματίσματος (συστατικού και εναλλακτικού) μέσω των φωσφορυλιώσεων που επιφέρουν στις SR πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στην αναγνώριση των εξονίων. Παρ' όλα αυτά έχουν βρεθεί και σε οργανισμούς όπου δεν συμβαίνει μάτισμα όπως επίσης και κάποια αναγνωρισμένα υποστρώματά τους δεν φαίνεται να σχετίζονται άμεσα με τη διαδικασία του ματίσματος. Είναι κατά συνέπεια εύλογο να υποθεθεί ότι αυτές οι κινάσες εξυπηρετούν και άλλες λειτουργίες μέσα στο κύτταρο οι οποίες δεν έχουν ακόμα αναγνωριστεί.

Η SRPK1a είναι ένα νέο μέλος της οικογένειας των ανθρώπινων SRPK της οποίας το μετάγραφο προέρχεται από εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου της SRPK1 καταλήγοντας σε μια ισομορφή της με ένα πρόσθετο τμήμα 171 αμινοξέων στο N-τελικό άκρο της (εκτός της περιοχής κατάλυσης). Η ειδική για την SRPK1a αλληλουχία είναι ιδιαίτερα πλούσια σε προλίνες, ένα χαρακτηριστικό περιοχών που δημιουργούν επιφάνειες διεπαφής μεταξύ πρωτεϊνών.

Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν η ανίχνευση μορίων που αλληλεπιδρούν με το πρόσθετο N-τελικό τμήμα της SRPK1a. Η διευκρίνιση και μελέτη αυτών των αλληλεπιδράσεων θα έδινε πληροφορίες για τη λειτουργία της SRPK1a ειδικά, αλλά πιθανόν και γενικότερα για τους ρόλους των κινασών SRPK. Λόγω του πλούσιου σε προλίνες χαρακτήρα της συγκεκριμένης περιοχής είχε προβλεφθεί ότι ήταν πολύ πιθανό να προκύψει αρκετά μεγάλος αριθμός πιθανών αλληλεπιδράσεων.

Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα των δύο υβριδίων στον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, μια τεχνική η οποία ανιχνεύει αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, οι οποίες σε μεγάλο ποσοστό αποδεικνύονται να ισχύουν και *in vivo* όπως προκύπτει από πολλαπλές αναφορές στη βιβλιογραφία.

Η ανίχνευση νέων μοριακών παρτενέρ της SRPK1a είναι το πρώτο βήμα για την αποκάλυψη νέων συσχετισμών στις λειτουργίες των SR κινασών.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι κινάσες της οικογένειας των SRPK θεωρούνται κύριοι ρυθμιστές του ματίσματος (συστατικού και εναλλακτικού) μέσω των φωσφορυλιώσεων που επιφέρουν στις SR πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στην αναγνώριση των εξονίων. Παρ' όλα αυτά έχουν βρεθεί και σε οργανισμούς όπου δεν συμβαίνει μάτισμα όπως επίσης και κάποια αναγνωρισμένα υποστρώματά τους δεν φαίνεται να σχετίζονται άμεσα με τη διαδικασία του ματίσματος. Είναι κατά συνέπεια εύλογο να υποτεθεί ότι αυτές οι κινάσες εξυπηρετούν και άλλες λειτουργίες μέσα στο κύτταρο οι οποίες δεν έχουν ακόμα αναγνωρισθεί.

Η SRPK1a είναι ένα νέο μέλος της οικογένειας των ανθρώπινων SRPK της οποίας το μετάγραφο προέρχεται από εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου της SRPK1 καταλήγοντας σε μια ισομορφή της με ένα πρόσθετο τμήμα 171 αμινοξέων στο N-τελικό άκρο της (εκτός της περιοχής κατάλυσης). Η ειδική για την SRPK1a αλληλουχία είναι ιδιαίτερα πλούσια σε προλίνες, ένα χαρακτηριστικό περιοχών που δημιουργούν επιφάνειες διεπαφής μεταξύ πρωτεϊνών.

Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν η ανίχνευση μορίων που αλληλεπιδρούν με το πρόσθετο N-τελικό τμήμα της SRPK1a. Η διευκρίνιση και μελέτη αυτών των αλληλεπιδράσεων θα έδινε πληροφορίες για τη λειτουργία της SRPK1a ειδικά, αλλά πιθανόν και γενικότερα για τους ρόλους των κινάσων SRPK. Λόγω του πλούσιου σε προλίνες χαρακτήρα της συγκεκριμένης περιοχής είχε προβλεφθεί ότι ήταν πολύ πιθανό να προκύψει αρκετά μεγάλος αριθμός πιθανών αλληλεπιδράσεων.

Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα των δύο υβριδίων στον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, μια τεχνική η οποία ανιχνεύει αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, οι οποίες σε μεγάλο ποσοστό αποδεικνύονται να ισχύουν και *in vivo* όπως προκύπτει από πολλαπλές αναφορές στη βιβλιογραφία.

Η ανίχνευση νέων μοριακών παρτενέρ της SRPK1a είναι το πρώτο βήμα για την αποκάλυψη νέων συσχετισμών στις λειτουργίες των SR κινάσων.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι κινάσες της οικογένειας των SRPK θεωρούνται κύριοι ρυθμιστές του ματίσματος (συστατικού και εναλλακτικού) μέσω των φωσφορυλιώσεων που επιφέρουν στις SR πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στην αναγνώριση των εξονίων. Παρ' όλα αυτά έχουν βρεθεί και σε οργανισμούς όπου δεν συμβαίνει μάτισμα όπως επίσης και κάποια αναγνωρισμένα υποστρώματά τους δεν φαίνεται να σχετίζονται άμεσα με τη διαδικασία του ματίσματος. Είναι κατά συνέπεια εύλογο να υποτεθεί ότι αυτές οι κινάσες εξυπηρετούν και άλλες λειτουργίες μέσα στο κύτταρο οι οποίες δεν έχουν ακόμα αναγνωρισθεί.

Η SRPK1a είναι ένα νέο μέλος της οικογένειας των ανθρώπινων SRPK της οποίας το μετάγραφο προέρχεται από εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου της SRPK1 καταλήγοντας σε μια ισομορφή της με ένα πρόσθετο τμήμα 171 αμινοξέων στο N-τελικό άκρο της (εκτός της περιοχής κατάλυσης). Η ειδική για την SRPK1a αλληλουχία είναι ιδιαίτερα πλούσια σε προλίνες, ένα χαρακτηριστικό περιοχών που δημιουργούν επιφάνειες διεπαφής μεταξύ πρωτεϊνών.

Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν η ανίχνευση μορίων που αλληλεπιδρούν με το πρόσθετο N-τελικό τμήμα της SRPK1a. Η διευκρίνιση και μελέτη αυτών των αλληλεπιδράσεων θα έδινε πληροφορίες για τη λειτουργία της SRPK1a ειδικά, αλλά πιθανόν και γενικότερα για τους ρόλους των κινασών SRPK. Λόγω του πλούσιου σε προλίνες χαρακτήρα της συγκεκριμένης περιοχής είχε προβλεφθεί ότι ήταν πολύ πιθανό να προκύψει αρκετά μεγάλος αριθμός πιθανών αλληλεπιδράσεων.

Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα των δύο υβριδίων στον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, μια τεχνική η οποία ανιχνεύει αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, οι οποίες σε μεγάλο ποσοστό αποδεικνύονται να ισχύουν και *in vivo* όπως προκύπτει από πολλαπλές αναφορές στη βιβλιογραφία.

Η ανίχνευση νέων μοριακών παρτενέρ της SRPK1a είναι το πρώτο βήμα για την αποκάλυψη νέων συσχετισμών στις λειτουργίες των SR κινασών.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι κινάσες της οικογένειας των SRPK θεωρούνται κύριοι ρυθμιστές του ματίσματος (συστατικού και εναλλακτικού) μέσω των φωσφορυλιώσεων που επιφέρουν στις SR πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στην αναγνώριση των εξονίων. Παρ' όλα αυτά έχουν βρεθεί και σε οργανισμούς όπου δεν συμβαίνει μάτισμα όπως επίσης και κάποια αναγνωρισμένα υποστρώματά τους δεν φαίνεται να σχετίζονται άμεσα με τη διαδικασία του ματίσματος. Είναι κατά συνέπεια εύλογο να υποτεθεί ότι αυτές οι κινάσες εξυπηρετούν και άλλες λειτουργίες μέσα στο κύτταρο οι οποίες δεν έχουν ακόμα αναγνωριστεί.

Η SRPK1a είναι ένα νέο μέλος της οικογένειας των ανθρώπινων SRPK της οποίας το μετάγραφο προέρχεται από εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου της SRPK1 καταλήγοντας σε μια ισομορφή της με ένα πρόσθετο τμήμα 171 αμινοξέων στο N-τελικό άκρο της (εκτός της περιοχής κατάλυσης). Η ειδική για την SRPK1a αλληλουχία είναι ιδιαίτερα πλούσια σε προλίνες, ένα χαρακτηριστικό περιοχών που δημιουργούν επιφάνειες διεπαφής μεταξύ πρωτεϊνών.

Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν η ανίχνευση μορίων που αλληλεπιδρούν με το πρόσθετο N-τελικό τμήμα της SRPK1a. Η διευκρίνιση και μελέτη αυτών των αλληλεπιδράσεων θα έδινε πληροφορίες για τη λειτουργία της SRPK1a ειδικά, αλλά πιθανόν και γενικότερα για τους ρόλους των κινασών SRPK. Λόγω του πλούσιου σε προλίνες χαρακτήρα της συγκεκριμένης περιοχής είχε προβλεφθεί ότι ήταν πολύ πιθανό να προκύψει αρκετά μεγάλος αριθμός πιθανών αλληλεπιδράσεων.

Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα των δύο υβριδίων στον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, μια τεχνική η οποία ανιχνεύει αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, οι οποίες σε μεγάλο ποσοστό αποδεικνύονται να ισχύουν και *in vivo* όπως προκύπτει από πολλαπλές αναφορές στη βιβλιογραφία.

Η ανίχνευση νέων μοριακών παρτενέρ της SRPK1a είναι το πρώτο βήμα για την αποκάλυψη νέων συσχετισμών στις λειτουργίες των SR κινασών.

B. ΜΕΘΟΔΟΙ

Για τις μεθόδους που αναφέρονται στο μέρος αυτό της διατριβής περιγράφεται κατ' αρχήν το θεωρητικό υπόβαθρο της κάθε τεχνικής και στη συνέχεια το πειραματικό πρωτόκολλο. Τα διαλύματα και τα θρεπτικά υλικά που αναφέρονται σε όλο το κεφάλαιο περιγράφονται λεπτομερώς στο Παράρτημα I.

B.1. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Θεωρητικό μέρος.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction) αποτελεί μία τεχνική με την οποία ενισχύεται ένα συγκεκριμένο τμήμα του DNA με καθορισμένο μήκος και αλληλουχία και παράγονται πολλά αντίγραφα του. Αρχικά απαιτείται κάποια γνώση του ακραίου τμήματος του DNA που λειτουργεί ως εκμαγείο (template) και από την οποία προκύπτει η χημική σύνθεση των ολιγονουκλεοτιδίων που ονομάζονται εκκινητές (primers).

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αποτελείται από τρία καθορισμένα στάδια α) την αποδιάταξη (denaturation), β) την υβριδοποίηση (annealing) και γ) την επιμήκυνση (extension).

Στο πρώτο στάδιο το δίκλωνο DNA εκμαγείο αποδιατάσσεται σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 90°C (30 sec-5min). Με τον τρόπο αυτό διασπώνται οι δεσμοί υδρογόνου που συγκρατούν τις δύο αλυσίδες της έλικας του DNA και το τμήμα του DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε γίνεται προσιτό.

Στο δεύτερο στάδιο συμβαίνει η υβριδοποίηση των δύο εκκινητών, οι οποίοι βρίσκονται σε περίσσεια και αναγνωρίζουν τα συμπληρωματικά άκρα του DNA στόχου. Η θερμοκρασία βρίσκεται μεταξύ 40⁰-65⁰C (20-60 sec). Η επιλογή της θερμοκρασίας είναι κρίσιμη και πρέπει να εκτιμάται σωστά διότι διαφορετικά έχουμε μη αναμενόμενα αποτελέσματα. Επίσης και ο σχεδιασμός και η συγκέντρωση των εκκινητών είναι καθοριστικής σημασίας. Οι εκκινητές είναι μικρού μεγέθους 18-30 βάσεων συνήθως. Ο καθένας πρέπει να είναι συμπληρωματικός του 3' άκρου της μιας αλυσίδας από τις δύο του εκμαγείου DNA και δεν πρέπει να είναι συμπληρωματικός του άλλου ή του εαυτού του διότι σχηματίζονται διμερή και εμποδίζεται η ενίσχυση

του DNA. Απαιτείται ακόμη να ταιριάζουν στην περιεκτικότητά τους σε G+C αναλογία και να έχουν παρόμοιες θερμοκρασίες υβριδίωσης. Ο σχεδιασμός τους μπορεί να επιτευχθεί με διάφορα προγράμματα του διαδικτύου όπως:

<http://www.ebi.ac.uk/biocat/biocat.html>

http://www.biotech.iastate.edu/Facilities/DSSF/primer_design.html

<http://biochem.roche.com/benchmate>

Στην παρούσα εργασία ο σχεδιασμός για την επιλογή του καταλληλότερου ζεύγους εκκινητών έγινε με την χρήση του προγράμματος Primer Pair Data, Saccharomyces Genome Database στην διεύθυνση <http://genome-www2.Stanford.edu/>

Στο τρίτο στάδιο λαμβάνει μέρος η σύνθεση και η επιμήκυνση της αλυσίδας του DNA. Οι εκκινητές λειτουργούν σαν αφετηρίες για την περαιτέρω σύνθεση του DNA αφού παρέχουν ένα ελεύθερο 3'-OH για την πολυμεράση του DNA. Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση είναι η θερμοάαντοχη πολυμεράση του DNA Taq που προσθέτει dNTPs στο 3' άκρο της κάθε αλυσίδας του DNA. Η πολυμεράση αυτή είναι ανθεκτική σε υψηλές θερμοκρασίες διότι δεν υφίσταται η ίδια μετουσίωση. Σε όλη την αντίδραση η συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου επίσης παίζει καθοριστικό ρόλο για την δράση του ενζύμου. Τα ιόντα Mg^{++} σχηματίζουν υδατοδιαλυτά συμπλέγματα με τα dNTPs και με το εκμαγείο του DNA και έτσι σχηματίζεται ένα πραγματικό υπόστρωμα που αναγνωρίζει η πολυμεράση.

Αυτά τα τρία στάδια που αποτελούν ένα κύκλο επαναλαμβάνονται 30-40 φορές (κύκλοι). Μετά τον πρώτο κύκλο θα χρησιμοποιηθούν ως εκμαγεία όχι μόνο οι αρχικές αλυσίδες του DNA αλλά και οι νεοσυντεθείσες οι οποίες έχουν μήκος ακριβώς προκαθορισμένο από τα άκρα των περιοχών που είναι συμπληρωματικά με τους εκκινητές. Με τον τρόπο αυτό όσο πιο πολλές φορές επαναλαμβάνονται οι κύκλοι αποδιάταξης, υβριδίωσης και επιμήκυνσης τόσο πιο πολύ DNA παράγεται. Το προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης ελέγχεται και ταυτοποιείται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

Πειραματικό μέρος.

- Τα αντιδραστήρια της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης είναι τα παρακάτω: (αναφέρονται οι τελικές συγκεντρώσεις τους)
 - 10-50 ng DNA εκμαγείο (template)
 - 200 ng από τον κάθε εκκινητή (primer)
 - 200μM από καθένα από τα dNTPs

- 1x ρυθμιστικό δ/μα της πολυμεράσης Taq (2mM Mg⁺⁺)
- 10% v/v DMSO (Διμεθυλοσουλφοξείδιο),
- 1,25 unit DNA πολυμεράση Taq (5units/μl),
- ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 50μl.

Το DNA εκμαγείο ενισχύθηκε με 30 κύκλους αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

Οι παράμετροι των κύκλων ήταν :

- μετουσίωση του DNA στους 94⁰C για 1 λεπτό,
- υβριδίωση στους 56⁰C για 1 λεπτό,
- η επιμήκυνση στους 72⁰C για 1 λεπτό.

B.2. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Θεωρητικό μέρος.

Η ηλεκτροφόρηση συγκεκριμένων τμημάτων DNA σε πηκτές αγαρόζης και η απομόνωσή τους απ' αυτές αποτελεί έναν απλό και αποδοτικό τρόπο διαχωρισμού και καθαρισμού τους. Χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό και την ανίχνευση τμημάτων DNA από 150 bp έως 7 kb.

Η μέθοδος βασίζεται στην παρασκευή πηκτών αγαρόζης με πολυμερισμό της αγαρόζης σε χαμηλές θερμοκρασίες. Στην αρχή η αγαρόζη τήκεται σε ρυθμιστικό διάλυμα μέχρι να σχηματιστεί ένα διαυγές διάλυμα. Με την ψύξη του διαλύματος σχηματίζεται ένα πλέγμα που το μέγεθος των πόρων του εξαρτάται από την συγκέντρωση της αγαρόζης. Με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου τα τμήματα του DNA, που είναι αρνητικά φορτισμένα σε ουδέτερο pH, μετακινούνται προς την άνοδο. Στα δείγματα του DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν προστίθεται διάλυμα χρωστικής που περιλαμβάνει συγκεκριμένες χρωστικές (μπλε βρωμοφαινόλης και κυανούν του ξυλενίου) που κινούνται προς την άνοδο έτσι ώστε να παρακολουθείται οπτικά η ηλεκτροφόρηση και κάποια ουσία (γλυκερόλη ή φικόλη) που διευκολύνει την ομαλή εναπόθεση του δείγματος στις εγκοπές.

Η ταχύτητα μετακίνησης των τμημάτων DNA και ο διαχωρισμός τους εξαρτάται από ορισμένους παράγοντες:

- Το μέγεθος των τμημάτων του DNA. Η ταχύτητα μετακίνησης των τμημάτων DNA στην πηκτή είναι αντιστρόφως ανάλογη του δεκαδικού λογάριθμου του αριθμού των βάσεων τους (δηλ. του μοριακού τους βάρους).

- Τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Ένα συγκεκριμένο τμήμα DNA μετακινείται με διαφορετικές ταχύτητες σε πηκτές με διαφορετική συγκέντρωση αγαρόζης.
- Τη διαμόρφωση των τμημάτων DNA. Υπερελικωμένα, κυκλικά και γραμμικά τμήματα DNA ίδιου μοριακού βάρους κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της πηκτής.
- Το δυναμικό που εφαρμόζεται στα άκρα της πηκτής.
- Τη συγκέντρωση και τη ρυθμιστική ικανότητα του διαλύματος της ηλεκτροφόρησης.
- Την παρουσία του βρωμιούχου αιθιδίου στην πηκτή. Η ουσία αυτή χρησιμοποιείται για την βαφή των τμημάτων DNA καθώς παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του. Η ιδιότητα της να απορροφά υπεριώδη ακτινοβολία και να την επανεκπέμπει στο κόκκινο ορατό φάσμα χρησιμοποιείται για να ανιχνευθούν τα τμήματα του DNA πάνω στην πηκτή.

Ανάλογα με το ποσοστό αγαρόζης στην πηκτή έχουμε δυνατότητα διαχωρισμού σε διαφορετικές περιοχές μεγεθών ως εξής :

Ποσοστό αγαρόζης %	Διαχωρισμός μεταξύ μεγεθών (bp)
0.3%	5000-6000
0.6%	1000-20000
0.7%	800-10000
0.9%	500-7000
1.2%	400-600
1.5%	200-300
2.0%	100-200

Πειραματικό μέρος.

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

εγκοπές και περιμένουμε να πήξει.

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

Οι ποσοτικοποιήσεις των δειγμάτων που ηλεκτροφορήθηκαν έγιναν κατά προσέγγιση μέσω σύγκρισης της έντασης της ζώνης του δείγματος με τις ζώνες του μάρτυρα γνωστής ποσότητας.

B.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Θεωρητικό μέρος.

Για την απομόνωση των διαχωρισθέντων τμημάτων του DNA από την αгарόζη χρησιμοποιούνται τα αντιδραστήρια και το πρωτόκολλο που παρέχονται από το Qiaquick Gel Extraction Kit της εταιρίας Qiagen. Με το πρωτόκολλο αυτό μπορούμε να απομονώσουμε DNA μεγέθους από 70 bp έως 10kb.

Πειραματικό μέρος.

- Το τμήμα του DNA που μας ενδιαφέρει αποκόπτεται από την πηκτή αгарόζης με Αποστειρωμένο νυστέρι και τοποθετείται σε σωλήνα μικροφυγοκέντρησης (eppendorf).
- Ζυγίζουμε την ποσότητα που ανακτήσαμε και προσθέτουμε 3 όγκους διαλύματος QG διαλυτοποίησης της αгарόζης με αναλογία 300 μl / 100 mg πηκτής.
- Επώαζουμε στους 50⁰ C για 10 λεπτά με κατά περιόδους ανάδευση ώστε η πηκτή να διαλυτοποιηθεί.
- Μετά την διαλυτοποίηση της αгарόζης ελέγχουμε εάν το χρώμα του μίγματος είναι παρόμοιο με του διαλύματος QG. Εάν είναι πορτοκαλί ή βιολετί τότε προσθέτουμε 3M CH₃COONa pH 5,0 για να γίνει το χρώμα κίτρινο και το DNA να απορροφηθεί στη στήλη σε pH<7,5.
- Προσθέτουμε ίσο όγκο ισοπροπανόλης με την ποσότητα που ζυγίσαμε και ανακατεύουμε.

- Περνάμε το διάλυμα από την ειδική στήλη Qiaquick για να γίνει η πρόσδεση του DNA και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό σε 12000g. Χύνουμε το έκλουσμα.
- Προσθέτουμε στη στήλη 0,5 ml διαλύματος QG και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό σε 12000g ώστε όλα τα ίχνη αγαρόζης να απομακρυνθούν .
- Προσθέτουμε 0,75 ml διαλύματος PE για να πλύνουμε την κολώνα, το αφήνουμε 2-5 λεπτά και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στις παραπάνω συνθήκες.
- Ξαναφυγοκεντρούμε την στήλη για 1 λεπτό για να διώξουμε τα υπολείμματα.
- Τοποθετούμε την στήλη σε καινούργιο σωληνάκι μικροφυγοκέντρου.
- Προσθέτουμε 50ml ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης EB (Elution Buffer) (10mM Tris-Cl pH 8,5) ή δις απεσταγμένου H₂O στο κέντρο της στήλης για την έκλουση του DNA.
- Την αφήνουμε για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ανακτούμε το DNA με φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 12000 g.

B.4. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ

Θεωρητικό μέρος.

Η κλωνοποίηση DNA σε πλασμιδιακούς φορείς βασίζεται στην ικανότητα του πλασμιδιακού DNA να διασπάται σε συγκεκριμένες θέσεις μετά από πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού και να συνδέεται με το 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 ώστε τα άκρα τους να είναι συμβατά και να μπορούν να επανακυκλοποιηθούν, συνδέονται ομοιοπολικά με την δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού καταλυόμενη από μία DNA λιγάση και μετασηματίζουν κατάλληλα στελέχη βακτηριακών κυττάρων. Εφόσον αναπτυχθούν παρουσία του αντιβιοτικού στο οποίο προσδίδει αντίσταση ο πλασμιδιακός φορέας, απομονώνεται το ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό DNA.

B.4.1. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ DNA ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ ΦΟΡΕΑ ΓΙΑ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ

Θεωρητικό μέρος.

Σε όλες τις περιπτώσεις κατά την διάρκεια της εργασίας η κλωνοποίηση γίνεται με πέψη των πλασμιδιακών φορέων με τις κατάλληλες ενδονουκλεάσες περιορισμού, στη

συνέχεια ακολουθεί ο χειρισμός των πλασμιδίων με αλκαλική φωσφατάση CIP (Calf Intestinal alkaline phosphatase), επώση με την πρωτεΐνωση K, εκχύλιση με φαινόλη χλωροφόρμιο, καθίζηση με αιθανόλη και η μεταφορά των τμημάτων του DNA στους πλασμιδιακούς φορείς με την αντίδραση της λιγάσης.

B.4.1.1. Πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Θεωρητικό μέρος.

Τα ένζυμα περιορισμού είναι ενδονουκλεάσες οι οποίες προέρχονται κατά κανόνα από μικροοργανισμούς και απαιτούν συγκεκριμένες συνθήκες για να έχουν τη μέγιστη δράση τους. Αυτές είναι α) παρουσία Mg^{++} σε συγκεντρώσεις των 10mM β) συνήθως θερμοκρασία 37⁰C (υπάρχουν και ένζυμα που προέρχονται από θερμοφιλα βακτήρια και απαιτούν 65⁰C) γ) pH 7,0-8,0 δ) παρουσία διθειοθρεϊτόλης (DTT) που προστατεύει τους δισουλφιδικούς δεσμούς που τυχόν έχει το ένζυμο ε) ιονική ισχύ ειδική για κάθε ένζυμο που κυμαίνεται μεταξύ 0-150mM ζ) παρουσία BSA (bovinum serum albumin-αλβουμίνη από ορό βοοειδούς) που δημιουργεί «πρωτεϊνικό περιβάλλον» στο ένζυμο.

Υπάρχουν δύο είδη τέτοιων αντιδράσεων α) η αναλυτική πέψη η οποία γίνεται για να ελέγξουμε το ένθεμα του DNA που μας ενδιαφέρει π.χ. εάν κόβεται, σε ποια σημεία, από συγκεκριμένα ένζυμα δειγματοληπτικά και β) η παρασκευαστική πέψη με την οποία τελικά παρασκευάζουμε το κομμάτι του DNA του ενδιαφέροντός μας για περαιτέρω χρήση. Η πρώτη γίνεται συνήθως σε 20μl και η δεύτερη σε μεγαλύτερο όγκο. Οι αναλογίες των αντιδραστηρίων παραμένουν ίδιες. Η ποσότητα κάθε ενζύμου που χρησιμοποιείται σε αντίδραση πέψης καθορίζεται από την ενεργότητά του (Unit/μl). Το 1 unit αντιπροσωπεύει την ποσότητα του ενζύμου που πέπτει 1μg DNA σε 1 ώρα στους 37⁰C. Προσέχουμε η μέγιστη ποσότητα του ενζύμου να είναι τόση (συνήθως 10%) ώστε η συγκέντρωση της γλυκερόλης που υπάρχει στο ένζυμο να μην υπερβαίνει το 5% του όγκου της αντίδρασης.

Πειραματικό μέρος.

■ Για την αντίδραση της πέψης αναμιγνύουμε τα παρακάτω:

- x μg πλασμιδιακού DNA
- y unit ενζύμου ή ενζύμων ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 10% κ.ο.
- ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου ώστε η τελική συγκέντρωσή του να είναι 1x.

- 10x BSA (bovine serum albumin-αλβουμίνη από ορό βοοειδούς), ώστε η τελική συγκέντρωση της να είναι 100μg/ml (σε όποιο ένζυμο χρειάζεται).
 - 0.5μl ριβονουκλεάσης RNase A
(Όταν το DNA προέρχεται από παρασκευη μικρής κλίμακας και περιέχει βακτηριακό RNA).
 - ddH₂O μέχρι του επιθυμητού τελικού όγκου .
- Επωάζουμε στην καθορισμένη (για κάθε ένζυμο) θερμοκρασία, για 2 ώρες.

B.4.1.2. Αποφωσφορυλίωση γραμμικού πλασμιδιακού DNA με αλκαλική φωσφατάση (CIP)

Η αλκαλική φωσφατάση καταλύει την αποφωσφορυλίωση των άκρων του δίκλωνου γραμμικού πλασμιδιακού φορέα εμποδίζοντας έτσι τα άκρα του να ενωθούν ξανά γεγονός που θα ανέστειλε την κλωνοποίηση.

- Προσθέτουμε στο μίγμα της αντίδρασης τα παρακάτω:
 - x μg πλασμιδιακού DNA
 - 1x ρυθμιστικού διαλύματος αλκαλικής φωσφατάσης
 - x units αλκαλικής φωσφατάσης εντέρου βοός (CIP) 1000 unit/ml (Biolabs)
(αναλογία 1 unit ανά μg DNA)
 - ddH₂O μέχρι τελικού όγκου.
- Επωάζουμε για 30 λεπτά στους 37⁰C.

B.4.1.3. Επώαση με πρωτεΐνωση K

Στην συνέχεια το πλασμιδιακό DNA καθαρίζεται από τα προϊόντα της πέψης με επώαση παρουσία Πρωτεΐνωσης K. Η πρωτεΐνωση K είναι μία πρωτεάση. Στο διάλυμα πέψης υπάρχει ρυθμιστικό διάλυμα του pH (Tris-HCl), NaCl (για σταθερή ιονική ισχύ), EDTA (για να προστατεύει απ' τις ενδογενείς νουκλεάσες), και SDS για να αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και να αποκαλύπτει τις αλληλουχίες στόχους της πρωτεάσης (η Πρωτεΐνωση K έχει πολύ ισχυρή τριτοταγή δομή και δεν αποδιατάσσεται στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις του SDS).

- Προσθέτουμε στο μίγμα της αντίδρασης τα παρακάτω:
 - 100μg/ml. Πρωτεΐνωσης K
 - 0,2% SDS

- Επωάζουμε για 60 λεπτά στους 37⁰C.

B.4.1.4. Καθαρισμός νουκλεϊκών οξέων με εκγυλίσεις με οργανικούς διαλύτες

Στην συνέχεια οι αποδιαταγμένες πρωτεΐνες απομακρύνονται από την αντίδραση με εκχύλιση με ισομοριακό μίγμα φαινόλης : χλωροφορμίου. Στην φαινολική φάση βρίσκονται τα υδρόφοβα μόρια όπως λιπίδια, στην μεσόφαση κατακρημνίζονται οι αποδιαταγμένες πρωτεΐνες και στην υδατική φάση όλα τα υδατοδιαλυτά μόρια όπως DNA, RNA, άλατα κ.α.

- Προσθέτουμε ίσο όγκο διαλύματος φαινόλης : χλωροφόρμιου (1:1) με το διάλυμα νουκλεϊκού οξέος.
- Αναδεύουμε μέχρι στο διάλυμα να συμβεί γαλακτωματοποίηση.
- Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά σε 12000g σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μεταφέρουμε την υδατική φάση σε αποστειρωμένο σωλήνα μικροφυγόκεντρου.
- Επαναλαμβάνουμε τα παραπάνω.
- Στην καινούργια υδατική φάση προσθέτουμε ίσο όγκο χλωροφόρμιου και επαναλαμβάνουμε την φυγοκέντρωση.
- Μεταφέρουμε την υπερκείμενη υδατική φάση σε νέο σωληνάκι.
- Ακολουθεί κατακρήμιση του DNA με αιθανόλη.

B.4.1.5. Κατακρήμιση νουκλεϊκών οξέων με αιθανόλη

- Προσθέτουμε 2,5 όγκους αιθανόλης 100% στο διάλυμα νουκλεϊκών οξέων και το 1/10 του όγκου CH₃COONa 3M (pH 5,2).
- Επωάζουμε στους -20⁰ C για 30 λεπτά τουλάχιστον.
- Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στους 4⁰ C σε 12000g.
- Ξεπλένουμε το ίζημα με 1ml EtOH 70% και ξαναφυγοκεντρούμε στις παραπάνω συνθήκες.
- Ξηραίνουμε το ίζημα στον αέρα.
- Το επαναδιαλύουμε σε ddH₂O ή σε ρυθμιστικό δ/μα TE .

B.4.1.6. Αντίδραση σύνδεσης με λιγάση

Ακολουθεί η αντίδραση με την λιγάση. Η DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T4 καταλύει την δημιουργία φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ γειτονικών 3'-υδροξυλικών και 5'-φωσφορικών άκρων.

- Προσθέτουμε στο μίγμα της αντίδρασης το DNA που θέλουμε να ενσωματώσουμε και το DNA του φορέα σε μοριακή (αριθμός μορίων) αναλογία 5:1
 - 1-5 units T4 DNA λιγάσης
 - 1x ρυθμιστικού διαλύματος T4 DNA λιγάσης
 - απιονισμένο H₂O μέχρι τελικού όγκου 20 μl.
- Επωάζουμε το μίγμα για 12-16 ώρες σε θερμοκρασία 16° C και ακολουθεί μετασηματισμός των κατάλληλων σε κάθε περίπτωση κυττάρων *E.coli* τα οποία έχουν ήδη γίνει επιδεκτικά.

B.4.2. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ DNA-ΕΝΘΕΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ

B.4.2.1. Χειρισμός του DNA με Klenow πολυμεράση

- Η αντίδραση του συμπληρώματος των άκρων τμήματος DNA με το ένζυμο DNA πολυμεράση I έχει ως εξής :
 - 1x ρυθμιστικού διαλύματος DNA Polymerase I, large (Klenow) fragment
 - 100μM από καθένα από τα dATP, dCTP, dTTP, dGTP
 - x μg του DNA
 - ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 20μl
 - x units DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment (5000units/ml BioLabs) (1 unit/μg DNA)
- Επωάζουμε στους 37⁰C για 15 λεπτά.
- Επωάζουμε στους 75⁰C για 20 λεπτά (απενεργοποίηση του ενζύμου).

B.5. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

B.5.1. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας με αλκαλική λύση

Η απομόνωση και ο καθαρισμός του πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα περιλαμβάνει τρία στάδια: την ανάπτυξη της μετασηματισμένης βακτηριακής καλλιέργειας, την συλλογή και λύση των κυττάρων, το διαχωρισμό του πλασμιδιακού DNA από το γενωμικό και τον καθαρισμό του.

- Επιμολύνουμε 1,5 ml κατάλληλου υγρού θρεπτικού μέσου παρουσία αντιβιοτικού με μία αποικία του στελέχους επιλογής.

- Επωάζουμε τα βακτήρια στους 37° C όλη νύχτα..

- Φυγοκεντρούμε σε 3000g για 10 λεπτά..

- Αιωρούμε το ίζημα των κυττάρων σε 200 μl διαλύματος I για 5 λεπτά.

Με το διάλυμα I που περιέχει γλυκόζη τα κύτταρα λύνονται λόγω οσμωτικού σοκ, το EDTA κατακρατεί τα ιόντα Mg^{++} και εμποδίζει τις DNάσες να δράσουν και το Tris pH 8,0 κρατά ελεγχόμενο το pH.

- Προσθέτουμε στο αιώρημα διπλάσιο όγκο (400μl) διαλύματος II και ομογενοποιούμε με απλή ανακίνηση του σωλήνα.

Με το διάλυμα II που περιέχει NaOH αποδιατάσσουμε το δίκλωνο DNA λόγω αλκαλικού περιβάλλοντος και με το SDS επιφέρουμε λύση των κυττάρων και αποδιάταξη των μεμβρανών.

- Επωάζουμε το μίγμα για 5 λεπτά στον πάγο.

- Στην συνέχεια προσθέτουμε 300 μl ψυχρού διαλύματος III (CH_3COOK 5M pH 5,8) και το επωάζουμε για 5 λεπτά στον πάγο.

Το διάλυμα III περιέχει υψηλή συγκέντρωση CH_3COOK και προκαλεί εξουδετέρωση του διαλύματος. Το πλασμιδιακό DNA επαναδιατάσσεται επειδή είναι μικρό και κυκλικό και παραμένει διαλυμένο στο νερό, ενώ το βακτηριακό σχηματίζει επαναδιατασσόμενο ένα δυσδιάλυτο μεγαλομοριακό σύμπλεγμα που καθιζάνει και έτσι διαχωρίζεται από το πρώτο

- Φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά σε 10000g.

Με την φυγοκέντρωση αυτή διαχωρίζονται τα ευδιάλυτα μόρια (πλασμίδιο Μονόκλωνο RNA, άλατα κ.λ.π.) που παραμένουν στο υπερκείμενο, από τα δυσδιάλυτα μόρια (βακτηριακό DNA, αποδιαταγμένες πρωτεΐνες, κυτταρικά συστατικά κ.λ.π.) που καθιζάνουν με μορφή ιζήματος.

- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο από κάθε καλλιέργεια σε καινούργια σωληνάκια μικροφυγόκεντρου και το DNA εκχυλίζεται με την προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης/χλωροφορμίου αναλογίας 1:1 (προαιρετικό).

- Φυγοκεντρούμε 5 λεπτά σε 12000 g στους 4°C .

- Απομονώνουμε από την υπερκείμενη στοιβάδα 700μl και προσθέτουμε ίσο όγκο ισοπροπανόλης. *Η ισοπροπανόλη επάγει την καθίζηση των νουκλεϊκών οξέων επειδή απορροφά νερό (όπως και η αιθανόλη) και τα μόρια δεν μπορούν να παραμείνουν διαλυμένα σε αυτό.*
- Επωάζουμε στους -20°C για 10 λεπτά.
- Φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά σε 10000 g.
Με την φυγοκέντρωση αυτή διαχωρίζεται το πλασμιδιακό DNA από διάφορα άλλα ευδιάλυτα μόρια.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και ξεπλένουμε το ίζημα με 1ml EtOH 70 %.
- Ξαναφυγοκεντρούμε στις παραπάνω συνθήκες.
- Ξηραίνουμε το ίζημα στον αέρα.
- Το ίζημα που προκύπτει, το αιωρούμε σε 20 μl διαλύματος T.E. και το φυλάσσουμε στους -20°C .

B.5.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας με τη μέθοδο της λύσης με βρασμό (ή Stet-Lysozyme method)

- Επιμολύνουμε 1,5 ml κατάλληλου υγρού θρεπτικού μέσου παρουσία αντιβιοτικού με μία αποικία του στελέχους επιλογής.
- Επωάζουμε τα βακτήρια στους 37°C όλη τη νύχτα.
- Φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό σε 10000 g και αφαιρούμε το υπερκείμενο.
- Προσθέτουμε στο ίζημα 200μl διαλύματος STET και αναδεύουμε.
- Επωάζουμε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθέτουμε 5μl λυσοζύμης 10mg/ml
(καταστροφή των βακτηριακών τοιχωμάτων).
- Επωάζουμε για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- Θερμαίνουμε στους 100°C για 1 λεπτό.
- Φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά σε 12000g σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε καινούργιο σωληνάκι μικροφυγοκέντρου και προσθέτουμε ένα όγκο ισοπροπανόλης.
- Αφήνουμε στους -20°C για 10 λεπτά
- Φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά σε 10000 g σε θερμοκρασία 4°C .
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και ξεπλένουμε το ίζημα με 1ml EtOH 70%.
- Ξαναφυγοκεντρούμε στις παραπάνω συνθήκες.

- Ξηραίνουμε το ίζημα στον αέρα.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε δις απεσταγμένο νερό ή σε ρυθμιστικό διάλυμα T.E. προσθέτοντας και RNase A και το διατηρούμε στους -20°C .

B.5.3. Απομόνωση και καθαρισμός πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας με την μέθοδο της Qiagen

Για την απομόνωση και καθαρισμό πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιώντας το kit Qiagen- tip 500 ακολουθείται το παρακάτω πρωτόκολλο όπως προτείνει ο κατασκευαστής.

- Επιμολύνουμε κατάλληλο όγκο υγρού θρεπτικού μέσου παρουσία αντιβιοτικού με μία αποικία του στελέχους επιλογής και το επωάζουμε όλη νύχτα στους 37°C .
- Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση σε 3000 g για 15 λεπτά στους 4°C .
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα που απομένει μετά από την απόχυση του υπερκειμένου σε 4 ml διαλύματος P1 στο οποίο έχουμε προσθέσει 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A.
- Προσθέτουμε 4 ml διαλύματος P2 με απαλή ανάδευση ώστε να καταστεί ομογενές και το αφήνουμε για διάστημα 5 λεπτών σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- Προσθέτουμε 4 ml ψυχρού διαλύματος P3 και μετά από απαλή ανακίνηση το αφήνουμε για 20 λεπτά στους 4°C .
- Φυγοκεντρούμε για 30 λεπτά σε 12000 g.
- Συγχρόνως εξισορροπούμε την στήλη tip 500 με 4 ml διαλύματος QBT
- Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης το περνάμε από γάζα (ήδη βρεγμένη με αποστειρωμένο νερό).
- Στην συνέχεια το αφήνουμε να περάσει από την στήλη tip 500.
- Μετά την διέλευση του υπερκειμένου από την στήλη, την ξεπλένουμε τέσσερις φορές με 2 ml διαλύματος QC ώστε να απομακρυνθούν τυχόν προσμίξεις από την προηγούμενη κατεργασία.
- Εκλούουμε το DNA από την στήλη. Αυτό επιτυγχάνεται με τη διέλευση 2 ml διαλύματος QF
- Αφού συλλέξουμε το σύνολο του παραπάνω διαλύματος προσθέτουμε 0.7 όγκους ισοπροπανόλης για κατακρήμιση του DNA.
- Φυγοκεντρούμε σε 12000 g για 30 λεπτά στους 4°C .
- Αποχύνουμε το υπερκείμενο και ξεπλένουμε με 1 ml 70% αιθανόλη. .

- Το ίζημα που παραλαμβάνουμε μετά από την φυγοκέντρηση σε 12000g το στεγνώνουμε και στην συνέχεια το αιωρούμε σε διάλυμα TE και το φυλάσσουμε στους -20°C .
- Μικρή ποσότητα από το έκλουσμα (2-4 μl) το ηλεκτροφορούμε σε πηκτή αγαρόζης για να διαπιστωθεί κατ' εκτίμηση η απόδοση της παρασκευής.

B.5.4. Παρασκευή γλυκερινικών αποθεμάτων των στελεχών - Glycerol stocks.

- Σε 850 μl πυκνής καλλιέργειας του στελέχους του ενδιαφέροντος μας $\text{OD}>2$ προσθέτουμε 150 μl γλυκερόλης 100% ώστε στο τελικό διάλυμα η περιεκτικότητα της να είναι 15%.
- Τα αναμιγνύουμε και τα αποθηκεύουμε αμέσως στους -70°C .

B. 6. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ S.C. ΜΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ DNA

Το πρωτόκολλο μετασχηματισμού κυττάρων S.c. περιλαμβάνει διάφορες παραλλαγές ανάλογα με την απαιτούμενη απόδοση (αποικίες/ μg DNA) Ακολουθούν τα παρακάτω πρωτόκολλα.

B.6.1. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΜΕ ΟΞΙΚΟ ΛΙΘΙΟ. (THE LiAc TRAF0 METHOD PAGE κατά Gietz & Woods)

Το πρωτόκολλο αυτό ενδείκνυται για μετασχηματισμό υψηλής απόδοσης κυττάρων σακχαρομύκητα.

- Επιάζουμε 2ml υγρής καλλιέργειας το στέλεχος του σακχαρομύκητα επιλογής σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο στους 30°C όλη νύχτα.
- Φωτομετρούμε την καλλιέργεια στα 600 nm και μεταφέρουμε ποσότητα αυτής σε 10ml θρεπτικού YPD ώστε ο αριθμός των κυττάρων στην τελευταία να είναι $5 \times 10^6/\text{ml}$.
- Επιάζουμε σε αναδευτήρα στους 30°C έως ότου να έχουμε 2×10^7 κύτταρα/ml. Αυτό χρειάζεται 3-5 ώρες. Είναι σημαντικό να επιτρέψουμε στα κύτταρα να ολοκληρώσουν τουλάχιστον δύο διαιρέσεις. Η ικανότητα του μετασχηματισμού

(μετασχηματισμένα κύτταρα /μg πλασμιδίου) παραμένει σταθερή για 3-4 διαιρέσεις.

- Φυγοκεντρούμε την καλλιέργεια για 5 λεπτά σε 3000g.
- Ξεπλύνουμε τα κύτταρα με 5 ml δις απεσταγμένου και αποστειρωμένου H₂O και ξαναφυγοκεντρούμε.
- Χύνουμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε το ίζημα των κυττάρων σε 1 ml οξικού λιθίου (CH₃COOLi) 0.1M.
- Φυγοκεντρούμε για 15 δευτερόλεπτα σε 10000 g.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο CH₃COOLi.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα των κυττάρων σε τελικό όγκο 100 μl CH₃COOLi 0.1M και αναδεύουμε.
- Φυγοκεντρούμε για 10 δευτερόλεπτα σε 10000 g.
- Στο ίζημα των κυττάρων προσθέτουμε τα παρακάτω αντιδραστήρια με την εξής σειρά :
 - 240 μl 50% (w/v) πολυαιθυλενγλυκόλη 3350MW (PEG) (η πολυαιθυλένγλυκόλη πρέπει να προστεθεί πρώτη για να προστατεύσει τα κύτταρα από την επιζήμια δράση της υψηλής συγκέντρωσης του CH₃COOLi),
 - 36 μl 1M CH₃COOLi,
 - 50μl ssDNA από σπέρμα σολομού 2mg/ml (το οποίο πρώτα θερμάναμε στους 100⁰ C για 30 λεπτά και μετά το παγώσαμε. Βλ. παρασκευή στο κεφάλαιο των διαλυμάτων.),
 - x μl πλασμιδιακού DNA (από 0,1-10 μg),
 - 34-x μl δις απεσταγμένου και αποστειρωμένου H₂O.
- Αναδεύουμε το μίγμα έως ότου τα κύτταρα διαλυθούν καλά .
- Επωάζουμε για 30 λεπτά στους 30⁰ C.
- Επωάζουμε για 20 λεπτά στους 42⁰ C.
- Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα σε 12000g για 15 δευτερόλεπτα.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα των κυττάρων σε 1 ml δις απεσταγμένου και αποστειρωμένου H₂O
(απαλά εάν θέλουμε υψηλή απόδοση στον μετασχηματισμό των κυττάρων).
- Απλώνουμε σε τρυβλία με κατάλληλο θρεπτικό μέσο και επωάζουμε για 2-4 ημέρες στους 30⁰ C.

B.6.2. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ

(Quick and Easy protocol κατά Gietz & Woods)

Με την μέθοδο αυτή μπορούμε να μετασχηματίσουμε γρήγορα οποιοδήποτε κύτταρο σακχαρομύκητα. Την χρησιμοποιούμε κυρίως σε περιπτώσεις που δεν μας ενδιαφέρει η απόδοση μετασχηματισμού.

- Μαζεύουμε από ένα τρυβλίο αποικίες του στελέχους του ενδιαφέροντός μας που θα μετασχηματιστεί (με scraper) έτσι ώστε ο όγκος των κυττάρων να αντιστοιχεί περίπου σε 25 μ l. *Φροντίζουμε το τρυβλίο μας να είναι όχι παλαιότερο από μία εβδομάδα.*
- Επωάζουμε το στέλεχος του σακχαρομύκητα σε κατάλληλο όγκο υγρής καλλιέργειας σε θρεπτικό μέσο επιλογής στους 30⁰C όλη νύχτα.
- Φωτομετρούμε την καλλιέργεια στα 600 nm και μεταφέρουμε ποσότητα αυτής σε κατάλληλο όγκο θρεπτικού υλικού ώστε ο αριθμός των κυττάρων στην τελευταία να είναι 5x10⁶/ml.
- Επωάζουμε σε αναδευτήρα στους 30⁰ C έως ότου να έχουμε 2x10⁷ κύτταρα/ml. *Αυτό χρειάζεται 3-5 ώρες. Είναι σημαντικό να επιτρέψουμε στα κύτταρα να ολοκληρώσουν τουλάχιστον δύο διαιρέσεις. Η ικανότητα του μετασχηματισμού (μετασχηματισμένα κύτταρα / μ g πλασμιδίου) παραμένει σταθερή για 3-4 διαιρέσεις.*
- Φυγοκεντρούμε την καλλιέργεια για 5 λεπτά σε 3000g.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα των κυττάρων σε 1 ml CH₃COOLi 0,1M και επωάζουμε για 5 λεπτά στους 30⁰C.
- Φυγοκεντρούμε για 5 δευτερόλεπτα σε 10000 g και αφαιρούμε το υπερκείμενο.
- Στο ίζημα των κυττάρων προσθέτουμε τα παρακάτω αντιδραστήρια με την ακόλουθη σειρά :
 - 240 μ l 50% (w/v) πολυαιθυλεγγλυκόλη 3350 MW (PEG),
 - 36 μ l 1M CH₃COOLi,
 - 50 μ l DNA από σπέρμα σολομού 2mg/ml (το οποίο πρώτα θερμάναμε στους 100⁰ C για 30 λεπτά και μετά το παγώσαμε),
 - x μ l πλασμιδιακού DNA (από 0,1 μ g -5 μ g),
 - 20-x μ l δις απεσταγμένου H₂O.
- Αναδεύουμε έως ότου τα κύτταρα διαλυθούν καλά.
- Επωάζουμε στους 30⁰ C για 30 λεπτά
- Επωάζουμε στους 42⁰ C για 20 λεπτά.

- Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα σε 12000g για 10 δευτερόλεπτα.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 200-400μl δις απεσταγμένου H₂O.
- Απλώνουμε το διάλυμα σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο επιλογής για το πλασμίδιο
- Οι αποικίες θα πρέπει να μεγαλώσουν σε 2-4 ημέρες στους 30°C.

B.6.3. ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΔΥΟ ΥΒΡΙΔΙΩΝ (TWO HYBRID SYSTEM TRAF0 PROTOCOL κατά Gietz & Woods)

Το πρωτόκολλο αυτό αποτελεί παραλλαγή του πρωτοκόλλου υψηλής απόδοσης για μεγάλες ποσότητες.

- Επωάζουμε υγρή καλλιέργεια του στελέχους που θα μετασχηματιστεί σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο στους 30°C όλη νύχτα. Ο όγκος της καλλιέργειας θα εξαρτηθεί από την κλίμακα που θα χρησιμοποιήσουμε.

Πολλαπλάσια κλίμακα αντίδρασης:	10 X	30 X	60 X
Όγκος καλλιέργειας:	25 ml	50 ml	100 ml

- Φωτομετρούμε την καλλιέργεια στα 600 nm. Ο τίτλος των κυττάρων θα πρέπει να είναι 1-2 x 10⁷/ml.
- Φυγοκεντρούμε την καλλιέργεια για 5 λεπτά σε 3000g και επαναδιαλύουμε το ίζημα σε υγρό θρεπτικό μέσο YPAD για δύο διαιρέσεις ακόμη έτσι ώστε να έχουμε αριθμό κυττάρων 5X10⁶/ml.

Πολλαπλάσια κλίμακα αντίδρασης:	10 X	30 X	60 X
Όγκος καλλιέργειας YPAD:	50ml	150 ml	300 ml
Αριθμός	2,5 x 10 ⁸	7,5 x 10 ⁸	1,5 x 10 ⁹

απαιτούμενων κυττάρων:	
Τίτλος κυττάρων	5X10 ⁶ /ml

- Επωάζουμε σε αναδευτήρα στους 30⁰ C για 3-4 ώρες έως ότου έχουμε 2x10⁷ κύτταρα/ml.
- Φυγοκεντρούμε την καλλιέργεια για 5 λεπτά σε 3000 g.
- Ξεπλένουμε τα κύτταρα με το 1/2 του αρχικού τους όγκου δις απεσταγμένου H₂O και ξαναφυγοκεντρούμε για 5 λεπτά σε 3000 g.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα των κυττάρων στον κατάλληλο όγκο CH₃COOLi 0,1M.

Πολ/σια κλίμακα αντίδρασης:	10 X	30 X	60 X
100mM CH₃COOLi	3 ml	3 ml	6 ml

- Επωάζουμε για 15 λεπτά στους 30⁰ C και φυγοκεντρούμε. Χύνουμε το υπερκείμενο.
- Στο ίζημα των κυττάρων προσθέτουμε τα παρακάτω αντιδραστήρια με την σειρά που δίνονται :

Πολ/σια κλίμακα αντίδρασης:	10 X	30 X	60 X
50%(w/v) PEG 3350	2,4 ml	7,2 ml	14,4 ml
1M CH₃COOLi	360 μl	1,08 ml	2,16 ml
DNA από σπέρμα σολομού (2mg/ml)	500 μl	1,50 ml	3,00 ml
Πλασμιδιακό DNA βιβλιοθήκης	A μl	B μl	Γ μl
Δις απεσταγμένο H₂O	340-A μl	1,02-B ml	2,04 -Γ ml

- Αναδεύουμε το μίγμα έως ότου τα κύτταρα διαλυθούν καλά
- Επωάζουμε για 30 λεπτά στους 30⁰ C.
- Ο χρόνος επώασης στους 42⁰ C φαίνεται στον παρακάτω πίνακα. Κάθε 5 λεπτά . ανακινούμε το περιεχόμενο της καλλιέργειας για 5 δευτερόλεπτα ώστε να έχουμε

ομοιόμορφη θερμοκρασία στο μίγμα.

Πολ/σια κλίμακα αντίδρασης:	10 X	30 X	60 X
Χρόνος στους 42^o C	30 λεπτά	40 λεπτά	45-60 λεπτά

- Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα σε 10000g για 10 δευτερόλεπτα.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα απαλά στον κατάλληλο όγκο δις απεσταγμένου H₂O.

Πολ/σια κλίμακα αντίδρασης:	10 X	30 X	60 X
Όγκος dd H₂O:	10 ml	40 ml	40 ml

- Απλώνουμε σε τρυβλία με κατάλληλο θρεπτικό μέσο και επωάζουμε για 3-5 ημέρες. Στην περίπτωση της 30X κλίμακας και της 60X απλώνουμε σε 100 τρυβλία.
- * Όλα τα διαλύματα που αναφέρονται στα τρία πρωτόκολλα πρέπει να αποστειρωθούν σε αυτόκαυστο πριν την χρήση.

B.7. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ

ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ

- Βάζουμε για επώαση στους 30^oC όλη νύχτα, υγρές καλλιέργειες όγκου 1ml σε σωληνάκια των 15 ml με τα μετασχηματισμένα κύτταρα του σακχαρομύκητα στο κατάλληλο θρεπτικό μέσο επιλογής.
- Την επόμενη ημέρα φυγοκεντρούμε για 2 λεπτά σε ταχύτητα 3000 g.
- Χύνουμε το υπερκείμενο.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα των κυττάρων που πήραμε από τις καλλιέργειες σε 200μl διαλύματος διάσωσης (RESCUE - αποδιοργάνωση των κυτταρικών μεμβρανών).
- Προσθέτουμε αποστειρωμένα υάλινα σφαιρίδια (glass beads, διαμέτρου 0,45 mm) μέχρι κάτω από την επιφάνεια του υγρού.
- Αναδεύουμε για 2 λεπτά.
- Προσθέτουμε 200μl διάλυμα φαινόλης.
- Αναδεύουμε για 1 λεπτό.
- Φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά με ταχύτητα 3000 g.

- Μεταφέρουμε το υδατικό υπερκείμενο σε καθαρό σωλήνα μικροφυγόκεντρο αποφεύγοντας να πάρουμε την μεσόφαση (*καθίζηση πρωτεϊνών με φαινόλη*).
- Προσθέτουμε 200μl διαλύματος φαινόλης : χλωροφόρμιου σε αναλογία 1:1.
- Αναδεύουμε για 1 λεπτό.
- Φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά με την ίδια ταχύτητα.
- Μεταφέρουμε την υδατική φάση σε νέο σωλήνα μικροφυγόκεντρο.
- Προσθέτουμε 2.5 όγκους αιθανόλη 100% και ένα 1/10 του όγκου CH₃COONa 3M.
- Επιάζουμε το DNA για 30 λεπτά σε -20°C.
- Φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά στους 4°C σε 12000g και χύνουμε το υπερκείμενο.
- Ξεπλένουμε με 1ml αιθανόλης 70% το ίζημα.
- Φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στις 12000g και χύνουμε το υπερκείμενο.
- Ξηραίνουμε το ίζημα.
- Προσθέτουμε 20ml TE
- Αποθηκεύουμε στους -20°C.
- Ακολουθεί μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων από τα πλασμίδια που απομονώθηκαν από την παραπάνω διαδικασία που αναφέρεται στην παράγραφο Β.4.

B.8. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΩΝ ΓΙΑ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Θεωρητικό μέρος.

Με τον όρο επιδεκτικό κύτταρο (competent cell), εννοούμε τα βακτηριακά κύτταρα που έχουν την ικανότητα να προσλαμβάνουν ξένο και συγκεκριμένα πλασμιδιακό DNA. Η τεχνική αυτή έχει ως στόχο να επάγει την επιδεκτικότητα των βακτηριακών κυττάρων, ώστε να είναι προετοιμασμένα για να προσλάβουν το πλασμίδιο επιλογής. Η μέθοδος βασίζεται στην παρατήρηση ότι βακτήρια κατεργασμένα με ψυχρά διαλύματα CaCl₂ και ακολούθως θερμασμένα μπορούν να προσλάβουν DNA, το οποίο προέρχεται από διάφορες πηγές.

Πολλές παραλλαγές της βασικής τεχνικής έχουν περιγραφεί και δύο από αυτές χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Τα επιδεκτικά κύτταρα *E.coli* που χρησιμοποιήθηκαν είναι α) KC8, β) Top10, γ) XL1/B και οι γονότυποι τους αναφέρονται στο παράρτημα II.

Πειραματικό μέρος.

B.8.1. Μέθοδος για επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα Top10 ή XL1/B

- 5ml κατάλληλου θρεπτικού υλικού εμβολιάζονται με βακτηριακά κύτταρα E.coli.
- Επώαζουμε για 12-16 ώρες στους 37° C υπό ανακίνηση.
- Αραιώνουμε την καλλιέργεια 1:100 σε τελικό όγκο 3 ml παρουσία του αντιβιοτικού επιλογής.
- Επώαζουμε στους 37° C για 2-3 ώρες.
- Αραιώνουμε 1:200 σε τελικό όγκο 50 ml θρεπτικού υλικού χωρίς αντιβιοτικό.
- Αφήνουμε την καλλιέργεια να μεγαλώσει έως ότου η απορρόφηση φτάσει σε $A_{590}=0,35-0,4$.
- Φυγοκεντρούμε στους 4°C στις 3000 g για 5 λεπτά.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 1/2 του αρχικού όγκου διαλύματος (25ml) TFBI .
Το TFBI φυλάσσεται στο ψυγείο. Η διαδικασία που ακολουθεί γίνεται σε παγόλουτρο.
- Το αφήνουμε στον πάγο για 10 λεπτά.
- Φυγοκεντρούμε στους 4°C στις 3000 g για 5 λεπτά.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 1/25 του αρχικού όγκου διαλύματος (2ml) TFBII.
- Αφήνουμε για 60 λεπτά στον πάγο.
- Το αιώρημα που προκύπτει μοιράζεται σε κλάσματα των 200 μl και εμβαπτίζεται σε λουτρό που αποτελείται από ξηρό πάγο/αιθανόλη για μικρό χρονικό διάστημα. Με τον τρόπο αυτό τα κύτταρα μπορούν να διατηρηθούν στους -70° C για πολλούς μήνες.

B.8.2. Μέθοδος για επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα KC8

- 5ml κατάλληλου θρεπτικού υλικού και με αντιβιοτικό επιλογής εμβολιάζονται με βακτηριακά κύτταρα στους 37° C όλη νύχτα.
- Επώαζουμε για 12-16 ώρες στους 37° C υπό ανακίνηση.
- Με 200ml της καλλιέργειας εμβολιάζουμε 50 ml L.B. με αντιβιοτικό επιλογής
- Επώαζουμε στους 37° C για 2-3 ώρες.
- Αφήνουμε την καλλιέργεια να μεγαλώσει έως ότου η απορρόφηση φτάσει σε $A_{550}=0.8$ (Περίπου 2-3 ώρες).
- Φυγοκεντρούμε στους 4°C σε 3000 g για 5 λεπτά.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 10ml κρύο TFBI (με χλωριούχο ρουβίδιο).

- Αφήνουμε στον πάγο για 20 λεπτά.
- Φυγοκεντρούμε στους 4⁰C σε 3000 g για 10 λεπτά.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 3ml TFBII (με χλωριούχο ρουβίδιο).
Αυτή η διαδικασία γίνεται στον πάγο.
- Το αιώρημα που προκύπτει το μοιράζουμε σε κλάσματα των 200 μl και αποθηκεύεται στους -70⁰ C.

B.9. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Ο μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* με το κλωνοποιημένο σε πλασμιδιακούς φορείς DNA περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

- Προσθέτουμε κατάλληλη ποσότητα από το DNA που θέλουμε να εισαγάγουμε σε 200μl επιδεκτικών κυττάρων *E.coli* από τους -70⁰C.
- Τα επωάζουμε για 30 λεπτά στον πάγο.
- Τα υποβάλλουμε σε θερμικό σοκ για 2 λεπτά στους 42⁰ C.
- Προσθέτουμε 1 ml υγρού θρεπτικού υλικού LB.
- Επωάζουμε στους 37⁰ C για 1 ώρα.
- Φυγοκεντρούμε για 10 δευτερόλεπτα σε 10000 g.
- Αφαιρούμε 900 μl από το υπερκείμενο και αιωρούμε το ίζημα των κυττάρων στα εναπομείναντα 100μl.
- Απλώνουμε το αιώρημα ομοίως σε τρυβλία με κατάλληλο θρεπτικό υλικό που περιέχει αντιβιοτικό επιλογής.
- Τα τρυβλία επωάζονται στους 37⁰ C για 12-16 ώρες ώστε να πολλαπλασιαστούν τα μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα.

B.10. ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ DNA ΣΕ MEMBRANE ME ΡΑΔΙΟΕΠΙΣΗΜΑΣΜΕΝΟ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ.

Η διαδικασία του υβριδισμού χρησιμοποιείται για να ανιχνευτούν ανάμεσα από ένα πληθυσμό μορίων DNA τα μόρια εκείνα που παρουσιάζουν ομολογία με μια συγκεκριμένη αλληλουχία. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένος ανιχνευτής DNA σε μονόκλωνη μορφή. Τα ραδιοσημασμένα κομμάτια DNA δημιουργούν δίκλινα μόρια (υβριδίζονται) μόνο με τα συμπληρωματικά μονόκλινα

κομμάτια του πληθυσμού. Τα υβρίδια εντοπίζονται γιατί εκεί εμφανίζεται η ραδιενέργεια. Αναλυτικότερα η μέθοδος περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

B.10.1. Ραδιοσήμανση με τυχαίους εκκινητές (Random prime labeling)

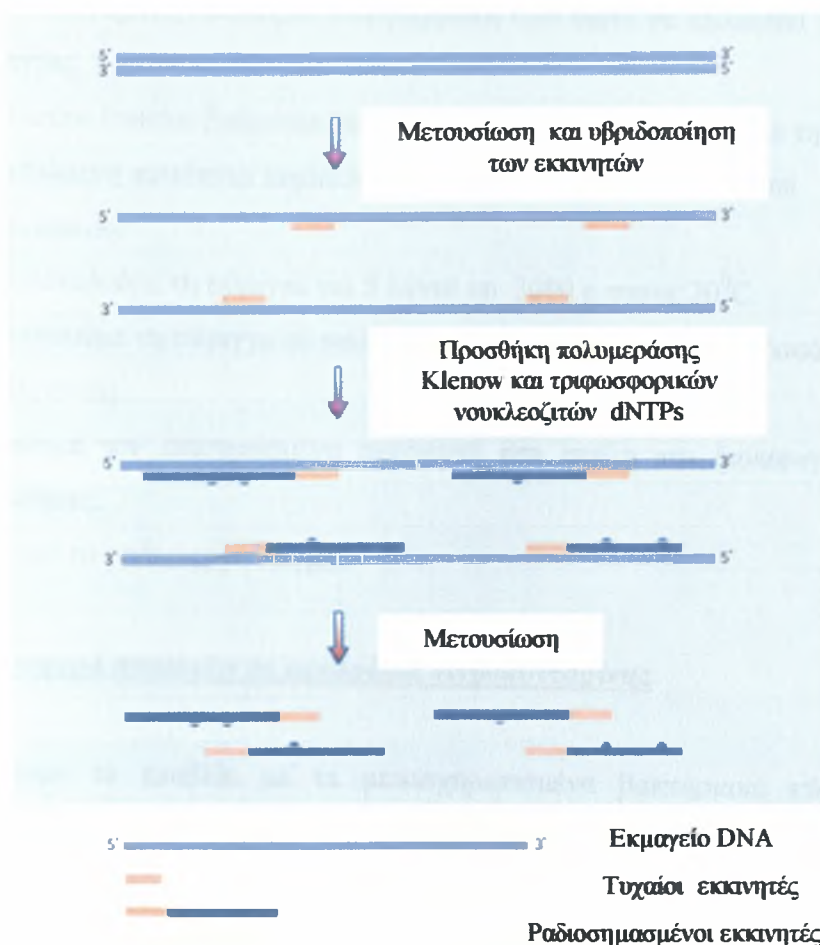
Θεωρητικό μέρος.

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για την παραγωγή ραδιοσημασμένων ανιχνευτών, κυρίως όμως χρησιμοποιούνται οι παρακάτω: α) Nick translation όπου συντίθεται DNA παρουσία ραδιενεργών νουκλεοτιδίων από την πολυμεράση I του DNA (Klenow), χρησιμοποιώντας σαν εκκινητές «σπασίματα» στο DNA, τα οποία και εκτοπίζει β) φωσφορυλίωση άκρων DNA από την T4 πολυνουκλεοτιδική κινάση και γ) τυχαία εκκίνηση. Η μέθοδος της τυχαίας εκκίνησης στηρίζεται στην εκκίνηση της σύνθεσης DNA από τη πολυμεράση του DNA σε τυχαία σημεία που καθορίζονται από εκκινητές τυχαίας αλληλουχίας (οκταμερή ή εξαμερή). Αρχικά στην αντίδραση επισήμανσης του ανιχνευτή προσθέτουμε τα εξαμερή νουκλεοτίδια τυχαίας εκκίνησης τα οποία υβριδίζονται με τα μονόκλιωνα μόρια του DNA που είχαν δημιουργηθεί κατά την θέρμανση. Στο μίγμα επίσης προσθέτουμε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει τρεις από τους τέσσερις τριφωσφορικούς δεοξυνουκλεοζίτες που χρειάζονται για τη σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου του DNA, ο τέταρτος τριφωσφορικός νουκλεοζίτης ραδιενεργά επισημασμένος (στην περίπτωση αυτή το dCTP), και η πολυμεράση Polymerase I, Large (Klenow) Fragment (τμήμα της Polymerase I του E.coli το οποίο έχει χάσει την 5'-3' ικανότητα εξωνουκλεάσης και διατηρεί μόνο την ικανότητα της πολυμεράσης). Στην επώαση που έπεται η πολυμεράση χρησιμοποιώντας ως εκκινητές τα εξαμερή συνθέτει το συμπληρωματικό κλώνο του DNA ενσωματώνοντας το ραδιοεπισημασμένο μονοφωσφορικό νουκλεοζίτη (εικόνα 23). Έτσι δημιουργείται ένα μίγμα ραδιοεπισημασμένων μορίων DNA ποικίλου μεγέθους τα οποία αποτελούν τον ανιχνευτή. Για να επιτύχουμε το ιδανικότερο μέγεθος ανιχνευτή το ποσό του ραδιενεργά επισημασμένου τριφωσφορικού νουκλεοζίτη dCTP πρέπει να είναι 10-125 pmol.

Η επιλογή της σήμανσης με τυχαίους εκκινητές έχει το πλεονέκτημα ότι μας δίνει ομοιόμορφα επισημασμένο ανιχνευτή με πολύ υψηλή ειδική ενεργότητα ($>10^9$ κρούσεις ανά λεπτό ανά μg DNA). Ο αριθμός των κρούσεων αποτελεί μέτρο της ενσωματωμένης ραδιενέργειας και μπορεί να μετρηθεί με ειδικούς μετρητές.

Πειραματικό μέρος.

- Επωάζουμε το DNA (25-50ng) μας για 3 λεπτά στους 100°C για να αποδιαταχθεί και το τοποθετούμε αμέσως στον πάγο.
- Η επισήμανση του ανιχνευτή γίνεται με προσθήκη των παρακάτω αντιδραστηρίων με την εξής σειρά :
 - ρυθμιστικό διάλυμα σήμανσης ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 1x
 - 25μM από καθένα από τα dATP, dGTP, dTTP
 - 25 ng DNA
 - x μl BSA (bovine serum albumin) απαλλαγμένη από νουκλεάσες ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 0,4mg/ml
 - 5 μl [α -³²P]dCTP ειδικής δραστηριότητας 3000 Ci/mmol και συγκέντρωσης 10mCi/ml
 - ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 50 μl (απαλλαγμένο από νουκλεάσες),
 - 5 units DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment (5units/μl).
- Επωάζουμε όλη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου.



Εικόνα 23 : Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου της επισήμανσης με τυχαία εκκίνηση. Στη θέση του βιοτυλιωμένου νουκλεοτιδίου μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ραδιοεπισημασμένο (203).

B.10.2. Καθαρισμός του ανιχνευτή με χρωματογραφία σε στήλη μοριακής διήθησης

Θεωρητικό μέρος.

Μετά την αντίδραση ραδιοσήμανσης το ραδιοσημασμένο DNA διαχωρίζεται από τα μη ενσωματωμένα ραδιενεργά νουκλεοτίδια με μοριακή διήθηση. Το πληρωτικό υλικό αποτελείται από πορώδη σφαιρίδια. Χρησιμοποιείται Sephadex G 50 ή G 25, όπου το DNA εκλούεται στο μέτωπο της στήλης (αποκλείεται από τα σωματίδια της πηκτής) ενώ τα νουκλεοτίδια μένουν κοντά στο σημείο εναπόθεσης. Έτσι ελέγχεται η ποιότητα της αντίδρασης ραδιοσήμανσης (με μέτρηση της ενσωματωμένης ραδιενέργειας σε μεγάλα μόρια) και καθαρίζεται ο ανιχνευτής από τα μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια.

Πειραματικό μέρος.

- Ετοιμάζουμε την στήλη Sephadex G 25.
 - Μέσα σε σύριγγα του ενός ml από την οποία αφαιρούμε την βελόνα, εισάγουμε την απαιτούμενη ποσότητα ναλοβάμβακα έτσι ώστε να καλυφθεί η έξοδος της σύριγγας.
 - Με πιπέτα Pasteur βρέχουμε τον ναλοβάμβακα και προσθέτουμε την απαιτούμενη ποσότητα Sephadex G 25 ώστε η σύριγγα να γεμίσει μέχρι επάνω.
 - Φυγοκεντρούμε τη σύριγγα για 5 λεπτά σε 3000 g στους 20⁰C.
 - Τοποθετούμε τη σύριγγα σε σωληνάκι μικροφυγόκεντρου με βιδωτό καπάκι (χωρίς αυτό).
- Προσθέτουμε τον επισημασμένο ανιχνευτή στη στήλη και ξαναφυγοκεντρούμε ίδιες συνθήκες.
- Συλλέγουμε το ραδιενεργό δείγμα.

B.10.3. Μεταφορά αποικιών σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης

- Ετοιμάζουμε τα τρυβλία με τα μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα που περιέχουν τους ανασυνδυασμένους πλασμιδιακούς φορείς .
- Τοποθετούμε πάνω σε κάθε τρυβλίο μία μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τέτοιο τρόπο ώστε να μην μεσολαβεί αέρας. Τοποθετούμε πρώτα το κέντρο και ύστερα τις

άκρες. Το αφήνουμε να βραχεί τελείως και ύστερα το σημειώνουμε με σύριγγα βελόνας ασύμμετρα.

- Σηκώνουμε τις μεμβράνες και τις τοποθετούμε σε σταγόνα 1ml διαλύματος 10% SDS για 5 λεπτά .
- Στην συνέχεια σηκώνουμε τις μεμβράνες και τις τοποθετούμε ομοίως σε 1ml αποδιατακτικού διαλύματος που προκαλεί μετουσίωση του DNA και το κάνει μονόκλωνο. Τις αφήνουμε για 7 λεπτά.
Πάντα οι αποικίες μας πρέπει να βρίσκονται στο πάνω μέρος των μεμβρανών και να μην έρχονται σε άμεση επαφή με τα διαλύματα αλλά αυτά να διαχέονται μέσω των πόρων της μεμβράνης.
- Στην συνέχεια σηκώνουμε τις μεμβράνες και τις εμβαπτίζουμε για 5 λεπτά σε διάλυμα εξουδετέρωσης και το οποίο εξουδετερώνει το προηγούμενο αλκαλικό διάλυμα. Αυτό επαναλαμβάνεται ακόμη μία φορά.
- Διαβρέχουμε τις μεμβράνες με διάλυμα 2x SSC τόσο ώστε να τις καλύπτει. Τις ανακινούμε για 10 λεπτά. *Με τον τρόπο αυτό καθαρίζονται από τυχόν υπολείμματα αγαρόζης και κυτταρικά υπολείμματα.*
- Τις τοποθετούμε σε χαρτί Whatman για να απομακρυνθεί το μεγαλύτερο μέρος του υγρού.
- Αφού στεγνώσουν τις τοποθετούμε ανάμεσα από χαρτιά πάχους 3MM και είτε τις επωάζουμε στο φούρνο στους 80⁰C για 1 ώρα είτε τις εκθέτουμε για 5 λεπτά σε υπεριώδη ακτινοβολία μήκους κύματος 254 nm έτσι ώστε να ακτινοβολείται η πλευρά του DNA.
- Στην συνέχεια τις τοποθετούμε στον κύλινδρο υβριδισμού για να προϋβριδιστούν.

B.10.4. Προϋβριδισμός και υβριδισμός των μεμβρανών

Θεωρητικό μέρος.

Ο ρόλος της προϋβριδοποίησης είναι να κορεστεί η μεμβράνη έτσι ώστε να αποφευχθεί η μη ειδική πρόσδεση του ανιχνευτή στην επιφάνεια της μεμβράνης. Οι τεχνικές προϋβριδισμού διαφέρουν στα παρακάτω σημεία :

- α) στο διάλυμα και στην θερμοκρασία που χρησιμοποιείται : χρησιμοποιούμε το λιγότερο 0,2 ml διαλύματος ανά τετραγωνικό εκατοστό της μεμβράνης. Η θερμοκρασία επηρεάζει την δημιουργία δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων. Εάν είναι πολύ χαμηλή ο υβριδισμός θα γίνει χωρίς

μεγάλη εξειδίκευση δηλ. θα υβριδοποιηθούν μόρια με χαμηλή συμπληρωματικότητα. Η θερμοκρασία προϋβριδοποίησης και υβριδοποίησης εξαρτάται από την σύνθεση και τη ομολογία των αλληλουχιών προς υβριδοποίηση. Την επιλέγουμε με βάση την συγγένεια του ανιχνευτή με το προς υβριδοποίηση μόριο DNA. (Π.χ. παρουσία φορμαμιδίου μπορούμε να χαμηλώσουμε την θερμοκρασία διότι αυτό εμποδίζει τη δημιουργία υβριδίων με χαμηλή ομολογία δημιουργώντας δεσμούς υδρογόνου με τις βάσεις των νουκλεοτιδίων). Η θερμοκρασία είναι σε υδατικά διαλύματα συνήθως 65⁰C ενώ είναι 42⁰C σε 50% φορμαμίδιο.

β) στον όγκο του διαλύματος και στη διάρκεια της υβριδοποίησης. Όσο μικρότερος ο όγκος τόσο το καλύτερο διότι η κινητική της αντίδρασης είναι γρηγορότερη. Φυσικά χρειάζεται τόσο υγρό ώστε να καλύπτεται η επιφάνεια των μεμβρανών .

γ) στην χρήση διαφόρων παραγόντων που εμποδίζουν τη μη ειδική πρόσδεση του ανιχνευτή στην επιφάνεια της μεμβράνης. Τέτοιες ουσίες είναι η ηπαρίνη το αντιδραστήριο Denhardt, που χρησιμοποιούνται μαζί με απορρυπαντικά όπως SDS και αποδιαταγμένο DNA από σπέρμα σολομού.

δ) στη συγκέντρωση και την ειδική ενεργότητα του ραδιενεργού ανιχνευτή μας.

ε) στις συνθήκες πλυσίματος που ακολουθούν την υβριδοποίηση. Επιλέγουμε ένα συνδυασμό θερμοκρασίας και ιονικής ισχύος που να είναι 12-20⁰C κάτω από την T_m (θερμοκρασία τήξεως) του υπό ανάλυση υβριδίου. Η T_m είναι η θερμοκρασία όπου έχουμε υβριδισμό κατά 50% και υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$T_m = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6 \log(\text{Na}^+) + 0,41(\% \text{GC}) - 0,63(\% \text{φορμαμιδίου}) - 600/\text{N} - 1,5\% \text{mismatch}$$

Όπου N: μήκος υβριδίου σε νουκλεοτίδια. Όταν το N > 80 τότε χρησιμοποιείται υδατικό διάλυμα σε θερμοκρασία 65⁰C.

Πειραματικό μέρος.

Προϋβριδισμός.

- Ετοιμάζουμε το διάλυμα προϋβριδισμού των Church and Gilbert (48).
- Προσθέτουμε κατάλληλο όγκο του παραπάνω διαλύματος. *Προσέχουμε έτσι ώστε να εμβραχούν όλες οι μεμβράνες χωρίς να υπάρχουν φυσαλίδες αέρα και να αιωρούνται μία μία και όχι όλες μαζί για καλύτερο προυβριδισμό.*
- Βάζουμε τον κύλινδρο στην συσκευή υβριδισμού στους 65⁰C και τις επωάζουμε για 30 λεπτά.

Υβριδισμός.

- Αφαιρούμε το διάλυμα Church and Gilbert με προσοχή από τον σωλήνα.
- Ετοιμάζουμε το διάλυμα της υβριδοποίησης προσθέτοντας κατάλληλο όγκο διαλύματος Church and Gilbert τον ανιχνευτή μας που έχει πριν αποδιαταχθεί με βρασμό στους 100⁰C για 3-5 λεπτά.
- Προσθέτουμε το διάλυμα της υβριδοποίησης στον περιστρεφόμενο κύλινδρο και το αφήνουμε για 12-16 ώρες στους 65 ⁰C.

Πλύσιμο των μεμβρανών.

- Αφαιρούμε προσεχτικά το ραδιενεργό διάλυμα από τον κύλινδρο και το αποθηκεύουμε.
- Ξεπλένουμε τις μεμβράνες με κατάλληλο όγκο διαλύματος (20 mM Na₂HPO₄ pH 7,2, 1% SDS, 1mM EDTA).
- Γίνονται αρκετές πλύσεις έτσι ώστε να εκλουσθεί όλη η ραδιενέργεια (3-4 πλύσεις για 10 λεπτά η κάθε μία.).

Οι υβριδοποιήσεις των μεμβρανών έγιναν σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Church and Gilbert που έχουν εισαγάγει την μεγάλη συγκέντρωση φωσφορικών ιόντων ως παράγοντα αυστηρότητας στη δημιουργία υβριδίων. Στο στάδιο αυτό μας ενδιαφέρει η συγκέντρωση των ιόντων του Na⁺ που θα δεσμεύσει τα φωσφορικά ιόντα PO₄⁻.

B.10.5. Αυτοραδιογραφία

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί φιλμ ακτίνων X για να κάνει ορατά μόρια ή τμήματα μορίων τα οποία έχουν ραδιοσημανθεί. Βασίζεται στην ικανότητα του ακτινογραφικού φιλμ να προσβάλλεται από την β- και γ-ακτινοβολία διαφόρων ραδιοϊσοτόπων (τέτοιου είδους ακτινοβολία εκπέμπουν τα στοιχεία: ³²P, ³⁵S, κ.α.). Το φιλμ έρχεται σε επαφή με την μεμβράνη ή την πηκτή και μαυρίζει στα σημεία που εκπέμπουν τα άτομα του ³⁵S. Κατά συνέπεια από την εικόνα του φιλμ που αποτελεί αντίγραφο της μεμβράνης μπορούμε να μεταφερθούμε στο τρυβλίο και να βρούμε την αποικία του ενδιαφέροντος. Επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας τμημάτων DNA. Η έκθεση του φιλμ γίνεται σε σκοτεινό θάλαμο και ο χρόνος έκθεσης εξαρτάται από την ένταση του σήματος που μετρούμε σε συσκευή

Geiger. Η εμφάνιση του film γίνεται με εμφάπτιση υπό ανακίνηση σε X-Ray developer για 5-7 λεπτά και η στερέωση σε X-Ray fixer για 10-15 λεπτά.

B.11. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ ΤΟΥ DNA

Θεωρητικό μέρος.

Η χρησιμοποιούμενη τεχνική για την εύρεση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων του DNA είναι η μέθοδος των διδεδοξυνουκλεοτιδίων ή ενζυμική μέθοδος κατά Sanger.

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στον τερματισμό μιας ενζυμικά καταλυόμενης από μια DNA πολυμεράση αντίδρασης σε συγκεκριμένες βάσεις, με την χρήση τριφωσφορικών διδεδοξυριβονουκλεοζιτών (ddNTP's). Τα εν λόγω μόρια μπορούν να ενσωματωθούν στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα του DNA από την πολυμεράση μέσω των 5' φωσφορικών ομάδων τους, αλλά η έλλειψη του 3' υδροξυλίου στην διδεδοξυριβόζη εμποδίζει την δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού με επόμενα dNTP's κάνοντας έτσι την επιμήκυνση της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας του DNA αδύνατη πέρα από το σημείο ενσωματώσής της.

Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιούνται τέσσερις διαφορετικές αντιδράσεις η καθεμία εκ των οποίων περιέχει την DNA πολυμεράση, τον εκκινητή, το τμήμα του DNA ως εκμαγείο, τα τέσσερα δεοξυριβονουκλεοτίδια από τα οποία ένα ραδιενεργά επισημασμένο με ^{35}S στην α-θέση ($\alpha\text{-}^{35}\text{S}$ dATP), αλλά και ένα (διαφορετικό σε κάθε αντίδραση) διδεδοξυριβονουκλεοτίδιο στο οποίο τερματίζει η αντίδραση. Έτσι προκύπτουν τμήματα DNA διαφορετικού μήκους τα οποία έχουν το ίδιο 5' άκρο (εκκινητή) αλλά διαφορετικό 3' άκρο το οποίο αντιπροσωπεύει το διδεδοξυνουκλεοτίδιο που ενσωματώθηκε. Τα τμήματα που προκύπτουν από τις τέσσερις αντιδράσεις μπορούν να αναλυθούν σε τέσσερις διαφορετικές διαδρομές (η μία δίπλα στην άλλη) ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες με ουρία και μετά από αυτοραδιογραφία, η εμφάνιση των ζωνών σε κάθε διαδρομή θα αντιστοιχεί στο αντίστοιχο διδεδοξυνουκλεοτίδιο του σημείου που τερματίζεται η αντίδραση. Έτσι με ανάγνωση της σειράς εμφάνισης των ζωνών πάνω στο φιλμ αυτοραδιογραφίας αποκαλύπτεται η ακολουθία του τμήματος DNA που εξετάζεται. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου της οποίας το ποσοστό σε πολυακρυλαμίδιο κυμαίνεται μεταξύ 6-8% ανάλογα το μέγεθος του νεοσυντιθέμενου DNA.

Πειραματικό μέρος.

Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε ήταν με βάση το Version 2.0 DNA sequencing kit της εταιρείας USB. Ο εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε υβριδίζει 17 νουκλεοτίδια ανοδικά της θέσεως της ενδονουκλεάσης περιορισμού NotI όπου είναι κλωνοποιημένες οι λείες (sense primer) [5'-GGGTACCGAGCTCAATTGCGGCCGC-3'].

- 3-5 μg DNA εκμαγείο σε 36 μl H₂O
- Προσθέτουμε 4μl NaOH 2N και 0,5 pmol από τον εκκινητή
- Επωάζουμε 5 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
(Αποδιάταξη των κλώνων του DNA σε μονόκλιωνα μόρια).
- Προσθέτουμε στο διάλυμα:
 - 6,4 μl οξικού νατρίου 3 M (pH 4,8),
 - 120 μl απόλυτης αιθανόλης.(Κατακρήμνιση των μορίων του DNA).
- Επωάζουμε στους -20° C για 20-30 λεπτά.
- Φυγοκεντρούμε 20 λεπτά σε 12000 g στους 4⁰C .
- Πλένουμε με 1ml 70% αιθανόλη.
- Επαναφυγοκεντρούμε στις ίδιες συνθήκες και στεγνώνουμε το ίζημα.
- Αιωρούμε το ίζημα που προκύπτει σε τελικό όγκο 10ml που αποτελείται από :
 - 7 μl ddH₂O
 - 0,5 pmol εκκινητή,
 - 2 μl διαλύματος υβριδισμού 5x ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 1x
- Επωάζουμε το διάλυμα (αφού το ανακινήσουμε απαλά) στους 65° C για 2 λεπτά.
- Επωάζουμε στη συνέχεια 30 λεπτά στους 37° C και 10 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (Αντίδραση υβριδίωσης νουκλεϊκών οξέων-annealing).
- Προσθέτουμε στο παραπάνω διάλυμα το διάλυμα επισήμανσης
(Αντίδραση επισήμανσης των νεοσυντιθέμενων κλώνων. Το διάλυμα επισήμανσης το διαλύουμε 1:10 όταν το DNA έχει απόσταση από τον εκκινητή 20-100 νουκλεοτίδια).
- Επωάζουμε μόνο για 2 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για να μην προχωρήσει αρκετά η αντίδραση εάν θέλουμε να αναγνώσουμε την περιοχή κοντά στον εκκινητή. (Αντίδραση επιμήκυνσης της αλυσίδας).
- Συγχρόνως προεπωάζονται στους 37° C τέσσερα διαφορετικά σωληνάκια που περιέχουν 2,5 μl από το μίγμα των τεσσάρων δεοξυνουκλεοτιδίων dNTPs με ένα διαφορετικό διδεοξυνουκλεοτίδιο ddNTPs το καθένα.

- Μεταφέρουμε 3,5 μl του διαλύματος της αντίδρασης επισήμανσης σε κάθε σωληνάκι διδεοξυνουκλεοτιδίων ddNTPs.
- Επωάζουμε 5 λεπτά στους 37°C (όπου γίνεται η σύνθεση των διαφορετικών τμημάτων DNA παρουσία των διδεοξυνουκλεοτιδίων).
- Προσθέτουμε 4 μl διαλύματος τερματισμού (Αντίδραση τερματισμού).
- Επωάζουμε στους 100° C για 2 λεπτά τις τέσσερις αντιδράσεις για να γίνει αποδιάταξη του DNA.
- Ηλεκτροφορούμε σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 6% πάχους 0.4mm.
Η ηλεκτροφόρηση γίνεται υπό σταθερή τάση 1300 V για 4-6 ώρες παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος TBE
- Η στερέωση του πηκτώματος γίνεται για 15 λεπτά σε διάλυμα που αποτελείται από:
 - 10% οξικό οξύ,
 - 10% μεθανόλη.
- Ξηραίνουμε την πηκτή.

B.12. ΕΥΡΕΣΗ ΟΜΟΛΟΓΙΑΣ – ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΚΟΛΟΥΘΙΩΝ ΜΕ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ

Εύρεση ακολουθιών ομόλογων με γνωστή ακολουθία DNA

Το πρόγραμμα BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) συγκρίνει την ακολουθία ενός νουκλεϊκού οξέος ή μιας πεπτιδικής αλυσίδας, την οποία υποβάλλει ο ενδιαφερόμενος με τις ακολουθίες όλων των νουκλεϊκών οξέων και των πολυπεπτιδικών αλυσίδων που είναι ήδη κατατεθειμένες σε ειδικές τράπεζες δεδομένων. Ο αλγόριθμος του προγράμματος βασίζεται σε ένα βαθμό ομοιότητας μεταξύ της γνωστής ακολουθίας και των ακολουθιών της βάσης δεδομένων. Το πρόγραμμα εντοπίζει και βαθμολογεί θετικά για την ομοιότητα ταυτόσημα αμινοξέα, αλλά και αμινοξέα με παρόμοιες ιδιότητες (π.χ. η ισολευκίνη θεωρείται πολύ όμοια με την υδρόφοβη βαλίνη), ενώ δίνει αρνητικούς βαθμούς σε αντικαταστάσεις με ανόμοια αμινοξέα ή σε παρεμβολές αμινοξέων. Τις ακολουθίες που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη ομοιότητα με την υποβληθείσα τις ταξινομεί με βάση τον βαθμό ομοιότητας (ομολογίας).

Αρχικά υποβάλλεται στο ηλεκτρονικό πρόγραμμα η νουκλεοτιδική αλληλουχία μιας λείας που έχει βρεθεί. Στην συνέχεια προκύπτει ένας αριθμός νουκλεϊκών οξέων

ομόλογων με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία που υποβλήθηκε και παρουσιάζονται με σειρά αυξανόμενης πιθανότητας. Επιλέγουμε το πιο πιθανό και το εισάγουμε σε πρόγραμμα μετάφρασης νουκλεϊκού οξέος σε πρωτεΐνη (Blastp). Μετά τον χρόνο έρευνας που απαιτείται παρουσιάζεται μία σειρά από πιθανές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από ένα μέρος ή από όλο το νουκλεοτιδικό κομμάτι που εισαγάγαμε.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η έκδοση του προγράμματος BLAST 2.2.10 (National Center of Biological Investigations, ΗΠΑ) και ερευνήθηκαν οι ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων του καθώς και του EMBL, Swiss Prot/TrEMBL, Genbank.

Μέσω της ομοιότητας με άλλες πρωτεΐνες για τις οποίες οι πληροφορίες είναι καταχωρημένες στις τράπεζες δεδομένων είναι δυνατή η ταυτοποίηση ενός πολυπεπτιδίου ή γονιδίου για το οποίο μόνο η ακολουθία των αμινοξέων είναι γνωστή. Επίσης είναι δυνατό να εντοπιστούν περιοχές με συντηρημένες ακολουθίες, ομολογίες στα διάφορα είδη οργανισμών, να εντοπισθούν σε ποιο χρωμόσωμα ανήκουν, την δομή του γονιδίου (ιντρόνια-εξόνια), μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης και πληροφορίες για τα σημεία που μπορούν να τροποποιηθούν ενζυματικά.

B.13. ΈΚΦΡΑΣΗ ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΥΝΤΗΞΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ (GST).

Θεωρητικό μέρος.

Η τεχνική αυτή επιτρέπει την έκφραση των πρωτεϊνών σε βακτηριακά κύτταρα με υψηλή απόδοση και τον εύκολο διαχωρισμό τους από το πρωτεϊνικό εκχύλισμα. Τα γονίδια των πρωτεϊνών που πρόκειται να εκφραστούν κλωνοποιούνται σε κατάλληλους πλασμιατικούς φορείς, οι οποίοι περιέχουν στο μόριο τους το γονίδιο της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST), ώστε η πρωτεΐνη που θα προκύψει να αποτελεί το προϊόν σύντηξης με αυτήν. Ως ενισχυτής χρησιμοποιείται ο ενισχυτής του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης ο οποίος ενεργοποιείται με προσθήκη του ισοπροπυλ-β-D-θειογαλακτοσίδης (IPTG) (που ευνοεί την έκφραση της πρωτεΐνης σύντηξης αναστέλλοντας τον καταστολέα lacI^q) και κατά συνέπεια επάγει την μεταγραφή του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης και των γονιδίων που έχουν τον ίδιο ενισχυτή. Ο καθαρισμός της πρωτεΐνης σύντηξης γίνεται με στήλη αγκιστείας που περιέχει γλουταθειόνη καθηλωμένη σε αδρανές υλικό (αγαρόζη). Έτσι ο διαχωρισμός της πρωτεΐνης από το εκχύλισμα γίνεται δυνατός χάρη στην αλληλεπίδραση της GST με

την γλουταθειόνη, με αποτέλεσμα την καθήλωσή της στα σφαιρίδια της στήλης. Η έκλυση της πρωτεΐνης γίνεται με την προσθήκη διαλύματος γλουταθειόνης σε περίσσεια το οποίο εκτός του ότι επιτρέπει την εύκολη και ποσοτική ανάκτηση της πρωτεΐνης από την στήλη, έχει το πλεονέκτημα να γίνεται σε πολύ ήπιες συνθήκες χωρίς να υπάρχει κίνδυνος αλλαγών στην δομή και την δράση της πρωτεΐνης σύντηξης.

Πειραματικό μέρος.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι κοινή σε όλες τις περιπτώσεις :

- Απλώνουμε τα βακτηριακά κύτταρα (XL1/B) που έχουν μετασχηματιστεί με τον ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό φορέα σε τρυβλία με κατάλληλο θρεπτικό υλικό που περιέχει αντιβιοτικό επιλογής .
- Επωάζουμε για 16 ώρες στους 37° C.
- Εμβολιάζουμε 50 ml υγρού θρεπτικού υλικού με αντιβιοτικό επιλογής με μία αποικία από το κατάλληλο τρυβλίο και επωάζουμε το αιώρημα υπό ανάδευση για 16 ώρες στους 37° C.
- Αφαιρούμε 2 ml από την καλλιέργεια που προκύπτει με τα οποία εμβολιάζουμε 50 ml θρεπτικού υλικού που περιέχει αντιβιοτικό επιλογής.
- Επωάζουμε την καλλιέργεια υπό ισχυρή ανάδευση στους 37° C μέχρι η απορρόφηση του αιωρήματος των κυττάρων γίνει ίση με $A_{590}=0.6-0.7$ (3-5 ώρες).
- Προσθέτουμε κατάλληλο όγκο από διάλυμα 100 mM IPTG ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 0,2mM IPTG.
- Επωάζουμε για 1.5-2.5 ώρες στους 28⁰C.
- Φυγοκεντρούμε 20 λεπτά σε 4000g σε θερμοκρασία 4°C (συλλογή κυττάρων).
- Αφαιρούμε από το υπερκείμενο ένα δείγμα για την ηλεκτροφόρηση SDS-page.
- Προαιρετική φύλαξη στους -20⁰C όλη νύχτα.
- Αιωρούμε το ίζημα των κυττάρων σε 1ml παγωμένου διαλύματος PBST και κρατούμε ένα δείγμα και από αυτό για την ηλεκτροφόρηση.
- Υποβάλλουμε το αιώρημα σε υπέρηχους όπως έχει οριστεί από την διεργασία δοκιμασιών που έχει γίνει για το συγκεκριμένο όργανο και στέλεχος κυττάρων (βλ.Αποτελέσματα) (Προσπαθούμε να μη δημιουργούμε αφρό γιατί μετουσιώνονται οι πρωτεΐνες. Η λύση των κυττάρων έχει ολοκληρωθεί όταν το διάλυμα από θολό γίνει διαυγές.)

Προαιρετικά στάδια για περαιτέρω ρήξη των κυττάρων:

- Φυγοκεντρούμε 100ml από το παραπάνω αιώρημα για 20 λεπτά σε 10000g και

λαμβάνουμε 10μl από το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης και 10μl από το ίζημα (αφού το διαλύσουμε πρώτα σε 100μl PBST).

- Στο υπόλοιπο του αιωρήματος (890μl) επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία ακόμη δύο φορές απομονώνοντας κάθε φορά ισόποσα δείγματα από το υπερκείμενο και το ίζημα που στην συνέχεια τα αναμιγνύουμε όλα με ίσο όγκο 2xSDS (τελική συγκέντρωση 1xSDS).
- Αφού επώασουμε τα δείγματα στους 95⁰C για 5 λεπτά τα ηλεκτροφορούμε σε πηκτή 10% SDS-PAGE.

Στην συνέχεια το πέρασμα από την στήλη γίνεται ως εξής:

- Αναμιγνύουμε το υπερκείμενο με το αιώρημα των κόκκων της στήλης και αναδεύουμε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 4° C (ώστε να δεσμευτεί η πρωτεΐνη σύντηξης στην γλουταθειόνη της στήλης).
- Φυγοκεντρούμε για 2 λεπτά στις 3000g και απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
- Πλένουμε με διάλυμα PBST για 10 λεπτά στους 4° C υπό ανάδευση (3 φορές)
- Φυγοκεντρούμε για 2 λεπτά στις 3000g (3 φορές).
- Εκλούουμε τη στήλη 2 συνεχόμενες φορές από 10 λεπτά την κάθε μία με διάλυμα που περιέχει 10 mM γλουταθειόνη και 50 mM Tris-Cl pH 8,0.
- Συλλέγουμε τα εκλούσματα (που περιέχουν την πρωτεΐνη σύντηξης) και τα φυλάσσουμε στους -20° C.
- Αναγεννάμε την στήλη της γλουταθειόνης μετά από κάθε χρήση με διαδοχικές πλύσεις σε όξινο και βασικό διάλυμα, τρεις φορές στους 4° C για 30 λεπτά στο κάθε διάλυμα.
- Εξισορροπούμε την στήλη και τη φυλάσσουμε σε διάλυμα PBST.

B.14. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ

Θεωρητικό μέρος.

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών ενός δείγματος πραγματοποιείται καθώς οι πρωτεΐνες, ως φορτισμένα μόρια, κινούνται διαμέσου των πόρων ενός πηκτώματος κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η ταχύτητα των πρωτεϊνών στο πήκτωμα (v) εξαρτάται από την διαφορά δυναμικού του ηλεκτρικού πεδίου (E) και το φορτίο της πρωτεΐνης (q) σύμφωνα με την εξίσωση:

$$v = E * q / f$$

όπου ο παράγοντας της εξίσωσης f εκφράζει την εξάρτηση από την μάζα και το σχήμα της πρωτεΐνης καθώς και το ιξώδες του πηκτώματος μέσα στο οποίο κινείται η πρωτεΐνη.

Ο σχηματισμός των πηκτών πολυακρυλαμιδίου βασίζεται στον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) και του N,N μεθυλενοδιακρυλαμιδίου ή bis-ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}-\text{CH}_2$) που συνδέει τις αλυσίδες του πρώτου. Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται ένα πολυμερές πλέγμα που διαθέτει πόρους και το μέγεθος τους εξαρτάται από το βαθμό πολυμερισμού ανάλογα με την συγκέντρωση των μονομερών στο διάλυμα. Ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου γίνεται μέσω της δημιουργίας ελευθέρων ριζών με την προσθήκη του υπερθειϊκού αμμωνίου $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ για την έναρξη του μηχανισμού και του φωτοχημικού καταλύτη τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED) για επιτάχυνση και διάδοσή του.

Το σχήμα των πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου μπορεί να είναι είτε κυλινδρικό είτε επίπεδο, ανάλογα με τη συσκευή στην οποία θα πραγματοποιηθεί ο πολυμερισμός. Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να είναι συνεχής ή ασυνεχής. Στην συνεχή ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα για την πηκτή και για τα δοχεία των ηλεκτροδίων. Στην ασυνεχή χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικά πηκτώματα, το πήκτωμα επιστοίβαξης που είναι υπεύθυνο για την συμπύκνωση των πρωτεϊνών του δείγματος σε μια πολύ λεπτή στοιβάδα, και το πήκτωμα διαχωρισμού που είναι υπεύθυνο για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών σε λεπτές ζώνες κατά την κίνησή τους μέσα σ' αυτό. Τα διαλύματα από τα οποία παρασκευάζονται τα δύο πηκτώματα είναι διαφορετικά ως προς το pH και την σύστασή τους, κατάλληλα σχεδιασμένα για το ρόλο που επιτελούν. Επίσης το ρυθμιστικό διάλυμα των δοχείων ηλεκτροφόρησης είναι διαφορετικό από τα δύο προηγούμενα.

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου μπορεί να γίνει απουσία ή παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων όπως το απορρυπαντικό SDS (μετά νατρίου άλας του θειικού δωδεκυλίου). Απουσία τέτοιων παραγόντων (μη μετουσιωτικές συνθήκες) οι πρωτεΐνες διατηρούν τις ανώτερες διαμορφώσεις τους, ενώ παρουσία τους (ηλεκτροφόρηση κάτω από μετουσιωτικές συνθήκες) αποδιατάσσονται και λαμβάνουν τυχαία διαμόρφωση.

B.14.1. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών κάτω από μετουσιωτικές συνθήκες (SDS-PAGE).

Θεωρητικό μέρος.

Η ανάλυση πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου-SDS είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται για τη μελέτη πρωτεϊνών και τις διαχωρίζει με βάση το μοριακό βάρος τους. Πριν την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται ως αποδιατακτικό μέσο το μετά νατρίου άλας του θειικού δωδεκυλίου (SDS) μαζί με ένα αναγωγικό παράγοντα το DTT και θέρμανση για να διαχωρίσει τις πρωτεΐνες στις επιμέρους υπομονάδες τους και να αποφευχθεί η συσσώρευσή τους κατά την διέλευσή τους μέσα από την πηκτή. Το SDS εκτός του ότι αποδιατάσει τις πρωτεΐνες δεσμεύεται πάνω σ' αυτές μέσω υδρόφοβων δεσμών, ανεξάρτητα από την πρωτεϊνική τους αλληλουχία και την ιονική ισχύ, σε εντελώς καθορισμένα ποσά κατά βάρος (1.4 gr SDS/gr πρωτεΐνης). Τα σύμπλοκα που σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση με το SDS φορτίζονται με καθαρό αρνητικό φορτίο και έλκονται από το θετικό πόλο. 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 δηλ. του μεγέθους της πρωτεΐνης. Χρησιμοποιώντας μάρτυρες μοριακού βάρους μπορούμε να προσδιορίσουμε το μοριακό βάρος μιας πρωτεΐνης.

Οι πρωτεΐνες είναι αναγκασμένες να περάσουν μέσα από ένα σύστημα δύο ρυθμιστικών διαλυμάτων διαφορετικού pH και αλατότητας σε ένα ασυνεχές σύστημα πηκτών. Το σύστημα αυτό αποτελείται από την πηκτή διαχωρισμού και την πηκτή επιστοιβαξης. Οι δύο πηκτές βρίσκονται η μία πάνω στην άλλη σε ένα κλειστό σύστημα ηλεκτροφόρησης. Η πηκτή επιστοιβαξης (stacking gel) είναι συνήθως μία αραιή πηκτή (5%) ακρυλαμιδίου και χρησιμεύει ώστε όλες οι πρωτεΐνες να φθάσουν μαζί στην επιφάνεια της πηκτής διαχωρισμού. Η πηκτή διαχωρισμού (resolving gel) μπορεί να ποικίλει σε εκατοστιαία σύσταση ακρυλαμιδίου από 6-15% ανάλογα με το μέγεθος των πρωτεϊνών που πρόκειται να αναλυθούν. Το ασυνεχές σύστημα ρυθμιστικών διαλυμάτων που χρησιμοποιείται επινοήθηκε αρχικά από τους Ornstein και Davis (1964). Το δείγμα και η πηκτή επιστοιβαξης περιέχουν Tris-Cl pH 6,8, το πάνω και κάτω διαμέρισμα των ρυθμιστικών διαλυμάτων περιέχουν Tris-γλυκίνη pH 8,3 και η πηκτή διαχωρισμού περιέχει Tris-Cl pH 8,8. Όλο το σύστημα περιέχει SDS 0.1%. Τα ιόντα χλωρίου στο δείγμα και στην πηκτή επιστοιβαξης σχηματίζουν ένα μέτωπο που προπορεύεται από το μέτωπο των ιόντων γλυκίνης. Ανάμεσα στα δύο αυτά μέτωπα δημιουργείται μια ζώνη χαμηλής αγωγιμότητας και υψηλού δυναμικού που ωθεί τις πρωτεΐνες του δείγματος προς την επιφάνεια της πηκτής διαχωρισμού. Εκεί το

υψηλότερο pH ιονίζει την γλυκίνη και τα ιόντα της γλυκίνης που προκύπτουν μετακινούνται διαμέσου των πρωτεϊνών του δείγματος αμέσως μετά από τα ιόντα του χλωρίου που προπορεύονται. Οι πρωτεΐνες απελευθερωμένες από το κινητό μέτωπο μετακινούνται μέσα στην πηκτή σε σταθερό δυναμικό και pH ανάλογα με το μέγεθος τους.

Συγκέντρωση ακρυλαμιδίου (%)	Γραμμικό εύρος διαχωρισμού (kDa)
15	12-43
10	16-68
7,5	36-94
5	57-212

Η αναλογία ακρυλαμιδίου προς N,N'-μεθυλέν-δισακρυλαμίδιο είναι 29:1.

Πειραματικό μέρος.

- Ετοιμάζουμε την συσκευή σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Έχουμε καθαρά και στεγνά τα τζάμια, τους δύο οδηγούς και την πλαστική οδοντωτή μήτρα που θα χρησιμοποιήσουμε. Προσαρμόζουμε τους οδηγούς ανάμεσα στα δύο τζάμια και τα τοποθετούμε στο σύστημα στήριξης.
- Ετοιμάζουμε 10ml πηκτής διαχωρισμού πάχους 1,5 cm 10% ή 12% και την ρίχνουμε στην συσκευή.
- Ρίχνουμε προσεκτικά 1ml ισοπροπανόλη 10% πάνω από το διάλυμα για να δημιουργηθεί μία επίπεδη επιφάνεια.
- Ξεπλένουμε την ισοπροπανόλη με λίγο απιονισμένο νερό όταν ο πολυμερισμός της πηκτής έχει τελειώσει.
- Αφού η πηκτή διαχωρισμού πολυμεριστεί ετοιμάζουμε 5ml της πηκτής επιστοίβαξης 5% πάχους 1,5 cm και την ρίχνουμε και αυτή στην συσκευή.
- Προσθέτουμε τα δύο αντιδραστήρια στην πηκτή επιστοίβαξης και ρίχνουμε το διάλυμα στην συσκευή μέχρι να καλύψουμε το ύψος του.
- Τοποθετούμε την πλαστική οδοντωτή μήτρα.
- Διαλύουμε τα δείγματα και τον μάρτυρα μοριακών βαρών πριν τα εισάγουμε στην πηκτή επιστοίβαξης σε διάλυμα 1xSDS.
- Θερμαίνουμε τα δείγματα για 3 λεπτά στους 100° C, ώστε οι πρωτεΐνες να αποδιαταχθούν πλήρως και να διευκολυνθεί η δημιουργία συμπλόκων SDS-

πρωτεΐνης. Η διθειοθρεϊτόλη που χρησιμοποιείται, ανάγει τους τυχόν δισουλφιδικούς δεσμούς που υπάρχουν, ώστε να διαχωριστούν οι πρωτεΐνες στις υπομονάδες τους.

- Μετά τον πολυμερισμό της πηκτής αφαιρούμε την πλαστική οδοντωτή μήτρα και γεμίζουμε τις δεξαμενές με ρυθμιστικό διάλυμα Tris-γλυκίνη για να απομακρύνουμε τυχόν μη πολυμερισμένο πολυακρυλαμίδιο .
- Φορτώνουμε τα δείγματα στις δεξαμενές με σύριγγα Hamilton. Στις άδειες δεξαμενές φορτώνουμε ίσο όγκο αποδιατακτικού διαλύματος με τα δείγματά μας.
- Η ηλεκτροφόρηση γίνεται κάτω από σταθερή ένταση ρεύματος 25 mA ή 8 V/cm έως τη στιγμή που ο μάρτυρας μοριακών βαρών αρχίζει να εξέρχεται από την πηκτή.

B.14.2. Βαφή των πηκτών SDS-PAGE με Coomassie Brilliant Blue R-250

- Εμβαπτίζουμε την πηκτή για την χρώση και στερέωση σε διάλυμα που περιέχει :
 - 0.25% Coomassie Brilliant Blue R-250,
 - 10% οξικό οξύ,
 - 45% μεθανόλη,όπου και ανακινείται για διάστημα 1 ώρας.
- Ανακινούμε την πηκτή σε διάλυμα :
 - 10% οξικό οξύ,
 - 45% μεθανόλη,έως ότου η πηκτή αποχρωματιστεί και μείνουν μόνο οι πρωτεΐνες χρωματισμένες. (3-4 φορές αλλαγή διαλύματος αναδεύοντας την κάθε φορά για 10 λεπτά).

B.15. ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN

B.15.1. Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών από πηκτή σε μεμβράνη

Θεωρητικό μέρος.

Η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή άλλου πολυμερούς βασίζεται στην κίνηση των πρωτεϊνών, που βρίσκονται υπό τη μορφή συμπλόκου με το SDS και είναι αρνητικά φορτισμένες, από την πηκτή προς την μεμβράνη κατά την εφαρμογή διαφοράς δυναμικού και στον

εγκλωβισμό τους στο πλέγμα της μεμβράνης. Δύο βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν την μεταφορά των πρωτεϊνών είναι α) η ικανότητα έκλουσης των πρωτεϊνών από την πηκτή και β) η ικανότητα πρόσδεσης της μεμβράνης με τις πρωτεΐνες. Ο πρώτος παράγοντας καθορίζεται από τη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου στην πηκτή, από την ιονική ισχύ, από το pH του διαλύματος και από τους επιπρόσθετους παράγοντες στο διάλυμα μεταφοράς όπως το SDS και η μεθανόλη (αυξάνει τις υδρόφοβες περιοχές των πρωτεϊνών που μπορούν να αλληλεπιδράσουν με την μεμβράνη). Ο δεύτερος παράγοντας καθορίζεται από την φύση της μεμβράνης και από την σύνθεση του διαλύματος μεταφοράς.

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

Το πρώτο αντίσωμα anti-GST που χρησιμοποιήθηκε προέρχεται από κατσίκια και είναι της εταιρείας Pharmacia. Το δεύτερο αντίσωμα που προέρχεται από ποντίκι απέναντι στις ανοσοσφαιρίνες IgG κατσίκας είναι συζευγμένο με το την υπεροξειδάση του φυτού *Armoracia pathifolia* (horse raddish peroxidase-HRP) και προέρχεται από την εταιρία Jakson Immuno Research Laboratories (εικόνα 25).

Πειραματικό μέρος.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης:

- Μεταφέρουμε τη μεμβράνη, την πηκτή και τα διηθητικά χαρτιά σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer) (pH 8,3).
- Η τοποθέτηση τους στην συσκευή ηλεκτρομεταφοράς γίνεται ως εξής:
 - τρία χαρτιά Whatman 3MM
 - η πηκτή προς τον αρνητικό πόλο
 - η μεμβράνη προς τον θετικό πόλο
 - τρία χαρτιά Whatman 3MM

Η επαφή μεταξύ πηκτής και μεμβράνης πρέπει να είναι άμεση και χωρίς την παρεμβολή φυσαλίδων που παρεμποδίζουν την διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος. Η

συσκευή που χρησιμοποιείται είναι το μοντέλο *Trans- Blot Semi-Dry* της εταιρίας *BIO-RAD*.

- Η μεταφορά γίνεται για 45 λεπτά κάτω από σταθερή τάση ρεύματος (10 Volt) ανάλογα με το μέγεθος της πηκτής και των πρωτεϊνών που πρόκειται να μεταφερθούν.

B.15.2. Βαφή με Ponceau S

Για να ελέγξουμε την πιστότητα της μεταφοράς μετά το τέλος της ηλεκτρομεταφοράς ακολουθούμε τα παρακάτω βήματα χρωματίζοντας την πηκτή με την χρωστική Ponceau S.

- Βγάζουμε την πηκτή και την ξεπλένουμε με νερό.
- Προσθέτουμε την βαφή 0,2% Ponceau S για 1 λεπτό.
- Ξεπλένουμε με νερό ξανά και οι πρωτεΐνες εμφανίζονται κόκκινες.
- Στην συνέχεια ξεπλένουμε με PBS 2-3 φορές από 5 λεπτά για να ξεβάψουμε την πηκτή.

B.15.3. Ανοσοανίχνευση

Πειραματικό μέρος.

Τα γενικά στάδια της διαδικασίας που εφαρμόζεται, είναι κοινά σε όλες τις περιπτώσεις:

- Εμβαπτίζουμε την μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (μετά το τέλος της ηλεκτρομεταφοράς) υπό ανάδευση για 1 ώρα σε διάλυμα κορεσμού που αποτελείται από 5% σκόνη γάλακτος όχι λιπαρή σε διάλυμα PBS που περιέχει 0,1% Tween-20 (PBS-T) (ώστε να κορεστεί η μεμβράνη από την αλβουμίνη του ορού γάλακτος και να αποφύγουμε τις μη ειδικές αλληλεπιδράσεις της μεμβράνης με το αντίσωμα).
- Στην συνέχεια ξεπλένουμε με PBS-T για να φύγει ο περίσσιος παράγοντας μπλοκαρίσματος.
- Επωάζουμε την μεμβράνη με το αντίστοιχο αντίσωμα που έχει αραιωθεί κατάλληλα σε διάλυμα κορεσμού PBS-T, υπό συνεχή ανακίνηση για 1-3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ξεπλένουμε την μεμβράνη τρεις φορές από 10 λεπτά με διάλυμα PBS-T.
- Επωάζουμε την μεμβράνη για 2 ώρες υπό ανάδευση σε θερμοκρασία

περιβάλλοντος με το δεύτερο αντίσωμα σε διάλυμα κορεσμού PBS-T

- Ξεπλένουμε την μεμβράνη 3 φορές από 10 λεπτά με PBS-T .
- Εκτελούμε την χρωμοαντίδραση με την υπεροξειδάση έως ότου γίνει εμφανής η ζώνη της πρωτεΐνης. Αυτό επιτυγχάνεται επωάζοντας την μεμβράνη με το διάλυμα χρωμοαντίδρασης.
- Πλένουμε την μεμβράνη 2 φορές με ddH₂O και την στεγνώνουμε σε διηθητικό χαρτί.

B.16. ΚΑΘΙΖΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΑΚΕΤΟΝΗ

Η καθίζηση των πρωτεϊνών προτιμάται όταν η συγκέντρωση τους στο διάλυμα δεν είναι ικανοποιητική και μικρότερη της 1 μg/ml. Περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Προσθέτουμε στο δείγμα μας 5 όγκους κρύας ακετόνης (-20⁰C) και το αναδεύουμε.
- Το αφήνουμε για 30 λεπτά τουλάχιστον στους -20⁰C.
- Φυγοκεντρούμε σε 10000g για 5 λεπτά.
- Αφαιρούμε την υπερκείμενη φάση και αφήνουμε το ίζημα να στεγνώσει.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε PBS.

B.17. ΣΥΝΘΕΣΗ RNA - ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ *IN VITRO*

Θεωρητικό μέρος.

Οι αντιδράσεις μεταγραφής *in vitro* χρησιμοποιούνται ευρέως για την σύνθεση RNA από συγκεκριμένα DNA-εκμαγεία. Ανάλογα με την περαιτέρω χρήση του νεοσυντιθέμενου RNA μπορεί να είναι ραδιενεργό ή όχι. Η μέθοδος της *in vitro* μεταγραφής παράγει ραδιενεργούς μονόκλωνους ανιχνευτές πολύ υψηλότερης ειδικής ενεργότητας (κρούσεις ανά μόριο) απ' ό,τι οι υπάρχουσες τεχνικές ραδιοεπισημάνσης μονόκλωνου DNA. Η παρασκευή μη ραδιενεργού RNA *in vitro* βρίσκει εφαρμογή στις περιπτώσεις όπου είναι αναγκαία η παρασκευή μεγάλων ποσοτήτων RNA: α) εκμαγείο RNA για *in vitro* μετάφραση και παρασκευή πρωτεΐνης β) παρασκευή tRNA, rRNA ή άλλων μικρών λειτουργικών RNA γ) παρασκευή ιικών RNA, δ) παρασκευή ριβοενζύμων κ.α.

Την ανάπτυξη στην τεχνική αυτή επέτρεψε η δημιουργία πλασμιδιακών φορέων που περιέχουν προαγωγείς RNA πολυμερασών από βακτηριοφάγους όπως του SP6 της *Salmonella typhimurium* ή του T3 και T7 του *E.coli*. Οι προαγωγείς αυτοί βρίσκονται

ακριβώς πριν από την περιοχή κλωνοποίησης όπου γίνεται η ένθεση του ξένου DNA έτσι ώστε η πολυμεράση στην πορεία της να χρησιμοποιήσει σαν εκμαγείο το DNA που έχουμε ενθέσει. Οι συγκεκριμένες πολυμεράσες έχουν επιλεχθεί γιατί έχουν μεγάλη εξειδίκευση για τους προαγωγείς τους (δεν αναγνωρίζουν άλλους εκτός από τους δικούς τους), δεν κάνουν εκκίνηση της μεταγραφής από τυχαίες αλληλουχίες ή «σπασμένα» άκρα DNA και μπορούν να μεταγράψουν μεγάλο μήκος εκμαγείου (αρκετές Kb).

Έτσι εφ' όσον ένας φορέας που περιέχει έναν τέτοιο προαγωγέα και το DNA του ενδιαφέροντος εντεθειμένο ακριβώς μετά, γίνει γραμμικός με πέψη με ενδονουκλεάση περιορισμού στο σημείο που είναι επιθυμητός ο τερματισμός της μεταγραφής, το προϊόν της μεταγραφής θα είναι ένας ομογενής πληθυσμός μορίων RNA που ξεκινούν όλα από τον προαγωγέα και θα καταλήγουν στο άκρο του εκμαγείου που έχει δημιουργηθεί με την πέψη.

Στα πειράματα τέτοιου είδους πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κάποιιο παράγοντες :

- Το ένζυμο περιορισμού που θα χρησιμοποιηθεί για την πέψη πρέπει να αφήνει 5'προεξέχοντα άκρα διότι έχει δείχθει ότι εάν τα άκρα είναι 3'προεξέχοντα, τότε η πολυμεράση συνθέτει ένα μικρό ποσοστό RNA κάνοντας εκκίνηση από το προεξέχον άκρο του εκμαγείου και παράγει το συμπληρωματικό RNA του επιθυμητού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία δίκλωνων μορίων RNA που μειώνει την συγκέντρωση του επιθυμητού μονόκλωνου RNA.
- Η προστασία του RNA από τις ριβονουκλεάσες που το αποικοδομούν. Σε όλους τους χειρισμούς του πειράματος πρέπει τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται να είναι αποστειρωμένα και να χρησιμοποιούνται γάντια.
- Το γραμμικό πλασμιδιακό DNA που θα χρησιμοποιηθεί ως εκμαγείο πρέπει να παρασκευασθεί απουσία ριβονουκλεάσης. Γι' αυτό μετά την πέψη με το ένζυμο, το πλασμιδιακό DNA καθαρίζεται με επώαση παρουσία Πρωτεϊνάσης K (παράγραφος B.4.1.3.).
- Η αντίδραση μεταγραφής είναι μία DNA-εξαρτώμενη σύνθεση RNA απ' την RNA πολυμεράση. Η αντίδραση γίνεται παρουσία ιόντων Mg^{++} και συχνά προστίθεται και σπερμιδίνη η οποία σταθεροποιεί το DNA. Η αντίδραση πρέπει να ετοιμαστεί σε θερμοκρασία δωματίου, γιατί το DNA έχει την τάση να καθιζάνει παρουσία σπερμιδίνης σε χαμηλές θερμοκρασίες.

Μετά την αντίδραση μεταγραφής για να απομονωθεί και να καθαριστεί το RNA πρέπει πρώτα να απομακρυνθεί το DNA. Αυτό επιτυγχάνεται με την χρήση

δεοξυριβονουκλεάσης η οποία αποικοδομεί εξειδικευμένα το DNA και είναι συγχρόνως ελεύθερη ριβονουκλεασών (RNase-free DNase).

Οι πρωτεΐνες απομακρύνονται από την αντίδραση με εκχύλιση με ισομοριακό μίγμα φαινόλης χλωροφορμίου (παράγραφος B.4.1.4.). Τέλος το RNA απομονώνεται με την μορφή ιζήματος με καθίζηση με αιθανόλη (παράγραφος B.4.1.5.). Επειδή όλα τα μόρια RNA αποκτούν δευτεροταγή δομή η οποία επηρεάζει την κίνησή τους σε πηκτική αгарόζης γι' αυτό χρησιμοποιούνται αποδιατακτικές πηκτές, πηκτές δηλαδή που περιέχουν ουσίες που διασπούν τους δεσμούς υδρογόνου έτσι ώστε να καταστρέφεται η δευτεροταγής δομή τους. Τέτοιες ουσίες είναι η ουρία, η γλυοξάλη, η φορμαλδεύδη κ.α. Πρέπει όμως η πηκτική να απαλλαγθεί από την αποδιατακτική ουσία για να βαφεί. Γι' αυτό το λόγο εάν οι απαιτήσεις του πειράματος είναι μικρές αποδιατάσσουμε τα δείγματα μας και όχι την πηκτική. Αυτό γίνεται με θέρμανση αμέσως πριν την ηλεκτροφόρηση ώστε να καταστραφεί η δευτεροταγής δομή του, τα RNA να γίνουν γραμμικά και η κίνηση τους να επηρεάζεται μόνο από τα μοριακά τους βάρη.

Πειραματικό μέρος.

- Ετοιμάζουμε την αντίδραση μεταγραφής (τελικός όγκος 20 μ l) σε θερμοκρασία δωματίου :
 - 1x ρυθμιστικό διάλυμα μεταγραφής για την πολυμεράση T3
 - 0.5mM τελική συγκέντρωση το καθένα από τα ATP,CTP, GTP,UTP
 - x μ l από το εκμαγείο DNA (0,2-1,0 μ g/ml)(ελεύθερο από νουκλεάσες και επωασμένο με Πρωτεΐνωση K)
 - 1 μ l T3 RNA πολυμεράση (15-20 u/ μ l) μαζί με αναστολέα της ριβονουκλεάσης RNasin.
 - H₂O ελεύθερο από νουκλεάσες μέχρι τα 20 μ l
- Επωάζουμε για 120 λεπτά στους 37⁰C
- Αφαιρούμε 5 μ l και στο υπόλοιπο προσθέτουμε 1 unit από το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης RQ1 RNase-free Dnase I (1u/ μ l) και επωάζουμε για 15 λεπτά στους 37⁰C (αποικοδόμηση DNA).
- Εκχυλίζουμε με ίσο όγκο όξινης φαινόλης/χλωροφορμίου (1:1) (απομάκρυνση πρωτεϊνών)
- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε καινούργιο σωληνάκι όπου προσθέτουμε
 - 2,5 όγκους 100% αιθανόλης
 - 1/10 όγκο CH₃COONa 3M pH 5,2

και το επωάζουμε για 30 λεπτά στους -20°C (καθίζηση RNA).

- Φυγοκεντρούμε στους 4°C με ταχύτητα 12000 g για 20 λεπτά.
- Ξεπλένουμε το ίζημα με 70% αιθανόλη.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε κατάλληλο όγκο TE ή σε H_2O απαλλαγμένο από νουκλεάσες.
- Προσθέτουμε στο δείγμα της αντίδρασης το ένζυμο RQ1 και θερμαίνουμε για 5 λεπτά στους 55°C τα δείγματα με ή χωρίς την προσθήκη της RQ1 (αποδιάταξη RNA).
- Αναμιγνύουμε τα δείγματα με κατάλληλη χρωστική για RNA και τα ηλεκτροφορούμε σε πηκτή αгарόζης για επιβεβαίωση της δημιουργίας RNA και της αποικοδόμησης του DNA (μάρτυρας μοριακών βαρών RNA).
Ο χειρισμός της αντίδρασης της μεταγραφής πρέπει να γίνεται με γάντια και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται να είναι ελεύθερα ριβονουκλεασών.

B.18. ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΤΟΥ RNA ΣΕ ΠΡΩΤΕΪΝΗ *IN VITRO*

Θεωρητικό μέρος.

Η σύνθεση πρωτεϊνών χωρίς την μεσολάβηση του κυττάρου έχει γίνει σπουδαίο εργαλείο για την *in vitro* έκφραση των πρωτεϊνών από κλωνοποιημένα γονίδια. Το κυριότερο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι η *in vitro* μετάφραση οδηγεί στην έκφραση συγκεκριμένης πρωτεΐνης χωρίς να έχουμε παρέμβαση από άλλες πρωτεΐνες που δημιουργούνται από ενδογενή RNAs όπως συμβαίνει στην *in vivo* μετάφραση. Η σύνθεση της πρωτεΐνης μπορεί να ανιχνευθεί με διάφορους τρόπους. Συνήθως ένα ραδιενεργά επισημασμένο αμινοξύ προστίθεται στην αντίδραση και μετά την ενσωμάτωσή του στο τελικό προϊόν ανιχνεύεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδιου, και στην συνέχεια με αυτοραδιογραφία. Εάν η ανίχνευση της πρωτεΐνης δεν γίνει με ραδιενέργεια τότε χρησιμοποιούμε τεχνικές όπως η ανοσοκαθίζηση ή η ανοσοανίχνευση.

Η διαδικασία της *in vitro* μετάφρασης ενός mRNA λαμβάνει μέρος σε αιμόλυμα δικτυοερυθροκυττάρων κουνελιού (Promega). Τα δικτυοερυθροκύτταρα είναι κύτταρα της ερυθρής σειράς ένα στάδιο πριν την διαφοροποίησή τους σε ερυθροκύτταρα. Διαθέτουν ένα πολύ καλά οργανωμένο σύστημα μετάφρασης πρωτεϊνών λόγω του ότι πρόκειται να μεταφράσουν απίστευτα μεγάλες ποσότητες από το mRNA των α και β σφαιρινών ώστε κατά την ωρίμανσή τους να διαθέτουν τα απαραίτητα ποσά

αιμοσφαιρίνης για να φέρουν σε πέρας την λειτουργία τους. Το αιμόλυμα των δικτυοερυθροκυττάρων παρασκευάζεται με αφαιμάξη κουνελιών και απομόνωση των δικτυοερυθροκυττάρων. Μετά την λύση των δικτυοερυθροκυττάρων το αιμόλυμα επεξεργάζεται με μικροκοκκική νουκλεάση ώστε το ενδογενές mRNA να καταστραφεί και η μετάφραση να οφείλεται μόνο στο mRNA που εμείς θα προσθέσουμε στο σύστημα. Το αιμόλυμα των δικτυοερυθροκυττάρων κουνελιού (ευκαρυωτικό σύστημα έκφρασης) περιέχει όλους τους απαραίτητους παράγοντες για τη σύνθεση πρωτεϊνών όπως tRNAs, ριβοσώματα, αμινοξέα, παράγοντες έναρξης επιμήκυνσης και τερματισμού. Επίσης προστίθενται α) ένα σύστημα παραγωγής ενέργειας όπως φωσφοκρεατίνη και κινάση της φωσφοκρεατίνης, β) συμπληρωματικό μίγμα tRNAs, γ) αιμίνη η οποία καταστέλλει τον αναστολέα της έναρξης της μετάφρασης eIF-2A (elongation factor) δ) οξικό κάλιο και οξικό μαγνήσιο ε) μάρτυρα RNA που εκφράζει την πρωτεΐνη της λουσιφεράσης μοριακού βάρους 60 KDa, ζ) μίγμα αμινοξέων εκτός της μεθειονίνης.

Όπως και στην μεταγραφή έτσι και στην μετάφραση υπάρχουν ορισμένοι παράγοντες που επηρεάζουν το αποτέλεσμα της αντίδρασης όπως :

- Το ραδιενεργό αμινοξύ που χρησιμοποιείται είναι η [³⁵S] L-μεθειονίνη η οποία οξειδώνεται σε σουλφοξειδία που αναστέλλουν την μετάφραση γι' αυτό πρέπει να αποθηκεύεται στους -70°C αφού μοιραστεί σε μικρές ποσότητες με διάλυμα DTT ή β-μερκαπτοαιθανόλης που είναι αντιοξειδωτικές ουσίες.
- Η παρουσία του αναστολέα ριβονουκλεάσης RNasin που προστατεύει το RNA από αποικοδόμηση.
- Η παρουσία πολυαμινών όπως η σπερμιδίνη (0,1-0,5mM) που έχει αποδειχθεί ότι ενεργοποιεί την μετάφραση.
- Ο βαθμός της δευτεροταγούς δομής του RNA μπορεί να επηρεάσει την μετάφραση γι' αυτό επωάζουμε το εκμαγείο RNA στους 67°C για 10 λεπτά και το τοποθετούμε στον πάγο. Αυτό αυξάνει την ικανότητα της μετάφρασης ειδικά σε mRNA πλούσια σε βάσεις GC διότι καταστρέφει τις περιοχές της δευτεροταγούς δομής του.
- Το αιμόλυμα δικτυοερυθροκυττάρων είναι εξαιρετικά ευαίσθητο και επειδή αρκετά συστατικά του αλλοιώνονται σε θερμοκρασία δωματίου το ξεπαγώνουμε από τους -70°C τρίβοντας το ελαφρά με το χέρι μας μόνο όταν είναι η ώρα της αντίδρασης.

Πειραματικό μέρος.

- Λαμβάνουμε τα αντιδραστήρια από τους -70°C και τα τοποθετούμε στον πάγο.
- Επωάζουμε στους 67°C το εκμαγείο RNA για 10 λεπτά και το τοποθετούμε στον πάγο.
- Ετοιμάζουμε την αντίδραση μετάφρασης που διεξάγεται σε παγόλουτρο.
Σε τρία σωληνάκια μικροφυγοκέντρου προσθέτουμε τα εξής :

Αντιδραστήρια	1 χωρίς RNA	2 Εκμαγείο RNA	3 RNA ελέγχου
Αιμόλυμα δικτυοερυθροκυττάρων Κουνελιού (50-70%)	17,5μl	17,5μl	17,5μl
Μίγμα αμινοξέων χωρίς Μεθειονίνη 1mM	1 μl	1 μl	1 μl
[^{35}S]L- μεθειονίνη (1200Ci/mmol σε 10mCi /ml)	1 μl	1 μl	1 μl
Υπόστρωμα RNA 10-20 μg/ml από <i>in vitro</i> μεταγραφή	--	1 μl	--
Υπόστρωμα RNA ελέγχου (RNA λουσιφεράσης 1μg/μl)	--	--	1 μl
H ₂ O (ελεύθεροRNAσών) μέχρι τελικού όγκου 25 μl	5,5μl	4,5 μl	4,5 μl

- Επωάζουμε στους 37°C για 90-120 λεπτά.
- Το αποθηκεύουμε στους -20°C μέχρι να το ηλεκτροφορήσουμε.

Η αντίδραση έχει την ευελιξία να πραγματοποιηθεί από 25μl–500μl τελικό όγκο. Ο αρνητικός μάρτυρας (δείγμα χωρίς RNA) χρησιμοποιείται για να ελέγξουμε το υπόβαθρο της αντίδρασης εάν είναι καθαρό από τυχόν επιμόλυνση. Ο θετικός μάρτυρας (δείγμα με RNA ελέγχου) μας επιβεβαιώνει ότι τα αντιδραστήρια δούλεψαν εάν παρουσιαστούν δυσκολίες στην μετάφραση του εκμαγείου μας.

B.19. ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ *IN VITRO*

Θεωρητικό μέρος.

Χρησιμοποιήσαμε και την μέθοδο μεταγραφής και μετάφρασης *in vitro* κατευθείαν σε ένα στάδιο για καλύτερα αποτελέσματα. Το T_NT T3 Coupled Reticulocyte Lysate System L4950 ήταν της Promega. Σ' αυτή την περίπτωση ξεκινούμε από DNA εκμαγείο και συνθέτουμε την πρωτεΐνη. Το DNA εκμαγείο μπορεί να είναι γραμμικό ή κυκλικό. Οι προαγωγείς που χρησιμοποιούνται μπορεί να είναι της T3 ή T7 ή της SP6 RNA πολυμεράσης (εικόνα 26). Στην έναρξη της μετάφρασης η αλληλουχία "Kozak" είναι απαραίτητη για την δράση του αιμολύματος δικτυο-ερυθροκυττάρων κουνελιού. Η αλληλουχία αυτή περιέχει μία πουρίνη στην θέση +3 και μια γουανίνη στην θέση +4.

Πειραματικό μέρος.

- Ετοιμάζουμε την αντίδραση μεταγραφής και μετάφρασης
- Σε τρία σωληνάκια μικροφυγοκέντρου προσθέτουμε τα εξής :

Αντιδραστήρια	1 χωρίς DNA	2 Εκμαγείο DNA	3 DNA ελέγχου
Αιμόλυμα δικτυοερυθροκυττάρων Κουνελιού (50-70%)	25 μl	25 μl	25 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης	2 μl	2 μl	2 μl
T3 RNA πολυμεράση	1 μl	1 μl	1 μl
Μίγμα αμινοξέων χωρίς Μεθειονίνη 1mM	1 μl	1 μl	1 μl
[³⁵ S] L-μεθειονίνη (1200Ci/mmol σε 10mCi/ml)	3 μl	3 μl	3 μl
Εκμαγείο DNA	--	0,2-2μg	--
Υπόστρωμα DNA ελέγχου (DNA λουσιφεράσης 1μg/μl)	--	--	1 μl
H ₂ O (ελεύθερο RNAσών) μέχρι τελικού όγκου 50 μl	18 μl	50-(32 +μl DNA)	17 μl

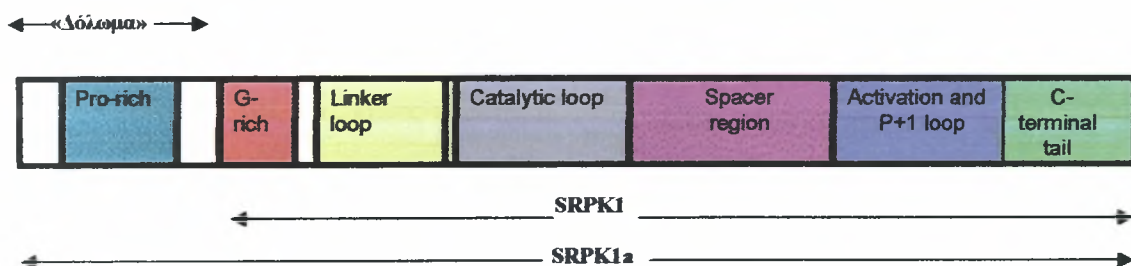
- Επωάζουμε στους 37⁰C για 120 λεπτά.
- Το μίγμα το αποθηκεύουμε στους -20⁰C μέχρι να το ηλεκτροφορήσουμε.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ *IN VIVO* ΜΙΑΣ ΙΣΟΜΟΡΦΗΣ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ SRPK1 ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΩΝ ΔΥΟ ΥΒΡΙΔΙΩΝ ΣΤΟΝ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*.

Γ.1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Για να απομονωθούν πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν εξειδικευμένα με την αμινοτελική περιοχή της SRPK1a (εικόνα 24) (δεδομένου ότι η συγκεκριμένη περιοχή την διαφοροποιεί από την SRPK1) χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των δύο υβριδίων στον *Saccharomyces cerevisiae*.



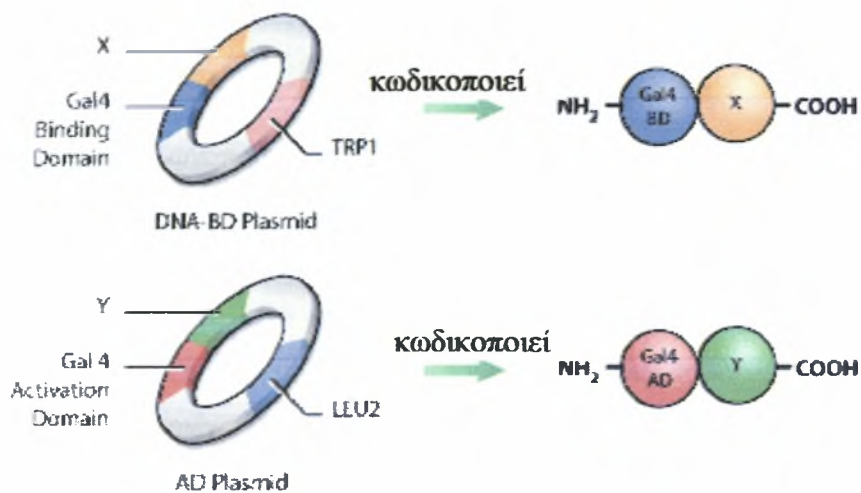
Εικόνα 24 : Σχηματική αναπαράσταση της SRPK1 και SRPK1a όπου υποδεικνύεται η περιοχή που χρησιμοποιήθηκε ως «δόλωμα» στη μέθοδο των δύο υβριδίων.

Εισαγωγή στην μέθοδο των δύο υβριδίων.

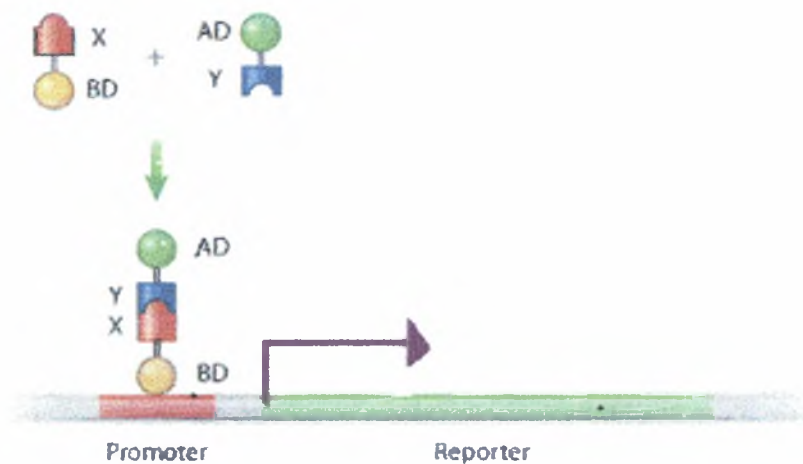
Η μέθοδος των δύο υβριδίων είναι μία τεχνική κατάλληλη για την ανίχνευση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, που χρησιμοποιεί την πολύ καλά ανεπτυγμένη σε μοριακή βάση γενετική του μύκητα *S.cerevisiae*. Η τεχνική των δύο υβριδίων χρησιμοποιεί δύο ανασυνδυασμένα πλασμίδια τα οποία μετασηματίζουν το κατάλληλο στέλεχος *S.cerevisiae* που περιέχει ενσωματωμένα στο γονιδιώμα του γονίδια αναφοράς των οποίων η μεταγραφή καταλήγει σε απλές και εύκολα παρατηρούμενες αλλαγές φαινοτύπου. Το γονίδιο της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος («δόλωμα», όπως αποκαλείται) είναι κλωνοποιημένο σε σύντηξη με την περιοχή

πρόσδεσης στο DNA [DNA Binding Domain (BD)] του μεταγραφικού παράγοντα GAL4 (πλασμίδιο-δόλωμα). Μία βιβλιοθήκη cDNA είναι κλωνοποιημένη σε σύντηξη με την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής [Activation Domain (AD)] του παράγοντα VP16 (πλασμίδια-λείες). Τυχόν αλληλεπίδραση των χημικών πρωτεϊνών που παράγονται από τα δύο ανασυνδυασμένα πλασμίδια έχει σαν αποτέλεσμα την προσέγγιση της περιοχής ενεργοποίησης της μεταγραφής (AD) (που φέρεται από την χημική πρωτεΐνη «λεία») στην περιοχή πρόσδεσης στο DNA (BD) (που φέρεται από την πρωτεΐνη «δόλωμα») με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων αναφοράς που φέρουν στον υποκινητή τους τις αλληλουχίες αναγνώρισης από τον μεταγραφικό παράγοντα GAL4 (εικόνες 25-26-27).

Η δυναμική αυτής της μεθόδου πολλές φορές περιορίζεται από τα υπάρχοντα εργαλεία της. Αυτοί οι περιορισμοί αφορούν α) είτε δύσχρηστους πλασμιατικούς φορείς, β) είτε φτωχά σχεδιασμένες βιβλιοθήκες, γ) είτε στελέχη-υποδοχείς που καταλήγουν σε μεγάλο αριθμό «ψευδών» φαινοτύπων. Στα περιγραφόμενα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν βελτιωμένοι πλασμιατικοί φορείς, cDNA βιβλιοθήκη με υψηλή πολυπλοκότητα και στέλεχος-υποδοχέα που είναι ευαίσθητο σε αδύναμες αλληλεπιδράσεις αλλά συγχρόνως ελαχιστοποιεί και τους «ψευδώς» θετικούς φαινοτύπους.



Σχήμα 25: Σχηματική αναπαράσταση πλασμιδίων του φορέα του δολώματος που κωδικοποιεί για την χιμαιρική πρωτεΐνη Gal4BD-X (X: γονίδιο του δολώματος) και του φορέα της λείας που κωδικοποιεί για την χιμαιρική πρωτεΐνη Gal4AD-Y (Y: γονίδιο της λείας)



Σχήμα 26: Σχηματική αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης δολώματος-λείας που καταλήγει σε ενεργοποίηση των γονιδίων αναφοράς.

Εργαλεία της μεθόδου.

A) Πλασμίδιο-φορέας δολώματος

Για την κλωνοποίηση του δολώματος χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας έκφρασης pGBT9 μεγέθους 5.5 Kb (Παράρτημα ΙΙΙ) που φέρει τις εξής περιοχές: α) την περιοχή πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης (polylinker ή MCS), περιοχή που εισάγονται ξένα τμήματα DNA με την βοήθεια των ενζύμων EcoRI–SmaI–BamHI–SalI–PstI, β) το γονίδιο Amp^r που επιτρέπει την επιλογή βακτηριακών κυττάρων που το περιέχουν αποκτώντας αντίσταση στο αντιβιοτικό της αμπικιλίνης, γ) το γονίδιο TRP1 που επιτρέπει την επιλογή κυττάρων *S.cerevisiae* που το περιέχουν προσδίδοντας πρωτοτροφία στο αμινοξύ τρυπτοφάνη, δ) αλληλουχία του *S.cerevisiae* που κωδικοποιεί για τον προαγωγέα ADH1, ε) τις περιοχές fl origin και ColE1 origin που του επιτρέπουν να πολλαπλασιάζεται σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli*, ζ) την περιοχή έναρξης αντιγραφής 2μ (origin of replication) που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό του πλασμιδίου σε υψηλό αριθμό αντιγράφων (high copy) στον *S.cerevisiae*, η) την αλληλουχία GAL4-BD που κωδικοποιεί για την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του μεταγραφικού παράγοντα GAL4.

B) cDNA βιβλιοθήκη

Η cDNA «βιβλιοθήκη» αποτελεί ένα ετερογενές σύνολο ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που το καθένα φέρει ένα διαφορετικό ένθεμα cDNA και το σύνολό τους αντιπροσωπεύει τα mRNA που εκφράζονται σε συγκεκριμένες συνθήκες. Η cDNA βιβλιοθήκη που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την περίπτωση (πλασμίδια–λείες) ήταν ισομοριακό μίγμα εμβρυακής cDNA βιβλιοθήκης ποντικού E9.5 (εμβρυικής ημέρας 9.5) και E10.5 (εμβρυικής ημέρας 10.5) που έχει εισαχθεί στον πλασμιδιακό φορέα pVP16 στην περιοχή πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης στην θέση του ενζύμου NotI (67). Το μέσο μέγεθος ενθέματος είναι 500bp και η πολυπλοκότητα της βιβλιοθήκης είναι της τάξης των $2,5 \times 10^6$. Τα πλεονεκτήματα των μικρών σε μέγεθος cDNAs είναι α) η διευκόλυνση στον προσδιορισμό των αλληλουχιών DNA, β) ο αποκλεισμός των αλληλεπιδράσεων περιοχών πρωτεϊνών με ανασταλτικές περιοχές που περιέχονται σε πρωτεΐνες που εκφράζονται ολόκληρες και γ) η ελάττωση της τοξικότητας που μερικές φορές παρατηρείται στον ξενιστή όταν υπερεκφράζονται πρωτεΐνες μεγάλου μεγέθους. Αντίθετα, το μειονέκτημα των μικρών σε μέγεθος ενθεμάτων είναι ότι πρέπει να περάσουν από επιλογή περισσότεροι κλώνοι και μπορεί να λείπουν μεγάλες

περιοχές. Επίσης τμήματα πρωτεϊνών μπορεί να παρουσιάσουν αλληλεπιδράσεις άσχετες με την μητρική πρωτεΐνη, γεγονός που αυξάνει την συχνότητα των «ψευδώς» θετικών αλληλεπιδράσεων.

Ο φορέας pVP16 μεγέθους 8.1Kb που χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση των λειών (Παράρτημα III) περιέχει τις εξής περιοχές: α) την περιοχή πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης περιοχή που κλωνοποιούνται ξένα τμήματα DNA με την βοήθεια των ενζύμων BamHI–KpnI–NotI–EcoRI, β) το γονίδιο Amp^r που μας επιτρέπει την επιλογή βακτηριακών κυττάρων που το περιέχουν αποκτώντας αντίσταση στο αντιβιοτικό της αμπικιλίνης, γ) το γονίδιο LEU2 που επιτρέπει την επιλογή κυττάρων που το περιέχουν προσδίδοντας πρωτοτροφία στην λευκίνη, δ) την αλληλουχία του *S.cerevisiae* που κωδικοποιεί για τον προαγωγέα ADH1, ε) την περιοχή f1 origin και ColE1 origin, που του επιτρέπει να πολλαπλασιάζεται σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli* αντίστοιχα, ζ) την περιοχή έναρξης αντιγραφής 2μ ορί που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό του πλασμιδίου σε υψηλό αριθμό αντιγράφων (high copy) στον *S.cerevisiae*, η) την αλληλουχία του *S.cerevisiae* που αναγνωρίζεται από την RNA πολυμεράση του φάγου SP6, θ) την αλληλουχία VP16-AD αλληλουχία που κωδικοποιεί για την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής του μεταγραφικού παράγοντα VP16.

Γ) Στέλεχος-υποδοχέα

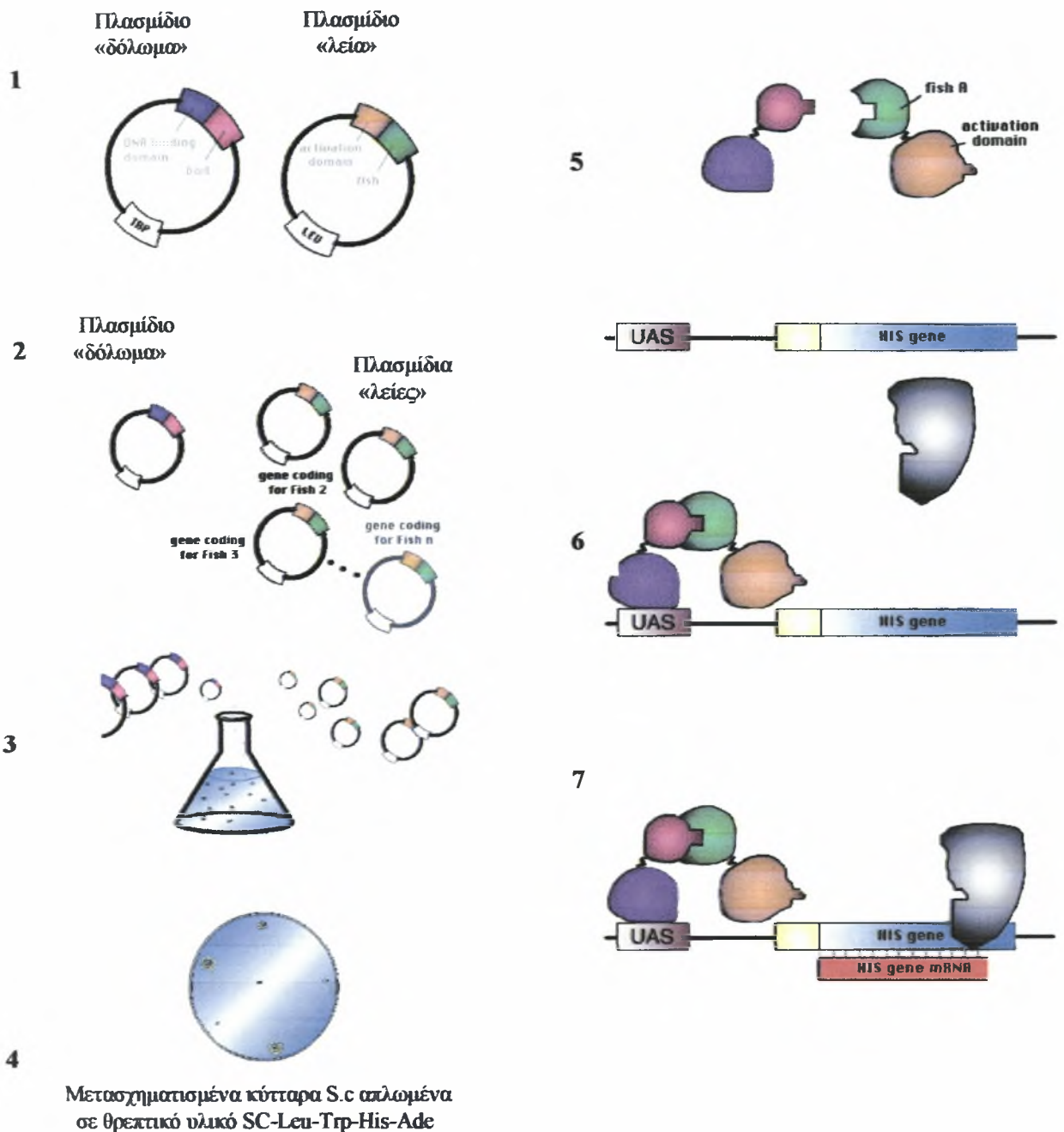
Το στέλεχος του *S.cerevisiae* που χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή της μεθόδου των δύο υβριδίων ήταν το pJ69-4A (MATa trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ) (Παράρτημα II) (29). Για να είναι επιτυχημένες οι επιλογές των κλώνων της μεθόδου των δύο υβριδίων απαιτείται ένα κύτταρο-υποδοχέας το οποίο να περιέχει γονίδια αναφοράς που να παρέχουν έναν ανιχνεύσιμο φαινότυπο. Συγχρόνως θα πρέπει να είναι ευαίσθητο σε μικρές αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων αναφοράς αλλά και να παρέχει μικρό ποσοστό «ψευδώς» θετικών φαινοτύπων. Το στέλεχος pJ69-4A είναι Ura⁻, Trp⁻, Leu⁻, His⁻, Ade⁻. Περιέχει τρία γονίδια αναφοράς (HIS3, ADE2, και LacZ) τα οποία ελέγχονται από τρεις διαφορετικούς προαγωγείς έτσι ώστε να ελαχιστοποιούνται τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Από τις μελέτες που έχουν γίνει δεν έχει διαπιστωθεί κανένα ψευδώς θετικό στέλεχος να ενεργοποιεί παραπάνω από ένα γονίδιο αναφοράς και καμία αληθινή αλληλεπίδραση που να μην είναι ικανή να ενεργοποιήσει και τα τρία γονίδια αναφοράς (127).

-Το γονίδιο HIS3 κωδικοποιεί για ένζυμο του βιοσυνθετικού μονοπατιού της ιστιδίνης και έτσι όταν αυτό ενεργοποιείται, το στέλεχος αποκτά πρωτοτροφία για την ιστιδίνη (His⁺). Επιπλέον υπάρχει η δυνατότητα ποσοτικοποίησης της έκφρασης του γονιδίου μέσω της ικανότητας επιβίωσης του στελέχους παρουσία της ουσίας 3-αμινοτριαζόλη (AT), η οποία αποτελεί συναγωνιστικό αναστολέα του ενζύμου .

-Το γονίδιο ADE2 κωδικοποιεί για ένζυμο του βιοσυνθετικού μονοπατιού της αδενίνης και έτσι όταν αυτό ενεργοποιείται, το στέλεχος αποκτά πρωτοτροφία για την αδενίνη (Ade⁺). Επιπλέον η έκφραση του γονιδίου φαίνεται από το χρώμα του στελέχους [κόκκινο όταν δεν υπάρχει έκφραση (Ade⁻) και άσπρο όταν υπάρχει (Ade⁺)].

-Το γονίδιο LacZ κωδικοποιεί για το βακτηριακό ένζυμο β-γαλακτοσιδάση το οποίο παράγει προϊόν μπλε χρώματος όταν τα στελέχη αναπτύσσονται στο τεχνητό του υπόστρωμα X-gal (5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλ-β-D-γαλακτοζίτης).

Έτσι ένα στέλεχος το οποίο εκφράζει και τα τρία γονίδια αναφοράς, όταν συμβαίνει αλληλεπίδραση δολώματος-λείας, θα μπορεί να αναπτυχθεί απουσία ιστιδίνης (και πιθανόν παρουσία AT), απουσία αδενίνης και θα αποκτά χρώμα μπλε όταν μεγαλώνει παρουσία X-gal.



Σχήμα 27 : Ανακαράσταση : 1) των πλασμιδίων του «δολώματος» και του πλασμιδίου της «λείας», 2) του ετερογενούς συνόλου των πλασμιδίων των «λειών», 3) της διαδικασίας μετασηματισμού μιας καλλιέργειας σακχαρομύκητα με τα δύο είδη πλασμιδίων, 4) ενός τρυβλίου όπου γίνεται η επιλογή μετασηματισμένων αμοικιών, 5-7) της ενεργοποίησης των γονιδίων αναφοράς εξαρτώμενης από την αλληλεπίδραση της χιμαρικής πρωτεΐνης «δολώματος» με την χιμαρική πρωτεΐνη «λεία».

Γ.1.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ-ΔΟΛΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ-ΛΕΙΑΣ

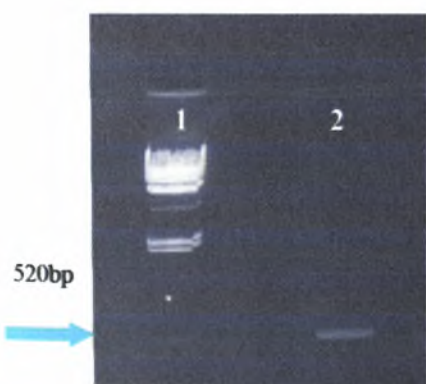
Κλωνοποίηση του δολώματος

Ως δόλωμα επιλέχθηκε τμήμα των 528 νουκλεοτιδίων που κωδικοποιεί για τα 176 αμινοξέα της αμινοτελικής περιοχής της SRPK1a (SRPK1aNt) (29). Η περιοχή αυτή απομονώθηκε με ενίσχυση μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) (B.1.) με επιπρόσθετη παρουσία 10%DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο). Συγκεκριμένα, ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκαν 20ng από τον κλώνο Lambda ZAP ExpressTM λ που περιέχει το cDNA της SRPK1a (22) και ως εκκινητές τα παρακάτω ολιγονουκλεοτίδια: A) νοηματικός εκκινητής (sense primer) [5'-CTGGAATTCATGGAGCGGA AAGGGAGCGG-3'] και B) αντινοηματικός εκκινητής (antisense primer) 5'-GGATCCCCCTAGAAGCTTCA CTGCAGGAGAGAGGGATGG-3']. Οι εκκινητές έχουν θέσεις αναγνώρισης των ενδονουκλεασών περιορισμού EcoRI (ο νοηματικός εκκινητής) και BamHI (ο αντινοηματικός) για να είναι τα άκρα τους συμβατά με το πλασμίδιο φορέα pGBT9. Το προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης SRPK1aNt απομονώθηκε από την πηκτή αγαρόζης (B.3.). Στην συνέχεια ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή 1,2% (εικόνα 28) (B.2.), υπολογίστηκε η συγκέντρωση του κατά προσέγγιση μέσω σύγκρισης της έντασης της ζώνης του δείγματος με τις ζώνες του μάρτυρα γνωστής ποσότητας και τέλος επώαστηκε με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού EcoRI και BamHI (B.4.1.1.).

Παράλληλα, για την προετοιμασία του πλασμίδιου-φορέα pGBT9 για την κλωνοποίηση ακολουθήθηκαν τα στάδια που αναφέρονται στην παράγραφο B.4.1. Πρώτα παρασκευάστηκε πλασμδιακό DNA του pGBT9 με την μέθοδο Qiagen (B.5.3.). Ηλεκτροφορήθηκαν 5μl σε πηκτή αγαρόζης 1,2%, για να υπολογιστεί η συγκέντρωσή του (B.2.) και στην συνέχεια επώαστηκε με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού EcoRI και BamHI. Πενήντα μl DNA pGBT9 (~1μg/μl) προστέθηκαν σε τελικό όγκο 300μl για να γίνει η πέψη όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο της παραγράφου B.4.1.1. Επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1,2% ότι η πέψη ήταν πλήρης και υπολογίστηκε η συγκέντρωση του γραμμικού πλασμιδίου. Στην συνέχεια το DNA pGBT9 που είχε συνεκτικά άκρα επεξεργάστηκε με αλκαλική φωσφατάση (CIP) η οποία αποφωσφορυλιώνει τις 5' φωσφορικές ομάδες για να αποφευχθεί η επανακυκλοποίησή του (B.4.1.2.). Στα προϊόντα της πέψης

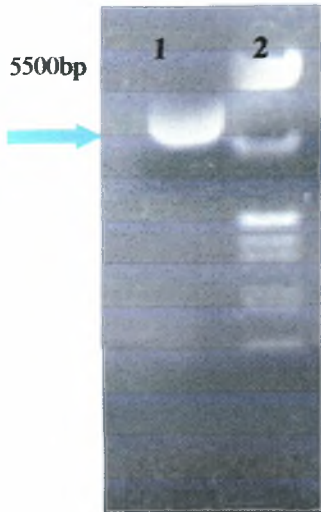
προστέθηκαν 50 units αλκαλικής φωσφατάσης. Ακολούθησαν για τον καθαρισμό του προϊόντος, η επώαση με πρωτεϊνάση K (B.4.1.3.), οι εκχυλίσεις με φαινόλη/χλωροφόρμιο (B.4.1.4.), η κατακρήμνισή του με αιθανόλη (B.4.1.5.) και τέλος η επαναδιάλυσή του σε 200μl TE (παράρτημα I). Ηλεκτροφορήθηκαν 5μl από το δείγμα (pGBT9/EcoRI-BamHI/CIP 5,5Kb) σε πηκτική αγαρόζης 1% όπου ποσοτικοποιήθηκε (εικόνα 29) (B.2.). Εκατό ng από τον φορέα pGBT9/EcoRI-BamHI/CIP πήραν μέρος στην αντίδραση λιγάσης (B.4.1.6.) αφού προστέθηκε το DNA του «δολώματος» SRPK1aNt/EcoRI-BamHI σε μοριακή αναλογία 1:5. Στη συνέχεια η αντίδραση λιγάσης μετασχημάτισε βακτηριακά κύτταρα *E.coli* Top10 (B.9.). Από τις αποικίες που προέκυψαν επιλέχθηκαν τυχαία 20, παρασκευάστηκε το πλασμιδιακό DNA τους με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης (B.6.1.) και ακολούθησε η πέψη τους με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού EcoRI και BamHI και η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης για να διαπιστωθεί ποια μόρια περιέχουν το επιθυμητό ένθεμα (εικόνα 30). Από την φωτογραφία προέκυψε ότι τα 9 από τα 20 πλασμιδιακά DNA παρουσίασαν το ένθεμα του σωστού μεγέθους (520bp) μετά την πέψη τους με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού EcoRI-BamHI.

Συνάγεται ότι το «δολώμα» κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pGBT9 στις περιοχές κλωνοποίησης EcoRI και BamHI σε πλαίσιο ανάγνωσης με την αλληλουχία του DNA που κωδικοποιεί για την περιοχή πρόσδεσης (DNA binding domain) του μεταγραφικού παράγοντα GAL4. Έτσι προέκυψε το πλασμίδιο «δολώμα» pGBT9-SRPK1aNt που εφόσον βρεθεί σε κύτταρα *S.cerevisiae* θα εκφράσει την χμαιοική πρωτεΐνη GAL4BD-SRPK1a.



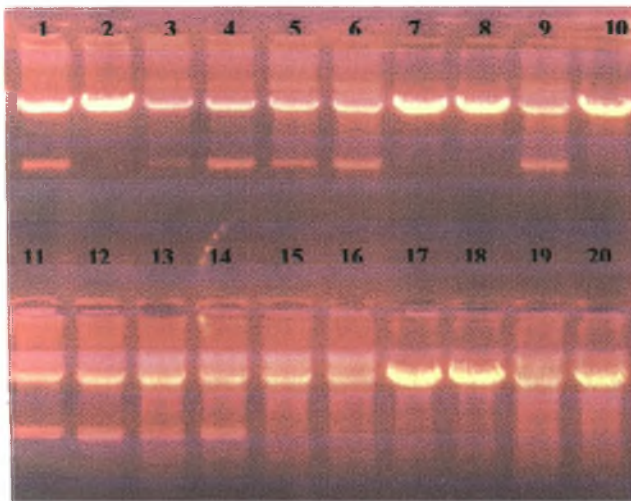
Εικόνα 28 : Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης 1,2% του DNA SRPK1aNt

Διαδρομές 1 : 1,5μg DNA του μάρτυρα μοριακών βαρών λ/Hind III
2 : 1μl DNA SRPK1aNt



Εικόνα 29: Ηλεκτροφόρηση DNA-pGBT9/EcoRI+ BamHI+CIP

Διαδρομή 1: 5μl DNA pGBT9/EcoRI+ BamHI+ CIP
 Διαδρομή 2: 1,5μg DNA του μάρτυρα μοριακών βαρών λ/HindIII-EcoRI.



Εικόνα 30 : Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 1% του pGBT9-SRPK 1aNt/EcoRI-BamHI

Διαδρομή 1-20: 50μl αντίδραση πέψης EcoRI-BamHI των πλασμιδιακών DNA που παρασκευάστηκαν από τις επιλεγείσες αποικίες. Το βέλος υποδεικνύει το ένθεμα SRPK 1aNt.

Επιβεβαίωση ότι το δόλωμα δεν ενεργοποιεί τα γονίδια αναφοράς

Πριν εφαρμοστεί η μέθοδος των δύο υβριδίων πρέπει να ελεγχθεί εάν υπάρχει περίπτωση ενεργοποίησης της μεταγραφής των γονιδίων αναφοράς από το ίδιο το δόλωμα (autoactivation). Σε τέτοια περίπτωση αποκλείεται η χρήση του συστήματος των δύο υβριδίων δεδομένου ότι τα γονίδια αναφοράς θα είναι ενεργοποιημένα ανεξάρτητα από την παρουσία των πλασμιδίων-λειών και άρα θα είναι αδύνατη η επιλογή πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με το «δόλωμα». Κάτι τέτοιο μπορεί να

συμβεί είτε γιατί το «δόλωμα» αποτελεί παράγοντα μεταγραφής, είτε γιατί, όντας μια τεχνητά κατασκευασμένη πρωτεΐνη, εκτός του φυσικού της περιβάλλοντος, ενεργοποιεί τυχαία τον μεταγραφικό μηχανισμό στους προαγωγείς των γονιδίων αναφοράς. Για τον έλεγχο της τυχόν αυτενεργοποίησης των γονιδίων αναφοράς από το «δόλωμα» ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα.

Μετασηματισμός κυττάρων σακχαρομύκητα με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο του δολώματος.

Μετασηματίστηκε το στέλεχος pJ69-4A (L⁻ U⁻ H⁻ T⁻ A⁻) με 1μg από το πλασμίδιο δόλωμα pGBT9-SRPK1aNt. Η αντίδραση μετασηματισμού έγινε με βάση το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην παράγραφο Β.6.2. Η επιλογή των μετασηματισμένων κυττάρων έγινε σε θρεπτικό υλικό επιλογής SC-Trp.

Έλεγχος φαινοτύπου του μετασηματισμένου στελέχους.

Το στέλεχος που προήλθε από τον μετασηματισμό με το πλασμίδιο pGBT9-SRPK1aNt ελέγχθηκε για την έκφραση των γονιδίων αναφοράς και συγκεκριμένα του HIS3 και του lacZ.

Για τον έλεγχο αυτό απομονώθηκαν αποικίες προερχόμενες από τον προαναφερθέντα μετασηματισμό σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό SC-Trp. Αυτές μεταφέρθηκαν σε τρυβλία με το ίδιο υλικό και αφού επώασθηκαν στους 30°C για τρεις ημέρες, «αντιγράφηκαν» με την μέθοδο του «πιστού «αποτυπώματος» (replica plating) σε τρυβλία με τα μέσα επιλογής που περιγράφονται στον πίνακα 1. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το αρχικό στέλεχος μετασηματισμένο με το πλασμίδιο pGBT9.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 1 το πλασμίδιο «δόλωμα» δεν ενεργοποιεί τα γονίδια αναφοράς HIS3 και LacZ διότι δεν μεγαλώνει απουσία ιστιδίνης (ούτε και παρουσία αμινοτριάζόλης). Επίσης παρουσία του υποστρώματος X-gal εμφανίζονται άσπρες αποικίες και όχι μπλε.

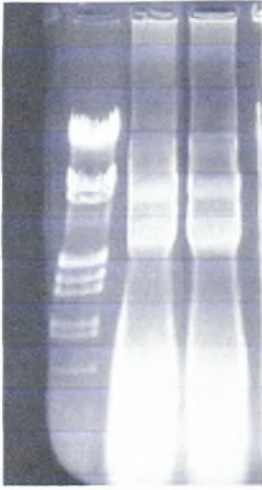
Πίνακας 1: Φαινότυπος των μετασηματισμένων με τα αναγραφόμενα πλασμίδια στελεχών *S.cerevisiae* [+;μεγαλώνει, -: δεν μεγαλώνει,].

Θρεπτικά υλικά Πλασμίδια	SC-Trp	SC-Trp-His	SC-Trp-His +3 mM AT	SC-Trp +X-gal
pGBT9- SRPK1aNt	+	-	-	+
				(Άσπρες αποικίες)
pGBT9	+	-	-	+
				(Άσπρες αποικίες)

Παρασκευή βιβλιοθήκης cDNA

Για να παρασκευασθεί το DNA της βιβλιοθήκης πρέπει να πολλαπλασιαστούν τα βακτηριακά κύτταρα *E.coli* που περιέχουν καθένα από αυτά τα πλασμίδια. Δεδομένου ότι σε υγρή καλλιέργεια υπάρχει κίνδυνος κάποια από τα κύτταρα να υπέρ- ή υπό- πολλαπλασιαστούν με αποτέλεσμα τελικά να μην υπάρχει σωστή αντιπροσώπευση των διαφορετικών cDNA της βιβλιοθήκης, προτιμήθηκε η καλλιέργεια σε τρυβλία όπου εκεί κάθε κύτταρο σχηματίζει μια αποικία και δεν ανταγωνίζεται με τα άλλα.

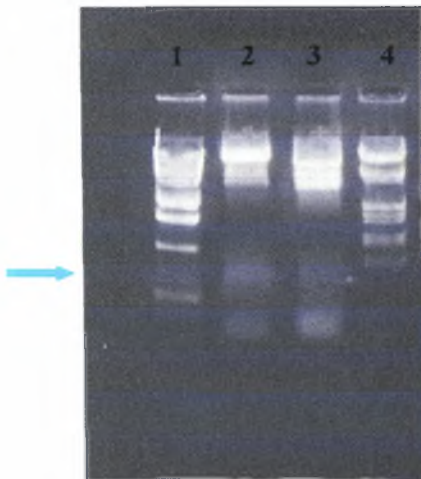
Κάθε βιβλιοθήκη (9,5 και 10,5 ημερών) απλώθηκε σε 30 τρυβλία με θρεπτικό υλικό L.B. και αντιβιοτικό επιλογής την αμικιλίνη (100μg/ml). Αφού τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 ώρες στους 37°C συλλέχθηκαν και αιωρήθηκαν σε θρεπτικό υλικό LB. Στην συνέχεια παρασκευάστηκε πλασμιδιακό DNA με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης (B.5.1) και φαίνεται στην εικόνα 31.



Εικόνα 31 : Ηλεκτροφόρηση του DNA της cDNA βιβλιοθήκης.

- Διαδρομή 1 : 1,5μg του μάρτυρα μοριακών βαρών λ / EcoRI-HindIII
 Διαδρομές 2 : 2μl DNA της βιβλιοθήκης 9,5 ημερών (E9,5)
 Διαδρομές 3 : 2μl DNA της βιβλιοθήκης 10,5 ημερών (E10,5)

Αφού παρασκευάστηκε το cDNA της βιβλιοθήκης ποσοτικοποιήθηκε σε 0,6μg/μl και δημιουργήθηκε το ισομοριακό μίγμα E 9,5 με E 10,5 που θα χρησιμοποιηθεί στην μέθοδο των δύο υβριδίων. Επίσης ένα μέρος της κάθε βιβλιοθήκης ξεχωριστά επωάστηκε με NotI για να φανούν τα μεγέθη των ενθεμάτων. Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης φαίνεται στην εικόνα 32. Διακρίνονται τα μικρά (μέσο μέγεθος ενθέματος 500nt) σε μέγεθος cDNAs που περιέχονται στην βιβλιοθήκη.



Εικόνα 32 : Ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης πένης του DNA της βιβλιοθήκης / NotI

- Διαδρομές 1,4 : 1,5μg του μάρτυρα μοριακών βαρών λ/EcoRI-HindIII
 Διαδρομές 2 : 2μl DNA της βιβλιοθήκης 9,5 ημερών (E 9,5) /NotI.
 Διαδρομές 3 : 2μl DNA της βιβλιοθήκης 10,5 ημερών (E10,5) /NotI.
 Το βέλος υποδεικνύει τα ενθέματα.

Τιτλοδότηση της βιβλιοθήκης.

Έγινε έλεγχος της αποδοτικότητας του μετασχηματισμού του στελέχους pJ69-4A *S.cerevisiae* που ήδη περιέχει το πλασμίδιο «δόλωμα» pGBT9-SRPK1aNt με την βιβλιοθήκη σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην παράγραφο Β.6.1. Ο έλεγχος αυτός γίνεται για να καθοριστεί η ελάχιστη ποσότητα cDNA βιβλιοθήκης που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ώστε να είναι σίγουρο ότι έχουν συμπεριληφθεί στο πείραμα όλα τα cDNA που περιέχονται στην βιβλιοθήκη.

Ο αριθμός των αποικιών που πρέπει να υπάρχει για να επιτευχθεί μια πιθανότητα της τάξης του 0,999 να αντιπροσωπεύονται όλα τα cDNA της βιβλιοθήκης (η οποία στην περίπτωσή μας έχει πολυπλοκότητα $2,5 \times 10^6$, περιέχει δηλαδή $2,5 \times 10^6$ διαφορετικά cDNAs) δίνεται από τον τύπο :

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-1/n)}$$

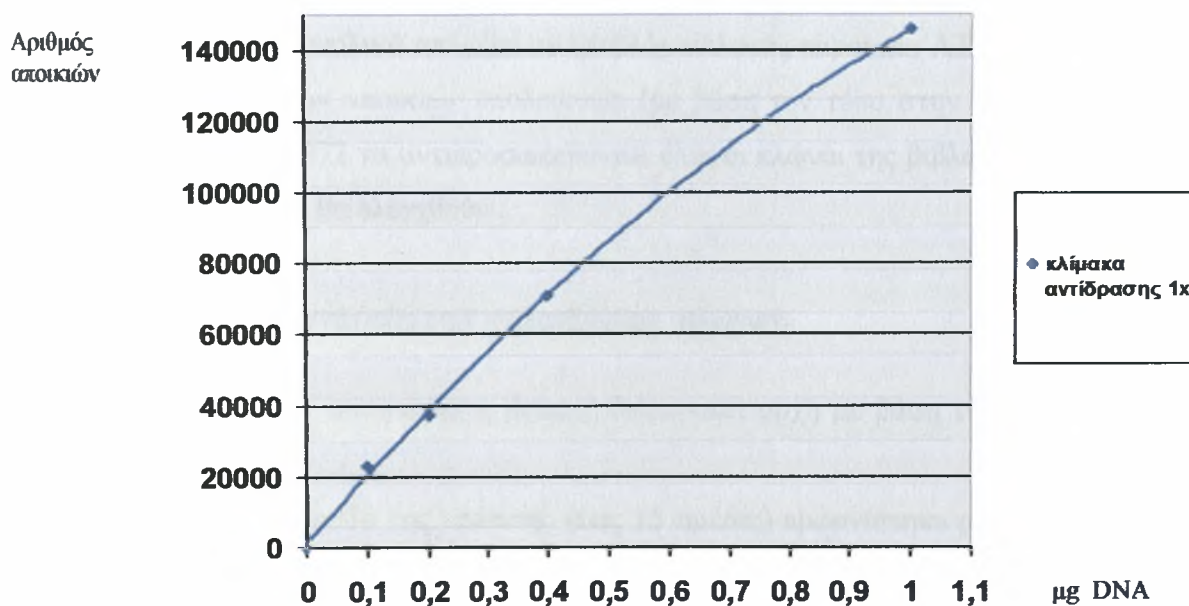
όπου P (πιθανότητα): 0,999 και n (αντιστοιχεί στην πολυπλοκότητα της βιβλιοθήκης): $2,5 \times 10^6$. Δεδομένου ότι $N=11,5 \times 10^6$, είναι απαραίτητο να ελεγχθούν $11,5 \times 10^6$ αποικίες.

Στον πίνακα 2A και στην γραφική παράσταση 2B αναγράφονται τα αποτελέσματα της τιτλοδότησης της βιβλιοθήκης καθώς και οι προβλέψεις για τις αντίστοιχες αντιδράσεις πολλαπλάσιας κλίμακας (60X). Δεδομένου ότι α) με την αύξηση της ποσότητας του DNA η αντίστοιχη αύξηση του αριθμού των αποικιών δεν είναι απολύτως γραμμική (πίνακας 2B) β) το DNA της βιβλιοθήκης είναι πολύτιμο και γ) οι αντιδράσεις πολλαπλής κλίμακας δεν προβλέπεται να αποδώσουν το ακριβές πολλαπλάσιο αποικιών, επιλέχθηκε να γίνουν δέκα αντιδράσεις της κλίμακας (60x) στην αντίδραση μετασχηματισμού με τα 0,1μg βιβλιοθήκης όπου, εφ' όσον η αναλογία θα ήταν απόλυτη, αναμένονταν $23.000 \times 10 \times 60 = 13,8 \times 10^6$ αποικίες.

Πίνακας 2A Αριθμός αποικιών που προέρχονται από αντιδράσεις μετασχηματισμού, του ήδη μετασχηματισμένου με το πλασμίδιο pGBT9-SRPK1aNi στελέχους pJ69-4A με τις αναγραφόμενες ποσότητες DNA της βιβλιοθήκης. Στη γραμμή 60x οι αριθμοί που αναγράφονται είναι θεωρητικοί και προέρχονται από τον πολλαπλασιασμό των αριθμών της γραμμής 1x.

ΚΑΙΜΑΚΑ \ μg DNA	0,1	0,2	0,4	1
1x	23.000	37.220	71.080	145.700
60x	1.380.000	2.237.200	4.264.800	8.742.000

Γραφική παράσταση 2B : Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων που αναφέρονται στον πίνακα 2A.



Γ.1.3. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΤΩΝ ΔΥΟ ΥΒΡΙΔΙΩΝ .

Μετασηματισμός του ήδη μετασηματισμένου με το πλασμίδιο-δόλωμα στελέχους S.c. με το πλασμιδιακό DNA της βιβλιοθήκης.

Το μετασηματισμένο στέλεχος με το πλασμίδιο-δόλωμα pGBT9-SRPK1aNt (ήδη ελεγμένο) μετασηματίστηκε επιπλέον με ισομοριακό μίγμα E9.5 και E10.5 εμβρυακής cDNA βιβλιοθήκης ποντικού που αποτελούσε τα πλασμίδια-λεία (67).

Εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο των «δύο υβριδίων» όπως αναφέρεται στην παράγραφο Β.6.3. Έγιναν 10 αντιδράσεις σε κλίμακα 60X. Στο τέλος το ίζημα επαναδιαλύθηκε και απλώθηκε σε 60 τρυβλία (200λ/ανά τρυβλίο) με θρεπτικό μέσο επιλογής SC-Leu-Trp-His-Ade+3mM AT και επώασθηκε στους 30⁰C. Σε αυτά τα τρυβλία, θα μεγάλωναν μόνο τα κύτταρα στα οποία το γονίδιο HIS3 έχει ενεργοποιηθεί (και άρα επιβιώνουν παρουσία AT) υποδηλώνοντας ότι υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των χημικικών πρωτεϊνών δολώματος και λείας. Συγχρόνως απλώθηκαν και υποσύνολα της βιβλιοθήκης 2λ (1/100) και 10λ (1/20) σε τρυβλία SC-Leu-Trp για να εκτιμηθεί η απόδοση της αντίδρασης μετασηματισμού. Η καταμέτρηση των αποικιών στα τρυβλία αυτά μας υπέδειξε ότι ο αριθμός των κυττάρων μετασηματισμένων συγχρόνως με πλασμίδιο-δόλωμα και με πλασμίδιο-λεία που είχαν συνολικά απλωθεί σε τρυβλία επιλογής παρουσία AT ήταν 9×10^6 . Το νούμερο αυτό των αποικιών υποδεικνύει (με βάση τον τύπο στην σελίδα 122) μια πιθανότητα $P=0,972$ να αντιπροσωπεύονται όλοι οι κλώνοι της βιβλιοθήκης ανάμεσα στις αποικίες που θα ελεγχθούν .

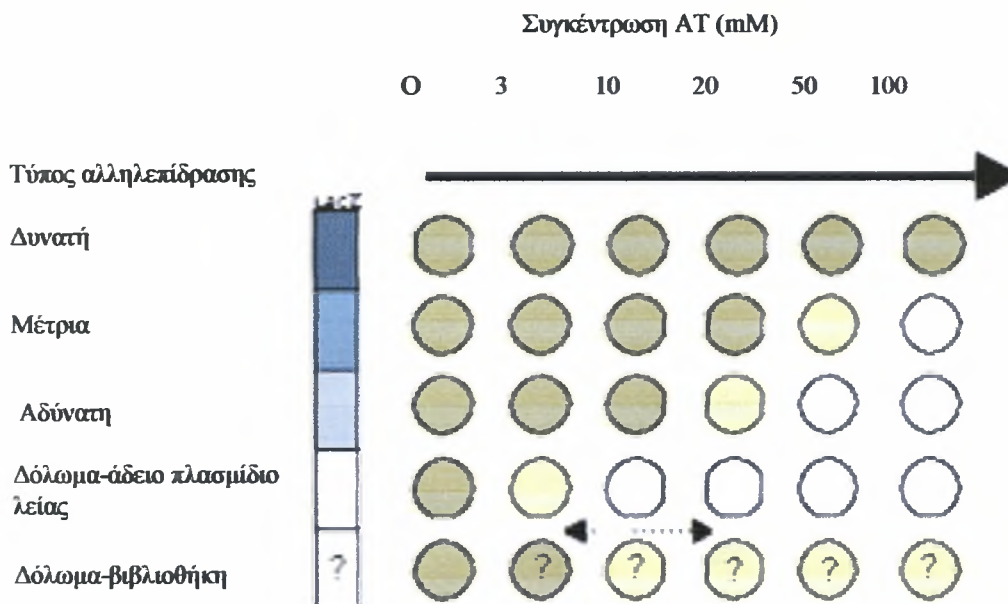
Διαλογή και κατάταξη των επιλεγθέντων κλώνων.

Όπως έχει αναφερθεί η επιλογή έγινε κατά αρχή με βάση την έκφραση του γονιδίου *HIS3*.

Με την πάροδο της επώασης (έως 15 ημέρες) εμφανίστηκε μεγάλος αριθμός κλώνων ανθεκτικών στο AT. Συνολικά 235 κλώνοι επιλέχθηκαν και μεταφέρθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό α) σε SC-Leu-Trp-His-Ade+3mM AT και β) SC-Leu-Trp+X-gal (εικόνα 33).

Έγινε μια πρώτη ομαδοποίηση συνδυάζοντας το μπλε χρώμα σε X-gal, το κόκκινο χρώμα στην αδενίνη και τον βαθμό ανάπτυξης σε 3mM AT. Οι κλώνοι μεταφέρθηκαν με σειρά προτεραιότητας σε καινούργια τρυβλία με θρεπτικό υλικό

SC-Leu-Trp-His-Ade. Μετά από τρεις ημέρες επώασης στους 30°C, εφαρμόστηκε η μέθοδος του πιστού αποτυπώματος για την δημιουργία πιστών αντιγράφων των μητρικών τρυβλίων σε θρεπτικό υλικό SC-Leu-Trp-His-Ade με αυξανόμενη συγκέντρωση AT (+10mM AT, +50mM AT και +100mM AT). Στην εικόνα 34 φαίνονται κάποια παραδείγματα διαφοροποιημένης ανάπτυξης επιλεγμένων κλώνων σε διάφορες συγκεντρώσεις AT. Με τον τρόπο αυτό διαπιστώθηκε α) ποια μετασηματισμένα στελέχη ενεργοποιούν τα γονίδια αναφοράς, β) πόσο ισχυρή είναι η αλληλεπίδραση «δολώματος-λείας» και οι κλώνοι ταξινομήθηκαν σε ομάδες με βάση την έκφραση του γονιδίου HIS3 όπως φαίνεται στον πίνακα 3.



Εικόνα 33 Αναπαράσταση του τρόπου ανάλυσης φαινοτύπων προς κατάταξη κατά τύπο αλληλεπίδρασης των επιλεγμένων αποικιών με βάση την βιωσιμότητά τους σε AT και με τη ένταση του μαλε χρώματος σε τρυβλία X-GAL : ⊙ αναπτύσσεται, ○ δεν αναπτύσσεται.

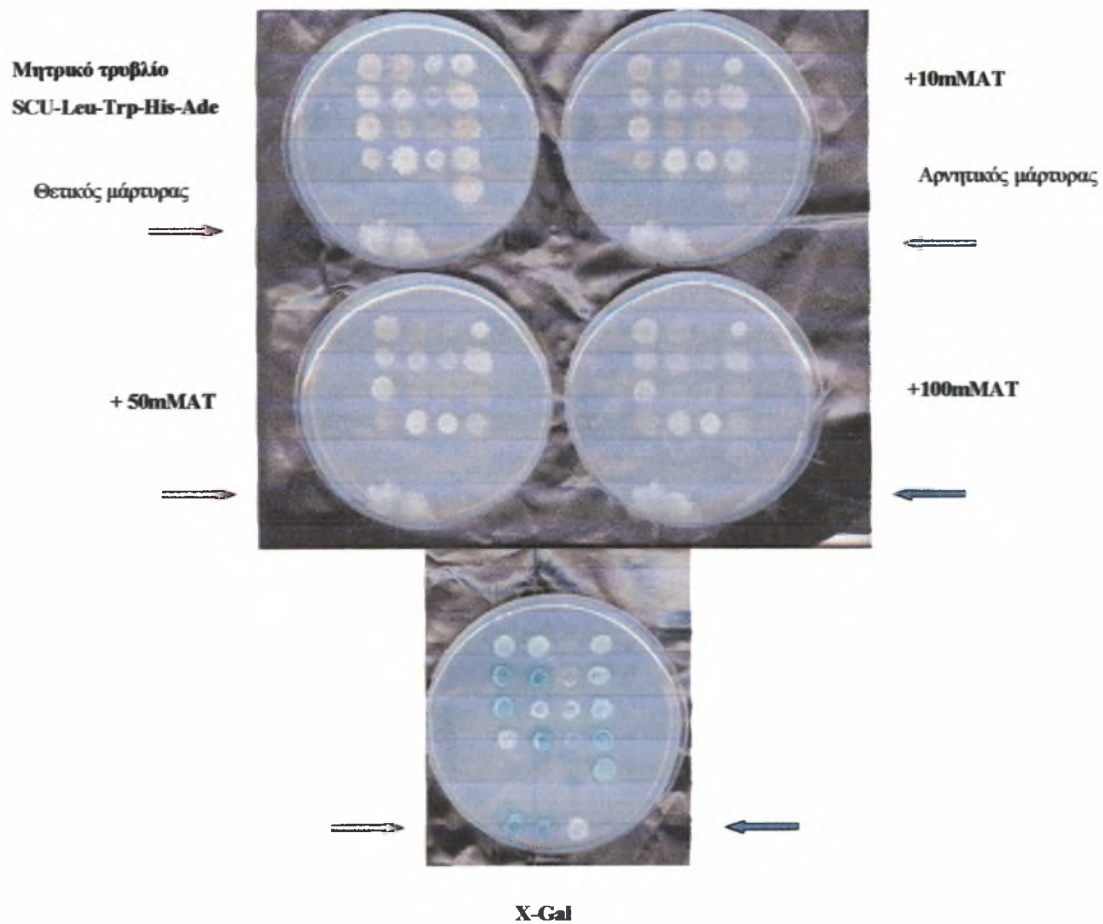
Πίνακας 3: Πρώτη ταξινόμηση των επιλεγμένων στελεχών με βάση την ικανότητα αναπτυξής τους στις αναγραφόμενες ποσότητες AT.



Συγκέντρωση AT αρ αποικιών	≥ 100 mM Α' κατηγορία	≥ 50 mM Β' κατηγορία	≥ 10 mM Γ' κατηγορία	≤ 10 mM Δ' κατηγορία
235	30	60	70	75

Στη συνέχεια ελέγχθηκε η έκφραση του γονιδίου lacZ στα τρυβλία με θρεπτικό υλικό σε SC-Leu-Trp-His-Ade+X-gal. Τελικά χρησιμοποιώντας τα δεδομένα των φαινοτύπων που εμφανίζουν τα στελέχη σε τρυβλία με AT και X-gal η ταξινόμηση κατέληξε όπως φαίνεται στον πίνακα 4.

Πίνακας 4 : Τελική ταξινόμηση των επιλεγμένων στελεχών με βάση την ικανότητα αναπτυξής τους στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις AT και με την ένταση του μπλε χρώματος που εμφανίζουν σε τρυβλία με X-gal.

Κατηγορίες	SCU+AT	Αποτελέσματα	Ένταση χρώματος μπλε
Α' κατηγορία	≥ 100 mM AT	1 ^η & 2 ^η Ομάδα 30 κλώνοι	++++
Β' κατηγορία	< 100 mM AT ≥ 50 mM AT	3 ^η & 4 ^η & 5 ^η Ομάδα 50 κλώνοι	+++
Γ' κατηγορία	< 50 mM AT ≥ 10 mM AT	5 ^η & 6 ^η & 7 ^η Ομάδα 65 κλώνοι	++
Δ' κατηγορία	< 10 mM AT ≥ 3 mM AT	8 ^η & 9 ^η & 10 ^η Ομάδα 90 κλώνοι	+



Εικόνα 34. Ανάπτυξη επιλεγμένων κλώνων σε τροβλία που δημιουργήθηκαν με την μέθοδο του πιστού αποτυπώματος .
 + Θετικός μάρτυρας (δύο αποικίες στέλεχους ανθεκτικού σε 100 mMAT),  - Αρνητικός μάρτυρας (μία αποικία στέλεχους μη ανθεκτικού σε 100 mMAT)

Γ.1.4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΤΑ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ *S.cerevisiae*

Από τους 235 κλώνους που επιλέχθηκαν αρχικά, έγινε η απομόνωση των τριών πρώτων στελεχών της κάθε κατηγορίας των πλασμιδίων-λειών.

Στα κύτταρα του σακχαρομύκητα υπάρχουν σε αυτή την φάση δύο πλασμίδια : το πλασμίδιο-δόλωμα και το πλασμίδιο-λεία. Επειδή δεν μπορεί να παραχθεί μεγάλη ποσότητα πλασμιδιακού DNA από κύτταρα σακχαρομύκητα, τα πλασμίδια πρέπει να «απομονωθούν» μετασχηματίζοντας με εκχύλισμα κυττάρων *S.cerevisiae* που τα περιέχουν, βακτηριακά κύτταρα *E.coli*.

Οι υγρές καλλιέργειες με τα μετασχηματισμένα κύτταρα του σακχαρομύκητα έγιναν σε θρεπτικό μέσο επιλογής SC-Leu στους 30⁰C όλη τη νύχτα. Στο υγρό μέσο προστέθηκε τρυπτοφάνη με σκοπό να βοηθηθούν τα κύτταρα του σακχαρομύκητα κατά τους διπλασιασμούς να χάσουν το πλασμίδιο «δόλωμα», το οποίο τείνει να “χαθεί” από το κύτταρο εφόσον δεν υπάρχει ανάγκη τρυπτοφάνης για την διαίωσιση του κατά την μίτωση. Ο μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων έγινε σύμφωνα με την μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο Β.9. Με την μέθοδο αυτή από τους 235 κλώνους που «απομονώθηκαν» μετασχηματίστηκαν όλοι σε επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E.coli*.

Μετασχηματισμός και επιλογή κυττάρων *E.coli* που περιέχουν το πλασμίδιο-λεία

Θεωρητικά κατά τον μετασχηματισμό θα εισχωρήσει στο βακτηριακό στέλεχος *E.coli* μόνο ένα από τα δύο πλασμιδιακά DNA (πλασμίδιο-δόλωμα, πλασμίδιο-λεία) που περιέχονται στο εκχύλισμα των κυττάρων *S.cerevisiae*.

Επιλέχθηκε για την «διάσωση» κατ’ αρχή το στέλεχος *E.coli* KC8, το οποίο, λόγω των αυξοτροφιών που παρουσιάζει (Παράρτημα ΙΙ), επιτρέπει τον εύκολο διαχωρισμό κυττάρων που περιέχουν τα πλασμίδιο-λεία (πρωτοτροφία σε λευκίνη) από εκείνα που περιέχουν το πλασμίδιο-δόλωμα (πρωτοτροφία σε τρυπτοφάνη). Παρόλα αυτά αποδείχθηκε ότι στο μέσο επιλογής για το πλασμίδιο-λεία M9+His+Ura+Trp (+Amp) αναπτύσσονται επίσης (σε μικρότερο μέγεθος) και αποικίες κυττάρων που περιέχουν το πλασμίδιο δόλωμα, καθιστώντας έτσι δύσκολο τον επιδιωκόμενο διαχωρισμό.

Ως εκ τούτου τα κύτταρα KC8 που προέρχονταν από μετασχηματισμό αναπτύσσονταν πρώτα σε τρυβλία LB (όπου μεγαλώνουν ανεξαρτήτως αυξοτροφίας) και μεταφέρονταν στη συνέχεια σε τρυβλία M9+His+Ura+Trp (+Amp) ή M9+His+Ura+Leu (+Amp) προκειμένου να διαχωριστούν αυτά που περιέχουν το πλασμίδιο-λεία από αυτά που περιέχουν το πλασμίδιο-δόλωμα αντίστοιχα. Ενώ όμως αναμενόταν να υπάρχει μια αναλογία περίπου 1:1 μεταξύ αυτών, αυτή αποδείχθηκε να είναι της τάξης των 1:10 αντίστοιχα.

Το φαινόμενο που παρατηρήθηκε μπορεί να ερμηνευθεί ως εξής: α) το πλασμίδιο φορέας του δολώματος pGBT9 έχει μέγεθος 5.5Kb ενώ το πλασμίδιο φορέας της λείας pVP16 είναι 8.5Kb. Αυτό σημαίνει ότι παρόλο που και τα δύο πλασμίδια περιέχουν θέσεις έναρξης αντιγραφής του 2μ.ori, μπορεί να πολλαπλασιαστεί πιο γρήγορα ο πλασμιδιακός φορέας pGBT9 από ότι ο pVP16 λόγω μεγέθους ή β) η αποδοτικότητα του μετασχηματισμού μπορεί να επηρεάζεται από ιδιαιτερότητες της αλληλουχίας των πλασμιδιακών φορέων που ευνοούν την παρουσία του πλασμιδίου-δολώματος. Επιπλέον το στέλεχος KC8 παρουσίαζε μικρότερη αποδοτικότητα μετασχηματισμού απ' ότι τα κοινώς χρησιμοποιούμενα στελέχη (Top 10, XL1-blue) με αποτέλεσμα συχνά να διασώζεται μόνο το πλασμίδιο-δόλωμα. Παρόλα αυτά με τη μέθοδο αυτή διασώθηκαν τα πλασμίδια-λείες από 86 κλώνους (Πίνακας 5).

Εναλλακτικά επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί ένα στέλεχος *E. coli* με μεγαλύτερη αποδοτικότητα μετασχηματισμού (Top10, Παράρτημα II) το οποίο όμως δεν παρουσιάζει αυξοτροφίες. Ως εκ τούτου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος υβριδισμού βακτηριακών αποικιών με ραδιοεπισημασμένο ανιχνευτή ως μέθοδος επιλογής των κυττάρων που περιέχουν το πλασμίδιο-λεία. Ως μόριο-ανιχνευτής επιλέχθηκε το DNA της SRPK1aNt (που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του πλασμιδίου-δολώματος), έτσι ώστε να εξαιρεθούν οι βακτηριακές αποικίες που περιείχαν το πλασμίδιο-δόλωμα (και άρα να επιλεχθούν αυτές που περιέχουν το πλασμίδιο-λεία).

Ο μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων έγινε σύμφωνα με την μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο Β.9.

Γ.1.5. ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΛΩΝΩΝ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΤΟ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ-ΔΕΙΑ ΜΕ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟ

Μεταφορά των αποικιών σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης και υβριδισμός αυτών

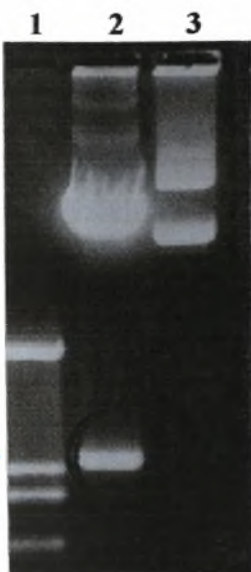
Είκοσι αποικίες προερχόμενες από το βακτηριακό μετασχηματισμό με κάθε κλώνο *S.cerevisiae* από τους υπόλοιπους 149 μεταφέρθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό LB έτσι ώστε να υπάρχει η μέγιστη πυκνότητα αποικιών ανά τρυβλίο (σε κυκλική διάταξη περίπου 100 αποικίες/τρυβλίο). Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 30 τρυβλία. Αφού επώασθησαν στους 37°C για 24 ώρες έγινε η μεταφορά των αποικιών σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης (B.10.3.).

Παρασκευή του ανιχνευτή και ραδιοεπισήμανσή του με την μέθοδο τυχαίας εκκίνησης (random priming)

10μg DNA του πλασμιδίου pGBT9-SRPK1aNt επώαστηκαν με τα ένζυμα EcoRI και BamHI σε τελικό όγκο 100μl. Μετά την επώαση διάρκειας δύο ωρών στους 37°C, ηλεκτροφορήθηκαν 5μl από το δείγμα σε πηκτή αγαρόζης 1,2%. Από τη φωτογραφία της ηλεκτροφόρησης (Εικ.35) φαίνεται ότι η πέψη είναι πλήρης. Στην διαδρομή 2 η μοναδική ζώνη αντιστοιχεί στο γραμμικό πλασμίδιο σε σχέση με το άκοπο δείγμα (στην διαδρομή 3 φαίνονται οι ζώνες που αντιστοιχούν στην χαλαρή και υπερλικωμένη μορφή του κυκλικού πλασμιδίου). Ακολούθησε η παρασκευαστική ηλεκτροφόρηση (Εικ.36) όπου ηλεκτροφορήθηκε ο συνολικός όγκος της αντίδρασης σε πηκτή αγαρόζης 1,2% και στο τέλος απομονώθηκε το θραύσμα του ενδιαφέροντος και απομονώθηκε από την πηκτή (B.3.). Μετά τον καθαρισμό του SRPK1aNt ηλεκτροφορήθηκε ένα δείγμα για να υπολογιστεί η ποσότητα που θα χρησιμοποιηθεί για την ραδιοεπισήμανση. Η συγκέντρωση του παρασκευασθέντος DNA υπολογίστηκε στα 50 ng/μl (B.2.).

Χρησιμοποιήθηκαν 0.5μl (25 ng) SRPK1aNt στην αντίδραση τυχαίας εκκίνησης με ραδιενεργά επισημασμένο dCTP [α -³²P] (B.10.1.) Το ραδιοεπισημασμένο DNA διαχωρίστηκε από τα μη ενσωματωμένα ραδιενεργά νουκλεοτίδια με χρωματογραφία σε στήλη μοριακής διήθησης Sephadex G25 (B.10.2.). Η απόδοση της αντίδρασης ελέγχθηκε ποιοτικά με μέτρηση του σήματος

της ραδιενέργειας που εκπέμπονταν από την στήλη και το έκλουσμά της, με τον μετρητή Geiger Muller. Αυτή ήταν περίπου 50%.



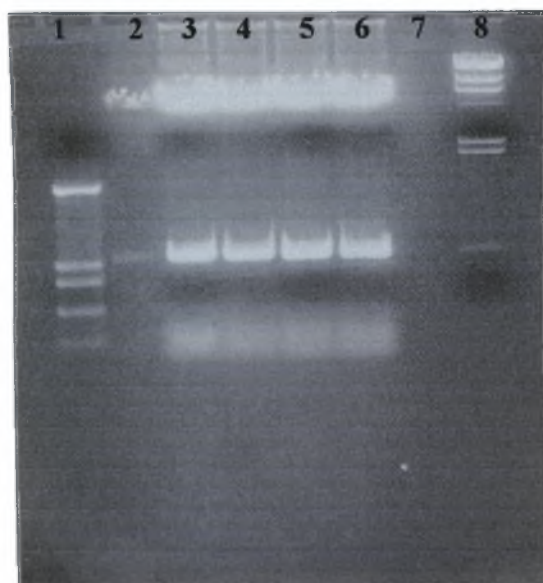
Εικόνα 35 : Ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης πέψης του pGBT9-SRPK1aNt με EcoRI-BamHI.

Διαδρομή 1 : 750ng DNA του μάρτυρα μοριακών βαρών pUC 18/Hinf I

Διαδρομή 2 : 5μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA pGBT9-SRPK1aNt/ EcoRI-BamHI

Διαδρομή 3: 5μl άκοπου PGBT9-SRPK1aNt

Το βέλος υποδεικνύει το μέγεθος του τμήματος SRPK1aNt.



Εικόνα 36 : Παρασκευαστική ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης πέψης του pGBT9- SRPK1aNt.

Διαδρομή 1 : 750ng DNA του μάρτυρα μοριακών βαρών pUC18/ Hinf I.

Διαδρομές : αντίδραση πέψης πλασμιδιακού pGBT9-SRPK1aNt με EcoRI- BamHI. 3-6

Διαδρομή 8 : 1,5μg DNA του μάρτυρα μοριακών βαρών λ/Hind III.

Υβριδισμός των μεμβρανών νιτροκυτταρίνης.

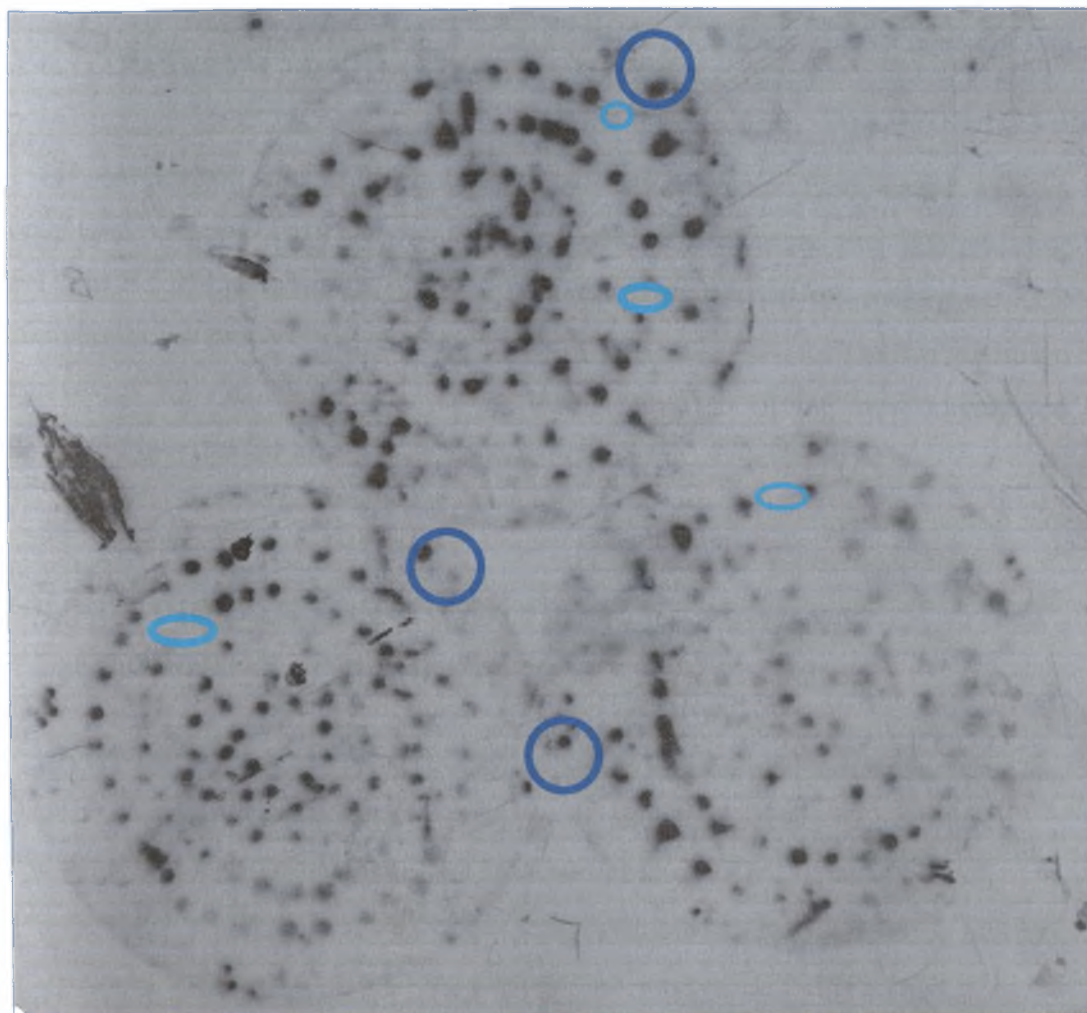
Μετά την διαδικασία της μεταφοράς των αποικιών οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης υβριδίστηκαν με το ραδιοεπισημασμένο DNA SRPK1aNt. Οι κλώνοι που δεν έδωσαν ραδιενεργό σήμα περιείχαν την λεία, και ήταν αυτοί που μας ενδιέφεραν. Ο προϋβριδισμός, ο υβριδισμός και η αυτοραδιογραφία των φίλτρων έγιναν σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που περιγράφονται στις παραγράφους B.10.4. και B.10.5. Ως θετικοί μάρτυρες είχαν τοποθετηθεί στα τρυβλία αποικίες που περιείχαν το ίδιο το πλασμίδιο-δόλωμα (pGBT9-SRPK1aNt) και ως αρνητικοί μάρτυρες αποικίες που περιείχαν ένα πλασμίδιο που δεν περιέχει την αλληλουχία SRPK1a. Οι μάρτυρες έδωσαν τα αναμενόμενα σήματα όπως φαίνεται στην εικόνα 37.

Με τη μέθοδο αυτή επιλέχθηκαν αποικίες που περιέχουν πεπτίδια-λείες για 80 κλώνους από τους αρχικούς 149. Στην συνέχεια ετοιμάστηκαν γλυκερινικά αποθέματα από αυτούς τα οποία αποθηκεύτηκαν στους -70°C (B.5.4.).

Συγκεντρωτικά, μέσω των βακτηριακών κυττάρων KC8 και του υβριδισμού σε βακτηριακά κύτταρα Top 10 διασώθηκαν 166 κλώνοι. Από αυτούς διερυνήθηκαν περαιτέρω μόνο οι 86 και οι υπόλοιποι αποθηκεύτηκαν για μελλοντική χρήση (Πίνακας 5).

	Επιτεύγματα	Εργαστηριακές Εργασίες (Research)	Αναστροφή μαθητών	Μεταδόσεις και προγράμματα	Εργαστήριο DNA	Επιτόκια	Επιτόκια on-line	Επιτεύγματα επιβεβαιωμένη εργασία	Ανάπτυξη αλληλεπίδρασης Squaring	Τεχνική Θύρα ως μονοκλάση
Αριθμός Κλάσεων	235	235	σε ΚΟ8 86	86	86	86	86	75	67	26
			σε Τροπ10 149	80	80	80	-	-	-	-
Σύνολο	235	235	235	166	166	166	86	75	67	26

Πίνακας 5. Προσέλιψη των κλάσεων αριθμητικά από την αρχή της μεθόδου των δύο υφαιδίων μέχρι την τελική τους επιλογή



Εικόνα 37. Αυτοραδιογραφία των υβριδισμένων μεμβρανών νιτροκυτταρίνης με ραδιοενεργό ανιχνευτή το δόλωμα PGBT9-SRPK.1aNt. Με έλλειψη (γαλάζιο χρώμα) σημειώνονται ενδεικτικά κάποιοι κλώνοι που δεν υβριδίστηκαν και απομονώθηκαν ενώ με κύκλο (μπλε χρώμα) ο θετικός μάρτυρας και αρνητικός (υβρισμένος και μη υβριδισμένος αντίστοιχα) που είχαν τοποθετηθεί στις μεμβράνες.

Γ.1.6. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ DNA - ΛΕΙΩΝ

Η απομόνωση και ο καθαρισμός των πλασμιδιακών DNA-λειών από τα βακτηριακά κύτταρα έγινε με δύο τρόπους όπως περιγράφεται στις παραγράφους Β.5.1. και Β.5.2. Για τα επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E.coli* του στελέχους ΚC8 ακολουθήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης διότι μόνο με αυτή επιτυγχανόταν η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA (λόγω ιδιομορφιών του κυτταρικού τοιχώματος του στελέχους).

Γ.1.7. ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΤΥΠΩΝ - ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ «ΑΞΙΟΠΙΣΤΙΑΣ» ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΚΛΩΝΩΝ

Προκειμένου να αναγνωστούν οι αλληλουχίες των ενθεμάτων των επιλεγμένων κλώνων έπρεπε να διαπιστωθεί ότι αυτοί πληρούν κάποιες προϋποθέσεις;

- I. Να περιέχουν ένθεμα στη θέση NotI του πλασμιδίου pVP16.
- II. Να προκαλούν έκφραση των γονιδίων αναφοράς όταν μετασχηματίσουν εκ νέου το στέλεχος rJ69-4A που εκφράζει το πλασμίδιο δόλωμα pGBT9-SRPK1aNt.

Έτσι θα επιβεβαιωνόταν ότι ο φαινότυπος των στελεχών που επιλέχθηκαν αρχικά (και από τα οποία απομονώθηκαν τα πλασμίδια-λείες), δεν οφειλόταν σε φαινόμενα άλλα από την συνύπαρξη του πλασμιδίων-λείας και του πλασμιδίου-δολώματος, όπως μεταλλάξεις στο γονιδίωμα του στελέχους (που θα έδινε π.χ. ανθεκτικότητα στο AT, κ.ά.).

- III. Να μην προκαλούν την έκφραση των γονιδίων αναφοράς όταν μετασχηματίσουν το ίδιο στέλεχος χωρίς την παρουσία δολώματος.

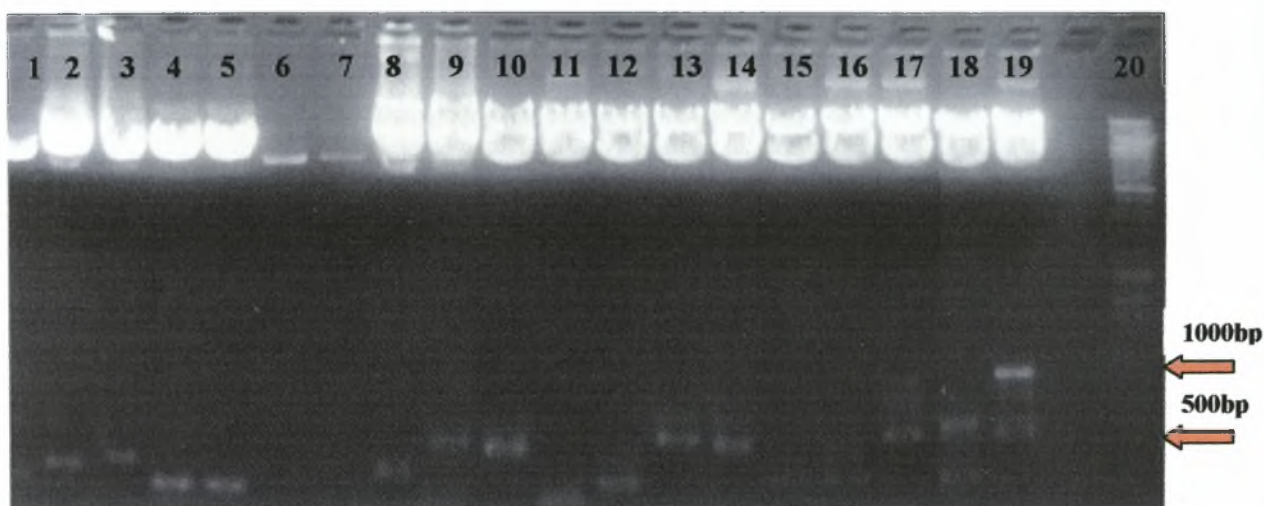
Έτσι θα αποκλειόταν η περίπτωση η πρωτεΐνη που παράγεται από τα πλασμίδια-λεία να επάγει την έκφραση των γονιδίων αναφοράς ανεξάρτητα από την παρουσία του δολώματος και άρα τελικά να μη σχετίζεται με την πρωτεΐνη «δόλωμα».

I. Πέψη των πλασμιδιακών DNA-λειών με την ενδονουκλεάση περιορισμού NotI

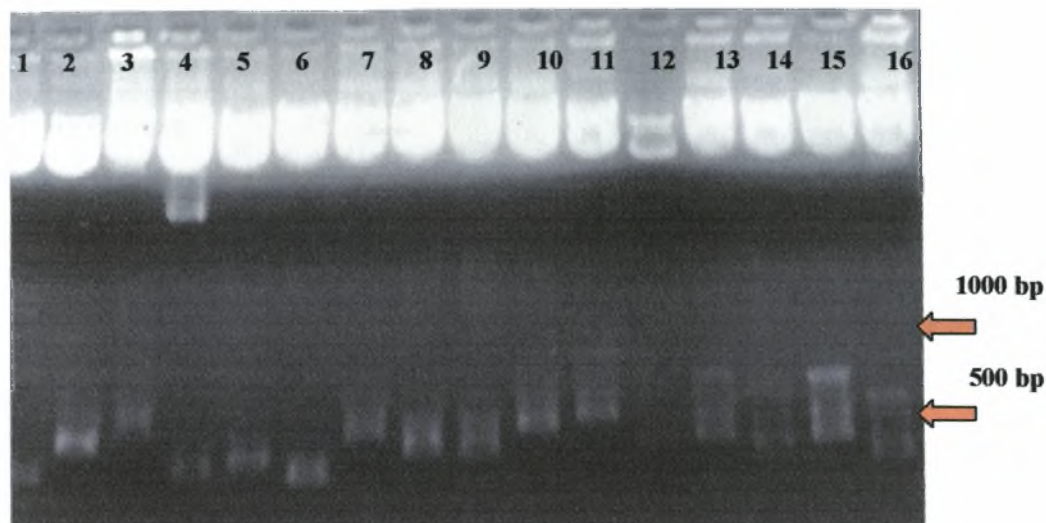
Κατ' αρχή τα απομονωθέντα πλασμίδια-λείες ελέγχθηκαν για την παρουσία ενθέματος σε πέψεις με την ενδονουκλεάση περιορισμού NotI. Η πέψη αυτή αποτελεί μέσο επιβεβαίωσης του γεγονότος ότι οι κλώνοι που απομονώθηκαν φέρουν όντως

ενθέματα cDNA. Όπως έχουμε ήδη αναφέρει τα ενθέματα της βιβλιοθήκης ήταν κλωνοποιημένα στο πλασμιδιακό φορέα pVP16 στην θέση αναγνώρισης του ενζύμου Not I.

Για την πέψη ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην παράγραφο B.4.1.1. Στην συνέχεια ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα των αντιδράσεων σε πηκτή αгарόζης 1,2%. Από τα 86 πλασμίδια-λείες περιείχαν ένθεμα τα 75 (πίνακας 5). Το μέγεθος των ενθεμάτων όπως προβλεπόταν από τις προδιαγραφές της βιβλιοθήκης κυμαινόταν από 350-700 bp. Στις φωτογραφίες 38 & 39 φαίνονται κάποιες από τις λείες που περιέχουν ένθεμα.



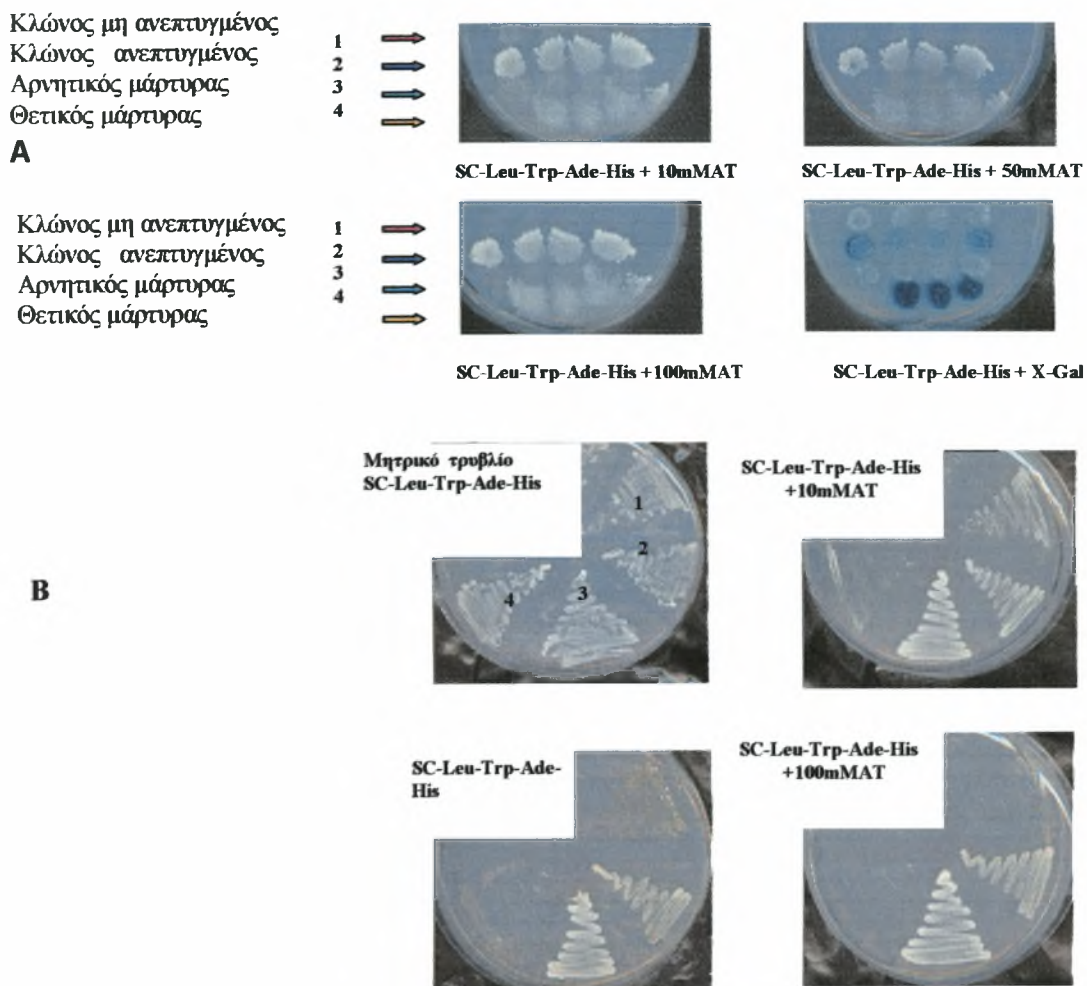
Εικόνα 38 : Διαδρομές 1-19: Ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων πέψης του πλασμιδιακού DNA pVP16-λείες με NotI (20μl)
Διαδρομή 20 : 750ng μάρτυρα μοριακών βαρών λ Hind III/EcoRI



Εικόνα 39 : Διαδρομές 1-16 : Ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων πέψης του πλασμιδιακού DNA pVP16-λείες με NotI (20μl).

II. Μετασηματισμός του αραγικού στελέχους που περιέχει το πλασμίδιο-δόλωμα (pGBT9-SRPK1aNt), με τα πλασμίδια-λείες

Το στέλεχος pJ69-4A ήδη μετασηματισμένο με τα πλασμίδια pGBT9-SRPK1aNt μετασηματίστηκε επιπλέον με καθένα από τα απομονωθέντα πλασμίδια-λείες (B.7.1.). Η καλλιέργεια του στελέχους προς μετασηματισμό ήταν σε Sc-Tgr και το προϊόν του μετασηματισμού απλώθηκε σε τρυβλία Sc-Tgr-Leu. Συνοπτικά οι αποικίες που προέκυψαν από τα πειράματα II (τέσσερις από κάθε μετασηματισμό) ελέγχθηκαν για την ικανότητα αύξησής τους στο αρχικό μέσο επιλογής Sc-Tgr-Leu-His-Ade+3mMAT. Αντιπροσωπευτικές αποικίες από τα συγκεκριμένα στελέχη ελέγχθηκαν για το μέγεθος της ανθεκτικότητάς τους σε AT με την παρατήρηση πιστών αποτυπωμάτων τους σε τρυβλία Sc-Tgr-Leu-His-Ade + (3, ή 10, ή 50, ή 100mM) AT με αποτέλεσμα τα 67 από τα 75 στελέχη να δώσαν ανθεκτικότητα στο AT παρουσία του πλασμιδίου pGBT9-SRPK1aNt. Χαρακτηριστικό παράδειγμα φαίνεται στην εικόνα 40 όπου το στέλεχος της γραμμής 1 επιβεβαιώνει τον αρχικό φαινότυπο ενώ της γραμμής 2 δεν τον επιβεβαιώνει. Στην ίδια εικόνα φαίνεται το παράδειγμα επιβεβαίωσης φαινοτύπου με διαφορετική τεχνική αποτύπωσης σε τρυβλία.

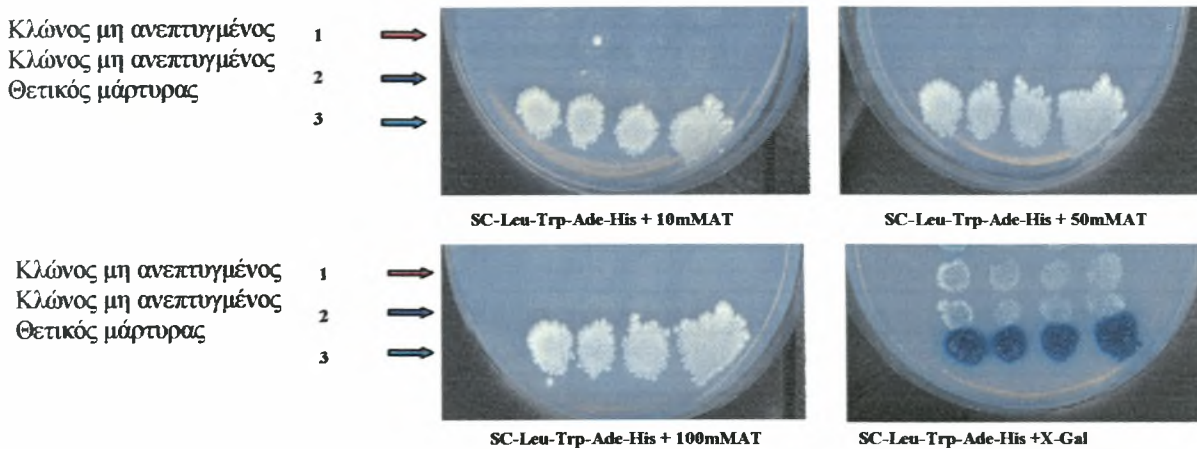


Εικόνα 40. Παράδειγμα ελέγχου φαινοτύπου 2 στελεχών. Α. Με τη μέθοδο του πιστού αποτυπώματος Τέσσερις αποικίες προερχόμενες από τον μετασχηματισμό του πατρικού στελέχους με το πλασμίδιο δόλωμα και δύο πλασμίδια λειών (γραμμή 1 & 2) αποτυπώθηκαν πιστά σε τρυβλία με κατάλληλα θρεπτικά υλικά όπως αναγράφεται Γραμμή 3 : Αρνητικός μάρτυρας Γραμμή 4 : Θετικός μάρτυρας. Β. Με την μέθοδο της επίστρωσης με κρίκο 1 :Κλώνος μη ανεπτυγμένος, 2 : κλώνος ανεπτυγμένος, 3 : Θετικός μάρτυρας, 4 : Αρνητικός μάρτυρας (κατά αντιστοιχία και στα υπόλοιπα τρυβλία).

III. Μετασχηματισμός του πατρικού στελέχους με τα πλασμίδια-λείες.

Προκειμένου να εξακριβωθεί η τρίτη προϋπόθεση το στέλεχος rJ69-4A με το πλασμίδιο rGBT9 (χωρίς ένθεμα) μετασχηματίστηκε επιπλέον με καθένα από τα απομονωθέντα πλασμίδια-λεία. Η καλλιέργεια του στελέχους προς μετασχηματισμό ήταν σε Sc-Trp και το προϊόν του μετασχηματισμού απλώθηκε σε τρυβλία Sc-Trp-Leu. Για ακόμη μία φορά ελέγχθηκαν αντιπροσωπευτικές αποικίες από συγκεκριμένα στελέχη για το μέγεθος της ανθεκτικότητάς τους σε AT με την παρατήρηση πιστών αποτυπωμάτων τους σε τρυβλία Sc-Trp-Leu-His-Ade + (10, ή 50, ή 100mM) AT.

Κανένα από τα πλασμίδια-λείες δεν προσέδωσε ανθεκτικότητα στο AT απουσία δολώματος. Ένα παράδειγμα φαίνεται στην εικόνα 41.



Εικόνα 41: Παράδειγμα ελέγχου φαινοτύπου 2 στελεχών. Α. Με τη μέθοδο του πιστού αποτυπώματος. Τέσσερις αποικίες προερχόμενες από τον μετασχηματισμό του πατρικού στελέχους δύο πλασμίδια λειών (γραμμή 1 & 2 μη ανεπτυγμένοι κλώνοι) αποτυπώθηκαν πιστά σε τρυβλία με κατάλληλα θρεπτικά υλικά. Γραμμή 3 : Θετικός μάρτυρας.

Γ.1.8. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ «ΛΕΙΩΝ» ΜΕ ΤΗΝ SRPK1.

Τα πλασμίδια-λείες που πληρούσαν τις προϋποθέσεις I, II και III (σελ.135-139) εξετάστηκαν και ως προς μία επιπλέον ιδιότητα: κατά πόσον είναι ικανά να ενεργοποιήσουν τα γονίδια αναφοράς παρουσία πλασμιδίου-δολώματος το οποίο περιέχει την αλληλουχία του cDNA της SRPK1, του τμήματος εκείνου δηλαδή που είναι κοινό μεταξύ SRPK1 και SRPK1a. Θα καθοριζόταν έτσι το μέγεθος της εξειδίκευσης των αλληλεπιδράσεων των προϊόντων των πλασμιδίων-λειών με το N-τελικό (ειδικό για την SRPK1a) τμήμα της SRPK1a. Ως πλασμίδιο-δόλωμα χρησιμοποιήθηκε το pGBT9-SRPK1 που δημιουργήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας του Χημικού Τμήματος Α.Π.Θ. από την Ελένη Νικολακάκη (29).

Το στέλεχος ρJ69-4A ήδη μετασχηματισμένο με το πλασμίδιο-δόλωμα pGBT9-SRPK1 μετασχηματίστηκε με τα επιλεγμένα πλασμίδια-λείες (B.6.1.). Οι διπλά μετασχηματισμένες αποικίες (επιβεβαίωση σε μέσον Sc-Trp-Leu) εξετάστηκαν με

την μέθοδο του πιστού αποτυπώματος για ικανότητα αύξησης σε μέσον Sc-Trp-Leu-His-Ade+(3, ή 10, ή 50, ή 100mM) AT.

Στον πίνακα 6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων που περιγράφονται στις παραγράφους Γ.1.7. και Γ.1.8. (δεν παρουσιάζονται οι κλώνοι για τους οποίους δεν επανεμφανίστηκε ο αρχικός φαινότυπος). Από τους 67 κλώνους συνολικά μόνο οι 17 κλώνοι παρουσίασαν θετικό φαινότυπο με πολύ χαμηλότερη αντοχή στο AT από ότι με την SRPK1a. Γεγονός που φανερώνει ότι οι αλληλεπιδράσεις είναι ειδικές για το αμινοτελικό άκρο της SRPK1a.

Γ.2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΧΘΕΝΤΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ-ΛΕΙΩΝ.

Από τους 86 κλώνους που διερευνήθηκαν για την αξιοπιστία τους με τις παραπάνω μεθόδους (Γ.1.7.) 67 κατέληξαν να πληρούν τα κριτήρια τα οποία ετέθησαν ώστε να θεωρηθεί ισχυρή η πιθανότητα να κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με το N-τελικό άκρο της SRPK1a (Πίνακας 6). Οι κλώνοι αυτοί (πλασμίδια-λείες) αναλύθηκαν περαιτέρω ως εξής:

1. Εύρεση της αλληλουχίας των ενθεμάτων τους .

Η αλληλουχία έστω και μικρής περιοχής του ενθέματος των πλασμιδίων-λειών και η περαιτέρω ανάλυσή της με τη βοήθεια προγραμμάτων βιοπληροφορικής στον υπολογιστή θα παρείχε αρκετές πληροφορίες ώστε είτε να αποκαλυφθεί η ακριβής ταυτότητα του κλωνοποιημένου cDNA εάν αυτό αντιστοιχεί σε πρωτεΐνη ήδη γνωστή από άλλες μελέτες, είτε να γίνει προφανές ότι αυτό δεν αντιστοιχεί σε ήδη μελετημένη πρωτεΐνη και να συλλεχθούν περισσότερες πληροφορίες που να αξιολογούν την παραγόμενη πρωτεΐνη ως πιθανό μοριακό παρτενέρ της SRPK1a.

2. Υποκλωνοποίηση των ενθεμάτων σε πλασμίδια κατάλληλα για την παραγωγή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε *E.coli*.

Σκοπός αυτής της διαδικασίας ήταν να παραχθούν οι πρωτεΐνες ενδιαφέροντος σε καθαρή μορφή και να ελεγχθεί εάν όντως αλληλεπιδρούν *in vitro* με το N-τελικό άκρο της SRPK1a. Η μέθοδος των δύο υβριδίων είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στο να υποδεικνύει πιθανές αλληλεπιδράσεις, χρησιμοποιεί όμως τις πρωτεΐνες παρτενέρ: α) σε μορφή χμαιοτική με ετερόλογα τμήματα (GAL4-DNA περιοχή πρόσδεσης του DNA του GAL4, περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής του VP16), β) μέσα σε

ετερόλογο κύτταρο (στη συγκεκριμένη περίπτωση) όπου πρωτεΐνες που υπάρχουν επιπλέον ή λείπουν από το αντίστοιχο ομόλογο κυτταρικό περιβάλλον είναι δυνατόν να παίζουν σημαντικό ρόλο. Είναι δυνατό δηλαδή μια αλληλεπίδραση που προκύπτει από το σύστημα των δύο υβριδίων και επιβεβαιώνεται στον S.c. να μην αντιστοιχεί σε αλληλεπίδραση η οποία συμβαίνει φυσιολογικά.

Κρίθηκε έτσι απαραίτητο, οι μοριακές αλληλεπιδράσεις που προέκυψαν από το σύστημα των δύο υβριδίων να επιβεβαιωθούν και με άλλες μεθόδους. Η μέθοδος που επιλέχθηκε είναι εκείνη που αποδεικνύει άμεσα, με χρωματογραφία αγγιστείας, την ικανότητα συμπλοκοποίησης δύο μορίων *in vitro*. Σε αυτήν το ένα μέλος του ζεύγους παράγεται σε μορφή η οποία να μπορεί να προσκολληθεί σε σφαιρίδια [στην περίπτωσή μας σε σύντηξη με το ένζυμο GST (Glutathione S Transferase) το οποίο μπορεί να προσκολληθεί σε σφαιρίδια γλουταθειόνης (GSH)] και το άλλο μέλος σε μορφή εύκολα ανιχνεύσιμη (π.χ. το μόριο είναι ραδιενεργό ή ανιχνεύσιμο με ειδικό αντίσωμα).

3. Επιλογή συγκεκριμένων κλώνων των οποίων τα χαρακτηριστικά πείθουν για τη συνάφειά τους με την SRPK1a, προς περαιτέρω μελέτη.

Η μελέτη αυτή θα αφορούσε την επιβεβαίωση της ύπαρξης συμπλόκου της συγκεκριμένης πρωτεΐνης με την SRPK1a σε κύτταρα θηλαστικών και έγινε στο εργαστήριο Βιοχημείας του Χημικού τμήματος του Α.Π.Θ.

Πίνακας 6 : Ανθεκτικότητα στο ΑΤ των στελεχών pJ69-4A διπλά μετασηματισμένων με τα αναγραφόμενα πλασμίδια-δολώματα σε συνδυασμό με κάθε ένα από πλασμίδια-λείες

Αρ.	Πλασμίδια-λείες	Πλασμίδιο-δόλωμα		
		pGBT9	pGBT9-SRPK1aNt	pGBT9-SRPK1
1	2A ₁	-	100	5
2	3A ₁	-	100	-
3	1B ₁	-	100	5
4	4A ₂	-	100	-
5	4B ₂	-	100	5
6	4Γ ₂	-	100	5
7	4Δ ₂	-	100	5
8	5A ₂	-	100	-
9	5B ₂	-	100	5
10	5Γ ₂	-	100	-
11	5Δ ₂	-	100	5
12	37I ₆	-	100	-
13	8Δ ₃	-	100	5
14	6B ₂	-	100	-
15	8A ₃	-	100	-
16	8B ₃	-	100	-
17	39A ₆	-	100	-
18	39Δ ₆	-	100	-
19	6A ₂	-	50	-
20	7Γ ₂	-	50	10
21	8E ₃	-	50	-
22	9A ₃	-	50	10
23	9Γ ₃	-	50	10
24	10A ₃	-	50	10
25	10B ₃	-	50	10
26	12E ₄	-	50	-
27	13A ₄	-	50	10
28	13B ₄	-	50	-

Αρ.	Πλασμιδία-λειτουργίες	Πλασμιδίο-δόλωμα		
		pGBT9	pGBT9-SRPK1aNt	pGBT9-SRPK1
29	15A ₄	-	50	10
30	16B ₄	-	50	10
31	19Z ₄	-	50	-
32	43A ₇	-	50	-
33	32A _{5β}	-	50	-
34	34E ₆	-	50	10
35	30A _{5β}	-	50	-
36	21Γ ₅	-	50	-
37	37Θ ₆	-	50	-
38	14Γ ₄	-	10	-
39	28Δ _{5β}	-	10	-
40	31A _{5β}	-	10	-
41	35E ₆	-	10	-
42	36Γ ₆	-	10	-
43	36E ₆	-	10	-
44	37H ₆	-	10	-
45	38Γ ₆	-	10	-
46	39A ₆	-	10	-
47	39Δ ₆	-	10	-
48	39Z ₆	-	10	-
49	42A ₇	-	10	-
50	43B ₇	-	10	-
51	48A ₈	-	10	-
52	48B ₈	-	10	-
53	21A _{5β}	-	3	-
54	21H ₅	-	3	-
55	13Θ ₄	-	3	-
56	49Z ₈	-	3	-
57	50A ₈	-	3	-

Αρ.	Πλασμιδια-λείες	Πλασμιδιο-δόλωμα		
		pGBT9	pGBT9-SRPK 1aNt	pGBT9-SRPK I
58	50Γ ₈	-	3	-
59	50E ₈	-	3	-
60	51Γ ₈	-	3	-
61	51H ₈	-	3	-
62	52E ₈	-	3	-
63	52H ₈	-	3	-
64	54A ₉	-	3	-
65	56E ₉	-	3	-
66	59Γ ₉	-	3	-
67	61E ₉	-	3	-

Γ.2.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ DNA ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΩΝ ΕΝΘΕΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΧΘΕΝΤΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ-ΛΕΙΩΝ

Το DNA του καθενός από τα πλασμίδια-λείες παρασκευάστηκε με τη μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο Β.5.1. Στη συνέχεια 1-2 μg από το καθένα χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση της αλληλουχίας του ενθέματός του με την μέθοδο Sanger (B.11.). Οι αναγνώσεις των αλληλουχιών έγιναν στο εργαστήριό μας και στο εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Α.Π.Θ.

Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής (sense primer) [5'-GGGTAC CGAGCTCAATTGCGGCCGC-3'] που υβριδίζει στην περιοχή ενεργοποίηση της μεταγραφής (AD) και η σύνθεση του DNA προχωράει στην περιοχή κλωνοποίησης των λειών (θέση NotI) και συνεχίζει αντιγράφοντάς τες.

Αφού βρέθηκαν οι 67 αλληλουχίες, με συγκρίσεις που έγιναν σε βάσεις δεδομένων ανιχνεύθηκαν οι ταυτόσημες τους πρωτεΐνες. Επειδή μερικές από τις αλληλουχίες εμφανίστηκαν περισσότερες φορές από μία (Πίνακας 5) καταλήξαμε σε 26 διαφορετικές. Για πρακτικούς λόγους παρατίθενται παρακάτω μόνο από μία φορά η κάθε αλληλουχία και συγκεκριμένα η μεγαλύτερη σε μήκος. Τα αποτελέσματα αναγράφονται στην αμέσως παρακάτω παράγραφο όπου για κάθε κλώνο παρουσιάζεται: α) η αλληλουχία τμήματος του ενθέματος μαζί με τη μετάφραση του πλαισίου ανάγνωσης που βρίσκεται σε σύντηξη με το πλαίσιο ανάγνωσης του AD του VP16, β) η ταυτότητα των πρωτεϊνών εάν αυτή είναι γνωστή, γ) λίγα εισαγωγικά στοιχεία για τις ιδιότητες της πρωτεΐνης. Επιπλέον παρατίθεται συνοπτικός πίνακας στο τέλος του κεφαλαίου (πίνακας 7). Όλες οι παρακάτω αλληλουχίες που φέρουν το σημάδι *(Άγνωστο) όταν απομονώθηκαν από την μέθοδο των δύο υβριδίων δεν βρέθηκαν ταυτόσημες με καμία από τις μέχρι τότε υπάρχουσες αλληλουχίες που υπήρχαν στις βάσεις δεδομένων και άρα είχαν καταταχθεί στην κατηγορία «άγνωστες». Στο κείμενο δίδονται πληροφορίες από μετέπειτα συγκρίσεις των αλληλουχιών με τις βάσεις δεδομένων. Οι 26 αλληλουχίες που βρέθηκαν ήταν οι παρακάτω:

2A1

```
ACAGATCTGCAAACCTTAAGAGGGAGGAGAAAGGTGAGAGAAAAGACGATGCCAAGAAGA  
CAGATGATGGGAGCACAGAGAAGAGCAAAGACGCAGATGACCAGAAACCTGGGCCTTCAG  
AGCGCTCGCGAACGACCAAGTCAGGAAGCCGTGGCACTGAGCGCACTGTGGTGATGGACA  
AGTCCAAAGGTGTGCCTGTCTCAGTGTGAAAACATCTGGGTCTAAAGAGAGAGCCTCCA
```

AAAGTCAGGACCGGAAGTCAGCCAGCCGGGAGAAGCGGTCTGTTGTGTCTTTGACAAAG
TTAAAGAGTCTCGAAAGTCCAGAGACTCAGAGTCTCGGAGGGAACGGGAGCGCAGTGAGC
GGGAGCAGAGGCTGCAGGCCAGTGGGAGCGGGAGGAGCGAGAGCGGCTGGAGATTGCTC
GTGAGCGCTTGGCATTCCACCGCCATCGGCTAGAGCGTGAACGCATGGAGCGGGAGCGGC
TGGAGCGGGAGCGGATGCATGTAGAACAGGAGCGGGAGGCGTGAGCAAGAGCGCATTACC
GAGAGCGAGAGGAGCTTCGGCGTCAGCAGGAGCTGCGCTATGAACAGGAGCGCCGGCCTG
CTGTGCGCAGGCCCTATGAAGTGGATGGCCGGCGAGATGATGCCTATTGGCCAGAAGCTA
AACGGGCTGCTCTGGATGACCGTTACCACTCAGACTTCAGCCGCCAGGAC

acagatctgcaaaccttaagagggaggagaaaggtgagagaaaagacgatgccaagaagaca
R S A N L K R E E K G E R K D D A K K T
gatgatgggagcacagagaagagcaaagacgcagatgaccagaaacctgggccttcagag
D D G S T E K S K D A D D Q K P G P S E
cgctcggaacgaccaagtcaagagccgtggcactgagcgcactgtggtgatggacaag
R S R T T K S G S R G T E R T V V M D K
tccaaagtgctgctgtcatcagtgtaaaacatctgggtctaaagagagagcctccaaa
S K G V P V I S V K T S G S K E R A S K
agtcaaggaccggaagtcaagccagccgggagagcgggtctgttgtgtcctttgacaaagtt
S Q D R K S A S R E K R S V V S F D K V
aaagagtctcgaaagtcagagactcagagtctcggagggaaacgggagcgcagtgagcgg
K E S R K S R D S E S R R E R E R S E R
gagcagaggctgcaggcccagtgaggagcgggagcagagcggctggagattgctcgt
E Q R L Q A Q W E R E R E R E R L E I A R
gagcgttggcattccaccgcatcggttagagcgtgaacgcatggagcgggagcggctg
E R L A F H R H R L E R E R M E R E R L
gagcgggagcggatgcatgtagaacaggagcggagcgtgagcaagagcgcattcaccga
E R E R M H V E Q E R R R E Q E R I H R
gagcagagaggagcttcggcgtcagcaggagctgcgctatgaacaggagcggcggcctgct
E R E E L R R Q Q E L R Y E Q E R R P A
gtgagcagccctatgaagtgatggcggcgagatgatgcctattggccagaagctaaa
V R R P Y E V D G R R D D A Y W P E A K
cgggctgctctggatgaccggttaccactcagacttcagccggcaggac
R A A L D D R Y H S D F S R Q D

[gi|94402073|ref|XP_001002609.1|](#)  PREDICTED: scaffold attachment factor B
[Mus musculus]
Length=991

Score = 465 bits (1197), Expect = 7e-130
Identities = 236/236 (100%), Positives = 236/236 (100%), Gaps = 0/236 (0%)
Frame = +3

Query	3	RSANLKREEKGERKDDAKKTDDGSTEKSKDADDQKPGPSESRRTTKSGSRGTERTVVMKD	182
		RSANLKREEKGERKDDAKKTDDGSTEKSKDADDQKPGPSESRRTTKSGSRGTERTVVMKD	
Sbjct	585	RSANLKREEKGERKDDAKKTDDGSTEKSKDADDQKPGPSESRRTTKSGSRGTERTVVMKD	644
Query	183	SKGVPVISVKTSGSKERASKSQDRKSASREKRSVVSFDKVKESRKS RDSESR RERERSER	362
		SKGVPVISVKTSGSKERASKSQDRKSASREKRSVVSFDKVKESRKS RDSESR RERERSER	
Sbjct	645	SKGVPVISVKTSGSKERASKSQDRKSASREKRSVVSFDKVKESRKS RDSESR RERERSER	704
Query	363	EQLRQAQWEREERERLEIARERLAFHRHRLERERMERERLERERMHVEQERRREQERIHR	542
		EQLRQAQWEREERERLEIARERLAFHRHRLERERMERERLERERMHVEQERRREQERIHR	
Sbjct	705	EQLRQAQWEREERERLEIARERLAFHRHRLERERMERERLERERMHVEQERRREQERIHR	764
Query	543	EREELRRQQLRYEQERRPAVRRPYEVDGRRDDAYWPEAKRAALDDRYHSDFSRQD	710
		EREELRRQQLRYEQERRPAVRRPYEVDGRRDDAYWPEAKRAALDDRYHSDFSRQD	
Sbjct	765	EREELRRQQLRYEQERRPAVRRPYEVDGRRDDAYWPEAKRAALDDRYHSDFSRQD	820

Η αλληλουχία αυτή βρέθηκε ταυτόσημη με την πρωτεΐνη **SAFB (Scaffold attachment factor B)**. Η πρωτεΐνη SAFB (βλ. Συζήτηση εικόνα 68) περιέχει πολλές λειτουργικές περιοχές : α) μία περιοχή πρόσδεσης στο RNA, περιοχή RRM (RNA recognition motif) (409-484), μία περιοχή SAP (αμινοξέα 31-65) (περιοχή που προσδέεται στο DNA και που θεωρητικά παίρνει μέρος στην οργάνωση της χρωματίνης), μία περιοχή πυρηνικού εντοπισμού (αμινοξέα 519-614) (NLS), μία περιοχή RE (πλούσια σε Arg-Gly) (αμινοξέα 612-831) της οποίας ένα μέρος εμπεριέχεται στην περιοχή αλληλεπίδρασης με την SRPK1α (αμινοξέα 585-720) και μία περιοχή πλούσια σε γλυκίνη στο καρβοξυτελικό άκρο του (αμινοξέα 785-903). Εντοπίζεται στον πυρήνα. Βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη SAFB ανήκει στις πρωτεΐνες της πυρηνικής μήτρας (nuclear matrix proteins–NMPs) και στις περιοχές scaffold/matrix attachments regions (S/MAR) του DNA όπου σχηματίζει μαζί με άλλες SR πρωτεΐνες και την πολυμεράση II του RNA το σύμπλεγμα της μεταγραφής (transcriptosomal complex) που συμμετέχει στην μεταγραφή, στο μάτισμα και στην ωρίμανση του RNA (118, 129). Είναι μονομερής πρωτεΐνη αλλά μπορεί να σχηματίσει και ομοδιμερή. Βρέθηκε επίσης ότι δρα ως ρυθμιστής της πρωτεΐνης heat shock 27 διότι ενώνεται με τον προαγωγέα του γονιδίου της στην περιοχή ERE (estrogen receptor element). Για τον λόγο αυτό ονομάζεται και HET (Hsp27-ERE-TATA-binding protein) (130). Περιγράφεται ένας από τους οκτώ κλώνους που απομονώθηκαν.

4A2

```
CTGTAATTCAGCCTTGCCACTTTATCCAGACCCAGTGAGGCTCATCCGGTATGGAACCAAATGT
CCTGAATGTCACAAGCAGATGCGAGATTATATGGTCTGGCTACACATTTCCAGAGGACAACAGA
GGAAACCGAGGGGCTAACTTGTCAGGTATGCCAGATGCTGCTGCCCAACCA
```

```
ctgtaattccagccttgccactttatccagacccagtgaggctcatccgggatggaaccaa
V I P A L P L Y P D P V R L I R Y G T K
tgtcctgaatgtcacaagcagatgcgagattatggctcctggctacacatttccagaggaca
C P E C H K Q M R D Y M V L A T H F Q R T
acagaggaaaccgaggggctaacttgtcaggtatgccagatgctgctgccaacca
T E E T E G L T C Q V C Q M L L P N
```

```
sp Q8BHZ4 Zinc finger protein 592 (Zfp-592) [Znf592] [Mus 1262
ZN592_MOUSE musculus (Mouse)] AA
align
```

```
Score = 155 bits (351), Expect = 3e-37
Identities = 59/59 (100%), Positives = 59/59 (100%)
```

```
Query: 1 VIPALPLYPDPVRLIRYGTKCPECHKQMRDYMVLATHFQRTTEETGLTCQVCQMLLPN 59
```

VIPALPLYPDPVRLIRYGTKCPECHKQMRDYMVLATHFQRTTEETEGLTQVCQMLLPN

Sbjct: 693 VIPALPLYPDPVRLIRYGTKCPECHKQMRDYMVLATHFQRTTEETEGLTQVCQMLLPN 751

Η αλληλουχία αυτή βρέθηκε ταυτόσημη με την πρωτεΐνη **Zfp-592 (Zinc Finger protein 592)** του ποντικού. Η πρωτεΐνη αυτή περιέχει στο μόριό της 13 δακτύλους Zn τύπου C2H2. Βρέθηκε σε βιβλιοθήκη που προέρχεται από εμβρυακό ιστό ποντικού και πιθανώς εντοπίζεται στον πυρήνα του κυττάρου. Προβλέπεται να είναι μεταγραφικός παράγοντας που προσδένεται στο DNA.

3A1* (Αγνωστο)

ACCCTATGCTCTTCTCGCCGTCTTCACTCCTCGCTGCATCAGTACATCTGCCACCCTCTTTGCAGAAGCC
CAGGTCAGGCACCCCTGTTGTTCCCTGCTACCTCTATCCCTGCTGCAGTACCAGAGGTAGCTTCTGGAG
GA

accctatgctcttctcgccgtcttcactcctcgctgcatcagtacatctgccaccctcttt
P Y A L L A V F T P R C I S T S A T L F
gcagaagccaggtccaggcacccccctggtgctcctgctacctctatccctgctgcagta
A E A Q V Q A P P V V P A T S I P A A V
ccagaggtagcttctggagga
P E V A S G G

tr Q3U3X8 NOD-derived CD11c +ve dendritic cells cDNA, 433
Q3U3X8_MOUSE RIKEN full-length enriched library, AA
clone:F630044K09 product:oxidase assembly 1-align
like, full insert sequence (NOD-derived
CD11c +ve dendritic cells cDNA, RIKEN full-
length enriched library, clone:F630016O06
product:oxidase assembly 1-like, full insert
sequence) [Oxall] [Mus musculus (Mouse)]

Score = 125 bits (291), Expect = 2e-28
Identities = 47/47 (100%), Positives = 47/47 (100%)

Query: 1 PYALLAVFTPRCISTSATLFAEAQVQAPPVVPATSIPAAVPEVASGG 47
PYALLAVFTPRCISTSATLFAEAQVQAPPVVPATSIPAAVPEVASGG
Sbjct: 47 PYALLAVFTPRCISTSATLFAEAQVQAPPVVPATSIPAAVPEVASGG 93

Η αλληλουχία αυτή βρέθηκε ταυτόσημη με την πρωτεΐνη **Oxall (Oxidase assembly 1-like protein)** του ποντικού. Βρίσκεται στο χρωμόσωμα 14, έχει μοριακό βάρος 48,2 kDa και μήκος 433 αμινοξέων. Εντοπίζεται στον εμβρυακό ιστό, στο πάγκρεας και στους πνεύμονες. Αποτελεί δομική πρωτεΐνη των εσωτερικών μεμβρανών και των μιτοχονδρίων. Είναι αναγκαία για την συναρμολόγηση της οξειδάσης του κυτοχρώματος και απαιτείται η παρουσία της για την εισαγωγή δομικών

πρωτεϊνών στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Παίζει ρόλο στην μεταφορά πρωτεϊνών και στη μετάδοση σήματος.

5A2* (Αγνωστο)

ATACCCTAAACACACTGGTACGGGAGAGGAAAATCTATCCGACTCCGGATGGCTATTTTCATTGTGACCCC
ACAGACTTATTTTCATT

ataccctaaacacactgggtacgggagaggaaaatctatccgactccggatggctattttcatt
T L N T L V R E R K I Y P T P D G Y F I
gtgacccacagacttatttcatt
V T P Q T Y F I

tr Q8CDI1 Adult male testis cDNA, RIKEN full-length 801
Q8CDI1_MOUSE enriched library, clone:4932415L14 AA
product:hypothetical protein, full insert align
sequence, **Storkhead box 2 [Stox2] [Mus musculus
(Mouse)]**

Score = 96.5 bits (220), Expect = 9e-20
Identities = 28/28 (100%), Positives = 28/28 (100%)

Query: 1 TLNLTVRERKIYPTPDGYFIVTPQTYFI 28
TLNLTVRERKIYPTPDGYFIVTPQTYFI
Sbjct: 57 TLNLTVRERKIYPTPDGYFIVTPQTYFI 84

Η αλληλουχία αυτή βρέθηκε ταυτόσημη με την πρωτεΐνη **Stox2 (Storkhead box 2)** που βρέθηκε σε βιβλιοθήκη όρχεων ενηλίκου ποντικού. Έχει μοριακό βάρος 89 kDa και μήκος 801 αμινοξέα. Δεν περιέχει γνωστά δομικά μοτίβα και η λειτουργία της δεν είναι γνωστή.

5Γ2* (Αγνωστο)

ACACGGTGGAGAACCTCTCCATTCAACTAAGGCTGATGACCCGTGAGAGGAATGAGCTACGCAAGCGCCT
GGCCTTCGCCACCCATGGAGCCACCTTTGACAAAAGGCCCTACCACAGGCTGAATCCTGATTATGAGAGG
CTAAAGATCCAGTGTGTGCGGGCCATGTCGGACCTGCAGAGCTTACAGAACCAGCACACCAA

acacggtggagaacctctccattcaactaaggctgatgaccggtgagaggaatgagctacgc
T V E N L S I Q L R L M T R E R N E L R
aagcgcctggccttcgccacccatggagccacctttgacaaaaggccctaccacaggctg
K R L A F A T H G A T F D K R P Y H R L
aatcctgattatgagaggctaaagatccagtgtgtgcgggccatgtcggacctgcagagc
N P D Y E R L K I Q C V R A M S D L Q S
ttacagaaccagcacaccaa
L Q N Q H T

tr Q3UH41 CDNA, RIKEN full-length enriched library, 1898
Q3UH41_MOUSE clone:M5C1086C06 product:discs, large homolog 5 AA
(Drosophila), full insert sequence [Dlg5] [Mus align
musculus (Mouse)]

Score = 164 bits (372), Expect = 5e-40
Identities = 66/66 (100%), Positives = 66/66 (100%)

Query: 1 TVENLSIQLRLMTRERNELRKRLAFATHGATFDKRPYHRLNPDYERLKIQCVRAMSDLQS 60
TVENLSIQLRLMTRERNELRKRLAFATHGATFDKRPYHRLNPDYERLKIQCVRAMSDLQS
Sbjct: 122 TVENLSIQLRLMTRERNELRKRLAFATHGATFDKRPYHRLNPDYERLKIQCVRAMSDLQS 181
Query: 61 LQNQHT 66
LQNQHT
Sbjct: 182 LQNQHT 187

Η αλληλουχία αυτή βρέθηκε ταυτόσημη με την πρωτεΐνη **Dlg5 (Discs large homolog 5)** του ποντικού. Ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών MAGUKs (membrane associated guanylate kinases). Περιέχει την περιοχή guanylate kinase-like domain, 4 περιοχές PDZ (DHR ή GLGF= Gly-leu-Gly-Phe), μία SH3 περιοχή, μία περιοχή CARD (caspase recruitment domain), μία περιοχή άγνωστης λειτουργίας την Duf 622 (αμινοξέα 104-193) η οποία εμπεριέχεται στην περιοχή αλληλεπίδρασης με το «δόλωμα» (αμινοξέα 122-290) και ένα μοτίβο RCC1-2 (αμινοξέα 1496-1506) (Regulator of chromosome condensation (RCC1) signature 2). Η περιοχή PDZ βρίσκεται κυρίως σε πρωτεΐνες που συνδέονται με την κυτταρική μεμβράνη όπου υπάρχει η 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλ-ινοσιτόλη (PIP2) ενώ η SH3 περιοχή αναγνωρίζει περιοχές πλούσιες σε προλίνη. Εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη και στο κυτταρόπλασμα. Η λειτουργία της δεν είναι γνωστή αλλά υπάρχουν στοιχεία για την αντίστοιχη πρωτεΐνη στον άνθρωπο. Η ανθρώπινη Dlg5 βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά με την μεμβρανική πρωτεΐνη p55 και σχηματίζει σύμπλοκο το οποίο παίζει ρόλο στην διατήρηση της δομής των επιθηλιακών κυττάρων και στην μεταβίβαση των εξωκυττάρων μηνυμάτων στην μεμβράνη και στον κυτταροσκελετό και πιθανόν ρυθμίζει αρνητικά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (131). Επίσης εμπλέκεται και στην πρόσφυση των κυττάρων (cell-cell adhesion).

13A4* (Άγνωστο)

TGACATCACCCCGGAAGAGCAGCAGCTCCTGGCCAGCACCTCCAAGCCTGTGGTGAAGCTTCTACACAA
CCG CAGTAACAACAAGTACTCTTACACCAG


```

tgacatcaccggaagagcagcagctcctggccagcacctccaagcctgtggtgaagctt
  T S P R E E Q Q L L A S T S K P V V K L
ctacacaaccgagtaacaacaagtactcttacaccag
  L H N R S N N K Y S Y T

```

```

sp Q8BGV7      Potassium channel tetramerisation domain-containing 329
  KCD13_MOUSE protein 13 (Polymerase delta-interacting protein 1) AA
                [Kctd13] [Mus musculus (Mouse)]                align

```

Score = 103 bits (237), Expect = 6e-22
 Identities = 32/32 (100%), Positives = 32/32 (100%)

```

Query: 2      TSPREEQQLLASTSKPVVKLLHNRSNKYSYT 33
             TSPREEQQLLASTSKPVVKLLHNRSNKYSYT
Sbjct: 154    TSPREEQQLLASTSKPVVKLLHNRSNKYSYT 185

```

Η παραπάνω αλληλουχία βρέθηκε ταυτόσημη της πρωτεΐνης **Kctd13 (Potassium channel tetramerisation domain-containing protein 13)**. Περιέχει μία περιοχή BTB (αμινοξέα 41-109). Η αντίστοιχη ανθρώπινη πρωτεΐνη PDIP 1 έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με την πολυμεράση δ (polymerase delta-interacting protein). Εντοπίζεται στον πυρήνα παίρνει μέρος στην μεταφορά των ιόντων K⁺ και επάγεται από τον παράγοντα νέκρωσης όγκων (tumor necrosis factor alpha, TNF-alpha) (132).

9A3

```

CGCATGCAGCACCTGATTGCCCGAGAGGCAGAGGCTGCCATCTACCACTTGCAGCTATTCGAGGAACTCC
GCCGCCTGGCGCC

```

```

cgcacatgcagcacctgattgcccgagagggcagagggctgccatctaccacttgcagctattc
  R M Q H L I A R E A E A A I Y H L Q L F
gaggaactccgcccctggcgcc
  E E L R R L A

```

```

sp P52480      Pyruvate kinase isozyme M2 (EC 2.7.1.40) [Pkm2] 530
  KPYM_MOUSE [Mus musculus (Mouse)]                AA
                                                        align

```

Score = 91.8 bits (209), Expect = 2e-18
 Identities = 27/27 (100%), Positives = 27/27 (100%)

```

Query: 1      RMQHLIAREAEAAIYHLQLFEELRRLA 27
             RMQHLIAREAEAAIYHLQLFEELRRLA
Sbjct: 375    RMQHLIAREAEAAIYHLQLFEELRRLA 401

```

Η παραπάνω αλληλουχία που ανιχνεύθηκε βρέθηκε ταυτόσημη της **Pkm2 ή Pk3 κινάσης του πυροσταφυλικού**. Στα θηλαστικά κύτταρα έχουν βρεθεί 4 διαφορετικά

ισοένζυμα της κινάσης του πυροσταφυλικού. Οι L, R, M1, και η M2. Η L μορφή απαντάται κυρίως στο συκώτι, η R στα ερυθροκύτταρα, η M1 στους μυς, καρδιά και εγκέφαλο ενώ η M2 στους εμβρυακούς ιστούς. Η M2PK και η M1PK εκφράζονται διαφορετικά κατά την ανάπτυξη των όρχεων. Η έκφραση της M2PK μειώνεται κατά την σπερματογένεση ενώ της M1PK αυξάνει στην ωρίμανση των όρχεων και παρουσία των σπερματιδίων (133). Σαν κινάση του πυροσταφυλικού παίρνει μέρος στο τελικό βήμα της γλυκόλυσης τόσο των προκαρυωτικών όσο και των ευκαρυωτικών κυττάρων και βρίσκεται υπό μορφή τετραμερούς όταν είναι ενεργή ενώ αντίθετα είναι ανενεργή ως μονομερές.

12E4

ACTCCAGTGGGAACCTTCTGGGACGGGACAGCTTTGAGGTTTCGTGTTTGTGCCTGCCCTGGGAGAGACCCG
CCGTACAGAAGAAGAAAATTTCCGCAAAAAGGAAGTCCTTT

actccagtgggaaccttctgggacgggacagctttgaggttcgtgtttgtgcctgccctggg
S S G N L L G R D S F E V R V C A C P G
agagaccgccgtacagaagaagaaaatTTCCGCAAAAAGGAAGTCCTTT
R D R R T E E E N F R K K E V L

sp P02340 Cellular tumor antigen p53 (Tumor suppressor p53) 390
P53_MOUSE [Tp53] [Mus musculus (Mouse)] AA
align

Score = 102 bits (235), Expect = 2e-21
Identities = 36/36 (100%), Positives = 36/36 (100%)

Query: 1 SSGNLLGRDSFEVRVCACPGRDRRTEEEENFRKKEVL 36
SSGNLLGRDSFEVRVCACPGRDRRTEEEENFRKKEVL
Sbjct: 257 SSGNLLGRDSFEVRVCACPGRDRRTEEEENFRKKEVL 292

Η παραπάνω αλληλουχία βρέθηκε ταυτόσημη της πρωτεΐνης **p53 (Tumor suppressor p53)**. Περιέχει μία N-τελική περιοχή ενεργοποίησης (transactivation), μία περιοχή πλούσια σε προλίνη, μία περιοχή πρόσδεσης στο DNA (αμινοξέα 95-289), μία περιοχή τετραμερισμού (tetramerisation) (αμινοξέα 325-356) και μία C-τελική ρυθμιστική περιοχή. Η περιοχή αλληλεπίδρασης με το «δόλωμα» (αμινοξέα 257-400) ανήκει κατά ένα μέρος στην περιοχή πρόσδεσης στο DNA που περιέχει η πρωτεΐνη p53 και εμπεριέχει και την περιοχή τεταμερισμού η οποία ευθύνεται για πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Εντοπίζεται στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα. Η πρωτεΐνη είναι μεταγραφικός παράγοντας και δρα ως

καταστολέας δημιουργίας όγκων σε πολλούς τύπους όγκων. Διεγείρει την καταστολή της ανάπτυξης των κυττάρων και την απόπτωση. Εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, επίσης καταστέλλει την διαίρεση του κυττάρου δρώντας ως αναστολέας της έκφρασης γονιδίων που είναι υπεύθυνα για αυτήν την διαδικασία. Η πρωτεΐνη p53 βρίσκεται μεταλλαγμένη ή αδρανοποιημένη στο 50% των καρκινικών όγκων.

43A7

AAATCCATCTCCCACCAAACGTACAGCAGCTGGTCCTGGAGAAGGAGCAAGCCCTGGCTGACCTG

aaatccatctcccaccaaactgtacagcagctggtcctggagaaggagcaagccctggctgacctg
K S I S H Q T V Q Q L V L E K E Q A L A D L

tr Q99KQ6 Tacc2 protein [Tacc2] [Mus musculus (Mouse)] 598 AA
Q99KQ6_MOUSE align

Score = 71.0 bits (160), Expect = 4e-12
Identities = 22/22 (100%), Positives = 22/22 (100%)

Query: 1 KSISHQTVQQLVLEKEQALADL 22
KSISHQTVQQLVLEKEQALADL
Sbjct: 454 KSISHQTVQQLVLEKEQALADL 475

Η παραπάνω αλληλουχία βρέθηκε ταυτόσημη της πρωτεΐνης **Tacc2 (Transforming acidic coiled-coil-containing protein 2)**. Η πρωτεΐνη Tacc2 περιέχει μία αλυσίδα που χαρακτηρίζεται ως coiled coil containing protein 2 (αμινοξέα 1-1035), την περιοχή SPAZ (Ser/Pro-rich AZU-1) (394-482 αμινοξέα) μέρος της οποίας εμπεριέχεται στην περιοχή αλληλεπίδρασης (454-640 αμινοξέα) με το «δόλωμα», δύο δυνητικές περιοχές coiled coil (σπειροειδούς ελάσματος) (763-791 και 834-1034), μία περιοχή πλούσια σε προλίνες (αμινοξέα 43-51) και μία περιοχή πλούσια σε λυσίνες (αμινοξέα 496-499). Στην περιοχή SPAZ βρέθηκαν δύο σερίνες ως θέσεις αναγνώρισης κινασών και κατά συνέπεια θέσεις ρύθμισης μέσω φωσφορυλίωσης (135). Η περιοχή coiled coil που βρίσκεται στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης έχει μεγάλη ομοιότητα με το ανθρώπινο γονίδιο SB1.8 (DXS423E), ομόλογο με την πρωτεΐνη SMC1 του *S. cerevisiae* η οποία ανήκει στην οικογένεια των cohesins και ρυθμίζει τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά την διαδικασία της μίτωσης. Μεταλλάξεις στην περιοχή αυτή επιφέρουν μη διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων και συντελούν σε γονιδιακή αστάθεια και ίσως και σε ανάπτυξη όγκων (134). Η Tacc2 βρίσκεται στα κεντροσώματα,

αλληλεπιδρά με τους μικροσωληνίσκους και είναι απαραίτητη για την μίτωση διότι συνδέεται με τον σχηματισμό της ατράκτου (135). Έχει απομονωθεί και ως ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη (AZU-1) (134).

6A2

```
GGGACAATGAGCGATTGCAGAGAGAGCTGGAGAGCACTTCAGAGAAGGCTGGCCGCATAGAAAAGCTG  
GAAAATGAAA
```

```
gggacaatgagcgattgcagagagagctggagagcacttcagagaaggctggccgcatagaa  
  D N E R L Q R E L E S T S E K A G R I E  
aagctggaaaatgaaa  
  K L E N E
```

```
sp Q8K371      Angiomotin-like protein 2 [Amotl2] [Mus 772  
  AMOL2_MOUSE musculus (Mouse)] AA  
                                align
```

```
Score = 82.1 bits (186), Expect = 2e-15  
Identities = 25/25 (100%), Positives = 25/25 (100%)
```

```
Query: 1   DNERLQRELESTSEKAGRIEKLENE 25  
          DNERLQRELESTSEKAGRIEKLENE  
Sbjct: 323 DNERLQRELESTSEKAGRIEKLENE 347
```

Η παραπάνω αλληλουχία βρέθηκε ταυτόσημη με την πρωτεΐνη, **Amotl2** (**Angiomotin-like protein 2**). Όλες οι αλληλουχίες των γονιδίων όταν μεταφραστούν περιέχουν συντηρημένες δομές coiled coil (σπειροειδούς ελάσματος), περιοχές PDZ και πλούσιες σε προλίνη περιοχές. Η αμινοτελική περιοχή της που περιλαμβάνει σπειροειδή ελάσματα μαζί με την περιοχή πλούσια σε προλίνη προτείνεται ότι σχηματίζει σύμπλοκα πρωτεϊνών (85, 111, 179). Εντοπίζεται στα ελασματοπόδια στην άκρη των μεταναστευόντων ενδοθηλιακών κυττάρων. Η πρωτεΐνη Angiomotin ταυτοποιήθηκε με την μέθοδο των δύο υβριδίων ότι αλληλεπιδρά με την αγγειοστατίνη (αναστολέας της αγγειογέννεσης). Εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών, στα αγγεία του πλακούντα και σε όγκους όπου και συμβαίνει αγγειογέννεση. Η Angiomotin διεγείρει την αγγειογέννεση με το να αυξάνει την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και η αλληλεπίδραση της με την αγγειοστατίνη αναχαιτίζει αυτήν την λειτουργία της (179).

7G2

AGGATGTACAGTTACCCAGCGCGGGTTCCTCCTCCTCCTCCTATTGCTCGAGCTGTGGTGCCTTCCAAAC
GTCAGCGTGTTCAGGGAACACCTCACGAAGGGGCAAAAAGTGGATTCAATTCGAAGAGTGGACAAAGGGG
ATCTTCTTCCAAGTCTGGAAAATTGAAAGGTGATGACCTTCAGGCCATTAAAA

aggatgtacagttacccagcgcggggttcctcctcctcctcctcctattgctcgagctgtggtg
R M Y S Y P A R V P P P P P I A R A V V
ccttccaaacgtcagcgtgtttcagggaaacacctcacgaaggggcaaaaagtggattcaat
P S K R Q R V S G N T S R R G K S G F N
tcgaagagtggacaaaggggatccttcttccaagtctggaaaattgaaaggtgatgacctt
S K S G Q R G S S S K S G K L K G D D L
caggccattaaaa
Q A I K

sp Q9Z204 **Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2** 313 AA
HNRPC_MOUSE (hnRNPC1/hnRNPC2) [Hnrpc] [Mus musculus (Mouse)] align

Score = 160 bits (363), Expect = 8e-39
Identities = 64/64 (100%), Positives = 64/64 (100%)

Query: 1 RMYSYPARVPPPPPIARAVVPSKRQRVSGNTSRRGKSGFNKSGQRGSSSKSGKLGDDL 60
RMYSYPAEVPPPEPPIARAVVPSKRQRVSGNTSRRGKSGFNKSGQRCSSSKSGKLGDDL
Sbjct: 135 RMYSYPARVPPPPPIARAVVPSKRQRVSGNTSRRGKSGFNKSGQRGSSSKSGKLGDDL 194
Query: 61 QAIK 64
QAIK
Sbjct: 195 QAIK 198

Η παραπάνω αλληλουχία βρέθηκε ταυτόσημη με την πρωτεΐνη **hnRNP-C1/C2 (Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2)**. Οι πρωτεΐνες hnRNP C1 και C2 αποτελούν προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος του ίδιου γονιδίου και ανήκουν στην μεγάλη οικογένεια των ετερογενών πυρηνικών ριβονουκλεοπρωτεϊνών (RNA binding proteins). Περιέχουν μία περιοχή που είναι γνωστή ως RNP-1 ή RNA recognition motif (RRM)(αμινοξέα 16-87). Φωσφορυλιώνονται από την κινάση της καζεΐνης II (CKII). Η φωσφορυλίωση της καρβοξυτελικής περιοχής ρυθμίζει την πρόσδεση της hnRNP-C1/C2 στο mRNA (136). Λαμβάνουν μέρος στην βιογένεση του mRNA και στην ωρίμανσή του. Έχει προταθεί ότι εμπλέκονται στην διαμόρφωση της χρωματίνης (137) αλλά και στην διαμόρφωση των τελομερών (138).

8E3

AGGGGGCCACCGATGGTGTGTCTGCTGTGTGCTAGCAAAGGCCTCCATGAGCTGGTTTTTTGCCAAGTCT
GCTGCGAT

gggggccaccgatggtgtgtctgctgtgtgctagcaaaggcctccatgagctggTTTTTTGCCAAGTCT

G P P M V C L L C A S K G L H E L V F C
caagtctgctgcat
Q V C C D

tr Q5NU09 Q5NU09_MOUSE Mixed lineage leukemia 2 [2610014H22Rik] align
[Mus musculus (Mouse)] 2713
AA

Score = 87.6 bits (199), Expect = 4e-17
Identities = 25/25 (100%), Positives = 25/25 (100%)

Query: 2 GPPMVCLLCASKGLHELVEFCVCCD 26
GPPMVCLLCASKGLHELVEFCVCCD
Sbjct: 1205 GPPMVCLLCASKGLHELVEFCVCCD 1229

Η παραπάνω αλληλουχία βρέθηκε ταυτόσημη της πρωτεΐνης **Mll2 (Mixed lineage leukemia 2)** η οποία είναι συνώνυμη της WW domain binding protein 7 και η οποία περιέχει τέσσερις δακτυλίους ψευδαργύρου και εντοπίζεται στον πυρήνα. Η περιοχή αλληλεπίδρασης (αμινοξέα 1205-1360) εμπεριέχει τον ένα δακτύλιο ψευδαργύρου τύπου ZF.PHD.2 (αμινοξέα 1255-1309). Αλληλεπιδρά με περιοχές WW και προτείνεται να είναι μεταγραφικός παράγοντας που προσδένεται στο DNA.

14Γ4

TATGTTGATCATTTCACAAGAACCACAACATGGCAGAGGCCAACCTTGGAAATCTGTCCGGAACATAT
GAACAGTGGCAGCTACAGCGTAGTCAGCTTCAGGGAGCAATGCAGCAGTTTAACCAGAGATTC

tatgttgatcatttcacaagaaccacaacatggcagagggccaaccttggaaatctgtc
Y V D H F T R T T T W Q R P T L E S V
cggaaactatgaacagtggcagctacagcgtagtcagcttcagggagcaatgcagcagttt
R N Y E Q W Q L Q R S Q L Q G A M Q Q F
aaccagagattc
N Q R F

sp Q8C863 Itchy E3 ubiquitin protein ligase (EC 864
ITCH_MOUSE 6.3.2.-) [Itch] [Mus musculus (Mouse)] AA
align

Score = 132 bits (307), Expect = 2e-30
Identities = 43/43 (100%), Positives = 43/43 (100%)

Query: 2 YVDHFTRTTTWQRPTLESVRNIEQWQLQRSQLQGAMQQFNQRF 44
YVDHFTRTTTWQRPTLESVRNIEQWQLQRSQLQGAMQQFNQRF
Sbjct: 337 YVDHFTRTTTWQRPTLESVRNIEQWQLQRSQLQGAMQQFNQRF 379

Η παραπάνω αλληλουχία βρέθηκε ταυτόσημη της πρωτεΐνης **Itchy E3 (ubiquitin**

protein ligase E3). Περιέχει μία περιοχή C2 (5-95 αμινοξέα), μία περιοχή HECT (E6AP-type E3 ubiquitin-protein ligase) και τέσσερις WW περιοχές (293-318, 325-350, 405-430, 445-470) εκ των οποίων σχεδόν οι τρεις εμπεριέχονται στην περιοχή αλληλεπίδρασης με το «δόλωμα» (αμινοξέα 337-520). Εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα. Η E3 παραλαμβάνει την ubiquitin από την E2 ubiquitin-conjugating enzyme και την μεταφέρει στα υποστρώματα στόχους της. Αλληλεπιδρά με τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες Occludin (139) και Notch (140) διαμέσου των περιοχών WW. Ρυθμίζει τη μεταγραφική ικανότητα διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων και κυρίως παίζει ρόλο στην ανοσοαπόκριση.

28Δ5

```
GAAGGCTTTTCATGAACGCGAAGGCCGCCCGTATTGCCGCCGCGATTTTCTGCAGCTGTTT
GCGCCGCGCTGCCAGGGCTGCCAGGGGCCGATTCTGGATAACTATATTAGCGCGCTGAGC
```

```
gaaggctttcatgaacgcgaaggccgcccgctattgccgccgcgatTTTTctgcagctgttt
E G F H E R E G R P Y C R R D F L Q L F
gcgcccgcgctgccagggctgccagggcccgattctggataactatattagcgcgctgagc
A P R C Q G C Q G P I L D N Y I S A L S
```

```
Q62219      Hic-5 (Tgfbli1 protein) (Activated spleen cDNA, RIKEN 444
Q62219_MOUSE full-length enriched library, clone:F830021F18 AA
product:transforming growth factor beta 1 induced align
transcript 1, full insert sequence) (Paxillin-like
protein) (Transforming growth factor beta 1 induced
transcript 1) [Tgfbli1] [Mus musculus (Mouse)]
```

Score = 119 bits (277), Expect = 1e-26
Identities = 40/40 (100%), Positives = 40/40 (100%)

```
Query: 1   EGFHEREGRPYCRRDFLQLFAPRCQGCQGPILDNYISALS 40
          EGFHEREGRPYCRRDFLQLFAPRCQGCQGPILDNYISALS
Sbjct: 306 EGFHEREGRPYCRRDFLQLFAPRCQGCQGPILDNYISALS 345
```

Η παραπάνω αλληλουχία βρέθηκε ταυτόσημη της πρωτεΐνης **Hic-5** ή **Tgfbli1** (**Transforming growth factor beta 1**) ή **Paxillin-like protein**. Η πρωτεΐνη Hic-5 περιέχει στο αμινοτελικό άκρο της μοτίβα LD και στο καρβοξυτελικό άκρο της τέσσερις περιοχές LIM (αμινοξέα 211-265, 268-324, 327-383, 388-442) εκ των οποίων οι δύο περιέχονται μέσα στην περιοχή της αλληλεπίδρασης με την SRPK1a (αμινοξέα 306-550). Ανήκει μαζί με την Paxillin στην καινούργια οικογένεια των πρωτεϊνών LIM (141). Εντοπίζεται στις περιοχές προσκόλλησης των κυττάρων (142)

όπου ενώνεται με την κινάση Cell adhesion kinase beta (CAKbeta/PYK2) αλλά βρέθηκε και στον πυρήνα σε συνθήκες οξειδωτικού στρες όπου εμπλέκεται στην ρύθμιση της μεταγραφής (141). Η ομόλογή της πρωτεΐνη στον άνθρωπο έχει περιγραφεί σαν συνεργαζόμενος παράγοντας του υποδοχέα των ανδρογόνων [coactivator of Androgen receptor (ARA55)] ο οποίος αλληλεπιδρά μαζί του και επάγει την μεταγραφική του δραστηριότητα. Η αλληλεπίδραση οφείλεται στη καρβόξυτελική περιοχή του που περιέχει τέσσερις LIM περιοχές όπως και η Paxillin (143).

36E6

```
AGCCAGGATTGCCATAACCTGCCGGGCAGCTATCAGTGCACCTGCCCGGATGGCTATCGC
AAAATTGGCCCGGAATGCGTGGATATTGATGAATGCCGCTATCGCTATTGCCAGCATCGC
TGCGTGAACCTGCCGGGCAGCTTTCGCTGCCAGTGC
```

```
agccaggattgccataacctgccgggcagctatcagtgcacctgcccgatggctatcgc
S Q D C H N L P G S Y Q C T C P D G Y R
aaaattggcccggaatgcggtggatattgatgaatgccgctatcgctattgccagcatcgc
K I G P E C V D I D E C R Y R Y C Q H R
tgcgtgaacctgccgggcagctttcgctgccagtgc
C V N L P G S F R C Q C
```

```
sp Q9WVJ9 EGF-containing fibulin-like extracellular 443
FBLN4_MOUSE matrix protein 2 precursor (Fibulin-4) (FIBL- AA
4) (Mutant p53-binding protein 1) [Efemp2] align
[Mus musculus (Mouse)]
```

```
Score = 150 bits (340), Expect = 7e-36
Identities = 52/52 (100%), Positives = 52/52 (100%)
```

```
Query: 1 SQDCHNLPGSYQCTCPDGYRKIGPECVDIDECRYRYCQHRCVNLPGSFRCQC 52
SQDCHNLPGSYQCTCPDGYRKIGPECVDIDECRYRYCQHRCVNLPGSFRCQC
Sbjct: 137 SQDCHNLPGSYQCTCPDGYRKIGPECVDIDECRYRYCQHRCVNLPGSFRCQC 188
```

Η παραπάνω αλληλουχία βρέθηκε ταυτόσημη της πρωτεΐνης **MBP1 (Mutant p53-binding protein 1)** ή **Fibulin-4**. Περιέχει έξι περιοχές EGF-like (epidermal growth factor like) (αμινοξέα 54-80, 123-149, 164-186, 203-226, 243-267, 283-309) που βρίσκονται κυρίως σε μεμβρανικές πρωτεΐνες και στον εξωκυττάριο χώρο όπου εκκρίνεται και η ίδια. Η περιοχή αλληλεπίδρασης εμπεριέχει κάποιες από αυτές τις περιοχές (137-270 αμινοξέα). Η πρωτεΐνη αυτή ανακαλύφθηκε με την μέθοδο των δύο υβριδίων όταν χρησιμοποιήθηκε μία μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης p53. Η

αλληλεπίδρασή τους φαίνεται να οφείλεται περισσότερο σε δομικές αλλαγές που φέρει η μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης p53. Η MBP1 παρουσιάζει περισσότερη αγχιστεία με την μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης p53 για αυτό και η μόνη λειτουργία στην οποία μπορούμε να αναφερθούμε είναι ότι ορίζεται σαν ογκογονίδιο (144).

37H6

```
GCATTATCGACATGCCTTGCGGCTGAAGCCTGATTTTCATTGATGGTTATATTAACCTGGCAGCAGCCTTG  
GTAGCAGCAGGTGACATGGAAGGA
```

```
gcattatcgacatgccttgccgctgaagcctgatttcattgatggttatattaacctggca  
  H Y R H A L R L K P D F I D G Y I N L A  
gcagccttggtagcagcaggtgacatggaagga  
  A A L V A A G D M E G
```

trQ91Y38

Q91Y38_MOUSE UDP-N-acetylglucosaminyltransferase [Ogt] [Mus musculus
(Mouse)] O-linked N-acetylglucosamine transferase [Ogt] [Mus musculus
(Mouse)] 1046AA align

Score = 102 bits (234), Expect = 1e-21
Identities = 31/31 (100%), Positives = 31/31 (100%)

Query: 1 HYRHALRLKPDFIDGYINLAAALVAAGDMEG 31
HYRHALRLKPDFIDGYINLAAALVAAGDMEG
Sbjct: 111 HYRHALRLKPDFIDGYINLAAALVAAGDMEG 141

Η παραπάνω αλληλουχία βρέθηκε ταυτόσημη της πρωτεΐνης **Ogt (UDP-N-acetylglucosaminyltransferase)** του ποντικού. Περιέχει 12 επαναλαμβανόμενα μοτίβα TPR (Tetratricopeptide repeat) εκ των οποίων αρκετά εμπεριέχονται στην περιοχή αλληλεπίδρασης με το «δόλωμα» (αμινοξέα 111-260). Το μοτίβο αυτό ευθύνεται για αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και τον σχηματισμό συμπλόκων (145). Ετεροδιμερίζεται με δύο υπομονάδες των 11 kDa και των 70 kDa. Υπάρχουν 2 ισομορφές της που προέρχονται από εναλλακτικό μάτισμα. Η μία βρίσκεται στα μιτοχόνδρια και η άλλη εντοπίζεται στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα (146). Η πρωτεΐνη αυτή παίρνει μέρος στην γλυκοσυλίωση των πρωτεϊνών όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση:

UDP-N-acetyl-D-glucosamine + peptide = UDP + N-acetyl-beta-D-glucosaminyl-peptide.

Προσθέτει την N-ακετυλο-D-γλουκοζαμίνη σε πεπτίδιο μέσω ενός O-γλυκοσιδικού δεσμού με το υδροξύλιο της σερίνης ή θρεονίνης. Πιο πρόσφατα δείχτηκε ότι έχει και δράση τρανσακετυλάσης των ιστονών. Η OGT μπορεί να συνεισφέρει με τη δράση της ως τρανσακετυλάσης στην καταστολή της γονιδιακής έκφρασης και συγχρόνως με τις O-GlcNAc τροποποιήσεις που μπορεί να επιφέρει στους μεταγραφικούς ενεργοποιητές αναστέλλοντας τη δράση τους (147).

35E6

AAAAATACTATTATGCTCTCTATGAACTTGTTCATCCGTGGCAACTGCTTCTGCTAT

aaaaatactattatgctctctatgaacttgtcatccgtggcaactgcttctgctat
 K Y Y Y A L Y E L V I R G N C F C Y

sp Q61292 Laminin beta-2 chain precursor (S-laminin) 1799 AA
 LAMB2_MOUSE (S-LAM) [Lamb2] [Mus musculus (Mouse)] align

Score = 67.2 bits (151), Expect = 6e-11
 Identities = 18/18 (100%), Positives = 18/18 (100%)

Query: 1 KYYYALYELVIRGNCFCY 18
 KYYYALYELVIRGNCFCY
 Sbjct: 272 KYYYALYELVIRGNCFCY 289

Η παραπάνω αλληλουχία βρέθηκε ταυτόσημη της πρωτεΐνης **β-λαμινίνης**. Ανήκει στην οικογένεια των γλυκοπρωτεϊνών και αποτελείται από τρεις διαφορετικές πεπτιδικές αλυσίδες (άλφα, βήτα και γάμμα). Περιέχει 13 περιοχές laminin EGF-like, μία περιοχή laminin IV type B και μία περιοχή laminin N-terminal domain (αμινοξέα 46-285) της οποίας ένα μέρος εμπεριέχεται και στην περιοχή της αλληλεπίδρασής της με το δόλωμα (αμινοξέα 272-830). Εκκρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο και κυρίως στις νευρομυϊκές συνάψεις (148-149). Προσδένεται στα κύτταρα μέσω ενός υποδοχέα και μεσολαβεί στην προσκόλληση, την μετανάστευση και την οργάνωση των κυττάρων σε ιστούς κατά την εμβρυική ανάπτυξη.

31A5

CCATGGACCCGCTACGTATTCCAGGGGCCTTACGGTCCCCGGGCCACTGGCCTGGGCACTG
GAAAGGCCGAGGGAATCTGGAAGACACCAGCCGCGTACATCGGCCGAGGCCCGGCGTGT
CGGCCCTGAGCGTGCGGCGTTTATTCGAGAGCTGCAGGAAGCGTTGTGTCTTAATCCACCA
CCCACGAAGAAGATCACCGAAGATGATGTCAAAGTGATGTTGTATTTGCTGGAAGAGAAA
AACGGGACCTGAACACAGCCGCCCGGATCGGCCAGTCCCTGGTGAAACAGAACAGTGTCTT
GATGGAGGAGAATAATAAGCTGGAAACCATGCTGGGCTCAGCCAGGGAGGAGATTTTACAT
CTCCGGAAGCAGGTGAACCTGCGAGATGACCTTCT

ccatggaccgctacgtattccaggggccttacgggtccccggggcc
P W T R Y V F Q G P Y G P R A
actggcctgggcaactggaaggccgaggggaatctggaagacaccagccgctacatcggc
T G L G T G K A E G I W K T P A A Y I G
cggaggccccggcgtgtccggcctgagcgtgcccgtttatttcgagagctgcaggaagcg
R R P G V S G P E R A A F I R E L Q E A
ttgtgtcctaatccaccaccacgaagaagatcaccgaagatgatgtcaaagtgatgttg
L C P N P P P T K K I T E D D V K V M L
tatttgctggaagagaaaagaacgggacctgaacacagccgcccggatcggccagtccttg
Y L L E E K E R D L N T A A R I G Q S L
gtgaaacagaacagtgcttcttgaggagagaataataagctggaaaccatgctgggctca
V K Q N S V L M E E N K L E T M L G S
gccaggaggagattttacatctccggaagcaggtgaacctgcgagatgaccttct
A R E E I L H L R K Q V N L R D D L

sp Q35668 **Huntingtin-associated protein 1 (HAP-1) [Hap1] [Mus** 628
HAP1_MOUSE musculus (Mouse)] AA
align

Score = 271 bits (694), Expect = 3e-72
Identities = 133/133 (100%), Positives = 133/133 (100%)

Query: 1 PWTRYVFQGPYGPRTGLGTGKAEGIWKTPAAYIGRRPGVSGPERAAFIRELQEALCPNP 60
PWTRYVFQGPYGPRTGLGTGKAEGIWKTPAAYIGRRPGVSGPERAAFIRELQEALCPNP
Sbjct: 76 PWTRYVFQGPYGPRTGLGTGKAEGIWKTPAAYIGRRPGVSGPERAAFIRELQEALCPNP 135
Query: 61 PPTKKITEDDDVKVMLYLLEEKERDLNNTAARIGQSLVKQNSVLMEENNKLETMLGSAREEI 120
PPTKKITEDDDVKVMLYLLEEKERDLNNTAARIGQSLVKQNSVLMEENNKLETMLGSAREEI
Sbjct: 136 PPTKKITEDDDVKVMLYLLEEKERDLNNTAARIGQSLVKQNSVLMEENNKLETMLGSAREEI 195
Query: 121 LHLRKQVNLRDDL 133
LHLRKQVNLRDDL
Sbjct: 196 LHLRKQVNLRDDL 208

Η παραπάνω αλληλουχία βρέθηκε ταυτόσημη της πρωτεΐνης **HAP-1 (Huntingtin-associated protein 1)**. Περιέχει τέσσερις συνεχόμενες προλίνες (467-470 αμινοξέα) και μία περιοχή την Hap1-N-τελική (αμινοξέα 79-403) η οποία εμπεριέχει την περιοχή της αλληλεπίδρασης (αμινοξέα 76-230). Εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η πρωτεΐνη HAP-1 συνδέεται με την πρωτεΐνη huntingtin που αποτελεί βάση της αντίστοιχης ασθένειας. Οι πρωτεΐνες HAP και η Huntingtin συνεντοπίζονται στον ενδιάμεσο χώρο των δύο μεμβρανών του πυρηνικού

φακέλου. Η ασθένεια Huntington (HD) είναι νευροεκφυλιστική και χαρακτηρίζεται από απώλεια ραβδωτών νευρώνων η οποία προκαλείται από μία επέκταση πολυγλουταμίνης στην πρωτεΐνη huntingtin. Η HAP-1 αποδείχθηκε ότι συνδέεται με την huntingtin με τρόπο που εξαρτάται από το μήκος της επαναλαμβανόμενης γλουταμίνης που υπάρχει στο μόριό της. Η ανθρώπινη πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με τουλάχιστον δύο πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού (την δυνακτίνη και την pericentriolar protein-PCM1). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις προτείνουν ένα ρόλο μεταφοράς κυστιδίων ή μεταφοράς οργανιδίων.

36Γ6

TTTCATCGGCCCAAAATTTGGAAGACTGATTGTTGTAATTGCCAAAATCATTGTAGCTTCCACCACCTCCAA
AA

ttttggaggtggtggaagctacaatgattttggcaattacaacaatcagtccttccaatttt
F G G G G S Y N D F G N Y N N Q S S N F
gggccgatgaa

sp P49312 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 319
ROA1_MOUSE (Helix-destabilizing protein) (Single-strand AA
binding protein) (hnRNP coreprotein A1) (HDP-1) align
(Topoisomerase-inhibitor suppressed)
[Hnrpa1] [Mus musculus (Mouse)]

Score = 77.8 bits (176), Expect = 4e-14
Identities = 23/23 (100%), Positives = 23/23 (100%)

Query: 1 FGGGGSYNDFGNYNQSSNFGPM 23
FGGGGSYNDFGNYNQSSNFGPM
Sbjct: 253 FGGGGSYNDFGNYNQSSNFGPM 275

Η παραπάνω αλληλουχία βρέθηκε ταυτόσημη της πρωτεΐνης **hnRNP1 (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1)**. Περιέχει δύο RRM περιοχές με τις οποίες αλληλεπιδρά με το RNA. Αποτελεί μία από τις πιο άφθονες ριβονουκλεοπρωτεΐνες και εντοπίζεται στον πυρήνα. Το γονίδιο της πρωτεΐνης καταστέλλεται από αναστολείς της τοποϊσομεράσης II όπως η ετοποσίδη που επάγει το διαχωρισμό των αλυσίδων του DNA αλλά και της τοποϊσομεράσης I όπως είναι η camptothecin που επάγει την διάσπαση των αλυσίδων του DNA. Για τον λόγο αυτό ονομάζεται και Topoisomerase inhibitor suppressed (150). Εμπλέκεται στο «πακετάρισμα» του pre-mRNA σε

hnRNPs, στην μεταφορά του πολυαδενυλιωμένου mRNA από τον πυρήνα και στην επιλογή των άκρων του ματίσματος.

21A5

GCAGCAGCCCAGACATCAGCAGATGGCTCCCAGACTCAGAACGTGGAGTCCCGGACTATAATTCGGGGCA
AGAGGACCCGCAAGGTTAATAACTTGAATGT

gcagcagcccagacatcagcagatggctcccagactcagaacgtggagtcccgactata
A A A Q T S A D G S Q T Q N V E S R T I
atcggggcaagaggaccgcaagggttaataacttgaatgt
I R G K R T R K V N N L N

sp Q9QYH6 Melanoma-associated antigen D1 (MAGE-D1 775
MAGD1_MOUSE antigen) (Neurotrophin receptor-interacting AA
MAGE homolog) (Dlxin-1) [Maged1][Mus musculus align
(Mouse)]

Score = 103 bits (237), Expect = 6e-22
Identities = 33/33 (100%), Positives = 33/33 (100%)

Query: 1 AAAQTSADGSQTQNVESRTIIRGKRTRKVNNLN 33
AAAQTSADGSQTQNVESRTIIRGKRTRKVNNLK
Sbjct: 219 AAAQTSADGSQTQNVESRTIIRGKRTRKVNNLN 251

Η παραπάνω αλληλουχία βρέθηκε ταυτόσημη της πρωτεΐνης **MAGE-D1 (Melanoma-associated antigen D1)**. Περιέχει μία περιοχή mage. Εντοπίζεται στην μεμβράνη και στο κυτταρόπλασμα. Η πρωτεΐνη MAGE-D1 ή Neurotrophin receptor-interacting MAGE homolog (NRAGE) ή Dlxin-1, όπως αλλιώς ονομάζεται, αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα της νευροτροφίνης και επάγει την απόπτωση αναχαιτίζοντας έτσι την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου (151). Αλληλεπιδρώντας με την πρωτεΐνη ρυθμίζει την δράση διαφόρων μελών της οικογένειας Dlx/Msx στην κυτταρική διαφοροποίηση (152). Αλληλεπιδρώντας με τα μόρια DLX5, DLX7 και MSX2 σχηματίζει πολυμερή.

1304

ATGAGTACAAGCTGGCTCAAGCCCTGCATGAGATGCGG

atgagtacaagctggctcaagccctgcatgagatgcg
E Y K L A Q A L H E M R

sp P14733 Lamin-B1 [Lmnb1] [Mus musculus (Mouse)] 587 AA

Score = 43.5 bits (95), Expect = 8e-04
 Identities = 12/12 (100%), Positives = 12/12 (100%)

Query: 1 EYKLAQALHEMR 12
 EYKLAQALHEMR
 Sbjct: 239 EYKLAQALHEMR 250

Η παραπάνω αλληλουχία βρέθηκε ταυτόσημη της πρωτεΐνης **λαμίνης B** που αποτελεί συστατικό του πυρηνικού ελάσματος (λάμινας) και βρίσκεται στο νουκλεόπλασμα, κάτω από την εσωτερική πυρηνική μεμβράνη και που προκύπτει από τον πολυμερισμό των πυρηνικών λαμινών. Η λαμίνη B συνδέεται με τον LBR (υποδοχέα της λαμίνης B) ο οποίος όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι υπόστρωμα των SRPK1 και SRPK1a (50). Η λάμινα παρέχει ένα σκελετό στον πυρηνικό φάκελο, βρίσκεται σε στενή επαφή με την περιφερική ετεροχρωματίνη και μπορεί να παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην οργάνωση του γονιδιώματος (153). Η πυκνότητα της λάμινας ρυθμίζεται αυστηρά από τον κυτταρικό κύκλο και συγκεκριμένα από την διάλυση και τον σχηματισμό του πυρηνικού φακέλου στην πρόφαση και στη τελόφαση αντίστοιχα. Αυξημένη φωσφορυλίωσή τους συμβαίνει στην αποδιοργάνωση του πυρηνικού φακέλου και επηρεάζει τις διασυνδέσεις της.

51Γ8

TCCCCAACAGGCGATACCCTGGCCCTCTCCACCACCAGGCTCAAAGATTCAGGCTGGACAATTTGCTT
 AATATGGCCTATGGCGTAAAGAGACTGATGTCTGGACCAGTCCCCCCTCTGCTTGTCCCCCAGGTTCT
 CCCCATCACCATTGACGGGATGACAAGTCTTGTGGGAATGAACATCCCTGGTCACACAGGGACAGGCTG
 GTGCATCTTCGTCTATAACTGTCCCTGATTCTGATGAGAGTGTCCCTCTGGCAGCTCTTTGGCCCTTTG
 CGCAGTGAACAACGTCAAGGTCATCCGTGACTTCAACACCAACAAGTGCAAGGGATTCCGGCTTCGTACC
 ATGACCAACTACGATGAGGCAGCCATGGCCATCGCCAGCCTCAATGGCTATCGCCTGGGAGACAGAGTGT
 TGCAAGTTTCTTTAAAACCAACAAAGCCCCACAAATCC

tccccaacagggcgataccctggccctctccaccaccagggtcaaagattcaggctggac
 S P N R R Y P G P L H H Q A Q R F R L D
 aatttgcttaatatggcctatggcgtaaagagactgatgtctggaccagtcccccttct
 N L L N M A Y G V K R L M S G P V P P S
 gcttgccccccaggttctccccaatcaccattgacgggatgacaagtcttggtgggaatg
 A C P P R F S P I T I D G M T S L V G M
 aacatccctgggtcacacagggacaggctgggtgcatcttcgtctataacctgtcccctgat
 N I P G H T G T G W C I F V Y N L S P D
 tctgatgagagtgtcctctggcagctctttggccctttggcgcagtgacaacagtcgcaag
 S D E S V L W Q L F G P F G A V N N V K
 gtcacccgtgacttcaacaccaacaagtgcaagggattcggcttcgctaccatgaccaac
 V I R D F N T N K C K G F G F V T M T N
 tacgatgaggcagccatggccatcgccagcctcaatggctatcgccctgggagacagagtg
 Y D E A A M A I A S L N G Y R L G D R V

ttgcaagtttccttttaaaaccaacaaagcccacaaatcc
L Q V S F K T N K A H K S

sp Q61701 ELAV-like protein 4 (Paraneoplastic 385
ELAV4_MOUSE encephalomyelitis antigen HuD) (Hu-antigen D) AA
[Elavl14] [Mus musculus (Mouse)] align

Score = 323 bits (828), Expect = 1e-87
Identities = 153/153 (100%), Positives = 153/153 (100%)

Query: 1 SPNRRYPGPLHHQAQRFRLLDNLLNMAYGVKRLMSGPVPSPACPPRFSPITIDGMTSLVGM 60
SPNRRYPGPLHHQAQRFRLLDNLLNMAYGVKRLMSGPVPSPACPPRFSPITIDGMTSLVGM
Sbjct: 233 SPNRRYPGPLHHQAQRFRLLDNLLNMAYGVKRLMSGPVPSPACPPRFSPITIDGMTSLVGM 292
Query: 61 NIPGHTGTGWCI FVYNLSPDSDESVLWQLFGPFGAVNNVKVIRDFNTNKCKGFGFVTMTN 120
NIPGHTGTGWCI FVYNLSPDSDESVLWQLFGPFGAVNNVKVIRDFNTNKCKGFGFVTMTN
Sbjct: 293 NIPGHTGTGWCI FVYNLSPDSDESVLWQLFGPFGAVNNVKVIRDFNTNKCKGFGFVTMTN 352
Query: 121 YDEAAMAIASLNGYRLGDRVLQVSFKTNKAHKS 153
YDEAAMAIASLNGYRLGDRVLQVSFKTNKAHKS
Sbjct: 353 YDEAAMAIASLNGYRLGDRVLQVSFKTNKAHKS 385

Η παραπάνω αλληλουχία βρέθηκε ταυτόσημη της πρωτεΐνης **ELAV-like protein 4 (Paraneoplastic encephalomyelitis antigen HuD)**. Περιέχει τρεις περιοχές RRM πρόσδεσης στο RNA (αμινοξέα 51-129, 137-217, 302-380) (154). Από το γονίδιο της πρωτεΐνης HuD προέρχονται μέσω εναλλακτικού ματίσματος τρεις μορφές mRNAs δύο κύρια mRNAs (3,7 και 4,4 kb) που βρίσκονται στον εγκέφαλο ειδικά και ένα mRNA (1,3 kb) που βρίσκεται στους όρχεις ειδικά (155). Η Paraneoplastic encephalomyelitis αποτελεί ασθένεια του νευρικού συστήματος και συνδέεται με καρκίνο των πνευμόνων. Η παθολογία είναι χαρακτηριστική αυτοάνοσου νοσήματος και αναπτύσσονται στους ασθενείς αντισώματα που αντιδρούν με τα αντιγόνα της ασθένειας που εκφράζονται στους νευρώνες και στα ογκίδια (HuD antigen) (156). Η πρωτεΐνη HuD αλληλεπιδρά με το RNA και απαιτείται σε διαφορετικά σημεία κατά την ανάπτυξη των νευρώνων, συμπεριλαμβάνοντας και την αρνητική ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των νευρικών κυττάρων. Παίζει ρόλο στην ωρίμανση του RNA ειδικά στα νευρικά κύτταρα. Επίσης βρέθηκε πως ο υποδοχέας TAP του mRNA που το εξάγει από τον πυρήνα αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη HuD (157).

21H5* (Αγνωστο)

CTTTGCACCAGGGCATGGCCCTGCATTTCCACCTGGCTTAGGGGGCTCCTTGCCGTCAGCTTA

CCAGTTC

```
ctttgcaccagggcatggcccctgcatttccacctggcttagggggctccttgccgtcagcttac
  L H Q G M A P A F P P G L G G S L P S A Y
cagttc
  Q F
```

tr Q80WC3 MOUSE **Zinc finger protein 469 [Zfp469] [Mus musculus (Mouse)]** 1755 AA
[align](#)

Score = 75.7 bits (171), Expect = 2e-13
Identities = 23/23 (100%), Positives = 23/23 (100%)

Query: 1 LHQMAPAFPPGLGGSLPSAYQF 23
LHQMAPAFPPGLGGSLPSAYQF
Sbjct: 754 LHQMAPAFPPGLGGSLPSAYQF 776

Η αλληλουχία αυτή βρέθηκε ταυτόσημη με την πρωτεΐνη **Zfp469 (Zinc finger protein 469)** που ανήκει στην ίδια οικογένεια με την 4A2 και η λειτουργία της δεν είναι γνωστή ακόμη.

59Γ9* (Αγνωστο)

CTGGCTTTTGGGGTCTCTGGCCCCACCTGGCCTTTTGGGTCTCTGGCCCCACCTGGCCTTTTGGG

```
cccaaaagggccaggtggggccagaggacccaaaaggccaggtggggccagaggaccccaaa
  P K G Q V G P E D P K G Q V G P E D P K
agccagtg
  S Q
```

sp Q99PG2 OGFR_MOUSE **Opioid growth factor receptor (OGFr) 633 AA**
(Zeta-type opioid receptor) [Ogfr] [Mus musculus (Mouse)] [align](#)

Score = 71.5 bits (161), Expect = 3e-12
Identities = 22/22 (100%), Positives = 22/22 (100%)

Query: 1 PKGQVGPEDPKGQVGPEDPKSQ 22
PKGQVGPEDPKGQVGPEDPKSQ
Sbjct: 525 PKGQVGPEDPKGQVGPEDPKSQ 546

Η παραπάνω αλληλουχία βρέθηκε ταυτόσημη της πρωτεΐνης **OGFr (opioid growth factor receptor)**. Η πρωτεΐνη αυτή περιέχει ένα χαρακτηριστικό μοτίβο το OGFr. Αποτελεί τον υποδοχέα των οπιοειδών νευρομεταβιβαστών. Ο φυσικός αυξητικός οπιοειδής παράγοντας OGF ή [Met(5)]-εγκεφαλίνη είναι ένα πεπτίδιο που ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την επούλωση των τραυμάτων και την

αγγειογένεση. Ο υποδοχέας του αποτελεί μία δομική μεμβρανική πρωτεΐνη που ανευρίσκεται στον πυρήνα. Έχει εντοπιστεί στην εξωτερική μεμβράνη του πυρηνικού φακέλου όπου αλληλεπιδρά με την εγκεφαλίνη και το σύμπλοκο μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου παρατηρείται στο εσωτερικό της πυρηνικής μήτρας (nuclear matrix) και στην περιφέρεια της ετεροχρωματίνης (158-159).

61E9

```
CTGGTGCTGCTGCTGCTGCCGCTGATGCTGGTGCCGCGAGCCGATTGCGGGCCATGGCGGC
AAATATAGCCGCGAAAAAACGAACCGGAAATGGCGGCGAAACGCGAAAAGCGGCGAAGAA
TTTCGCATGGAAAAACTGAACAGCTGTGGGAAAAAGCGAAACGCCTGCATCTGAGCCCG
GTGCGCCTGGCGGAACAGCATAGCGATCTGAAAAATCAGGAACGCGATGAACCTGAACCTGG
AAAAAAGTGAAGTGGAAAGCCTGGATAAAGATGGCGAAAAAGAAGCGAAACTGATTCAT
AACCTGAACGTGATTCTGGCGCGCTATGGCCTGGATGGCCGCAAAGATGCGCAGATGGTG
CATAGCAACGCG
```

```
ctggtgctgctgctgctgctgccgctgatgctggtgccgcagccgattgctgggccaatggcggc
L V L L L L L P L M L V P Q P I A G H G G
aaatatagccgcgaaaaaacgaaccggaaatggcggcgaaacgcgaaagcggcgaaagaa
K Y S R E K N E P E M A A K R E S G E E
tttcgcatggaaaaactgaaccagctgtgggaaaaagcgaaacgcctgcatctgagcccg
F R M E K L N Q L W E K A K R L H L S P
gtgcgccctggcggaactgcatagcgatctgaaaattcaggaacgcgatgaactgaactgg
V R L A E L H S D L K I Q E R D E L N W
aaaaaactgaaagtggaagcctggataaagatggcgaaaaagaagcgaaactgattcat
K K L K V E G L D K D G E K E A K L I H
aacctgaacgtgattctggcgcgctatggcctggatggccgcaaagatgcgcgagatggtg
N L N V I L A R Y G L D G R K D A Q M V
catagcaacgcg
H S N A
```

```
sp P55302 Alpha-2-macroglobulin receptor-associated protein 360
MRP_MOUSE precursor AA
(Alpha-2-MRAP) (Low density lipoprotein receptor-related align
protein-associated protein 1) (RAP) (Heparin-binding
protein 44) (HBP-44) [Lrpap1] [Mus musculus (Mouse)]
```

Score = 249 bits (637), Expect = 1e-65
Identities = 124/124 (100%), Positives = 124/124 (100%)

```
Query: 1 LVLLLLPLMLVPQPIAGHGGKYSREKNEPEMAAKRESGEEFRMEKLNQLWEKAKRLHLS 60
LVLLLLPLMLVPQPIAGHGGKYSREKNEPEMAAKRESGEEFRMEKLNQLWEKAKRLHLSF
Sbjct: 17 LVLLLLPLMLVPQPIAGHGGKYSREKNEPEMAAKRESGEEFRMEKLNQLWEKAKRLHLS 76

Query: 61 VRLAELHSDLKIQRDELNWKKLKVEGLDKDGEKEAKLIHNLNVILARYGLDGRKDAQMV 120
VRLAELHSDLKIQRDELNWKKLKVEGLDKDGEKEAKLIHNLNVILARYGLDGRKDAQMV
Sbjct: 77 VRLAELHSDLKIQRDELNWKKLKVEGLDKDGEKEAKLIHNLNVILARYGLDGRKDAQMV 136

Query: 121 HSNA 124
HSNA
Sbjct: 137 HSNA 140
```

Η παραπάνω αλληλουχία βρέθηκε ταυτόσημη της πρωτεΐνης **HBP-44 (Heparin-binding protein 44)**. Εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Όταν βρίσκεται στην επιφάνεια του κυττάρου σχηματίζει σύμπλοκα με τις βαριές και ελαφριές αλυσίδες του υποδοχέα των α-μακροσφαιρινών (LRP1/alpha-2). Όταν βρίσκεται ενδοκυτταρικά ενώνεται με διάφορους υποδοχείς. Αλληλεπιδρά και με τον υποδοχέα της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (low density lipoprotein-LDL)(160). Επίσης συνδέεται με την ηπαρίνη (161).

56E9

```

ACCATGAGATTTGGGGAGCCCACCTCCAGTGAGACCCTGTCCTGTGTGCATCATCTTTGTGTCATTGTGTACT
ATGCCTTGATGGCTGGAGTAGTCTGGTTTCGTGGTCCTCACCTATGCCTGGCACACCTCCCTTCAAAGCCCT
GGGCACCACCTACCAGCCTCTCTCGGGCAAGACATCCTATTTCCACCTGCTCACGTGGTCACTCCCCTTT
GTCCTCACGGTGGCAATCCTGGCTGTGGCTCAGGTAGATGGAGACTCCGTGAGTGGCATCTGTTTTGTAG
GCTACAAGAAGTATCGGTACCGTGTGGCTTTGTCCTGGCCCCAATTGGCCTGGTGTATTGTGGGAGG
CTACTTCCCTCATCAGAGGGGTCTGACTCTGTTCTCCACAAGAGCAACCACCCTGGGCTTCTGAGTGAGA
AGGCAGCCAGCAAGATCAACGAGACCATGCTGCGCCTGGGCATTTTTTGGC

```

```

accatgagatTTGGGGAGCCCACCTCCAGTGAGACCCTGTCCTGTGTGCATCATCTTTGTGTCATTGTGTACT
T M R F G E P T S S E T L S C V I I F V
attgtgtactatgccttgatggctggagtagtctggttcgtggtcctcacctatgcctgg
I V Y Y A L M A G V V W F V V L T Y A W
cacacctccttcaaagccctgggaccacctaccagcctctctcgggcaagacatcctat
H T S F K A L G T T Y Q P L S G K T S Y
ttccacctgtctcacgtggctcactccccctttgtcctcacgggtggcaatcctggctgtggct
F H L L T W S L P F V L T V A I L A V A
caggtagatggagactccgtgagtggtcatctgttttgtaggctacaagaactatcggtac
Q V D G D S V S G I C F V G Y K N Y R Y
cgtgctggctttgtcctggcccccaattggcctgggtgcttattgtgggaggctacttcctc
R A G F V L A P I G L V L I V G G Y F L
atcagaggggtcatgactctgttctccatcaagagcaaccaccctgggcttctgagtgag
I R G V M T L F S I K S N H P G L L S E
aaggcagccagcaagatcaacgagaccatgctgcgccctgggcatttttggc
K A A S K I N E T M L R L G I F G

```

```

sp P56726 Smoothened homolog precursor (SMO) [Smo] [Mus musculus] 793
SMO_MOUSE (Mouse) ] AA
align

```

```

Score = 315 bits (808), Expect = 2e-85
Identities = 157/157 (100%), Positives = 157/157 (100%)

```

```

Query: 1 TMRFGPTSSETLSCVIIIFVIVYYALMAGVWVFWVLTLYAWHTSFKALGTTYQPLSGKTSY 60
TMRFGPTSSETLSCVIIIFVIVYYALMAGVWVFWVLTLYAWHTSFKALGTTYQPLSGKTSY
Sbjct: 304 TMRFGPTSSETLSCVIIIFVIVYYALMAGVWVFWVLTLYAWHTSFKALGTTYQPLSGKTSY 363

Query: 61 FHLLTWSLPPVLTVAAILAVAQVDGDSVSGICFVGYNRYRAGFVLAFIGLVLIVGGYFL 120
FHLLTWSLPPVLTVAAILAVAQVDGDSVSGICFVGYNRYRAGFVLAFIGLVLIVGGYFL
Sbjct: 364 FHLLTWSLPPVLTVAAILAVAQVDGDSVSGICFVGYNRYRAGFVLAFIGLVLIVGGYFL 423

Query: 121 IRGVMTLFSIKSNHPGLLSEKAASKINETMLRLGIFG 157
IRGVMTLFSIKSNHPGLLSEKAASKINETMLRLGIFG
Sbjct: 424 IRGVMTLFSIKSNHPGLLSEKAASKINETMLRLGIFG 460

```

Η παραπάνω αλληλουχία βρέθηκε ταυτόσημη της πρωτεΐνης **SMO (Smoothened homolog precursor)**. Η πρωτεΐνη Smo περιέχει μία περιοχή F2 και μία περιοχή που αποτελεί προφίλ των υποδοχέων των G-πρωτεϊνών (G-Protein coupled receptors family 2 profile 2) Εντοπίζεται στην μεμβράνη και το μόριό της την διαπερνά αρκετές φορές. Συζευγνύεται με τις G-πρωτεΐνες. Πιθανώς συνδέεται με την πρωτεΐνη PTCH για την μεταφορά του σήματος της πρωτεΐνης Hedgehog.

Αρ.	Ονομασία	Αλληλεπίδραση με SRPK1aNt (mM AT)	Φορές εμφάνισης	Ταυτότητα της λείας
1	2A ₁	>100	8	gi 94402073 XP_001002609.1 SAF-B
2	4A ₂	>100	3	O8BHZ4 Zfp-592
3	3A ₁ *	>100	2	O3U3X8 Oxall
4	5A ₂ *	>100	2	O8CDI1 Stox2
5	5Γ ₂ *	>100	3	O3UH41 Dlg5
6	13A ₄ *	>50	2	O8BGV7 Kctd13
7	9A ₃	>50	4	P52480 Pkm2
8	12E ₄	>50	4	P02340 p53
9	43A ₇	>50	2	O99KO6 Tacc2
10	6A ₂	>50	2	O8K371 Amotl2
11	7Γ ₂	>50	3	O9Z204 HnRNP-C1/C2
12	8E ₃	>50	2	O5NU09 Mlh ₂
13	14Γ ₄	>10	2	O8C863 Itchy E3
14	28Δ _{5β}	>10	4	O62219 Hic-5 ή Tgfb1l1 ή ARA 55
15	36E ₆	>10	2	O9WVJ9 MBP1 ή Fibulin-4
16	37H ₆	>10	2	O91Y38 Ogt
17	35E ₆	>10	2	O61292 S-laminin
18	31A _{5β}	>10	1	O35668 Hap-1
19	36Γ ₆	>10	2	P49312 HnRNP1
20	21A _{5β}	>3	7	O9OYH6 MAGE-D1
21	13Θ ₄	>3	3	P14733 Lamin-B1
22	51Γ ₈	>3	1	O61701 ELAV-like protein 4
23	21H ₅ *	>3	1	O80WC3 Zfp 469
24	59Γ ₉ *	>3	1	O99PG2 Ogfr
25	61E ₉	>3	1	P55302 Hbp-44
26	56E ₉	>3	1	P56726 Smo

Πίνακας 7 : Συγκενρωτική παρουσίαση της ταυτότητας των «λειών», της ανθεκτικότητας τους στο AT και της επαναληψιμότητάς τους.

Γ.2.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ *IN VITRO* ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΧΘΕΝΤΩΝ ΚΛΩΝΩΝ ΜΕ ΤΗΝ SRPK1aNt.

Για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης *in vitro* των προϊόντων των επιλεχθέντων κλώνων με την SRPK1aNt έγινε : α) υποκλωνοποίηση των επιλεγμένων λειών σε φορέα pGEX (προκειμένου να παραχθούν οι αντίστοιχες πρωτεΐνες σε σύντηξη με την GST). Επιλέχθηκαν 10 πλασμίδια-λίες με γνώμονα την λειτουργική συνάφεια που θα μπορούσαν να έχουν με την SRPK1a. Σημαντικό κριτήριο για την επιλογή των 10 κλώνων αποτέλεσε ο αριθμός των φορών που ο συγκεκριμένος κλώνος είχε προκύψει από το σύστημα των δύο υβριδίων (Πίνακας 6). Συγχρόνως αξιολογήθηκε η πιθανότητα να συσχετίζεται ο νέος κλώνος με την SRPK1a, με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα. β) μεταγραφή και μετάφραση παρουσία ραδιενεργού μεθειονίνης του N-τελικού τμήματος της SRPK1a, προκειμένου να παραχθεί αυτή σε ραδιενεργό μορφή. Σκοπός του πειράματος ήταν η ακινητοποίηση των χημικών GST-πρωτεϊνών σε σφαιρίδια γλουταθειόνης και η διερεύνηση της συγκράτησης ή μη της ραδιενεργού SRPK1aNt στα συγκεκριμένα σφαιρίδια.

Γ.2.2.1.Υποκλωνοποίηση των ενθεμάτων σε πλασμίδια κατάλληλα για την παραγωγή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε *E.coli*.

Παρασκευή και προετοιμασία των DNA των πλασμιδιακών φορέων pGEX-1N και pGEX-3X για κλωνοποίηση.

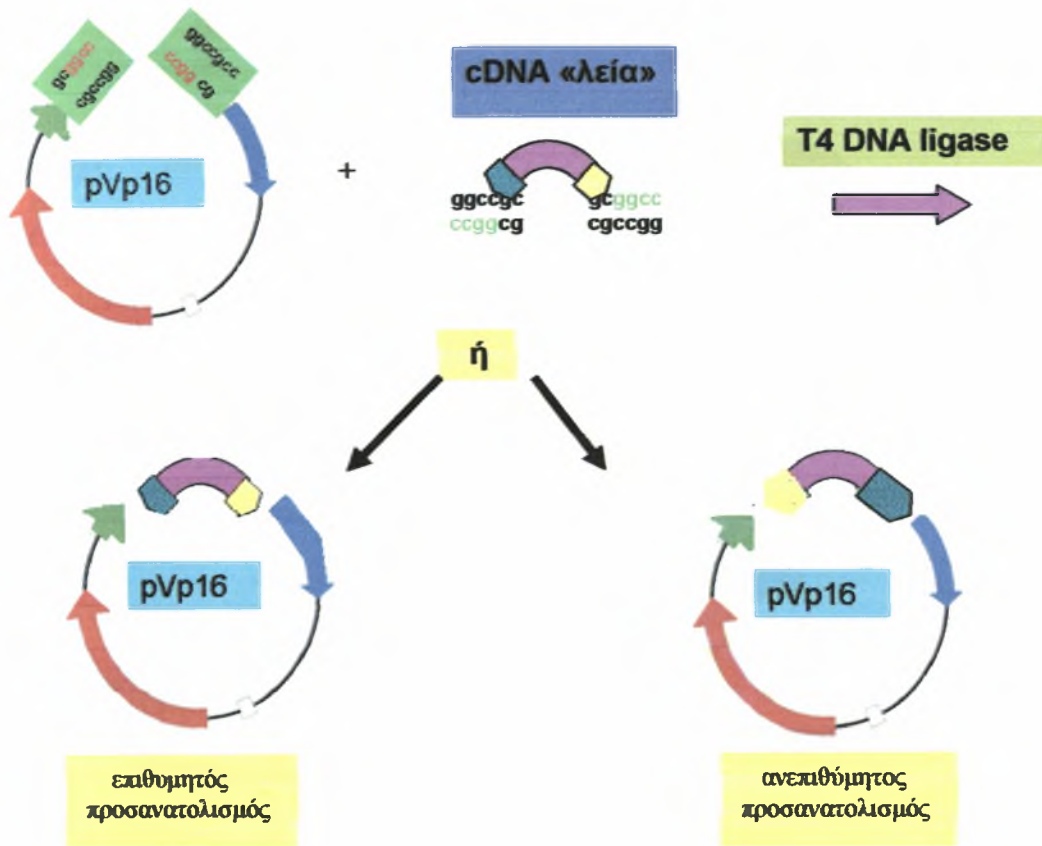
Για την κλωνοποίηση των «λειών» με σκοπό την έκφρασή τους ως πρωτεΐνες χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pGEX (Παράρτημα III).

Ο πλασμιδιακός φορέας pGEX (4948 bp) περιέχει α) την περιοχή έναρξης αντιγραφής 2μ (origin of replication), β) το γονίδιο *lac I^f* το οποίο κωδικοποιεί για μία κατασταλτική πρωτεΐνη η οποία προσδένεται στην περιοχή χειρισμού του *lac* προαγωγέα και εμποδίζει την έκφρασή του μέχρι την εισαγωγή του IPTG (ισοπροπυλ-β-D-θειογαλακτοπυρανοσίδης), γ) το γονίδιο *Amp^r* που επιτρέπει την επιλογή βακτηριακών κυττάρων που το περιέχουν αποκτώντας αντίσταση στο αντιβιοτικό της αμικιλίνης, και δ) το γονίδιο της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) το οποίο περιέχει την αλληλουχία έναρξης της μετάφρασης ATG για την έκφραση της πρωτεΐνης και θέση πρόσδεσης στα ριβοσωμάτια και βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο

του ε) τον προαγωγέα *tac* που ευθύνεται για την επαγωγή υψηλής έκφρασης πρωτεϊνών και τέλος ζ) την περιοχή κλωνοποίησης του πλασμιδίου, σε συνέχεια με το γονίδιο της GST, όπου βρίσκονται οι θέσεις αναγνώρισης των ενδονουκλεασών περιορισμού BamHI, SmaI και EcoRI που χρησιμοποιούνται για την εισαγωγή των ξένων αλληλουχιών DNA. (βλ. Παράρτημα III). Οι φορείς αυτοί υπάρχουν στο εμπόριο σε τρεις μορφές όπου η κάθε μία διαφέρει από την άλλη κατά ένα νουκλεοτίδιο στην περιοχή μεταξύ του γονιδίου της GST και της περιοχής κλωνοποίησης, επιτρέποντας την κλωνοποίηση οποιουδήποτε ενθέματος σε συνέχεια με το ανοικτό πλαίσιο διαβάσματος της GST. Επίσης περιέχεται ένα κωδικόνιο τερματισμού σε κάθε αναγνωστικό πλαίσιο.

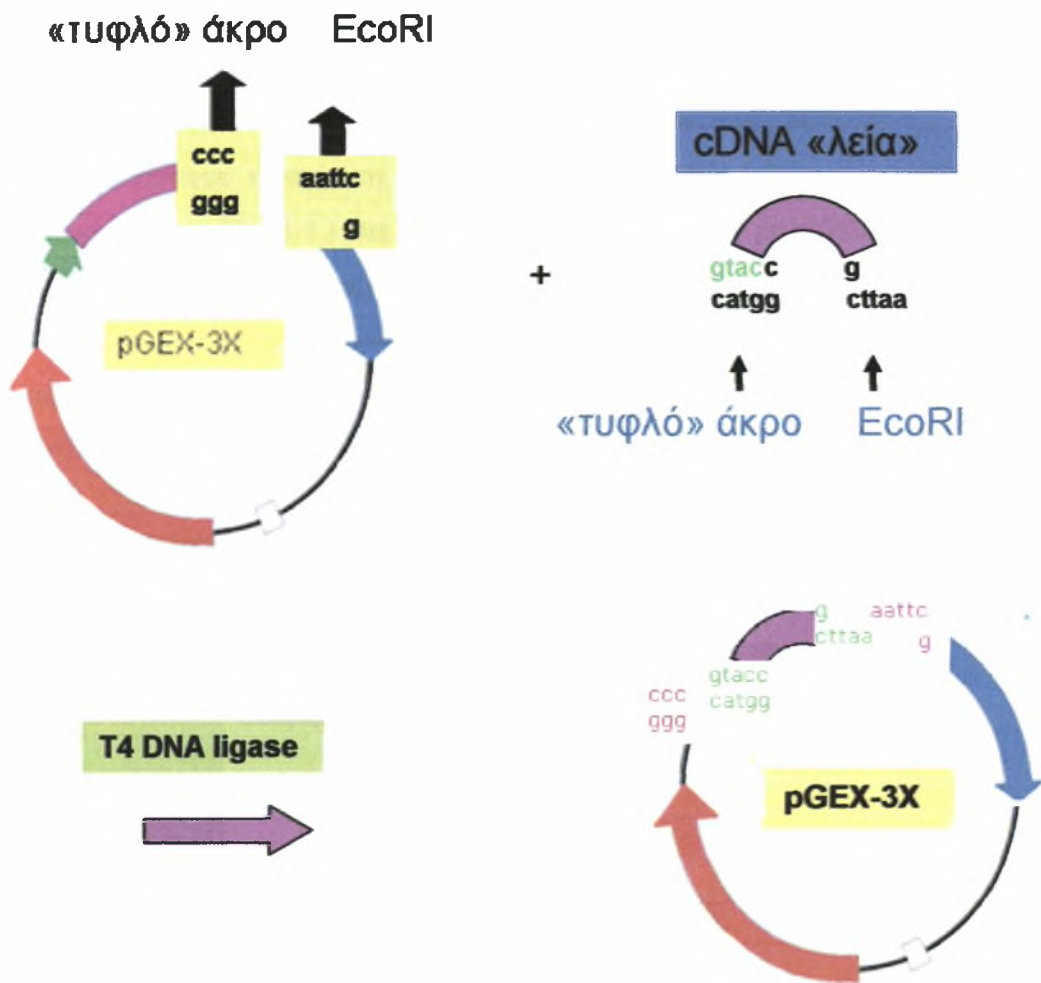
Η υποκλωνοποίηση των ενθεμάτων των πλασμιδίων-λειών έγινε για τεχνικούς λόγους με δύο τρόπους : α) είτε στη θέση SmaI του φορέα pGEX-1N με την διαδικασία που παρουσιάζεται στο σχήμα 42, όπου όμως ήταν απαραίτητος ο μετέπειτα καθορισμός του προσανατολισμού του κλωνοποιημένου ενθέματος σε σχέση με το γονίδιο της GST, είτε β) στις θέσεις SmaI και EcoRI του φορέα pGEX-3X (σχήμα 43) όπου η κλωνοποίηση του ενθέματος προκαθόριζε και τον σωστό προσανατολισμό του και δεν καθιστούσε αναγκαία την περαιτέρω ανάλυση για την επιλογή των πλασμιδίου που θα παρήγαγε την πρωτεΐνη σύντηξης με GST. Χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pGEX-1N/Sma για τις λείες 2A₁, 5A₂, 12E₄, 35E₆, 43A₇, και ο φορέας pGEX-3X/Sma/EcoRI για τις λείες 4A₂, 5Γ₂, 28Δ₅, 36E₆, 37H₆.

A



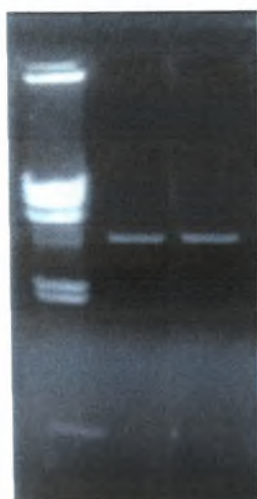
Εικόνα 42 : Σχηματική αναπαράσταση της κλωνοποίησης των λειών (Α' ομάδας) στον φορέα pGEX-1N.
Α. Αντίδραση σύνδεσης.

A



Εικόνα 43 : Σχηματική αναπαράσταση της κλωνοποίησης των λειών (B' ομάδας) στον φορέα pGEX-3X.
Α. Αντίδραση σύνδεσης.

Για να προετοιμαστεί το κάθε πλασμιδίο-φορέας για την κλωνοποίηση ακολουθήθηκαν τα στάδια που αναφέρονται στην παράγραφο B.4.1. Για τον φορέα pGEX-1N παρασκευάστηκε πλασμιδιακό DNA με την μέθοδο Quiagen (B.5.3.). Στην συνέχεια 10μg DNA του pGEX-1N επωάστηκαν με την ενδονουκλεάση περιορισμού SmaI σε τελικό όγκο 300μl (B.4.1.1.). Επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης ότι η πέψη ήταν πλήρης και υπολογίστηκε η συγκέντρωση του γραμμικού πλασμιδίου. Το πλασμιδίο-φορέας αποφωσφορυλιώθηκε από την αλκαλική φωσφατάση (B.4.1.2.). Ακολούθησε η επώαση με πρωτεΐνάση K, (B.4.1.3.), οι εκχυλίσεις με φαινόλη/χλωροφόρμιο (B.4.1.4.) και τέλος η κατακρήμνισή του με αιθανόλη (B.4.1.5.). Τέλος το δείγμα ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης για να ποσοτικοποιηθεί (B.2.) (εικόνα 44). Η ίδια διαδικασία προετοιμασίας για την κλωνοποίηση ακολουθήθηκε και για τον φορέα pGEX-3X εκτός ότι αυτός επωάστηκε με τα ένζυμα SmaI και EcoRI (εικόνα 44).



Εικόνα 44: Ηλεκτροφόρηση των γραμμικών φορέων pGEX-1N/SmaI/CIP και pGEX-3x/SmaI/CIP

Διαδρομή 1: 1,5μg μάρτυρα μοριακών βαρών λ /HindIII.

Διαδρομή 2: 1μl DNA του φορέα pGEX-1N/SmaI/ CIP

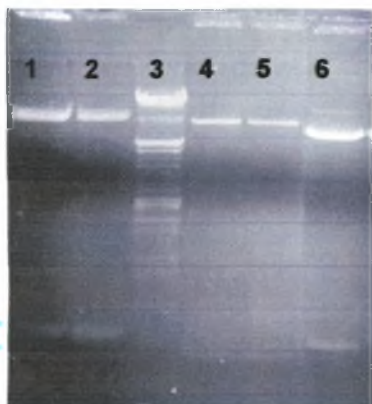
Διαδρομή 3 : 1μl DNA φορέα pGEX-3X/SmaI/CIP

Παρασκευή και προετοιμασία των DNA των ενθεμάτων.

I. Παρασκευή και προετοιμασία των DNA των ενθεμάτων 2A₁, 12E₄, 35E₆, 5A₂, 43A₇, (A' ομάδα) για κλωνοποίηση στον φορέα pGEX-1N.

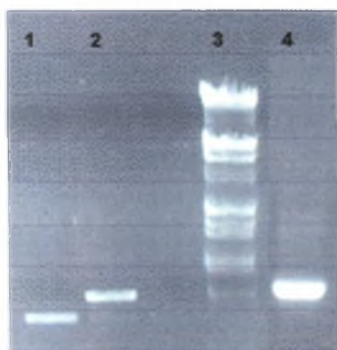
Αρχικά παρασκευάστηκε DNA από τα πλασμιδία-λείες 2A₁, 12E₄, 35E₆, 5A₂, 43A₇ (B.5.1.). Στην συνέχεια επωάστηκαν 5μg πλασμιδιακού DNA από το κάθε πλασμιδίο-λεία με την ενδονουκλεάση περιορισμού NotI σε τελικό όγκο 100μl (B.4.1.1.). Τα προϊόντα πέψης επωάστηκαν με πολυμεράση Kleow έτσι ώστε τα άκρα τους να γίνουν συμβατά με τα «τυφλά» άκρα του φορέα που προέκυψαν από την πέψη

του με *Sma*I (εικόνα 42) (B.4.2.1). Ακολούθως ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτική αγαρόζη (εικόνα 45) και απομονώθηκαν (B.2. και B.3.) (εικόνα 46).



Εικόνα 45 : Ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων πέψης των πλασμιδίων-λειών με *Not*I.

Διαδρομή 3 : 1μg μάρτυρα μοριακών βαρών λ/*Hind*III-*Eco*RI
Διαδρομή 1-2: 50μl αντίδρασης πέψης των πλασμιδίων –λειών με *Not*I
12E₄, 2A₁, αντίστοιχα.
Διαδρομή 4-5 50μl αντίδρασης πέψης των πλασμιδίων –λειών με *Not*I
35E₆, 5A₂, 43A₇, αντίστοιχα.
Τα βέλη υποδεικνύουν τα ενθέματα

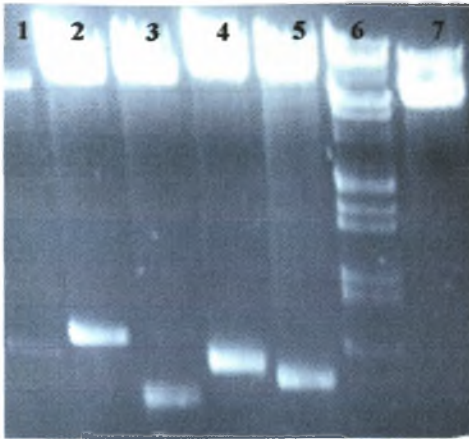


Εικόνα 46 Ηλεκτροφόρηση κάποιων DNA από τα απομονωμένα ενθέματα των λειών.

Διαδρομή 1-2 : 1μl από τα απομονωμένα ενθέματα των λειών
12E₄, 2A₁, αντίστοιχα.
Διαδρομή 4-5 : 1μl από τα απομονωμένα ενθέματα των λειών 43A₇.
Διαδρομή 3 : 1μg μάρτυρα μοριακών βαρών λ/*Hind*III- *Eco*RI.

II. Παρασκευή και προετοιμασία των DNA των ενθεμάτων 4A₂, 5Γ₂, 28Δ₅, 36E₆, 37H₆, (B' ομάδα) για κλωνοποίηση στον φορέα pGEX-3X.

Αρχικά παρασκευάστηκε DNA από τα πλασμίδια-λείες 4A₂, 5Γ₂, 28Δ₅, 36E₆, 37H₆ (B.5.1.). Τα DNA επωάσθηκαν με το ένζυμο *Kpn*I. Στην συνέχεια τα γραμμικά DNA επωάσθηκαν με την πολυμεράση *Klenow* και μετά με *Eco*RI. Τα προϊόντα πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτική αγαρόζη (εικόνα 47) απ' όπου απομονώθηκαν (B.2. και B.3.) (εικόνα 48).

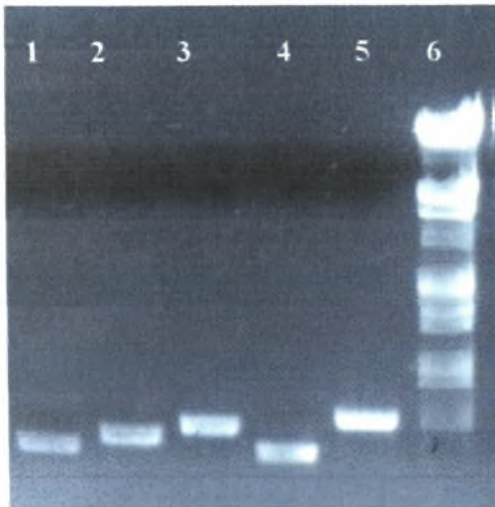


Εικόνα 47 : Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πλασμιδίων-λειών με KpnI-EcoRI

Διαδρομή 1-5: 20μl DNA αντίδρασης πέψης των πλασμιδίων – λειών 36E₆, 28Δ₅, 4A₂, 37H₆, 5Γ₂ με KpnI-EcoRI

Διαδρομή 6: 1μg μάρτυρα μοριακών βαρών λ /Hind III-EcoRI

Διαδρομή 7: 20μl DNA του φορέα pGEX-3X/SmaI



Εικόνα 48 : Ηλεκτροφόρηση κάποιων DNA από τα απομονωμένα ενθέματα των λειών

Διαδρομή 1-5 : 1μl από τα απομονωμένα ενθέματα των λειών 5Γ₂, 37H₆, 36E₆, 4A₂, 28Δ₅.

Διαδρομή 6: 1μg μάρτυρα μοριακών βαρών λ/HindIII- EcoRI.

Αντίδραση κλωνοποίησης της Α'ομάδας στον φορέα pGEX-1N και της Β'ομάδας στον φορέα pGEX-3X.

Στην συνέχεια πήραν μέρος στην αντίδραση σύνδεσης α) 50ng DNA από τα απομονωμένα ενθέματα των λειών (2A₁, 12E₄, 35E₆, 5A₂, 43A₇-Α' ομάδα) με τον φορέα pGEX-1N/SmaI/CIP και β) 50ng DNA από τα απομονωμένα ενθέματα των λειών (4A₂, 5Γ₂, 28Δ₅, 36E₆, 37H₆-Β' ομάδα) με τον φορέα pGEX-3X/SmaI-EcoRI/CIP παρουσία πάντοτε του ενζύμου T4 DNA λιγάση (B.4.1.6.). Η αναλογία των μορίων του φορέα με το DNA της ενθέματος ήταν 1:5. Η αντίδραση επώαστηκε στους 16⁰C και στην

συνέχεια ακολούθησε ο μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων XL-1 blue τα οποία είναι κατάλληλα για την έκφραση πρωτεϊνών παραγόμενων από τους φορείς pGEX (Παράρτημα II).

Επιλογή ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pGEX.

Δεδομένου ότι για κάθε μία από τις λείες (και ιδιαίτερα για εκείνες των οποίων έπρεπε να προσδιοριστεί περαιτέρω ο προσανατολισμός) έπρεπε να αναλυθούν τουλάχιστον 5-10 αποικίες για να είναι βέβαιη η απόκτηση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου εν μέσω επανακυκλοποιημένων μορίων φορέα χωρίς ένθεμα, επιλέχθηκε η τεχνική του υβριδισμού σε βακτηριακές αποικίες με σκοπό να επιλεγθούν κατευθείαν πλασμίδια με το επιθυμητό ένθεμα. Προκειμένου όμως να εκτελεστούν 10 διαφορετικοί υβριδισμοί με 10 διαφορετικούς ανιχνευτές στις αποικίες που προέρχονταν από τις 10 διαφορετικές κλωνοποιήσεις αποφασίστηκε να γίνει ένας μόνο υβριδισμός σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης με αποικίες προερχόμενες από όλες τις υποκλωνοποιήσεις χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτή μείγμα και των 10 ραδιενεργά επισημασμένων ενθεμάτων.

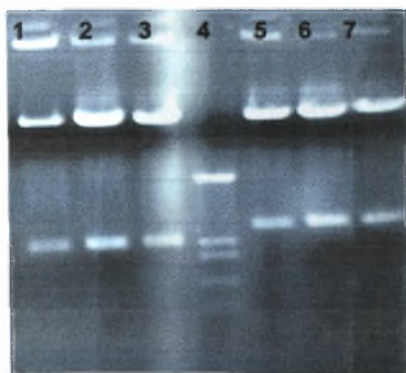
Υβριδισμός των κλωνοποιημένων λειών και επιλογή τους.

Αφού μεταφέρθηκαν οι αποικίες σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης από τα αντίστοιχα τρυβλία του μετασχηματισμού και κατεργαστήκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο της παραγράφου B.10.3., προϋβριδίστηκαν όπως περιγράφεται στην παράγραφο B.10.4. 25ng DNA από την κάθε λεία που είχε απομονωθεί για την αντίδραση σύνδεσης με τους φορείς pGEX-1N, pGEX-3X, (εικόνες 46 & 48) χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση σήμανσης των ανιχνευτών (B.10.1.).

Παρασκευή των DNA των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων και πέψη αυτών.

Από τις αποικίες που υβριδίστηκαν παρασκευάστηκαν τα πλασμιδιακά DNA των αντίστοιχων κλώνων (B.5.1.). 1μg DNA (από το κάθε πλασμιδιακό DNA) επωάστηκε με τα ένζυμα περιορισμού BamHI-EcoRI (B.4.1.1.) για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη ενθέματος. Κάποιες από αυτές τις λείες φαίνονται στις εικόνες 49 & 50.

Δεδομένου ότι στην Β' ομάδα οι λείες 4A₂, 5Γ₂, 28Δ₅, 36E₆, 37H₆, βρίσκονται κλωνοποιημένες με τον σωστό προσανατολισμό στον φορέα pGEX-3X, δημιουργήθηκαν τα γλυκερινικά αποθέματα και αποθηκεύτηκαν.

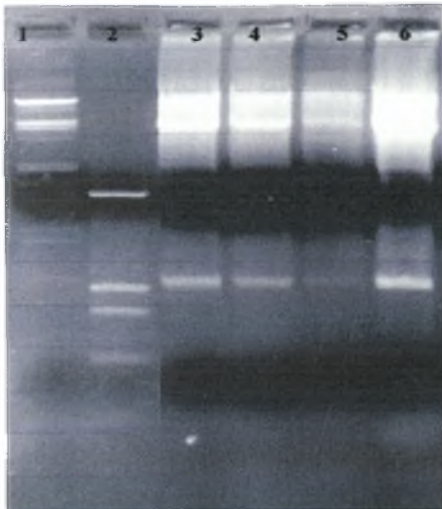


Εικόνα 49 : Ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων πέψης των πλασμιδίων-λειών με BamHI-EcoRI.

Διαδρομές 1-3 : DNA προερχόμενο από τρεις διαφορετικές αποικίες των κλώνων pGEX-3X-36E₆

Διαδρομή 4 : 750ng μάρτυρα μοριακών βαρών pUC 18/HinfI

Διαδρομές 5-7 : DNA προερχόμενο από τρεις διαφορετικές αποικίες των κλώνων pGEX-3X-28Δ₅



Εικόνα 50 : Ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων πέψης των πλασμιδίων-λειών με BamHI-EcoRI.

Διαδρομή 1: 750ng μάρτυρα μοριακών βαρών EcoRI-HindIII

Διαδρομή 2: 750ng μάρτυρα μοριακών βαρών pUC 18 /HinfI.

Διαδρομή 3-6: DNA DNA προερχόμενο από διαφορετικές αιουκίες των κλώνων pGEX-3X-37H₆.

Τα βέλη υποδεικνύουν τα ενθέματα.

Έλεγχος του προσανατολισμού των κλωνοποιημένων λειών (Α' ομάδα).

Στην ομάδα Α' επειδή τα άκρα της κάθε λείας και του φορέα ήταν «τυφλά» και συμμετρικά, η πιθανότητα ο προσανατολισμός του ενθέματος κατά την κλωνοποίηση να είναι ο επιθυμητός (συνέχεια του ανοικτού πλαισίου διαβάσματος της GST) ή ο ανεπιθύμητος (αντίστροφη κατεύθυνση ανάγνωσης από την αλληλουχία της GST) έπρεπε να ελεγχθεί περαιτέρω (εικόνα 42). Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού που επιλέχθηκαν για τον κάθε κλώνο έπρεπε α) να πέπτουν ασύμμετρα τα ενθέματα και μόνο σε μία θέση για να μην προκύπτουν πολλαπλά θραύσματα και β) να πέπτουν και τον φορέα σε μία μόνο θέση επίσης.

Χρησιμοποιώντας την αλληλουχία των ενθεμάτων, τους χάρτες των φορέων pGEX και με την χρήση προγραμμάτων του ηλεκτρονικού υπολογιστή βρήκαμε τις παρακάτω λύσεις όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 8.

I) Την ενδονουκλεάση περιορισμού MscI για το πλασμίδιο pGEX-1N-2A₁ που επωαζόμενη με αυτήν θα προέκυπταν θραύσματα μεγέθους 730bp και 4680bp εφόσον ο προσανατολισμός ήταν σωστός και 670bp και 4740bp εφόσον ήταν αντίθετος. Όταν έγινε η ηλεκτροφόρηση της πέψης με το παραπάνω ένζυμο όπως φαίνεται στην εικόνα 51 παρατηρήθηκε ότι στις διαδρομές 3 και 4 τα προϊόντα πέψης υποδεικνύουν σωστό προσανατολισμό ενώ στη διαδρομή 5 του ανεπιθύμητου προσανατολισμού.

II) Τις ενδονουκλεάσες περιορισμού AfeI και EcoRI για την λεία 12E₄ που επωαζόμενη με αυτές θα προέκυπταν θραύσματα μεγέθους 360bp και 5100bp εφόσον

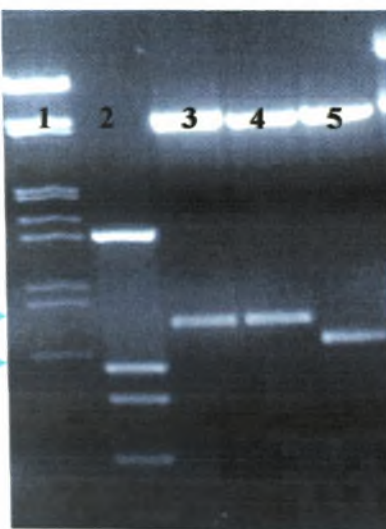
ο προσανατολισμός ήταν σωστός και 150bp και 5310bp εφόσον ήταν αντίθετος. Όταν έγινε η ηλεκτροφόρηση της πέψης της με τα παραπάνω ένζυμα όπως φαίνεται στην εικόνα 52 παρατηρήθηκε ότι στη διαδρομή 2 τα προϊόντα πέψης υποδεικνύουν σωστό προσανατολισμό ενώ στη διαδρομή 3 του ανεπιθύμητου προσανατολισμού.

III) Τις ενδονουκλεάσες περιορισμού StyI και BamHI για τη λεία 35E₆ που επωαζόμενη με αυτές θα προέκυπταν θραύσματα μεγέθους 390bp και 5030bp εφόσον ο προσανατολισμός ήταν σωστός και 150bp και 5270bp εφόσον ήταν αντίθετος. Όταν έγινε η ηλεκτροφόρηση της πέψης της με τα παραπάνω ένζυμα όπως φαίνεται στην εικόνα 53 παρατηρήθηκε ότι στις διαδρομές 1-4 τα προϊόντα πέψης υποδεικνύουν σωστό προσανατολισμό.

IV) Τις ενδονουκλεάσες περιορισμού KpnI και BamHI για την λεία 5A₂ που επωαζόμενη με αυτές θα προέκυπταν θραύσματα μεγέθους 150bp και 5300bp εφόσον ο προσανατολισμός ήταν σωστός και 340bp και 5110bp εφόσον ήταν αντίθετος. Όταν έγινε η ηλεκτροφόρηση της πέψης της με τα παραπάνω ένζυμα όπως φαίνεται στην εικόνα 54 παρατηρήθηκε ότι στις διαδρομές 3-6 τα προϊόντα πέψης υποδεικνύουν σωστό προσανατολισμό.

V) Τις ενδονουκλεάσες περιορισμού KpnI και BamHI για την λεία 43A₇ που επωαζόμενη με αυτές θα προέκυπταν θραύσματα μεγέθους ~200bp και 5300bp εφόσον ο προσανατολισμός ήταν σωστός και ~350bp και 5150bp εφόσον ήταν αντίθετος. Όταν έγινε η ηλεκτροφόρηση της πέψης της με τα παραπάνω ένζυμα όπως φαίνεται στην εικόνα 55 παρατηρήθηκε ότι στη διαδρομή 3 και 5 τα προϊόντα πέψης υποδεικνύουν σωστό προσανατολισμό ενώ στη διαδρομή 4 του ανεπιθύμητου προσανατολισμού.

Επλέχθηκαν οι κλωνοποιημένες λείες με τον επιθυμητό προσανατολισμό και αφού παρασκευάστηκε μικρής κλίμακας DNA, ετοιμάστηκαν γλυκερινικά αποθέματα και αποθηκεύτηκαν.



Εικόνα 51 : Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης με MscI του pGEX-1N-2A₁.

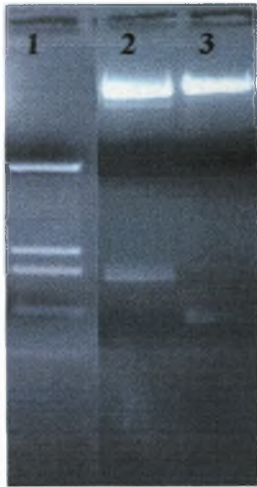
Διαδρομή 1 : 750ng μάρτυρα μοριακών βαρών λ /HindIII-EcoRI

Διαδρομή 2 : 750ng μάρτυρα μοριακών βαρών pUC18 /HinfI

Διαδρομές 3-4 : DNA προερχόμενο από διαφορετικές αποικίες του κλώνου 2A₁

Διαδρομή 5 : DNA προερχόμενο από διαφορετικές αποικίες του κλώνου 2A₁.

Τα βέλη υποδεικνύουν τα αντίστοιχα μοριακά βάρη του μάρτυρα μοριακών βαρών.



Εικόνα 52 : Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης με *AfeI-EcoRI* του *pGEX-1N-12E₄*

Διαδρομή 1: 750ng μάρτυρα μοριακών βαρών *pUC 18 /HinfI*

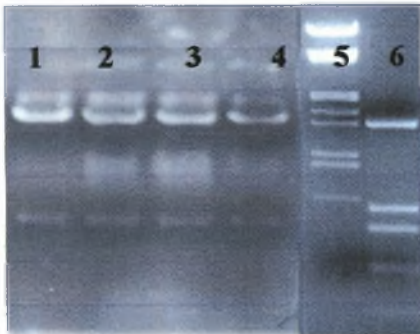
Διαδρομή 2: DNA προερχόμενο από διαφορετικές αποικίες του κλώνου *12E₄*

Διαδρομή 3: DNA προερχόμενο από διαφορετικές αποικίες *12E₄*
Τα βέλη υποδεικνύουν τα αντίστοιχα μοριακά βάρη του μάρτυρα μοριακών βαρών.

520kb



210kb



Εικόνα 53 : Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης με *StyI/BamHI* του *pGEX-1N-35E₆*

Διαδρομή 1-4 : DNA προερχόμενο από διαφορετικές αποικίες του κλώνου *35E₆*

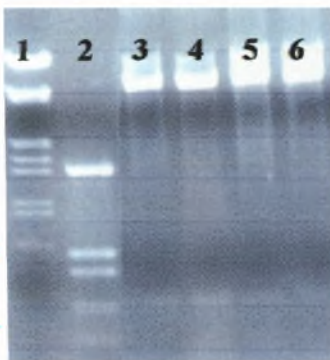
Διαδρομή 5: 750ng μάρτυρα μοριακών βαρών λ /*HindIII-EcoRI*.

Διαδρομή 6: 750ng μάρτυρα μοριακών βαρών *pUC18 /HinfI*.
Τα βέλη υποδεικνύουν τα αντίστοιχα μοριακά βάρη του μάρτυρα μοριακών βαρών.

400bp



210bp



Εικόνα 54 : Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης με *KpnI-BamHI* του *pGEX-1N-5A₂*

Διαδρομή 1: 750ng μάρτυρα μοριακών βαρών λ /*Hind III-EcoRI*

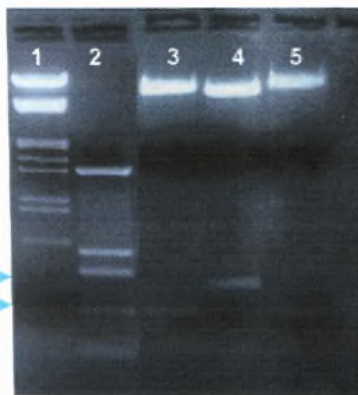
Διαδρομή 2: 750ng μάρτυρα μοριακών βαρών *pUC 18 /HinfI*

Διαδρομή 3-6 : DNA προερχόμενο από διαφορετικές αποικίες του κλώνου *5A₂*.
Τα βέλη υποδεικνύουν τα αντίστοιχα μοριακά βάρη του μάρτυρα μοριακών βαρών.

210kb



75kb



Εικόνα 55 : Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης με *KpnI-BamHI* του *pGEX-1N-43A₇*.

Διαδρομή 1: 750ng μάρτυρα μοριακών βαρών λ /*HindIII-EcoRI*

Διαδρομή 2: 750ng μάρτυρα μοριακών βαρών *pUC 18 /HinfI*

Διαδρομή 3 & 5 :DNA προερχόμενο από διαφορετικές αποικίες *43A₇*.

Διαδρομή 4: DNA προερχόμενο από διαφορετικές αποικίες *43A₇*.
Τα βέλη υποδεικνύουν τα αντίστοιχα μοριακά βάρη του μάρτυρα μοριακών βαρών.

400kb

210kb

Πίνακας 8 : Πίνακας αναφοράς του προσανατολισμού των κλωνοποιημένων λειών

Κλωνοποιημένες λείες	Επώαση με ενδονουκλεάση περιορισμού	Προϊόντα πέψης	Προσανατολισμός λείας
ρGEX-1N-2A₁	MscI	730bp & 4680bp	Επιθυμητός
		670bp & 4740bp	Ανεπιθύμητος
ρGEX-1N-12E₄	AfeI-EcoRI	360bp & 5100bp	Επιθυμητός
		150bp & 5310bp	Ανεπιθύμητος
ρGEX-1N-35E₆	StyI-BamHI	390bp & 5030bp	Επιθυμητός
		150bp & 5270bp	Ανεπιθύμητος
ρGEX-1N-5A₂	KpnI-BamHI	150bp & 5300bp	Επιθυμητός
		340bp & 5110bp	Ανεπιθύμητος
ρGEX-1N-43A₇	Kpn-BamHI	200bp & 5300bp	Επιθυμητός
		350bp & 5150bp	Ανεπιθύμητος

Γ.2.2.2. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΩΝ cDNA-ΛΕΙΩΝ - ΣΥΝΤΗΞΗ ΜΕ ΤΗΝ GST.

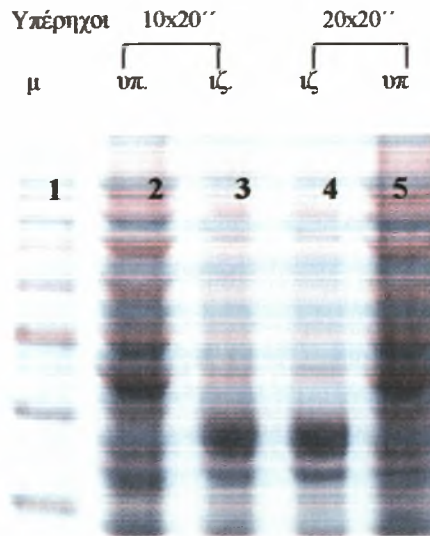
Γ.2.2.2.1. Έκφραση των πρωτεϊνών-λειών σε σύντηξη με την GST.

Μετά το τέλος των κλωνοποιήσεων έγινε έκφραση των προϊόντων των cDNA-λειών υπομορφή χμαιοικών πρωτεϊνών σε σύντηξη με την GST και ανίχνευση αυτών με ανοσοανίχνευση (Western Blotting). Οι πρωτεΐνες που επιλέχθηκαν να εκφραστούν με αυτή την μέθοδο είναι οι χμαιοικές πρωτεΐνες GST-5A₂ και η GST-28Δ₅. Επιλέχθηκε μία πρωτεΐνη άγνωστη (5A₂) από την κατηγορία των ισχυρών αλληλεπιδράσεων (>100mMAT) και η πρωτεΐνη ARA-55 (28Δ₅) από την μικρότερη κατηγορία (>10mMAT). Ο πλασμιδιακός φορέας στον οποίο είναι κλωνοποιημένα τα παραπάνω cDNA είναι οι pGEX-1N και pGEX-3X αντίστοιχα.

Καθορισμός παραμέτρων διάσπασης των βακτηριακών κυττάρων.

Προκειμένου να απομονωθεί μια βακτηριακά εκφρασμένη πρωτεΐνη, πρέπει μετά την επαγωγή της έκφρασης της από IPTG να διασπαστούν τα κύτταρα που τη περιέχουν. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε μία δοκιμαστική καλλιέργεια του στελέχους Top10 για τον καθορισμό των παραμέτρων διάσπασης των βακτηρίων. Δοκιμάστηκαν διαφορετικός αυξανόμενος αριθμός επαναλήψεων των υπερήχων και με διαφορετική διάρκεια. Οι συνθήκες που επιλέχθηκαν αναφέρονται στην παράγραφο Β.13. Από την εικόνα της πηκτής διαπιστώθηκε ότι α) στο ίζημα υπήρχαν περισσότερες πρωτεΐνες από ότι στο υπερκείμενο (γεγονός που σημαίνει ότι η ρήξη των κυτταρικών τοιχωμάτων δεν ήταν ικανοποιητική) και ότι β) δεν υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων που προέρχονταν από διαφορετικό αριθμό και ένταση υπερήχων. Αποφασίστηκε για αποτελεσματικότερη ρήξη των κυττάρων να εφαρμοστούν οι εξής τροποποιήσεις: α) μετά την συλλογή των κυττάρων τα δείγματα να επωάζονται για μία ώρα τουλάχιστον στους -20⁰C, έτσι τα κύτταρα γίνονται πιο εύθραυστα, β) να αυξήσουμε την συχνότητα των παλμών των υπερήχων και γ) συγχρόνως να συμπυκνώνονται με καθίζηση οι πρωτεΐνες των δειγμάτων.

Στο επόμενο πείραμα οι πρωτεΐνες κατακρημνίσθηκαν πρώτα με ακετόνη (Β. 16.) και ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση που έδειξε ότι η λύση των κυττάρων ήταν επιτυχής (εικόνα 56).



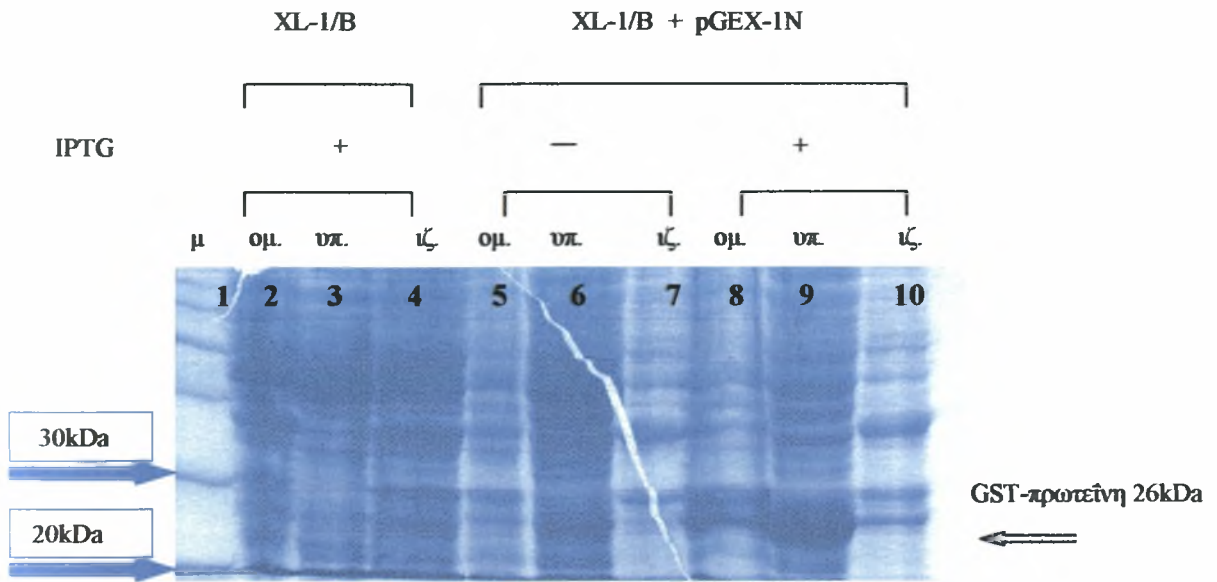
Εικόνα 56 : Ηλεκτροφόρηση βακτηριακών εκχυλισμάτων που κατακρημνίστηκαν με ακετόνη σε πηκτή SDS-page10%.

Όπου μ : πρωτεϊνικός μάρτυρας μοριακών βαρών 20-120 kDa (παράρτημα ΙΙΙ)
ομ : ομογενοποιημένο δ/μα κυττάρων, υπ. : υπερκείμενο, ιζ. : ίζημα.

Έκφραση των πρωτεϊνών GST-5A₂ και GST-28Δ₅.

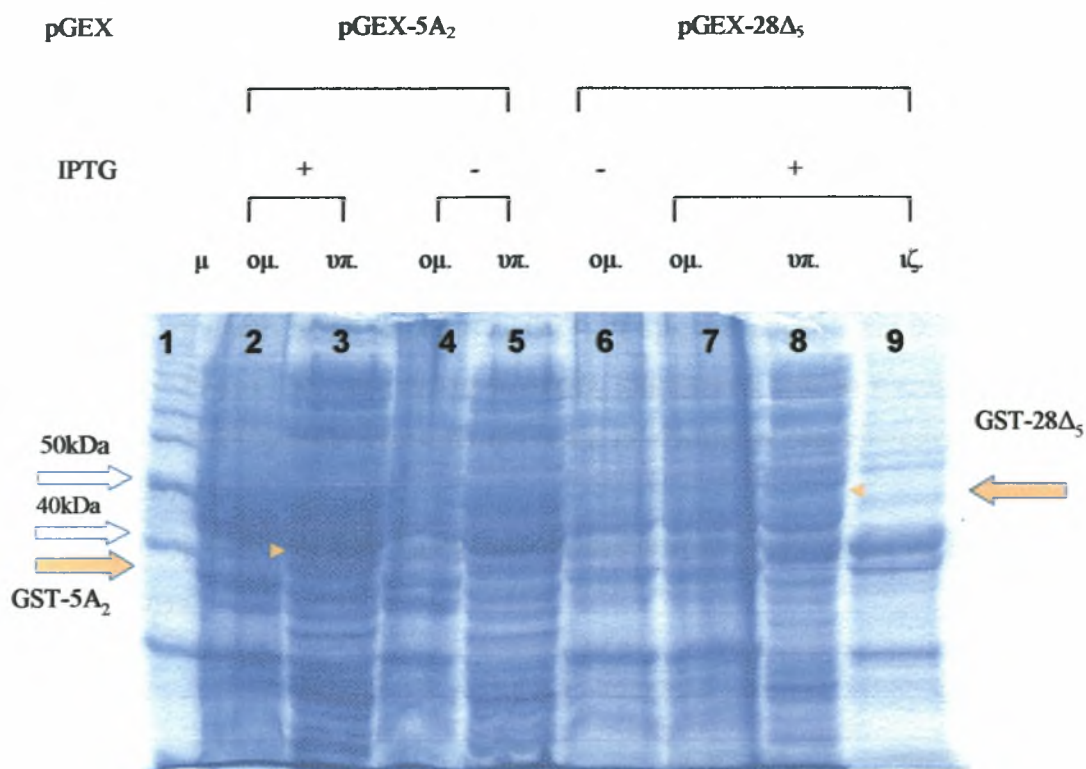
Αφού καθορίστηκαν οι παράμετροι λύσης των κυττάρων ελέγχθηκε η έκφραση των δύο προαναφερθέντων χμιαϊκών πρωτεϊνών. Οι καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν και επεξεργάστηκαν (B.14.) ήταν : α) κύτταρα XL-1/B χωρίς πλασμίδιο, β) κύτταρα XL-1/B με πλασμίδιο pGEX-1N, γ) κύτταρα XL-1/B με πλασμίδιο pGEX-1N-5A₂, δ) κύτταρα XL-1/B με πλασμίδιο pGEX-3X-28Δ₅. Κατά την διάρκεια της επεξεργασίας κρατήθηκαν και ηλεκτροφορήθηκαν δείγματα από διάφορα στάδια (πριν από τη προσθήκη IPTG, από το ομογενοποίημα των κυττάρων πριν από την φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο και το ίζημα της φυγοκέντρησης) τα οποία φαίνονται στις εικόνες 34 και 35. Οι πρωτεΐνες που θα παράγονταν από τα πλασμίδια φορείς θα είχαν μέγεθος : α) GST : 26kDa β) GST-5A₂ : 26+12,5 = 38,5 kDa γ) GST-28Δ₅ : 26+22 = 48 kDa (με βάση το μέγεθος των ενθεμάτων).

Όπως φαίνεται στην εικόνα 57 η πρωτεΐνη GST (26kDa) εκφράστηκε επιτυχώς και είναι διαλυτή. Αυτό συνάγεται από το γεγονός ότι εμφανίζεται μια ζώνη στο ύψος των 26kDa στην καλλιέργεια που περιέχει το πλασμίδιο pGEX-1N, μόνο όταν σε αυτήν έχει προστεθεί IPTG (διαδρομές 8 και 9) και αυτή είναι πολύ πιο έντονη στο υπερκείμενο (διαδρομή 9) από το ίζημα (διαδρομή 10) της καλλιέργειας.



Εικόνα 57 : 10μl από κάθε κλάσμα (όπως περιγράφεται στην εικόνα) ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή SDS-page 12,5%.
 Όπου μ : πρωτεϊνικός μάρτυρας μοριακών βαρών 20-120 kDa
 ομ.: ομογενοποιημένο δ/μα κυττάρων, υπ. : υπερκείμενο, ιζ. : ίζημα.
 Τα βέλη υποδεικνύουν τις ζώνες ενδιαφέροντος του πρωτεϊνικού μάρτυρα και την πρωτεΐνη GST.

Αντίστοιχα στην εικόνα 58 υπάρχουν ενδείξεις ότι οι πρωτεΐνες σύντηξης GST-5A₂ και η GST-28Δ₅ εκφράζονται και είναι πιθανόν διαλυτές. Αυτό συνάγεται από το γεγονός ότι εμφανίζονται α) μία ζώνη στο ύψος ~40kDa στην καλλιέργεια που περιέχει το πλασμίδιο pGEX-5A₂ μόνο όταν σε αυτήν έχει προστεθεί IPTG και αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη σύντηξης GST-5A₂ (διαδρομές 2, 3), και β) μία ζώνη στο ύψος ~48kDa στην καλλιέργεια που περιέχει το πλασμίδιο pGEX-28Δ₅ μόνο όταν σε αυτήν έχει προστεθεί IPTG και αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη σύντηξης GST-28Δ₅ και αυτή είναι πολύ πιο έντονη στο υπερκείμενο (διαδρομή 8) από το ίζημα (διαδρομή 9) της καλλιέργειας.



Εικόνα 58 : 10μl από κάθε κλάσμα (όπως περιγράφεται στην εικόνα) ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή SDS-page 10%.
 Όπου μ : πρωτεϊνικός μάρτυρας μοριακών βαρών 20-120 kDa,
 ομ.: ομογενοποιημένο δ/μα κυττάρων, υπ. : υπερκείμενο, ιζ. : ίζημα.
 Τα βέλη υποδεικνύουν τις πρωτεΐνες σύντηξης GST-28Δ₅ και GST-5A₂

Προκειμένου αυτό να επιβεβαιωθεί, ακολουθήθηκε η διαδικασία της ανοσοανίχνευσης των χμαιρικών πρωτεϊνών με αντίσωμα κατά της GST.

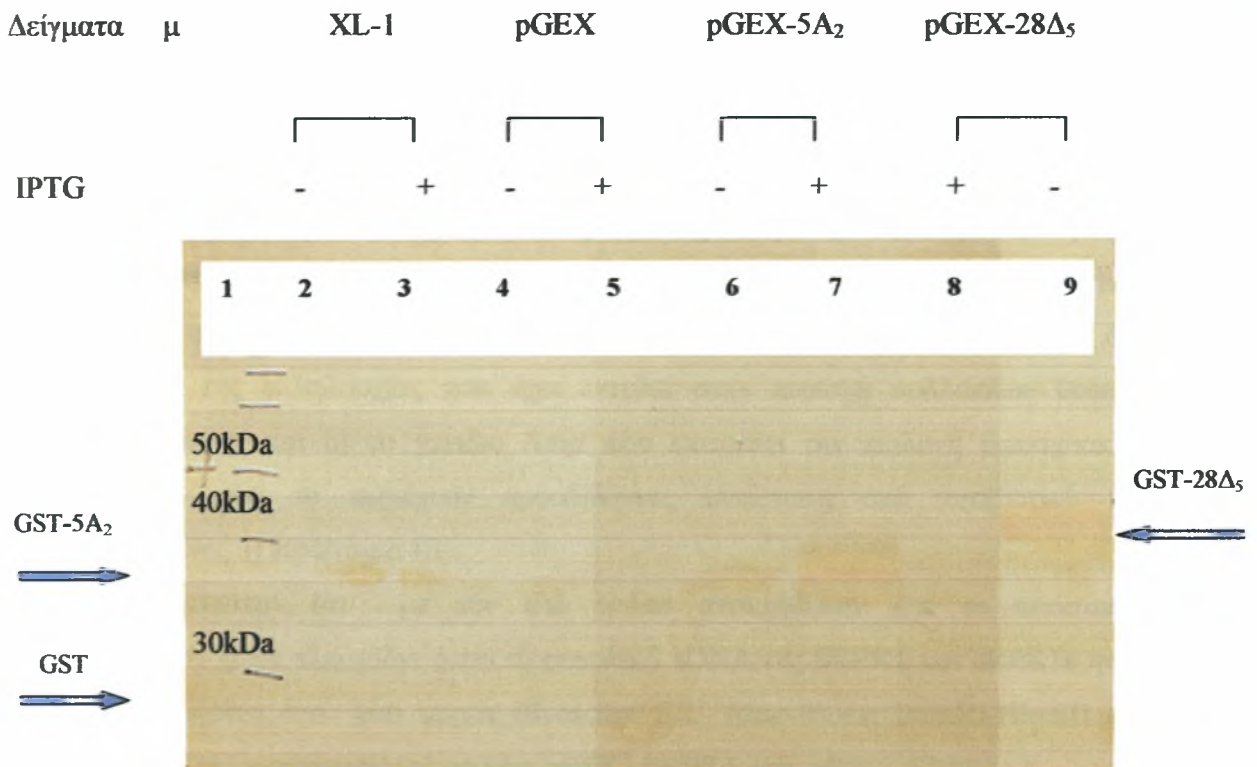
Ανοσοανίχνευση των χμαιρικών πρωτεϊνών GST-λειών.

Ακολουθήθηκε η διαδικασία που αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα . Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή 12,5% (B.14.). Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης έγινε η ηλεκτρομεταφορά της πηκτής σε μεμβράνη (B.15.1.). Η πιστότητα της μεταφοράς ελέγχθηκε με χρωματισμό της πηκτής με βαφή 0,2% Ponceau S (B.15.2.). Στην συνέχεια αφού κορέστηκε η μεμβράνη για να αποφευχθούν τυχόν μη εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις επώασθηκε πρώτα με το αντίσωμα κατσίκας κατά της GST αραιωμένο 1:1000 (B.15.3.) και ακολούθησαν

πλύσεις της μεμβράνης για να επωασθεί με το δεύτερο αντίσωμα αραιωμένο 1:1000. Στην συνέχεια ακολουθεί η χρωμοαντίδραση (B.15.3.).

Στην εικόνα 59 παρατηρείται : α) μία ζώνη στο ύψος των ~35-38 kDa η οποία είναι παρούσα σε όλα τα δείγματα γεγονός που υποδηλώνει μη ειδική σύνδεση του αντισώματος σε κάποια πρωτεΐνη του *E.coli*, β) στην διαδρομή 5 εμφανίζεται μία ζώνη ~26kDa η οποία αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη που παράγεται από το πλασμίδιο pGEX-1N παρουσία IPTG και είναι η GST, γ) στις διαδρομές 7 και 9 εμφανίζονται δύο ζώνες ~38 και ~45 αντίστοιχα οι οποίες παράγονται από τα πλασμίδια pGEX-5A₂ και pGEX-28Δ₅ μόνο παρουσία IPTG και αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες GST-5A₂ και GST-28Δ₅.

Άρα η έκφραση των χημικών πρωτεϊνών που επιλέξαμε να εκφράσουμε ήταν επιτυχής.



Εικόνα 59 : Western Blotting

Όπου μ : πρωτεϊνικός μάρτυρας μοριακών βαρών 20-120KDa,

Τα βέλη υποδεικνύουν τις πρωτεΐνες σύντηξης GST-28Δ₅ και GST-5A₂

Γ.2.2.3. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΡΑΔΙΟΣΗΜΑΣΜΕΝΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ SRPK1aNt

Εισαγωγή

Για να παρασκευαστεί το πρωτεϊνικό τμήμα της SRPK1aNt ραδιοσημασμένο (παράγραφος Γ.2.2.) προκειμένου να είναι ανιχνεύσιμο σε ένα πείραμα συγκατακρήμνισης με τις πρωτεΐνες σύντηξης GST-«λεία», χρειαζόταν το αντίστοιχο cDNA κλωνοποιημένο σε ένα φορέα από τον οποίο θα μπορούσε να παραχθεί το αντίστοιχο RNA με *in vitro* μεταγραφή και στην συνέχεια η αντίστοιχη πρωτεΐνη σε σύστημα πρωτεϊνοσύνθεσης. Ένα τέτοιο πλασμίδιο είχε ήδη παρασκευασθεί από το Εργαστήριο Βιοχημείας του Χημικού Τμήματος του Α.Π.Θ. όπου το τμήμα του cDNA που κωδικοποιεί για το τμήμα SRPK1aNt είχε κλωνοποιηθεί στις θέσεις BamHI και HindIII του φορέα Bluescript SK⁺ (πλασμίδιο pBSK⁺-SRPK1aNt) και το οποίο μας προσφέρθηκε από την κ. Νικολακάκη.

Ο φορέας pBluescript SK⁺ της εταιρείας Stratagene (2958 bp) περιέχει α) τις περιοχές fl origin και ColE1 origin, β) την αλληλουχία του γονιδίου lacZ που επιτρέπει την επιλογή των ανασυνδυασμένων κλώνων (μπλέ/άσπρες αποικίες σε κατάλληλο υπόστρωμα), γ) την περιοχή πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης (polylinker ή MCS) όπου υπάρχουν θέσεις αναγνώρισης πολλών ενδονουκλεασών περιορισμού και η οποία περιέχει εκατέρωθεν τις αλληλουχίες για τους προαγωγείς της T3 και T7 RNA πολυμεράσης με αποτέλεσμα να μπορεί κανείς να μεταγράψει *in vitro*, χρησιμοποιώντας τις αντίστοιχες RNA πολυμεράσες οποιαδήποτε από τις δύο αλυσίδες της αλληλουχίας που έχει εντεθεί στην περιοχή πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης και δ) το γονίδιο Amp^r που επιτρέπει την επιλογή βακτηριακών κυττάρων που το περιέχουν προσδίδοντας αντίσταση στο αντιβιοτικό της αμπικιλίνης (Παράρτημα III).

Σημειωτέον ότι με τον ίδιο τρόπο αποκτήθηκαν και τα αντίστοιχα ανασυνδυασμένα πλασμίδια όπου το συνολικό cDNA της SRPK1 και SRPK1a ήταν κλωνοποιημένα στον ίδιο φορέα Bluescript SK⁺ (στις θέσεις BamHI-HindIII και BamHI-KpnI αντίστοιχα) (πλασμίδια pBSK⁺-SRPK1 και pBSK⁺-SRPK1a).

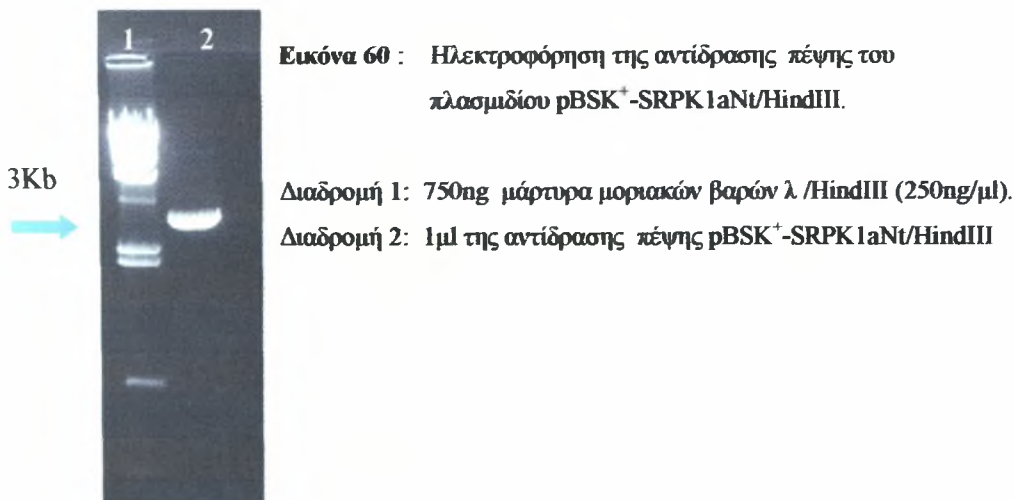
Γ.2.2.3.1.ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΤΟΥ DNA ΤΗΣ SRPK1aNt

Παρασκευή του RNA της SRPK1aNt *in vitro*

Προετοιμασία του DNA pBSK⁺-SRPK1aNt για εκμαγείο σε *in vitro* μεταγραφή.

Για να μεταγραφεί το DNA του ενθέματος SRPK1aNt έπρεπε πρώτα το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο να γίνει γραμμικό ώστε να μπορέσει η RNA πολυμεράση να αντιγράψει μόνο το κομμάτι το ενδιαφέροντος και να σταματήσει χωρίς να συνεχίσει την μεταγραφή για όλο το πλασμίδιο. Το τμήμα SRPK1aNt ήταν κλωνοποιημένο με προσανατολισμό BamHI-HindIII (5'-3') και είχε ανοδικά του τον εκκινητή της T3 RNA πολυμεράσης και καθοδικά του τον εκκινητή της T7 RNA πολυμεράσης. Επώασθηκε με το ένζυμο HindIII για να γίνει γραμμικό και χρησιμοποιήθηκε η T3 RNA πολυμεράση για την παραγωγή του νοηματικού RNA.

Το πλασμιδιακό DNA του pBSK⁺-SRPK1aNt παρασκευάστηκε (B.5.3.), χωρίς όμως την προσθήκη RNase προκειμένου να αποφευχθεί η αποικοδόμηση του παραγόμενου RNA από αυτήν κατά την επακόλουθη *in vitro* μεταγραφή. Ηλεκτροφορήθηκε 1μl από το δείγμα και ποσοτικοποιήθηκε εμπειρικά σε 150ng/μl (B.2.) (εικόνα 60).

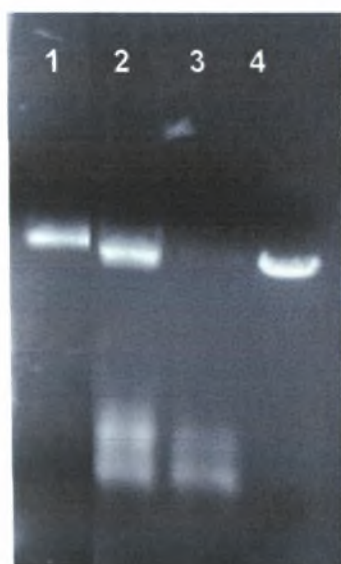


***In vitro* μεταγραφή του pBSK⁺-SRPK1aNt/HindIII.**

Στη συνέχεια έλαβε μέρος η μεταγραφή του γραμμικού DNA του pBSK⁺-SRPK1aNt/HindIII. Στην αντίδραση προστέθηκαν τα αντιδραστήρια όπως αναφέρονται στο πρωτόκολλο της παραγράφου B.20. και 300ng DNA pBSK⁺-

SRPK1aNt που επωάσθηκε μαζί με τα υπόλοιπα στους 37°C για 2 ώρες. Κατόπιν καθαρίστηκαν τα δείγματα από το DNA εκμαγείο που υπήρχε προσθέτοντας το ένζυμο RQ1-RNase (το οποίο έχει την ικανότητα να αποικοδομεί το DNA διατηρώντας το RNA ανέπαφο). Ακολούθησε η απομόνωση του RNA και η επαναδιάλυση του ιζήματος όπως αναφέρεται στο ίδιο πρωτόκολλο. Το μέγεθος του αναμενόμενου RNA ήταν ~550nt. Κατόπιν επωάσθηκαν τα δείγματα της αντίδρασης για 5 λεπτά στους 55°C και ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1% για επιβεβαίωση της δημιουργίας RNA και της αποικοδόμησης του DNA όπως φαίνεται στην εικόνα 61.

Συγκρίνοντας τις διαδρομές 4 και 2 παρατηρούμε ότι μετά την αντίδραση μεταγραφής εμφανίζεται μία διάχυτη ζώνη στην περιοχή των μικρών μοριακών βαρών (Σημειώνεται ότι μονόκλωνο RNA δεν μπορεί να συγκριθεί με τους μάρτυρες μοριακών βαρών DNA σε μία μη αποδιατακτική πηκτή). Με την προσθήκη της RQ1Dnase (διαδρομή 3) η ζώνη αυτή μένει ανέπαφη ενώ η ζώνη του εκμαγείου εξαφανίζεται (σύγκριση διαδρομών 1,3). Επιπλέον με την προσθήκη RNase A εξαφανίζεται η διάχυτη ζώνη χαμηλού μοριακού βάρους επιβεβαιώνοντας την παραγωγή RNA κατά την αντίδραση (σύγκριση διαδρομών 2,4). Συνάγεται από τα παραπάνω ότι στην αντίδραση μεταγραφής παρήχθει το RNA το οποίο είναι στα πλαίσια των μεγεθών που αναμένονται.



Εικόνα 61 : Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης μεταγραφής.

Διαδρομή 1 : 750ng εκμαγείο DNA της SRPK1aNt.

Διαδρομή 2 : 5μl αντίδρασης *in vitro* μεταγραφής του pBSK⁺-SRPK1aNt / HindIII.

Διαδρομή 3 : 5μl αντίδρασης *in vitro* μεταγραφής του pBSK⁺-SRPK1aNt / HindIII + 1μl RQ1Dnase.

Διαδρομή 4 : 5μl αντίδρασης *in vitro* μεταγραφής του pBSK⁺-SRPK1aNt / HindIII + 1μl RNase A.

Γ.2.2.3.2. ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΤΟΥ RNA SRPK1aNt ΣΕ ΠΡΩΤΕΪΝΗ *IN VITRO*.

Δεδομένου ότι παράχθηκε RNA SRPK1aNt, ένα μέρος του χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση της μετάφρασης για να συντεθεί η πρωτεΐνη του ενδιαφέροντος (B.21.). Χρησιμοποιήθηκε 1μg RNA για την αντίδραση μετάφρασης. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το RNA της λουσιφεράσης που περιέχεται από τον κατασκευαστή του συστήματος και μεταφράζεται σε πρωτεΐνη 60kDa. Στη συνέχεια η πηκτή αποξηράνθηκε για αυτοραδιογραφία. Από την εικόνα 62 συμπεραίνουμε ότι το RNA της λουσιφεράσης μεταφράστηκε στην ομώνυμη πρωτεΐνη (διαδρομή 3) η οποία και κινείται στο αναμενόμενο ύψος των 60kDa ενώ δεν ανιχνεύεται καμία πρωτεΐνη στη διαδρομή της αντίδρασης όπου χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο το RNA SRPK1aNt (διαδρομή 2).

Μετά από πολλές επαναλήψεις του πειράματος με αλλαγή κάποιων συστατικών (ραδιενέργεια, μεθειονίνη, αιμόλυμα δικτυοερυθροκυττάρων, κ.α.) και δεδομένου ότι σε όλες τις περιπτώσεις η μετάφραση του RNA ελέγχου ήταν επιτυχής, ανέκυψε η πιθανότητα το RNA το προερχόμενο από την μεταγραφή του pBSK⁺-SRPK1aNt να μην είναι κατάλληλο για σωστή μετάφραση. Αυτό μπορεί να προέκυπτε είτε λόγω ακαταλληλότητας της παρασκευής του RNA, είτε λόγω ακαταλληλότητας της δομής του ίδιου του RNA.



Εικόνα 62 : Αυτοραδιογραφία της αντίδρασης μεταγραφής.

Διαδρομή 1 : πρωτεϊνικός μάρτυρας μοριακών βαρών [Παράρτημα IV].

Διαδρομή 2 : αντίδραση μετάφρασης *in vitro* του RNA της SRPK1aNt.

Διαδρομή 3 : αντίδραση μετάφρασης *in vitro* του RNA της λουσιφεράσης (θετικός μάρτυρας).

Διαδρομή 4 : Δείγμα χωρίς DNA (αρνητικός μάρτυρας).

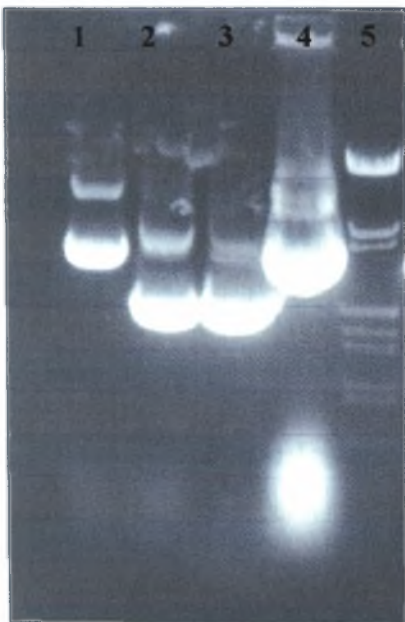
Γ.2.2.3.3. ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ - ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ *IN VITRO* ΤΩΝ SRPK1aNt (NEOY), SRPK1 ΚΑΙ SRPK1a

Για τον έλεγχο της πρώτης περίπτωσης επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί ένα άλλου τύπου σύστημα λύματος δικτυοερυθροκυττάρων, όπου η μεταγραφή και η μετάφραση γίνονται συγχρόνως στην ίδια αντίδραση και δεν είναι απαραίτητος ο πρότερος καθαρισμός του RNA.

Στο σύστημα αυτό χρησιμοποιήθηκαν (εκτός από το πλασμίδιο ελέγχου που περιέχει ο κατασκευαστής του συγκεκριμένου συστήματος) και τα πλασμίδια pBSK⁺-SRPK1 και pBSK⁺-SRPK1aNt.

Παρασκευή και προετοιμασία των DNA SK⁺-SRPK1, SK⁺-SRPK1a

Αφού παρασκευάστηκαν τα DNA των SK⁺-SRPK1, SK⁺-SRPK1a και του SK⁺SRPK1aNt (B.5.3.) και χωρίς όμως την προσθήκη RNase, τα πλασμίδια ηλεκτροφορήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν (εικόνα 63).



Εικόνα 63 : Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων DNA

Διαδρομή 1 : 10µl DNA SK⁺-SRPK1

Διαδρομή 2-3 : 10µl DNA SK⁺SRPK1aNt

(παρασκευές του ίδιου πλασμιδίου)

Διαδρομή 4 : 10µl DNA SK⁺-SRPK1a

Διαδρομή 5 : 750ng DNA μάρτυρα μοριακών βαρών λ/EcoRI-HindIII.

Μεταγραφή και μετάφραση των DNA SK⁺-SRPK1, SK⁺-SRPK1a και SK⁺-SRPK1aNt.

Οι αντιδράσεις μεταγραφής-μετάφρασης που έλαβαν χώρα ήταν πέντε : τρεις με τα εκμαγεία, μία έχοντας ως θετικό μάρτυρα το DNA της λουσιφεράσης και μία χωρίς DNA ως αρνητικός μάρτυρας. Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της παραγράφου Β.22. Τα DNA ήταν κυκλικά και όχι γραμμικά όπως τις προηγούμενες φορές γεγονός όμως που επιτρεπόταν από τον κατασκευαστή.

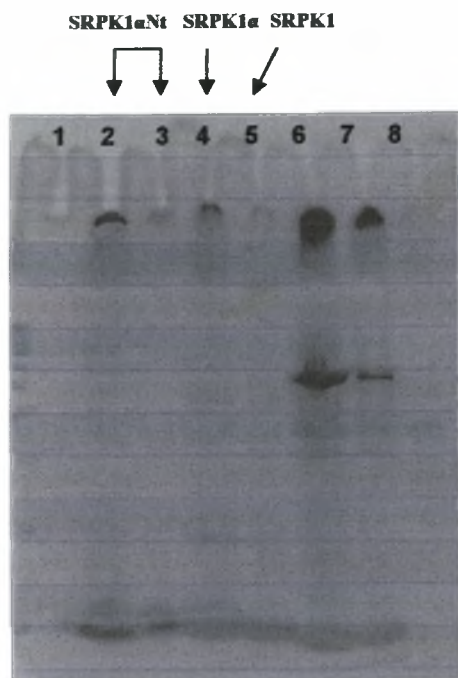
Μετά το τέλος των αντιδράσεων τα δείγματα αποδιατάχθηκαν και ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή 12% με πρωτεϊνικό μάρτυρα μοριακών βαρών 20-120 kDa (Παράρτημα IV) (Β.14.). Στη συνέχεια η πηκτή αφυδατώθηκε και εκτέθηκε για αυτοραδιογραφία.

Τα μοριακά βάρη των αναμενόμενων πρωτεϊνών ήταν : SRPK1 (72 kDa), SRPK1a (91 kDa), SRPK1aNt (528 bp μοριακού βάρους 19kDa) και η λουσιφεράση (60 kDa). Από την εικόνα 64 συνάγεται το γεγονός ότι η λουσιφεράση (θετικός μάρτυρας, διαδρομές 6-7) μεταφράστηκε, αλλά αντίθετα δεν ανιχνεύεται καμία ζώνη στο αναμενόμενο ύψος στις υπόλοιπες διαδρομές. Το πείραμα επαναλήφθηκε με τις ίδιες παραμέτρους αλλά τα αποτελέσματα ήταν τα ίδια.

Με την χρήση του συστήματος TNT όπου η μεταγραφή και η μετάφραση γίνονται ταυτόχρονα, αποκλείεται η περίπτωση να είναι υπεύθυνη η ποιότητα παρασκευής του RNA που χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για την μετάφραση.

Προκειμένου να ελεγχθεί η δεύτερη πιθανότητα (βλ. Μετάφραση RNA) δημιουργήθηκε καινούργια κατασκευή πλασμιδίου pBSK⁺-SRPK1aNt όπου ο σχεδιασμός του ολιγονουκλεοτιδίου που αποτελούσε τον εκκινητή για την δημιουργία του 5' άκρου του cDNA της SRPK1aNt περιείχε όλα τα απαραίτητα στοιχεία για την σωστή καθοδήγηση της μετάφρασης.

Το πλασμιδιακό προϊόν (pBSK⁺-SRPK1aNt 2) χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο σε καινούργιες αντιδράσεις μεταγραφής-μετάφρασης σε TNT αλλά δεν κατέστη δυνατόν να παραχθεί η επιδιωκόμενη ραδιενεργά επισημασμένη SRPK1aNt .



Εικόνα 64 : Ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων μεταγραφής-μετάφρασης.

Διαδρομή 1 : πρωτεϊνικός μάρτυρας μορ. βαρών 20-120kDa

Διαδρομή 2: 30 μl αντίδραση μεταγραφής & μετάφρασης *in vitro* του DNA του SK⁻-SRPK1αNt.

Διαδρομή 3 : 15 μl αντίδραση μεταγραφής & μετάφρασης *in vitro* του DNA του SK⁻-SRPK1αNt.

Διαδρομή 4 : 30 μl αντίδραση μεταγραφής & μετάφρασης *in vitro* του DNA του SK⁺-SRPK1α.

Διαδρομή 5 : 15 μl αντίδραση μεταγραφής & μετάφρασης *in vitro* του DNA του SK⁺-SRPK1α.

Διαδρομές 6-7 : αντίδραση μεταγραφής & μετάφρασης *in vitro* του DNA της λουσιφεράσης (θετικός μάρτυρας).

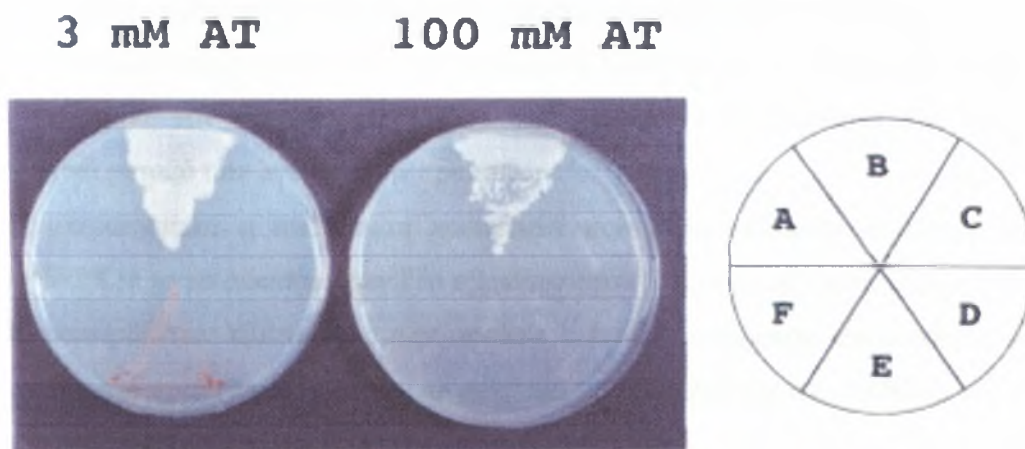
Διαδρομές 8 : Δείγμα χωρίς DNA (αρνητικός μάρτυρας).

Γ.2.3. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ SAFB1-SRPK1a ΣΕ

ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

Όπως περιγράφεται στην εισαγωγή του παρόντος κεφαλαίου (Γ.2.), παράλληλα με την μελέτη και περαιτέρω επιβεβαίωση των επιλεχθέντων κλώνων, επιλέχθηκε ένας με την μεγαλύτερη κατά την γνώμη μας λογική συνάφεια με την SRPK1a για να μελετηθεί άμεσα όσο αφορά την σχέση του με την κινάση.

Ο κλώνος που μελετήθηκε άμεσα ήταν ο 2A₁ που κωδικοποιεί για τη πρωτεΐνη SAFB, μια πρωτεΐνη της πυρηνικής μήτρας η οποία είναι πιθανόν να παίζει ρόλο στην διαθεσιμότητα της χρωματίνης μεταγραφικά. Θεωρήθηκε πολύ πιθανός ο λειτουργικός συσχετισμός του SAFB με την SRPK1a, δεδομένου ότι οι κινάσες SRPK1a και SRPK1 φωσφορυλιώνουν πρωτεΐνες που επίσης συμμετέχουν στην συμπύκνωση της χρωματίνης (LBR, πρωταμίνη P1, βλ. εισαγωγή και συζήτηση). Στην εικόνα 65 φαίνεται η επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης SAFB-1 με την SRPK1a στον S.c. (το στέλεχος που περιέχει τα δύο πλασμίδια είναι ανθεκτικό σε ποσότητες μέχρι και 100mMAT), αλλά και μια μικρή αλληλεπίδραση του SAFB με την SRPK1 (ανθεκτικότητα σε 3mMAT).



Εικόνα 65 : Η αμινοτελική περιοχή της SRPK1a αλληλεπιδρά με τον παράγοντα SAF-B στο S.c. Το στέλεχος S.c. pJ69-4A μετασηματίστηκε με τα πλασμίδια A) pGBT9-SRPK1aNt και pVP16, B) pGBT9-SRPK1aNt και pVP16-SAF-B, C) pGBT9 και pVP16-SAF-B, D) pGBT9-SRPK1 και pVP16, E) pGBT9-SRPK1 και pVP16-SAF-B, F) pGBT9 και pVP16. Τα τρυβλία έχουν ακριβώς την ίδια ακολουθία στελεχών και περιέχουν θρεπτικό υλικό Sc-Trp-Leu-Ade-His +3 mM AT (αριστερά) ή Sc-Trp-Leu-Ade-His + 100 mM AT (δεξιά).

Η διαδικασία επιβεβαίωσης της αλληλεπίδρασης *in vivo* και *in vitro* έγινε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Χημικού Τμήματος του Α.Π.Θ. όπου:

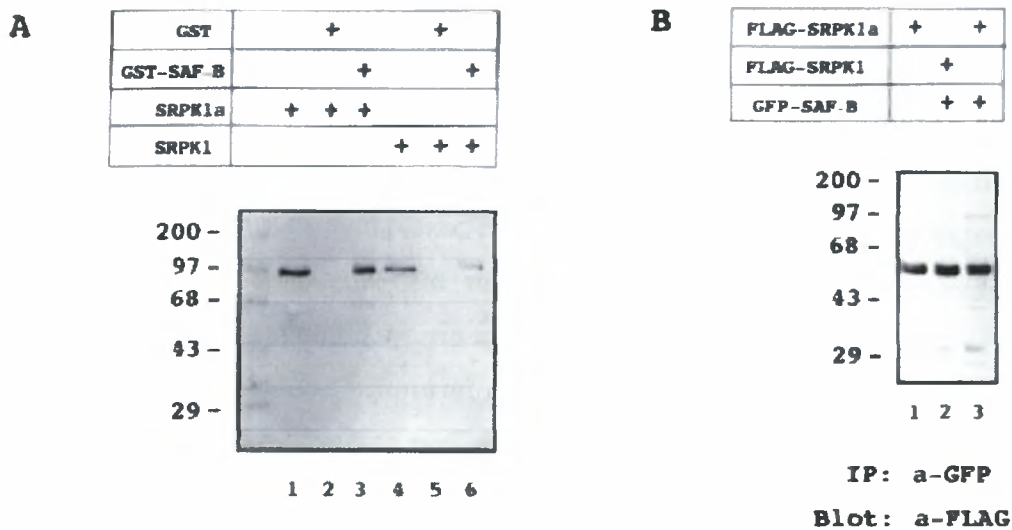
1) έγινε συν-ανοσοκατακρήμιση της SRPK1a με τον παράγοντα SAFB από κύτταρα 293T επιμολυσμένα με πλασμίδια που παράγουν τις δύο πρωτεΐνες. Συνοπτικά, κύτταρα 293T επιμολύνθηκαν συγχρόνως με πλασμίδια που παράγουν α) την SRPK1a (ή την SRPK1) σε σύντηξη με τον επίτοπο FLAG και β) τον παράγοντα SAFB σε σύντηξη με την GFP (Green Fluorescent Protein). Από τα εκχυλίσματα των κυττάρων ανοσοκατακρημνήστηκαν η πρωτεΐνη GFP-SAFB με αντίσωμα αντι-GFP προσκολλημένο σε σφαιρίδια πρωτεΐνης A και τα προϊόντα της ανοσοκατακρήμισης διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Στην συνέχεια έγινε ανίχνευση της παρουσίας των κινασών SRPK1a-FLAG και SRPK1-FLAG με αντίσωμα αντι-FLAG με ανοσοαποτύπωμα κατά Western και δείχτηκε ότι η SRPK1a συν-ανοσοκατακρημνίζεται όντως με τον παράγοντα SAFB. Σημειώνεται ότι βρέθηκαν και μικρές ποσότητες SRPK1 στα προϊόντα ανοσοκατακρήμισης υποδεικνύοντας ασθενή αλληλεπίδραση του SAFB με την SRPK1, όπως είχε προβλεφθεί από τις δοκιμασίες που έγιναν με το σύστημα των δύο υβριδίων (πίνακας 6 και εικόνα 66B)

2) αποδείχθηκε επιπλέον η *in vitro* αλληλεπίδραση των δυο πρωτεϊνών με την χρήση χημιαϊκής πρωτεΐνης GST-SAFB παραχθείσης σε *E.coli* και FLAG-SRPK1a παραχθείσης σε κύτταρα 293T (εικόνα 66A).

Η μοριακή αλληλεπίδραση που προέκυψε από το σύστημα δύο υβριδίων, παρόλο που το «δόλωμα» προερχόταν από την ανθρώπινη SRPK1a και η «λεία» (cDNA που κωδικοποιεί για τον παράγοντα SAFB) από ποντίκι επιβεβαιώθηκε ότι ισχύει φυσιολογικά μεταξύ των ανθρωπίνων πρωτεϊνών.

Συμπερασματικά η αναζήτηση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν ειδικά με την κινάση SRPK1a με το σύστημα των δύο υβριδίων στον *S.c.* κατέληξε στην επιλογή των 27 προαναφερθέντων κλώνων εκ των οποίων ο ένας τουλάχιστον αποδείχθηκε ότι κωδικοποιεί για πρωτεΐνη που πέραν αμφιβολίας αλληλεπιδρά με την SRPK1a και σε κύτταρα θηλαστικών.

Τα αποτελέσματα αυτά αποτέλεσαν το υλικό κοινής δημοσίευσης μεταξύ του Εργαστηρίου Βιοχημείας του Χημικού Τμήματος Α.Π.Θ. και του Εργαστηρίου Βιοχημείας του Ιατρικού Τμήματος του Π.Θ. (29) η οποία παρατίθεται στο τέλος αυτής της διατριβής.



Εικόνα 66 : Αλληλεπίδραση μεταξύ της SRPK1a και του παράγοντα SAF-B in vitro και σε κύτταρα θηλαστικών.

A. GST-SAF-B-PC ή GST μόνη της ως αρνητικός μάρτυρας, επωάσθησαν με κυτταρικά εκχυλίσματα από κύτταρα 293T που είχαν επιμολυνθεί με τον φορέα pCMV-2 που κωδικοποιεί για την FLAG-SRPK1a ή για την FLAG-SRPK1. Τα σύμπλοκα ανακτήθηκαν μετά από συνκατακρήμνιση από στήλη γλουταθειόνης σεφαρόζης και αναλύθηκαν σε 10% SDS-PAGE. Οι προσδεμένες SRPK1a και SRPK1 ανιχνεύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά Western χρησιμοποιώντας το μονοκλωνικό αντίσωμα M5 αντι-FLAG.

B. Κύτταρα 293T επιμολύνθηκαν με τα πλασμίδια που εκφράζουν την FLAG-SRPK1a ή την FLAG-SRPK1 και τον GFP-SAF-B-PC. Τα σύμπλοκα μεταξύ SAF-B και SRPKs ανοσοκατακρήμνιστηκαν με μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-GFP και αναλύθηκαν σε 10% SDS-PAGE. Οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε φίλτρα νιτροκυταρίνης και οι FLAG-SRPK1a, FLAG-SRPK1 ανιχνεύθηκαν με μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-FLAG. Καμία άμεση ανοσοκατακρήμνιση της FLAG-SRPK1a με το αντίσωμα αντι-FLAG δεν παρατηρήθηκε (στήλη 1).

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μέχρι πρόσφατα πιστευόταν ότι οι πρωτεΐνες αποτελούν μεμονωμένες οντότητες που βρίσκονται διάχυτες στο κυτταρόπλασμα και δρουν ανεξάρτητα από τις πρωτεΐνες που τις περιβάλλουν. Σήμερα γνωρίζουμε ότι αυτή η εικόνα είναι πολύ απλή για να εξηγηθούν οι περίπλοκες διεργασίες που χαρακτηρίζουν το φαινόμενο της ζωής. Αντίθετα, η πλειονότητα των κυτταρικών φαινομένων διεξάγεται από πρωτεϊνικές «μηχανές» ή συμπλέγματα που αποτελούνται από πολλές πρωτεΐνες μαζί. Η λειτουργία μιας πρωτεΐνης εξαρτάται από την φυσική της αλληλεπίδραση με άλλα μόρια. Οι βιολογικές διεργασίες που αποτελούν κινητήρια δύναμη της ροής των πληροφοριών μέσα στο κύτταρο και ελέγχουν τις αποφάσεις του κυττάρου, από την μετάδοση σήματος μέχρι την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου κυβερνώνται από τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Κοινή εστίαση του μοριακού και του κυτταρικού βιολόγου είναι η ταυτοποίηση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και η κατανόησή της σημασίας των διαφόρων αλληλεπιδράσεων αποτελεί «κλειδί» για την τρόπο λειτουργίας των βιολογικών συστημάτων.

Στην παρούσα εργασία διερευνώνται οι μοριακές αλληλεπιδράσεις μιας ισομορφής της ανθρώπινης κινάσης SRPK1 και στην συνέχεια μελετάται μια από αυτές. Η τεχνική που επιλέχθηκε για να χρησιμοποιηθεί σε αυτήν την μελέτη είναι το σύστημα των δύο υβριδίων σε κύτταρα του *Saccharomyces cerevisiae*. Όπως έχει αναφερθεί η SRPK1 ανήκει στη οικογένεια των SR κινασών διότι φωσφορυλιώνει σερίνες που βρίσκονται σε διπεπτίδια αργινίνης/σερίνης (μοτίβο RS). Παρ' ότι η δράση των κινασών SRPK έχει συνδεθεί στενά με τη δράση των παραγόντων SR και το μάτισμα του mRNA, έχουν περιγραφεί και υποστρώματά τους τα οποία δεν φαίνεται να έχουν άμεση σχέση με το μάτισμα προσδίδοντας έτσι μια πολυδιάστατη λειτουργικότητα στις SR κινάσες. Αυτά είναι πρωτεΐνες με περιοχές RS που όμως δεν ανήκουν στην κατηγορία των παραγόντων ματίσματος. Πρόκειται για τον υποδοχέα της λαμίνης B, την πρωταμίνη 1 (P1), την πρωτεΐνη P2P-R και την πυρηνική πρωτεΐνη του ιού της ηπατίτιδας (HBV core protein). Ο υποδοχέας της λαμίνης B αποτελεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης που πιστεύεται ότι έχει σημαντικό ρόλο στην συμπύκνωση της χρωματίνης και την γονιδιακή έκφραση. Η πρωταμίνη παίζει κι αυτή ρόλο στην συμπύκνωση της χρωματίνης, αντικαθιστώντας τις ιστόνες κατά την διάρκεια της σπερματογένεσης.

Όπως διαφαίνεται, οι SR κινάσες συμμετέχουν σε πληθώρα βασικών κυτταρικών λειτουργιών για πολλές από τις οποίες όμως ο ρόλος παραμένει ασαφής. Παρόλο που όλα τα γνωστά υποστρώματα των SR κινασών είναι πυρηνικά, αυτές εντοπίζονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα. Έχει αναφερθεί ότι η SRPK1 εκφράζεται κυρίως στους όρχεις όπου υπερεκφράζεται σε όλα τα ανώριμα σπερματικά κύτταρα εκτός των σπερματοζωαρίων. Η υψηλή έκφραση της SRPK1 στα πρώιμα στάδια της σπερματογένεσης μπορεί να οφείλεται στον πολύπλευρο ρόλο αυτής της κινάσης.

Η SRPK1a που πρόσφατα ανιχνεύθηκε, προέρχεται από εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου της SRPK1 και είναι μεγαλύτερη κατά 171 αμινοξέα από την SRPK1 στο N- τελικό άκρο. Ο βιολογικός ρόλος της SRPK1a, αν και αυτή παρουσιάζει ελάχιστες διαφορές στην ενζυμική δράση, στην εξειδίκευση, στην επίδραση στη ρύθμιση του ματίσματος και τον ενδοκυττάριο εντοπισμό από την SRPK1, παραμένει άγνωστος. Θεωρήσαμε ότι η διερεύνηση των μοριακών της αλληλεπιδράσεων θα βοηθήσει στην διαλεύκανση της λειτουργίας της και θα προσθέσει πολύτιμες πληροφορίες στην γνώση για την δράση των SR κινασών.

Επιλέξαμε το αμινοτελικό άκρο της (που την διαφοροποιεί από την SRPK1) ως δόλωμα στην μέθοδο των δύο υβριδίων και απομονώσαμε αρκετά μόρια που παρουσιάζουν αλληλεπίδραση με το συγκεκριμένο τμήμα της.

Η μέθοδος των δύο υβριδίων είναι μία τεχνική ειδική για την ανίχνευση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, που χρησιμοποιεί την πολύ καλά ανεπτυγμένη σε μοριακή βάση γενετική του Σακχαρομύκητα. Έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα για την ταυτοποίηση αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών τα τελευταία δέκα χρόνια με αξιοσημείωτα αποτελέσματα. Όπως φαίνεται από πληθώρα βιβλιογραφικών αναφορών πολύ μεγάλο μέρος γνωστών σήμερα αλληλεπιδράσεων έχει εντοπιστεί με αυτή τη μέθοδο της οποίας η αξία ως ανιχνευτικής μεθόδου πλέον δεν αμφισβητείται. Παρόλα αυτά τα αποτελέσματα της τεχνικής καταλήγουν σε ανίχνευση «αληθινών» αλλά και συχνά «ψευδών» λειών. Για παράδειγμα μία κατηγορία τέτοιων αλληλεπιδράσεων περιλαμβάνει πρωτεΐνες που δεν εκφράζονται την ίδια χρονική στιγμή αλλά ούτε και στο ίδιο κύτταρο. Επίσης τμήματα πρωτεϊνών μπορεί να παρουσιάσουν αλληλεπιδράσεις άσχετες με την μητρική πρωτεΐνη, γεγονός που αυξάνει την συχνότητα των «ψευδώς» θετικών αλληλεπιδράσεων.

Παρόλα τα «ψευδώς» θετικά αποτελέσματα που μπορούν να εμφανιστούν τεχνικά η μέθοδος έχει εξελιχθεί ώστε να μειώνεται όλο και πιο πολύ η πιθανότητα παρουσίας τους. Στην περίπτωση της παρούσης εργασίας χρησιμοποιήθηκαν

βελτιωμένοι πλασμιδιακοί φορείς, cDNA βιβλιοθήκη πλούσια σε πολυπλοκότητα και στέλεχος υποδοχέα που περιέχει τρία γονίδια αναφοράς (HIS3, ADE2, και LacZ) τα οποία ελέγχονται από τρεις διαφορετικούς προαγωγείς έτσι ώστε να ελαχιστοποιούνται τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα.

Συνοπτικά, ξεκινήσαμε με την κλωνοποίηση του δολώματος (N-τελική περιοχή της SRPK1α, 176 αμινοξέα) στον κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα. Αφού παρασκευάστηκε το πλασμίδιο-δόλωμα επιβεβαιώθηκε ότι αυτό δεν ενεργοποιεί την μεταγραφή των γονιδίων αναφοράς από μόνο του. Εφόσον διαπιστώθηκε η απουσία ενεργοποίησης των γονιδίων αναφοράς από το «δόλωμα» προχωρήσαμε στο δεύτερο βήμα το οποίο ήταν η παρασκευή DNA της βιβλιοθήκης και η τιτλοδότησή της. Ο έλεγχος της αποδοτικότητας του μετασχηματισμένου στελέχους pJ69-4A του *S.c.* με το πλασμίδιο «δόλωμα» pGBT9-SRPK1αNt και με την βιβλιοθήκη έγινε ώστε να καθοριστεί η ελάχιστη ποσότητα που θα χρησιμοποιηθεί αλλά συγχρόνως θα περιέχει όλα τα cDNA της βιβλιοθήκης.

Στην συνέχεια εφαρμόστηκε η μέθοδος των δύο υβριδίων όπου μετασχηματίστηκε το ήδη μετασχηματισμένο με το πλασμίδιο-δόλωμα στέλεχος *S.c.* με το πλασμιδιακό DNA της βιβλιοθήκης. Η επιλογή των κλώνων έγινε συνδυάζοντας τους φαινοτύπους έκφρασης των γονιδίων αναφοράς (το μπλε χρώμα σε X-gal, το κόκκινο χρώμα στην αδενίνη και τον βαθμό ανάπτυξης σε 3mM AT). Με τα κριτήρια αυτά επιλέξαμε 235 κλώνους για τους οποίους παρασκευάσαμε τα κυτταρικά εκχυλίσματά τους. Από αυτούς οι 86 κλώνοι μετασχημάτισαν βακτηριακά κύτταρα KC8 ενώ οι 149 κλώνοι βακτηριακά κύτταρα Top 10. Από αυτούς τους μετασχηματισμούς επιλέχθηκαν μέσω των βακτηριακών κυττάρων KC8 86 κλώνοι και μέσω του υβριδισμού σε βακτηριακά κύτταρα Top 10 ακόμη 80. Συγκεντρωτικά απομονώθηκαν 166 κλώνοι και αποθηκεύτηκαν. Στη συνέχεια επαληθεύσαμε τους φαινοτύπους για 86 απομονωθέντες κλώνους. Για να διερευνήσουμε την αξιοπιστία των κλώνων που απομονώθηκαν επιβεβαιώσαμε α) ότι τα πλασμίδια-λείες περιέχουν ένθεμα στην θέση NotI του πλασμιδίου pVP16, β) ότι προκαλούν έκφραση των γονιδίων αναφοράς όταν μετασχηματίσουν εκ νέου το στέλεχος pJ69-4A που εκφράζει το πλασμίδιο δόλωμα pGBT9-SRPK1αNt (έτσι θα επιβεβαιωνόταν ότι ο φαινότυπος των στελεχών που επιλέχθηκαν αρχικά και από τα οποία απομονώθηκαν τα πλασμίδια-λείες, δεν οφειλόταν σε φαινόμενα άλλα από την συνύπαρξη του πλασμιδίων-λείας και του πλασμιδίου-δολώματος), γ) ότι δεν προκαλούν την έκφραση των γονιδίων αναφοράς όταν μετασχηματίσουν το ίδιο στέλεχος χωρίς την

παρουσία δολώματος (transactivation) (έτσι θα αποκλειόταν η περίπτωση η πρωτεΐνη που παράγεται από τα πλασμίδια-λεία να επάγει την έκφραση των γονιδίων αναφοράς ανεξάρτητα από την παρουσία του δολώματος και άρα τελικά να μην σχετίζεται με την πρωτεΐνη «δόλωμα»), δ) ότι δεν είναι ικανά να ενεργοποιήσουν τα γονίδια αναφοράς παρουσία πλασμιδίου-δολώματος το οποίο περιέχει την αλληλουχία του cDNA της SRPK1, του τμήματος εκείνου δηλαδή που είναι κοινό μεταξύ SRPK1 και SRPK1a (θα καθοριζόταν έτσι το μέγεθος της εξειδίκευσης των αλληλεπιδράσεων των προϊόντων των πλασμιδίων-λειών με το αμινοτελικό -ειδικό για την SRPK1a-τμήμα της SRPK1a).

Έτσι, για τα 75 από τα 86 πλασμίδια-λείες για τα οποία επιβεβαιώθηκε ότι περιέχουν ένθεμα (κριτήριο α)(βλ. Πίνακας 5, Αποτελέσματα) αποδείχθηκε ότι τα 67 επιβεβαιώνουν τον φαινότυπο με τον οποίο επιλέχθηκαν όταν επανεισαχθούν στο πατρικό στέλεχος (κριτήριο β) και ο φαινότυπος αυτός εξαρτάται από το πλασμίδιο-«δόλωμα» (κριτήριο γ). Τέλος, μόνο 4 πλασμίδια-λείες παρουσίασαν αλληλεπίδραση και με την SRPK1 αλλά και αυτή ιδιαίτερα ασθενή (βλ. Πίνακας 6, Αποτελέσματα).

Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα της διερεύνησης της αξιοπιστίας των επιλεγμένων κλώνων επιβεβαιώνουν ότι οι αλληλεπιδράσεις που παρατηρήθηκαν συμβαίνουν στην πραγματικότητα μέσα στα κύτταρα του σακχαρομύκητα και επίσης αποτελούν εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις της SRPK1a αφού δεν συμβαίνουν με την SRPK1. Είναι προφανές ότι η πρόσθετη αλληλουχία των 171 αμινοξέων προσδίδει στην SRPK1a μια επιφάνεια διεπαφής με πληθώρα άλλων πρωτεϊνών (όπως φαίνεται από τα αποτελέσματά μας) η αλληλεπίδραση με κάποιες από τις οποίες πιθανόν να της προσδίδει τα χαρακτηριστικά που τη διαφοροποιούν από την SRPK1.

Στην συνέχεια έγινε η ανάγνωση των αλληλουχιών των ενθεμάτων των 67 κλώνων με τη μέθοδο Sanger. Από τις λείες, πολλές εμφανίστηκαν πολλαπλές φορές με αποτέλεσμα οι αλληλουχίες των 67 κλώνων να καταλήξουν να είναι ταυτόσημες με 26 πρωτεΐνες. Το γεγονός ότι πολλές λείες αντιπροσωπεύονται πολλαπλώς και με διαφορετικούς (αλληλοεπικαλυπτόμενους) μεταξύ τους κλώνους, επιβεβαιώνει την ακρίβεια και επαναληψιμότητα της μεθόδου.

Από τα αποτελέσματα της εύρεσης των αλληλουχιών που αναφέρθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο (βλ αποτελέσματα, πίνακας 7) μπορούμε να κάνουμε κάποιες γενικές παρατηρήσεις και κάποιες πιο ειδικές όσο αφορά α) την δομή των πρωτεϊνών που ανιχνεύθηκαν β) την ιστοειδική έκφραση τους και γ) τον λειτουργικό τους ρόλο.

Γενικές παρατηρήσεις

A) Δομή

Παρατηρώντας την δομή των πρωτεϊνών που ανιχνεύθηκαν ως αλληλεπιδρούσες με το N-τελικό άκρο της SRPK1a φάνηκε ότι αυτές δεν έχουν κάποια κοινά δομικά στοιχεία μεταξύ τους βάσει των οποίων να μπορούν να ομαδοποιηθούν. Επίσης καμία πρωτεΐνη από αυτές δεν περιέχει περιοχές RS παρόλο που θα αναμέναμε κάποιες από αυτές να είναι υποστρώματά της. Αν και η αμινοτελική περιοχή η οποία αποτέλεσε το «δόλωμα» δεν συμμετέχει στην δημιουργία του καταλυτικού κέντρου της κινάσης θα αναμενόταν οι αλληλεπιδράσεις της με άλλα μόρια πιθανόν να εξυπηρετούν την προσέγγισή τους στο κέντρο της κινάσης ώστε να επέλθει η φωσφορυλίωσή τους. Το φαινόμενο αυτό (της έλλειψης της περιοχής RS στις πρωτεΐνες-λείες) μπορεί να ερμηνευθεί με δύο τρόπους: α) μπορεί να είναι τυχαίο (αλλά στατιστικά απίθανο) διότι έγινε ανάγνωση και ταυτοποίηση μόνο των 67 αλληλουχιών και όχι όλων, γεγονός που δεν αποκλείει όλες τις πιθανότητες για ανίχνευση περιοχής RS στις «λείες», β) μπορεί η αμινοτελική περιοχή να είναι υπεύθυνη για διαφορετικής φύσης αλληλεπιδράσεις που πιθανόν να έχουν σχέση με κυτταρικό εντοπισμό ή στρατολόγηση πρωτεϊνών σε σύμπλοκο, ή και με άλλες διαδικασίες. Το ότι η SRPK1a αλληλεπιδρά εξειδικευμένα με αρκετές κυτταρικές πρωτεΐνες που δεν περιέχουν περιοχές RS αποτελεί πρόκληση για την διερεύνηση του ρόλου αυτού της αλληλεπίδρασης.

Οι πρωτεΐνες «λείες» που προέκυψαν αποτελούνται δομικά από διαφόρων ειδών περιοχές από τις οποίες μερικές είναι υπεύθυνες για πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις και δημιουργία συμπλόκων όπως η περιοχή PDZ που υπάρχει DLG5 και στην Amotl2 και η περιοχή TPR (Tetratricopeptide repeat) που περιέχεται στην «λεία» OGT (145). Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι «λείες» που τυχόν αλληλεπιδρούν άμεσα με την SRPK1a μπορούν συγχρόνως να αλληλεπιδρούν και με άλλες πρωτεΐνες (διαμέσω άλλων περιοχών τους σχηματίζοντας σύμπλοκο) με τις οποίες μπορεί να συνδέεται και η SRPK1a ή όχι.

Άλλωστε, όπως αναφέρθηκε ήδη (βλ. εισαγωγή) η περιοχή του N-τελικού άκρου της SRPK1a είναι ιδιαίτερα πλούσια σε προλίνες, δημιουργώντας επιφάνειες ιδιαίτερα ευνοϊκές για αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών-πρωτεϊνών (42). Έχει αναφερθεί ότι μία περιοχή πλούσια σε προλίνες όπως το «δόλωμα» που χρησιμοποιήθηκε είναι ευνοϊκή για αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (42). Η προλίνη είναι το μοναδικό αμινοξύ που έχει την πλευρική αλυσίδα κυκλοποιημένη πάνω στο άτομο

του αζώτου και αποτελεί ένα κρίσιμο αμινοξύ διότι έχει τις ιδιότητες να επάγει β-πτυχώσεις και να εισάγει κλίσεις σε διαμεμβρανικές έλικες, ώστε οι πρωτεΐνες να αλλάζουν διαμορφώσεις. Σαν αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες πλούσιες σε προλίνη εμφανίζουν συχνά PP II έλικα που παρουσιάζει μια υδροφοβική επιφάνεια, όσο και μια καλή θέση δεσμού υδρογόνου. Αυτό σημαίνει ότι οι προλίνες είναι δομικά περιορισμένες αλλά και ηλεκτρονικά πλούσιες και έτσι έχουν καλύτερη θέση για να αλληλεπιδράσουν με άλλες πρωτεϊνικές περιοχές (42, 163).

Όπως αναφέρθηκε και προηγούμενα ο αριθμός των πρωτεϊνικών δομικών περιοχών που έχουν περιγραφεί να αλληλεπιδρούν με περιοχές πλούσιες σε προλίνη γίνεται όλο και μαγαλύτερος. Οι κυριότερες και πιο καλά μελετημένες είναι οι περιοχές WW και SH3, καθώς και τα σύμπλοκά τους με περιοχές πλούσιες σε προλίνη.

Οι WW περιοχές αποτελούνται από 38-40 αμινοξέα και η ονομασία τους προκύπτει από δύο συντηρημένες τρυπτοφάνες (W) που απέχουν 20-22 αμινοξέα και παίζουν ρόλο στη δομή και λειτουργία της περιοχής (164). Με τα παραπάνω δεδομένα συμβαδίζει το γεγονός ότι ανάμεσα στις «λείες» μας βρέθηκε μία πρωτεΐνη με περιοχή WW (η λιγάση της ουβικιτίνης) και της οποίας η περιοχή αλληλεπίδρασης με την SRPK1a (337-520 αμινοξέα) εμπεριέχει σχεδόν τις τρεις περιοχές WW από τις τέσσερις που περιέχει (293-318, 325-350, 405-430, 445-470 αμινοξέα).

Οι SH3 περιοχές είναι μήκους 50-70 αμινοξέων και συχνά περιέχονται σε ευκαρυωτικές πρωτεΐνες μεταβίβασης μηνυμάτων ή κυτταροσκελετικές. Πειράματα κατέδειξαν ότι οι περιοχές SH3 αναγνωρίζουν αλληλουχίες πλούσιες σε προλίνη που περιέχουν την αλληλουχία PxxP (165, 166). Η SRPK1a περιέχει το μοτίβο PxxP 7 φορές και επίσης παρατηρείται να προηγούνται των προλινών σερίνες ή θρεονίνες (βλ.εισαγωγή, εικόνα 6). Παρόλα αυτά καμία από τις περιοχές που βρέθηκαν να αλληλεπιδρούν με το αμινοτελικό άκρο της SRPK1a δεν περιέχει περιοχές SH3.

B) Ιστοειδική έκφραση

Όσον αφορά την ιστοειδική έκφραση των λειών παρατηρήθηκε ότι έχουν ανιχνευθεί 1) σε εμβρυικούς ιστούς, οι ZFp 592, η Oxa11 και η Pkm2, 2) στα αγγεία, η Atp1l 2, 3) στους πνεύμονες η Oxa11, 4) στον εγκέφαλο η ELAV-like protein 4, 5) στο πάγκρεας η Oxa11 και 6) αρκετές από αυτές έχουν ανιχνευθεί κυρίως στους όρχεις όπου εντοπίζεται κυρίως και η SRPK1a. Αυτές είναι i) η

πρωτεΐνη Stox2, ii) η κινάση του πυροσταφυλικού Pkm2, iii) η πρωτεΐνη ELAV-like protein 4 και iv) η πρωτεΐνη ARA 55.

Όσον αφορά τον ενδοκυττάριο εντοπισμό τους επίσης παρατηρήθηκε ποικιλομορφία. Οι δεκατρείς από αυτές εντοπίστηκαν στον πυρήνα (SAF-B, Zfp-592, Kctd13, p53, Tacc2, hnRNP-C1/C2, Mll 2, Itchy E3, Hic-5, Ogt, HnRNP1, λαμίνη B, Ogfr) άλλες έξι στο κυτταρόπλασμα (Dlg5, p53, Itchy E3, Ogt, MAGE-D1, Hbp-44), επτά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (Dlg5, Hic-5, Mbp1, Har-1, MAGE-D1, Hbp-44, Smo) δύο στα μιτοχόνδρια (Oxal1, Ogt) και άλλες δύο εκκρινόμενες στο ενδιάμεσο περιβάλλον που υπάρχει μεταξύ των κυττάρων (extracellular matrix) (Mbp 1, β-λαμίνη). Μερικές από αυτές εντοπίζονται σε παραπάνω από ένα διαμερίσματα του κυττάρου.

Γ) Λειτουργία

Από πλευράς λειτουργικού ρόλου των «λειών» παρατηρήθηκε ότι πολλές έχουν σχέση με την μεταγραφή (μεταγραφικοί παράγοντες, συν ενεργοποιητές ή συν-καταστολείς μεταγραφικών παραγόντων, προϊόντα ογκοκατασταλτικών γονιδίων), άλλες επηρεάζουν άμεσα ή έμμεσα τη διαμόρφωση της χρωματίνης, άλλες συμμετέχουν στο μάτισμα και άλλες στην μεταφορά και ωρίμανση του mRNA.

Ειδικές παρατηρήσεις

Παρακάτω παρατίθενται οι λείες χωρισμένες σε κατηγορίες βάσει της λειτουργίας τους ξεκινώντας από την μεγαλύτερη ομάδα σε αριθμό μελών. Μερικές από τις λείες εμφανίζονται σε παραπάνω από μία κατηγορίες λόγω του πολύπλευρου ρόλου τους (π.χ. SAFB, hnRNP C1/C2, Hic 5, p53).

Λείες σχετιζόμενες με τη μεταγραφή

Οι κλώνοι 2A₁, 4A₂, 8E₃, 21H₅, 12E₄, 28Δ₅, που ταυτοποιήθηκαν ως SAF-B, Zfp-592, Mll2, Zfp-469, p53, Hic-5 ή ARA55 αντίστοιχα, αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες και εντοπίζονται στον πυρήνα. Οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι πρωτεΐνες που απαιτούνται για την αναγνώριση ορισμένων αλληλουχιών στους υποκινητές των γονιδίων. Μερικοί διεγείρουν την μεταγραφή από την πολυμεράση II του RNA όταν ενώνονται σε προαγωγείς ή ενισχυτές της μεταγραφής.

Ο παράγοντας SAF-B (SAFB) έχει απομονωθεί ως πρωτεΐνη της πυρηνικής μήτρας και προσδέεται στις περιοχές S/MAR. Επίσης εμπλέκεται και σε άλλες

λειτουργίες όπως το ότι έχει περιγραφεί ως μεταγραφικός παράγοντας, ως συστατικό των hnRNP's (167) και ως συν-καταστολέας του υποδοχέα των οιστρογόνων (ER) (168). (Περισσότερες πληροφορίες δίνονται παρακάτω).

Οι λείες Zfp-592, Mll2 και η Zfp 469 περιέχουν δακτύλους ψευδαργύρου για αυτό προβλέπεται ότι προσδέονται στο DNA και προτείνονται ως μεταγραφικοί παράγοντες.

Η πρωτεΐνη p53 όπως οι περισσότεροι μεταγραφικοί παράγοντες προσδέεται στο DNA και ενεργοποιεί την μεταγραφή πολλών γονιδίων. Επίσης επηρεάζει την μεταγραφή πολλών γονιδίων έμμεσα αλληλεπιδρώντας με πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην γονιδιακή ρύθμιση. Επίσης εμπλέκεται σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες όπως η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η διαφοροποίηση των κυττάρων, η απόπτωση και η καταστολή όγκων αλληλεπιδρώντας με πολλές κυτταρικές πρωτεΐνες. Το γονίδιο *p53* «αντιλαμβάνεται» και απαντά σε βλάβες του DNA επιτυγχάνοντας συσσώρευση της πρωτεΐνης p53 με μετα-μεταγραφικούς μηχανισμούς. Ακόμη αναφέρθηκε ότι αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα των οιστρογόνων ERα (169) και καταστέλλει την δράση του όπως ο SAFB (168) (εικόνα 67B).

Η λεία Hic-5 ή ARA55 ανιχνεύθηκε στον πυρήνα να αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα των ανδρογόνων (AR) γι' αυτό και χαρακτηρίστηκε σαν συν-ενεργοποιητής του επειδή επάγει την μεταγραφική του δραστηριότητα (143).

Το γεγονός της αλληλεπίδρασης της SRPK1a με μεταγραφικούς παράγοντες θα μπορούσε να ήταν αναμενόμενο διότι η μέχρι τώρα γνωστή λειτουργία της SRPK1 είναι η φωσφορυλίωση των παραγόντων ματίσματος που επιφέρει μεταβολές στο μάτισμα του RNA αλλά και στην μεταγραφή με την οποία αυτό συζεύγνυται. Η φωσφορυλίωση και αποφωσφορυλίωση των παραγόντων ματίσματος είναι σημαντική για την αλληλεπίδραση τους με την καρβοξυτελική περιοχή της πολυμεράσης (CTD) και αποτελεί κρίσιμο μηχανισμό για την λειτουργία της στην διαδικασία της μεταγραφής (βλ. εισαγωγή).

Λείες σχετιζόμενες με τη διαμόρφωση της χρωματίνης

Οι κλώνοι 13Θ₄, 7Γ₂, 37H₆, 2A₁, που ταυτοποιήθηκαν ως λαμίνη B, SAF-B, hnRNP C1/C2 και η τρανσφεράση της N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνης (Ogt) αντίστοιχα έχουν άμεση ή έμμεση σχέση με την συμύκνωση της χρωματίνης.

Η λαμίνη B αποτελεί συστατικό του πυρηνικού ελάσματος (λάμινας), βρίσκεται στο πυρηνόπλασμα κάτω από την εσωτερική πυρηνική μεμβράνη όπου παρέχει ένα δίκτυο στήριξης για τον πυρηνικό φάκελο αλλά αλληλεπιδρά και με την χρωματίνη. Οι λαμίνες A, B, C αλληλεπιδρούν με τις περιοχές S/MAR (170). Όπως έχει αναφερθεί, ο υποδοχέας της λαμίνης B αποτελεί ακόμη ένα υπόστρωμα της SRPK1 κινάσης. Το γεγονός όμως πως η φωσφορυλίωση του LBR από την SRPK1 ή SRPK1a αυξάνει την ικανότητα δέσμευσης του LBR στην χρωματίνη καταδεικνύει τον σημαντικό ρόλο της φωσφορυλίωσής του στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ λάμινας και χρωματίνης (109-110). Επομένως η φωσφορυλίωσή του από την SRPK1 ρυθμίζει ή και διατηρεί τις αλληλεπιδράσεις του με την χρωματίνη (171). Η αλληλεπίδραση της SRPK1a με την λαμίνη B μπορεί να συμβαίνει πριν από την φωσφορυλίωσή του LBR και πιθανόν μέσω αυτής της αλληλεπίδρασης να προσεγγίζει τον LBR και έτσι τον φωσφορυλιώνει, ή δευτερευόντως μετά από αυτήν διότι φωσφορυλιώνοντάς τον αυτός προσδένεται στην λαμίνη B και έτσι η SRPK1a αλληλεπιδρά μαζί της. Για την εύρεση του ρόλου στο συγκεκριμένο σύμπλοκο χρειάζεται να γίνουν περαιτέρω πειράματα.

Η λεία hnRNP C1/C2 ανήκει στην οικογένεια των hnRNP's (ετερογενείς πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες). Οι ριβονουκλεοπρωτεΐνες είναι γνωστό ότι λαμβάνουν μέρος στην ωρίμανση και στην μεταφορά του RNA αλλά συμμετέχουν και σε άλλες διαδικασίες.

Συγκεκριμένα για την πρωτεΐνη hnRNP C1/C2 έχει δειχθεί σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης να βρίσκεται σε σύμπλοκο με την τοποϊσομεράση IIa, την SRPK1 και με ακόμη τέσσερις πρωτεΐνες. Από αυτές οι δύο είναι ATPάσες /ελικάσες [RNA helicase A (RHA), και η RHII/Gu], η μία είναι HMG πρωτεΐνη (SSRP1) και η άλλη είναι παράγοντας ματίσματος pre-mRNA (PRP8) (125). Έχει προταθεί ότι η hnRNP C1/C2 εμπλέκεται στην επαναδιαμόρφωση της χρωματίνης διότι αποτελεί ένα μέρος του συμπλόκου LARC (Locus control regions associated remodeling complex) το οποίο ενώνεται με συγκεκριμένη ακολουθία του DNA και ανακατασκευάζει τα νουκλεοσώματα (137). Έχει προταθεί επίσης ότι η hnRNP C1/C2 εμπλέκεται και στην ρύθμιση του μήκους των τελομερών διότι συνδέεται με την τελομεράση (138). Επίσης βρέθηκε ότι η φωσφορυλίωσή της hnRNP C1/C2 από την κινάση της καζεΐνης I (CK1) ρυθμίζει την πρόσδεση της στο mRNA (172). Το γεγονός ότι η hnRNP C1/C2 έχει ήδη βρεθεί να συνανοσοκατακρημνίζεται με την SRPK1 ενισχύει την αξιοπιστία της μεθόδου και επιβεβαιώνει την ποιότητα των πειραμάτων και την

άποψη της αληθινής αλληλεπίδρασής τους. Ακόμη το γεγονός ότι η hnRNP C1/C2 φωσφορυλιώνεται από την CK1 είναι ενισχυτικό της άποψης ότι η αλληλεπίδρασή του με την SRPK1a δεν έχει σχέση με τον ρόλο της ως κινάση αλλά εξυπηρετεί κάποιον άλλο ρόλο της που έχει σχέση με την διαμόρφωση του DNA αφού η τοποϊσομεράση II που βρίσκεται στο ίδιο σύμπλοκο λειτουργεί ως ρυθμιστής της δομής των χρωμοσωμάτων αλλά και της διαμόρφωσής τους. Τελικά παρόλο που η hnRNP C1/C2 αποτελεί μία πρωτεΐνη hnRNP και συσχετίζεται με τον μηχανισμό του μάτισματος έχει σχέση και με την συμπύκνωση της χρωματίνης.

Η τρανσφεράση της N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνης αποτελεί ένα ένζυμο το οποίο προσθέτει την N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνη σε πεπτίδια μέσω ενός O-γλυκοσιδικού δεσμού με το υδροξύλιο της σερίνης ή θρεονίνης. Εκ πρώτης όψεως μπορεί να θεωρηθεί άσχετη η αλληλεπίδρασή της με την SRPK1a αλλά πιθανόν και όχι διότι πρόσφατα έχει βρεθεί ότι η Ogt μαζί με τις απακετυλάσες των ιστονών (HDACs) καταστέλλουν την γονιδιακή έκφραση διαμέσω τροποποιήσεων που επιφέρει η γλυκοσυλίωση των μεταγραφικών ενεργοποιητών (147). Είναι γνωστό ότι οι ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών (HATs) μαζί με τις απακετυλάσες των ιστονών (HDACs) δρουν μέσα σε μεγάλα πρωτεϊνικά σύμπλοκα που συναρμολογούνται στα νουκλεοσώματα του DNA και συναγωνίζεται η μία οικογένεια την δράση της άλλης με αποτέλεσμα να επιφέρουν την χαλάρωση του DNA και ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων ή την συμπύκνωση και καταστολή της γονιδιακής έκφρασης αντίστοιχα.

Ο SAFB όπως προαναφέρθηκε αποτελεί πρωτεΐνη της πυρηνικής μήτρας και έχει άμεση σχέση με την διαμόρφωση της χρωματίνης.

Λείες σχετιζόμενες με το μάτισμα και την ωρίμανση του mRNA.

Οι κλώνοι 36Γ₆, 7Γ₂, 51Γ₈ ταυτοποιήθηκαν ως οι hnRNP C1/C2, hnRNP A1 και ELAV-like protein 4 αντίστοιχα. Οι πρώτες δύο ανήκουν στην οικογένεια των hnRNP's (ετερογενείς πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες) και σχετίζονται με το μάτισμα και την ωρίμανση του mRNA ενώ η τρίτη εμπλέκεται στην μεταφορά του.

Η hnRNP A1 ανταγωνίζεται την δραστηριότητα των SR-πρωτεϊνών προκαλώντας αλλαγή και προωθώντας την επιλογή των 5' απομακρυσμένων θέσεων. Το αποτέλεσμα του ανταγωνισμού τους με τις πρωτεΐνες SR εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις τους και από την περιοχή πρόσδεσής τους στο pre-mRNA η οποία

επηρεάζεται από την φωσφορυλίωσή τους. Η SRPK1 η οποία φωσφορυλιώνει τις πρωτεΐνες SR επηρεάζει έμμεσα αυτόν τον ανταγωνισμό (εικόνα 67E).

Η hnRNP C1/C2 προσδένεται στο mRNA και λαμβάνει μέρος στην βιογένεση και ωρίμανσή του (136). Το γεγονός λοιπόν της ανεύρεσης της αλληλεπίδρασης των hnRNP C1/C2 και hnRNP A1 με την SRPK1a συμβαδίζει με τον λειτουργικό τους ρόλο.

Η ELAV-like protein 4 η οποία αποτελεί ασθένεια του νευρικού συστήματος και συνδέεται με καρκίνο των πνευμόνων, εκφράζεται στους νευρώνες και στα ογκίδια (HuD antigen). Από το γονίδιο της πρωτεΐνης ELAV-like protein 4 προέρχονται μέσω εναλλακτικού ματίσματος τρεις μορφές mRNAs δύο κύρια mRNAs (3,7 και 4,4 kb) που βρίσκονται στον εγκέφαλο ειδικά και ένα mRNA (1,3 kb) που βρίσκεται στους όρχεις ειδικά (155). Η πρωτεΐνη αυτή προσδένεται ειδικά στο RNA σε κύτταρα νευρώνων και εμπλέκεται στην σταθεροποίηση και στην έξοδο των mRNA's που περιέχουν περιοχές πλούσιες σε AU (AU rich elements-AREs) στην 3'-αμετάφραστη περιοχή. Επίσης βρέθηκε να αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα TAP (nuclear export receptor 1) του mRNA και να δημιουργεί σύμπλοκο με αυτόν και με το mRNA (173). Προτάθηκε ότι λειτουργεί σαν βοηθητική πρωτεΐνη του TAP για πιο ικανοποιητική έξοδο των συγκεκριμένων mRNAs στα νευρικά κύτταρα. Όπως ήδη αναφέρθηκε με τον TAP/NXF1 αλληλεπιδρούν άμεσα και οι SR-πρωτεΐνες αφού πρώτα αποφωσφορυλιωθούν (βλ. εισαγωγή). Έχοντας υπόψη ότι οι κινάσες SRPK φωσφορυλιώνουν τις SR-πρωτεΐνες και η πρόσδεσή τους με τον TAP ρυθμίζεται από διαφορετική φωσφορυλίωση της RS περιοχής (91) το γεγονός ότι η SRPK1a αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη ELAV-like protein 4 μπορεί να έχει σχέση με τα παραπάνω δεδομένα αλλά χρειάζεται περισσότερα στοιχεία για να διαλευκανθεί η μεταξύ τους σχέση.

Λείες σχετιζόμενες με την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου

Οι κλώνοι 43A₇, 21A₅, 36E₆, 12E₄, 51Γ₈ που ταυτοποιήθηκαν ως λείες, Tacc2, Maged 1, Mbp 1, p53, ELAV-like protein 4 αντίστοιχα σχετίζονται με την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Οι παραπάνω πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από αντι-ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια (tumor suppressor genes). Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες σε φυσιολογική κατάσταση ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο και σε κατάσταση γρήγορου πολλαπλασιασμού των κυττάρων (π.χ. καρκινογένεση) βρίσκονται ή απενεργοποιημένες ή μεταλλαγμένες.

Η πρωτεΐνη Tacc2 βρίσκεται στα κεντροσωμάτια, αλληλεπιδρά με τους μικροσωληνίσκους και την τουμπουλίνη και οι αλληλεπιδράσεις αυτές ρυθμίζονται από τον κυτταρικό κύκλο. Συγχρόνως είναι απαραίτητη για την μίτωση διότι συνδέεται με τον σχηματισμό της ατράκτου αυξάνοντας τον αριθμό και την σταθερότητα των μικροσωληνίσκων (135). Έχει απομονωθεί και ως ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη (AZU-1) (134).

Η Maged 1 προάγει την απόπτωση όταν ο παράγοντας ανάπτυξης των νεύρων (nerve growth factor-NGF) συνδέεται σε νευρωνικά κύτταρα και αναχαιτίζει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου.

Η πρωτεΐνη Mbp 1 έχει ήδη δείχθει ότι αποτελεί μία πρωτεΐνη που προσδέεται στην πρωτεΐνη p53. Η Mbp 1 επειδή παρουσιάζει περισσότερη αγχιστεία με την μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης p53 από την wild type θεωρείται προϊόν ογκογονιδίου (144) (εικόνα 67Α). Κατά συνέπεια επηρεάζει και αυτή με έμμεσο τρόπο τις λειτουργίες στις οποίες εμπλέκεται η p53.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι συγχρόνως βρέθηκε και άλλη πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με την p53 να αλληλεπιδρά και με την SRPK1α όπως η πρωτεΐνη P2P-R. Για την P2P-R ήταν ήδη γνωστό ότι προσδέεται με την p53 και την Rb1 (Retinoblastoma) (115). Η ανίχνευση της αλληλεπίδρασης μεταξύ SRPK1α και p53 (της παρούσης εργασίας) συγχρόνως με το δεδομένο ότι η P2P-R περιέχει περιοχές RS αποτέλεσαν αφετηρία περαιτέρω πειραματικών προσεγγίσεων για αναζήτηση τυχόν αλληλεπίδρασής τους. Έτσι κατέληξαν να αποδείξουν ότι η P2P-R φωσφορυλιώνεται από την SRPK1α στις RS-περιοχές (117), Όπως επίσης ότι εντοπίζεται στις περιοχές πυρηνικού ικριώματος διότι αλληλεπιδρά με τον SAFB και αποτελεί και αυτή συν-καταστολέα του ERα (Θωμάς Γιαννακούρος προσωπική επικοινωνία) (εικόνα 67Γ).

Η πρωτεΐνη p53 όπως έχει αναφερθεί εμπλέκεται στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Αυτό επιτυγχάνεται με αρνητική ή θετική ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων στόχων, δηλ. επηρεάζοντας ως μεταγραφικός παράγοντας την μεταγραφή πολλών γονιδίων προκαλεί στάση της κυτταρικής ανάπτυξης ή επάγει την απόπτωση αναλόγως τον τύπο και την κατάσταση του κυττάρου στο οποίο βρίσκεται.

Επίσης για την πρωτεΐνη HuD που έχει ήδη αναφερθεί βρέθηκε ότι ρυθμίζει την έκφραση του πρωτο-ογκογονιδίου *N-myc* το οποίο υπερεκφράζεται σε κύτταρα νευροβλαστώματος γι' αυτό και κατατάσσεται στα ογκοκατασταλτικά γονίδια (174).

Λείες σχετιζόμενες με την προσκόλληση των κυττάρων.

Οι κλώνοι 5Γ₂, 35E₆, 28Δ₅, που ταυτοποιήθηκαν ως Dlg5, λαμινίνη B και Hic-5 ή ARA55 αντίστοιχα λαμβάνουν μέρος στην προσκόλληση των κυττάρων (cell-cell adhesion) για αυτό η λειτουργία τους εντοπίζεται στο ενδιάμεσο περιβάλλον που υπάρχει μεταξύ τους. Τα μέλη αυτής της οικογένειας εντοπίζονται στην κυτταρική επιφάνεια κυττάρων συνεκτικού ιστού, σε ειδικές δομές που ονομάζονται εστίες προσκόλλησης.

Η πρωτεΐνη Dlg5, ανήκει στην οικογένεια των MAGUK (membrane-associated guanylate kinase homologue). Η Dlg5 εμπλέκεται στην οργάνωση επιθηλιακών και ενδοθηλιακών διακυτταρικών ενώσεων για αυτό και εντοπίζεται στο ενδιάμεσο περιβάλλον που υπάρχει μεταξύ τους αλλά λόγω των μοτίβων RCC1.2 (Regulator of chromosome condensation signature 2) (1496-1506 αμινοξέα) που περιέχει, έχει υποθεθεί ότι εντοπίζεται και στον πυρήνα. Είναι ενδιαφέρον ότι στην ίδια οικογένεια ανήκει και η πρωτεΐνη ZO-2 η οποία βρέθηκε να αλληλεπιδρά στον πυρήνα με την καρβοξυτελική περιοχή του SAFB (175). Εν τω μεταξύ ο παράγοντας SAFB έχει ήδη βρεθεί να αλληλεπιδρά με την SRPK1a. Το γεγονός λοιπόν ότι η SRPK1a αλληλεπιδρά με ένα μέλος της ίδιας οικογένειας που αλληλεπιδρά και ο SAFB μπορεί να είναι τυχαίο αλλά μπορεί και να σημαίνει κάτι που πρέπει όμως να επιβεβαιωθεί με περαιτέρω πειράματα (εικόνα 67Z).

Η λαμινίνη B προσδένεται στα κύτταρα μέσω ενός υποδοχέα και μεσολαβεί στην προσκόλληση, την μετανάστευση και την οργάνωση των κυττάρων σε ιστούς κατά την εμβρυική ανάπτυξη. Εκκρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο και κυρίως στις νευρομυϊκές συνάψεις (148-149). Για την λαμινίνη B που έχει εντοπισθεί μόνο στον εξωκυττάριο χώρο δεν μπορεί να ερμηνευθεί η αλληλεπίδρασή της με τα υπάρχοντα δεδομένα.

Η Hic-5 έχει ήδη αναφερθεί σαν συν-ενεργοποιητής του υποδοχέα των ανδρογόνων αλλά συγχρόνως έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με διάφορες πρωτεΐνες μαζί με την Paxillin. Για αυτό έχει προταθεί ότι παίζει τον ρόλο του «προσαρμοστή» στις εστίες προσκόλλησης είτε ανταγωνιστικά είτε συνεργιστικά με την Paxillin (176-177). Αυτές οι δομές δεν μεσολαβούν μόνο για την σύνδεση της εξωκυττάριας μήτρας (extracellular matrix-ECM) και της ενδοκυττάριας ακτίνης του κυτταροσκελετού αλλά επίσης συγχρονίζουν και μεταφέρουν τις πληροφορίες από

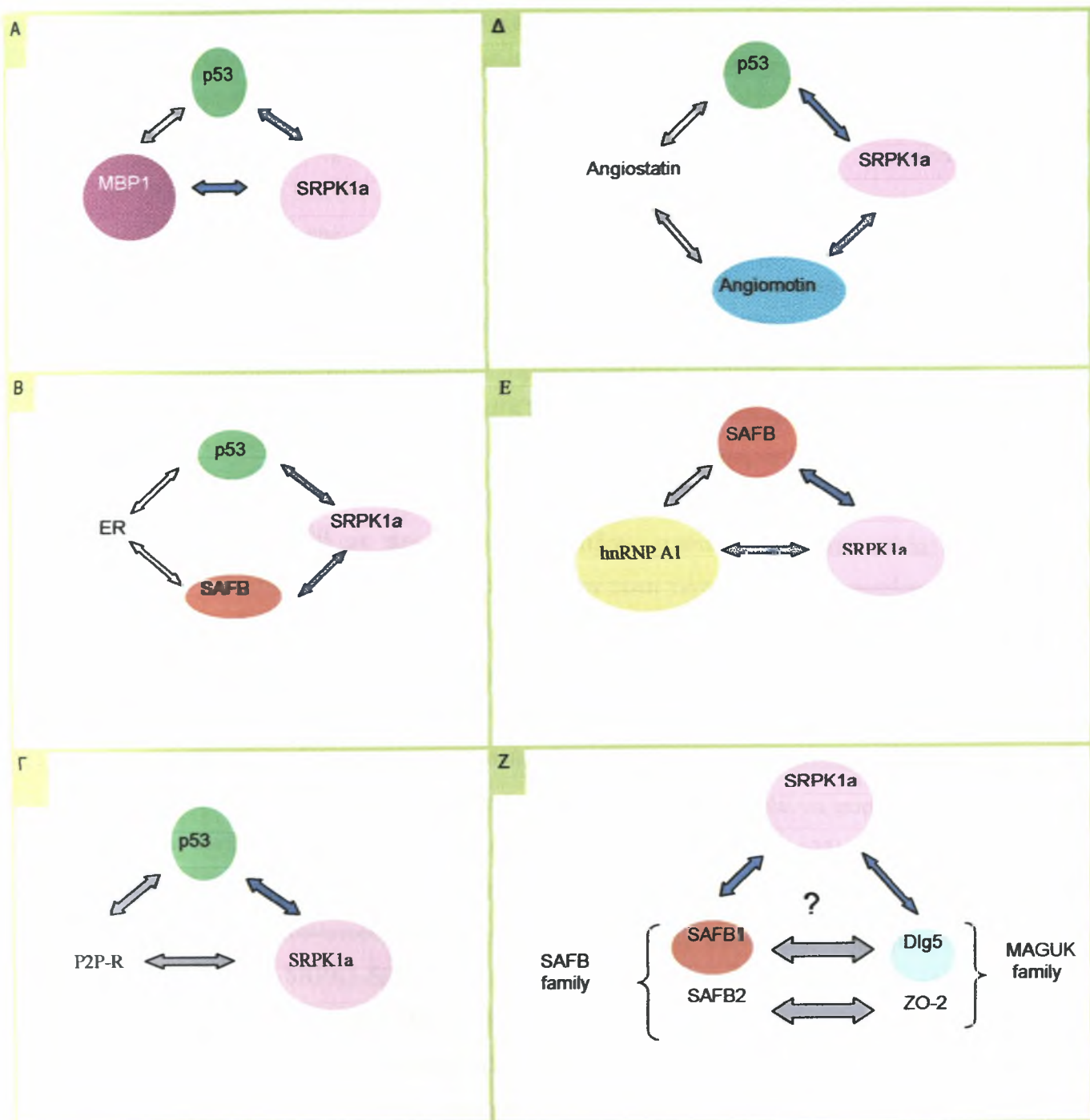
την επιφάνεια του κυττάρου στον πυρήνα (178). Όντως έχει βρεθεί ότι η Hic-5 επικοινωνεί μεταξύ των εστιών προσκόλλησης και του πυρήνα μέσω ενός σήματος (nuclear export signal-NES) το οποίο περιέχει και είναι ευαίσθητο σε οξειδωτικές ουσίες όπως το H₂O₂ (141).

Αρχικά η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών Hic-5 και Dlg5 με την SRPK1a έρχεται σε αντίφαση με την μέχρι τώρα παρουσία της SRPK1a στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα. Είναι ενδιαφέρον όμως α) ότι η πρωτεΐνη (Hic-5 ή ARA 55 εκτός του ότι εντοπίζεται στην περιοχή προσκόλλησης των κυττάρων και εμπλέκεται σε αυτή την διαδικασία, συγχρόνως εντοπίζεται και στον πυρήνα και β) ότι η πρωτεΐνη Dlg5 λόγω των μοτίβων που περιέχει έχει υποθεθεί ότι εντοπίζεται και στον πυρήνα.

Διαφορετικές σε λειτουργία λείες

Ο κλώνος 59Γ₉ ταυτοποιήθηκε ως υποδοχέας του οπιοειδή παράγοντα ανάπτυξης (Ogfr). Η πρωτεΐνη Ogfr εντοπίζεται στην εξωτερική μεμβράνη του πυρηνικού φακέλου όπου αλληλεπιδρά με την εγκεφαλίνη και το σύμπλοκο μετατοπίζεται στο πυρήνα και παρατηρείται στο εσωτερικό της πυρηνικής μήτρας (nuclear matrix) και στην περιφέρεια της ετεροχρωματίνης (158-159). Η φύση της αλληλεπίδρασης της με την SRPK1a δεν είναι ακόμη κατανοητή και χρειάζονται περαιτέρω πειραματικές προσεγγίσεις για να διευκρινιστεί.

Ο κλώνος 6A₂ ταυτοποιήθηκε ως λεία Amotl 2. Η αγγειομοτίνη είναι μία πρωτεΐνη που η έκφρασή της αυξάνει την κινητικότητα των κυττάρων και αναχαιτίζεται από την αλληλεπίδρασή της με την αγγειοστατίνη (179). Η τελευταία αναστέλλει την αγγειογένεση *in vivo* με τρόπο εξαρτώμενο από το p53 (180). Παρόμοια με την περίπτωση που η SRPK1a αλληλεπιδρά με δύο μόρια (SAFB, p53) που αυτά με την σειρά τους αλληλεπιδρούν με ένα άλλο μόριο κοινό (ERα) μπορούμε να αναφέρουμε και το παράδειγμα της αλληλεπίδρασης της SRPK1a με την αγγειομοτίνη (Angiotensin) και την πρωτεΐνη p53 που έχουν κοινό συνδετικό κρίκο το μόριο της αγγειοστατίνης με το οποίο αλληλεπιδρούν (εικόνα 67Δ).



Εικόνα 67 : Σχηματική αναπαράσταση μερικών αλληλεπιδράσεων της SRPK1a και συσχετισμός τους με άλλα αλληλεπιδρώντα μόρια. Με χροματιστό κύκλο παρίστανται οι πρωτεΐνες p53, Angiomotin, SAFB, Dlg5, Mbp1, hnRNP A1 που αλληλεπιδρούν με την SRPK1a, με μαύλε βέλη οι αλληλεπιδράσεις που έχουν βρεθεί με την παρούσα εργασία ενώ με γκρι οι γνωστές από τη βιβλιογραφία αλληλεπιδράσεις.

Παρατηρούμε ότι από τις λείες που ανιχνεύθηκαν να αλληλεπιδρούν με την SRPK1a οι περισσότερες ήταν πρωτεΐνες που παίζουν ρόλο στην μεταγραφή και στη συμπύκνωση της χρωματίνης. Έτσι, υποδηλώνεται ότι η SRPK1a λαμβάνει μέρος και σε άλλες κυτταρικές λειτουργίες εκτός της φωσφορυλίωσης των παραγόντων ματίσματος.

Βάσει αυτής της παρατήρησης επιλέξαμε να μελετήσουμε περαιτέρω κάποιο από τα αλληλεπιδρώντα μόρια της SRPK1a που να λαμβάνει μέρος και στις δύο αυτές διεργασίες (μεταγραφή-συμπύκνωση της χρωματίνης) για να διαλευκανθεί περαιτέρω ο ρόλος της. Η συμμετοχή της SRPK1a στην μεταγραφή δεν είναι γνωστή αλλά το γεγονός αφ' ενός ότι η SRPK1a στην ιδιαίτερη περιοχή της περιέχει δύο μοτίβα LXXLL (βλ. εικόνα 7 Εισαγωγή) που περιέχουν κυρίως οι συν-ενεργοποιητές της μεταγραφής των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών (45) και συγχρόνως το γεγονός ότι ο SAFB με τον οποίο αλληλεπιδρά αποτελεί συν-καταστολέα του υποδοχέα των οιστρογόνων (ER) μπορεί να μην είναι τυχαίο αλλά να σημαίνει κάτι που με τα σημερινά δεδομένα δεν μπορεί να ερμηνευθεί. Επίσης το ότι ο SAFB αποτελεί πρωτεΐνη της πυρηνικής μήτρας που προσδένεται στις περιοχές S/MARs και παίζει ρόλο στην διαμόρφωση της χρωματίνης και το ότι η SRPK1a έχει ήδη συσχετιστεί με τη διαμόρφωση της χρωματίνης διαμέσου των αλληλεπιδράσεών της με τον LBR και την πρωταμίνη αποτελούν στοιχεία που μπορούν να συσχετιστούν μεταξύ τους μετά από επιπλέον διερεύνηση της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης. Επιπλέον δεδομένου ότι ο SAFB δεν περιέχει μοτίβα RS κι άρα δεν συμβαίνει αντίδραση ενζύμου-υποστρώματος με την κινάση η βιολογική σημασία της αλληλεπίδρασης SRPK1-SAFB λοιπόν δεν ήταν προφανής. Για τους παραπάνω λόγους επιλέχθηκε να μελετηθεί ο SAFB που συμμετέχει στις παραπάνω διαδικασίες και τις συνδυάζει. Διότι οι μοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της χρωματίνης και της πυρηνικής μήτρας έχουν διπλή σπουδαιότητα. Πρώτον, όπως υποδηλώνεται από πολλές βιοχημικές μελέτες η πρόσδεση του DNA στη πυρηνική μήτρα παίζει ρόλο στην διαμόρφωση της χρωματίνης και δεύτερον εξυπηρετεί την ρύθμιση της μεταγραφής. Επίσης όμως ο SAFB αποτελεί μία από τις πιο ισχυρές αλληλεπιδράσεις (>100mM AT) της SRPK1a που εμφανίστηκε και τις πιο πολλές φορές (οκτώ).

Στην πρωτεΐνη SAFB έχουν αποδοθεί πολλές ιδιότητες. Αρχικά απομονώθηκε ως πρωτεΐνη της πυρηνικής μήτρας (nuclear matrix proteins–NMPs) που προσδένεται στις περιοχές πυρηνικού ικρίωματος του DNA (118). Παράλληλα όμως έχει περιγραφεί και ως HET (Hsp27-ERE-TATA-binding protein) λόγω της σύνδεσής του

στον υποκινητή του γονιδίου Hsp27 (130) και ως HAP (hnRNP A1 associated protein) επειδή έχει βρεθεί σε σύμπλοκα hnRNP όπου αλληλεπιδρά με την hnRNPA1 (167). Επίσης σχηματίζει μαζί με άλλες SR πρωτεΐνες και την πολυμεράση II του RNA το σύμπλεγμα της μεταγραφής (transcriptosomal complex) που συμμετέχει στην μεταγραφή, στο μάτισμα και στην ωρίμανση του RNA (118, 129). Έχει δειχθεί ακόμη διεξοδικά ότι δρα και ως συν-καταστολέας του υποδοχέα των οιστρογόνων (ER) (168).

Η λεία SAFB ως πρωτεΐνη πρόσδεσης στις περιοχές S/MARs

Η ευκαρυωτική χρωματίνη οργανώνεται μέσα στο πυρήνα με την μορφή «θηλιών». Οι θηλιές είναι στερεωμένες στη βάση τους σε ένα πυρηνικό πλέγμα που αποτελείται από πρωτεΐνες και RNA το οποίο ονομάζεται πυρηνική μήτρα ή ικρίωμα (nuclear matrix/scaffold) (181, 182). Σύμφωνα με τους Beverney & Coffey πυρηνική μήτρα είναι η πρωτεϊνική δομή που απομένει μετά από αφαίρεση από των πυρήνα των πυρηνικών μεμβρανών, ιστονών, διαλυτών πυρηνικών πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων (181). Η επαφή της χρωματίνης στην πυρηνική μήτρα γίνεται διαμέσου κάποιων συγκεκριμένων περιοχών DNA που ονομάζονται S/MAR (Scaffold/Matrix Attachments Regions). Αποτελούν στοιχεία DNA μήκους 300-3000bp και είναι πλούσιες σε A+T (70%) (183). Πιστεύεται ότι δεν είναι μόνο σημαντικές για την προσκόλληση της χρωματίνης στο πυρηνικό πλέγμα αλλά εμπλέκονται και στην οργάνωσή της στην αντιγραφή, στην μεταγραφή και στην μίτωση. Έχουν ταυτοποιηθεί πρώτα στα εξόνια και τελευταία και στα ιντρόνια που προηγούνται των 5' άκρων των γονιδίων (184). Και στις δύο περιπτώσεις οι πρωτεΐνες που συνδέονται με τις περιοχές αυτές πιστεύεται ότι λαμβάνουν μέρος στον έλεγχο της μεταγραφής και σε πολλές άλλες πυρηνικές διεργασίες.

Ο SAFB είναι μία από αυτές και προσδένεται στις περιοχές S/MAR συνδέοντας την χρωματίνη με τις πρωτεΐνες της πυρηνικής μήτρας. Αρχικά ο παράγοντας SAFB απομονώθηκε και καθαρίστηκε από κύτταρα HeLa και κλωνοποιήθηκε για την ιδιότητά του να δεσμεύεται στις περιοχές S/MARs (118). Τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του SAFB στην φάση G₂-M υποδηλώνουν τον ρόλο του για το «πακετάρισμα» της χρωματίνης πριν την μίτωση. Επίσης στην φάση αυτή του κυτταρικού κύκλου η μεταγραφή καταστέλλεται οπότε η υπερέκφρασή του μπορεί να αιτιολογηθεί βάσει της λειτουργίας καταστολής της μεταγραφής κάποιων γονιδίων (185).

Το ότι ο παράγοντας SAFB μεσολαβεί στην δέσμευση της χρωματίνης στην πυρηνική μήτρα ενισχύει την αρχική άποψη ότι η SRPK1α εμπλέκεται και σε άλλα μονοπάτια εκτός του ματίσματος και μπορεί να υποτεθεί ότι η ειδική αλληλεπίδρασή του με την SRPK1α εξυπηρετεί πιθανώς την προσέγγισή της με άλλα υποστρώματα σε συγκεκριμένα υποπυρηνικά διαμερίσματα και συγχρόνως ταιριάζει με την ήδη γνωστή αλληλεπίδρασή της με την πρωταμίνη και τον LBR που ενοχοποιεί την SRPK1α για συμμετοχή στην συμπύκνωση της χρωματίνης.

Ρόλος του SAFB στο μάτισμα

Επίσης διαμέσου της περιοχής RRM ο SAFB αλληλεπιδρά με πολλές πρωτεΐνες που παίρνουν μέρος στον μεταβολισμό του RNA (ωρίμανση του pre-mRNA, μάτισμα, σταθερότητα, εξαγωγή από τον πυρήνα και μετάφραση) όπως η AUF1/hnRNP D, hnRNP A1, htra2-β1, ASF/SF2, SRp30c, CLK2 (129, 167, 186). Η ριβονουκλεοπρωτεΐνη AUF1/hnRNP D αποτελείται από τέσσερις ισομορφές (p45, p42, p40, και p37) προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος και προάγει την αποικοδόμηση του mRNA. Ο παράγοντας SAFB αλληλεπιδρά (αμινοξέα 443-849) μόνο με τις p45 και p42 ισομορφές της AUF1/hnRNP D τις οποίες και συγκρατεί στον πυρήνα σε αντίθεση με τις άλλες δύο που πηγαινοέρχονται μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος (186). Επίσης σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης που έγιναν σε κύτταρα HeLa συνκατακρημνίστηκε με τις hnRNPA1, hnRNPC1/C2 και U και θεωρήθηκε μέλος της οικογένειας hnRNP [για αυτό και η ονομασία του HAP (hnRNP A1 associated protein)] προτείνοντας για ακόμη μία φορά ότι πρωτεΐνες hnRNP έχουν σχέση με την πυρηνική μήτρα. Για παράδειγμα η hnRNP U περιγράφηκε ως SAFA (187). Παρατηρήθηκε επίσης ότι η HAP/SAFB ενώ εντοπίζεται στα ινίδια της χρωματίνης (Perichromatin fibrils) μετά από θερμικό σοκ του κυττάρου μετατοπίζεται στα HAP bodies τα οποία αποτελούνται από κοκκία χρωματίνης (PGs). Έχει αποδειχθεί ότι το στρες ελαττώνει την μεταγραφή των περισσότερων γονιδίων και εμποδίζει την ωρίμανση του mRNA στα κύτταρα. Το παραπάνω γεγονός φανερώνει πως δεν συμβαίνει καμία μεταγραφή στους σχηματισμούς αυτούς αλλά λειτουργούν σαν «αποθήκες» των RNAs που θα συντεθούν πριν και μετά το θερμικό σοκ (188).

Όλες οι επιβεβαιωμένες αλληλεπιδράσεις του μορίου του SAFB με την οικογένεια hnRNP και αυτές που ανιχνεύθηκαν με το αμινοτελικό άκρο της SRPK1α

με την ίδια οικογένεια μπορούν να οδηγήσουν στην υπόθεση ότι η SRPK1a και ο SAFB μπορεί να αλληλεπιδρούν με την μορφή συμπλόκου (εικόνα 67E).

Ρόλος του SAFB στην μεταγραφή

Ακόμη διαπιστώθηκε ότι ο SAFB αλληλεπιδρά με την περιοχή CTD της πολυμεράσης II του RNA (*in vivo & in vitro*), με τον παράγοντα ματίσματος SRp30c (*in vitro*) διαμέσου της περιοχής RS και ότι φωσφορυλιώνεται από την κινάση CLK2 (129). Δεδομένου ότι η πολυμεράση II προκαλεί σύζευξη μεταγραφής, ματίσματος και 3' επεξεργασίας του RNA προτάθηκε ότι το μόριο του SAFB εμπλέκεται στην δημιουργία του συμπλόκου της μεταγραφής «μεταγραφοσώματος» (transcriptosome) διότι προσεγγίζει το εργοστάσιο του RNA (“RNA Factory”) στις περιοχές S/MARs που βρίσκονται κοντά στις μεταγραφικά ενεργές περιοχές. Τα μεγαλομοριακά αυτά σύμπλοκα (πολυμεράση II RNA-παράγοντες ματίσματος-πυρηνική μήτρα) είχαν αναφερθεί και προηγουμένως ότι ισχύουν (189, 190).

Επιπλέον διαπιστώθηκε ότι ο SAFB αποτελεί ένα μεταγραφικό καταστολέα διότι συνδέεται στον εκκινητή του γονιδίου της *Hsp27* (heat shock protein) και εμποδίζει την μεταγραφή του (130). Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ *Hsp27* είναι ρυθμιζόμενη από τα οιστρογόνα και προάγει τον πολλαπλασιασμό και την αντοχή σε φάρμακα στον καρκίνο στήθους (191). Ο εκκινητής της περιέχει ένα στοιχείο απάντησης στα οιστρογόνα (estrogen response element-ERE) και μετά από 13 νουκλεοτίδια ένα πλαίσιο TATA στο οποίο προσδέεται η πρωτεΐνη SAFB. Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι ο HET/SAFB συνδέεται *in vitro* και *in vivo* με τον υποδοχέα των οιστρογόνων (estrogen receptor-ER) καταστέλλοντας την δράση του. Ο SAFB ενώνεται με τον ER με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DBD) και με την περιοχή του αρμού (hinge). Η σύνδεση του ER με τον HET/SAFB συμβαίνει παρουσία ή απουσία οιστρογόνων αλλά αυξάνεται σημαντικά παρουσία του ανταγωνιστή των οιστρογόνων ταμοξιφένης και ενισχύει την δράση της (168). Αλλά όταν ο SAFB υπερεκφραστεί καταστέλλει την δράση των οιστρογόνων και της ταμοξιφένης που επιτελείται με την μεσολάβηση του υποδοχέα ER.

Ο μηχανισμός δράσης του SAFB ως συν-καταστολέα του υποδοχέα των οιστρογόνων δεν είναι ακόμη ξεκάθαρος. Ένας δρόμος είναι μέσω της άμεσης ή έμμεσης αλληλεπίδρασής του με την πολυμεράση του RNA. Τελευταία ανακοινώθηκε ότι για την κατασταλτική του δράση ευθύνεται μία δομή του που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο, η περιοχή καταστολής (repression domain-RD)

(192) όπως έχει βρεθεί και για άλλους συν-καταστολείς. Η περιοχή αυτή είναι διαφορετική της περιοχής μέσω της οποίας αλληλεπιδρά ο SAFB με τους υποδοχείς (ER interacting domain-EID) και ανιχνεύθηκε με τη μέθοδο των δύο υβριδίων ότι αλληλεπιδρά με τον παράγοντα TAFII68 (TBP-associated factor). Στην συνέχεια αυτή η αλληλεπίδραση επιβεβαιώθηκε και με πειράματα συγκατακρήμνισης (192). Ο TAFII68 είναι μέλος της οικογένειας TET και αλληλεπιδρά με τον παράγοντα TFII (transcription factor II) και την RNA πολυμεράση επίσης (193). Βάσει των παραπάνω αλληλεπιδράσεων μπορεί να διατυπωθεί ότι ο SAFB προκαλεί άμεση αναστολή της πολυμεράσης II λόγω της αλληλεπίδρασής του με την CTD (129) ή έμμεσα (193) (διαμέσω της αλληλεπίδρασής του με τον παράγοντα TAFII68) και κατά συνέπεια καταστολή της μεταγραφής.

Επίσης νεότερες μελέτες επιβεβαίωσαν ότι η περιοχή RD του SAFB αλληλεπιδρά και με την RD ενός άλλου συν-καταστολέα του ER, του N-CoR (nuclear hormone receptor corepressor) *in vitro* και *in vivo* και έδειξαν ότι αυτή η αλληλεπίδραση είναι απαραίτητη εν μέρει για την μεταγραφική καταστολή του. Διότι μέσω αυτής της αλληλεπίδρασης συνδέεται έμμεσα με την απακετυλάση HDAC3 που χρειάζεται για να επιφέρει την καταστολή του ER (194-195). Το ενδιαφέρον είναι ότι η περιοχή της αλληλεπίδρασης του N-CoR με την HDAC3 είναι διαφορετική από αυτήν του SAFB οπότε οι αλληλεπιδράσεις αυτές δεν είναι αμοιβαία ανταλλασσόμενες αλλά συμβαίνουν ταυτόχρονα (194). Επίσης ο SAFB βρέθηκε ως συν-καταστολέας και του υποδοχέα PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) αλλά και άλλων πυρηνικών υποδοχέων.

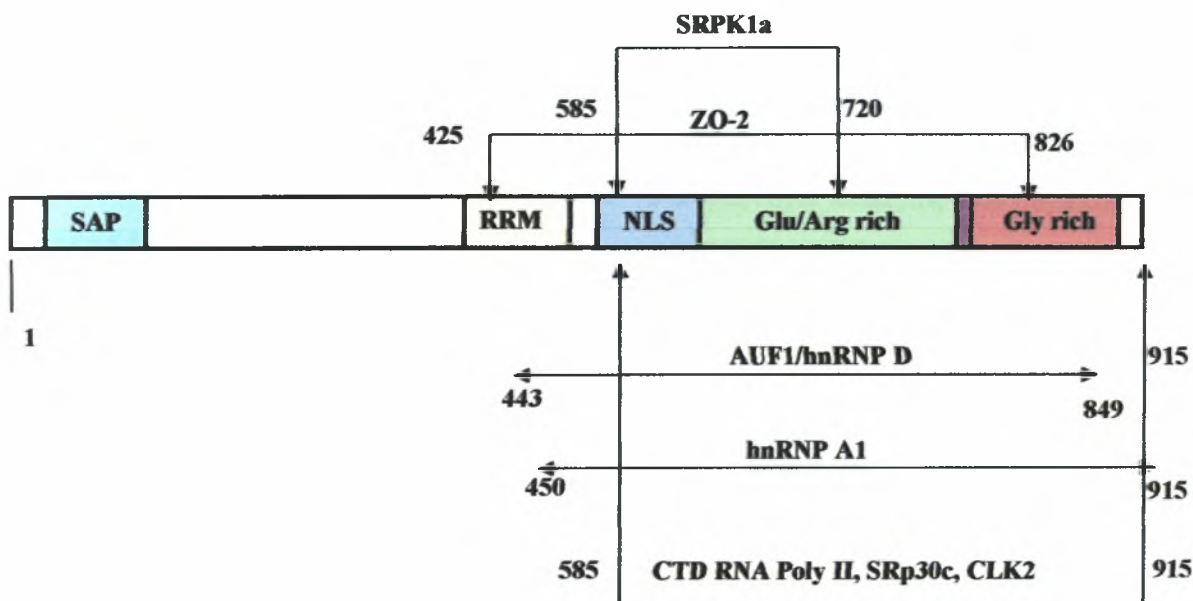
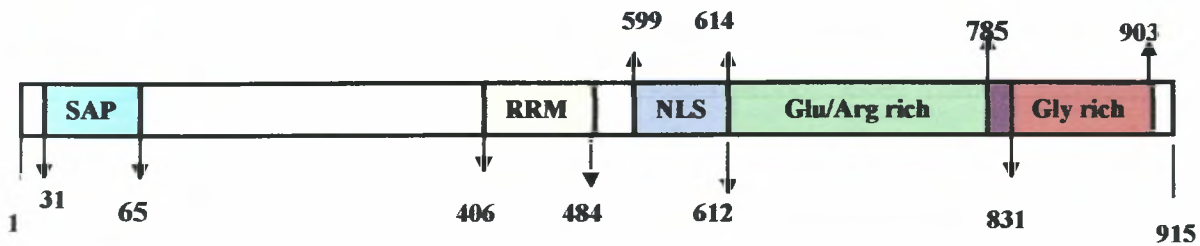
Επειδή τα οιστρογόνα είναι από τις πιο ισχυρές μιτογόνες ουσίες για τον καρκίνο μαστού ο ρόλος του HET/SAFB υποδηλώνει ότι παίζει ρόλο στην ρύθμιση της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων και συγκεκριμένα αποδείχθηκε ότι η υπερέκφρασή του αναστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων και δημιουργεί πολυπυρηνικά κύτταρα, ανυπλοειδία και έλλειψη ετεροζυγωτικών κυττάρων ως προς το χρωμόσωμα 19p13 σε διάφορες κυτταροκαλλιέργειες καρκίνου μαστού (185, 196). Επίσης βρέθηκε αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων και σε κυτταρικές σειρές αρνητικές σε ER α γεγονός που σημαίνει ότι ο SAFB1 αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ανεξάρτητα από την καταστολή του ER α (185). Τα ευρήματα αυτά δηλώνουν ότι ο HET/SAFB συμμετέχει σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες που έχουν σχέση με την καρκινογένεση. Επίσης επειδή η έκφρασή του ελαττώνεται στην αρχή της διαφοροποίησης των κυττάρων του λιπώδη ιστού και

ρυθμίζεται κατά την διαφοροποίηση των εντερικών κυττάρων προτάθηκε ότι συμμετέχει στον πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των κυττάρων (197).

Δομή SAFB

Η πρωτεΐνη SAFB στην αμινοτελική περιοχή της περιέχει ένα SAF-Box (επίσης ονομάζεται και περιοχή SAP) (αμινοξέα 31-65) η οποία πιστεύεται ότι συμμετέχει στην οργάνωση της χρωματίνης και πιο εξειδικευμένα στην αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών της πυρηνικής μήτρας και των περιοχών S/MAR. Οι περιοχές αυτές εμπλέκονται σε κυτταρικές διαδικασίες όπως η μεταγραφή, η επεξεργασία του RNA, η αποπτωτική αποικοδόμηση της χρωματίνης και η επιδιόρθωση του DNA (198). Περιέχει επίσης την περιοχή αναγνώρισης του RNA (RRM 409-484 αμινοξέα) μία περιοχή πυρηνικού εντοπισμού (NLS), μία περιοχή RE (πλούσια σε Arg-Glu) που μεσολαβεί και στην πρόσδεσή του με την SRPK1a (585-720) και μία περιοχή πλούσια σε γλυκίνη στο καρβοξυτελικό άκρο του. Η περιοχή RE με τα εναλλασσόμενα θετικά και αρνητικά φορτία θυμίζει την περιοχή RS όταν αυτή είναι φωσφορυλιωμένη και μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών. Επειδή η πρωτεΐνη περιέχει πολλά φορτισμένα αμινοξέα χωρίζεται σε ένα υψηλά βασικό αμινοτελικό άκρο από 97 αμινοξέα, ένα όξινο κεντρικό τμήμα 464 αμινοξέα και ένα βασικό καρβοξυτελικό μήκους 287 αμινοξέων. Λόγω του παραπάνω φαινομένου παρατηρείται στις πηκτές SDS PAGE να κινείται σαν να έχει μοριακό βάρος 150kDa ενώ το πραγματικό είναι 97 kDa. Στην δευτεροταγή του δομή κυρίως περιέχει α-έλικες και λίγες β-πτυχώσεις (εικόνα 68).

Βρέθηκαν ακόμη δύο μέλη της ίδιας οικογένειας στον άνθρωπο, ο SAFB2 και ο SAFB3 οι οποίοι παρουσιάζουν 70% και 35% ομοιότητα με τον SAFB1 αντίστοιχα (199). Το γονίδιο *SAFB2* βρίσκεται «κεφαλή με κεφαλή» με το γονίδιο του *SAFB1* στο χρωμόσωμα 17 και τους χωρίζει ένας διπλής κατεύθυνσης εκκινητής που ρυθμίζει την έκφρασή τους. Ο SAFB1 ομοπολυμερίζεται και ετεροπολυμερίζεται με τους SAFB2 και SAFB3 (199). Η ομοιότητα των δύο πρώτων μελών οδήγησε στο ερώτημα κατά πόσον ο SAFB2 παρουσιάζει παρόμοια λειτουργία με τον SAFB1. Όντως ο SAFB2 έχει παρόμοιες ιδιότητες με τον SAFB1.



Εικόνα 68. Σχηματική αναπαράσταση της δομής της πρωτεΐνης SAFB και των αλληλεπιδράσεών της με άλλες πρωτεΐνες.

Η μόνη διαφορά που έχει βρεθεί μεταξύ τους είναι ότι ο SAFB1 εντοπίζεται στον πυρήνα ενώ ο SAFB2 κυρίως στο κυτταρόπλασμα όπου αντιδρά με την βινεξίνη (vinexin) μία πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού και με την ZO-2 (zonula occludens protein) που συνδέει τις διακυτταρικές πρωτεΐνες με τα ινίδια ακτίνης και ανήκει στην οικογένεια των MAGUK (membrane-associated guanylate kinase homologue) στην ίδια που ανήκει και η «λεία» Dlg5 της SRPK1α (175, 197, 200) (εικόνα 67Z).

Αν και οι πληροφορίες που συλλέχθηκαν από την ανάγνωση των αλληλουχιών και την διερεύνηση των δομών και λειτουργιών των πρωτεϊνών «λειών» επέτρεψαν τους παραπάνω συσχετισμούς με την SRPK1α αυτές όμως δεν αποτελούν στοιχεία που επιβεβαιώνουν τη μοριακή αλληλεπίδραση με την SRPK1α.

Για τους παραπάνω λόγους επιλέχθηκε να διερευνηθεί κατά πόσο το σύμπλοκο SRPK1α/SAFB όντως δημιουργείται *in vivo* σε κύτταρα θηλαστικών. Η εργασία αυτή έγινε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Α.Π.Θ. όπου, συνοπτικά επιτεύχθηκε η συν-ανοσοκατακρήμιση της SRPK1α με τον παράγοντα SAFB από κύτταρα 293T επιμολυσμένα με πλασμίδια που παράγουν τις δύο πρωτεΐνες. Παρατηρήθηκε ότι βρέθηκαν και μικρές ποσότητες SRPK1 στα προϊόντα ανοσοκατακρήμισης υποδεικνύοντας ασθενή αλληλεπίδραση του SAFB με την SRPK1 όπως άλλωστε υποδεικνυόταν και από τα αποτελέσματα της μεθόδου των δύο υβριδίων (Πίνακας 6 Αποτελέσματα).

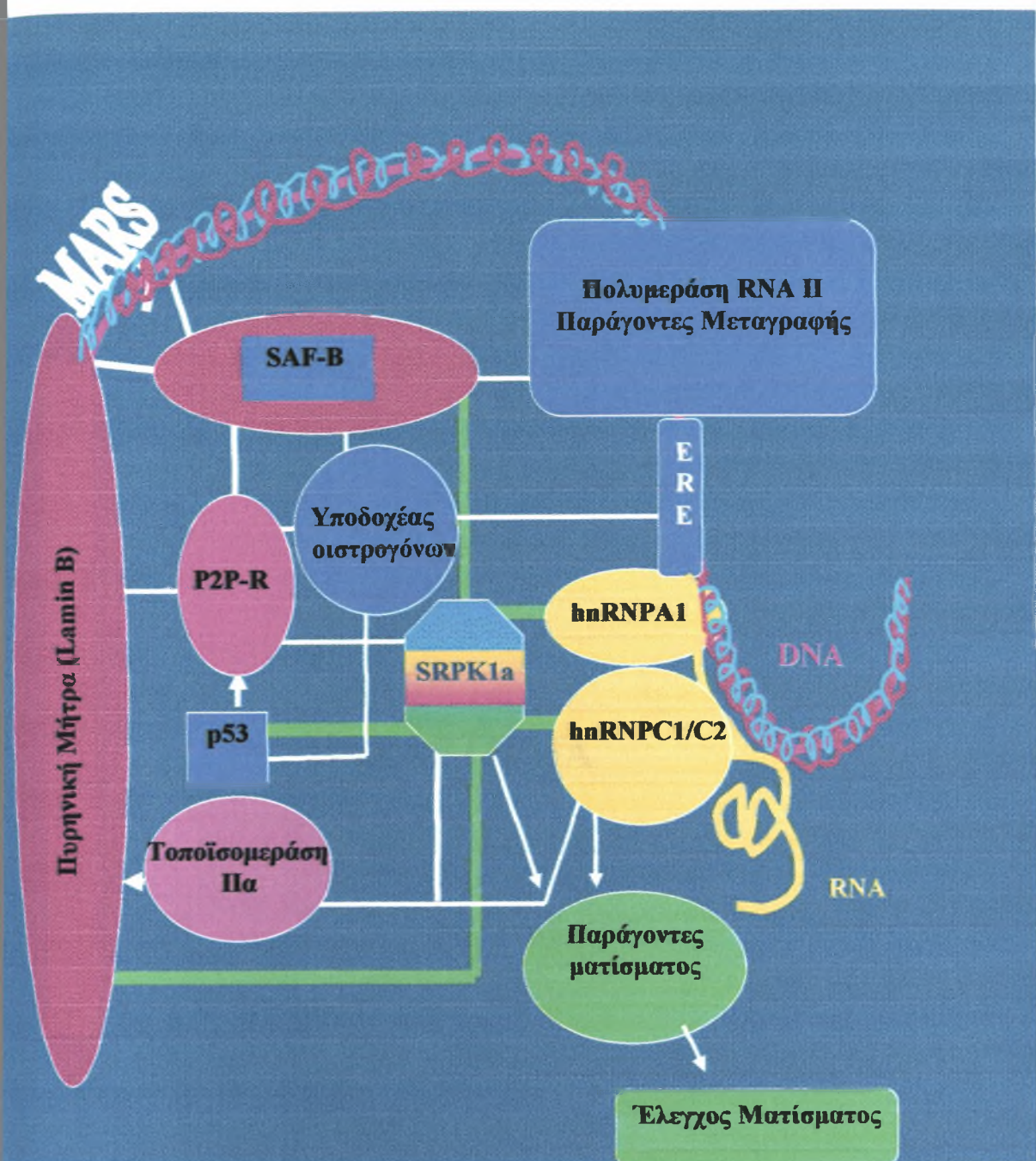
Επίσης αποδείχθηκε και η *in vitro* αλληλεπίδραση των δυο πρωτεϊνών με την χρήση χημεικής πρωτεΐνης GST-SAFB παραχθείσης σε *E.coli* και FLAG-SRPK1α παραχθείσης σε κύτταρα 293T.

Επειδή ο SAFB μπορεί να παρέχει ένα δομικό σκελετό για την χρωματίνη και την μεταγραφική «μηχανή» και συγχρόνως επηρεάζει την ρύθμισή της γονιδιακής έκφρασης σε διάφορα στάδια της μεταγραφής μέσω του ER, η SRPK1α μπορεί με την σειρά της να χρησιμοποιεί τον παράγοντα SAFB σαν «αποβάθρα» όπου βρίσκονται οι παράγοντες ματίσματος ή πρωτεΐνες με RS περιοχές, οι οποίες βρίσκονται κοντά στην πυρηνική μήτρα. Η φωσφορυλίωση τους μπορεί να μην είναι κρίσιμη για την λειτουργία τους αλλά διαμέσω αυτής να επηρεάζεται η αλληλεπίδρασή τους με την πυρηνική μήτρα (π.χ. P2P-R). Αυτή η υπόθεση συμβαδίζει με την προκαταρκτική παρατήρηση ότι η φωσφορυλίωση πέντε πολυπεπτιδίων (29,36,50,80, και 190kDa αντίστοιχα) που συνκατακρημνίζονται με τον SAFB αυξάνεται σημαντικά σε κύτταρα που υπερεκφράζουν την SRPK1α (29).

Συνοψίζοντας, η επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης της SRPK1a με τον SAFB είναι ακόμη ένα γεγονός που ενισχύει την αξιοπιστία της μεθόδου των δύο υβριδίων και κατά αναλογία οι υπόλοιπες πληροφορίες που προκύπτουν από αυτήν είναι σημαντικές αλλά χρειάζονται επιπλέον πειραματικές προσεγγίσεις για να διαλευκανθεί η σχέση τους με την SRPK1a. Στην εργασία αυτή επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη συμπλόκου SRPK1a/SAFB αλλά ο βιολογικός ρόλος της αλληλεπίδρασης των δύο μορίων παραμένει άγνωστος.

Με βάση όλα τα δεδομένα που προαναφέρθηκαν μπορεί να προταθεί ένα μοντέλο όσο αφορά τον ρόλο της SRPK1a που να περιλαμβάνει αρκετές από τις αλληλεπιδράσεις της και να διευκολύνει για μελλοντικά πειράματα που θα συνεισφέρουν στην καλύτερη κατανόηση της λειτουργίας της (εικόνα 75). Στο μοντέλο αυτό απεικονίζονται με πράσινα γραμμές οι αλληλεπιδράσεις που ανιχνεύθηκαν στην παρούσα εργασία.

Παρατηρούμε ότι η SRPK1a αλληλεπιδρά με διάφορα μόρια που εμπλέκονται σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες οι οποίες μέσω αυτών συζεύγνυνται. Αρχικά η SRPK1a διαμέσω των αλληλεπιδράσεων με τα μόρια του SAFB και της λαμίνης B και της P2P-R που αποτελούν και οι τρεις πρωτεΐνες της πυρηνικής μήτρας και με της τοποισομεράσης IIa πιθανόν να εμπλέκεται στην οργάνωση της χρωματίνης. Επίσης η SRPK1a μέσω των αλληλεπιδράσεων με την πρωτεΐνη p53 και τον SAFB που αποτελούν και οι δύο μεταγραφικούς παράγοντες και συγκεκριμένα συν-καταστολείς των πυρηνικών υποδοχέων εμπλέκεται πιθανά και στην μεταγραφή. Ακόμη και η φωσφορυλίωση των παραγόντων μπίσματος από την SRPK1a και οι αλληλεπιδράσεις της με τις ριβονουκλεοπρωτεΐνες hnRNPA1 και hnRNPC1/C2 συνεισφέρουν άμεσα στην συμμετοχή της στο μπίσμα και έμμεσα και στην μεταγραφή.



Εικόνα 75 : Μοντέλο ανατομίας μερικών πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της SRPK1a. Με πράσινες γραμμές συμβολίζονται οι αλληλεπιδράσεις που ανιχνεύθηκαν με την παρούσα εργασία ενώ με άσπρες οι αλληλεπιδράσεις που είναι γνωστές από την βιβλιογραφία.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ – ΥΛΙΚΑ

Δ.1. Θρεπτικά Υλικά για καλλιέργειες

■ LB [Luria Bretani]

- 10 gr bacto tryptone
- 5 gr bacto yeast extract
- 10 gr NaCl
- ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 1000 ml

Προσαρμόζουμε το pH σε 7,0 με NaOH 1N.

- για τρυβλία: + 20 gr agar.

Αποστείρωση σε αυτόκαυστο.

■ YPD ή Yeast Extract -Peptone-Dextrose

- 20 gr glucose
- 10 gr bacto yeast extract
- 20 gr bacto peptone
- ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 1000 ml
- για τρυβλία: + 20 gr agar

Αποστείρωση σε αυτόκαυστο.

■ YPAD ή Yeast Extract -Peptone-Dextrose με αδενίνη

Όπως το YPD με την προσθήκη 600mg αδενίνης.

■ SC

- 20 gr glucose
- 1,7 gr Yeast Nitrogen Base χωρίς αμινοξέα και χωρίς (NH₄)₂SO₄
- 5 gr (NH₄)₂SO₄
- 2 gr από μίγμα 17 αμινοξέων (δεν περιέχονται: ιστιδίνη, λευκίνη, τρυπτοφάνη)

- ~350 ml NaOH 5 M (pH 5,6)
- ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 1000 ml
- για τρυβλία: + 20 gr agar

Αποστείρωση σε αυτόκαυστο

■ SC X-gal τρυβλία

- 20 gr glucose
- 1,7 gr Yeast Nitrogen Base χωρίς αμινοξέα, και χωρίς (NH₄)₂SO₄
- 5 gr (NH₄)₂SO₄
- 2 gr από μίγμα 17 αμινοξέων (δεν περιέχονται: ιστιδίνη, λευκίνη τρυπτοφάνη)

Προσαρμόζουμε το pH σε 5,6 με NaOH 5 M (350 ml)

- ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 950 ml
- +20 gr agar

Αποστείρωση σε αυτόκαυστο.

- 50 ml KH₂PO₄ 0,66 M (pH: 7,0)
- 2 ml X-gal 20mg/ml [5-βρωμο-4-χλωρο-3- ινδολυλ-β-D-γαλακτοσίδης διαλυμένος σε διμεθυλοφορμαμίδιο]

■ M9

- 200 ml 5XM9
- 750 ml ddH₂O
- για τρυβλία +20 gr agar

Αποστείρωση σε αυτόκαυστο.

Στην συνέχεια προσθέτουμε

- 2 ml MgSO₄ 1M
- 20 ml glucose 20%
- 0,1 ml CaCl₂ 1 M

Το αποστειρώνουμε περνώντας το από φίλτρο.

⇒ Διάλυμα 5XM9 αλάτων

- 42,5 gr Na₂HPO₄ x 2H₂O
- 15 gr KH₂PO₄

- 2,5 gr NaCl
- 5 gr NH₄Cl
- H₂O μέχρι τελικού όγκου 1000 ml

Αποστείρωση σε αυτόκαυστο.

- Στα παραπάνω θρεπτικά υλικά ανάλογα με την επιλογή των κλώνων που σκοπεύαμε να κάνουμε προσθέταμε σαν αντιβιοτικό επιλογής την αμπικιλίνη και κάποια από τα παρακάτω αμινοξέα :

- Amp (0,1gr/1ml) 100μg/ml
- ADE (166x) 0,17 gr/ 50 ml
- URA (100x) 0,112 gr / 50 ml
- TRP (100x) 0,56gr / 50 ml
- HIS (330x) 1,048 gr/ 50 ml
- LEU (90x) 1,18gr/ 50 ml
- AT (3-Αμινοτριαζόλη) 2 M

Δ.2. Διαλύματα για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

- 1x Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης Taq
 - 10 mM KCl
 - 20 mM Tris-HCl (pH 8,8 στους 25⁰C)
 - 10 mM (NH₄)₂SO₄
 - 2mM MgSO₄
 - 0,1% Triton X-100

Δ.3. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

- Διάλυμα 50x TAE (Tris-acetate EDTA)
 - 2M Tris-οξικό (pH 8,0)
 - 0,5M EDTA

■ Διάλυμα χρωστικής

- 0,25% μπλε βρωμοφαινόλης
- 0,25% κυανούν του ξυλενίου
- 30% γλυκερόλη

Δ.4. Διαλύματα κλωνοποίησης DNA σε πλασμιδιακούς φορείς

Αποφωσφορυλίωση γραμμικού πλασμιδιακού DNA με αλκαλική φωσφατάση

■ Το 1x ρυθμιστικό διάλυμα της αλκαλικής φωσφατάσης

- 100mM NaCl
- 50mM Tris-HCl (pH 8,0)
- 10mM MgCl₂
- 1mM DTT

Κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων με αιθανόλη

■ Το διάλυμα TE

- 10mM Tris-HCl (pH 7,5)
- 1mM EDTA

Αντίδραση σύνδεσης με λιγάση

■ 1x ρυθμιστικό δ/μα της T4 DNA λιγάσης (pH 7,5)

- 50mM Tris-HCl
- 10mM MgCl₂
- 10mM DTT
- 1 mM ATP
- 25 μg/ml BSA

Χειρισμός του DNA με Klenow πολυμεράση

- 1x ρυθμιστικό δ/μα της DNA Polymerase I, large (Klenow) fragment (pH 7,5),
 - 10mM Tris-HCl
 - 5mM MgCl₂
 - 7,5mM DTT

Δ.5. Διαλύματα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας

Με αλκαλική λύση

- Διάλυμα I
 - 50 mM γλυκόζη
 - 25 mM Tris-Cl (pH 8,0)
 - 10 mM EDTA (pH 8,0)

- Διάλυμα II
 - 0.2M NaOH
 - 1% SDS

- Διάλυμα III
 - δ/μα οξικού καλίου CH₃COOK 5M (pH 5,8).
Προσαρμόζουμε το pH σε 5,8 με CH₃COOH

Με τη μέθοδο της λύσης με βρασμό (ή Stet-Lysozyme method)

- Διάλυμα STET
 - 0,1M NaCl,
 - 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
 - 1 mM EDTA pH (8,0)
 - 5% Triton X-100

- ddH₂O.

Το αποθηκεύουμε σε πλαστικό μπουκάλι και το διατηρούμε σε θερμοκρασία δωματίου.

Λ.6. Διαλύματα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας με την μέθοδο της Qiagen

Διάλυμα επαναδιάλυσης P1 (Resuspension buffer)

- 50 mM Tris-Cl (pH 8,0)
- 10 mM EDTA
- 100 µg/ml RNase A

Φύλαξη σε 2-6°C.

Διάλυμα λύσης P2 (Lysis Buffer)

- 200 mM NaOH
- 1% SDS

Διάλυμα εξουδετέρωσης P3 (Neutralization Buffer)

- δ/μα οξικού κάλιου CH₃COOK 3M (pH 5,5)

Διάλυμα εξισορρόπησης QBT (Equilibration Buffer)

- 750 mM NaCl
- 50 mM MOPS
- 15% ισοπροπανόλη
- 0.15% Triton X-100 (pH 7,0)

Διάλυμα για πλύσεις QC (Wash Buffer)

- 1M NaCl
- 50 mM MOPS
- 15% ισοπροπανόλη(pH 7,0)

■ Διάλυμα έκλουσης QF (Elution Buffer)

- 1.25 M NaCl
- 50 mM Tris-Cl
- 15% ισοπροπανόλη (pH 8,5)

Δ.7. Διαλύματα για μετασχηματισμό κυττάρων του σακχαρομύκητα

■ Παρασκευή διαλύματος DNA από σπέρμα σολομού (salmon-sperm DNA)

- 200 mg salmon sperm nuclei σε 50 ml TE
- Προσθέτουμε 0,5 ml πρωτεϊνάση K (10μg/ml). Επώαση για 3 ώρες.
- Εκχυλίσεις με φαινόλη/χλωροφόρμιο
- Κατακρήμνιση με αιθανόλη
- 10 ml ddH₂O
- Ποσοτικοποίηση με φωτομέτρηση στα 260 και 280nm

Συγκέντρωση διαλύματος 2 mg/ml.

⇒ Το διάλυμα TE αποτελείται από:

- 10mM Tris-HCl (pH 8,0)
- 1mM EDTA

Δ.8. Διαλύματα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA από κύτταρα σακχαρομύκητα

■ Διάλυμα διάσωσης (RESCUE)

- 100 mM NaCl
- 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
- 1 mM EDTA
- 0,1% SDS.

Δ.9. Κατεργασία βακτηριακών κυττάρων επιδεκτικών για μετασχηματισμό (E.coli competent)

■ Για τα βακτηριακά κύτταρα Top10 ή XL1/B

⇒ Θρεπτικό διάλυμα TYM

- 2 % tryptone
- 0,5% yeast extract
- 0,1 M NaCl
- 10 mM MgSO₄.

⇒ Διάλυμα TFBI (pH 7,0)

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

Προσαρμόζουμε το pH σε 7,0 με CH₃COOH 1M

⇒ Διάλυμα TFBII (pH 7,0)

- 10 mM MOPS (4-μορφόλινο-πρόπανο-σουλφονικό οξύ)
- 75 mM CaCl₂
- 10 mM KCl
- 20% γλυκερόλη

Προσαρμόζουμε το pH σε 7,0 με NaOH 1M.

■ Για τα βακτηριακά κύτταρα KC8.

⇒ Διάλυμα TFBI (pH 5,8)

- 100mM RbCl₂
- 50mM MnCl₂
- 30mM KOAc
- 10mM CaCl₂
- 15% γλυκερόλη

Προσαρμόζουμε το pH σε 5,8 με CH₃COOH 0,2M.

⇒ Διάλυμα TFBII (pH 7,0)

- 10 mM MOPS
- 10mM RbCl₂
- 75 mM CaCl₂
- 15% γλυκερόλη

Προσαρμόζουμε το pH σε 7,0 με NaOH 1M.

Τα διαλύματα της μεθόδου δεν αποστειρώνονται με αυτόκαυστο αλλά τα περνάμε από φίλτρο για να αποστειρωθούν. Χρησιμοποιούμε φίλτρα 0,45μ. Τα αποθηκεύουμε στους 4⁰C.

Δ.10 Ραδιοσήμανση του ανιχνευτή

■ 1x Ρυθμιστικό διάλυμα σήμανσης

- 0,05M Tris-HCl (pH 7,2)
- 10mM MgCl₂
- 2mM DTT (διθειοθρεϊτόλη)
- 200mM HEPES (pH 6,6)
- μίγμα 26 τυχαίων εξαδεοξυριβονουκλεοτιδίων A₂₆₀ units /ml

Διαλύματα μεταφοράς αποικιών σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης και υβριδισμός αυτών

■ Αποδιατακτικό διάλυμα (Denaturing solution buffer)

- 0.5M NaOH
- 1.5M NaCl

■ Διάλυμα εξουδετέρωσης (Neutralization solution buffer)

- 1.5M NaCl
- 0.5M Tris HCl (pH 7,4).

■ 2x SSC (saline sodium citrate)

- 0.3 M NaCl
- 0,03 M κιτρικό νάτριο

■ Διάλυμα προϋβριδισμού και υβριδισμού Church and Gilbert (48)

Ετοιμάζουμε το διάλυμα προϋβριδισμού και υβριδισμού και το διατηρούμε στους 65°C.

- 0,5 M pH 7,2 ρυθμιστικό δ/μα φωσφορικών
- 1mM EDTA pH 8,0
- ddH₂O
- 7% SDS (έτσι αποφεύγεται η δημιουργία ιζήματος).

⇒ Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 1M (Phosphate buffer pH 7,2)

➤	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	MW 138	38,6 g
➤	Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	MW 268	193 g
➤	Na ₂ HPO ₄	MW 14	102 g
➤	H ₂ O μέχρι τελικού όγκου		1000ml

Το διαλύουμε όλο το βράδυ στους 65°C ή διαφορετικά διαλύουμε την σκόνη SDS σε βρασμένο νερό για 1 ώρα.

Πλύσιμο των μεμβρανών

■ Διάλυμα για πλύσεις

- 20 mM Na₂HPO₄ (pH 7,2)
- 1% SDS
- 1mM EDTA

Δ.11. Διαλύματα εύρεσης της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων του DNA

Αντίδραση υβριδίωσης νουκλεϊκών οξέων-annealing.

■ Διάλυμα υβριδισμού 5x

- 200mM Tris-Cl (pH 7,5)
- 100 mM MgCl₂
- 250 mM NaCl

Αντίδραση επισήμανσης των νεοσυντιθέμενων κλώνων.

■ Διάλυμα επισήμανσης

- 1μl DTT 0.1M
- 2 μl από μίγμα επισήμανσης τριφωσφορικών νουκλεοζιτών dNTPs (7,5 μM το καθένα dCTP, dGTP, dTTP αρχική συγκέντρωση) αραιωμένο 1:5
- 0.5 μl α-³⁵S dATP
- 2μl DNA πολυμεράσης του βακτηριοφάγου T7 (13 U/μl) αραιωμένης 1:8 στο παρακάτω διάλυμα:
 - 20 mM Tris-Cl (pH 7,5)
 - 2 mM DTT
 - 0.1 mM EDTA
 - 50% γλυκερόλη

⇒ Διάλυμα διθειοθρεϊτόλης (DTT) 1M

- DTT 3,09gr
- 0,01M CH₃COONa (pH 5,2) 20ml

Αποστείρωση με φίλτράρισμα. Διαχωρισμός σε ποσότητες των 1ml και αποθήκευση στους -20⁰C.

Αντίδραση τερματισμού

■ Διάλυμα τερματισμού

- 0,05% Bromophenol Blue
- 0,05% Xylene Cyanol FF
- 20 mM EDTA (pH 7,5)
- 95% απιονισμένο φορμαμίδιο

■ Ρυθμιστικό διάλυμα 10x TBE (Tris-βορικό)

- 108 gr Tris-βορικό (pH 8,3)
- 55 gr βορικό οξύ
- 40ml 0,5M EDTA (pH 8,0)
- H₂O μέχρι τελικού όγκου 1000ml

■ Η πηκτή πολυακρυλαμίδιου 6% πάχους 0,4mm αποτελείται από:

- 5.7% ακρυλαμίδιο,
- 0.3% N,N-μεθυλένδισακρυλαμίδιο
- 8 M ουρία
- 1x TBE
- ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 50ml
- 150μl υπερθειϊκό αμμώνιο (NH₄)₂S₂O₈ 10% (APS)
- 150μl τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη TEMED

Τα δύο τελευταία αντιδραστήρια προστίθενται στο σωλήνα την ώρα που είμαστε έτοιμοι να ρίξουμε την πηκτή στην συσκευή διότι διαφορετικά θα αρχίσει ο πολυμερισμός τους μέσα στον σωλήνα. Αναδεύουμε σιγά αλλά σταθερά και ρίχνουμε το διάλυμα ανάμεσα από τα τζάμια της συσκευής.

Δ.12. Διάλυμα έκφρασης πρωτεϊνών σύντηξης με την τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST)

■ Διάλυμα 1x PBS (Phosphate buffered saline pH 7,4):

- 140 mM NaCl
- 2,7 mM KCl
- 10mM Na₂HPO₄
- 1.8 mM KH₂PO₄,

Αποστείρωση στο αυτόκαυστο.

■ Διάλυμα PBST (PBS+ Triton pH 7,4)

- 1xPBS

- 1% Triton X-100
- 1% β-μερκαπταιθανόλη
- 1 mM PMSF (φαινυλομεθυλο φθοριούχος εστέρας του σουλφονικού οξέος)

Αποστείρωση στο αυτόκαυστο.

■ Διαλύματα για αναγέννηση της στήλης της γλουταθειόνης

Όξινο δ/μα

- 0,1 M CH₃COONa
- 0,5 M NaCl (pH 4,5)

Βασικό δ/μα

- 0,1 M NaCl,
- 0,1 M Tris-Cl (pH 8,5)
-

Δ.13. Διαλύματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου.

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών κάτω από μετουσιωτικές συνθήκες (SDS-PAGE).

■ Πηκτές διαχωρισμού πάχους 1,5 cm 10% ή 12%

10%	12%
10% μίγμα ακρυλαμιδίου (29:1)	12% μίγμα ακρυλαμιδίου (29:1)
0,375M Tris pH 8,8	0,375M Tris pH 8,8
0,1% SDS	0,1% SDS
0,1% υπερθειϊκό αμμώνιο (APS)	0,1% υπερθειϊκό αμμώνιο (APS)
0.04% TEMED	0.04% TEMED

Τα δύο τελευταία αντιδραστήρια πρέπει να παρασκευάζονται εκείνη την στιγμή και να προστίθενται την ώρα που είμαστε έτοιμοι να ρίξουμε την πηκτή διαχωρισμού στην συσκευή διότι διαφορετικά θα αρχίσει ο πολυμερισμός τους μέσα στον σωλήνα. Αναδεύουμε σιγά αλλά σταθερά και ρίχνουμε το διάλυμα ανάμεσα από τα τζάμια της συσκευής

■ Ετοιμάζουμε 5ml της πηκτής επιστοιβαξης 5% πάχους 1,5 cm

- 5% μίγμα ακρυλαμιδίου (29:1)
- 0,125M Tris (pH 6,8)
- 0,1% SDS
- 0,1% υπερθειϊκό αμμώνιο
- 0.01% TEMED

Τα δύο τελευταία αντιδραστήρια πρέπει να παρασκευάζονται εκείνη την στιγμή και να προστίθενται την ώρα που είμαστε έτοιμοι να ρίξουμε την πηκτή επιστοιβαξης στην συσκευή διότι διαφορετικά θα αρχίσει ο πολυμερισμός τους μέσα στον σωλήνα.

■ Διάλυμα 1xSDS

- 50 mM Tris-Cl (pH 6,8)
- 2% SDS
- 100 mM DTT (Dithiothreitol)
- 10% γλυκερόλη
- 0.1% κυανούν της βρωμοφαινόλης

Το παραπάνω διάλυμα παρασκευάζεται συνήθως δύο φορές πυκνότερο (2x), έτσι ώστε να προστίθεται ίσος όγκος με τον όγκο του διαλύματος και να έχει τελική συγκέντρωση 1x.

■ Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-γλυκίνη

- 25mM Tris
- 250mM γλυκίνη (pH 8,3)
- 0,1% SDS

Δ.14. Διαλύματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western

■ Διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer pH 8,3)

- 48 mM Tris base
- 0,037% SDS

- 39 mM γλυκίνη
- 20% μεθανόλη

Αποστείρωση στο αυτόκαυστο.

■ Διάλυμα stock solution Ponceau S 2%

3-υδροξυ-4-(2-σουλφο-4-[4-θειο-φαινυλαζο]-φαινυλ-αζο)-2,7-ναφθαλενδισουλφονικό οξύ

- | | |
|--------------------------|-------|
| ➤ Ponceau S | 2gr |
| ➤ τριγλωροοξικό οξύ | 30gr |
| ➤ σουλφοσαλικυλικό οξύ | 30gr |
| ➤ H ₂ O μέχρι | 100ml |

Αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου. Φύλαξη σε θερμοκρασία -20°C.

Διαλύματα Ανοσοανίχνευσης

■ Διάλυμα PBS-T (PBS-Tween 20)

- 1x PBS
- 0.1% Tween-20

■ Διάλυμα χρωμοαντίδρασης

- 10μl από το stock solution χλωρο-ναφθόλης 0,5gr/ml
- 1ml μεθανόλης
- 9ml PBS-T
- 10μl H₂O₂ 30%

Δ.15. Διαλύματα σύνθεσης RNA - Μεταγραφή in vitro (Transcription).

■ Διάλυμα μεταγραφής 5x για την T3 πολυμεράση

- 400mM Tris-HCl (pH 7,5)
- 10mM σπερμιδίνη

- 120 mM MgCl₂
- 200 mM DTT

■ Διάλυμα ριβονουκλεοτιδίων rRNTPs (2,5 mM το καθένα) ετοιμάζεται από ίσους όγκους των 10mM ATP,CTP, GTP, UTP.

Χημικά αντιδραστήρια.

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στα παραπάνω πειράματα ήταν αναλυτικής καθαρότητας από τους οίκους: Merck, Sigma, και Serva.

Τα glass beads είναι διαμέτρου 0,45 mm της εταιρείας Sigma.

Η ραδιενεργή L-μεθειονίνη ³⁵S (1200Ci/mmol σε 10mCi/ml) και το [α -³⁵S] dATP (1200Ci/mmol) ήταν του οίκου ICN Pharmaceuticals Inc.California.

Τα ακτινογραφικά φιλμ που χρησιμοποιήθηκαν για τις αυτοραδιογραφίες είναι του τύπου BxW instant Polaroid FP 3000B και τα υλικά εμφάνισης και στερέωσης των ακτινογραφικών φιλμ ήταν αντίστοιχα: X-Ray developer και X-Ray fixer της ίδιας εταιρίας.

Ένζυμα και υλικά μοριακής βιολογίας.

Τα ένζυμα μοριακής βιολογίας που χρησιμοποιήθηκαν είναι της εταιρίας New England BioLabs Inc.

Οι μεμβράνες του υβριδισμού I και II III και IV αγοράστηκαν από την εταιρεία Clontech (Palo Alto CA).

Το πρώτο αντίσωμα anti-GST προέρχεται από κατσίκια και είναι της εταιρείας Pharmacia. Το δεύτερο αντίσωμα που προέρχεται από ποντίκι απέναντι στις ανοσοσφαιρίνες IgG κατσίκας είναι συζευγμένο με το την υπεροξειδάση του φυτού *Armoracia pathifolia* (horse raddish peroxidase-HRP) και προέρχεται από την εταιρία Jakson Immuno Research Laboratories.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ

Στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην μέθοδο δύο υβριδίων.

I. Στέλεχος σακχαρομύκητα που χρησιμοποιήθηκε:

pJ69-4A (MATa *trp1-901 leu2-3*, 112 *ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ*).

II. Στελέχη βακτηριακών κυττάρων *E.coli* που χρησιμοποιήθηκαν:

KC8 : *hsd R leu B600 trp C9830 pyr::Tn5 his B463 lac DeltaX74 str A gal Ugal K*.

TOP10: F', *mcrA*, Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*), φ80*lacZΔM15 ΔlacX74, deoR, recA1, araD139 Δ(ara-leu)7697, galK, rpsL(StrR), endA1, mupG* . High efficient cloning (Invitrogen)

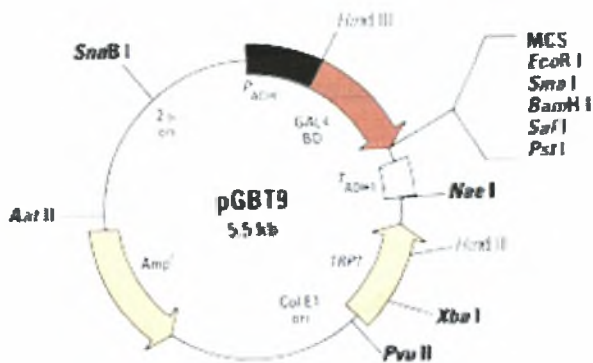
XL1-Blue strain: *recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(γ_K⁻, m_K⁺), supE44, relA1, lac⁻, [F' *proAB, lacI^qZ ΔM15, Tn10(Tet')*]*.

Τα κύτταρα KC8 παρουσιάζουν αυξοτροφία για τα αμινοξέα λευκίνης, τρυπτοφάνης, ιστιδίνης και ουρακίλης. Τα Top10 δεν παρουσιάζουν καμία αυξοτροφία.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΠΙ

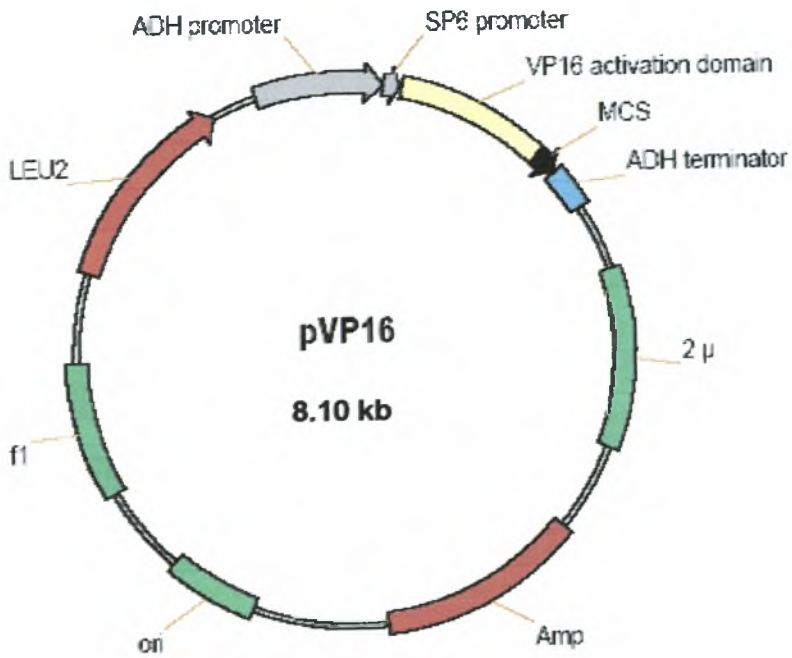
ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ:

1) pGBT9



Εικόνα 1. Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pGBT9

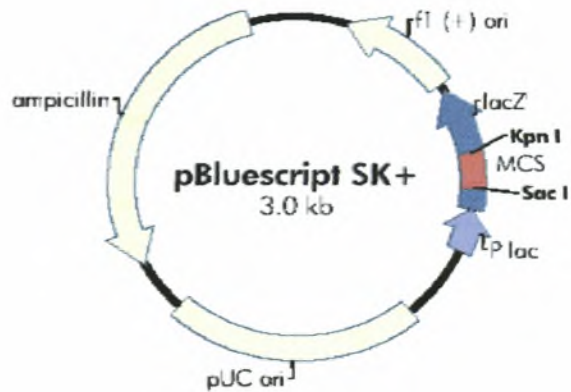
2) pVP16



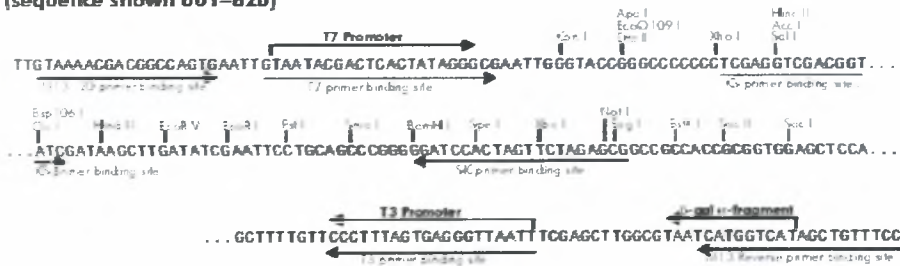
Εικόνα 2. Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pVP16.

3) pBluescript SK+

f1 (+) origin 138-444
 β -galactosidase α -fragment 463-816
 multiple cloning site 653-760
 lac promoter 817-938
 pUC origin 1158-1825
 ampicillin resistance (*bla*) ORF 1976-2833



pBluescript SK (+/-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 601-826)



Εικόνα 3. Ο χάρτης του πλασμδιακού φορέα pBluescript SK⁺.

pGEX-2T (27-4801-01)

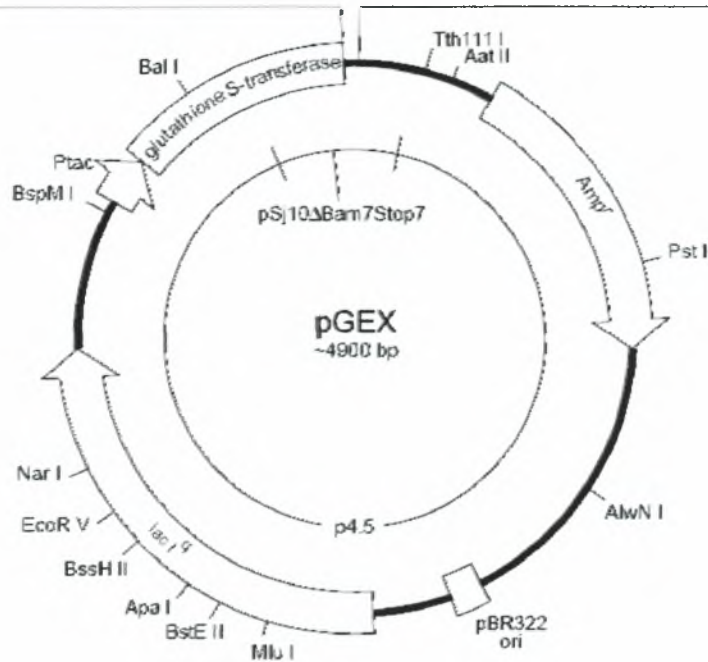
Thrombin

```
Leu Val Pro Arg Gly Ser Pro Gly Ile His Arg Asp
CTG GTT CCG CGT GGA TCC CCG GGA ATT CAT CGT GAC TGA CTG ACG
          BamH I   Sma I   EcoR I           Stop codons
```

pGEX-3X (27-4803-01)

Factor Xa

```
Ile Glu Gly Arg Gly Ile Pro Gly Asn Ser Ser
ATC GAA GGT CGT GGG ATC CCC GGG AAT TCA TCG TGA CTG ACT GAC
          BamH I   Sma I   EcoR I           Stop codons
```

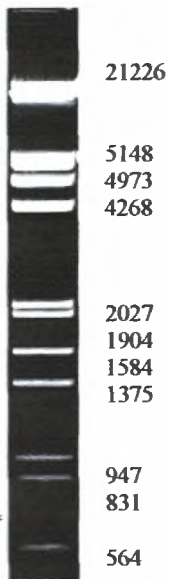


Εικόνα 4. Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pGEX.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

ΜΑΡΤΥΡΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΒΑΡΩΝ DNA, RNA, ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.

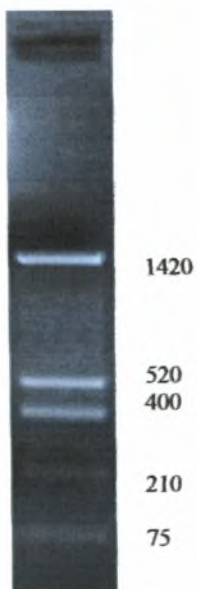
1) Lambda DNA / EcoRI - HindIII Digest



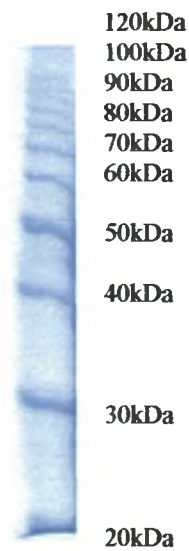
2) Lambda DNA / HindIII Digest



3) puc 18/HinfI



4) Πρωτεϊνικός μάρτυρας μ.β. 20kDa-120kDa



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διατριβή ανιχνεύθηκαν οι μοριακές αλληλεπιδράσεις του N-τελικού άκρου της SRPK1a (SRPK1aNt), μιας πρόσφατα ανιχνευθείσας μορφής SR κινάσης που προέρχεται από εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου της SRPK1 (του κυριότερου εκπροσώπου των SR κινασών στον άνθρωπο). Οι SR κινάσες φωσφορυλιώνουν σερίνες που βρίσκονται σε μοτίβα RS (εναλλαγές σερίνης/αργινίνης) και ενώ έχουν ανιχνευθεί ως κύριοι ρυθμιστές του ματίσματος μέσω φωσφορυλίωσης των SR παραγόντων ματίσματος, πολλά στοιχεία υποδεικνύουν ότι εμπλέκονται και σε άλλες κυτταρικές λειτουργίες για τις οποίες όμως ο ρόλος τους είναι ασαφής. Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν να προσεγγισθεί ο ιδιαίτερος ρόλος της SRPK1a και μέσω αυτού ο ρόλος των SR κινασών γενικότερα.

Για να απομονωθούν οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την αμινοτελική περιοχή της SRPK1a χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των δύο υβριδίων στον *Saccharomyces cerevisiae*. Επιλέχθηκε ως «δόλωμα» και κλωνοποιήθηκε το τμήμα των 528 νουκλεοτιδίων που κωδικοποιεί για τα 176 αμινοξέα της αμινοτελικής περιοχής της SRPK1a (SRPK1aNt) και το οποίο την διαφοροποιεί από την SRPK1. Αφού επιβεβαιώθηκε ότι το «δόλωμα» δεν ενεργοποιεί τα γονίδια αναφοράς εφαρμόστηκε η μέθοδος των δύο υβριδίων με τη χρήση cDNA βιβλιοθήκης η οποία αντιπροσώπευε τα mRNA που εκφράζονται σε αγέννητο έμβρυο ποντικού 9,5 και 10,5 ημερών. Ακολούθησε η επιλογή και κατάταξη των επιλεγθέντων κλώνων βάσει της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς *HIS3*. Διασώθηκαν τα 86 πλασμιδιακά DNA από τα 235 επιλεγμένα στελέχη *S.c.* τα οποία ελέγχθηκαν για την επαλήθευση του αρχικού φαινότυπου, δηλ. ότι : i) τα πλασμιδιακά DNA περιέχουν ένθεμα της cDNA βιβλιοθήκης, ii) δεν ενεργοποιούν από μόνα τους την έκφραση των γονιδίων αναφοράς και τρίτον iii) ότι επιβεβαιώνουν τον φαινότυπο με τον οποίο επιλέχθηκαν εφ' όσον επανεισαχθούν στο αρχικό στέλεχος. Για τις 67 «λειές» που επιλέχθηκαν τελικά διερευνήθηκε εάν είναι ικανές να ενεργοποιήσουν τα γονίδια αναφοράς παρουσία του πλασμιδίου-δολώματος που περιείχε το cDNA της SRPK1 (του τμήματος εκείνου που είναι κοινό μεταξύ SRPK1 και SRPK1a). Αφού διαπιστώθηκε ότι οι αλληλεπιδράσεις του N-τελικού τμήματος της SRPK1a είναι εξειδικευμένες έγινε περαιτέρω ανάλυση τους. Αρχικά αναλύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν οι αλληλουχίες. Κατόπιν κατηγοριοποιήθηκαν και αξιολογήθηκαν με βάση τα γνωστά

από τη βιβλιογραφία δεδομένα για την κάθε μία αλλά και για τις SR κινάσες. Για τις λείες που δεν ταυτίστηκαν με γνωστές αλληλουχίες στις βάσεις δεδομένων έγινε ανάλυση των αντίστοιχων mRNAs σε ανθρώπινους ιστούς με την μέθοδο υβριδισμού κατά Northern. Για δέκα από αυτές έγινε υποκλωνοποίηση σε κατάλληλα πλασμίδια ώστε να παραχθούν πρωτεΐνες σύντηξης με GST και να βεβαιωθεί ότι αλληλεπιδρούν *in vitro* με το N-τελικό άκρο της SRPK1a με χρωματογραφία αγγιστείας.

Τέλος, επιλέχθηκε μία «λεία», ο παράγοντας SAFB (πρωτεΐνη της πυρηνικής μήτρας) για να μελετηθεί πιο διεξοδικά η σχέση του με την SRPK1a. Η επακόλουθη επιβεβαίωση της δημιουργίας συμπλόκου του SAFB με την SRPK1a *in vitro* και *in vivo* σε κύτταρα θηλαστικών α) αναδεικνύει την αξία του συστήματος των δύο υβριδίων ως αξιόλογη μέθοδο ανίχνευσης μοριακών αλληλεπιδράσεων της SRPK1a και β) υποδηλώνει σχέση των SR κινασών με βασικούς κυτταρικούς μηχανισμούς εκτός, αποκλειστικά του ματίσματος, όπως η διαμόρφωση της χρωματίνης και η μεταγραφή, στην οποία εμπλέκεται ο SAFB αλλά και πολλές άλλες από τις υποψήφιες αλληλεπιδρούσες με την SRPK1a πρωτεΐνη.

SUMMARY

In the present thesis were detected the molecular interactions of the N-terminal domain of SRPK1a (SRPK1aNt), a recently detected form of SR kinase which results from alternative splicing of the gene of SRPK1 (the main representative of SR kinases in human). The SR kinases phosphorylate serines that are found in RS motifs (alternations of serines/arginines) and while they have been detected as main regulators of splicing via phosphorylation of SR splicing factors a lot of elements indicate that they are also involved in other cellular processes in which their role is not clear. The aim of this work was to approach the particular role of SRPK1a and via this the role of SR kinases in general.

In order to isolate the proteins that interact with the N-terminal domain of SRPK1a the method of two hybrids in the *Saccharomyces cerevisiae* was used. As "bait" the segment of 528 nucleotides that codes for 176 amino-acids of the N-terminal domain of SRPK1a (SRPK1aNt) which differentiates SRPK1a from the SRPK1, was selected and cloned. After it was confirmed that the "bait" does not activate the reporter genes, the method of two hybrids was applied using a cDNA library which represents the mRNAs that are expressed in mouse fetus of 9,5 and 10,5 days. Clones were selected and classified according to the expression of the reporter gene *HIS3*. From the 235 selected S.c. strains which were checked for the verification of initial phenotype, 86 plasmids DNA were rescued. i.e. i) the plasmids DNA contain insert of the cDNA library, ii) that they do not activate the expression of reporter genes alone and third iii) that they confirm the phenotype for which they were selected when they are introduced in the initial strain. For the 67 "preys" that were selected, it was investigated whether they were capable to activate the reporter genes in the presence of the plasmid-bait that contained the cDNA of SRPK1 (the segment that is common between SRPK1 and SRPK1a). After it was realised that the interactions of the N-terminal domain of SRPK1a are specific, they were analysed. Initially the sequences were analyzed and identified. Then they were categorized and evaluated according to the known bibliography data for each one, but also for the SR kinases. For the "preys" that were not identified with known protein sequences in data banks, the corresponding mRNAs were analysed in human tissues with Northern hybridisation. Ten "preys" were subcloned in suitable plasmids in order to produce

proteins fused with GST and to confirm that they interact *in vitro* with the N-terminal domain of SRPK1a by affinity chromatography.

Finally, one "prey", factor SAFB (protein of nuclear matrix) was selected in order to study more extensively the relation with the SRPK1a. The consequent confirmation of the interaction between SAFB with SRPK1a *in vitro* and *in vivo* in mammalian cells a) demonstrates the value of the system of two hybrids as a valuable method of detection of molecular interactions of SRPK1a and b) it underlines the relation of the SR kinases with basic cellular mechanisms besides splicing, such as remodeling of chromatin, and transcription, in which are involved SAFB, but also a lot of other candidate proteins in interactions with SRPK1a.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1] Γεωργάτσος, Ι.Γ. *Ενζυμολογία* (1991).
- 2] Lubert Stryer, *Biochemistry Fifth edition*.
- 3] Hardie G. and Hanks S. *The protein kinase Facts Book* (1995).
- 4] Steven K. Hanks and Tony Hunter. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 9, 576-596, (1995).
- 5] Roach P.J. Multisite and hierarchal protein phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 266, 14139-14142, (1991).
- 6] Valcarcel, J. and Green, M.R. The SR protein family: pleiotropic functions in pre-mRNA splicing. *Trends Biochem. Sci.* 21, 296-301 (1996).
- 7] Kuroyanagi, H., Kimura, T., Wada, T., Hisamoto, N., Matsumoto, K. and Hagivara, M. SPK-1, a *C. elegans* SR protein kinase homologue, is essential for embryogenesis and required for germline development. *Mech. Dev.* 99, 51-64, (2000).
- 8] Woppmann A., Will C.L., Kornstadt U., Zuo P., Manley J. and Luhrmann R. Identification of an snRNP-associated kinase activity that phosphorylates arginine/serine-rich domains typical of splicing factors. *Nucleic Acids Res.* 21, 2815-2822, (1993).
- 9] Colwill, K., Pawson, T., Andrews, B., Prasad, J., Manley, J.L., Bell, J.C. and Duncan, P.I. The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution. *EMBO J.* 15, 265-275, (1996).
- 10] Rossi, F., Labourier, E., Forne, T., Divita, G., Derancourt, J., Riou, J-F., Antoine, E., Cathala, G., Brunel, C. and Tazi, J. Specific phosphorylation of SR proteins by mammalian topoisomerase I. *Nature* 381, 80-82, (1996).
- 11] Gui, J-F., Lane, W.S. and Fu, X-D. A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factor in the cell cycle. *Nature* 369, 678-682, (1994).
- 12] Keith Wilson and John Walker. Principles and Techniques of Practical Biochemistry. *Cambridge University Press, Fifth edition* (2000).
- 13] Nikolakaki, E., Cheng, D., Lai, J., Giannakouros, T., Cantley, L. and Rabinow, L. Phosphorylation by LAMMER protein kinases. Determination of a Consensus Site, Identification of In vitro Substrates and Implications for substrate preferences. *Biochemistry* 41, 2055-66, (2002).

- 14] Gui J-F., Tronchere H., Chandler S.D. and Fu X-D. Purification and characterization of a kinase specific for the serine- and arginine-rich pre-mRNA splicing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91, 10824-10828, (1994).
- 15] Wang, H-Y., Lin, W., Dyck, J.A., Yeakley, J.M., Songyang, Z., Cantley, L.C. and Fu, X-D. SRPK2: A differentially Expressed SR Protein specific Kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 140, 737-750, (1998).
- 16] Chi Y. Yun and Xiang-Dong Fu. Conserved SR protein kinase functions in nuclear import and its action is counteracted by arginine methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 150, 707-717, (2000).
- 17] Chi Y. Yun, Adolfo L. Velazquez-Dones, Susan K. Lyman, and Xiang-Dong Fu. Phosphorylation-dependent and- independent nuclear import of RS domain-containing splicing factors and regulators. *J. Cell Biol.* 278, 18050-18055, (2003).
- 18] Lai, M.C., Lin, R.I., Huang, S.Y., Tsai, C.W., and Tarn, W.Y. A human importin beta family protein, transportin-SR2, interacts with the phosphorylated RS domain of SR proteins. *J. Biol. Chem.* 275, 7950-7957, (2000).
- 19] Omri, E. and Kahana, C. Screening for modulators of spermine tolerance identifies Sky1, the SR protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, as regulator of polyamine transport and ion homeostasis. *Mol. Cell. Biol.* 21, 175-184, (2001).
- 20] Osamu Nakagawa ,Michael Arnold , Masayo Nakagawa, Hideaki Hamada, John M. Shelton, Hajime Kusano, Thomas M. Harris, Geoffrey Childs, Kevin P. Campbell' James A. Richardson, Ichizo Nishino and Eric N. Olson. Centronuclear myopathy in mice lacking a novel muscle-specific protein kinase transcriptionally regulated by MEF2. *Genes Dev.* 19, 2066-2077, (2005).
- 21] Papoutsopoulou, S., Nikolakaki, E. and Giannakouros, T. SRPK1 and LBR protein kinases show identical substrate specificities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255, 602-607, (1999).
- 22] Papoutsopoulou, S., Nikolakaki, E., Chalepakis, G., Krufft, V., Chevaillier, P. and Giannakouros, T. SR protein-specific kinase 1 is highly expressed in testis and phosphorylates protamine 1. *Nucleic Acids Res.* 27, 2972-2980, (1999).
- 23] Portal Daniel, Lobo S.Guillermo, Kadener Sebastian, Prasad Jayendra, Espinosa M. Joaquin, Pereira Claudio, Zhaohua Tang, Lin Ren-Jang, Manley James, Korndlihtt Alberto, Flawia Mirtha, Torres Hector. *Trypanosoma cruzi* TcSRPK, the first protozoan member of the SRPK family, is biochemically and functionally conserved with metazoan SR protein-specific kinases. *Mol. Biochem. Parasitology* 127, 9-21, (2003).
- 24] Morgan Huse, John Kuriyan. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* 109, 275-282, (2002).

- 25] Bossemeyer, Dirk. Protein kinases-structure and function. *FEBS Lett.* 369, 57-61, (1995).
- 26] Johnson, L.N., Noble, M.E., and Owen, D.J.. Active and inactive protein kinases: Structural basis for regulation. *Cell* 85, 149-158, (1996).
- 27] Natarajan Kannan and Andrew F. Neuwald .Evolutionary constraints associated with functional specificity of the CMGC protein kinases MAPK, CDK, GSK, SRPK, DYRK and CK2 α . *Protein Sci.* 13, 2059-2077, (2004).
- 28] Nolen, B., Yun, C.Y., Wong, C.F., McCammon, J.A., Fu, X-D. and Ghosh, G. The structure of Sky1p reveals a novel mechanism for constitutive activity. *Nat. Struct. Biol.* 8, 176-183, (2001).
- 29] Nikolakaki E., Kohen R., Hartmann A.M., Stamm S., Georgatsou E. and Giannakouros, T. Cloning and characterization of an alternatively spliced form of SR protein kinase 1 that interacts specifically with Scaffold Attachment Factor B. *J. Biol. Chem.* 276, 40175-40182, (2001).
- 30] Chi Y. Yun, Adolfo L. Velazquez-Dones, Susan K. Lyman, and Xiang-Dong Fu. Phosphorylation-dependent and- independent nuclear import of RS domain-containing splicing factors and regulators. *J. Cell Biol.* 278, 18050-18055, (2003).
- 31] Ding JH, Zhong XY, Hagopian JC, Cruz MM, Ghosh G, Feramisco J, Adams JA and Fu XD. Regulated Cellular Partition of SR Protein-specific Kinases in Mammalian Cells. *Mol. Biol. Cell* 10, (2005).
- 32] Gilbert, W., Siebel, C.W. and Guthrie, C. Phosphorylation by Sky1p promotes Np13p shuttling and mRNA dissociation. *RNA* 7, 302-313, (2001).
- 33] Siebel, C.W., Feng, L., Guthrie, C. and Fu, X-D. Conservation in budding yeast of a kinase specific for SR splicing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 5440-5445, (1999).
- 34] Gilbert, W., and Guthrie, C. The Glc7p nuclear phosphatase promotes mRNA export by facilitating association of Mex67p with mRNA. *Mol. Cell* 13, 201-212, (2004).
- 35] Fukuda M., Asano S., Nakamura T., Adachi M., Yoshida M., Yanagida M., et al. CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by nuclear export signal. *Nature* 390, 308-311, (1997).
- 36] Jun Koizumi, Yoshichika Okamoto, Hiroshi Onogi, Akila Mayeda, Adrian R. Krainer, and Masatoshi Hagiwara. The subcellular localization of SF2/ASF is regulated by direct interaction with SR protein kinases (SRPKs). *J. Biol. Chem.* 274, 11125-11131, (1999).
- 37] Henrik Daub, Stephanie Blencke, Peter Habenberger, Alexander Kurtenbach, Julia Dennenmoser, Josef Wissing, Axel Ullrich, and Matt Cotton.

Identification of SRPK1 and SRPK2 as the Major Cellular Protein Kinases Phosphorylating Hepatitis B Virus Core Protein. *J. Virol.* 76, 8124–8137, (2002).

38] Zhou, S., and D. N. Standring. Hepatitis B virus capsid particles are assembled from core-protein dimer precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10046-10050, (1992).

39] Mylonis Hlias, Victoria Drosou, Stefano Brancorsini, Eleni Nikolakaki, Paolo Sassone-Corsi, and Thomas Giannakouros. Temporal Association of Protamine 1 with the Inner Nuclear Membrane Protein Lamin B Receptor during Spermiogenesis. *J. Biol. Chem.* 279, 11626-11631, (2004).

40] Mylonis Hlias, and Thomas Giannakouros. Protein kinase CK2 phosphorylates and activates the SR protein-specific kinase 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 650-656, (2002).

41] Yutani, Y., Tei, Y., Yukioka, M. and Inoue, A. Occurrence of NI and NII type protein kinases in the nuclei from various tissues of the rat. *Arch. Biochem. Biophys.* 218, 409-420, (1982).

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

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

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

45] Heery, D. M., Kalkhoven, E., Hoare, S., and Parker, M. G. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387, 733–736, (1997).

46] Collingwood TN, Urnov FD, Wolffe AP. Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. *J Mol Endocrinol.* 23, 255-75, (1999).

47] Wang, H-Y., Arden, K.C., Bermingham, J.R., Jr., Viars, C.S., Lin, W., Boyer, A.D. and Fu, X-D. Localisation of serine kinases, SRPK1 (SFRSK1) and SRPK2 (SFRSK2), specific for the SR family of splicing factors in mouse and human chromosomes. *Genomics* 57, 310-315, (1999).

48] Church and Gilbert. *PNAS* 81, 1991-1995 (1984).

49] Colwill, K., Feng, L.L., Yeakley, J.M., Gish, G.D., Caceres, J.F., Pawson, T. and Fu, X-D. SRPK1 and CLK/STY protein kinases show distinct substrate specificities for serine/arginine-rich splicing factors. *J. Biol. Chem.* 271, 24569-24575, (1996).

- 50] Nikolakaki, E., Meier, J., Simos, G., Georgatos, S.D. and Giannakouros, T. Mitotic phosphorylation of the lamin B receptor by a serine/arginine kinase and p34/cdc2. *J. Biol. Chem.* 272, 6208-6213, (1997).
- 51] Adolfo Velazquez-Dones, Jonathan C. Hagopian, Chen-Ting Ma, Xiang-Yang Zhong, Huilin Zhou, Gourisankar Ghosh, Xiang-Dong Fu, and Joseph Adams. Mass spectrometric and kinetic analysis of ASF/SF2 phosphorylation by SRPK1 and CLK/STY. *J Biol Chem.* 280, 41761-8, (2005).
- 52] Brandon E. Aubol, Sutapa Chakrabarti, Jacky Ngo, Jennifer Shaffer, Brad Nolen, Xiang-Dong Fu, Gourisankar Ghosh and Joseph A. Adams. Processive phosphorylation of alternative splicing factor/splicing factor 2 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100, 12601-12606, (2003).
- 53] Jacky-Chi Ki Ngo, Sutapa Chakrabarti, Jian-Hua Ding, Adolfo Velazquez-Dones, Brand Nolen, Brandon E. Aubol, Joseph A. Adams, Xiang-Dong Fu, and Gourisankar Ghosh. 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, (2005).
- 54] Xiang-Dong Fu. The superfamily of arginine/serine splicing factors. *RNA* 1, 663-680, (1995).
- 55] Javier F. Cáseres, Gavin R. Sreaton, and Adrian R. Krainer. A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev.* 12, 55-66, (1998).
- 56] Javier F. Cáseres, Tom Misteli, Gavin R. Sreaton, David L. Spector, and Andrian R. Krainer. Role of the modular domains of SR proteins in subnuclear localization and alternative splicing specificity. *J. Cell Biol.*, 138, 225-238, (1997).
- 57] Manley, J. L. and Tacke, R. SR proteins and splicing control. *Genes Dev.* 10. 1569-1579 (1996).
- 58] Corden L. Jeffry and Meera Patturajan. A CTD function linking transcription to splicing. *Trends Biochem. Sci.* 22, 413-416, (1997).
- 59] Brenton R. Graveley. Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA* 6, 1197-1211, (2000).
- 60] Smith Christopher W.J. and Varcарcel Juan. Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem. Sci.* 25, 381-388, (2000).
- 61] Spector DL, Schrier WH, Busch H. Immunoelectron microscopy localization of snRNPs. *Biol. Cell.* 49, 1-10, (1983).
- 62] Tom Misteli. Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing : nuclear architecture meets nuclear function. *J. Cell Sci.* 113, 1841-1849, (2000).

- 63] Fu XD. Specific commitment of different pre-mRNAs to splicing by single SR proteins. *Nature* 2, 82-5, (1993).
- 64] Kuroyanagi, N., Onogi, H., Wakabayashi, T. and Hagiwara, M. Novel SR-protein-specific kinase, SRPK2, disassembles nuclear speckles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242, 357-364, (1998).
- 65] Mintz, P. J., Patterson, S. D., Neuwald, A. F., Spahr, C. S. and Spector, D.L. Purification and biochemical characterization of interchromatin granule clusters. *EMBO J.* 18, 4308-4320, (1999).
- 66] Angus I. Lamond and David L. Spector. Nuclear speckles : A model for nuclear organelles. *Nature Reviews : Mol. Cell Biol.* 4, 605-612, (2006).
- 67] Hollenberg S.M., Sternglanz,R., Feng Cheng,P., and Weintraub H. Identification of a new family of tissue-specific basic helix-loop- helix proteins with a two-hybrid system. *Mol.Cell.Biol.* 15, 3813-3822, (1995).
- 68] Chirat, F., Arkhis, A., Martinage, A., Jaquinod, M., Chevaillier, P. and Sautiere, P. Phosphorylation of human sperm protamines HP1 and HP2 : identification of phosphorylation sites. *Biochim. Biophys. Acta* 1203, 109-114 (1993).
- 69] Shen, H., and Green, M.R. A pathway of sequential arginine-serine-rich domain splicing signal interactions during mammalian spliceosome assembly. *Mol. Cell* 16, 363-373, (2004).
- 70] Shen, H., Kan, J.L., and Green, M.R. Arginine-serine-rich domains bound at splicing enhancers contact the branchpoint to promote prespliceosome assembly. *Mol. Cell* 13, 367-376 , (2004).
- 71] Korie E. Handwerker1 and Joseph G. Gall. Subnuclear organelles : new insights into form and function. *Trends Cell Biol.* 16, 19-26, (2006).
- 72] Prasad, J., Colwill, K., Pawson, T., and Manley, J.L. The protein kinase Clk/Sty directly modulates SR protein activity: both hyper- and hypophosphorylation inhibit splicing. *Mol. Cell Biol.* 19, 6991-7000, (1999).
- 73] Cao, W., Jamison, S.F. and Garcia-Blanco, M.A. Both phosphorylation and dephosphorylation of ASF/SF2 are required for pre-mRNA splicing in vitro. *RNA* 3, 1456-1467, (1997).
- 74] Xiao, S. H. and Manley J. L. Phosphorylation of the ASF/SF2 RS domain affects both protein-protein and protein-RNA interactions and is necessary for splicing. *Genes Dev.* 11, 334-344, (1997).
- 75] J E Mermoud, P T Cohen, and A I Lamond. Regulation of mammalian spliceosome assembly by a protein phosphorylation mechanism. *EMBO J.* 13, 5679-5688, (1994).

- 76] Maniatis Tom and Tasic Bosilijka. Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature* 418, 236-243, (2002).
- 77] Mabon Stephen A., Misteli Tom. Differential recruitment of pre-mRNA splicing factors to alternatively spliced transcripts in vivo. *Plos Biology* 3, e374, (2005).
- 78] Caceres JF, Stamm S, Helfman DM, and Krainer AR. Regulation of alternative splicing in vivo by overexpression of antagonistic splicing factors. *Science* 265, 1706-9, (1994).
- 79] Izaurrealde, E., Kutay, U., von Kobbe, C., Mattaj, I.W., and Gorlich, D. The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *EMBO J.* 16, 6535-6547, (1997).
- 80] Camacho-Vanegas O. F. Weighardt C. Ghigna F. Amaldi S. and Riva G. Biamonti. Growth-dependent and growth-independent translation of messengers for heterogeneous nuclear ribonucleoproteins. *Nucleic Acids Res.* 25, 3950-3954, (1997).
- 81] Matunis, e. L., R. Kelley, and G. Dreyfuss. Essential role for a heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) in oogenesis: hrp40 is absent from the germ line in the dorsoventral mutant squid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 2781-2784, (1994).
- 82] Yutaka Hirose and James L. Manley. RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes Dev.* 14, 1415-1429, (2000).
- 83] Javier F. Cáceres, and Alberto R. Kornblihtt. Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genetics* 18, 186-193, (2002).
- 84] Kanopka, A., O.Muhlemann, and G.Akusjarvi. Inhibition by SR proteins of splicing of a regulated adenovirus pre-mRNA. *Nature* 381, 535-538, (1996).
- 85] Bratt A, Wilson WJ, Troyanovsky B, Aase K, Kessler R, Van Meir EG, and Holmgren L. Angiomotin belongs to a novel protein family with conserved coiled-coil and PDZ binding domains. *Gene* 298, 69-77, (2002).
- 86] Spector, D.L., Fu, X.-D. & Maniatis,T. Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus. *EMBO J.* 10, 3467-3481, (1991).
- 87] Jimenez-Garcia, L.F. & Spector, D.L. *In vivo* evidence that transcription and splicing are coordinated by a recruiting mechanism. *Cell* 73, 47-59, (1993).
- 88] Hedley, M.L., Amrein, H., and Maniatis, T. An amino acid sequence motif sufficient for subnuclear localization of an arginine/serine-rich splicing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 11524-11528, (1995).

- 89] Yeakley, J.M., Tronchere, H., Olesen, J., Dyck, J.A., Wang, H-Y. and Fu X-D. Phosphorylation regulates in vivo interaction and molecular targeting of Serine/Arginine-rich pre-mRNA splicing factors. *J. Cell Biol.* 145, 447-455, (1999).
- 90] Misteli Tom, Caseres F. Javier, Clement Q.Jade, Krainer R. Adrian, Wilkinson F. Miles, Spector L. David. Serine phosphorylation of SR proteins is required for their recruitment to sites of transcription in vivo. *J. Cell Biol.* 143, 297-307, (1998).
- 91] Lai, M.C., and Tarn, W.Y. Hypophosphorylated ASF/SF2 binds TAP and is present in messenger ribonucleoproteins. *J. Biol.Chem.* 279, 31745-31749, (2004).
- 92] Ming-Chih Lai, Hao-Wei Kuo,Wen-Cheng Chang and Woan-Yuh Tarn. A novel splicing regulator shares a nuclear import pathway with SR proteins. *EMBO J.* 22, 1359-1369, (2003).
- 93] Paula Sacco-Bubulya and David L.Spector. Disassembly of interchromatin granule clusters alters the coordination of transcription and pre-mRNA splicing. *J. Cell Biol.* 156, 425-436, (2002).
- 94] Tom Maniatis and Robin Reed. An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* 416, 499-506, (2002).
- 95] Zhaohua Tang, Tiffany Kuo,Jenny Shen,and Ren-Jang Lin. Biochemical and genetic conservation of fission yeast Dsk1 and human SR protein-specific kinase 1. *Mol. Cell. Biol.* 20, 816-824, (2000).
- 96] Pante, N. and Aebi, U. Molecular dissection of the nuclear pore complex. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 31, 153-199, (1996).
- 97] Worman, J.H., Yuan, J., Blobel, G. and Georgatos, S.D. A lamin B receptor in the nuclear envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 8531-8534, (1988).
- 98] Spyros D. Georgatos. The inner nuclear membrane: simple, or very complex? *EMBO J.* 20, 2989-2994, (2001).
- 99] Pyrpasopoulou, A., Meier, J., Maison, C., Simos, G. and Georgatos, S.D. The lamin B receptor (LBR) provides essential chromatin docking sites at the nuclear envelope. *EMBO J.* 15, 7108-7119, (1996).
- 100] Collas, P., Courvalin, J.C. and Poccia, D. Targeting of membranes to sea urchin sperm chromatin is mediated by a lamin B receptor-like integral membrane protein. *J. Cell Biol.* 135, 1715-172, (1996).
- 101] Worman J.H., Evans, C.D. and Blobel G. The lamin B receptor of the nuclear envelope inner membrane: a polytopic protein with eight potential transmembrane domains. *J. Cell Biol.*, 111, 1535-154, (1990).

- 102] Ye Q. and Worman H.J. Primary structure analysis and lamin B and DNA binding of human LBR, an integral protein of the nuclear envelope. *J. Biol. Chem.* 269, 11306-11311, (1994).
- 103] Appelbaum, J., Blobel G. and Georgatos S.D. In vivo phosphorylation of the lamin B receptor. Binding of lamin B to its nuclear membrane receptor is affected by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 265, 4181-4184, (1990).
- 104] Soullam B. and Worman H.J. The amino terminal domain of the lamin B receptor is a nuclear envelope targeting signal. *J. Cell Biol.* 120, 1093-10100, (1993).
- 105] Simos G. and Georgatos S.D. The inner nuclear membrane protein p58 associates in vivo with a p58 kinase and the nuclear lamins. *EMBO J.* 11, 4027-4036, (1992).
- 106] Nikolakaki E., Simos, G., Georgatos S.D. and Giannakouros T. Nuclear envelope associated kinase phosphorylates arginine-serine motifs and modulates interactions between the lamin B receptor and other nuclear proteins. *J. Biol. Chem.* 271, 8365-8372, (1996).
- 107] Nikolakaki, E., Meier, J., Simos, G., Georgatos, S.D. and Giannakouros T. Mitotic phosphorylation of the lamin B receptor by a serine/arginine kinase and p34/cdc2. *J. Biol. Chem.* 272, 6208-6213, (1997).
- 108] Worman J.H., Yuan J., Blobel G. and Georgatos S.D. A lamin B receptor in the nuclear envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8531-8534, (1988).
- 109] Makoto Takano, Masaki Takeuchi, Hiromi Ito, Kazuhiro Furukawa, Kenji Sugimoto, Saburo Omata, Tsuneyoshi Horigome. The binding of lamin B receptor to chromatin is regulated by phosphorylation in the RS region. *Eur.J.Biochemistry* 269, 943-953, *FEBS* (2002).
- 110] Makoto Takano, Yuhei Koyama, Hiromi Ito, Satomi Hoshino, Hiroshi Onogi, Masatoshi Hagiwara, Kazuhiro Furukawa, and Tsuneyoshi Horigome. Regulation of binding of lamin B receptor to chromatin by SR protein Kinase and cdc2 kinase in *Xenopus* egg extracts. *J. Biol. Chem.* 279, 13265-13271, (2004).
- 111] Bruce R. Zetter .Hold that Line: Angiotensin Regulates Endothelial Cell Motility. *J. Cell Biol.* 152, 35-36, (2001).
- 112] Polioudaki, H., Kourmouli, N., Drosou, V., Bakou, A., Theodoropoulos, P.A., Singh, P.B., Giannakouros, T. and Georgatos. S. Histones H3/H4 form a tight complex with the inner nuclear membrane protein LBR and heterochromatin protein 1. *EMBO Rep.* 21, 10 (2001).
- 113] Domenjoud, L., Nussbaum,G., Adham,I.M., Greeske,G. and Engel,W. Evolution of pro-protamine P2 genes in primates. *Genomics*, 8, 127-133, (1990).

- 114] Johnson, P.A., Peschon, J.J., Yelick, P.C., Palmiter, R.D. and Hecht, N.B. Sequence homologies in the mouse protamine 1 and 2 genes. *Biochim. Biophys. Acta*, 950, 45-53, (1988).
- 115] Simons A, Melamed-Bessudo C, Wolkowicz R, Sperling J, Sperling R, Eisenbach L, Rotter V. PACT: cloning and characterization of a cellular p53 binding protein that interacts with Rb. *Oncogene* 14, 145-55, (1997).
- 116] Witte, M. M., and Scott, R.E. The proliferation potential protein-related (P2P-R) gene with domains encoding heterogeneous nuclear ribonucleoprotein association and Rb1 binding shows repressed expression during terminal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 1212-1217, (1997).
- 117] Robert E. Scott, Thomas Giannakouros, Sizhi Gao, and Philippos Peidis Functional potential of P2P-R: A role in the cell cycle and cell differentiation related to its interactions with proteins that bind to matrix associated regions of DNA. *J. Cell. Bioch.* 90, 6-12, (2003).
- 118] Renz A, and Fackelmayer FO. Purification and molecular cloning of the scaffold attachment factor (SAF-B), a novel human nuclear protein that specifically binds to S/MAR-DNA. *Nucleic acids Res.* 24, 843-849, (1996).
- 119] Dickinson LA and Kohwi-Shigematsu T. Nucleolin is a matrix attachment region DNA-binding protein that specifically recognizes a region with base-unpairing potential. *Mol. Cell Biol.* 15, 456-465, (1995).
- 120] Takeuchi M., and Yanagida M. A mitotic role for a novel fission yeast protein kinase *dsk1* with cell cycle stage dependent phosphorylation and localization. *Mol. Biol. Cell* 4, 247-260, (1993).
- 121] Zhaohua Tang, Mitsuhiro Yanagida, and Ren-Jang Lin. Fission yeast mitotic regulator *Dsk1* is an SR protein specific kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 5963-5969, (1998).
- 122] Guenhael Sanz, Lluís Mir and Alain Jacquemin-Sablon. Bleomycin resistance in mammalian cells expressing a genetic suppressor element derived from the *SRPK1* Gene. *Cancer Res.* 62, 4453-4458, (2002.)
- 123] Schenk PW, Stoop H, Bokemeyer C, Mayer F, Stoter G, Oosterhuis JW, Wiemer E, Looijenga LH, and Nooter K. Resistance to platinum-containing chemotherapy in testicular germ cell tumors is associated with downregulation of the protein kinase *SRPK1*. *Neoplasia*, 6, 4 297-301, (2004).
- 124] Kathryn S. Sciabica, Qian J. Dai and Rozanne M. Sandri-Goldin. ICP27 interacts with *SRPK1* to mediate HSV splicing inhibition by altering SR protein phosphorylation. *EMBO J.* 22, 1608-1619, (2003).
- 125] Chee-Gun Lee, Lisa K. Hague Hong Li and Robert Donnelly. Identification of toposome, a novel multisubunit complex containing topoisomerase IIa. *Cell Cycle* 3, 638-647, (2004).

- 126] Scaturro G, Zito F, and Matranga V. The oligomeric integrity of toposome is essential for its morphogenetic function. *Cell Biol. Int.* 22, 321-6, (1998).
- 127] James P., Halladay J., and Craig G, E.A. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient Two-hybrid selection in Yeast. *Genetics* 144, 1425-1436, (1996).
- 128] Gao, S. Scott, R.E. Stable overexpression of specific segments of the P2P-R protein in human MCF-7 cells promotes camptothecin-induced apoptosis, *J. Cell. Physiol.* 197, 445-452, (2003.)
- 129] Nayler O., Stratling W., Bourquin J.-P., Stagljar I., Lindemann L., Jasper H., Hartmann A.M., Fackelmayer F.O., Ullrich A., and Stamm S. "SAF-B couples transcription and pre-mRNA splicing to SAR/MAR elements." *Nucleic Acids Res.* 26, 3542-3549, (1998).
- 130] Oesterreich S., Lee A.V., Sullivan T.M., Samuel S.K., Davie J.R., and Fuqua S.A.W. "Novel nuclear matrix protein HET binds to and influences activity of the HSP27 promoter in human breast cancer cells." *J. Cell. Biochem.* 67, 275-286 (1997).
- 131] Nakamura, H.; Sudo, T.; Tsuiki, H.; Miyake, H.; Morisaki, T.; Sasaki, J.; Masuko, N.; Kochi, M.; Ushio, and Y.; Saya, H. Identification of a novel human homolog of the *Drosophila* dlg, P-dlg, specifically expressed in the gland tissues and interacting with p55. *FEBS Lett.* 433, 63-67, (1998).
- 132] H. He, C.K. Tan, K.M. Downey and A.G. So. A tumor necrosis factor alpha- and interleukin 6-inducible protein that interacts with the small subunit of DNA polymerase delta and proliferating cell nuclear antigen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 11979-11984, (2001).
- 133] Oscar de Luis and Jesús del Mazo. Gene expression of mouse M1 and M2 pyruvate kinase isoenzymes correlates with differential poly(A) tract extension of their mRNAs during the development of spermatogenesis." *Biochim. Biophys. Acta* 1396, 294-305, (1998).
- 134] Huei-Mei Chen, Karen L. Schmeichel, I. Saira Mian, Sophie Lelièvre, Ole W. Petersen, and Mina J. Bissell. AZU-1: A Candidate Breast Tumor Suppressor and Biomarker for Tumor Progression. *Mol. Biol. Cell* 11, 1357-1367, (2000).
- 135] Gergely F, Karlsson C, Still I, Cowell J, Kilmartin J, and Raff JW . The TACC domain identifies a family of centrosomal proteins that can interact with microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 14352-7, (2000).
- 136] Stone JR, Maki JL, and Collins T. Basal and hydrogen peroxide stimulated sites of phosphorylation in heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2 *Biochemistry* 42, 1301-8, (2003).
- 137] Mahajan MC, Narlikar GJ, Boyapaty G, Kingston RE, and Weissman SM.

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2, MeCP1, and SWI/SNF form a chromatin remodeling complex at the beta-globin locus control region. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 15012-7, (2005).

138] Ford LP, Wright WE, and Shay JW. A model for heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in telomere and telomerase regulation. *Oncogene* 21, 580-3, (2002).

139] Andreas Traweger, Deyu Fang, Yun-Cai Liu , Wolfgang Stelzhammer, István A. Krizbai , Fritz Fresser, Hans-Christian Bauer, and Hannelore Bauer. The Tight Junction-specific Protein Occludin Is a Functional Target of the E3 Ubiquitin-protein Ligase Itch. *J. Biol. Chem.* 277, 12, 10201-10208, (2002).

140] Ling Qiu, Claudio Joazeiro, Nan Fang, Hong-Ying Wang, Chris Elly, Yoav Altman, Deyu Fang, Tony Hunter, and Yun-Cai Liu. Recognition and Ubiquitination of Notch by Itch, a Hect-type E3 Ubiquitin Ligase. *J. Biol. Chem.*, 275, 35734-35737, (2000).

141] Shibanuma M, Kim-Kaneyama JR, Ishino K, Sakamoto N, Hishiki T, Yamaguchi K, Mori K, Mashimo J, and Nose K. Hic-5 communicates between focal adhesions and the nucleus through oxidant-sensitive nuclear export signal. *Mol Biol Cell.* 14, 1158-71, (2003).

142] Matsuya M, Sasaki H, Aoto H, Mitaka T, Nagura K, Ohba T, Ishino M, Takahashi S, Suzuki R, Sasaki T. Cell adhesion kinase beta forms a complex with a new member, Hic-5, of proteins localized at focal adhesions. *J. Biol. Chem.* 273, 1003-14, (1998).

143] Fujimoto N, Yeh S, Kang HY, Inui S, Chang HC, Mizokami A, and Chang C. Cloning and characterization of androgen receptor coactivator, ARA55, in human prostate. *J Biol Chem.* 274, 8316-21, (1999).

144] Gallagher WM, Argentini M, Sierra V, Bracco L, Debussche L, and Conseiller E. MBP1: a novel mutant p53-specific protein partner with oncogenic properties. *Oncogene* 18, 3608-16, (1999).

145] D'Andrea LD, and Regan L. TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem. Sci.* 655-662, (2003).

146] Hanover JA, Yu S, Lubas WB, Shin SH, Ragano-Caracciola M, Kochran J, and Love DC. Mitochondrial and nucleocytoplasmic isoforms of O-linked GlcNAc transferase encoded by a single mammalian gene. *Arch. Biochem. Biophys.* 409, 287-97, (2003).

147] Toleman C, Paterson AJ, Whisenhunt TR, and Kudlow JE. Characterization of the histone acetyltransferase (HAT) domain of a bifunctional protein with activable O-GlcNAcase and HAT activities. *J. Biol Chem.* 279, 53665-73, (2004).

148] Nishimune H, Sanes JR, and Carlson SS. A synaptic laminin-calcium

channel interaction organizes active zones in motor nerve terminals. *Nature* 432, 580-7 (2004).

149] Knight D, Tolley LK, Kim DK, Lavidis NA, and Noakes PG. Functional analysis of neurotransmission at beta2-laminin deficient terminals. *J. Physiol.* 546,789-800, (2003).

150] Yoshiaki Onishi 1 and Harutoshi Kizaki. Molecular Cloning of the Genes Suppressed in RVC Lymphoma Cells by Topoisomerase Inhibitors 1. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 228, 7-13, (1996).

151] Amir H. Salehi, Steven Xanthoudakis, and Philip A. Barker. NRAGE, a p75 Neurotrophin Receptor-interacting Protein, Induces Caspase Activation and Cell Death through a JNK-dependent Mitochondrial Pathway. *J. Biol. Chem.*, 277, 48043-48050, (2002).

152] Kuwajima T, Taniura H, Nishimura I, and Yoshikawa K . Necdin interacts with the Msx2 homeodomain protein via MAGE-D1 to promote myogenic differentiation of C2C12 cells. *J. Biol. Chem.* 279, 40484-93, (2004).

153] Georgatos, S.D. Towards an understanding of nuclear morphogenesis. *J. Cell. Biochem.*, 55, 69-76 (1994).

154] Michael V. Inmana, Levyb, Beverly A. Mocke and Geoffrey C. Owensa. Gene organization and chromosome location of the neural-specific RNA binding protein Elavl4. *Gene* 208, 139-145, (1998).

155] Ryoichi Abe, Yutaka Uyeno, Koichi Yamamoto, and Hiroshi Sakamoto Tissue-Specific Expression of the Gene Encoding a Mouse Binding Protein Homologous to Human HuD Antigen. *DNA Res.* 1, 175-180, (1994).

156] Szabo, A., Dalmau, J., Manley, G.; Rosenfeld, M.; Wong, E.; Henson, J.; Posner, J. B.; and Furneaux, H. M. HuD, a paraneoplastic encephalomyelitis antigen, contains RNA-binding domains and is homologous to elav and sex-lethal. *Cell* 67, 325-333, (1991).

157] Saito K, Fujiwara T, Katahira J, Inoue K, and Sakamoto H. TAP/NXF1, the primary mRNA export receptor, specifically interacts with a neuronal RNA-binding protein HuD. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291-7, (2004).

158] Zagon IS, Verderame MF, and McLaughlin PJ. The biology of the opioid growth factor receptor (OGFr). *Brain Res Brain Res Rev.* 38, 351-76, (2002).

159] Ian S. Zagon , a, Michael F. Verderameb, Warren E. Zimmerc and Patricia J. McLaughlina. Molecular characterization and distribution of the opioid growth factor receptor (OGFr) in mouse*1 *Brain Res. Mol. Brain Res.* 84, 106-114,(2000).

160] Herz J, Hamann U, Rogne S, Myklebost O, Gausepohl H, and Stanley KK.

Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *EMBO J.* 7, 4119-27, (1988).

161] Nakamoto M, Ozawa M, Jacinto SD, Furukawa T, Natori Y, Shirahama H, Yonezawa S, Nakayama T, and Muramatsu T. Mouse heparin binding protein-44 (HBP-44) associates with brushin, a high-molecular-weight glycoprotein antigen common to the kidney and teratocarcinomas. *J. Biochem.* 114, 344-9, (1993).

163] Williamson, M. P. The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem. J.* 297,249-260, (1994).

164] Bork, P., and Sudol, M. The WW domain: a signalling site in dystrophin?. *Trends Biochem. Sci.* 19, 531-533, (1994).

165] Feller, R., Ren, R., Hanafusa, H., and Baltimore, D. SH2 and SH3 domains as molecular adhesives: the interactions of Crk and Abl. *Trends Biochem. Sci.* 19, 453-458, (1994.)

166] Mayer, B. J., and Eck, M. J. SH3 domains: minding your p's and q's. *Curr. Biol.* 5, 364-367, (1995).

167] Florian Weighardt, Fabio Cobianchi Luca Cartegni, Ilaria Chiodi,, Antonello Villa, Silvano Riva and Giuseppe Biamonti. A novel hnRNP protein (HAP/SAF-B) enters a subset of hnRNP complexes and relocates in nuclear granules in response to heat shock. *J. Cell Sci.* 112, 1465-1476, (1999.)

168] Steffi Oesterreich, Qingping Zhang, Torsten Hopp, Suzanne A. W. Fuqua, Marten Michaelis, Holly H. Zhao, James R. Davie, C. Kent Osborne, and Adrian V. Lee. Tamoxifen-Bound Estrogen Receptor (ER) Strongly Interacts with the Nuclear Matrix Protein HET/SAF-B, a Novel Inhibitor of ER-Mediated Transactivation. *Mol. Endocrinol.* 14, 369-381, (2000).

169] Liu G, and Schwartz JA & Brooks SC p53 down-regulates ER-responsive genes by interfering with the binding of ER to ERE. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264, 359-364, (1999).

170] M. E. Eva Ludéruša, Arjan de Graafb, Elena Mattiaa, , Jan L. den Blaauwena, Marjolein A. Grandea, Luitzen de Jonga and Roel van Driela Binding of matrix attachment regions to lamin B1. *Cell* 70, 949-959, (1992).

171] Ηλίας Α. Μυλωνής. «Χαρακτηρισμός και μελέτη της κινάσης πρωτεϊνών που φωσφορυλιώνει τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες αργινίνης/σερίνης του αμινοτελικού άκρου του υποδοχέα της λαμίνης Β». *Διδακτορική διατριβή* (2003).

172] Kattapuram T, Yang S, Maki JL, and Stone JR. Protein kinase CK1alpha regulates mRNA binding by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C in response to physiologic levels of hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* 280, 15340-7, (2005).

- 173] Saito K, Fujiwara T, Katahira J, Inoue K, and Sakamoto H. TAP/NXF1, the primary mRNA export receptor, specifically interacts with a neuronal RNA-binding protein HuD. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321, 291-7, (2004).
- 174] Chitra F. Manohar, Marc L. Short§, Anthony Nguyen, Nadine N. Nguyen, Daniel Chagnovich, Qiwei Yang, and Susan L. Cohn. HuD, a Neuronal-specific RNA-binding Protein, Increases the in Vivo Stability of MYCN RNA *J. Biol. Chem.* 277, 1967-1973, (2002).
- 175] Andreas Traweger, Renate Fuchs, Istvan A. Krizbai, Thomas M. Weiger, Hans-Christian Bauer, and Hannelore Bauer. The Tight Junction Protein ZO-2 Localizes to the Nucleus and Interacts with the Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein Scaffold Attachment Factor B. *J. Biol. Chem.*, 278, 2692-2700, (2003).
- 176] Hiroo Fujita, Kenjiro Kamiguchi, Donny Cho, Motoko Shibanuma, Chikao Morimoto, and Kouichi Tachibana. Interaction of Hic-5, A Senescence-related Protein, with Focal Adhesion Kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 26516-26521, (1998).
- 177] Naoyuki Nishiya, Kouichi Tachibana, Motoko Shibanuma, Jun-Ichi Mashimo, and Kiyoshi Nose. Hic-5-Reduced Cell Spreading on Fibronectin: Competitive Effects between Paxillin and Hic-5 through Interaction with Focal Adhesion Kinase. *Mol. Cell. Biol.* 21, 5332-5345, (2001).
- 178] Filippo G. Giancotti, and Erkki Ruoslahti. Integrin Signaling *Science* 285, 1028 – 1033, (1999).
- 179] Troyanovsky B, Levchenko T, Mansson G, Matvijenko O, and Holmgren L. Angiomotin: an angiostatin binding protein that regulates endothelial cell migration and tube formation. *J. Cell Biol.* 152, 1247-54, (2001).
- 180] Jimenez B, Volpert OV, Crawford SE, Febbraio M, Silverstein RL, and Bouck N. Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat Med.* 6, 41-8, (2000).
- 181] Berezney R, and Coffey DS. Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60, 1410–1417, (1974).
- 182] Mirkovitch, J., Mirault, M.-E. and Laemmli, U.K. Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold. *Cell*, 39, 223–232, (1984).
- 183] Adachi, Y., E. Ka's, and U. K. Laemmli. Preferential, cooperative binding of DNA topoisomerase II to scaffold-associated regions. *EMBO J.* 8, 3997–4006. (1989).
- 184] Galina V. Glazko, Eugene V. Koonin, Igor B. Rogozin and Svetlana A. Shabalina. A significant fraction of conserved noncoding DNA in human and

mouse consists of predicted matrix attachment regions. *Trends Genetics* 19, 119-124, (2003).

185] Steven M. Townson, Toby Sullivan, QingPing Zhang, Gary M. Clark, C. Kent Osborne, Adrian V. Lee, and Steffi Oesterreich. HET/SAF-B Overexpression Causes Growth Arrest and Multinuclearity and Is Associated with Aneuploidy in Human Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* 6, 3788-3796, (2000).

186] Arao Y, Kuriyama R, Kayama F, and Kato S. A nuclear matrix-associated factor, SAF-B, interacts with specific isoforms of AUF1/hnRNP D. *Arch. Biochem. Biophys.* 380, 228-36, (2000).

187] Romig, H. Fackelmayer, F. O.; Renz, A. Ramsperger, U. and Richter, A. Characterization of SAF-A, a novel nuclear DNA binding protein from HeLa cells with high affinity for nuclear matrix/scaffold attachment DNA elements. *EMBO J.* 11, 3431-3440, (1992).

188] Ilaria Chiodi, Marco Biggiogera, Marco Denegri, Margherita Corioni, Florian Weighardt, Fabio Cobianchi, Silvano Riva and Giuseppe Biamonti. Structure and dynamics of hnRNP-labelled nuclear bodies induced by stress treatments. *J. Cell Sci.* 113, 4043-4053, (2000).

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

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

191] Oesterreich S, Weng CN, Qiu M, Hilsenbeck SG, Osborne CK, and Fuqua SA. The small heat shock protein hsp27 is correlated with growth and drug resistance in human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 53, 4443-8, (1993).

192] Steven M. Townson, Kaiyan Kang, Adrian V. Lee, and Steffi Oesterreich Structure-Function Analysis of the Estrogen Receptor. Corepressor Scaffold Attachment Factor-B1. Identification of a potent transcriptional repression domain. *J. Biol. Chem.* 279, 26074-26081, (2004).

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

194] Shiming Jiang, Rene Meyer, Kaiyan Kang, C. Kent Osborne, Jiemin Wong, and Steffi Oesterreich. Scaffold attachment factor SAFB1 suppresses ER α -mediated transcription in part via interaction with N-CoR. *Mol. Endocrinol.* (2005.)

195] S. Oesterreich , Q.P. Zhang, and A.V. Lee Inhibition of oestrogen receptor activity by the co-repressor HET/SAF-B is relieved by blockade of histone deacetylase activity. *Eur. J. Cancer* 36, 43-44, (2000).

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

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

198] Michael Kipp, Frank Go`Hring,, Thorsten Ostendorp, Cornelis M. Van Drunen, Roel Van Driel, Michael Przybylski, and Frank O. Fackelmayer. SAF-Box, a Conserved Protein Domain That Specifically Recognizes Scaffold Attachment Region DNA. *Mol. Cell. Biol.* 20, 7480-7489, (2000).

199] A. Lymberopoulou, R. Kohen, M. Goudovas, I. Sanidas, G. Panayotou, E. Nikolakaki and E. Georgatsou. Identification and partial characterization of proteins interacting with SAF-B, a nuclear scaffold associated protein. *Books of Abstracts of the 55th Meeting of Hellenic Society of Biochemistry & Molecular Biology.* 50, (2003.)

200] Steven Townson, Klaudia M. Dobrzycka, Adrian V. Lee, Mamie Air, Wanleng Deng, Kaiyan Kang, Shiming Jiang, Kioka Noriyuki, Kai Michaelis, and Steffi Oesterreich. SAFB2. A new SAFB homolog and estrogen receptor corepressor. *J. Biol. Chem.*, 278, 20059-20068, (2003).

201] Klemens J. Hertel and Brenton R. Graveley. RS domains contact the pre-mRNA throughout spliceosome assembly. *Trends in Bioch. Sci.* 30, 115-118, (2005).

202] Casiano C.A., Martin S.J., Green D.R. and Tan E.M. Selective cleavage of nuclear autoantigens during CD95(Fas/APO-1)-mediated T cell apoptosis. *J. Exp. Med.* 184, 765-770, (1996).

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΟΝΟΜΑ : ΚΟΕΝ ΡΑΣΕΛΑ
ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ : Λάρισα, Ελλάδα
ΗΜΕΡ. ΓΕΝΝΗΣΗΣ : 7/6/1967
ΟΙΚΟΓ. ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ : Έγγαμη
ΥΠΗΚΟΟΤΗΤΑ : Ελληνική
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ : Ανθίμου Γαζή 1, 41 222 Λάρισα
ΤΗΛΕΦΩΝΟ : (2410) 534264, 535260
FAX : (2410) 258381
EMAIL : rkoen@med.uth.gr
rkoen@otenet.gr

A. ΣΠΟΥΔΕΣ – ΔΡΑΣΗ

I. Πανεπιστημιακή Εκπαίδευση

Σεπτέμβριος 1986 - : Τμήμα Φαρμακευτικής, Σχολή Επιστημών
Μάρτιος 1991 : Υγείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο
Θεσσαλονίκης.
Αποφοίτηση με βαθμό πτυχίου: Επτά και
ενενήντα έξι εκατοστά (7,96) "ΛΙΑΝ ΚΑΛΩΣ"

ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 1999 – : Εκπόνηση Διδακτορικής διατριβής του Τομέα
Σήμερα : Βιοχημείας στο Ιατρικό Τμήμα, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας, με θέμα: "Ανίχνευση των
αλληλεπιδράσεων μιας ισομορφής της κινάσης
SRPK - 1 με την τεχνική in vivo των δύο
υβριδίων".

II. Ειδική Εκπαίδευση

Σεπτέμβριος 1990- : Παρακολούθηση Εκπαιδευτικού πρόγραμματος για
Ιούνιος 1991 : Φαρμακοποιούς και Ιατρούς από την Ελληνική
Εταιρεία Ομοιοπαθητικής Ιατρικής στο Ιπποκράτειο

Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης.

- Σεπτέμβριος 1991 -
Ιούνιος 1993** : Παρακολούθηση Μεταπτυχιακών σεμιναρίων Αρωματοθεραπείας και Φυτοθεραπείας υπό την αιγίδα των τομέων Φαρμακολογίας και Φαρμακογνωσίας Πανεπιστημίου Αθηνών.
- Οκτώβριος 1994** : Σεμινάριο Εθνοφαρμακολογίας στο δάσος του Αμαζονίου (Περού) που διοργανώθηκε από το Αμερικάνικο Βοτανικό Συμβούλιο (American Botanical Council)
- Μάιος 1996 -
Δεκέμβριος 1996** : Σειρά εκπαιδευτικών σεμιναρίων για τα ανθοϊάματα του Dr. Bach.

Συμμετοχή σε Ερευνητικά Προγράμματα:

- 1991 - 1992** : "Μεταγραφικοί παράγοντες στην ανάπτυξη και Διαφοροποίηση" Karolinska Institute, Center for Biotechnology, Novum Huddinge Sweden.
- 2000 - 2001** "Δομή και λειτουργία του ευκαρυωτικού ριβοσώματος και αλληλεπιδράσεις μεταξύ ριβοσωματικών συστατικών με τη βοήθεια μεταλλάξεων γονιδίων. α) του Ριβοσωματικού RNA, β) Ριβοσωματικών πρωτεϊνών και γ) του eRF1 ενός παράγοντα τερματισμού της πρωτεϊνοσύνθεσης που εμπλέκεται στο μοντέλο prion της ζύμης" με κωδικό ΠΕΝΕΔ 99ΕΔ-479

Υποτροφίες

1991 - 1992 : Μεταπτυχιακή υπότροφη του Karolinska Institute, Center for Biotechnology Sweden. που χρηματοδοτείται από την Γ.Γ.Ε.Τ.

Συμμετοχή σε Επιστημονικά Συνέδρια και Εκπαιδευτικά Σεμινάρια

21-23 Μαΐου 1986

Συμμετοχή στο 4ο Πανελλήνιο Φαρμακευτικό Συνέδριο στην Αθήνα

25 - 29 Μαΐου 1990

Συμμετοχή στο 5ο Πανελλήνιο Φαρμακευτικό Συνέδριο στην Αθήνα

24-25 Μαΐου 1991

Συμμετοχή στο 2^ο Σεμινάριο στην προχωρημένη Φαρμακοχημεία με θέμα "Πρόοδοι στον σχεδιασμό φαρμάκων" στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

5 - 8 Νοεμβρίου 1992

Σεμινάριο με θέμα: "Φαρμακολογία και Τοξικολογία των αιθερίων ελαίων.

Διοργανώθηκε από το Aromatherapy organisation council στο Λονδίνο.

21 - 22 Οκτωβρίου 1995

Συμμετοχή στο 2ο Διεθνές Συνέδριο Οφθαλμικής, Μικροσημειοτικής και Φυσικής Ιατρικής στην Θεσσαλονίκη με θέμα "Ιριδολογία και Ιριδιοδιαγνωστική με Η/Υ"

4 - 5 Νοεμβρίου 1995

Συμμετοχή στο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο της Ελληνικής Εταιρείας Εθνοφαρμακολογίας με θέμα: "Φαρμακολογική και Τοξικολογική δράση των Μυκήτων"

28 - 29 Ιουνίου 1997

Συμμετοχή στο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο της Ελληνικής Εταιρείας Εθνοφαρμακολογίας με θέμα: "Παθήσεις του Ουροποιητικού Συστήματος & Φυτοθεραπευτική προσέγγιση".

3 - 5 Οκτωβρίου 1997

Συμμετοχή στο Διεθνές Συμπόσιο που διοργανώθηκε από το Υπουργείο Αιγαίου με θέμα "Η Μαστίχα της Χίου".

12 - 14 Σεπτεμβρίου 1998

Συμμετοχή στο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο της Ελληνικής Εταιρείας Εθνοφαρμακολογίας με θέμα: "Κρόκος: Φάρμακο & Αρτυμα"

7 - 9 Νοεμβρίου 1998

Συμμετοχή στο 9^ο Πανελλήνιο Φαρμακευτικό Συνέδριο Αθήνα.

20 - 21 Μαρτίου 1999

Συμμετοχή στο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο της Ελληνικής Εταιρείας Εθνοφαρμακολογίας με θέμα: "Ιαματικά Νερά της Ελλάδος - Εφαρμογές στην θεραπευτική και Κοσμητολογία".

19 - 20 Ιουνίου 1999

Συμμετοχή στο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο της Ελληνικής Εταιρείας Εθνοφαρμακολογίας με θέμα: "Το τσάι του βουνού" (*Sideritis spp*).

29 - 30 Ιανουαρίου 2000

Συμμετοχή στο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο της Ελληνικής Εταιρείας Εθνοφαρμακολογίας με θέμα: "Παθήσεις του μυοσκελετικού συστήματος και η φυτοθεραπευτική τους προσέγγιση".

16-20 Ιουλίου 2000

Συμμετοχή στο 18th Διεθνές Συνέδριο Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας
“Beyond the Genome” Birmingham, UK.

13-15 Νοεμβρίου 2003

Συμμετοχή στο 55^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και
Μοριακής Βιολογίας, Αθήνα.

25-27 Νοεμβρίου 2004

Συμμετοχή στο 56^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και
Μοριακής Βιολογίας, Λάρισα.

25-26 Ιουνίου 2005

Συμμετοχή στο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο της Ελληνικής Εταιρείας
Εθνοφαρμακολογίας με θέμα: «Το φασκόμηλο» (*Salvia officinalis*).

28-30 Οκτωβρίου 2005

Συμμετοχή στο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο της Ελληνικής Εταιρείας
Εθνοφαρμακολογίας με θέμα: « Βρώσιμοι και Θεραπευτικοί μύκητες».

Συμμετοχή στο 9-11 Δεκεμβρίου 2005

Συμμετοχή στο 57^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και
Μοριακής Βιολογίας, Αθήνα.

Επαγγελματική Δραστηριότητα:

1991 - 1999 : Εξάσκηση του Φαρμακευτικού Επαγγέλματος.

1999 - Σήμερα Εκπόνηση Διδακτορικής διατριβής.

ΑΝΑΚΟΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ – ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Ανακοινώσεις

1. Ομιλία στο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο της Ελληνικής Εταιρείας Εθνοφαρμακολογίας με θέμα: "Παθήσεις του μυοσκελετικού συστήματος και η φυτοθεραπευτική τους προσέγγιση". Ιανουάριος 2000
2. Eleni Nikolakaki, Rachel Kohen, Elena Georgatsou and Thomas Giannakouros,. “ Biochemical characterization and alternative splicing of SR Protein Kinase 1”. Proceedings of the 52nd Meeting of the Hellenic Society of Biochemistry and molecular Biology (EEBMB). Newsletter, Vol 47 (pp.78-82), Thessaloniki 2000.
3. A. Lymberopoulou, R. Kohen, M. Goudovas, I. Sanidas, G. Panayotou, E. Nikolakaki² and E. Georgatsou. “Identification and partial characterization of proteins interacting with SAF-B, a nuclear scaffold associated protein”. Proceedings of the 55nd Meeting of the Hellenic Society of Biochemistry and molecular Biology (EEBMB). Newsletter Vol. 50, (pp.391-396) Athens 2003.
4. D.Tsianou, A.Lyberopoulou, R.Kohen, S.Bonanou, E.Georgatsou. “Analysis of molecules differentially interacting with the Highly homologous SAFB1 and SAFB2 proteins”. Proceedings of the 57nd Meeting of the Hellenic Society of Biochemistry and molecular Biology (EEBMB). Newsletter Vol. 52, (pp.210), Athens 2005.

Δημοσιεύσεις

1. Nikolakaki E., Kohen R., Hartmann A.M., Stamm S., Georgatsou E. And Giannakouros, T. “Cloning and characterization of an alternatively spliced form of SR Protein kinase 1 that interacts specifically with scaffold attachment factor-b.”_ Journal of Biological Chemistry, vol.276 No. 43, Issue of October 26, pp.40175-40182, 2001.

ΓΛΩΣΣΕΣ

- ΑΓΓΛΙΚΑ: Certificate of Proficiency of Palso, Proficiency C.B.S.
- ΓΑΛΛΙΚΑ: Καλή γνώση
- ΕΒΡΑΪΚΑ: Καλή γνώση

ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ

- Μέλος της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας
- Μέλος της Παγκόσμιας Ομοιοπαθητικής Εταιρείας Liga Medicorum
- Μέλος της Ελληνικής Εταιρείας Φαρμακοποιών (Ε.Ε.Φ.Ο.Φ.)
- Μέλος της Ελληνικής Επιστημονικής Εταιρείας Φυτοθεραπείας και Αρωματοθεραπείας (ΕΛ.ΕΠ.Ε.Φ.Α.)
- Μέλη της Ελληνικής Εταιρείας Εθνοφαρμακολογίας

Cloning and Characterization of an Alternatively Spliced Form of SR Protein Kinase 1 That Interacts Specifically with Scaffold Attachment Factor-B*

Received for publication, May 24, 2001, and in revised form, July 20, 2001
Published, JBC Papers in Press, August 16, 2001, DOI 10.1074/jbc.M104755200

Eleni Nikolakaki‡§, Rachel Kohen¶, Annette M. Hartmann||, Stefan Stamm**, Elena Georgatsou¶, and Thomas Giannakouros‡

From the ‡Laboratory of Biochemistry, School of Chemistry, The Aristotelian University of Thessaloniki, Thessaloniki 54006, Greece, the ¶Laboratory of Biochemistry, Medical School, University of Thessaly, Larissa 41222, Greece, the ||Ludwig Maximilian University, Nussbaumstrasse 7, München 80336, Germany, and the **Institute of Biochemistry, University of Erlangen-Nuremberg, Fahrstrasse 17, Erlangen 91054, Germany

Serine/arginine protein kinases have been conserved throughout evolution and are thought to play important roles in the regulation of mRNA processing, nuclear import, germline development, polyamine transport, and ion homeostasis. Human SRPK1, which was first identified as a kinase specific for the SR family of splicing factors, is located on chromosome 6p21.2-p21.3. We report here the cloning and characterization of SRPK1a, which is encoded by an alternatively processed transcript derived from the SRPK1 gene. SRPK1a contains an insertion of 171 amino acids at its NH₂-terminal domain and is similar to SRPK1 in substrate specificity and subcellular localization. Moreover, both isoforms can induce alternative splicing of human tau exon 10 in transfected cells. Using the yeast two-hybrid assay, we found that the extended NH₂-terminal domain of SRPK1a interacts with Scaffold Attachment Factor-B, a nuclear scaffold-associated protein. Confirmation of this interaction was provided by *in vitro* binding assays, as well as by co-immunoprecipitation from 293T cells doubly transfected with SRPK1a and SAF-B. Our studies suggest that different SRPK family members are uniquely regulated and targeted and thus the multiple SRPK kinases present in higher eukaryotes may perform specialized and differentiable functions.

class of enzymes that specifically modify SR or RS dipeptide motifs. To date, at least nine distinct genes encoding SR protein kinases have been identified in the genomes of mammals (*human SRPK1*, GenBank[®] accession number U09564; *human SRPK2*, U88666A; *mouse SRPK1*, AJ224115; *mouse SRPK2*, B006036), yeast (*Saccharomyces cerevisiae Sky1*, S55098; *Schizosaccharomyces pombe Dsk1*, D13447), fruit fly (*Drosophila SRPK1*, AF01149), nematode (*Caenorhabditis elegans SPK-1*, AF241656), and plants (*Arabidopsis thaliana SRPK1*, AJ292978).

Mammalian SRPK1 and SRPK2, which are highly related in sequence, kinase activity, and substrate specificity, were initially purified and cloned on the basis of their ability to phosphorylate members of the SR family of splicing factors *in vitro* and mediate splicing factor redistribution during the cell cycle (1–4). SR proteins themselves constitute a highly conserved protein family that is intimately involved in the regulation of pre-mRNA splicing and other steps of RNA metabolism (for reviews, see Refs. 5–7). Biochemical studies demonstrated that SR proteins are required at multiple steps in the assembly of the spliceosome, the dynamic RNA-protein complex that catalyzes intron removal (8–10). Because RS domains are known to participate in protein-protein and protein-RNA interactions during spliceosome assembly, phosphorylation of these domains can modulate interactions involving SR proteins and is, therefore, essential for their function in constitutive splicing (3, 11, 12). Furthermore, phosphorylation of SR proteins leads to their release from nuclear speckles, in which they are concentrated to active sites of transcription in the nucleoplasm (1, 3, 13–15). Because changes in the intranuclear SR protein concentration play a critical role in determining which of the competing splice sites are selected, phosphorylation can also indirectly control alternative splice site selection (16–20). Finally, it has been proposed that the formation of complexes between SF2/ASF and SRPKs may modulate the subcellular distribution of SF2/ASF (21).

Yet, the lack both of authentic SR proteins in the yeast genome and of alternative mRNA splicing in yeast suggests that these kinases play roles in the regulation of cellular processes in addition to that of mRNA splicing. Indeed, genetic analyses have implicated Dsk1, which is the fission yeast homologue of SRPK1 in the regulation of chromosome segregation at the metaphase/anaphase transition (22). Furthermore, one of the endogenous substrates of Sky1p, in *S. cerevisiae*, is the RNA binding protein Npl3p, which has been implicated in mRNA transport (23). Sky1p was found to regulate nuclear import of Npl3p by promoting the interaction between Npl3p

Serine/arginine (SR¹) protein kinases represent a novel

* This work was supported by grants from the Greek Secretariat of Research and Technology (IENEAE 1999 to T. G. and E. G.), from the Greek Ministry of Education (Π.Σ.Ε to E. G.), and from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 473) and the Johannes and Frieda Marohn Stiftung (to S. S.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

The nucleotide sequence(s) reported in this paper has been submitted to the GenBank[™]/EBI Data Bank with accession number(s) AJ318054 and AJ224115.

§ To whom correspondence should be addressed: Laboratory of Biochemistry, School of Chemistry, Aristotelian University of Thessaloniki, Thessaloniki 54006, Greece. Tel.: 30-31-997726; Fax: 30-31-997689; E-mail: nikol@ccf.auth.gr.

¹ The abbreviations used are: SR, serine/arginine; SRPK serine/arginine protein kinase; SC, synthetic complete; LBR, lamin B receptor; SAF-B, scaffold attachment factor-B; S/MAR, scaffold/matrix attachment regions; bp, base pair(s); RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; GST, glutathione S-transferase; CMV, cytomegalovirus; GFP, green fluorescence protein; AT, 3-aminotriazole; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis.

and its nuclear import receptor Mtr10p (24). In a recent report it was also demonstrated that Sky1p is a key regulator of polyamine transport in *S. cerevisiae* (25). *Sky1* disruption in yeast cells resulted in dramatically reduced uptake of spermine, spermidine, or putrescine. Data presented in the same report suggest that Sky1p is also involved in regulating ion homeostasis.

Further support for the hypothesis that SRPKs have a broader regulatory role was obtained with the finding that the *C. elegans* family member *spk-1* is predominantly expressed in germ cells and is required for germline development in *C. elegans* (26). In line with the above observations we have recently shown that SRPK1 is highly expressed in human and mouse testis and that the enzyme phosphorylates protamine 1 in an efficient and highly specific manner (27). SRPK1 also has other additional substrates, besides the SR family of splicing factors, such as the Lamin B Receptor (LBR), an integral protein of the inner nuclear membrane, that contains a stretch of RS repeats at its nucleoplasmic NH₂-terminal domain (28, 29).

Here we report the cloning and characterization of a novel SRPK1 gene product, named SRPK1a, that contains an insertion of 171 amino acids at its NH₂-terminal domain. The two SRPK isoforms are nearly identical in terms of substrate specificity and subcellular localization and in their ability to induce alternative splicing in transfected cells. Furthermore, they were similarly expressed in various human tissues, although the level of expression of SRPK1a was significantly lower than that of SRPK1. Yet, using the yeast two-hybrid assay we found that, unlike SRPK1, SRPK1a interacts, via its NH₂-terminal domain, with SAF-B, a well characterized S/MAR binding protein. The so-called S/MARs (for Scaffold/Matrix Attachment Regions) are specialized DNA elements that mediate the attachment of chromatin to the nuclear scaffold and have been found in all eukaryotic organisms investigated (for review see Ref. 30). The implications of this interaction are discussed below.

MATERIALS AND METHODS

Cloning of Human SRPK1a—A Lambda ZAP Express human testis cDNA library (Stratagene, La Jolla, CA) was screened using a 617-bp fragment, comprising part of the sequence of human SRPK1 (1) (nucleotides 262–879, starting from ATG; for details see Ref. 27). 5 × 10⁶ plaques were screened by hybridization of Hybond filters (Amersham Pharmacia Biotech) using standard procedures (31) and yielded ten positive clones. One of the clones corresponded to full-length SRPK1. Two of the clones were identical to SRPK but contained an insertion of 513 bp between AAA (encoding lysine, the fourth amino acid of SRPK1) and GTG (encoding valine, the fifth amino acid of SRPK1). The sequence of both strands was determined using specific oligonucleotide primers and by a series of nested deletions and unidirectional exonuclease III digestion according to the manufacturer's instructions (double-stranded Nested deletion kit, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). The EMBL data bank accession number for SRPK1a is AJ318054.

Northern Blot Hybridization—Human multiple tissue I and II Northern blot filters were purchased from CLONTECH Laboratories (Palo Alto, CA) and processed as previously described (27). A cDNA of 860 bp, comprising nucleotides 1–860 of the sequence of mouse SRPK1 (EMBL data bank accession number AJ224115; see also Ref. 27), and a PCR fragment of 528 bp, comprising nucleotides 1–528 of the coding region of human SRPK1a, were used as probes for SRPK1 and SRPK1a, respectively. The 860-bp mouse fragment is 92% identical, at the DNA level, (98% at the protein level) to the respective human fragment.

RT-PCR Analysis—RT-PCR analysis was performed using the Titan One Tube RT-PCR system (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim D-68298, Germany) as per the manufacturer's instructions. Total RNA from human testis, provided from CLONTECH laboratories, was used as template. Two micrograms of testis RNA was initially denatured at 94 °C for 1 min and then incubated, for first-strand cDNA synthesis, with 10 pmol of antisense primer (5'-CTTCTGCTCTGTAGATCAC-3') at 55 °C for 35 min. The following sense primer (10 pmol) was used for PCR amplification: 5'-GGTCTCACCATGGAGCGGAAA-3'. PCR

conditions were: denaturation at 94 °C for 2 min, followed by 40 cycles: 30-s denaturation at 94 °C, annealing at 58 °C for 30 s, extension at 68 °C for 40 s, and a final extension at 68 °C for 10 min. Amplified products were resolved by electrophoresis through 1% agarose gel and ethidium bromide staining.

Plasmids, Expression of Proteins, and Antibodies—The pGEX-2T bacterial expression vector (Amersham Pharmacia Biotech) was used to express human SRPK1 (27, 28) and the NH₂-terminal domain of SRPK1a (amino acids 1–176; construct termed GST-SRPK1aNt) fused with glutathione S-transferase (GST) in *Escherichia coli*. To subclone the NH₂-terminal domain of SRPK1a into pGEX-2T, two primers (sense: 5'-AGTAGGATCCATGGAGCGGAAAGGTGAGCGG-3', containing a BamHI site; antisense: 5'-CTAGAAGCTTCACTGCAGAGAGAGGGATGG-3') were used to amplify a DNA fragment, comprising nucleotides 1–528 of the coding region of SRPK1a, by polymerase chain reaction. PCR was performed as described (29) but with the addition of 10% Me₂SO. The PCR fragment was digested with BamHI, repurified, and cloned into the BamHI and SmaI sites of pGEX-2T. Wild-type and specifically altered forms of LBR protein were prepared as GST fusion proteins as previously described (29). Briefly, wtNt: contains the NH₂-terminal domain of LBR (amino acids 1–205); ΔRSNt: contains the NH₂-terminal domain of LBR but lacks the RS motifs (amino acids 75–84; ⁷⁵RSRSRSRSRS⁸⁴); wtNtG⁷⁸, wtNtA⁸⁰, wtNtA⁸², and wtNtA⁸⁴: fusion proteins identical to wtNt except that in each case Ser⁷⁸, Ser⁸⁰, Ser⁸², or Ser⁸⁴ was mutated to Gly or Ala. Full-length SRPK1 and SRPK1a were also subcloned into the p-FLAG-CMV-2 (Eastman Kodak) vector and expressed in 293T cells with a FLAG tag fused at their NH₂ termini. For this purpose oligonucleotides corresponding to the 5'- and 3'-complementary coding regions of human SRPK1 and SRPK1a with additional EcoRI sites at the 5'- and 3'-ends, respectively, were prepared (SRPK1, sense: 5'-CGGGAATTCATGGAGCGGAAAGTGCTTGGCG-3', antisense: 5'-CGAGAATTCCTCCGGAGTTAAGCCAAGGGTGCCG-3'; SRPK1a, sense: 5'-CGGGAATTCATGGAGCGGAAAGGTGAGCGG-3', antisense: 5'-CGAGAATTCCTCCGGAGTTAAGCCAAGGGTGCCG-3'), and PCR was performed. The products were digested with EcoRI, repurified, and cloned into the EcoRI site of p-FLAG-CMV-2 in the correct orientation. Rat SAF-B-PC encoding the COOH-terminal part of rat SAF-B (starting from nucleotide 1746 of the rat SAF-B sequence; EMBL data bank accession number AF056324) was expressed as a GST fusion protein or subcloned into the pEGFP-C2 vector (CLONTECH) and expressed in 293T cells with green fluorescence protein (GFP) fused at its NH₂ terminus as previously described (32).

Polyclonal antibodies against SRPK1/SRPK1a and specifically against SRPK1a were produced by injecting GST-SRPK1 and GST-SRPK1aNt into rabbits as described previously (33). The M5 anti-FLAG monoclonal antibody was a kind gift of George Mosialos (Biomedical Sciences Research Center Al. Fleming, Vari, Attiki), whereas the anti-GFP monoclonal antibody was obtained from Roche Molecular Biochemicals.

Yeast Two-hybrid Screen—A 528-bp fragment coding for the NH₂-terminal domain of SRPK1a (SRPK1aNt; see above) was amplified by PCR (sense primer: 5'-CTGGAATTCATGGAGCGGAAAGGTGAGCGG-3'; antisense primer: 5'-CTAGAAGCTTCACTGCAGGAGAGAGGGATGG-3'), digested with BamHI, and cloned into the BamHI and SmaI sites of pGBT9 (CLONTECH) in-frame with the GAL4 DNA binding domain. *S. cerevisiae* strain pJ69-4A (*MATa trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ*) (34) was co-transformed with pGBT9-SRPK1aNt and an equimolar mixture of E9.5 and E10.5 mouse embryonic cDNA libraries constructed in the pVP16 fusion vector (35). Positive clones were selected on SC (synthetic complete) minus Trp, Leu, His medium (36) containing 11.25 μM Ade and 3 mM AT (3-amino triazole). The positive pVP16-derived plasmids isolated in this screen were rescued and used to again co-transform yeast strain pJ69-4A with pGBT9-SRPK1aNt or pGBT9-SRPK1 to confirm and test the specificity of the interactions. The coding region of SRPK1 was amplified by PCR (sense primer: 5'-GTAGAATTCATGGAGCGGAAAGGTGCTTGGCG-3'; antisense primer: 5'-TAGGAATTCGGAGTTAAGCCAAGGGTGCCG-3'), digested with EcoRI, and cloned into the EcoRI site of pGBT9 in the correct orientation.

Cell Culture, Western Blotting, and Immunoprecipitation—Human 293T cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum and antibiotics. 5 × 10⁵ cells (~50% confluent) were transfected with 5 μg of p-FLAG-CMV-2-SRPK1 or p-FLAG-CMV-2-SRPK1a DNA using the calcium phosphate method (37). Total amounts of plasmid DNA were made up to 20 μg with pcDNA3 (Invitrogen). After 16 h the medium was changed and the

cells were incubated for another 24 h. Cells were lysed with 200 µl of 1% Triton buffer (1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 µg/ml aprotinin, and 1 mM PMSF) for 30 min on ice. Whole cell extracts were clarified by centrifugation for 15 min in a microfuge, and the protein concentration was determined by the method of Bradford (38). One hundred and fifty micrograms of each lysate was supplemented with the appropriate volume of 5× sample electrophoresis buffer and analyzed on 10% SDS-PAGE. Western blotting was performed with the M5 anti-FLAG monoclonal antibody, an alkaline phosphatase-coupled goat anti-mouse secondary antibody, and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium substrate. For immunoprecipitation 100 µg of each extract was incubated with 1 µl of the M5 anti-FLAG monoclonal antibody or with 5 µl of the anti-SRPK1 or the anti-SRPK1a polyclonal antibodies for 3 h on ice. Twenty microliters of protein G beads (for the monoclonal antibody) or protein A beads (for the polyclonal antibodies) was added and incubated overnight on ice. Antigen-antibody complexes were collected by centrifugation and were washed three times with lysis buffer. In vitro phosphorylation assays were performed on beads as described previously (29) using as substrates wild-type and specifically altered forms of LBR protein (see above) and recombinant ASF/SF2 (kindly provided by Jamal Tazi, Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, UMR 5535, CNRS). The same procedure was followed for immunoprecipitation from rat testis cytosol.

Cells co-transfected with plasmid DNA encoding GFP-SAF-B-PC and FLAG-SRPK1 or FLAG-SRPK1a were lysed in 200 µl of radioimmune precipitation buffer (1% Nonidet P-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 10 mM sodium phosphate, pH 7.2, 2 mM EDTA, 10 µg/ml aprotinin, and 1 mM PMSF). One hundred microliters of the supernatants, following centrifugation, was diluted 4-fold in radioimmune precipitation rescue buffer (10 mM sodium phosphate, pH 7.2, 20 mM NaCl, 10 µg/ml aprotinin, and 1 mM PMSF) and immunoprecipitations were performed overnight at 4 °C, under shaking, using 3 µl of anti-GFP antibody and 20 µl of protein G-Sepharose. The beads were washed three times in a buffer (50 mM Hepes, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 10 µg/ml aprotinin, and 1 mM PMSF) and resuspended in 30 µl of SDS sample buffer. The bound proteins were subsequently analyzed on 10% SDS-PAGE followed by Western blotting using the M5 anti-FLAG monoclonal antibody.

GST Pull-down Experiments—GST-SAF-B (~3–4 µg) immobilized on glutathione-Sepharose beads was incubated with 50 µl of cell extract, derived from 293T cells transfected with plasmid DNA encoding either FLAG-SRPK1 or FLAG-SRPK1a, in phosphate-buffered saline buffer (20 mM phosphate buffer, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5 mM PMSF) in a total volume of 0.5 ml. Incubations were carried out for 60 min at room temperature. The beads were harvested, washed three times with phosphate-buffered saline, and resuspended in 25 µl of SDS sample buffer. Bound SRPK1 and SRPK1a were analyzed on 10% SDS-polyacrylamide gels and detected by Western blotting using the M5 anti-FLAG monoclonal antibody.

In Vivo Splicing of Human Tau 9-10-11 Minigene—Tau construct SV9/10/11, containing exon 10 flanked by tau exons 9 and 11, was described earlier (39). In vivo splicing was performed essentially as described (40). Briefly, 3 × 10⁵ HEK293 cells were transfected with 1 µg of the reporter gene together with increasing amounts (0, 0.5, and 1 µg) of plasmid DNA encoding FLAG-SRPK1 or FLAG-SRPK1a, using the calcium phosphate method. RNA was isolated 17–24 h following transfection, using the RNeasy mini kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription and PCR were carried out as described previously (40).

RESULTS

In our previous reports we used a PCR approach to reclone the SRPK1 cDNA to examine its relationship with a previously identified LBR kinase (28, 29) and identify novel substrates besides the SR family of splicing factors (27). In this respect we screened a Lambda ZAP Express human testis cDNA library, at high stringency, using as a probe a 617-bp PCR fragment comprising nucleotides 262–879 of the sequence of human SRPK1 (for details see Ref. 27). We isolated three full-length cDNA sequences corresponding to SRPK1. However, one of the clones contained an insertion of 513 bp between AAA (encoding lysine, the fourth amino acid of SRPK1) and GTG (encoding valine, the fifth amino acid of SRPK1), which is absent from the known sequence of SRPK1 (see Figs. 1 and 2). Because it is well

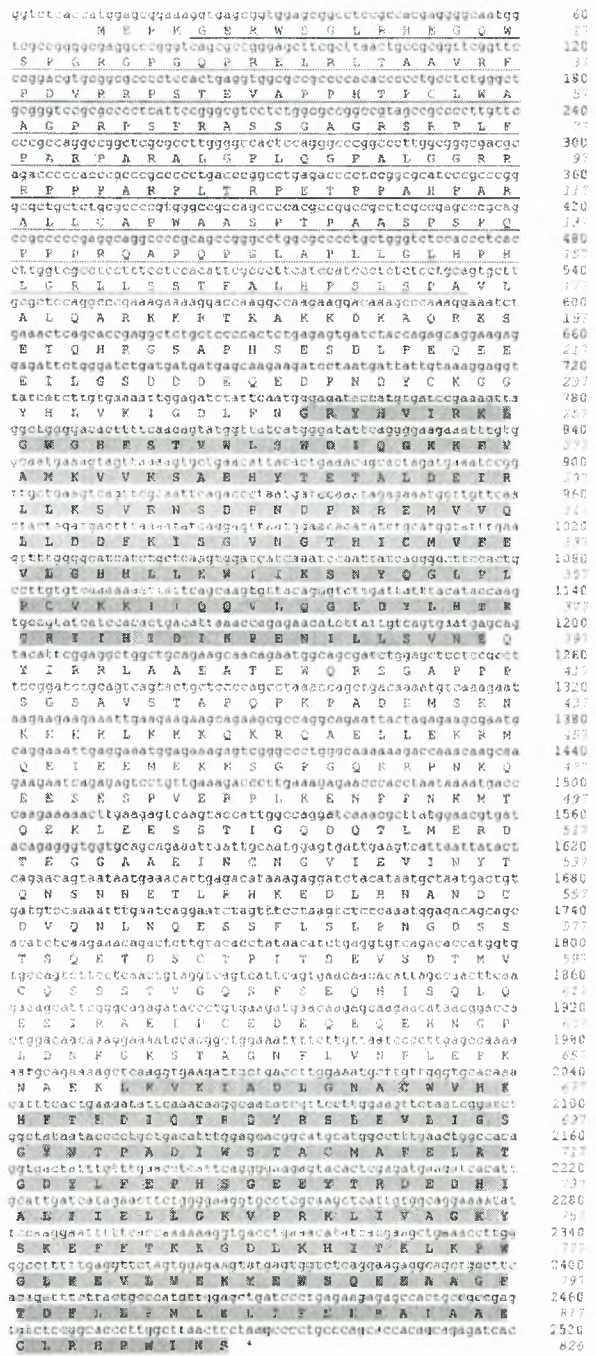


FIG. 1. Nucleotide and predicted amino acid sequences of SRPK1a (EMBL accession number AJ318054). Underlined is the sequence encoded by the 513-bp insert, and shaded are kinase catalytic domains. A spacer sequence separates the catalytic domains.

documented that human SRPK1 is mapped to chromosome 6p21.2-p21.3 (41) and the genomic sequence is available (EMBL data bank, locus HS422H11, accession number Z99128) we compared the sequence of the isolated clone with the genomic sequence. The sequence alignment revealed that the SRPK1 gene comprises 16 exons (Fig. 2A, see also EMBL data bank, locus HS422H11, accession number Z99128, gene = dJ422H11.1). The 513-bp insert is located between the first two exons of SRPK1. This suggests that this sequence may be alternatively spliced. The SRPK1 cDNA originally isolated by

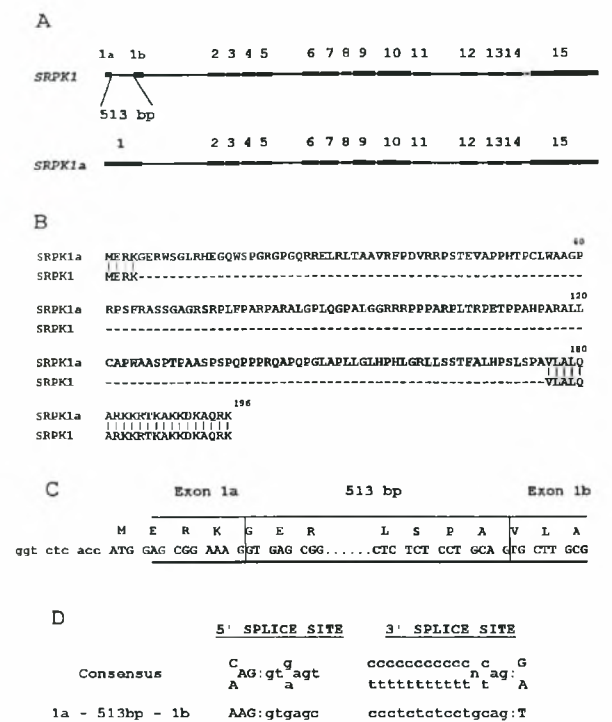


FIG. 2. Schematic representation of the alternative splicing of the 513-bp fragment. A, schematic representation of the *SRPK1a/SRPK1* gene structure. Sequence comparison of AJ318054 and Z99128 revealed the genomic organization of the *SRPK1a/SRPK1* gene. Boxes indicate exons; nucleotide positions in Z99128 are 94672–94651, 94136–94076, 64621–64503, 62531–62423, 61719–61632, 60419–60332, 47947–47841, 46336–46171, 44567–44542, 44102–43889, 43509–43090, 42718–42621, 30976–30869, 16212–16143, 12037–11945, 9096–6642 (the genomic sequence is antiparallel to AJ318054). Exon 1 within the *SRPK1a* transcript comprises exons 1a and 1b of *SRPK1* as well as the 513-bp segment (nucleotides 94650–94137), which is excluded from *SRPK1*. B, comparison of the amino acid sequence encoded by exon 1 of *SRPK1a* with the respective sequences encoded by exons 1a and 1b of *SRPK1*. The sequence encoded by the 513-bp segment, which is absent in *SRPK1*, is denoted by the dashed line. C, the nucleotide sequence surrounding the alternatively spliced 513-bp segment. Splicing out of the 513-bp segment would result in production of *SRPK1* (containing the amino acid sequences encoded by exons 1a and 1b). Splicing in of the 513-bp segment would result in production of *SRPK1a* (containing the amino acid sequence encoded by the entire exon 1). D, 5'- and 3'-splice sites found at the boundaries between exons 1a/1b and the 513-bp segment. The coding sequence in both *SRPK1a* and *SRPK1* is capitalized, whereas the spliced out sequence (513-bp segment) from *SRPK1* is in lowercase letters.

Gui *et al.* (1) would encode the isoform lacking the 171 amino acids encoded by the 513-bp segment, whereas the novel cDNA, designated *SRPK1a* (EMBL data bank, accession number AJ318054), would encode the isoform containing this sequence (Fig. 2, A–C). Further analysis revealed the presence of 5'- and 3'-splice sites at the ends of the intervening regions, suggesting that the 513-bp segment normally represents an intronic sequence that is not, however, spliced out from the *SRPK1a* transcript (Fig. 2D).

The extended NH₂-terminal domain of *SRPK1a* shares no significant similarity to known proteins and contains a relatively high number of proline residues (Fig. 1B). Yet, unlike *SRPK2*, it does not contain the PPLP consensus motif required for the binding of a subclass of WW domain-containing proteins (3, 42). Most notably, *SRPK1a* contains two LXXLL motifs (¹⁴⁸LAPLL¹⁵² and ¹⁵⁸LGRLL¹⁶²), which are thought to facilitate the interaction of different proteins with nuclear receptors (43, 44).

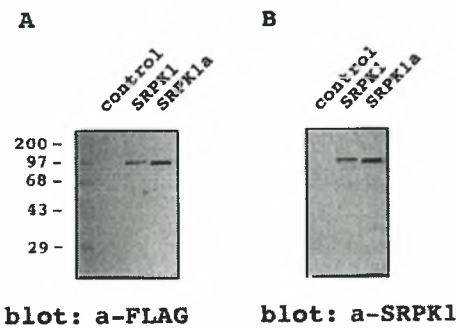


FIG. 3. Expression of SRPK1a in mammalian cells. Lysates from 293T cells transfected with the pCMV-2 vector alone (*control*) or with pCMV-2 vectors encoding FLAG-tagged SRPK1 or SRPK1a were analyzed on 10% SDS-polyacrylamide gels. The proteins were then transferred to nitrocellulose, and epitope-tagged SRPK1 or SRPK1a were detected with the M5 anti-FLAG monoclonal antibody (A) or the anti-SRPK1 polyclonal antibody (B).

The predicted molecular mass of the kinase encoded by the *SRPK1a* cDNA is 92.3 kDa. To detect this protein product, we tagged the *SRPK1a* polypeptide with a FLAG epitope and expressed the fusion protein in 293T cells. As a control we used FLAG-tagged SRPK1. Extracts from 293T cells transfected with the pCMV-2 vector alone showed no proteins detected by anti-FLAG immunoblotting (Fig. 3A, control), whereas extracts from 293T cells transfected with pCMV-2 vectors encoding FLAG-tagged SRPK1 or SRPK1a demonstrated immunoreactive proteins of ~97 and 92 kDa, respectively (Fig. 3A; note that, although the predicted molecular mass of SRPK1 is 74.3 kDa, the protein was shown to migrate on SDS-polyacrylamide gels with an apparent molecular mass of 92–95 kDa; see Refs. 1 and 21). The same bands were also obtained when the immunoblotting was performed with an anti-SRPK1 polyclonal antibody raised against GST-SRPK1 (Fig. 3B). Only a faint band of 92 kDa corresponding to FLAG-SRPK1a could be detected when the immunoblotting was performed with a specific anti-SRPK1a polyclonal antibody raised against GST-SRPK1a_{Nt} (the extended NH₂-terminal domain of SRPK1a fused to GST; data not shown).

To demonstrate that *SRPK1a* cDNA encodes an active protein kinase, we carried out immunoprecipitation experiments. FLAG-tagged SRPK1 or SRPK1a were transiently transfected into 293T cells, and the cells were harvested and lysed 48 h post-transfection. Immunoprecipitations were carried out with either the M5 anti-FLAG monoclonal antibody or the anti-SRPK1 polyclonal antibody or the specific anti-SRPK1a polyclonal antibody. SR protein-kinase activity was assayed on beads incubated in kinase buffer with bacterially expressed ASF/SF2 or LBR as substrates and radiolabeled ATP. As shown in Fig. 4 the anti-FLAG and the anti-SRPK1 antibodies immunoprecipitated both SRPK1 and SRPK1a, whereas the specific anti-SRPK1a antibody immunoprecipitated a kinase activity only from 293T cells transfected with pCMV-2 vector encoding FLAG-tagged SRPK1a. Interestingly, we reproducibly observed that SRPK1a was 2- to 3-fold more active than SRPK1. As expected, SRPK1a-mediated phosphorylation took place in the RS domain, because the immunoprecipitated enzyme was unable to modify a GST fusion protein that contains the NH₂-terminal domain of LBR but lacks the RS motifs (Δ RSNt, Fig. 4). Furthermore, as previously shown with SRPK1 (28), SRPK1a efficiently phosphorylated various derivatives of the NH₂-terminal domain of LBR fused to GST, in which Ser⁷⁸, Ser⁸⁰, Ser⁸², and Ser⁸⁴ of the RS domain (⁷⁵RSRSRSRSRS⁸⁴) were mutated to Gly (wtNtG⁷⁸), Ala

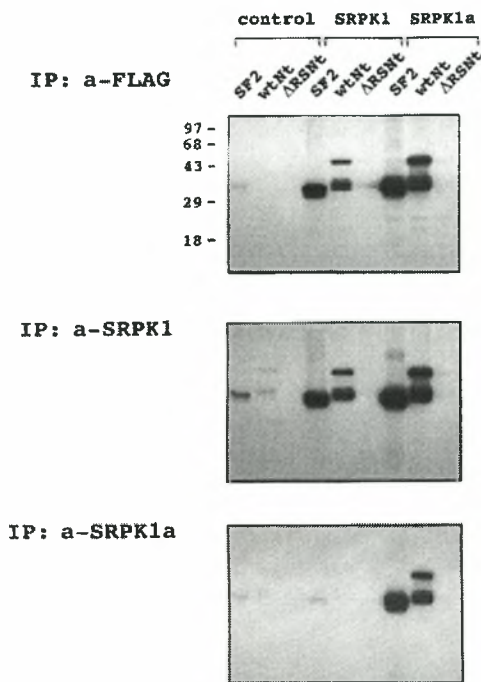


FIG. 4. SRPK1a cDNA encodes an active protein kinase. 293T cells were transiently transfected with the pCMV-2 vector alone (*control*) or with pCMV-2 vectors encoding FLAG-tagged SRPK1 or SRPK1a. Extracts were prepared at 48 h post-transfection, and immunoprecipitations were carried out with either the M5 anti-FLAG monoclonal antibody or the anti-SRPK1 polyclonal antibody or the specific anti-SRPK1a polyclonal antibody. The immunoprecipitates were incubated under *in vitro* phosphorylation conditions with bacterially produced SF2, wtNt (a GST fusion protein containing the NH₂-terminal domain of LBR; amino acids 1–205) and ΔRSNt (contains the NH₂-terminal domain of LBR but lacks the RS motifs; amino acids 75–84). Labeled proteins were detected by SDS-PAGE and autoradiography. The full-length wtNt migrates with an apparent molecular mass of ~51 kDa. The lower bands represent degradation products (see also Ref. 29). The gels were exposed for 2 h. Bars on the left indicate molecular masses (in kDa).

(wtNtA⁸⁰), Ala (wtNtA⁸²), and Ala (wtNtA⁸⁴), respectively (data not shown).

Next, we determined the subcellular localization of FLAG-tagged SRPK1 and 1a in transfected COS-1 cells by indirect immunofluorescence using the M5 anti-FLAG monoclonal antibody. Consistent with previous reports for SRPK1 (2, 3) the cytoplasmic signal was predominant for both isoforms, although the expressed kinases were also clearly visible in the nucleus (data not shown). The cytoplasmic and nuclear localization is a characteristic feature of all SRPK family members and probably reflects a function for these kinases in both compartments. An alternative, although not mutually exclusive, hypothesis is that the cytoplasmic sequestering of these enzymes may regulate their nuclear functions by controlling their availability to nuclear substrates.

SR protein kinases affect alternative splicing through a phosphorylation-mediated release of SR proteins from nuclear storage sites. In this respect we have previously shown that SRPK1 was able to regulate the alternative splicing of human tau exon 10 in transfected cells (45). To determine whether SRPK1a had an effect similar to that of SRPK1, we tested both isoforms in co-transfection experiments with the tau minigene SV9–10L–11 consisting of exon 10 and its flanking exon and intron regions (Fig. 5A; see also Ref. 39). Without addition of SRPK1, exon 10 is skipped in about 25% of the minigene-derived RNA, whereas in the presence of SRPK1 or SRPK1a

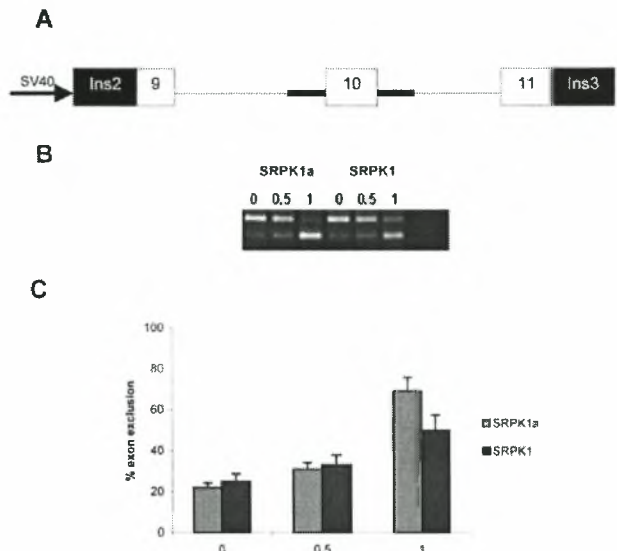


FIG. 5. Influence of SRPK1a and SRPK1 on alternative splicing of human tau exon 10. A, schematic representation of the expression construct SV9/10L/11. Exon 10 is flanked by tau exons 9 and 11. Exons 9 and 11 are fused with insulin exons 2 and 3, respectively. Primers located in these insulin exons were used for amplification. Thick lines around exon 10 indicate the flanking intronic regions (471 nucleotides downstream, 409 nucleotides upstream). The SV40 promoter is indicated with an arrow. B, HEK293 cells were co-transfected with 1 μg of the SV910L/11 minigene together with increasing amounts (0, 0.5, and 1 μg) of plasmid DNA encoding FLAG-SRPK1 or FLAG-SRPK1a. RNA was isolated 17–24 h following transfection, and RT-PCR was carried out. The splice products have a size of 336 and 429 nucleotides, respectively. C, statistical evaluation of three independent experiments. Numbers indicate micrograms of SRPK1 or SRPK1a expression constructs transfected.

this percentage increases to about 50–70% (Fig. 5B). Consistent with our data from the immunoprecipitation experiments in transfected cells (see Fig. 4) SRPK1a was more efficient than SRPK1 in promoting skipping of human tau exon 10.

Thus both isoforms are very similar in terms of substrate specificity and subcellular localization and in their ability to induce alternative splicing in transfected cells. It is, however, unlikely that they are completely redundant kinases, because they may be differentially expressed and/or regulated. To explore these possibilities we first examined the expression of both isoforms, by Northern blotting analysis, in multiple human tissues as well as in various human cancer cell lines. In agreement with our previous report, SRPK1 was predominantly expressed in the testis but was also present at low levels in most of the tissues examined (Fig. 6A; see also Ref. 27). SRPK1a was clearly detected only in testis, at a significantly lower percentage the level of SRPK1 (Fig. 6B). For both isoforms we detected a smaller transcript of 2.7 kb in the testis (see also Ref. 27).

To further demonstrate that SRPK1a is expressed in testis we performed reverse transcription coupled with PCR amplification (RT-PCR) to amplify the region encompassing the 513-bp segment of SRPK1a (nucleotide position 1–658, see Fig. 1) from human testis-derived cDNA. Two DNA species were amplified, the sizes of which (145 and 658 bp, respectively) were consistent with alternative splicing of the 513-bp segment (Fig. 7A). In addition we carried out immunoprecipitation experiments from rat testis cytosol with the specific anti-SRPK1a polyclonal antibody or the anti-SRPK1 polyclonal antibody. As shown in Fig. 7B the specific anti-SRPK1a antibody immunoprecipitated a kinase activity that was able to phosphorylate ASF/SF2 or recombinant LBR but not ΔRSNt that lacks the RS

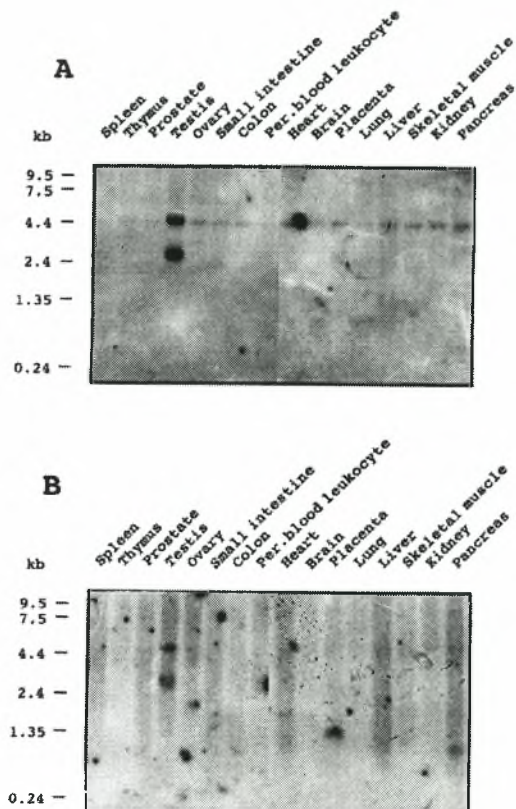


FIG. 6. Northern blotting analysis of SRPK1 and SRPK1a. Human multiple tissue I and II Northern blot filters were purchased from CLONTECH and processed as described under "Materials and Methods." A cDNA of 860 bp, comprising nucleotides 1–860 of the sequence of mouse *SRPK1* (EMBL data bank accession number AJ224115; see also "Materials and Methods" and Ref. 27), and a PCR fragment of 528 bp, comprising nucleotides 1–528 of the coding region of human *SRPK1a*, were used as probes for *SRPK1* (A) and *SRPK1a* (B), respectively. Exposure time in B was seven times as long as in A. Positions of molecular size markers in kilobases, are indicated.

motifs, whereas the anti-SRPK1 antibody immunoprecipitated a 4-fold higher kinase activity, corresponding to both SRPK1 and SRPK1a. The ratio of SRPK1/SRPK1a, as estimated from the immunoprecipitation experiment, is lower than the ratio observed with the RT-PCR and Northern blotting analyses. This is probably due to the higher activity of SRPK1a as compared with that of SRPK1.

Next, a yeast two-hybrid screen was performed to isolate proteins that interact specifically with the extended NH₂-terminal domain of SRPK1a, because it is well known that interactions through specific protein modules mediate the specificity of signal transduction events. To this end, *SRPK1aNt* (encoding amino acids 1–176) was subcloned to pGBT9 in-frame with the GAL4 DNA binding domain. The yeast strain pJ69-4A carrying the pGBT9-SRPK1aNt vector was transformed with an equimolar mixture of E9.5 and E10.5 mouse embryonic cDNA libraries in which cDNAs were fused to the coding sequence for the VP16 activation domain. Screening of $\sim 8 \times 10^6$ recombinant clones led to the isolation of about 80 that grew on the appropriate selection medium and gave detectable β -galactosidase activity. Twenty-one clones remained positive for β -galactosidase activity when co-transformed with the SRPK1aNt fusion protein but not with the DNA binding domain of GAL4 alone. As deduced by DNA sequencing and BLAST searching three of the positive clones, showing the strongest interaction,

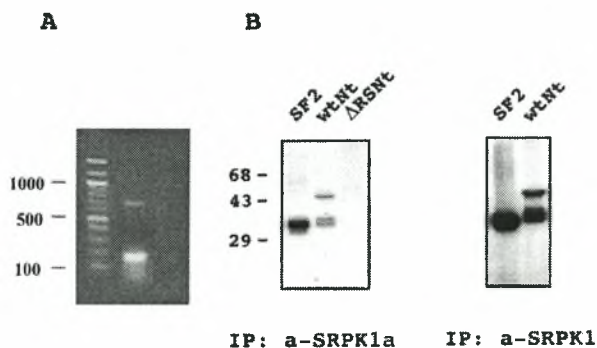


FIG. 7. Expression of SRPK1a in human and rat testis. A, RT-PCR analysis of *SRPK1a*/*SRPK1* transcripts demonstrates alternative splicing. Oligonucleotide primers flanking the 513-bp segment were used to amplify the cDNA generated from human testis total RNA. The spliced product has a predicted size of 145 bp, whereas the unspliced product, containing the 513-bp segment, has a predicted size of 658 bp. A 100-bp DNA ladder is shown on the left. B, SRPK1a or both SRPK1 and SRPK1a were immunoprecipitated from rat testis cytosol with the specific anti-SRPK1a polyclonal antibody or the anti-SRPK1 polyclonal antibody, respectively. The immunoprecipitates were incubated under *in vitro* phosphorylation conditions with SF2, wtNt, and Δ RSNt (SRPK1a only). Labeled proteins were detected by SDS-PAGE and autoradiography. The gels were exposed for 2 days. Bars on the left indicate molecular masses (in kDa).

were different isolates of SAF-B, a nuclear scaffold-associated protein. On the basis of the SAF-B sequences isolated by the two-hybrid screen, COOH-terminal residues 585–720 (EMBL data bank accession number AF056324) appear to be sufficient for the interaction with the NH₂-terminal domain of SRPK1a. Most interestingly, the observed interaction was specific, because all three clones showed a very weak interaction with SRPK1 when pJ69-4A carrying the clones was co-transformed with a cDNA, encoding the full-length coding region of SRPK1, fused to the GAL4 binding domain (Fig. 8).

To confirm the interactions detected in the yeast two-hybrid assay, we showed that SRPK1a, but not SRPK1, bound strongly to SAF-B *in vitro* (Fig. 9A). Purified GST-SAF-B-PC (containing the COOH-terminal domain of SAF-B, amino acids 493–874; see also Ref. 32), or GST alone were incubated with cell extracts from 293T cells transfected with pCMV-2 vectors encoding either FLAG-tagged SRPK1 or SRPK1a. The complexes were recovered by pull-down with glutathione-Sepharose beads and analyzed by Western blotting with the M5 anti-FLAG monoclonal antibody. The specific interaction of SRPK1a with SAF-B was also demonstrated *in vivo* by co-immunoprecipitation/Western blotting analysis (Fig. 9B). To this end FLAG-tagged SRPK1a or SRPK1 and GFP-tagged SAF-B-PC were transiently transfected in 293T cells. Complexes between SAF-B and SRPKs were immunoprecipitated with an anti-GFP monoclonal antibody and separated by SDS-PAGE. The proteins were then transferred to nitrocellulose and epitope-tagged SRPK1a or SRPK1 were detected with the M5 anti-FLAG monoclonal antibody. When FLAG-tagged SRPK1a was co-transfected with GFP-tagged SAF-B-PC, the 92-kDa FLAG-SRPK1a polypeptide was detected in the anti-GFP immunoprecipitate (Fig. 9B, last lane), demonstrating a stable interaction between SAF-B and SRPK1a. When single transfections with FLAG-SRPK1a were carried out, the 92-kDa band was not obtained in the immunoprecipitates (Fig. 9B, lane 1), ruling out the possibility that the anti-GFP antibody directly immunoprecipitated SRPK1a.

These results strongly suggest that one of the SRPK family members binds specifically to a nuclear scaffold-associated protein. SAF-B has been found phosphorylated *in vivo* (46). How-

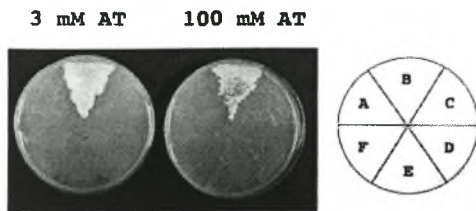


FIG. 8. The NH₂-terminal domain of SRPK1a interacts with SAF-B in yeast. *S. cerevisiae* strain pJ69-4A was co-transformed with (A) pGBT9-SRPK1aNt and pVP16, (B) pGBT9-SRPK1aNt and pVP16-SAF-B, (C) pGBT9 and pVP16-SAF-B, (D) pGBT9-SRPK1 and pVP16, (E) pGBT9-SRPK1 and pVP16-SAF-B, and (F) pGBT9 and pVP16. The strains were streaked in the same order on plates containing SC minus Trp, Leu, Ade, His, and 3 mM AT (left) or SC minus Trp, Leu, Ade, His, and 100 mM AT (right). The SAF-B clone used in these experiments encodes amino acids 585–720 of rodent SAF-B (EMBL data bank accession number AF056324).

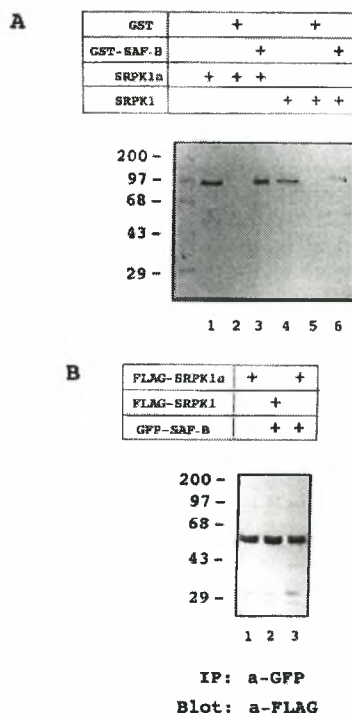


FIG. 9. Interaction between SRPK1a and SAF-B in vitro and in mammalian cells. **A**, GST-SAF-B-PC or GST alone, as a negative control, were incubated with cell extracts from 293T cells transfected with pCMV-2 vectors encoding either FLAG-tagged SRPK1a or SRPK1. The complexes were recovered by pull-down with glutathione-Sepharose beads and analyzed on 10% SDS-polyacrylamide gels. Bound SRPK1a or SRPK1 were detected by Western blotting using the M5 anti-FLAG monoclonal antibody. A standard amount of cell extract, one-third of which is shown (lanes 1 and 4), was used in each binding assay. **B**, 293T cells were co-transfected with plasmids expressing FLAG-tagged SRPK1a or SRPK1 and GFP-tagged SAF-B-PC. Complexes between SAF-B and SRPKs were immunoprecipitated with an anti-GFP monoclonal antibody and analyzed on 10% SDS-polyacrylamide gels. The proteins were then transferred to nitrocellulose, and epitope-tagged SRPK1a or SRPK1 were detected with the M5 anti-FLAG monoclonal antibody. No direct immunoprecipitation of FLAG-tagged SRPK1a by the anti-GFP antibody was observed (lane 1).

ever, this protein is not a potential substrate of the SRPKs, because it does not contain any alternating RS or SR dipeptides. Indeed, we have been unable to detect any phosphorylation of GST-SAF-B-PC by immunoprecipitated FLAG-tagged SRPK1a or bacterially expressed GST-SRPK1 (data not shown). This implies that SAF-B acts as a “docking site” rather than as a substrate for SRPK1a and thereby, RS domain-

containing proteins, which are in close vicinity with the nuclear scaffold, may be preferentially targeted by this kinase isoform.

DISCUSSION

We report here the cloning and characterization of a third member of the SRPK family of protein kinases, which is an alternatively spliced form of SRPK1, named SRPK1a. The SRPK1/SRPK1a locus is situated on human chromosome 6. Splicing out of a 513-bp segment, which is located between exons 1a and 1b, would result in the production of SRPK1, whereas splicing in of the 513-bp segment would yield SRPK1a (see Fig. 2). In the latter case a large exon 1 is assembled within the SRPK1a transcript that comprises exons 1a and 1b of SRPK1 as well as the 513-bp segment.

Probably, SRPK1a does not represent the only paradigm of SR protein kinase regulation at the pre-mRNA processing level. Bedford *et al.* (47) identified a partial mouse cDNA clone, WBP6 (WW-domain binding protein 6; accession number U92456), based on its binding to a WW domain-containing protein probe in an expression screen. The nucleotide sequence of this clone is identical to mouse SRPK2 with the exception of an additional NH₂-terminal sequence in WBP6. Although further studies are required, this suggests that WBP6 may be an alternatively spliced SRPK2 product found in the mouse. Furthermore, two more isoforms encoded by the SRPK1 gene, each containing a different exon 14, have been predicted by the Sanger Center (locus HS422H11, accession number Z99128, gene products dJ422H11.1.1 and dJ422H11.1.2). Exon 14 encodes the amino acid sequence between catalytic subdomains X and XI (catalytic subdomains are indicated analytically in Ref. 1). Even though the existence of those isoforms is not experimentally documented, our data, supported by the above prediction, raise the intriguing possibility that four different isoforms may arise from a single SRPK1 gene.

Several isoforms of the ubiquitous LAMMER protein kinase family (named upon the existence of the motif EHLAMMER-ILG in their catalytic sub-domain X), which also target SR proteins and affect splicing (13), have also been identified. Both mouse CLK1 and the *Drosophila* homologue *doa* give rise to transcripts coding for either the full-length catalytically active kinase or a truncated protein lacking the catalytic domain (48, 49). Identical splice forms were also found in human homologues (50). The ratio of these splice products appears to be regulated developmentally in *Drosophila* (48) and in a tissue and cell-specific manner in mammals (49, 50). In addition, in adult mouse tissues or upon stem cell differentiation, larger transcripts, representing partially spliced products that are sequestered in the nucleus and are unavailable for protein translation, were also detected (49, 51).

SRPK1a expressed in mammalian cells was highly active and showed the same substrate specificity as SRPK1. Both isoforms were able to induce alternative splicing of human tau exon 10 in transfected cells. Furthermore, they were similarly expressed in various human tissues, although the level of expression of SRPK1a was significantly lower than that of SRPK1. Despite their high similarity, these two SRPK family members probably exert distinct cellular functions through differential targeting. Using the yeast two-hybrid assay we found that the NH₂-terminal domain of SRPK1a interacts with SAF-B, implying that this isoform is associated with the nuclear matrix. An SAF-B fusion protein can extract SRPK1a but practically no SRPK1 from cell lysates, and antibodies that immunoprecipitate SAF-B can specifically co-precipitate SRPK1a, further confirming the specificity of this interaction. Furthermore, two of the isolated clones in our two-hybrid screen encoded overlapping parts of lamin B. Although this interaction has not yet been ascertained by binding experi-

ments, it is interesting to note that lamins and other proteins containing coiled-coiled α -helices have also been found to interact with S/MAR DNA sequences (52).

An immunofluorescence analysis of the intracellular localization of SRPK1a did not indicate a localization within the nucleus, similar to that observed for SAF-B (32). On the contrary, the cytoplasmic localization of the kinase was predominant. Although the subcellular localization of SRPK1a in interphase cells does not, therefore, support the co-localization of SRPK1a and SAF-B, it has been suggested that the cytoplasmic sequestering of all SRPK family members, mediated by a non-conserved spacer sequence that separates the conserved catalytic kinase domains, may regulate their nuclear functions by controlling their nuclear concentration (22, 23). Thus only a specific fraction of each kinase enters the nucleus, which then may have a distinct subnuclear localization.

Several nuclear matrix proteins were found to interact with members of the splicing machinery and function to the recognition and sequestration of exon sequences during the processing of pre-mRNA (53, 54). Furthermore, a number of recent reports established the existence of macromolecular complexes containing transcriptional and pre-mRNA processing proteins (see Ref. 32 and references therein). SAF-B has been implicated both in transcription (32, 55, 56) and splicing (32, 57). Recently it has been considered as a molecular base where a "transcriptosome complex" could be assembled, in the vicinity of actively transcribed genes (32). Most interestingly, although SAF-B does not contain any alternate RS dipeptides and, therefore, is not a substrate for the SRPKs, it contains a region rich in glutamic acid/arginine repeats (amino acids 585–658), which was part of our yeast two-hybrid clones. The presence of alternating positive and negative residues in this domain is reminiscent of similar dipeptide motifs found in phosphorylated SR domains and might be critical for protein-protein interactions.

SRPK1a may therefore utilize SAF-B as a docking site to phosphorylate splicing factors and other RS domain-containing proteins, that are in close vicinity with the nuclear matrix. Phosphorylation of these proteins may not only be critical to their function but also regulate their interaction with the nuclear matrix. Along these lines we noticed that phosphorylation of five polypeptides, with apparent molecular masses of 29, 36, 50, 80, and 190 kDa, respectively, that co-precipitate with SAF-B, was significantly increased when SRPK1a was overexpressed in 293T cells (data not shown). The identity of those proteins remains unknown at present.

Taken together our data support the concept that mammalian cells have evolved multiple SR protein kinases that are uniquely regulated and targeted. Thus, although various SRPKs show the same substrate specificity, they may perform specialized cellular functions. The identification of additional SRPK family members, together with the delineation of their regulation pathways and the identification and characterization of additional substrates, specifically modified by them, will ultimately contribute to an understanding of the functions of these enzymes.

Acknowledgments—We thank J. Tazi for providing us with recombinant ASF/SF2, G. Mosialos for the M5 anti-FLAG monoclonal antibody, G. Chalepakis for the mouse embryonic cDNA library, Andrea Andreadis for the SV9/10/11, and A. Mungall, on behalf of the Sanger Center, for the PAC 422H11 genomic clone. We also thank L. Papadopoulou for RT-PCR analysis, A. Tsiftoglou for providing us with tissue culture facility, S. Bonanou for her constant support, and S. D. Georgatos and J. G. Georgatsos for useful discussions and comments on the manuscript.

REFERENCES

- Gui, J.-F., Lane, W. S., and Fu, X.-D. (1994) *Nature* **369**, 678–682
- Gui, J.-F., Tronchere, H., Chandler, S. D., and Fu, X.-D. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 10824–10828
- Wang, H.-Y., Lin, W., Dyck, J. A., Yeakley, J. M., Songyang, Z., Cantley, L. C., and Fu, X.-D. (1998) *J. Cell Biol.* **140**, 737–750
- Kuroyanagi, N., Onogi, H., Wakabayashi, T., and Hagiwara, M. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **242**, 357–364
- Fu, X.-D. (1995) *RNA (N. Y.)* **1**, 663–680
- Manley, J. L., and Tacke, R. (1996) *Genes Dev.* **10**, 1569–1579
- Valcarcel, J., and Green, M. R. (1996) *Trends Biochem. Sci.* **21**, 296–301
- Fu, X.-D. (1993) *Nature* **365**, 82–85
- Kohtz, J. D., Jamison, S. F., Will, C. L., Zuo, P., Luhrmann, R., Garcia-Blanco, M. A., and Manley, J. L. (1994) *Nature* **368**, 119–124
- Tarn, W. Y., and Steitz, J. A. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 2504–2508
- Valcarcel, J., Gaur, R. K., Singh, R., and Green, M. R. (1996) *Science* **273**, 1706–1709
- Xiao, S. H., and Manley, J. L. (1997) *Genes Dev.* **11**, 334–344
- Colwill, K., Pawson, T., Andrews, B., Prasad, J., Manley, J. L., Bell, J. C., and Duncan, P. I. (1996) *EMBO J.* **15**, 265–275
- Misteli, T., Caseres, J. F., and Spector, D. L. (1997) *Nature* **387**, 523–527
- Misteli, T., Caseres, J. F., Clement, J. Q., Krainer, A. R., Wilkinson, M. F., and Spector, D. L. (1998) *J. Cell Biol.* **143**, 297–307
- Mayeda, A., and Krainer, A. R. (1992) *Cell* **68**, 365–375
- Zahler, A. M., Neugebauer, K. M., Lane, W. S., and Roth, M. B. (1993) *Science* **260**, 219–222
- Caceres, J. F., Stamm, S., Helfman, D. M., and Krainer, A. R. (1994) *Science* **265**, 1706–1709
- Screaton, G. R., Caceres, J. F., Mayeda, A., Bell, M. V., Plebanski, M., Jackson, D. G., Bell, J. I., and Krainer, A. R. (1995) *EMBO J.* **14**, 4336–4349
- Wang, J., and Manley, J. L. (1995) *RNA (N. Y.)* **1**, 335–346
- Koizumi, J., Okamoto, Y., Onogi, H., Mayeda, A., Krainer, A. R., and Hagiwara, M. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 11125–11131
- Takeuchi, M., and Yanagida, M. (1993) *Mol. Biol. Cell* **4**, 247–260
- Siebel, C. W., Feng, L., Guthrie, C., and Fu, X.-D. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 5440–5445
- Yun, C. Y., and Fu, X.-D. (2000) *J. Cell Biol.* **150**, 707–717
- Erez, O., and Kahana, C. (2001) *Mol. Cell Biol.* **21**, 175–184
- Kuroyanagi, H., Kimura, T., Kazuhiro, W., Hisamoto, N., Matsumoto, K., and Hagiwara, M. (2000) *Mech. Dev.* **99**, 51–64
- Papoutsopoulou, S., Nikolakaki, E., Chalepakis, G., Kruff, V., Chevallier, P., and Giannakouros, T. (1999) *Nucleic Acids Res.* **27**, 2972–2980
- Papoutsopoulou, S., Nikolakaki, E., and Giannakouros, T. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **255**, 602–607
- Nikolakaki, E., Simos, G., Georgatos, S. D., and Giannakouros, T. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 8365–8372
- Bode, J., Benham, C., Knopp, A., and Mielke, C. (2000) *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **10**, 73–90
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Nayler, O., Stratling, W., Bourquin, J. P., Stagljar, I., Lindemann, L., Jasper, H., Hartmann, A. M., Fackelmayr, F. O., Ullrich, A., and Stamm, S. (1998) *Nucleic Acids Res.* **26**, 3542–3549
- Harlow, E., and Lane, D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- James, P., Halladay, J., and Craig, E. A. (1996) *Genetics* **144**, 1425–1436
- Hollenberg, S. M., Sternglanz, R., Feng Cheng, P., and Weintraub, H. (1995) *Mol. Cell Biol.* **15**, 3813–3822
- Rose, M. D., Winston, F., and Hieter, P. (1990) *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Chen, C., and Okayama, H. (1997) *Mol. Cell Biol.* **7**, 2745–2752
- Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248–254
- Gao, Q. S., Memmott, J., Lafyatis, R., Stamm, S., Screaton, G., and Andreadis, A. (2000) *J. Neurochem.* **74**, 490–500
- Stoss, O., Stoilov, P., Hartmann, A. M., Nayler, O., and Stamm, S. (1999) *Brain Res. Prot.* **4**, 383–394
- Wang, H.-Y., Arden, K. C., Bermingham, J. R., Viars, C. S., Lin, W., Boyer, A. D., and Fu, X.-D. (1999) *Genomics* **57**, 310–315
- Sudol, M. (1996) *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **65**, 113–132
- Torchia, J., Rose, D. W., Inostroza, J., Kamel, Y., Westin, S., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1997) *Nature* **387**, 677–684
- Heery, D. M., Kalkhoven, E., Hoare, S., and Parker, M. G. (1997) *Nature* **387**, 733–736
- Hartmann, A. M., Rujescu, D., Giannakouros, T., Nikolakaki, E., Goedert, M., Mandelkow, E., Gao, Q. S., Andreadis, A., and Stamm, S. (2001) *Mol. Cell Neurosci.* **18**, 80–90
- Renz, A., and Fackelmayr, F. O. (1996) *Nucleic Acids Res.* **24**, 843–849
- Bedford, M. T., Chan, D. C., and Leder, P. (1997) *EMBO J.* **16**, 2376–2383
- Yun, B., Farkas, R., Lee, K., and Rabinow, L. (1994) *Genes Dev.* **8**, 1160–1173
- Duncan, P. I., Howell, B. W., Marius, R. M., Drmanic, S., Douville, E. M. J., and Bell, J. C. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 21524–21531
- Hanes, J., von der Krammer, H., Kludiny, J., and Scheit, K. H. (1994) *J. Mol. Biol.* **244**, 665–672
- Ben-David, Y., Letwin, K., Tannock, L., Bernstein, A., and Pawson, T. (1991) *EMBO J.* **10**, 317–325
- Luderus, M., de Graaf, A., Mattia, E., der Blaauwen, J., Grande, M., Jong, L., and von Driel, R. (1992) *Cell* **70**, 949–959
- Blencowe, B. J., Nickerson, J. A., Issner, R., Penman, S., and Sharp, P. A. (1994) *J. Cell Biol.* **127**, 593–607
- Blencowe, B. J., Bauren, G., Eldridge, A. G., Issner, R., Nickerson, J. A., Rosonina, E., and Sharp, P. A. (2000) *RNA (N. Y.)* **6**, 111–120
- Oesterreich, S., Lee, A. V., Sullivan, T. M., Samuel, S. K., Davie J. R., and Fuqua, S. A. W. (1997) *J. Cell. Biochem.* **67**, 275–286
- Arao, Y., Kuriyama, R., Kayama, F., and Kato, S. (2000) *Arch. Biochem. Biophys.* **380**, 228–236
- Weighardt, F., Cobianchi, F., Cartegni, L., Chiodi, I., Villa, A., Riva, S., and Biamonti, G. (1999) *J. Cell Sci.* **112**, 1465–1476